

フェニールアラニンおよびその代謝産物の ミトコンドリア機能に与える影響 (Ⅲ)

芳野 信, 山下文雄
(久留米大学小児科)

研究目的

われわれは、フェニールケトン尿症の障害の機序を、好氣的エネルギー産成阻害の観点から検討中である。過去にフェニールアラニン(Phe)代謝産物の一部が、各種の呼吸基質存在下でのラット肝ミトコンドリアのATP準位の低下、呼吸鎖の還元を抑制をひきおこすことを報告した¹⁾。今回はそれらの機序につき検討した。

研究方法

1. ミトコンドリア分画の調整

ラット肝ミトコンドリア分画は既報¹⁾のように調整、B液に懸濁し以下の実験に用いた。

2. 呼吸基質, Phe およびその代謝産物の調整

各種呼吸基質, Phe, フェニールピルビン酸(PPA), フェニール乳酸(PLA) およびフェニール酢酸(PA)はB液に溶解し, pH7.4に調整したのち, それぞれの濃度になるよう添加した。以下, これらの濃度は反応系中での終濃度で表現した。

3. 呼吸鎖の還元状態の観察

ミトコンドリア懸濁液のみ, または実験によっては2.2 mMのPheなど, およびロテノン(呼吸基質がコハク酸の場合)を添加後, 30°C, 10分プレインキュベートし, 1.7 mM ADP, 呼吸基質13.3 mM(イソクエン酸の場合はL-一体として6.7 mM)を添加, 終容量1.5 mlとし, 既報¹⁾の手順で呼吸鎖成分の還元状態を経時的に記録した。

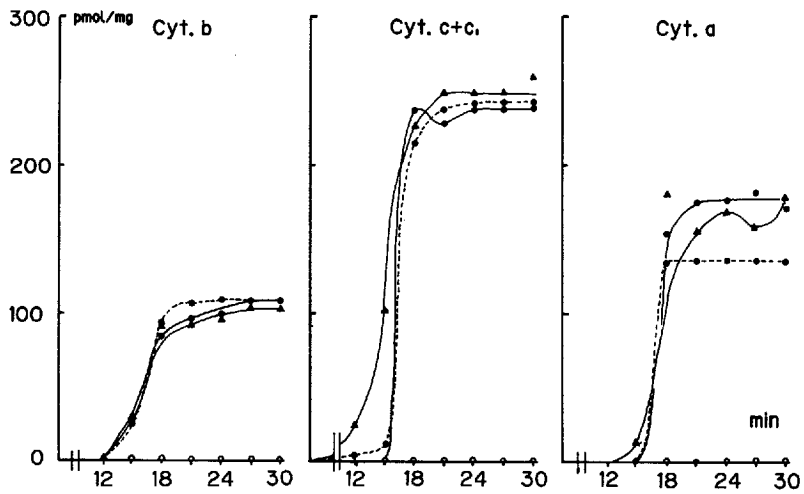
4. 破碎ミトコンドリアによるNADHの還元およびNADH-CoQ還元酵素活性

ミトコンドリア懸濁液をタンパク濃度2.0 mg/dlとなるようB液で希釈し, その一定容量を15秒3回超音波処理をおこなったものを以下の実験に用いた。NADH-CoQ還元酵素活性はRouslin, Millardの方法²⁾に準じ測定した。破碎ミトコンドリアにB液, 実験によってはさらに1.6 mMのPheなど, およびロテノンを加え, 30°C, 5分プレインキュベートしたのち, あらかじめ30°Cに保温した80 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.3 mM NADH, 0.125 mM CoQ₁₀, 5 mM KCNの混合液に添加し, NADH酸化の総活性を測定した。さらにロテノン添加時の残存活性を総活性より差し引いた値をNADH-CoQ還元酵素活性とした。

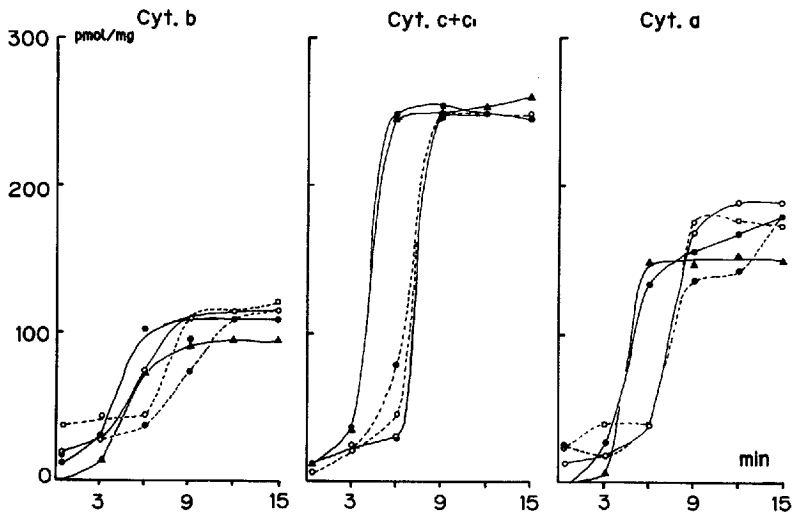
研究結果

1. 呼吸鎖の還元に与えるPheなどの効果

コハク酸(+ロテノン)を呼吸基質とした場合, 各チトクロームの還元は, 反応開始3分後にはほぼそれぞれの最大値に達し, Pheなどの添加により有意の影響をうけなかった。いっぽう,



(A) 呼吸基質：ピルビン酸



(B) 呼吸基質：D, L-イソクエン酸

▲—▲：対照, ●—●：Phe, ○—○：PPA, ●—●：PLA, ○—○：PA

図1. ピルビン酸 (A), D, L-イソクエン酸 (B) の存在下における呼吸鎖の還元を与えるPheなどの効果

ピルビン酸が呼吸基質の場合は、各チトクロームの還元は反応開始21分後に最大値に達した。そしてこれらの還元はPPAまたはPAの添加により完全に阻害された(図1, A)。D,L-イソクエン酸を基質とした場合は、PPA, PLA, PAの添加により、各チトクロームの還元は対照より遅延したが、最終的には対照とほぼ同程度に達した(図1, B)。

2. NADH酸化の総活性とNADH-CoQ

破碎ミトコンドリアではPheなどはNADH酸化の総活性、NADH-CoQ還元酵素活性のいずれも抑制せず、PPA添加により両活性ともむしろ著明に亢進した(表1)。

表1 NADH酸化の総活性およびNADH-CoQ還元酵素活性に与えるPheなどの効果

添加物質	総活性	NADH-CoQ還元活性
対照	2.82 ± 0.47	0.52 ± 0.21
Phe	3.46 ± 0.31	0.66 ± 0.25
PPA	29.24 ± 10.40	9.05 ± 3.02
PLA	3.44 ± 0.76	1.30 ± 0.84
PA	2.87 ± 0.69	0.47 ± 0.25

nmol/min-mg protein

考 察

PPA, PAはコハク酸による呼吸鎖の還元は阻害しなかったが、NADを水素受容体とする反応の基質であるピルビン酸、イソクエン酸を基質とした場合には阻害がみられた。これは既報¹⁾のATP準位に対するPPA, PAなどの挙動と一致する。また、PPA, PAは呼吸鎖のうち、NADH-CoQ還元酵素活性は阻害しないこと(表1)からPPA, PAは、ピルビン酸、イソクエン酸などのミトコンドリア内への転送または脱水素反応のいずれかまたはその両者を阻害すると考えられる。とくにPPAは、ピルビン酸のラット脳ミトコンドリア内への転送を阻害することが知られているので、ラット肝ミトコンドリアでも同様の現象がおこることは予測される。

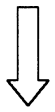
PPAによるNADHの酸化亢進(表1)は、PPAがミトコンドリア標品に含まれる芳香族 α -ケト酸還元酵素の基質となるためであろう。

文 献

- 1) 芳野 信, 山下文雄: フェニールアラニンおよびその代謝産物のミトコンドリア機能に与える影響. 厚生省心身障害研究マスキリーニングに関する研究. 昭和59年度報告書, pp 61 - 64, 1984.
- 2) Rouslin, W. and Millard, R.W.: Mitochondrial inner membrane enzyme defects in porcine myocardial ischemia. *Am. J. Physiol.*, 240:H 308, 1981.
- 3) Clark, J. B. and Land, J.M.: Phenylketonuria and maple syrup urine disease and their association with brain mitochondrial substrate utilization, In, F. A. Hommes and C. J. Van den Berg eds., "Normal and pathological development of energy metabolism", pp 177-191, Academic Press, New York, 1975.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



研究目的

われわれは、フェニールケトン尿症の障害の機序を、好氣的エネルギー産成障害の観点から検討中である。過去にフェニールアラニン(Phe)代謝産物の一部が、各種の呼吸基質存在下でのラット肝ミトコンドリアの ATP 準位の低下、呼吸鎖の還元抑制をひきおこすことを報告した。今回はそれらの機序につき検討した。