

●原 著

酸素ラジカル種のヒトとの関わり

牧野圭祐* 遠藤伸之* 鈴木利典*

はじめに

生体中で酸素を中心にもつラジカル種が生成して様々な疾患と関連を持つことは1960年代には議論されはじめていたが、1969年のフリードビッチのスーパーオキシドラジカル消去酵素(スーパーオキシドディスムターゼ, SOD) 発見¹⁾にいたってそれが俄然現実味を帯びた課題として浮上し、生体内フリーラジカル研究は一気に多くの研究者の興味を引くに至った。それまでは化学の分野でさえ満足な教科書もなかったフリーラジカル研究が生化学分野で多くの研究者の興味を引くことになったことは、それまで水溶液中に生成する極めて短寿命のフリーラジカルをどのようにして一般の化学種と同様に研究することができるのかということに腐心していた私どもにとって大きな驚きであった。第32回日本高気圧環境医学会会長眞野喜洋先生に会長招請講演の御依頼を受けた

とき、この短い期間に急速な成長を遂げた膨大な報告がなされた分野についてどのようなまとめをすべきかない頭を絞ったが、自信を持って御出席の方々にお役に立てる内容にすべきと考え、結局は自分にとって最も関わりの深い以下の2つについてお話をすることとした。

本稿は講演内容を中心にまとめたものである。

電子スピン共鳴法を用いた活性酸素研究

活性酸素とは生体内で生成する酸素原子をもった化学種の総称であるが、一般的には図1に示したものを指す。フリーラジカルとは不対電子をもった化合物であり、一般的に非常に高い反応性をもつ。図1中でフリーラジカルはスーパーオキシドラジカル($\cdot O_2^-$)とヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)である。ともにミリ秒およびマイクロ秒の半減期をもち、一般的に用いられる化学的・生化学的方法では検出することができない。

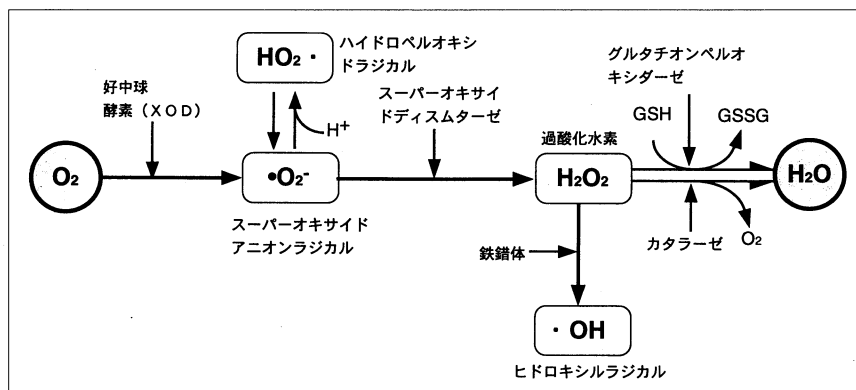


図1 生体内活性酸素生成機構

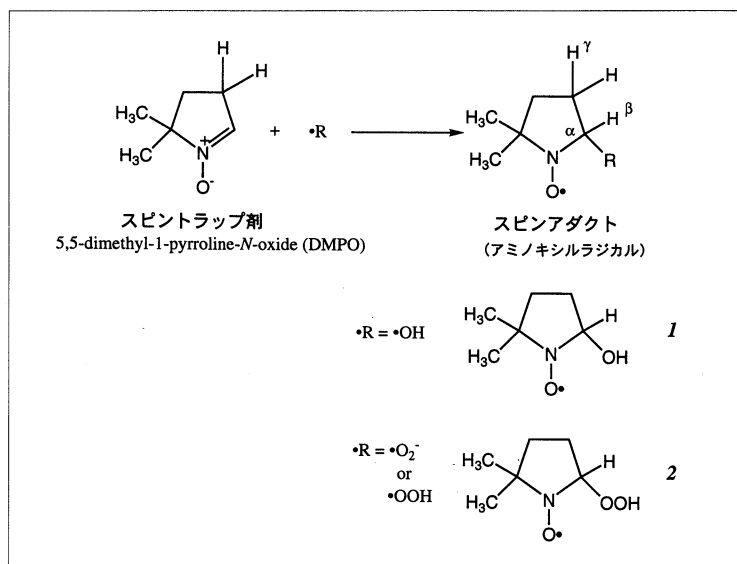


図2 DMPOを用いたスピントラッピング法

このように短い半減期をもったフリーラジカルに対しては古くから解析法が研究されており、この中で最も簡便であってしかも測定対象の広い方法がスピントラッピング法である。スピントラッピング法は、1968~70年にE.G.Janzenをはじめとする5ないし6の研究グループによって同時に開発され、大きな関心をよんだ²⁾。当時の目的は化学反応、たとえば放射線等によって生成する活性種を検出するのが大きな目的の一つであったが、2-methyl-2-nitrosopropaneを用いた優れた研究が発表され、この分野の発展に大きな貢献をした。

図2にスピントラッピング法の概念図を示した。この方法では、反磁性化合物(不対電子をもたない、いわゆる一般的な化合物)であるスピントラップ剤がフリーラジカルと反応して、分から時間単位の半減期をもった比較的安定なフリーラジカル(スピニアダクト)を生成する。生化学で用いられるスピントラップ剤はほとんどの場合、5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)である。またこの場合、図2で示したように、スピニアダクトはアミノキシルラジカル(ニトロキシドラジカル)である。図中には代表的酸素中心ラジカルであるヒドロキシルラジカル(1)及びスーパーオキサイドラジカル(2)のDMPOスピニアダクトを示した。これを電子スピン共鳴法(ESR法)で解析することによって系中に生成した短寿命ラジカ

ルを同定する。

得られるESRスペクトルの解析は以下のように行う。図2にはスピニアダクトの各原子の名称を記しておいたが、実際にDMPOを用いたときにESRスペクトル中で超微細分裂が現れるのは β 水素までである。したがってニトロキシド基の窒素による3本線への分裂が生じ、ついでその各々が β 水素によって2本に分裂する。したがって一般的には6本線が得られるが、酸素中心ラジカルのアダクトの場合は6本線でないスペクトルが得られることが多い(図3)。DMPO/ $\cdot O_2 \cdot$ アダクトの場合は、棒ダイアグラムで示したように、6本線がさらに γ 水素2個のうちの1個によって2本に分裂しており、都合12本の線から構成されている(図3a)。DMPO/ $\cdot OH$ アダクトの場合は、窒素と β 水素の超微細結合定数が一致しているために6本のうちの真ん中の2本が重なっており、強度比1:2:2:1の4本線が得られる(図3b)。このようにスピニアダクトのESRスペクトルはトラップされたラジカル種に応じて変化するために、スピニアダクトのスペクトルを解析することによって、もとのラジカルを同定することができる。スピニアダクトのESRスペクトルの数値化は、各原子による分裂を磁場の単位で表した超微細結合定数で表される。代表的なスピニアダクトの超微細分裂定数を表1に示した。また測定にとって

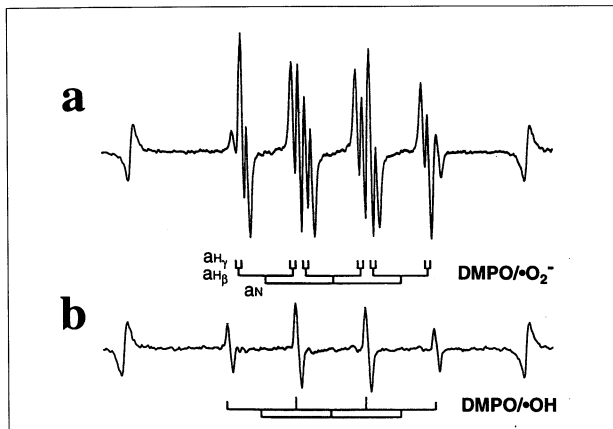


図 3 DMPOスピニアダクトのESRスペクトル
 a. DMPO/ $\cdot O_2^-$ アダクト (棒ダイアグラムで各原子の超微細分裂を示した。γ位のプロトンによる分裂が観察される珍しい例である)
 b. DMPO/ $\cdot OH$ アダクト (窒素核とβ水素の超微細結合定数が一致する珍しい例である)

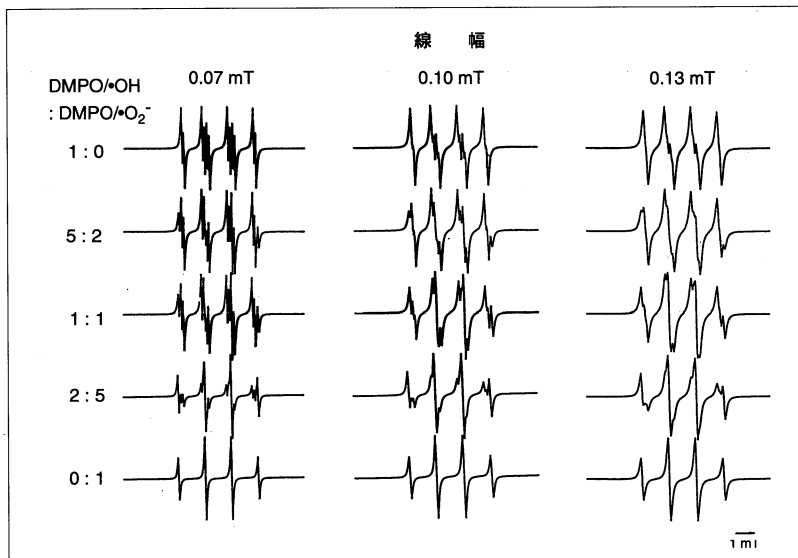


図 4 DMPO/ $\cdot O_2^-$ アダクトとDMPO/ $\cdot OH$ アダクトを含む系から得られるESRスペクトルのコンピュータシミュレーション
 存在比及び線幅の変化でスペクトルの形が大きく変化することに注意。

表 1 DMPOスピニアダクトの超微細結合定数 (mT)

ラジカル	a_N	$a_{\beta H}$	$a_{\gamma H}$
•H	1.66	2.25	
•OH	1.49	1.49	
•O ₂ ⁻	1.43	1.17	0.13

重要なスピニアダクトの寿命であるが、pH7で測定する場合、DMPO/ $\cdot OH$ アダクトが9分の半減期をもち、DMPO/ $\cdot O_2^-$ アダクトの場合は1~2分程度であるので迅速な測定が必要である。また系中で生成する過酸化水素に対しては安定である。

このような諸性質が明らかになっており、しかも生化学系に対してあまり影響を与えないという特徴から、DMPOは1980年頃から生化学的目的で使用されるようになり、今日でも生体内フリーラジカル研究に多用されている。しかしながら水溶液試料とは異なって生体試料の場合は線幅が広がることからスペクトル解析が困難な場合がある。図4に種々の比率で両スピニアダクトが生成した場合のESRスペクトルを線幅を変化させながらコンピュータシミュレーションした結果を示した。生体試料から得られたスペクトルに対してはこのような解析法を用いて結果の正確な解析を行うべきである。またヒドロキシルラジカルやス

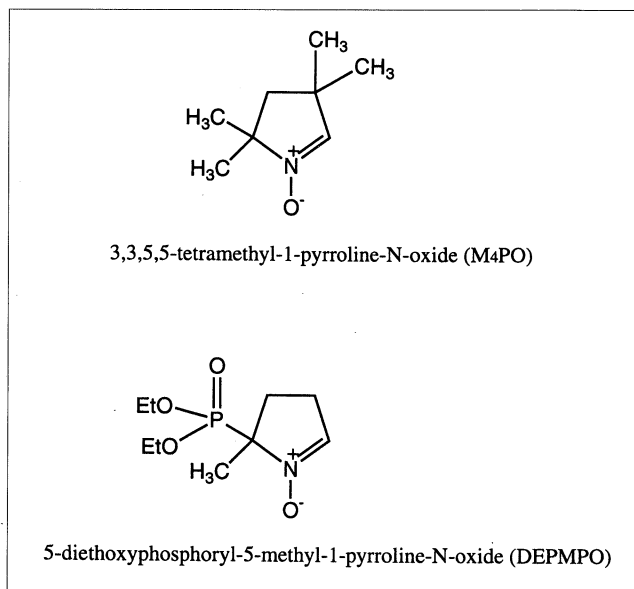


図5 DMPOの短所を改良したスピントラップ剤

スーパーオキシドラジカルをスピントラッピング法で解析する場合、後述するようにフリーラジカル反応以外の反応でスピニアダクトが生成することもあり得るので、捕捉剤を共存させて観測を行い、競争的にスピニアダクト強度が減少することを観察して、スピニアダクトがフリーラジカルとスピントラップ剤との直接反応で生成したことを証明することも基本である。

なお、DMPOにも①スピニアダクトの寿命が定量実験には短い、②購入したトラップ剤には酸化によってアミノキシルラジカルに変化する除去しにくい不純物が含まれることがある、③鉄などの遷移金属イオン共存下では水の求核付加反応によってDMPO/ \cdot OHアダクトと同一のアミノキシルラジカルが生成してさらに酸化された形のアミノキシルラジカル (DMPOX) が生成する³⁾、等の問題点があり、改良が試みられてはいるが、未だ完全なスピントラップ剤は存在していない。比較的改良されたスピントラップ剤としては、結晶性であり不純物の少ないしかも鉄イオン存在下でも水の求核攻撃を受けにくい3,3,5,5-tetramethyl-pyrroline-N-oxide (M₄PO)、さらにはスピニアダクトの寿命の長い5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (DEPMPO)⁴⁾がある(図5)。ただし、前者は動物体内中に投与できない。また

後者は最近データ取りが進行しているが、得られるスペクトルが異性体の存在によって比較的複雑であるので、データの集約を待って一般化されてから使用することになると思う。

論文の査読をしていると未だ不完全なスペクトルや不完全な解釈が多々見受けられる。あくまでもスピントラッピング法は間接的なフリーラジカル解析法であり、用いられている反応や生成するスピニアダクトの化学的性質を十分に把握して初めて正しい使用ができると考える。上に示したことは基本中の基本であると考えられる。

生体内フリーラジカルとしての一酸化窒素(NO)

NOは単純な二原子分子であり、その嵩の小ささと中性であるという特性から生体中でも特異性を発揮する。生体での寿命は数秒そこそこをもち、細胞間を自由に移動することができる。NOはフリーラジカルであるが、他のフリーラジカルが有機化合物等に非常に高い反応性をもつのに比してさほど高い反応性は示さないために比較的安定であるが、金属酵素の金属との反応性は高い。

1998年のノーベル医学・生理学賞は、ノーベル賞誕生のいきさつに照らし合わせて、極めて印象の強いものであった。本年度の賞は3人の米国の

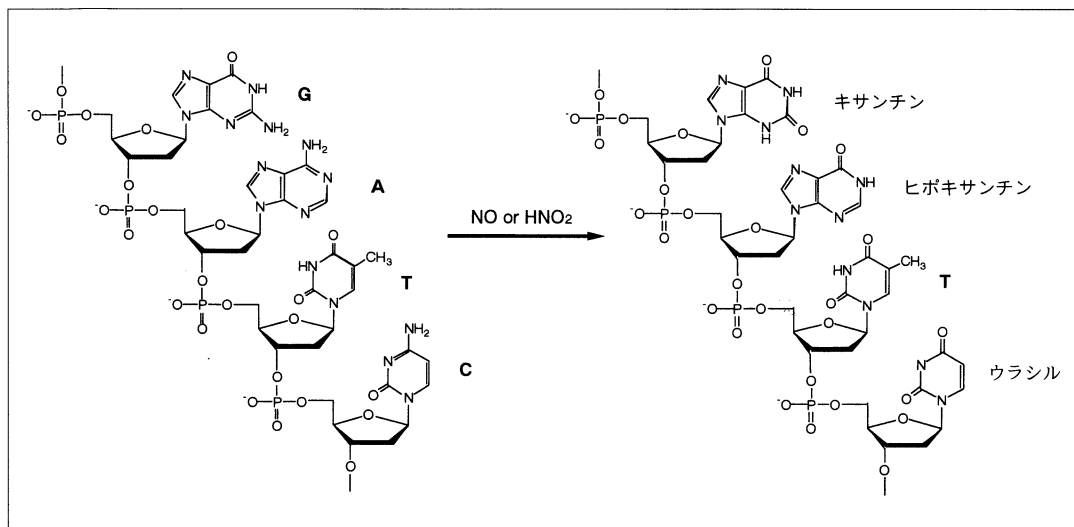


図6 亜硝酸あるいはNOによってDNA中に生じる損傷塩基

研究者、Robert F.Furchgott⁵⁾、Louis J.Ignarro⁶⁾、Ferid Murad⁷⁾に授与された。

NOはNO合成酵素 (NO Synthase, NOS) がL-アルギニンを酸化してL-シトルリンに変換するときに生合成される⁸⁾。たとえば、血管内皮細胞に対する刺激によって細胞内のカルシウム濃度が上昇するとカルモジュリンと複合体を形成しているeNOSが活性化され、L-アルギニンの酸化によってNOを生成する。血管内皮細胞は一層から成っており、NOはこの下に隣接する血管平滑筋細胞に移行する。平滑筋細胞内には、ヘムタンパク質の一種である可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) が存在しており、NOはこの酵素のヘム鉄と結合してsGCの構造変化を誘起して活性化する。活性型sGCはグアノシン三リン酸 (GTP) をサイクリックGMP (cGMP) に変化する。cGMP濃度の上昇に伴って細胞内のカルシウムイオン濃度が減少し、平滑筋の弛緩が起こり、この結果血管が拡張する。これが現在よく知られているNOの血管弛緩のメカニズムであるが、小さな二原子分子が我々の生命活動をここまで巧妙に支えているということは驚きの一語であるが、いいかえると我々の体はどこにでも存在する分子を巧妙に取り込んだすばらしい生命維持システムを完成させてしまった、ということができる。

それではNOは我々にとって常に良き隣人なのだろうか。上で述べたように、NOの生理活性は生命現象維持に必須であるが、それでは生体中のNOはすべて生理現象維持のためにだけ働いているのだろうか。事実NOは排気ガス公害の主役の一つであるし、反応性は他のフリーラジカルと比べて低いとはいえ、フリーラジカルである。炎症部位などではNO濃度が高くなるという報告もあり、この分子が生体中では数個の細胞を貫通することができるということを考え併せてみると、遺伝子に遭遇して反応することも十分に考えられるのではないだろうか。すなわち、絶対に必要であって我々の体が積極的に合成する分子が両刃の剣になりうるか、という疑問がある。

NOは酸素と出会うと容易に酸化され、二酸化窒素 (NO₂) になる。周りの環境が水の場合、NOとNO₂から亜硝酸 (HNO₂) が得られる。すなわちNOの化学は亜硝酸の化学と重複する部分をもつ。亜硝酸については、食品添加物という重要性から、古くから遺伝子との反応について研究が行われてきたが、NOについてはあまり詳しく調べられていなかったようである。遺伝子の本体であるDNAが亜硝酸と反応すると、塩基部分が損傷を受けることが知られている (図6)。これらの反応は古く1950年代には明らかにされていたことで

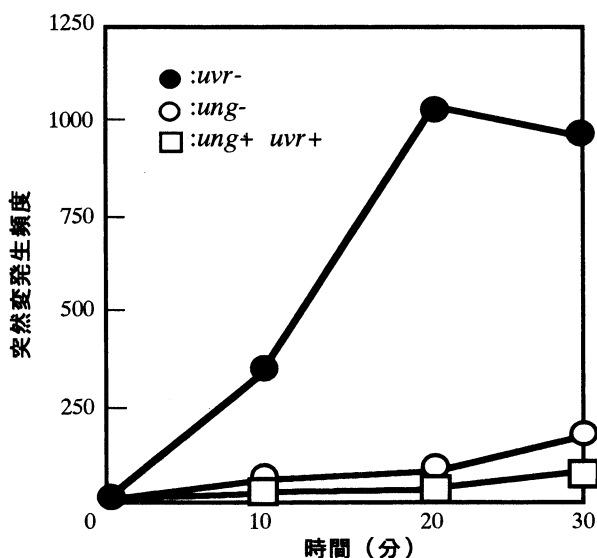


図7 UVRエンドヌクレアーゼ及びデオキシウリジンデグリコシラーゼ遺伝子欠損株(大腸菌)の亜硝酸含有培地中での突然変異誘発頻度の比較

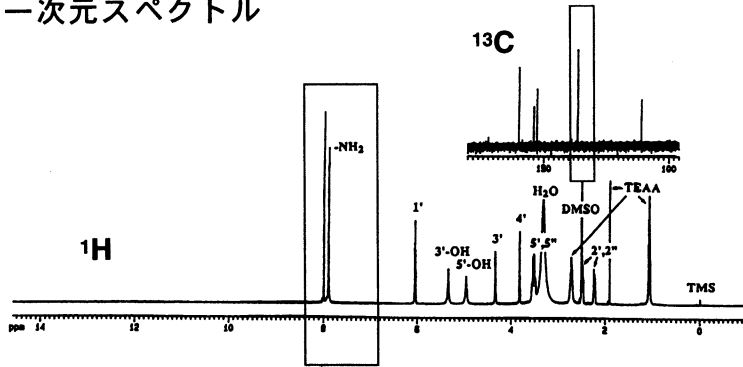
あるが、1991年、同様の塩基損傷がNOによっても生成することが明らかにされた。すなわち、過剰に生成したNOは突然変異を誘発するかもしれない。

それでは考えられるNOによる遺伝子損傷は図6中に示したもののだけであろうか。勿論、これらの損傷塩基は突然変異の原因になる可能性をもっているが、大腸菌を用いた一つの興味深い報告がある。結果の一部を図7に示す。損傷塩基デオキシウリジンの塩基部分と糖部分の結合部位であるグリコシド結合を切断して修復するデオキシウリジンデグリコシラーゼ(DUG)の遺伝子欠損株では亜硝酸中でも細胞の変異は起きないが、損傷部位を大きく切り取って修復するUVRエンドヌクレアーゼ遺伝子が欠損している株では高い確率で細胞の変異が生じる⁹⁾。すなわち、亜硝酸によってDNA中に損傷部位が生じ、生じた損傷部位の修復にはかなり大きな部分のDNAが切り出されなければならない。すなわち、損傷部位は架橋反応等の複雑な構造である可能性が高いと考えられる。

我々は4種類の核酸を構成する塩基の中で最も

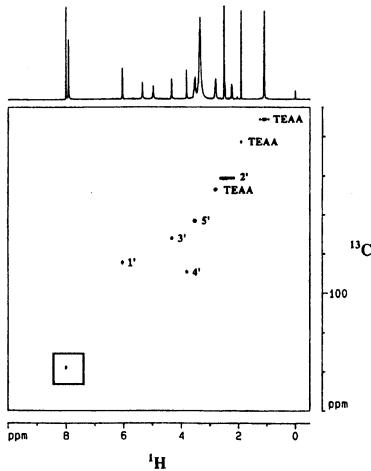
損傷を受けやすいグアノシンに注目して詳細な文献検索を行い、亜硝酸によってグアノシンから生成する種の約30%程度が未同定であることを発見した。亜硝酸とグアノシンとの反応液を詳細に高速液体クロマトグラフィーで分析した。クロマトグラムには出発化合物のグアノシン及び主生成物キサントシン(XaO)以外にプリン環と異なる紫外吸収スペクトルを示すピークが現れた。質量は152でXaoと同じ、また構成元素比も同じであった。この化合物の構造決定は最終的には高度な核磁気共鳴法によって行った。まず得られたスペクトルはリング上のプロトン以外はグアノシンあるいはキサントシンのそれと非常に類似しており、プリン環のみに変化が起きた。図8に、同定に用いたスペクトルを示すが、¹Hスペクトル上では8 ppm付近に2つのリングプロトンのシグナルが得られた(未同定化合物のシグナルをNH₂で表す)。一方¹³Cスペクトルには136ppmに一本のピークが現れており、これが¹H-¹³C二次元スペクトル上では、8 ppm付近に現れるリングプロトンのシグナルの一つと相関をもっていた。すなわちこの¹Hピークは炭素に結合したプロトンに帰属され

一次元スペクトル



二次元スペクトル

¹H-¹³C HMQC



¹H-¹⁵N HMQC

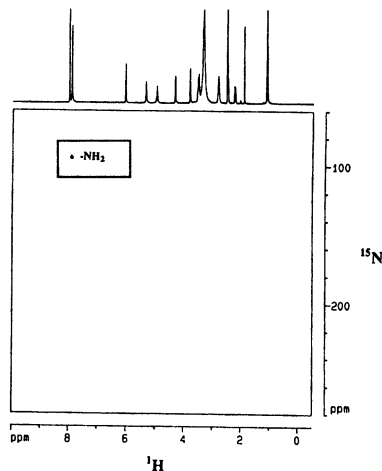


図8 弱酸性亜硝酸水溶液中でデオキシグアノシンから生成した未同定化合物のNMRスペクトル

る。さてそれでは残ったもう一方の8ppm付近のプロトンシグナル (7.90ppm) の帰属は一体どうやって行えばいいのだろうか。試料に軽水を加えていくとこのシグナルが消失することから、酸素あるいは窒素元素に結合したプロトンであることは分かったが、そのどちらかは不明である。できるだけたくさんの試料をHPLCで分取し、¹H-¹⁵N相関を測定した。1万回の積算の結果、図8に示した二次元スペクトルが得られた。NH₄⁺¹⁵NO₃を基準として93.3ppmに7.90ppmプロトンとのクロススピークが現れている。すなわちこのプロトンは

一級アミノ基のプロトンである。またこの一級アミノ基のピークはグアニンのそれと比較して低磁場にシフトしているため、このアミノ基の近傍には酸素原子が存在すると考えられた。以上のような検討の結果、この分子を図9に示した構造に同定した。

それでは、この同定は正しいのだろうか。詳細に文献を調査したところ、この化合物のリボ体が放線菌によって生産され、抗生物質として研究された経過があることが分かった。ここでやっと同定を完了することができ、この新規損傷塩基をデ

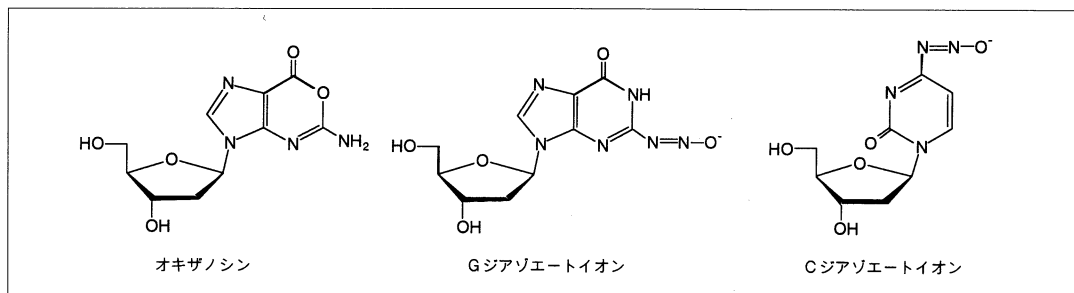


図9 弱酸性亜硝酸水溶液中で生成する損傷ヌクレオシド

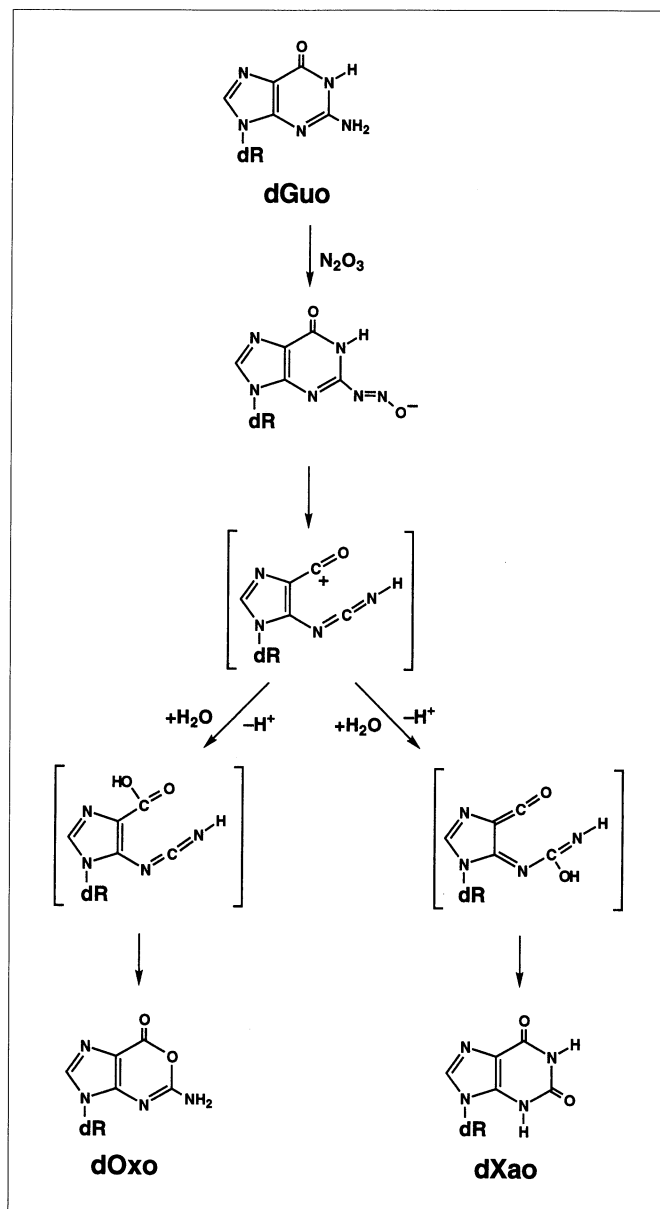


図10 デオキシグアノシンからデオキシオキザノシンが生成する反応の機構

オキシオキザノシン (以下オキザノシンと略) と同定した。オキザノシン構造は、式 (1) に示したように、カルボジイミドで活性化したカルボン酸をもっている。



すなわち、オキザノシンは近傍にアミノ基などが存在するとき、開環してアミド結合等で架橋反応をすることができる。

それではこの化合物は一体どのような機構でグアノシンから生成するのだろうか、というのが次の質問である。詳細については紙面の都合上割愛させていただくが、既に完全な反応機構を明らかにしており、この中で重要な発見は、反応中間体としてグアノシンのジアゾエートイオンが生成することであり (図9)、この中間体も周辺のアミノ基と反応する。同様に我々はシトシンからも反応性の高いしかも中性域で安定なジアゾエートイオンが生成することを見いだしている。このような研究の結果得られたグアノシンからオキザノシンが生成する反応機構を決定することができたので、これを図10に示した。

以上の結果を総合すると、NOは核酸と反応してジアゾエートイオン及びオキザノシンを生成する。これらは核内に存在するタンパク質のアミノ基やアミン類と架橋反応をする可能性をもっている。上で述べたUVRエンドヌクレアーゼを欠損した細胞が突然変異にさらされやすいのはこのような理由によるのではないかと思って研究を継続している^{10)~13)}。

おわりに

生体内フリーラジカルに関する研究は今や分子生物学とも密接に結びつき、より複雑になってきた。私たち化学者がこの分野で貢献することがで

きるのは、極めて精緻な分子レベルでの反応・構造解析であり、さらには合成化学的手法による新しい化合物の創製である。初めに述べたように、フリーラジカル研究は極めて困難の多い複雑なものであるが、化学・生化学の研究者が密接に協力しあうことで今後大きな展開が期待できるものと考えている。

【参考文献】

- 1) J.M.McCord and I.Fridovich, *J.Biol.Chem.* 244 : 6049-6055, 1969
- 2) E.G.Janzen, *Acc.Chem.Res.* 4 : 31-40, 1971
- 3) K.Makino, A.Hagi, H.Ide, A.Murakami, and M.Nishi, *J.Can.Chem.* 70 : 2818-2827, 1992
- 4) C.Frejaville, H.Karoui, B.Tuccio, F.Le Moigne, M.Culcasi, S.Pietri, R.Lauricella, and P.Tordo, *J.Med.Chem.* 38 : 258-265, 1995
- 5) R.F.Furchgott, and J.V.Zawadzki, *Nature* 288 : 373-376, 1980
- 6) R.M.J.Palmer, A.G.Ferrige, and S.Moncada, *Nature* 327 : 524-526, 1987
- 7) L.J.Ignarro, G.M.Buga, K.S.Wood, R.E.Byrns, and G.Chaudhuri, *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, 84, 9265-9269, 1987
- 8) M.A.Marletta, *Cell* 78 : 927-930, 1994
- 9) Hartman, Z., Henrikson, E.N., Hartman, P.E. and Cebula, T.A., *Environ.Mol.Mutagen.* 24 : 168-175, 1994
- 10) T.Suzuki, R.Yamaoka, M.Nishi, H.Ide, and K.Makino, *J.Am.Chem.Soc.* 118 : 2515-2516, 1996
- 11) T.Suzuki, Y.Matsumura, H.Ide, K.Kanaori, K.Tajima, and K.Makino, *Biochemistry* 36 : 8013-8019, 1997
- 12) T.Suzuki, M.Yoshida, M.Yamada, H.Ide, M.Kobayashi, K.Kanaori, K.Tajima, and K.Makino, *Biochemistry* 37 : 11592-11598, 1998
- 13) T.Suzuki, T.Nakamura, M.Yamada, H.Ide, K.Kanaori, K.Tajima, T.Morii, and K.Makino, *Biochemistry* 38 : 7151-7158, 1999