

酸化ストレスの源としてのミトコンドリア由来スーパーオキシド直接検出

筑波技術大学保健科学部附属東西統合医療センター

*なめがた地域総合病院内科

平山 暁, 植田敦志*, 青柳一正

要旨: ミトコンドリアにおけるスーパーオキシドリークは生体内酸化ストレス源と考えられているが、その直接検出は困難が伴う。本研究では電子スピン共鳴 (ESR)法により、新規に開発されたスピントラップ剤 CYPMPO を用い単離ミトコンドリアからのスーパーオキシド直接検出を試みた。CYPMPO では NADH, コハク酸などの基質添加後ミトコンドリアからのスーパーオキシドが検出可能であったが、従前汎用されるスピントラップ剤 DMPO では検出不可能であった。

Key words: 酸化ストレス, ミトコンドリア, 呼吸鎖複合体, 電子スピン共鳴

緒言

酸化ストレスとは生体内の酸化—抗酸化バランスが崩れ酸化的に傾くことにより潜在的に生体に障害を与えうる状態を指し、現在では多くの病態や老化など生命現象全般に幅広く関与していることが知られている[1]。酸化的側面の構成要素として中心をなすものが活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)でありヒドロキシラジカル・スーパーオキシド(O₂⁻)等が知られている。ミトコンドリアは ATP を産生し生体エネルギー代謝を司る細胞内小器官 (オルガネラ)である。ATP 産生過

程ではミトコンドリア呼吸鎖複合体(complex)の電子伝達系上にて4電子還元反応が起こる (図 1)。この過程において、何らかの病因により複合体分子が変性すると呼吸鎖から電子がリークし、酸素分子と反応することにより O₂⁻が発生する。この現象は酸化ストレスの重要な源と考えられているが、O₂⁻リークなど ROS 関連反応の直接検出はその反応速度の高さから技術的困難が大きく、これまでの多くの報告は間接的な代謝産物の測定に留まり定量性を大きく欠く。この酸化ストレス関連反応における出発点の不完全さは、酸化ストレス

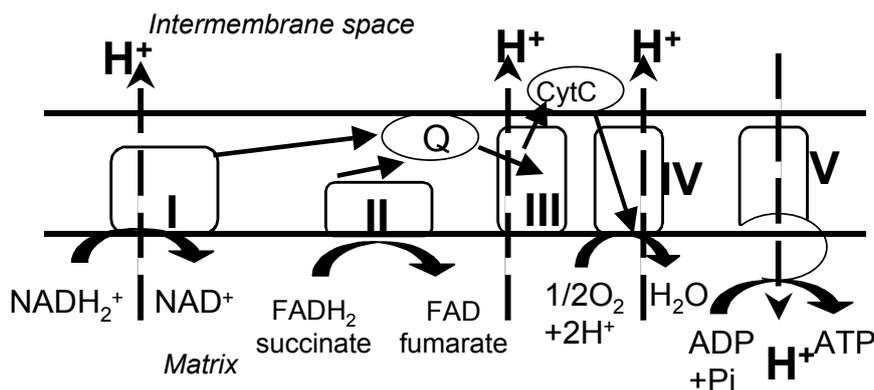


図 1; ミトコンドリア呼吸鎖複合体と電子伝達

I: 複合体I NADH dehydrogenase: $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CoQ} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{CoQH}_2$

II: 複合体II Succinate dehydrogenase: $\text{FADH}_2 + \text{succinate} + \text{CoQ} \rightarrow \text{FAD} + \text{CoQH}_2 + \text{fumarate}$

III: 複合体III Cytochrome bcl: $\text{CoQH}_2 + 2 \text{Cyt } c(\text{Fe}^{3+}) \rightarrow \text{CoQ} + 2 \text{Cyt } c(\text{Fe}^{2+}) + 2\text{H}^+$

CytC: シトクロムc $\text{cyt } c(\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow 4 \text{ cyt } c(\text{Fe}^{2+})$

IV: 複合体IV Cytochrome C oxidase: $4 \text{ cyt } c(\text{Fe}^{2+}) + \text{O}_2 + 4\text{H}^+ \rightarrow 4 \text{ cyt } c(\text{Fe}^{3+}) + 2\text{H}_2\text{O}$

V: 複合体V 複合体 I, III, IV により膜間へ輸送された H⁺が複合体 V 内をマトリックス側に移動する際に、1 分子の ATP が合成される。

実線: 電子伝達, 破線: H⁺輸送, Q: Coenzyme Q.

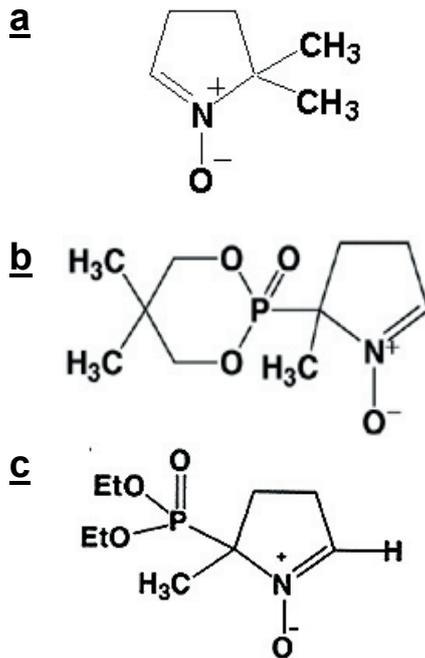


図2；スピントラップ剤

a: DMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-Oxide)

現在 ESR 研究においてもっとも汎用されるスピントラップ剤

b: CYPMPO (5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy-cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide)

c: DEPMPO (5-Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide)

販売元ホームページより引用

<http://homepage3.nifty.com/rinc/esr/reagent/index.html>

研究の発展の障害要因となっており、引いては闇雲に抗酸化効果を謳う製品の氾濫など商業主義的介入を招き、健康被害の実例さえ報告される結果に繋がっている[2].

我々は定量性を伴う ROS の直接検出を目指し、電子スピン共鳴法(ESR)の応用研究に従事してきた。5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy-cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (CYPMPO) は Kamibayashi らにより開発された新しい ESR スピントラップ剤である[3] (図 2a)。我々は開発者との従前からの協力関係から優先的に CYPMPO を入手し応用研究を行ってきた。この中で CYPMPO は従来汎用されてきたスピントラップ DMPO と比べ、ヒドロキシルラジカルと O_2^- で磁場上の特有の信号位置が異なるため重畳を生じることなく両者が容易に鑑別され、かつラジカルトラップ後のアダクトが長時間にわたり安定であるという特性を認め、ミトコンドリア由来 O_2^- リークの検出への応用可能性を見出した。

腎ミトコンドリアからのスーパーオキシドリーク

ミトコンドリアは腎組織を用い、市販のミトコンドリア単離キットにより濃度勾配法により分画した。得られたミトコンドリア分画に基質(コハク酸、グルタミン酸、リンゴ酸)各 1mM, NADH 1mM および CYPMPO 10mM を添加し 15 分静置後 ESR 測定を行った比較として、従前より広く使用されているスピントラップ剤 DMPO(5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-Oxide)を用いた。

ミトコンドリア分画では CYPMPO 添加により $g=2.016$ に 11 本線の複合スペクトルが観察された(図 3a)。このスペクトルは SOD 添加により、比

較的 dull な 3 本線スペクトル (図 2a 中の↓) のみ残存した。両者の差分スペクトル (図 3a 中の*) はシミュレーションによる CYPMPO の O_2^- アダクト (CYPMPO-OOH) と一致し、 O_2^- の検出に成功した (図 3b)。DMPO では同一条件あるいは基質濃度の増量などを試みるも 10 本線のスペクトルのみ観察可能であった (図 3c)。これは超微細構造定数解析からメチルラジカルとヒドロキシルラジカルの重畳した複合スペクトルと決定され、 O_2^- の直接検出は不可能であった。

DMPO は ESR スピントラップとして汎用されてきたが、 O_2^- アダクトは寿命が短く (1 分未満) また DMPO-OH アダクトへ変成するため OH との鑑別が難しく O_2^- の評価には不向きであった。これに対し DEPMPO (5-Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide) が開発されたが、脂溶性が高く取り扱いに難しいといった欠点があった。CYPMPO は水溶性且つ常温で固体であり、OH と O_2^- の鑑別が容易である。これらの利点に加え、アダクトの安定性が高いことから、本研究で示す O_2^- リークの検出を可能にしたと考えられる。

この検出法を病態モデルに応用し、定量性検出の可能性を検討した。我々は先にピューロマイシン腎症顕性蛋白尿期ではミトコンドリア機能異常が見られることを報告している[4, 5]。同時期において単離ミトコンドリアからの O_2^- を測定したところ、無処置群に比べリークの増加が確認された (データ非提示)。

上述の如く酸化ストレスは腎のみならず広領域の疾患・病態において関与が知られ、他の実験系への応用が期待される。本法を北海道大学稲波修教授らとの共同研究により放射線照射後のアポトーシス研究へ応用した。A549 細胞 (ヒト肺ガン

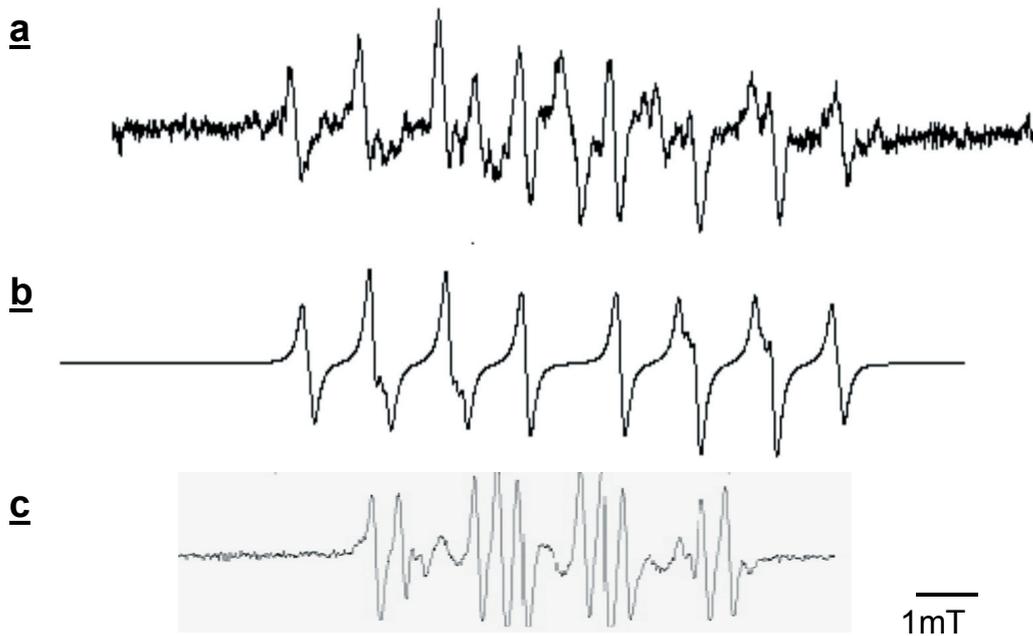


図3；ミトコンドリア由来スーパーオキシドのESRスペクトル
 a: 単離ミトコンドリアに CYPMPO 10mM をスピントラップとして得られた ESR スペクトル。
 CYPMPO-OOH と不明な 3 本線の broad なスペクトルの重畳スペクトル。
 b: CYPMPO-OOH のシミュレーションスペクトル。
 c: a と同一条件で DMPO をスピントラップとした際の ESR スペクトル。

細胞系列)に放射線照射し、照射後単離ミトコンドリアを回収し本法にて O_2^- 測定を行ったところ、非照射群に比べ有意な O_2^- の増加を認められた [6]。またこのほかにも胃ガン細胞系列や肝虚血再還流における O_2^- 動態も本法により追跡している。

本法は濃度勾配法により分画された単離ミトコンドリアを使用しているため、ミトコンドリア自体の viability が測定上問題となる。このため、酸素消費量の測定などの併用によるミトコンドリア機能の確認が必要である。またミトコンドリア内には多量の Mn-SOD が分布するため、 O_2^- リークは簡単に生じないとする議論もある。近年間接的ながら ESR 測定による O_2^- リーク同定を支持する結果も報告されており [7]、今後細部の検討が必要である。

まとめ

ミトコンドリア O_2^- リークは加齢や発癌との関連が云われているが、これまで O_2^- そのものの検出は困難であり、ESR を用いても連鎖反応ラジカルの検出が主体であった。CYPMPO のようなスピントラップの発展により、今後 O_2^- 自体の評価が発展すると考えられる。今回の結果はミトコンドリアの還元能低下と同時に O_2^- リークが増加することを裏付けている。

謝辞

本研究の遂行に当たりご協力いただいたあさおクリニック・大和田滋博士、京都薬科大学・上林将人博士、北海道大学・稲波修教授、Oklahoma Medical Research Foundation・古武弥成教授に感謝申し上げます。また呼吸鎖複合体解析研究は故吉村哲彦博士の多岐にわたるご指導によります。本研究の一部は平成 20 年度筑波技術大学研究高度化推進事業により行われております。

参考文献

- 1) Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med. 1991 Sep 30;91(3C):31S-38S.
- 2) 平山 暁. 暗闇で黒猫を探す. 腎と透析「巻頭言」腎と透析64(3):p301-302
- 3) Kamibayashi M, Oowada S et al.: Synthesis and characterization of a practically better DEPMPO-type spin trap, 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO). Free Radic Res 40: 1166-72, 2006.
- 4) Aoyagi K, Akiyama K et al.: Imaging of hydroperoxides in a rat glomerulus stimulated by puromycin aminonucleoside. Kidney Int 56: S153-5, 1999.

- 5) Ueda A, Yokoyama H et al.: Identification by an EPR technique of decreased mitochondrial reducing activity in puromycin aminonucleoside-induced nephrosis. *Free Radic Biol Med* 33: 1082, 2002.
- 6) Ogura A, Oowada S, et al. .Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer Lett.* 2008 Dec 29. [Epub ahead of print]
- 7) O'Malley Y, Fink BD et al.: Reactive oxygen and targeted antioxidant administration in endothelial cell mitochondria. *J Biol Chem* 281: 39766-75, 2006.

Direct detection of mitochondrial superoxide leakage as an origin of oxidative stress

HIRAYAMA Aki, UEDA Atsushi*, AOYAGI Kazumasa

Department of Internal Medicine, Center for Integrative Medicine, Faculty of Health Sciences, Tsukuba University of
Technology

* Department of Internal Medicine, Namegata District General Hospital

Abstract : Requirements for the direct detection and quantification of mitochondrial superoxide leakage are seriously increasing. We developed a new method to allow a direct detection of superoxide from isolated mitochondria based on electron spin resonance (ESR)-spin trapping technology. A newly developed spin trapping reagent CYPMPO (5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide) shows a long and stable formation of superoxide spin adduct, which allows us a detection of CYPMPO-OOH spectrum in a mitochondrial suspension.

Key words : Oxidative Stress, Mitochondria, Respiratory chain complexes, Electron spin resonance