

# Interrelation between Catecholamine and Mitochondrial Energy Producing System during Starvation

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8169">http://hdl.handle.net/2297/8169</a>

## 飢餓におけるカテコールアミン代謝とミトコンドリア エネルギー産生系の相互関係

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

宮 川 和 彦

(平成2年1月17日受付)

飢餓状態におけるカテコールアミン (catecholamine, CA) 代謝とミトコンドリアエネルギー産生系の相互関係について検討した。成熟ラットを3~5日間絶食することにより、尿中 CA 排泄量、副腎芳香族 L-アミノ酸デカルボキシラーゼ活性、ドパミン $\beta$ -ヒドロキシラーゼ活性は低下し、末梢レベルでの CA 合成分泌は抑制されていた。また、絶食と同時にノルエピネフリン (norepinephrine, NE) を腹腔内投与し、肝酸素消費量及び肝ミトコンドリア分画の NADH-cytochrome c reductase (CR),  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase, carnitine palmitoyl transferase, pyruvate dehydrogenase (PDH) 活性を測定したところ、肝酸素消費量と CR 活性の低下を認めたが、摂食ラットでは変化は認めなかった。異なる作用機序の adenosine triphosphate 産生阻害剤である oligomycin (OM), 2,4-dinitrophenol, N-ethylmaleimide の腹腔内投与では、いずれも尿中 CA 排泄量は抑制され、OM 投与後の副腎エピネフリン含量、チロシンヒドロキシラーゼ活性低下より CA 合成も抑制を受けた。また、肝ミトコンドリア CR 活性とチロシンヒドロキシラーゼ活性との間には有意の相関関係を認めた。CA 代謝抑制の目的で6-ヒドロキシドーパミンを腹腔内投与したところ、CR 活性、PDH 活性は低下し、肝酸素消費量に変化は認めなかった。肝灌流系では、絶食肝に対する NE 負荷により CR 活性、PDH 活性、ミトコンドリアにおけるアデニンヌクレオチド輸送の低下を認め、摂食肝ではこれらの変化は認めなかった。従って、in vivo における変化が CA の直接作用であることが示された。以上の結果より、飢餓状態における肝ミトコンドリアエネルギー産生系は、CA 過敏状態にあり、合目的機序により CA の合成分泌が低下することが示唆された。

**Key words** 飢餓, カテコールアミン, ミトコンドリア

カテコールアミン (catecholamine, CA) の作用は多岐にわたるが、主として細胞の代謝率を亢進させる作用<sup>1)</sup>とエネルギー供給のための基質産生にかかわる作用<sup>2)</sup>とに大別される。後者に属するものとして、解糖、脂肪分解、糖新生における CA の作用はよく知られており、現在さらに詳細な検討が行なわれている。CA と細胞のエネルギー代謝については、非ふるえ熱産生における CA の役割<sup>3,4)</sup>が有名である。また、近年 CA が肝における呼吸を刺激することが灌流肝<sup>5-7)</sup>及

び肝培養細胞<sup>8,9)</sup>において証明されて以来、CA と細胞エネルギー代謝の密接な関連性が認識されるようになった。

一方、栄養状態により CA 代謝は強く影響を受ける。肥満における CA 代謝の変化については多くの報告があり<sup>10-14)</sup>、また、やせおよび飢餓状態での CA 代謝レベルについての検討も報告<sup>15-19)</sup>されている。しかし、栄養状態による CA 代謝の変化が、細胞のエネルギー代謝にどのような影響をもたらしているかは不明

Abbreviations: AADC, aromatic L-amino acid decarboxylase; AdN, adenine nucleotide; ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; CA, catecholamine; CPT, carnitine palmitoyl transferase; CR, cytochrome c reductase; DA, dopamine; DBH, dopamine  $\beta$ -hydroxylase; DHBA, dihydroxybenzylamine; DNP, 2,4 dinitrophenol; E,

な点が多い。そこで今回、飢餓状態における CA と細胞の、特に肝ミトコンドリアエネルギー産生系との関連性を明らかにするために、飢餓ラット及び CA やアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP) 産生阻害剤投与時における CA 代謝とミトコンドリア機能とを比較検討した。

### 材料および方法

#### I. 実験動物

体重200~250g のウイスター系雌ラットを用いた。

#### II. 絶食における CA 代謝の変動

##### 1. 絶食方法及び検体採取

ラットを1匹ずつ代謝ゲージに入れ、蓄尿し、ゲージに置いて2日後より5日間絶食し、7日目より再び摂食させた。絶食前、絶食中、絶食後の体重、尿量を測定し、採取した尿は、6N 塩酸0.1mlを加えて酸性にした後、4°Cに保存し、数日中に尿中 CA [ノルエピネフリン (norepinephrine, NE), エピネフリン (epinephrine, E), ドーパミン (dopamine, DA)] 排泄量を測定した。次にラットを3日間絶食とし、対照として通常に摂食させていたラットと共に、3日後エーテル麻酔下にて断頭屠殺し、大脳、小脳、副腎、心臓、腎臓を摘出し、0.1N 過塩素酸 (perchloric acid, PCA) 1~2ml でホモジナイズし、遠心後上清を CA 測定用検体として-20°Cに保存し、数日中に組織 CA 含量を定量した。なお、片側の副腎は0.25M ショ糖液でホモジナイズし、遠心後上清の芳香族 L-アミノ酸デカルボキシラーゼ (aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) 活性、ドーパミンβ-ヒドロキシラーゼ (dopamine β-hydroxylase, DBH) 活性を測定した。

##### 2. 尿中及び組織 CA 含量の定量

尿 1ml に 1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.7) 1ml, 活性アルミナ (和光, 大阪) 10mg, 内部標準としてジヒドロキシベンジラミン (dihydroxybenzylamine, DHBA, Sigma, 米国) 20ng を加え、30分間ゆっくり振盪混和した。静置して上清を吸引除去後、アルミナを 3ml の蒸留水にて3回洗浄し、最後に0.1N PCA 200μl を加えて CA を抽出し、このうち20μl を測定に用いた。組織 CA 含量も同様に、CA 測定用検体に含まれる CA をアルミナに吸着させ、PCA にて抽出したものを測定に用いた。CA の測定には、電気化学

検出器 Coulochem 5100 (ESA, 米国) 付き高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) LC-5A (島津, 京都) に注入し CA 含量を測定した。標準物質の重酒石酸ノルエピネフリン (和光), 重酒石酸エピネフリン (Sigma, 米国), 塩酸ドーパミン (Sigma), DHBA は0.1N PCA に溶解して、尿中及び組織 CA 含量濃度に合わせて加える量を調節した。測定内変動係数は5%以内であった。

#### 3. 副腎 AADC 活性, DBH 活性の測定

AADC 活性は Rahman ら<sup>20)</sup>の方法に従い、DBH 活性は Nagatsu ら<sup>21)</sup>の方法に従い測定した。蛋白は Lowry 法<sup>22)</sup>により定量した。

#### III. NE 腹腔内投与における肝臓の酸素摂取量, 肝ミトコンドリア酵素活性, 肝アデニンヌクレオチド (adenine nucleotide, AdN) 含量の変化

##### 1. 薬剤の投与方法及び検体採取

NE1mg/kg体重の量を、0.5mlの生理食塩水に溶解し、これを1回量として、摂食ラット及び絶食ラットに1日2回(12時間毎)3日間腹腔内投与した。絶食は、初回投与の12時間前より開始し、最終投与までの3日間続けた。摂食群及び絶食群ともに、生理食塩水0.5mlを同様の方法で投与したものを対照とした。最終投与1時間後ペントバルビタール(50mg/kg体重)腹腔内投与による麻酔下にて開腹後肝臓を摘出し、1gを10容の0.25M ショ糖液中でホモジナイズした後、Hageboom ら<sup>23)</sup>の方法に従いミトコンドリア分画を調整し、酸素消費量及びミトコンドリア酵素活性の測定に使用した。別の1gを10容のリン酸緩衝 Krebs Ringer 液(154mM NaCl, 154mM KCl, 110mM CaCl<sub>2</sub>, 154mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 154mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1M リン酸緩衝液)でホモジナイズし、肝ホモジネート酸素消費量測定に用いた。酸素消費量は検体調整後直ちに測定し、各種酵素は-20°Cに保存しておいた検体を数日中に測定した。組織 AdN 測定用検体は急速凍結法<sup>24)</sup>にて摘出した肝臓を用いた。すなわち、あらかじめ液体窒素中にて冷却しておいた、柄の付いた2本のアルミニウムブロックで肝臓を両面より圧迫凍結し、直ちに凍結部を取り出して、冷却した乳鉢中で粉状にし、液体窒素中に保存し測定用検体とした。

##### 2. 酸素消費量の測定

epinephrine; α GPD, α-glycerophosphate dehydrogenase; HPLC, high performance liquid chromatography; NE, norepinephrine; NEM, N-ethylmaleimide; 6OHD, 6-hydroxydopamine; OM, oligomycin; PCA, perchloric acid; PDH, pyruvate dehydrogenase, TH, tyrosine hydroxylase

Winterstein 法を改良した O<sub>2</sub> UPTESTER (大洋科学, 東京) を用いて, ミトコンドリア分画の場合は, 5mg 蛋白の分画を Krebs Ringer phosphate 液と共に総容量 5ml となるように反応フラスコに入れ, 空気気相, 37.5°C の恒温条件で 20 分間プレインキュベーションを行なった後, 1 時間測定した. 反応フラスコ内には基質として 5mM コハク酸ナトリウム (和光) または 80 $\mu$ M 塩化パルミトイルカルニチン (Sigma) を添加した. また, 炭酸ガス吸収剤として 20% 水酸化カリウムを使用した.

### 3. ミトコンドリア酵素活性の測定

ミトコンドリア酵素として, NADH-cytochrome c reductase (CR),  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase ( $\alpha$ -GPD), carnitine palmitoyl transferase (CPT), pyruvate dehydrogenase (PDH) の 4 種の酵素活性を測定した. CR は Hatefi ら<sup>20</sup>の方法に従い,  $\alpha$ -GPD は Lee ら<sup>21</sup>の方法, CPT は Saggerson ら<sup>22</sup>の方法, PDH は梶田ら<sup>23</sup>の方法にて測定した.

### 4. 組織 AdN 含量の測定

液体窒素中に保存しておいた粉末状の肝組織 0.5g を 6% 過塩素酸 2ml 中にいれホモジナイズし, 遠心後の上清を 0.22 $\mu$ m のミリポアフィルター (日本ミリポア工業, 米沢) に通し, その内 30 $\mu$ l を紫外可視分光検出器 UVIDEC-100-IV 型 (日本分光, 東京) 付き高速液体クロマトグラフィー TRI ROTAR-IV 型 (日本分光) に注入し, 肝組織内 ATP 及び adenosine-5'-diphosphate (ADP) を測定した. 標準物質の adenosine-5'-triphosphate disodium salt (和光), adenosine-5'-diphosphate sodium salt (和光) は 6% 過塩素酸に溶解し肝組織内 AdN の濃度に合わせて加える量を調節した. 測定内変動係数は 5% 以内であった.

### IV. ATP 産生阻害剤投与による CA 代謝の変動

ラットを代謝ゲージに入れ審尿し, 2 日後より 3 種の作用機序の異なる ATP 産生阻害剤, すなわち oligomycin (OM) (Sigma)<sup>30</sup>, 2,4-dinitrophenol (DNP) (和光)<sup>30</sup> N-ethylmaleimide (NEM) (和光)<sup>30</sup> を 1 回 100  $\mu$ g/kg 体重 3 日間腹腔内投与した. 投与前後の尿中 CA 排泄量を測定し, 3 種の中で効果の最も強かった群については, 改めて同量を 1 回のみ投与し, 投与前も含めて 4 日後まで経時的に心臓, 副腎 CA 含量, 副腎チロシンヒドロキシラーゼ (tyrosine hydroxylase, TH) 活性, AADC 活性, DBH 活性及び肝 CR 活性を測定した. ラットはエーテル麻酔下に断頭屠殺し, 心臓, 肝臓, 副腎を摘出した. 片側の副腎は, 0.1N 過塩素酸 1~2ml でホモジナイズし組織 CA 測定用検体とした. 他側の副腎は, 0.25M ショ糖液でホモジナイ

ズし遠心後上清を AADC, DBH, TH 活性に用いた. 副腎 AADC, DBH 活性, 肝ミトコンドリア分画の CR 活性, 尿中及び組織 CA 含量の測定は先の実験と同様の方法にて測定した. 副腎 TH 活性は, Nagatsu ら<sup>30</sup>の方法に従って測定した.

### V. 6-ハイドロキシドーパミン (6-hydroxydopamine, 6OHD)<sup>32</sup> 腹腔内投与における, 肝臓酸素消費量及びミトコンドリア酵素の変化

ラットに 6OHD 100mg/kg 体重を 1 日 2 回 12 時間毎に腹腔内投与した. 最終投与 1 時間後にペントバルビタール麻酔下 (50mg/kg 体重) に開腹し肝臓を摘出し, 既述の方法にて肝 CA 含量, 肝臓の酸素消費量, およびミトコンドリア酵素 (CR,  $\alpha$ GPD, CPT, PDH) 活性を測定した.

### VI. 灌流肝におけるノルエピネフリン負荷の反応

#### 1. 肝灌流法

摂食ラット及び 3 日間の絶食ラットにペントバルビタール (50mg/kg 体重) 腹腔内投与による麻酔を行ない開腹し, 門脈, 下大静脈にカニューレを挿入して, そのままの位置で灌流した. 灌流液は, 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> で飽和した重炭酸緩衝 Krebs Ringer 液 (154mM NaCl, 154mM KCl, 110mM CaCl<sub>2</sub>, 154mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 154mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 154mM NaHCO<sub>3</sub>) を用い, 32°C, 流速 25ml/分で門脈より flow-through 方式<sup>33</sup>にて灌流し, 開始して代謝状態が一定となる 20 分後より, 下大静脈より流出する灌流液を 5 分毎に採取した. 灌流開始 40 分後から 10mM ノルエピネフリンを含む重炭酸緩衝 Krebs Ringer 液を 20 分間流し開始より 60 分後に灌流終了とした. 灌流後直ちに肝臓を摘出し, 前述した方法にてミトコンドリア分画を調整した. 対照として, 重炭酸緩衝 Krebs Ringer 液のみを 60 分間灌流した後にとりだした分画を用いた.

#### 2. ノルエピネフリン負荷による, グルコース, 乳酸, ピルビン酸の変化

灌流液採取後直ちに灌流液中のグルコース, 乳酸, ピルビン酸を経時的に測定した. グルコースは Bergmeyer ら<sup>34</sup>の方法で, 乳酸は Noll ら<sup>35</sup>の方法, ピルビン酸は Czok ら<sup>36</sup>の方法で分光吸光度による測定をおこなった.

#### 3. 肝灌流後のミトコンドリア酵素活性の測定

摂食ラット, 絶食ラットそれぞれに, 重炭酸緩衝 Krebs Ringer 液のみで灌流したもの及び重炭酸緩衝 Krebs Ringer 液で灌流後 NE を負荷した肝より調整したミトコンドリア分画を用いて, CR 活性,  $\alpha$  GPD 活性, CPT 活性, PDH 活性を既述の方法で測定した.

4. ノルエピネフリン負荷による、ミトコンドリア内 AdN 含量に及ぼす影響

Hamman ら<sup>20)</sup>の方法により、灌流後調整したミトコンドリアを用いて、AdN を枯渇させた後あらためて AdN を負荷し、ミトコンドリア内にプールされた AdN を測定した。すなわち、調整したミトコンドリア分画を 225mM ショ糖、10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5mM MgCl<sub>2</sub>、10mM N-tris (hydroxymethyl)-2-aminoethane sulphonate を含んだ溶液 (pH7.4) に混ぜ30°C 2 分間インキュベートし AdN の枯渇を行なった。0.25 M ショ糖液で 2 回洗浄したミトコンドリアを、今度は先に用いた溶液に 10mM ATP を混ぜたものに、蛋白濃度 1.2 mg/ml となるように加え、0°C 10 分間インキュベートした。0.3M ショ糖にて 2 回洗浄後、300 μl の 6% 過塩素酸を加え遠心後、上清 30 μl を用いて既述の方法にて AdN を測定し、ミトコンドリア内 AdN 含量した。

VII. 統計学的処理

測定値はすべて平均値±標準偏差で表した。平均値の差の検定は、t 検定または一元配置分散分析を行なったのち Scheffé または Dunnett の方法により多重比較を行ない、危険率が 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。2 変量間のピアソン積率相関係数の有

意差検定には t 検定を用い、危険率 0.05 以下をもって有意とした。

成 績

I. 絶食による体重、尿量の変化 (図 1)

絶食 5 日目に、体重は平均 -17%、尿量は平均 -55% 減少した。

II. 絶食による CA 代謝の変化

1. 尿中 CA 排泄量 (図 2)

尿中 CA 排泄量は、絶食開始とともに減少し、2 日目には NE は前値の 20% に、E, DA は前値の 9% に減少し、この低値は絶食終了まで持続した。摂食再開後、E, DA はすみやかに回復傾向を認めたが NE は低値に止まった。

2. 組織 CA 含量 (図 3)

大脳、小脳の DA 含量は、各々対照の 239 ± 41 pg/mg 組織、11.7 ± 1.9 mg 組織に比し有意に低下 [大脳、128 ± 48; 小脳、6.0 ± 2.9 (共に p < 0.05)] した。

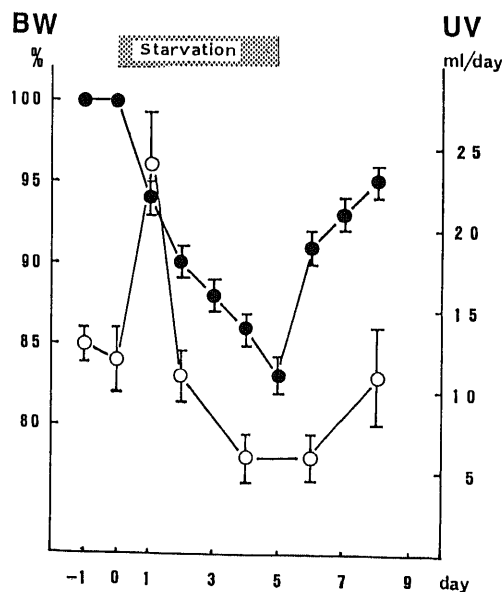


Fig. 1. Changes in body weight and urine volume during 5 day starvation followed by refeeding. ●, body weight (BW); ○, urine volume (UV). Vertical bar, mean ± S. D. for 6 rats.

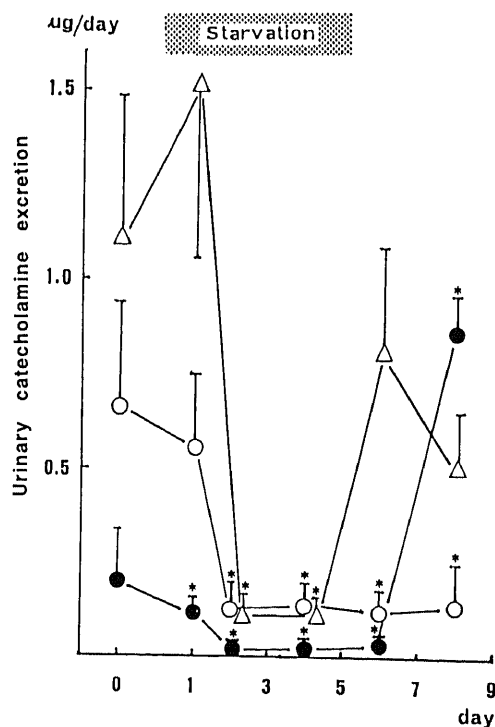


Fig. 2. Changes in urinary CA excretion during 5 day starvation followed by refeeding. ○, norepinephrine; ●, epinephrine; △, dopamine. Vertical bar, mean ± S. D. for 6 rats. \*p < 0.05 vs day 0 by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison procedure.

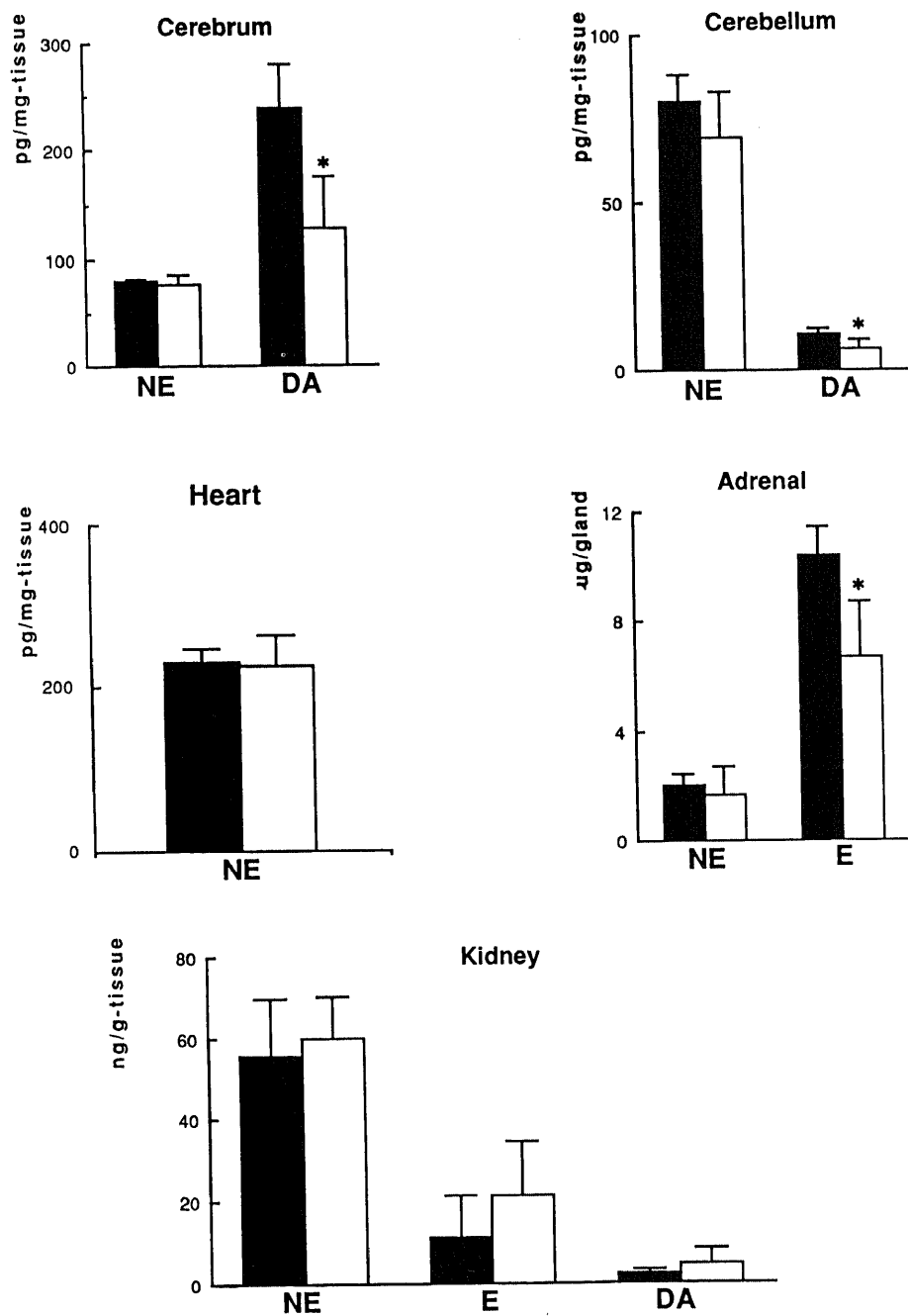


Fig. 3. Effect of 3 day starvation on tissue CA content in rats. After starvation for 3 days, rats were sacrificed and tissue CA contents were measured by HPLC. Control rats were fed ad libitum. ■, fed rat; □, starved rat. Vertical bar, mean  $\pm$  S. D. of 4 rats; \*  $p < 0.05$  vs fed rat by student's t-test.

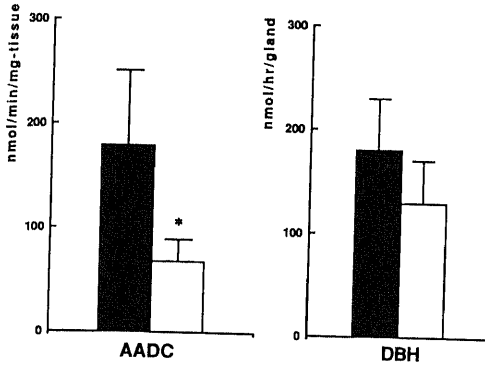


Fig. 4. Effect of 3 day starvation on AADC and DBH activity in rat adrenal gland. the treatments were the same as those described in Fig. 3. ■, fed rat; □, starved rat. Vertical bar, mean±S. D. of 5 rats. \* p<0.05 vs fed rat by student's t-test.

副腎 E 含量も対照の $10.40 \pm 1.04 \mu\text{g}/\text{臓器}$ に比して有意に低下 [ $6.70 \pm 3.40$  ( $p < 0.05$ )] した。

3. 副腎 AADC, DBH 活性の変化 (図 4)

AADC 活性は, 対照群が $179.1 \pm 71.0 \text{nmol}/\text{分}/\text{mg}$ 蛋白であるのに対し, 有意に低下 ( $67.6 \pm 21.7 \text{nmol}/\text{分}/\text{mg}$ 蛋白,  $p < 0.05$ ) し DBH 活性も低下傾向を認めた。

III. NE 腹腔内投与による肝臓酸素消費量及びミトコンドリア酵素活性に及ぼす影響

1. 肝臓酸素消費量の変化 (表 1)

1) コハク酸を基質とした場合

摂食ラット及び絶食ラットの対照群間では, ホモジネート, ミトコンドリアとも酸素消費量に差はなかった。しかし, NE 投与により, ホモジネートでは絶食+NE 投与群が摂食対照群, 摂食+NE 投与群及び絶食対照群に比して有意に低下 (いずれも  $P < 0.05$ ) した。ミトコンドリアにおいても絶食+NE 投与群は, 両対照群に対して低下する傾向にあり, 摂食+NE 投

Table 1. Effect of starvation and NE treatment on the oxygen uptake of rat liver

Rats	with succinate		with palmitoyl carnitine	
	homogenate	mitochondria	homogenate	mitochondria
Fed (5)	$47.1 \pm 5.6$	$0.76 \pm 0.06$	$13.7 \pm 3.4$	$0.14 \pm 0.04$
Fed+NE (5)	$48.5 \pm 2.5$	$0.81 \pm 0.18$	$15.0 \pm 2.9$	$0.16 \pm 0.04$
Starved (5)	$47.5 \pm 1.8$	$0.70 \pm 0.18$	$14.4 \pm 3.0$	$0.19 \pm 0.06$
Starved+NE (5)	$40.5 \pm 2.1^{**}$	$0.55 \pm 0.06^{\#}$	$11.7 \pm 1.6$	$0.14 \pm 0.05$

Starved rat for 3 days or normally fed control rats were administered with NE (1 mg/kg body weight) intraperitoneally every 12 hr for 3 days. Starvation was started 12 hr before first administration of NE. One hr after the last administration, rats were sacrificed and the oxygen uptake of liver homogenate or mitochondria was measured by  $\text{O}_2$  UPTESTER. Values are mean±S.D. in  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g-tissue}$  except for mitochondria in  $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg-prot}$ . Numbers in parenthesis show number of rats used.

\* p<0.05 vs Fed, # vs Fed+NE, \*\* vs Starved by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison procedure.

Table 2. Effect of starvation and NE treatment on mitochondrial enzyme activity in rat liver

Rats	CR	$\alpha\text{GPD}$	CPT	PDH
	$(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg-prot})$		$(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg-prot})$	
Fed (5)	$0.701 \pm 0.041$	$8.01 \pm 0.5$	$16.64 \pm 3.08$	$3.06 \pm 0.93$
Fed+NE (5)	$0.672 \pm 0.116$	$10.15 \pm 1.89$	$13.84 \pm 2.20$	$2.78 \pm 0.68$
Starved (5)	$0.444 \pm 0.103^{**}$	$10.28 \pm 2.11$	$23.97 \pm 2.27^{**}$	$1.01 \pm 0.24^*$
Starved+NE (5)	$0.364 \pm 0.065^{**}$	$9.62 \pm 0.75$	$25.31 \pm 5.74^{**}$	$1.10 \pm 0.38^*$

The treatments were the same as those described in Table 1. Values are mean±S.D. Numbers in parenthesis show number of rats used. \* p<0.05 vs Fed, #p<0.05 vs Fed+NE by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison procedure.

与群に対しては有意に低下 ( $p < 0.05$ ) した。

2) パルミトイルカルニチンを基質とした場合ホモジネート, ミトコンドリアのいずれにおいても, 摂食対照群, 摂食+NE 投与群, 絶食対照群, 絶食+NE 投与群の4群間に差は認めなかった。

2. NE 腹腔内投与による, ミトコンドリア酵素の変化 (表2)

対照群間では, 絶食により CR 活性, PDH 活性が有意に低下 ( $p < 0.05$ ) し, 逆に CPT 活性は有意に上昇 ( $p < 0.05$ ) した. 絶食ラットに NE を投与することによって, 絶食により低下した CR 活性がさらに低下する傾向にあった. 他の酵素活性は, NE を投与しても各対照群に対する変化は認めなかった。

3. 肝組織内 AdN 含量の変化 (表3)

組織内 ATP 含量は, 摂食群に比して絶食群で有意に低下 ( $p < 0.05$ ) した. また, ATP/ADP 比も低下傾向にあった. しかし, NE の投与により摂食群, 絶食群とも各対照群との間で有意な差は認めなかった。

IV. ATP 産生阻害剤投与による CA 代謝及びミトコンドリア代謝に及ぼす影響

1. 3種の ATP 産生阻害剤投与による尿中 CA 排泄量の変化 (図5)

OM, DNP, NEM 投与群のいずれも尿中 NE 排泄量は, 投与した翌日より抑制され, OM 群では, 前値 (投与前の2日間の平均値  $0.60 \pm 0.36 \mu\text{g}/\text{日}$ ) の10% ( $0.06 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{日}$ ) と最も強い抑制効果を確認した. 尿中 E, DA 排泄量に有意な差は認めなかった. そこで, OM を, あらためて1回投与し, その後の組織 CA 含量, CA 合成酵素活性, CR 活性を経時的に測定した。

2. OM 投与による組織 CA 含量の変化

副腎 E 含量は, 投与前の  $10.67 \pm 1.37$  から投与2日目には  $7.67 \pm 0.34$  へ有意に低下 ( $p < 0.05$ ) した. ま

た, NE 含量も投与2日目に低下傾向を認めた. (図6 A) 心筋 NE 含量は, 3, 4日目に低下傾向を認めた. (図6 B)

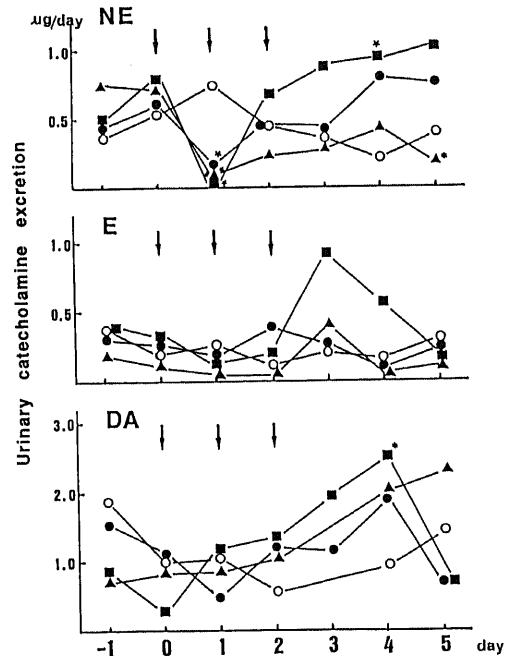


Fig. 5. Effect of intraperitoneal administration of OM, NEM, DNP on urinary NE, E, and DA excretion. Rats were treated with intraperitoneal administration of OM, NEM, DNP ( $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  body weight) for 3 consecutive days. Control rats were treated with  $0.5\text{ml}$  saline.  $\blacktriangle$ , OM;  $\blacksquare$ , NEM;  $\bullet$ , DNP;  $\circ$ , control. Arrows indicate the administration of each drug. Each point shows the mean value of 5 rats. \*  $p < 0.05$  vs day 0,  $\star p < 0.05$  vs control by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison procedure.

Table 3. Effect of starvation with or without intraperitoneal administration of NE on total tissue AdN content in rat liver

Rats	ATP	ADP	ATP/ADP
	$\mu\text{mol}/\text{g-tissue}$		
Fed (3)	$3.26 \pm 0.22$	$1.07 \pm 0.02$	$3.01 \pm 0.16$
Fed+NE (3)	$2.86 \pm 0.17$	$1.00 \pm 0.09$	$2.86 \pm 0.17$
Starved (3)	$2.47 \pm 0.19^*$	$1.02 \pm 0.20$	$2.47 \pm 0.41$
Starved+NE (3)	$2.25 \pm 0.16^*$	$0.96 \pm 0.11$	$2.36 \pm 0.24$

The treatments were the same as those described in Table 1. Liver was excised by quick-freeze technique and stored in liquid nitrogen until assay. Tissue AdN contents were measured by HPLC. Values are mean  $\pm$  S.D. Numbers in parenthesis show number of rats used. \*  $p < 0.05$  vs Fed by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison procedure.



3. OM 投与による, CA 合成酵素活性及び CR 活性の変化

TH 活性は, 投与前 $61.3 \pm 6.5$  pmol/分/mg組織であったのに対して投与後徐々に低下し3日目 ( $22.2 \pm 5.9$ ) 及び4日目 ( $26.5 \pm 11.5$ ) に有意に低下 ( $p < 0.05$ ) した. AADC 活性, DBH 活性に有意な変化は認めなかった. (図7 A) CR 活性は投与前 $0.695 \pm 0.035$   $\mu$ mol/分/mg蛋白であったのに対し, 投与後徐々に低下し3日目, 4日目と有意に低下 (各々 $0.587 \pm 0.301$ ,  $p < 0.05$ ;  $0.578 \pm 0.020$ ,  $p < 0.05$ ) した. (図7 B) また, CR 活性を横軸 (X) に, TH 活性を縦軸 (Y) に描いた相関図では,  $Y = 241.3X - 112.4$  ( $\mu$ mol/分/mg蛋白) -  $112.4$  (pmol/分/mg組織), ピアソンの相関係数 $0.768$  ( $p < 0.05$ ) で, 有意な正の相関関係を認めた. (図8)

V. 6OHD 腹腔内投与後の肝酸素消費量及びミトコンドリア酵素活性の変化

1. 肝 CA 含量の変化

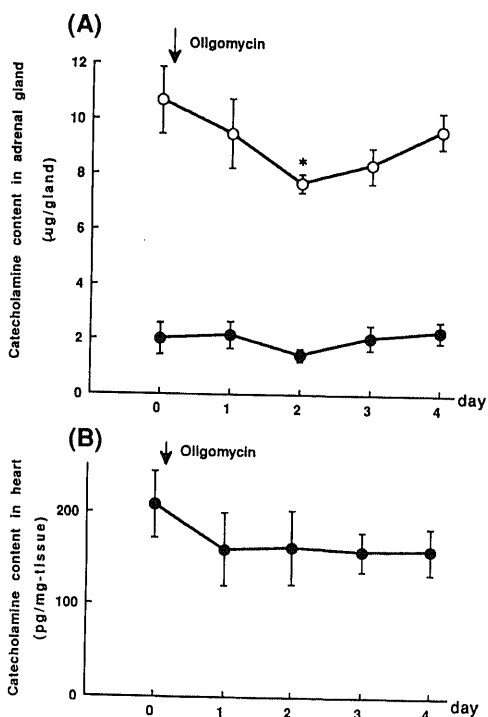


Fig. 6. Effect of intraperitoneal administration of OM ( $100 \mu$ g/kg body weight) on CA content in rat adrenal gland (A) and heart (B). On each day, five rats were sacrificed and tissue CA contents were measured by HPLC.  $\circ$ , E;  $\bullet$ , NE. Vertical bar, mean  $\pm$  S. D.; \*  $p < 0.05$  vs day 0 by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison procedure.

対照群 $89.7 \pm 13.2$  ng/g組織に対して 6OHD 投与群は $5.4 \pm 1.2$  ng/g組織と著しい抑制をうけた. ( $p < 0.05$ )

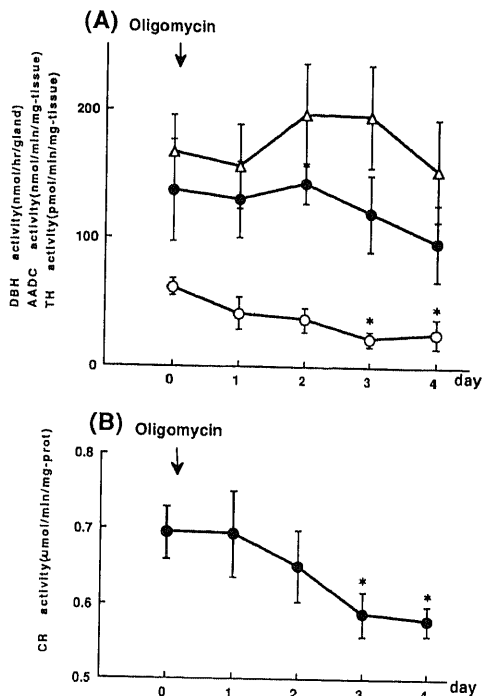


Fig. 7. Effect of intraperitoneal administration of OM ( $100 \mu$ g/kg body weight) on CA synthesizing enzyme activity in adrenal gland (A) and CR activity in liver (B). In panel (A),  $\Delta$ , DBH activity;  $\bullet$ , AADC activity;  $\circ$ , TH activity. Vertical bar, mean  $\pm$  S. D. for 4 rats.; \*  $p < 0.05$  vs day 0 by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison procedure.

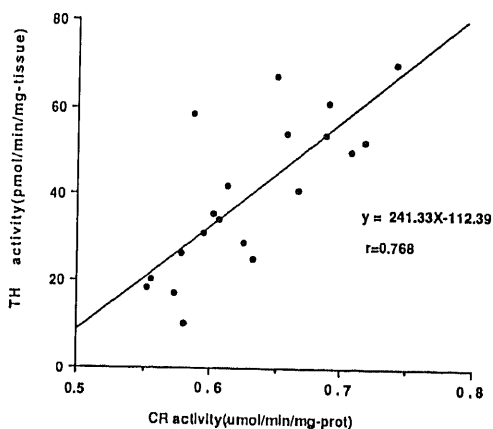


Fig. 8. Correlation between CR activity (X) and TH activity (Y) after OM treatment.

## 2. 酸素消費量の変化 (表4)

コハク酸, パルミトイルカルニチンを基質として測定した肝酸素消費量は, 肝ホモジネート, 肝ミトコンドリアともに対照群と 6OHD 投与群間に差は認めなかった。

## 3. ミトコンドリア酵素活性の変化 (表5)

CR 活性, PDH 活性は 6OHD 投与により, 有意に低下 (いずれも  $p < 0.05$ ) したが,  $\alpha$  GPD 活性, CPT 活性に有意な変化を認めなかった。

## VI. 肝灌流系における, NE 負荷反応

1. 灌流液中のグルコース, 乳酸, ピルビン酸の変化, 灌流液中に含まれるグルコース濃度は, 負荷前,

摂食肝では平均  $216 \mu\text{mol}/100\text{g}$  体重/時間であったのに対し, 絶食肝では 30% の  $64 \mu\text{mol}/100\text{g}$  体重/時間であった。NE 負荷により 5 分後, 両者とも 4 倍の上昇を認めたものの, 摂食肝はその後も効果が持続したのに対し, 絶食肝では徐々にその濃度が低下した。(図 9 A) 乳酸は, NE 負荷前, 摂食肝で平均  $232 \mu\text{mol}/100\text{g}$  体重/時間, 絶食肝は平均  $153 \mu\text{mol}/100\text{g}$  体重/時間であった。NE 負荷により, 摂食肝は 5 分後に負荷前に対して 1.5 倍のピーク値を認めたのに対して, 絶食肝では 10 分後に 1.8 倍のピーク値を認めた。(図 9 B)

ピルビン酸は, NE 負荷前, 摂食肝で平均  $58 \mu\text{mol}/100\text{g}$  体重/時間, 絶食肝で  $26 \mu\text{mol}/100\text{g}$  体重/時間であった。NE 負荷に対し摂食肝は, 15 分後に 1.6 倍のピーク値を認めたのに対し, 絶食肝は 20 分後に 1.8 倍に上昇した。(図 9 C)

乳酸/ピルビン酸比は, 絶食肝が相対的に高い値をとり, NE 負荷により摂食肝では負荷直後に一時的に

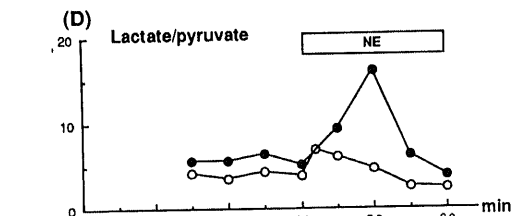
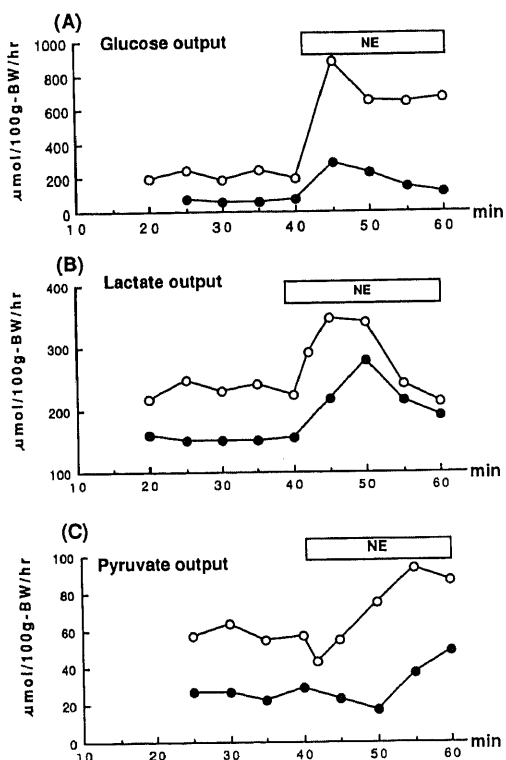


Fig. 9. Effect of NE on glucose, lactate and pyruvate output in perfused rat livers from normal fed or 3 day starved rat. Livers were perfused at flow rate of 25ml/min of Krebs Ringer bicarbonate solution for 60 min. Collection of perfusate was started at 20 min and 10 mM NE was administered from 40 min to the end of the experiment. Mean values of two experiments are shown. Panel (A), glucose output; panel (B), lactate output; panel (C), pyruvate output; panel (D), lactate/pyruvate.  $\circ$ , fed rat;  $\bullet$ , starved rat.

Table 4. Effect of intraperitoneal administration of 6OHD on oxygen uptake in rat liver

Rats	with succinate		with palmitoyl carnitine	
	homogenate	mitochondria	homogenate	mitochondria
Control (5)	$50.9 \pm 2.7$	$0.61 \pm 0.10$	$13.9 \pm 1.9$	$0.12 \pm 0.10$
6OHD (5)	$49.8 \pm 2.1$	$0.58 \pm 0.07$	$13.7 \pm 1.2$	$0.17 \pm 0.09$

Rats were treated with intraperitoneal administration of 6OHD (100 mg/kg body weight) every 12 hr for 3 days. One hour after the last administration of 6OHD, rats were sacrificed and oxygen uptake of liver homogenate or mitochondria were measured by  $\text{O}_2$  UPTESTER. Values are mean  $\pm$  S.D., expressed in  $\mu\text{lO}_2/\text{min}/\text{g}$ -tissue for homogenate and for in  $\mu\text{lO}_2/\text{min}/\text{mg}$ -protein for mitochondrial fraction. Numbers in parenthesis show number of rats used.

上昇しその後徐々に低下したのに対し、絶食肝は負荷10分後に16.2と著明に高い値をとった。(図9 D)

2. 灌流肝における、ミトコンドリア酵素活性の変化(表6)

NE腹腔内投与の場合と同様に、絶食群においてCR活性の低下、CPT活性の上昇(いずれも  $p < 0.05$ )を認めた。また $\alpha$ GPD活性は有意に低下( $p < 0.05$ )した。NE負荷により、摂食ラットでは対照群と

負荷した群とで差は認めなかったが、絶食ラットでは、NE負荷によりCR活性が対照群に対し有意に低下( $p < 0.05$ )し、 $\alpha$ GPD活性は有意に上昇( $p < 0.05$ )した。また、PDH活性は低下する傾向にあった。

3. 灌流肝における、ミトコンドリア内AdNの変化(表7)

ミトコンドリア内にプールされたAdN含量は、摂

Table 5. Effect of intraperitoneal administration of 6OHD on mitochondrial enzyme activity in rat liver

Rats	CR	$\alpha$ GPD	CPT	PDH
	( $\mu$ lO <sub>2</sub> /min/mg-prot)		(nmol/min/mg-prot)	
Control (5)	0.86 $\pm$ 0.10	11.10 $\pm$ 0.19	14.50 $\pm$ 1.20	2.17 $\pm$ 0.20
6OHD (5)	0.55 $\pm$ 0.07*	10.50 $\pm$ 0.84	14.68 $\pm$ 1.51	1.02 $\pm$ 0.17*

The treatments were the same as those described in Table 4. Values are mean $\pm$ S.D. Numbers in parenthesis show number of rats used.

\* $p < 0.05$  vs control by student's t-test.

Table 6. Effect of NE loading on mitochondrial enzyme activities in perfused rat liver from fed or starved rat

Rats	CR	$\alpha$ GPD	CPT	PDH
	( $\mu$ mol/min/mg-prot)		(nmol/min/mg-prot)	
Fed (4)	0.223 $\pm$ 0.015	5.53 $\pm$ 0.90	13.56 $\pm$ 2.31	3.91 $\pm$ 1.31
Fed+NE (4)	0.203 $\pm$ 0.024	5.60 $\pm$ 0.56	15.37 $\pm$ 1.46	4.31 $\pm$ 3.78
Starved (4)	0.117 $\pm$ 0.017**	3.34 $\pm$ 0.19**	26.05 $\pm$ 3.64*	3.78 $\pm$ 2.45
Starved+NE (4)	0.073 $\pm$ 0.011***	5.14 $\pm$ 0.77*	28.00 $\pm$ 1.28*	0.44 $\pm$ 0.18

The treatments were the same as those described in Fig. 9. After 60 min perfusion, liver was excised and mitochondrial fraction was prepared for measurement of mitochondrial enzyme activities. Values are mean $\pm$ S.D. Numbers in parenthesis show number of rats used.

\* $p < 0.05$  vs Fed, # $p < 0.05$  vs Fed+NE, \*\* $p < 0.05$  vs starved by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison procedure.

Table 7. Intramitochondrial AdN content after incubation with ATP

Rats	ATP	ADP	ATP/ADP
	(nmol/mg-prot)	(nmol/mg-prot)	
Fed (4)	17.92 $\pm$ 1.11	8.34 $\pm$ 0.98	2.18 $\pm$ 0.29
Fed+NE (4)	22.16 $\pm$ 2.32	6.92 $\pm$ 1.31	3.26 $\pm$ 0.49*
Starved (4)	17.22 $\pm$ 2.17#	6.68 $\pm$ 1.19	2.63 $\pm$ 0.51
Starved+NE (4)	13.50 $\pm$ 1.88**	5.80 $\pm$ 0.52*	2.33 $\pm$ 0.23#

Liver mitochondria preparations were the same as those described in Fig. 9, Table 6. Liver mitochondria was incubated in sucrose/salt buffer medium for 2 min at 30°C, followed by an incubation of 0°C for 10 min with 10 mM ATP. 6% HC10<sub>4</sub> was added to the pellet of the incubated mitochondria and nucleotides were extracted. The supernatants were used for the assay of intramitochondrial AdN content. Values are mean $\pm$ S.D. Numbers in parenthesis show number in rats used. \* $p < 0.05$  vs Fed, # $p < 0.05$  vs Fed $\pm$ NE by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison procedure.

食ラットと絶食ラットで差は認めなかった。NE 負荷により、摂食ラットは、ATP 含量、ATP/ADP 比が有意に上昇 ( $p < 0.05$ ) したのに対し、絶食ラットでは ATP、ADP 含量とも低下 ( $p < 0.05$ ) し、ATP/ADP 比に変化は認めなかった。

## 考 察

栄養状態による CA 代謝の変化は交感神経系に調節されると言われる。Yung ら<sup>38)39)</sup>は、ラットにおいて、48時間の絶食で心臓、肝臓、脾臓における NE の代謝回転率が減少し、摂食により回復することより、交感神経系が栄養状態の変化に対する CA 代謝の調節を行っていると報告している。人においても Dea ら<sup>40)</sup>の報告により、高カロリー摂取により NE 代謝回転率は亢進し、低カロリー摂取により低下することがみとめられている。一方 CA は、交感神経系のみならず副腎髄質との両方により代謝調節を行なうが、代謝調節における両者の相互関係はまだ不明な点が多い。本研究では、まず絶食ラットにおける CA 代謝の動態を、副腎髄質との関係も含めて検討した。

尿中 CA 排泄量は NE、E、DA とともに絶食により減少し、主たる CA 含有臓器である副腎の E 含量の低下及びその合成酵素である AADC 活性、DBH 活性の低下傾向をみることで、絶食中は CA 分泌のみならず CA 合成も抑制されていることが示唆された。絶食時にエピネフリン分泌は変化しないという報告<sup>41)</sup>もあるが、著者が施行した3日間絶食の条件では、副腎髄質系も抑制されると思われた。

次に、このような交感副腎系が抑制された状態でのミトコンドリア機能を摂食ラットと絶食ラットで比較し、さらに CA との関連性を検討するために、NE を各群に投与しその変化を比較検討した。酸素消費量は、摂食肝と絶食肝との間に差は認めなかった。絶食時における酸素消費量についての報告はさまざまで、15時間では亢進<sup>42)</sup>し、2日間、4日間、6日間<sup>43)44)</sup>では変化なく、8日間絶食でのみ低下した<sup>45)</sup>などの報告があるが、その理由は絶食期間に左右されるものと考えられる。従って、著者の成績も含めて考えると少なくとも2～6日間の絶食では、酸素消費量は影響を受けず摂食ラットと同様に安定していると考えられる。しかし、NE 投与により絶食肝では、コハク酸を基質にした時、酸素消費量は有意に低下し、肝ホモジネートにおいても同様の結果を認めた。一方、パルミトイルカルニチンを基質とした場合には、変化を認めなかったことより、次のことが考えられる。第一に、コハク酸は、酸化されて放出される電子が通常の NADH を介

する流れと異なり、複合体 II を経由して呼吸鎖に入る。従って、この複合体 II に問題のある場合である。第二の可能性は、呼吸鎖全体の活動性は低下しているが、パルミトイルカルニチンを基質とした場合の酸素消費量の変化が小さいために有意な差となつて反映されていない場合である。両者の可能性に関する議論は後述する。

ミトコンドリア酵素活性については、呼吸鎖に関連する CR 活性<sup>46)</sup>、甲状腺ホルモンによる影響を受け熱産生に関与する  $\alpha$ -GPD 活性<sup>47)</sup>、脂肪酸酸化の最初のステップと考えられる CPT 活性<sup>48)</sup>、グルコース酸化と脂肪合成の調整に関与する PDH 活性<sup>49)</sup>の4種を比較検討した。この内、3酵素に絶食による有意な変化を認めたものの、NE 投与による有意差はなかった。しかし、CR 活性の低下傾向は、酸素消費量の結果と合わせて考えると呼吸鎖自体の活動性が低下している可能性を示唆している。

エネルギー産生抑制のため使用した3種の薬剤は、それぞれ異なる作用機序をもつ ATP 産生阻害剤である<sup>30)</sup>。すなわち、OM はプロトンの流れをブロックする真の酸化的リン酸化阻害剤、DNP は脱共役剤、NEM はリン酸輸送阻害によりその効果を表す。この3剤投与においては、いずれも同様のパターンで尿中 CA 排泄量は抑制され、作用機序の如何にかかわらず ATP 産生阻害により CA 排泄が抑制されることが示された。また、組織 CA 含量においても副腎 E 含量、心筋 NE 含量は低下し、しかも CA 合成酵素において律速酵素である TH 活性が低下していたことより、ATP 産生抑制により CA 分泌のみならず CA 合成も抑制されていることが示唆された。さらに、OM 投与により抑制をうける CR 活性と、TH 活性との間に認められた有意な相関関係は、CA 代謝と ATP 産生系の密接な関連性を示唆するものと考えられた。

次に、CA 代謝を外因性に抑制した時のミトコンドリア機能を検討するために、6OHD を投与した。6OHD は生体に投与されると CA 貯蔵顆粒に取り込まれ、CA を変性させ、いわゆる化学的神経切除の状態を作る。<sup>30)</sup>著者の実験では、6OHD 投与により酸素消費量にはいずれも変化なく、ミトコンドリア酵素では CR 活性と PDH 活性が低下した。先の実験で示された CA 代謝と ATP 産生系の密接な関連性より、CR 活性の低下が CA 分泌の低下によりもたらされた可能性はある。一方、6OHD の細胞傷害についてのメカニズムが詳細に検討されるようになり Sachs ら<sup>50)</sup>は、6OHD は酸化されて過酸化水素やパラキノンを生産して細胞傷害をおこすとし、Thakar ら<sup>51)</sup>は低濃度

の 6OHD とミトコンドリアとのインキュベーションでは酸化リン酸化には影響はないが、高濃度では、脱共役としての作用により酸化リン酸化は阻害され ATP 合成が抑制されると報告している。従って、CR 活性低下は、呼吸鎖自体の障害により生じた可能性もあり、6OHD が脱共役剤として作用したのであれば、酸素消費が対照群に比して低下していない点も矛盾しない。CR 活性の低下がいずれの理由としても、おそらく PDH 活性の低下も同じ原因によるものと考えられた。

以上の実験に CA 代謝と肝ミトコンドリアエネルギー産生系との関連が推察されたが、肝ミトコンドリア機能の変化が CA の直接的作用であるのかを検討するために、肝灌流法による実験を行なった。灌流液中のグルコース、乳酸、ピルビン酸の NE に対する反応性は、著者と同じ実験系で  $\alpha$  刺激作用を検討した最近の報告<sup>59</sup>とほぼ同じ結果であり、本実験法における摂食肝および絶食肝が細胞レベルにおいて正常なグリコーゲン分解作用、解糖作用、ニコチンアミドジヌクレオチド酸化還元ポテンシャルを示していることを確認した。灌流後のミトコンドリア酵素の変化をみると、NE 腹腔内投与時と同様、絶食肝の CR 活性は NE 負荷により有意に低下していた。この事は、NE 腹腔内投与において認められた変化が、肝に対する CA の直接的作用であったことを意味している。すなわち、正常の栄養状態では認めないものの、絶食状態においては、NE 負荷により肝ミトコンドリア機能、特に呼吸鎖レベルの活動性が低下すると考えられた。また、灌流実験において、PDH 活性も低下傾向にあり、ミトコンドリア酵素の変化は 6OHD 投与時とほぼおなじパターンであった。従って、6OHD 投与によるミトコンドリア酵素の変化は、CA 分泌の低下より 6OHD 自体が呼吸鎖に影響を及ぼした可能性が強いと思われる。最近、肝ミトコンドリアにおける呼吸とカルシウムイオンについての関連性が解明されつつあり、ミトコンドリア内カルシウムイオン濃度の上昇により 2-Oxoglutarate dehydrogenase, NAD-linked isocitrate dehydrogenase 及び PDH が刺激され肝における酸素消費が上昇することが報告<sup>60</sup>されている。ミトコンドリア膜におけるカルシウムイオンの輸送機構については、まだ不明な点が多いが、6OHD 投与及び絶食肝における NE 負荷による CR 活性、PDH 活性の低下機序にカルシウムイオン代謝が関与している可能性が考えられた。

CA の肝 AdN 代謝に及ぼす影響については、意見の分かれるところであるが<sup>60-62</sup>、本実験においては、

NE 腹腔内投与にて肝 AdN 総量は影響を受けなかった。灌流後のミトコンドリアを、ATP とともにインキュベーションした後に測定したミトコンドリア内 AdN 含量は、ミトコンドリア内膜を介する AdN の輸送機序、すなわち AdN トランスロカーゼを反映していると考えられる<sup>63</sup>。著者の結果では、NE 投与にて摂食肝で認めたミトコンドリア内 AdN のプールの増加は絶食肝では認められず、トランスロカーゼの活性が低下していることが予想された。従って、CA は絶食肝において、AdN の合成系よりも、その輸送に対して影響を及ぼしている可能性が示された。著者は、先にカルシウムイオン代謝が関与している可能性を述べたが、Sanchez<sup>64</sup>は、肝ミトコンドリアにおけるカルシウムイオンが AdN の輸送を調節していることを報告している。もし、絶食肝における CA 負荷により、ミトコンドリアのカルシウムイオンが影響を受けるとすれば、先の結果とともに AdN の輸送に変化が及ぶことも十分考えられると思われた。

今回の成績から、絶食状態においては、肝ミトコンドリア機能は CA に対して感受性の亢進した状態になることが判明した。従って、絶食時交感副腎系により CA 合成分泌が抑制されていることは生体防御の面で非常に合目的である。その直接的メカニズム及び情報伝達については、カルシウムイオンをはじめとするミトコンドリア機能の詳細な解明が必要であるが、今回の成績は、CA とミトコンドリア機能の密接な関連性を示すものと考えられる。

## 結 論

1. 飢餓状態における CA 代謝は、末梢レベルにおいて合成分泌ともに抑制されていた。
2. 絶食ラットに対する NE 腹腔内投与にて、肝酸素消費量及びミトコンドリア CR 活性の低下を認めた。
3. ATP 産生阻害剤腹腔内投与にて、CA 合成分泌は抑制され、CR 活性と TH 活性との間に有意の相関関係を認めた。
4. 6OHD 腹腔内投与にて CR 活性、PDH 活性の低下を認めたが、酸素消費量に変化はなかった。
5. 肝灌流系にて、絶食肝に対する NE 負荷により CR 活性、PDH 活性、AdN 輸送の低下を認め、NE 腹腔内投与にて認められた変化が CA の直接作用であることが示された。

以上の結果から、飢餓状態における肝ミトコンドリアエネルギー産生系は CA 過敏状態にあり、合目的機序により CA の合成分泌が低下することが

示唆された。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に深く感謝の意を表します。また、御指導と御助言を頂きました佐藤保助教授をはじめ小児科学教室内分泌グループの諸先生方に感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は第22回日本小児内分泌学会及び第62回日本内分泌学会において発表した。

### 文 献

- 1) **Himms-Hagen, J.**: Cellular thermogenesis. *Annu. Rev. Physiol.*, **38**, 315-351 (1976).
- 2) **Young, J. B. & Landsberg, L.**: Catecholamines and intermediary metabolism. *Clin. Endocrinol. Metab.*, **6**, 599-631 (1977).
- 3) **Hsieh, A. C. L., Carlson, L. D. & Gray, G.**: Role of the sympathetic nervous system in the control of chemical regulation of heat production. *Am. J. Physiol.*, **190**, 247-251 (1957).
- 4) **Foster, D. O. & Frydman, M. L.**: Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm-or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: The dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by non-shivering thermogenesis. *Can. J. Physiol.*, **57**, 257-270 (1979).
- 5) **Jacob, A. & Diem, S.**: Metabolic responses of perfused rat livers to alpha-and beta-adrenergic agonists, glucagon and cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Acta.*, **404**, 57-66 (1975).
- 6) **Reinhart, P. H., Taylor, W. M. & Bygrave, F. L.**: Trifluoperazine, an inhibitor of calmodulin action, antagonises phenylephrine-induced metabolic responses and mitochondrial calcium fluxes in liver. *FEBS Lett.*, **120**, 71-74 (1980).
- 7) **Reinhart, P. H., Taylor, W. M. & Bygrave, F. L.**: Studies on  $\alpha$ -adrenergic-induced respiration and glycogenolysis in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1906-1912 (1982).
- 8) **Dehaye, J. P., Hughes, B. P., Blackmore, P. F. & Exton, J. H.**: Insulin inhibition of  $\alpha$ -adrenergic actions in liver. *Biochem. J.*, **194**, 949-956 (1981).
- 9) **Binet, A. & Claret, M.**:  $\alpha$ -adrenergic stimulation of respiration in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.*, **210**, 867-873 (1983).
- 10) **Jung, R. T., Shetty, P. S., Barrand, M., Callingham, B. A. & James, W. P. T.**: Role of catecholamines in hypotensive response to dieting. *Br. med. J.*, **1**, 12-13 (1979).
- 11) **Jing, R. T., Shetty, P. S. & James, W. P. T.**: Reduced thermogenesis in obesity. *Nature*, **279**, 322-323 (1979).
- 12) **Katzeff, H. L., O'Connell, M., Horton, E. S., Danforth, E., Young, J. B. & Landsberg, L.**: Metabolic studies in human obesity during overnutrition and undernutrition: thermogenic and hormonal responses to norepinephrine. *Metabolism*, **35**, 166-175 (1986).
- 13) **Johnston, J. L., Warsh, J. J. & Anderson, G. H.**: Obesity and precursor availability affect urinary catecholamine metabolite production in women. *Am. J. Clin. Nutr.*, **38**, 356-368 (1983).
- 14) **Bazelmans, J., Nestel, P. J., O'Dea, K. & Esler, M. D.**: Blunted norepinephrine responsiveness to changing energy states in obese subjects. *Metabolism*, **34**, 154-160 (1985).
- 15) **Jung, J. B. & Landsberg, L.**: Suppression of sympathetic nervous system during fasting. *Science*, **24**, 1473-1475 (1977).
- 16) **Gross, H. A., Lake, C. R., Ebert, M. H., Ziegler, M. G. & Kopin, I. J.**: Catecholamine metabolism in primary anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **49**, 805-809 (1979).
- 17) **Graham, G. G. & Placko, R. P.**: Free catecholamine excretion in the urine in normal infants and in those with marasmus or kwashiorkor. *J. Pediatr.*, **86**, 965-969 (1975).
- 18) **Hoeldtke, R. D. & Wurtman, R. J.**: Excretion of catecholamines and catecholamine metabolites in kwashiorkor. *Am. J. Clin. Nutr.*, **26**, 205-210 (1973).
- 19) **Johnston, J. L., Leiter, L. A., Burrow, G. N., Garfinkel, P. E. & Anderson, G. H.**: Excretion of urinary catecholamine metabolites in anorexia nervosa: effect of body composition and energy intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, **40**, 1001-1006 (1984).
- 20) **Rahman, M. K., Nagatsu, T. & Kato, T.**: Aromatic L-amino acid decarboxylase activity in central and peripheral tissues and serum of rats with L-dopa and L-5-hydroxytryptophan as

- sub-strates. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 645-649 (1981).
- 21) Nagatsu, T. & Kuzuya, H.: A simple assay of dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity in homogenate of the adrenal medulla. *Enzymologia*, **36**, 31-36 (1969).
- 22) Lowry, O. H., Rousenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256-257 (1961).
- 23) Hageboom, G. H., Schneider, W. C. & Pallade, G. E.: Cytochemical studies of mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, **172**, 619-635 (1948).
- 24) Hess, B. & Brand, K.: Methods of animal tissues and micro-organisms. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 1, 2nd English ed., p399-409, Academic Press, New York, 1974.
- 25) 駒林隆夫, 坪井 実: 褐色脂肪組織の酸素摂取におよぼす  $K^+$  ならびに norepinephrine の影響について. *日本生理誌*, **38**, 447-456 (1976).
- 26) Hatefi, Y. & Rieske, J. S.: The preparation and properties of DPNH-cytochrome c reductase (complex I-III of the respiratory chain). In R. W. Estabrook & M. E. Pullman (eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. X., 2nd., p225-231, Academic Press, New York, 1967.
- 27) Lee, Y. & Lardy, H. A.: Influence of thyroid hormones on L- $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenases and other dehydrogenases in various organs of the rat. *J. Biol. Chem.*, **240**, 1427-1436 (1965).
- 28) Saggerson, E. D.: Carnitine acyltransferase activities in rat liver and liver and heart measured with palmitoyl-CoA and octanoyl CoA. *Biochem. J.*, **202**, 397-405 (1982).
- 29) 梶田光春, 前原光夫, 渡辺一功: 高速液体クロマトグラフィーによるピルビン酸脱水素酵素の活性測定法. *日児誌*, **92**, 1100-1104 (1988).
- 30) Ji, S.: A model of oxidative phosphorylation that accommodates the chemical intermediate, chemiosmotic, localized proton and conformational hypotheses. *J. Theor. Biol.*, **59**, 319-330 (1976).
- 31) Nagatsu, T., Oka, K., Numata, Y. & Kato, T.: A simple and sensitive assay for tyrosine hydroxylase activity. *Analy. Biochem.*, **93**, 82-87 (1979).
- 32) Clark, D. W. J.: Long-lasting peripheral and central effects of 6-hydroxydopamine in rats. *Br. J. Pharmacol.*, **44**, 233-243 (1972).
- 33) 木村 哲: 肝灌流法. 内分泌動物実験法 (井村裕夫, 加藤 讓編), 第1版, 273-282頁, 講談社, 東京, 1982.
- 34) Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Schmidt, F. & Stork, H.: Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol.3, 2nd English ed. p1196-1199, Academic Press, New York, 1974.
- 35) Noll, F.: Determination with LDH, GPT and NAD. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol.3, 2nd English ed. p1475-1479, Academic Press, New York, 1974.
- 36) Czok, R. & Lamprecht, W.: Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol.3, 2nd English ed. p1446-1451, Academic Press, New York, 1974.
- 37) Hamman, H. C. & Haynes, Jr, R. C.: Elevated intramitochondrial adenine nucleotides and mitochondrial function. *Arch. Biochem. Biophys.*, **233**, 85-94 (1983).
- 38) Yung, J. B. & Landsberg, L.: Suppression of sympathetic nervous system during fasting. *Science*, **196**, 1473-1475 (1977).
- 39) Yung, J. B. & Landsberg, L.: Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in pancreas and liver. *Am. J. Physiol.*, **236**, 5-6 (1979).
- 40) O'Dea, K., Esler, M., Leonard, P., Stockigt, J. R. & Nestel, P.: Noradrenaline turnover during under and over-eating in normal weight subject. *Metabolism*, **31**, 896-899 (1982).
- 41) Landsberg, L. & Yung, J. B.: Fasting, feeding and regulation of the sympathetic nervous system. *N. Engl. J. Med.*, **298**, 1295-1301 (1978).
- 42) Wojtczak, A. B. & Thienen, W. I. A. E.: Stimulation of mitochondrial function by glucagon treatment, starvation and by treatment of isolated mitochondria with glycogen bound enzymes. *Int. J. Biochem.*, **19**, 479-482 (1987).
- 43) Dimarco, J. P. & Hoppel, C.: Hepatic

mitochondrial function in ketogenic states. *J. Clin. Invest.*, **55**, 1237-1244 (1975).

44) **Rasheed, B. K. A., Chhabra, S. & Kurup, C. K. R.** : Influence of starvation and clofibrate administration on oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria. *Biochem. J.*, **190**, 191-198 (1980).

45) **Brandy, L. & Hoppel, C. L.** : Effect of diet and starvation on hepatic mitochondrial function in the rat. *J. Nutr.*, **113**, 2129-2137 (1983).

46) **Hatefi, Y., Haavik, A. G. & Jurtschuk, P.** : Studies on the electron transport system XXX. DPNH-cytochrome c reductase I. *Biocim. biophys. Acta.*, **52**, 106-118 (1961).

47) **Tarentino, A. L., Richert, D. A. & Westerfeld, W. W.** : The concurrent induction of hepatic  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and malate dehydrogenase by thyroid hormone. *Biochim. biophys. acta*, **124**, 295-309 (1966).

48) **Saggerson, E. D. & Carpenter, C. A.** : Response to starvation of hepatic carnitine palmitoyltransferase activity and its regulation by malonyl-CoA. *Biochem. J.*, **208**, 673-678 (1982).

49) **Holness, M. J. & Sugden, M. C.** : Regulation of renal and hepatic pyruvate dehydrogenase complex on carbohydrate re-feeding after starvation. *Biochem. J.*, **241**, 421-425 (1987).

50) **Fozard, J. R., Kelly, M. J. & Small, R. C.** : Chemical sympathectomy of rabbit with 6-hydroxydopamine. *Br. J. Pharmacol.*, **49**, 182p-183p (1973).

51) **Sachs, C. & Jonsson, G.** : Mechanisms of action of 6-hydroxy-dopamine. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1-8 (1975).

52) **Thakar, J. H. & Hassan, M. N.** : Effect of 6-hydroxydopamine on oxidative phosphorylation of mitochondria from rat striatum, cortex, and liver. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **66**, 376-379 (1988).

53) **Manchon, C. G., Saz, J. M., Ayuso, M. & Parrilla, R.** : Characterization of the  $\alpha$ -adrenergic stimulation of hepatic respiration. *Arch. Biochem. Biophys.*, **265**, 258-266 (1988).

54) **Johnston, J. D. & Brand, M.** : Stimulation of the respiration rate of rat liver mitochondria by sub-micromolar concentrations of extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biochem. J.*, **245**, 217-22 (1987).

55) **Titheradge, M. A. & Haynes, Jr, R. C.** : The stimulation of the mitochondrial uncoupler-dependent ATPase in isolated hepatocytes by catecholamines and glucagon and its relationship to gluconeogenesis. *Eur. J. Biochem.*, **102**, 117-124 (1979).

56) **Siess, E. A., Brocks, D. G. & Wieland, O. H.** : Comparative studies on the influence of hormones on metabolite. Compartmentation in isolated liver cells during Gluconeogenesis from lactate. *Biochem. Soc. Trans.*, **6**, 1139-1144 (1978).

57) **Taylor, W. M., Pol, E. V. D. & Bygrave, F. L.** : The stimulation of the tricarboxylic acid-cycle flux by  $\alpha$ -adrenergic agonists in perfused rat liver. *Biochem. J.*, **233**, 321-324 (1986).

58) **Sanchez, R. M.** : Contribution of the translocator of adenine nucleotide and ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12554-12560 (1985).



**Interrelation between Catecholamine and Mitochondrial Energy Producing System during Starvation** Kazuhiko Miyagawa, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 82—97, (1990)

**Key words** catecholamine, mitochondria, starvation

**Abstract**

The metabolid interrelation between catecholamine (CA) and the mitochondrial energy producing system during starvation was examined in adult female Wister rats. In 3 to 5 days of fasting, urinary CA excretion and adrenal aromatic L-amino acid decarboxylase and dopamine  $\beta$ -hydroxylase activities were gradually decreased, indicating that both CA synthesis and secretion are suppressed during starvation. Liver mitochondria preparation from starved rats, who had been treated with intraperitoneal injections of norepinephrine (NE) for 3 days, showed a decrease in oxygen uptake and NADH-cytochrome c reductase (CR) activity, whereas  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase, carnitine palmitoyltransferase and pyruvate dehydrogenase (PDH) activities remained unaffected. Blocking in adenosine triphosphate (ATP) production by oligomycin (OM), 2-4-dinitrophenol or N-ethylmaleimide resulted in a similar suppression of urinary CA excretion, irrespective of the specified blocking sites of these drugs in the ATP pathway. With OM treatment, the adrenal epinephrine content and tyrosine hydroxylase (TH) activity were also reduced. There was a significant linear correlation between the adrenal TH activity and mitochondrial CR activity. Chemical sympathectomy by 6-hydroxydopamine induced a similar reduction of the mitochondrial CR and PDH activities. In the liver perfusion system, NE infusion induced a reduction of CR and PDH activities as well as adenine nucleotide transport activity in starved rats, but did not in fed rats. These results indicate that (1) during starvation, there is a close metabolic correlation between the mitochondrial energy producing system and CA status, and (2) starvation induces a hypersensitive state in the mitochondria to CA, which exerts direct action on the NADH and ATP transport system.