



Title	ラット肝ミトコンドリア活性酸素除去系のt-ブチルヒドロペルオキシド負荷による定量的解析
Author(s)	芝田, 英生
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36000
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【6】

氏名・(本籍)	しば	た	ひで	お
	芝	田	英	生
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8083	号	
学位授与の日付	昭和63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	ラット肝ミトコンドリア活性酸素除去系のt-ブチルヒドロペル オキシド負荷による定量的解析			
論文審査委員	(主査)			
	教授	田川	邦夫	
	(副査)			
	教授	坂本	幸哉	教授 谷口 直之

論文内容の要旨

[目 的]

高等生物は好氣的代謝を営み効率良いエネルギー変換を行っている。好氣的代謝にともないスーパーオキシドアニオン (O_2^-) 等の活性酸素分子種が細胞質、ミトコンドリア (Mt) で発生することが知られている。細胞には、この活性酸素による過酸化障害防御のため、グルタチオン (GSH)、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、GSHペルオキシダーゼ、GSSG還元酵素が存在している。実際に、灌流肝、培養細胞、単離したMtにt-ブチルヒドロペルオキシド (t-BuOOH) などで酸化ストレスをかけるとGSH、NADPHの酸化が起こることが報告されてきた。本研究では、新たに確立したGSH、NADPHのHPLCによる微量定量法を利用し、GSHペルオキシダーゼの基質となるt-BuOOHを用いて、ラット肝Mtにおける活性酸素除去系の律速段階を明らかにし、その定量的解析を行った。

[方 法]

300g雄性SDラット肝より調製したMt分画にt-BuOOHを用いて酸化ストレスをかけGSH、NADPHの変化を測定した。GSHは、過塩素酸抽出液をHPLCを用いて分離後、白金を作用電極とする電気化学検出器を用いて定量を行った。NADPH、NADHは、過塩素酸抽出液を24時間0℃に保ちADPリボースリン酸、ADPリボースにそれぞれ転換した後、HPLCを用いて分離定量を行った。NADP、NADはHPLCを用いて、t-BuOOHは酵素法でそれぞれ定量を行った。

[成 績]

単離したMtにt-BuOOHを添加するとGSH、NADPHはそれぞれGSSG、NADPに酸化さ

れ、t BuOOHは0次反応で還元された。t BuOOHは垂ミトコンドリア粒子やGSH不存在下のMtマトリクス分画で還元されないことから、GSHペルオキシダーゼによって還元されていると考えられた。このt BuOOHの還元速度は呼吸基質の添加により増加したことからNADPHの供給により決定されていると考えられた。

MtのNADP(H)含量は6.1nmol/mg proteinでNAD(H)含量の約2倍であった。NAD(H)はstate 3ではほぼ全て酸化型で存在していたが、NADP(H)は約90%が還元型で存在していた。

MtでNADPHの供給を行う酵素は、NADP-イソクエン酸脱水素酵素とピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼの2種類存在することが知られている。これらの2種類の酵素によるNADPHの供給を調べるために、呼吸状態と呼吸基質を変えた時のt BuOOHの還元速度、GSH及びNADPHの変動を調べた。state 4でクエン酸、コハク酸、 α ケトグルタル酸(α KG)を基質としたt BuOOHの還元速度は、それぞれ13.2, 13.2, 8.8nmol/min/mg proteinであった。いずれの場合もGSHは95%以上が酸化されたが、NADPHは α KGを基質とした時のみ酸化が認められた。state 3では、クエン酸、コハク酸、 α KGを基質としたt BuOOHの還元速度は、それぞれ9.2, 6.1, 5.4nmol/min/mg proteinであった。いずれの場合もGSHは95%以上が酸化され、NADPHの酸化が認められた。この結果から、state 4でクエン酸、コハク酸を基質とした時はGSSG還元酵素が、state 4で α KGを基質とした時及びstate 3ではNADPHの供給が律速段階となっていることが示された。以上の各条件下及び、CCCP存在下のt BuOOH還元速度の差から求めたクエン酸、コハク酸、 α KGを基質とした場合のトランスヒドロゲナーゼ活性は、生理的条件に近いと考えられるstate 3では、それぞれ4.0, 3.7, 3.7nmol/min/mg proteinであった。また、イソクエン酸脱水素酵素の活性は5.2nmol/min/mg proteinであった。

次に、NADPHの供給がt BuOOH還元の律速段階である時のNADPHレベル、GSSG還元酵素活性及びt BuOOHの還元速度の関係を解析した。その結果、GSSG還元酵素はNADPによって拮抗阻害を受け、阻害定数は20 μ Mであった。各条件で実測したt BuOOH還元速度は、NADPH、NADPの含量より計算されたGSSG還元酵素活性の理論値とよく一致した。この結果から、NADPH、NADPの含量からNADPHの供給速度が求められることが示された。

[総括]

1. ラット肝Mt内NADP(H)含量はNAD(H)含量の約2倍であり、生理的条件に近いstate 3では約90%が還元型で存在していた。
2. Mtの活性酸素除去系は生理的条件に近いstate 3ではNADPHの供給で律されており、この場合にはNADPH、NADPの含量からNADPHの供給速度を求めることができる。
3. state 3でトランスヒドロゲナーゼによるNADPHの供給速度は、クエン酸、コハク酸、 α KGを基質にした場合、それぞれ4.0, 3.7, 3.7nmol/min/mg proteinであった。
4. state 3で、イソクエン酸脱水素酵素によるNADPHの供給速度は5.2nmol/min/mg proteinで、トランスヒドロゲナーゼ以上にNADPHの供給に寄与していると考えられた。

論文の審査結果の要旨

ミトコンドリアでは活性酸素により過酸化障害の起こることが知られているが、活性酸素が不安定なラジカルであるためその除去系の定量的な解析は殆ど行われていない。本研究では、NADPH, GS Hの微量定量法を開発し、肝ミトコンドリア活性酸素除去系の動力学的解析を行っている。その結果、肝ミトコンドリアではNADPHは呼吸状態に関係なく還元型で存在すること、活性酸素除去系の速度はNADPH供給速度に依って決定されていること、NADPH供給にはトランスヒドロゲナーゼ、NADP-イソクエン酸脱水素酵素が約1 : 1で寄与しており、最大速度は呼吸速度の約15%であることを明らかにした。これらの知見は活性酸素除去系の解明、過酸化障害の病態の解析に貢献が大きく、本論文は学位論文として価値あるものと認められる。