

テトラヒメナを用いたミトコンドリア活性化因子の探索とその生理効果

藤原 隆史, 小澤 哲夫, 沼田 治 (筑波大学・生命環境科学研究科)

Search of mitochondrial activation factors using *Tetrahymena* and study on their physiological effects

Takashi FUJIHARA, Tetsuo OZAWA, Osamu NUMATA

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

SUMMARY

Using *Tetrahymena* and rhodamine 123, we developed a simple method of measuring mitochondrial membrane potential. We then examined whether several catechins, oolong tea and black tea could increase mitochondrial membrane potential. We found that the high-molecular-weight polyphenols in both teas, and several catechins, could increase mitochondrial membrane potential and activate the mitochondria. The high-molecular-weight polyphenol was referred as MAF (mitochondrial activation factor). The MAFs were purified from oolong tea and black tea by a combination of solvent extraction and Toyopearl HW-40F column chromatography. The MAFs have gallic acid residues, procyanidin structures and bonding between B ring and B ring of catechin group. The MAF isolated from oolong tea increased the mitochondrial membrane potential and ATP content in *Tetrahymena* and mouse sperm, and elevated their swimming velocity. These results suggest that the MAF increases ATP synthesis through activation of oxygen respiration in the mitochondria and that the MAF is a first respiratory activator. Since swimming velocity depends on ciliary and flagellar motility, the MAF directly or indirectly activates ciliary and flagellar movement. When MAF was administered to diabetic model mice on a daily basis, their blood sugar level decreased to 80% of the previous level and the occurrence of fatty liver was reduced.

【目的】 ミトコンドリアは細胞が利用するほとんどの ATP を生産する。高エネルギー電子が電子伝達系を移動する過程で水素イオンがミトコンドリア・マトリックスから内膜と外膜の膜腔にくみ出される。その結果、内膜の両側に水素イオンの電気化学的勾配ができ、ミトコンドリア膜電位が生じる。水素イオンが膜腔からマトリックスに戻る際に内膜上にある ATP 合成酵素によって ADP+Pi から ATP が産生される。このようなミトコンドリアの酸素呼吸を阻害する物質は KCN, antimycin A, rotenone, Na₂S, NaN₃, などが知られている。しかし、ミトコンドリアを活性化する物質についてはほとんど知られていない。そこで我々は環境中からミトコンドリアの活性を上昇させる物質を探索するためにテトラヒメナとローダミン123を用いてミトコンドリア活性化因子の簡便な探索法を開発した。この方法を用いて、カテキン類、ウーロン茶、紅茶などがミトコンドリアを活性化するかどうか検討し、ウーロン茶や紅茶などの発酵茶にミトコンドリア活性化因子 (MAF : mitochondrial activation factors) が存在することを発見した。本研究では MAF の分離法、性状、生理活性などについて検討した。

【材料と方法】 細胞としては *Tetrahymena thermophila* とマウス精子を用いた。ミトコンドリアの活性化は膜電位、ATP 産生量、酸素消費量を測定して調べた。ミトコンドリア膜電位の上昇については、ローダミン123の緑色蛍光強度が膜電位の大きさに比例しているため、ミトコンドリア膜電位をローダミン123の生体染色によって定量的に測定した。MAF の分離はウーロン茶あるいは紅茶抽出物を酢酸エチルと酸性ブタノールで溶媒抽出し、酸性ブタノール画分を Toyopearl HW-40F カラムにかけ、吸着した MAF をアセトンで溶出して分離した。MAF の構造は熱分解クロマトグラフィーなどを用いて明らかにした。MAF の生理効果は2型糖尿病モデルマウス (BSK.Cg-m+/+Lep<db>/Jcl) への MAF の腹腔注射によって調べた。

【結果と考察】 我々が開発したミトコンドリア活性化因子の探索法はローダミン123による生体染色によってサンプルで処理したテトラヒメナのミトコンドリア膜電位の上昇を定量的に測定するものである。作業

は簡単で、再現性も高い。この方法を用いて、カテキン類や発酵茶成分のミトコンドリア活性化能を調べた。その結果、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、そして発酵茶に含まれる高分子ポリフェノール (MAF) にミトコンドリア活性化能があることが分かった。特に MAF の活性は顕著であった。

MAF はテトラヒメナのミトコンドリアの膜電位、ATP 産生量、そして酸素消費量を上昇させた。MAF の構造解析の結果、MAF はカテキンが酸化重合した高分子ポリフェノールであること、分子量は9,000~18,000であること、カテキンが持つ A, B, C の3つの環のうちの B 環同士の結合を分子内に持つことなどが明らかになった。また、MAF はマウス精子や培養細胞のミトコンドリア膜電位を上昇させ、種を超えてミトコンドリアを活性化する能力を持つことが分かった。これらの結果は MAF がミトコンドリアの酸素呼吸を活性化する世界初の物質であることを示している。現在、MAF によるミトコンドリア活性化の分子機構に関して、MAF 処理によって発現量が顕著に変動する遺伝子の探索などを行い検討している。

MAF はテトラヒメナの繊毛運動を活性化させ遊泳速度を35%上昇させた。この結果から、MAF の精子鞭毛運動に対する効果を調べた。マウス精子を室温で90分間置くと、遊泳速度が4分の1に減少する。このような精子に MAF を処理すると遊泳速度が2倍近く上昇した。これらの結果は MAF が繊毛運動や鞭毛運動を活性化することを示唆している。

次に MAF の生体内での生理作用を調べるために、2型糖尿病モデルマウス (BSK.Cg-m+/+Lep<db>/Jcl) の腹腔に90 µg ずつ、MAF を70日間注射した。その結果、血糖値が20%低下し、脂肪肝の発症が抑制されることが分かった。これらの結果から、我々は MAF がミトコンドリアを活性化することによって、糖代謝を促進して血糖値を低下させ、また脂肪代謝を促進して脂肪肝の発症を抑制させると考えた。すなわち MAF によるミトコンドリア活性化のメカニズムを明らかにすることは、生物学的な意義があるばかりではなく、糖尿病や脂肪肝などの生活習慣病の予防や治療にも道を開くものである。

以上の研究結果から、我々が開発したテトラヒメナとローダミン123を用いたミトコンドリア活性化因子の探索法は、応用面で威力を発揮することが明らかに

なった。今後、この方法を用いて、新たなミトコンドリア活性化因子の探索を進めたいと考えている。