



## 脂質ラジカルとリポキシゲナーゼ作用

### 1. はじめに

リポキシゲナーゼは、動脈硬化、虚血再灌流障害、がん転移などの病態の誘導あるいは進展に重要な役割を演じる酵素群である。これらの疾患は酸化ストレス疾患として認識されており、フリーラジカルの関与が指摘されている。このフリーラジカル産生に関わるのがリポキシゲナーゼである。実際、ラジカルスカベンジャーであるプロブコールやエダラボン（商品名ラジカット）が、各々動脈硬化や脳梗塞における後遺障害を軽減することが知られている。しかし、これらのラジカルスカベンジャーが標的とするラジカル種については特定されていないのが現状である。リポキシゲナーゼは、哺乳類から植物に至るまで、幅広く存在する非ヘム鉄酵素であり、鉄を含む活性部位の構造は、種に関係なく保持されている。また、アラキドン酸への酸素の導入位置を別にするアイソザイムが複数存在する。リポキシゲナーゼ反応に関する研究は、長い歴史を有するが、今なお解明されていない問題が、反応産物である脂質ヒドロペルオキシドの位置特異性および立体特異性を厳密に規定している機序が確定していないことである。

### 2. 多価不飽和脂肪酸への酸素付加反応

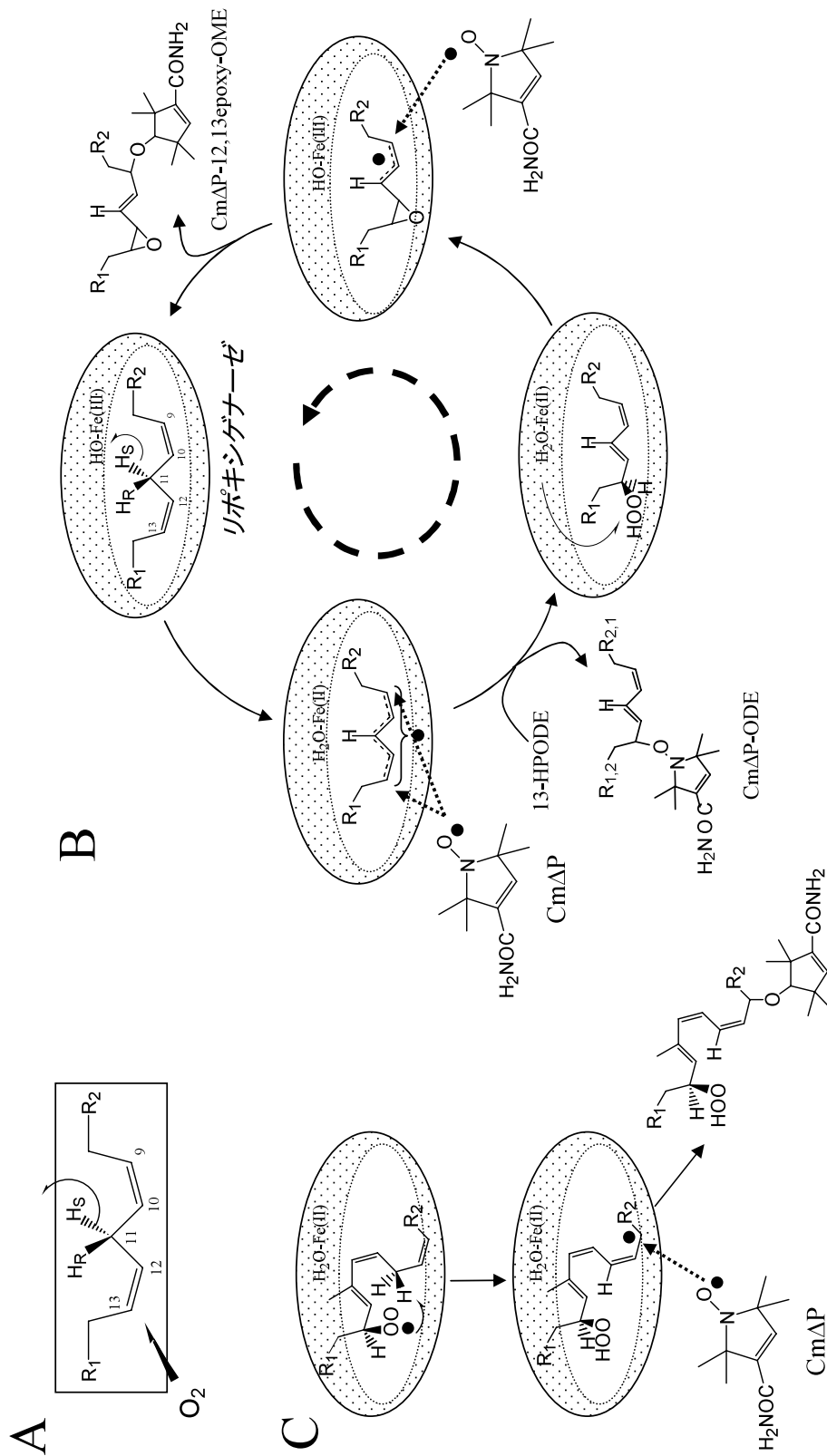
リポキシゲナーゼの中でも最も研究が活発になされてきた大豆リポキシゲナーゼ-1は、リノール酸の11位のメチレンからプロトンを引き抜き13位に酸素分子を導入し、13-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸(13-HPODE)を生成する。この反応の特徴は、リノール酸の11S位のプロトンを引き抜き、反応産物は13S-HPODEであることである(図1A)。この事実は、プロトンを引き抜く方向とは逆の方向から、酸素分子がC13位の炭素中心ラジカルを

攻撃することを意味する。リポキシゲナーゼ反応の初段反応では、プロトンの引き抜きにより、pentadienyl radical ( $-\cdot\text{CH}=\text{CH}=\text{CH}=\text{CH}=\text{CH}-$ )が生成する。不対電子はC13位とC9位に等頻度で存在することから、非酵素的に酸素分子が無秩序に炭素中心ラジカルと反応する場合には、生成物は、9S-, 9R-, 13S-および13R-HPODEの4種類が生成するはずである。

リポキシゲナーゼによるこの位置特異的な酸素付加反応を説明するには、酸素分子が脂肪酸鎖に対する特定の空間位置に固定されると考えるのが自然であるが、酸素分子が活性中心のアミノ酸や鉄イオンに結合することを示す証拠はこれまでのところ示されていない。現在提唱されている有力な仮説としては、(1)構造遮蔽仮説、(2)酸素通路仮説、(3)酸素ポケット仮説が挙げられる(総説参照<sup>1)</sup>)。構造遮蔽仮説では、pentadienyl radicalの近傍が込み合っており、酸素分子は、一部露出した炭素中心ラジカルにのみ攻撃ができるとするものである。酸素通路仮説では、酵素-pentadienyl radical複体の炭素中心ラジカルに酸素が到達し得る通路があり、通路の先の炭素中心ラジカルに出会い頭的に反応するとするものである。酸素ポケット仮説は、酵素の活性中心と脂肪酸鎖の間に酸素が1分子入ることができるポケットが存在し、このポケットに近接する炭素中心ラジカルに酸素が攻撃するとするものである。構造遮蔽仮説を支持する結果としては、大豆15-リポキシゲナーゼの活性中心のAla<sup>542</sup>(活性部位に結合したリノール酸のC9位に近接するアミノ酸残基)をGlyに置き換え、空間的にゆとりを持たせたリポキシゲナーゼにリノール酸を作用させると、13S-HPODEと9R-HPODEがほぼ等量生成することが示されている<sup>2)</sup>。これらの仮説は、反応産物の立体特異性を説明するのに適した仮説ではあるが、他方で疑問を投げかける結果も報告されている。アラキドン酸の13trans-アナログ体である5Z, 8Z, 11Z, 13E-20:4 $\omega$ 7を12S-リポキシゲナーゼに作用させて生じる産物は本仮説によれば12S-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸(12S-HPETE)となるはずであるが、実際には共役トリエン構造をとるheptatrienyl radicalの14位に酸素が付加して生成する14S-HPETEなのである<sup>3)</sup>。

### 3. 脂質アリルラジカル周囲の空間的遮蔽状況

これらの仮説はいずれも、酸素分子が自由に脂質アリルラジカルを攻撃できる状況にないことを意味している。これに対して、我々は、酸素分子に比べはるかに分子サイズの大きいニトロキシルラジカル3-carbamoyl-2,2,5,5-



## CmΔP-HPOTE

図1 リポキシゲナーゼ反応で生成する脂質由来炭素中心ラジカルのニトロキシラジカルによる捕捉反応。

A リポキシゲナーゼによるアリル水素引き抜きおよび酸素付加の空間特異性。

B 低酸素下、ニトロキシゲナーゼによるリポキシゲナーゼ活性部位の脂質アリルラジカルトラップ反応により駆動される、Fe(III)-リポキシゲナーゼ—

Fe(II)-リポキシゲナーゼ間の1電子レドックスサイクル反応。このサイクル反応一回転により、CmΔP-12,13epoxy-OMEが1分子生成する。

C リポキシゲナーゼ上のα-リノレン酸由来9-パーオキシラジカルは、活性部位内でC14位のアリル水素を引き抜き、生成する炭素中心ラジカルがニトロキシラジカルにトラップされる。この反応により共役トリエン構造が形成される。

tetramethyl-3-pyrroline-*N*-oxyl (CmΔP) を用いて、リポキシゲナーゼ反応で生成する炭素中心ラジカルのトラップ解析を試みた。嫌気的な条件下で、大豆 15-リポキシゲナーゼに、CmΔP 存在下リノール酸と 13-HPODE を作用させ、反応産物を LC-MS/MS-プレカサージオンスキニング法で解析したところ、9-CmΔP-ODE と 13-CmΔP-ODE がほぼ等量生成することが明らかとなった<sup>4)</sup>。興味深いことに、両産物の共役ジエン構造は共に *cis/trans* 体であった<sup>5)</sup>。一方、非酵素的にリノール酸の 11 位のプロトンを引き抜いて生じる脂質アリルラジカルをニトロキシルラジカルでトラップすると生成物は *trans/trans* 体である。この結果は、酵素-ラジカル複合体の炭素中心ラジカルをニトロキシルラジカルが直接トラップすることを意味する。

酵素-脂質アリルラジカル複合体のリポキシゲナーゼ中の鉄イオンは Fe(II) であり、ニトロキシルラジカルが酵素上のアリルラジカルをトラップすると、不活性型の Fe(II)-リポキシゲナーゼが遊離する。Fe(II)-リポキシゲナーゼを Fe(III)-リポキシゲナーゼに活性化する因子は、リポキシゲナーゼ反応産物である脂質ヒドロペルオキシドである<sup>6)</sup>。この活性化反応で、酸素中心ラジカルである脂質アルコキシルラジカルが生じるが、分子内転移によりエポキシド構造を形成すると共に、不対電子は炭素上に局在し炭素中心ラジカルとなる。ニトロキシルラジカルはこの炭素中心ラジカルをトラップし、9-CmΔP-12,13-エポキシオクタデカモノエン酸 (9-CmΔP-12,13epoxy-OME) と 11-CmΔP-12,13epoxy-OME を生成する。すなわち、嫌気的な条件下で、大豆 15-リポキシゲナーゼに、ニトロキシルラジカル存在下リノール酸と 13-HPODE を作用させることで、CmΔP-ODE と CmΔP-12,13epoxy-OME が等量生成することが明らかとなり、Fe(II)-リポキシゲナーゼ—Fe(III)-リポキシゲナーゼサイクル反応が回転していることが明らかとなった。一連の 1 電子レドックスサイクル反応を図 1B に模式的に示す。

ニトロキシルラジカル存在下、大豆 15-リポキシゲナーゼに  $\alpha$ -リノレン酸および 13-ヒドロペルオキシオクタデカトリエン酸 (13-HPOTE) を作用させると、上記現象と同様に CmΔP-オクタデカトリエン酸と CmΔP-12,13-エポキシオクタデカジエン酸が生成するが、興味深いことに、共役トリエン構造を有する CmΔP-HPOTE の生成が認められた。また、この反応は有酸素下で起こり得ることが明らかとなった。この構造体が産生されるためには、リノレン酸の C9 位に酸素が付加し、生成したペルオキシラジカルが C14 位のメチレンプロトンを引き抜き、C16 位に不対電子

が乗った炭素中心ラジカルが生成しなくてはならない (図 1C)。CmΔP-HPOTE はクロマトグラフィーにより単一ピークとして検出されることから、この分子内転移はリポキシゲナーゼの活性部位で起こっていることが示唆された<sup>7)</sup>。この結果より、リポキシゲナーゼの活性部位は、多価不飽和脂肪酸が隙間無く入り込む状況ではなく、かなり自由にコンフォメーションを変化し得るゆとりある空間であることが推察される。

#### 4. リポキシゲナーゼのレドックススイッチング

リポキシゲナーゼの関与が疑われている動脈硬化病変部、脳梗塞障害近傍、がん原発部位は比較的低酸素下にある。動脈硬化の誘導・進展では、リポキシゲナーゼの関与が示唆されているものの、関連アイソザイムに関しては、5-リポキシゲナーゼ、15-リポキシゲナーゼおよび 12-リポキシゲナーゼのいずれを阻害しても動脈硬化の誘導・進展が抑制される。では、これら酸化ストレス疾患を、リポキシゲナーゼを標的として制御するには、如何なる条件が必要かを列挙してみる。(1)低酸素環境下でリポキシゲナーゼを不活化するが好気下では不活化しない、(2)いずれのアイソザイムに対しても普遍的に作用する、(3)可逆的な阻害機構である、(4)急性毒性のみならず慢性毒性が無い。これらの条件から次のようなコンセプト、「慢性的な疾患に対して、病変部以外でリポキシゲナーゼ活性を阻害することなく、全てのアイソザイムの活性を抑制し、その一方、炎症反応の収束期に産生される抗炎症性メディエーターの産生を抑制しない」を考えた。我々は、これらの条件及びコンセプトを満たす機構として、低酸素下で、酵素-脂質アリルラジカル複合体の炭素中心ラジカルをラジカルスカベンジャーで 1 電子還元し、活性型 Fe(III)-リポキシゲナーゼを不活性型 Fe(II)-リポキシゲナーゼに変換するレドックススイッチング法の開発を目指して検討を試みている。

これらのラジカルスカベンジャーのスクリーニング法として、酵素-脂質アリルラジカル複合体の炭素中心ラジカルに対する、ニトロキシルラジカルとの競合作用を指標とする方法を確立した。基礎検討として、一般的な抗酸化物質に対して評価したところ、アスコルビン酸や  $\alpha$ -トコフェロール、各種チオールには競合作用は認められないものの、エダラボンおよびプロブコールに競合作用が認められた (図 2) (投稿準備中)。動脈硬化誘導の酸化ストレス仮説に基づき、内因性ラジカルスカベンジャーである  $\alpha$ -トコフェロールを用いた大規模臨床試験の結果が報告され

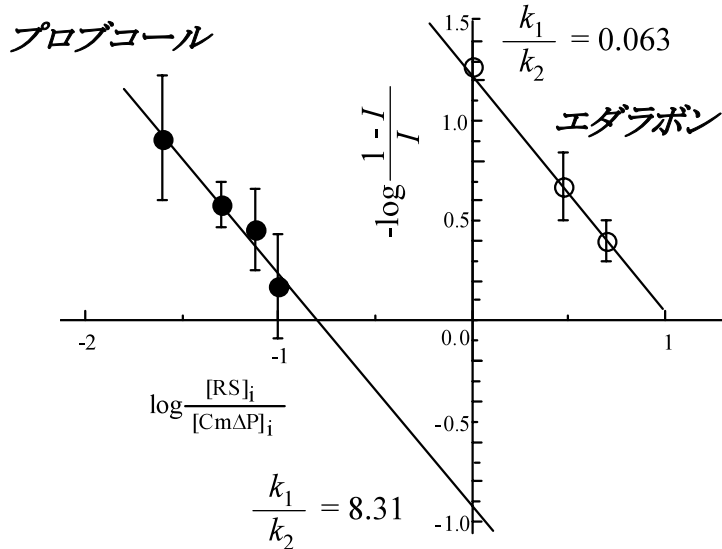
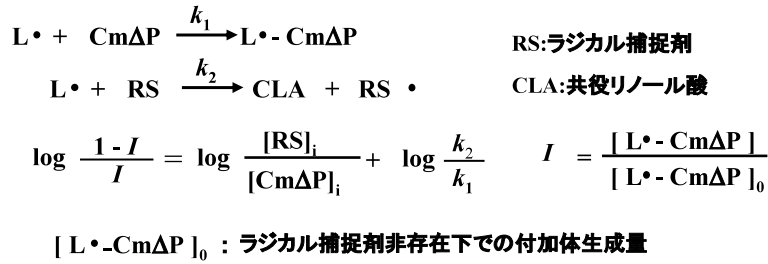


図2 抗酸化剤によるリポキシゲナーゼのレドックススイッチング活性評価。低酸素下、ニトロキシルラジカルによるリポキシゲナーゼ活性部位の脂質アリルラジカルトラップ反応速度 ( $k_1$ ) に対する、抗酸化剤と脂質アリルラジカルとの反応速度 ( $k_2$ ) の相対比より、競合的阻害効果を評価する。ニトロキシルラジカル初期濃度とラジカル捕捉剤の初期濃度比  $[\text{RS}]_i/[\text{Cm}\Delta\text{P}]_i$  を変えて、ラジカル捕捉剤の非存在下におけるニトロキシルラジカル-脂質アリルラジカル付加体生成量と存在下での付加体生成量の比  $I$  を求める。x-y 座標軸で、 $\log([\text{RS}]_i/[\text{Cm}\Delta\text{P}]_i)$  に対して  $\log\{(1-I)/I\}$  をプロットすると直線式となり、y 切片から反応速度比  $k_1/k_2$  を求めることができる。各種抗酸化剤について評価したところ、アスコルビン酸や  $\alpha$ -トコフェロールに活性は認められなかったが、プロブコールおよびエダラボンに活性が認められた。

ているが、残念なことに、 $\alpha$ -トコフェロールが動脈硬化の誘導・進展を有意に抑制するとの結果は得られていない。これに対して、抗酸化作用を有するプロブコールが、動脈硬化モデル動物において動脈硬化の誘導・進展を抑制することから<sup>8)</sup>、今回のスクリーニング結果との関連でたいへん興味を持たれる。余談ではあるが、ニトロキシルラジカルにこれら疾病に対する抑制作用が期待されるはずであるが、事実、モデル動物を用いた虚血再灌流障害などの酸化ストレス病態に対して抑制効果が報告されている<sup>9)</sup>。ただし、ニトロキシルラジカルは「膜透過性スーパーオキシド

ジスムターゼ様物質」として作用していると考えられている。

## 5. おわりに

リポキシゲナーゼ反応における反応産物の位置特異性ならびに立体特異性が、活性部位の脂質アリルラジカルを取り巻くアミノ酸残基の立体障害に司られているとする仮説に縛られてきた感がある。しかし、我々の結果は、この縛りから大きく放たれるものである。また、酸化ストレス仮説で悪玉と考えられているラジカル種として、ヒドロキシ

ルラジカル, スーパーオキシド, 脂質由来酸素中心ラジカル等が挙げられてきた。これらのラジカル種を不活性化する内因性ラジカルスカベンジャーであるアスコルビン酸や $\alpha$ -トコフェロールが酸化ストレス疾患の誘導を予防できないことに加え, これら疾患に有効なラジカルスカベンジャーの標的ラジカルが低酸素下におけるリポキシゲナーゼ-脂質アリルラジカル複合体であるとすると, これもまた, 古くからの“疾患とフリーラジカル”に対する知識の縛りから大きく放たれることになる。リポキシゲナーゼの活性を巧みに制御することで, 動脈硬化, 虚血再灌流障害, がん転移といった, 死因のトップ集団を走る疾病の予防が可能になるかもしれないという夢を持ちながら, この分野の研究を行っている。

- 1) Schneider, C., Pratt, D.A., Porter, N.A., & Brash, A.R. (2007) *Chem. Biol.*, 14, 473-488.
- 2) Coffa, G., Imber, A.N., Maguire, B.C., Lazmikanthan, G., Schneider, C., Gaffney, B.J., & Brash, A.R. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 38756-38766.
- 3) Labelle, M., Falgoutyret, J.P., Reindeau, D., & Rokach, J. (1990) *Tetrahedron*, 46, 6301-6310.
- 4) Koshiishi, I., Tsuchida, K., Takajo, T., & Komatsu, M. (2005) *J. Lipid Res.*, 46, 2506-2513.
- 5) Koshiishi, I., Tsuchida, K., Takajo, T., & Komatsu, M. (2006) *Biochem. J.*, 395, 303-309.
- 6) Takajo, T., Tsuchida, K., Ueno, K., & Koshiishi, I. (2007) *J. Lipid Res.*, 48, 1371-1377.
- 7) Takajo, T., Tsuchida, K., Murahashi, T., Ueno, K., & Koshiishi, I. (2007) *J. Lipid Res.*, 48, 855-862.
- 8) Kita, T., Nagano, Y., Yokode, M., Ishii, K., Kume, N., Ooshima, A., Yoshida, H. & Kawai, C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 5928-5931.
- 9) Rak, R., Chao, D.L., Pluta, R.M., Mitchell, J.B., Oldfield, E.H., & Watson, J.C. (2000) *J. Neurosurg.*, 92, 646-651.

輿石 一郎

(群馬大学医学部保健学科)

#### Lipid-derived radicals in lipoxygenase reactions

Ichiro Koshiishi (School of Health, Faculty of Medicine, Gunma University, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan)

## 神経シナプスにおけるポンプ活性非依存的なナトリウムポンプ

### 1. はじめに

ナトリウムポンプ (sodium pump, あるいは $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase) は, 原形質膜上に存在し, 細胞内外のイオン濃度勾配形成を司る中心的分子として古くから知られている。ATP1分子の加水分解から得られるエネルギーを用い, イオン濃度勾配に逆らって3個の $\text{Na}^+$ を細胞外に, 2個の $\text{K}^+$ を細胞内に輸送することで, 細胞内の $\text{K}^+$ 濃度を高く,  $\text{Na}^+$ 濃度を低く維持する。カルシウムポンプ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPase)やプロトンポンプ( $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPase)と同じP型ATPaseのタイプ2に属し, これらの分子と同様に二つの $\alpha$ サブユニットと二つの $\beta$ サブユニットが一つのポンプ分子を構成する。そのイオンポンプとしての作用機序や機能の重要性についての詳細はここでは割愛するが, 近年この分子がポンプ活性とは非依存的に, すなわちイオンポンプとは独立した機能を有し細胞内の様々な生理現象を制御することが分かってきた。本ミニレビューでは, 筆者らが発見した線虫 (*C. elegans*) のシナプスにおけるナトリウムポンプの新規機能に併せて, ヒト神経疾患に関しての最近の知見と神経細胞死抑制に対する役割について議論したい。これにより, 六十年に渡る長いポンプの研究から得られてきた概念を越えた, ナトリウムポンプの生体内, 特に神経系における役割についての理解が深まり, ナトリウムポンプ遺伝子上の突然変異が引き起こすヒト神経疾患の発症原因の解明に繋がれば幸いである。

### 2. 神経系におけるナトリウムポンプと線虫ポンプ変異体のシナプス伝達異常

細胞内外のイオン濃度勾配形成を司る中心的分子であるナトリウムポンプは, 脱分極あるいは過分極などによりイオン濃度勾配変化の多い神経細胞の機能維持には必須の分子である。ポンプの異常は強い神経機能の喪失を引き起こすが, 多くの場合でイオン濃度勾配変化による膜電位形成異常が原因と考えられてきた。しかしながら, その神経細胞内での分布パターンなど, 詳細な細胞・分子レベルでの解析は近年までほとんどなされていなかった。最近 Hilgenberg らによって, 哺乳類では四つあるナトリウムポンプ $\alpha$ サブユニットのうち, 脳特異的に発現している $\alpha 3$