

B-5 ライ症候群の発症機構に関する研究 (第4報) 脳ミトコンドリア膜に及ぼすオレイン酸および その誘導体の影響について

研究協力者：小川昭之 (大分医科大学 小児科)

共同研究者：永見真木子、小川真智子 (大分医科大学 小児科)

吉田 敏、竹下正純 (大分医科大学 生化学)

目的: 私たちはこれまで、ライ症候群患者血清がミトコンドリア(以下Mtと略す)の電子伝達系酵素であるチトクロムc酸化酵素活性に一種の阻害作用を示し、その形式が患者骨格筋Mtで著増していたオレイン酸と類似の形式であることを報告した。患者血清の阻害作用機序を解明するため、オレイン酸を用い、in vitroでMt膜にどのような変化を起こすかについて検討した。

方法: 1) ラット肝MtはSchneiderの変法により分離し、オレイン酸を加え呼吸調節率を測定した。2) 豚脳MtはLaiら[1]の方法により分離し、ジオレイン、トリオレインを混じチトクロムc酸化酵素活性を測定した。豚脳Mtにオレイン酸を加え0℃60分インキュベート後、BSAを含むisolation mediumで洗ったMtから脂質を抽出し、TLCでリン脂質と遊離脂肪酸に分離し、その各々について脂肪酸分析した。

3) オレイン酸とインキュベートした豚脳Mt膜の流動性変化を図1に示す原理で測定した。

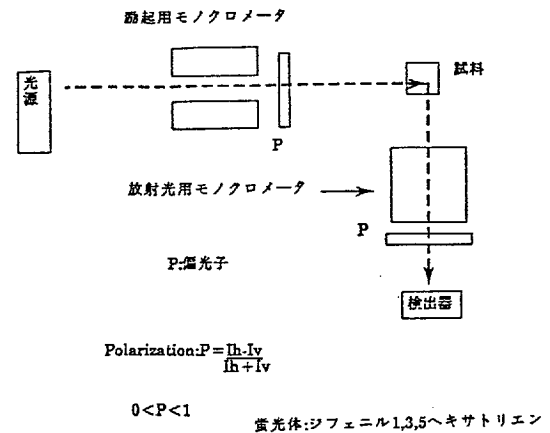


図1 膜流動性変化の測定

結果: 1) オレイン酸を加えた場合の呼吸調節率の変化を図2に示す。

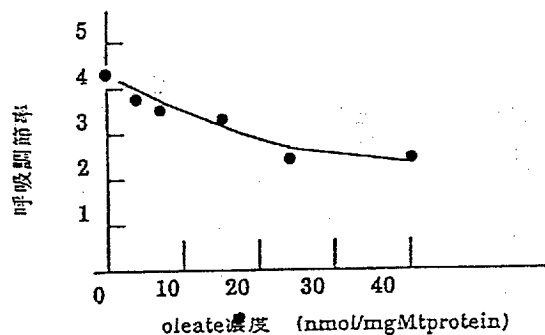


図2 オレイン酸による呼吸調節率の変化

オレイン酸を加えることによりRCRの低下が認められた。2) ジオレイン、トリオレインを加えたときのチトクロム *c* 酸化酵素の K_m 値の変化を図3に示す。

ジオレイン1モルはオレイン酸2モルに、トリオレイン1モルはオレイン酸3モルに換算した。両者では濃度大となっても K_m 値に変化はなかった。

3) オレイン酸とインキュベートした豚脳Mtと対照のMtから抽出した遊離脂肪酸分画のガスクロマトグラムを図4に示す。また各々についてC18:1/C18:0を計算するとリン脂質中では対照との差はないが遊離脂肪酸分画でこの比は著増し、オレイン酸はMt膜には遊離脂肪酸のかたちでとりこまれることが示された。

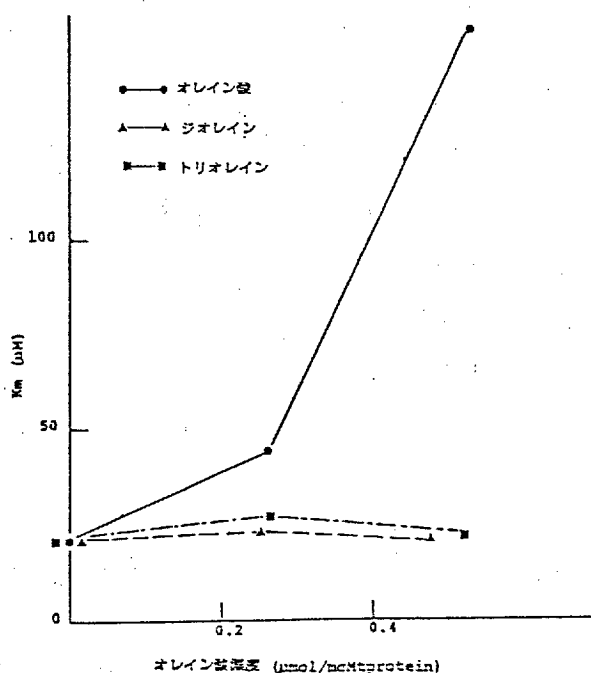
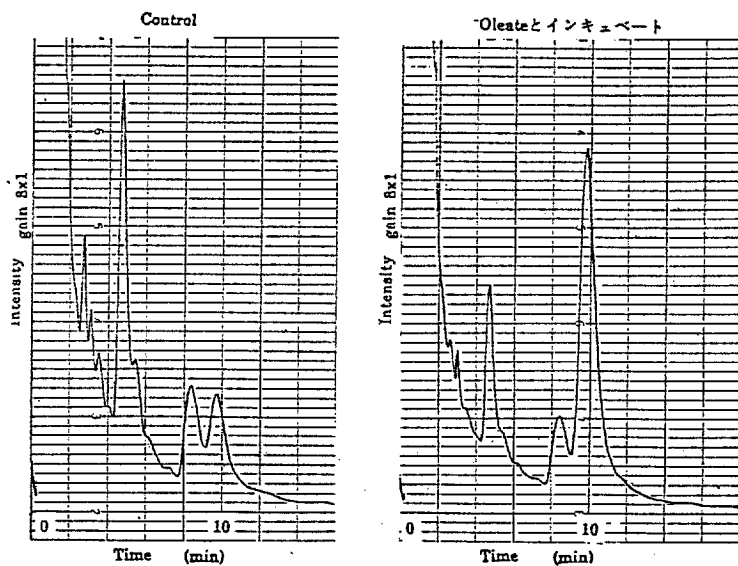


図3 ジオレイン、トリオレインのチトクロム *c* 酸化酵素に及ぼす影響



(遊離脂肪酸分画の脂肪酸分析)

C18:1/C18:0	FFA	PL
Control	1.0	1.6
Oleate (0.56mM)	7.2	1.7

図4 オレイン酸のMt膜へのとりこみ

3) オレイン酸とインキュベートしたときのMt膜の流動性変化を図5に示す。流動性変化は図1に示した偏光度Pの大小であらわされ、Pが1に近づくほど流動性の低下、すなわち膜が硬くなることを示す。オレイン酸とのインキュベートにより偏光度Pが大きくなり流動性の低下が認められた。

4) 患者(7カ月男児)の第1,2,3病日の血清脂肪酸分析の結果を表1に示す。リン脂質、トリグリセライドでは、各脂肪酸が病日がすすむにつれ増加傾向を、遊離脂肪酸では減少傾向を示した。

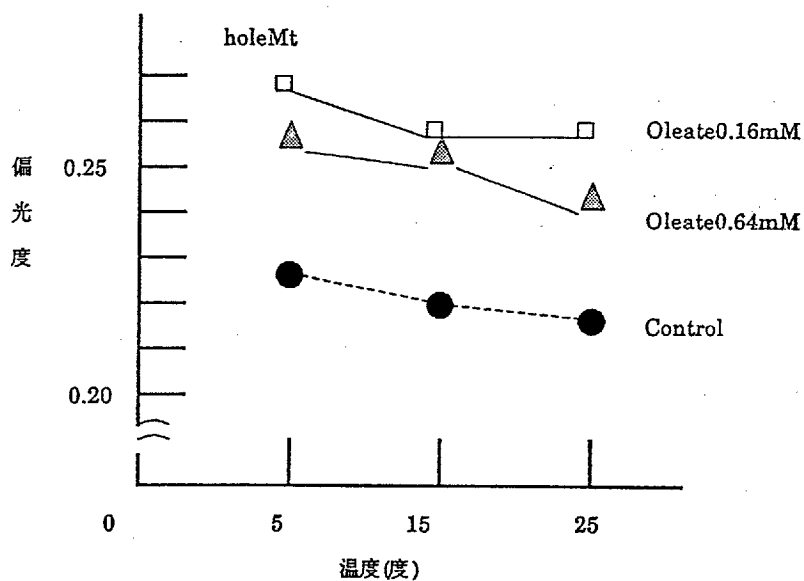


図5 Mt膜の流動性変化

病日	リン脂質			遊離脂肪酸			トリグリセライド		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
C16:0	161.8	230.4	285.9	256.1	97.8	50.1	86.0	266.7	91.2
C18:0	73.0	92.5	93.8	94.2	34.6	24.9	24.2	72.3	62.3
C18:1	237.4	61.4	194.9	109.2	37.0	42.2	73.3	155.9	475.0

(μg/ml)

表1 患者血清中の脂肪酸

考案: オレイン酸を加えることによりラット肝Mtの呼吸調節率の低下を認めた。これはstate4のO₂消費量増加、state3のO₂消費量不変によるものであった。電子伝達系のチトクロムc酸化酵素阻害作用が、ジオレインやトリオレインで認められなかったのは両者が遊離オレイン酸に比べdetergent作用が少ない

ためと思われた。患者血清やオレイン酸による K_m , V_{max} 上昇というチトクロム c 酸化酵素阻害形式は、精製したチトクロム c 酸化酵素に detergent を加えたときに認められる[2]ものと同じであり、血清やオレイン酸の酵素阻害作用は、膜の状態が変化することにより起こる可能性が示唆された。今回はオレイン酸による膜の状態変化の指標のひとつとして膜流動性変化を測定したが、今後Mt障害を引き起こすと思われるオレイン酸以外の物質についても、膜流動性に及ぼす影響を検討していきたい。

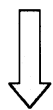
結論: 1) オレイン酸はラット肝Mtの呼吸調節率を低下させた。

2) ジオレイン、トリオレインではチトクロム c 酸化酵素活性に影響を及ぼさなかった。

3) Mtとオレイン酸をインキュベートするとMt膜中の遊離オレイン酸が増加し、膜流動性の低下が起こった。

文献

- [1] Lai, J.C., Clark, J.B. : Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondria from mammalian brain. *Methods in Enzymology*, 55:51-59, 1979
- [2] Nichlis, P., Shaughnessy, S. : Effects of detergents and cytochrome c binding on scalar and vectrical proton ejection by proteoliposomes containing cytochrome c oxidase. *Biochem. J.*, 228:201-210, 1985



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:私たちはこれまで、ライ症候群患者血清がミトコンドリア(以下 Mt と略す)の電子伝達系酵素であるチトクロム C 酸化酵素活性に一種の阻害作用を示し、その形式が患者骨格筋 Mt で著増していたオレイン酸と類似の形式であることを報告した。患者血清の阻害作用機序を解明するため、オレイン酸を用い、invitro で Mt 膜にどのような変化を起こすかについて検討した。