有機過酸化物によるミクロゾーム酵素の障害作用と チトクローム P-450のペルオキシダーゼ活性

An Organic Peroxide, Methyl Ethyl Ketone Peroxide,
Damage to Cytochrome P-450 Peroxidase
and Microsomal Enzymes Activity

国立公害研究所環境保健部

安 藤 満

Mitsuru Ando

National Institute for Environmental Studies, Ibaraki

In vivo, an organic peroxide, methyl ethyl ketone peroxide (MEKP) damaged microsomal cytochrome P-450 and cytochrome P-450 peroxidase in vitamin E deficient rat livers. Dietary vitamin E protected the microsomal enzymes from MEKP damage. Phenobarbital induced liver cytochrome P-450 peroxidase and glutathione S-transferase and decreased MEKP damage on microsomal enzymes. MEKP induced production of more lipid peroxides (TBARS) in liver microsomes from vitamin E deficient rats than from vitamin E supplemented rats. Cytochrome P-450 and aminopyrine demethylase from vitamin E deficient rat microsomes were damaged to a greater extent by MEKP than were those from vitamin E supplemented rat microsomes. MEKP markedly inhibited liver microsomal TMPD- and NADH-peroxidase. *In vivo*, adequate levels of vitamin E, NADH, and NADPH are probably necessary to provide important protection to the endoplasmic reticulum from damage by organic peroxides.

Key words: Peroxide, Lipid peroxidation, Microsome, Cytochrome P450, Peroxidase
過酸化物, 脂質過酸化, ミクロゾーム, チトクローム P450, ペルオキシダーゼ

序

有機過酸化物は、多くの合成化合物や天然化合物の空气中での過酸化により生成する。食品中の不飽和脂肪酸の過酸化により生じる過酸化脂質は食品の安全性の上から注目されている有機過酸化物の一種である。有機過酸化物は生体内においては膜中の不飽和脂肪酸の過酸化や生体高分子の変成をひき起こす¹⁾。現在、工業的利用として合成有機過酸化物はポリエステルやビニールモノマーの重合過程等に用いられ、高分子の合成過程への適用が拡大しつつある。現在市販されている多数の合成有機過酸化物は、遷移金属：銅、コバルト、鉄、バナジウム、マンガ、鉛やスズ等により常温で容易に分解し下記のようにフリーラジカルを生成する²⁾。

工業用有機過酸化物は、その性質上容易にフリーラジカルを生成する為、投与されたマウスやラットに溶血とともに肺や肝臓の障害を引き起こす³⁾。このため使用過程における作業者の経口、経皮、経気道等を通じた暴露による毒性が心配される。生産過程での暴露や食品摂取により生体内に侵入した有機過酸化物によるフリーラジカル生成は、生体内不飽和脂肪酸と連鎖反応を引き起こし脂質過酸化を進める^{4,5)}。一方、生体膜の障害、酵素の不活性化等様々な機能障害を引き起こす⁶⁾。さらに、ラジカルの発癌過程への関与も推定されつつある⁷⁾。

脂質の過酸化による生体膜の破壊は、細胞の種々の機能を障害する一方、生成した脂質過酸化物が小胞体構造

を破壊し、ミクロゾームの酵素活性を阻害することがリノレン酸の過酸化物を用いて明らかにされている⁸⁻¹¹⁾。種々の環境汚染物質や薬物の活性化や解毒に働くチトクローム P-450は、このような脂質過酸化物により阻害を受けやすい酵素の一つである¹¹⁾。一方、生体内にはこのような有機過酸化物の代謝に働く数種のペルオキシダーゼが知られている。グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオン S-トランスフェラーゼは、細胞質での重要な過酸化物代謝酵素である¹²⁾。チトクローム P-450は過酸化物依存性の基質酸化を行い、脂質過酸化物に対するペルオキシダーゼ活性をもっている¹³⁻¹⁸⁾。

小胞体はリン脂質に富む細胞内小器官であり、過酸化による障害を受けやすいと考えられるが、ミクロゾームのペルオキシダーゼは、小胞体において生成した過酸化脂質の代謝に関与している^{14,15)}。ミクロゾームのペルオキシダーゼの有機過酸化物の代謝活性と過酸化物自体による酵素障害との関連の研究は、有機過酸化物の生体影響を検討してゆく上で重要な問題と考えられる。

この研究では過酸化物の一種、Methyl Ethyl Ketone Peroxide (MEKP) によるチトクローム P-450の障害作用と、そのペルオキシダーゼや薬物代謝酵素活性の障害作用について検討した。またフェノバルビタールのペルオキシダーゼへの作用やビタミンEの過酸化物障害の防御効果についても研究した。

試料および方法

NADH, NADPH およびフェノバルビタールは Sigma 製のもの、MEKP とクメンハイドロペルオキシドは Polyscience 製のものを使用した。他の化合物は市販の最高純度のものを使用した。

3週齢の雄のSD系ラットを21から24°Cの温度下で14-10時間の明暗サイクルで飼育した。ラットはビタミンE (V.E) 欠乏食とビタミンE給飼 (40 IU/kg の α -トコフェロール) 食¹⁹⁾ で6週間飼育した。フェノバルビタールは、MEKP 投与前3日間80 mg/kg 体重を腹腔内投与した。MEKPの脂質過酸化による障害はビタミンE摂取により抑制される。このためビタミンE給餌群にはMEKP32.5 mg/kg 体重 (LD₅₀ の1/2) を投与し生体へのMEKPの影響をみた。一方、MEKPの毒性がビタミンE欠乏食により増大する^{4,5)} ので、実験途中の死亡を防ぐためビタミンE欠乏群にはMEKP21.7 mg/kg 体重 (LD₅₀ の1/3) を投与した。

ミクロゾームは野城と大村 (1978)²⁰⁾ の方法により調整し液体窒素下に保存した。チトクローム P-450 とチト

クローム b₅ の測定は、大村と佐藤 (1964)²¹⁾ と Estabrook と Werringloer (1978)²²⁾ の方法を用い、ミクロゾームの調整日に測定した。蛋白質濃度の測定は、Bradford (1976)²³⁾ の方法を用い測定した。

チトクローム P-450 の関与するアミノピリン N-脱メチル化酵素 (AP-DM) の活性は Orrenius (1965)²⁴⁾ の方法を、TMPD ペルオキシダーゼ (TMPD-Px) の活性は O'Brien と Rahimtula (1978)²⁵⁾ の方法を、また NADH ペルオキシダーゼ (NADH-Px) の活性は Hrycay と O'Brien (1974)¹⁵⁾ の方法を用い測定した。細胞質のグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) 活性は Wendel (1980)²⁶⁾ の方法を、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GSH-Tf) 活性は Habig ら (1974)²⁷⁾ の方法を用い測定した。又、MEKP の *in vitro* でのチトクローム P-450, チトクローム b₅ の関与する AP-DM, TMPD-Px, NADH-Px への作用を測定した。測定は、300 μ M の MEKP を 24°C 下、一定時間 (0-20 分間) 6 mg/ml に調整したミクロゾームとインキュベート後、試料用セルと対照用セルに均等に分け、チトクローム P-450 及び各酵素活性を測定した。各酵素活性の測定の際、基質のクメンハイドロペルオキシドを加えない時の反応を常時補正測定した。過酸化脂質 (TBA 値) の測定は、Ohkawa ら (1979)²⁸⁾ の方法を用いて行った。有意差検定には、Student の t-検定を用い $p < 0.05$ 有意差ありとした。

結 果

現在市販されているペルオキシドは一般に眼や皮膚への刺激が強く、溶血を引き起こす一方、肝臓、肺の障害もみられるが、その毒性は各ペルオキシドにより異なる^{1-3,29)}。ここでは MEKP のミクロゾーム酵素、特にチトクローム P-450 とそのペルオキシダーゼ活性への影響を検討した。

Fig. 1 にビタミンEの給餌条件と、フェノバルビタール投与条件を変えたラットにおける MEKP 投与の影響を示す。GSH-Px はいずれの条件下でも変動せず、全群において極めて安定した活性を示した。これに対し、GSH-Tf はフェノバルビタール投与により著しく誘導された。しかしながら、MEKP による著しい阻害はみられない。ミクロゾームのペルオキシダーゼである TMPD-Px はフェノバルビタールにより著しく誘導される。ビタミンE欠乏食群においては MEKP による活性の有意な低下がみられるが、ビタミンE給餌群では有意な低下はみられなかった。フェノバルビタール投与群においては MEKP の影響はみられず、誘導された TMPD-Px 活

Fig. 1 *In vivo* effect of vitamin E, phenobarbital and MEKP on glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and TMPD-peroxidase in rat livers. Methods are described in the text. Values are mean $\pm$ standard deviation. The rats were fed a vitamin E-deficient diet or a diet supplemented with 40 IU dl-tocopheryl acetate/kg. *: Significantly different from vitamin E supplemented rats.

性の低下はみられない。

MEKP はミクロゾームの酵素を阻害すると考えられるため、TMPD-Px の活性をもつチトクローム P-450 蛋白への MEKP の影響を検討してみた。Fig. 2 に示すように、MEKP 処置後、時間経過とともにチトクローム P-450 の破壊が引き起こされた。MEKP のこの作用は 20 分でほぼ最大に達する。これは既に報告したチトクローム P-450 への MEKP の結合による酵素蛋白質の破壊の現象と一致する³⁰⁾。さらに、MEKP の種々のミクロゾーム酵素への影響を MEKP 未処理の時の活性と比較検討してみた。MEKP のチトクローム b₅ 破壊作用は弱かつ

た。NADH-Cyt. b₅ 還元酵素、NADPH-Cyt. P-450 還元酵素、およびデサチラーゼに対する MEKP の阻害 (300 μ M, 20 分) は、各々 12, 28, および 15% と少なかった。これに対し Fig. 3 に示すように、チトクローム P-450 が関与する酵素活性 AP-DM, NADH-Px (NADPH-

Fig. 2 Destruction of cytochrome P-450 by addition of 300 μ M MEKP to a pooled sample of microsomes prepared from three vitamin E supplemented rats as a function of time (0-20 min).

Fig. 3 *In vitro* effect of 300 μ M MEKP on cytochrome P-450, aminopyrene demethylase, TBARS formation, TMPD-, and NADH-peroxidase in rat livers. Microsomes are prepared from the rats fed a vitamin E-deficient diet (■) or a diet supplemented with 40 IU dl-tocopheryl acetate/kg (□). The content of cytochrome P-450 and the activities of microsomal enzymes without MEKP were taken as 100%. *: Significantly different from vitamin E supplemented rat microsomes.

Px), TMPD-Px は MEKP により著しく阻害された。チトクローム P-450 の MEKP による破壊に比べ、チトクローム P-450 が関与する酵素, AP-DM, NADH-Px, TMPD-Px の活性の低下が著しかった。

既に述べたように (Fig. 1 参照), ビタミン E 欠乏のみによるミクロゾーム酵素活性の低下は認められなかったが, 過酸化物によるミクロゾーム酵素阻害についてビタミン E の保護作用を検討した。ビタミン E 給餌ラットとビタミン E 欠乏ラットの, ミクロゾームのチトクローム P-450 およびその酵素活性への MEKP の作用を MEKP 未処理の時の活性を100%として比較検討した。Fig. 3 に示すように, MEKP によるチトクローム P-450 の破壊はビタミン E 欠乏により著しく促進される。AP-DM 活性に及ぼす MEKP の阻害作用も, ビタミン E 欠乏により著しく増強する。また MEKP による TBA 値の増加が, ビタミン E 欠乏ラットミクロゾームにおいて著しい。このことは, MEKP によるミクロゾームの脂質過酸化が, ビタミン E 欠乏により著しく促進されていることを示す。

考 察

肝臓の小胞体のチトクローム P-450 をはじめとした電子伝達系は, 脂溶性ホルモン, ビタミン及び脂質の代謝に重要な役割を持つ一方, 脂溶性環境汚染物質, 特に発癌物質の活性化, 解毒化に中心的役割を占めている³¹⁾。既に述べたようにミクロゾームの電子伝達系チトクローム P-450 ペルオキシダーゼは, MEKP 等の外来性の有機過酸化物, さらに生体内で生成する各種脂質過酸化物を基質とし, NADH もしくは NADPH を消費してその代謝を行う^{14,15,30)}。

現在種々の有機過酸化物が工場における有機化合物の合成過程で使われている^{1,2)}。これら有機過酸化物の毒性についての検討は未だ充分なされていないが, 生体中に取り込まれた際, ラジカル生成, さらに脂質過酸化を引き起こすと考えられる^{4,6)}。また種々の環境要因 (X線, γ 線, 二酸化窒素等) により過酸化反応が生体内で促進され, ラジカル生成, 脂質過酸化物生成を引き起こすことが明らかにされつつある³²⁾。

このような有機過酸化物は, 生体中で種々の高分子と反応し酵素反応を阻害する。肝臓の小胞体の電子伝達系は, 有機過酸化物により阻害される。MEKP のチトクローム b_5 , NADH-チトクローム b_5 還元酵素, NADPH-チトクローム P-450 還元酵素, デサチュラーゼ活性に対する阻害は少ない。しかしながら, チトクローム P-450 の

関与する酵素反応は著しく阻害されやすい。有機過酸化物のチトクローム P-450 の破壊は, チトクローム P-450 からチトクローム-420 への変性を引き起こす, 重金属³³⁾や界面活性剤³¹⁾の作用と異なる。

フェノバルビタールはミクロゾームのチトクローム P-450 の誘導剤であるが, チトクローム P-450 ペルオキシダーゼと GSH-Tf の著しい増強をもたらす。これらの酵素は, 過酸化物を基質とし, その代謝を行う。GSH-Px はフェノバルビタールで誘導されないが, MEKP 処理に対しても安定である。

ビタミン E は, MEKP のチトクローム P-450 の破壊, AP-DM, NADH (NADPH)-Px, TMPD-Px 阻害に対して保護作用を示す。その保護作用はチトクローム P-450 の酵素作用により差があり, TMPD-Px の阻害の防御に対してはビタミン E は有効性は少ないが, NADH-Px に対しては有効に防御し, AP-DM に対する阻害は著しく有効な防御作用を示す。

既に報告したように MEKP のチトクローム P-450 活性阻害のメカニズムは, MEKP とチトクローム P-450 との直接結合による不可逆的阻害である³⁰⁾。またビタミン E 欠乏ラットのミクロゾームは, ビタミン E 給餌ラットのミクロゾームに比べ過酸化脂質をより多く生成する。

チトクローム P-450 や AP-DM 活性の MEKP による阻害は, MEKP 自体によるものと, 生成する脂質過酸化物の両者によると考えられる。チトクローム P-450 ペルオキシダーゼ (TMPD-Px, NADH (NADPH)-Px) の活性阻害は, MEKP 自体による割合が大きいものと考えられる。

以上のことから, ビタミン E の十分な給餌と NADH, NADPH の安定した生成は, ミクロゾームを過酸化的障害より保護するために必要なことと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにのぞみ, 終始御教示いただいたカルフォルニア大学デービス校 A.L. Tapple 教授に, 深く謝意を表します。また研究に御協力いただいた鹿児島大学公衆衛生学教室協阪一郎教授, 当研究所嵯峨井勝博士に深謝致します。

文 献

- 1) Swern, D.: Organic Peroxides, vol 3, John Wiley & Sons Inc., New York, (1972).
- 2) Sheppard, C. S. and Mageli, O. L.: In "Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 17" (Edi-

- tor; Kirk-Othmer) p. 27-89, Awiley-Interscience Publication, New York (1982).
- 3) Sitting, M.: Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens, Second Edition Noyes Publication, New Jersey, USA. (1985).
- 4) Herschberger, L. A. and Tappel, A. L.: Effect of vitamin E on pentane exhaled by rats treated with methyl ethyl ketone peroxide, *Lipids*, **17**, 686-691 (1982).
- 5) Litov, R. E., Matthews, L. C. and Tappel, A. L.: Vitamin E protection against *in vivo* lipid peroxidation initiated in rats by methyl ethyl ketone peroxide as monitored by pentane, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 96-106 (1981).
- 6) Pryor, W. A.: Free radicals in biology, vol. 3, Academic Press, New York, (1976).
- 7) Nakayama, T., Kodama, M. and Nagata, C.: Free radical formation in DNA by lipid peroxidation, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 571-572 (1984).
- 8) Hruszkewycz, A. M., Glende, JR., E. A. and Recknagel, R. O.: Destruction of microsomal cytochrome P-450 and glucose-6-phosphatase by lipid extracted from peroxidized microsomes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46**, 695-702 (1978).
- 9) Cadenas, E., and Sies, H.: Low level Chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by tert-butyl hydroperoxide, *Eur. J. Biochem.*, **124**, 349-356 (1982).
- 10) O'Brien, P. J.: Hydroperoxides and superoxides in microsomal oxidations. In "International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, Section 108: Hepatic Cytochrome P-450 Monooxygenase System" (Eds.: J.B. Schenckman and D. Kupfer) p. 567-586, Pergamon Press, New York (1982).
- 11) Jeffery, L. H., Nerland, D., EL-Azbary, R. and Mannering, G. J.: Destruction of cytochrome P-450 by linoleic acid hydroperoxide. In "Microsomes and Drug Oxidations (Eds. V. Ullrich, I. Roots, A. Hildebrandt, R.W. Estabrook, and A.H. Conney) p. 323-330, Pergamon Press, New York (1978).
- 12) Arias, I. M. and Jakoby, W. B.: Glutathione, Metabolism and Function, Raver Press, New York (1976).
- 13) Hrycay, E. G. and O'Brien, P. J.: Cytochrome P-450 as a microsomal peroxidase in steroid hydroperoxide reduction, *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 480-494 (1972).
- 14) Hrycay, E. G. and O'Brien, P. J.: Microsomal electron transport. I. Reduced nicotinate adenine dinucleotide phosphate-cytochrome reductase and cytochrome P-450 as electron carriers in microsomal NADPH-peroxidase activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **157**, 7-22 (1973).
- 15) Hrycay, E. G. and O'Brien, P. J.: Microsomal electron transport. II. Reduced nicotinate adenine dinucleotide-cytochrome b_5 reductase and cytochrome P-450 as electron carrier in microsomal NADH-peroxidase activity, *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 230-245 (1974).
- 16) Nordblom, G. D., White, R. E. and Coon, M. J.: Studies on hydroperoxide dependent substrate hydroxylation by purified liver microsomal cytochrome P-450, *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 524-533 (1976).
- 17) Rahimtula, A. D. and O'Brien, P. J.: Hydroperoxide catalyzed liver microsomal aromatic hydroxylation reactions involving cytochrome P-450, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 440-447 (1974).
- 18) Rahimtula, A. D. and O'Brien, P. J.: The role of cytochrome P-450 in the hydroperoxide-catalyzed oxidation of alcohols by rat liver microsomes, *Eur. J. Biochem.*, **77**, 201-208 (1977).
- 19) Draper, H. H., Bergan, J. G., Chiu, M., Csallany, A. S. and Boaro, A. V.: A further study of the specificity of the vitamin E requirement for reproduction, *J. Nutr.*, **84**, 395-400 (1964).
- 20) Noshiro, M. and Omura, T.: Immunochemical study on the electron pathway from NADH to cytochrome P-450 of liver microsomes, *J. Biochem.*, **83**, 61-77 (1978).
- 21) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378 (1964).

- 22) Estabrook, R. W. and Werringloer, J. : The measurement of difference spectra application to cytochromes of microsomes. In "Methods in Enzymology, vol. LII" (Eds: S. Fleischer and L. Packer) p. 212-220, Academic Press, New York (1978).
- 23) Bradford, M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 24) Orrenius, S. : On the mechanism of drug hydroxylation in rat liver microsomes, *J. Cell Biol.*, **26**, 713-723 (1965).
- 25) O' Brien, P. J. and Rahimtula, A. D. : A peroxidase assay for cytochrome P-450. In "Methods in Enzymology, vol. LII" (Eds: S. Fleischer and L. Packer) p. 407-412, Academic Press, New York (1978).
- 26) Wendel, A. : In "Enzymatic Basis of Detoxication" (Editor: W.B. Jakoby) p. 333-, Academic Press, New York (1980).
- 27) Habig, W. H., Past, M. J. and Jakoby W. B. : Glutathion S-transferases, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139 (1974).
- 28) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358 (1979).
- 29) Nat. Inst. for Occup. Safety and Health : Information Profiles on Potential Occupational Hazards: MEKP, Report PB-276, 687, p. 37-41, Rockville, USA (1977).
- 30) Ando, M. and Tappel, A. L. : Methyl ethyl ketone peroxide damage to cytochrome P450 peroxidase, activities, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **81**, 517-524 (1985).
- 31) Sato, R. and Omura, T. : Cytochrome P-450, Kodansha-Academic Press, Tokyo-New York (1978).
- 32) 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝 : 過酸化脂質と生体, 学会出版センター, 東京 (1984).
- 33) Ando, M. : Cadmium effect on microsomal drug metabolizing enzyme activity in rat livers with respect to differences in age and sex, *Environ. Research*, **27**, 446-456 (1982).

(受付 1985年12月4日 受理 1986年2月24日)