生体における活性酸素の産生と消去*

長 野 哲 雄

1. はじめに

酸素は人間を始めとする好気性生物が生きるために必要不可欠な気体である。地球上に高度の進化を遂げた人類が出現したのも酸素を利用した効率のよい生体内エネルギー生産が可能であったからにはかならない。しかしながら最近この酸素が生体にとって一筋縄では御しきれない複雑な性格を持つ分子であることが明らかとなってきた。生体にとって酸素分子は好ましい作用だけでなく害を及ぼす作用もあること、すなわち両刃の剣としての機能を有することがわかってきたのである。酸素から生ずる活性酸素種は生体の構成成分である脂質、タンパク質、核酸それぞれに障害を与えることが明らかにされてきた。脂質に対しては過酸化であり¹⁾、タンパク質に対してはアミノ酸の酸化・ペプチド鎖の切断・S-S結合のかけかえ^{2)~4)}、核酸に対しては核酸塩基の修飾(グアニンの8位水酸化等)・DNA鎖の切断・核酸塩基の遊離等の反応である(図1)⁵⁾。

以下、本稿では酸素毒性の発現機構およびその消去を分子レベルで論述する。

2. 活性酸素とは

酸素が生体に障害を与える際の反応作用種は活性酸素である。現在スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素の四種を活性酸素種と呼んでいる。そして一重項酸素を除いて、いずれも酸素分子の還元体であり、細胞内での生成が確認されている。空气中に存在する基底状態の酸素分子は三重

項であるためピラジカル性を有するにもかかわらずその反応性は低く、基底状態の酸素分子それ自身が直接生体に障害を与えることはない。一方、活性酸素種はかなりの反応性を有し、細胞内の酸素分子濃度が変化した場合等のように生体の恒常性が保たれないときに、容易に産生し、細胞障害をひきおこす。

3. 活性酸素種の反応性

スーパーオキシドは三重項酸素分子が一電子還元されたものでその特異な電子配置から O_2^- あるいは $O_2^{\cdot -}$ と表記される。 $O_2^- + H^+ \rightleftharpoons \cdot O_2H$ の pK_a が4.88であることより中性の水溶液中では大部分が解離した状態にある。 O_2^- はアセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ベンゼン等非水系溶媒中ではアニオン性、ラジカル性の多様な反応性を有する(図2)。このような疎水的非プロトン性溶媒中(生体では脂質膜が疎水的環境にある)では裸の O_2^- として高い反応性を示し、半減期も室温で数分から数時間である。

H_2O 中では強く水和するとともに不均化反応を起こし O_2 と H_2O_2 を生成する(図3)。そのため O_2^- 自身の H_2O 中での反応は主として一電子還元であり、水溶液中で O_2^- の反応性がスーパーであるか否か意見の分かれるところである。 O_2^- がスーパーな反応性を有すると主張しているのは O_2^- の不均化を触媒する酵素スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)⁶⁾の発見者として有名なフリドヴィチであり⁷⁾、他方 O_2^- は単に他の活性酸素種の前駆体にすぎずそれほどスーパーなものではないと主張しているのはソイヤーの一派である⁸⁾。後者は鉄触媒ハーバーワイス反応(式1)により生成する $\cdot OH$ あるいは O_2^- がプロトン化した $\cdot OOH$ が真の酸素毒性発現種であると考えている。

いずれにしても O_2^- の反応性の特徴は多様性にあり、表1に示す O_2^- の検出法にもみられるように、酸化剤として、また還元剤としても働く両面性を有している。

O_2^- がプロトン化した $\cdot O_2H$ は O_2^- と比べると反応性は高く、脂質過酸化、生体膜の変性を引き起こすイニシエーターになり得る⁹⁾。

一方著者等は O_2^- がハロゲン化物^{9),10)}、酸ハライ

Tetsuo Nagano

昭和52年 東京大学薬学系大学院博士
課程終了

同年 東京大学薬学部助手
58年 米国デューク大学留学
61年 東京大学薬学部助教授
薬学博士

(趣味) スポーツ 読書 囲碁 将棋

* Chemical and Biochemical Aspects of Active Oxygen Species, 昭和62年6月17日受理

図1 活性酸素種による生体障害

図2 スーパーオキシドの反応性

図3 スーパーオキシドの不均化反応

表1 スーパーオキシドの検出法

1. テトクローム C の還元
2. ニトロブルーテトラゾリウムの還元
3. テトラニトロメタンの還元
4. エピネフリンの酸化
5. ラクトペルオキシダーゼ- O_2 複合体生成
6. 亜硫酸の酸化
7. 乳酸脱水素酵素-NADH の酸化

ド^{11)~13)}、二酸化炭素、リン酸官能基¹⁴⁾等の存在下でより酸化能の高い $ROO^\bullet$ あるいは ROO^- を生成することを見出した(図4)。これらの反応種は各種化合物を高収率で酸化し核酸、脂質等生体構成成分に障害を与える。また、 CCl_4 に代表される肝障害誘因物質の毒性発現機構も O_2^- 関与であることがわかった¹⁵⁾。

過酸化水素 (H_2O_2) は他の活性酸素種に比べ非常に安定で生体膜も容易に通過できる¹⁶⁾。その反応様式は解離した $\bullet OOH$ アニオンが基質を求核的に酸化する場合と式(1)に示すように $O-O$ 結合の開裂により生ずる $\bullet OH$ の前駆体として作用する場合の2通りある。 H_2O_2 は還元剤として機能する場合もあるが、生体障害の観点からは酸化剤としての作用と、 $\bullet OH$ 生成としての作用が重要である。 H_2O_2 による酵素の選択的不活化も報告されている。

ハイドロキシルラジカル ($\bullet OH$) は、酸素原子に $H^\bullet$ が付加した形をしており、 H_2O_2 の酸化還元分解、光分

解、放射線分解で生成する。細胞内では鉄触媒ハーバーワイス反応により生成すると考えられており、 $\bullet OH$ は活性酸素の中では最強の酸化能を有し、タンパク質、DNA、脂質、糖質等ほとんどすべての生体構成成分と拡散律速に近い速度で反応する。 $\bullet OH$ は不安定で、かつ反応性が高いため、 $\bullet OH$ 発生部位で酸化反応を引き起こし遠く離れた部位での反応は考えにくい。この点 H_2O_2 と大きく異なる。

一重項酸素 ($^1O_2$) は疎水環境においてはかなり長寿命(半減期 $\tau = 10^{-5} \sim 10^{-3}$ 秒)であるが H_2O 中では容易に基底状態の三重項酸素に戻る ($\tau = 2 \times 10^{-6}$ 秒)。重水 (D_2O) 中では H_2O に比べ寿命が約10倍になり、このことは $^1O_2$ 生成の証明にしばしば利用される。 $^1O_2$ は求電子性を有し、この点 O_2^- 、 H_2O_2 と異なる。そしてジェン、オレフィン、各種アミノ酸、例えばメチオニン、ヒスチジン、トリプトファン、システイン、チロシン等と反応し酸化物を与える。また、コレステロー

図4 スーパーオキシドと各種化合物の反応

ルと反応し過酸化物を生じる。

4. 活性酸素の生成

O_2^- の生成法にはキサンチンオキシダーゼ、NADPH オキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、 $^3O_2$ の電解還元、フラビン光還元、パルスラジオリシス、白血球・マクロファージ等の方法がある。キサンチン・キサンチンオキシダーゼを用いる方法は一般的で活性酸素研究に広く使用されている。この酵素反応ではキサンチンは尿酸に酸化され、同時に O_2 から O_2^- と H_2O_2 を発生する。また、 O_2^- のK塩である KO_2 は市販されている。しかしながらその純度は低い(<85%)。いずれの生成方法も反応液中に O_2^- と同時にその不均化により生じる H_2O_2 、さらに $\cdot OH$ が生成し、反応の真の活性種が何であるかを決定するのに困難が伴う。その際後述するSOD、カタラーゼ、各種活性酸素消去系の添加効果の検討が必要となる。

最近、 O_2^- 増産剤が注目されている。これは還元剤あるいは還元系の存在下で触媒的に多量の O_2^- を生成するもので、その種類は以下の3つに大別できる。

(1)金属錯体類、(2)キノン類化合物、(3)N-四級塩化合物。金属錯体類の代表として制ガン剤ブレオマイシンがある。この鉄錯体は $Fe(II) \rightleftharpoons Fe(III)$ に示す価数変化により O_2 の還元を行う。キノン類もヒドロキノン、セミキノンラジカル、キノン間の変換により一電子の受け渡しを $^3O_2$ との間で行う。N-四級塩化合物としては農薬バラコートがあげられる¹⁷⁾。これは人間が服用すれば毒性を発現するがこの機構も細胞内で酵素的に一電子還元されカチオンラジカルを生成しさらにこれが酵素を還元すると推定されている。他に新規の O_2^- 増産剤として筆者らにより研究されているヘテロペンタレン類がある。このペンタレン類も準安定なアニオンラジカル種を生成し O_2^- 増産能を示す¹⁸⁾。

H_2O_2 は各種オキシダーゼ(アミノ酸オキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ等)あるいは O_2^- の不均化反応、 O_2^- の還元反応から生成する。ミトコンドリア部位

の H_2O_2 は O_2^- の不均化によるものがほとんどである。 $\cdot OH$ の生成は H_2O の放射線照射、ハーバー・ワイス反応による。 $^1O_2$ は色素であるメチレンブルー、ローズベンガル存在下で光照射により $^3O_2$ から生成する。また、 $NaOCl$ と H_2O_2 からも化学的に生成することができ、酵素的にはミエロパーオキシダーゼにより生ずる報告もあるが確かではない。 $^1O_2$ に関する疾病としてはポルフィリア病がある。これはヘモグロビンの前駆物質であるポルフィリン誘導体が尿中に排泄されるもので、この患者は皮膚に蓄積したポルフィリン色素が光励起され $^1O_2$ を生成し溶血を引き起こすと考えられている。

5. 生体における活性酸素種の消去

消費されている O_2 量の約1%が常時普遍的に活性酸素種の生成に使用されていると推測されている。生体はこの活性酸素種の攻撃から細胞を防御するため、各種の消去系を有する。

O_2^- は H_2O 中で H_2O_2 と O_2 に不均化するが、SODはこの反応を拡散律速に近い速度 $\sim 2 \times 10^9 M^{-1} S^{-1}$ (pH 5~9.5)で触媒する(式2)。この酵素の発見を

M: Cu, Fe, Mn,

契機として活性酵素の研究が始まったといっても過言ではない。SOD酵素は含有する金属により三種に分けられる。人間の細胞中には分子量約3万、2つのサブユニットからなるCu, Zn-SOD、分子量約4万、2つのサブユニットからなるMn-SODの二種存在する。前者は細胞質、後者はミトコンドリアにある。好気性生物の細胞や細胞内顆粒は約 $10^{-5} M$ のSODを有しており、 O_2^- は $10^{-11} \sim 10^{-12} M$ の低濃度に保たれている¹⁹⁾。大腸菌にはMn-SOD、Fe-SODの二種存在する。酵素としての触媒能に大きな違いはない。 O_2^- 増産剤でSODが誘導されるが大腸菌を使った実験ではMn-SODのみに誘導が認められFe-SODの酵素量是不変であった¹⁷⁾。Fe-SOD本来の役割が O_2^- の消去であるか否か疑問視するグループもある。SODは細胞内に存在するが細胞外液である血清中には Cu^+ 蛋白であるセロプラスミンがあり、 O_2^- 消去能を有する。このセロプラスミンはSODと異なり O_2^- を H_2O にまで3電子還元する。

H_2O_2 消去系としては、カタラーゼ、ペルオキシダーゼがある。カタラーゼは H_2O_2 を不均化して除去する(式3)。そして細胞内 H_2O_2 を $10^{-7} \sim 10^{-9} M$ に保って

いる。カタラーゼは H_2O_2 が多量に発生するペルオキシゾームには特に局在している。ペルオキシダーゼも H_2O_2 の分解を司どり、酸素毒性防御に関与している(式4)。 H_2O_2 の分解を司どり、酸素毒性防御に関与している(式4)。グルタチオンを電子供与体とするものをグル

タチオンペルオキシダーゼと呼び動物・カビにのみ存在が確認されている。

・OHの消去系として、特定の酵素、化合物があるわけではない。 $^1\text{O}_2$ に関して恐らくカロチノイド等が体内消去剤として働いていると考えられている。

6. おわりに

人間をはじめとする好気性生物は酸素を使う以上、活性酸素種との戦いは避けることはできない。その消去系は通常活性酸素種が発生しやすい部位に配置されており、酸素毒性から細胞を防御している。しかしながら放射線・紫外線照射により細胞内に・OH、 O_2^- 、 H_2O_2 が多量に生じたり、我々のまわりの環境には多くの有害化合物、公害ガス、タバコ等が存在し活性酸素種産生剤として働くことがある。通常濃度以上の活性種を生じ身の危険にさらされていることになる。

最近海洋中における活性酸素種に関する論文が報告された。飽和空気を含んだ海洋表面では容易に H_2O_2 が発生する。この H_2O_2 量に基づく O_2^- は $\sim 10^{-8}$ mol/l濃度で存在し、細胞内濃度の $10^3 \sim 10^4$ 倍高濃度に生成していることになる²⁰⁾。

発癌、炎症、老化、白内障、動脈硬化、心不全等多くの疾病の作用種として活性種は注目されており、最近ではパーキンソン病への関与も示唆されている。

現在までに、環境汚染を活性酸素生成の立場から論じた報告は少なく、今後の課題として残されていることを指摘しておきたい。

文 献

酸素、活性酸素に関する本については拙著：ファルマシア(1986) Vol.22, 350-351 参照

- 1) Bielski, B.H.J., Arudi, R.L. and Sutherland, M.W. (1983) A study of the reactivity of HO_2/O_2^- with unsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.*, **258**, 4759-4761.
- 2) Nagano, T., Arakane, K. and Hirobe, M. (1980) Disulfide interchange reactions by superoxide, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 5021-5024.
- 3) Inoue, H., Nagano, T. and Hirobe, M. (1987) Model reaction of protein denaturation by active oxygen and protective effect of cytskinin in the presence of heavy metal ion, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, S-19.
- 4) Inoue, H., Nagano T. and Hirobe, M. (1984) Cleavage of

- disulfide dependent on superoxide, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 317-320.
- 5) 柏村直樹, 森田潤司 (1984) 核酸を切断する糖質誘導体, 有合協, **42**, 523-535およびその引用文献.
- 6) McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase-An enzymic function for erythrocyte, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.
- 7) Fridovich, I. (1982) How innocuous is superoxide? *Acc. Chem. Res.*, **15**, 200.
- 8) Sawyer, D.T. and Valentine, J.S. (1981) How super is superoxide? *Acc. Chem. Res.*, **14**, 393-400.
- 9) Yamamoto, H., Mashino, J., Nagano, T. and Hirobe, M., (1986) Epoxidations of olefins by peroxy intermediate generated in situ from CCl_4 and superoxide, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 539-541.
- 10) Nagano, T., Yamamoto, H. and Hirobe, M. (1987) Toxicity of carbon tetrachloride induced by superoxide, The Biological Role of Reactive Oxygen Species in Skin, 241-251, University of Tokyo Press.
- 11) Nagano, T., Arakane, K. and Hirobe, M. (1980), Epoxidation of Olefins by Superoxide in the Presence of Acyl Halide *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3719-3721.
- 12) Nagano, T., Yokooji, K. and Hirobe M. (1983) Direct Epoxidation of Polycyclic Compounds by Superoxide in the Presence of Phosgen Dimer, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 3481-3484.
- 13) Nagano, T., Yokooji, K. and Hirobe, M., (1984) Oxidation of Substrates Having Labile Hydrogens by Superoxide in the Presence of Phosgen Dimer, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 965-968.
- 14) Yamane, H., Yada, N., Katori, E., Mashino, T., Nagano, T. and Hirobe, M., (1987) Base Liberation from Nucleotides by Superoxide and Intramolecular Enhancement Effect of Phosphate Group, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 1104-1110.
- 15) Lawrence, R.A. and Jenkinson, S.G., (1987) Effects of Copper Deficiency on Carbon Tetrachloride-induced Lipid Peroxidation, *J. Lab. Clin. Med.*, **109**, 134-140.
- 16) Turrens, J.F., Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982) Hyperoxia Increases H_2O_2 Release by Lung Mitochondria and Microsomes *Arch. Biochem. Biophys.*, **217**, 411-421.
- 17) Hassan, H.M. and Fridovich, I., (1979) Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of Production of Extracellular Superoxide Radical, *J. Biol. Chem.*, **254**, 10846-10852.
- 18) Camilleri, P., Bowyer, J.R., Clark, M.T. and O'Neil, P. (1984) Dioxathiadiaza-heteropantalenones, New photosystem-I Electron acceptors, *Biochimica et Biophysica Acta*, **765**, 236-238.
- 19) Fridovich, I., (1975) Superoxide Dismutases, *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 147-159.
- 20) Petasne, R.G. and Zika, R.G., (1987) Fate of Superoxide in coastal sea water, *Nature*, **325**, 516-518.