

B-12 バルプロ酸ナトリウムによる分離ラット肝ミト コンドリアにおけるシトルリン合成阻害の機序 —その阻害に対するアルギニン, L-カルニチンの効果—

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 久留米大学 小児科

Sodium valproate (VPA) が分離ミトコンドリアにおける, citrulline 合成を阻害する機序, および, citrulline 合成阻害にたいする arginine, L-carnitine の回復効果を検討した.

1) ミトコンドリアの citrulline 合成は, pyruvate, glutamate を酸化基質とした場合, 有意の阻害をしめた.

2) ATP 生成は, pyruvate を酸化基質とした場合, VPA で阻害された. この阻害は, arginine, L-carnitine 添加で, 軽度回復した.

3) N-acetylglutamate 合成酵素活性は, VPA で阻害されなかったが, みかけの N-acetylglutamate は著減した. また, arginine で, N-acetylglutamate 合成酵素活性は, 約 2.4 倍に増加をしめし, みかけの N-acetylglutamate 濃度も約 4.5 倍に増加した. しかし, L-carnitine 添加では, 両者とも, 有意の回復はしめさなかった.

4) ミトコンドリア内への ornithine 転送へ与える VPA の効果は, pyruvate を酸化基質とした場合, 影響はなかったが, succinate を基質とした場合は, 軽度, 非拮抗阻害のパターンがみとめられた.

以上より, VPA の citrulline 合成阻害の機序は, 主として, ミトコンドリア内の N-acetylglutamate 含量の低下であることをしめた. また, VPA の阻害効果は, arginine で回復したことから, 臨床でも VPA で誘発された高アンモニア血症が arginine の投与で回復することが期待される.

はじめに

sodium valproate (n-dipropylacetate, VPA) は, 比較的新しい抗けいれん剤である¹⁾²⁾. 本剤の投与中の患者に種々の程度の高アンモニア血症が見られることが報告されている³⁾⁻⁷⁾. その機序として, (1) 肝ミトコンドリアにおける citrulline 合成の障害⁸⁾, (2) 腎によるアンモニア生成の増加⁹⁾¹⁰⁾ が推測されている. 今回, われわれは, ラット肝ミトコンドリアをもちいて, VPA による, citrulline 合成阻害の機序について検討した. citrulline 合成の調節に関する因子として, carbamylphosphate synthetase-I (CPS-I), ornithine transcarbamylase (OTC) 活性, ミトコンドリア内の N-acetylglutamate

(AGA) 濃度や, ATP の準位, ornithine のミトコンドリア内への転送などがかんがえられる. そこで, われわれは, VPA によって誘発される高アンモニア血症の機序に, これらの因子のどれがどの程度関与しているかを検討した.

Coudéらは, おそらくは, acetyl-CoA の濃度の低下を介して, VPA が, ミトコンドリア内の AGA 濃度を低下させることを報告している⁸⁾. ところで, arginine は, N-acetylglutamate 合成酵素の activator であることが知られている¹¹⁾¹²⁾. また, L-carnitine は, 長鎖脂肪酸と結合して, acylcarnitine としてミトコンドリア内に転送するのに必要な物質である¹³⁾. いっぽう, L-carnitine は, ミトコンドリア

内で, acyl-CoA と結合し, CoA-SH を再生産する効果をもつ¹⁴⁾. 以上の事実にもとづき, arginine および, L-carnitine が, VPA による citrulline 合成阻害を回復させるか否かを検討した.

実験材料および方法

1. 実験材料

(1) 動物

ウイスター系雄ラット (体重 150~250 g) を用いた.

(2) 試薬

[¹⁴C] NaHCO₃ (7.7 mCi/mmol), [¹⁴C] L-glutamate (294.0 mCi/mmol), [¹⁴C] L-ornithine (266.0 mCi/mmol), [¹⁻³H] sucrose (10.1 Ci/mmol) は New England Nuclear 社 (Boston) より購入した. [¹⁴C] NaHCO₃ は使用直前に 10 mM HEPES-KOH buffer, pH 7.2 で 0.5 μCi/50 μl とするよう調整した.

[¹⁴C] L-ornithine の原液は, 非標識 L-ornithine を添加して, specific activity が 0.05 μCi/μmol とするよう調整した. また, [¹⁻³H] sucrose の原液は 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM KH₂PO₄ をふくむ 1 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 で specific activity が 0.29 μCi/μmol になるよう希釈した. sodium valproate は協和発酵より恵与いただいた.

ADP および ATP 測定キットは Boehringer-Mannheim 社, L-carnitine, bovine serum albumin (fraction V) は Sigma 社, 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 (Fig. 1)

ラットを約 20 時間絶食後, ether 麻醉下で断頭, 脱血し, ただちに肝を摘出, 氷冷した Medium 1 で 2~3 回洗浄後, 血管, 被膜, 脂肪組織を取り除き, ろ紙で水分を吸着し, 重量を測定した. ついで, Medium 1 中で細断後, Schneider の変法¹⁵⁾ に従い, ミトコンドリアを分離した. sucrose が citrulline の比色に影響を与えるため, 得られたミトコンドリア分画は Medium 2 で 2 回洗浄の後, 実験に用いた.

(2) citrulline 合成能の測定

ミトコンドリア分画 3~5 mg に反応液 (6.75 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 10 mM ornithine, 10 mM NH₄HCO₃, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4) を

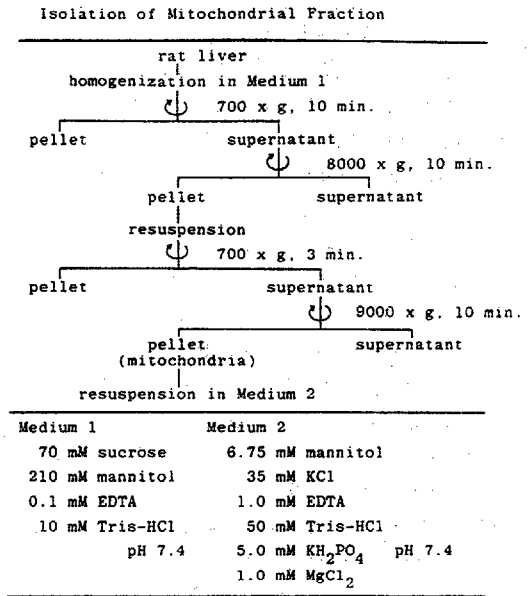


Fig. 1. Isolation of mitochondrial fraction

加え, さらに酸化基質として, 5 mM pyruvate, succinate, glutamate のいずれか, さらに, 0.5 mM VPA, 1 mM arginine および, 1 mM carnitine のいずれか, または, VPA と他の 2 者のいずれかを添加し, 総量 2.0 ml とした. 37°C, 15 分間インキュベーション後, 0.5 ml 1 M PCA で反応を停止させ, 3000 rpm, 5 分間遠心分離後, 上清 1.0 ml を用いて Grisolia らの方法¹⁶⁾ に準じて citrulline を定量した. 測定ごとに 0~0.8 μmol/tube の濃度の citrulline の標準曲線を作成した. インキュベーション時間は, 5~20 分, タンパク量は 3~9 mg/incubation の範囲で citrulline 生成量は直線的であった.

(3) N-acetylglutamate (AGA) の定量

Shigesada らの方法¹⁷⁾ を改変した Zollner らの方法¹⁸⁾ に準じて測定した. 反応液の組成は, 検体 0.4 ml, 20 mM ornithine, 15 mM MgCl₂, 20 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.5 μCi [¹⁴C] NaHCO₃, 5 mM ATP, 2~3 mg の CPS-I+OTC 酵素源, 100 mM HEPES-KOH buffer, pH 7.2 で総量を 1.2 ml とした. 37°C, 15 分インキュベーション後, 60% PCA 0.1 ml で反応を停止させた. 3000 rpm, 5 分間遠心, 上清 1.0 ml を 10 分煮沸後, 室温にて, 20 分放置後, 0.8 ml をとり, Bray シンチレーション液

10 ml を加え、酸安定分画にとりこまれた ^{14}C の放射能より AGA 量を測定した。

CPS-I + OTC 酵素源として肝 1 g 相当のミトコンドリア分画に、氷冷した 0.1% CTAB, 0.5 mM dithiothreitol をふくむ 20 mM Hepes-NaOH buffer (pH 7.2) 0.5 ml を加え、氷冷下でガラス-テフロンホモジナイザーで 1 分、3 ストロークホモジナイズし、その後、9000×g, 10 分間遠心、上清を Visking Company 製 seamless cellulose tubing 20/32 透析膜を用い、氷冷した透析液 (0.5 mM dithiothreitol, 20 mM Hepes-NaOH buffer, pH 7.2) にて一昼夜透析したものをもちいた。

以上の測定条件下で、CPS-I + OTC 酵素源タンパク量 0.5~2 mg の範囲で、酸安定分画へとりこまれた ^{14}C の放射能は直線関係が得られた。また測定ごとに 0~50 nmol/incubation の濃度の AGA 標品をもちい、標準曲線を作成した。

本測定法では、その原理上、CPS-I の阻害物質や、活性物質が共存する場合、真の AGA 量を表わさないで、以下の AGA 量はみかけの AGA 量を表わすものとする。

(4) N-acetylglutamate 合成酵素活性の測定

Shigesada らの方法¹⁷⁾ に準じて、可溶化ミトコンドリア上清 0.5~0.8 mg, 1.0 mM glutamate (0.5 $\mu\text{Ci}/\text{incubation}$), 0.5 mM acetyl-CoA, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.2 からなる総量 0.1 ml の反応液を 37°C, 30 分インキュベーションした。5 μmoles の非標識 AGA を含む 1 M HCOOH 50 μl で反応停止させ、 ^{14}C L-glutamate の ^{14}C の AGA 分画の取り込みにもとずき、活性を測定した。なお原法のろ紙クロマトグラフィーのかわりにケイ酸薄層クロマトグラフィー (Merck 社製 Kieselgel 60) によって生成した AGA を分離精製した。この薄層プレートでの AGA の Rf は、第 1 回目の展開では 0.3, 第 2 回目の展開では 0.6 であった。いずれも展開終了後、プレートを乾燥させ、0.02% bromophenol blue ethanol 液を噴霧して、AGA の spot を検出し、その部分のケイ酸を剝離した。

さらに、2 回目の剝離後、1 ml の水で抽出し、10 ml の Bray シンチレーション液を加えて放射能を測定した。

本測定法では、N-acetylglutamate の濃度と、インキュベーション時間、タンパク量はそれぞれ 10~

60 分、0.5~0.8 mg/incubation の範囲で直線関係が得られた。

(5) ミトコンドリア分画の N-acetylglutamate (AGA) 準位および AGA 合成酵素活性にあたる VPA の影響

a) ミトコンドリア内 AGA 濃度にあたる影響

ミトコンドリア分画 10~15 mg に 2) とおなじ反応液および 0.5 mM acetyl-CoA, 10 mM glutamate を添加し、pH 7.2 に調整、さらにあらかじめ pH 7.2 に調整した VPA および arginine, または L-carnitine を添加し、総量を 0.4 ml とした。37°C 10 分間インキュベーション後、0.1 ml の 1.8 N HCl を添加、ただちに氷冷し、反応を停止させた。4°C にて、3000 rpm, 5 分遠心し、上清 0.3 ml をとり、KOH にて pH 7.1~7.2 に調整し、総量を 0.5 ml とした。この反応液 0.4 ml をもちいて、上記の Shigesada ら、Zollner らの方法を用いて AGA 量を測定した。

b) AGA 合成酵素活性におよぼす影響

ミトコンドリア分画を Medium 2 に 50 mg/ml とするよう懸濁し、氷冷下にて Cell Disruptor (Heat Systems Ultrasonics, Inc.) にて、20 KHz 10 秒間の超音波処理を 3 cycle 行ない、9000×g 20 分遠心後、pH を 8.2 に調整した。この上清を用い、結果の項に示すように、VPA, arginine および L-carnitine の添加時の AGA 合成酵素活性を検討した。

(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 2 mg に反応液 (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM aminooxyacetate, $[1\text{-}^3\text{H}]$ sucrose 0.2 μCi , ^{14}C L-ornithine 0.5~10 mM (0.05 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) をふくむ 1 mM Tris-HCl buffer pH 7.4), および酸化基質として、5 mM pyruvate または succinate を添加した¹⁹⁾²⁰⁾。37°C 2 分間インキュベーション後、孔径 0.45 μm のセルロースアセテートメンブレンフィルター (Sartorius 社製) をもちいた吸引ろ過法により、フィルター上にミトコンドリア分画を回収した。氷冷した洗浄液 (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM Tris-HCl buffer pH 7.4) 5 ml で試験管内を 2 回洗浄し、さらに、10 ml で 2 回フィルターを洗浄後、過剰の水分を吸引除去し、フィルターを counting vial に入れ、一昼夜乾燥させた。ついで 15 ml の Bray シンチレーション

ン液をくわえ、フィルターを完全に溶解し、液体シンチレーションカウンターにて ^{14}C , ^3H の放射能を測定した。インキュベーション時間を0とした反応液をブランクとした。ミトコンドリア外液量は $[1\text{-}^3\text{H}]$ sucroseの放射能にもとづき補正した。ミトコンドリア分画2mgをもちいた測定では、1~3分の範囲で直線関係がえられた。ここでは、ornithine転送量は便宜上、ミトコンドリア内に転送されたornithineとミトコンドリア外膜に付着したornithineの総和を表わすものとする。

(7) ATP 測定

ミトコンドリア分画2mgをMedium 2に懸濁し、5mM ADPを加え、酸化基質として5mM pyruvate, succinate, glutamateのいずれか、0.5mM VPA, さらに1mM arginineまたは0.1mM L-carnitineを添加し、総量を1.0mlとした。37°C 15分間インキュベーション後、0.5mlの1M PCA添加により反応を停止させた。3000 rpm, 5分間遠心したのち、上清0.1mlを用いてATPテスト®にて測定した²¹⁾。

(8) タンパク測定

bovine serum albumin fraction V (Sigma 社)を標準とし、Lowry法²²⁾にて測定した。

結 果

1. citrulline 合成におよぼす VPA, arginine, L-carnitine の効果

ミトコンドリアにおけるcitrulline合成のVPAによる阻害は、pyruvateまたはglutamateを酸化基質とした場合は、それぞれ $P < 0.01$, $P < 0.05$ で有意の阻害がみとめられた。succinateを酸化基質としたときにはcitrulline合成は、VPA添加によって減少傾向を示したが、 $P < 0.05$ の水準では、有意の阻害効果を示さなかった (Table 1)。

また、pyruvate, glutamateを基質とした場合、VPAの濃度が0.1, 0.5, 1.0 mMと上昇するにつれて、阻害効果は、それぞれ対照の70%から50%, 80%から55%に増大する傾向にあった。

citrulline 合成におよぼす arginine の効果を検討するために、5mM pyruvate を酸化基質として、arginine を0.1~10 mM までの種々の濃度で添加し、citrulline 合成をおこなわせた。arginine の濃度が0.1~3.0 mM で約2倍の増加を示したが、1.0

mM の時、citrulline 合成増加がもっとも顕著であった (Fig. 2)。そこで以下の arginine 濃度は1.0 mM で検討した。

pyruvate, glutamate を酸化基質とした場合、VPA による citrulline 合成阻害は1.0mM arginine の添加で、それぞれ対照に比し、76%から146%, 81%から113%に回復した (Table 2)。ところが、

Table 1 Effects of VPA on citrulline synthesis

Compounds added (5 mM)	Citrulline formed ($\mu\text{mol/hr. mg protein}$)	
	None	0.5 mM VPA
Pyruvate	0.514 \pm 0.012	0.312 \pm 0.029 (**)
Succinate	0.435 \pm 0.036	0.370 \pm 0.043 (5)
Glutamate	0.709 \pm 0.064	0.501 \pm 0.050 (*)(6)

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; Numbers in parentheses indicate those of experiments.

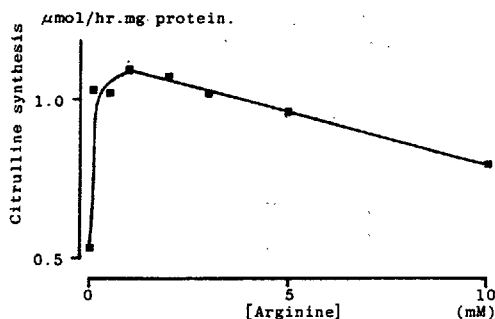


Fig. 2. Effect of varying concentrations of arginine on citrulline synthesis with pyruvate as substrate

Table 2 Effects of VPA and the addition of arginine on citrulline synthesis

Compounds added (5 mM)	Citrulline formed (%: Mean \pm SE)		
	None	0.5mM VPA	0.5mM VPA + 1mM Arginine
Pyruvate	100	76 \pm 6	146 \pm 40 (3)
Succinate	100	91 \pm 14	105 \pm 28 (4)
Glutamate	100	81 \pm 5	113 \pm 18 (2)

Numbers in parentheses indicate those of experiments.

L-carnitine の添加では、0.1, 1.0, 10mM のいずれの濃度においても回復はみとめられなかった (Fig. 3).

2. ATP 生成におよぼす VPA, arginine, L-carnitine の効果 (Fig. 4)

酸化基質が pyruvate の場合, ATP 生成量は VPA を添加していない対照に比較して 45% と有意に低下した。しかし, succinate, glutamate を基質とした場合, それぞれ 80%, 85% と有意の阻害はみとめられなかった。また, pyruvate を酸化基質とした場合,

1.0mM arginine, 0.1mM L-carnitine 添加により, それぞれ対照の 63%, 66% と阻害の回復傾向を認めたが, 完全には回復しなかった。

3. AGA 合成酵素活性におよぼす VPA, arginine, L-carnitine の効果 (Table 3)

0.5mM VPA の添加で, AGA 合成酵素活性は VPA を添加していない対照と有意の差はなかった。VPA にさらに arginine を添加したところ, AGA 合成酵素活性は対照の約 2.4 倍に上昇した。しかし L-carnitine 添加では軽度低下傾向を示した。

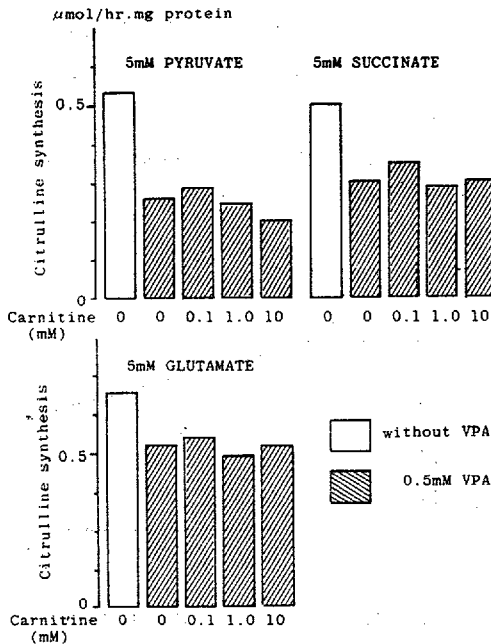


Fig. 3. Effects of VPA, and the addition of carnitine on citrulline synthesis

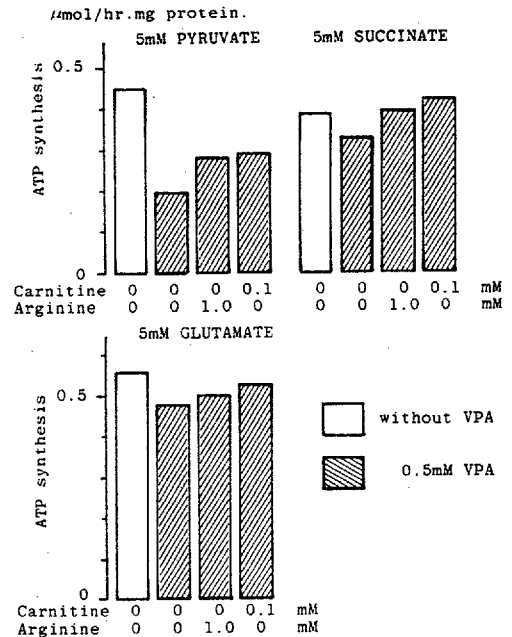


Fig. 4. Effects of VPA, arginine and carnitine on ATP synthesis

Table 3 Effects of the addition of VPA, arginine and carnitine on AGA synthetase activity and the concentration of AGA-like substance

Compounds added	AGA synthetase activity (%)	AGA like substance (%)
None	100	100
0.5 mM VPA	107	11
0.5 mM VPA+1mM Arginine	241	445
0.5 mM VPA+1mM carnitine	79	18

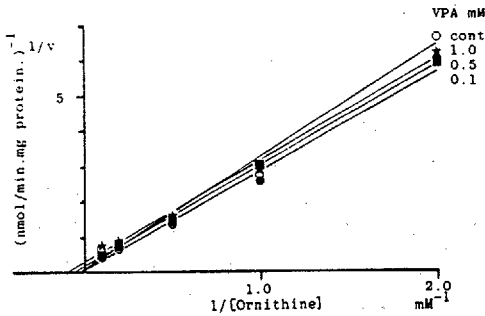


Fig. 5. Effect of VPA on ornithine transport supported by pyruvate

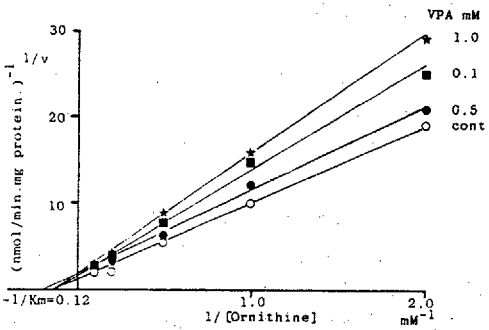


Fig. 6. Effect of VPA on ornithine transport supported by succinate

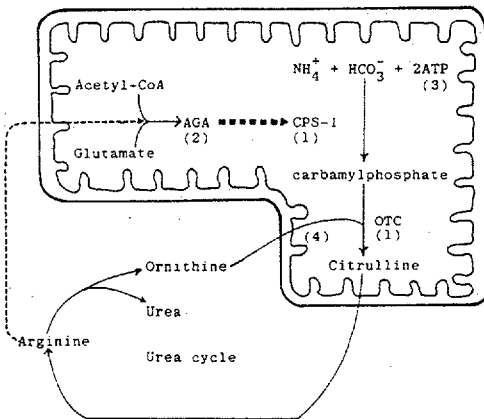


Fig. 7. Metabolic pathway of urea synthesis

4. みかけの AGA 量によらず VPA, arginine, L-carnitine の効果 (Table 3)

VPA の添加により, なにも添加していない対照の 11% と著明に低下した. VPA にさらに arginine を添加したところ, みかけの AGA 量は, 約 4.5 倍に上昇した. しかし VPA に L-carnitine を添加しても対照の 18% と低値のままであった.

5. ミトコンドリア内への ornithine 転送にあたる VPA の効果

Fig. 5, 6 は pyruvate, succinate を酸化基質として添加した場合のミトコンドリア内への ornithine 転送速度を Lineweaver-Burk のプロットでしめたものである. pyruvate を酸化基質とした場合, 対照と VPA 0.1, 0.5, 1.0 mM 添加群で有意の差はなかった. succinate を酸化基質とした場合, 添加 VPA 濃度が上昇するにつれて, 軽度の非拮抗的阻害のパターンをしめた.

考 察

分離肝ミトコンドリアにおける citrulline 合成の調節にかかわる因子として, Fig. 7 に示すように (1) CPS-I, OTC の活性, (2) CPS-I の活性化因子である AGA の濃度, (3) ATP の準位, (4) ornithine のミトコンドリア内への転送が考えられる. VPA は AGA 減少を介して CPS-I の活性化を阻害する事が報告されている⁸⁾. 今回の実験結果でも VPA はミトコンドリア内のみかけの AGA 濃度の減少をおこす事が証明された.

AGA 合成酵素活性が VPA で阻害されない (Table 3) ことを考慮すると, VPA によるミトコンドリア内の AGA 含量の低下の機序は, (1) AGA 合成酵素の基質となる acetyl-CoA または glutamate の準位の減少, (2) valproyl-CoA またはその代謝産物の CoA 誘導体が AGA 合成酵素の基質となり, valproylglutamate などが生成し, AGA による CPS-I の活性化を阻害する, の 2 つが考えられる. Becker らは, VPA はラット肝細胞において CoA-SH, acetyl-CoA を減少させ, 中鎖 acyl-CoA (主として valproyl-CoA とその誘導体の CoA ester) を増加させると報告している²³⁾. このことから VPA によってミトコンドリア内の acetyl-CoA 準位が低下し, 結果的に生成される AGA の量が減少することが推測される. いっぽう, Shigesada ら²²⁾, Sonoda ら²⁴⁾

によれば、AGA 合成酵素は、基質特異性が高く、acetyl-CoA 以外の CoA ester, acetylcarnitine などは acyl donor としては殆ど作用しない (acetyl-CoA の 1~数%)。本酵素の valproyl-CoA に対する基質親和性は知られていない。しかし、以上の Shigesada らの報告から推察すると、ミトコンドリア内 valproylglutamate などの物質が生成して CPS-I 活性を阻害する可能性は低いと考えられる。以上から、VPA によってひきおこされるみかけの AGA 濃度の減少は acetyl-CoA の単位の低下が主な原因と考えられる。

pyruvate を酸化基質とした場合、ATP 生成は、VPA 添加によって、著明に阻害された。いっぽう、succinate, glutamate を基質としたときには、有意の阻害を認めなかったが、20% 程度の低下が見られた。このことから、これらの基質の酸化から ATP 生成までの過程のどこかを VPA が阻害するか、または ATP の消費を促進させることが考えられる。

Benavides ら²⁵⁾ は、VPA は呼吸鎖、TCA サイクル酵素には影響をあたえないとのべている。いっぽう、VPA は脱共役作用を有することが報告されている²³⁾²⁶⁾。これは VPA が有機陰イオンとして作用し、ミトコンドリア内外の水素イオン濃度勾配形成を阻害するためと推測される²⁵⁾。さらに、VPA は *in vitro* で肝細胞内の CoA-SH 単位の低下をおこす²³⁾。これらの機序による酸化基質の酸化抑制が、VPA による ATP 生成低下の機序に関与していると推測される。さらに VPA による ATP 生成阻害が、pyruvate を酸化基質とした場合、特に著明であったのには、VPA が pyruvate のミトコンドリア内への転送を阻害するという機序が関与していると推測される²⁵⁾。

VPA による citrulline 合成阻害は、1 mM arginine の添加で対照以上の値まで回復し (Table 2)、さらに、AGA 合成酵素活性も arginine 添加で対照の 2.4 倍まで上昇した (Table. 3)。arginine が AGA 合成酵素の活性化因子であることは確立されている¹¹⁾¹²⁾。したがって、VPA による citrulline 合成阻害の arginine による回復は AGA 合成酵素活性上昇が大きく関与していると推定される。

VPA による citrulline 合成阻害は L-carnitine によって改善されなかった。いっぽう、pyruvate を酸化基質とした ATP 生成阻害は L-carnitine で軽度改善を示した。C₂~C₁₂ の acyl-CoA と L-carni-

tine の結合を触媒するカルニチン中鎖アシルトランスフェラーゼ活性はミトコンドリアよりもペルオキシゾームのほうが高く、いっぽうカルニチンアセチルトランスフェラーゼはミトコンドリア、ペルオキシゾーム、小胞体のいずれにも存在する¹⁴⁾。これらのことから全肝細胞または全動物のレベルでは VPA の存在下で carnitine は主としてペルオキシゾームの酵素の作用によって VPA またはその代謝産物の acyl-CoA と結合し、それらを acetylcarnitine として除去し、同時に CoA-SH の再生をうながす効果があると考えられる。いっぽう、カルニチンアセチルトランスフェラーゼの触媒作用によって acetyl-CoA とも結合し、acetylcarnitine となる。この結果、acetyl-CoA の準位を低下させ、反面、CoA-SH の再生効果も有すると考えられる。

本実験のように分離ミトコンドリアを用いた場合、ミトコンドリア分画はカルニチン中鎖アシルトランスフェラーゼの活性が低く、いっぽう、カルニチンアセチルトランスフェラーゼ活性は充分存在するため acetylcarnitine 生成はおこるが、VPA やその代謝産物の acetylcarnitine としての除去効果は弱いと考えられる。これらの結果、CoA-SH 準位は上昇し、いっぽう、acetyl-CoA は相対的に減少すると推測される。これにより低いレベルでの CoA-SH で律速されていたミトコンドリアの酸化基質の酸化が回復し、ATP 生成は増加する。その反面、acetyl-CoA 準位は低下するため、citrulline 合成は carnitine 添加では不変か、pyruvate を基質とした場合のように、carnitine が高濃度になるとむしろさらに阻害されるものと考えられる。

ミトコンドリア内への ornithine の転送の機構には、(1) 細胞内呼吸と連係した転送機序 (Gamble and Lehninger の説¹⁹⁾) と、(2) ミトコンドリア内の citrulline との交換 (ornithine-citrulline antiporter 説²⁷⁾) の 2 つが提唱されている。VPA がミトコンドリア内外での水素イオン勾配の形成を阻害する効果をもつ可能性が示唆されている²⁵⁾ ことから、本実験では (1) の機構について検討した。

ornithine の転送は、succinate を酸化基質とした場合に VPA によって軽度阻害されたがその程度は著明ではなかった。肝における ornithine の濃度は 0.3 mM²⁸⁾ 程度であることが知られている。この値は、われわれの実験で得られた ornithine 転送の Km 値

(8 mM) より充分低値であるため、ミトコンドリアへの ornithine 転送における VPA の抑制効果はあまり大きな比重をしめないと考えられる。また、VPA が ornithine citrulline antiporter 機構にあたる影響は、不明である。これからの課題であろう。

本実験でもちいた VPA の濃度は多くの場合、0.5 mM (88 $\mu\text{g}/\text{ml}$) であった。これはヒトに VPA を投与した場合の、いわゆる有効血中濃度 (50~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)¹¹⁾ の範囲内である。このことから、今回の実験での *in vitro* で観察されたようなことが、*in vivo* でも起こりうる可能性が充分考えられる。また、arginine 濃度は本実験では 1 mM を使用したが、Shigesada らの報告¹¹⁾ およびわれわれの成績 (Fig. 2) でも arginine の生理的血中濃度よりわずかに高い 0.1 mM の低濃度でもかなりの citrulline 合成の昂進が認められるので、VPA 投与中の高アンモニア血症に対し、arginine 投与が血中アンモニア値を下げることも期待できるであろう。また、L-carnitine は、今回の分離ミトコンドリアを用いた実験では citrulline 合成阻害を回復させなかったが、肝細胞、*in vivo* のレベルでは有効である可能性はあると考える。

山下文雄教授のご指導、ご校閲に深謝する。直接指導いただいた芳野 信 講師およびご援助いただいた代謝部の諸先生に感謝する。また、sodium valproate を恵与下さった、協和発酵に感謝する。

なお、本研究は、厚生省心身障害研究費 (乳幼児期における原因不明疾患に関する研究 - 原因不明の脳症 (Reye 症候群等) に関する研究) の援助をうけた。

本論文の要旨は、第 27 回先天代謝異常学会 (昭和 59 年 10 月、札幌市) において発表した。

(久留米医学会誌, 47: 1485-1494, 1984 より転載)

文 献

- 1) Rall, T.W. and Schleifer, L.S.: Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: The pharmacological basis of therapeutics, (A.G. Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman, eds.), 6th ed., New York, MacMillan publishing Co., Inc., pp 462-464, 1980.
- 2) Browne, T.R.: Valproic acid. New. Engl. J. Med., 302, 661-666, 1980.
- 3) Coulter, D.L. and Allen, R.J.: Secondary hyperammonemia: a possible mechanism for valproate encephalopathy. Lancet, 1, 1310-1311, 1980.
- 4) Sills, J.A., Trefor Jones, R.H. and Taylor, W.H.: Valproate, hyperammonemia, and hyperglycinemia. Lancet, 2, 260-261, 1980.
- 5) Rawat, S., Borkowski, W.J. and Swick, H.M.: Valproic acid and secondary hyperammonemia. Neurology (Ny), 31, 1173-1174, 1981.
- 6) Zaret, B.S., Beckner, R.R., Marini, A.M., Wagle, W. and Passarelli, C.: Sodium valproate-induced hyperammonemia without clinical hepatic dysfunction. Neurology (Ny), 32, 206-208, 1982.
- 7) Murphy, J.V. and Marquardt, K.: Asymptomatic hyperammonemia in patients receiving valproic acid. Arch. Neurol., 39, 591-592, 1982.
- 8) Coudé, F.X., Rabier, D., Cathelineau, L., Grimber, G., Parvy, P. and Kamoun, P.P.: A mechanism for valproate-induced hyperammonemia. Pediatr. Res., 15, 974-975, 1981.
- 9) Warter, J.M., Brandt, C., Marescaux, C., Rumbach, L., Micheletti, G., Chabrier, G., Krieger, J. and Imler, M.: The renal origin of sodium valproate-induced hyperammonemia in fasting humans. Neurology (Ny), 33, 1136-1140, 1983.
- 10) Warter, J.M., Imler, M., Marescaux, C., Chabrier, G., Rumbach, L., Micheletti, G. and Krieger, J.: Sodium valproate-induced hyperammonemia in the rat: role of the kidney. Eur. J. Pharmacol., 87, 177-182, 1983.
- 11) Shigesada, K. and Tatibana, M.: Enzymatic synthesis of acetylglutamate by mammalian liver preparations and its stimulation by arginine. Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1117-1124, 1971.
- 12) Shigesada, K. and Tatibana, M.: N-acetylglutamate synthetase from rat-liver mito-

- chondria: partial purification and catalytic properties. *Eur. J. Biochem.*, **84**, 285-291, 1978.
- 13) Fritz, I.B. and Marquis, N.R. : The role of acylcarnitine esters and carnitine palmitoyltransferase in the transport of fatty acyl groups across mitochondrial membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **54**, 1226-1233, 1965.
 - 14) Bieber, L.L., Emaus, R., Valkner, K. and Farrell, S. : Possible functions of short-chain and medium-chain carnitine acyltransferases. *Fed. Proc.*, **41**, 2858-2862, 1982.
 - 15) Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. and Pallade, G.E. : Cytochemical studies of mammalian tissues. I. isolation of intact mitochondria from rat liver: some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.*, **172**, 619-635, 1948.
 - 16) Hunninghake, D. and Grisolia, S. : A sensitive and convenient micromethod for estimation of urea, citrulline, and carbamyl derivatives. *Anal. Biochem.*, **16**, 200-205, 1966.
 - 17) Shigesada, K. and Tatibana, M. : Role of acetylglutamate in ureotelism I. occurrence and biosynthesis of acetylglutamate in mouse and rat tissues. *J. Biol. Chem.*, **246**, 5588-5595, 1971.
 - 18) Zollner, H. : Regulation of urea synthesis: the effect of ammonia on the N-acetylglutamate content of isolated rat liver cells. *Biochem. Biophys. Acta.*, **676**, 170-176, 1981.
 - 19) Gamble, J.G. and Lehninger, A.J. : Transport of ornithine and citrulline across the mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, **248**, 610-618, 1973.
 - 20) McGivan, J.D., Bradford, N.M. and Beavis, A.D. : Factors influencing the activity of ornithine aminotransferase in isolated rat liver mitochondria. *Biochem. J.*, **162**, 147-156, 1977.
 - 21) Bücher, T. : Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1**, 292-314, 1947.
 - 22) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Landall, R.J. : Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
 - 23) Becker, C-M and Harris, R.A. : Influence of valproic acid on hepatic carbohydrate and lipid metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 381-392, 1983.
 - 24) Sonoda, T. and Tatibana, M. : Purification of N-acetyl-L-glutamate synthetase from rat liver mitochondria and substrate and activator specificity of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **258**, 9839-9844, 1983.
 - 25) Benavides, J., Martin, A., Ugarte, M. and Valdivieso, F. : Inhibition by valproic acid of pyruvate uptake by brain mitochondria. *Biochim. Pharmacol.*, **31**, 1633-1636, 1982.
 - 26) Haas, R., Chir, B., Stumpf, D.A., Parks, J.K. and Eguren, L. : Inhibitory effects of sodium valproate on oxidative phosphorylation. *Neurology (Ny)*, **31**, 1473-1476, 1981.
 - 27) Bradford, N.M. and McGivan, J.D. : Evidence for the existence of an ornithine/citrulline antiporter in rat liver mitochondria. *FEBS Lett.*, **113**, 294-298, 1980.
 - 28) Krebs, H.A., Hems, R. and Lund, P. : Regulatory mechanisms in the synthesis of urea. In, *Inborn errors of metabolism* (F.A. Hommes and C.J. van den Berg, eds.), New York, Academic Press, pp. 201-219, 1973.

MECHANISM OF INHIBITION BY SODIUM VALPROATE
ON CITRULLINOGENESIS BY ISOLATED RAT
LIVER MITOCHONDRIA

—Effects of Arginine and L-Carnitine on the Inhibition—

Shuuichi Aramaki

*Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine
(Director: Prof. F. Yamashita, M.D.)*

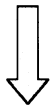
We report the effects of sodium valproate (VPA) on citrulline synthesis by isolated rat liver mitochondria.

When citrullinogenesis was supported by pyruvate or glutamate, there were significant inhibitions (39 % for pyruvate, and 29 % for glutamate) by 0.5 mM VPA. These inhibition were alleviated by the addition of 1.0 mM arginine, but not by 1.0 mM L-carnitine. Generation of ATP, when supported by pyruvate, was similarly inhibited by 0.5 mM VPA. However, this inhibition was partially alleviated by either 1.0 mM arginine or 0.1 mM carnitine.

VPA reduced the apparent concentration level of N-acetylglutamate, but did not reduce the activity of N-acetylglutamate synthetase. With addition of 1.0 mM arginine, the apparent level of N-acetylglutamate was increased 4.5-fold in association with a 2.4-fold increase in the N-acetylglutamate synthetase activity. L-carnitine showed no effects on either the acid concentration level or the enzyme activity.

Transport of ornithine across mitochondrial membrane was non-competitively inhibited by VPA at a VPA concentration of 0.5 mM, with pyruvate serving as respiratory substrate.

These observations indicate that the inhibition of citrulline synthesis by VPA is mainly caused by the depression of the N-acetylglutamate concentration, and suggest that arginine may be effective for the alleviation of VPA-induced hyperammonemia.



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



Sodium valproate(VPA)が分離ミトコンドリアにおける,citrulline 合成を阻害する機序, および,citrulline 合成阻害にたいする arginine,L-carnitine の回復効果を検討した。

1)ミトコンドリアの citrulline 合成は,pyruvate,glutamate を酸化基質とした場合、有意の阻害をしめした。

2)ATP 生成は,pyruvate を酸化基質とした場合,VPA で阻害された。この阻害は,arginine,L-carnitine 添加で,軽度回復した。

3)N-acetylglutamate 合成酵素活性は,VPA で阻害されなかったが,みかけの N - acetylglutamate は著減した。また,arginine で,N-acetylglutamate 合成酵素活性は,約 2.4 倍に増加をしめし,みかけの N-acetylglutamate 濃度も約 4.5 倍に増加した。しかし,L - carnitine 添加では,両者とも,有意の回復はしめさなかった。

4)ミトコンドリア内への ornithine 転送へ与える VPA の効果は,pyruvate を酸化基質とした場合,影響はなかったが,succinate を基質とした場合は,軽度,非拮抗阻害のパターンがみとめられた。

以上より,VPA の citrulline 合成阻害の機序は,主として,ミトコンドリア内の N-acetylglutamate 含量の低下であることをしめした。また,VPA の阻害効果は,arginine で回復したことから,臨床でも VPA で誘発された高アンモニア血症が arginine の投与で回復する事が期待される。