研究ノート

マウスのセレン栄養状態が赤血球の グルタチオンペルオキシダーゼ 活性と酸化タンパク質 レベルに及ぼす影響

何 普 明, 安本 教 傳
京都大学食糧科学研究所

Glutathione Peroxidase Activity and Oxidized Protein Level in Erythrocytes from Mice Fed Selenium-Deficient and -Adequate Diets

Puming HE and Kyoden YASUMOTO
*Research Institute for Food Science,
Kyoto University, Uji 611*

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn.
Soc. Nutr. Food Sci.*) 46, 241~243 (1993)

The effects of selenium deficiency on the antioxidative status of erythrocytes from male SAM-R/1 mice were studied. The erythrocytes were obtained from mice fed Torula yeast-based, Se-deficient and Se-adequate diets for one year. The erythrocytes obtained were separated into 4 fractions of different cell density by density-gradient centrifugation, and the respective fractions were compared for activities of glutathione peroxidase (GSHPx), superoxide dismutase and catalase and for the levels of oxidized protein. Se deficiency depressed GSHPx activities significantly (about 90%) in all 4 density fractions, but depressed superoxide dismutase and catalase activities non-significantly in the respective density fractions and also in the whole erythrocyte fraction. The levels of oxidized protein were significantly higher in the 3 low-density fractions from Se-deficient mice than in the corresponding fractions from Se-adequate mice. These results indicate that Se deficiency impairs cellular antioxidative status, inflicts oxidative damage on erythrocytes, and accelerates their aging.

Key Words aging, antioxidative status, erythrocytes, oxidized protein, selenium.

(Received August 17, 1992)

セレンウム(Se)は、ヒト、家畜、実験動物にとって必須な微量栄養素の一つである¹⁾。Se は、セレノシステインの形態でグルタチオンペルオキシダーゼ ([EC 1.11.1.9], GSHPx) の反応中心を構成し²⁾³⁾、生体内の過酸化水素をはじめとする種々の過酸化物を除去して、細胞を酸化的障害から防御するのに役立っている⁴⁾⁵⁾。先に著者らは市販飼料で飼育した老化促進モデルマウス赤血球について、その細胞齢が赤血球細胞内の GSHPx を含む抗酸化系の活性と密接な関係にあることを明らかにした⁶⁾。本研究では、トル酵母を基本とした Se 欠乏および充足飼料でマウスを飼育し、Se 栄養状態が赤血球細胞齢に及ぼす影響を調べた。

実験方法

1. 飼料組成および動物

京都大学胸部疾患研究所竹田教授から分与された正常老化型老化促進モデルマウス (SAM-R/1) を自家繁殖させて得た 4 週齢の雄に、トル酵母を基本とした飼料 (Se (一) 食, Table 1) およびそれに Se として 0.1 ppm 含有するように亜セレン酸ナトリウムを添加した Se 充足飼料 (Se (十) 食) を 1 年間投与した。

2. 試料の調製および分析

飼育期間終了後断頭屠殺により全血を採取した。血漿を遠心除去した血球画分をセルロースカラムに通して、白血球および血小板を除いた⁷⁾。集めた赤血球画分をパーコールの密度勾配中で遠心分離した後⁸⁾、4 等分に分取し、密度の重い方からそれぞれ画分 1, 2, 3, 4 とした。分取した各画分に生理食塩水を加えてパーコールおよびアンギオグラフィンを除去した後、プロテアーゼインヒビターを含む緩衝溶液 (pH 7.4, 1.0 mM HEPES, 1.1 mM EGTA, 0.6 mM MgSO₄, 1.1 mM KH₂PO₄, 4.6 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.5 mg/l leupeptin, 0.7 mg/l pepstain, 40 mg/l phenylmethylsulfonyl fluoride) に懸濁し (カタラーゼ活性は、この時点で分析)、赤血球を超音波破碎して分析に供した。

ヘモグロビンはシアノメトヘモグロビン法に準拠した市販キット (ヘモグロビン-テストワーク, コード No. 279-10701) を用いて分析した。GSHPx 活性は, Paglia らの方法⁹⁾に準じて、*N*-ブチルヒドロペルオキシドを過酸化基質として用いた GSHPx 反応とグルタチオン還元酵素 [EC 1.6.4.2] を共役させて、酸化型グルタチオンの還元消費された NADPH の消失速度から測定した。スーパーオキシドジスムターゼ ([EC 1.15.1.1], SOD) 活性は McCord らの方法¹⁰⁾によって測定した。キサンチンオキシダーゼ [EC 1.2.3.2] 反応で発生した O₂⁻ が、SOD によって O₂ と H₂O₂ 不均化される反応と、酸化

型チトクロム *c* を還元する反応の間の拮抗作用を利用して、生成した還元型チトクロム *c* から SOD 活性を求めた。カタラーゼ活性は Aebi らの方法¹¹⁾によって測定した。酸化タンパク質含量は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) の取込み量をもって評価した¹²⁾¹³⁾。

結 果 と 考 察

1. 赤血球の細胞齢分布

赤血球は細胞齢が高くなるほど、その密度が増加することが知られている¹⁴⁾。Se (－) 食群では、高密度画分のヘモグロビン含量、すなわち画分 1 の赤血球量が有意に減少し、低密度の画分 3 の赤血球量が有意に増加した (Table 2)。このように若齢赤血球の相対比率が多くなったのは、Se (－) 食群の赤血球が溶血しやすいためである⁵⁾。

2. 抗酸化酵素活性の変動

赤血球 GSHPx の比活性は Se (－) 食群で著しく低下し、両群ともに赤血球齢が高くなるにつれて低下した (Fig. 1A)。SOD の比活性は、赤血球齢が高くなるにつれて、Se (－) 食群においては有意に低下したが、Se (＋) 食群では有意な変化が認められなかった。密度分画を行う前の全赤血球画分について比べても有意差はなかった (Table 2)。カタラーゼ活性についても赤血球齢による違いは認められなかった。画分 1 のみで Se (－) 食群のカタラーゼ活性が有意に低下したが、他の画分では有意差はなかった (Table 2)。

3. 酸化タンパク質レベル

酸化タンパク質は生体内に発生するヒドロキシラジカルのような活性酸素が、タンパク質を酸化してできたものであり、酸化障害の程度を示す指標である¹⁵⁾。酸化タンパク質含量は、同密度の赤血球画分間で比較すると、画分 1 を除いて Se (－) 食群の赤血球画分で有意に高

かった (Fig. 1B)。つまり、細胞齢が同じであっても、Se (－) 食群マウス赤血球のほうがより著しく酸化的障害を受けていることが判明した。

Se (－) 食群マウス赤血球細胞で酸化タンパク質含量が高いのは、主として GSHPx の活性が低下したため、つまり抗酸化機能が障害されているためであると考えられる。Se 欠乏マウスでは、循環血中に若齢赤血球の占める割合が高かったが (Table 2)、これは抗酸化機能が障害された高齢赤血球は溶血しやすいためであろう。以上の結果は赤血球細胞の老化が細胞内の酸化的障害の程度と密接に関係していること、低 Se あるいは Se 欠乏状態が赤血球細胞の老化を促進するという考え方を支持するものである。

なお、本実験に用いた SAM-R/1 マウスに比べて、成熟後加齢の速度が高く、寿命の短い老化促進型マウス

Table 1. Composition of basal diet.^{a)}

(%)	
Ingredient	Amount
Torula yeast ^{b)}	35.7
DL-Methionine	0.3
Sucrose	44.0
Soybean oil	13.0
Mineral mixture ^{c)}	4.0
Vitamin mixture ^{c)}	1.0
Cellulose powder	2.0

^{a)} Basal diet contained less than 0.01 ppm Se on fluorometric analysis. ^{b)} Obtained from Sanyo-Kokusaku Pulp Co., Ltd. (Goutsu, Japan). ^{c)} Oriental formula obtained from Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Table 2. Distribution of hemoglobin, superoxide dismutase and catalase activity in Se-deficient and Se-adequate erythrocytes fractionated by density.^{a)}

Fraction of decreasing density	Hemoglobin (%)		Superoxide dismutase (U/mg hemoglobin)		Catalase (U/g hemoglobin)	
	Se(＋)	Se(－)	Se(＋)	Se(－)	Se(＋)	Se(－)
1	49±6.6	21±2.5*	7.5±0.38	6.8±0.48a	0.42±0.04	0.27±0.05*
2	17±1.2	17±1.3	7.8±0.66	7.5±0.39ab	0.50±0.05	0.38±0.09
3	19±4.9	37±6.2*	8.6±0.32	9.0±0.37bc	0.54±0.05	0.44±0.07
4	15±3.1	24±9.7	9.3±1.23	9.0±0.41c	0.64±0.12	0.39±0.08
Whole blood	—	—	7.9±0.29	8.1±0.33	0.50±0.02	0.37±0.06

^{a)} Values are means±SEM for 6 and 9 mice of Se(＋) and Se(－) group, respectively. Means with an asterisk are significantly different at $p<0.05$ from those of corresponding fraction of Se(＋) group as determined by Student's *t*-test. Means in a column without common superscript are significantly different at $p<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

Fig. 1. Changes in glutathione peroxidase activity (A) and oxidized protein levels (B) in the erythrocytes from mice fed Se-deficient (solid circle) and -adequate (open circle) diet.

The erythrocytes were fractionated by density gradient centrifugation as described in "Experimentals." The values are mean $\pm$ SEM ($n=7$ for Se (-) group and $n=5$ for Se (+) group). Asterisks represent a significant difference at $p<0.05$ between Se (+) and Se (-) groups as determined by Student's t -test.

(SAM-P/1) に Table 1 の配合飼料を投与すると、24週目から生存率が急激に低下するために、Se 栄養状態が赤血球の加齢に及ぼす影響を調べることができなかった。

本研究は文部省科学研究費補助費（研究課題番号 01480061）によって行ったものである。

文 献

- 1) 安本教傳：セレン (Se)，臨床栄養の進歩 1991 (岡田 正，高久史磨，田中武彦，武藤輝一，武藤泰敏，弓狩康三編)，45 (1991)，光生館 (東京)
- 2) Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G.: *Science*, **179**, 588 (1973)
- 3) Flohe, L., Guenzler, W.A. and Schock, H.H.: *FEBS Lett.*, **32**, 132 (1973)
- 4) Little, C. and O'Brien, P.J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 145 (1968)
- 5) Kim, C., Yasumoto, K., Suzuki, T. and Yoshida, M.: *Nutr. Res.*, **8**, 767 (1988)
- 6) 何 普明，安本教傳：栄食誌，**43**, 121 (1990)
- 7) Beutler, E., West, C. and Blume, K.-G.: *J. Lab. Clin. Med.*, **88**, 328 (1962)
- 8) Vottore, L., DeMatteis, M.C. and Zampini, P.: *Am. J. Hematol.*, **8**, 291 (1980)
- 9) Paglia, D.E. and Valentine, W.N.: *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158 (1967)
- 10) McCord, J.M. and Fridovich, I.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969)
- 11) Aebi, H.: *Methods Enzymol.*, **105**, 121 (1984)
- 12) Starke, P.E., Oliver, C.N. and Stadtman, E.R.: *FASEB J.*, **1**, 36 (1987)
- 13) Ahn, B., Rhee, S.G. and Stadtman, E.R.: *Anal. Biochem.*, **161**, 245 (1987)
- 14) Borun, E.R., Figueroa, W.G. and Perry, S.M.: *J. Clin. Invest.*, **36**, 676 (1957)
- 15) Oliver, C.N., Livine, R.L. and Stadtman, E.R.: *J. Am. Geriatr. Soc.*, **35**, 947 (1987)

(1992年8月17日受理)