

# 異なる筋のミトコンドリアにおける活性酸素消去活性について

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山下, 晴子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/36057">http://hdl.handle.net/2297/36057</a>

## 【緒言】

O<sub>2</sub>代謝過程において、約2~3%のO<sub>2</sub>が活性酸素種(ROS)に変換される(Reid, 2001)。微量のROSでは、生体内に備わる抗酸化機構によって消去・不活性化される(増田ら, 2002)。ROS生成量が抗酸化機構の許容範囲を上回った場合に酸化ストレスが生じる(Masuda et al, 2003)。

ところで、運動時にはO<sub>2</sub>摂取量が安静時の10~15倍になり、活動筋組織へのO<sub>2</sub>流量は安静時の数百倍に増大するため、ROSの産出量も増大する(Sen et al, 1994)。骨格筋においては、クエン酸合成酵素(CS)活性と電子スピン共鳴装置(ESR)によるROS消去活性との間に相関関係が認められていることから、酸化的リン酸化能力の高い筋組織では、ROS消去活性レベルも高いことが示唆される(Masuda et al, 2003)。さらに、収縮特性や代謝特性が異なる様々な筋におけるROS消去活性の違いが認められている(Masuda et al, 2003)。細胞におけるO<sub>2</sub>消費の大部分が、骨格筋内のミトコンドリア(mit)において行われるため、産出されたROSによるmit自身の損傷が危惧されるものの、ROS消去活性とmit容量との関連性については不明である。

ROSは非常に不安定な状態で存在しているために、直接的に観察することが難しい。現在、抗酸化能力を評価する方法の一つとして、ESRを用いた測定方法があり、ESRとスピントラップ剤の併用によりROSを化合物化して定量化することが出来る(Masuda et al, 2003)。

そこで本研究では、収縮特性・代謝特性の異なる筋でのROS消去能力の違いが、それぞれの筋に含まれるmitのROS消去能力と関連しているのかを明らかにするため、異なる筋から分画したmitのROS消去活性について、ESRとスピントラップ剤を併用した方法によって評価し、比較した。

## 【方法】

被験動物にはWistar系雄性ラット(n=10, age: 10 week old, body weight: 248.9±6.7 g)を用いた。被験部位としては心筋(Hrt)、ヒラメ筋(Sol)、腓腹筋(表層部(Gas-S)・深層部(Gas-D))、足底筋(Pla)を用いた。

筋重量を測定後、Homogenete Buffer(HB)を加えて希釈し、ホモジネートした。ホモジネートサンプルに遠心分離を行い、ミトコンドリアを抽出した後、吸光度を測定した。さらにウシ血清アルブミンを用いた検量線によって定量した。組織タンパク濃度の測定は、ホモジネートサンプルを希釈した後、mitと同様に定量した。

抽出したmitのスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性値の測定は、Masuda et al. (2003)やNoda et al. (1997)に従いながら測定した。抽出されたmitが入った専用セル内において、発生するO<sub>2</sub><sup>•-</sup>をDMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)でスピントラップして、そのスペクトルをESR(JES-TE25X, JEOL, 日本)によって直接的に測定した。さらに、濃度の異なるSOD(6.25, 12.5, 25, 50 U/ml SOD)を混和したときのESRスペクトルから、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>の消去率(DMPOとSODの競争反応)をSOD活性値([SOD])に換算するための回帰式とした。また換算した[SOD]を、mit量あたり([SOD/mit])、筋重量あたり([SOD/mw])に再計算した。

筋内の総グルタチオン濃度([total GSH])、還元型グルタチオン濃度([GSH])、酸化型グルタチオン濃度([GSSG])、グルタチオン酸化還元比([GSSG/GSH])の測定には、ホモジネートサンプルに除タンパク質を行った後、Glutathione assay kit

(Caymanchemical Co., Ann Arbor, MI) を使用し、405 nm の吸光度を吸光度計 (Ultrospec Visible Plate Reader Biotrak, Amersham Bioscience, Austria) により測定した。また各パラメータを、筋重量あたり ([total GSH/mw], [GSH/mw], [GSSG/mw]) に標準化した。

【結果】

・Sol の筋重量あたりの mit 濃度 ([mit/mw]) は、Gas-S および Pla のそれに比べて有意に高値を示した (p<0.01, 図1)。

・抗酸化物質における各パラメータの筋別比較を表1に示した。

Hrt および Sol の [total GSH] は、Gas-D、Gas-S および Pla のそれに比べて有意に高値を示した (p<0.01)。

Gas-D のそれは、Pla のそれに比べて有意に高値を示した。 (p<0.01)。

Sol の [total GSH/mw] は、Gas-D、

Gas-S および Pla のそれに比べて有意に高値を示し、Hrt のそれは、Gas-S および Pla のそれに比べて有意に高値を示した (p<0.01)。また、Gas-D のそれは、Pla のそれに比べて有意に高値を示した (p<0.01)。

Hrt および Sol の [GSH] は、Gas-D、Gas-S および Pla のそれに比べて有意に高値を示した (p<0.01)。Sol の [GSH/mw] は、Gas-D、Gas-S および Pla のそれに比べて、有意に高値を示した (p<0.01)。また Hrt のそれは、Pla のそれに比べて有意に高値を示した (p<0.01)。

Hrt の [GSSG] は、Gas-D、Gas-S および Pla のそれに比べて、有意に高値を示した (p<0.01)。Sol のそれは、Gas-S および Pla に比べて有意に高値を示し (p<0.01)、Gas-D のそれは Pla に比べて有意に高値を示した (p<0.05)。Hrt、Sol および Gas-D の [GSSG/mw] は、Gas-S および Pla のそれに比べて有意に高値を示した (p<0.01)。

[GSSG/GSH] はいずれの筋間にも有意差は認められなかった。

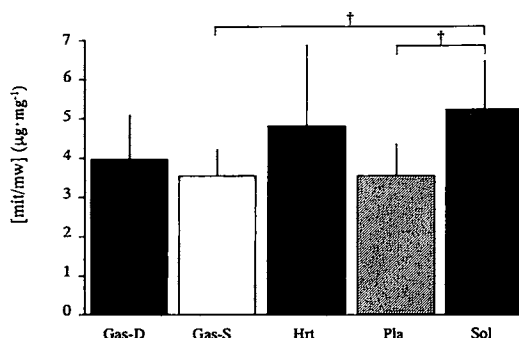


図1. 異なる筋における筋重量あたりのmit濃度の比較。

表1. 抗酸化物質濃度の筋別比較

	Gas-D	Gas-S	Hrt	Pla	Sol
n=	10	10	10	10	9
[total GSH] (μM)	1060.46±216.50 ** ††	881.86±372.93 ** ††	1785.61±225.29	617.63±162.94 ** †† ##	1829.60±175.30
[total GSH/mw] (μM·mg <sup>-1</sup> )	26.11±4.37 ** ††	17.85±6.89 ** ††	33.85±4.82	13.97±3.12 ** †† ##	39.23±10.25
[GSH] (μM)	764.91±208.64 ††	729.52±399.26 ††	1268.87±218.08	485.44±166.58 ** ††	1442.46±279.45
[GSH/mw] (μM·mg <sup>-1</sup> )	18.79±4.37 **	14.82±7.60 ** ††	24.01±4.14	11.03±3.45 ** †† #	31.32±11.00
[GSSG] (μM)	295.54±57.12	152.34±83.10 ** †† ##	516.74±96.10	132.19±43.46 ** †† ##	387.15±182.20
[GSSG/mw] (μM·mg <sup>-1</sup> )	7.32±1.37	3.03±1.42	9.83±2.06	2.95±0.69	7.91±2.94
[GSSG/GSH]	0.41±0.13	0.27±1.89	0.42±0.10	0.31±0.14	0.30±0.21

平均値±標準偏差. アスタリスク (\*), ダガー (†), シャープ (#) は、筋間における有意差を示している (\*\*: p<0.01 vs Hrt, ††: p<0.01 vs Sol, #: p<0.05 vs Gas-D, ##: p<0.01 vs Gas-D)。

・ESR に用いたサンプル内の mit 量 ([mit in ESR sample]) と [SOD] との間に、有意な正の相関関係が認められた (r=0.56, p<0.01, 図2-A)。

[mit/mw] と [SOD/mit] との間に、有意な負の相関関係が認められた ( $r=-0.74$ ,  $p<0.01$ , 図2-B)。

[mit/mw] と [SOD/mw] との間に、有意な正の相関関係が認められ ( $r=0.41$ ,  $p<0.01$ )、Hrt の [SOD/mw] は Pla のそれに比べて有意に高値を示した ( $p<0.01$ , 図2-C)。

【考察】

本研究において、筋間での [mit/mw] を検討した結果、Sol が Gas-S および Pla に比べて高いことが認められた (図1)。Sol は、その大部分を Type I 線維が占めており、Type I 線維は収縮速度が遅く ATPase 活性やクレアチンリン酸の貯備量は低い、酸化系酵素活性や毛細血管密度、ミオグロビン含量、ミトコンドリア密度が高い (大石, 1993)。このため、本研究の結果は、先行研究を支持するものと思われる。また、心筋の ATPase 活性は比較的低く、収縮蛋白系は骨格筋の遅筋線維と類似している (金尾と稲木, 1993)。しかしながら、Hrt の [mit/mw] は、いずれの筋のそれとも有意差が認められなかったため、さらなる検討が必要であると考えられる。

抗酸化物質濃度に関する本研究の結果、Hrt と Sol において GSH 濃度が高く、酸化能力の高い筋組織では、GSH 濃度が高い傾向にあった。GSH 量は組織によって様々であり、組織の機能や酸化能力に依存している (Halliwell and Gutteridge, 1989)。本研究の結果は、この先行研究を支持するものと示唆される。

また、細胞は、GSSG/GSH 比の維持、酸化ストレスの緩和のために、GSSG を GSH に還元する能力に優れている (Meister and Anderson, 1983)。この機能は、心臓、骨格筋においても報告されている (Sen et al., 1993)。本研究では、Hrt、Sol、Gas-S、Gas-D、Pla における GSSG/GSH 比は、収縮特性や代謝特性による違いを示さなかったことから、GSSG/GSH 比は、細胞内で一定に維持されていると示唆される。

本研究において、mit 濃度の高い筋では、SOD 活性値も高い傾向が認められた (図2-A, C)。CS 活性と SOD 活性には有意な相関関係が認められており、酸化能力の高い筋では、SOD による ROS 除去活性が高い (Masuda et al., 2003)。また、ミトコンドリアスー

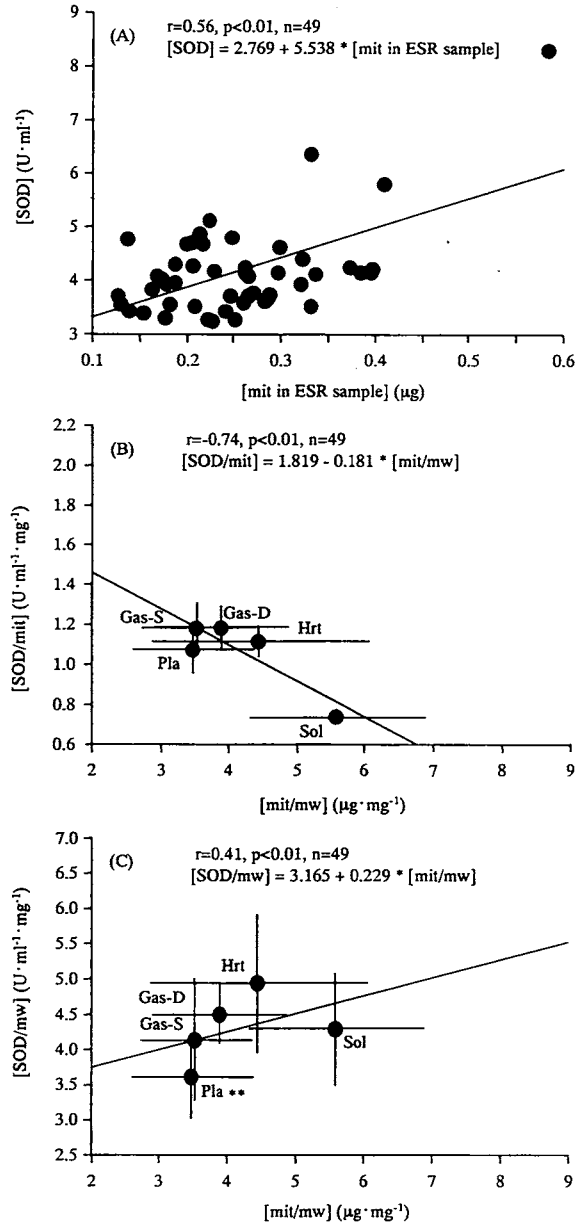


図2. ミトコンドリアと活性酸素消去活性の関連性.

パーオキシドジスムターゼは、cytochrome oxidase 活性とも関連しているため、mit 量の多い筋細胞では、SOD 活性が高い (Leary et al., 2003)。本研究の結果は、mit 量が多いことによって SOD 酵素量も多くなることを示唆しており、これらの先行研究を支持するものと思われる。しかしながら、[SOD/mw] を筋間で比較すると、Hrt と Pla についてのみ有意差が認められた (図 2-C)。骨格筋における抗酸化酵素活性は、筋の代謝特性によって非常に異なるため (Masuda et al., 2003)、さらなる検討が必要であると考えられる。

また本研究において、mit 濃度の高い筋ほど [SOD/mit] に低下傾向が認められた (図 2-B)。Sol における CS 活性と SOD 活性値は、運動時間および強度に伴って上昇する (Powers et al., 1994)。しかしながら、Gas-S の CS 活性は強度に応じて上昇するものの、その SOD 活性はトレーニング時間に伴って低下する (Powers et al., 1994)。このため Gas-S においては、mit 量が増加するにしたがい [SOD/mit] が低下する傾向にあると推察される。運動トレーニングは、酸化能力の高い筋においてのみ選択的に SOD 活性値を上昇させ、酸化能力と抗酸化酵素活性は必ずしも平行して上昇するわけではない (Powers et al., 1994)。本研究の結果はこの先行研究を支持するものであり、酸化的リン酸化能力と [SOD/mit] は、必ずしも平行して高値を示すわけではなく、筋の特性に応じて特異的であることが示唆された。

#### 【参考文献】

- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nd ed). pp. 136-158. Oxford: Clarendon Press.
- 金尾洋治, 稲木光晴. (1993) 骨格筋の構造と機能. In *運動生理学20講* (edited by 勝田茂), pp. 54-62. 東京: 朝倉書店.
- 増田和実, 田辺解, 久野譜也. (2002) 運動と酸化ストレスと健康. *筑波大学体育科学系紀要* 25: 1-11.
- Masuda, K., Tanabe, K., Kuno, S., Hirayama, A. and Nagase, S. (2003) Antioxidant capacity in rat skeletal muscle tissues determined by electron spin resonance. *Comp. Biochem. Physiol. Pt. B Biochem. Mol. Biol.* 134: 215-220.
- Leary, S. C., Lyons, C. N., Rosenberger, A. G., Ballantyne, J. S., Stillman, J. and Moyes, C. D. (2003) Fiber-type differences in muscle mitochondrial profiles. *Am. J. Physiol.* 285: R817-R826.
- Meister, A. and Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 711-760.
- Noda, Y., Anzai, K., Mori, A., Kohno, M., Shinmei, M. and Packer, L. (1997) Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochem. Molecul. Biol. Int.* 42: 35-44.
- 大石康晴. (1993) 骨格筋の構造と機能. In *運動生理学20講* (edited by 勝田茂), pp. 1-8. 東京: 朝倉書店.
- Powers, S. K., Griswell, D., Lawler, J., L. L., Martin, D., Herb, R. A. and Dudley, G. (1994) Influence of exercise intensity and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 266: R375-R380.
- Reid, M. B. (2001) Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.* 90: 724-731.
- Sen, C. K., Rahkila, P. and Hanninen, O. (1993) Glutathione metabolism in skeletal muscle derived cells of the L6 line. *Acta Physiol. Scand.* 148: 21-26.
- Sen, C. K., Rankinen, T., Vaisanen, S. and Rauramaa, R. (1994) Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation. *J. Appl. Physiol.* 76: 2570-2577.