

B-5 培養ヒト線維芽細胞およびラット肝ミトコンドリア におけるピルビン酸酸化におよぼす 中・短鎖脂肪酸の影響

分担研究者 山下文雄 久留米大学 小児科
共同研究者 古賀靖敏 久留米大学 小児科

1. 中・短鎖脂肪酸が、正常ヒトおよび有機酸血症児由来の培養線維芽細胞、またはラット肝ミトコンドリアにおける、ピルビン酸の酸化に与える影響について検討した。さらに、その影響に対して、グリシン、カルニチン、essentially fatty acid free-albumin がおよぼす効果について検討を加えた。

2. 正常ヒト線維芽細胞による U- ^{14}C ピルビン酸からの $^{14}\text{CO}_2$ 生成は、メチルマロン酸 (10 mM)、イソ酪酸 (1 mM) の添加で亢進したが、それ以外の中・短鎖脂肪酸の添加によりすべて対照と同等か、抑制された。

3. イソ吉草酸血症、プロピオン酸血症、メチルマロン酸血症児由来の線維芽細胞では、いずれも短鎖脂肪酸非添加時も、U- ^{14}C ピルビン酸からの $^{14}\text{CO}_2$ 生成量は正常細胞の 50~90%と低値を示した。さらに、プロピオン酸血症細胞では、プロピオン酸 (10 mM, 1 mM) の添加により、正常細胞より強い $^{14}\text{CO}_2$ 生成の阻害がみられた。グリシン、essentially fatty acid free-albumin 添加では $^{14}\text{CO}_2$ 生成は同濃度の短鎖脂肪酸添加時に比し、同等かやや促進的に働き、カルニチン添加では同等かやや抑制的に働いた。

4. ラット肝ミトコンドリアでの U- ^{14}C ピルビン酸の酸化、および ATP 生成に与える中・短鎖脂肪酸の影響より、検討した中・短鎖脂肪酸は大別して4タイプに分けられた。a) ピルビン酸からの $^{14}\text{CO}_2$ 生成は亢進させるが、ATP 産生は低下させるもの (イソ酪酸、メチルマロン酸)、b) $^{14}\text{CO}_2$ 生成は低下させるが、ATP 産生には影響を与えないもの (4-ペンテン酸の他、ほとんどの中・短鎖脂肪酸が含まれる)、c) $^{14}\text{CO}_2$ 生成、ATP 産生ともに低下させるもの (オクタン酸)、d) $^{14}\text{CO}_2$ 生成 ATP 産生ともに影響を与えないもの (酢酸)。

5. ラット肝ミトコンドリアの呼吸に対し、中・短鎖脂肪酸は高濃度となるほど呼吸調節率を低下させ、酸素消費を state 3 では減少、State 4 では増加させ、loose coupling の傾向が共通して認められたが、ロテノン添加しコハク酸を基質とした場合、ADP/O 比、ATP 産生には 10 mM のオクタン酸以外は著明な効果はみられなかった。

I. はじめに

有機酸血症の酸血症発作時や Reye 症候群では、血中にさまざまな短鎖脂肪酸が蓄積する¹⁾⁻¹¹⁾。また、これらの病態では、高乳酸血症がみられることが報告されている⁴⁾⁻¹¹⁾が、各種の短鎖脂肪酸がピルビン酸代謝および細胞内呼吸に与える影響については、系統的な研究は少ない¹²⁾⁻¹⁴⁾。われわれは、上記病態研究の一環として、各種中・短鎖脂肪酸のエネルギー代

謝に与える影響、および、グリシン、カルニチン、essentially fatty acid free-albumin の中・短鎖脂肪酸によるピルビン酸酸化の阻害に与える効果について検討した。

II. 材料と方法

1. 材料
ヒト皮膚線維芽細胞

健康成人（男子3名，女子1名）より得られた4系統，および，ビタミンB₁₂非反応型メチルマロン酸血症児1系統，プロピオン酸血症児2系統，イソ吉草酸血症児1系統を用いた。実験にはすべて4～10継代のものを使用した。

ラット

ウイスター系オスラット（体重150～250g）を用いた。

試薬

U-¹⁴C ピルビン酸ナトリウム塩（16.6 μCi/μmol）は，Amersham International Co. より購入し，使用にあたりピルビン酸カリウムを添加して，specific activity が，0.1 μCi/μmol となるように調整した。メチルマロン酸は，Aldrich Chemical Company Inc.，プロピオン酸，イソ酪酸，イソ吉草酸，酢酸，オクタン酸ナトリウムは和光純薬工業，2-ヘキセン酸，n-ヘキサン酸，クロトン酸，4-ペンテン酸，酪酸は東京化成工業の製品を用いた。バルプロ酸ナトリウム（ジプロピル酢酸ナトリウム）は協和発酵より恵与いただいた。アデノシン-2-リン酸-2-ナトリウム塩および ATP 側定キットはペーリンガー・マンハイム社，fetal bovine serum（以下“FCS”と略す）は GIBCO 社，essentially fatty acid free-albumin（以下“アルブミン”と略す）は SIGMA 社，D, L-カルニチンは東京化成工業の製品を使用した。その他の試薬は，市販の特級の製品を用いた。

2. 方法

1) 線維芽細胞の培養，収穫

パンチバイオプシーにて得た皮膚組織片¹⁵⁾を，無菌的に Puck 液中で数回洗浄後，10% FCS，カナマイシン（60 μg/ml）を含む Eagle's minimal essential medium（以下“MEM”と略す）中で継代培養した。細胞は，4～10継代したものを用いた。harvest には，0.05%トリプシン，0.05% EDTA を含む Puck 液にて剥離後，10% FCS 加 MEM 5 ml を加え，1000g 5分間遠沈し細胞を得た。さらにその細胞を，氷冷した phosphate buffered saline（以下“PBS”と略す：0.11 M NaCl を含む 0.04 M potassium phosphate buffer, pH 7.4）にて3回洗浄後，線維芽細胞を大角ビン1本当たり 5 ml の PBS 中に均一に懸濁し実験に用いた¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに，その一部は，trypan blue 染色による生存細胞数の測定，蛋白測定に用いた。

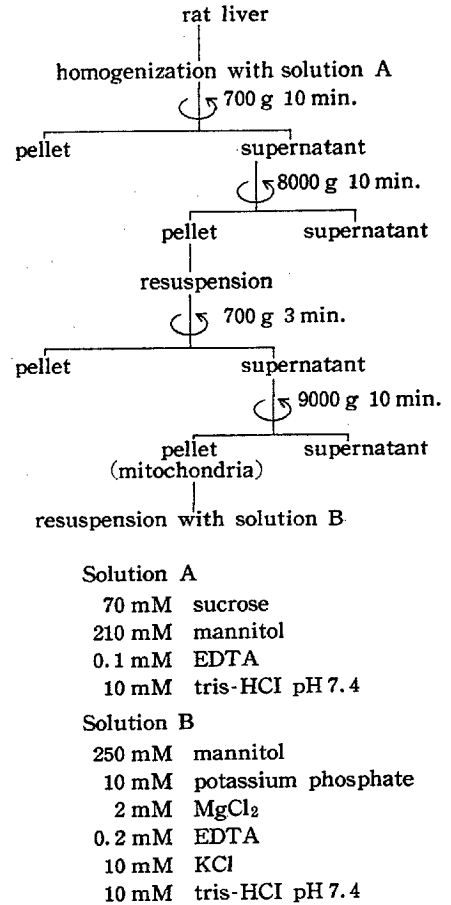


Fig. 1. Preparation of Mitochondrial Fraction (modified Schneider's method)

2) ミトコンドリアの分離

ラットを24時間絶食後，エタノール麻醉下に断頭放血し，1分以内に肝を摘出，氷冷した調整液A中で2～3回洗浄した。その後，肝門部血管や被膜：脂肪組織を取り除き，口紙にて水分を充分吸着し肝総重量を測定した。ついで，調整液A（0～4℃）中でハサミにて細切したのち，肝1g当り10mlの調整液Aを加え，ガラステフロンホモジナイザーにて1分間，3ストローク，1000rpmでホモジナイズした。ホモジネートは，1Mトリス液にてすみやかにpH7.4に合わせ，以下Schneiderの変法¹⁸⁾（Fig. 1）に従い，ミトコンドリアを分離した。得られたミトコンドリア分画を，氷冷した調整液Bに肝1g当り1mlの割合

になるよう懸濁し、各種実験ならびに蛋白定量に用いた。

3) U-¹⁴Cピルビン酸の酸化

① 線維芽細胞

シリコン処理した液体シンチレーションカウンター用ガラスバイアル (Wheaton liquid scintillation vial) を用いて、PBS (pH 7.4) に懸濁した、 $1.0 \sim 2.0 \times 10^6$ 個の線維芽細胞、U-¹⁴Cピルビン酸 0.05 mM (0.1 μ Ci/0.1 μ mol)、およびあらかじめ pH を 7.4 に調整した各種中・短鎖脂肪酸を、終濃度 0, 0.1, 1.0, 10 mM となるように添加し、総量を 2.0 ml とした。さらに、一部の試験では、10 mM の中・短鎖脂肪酸による阻害効果に与えるグリシン、D, L-カルニチン、アルブミンの効果を見る目的で、それぞれ 1.0 mM, 2.0 mM (L-カルニチンとして 1.0 mM)、1.0% W/V となるように各物質を加えた。インキュベーションは、すべて duplicate で 37.0°C, 90 分、45 回/分の振盪下に行つた。生成した ¹⁴CO₂ は、インキュベーションバイアルに留置した 1 N KOH 0.1 ml をしみ込ませた paper wick (1 × 5 cm 東洋口紙 No. 6) に吸着させた後 paper wick を 10 ml の Bray's シンチレーション溶液中にうつし、シンチレーションカウンターにて放射能を計測した¹⁶⁾¹⁷⁾。なお、グリシン、D, L-カルニチン、アルブミンはいずれも添加前に pH を 1 N KOH にて 7.4 に調整した。

② ミトコンドリア

同上のバイアルに調整液 B、ミトコンドリア懸濁液 (タンパク 0.5 ~ 1.0 mg 相当)、ADP 4.2 mM、コハク酸 10 mM、および 1) と同様に調整した、中・短鎖脂肪酸を終濃度 0, 0.1, 1.0, 10 mM となるよう添加し総量を 2.0 ml とした。また、一部の試験では、1.0, 10 mM の中・短鎖脂肪酸の ¹⁴CO₂ 生成に対する影響に与える、グリシン、D, L-カルニチン、アルブミンの効果を見る目的で、それぞれ 1.0 mM, 2.0 mM (L-カルニチンとして 1.0 mM)、1.0% W/V となるように各物質を加えた。インキュベーションは、37°C, 30 分、45 回/分の振盪下に行つた。以下生成した ¹⁴CO₂ の測定は、線維芽細胞の実験に準じた¹⁶⁾¹⁷⁾。また、本実験と同時に、実験終了後のインキュベーション溶液を用いて ATP の測定も行つた。なお、ミトコンドリアの標品は、すべて呼吸調節率 5.0 以上のものを用いた。

4) ミトコンドリアの ATP 生成量の測定

ピルビン酸の酸化測定に用いたのと同じラット肝ミトコンドリア標品につき、ATP テスト®を用いて測定した¹⁹⁾。反応終了後の水冷したインキュベーション溶液に、ただちに 0.6 N 過塩素酸 2.0 ml を加え除タンパクした後、4°C にて 3000 rpm 10 分間遠沈した。つぎに、上清 0.1 ml に溶液 I (0.5 M triethanolamine buffer pH 7.6, 4 mM MgSO₄, 6 mM glycerate-3-phosphate を含む) 1.0 ml、溶液 II (2.5 mM NADH) 0.1 ml を加え、波長 365 nm における吸光度 E₁ を測定した。ついで、酵素溶液 III (GAPDH: グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 350 U/ml \leq , PGK: ホスフォグリセレートキナーゼ 450 U/ml \leq , GDH: グリセロール-1-リン酸脱水素酵素 60 U/ml \leq , TIM: トリオースフェオレートイソメラーゼ 800 U/ml \leq) 0.01 ml を加え、混和したのち吸光度 E₂ を測定し、吸光度の減少率より ATP 濃度を求めた。

5) ミトコンドリアの呼吸

ミトコンドリアの呼吸は、Chance and Williams ら²⁰⁾の方法に従い、Clark 型電極を用いて、Yanaco model PO 100-A ポーラログラフ (柳本製作所) にて測定した。あらかじめ 30°C にて灌流したポーラログラフ用恒温容器に、調整液 B、ミトコンドリア懸濁液 (タンパク 2.0 ~ 2.5 mg 相当) を入れ、これに pH を 7.4 に調整済みの中・短鎖脂肪酸を終濃度 0, 0.1, 1.0, 10 mM となるように添加し、反応液の総容量を 3.3 ml とした。つぎにロテノン 6 μ g を添加し、呼吸が安定した後にコハク酸 50 μ mol、さらに ADP 1.0 μ mol を加え、state 3, state 4 の呼吸を記録した。コハク酸添加後 10 分間酸素消費を追跡し、反応終了後はただちに氷冷後、0.6 N 過塩素酸 2.0 ml を加え、ATP 含量の測定に供した。酸素消費の実測値より呼吸調節率 (以下 "RCR" と略す)、および ADP/O 比を算出した²¹⁾²²⁾。

6) タンパク定量

タンパク定量は、Lowry²³⁾法によつた。

III. 結果

1. 線維芽細胞によるピルビン酸の酸化

1) インキュベーション時間およびタンパク量の検討

インキュベーション時間 30 分 ~ 90 分、タンパク量 約 0.1 ~ 0.4 mg/incubation の範囲で ¹⁴CO₂ 生成量

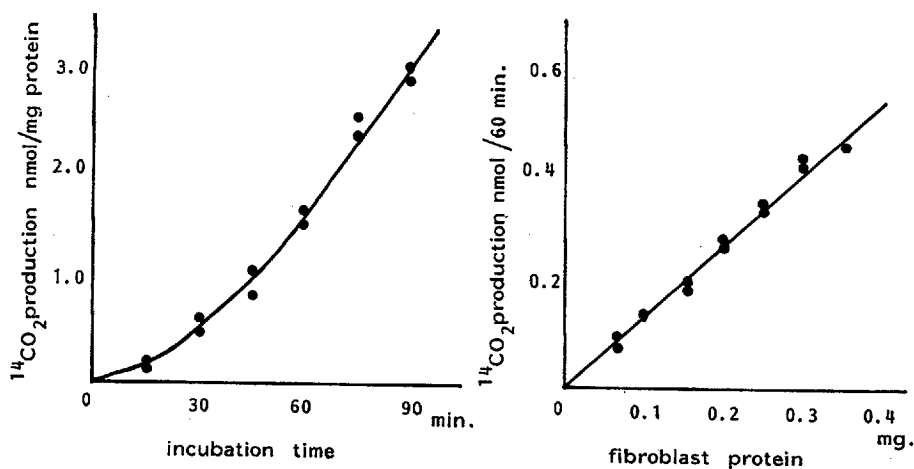


Fig. 2 $^{14}\text{CO}_2$ production from U- ^{14}C pyruvate by human fibroblasts.

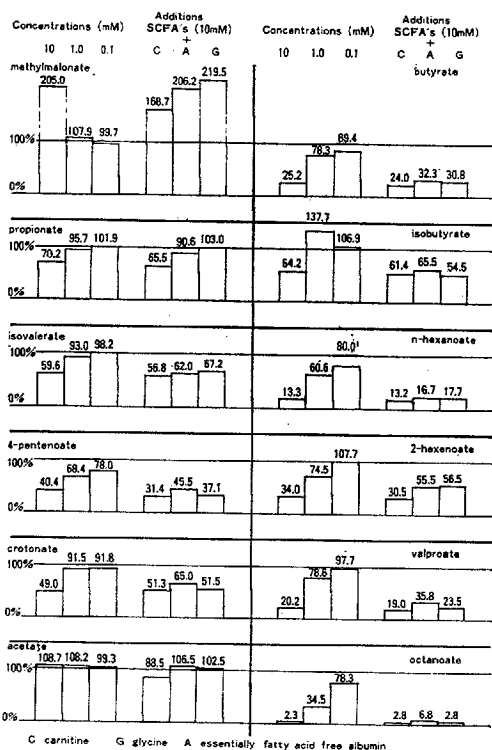


Fig. 3 Effects of medium or short chain fatty acids on $^{14}\text{CO}_2$ production from U- ^{14}C pyruvate in the presence or absence of added glycine, carnitine and albumin in cultured skin fibroblasts.

は直線的であつた (Fig. 2). したがつて、以下の実験はインキュベーション時間 90 分、タンパク量 0.2 ~ 0.3 mg/incubation で行つた。

2) 正常ヒト線維芽細胞によるピルビン酸酸化に与える中・短鎖脂肪酸の影響

培養ヒト線維芽細胞による U- ^{14}C ピルビン酸からの $^{14}\text{CO}_2$ 生成は、検討したほとんどの中・短鎖脂肪酸の添加により抑制され、その傾向は、高濃度となるほど一般に著明であつた (Fig. 3). 特にオクタン酸 (1.0, 10 mM), n-ヘキサン酸 (10 mM), パルプロ酸 (10 mM), 酪酸 (10 mM) は、中・短鎖脂肪酸非添加の対照 (以下“対照”と略す) の 30% 以下と著明な $^{14}\text{CO}_2$ 生成の抑制を示した。また、2-ヘキセン酸、4-ペンテン酸、クロトン酸、イソ吉草酸、イソ酪酸、プロピオン酸では、10 mM で 30~70% と中等度の抑制がみられた。いつぼう、メチルマロン酸は、10 mM で対照の 200% と著明な促進効果を示した。また、イソ酪酸においても、1.0 mM で 130% 前後の軽度促進がみられた。酢酸では、各濃度においてピルビン酸からの $^{14}\text{CO}_2$ 生成に影響はみられなかつた。

3) 正常ヒト線維芽細胞によるピルビン酸酸化に与えるグリシン、カルニチン、アルブミンの影響

中・短鎖脂肪酸を加えない対照の incubation にカルニチンを添加すると、 $^{14}\text{CO}_2$ 生成は 60% 前後に抑制されたが、グリシン、アルブミンはほとんど影響を与えなかつた (Table 1).

4) 中・短鎖脂肪酸のピルビン酸酸化に与える影響

に対するグリシン、カルニチン、アルブミンの効果

中・短鎖脂肪酸 (10 mM) による $^{14}\text{CO}_2$ の生成阻害に対し、グリシンの添加はプロピオン酸 (10 mM) による阻害に対して有意な回復を示した以外、特別な影響は認められなかった。また、メチルマロン酸 (10 mM) による $^{14}\text{CO}_2$ 生成亢進に対し、グリシン添加は影響を与えなかった (Fig. 3)。

カルニチンの添加は、メチルマロン酸 (10 mM) による $^{14}\text{CO}_2$ 生成亢進効果を軽度抑制したが、それ以外の検討したすべての中・短鎖脂肪酸による阻害を回復させなかった。

アルブミン添加により、プロピオン酸、クロトン酸、ヘキセン酸、バルプロ酸による生成阻害は、対照比で 15~20% 回復した。メチルマロン酸による $^{14}\text{CO}_2$ 生成の促進は、アルブミン添加により有意の影響を受けなかった。酢酸は、ほとんど $^{14}\text{CO}_2$ 生成に影響を与えず、さらにアルブミンの添加にても影響はみられなかった (Fig. 3)。

5) 有機酸血症患児線維芽細胞に対する各種中・短鎖脂肪酸の効果

a) ビタミン B₁₂ 不応型メチルマロン酸血症児の線維芽細胞における、メチルマロン酸、プロピオン酸のピルビン酸酸化への影響と、グリシン、カルニチン、アルブミンの効果

メチルマロン酸血症児の線維芽細胞による $^{14}\text{CO}_2$ 生成量 (1.66 nmol/90 min·mg·protein) は、中・短鎖脂肪酸非添加時、正常細胞 (3.07±2.10 nmol/90

min·mg·protein : N=17) に比べ、50% と低かった。メチルマロン酸 (0.1, 1.0, 10 mM) および、それに対するグリシン、カルニチン、アルブミンの効果は、正常細胞に対するのと同様のパターンを示し、メチルマロン酸 1.0 mM, 10 mM でそれぞれメチルマロン酸非添加時の患児細胞の $^{14}\text{CO}_2$ 生成の 124%, 203%, と促進された (Fig. 4)。また、プロピオン酸は 10 mM では正常細胞に対するのと同様、プロピオン酸非添加患児細胞の 80~90% とやや抑制傾向を示したが、0.1 mM, 1.0 mM では、それぞれ 113%, 133% と逆にわずかながら促進傾向を示した。グリシン、カルニチン、アルブミン添加の効果は、正常細胞とほぼ同様のパターンを示した。

b) プロピオン酸血症児の線維芽細胞 2 系統におけるメチルマロン酸、プロピオン酸のピルビン酸酸化に与える影響と、グリシン、カルニチン、アルブミンの効果

プロピオン酸血症児の線維芽細胞による $^{14}\text{CO}_2$ 生成量 (2.43±2.99 nmol/90 min·mg·protein : N=4) は、中・短鎖脂肪酸非添加時の正常細胞の 75% であつた (Table 1)。メチルマロン酸の添加では、正常細胞同様、高濃度となるほど $^{14}\text{CO}_2$ 生成は促進され、低濃度になるにしたがいがその促進効果は少なくなり、同様のパターンを示した (Fig. 4)。いつぼう、プロピオン酸添加では、正常細胞に比較して患児細胞では、10 mM の濃度で抑制効果が強く現われ (50%, 正常細胞 70%), 1.0 mM においても抑制傾向がみら

Table 1 Effects of additions of glycine, carnitine and albumin on $^{14}\text{CO}_2$ production in the absence of medium or short chain fatty acids from U- ^{14}C pyruvate in cultured fibroblasts derived from normal individuals and patients with propionic, methylmalonic and isovaleric acidemias.

fibroblasts	$^{14}\text{CO}_2$ production, n mol/90 min·mg protein (mean±SD)			
	no addition	glycine	carnitine	albumin
control	3.07±2.10 (17)	3.45±0.79 (8)	1.66±1.85 (8)	3.67±4.20 (6)
methylmalonic acidemia	1.66 (2)	1.91 (2)	0.97 (2)	2.04 (2)
propionic acidemia	2.43±2.99 (4)	2.12±3.51 (4)	1.84±4.80 (4)	3.73±4.24 (4)
isovaleric acidemia	2.70 (2)	2.91 (2)	1.71 (2)	2.58 (2)

(): numbers of assays

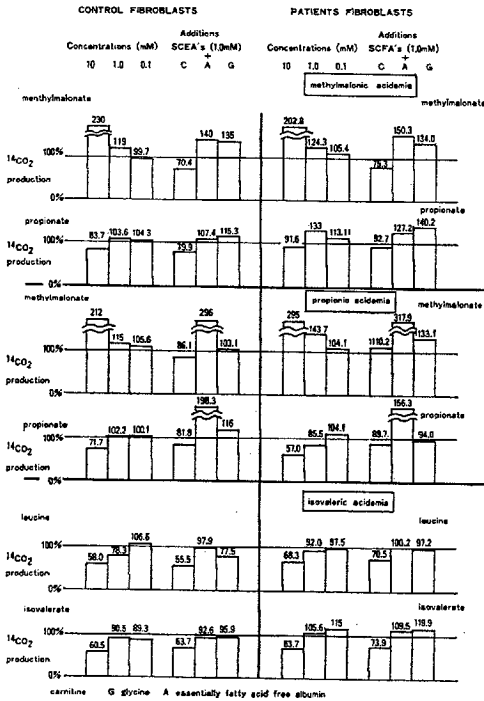


Fig. 4 Effects of medium or short chain fatty acids on $^{14}\text{CO}_2$ production from U- ^{14}C pyruvate in the presence or absence of added glycine, carnitine and albumin in cultured skin fibroblasts derived from normal individuals and patients with propionic, methylmalonic and isovaleric acidemias.

れた (85.5%, 正常細胞 102%) が, 0.1 mM においてはその影響はほぼ正常細胞と同様のパターンを示した。アルブミン添加では, 156% と促進効果がみられたが, 正常細胞でも 198% と同様の促進がみられた。グリシン, カルニチン添加では, 著明な効果は認めなかつた (Fig. 4)。

c) イソ吉草酸血症児の線維芽細胞における, ロイシン, イソ吉草酸の影響と, グリシン, カルニチン, アルブミンの効果

患児細胞では, 中・短鎖脂肪酸非添加時でも, その $^{14}\text{CO}_2$ 生成量 (2.70 nmol/90 min·mg·protein) は正常細胞のその 88% であつた (Table 1)。イソ吉草酸血症児細胞では, ロイシン, イソ吉草酸 (いずれも

0.1, 1.0, 10 mM) とともに正常線維芽細胞とほとんど同様の影響を示した (Fig. 4)。ロイシン添加では, 0.1, 1.0, 10 mM の各濃度で 97.5%, 92%, 68.3% と 10 mM でのみ $^{14}\text{CO}_2$ 生成の低下をみたが, 正常細胞でも 1.0, 10 mM でそれぞれ 78.3%, 58.0% と抑制がみられた。また, イソ吉草酸添加でも, 10 mM の濃度においてのみ, 63.7% (正常細胞 60.5%) と抑制をみたが, 1.0, 0.1 mM の濃度ではその抑制効果はみられず, 各濃度ともに正常細胞と同様のパターンを示した。いつぼう, カルニチンの添加により, イソ吉草酸またはロイシン添加の有無にかかわらず, 対照に比較して 70% と軽度抑制がみられた。グリシン, アルブミンの添加では, 著明な効果は得られなかつた (Fig. 4)。

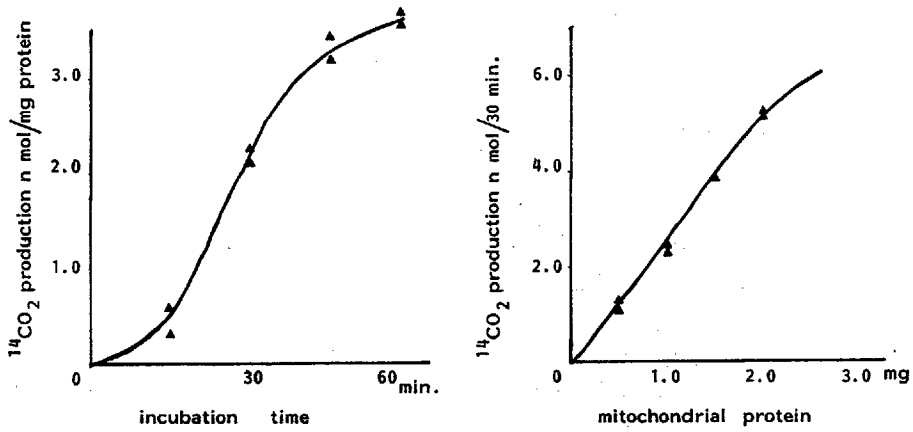
2. ミトコンドリアによるピルビン酸の酸化

1) インキュベーション時間およびタンパク量の検討

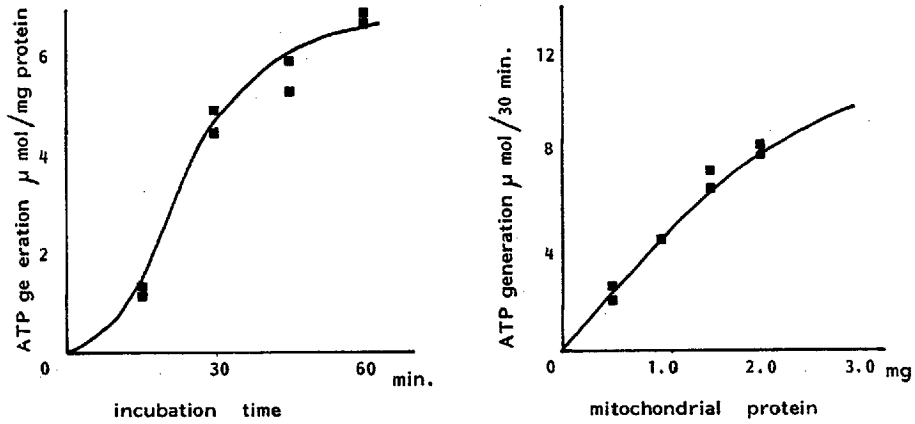
インキュベーション時間 15~40 分, ミトコンドリアのタンパク量 0.3~1.5 mg/incubation の範囲で直線関係が得られた (Fig. 5)。したがつて, 以下の実験は, インキュベーション時間 30 分, タンパク量 0.45~1.0 mg/incubation の範囲で行つた。この条件下では, $^{14}\text{CO}_2$ 生成量は 2.53 ± 3.94 nmol/30 min·mg·protein $N=10$ であつた。

2) ミトコンドリアによるピルビン酸酸化に対する中・短鎖脂肪酸の影響

中・短鎖脂肪酸非添加時の $^{14}\text{CO}_2$ 生成を対照としたメチルマロン酸の添加では, 10 mM で対照の 170% と著明に亢進しており, いつぼう 1.0 mM では逆に 52.8% と抑制, 0.1 mM では 77.0% という値を示した (Figs. 6~9)。プロピオン酸, イソ吉草酸, 酪酸では, 10 mM で対照と同等かやや抑制傾向を示し, 低濃度になるほどその抑制効果は著明となつた。4-ペンテン酸では, 抑制効果はいつそう著明であり, 各濃度とも 20~26% であつた。2-ヘキセン酸, n-ヘキサン酸, バルプロ酸でも各濃度ともその抑制効果は 50~60% と 4-ペンテン酸と同様のパターンを示した。クロトン酸では, 10 mM にて抑制効果が強く, 1.0, 0.1 mM ではその抑制効果は弱くなつた。いつぼう, イソ酪酸では 10 mM, 1.0 mM に関しては著明な亢進 (296%, 216%) を示し, 0.1 mM に関しては対照に比較し, 軽度の抑制効果を示した。また, オクタン酸では, 10 mM で 56.2%, 1.0 mM では



1) $^{14}\text{CO}_2$ production from U- ^{14}C pyruvate in rat liver mitochondria.



2) ATP generation in rat liver mitochondria.

Fig. 5 $^{14}\text{CO}_2$ production from U- ^{14}C pyruvate and ATP generation in rat liver mitochondria.

19.2%と著明な抑制を示し、0.1 mM でも 26.5%と著明な抑制がみられた。酢酸では、各濃度ともに $^{14}\text{CO}_2$ 生成に著明な影響はみられなかった。

3) ミトコンドリアでの 0, 0.1, 1.0, 10 mM の中・短鎖脂肪酸添加によるピルビン酸酸化実験後の ATP 生成量

インキュベーション時間 15~45 分、ミトコンドリアのタンパク量 0.2~1.0 mg/incubation の範囲で直線関係が得られた (Fig. 5)。したがって、以下の実験は、ピルビン酸酸化実験の条件に準じて行った。

中・短鎖脂肪酸非添加時のピルビン酸酸化実験に用いたと同一のミトコンドリア標品による ATP 生成量は、 $4.53 \pm 1.44 \mu\text{mol}/30 \text{ min} \cdot \text{mg} \cdot \text{protein}$ (N=9) であつた。メチルマロン酸では、10 mM のみ ATP 生成抑制 (対照比 59%) を示したが、他の濃度では有意の影響を与えなかつた (Figs. 6~9)。酪酸、イソ酪酸では、各濃度とも 60~70% の中等度抑制を示した。オクタン酸では、10 mM で 40.4% と ATP 生成抑制が強く、1.0 mM では 75.6% と軽度抑制、0.1 mM では抑制はみられなかつた。また、他のプ

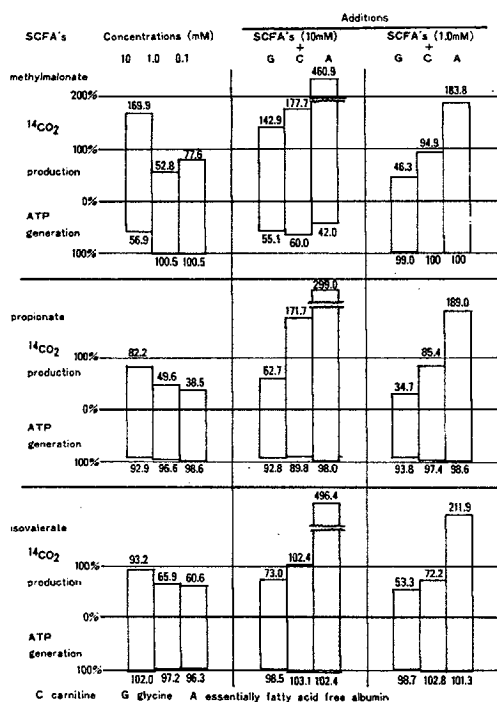


Fig. 6 Effect of medium or short chain fatty acids on $^{14}\text{CO}_2$ production and ATP generation in the presence or absence of added glycine, carnitine and albumin in rat liver mitochondria.

ロピオン酸, イソ吉草酸, パルプロ酸, ヘキサン酸, ヘキセン酸, クロトン酸, 4-ペンテン酸, 酢酸では ATP 生成はほとんど対照と同等の値を示した。

4) 中・短鎖脂肪酸非添加対照におけるグリシン, カルニチン, アルブミンの効果

$^{14}\text{CO}_2$ 生成は, グリシン添加では対照と同等 85 ~ 108%, カルニチン添加では 106 ~ 133%と軽度促進, アルブミン添加では, 202 ~ 530%と高度促進効果を示した。いつぼう, いずれの添加も ATP 生成には影響をおよぼさなかつた (Table 2)。

5) 中・短鎖脂肪酸, 1.0, 10 mM の各濃度におけるグリシン, カルニチン, アルブミンの効果

グリシンの添加は, 10 mM のプロピオン酸, イソ吉草酸, 酪酸, ヘキサン酸, ヘキセン酸, オクタン酸の共存時に, さらに抑制効果を示し, 1.0 mM の酪

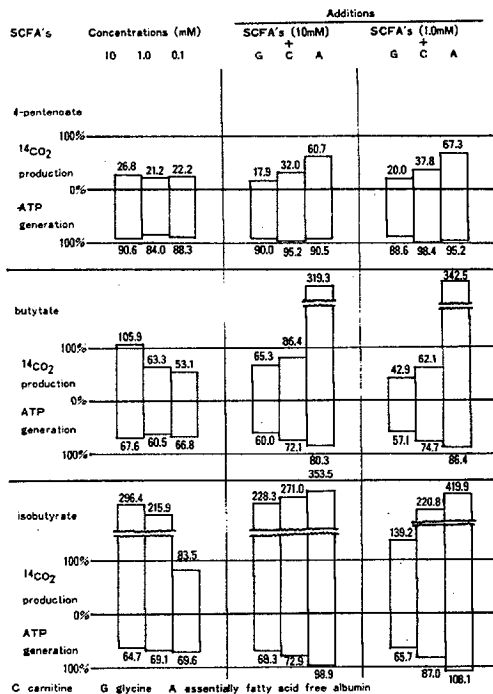


Fig. 7 Effects of medium or short chain fatty acids on $^{14}\text{CO}_2$ production and ATP generation in the presence or absence of added glycine, carnitine and albumin in rat liver mitochondria.

酸, イソ酪酸, ヘキサン酸においても同様の軽度抑制効果を示した (Figs. 6 ~ 9)。いつぼう ATP 生成には影響を与えなかつた。

カルニチン添加では, 1.0 mM のメチルマロン酸の存在時, $^{14}\text{CO}_2$ 生成は 52.8%から 94.7%と改善した。また, 10 mM のプロピオン酸では, 82.2%が, 172%へと亢進, 1.0 mM では, 49.6%が 85.4%へと改善をみた。10 mM のヘキサン酸, ヘキセン酸では逆に抑制傾向を示した。ATP 生成に関しては, 10 mM のイソ酪酸で軽度の改善効果 (64.7%から 72.9%へ), 1.0 mM では, 69.1%が 87.0%へと著明な改善効果をみた。また, 1.0 mM の酪酸添加時でも ATP 生成は 60.5%が 74.7%へと改善を示した。

アルブミン添加では, 4-ペンテン酸, オクタン酸以外は, $^{14}\text{CO}_2$ 生成は高度亢進又は中等度亢進しており, いつぼうオクタン酸では, $^{14}\text{CO}_2$ 生成 ATP 生

Table 2 Effects of additions of glycine, carnitine and albumin on $^{14}\text{CO}_2$ production and ATP generation in the absence of medium or short chain fatty acids in rat liver mitochondria.

(mean \pm SD)

	no addition	glycine	carnitine	albumin
$^{14}\text{CO}_2$ production (10) n mol/30 min-mg protein	2.53 \pm 3.94	2.51 \pm 4.19	3.05 \pm 4.20	8.10 \pm 4.27
ATP generation (9) μ mol/30 min-mg Protein	4.54 \pm 1.44	4.48 \pm 1.44	4.72 \pm 1.43	4.68 \pm 1.39

() : numbers of assays

Table 3 Effects of short chain fatty acids on the oxygen consumption rates in states 3 and 4, respiratory control ratio (RCR), ADP/O ratio and ATP of rat liver mitochondria.*

SCFA's concentration (mM)	state 3*			state 4*			RCR*			ADP/O*#			ATP*		
	0.1	1.0	10	0.1	1.0	10	0.1	1.0	10	0.1	1.0	10	0.1	1.0	10
Methylmalonate	99.5	92.1	84.7	98.7	98.7	118.4	100.7	93.2	71.4	102.1	89.7	90.3	105.2	96.9	87.7
Propionate	101.6	90.5	93.7	115.1	105.3	125.0	88.1	85.4	75.2	101.0	110.2	88.7	94.3	88.7	87.5
Isovalerate	95.2	91.4	92.1	180.9	146.4	123.4	52.7	62.1	74.6	103.6	97.4	102.1	95.7	86.3	79.2
4-Pentenoate	88.9	90.8	81.0	130.0	120.1	136.5	68.7	75.8	59.0	101.0	96.9	97.4	98.1	99.3	88.7
Valproate	88.9	66.7	76.2	177.6	115.1	65.8	50.1	57.9	60.9	106.2	105.1	96.9	99.3	94.6	101.7
Octanoate	66.7	66.7	57.1	111.8	120.1	296.1	59.6	55.2	19.3	93.8	88.7	**	102.8	102.8	39.0
Butyrate	88.9	68.3	57.1	111.0	123.3	103.6	80.0	55.4	55.2	92.8	108.2	92.3	99.3	100.4	94.6
Isobutyrate	71.4	92.1	79.4	156.3	115.0	115.0	45.7	79.8	68.2	106.7	95.4	87.7	98.1	95.7	94.6
n-Hexanoate	100.0	91.3	82.6	103.4	92.0	92.0	94.5	97.0	87.8	97.6	92.8	96.2	102.2	92.3	92.3
2-Hexenoate	97.8	82.6	76.1	103.4	109.2	103.4	92.3	73.8	71.6	95.2	87.1	90.0	95.6	98.9	97.8
Crotonate	100.0	108.7	76.1	97.7	92.0	80.5	100.0	115.5	92.3	105.3	94.8	99.5	91.2	92.3	96.7
Acetate	108.7	121.7	108.7	80.5	103.4	103.4	131.7	114.8	102.6	95.2	95.7	104.3	95.6	94.5	87.9

* % of control (which received no short chain fatty acids)

** not calculated because of a marked increase in oxygen consumption at state 4 respiration

the values of ADP/O for control : 1.94 \pm 0.04 (M \pm SD, N = 18)

成ともに何の効果もみられなかった。4-ペンテン酸では、 $^{14}\text{CO}_2$ 生成の軽度改善がみられた。ATP の生成に関しては、酪酸、イソ酪酸において、対照と同等まで改善がみられたが、メチルマロン酸では、ATP 合成に何ら効果はみられなかった。

3. ミトコンドリアの呼吸に対する中・短鎖脂肪酸の影響

10 mM の中・短鎖脂肪酸を添加すると、酢酸、ヘキセン酸を除くすべての脂肪酸で RCR の 20% 以上

の低下が認められた (Table 3)。特にオクタン酸では、その抑制効果が著明 (対照比 19.3%) であり、4-ペンテン酸、酪酸、イソ酪酸、バルプロ酸も RCR の低下をもたらした。クロトン酸、ヘキセン酸、酢酸以外の中・短鎖脂肪酸では、state 4 における酸素消費を亢進させ、特にオクタン酸 (10 mM) では state 4 の酸素消費は対照の 296% と著明であった。さらに 10 mM のオクタン酸、バルプロ酸、酪酸、イソ酪酸、ヘキセン酸、クロトン酸では、対照の 20% 以上

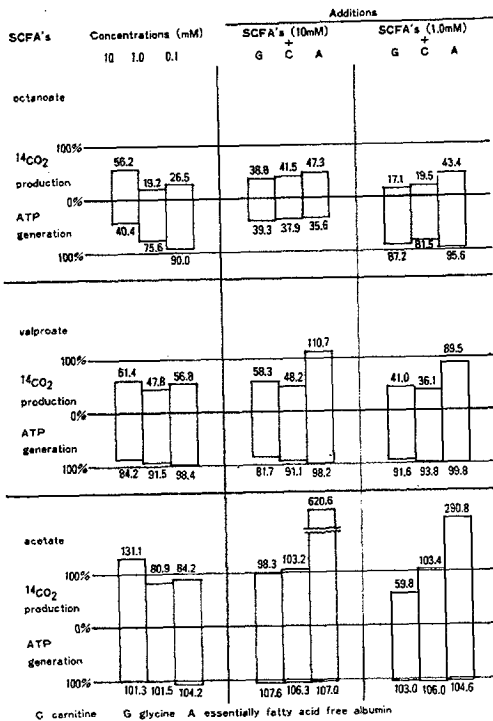


Fig. 8 Effects of medium or short chain fatty acids on ¹⁴CO₂ production and ATP generation in the presence or absence of added glycine, carnitine and albumin in rat liver mitochondria.

の state 3 での酸素消費の低下もみられた。10 mM のオクタン酸は、state 4 での酸素消費を溶存酸素が完全消費されるまで進行させた。また、同じインキュベーション溶液の ATP 含量を測定したところ、10 mM のオクタン酸添加時のみ著明な ATP 量の減少 (対照の 39%) を示した。また、10 mM では、イソ吉草酸、酪酸、オクタン酸、パルプロ酸で RCR は 60% 以下と低下をみ、4-ペンテン酸、イソ酪酸でも 70% と軽度抑制を示した。さらに 0.1 mM のイソ吉草酸、4-ペンテン酸、イソ酪酸、オクタン酸、パルプロ酸でも軽度の低下をみた。他は、ADP/O 比、ATP 生成には有意の影響はみられなかった。

IV. 考 察

Reye 症候群の急性期には、血中のプロピオン酸、酪酸、イソ酪酸などが異常高値を示すことが報告され

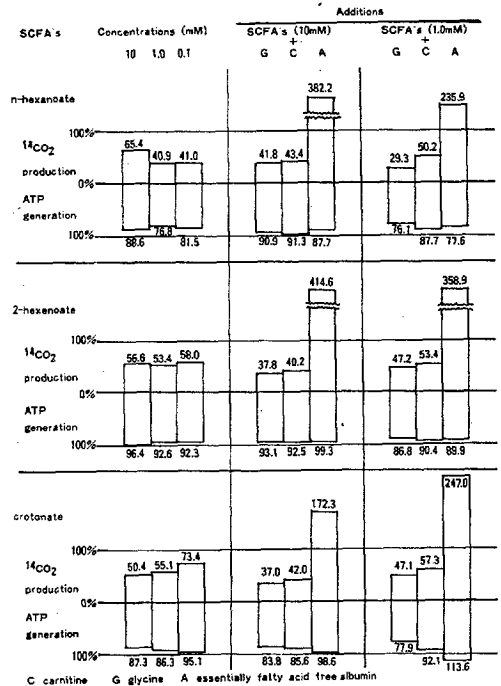


Fig. 9 Effects of medium or short chain fatty acids on ¹⁴CO₂ production and ATP generation in the presence or absence of added glycine, carnitine and albumin in rat liver mitochondria.

ている¹⁾²⁾。また、有機酸血症でもそれぞれの酵素欠損に対応して、プロピオン酸、メチルマロン酸、イソ吉草酸などの短鎖脂肪酸およびその代謝産物の蓄積がおこる⁵⁾⁶⁾。両者の急性発作時の症状、病態に共通点があることより、これらの異常蓄積した短鎖脂肪酸が病態の発現に一部関与している可能性が指摘¹⁾¹¹⁾²⁴⁾されている。いつばう、有機酸血症発作時や Reye 症候群では、高乳酸血症がみられることが報告されており⁴⁾¹¹⁾、これらの病態ではピルビン酸代謝の二次的な障害、ひいては、ATP 生成の障害がおこることが推測される。そこでわれわれは、これらの病態におけるピルビン酸の代謝、および、ミトコンドリアにおける ATP 生成に与える各種中・短鎖脂肪酸の影響につき検討した。また、近年抗けいれん剤として広く用いられているパルプロ酸の投与中に、Reye 症候群様の病変をおこした例が報告されている²⁵⁾。今回、パルプロ

酸についても合わせて検討を行った。

1. ピルビン酸代謝における調節因子

ピルビン酸の酸化に影響する調節因子として、1) ピルビン酸の細胞膜、ミトコンドリア膜を介しての転送²⁶⁾²⁷⁾、2) AcetylCoA/CoA 比、3) NADH/NAD 比²⁸⁾、4) ATP/ADP 比²⁹⁾、5) ピルビン酸、オキサロ酢酸²⁹⁾、クエン酸³⁰⁾、アシルカルニチン、 α -ケトグルタル酸、コハク酸³¹⁾、などの基質濃度によりピルビン酸の酸化は調節を受けることが知られている。そして、2)、3)、4) の分子比の増大がピルビン酸の酸化的脱炭酸に対して抑制的に作用することが知られている。

生理的な血中濃度 (0.05 mM) 程度でのピルビン酸の酸化は、脂肪酸の添加により促進される³²⁾。これは、脂肪酸の β 酸化によつてミトコンドリア内で蓄積したアセト酢酸が、ミトコンドリア外のピルビン酸と monocarboxylate translocator を介して、ミトコンドリア内へ急速に流入すること³²⁾、また、低濃度のピルビン酸が pyruvate dehydrogenase kinase を活性化し、pyruvate dehydrogenase を抑制状態に保つ結果とも考えられている。さらに ketogenic な状態下では、脂肪酸の β 酸化の結果生じた NADH や Acetyl CoA が、代替エネルギー源として使用され、ピルビン酸の酸化は抑制される³²⁾。

以上のように、中・短鎖脂肪酸を含め、脂肪酸はピルビン酸の酸化の調節因子として種々の効果を呈する。いつぼう、前述のように、各種有機酸血症や Reye 症候群では、各種の短鎖脂肪酸の蓄積が知られている。そこで、これらの疾患と関連ある中・短鎖脂肪酸および抗けいれん剤であるバルプロ酸が、ピルビン酸の酸化に与える影響を検討した。

2. 正常ヒト培養線維芽細胞におけるピルビン酸酸化に与える各種中・短鎖脂肪酸の影響

正常線維芽細胞によるピルビン酸からの $^{14}\text{CO}_2$ 生成抑制は、メチルマロン酸、イソ酪酸、酢酸を除く、検討したすべての中・短鎖脂肪酸の 10 mM の添加でみられた (Fig. 3)。中・短鎖脂肪酸も長鎖脂肪酸と同様にミトコンドリア内で acyl CoA となることが知られている。一般に、acyl CoA は、SuccinylCoA ligase などの TCA サイクルの酵素を抑制する³³⁾⁻³⁵⁾。また、アシル化にとまない、ミトコンドリア内の free CoA が消費され、acetyl CoA/CoA 比の上昇、NADH/NAD 比の上昇³⁶⁾による pyruvate dehydro-

genase complex の活性の抑制²⁸⁾、ピルビン酸の細胞内、ミトコンドリア内への転送の阻害²⁶⁾²⁷⁾、さらに酸化的リン酸化によつて生成したエネルギーの中間体の部位での補促障害³⁷⁾³⁸⁾などの効果を持っている。したがつて、メチルマロン酸などを除く他の中・短鎖脂肪酸のピルビン酸酸化の抑制には、これらの機序の関与が推測される。

いつぼう、メチルマロン酸は、10 mM で $^{14}\text{CO}_2$ 生成を亢進させている。同様の現象が methylmalonyl-CoA mutase 活性を欠如するメチルマロン酸血症患児の細胞でもみられた (Fig. 4) ことから、 $^{14}\text{CO}_2$ 生成の亢進はメチルマロン酸自体、または、methylmalonyl CoA の効果と考えられる。メチルマロン酸は、ミトコンドリアのリンゴ酸-リン酸交換転送機構を阻害することが知られている³⁹⁾。このため、高濃度のメチルマロン酸は、ミトコンドリア内の NADH/NAD 比、acetyl CoA/CoA 比の低下を来し、あるいは、methylmalonyl CoA の pyruvate carboxylase に対する阻害の結果⁴⁰⁾ピルビン酸の酸化的脱炭酸が亢進した可能性が考えられる。イソ酪酸は、1.0 mM で $^{14}\text{CO}_2$ 生成を亢進させた。これは同じく分枝鎖脂肪酸であるイソ吉草酸の効果と対照的であった。この差には、炭素数の大きさが関与しているかも知れない。

いつぼう、これらの中・短鎖脂肪酸による $^{14}\text{CO}_2$ 生成の抑制、促進効果は、いずれも 0.1 mM では 4-ペンテン酸、オクタ酸、ヘキサ酸を除けば、ほとんどみられなかつた。したがつて、ヒトの疾患における病態では、これらの中・短鎖脂肪酸がピルビン酸酸化に与える影響はさほど大きいとは考えにくい。

4-ペンテン酸は、短鎖脂肪酸の中で低血糖をひきおこす構造的特徴を持つものでもつとも単純な化学構造を持つ物質である⁴¹⁾。4-ペンテン酸は、free CoA、acetyl CoA を減少させ、acyl CoA を増加させ、4-ペンテン酸あるいはその代謝産物は、pyruvate dehydrogenase の活性を抑制すると考えられている⁴²⁾。実際、ミトコンドリアでも $^{14}\text{CO}_2$ 生成のみ抑制しているが、ATP 生成には何ら影響を与えていないことから、4-ペンテン酸は、ピルビン酸の酸化的脱炭酸のレベルでの障害を主な機序とすることが推察できる。また、4-ペンテン酸により、Reye 症候群の主要病像がラットで再現できることが知られている⁴³⁾。

オクタン酸は、線維芽細胞では、10 mM, 1.0 mM で著明な $^{14}\text{CO}_2$ 生成低下がみられ、同様の現象がミトコンドリアでも観察された。さらに、ミトコンドリアの呼吸に対し、10 mM で state 4 での酸素消費：RCR の低下など脱共役効果を示し (Table 3), ATP の産生も抑制している。このことより、これらの濃度では、脱共役作用が重要な役割を果たすことが強く推測される。さらに、動物実験において、オクタン酸の注入により脳浮腫がおこなることが報告され⁴⁴⁾、Reye 症候群における脳浮腫の成因における中・短鎖脂肪酸の病因に対する役割が推測されている。その機序として、Na-K ATP ase の抑制が考えられており、これにはオクタン酸の強力な脱共役作用が関与しているかもしれない⁴⁵⁾。

3. 正常ヒト線維芽細胞、ラット肝ミトコンドリアにおける中・短鎖脂肪酸のピルビン酸酸化に与える影響とグリシン、カルニチン、アルブミンの効果

グリシンは、肝ミトコンドリアに存在する glycin-N-acylase の作用で、短鎖 acyl CoA と縮合することが知られている⁴⁶⁾⁴⁷⁾。このことから、イソ吉草酸血症発作時、グリシンを投与し、isovaleryl CoA を isovalerylglycine として解毒しようとする試みがなされている⁴⁸⁾。

正常ヒト細胞で 10 mM のプロピオン酸、イソ吉草酸、ヘキセン酸による、またプロピオン酸血症児の細胞で 1.0 mM のプロピオン酸による $^{14}\text{CO}_2$ 生成の阻害がグリシンの添加で種々の程度の回復がみられた (Fig. 3)。しかし、肝ミトコンドリアでは、同様の現象はみられず、線維芽細胞でのグリシンによる $^{14}\text{CO}_2$ 生成阻害の回復は、これらの acyl CoA のグリシン抱合では説明できず、その機序は明らかではなかつた。

カルニチン (γ -amino- β -hydroxybutyric acid) は、長鎖脂肪酸のミトコンドリア膜の通過に関与するのみでなく⁴⁹⁾、近年、分枝鎖および短鎖脂肪酸の代謝へも大きく影響することが報告されてきた⁵⁰⁾⁵¹⁾。いつぼう、非生理的高濃度では、カルニチン自体、またはその代謝産物がピルビン酸の酸化に何らかの影響をおよぼす可能性がある。Khairallah らによると、カルニチンは、carnitine decarboxylase により脱炭酸を受け代謝される⁵²⁾という。

線維芽細胞による $^{14}\text{CO}_2$ 生成に対する各種中・短鎖脂肪酸の阻害は、正常、有機酸血症細胞のいずれの場合も、カルニチンの添加により回復がみられなかつ

た。しかし、ミトコンドリアでは、カルニチン添加により、脂肪酸非添加時でも、 $^{14}\text{CO}_2$ 生成は 30% 程度亢進した (Table 2)。さらに、10 mM のプロピオン酸、イソ吉草酸および 1.0 mM のプロピオン酸、4-ペンテン酸の添加による $^{14}\text{CO}_2$ 生成阻害は、カルニチン添加により回復がみられた (Figs. 6~9)。

以上のことより、上記の中・短鎖脂肪酸が蓄積した状態では、カルニチンの投与によりピルビン酸の酸化障害が緩和されることが期待される。さらに長鎖脂肪酸のみならず、メチルマロン酸、プロピオン酸もカルニチンと結合することが知られている⁵³⁾。したがって、これらの中・短鎖脂肪酸およびカルニチンの両者が、非生理的高濃度に存在する場合にはこれらの中・短鎖脂肪酸はカルニチンと縮合し、acylcarnitine となりミトコンドリア内での acyl CoA 単位の上昇が抑制されることが予想される。メチルマロン酸、プロピオン酸による $^{14}\text{CO}_2$ 生成阻害がカルニチンによって回復したことには、このような機序が関与していると考えられる。

線維芽細胞でのアルブミン添加による中・短鎖脂肪酸の阻害改善効果は、アルブミンが脂肪酸と結合することで遊離の脂肪酸の濃度を相対的に減少させることによる効果²⁴⁾と考えられる。いつぼう、アルブミンは、ラット肝ミトコンドリアではすみやかに代謝されるという⁵⁴⁾。さらに、脂肪酸に結合することにより、その相対的濃度を下げ、脂肪酸による ATP ase 活性の促進を抑制するという²⁴⁾⁵⁵⁾⁵⁶⁾。今回アルブミンを添加することで、脂肪酸非添加時でもミトコンドリアでの $^{14}\text{CO}_2$ 生成は著明に亢進し、しかも ATP 生成は増加していなかつた。このことから、アルブミン添加による $^{14}\text{CO}_2$ 生成の亢進は、アルブミンが代謝された結果スパーカーとしての基質の供給増加のみでは説明できず、ピルビン酸のミトコンドリア膜を介した強力なピルビン酸の転送の促進も考えられる。

4. 有機酸血症細胞における中・短鎖脂肪酸の影響
メチルマロン酸およびプロピオン酸血症由来の細胞では、 $^{14}\text{CO}_2$ 生成量が中・短鎖脂肪酸非添加時でも正常細胞のその 50% および 75% であつた (Table 2)。また、プロピオン酸血症細胞では、プロピオン酸添加によつて、正常細胞よりも強い抑制がみられた (Fig. 4)。このことは、これらの疾患の細胞では、propionyl CoA の蓄積により、ピルビン酸の酸化が阻害されることが大きな原因と考えられる。事実、プ

ロピオン酸血症患児尿中には、propionyl CoA がオキサロ酢酸と縮合して生ずる2-メチルクエン酸などの異常代謝産物が出現することが報告されており⁵⁷⁾、この物質による TCA サイクルの二次的酵素阻害も関与していると考えられている³³⁾³⁴⁾。いつぼう、イソ吉草酸血症細胞では、高濃度のイソ吉草酸やロイシンの添加で $^{14}\text{CO}_2$ 生成の阻害がみられたが、その阻害の程度は正常細胞と差がなかった。これは、イソ吉草酸血症細胞では蓄積すると考えられる isovaleryl CoA の、ピルビン酸の酸化脱炭酸に対する阻害効果が propionyl CoA など他の acyl CoA と比べ弱いことが原因と考えられる。

5. ラット肝ミトコンドリアによるピルビン酸酸化と ATP 生成に与える中・短鎖脂肪酸の影響の関連

肝ミトコンドリアには多数の酵素が存在しており⁵⁸⁾、その機能障害は生体に重篤な病態をもたらす。今回の実験では、ピルビン酸からの $^{14}\text{CO}_2$ 生成は、10 mM のメチルマロン酸、イソ酪酸により亢進したが、その他の脂肪酸では抑制傾向が認められ、おおむね線維芽細胞の成績と一致した。しかし、ミトコンドリアの実験では、酢酸、イソ酪酸を除き、 $^{14}\text{CO}_2$ 生成は 1.0 mM、0.1 mM でも抑制がみられた。このことは、脂肪酸は一般に detergent 効果を持っているため細胞膜を取り去ったミトコンドリアが、直接高濃度の脂肪酸にさらされ、ミトコンドリア膜が障害された可能性もある。これは、ミトコンドリアに脂肪酸を添加すると、ミトコンドリアの形態学的膨化が認められた⁵⁹⁾という報告からも容易に推察できる。さらに、高濃度の脂肪酸の存在で、ミトコンドリア膜におけるピルビン酸の転送阻害も考えられている⁶⁰⁾。ATP 生成阻害が著しくなく、低濃度 (0.1 mM) では著明な脱共役作用が認められず、かつピルビン酸からの $^{14}\text{CO}_2$ 生成の抑制のみが著明なプロピオン酸、イソ吉草酸、4-ペンテン酸、ヘキセン酸、ヘキサノ酸、クロトン酸、バルプロ酸では同様の機序が働いている可能性がある。

10 mM のメチルマロン酸、イソ酪酸では、線維芽細胞と同様 $^{14}\text{CO}_2$ 生成の亢進が認められ、いつぼう、ATP 生成は抑制された。これらの酸の ATP 生成阻害効果は、恐らく脂肪酸が一般に持っているエネルギー伝達阻害剤的作用³⁷⁾、loose coupling 効果によると推測される。特に後者の機序は、ミトコンドリアにおける酸素消費、ADP/O 比の成績 (Table 3) からもうらづけられる。

酪酸は、イソ酪酸とは構造異性体でありながら、 $^{14}\text{CO}_2$ 生成、ATP 生成両者ともに抑制し、さらにミトコンドリアの呼吸においても、酪酸、イソ酪酸の両者で state 3 および state 4 における酸素消費量、ADP/O 比に与える影響が微妙に異なっている。これらのことは、分枝の有無によつてそれらの代謝に与える阻害効果の機序に差があることを示唆している。

4-ペンテン酸、プロピオン酸、イソ吉草酸、ヘキサノ酸、ヘキセン酸、クロトン酸、バルプロ酸は、スーパーカーとしてのコハク酸が充分に存在すれば、ATP 産生には影響を与えず、 $^{14}\text{CO}_2$ 生成のみを阻害している。このことから、TCA サイクルの各酵素に対しては、際立つた阻害効果はなく、むしろ、ピルビン酸のミトコンドリア膜を介した転送機構、あるいは、pyruvate dehydrogenase 自体を直接的あるいは間接的に阻害していると考えられる。

オクタン酸は、線維芽細胞と同様、ミトコンドリアにおける $^{14}\text{CO}_2$ 生成も著明に抑制したが、同時に、1.0、10 mM においては、ATP 生成も抑制した。このことは、オクタン酸がミトコンドリアの呼吸において脱共役効果を呈したことと一致しており、オクタン酸の、ピルビン酸酸化阻害の機序には、その脱共役作用が大きな原因となつていることが考えられる。さらにオクタン酸による、内因性の ATP ase, adenylate kinase 活性の上昇が報告されており³⁸⁾、ATP 生成の抑制に拍車をかけている可能性がある。

7. ミトコンドリアの呼吸に与える中・短鎖脂肪酸の影響

酢酸を除くほとんどの中・短鎖脂肪酸では、ロテノン添加時コハク酸を基質として酸素消費をみた場合、RCR の低下が認められ、この傾向は一般に高濃度になるほど著明であつた。RCR (state 3 の酸素消費量/state 4 の酸素消費量) が低下する因子として、state 4 での酸素消費量の上昇、または、state 3 での酸素消費量の低下の両者が関与する。酢酸、クロトン酸、ヘキセン酸、ヘキサノ酸を除く、すべての中・短鎖脂肪酸で state 4 での酸素消費量が上昇しており、これらの酸は、loose coupling の効果を持っている。いつぼう、クロトン酸、ヘキセン酸、カプロン酸では、state 4 の酸素消費が対照と同等价、もしくは低下しているにもかかわらず、RCR は低下している。このことはむしろ、state 3 での酸素消費の抑制が強く関与していると考えられ、脂肪酸の呼吸に与える作

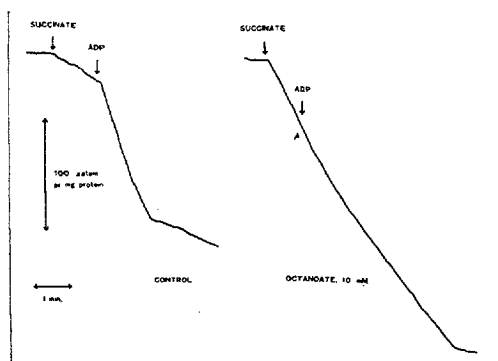


Fig. 10 Respirations of isolated rat liver mitochondria in the presence or absence of octanoate (10 mM), which were determined polarographically according to the method of Williams and Chance, using a Clark type electrode at 30°C.

用部位がやや異なっている可能性も考えられる。

イソ吉草酸, 4-ペンテン酸, パルプロ酸, オクタン酸, イソ酪酸では, 0.1 mM の低濃度でも RCR の著明な低下がみられている。これらの酸では, 従来, 呼吸抑制の報告が多くなされ¹⁴⁾²⁴⁾⁴¹⁾⁴⁵⁾⁶¹⁾⁶²⁾, また, Reye 症候群の実験モデルの作製に利用されている⁴³⁾⁴⁴⁾⁶³⁾。特に, オクタン酸では, 10 mM において著明な state 4 での酸素消費の上昇 (296%) がみられ, ADP/O 比は 1.0 となり典型的な脱共役剤のパターンを示し, Parker ら⁴⁵⁾の報告と一致した。Reye 症候群や有機酸血症では, これらの酸の蓄積が認められており¹¹⁻¹³⁾, 高度蓄積により二次的なミトコンドリアの障害を来すことは充分考えられる。プロピオン酸やメチルマロン酸血症児の肝における cytochrome oxidase の活性の低下も報告⁶⁴⁾されているが, 今回の結果では, これらの酸における RCR の著明な低下はみられなかった。

いつぼう, ミトコンドリアの共役の指標となる ADP/O 比は, 10 mM オクタン酸以外の各脂肪酸, 各濃度について著明な影響はみられなかった。このことは, これらの酸はこれらの濃度では, ADP/O 比を変化させるほど強力な脱共役作用を呈さないことを示している。いつぼう, オクタン酸の 10 mM の添加では, 典型的な脱共役パターンを示した (Fig. 10)。

ピルビン酸の酸化に与える中・短鎖脂肪酸の効果は, 分子量, 化学構造, 濃度により, 複数の作用機序が関与すると考えられ, 生体内では, その代謝産物のさまざまな関与を受けることも問題となる。ミトコンドリアでは中・短鎖脂肪酸の多くが, 有機酸血症発作時の血中濃度程度の濃度 (1.0 mM 以下) で, 著明な酸化阻害効果を呈したが, コハク酸の共存下では, オクタン酸添加時以外には ATP の生成の有意の低下はみられなかった。このことは, これらの中・短鎖脂肪酸によつて有機酸血症での発作時でも, 酸化基質が十分に存在する限り, ATP の生成阻害は著明ではないことが推測される。

また, カルニチンの添加により, プロピオン酸やメチルマロン酸による酸化の阻害は回復した。このことは, プロピオン酸血症やメチルマロン酸血症の発作時にカルニチンの投与がよりピルビン酸酸化障害を緩和させ得る可能性を示唆する。

近年, Reye 症候群の患児において, 肝ミトコンドリアにおける酵素活性の低下⁶⁵⁾, 肝 ATP の含量の低下⁶⁶⁾, 肝の pyruvate dehydrogenase および pyruvate carboxylase の酵素活性の低下⁶⁷⁾が報告されている。今回の実験結果より, 有機酸血症や Reye 症候群で異常蓄積した中・短鎖脂肪酸が, 二次的にピルビン酸代謝, ミトコンドリアの細胞内呼吸を障害し, その病態に悪影響を与えている可能性は充分考えられた。

稿を終えるに臨み, 終始御指導と御校閲を賜った恩師山下文雄教授, および御助言いただいた本学医化学小倉良平教授に深く感謝をさせていただきます。また, 直接御指導いただいた小児科学教室芳野信講師はじめ代謝グループの諸先生方に感謝します。貴重なプロピオン酸血症線維芽細胞を恵いただいた, W.L. Nyhan 教授に深謝します。パルプロ酸を分与いただいた協和発酵工業株式会社に感謝します。

本研究は, 第 21 回国際先天代謝異常シンポジウム (リヨン, 1983 年 9 月), および第 26 回小児代謝研究会 (東京, 1983 年 10 月) で発表した。

なお, 本研究は, 厚生省心身障害研究 [乳幼児期における原因不明疾患に関する研究, 成因不明の脳症 (Reye 症候群等) の研究] より研究費の援助を受けた。(久留米医学誌, 47:170-188, 1984)

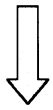
文 献

- 1) Trauner, D. A., Nyhan, W. L. and Sweetman, L. : Short-chain organic acidemia and Reye's syndrome. *Neurology*, **25**, 296, 1975.
- 2) Varma, R. R., Cherayil, G., Casper, J. T., Lewis, J. D., Harrington, G. and Parker, H. W. : Short chain fatty acids (SCFA) in Reye's syndrome (RS). *Gastroenterology*, **68**, 1086, 1975.
- 3) Cooperstock, M. S., Tucker, R. P. and Baublis, J. V. : Possible pathogenic role of endotoxin in Reye's syndrome. *Lancet*, **7**, 1272, 1975.
- 4) Mamunes, P., De Vries, C. H., Miller, C. D. and David, P. B. : Fatty acid quantitations in Reye's syndrome. In: Pollack, J. D. ed. *Reye's syndrome*. New York: Grune and Stratton, 245, 1975.
- 5) Corbeel, L., Tada, K., Colombo, J. P., Eeckels, R., Eggermont, E., Jaeken, J., Den Tandt, W., Harvengt, L., Delhaye, J. and Deloecker, W. : Methylmalonic acidemia and nonketotic hyperglycinaemia. *Clinical and biochemical aspects*. *Arch. Dis. Child.*, **50**, 103, 1975.
- 6) Kuhara, T., Shinka, T., Matsuo, M. and Matsumoto, I. : Increased excretion of lactate, glutamate, 3-hydroxyisovalerate and 3-methylglutaconate during clinical episodes of propionic acidemia. *Clin. Chim. Acta*, **123**, 101, 1982.
- 7) Budd, M. A., Tanaka, K., Holmes, L. B., Efron, M. L., Crawford, J. D. and Isselbacher, K. J. : Isovaleric acidemia. *N. Eng. J. Med.*, **277**, 321, 1967.
- 8) Gibson, G. E. and Blass, J. P. : Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple-syrup-urine disease metabolites. *J. Neurochemistry*, **26**, 1073, 1976.
- 9) Roth, K. S., Yang, W., Foreman, J. W., Rothman, R. and Segal, S. : Holocarboxylase synthetase deficiency: A biotin-responsive organic acidemia. *J. Pediatrics*, **96**, 845, 1980.
- 10) Robinson, B. H., Sherwood, W. G., Taylor, J., Balfe, J. W. and Mamer, O. A. : Acetoacetyl CoA thiolase deficiency: A cause of severe ketoacidosis in infancy stimulating salicylism. *J. Pediatrics*, **95**, 228, 1979.
- 11) Leonardo, J. V., Seakins, J. W. T., Bartlett, K., Hyde, J., Wilson, J. and Clayton, B. : Inherited disorders of 3-methylcrotonyl CoA carboxylation. *Arch. Dis. Child.*, **56**, 53, 1981.
- 12) Gregersen, N. : Studies on the effects of saturated and unsaturated short-chain monocarboxylic acids on the energy metabolism of rat liver mitochondria. *Pediat. Res.*, **13**, 1227, 1979.
- 13) Glasgow, A. M. and Chase, H. P. : Effect of propionic acid on fatty acid oxidation and ureagenesis. *Pediat. Res.*, **10**, 683, 1976.
- 14) Hird, F. J. R. and Weidemann, M. J. : Oxidative phosphorylation accompanying oxidation of short-chain fatty acids by rat-liver mitochondria. *Biochem. J.*, **98**, 378, 1966.
- 15) Uhlendorf, B. W., Holtz, A. I., Mock, M. B. and Fredrickson, D. S. : Persistence of a metabolic defect in tissue cultures derived from patients with Niemann-Pick disease. In: Aronson, S. M. ed. *Inborn disorders of sphingolipid metabolism*. New York: Pergamon Press, 443, 1966.
- 16) Blass, J. P., Avigan, J. and Uhlendorf, B. W. : A defect in pyruvate decarboxylase in a child with an intermittent movement disorder. *J. Clin. Invest.*, **49**, 423, 1970.
- 17) Blass, J. P., Schulman, J. D., Young, D. S. and Hom, E. : An inherited defect affecting the tricarboxylic acid cycle in a patient with congenital lactic acidosis. *J. Clin. Invest.*, **51**, 1845, 1972.
- 18) Hogeboom, G. H., Schneider, W. C. and Pallade, G. E. : Cytochemical studies of mammalian tissues. 1. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic

- particulate material. *J. Biol. Chem.*, **172**, 619, 1948.
- 19) Bücher, T. : Über ein phosphatübertragendes gärungsferment. *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 292, 1947.
 - 20) Chance, B. and Williams, G. R. : Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. 1. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.*, **217**, 383, 1955.
 - 21) Estabrook, R. W. : 7] Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. In: Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. ed. *Methods in enzymology*. Vol. 10, 41 Academic press, New York, 1967.
 - 22) Slater, E. C. : 8] Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation. In. Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. ed. *Methods in enzymology*. Vol. 10, 48, Academic Press, New York, 1967.
 - 23) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
 - 24) Ansevin, C. F. : Reye syndrome: Serum-induced alterations in brain mitochondrial function are blocked by fatty-acid-free albumin. *Neurology*, **30**, 160, 1980.
 - 25) Gerber, N., Dickinson, R. G., Harland, R. C., Lynn, R. K., Houghton, D., Antonias, J. I. and Schimschock, J. C. : Reye-like syndrome associated with valproic acid therapy. *J. Pediatr.*, **95**, 142, 1979.
 - 26) Halestrap, A. P. : The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem. J.* **148**, 85, 1975.
 - 27) Mowbray, J. : A mitochondrial monocarboxylate transporter in rat liver and heart and its possible function in cell control. *Biochem. J.*, **148**, 41, 1975.
 - 28) Bremer, J. : Pyruvate dehydrogenase, substrate specificity and product inhibition. *Eur. J. Biochem.*, **8**, 535, 1969.
 - 29) Patel, M. S. and Tilghman, S. M. : Regulation of pyruvate metabolism via pyruvate carboxylase in rat brain mitochondria. *Biochem. J.*, **132**, 185, 1973.
 - 30) Silbert, C. K. and Martin, D. B. : Inhibition by citrate of pyruvate dehydrogenase in rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 818, 1968.
 - 31) Bremer, J. : Comparison of acylcarnitine and pyruvate as substrates for rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **116**, 1, 1966.
 - 32) Dennis, S. C., DeBuysere, M., Scholz, R. and Olson, M. S. : Studies on the relationship between ketogenesis and pyruvate oxidation in isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **253**, 2229, 1978.
 - 33) Stumpf, D. A., McAfee, J., Parks, J. K. and Eguren, L. : propionate inhibition of succinate: CoA ligase (GDP) and the citric acid cycle in mitochondria. *Pediatr. Res.*, **14**, 1127, 1980.
 - 34) Cheema-Dhadli, S., Leznoff, C. C. and Harperin, M. L. : Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: Implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic acidemia. *Pediatr. Res.* **9**, 905, 1975.
 - 35) Bergen, B. J., Stumpf, D. A., Haas, R., Parks, J. K. and Eguren, L. : A mechanism of Reye-like syndrome in isovaleric acidemia. *Neurology, (Ny)*, **30**, 451, 1980.
 - 36) Stimulation of ketogenesis in rat liver mitochondria by long chain fatty acyl-CoA esters. *Nutrition Reviews*, Vol. **32**, 86, 1974.
 - 37) Vazquez-Colon, L., Ziegler, F. D. and Elliott, W. B. : On the mechanism of fatty acid inhibition of mitochondrial metabolism. *Biochemistry*, **5**, 1134, 1966.
 - 38) Mannaerts, Debeer, L. J. and De Schepper, P. J. : Effect of free fatty acids on hepatic adenine nucleotide content and oxidative

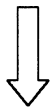
- metabolism. *Societe Belge De Physiologie Et De Pharmacologie*, p. 357, 1973.
- 39) Halperin, M.L., Schiller, C.M. and Fritz, I. B. : The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *J. Clin. Invest.*, **50**, 2276, 1971.
- 40) Utter, M.S. : Metabolic regulation and enzyme action. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Symp.*, **19**, 9, 1970.
- 41) Senior, A.E. and Sherratt, H.S.A. : Biochemical effects of the hypoglycaemic compound pent-4-enoic acid and related non-hypoglycaemic fatty acids. Oxidative phosphorylation and mitochondrial oxidation of pyruvate, 3-hydroxybutyrate and tricarboxylic acid-cycle intermediates. *Biochem. J.*, **110**, 499, 1968.
- 42) Fukami, M.H. and Williamson, J.R. : On the mechanism of inhibition of fatty acid oxidation by 4-pentenoic acid in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **246**, 1206, 1971.
- 43) Glasgow, A.M. and Chase, H.P. : Production of the features of Reye's syndrome in rat with 4-pentenoic acid. *Pediatr. Res.*, **9**, 133, 1975.
- 44) Trauner, D.A. and Adams, H. : Intracranial pressure elevations during octanoate infusion in rabbits: an experimental model of Reye's syndrome. *Pediatr. Res.*, **15**, 1097, 1981.
- 45) Parker, W.D., Haas, R., Stumpf, D.A. and Eguren, L.A. : Effects of octanoate on rat brain and liver mitochondria. *Neurology*, **33**, 1374, 1983.
- 46) Bartlett, K. and Gompertz, D. : The specificity of glycine-N-acylase and acylglycine excretion in the organicacidaemias. *Biochem. Med.*, **10**, 15, 1974.
- 47) Motokawa, Y. and Kikuchi, G. : Glycine metabolism in rat liver mitochondria. V. Intramitochondrial localization of the reversible glycine cleavage system and serine hydroxymethyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 461, 1971.
- 48) Yudkoff, M., Cohn, R.M., Puschak, R., Rothman, R. and Segal, S. : Glycine therapy in isovaleric acidemia. *J. Pediatr.*, **92**, 813, 1978.
- 49) Yen, Y.Y. and Zee, R. : Fatty acid oxidation in isolated rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **199**, 560, 1979.
- 50) Bieber, L.L., Ermaus, R., Valkner, K. and Farrell, S. : Possible function of short-chain and medium-chain carnitine acyltransferases. *Fed. Roc.*, **41**, 2858, 1982.
- 51) May, M.E., Aftring, R.P. and Buse, M.G. : Mechanism of the stimulation of branched chain oxoacid oxidation in liver by carnitine. *J. Biol. Chem.*, **250**, 8394, 1980.
- 52) Khairallah, E. A. and Wolf, G. : Carnitine Decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, **242**, 32, 1967.
- 53) Valkner, K. J. and Bieber, L. L. : Short-chain acycarnitines of human blood and urine. *Biochem. Med.*, **28**, 197, 1982.
- 54) Penn, N.W. : The requirement for serum albumin metabolism in subcellular fractions of liver and brain. *Biochim. Biophys. Acta*, **37**, 55, 1960.
- 55) Teresi, J.D. and Luck, J.M. : The combination of organic anions with serum albumin. VIII. Fatty acid salts. *J. Biol. Chem.*, **194**, 823, 1952.
- 56) Bjorntorp, P., Ellis, H.A. and Bradford, R.H. : Albumin antagonism of fatty acid effects on oxidation and phosphorylation reactions in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **239**, 339, 1964.
- 57) Ando, T., Rasmussen, K., Wright, J.M. and Nyhan, W.L. : Isolation and identification of methylcitrate, a major metabolic product of propionate in patients with propionic acidemia. *J. Biol. Chem.*, **247**, 2200, 1972.
- 58) Stumpf, D.A. : Mitochondrial multisystem disorders: Clinical, biochemical, and morphologic features. In. Tyler, H. R. and

- Dawson, D. M. ed.: Current neurology, Boston, Houghton Mifflin Professional Publishers, p.117, 1979.
- 59) Zborowski, J. and Wojtczak, L.: Induction of swelling of liver mitochondria by fatty acids of various chain length. *Biochim. Biophys. Acta*, **70**, 596, 1963.
- 60) Benavides, J., Martin, A., Ugarte, M. and Vailedivso, F.: Inhibition by valproic acid of pyruvate uptake by brain mitochondria. *Biochem. Pharmacology*, **31**, 1633, 1982.
- 61) Bergen, B. J., Stumpf, D. A., Haas, R., Parks, J. K. and Eguren, L. A.: A mechanism of toxicity of isovaleric acid in rat liver mitochondria. *Biochem. Med.*, **27**, 154, 1982.
- 62) Haas, R., Chir, B., Stumpf, D. A., Parks, J. K. and Eguren, L.: Inhibitory effects of sodium valproate on oxidative phosphorylation. *Neurology (Ny)*, **31**, 1473, 1981.
- 63) Thurston, J. H., Hauhart, R. E., Schulz, D. W., Naccarato, E. F., Dodson, W. E. and Carroll, J. E.: Chronic valproate administration produces hepatic dysfunction and may delay brain maturation in infant mice. *Neurology (Ny)*, **31**, 1063, 1981.
- 64) Hayasaka, K., Metoki, K., Satoh, T., Narisawa, K. and Tada, K.: Reduction of cytochrome oxidase activity in the livers of propionic and methylmalonic acidemias. *Biochem. Intern.*, **3**, 51, 1981.
- 65) Mitchell, R. A., Ram, M. L., Arcinue, E. L. and Chang, C. H.: Comparison of cytosolic and mitochondrial hepatic enzyme alterations in Reye's syndrome. *Pediatr. Res.*, **14**, 1216, 1980.
- 66) Greene, H. L., Wilson, F. A., Glick, A. D., Dunn, G. D. and Kilroy, A. W.: Hepatic ATP concentrations and glycolytic enzyme activities in Reye syndrome. *J. Pediatr.*, **89**, 777, 1976.
- 67) Robinson, B. H., Gall, D. G. and Cutz, E.: Deficient activity of hepatic pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in Reye's syndrome. *Pediatr. Res.*, **11**, 279, 1977.



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



1. 中・短鎖脂肪酸が,正常ヒトおよび有機酸血症児由来の培養線維芽細胞,またはラット肝ミトコンドリアにおける,ピルビン酸の酸化に与える影響について検討した.さらに,その影響に対して,グリシン,カルニチン,essentially fatty acid free-albuminがおよぼす効果について検討を加えた.
2. 正常ヒト線維芽細胞による U-14C ピルビン酸からの $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 生成は.メチルマロン酸(10mM),イソ酪酸(1mM)の添加で亢進したが,それ以外の中・短鎖脂肪酸の添加によりすべて対照と同等か,抑制された.
3. イソ吉草酸血症,プロピオン酸血症,メチルマロン酸血症児由来の線維芽細胞では,いずれも短鎖脂肪酸非添加時も,U-14C ピルビン酸からの $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 生成量は正常細胞の 50~90%と低値を示した.さらに,プロピオン酸血症細胞では,プロピオン酸(10mM,1mM)の添加により,正常細胞より強い $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 生成の阻害がみられた.グリシン,essentially fatty acid free-albumin 添加では $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 生成は同濃度の短鎖脂肪酸添加時に比し,同等かやや促進的に働き,カルニチン添加では同等かやや抑制的に働いた.
4. ラット肝ミトコンドリアでの U-14C ピルビン酸の酸化,および ATP 生成に与える中・短鎖脂肪酸の影響より,検討した中・短鎖脂肪酸は大別して 4 タイプに分けられた.'
 - a)ピルビン酸からの $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 生成は亢進させるが,ATP 産生は低下させるもの(イソ酪酸,メチルマロン酸),
 - b) $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 生成は低下させるが,ATP 産生には影響を与えないもの(4-ペンテン酸の他,ほとんどの中・短鎖脂肪酸が含まれる),
 - c) $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 生成,ATP 産生ともに低下させるもの(オクタン酸),
 - d) $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 生成 ATP 産生ともに影響を与えないもの(酢酸).
5. ラット肝ミトコンドリアの呼吸に対し,中・短鎖脂肪酸は高濃度となるほど呼吸調節率を低下させ,酸素消費を state3 では減少,State4 では増加させ,loose coupling の傾向が共通して認められたが,ロテノンを追加しコハク酸を基質とした場合,ADP/O 比,ATP 産生には 10mM のオクタン酸以外は著明な効果はみられなかった.