

SOD1 ノックアウトマウスに発症する皮膚炎への 活性酸素の関与の解明

山形大学大学院医学系研究科生命環境医科学専攻 生体分子機能学

藤井 順逸

Superoxide dismutase (SOD) is a principal enzyme to protect cells from cytotoxic effects of reactive oxygen species. We first examined mechanism of singlet oxygen-induced cell damage and also established detection systems for oxidized Trp and glutathionylated proteins. SOD1-deficient mice showed accelerated aging, such as inflammation in facial skin. Keratinocyte from SOD1-deficient mice was less capable of adhesion and proliferation in primary culture probably due to elevated oxidative stress.

1. 緒言

酸素呼吸を行う生物においては活性酸素種が不可避的に生じ、それが生体を傷害し老化の原因となると考えられている。こうした活性酸素から生体を防御する抗酸化物質や抗酸化酵素が幾つか知られている。中でも Superoxide dismutase (SOD) は酸素分子が一電子還元を受けて生じる最初の活性酸素・スーパーオキシドを消去するため、酸化ストレスからの防御の上で中心的な役割を果たすと考えられてきた¹⁾。しかし一方で、SOD の中でも最も量の多い Cu, ZnSOD の遺伝子 SOD1 を欠損するマウスは、老化その他について顕著な表現型を示さないと報告されており、その役割について疑問が投げかけられている²⁾。

活性酸素種の生成量はストレスなどにより増し、皮膚では特に紫外線 (UV) 照射により生成し、皮膚がんや光老化に関わると考えられている。UVB がスーパーオキシドやヒドロキシルラジカルといった細胞傷害性の高い活性酸素種を生成するのに対して、UVA は主にフラビンやヘムなどの色素化合物と反応して一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の生成に関係する。UVB は様々な化学反応を起こすため影響が現れやすく、それに関する研究は多数ある³⁾。しかし一重項酸素については、その効果を厳密に評価することができないため解明が遅れている。これまでは一重項酸素に関する研究のほとんどが色素に光を照射して生成させる光増感反応に頼っていた。しかしこの方法では生成量のコントロールが難しい上に、副産物として他の活性分子種が生成するため、一重項酸素の影響だけを純粋に評価することは難しい。最近、共同研究者が開発した、一重項酸素のみを生成

するナフタレン誘導体エンドペルオキシドを用いることによって、細胞への一重項酸素の効果を純粋に評価することが可能となった⁴⁾。

本研究では、(1) このナフタレン誘導体エンドペルオキシドを用いて、アポトーシスとその誘導にかかわるカスパーゼならびにチトクローム *c* (cyt-*c*) に対する一重項酸素による細胞傷害作用について検討した。また、(2) システインプロテアーゼであるカスパーゼと活性基との関連を調べるために、ヒト皮膚線維芽細胞のリソソーム酵素であるカテプシン群での検討を行った。さらに、(3) 皮膚の光老化現象と酸化ストレスの関連を調べるために、酸化アミノ酸とグルタチオン化タンパクの2つの酸化ストレスマーカーの検出法を開発した。(4) そして活性酸素からの防御の上で重要と考えられている SOD1 を欠くマウスの皮膚への影響について検討を行った。

2. 実験

2-1 一重項酸素による細胞傷害性の解析

ヒト由来培養細胞 HepG2 を用いて、ナフタレン誘導体エンドペルオキシドから生じる一重項酸素による細胞傷害活性を調べた。ミトコンドリアからの cyt-*c* 流出・クロマチン凝集・DNA ラダー形成・カスパーゼ活性化といったアポトーシスの指標となる項目について検討し、細胞をエトポシド処理して典型的なアポトーシスを誘導させた場合と比較した。

また、精製ウマ cyt-*c* を用いて、その酸化還元 (レドックス) 状態とアポトーシス誘導能との関連について解析した。さらに、細胞抽出液を用いた無細胞再構成系を用いて、一重項酸素処理した cyt-*c* によるアポトーシス誘導能について検討した。

2-2 ヒト皮膚線維芽細胞のカテプシンアイソザイムに対する一重項酸素の影響

正常ヒト皮膚線維芽細胞ならびにその細胞抽出画分をエ



Investigation on Involvement of Reactive Oxygen Species in Dermatitis Developed in SOD1-Knockout Mice

Junichi Fujii

Department of Biomolecular Function,
Major of Environmental Life Science,
Graduate School of Medical Science,
Yamagata University

ンドペルオキシド処理し、生成した一重項酸素のカテプシン B、L/S、D/E 活性に対する影響を検討した。さらに、精製ヒトカテプシン B を用いて活性測定ならびにタンパク化学的解析を行った。

2-3 酸化ストレスマーカーの検出系の開発

酸化に弱いアミノ酸のうち、Met, His, Tyr, Trp の4種類を、一重項酸素・スーパーオキシド・ヒドロキシラジカルの各活性酸素種に曝し、生成する酸化物の構造決定を行った。その中の一つで、Trp の主要な酸化物である N-formylkynurenine (NFK) に対する抗体を作成した。

Glutathione S-transferase (GST) がグルタチオンを特異的に認識・結合することを利用した検出系の開発を行った。ビオチン化した GST をグルタチオン化タンパクに結合させ、horse radish peroxidase (HRP) 標識した streptavidin で検出した。

2-4 SOD1 欠損マウスの解析

SOD1 欠損マウスの加齢に伴い、皮膚の炎症の出現、体重、臓器重量の変動といった表現型がどのように変化するか観察・測定した。貧血との関連が疑われたので、赤血球含量について計測した。また、皮膚よりケラチノサイトを初代培養し、細胞分裂能や接着性ならびに栄養要求性について調べた。

3. 結果

3-1

ナフレン誘導体エンドペルオキシドを用いた解析から、一重項酸素は強力な細胞傷害作用を有することが分かった。この細胞傷害過程でミトコンドリアからの cyt-c 流出を促進することから、その細胞傷害の機構としてはアポトーシスが疑われた。しかし、DNA ラダー形成・カスパーゼ

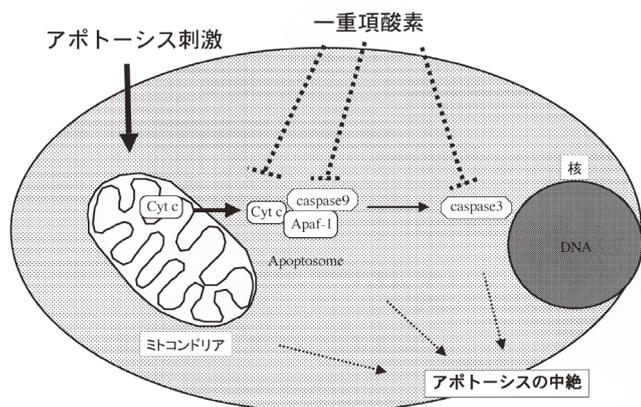


図1 一重項酸素によるアポトーシス経路の抑制

の活性化といったアポトーシスの過程で起こる現象は、エンドペルオキシド処理した場合に比較して著しく低く、アポトーシス経路はむしろ抑制されていた⁵⁾。詳細な解析を行った結果、一重項酸素はカスパーゼ活性を阻害すること、さらに cyt-c により活性化される apoptosome の形成を阻害し、典型的なアポトーシスとは異なる細胞死をもたらすことが分かった (図1)。

cyt-c はアポトーシスを誘導するが、結合しているヘムが還元型と酸化型のいずれでアポトーシスを誘導するかについては一致した見解が得られていなかった。そこで精製ウマ cyt-c を用いて、結合しているヘムの酸化還元 (レドックス) 状態について解析した。その結果、酸化型 cyt-c にはのみアポトーシス誘導能が認められ、還元型 cyt-c にはなかった (図2)⁶⁾。一重項酸素処理することによってアポトーシス誘導能は不可逆的に消失し、タンパク中のカルボニル含量が増加した。以上の結果は、ヘムの酸化還元ではなく、タンパクの酸化的修飾が cyt-c のアポトーシス誘導能喪失の原因となっていることを示している⁷⁾。

3-2

細胞内小器官であるリソソームに含まれる酸性プロテアーゼ・カテプシンに対する一重項酸素の影響を解析したところ、システインプロテアーゼ群に属するカテプシン B と L/S 活性のみが阻害され、アスパラギン酸プロテアーゼ群に属する D/E 活性はまったく影響を受けなかった⁸⁾。システインはこの一重項酸素による阻害効果に対して極めて有効な保護作用を示した。しかし、一重項酸素処理で失活したカテプシン B と L/S 活性は還元剤処理によって回復しなかった。精製カテプシン B を用いた場合でも同様の結果が得られた (図3)。

3-3 酸化ストレスマーカーの検出系の開発

酸化に弱い Met, His, Tyr, Trp の4種類のアミノ酸を各

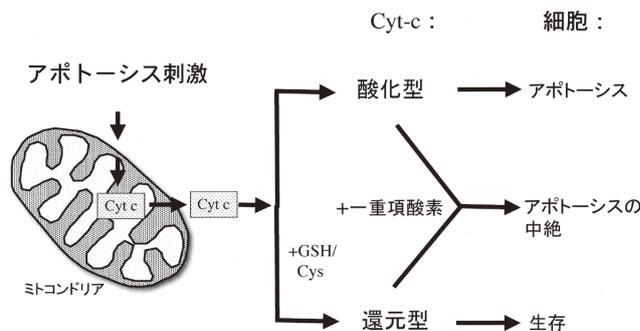


図2 cyt-c は酸化型でのみアポトーシスを誘導する。一重項酸素はアポトーシス刺激を受けた細胞でもアポトーシスを中絶させる。

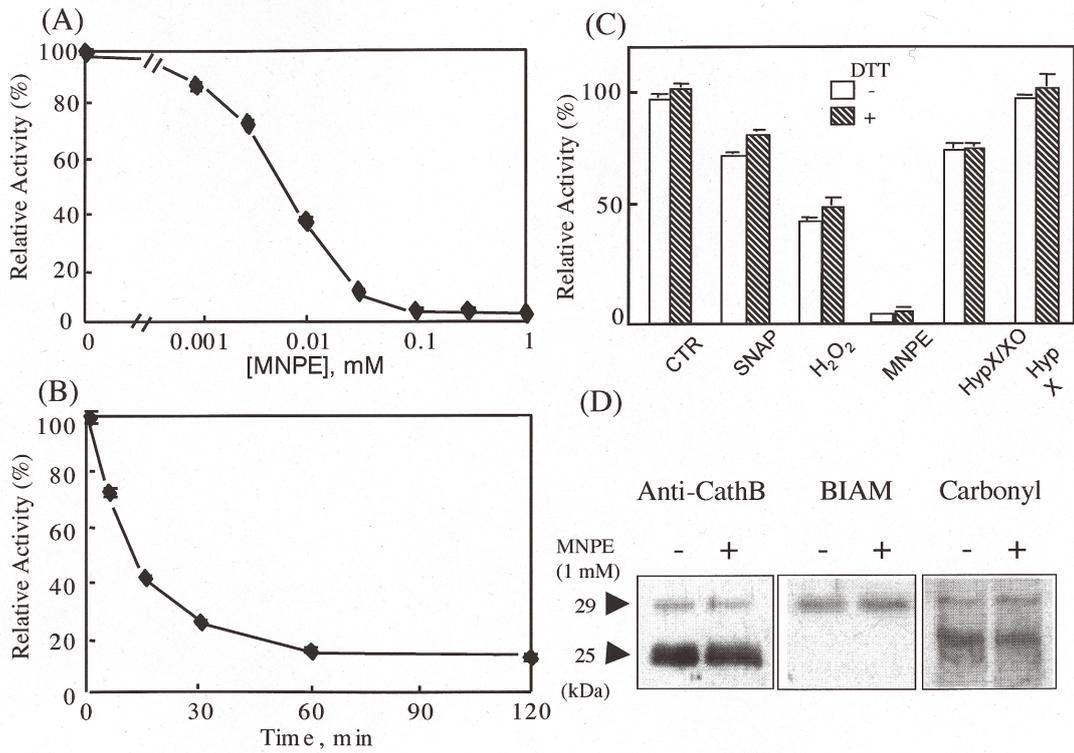


図3 精製ヒト・カテプシンBの一重項酸素 (MNPE) による阻害：濃度依存性 (A)、経時変化 (B)、不可逆性 (C)、アミノ酸修飾の解析 (D)

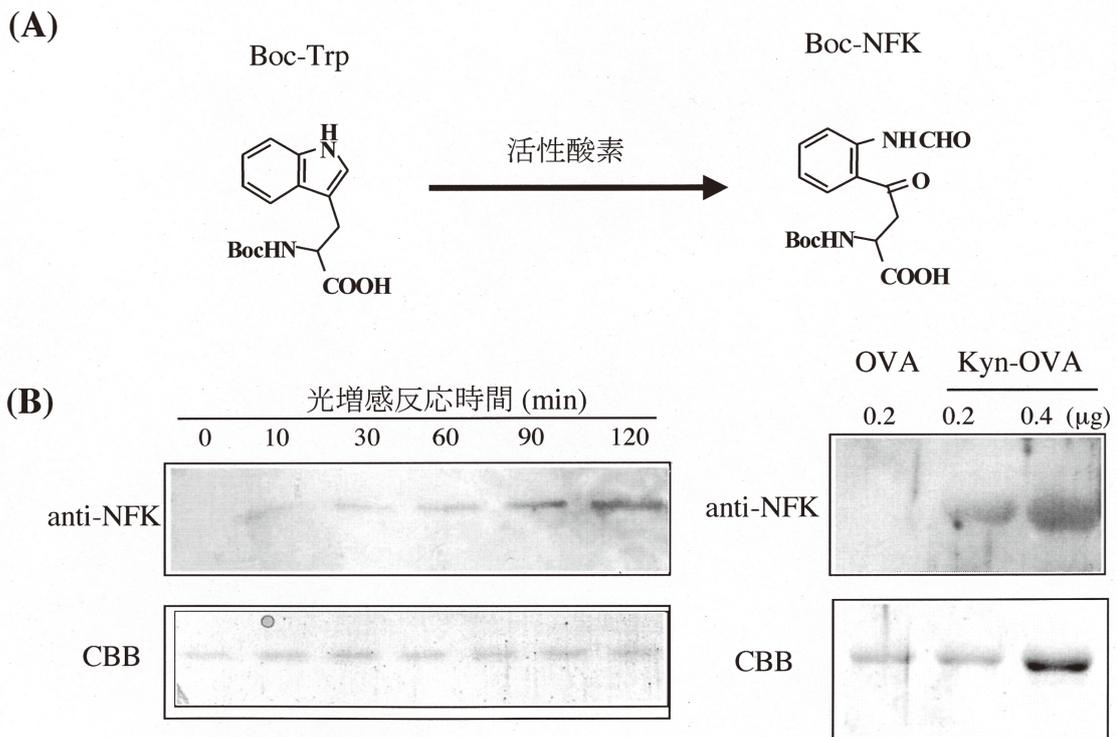


図4 (A) Trp は活性酸素により NFK に酸化される。
(B) 抗 NFK 抗体の特異性と、kynurenine (Kyn) との反応性。

活性酸素種に曝し、生成する酸化物の構造決定を行った。その中の1つ N-formylkynurenine (NFK) は、Trp から酵素的に kynurenine が精製する際の重要な前駆体であるため、牛胎児血清アルブミン (BSA) に結合させ抗原としてウサギに免疫し、抗体を作成した⁹⁾。トリプシンを一重項酸素処理してウエスタンブロット解析に用いた場合、得られた抗血清は処理時間に依存して反応性が増したことから、NFK を認識する抗体ができていた事が分かった (図4)。Kynurenine を結合させた卵白アルブミン (OVA) を用いてウエスタン解析したところ特異的に検出されたことから、本抗体は kynurenine も認識することが分かった。

また、日本住血吸虫の GST をビオチン化し、これをプローブとしてグルタチオン化タンパクを検出する系を確立した¹⁰⁾。結合したビオチン化 GST は、HRP-streptavidin で検出された (図5)。この方法により、グルタチオン化タンパクを簡便に検出し、酸化ストレスの評価をより詳細に行うことが可能となった。本法による解析から、S-ニトロソグルタチオンが最もタンパクの S-グルタチオン化を促進することが分かった。

3-4 SOD1 欠損マウスの解析

SOD1 欠損マウスの全身ならびに皮膚に現れる老化現象について解析した。SOD1 欠損マウスを長期に渡って飼育し体重の変動を調べたところ、野生型に比べて有意に軽いことが分かった。また、赤血球含量の加齢変化を調べたと

ころ、野生型よりも低く貧血の症状を呈していた。解剖したところ、脾臓の肥大が認められ、組織学的解析から赤血球の破壊とそれを代償するために造血が亢進していると考えられた。さらに、顔面に皮膚炎が見られたことからその原因を解明するために、新生仔皮膚よりケラチノサイトを単離・培養し、解析を行った。SOD1 欠損マウス由来細胞は培養皿への接着性が低下していた。その主な原因としては、培養に用いる血清中の成分が関係していることをつきとめた。

4. 考察

4-1

細胞はアポトーシスを起こす事によって断片化され、マクロファージなどの貪食細胞に取込まれるため、細胞内容物は細胞外にほとんど漏れ出ない。しかし、ネクローシスやアポトーシスが中絶された場合には細胞外に内容物が漏れ出る事から、貪食によるアポトーシス細胞の除去が阻害された場合文献¹¹⁾と同様に、それが抗原となり、自己免疫疾患を惹起する可能性がある。今回の結果から、UVA が一重項酸素の生成をもたらし、それがアポトーシスを阻害することで、死んだ細胞の内容物が細胞外に漏れ出ることが UVB による炎症の劇症化につながる可能性を示唆している。

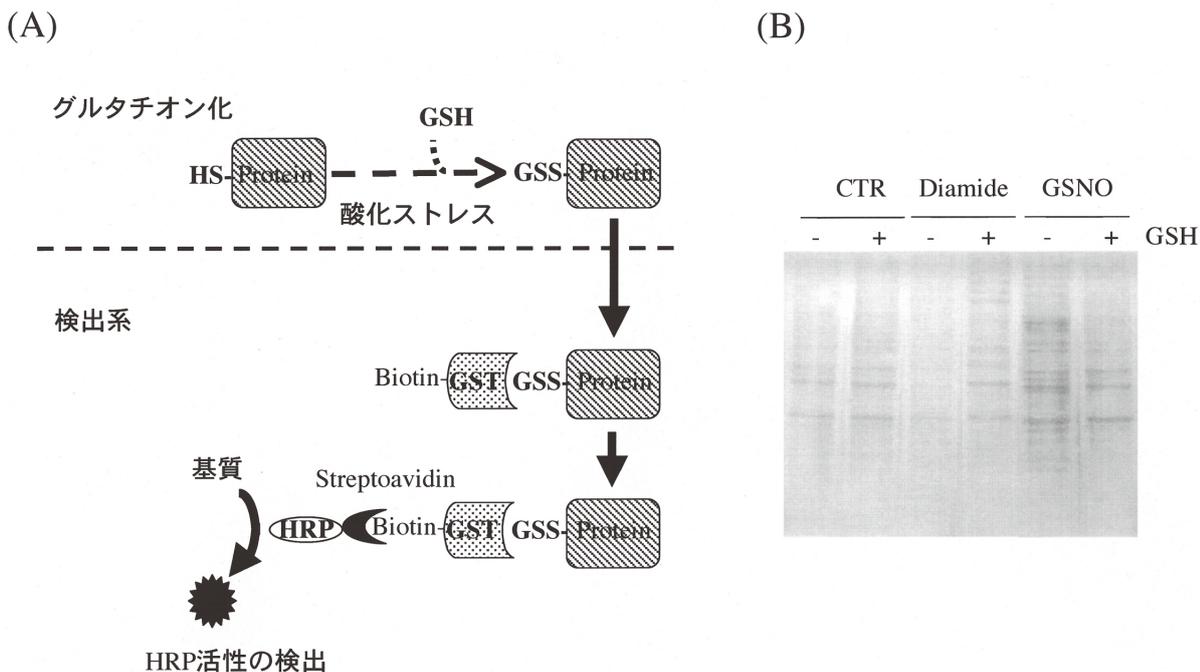


図5 新たに開発した GST によるグルタチオン化タンパク検出系の原理 (A) と結果の例 (B)

4-2

一重項酸素処理によってカスパーゼだけではなくカテプシン群についても、システインプロテアーゼに属するアイソザイムのみが阻害された。これはシステインプロテアーゼの酵素活性にかかわるアミノ酸が特異的に酸化された可能性を示唆している。調べた限り、触媒中心を形成するシステインが酸化されていないことから、触媒活性に必要なヒスチジンが一重項酸素の標的となっている可能性がある。

4-3 酸化ストレスマーカーの検出系の開発

Kynurenine は、Trp が脳で酵素的に代謝されてドーパミンに変換される過程で生成する中間体化合物である。これまでに kynurenine を認識する抗体を作成したとの報告はなく、本報告がはじめてである。本抗体を用いる事によって組織切片での検出が可能となるので、今後の組織学的応用が考えられる。グルタチオン化タンパクについては、従来の方法では放射性同位元素を用いるなど、その検出には煩雑で特殊な技術ならびに設備を必要とした。しかし、今回開発した方法を用いる事によって、免疫学的方法に準じた手軽さで、しかも高感度の検出が可能である。

4-4 SOD1 欠損マウスの解析

SOD1 欠損マウスは通常の飼育下では目立った表現型は示さないとされていたが、長時間に渡る多数のマウスの観察結果から、SOD1 欠損は血液や皮膚に老化現象を引き起こす事が分かった。初代培養実験から、皮膚の炎症と増殖因子との関連が示唆された。この SOD1 欠損マウスの皮膚に現れる炎症の原因解明のために、個体・組織・細胞・そして分子レベルのより詳細な検討を進めている。

5. 総括

本研究では、まず活性酸素種の 1 つ一重項酸素の細胞傷害機構を調べ、光老化を解明する上でタンパク質の酸化的修飾の解析の重要性を示した。酸化アミノ酸を検出するために有用な、トリプトファン酸化物と反応する抗体を作成し、またグルタチオン化タンパクの簡便な検出法を開発した。SOD1 欠損マウス顔面の皮膚の炎症について、初代培養を行う事で分子レベルの解析を行った。

謝辞

本研究にご助成いただきましたコスメトロジー研究振興財団に深謝申し上げます。また、本研究の遂行にご尽力い

ただきました共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます。

(参考文献)

- 1) Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 97-112, 1995.
- 2) Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, ほか: Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 3, 43-47, 1996.
- 3) Halliwell B, and Gutteridge JMC. (eds) *Free Radical Biology and Medicine*, 3rd ed. Clarendon Press, Oxford, 1999.
- 4) Liu W, Ogata T, Sato K, ほか: Syntheses of water-soluble endoperoxides as a singlet oxygen source. *ITE Letters on Batteries, New Technologies and Medicine* 2, 98-101, 2001.
- 5) Otsu K, Sato K, Ikeda Y, ほか: Abortive apoptotic pathway by singlet oxygen due to the suppression of caspase activation. *Biochem. J.* 389, 197-206, 2005.
- 6) Suto D, Sato K, Ohba Y, ほか: Abolished pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via heme redox state-independent mechanism. in "Natural Antioxidants and Micronutrients"(B Zhao, G Liu, L Packer, eds), Medimond, Bologna, 87-90, 2005.
- 7) Suto D, Sato K, Ohba Y, ほか: Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a heme redox state-independent mechanism. *Biochem. J.* 392, 399-406, 2005.
- 8) Nagaoka Y, Otsu K, Okada F, ほか: Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 215-223, 2005.
- 9) Suto D, Ikeda Y, Fujii J, ほか: Structural analysis of amino acids, oxidized by reactive oxygen species and an antibody against N-Formylkynurenine. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 38, 107-111, 2006.
- 10) Cheng G, Ikeda Y, Iuchi Y, ほか: Detection of S-glutathionylated proteins by glutathione S-transferase overlay. *Arch. Biochem. Biophys.* 435, 42-49, 2005.
- 11) Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, ほか: Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 304, 1147-1150, 2004.