

ラット骨格筋におけるプリン体の de novo 合成に 及ぼす運動負荷の影響

福島 秀夫・原田 和彦*・三輪 泰子
野坂 俊弥**・松田 光生

Effect of exercise on the de novo purine synthesis in rat skeletal muscle

Hideo FUKUSHIMA, Kazuhiko HARADA*, Yasuko MIWA, Toshiya NOSAKA**,
Mitsuo MATSUDA

The purpose of this study is to investigate whether or not the de novo purine synthesis is accelerated by strenuous exercise in rat skeletal muscle. Further, to consider the relation between de novo purine synthesis and muscle exercise induced hyperuricemia. 10 weeks aged male rats were exercised by treadmill running in 25 m/min for 30 minutes. Then, the extensor digiti IV et V muscle was isolated intact from forelimb and incubated for one hour in the medium containing 1-¹⁴C-formate as precursor of purine body. After incubation, muscle was homogenated and extracted acid-soluble purines with perchloric acid. Extracted purines were separated into nine nucleotides by PEI-cellulose thin layer chromatography by a discontinuous gradient development. Radioactivity in each nucleotide fraction was measured by liquid scintillation counting. The results obtained were as follows:

1) De novo purine synthesis in rat skeletal muscle of exercise group were remarkably accelerated by approximately 100% compared to control group.

2) Incorporations of radioactivity after exercise increased in most nucleotide fractions, and its relative percent distributions were not changed significantly.

It is quite possible that the acceleration of de novo purine synthesis in skeletal muscle become one of the cause of hyperuricemia.

Key words: Purine synthesis, Muscle, Exercise

I 緒 言

筋運動負荷による一過性の血清尿酸値の上昇、いわゆる muscle exercise induced hyperuricemia については数多くの報告がある¹⁾¹⁷⁾。古くは Quick ら (1935)¹²⁾の高乳酸血症およびケトン血症にその原因を求めた報告があるが、その後の

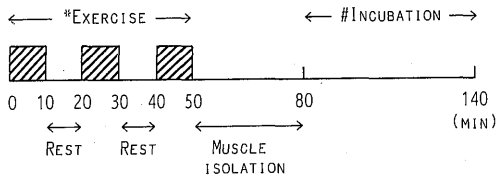
研究もほとんどが腎機能排泄障害によって説明したものであった²⁾。しかし、Knochel (1974)⁷⁾はその発症機序を主としてヌクレオチドの異化亢進に求めている。すなわち、筋収縮のためには ATP がエネルギー源として使用され、ATP の利用は速やかな ATP 減少を招き ADP, AMP に代謝される。この ATP depletion によるアデニンヌクレオチドの速やかな異化作用は IMP, イノシンを経て尿酸生成に至る代謝系を活性化すると考えられて

* (財) 河野臨床医学研究所

** 筑波大学体育研究科研究生

いる⁴⁾。

一方, Murray (1971)¹⁰⁾は哺乳動物の筋組織において減少したプリンヌクレオチドの補充は salvage 経路のみで, de novo 合成経路が存在するという証拠はないと述べていた。よって筋中のプリン体の由来は, de novo 合成の主要な臓器である肝臓から輸送されたものであると考えられていた。しかしその後, Sheehan ら (1977)¹⁵⁾および Tully ら (1980)¹⁶⁾は, 未成熟ラットの長指伸筋を用いて筋肉が完全なプリン体の de novo 合成系を持つことを確認した。これらの事実から筋運動負荷によって, はたして筋中のプリン体の de novo 合成が亢進するかどうかという疑問が生じる。しかし, この疑問に答えるべき研究は未だ報告されていない。したがって本研究は成熟ラットについて, 成熟後の骨格筋のプリン体の de novo 合成を確認し, ついで強制運動負荷を与え, 運動により骨格筋のプリン体の de novo 合成を亢進するかどうかを標識前駆体を投与し, そのプリンヌクレオチドへの取り込みを持って調べることを目的とした。これにより de novo 合成が亢進することが証明されると, muscle exercise induced hyperuricemia の発症機序の説明は, 腎排泄障害およびプリン体異化亢進に加えて筋での de novo 合成が新たな原因となるかもしれない。



* The exercise were 3 times of treadmill running at 25m/min for 10 min.

The muscle were incubated in the medium containing 1-¹⁴C-formate for 1 hr.

Fig. 1 Protocol of experimental study.

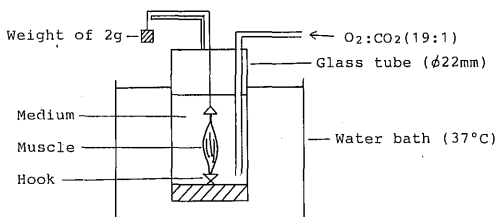


Fig. 2 Illustration of the incubation cuvette.

II 方法

1. 実験動物および運動負荷法

実験動物として飲水および市販固形飼料 (日本クレア, CE-2) を自由摂取させ, 約1週間の観察期間をおいた生後10週齢 (体重325~380g) の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを用いた。運動負荷は, 小動物用トレッドミルを用いた強制運動とした。実験前日, トレッドミル走行を学習させた運動群ラット (6匹) は, ベルト回転速度 25m/min (傾斜角度 0度) で10分間走行後, 10分間休息を入れ, これを3回繰り返すことを標準とし, 最終的には疲労困憊に導いた。そのプロトコルを図-1に示した。対照群ラット (6匹) は同じ条件で飼育したラットを用いて, 強制運動負荷以外は全く運動群と同じに扱った。

2. 骨格筋の分離およびインキュベーション

骨格筋組織は, ラット前肢第4, 5指伸筋 (Extensor digiti IV et V muscle) を用いた。運動終了後, ラットはペントバルビタールナトリウム 50mg/kg 腹腔内投与を行って麻酔し, 右前肢より 25~45mg の筋を腱と共にまるごと摘出した。この大きさの筋を用いたのは, インキュベーション法における酸素摂取の限界から選択した¹¹⁾。以下の操作は, Sheehan ら (1983) の方法に準じて行った¹⁶⁾。摘出筋は冷生理食塩水 (0.9% NaCl) に浸して洗浄し, すばやく秤量後, 自製のガラス管製インキュベーションキュベット (内径22mm) にセットした (Fig. 2)。このとき, 筋は自然長を保持させるため 2g の張力を与えた。インキュベーションメディウムは, グルコース, 牛血清アルブミン V およびシリコン系消泡乳濁液を含んだ Krebs & Henseleit, (1932) メディウムを用いた。その組成は表-1に示した。摘出筋をセットしたインキュベーションキュベットに予備加温 (37°C) したこのメディウム 15ml を入れ, プリン体の標識前駆体として 1-¹⁴C-ギ酸ナトリウム (57mCi/

Table 1 Composition of the incubation medium

NaCl	118.00 mM	Glucose	5 mM
KCl	2.55 mM	Bobine serum albumin	1.5 g/l
CaCl ₂	1.18 mM	30% Silicone	
MgSO ₄	1.18 mM	antifoam	50μl
KH ₂ PO ₄	24.88 mM	emulsion	
NaHCO ₃			

mmole; NEN) を 0.1mM (136.359cpm/10 μ l) になるように添加した。インキュベーションは、メディアウム中に O₂:CO₂ (19:1) 混合ガスをガラス管を通し (O₂分圧 452mmHg) bubbling しつつ、37°Cの恒温水槽内で1時間行った。

3. プリン体の抽出

インキュベーション終了後、筋は冷生理食塩水にすばやく浸し軽く洗浄した後、液体窒素中で瞬間凍結した。凍結筋は 0.4ml の冷 0.9N 過塩素酸を加え氷冷下、15秒間ホモジナイズした。3,000 \times g, 10分間、4°Cで遠心分離し、その除タンパク上清に65 μ l の KCl 飽和冷 4.2NKOH を加え過塩素酸を中和沈殿除去した。KCl 飽和液は KClO₄の溶解度を最小にするために加えた。中和抽出物は KClO₄を完全に沈殿させるため、0°C, 20分間放置した。その後、2,000 \times g, 5分間、4°Cで遠心分離し、上清抽出物はただちに薄層クロマトグラフィーで分離、分析、あるいは-80°Cで保存後分離、分析した。

4. プリンヌクレオチドの分離、検出および放射活性の測定

プリンヌクレオチドは、ポリエチレンイミン (PEI) -セルロースプレート (20cm \times 20cm) を用いた薄層クロマトグラフィーにより分離した³⁾。PEI 薄層プレート (メルク) にプリンヌクレオチド混合標準溶液 (アデノシン-5'-3リン酸: ATP, アデノシン-5'-2リン酸: ADP, アデノシン-5'-1リン酸: AMP, ニコチンアミドアデニジヌクレオチド: NAD, グアノシン-5'-3リン酸: GTP, グアノシン-5'-2リン酸: GDP, グアノシン-5'-1リン酸: GMP, イノシン-5'-1リン酸: IMP, キサントシン-5'-1リン酸: XMP; シグマ社, 各10 μ mole/ml を含んだ水溶液) の 2 μ l をキャリアーとしてマイクロシリンジでアプライした後、調整試料抽出液の 8 μ l を重ねて風乾しながらアプライした。アプライは同一プレートに10か所行った。

アプライ後、薄層プレートは前処理としてメタノール:水 (1:1) で最高端まで展開 (室温, 4時間) し、未反応の1-¹⁴C-formate をはじめとして、プリン塩基、ヌクレオチド、無機塩類およびヌクレオチド以外の¹⁴C含有物を除去した。このとき、ヌクレオチド類は移動しない。風乾後、各ヌクレオチドを分離するための展開溶媒は、ギ酸-ギ酸ナトリウム緩衝液 pH3.4 (以下、ギ酸バッ

ファーと略す) を用いた。展開は上昇法の段階展開法 (3濃度段階) で行った。すなわち、0.5M-ギ酸バッファーで30分間飽和した薄層プレートは、同溶媒で起点から 2 cm まで展開し、つぎに 2.0M-ギ酸バッファーで起点から 6 cm まで展開し、さらに 4.0M-ギ酸バッファーで起点から 15cm まで展開した。総展開時間は、およそ 2.5時間であった。

展開した薄層プレートは風乾後、プリンヌクレオチドを検出するため暗視野内、紫外線ランプ (254nm) で照射し、吸収部分はピンでマークした。分離した各ヌクレオチドスポットの起点からの距離 (cm) は、およそ GTP (1.0), ATP (2.8), GDP (3.6), ADP (7.2), GMP (8.0), XMP (8.8), IMP (9.8), AMP (11.2) および NAD (12.4) であった。マークした紫外部吸収部分はスパーテルで削り取り、バイアル瓶中で 20ml の液体シンチレーションカクテル (シンチゾール 500) と混合し、バックマン LS-7500 液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

III 結 果

対照群と運動群の体重、摘出筋重量および運動群の走行距離を表-2 に示した。

対照群と運動群の筋 100mg 湿重量当りの酸可溶性標識ヌクレオチドの放射活性 (cpm) を図-3 に示し、運動負荷による効果は両群の平均の差 (Δ cpm) と変化率 (%) を求め、表-3 に示した。運動を負荷することにより、ATP (P<0.05), ADP (P<0.005), AMP (P<0.05), NAD (P<0.01), GTP (P<0.01) および IMP (P<0.005) の 6 つのヌクレオチドで有意に 1-¹⁴C-formate の取り込みが増加し、残る GDP, GMP および XMP も増加傾向にあった。全ヌクレオチドの総計でも有意 (P<0.005) な増加が認められた (統計的有意

Table 2 Body weight, weight of extensor digiti IV et V muscle and distance of treadmill running of rats

Group (n=6)	Control	Exercise
Body weight (g)	386 \pm 13	355 \pm 22
Muscle weight (mg)	38 \pm 4	38 \pm 7
Running distance (m)	-	506 \pm 130

Values represent the "mean \pm standard deviation"

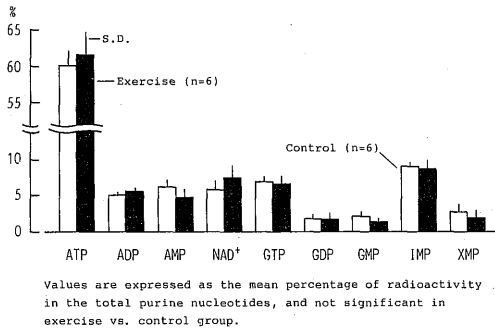


Fig. 3 Incorporations of radioactivity into acid-soluble purine nucleotides from 1-¹⁴C-formate.

性は t 検定を用いた)。取り込み増加の傾向として、アデニンヌクレオチドでは ATP>ADP>AMP であり、またグアニンヌクレオチドでは GTP>GDP>GMP であり、高エネルギーヌクレオチドにおいて顕著な増加が認められた。さらにアデニンヌクレオチドのほうがグアニンヌクレオチドよりも増加率は大きかった。

対照群と運動群の全標識ヌクレオチドに対する各標識ヌクレオチドの相対分布 (%) を図-4 に示した。対照群と運動群の間には、全てのヌクレオチドにおいて相対分布に有意な差は認められなかった。両群とも最も取り込みの高いのは ATP で対照群 60.0%, 運動群 61.1% であった。他の全てのヌクレオチドは、両群とも平均で 10% 以下であり、特に GDP, GMP および XMP は 3% 以下であった。アデニンヌクレオチドの総計 (ATP, ADP, AMP および NDA の和) は対照群で 77.3%, 運動群で 80.1% に達した。

IV 考 察

筋組織におけるプリン体の de novo 合成の研究は、ラット筋初代培養¹⁾, ラット胚筋管形成期¹⁹⁾, ラット胚器管形成期¹⁴⁾ および未成熟ラットの長指伸筋などで確かめられている。しかし、これらはどれも筋組織の分化形成期の研究であった。本研究で成熟ラットの四肢第 4, 5 指伸筋において 1-¹⁴C-formate を標識前駆体として、プリン体の de novo 合成が活発に行われていることを確認した。また、この事実は本研究の予備実験として行った 1-¹⁴C-glycine を前駆体を用い

Table 3 Effects of exercise on the incorporation of radioactivity into muscle acid soluble purine nucleotides from 1-¹⁴C-formate

NUCLEOTIDES	ΔCPM*	INCREASE OF
		INCORPORATION(%)
ATP	+14,847	+110
ADP	+1,347	+116
AMP	+664	+47
NAD ⁺	+1,982	+147
GTP	+1,378	+87
GDP	+350	+83
GMP	+152	+32
IMP	+1,991	+97
XMP	+158	+25
TOTAL	+22,868	+101

*The ΔCPM represents the mean differentials of cpm per 100mg of muscle wet weight of exercise (n=6) to control (n=6) group.

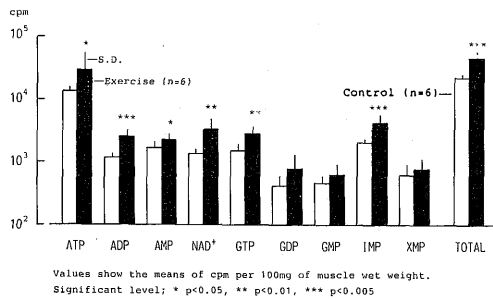


Fig. 4 Relative percent distributions of radioactivity in muscle acid-soluble purine nucleotides.

た実験においても、プリンヌクレオチド中への放射活性の取り込みが認められた。Formate の炭素原子は、N⁵, N¹⁰-methenyl-H₄folate および N¹⁰-formyl-H₄folate を介してそれぞれプリン環の 8 位と 2 位に取り込まれ、その取り込み率は、律速段階にあるプリン体の de novo 合成速度に比例する。ヒト血清における formate 濃度は、およそ 1.2mg/dl (0.18mM) 以下とされている⁹⁾。

上述の通り、非運動時の筋における de novo 合成が確実にあったので、次の問題はいわゆる muscle exercise induced hyperuricemia の発症機序と関連して、運動負荷でこの de novo 合成が亢進するかどうかである。これについての研究は未だ報告がなく、今回の実験はこの問題解明の目的を

もって取り上げた。その結果、運動負荷を与えることによりプリン体の de novo 合成は、およそ 100% (2 倍) に著明に亢進した。これは運動負荷により失われたプリンヌクレオチドを補充するため、プリン体の de novo 合成が高まったものと考えられる。また、今まで運動における細胞内のヌクレオチド動態は主にプリンヌクレオチドサイクルによって説明されてきた⁵⁾⁸⁾。すなわち、運動により ATP は IMP まで代謝されるが IMP は筋細胞内でアデニルコハク酸を経て再び AMP に転換され、さらに ATP に転換されるという反応である。従って、今回の実験結果から細胞内アデニンヌクレオチドの変動は、プリン体の de novo 合成系酵素群にフィードバック機構が働き、ヌクレオチド合成を促進させ、プリンヌクレオチドサイクルへも複雑に影響するものと考えられる。しかし、合成速度が 2 倍になったにもかかわらず、ヌクレオチドの相対分布に著名な変化が認められなかったことは、合成されたヌクレオチドの転換反応が、特定のヌクレオチドを蓄積することなく律速状態にあるといえる。

前述のように 1977 年頃まではプリン体の de novo 合成は肝臓で行われ、それが各組織に輸送されると考えられてきた。しかし、筋肉においても肝臓と同等のプリン体合成能があるとすると、肝臓と筋肉の体組織に占める割合から、むしろ筋肉におけるプリン体合成量が尿酸代謝全体に及ぼす影響は大きいと考えられる。したがって、トレーニングにより増大した骨格筋を有するスポーツ選手にとって、筋肉におけるプリン体の de novo 合成量は正常人より常に大きくそれが原因で血清尿酸値を高くしていることも考えられる。

また、Murphy ら⁹⁾はラット長肢伸筋を用いて、尿酸生合成阻害剤である allopurinol を投与することにより 8-¹⁴C-hypoxanthine のヌクレオチドへの取り込みが有意に高まったことを報告している。これは、筋組織が salvage 経路によってもヌクレオチド合成をコントロールしていることを示し、骨格筋が尿酸代謝全体に関与していることを示唆する。

本研究においては、摘出筋の 1 時間のインキュベーションにより対照群、運動群ともに ATP におよそ 60% の放射活性が集中した。この合成された ATP は生体内では、さらに核酸塩基に移行し、やがては尿酸を含むあらゆるプリン体に分布する

ようになる。筋肉におけるプリン体の de novo 合成が尿酸代謝に及ぼす影響は、合成からヌクレオチドの転換、さらに異化過程まで調べなければならないが、身体組成の 40~50% を占める骨格筋が尿酸前駆体を作る重要な臓器であることが示唆される。

V 結 語

骨格筋におけるプリン体の de novo 合成が運動負荷によって亢進するかどうかを調べるため、SD 系 10 週齢雄性ラットの四肢第 4, 5 指伸筋を用いて以下のような結果を得た。

トレッドミル走 25m/min, 30 分間の負荷直後より、1 時間までのプリン体の de novo 合成は、

- (1) 非運動時に比べ、運動群はおよそ 100% の著明な合成亢進を認めた。
- (2) 多くのプリンヌクレオチド画分が運動時有意に増加するが、その相対分布には非運動時に比べ著明な変化は認められなかった。

この事実は、運動誘発性の高尿酸血症の一因が、プリン体の骨格筋における de novo 合成の亢進にある可能性を示唆する。

参 考 文 献

- 1) Brosh, S., et al: De novo purine synthesis in rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 714: 181-183, 1982.
- 2) Castenfors, J.: Renal function during exercise. *Acta Physiol. Scand*, 70(Suppl.): 293-297, 1967.
- 3) Crabree, G.W. and Henderson, J.F.: Rate-limiting step in the interconversion of purine ribonucleotides in Ehrlich ascites tumor cells in vitro. *Cancer Reseach*, 31:985-991, 1971.
- 4) Fox, I.H.: Metabolic basis for disorder of purine nucleotide degradation. *Metabolism*, 30: 616-634, 1981.
- 5) Gorski, J. et al: Incorporation of ¹⁵N-leucine amine into ATP of fast-twitch muscle following stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 128:1254-1260, 1985.
- 6) John, D.O., et al: Serum formate concentrations in methanol intoxication as a criterion for hemodialysis. *Ann. Intern. Med*, 104:200-203, 1986.
- 7) Knochel, J.P., et al: Heat stress, exercise and muscle injury, Effect on urate metabolism and

- renal function. *Ann. Int. Med.*, 81:321-328, 1974.
- 8) Manfredi, J.P. and Holems, E.W.: Control of the purine nucleotide cycle in extracts of rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 233: 515-529, 1984.
 - 9) Murphy, J.M. and Tully, E.R.: Effect of allopurinol (4-hydroxypyrazolo [3,4-d] pyrimidine) on purine metabolism in rat skeletal muscle. *Biochem. Soc. Trans.*, 12:455, 1984.
 - 10) Murray, A.W.: The biological significance of purine salvage. *Ann. Rev. Biochem.*, 40:811-826, 1971.
 - 11) Pain, V.M. and Manchester, L.K.: The influence of electrical metabolic parameter of rat extensor digitorum longus muscle. *Biochem. J.*, 118: 209-220, 1970.
 - 12) Quick, A.J.: The effect of exercise on excretion of uric acid. *J. Biol. Chem.*, 110:107-111, 1935.
 - 13) Rovgier, G. and Babin, J.P.: A blood and urate study of heavy muscular work on uric and uric metabolism in man. *J. Sports Med.*, 15: 212-222, 1975.
 - 14) Rowe, P.B. and McEwen, S.E.: De novo purine synthesis in cultured rat embryo undergoing organogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80: 7333-7336, 1983.
 - 15) Sheehan, T.G., Buckley, B.M. and Tully, E.R.: An experimental model for the investigation of purine biosynthesis de novo in rat skeletal muscle. *Biochem. Soc. Trans.*, 5:1753-1755, 1977.
 - 16) Sheehan, T.G. and Tully, E.R.: Purine biosynthesis in rat skeletal muscle. *Biochem. J.*, 216: 605-610, 1983.
 - 17) Sutton, J.R., et al: Purine metabolism during strenuous muscular exercise in man. *Metabolism*, 29:254-259, 1980.
 - 18) Tully, E.R. and Sheehan, T.G.: Purine metabolism in rat skeletal muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 122B:13-17, 1980.
 - 19) Zoref-Shani, E. et al: Alterations in purine nucleotide metabolism during muscle differentiation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116:507-512, 1983.