

スーパーオキシドディスムターゼ

セミナー

金沢大学薬学部助教授 今成登志男

TOSHIO IMANARI

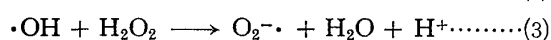
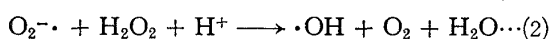
我々の生命が酸素なしには維持できないように、活性酸素に対する生体の防御機構がなければその毒性のために死滅してしまうことも又事実だろう。古くから生体に及ぼす酸素の毒性に関心はもたれていたがその知識は浅く、主に過酸化水素が酸素毒性にかかわる分子種と考えられ、この作用から生体を保護する酵素としてカタラーゼとペルオキシダーゼが重要視されていた。これに加えてスーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase, 以下 SOD と略す) が生体の酸素毒性防御機構という観点から注目を集めたのは最近のことである。即ち、Fridovich と McCord がキサンチンオキシダーゼ (xanthine oxidase) の研究からその中間生成物であるスーパーオキシド (superoxide, $O_2^{\cdot-}$) を分解する酵素—SOD を発見し、1969年に報告したことに端を発する。この研究によって生体内の $O_2^{\cdot-}$ および SOD の役割が検討され、各種活性酸素の生体への作用も活発に研究されるようになった。ここでは $O_2^{\cdot-}$ と SOD の周辺を簡単に説明するが、詳しくは SOD や酸素毒性に関する優れた綜説があるので参照されたい。^{1~11)}

I. $O_2^{\cdot-}$ の性質と生体内における発生

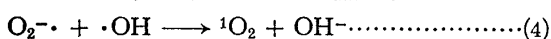
$O_2^{\cdot-}$ は分子状酸素が一電子還元を受けたもので、強い酸化剤であると同時に還元剤でもある。水溶液中で $O_2^{\cdot-}$ は非常に不安定で、非酵素的に2分子が異性化して一重項酸素(1O_2)と H_2O_2 を生じると云われる。 1O_2 は励起されたエネルギー準位の高い酸素で反応性に富んでいる。



又、 $O_2^{\cdot-}$ が H_2O_2 と反応すると Haber-Weiss 反応と云ってヒドロキシル・ラジカル ($\cdot OH$) を生成する。



$\cdot OH$ と $O_2^{\cdot-}$ が反応すると 1O_2 が生成する。



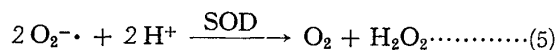
$O_2^{\cdot-}$ の生体に対する毒性は生体成分と $O_2^{\cdot-}$ の反応ばかりでなく、上記のような反応で生成する非常に反応性

に富んだ 1O_2 や $\cdot OH$ の作用を含めて説明できる場合も多い。

生体における $O_2^{\cdot-}$ の発生に関しての報告は多数見受けられる。キサンチンオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、NADPH-オキシダーゼ等の酸化酵素は中間生成物として $O_2^{\cdot-}$ を発生する。ミトコンドリアでも $O_2^{\cdot-}$ の生成が認められているが、電子伝達系のどの部分が O_2 を還元するかは明らかでない。又、ヘモグロビンの自動酸化の際にも $O_2^{\cdot-}$ が発生するし、白血球の食菌作用のときにも多量の $O_2^{\cdot-}$ の発生があると云われる。以上の他にも種々の化学的又は物理的条件下で生体内に $O_2^{\cdot-}$ が生成する可能性が指摘されている。^{8)-P.229} 生体にとって $O_2^{\cdot-}$ の発生又は存在が必ずしも不要なものではないことは、 $O_2^{\cdot-}$ を基質とするインドールアミン酸素添加酵素が存在することなどからも明らかである。しかし、 1O_2 や $\cdot OH$ に容易に変化し得る $O_2^{\cdot-}$ が生体内に発生すると、生体はいつもこれら活性酸素による非特異的酸化障害の危険にさらされることになる。ここに SOD が $O_2^{\cdot-}$ の毒性から生体を防御するものとして注目される所以がある。

II. SOD の種類と構造

SOD は $O_2^{\cdot-}$ を (5) の不均化反応によって O_2 と H_2O_2 に異性化する酵素であり、Fridovich と McCord によってウシの赤血球中より見出されたのが初めてである。



この酵素は単離してみると、古くからエリスロクブレイン、ヘモクブレインなどとして知られていた銅蛋白であった。その後この酵素には Zn も含まれていることが明らかにされ、Cu, Zn-SOD と呼ばれている。さらに生物中の SOD 様活性物質を探究すると、Mn を含む酵素 (Mn-SOD) や Fe を含む酵素 (Fe-SOD) が発見された。この3種の SOD の性質を表1に示した。

SOD は生物界に非常に広く分布しているが、上記の Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD の3種の生物および生

表 1. SOD の種類⁹⁾

SOD	分子 量	サブユニット	金属/分子	存 在
Cu, Zn-SOD	32000	2	2 Cu, 2 Zn	動物, 植物
	32700 ; 31000	2	2 Cu, 2 Zn	酵母, カビ
	33000	2	1 Cu, 2 Zn	発光細菌
Mn-SOD	39500	2	2 Mn	細菌
	80000	4	4 Mn	ミトコンドリア
Fe-SOD	38700	2	1 Fe	細菌
	42000	2	2 Fe	ラン藻

体内における分布には大きな特徴が見られる。即ち、Cu, Zn-SOD は主に真核生物の細胞質に存在し、Mn-SOD は原核細胞およびミトコンドリアに、又、Fe-SOD は嫌気性細菌を含めた原核生物に見出されている。しかし、SOD の分布に対するこの概念は一般的には受け入れられるにしろ、ヒトやニワトリの肝臓の細胞質にかなりの Mn-SOD が存在することや、嫌気性鞭毛虫類や真核藻類の細胞質にも Fe-SOD や Mn-SOD が見出されるなどの事実から再考の必要があろう。^{5)-P.222}

SOD の構造に関しては、ウシの赤血球から比較的多量に精製される Cu, Zn-SOD について全一次構造および主鎖の三次構造も決定された。Mn-SOD, Fe-SOD については起源の異なるもの各種について検討が行われている。アミノ酸組成についてみれば Cu, Zn-SOD はチロシン、トリプトファンを含まず紫外吸収極大は 258nm であるに対し、Mn-SOD, Fe-SOD はチロシン、トリプトファンを含み吸収極大は 280 nm である。又、1 mM KCN での阻害を比較すると Cu, Zn-SOD が阻害を受けるのに対して、Mn-SOD, Fe-SOD は阻害を受けない。熱に対する安定性では Cu, Zn-SOD は中性溶液中で 60° 20分加熱してもほとんど失活しないが、Mn-SOD および Fe-SOD は不安定である。一般に Mn-SOD と Fe-SOD は類似構造を有し、Cu, Zn-SOD とは相同性がないとされている。以上の構造上の特徴や分布が生物の進化を考える上で有力な手掛りとなり得ることは云うまでもない。金属を除去するアポ化やその再構成については、Cu, Zn-SOD では方法が確立し、Mn-SOD, Fe-SOD についても研究が進んでいて、活性中心の銅、マンガ、鉄の選択性と役割が再認識されている。

III. SOD の活性測定法

基質として用いる O_2^- が水溶液中で非常に不安定である所にこの測定法の難しさがある。パルスラジオリシスで O_2^- を発生させ 10—20 ミリ秒までの短時間で O_2^- の減少を測定する方法もあるが、一般的ではない。通常 O_2^- を一定速度で継続的に生成させる系を用いて、こ

表 2. O_2^- の生成系と O_2^- の検出反応系

生 成 系	検 出 反 応 系
1. キサンチンオキシダーゼ	① チトクロム c 還元
2. リボフラビン-光	② ニトロブルーテトラゾリウム還元
3. エピネフリンの自動酸化	③ エピネフリンの酸化
4. NADH-フェナチンメトサルフェート	④ 亜硫酸酸化
5. O_2 の電解還元	⑤ 化学発光
6. パルスラジオリシス	⑥ 光吸収

に O_2^- と反応する物質を検出系として加え、その反応が SOD によって阻害される割合から活性を測定している。

O_2^- の生成系と O_2^- の検出反応系を表 2 に示す。

SOD はキサンチンオキシダーゼによるチトクロム c 還元のインヒビターとして発見されたものであり、1—①の組合せの測定が標準法となっている。その他種々の組合せの測定法が考えられるが、著者らは簡便で信頼性の高い方法を検討した結果、1—②と 2—②の組合せの方法を選択し改良した。以下、参考までに記しておく。

1) キサンチンオキシダーゼ法

試験管 (5 ml) に 0.05 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.2) 2.4 ml をとり、さらに 3 mM キサンチン、3 mM EDTA、0.15% ウシアルブミン、0.75 mM ニトロブルーテトラゾリウム各々 0.1 ml を加える。これに SOD を含む試料 0.1 ml を加え、25° で 10 分間放置後、キサンチンオキシダーゼ溶液^{*1)} 0.1 ml を加え、手早く攪拌し、25° でインキュベートを開始する。20 分後に 6 mM 塩化銅 0.1 ml を加えて反応を停止させ、560 nm で吸光度を測定する。空試験は試料の代りに蒸留水を用いて上記の如く操作する。この測定条件で 1/2 阻害をする SOD 活性を 1 単位と定める。

*1) 空試験の吸光度が 0.23 前後になるように市販の

キサンチンオキシダーゼを希釈する。約 $2.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ に相当する。

2) リポフラビン—光法

できるだけ直径の揃った同質の試験管 (5 ml) に $1/15 \text{ M}$ リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.8) 2.5 ml と 0.1 M EDTA, 0.3% ウンアルブミン, 1.68 mM ニトロブルーテトラゾリウム および 試料各々 0.1 ml を加えてよく攪拌し, 10分間遮光して室温に放置する。別に空試験として試料の代りに蒸留水を加えたものを同様に調製する。各試験管に 0.06 mM リポフラビン 0.1 ml を加えて攪拌し, 白色蛍光灯 (15 W) で通常 20分間照射後^{*2)} 560 nm で吸光度を測定する。空試験の吸光度が 0.25—0.35 の範囲にくるように照射条件を設定する。

*2) 均一に照射するために円板のまわりに穴をあけて試験管立てとし, 回転させながら照射させながら照射するとよい。

以上, 1) と 2) の方法を比較すると, 2) の方法は簡便であるが共存物質の影響を受け易い。1) の方法は比較的信頼性が高いが, 測定原理に基く複雑な反応系への多数の物質の影響は本質的に避けられない。いずれにしても夾雑物の多い生体試料への応用に当っては, 十分な前処理法の検討が必要である。

IV. SOD の生体内における役割

O_2^- は直接又は間接的に蛋白質, 多糖体, 核酸と反応して解重合させたり, 重合させたりして生体の正常な機能を妨害することが推定されている。最近, O_2^- の毒性の1つとして注目されているのは脂質の過酸化促進反応である。 O_2^- がどのような機構で脂質成分と反応して過酸化物を誘発するかの問題は複雑で未解決のところも多く, 他に譲ることにするが, O_2^- の性質の項で述べたような連鎖反応によって生成される H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ を含めた活性酸素が作用していると考えられ, 共存する微量金属の触媒作用も無視できない。生体内の過酸化脂質の生成を抑制するためには, 反応の初期に関与する O_2^- と H_2O_2 を SOD とカタラーゼによって除去することが能率のよい方法である。過酸化物を除く作用のあるグルタチオン・ペルオキシダーゼも H_2O_2 の除去に重要であり, SOD, カタラーゼ, グルタチオン・ペルオキシダーゼの3つを過酸化反応防御系の重要な酵素として捉えている研究が数多く見受けられる。

O_2^- がどのような機構で生体に毒性として作用するか, SOD がどこで解毒作用を発揮するか説明は困難であるが, SOD が生体内で重要な役割を演じている証拠が多く存在する。Fridovich らは初期の研究で細菌中

ファルマシア

の SOD 活性を測定し, 好気性菌には SOD 活性が高いが, 嫌気性菌には活性がないと主張した。その後いくつかの例外は見出されているが, 酸素毒性と SOD の関係を示す重要な研究である。動物に関してのよい例の1つはラット, モルモット, ハムスター, マウスを 85% 酸素中で 7日間飼育した後, 引き続き 100% 酸素中に 7日間飼育した実験である。モルモットは 85% 酸素中で死亡したが, その他は生き残り, 次の 100% 酸素飼育で生き残ったのはラットのみで, ハムスター, マウスは死亡した。最後まで生き残ったラットの肺には著しい SOD 活性の増加が認められている。この実験は酸素耐性と酸素誘導に対する種差を示すと同時に SOD の重要な酸素毒性防御作用を示唆するものである。又, 細菌を用いた多くの研究があり, 嫌氣的培養条件から高圧酸素下に移された *E. coli B* や *Streptococcus faecalis* では SOD が誘導されるという。

SOD の活性としてペルオキシダーゼ作用も報告されているが, 生理的条件下での意義は考えられず, これまでの知見からはやはり O_2^- の分解酵素としての位置づけは変わらないものと思われる。

V. SOD と臨床化学

SOD に関するこれまでの研究成果からどのような臨床化学的展開が期待できるかを述べてみたい。 O_2^- の体内調節に SOD が関与しているならば, その濃度レベル(活性)が問題となろう。SOD の活性低下によって O_2^- が増加し, 各種神経伝達物質の酸化が促進されて神経に異常を来し, 又, 膜や細胞中のミトコンドリア (特に肝臓の) に障害が起るだろう。又, O_2^- とそれによって生ずるフリーラジカルによって突然変異を起す可能性もある。SOD の活性が強まれば, O_2^- が中間生成物となる酸化酵素や O_2^- を基質とする酵素 (例えばインドールアミン酸素添加酵素) の作用が抑制されて神経の衰弱, 異常が起るかも知れない。これらのことから SOD の生体内レベルは厳重に調節される必要がある。赤血球中の SOD レベルは非常に高いが, ヘモグロビンの自動酸化で O_2^- が生成することを考えると防御機構としての重要性が理解される。細胞質には SOD と共にカタラーゼが, 膜にはグルタチオン・ペルオキシダーゼが存在することも興味深い。

赤血球中の SOD (Cu, Zn-SOD) 活性は測定が容易なことからヒトについても病態との関連で検討が進んでいる。健康人について調べられた結果では年令その他の条件で影響され難く, 比較的一定であり, また病態による変動も少ない。血色素沈着症 (hemochromatosis), 脾腫腫様ガン (splenomegaly myeloid cancer), ポルフィ

リン症 (porphyria), アルコール性硬変症 (alcoholic cirrhosis) で赤血球の SOD とカタラーゼのレベルが調べられたが, 有意の差が認められなかった. しかし, ヘモグロビンのレベルが低下する血液透析では SOD 活性の上昇とカタラーゼ活性の低下, 無カタラーゼ症 (acatalasemia) では SOD 活性の僅かな上昇, 高カタラーゼ症 (hypercatalasemia) では健常人の3倍の SOD 活性が観察された. 又, 真性赤血球増加症 (Vaquez's Disease), Trisomy 21 等の疾患では Cu, Zn-SOD が高レベルを示した. ファンコニー貧血 (Fanconi's anemia) については赤血球中の SOD 活性が健常人よりも30%前後低いとの報告がある.

血液から赤血球, 多形核白血球, リンパ球を分離して, 各々について Cu, Zn-SOD と Mn-SOD を測定することも試みられている. 白血病患者の白血球中で Mn-SOD が消失し, Cu, Zn-SOD が増加するなどの興味ある結果が得られているが, それが何を意味するか等の研究はこれからであろう. この際, 血球の分離には密度勾配遠沈分画法が用いられているが, 操作の煩雑さと分画精度に問題があり, 各種の吸着クロマトグラフィーの方法が検討されている. これが解決されれば白血病以外の多くの病気にも血球分画測定法が容易に応用され, 新しい知見が得られる領域と思われる.

最後に SOD が治療薬として用いられる可能性に触れて置きたい. SOD は抗炎症剤として関節炎に用いられる程度の効果は認められたようであり, リウマチ様関節炎の子供の多形核白血球中の SOD 活性が低いという研究がこの効果を裏付けているとも考えられる. 現状は SOD が実際に何らかの病気の治療に使用できるか否かの試みが行われている段階であるが, 長期的治療への応用を考えると, 抗体の産生を考慮してヒトから精製した SOD を用いるか, SOD 様活性を有する低分子化合物で代用することが望ましい. *In vitro* では Cu(II), Mn(II) そのものに強い SOD 活性が認められるが, *in vivo* では蛋白質等の高分子化合物と結合して活性を失うものと思われる. 有力な化合物として水溶性キレート化合物

が考えられ, これまでにアミノ酸, ペプチド, サリチル酸の Cu キレートや Fe(III)-EDTA 等が知られている. これらを臨床的に応用するためには毒性の検討も十分行われるべきだろう.

VI. まとめ

10年前までは単に銅蛋白として分類され, 生体成分の1つとして細々と構造研究が行われていたに過ぎなかったものが, その活性が見出されると酸素毒性の防御機構を担う成分として脚光を浴び, 一躍スターにのし上がった. SOD の発見は生化学の領域に非常に大きな貢献をもたらしたと同時に金属の生体内の役割を再考する機会を与えてくれたように思う. 活性中心が銅ばかりでなくマンガン, 鉄が顔を揃えた所も面白い. これらの金属を含む蛋白質に限ってみても, 生体内にはその作用のわからないものが多数存在する. 金属の生理活性と代謝を関連づけながら代謝調節を再検討することによって, 生体内金属の生理的意義がより明らかにされるのではないだろうか.

文 献

- 1) I. Fridovich, "Advances in Enzymology," **41**, 35 (1974).
- 2) 沢田幸治, 山崎勇夫, 蛋白質・核酸・酵素, **19**, 527 (1974).
- 3) 浅田浩二, 生化学, **48**, 226 (1976).
- 4) 浅田浩二, 蛋白質・核酸・酵素, **23**, 200 (1978).
- 5) 山倉文幸, 鈴木皓司, 蛋白質・核酸・酵素, **23**, 221 (1978).
- 6) 真杉文紀, 中村哲也, 医学のあゆみ, **96**, 429 (昭51).
- 7) 山中直樹 他, 医学のあゆみ, **97**, 573 (昭51).
- 8) "生化学実験講座," 12巻下, p. 737, 東京化学同人.
- 9) 水野伝一 他, "生体と酸素," 朝倉書店.
- 10) "Biochemical and medical Aspects of Active Oxygen," University of Tokyo Press (1977).
- 11) "Superoxide and Superoxide Dismutase," Academic Press (1977).