

B-7 脳症関連物質のラット肝ミトコンドリア 呼吸鎖に及ぼす影響

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・吉 田 一 郎・芳 野 信
久留米大学 小児科

目的

Reye症候群の病態は、その主座が多臓器のミトコンドリアにあると考えられている。本症でのミトコンドリア障害に、いくつかの外因性、内因性物質の関与が推測されている。われわれは、これらの物質（以下脳症関連物質と呼ぶ）が、ラット肝ミトコンドリアの呼吸に与える影響についてoxographyを用いて検討してきたが^(1, 2)、今回、それらの物質がミトコンドリア機能に与える影響をより詳細に検討する目的で脳症関連物質が呼吸鎖のうちの4成分、すなわち、flavoprotein、cytochrome b、cytochrome c+c₁、cytochrome a+a₃の酸化還元に与える影響を検討した。

材料および方法

1 材料

ビルビン酸カリウム、コハク酸ナトリウム、D,L-イソクエン酸ナトリウムは、SIGMA社

より購入した。脳症関連物質としてのサリチル酸誘導体4種のうちアセチルサリチル酸 (ASA) は、Aldrich Chemical, Inc.より、サリチル酸 (SA)、ゲンチジン酸 (GA)、サリチル尿酸 (SU) は和光純薬工業より、4-ペンテン酸 (4-P)、オクタン酸ナトリウム (OCT) は、東京化成工業より購入し、アセトアミノフェン (ACE)、バルプロ酸ナトリウム (VPA)、ホバンテン酸ナトリウム (HO) は、それぞれ市販の製品を用いた。その他の試薬は、市販の特級の製品を用いた。

2 方法

1) ミトコンドリアの分離

ウイスター系オスラット (180-370g) を24時間絶食後、エーテル麻酔下に断頭放血し、1分以内に肝を摘出、氷冷した調整液A (70mM ショ糖、210mM マニトール、0.1mM EDTA、10mM Tris-HCl pH7.4) 中で2-3回洗浄した。その後、調整液A中で細切し、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。以後は、Schneiderの方法に準じてミトコンドリアを分離した⁽²⁾。得られたミトコンドリアは、氷冷した調整液B (250mM マニトール、10mM リン酸カリウム、2mM MgCl₂、0.2mM EDTA、10mM KCl、10mM Tris-HCl pH7.4) に懸濁し、実験に用いた。

2) 差スペクトルの測定

呼吸鎖の各成分の酸化還元状態は、Chanceら⁷の方法に準じ、島津UV-3000 spectrophotometerにて観察した。調整液B、ミトコンドリア懸濁液 (タンパク量で 1.2-3.6mg相当)、ADP 1.6mM及び、後述の種々の濃度の脳症関連物質を加え、終容量1.5ml、pH 7.4とし、30°Cにて5分間preincubationした。ついで、基質 (コハク酸、イソクエン酸、ピルビン酸のいずれか一つ) を終濃度1.0mM (D, L-イソクエン酸は2mM) となるように加え、差スペクトルを測定した。

差スペクトルからの呼吸鎖成分の定量は、Chance&萩原による分子吸光係数により算出した⁽³⁾。

3) 脳症関連物質添加による差スペクトルの反応時間による比較

脳症関連物質非添加の反応液に各基質を添加し、経時的に差スペクトルを記録して、4つの呼吸鎖成分のすべてが初めてピークとして描出された時点とその5分後で、それぞれの呼吸鎖成分を定量し（以下コントロールと称する）、脳症関連物質添加反応液についても同様の測定をおこない、コントロールと比較した。

4) ATP測定

差スペクトルの測定と同じ条件で、インキュベーションを30°C、30分とし反応液を0.6N過塩素酸で除タンパクし、遠沈後の上清についてベーリンガーマンハイム社のATP測定キットを用い定量した。対照は、内因性の呼吸基質由来のATP値を差し引いたものとし、外因性の呼吸基質により生成したATPに関して、結果を考察した。

5) タンパク濃度は、Lowry法により定量した。

結果

1) コントロールでの差スペクトル

コントロールの基質添加後の、呼吸鎖成分の還元状態の経時的变化を示す（図1）。まず、flavoprotein、cytochrome b、cytochrome c+c₁が還元型となって尖鋭なピークを示す（B）。ついで、cytochrome a+a₃のピークも描出され（C）、更にスキャンを続ければ、ピークは消失する。

2) 差スペクトルの比較時間の決定

コハク酸、イソクエン酸、ピルビン酸を基質とした場合、それぞれ5分、5分および15分で初めてflavoprotein、cytochrome b、cytochrome c+c₁、cytochrome a+a₃の還元型ピークが得られた。従って、脳症関連物質添加群、コントロール両群の還元型呼吸鎖成分の比較は、コハク酸、イソクエン酸、ピルビン酸を基質とした場合、それぞれ5分と10分、10分と15分および15分と20分で行った。

3) コハク酸を基質とした場合の脳症関連物質のミトコンドリア呼吸鎖に与える影響

コハク酸を基質とした場合、基質添加後5分で初めてflavoprotein、cytochrome b、cytochrome $c+c_1$ 、cytochrome $a+a_3$ の還元型としてのピークが得られた。基質添加後5分、および10分での各電子伝達系の還元状態は、表1のごとくであった。還元型flavoproteinは、OCT添加時以外は、5分10分いずれも各脳症関連物質の添加でコントロールに比してすべて増加傾向を示した。また、ASA (1.0 mM)、SA (1.0 mM) およびVPA (0.5 mM) は、5分でのcytochrome b、 $c+c_1$ 、 $a+a_3$ の還元を減少させた。OCTでは、5分、10分共に全く呼吸鎖成分が還元されなかった。

4) イソクエン酸を基質とした場合の脳症関連物質のミトコンドリア呼吸鎖に与える影響

脳症関連物質の添加による5分、10分での呼吸鎖成分の還元状態を表2に示す。5分での各cytochromeの還元は、脳症関連物質の添加で、コントロールに比し、全て減少傾向を示した。中でも、SAは5分で有意にcytochromeの還元を減少させ、さらに、15分では、flavoprotein、cytochrome b、cytochrome $c+c_1$ 、cytochrome $a+a_3$ の還元は、何れもコントロールと同等の値を示した。OCTは、5分、10分ともに呼吸鎖成分の還元を完全に阻害した。

5) ビルビン酸を基質とした場合の脳症関連物質のミトコンドリア呼吸鎖に与える影響

結果を表3に示す。脳症関連物質を添加すると、15分では、ACEを除く全ての物質で、flavoprotein、cytochrome b、cytochrome $c+c_1$ 、cytochrome $a+a_3$ の減少がみられ、ASA、SA、VPAでは、特にその還元の減少が著明であった。一方、20分の時点では、VPA以外は、flavoproteinを含めて全ての電子伝達物質の還元は、コントロールと有意差のない程度まで回復した。一方、VPAでは15分、20分ともにすべての呼吸鎖成分の還元は、抑制され、20分での回復は見られなかった。ACEでは、15分20分ともに各呼吸鎖成分は、コントロールと同程度であり、還元の抑制は見られなかった。OCT添加では、15分、20分ともにまったく呼吸鎖成分の還元が阻害された。

6) 脳症関連物質のミトコンドリアATP含量に及ぼす影響

結果を図2に示す。インキュベーション30分時のコントロールのATP含量は、1 m

Mのコハク酸、イソクエン酸、ビルビン酸を基質とした場合、それぞれ1.78, 2.78, 0.81 μ moles/mg of mitochondrial proteinであった。VPA, 4-P, GA以外の脳症関連物質添加では、すべての基質でATP含量を同程度に落すが、その阻害効果はOCT, SA, ASAでは中等度、SU, HOPA, ACEでは軽度であった。GAは、コハク酸、ビルビン酸を基質とした場合、軽度の、イソクエン酸では著明なATP阻害効果を示した。VPA, 4-Pでは、コハク酸を基質とした場合その阻害効果は軽度であったが、イソクエン酸、ビルビン酸が基質の場合はATP含量に著明な阻害効果を示した。

考察

これらの物質のうち、ASA, SAは、イソクエン酸、ビルビン酸を呼吸基質としたときは、flavoprotein以下cytochromeの還元も阻害した。いっぽう、コハク酸を呼吸基質としても、cytochromeの減少をひき起こした。これらの結果から、ASA, SAはそれぞれの呼吸基質の脱水素反応から、CoQ-Cyt. b間の何れかの部位を阻害することが推測される。今回のこの結果は、以前の著者らのoxographでの報告⁽¹⁾と一致している。このことは、サリチル酸誘導体のなかでもSAの毒性が最も強いこと⁽⁴⁾と関係があるかもしれない。

コハク酸を基質としたときには、検討した物質のうち、OCTを除くすべての添加で還元型flavoproteinが増加した。これは、1) コハク酸脱水素酵素のフラビンヌクレオチドタンパク(FP₂)は、元来、再酸化されにくいいため、添加した脳症関連物質自体の酸化にともなう、ミトコンドリア内NADH/NAD比の、わずかの上昇によって、FP₂→CoQの電子伝達が抑制されがちであること、2) さらにASA, SA添加時については、反応系にロテノンを加えていないため、ASA, SAによるCoQ→Cyt. bの電子伝達の阻害にともなう、電子がFMNやETPなどのその他のフラビタンパクへ逆流するため、flavoproteinの総和としては増加するなどが、可能性として考えられる。SA

およびASAは、ピルビン酸を基質とした場合反応初期におけるcytochrome系を著明に減少させた。Aprilleら⁽⁵⁾はSAのミトコンドリアに対する作用として、サリチル酸中毒よりさらに高濃度では、1)その脱共役作用は、直接F₀F₁-ATPaseを阻害するよりもATP生成に関与しないH⁺イオンのサイクリングによること、2)adenine nucleotide translocase活性を下げることでミトコンドリアマトリックスのATP/ADP比を上げることなどを報告した。今回、サリチル酸の有効血中濃度の濃度域においてもAprilleらの報告と異なる阻害効果が見られたこと、さらには、解熱鎮痛剤であるACEでは殆ど阻害効果がなかったことと考え合せると非常に興味深かった。なお、詳細な作用機転解明は今後の課題である。

検討した物質中、VPA、4-P、OCTは、いずれも中鎖脂肪酸である。VPAは、コハク酸、イソクエン酸のいずれかを呼吸基質とした時にも、flavoproteinの減少をともなわないcytochromeの減少をおこした。このことから、VPAは、少なくともC_oQ→Cyt. bの電子の流れを阻害することが考えられる。ピルビン酸を呼吸基質とした場合、flavoprotein、cytochromeのすべてが減少した。VPAについては、従来、1)ミトコンドリアにおけるピルビン酸のとりこみを阻害するため、結果としてピルビン酸の酸化をおさえること⁽⁶⁾、2)ピルビン酸の脱水素反応に不可欠な肝内のfree-CoAを減少させる可能性のあること⁽⁷⁾などが云われており電子伝達の阻害というよりも、ピルビン酸の酸化阻害を反映した可能性も考えられる。しかし、バルプロ酸による代謝阻害の報告がなされていないコハク酸、イソクエン酸を基質としても、ピルビン酸と同様cytochrome系の還元が抑制されたことは、バルプロ酸に電子伝達阻害効果があり、阻害部位としてはcytochrome Qの前後のレベルであることが推測される。

VPAと対照的に、4-Pは、呼吸鎖、とくにcytochromeの還元には、著明な影響を与えなかった。これは、4-Pの阻害が、分枝鎖アシルC_oA脱水素反応に比較的特異的であるため、呼吸鎖に著明な影響を与えないのかもしれない。さらにOCTは、呼吸鎖の還元を完全に阻害した。これは、OCTのdetarгент効果によるミトコンドリア構造の障害に伴う、非特異的阻害である可能性も大きい。中鎖および長鎖脂肪酸は元來detarгент効

果を持っており⁽³⁾、また1.0mM OCT（炭素数8個の飽和直鎖脂肪酸）はポーラログラフ上脱共役を示す⁽²⁾ことより、細胞膜を取りさったミトコンドリアが直接高濃度の脂肪酸にさらされ、ミトコンドリア膜構造が障害された可能性も考えられる。Zborowskiらは、脂肪酸でのミトコンドリア障害は不飽和結合を持つ中鎖脂肪酸が最も強いと報告した⁽³⁾が、今回の結果はかれらの意見を支持するものであった。

要旨

1. Reye症候群と関連があるといわれている脳症関連物質9種類についてラット肝ミトコンドリア呼吸鎖（flavoprotein、cytochrome b、cytochrome c+c₁、cytochrome a+a₂）およびミトコンドリアATP含量へ及ぼす影響を検討した。
2. 脳症関連物質としてアセチルサリチル酸、サリチル酸、ゲンチジン酸、サリチル尿酸、アセトアミノフェン、ホバンテン酸ナトリウム、4-ベンテン酸、バルプロ酸ナトリウム、オクタン酸を選んだ。
3. 脳症関連物質添加により、いずれもミトコンドリアの電子伝達は、反応初期に阻害されたが、古典的な電子伝達阻害剤とことなりその阻害効果は可逆的であった。
4. サリチル酸誘導体のうち、サリチル酸が電子伝達阻害効果が最も強かった。
5. アセトアミノフェンは、サリチル酸誘導体と異なり電子伝達阻害効果が殆ど見られなかった。
6. バルプロ酸ナトリウムには、軽度のしかもある程度不可逆的な電子伝達阻害効果があり、その阻害部位はNADからコエンザイムQ間に存在することが推測された。

文 献

- 1) 厚生省心身障害研究報告書 昭和58年度研究業績：第一分冊 関連不明の脳症 (Reye症候群等) に関する研究 (研究分担者 山下文雄)
- 2) 古賀精敏：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ビルビン酸酸化 におよぼす中・短鎖脂肪酸の影響 久留米医学会雑誌 47,170-188,1984
- 3) 萩原文二：差スペクトルと二波長測定 of 生体内酸化還元色素への応用 蛋白質核酸酵素 12,370-385,1968
- 4) Martens, M.E. and Lee, C. : Reye's syndrome: Salicylates and Mitochondrial Functions Biochemical Pharmacology 33,2869-2876,1984
- 5) Aprille, J.R.: Salicylate has several effects on mitochondrial function. J. Nat. Reye's Syndrome Fudn. 2,56,1981
- 6) Benavides, J., Martin, a., Vgarte, M. and Vailedivso, F. : Inhibition by valproic acid of pyruvate uptake by brain mitochondria. Biochem. Pharmacology, 31,1633,1982
- 7) Becker, C.M. and Harris, R.A. : Influence of valproic on hepatic carbohydrate and lipid metabolism. Arch. Biochem. Biophys., 223,381-392,1983
- 8) 望月洋一：脂肪酸 β 酸化とperoxisome 医学のあゆみ 126,814-822,1983
- 9) Zborowski, J. and Wojtczak, L. : Induction of swelling of liver mitochondria by fatty acids of various chain length Biochim. Biophys. Acta 70,596-598,1963

図1. コントロールでの電子伝達成分の時間的推移

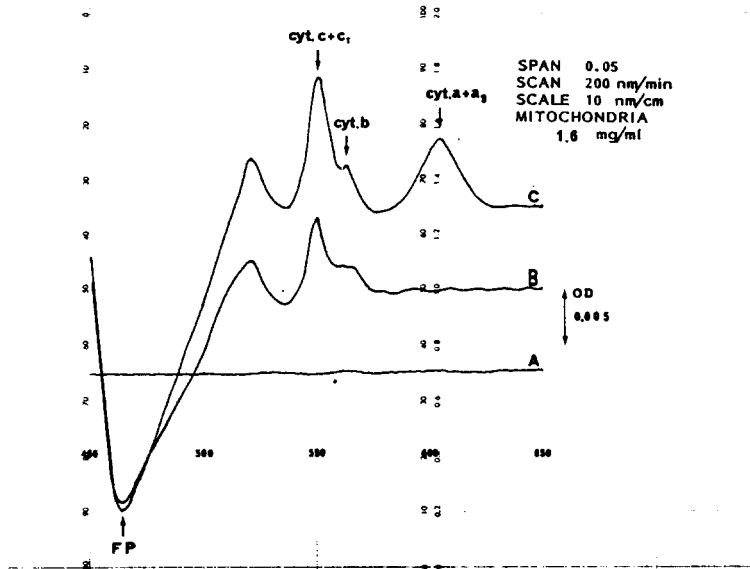


図2. 脳症関連物質のミトコンドリアATP含量に及ぼす影響

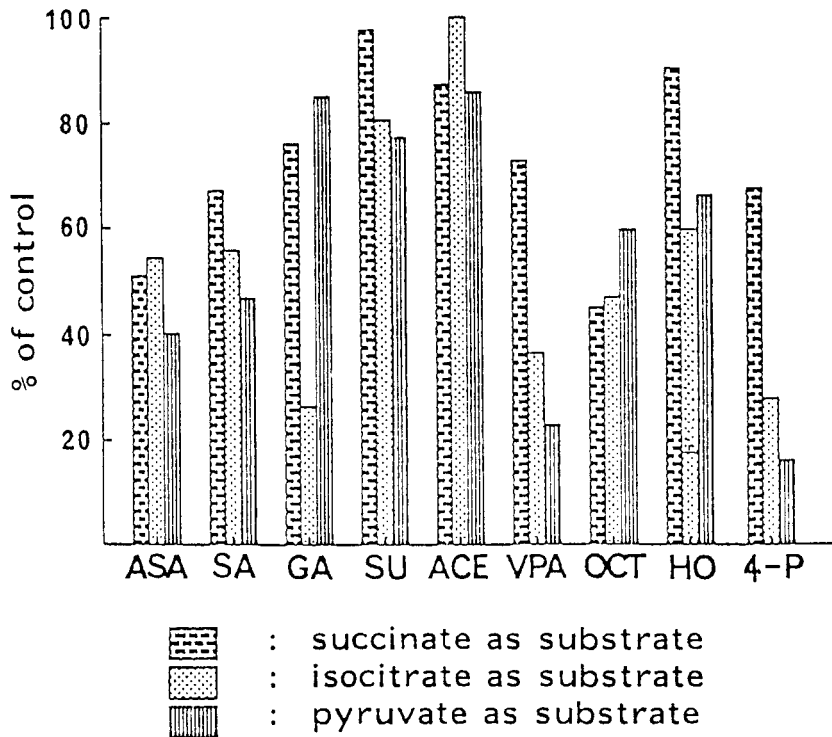


表1. コハク酸を基質とした場合の各電子伝達成分の還元量

CONDITION	5 min				10 min			
	FP	Cyt.b	Cyt.c+c ₁	Cyt.a+a ₃	FP	Cyt.b	Cyt.c+c ₁	Cyt.a+a ₃
CONTROL (n=6)	0.60±0.20	0.88±0.23	1.13±0.36	0.21±0.07	1.23±0.65	2.09±1.10	2.78±1.46	0.63±0.35
1.0mM ASA (n=4)	1.98±0.70	0.46±0.19	0.47±0.41	0.30±0.12	5.40±0.51	0.86±0.11	1.49±0.14	1.10±0.10
1.0mM SA (n=4)	1.98±0.64	0.26±0.07	0.12±0.09	0.04±0.01	5.57±0.74	0.83±0.10	1.54±0.16	1.05±0.11
1.0mM GA (n=3)	4.01±0.26	0.69±0.06	1.08±0.03	0.97±0.17	5.20±0.27	0.76±0.09	1.18±0.08	0.91±0.17
1.0mM SU (n=3)	4.62±0.16	0.76±0.05	1.24±0.06	1.15±0.07	5.42±0.25	0.74±0.06	1.34±0.06	1.07±0.06
1.0mM ACE (n=3)	4.10±0.46	0.72±0.04	1.17±0.05	1.17±0.59	5.10±0.36	0.79±0.02	1.29±0.05	1.13±0.09
2.0μM HO (n=3)	5.78±1.16	0.82±0.03	1.34±0.17	1.11±0.13	6.94±1.22	0.81±0.03	1.45±0.16	0.93±0.15
1.0mM 4-P (n=3)	3.53±1.05	0.65±0.15	1.09±0.18	1.08±0.16	4.91±0.90	0.80±0.12	1.26±0.10	1.20±0.11
0.5mM VPA (n=2)	1.74	0.16	0.23	0	5.03	0.69	0.15	0.31
1.0mM OCT (n=2)	0	0	0	0	0	0	0	0

substrate : succinate
 value : mean ± se (nmoles/mg-protein)
 * : p < 0.05
 ** : p < 0.01

表2. イソクエン酸を基質とした場合の各電子伝達成分の還元量

CONDITION	5 min				10 min			
	FP	Cyt.b	Cyt.c+c ₁	Cyt.a+a ₃	FP	Cyt.b	Cyt.c+c ₁	Cyt.a+a ₃
CONTROL (n=3)	6.13±0.70	0.91±0.10	2.50±0.05	1.41±0.09	7.47±0.50	0.84±0.08	2.38±0.07	1.52±0.06
1.0mM ASA (n=3)	4.03±0.87	0.52±0.23	1.60±0.63	0.86±0.40	6.54±0.32	0.88±0.04	2.35±0.04	1.37±0.12
1.0mM SA (n=3)	3.78±0.97	0.36±0.30	1.05±0.71	0.54±0.48	6.91±0.34	0.78±0.13	2.35±0.12	1.37±0.10
1.0mM GA (n=3)	7.76±1.23	0.82±0.10	2.18±0.23	1.31±0.17	8.08±1.78	0.80±0.11	2.30±0.25	1.39±0.09
1.0mM SU (n=3)	1.93±1.16	0.36±0.29	0.85±0.52	0.65±0.45	5.75±0.23	0.93±0.11	2.05±0.18	1.54±0.15
1.0mM ACE (n=3)	6.14±0.97	0.89±0.19	1.99±0.19	1.41±0.26	6.01±1.34	0.92±0.18	2.00±0.16	1.40±0.22
0.5mM VPA (n=3)	6.07±1.24	0.49±0.09	1.79±0.40	0.62±0.27	6.74±1.02	0.70±0.06	1.95±0.30	1.17±0.08
2.0μM HO (n=2)	8.00	0.53	2.58	0.83	8.39	0.55	2.71	0.73
1.0mM 4-P (n=2)	3.74	1.49	2.71	1.61	6.37	1.73	2.67	1.61
1.0mM OCT (n=2)	0	0	0	0	0	0	0	0

substrate : isocitrate
 value : mean ± se (nmoles/mgprotein)
 * : P < 0.05
 ** : P < 0.01

表3. ピルビン酸を基質とした場合の各電子伝達成分の還元量

CONDITION	i5 min				20 min			
	FP	Cyt.b	Cyt.c+c ₁	Cyt.a+a ₃	FP	Cyt.b	Cyt.c+c ₁	Cyt.a+a ₃
CONTROL (n=5)	7.21±0.08	1.04±0.14	2.66±0.12	1.67±0.17	8.39±0.16	1.16±0.15	2.73±0.14	1.57±0.24
1.0mM ASA (n=5)	1.47±0.48	0.01±0.01	0.02±0.02	0.01±0.01	5.64±0.99	0.72±0.18	2.03±0.47	1.21±0.32
1.0mM SA (n=5)	1.41±0.89	0.05±0.03	0.11±0.06	0.01±0.01	5.19±0.99	0.83±0.17	2.12±0.49	1.23±0.33
1.0mM ACE (n=3)	7.45±0.74	0.87±0.18	2.59±0.09	1.40±0.36	8.71±0.55	0.98±0.26	2.76±0.10	1.54±0.41
0.5mM VPA (n=3)	1.83±1.78	0.35±0.35	0.98±0.98	0.66±0.65	1.91±1.84	0.34±0.33	0.97±0.96	0.68±0.67
2.0μM HO (n=2)	7.65	0.22	2.86	0.45	8.77	0.34	2.86	0.60
1.0mM OCT (n=2)	0	0	0	0	0	0	0	0

substrate : pyruvate
 value : mean ± se (nmoles/mgprotein)
 * : p < 0.05
 ** : p < 0.01



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



要旨

1. Reye 症候群と関連があるといわれている脳症関連物質 9 種類についてラット肝ミトコンドリア呼吸鎖(flavoprotein、cytochrome b、cytochrome c+c1、cytochrome a+a)およびミトコンドリア ATP 含量へ及ぼす影響を検討した。
2. 脳症関連物質としてアセチルサリチル酸、サリチル酸、ゲンチジン酸、サリチル尿酸、アセトアミノフェン、ホバンテン酸ナトリウム、4 -キペンテン酸、バルプロ酸ナトリウム、オクタン酸を選んだ。
3. 脳症関連物質添加により、いずれもミトコンドリアの電子伝達は、反応初期に阻害されたが、古典的な電子伝達阻害剤とことなりその阻害効果は可逆的であった。
4. サリチル酸誘導体のうち、サリチル酸が電子伝達阻害効果が最も強かった。
5. アセトアミノフェンは、サリチル酸誘導体と異なり電子伝達阻害効果が殆ど見られなかった。
6. バルプロ酸ナトリウムには、軽度のしかもある程度不可逆的な電子伝達阻害効果があり、その阻害部位は NAD からコエンザイム Q 問に存在することが推測された。