

## 第7章 討 論

運動誘発性酸化ストレス下における SH 基の変動に関連した研究は、そのほとんどが GSH を扱ったものであるが、生体内には p-SH 基が高濃度存在している。ヒト血管内では、赤血球にヘモグロビン由来、血漿にアルブミン由来の p-SH 基が、それぞれ GSH よりも高濃度存在する。過度の運動によって血管内で亢進される酸化ストレスがもたらすリスクが懸念されることから、ヒト血管内における p-SH 基の生物学的意義についての理解を深めることは意義深いものと考えられる。

一過性の運動負荷によってヒト赤血球の GSH が酸化されることは報告されているが、p-SH 基にもたらされる運動の影響は知られていない。実験 1 では、非鍛錬者である成人女性の赤血球ならびに血漿の p-SH 基が、中等度の運動負荷によって減少することを明らかにした。

このとき、赤血球では、運動負荷直後にみられた GSH ならびに p-SH 基の減少が、運動終了 2 時間後には初期値まで回復している。細胞内での GSH の酸化によって生じた GSSG は、NADPH 依存性の GSH レダクターゼにより GSH に還元される。強い酸化ストレス下においてその還元能を超えた GSSG が生成された場合は、GSSG の過剰な蓄積が生じる前に  $\text{SH} \rightleftharpoons \text{S-S}$  反応による protein S-thiolation が生成される (Thomas et al, 1995, Dafre and Reischl, 1998)。ヒト赤血球で観察された p-SH 基の減少とその速やかな回復は、酸化ストレスによる GSSG の過剰な蓄積に誘起される  $\text{SH} \rightleftharpoons \text{S-S}$  反応が生じたこと、それは GSH と同様、*in vivo* における抗酸化機能の一翼を担っていることを示唆する。一方、血漿 p-SH 基の減少が翌日においても回復しなかったことは、血漿には GSH レダクターゼがきわめて少ないといった細胞内外における還元システムの違いを反映したものであろう。

実験 1 の p-SH 基の回復過程が血漿と赤血球では異なるという結果を受けると、血漿における p-SH 基が抗酸化物質として有効に機能しているのか疑問が生じる。酸化ダメージを受けたタンパク質は速やかに異化排泄されることから、血漿 p-SH 基の回復過程を観察する必要性がある。

まずは、血漿 p-SH 基の回復過程について論じる前に、運動によって誘起された血漿 p-SH 基の減少が酸化であることを証明しなければならない。実験 2 では p-SH 基に生じた反応を検証することを目的としたが、当初、血漿 p-SH 基は GSH との混合ジスルフィドを形成し減少すると予想していた。酸化ストレス下におけるタンパク質の酸化と SH 基との関連を扱った総説の多くは p-S-SG 形成について論じており (Cotgreave et al, 1998)、また、動物実験では運動負荷によって肝臓から循環系への GSH 放出が高まることが報告されていたためである (Pyke et al, 1986)。しかし、還元剤の利用によって p-SH 基から遊出されてきた低分子 SH 基はシステインであった。混合ジスルフィドの相手が GSH ではなくシステインであったことの説明が必要となる。

GSH の分解酵素である  $\gamma$ -GTP は、ヒトの腎臓、小腸、胆管の尖端膜表面に高濃度存在している (Meister et al, 1981)。 $\gamma$ -GTP と dipeptidase はその活性サイトを血管内腔側に呈している。上述したように運動負荷によって肝臓から循環系への GSH 放出が増加し、酸化ストレス下にて p-S-SG が生じた後、 $\gamma$ -GTP と dipeptidase の作用によって p-S-Cys に分解されるという反応メカニズムが考えられる。この説明のためには、 $\gamma$ -GTP と dipeptidase が GSH のみならず p-S-SG にも作用することを確認する必要がある。実験 2 では、*in vitro* での反応試験によって、Fig. 5-4 に示したように  $\text{protein-SH} + \text{GSH} \rightarrow \text{protein-S-SG}$ ,  $\text{protein-S-SG} \rightarrow \text{protein-S-cysteinyl-glycine} + \text{glutamic acid}$ ,  $\text{protein-S-cysteinyl-glycine} \rightarrow \text{protein-S-Cys} + \text{glycine}$  という一連の反応に、 $\gamma$ -GTP ならびに dipeptidase が関与する可能性があることを確認した。

一方、血漿には p-SH 基と比較すると濃度は低いものの、低分子 SH 基である cyst(e)in が GSH よりも多く、60 mM 程度存在する (Table 4-1)。 $2 \text{ protein-SH} + \text{Cy-S-S-Cy} \rightarrow 2 \text{ protein-S-Cys}$  (King, 1961) という反応機序を考え、*in vitro* にて酸化的付加反応を検討し、1 モルのシスチンが 2 モルの p-S-Cys と化学量論的に変換したことを確認した。

実験 2 では、上記の 2 つの反応機序の可能性について検討したわけであるが、*in vivo* においてどちらの反応が優位であるかは不明である。生体内には巧妙な抗酸化ネットワークが構築されており、この問題を解明するためにはさらなる研究が必要である。

いずれにせよ、運動誘発性血漿 p-SH 基の減少が可逆的な反応である混合ジスルフィド結合であれば、循環血液中で再還元される可能性が高い。赤血球でみられた SH 基の再還元には、

GSH レダクターゼといった細胞内の還元システムの存在がある。しかし、GSH レダクターゼは細胞質やミトコンドリアに局在しており、NADPH の存在しない血漿ではその活性はきわめて低い。血漿酸化型 p-SH 基の再還元のみカニズムについて、いくつかの可能性を論じてみたい。

血中の酸化還元制御因子として GSH 系が関与することは周知のことである。血漿中の GSH 濃度そのものは低いが、動物実験からは肝臓での GSH が数十分の短い半減期で代謝回転していること、この GSH の代謝回転が速いことが肝臓からの GSH 放出によっても量的に説明が可能であること、肝・腎を主体とする臓器相関のもとに高速で代謝輸送されることから、細胞内外の GSH 動員量が同程度に維持されている、つまり血漿 GSH の総代謝量は細胞内に劣らないことが知られている (Inoue et al, 1995)。酸化ストレスにより GSH 代謝は亢進する (Inoue et al, 1995)。事実、動物実験では運動負荷によって肝臓からの GSH 放出が増大している (Pyke et al, 1986)。継続した高強度の運動負荷により、酸化ストレスによる GSH 代謝動態の変動が血漿 p-SH 基の酸化還元に影響をもたらす可能性が考えられる。

GSH 系と同様、チオレドキシソによるレッドックス酸化還元制御活性が注目されている (Masutani and Yodoi, 2002)。チオレドキシソ (MW 12 kDa) は SH 基を有するタンパク質であり、大腸菌や植物から高等動物に至るまで広く分布している。2 つの遊離の SH 基を活性中心にもち、SH<sub>2</sub>⇌SS 交換反応による可逆的な酸化還元によって、基質の SH 基の酸化還元状態を制御する。チオレドキシソ自身は酸化されるが、NADPH 依存性のチオレドキシソレダクターゼによって再還元される。GSH の細胞内濃度が mM レベルであるのに対し、チオレドキシソのそれは  $\mu$ M レベルであるが、GSH の細胞内濃度の低下やウイルス感染、種々の酸化ストレスによりあらゆる臓器で誘導され、傷害部位で高発現して生体防御機構の中心的な役割を果たすと考えられている。チオレドキシソが細胞内外を輸送されること、モデル動物へのチオレドキシソの静脈内投与によって虚血再灌流傷害が抑制されたことなどの報告がある一方で (Shibuki et al, 1998)、血漿チオレドキシソの高い HIV1 患者の予後は悪いなど (Nakamura et al, 1996)、血漿におけるチオレドキシソの生物的意義は未解明の部分も残されているもの (近藤および淀井, 2001)、運動という酸化ストレスによって誘導されたチオレドキシソが血漿にみ

いだされ、酸化された p-SH 基の再還元に関与する可能性は高いと考えられる。

ここでは、酸化された血漿 p-SH 基の還元について複数の可能性を論じたが、発生した酸化ストレスに対する生体内での反応のプロセスを説明するルートが一つだけとは限らない。上記の可能性を探るためには、血漿チオレドキシンの測定を通して酸化ストレスによるチオレドキシンの発現誘導を検証する、あるいは GSH 代謝を阻害したモデル動物を用いて血漿 p-SH 基の酸化還元に関与する GSH の意義を解明するといった新たな課題が考えられよう。

実験 3 では、フルマラソンレースという持久運動によって生じる酸化ストレスによる血漿 p-SH 基の変動を、運動終了数日間にわたって観察したが、その結果は、対象者のトレーニング状況によって回復過程が異なるというものであった。実験 3-2 にみられた高強度のトレーニング状況にある対象者では減少した血漿 p-SH 基が翌日に回復したという事実は、p-SH 基の供与体であるアルブミンの分子量 (60 kDa) と半減期 (約 21 日) を考えあわせると、血漿 p-SH 基が循環血液中で再還元されうることを意味すると同時に、何らかの機序によって高強度のトレーニングがその還元反応を促進させる可能性を示唆する。実験 3-1 の中等度のトレーニング状況にある対象者はマラソンレース参加に向けてトレーニングを実施していたにも関わらず、高強度トレーニング実施者にみられたような血漿 p-SH 基の回復は、レース終了 48 時間後まで観察されなかった。血漿 p-SH 基の酸化還元の違いが生じるようになるには、健康の維持増進のために推奨されているような有酸素運動ではなく、高強度のトレーニング負荷が必要であるのかもしれない。高強度の持久トレーニングによってヒト赤血球の抗酸化酵素活性の増加と白血球の活性酸素産生減少が生じることが報告されていることから (Miyazaki et al., 2001)、高強度トレーニングの生理的意義を解明するためのさらなる研究が望まれる。

一方、実験 3-2 で観察された現役または現役に近いトレーニングを実施していた対象者の血漿 p-SH 基がフルマラソンレースによって変動しなかったことは、誘起される酸化ストレスの違いを反映している可能性も捨てきれない。赤血球にみられた SH 基の酸化は、運動による酸素消費量の増大によるものと考えられるが、継続した血漿 p-SH 基の酸化は、肝臓や筋などの組織に生じた持続的な炎症が誘起する活性酸素の生成と関連している可能性も考えられる。ヒ

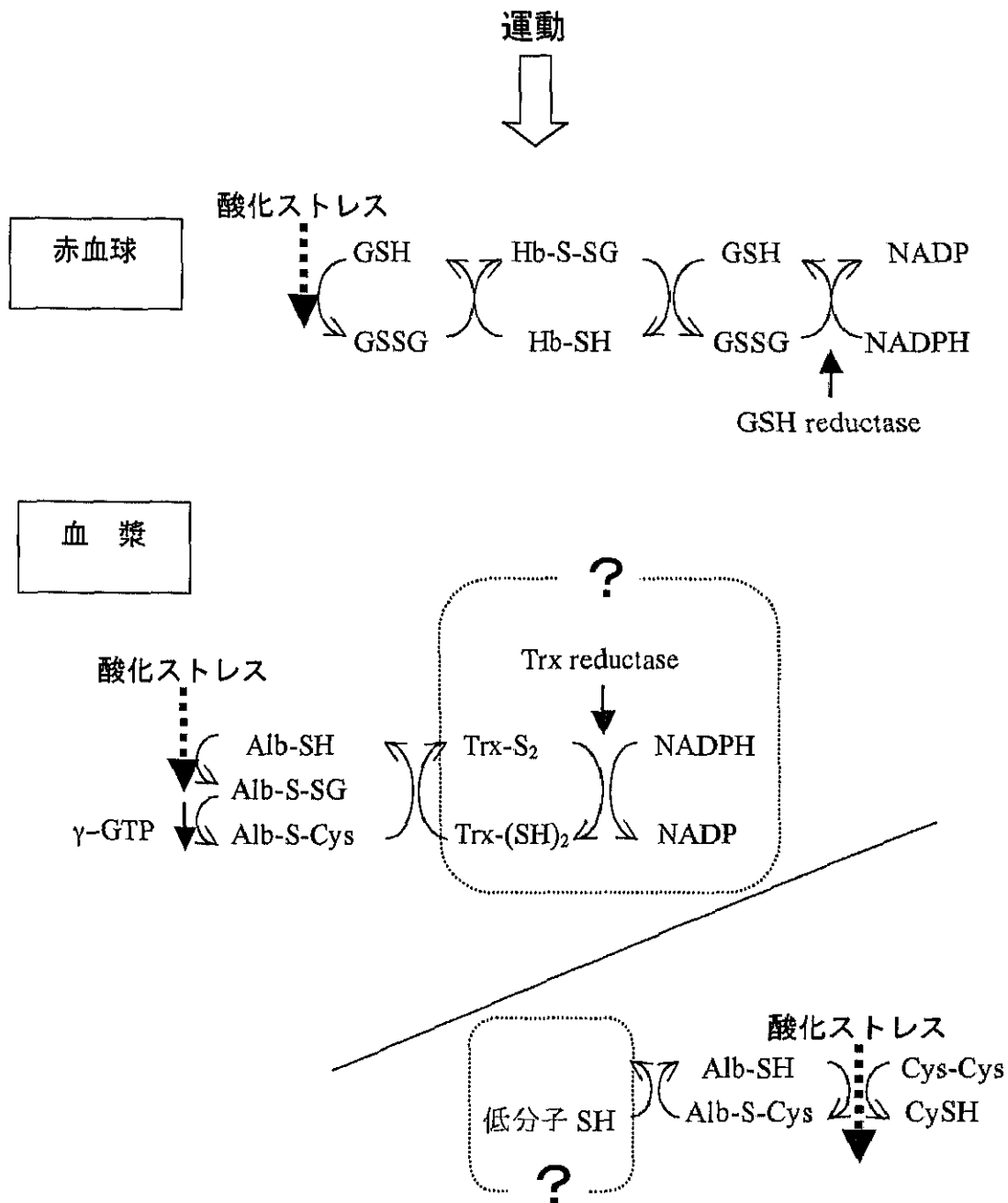


Fig. 7-1. タンパク性 SH 基の酸化モデル

赤血球では、酸化ストレス下にて GSH が酸化・還元される。より強い酸化ストレスによりその還元能を超えた GSSG が生成された場合、GSSG の過剰な蓄積が生じる前に SH⇌S-S 反応による protein S-thiolation が生じる。血漿では、酸化ストレスによって p-SH 基が酸化され p-S-Cys が形成される。その酸化機序にはγ-GTP ならびに peptidase による p-S-SG の加水分解、あるいはまた、cyst(e)in との酸化的付加反応が考えられる。血漿 p-SH 基の再還元のみカニズムは未解明であるが、GSH 代謝の充進による低分子 SH 基やチオレドキシソが関与する可能性が考えられる。

Trx: thioredoxin (チオレドキシソ)

トにおける活性酸素・フリーラジカルの産生を測定することは容易なこととは言えないが、活性酸素の発生を非侵襲的直接的に測定しうる ESR 分析も開発され、ヒトでの応用が期待されている。上記のような酸化ストレスのイベントの違いを検討するには、さらなる測定方法の進展が期待される。

血管弛緩作用を示す NO<sup>•</sup> は速やかに SH 基と反応しニトロソチオール (RS-NO) を形成する。動物実験ではアルブミンの SH 基が NO<sup>•</sup> の slow releaser (徐放剤) 的作用を有し、比較的長時間にわたり NO<sup>•</sup> と同様の血管弛緩作用を示すことで短寿命の NO<sup>•</sup> を有効に作用させることが報告されている (Minamiyama et al, 1996)。一方、赤血球のヘモグロビンは NO<sup>•</sup> のスカベンジャーとなり、ガス状分子の生物作用をそれが発生した局所近辺に限局させる重要な因子として作用すると考えられている (Jia et al, 1996)。本研究は、一過性の運動負荷による血管内の p-SH 基の酸化還元について検証することで、血漿アルブミンならびに赤血球ヘモグロビンのシステイン残基がヒト血管内抗酸化ネットワークの一員として機能する可能性を示唆したものである。運動による動脈硬化リスクの軽減といった健康効果を考える上でも、運動負荷が誘起するヒト血管内の酸化反応と抗酸化反応を解明し、p-SH 基の生物学的意義を理解するために、さらなる研究の遂行が望まれる。