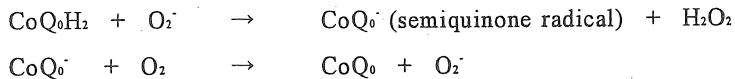


9746 SODのユビキノール酸化抑制作用におよぼす塩類とミネラルの影響

助成研究者：中山 勉 (静岡県立大学 食品栄養科学部)
 共同研究者：熊澤 茂則 (静岡県立大学 食品栄養科学部)

ユビキノール (CoQ₀H₂ = 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-hydroquinone) の自動酸化反応を、ユビキノン (CoQ₀ = 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-quinone) と過酸化水素 (H₂O₂) の生成量を指標として調べた。8種類の金属塩 (硫酸塩) のうち、マンガン・銅・鉄の3種類の金属がユビキノールの酸化を促進した。食塩には何の効果もなかった。また金属塩が存在しない状態で4種類のキレート剤の効果を調べると、それぞれ酸化反応を抑制した。特にDTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) に抑制効果が強いことから、反応に用いたリン酸緩衝液中の微量の鉄イオンが酸化に関与していることが示唆された。

次にユビキノール酸化反応におけるSOD (スーパーオキシドディスムターゼ) の効果を調べた。SOD (CuZn-SODおよびMn-SOD) は、DTPAの存在下、ユビキノンとH₂O₂の生成量を同様に減少させ、ユビキノールの酸化反応を抑制することが明らかになった。SODは、「2O₂ + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂」なる反応を触媒し、結果としてスーパーオキシド (O₂⁻) を消去する酵素である。したがって本研究で見いだされたSODによるH₂O₂生成の抑制作用は上記の反応式と矛盾しているように見える。しかし、O₂⁻が連鎖媒体として関与する下記のような連鎖的酸化反応を想定すると、実験結果がよく説明できることが明らかになった。



ユビキノールの酸化反応を促進する鉄、マンガン、銅などのミネラルはとりもなおさずSODの活性中心に存在するものである。特に、原核生物のFe-SODは地球に最初生命が誕生してからまもなく出現した酵素と考えられており、鉄イオンをSODの形で利用することは、ユビキノールの酸化を抑制する上で二重の働きをしている可能性がある。また真核細胞のミトコンドリアにはMn-SODが存在し、細胞質にはCuZn-SODが存在している。ユビキノールもミトコンドリアと細胞質の両方に存在しており、Mn-SODとCuZn-SODのいずれもが、ユビキノールの酸化反応を同様に抑制したことは両者に共通の役割があることを暗示している。

9746 SODのユビキノール酸化抑制作用におよぼす塩類とミネラルの影響

助成研究者：中山 勉 (静岡県立大学 食品栄養科学部)
 共同研究者：熊澤 茂則 (静岡県立大学 食品栄養科学部)

1. 研究目的

SOD (スーパーオキシドディスムターゼ) は、「 $2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ 」なる反応を触媒し、結果としてスーパーオキシド (O_2^-) を消去する酵素である。

我々はすでに緑茶ポリフェノールの一種であるカテキンの酸化とそれに伴う過酸化水素 (H_2O_2) の生成を SOD が抑制することを報告した。¹⁾ SOD による H_2O_2 生成の抑制作用は上記の反応式と一見矛盾しているように見えるが、 O_2^- が連鎖媒体として関与する連鎖的酸化反応を想定すると、合理的に解釈することができる。

ところでユビキノールは好気生物 (さらに真核生物においてはミトコンドリア) に存在する電子伝達系の一成分であり、最近では血液中に存在する LDL (low density lipoprotein) の酸化を抑制する物質 (抗酸化物質) としても注目されている。ユビキノール自体は酸化を受けやすく、我々は、ユビキノールの酸化反応においても、カテキンの酸化反応の場合と同様な SOD のによる抑制効果があることを予備実験で見いだした。さらに SOD の効果はミネラルやキレート物質の影響を受けやすいことにも気がついた。そこで本研究は「ユビキノールのユビキノンへの酸化反応とそれともなう H_2O_2 の生成反応」における SOD とミネラルの複合効果を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2. 1 ユビキノールの調製

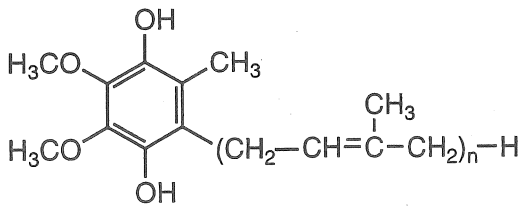
ユビキノールは一般的に Fig. 1 のような構造をしているが、本研究では $n=0$ である水溶性の CoQ_0H_2 と $n=2$ である脂溶性の CoQ_2H_2 を用いた。多数のサンプルによる繰り返し実験の容易さから主として CoQ_0H_2 を用いた。一方、 CoQ_2H_2 は生体中のユビキノールが脂溶性であることから確認の意味で用いた。

2. 1. 1 CoQ_0H_2 の調製

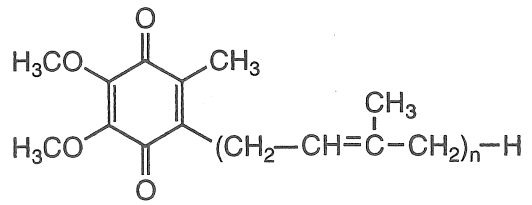
CoQ_0 (2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-quinone) 水溶液に $NaBH_4$ 水溶液を加え、還元反応により CoQ_0H_2 を調製した。塩酸を加えて過剰の $NaBH_4$ を分解し、このまま使用時まで冷暗下保存した。

2. 1. 2 CoQ_2H_2 の調製

CoQ_2 のメタノール溶液に $NaBH_4$ のメタノール溶液を加え、還元反応を行った。ジエチルエーテルと塩酸を加えて $NaBH_4$ を分解すると同時に、 CoQ_2H_2 をエーテル抽出した。窒



ubiquinol (CoQ_nH₂)



ubiquinone (CoQ_n)

Fig. 1 Structures of ubiquinols and ubiquinones

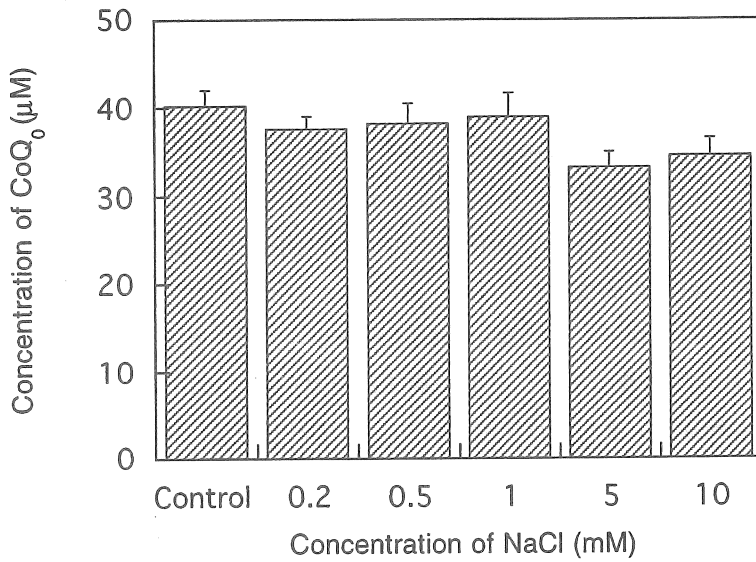


Fig. 2 Effects of NaCl on the CoQ₀ formation

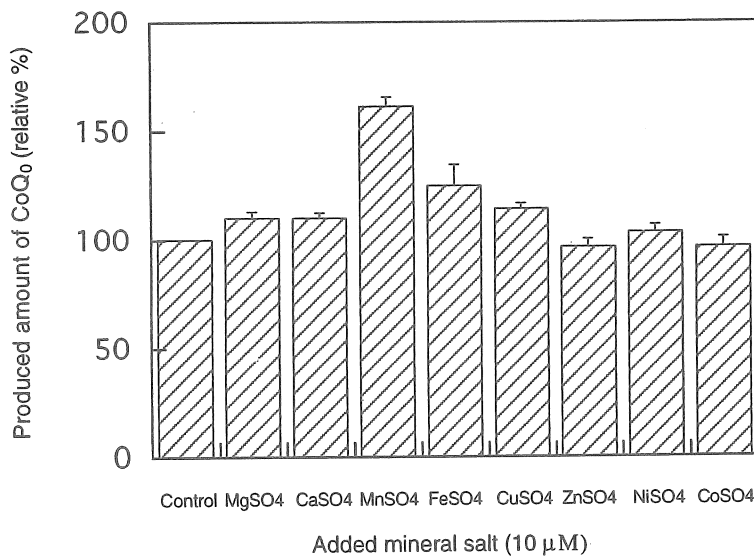


Fig. 3 Effects of minerals on the CoQ₀ formation

素ガスによりエーテルを除去した後、メタノールを加えて CoQ_2H_2 のメタノール溶液とした。

2. 2 酸化反応

2. 2. 1 CoQ_2H_2 酸化量の測定

50 μM の CoQ_2H_2 溶液 (通常は 10 mM, pH 7.2 のリン酸緩衝液に希釈したもの) を 37 °C で 1 時間インキュベートした後、生成した CoQ_2 をその最大吸収波長 (268 nm) の吸光度から定量した。

2. 2. 2 CoQ_2H_2 酸化量の測定

50 μM の CoQ_2H_2 溶液 (通常はメタノールを含む 50 mM, pH 7.4 のリン酸緩衝液に希釈したもの) を 37 °C で 4 時間インキュベートした。メタノールで希釈し、そこに含まれる CoQ_2H_2 と CoQ_2 の量を HPLC で定量した。

2. 2. 3 H_2O_2 の測定

最終濃度で 74 $\mu\text{g/ml}$ の *p*-hydroxyphenylacetic acid (HPA) と 20 $\mu\text{g/ml}$ の HRP を含む、100 mM pH 8.5 Tris 塩酸緩衝液 5 ml に、逆相短カラム (Sep-Pak C18) 処理したユビキノールの酸化反応溶液を 0.25 ml 加えた。37 °C で 15 分間インキュベート後、励起波長 317 nm、測定波長 410 nm の蛍光強度を測定し、検量線から H_2O_2 濃度を求めた。

3. 研究結果

(以下、特にことわらない限りユビキノールは CoQ_2H_2 を、ユビキノンは CoQ_2 を示すことにする。また、実験は 4 連で行い、その標準偏差をグラフ中に示した。)

3. 1 ユビキノール酸化反応におよぼす食塩と金属塩の影響

3. 1. 1 食塩の影響

50 μM のユビキノール溶液を 37 °C で 1 時間インキュベートした時に生成するユビキノン量に対する食塩の効果を様々な濃度で調べた (Fig. 2)。その結果、食塩はユビキノールの酸化にほとんど影響を及ぼさないことが明らかになった。

3. 1. 2 金属塩の影響

8 種類の金属塩 (10 μM) の添加効果を調べたところ、 MnSO_4 と FeSO_4 に酸化促進効果が認められた (Fig. 3)。他の金属塩に関してはそのような効果がなかった。また硫酸塩の代わりに塩酸塩を用いて同様の実験を行っても、まったく同じ傾向が見られた (データは省略)。次に 500 nM 以下の様々な濃度で 4 種類の金属塩の効果を調べた (Fig. 4)。この濃度範囲において、 MnSO_4 の場合は濃度依存的にユビキノールの酸化反応を促進した。 FeSO_4 の場合は 10 μM のときと異なり酸化促進効果が認められなかった。 CuSO_4 の場合は酸化促進効果が見られ、500 nM よりも 100 nM の時の方が著しかった。そこでさらに 100 nM 以下についても調べたところ (Fig. 5)、そこでは濃度依存的に酸化を促進した。 ZnSO_4 の場合は Fig. 4 で示した濃度範囲においても酸化促進効果はなかった。

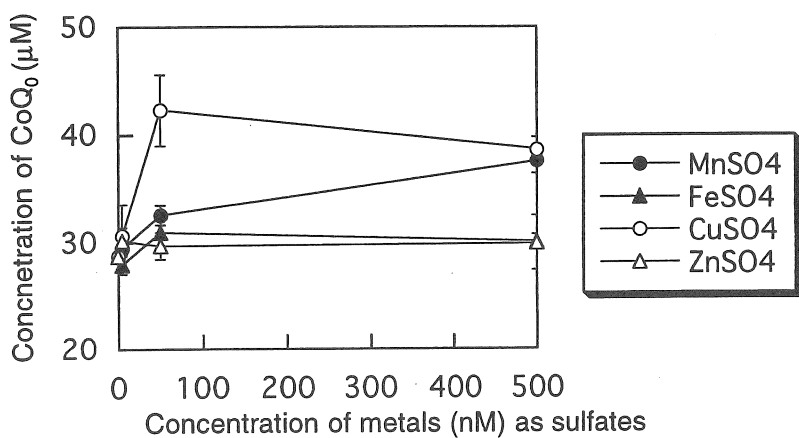


Fig. 4 Dose effects of 4 minerals on the formation of CoQ₀

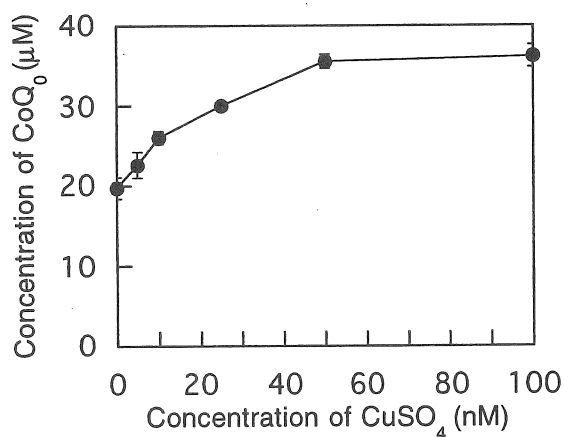


Fig. 5 Dose effects of cupric ion on the formation of CoQ₀

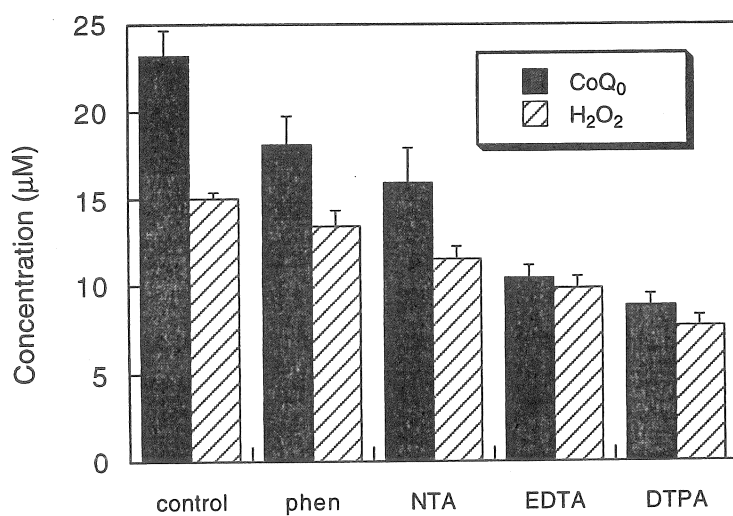


Fig. 6 Effects of chelators on CoQ₀ and H₂O₂ formation

3. 1. 3 キレート剤の影響

リン酸緩衝液中には鉄イオンをはじめとして様々な金属イオンが微量に含まれている。もしこのような金属イオンがユビキノールの酸化反応に関与しているとすれば、金属キレート剤の添加効果を受けるはずである。そこで4種類のキレート剤を用いて、ユビキノンと H_2O_2 の生成量に対する効果を調べた (Fig. 6)。

(図中の略号はそれぞれ、phen: *o*-phenanthroline; NTA: nitrilotriacetate; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; DTPA: diethylenetriaminepentaacetic acid を示す。) 概ねユビキノンと H_2O_2 の生成量は同じオーダーであり、キレート剤の添加により両者とも低下した。特に EDTA と DTPA の場合に酸化抑制効果が顕著であり、ユビキノンと H_2O_2 の生成量がほぼ同量となった。

3. 2 SOD のユビキノール酸化抑制作用

3. 2. 1 CuZn-SOD と Mn-SOD の効果

DTPA の存在下、CuZn-SOD はユビキノンと H_2O_2 の生成量を抑制した (Fig. 7(a))。また Mn-SOD も同様の抑制効果を示した (Fig. 7(b))。熱で不活化した両酵素に抑制活性がないことは、SOD のユビキノール酸化抑制作用がその酵素反応によることを示している。2種類の酵素で抑制効果に差がないことから、以後の実験では CuZn-SOD を用いることにした。またユビキノールとして CoQ_2H_2 を用いた場合にも同様の SOD による酸化抑制効果が得られている (データは省略)。

3. 2. 2 pH の影響

実験条件を ● : DTPA と SOD のどちらも添加しない場合、○ : DTPA を添加し、SOD を添加しない場合、▲ : DTPA と SOD のどちらも添加する場合の3種類に分けた。それぞれの条件で、pH を 6.9 から 7.4 まで 0.1 ずつ変えて、ユビキノンの生成量を調べた (Fig. 8)。どの条件でも、pH の上昇に伴ってユビキノンの生成量が増大した。また pH 7.3 以上では、3条件における生成量の差がほとんどなかった。pH 6.9 から pH 7.2 まで DTPA 単独でユビキノールの酸化を抑制し、SOD の添加はその抑制効果をさらに著しいものにした。

3. 2. 3 DTPA と FeSO_4 の濃度比が SOD の添加効果に与える影響

CuZn-SOD と Mn-SOD が DTPA の存在下でユビキノールの酸化を抑制することをすでに述べたが、DTPA の非存在下では SOD はわずかながら酸化を促進した。そこで、DTPA と FeSO_4 の添加量をそれぞれ変化させて、ユビキノンの生成量とそれに対する SOD の影響を調べた。まず FeSO_4 と SOD を添加せず、DTPA の濃度を変化させたところ (Fig. 9)、濃度依存的にユビキノンの生成量は減少した。さらに DTPA の濃度が 10^{-7} M 以上では SOD の添加によりユビキノンの生成量が対応する SOD 無添加群に対して減少し、SOD の抑制効果が認められた。一方、DTPA の濃度が 10^{-8} M 以下では、SOD の添加によりユビキノンの生成量がわずかながら増大した。次に DTPA の濃度を 10^{-6} M に固定し FeSO_4 を

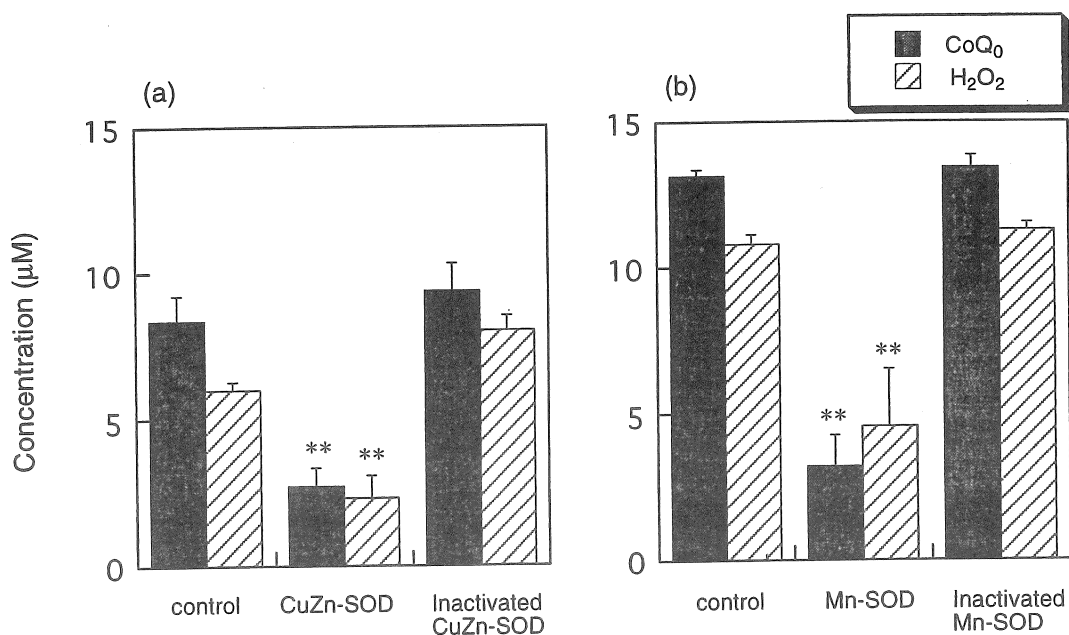


Fig. 7 Effects of SODs in CoQ₀ and H₂O₂ formation in CoQ₀H₂ solutions. CoQ₀H₂ solutions were incubated in the presence of DTPA. (a): Effects of CuZn-SOD (1 unit/ml) and the heat-inactivated CuZn-SOD. (b): Effects of Mn-SOD (1 unit/ml) and the heat-inactivated Mn-SOD. **Significantly different ($p < 0.01$) from the control.

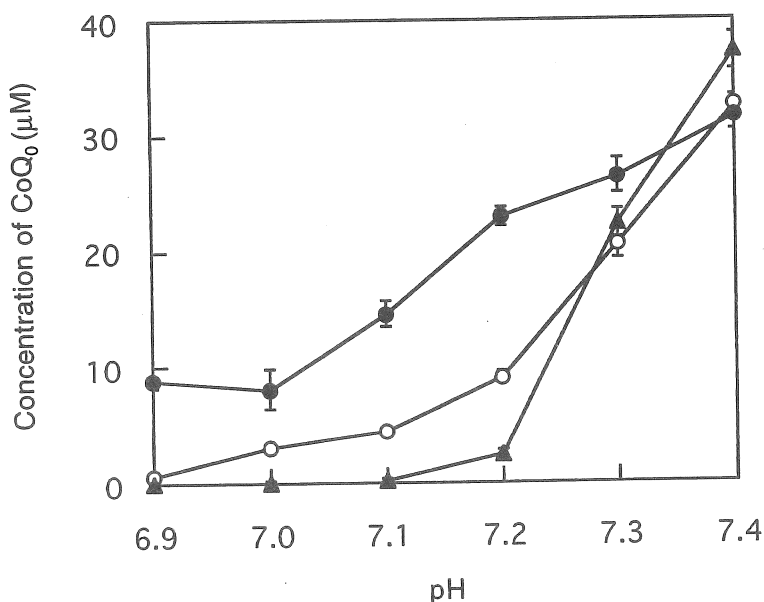


Fig. 8 pH dependence of CoQ₀ formation in CoQ₀H₂ solutions. ●, CoQ₀ concentration in the control solution in the absence of DTPA; ○, CoQ₀ concentration in the solution containing 10 μM of DTPA; ▲, CoQ₀ concentration in the solution containing 10 μM of DTPA and CuZn-SOD (1 unit/ml)

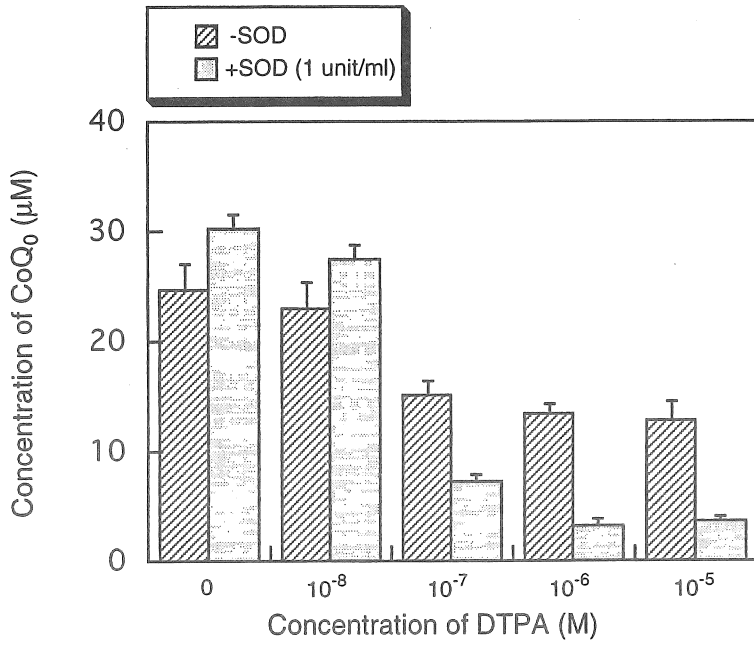


Fig. 9 Dose effects of DTPA on the CoQ₀ formation without addition of any FeSO₄.

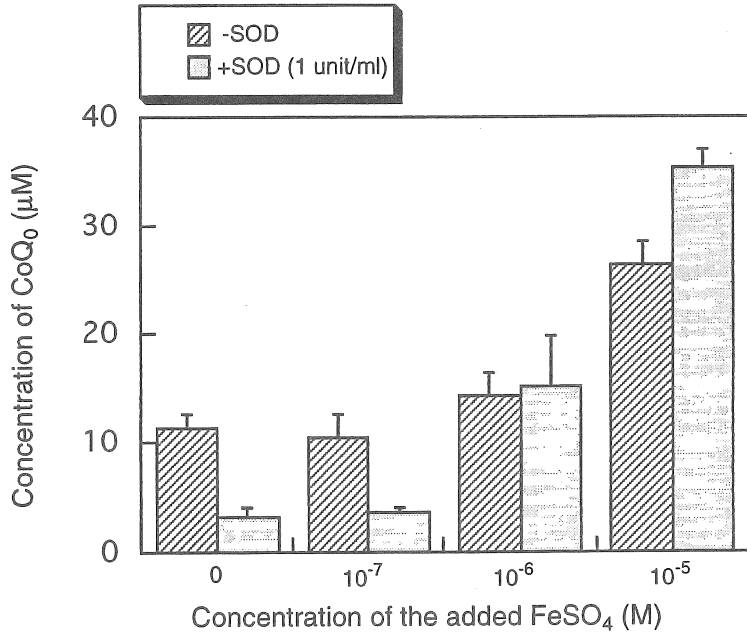


Fig. 10 Dose effects of FeSO₄ on the CoQ₀ formation in the presence of 10⁻⁶ M DTPA

3種類の濃度で添加したところ (Fig. 10)、 FeSO_4 を添加していない場合と 10^{-7} Mでは、SODによる酸化抑制効果が認められ、 10^{-6} Mでは、何の効果もなく、 10^{-5} Mではわずかながら酸化促進効果があった。

4. 考察

4. 1 ユビキノールの酸化機構

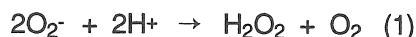
4. 1. 1 ミネラルが関与する酸化

用いた8種類のミネラルのうちマンガン・銅・鉄に酸化促進効果が見られた (Fig. 3,4,5)。銅は低濃度 (100 nM) で効果を示し、鉄はそれより高い濃度で効果があった。ただし FeSO_4 を添加しない系でも、鉄キレート剤であるDTPAなどの抑制効果が見られたことから (Fig. 6,8,9)、用いたリン酸緩衝液中に含まれる微量の鉄イオンがユビキノールの酸化を促進していると考えられる (Fig. 11のスキームD)。マンガンや銅の場合でも同様の酸化機構があると考えられる。

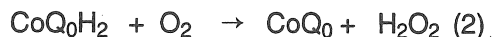
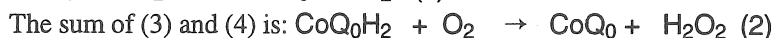
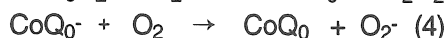
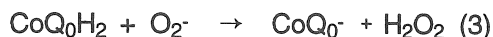
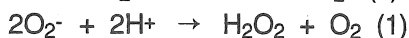
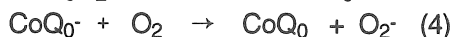
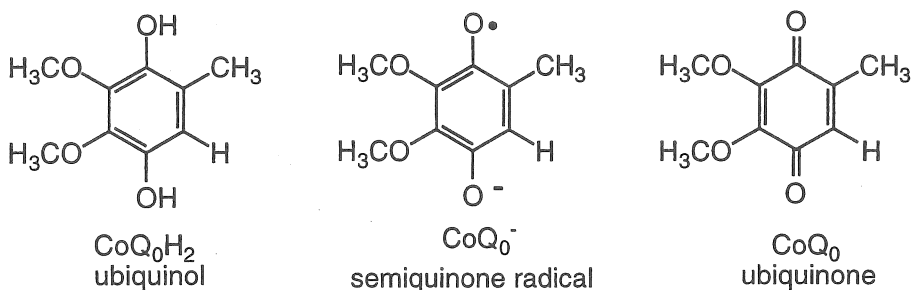
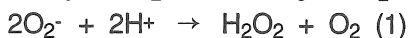
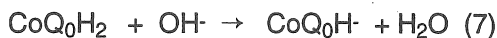
4. 1. 2 スーパーオキシドが関与する酸化

SODによるユビキノール酸化抑制効果は、DTPA添加時のみ観測された (Fig. 7,8,9,10)。効果発現のためには FeSO_4 非存在下でも一定濃度以上のDTPAが必要なことや (Fig. 9)、 FeSO_4 存在下ではその濃度以上のDTPAが必要なことは (Fig. 10)、反応液中に存在する鉄イオンをすべてキレートした場合にのみSODがユビキノールの酸化を抑制することを示している。したがってこの場合は Fig. 11のスキームDはあてはまらず、スキームCのようなメカニズムでユビキノールが酸化すると考えられる。すなわちユビキノールに最初に反応するのは O_2 であり、その結果ユビキノールのセミキノンラジカルと H_2O_2 が生成する (反応式(3))。次にセミキノンラジカルは酸素分子と反応し、ユビキノンと O_2 が生成する (反応式(4))。この O_2 は再び反応 (3) に使われ、結果としてユビキノールの連鎖的酸化反応が進む。もしこの反応系にSODが存在すると、反応式 (3) を阻害することにより連鎖反応の回転数を低下させ、結果としてユビキノールの酸化反応を抑制することになる。スキームEで示したアルカリ条件下での酸化メカニズムに関してはまだ不明の点があるが、スキームC,D,Eのいずれの場合も、酸化反応全体の収支は同じである。すなわちスキームBのように、1分子のユビキノールと1分子の酸素が反応し、1分子のユビキノンと1分子の H_2O_2 が生成する。したがってスキームCとDの違いは連鎖反応の連鎖媒体 (触媒) が鉄イオンと O_2 の違いによるという考え方もできる。研究目的のところで述べたように、酵素反応により H_2O_2 を生成するSODが、結果として H_2O_2 の生成を低下させるのは矛盾しているように見えるが、スキームCで示した連鎖反応の回転数を低下させると考えれば合理的な説明がつく。DTPAの非存在下でSODがむしろユビキノールの酸化促進作用を示すのは、スキームDの反応式(6)において、SODは平衡を右辺にずらすことにより Fe^{2+} の酸化を促進するためと考えられる。

A. Dismutation of superoxide



B. The observed overall reaction

C. CoQ_0H_2 oxidation driven by superoxide anion radicalD. CoQ_0H_2 oxidation driven by transition metal ionE. CoQ_0H_2 oxidation driven by alkaline conditionsFig. 11 Proposed schemes of CoQ_0H_2 oxidation for different mechanisms.

4. 2 SODの生物学的役割とそこに含まれるミネラルの進化論的意義

SODの真の生物学的な役割はまだ完全には明らかになっていない。²⁾ ただこの酵素を欠損した大腸菌・酵母・動物細胞の生存や増殖が好氣的条件下で止まってしまうことが、最近相次いで報告されている。^{3,4)} O₂の不均化反応は放置しておいても速く進むが、それをさらに促進する酵素がこれほど生命現象に不可欠であることは、(H₂O₂ではなく) O₂と直接反応する生体分子があり、その酸化反応が致命的であることを示唆している。ユビキノールはその一つの候補であり、ユビキノールの酸化反応にO₂が関与することはいままでにも示唆されてきたが、⁵⁾ 本研究により初めて化学的に証明されたことになる。

本研究により、ユビキノールの酸化反応に鉄、マンガン、銅などのミネラルが関与することが明らかになった。これらの金属はとりもなおさずSODの活性中心に存在するものであり、興味深い。進化的にはFe-SODが最初に細菌中に生まれ、その活性中心がマンガンに置き換わっていったとされている。したがって現在でも細菌中のFe-SODと真核細胞のオルガネラであるミトコンドリア中のMn-SODのアミノ酸配列には相同性がある。⁶⁾ 一方、海洋中の鉄イオンがすべて酸素分子によって酸化、沈殿した後、金属酵素の活性中心に銅が使われるようになったといわれているが、⁷⁾ SODの中でもCuZn-SODは進化の歴史の中では後発であり、真核細胞の細胞質等に存在し、Fe-SODやMn-SODとはアミノ酸配列に相同性はない。ユビキノールもミトコンドリアと細胞質の両方に存在しており、Mn-SODとCuZn-SODのいずれもが、ユビキノールの酸化反応を同様に抑制したことは(Fig. 7)、両者に共通の役割があることを暗示している。

5. 今後の課題

SODを欠損した、大腸菌・酵母・動物細胞の酸化傷害に、ユビキノールの酸化反応が関与していることを証明することが必要である。

なお本研究の一部は *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 2034-2038 (1997) に発表した。

6. 文献

- 1) T. Nakayama, Y. Enoki, and K. Hashimoto, *Food Sci. Technol., Int.*, 1, 65-69 (1995).
- 2) I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 272, 18515-18517 (1997).
- 3) A. S. Gort and J. A. Imlay, *J. Bacteriol.*, 180, 1402-1410 (1998).
- 4) V. D. Longo, E. B. Gralla, and J. S. Valentine, *J. Biol. Chem.*, 271, 12275-12280 (1996).
- 5) T-T. Huang, M. Yasunami, E. J. Carlson, A. M. Gillespie, A. G. Reaume, E. K. Hoffman, P. K. Chan, R. W. Scott, and C. J. Epstein, *Arch. Biochem. Biophys.*, 344, 424-432 (1997).
- 6) B. Frei, M. C. Kim, and B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4879-4883 (1990).
- 7) 浅田浩二、臨床検査、40, 137-145 (1996).
- 8) 落合栄一郎 (著)、生命と金属、共立出版、1991年。

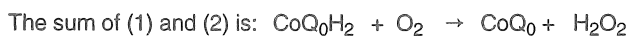
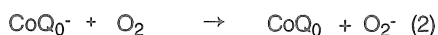
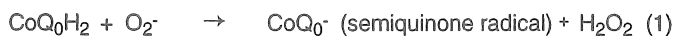
Effects of salts and minerals on SOD inhibition of ubiquinol oxidation

Tsutomu Nakayama, Shigenori Kumazawa

School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

Summary

Ubiquinone (CoQ₀ = 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were formed in the process of oxidation of ubiquinol (CoQ₀H₂ = 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-hydroquinone) in a phosphate buffer. Among eight mineral salts investigated, FeSO₄, MnSO₄ and CuSO₄ increased the ubiquinone formation. NaCl had no effect. Chelators such as DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) decreased the amount of ubiquinone and H₂O₂. This suggests that trace amount of Fe ion in the buffer increased the ubiquinol oxidation. The amount of H₂O₂ was almost equal to that of CoQ₀, indicating that the H₂O₂ formation was coupled with the CoQ₀ formation. Copper-zinc superoxide dismutase (CuZn-SOD) and manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), which accelerate the dismutation of superoxide ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), inhibited both the CoQ₀ formation and the H₂O₂ formation in the presence of DTPA. We propose that CoQ₀H₂ oxidation occurs as a chain reaction with superoxide (O₂⁻) as the chain carrier and that SOD inhibits this reaction by lowering the superoxide concentration.



It is interesting that the active sites of SODs consist of the minerals which increased the ubiquinol oxidation. In animal cells, Mn-SOD is located in the mitochondria, and CuZn-SOD is located in the cytoplasm. Ubiquinols are also located in both the mitochondria and the cytoplasm. Similar inhibitory effects of Mn-SOD on the CoQ₀ formation and the H₂O₂ formation at the same enzymatic activity as in the case of CuZn-SOD imply that these enzymes have a common antioxidative role in different parts of the cells.