

活性酸素とスーパーオキシドジスムターゼによる制御

五十嵐 辰 夫
井 上 國 世
三 苫 恵 民

Active Oxygen and Regulation by Superoxide Dismutase

Tatsuo IGARASHI
Kuniyo INOUE
Yasutami MITOMA

Active oxygens such as O_2^- , O_2 , and $\cdot OH$ are playing an important role in physiological reactions. Abnormally increased production of active oxygen, however, causes damage to the body's tissues. In 1969 an enzyme which can catalyse the dismutation of $O_2^- (2H^+ + 2O_2^- \longrightarrow O_2 + H_2O_2)$ was discovered and named as superoxide dismutase (SOD). Due to this specific property, SOD has since been expected as a potential medicine for diseases caused by increased production of O_2^- . In this review, the application of SOD as practical medicine is described. In addition, highly purified SOD is briefly described which is obtained by using HPLC now under development in our Company.

1. はじめに

元来、生体にとって酸素は必須な元素であるが、逆に紫外線、生化学反応等で生成する活性酸素、例えば、 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 $^1 O_2$ 、 H_2O_2 は種々の障害を起すことがある。いわゆる酸素毒性という現象である。

白血球やマクロファージが、細菌などの異物に対し貪食作用を呈することは以前から知られているが、この際、活性酸素を産生する。

1967年 Holmes¹⁾ らが慢性肉芽腫症の白血球を用い、殺菌作用機構を解明した。その主力は O_2^- であって、異物が白血球やマクロファージの表面に接触することにより、 O_2^- の産生が増強され、活性酸素が生体内で殺菌作用を呈することが明確になった。

時期を同じくして、1969年 McCord & Fridovich²⁾ らが O_2^- を不均一化反応して分子状酸素と過酸化水素にするスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を発見し、生体での酸素毒性に対して防御する酵素をつきとめた。

健康人であれば活性酸素は異物処理に使用され、過剰の活性酸素は SOD により無毒化する機構が働き、健康を維持している。

ところが、生体のバランスが崩れて、活性酸素が異常

に亢進することで各種の疾病が起る。

このような原因で起る疾病は、放射線療法による活性酸素障害⁴⁾、脂質の酸化⁵⁾、DNA の損傷 (発がん)⁶⁾、肝臓障害⁷⁾、腎障害、未熟児網膜症、白内障、動脈硬化があり、生体のいたるところで活性酸素障害がみられる。

最近の研究進歩から生体内での酸化還元による異状で、原因となる疾病が多く、その原因が活性酸素によるとされる症候群が多くなって来ている。そのためか、最近、特にこの方面の研究報告、報文が多く、学者間の関心が高まって来ている。

疾病の原因が解明されれば、その原因を除くことで新薬が誕生することになり、本酵素 SOD についても各種疾病の治療薬として開発されている。ヨーロッパでは、リウマチ治療、放射線障害などの治療薬³⁾ として上市されている。

当社では、かねてから GPC、HPLC の分析装置および各種ゲルを販売しているが、ユーザーの対応で蓄積してきた分離、精製技術を活用し、生体微量成分を迅速かつ高純度に得る状況になった。その1つとして、牛新鮮血を原料に高純度に SOD を精製することが出来たので、この機会をとらえ活性酸素に対する SOD の役割を概説

図 1

| | | | | | | | | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| N末端からの番号 | 17 | | 19 | | 22 | | 24 | | 25 | 26 | 28 | 30 |
| 牛 血 球 | thr | | Hls | | Ala | | Gly | — | Asp | Thr | Val | Thr |
| ヒ ト 血 球 | Ser | | Asn | | Glu | | Glu | Ser | Asp | Pro | Lys | Trp |
| 番 号 | 34 | 40 | 51 | 53 | 67 | 96 | 98 | 100 | 101 | 107 | 108 | |
| 牛 | Thr | Asp | Asn | Gln | Lys | Asp | Val | Pro | Leu | Glu | Tyr | |
| ヒ ト | Lys | Leu | Asp | Ala | Arg | Val | Glu | Ser | Val | Asp | His | |
| 番 号 | 109 | 115 | 121 | 126 | 151 | | | | | | | |
| 牛 | Ser | Met | Pro | Arg | Lys | | | | | | | |
| ヒ ト | Cys | Leu | Ala | Lys | Gln | | | | | | | |

CuZn-SOD アミノ酸N末端からの配列の相違するアミノ酸比較⁹⁾

するとともに当社製の高純度 SOD を紹介する。

2. SOD の種類, 分布および構造

・種類

SOD は多くの生物体に存在する。又その分子中には金属を含有し、一応三種類に分けることができる。

(1) Fe-SOD

Fe³⁺ を2分子含む分子量約4万のもの

(2) Mn-SOD

2分子の Mn²⁺ を含む分子量約4万のもの

(3) CuZn-SOD

2分子の Cu²⁺ と2分子の Zn²⁺ を含むサブユニット2個からなる分子量31,200のもの。

嫌気性細菌は Fe-SOD, 好気性細菌では Mn-SOD, Fe-SOD とともに含むものと Fe-SOD のみのものがある。

真菌, 粘菌には高等動物にみられる CuZn-SOD, および Mn-SOD が存在する。

植物にも特にホウレン草には遊離蛋白質中の20~30%も Mn-SOD を含んでいる。

高等動物ではミトコンドリア由来の Mn-SOD と細胞質由来の CuZn-SOD が存在している。

・分布および構造

高等動物における SOD の分布は各臓器に含まれていて、その機能については不明な点が多い。膜には SOD 活性がないのは O₂⁻ がこの部分で産生され殺菌作用などを示すためだろう。

例へばラットでは可溶性に84%, ミトコンドリア画分には16%の SOD 活性が認められ⁴⁾, 各臓器別の SOD 分布は表1に示すように肝臓に最も高い活性を有している。

SOD のアミノ酸の一次構造では Fe-SOD と Mn-

表1 ラット各臓器の SOD 分布⁸⁾

| 器 官 | 活性(units/g) | 比活性 (units/mg蛋白質) |
|-----|-------------|-------------------|
| 肝 臓 | 4480±1165 | 22.1±6.2 |
| 副 腎 | 1563±1053 | 19.7±5.6 |
| 腎 臓 | 1342± 383 | 12.9±3.0 |
| 血 液 | 785± 317 | 3.6±1.0 |
| 脾 臓 | 441± 95 | 4.7±1.1 |
| 心 臓 | 421± 109 | 8.6±2.0 |
| 膝 臓 | 330 | 1.5 |
| 脳 | 262± 68 | 2.8±0.6 |
| 肝 臓 | 200± 55 | 3.1±1.0 |
| 胃 | 140± 30 | 6.5±2.2 |
| 腸 | 122± 43 | 2.5±1.5 |
| 卵 巣 | 112± 45 | 2.0±0.8 |

SOD は高い類似性をもっているが、CuZn-SOD とではかなりの部分に相違がみられる。ここに特に CuZn-SOD を注目し、ヒト CuZn-SOD と牛血球の CuZn-SOD のアミノ酸の一次構造を比較してみた。

図1に両者のアミノ酸N末端からの配列で相違のあるアミノ酸を示した。

牛血球由来の CuZn-SOD のアミノ酸数は151ケでヒトのものと比較して2ケのアミノ酸(N末端24と25番目の間)が欠失している。ヒトとのホモロジーは欠失のアミノ酸を除いて151個のアミノ酸のうち24ケのアミノ酸が異っていて、84.7%のホモロジーを示している。

N末端1~16, 67~93, 127~150がまったく同一のアミノ酸配列をしていて何か意味を有しているものと思われる。

3. CuZn-SOD と医薬

CuZn-SOD はオルゴテイン (orgotein)¹⁾として1965年すでに知られていて、細胞遊走阻害作用を呈することがみとめられていた。1969年に、McCord & Fridovich は牛血球から SOD を単離し、その作用機構を研究されていた。

その後 Diagnostic data 社 (DDI 社)¹⁰⁾ が牛肝臓よりオルゴテインを抽出し、抗炎症作用物質として昭和47年に特許化している。

オルゴテインの毒性はラットで 4g/kg という無毒性に近く、マウス、ラット、モルモット、サル等で腹腔内又は筋肉投与により何んら障害が認められていない¹¹⁾。

医薬品としての開発状況では DDI 社が動物薬として palosein の商品名で市販している³⁾。なおヒトの医薬品は臨床試験中と聞いている。

一方、ヨーロッパの動きは、DDI 社のライセンスを受け、西独—Gruenthal, (Peroxinorm としてヒト用医薬品で認可) イタリア—Zambeletti (Oxinorms の名称でヒト用医薬品で認可) その他、スペイン、スイス、オーストリア、韓国などの国で開発中³⁾である。

又イタリア—セロノ社³⁾では自社開発で近々商品化の段階に来ている。

さて、日本は新聞、文献等の情報からでは、DDI 社製の牛肝臓 SOD (製剤化されたもの) を輸入し、リウマチ治療薬として東洋醸造が開発、すでに臨床試験を終了している。その後の動きはとだえている。

遊離の CuZn-SOD は腎ですばやく代謝され半減期が6分という短命で、全身投与には効果がなく、臨床では、関節腔等の限局した部位に投与されて効果を示している。現在上市されているものは上述したような処方のものである。

そこで生体での安定性を増す試みが各国で研究され、Polyethylene glycol を SOD につけプロテアーゼから保護することが行われたが、組織への浸透性、組織特異性等で期待薄となっている。

薬の徐放性をもたせるため、カプセル化が進み、実際に供されているが、その延長に組織特異性を考慮したリポソームの研究が盛んに行われている。

SOD についてもリポソームに包み込む研究が進み、フランス国立生物物理化学研究所、Dr. Michelson¹²⁾らによってリポソーム SOD (L-SOD) が開発された。

中性、カチオン性、アニオン性のリポソームで、動物による組織特異性をチェックしている。

このようにして得られた L-SOD はリポソームによ

って異なるが、分子量 10^5 で、生体内の安定性は7.24hr (半減期)を有し、遊離の SOD に比較し大巾に増した。

この L-SOD は組織への浸透性が早く、組織表面への付着後 penetration が良好で、組織に分布された後、少量ずつ血中に SOD¹³⁾を放出する。

又組織表面付着後、細胞膜の内側に入り、本来の活性酸素による殺菌作用を阻害することなく、薬効を示す利点をもっている。

Dr. Michelson らが開発した L-SOD の臨床試験がフランスはもとより日本においても実施され、厚生省の特定疾患ベーチェット病調査研究班では医薬品としての有効性を報告¹⁴⁾している。

次にこれらの SOD がどのような疾病に対して有効性を示すか述べる。

Dr. Michelson, Scott, Emerit らは、自己免疫の発生病理の一つとして Crohn 氏病, SLE, Scleroderma などの患者において異常なリンパ球より血清中に clastogenic factor¹⁵⁾ (分子量 1,000~10,000, 50°C で破壊され、蛋白分解酵素によって分解されない物質) が産生されることが見出された。この因子が、生体の O_2^- によって活性化されて、リンパ球などのクロモゾームを壊し、自己免疫疾患を呈することが判明した。

即ち clastogenic factor を産生する疾患、post radio therapeutic necrosis, crohn 病、潰瘍性大腸炎、SLE PSS に有効という報告がある。

又、丹羽靱負らの研究成果¹⁴⁾によれば、食細胞の活性酸素産生能が亢進している Behçet 病, MCLS, Duh-ring, 皮膚炎, RA (関節腔), 発症5日以内の川崎病にも有効であるという報告がある。

更に、制がん剤として多用されている Adreamycin, Daunomycin, は心筋細胞でこれら薬剤の代謝が不十分なことにより、残留薬剤のため活性酸素を放出し心筋毒を呈し、突然死の症例が臨床上経験されている。

L-SOD はリポソームの性質から臓器特異性を有し心筋毒となる O_2^- を消去することから制がん剤の副作用¹⁶⁾を防止出来る。

このように SOD は将来の医薬品として期待されている。活性酸素の生体に対する影響は今迄ほんの一部について述べて来たが、生体膜の傷害、炎症とのかかわり、免疫、癌、動脈硬化などあらゆる個所で悪い影響を与えている。

4. CuZn-SOD の製法と精製

[1] 粗 SOD の製法

通常、McCord & Fridovich²⁾ の方法が使用されてい

るが、特許では、溶血後加熱処理 (SOD は熱に対してかなり安定) し夾雑蛋白を凝固させ、上清の SOD を精製する方法もある。

一般的には新鮮牛血球を生理食塩水で数回洗条し、得られた血球部分を同量のイオン交換水で溶血させる。

次に土橋法によりヘモグロビンを凝固させ、遠心濾過機で上清を得る。上清液にリン酸第2カリを加え、二層になった上層部分 (SOD が抽出された部分) にアセトンを加え粗酵素 SOD を洗殿させる。この際、アセトンで分画することも出来る。

〔2〕 精 製

精製法には大きくわけて三つの方法がある。

(1) 硫酸, アセトンによる分画法

但しこの方法では高純度の SOD を得ることが出来ない。

(2) 限外濾過膜法

一般に本法は分画分子量を限密に設定することが出来ず、SOD の分子量と近い夾雑蛋白質の除去には向かない。但し濃縮, 脱塩用としては有効である。

(3) ゲル濾過, イオン交換ゲル及びその他¹⁷⁾

分子篩としてゲル濾過は有効であるが、SOD のアイソザイムの除去には向かない。但しイオン交換ゲルと併用することはよく使用されている。

CuZn-SOD という金属を配位した酵素なのでキレートゲルはもちろん、pH, イオン活度をうまく利用したイオン交換ゲル, および CuZn-SOD の抗体をつけたゲルなどの使用は有効である。特許でも SOD の精製はこの部分での出願が大半を占めている。

参考として TSK の精製法について簡単¹⁸⁾に示すと、

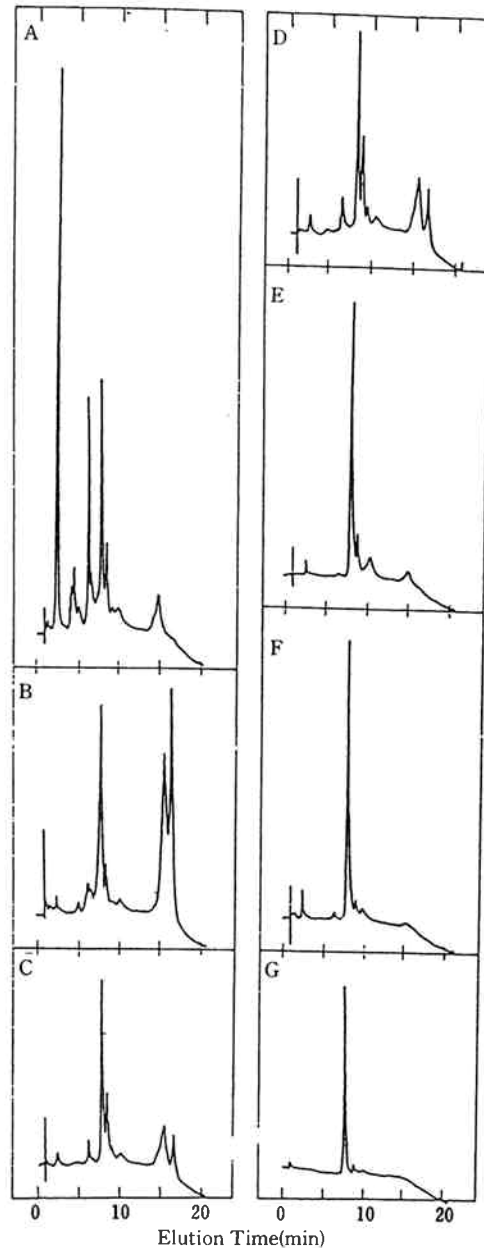
東洋曹達製, TSK-GEL DEAE-TOYOPEARL 650M を用い (サイズ: 21.5mm×150mm) 粗酵素をゲル溶出に使用する緩衝液と同一の組成のもので溶解し、ゲルにアプライした。

使用した装置は、

| | |
|----------|---------------|
| 高速液体クロマト | HLC-803D |
| 検出器 | UV-8 Model II |
| グラジェンター | GE-4 |

からなり、サンプルをカラムに注入し、同時にリニア塩勾配溶出をかけた。溶出液を280nmの吸収で測定し、各溶出液を分画した。

その際、溶出の際の塩濃度, pH, グラジェントのかけ方, サンプルチャージ量, 溶出流速, 操作温度など検討し、最適条件を設定した。



A : Sigma Lot 72 F 9365
 B : Calbio chem Lot 202044
 C : Miles, Lot 7017
 D : Boehringer Mannheim Lot 1112203
 E : Toyobo 3422
 F : Diagnostic Data
 G : Toyo Soda Lot 83001

図2 HPLC Pattern (他社品との比較)

各フラクションは蛋白質濃度, チトクロームC法による SOD 活性, DEAE-5PW, および電気泳動によりチェックした。

5. 他社品との HPLC Pattern 比較

CuZn-SOD の上市されているサンプルおよび DDI 社の好意でいただいたサンプルについて、TSK-GEL DEAE-5PW(7.5mm×75mm) で比較した。

カラムには 30ul の酵素液 (濃度 7.5mg/ml) を注入

し、同
もの)
測定し
Toy
6.
紙面
東洋曹
販売し
物質の
な生理
今匠
につい
単離で
およこ
図:

M
Ac
(ur
Pro
(m
Sp
(u
Mc
(%)
*Mc
**Mc

Remaining activity (%)

Sc
in
co
C

し、同時に食塩濃度ゼロから 0.5M (緩衝液に溶解したもの) までグラジェントを60分間行い、280nm の吸収を測定した。この結果を図 2 に示す。

Toyo Soda Lot 83001 が最もよく精製されている。

6. 東洋曹達製 SOD の紹介

紙面をかりて TSK 製 SOD の紹介をする。

東洋曹達工業(株)は以前から HPLC の装置およびゲルを販売し、好評をいただいている。この間種々の生理活性物質の分析について技術蓄積が出来、微量成分や不安定な生理活性物質も迅速に単離出来る状況が整ってきた。

今回前述したように医薬品として将来性のある SOD について当社の分離技術を駆使して、高収率、高純度に単離できた。本年 4 月より、研究試薬用として宝酒造(株)および丸善石油バイオケミカル(株)で販売する。Table 2, 図 3, 4, 5, 6, 7 に比活性及び物理化学的性質を示す。

Table 2 SOD 比活性

| MEASUREMENT | TOYO SODA- SOD | | |
|----------------------------|----------------|--------|--------|
| | #1 | #2 | #3 |
| Activity (units/ml) | 8585.4 | 7166.7 | 8095.2 |
| Protein conc* (mg/ml) | 2.7 | 2.2 | 2.5 |
| Specific activ. (units/mg) | 3179.8 | 3257.6 | 3238.1 |
| Moisture** (%) | 9.23 | 11.28 | 7.78 |

*Measured by Lowry method

**Measured by Karl Fischer method

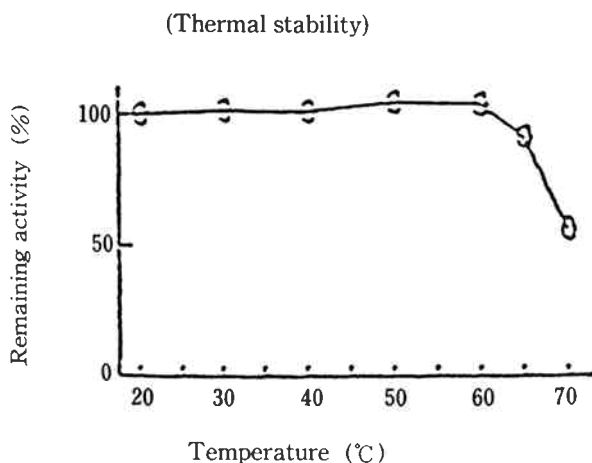
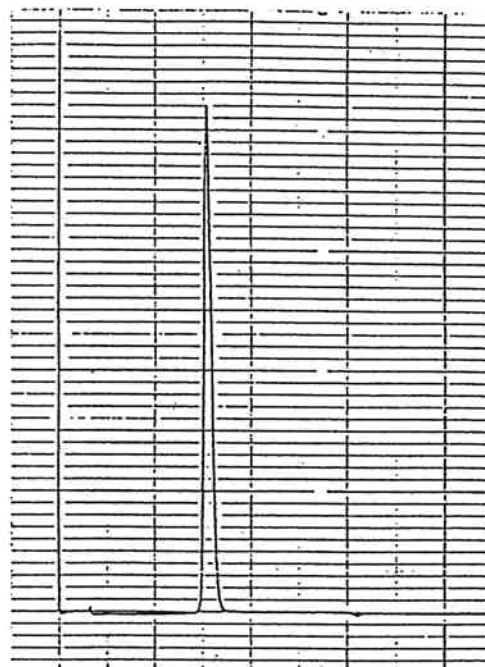


図 3 熱安定性

SOD solutions in phosphate buffer (pH7.8) were incubated for 30 min at various temperature, and cold to 4 °C The solutions were measured at 25 °C by standard

HPLC analysis



Elution pattern of purified SOD by ion exchange HPLC

Column : TSKgel DEAE-5PW (7.5mmID×7.5cm)

Buffer : 10mM Tris-HCl (pH 7.5)

Gradient : 0-0.15M NaCl/30 min.

Flow rate : 1.0 ml/min

Detection : UV (280 nm)

図 6 HPLC 分析

(Heat inactivation)

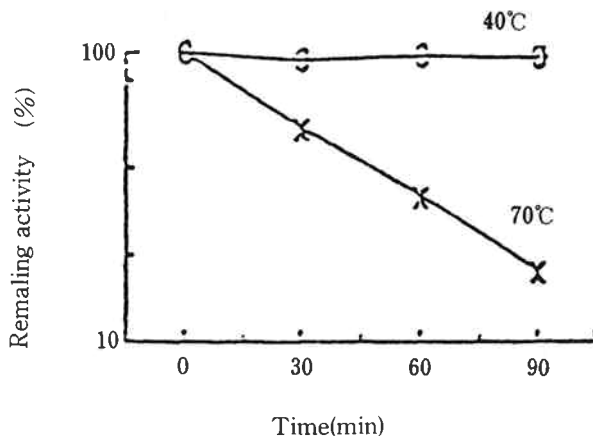
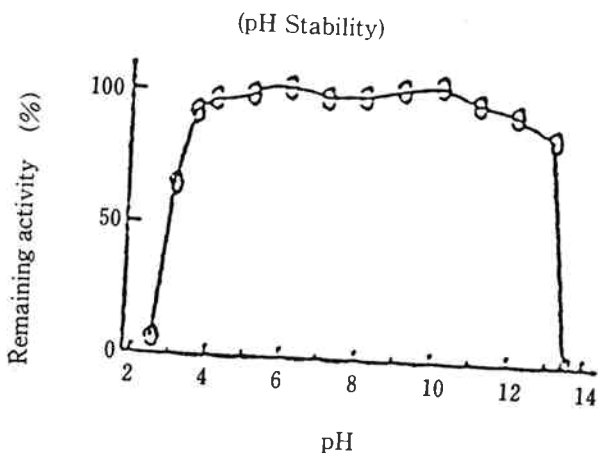


図 4 熱失活

SOD solutions in phosphare buffer (pH 7.8) were incubated at 40°C or 70°C for various time, and cold to 4°C Teh solutions werle diluted, and activities were measured at 25°C by standard method.



SOD were treated by various pH of buffer for 20 hours at 4°C and diluted, 20-fold by phosphate buffer (pH 7.8). The solutions were diluted again, and activities were measured at 25°C by standard method.

図5 pH安定性

Superoxide, dismutase [EC: 1, 15, 1, 1]

[Sources] 牛血球

[性状] 凍結乾燥, 粉末 25mg 入バイアル瓶

[活性] ≥3000 units/mg 蛋白質

[純度] ≥94% (SDS-PAGE で 1 Band)

7. まとめ

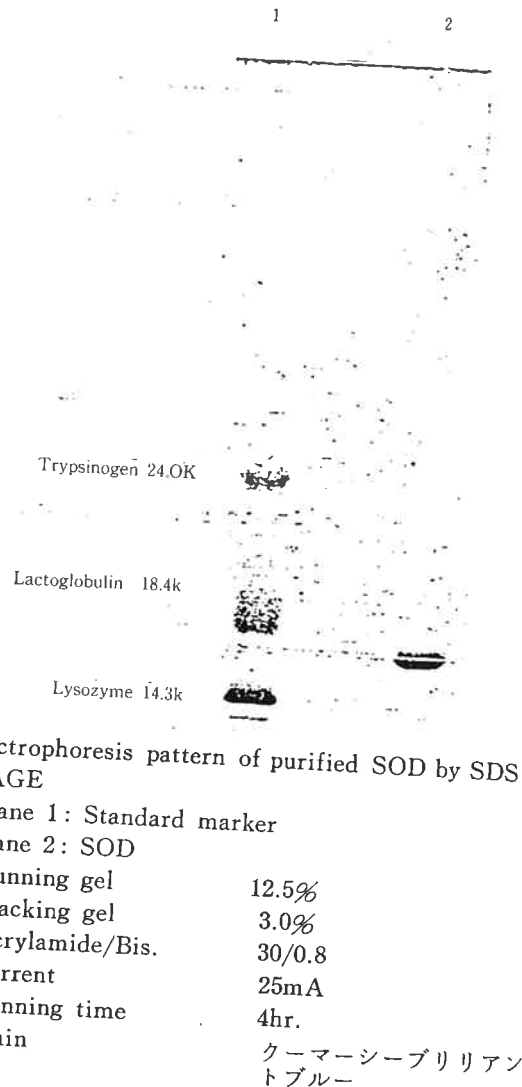
生体にとって酸素は重要な元素であるとともに, 生体内で酸素は生化学反応で活性酸素に変換され, 殺菌作用にも役立っている。

しかし活性酸素の異常亢進は細胞に障害を与える。1969年, 活性酸素を制御する酵素, SOD が発見され, 生体内での作用機構が解明された。

すでにヨーロッパでは, 活性酸素の異常亢進により起る疾病に SOD が使用されているが, まだいくつかの問題をかかえている。

ここでは SOD による活性酸素の制御とそれにもとづく医薬品への応用を述べた。又当社で開発した HPLC を使用した高純度 SOD の研究試薬を紹介した。

Electrophoresis analysis



Electrophoresis pattern of purified SOD by SDS-PAGE

Lane 1: Standard marker

Lane 2: SOD

Running gel 12.5%

Stacking gel 3.0%

Acrylamide/Bis. 30/0.8

Current 25mA

Running time 4hr.

Stain

クーマーシーブリリアントブルー

図7 電気泳動

文献

- 1) B. Holmes, A. R. poge & R. A. Good; clin, Invest., 46, 1422-1432 (1967)
- 2) J. M. McCord & I. Fridovich: J. Biol, chem, 244 (22), 6049-6055 (1969)
- 3) Pharma projects Manufacturers and Index V & O publications Ltd, Musculoskeletal products
- 4) R. E. Anderson, J. C. Stondefer & J. V. Scalletti; Cellular Immunology 33, 45~61 (1977)
P. E. Bryant; Nature 261, 588-590 (1976)
P. Milvy.; Fed. Proc., 32 (8), 1895-1902(1973)
- 5) D. D. Tyler; FEBS Letters 51, (1) 180-183 (1975)
J. S. Bus, S. D. Aust & J. E. Gibson; Biochem. Biophys. Res. Commun., 58 (3) 749-755 (1974)
T. Noguchi & M. Nakano; Biochim. Biophys. Acta., 368, 446-455 (1974)
- 6) W. J. Bruyninckx, H. S. Mason, & S. A.

- Morse; nature, 274 (5671), 606-607 (1978)
 H. N. Ananthaswamy, & A. Eisenstark: J. Bacteriol., 130 (1), 187-191 (1977)
- 7) A. E. M. Mclean & L. Nuttall: Biochem. pharmacol., 27, 425-430 (1978)
 B. Kalyanaraman, R. P. Mason, E. Pereg-Reyes et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1065-1072 (1979)
- 8) C. Peeters-Joris, A. -M. Vandevoorde & P. Bandhuin, Biochem. J., 150, 31-39 (1975)
- 9) Superoxide dismutase vol 1 L. W. Oberley CRC Press p 32
- 10) W. Huber (DDI): Brit. Pat. Specification, No 1, 160, 151 (Nov. 26, 1969)
 W. Huber (DDI): U. S. Patent. No 3, 637,640 (Jan. 25, 1972)
- 11) W. Huber, K. B. Menander-Huber, M. G. P. Saifer etc. Perspectives in Inflammation-Future Trends and Developments. ed. by Willoughby et al., Red Woob Burn Ltd 1977. p 527-544.
- 12) Michelson, A. M.: Oxygen radicals Agents and Action (Suppl) 11: 179~201 (1982)
 Michelson, A. M.: Superoxide dismutase, In Metalloproteins (Weser, U., ed.), p. 88~116, Geory Thieme Verlag Stuttgart, New York, 6979
 Michelson, A. M.: In Pathology of Oxygen p. 280~292, Academic Press (1982)
- 13) Michelson, A. M. & K. Puget: Act. Physiol. Scand. 1980. Suppl. 492. 67-80
- 14) 丹羽鞆負, 前田麻子; 厚生省特定疾患ベータレット病調査研究班, 昭58年度研究業績 Liposomal-encapsulated SOD の治療効果及びその化学構造作用機序, 適要についての示唆 (第2報)
 丹羽鞆負, 山本修二;
 小児腸管ベータレット病患者に使用した op-1206 α -CD 及び liposomal SOD の効果
 丹羽鞆負, 石本浩市; 昭57年度研究業績 Liposomal encapsulated SOD の薬理作用機序と Behçet 病患者治療結果について
- 15) I. Emerit,; Lymphokines Vol 8 p 413~423. Academic Press (1983)
 I. Emerit, A. M. Michelson; Acta Physiol. Scand. 1980, Suppl. 492: 59-65
- 16) Y. Niwa, K. Somiya, & A. M. Michelson; Brit. Medical, J. 投稿中
- 17) DDI: 日本特許公告 49-48121, オルゴテイン精製法
 DDI: ≡ 53-31205 オルゴテインの一工程クロマトグラフ単離方法
 DDI: USP 36871927 (1972)
 杉浦衛: 日本特許公開57-141288 比細胞 SOD の製造法
 わかもと製薬 " 57-150382 SOD の精製法
 富士臓器 " 58-179487 SOD の分離取得方法
 わかもと製薬 " 58-183091 SOD の精製法
 " " 59-9686 "
 東洋曹達 " 59-25682 Cn-Zn-SOD の単離精製法
- 18) K. Inouye, K. Nakamura, Y. Mitoma, N. Matsumoto, T. Igarashi. J. Chromatogr., 327, 301~311