

B-4 脂肪酸のミトコンドリア機能にあたる影響

分担研究者：山下文雄（久留米大学 小児科）

共同研究者：田中信夫（久留米大学 小児科）

目的：Reye症候群では血中、尿中脂肪酸の増加が報告されている。それらは、短鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸、ジカルボン酸などであり、最近特に注目されているのが、多価不飽和脂肪酸および長鎖のジカルボン酸である。^{1) 2) 3)}一方、ライ症候群ではミトコンドリア機能不全がその病態の中心にあると考えられている。我々は、ラット肝ミトコンドリアにアセチルサリチル酸、4-ペンテン酸、バルプロ酸ナトリウムなどを添加し、呼吸、呼吸鎖を検討してきたが、^{4) 5)}今回ミトコンドリア障害の原因として長鎖脂肪酸、ジカルボン酸をラット肝ミトコンドリアに添加し、呼吸、呼吸鎖におよぼす影響を検討した。

方法：

1) ミトコンドリアの分離

ウィスター系オスラット（200-350 g）を24時間絶食後、エーテル麻酔下に断頭放血し肝を摘出、Schneiderの変法にてミトコンドリアを分離、実験に用いた。

2) ミトコンドリアの呼吸

ミトコンドリアの呼吸は、Chance and Williamsらの方法に従い、Clark型電極を用いてポーラログラフィーにて測定した。あらかじめ30°Cにて灌流したポーラログラフィー用恒温容器に、調節液 B（250 mM マネー、10 mM リン酸カリウム、2 mM MgCl₂ 0.2 mM EDTA、10 mM KCl、10 mM Tris-HCl, PH 7.4）、ミトコンドリア懸濁液（タンパク 5.0 mg）をいれ、これにPHを7.4に調節ずみの、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸を終濃度、2 μM、10 μM、100 μMとなるように添加し、つぎにロテノン 6 μgを添加した。呼吸が安定した後にコハク酸30 μmol、さらにADP₁、26 μmolを加え、State 3, State 4,の呼吸を記録した。酸素消費の実測値より呼吸調節率（以下 RCR）、及びADP/O比を算出した。また、オレイン酸濃度 10 μM 時

の呼吸に与える、サルチル酸、アセトアミノフェン、カルニチン、アルブミンの影響を見る目的でそれぞれ 0.5 mM, 100 μ M (L-カニチン 50 μ M), 0.5 % w/v となるように各物質を加えた。ジカルボン酸では、アジピン酸、スベリン酸を終濃度、0.5 mM, 1.0 mM, 10.0 mM となるよう添加し呼吸をみた。

3) ミトコンドリアの呼吸鎖

呼吸鎖の各成分の酸化還元状態は、Chanceらの方法に準じ、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 2.0-3.5 mg 相当）、ADP 2.36 μ mol 及び、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸を、終濃度 20 μ M, 200 μ M, 600 μ M, アジピン酸、スベリン酸を、終濃度 10 mM となるように加え、終容量 1.5 ml、PH 7.4 とし、30°C にて 5 分間 preincubation した。ついで、基質（コハク酸、 α -ケトグルタル酸）を終濃度 5.0 mM となるように加え、差スペクトルを測定した。

4) ATP 測定

ミトコンドリア呼吸鎖測定と同じ条件で、incubation 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 測定キットを用いて定量した。

5) タンパク濃度は、Lowry 法により測定した。

成績：

1) ミトコンドリアの呼吸に対する長鎖脂肪酸の影響

ステアリン酸では 100 μ M、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸では 10 μ M で State 4 の酸素消費の増加、RCRの低下、ADP/O比の低下がみられた。オレイン酸、リノール酸、リノレン酸は、100 μ M で完全な脱共役を示した。（表1）

2) オレイン酸 10 μ M の濃度におけるサルチル酸、アセトアミノフェン、カルニチン、アルブミンの影響。

サルチル酸 0.5 mM の単独添加で、State 4 の酸素消費の増加、RCRの低下、ADP/O比の低下が見られた。

サルチル酸 0.5 mM, オレイン酸 10 μ M 添加では、オレイン酸 10 μ M 単独添加と比較し、State 4 の酸素消費の増加、RCRの低下、ADP/O比の低下傾向を示した。アセトアミノフェン 0.5 mM 単独添加では、ミトコンドリアの呼吸に影響を与え

なかつた。

アセトアミノフェン 0.5 mM、オレイン酸 10 μ M 添加は、オレイン酸 10 μ M 単独添加と比較し変化がみられなかつた。

カルニチン 100 μ M 添加では、10 μ M のオレイン酸存在時でも、コントロール（オレイン酸非添加）と比較し変化みられなかつた。オレイン酸 10 μ M、サルチル酸 0.5 mM 存在時では、オレイン酸 10 μ M、サルチル酸 0.5 mM 添加時と同様な State 4 の酸素消費増加、RCRの低下、ADP/O比の低下を示した。

アルブミンの添加では、カルニチン添加と同様に、オレイン酸 10 μ M 添加に対しては、コントロール（オレイン酸非添加）と比較し変化みられなかつた。オレイン酸 10 μ M、サルチル酸 0.5 mM 添加では、State 4 の酸素消費の増加、RCRの低下、ADP/O比の低下を示した。（表2）

3) ミトコンドリアの呼吸に対するジカルボン酸の影響。

アジピン酸、スベリン酸を 0.5 mM, 1.0 mM, 10.0 mM となるよう添加したが、コントロールと比較し、ミトコンドリアの呼吸に影響をしめさなかつた。（表5）

4) コハク酸を基質とした場合の長鎖脂肪酸のミトコンドリア呼吸鎖に与える影響。

ステアリン酸 600 μ M、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸 200 μ M で、5 分での各Cytochrome の環元はみられなかつた。10 分では、各Cytochrome の環元はコントロールと差がみられなかつた。オレイン酸、リノール酸、リノレン酸 600 μ Mでは、各Cytochrome の環元は完全に阻害された。（表3）

5) α -ケトグルタル酸を基質とした場合の長鎖脂肪酸のミトコンドリア呼吸鎖に与える影響。

ステアリン酸 600 μ M、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸 200 μ M では、10分での各Cytochrome の環元はみられなかつた。15分では、各Cytochromeの環元はコントロールと差がみられなかつた。オレイン酸、リノール酸、リノレン酸 600 μ Mでは、各Cytochrome の環元は完全に阻害された。（表4）

6) 長鎖脂肪酸のミトコンドリアATP含量に及ぼす影響。

コハク酸、 α -ケトグルタル酸を基質とした場合、両者とも、長鎖脂肪酸の濃度の増加により ATP含量の低下がみられた。ステアリン酸とオレイン酸、リノール酸、リノレン酸を比較すると、後者の各不飽和脂肪酸群がATP含量の低下が著明だ

つた。

7) コハク酸を基質とした場合のジカルボン酸のミトコンドリア呼吸鎖に与える影響。

アジピン酸、スベリン酸、10 mM の濃度で、コントロールと比較し、各Cytochrome の環元の差はみられなかつた。(表6)

考察：

1) ミトコンドリアの呼吸に対する脂肪酸の影響。

脂肪酸は脱共役作用があることは知られている。⁶⁾ 今回の実験でも、長鎖脂肪酸でState 4 の酸素消費の増加がみられ、オレイン酸らの不飽和脂肪酸では、100 μ M の濃度で完全な脱共役を示した。今までにわれわれは、中、短鎖脂肪酸のミトコンドリア呼吸に対する影響を検討してきたが、中、短鎖脂肪酸に比し、長鎖脂肪酸、特に不飽和脂肪酸のミトコンドリアの呼吸に対する脱共役作用は著明であり、Reye 症候群では多価不飽和脂肪酸の増加の報告もあり、^{1) 2)} 原因のひとつの可能性がある。

オレイン酸 10 μ M 濃度における、カルニチン、アルブミン添加では、オレイン酸非添加のコントロールと比較し、差がみられなかつた。カルニチン、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が考えられる。

またサルチル酸添加では、サルチル酸自身脱共役作用があり、⁴⁾ オレイン酸 10 μ M 濃度の共存で、脱共役作用の増強傾向があつた。オレイン酸、サルチル酸共存時は、カルニチン、アルブミン添加しても、脱共役作用は強く、Reye 症候群で、サルチル酸はミトコンドリア障害の増悪因子の可能性があると考えられた。

ジカルボン酸は、アジピン酸、スベリン酸で、ミトコンドリアの呼吸に対する影響はみられなかつたが、Reye症候群では血清中に、炭素数が多いジカルボン酸の増加する事が報告されており、^{2) 3)} 今後検討する必要がある。

2) ミトコンドリアの呼吸鎖に対する脂肪酸の影響。

長鎖脂肪酸(特に不飽和脂肪酸)で、コハク酸、 α -ケトグルタル酸を基質として、各Cytochrome の環元の遅延がみられた。時間の経過で、各Cytochrome の環元はコントロールと差がみられなかつた。われわれは、脂肪酸のミトコンドリア

障害のひとつとして膨化実験をおこなっているが、今回の結果では、電子伝達障害というより、ミトコンドリア膜障害による遅延が考えられた。

結論：今回の実験から、Reye 症候群のミトコンドリア障害の原因のひとつとして、長鎖脂肪酸の影響が考えられた。

ジカルボン酸は、今回の実験では影響なかつたが、今後炭素数の多いジカルボン酸のミトコンドリアに対する影響を検討する必要がある。

文 献

- 1) Ogburn, P., Sharp, H.,: Abnormal polyunsaturated fatty acid patterns of serum lipids in Reye's syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 908-911. 1982.
- 2) Tonsgard, J. H., Getz, G. S.,: Effect of Reye's Syndrome Serum on Isolated Chinchilla Liver Mitochondria. J. Clin. Invest. 76: 816-825. 1985.
- 3) Kwokei, J. N. G., et al: Identification of long chain dicarboxylic acids in the serum of two patients with Reye's syndrome. Journal of Chromatography, 276: 1-10. 1983.
- 4) 古賀靖敏：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.
- 5) 厚生省心身障害研究報告書 昭和59年研究業績：第一分冊 原因不明の脳症（Reye 症候群等）に関する研究（研究分担者 山下文雄）
- 6) Matuoka, I., Nakamura, T.,: Reversible effects of fatty acids on respiration, oxidative phosphorylation, and heat production of rat liver mitochondria. J. Biochem. 86: 675-681. 1979.

表1 呼吸に対する長鎖脂肪酸の影響

| | State3 | State4 | RCR | P/O | ATP |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CONT n=4 | 4.33±0.32 | 0.86±0.10 | 5.09±0.48 | 1.95±0.02 | 0.30±0.05 |
| STE 2 μM n=4 | 4.23±0.05 | 0.85±0.13 | 5.06±0.79 | 1.96±0.01 | 0.30±0.06 |
| 10 μM n=4 | 4.08±0.15 | 0.95±0.26 | 4.53±1.13 | 1.94±0.04 | 0.29±0.03 |
| 100 μM n=4 | 3.28±0.58 | 1.30±0.14 | 2.55±0.56 | 1.83±0.04 | 0.22±0.06 |
| OLE 2 μM n=3 | 4.27±0.15 | 1.00±0.26 | 4.48±1.20 | 1.95±0.02 | 0.22±0.02 |
| 10 μM n=3 | 3.83±0.21 | 1.47±0.42 | 2.80±0.98 | 1.63±0.12 | 0.20±0.06 |
| 100 μM n=3 | | | | | 0.07±0.03 |
| LIN 2 μM n=3 | 4.40±0.40 | 0.90±0.17 | 4.95±0.57 | 1.93±0.04 | 0.28±0.09 |
| 10 μM n=3 | 4.07±0.40 | 1.10±0.26 | 3.81±0.71 | 1.66±0.05 | 0.25±0.09 |
| 100 μM n=3 | | | | | 0.03±0.03 |
| LIL 2 μM n=4 | 4.25±0.24 | 0.98±0.15 | 4.41±0.46 | 1.94±0.03 | 0.22±0.04 |
| 10 μM n=4 | 4.13±0.17 | 1.30±0.18 | 3.23±0.57 | 1.77±0.05 | 0.19±0.05 |
| 100 μM n=4 | | | | | 0.08±0.04 |

基質：コハク酸， M ± SD

表2 オレイン酸 10 μM濃度でのサリチル酸，アセトアミノフェン，カルニチン，アルブミンの呼吸への影響

| | State 3 | State 4 | RCR | P / O |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CONT n=9 | 3.69±0.53 | 0.74±0.11 | 4.99±0.54 | 1.93±0.03 |
| OLE 10 μM n=7 | 3.41±0.59 | 1.11±0.25 | 3.13±0.56 | 1.63±0.12 |
| SA 0.5 mM n=3 | 3.50±0.50 | 0.97±0.06 | 3.63±0.55 | 1.73±0.13 |
| OLE+SA n=5 | 3.24±0.26 | 1.22±0.08 | 2.67±0.35 | 1.53±0.12 |
| ACE 0.5 mM n=3 | 3.47±0.85 | 0.83±0.28 | 4.33±0.85 | 1.89±0.02 |
| OLE+ACE n=3 | 3.30±0.90 | 1.07±0.23 | 3.08±0.38 | 1.52±0.08 |
| + CAR | | | | |
| OLE 10 μM n=5 | 3.54±0.51 | 0.76±0.11 | 4.68±0.50 | 1.91±0.06 |
| OLE+SA n=3 | 2.96±0.25 | 1.20±0.35 | 2.59±0.67 | 1.61±0.09 |
| + ALB | | | | |
| OLE 10 μM n=3 | 4.40±0.56 | 0.83±0.06 | 5.27±0.35 | 1.84±0.07 |
| OLE+SA n=3 | 3.33±0.61 | 1.10±0.20 | 3.12±0.84 | 1.58±0.08 |

基質：コハク酸 M ± SD

表 3 コハク酸を基質とした場合の各電子伝達成分の還元量

| | 5 Min | | | | | 10 Min | | | | |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----|
| | FP | Cyt.b | Cyt.c+c | Cyt.a+a | ATP | FP | Cyt.b | Cyt.c+c | Cyt.a+a | ATP |
| CONTROL (n=6) | 4.28±0.73 | 0.55±0.07 | 1.90±0.20 | 1.45±0.17 | 5.52±0.74 | 0.80±0.33 | 1.85±0.17 | 1.45±0.15 | 0.87±0.12 | |
| STE 20 μM (n=3) | 4.38±0.22 | 0.62±0.12 | 1.79±0.09 | 1.45±0.13 | 5.41±0.57 | 0.70±0.05 | 1.75±0.16 | 1.50±0.16 | 0.80±0.20 | |
| 200 μM (n=3) | 4.81±0.75 | 0.65±0.03 | 1.96±0.17 | 1.50±0.16 | 6.15±0.85 | 0.69±0.10 | 1.99±0.18 | 1.60±0.13 | 0.55±0.22 | |
| 600 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.92±1.18 | 0.65±0.03 | 2.02±0.33 | 1.55±0.22 | 0.42±0.21 | |
| OLE 20 μM (n=3) | 4.84±0.24 | 0.88±0.12 | 1.88±0.05 | 1.55±0.28 | 5.22±0.19 | 0.63±0.08 | 2.02±0.12 | 1.59±0.27 | 0.48±0.22 | |
| 200 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.73±1.07 | 0.64±0.16 | 2.03±0.02 | 1.69±0.10 | 0.16±0.11 | |
| 600 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.07±0.03 | |
| LIN 20 μM (n=3) | 4.69±0.03 | 0.54±0.03 | 1.89±0.16 | 1.67±0.42 | 5.29±0.45 | 0.54±0.03 | 1.93±0.22 | 1.57±0.35 | 0.71±0.14 | |
| 200 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.91 | 0.49 | 1.33 | 1.10 | 0.13±0.04 | |
| 600 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -0.07±0.01 | |
| LIL 20 μM (n=3) | 5.29±0.70 | 0.60±0.08 | 1.80±0.18 | 1.40±0.14 | 5.60±0.44 | 0.68±0.09 | 1.87±0.25 | 1.45±0.12 | 0.64±0.24 | |
| 200 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.86±0.09 | 0.56±0.05 | 1.79±0.11 | 1.45±0.12 | 0.11±0.06 | |
| 600 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.05±0.03 | |

value : mean ± sd
ATP : μmoles / mg of mitochondrial protein

表 4 α-ケトグルタル酸を基質とした場合の各電子伝達成分の還元度

| CONDI | 10 Min | | | | | 15 Min | | | | | ATP |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|-----|
| | FP | Cyt. b | Cyt. c+c | Cyt. a+a | FP | Cyt. b | Cyt. c+c | Cyt. a+a | | | |
| CONTROL (n=7) | 3.40±0.70 | 0.50±0.10 | 1.58±0.22 | 1.21±0.13 | 4.66±0.73 | 0.56±0.08 | 1.68±0.20 | 1.21±0.09 | 1.38±0.26 | | |
| STE 20 μM (n=3) | 4.41±0.27 | 0.57±0.14 | 1.65±0.14 | 1.16±0.15 | 5.46±0.23 | 0.57±0.14 | 1.70±0.19 | 1.40±0.18 | 1.32±0.43 | | |
| 200 μM (n=3) | 4.88±0.79 | 0.59±0.03 | 1.70±0.19 | 1.43±0.10 | 5.27±0.56 | 0.59±0.03 | 1.90±0.15 | 1.45±0.10 | 0.03±0.22 | | |
| 600 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.36±0.93 | 0.51±0.10 | 1.85±0.16 | 1.46±0.13 | 0.36±0.22 | | |
| OLE 20 μM (n=3) | 4.60±0.28 | 0.50±0.07 | 1.65±0.13 | 1.38±0.07 | 5.02±0.19 | 0.50±0.07 | 1.66±0.12 | 1.31±0.07 | 1.22±0.20 | | |
| 200 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.68±0.55 | 0.46±0.08 | 1.48±0.33 | 1.24±0.12 | 0.16±0.04 | | |
| 600 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.06±0.01 | | |
| LIN 20 μM (n=3) | 4.46±0.56 | 0.55±0.06 | 1.69±0.23 | 1.37±0.15 | 4.93±0.49 | 0.66±0.13 | 1.69±0.23 | 1.29±0.12 | 1.20±0.15 | | |
| 200 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.59±0.29 | 0.47±0.07 | 1.76±0.19 | 1.45±0.14 | 0.16±0.02 | | |
| 600 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.06±0.01 | | |
| LIL 20 μM (n=3) | 5.06±0.78 | 0.61±0.09 | 1.64±0.11 | 1.28±0.17 | 5.70±0.26 | 0.60±0.10 | 1.76±0.11 | 1.25±0.17 | 1.28±0.14 | | |
| 200 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.72±0.36 | 0.57±0.05 | 1.81±0.09 | 1.37±0.08 | 0.16±0.07 | | |
| 600 μM (n=3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.07±0.01 | | |

substrate : α-ketoglutarate
 value : mean ± sd nmoles / mg-protein
 ATP : μmoles / mg of mitochondrial protein

表5 呼吸に対するジカルボン酸の影響

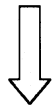
| | State 3 | State 4 | RCR | P / O |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CONT n=4 | 3.35±0.37 | 0.70±0.08 | 4.79±0.25 | 1.92±0.03 |
| AD 0.5mM n=4 | 3.73±0.48 | 0.80±0.16 | 4.73±0.55 | 1.86±0.04 |
| 1 mM n=4 | 3.25±0.64 | 0.73±0.21 | 4.58±0.53 | 1.95±0.05 |
| 10 mM n=4 | 3.28±0.32 | 0.75±0.24 | 4.57±0.86 | 1.93±0.05 |
| SB 0.5mM n=4 | 3.30±0.48 | 0.68±0.17 | 5.01±0.72 | 1.91±0.04 |
| 1 mM n=4 | 3.20±0.48 | 0.69±0.17 | 4.77±0.72 | 1.83±0.14 |
| 10 mM n=4 | 3.40±0.53 | 0.78±0.21 | 4.49±0.58 | 1.88±0.05 |

基質：コハク酸，N±SD

表6 ジカルボン酸の呼吸鎖に与える影響

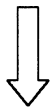
| | 5 Min | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | FP | Cyt.b | Cyt.c+c | Cyt.a+a |
| CONT n=3 | 4.24±0.23 | 0.46±0.04 | 1.61±0.19 | 1.23±0.24 |
| AD 10mM n=3 | 4.82±0.60 | 0.45±0.06 | 1.60±0.10 | 1.32±0.17 |
| SB 10mM n=3 | 4.51±0.24 | 0.48±0.04 | 1.54±0.14 | 1.08±0.29 |
| | 10 Min | | | |
| CONT n=3 | 4.88±0.40 | 0.55±0.17 | 1.69±0.14 | 1.32±0.17 |
| AD 10mM n=3 | 5.19±0.32 | 0.49±0.13 | 1.60±0.10 | 1.29±0.22 |
| SB 10mM n=3 | 5.08±0.71 | 0.54±0.03 | 1.60±0.07 | 1.26±0.19 |

基質：コハク酸，N±SD(moles / mg-protein)



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:Reye 症候群では血中、尿中脂肪酸の増加が報告されている。それらは、短鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸、ジカルボン酸などであり、最近特に注目されているのが、多価不飽和脂肪酸および長鎖のジカルボン酸である。1)2)3)一方、ライ症候群ではミトコンドリア機能不全がその病態の中心にあると考えられている。我々は、ラット肝ミトコンドリアにアセチルサリチル酸、4-ベンチン酸、バルプロ酸ナトリウムなどを添加し、呼吸、呼吸鎖を検討してきたが、4)5)今回ミトコンドリア障害の原因として長鎖脂肪酸・ジカルボン酸をラット肝ミトコンドリアに添加し、呼吸、呼吸鎖におよぼす影響を検討した。