

活性酸素によるDNA損傷作用

武 部 聡

DNA damage induced by active oxygens

So Takebe

好気性生物は酸素の持つ強い化学反応力を利用して様々な代謝反応を行い、その結果得られるエネルギーを利用して生命活動を営んでいる。酸素は、このように生物にとって有用な物質であるが、反面、その反応性の高さに由来する毒性によって生体に障害をもたらす。酸素障害の作用分子種は活性酸素と呼ばれ、生体内における酸化還元反応の副産物として生じる。多くの生命現象は、酸素の利用とその反応の副産物として生じた活性酸素の消去という微妙なバランスの上に成り立っているが、ひとたびそのバランスが崩れると余剰に生じた活性酸素は脂質、多糖、タンパク質、核酸など生体内のあらゆる成分を攻撃する。生物は、酸素障害から身を守るために活性酸素を生成しない反応系、生成した活性酸素の消去系を長い進化の過程で獲得してきた。さらに、これらの防御機構をくぐり抜けて生じた活性酸素による障害に対する修復系、再生系をも備えている(図1)。しかし、それでも標的分子(脂質、タンパク質、核酸など)の酸化的損傷を完全に防ぐことはできない。このような損傷が老化やガン化の一因になると考えられている。

活性酸素は、あらゆる生体成分を標的にすることができるが、中でもDNAに与える損傷は、長期にわたって保存・蓄積され、その修復に際しては変異など遺伝情報の変化をともなうことがあるため重大である。さらに、遺伝子情報の変化は他の生体成分に影響を及ぼし、結果として細胞の異常分化や老化をもたらす可能性がある。ここでは、種々の化合物から生じる活性酸素のDNA損傷作用と、これらの損傷が生体内で修復される際に導入される変異について考えてみたい。

1. 活性酸素について

酸素分子は、結合や反応に関与する2P軌道のうちエネルギーレベルの等しい反結合性軌道(2P π_x^* , 2P-

π_y^*)に同じ向きのスピンを持った電子が1つずつ入った状態がもっとも安定であり、基底状態で三重項を示す。大部分の有機分子は、基底状態で一重項であるため、三重項酸素(3O_2)との反応性は低い。酸化反応のためには、酸素分子の活性化が必要となる。

酸素のもっとも酸化された状態が酸素分子であり、これが4電子還元され、プロトン化されると水になる。この還元過程において、1電子還元を受けるごとにスーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル(HO^{\cdot})の3つの中間体が生じる。一方、 3O_2 を励起すると π_x^* , π_y^* 軌道の電子のスピンが対になり、一重項励起状態になる。有機分子との酸化反応には、基底状態の酸素分子をこのような反応性の高い分子種にすることが必要であり、これらの分子種をまとめて活性酸素と呼ぶ。

活性酸素は様々な要因で生じるが、食品成分や生体成分の自分酸化によっても生成する。例えば、リノール酸やリノレン酸のような多価不飽和脂肪酸は空気中の分子状酸素によって容易に酸化され、その後非酵素的に進む自動酸化によって、いろいろな過酸化物を生じる。このようにして生じた有機分子の過酸化物(ROOH)も、また、寿命の長い活性酸素と考えられている。

2. 活性酸素によるDNA損傷

活性酸素の中でもっとも反応性が高く生物にとって有害であると考えられているのは、ヒドロキシルラジカルである。ヒドロキシルラジカルは、過酸化水素を鉄などの遷移金属イオンで還元することにより生成する。この分子種は、DNA鎖を切断し、また、DNAを構成する4種の塩基のうちグアニンに損傷を与える。DNAは、決して反応性の高い有機物ではないが、ヒドロキシルラジカルはそのDNAをとどこかまわらず切り刻み、塩基の中でもっとも酸化的損傷を受け易いグ

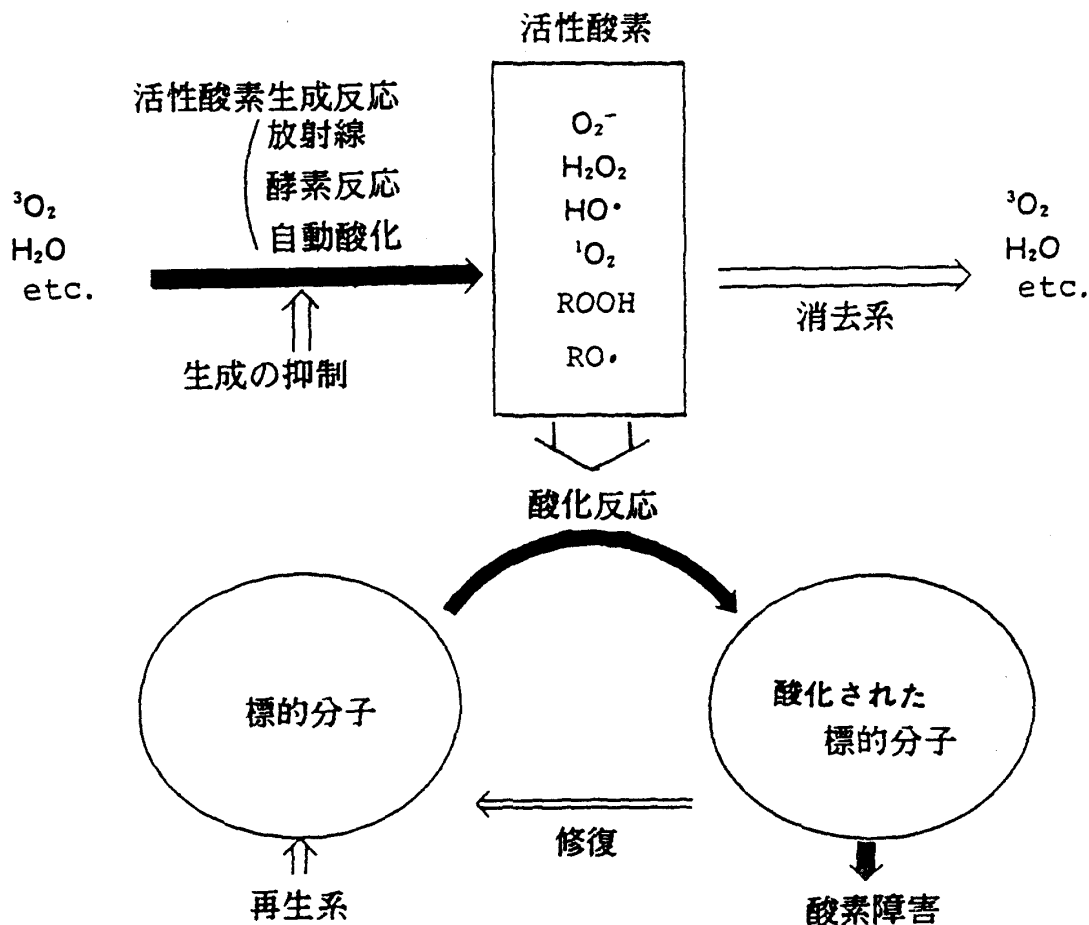


図1 活性酸素による障害とその防御

アニンを攻撃する。このような強い DNA 切断作用を利用して、最近では、DNA フットプリンティングや人工制限酵素などの遺伝子操作への応用が試みられている。

ヒドロキシルラジカルは寿命が短いため、細胞成分と拡散律速に近い速さで反応することが多く、生成場所に標的分子があれば障害をもたらすが、そうでない場合には消去する。したがって、細胞質中に発生したフリーなヒドロキシルラジカルが DNA を攻撃できる機会はほとんどないと考えられる。生体内で DNA に損傷を与えるためには、制ガン抗生物質であるブレオマイシンのように DNA との相互作用によって DNA の極近傍で活性酸素を発生させるような“からくり”が必要である。

筆者らはこれまで、比較的安定で寿命の長い過酸化物が銅イオン存在下において示す DNA 損傷作用について、いろいろな化合物を用いて調べてきた。この後、そのうちのいくつかについて紹介し、このような DNA 損傷が生体に与える影響について述べたい。

1) 脂質過酸化物による DNA 損傷作用

脂質過酸化物は発ガンや老化との関わりで現在もっ

とも注目されている。生体には、リノール酸やリノレン酸などの不飽和脂肪酸が多量に存在し、これらは主にリン脂質として生体膜を構成している。不飽和脂肪酸は、酸素と反応して過酸化物となると、以後自動触媒的に酸化分解、重合反応が進行し様々な過酸化物、フリーラジカルなどの活性酸素を生成、蓄積し、脂質のみならずタンパク質や核酸などの生体成分とも反応し損傷を与える。

不飽和脂肪酸としてリノレン酸メチルを用い 37°C、空気中で自動酸化させたものを DNA に作用させたところ強い DNA 損傷作用を示す中間生成物の蓄積がみられた (図2)。この損傷作用は金属イオン (特に銅イオン) を必要とし、DNA に対し一本鎖切断と熱-ピペリジン処理に不安定な損傷の二種類の損傷を同時に起こすことがわかった。熱-ピペリジン処理不安定な損傷を受け易い塩基はプリン残基の 5' 側のピリミジン残基であり、ヒドロキシルラジカルのそれとは異なっていた。さらに、この物質による DNA 損傷作用は、過酸化物を消去する作用を持つヨウ化カリウムとカタラーゼおよび金属キレート剤によって強く阻害され、ヒドロキシルラジカル消去剤である安息香

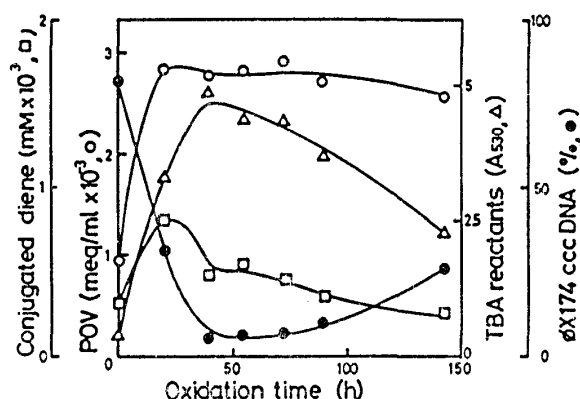


図2 リノレン酸メチルの自動酸化と DNA 損傷作用の強さ
 リノレン酸メチルの自動酸化による過酸化価 (○), チオバルビツール酸値 (Δ), 共役ジエン量 (□) および DNA 損傷作用の強さ (●) の経時変化を示した。DNA 損傷の強さは、切断を受けなかった DNA 分子の全体に対する割合で示してある。

酸ナトリウム, 一重項酸素捕捉剤の DABCO, およびスーパーオキシドジスムターゼによる阻害はほとんど受けなかったことから, DNA を攻撃する物質は ROOH であらわせる過酸化物質またはそれから生じるラジカルであると思われた。

2) アスコルビン酸による DNA 損傷作用

アスコルビン酸は強力な還元剤であり, 鉄や銅イオンを還元することができる。還元型の遷移金属イオンは分子状酸素を還元する事ができ, したがって遷移金属イオンとこれを還元できる還元剤を共存させると活性酸素が発生する。従来, このような反応系で用いる金属イオンは鉄イオンであり, この場合, ヒドロキシルラジカルが生じるとされてきた。ところが, 筆者らが行った実験条件では, アスコルビン酸は鉄イオンを用いても DNA 損傷作用を示さず, 銅イオンを用いたときのみ強い損傷作用を示した。この損傷作用は阻害剤の効果や DNA 損傷の塩基配列特異性において脂質酸化物と同様の性質を持っていたことから, 過

酸化物と銅イオンが関与していると思われた。

3) 過酸化水素による DNA 損傷作用に対する金属イオンの影響

過酸化水素が鉄イオン存在下でヒドロキシルラジカルを発生することはすでに物理的, 化学的手法によって証明された事実であり, 他の金属イオン (銅イオンなど) の下でも同様の反応式により活性酸素が生じると考えられていた。しかし前述したように, 過酸化物は銅イオン存在下においてヒドロキシルラジカル以外の DNA 損傷作用を示す活性酸素を生じる。そこで, 過酸化物の中でもっとも簡単な構造を持つ過酸化水素を用いて銅イオンを共存させたときの DNA 損傷作用を鉄イオンのときと比較し, 反応に対する金属イオンの効果を調べた。その結果, 銅イオン存在下では二種類の損傷反応が起きていることがわかった。主におこる損傷反応は脂質酸化物やアスコルビン酸のそれと酷似しており, これとは別に, おそらくヒドロキシルラジカルによると思われる損傷反応も同時に起きていた。

以上をまとめると表1のようになる。

細胞質中で生じた過酸化物は, 寿命の短いヒドロキシルラジカルと異なり, 生体膜中に数多く存在する不飽和脂肪酸に受け渡され, 長期にわたって保存, 蓄積される。このようにして蓄積された過酸化物は, 核膜を通じて核内の DNA に接近し, これに損傷を与えることが可能である。このように考えると, 過酸化物の DNA 損傷作用には, 生物学的に重要な意味がある。

最後に, DNA 損傷から老化やガン化へのプロセスの一過程と考えられる損傷部位への変異の導入の可能性について検討してみた。DNA に損傷を与えてから生体に戻し, これが修復される際に誘発される変異の性質を, プラスミドと大腸菌を用いて調べたところ, 1%の形質転換効率において約 10⁻⁴ という高頻度で酵素活性の低下を伴う変異が生じた。損傷を与えない DNA を導入しても変異体は得られなかったことか

表1 DNA 損傷作用のまとめ

化合物	金属	損傷部位	害 阻 例	
			効果あり	効果なし
過酸化脂質	Cu ²⁺	Py-Pu	KI, CAT	安息香酸
アスコルビン酸	Cu ²⁺	Py-Pu	KI, CAT	安息香酸
過酸化水素	Cu ²⁺	Py-Pu	KI, CAT	安息香酸
	Fe ²⁺	G, T, C	安息香酸, CAT	KI

太字が損傷を受ける塩基を示す。KI, ヨウ化カリウム; CAT, カタラーゼ

ら、与えた損傷が変異を誘発することが示された。

おわりに

食品中および生体中に存在するいくつかの物質から生成する活性酸素の DNA 損傷について述べた。ここで述べたことは、主に試験管内での証拠に基づいている。生きた細胞内の DNA は普段はタンパク質に包まれ、コンパクトに折り畳まれた構造をしているため損傷を受ける機会が少ないが、転写や複製のときには DNA もむき出しになる。その頻度は、活発に遺伝子を発現している細胞や盛んに増殖している細胞ほど高くなり、それだけ損傷を受ける可能性も高くなる。生体は、いろいろな機能を持った細胞がより集まって1個体を形成しているため、1細胞が受けた損傷や変異がストレートに発ガンや老化につながる可能性は少ないが、活発に活動している細胞ほど活性酸素による損傷を受け易くなり、変異も蓄積しやすいと考えられる。しかし、生体内でこのような損傷がどの程度の割合で起こり、そのうちのどの程度が変異につながるのかの解明は、今後の研究課題である。

参考文献

活性酸素に関する総説、成書は最近数多く出されている。ここでは、本稿に特に関わりの深いものをいくつか挙げておく。

中野 稔, 松浦輝男, 二木鋭男編, 「スーパーオキシド——化学・生物学・医学——」, 医歯薬出版, 1984

H. Sies 著, 「活性酸素と疾患」, 学会出版センター, 1987

八木國夫, 中野 稔監訳, 二木鋭男, 島崎弘幸編集, 「活性酸素——化学・生物学・医学——」, 医歯薬出版, 1987

駒野 徹ら, 活性酸素による遺伝子の損傷, 農化, 61, 233-249 (1987)

浅田浩二ら, 活性酸素——生物での生成・消去・作用の分子機構——, 蛋白質核酸酵素, 臨時増刊, 1988

柏村直樹, 糖質と活性酸素——自動酸化研究の新展開と多糖類切断に関する最近の知見を中心として——, 蛋白質核酸酵素, 臨時増刊, 3116-3126 (1988)

森田潤司, 活性酸素による DNA 損傷機構——還元性糖質の活性酸素生成と DNA 損傷機構を中心として——, 農化62, 1749-1756 (1988)