

B-11 アセチルサリチル酸とその代謝産物およびアセトアミノフェンのミトコンドリアにおけるシトルリン合成に及ぼす影響

分担研究者 山下文雄 久留米大学 小児科
 共同研究者 荒牧修一・森田潤・古賀靖敏
 吉田一郎・芳野信 久留米大学 小児科

目的：アセチルサリチル酸は小児科領域において広く使用されている解熱鎮痛剤である。しかし、最近、肝障害、高アンモニア血症を起こす事、さらにライ症候群との因果関係などが注目されている。そこで、アセチルサリチル酸（ASA）およびその代謝産物である、サリチル酸（SA）、ゲンチジン酸（GA）、サリチル尿酸（SuA）ならびに、最近比較的副作用が少ないといわれているアセトアミノフェンについてミトコンドリアにおけるシトルリン合成阻害の程度について検討した。いっぽう、サリチル酸に関しては、脱共役作用、ATP生成の阻害の報告がある。このことより、カルバミルリン酸合成能の低下、またミトコンドリア内外のイオン隔差の生成障害によりミトコンドリア内へのオルニチン転送の障害をおこす可能性がある。そこでサリチル酸のシトルリン合成阻害にこれらの因子がどの程度関与しているかを検討した。

方法：1. ラット肝ミトコンドリア分画の採取：ウイスター系オスラット（250-350g）を約24時間絶食後、断頭、直ちに肝を摘出し、Schneider法に準じてミトコンドリア分画を採取した¹⁾。

2. シトルリン合成能の測定：反応液は6.75mM KH_2PO_4 、1mM MgCl_2 、10mM ornithine、10mM NH_4HCO_3 、50mM Tris-HCl buffer、pH7.4、ミトコンドリア分画5mg、酸化基質として5mM glutamate、さらに各種濃度のASA、SA、GA、SuA、またはアセトアミノフェンのいずれかを添加し、総量2mlとした。37℃、15分インキュベーション後1M PCA 0.5mlを加え反応

を停止させ、上清中シトルリンをGrisoliaらの方法に従って比色定量した²⁾。なお測定毎に0-0.8 $\mu\text{mol}/\text{tube}$ の検量曲線を作製した。

3. N-acetylglutamateの定量：ミトコンドリア分画8mgをシトルリン合成と同じ組成の反応液に10mM glutamateを添加し、総量0.5mlとした。37℃、15分インキュベーション後、1.8N HCl 0.1mlにて反応停止させ、上清0.4mlをKOHにてpH7.1-7.2に調整した。この反応液0.6mlを用いてZollnerらの方法に準じてCPSIの活性化によりN-acetylglutamate濃度を定量した³⁾。測定毎に0-50nmol/tubeのN-acetylglutamate標品で検量曲線を作製した。

4. N-acetylglutamate合成酵素活性の測定：可溶化ミトコンドリア上清(タンパク0.8mg)、1mM [U-¹⁴C] glutamate (0.5 $\mu\text{Ci}/\text{assay}$)、0.5mM acetyl-CoA、1mM EDTA、50mM Tris-HCl buffer、pH8.2からなる総量0.1mlの反応液を37℃、30分インキュベーションした。5 μmole の非標識N-acetylglutamateを含む1M HCOOH 50 μl で反応を停止させ、Shigesadaらの方法に準じて、生成したAGAを精製し、その分画への放射能の取込みにもとづき活性を測定した⁴⁾。

5. サリチル酸のシトルリン合成阻害に及ぼす外因性ATPの効果：シトルリン合成と同じ組成に5mM ATP、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oligomycine、0.04mM 2,4-dinitrophenol、さらに1mM サリチル酸を添加し、生成したシトルリンを測定した。

6. ミトコンドリア内へのornithine転送の測定：ミトコンドリア分画2mg、210mM mannitol、70mM sucrose、5mM KH_2PO_4 、0.5mM aminoxyacetate、[1-³H] sucrose 0.2 μCi 、[¹⁴C] L-ornithine 0.5mM-10mM (0.05 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$)、1mM Tris-HCl buffer pH7.4、および酸化基質として5mM glutamate、あるいはsuccinateを添加した。37℃、2分インキュベーション後、吸引ろ過法にて採取したミトコンドリア分画に取り込こまれた放射能を測定した⁵⁾。

7. ミトコンドリアのタンパク濃度はLowry法にて測定した。

結果：1. シトルリン合成に及ぼす効果：シトルリン合成阻害効果はサリチル酸が最も強く、1 mMでシトルリン合成はコントロールの35%と著減した。アセチルサリチル酸は1 mMでコントロールの80%と軽度の阻害が認められたが、ゲンチジン酸、サリチル尿酸では1 mMで有意の阻害は認められなかった。またアセトアミノフェンは1 mMまでは阻害効果は認められなかったが、10 mMではコントロールの42%に減少した。また、サリチル酸とアセチルサリチル酸は濃度が上昇するにつれて阻害効果は増強する傾向にあった。(図1)

今回、いわゆる解熱に対する有効血中濃度と同じ濃度で有意の阻害が認められたサリチル酸のシトルリン合成阻害の機序についてさらに検討した。

2. SAのシトルリン合成阻害に及ぼす外因性ATPの効果：*oligomycine*+2、4-dinitrophenolの存在下にATPを加え、シトルリン合成に及ぼす1 mMサリチル酸の効果を見た。(図2) No. 1-4のカラムは外因性のATPを添加していない群、No. 5-8のカラムは外因性のATPを添加した群である。ATP非添加群No. 1-4では、1 mMサリチル酸添加でNo. 1のコントロールの50%と減少した。また*oligomycine*+2、4-dinitrophenol添加のみでもシトルリン合成は阻害された。さらに、サリチル酸と*oligomycine*+2、4-dinitrophenolによるシトルリン合成阻害は相加的でないことから、サリチル酸によるシトルリン合成阻害の機序は*oligomycine*+2、4-dinitrophenolの作用と共通の部分があることが推測される。また、ATP添加群No. 5-8では1 mMサリチル酸添加でNo. 5のコントロールの68%と阻害されたが、No. 8の*oligomycine*+2、4-dinitrophenol添加群ではコントロール以上に回復した。このことはサリチル酸のシトルリン合成阻害の機序に少なくとも部分的にはミトコンドリア内ATP準位の減少が関与していることを示唆する。しかし、ATP添加群でさらに*oligomycine*+2、4-dinitrophenolを添加したNo. 8と添加していないNo. 7を比較して、サリチル酸添加でシトルリン合成が阻害されたことより、ATP減少以外の機序も関与していることが推測される。(図2)

3. N-acetylglutamateとN-acetylglutamate合成酵素活性におよぼす効果：1 mMのサリチル酸の存在下でN-acetylglutamate生成はコントロールの75%と減少したが、N-acetylglutamate合成酵素活性は影響を受けなかった。(図3)

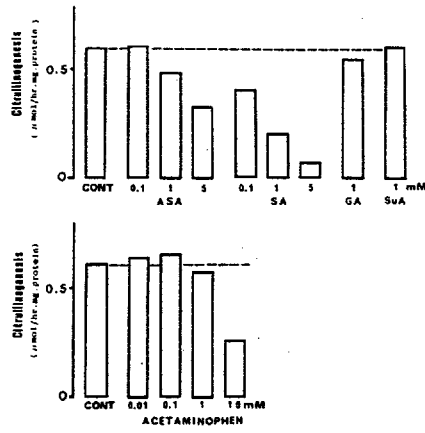
4. ミトコンドリア内へのオルニチントランスポートの測定：5 mMのsuccinate、glutamateを酸化基質とした場合のオルニチンのミトコンドリア内へのトランスポート

をLineweaver-Burkのplotで示した。succinateでは、コントロールと1mMサリチル酸添加群で差はなかった。しかし、glutamateを酸化基質とした場合、非拮抗阻害が認められた。(図4)

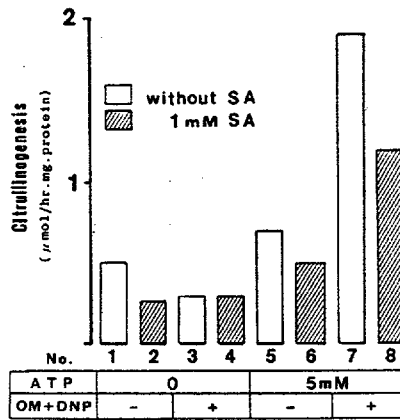
考察：アセチルサリチル酸、およびその代謝産物の中ではサリチル酸が最も強いシトルリン合成阻害効果を示した。その機序について、Glasgowらはミトコンドリア内ATP準位の低下によると報告している⁶⁾。いっぽう、Aprilleらもサリチレートがadenine nucleotide translocaseを阻害すると報告している⁷⁾。今回われわれもサリチル酸がシトルリン合成阻害をおこすことを示したが、その機序はミトコンドリア内ATP準位の低下以外にミトコンドリア内N-acetylglutamate準位の低下、および呼吸にカップルしたミトコンドリア内へのオルニチントランスポートの非拮抗阻害の関与も考えられた。

文献

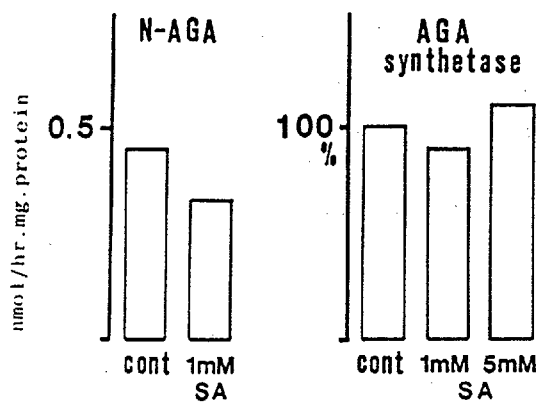
- 1)Hogeboom,G.H.,Schneider,W.C.and Pallade,G.E., J.Biol.Chem.,172-619,1948.
- 2)Hunninghake,D. and Grisolia,S.,Ann.Biochem.,16,200-205,1966.
- 3)Zollner,H.,Biochem.Biophys.Acta.,676,170-176,1981.
- 4)Shigesada,K.,Tatibana,M.,J.Biol.Chem.,246,5588-5595,1971.
- 5)Gamble,J.G.,Lehninger,A.J.,J.Biol.Chem.,248,610-618,1973.
- 6)Glasgow,A.M.,Peter Chase,H.,Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,155,48-54,1977.
- 7)Aprille,J.R.,J.Nat.Reye's Syndrome.Found.,2,56-60,1981.



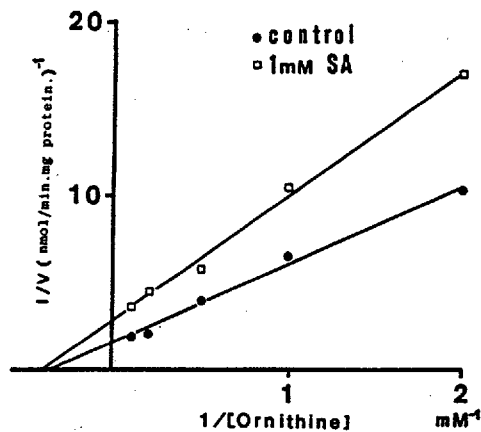
(図1) サリチル酸とその代謝産物、およびアセトアミノフェンのシトルリン合成に及ぼす効果。



(図2) サリチル酸によるシトルリン合成阻害に及ぼす外因性ATPの効果。



(図3) N-ACETYLGLUTAMATE合成、および
N-ACETYLGLUTAMATE合成酵素活性に及ぼす
サリチル酸の効果。



(図4) グルタミン酸を酸化基質とした
ミトコンドリア内オルニチントランスポートに
およぼすサリチル酸の効果。

(Lineweaver-Burkのplot)



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



目的: アセチルサリチル酸は小児科領域において広く使用されている解熱鎮痛剤である。しかし、最近、肝障害、高アンモニア血症を起こす事、さらにライ症候群との因果関係などが注目されている。そこで、アセチルサリチル酸(ASA)およびその代謝産物である、サリチル酸(SA)、ゲンチジン酸(GA)、サリチル尿酸(SuA)ならびに、最近比較的副作用が少ないといわれているアセトアミノフェンについてミトコンドリアにおけるシトルリン合成阻害の程度について検討した。いっぽう、サリチル酸に関しては、脱共役作用、ATP 生成の阻害の報告がある。このことより、カルバミルリン酸合成能の低下、またミトコンドリア内外のイオン隔差の生成障害によりミトコンドリア内へのオルニチン転送の障害をおこす可能性がある。そこでサリチル酸のシトルリン合成阻害にこれらの因子がどの程度関与しているかを検討した。