



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Transport of Glutathione Across the Mitochondrial Membranes                                                                                     |
| Author(s)    | 黒澤, 和平                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1991, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/37396">https://hdl.handle.net/11094/37396</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

【130】

|         |                                                                                        |          |    |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------|----|----|
| 氏名・（本籍） | くろ                                                                                     | さわ       | かず | へい |
|         | 黒                                                                                      | 澤        | 和  | 平  |
| 学位の種類   | 医                                                                                      | 学        | 博  | 士  |
| 学位記番号   | 第                                                                                      | 9 4 8 4  |    | 号  |
| 学位授与の日付 | 平成 3 年 2 月 4 日                                                                         |          |    |    |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 2 項該当                                                                       |          |    |    |
| 学位論文題目  | Transport of Glutathione Across the Mitochondrial Membranes<br>(ミトコンドリア内膜におけるグルタチオン輸送) |          |    |    |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 田川 邦夫                                                                       |          |    |    |
|         | (副査)<br>教授 谷口 直之                                                                       | 教授 鎌田 武信 |    |    |

論文内容の要旨

【目 的】

グルタチオン (GSH) は  $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycine という tripeptide で、生体内では細胞内及び細胞外液中に広く分布している。細胞内の GSH は細胞質とミトコンドリア分画に高濃度に存在し、解毒や過酸化物除去等、多くの生理作用を有している。

ミトコンドリア (Mt) 分画の GSH の存在は、1975 年イギリスの Jocelyn によって確認された。当時から Mt 内膜は GSH に対する透過性が非常に低いとされ、Mt の GSH は Mt の内部で合成されるとする説が有力であった。しかし 1985 年アメリカの Meister らは、Mt 内部には GSH の合成酵素系は存在しないことを明らかにし、従って Mt 内 GSH は細胞質から輸送されたものと考えざるを得ないという結論に達した。現在までのところ、Mt 内膜での GSH 輸送に関する知見はなく、このメカニズムは Mt 内膜の Anion 輸送の関連からも重要な問題と思われる。本研究では、Mt 内膜における GSH 輸送を確認するとともに、その輸送酵素の特徴付けを行うことを目的とした。

【方法ならびに成績】

- (1) ラット肝 Mt を調製し、高濃度 (10 mM) の GSH と incubate すると、state 4 呼吸のような内膜ポテンシャルが高い時には GSH は徐々に Mt 内へ取り込まれた。Anoxia や Antimycin A で呼吸を阻害した時は取り込みは抑制された。
- (2) Mt をリン酸を含む溶液で incubate し、途中で脱共役剤 CCCP (carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone) を加えると GSH は Mt から急速に放出された。この放出のためにはリン酸 (Pi) の存在が必要で、他の陰イオン ( $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $\beta$ -Hydroxybutyrate, Glutamate, 等) の存在

下では放出は生じなかった。逆に、MtをPiを含まない溶液で incubate し、まず CCCP で処理した後でPiを加えると、Piの量に依存してGSHが放出された。これよりMt内膜のGSHチャンネルはGSH/Pi antiporter であることが示唆された。

- (3) CCCP添加時のMt内のPiの挙動を追跡した。Mt内には内因性のPiが高濃度に含まれているが、CCCPによりproton勾配を除くと、Mt内Piは瞬間的外部に放出され、内部のレベルは低下した。Mt外部にPiが存在する条件下では、CCCPで内部のPiが低下すると外部のPiは相対的に高濃度となり、一方Mt内には内因性のGSHが高濃度に存在するためそれらの交換輸送によりGSHの放出が生ずると考えられた。
- (4) 上述したように、CCCP添加後Piを加えるとGSHが放出されるが、この時Mt内へ流入するPi量を $^{32}\text{P}$ を用いて測定した。この時のGSH量とPi量とは比例していたが、モル比でみると流入したPiのほうが流出したGSHよりも数倍高かった。このことはPiと交換輸送されるAnionはGSHのほかにも存在することを示唆する。実際この時のMediumを調べると、Adeninenucleotide (特にAMP), Coenzyme A, ADP-Ribose 等が、GSHと同様に放出されてくることが確認された。

#### 【総括】

- (1) GSHは種々の条件下でMt内膜を輸送されることが観察された。更にこの輸送は、同時にPiが反対方向へ移動可能なときに生じることが示された。このことはGSH/Pi-antiporterの存在を示唆するが、他にも内膜輸送に関してGSHと同様な挙動を示すAnionが存在し、これらもPiとの交換で内膜を輸送されることが考えられた。
- (2) Piは $\text{H}^+$ とのsymportでMt内へ輸送されることが知られており、Mt内にPiが高濃度に維持されるのは、内膜ポテンシャルによるものと考えられている。本実験の結果は、Piの輸送チャンネルが、Pi,  $\text{H}^+$ -symporterの他にPi/Anion-antiporterの形で存在することを示唆する。単離したintactなMtで、GSHの取り込みが飽和曲線を示さないのは、Piの輸送がGSHとの交換以外の経路でも行われるためと思われる。

#### 【結論】

- (1) Mt内膜にはGSHのチャンネルが存在することが明らかとなった。
- (2) このGSHの輸送チャンネルはPiとのantiporterであることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、ミトコンドリア内膜におけるグルタチオン輸送蛋白の存在を明確にするとともに、その特徴付けを行ったものである。それによると、グルタチオンは見かけ上エネルギー依存性にミトコンドリアに取り込まれるが、実際にエネルギー依存性に輸送されるのはリン酸であり、そのリン酸との交換輸送でグルタチオンの移動が生ずる。またミトコンドリアには、同様な機序で輸送される有機陰イオン化合物が他にも複数存在する。本論文は、ミトコンドリア内膜における陰イオン輸送蛋白の存在とその機構に対し

て、新しい知見をもたらしたものであり、学位論文として評価される。