

植物シデロホアの一種ムギネ酸の鉄排泄活性

三野芳紀,* 井尻章悟, 内田浩司, 氏田国恵, 安田正秀

Iron-Excretion Ability of Mugineic Acid, a Phytosiderophore

Yoshiki MINO,* Shohgo INOSHIRI, Kohji UCHIDA, Kunie UJITA, Masahide YASUDA

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received November 27, 2006; Accepted December 12, 2006)

Mugineic acid (MA), a phytosiderophore, was examined on the ability of iron (^{59}Fe) excretion from rats, as compared with desferrioxamine, a microbial siderophore. In the case of i.v., the excretion ability of mugineic acid is only about a half of that of desferrioxamine, but in the case of p.o., mugineic acid showed significantly greater ability of urinary excretion of iron from rats than desferrioxamine. This result suggests that mugineic acid may be a candidate as a new oral iron-chelating drug.

Key words—mugineic acid (MA); siderophore; iron excretion; chelator; desferrioxamine

序 論

鉄は生体にとって必要不可欠な元素であり、酸素運搬や電子伝達系などにおいて特に重要な役割を果たしている。¹⁾ 一方、鉄が過剰に蓄積した場合は、生体に有害な作用をもたらす。例えば、サラセミアでは、ヘモグロビンのヘム鉄が再利用できないため、ヘム鉄由来の鉄が異常に体内に蓄積し、それによって深刻な症状が現われる。²⁾ このような特別な疾患でなくても、フェリチンが変化して生じたヘモジデリンは生体に有害作用を与えることも報告されている。³⁾ さらに、鉄イオンや銅イオンなどは、生体内で活性酸素を産生する原因物質とも云われている。従って、生体内の過剰鉄を体外に排泄する能力をもつキレート剤は、重要な医薬品になり得ると考えられる。実際、鉄(III)イオンに強力なキレート能を有する微生物シデロホア、デスフェリオキサミン (desferrioxamine,

以下 DF と略す) は生体内鉄除去剤として広く使用されている (Fig. 1)。⁴⁾ しかしながら、この鉄キレート剤は、その投与方法が注射に限られているため、現在、経口投与が可能な新規鉄キレターの開発が望まれている。そこで我々は、DF のような微生物シデロホアとは全く構造の異なる植物由来の代表的シデロホアであるムギネ酸 (mugineic acid, 以下 MA と略す) に着目した (Fig. 1)。

MA は、大麦の根から分泌されるキレターで、鉄(III)イオンに特に強い親和性を有し、また、その分泌量が鉄欠乏時に顕著に増加することから、植物界のシデロホアと考えられている。⁵⁻⁷⁾ 微生物シデロホアには、多彩な構造を有するものが多く知られているが、カテコール基やヒドロキサム酸基を含むペプチド構造をもつ場合が一般的である。一方、植物シデロホアでは、MA とその類似構造のものしか見い出されておらず、それらはアゼチジン環を含む新規アミノ酸であり、鉄原子に対する配位子も酸

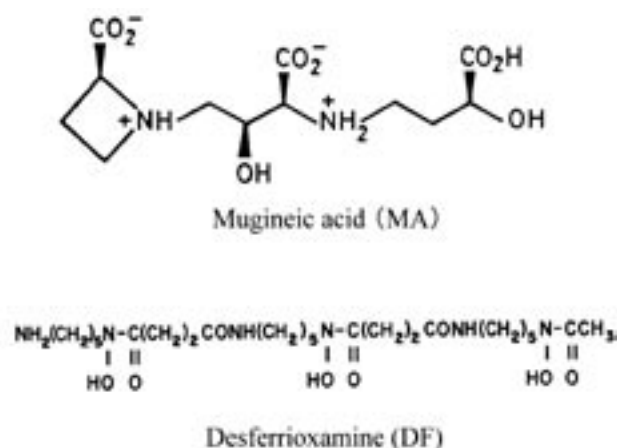


Fig. 1. Structures of Mugineic Acid and Desferrioxamine

素原子だけではなく、窒素原子もその配位に関与するなど、微生物シデロホアとは大幅に異なる性質を有している。MAは、植物の鉄取り込みを促進する作用が明らかになっているが、動物に対する生理作用は今までほとんど報告されていない。⁶⁾経口投与で有効な鉄キレート剤の開発を目的として、現在臨床で使用されているDFとは全く異なる構造を有するMAの生理作用を調べることは大変興味深い。

そこで、本研究においては、⁵⁹Fe標識ラットを用いて鉄排泄量を調べるWilliamsらの方法に準じて実験を行い、^{8,9)}MA及びDFの鉄排泄活性について比較検討した。

方法

1. キレート剤

MAは、Takemotoらの方法に準じて、大麦根の洗液から精製した。¹⁰⁾DFは、日本チバガイギー社から恵与された。

2. 鉄欠乏食

標準B変型鉄欠乏飼料(オリエンタル酵母工業)を水で練り、親指大に成形したものを乾燥させて調

製した。なお、実験期間中、ラットは、この鉄欠乏飼料と蒸留水のみを与えて飼育した。

3. 実験操作

Wistar系雌性ラット(5週齢、体重約150g)24匹を外因性の鉄を除き、且つ⁵⁹Feの標識率を上げるために、鉄欠乏飼料と蒸留水を用い室温24±1℃、相対湿度55±10%の環境下で1週間飼育した。そのラットにネンブタール注射液®(大日本住友製薬)を腹腔内に投与(1.0 ml/kg)し、麻酔を行った。鼠径部を切開し、大腿静脈から⁵⁹Fe-クエン酸鉄4.1×10⁵Bq(クエン酸鉄[III]濃度:2 mM)/0.5 ml/Ratを投与した。⁵⁹Fe投与11日後、各キレート剤を同様の方法で静脈注射あるいは経口投与した。投与量は、MA(i.v.)では14.6 mg(45 mmol)/0.5 ml/Rat(97 mg/kg)、MA(p.o.)では29.2 mg(91 mmol)/0.5 ml/Rat(195 mg/kg)、DF(i.v.)では30.0 mg(46 mmol)/0.5 ml/Rat(200 mg/kg)、及びDF(p.o.)では60.0 mg(91 mmol)/0.5 ml/Rat(400 mg/kg)とした。

キレート剤投与後7日目(⁵⁹Fe投与後18日目)、麻酔下で心臓穿刺により採血、肝臓、脾臓、腎臓

を抽出した。

採尿及び採糞は、 ^{59}Fe 投与後 5 日目から 18 日目まで行い、血液及び各臓器と同様に、放射能を測定した。

ラット組織中の鉄の定量は、一定量の生体試料を濃硝酸-濃硫酸により湿式灰化した後、1,10-フェナントロリン法を用いて行った。⁵⁾

ラット臓器中の ^{59}Fe は、 γ 線ウェル型シンチレーションカウンター (Aloka ARC-300) で測定した。

結果と考察

ラット尿中への鉄排泄に与える MA 及び DF の影響を Fig. 2-a に示した。ラットに ^{59}Fe -クエン

酸を静注し、尿中に排泄される ^{59}Fe 量を調べると、静注後、4 日目までに注入量の約 12% の ^{59}Fe 排泄が認められたが (データは省略)、5 日目以降の排泄量はわずかになった。この期間に、注入された ^{59}Fe は、各臓器などに均一に分布し、定常状態に近くなったと考えられる。¹¹⁾ 11 日目に MA を静注した場合、その投与後 3 日間で ^{59}Fe 排泄 (投与後 1 日目: 2.4%, 2 日目: 0.9%, 3 日目: 0.8% [投与 ^{59}Fe 量に対する %]) が観察された。一方、DF では、明らかにより多くの ^{59}Fe 排泄 (投与後 1 日目: 4.3%, 2 日目: 2.1%, 3 日目: 2.0%) がみられた。この結果は、臨床で用いられている DF の鉄 (III) イオンに対する安定度定数が 31 であり、MA の 18.1 より大きいという事実と一致している。^{7,12)}

経口投与においては、興味深い結果が観察され

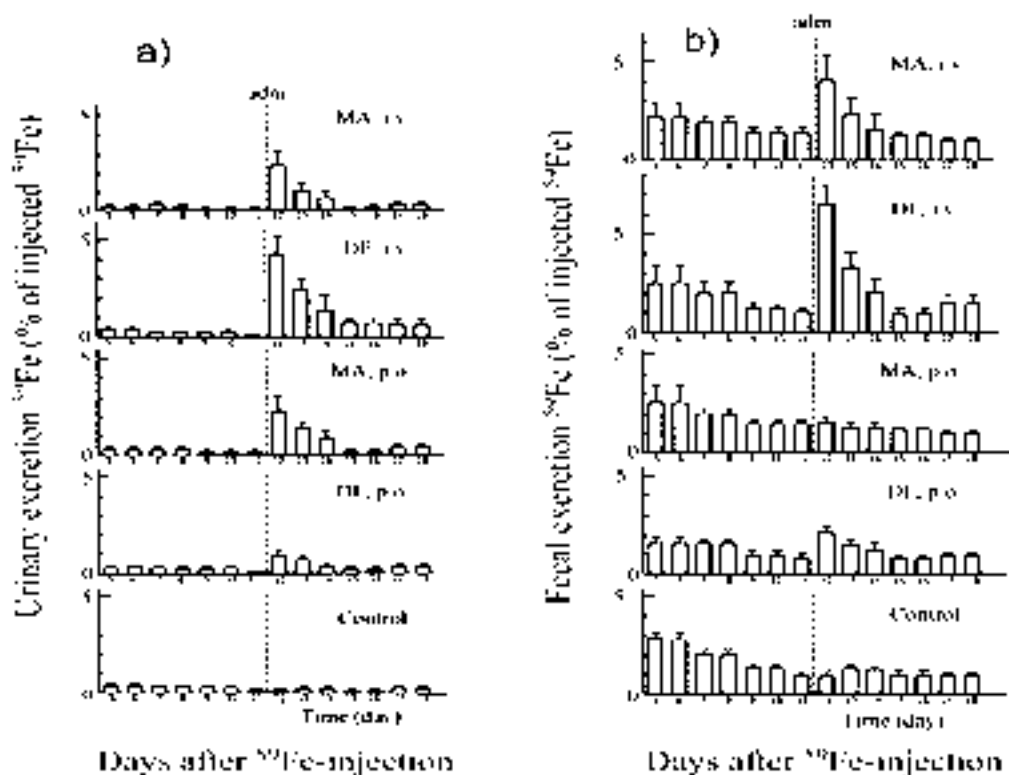


Fig. 2. Time Course of ^{59}Fe Level in Urine or Feces of Rats after Administration of Mugineic Acid or Desferrioxamine

Values are mean \pm standard deviation of 4 experiments.

た。すなわち、DF ではその排泄効果（投与後 1 日目：1.0%，2 日目：0.6%，3 日目：0.5%）が弱い のに対して、MA では明らかに優れた鉄排泄効果（投与後 1 日目：2.3%，2 日目：1.3%，3 日目：1.1%）を示した。現在、経口投与可能な生体用鉄キレート剤の開発が望まれているが、植物シデロホアである MA はその候補になり得ると思われる。

次に、糞中への ^{59}Fe 排泄量に及ぼす両キレター の効果を比較し、その結果を Fig. 2-b に示した。 ^{59}Fe -クエン酸投与（静注）後、4 日目までに注入量の約 15% に相当する ^{59}Fe の排泄が認められた。さらに 10 日目以降も ^{59}Fe の断続的な排泄がコントロール群においても観察され、尿中への排泄と比べ、糞中への排泄量が 10 倍程度多かった。MA 及び DF をそれぞれ静注した場合は、明らかな排泄効果（DF > MA）が認められたが、経口投与では両者とも排泄効果は認められなかった。

Green らは、血液や各臓器における放射能及び鉄含量を調べることにより、実際に排泄される鉄量を

概算できると報告している。¹¹⁾そこで、予備実験において同じ条件で ^{59}Fe -クエン酸を投与したラットを 11 日間飼育した後、血液及び各臓器の放射能とそれらの鉄含量を測定し、放射能と鉄量の関係を求めた（データは省略）。その結果、臓器毎に若干の差はあるものの、放射能：鉄量の関係が 5.9%（投与 ^{59}Fe に対する割合）：鉄 1.0 mg であることが判明した。Fig. 3 には、この関係を用いてキレート剤投与前後（各 3 日間）の排泄鉄量を比較した結果を示した。尿中排泄においては、キレート剤投与前では、鉄の排泄はほとんどみられないが、何れの投与法でもキレート剤投与後は鉄排泄量が増加した。MA の場合、鉄排泄量は静注で約 $7.5\mu\text{g}/3\text{ days}$ 、経口で $8.5\mu\text{g}/3\text{ days}$ であり、投与法によって大きな差は見られなかったが、DF では経口投与の場合に極端に排泄量が低下した。経口投与では、DF より MA の方がより強い鉄排泄効果を示すことが明らかとなった。

一方、糞中への排泄では、キレート剤投与前で

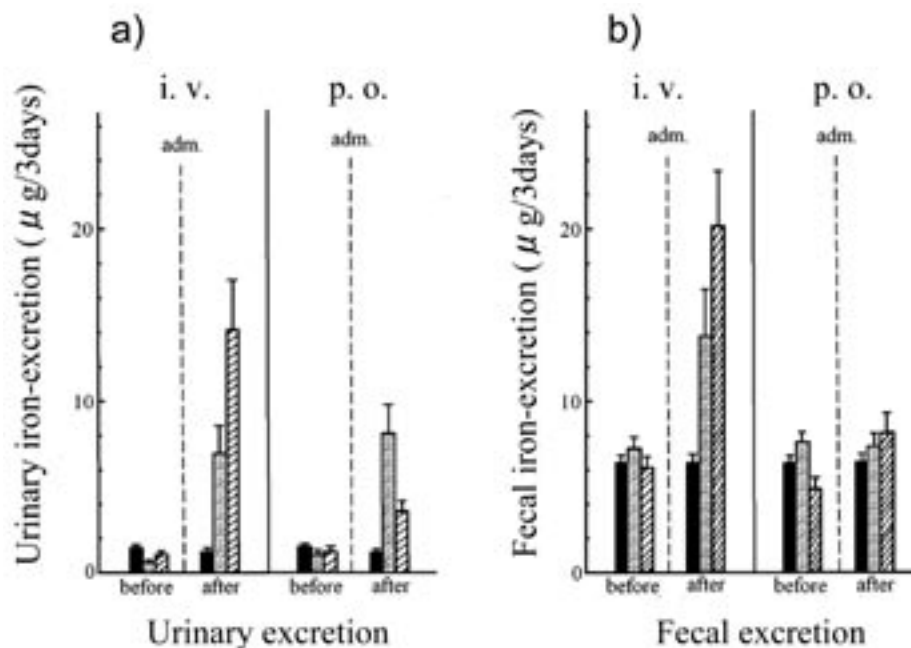


Fig. 3. Effects of Mugineic Acid or Desferrioxamine on Iron-excretion (3 days) from Rats

■ : control, ▨ : mugineic acid, ▩ : desferrioxamine
Values are mean ± standard deviation of 4 experiments.

もかなりの量の排泄がみられた。両キレート剤の静注により鉄排泄量は増加したが、経口の場合は、排泄量の増加は認められなかった。

尿及び糞中への総排泄量については、静注では、MAが12 µg/3 days, FDが26 µg/3 daysの鉄排泄をそれぞれ促進させたが、経口では、MAが6 µg/3 days, FDが2 µg/3 daysの鉄排泄量をそれぞれ増加させるに留まった。

2005年11月に世界ではじめて経口鉄キレート剤, deferasirox {4-[3,4-Bis (2-hydroxyphenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl]-benzoic acid}がNOVARTISから発表され、米国で承認されている¹³⁾。このキレート剤は化学合成によるもので、脂溶性が高いため消化管からの吸収が優れていると思われる。今回調べたMAは、DF同様、水溶性は高いが、他の植物シデロホアの中には水溶性の低いものも存在している。今後MA構造類似体及びそれらの誘導体などの鉄排泄効果についても検討がなされるべきであろう。

現状では、MAが新規な経口投与可能な鉄キレート剤の候補になる可能性は必ずしも高くはないが、今回の結果は、MAがDFなどの鉄排泄剤とは異なった性質を有していることを明示しており、今後の新規鉄キレート剤の開発に有効な情報を与えるものと考えられる。

REFERENCES

- 1) Underwood E. J., "Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 4th ed.," ed. by Underwood E. J., Academic Press, New York, 1977, pp.13-55.
- 2) Subcommittee on iron, "Medical and Biologic Effects on Environmental Pollutants 12, Copper and Iron" ed. by Committee on Medical and Biologic Effects on Environmental Pollutants, National Research Council, Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, 1977, pp.253-279.
- 3) Willson R. L., "Iron Metabolism, (Ciba Foundation Symposium 51)," Elsevier/Excerpta Medica/North-Holland, Amsterdam/Oxford/New York, 1977, pp.331-354.
- 4) Wöhler F., *Acta Haemat.*, **30**, 65-87 (1963).
- 5) Takagi S., *Soil. Sci. Plant Nutr.*, **22**, 423-433 (1976).
- 6) Sugiura Y., Tanaka H., Mino Y., Ishida T., Ota N., Inoue M., Nomoto K., Yoshioka H., Takemoto T., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6979-6982 (1981).
- 7) Mino Y., Ishida T., Ota N., Inoue M., Nomoto K., Takemoto T., Tanaka H., Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4671-4676 (1983).
- 8) Williams A., Pugh A., Hoy T. G., Jacobs, A., "The Biochemistry and Physiology of Iron," ed. by Saltman P. and Hegener J., Elsevier North Holland, Inc., 1982, pp.199-204.
- 9) Graziano J. H., Grady R. W., Cerami A., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **190**, 570-575 (1974).
- 10) Takemoto T., Nomoto K., Fushiya S., Ouchi R., Kusano G., Hikino H., Takagi S., Matsuura Y., Kakudo M., *Pro. Japan Acad.*, **54**, B, 469-473 (1978).
- 11) Green R., Knecht T., Curran D., "The Biochemistry and Physiology of Iron," ed. by Saltman P. and Hegener J., Elsevier Biomedical, New York/Amsterdam/Oxford, 1982, pp.729-732.
- 12) Schwarzenbach G., Schwarzenbach K., *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1390-1400 (1963).
- 13) Prescribing information for deferasirox:
(<http://www.fda.gov/cder/foi/label/2005/021882lbl.pdf>)