

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18500519
 研究課題名（和文）過剰運動時に漏出するミオグロビンにより生成する脂質由来ラジカルの検出とその同定
 研究課題名（英文）Detection and identification of lipid-derived radicals formed by myoglobin released from damaged skeletal muscles after excessive exercise.
 研究代表者
 熊本 和正（KUMAMOTO KAZUMASA）
 近畿大学・健康スポーツ教育センター・准教授
 研究者番号：50225231

研究成果の概要：牛腎ミクロソームにスピントラップ剤 4-POBN、NADPH、ADP および FeCl₃ を添加し、37℃で 60 分間反応後、高速液体クロマトグラフィー／電子常磁性共鳴／質量測定をしたところ、ペンチルラジカルおよびヒドロキシペンチルラジカルが検出・同定された。このラジカル生成反応において、ミオグロビンが過酸化脂質からのフリーラジカル生成を促進することにより腎毒性を発揮する可能性が示唆された。また、このラジカル生成反応において何らかのフリーな鉄の関与も示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|----------|---------|----------|
| 2006 年度 | 500,000 | 0 | 500,000 |
| 2007 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 2008 年度 | 400,000 | 120,000 | 520,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 1400,000 | 270,000 | 1670,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、スポーツ科学

キーワード：横紋筋融解症、急性腎不全、ミオグロビン、ラジカル、脂質過酸化、スピントラッピング、EPR、ミクロソーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 過剰運動によって骨格筋が傷害され、筋の融解壊死によって血中にミオグロビン(Mb)やクレアチンキナーゼなどが漏出される。この骨格筋細胞の融解が高ずることにより、横紋筋融解症を発症し、さらに急性腎不全に至ることがある。

(2) 過剰運動による腎障害におけるフリーラジカルの関与についてはよく言われているが、フリーラジカルの検出および同定に関してはほとんど行われていない。

2. 研究の目的

この過剰運動に伴う横紋筋融解症や急性腎不全とフリーラジカルとの関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

筋の融解壊死時に血中に漏出するミオグロビンによる脂質過酸化反応に焦点をあて、(1) ミオグロビンと脂質との反応により生ずるフリーラジカルを HPLC-ESR 法および HPLC-ESR-MS 法を用いて検出および同定を行う。(2) 続いて、マイクロダイアリース・シス

テムによるフリーラジカルのラット生体内検出へと進展する。

フリーラジカルそのものの検出を行うことにより、過剰運動に伴う横紋筋融解症や急性腎不全とフリーラジカルとの関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ラット脳ホモジネート/二価鉄/アスコルビン酸反応溶液中に生成するフリーラジカルの検出・同定をおこなった。

生体中のフリーラジカルの検出・同定に慣れるために、ラット脳ホモジネートに二価鉄およびアスコルビン酸を加えた反応溶液中に生成するラジカルの高速液体クロマトグラフィー/電子スピン共鳴 (HPLC-EPR) 法および高速液体クロマトグラフィー/電子スピン共鳴/質量分析 (HPLC-EPR-MS) 法による検出と構造決定をおこなった。反応溶液の EPR スペクトルを測定すると強いシグナルが得られたが、反応溶液からラット脳ホモジネートおよび二価鉄をそれぞれ除去すると、EPR スペクトルは殆ど得られなかった。また、反応溶液からアスコルビン酸あるいは EDTA を除去した場合、EPR スペクトルのピーク高はそれぞれ 35%と 54%に減少した。反応溶液の HPLC-EPR 測定をおこなったところ、4つの強いピークが得られた。反応溶液からラット脳ホモジネート、二価鉄およびアスコルビン酸をそれぞれ除去すると、HPLC-EPR ピークは殆ど得られなかった。また、反応溶液から EDTA を除去すると HPLC-EPR ピーク高が減少した。4番目の最も強いピーク (保持時間 33.7分) について、HPLC-EPR-MS 測定を行ったところ、2つのイオンが得られた (m/z 224 および m/z 137)。この m/z 224 のイオンは ethyl ラジカルとスピントラップ剤 (4-POBN) との付加体に対応し、このイオンから $(\text{CH}_3)_3\text{C}(\text{O})\text{N}$ が開裂した残りが m/z 137 のイオンに対応する。これらのことより、ラット脳ホモジネートに二価鉄およびアスコルビン酸を加えた反応溶液中において ethyl ラジカルが生成されたことがわかった。

(2) Mb の腎毒性のメカニズムを明らかにするために牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液中のフリーラジカル生成に対するミオグロビン添加の影響について検討した。

牛腎ミクロソームにスピントラップ剤 4-POBN、NADPH、Mb を添加し、37°C で 60 分間反応後、電子常磁性共鳴スペクトル (EPR) 測定した。完全反応溶液の EPR スペクトルを測定すると、トリプレット・ダブレットからなる典型的な 4-POBN ラジカルアダクトの顕

著な EPR シグナルがみられ、反応溶液中にフリーラジカルが生成していることが明らかになった。この反応溶液より、ミクロソームあるいは NADPH を除くと、EPR シグナルがほとんど見られなかった。一方、Mb を反応溶液から除くと、EPR シグナル強度が減少した (Fig. 1)。以上のことから、Mb は牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液中のフリーラジカル生成を促進することが分かった。完全反応溶液に EDTA を添加すると EPR シグナルが消失し、Mb 溶液に EDTA を添加しても可視吸収スペクトルに変化がないことから、EDTA は Mb のヘム鉄にキレートしないことがわかった。このことから、この反応にフリーな鉄イオンの関与が示唆された。

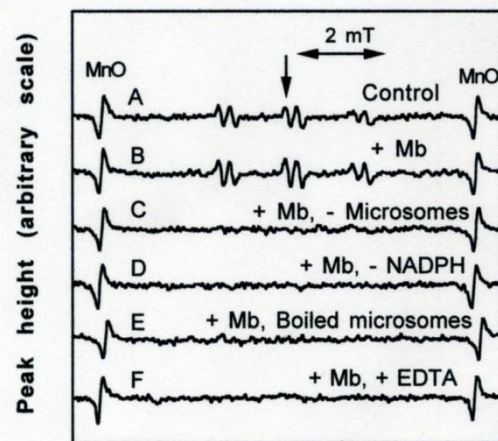


Fig. 1 牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液の EPR 測定

過酸化脂質からのフリーラジカルの生成に対する Mb の影響を検討するために、13-ヒドロペルオキシドと Mb との混合溶液にスピントラップ剤 4-POBN を添加し EPR スペクトルを測定した。この 13-ヒドロペルオキシドはリノール酸と大豆リポキシゲナーゼとの反応によりを得た。Mb を添加することにより、顕著な EPR シグナルが観測され、Mb は 13-ヒドロペルオキシド (過酸化脂質) からのフリーラジカルの生成を触媒することがわかった (Fig. 2)。

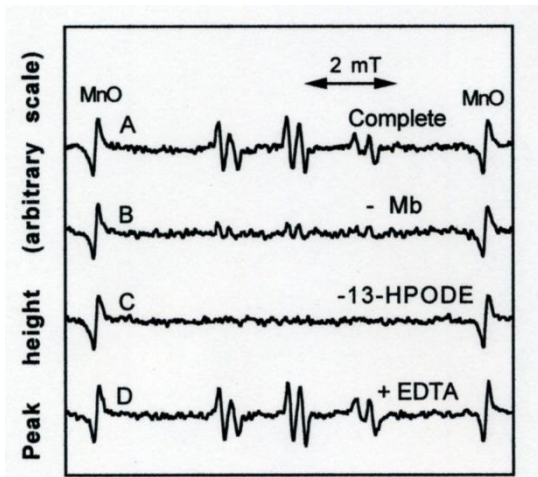
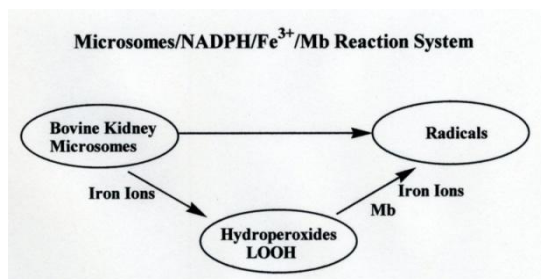


Fig. 2 13-HPODE と Mb との反応の EPR 測定

以上をまとめると牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液中において Mb は過酸化脂質からのフリーラジカルの生成を促進することにより腎毒性を発揮する可能性が示唆された (Scheme1)。



Scheme1. 本研究で用いられた反応系に対するミオグロビンおよび何らかのフリーな鉄の影響

牛腎ミクロソーム/NADPH反応溶液にADP (10mM) およびFeCl₃ (0.17mM) を添加した反応溶液 (牛腎ミクロソーム/NADPH/ADP/FeCl₃反応溶液) をHPLC-EPR測定したところ、P₁ (保持時間29.4分)、P₂ (保持時間32.4分) およびP₃ (保持時間46.6分) の3つのピークが検出された。これらの3つのピークを質量測定すると、P₃については質量数266 m/zが、P₂およびP₁については質量数282 m/zが得られ、P₃はペンチルラジカル、P₂とP₁はそれぞれヒドロキシペンチルラジカルであると推定された (Fig. 3)。別途合成したペンチルラジカルおよびヒドロキシペンチルラジカルのHPLC-EPRの保持時間とP₁, P₂, P₃の保持時間を比較することによりP₃はペンチルラジカル、P₂とP₁はそれぞれヒドロキシペンチルラジカルであると同定された (Fig. 4)。

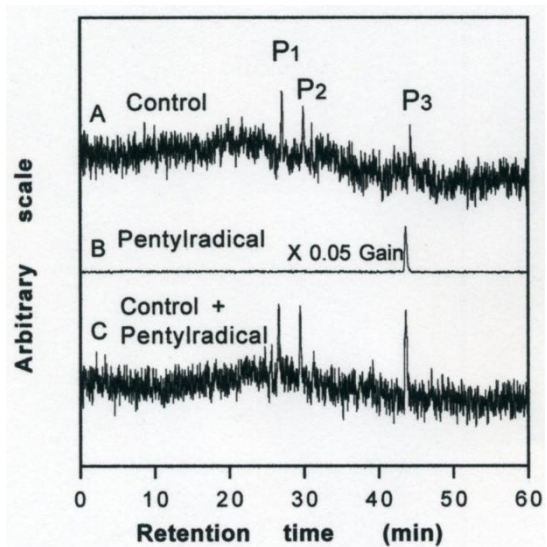


Fig. 3 牛腎ミクロソーム/NADPH/ADP/FeCl₃ 反応溶液と合成されたペンチルラジカルの EPR測定

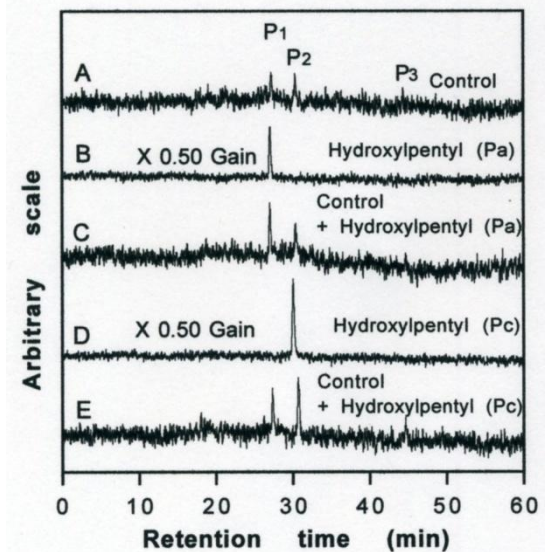


Fig. 4 牛腎ミクロソーム/NADPH/ADP/FeCl₃ 反応溶液と合成されたヒドロキシペンチルラジカルの EPR測定

牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液中のラジカル種生成に対する、金属イオンの影響および金属キレート剤の影響について検討した。牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液に種々濃度の種々の金属イオン (0, 10, 50, 100 μM) を添加し、EPR 測定をおこなった。添加した金属イオンは、モール塩、塩化銅、塩化亜鉛、塩化鉄 (III)、塩化カルシウムおよび塩化マグネシウムであった。モール塩では EPR ピーク強度がわずかに増加し、塩化銅および塩化亜鉛では減少した。塩化鉄 (III)、塩化カルシウムおよび塩化マグネシウムでは変

化が見られなかった。

牛腎ミクロソーム/NADPH反応溶液に種々の金属キレート剤 (100 μ M) を添加し、EPRピーク高の変化を調べた。添加した金属キレート剤は、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)、NTA(ニトリロ三酢酸)、DTPA(ジエチレントリアミン五酢酸)およびDFO(デフェロキサミン)であった。EDTA、DTPAおよびDFOを添加すると、EPRシグナルは消失し、NTAを添加すると、EPRピーク高が35.8%増加した。以上のことからこのラジカル生成反応において何らかのフリーな鉄の関与が示唆された。

マイクロダイアリース・システムによるフリーラジカルのラット生体内検出については目下のところ成功しなかった。今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Kumamoto K, Hirai T, Kishioka S and Iwahashi H, Identification of a radical formed in the reaction mixture of rat brain homogenate with a ferrous ion/ascorbic acid system using HPLC-EPR and HPLC-EPR-MS, Free Radical Research, 41(6), 650-654, 2007, 査読有り

② Iwahashi H, Hirai T and Kumamoto K, High performance liquid chromatography/electron spin resonance/mass spectrometry analyses of radicals formed in an anaerobic reaction of 9-(or 13-)hydroperoxide octadecadienoic acids with ferrous ions, Journal of Chromatography A, 1132(1-2), 67-75, 2006, 査読有り

[学会発表] (計3件)

① 熊本和正, 平井富弘, 岸岡史郎, 岩橋秀夫, 牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液中のフリーラジカル生成に対するミオグロビン添加の影響, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会, 第80回日本生化学会大会 合同大会), 2007年12月11日~15日, 横浜

② Kumamoto K, Hirai T, Kishioka S and Iwahashi H, Identification of 1-Ethoxyethyl Radicals in the Reaction of Ferrous Ions with Serums from Rats Exposed to Diethyl Ether, The XI International Congress of Toxicology (Montreal, Canada, July 15-19, 2007)

③ Kumamoto K, Hirai T, Kishioka S and Iwahashi H, Identification of a radical formed in the reaction mixture of rat brain homogenate with ferrous ion/ascorbic acid using HPLC-ESR and HPLC-ESR-MS, The 13th Congress of the Society for Free Radical Research International (Davos, Switzerland, August 15-19, 2006)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊本 和正 (KUMAMOTO KAZUMASA)
近畿大学・健康スポーツ教育センター・
准教授
研究者番号: 50225231

(2) 研究分担者

岩橋 秀夫 (IHASHI HIDEO)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50145926
(2008年より連携研究者に変更)
岸岡 史郎 (KISHIOKA SHIROH)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60137255
(2008年より連携研究者に変更)
平井 富弘 (HIRAI TOMIHIRO)
大阪産業大学・人間環境学部・教授
研究者番号: 70020104
(2008年より連携研究者に変更)

(3) 連携研究者