

## ラジカルイニシエーターまたはデヒドロアスコルビン酸を投与したニワトリ 肝臓におけるグルタチオン依存性デヒドロアスコルビン酸還元酵素活性

佐々木啓介<sup>1)</sup>・古賀賢悟<sup>2)</sup>・成田 玲<sup>2)</sup>・福田龍樹<sup>2)</sup>・北口泰也<sup>2)</sup>・青柳陽介<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 農業技術研究機構畜産草地研究所, 茨城県茎崎町 305-0901

<sup>2)</sup> 茨城大学農学部, 茨城県阿見町 300-0392

生体は, アスコルビン酸 (AA) の酸化によって生じる酸化型 AA, すなわちデヒドロアスコルビン酸 (DHAA) をすみやかにもとの AA に還元する機構を備えている。この機構を主として担っているグルタチオン依存性 DHAA 還元酵素 (GSH-DHAR) 活性が, ニワトリ肝臓において, 2,2'-アゾビスアミジノプロパン二塩酸塩 (AAPH) 投与により誘起した酸化的ストレスおよび DHAA 投与によりどのように変化するかについて検討した。16 日齢のニワトリに AAPH あるいは DHAA を 100 g 体重当たり 40  $\mu$  mol 腹腔内投与し, 3 時間後に屠殺して肝臓をサンプルとして得た。酸化的ストレスにより肝臓のチオバルビツール酸反応物 (TBARS) 量は増加し, AA は減少した。DHAA 投与により肝臓の TBARS 量は変化せず, AA 濃度は増加した。肝臓の GSH-DHAR 活性は酸化的ストレスによっては変化しなかったが, DHAA 投与により有意に上昇した。GSH-DHAR 活性の制御に対してその基質である DHAA が重要な役割を演じていることが示唆された。

**キーワード:** ニワトリ, アスコルビン酸リサイクル, グルタチオン依存性デヒドロアスコルビン酸還元酵素, 酸化的ストレス

### 緒 言

アスコルビン酸 (AA) は, 重要な抗酸化物質の一つであり, 生体の水溶性画分においてラジカル分子種を捕捉し, 生体を酸化的ストレスから防御する働きを有する (Rose and Bode, 1993)。ニワトリ生体において, AA 誘導体の給与は暑熱ストレス曝露あるいはラジカル開始剤投与による摂食量および飼料効率の低下を軽減することが報告されている (青柳ら, 1996; 青柳ら, 1997)。これはニワトリ生体内においても AA が酸化的ストレスに対し防御的に働いたためと考えられている。このような AA の酸化的ストレスに対する防御反応により, AA は自らが酸化されアスコルビン酸フリーラジカルおよびデヒドロアスコルビン酸 (酸化型アスコルビン酸,

DHAA) に変換される (Rose and Bode, 1993)。DHAA は不安定な化合物であり加水分解されやすいが (倉田, 1990), 生体はこれを還元して AA に戻すリサイクル機構の存在が知られている。ヒトやラットにおける DHAA の還元を直接的に担う酵素としてグルタチオン依存性デヒドロアスコルビン酸還元酵素 (GSH-DHAR, EC 1.8.5.1) が知られており, 諸性質が調べられている (Maellaro *et al.*, 1994; Ishikawa *et al.*, 1998)。

著者らはこれまでに, ニワトリ各臓器における GSH-DHAR 活性について検討し, その結果当該酵素活性は肝臓において最も高いこと, 活性は細胞質ゾルに局在し, 確かにグルタチオン依存性であることを明らかにしている。また, 培養肝細胞においても細胞外 DHAA が迅速に AA に還元されることを確認しており, 肝臓は AA リサイクル機構において重要な役割を演じているものと期待される (Sasaki *et al.*, 2001)。

霊長類を除く哺乳類や高度に進化した鳥類においては, AA の生合成は肝臓において行われるが, ニワトリをはじめとする家禽においては, AA 生合成の場は腎臓である (Chatterjee, 1973; Kiuchi *et al.*, 1982)。一方, 肝臓における薬物代謝系において AA が必要である (堀

2001年9月28日受付 2001年11月28日受理

連絡者: 佐々木啓介

〒305-0901 農業技術研究機構畜産草地研究所品質開

発部畜産物品質評価研究室, 茨城県茎崎町池の台2

Tel 0298-38-8690 (直通)

Fax 0298-38-8606 (代表)

Email: ksuk@affrc.go.jp

尾・吉田, 1990)。これらのことから、肝臓は比較的 AA の要求性が高い臓器である可能性が高い。このため、ニワトリ肝臓における AA リサイクルは、AA 量を維持するための重要な機能の一つである可能性が考えられた。

本研究では、ニワトリ肝臓における AA リサイクルの制御機構解明の一環として、ラジカル開始剤を投与して酸化ストレスを誘導したニワトリ、および GSH-DHAR の基質である DHAA を投与したニワトリの肝臓中 GSH-DHAR 活性がどのように変化するかについて検討した。

### 材料および方法

単冠白色レグホーン種初生雄ヒナを市販の幼雛用飼料で 16 日間予備飼育した。環境温度は  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照明は、24 時間照明とした。予備飼育終了後、ニワトリを 5 羽ずつ 3 群にわけ、それぞれを対照区 (C 区)、ラジカルイニシエーター (2,2'-アゾビスアミジノプロパン二塩酸塩, AAPH) 投与区 (R 区)、DHAA 投与区 (D 区) とした。AAPH は水溶性のラジカル開始剤であり (Niki, 1990)、ニワトリ個体における酸化ストレス誘導に有効な物質である (青柳ら, 1996)。R 区および D 区には、体重 100 g あたり 0.5 ml の生理的食塩水で溶解した AAPH または DHAA (80 mM,  $40 \mu\text{mol}/100 \text{g}$  体重) をそれぞれ腹腔内投与し、C 区には体重 100 g あたり 0.5 ml の生理的食塩水を腹腔内投与した。投与 3 時間後にニワトリを過麻酔により屠殺し、肝臓をサンプルとして得た。これらサンプルについてチオバルビツール酸反応物 (TBARS)、AA、および GSH-DHAR 活性をそれぞれ測定した。AA 量については  $\alpha, \alpha'$ -ジピリジル法 (Zannoni *et al.*, 1974) で、TBARS 量については Masugi and Nakamura (1977) の方法でそれぞれ測定した。GSH-DHAR 活性については、肝臓を 10 倍容の 100mM リン酸カルシウム緩衝液 (pH 7.2) でホモゲナイズ後、12,000 g で遠心分離した上清を用いた。活性測定は Stahl *et al.* (1985) の方法、すなわち 0.25 mM DHAA, 1 mM GSH および 1/10 容の肝ホモジネート上清を含む 100mM リン酸カルシウム緩衝液 (pH 7.2) を  $30^\circ\text{C}$  でインキュベートし、生成する AA を 265 nm の吸光度でモニターすることで行った。AA のモル吸光度係数は  $14,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を用いた。GSH-DHAR 活性は  $30^\circ\text{C}$  で 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  の AA を生成する酵素量を 1 unit と定義し、全タンパク質あたりの比活性で表現した。タンパク質量は Lowry 法を用いて測定し、標準物質としては牛血清アルブミンを用いた。

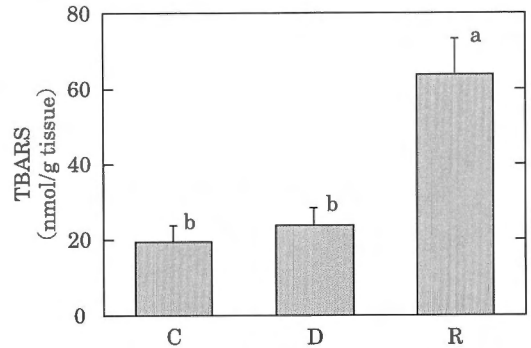


図 1. デヒドロアスコルビン酸または 2,2'-アゾビスアミジノプロパン二塩酸塩 (AAPH) 投与がニワトリ肝臓のチオバルビツール酸反応物 (TBARS) 濃度に及ぼす影響

Fig. 1. Effect of dehydroascorbic acid and 2,2'-azobis (amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) on thibarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in chicken liver

値は平均値±標準誤差 (n=5).

Values are mean±SE (n=5).

異符号間に有意差あり (P<0.05).

Means with different superscript are different significantly (P<0.05).

### 結果および考察

AAPH あるいは DHAA 投与 3 時間後のニワトリ肝臓中 TBARS 濃度を図 1 に示した。D 区においては、TBARS 濃度は C 区と差は見られなかった。R 区においては、TBARS 濃度は C 区に比べて有意に上昇した。TBARS は脂質過酸化物の指標として広く用いられている。青柳ら (1996) は既に AAPH を投与することで、AAPH 由来のラジカルによると考えられる酸化障害、すなわち TBARS 量の上昇が肝臓で誘起されることを示している。R 区において肝臓中の TBARS 量が増加したことから、AAPH によりニワトリに酸化ストレスが誘導されたものと考えられた。

肝臓の AA 濃度を図 2 に示した。D 区においては、AA 濃度は C 区と比較して有意に上昇した。前述の通り、生体は DHAA を還元して AA に変換する機構を備えており、D 区における AA 濃度の上昇は、投与した DHAA が還元されたことが主な要因として考えられた。ただし、本研究における AA 濃度の上昇はあまり大きなものではなかった。著者らはニワトリ培養肝細胞を DHAA で処理したところ、細胞内 AA は処理 1 時間後

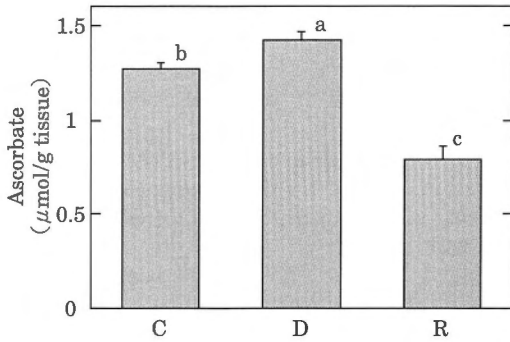


図 2. デヒドロアスコルビン酸または 2,2'-アゾビスアミジノプロパン二塩酸塩 (AAPH) 投与がニワトリ肝臓のアスコルビン酸濃度に及ぼす影響

Fig. 2. Effect of dehydroascorbic acid and 2,2'-azobis (amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) on ascorbate concentration in chicken liver

値は平均値±標準誤差 (n=5).

Values are mean±SE (n=5).

異符号間に有意差あり (P<0.05).

Means with different superscript are different significantly (P<0.05).

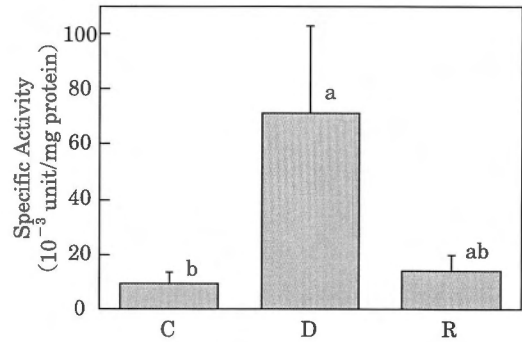


図 3. デヒドロアスコルビン酸または 2,2'-アゾビスアミジノプロパン二塩酸塩 (AAPH) 投与がニワトリ肝臓のグルタチオン依存性デヒドロアスコルビン酸還元酵素活性に及ぼす影響

Fig. 3. Effect of dehydroascorbic acid and 2,2'-azobis (amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) on glutathione-dependent dehydroascorbate reductase activity in chicken liver

値は平均値±標準誤差 (n=5).

Values are mean±SE (n=5).

異符号間に有意差あり (P<0.05).

Means with different superscript are different significantly (P<0.05).

にもっとも上昇し、その後ゆるやかに減少することを示している (Sasaki *et al.*, 2001)。また、本研究における DHAA の体重あたり投与量は血中 AA 濃度をめやすとして設定しており、投与量としては十分であると考えられる。このため、図 2 における D 区での肝臓中 AA 上昇があまり大きくない理由としては、一度上昇した後に減少に転じた場面を測定した可能性が考えられる。この点を明らかにするためには、DHAA 投与時における生体内の AA および DHAA 濃度に関して経時的な検討が今後必要であると考えられた。一方、R 区については、肝臓 AA 濃度は C 区に比べて有意に減少した。R 区における肝臓 AA 濃度の減少は、AAPH により誘導された酸化ストレスに対し AA が防御的に働き酸化されたためと考えられた。AAPH 投与により酸化ストレスが誘導された R 区においては、AA 代謝が C 区に比べて変動したものと考えられた。

肝臓の GSH-DHAR 活性を図 3 に示した。D 区においては C 区に対し有意に上昇したが、R 区においては C 区と比べて変化は見られなかった。R 区において、ニワトリは明らかに酸化ストレス下にあり、さらに AA 代謝の変動が見られたにも関わらず、GSH-DHAR 活性には変化が見られなかったことから、GSH-DHAR 活性は

酸化ストレスによっては直接的に制御されない可能性が強く示唆された。一方、D 区において GSH-DHAR 活性の上昇が見られたことから、GSH-DHAR 活性は、その基質である DHAA により制御されている可能性が示唆された。また、D 区の肝臓で見られた AA 濃度の上昇 (図 2) は、活性の上昇した GSH-DHAR が投与された DHAA を還元した結果であると考えられた。また、著者らは予備的にニワトリ肝実質細胞の初代培養系を用いた実験により、培養肝細胞の外因性 DHAA の還元能力が AAPH による酸化ストレス処理によって誘導されないことを見いだしている (データ示さず)。以上の結果はニワトリ肝臓の GSH-DHAR 活性が R 区において変化しなかったことと符合し、酸化ストレスが AA リサイクルを直接的に制御しない可能性をさらに強めるものと考えられた。

以上の結果より、AA リサイクルにおいて主要な働きを演じる GSH-DHAR 活性は、肝臓においてはその基質である DHAA がその制御に対し重要な働きを演じている可能性が考えられた。AA が利用されて DHAA に酸化される反応は、酸化ストレスに対して防御的に働く場合のみならず、コラーゲン合成 (佐藤・吉中, 1990)

など他の場面においても存在する。このことから、基質である DHAA が GSH-DHAR の活性に直接影響することは、酸化ストレスにより制御される可能性に比べて合理的であると考えられた。これらのメカニズム、特に DHAA の作用機作についてさらに詳細な検討が必要であるとと考えられた。

しかし、R 区においては酸化ストレスにより AA が消費され DHAA が生じると考えられるにも関わらず、GSH-DHAR 活性に有意な変化は無かった。D 区においては既に述べたとおり、大量の DHAA を投与していると考えてよい場合、GSH-DHAR 活性に有意な影響をおよぼしたと考えられた。しかし、AAPH 処理による DHAA の生成については GSH-DHAR を誘導するほどの量ではなかった可能性がある。このことを明確にするためには、酸化ストレスに曝露したニワトリにおける体内 DHAA 量に関して経時的かつ定量的な検討が必要であると考えられた。以上のことから、酸化ストレス防御機構として AA リサイクルが機能するかどうかを解明するためには、酸化ストレス下での生体内 DHAA 濃度や肝臓 GSH-DHAR 活性について、経時的な検討が必要であると考えられた。

### 引用文献

青柳陽介・成宮克英・伊藤 忍・佐々木啓介・中谷哲郎. ラジカルイニシエーター投与ヒナに及ぼす L-アスコルビン酸-2-リン酸マグネシウムの飼料添加の影響. 日本家禽学会誌, 33 : 383-387. 1996.

青柳陽介・大西 崇・伊藤 忍・中谷哲郎. 暑熱ストレス及び L-アスコルビン酸-2-リン酸マグネシウムがニワトリヒナの血漿と肝臓のチオバルビツール酸反応物および肝臓のタンパク質カルボニル濃度に及ぼす影響. 日本家禽学会誌, 34 : 63-66. 1997.

Chatterjee IB. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science*, 182 : 1271-1272. 1973.

堀尾文彦・吉田 昭. ビタミン C と薬物代謝系. 日本農芸化学会誌, 64 : 1854-1857. 1990.

Ishikawa T, Casini AF and Nishikimi M. Molecular cloning and functional expression of rat liver glutathione-dependent dehydroascorbate reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 : 28708-28712. 1998.

Kiuchi K, Nishikimi M and Yagi K. Purification and characterization of L-gulonolactone oxidase from chicken kidney microsomes. *Biochemistry*, 27 : 5076-5082. 1982.

倉田忠男. ビタミン C の酸化還元性. 日本農芸化学会誌, 64 : 1846-1849. 1990.

Maellaro E, Bello BD, Sugherini L, Santucci A, Comport M and Casini AF. Purification and characterization of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver. *Biochemical Journal*, 301 : 471-476. 1994.

Masugi F and Nakamura T. Measurement of thibarbituric acid value in liver homogenate solubilized with sodium dodecylsulphate and variation of the values affected by vitamin E and drugs. *Vitamins (Japan)*, 51 : 21-29. 1977.

Niki E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods in Enzymology*, 186 : 100-108. 1990.

Rose RC and Bode AM. Biology of free radical scavengers : an evaluation of ascorbate. *FASEB Journal*, 7 : 1135-1142. 1993.

Sasaki K, Kitaguchi Y, Koga K, Narita R, Fukuda T and Aoyagi Y. Dehydroascorbic acid reduction in several tissues and cultured hepatocytes of the chicken. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 65 : 2288-2290. 2001.

Stahl RL, Liebes LF and Silber R. A reappraisal of leukocyte dehydroascorbate reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 839 : 119-121. 1985.

佐藤 守・吉中禮二. ビタミン C とコラーゲンの生成. 日本農芸化学会誌, 64 : 1850-1853. 1990.

Zannoni V, Lynch M, Goldstein S and Sato P. A rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissue. *Biochemical Medicine*, 11 : 41-48. 1974.

## Glutathione-Dependent Dehydroascorbate Reductase Activity in Liver of Chicken Treated with Dehydroascorbate or Radical Initiator

Keisuke Sasaki<sup>1)</sup>, Kengo Koga<sup>2)</sup>, Rei Narita<sup>2)</sup>, Tatsuki Fukuda<sup>2)</sup>,  
Yasunari Kitaguchi<sup>2)</sup> and Yosuke Aoyagi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> National Institute of Livestock and Grassland Science, Kukizaki, Ibaraki 305-0901

<sup>2)</sup> School of Agriculture, Ibaraki University, Ami, Ibaraki 300-0392

Glutathione-dependent dehydroascorbate reductase (GSH-DHAR) activity in liver of chicken treated with dehydroascorbate or radical initiator was investigated. 16-days-old male chicken were administrated with dehydroascorbate or radical initiator, 2,2'-azobis (amidinopropane) dihydrochloride, at 40  $\mu$ mol/100 g body weight. After 3 hours, liver was harvested and applied to analysis. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) increased by radical initiator in liver. Liver ascorbate decreased in the birds treated with radical initiator. Dehydroascorbate did not affected TBARS concentration but increased ascorbate in liver. GSH-DHAR activity was not changed by radical initiator, but increased by dehydroascorbate treatment. It was suggested that dehydroascorbate, an substrate of GSH-DHAR, plays an important role for regulation of dehydroascorbate reduction system in chicken liver.

*(Japanese Poultry Science, 39 : J41-J45, 2002)*

**Key word** : chicken, ascorbic acid recycling, glutathione-dependent dehydroascorbate reductase, oxidative stress