



Title	Ca <sup>2+</sup> -induced accumulation of pyrophosphate in mitochondria during acetate metabolism
Author(s)	井上, 徹
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37138">https://hdl.handle.net/11094/37138</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

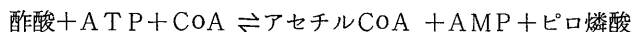
【 4 】

氏 名・(本籍)	い	うえ	とおる
	井	上	徹
学 位 の 種 類	医	学	博 士
学 位 記 番 号	第	9 0 6 8	号
学位授与の日付	平 成	2 年	3 月 2 4 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	Ca <sup>2+</sup> -induced accumulation of pyrophosphate in mitochondria during acetate metabolism		
	酢酸代謝過程におけるピロリン酸の肝ミトコンドリア内蓄積		
論文審査委員	(主査)	田川 邦夫	
	教授	鎌田 武信	教授 和田 博
	(副査)		
	教授		

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

酢酸は、輸液や血液透析療法に用いられる他、エタノールの代謝産物としても人体に大量に負荷される物質であるが、一般には無毒と考えられている。酢酸は、主として肝臓で次の反応で迅速に代謝される。



この反応の平衡は、ATP産生側にずれているので、反応が進むにはピロリン酸がピロフォスファターゼによって加水分解されることが必須である。しかし最近、ラット肝で酢酸の腹腔内投与による大量（対照の100倍）のピロリン酸の蓄積が報告され、これが輸液や透析療法時の病態やエタノールによる細胞障害の原因である可能性がある。本研究は、この酢酸投与によるピロリン酸蓄積の機構の解析を目的とした。

〔 方 法 〕

絶食したSD系雄性ラット（200g～250g）肝を95% O<sub>2</sub>と5%CO<sub>2</sub>で平衡化した重炭酸緩衝液で灌流し、灌流液に酢酸・ホルモン等を加えてその影響を調べた。ミトコンドリアは常法により単離した。ピロリン酸、ケトン体、尿素は酵素法で、酢酸はHPLCでそれぞれ定量した。Ca<sup>2+</sup>は、Arsenazo IIIを用いて比色定量した。

〔 成 績 〕

- ① 灌流肝におけるピロリン酸の蓄積：10 mM 酢酸を単独で灌流液に加えても、肝のピロリン酸量は0.09 μmol/g 肝と対照（0.02 μmol/g 肝）に比べ僅かしか増加しなかった。酢酸の腹腔内投与では絶食ラットでのみピロリン酸の大量蓄積がみられたことから、絶食状態で肝に作用すると考えられるノルアドレナリンやグルカゴンを酢酸とともに灌流液に加えると、ピロリン酸は0.2 μmol/g 肝と更に増加し

たが、腹腔内投与時に比べるとまだ10分の1の量であった。そこでこれらのホルモンを両者同時に酢酸とともに灌流液に添加すると、 $2.4 \mu\text{mol/g}$  肝と腹腔内投与時と同程度の蓄積量となった。灌流肝による酢酸の代謝は、ホルモンによって増大することはなかったことから、これらのホルモンの作用はピロリン酸の産生の増加ではなく、分解の抑制にあると考えられる。グルカゴンには、ノルアドレナリンなどによる肝細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇を更に増大させる作用のあることが知られている。したがってこれらホルモンによるピロリン酸の蓄積は、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の関与を示唆している。事実、灌流液から $\text{Ca}^{2+}$ を除くか、 $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗剤を加えると、上記のホルモンが存在しても蓄積はみられなかった。すなわち灌流肝におけるピロリン酸の蓄積は、細胞内に増加した $\text{Ca}^{2+}$ によってピロフォスファターゼが阻害された結果と考えられる。

- ② ピロリン酸のミトコンドリア内蓄積：グルタミンを酢酸の代わりに灌流液に加えて尿素サイクルを活性化しても、肝ピロリン酸量は全く増えなかった。酢酸の代謝は、細胞質とミトコンドリア両方で行われるのに対し、尿素サイクルでは細胞質でのみピロリン酸ができることから、ミトコンドリアで発生したときのみ蓄積すると考えられた。

そこで酢酸とホルモンによりピロリン酸の蓄積した灌流肝よりミトコンドリアを単離したところ、対照ミトコンドリアに比べ50倍、肝全体の量をほぼ説明できるピロリン酸の蓄積がみられた。また酢酸やホルモン単独ではこのピロリン酸の蓄積は小さく、灌流肝での結果とよく一致した。次にこのミトコンドリアの $\text{Ca}^{2+}$ 含量を調べるために、脱共役剤によるミトコンドリアからの $\text{Ca}^{2+}$ の放出をみた。ピロリン酸の蓄積したミトコンドリアでは、 $\text{Ca}^{2+}$ の放出は対照群（ $4 \text{ nmol/mg}$  蛋白）に対し $25 \text{ nmol/mg}$  蛋白とはるかに多く、またこのときピロリン酸は、 $\text{Ca}^{2+}$ の放出と同様の時間経過で徐々に分解されていた。

酢酸の代謝過程で $\text{Ca}^{2+}$ が存在するとピロリン酸が蓄積することは、単離したミトコンドリアでも確認した。正常肝より単離したミトコンドリアに $10 \text{ mM}$ の酢酸を加えると、酢酸は代謝されていたが、前もって $\text{Ca}^{2+}$ を負荷した場合のみ大量（ $30 \text{ nmol/mg}$  蛋白）のピロリン酸が蓄積した。

#### 〔総括〕

酢酸の代謝過程で大量のピロリン酸が蓄積するためには、その反応の平衡からみて、発生したピロリン酸は反応系から除かれていなければならない。 $\text{Ca}^{2+}$ はピロフォスファターゼの強力な阻害剤であるが、ピロリン酸との高い安定化定数（ $\log K = 5.0$ ）からみて、ここではピロリン酸と複合体、 $\text{CaPPi}^-$ を形成することにより分解を妨げていると考えられる。ミトコンドリアには活発な $\text{Ca}^{2+}$ 輸送系が存在し、細胞質遊離 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度がある程度以上となるとこれを取り込む性質がある。このような状況下で、酢酸の代謝によりミトコンドリア内でピロリン酸が発生すると、 $\text{CaPPi}^-$ 複合体としての蓄積が生じるものと結論される。

## 論文の審査結果の要旨

血液透析療法施行時やエタノール摂取時には、モルオーダーの酢酸が短時間のうちに代謝されねばならない。本研究は、これまで無害と考えられてきた酢酸が肝内に大量のピロリン酸を蓄積させる機構を、生化学的手法を用いて解明したものである。細胞内に取り込まれた  $\text{Ca}^{2+}$  によってピロフォスファターゼが阻害された結果ピロリン酸が蓄積すること、またこのときピロリン酸は、 $\text{Ca}^{2+}$  と複合体を形成してミトコンドリア内に存在することが明確に示されている。最近注目されている細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の異常が病態に関与する例として、またエタノールによる肝細胞障害の機構の解明に新しい視点を示した点でも評価することができ、学位論文に値するものと認める。