

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

芳野 信、山下文雄

(久留米大小児科)

研究目的

われわれは、フェニールケトン尿症や、maternal PKU の障害の機序を、ミトコンドリアのエネルギー代謝の観点から検討中である。過去に、フェニールアラニン(Phe)が、ラット肝ミトコンドリアの呼吸調節率(RCI)とP/O比を低下させることを報告した¹⁾。今回は、さらに、Phe およびその代謝産物の、ミトコンドリアにおけるATP単位、呼吸鎖に与える影響について検討した。

研究方法

1. ミトコンドリア分画の調製

ラット肝ミトコンドリア分画は既報²⁾のように調製し、氷冷したB液(250 mMマニトール、10 mMリン酸カリウム、2 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 10 mM トリシュー HCl, pH 7.4)に懸濁した。

2. Phe とその代謝産物の添加

以下の実験には、フェニールピルビン酸(PPA)、フェニール乳酸(PLA)、フェニール酢酸(PA) (以下“Phe等”と総称する)をB液に溶解し、pH 7.4に調整したのち、終濃度2.0 mM となるように添加した。

3. 酸素消費量の測定

Clark型電極をもちいてコハク酸(+ロテノン)を呼吸基質として既報¹⁾の手順で測定した。

4. ATP 単位の測定

ミトコンドリア懸濁液に、2.5 mM ADP、呼吸基質(図1)のいずれか1種、および2.0 mM Phe等を加え、25℃、30分インキュベートした後、ATPを酵素法³⁾で定量した。

5. 還元型呼吸鎖成分の測定

ミトコンドリア懸濁液に、1.7 mM ADP, 2.0 mM Phe等を加え、25℃、10分プレインキュベートしたのち、呼吸基質を添加、Chanceの方法⁴⁾に準じ、フラボタンパク(FP)、チトクローム(Cyt.) b, c+c₁, aの還元状態を経時的に観察した。

以下の結果は、Phe等を添加していない対照値に対する%で表示した。

研究結果

1. ミトコンドリアの呼吸に与える Phe 等の効果

2.0 mM Phe に 1.0 mM p-chlorophenylalanine を加えたところ、RCI は相対的に低下した。このことから、呼吸に影響をおよぼすのは Phe 自体よりもその代謝産物であることが予測されたため、代謝産物の効果を観察した。PPA, PLA, PA の添加により、RCI は、それぞれ、 $89 \pm 2\%$ 、 $80 \pm 4\%$ 、 $86 \pm 6\%$ と軽度低下した。

これらの低下は、主として、state 4 の酸素消費の昂進によるものであった。

2. ATP 単位に与える影響

コハク酸 (+ロテノン) を呼吸基質とした場合は、Phe 等は ATP 単位に有意の影響を与えなかった (図 1)。しかし、ピルビン酸 (+スパーカー; リンゴ酸) を基質とした場合は、ATP 単位は PPA, PA の添加によって有意に低下した (図 1)。

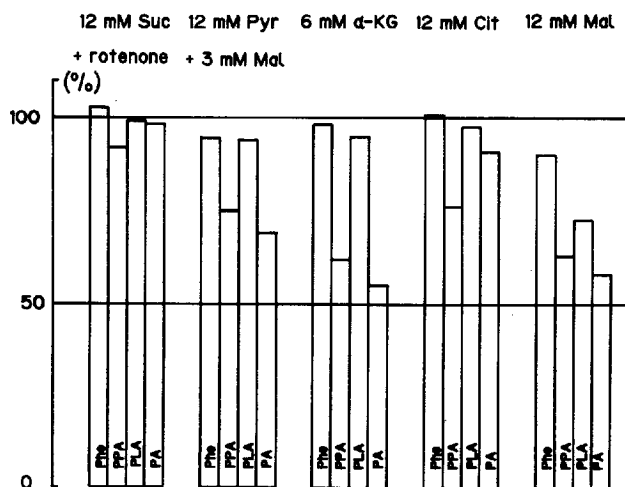


図 1. Phe およびその代謝産物が ATP 単位に与える影響

Suc : コハク酸、 Pyr : ピルビン酸、

α-KG : α-ケトグルタル酸、

Cit : クエン酸、 Mal : リンゴ酸

3. 呼吸鎖の還元に与える影響

呼吸基質がコハク酸 (+ロテノン) の場合は、PPA によって還元型 Cyt. b が軽度増加した以外は、有意の影響はみられなかった (図 2)。いっぽう、ピルビン酸 (+リンゴ酸) を基質

としたときには、呼吸鎖の各成分の還元はPLA添加により、軽度促進されたが、PPA、PAの添加では著明に抑制された（図2）。

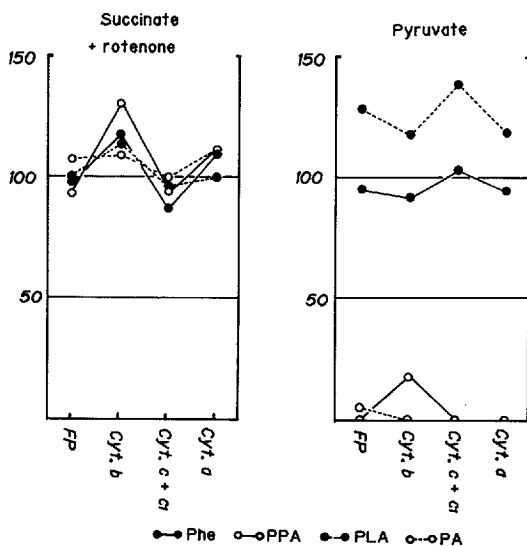


図2. Phe およびその代謝産物が呼吸鎖の還元に与える影響

考 察

図1、2に示す結果から、PPA、PAによるATP準位低下は、1) NADを直接の水素受容体とする反応の基質（ピルビン酸など）の、ミトコンドリア内への転送阻害 2) それらの基質の脱水素反応の阻害 3) ATP分解の昂進の関与が推測される。しかし、フラボタンパクを水素受容体とする反応の基質（コハク酸）を用いた場合には、PPA、PAは、ATP準位、呼吸鎖の還元には有意の影響を与えないこと、RCIの低下も軽度であることから、PPA、PAの効果は主として前記1)、2)の機序の関与が考えられる。さらに、ミトコンドリア内膜内外の水素イオン濃度勾配の形成、ATP合成および分解にあたるPhe等の効果を検討予定である。

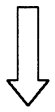
文 献

- 1) 芳野 信、荒牧修一、古賀靖敏、山下文雄：フェニールアラニンのラット肝ミトコンドリアの呼吸に与える影響。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58年度研究報告書，pp. 37～39，1983.
- 2) 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.
- 3) Bücher, T. : Über ein phosphatübertragendes gärungsferment. Biochim Biophys. Acta, 1 : 292, 1947.
- 4) Chance, B. : Methods in Enzymology, vol. 4 (S. P. Colowick, N. O. Caplan eds.) Academic Press, New York, p. 273, 1954.



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や、maternal PKU の障害の機序を、ミトコンドリアのエネルギー代謝の観点から検討中である。過去に、フェニールアラニン(Phe)が、ラット肝ミトコンドリアの呼吸調節率(RCI)と P/O 比を低下させることを報告した。¹⁾今回は、さらに、Phe およびその代謝産物の、ミトコンドリアにおける ATP 準位、呼吸鎖に与える影響について検討した。