

Title	ミトコンドリアの生化学的研究
Author(s)	小川, 嘉誉
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/28730">http://hdl.handle.net/11094/28730</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	小 川 嘉 誉
	お がわ よし たか
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 6 7 8 号
学位授与の日付	昭 和 40 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 生 理 系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ミトコンドリアの生化学的研究
	(主査) (副査)
論文審査委員	教 授 坂 本 幸 哉 教 授 萩 原 文 二 教 授 次 田 皓

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

ミトコンドリア(Mc)の微細構造に関しては最近次第に明らかになり、その機能との関係も、Green一派、その他の人々によって次第に明らかにされてきた。即ち Mc は ①不溶性の構造蛋白(S. P)と磷脂質よりなる二重の網状組織と ②その中にはめこまれた、或いはそれに結合した電子伝達連鎖(基本粒子)及び ③これらに結合した容易に可溶化されるクエン酸回路の酵素群、その他の酸化酵素系及び酸化的リン酸化共軛因子(可溶性分画)からなると考えられている。

しかしながらこの Mc のでき方についてはほとんど分っていない現状である。そこで私はこの問題の解明に資する目的で、まずラット肝 Mc を使用して、これら3つの亜分画の分離(特に S. P に関して)を行ない種々状態における Mc 及び亜分画への C<sup>14</sup>-アミノ酸の取り込みを調べた。

#### 〔方法並びに成績〕

#### I ミトコンドリア分画の調製

##### (1) 構造蛋白調製実験

ラット肝の 0.25 M sucrose+1 mM EDTA (pH 7.4) の 10% ホモジェネートを 1000×g, 10 分間遠心し、その上清を 8000×g, 15 分間遠心、その沈渣を更に 0.25 M sucrose で 3 回洗滌したものを Mc 分画として使用した。

##### (2) アミノ酸取り込みに関する実験

上記実験より更にミクロゾーム(Ms)の混在を少なくするため肝の 10% ホモジェネートを 800×g, 10 分間遠心し、その上清を 5000×g, 15 分間遠心し、その沈渣を 5~6 回、0.25 M sucrose で洗滌し Mc 分画とした。この様な分画では、Ms の marke renzyme である G-6-Pase. esterase 活性はほとんどなく、又予め標識した Ms をこの分画に人為的に混合した場合も、この

条件で洗滌することにより除去しうる。

## II 構造蛋白に関する研究

### (1) 調製法

第1法 Green 等が牛心筋 Mc より S.P を調製した方法を部分的に改良した。0.25 M sucrose に浮遊せる Mc に deoxycholate, cholate, sodium dodecylsulfate (SDS) を各々 2%, 1%, 0.75% に加え, 105000×g 1時間遠心し, その上清に硫安を 12% 飽和に加え, 生じた沈澱を, deoxycholate, 20% 飽和硫安存在で butanol (容量で 20%) 処理して脂質を除き, 更に 50°C で 30 秒間, 50% methanol で 2 回処理すると白黄色沈澱が得られる。

第2法 Green 等が基本粒子の調製に使用した方法を改良した。Mc を A.W.Linnane 等の方法により超音波砕砕し, 105000×g 1時間遠心することにより可溶性分画を除き (isocitrate dehydrogenase を指標とし全活性が上清にあることを確かめている。) その沈渣に cholate, deoxycholate を 0.5 mg/mg protein 加え硫安分画を行なう。

0~15% 硫安飽和の分画には succinate-cytochrome c reductase 活性はみられず構造蛋白と基本粒子を含む分画とはこれによって分離される。以下第1法と同じく butanol, methanol 処理をする。

### (2) 性質

この様にして得られた S.P. 分画は, 水には全く不溶性であり, 0.5% 以上の溶解度をうるには, SDS と稀釈 NaOH を含む溶液 (pH 12.0 以上) が必要である。この溶液は, 280 mμ に最大吸収をもち, heme の吸収はみられない。超遠心分析, 電気泳動でもほぼ単一のピークを示し, 第1法と第2法でえたものについてアミノ酸分析を行なったが同様であった。

(3) 再生肝, DAB を含む飼料で飼育せるラット肝 (DAB 食肝), DAB 肝癌, AH 腹水細胞から S.P を取り取量, 性質を比較した。S.P の Mc の総蛋白量に対する割合は, 正常肝 20%, 再生肝 17%, AH 腹水細胞 16% (2例), DAB 肝癌 15% (1例), DAB 食肝 (5ヶ月~7ヶ月) 12% (ばらつきが大きい。) であつた。DAB 食肝については, 正常肝と超遠心, 電気泳動, アミノ酸分析で比較した。

## III Mc 及び亜分画へのアミノ酸の取り込み

ネムブータル麻酔下でラットの大腿静脈より  $C^{14}$ -valine (16.6 μc) を注射後, 一定時間に肝を取り出し Mc 及び亜分画 (第2法) の調製を行なった。

### (1) 取り込み時間との関係

取り込み時間 10 分の場合, Mc への相対的比活性  $\left(\frac{\text{Mc の総カウント数}}{\text{Mc の総蛋白量}} / \frac{\text{ホモジェネートの総カウント数}}{\text{ホモジェネートの総蛋白量}}\right)$  は低い が 2 時間, 24 時間になるにつれて上昇する。Ms では減少する。又亜分画への取り込みは, 10 分では, 最も S.P 分画で比活性 (S.A) も, 相対的比活性 (R.S.A) も高く時間がたつにつれて他の 2 つの分画では高くなって来る。

### (2) DAB 食 “初期取り込み” への影響

DAB 食肝 (3ヶ月, 及び 6~7ヶ月) の Mc への取り込みは, 正常肝に比して少し減少してい

る程度で亜分画への取り込み方にも大差はなかった。

DAB 肝癌の Mc では、肝癌周辺部、及び正常肝より R.S.A は高かった。

### (3) 再生肝との比較

部分的肝切除後、48時間経過せるラット Mc への取込みをみた。取り込み時間10分では S.A は、正常肝より2~3倍高いが、R.S.A は低かった。2時間後では S.A, R.S.A 共に正常より高くなる。

亜分画への取り込みについては再生肝では、可溶性分画では少し減少している傾向にあり他の2つの亜分画では少し高い様な傾向にある。

#### 〔総括〕

- ① ラット肝 Mc を更に細分画し、ほぼ単一と思われる構造蛋白を得、更にその諸性質を検討した。
- ② in vivo での Mc へのアミノ酸の取り込みをみると、短時間で Mc への取り込みがあり時間と共に増加している。これは Mc 自身の蛋白合成によるものと思われる。その際構造蛋白への取り込みが最も早い。従ってこの部分が Mc の蛋白合成更に形成に重要な役割を果しているのではないかと考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

ミトコンドリアは構造蛋白、基本粒子、及び可溶性部分からなると考えられているが著者はラットの肝臓のミトコンドリアを使用してミトコンドリアを3つの component に細分画した。特に構造蛋白に関しては、これを更に精製し、電気泳動、超速心分析で、ほぼ単一のものを得、アミノ酸分析等の諸性質を調べ、Green 等が精製した牛心筋ミトコンドリアの構造蛋白とかなり類似したものであることを認めた。

更に種々条件下におけるラット肝のミトコンドリア及びその亜分画への  $C^{14}$ -valine の“とりこみ”を調べ、in viro 及び in vitro でミトコンドリアの蛋白への  $C^{14}$ -valine の“とりこみ”が行なわれていることを確認し、その“とりこみ”が細胞の増殖の盛んな DAB 肝癌、再生肝で高くなっていることから細胞の増殖と密接な関係をもっていることを明らかにした。又 DAB を長期に投与したラット肝では“とりこみ”の減少がみられるが、この事実は発癌ということと関連して極めて興味深い。次にミトコンドリアの亜分画の“とりこみ”を調べたが3つの分画のうち、特に構造蛋白への“とりこみ”が最も早く、多くとりこまれ、他の分画へは、時間の経過と共に“とりこみ”の割合が多くなること、又細胞増殖の盛んな組織では可溶性分画への“とりこみ”が更に低くなり、又 in vitro でも可溶性分画への“とりこみ”が in vivo の場合より更に低くなることからミトコンドリアの蛋白へのアミノ酸の“とりこみ”の主要な部分が構造蛋白を含む膜様構造の部分にあることを明らかにした。

以上本研究は、ミトコンドリアの蛋白合成の意義、ミトコンドリアの細胞内における形成の問題に対する示唆を与えた独創的な研究である。