ミエロペルオキシダーゼによるステロイドの代謝

小田島 武志 尾西 みほ子 佐藤 尚子

東日本学園大学歯学部口腔生化学講座*

[受付: 昭和56年6月15日]

Metabolism of steroid by myeloperoxidase

Takeshi Odajima, Mihoko Onishi and Naoko Sato

Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry,

Higashi Nippon Gakuen University,

Kanazawa 1757, Tobetsu, Hokkaido 061-02

[Accepted for publication June 19, 1981]

Key words: myeloperoxidase/estriol/estrogen metabolism

Abstract: Steroids, which have a hydroxyl group at 3-position, such as estrone, estradiol and estriol, were effectively oxidized by myeloperoxidase and hydrogen peroxide, and the oxidation reaction was accelerated by adding halide, chloride or bromide into the reaction mixture. The absorption spectra of these steroids after their oxidation in the presence or absence of halide in the reaction system showed serious differences.

In a high pressure reverse phase partition chromatography, it was detected that the sample of estriol oxidized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system at a low acidity contained two major and several minor components.

The results suggest that the steroids with a hydroxyl group at 3-position are degraded by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system.

緒 言

ラットにエストラジオールを投与すると、その子宮にペルオキシダーゼが誘導される事実が報告されている¹⁾。7,12-ジメチルベンズアントラセンによって、乳腺癌が誘発されるが、このとき乳腺癌細胞中に、ミルクから得られるラクトペルオキシダーゼによく似た性質を持つペルオキシダーゼも同時に誘導され、このペルオキシダーゼは、過酸化水素の存在下で、エストラジオールを水溶性及びエーテル可溶性物質に酸化分解することが報告されている²⁾。今回、著者らは好中球から抽出したミエロペルオキシダーゼ³⁾によってエストロ

ン、エストラジオール及びエストリオールが酸化分解される事実を発見したので報告する。

材料及び方法

ミエロペルオキシダーゼ (donor: H_2O_2 Oxidoreductase, EC 1.11.1.7) は豚末梢血液の白血球から精製³⁾した標品を用いた。西洋ワサビペルオキシダーゼは野生西洋ワサビ根から Shannon ら⁴⁾の方法で抽出精製したB+C型アイソザイムを用いた。ステロイド化合物は、それぞれ高純度の市販品を用いた(17 α -及び17 β -エストラジオール、エストリオール、コルチコステロン及びコレステロール: Sigma, エストロン: Merck, テストステロンプロピオネート: 東京化成, コルチゾ

* 北海道石狩郡当別町字金沢1757番地 (〒 061-02)

ン：半井化学)。これらのステロイド化合物を反応液に加えるときは、反応液2.5~2.6ml に対して10 μ l 以下になるようにあらかじめその濃度を調製したエタノール溶液として用いた。

実験はすべて25°C で行った。この実験に使った緩衝液の組成は、pH 4.0~6.5は酢酸、pH 7.0はリン酸、pH 8.0~9.0はホウ酸-炭酸ナトリウムで、濃度はすべて0.1M であった。

高速液体クロマトグラフィーによる分析のためのミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素-塩素イオン系で酸化されたエストリオールの酸化物の試料は以下のような手順で調製した。

0.1M 緩衝液 (pH は図の説明の中に示してある)、エストリオールのエタノール溶液、ミエロペルオキシダーゼ、塩素イオン(NaCl 又は KCl) 及び過酸化水素を順次加え、攪拌しながら25°C で約20分間反応させた後、この反応液をミリポアフィルター (type: HA, 0.45 μ m) でろ過し、そのろ液を測定試料とした。酵素、その他の濃度は図の説明の中に示してある。反応液から過酸化水素又は塩素イオンを抜いた試料についても同様の手順で調製した。

高速液体クロマトグラフは Waters Associate 社製6000A 型高圧定量ポンプ、U6K 型インジェクター及び島津社製 SPD-1 型高速液体クロマトグラフ用紫外可視分光光度計を組合せたもので、使った担体は Waters Associate 社製の逆相分配系カラム μ -Bondapak C₁₈ (3.9mm $\times$ 30cm) で、移動相 (溶媒) は CH₃CN/water (40/60) で、流速は0.5ml/min であった。

分光スペクトル (Repeat Scan) は日立557型二波長分光光度計で観測し、Kinetics は日立200-20型自記分光光度計を用いて得た。

結 果

過酸化水素とミエロペルオキシダーゼあるいは西洋ワサビペルオキシダーゼとによって、エストロン、エストラジオール及びエストリオールが酸化されることがわかった。これらのステロイドのこの2種類のペルオキシダーゼ-過酸化水素系による酸化反応の間には、反応速度の pH 依存性、反応後の吸収スペクトルには際立った差は認めら

れなかった。興味あることは、弱酸性溶液中において、ミエロペルオキシダーゼと過酸化水素によるエストロン、エストラジオール及びエストリオールの酸化反応が、その反応系に塩素又は臭素イオンが存在すると促進されることである。しかし、フッ素イオンは、化学的には塩素や臭素と同様のハロゲン族であるにもかかわらず、このような促進効果はみられなかった。

ミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素-塩素又は臭素イオン系で酸化されたエストロン、17 α -及び17 β -エストラジオール及びエストリオールのそれぞれの反応後の吸収スペクトルは、これらのハロゲンイオンの存在しない酸化反応系、即ち、ミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素系で酸化されたもののそれぞれの吸収スペクトルと比較して、その吸光度が全体的に大きく、またその吸収スペクトルは未反応のそれらとはかなり異っていた。特にエストリオールでは、未反応のエストリオールの紫外吸収スペクトルには認められなかった新しい吸収極大が、塩素イオン系で250nm (肩) に、臭素イオン系では254nm に明瞭な吸収極大が現れる点で特徴的であった (Fig. 1)。また、この図から明らかな如く、塩素イオン系と臭素イオン系とでは、その反応後の吸収スペクトルが全く異っていた。更に、臭素イオン系の場合、反応開始直後に254nm に吸収極大を持つ化合物が生成し、次いで比較的遅い速度で、吸光度の増加を伴って261nm に吸収極大を持つ化合物になり (Fig.1 c)、再び吸光度が減少し、最終的には吸光度の減少を伴って262nm に吸収極大を持つ化合物へと比較的ゆっくりとした速度で変換した (Fig.1 d)。このような現象は、ハロゲンイオンが存在しないミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素系による酸化反応においても、又、塩素イオンが存在する酸化反応系においても認められなかった。しかし、反応開始直後に速い反応が観測される点においては共通していた (Fig. 2)。

Fig. 3 はエストリオールのミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素系及びこの系に塩素又は臭素イオンが存在する条件での酸化反応の pH 依存性を調べた結果である。ハロゲンイオンが存在しない反応系では、pH 8.0に極大が存在した。塩素

Fig. 1 Oxidation process of estriol by the myeloperoxidase- H_2O_2 -chloride system.

Arrow on the chart shows the increment or decrement of the absorbance. Experiment was carried out at 25°C and in 0.1M acetate buffer (pH 5.5). Chart a, $55\mu\text{M}$ estriol + 24nM myeloperoxidase + 0.1mM H_2O_2 . The first spectrum but one from the bottom (estriol) was recorded at 5 sec after the addition of H_2O_2 , and then repeatedly recorded at 1-min intervals (scan speed; 120nm/min). Chart b, $55\mu\text{M}$ estriol + 24nM myeloperoxidase + 0.1mM H_2O_2 + 38mM potassium chloride. The first spectrum but one from the bottom (estriol) was recorded at 15 sec after the addition of H_2O_2 , and then repeatedly recorded at 1-min intervals. Chart c, reaction solution contained the same components as those of Chart b except the substitution of halide from chloride to bromide (potassium bromide). Curves 1, 2, 3, and 4 were recorded at 5, 22.2, 39.4 and 56.6 sec after the addition of H_2O_2 , respectively (scan speed; 300nm/min). Chart d, the reaction conditions were the same as those of Chart c, but the record was started from the spectrum 3 of Chart c. Repeat scanning was carried out at 2-min intervals (scan speed; 300nm/min). Recording was done the range of wavelength from 300nm to 220nm for Charts a and b and from 290nm to 230nm for Charts c and d.

イオンが存在する系では pH 5.5 に新たな極大が現われ、臭素イオンでは pH 6.0 に極大が移り、これらのハロゲンイオンの影響がみられた。

Fig. 4 及び 5 に、ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素系によるエストリオールの酸化反応の反応速度に及ぼす塩素イオン及び臭素イオンの濃度

の影響について、pH 4.5, 5.5 及び 8.0 で測定した結果を示した。図から明らかな如く、pH 8.0 においては、エストリオールの酸化反応速度は塩素イオン濃度がほぼ 1mM までは比例的に増大し、それ以上の濃度になると反応速度の減少がみられたが、臭素イオンではこのような濃度依存性はみら

Fig. 2 Time course of the oxidation of estriol by the myeloperoxidase system. a, $57\mu M$ estriol + $12.3nM$ myeloperoxidase + $0.1mM$ H_2O_2 ; b, a + $78.6mM$ KCl ; c, $55\mu M$ estriol + $24nM$ myeloperoxidase + $38mM$ KBr + $0.1mM$ H_2O_2 . The vertical axis shows absorbance at 280nm. The horizontal shows reaction time (min). In this figure myeloperoxidase is abbreviated as MPO.

Fig. 3 Effect of pH on the oxidation of estriol by the myeloperoxidase system. The reaction solution contained $49\mu M$ estriol + $6nM$ myeloperoxidase + $0.1mM$ H_2O_2 + $19.3mM$ halide.

Fig. 4 Effect of the concentration of chloride on the oxidation of estriol by the myeloperoxidase system.

Reaction conditions; $51\mu\text{M}$ estriol + 12nM myeloperoxidase + 0.1mM H_2O_2 + KCl . Vertical axis shows initial velocity of absorbance at 280nm . Horizontal axis shows logarithms of the concentration of potassium chloride.

れなかった。pH 5.5においては、塩素及び臭素イオン濃度がそれぞれほぼ 2mM 及び 1mM のとき反応速度が最大となり、両者共それ以上の濃度になると反応速度は徐々に減少した。又、pH 4.5においては、塩素イオンの場合はその濃度が 5mM のとき反応速度が最大となり、臭素イオンの場合は 0.5mM のとき反応速度が最大となり、それ以上の濃度になると pH 5.5 のときと同様に反応速度の減少がみられた。

Fig. 6 は、pH 5.0 及び 8.0 において、ミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素系及びこの系に塩素イオンが存在する条件で酸化されたエストリオールの酸化生成物を高速液体クロマトグラフィーで紫外外部吸収 (280nm) を測定することによって調べた結果である。この実験から、塩素イオンが存在する系で酸化されたエストリオールの酸化物中には、大きな吸収を示す 2 種類と、その他に小さな吸収を示す物質とが検出された (Fig. 6 a-1, 大きな吸収をもつ 2 種類の物質を仮に極性の高い方から順に生成物 I 及び II と呼ぶ)。pH 5.0 でミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素系によって酸化されたエストリオールの生成物は検出できなかった (Fig. 6 a-2)。pH 8.0 では、塩素イオンの有無にかかわらず、検出される生成物は 1 種類であった (Fig. 6 b-1 及び b-2)。pH 5.0 で検出された生成物 I 及び II の吸光度を 244nm から 292nm までの波長範囲で、 6nm おきに測定し、それぞれの

Fig. 5 Effect of the concentration of bromide on the oxidation of estriol by the myeloperoxidase system.

Reaction conditions were the same as those of Fig. 4 except the substitution of halide.

Fig. 6 Detection of the product of estriol oxidized by the myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system by using high pressure liquid chromatography.

Chart a-1, 140 μ M estriol + 30 nM myeloperoxidase + 19.3 mM potassium chloride + 0.1 mM H₂O₂; a-2, minus chloride; a-3, minus H₂O₂. In 0.1 M acetate buffer (pH 5.0). Chart b-1, 70 μ M estriol + 23.7 nM myeloperoxidase + 75.9 mM sodium chloride + 0.1 mM H₂O₂. In 0.1 M borate buffer (pH 8.0).

測定波長におけるピークの高さをプロットした結果、生成物 I は 256 nm 及び 280 nm に吸収極大を持ち、II は 286 nm に吸収極大を持つことがわかった (Fig. 7)。

テストステロン、コルチコステロン、コルチゾン及びコレステロールについても、ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素系、西洋ワサビペルオキシダーゼ—過酸化水素系及び、これらの酸化反応系にフッ素、塩素又は臭素などのハロゲンイオン

を添加した系によって酸化されるか否かを、いずれの系においても pH 4.0 から 9.0 の範囲にわたって分光学的に調べた。その結果テストステロン、コルチコステロン、コルチゾンはいずれの反応系でも全く酸化されなかった。一方、コレステロール (26 μ M) はミエロペルオキシダーゼ (25 nM) —過酸化水素 (0.1 mM) —塩素イオン (40 mM) 系で、pH 4.5 (0.1 M 酢酸緩衝液) において、220 nm ~ 400 nm における吸光度の増大がみられた。

Fig. 7 Light absorption spectra of the products I and II.

Reaction conditions and experimental procedures were the same as those of Fig. 6, but the chromatogram obtained at 6-nm intervals and the peak height of products I and II at the individual wavelength were plotted.

又、ミエロペルオキシダーゼ (24nM)―過酸化素 (0.1mM)―臭素イオン (2.0mM) 系によって、pH 6.0 (0.1M 酢酸緩衝液) において、その230 nm~260nm 付近の吸光度の増大 (ふくらみ) がみられた。このように、コレステロールの場合は酸化反応に伴うその吸収スペクトルの変化そのものは、エストロン、エストラジオール及びエストリオールなどでみられたものに比べて小さかったが、ミエロペルオキシダーゼ―過酸化水素―塩素及び臭素イオン系によって酸化されることは確かであった。

考 察

ペルオキシダーゼは種々の動物及び植物組織に存在している。これらのペルオキシダーゼは、その物理化学的性質においてはかなりの差異があるにもかかわらず、過酸化水素と種々の物質との酸化還元反応を触媒する活性においては、本質的な差はないと言っても過言ではない。しかし、好中球に存在するミエロペルオキシダーゼは、ハロゲンイオンの存在において種々の物質を酸化 (分解)⁵⁻⁷⁾ し、更には殺菌⁸⁾する活性を示す点において、興味深いペルオキシダーゼである。本酵素は、

今回の研究で明らかにされた如く、エストロン、エストラジオール、エストリオール及びコレステロールの酸化反応においてもその活性がハロゲンイオンの存在で、より促進され、植物由来のペルオキシダーゼとは違った活性を示した。

動物組織のペルオキシダーゼによるステロイドホルモンの代謝との関連については、McNabbら¹⁾による子宮ペルオキシダーゼのエストラジオールによる誘導、Jellinckら²⁾による発癌性化学物質による乳腺癌細胞中へのペルオキシダーゼの誘導並びにそのペルオキシダーゼによるエストラジオールの酸化反応などの報告がある。また、Klebanoff⁹⁾は種々のエストロゲン、特に 17β -エストラジオールによって、ミエロペルオキシダーゼ―過酸化水素―ハロゲンイオン系による殺菌効果が阻害されると報告している。Klebanoff のみたこの阻害効果は、今回我々がみたステロイドの酸化反応を考慮することによっても説明出来る。即ち、エストラジオールが菌体と同一機構でミエロペルオキシダーゼ―過酸化水素―ハロゲンイオン系によって酸化され、しかもエストラジオールが菌体に比べて酸化され易いために、反応系中にエストラジオールと菌とが共存したとき、エストラジオールの酸化反応のために系中の酸化剤が消費されるためと単純に説明できる。

しかしながら、ミエロペルオキシダーゼ―過酸化水素―ハロゲンイオン系による、特にエストリオールの酸化反応そのものは、単純な反応ではなく、むしろ、いくつかの反応からなり、最終的にはエストリオールが酸化分解される反応と考えられる。このことは、塩素イオン系及び臭素イオン系によるエストリオールの酸化反応に伴うその吸収スペクトルの変化過程 (Fig. 1, 2) から、少なくとも2種類以上の反応段階が認められることと、複数種の生成物が検出された高速液体クロマトグラムの結果 (Fig. 6, 7) とから言えることである。調べたステロイドのうちで、エストロン、エストラジオール、エストリオール及びコレステロールのみがミエロペルオキシダーゼ―過酸化水素系並びにハロゲンイオンが存在する反応系で、容易に、しかも特異的に酸化 (分解) されるのは、これらのステロイドの化学構造 (Fig. 8) の共通性に起

Fig. 8 Chemical structure of steroids

因しているものと考えられ、可能性として、3位の水酸基が挙げられる。更に、3位に水酸基を持つステロイドでも、エストロン、エストラジオール及びエストリオールがコレステロールよりも容易に酸化される結果は、前者が持つ3位の水酸基がフェノール性水酸基であるところに起因しているものと考えられる。しかし、この3位の水酸基が酸化された後、どのような機構で複数種の生成物を生ずるのかという点及びその生成物の個々の化学構造については明らかでない。これらを明らかにすることは、単に、ミエロペルオキシダーゼによるステロイドの代謝(酸化反応)機構を知るためばかりではなく、ミエロペルオキシダーゼが持つ解毒¹⁰⁾及び殺菌作用機構^{8, 11-12)}を解明する

ためにも重要な事柄である。今後、詳細な検討が必要である。

結 論

多形核白血球に存在しているミエロペルオキシダーゼが、3位に水酸基を持つエストロン、エストラジオール及びエストリオールなどのステロイドホルモンを過酸化水素とハロゲンイオン、特に塩素又は臭素イオンの存在する条件下で酸化分解することが明らかにされた。

この結果は、本酵素がステロイドホルモン、特に女性ホルモンの代謝に何等かのかかわりを持っていることを示唆しているのかも知れない。

抄録：ミエロペルオキシダーゼ-H₂O₂-ハロゲンイオン系によって、3位に水酸基を持つステロイドホルモン(エストロン、エストラジオール及びエストリオール)が酸化された。これらのステロイドは、反応系にハロゲンイオンの存在しない条件においても、即ち、ミエロペルオキシダーゼ-H₂O₂-系でも酸化されたが、その酸化反応後(酸化生成物)の分光スペクトルは、ハロゲンイオンの存在する反応系のものとは異っていた。エストリオールがミエロペルオキシダーゼ-H₂O₂-塩素イオン系によって酸化されたとき、少なくとも2種類以上の酸化生成物が存在することが高速液体クロマトグラフィーによって検出され、結果として、エストリオールがミエロペルオキシダーゼ-H₂O₂-塩素イオン系によって酸化分解されることが明らかにされた。

文 献

- 1) McNABB, T. and JELLINCK, P. H.: Purification and properties of oestrogen-induced uterine peroxidase. *Biochem. J.*, **151** : 275-279, 1975.
- 2) JELLINCK, P. H., SMITH, G. and CLEVE-

LAND, S.: Metabolism of [4-¹⁴C] estradiol by 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumor peroxidase. *Steroids*, **26** : 329-337, 1975.

- 3) ODAJIMA, T.: Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood, Nature of the prosthetic group of myeloperoxidase. *J.*

- Biochem.*, **87** : 379-391, 1980.
- 4) SHANNON, L. M., KAY, E. and LEW, J. Y.: Peroxidase isozymes from horseradish roots, I. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.*, **241** : 2166-2172, 1966.
 - 5) 小田島武志：ミエロペルオキシダーゼー過酸化水素ーハロゲン系による殺菌（解毒）作用機構, II. ミエロペルオキシダーゼによる発癌性マイコキシンの酸化分解. 歯基礎誌, **22** : 174-180, 1980.
 - 6) 小田島武志：ミエロペルオキシダーゼー過酸化水素ーハロゲン系による殺菌（解毒）作用機構, III. ミエロペルオキシダーゼ系による核酸とその構成成分の酸化分解. 歯基礎誌, **22** : 502-512, 1980.
 - 7) 小田島武志, 佐藤尚子, 尾西みほ子：ミエロペルオキシダーゼー過酸化水素ーハロゲン系による殺菌（解毒）作用機構, IV. ミエロペルオキシダーゼー過酸化水素ー塩素イオン系によるサ
イトカラシンの酸化反応. 歯基礎誌, **22** : 545-549, 1980.
 - 8) KLEBANOFF, S. J.: Myeloperoxidase-halide-hydrogen Peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.*, **95** : 2131-2138, 1968.
 - 9) KLEBANOFF, S. J.: Effect of estrogens on the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *Infection and Immunity*, **25** : 153-156, 1979.
 - 10) AGNER, K.: Studies on peroxidative detoxification of purified diphtheria toxin. *J. Exp. Med.*, **92** : 337-347, 1950.
 - 11) BELDING, S. J. and KLEBANOFF, S. J.: Peroxidase-mediated virucidal systems. *Science*, **167** : 195-196, 1970.
 - 12) LEHRER, R. I.: Antifungal effect of peroxidase systems. *J. Bacteriol.*, **99** : 361-365, 1969.