

Title	虚血肝細胞壊死の分子機作 ATPによるミトコンドリアの酸化的磷酸化能の保護の作用を中心にして
Author(s)	渡邊, 房男
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/34649">https://doi.org/10.18910/34649</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

【42】

氏名・(本籍)	わた 渡	なべ 邊	ふさ 房	お 男
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6836	号	
学位授与の日付	昭和60年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	虚血肝細胞壊死の分子機作 ATPによるミトコンドリアの酸化的磷酸化能の保護の作用を 中心にして			
論文審査委員	(主査) 教授	田川 邦夫		
	(副査) 教授	山野 俊雄	教授	和田 博

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

虚血によって、肝臓、腎臓などの組織が壊死に陥るのは、その組織のミトコンドリアが、無酸素条件下で、酸化的磷酸化能を失うことが、ひとつの要因である。よって、無酸素条件下でのミトコンドリアの酸化的磷酸化能の障害の機作を究明することは臨床的にも重要な問題である。我々はこの酸化的磷酸化能の障害がミトコンドリア内アデニンヌクレオチド特にATP, ADPの分解消失によること及びアデニンヌクレオチド含量を維持すると酸化的磷酸化能が保護されることをみいだした。このことは単離したミトコンドリアを無酸素条件に保温した実験系においても確認された。単離したミトコンドリアにアデニンヌクレオチド(ATP, ADP)を添加すると酸化的磷酸化能が保護される。このことは古くから知られてきたにもかかわらずその保護作用がどのような機作によるのか解明されてはいなかった。今回、このアデニンヌクレオチドの酸化的磷酸化能の保護の機作をアデニンヌクレオチドの不代謝性の各種アナログを用い解明しようとした。その結果、この保護作用はATPのみにみられること及びATPは、エネルギー供給源として作用するのではなくATP分子自体の作用によって酸化的磷酸化能を保護していることが明らかとなった。

(方 法)

(ミトコンドリアの調製) 一晩絶食した雄性SD系ラットをケタミン麻酔下に開腹後、肝臓を採取し、これよりミトコンドリアをEDTA, BSAを含む0.3 Mマンニトール液中で調製した。

(虚血肝モデルの作成) 虚血肝モデルは採取した肝臓を生理的食塩水中で37℃に保温して作成した。

(ミトコンドリアの保温条件) ミトコンドリアをMgCl<sub>2</sub>, EDTA, BSA, Tris-HCl buffer, 磷酸

buffer を含むマンニトール液中で、ミトコンドリアが10-17mg protein/mlになるように分散し無酸素条件下に25°Cの保温を行った。

(アデニンヌクレオチド及びそのアナログの定量法) ミトコンドリアを遠心ゲルろ過法を用いて外液と分離したのち、アデニン化合物を0.5 N 過塩素酸水溶液で抽出した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。

(ミトコンドリアの酸化的磷酸化能の測定) ミトコンドリアの酸化的磷酸化能の障害は最も鋭敏な指標である呼吸調節能の低下で評価した。ミトコンドリアの呼吸速度は、コハク酸を基質として、クラーク型酸素電極を用いて測定した。

#### (成 績)

- (1) 虚血肝より単離したミトコンドリアの酸化的磷酸化能は、虚血時間の延長に従って低下し、2時間で消失した。このときミトコンドリア内のアデニンヌクレオチド含量もこれに平行して消失した。単離したミトコンドリアでも無酸素条件下で保温すると、その酸化的磷酸化能もアデニンヌクレオチド含量も虚血肝の場合と同様の低下が見られた。
- (2) 無酸素条件下における酸化的磷酸化能の消失は、state 3 呼吸の減少も部分的には寄与するが、主にはstate 4 呼吸の増加による。この増加したstate 4 呼吸はオリゴマイシンによって阻害されないことから、FoF<sub>1</sub>-ATPaseの活性化によるものではなく、H<sup>+</sup>に対するミトコンドリア内膜の透過性の増加によることが示された。
- (3) state 3 呼吸の減少は、脱共役剤によって開放されるミトコンドリアの呼吸速度が一定であることから、従来から言われてきたような呼吸鎖の傷害によるのではなくミトコンドリア内アデニンヌクレオチド含量の低下によってATP/ADPトランスロケースによるADPの取り込みが障害をうけるためである。
- (4) ATPの添加はこれらの酸化的磷酸化能の傷害を保護するが、このATPはミトコンドリアによって、ゆっくりと分解されていた。ミトコンドリアによって分解されないATPアナログの添加でも酸化的磷酸化能を保護できることから、このATPによるミトコンドリアの保護作用はATP分解によるエネルギーを必要としないことを示している。
- (5) ADPの添加も、みかけ上ではミトコンドリアの酸化的磷酸化能を保護する。しかし、ADPはそれ自身が保護作用を持つのではなく、ミトコンドリア内のアデニレートキナーゼによって生じたATPが作用していると考えられる。このことはアデニレートキナーゼの基質にならないADPアナログは酸化的磷酸化能を保護しないことから確かめられた。

#### (総 括)

- (1) 虚血によるミトコンドリアの酸化的磷酸化能の消失はミトコンドリア内のATPの分解消失に起因する。
- (2) 無酸素条件下におけるミトコンドリアの傷害は、ATP消失によるミトコンドリア内膜のH<sup>+</sup>に対する透過性の増加による。
- (3) 単離したミトコンドリアにおいてもATPの保護作用はみられる。この保護機作にはエネルギーの

供給を必要としない。

### 論文の審査結果の要旨

高等動物の臓器への血流を長時間遮断すると、その組織は傷害を受け壊死に陥る。この問題は細胞生物学のみならず臨床医学的にも虚血手術時の臓器保護や梗塞の治療などに関連をもち、従来より多くの研究がなされてきた。この虚血性傷害は、ミトコンドリアの酸化的磷酸化能の消失が原因であるとされていたが、酸化的磷酸化能の消失の詳細な機作については不明な点が多かった。

本論文は、ミトコンドリアの酸化的磷酸化能の維持にはミトコンドリア内のアデニンヌクレオチド、特に ATP が必要であり、無酸素条件下ではこの ATP が分解消失するために酸化的磷酸化能が傷害されることを明らかにした。この研究は虚血性細胞壊死の機作を解明する上に大きい貢献をなすもので、医学博士の学位を授与するに値すると認めた。