

酸素欠乏による ミトコンドリア障害の発生機序と障害の防御

宮原 正信・高橋 正彦
(生物学教室)

Mitochondrial Dysfunction due to Oxygen Deficiency and its Improvement by Membrane Stabilizing Agents

Masanobu MIYAHARA and Masahiko TAKAHASHI

Department of Medical Biology, Kochi Medical School, Nankoku, Kochi 781-51, Japan

Abstract. Mitochondrial dysfunction due to oxygen deficiency was studied in the systems of *in vivo* and *in vitro* using rat livers, and the following results were obtained: The decrease in oxidative phosphorylation in mitochondria exposed to oxygen deficiency *in vitro* was improved by treating them with membrane stabilizing agents such as chlorpromazine and cepharanthine. The oxygen deficiency induced membrane deterioration involved in barrier function and the sensitivity to lipid peroxidation of the membranes. The agents protected the membranes from the above lesions without giving any effects on adenine nucleotide degradation in the absence of oxygen. Previous intravenous injection of cepharanthine (0.4mg/100g body weight) protected the mitochondria from the dysfunctions due to hepatic ischemia. From these results, in addition to our previous results, the mechanism of mitochondrial dysfunction due to oxygen deficiency was discussed.

脳, 心, 腎あるいは肝等にみられる虚血性組織障害は, 形態学的にはミトコンドリアクリステの崩壊を特徴とする(1-4)。このことは虚血による酸素供給停止, すなわち呼吸によってATP合成を行なうミトコンドリアの機能障害が, primary cause とする仮説の基本となっている(3, 5)。この説によると, 酸化的磷酸化反応の低下によるATP含量の減少が他の細胞内ATP要求性の種々の反応(特に膜を介したイオンバランスの調節機構)の低下を誘起することにより, 更により一般的な代謝変動を引き起こし, Lysosome 酵素の放出による加水分解の亢進が, 最終的には組織構造の崩壊となって現われると説明されてきた(3, 5)。この仮説

は実験動物による虚血心や肝等から分離したミトコンドリアの state 4 呼吸増加 (2, 4, 6) や、酸化的磷酸化能の低下 (2, 7, 8) していること、あるいはミトコンドリア内アデニンヌクレオチド含量等が磷酸化能と相関する (9-12) という報告等から支持されてきた。

周知のごとく虚血状態は単に酸素供給の停止ということばかりでなく、組織細胞への栄養素等の供給停止や、細胞が生成する CO₂ 等の代謝産物の除去等も関与し、その病態生理はかなり複雑と考えられるが、最も重要な病因のひとつと考えられる酸素欠乏に伴うミトコンドリア機能障害発生の生化学的解析は、この病因解明の大きな鍵と考えられる。このような理由から本研究ではラット肝を用いて in vivo 及び in vitro で酸素欠乏状態にした時の肝ミトコンドリアの機能障害の発生機序と、障害の軽減化をはかる方法を検討し、得られた結果を報告する。

実験方法

肝虚血の方法：Wistar 系ラット (体重 250-300 g, ♂) をネンブタール麻酔し開腹して肝動脈及び肝門脈を血管鉗子で阻血し、閉腹して室温 (25°C) で60分放置した。障害保護作用を検討した薬物は、阻血30分前に陰茎海綿体より静注した。

肝ミトコンドリアの単離法とミトコンドリア機能の測定法：肝ミトコンドリアはHogeboom-Schneider 法 (13) を用いて単離し 0.25 M Sucrose, 3 mM Tris-HCl, pH 7.4 (0-4°C) に suspend し、測定に供した。ミトコンドリアの呼吸及び酸化的磷酸化能はクラーク型酸素電極を装着したオキシメーターを用いて25°Cの恒温下で測定した (14)。またミトコンドリアのイオン輸送能や脂質過酸化反応は、その swelling を 560nm における濁度変化で示される膨潤度合より分光光度計を用いて測定した。なお呼吸、磷酸化能及びイオン輸送の測定は、0.2 M Sucrose, 20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM KPi, 3 mM Tris-HCl buffer, pH 7.40 で、脂質過酸化反応には、0.17 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.40 の反応液を用いて測定した。

結 果

In vitro で低酸素処理したミトコンドリアの機能変化：Figure 1 に示すように正常肝から単離したミトコンドリアを低酸素処理すると、呼吸及び酸化的磷酸化能の指標となる state 4 及び, state 3 呼吸が著明に変動する(黒カラム)が、このような変動は、酸素が供給されなくても ATP を供給することによって著明におさえられた。20分低酸素状態で起こるミトコンドリアの機能障害を防ぐのに必要な ATP 量は、1 μmol / mg 蛋白であった (Fig.2)。このことは、低酸素状態自体がミトコンドリアの機能を障害することを示すと共に、ミトコンドリアの機能保持に ATP が重要な働きを持つことを示唆する。同様な機能保持作用は、膜安定化剤としてよく知られている物質、例えばセファランチンやクロルプロマジン等でミトコンドリア

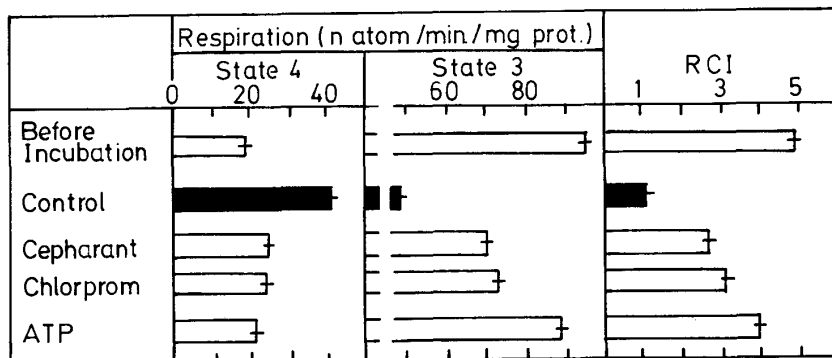


Figure 1. Dysfunction of respiration and oxidative phosphorylation in mitochondria exposed to anoxia and protection from the dysfunction by membrane stabilizing agents in vitro

Normal rat liver mitochondria were incubated for 20 min at 25°C under anoxia as described in the text in the presence of cepharanthine (1.9 nmol /mg prot), chlorpromazine (3 nmol /mg prot) and/or ATP (10 nmol /mg prot), and polarographic measurements were performed with 2.5 to 3.5 mg mitochondrial proteins, using 3 mM succinate as respiratory substrate. The bars in the columns show the standard errors from five different preparations.

を前処理し、低酸素処理すると著明な障害の軽減がみられた (Fig.1)。これらの条件下では、ATP等アデニンヌクレオチドの低下が障害の直接の原因となるのではなく、それに引き続き起こる膜の不安定化が障害の発生に関与することを示唆する。

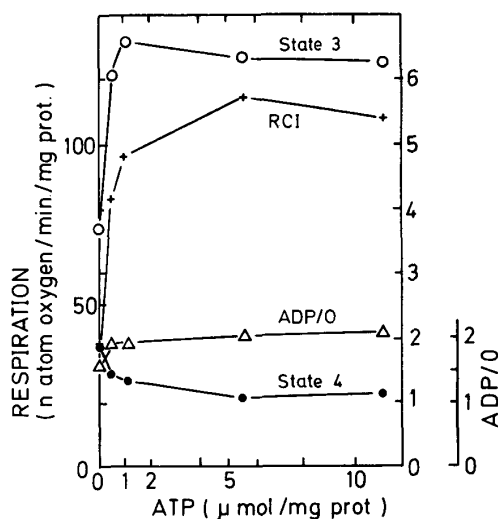


Figure 2. ATP-dependent preservation of respiration and oxidative phosphorylation of mitochondria exposed to anoxia in vitro

Normal rat liver mitochondria were incubated under anoxia in the presence of varied amounts of ATP for 20 min at 25°C, and the functions were measured as described in Figure 1.

このような障害の発生機序は低酸素処理されたミトコンドリアが Ca^{++} に対する膜の integrity を弱め (Fig.3), Fe^{++} による脂質過酸化反応の誘導をはやめること (Fig.4) 等から支持される。図にみられるようにこれらの現象に対し、膜安定化剤といわれる上記薬物は、やはりミトコンドリア膜構造の乱れを阻止する様に働くばかりでなく、肝ミクロゾームの膜安定化に対しても同様な作用を示した (Fig.5)。

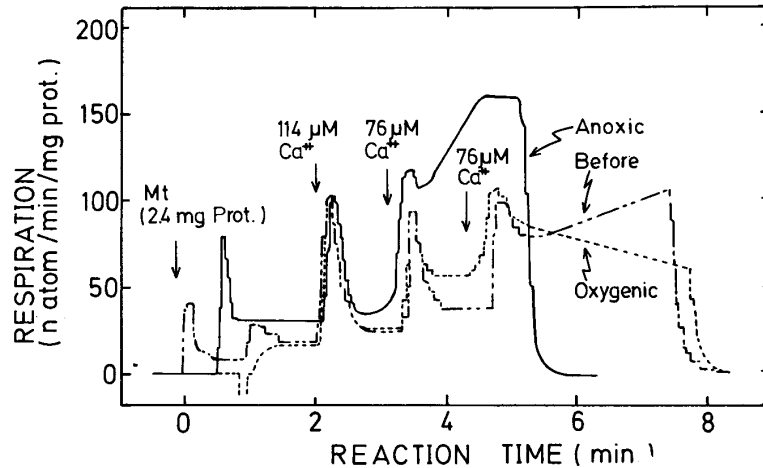


Figure 3. Decrease in Ca^{++} -transport activity in mitochondria exposed to anoxia in vitro

Normal rat liver mitochondria were incubated under anoxia for 20 min at 25°C, and the function was measured as shown in Figure 1 using succinate as respiratory substrate. The curves show the rate of respiration.

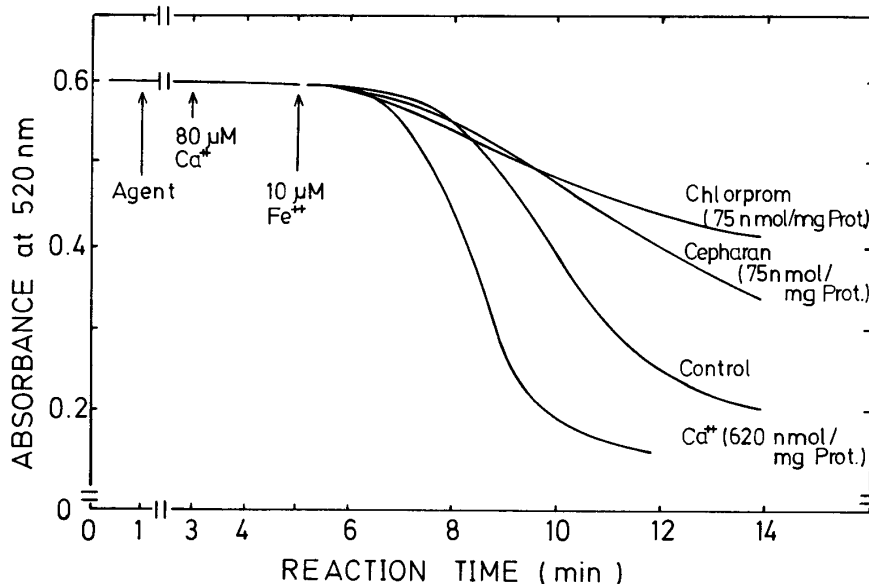


Figure 4. Stimulation of lipid peroxidation by calcium and its protection by membrane stabilizing agents

Normal rat liver mitochondria (400 μg prot) were suspended in 0.17 M KCl containing 10 mM Tris.HCl, pH 7.40, and received agents shown in the curves, respectively, at 25°C. Lipid peroxidation was started by adding 10 μM Fe^{++}

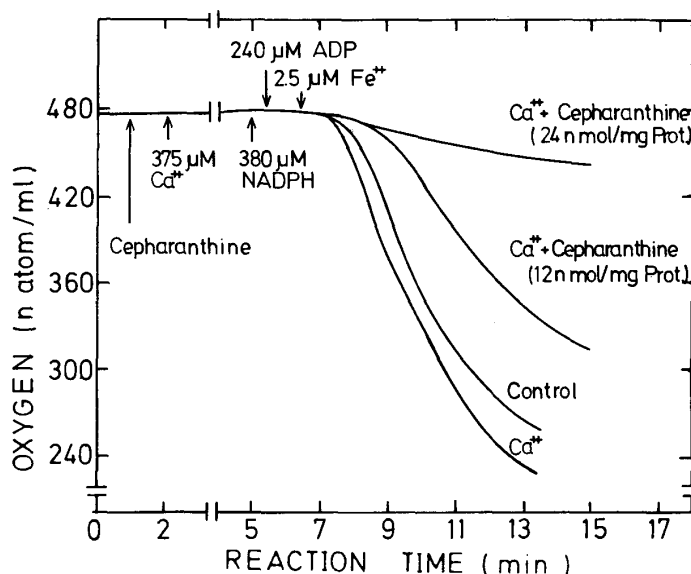


Figure 5. Suppression by cepharanthine of calcium-induced stimulation of lipid per-oxidation in rat liver microsomes

Normal rat liver microsomes (8 mg prot) were suspended in 0.15 M KCl containing 5 mg $MgCl_2$ and 10 mM Tris.HCl, pH 7.40 and the reactions were performed as shown in the figure.

虚血性肝ミトコンドリアの機能障害に対する膜安定化物質の前処置効果：始めにも述べたように、虚血肝より単離したミトコンドリアは著明な機能の低下がみられるが *in vitro* の系で低酸素処理されたミトコンドリア機能の障害軽減作用を示した膜安定化剤が（ここではセファランチンを用いた）*in vivo* でも同様に働くかどうかを検討した（Fig.6）。虚血30分前に種々のdoseのセファランチンを静注し60分肝虚血を行なって、ミトコンドリアを単離し、その機能を呼吸調節能（RC I）で比較すると、肝ミトコンドリアのRC I値は、虚血によって顕著に低下したが、セファランチンで前処置するとRC I値の低下が軽減され、succinate呼吸の場合もNADH-連鎖基質のひとつである α -ケトグルタル酸呼吸の場合も、体重当たりほぼ同じoptimalなdoseがみられた。このことは、セファランチンが*in vivo*でも虚血によるミトコンドリアの機能障害を軽減する作用のあることを示した。

考 察

虚血性組織障害の発生機序のinitial eventはミトコンドリアの機能低下であるということは定説になりつつあるが、組織細胞への酸素供給停止がどのような機構でミトコンドリアの機能低下を引き起こすかについては、以下のような諸説が提唱されている：すなわち (i) アデニンヌクレオチドの低下 (2, 15); (ii) ホスホリパーゼの活性化 (6, 7, 16); (iii) 細胞内への Ca^{++} の流入 (17); (iv) 脂質過酸化反応の亢進 (18) 等であるが、このような説に対し、本研究

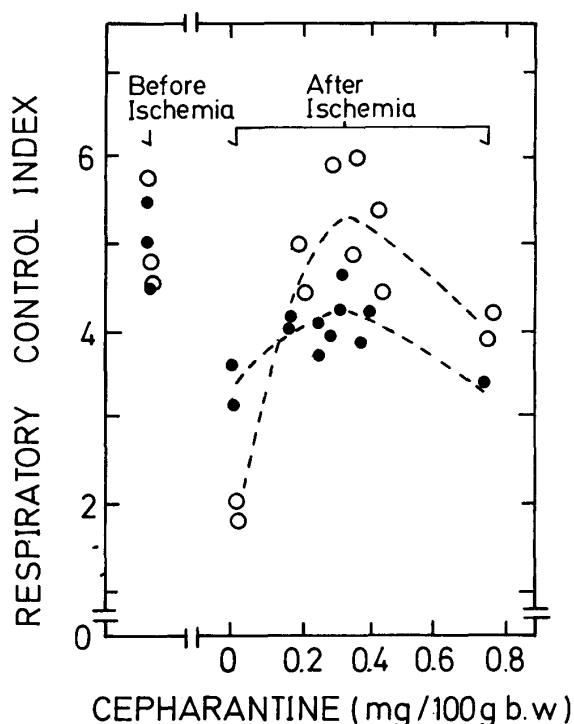


Figure 6. Preservation of mitochondrial function in ischemic rat liver mitochondria by pretreatment with cepharanthine

The rats received varied amounts of cepharanthine and were left to stand for 30 min at 25°C. The liver was made ischemic by ligating its portal vein and hepatic artery for 60 min at 25°C, and liver mitochondria were isolated. For measurement of mitochondrial functions a-ketoglutarate (open circles) and/or succinate (closed circles) were used under a similar condition to that shown in Figure 1.

ではラット肝ミトコンドリアを用いて, *in vitro* 及び *in vivo* の系で酸素欠乏状態にしたときのミトコンドリアの機能低下のメカニズムを解析し, つぎのような結果を得た。正常肝より単離したミトコンドリアを *in vitro* で anoxia 処理すると酸化的磷酸化能が低下したが, この低下は無酸素状態でも ATP (or ADP) が存在すれば軽減され, anoxia による機能低下にはアデニンヌクレオチド含量が関係することが示唆された。しかし同様な機能低下の抑制は膜安定化剤処理でもみられるが (Fig.1), 同時にアデニンヌクレオチド含量の著明な低下も認められ(14), ヌクレオチド含量の低下が機能低下の直接原因でないことが示唆された。従って anoxia による組織障害は, 呼吸停止→酸化的磷酸化反応の停止→ATP (ADP) 含量の低下→膜構造の不安定化→機能障害の発現という過程で進行すると想定された。Anoxia 処理によって膜構造 (機能も含めて) の不安定化が起こることは Figure 3 に示されるように anoxia 処理によって Ca^{++} に対する膜の区画性維持機能の低下することや, 脂質過酸化反応が起こりやすくなる (Fig.4) こと等からも支持される。またセラファランチン等の膜安定剤による機能保持能は, 膜構造の異なるミクロソーム膜についても観察された (Fig.5)。一方 anoxia による機能の低下にホスホ

リパーゼの活性化や脂質過酸化反応の亢進の関与が示唆されているが、ミトコンドリアの磷脂質は90分の anoxia 処理によってほとんど分解していないことや、脂質過酸化反応の阻害剤が必ずしも anoxia によるミトコンドリア機能の障害を軽減しないこと(14)から、これらふたつの機構は障害の過程にあまり関与しないと考えられる。一方 in vivo の実験で虚血性肝ミトコンドリアの機能低下がセファランチンの前処理によって軽減された (Fig.6)。その作用機構は現在のところ明かでないが in vitro の系でみられたように膜安定化作用によるものであれば、酸素の供給停止すなわち、エネルギーレベルの低下による膜透過性の非特異的亢進による血中 Ca^{++} の流入や、細胞内での Ca^{++} の区画性の変動によって Ca^{++} 依存性反応の亢進を伴い、結果として膜構造の崩壊や、膜機能の低下等の誘導が考えられ、これが虚血性組織障害機構に関与する可能性が示唆される。従ってこれらについては今後の研究されるべき問題として残されている。

結 論

虚血性組織障害時に見られるミトコンドリアの構造及び機能の障害機構を、in vivo 並びに in vitro の系でラット肝を用いて解析し次のことを明かにした。

- 1) In vitro の系でミトコンドリアを anoxia 処理すると、酸化的磷酸化能が障害されるが、その障害は膜安定化作用を持つクロルプロマジンやセファランチンで軽減された。
- 2) 上記薬物はアデニンヌクレオチドの分解を抑制することなしに、酸素供給停止によって誘起される膜の限界膜機能の低下や、脂質過酸化反応による膜構造等の崩壊を抑制した。
- 3) 肝における虚血性のミトコンドリアの機能低下は、0.4mg/100g 体重のセファランチンの前処理で抑制された。
- 4) 以上の結果を中心にして、酸素供給停止に起因するミトコンドリアの機能低下の機構を考察した。

文 献

- 1 . Lindenmayer,G.E., Sordahl,L.A., and Schwartz,A. (1968) *Circ.Res.*, **23**, 439-450
- 2 . Schwartz,A., Wood,J.M., Aller,J.C., Bornet,E.P., Entman,M.L., Goldstein,M.A., Sordahl, L.A., Suzuki,M., and Lewis,R.M. (1973) *Am.J.Cardiol.*, **32**, 46-61
- 3 . Trump,B.F., Mergner,W.J., Kahng,M.W., and Saladino,A,J. (1976) *Circulations* 53 (Suppl.1), 1 17-1 29
- 4 . Jennings,R.B., and Ganote,C.E. (1976) *Circ.Res.* **38** (Suppl.1) 180-1 89
- 5 . Trump,B.F., and Arstila,A.U. (1975) In *Principles of Pathobiology* (La Via, M.F., and Hill, R.B., eds.) pp.9-94, Oxford Univ.Press, New York
- 6 . Boime,I., Smith,E.E., and Hunter,F.E. (1970) *Arch.Biochem.Biophys.* **139**, 425-443

7. Boime, I., Smith, E.E., and Hunter, F.E. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 704-715
8. Mergner, W.J., Smith, M.W., and Trump, B.F. (1977) *Virchows Arch. B Cell Pathol.* **26**, 17-26
9. Asimakis, G.K., and Aprille, J.R. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **203**, 307-316
10. Lemasters, J.J., and Sowers, A.E. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 1248-1251
11. Brierley, G.P., Murer, E., and Bachman, E. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 89-102
12. Nakazawa, T., and Nunokawa, T. (1977) *J. Biochem.* **82**, 1575-1583
13. Hogeboom, G.H. (1955) in *Methods in Enzymol.* (Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., eds.) **Vol. 1**, pp.16-19, Acad. Press, New York
14. Miyahara, M., Okimasu, E., Mikasa, H., Terada, S., Kodama, H., and Utsumi, K. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* **233**, 139-150
15. Jurkowitz, M., Scotto, K.M., Altschuld, R.A., Merola, A.J., and Brierley, G.P. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **165**, 98-113
16. Chien, K.R., Abrams, J., Serroni, A., Martin, J.T., and Farber, J.L. (1968) *J. Biol. Chem.* **253**, 4809-4817
17. Mittnacht, S., Sherman, S.C., and Farber, J.L. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 9871-9878
18. Kawasaki, T., Hayashi, K., Marubayashi, S., and Dohi, K. (1981) in *Biomedical and Clinical Aspect of Coenzyme Q* (Folkers, K., and Yamamura, Y., eds) **Vol. 3**, pp.337-348, Elsevier/North-Holland, Amsterdam / New York / Oxford

(1986年1月30日受理)