

福原亮史

我々ヒトを含む好気性生物は絶えず酸素を必要としている。ヒトの場合、1日当たり約500 lの酸素を消費し、そのうち数%が生体内で活性酸素に変換される。活性酸素とはスーパーオキシドアニオン (O_2^-) やヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) を始めとする分子種である。これらの活性酸素は生体内に侵入した微生物に対する防御機構としての役割を持つ。しかし、活性酸素が過剰に存在すると、正常な生体内分子をも破壊してしまう可能性が出てくる。そのため生体内には活性酸素生成・消去酵素と呼ばれる酵素群によって活性酸素を生成・消去するシステムが存在している。

抗酸化酵素のうち特に重要なスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) は1969年にMcCordとFridovichによって確認された[1]。高等動物の場合、SODには主にミトコンドリアで働き、活性中心にマンガンをもつMn-SODと主に細胞質で働き、活性中心に銅と亜鉛をもつCu,Zn-SODが存在する。両SODともに O_2^- を消去する働きをもつがその生化学的特性は全く異なる。両SODともに様々な疾病や寿命に関係していることから[2,3]、SODの機能を解明することは病理学的な面からも非常に重要であると考えられる。

本研究では活性酸素生成・消去システムの解明のため、ニホンザルの各組織における活性酸素生成・消去酵素の活性を測定した。また、霊長類におけるMn-SOD およびCu,Zn-SODの機能を解明するための第一段階として、霊長類8種において両SODのcDNA塩基配列を決定した。また、SODの機能をアミノ酸の変異から見るために両SODの分子進化系統樹を作成し、どのようなアミノ酸変異がどの分岐で見られるのかを明らかにした。

I. ニホンザル各組織における活性酸素生成・消去系酵素の活性測定及びアイソザイムの検出

ニホンザルの若いオス3頭の各組織を破碎後、それぞれのサンプルのNADH/NADPHオキシダーゼ、キサントキシダーゼ (XOD)、SOD、カタラーゼ、アスコルビン酸パーオキシダーゼ (APX) の比活性を測定した結果、小腸、腎臓および小脳で全体に活性が高かった。また、肺と筋肉では活性酸素生成系の酵素活性が高く、消去系の酵素活性が低いこと、肝臓では生成系・消去系ともに酵素活性が低いことが挙げられる (図1)。また、活性染色によって、NADPHオキシダーゼとカタラーゼでは2種類、XOD、SODおよびAPXでは3種類のアイソザイムが検出され、その量比は各組織で様々であった (表1)。

これらの結果からニホンザル各組織ではそれぞれの酵素の活性の高低のみによるものでなく、性質の異なるアイソザイムの組み合わせによって生じている組織特異的な活性酸素生成・消去系が存在することが示唆された [2]。これは生体内で活性酸素生成・消去系が多様化していることを示しており、今後個々のアイソザイムの酵素的性質の詳細な比較解析、遺伝子発現調節などの解明が必須である。

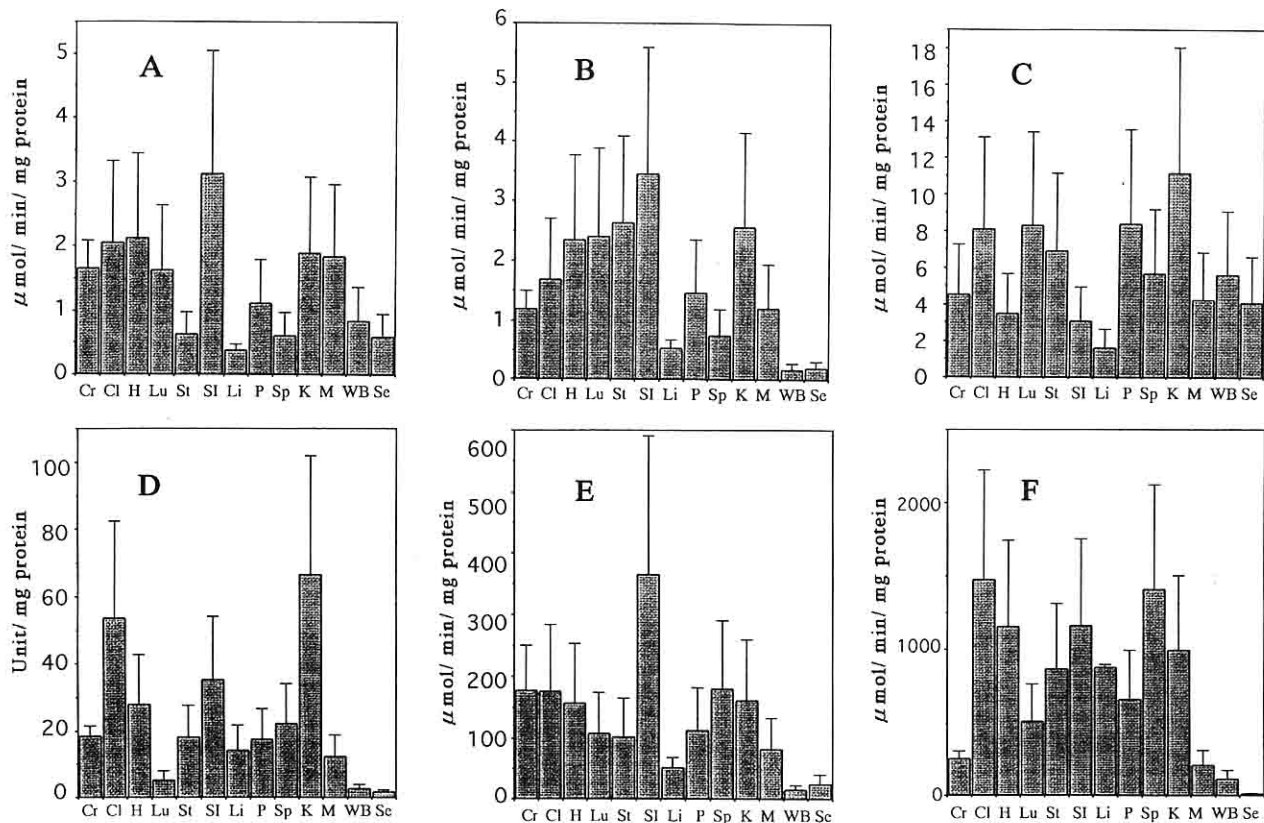


図 1 ニホンザル各組織における NADH oxidase (A), NADPH oxidase (B), xanthine oxidase (C), superoxide dismutase (SOD) (D), ascorbate peroxidase (E),及び catalase (F) の相対比活性. 各酵素の活性は SOD を除き基質の分解速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}$) で表した. SOD の活性は浅田ら(1973)の方法による unit を用いて表した. 相対比活性は組織の全活性を可溶性タンパク質で割ったものである. 各データは 3 個体の平均値 \pm 標準偏差で表した. Cr, 大脳; Cl, 小脳; H, 心臓; Lu, 肺; St, 胃; SI, 小腸; Li, 肝臓; Sp, 脾臓; P, 膵臓; K, 腎臓; M, 筋肉; WB, 全血; Se, 血清

表 1. ニホンザル各組織における NADPH oxidase, xanthine oxidase (XOD), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), 及び catalase の活性染色結果. 各酵素をポリアクリルアミドゲルで電気泳動後活性染色を行い, 検出されたバンドの濃さを相対的に表した. Cr, 大脳; Cl, 小脳; H, 心臓; Lu, 肺; St, 胃; SI, 小腸; Li, 肝臓; P, 膵臓; Sp, 脾臓; K, 腎臓; M, 筋肉; WB, 全血; Se, 血清

	Cr	Cl	H	Lu	St	SI	Li	P	Sp	K	M	WB	Se
NADPH oxidase													
band-1	+	++	+	++	+	+++	+	+	++	++	+	-	-
band-2	+	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	++	-
XOD													
band-1	+	+	+	++	+++	+	+	++	+	+	+	++	++
band-2	+	+	+	+	±	+	+	+	++	++	±	++	+
band-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-
SOD													
band-1	+	+	+++	+	+	+	+	+	++	+	+	+	-
band-2	±	±	±	±	±	+	±	±	±	+	±	+	-
band-3	++	+++	++	+	++	++	++	++	++	+++	+	+	-
APX													
band-1	++	+	+	±	±	+	+	+	+	++	+	+	+
band-2	+	+	+	++	++	++	+	+	+++	+	+	+++	-
catalase													
band-1	++	++	+	++	++	+	+	+	+++	+	++	+++	-
band-2	±	±	±	±	±	±	+	±	±	+	±	-	-

II. 霊長類 8 種における SOD の cDNA 塩基配列の決定

チンパンジー、オランウータン、シロテテナガザル(以上類人猿)、ニホンザル、カニクイザル、アカゲザル(以上旧世界ザル)、フサオマキザルおよびコモンマーモセット(以上新世界ザル)の各組織から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて cDNA を合成、塩基配列を決定した。Mn-SOD は全ての霊長類で 198 個のアミノ酸からなっており、ヒトに対するホモロジーは 98.5~99.5% であった。また、活性中心である 3 個のヒスチジン残基と 1 個のアスパラギン酸残基は全ての霊長類で良く保存されていた。Cu,Zn-SOD はオランウータンは 154 個、それ以外の霊長類では 153 個のアミノ酸からなっており、ヒトに対するホモロジーは 94%~99.6% であった。また、活性中心である 6 個のヒスチジン残基は全ての霊長類でよく保存されていた。また、両 SOD のホモロジーは全くなかった。さらにサザン分析により霊長類の両 SOD には多型が存在しないことが推測された。

III. 霊長類における SOD の変異

霊長類両 SOD の塩基配列を基に近隣結合法により分子進化の系統樹を作成した結果、従来言われている霊長類の進化(新世界ザル→旧世界ザル→類人猿の順に分岐)と一致した。また、霊長類における両 SOD がどの分岐の段階でどのアミノ酸に変異が起こったのかを見るため、模式的な系統樹とともに両 SOD の祖先型からのアミノ酸の変異を示した(図 2)。この解析によると Mn-SOD は霊長類間で変異率が一定であることが分かった。また、Cu,Zn-SOD は Mn-SOD に比べて変異が多いが、特に類人猿(特にオランウータン)での変異が多いことが分かった。これまでに平均寿命の長い霊長類ほど SOD 活性が高いことが報告されている[5]。類人猿はその他の霊長類に比べて寿命が長いことから、今回見られた類人猿での多数のアミノ酸変異の中に SOD の機能を高めるために重要な変異があるのではないかと推測できる。

文 献

- [1] McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055
- [2] Orr, W. C. and Sohal R. S. (1994) *Science* 263, 1128-1130
- [3] Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M., Walker, D. W., Clayton, P. E., Wallace, D. C., Malfroy, B., Doctrow, S. R., and Lithgow, G. J. (2000) *Science* 289, 1567-1569
- [4] Fukuhara, R., Kageyama, T., Suzuki, H., and Tezuka, T. (2001) *Zool. Sci.* 18, 207-213
- [5] Tolmasoff, J. M., Ono T., and Cutler, R. G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2777-2781

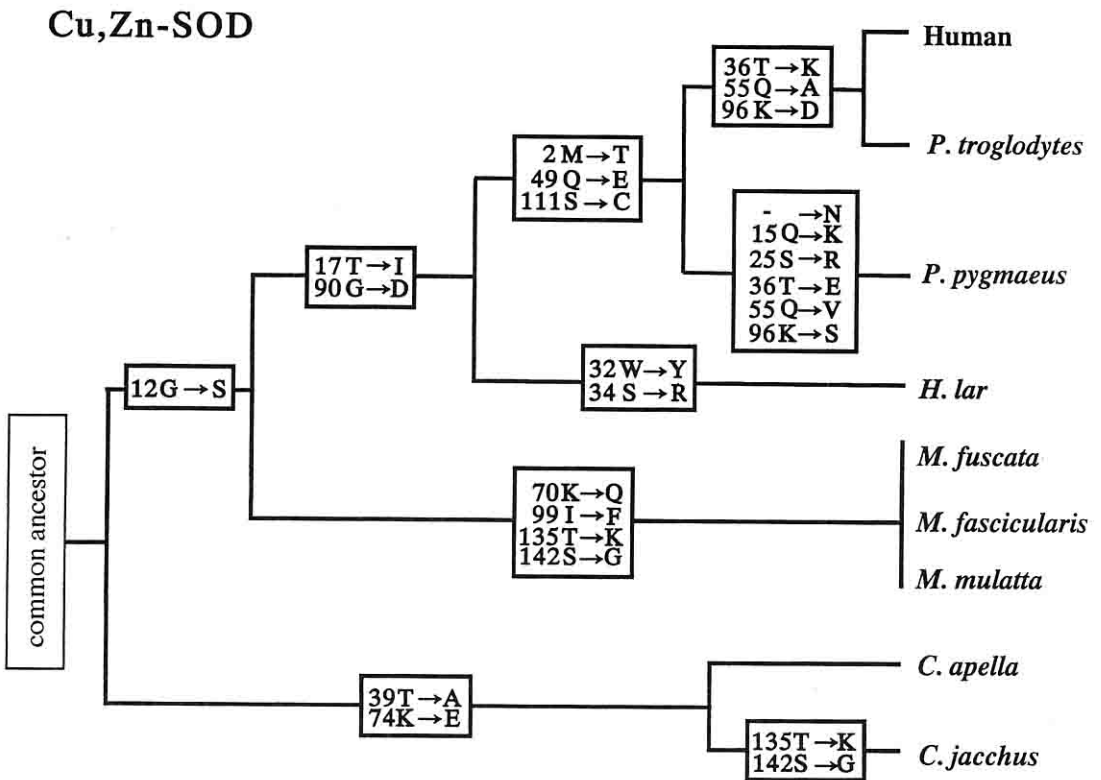
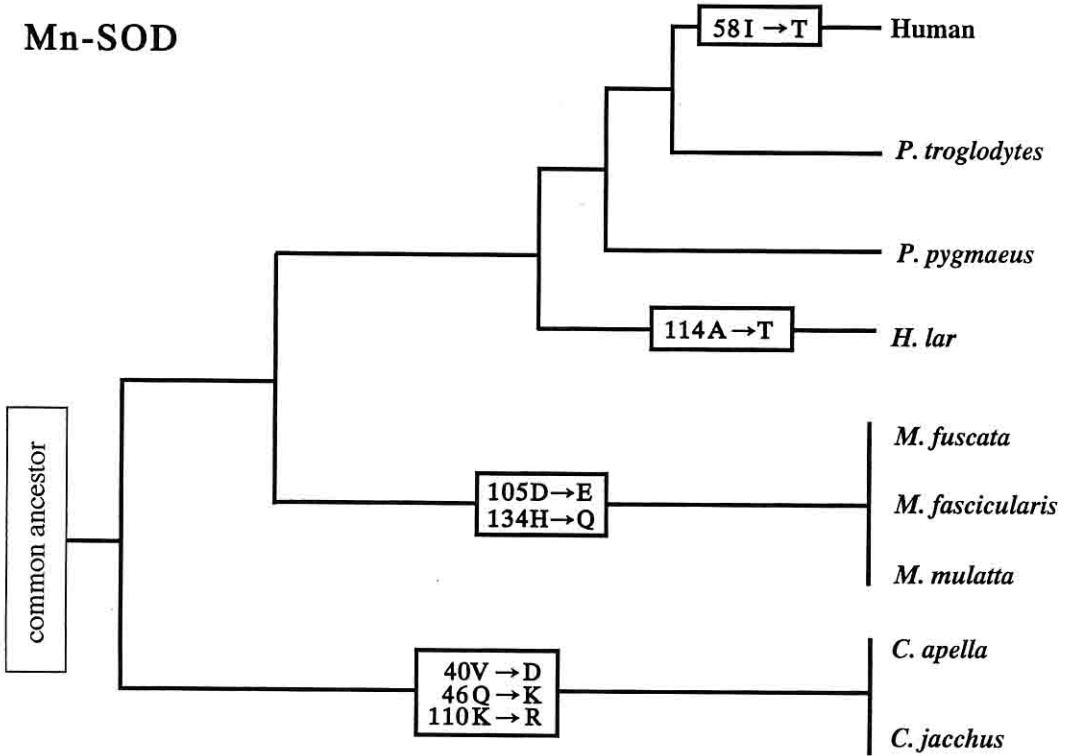


図2 霊長類における Mn-SOD (上) 及び Cu,Zn-SOD (下) の分子系統樹の模式図。祖先型のアミノ酸配列を基に各分岐段階におけるアミノ酸の置換を示した。

(ふくはら りょうじ、京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター)