

第5章 運動誘発性血漿 p-SH 基の減少はシステインとの混合ジスルフィド形成による酸化である (実験2)

5.1 緒言

SH 基は酸化ストレスに対する細胞内の防御機構において、抗酸化物質として重要な役割を果たしている (Packer, 1997, Ji, 1999, Sen and Packer, 2000, Schafer and Buettner, 2001)。SH 基には、GSH やシステインといった低分子 SH 基ならびにタンパク質のシステイン残基である p-SH 基がある。ヒト血中の低分子 SH 基の酸化還元動態は、酸化ストレスの指標となりうると考えられているのに対し (Jones et al, 2000)、p-SH 基の生理的意義に関する理解は進んでいない。ヒト血漿に含まれる GSH 濃度は 5~25 μM ときわめて少ない一方で、その大部分がアルブミンに由来する p-SH 基は高濃度存在する (0.5~0.7 mM) (Inoue et al, 1995)。このヒト血漿 p-SH 基は運動によって減少することが見いだされているが (Inayama et al, 1996, 2002a)、そのメカニズムはまだ解明されていない。動物実験によると、運動負荷は肝臓から循環血液中への GSH 放出を増加させ (Pyke et al, 1986)、酸化ストレスが亢進した動物では GSH (およびシステイン) とアルブミンとの結合が増加することが示されている (Inoue et al, 1995)。しかし、ヒトにおいても同様の現象が観察されるか否かは、明らかになっていない。

本研究は、ROS の生成の増加に伴い、ヒトにおいても血漿タンパク質の酸化による低分子 SH 基との混合ジスルフィド結合が増加する可能性があるという仮説のもとに進められた。有酸素運動によって血漿 p-SH 基が減少した健常な女性の血漿サンプルを用いて (Inayama et al, 2002a) p-SH 基との結合物質を同定することで、循環血漿中でタンパク-GSH 混合ジスルフィド (protein-bound GSH: p-S-SG) ではなく、タンパク-システイン混合ジスルフィド (protein cysteine mixed disulfides: p-S-Cys) が形成されていることを見いだした。そこで、試験管内実験によって p-S-Cys が形成されるメカニズムについて検討を加えた。

5.2 方法

5.2.1 実験計画

中等度の有酸素運動によって血漿 p-SH 基が減少した 6 名の健常な女性対象者 (Inayama et al,

2002a) よりヒト血漿サンプルを得た。負荷運動は、各自の VT レベルでの 30 分トレッドミルランニングであった。ランニング前後に肘正中皮静脈より採血し、血液凝固阻止にはヘパリン処置を施した試験管を用いた。研究計画は予め国立健康・栄養研究所の倫理委員会にて審議を経ており、ヒトを対象としたヘルシンキ宣言に則ったものである。

5.2.2 試薬

Aminopeptidase M ならびに γ -GTP は Sigma Co. (MO, USA)、システインは Takara Kohsan (東京)、他の試薬はいずれも和光純薬 (株) のものを用いた。

試験管内実験に要する p-S-SG サンプルを得るため、ヒト血漿に 4 mM GSH ならびに 10 μ M FeCl₂ を加え、大気下にて 37°C で 5 日間インキュベートすることで p-S-SG を生成させた。その後、10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) にて 1 日透析処理を行ったものをヒト血漿 p-S-SG サンプルとした。この操作によって、血漿 p-SH 基は 500 μ M から 203 μ M に減少した。

5.2.3 分析方法

血漿には低分子 SH 基であるシステイン (4.9~6.3 μ M)、シスチン (58~61 μ M)、GSH (2.2~2.6 μ M) が存在している (Inayama et al, 2002a)。これら低分子 SH 基を取り除くため、0.01 mM EDTA を含む 50 mM potassium phosphate (pH 6.5) にて血漿サンプルを 1 日透析処理した後、分析まで -80°C にて保存した。

血漿 p-S-Cys を測定するため、透析処理した血漿に 5 mM ジチオトレイトール (dithiothreitol: DTT) を加え 37°C にて 60 分間インキュベートした。その後、終濃度 5% SSA を加え酸処理した血漿サンプルを 10,000 \times g にて 5 分間遠心分離して上清を得た。上清に含まれるシステインは、既報の方法 (Inayama et al, 2002a) にて、HPLC を用いて検出した。

血漿 p-S-SG の測定では、透析処理後の血漿 0.2 ml に 6 mM sodium tetrahydroborate、5.7 M 尿素、3 mM EDTA を含む 50 mM glycine-NaOH (pH 10) 0.2 ml を加え、38°C にて 15 分間インキュベートした。その後、0.14 M potassium dihydrogenphosphate 0.5 ml および 50% SSA 0.1 ml を加え酸処理したサンプルを 10,000 \times g にて 5 分間遠心分離して上清を得、HPLC にて GSH を測定した。

血漿 p-SH 基濃度ならびにタンパク質濃度は、既報 (Sedlak and Lindsay, 1968, Inayama et al, 1996) に従った。全ての分析は、採血後 3 日以内に終えた。

5.2.4 統計処理

測定結果は平均±SE にて示す。統計処理は、繰り返しのある ANOVA テストにて Fisher's Protected Least Significant Difference による事後の処理を行い、ランニング前の値と比較した。 $p < 0.05$ をもって有意差があるとした。

5.3 結果ならびに考察

5.3.1 運動による血漿 p-S-Cys の形成

非鍛錬者である健常な女性において、VT レベルでの 30 分トレッドミルランニングは、GSH やシステインといった血漿低分子 SH 基濃度には有意な影響をもたらさなかったものの、血漿 p-SH 基濃度を有意に減少させた (Inayama et al, 2002a)。血漿低分子 SH 基の代謝回転速度はきわめて速いのに対し、p-SH 基の供与体であるアルブミンの半減期は長い。通常、血漿 p-SH 基の減少は低分子 SH 基との混合ジスルフィドの形成を意味すると考えられる。この可能性を明らかにするため、透析処理した血漿を DTT あるいは sodium tetrahydroborate で還元処理することで、遊離してくるシステインあるいは GSH の量を HPLC にて測定した。

ランニング前、血漿 p-SH 基濃度は $570 \pm 20 \mu\text{M}$ 、p-S-Cys は $107 \pm 7 \mu\text{M}$ であったが、p-S-SG は検出されなかった。この結果は、ヒト血漿 p-SH 基がシステインおよびシステイン-グリシンと混合ジスルフィド結合しているという既報 (Yasuhara and Nokihara, 1998) と一致したものである。

30 分トレッドミルランニングによって、血漿 p-SH 基濃度は 1 時間後に $553 \pm 19 \mu\text{M}$ ($-17 \mu\text{M}$)、2 時間後に $556 \pm 17 \mu\text{M}$ ($-14 \mu\text{M}$) と減少するのに伴い、p-S-Cys は 1 時間後に $118 \pm 8 \mu\text{M}$ ($+11 \mu\text{M}$, $p < 0.05$)、2 時間後に $127 \pm 6 \mu\text{M}$ ($+20 \mu\text{M}$, $p < 0.01$) と有意に増加した。ランニング 5 分後に観察された p-SH 基の不一致は、おそらく運動によって生じた脱水によるものと考えられる (Fig. 5-1)。一方、p-S-SG はいずれの採血時点においても検出されなかった。また、血漿 cyst(e)ine ならびに GSH に有意な変動は認められなかったが、これはきわめて速い代謝回転に

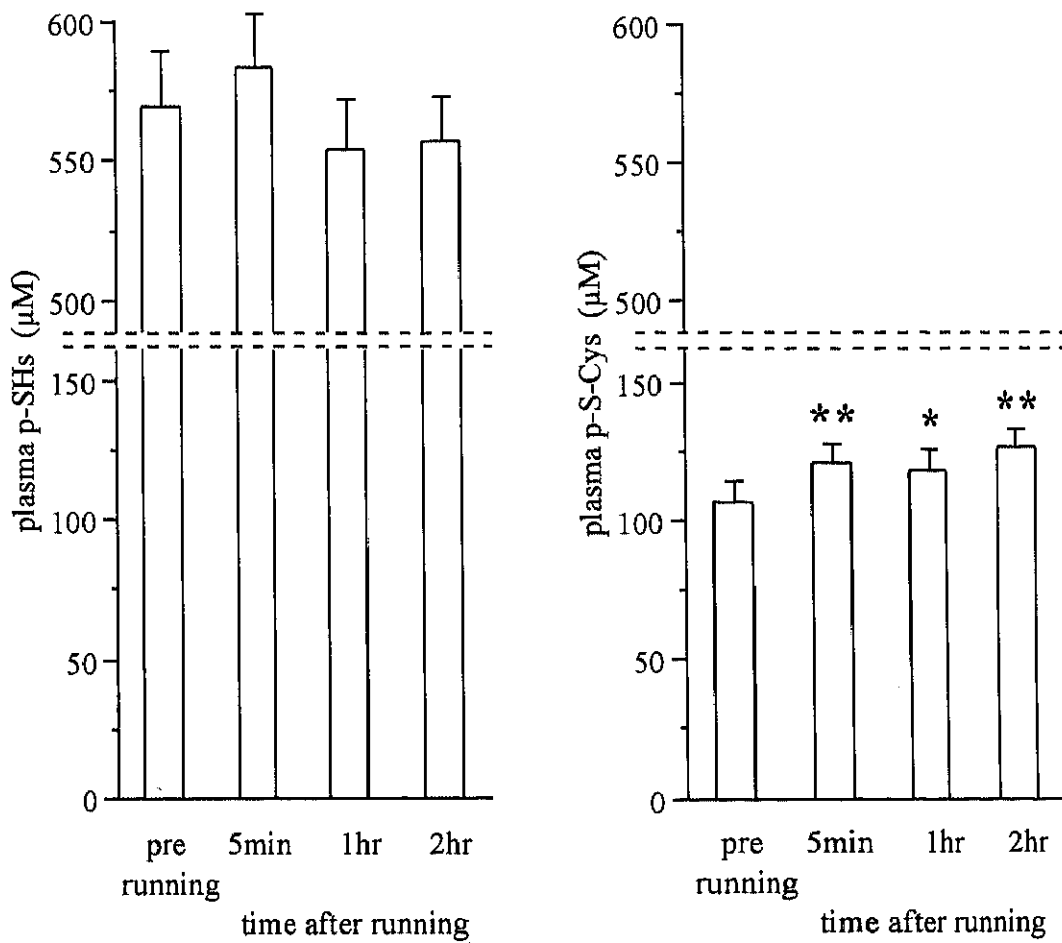


Fig. 5-1. Changes in human plasma levels of p-SHs and p-S-Cys after 30-min treadmill running. Blood samples were collected 30 min before running and 5 min, 1 hr, and 2 hr after running. The values are expressed as means \pm SE (n=6). * and ** indicate significant difference ($p < 0.05$, $p < 0.01$) from the pre-running value as analyzed by repeated-measures ANOVA with post hoc test.

よるものと考えられる (Meister, 1983)。本検討の結果、中等度の一過性の運動は、血漿 p-SH 基を酸化し p-S-Cys を形成すると結論づけられた。

5.3.2 システイン混合ジスルフィド形成のメカニズム

動物を対象とした *in vivo* での実験では、酸化ストレスによって血漿タンパク質のシステイン残基は GSH ならびにシステインと混合ジスルフィドを形成する (Lash and Jones, 1985, Inoue et al, 1995)。マウスを用いた検討では、³⁵S でラベルした GSH は速やかに循環血漿中のアルブミンと結合した (Libenson and Jena, 1967)。運動負荷したラットでは、肝臓から循環系への GSH の放出が増加することによって、血漿 GSH 濃度の増加と一致して肝臓中の GSH 濃度が減少することが報告されている (Pyke et al, 1986)。上述したように、ヒトでは運動負荷によって循環血漿中に p-S-SG ではなく p-S-Cys が形成されたが、そのメカニズムについて以下のような仮説が考えられた。

第一に、 γ -GTP ならびに dipeptidase によって、ヒト血漿 p-S-SG が加水分解される可能性が考えられる。ヒトではこれら GSH の加水分解酵素が、腎臓、小腸、胆管 bile-tree cells の尖端膜表面に高濃度存在する (Meister et al, 1981)。 γ -GTP の阻害剤で処置した動物では血漿 GSH 濃度が増加し、尿中への GSH、 γ -グルタミルシステイン、システインの排泄がみられる (Meister, 1983)。このことは、 γ -GTP が血管内腔で十分機能することを意味する。事実、正常動物に注入されたノンメルカプトアルブミン (大部分が Alb-S-SG) は、メルカプトアルブミン (Alb-SH) の増加と一致して速やかに減少することが報告されている (Inoue et al, 1987a)。Fig. 5-2 は、 γ -GTP と aminopeptidase M の存在下での 30 分間インキュベーションによって p-S-SG が p-S-Cys に変換すること、しかし、酵素あるいは p-S-SG が存在しない場合には p-S-Cys 濃度の増加がみられないことを明示している。すなわち、GSH の分解酵素である γ -GTP と aminopeptidase M はタンパク質に結合した GSH にも作用することが *in vitro* において確認された。

現時点においては、p-S-SG が形成されるメカニズムは明らかになっていない。しかし、運動によってヒト循環血中に NO の産生が誘起されること (Brown et al, 2000)、S-nitroso-albumin が形成され (Stamler et al, 1992)、それが前駆体となっている可能性も考えられる。そうであるとすれば、S-nitroso-albumin は恐らく GSH やシステインとそれぞれ交換反応し、より安定な混

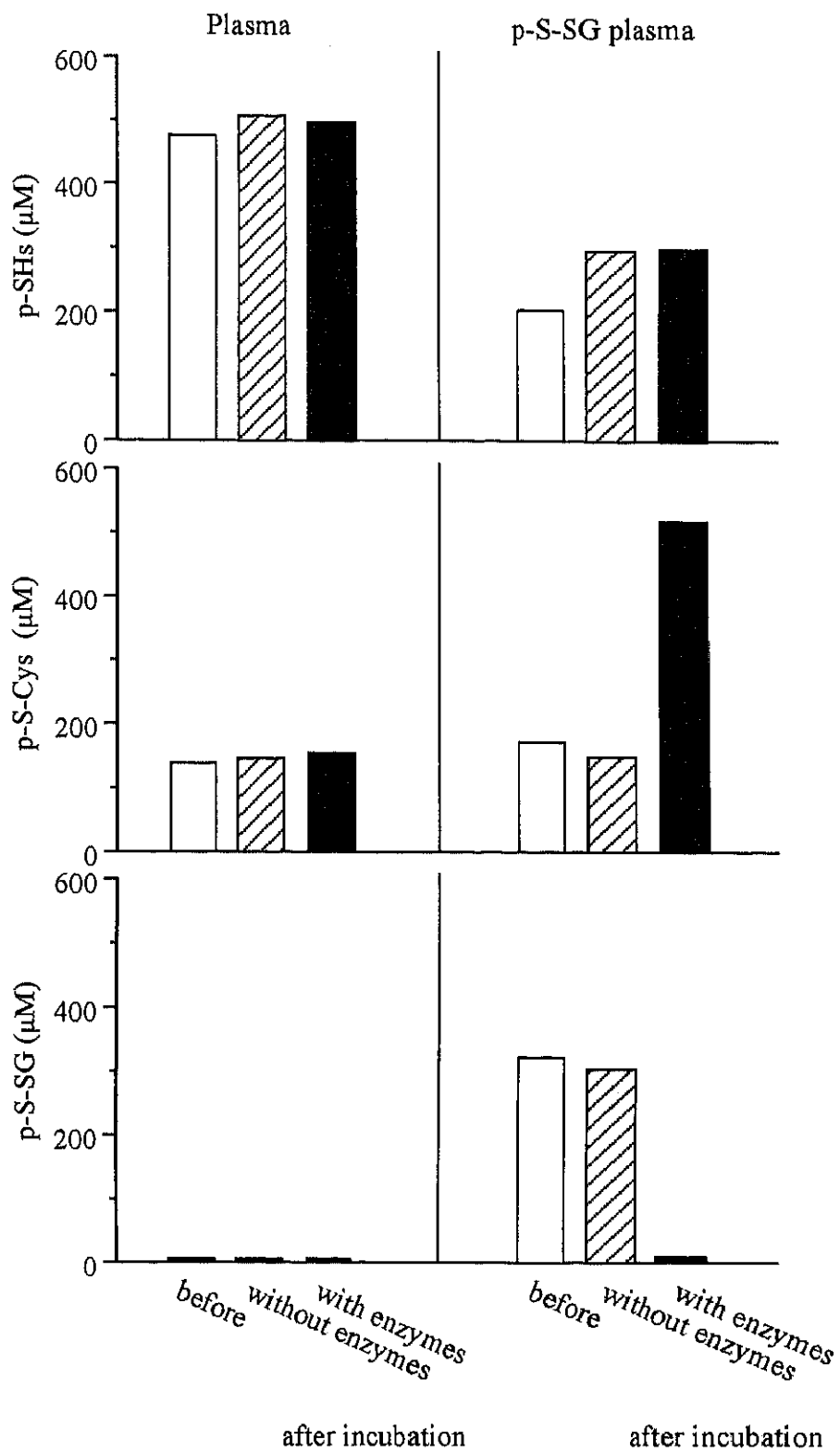


Fig. 5-2. The formation of p-S-Cys from human plasma (left panel) and plasma containing 324 μM p-S-SG(right panel) treated with γ -GTP and aminopeptidase M (0.125 unit each) at 37°C for 30 min.

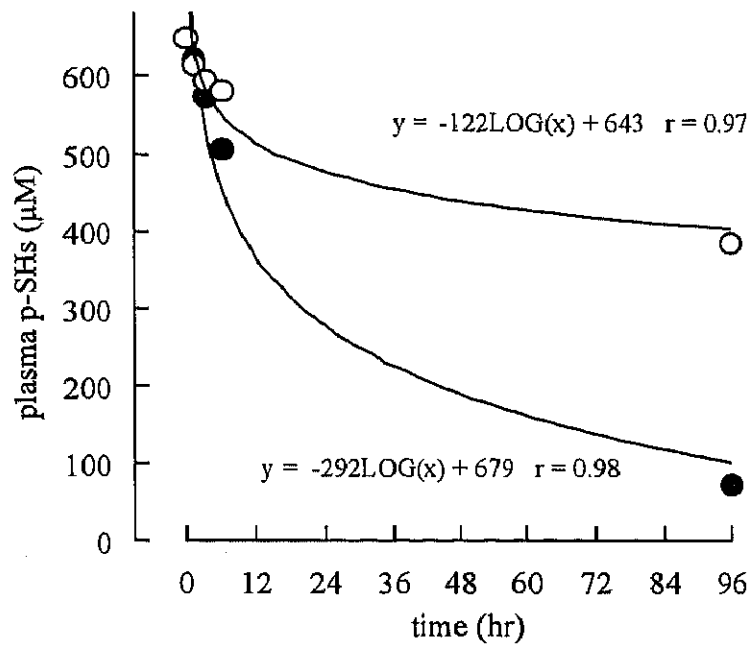


Fig. 5-3 The decay of p-SHs during the incubation of human plasma without (open circle) or with (closed circle) the addition of 350 µM cystine at 37°C for 96 hr under aerobic conditions.

合ジスルフィドである p-S-SG、p-S-Cys に変換されるであろう (Klatt and Lamas, 2000,)。これらの反応速度はきわめて速いものであり、本研究においても Saville's 法 (Saville, 1958) による測定を試みたが、S-nitroso-albumin の形成の増加を検出することはできなかった。

第二に、p-SH 基と cyst(e)ine との酸化反応 (King, 1961) という、もうひとつのメカニズムの可能性についての仮説が考えられる。ヒト血漿中のシスチンの生理的濃度は約 60 μM である。大気下にて 37°C でインキュベートした *in vitro* での観察では、血漿 p-SH 濃度は 649 μM から 1 時間後 616 μM 、3 時間後 594 μM と減少した (Fig. 5-3 の上部のカーブ)。この減少割合は必ずしも大きなものとはいえないが、ヒトを対象とした運動負荷実験において観察されたそれと一致する (Fig. 5-1)。p-SH 基と cyst(e)ine との酸化反応をより明確にするために、ヒト血漿に 350 μM のシスチンを添加した条件下にて、大気下 37°C でインキュベートするという実験を追加した (Fig. 5-3 の下部のカーブ)。その結果、シスチン添加が p-SH の減少割合を加速することが明らかとなり、p-SH 基とシスチンとの反応が起こりうることが支持された。

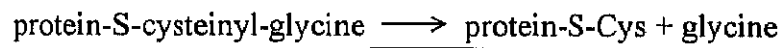
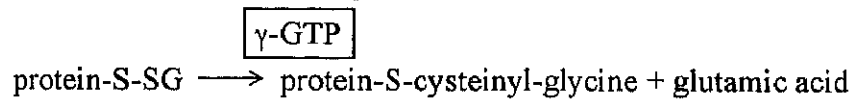
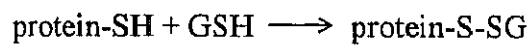
さらに、インキュベーション 96 時間後の時点で、HPLC にて血漿 p-S-Cys を分析することによって、1 モルのシスチンが 2 モルの p-S-Cys に化学量論的に変換したことを確認した。シスチンの減少量 60 μM は、その倍量に相当する 115 μM の p-S-Cys が生成されたことで説明される (Fig. 5-3 の上部のカーブ)。また、過剰量の 350 μM のシスチンを血漿に添加することによって 414 μM の p-S-Cys が形成されたが、これはシスチンの減少量 210 μM と一致することを観察した (Fig. 5-3 の下部のカーブ)。

これらの結果を要約すると、中等度の運動が血漿タンパク質を酸化し、システインとの混合ジスルフィドを形成させることが見いだされた。試験管研究の結果に基づくと、p-S-Cys は p-S-SG の加水分解、あるいはまた、cyst(e)ine から p-SH 基への酸化的付加反応によって形成される可能性が考えられた (Fig. 5-4)。

5.4 要 旨

非鍛錬者の成人女性にみられた 30 分トレッドミルランニングでは、赤血球の GSH および p-SH 基の酸化が速やかに再還元されたのに対し、血漿 p-SH 基は減少したものの、その酸化、再還元のプロセスは不明であった。In vivo における血漿 p-SH 基の酸化還元の機序を考究する

[1]



Peptida

[2]

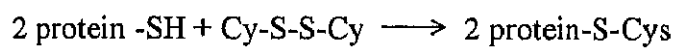


Fig. 5-4. Plasma protein thiols to cysteine mixed disulfides.

ことを目的として、一過性の運動負荷によって血漿 p-SH 基が減少した血漿サンプルを用い、還元剤処置によって SH 基が減少した血漿タンパク質から遊離してくる低分子 SH 基を同定した。その結果、運動負荷による血漿 p-SH 基の減少に伴い、タンパク質とシステインとの混合ジスルフィド結合が増加したことを見いだした。一方、運動前後いずれにおいても、血漿中に p-S-SG ならびに S-nitroso-albumin は検出されなかった。運動誘発性血漿 p-SH 基の減少はヒト血管内に生じた酸化ストレスによるタンパク質の酸化であることが証明された。さらに、試験管内での反応実験を検討することで、p-S-Cys は、 γ -GTP ならびに peptidase による p-S-SG の加水分解、あるいはまた p-SH 基との cyst(e)in の酸化的付加反応によって生じるというメカニズムが考えられた。