

ラット多形核白血球のスーパーオキシドアニオン生成機構におよぼす マグネシウム欠乏の影響

吉原 富子¹⁾・細川 優²⁾・東 條 仁 美²⁾

佐藤 郁雄²⁾・新 関 嗣 郎²⁾・山 口 賢 次¹⁾

(¹⁾東京家政大学*, (²⁾国立健康・栄養研究所母子健康・栄養部**)

The Effect of Magnesium Deficiency on Superoxide Anion Production of Polymorphonuclear Leukocytes in Rats

Tomiko YOSHIHARA¹⁾, Yu HOSOKAWA²⁾, Hitomi TOIYO²⁾,

Ikuo SATO²⁾, Siro NIIZEKI²⁾ and Kenji YAMAGUCHI¹⁾

¹⁾Tokyo Kasei University, ²⁾Division of Maternal and Child Nutrition, The National Institute of Health and Nutrition

Superoxide anion production of PMN induced by FMLP or PMA was increased by magnesium deficiency in rats. The dose dependent increase of superoxide anion production was observed up to 10^{-7} M FMLP in control and 10^{-6} M FMLP in magnesium deficient group, respectively. Cytosolic free calcium concentrations after stimulation with 10^{-7} M FMLP in magnesium deficient group were higher than those in control. The inhibition of H-7, a protein kinase C agonist, on FMLP induced superoxide anion production in magnesium deficient group was less than that in control. These results indicate that cytosolic calcium and protein kinase C are involved in increase of FMLP induced superoxide anion production observed in magnesium deficient rats.

マグネシウム欠乏ラットでは、血漿マグネシウム濃度の低下、白血球の著しい増加が見られ¹⁾、その時白血球中のライソゾーム酵素の活性と fMet-Leu-Phe (FMLP) 刺激によるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) の生成が上昇することが認められている²⁾。一方、白血球の各種刺激剤による O_2^- 産生やライソゾーム酵素の細胞外放出の機序には、細胞内遊離カルシウム濃度の上昇、イノシトールリン脂質の代謝回転、蛋白リン酸化酵素の活性化や特異的蛋白質のリン酸化などの情報伝達機構が関与することが推測されている³⁾。本研究では、マグネシウム欠乏時に認められる O_2^- 生成の増加に細胞内遊離カルシウム濃度や、蛋白リン酸化酵素が関与しているかを検討した。

*所在地：東京都板橋区加賀 1-18-1 (〒173)

**所在地：東京都新宿区戸山 1-23-1 (〒162)

実験方法

1) 実験動物および飼料

5週齢の雄性 Sparague-Dawley 系ラットを AIN-76組成の飼料で10日間予備飼育後実験飼料で10日間飼育した。マグネシウム欠乏飼料では、AIN-76組成の塩混合から酸化マグネシウムを除去し、サッカロースで置き換えた。飼料および飲料水は自由摂取とし、飲料水は脱イオン水を用いた。

2) 多形核白血球の分離

飼育4, 7, および10日にエーテル麻酔で腹部大動脈より採血後、リンホプレップを用いる密度勾配、および1.5%デキストラン T-500溶液を用いる沈降法で分離精製した⁴⁾。

3) ライソゾーム酵素の細胞外放出

ライソゾーム酵素の細胞外放出は FMLP と サイトカラシン B の混液で10分間刺激し放出させた。ライソゾーム酵素の活性は鈴木等の方法⁵⁾で測定した。なお、放出率は放出活性/全活性×100 (%) で表わした。

4) O_2^- の測定

O_2^- の生成は、FMLP と サイトカラシン B の混液あるいは、ホルポール12-ミリスレート13-アセテート (PMA) を刺激剤とし、フェリチンクローム C の還元で測定した⁶⁾。

5) 細胞内遊離カルシウム濃度の測定

細胞内遊離カルシウム濃度は、クイン2をプローブとして用いるリンクの方法⁷⁾で測定した。

結果と考察

Table 1 に示すようにマグネシウム欠乏ラットでは白血球中のライソゾーム酵素の全活性が欠乏7日目より著しく上昇することが認められた。同様な酵素活性の上昇は、細胞質上清に存在する LDH 活性でも認められ、マグネシウム欠乏では、一般的に細胞内の酵素量が増加している可能性が考えられる。またマグネシウム欠乏ラットでは FMLP 刺激による O_2^- の生成も7日目より約2倍に上昇することが認められた。

このようなマグネシウム欠乏で見られる O_2^- 生成上昇の機序を飼育10日目のラットを用いて解析した。Fig. 1 は、FMLP と PMA の濃度を変えて O_2^- の生成量を検討したものである。PMA 刺激では両群とも同様な濃度依存性を示し、各濃度で欠乏群は対照に比べて高値を示した。FMLP 刺激では $10^{-8}M$ で両群に差は見られなかった。また、対照群では FMLP 濃度が $10^{-7}M$ で O_2^- の生成は、ほぼプラトーに達するのに対して、欠乏群では $10^{-6}M$ でさらに上昇する傾向が認められた。この結果は、マグネシウム欠乏では、 O_2^- の生成が最高値に達するのに、より高濃度の FMLP を必要とすることを示しており、マグネシウム欠乏では FMLP に対する感受性は若干低下していると推定される。

Table 1. Total activities of lysosomal enzymes and superoxide anion production of PMN from magnesium deficient rats

Day	4	7	10
β -GL activities(pmol/min/ 2×10^6 PMN)			
Cont.	194 \pm 36	283 \pm 80	255 \pm 43
Mg-def.	268 \pm 91	619 \pm 136**	730 \pm 210**
MPO activities(ΔA_{655} /min/ 2×10^6 PMN)			
Cont.	3.94 \pm 1.23	6.59 \pm 2.88	6.07 \pm 1.79
Mg-def.	3.72 \pm 1.57	14.00 \pm 2.93**	18.61 \pm 3.84**
LDH activities(nmol/min/ 10^6 PMN)			
Cont.	4.00 \pm 0.79	6.43 \pm 2.20	8.23 \pm 6.09
Mg-def.	6.40 \pm 3.32	10.85 \pm 2.14**	15.35 \pm 3.82**
O_2^- production(nmol/min/ 10^7 PMN) ¹⁾			
Cont.	5.14 \pm 3.00	7.85 \pm 1.76	6.14 \pm 2.81
Mg-def.	6.52 \pm 3.71	16.48 \pm 4.90**	15.19 \pm 5.10**

¹⁾PMN were stimulated with the mixture of 10^{-6} M FMLP and $5 \mu\text{g/ml}$ cytochalasin B. Results are expressed as means \pm S.D.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

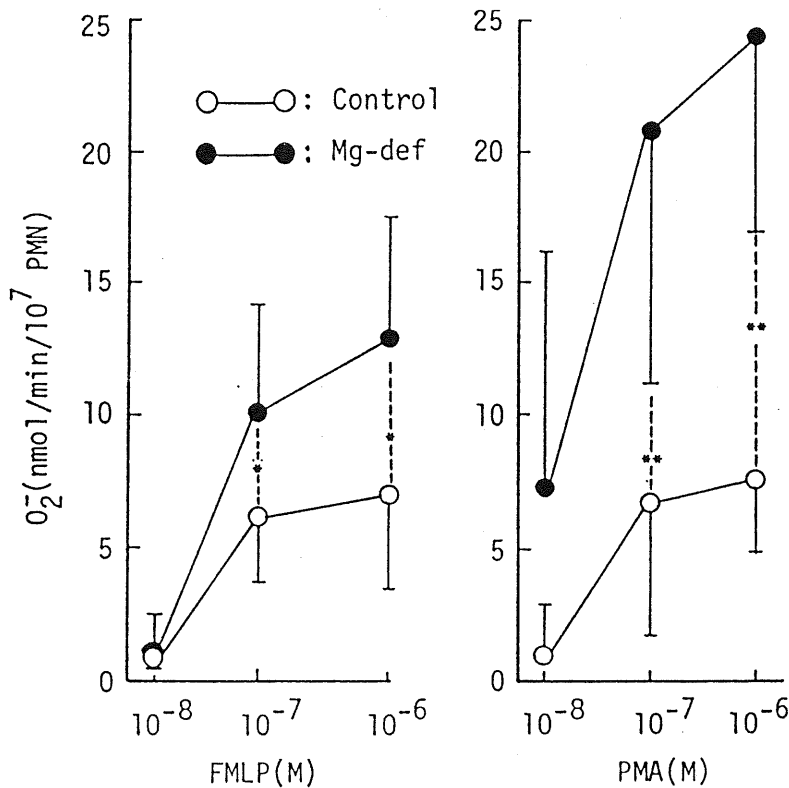


Fig. 1. Superoxide anion production as function of stimulus concentration. PMN were stimulated with PMA or the mixture of FMLP and $5 \mu\text{g/ml}$ cytochalasin B. Results are expressed as means \pm S.D. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

また、FMLP 刺激では機能発現にさいして受容体への FMLP の結合により、イノシトール燐脂質の代謝、細胞内カルシウム濃度の上昇、蛋白リン酸化酵素の活性化を介して、特異的蛋白のリン酸化が起こると推定されている。

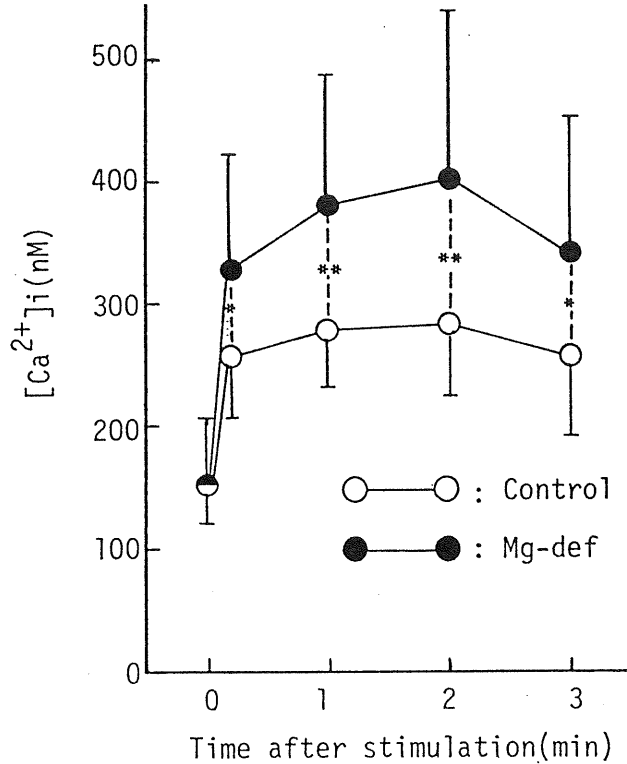


Fig. 2. FMLP induced elevation of intracellular free calcium concentration. PMN were stimulated with 10^{-7} M FMLP. Results are expressed as means \pm S.D. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

次にマグネシウム欠乏での O_2^- 生成上昇の機序に細胞内遊離カルシウム濃度の上昇が関与しているかを検討した。この実験では、 10^{-7} M の FMLP を刺激剤として用いた。Fig. 2 に示すように欠乏群では、刺激10秒後のカルシウム濃度は対照群に比べて高くなっており、時間を経過するに従ってさらにその差は大きくなった。細胞内カルシウム濃度の上昇には、細胞内貯蔵部位からの遊離と細胞外からの流入が関与し、刺激直後の変化は貯蔵部位からの遊離、時間の経過にともなう変化は、細胞内への流入を反映すると考えられている^{8,9)}。マグネシウム欠乏の場合には、刺激直後だけでなく、時間経過に従いさらに上昇することから、貯蔵部位からの遊離と細胞外からの流入の両方が高まっている可能性が考えられる。

さらにカルモジュリン依存性プロテインキナーゼの阻害剤である W-7 (N-6-aminoethyl-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide-hydrochloride) および Ca^{2+} 燐脂質依存性プロテインキナーゼ (C-キナーゼ) の阻害剤である H-7 (1-5-Isoquinolinesulfonyl-2-methylpiperazine-dihydrochloride) を用いて、2種

の蛋白リン酸化酵素の関与を検討した。Table 2 に示すように対照群では、10 μ M の W-7 で約40%、100 μ M の H-7 で約30%の阻害が認められた。欠乏群では、W-7 の阻害率は対照群と変化はないが、H-7 の阻害率は非常に低くなっていた。以上の結果より、マグネシウム欠乏では刺激後の遊離カルシウム濃度の上昇が著しく、O₂⁻生成増加の一因になっている可能性が考えられる。しかしマグネシウム欠乏では、カルシウム濃度の上昇を介さずに O₂⁻生成を引き起こす、PMA 刺激時にも著しく O₂⁻生成は上昇することから、他の因子も関与していると考えられる。またマグネシウム欠乏では H-7 の阻害率が低くなっており、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ C が関与する割合が高まっている可能性も推定されるが、今後さらに詳しく検討する必要があると考えられる。

Table 2. Effect of W-7 or H-7 on FMLP induced superoxide anion production

Inhibitor	Control	Mg-def.
None	100	100
W-7	58.5 \pm 7.0	62.7 \pm 9.7
H-7	70.0 \pm 19.8	96.5 \pm 8.2

PMN were preincubated for 5 min. with or without W-7 or H-7 and stimulated with the mixture of 10⁻⁶ M FMLP and 5 μ g/ml cytochalasin B.

文 献

1. KASHIWA, H. K. and G. F. HUNGERFORD(1958)Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 99 : 441
2. 細川 優, 吉原富子, 東條仁美, 佐藤郁雄, 新関嗣郎, 村岡 亮, 長谷川和夫, 山口賢次 (1988) 微量栄養素研究 5 : 25
3. ROSSI, F.(1986)Biochem. Biophys. Acta 853 : 65
4. SUZUKI, K., C. SWENSON, S. SASAGAWA, T. SAKATANI, M. WATANABE, M. KOBAYASHI and T. FUJIKURA (1983)Exp. Hematol. 11 : 1005
5. SUZUKI, K., H. OTA, S. SASAGAWA, T. SAKATANI and T. FUJIKURA(1983)Anal. Biochem. 132 : 345
6. KITAGAWA, S. and F. TAKAKU(1981)FEBS Lett. 128 : 5
7. TSIEN, R. Y., T. POZZAN and T. J. RINK(1982)J. Cell Biol. 94 : 325
8. KRUSKAL, B. A. and F. R. MAXFIELD(1987)J. Cell. Biol. 105 : 2685-2693
9. KORCHAK, H. M., L. B. VOSSHALL, G. ZAGON, P. LJUBICH, A. M. RICH and G. WEISSMANN(1988)J. Biol. Chem. 263 : 11090-11097