

B-6 バルプロ酸の分離ラット肝ミトコンドリアの エネルギー代謝に与える影響

分担研究者：山下文雄（久留米大学 小児科）

共同研究者：古賀靖敏、吉田一郎、芳野 信

目的：バルプロ酸が、ミトコンドリアのいくつかの機能に影響を与えることが知られている。われわれは、脳症関連物質の分離ラット肝ミトコンドリア機能に与えるスクリーニングの一貫として、バルプロ酸の主としてミトコンドリアのエネルギー代謝に及ぼす影響について検討したので報告する。

方法：24時間絶食ウイスター系オスラット(180-360g)より肝を摘出、Hogeboomらの方法⁽¹⁾に従いミトコンドリアを分離し、250mMマニトール、0.2mMEDTA、10mM燐酸カリウム、2mM塩化マグネシウム、10mM塩化カリウム、10mMトリス-HCl(pH7.4)に懸濁し各実験に使用した。酸素消費は、コハク酸(+ロテノン)を基質としWilliams & Chance⁽²⁾の方法で、還元型呼吸鎖成分のうちフラボプロテイン、チトクロームb、c + c₁、a + a₃は、Chanceらの方法⁽³⁾で、ATP含量はBucherの方法⁽⁴⁾で、Acetyl-CoA、Acid-soluble CoA、Acid-insoluble CoAはIngebrestenの方法⁽⁵⁾で分画し、Allredのenzyme-recycling法⁽⁶⁾によりそれぞれ定量した。

結果：0.5mMバルプロ酸の添加で、1)呼吸調節率は、バルプロ酸非添加コントロール(5.0±0.2)の60%まで低下した(state4の酸素消費を30%上昇)が、その脱共役作用はサリチル酸と比較して軽度であった(Table.1)。2)チトクロームの還元速度は、コハク酸を基質とした場合反応初期に軽度遅延したが、イソクエン酸、ピルビン酸を基質とした場合より著明であった。さらにイソクエン酸、ピルビン酸を基質とした場合、リピートスキャンによる各還元型チトクロームの出現は、各成分に位相なく同様に遅延したが、ピルビン酸の場合がより著明であった(図1)。3)ATP含量は、コハク酸を基質とした場合に較べ(コントロールの78%)、イソクエン酸、ピルビン酸を基質としたほうが著明に減少した(コントロールの30-40%)(Table.2)。4)ミトコンドリア内Acetyl-CoA、Acid-solubleCoAは、著明に減少し

た(Table.3)。

考案：バルプロ酸の分離ラット肝ミトコンドリア機能にあたる阻害作用は、0.5mMという有効血中濃度においては、サリチル酸と違い脱共役作用が主ではないこと、NAD依存性呼吸基質のミトコンドリア内膜転送からその酸化にともなう呼吸鎖の還元 of いずれかの部位を阻害する可能性のあること、CoA-SHおよびacetyl-CoAの低下およびATP準位低下がその阻害作用に関係すると考えられた。

文献

- 1) Hogeboom GH., Schneider WC., Pallade GE. 1948 Cytochemical studies of mammalian tissues. 1. Isolation of intact mitochondria and submicroscopic particulate material. J Biol Chem 172:619-635
- 2) Chance B., Williams GR. 1955 Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. 1. Kinetics of oxygen utilization. J Biol Chem 217:383-399
- 3) Chance B., Hagihara B. 1963 Direct spectroscopic measurements of interaction of components of the respiratory chain with ATP, ADP, phosphate and uncoupling agent. In: Slater EC. (eds) Proceedings of the international congress of biochemistry 5th Congress Moscow Pergamon Press, Oxford, pp3-33
- 4) Bucher T. 1947 Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment. Biochem Biophys. Acta 1:292
- 5) Ingebresten OC., Bakken AM., Farstad M. 1982 The content of coenzyme A, acetyl CoA and long-chain acyl-CoA in human blood platelets. Clinica Chimica Acta 126:307-313
- 6) Allred JB., Guy DG. 1969 Determination of coenzyme A and acetyl CoA in tissue extracts. Analytical Biochemistry 29:293-299

Table 1 Effects of VPA on state 3 and state 4 rates of O₂ consumption, the respiratory control ratio (RCR), ADP/O ratio and intramitochondrial ATP contents

Incubations	state 3	state 4	RCR	ADP/O	ATP
Control (6)	163.3 ± 35.6	32.6 ± 6.4	5.01 ± 0.23	1.94 ± 0.24	1.42 ± 0.08
VPA 0.1 mM (4)	145.2 ± 25.7	56.7 ± 9.4*	2.56 ± 0.64*	1.97 ± 0.46	1.40 ± 0.12
0.5 mM (4)	124.1 ± 26.5	51.4 ± 9.8*	2.41 ± 0.71*	1.93 ± 0.32	1.36 ± 0.65
1.0 mM (4)	124.2 ± 33.1	47.0 ± 10.6	2.64 ± 0.82*	1.88 ± 0.89	1.27 ± 0.97

The values of oxygen consumption represent x ± SD natom Oxygen per min per mg protein.

The values of ATP concentration represent x ± SD umoles per 10 min per mg protein.

The numbers in parentheses represent numbers of experiments.

* Values were significantly less p < 0.05 with a one tailed t tested for independent mean probability.

Table 2 Effects of VPA on intramitochondrial ATP contents

SUBSTRATES	SUCCINATE	ISOCITRATE	PYRUVATE
CONTROL (6)	1.78 ± 0.34	2.78 ± 0.77	0.81 ± 0.18
VPA 0.5mM (4)	1.39 ± 0.21**	0.95 ± 0.53**	0.23 ± 0.09**

The values of ATP contents represent x ± SD umoles per 30 min per mg protein.

** Values were significantly less p < 0.01 with a one tailed t tested for independent mean probability.

Table 3 Effects of VPA on intramitochondrial levels of acetyl CoA, acid-soluble CoA and acid-insoluble CoA

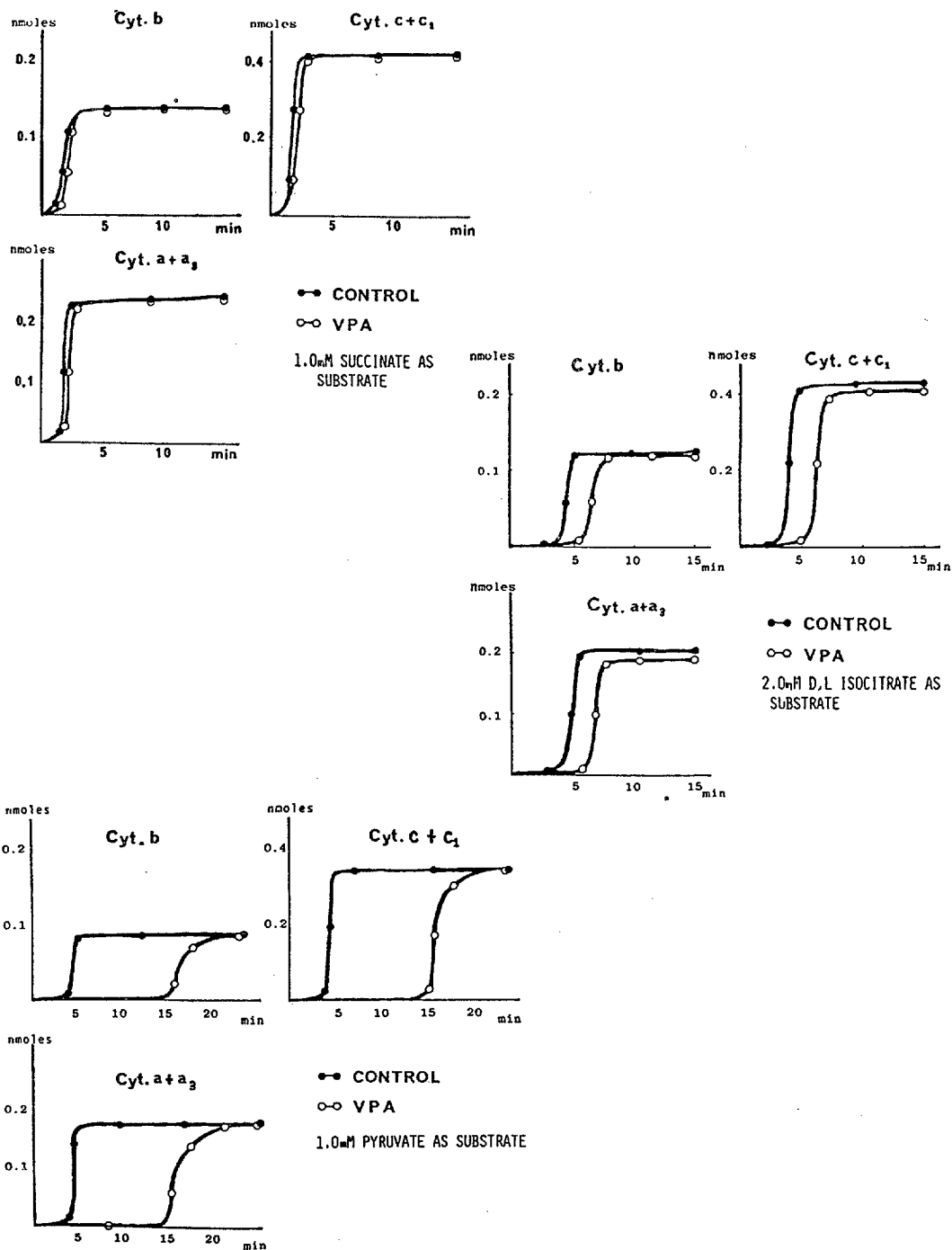
Incubations	acetyl CoA	acid-soluble CoA	acid-insoluble CoA	Total CoA
control (6)	0.52 ± 0.05	1.06 ± 0.05	0.88 ± 0.09	1.93 ± 0.11
VPA 0.5mM (3)	0.18 ± 0.08**	0.31 ± 0.12**	1.67 ± 0.62**	1.99 ± 0.82**

The values of CoA components represent x ± SD nmoles per mg protein.

** Values were significantly less p < 0.01 with a one tailed t tested for independent mean probability.

1.0mM of succinate as substrate.

図1. バルプロ酸のミトコンドリア呼吸鎖に与える影響





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:バルプロ酸が、ミトコンドリアのいくつかの機能に影響を与えることが知られている。われわれは、脳症関連物質の分離ラット肝ミトコンドリア機能に与えるスクリーニングの一貫として、バルプロ酸の主としてミトコンドリアのエネルギー代謝に及ぼす影響について検討したので報告する。