

原 著

# マウスにおける運動が生体内グルタチオン動態に及ぼす 急性的影響について

今村友美<sup>\*1</sup>, 越智沙織<sup>\*2</sup>, 伊藤 幸<sup>\*1</sup>, 張 菜菜<sup>\*1</sup>, 土井千春<sup>\*1</sup>, 野口紗代<sup>\*1</sup>,  
平野槇依子<sup>\*1</sup>, 山本久美<sup>\*1</sup>, 堀江 登<sup>\*1</sup>

\*1: 武庫川女子大学 生活環境学部 食物栄養学科

\*2: 武庫川女子大学大学院 生活環境学研究科 食物栄養学専攻

## Acute effects of physical exercise on glutathione status in mouse.

Tomomi IMAMURA<sup>\*1</sup>, Saori OCHI<sup>\*2</sup>, Sachi ITO<sup>\*1</sup>, Nana CHO<sup>\*1</sup>, Chiharu DOI<sup>\*1</sup>,  
Sayo NOGUCHI<sup>\*1</sup>, Maiko HIRANO<sup>\*1</sup>, Kumi YAMAMOTO<sup>\*1</sup> and Noboru HORIE<sup>\*1</sup>

\*1: Department of Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University

\*2: Food Science and Nutrition Major, Graduate School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University

### Abstract

Production of reactive oxygen is increased during physical exercise, and it has danger to give the body bad influence when its production exceeds the antioxidant system in the body. Glutathione(GSH) is the most abundant antioxidant thiol in animal, and plays an important role of decrease of oxidative stress.

In this study, we investigated how physical exercise influenced redox status, mainly on the glutathione system. Mouse were divided into three groups; non-exercise group(RUN-), low intensity exercise group(RUN+) and high intensity exercise group(RUN++). RUN+ group and RUN++ group exercised by treadmill running at 18 m/min (RUN+) and 29 m/min (RUN++) for 60 minutes. Several tissue (brain, lung, liver, quadriceps femoris muscle) and blood were harvested just after the exercise end. In the mouse of RUN++ group, liver GSH and GSSG contents were decreased significantly, but in other tissue, exercise had no effect on GSH or GSSG content. The decrease of liver GSH by exhaustive exercise was reported before, and the reason is because it was probably consumed to scavenge oxidative stress which were generated during exercise.

Glutamate-cysteine ligase(GCL) is the rate limiting enzyme in GSH biosynthesis, and liver GCL subunit(GCLM and GCLC) mRNA expression was decreased in exercised groups.

These results indicated that the influence of oxidative stress by physical exercise was different among each tissues, and liver GSH was consumed during exercise of higher intensity. Furthermore, liver GCL mRNA expression was also decreased, and it was maybe the one of the factors of decrease of GSH. Therefore, it is important that the exercise training and the food intake which can keep a lot of quantity of liver GSH beforehand.

**Key words:** グルタチオン (glutathione), 運動 (exercise), 酸化 (oxidant)

## I. 緒 言

運動には体脂肪の減少, 除脂肪体重の増大, 体力の維持・増進, 基礎代謝の亢進, 生活習慣病等の疾病のリスクファクターの除去などの効果がある。近年, 生活習慣病等の予防の観点から, 有酸素運動の重要性が注目され

ている。しかし, 過度の運動には, 逆に生体に悪影響を与える危険性が示唆される。その原因の1つが運動時における過剰な活性酸素の発生である。

運動時には, 酸素消費量が安静時の10~20倍に増大し, 活動筋への酸素流入量は約100倍に増大する<sup>1)</sup>。それに伴って活性酸素の発生が増大することが多く報告されて

いる<sup>1)-5)</sup>。さらに、とくに激しい運動中は血流の再配分が起こり、活動筋への血流をより多く保つため、その他の内臓などの組織では血流量が減少し、一時的な虚血に陥る。そして、血流が再開するとき活性酸素が大量に生じることが報告されている<sup>6)-8)</sup>。活性酸素は、生体内で生じる様々な反応に極めて重要な役割を果たしているが、その発生が過剰で、それを消去するための抗酸化能力を超えてしまうと、生体に傷害を及ぼす危険性がある。

生体内には本来この様な活性酸素を消去するためのメカニズムが備わっており、さらに、我々が日常的に摂取する食品成分にも抗酸化活性をもつものが多く存在する。生体内に存在する抗酸化物質または抗酸化酵素として、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、ビタミンE、ビタミンC、グルタチオン、カロテノイド、フラボノイド等がある。本研究では、この中でも特に、生体内で合成することができ、あらゆる細胞に広く分布し、比較的高濃度で存在するグルタチオンに着目した。

グルタチオンは主に肝臓で合成され、グルタミン酸とシステインとグリシンの3つのアミノ酸が結合したトリペプチドである<sup>9)-11)</sup>。グルタチオンの抗酸化性はシステイン残基のSH基によるもので、非酵素的に活性酸素を消去するだけでなく、還元型グルタチオンであるGSH 2分子がグルタチオンペルオキシダーゼによって酸化され、ジスルフィド結合し、酸化型グルタチオン (GSSG) となる。この時、GSH自身が酸化されることにより対象物質は還元され、抗酸化力が発揮される。GSSGはグルタチオンレダクターゼの作用とNADPHによって再びGSHに還元され、リサイクルされる<sup>11)</sup>。よって、レドックス状態が酸化型に傾くと、GSSGが増加し、GSH/GSSG比が低下する。GSHは活性酸素であるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>や一重項酸素の消去作用を持つ<sup>9),11)</sup>。

グルタチオンの合成は律速酵素であるグルタミン酸システインリガーゼ (GCL) によって調節されている<sup>9)-11)</sup>。GCLは活性中心が存在する触媒部位 (catalytic subunit; GCLC) および修飾部位 (modifier subunit; GCLM) の2つのサブユニットから成る。これらのサブユニットは別々の遺伝子にコードされており、それぞれ発現が調節されている。活性中心は、GCLCに存在するが、十分な活性発現にはGCLMの存在が不可欠である。これまでに、GCLサブユニットのmRNA発現が種々の酸化ストレス、化学物質や熱ショックにより発現が誘導されることが報告されている<sup>9),11)</sup>。また、GCLは最終生成物であるグルタチオンによってフィードバック阻害を受け<sup>10)</sup>、グルタチオン量が維持されている。

本研究では、有酸素運動時の生体内レドックス状態の変化が、グルタチオン酸化還元状態やグルタチオン合成系にどのように影響を及ぼすかを、マウスを用いた実験

モデルで検討を行った。

## II. 方 法

### 1. 実験動物および飼育方法

実験動物は、雌性の11週齢ICRマウス(日本クレア)を使用した。飼育には環境制御装置(ダルトン)を用い、温度は22~24°Cに、湿度は45~55%に調節し、飼育棚内に床敷きとしてかな屑(日本クレア)を約4cmの厚さに敷き、清潔な環境を作った。明暗サイクルは12時間(明期8~20時)とした。ケージは225mm×338mm×140(h)mmを使用し、1ケージに15匹を飼育した。給餌は12mmφペレット状の固形飼料(MF:オリエンタル酵母工業)を使用し、給水は給水瓶によって水道水を自由摂取させた。

### 2. 運動負荷方法

運動負荷は小動物用トレッドミル装置(竹井機器工業)を用いて、低強度運動群には分速18mの走行運動を、高強度運動群には分速29mの走行運動を60分負荷した。なお、運動負荷中は常に監視し、異常がみられたマウスは運動を中止し、サンプルから除外した。

### 3. サンプルの調製

運動負荷終了直後にエーテル麻酔により安楽死させ、腹部後大静脈からの採血および器官(脳、肺、肝臓、大腿四頭筋)の摘出を行った。

### 4. 血液生化学検査の方法

#### 1) 血中グルコース濃度の測定

血漿サンプル中のグルコース濃度をグルコースキットグルコースC II-テストワコー(ムロターゼ・GOD法、和光純薬工業)を用いて測定した。操作は同測定キット添付の取扱説明書に従って行い、測定はマイクロプレート用分光光度計を用いて、505nmにおける吸光度を測定した。同様に測定した標準サンプルの吸光度より作成した検量線にて濃度を求めた。

#### 2) 血中トリグリセリド濃度の測定

血漿サンプル中のトリグリセリド濃度をトリグリセライドキットトリグリセライドE-テストワコー(GPO・DAOS法、和光純薬工業)を用いて測定した。操作は同キット添付の取扱説明書に従って行い、測定はマイクロプレート用分光光度計を用いて、600nmにおける吸光度を測定した。同様に測定した標準サンプルの吸光度より作成した検量線にて濃度を求めた。

#### 3) 血中遊離脂肪酸濃度の測定

血漿サンプル中の遊離脂肪酸濃度を非エステル結合型

脂肪酸キット NEFA C- テストワコー (ACS・ACOD 法, 和光純薬工業) を用いて測定した。操作は同キット添付の取扱説明書に従って行い, 測定はマイクロプレート用分光光度計を用いて, 550 nm における吸光度を測定した。同様に測定した標準サンプルの吸光度より作成した検量線にて濃度を求めた。

#### 4) 血中尿素窒素濃度の測定

血漿サンプル中の尿素窒素濃度を血液検査用尿素窒素キット尿素窒素 B- テストワコー (ウレアーゼ・インドフェノール法, 和光純薬工業) を用いて測定した。操作は同キット添付の取扱説明書に従って行い, 測定はマイクロプレート用分光光度計を用いて, 570 nm における吸光度を測定した。同様に測定した標準サンプルの吸光度より作成した検量線にて濃度を求めた。

### 5. グリコーゲン量の測定

#### 1) 組織からのグリコーゲンの抽出

抽出した肝臓の一部を 0.2 ~ 0.4g の範囲に秤量して試験管にとった。重量に対して 5 倍容量の 30% 水酸化カリウム (ナカライテスク) 溶液を加え, 沸騰水浴中で 30 分間加熱して溶かした。溶解したものに 95% エタノール (和光純薬工業) 液を 2 倍容量加えて混和し, それを加熱して沸騰させた後, 直ちに放冷して, 室温に達したら遠心分離機 (HITACHI CF7D2) で 3,000 rpm, 15°C, 30 分間遠心分離し, その上清を取り除いた。残渣に蒸留水 2 ml を加えて溶解し, その中に飽和塩化カリウム溶液を 1 滴加え, その後 95% エタノール液を 3.5 ml 加えて混和した。それを再度加熱して沸騰させた後, 直ちに放冷して室温に達したら遠心分離機で 3,000 rpm, 15°C, 10 分間遠心分離して, 上清を取り除いた。この操作をもう一度繰り返す, 残渣の水分をデシケーターの中で蒸発させた。

#### 2) グリコーゲンの定量 (フェノール硫酸法)<sup>12)</sup>

抽出したグリコーゲンの残渣に蒸留水 2.0 ml を加え, 溶解した。そのうちの 0.4 ml をサンプルとして使用した。試験管に採取したサンプルと同量の 5% フェノール溶液 (和光純薬工業) を加えて混和した。さらに 2 ml の濃硫酸 (和光純薬工業) を加え直ちに混和し, 10 分間放置後, 再びよく混和し, 室温で放冷した。吸光度計 (SP-20A 島津製作所) を用いて 490 nm における吸光度の測定をした。ブドウ糖 (ナカライテスク) を適宜希釈したものを標準サンプルとして同様に測定を行い, その吸光度より作成した検量線にて濃度を求めた。なお, 結果は肝臓の湿重量 1 g 当たりの量で示した。

#### 6. 組織中のグルタチオン量の測定<sup>13),14)</sup>

抽出した組織は 9 倍量の 1 M 塩化カリウム溶液とともに直ちにホモジナイズし, 10% 組織ホモジネート溶液を

作製した。組織ホモジネート溶液 300  $\mu$  l に 60% 過塩素酸溶液 18  $\mu$  l を加えてよく混和し, 微量冷却遠心機 (HITACHI, CF 15RX II) で 15,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離を行った。上清の 200  $\mu$  l に 80 mM ヨード酢酸 (和光純薬工業) 200  $\mu$  l を加えてよく混和した。その後, 飽和炭酸水素カリウム (和光純薬工業) 300  $\mu$  l を混合し, 遮光して 1 時間放置した。その後 5%(v/v) 1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンエタノール溶液 200  $\mu$  l を混合し, 遮光して 4°C で 4 時間放置した。シリンジ用フィルター (Minisart RC4, pore size 0.45  $\mu$  m, sartorius stedim biotech) でバイアル瓶へ濾過後, 高速液体クロマトグラフィ装置 (HITACHI D-2000 Elite LaChrom; Organizer, UV Detector L-2400, Column Oven L-2300, Autosampler L-2200, Pump L-2130, Hitachi Model D-2000 Elite Chromatography Data Station Software HPLC System Manager) を用いて分析した。分析カラムは Develosil NH2-5 (4.6 mm  $\times$  250 mm) (野村化学) を用い, 温度 25°C に保ち, 365 nm にて検出を行った。移動相 A は 80%(v/v) メタノール (高速液体クロマトグラフ用, 和光純薬工業), 移動相 B は酢酸アンモニウム (和光純薬工業) 61.6 g を超純水 209 ml に溶解し, メタノール (高速液体クロマトグラフ用, 和光純薬工業) 640 ml および酢酸 (精密分析用, 和光純薬工業) 151 ml を混合したものを使用した。それぞれの移動相溶媒は, オムニポアメンブレン (JHWPO 4700, FILTER TYPE 0.45 mJH) でろ過し, 超音波照射と同時に吸引脱気した後に, 分析に用いた。分析は, 濃度勾配プログラムを設定して行った (0 ~ 5 分; 移動相 A 80% 移動相 B 20%, 5 分 ~ 20 分; 移動相 A 80-0% 移動相 B 20-100%, 20 分 ~ 25 分; 移動相 A 0% 移動相 B 100%, 25 分 ~ 30 分; 移動相 A 0-80% 移動相 B 100-20%, 30 分 ~ 35 分; 移動相 A 80% 移動相 B 20%, 流速 1.0 ml/min)。GSH [グルタチオン (還元型), 和光純薬工業] および GSSG [グルタチオン (酸化型), 和光純薬工業] の水溶液を適宜希釈したものを標準サンプルとして同様に分析し, そのピークエリアから検量線を作成し, サンプル中の GSH 量, GSSG 量を求めた。なお, 結果は, CBB 色素試液 (ナカライテスク) を用いて Bradford 法によりタンパク定量を行い, 組織ホモジネート溶液中のタンパク質 1 mg 当たりの量で示した。

### 7. GCL mRNA 発現の測定 (リアルタイム RT-PCR 法)

#### 1) RNA の抽出および精製

抽出したマウスの肝臓約 0.1 g を直ちに 0.5 cm 未満の厚さにスライスし, RNeasy<sup>®</sup> RNA Stabilization Reagent (QIAGEN) に浸漬した。4°C で一晩インキュベートした後, RNeasy 溶液を取り除き, -80°C にて冷凍保存した。RNA の抽出および精製は FastPure RNA Kit (TaKaRa) を用いて行った。なお操作は同キット添付の取扱説明書に従って行った。

## 2) 逆転写反応 (cDNA の生成)

1) の方法で抽出および精製した total RNA は RNA 量を定量し、その 250 ng を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応は PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて行った。なお、操作は同キット添付の取扱説明書に従って行った。逆転写反応後に得られた cDNA 溶液は 4°C にて保存した。

## 3) リアルタイム PCR 反応

2) の方法で得られた cDNA 溶液と SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて PCR 反応溶液を調製した。なお、操作は同キット添付の取扱説明書に従って行い、PCR 反応および検出は Applied Biosystems 7500 を用いて行った。測定に用いたプライマーの塩基配列は、GCLM 用プライマーは Forward: 5'-ACCGGGAACCTGCTCAACTG-3', Reverse: 5'-GAT TTGGGAACCTCCATTCATTCAAG-3', GCLC 用プライマーは Forward: 5'-TGGACACCCGATGCAGTATTC-3', Reverse: 5'-ATCCACCTGGCAACAGTCATTAG-3', GAPDH 用プライマーは Forward: 5'-AAATGGTGAA GGTCCGGTGTG-3', Reverse: 5'-TGAAGGGGTCGTTGATGG-3' である。

結果は、GCLC および GCLM の mRNA 発現量を house-keeping gene として測定した GAPDH の mRNA 発現量で除した値で示した。

## 8. 統計処理

統計処理は Sheffe 法による多重比較検定を行い、危険率 5% 未満を有意水準とした。

## III. 結 果

解剖時の血液生化学検査の結果を Fig.1 に示す。血中グルコース濃度 (A) 及び血中トリグリセリド濃度 (B) は、3 つの実験群間に有意な差はみられなかった。血中遊離脂肪酸濃度 (C) は運動負荷群で有意に増加した。血中尿素窒素濃度 (D) は、高強度運動群で有意に高値を示した。

次に、肝臓中のグリコーゲン量を Fig.1E に示す。肝臓中のグリコーゲン量は運動強度が増加するにつれて有意に減少した。

次に、Fig.2 に各器官における GSH 量 (A) 及び GSSG 量 (B)、GSH/GSSG 比 (C) を示す。肝臓や脳は GSH/GSSG 比が高値であり、GSH 量の割合が多かった。一方で肺や赤血球では GSH/GSSG 比が他の組織と比較して低値を示し、GSSG 量の割合が高かった。

運動負荷強度の違いを比較すると、GSH 量の定量結果において、肝臓中の GSH 量が高強度運動群で有意に減少した (Fig.2A)。その他の器官では、運動負荷による影響はみられなかった。GSSG の定量結果は、肝臓において、運動強度が高くなるにつれて減少傾向を示し、高強度運

動群において非運動群と比較して有意に減少した。その他、脳や肺、赤血球においても高強度運動群において減少傾向を示した (Fig.2B)。骨格筋の GSSG 量は低強度運動群に比べて高強度運動群で有意に減少した (Fig.2B)。GSH/GSSG 比を Fig.2C に示した。肝臓では、低強度運動群と比べて高強度運動群で有意に低下した。脳においては、高強度運動群で非運動群及び低強度運動群と比較して有意に増加した。

次に、GCL の mRNA 発現の測定結果を Fig.3 に示す。GCLC の mRNA 発現は、低強度運動群で低下傾向を示し、高強度運動群では有意に低下した。また、GCLM の mRNA 発現は運動負荷群で有意な低下がみられた。

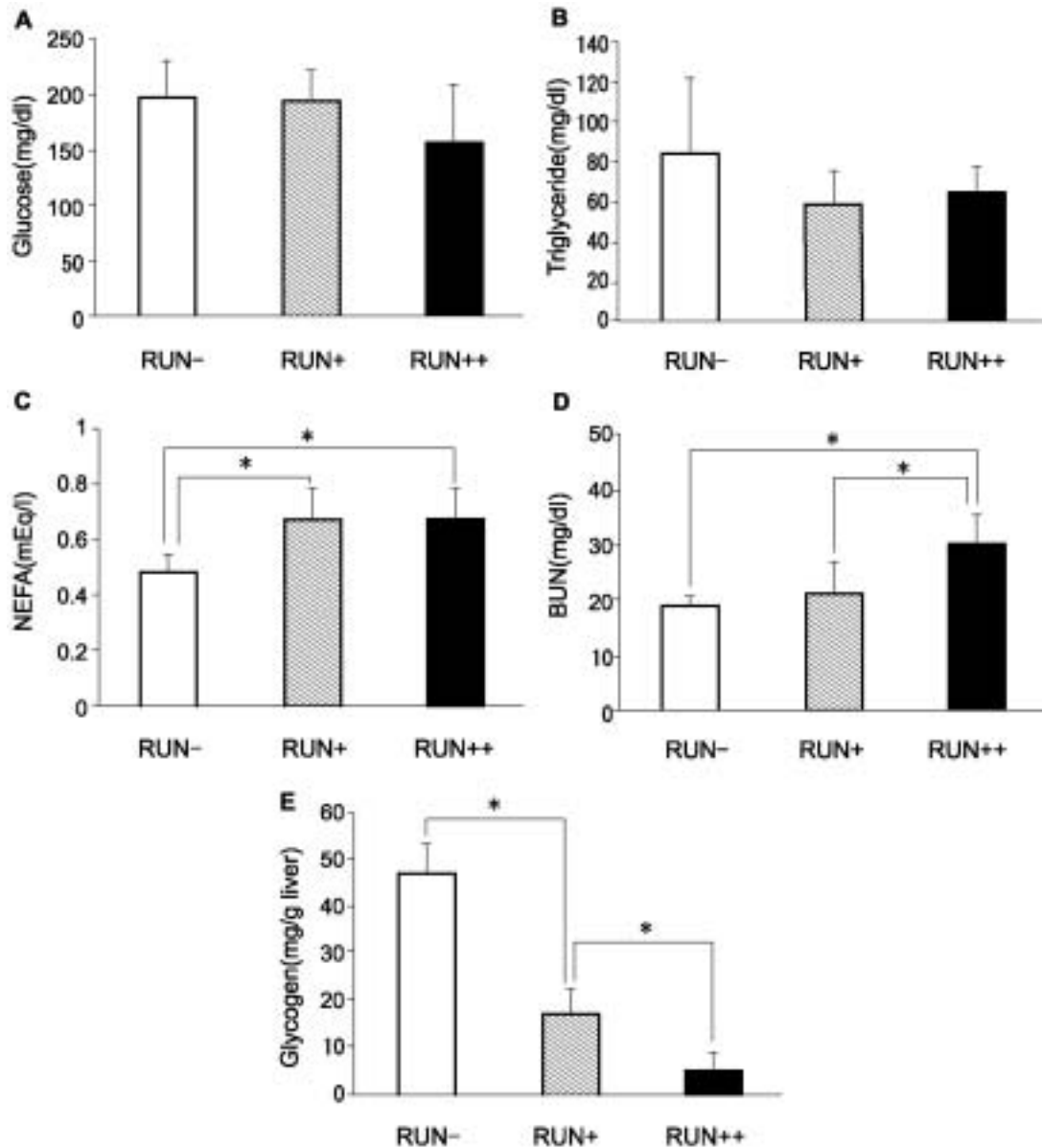
## IV. 考 察

本研究では、運動中に発生する活性酸素が生体の酸化還元状態にどの様に影響するかを、グルタチオン系に注目して、マウスを用いた動物実験にて検討を行った。

運動負荷は、運動強度の違いによる影響を確認するために、低強度と高強度の 2 段階の強度で行った。生体内グルタチオンの酸化還元状態を確認するために肝臓、脳、肺、大腿四頭筋、赤血球における GSH および GSSG を定量し GSH/GSSG 比を求めた。さらに、グルタチオン合成系への影響を検討するために、グルタチオン合成系の律速酵素である GCL サブユニットの mRNA 発現の測定を行った。

まず、血液生化学検査結果 (Fig.1) について、運動負荷により血中遊離脂肪酸量の増加がみられた (Fig.1C)。このことは、有酸素運動を負荷することにより、エネルギー源としての脂肪の利用が高まり、中性脂肪から生じた脂肪酸が血中に増加したと考える。次に、運動負荷後の肝臓中のグリコーゲン量の測定結果についてであるが、肝臓中のグリコーゲン量は運動強度依存的に減少した (Fig.1E)。運動中の血糖値の維持のために肝臓中に蓄えられているグリコーゲンが消費されと考えられる。高強度の運動負荷でより大きな減少を示したことから、高強度の運動負荷ではより激しくエネルギーを消耗し、肝臓のグリコーゲンが動員されていたことがわかる。

次に、血中尿素窒素量は運動強度が高まるにつれて有意な増加を示した (Fig.1D)。データには示していないが、高強度運動群では対照と比較して採血量がやや減少する傾向がみられた。発汗や、末梢血管への血液の移行により、腹部後大静脈から採血することのできる血液量が減少したと考えられる。よって、血中尿素窒素量の増加は、単なる血液濃縮という要因も考えられるが、採血量を加味して検討したが同様に、運動強度の増加に伴い高値を示す傾向にあった。これは、全身運動により循環血液の再分配が起こり、腎臓への血流量が極端に減少したため、腎臓からの尿素窒素の排泄が行われず、結果として一時

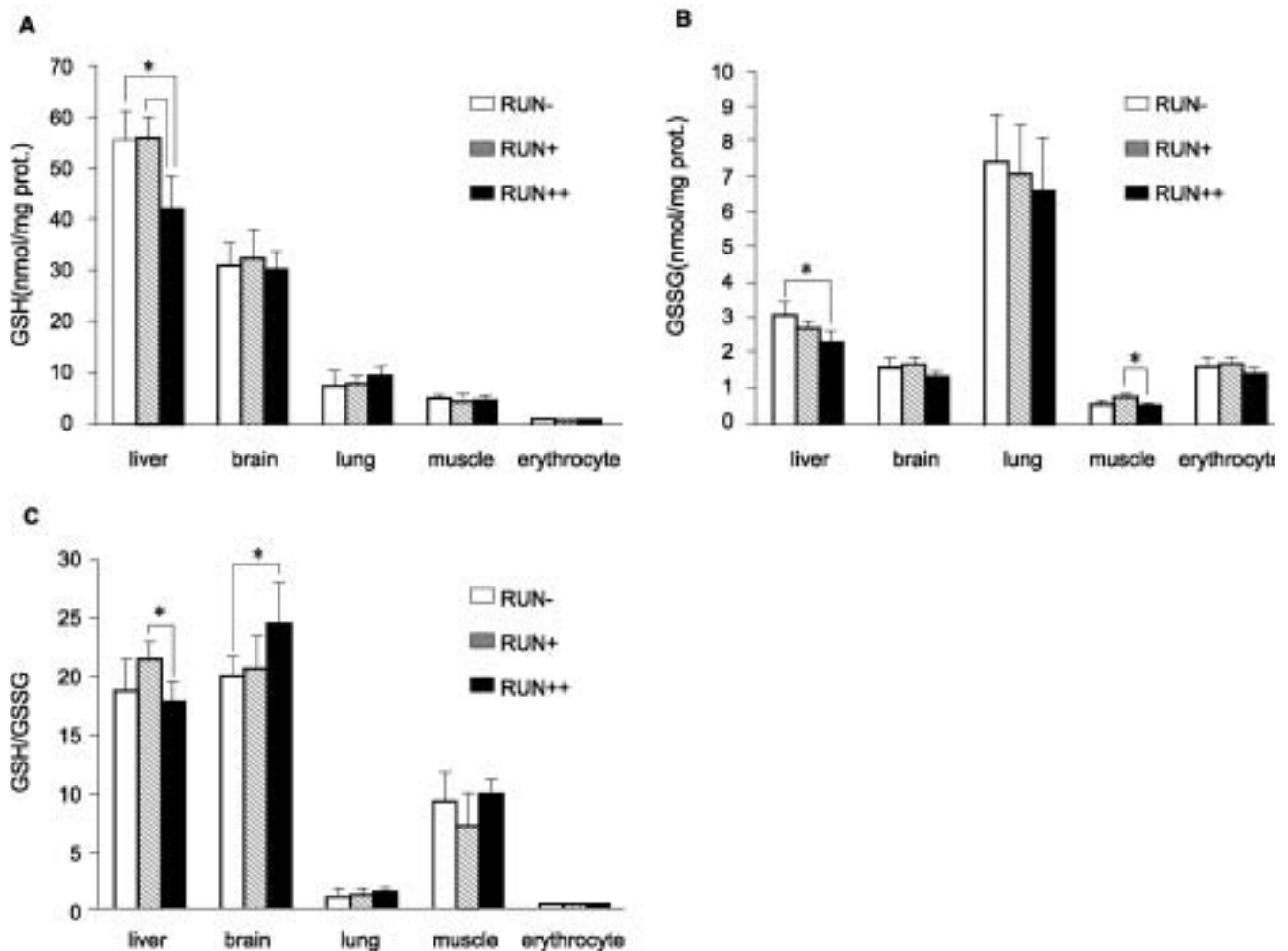


**Fig.1 Acute effects of aerobic exercise on metabolic blood parameters of lipid and glucose metabolism, and blood urea nitrogen in exercised mice: blood glucose(A), triglyceride(B), non-esterified fatty acid (NEFA)(C), blood urea nitrogen (BUN)(D) and liver glycogen content(E). Mice were non-exercise group(RUN-), low intensity exercise group(RUN+) and high intensity exercise group(RUN++). Values are means ± SD (n=8). \*;P<0.05**

的な血中の尿素窒素濃度の上昇につながったと考えられる。安静時には循環血液量の約5分の1が腎臓に流れているが、運動時には、骨格筋への血流が増加するために、腎臓への血流が全身の100分の1まで抑制されることが報告されている<sup>15),16)</sup>。よって、この血中尿素窒素量の増加は、運動負荷により確実に循環血液の再分配が起こっていることを暗示するものである。

次に、各器官におけるグルタチオン定量の結果についてである。まず、肝臓のGSH量が高強度運動群で非運動群と比較して有意に減少した(Fig.2A)。急性的な運動に

より肝臓中のGSH量が減少することはこれまでも報告されており<sup>17)-20)</sup>、本研究結果もそれと同様の結果が得られた。運動時の肝臓GSH量の減少は、肝臓での消費の亢進および肝臓からの流出が高まったためであると考えられる。運動時には肝臓においても活性酸素が発生すると考えられるが、その活性酸素消去のためにGSHが消費されたと推察する。肝臓からのグルタチオンの流出にはホルモンが関与しており、アドレナリンやグルカゴンの作用により肝臓からのGSH放出が亢進することが報告されている<sup>21),22)</sup>。よって、運動によるアドレナリンやグルカ



**Fig.2** Acute effects of aerobic exercise on tissue glutathione status in exercised mice: GSH content (A), GSSG content(B) and GSH/GSSG ratio(C) in indicated tissue. Mice were non-exercise group(RUN-), low intensity exercise group(RUN+) and high intensity exercise group(RUN++). Values are means  $\pm$  SD (n=8). \*;P<0.05

ゴンの分泌増加に伴い GSH 流出が増加し、このことも結果として肝臓中 GSH 量の減少に関与していたと考えられる。さらに、他の組織における活性酸素消去のためにも、肝臓から放出された GSH が消費されたものと推察する。

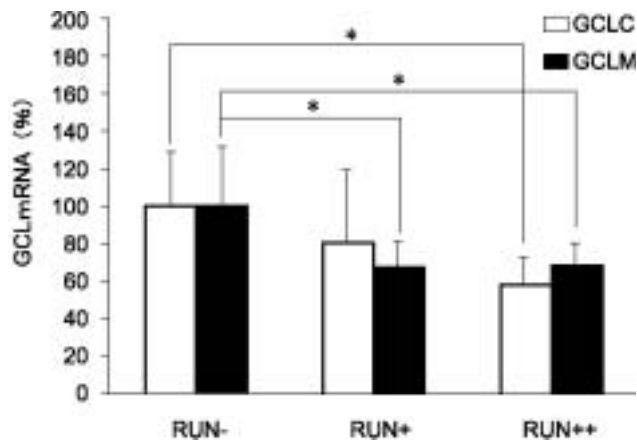
低強度運動群では GSH 量は変化しなかった。よって急性運動における肝臓 GSH 減少は運動強度が激しい場合に、肝臓での消費量が生成量を上回り生じたものと考えられる。

肝臓以外で、運動負荷により GSH 量の減少がみられた器官は無かった。このことは、肝臓以外の組織では、肝臓ほど活性酸素の発生が多くなかったか、もしくは肝臓から放出された GSH が活性酸素消去に消費されたか、あるいはグルタチオン以外の他の抗酸化系の関与が大きいのではないかと、など多くの可能性が推察される。

ここで、組織間の比較をすると、とくに肺や赤血球では、その他の組織に比べて GSH/GSSG 比が低値を示し、GSSG 量の割合が多いことが分かった。これは、肺や赤

血球は他の組織と比べて酸素への暴露が激しく、酸化ストレスを受けやすいためであると考えられる。これらの組織においては、タンパク質の高次構造の保持に-SS-結合が重要な役割を果たすように、グルタチオンはあらかじめ-SS-結合を形成した酸化型で存在するほうが安定であるという説もあり<sup>23)</sup>、適度に酸化型に傾いた状態を保つと考えられる。しかし、運動負荷強度の違いによる影響はみられなかった。

次に、肝臓における GCL の mRNA 発現の測定結果についてである。GCL は、グルタチオン合成の律速酵素であり、GCLC および GCLM の 2 つのサブユニットからなる。それぞれのサブユニットの mRNA 発現が種々の酸化ストレス等により誘導されることが報告されている<sup>11)</sup>。本研究においても、運動時に発生する活性酸素の影響や、グルタチオン量の減少等により、その発現が誘導され、肝臓における GCL mRNA 量は増加すると予測していたが、結果は運動負荷により減少していた (Fig.3)。本研究では、



**Fig.3 Acute effects of aerobic exercise on GCL subunits mRNA expression in liver. The relative mRNA levels for GCLC (white bar) and GCLM (dark bar). Mice were non-exercise group(RUN-), low intensity exercise group(RUN+) and high intensity exercise group(RUN++). Each bar are presented with percentages of non-exercised mice(RUN-). Values are means  $\pm$  SD (n=8). \*;P<0.05**

60分間の運動負荷終了直後に解剖を行い、サンプルを抽出したが、そのタイミングではGCLのmRNA発現が抑制されていることが本研究で明らかとなり、このことも、肝臓におけるGSH量減少の一因となっている可能性を暗示するものである。

主に肝臓で生成されるとされているグルタチオンは活性酸素等による生体酸化の抑制に重要な役割を果たしており、運動中においてもその重要性は高いと考えられる。また、グルタチオンは、持久性運動の持続時間を維持する上でも重要であり<sup>24)</sup>、これにはグルタチオンの抗酸化性による酸化ストレスの低減が深く関与していると考えられる。本研究結果から、有酸素運動中のGSH合成能がGCL mRNA発現の減少とともに急性的に低下していたことが明らかとなったため、肝臓GSH量をあらかじめ増加させておくことが、運動中の生体酸化の抑制や運動の持久性の面からも重要になってくる。運動中の酸化ストレスの低減のためには、抗酸化物質摂取が有効であるという報告が多くある<sup>25)-27)</sup>。また、運動中に発生する酸化ストレスへの応答として、習慣的な有酸素運動トレーニングが生体内の抗酸化メカニズムの強化につながるという報告も多数ある<sup>28)-30)</sup>。また一方では、抗酸化物質の摂取は逆に、この抗酸化メカニズムの強化の妨げになるという報告がある<sup>31),32)</sup>。よって、運動中の抗酸化物質摂取の有効性については、未だ不明な点が多く、有酸素運動の他にも、種々の酸化ストレスから生体を保護する上でも、グルタチオン等の抗酸化物質の動態を把握することが重要になってくる。内因的な抗酸化能力のアップにつながるような運動トレーニングの方法や食品成分の摂取等の影響を詳細に検討していくことが、今後の課題となってくだろう。

## 参考文献

- 1) Sen CK: Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Med*, **31**,891-908, 2001
- 2) Sachdev S, Davies KJ : Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med*, **44**, 215-23, 2008
- 3) Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E: Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. *Exerc Immunol Rev*, **5**, 22-56, 1999
- 4) Ohkuwa T, Sato Y, Naoi M : Glutathione status and reactive oxygen generation in tissues of young and old exercised rats. *Acta Physiol Scand*. **159**, 237-44,1997
- 5) Alessio HM: Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, **25**, 218-24, 1993
- 6) Zulueta JJ, Sawhney R, Yu FS, Cote CC, Hassoun PM: Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol*, **272**, L897-902, 1997
- 7) Ji LL, Fu RG, Waldrop TG, Liu KJ, Swartz HM: Myocardial response to regional ischemia and reperfusion in vivo in rat heart. *Can J Physiol Pharmacol*, **71**, 811-17, 1993
- 8) Simpson PJ, Lucchesi BR: Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Lab Clin Med*, **110**, 13-30, 1987
- 9) Lu SC: Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, **30**, 42-59,2009
- 10) Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND: Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, **134**, 489-92, 2004
- 11) Lu SC: Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J*, **13**, 1169-83, 1999
- 12) DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F : Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.*, **28** (3), pp 350-56, 1956
- 13) Ikemoto M, Nikawa T, Kano M, Hirasaka K, Kitano T, Watanabe C, Tanaka R, Yamamoto T, Kamada M, Kishi K : Cysteine supplementation prevents unweighting-induced ubiquitination in association with redox regulation in rat skeletal muscle. *Biol Chem*, **383**, 715-21, 2002
- 14) Fariss MW, Reed DJ: High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Methods Enzymol*, **143**, 101-9, 1987
- 15) Grimby G, Nilsson NJ, Saltin B. Cardiac output during submaximal and maximal exercise in active middle-aged

- athletes. *J Appl Physiol*, **21**, 1150-6, 1966
- 16) McArdle WD, Katch FI, Katch VL: EXERCISE PHYSIOLOGY – Energy, Nutrition, and Human Performance – (Second Edition), p.259-68, 杏林書院, 東京, 1992
  - 17) Leeuwenburgh C, Ji LL: Glutathione and glutathione ethyl ester supplementation of mice alter glutathione homeostasis during exercise. *J Nutr*, **128**, 2420-6, 1998
  - 18) Leeuwenburgh C, Ji LL: Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys*, **316**, 941-9, 1995
  - 19) Pyke S, Lew H, Quintanilha A: Severe depletion in liver glutathione during physical exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, **139**, 926-31, 1986
  - 20) Lew H, Pyke S, Quintanilha A: Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *FEBS Lett*, **185**, 262-6, 1985
  - 21) Simmons HF, James RC, Harbison RD, Patel DG, Roberts SM: Examination of the role of catecholamines in hepatic glutathione suppression by cold-restraint in mice. *Toxicology*, **67**, 29-40, 1991
  - 22) Lu SC, Garcia-Ruiz C, Kuhlenkamp J, Ookhtens M, Salas-Prato M, Kaplowitz N: Hormonal regulation of glutathione efflux. *J Biol Chem*, **265**, 16088-95, 1990
  - 23) 朴雅美, 井上正康: 酸化ストレスマーカー .p.144-149, 学会出版センター, 東京, 2005
  - 24) Sen CK, Atalay M, Hänninen O: Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *J Appl Physiol*, **77**, 2177-87, 1994
  - 25) Ciocoiu M, Badescu M, Padurarur I: Protecting antioxidative effects of vitamins E and C in experimental physical stress. *J Physiol Biochem*, **63**, 187-94, 2007
  - 26) Clarkson PM, Thompson HS: Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*, **72**, 637S-46S, 2000
  - 27) Kumar CT, Reddy VK, Prasad M, Thyagaraju K, Reddanna P: Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Mol Cell Biochem*, **111**, 109-15, 1992
  - 28) Taysi S, Oztasan N, Efe H, Polat MF, Gumustekin K, Siktar E, Canakci E, Akcay F, Dane S, Gul M: Endurance training attenuates the oxidative stress due to acute exhaustive exercise in rat liver. *Acta Physiol Hung*, **95**, 337-47, 2008
  - 29) Anuradha CV, Balakrishnan SD: Effect of training on lipid peroxidation, thiol status and antioxidant enzymes in tissues of rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, **42**, 64-70, 1998
  - 30) Itoh H, Ohkuwa T, Yamamoto T, Sato Y, Miyamura M, Naoi M: Effects of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues. *Life Sci*, **63**, 1921-9, 1998
  - 31) Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehnopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M: Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 8665-70, 2009
  - 32) Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Viña J: Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr*, **87**, 142-9, 2008