

「分子状酸素」に関わり続けた48年の研究足跡

樋口 善博

(元) 鈴鹿医療科学大学 薬学部 特任教授

寄稿

「分子状酸素」に関わり続けた 48 年の研究足跡

樋口 善博

(元) 鈴鹿医療科学大学 薬学部 特任教授

キーワード： 分子状酸素, 酸素添加酵素, 酸化ストレス, DNA 損傷, 細胞死誘導, 老化

要旨

私の 48 年間の研究活動で、一貫したテーマである「分子状酸素（活性酸素）の生体反応における役割」に関して、その科学歴史的背景を踏まえつつ、特に酸化的細胞死誘導機構、そして人の寿命をコントロールしている仕組みを以下のテーマで経年的に紹介する。1) 分子状酸素取り込みの発見, 2) 酸素添加反応における電子授受機構の解析, 3) カビ代謝産物の代謝・生合成経路の解析, 4) 細菌由来の抗腫瘍性活性物質の探索, 5) Fenton 反応による酸素フリーラジカルの発生, 6) 神経系細胞における酸化的 DNA 損傷を介する細胞死誘導機構の解明, 7) 活性酸素による老化促進の原因解明

はじめに

平成 31 年 3 月末にて鈴鹿医療科学大学を退職しました。本学での 11 年間を含め、初めて研究に携わった 1971 年の金沢大学理学部での卒業研究から現在までの 48 年間の研究内容を振り返りつつ、「分子状酸素」をキーワードとして関わってきた具体的な研究テーマとその当時の研究背景について考察したい。

酸素は、地球上では 35 億年前より発生し始めたといわれている。やがて大気中の酸素濃度が上昇と下降を繰り返しながらオゾン層が形成された頃から濃度が安定し、以来現在に至るまで約 21% を保っている。酸素は、生物が生きて活動するために必要なエネルギー（ATP）を細胞内のミトコンドリアで作出すいわば燃料であり、生命にとって不可欠な分子である。その一方で、現代人の身体は、環境汚染や食品添加物、強い紫外線、ストレスなどで、活性酸素が多量に発生することによりそのダメージを強く受けている。このことが人間の寿命を決めている可能性がある。

1. 生体系における分子状酸素の取り込みの発見

1955 年に、日本の早石修博士（当時米国 NIH 研究員、後に京都大教授）と片桐正之博士（同所属、後に金沢大教授）ら¹⁾のグループ、及び米国の Mason ら²⁾の研究グループから同時期に独立して大きな発見が報告された。つまり、ピロカテカーゼ（ベンゼン環開裂酵素）がカテコールを酸素原子 2 個（放射性同位元素： $^{18}\text{O}_2$ ）で次のように分子状酸素の基質への直接の取り込み反応で酸化の開環することを明らかにしたのである。（図 1）

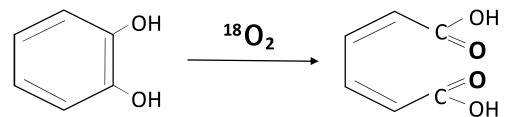


図 1. ピロカテカーゼによる分子状酸素を取り込むカテコール開裂反応

さらに、早石博士らは、空気中の酸素分子をトリプトファンに取り込んでいる酵素があることを発見し³⁾、これを「酸素添加酵素：Oxygenase」と名付け、トリプトファンの代謝経路を明らかにした。当時は、「分子状酸素が加わるのではなく、水分子の酸素原子が加わって水素がとれる（脱水素）」という概念が、1927 年にノーベル化学賞を受賞した大学者 Wieland⁴⁾ 以来の定説であった。早石教授らはこれに対して、生体酸化には、脱水素酵素による脱水素反応の他に、酸素添加酵素によって触媒される分子状酸素の添加反応があることを示したことになる。これは、それまでの教科書を書き変える大発見となり、早石教授らによる「酸素添加酵素群の発見と構造および生物学的意義の発見」³⁾ に対して、1986 年ウルフ賞医学賞が授与された。また、以後ずっとノーベル賞の候補にもあがっていた。酸素添加酵素は人間をはじめ、動・植物、微生物に広く分布し、アミノ酸や脂質、ホルモンや薬物・毒物の代謝に重要な役割を果たしている。代表的な酸素添加酵素としては、薬物代謝酵素であるチトクローム P450、サリチル酸水酸化酵素、プロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) など、現在では 100 種以上の酵素が知られている。そしてそれらの触媒反応機構は次の 2 群に分類される。

(1) 分子状酸素 (O_2) の酸素 1 原子を添加する反応を触媒する酵素群（モノオキシゲナーゼ）

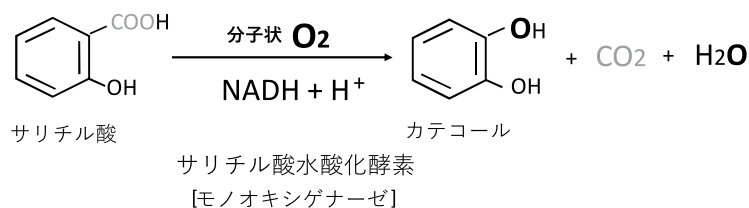
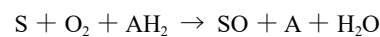
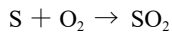


図 2. 緑膿菌由来サリチル酸水酸化酵素によるサリチル酸のカテコールへの酸素添加反応式

(2) 酸素 2 原子を添加する反応を触媒する酵素群 (ジオキシゲナーゼ)



チトクローム P450 は、1964 年に佐藤了博士 (当時大阪大教授, 元金沢大理学部化学科生物化学講座初代教授) らによって、肝臓のミクロゾームのホモジェネートに CO (一酸化炭素) を加えるとその酵素が着色し、波長 450 nm に最大の差スペクトルを示す物質があることが発見され、Pigment (色素) 450 という意味で命名された⁵⁾。サリチル酸水酸化酵素の場合は、酸素分子のうち 1 原子のみがベンゼン核に導入され、他の 1 原子は補酵素が受取る反応であり (図 2)、式のように基質と補酵素とを組合せて酸化するオキシゲナーゼを、特に混合機能 (mixed function) 型オキシゲナーゼと呼ぶ。

2. 酸素添加反応における電子授受機構の解析 (1971 年 - 1972 年)

私は、理学部化学科生物化学講座 (片桐正之; 当講座第 3 代教授) の下で卒業研究をさせて頂いた。そこでは、片桐教授らが 1955 年の酸素添加酵素を発見して以来、その酵素のタンパク化学解析が研究室の一大テーマであった。当時は、片桐教授らによって細菌 (*Pseudomonas*

putida) のサリチル酸水酸化酵素の精製とフラビン酵素としての性質が明らかにされていた^{6), 7)}。それで、私の卒業研究のテーマは、サリチル酸水酸化酵素反応における「基質-酵素 (補酵素) - 酸素 の三者複合中間体」を、精製した酵素標品を用いて、可視吸収スペクトル、および CD スペクトル法により、複合体形成時の電子授受の移動とセミキノン型の反応中間体の存否を確認し、その機構を解析することであった。その為には、キューベット型ツンベルグ管を用いて脱酸素 (脱気及び窒素ガス置換) した後、さらに徐々に酸素を取り入れる (添加) することが要求されるデリケートな実験であった。

3. カビの代謝産物の生体内生合成代謝経路の解析 (1972 年 - 1974 年)

大学院薬学研究科 (修士課程) では、ハウスダストに含まれているカビ (*Aspergillus terreus*) の代謝産物であり、喘息 (アレルギー性気管支肺アスペルギルス症) を引き起こす物質である Terremutin は、分子状酸素の 1 原子を添加するモノオキシゲナーゼなどによって代謝・生合成されることを示し、酸素添加酵素が真菌にも存在することを明らかにした⁸⁾。

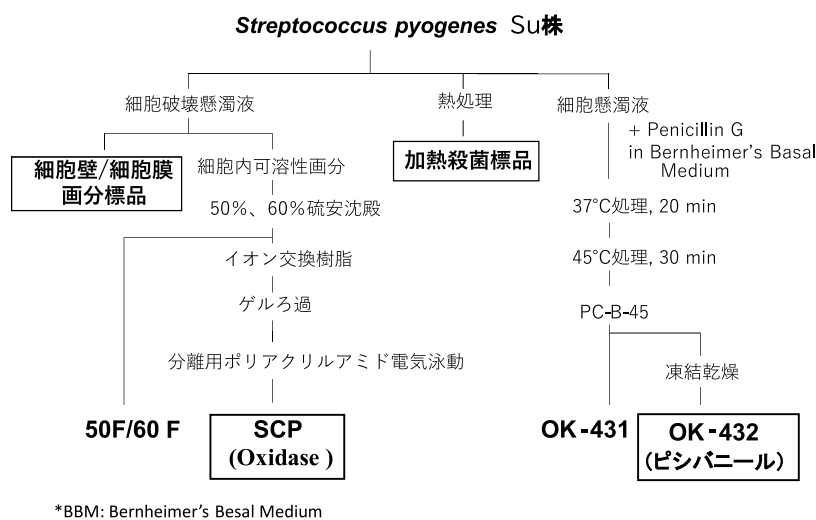


図 3. 緑膿菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来の各抗腫瘍活性物質の調整法¹⁶⁾

4. 細菌由来の抗腫瘍性活性物質の解析 (1974年—1991年)

1974年4月より金沢大学医学部薬理学教室の文部教官(助手)となり、職業人としての教育・研究生活がスタートした。

当時の薬理学教室は、岡本肇名誉教授(日本学士院賞を受賞)らが開発した溶血性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*, Su株)由来の免疫系細胞賦活性抗腫瘍製剤(OK432, ピシバニール)が認可され、臨床サイドに治験薬として応用されていた。生菌を特殊な培地とペニシリンG存在下で37℃及び45℃処理したもので、感染性は消失し免疫賦活性が増加することが明らかになり、外科療法、放射線療法、化学療法に続く、生物学的応答調節物質(BRM: biological response modifiers)と分類される新たな第4の癌免疫療法の先駆けとして注目された。一方で、癌化学療法剤のように直接的作用効果があるのではとの考えのもとで、細菌本体より目的の活性物質を単離・精製することが私の研究テーマでした。そこでこの課題をもって京都大学薬学部(山科郁男教授:元金沢大理学部化学科生物化学講座第2代教授)に国内留学をした。その結果、溶血性連鎖球菌由来成分として分子状酸素を取り込み H_2O_2 が発生する酵素(SCP oxidase)が関与していることを明らかにした^{9), 10)}。(図3)

5. Fenton 反応による酸素フリーラジカルの 産生 (1991年—1993年)

この頃、私は海外留学を希望し、米国西海岸の大学・研究機関の数か所に手紙を出した。その結果、「電磁波照射によるDNA損傷とその修復機構の解析」を主要なテーマとして精力的に研究を展開しているカリフォルニア大学バークレー校のStuart Linn教授からオファーがあり、客員研究員として家族とともに2年間留学することになった。当時、DNAのGuanine塩基は活性酸素により酸化され8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG)が産生し、生体の酸化ストレスマーカーとして利用され始めていた。留学先での研究テーマは、 H_2O_2 と生体内遷移金属、いわゆるFenton反応によって生ずる活性酸素($\cdot OH$)による



ミトコンドリアDNAの化学修飾化であり、新たな生成物質の探索とその産生機構を解明することができた¹¹⁾。

6. 神経系細胞における酸化的DNA損傷を介する 細胞死誘導機構の解明 (1993年—2000年)

高濃度のグルタミン酸は、神経系細胞であるグリア細胞に対して、Cystineの取り込みを司っているアミノ酸トラン

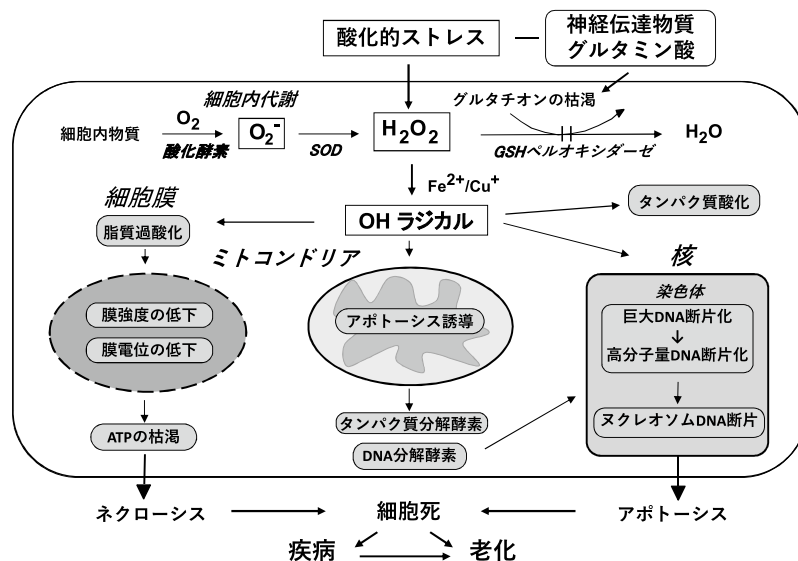


図4. グルタミン酸の酸化的ストレスによる細胞死誘導機構 (中華レストラン症候群誘因機構の樋口モデル)

ンスポーターを抑制し、細胞死を誘導することが 1980 年代半ばに明らかにされていた¹²⁾。そこで私はこの細胞死の分子機構を解析した。その結果、高濃度 (5mM) のグルタミン酸によって、グリア細胞で Cystine (Cysteine) から作られる還元型グルタチオン (GSH) の濃度が低下し、そのため細胞内で酸化還元状態のバランスが崩れ過酸化物が蓄積し、発生する活性酸素 (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$, 脂質ラジカル等) が染色体 DNA の損傷をもたらすことを明らかにした。この研究を進展させ確実なものにすることができたのは、パルスフィールド電気泳動装置を日本で初めて導入し、染色体巨大 DNA 断片 (1~10 Mbp) を単離、検出する方法を確立したことが大きかった¹³⁾。(図 4)

7. 活性酸素による老化促進の原因解明 (2000 年— 2019 年)

活性酸素によって細胞が酸化的傷害を受け、その過酸化物が蓄積するために老化が促進するという説は、1960 年代に登場し、老化メカニズムの“定説”になった。しかし、そう単純なものではないようであるが、私の分子レベルでの実験による細胞死誘導機構の解析研究が多少なりとも寄与したのではないかと自負している。

即ち、細胞内の活性酸素消去物質である還元型 GSH が減少すると、内因性の活性酸素が蓄積することにより、① ミトコンドリア膜損傷により ATP 産生が減少し、細胞内濃度レベルが低下する。② 染色体 DNA の損傷と NAD (損傷 DNA の修復に関与) の減少によって DNA 修復活性が減退する。③ 生体膜でおこる脂質過酸化反応が亢進し、それによる膜機能が減退する。④ 酸化タンパク質の増加・蓄積することで、細胞活性維持機構が減退する。

これらのメカニズムをグリア細胞とグルタミン酸を用いた実験系で解析し、「神経系細胞死誘導による老化促進機構」と「中華レストラン症候群発症機構」にも繋がるため、この細胞死誘導機構を「樋口モデル」と呼ばれるようになった^{14), 15)}。(図 4)

おわりに

研究者個人の研究テーマは、ちょっとしたきっかけ (要因で) 選ばれ、必然と偶然が重なりあってそれが継続するときに結果的にライフワークになると考えられる。そのテーマに出会った時期 (科学的時代背景)、興味 (関心) からくる憧れ、師と仰ぐ指導教授のライフワークが少なからずその要因となるかもしれない。小生について考えてみると、1970 年代、分子状酸素、細胞死誘導機構 (アポトーシス・ネクロシス)、金沢大学理学部 (片桐正之教授)、を挙げるができる。

最後に、この寄稿文執筆の機会を与えて頂いた研究紀要委員会 (委員長：鈴木宏治教授) に感謝いたします。

文 献

- 1) Hayaishi, O., Katagiri M., and Rothberg, S.: Mechanism of the pyrocatechase reaction, *J Am Chem Soc.* 1955; **77**: 5450-5451.
- 2) Mason HS, Fowlks WK, and Peterson E: Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J Am Chem Soc.* 1955; **77**: 2914-2915.
- 3) Hayaishi O: Biological oxidations. *Annual Rev Biochem.* **25**, 1962
- 4) He won the 1927 Nobel Prize in Chemistry for his research into the bile acids.
- 5) Omura T and Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem.* 1964; **239**: 2370-2378.
- 6) Yamamoto S, Katagiri M, Maeno H. et al. Salicylate Hydroxylase, a Monooxygenase Requiring Flavin Adenine Dinucleotide. I. Purification and general properties. *J Biol Chem.* 1965; **240**: 3408-3413.
- 7) Takemori S, Yasuda H, Mihara K, et al.: Mechanism of the salicylate hydroxylase reaction II. The enzyme-substrate complex, *Biochim Biophys Acta-Enzymology.*1969; **191**: 58-68.
- 8) Kiriyaama N, Higuchi Y, Yamamoto Y: Studies on the

- metabolic products of *Aspergillus terreus*. Structure and biosynthesis of metabolite of the strain ATCC 12238. Chem Pharm Bull. 1977; **25**: 1265-1272.
- 9) Higuchi Y and Shoin S: Purification and characterization of a novel cytotoxic substance from cell-free extract of *Streptococcus pyogenes*. Biochim Biophys Acta. 1988; **966**: 239-247.
- 10) Higuchi Y, Shoin S and Matsukawa, S: Active oxygen-mediated cytotoxic and antitumor actions of streptococcal cytotoxic protein. Jpn J Cancer Res (Cancer Science). 1990; **81**: 169-175.
- 11) Higuchi Y and Linn S: Purification of all forms of HeLa cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondria or cells. J Biol Chem. 1995; **270**: 7950-7956.
- 12) Bannai S: Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. J Biol Chem. 1986; **261**: 2256-2263.
- 13) Higuchi Y and Matsukawa S: Appearance of 1-2 Mbp giant DNA fragments as an early common response leading to cell death induced by various substances which cause oxidation stress. Free Radical Biol Med. 1997; **23**: 90-99.
- 14) Higuchi, Y. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. In APOPTOSIS 2003-From signaling pathways to therapeutic tools. Luxembourg, 2003.
- 15) Higuchi Y: (Review) Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. Biochem Pharmacol. 2003; **66**: 1527-1535.
- 16) Higuchi Y: (Review) Antitumor and biological effects of *Streptococcus pyogenes*. Trends in Cancer Res. 2006; **2**: 113-118.

Retrospective on the Roles of Molecular Oxygen in Biological Reactions, Chronicled over a 48-Year Research Career

Yoshihiro HIGUCHI

(Former)

Department of Molecular Pharmacology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Suzuka University of Medical Science

Key words: Molecular oxygen, Oxygenase, Oxidative stress, DNA damage, Cell death induction, Aging

Abstract

On March 31st, 2019, I retired from Suzuka University of Medical Science, ending a long career in scientific research that began in 1971 with my undergraduate thesis at Kanazawa University Faculty of Sciences. In the last 48 years, I have studied a variety of topics related to molecular oxygen in biological processes. In this retrospective, I will chronologically review my career works, which span the following topics: (1) the discovery of molecular oxygen uptake, (2) the electron transfer mechanism in mixed oxygenase reaction systems, (3) the metabolism of chemicals by oxygenases in fungi, (4) the screening of bacterial factors for potential antitumor activity, (5) the generation of oxygen free radicals by Fenton's reaction, (6) oxidative DNA damage due to glutamate-induced GSH depletion in glial cells and (7) the roles of molecular oxygen species in aging-related cellular processes.

略 歴

樋口 善博 (医学博士)

学 歴：

- 昭和47年 3月 金沢大学 理学部 化学科卒
49年 3月 金沢大学 大学院薬学研究科 修士課程修了
63年11月 医学博士(金沢大学)

職 歴：

- 昭和49年 4月 金沢大学 医学部(医学系研究科) 文部教官 助手
平成17年 4月 国立大学法人金沢大学 医学系研究科 助教
19年 3月 同 講師
20年 3月 同 退職
20年 4月 鈴鹿医療科学大学 薬学部 教授
26年 4月 同 特任教授
31年 3月 同 退職

併 任：

- ・昭和54年 4月 京都大学 薬学部 流動研究員(日本学術振興会) 「昭和55年3月まで」
- ・昭和63年 4月 北陸学院短期大学 食物栄養学科 非常勤講師 「平成20年3月まで」
- ・平成 3年 9月 アメリカ合衆国カリフォルニア大学バークレー校 客員研究員 「平成5年9月まで」
- ・平成 6年 4月 石川県立総合看護専門学校 非常勤講師 「平成20年3月まで」
- ・平成20年 4月 国立大学法人金沢大学 医学系研究科 協力研究員 「平成28年3月まで」
- ・平成22年 4月 国立大学法人三重大学 医学系研究科 非常勤講師 「平成27年3月まで」

受賞・招待講演：

- ・昭和54年 4月 日本学術振興会流動研究員研究助成
- ・昭和55年 9月 第2回基礎腫瘍学研究会研究助成
- ・平成 3年 8月 第5回北国がん基金海外派遣研究助成
- ・平成 5年 9月 第4回金沢大学老人医療基金研究助成
- ・平成 6年 9月 第9回医用薬物研究奨励富岳基金研究助成
- ・平成12年 7月 UNESCO/MCBN/COSTAM/SFRR Workshop in Malaysia 招待講演
- ・平成13年 6月 優秀発表論文賞 (Inter. Symposium on Natural Antioxidants in Beijing)
- ・平成15年 2月 Symposium “APOPTOSIS 2003” in Luxembourg 招待講演
- ・平成17年 6月 韓国東亜大学大学院(釜山) 招待講演

・平成17年10月 第19回北国がん基金研究助成

主な研究テーマ：

- ・活性酸素によるDNA損傷とその修復機構解明
- ・活性酸素によるプログラム細胞死誘導と老化機構の解明
- ・活性酸素を介する新規な抗腫瘍剤の開発
- ・環境汚染物質（ナノ粒子二酸化チタン）による細胞死誘導の解明