「プロテインエンジニアリングの期待と展望」特集

抗酸化酵素と老化

渡 辺 和 忠

1. はじめに

人は壮年期以降、歳をとるに連れて心身の衰えを感じないわけにはゆかない。このように生殖年齢以降に起きる生体の機能低下を説明するために数多くの老化学説が提示されている。

老化学説には、大きく分けて二つある。一つは、老化が生物にとって積極的な意味を持ち、そのための情報を各個体が持っていると考えられる老化のプログラム説である。寿命が遺伝的に規定されていることを考えると、老化のプログラム説は魅力的ではあるが、残念ながらこれを積極的に支持する結果は未だ知られていない。もう一つは生物が生活してゆく上で生じる副産物が必然的に生体の正常な機能に支障を引き起こすことが老化の過程であるとする説である。この様な考え方に基づく学説の中でもフリーラジカル説は近年注目を集めている。この説では老化現象は生体の活動にともない発生するフリーラジカ

ルによるものと考えている。即ち、人が生きてゆく限り必ずフリーラジカルが作られ、生体の機能に障害がおき、老化してゆくことになる。この小論文の中では老化のフリーラジカル説を中心に述べ、そのなかで重要と考えられる抗酸化酵素スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)について触れてみたい。

2. フリーラジカルの生成と防御機構

生物が酸素を利用して生きてゆく限り、細胞の通常の代謝過程に於てフリーラジカルは常に生成されている(図1)¹⁾。電子伝達系や、酵素の触媒作用において、また微生物に対する防御機構としての食細胞現象でも作られている。ヒドロキノリン、チオール、カテコールアミン、フェレドキシンなどの酸化によりフリーラジカルとして活性酸素 O_2^- が生じる。また、ヘモグロビンやミオグロビンが酸化型からメト型に変換される時、更にキサンチン・オキシダーゼ、アルデヒド・オキシダーゼ等の触媒

図1 細胞内でのフリーラジカルの生成(文献1)より)

Superoxide Dismutase and Aging

筆者紹介 KAZUTADA WATANABE, TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF GEL-ONTOLOGY, (財)東京都老人総合研究所 生化学部 主任研究員

筆者は、分子生物学を専門とされ、現在、タンパク質修飾酵素遺伝子のクローニングについて、その酵素の改変を目的の一つとして、活発に研究されておられる。

本稿では、老化の機構と制御における抗酸化酵素の役割、ならびにその酵素のタンパク質工学について平易に紹介していただいた。

作用の際にも O_2^- は生成される。この活性酸素 O_2^- が様々な生体分子と反応し障害を起こすと考えられている。

次々に作られるフリーラジカルに対して生体は防御機構を持っている。その一つはチトクロームオキシダーゼ系であり、これは活性酸素の生成を防ぐ役割をしている。次には、生じたフリーラジカルを取り除く酵素類がある。これらの酵素類の中でSODは、 $2O_2^-$ から H_2O_2 と O_2 への反応を触媒する。ここで生じた H_2O_2 はカタラーゼにより H_2O と O_2 に分解され活性酸素は取り除かれる。更に、ビタミンEやアスコルビン酸等も抗酸化剤として働いている可能性がある。

3. 活性酸素は老化と関係しているか

フリーラジカルが老化現象において重要な働きをしていると考える根拠は比較生物学的解析により得られた。

生物種の間で生体の代謝活性を比較してみると寿命が短い生物種ほど代謝活性が高い傾向がある(図2)³⁾。即ち、ある生物種がその体重当り一日に使用する酸素の全消費量から得られた比代謝率(SMR)とその生物種の最大潜在寿命(MLSP)の間にはほぼ逆比例の関係があり、この二つの値を掛け合わせた量(LEP)は、ほとんどの霊長類では458 kcal/gであるが、ヒトは異常に高いLEP値を示し、815 kcal/gであった。

この様に、酸素の消費量と寿命の間に密接な関係が存在するが、これは呼吸に伴い発生する活性酸素の毒性のためではないかと考えられる。このことは生物が酸素を使用して生きてゆく限り必然的に起きることであり、長期にわたる影響が老化の過程として現れ、遂には寿命の決定にも関与することになる。

4. 何が老化の速度を決めているか

老化がフリーラジカルにより促進されているとすれば、先に触れたような抗酸化剤、抗酸化酵素は老化を制御しているかも知れない。生体内の様々な抗酸化物質の量と寿命との関係を調べた結果、低分子物質ではプリンの代謝産物である尿酸(図3)やビタミンAの前駆体であるベータカロチン、ビタミンEの血中濃度が高い生物種ほど寿命が長い傾向がみられた³⁾。一方、抗酸化酵素ではSODが寿命との間に非常に強い正の相関を示したが(図4)、グルタチオンパーオキシダーゼやカタラーゼではその様な傾向は見られなかった^{3,4)}。即ち、比代謝率当りのSOD活性は寿命の長い生物種ほど高いことが明らかにされた。これらの結果は、フリーラジカルを取り除く

図3 霊長類の最大潜在寿命に対する比代謝率当りの血中の尿酸量(文献3)より)

図2 哺乳類の最大潜在寿命と比代謝率(文献2)より)

図4 霊長類とゲッ歯類の最大潜在寿命に対する比代謝率当りのSOD活性(文献3)より)

抗酸化剤の中には老化の進行を抑える役割を果たしているものがある可能性を示している。

この様な理由から老化・寿命の決定に重要なタンパク質として SOD が注目されているが、この他にもカロチノイドや尿酸の代謝に関与しているカロチノイドジオキシゲナーゼや尿酸酸化酵素なども考えられる。

5. 老化のモデルと抗酸化

老化のモデルと考えられる疾患はフリーラジカル説からはどの様に考えられるであろうか。ヒトの場合ではダウン症および糖尿病が老化或は老化にともなう疾患のモデルと考えられる場合が多い。

糖尿病においてはアテローム性動脈硬化症や白内障など老化に伴い現れる症状と同じ症状を示すことが知られている。老人と同様、糖尿病患者においてもやはり血中の過酸化物質の量が異常に高く^{5,6)}、糖尿病の示す症状にフリーラジカルが関与している可能性が高い。

一方、ダウン症が老化の研究で注目されるのは、35歳以上の患者では非常に高い頻度で老人性痴呆症であるアルツハイマー病に特徴的な症状を呈するためである。ダウン症の原因は21番目の染色体、或はその一部がトリソミーになっており、このため神経障害や精神薄弱、免疫不全を起こし、また白内障や視力障害を起こす危険性が高い。

SODのなかでも細胞質に存在するSOD (CuZnSOD) の遺伝子はヒトの場合21番目の染色体上に存在していることが明らかにされており⁷⁾、このためダウン症ではSOD活性が正常人と比較して1.5倍高くなっている⁸⁾。このことがダウン症で精神薄弱を起こす一因であり、ま

た、老化と同様の症状を示すことに関連しているのではないかと考えられている。しかし、ダウン症においてはSOD活性が1.5倍高いにも拘らず、むしろ老化が促進された症状を呈することについて合理的な説明はされていない。ただしダウン症においては、SODの遺伝子のみではなく21番目の染色体上にある他の遺伝子の影響も考えられるため容易に結論を出すことが出来ない。

SODと老化の関係を調べるための優れた実験系としてトランスジェニックマウスが作製されている。ヒトのSODの遺伝子をマウスの授精卵に注入することにより、脳において正常より16倍から6倍高いSOD活性を持つマウスが作られている⁹⁾。現在その性質が調べられており、結果が期待されている。

6. 老化制御とSOD

老化に伴ってフリーラジカルからの防御機能も低下している可能性が考えられる。例えば老化とともに血中の過酸化物質が増加し、抗酸化防御機構が弱まっていることが報告されている。また、牛の目のレンズの抗酸化酵素は加齢と共に減少すること、白内障のヒトのレンズは正常なヒトのレンズと比べてSODの活性が低いことなども知られている¹⁰⁾。

それでは抗酸化剤を補えば老化を遅らせたり、白内障を予防したりできるだろうか。現在、SODは活性酸素が関与している疾患に対して医薬として使用されている。例えば慢性関節リウマチに特徴的な関節炎には、抗リウマチ剤として牛から抽出されたSODが関節腔へ投与されている。この他にも骨関節炎や放射性膀胱炎など活性酸素が関連していると考えられる疾患は数多く、これらの疾患群に対してもSODの投与によりその効果が期待される。しかし、投与されたSODは生体内での半減期が短く、腎臓から速やかに排出されてしまうためその効果を期待するためには解決しなければならない点が多い。この様な観点から、また老化制御におけるSODの役割を明らかにするためにもSODを改変し、生体内での半減期が長く、活性の強い酵素が得られればその意義は大きい。

7. SODとは

SODは1938年に初めて単離され¹¹⁾、当初は銅の貯

蔵のためのタンパク質と考えられていたが、後にその触媒作用はMcCordとFridovichにより示された¹²⁾。SODには三種類知られており、銅と亜鉛を含むCuZnSODは有核細胞の細胞質に、マンガンを含むMnSODはミトコンドリア内や多くのバクテリアで見つかっている。この他に鉄をふくむFeSODが主としてバクテリアに見られる。それらすべてが

の反応を触媒している。この反応は二段階から成っており、最初SODの持つ金属が O_2^- により還元され一分子の酸素を放出する。次にもう一分子の O_2^- が還元された金属を酸化する¹³⁾。

三種類のSODのアミノ酸配列を比較した結果、MnSODとFeSODでは強い類似度がみられ同一のタンパク質から進化したと考えられる^{14,15)}。一方、CuZnSODはこれら二種類のSODとは異なる遺伝子から進化した同一の活性を持つに至ったものと考えられている^{14,16)}。

ミトコンドリアのMnSODは分子量約23,000サブユニットからなる四量体を形成しており、それぞれのサブユニットが一分子のZn(II)を持っている。CuZnSODはサブユニット当りCu(II)とZn(II)を一分子ずつ持つ分子量約32,000のホモダイマーである。酵素中のZn(II)は他の金属で置き換えてもその活性は残存しているが、Cu(II)は酵素活性に必須である。CuZnSOD中の各サブユニットは分子内のジスルフィド結合により安定化されており、サブユニット間の結合は非共有結合である。ヒトの組織からは糖鎖を持つ、分子量135,000の四量体CuZnSODも見つけられている。これは血清中のSODの約90%にもなるが、肺では7%に過ぎない。このため細胞外SODと呼ばれており貪食細胞から放出される O_2^- を除去するために非常に重要な役割を果たしている¹⁷⁾。

老化に関与していると考えられ

るCuZnSODは牛の赤血球から、MnSODは好熱菌からそれぞれ結晶化されX線解析により立体構造が明らかにされている。CuZnSODの構造は逆平行の β 構造を形成するペプチド鎖が8本円筒状に並んだ β -バレルを持っている¹⁸⁾(図5A)。CuZnSODが二量体を形成することにより二つの活性中心はもっとも離れた位置に存在し、その距離は34Åである。活性中心にはCu(II)が四つのヒスチジンのイミダゾール基と結合しており、そのうちの一つはZn(II)とも結合している(図5B)¹⁹⁾。一方、MnSODには殆ど β 構造がなく α -ヘリックスが多く、Mn(II)の結合には三つのヒスチジンと一つのアスパラギン酸が関与している²⁰⁾。

図5 牛CuZnSOD二量体の立体構造(A:文献9)より)と活性中心の構造(B:文献10)より)

8. SODのタンパク質工学

ヒトのCuZnSODのcDNAの改変によりその活性を変化させ、活性に関与しているアミノ酸残基を明らかにする試みがなされている。ヒトのCuZnSODのcDNAは既に大腸菌や酵母中で大量に発現させることが出来る²¹⁾。通常ヒトの赤血球のSODはN末端がアセチル化されているが、大腸菌で作られた組換えSODではN末端にアセチル基を持っていない。しかし、組換えSODでも同程度の比活性を持っているため、このcDNAを改変することにより酵素の基質特異性、SODの持つ金属の種類や酵素の生体内における安定性を変化させることが可能になった。

それでは実際、遺伝子工学を使用してSODのどのような改変が行われているのであろうか。活性中心付近にあるどのアミノ酸残基が重要であるかを知るためにヒト型組換えSODのArg¹⁴⁸(牛SODのArg¹⁴¹に対応: 図5B参照)をIle, Glu, Aspに変え、SODの活性の変化が調べられた²²⁾。その結果、いずれの場合においてもSOD活性は大幅に減少し、やはりこのArg¹⁴⁸が重要であることが示された。一般的にいうと、酵素の安定性や活性を増大させることはそれらを減少させることより遥かに困難である。しかし、CuZnSODは構造特性や酵素の性質が詳細に調べられており、これまで得られている結果からある程度の予測をすることも出来るため目的とする性質を持つSODを作ることも決して不可能ではない²³⁾。例えば牛とヒトのSODのアミノ酸配列を比較すると、ヒトのSODでは牛に比べ表面にCysがあり反応性に富んでいるために結晶化の際にSH剤をいれておく必要があった。そこで、この反応性を無くし、より良い結晶を作るためにヒトのSOD中のCys⁶をAlaに、Cys¹¹¹をSerに改変したSODが作られてその結晶化が行われている²³⁾。

遺伝子工学以外の方法によってもSODの性質を変えることが行われている。生体外からタンパク質を投与する場合、ポリエチレングリコールと結合することにより抗原性を抑えたり、血中での半減期を延ばしたりすることが出来る。SODにポリエチレングリコールを結合した場合にも、51%の酵素活性を保持しており、生体に投与した場合未処理のSODに比べて血中の半減期が長くなる²⁴⁾。また、数回投与した後でも抗炎症効果が増大している。

一般にタンパク質の生体内における寿命はそのタンパク質のN末端のアミノ酸残基が何であるかにより決定されているらしいことが示されている²⁵⁾。もし遺伝子工学を用いてSODのN末端のアミノ酸を変え、生体内での

寿命を延ばすことが出来れば医薬として更に効果のあるものが出来る可能性がある。SODのタンパク質工学はまだ始められたばかりで、SODの改変により、生体内で効率的に活性酸素を取り除くものが出来れば老化に伴う疾患の軽減だけでなく、老化の機構の解明にも役立つものと期待される。

9. おわりに

以上、老化のフリーラジカル説に基づき、SODの役割とタンパク質工学による今後の可能性について述べた。しかし、SODのみが老化制御を行っているわけではなく、老化はフリーラジカルの生成とこれまで知られていない抗酸化酵素や抗酸化剤などを含めた微妙なバランスの上で進行していると考えられる。これらのバランスを無闇に乱すことなく効率的にフリーラジカルの生成を抑え、取り除くことが出来れば老化の制御も可能になるかも知れない。

執筆の機会を与えて下さった当研究所の小山内實部長と川島誠一室長に深く感謝すると共に本文を書くに当たり適切な助言・批判を下された丸山直記室長に謝意を表します。

文 献

- 1) B. A. Freeman, (D. Armstrong, R. S. Sohal, R. G. Cutler, and T. F. Slater, eds), pp43, Raven Press, New York (1984)
- 2) R. G. Cutler, *Gerontology*, **29**, 113 (1983)
- 3) R. G. Cutler, in "Molecular Basis of Aging" (A. K. Roy and B. Chatterjee, eds), pp263, Academic Press, New York (1984)
- 4) J. M. Tolmasoff, T. Ono, and R. G. Cutler, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **77**, 2777 (1980)
- 5) I. Nishigaki, M. Hagihara, H. Tsunekawa, M. Maseki, and K. Yagi, *Biochem. Med.*, **25**, 373 (1981)
- 6) P. Sato and S. Underfriend, *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 158 (1978)
- 7) Y. H. Tan, J. Tischfield, and F. H. Ruddle, *J. Exp. Med.*, **137**, 317 (1973)
- 8) W. W. Feaster, L. W. Kwok, and C. J. Epstein, *Am. J. Hum. Genet.*, **29**, 563 (1977)
- 9) C. J. Epstein, K. B. Avraham, M. Lovett, S. Smith, O. Elroy-Stein, G. Rotman, C. Bry, and Y. Groner, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **84**, 8044 (1987)
- 10) C. Ohloff, O. Hockwin, R. Olson, and S. Dickman, *Current Eye Res.*, **3**, 109 (1984)
- 11) T. Mann and D. Keilin, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **B126**, 303 (1938)
- 12) J. M. McCord and Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969)

- 13) I. Fridovich, *Science*, **201**, 875 (1978)
- 14) J.I. Harris and H.M. Steinman, in "Superoxide Dismutase" (A. M. Michelson, J. M. McCord, and I. Fridovich, eds.) pp225. Academic Press, New York (1977)
- 15) H. M. Steinman and R. L. Hill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3725 (1973)
- 16) H. M. Steinman, *J. Biol. Chem.*, **253**, 8708 (1978)
- 17) S. L. Marklund, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**, 634 (1982)
- 18) J. S. Richardson, K. A. Thomas, B. H. Rubin, and D. C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **72**, 1349 (1975)
- 19) J. A. Tainer, E. D. Getzoff, J. S. Richardson, and D. C. Richardson, *Nature*, **306**, 284 (1983)
- 20) W. C. Stallings, K. A. Patridge, R. K. Strong, and M. L. Ludwig, *J. Biol. Chem.*, **259**, 10695 (1984)
- 21) R. A. Hallewell, F. R. Masiaz, R. C. Najarian, J. P. Puma, M. R. Quiroga, A. Randolph, R. Sanchez-Pescador, C. J. Scandella, B. Smith, K. S. Steimer, and G. T. Mullenbach, *Nucl. Acids Res.*, **13**, 2017 (1985)
- 22) H. E. Parge, E. D. Getzoff, C. S. Scandella, R. A. Hallewell, and J. A. Tainer, *J. Biol. Chem.*, **34**, 16215 (1986)
- 23) E. D. Getzoff, R. A. Hallewell, and J. A. Tainer, in "Protein Engineering. Applications in Science, Medicine and Industry" (M. Inouye and R. Sarma, eds), pp71. Academic Press, New York (1986)
- 24) P. S. Pyatak, A. Abuchowski, and F. F. Davis, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **29**, 113 (1980)
- 25) A. Bachmair, D. Finley, and A. Varshavsky, *Science*, **234**, 179 (1986)

(昭和63年2月1日受理)

第24回 Chemical Abstracts 利用法講習会

主 催 化学情報協会

共 催 繊維学会ほか

日 時 昭和63年6月29日(水) 10時から16時

場 所 学士会東大分館(東京都文京区本郷7-3-1)

受講料(テキスト代含む) 一般 21,000円, 大学教職員
学生・化学情報協会賛助会員・維持会員(1名まで)
6,500円, 化学情報協会正会員の学協会会員 14,000円

定 員 20名

申込先 化学情報協会講習会受付係

(電話 03-816-3462)

賛助会員入会

大日本インキ化学工業株式会社(3口)

日本電気硝子株式会社 (1口)

正 会 員 (21名)

	紹介者		紹介者		紹介者
西川 昭文(福井工技)		宮崎 孝司(福井工技)	西川 昭文	伊藤 真義(理科大)	
伊藤 健二		渡辺 紀文(東洋インキ)		張 苡 相(淑明女子大)	
田上 真二(広島東工技)		森 勇吉(コスモクロス)	横井 功	大竹 君雄(太陽工業)	鳥居 壮
川島 睦美(文化女子大)		豊田 宏(太陽工業)		大石 国雄(木下製網)	
麻生 慶一(理科大)		太田 悦郎(群大工短大)	新井 幸三	高広 政彦(石川工試)	奥居 徳昌
橋本 正城(新家工業)		荒木 義敬(日清紡)	本宮 達也	富田 寿代(鈴鹿短大)	根本 嘉郎
加藤 忠(群馬大)		梶原 莞爾(京工織大)		広澤富喜子(東家政院大)	

学 生 会 員 (8名)

	紹介者		紹介者		紹介者
赤穂 徹(信州大)	本宮 達也	松本 崇彦(青学院)	本宮 達也	黒川 浩志(岡山大)	本宮 達也
竹田 恵司(京工織大)	脇田登美司	横溝 裕彦(横国大)	本宮 達也	荻上 勉(山梨大)	功刀 利夫
朱 亦 展(東工大)	酒井 哲也	馬 光 輝(群馬大)			