生体の酸素障害とその防御機構

酸素は生物に不可欠であるが一方で食品の酸化など変質の原因になり、また、最近では老化現象に酸素が関わっていることが明らかになってきている。酸化を防ぐ抗酸化剤が醸造物に含まれることも最近の研究でわかってきており、本誌で食品の機能性として紹介することになった。それらを理解する基礎的な知見を紹介していただいた。

寺 尾 純 二

はじめに

大気中に 21% 存在する酸素はいうまでもなくヒトを含む好気性生物の生存にとって必要不可欠である。しかし、食品の酸化変敗、ゴム・プラスチック樹脂の劣敗、金属の錆など日常目にする劣化現象も酸素の強い酸化力によって生じるものである。では、生体内ではこのような劣化はおこらないだろうか？ 植物の光合成廃棄物として酸素が大気中に大量に出現したのはおよそ 20 億年前といわれるが、この時生物にとって酸素は障害をもたらす公害であったに違いない。しかし、生物は酸素障害に対する優れた防御機構を獲得するとともに酸素を効率のよいエネルギー獲得の手段として利用することに成功した。すなわち、好気性生物の誕生である。進化のひとつの頂点に位置するヒトは酸素障害に対して巧妙な防御機構を備えており、食品や樹脂でみられるような劣化現象は生体では決しておこらない。しかし、その防御も完全ではないため酸素障害を避けることはできない。

酸素から反応性の高い活性酸素が過剰につくられ生体防御系によってこれが処理しきれない場合（酸化ストレス状態）には障害に苦しむことになる（第1図）。発ガンや虚血性疾患、糖尿病などの成人病や老年病といわれる疾患の発症や進行にこのような酸素障害が密接に関与することが明らかになってきた。また、老化そのものに酸素障害が関わっていることも示唆されている。生体の

第1図 酸素障害とその防御

酸素障害とその防御機構を解明することは疾患予防薬や治療薬の開発、老化予防のための生活様式の確立にもつながるものである。本稿では酸素障害をもたらす活性酸素の性質を概説するとともに、生体膜脂質における酸素障害とその防御機構を中心に現在までに得られた知見を要約して紹介する。本テーマに関してはいくつかの成書が刊行されているので詳細についてはそちらを参考にされたい¹⁾。

1. 活性酸素の生成とその性質

大気中に含まれる酸素分子は基底3重項状態 ($^3\text{O}_2$) であり、不対電子を2個含むラジカルである。しかし、大気中の酸素分子が直接に生体障害をもたらすことはない。生物が酸素を呼吸として利用する時、 $^3\text{O}_2$ はミトコンドリア電子伝達系の最終的な電子受容体として働く。この過程で1個の酸素分子が4電子還元されて水となる際にスーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2) 及びヒドロキシル ($\cdot\text{OH}$) が中間体として生じる（第2図）。活性酸素とは狭義にはこれら3つの酸素種と後述する一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) を指すものである。これら活性酸素種は電子伝達系からほとんど遊離せず、水として最終的に遊離する。しかし、この基本的な生命活動においても活性酸素の発生を避けることはできず、通常環境

第2図 生体内における酸素分子の変化

Oxidative Damage and Its Defense Mechanism in Biological Systems

Junji TERAO (National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)

下で好気性生物が消費する全体の酸素から約 1% の活性酸素が生成すると推定されている。

O_2^- は不対電子を 1 個もつアニオンラジカルであり、酸素分子の 1 電子還元によって生成する。

O_2^- は呼吸以外にも、キサンチンオキシダーゼや NADPH オキシダーゼのような酵素反応あるいはキノン系物質の酸化還元反応などで生じる。したがって、生体内で O_2^- は様々な組織で常に生成していると考えられる。しかし、 O_2^- 自体のラジカルとしての反応性は低く、より活性の高い活性酸素の前駆体としての役割の方が重要である。すなわち、生体中に O_2^- が生じると (2)~(4) の一連の反応により H_2O_2 を介して $\cdot OH$ が生じる。

特に H_2O_2 と鉄イオンとの反応は Fenton 反応と呼ばれ、生体内での有力な $\cdot OH$ 発生系である。 $\cdot OH$ は強いラジカル反応性を有し、ほとんどの生体構成成分と拡散律速に近い速度で反応する。

$$k_5, k_6 \approx 10^9 \sim 10^{10} M^{-1} \cdot S^{-1}$$

すなわち、 $\cdot OH$ は生成した部位の近傍で非特異的に種々の成分と速やかに反応する。したがって $\cdot OH$ による生体障害を考える場合には、 $\cdot OH$ が生体にとってどれだけ危険な部位で発生するかを考慮しなければならない。いいかえると、基本的な生命活動に関わっている部位での発生は致命的であるが、そうでなければ障害はもたらさない。 O_2^- 発生部位に鉄イオンなどの遷移金属イオンが存在し、しかもその部位が生体にとって重要である場合にはじめて $\cdot OH$ による障害が発生すると考えてよいであろう。

一方、 O_2^- がプロトン化したペルヒドロキシラジカル ($\cdot OOH$) は $\cdot OH$ に比べて反応性は低いものの、生体成分に障害をもたらす可能性がある。特に不飽和脂質からの水素の引き抜き反応をおこすことにより、生体膜脂質過酸化反応の引金として働くことが示唆されている²⁾。

$$k_8 \approx 10^2 M^{-1} \cdot S^{-1}$$

水中では O_2^- と $\cdot OOH$ の pK_a は 4.88 であり、細胞中の水相で生じた O_2^- はそのほとんどが O_2^- として存在する。しかし、 O_2^- 発生部位の pH が低下している

場合には $\cdot OOH$ に変わって、ラジカルと反応しやすい膜脂質やその他の生体成分を容易に攻撃するであろう。

一重項酸素 (1O_2) も活性酸素の一種であるが、他の活性酸素とは異なり、ラジカルではない。 1O_2 は特に親電子付加反応により生体成分の二重結合とは速い速度で反応する。

$$k_9 \approx 10^5 M^{-1} \cdot S^{-1}$$

白血球の殺菌作用で 1O_2 が発生することが確かめられている。また、遺伝病のポルフィリン症やクロロフィル誘導体の摂取で惹起される光過敏症は 1O_2 による障害に起因すると考えられている。

これら以外にも、活性酸素としては、大気汚染物質である窒素酸化物 (NO_x) やオゾン (O_3) が挙げられる。タバコ煙にも存在する NO_2 はそれ自体ラジカルであり、強い反応性をもつ。 O_3 にラジカル性はないが、生体成分と容易に反応する。

2. 活性酸素による生体成分の損傷

活性酸素は様々な生体構成成分と反応することによって障害をもたらすが、なかでも活性酸素のターゲットとして重要な生体成分は糖類、DNA 核酸、酵素タンパクと生体膜脂質である。糖と $\cdot OH$ の反応では糖分子からの水素引き抜きとグリコシド結合の開裂がおこる。ムコ多糖類の一種であるヒアルロン酸は滑液に広く存在するが、 $\cdot OH$ ラジカルによるヒアルロン酸の解重合が筋肉炎症や関節炎などの原因であると示唆されている。酵素タンパクに対する活性酸素の不活性化作用も酵素障害として重要である。この反応では特定アミノ酸の修飾やタンパク分子の重合化断片化などが起こり、種々の酵素が不活性化をうけることが知られている。

$\cdot OH$ による DNA 鎖の切断はデオキシリボースのラジカルからのリン酸エステル解離と塩基の脱離の機構で説明される。一方、DNA 塩基の修飾としてよく知られているものにチミンダイマーやチミングリコール (TG) がある (第 3 図)²⁾。ヒトに比べて酸素消費量が多く、したがって酸素障害をうけやすいラットやマウスでは尿中に排泄される TG やチミングリコール (αTG) が多い (第 4 図)⁴⁾。これはラットやマウスは生体内での酸化的 DNA 損傷をより多くうけていることを示すものである。最近では細胞内の DNA のグアニン残基が 8-ヒドロキシングアニンへ酸化されることが明らかとなっている。

生体膜における脂質過酸化反応はラジカル連鎖反応で

第3図 チミンと活性酸素との反応経路

第4図 酸化的 DNA 損傷と酸素消費量との関係⁴⁾

進行することに特徴づけられる (第5図)⁵⁾。まず、 $\cdot\text{OH}$ や $\cdot\text{OOH}$ が膜を構成するリノール酸以上の高度不飽和脂肪酸から水素を引き抜くと、脂質ラジカル ($\text{L}\cdot$) が生じる (開始反応)。すると自己触媒的にペルオキシラジカル ($\text{LOO}\cdot$) を介した連鎖反応が進行しヒドロペルオキシド (LOOH) を蓄積する (成長反応)。ラジカル同士の結合により反応は終結するが、さらに LOOH のラジカル開裂によりアルデヒド類やケトン類も蓄積する。酸化生成物の蓄積は膜透過性を上昇させるとともに、膜流

動性を低下させる。このような膜物性の変化は生化学反応の場としての膜機能を低下させ、最終的には膜構造そのものが破壊される。また、生成物である LOOH はさらに鉄イオンや銅イオンなどの遷移金属イオンにより、1電子還元されて、反応性の高いアルコキシラジカル ($\text{LO}\cdot$) を生じる。

脂質過酸化反応がもたらす生体障害として最近最も注目されているのは動脈硬化症における血漿リポタンパク

第5図 脂質のラジカル連鎖過酸化反応機構

の酸化変性の問題である。アテローム性動脈硬化の初期にみられる脂肪条は泡沫細胞が内皮下に集合したものであるが、この泡沫細胞形成に活性酸素が関与するという説が有力視されている(第6図)⁶⁾。すなわち、コレステロール輸送を担う血中の低比重リポタンパク(LDL)が内膜に進入後、動脈壁間隙において活性酸素により障害をうけて酸化LDLとなる。この酸化LDLは内皮細胞を障害するとともに、マクロファージが酸化LDLを特異的に認識して取り込むことによって泡沫細胞化するという考え方である。LDLは内部に多量のコレステロール

ルエステルと少量のトリアシルグリセロールを含み、表面はPUFAに富むリン脂質膜とアポタンパクからできている。したがって、酸化されやすく、試験管内では銅イオンの添加や血管内皮細胞とインキュベートするだけでリン脂質の酸化が進みアポタンパクが変性する。活性酸素によるLDLの酸化変性が動脈硬化症の引金になるのであれば、活性酸素に対するLDLの防御能を高めることで動脈硬化症を予防できるのではないかと期待される。

3. 活性酸素に対する生体防御機構

上述のような活性酸素の攻撃に対して生体はその防御機構を働かせることで障害を防いでいる^{7,8)}。これは活性酸素を生じさせない段階、生じた活性酸素を消去する段階、活性酸素による障害の進行を抑制する段階、生じた障害を消去修復する段階に分けられる。ここでは生体膜脂質を例にとってその巧妙な防御機構についてふれた

い。まず、細胞内の酸素濃度は大気中よりも低く保たれており(30~40 μM)、ミトコンドリア膜近傍では0.1 μM 程度まで低下している。さらに細胞質で O_2^- が発生しても、細胞質に存在するスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)やグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)などの酵素群は O_2^- や H_2O_2 を消去することにより、 $\cdot\text{OH}$ を生じることなく水に還元する。

第6図 酸化LDLによる動脈硬化促進のメカニズム⁶⁾

I：血中単球の遊走能を亢進し、内皮下へ単球を供給させる。II：壁にマクロファージの遊走を阻止し血中への再循環を抑える。III：マクロファージによる取り込みを増大させ泡沫細胞へ導く。IV：酸化LDLの細胞障害性により内皮が損傷する。

$$k_{11} \approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$$

カタラーゼは細胞内顆粒（ペルオキシソーム）に局在し、セレン酵素である GSH-Px は細胞質に分布する。遷移金属イオンを捕捉し遊離させないことも・OH を発生させない仕組みとして重要である。例えば、生体中の鉄イオンはトランスフェリンに結合した状態で輸送されフェリチンとして貯蔵されており、正常の状態では遊離の鉄イオンは検出されない。銅イオンもセルロプラスミンに結合して輸送される。血漿ではビタミンCや尿酸、ビリルビンなどの水溶性抗酸化剤も活性酸素（・OH, ・OOH, $^1\text{O}_2$ ）の消去に働くと考えられる。これらは細胞質や血漿水相での消去であるが、生体膜中で活性酸素が発生した場合には膜中に微量存在する低分子物質が障害の防御に働く。 $^1\text{O}_2$ の消去物質としてはβ-カロテンβ-car）をはじめとするカロテノイド群が知られている。

ビタミンEの $^1\text{O}_2$ 消去能はβ-カロテンの2%程度である。むしろビタミンE（α-TocH）はラジカル連鎖反応を担うLOO・をすばやく消去することにより、生体膜での脂質過酸化反応の進行を遅らすものである⁹⁾。

最近ではユビキノール類のラジカル捕捉作用も注目されている。ビタミンCは膜中のビタミンEラジカルを再生することが知られている。もし、生体内でもこの作用が発揮されるならばビタミンCはビタミンEを介して生体膜中での脂質過酸化反応の進行を抑制できることになる。

一方、酸素障害を修復する機構として、膜脂質の過酸化反応で生じたLOOHの消去系には次の2つの経路が提唱されている（第7図）¹⁰⁾。ひとつは膜リン脂質に生じたヒドロペルオキシ基を直接還元消去するものであり、リン脂質ヒドロペルオキシド（PL-OOH）特異的GSH-Pxが種々の組織に存在する。また、肝ミクロソーム膜に存在するグルタチオン-S-トランスフェラーゼはPL-OOHを還元消去できる。細胞質に存在するGSH-PxはPL-OOHを基質としない。LOOH消去系のもうひとつの経路はホスホリパーゼA₂（PLaseA₂）による遊離脂肪酸ヒドロペルオキシドの選択的切り出しとそれに続く細胞質のGSH-Pxによる還元消去である。しかし、どちらがより重要であるかは不明である。このように生体は活性酸素に対して何重もの防御系をはりめぐらすことによって酸素障害を防いでいることが明らかになりつつある。

おわりに

生体は酸素障害に対して優れた防御機能を有しており、この機能を医薬、食品など様々な分野に有効利用す

第7図 膜リン脂質ヒドロペルオキシドの消去機構

第8図 ビタミンC-リン脂質誘導体の構造

ることが考えられる。例えば、植物は酸素障害をさけるためビタミンEやカロテノイド以外にもポリフェノール類をはじめとする抗酸化物質を合成蓄積する¹¹⁾。すでにこれらは生薬の成分としてあるいは食品中の抗酸化成分として利用されている。微生物の産生するアルデヒド分解酵素は食品の酸化臭の除去に利用されているが、最近では脂質ヒドロペルオキシドを添加した培地に生育する耐性酵母は従来とは異なる基質特異性をもつ GSH-Px を誘導することが報告されている¹²⁾。このような試みから新たな有用物質が得られることが期待される。筆者らの研究室では酸性リン脂質であるホスファチジルセリンが鉄イオン依存性脂質過酸化反応を抑制することを明らかにした¹³⁾。この作用はリン脂質の鉄イオンとの特異的な結合によるものと推測した。さらに、水溶性のラジカル捕捉剤であるビタミンCをホスホリパーゼを用いてリン脂質誘導体とすることで膜構成リン脂質に組み込むことにも成功した(第8図)¹⁴⁾。酸素障害に対して生体が生みだした巧妙な防御機構を学ぶことにより、食品等の品質保持に有効な抗酸化物質を開発できるものと考えている。

＜農林水産省食品総合研究所＞

文 献

- 1) 活性酸素に関する最近の成書を以下に示す。
 - a. 八木国夫, 中野稔監修, 二木悦雄, 島崎弘幸編: 活性酸素—化学, 生物学, 医学—(医歯薬出版)(1987)
 - b. 中野 稔, 浅田浩二, 大柳善彦編: 活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構—(産科婦人科臨時増刊, 33, (共立出版)(1988)
 - c. H. SIES (井上正康訳): 活性酸素と疾患 (学会出版センター)(1987)
 - d. 大柳善彦: 活性酸素と病気—バイオサイエンスシリーズ—(化学同人)(1989)
 - e. B. HALLIWELL, J. M. C. GUTTERIDGE (松尾光芳, 蛭峨井勝, 吉川敏一訳): フリーラジカルと生体 (学会出版センター)(1988)
 - f. 日本化学会編: 活性酸素種の化学 (季刊化学総説) (学会出版センター)(1990)
- 2) J. AIKENS, T. A. DIX: *J. Biol. Chem.*, 266, 15091 (1991)
- 3) 葛西 宏: 活性酸素・フリーラジカル, 2, 322 (1991)
- 4) R. ADELMAN, R. L. SAUL, B. N. AMES: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2706 (1988)
- 5) 寺尾純二: 日本臨床 45, (10) 2149 (1988)
- 6) D. STEINBERG, S. PARTHASARATHY, T. E. CAREW, J. C. KHOO, J. L. WITZTUM: *N. Eng. J. Med.*, 320, 915 (1989)
- 7) 寺尾純二: 食品工業, 35, 37 (1992)
- 8) 寺尾純二: 化学と生物, 30, 256 (1992)
- 9) 二木悦雄: ビタミン 63, 539 (1989)
- 10) 山本順寛: 活性酸素・フリーラジカル 2, 49 (1991)
- 11) 中谷延二: 日食工誌, 37, 569 (1992)
- 12) 井上善晴, 木村 光: 農化, 66, 1605 (1992)
- 13) K. YOSHIDA, J. TERAU, T. SUZUKI, K. TAKAMA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 179, 1077 (1991)
- 14) A. NAGAO and J. TERAU: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 172, 385 (1990)