

【総 説】

活性酸素の生理機能

－エネルギー代謝亢進の解除時における活性酸素の生成亢進－

佐々木 徹

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所老化機構研究チーム

要約

活性酸素の生成とエネルギー代謝には相関関係があると考えられている。筆者らは、脳生組織を対象にex-vivo光イメージング法を用いて、活性酸素とエネルギー代謝の関係を調べた。その結果、活性酸素の生成とエネルギー代謝は単純な正の相関関係にないこと、活性酸素の生成は組織のエネルギー代謝の亢進に伴って生ずる低酸素の解除により亢進することが示された。このことは、組織の活性酸素の生成が活動時ではなく、活動から休止に移行する過程で亢進することを意味する。この現象の背景には、組織の低酸素とそれを原因とする「還元ストレス」の関与が示唆された。近年、活性酸素にはレドックスシグナルとしての役割があることがわかってきた。今回、筆者らは生理的に生成する活性酸素の一端を捉えることができたと考えている。これまで、「活性酸素毒性説」による説明が試みられてきた老化や疾患の理論を、「活性酸素の生理機能」の視点で再構築する必要がある。

キーワード：活性酸素、酸化還元ストレス、エネルギー代謝、低酸素、生理機能

1. はじめに

老化の進行や寿命は、身体内外の環境因子の影響を受ける。環境因子の一つとして有力視されるのが酸化ストレスである。老化のフリーラジカル学説は、酸化ストレスの原因物質である活性酸素が生体分子を酸化的に損傷し、その蓄積によって細胞機能低下を招き、老化の原因となるという考え方である[1]。活性酸素は老化だけではなく、様々な疾患の原因として考えられている。そこで、毒性因子としての活性酸素を制御することで疾患の治療を目指す「抗酸化療法」が考案されている。しかし、動物実験レベルで一定の学術的根拠は得られているが、臨床応用にまで至ったものは一例のみである[2]。一方で、脆弱な学術的根拠をもって、抗酸化療法を標榜した民間療法が先行している現状もある。

活性酸素は、外因のみならず内要因によっても生成される。ミトコンドリアでは、エネルギー産生の過程で副生成物として活性酸素が生成する。ある種の食細胞は、細菌などの異物処理のために活性酸素を産生する。活性酸素は必ずしも生物に都合の悪い存在ではない側面もある。活性酸素の一種でもある一酸化窒素の生体内での役割の再発見は、活性酸素を「シグナル分子」として捉える契機となった。その後の研究で、活性酸素に生理活性

物質、レドックスシグナル分子としての役割があることがわかってきた[3,4]。本稿では、脳の虚血・再灌流や加齢と活性酸素の関係について、筆者らが開発したイメージング法を用いて、「活性酸素毒性説」の視点で進めてきた研究結果を示すとともに、「活動状態にある組織が休止に移行する過程で活性酸素の生成が亢進すること」を示す最近の研究結果を提示して、「生理機能調節因子」としての活性酸素の可能性についても述べる。

2. インビボとインビトロをつなぐ新しいイメージング法の開発

「バイオラジオグラフィ法」は、生きて機能している組織の代謝や機能を、ラジオルミノグラフィ上に放射性探索子（主にポジトロン断層撮像法用トレーサ）の二次元分子画像として記録して、それを繰り返すことで動的に解析する方法論である[5]。筆者らは、この画像収集（放射線計測）と化学発光計測を融合して、複合の二次元分子画像としてリアルタイムに解析する方法「リアルタイムバイオラジオグラフィ法」を開発した[6-8] (図1)。ここで対象とする生組織では、生体と同様に糖代謝や酸素代謝が、脳組織では加えて神経伝達物質の生合成と放出、神経受容体への結合、細胞応答機能も維持されている。本法は、それらの過程をインビトロ実験に準じた精度で解析することができる[9-16]。活性酸素は、生体分子と反応する性質が強く、寿命が極めて短いため、他の物質のように測定することは容易でない。そこで筆者らは、このイメージング法を活性酸素の動的解析に応用し

連絡先：〒173-0015 板橋区栄町35-2
TEL: 03-3964-3241 (内3061)
FAX: 03-3579-4776
E-mail: tsasaki@center.tmig.or.jp

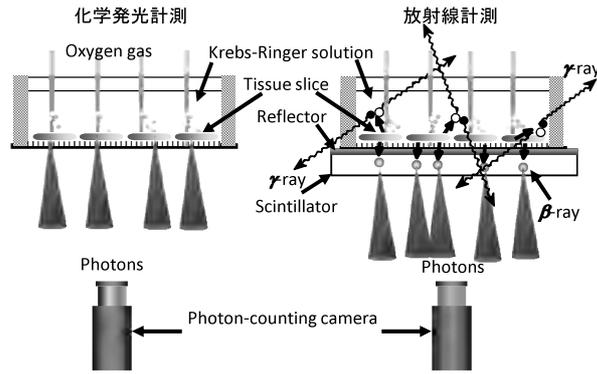
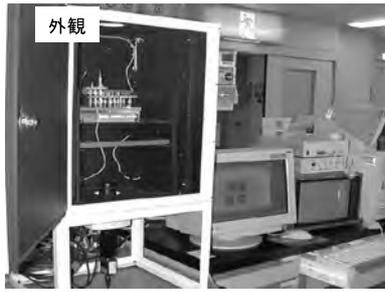


図1. リアルタイムバイオラジオグラフィ法

た。その結果、スーパーオキシド生成をルシゲニンによる化学発光から、糖代謝を [18 F] 2-フルオロ 2-デオキシグルコース (FDG) 集積から、画像化・解析することに成功した[6-8]。本法は、培養細胞や生体成分を用いたインビトロ計測法と、個体を対象とするインビボ計測法の中間に位置づけられ、インビトロの研究成果を臨床に結びつけるための有用な基礎データを提供するほか、基礎医学研究に有用な手段として期待される。

3. 老化の過程で活性酸素の生成亢進と寿命との関係

「老化のフリーラジカル説」は、活性酸素・フリーラジカルを「毒性因子」として捉え、老化を説明する[1]。実際、加齢に伴って酸化修飾を受けた生体内分子（タンパク質、脂質、DNA）の組織濃量が増加することが報告されており、この説の傍証とされる[17-21]。酸化ストレスの指標となる組織の酸化修飾物質の量は、(1) 活性酸素生成、(2) 活性酸素消去系、(3) 酸化修飾物

質修復・分解系、の三要因によって決定される。筆者らは、酸化修飾物質の量を規定する因子を明らかにすべく、活性酸素の組織レベルの加齢変化を、上述のイメージング法を用いて検討した。その結果、脳組織の活性酸素レベルは加齢に伴い直線的に増加し、その増加率は動物種固有の最大寿命と逆相関があること

を示した。一方、抗酸化酵素の活性は加齢に伴って変化しないことから、活性酸素の生成が第一義的に酸化修飾物質の量を決定すると考えられた[8,22,23](図2)。さらに、活性酸素の消去能の評価に関する研究も行った。組織の活性酸素レベルは、抗酸化物質であるアスコルビン酸の欠損[24]、スーパーオキシドデスムターゼの欠損[25]で増加、SODミミックの添加[8]、水素ガス処理[26]で低下することを示した(詳細は総説等を参照されたい)。

4. 低酸素-再酸素過程における活性酸素の生成機序

虚血-再灌流過程の活性酸素生成の分子機序解明は、脳、腎、心虚血の治療法や臓器移植医療の開発に重要である。活性酸素は虚血-再灌流、低酸素-再酸素過程に見られる細胞傷害の機序に重要な役割を果たすと考えられている[27-29]。虚血-再灌流過程の活性酸素の生成には、キサンチンオキシダーゼ[30-33]、ミトコンドリア電子伝達系[34-36]、シクロオキシゲナーゼ、NADPHオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ[27,29]の関与が示唆されている。

脳は酸化ストレスに特に脆弱である。臓器重量は体重の2%であるにもかかわらず、吸入した酸素の20%を消費する[37]。活性酸素の標的になる多価不飽和脂肪酸を多く含む一方で、脳の抗酸化物質、酵素レベルは他の臓器に比べ低い[38]。筆者らは、虚血-再灌流のモデル実験として、ラット脳生切片を対象に低酸素-再酸素過程におけるスーパーオキシド生成をルシゲニンによる化学発光から、糖代謝をFDGの集積から、リアルタイムバイオラジオグラフィ装置で画像化・解析した[8]。その結果、スーパーオキシド依存性の化学発光は再酸素処理時に著しく増強し、その部位に局在性が認められた(図3)。この化学発光強度は、細胞膜透過性を有するSODミミック(EUK-8)の添加で減少するが、Cu,Zn-SOD添加では変化しなかったことから、計測された化学発光は細胞内のスーパーオキシドレベルを反映するものと結論された。

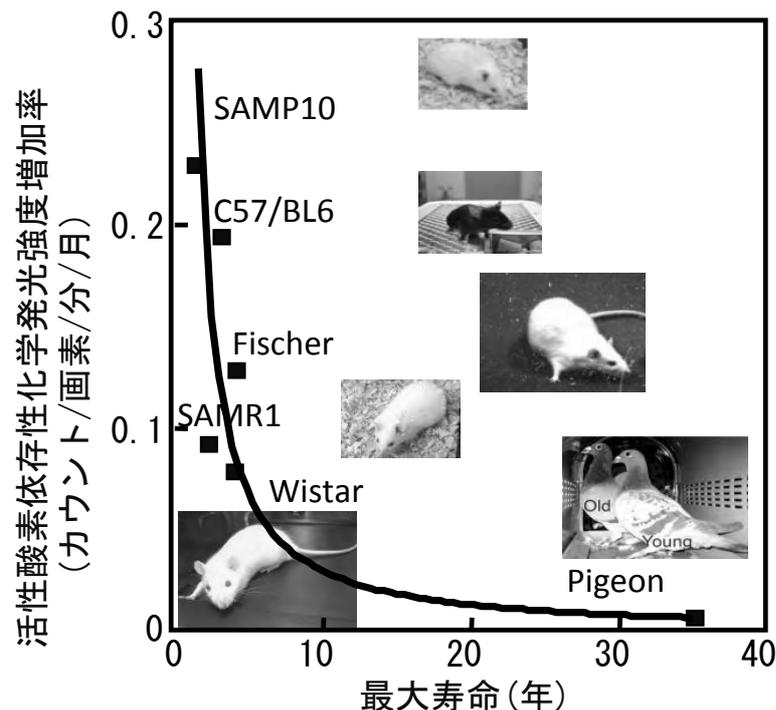


図2. 脳の活性酸素生成と寿命の関係

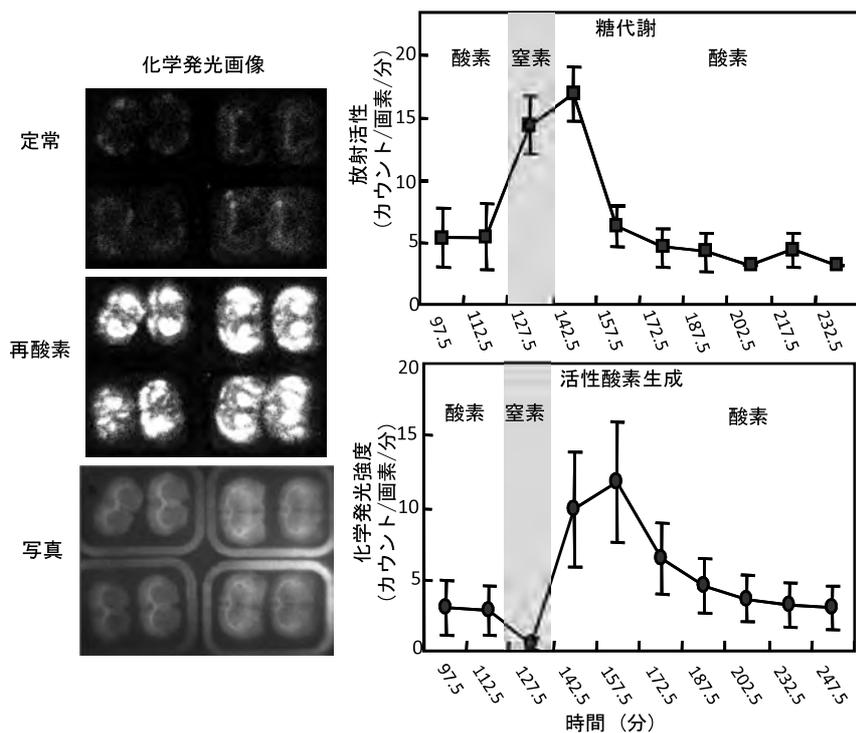


図3. 低酸素-再酸素過程における脳の活性酸素の生成と糖代謝の時間変化

細胞内におけるスーパーオキシドの生成に関して、ミトコンドリアを有力とするいくつかの証拠が得られている。ミトコンドリア電子伝達系の阻害剤であるシアン、ロテノン、アンチマイシンAでの処理は化学発光強度を一過性に亢進した。ミトコンドリア電子伝達系での活性酸素の主要な生成場所として、複合体IとIIIが示唆されている[39-43]。ミトコンドリア電子伝達系を阻害すると、活性酸素の放出は阻害部位の上流に位置する酸化還元反応中心で亢進する一方で、下流の放出は低下すると考えられている(図4)[39-43]。複合体Iの阻害剤であるロテノン、複合体IIIの阻害剤であるアンチマイシンA、複合

体IVの阻害剤であるシアンによる処理によって、複合体IとIIIからの活性酸素の放出が亢進することが単離ミトコンドリアと亜ミトコンドリア粒子において示されている[40-45]。しかし、複合体IIの阻害剤である3-ニトロプロピオン酸処理では化学発光の亢進を認めなかった。これは複合体IとIIの酸化還元反応中心は、複合体IIの阻害部位の上流には存在しないためと考えられる[41,45]。また、ミトコンドリアの熱産生に関連して、脱共役剤の影響を検討した(図4)。プロトン勾配を解消する脱共役剤のシアン化カルボニル*m*-クロロフェニルヒドラゾン(CCCP)は、化学発光強度を低下させ、脱共役タンパク質2(uncoupling protein2)の阻害剤であるゲニピンはそれを亢進した。一方、キサンチンオキシダーゼの阻害剤であるアロプリノールとNADPHオキシダーゼの阻害剤であるアポサイニン処理による変化は認められなかった。スーパーオキシドの分解酵素であるSODには3種類のアイソザイムが存在する。そのうちCu,Zn-SOD(SOD1)は細胞質に、Mn-SOD(SOD2)はミトコンドリアに局在する。脳特異的Mn-SOD欠損マウス、Cu,Zn-SOD欠損マウスから作成した脳組織生切片のスーパーオキシド依存性化学発光を野生マウスのものと比較することで、細胞質とミトコンドリアのスーパーオキシドのレベルに関する情報を得ることを試みた[25]。定常状態の化学発光は、SOD1欠損とSOD2欠損で野生に比べて亢進した。それぞれの亢進の割合の比較から、定常状態の細胞質とミトコンドリアのスーパーオキシドの総量は、同等か細胞質の方が多いと見積られた。一方、再酸素時の発光亢進はSOD2欠損が顕著で、再酸素時には特にミトコンドリアでスーパーオキシドの生成が亢進すると考えられた。さらに、ミトコンドリアの体積(細胞の1/5程度)を考慮して、スーパーオキシドを濃度で比較すると、ミトコンドリアのスーパーオキシドは定常状態で細胞質の2倍程度、再酸素時で8倍程度に達すると見積られた。以上の検討結果から、虚血-再灌流における活性酸素の生成に対するミトコンドリア電子伝達系の関与が示唆された。

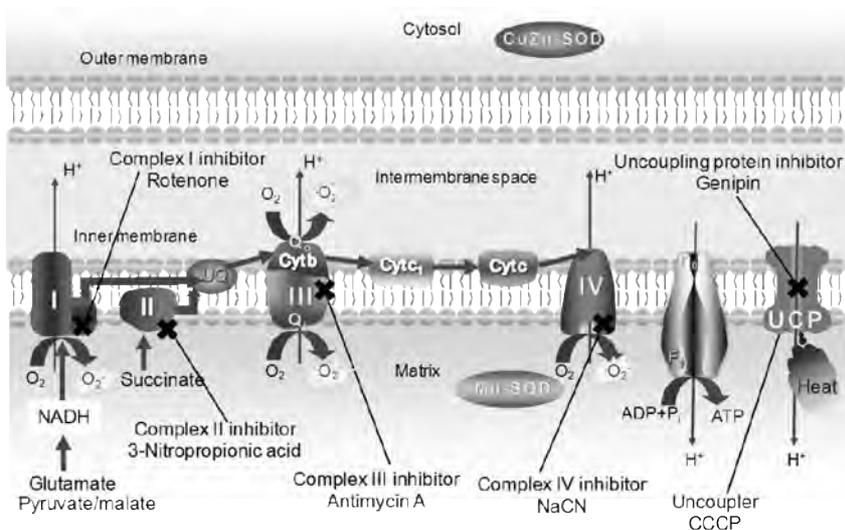


図4. ミトコンドリアの電子伝達阻害剤、脱共役剤および阻害剤の作用部位

5. 生活代謝学説と活性酸素・フリーラジカル学説の接点

寿命とエネルギー代謝率は反比例の関係にあり、老化は代謝率が高いほど早く進行する。生活代謝学説では、老化・寿命をエネルギー消費の視点から説明している[46-48]。この説は、ミトコンドリアを介して、活性酸素・フリーラジカル学説と接点を持つと考えられる。すなわち、ミトコンドリアはエネルギー産生場であり、生体内の主要な活性酸素の生成場とされる。外呼吸で取り込んだ酸素の90%以上は、内呼吸場であるミトコンドリアでエネルギー(ATP)産生のために消費される。その際、最終電子受容体として酸素が使われるが、一部(1-2%)が活性酸素に変わると考えられている[49](0.1%程度という説もある[48])。酸素消費はエネルギー需要の充進により増加するので、一般にはエネルギー代謝が充進すると活性酸素の生成も増加すると考えられる。

筆者らは、活性酸素の生成とエネルギー代謝の関係を明らかにすべく、上述の脳生組織を対象にした低酸素-再酸素モデルにおいて、溶液中のカリウムの濃度を段階的に増加させ、活性酸素の生成量を調べた。体内の酸素消費の80%はATP合成に共役する。そのATPの20%をNa/K-ATPaseが消費するが、特に脳ではそれが70%にも達する[50]。実際に、エネルギー代謝率がカリウム濃度に依存して充進することが、エネルギー指標(糖代謝率と酸素摂取率)の変化から確認された(図5)。しかし、このような状況にもかかわらず、定常状態のスーパーオキシドの生成は変化せず、逆に減少傾向を示した。この結果は、活性酸素の生成とエネルギー代謝は単純な正の関係にはないことを示唆する。「エネルギー代謝が充進すると活性酸素の生成は増加する」と考える根拠としては、以下の現象が知られている。(1)動物の寿命は体重あたりのエネルギー代謝率と逆相関を示す。身体サイズの小さい動物の単位体積あたりの体表面積は大きい。このような動物は体重あたりのエネルギー代謝率は大きくなり、単位体積あたりの活性酸素生成率は高い[46-48]。(2)寿命延長効果が知られるカロリー制限下ではエネルギー代謝率の低下と酸化ストレスの軽減を認める[51,52]。(3)エネルギー消費の充進を伴う運動で、組織

の活性酸素や酸化修飾物質の量が増加する[53,54]。一方、否定的な報告も知られる。(1)運動を嗜好する「ランナーマウス」は対照マウスより~30%エネルギー消費が増加していたが、寿命は対照マウスと変わらなかった[55]。(2)ミトコンドリアのState 3(ADP存在下の促進呼吸で生体の活動充進に相当)の活性酸素の生成は、State 4(ADP非存在下の抑制呼吸で活動休止に相当)の生成量より低い。State 4の活性酸素の生成は加齢に伴って増加あるいはカロリー制限によって低下するが、State 3にはそのような変化は認めない[56-58]。また、State 4の活性酸素の生成は動物の寿命と逆相関を示すが、State 3とは相関を認めない[59]。

6. 供給性低酸素と需要性低酸素

筆者らは、再酸素時の活性酸素の生成がエネルギー代謝率と一致して充進することを発見した(図5)。当初、この現象の理解は困難であったが、低酸素の背景にある二つの要因に着目するに至った。一つは、酸素の供給低下による低酸素であり、もう一つは、組織、細胞の酸素消費が充進した結果生ずる低酸素である。低酸素は、単に組織、細胞の環境の酸素濃度が低くなった状態ではない。血流による酸素の供給と組織の酸素消費のバランスで考えるべきである。酸素の消費の低下した状態(低温、冬眠など)では、呼吸が緩慢になり酸素の供給は低下するが、低酸素とはならない。一方、酸素消費が充進した状態(運動時、病的な例ではてんかんの発作時など)では、酸素は供給されるが低酸素の状態に相当すると考えた。筆者らは、先に酸素の供給低下による「供給性低酸素」に続く再酸素時(低酸素を解除した時)に、活性酸素の生成充進が認められることを示したが(図3)、酸素消費充進による「需要性低酸素」を解除した時にも、活性酸素の生成充進が起こるという作業仮説を立てた(図6)。その検証のために、濃度の異なるカリウム処理を組み合わせた実験をデザインした。その結果、高カリウム処理によって充進したエネルギー代謝の状態を解除(低カリウム処理)した時に、活性酸素の生成が充進することを認めた。一方、カリウム処理の順序を逆転(低濃度→高濃度)させたネガティブコントロールではそのような変化は認めなかった(図7)。

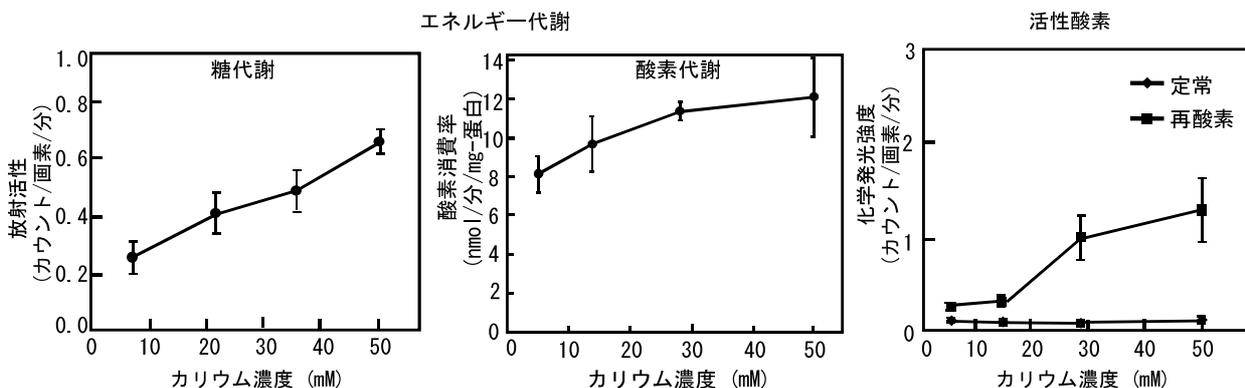


図5. 活性酸素の生成とエネルギー代謝の関係

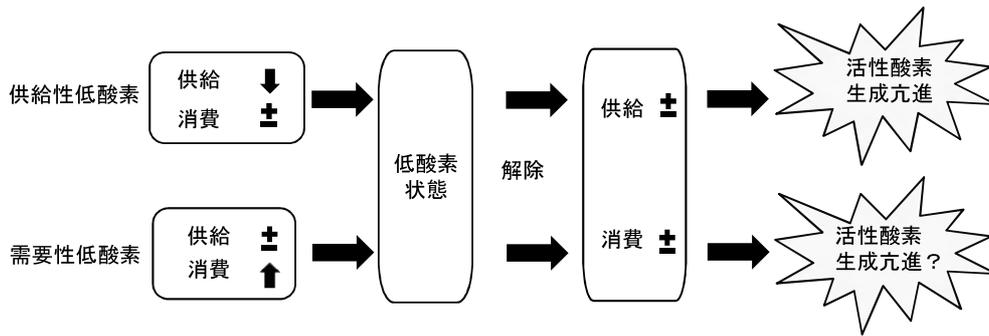


図6. 供給性低酸素と需要性低酸素の解除時における活性酸素の生成亢進

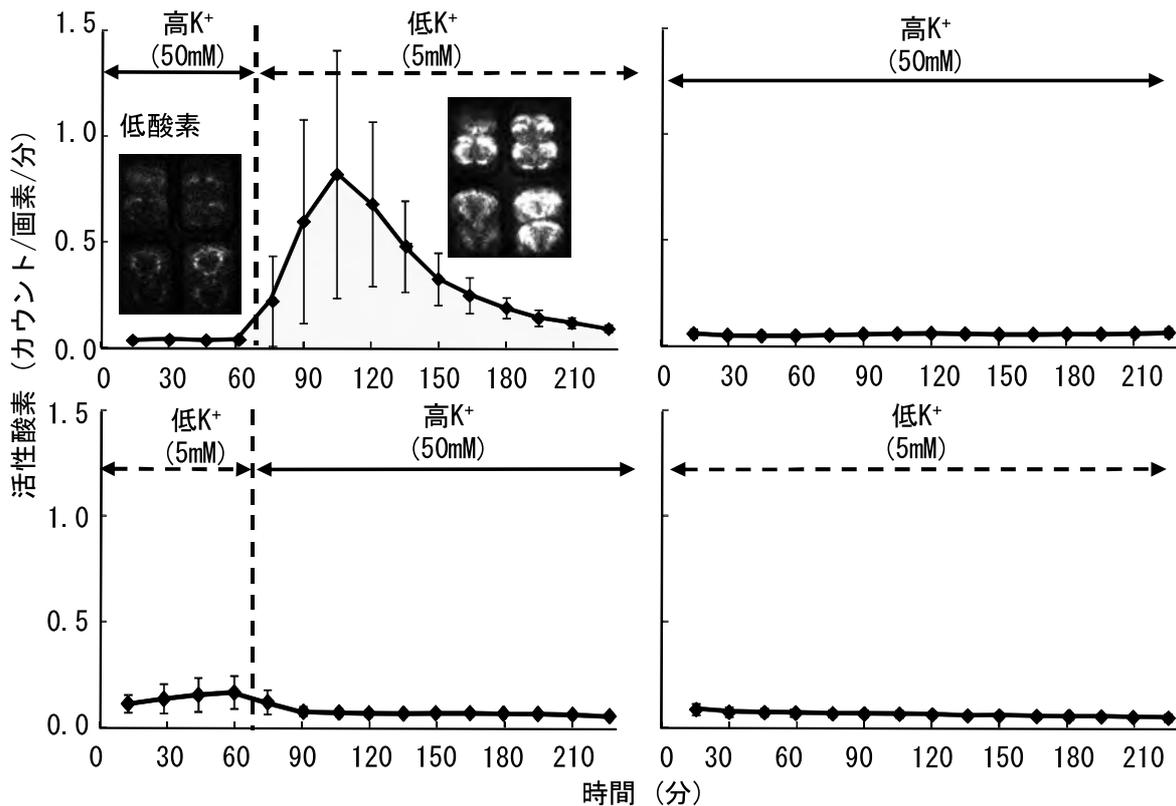


図7. 需要性低酸素の解除時における活性酸素の生成亢進

7. 活性酸素：毒性因子から生理機能因子へ

筆者らは、酸素の供給低下による低酸素に続く再酸素時に、活性酸素の生成亢進が認められることを示した(図3)が、今回、酸素消費亢進による低酸素を解除した時にも、活性酸素の生成が亢進することを発見した(図7)。前者は虚血・再灌流のモデルという病的な状況下に生成する活性酸素を再現した。一方、後者は生理的に発生する活性酸素「生理的活性酸素」を捉えたと考えられる。身体活動の強化と緩和は日常的に繰り返されている。身体活動の強化はエネルギー消費を高め、新たなエネルギー産生のために、より多くの酸素が消費される。これに伴い、組織内の酸素濃度は一時的に低下(低酸素)する[60]。ミトコンドリアの酸素濃度は酸素の供給と消費によって、 $3-30\mu\text{M}$ の範囲で変動する[61]。今回の発見は、活性酸素の生成が身体活動を強化した時ではなく、それを緩和した時に亢進することを示唆する。

現時点で、この活性酸素の生成機序は明らかにはなっていないが、低酸素を解除したタイミングで活性酸素の生成が亢進したことから、基本的には供給性低酸素の再酸素モデルと同様に、ミトコンドリアに関連していると考えている。脳生組織において、低酸素と酸化還元状態(レドックス)の変化に関連して、以下のことが知られている。脳組織を高カリウム処理や電氣的に刺激すると、エネルギー消費の亢進とそれに伴うエネルギー産生の賦活が起こる。エネルギー産生は酸素を要求するため、組織の酸素消費の亢進に伴う酸素濃度の低下が起こり、レドックスが還元側にシフトする。このような還元シフトは、血流の低下などによる供給性の低酸素時にも、 NADH/NAD^+ 比を指標にして示されている[62-64]。好気的環境下では、ミトコンドリアの酸化的リン酸化によって効率的にATPを合成することができる。解糖と酸

化的リン酸化により、一分子のブドウ糖から合わせて38分子のATPが得られる。一方、嫌気的環境下の解糖は非効率で、ATPの生成は2分子である。このような嫌気的環境下では、ワールブルグ効果（がん組織に見られる、低酸素時の代償的な解糖系の賦活）[65]と同様に、より多くのブドウ糖を取り込むことになる。筆者らは、低酸素処理による酸素代謝の低下（図3）とブドウ糖代謝の亢進を脳スライスで示した[6]。低酸素条件下では、解糖によって生成するNADHとピルビン酸の一部は乳酸脱水素酵素によってNAD⁺と乳酸に変換されるが[66,67]、NADHの還元力をミトコンドリアの電子伝達を介して受け取るのに十分な酸素が供給されないため、組織のNADH/NAD⁺比は還元側にシフトする[62-64]。脳組織の酸素濃度は、酸素の供給量の低下や酸素消費の亢進（高カリウム処理や電気刺激等による）によって低下する。このような低酸素時の活性酸素の生成は、定常時より低いことも明らかになった（図3）。一方で、ミトコンドリアからの活性酸素の生成は酸素濃度に依存すると考えられるが、低酸素処理下で活性酸素の生成の亢進が観察されるという事実が知られている。酸素から生成する活性酸素が、低酸素下で生成する矛盾「低酸素パラドクス」と呼ばれる[68,69]。この現象の説明として、(1)低酸素による、complex IIIのユビセミキノラジカル（ubisemiquinone radical）の安定化[70]や抗酸化酵素の阻害 [70-72]、(2)低酸素の実験の酸素濃度が、体内酸素濃度に比して十分低くないこと[70, 71]、などが示唆されている。活性酸素の生成亢進の背景因子として、CoQH₂/CoQ、NADH/NAD⁺比の上昇による組織の還元シフトが示唆されているが[69]、活性酸素が分子状酸素から生成されるならば、その生成には一定量の酸素の存在が必須である。したがって、活性酸素生成の背景には組織の過剰な還元（過還元）が必要であるが、その状態で活性酸素が生成するのではなく、この過還元が酸素の存在によって酸化側へ移行（レドックスシフト）することが重要であると考えられる。このようなレドックスシフトは生体内で実際に起こっている。脳組織のレドックスが、活動亢進に伴い一過性に還元シフトしたのち、血流の増加に伴って酸化側に変化することが知られている[60]。機能的磁気共鳴画像（fMRI）や近赤外光脳機能イメージング装置（fNIRS）は、脳の神経細胞の活動に伴って還元状態となった組織が、脳血流量の増加により酸化側に移行する過程を、脳血管内のヘモグロビンの酸化還元状態の磁気あるいは光画像として収集する。それらの画像データを解析することで、脳の活動部位を評価する[73,74]。筆者らの実験結果は、活性酸素の生成は活動時（還元状態）ではなく、休止（酸化状態）へ移行する過程で亢進することを示唆した。近年、活性酸素やガス状低分子化合物を一括にシグナル分子と捉える考え方が示されている[75]。今回、活性酸素の生成が身体活動の亢進と休止に伴う組織酸素需要と供給のバランスに呼応して変化することを示した。今後、酸素センサーやエネルギー調節因子としての活性酸素の役割を検討する必要があると考える。

8. 終わりに

生命存続の基本的要素の一つは、内部環境の恒常性の維持である。恒常性の一つが生体内の酸化と還元バランスによって調節されるレドックスホメオステイタスで、それが酸化に偏った状態が酸化ストレスである。筆者らは、活性酸素の生成に組織のレドックス還元シフトが関与することを示唆した。過還元状態（「還元ストレス」と呼称）を活性酸素の生成亢進の背景因子とするモデルを提案する（図8）。本研究では生理的に生成する活性酸素を捉えた可能性がある。これまで「活性酸素毒性説」で論じられてきた、老化や疾患の機序を活性酸素の生理機能の視点で捉え直し、理論を再構築する必要があると考える。

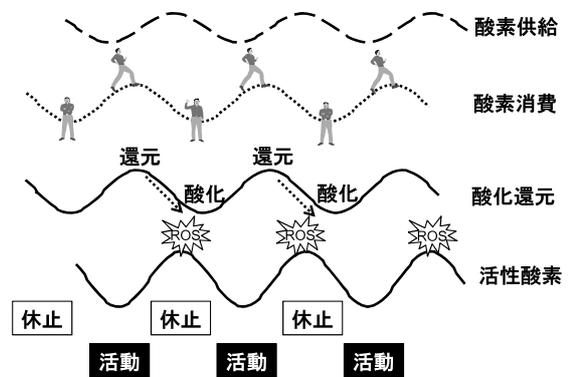


図8. 活性酸素の生成モデル

参考文献

1. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol* 11:298-300, 1956.
2. Watanabe T, Tanaka M, Watanabe K, et al. Research and development of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotectant. *Yakugaku Zasshi* 124:99-111, 2004.
3. Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C246-56, 2004.
4. Owusu-Ansah E, Banerjee U. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461:537-541, 2009.
5. Matsumura K, Bergstrom M, Onoe H, et al. In vitro positron emission tomography (PET): use of positron emission tracers in functional imaging in living brain slices. *Neurosci Res* 22:219-229, 1995.
6. Sasaki T, Iwamoto A, Tsuboi H, et al. Development of real-time bioradiographic system for

- functional and metabolic imaging in living brain tissue. *Brain Res* 1077:161-169, 2006.
7. 佐々木徹, 岩本明憲, 坪井寿ほか, リアルタイムバイオラジオグラフィ法, *Radioisotopes* 55:585-598, 2006.
 8. Sasaki T, Unno K, Tahara S, et al. Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds. *Aging Cell* 7:459-469, 2008
 9. Murata T, Matsumura K, Onoe H, et al. Receptor imaging technique with ^{11}C -labeled receptor ligands in living brain slices: its application to time-resolved imaging and saturation analysis of benzodiazepine receptor using [^{11}C]Ro15-1788. *Neurosci Res* 25:145-154, 1996.
 10. Sasaki T, Senda M, Ohno T, et al. Effect of in vitro ischemic or hypoxic treatment on mitochondrial electron transfer activity in rat brain slices assessed by gas-tissue autoradiography using. *Brain Res* 28: 25-31, 2001.
 11. Sasaki T, Kawamura K, Tanaka Y, et al. Assessment of choline uptake for the synthesis and release of acetylcholine in brain slices by a dynamic autoradiographic technique using [^{11}C]choline. *Brain Res Brain Res Protoc*10:1-11, 2002.
 12. Sasaki, T, Ishiwata K, Murata T, et al. Demonstration of competition between endogenous dopamine and [^{11}C]raclopride binding in in vitro brain slices using a dynamic autoradiography technique. *Synapse* 44: 42-50, 2002.
 13. Sasaki T, Funaki Y, Shozushima M, et al. Effect of anoxia on choline uptake and release of acetylcholine in brain slices estimated with a bioradiographic technique using [^{11}C]choline. *Radioisotopes* 52: 677-685, 2003.
 14. Sasaki T, Yamaguchi M and Kojima S. Demonstration of hyperaccumulation of [^{18}F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose under oxygen deprivation in living brain slices using bioradiography. *Synapse*55:252-261, 2005.
 15. Sasaki T, Nariai T, Maehara T, et al. A comparative study of bioradiography in human brain slices and preoperative PET imaging. *Brain Res* 1142:19-27, 2007.
 16. Sasaki T, Sato K, Umeda I, et al. Effects of aging and every-other-day feeding on the levels of oxygen radicals in rat brain slices. *Neuroscience Lett* 469:84-87, 2010.
 17. Adelman R, Saul RL and Ames BN. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2706-2708, 1988.
 18. Gil P, Farinas F, Casado A, et al. Malondialdehyde: A possible marker of aging. *Gerontology* 48: 209-214, 2002.
 19. Kaneko T, Tahara S and Matsuo M. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutat Res* 316:277-285, 1996.
 20. Leon TI, Lim BO, Yu BP, et al. Effect of dietary restriction on age-related increase of liver susceptibility to peroxidation in rats. *Lipids* 36:589-593, 2001.
 21. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928:22-38, 2001.
 22. 佐々木徹, 自然老化動物を用いた酸化ストレスの解析と抗老化研究, *YAKUGAKU ZASSHI* 130: 29-42, 2010.
 23. Sasaki T, Unno K, Tahara S, et al. Age-related increase of reactive oxygen generation in the brains of mammals and birds: Is reactive oxygen a signaling molecule to determine the aging process and life span? *Geriatr. Gerontol. Int* 10:S10-24, 2010.
 24. Kondo Y, Sasaki T, Sato Y, et al. Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*377:291-296, 2008.
 25. Sasaki T, Shimizu T, Koyama T, et al. Superoxide dismutase deficiency enhances superoxide levels in brain tissues during oxygenation and hypoxia-reoxygenation. *J Neurosci Res* 89:601-10, 2011.
 26. Sato Y, Kajiyama S, Amano A, et al. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 375:346-350, 2008.
 27. Li C and Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C227-241, 2002.
 28. Dhar-Mascareño M, Cárcamo JM and Golde DW. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radic Biol Med* 38: 1311-1322, 2005.
 29. Margaill I, Plotkine M and Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* 39:429-443, 2005.
 30. Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, et al. The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res* 57:599-

- 609, 1985.
31. Taylor MD, Mellert TK, Parmentier JL, et al. Pharmacological protection of reoxygenation damage to in vitro brain slice tissue. *Brain Res* 347: 268-273, 1985.
 32. Inauen W, Payne DK, Kviety PR, et al. Hypoxia/reoxygenation increases the permeability of endothelial cell monolayers: role of oxygen radicals. *Free Radic Biol Med* 9:219-223, 1990.
 33. Phillis JW, Sen S and Cao X. Amflutizole, a xanthine oxidase inhibitor, inhibits free radical generation in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 169:188-190, 1994.
 34. Asimakis GK, Lick S and Patterson C. Post-ischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2 (+/-) but not SOD1 (+/-) mouse hearts. *Circulation* 105:981-986, 2002.
 35. Kim G.W, Kondo T, Noshita N, et al. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke* 33: 809-815, 2002.
 36. Sims NR and Anderson MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke, *Neurochem. Int* 40:511-526, 2002.
 37. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221:1256-1264, 1983.
 38. Rice-Evans C and Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 32:71-110, 1993.
 39. Herrero A and Barja G. 8-oxo-deoxyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging. *Aging (Milano)* 11:294-300, 1999.
 40. Sun J and Trumpower BL. Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. *Arch Biochem Biophys* 419:198-206, 2003.
 41. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, et al. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278:36027-36031, 2003.
 42. Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, et al. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279:4127-4135, 2004.
 43. Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 7:1140-1149, 2005.
 44. Turrens JF and Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191:421-427, 1980.
 45. Barja G and Herrero A. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bioenerg Biomembr* 30:235-243, 1998.
 46. Tolmasoff JM, Ono T and Cutler RG. Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:2777-2781, 1980.
 47. Holloszy JO and Smith EK. Longevity of cold-exposed rats: a reevaluation of the "rate-of-living theory". *J Appl Physiol* 61:1656-1660, 1986.
 48. Speakman JR. Body size, energy metabolism and lifespan. *J Exp Biol.* 208:1717-1730, 2005.
 49. Sas K, Robotka H, Toldi J, et al. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 257:221-239, 2007.
 50. Cohadon F, Rigoulet M, Avéret N, et al. Membrane damage in acute brain trauma. *Ital J Neurol Sci* 10:147-155, 1989.
 51. Sohal RS and Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273:59-63, 1996.
 52. Sohal RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med* 33:37-44, 2002.
 53. Jackson MJ, Edwards RH and Symons MC. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 847:185-190, 1985.
 54. Ohkuwa T, Sato Y and Naoi M. Glutathione status and reactive oxygen generation in tissues of young and old exercised rats. *Acta Physiol Scand* 159:237-244, 1997.
 55. Vaanholt LM, Daan S, Garland T Jr, et al. Exercising for life? Energy metabolism, body composition, and longevity in mice exercising at different intensities. *Physiol Biochem Zool* 83:239-251, 2010.
 56. Barja G. Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Ann N Y Acad Sci* 854:224-238, 1998.
 57. Merry BJ. Calorie restriction and age-related oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 908:180-

- 198, 2000.
58. López-Torres M, Gredilla R, Sanz A, et al. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 32:882-889, 2002.
 59. Sohal RS, Ku HH and Agarwal S. Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species. *Biochem Biophys Res Commun* 196:7-11, 1993.
 60. Offenhauser N, Thomsen K, Caesar K et al. Activity-induced tissue oxygenation changes in rat cerebellar cortex: interplay of postsynaptic activation and blood flow. *J Physiol* 565:279-294, 2005.
 61. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335-344, 2003.
 62. Merrill DK and Guynn RW. The calculation of the cytoplasmic free [NADP⁺]/[NADPH] ratio in brain: effect of electroconvulsive seizure. *Brain Res* 221:307-318, 1981.
 63. Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Rosenthal M, et al. Antioxidants, mitochondrial hyperoxidation and electrical recovery after anoxia in hippocampal slices. *Brain Res* 754: 163-170, 1997.
 64. Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Carranza V, et al. Calcium influx from the extracellular space promotes NADH hyperoxidation and electrical dysfunction after anoxia in hippocampal slices. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:215-221, 1998.
 65. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 124:269-270, 1956.
 66. Harik SI, Lust WD, Jones SC, et al. Brain glucose metabolism in hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 79:136-140, 1995.
 67. Schurr A, West CA and Rigor BM. Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science* 240:1326-1328, 1988.
 68. Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, et al. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273:11619-11624, 1998.
 69. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1-13, 2009.
 70. Guzy RD and Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 91:807- 819, 2006.
 71. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11715- 11720, 1998.
 72. Sanjuan-Pla A, Cervera AM, Apostolova N, et al. A targeted antioxidant reveals the importance of mitochondrial reactive oxygen species in the hypoxic signaling of HIF-1 α . *FEBS Lett* 579:2669- 2674, 2005.
 73. Buxton RB, Uludağ K, Dubowitz DJ, et al. Modeling the hemodynamic response to brain activation. *Neuroimage* 23:S220-233, 2004.
 74. Miyai I, Tanabe HC, Sase I, et al. Cortical mapping of gait in humans: a near-infrared spectroscopic topography study. *Neuroimage* 14:1186-1192, 2001.
 75. Pryor WA, Houk KN, Foote CS, et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R491-511, 2006.

Increasing a generation of reactive oxygen in brain tissue at resting period
after the enhanced energy metabolism
-Physiological functions of reactive oxygen-

Toru Sasaki

Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

Abstract

Energy metabolic rate is known to correlate with the generation of reactive oxygen. To clarify the relationship between reactive oxygen generation and energy metabolic rate, we examined reactive oxygen-dependent chemiluminescent signals in ex-vivo brain slices using a novel photonic imaging method "real-time bioradiography". The results indicated that reactive oxygen generation is not correlated with metabolic rate, and that is transiently enhanced after the cancelation of hypoxia, which is induced by enhanced metabolic demand with high potassium treatment. The state of "hyper-reduction" under the hypoxia would be cause of the enhanced reactive oxygen generation. Recent reports indicate that reactive oxygen and free radical could be kinds of chemical messengers to play important roles in cell signaling, a process termed redox signaling. Here we show the physiologically generated reactive oxygen in brain tissue, which increases following the transient metabolic stimulation. We suggest that mechanism of aging and various diseases which had been elucidated by "reactive oxygen toxicity theory" has to reconstruct with "physiology of reactive oxygen" .

Keywords: reactive oxygen species, oxidative-reductive stress, energy metabolism, hypoxia, physiological function