

# ミトコンドリアのエネルギーの転換系に対する $K^+$ 依存性の V. E の作用

Effect of V. E and its  $K^+$  Dependency on the energy transfer reaction of rat liver mitochondria

長谷川 亨<sup>\*</sup>, 緒方正名<sup>\*\*</sup>, 内海耕 慥<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> (中国短期大学)

<sup>\*\*</sup> (岡山大学医学部公衆衛生)

<sup>\*\*</sup> (岡山大学医学部癌研究施設生化学部)

## 緒 言

Vitamin E (以不 V. E と略す) の生理作用の 1 つは生体膜系の構成脂質に対する抗酸化作用である<sup>1)</sup>。しかし、この外にも未知の生理作用の存在を示唆する実験が種々報告されている<sup>2)~5)</sup>。たとへば V. E 欠乏症の一種であるウサギの筋ジストロフィーを阻止するには、合成抗酸化剤では効果が少なく、V. E のみが効果がある事<sup>6)</sup>、また V. E 欠乏の肝ミトコンドリアの呼吸は正常に比してコハク酸による呼吸活性の低下がみられる事<sup>7)</sup>、更にまた V. E 欠乏の筋ミトコンドリアの呼吸調節能が低下している事<sup>8)</sup> などである。これらの事実は V. E 欠乏症ではミトコンドリアの機能障害がかなり重要な意味をもつ事が示唆される。

我々は先に正常ラット肝ミトコンドリアのエネルギー転換系に対する V. E の作用を検討し、特異的に  $K^+$  依存の DNP-ATPase 活性を阻害する事を明らかにした<sup>9)</sup>。しかもこの V. E の阻害作用を誘起するには、 $K^+$  によって DNP-ATPase が活性化される事を必要とする。即ちミトコンドリアのエネルギー転換系における  $K^+$  の ATPase 活性化作用を V. E が特異的に阻害している事を示すものと思われる。この様な実験事実に立脚して本研究ではミトコンドリアのエネルギー転換系に対する V. E と  $K^+$  との関係を検討し、エネルギー転換反応における  $K^+$  の作用が重要な役割をはたしている事を示唆すると同時に、その反応に対して V. E が作用する事を明らかにした。

## 方 法

### A) ミトコンドリアの分離

ドリュウ系ラット (体重約 200 g) の肝より Schneider の変法<sup>10)</sup> によって分画し、0.25 M Sucrose, 3 mM tris-HCl (pH 7.4) 中に懸濁した。

### B) 酸化的リン酸化反応

酸素電極 (ガルバニー電極) を用いた反応液中の溶存酸素濃度変化を経時的に測定し、RCI, P/D 比を算出した。反応温度 25 °C で容量 3 ml である。反応液は 0.25 M Sucrose, 3 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 2.5 mM Pi buffer (pH 7.4), 呼吸基質としてコハク酸ソーダ

5 mM, リン酸化基質の ADP は終末濃度 0.15~0.3 mM を使用した。

### C) リン酸化反応の測定

日立一堀場の pH メーターに直流増巾器を接続して, ATP 合成反応に伴う反応液中の  $H^+$  の減少を測定, 西村らの<sup>11)</sup>方法に従って ATP 1 分子当り  $H^+$  を 0.801 として計算した。

### D) ATP 加水分解反応

上記の pH メーターを用いて ATP 加水分解反応に伴う反応液中の  $H^+$  の報大より測定した。

### E) ミトコンドリアの加令処理法

0.25 M Sucrose, 3 mM Fris-HCl (pH 7.4) にミトコンドリアを懸濁し, 0°C で 24 hrs 加令させた。

### F) 種々 $K^+$ 濃度の等張液

0.25 M Sucrose と 0.15 M KCl を用いて, 浸透圧を一定に保ちながら,  $K^+$  の濃度を変化させて, 緩衝液にはトリス塩酸を用いた。終末濃度は 3 mM にした。

### G) Vitamin E の調製

99% エタノールに Vifamin E を 1 mM 溶かしたものを 50  $\mu$ l ミトコンドリアを添加後反応液に添加した。対照には 99% エタノールを用いた。

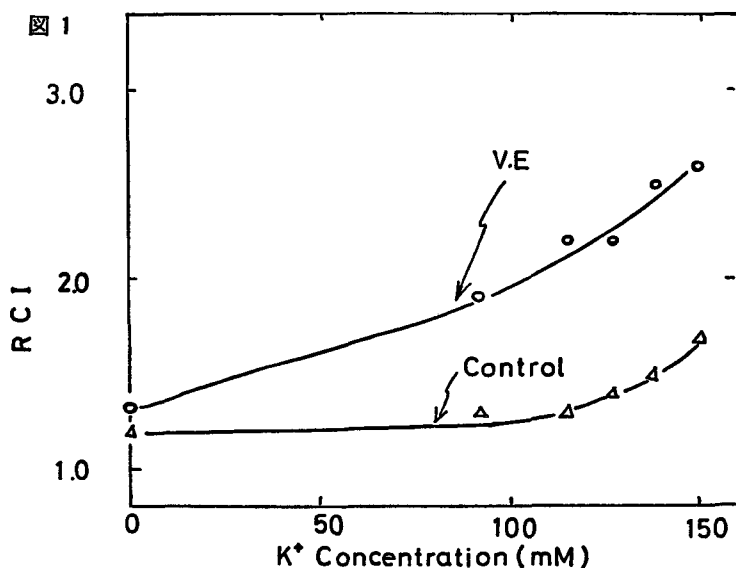
### H) 蛋白濃度測定

ビュレット法<sup>12)</sup>により測定した。

## 結 果

### 1. 呼吸調節能に対する V.E と $K^+$ の関係

無傷ミトコンドリアは基質がコハク酸の場合 RCI は 5~6 の値を示すが, 反応液に Mg が存在しないとこの値は 3~4 と若干低下する。この事は酸化的リン酸化反応に  $Mg^{2+}$  が要求されるという事実と一致する<sup>18)</sup>。これにエタノールを終末濃度 1.6% 加えミトコンドリアに傷害を与えると RCI は 1.7 と極端に低くなる。その様なミトコンドリアの RCI に対して,  $K^+$  は



どの様に作用を及ぼすかを検討し図 1 に示す様な結果を得た。この図から明らかな如く,  $K^+$  の濃度が低くなるにつれて RCI の低下が認められ, A. Gómez-Puyou らの結果と一致する<sup>14), 15)</sup>。即ち高い RCI を得るには  $K^+$  が要求される。この様なミトコンドリアに V.E を 16  $\mu$ M 加えると, この  $K^+$  の作用が著しく増加され, しかもエタ

ノール添加の対照に比して RCI がより高くなる。即ち V.E によりエタノールの傷害作用が阻止されしかもその作用は  $K^+$  の濃度に依存する事が明らかにされた。

ミトコンドリアを24時間加令すると、図2に示す如く初回のADP添加で示されるRCIの値が対照では $K^+$ の作用はほとんどみられないにもかかわらず、V.E添加により $K^+$ の作用が極めて高く認められる。このような現象は2回目のADP添加でより著明にみられる様になる(図3)。即ち対照では全く $K^+$ の作用が認められず完全に脱共役しているのが、V.E添加によって $K^+$ の作用に著明となり、しかもエタノールによる脱共役作用は $K^+$ の濃度に依存して阻止される様になる。

以上の実験結果はV.E添加によりミトコンドリアのATPase活性が抑制されている事を示唆する。

図2

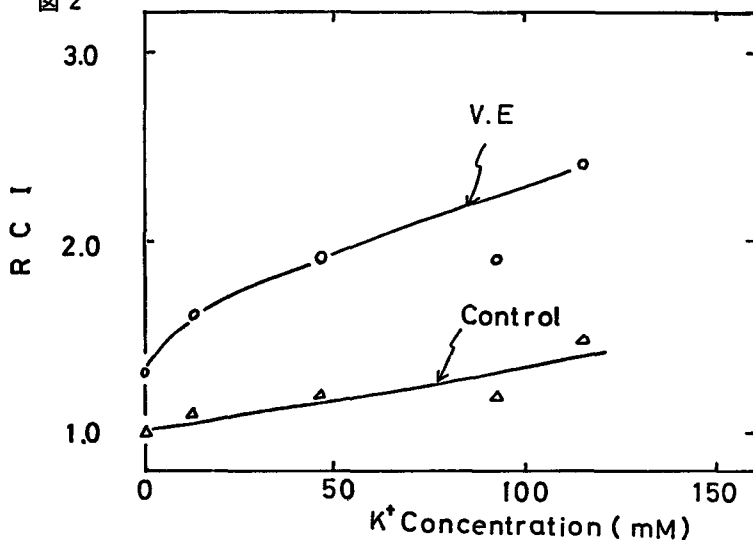
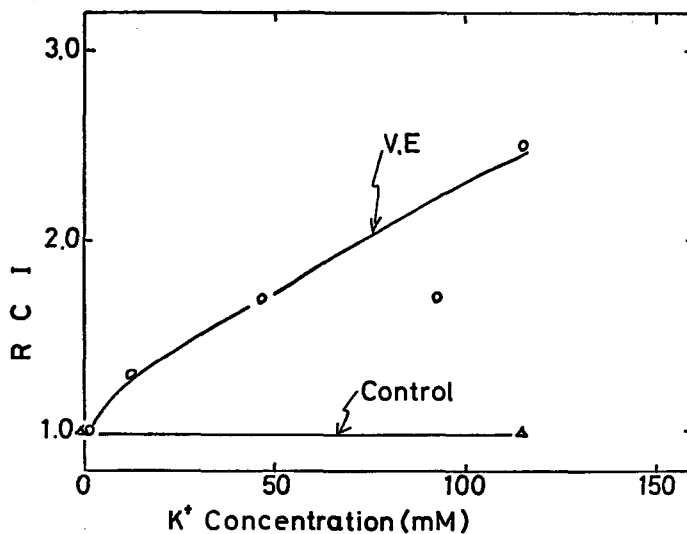


図3

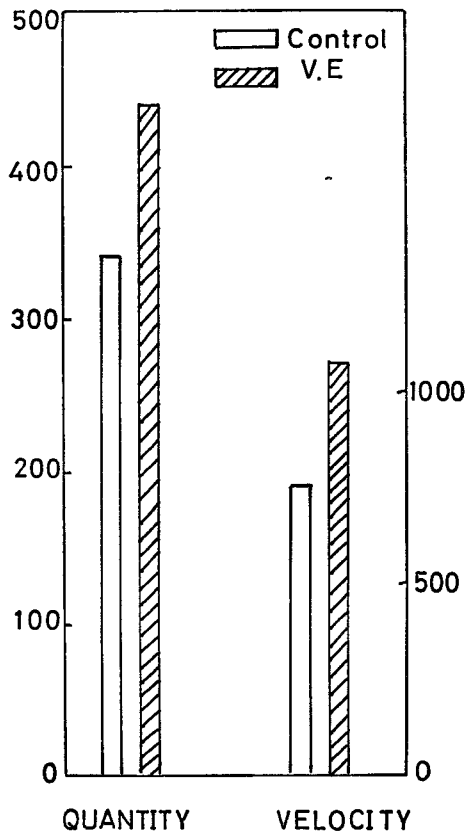


## 2. リン酸化反応に対する V.E の作用

ミトコンドリアは、 $ADP + Pi + nH = ATP + H_2O$  で示されるが如く、ATP合成反応には $H^+$ 濃度の減少を伴う事より、この $H^+$ 濃度の変化を測定する事によって、直接ADPのATPへのリン酸化量を測定する事ができる<sup>16)</sup>。この場合n値は0.801を用いた。

図4は0.15M KCl, 3mM Tris-HCl (pH7.4) 液中において、新鮮ミトコンドリアにV.Eを添加する時、ATP合成量及びリン酸化速度共に対照より高くでる事を示す。しかしこれらV.Eの作用はKClが反応液に存在しない0.25M Sucrose, 3mM Tris-HCl (pH7.4) 中ではほ

図 4  
The Amount of ADP phosphorylated (nmole/mg protein)

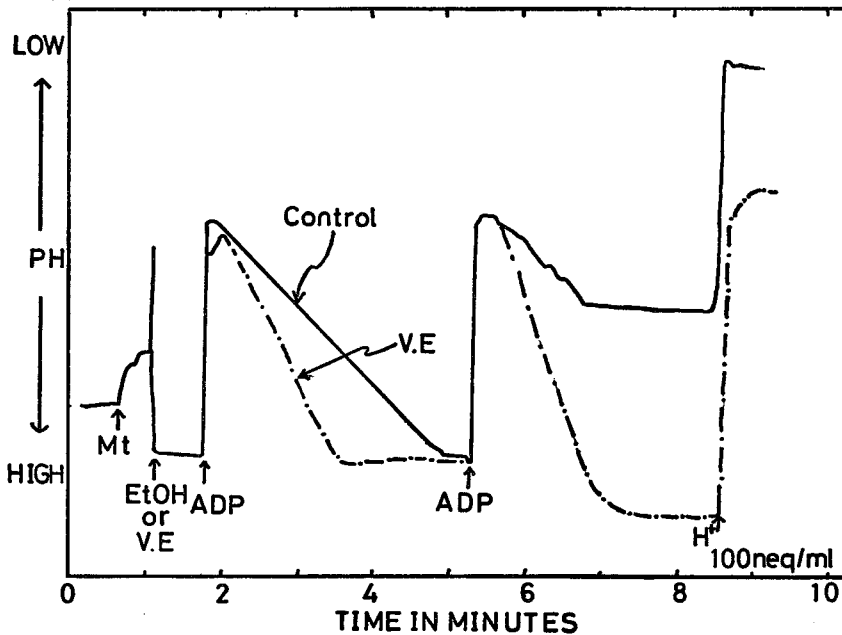


The Velocity of Phosphorylation (nmole/mg protein/min.)

とんどみられず (図に示していない) この V.E. の作用は  $K^+$  要求性である事が示唆される。

次にミトコンドリアを24時間  $0^{\circ}C$  で加冷させて同様にリン酸化反応を反応液中の  $H^+$  変化で測定すると、図5の如くである。図5から明らかな如く、対照は2回目の ADP 添加によるリン酸化反応は ATPase 活性の上昇により測定ができないが、V.E. 添加により初回の ADP 添加による呼吸調節同様リン酸化反応による呼吸調節が認められしかも2回目の方はリン酸化速度及び合或量共に増大しているのが認められる。又図に示していないが、もちろんこの場合  $K^+$  を含まない 0.25 M Sucrose 中では対照と V.E. 添加されたものとの両者に差が認められなかった。

図 5



### 3. ATPase 反応に対する V.E の作用

我々は先に  $K^+$  依存-DNP-ATPase 反応を V.E は特異的に阻害をかける事を報告したが、この現象が酵素としての ATPase そのものに対しても認められるかどうかを検討する意味で、Triton x-100 0.1% を添加しミトコンドリアを一部可溶化させての ATPase 活性を  $H^+$  の放出の初速度より計算しその結果が図6である。反応液は 0.15M KCl, 3 mM Tris-HCl (pH 7.4) である。この図から明らかな如く、ATP の濃度に無関係に Triton 処理された ATPase 活性は V.E により阻害される事が明らかにされた。更に先に報告した DNP-ATPase への作用を  $K^+$  の存在する場合としない場合について検討した。(図7, 8) 即ち本実験で行なった  $H^+$  の放出の測定からも明らかな如く、先の報告と一致し、 $K^+$  のある場合のみ V.E は ATPase 活性を抑制する結果を得た。

### 考 察

ミトコンドリアの呼吸調節やリン酸化速度に  $K^+$  が要求されるという報告は極めて多い<sup>14), 17)</sup>。しかし脱共役したミトコンドリアでも、例えば DNP-ATPase 活性が  $K^+$  で顕著な活性上昇が誘起される事が報告されている<sup>18)</sup>。また近年ミトコンドリア ATPase と内在 ATPase inhibitor との結合に対し  $K^+$  は阻害的に作用する事が明らかにされた<sup>19)</sup>。この様に  $K^+$  はミトコンドリアの共役状態、脱共役状態で各々異なった作用を示す事が明らかにされている。

本研究でも図1, 2, 3, に示す如く、 $K^+$  濃度に依存して RCI の上昇が見られるが、V.E は更にその作用を高める。これは恐らく  $Mg^{2+}$  のない反応液に 1.6% のエタノールを添加をしたために活

図 6

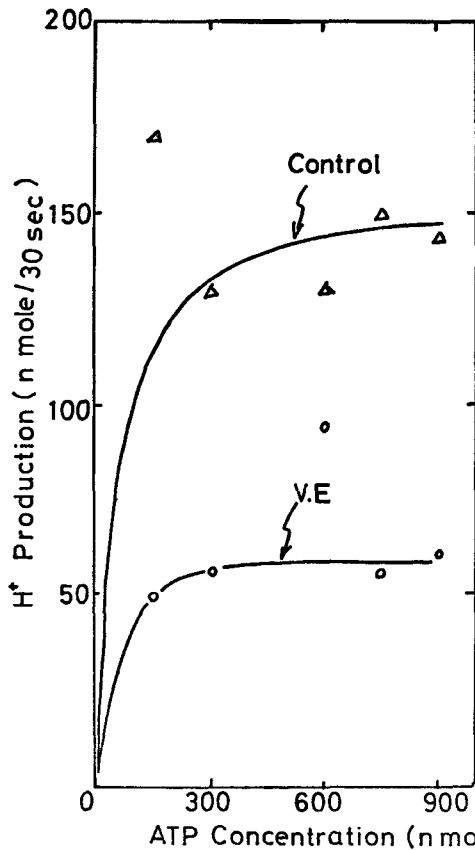
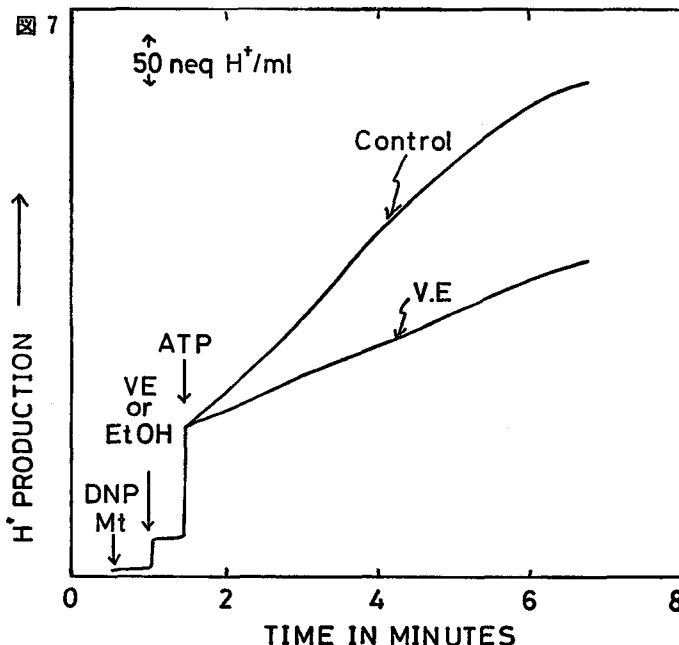
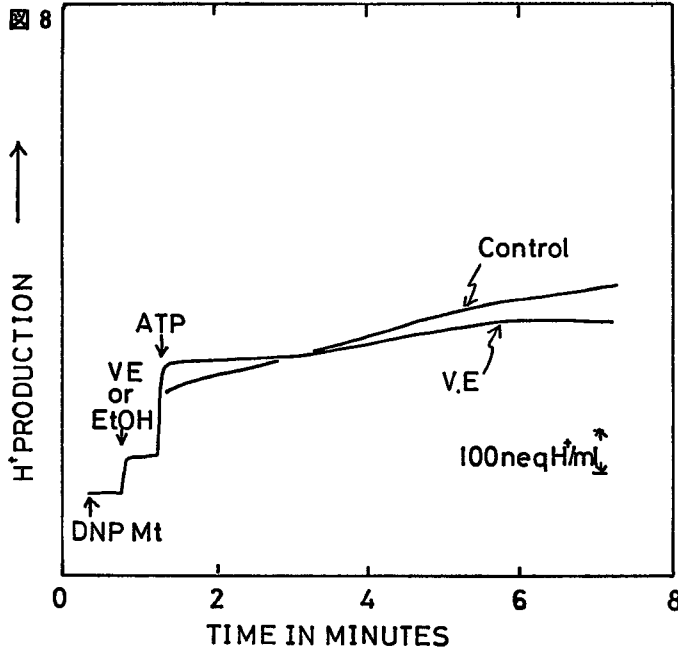


図 7





活性化された ATPase を抑制するためと考えられる。

24時間加令によるミトコンドリアでの呼吸調節能が初回と2回目で異なるのは、ADP 添加による呼吸調節と平行してミトコンドリア内の ATP 量が増大し、ATPase 活性がより活性化される (図6) ため2回目の ADP 添加で呼吸調節が認められなくなるものと考えられる。しかし State 4 の呼吸が増大しない事から、この点については更に検討を加える必要がある。これに反し、V.E 添加では ATPase 活性を抑制する事によって (図6) RCI が高められ

る。しかもこの時の  $K^+$  の要求性は極めて高い。これは図7に示す如く V.E が ATPase 活性を阻害するのが  $K^+$  溶液中でのみ認められ、Sucrose 中では観察されたい事からも明らかである。

この様に V.E はミトコンドリア内在 ATPase inhibitor 同様、ミトコンドリアのエネルギー転換系に対し重要な調節因子として作用している事が示唆され、事実中尾らの膜 ATPase<sup>e</sup> 特に Na-K-ATPase を阻害するという報告<sup>19)</sup> は他の膜エネルギー転換系との関係で注目される。

## 結 論

ミトコンドリアのエネルギー転換系に対する  $K^+$  依存性の V.E の作用を検討し次の結果を得た。

1.  $K^+$  濃度に依存して RCI の上昇が見られ V.E は更にその作用を高めた。
2. 加令ミトコンドリアも上記の新鮮なミトコンドリア同様  $K^+$  の RCI に対する作用が見られたが、V.E の作用は新鮮なものに比較して更に著明に観察された。
3. ADP のリン酸化反応を溶液中の  $H^+$  の減少で測定した結果、新鮮なミトコンドリアでは、対照よりも V.E 添加群の方が、ATP 合成量及びリン酸化速度共に高い活性を示した。加令ミトコンドリアでは、対照群は ATPase 活性増大によると思われるリン酸化反応阻害がみられたが、V.E 添加ではみられなかった。新鮮及び加令ミトコンドリア両者共に  $K^+$  のない場合には対照と V.E 添加との間に差が認められなかった。
4. Triton X-100 処理のミトコンドリア ATPase 活性を V.E は阻害した。更に DNP-ATPase 活性を  $K^+$  のある場合にのみ V.E は阻害した。
5. 以上の結果より V.E はミトコンドリアのエネルギー転換系に対し重要な調節因子として作用する事が示唆された、これに  $K^+$  を必要とする事が明らかされた。

- 図 1. 新鮮ミトコンドリアの呼吸調節能に対する  $K^+$  濃度及び V.E の作用  
 反応液 2.5mM Pibuffer (pH 7.4) 5 mM コハク酸ソーダ, 0.3mM ADP, 及び方法  
 に従って  $K^+$  濃度をかえた。2 mg 蛋白/ml 存在 (ミトコンドリア)  
 対照は 1.6% エタノール, V.E は 16 $\mu$ M 添加してある。反応容量 3 ml で反応温度は  
 25°C である。
- 図 2. 24時間加令ミトコンドリアの ADP 添加による初回目の呼吸調節能に対する  $K^+$  濃度及  
 び V.E の作用  
 反応条件は図 1 に同じ。但し ADP は 0.15mM 添加。
- 図 3. 24時間加令ミトコンドリアの ADP 添加による 2 回目の呼吸調節能に対する  $K^+$  濃度及  
 び V.E の作用  
 反応条件は図 2 に同じ。
- 図 4. 新鮮ミトコンドリアのリン酸化反応に対する V.E の作用  
 反応液 0.15M KCl, 3 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 2.5mM Pi, 5 mM Na-Suc-  
 cinate, 450 n moles ADP/ml, ミトコンドリア蛋白は 0.25mg/ml である。  
 反応容量は 3 ml, 反応温度 25°C である。対照は 1.6% エタノール及び V.E は 16 $\mu$ M  
 添加。
- 図 5. 24時間加令ミトコンドリアのリン酸化反応に対する V.E の作用  
 反応条件は図 4 と同じ, 但し添加 ADP 量は 225 n moles/ml である。
- 図 6. Triton X-100 処理ミトコンドリアの ATPase 活性に対する V.E の作用  
 反応液, 0.15M KCl, 3 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)  
 反応容量は 3 ml, 反応温度 25°C である。  
 対照は 1.6% エタノール, V.E は 16 $\mu$ M 添加。ミトコンドリア蛋白は 1 mg/ml であっ  
 た。Triton 処理は 35mg 蛋白/ml のミトコンドリア懸濁液 1 ml に Triton 1% を 10  $\mu$ l 添  
 加したものをを用いた。
- 図 7. DNP-ATPase 活性に対する V.E の作用  
 反応液 0.25M Sucrose, 3 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), DNP  $6 \times 10^{-5}$ M, ATP  
 1 mM  
 ミトコンドリア蛋白は 1 mg/ml であった。  
 対照は 1.6% エタノール, V.E は 16 $\mu$ M 添加。
- 図 8. DNP-ATPase 活性に対する V.E の作用  
 反応液 0.15M KCl, 3 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), DNP  $5 \times 10^{-5}$ M, ATP 1 mM  
 その他の条件は図 7 と同じ。

## 文 献

- 1) The Fat-Soluble Vitamins: ed. H. F. Deluca, J. W. Suttie: Univ. Wisconsin Press.  
P.P. 369-74
- 2) Lucy, J.A., Dingle, J.T., : Nature 204, 156, (1964)
- 3) Murty, H.S., Caasi, P.I., Brooks, S.K., Nair, P.P. : J. Biol. chem. 245, 5498, (1970)
- 4) Brown, R.G., Button, G.M., Smith, T.R. : J. Nutr. 91, 99 (1967)
- 5) Olson, R.E., Carpenter, P.C. : Advan. Enzyme, Regul 5, 325 (1967)
- 6) Wasserman, R.H., Taylor, A.N., : Ann. Rev. Biochem. 41, 182 (1972)

- 7) Carabello, Fran K.B., Bird, John. W.C., : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 92 (1969)
- 8) Grigor'eva, V.A., Shchukina, L.V., : *Ukr. Biokhim. Zh.* 39, 366 (1967)
- 9) Hasegawa, T, Ogata, M, Utsumi, K. : 投稿中
- 10) Utsumi, K. : *Acta. Med. Okayama* 17, 259 (1963)
- 11) Nishimura, M, Ito, T, Chance, B. : *Biochim. Biophys. Acta* 59, 177 (1962)
- 12) Layne, E. : *Methods in Enzymol.* 3. 447 (1957)
- 13) MacIennan, D.H', Tzagoloff, A. : *J. Biol. Chem.* 241, 1933 (1966)
- 14) Gómez-Puyou. A., Sandaval. F., Tuena. M., Senä, A., Chàvez, E., : *Biochim. Biophyo. Res. Commun.* 36, 316, (1969)
- 15) Gómez-Puyou, A., Sandaval, F., Tuena, M., Senä, A., Chávez, E., : *J. Biol. chem.* 245. 5239, (1970)
- 16) Ito, T. : 酵素化学シンポジウム予講集 13, 97, (1661)
- 17) Harris, E.J., Sressman, B.C., : *Biochemistry* 6, 1348, (1967)
- 18) Amons, R., Von den Bergh, S.G., Slater, E.C., : *Biochim. Biophyo, Acta.* 162. 452, (1968)
- 19) Kawai. K., Nskao, M., Nakao, T., Katsui, G., : *Am. J. Cclin-Nutr.* 27, 987, (1974)