HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	酸化的ストレスによる細胞死とエネルギー代謝
Author(s)	中村, 正雄; 西村, 吾朗; 野村, 保友; 神, 隆
Citation	電子科学研究, 2, 42-46
Issue Date	1995-01
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/24304
Type	bulletin (article)
File Information	2_P42-46.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

酸化的ストレスによる細胞死とエネルギー代謝

中村正雄，西村吾朗，野村保友，神　隆

酸化的ストレスの発生とその障害の機序をあきらかにするために，ここでは虚血再灌流時の各細胞下画分の酵素活性や酸化状態，特にミトコンドリアのエネルギー状態を in vitro あるいは in vivo で評価した。以下のことが明らかになった。

(1) 低酸素時に高いミトコンドリア膜電位を維持した。

(2) 細胞膜のキノン還元系の中で DT- diaphorase の相対活性は高く，酸化的ストレスに対する細胞レベルの防御系として重要な役割を果たしていた。

(3) 脳ミトコンドリアは虚血再灌流と同様に低酸素時の神経活動の活性化によって脱共役した。

はじめに

生体に生じる還元酸素種生成に基づく酸化的ストレスと種々の疾病，発癌，老化との関連が強く示唆されている。これは還元酸素種の生成により開始するラジカル連鎖反応で，この結果，生体膜や核酸が酸化的修飾を受ける為と考えられている。急激な酸化的ストレスとしては手術や臓器移植時の虚血—再灌流障害があげられ，多くの研究がなされている。現在，虚血時の障害についての解析が進んでいるが，再灌流時直後の障害は酸素パラドックスや抗酸化物パラドックスの言葉で述べられる様に不明な点が多い。虚血状態で細胞はエネルギー枯渇による還元障害を起こし，再灌流により酸素が流入すると還元酸素種の生成が起こり不可逆的な酸化的障害が進行し，細胞死に至ると推察されている。虚血時の肝細胞ではエネルギー状態が回復すると Ca^{2+} が過剰にミトコンドリアへ再流入し，これにより障害が起こるとされるなど，最近では臓器の再灌流障害は Ca^{2+} の動態を中心に語られることが多い[1]。

しかし提案されたスキームに多くの問題点が指摘されており[6]，大きく三つに分類される。(1)虚血時間が再灌流時の回復に影響するが，特に虚血後短時間に起こるイベントについて一致した見解が得られていない。(2)再酸素化直後に発生すると考えられる酸素ラジカルの生成は，スピントラップ法で試みられているが，スピントラップ剤そのものの不安定さなどからいまだに確証はない。またキサンチンオキシダーゼは本来脱水素酵素型であり，SH 基が修飾されることで酸化型酵素になってスーパーオキサイドを生成するとされているが，本酵素の活性が低い臓器もありこれだけでは説明できない[7]。(3)通常この種の研究は個々の細胞について調べられており，細胞間で統合された機能との関連で議論されることは少ない。

本研究では物質代謝，エネルギー代謝の活発な遊離肝細胞において酸化的ストレスにより細胞のエネルギー状態がどう変化し，どのような障害を経て細胞死に至るかを明らかにし，さらに細胞機能が統合された灌流脳に対する影響を検討する。

実験方法

(肝細胞の調製) 市販飼料で飼育した 7 − 8 週齢の雄ウィスター系ラット (180−240 g) にウレタン麻酔した (180 mg ethylcarbamate/100 g body weight)。Andersson らの方法[1] により，肝細胞を分散したが，酵素灌流液にはヒアルロニダーゼを用いなかった。0.3%トリパンブルーの排除テストによると，用いた単離肝細胞の viability は 90%以上であった。インキュベーションは温度 37°C，ガス組成 95% O_2 + 5% CO_2 の条件で行った。Modified Krebs-Ringer bicarbonate buffer (120 mM NaCl，4.8 mM KCl，1.3 mM $CaCl_2$，1.2

mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 24 mM $NaHCO_3$) を用いた。

(肝ミトコンドリアの調製) ラット肝ミトコンドリアを常法に従い，0.25 M sucrose と 2 mM K-Hepes を含む buffer (pH 7.4) で単離した。タンパク濃度はウシ血清アルブミンを対照として Lowry 法により定量した。

(灌流脳の調製) Inagaki and Tamura[5] の方法に従い，外頚動脈を結札し血流を保つため内頚動脈にバイパスカテーテルを挿入した。カテーテルから 6 ml/min の流速でフルオロカーボン (FC 43) を灌流した。5 時間以上 α 波と β 波を主体とする脳波が維持された。

(測定方法) ミトコンドリアと肝細胞のローダミン 123 によるミトコンドリア膜電位，灌流脳のチトクロームオキシダーゼの吸収測定は酸素電極をセットしたユニソク NIR-1000 四波長分光光度計により行った。細胞下画分のキノン還元反応は島津二波長分光光度計により測定した。還元酸素種の生成はスピントラップ剤 DMPO を用いて ESR バリアン E-109 B により測定した。

結果と考察

(嫌気時のミトコンドリア膜電位) ローダミン 123 はミトコンドリアの膜電位 (ATP 生成能を反映する) に依存して吸収及び励起発光スペクトルが変化することが知られている[3]。最近 Andersson ら[1] は単離肝細胞を用いて，再酸素化の際 ATP 濃度や酸素消費速度などのパラメータをほぼ回復できる無酸素状態 30 分後の変化をしらべた。酸素が欠乏することにより細胞質のリン酸化ポテンシャルは劇的に低下するが，ミトコンドリアでの ATP 生成能を反映するその膜電位は 18%の減少にとどまった。ここでは従来の研究に対し，酸素欠乏 30 分以内の比較的早い応答を明らかにするために，ローダミン 123 を用いてミトコンドリア膜電位の変化をしらべた。

図 1 は State 3 呼吸から嫌気になったときのエネルギー状態を示している。好気状態の呼吸活性測定の際，ADP の添加に対しすばやく膜電位が応答した。これはローダミン 123 の取り込みあるいは放出がミトコンドリアのエネルギー状態の変化とともに迅速に行われることを示している。嫌気状態で二つの点が注目された。(1)チトクロームオキシダーゼが還元される酸素濃度で

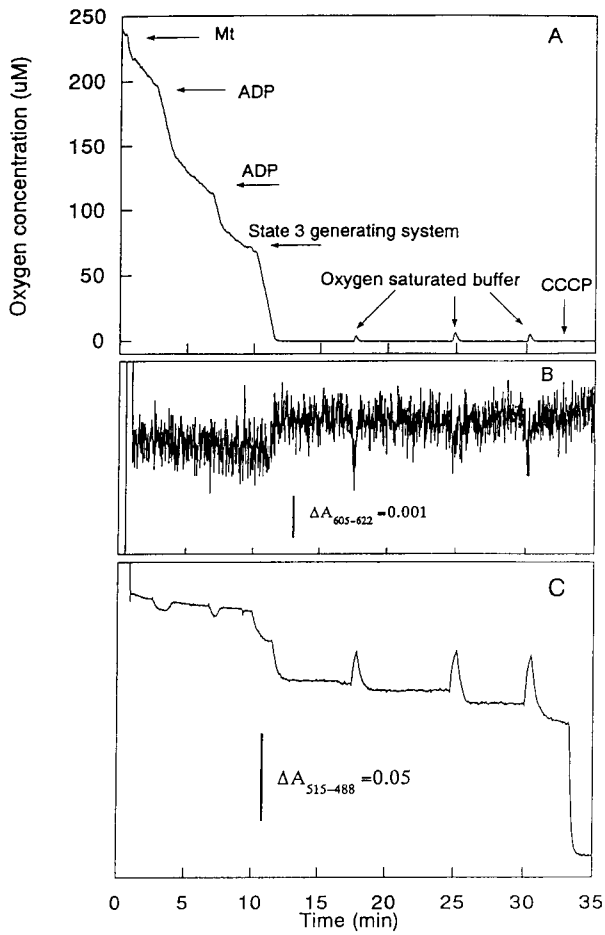

図 1 State 3 呼吸から嫌気状態になったときの単離ミトコンドリア懸濁液におけるチトクロームオキシダーゼの還元を伴うローダミン 123 の吸光度変化。ミトコンドリア 0.9 mg protein/ml と 1 μM RH 123 以外の実験条件は本文参照。

ミトコンドリア膜電位はすばやく 20%低下し，数分で一定になりその後維持されたことと，(2)再酸素化によりその膜電位が復活したことである。詳細に検討するために State 4 呼吸から嫌気になったときの変化と比較した。State 3 呼吸から嫌気になった時とは対照的に State 4 の場合，嫌気状態で膜電位は変化しなかった。この傾向は 30 分以上嫌気を維持しても観察された。State 4 の条件は好気ばかりではなく嫌気でも充分な ATP が反応液中で酵素的に供給されており，ミトコンドリアは外液から得た ATP により膜電位の低下を回避したと考えられる。一方 State 3 の条件では外液の ATP は常に分解されており，その嫌気状態では呼吸による ATP 生成は停止している。したがって嫌気の際のすばやい約 20%の膜電位低下は呼吸により生

成していたATPの供給停止に帰属され，その後維持された膜電位はミトコンドリア内膜のイオン輸送を阻害するようなイオン透過性の劇的な低下によると考えられた[9]。

（細胞下画分によるキノンの一電子及び二電子還元）フラビン蛋白は電子供与体に対して特異性が高いが電子受容体は幅広く利用できる。NADPH-P 450 reductaseやNADH-b_5 reductaseはキノンの一電子還元を触媒するがDT-diaphoraseは二電子還元であることが知られている。セミキノンによる酸素ラジカル生成はセミキノンの酸化還元電位から説明されている。NADPH-P 450 reductaseによるメナジオンを介した酸素の一電子還元はチトクロームC法あるいはESRによって明らかにされている。DT-diaphoraseによるキノンの還元から生成したハイドロキノンは酸素と反応してスーパーオキサイドを生成するが，pH依存性が高く中性ではこの反応は非常に遅い。Ernsterら[4]はDT-diaphoraseがすべての細胞下画分に存在することを示した。

図2はミクロソームによるキノンの還元を介した酸素ラジカルの生成を表わしている。ミクロソームのNAD(P)H-メナジオン還元反応によってスーパーオキサイドが生成することはESRのDMPO-OOHシグナルから確認された。細胞膜からはDMPO-OOHとDMPO-OHの両方のシグナルが観察されたが，シグナル強度からスーパーオキサイドの生成はミクロソームの1/10程度と計算された。

水酸ラジカルは強力な酸化剤であり生体分子との反応性が高いがその生成過程は不明な点が多い。セミキノンとH_2O_2の反応や微量金属の触媒作用によるとされているが論争中であり，本研究では細胞膜によるNADH酸化反応でキレーターを添加してもDMPO-OHのシグナルは観察された。水酸ラジカルはグルタチオンペルオキシダーゼなどの還元系と微量金属により生成すると考えられる。

図3は細胞下画分によるNADPH-メナジオン還元活性に及ぼすジクマロールの影響を表わしている。ミクロソームと細胞膜の活性の65%以上はジクマロールによって阻害されたが，両画分のメナジオンを介した酸素ラジカル生成は変化しなかった。細胞質では酸素ラジカルの生成は認められず，メナジオンの還元反応自体はDT-diaphoraseの阻害剤ジクマロールによ

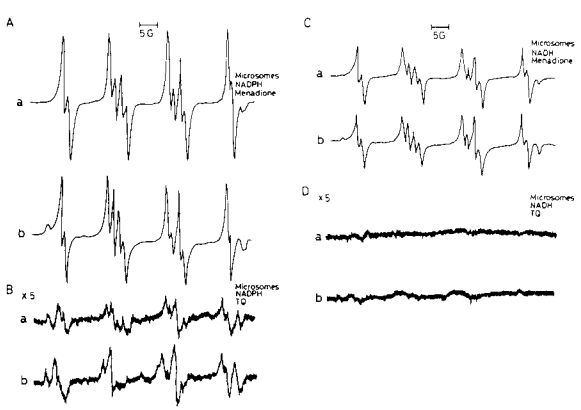

図2　ミクロソームが触媒するNADPH－キノン還元反応（A，B）とNADH－キノン還元反応（C，D）でみられるESRスペクトル。aは反応後2分でbは4分のスペクトル。サンプルの条件：200 μM NAD(P)H，2.1 mg protein/ml，0.5 mM DTPA，100 mM DMPO，30 μM メナジオン(A，C)，30 μM トコフェロールキノン(B，D)。ESRの条件：中心磁場3387 G，modulation amplitude 1.0 G，レシーバーゲイン1×10⁴，時定数0.125 s，microwave power 20 mW，scan speed 25 G/min。

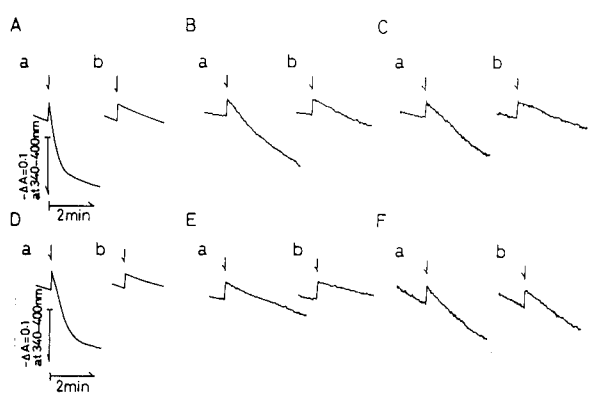

図3　細胞下画分が触媒するNADPH－キノン還元反応（A，B，C）とNADH－キノン還元反応（D，E，F）に及ぼすジクマロールの効果。矢印でキノンを添加した。サンプル条件：細胞下画分細胞質0.31 mg protein/ml(A，D)，ミクロソーム0.56 mg protein/ml(B，D)，細胞膜0.76 mg protein/ml(C，F)。ジクマロール　無添加(a)，10 μM添加(b)。80 μM NAD(P)H。20 μM メナジオン。

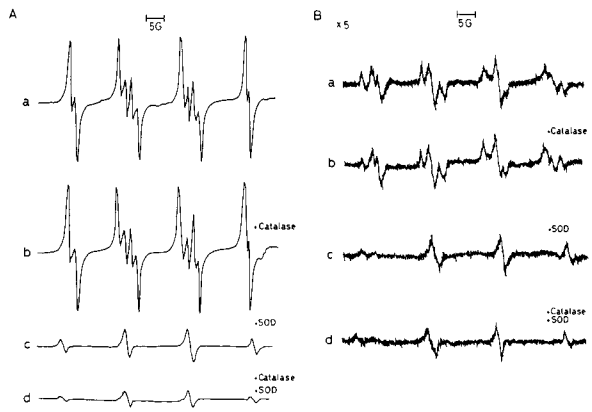

図4　ミクロソーム(A)と細胞膜(B)が触媒するNADPH－キノン還元反応開始後2分でみられるESRスペクトルに及ぼすカタラーゼとSODの効果。サンプル条件(A)：aはコントロール，b 40 nMカタラーゼ，c　0.1 μM SOD，dは40 nMカタラーゼ＋0.1 μM SOD。200 μM NADPH，30 μM メナジオン，2.1 mg protein/ml，0.5 mM DTPA，100 mM DMPO。サンプル条件(B)：2.5 mg protein/ml以外はサンプル条件(A)と同じ。

り抑制された。細胞膜はキノンを二電子還元し，キノン毒性を抑制している。

遊離肝細胞や灌流肝によるメナジオンの還元が報告されている。膜を通過する電子の流れは細胞内のNAD(P)Hの酸化による細胞外のメナジオンの還元と関連している。細胞外のチトクロームCの還元はメナジオンを共存させた遊離肝細胞で観察され，SODの添加によって抑制される。チトクロームCの還元はメナジオンのハイドロキノン型の自動酸化によって生成したスーパーオキサイドによると考えられた。DT-diaphoraseとSODの両方の阻害剤で前処理した遊離肝細胞がメナジオンの毒性を悪化させることからこの二つの酵素がキノン毒性から細胞を保護していると結論づけられる。図2，3，4はNADPH-P 450 reductaseに対するDT-diaphoraseの相対的な活性がミクロソームより細胞膜のほうで高いことを示している。キノン毒性に対する防御機構のアウトラインはわかっているが，細胞膜のDT-diaphoraseが細胞レベルで重要な役割を果たしていることが明らかになった[6]。

(酸化的ストレスによる肝細胞の変化と細胞死)肝細胞懸濁液のチトクロームオキシダーゼの酸化還元状態とミトコンドリア膜電位に応答するローダミン123の吸光度変化の測定結果からチトクロームオキシダーゼが還元される嫌気状態でもミトコンドリア膜電位が維持されることがわかった。肝細胞では嫌気になると5分以内で細胞内のATPが50%以下に減少することが知られている。細胞のエネルギー状態が激変しているにもかかわらず，ミトコンドリア内膜を介して電荷を分離するメカニズムが存在すると考えられる。アンカップラーの添加により膜電位が低下したことと，同様の処理をした細胞を蛍光顕微鏡で観察した場合に核は染色されず細胞質がほぼ一様に染色されていたことから，色素がミトコンドリアに取り込まれていることがわかった。次に酸素供給を再開した後に予想される酸化的ストレスのモデルとして遊離肝細胞にt-ブチルハイドロパーオキサイドを晒した。2 mMでは細胞膜表面で起こる酸化反応に起因するアルコキシラジカ

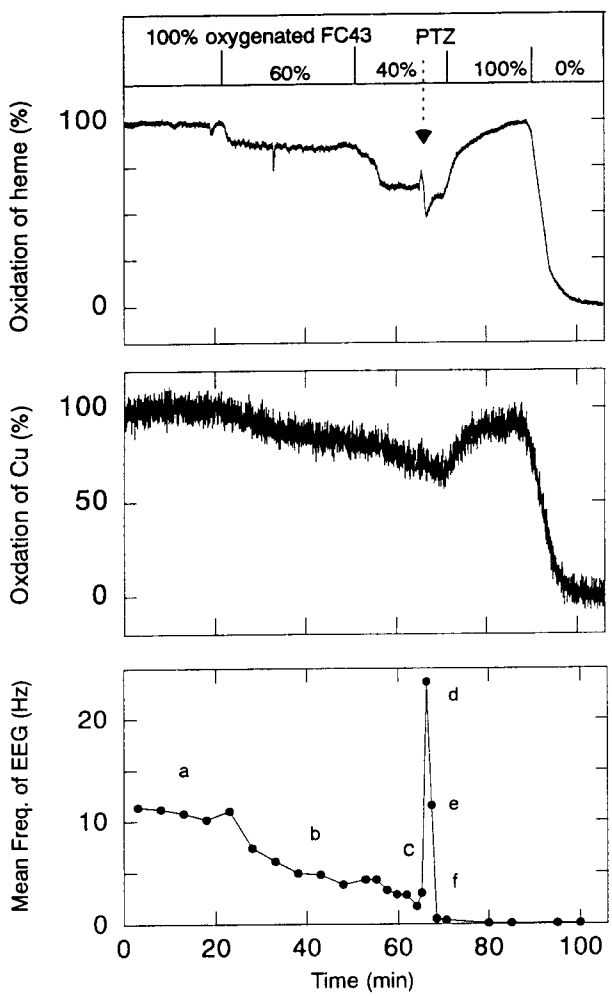

図5　低酸素状態の灌流脳に対してPTZを投与したときのチトクロームオキシダーゼのヘムaa 3と銅の酸化還元状態と脳波における変化。

ルとカーボンセンタードラジカルが付加化合物として30分以上にわたってESRスペクトル上に認められた。5 mMに濃度を高めると激しい酸化反応の結果，細胞内から漏出するアスコルビン酸とt-ブチルハイドロパーオキサイドの反応によるアスコルビン酸ラジカルが検出され，明らかな細胞死を呈することがわかった。

（灌流脳におけるミトコンドリアと脳機能に及ぼす低酸素の影響）定流量灌流で酸素濃度を低下させたときの脳波の徐波化とHeme aa 3の酸化状態の間に高い相関が認められた。また低酸素による脳波の消失後，ビククリンを投与するとてんかん発作を起こした[8]。酸素不足による脳機能の低下は，ATP合成の低下によって通常の電気的神経活動の維持に必要なエネルギー需要を賄えないが，短時間の神経活動が可能なATP濃度を維持するというエネルギー保存機構の一面を表わすと考えられる。本研究の結果はDuffy et. al.[2]の神経活動の低下がエネルギー不足を回避するための応答であるという提案を支持するものである。

結　論

本研究では酸化的ストレスの中でも虚血再灌流障害に焦点を合わせ，その中の各過程の様々なイベントから細胞死に至る経過を細胞内小器官に着目し検討した。まず虚血による酸素不足（2〜3 x $10^{-7}MO_2$）はATP濃度が低下する前に細胞間の協調による高次機能を抑制する。しかしこの酸素濃度における細胞活動の強制的な活性化はミトコンドリアを脱共役させ速やかな細胞死をもたらす。酸素濃度が〜10^{-8}M以下になるとATPの低下は避けられないものの高いミトコンドリア膜電位が維持されていた。このように無酸素に近い状態が持続するとミトコンドリア膜電位が低下し，ブレブ形成が始まる。再酸素化によって高いミトコンドリア膜電位を維持している細胞はブレブを吸収する。ミトコンドリア膜電位が低下した細胞では生成した還元酸素種によって膜構造が破壊され細胞内容物が漏出し細胞死に至る。還元酸素種の生成では酸化的ストレスにカップルしたキノン還元系が重要な役割を果たしていた。スーパーオキサイドを生成するNAD(P)H-メナジオン還元活性は細胞質が最も高く，ミクロソーム，細胞膜の順であった。しかし細胞膜ではキノン還元系の中で二電子還元を触媒するDT-diaphoraseの相対的な活性が高く，細胞レベルの防御系としての位置付けが再認識された。細胞の防御能力を超える酸化的ストレスを被ると，ブレブの崩壊に続いて細胞死に至ると考えられた。

【註および参考文献】

[1] Andersson, B. S., Aw, T. Y., and Jones, D. P. Am. J. Physiol. 252, C349-C355 (1987).

[2] Duffy, T. E., Nelson, S. R., and Lowry, O. H. J. Neurochem. 19, 959-977 (1972).

[3] Emaus, R. K., Grunwald, R., and Lemaster, J. J. Biochim. Biophys. Acta 850, 436-448 (1986).

[4] Ernster, L., Ljunggren, M., and Danielson, L. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2, 88-92 (1960).

[5] Inagaki, M., and Tamura, M. J. Biochem. 113, 650-657 (1993).

[6] Nakamura, M., and Hayashi, T. J. Biochem. 115, 1141-1147 (1994).

[7] Nakamura, M., and Yamazaki, I. Biochim. Biophys. Acta 327, 247-256 (1973).

[8] Nomura, Y., Matsunaga, A., and Tamura, M. Adv. Exp. Med. Biol. in press (1994).

[9] Nomura, Y., Miyao, T., and Tamura, M. Adv. Exp. Med. Biol. in press (1994).