

## ミトコンドリアのフリーラジカルに 及ぼすカルシウムイオンの作用

金沢大学医学部第二病理学講座(主任：石川大 刀雄教授)

阿 部 則 行

(昭和47年12月25日受付)

ミトコンドリアの主な役割は、基質の酸化(電子伝達)によって遊離する電気的なエネルギーを化学的エネルギーに変換(酸化的磷酸化)することであるが、近年これに共役しての各種イオンの能動透過が注目されている。すなわち、ミトコンドリアは、一価あるいは二価の陽イオン(特に $K^+$ 、 $Mg^{++}$ 、 $Ca^{++}$ )を取りこむことによって、膜内外のイオンバランスを保っていると考えられる。このミトコンドリアにおけるイオン輸送の現象は、はじめこれに伴って生じるミトコンドリアの形態変化と関係づけて研究されたが、形態変化の示す生理的意義の解明の困難さのために、結論を見出すには至らなかった。その後、1953年 P. Siekevitz<sup>1)</sup>らが、 $Ca^{++}$ 添加によって、ミトコンドリアの呼吸増大が生じることを発表して以来、Vasington<sup>2)~5)</sup>、Carafoli<sup>6)~9)</sup>、Rossi<sup>10)~12)</sup>、Lehninger<sup>13)~16)</sup>、等により、更にくわしく $Ca^{++}$ 取りこみに関する研究がなされた。Vasington<sup>2)</sup>によれば、 $Ca^{++}$ 取り込みはエネルギー依存性であり、そのエネルギーはATPからでも、呼吸基質からでも供給されることを示し、更に $Mg^{++}$ 、無機磷、ATP存在下では大量の $Ca^{++}$ がミトコンドリア内に蓄積することを明らかにした(Massive  $Ca^{++}$  uptake)。Chance<sup>17)</sup>は、呼吸と $Ca^{++}$ との関係を追求め、低濃度の $Ca^{++}$ はstate IV呼吸を開放し、その効果はADPと非常によく似ていることを報告している(limited  $Ca^{++}$  uptake)。この場合、酸素1原子消費あたりの $Ca^{++}$ の取りこみは、呼吸基質をコハク酸とすると4個、 $\beta$ -hydroxybutyrateでは6個となる。すなわち、1個の高エネルギー中間体当り2個の $Ca^{++}$ が取りこまれるが、 $Ca^{++}$ のmassive uptakeの場合にも同じ機構によると考えられている。この様に $Ca^{++}$ 取りこみについての報告は数多くなされているが、取りこみの際の高エネルギー中間体、あるいは、ATP、 $Mg^{++}$ 、Pi等の役割については全く不明の点が多い。

一方、高エネルギー中間体についてもいくつかの説が出されているが、現在定説はなく、この高エネルギー中間体が化学物質であるとするSlater<sup>18)</sup>及びChance<sup>19)</sup>のモデル、ATP合成酵素の蛋白分子としての高エネルギー単位の構造状態であるとするBoyer<sup>20)</sup>のモデル、ミトコンドリア内膜をはさんで、その内外に起こるelectrochemical potential差であるとするMitchell<sup>21)</sup>のモデル等が提出されているが、小田島<sup>22) 23)</sup>らはミトコンドリアのfree radicalと呼吸機能との関係から、電子伝達系、酸化的磷酸化系の機構の解明を試みている。このfree radicalは単に正常呼吸機能と関係するだけでなく、aging, sonication, pH変化等膜に対する種々の処理による膜の状態変化によってもfree radicalが減少することを見出した。又、free radicalが膜構造の保持に重要な役割を果していることを指摘している。この様なことから、膜を場とする種々の反応系、特にイオン輸送の問題を、free radicalの動態から追求することは重要な意味を持つと考えられる。その研究の一端として、ミトコンドリアに対する $Ca^{++}$ の作用、更に $Ca^{++}$ 取りこみに関与するsuccinate, ATP, Pi,  $Mg^{++}$ の作用や意義について、free radicalの動態を中心に検討した。

### 実験材料および実験方法

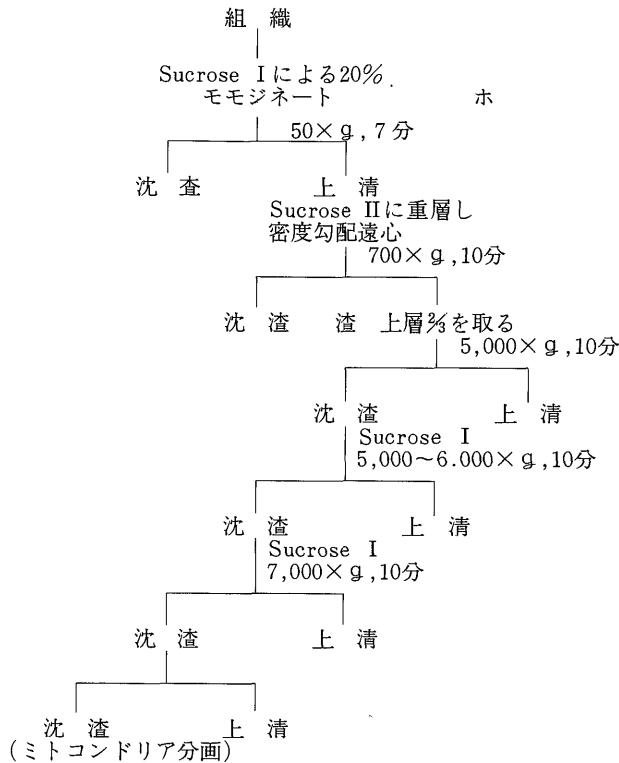
#### I. ミトコンドリアの分離

ミトコンドリアの分離はHogeboom-Schneider法に改良を加えた内海<sup>24)</sup>の方法に従った(表1)。

成熟ラットを無麻酔下で暫首、泻血後、すばやく肝臓を削出した。氷冷状態下(以下の操作はすべて0~4°Cで出来る限り迅速に行った)で肝臓を2~3mm<sup>3</sup>の細片とし、sucrose I液(0.25M sucrose, 0.1 mM EDTA, 0.01~0.02 M Tris-HCl buffer, pH7.2)で数回洗浄して血液成分を除去した。肝組織

Effect of Ca ion to the free radical of mitochondria. **Noriyuki Abe**, Department of Pathology (II) (Director : Prof. T. Ishikawa) School of Medicine, Kanazawa University.

表 I ミトコンドリアの分離方法



の4倍量の sucrose I 液を加え、Potter-Elvehjem 型ガラスホモジナイザー、テフロンホモジナイザーでホモジナイズして、20%ホモジネートとした。このホモジネートを50×g、7分間遠心し、上清を sucrose II 液 (0.34 M sucrose, 0.1 mM EDTA, 0.05 M Tris-HCl buffer, pH7.2) に重層し、700×g、10分間遠心して粗大夾雑物を除いた。表1に示した様に上清を5000×g、10分間遠心して得られたミトコンドリアを sucrose I 液に浮遊させ、6000×g、10分、7000×g、10分遠心洗浄し、更に sucrose III 液 (0.25 M sucrose, 0.01 M Tris-HCl buffer, pH7.2) に浮遊し、9000×g、10分遠心洗浄した。このミトコンドリア分画は300 mg wet-weight/ml になるように sucrose III 液に浮遊させ、氷冷下に保存し、以下の実験に供した。なお、このミトコンドリア浮遊液は蛋白量に換算すると、ほぼ30 mg protein/ml (Lowry<sup>25</sup>法)であった。ミトコンドリアはあらかじめオキシメーターによって呼吸能(電子伝達能並びに酸化磷酸化能)に異常のないことを確かめた。又、全ての同一系統の実験は、出来る限り同一ミトコンドリアを用いるようにした。

## II. ミトコンドリアの機能の測定

Chance<sup>26</sup>、荻原<sup>27</sup>等の考案による半閉鎖式回転白金電極法を用いてミトコンドリアの酸素消費量を測定した。図1は測定装置の概略図である。反応容器は石英ガラス製(1.0×1.0×2.0 cm, 容量2.0 ml)で、陽極には銀-塩化銀電極を用い、その表面は10% KClを含む4%寒天板でおおい、銀-塩化銀電極が直接ミトコンドリアに接触することのない様にした。陰極には先端が球状(球の直径は約1 mm)の回転白金電極をコロジオンで処理したものをを用いた。

この装置は電氣的に安定で、0.6~0.8 Vまでの電圧変化に対して陰極反応電流はほぼ一定値を示す。従って、この間の電圧(0.7 V±0.1 V)による電流は、medium に溶存する酸素張力に比例する。実際の測定では、電流量の減少から細胞内のO<sub>2</sub>消費量が計算される。電流の記録には、東亜電波(KK)製、Poly recorder Model EPR-3 Tを使用した。なお、外部からの酸素の侵入は、反応容器の形を工夫することによって、ほとんど無視出来ることを確かめた。図2はその実測例である。反応液は、0.25 M sucrose, 0.02 M KCl, 0.01 M Tris-HCl buffer, 0.1 mM

図1 オキシメーターの概略図

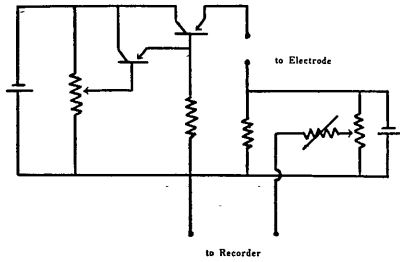
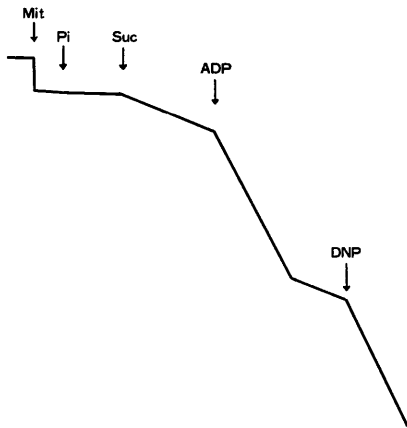


図2 ミトコンドリアの酸素消費曲線



EDTA, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub> (pH7.2) を使用した。以後 medium I とする)。この反応液2mlを反応器に入れ、陽一陰極間に0.7Vの電圧を负荷し、電流の安定をまち、ミトコンドリア懸濁液を、反応液1ml当り0.1ml(約3mg蛋白量のミトコンドリア)を加えた。急激な温度変化やミトコンドリア懸濁液の無酸素状態による酸素消費につづいて、内部呼吸による酸素消費(Chance<sup>28)</sup>らの state I 呼吸)がみられる。

次に3mMのPiを添加すると、1~2 μatoms oxygen/mg protein/min の酸素消費が見られ、これに呼吸基質として、6mMの succinate を加えると、酸素消費は促進され(20 μatoms oxygen/mg protein/min ; Chance 等の state IV 呼吸)、更にADPを添加すると、酸素消費は著明に増加し、state III 状態となる(100 μatoms oxygen/mg protein/min)。ADPが消費されると呼吸はstate IV 状態となり、この間に消費された酸素量と加えたADPの量からADP/O比が計算され、state III/state IV で呼吸調節率(RCI)が算出される。

この実験系で用いられたミトコンドリアは、すべてADP/O比1.8以上、RCI 4.0以上である。

### III. ESR測定装置並びに測定条件

free radicalの測定は、日本電子(KK)製、電子スピン共鳴装置、JES-ME-3Xを使用した。本装置の主な仕様は次の通りである。

1. 検出感度:  $5 \times 10^{13}$  spin/gauss (100KHZ変調)
2. 分解能:  $1 \times 10^{-5}$ 以上
3. 信号周波数: 9400MHz
4. 磁界変調: 0.02~20gauss
5. 磁界掃引:  $\pm 0.25 \sim \pm 5000$ gauss
6. 磁場可変範囲: ~6000gauss
7. 磁界設定精度: coarse 10gauss fine 0.1gauss
8. 磁界均一度:  $1 \times 10^{-5}$
9. 空洞共振器: TE<sub>011</sub>

測定条件は小田島ら<sup>29)</sup>の方法に従い、次の様に行った。

#### 1. マイクロ波

クライストロンの周波数は約9150C/秒で、X帯を用いた(温度可変装置を使用しない場合は約9400MC/秒)。

#### 2. 測定磁場掃引範囲

3290gaussを中心として $\pm 100$ gaussの磁場掃引を行い、測定磁場の確認のため、MnOを磁場マーカーとして同時に測定した。

modulation, power, 掃引時間等は小田島ら<sup>29)</sup>の方法を参考にした。

#### 3. 資料管

内径0.45cmの石英硬質ガラス製の資料管を用いた。

#### 4. 測定温度

水溶液系の測定では、誘電損失が大きく、空洞のQが低下し、検出感度が著しく低下するので、測定温度は重要な問題となる。

小田島ら<sup>29)</sup>によれば、凍結測定では超微構造の消失する不便さはあるが、低温による検出感度の増加(spin量の増加)や凍結することにより反応を一定時間で止めて、そのときの spin 量を測定できるという利点がある。又、ミトコンドリアの free radical の測定では、 $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ 間では spin 量や signal の波形に著しい変化がないことを確認している。

以上の点を考慮して、この実験では附属の温度可変装置を用い、 $-80^{\circ}\text{C}$ で測定を行なった。

#### 5. 波形の解析

相対的 spin 量は、電子スピン共鳴装置で得られ

る微分波形を積分波形に変換し、その面積を測定することによって得られるが、この相対的 spin 量はほぼその signal の intensity (signal の高さ) に比例することを確認の上、この実験系では、intensity を用い、試料管内に封入されたミトコンドリア濃度、試料管の太さ、実際に測定された容積などから、ミトコンドリア 10 mg protein 量に相当の intensity を算出した。

#### IV. ATPase 活性測定法

測定は Sjoerd L. Bonting ら<sup>30)</sup>の方法により、下記の順序で行なった。

1. 5.0  $\mu$ moles ATP, 1.2  $\mu$ moles KCl, 5.0  $\mu$ moles Tris-HCl buffer (pH7.5) を含む 0.3 ml の溶液にミトコンドリア懸濁液 0.2 ml (6 mg protein 量のミトコンドリア) を加え、30°C で incubate する。

2. 10% 過塩素酸液 1 ml を加え、反応を停止させ、4000 rpm 5 分遠心する。

3. この上清 0.5 ml に蒸留水 1.0 ml を加える。

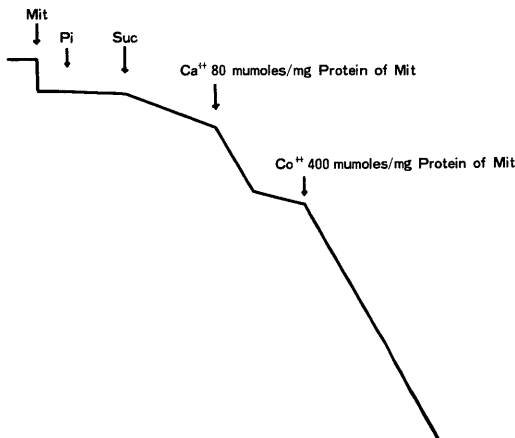
4. この液の無機磷を測定する。すなわち、上記の溶液 1.5 ml に color reagent (1.15N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 液に (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>•4H<sub>2</sub>O を 1% となる様加え、更に FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O を 10 ml に 400 mg の割合で溶かす) を 1.5 ml 加え、波長 700 m $\mu$  での吸光度を測定する。

### 実験結果

#### I. 正常ラット肝ミトコンドリアの呼吸に対する Ca<sup>++</sup> の作用

ミトコンドリアに Pi, succinate を加えた state

図3 ミトコンドリアの酸素消費に及ぼす Ca の影響



IV 呼吸の状態に、CaCl<sub>2</sub> (100  $\mu$  Ca<sup>++</sup>/mg protein 以下) を加えると呼吸は促進され、ADP 添加とよく似た挙動を示し、再び state IV 呼吸にもどる。この場合の Ca<sup>++</sup> の取りこみは、ミトコンドリアの形態変化や、呼吸調節能消失、磷酸化能の消失などは伴わず、いわゆる limited Ca<sup>++</sup> uptake である。しかし Ca<sup>++</sup> の微量添加 (20  $\mu$  Ca<sup>++</sup>/mg protein) を数回つづけていくと、ミトコンドリアの呼吸状態は変化し、加えた Ca<sup>++</sup> 量が 100  $\mu$  Ca<sup>++</sup>/mg protein をこえると、それ以上の Ca<sup>++</sup> は取りこまれなくなる (state VI)。この状態に ATP, Mg<sup>++</sup> を加えると、再び呼吸は促進され、Ca<sup>++</sup> の取りこみが始まるが、これは massive Ca<sup>++</sup> uptake で、ミトコンドリアは膨化し、最終的には、呼吸調節能や磷酸化能は消失する (図 3)。

#### II. 正常ラット肝ミトコンドリアの free radical に対する Ca<sup>++</sup> の作用

ミトコンドリアの free radical は、呼吸における電子伝達や酸化的磷酸化機能に大きな役割を果たしており、その形態とも密接な関係をもつものと考えられる。まずミトコンドリアの呼吸に伴う Ca<sup>++</sup> の能動透過 (limited uptake) における free radical の変化について検討した。

##### 1. ミトコンドリアの state I 呼吸状態における Ca<sup>++</sup> イオンの作用

Ca<sup>++</sup> イオンは、呼吸基質や ATP の存在しない正常ミトコンドリアに対しては、共役阻害剤として作用し、ATPase 活性を増大し、著しいミトコンドリアの膨潤をもたらすが、Ca<sup>++</sup> の取りこみはおこなわれない。

ミトコンドリアの ESR による呼吸曲線は、約 3300 gauss を中心に、40~60 gauss の拡がりをもつ微分波形で、g 値 2.0047,  $\Delta H_{msl}$  9.5 gauss, intensity 14 cm/mg protein of mit. である。この intensity は、約  $6.0 \pm 0.15 \times 10^{13}$  spin/mg protein of mit. の相対的スピン数に相当する。

medium I にミトコンドリアを浮遊させ、ミトコンドリア 1 mg protein 当たり、20  $\mu$ moles, 50  $\mu$ moles, 100  $\mu$ moles, 500  $\mu$ moles, の CaCl<sub>2</sub> を添加し (以後の Ca<sup>++</sup> 添加量はすべて mg protein of mit. 当りに換算したものである)、室温で 4 分 incubate すると、Ca<sup>++</sup> 濃度に従って、free radical の intensity は図 4 のように変化する。すなわち、Ca<sup>++</sup> を含まないミトコンドリアの free radical 量に対して、50  $\mu$ moles までは、やや増加の傾向を示すが、100  $\mu$ moles, 200  $\mu$ moles, 500

mμmoles ではそれぞれ74%, 84%, 67%と減少を示す(以下の表はすべて%で表わす). ミトコンドリアに34.5 mμCa<sup>++</sup>275.9 mμCa<sup>++</sup>のCaCl<sub>2</sub>を添加し, 室温, 酸素飽和の状態における incubate の時間経過に伴う free radical の変化は, 図5, 図6 に示してある. すなわち, 34.5 mμCa<sup>++</sup>添加の例では, 時間と共に free radical はわずかではあるが減少し, 10分后に

はほぼ64.3%になる. しかし275.9 mμCa<sup>++</sup>では, 時間とともに free radical は著明に減少し, 10分后では0分に対して28%にまで減少する.

2. Ca<sup>++</sup> uptake と free radical との関係

Ca<sup>++</sup>の取りこみには, limited, massive いずれの場合にも, 呼吸基質あるいはATPの存在が不可欠である.

図4 Ca<sup>++</sup> 濃度変化に伴う free radical の変化

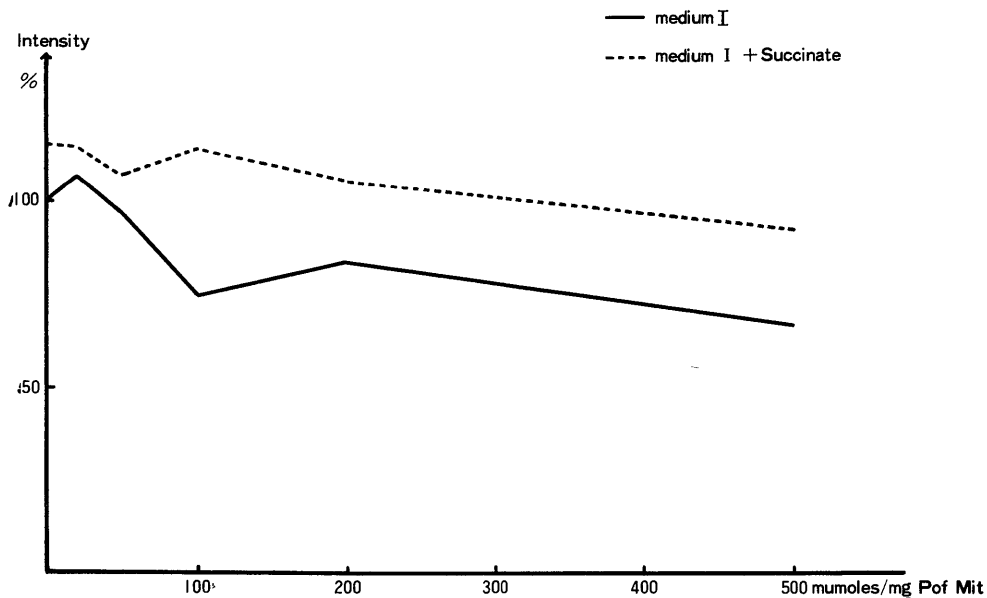
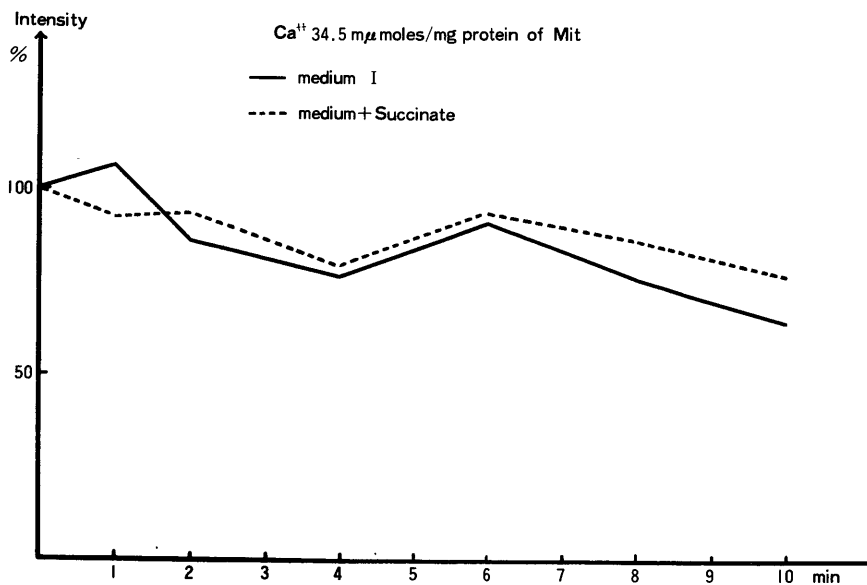


図5 Ca<sup>++</sup> 少量添加後の時間経過に伴う free radical の変化



1). succinate の添加

図4, 図5, 図6の……は, 呼吸基質として succinate を添加したものである. ミトコンドリアに succinate を添加すると free radical が増加することは, すでに報告されているが<sup>21)</sup>, この状態のミ

トコンドリアにCa<sup>2+</sup>を添加しても, succinate の存在しない場合1に比較して, free radical の減少は見られない. また, Ca<sup>2+</sup> 200 mμmoles 以下の添加ではむしろ free radical は増加し, Ca<sup>2+</sup> 500 mμmoles 添加でも92%の free radical を維持し

図6 Ca<sup>2+</sup> 大量投与後の時間経過に伴う free radical の変化

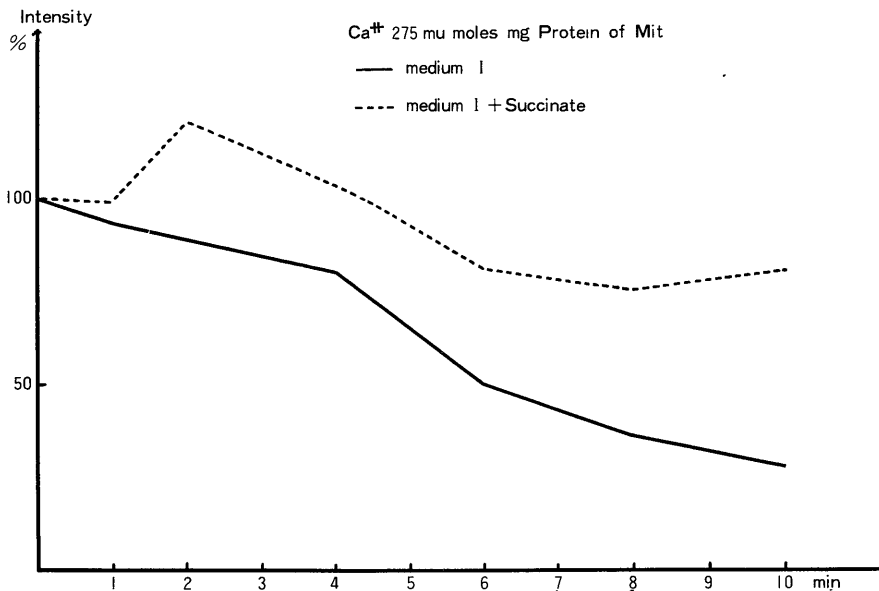
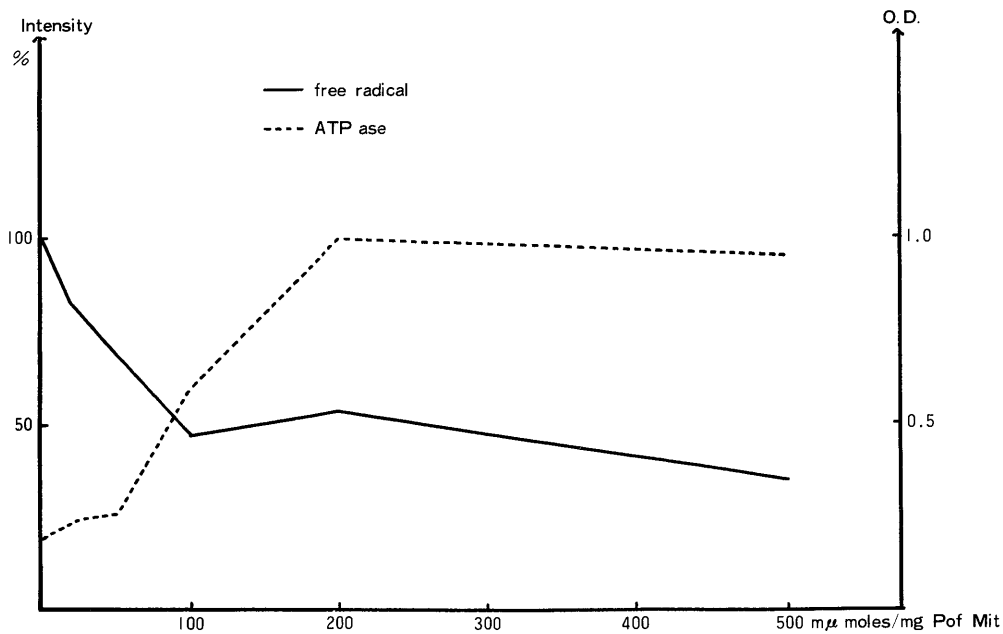


図7 ATP 存在下での Ca<sup>2+</sup> 濃度変化に伴う free radical と ATP ase 活性



ている(図4). 時間経過についてみると, ミトコンドリアに $34.5 \mu\text{Ca}^{2+}$ を添加した場合には, succinate のない場合とほとんど差が認められないが,  $275.9 \mu\text{Ca}^{2+}$ 添加の例では, 著しい差が認められる. すなわち, 図6に示す様に, free radical 量は4分ま

で増加の傾向を示し, 以後減少するが, 常に80%以下に減少することはない.

2). ATP添加

ミトコンドリアを KCl 40 mM, ATP 17 mM, Tris 17 mM (pH7.2) の medium (以後 ATP

図8 ATP存在下で少量 $\text{Ca}^{2+}$ 添加後の時間経過に伴う free radical の変化

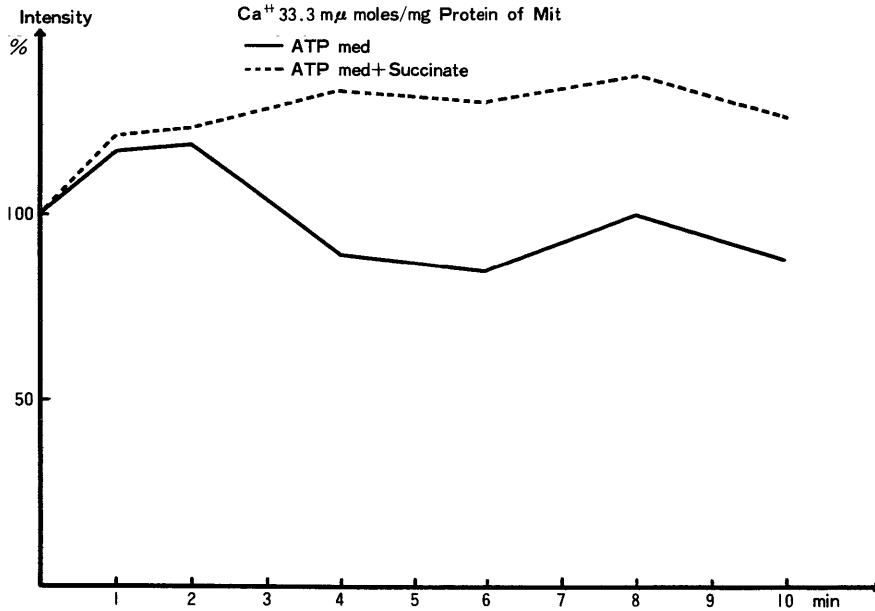
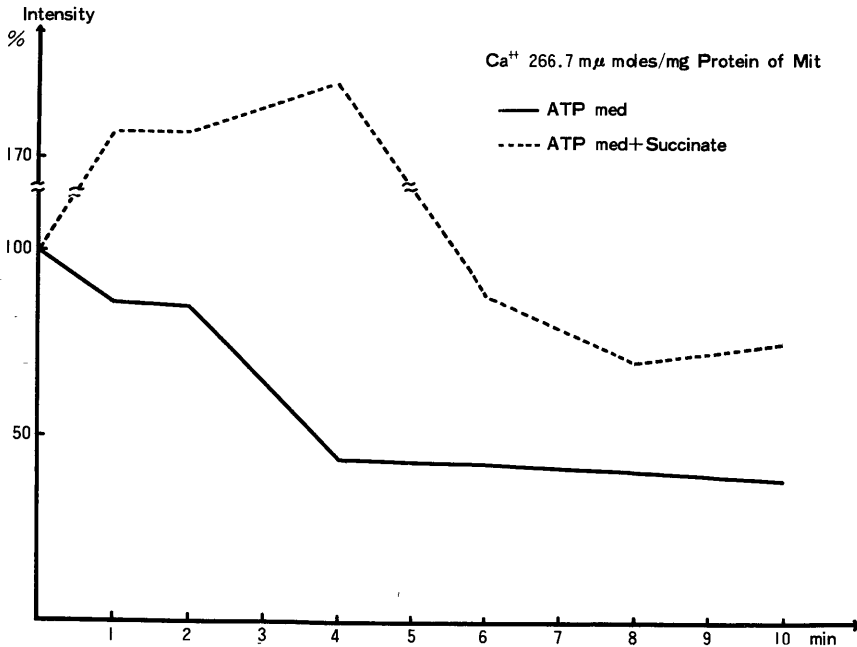


図9 ATP存在下で大量 $\text{Ca}^{2+}$ 添加後の時間経過に伴う free radical の変化



medium とする) に浮遊し, 各20, 50, 100, 200, 500  $\mu\text{moles}$  の $\text{CaCl}_2$ を加え,  $25^\circ\text{C}$  4分 incubate してその free radical の変化を検討した (図7). 添加する $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が100  $\mu\text{moles}$ 以下では, free radical はその添加量にほぼ比例して減少するが,

$\text{Ca}^{2+}$  100  $\mu\text{moles}$  以上の添加ではそれ以上の減少はみとめられず, 添加量に無関係にほぼ一定値を示す. つぎに時間変化についてみると,  $\text{Ca}^{2+}$ 33.3  $\mu\text{moles}$  添加 (図8) では2分まで free radical はむしろ増加し, それ以後著明な変化はなく, 15%以上減少

図10 少量  $\text{Ca}^{2+}$  添加後の時間経過に伴う ATP ase 活性の変化

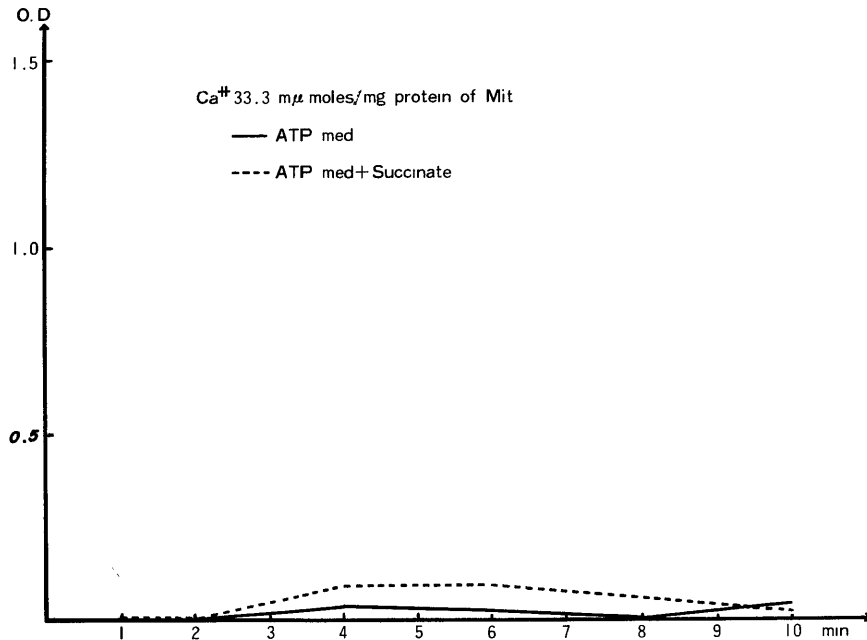
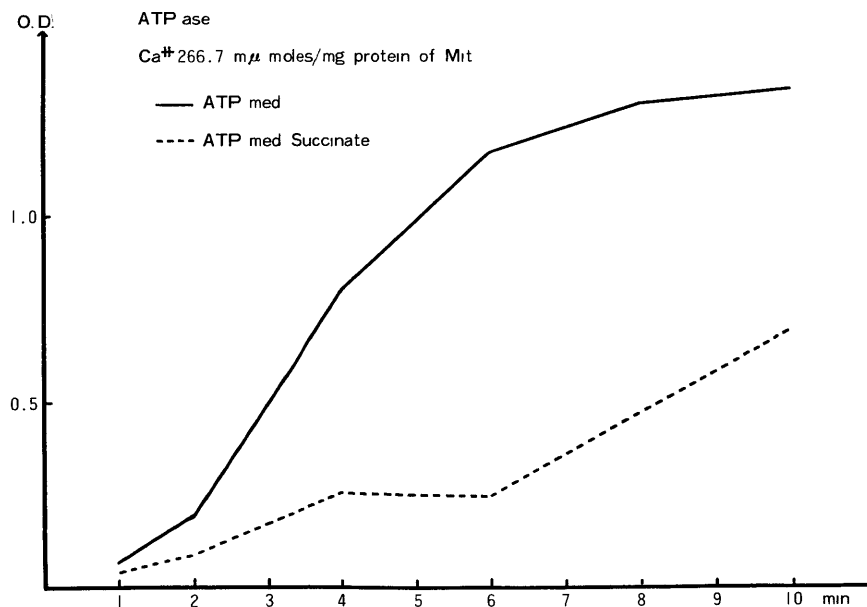


図11 大量  $\text{Ca}^{2+}$  添加後の時間経過に伴う ATP ase 活性の変化





することはない。しかし  $266.7 \mu\text{Ca}^{++}$  (図9) では、free radical は著明に減少し、4分で44%、10分では39%まで減少する。各場合のATPase活性は(図10、図11)で示されるが、 $33.3 \mu\text{Ca}^{++}$ の場合ほとんど活性化は認められず、 $266.9 \mu\text{Ca}^{++}$ の添加では、free radicalの減少に平行して著明なATPase活性の増大を認めた。

### 3). ATP と succinate 添加

次にATPと succinate を添加した場合の free radical と ATPase 活性について検討した。

ミトコンドリアに  $33.3 \mu\text{moles}$  の  $\text{CaCl}_2$  を加えた場合の free radical を時間経過とともに観察すると(図8)、常に増加の傾向を示すが、 $266.7 \mu\text{moles}$  の添加の場合(図9)では、その free radical の時間的变化は特異的である。すなわち、incubation 4分までは著明に増加し、ほぼ添加時の2倍にまで達するが、以後次第に減少する。この場合のATPase活性についてみると、 $\text{Ca}^{++}$   $33.3 \mu\text{moles}$  の添加では、succinateの存在によって活性がわずかに増加するが、 $\text{Ca}^{++}$   $266.7 \mu\text{moles}$  添加では、succinateによって、その活性はむしろ著しく抑制される(図10、図11)。

### III. $\text{Ca}^{++}$ uptake の促進因子 (Pi, $\text{Mg}^{++}$ ) と free radical

massive  $\text{Ca}^{++}$  uptake には呼吸基質、ATPの他、Pi、 $\text{Mg}^{++}$ が必要である。 $\text{Ca}^{++}$ の取りこみをささえるPiや $\text{Mg}^{++}$ の役割はなお明らかではないが、一般にPiは $\text{Ca}^{++}$ イオン取りこみに伴うカウンターイオンとして取りこまれ、 $\text{Mg}^{++}$ はATPと同様、ミトコンドリア膜構造の保護作用を示すと考えられている。

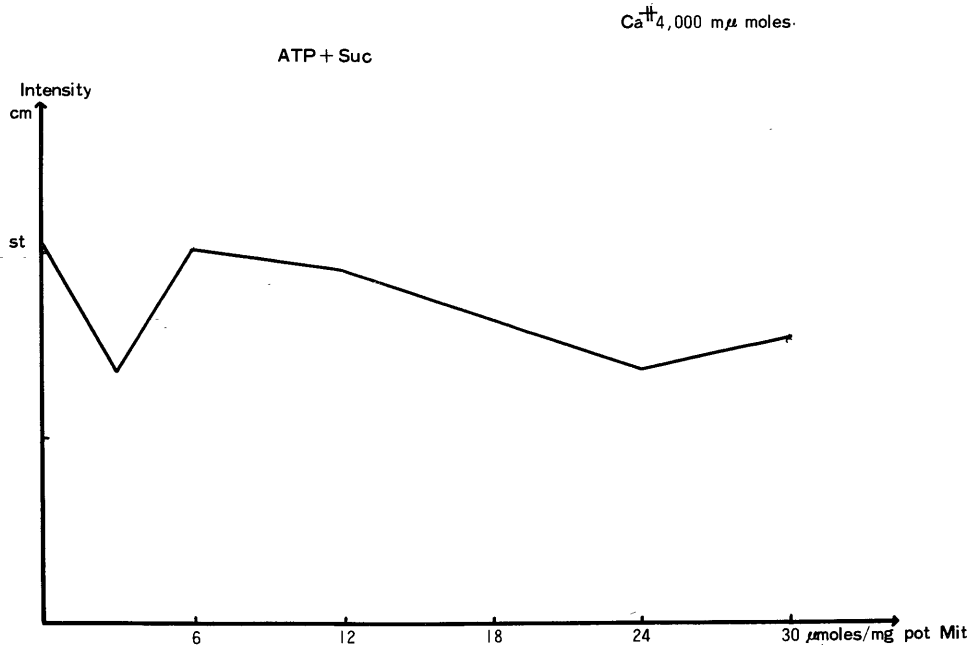
#### 1. Pi と free radical

ミトコンドリアにPiを添加すると著明な膨潤を示すが、それに伴って free radical はほぼ70%まで減少する<sup>23)</sup>。succinateの存在下では、この free radical の減少はなく、むしろ増加の傾向を示す。

10 mM  $\text{MgCl}_2$  および succinate を含む ATP medium I に  $\text{CaCl}_2$  を加え、Piの濃度変化に伴う free radical の変化についてみると、Piの添加量を3, 6, 12, 24, 30  $\mu\text{moles}$  に変化しても、free radical の著明な減少傾向はみられず、Pi量の増加に対する変化も一様でない(図12)。

succinate, Pi を含む medium I にミトコンドリアを添加し、1分 incubate した後、 $\text{CaCl}_2$  を加え、その後の時間経過に従って、free radical を測定すると、 $\text{Ca}^{++}$  添加1分で極めて著しい減少を認めるが(60%)、それ以後は著明な変化は認められない。はじめに $\text{Ca}^{++}$ を添加し、1分 incubate 后、Piを添加した場合についての時間変化も、ほぼ同じ傾向を示

図12  $\text{Ca}^{++}$  結合に対する Pi 濃度の影響



した(図13).

2.  $Mg^{2+}$ と free radical  
次に $Mg^{2+}$ を含む medium 中での $Ca^{2+}$  uptake とその free radical の変化について検討した。  
すなわち、10 mMの $MgCl_2$ を含む medium I と10

mMの $MgCl_2$ を含む ATP medium I にミトコンドリアを加え、 $Ca^{2+}$ 濃度変化に伴う free radical を測定した。

$CaCl_2$ 各20, 50, 100, 200, 400  $\mu$ molesの添加では、free radical はそれぞれ99%, 108%, 103%.

図13  $P_i$  と  $Ca^{2+}$  を含む medium 中での時間経過に伴う free radical の変化

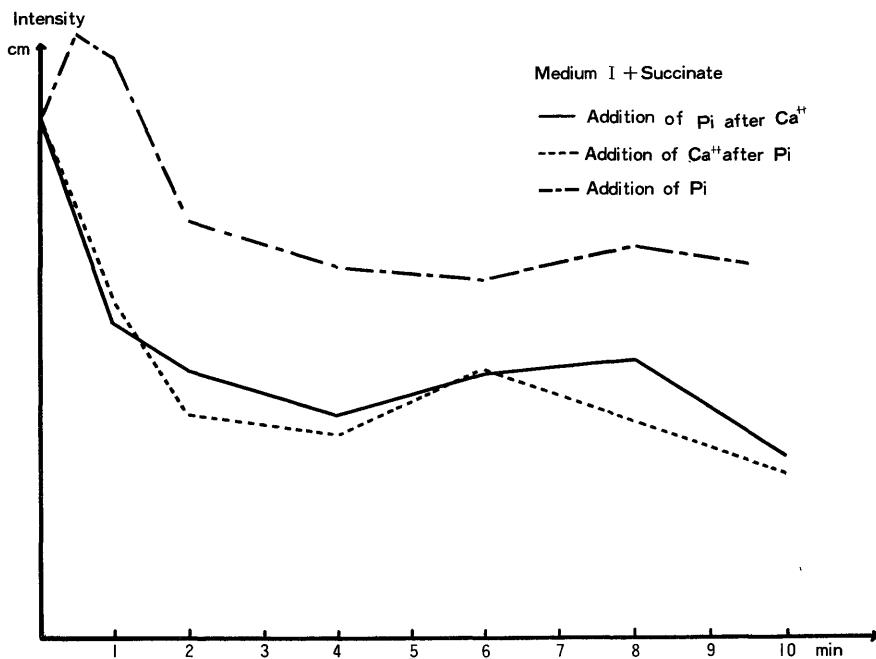


図14  $Ca^{2+}$  による free radical 変化への  $Mg^{2+}$  の影響

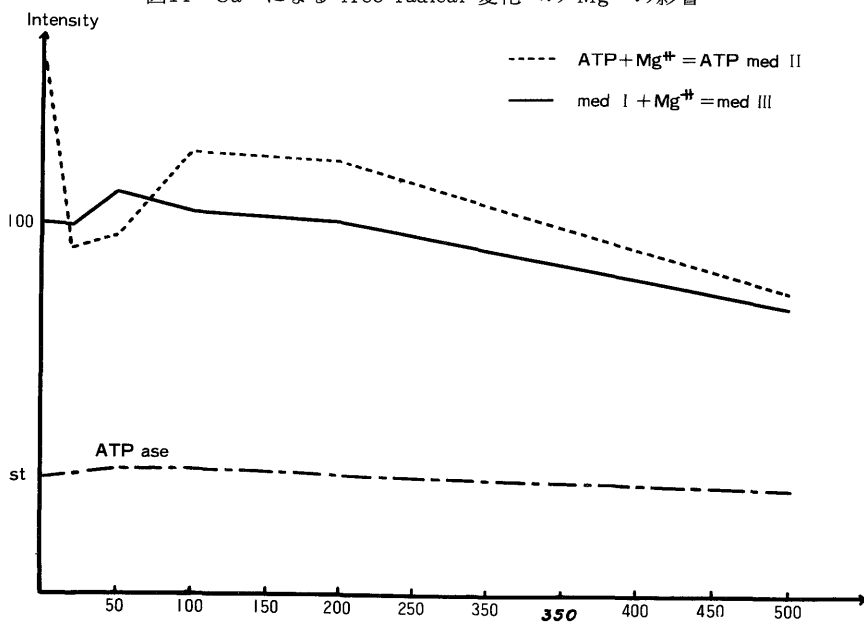
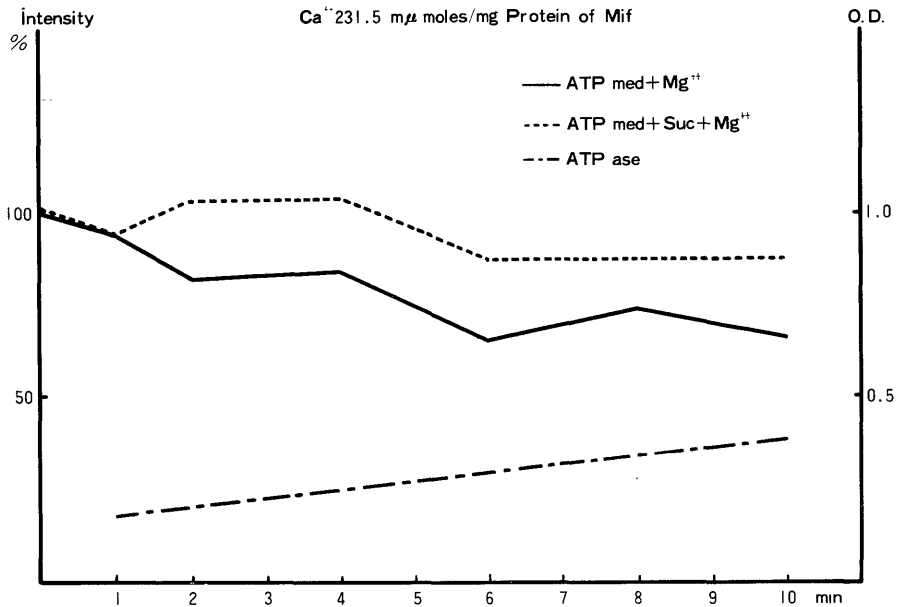


図15 Mg<sup>2+</sup> 存在下で大量 Ca<sup>2+</sup> 添加後の時間経過に伴う free radical の変化と ATP ase 活性の変化



100%, 85%で, Mg<sup>2+</sup>の存在しない medium における著明な free radical の減少は認められなかった. MgCl<sub>2</sub>を含む ATP medium I では, MgCl<sub>2</sub>がない場合には, CaCl<sub>2</sub> 400 μmoles で free radical の著明な減少がみられるが, Mg<sup>2+</sup>が存在すると図14に示すように, Ca<sup>2+</sup>濃度に対するミトコンドリアの free radical の著しい減少は認められない. この場合, Ca<sup>2+</sup>濃度に対してのATPase活性化はほとんど認められない(図14).

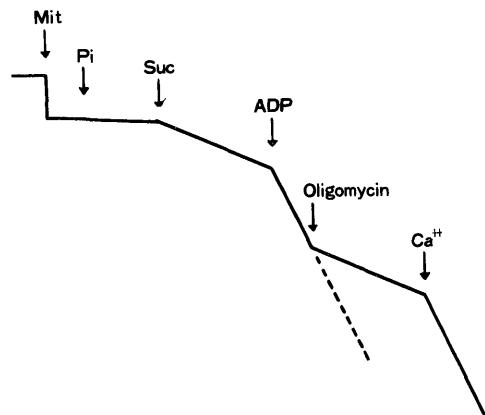
次にCa<sup>2+</sup>によるATPase活性およびそれに伴うミトコンドリア free radical の時間的変化について検討した. Mg<sup>2+</sup>によって free radical の減少は抑制され, ATP ase活性は時間経過に伴ってわずかに増加するが, 標準値 (CaCl<sub>2</sub>添加のないもの)とほとんど差が認められなかった. すなわち, Mg<sup>2+</sup>の存在下では, Ca<sup>2+</sup>によるATPase活性化は認められなかった. 更に succinate を加えた場合, free radical は一般に増加する(図15).

IV. ミトコンドリアのCa<sup>2+</sup> uptake に対する呼吸阻害剤の作用

1. Oligomycin の作用

正常ミトコンドリアに呼吸基質とPiを加えた state IV 呼吸状態にあらかじめ oligomycin を加えると, ADPを添加しても呼吸促進はおこらない. しかしCaCl<sub>2</sub>を添加すると図16に示される様に呼吸促進が

図16 ミトコンドリアの酸素消費に及ぼす oligomycin の作用



観察される. すなわち, CaCl<sub>2</sub>による呼吸促進は oligomycin によって阻害されない. ATP medium に oligomycin と CaCl<sub>2</sub>を加え, ミトコンドリア free radical の時間的変化についてみると, 4分まではやや増加し, それ以後減少する(図17).

図17の点線は同条件下で, 更に succinate を添加した場合のミトコンドリア free radical の変化を示している. すなわち, free radical の時間経過における減少は認められず, Ca<sup>2+</sup>の添加によって著明な増加が観察される.

2. malonic acid の作用

ミトコンドリアのCa<sup>2+</sup> uptake で succinate など呼吸基質による高エネルギー中間体の役割が重要であると考えられる。すなわち、ATPのみ存在する場合にはミトコンドリアの free radical は時間と共に

減少し、ATPase活性も増大するが、更に succinate を添加すると、この現象は阻止される。

電子伝達系阻害剤である malonic acid を succinate と共に添加すると、図18に示す様に、明らかに succinate によるATPase活性の抑制は開放さ

図17 大量 Ca<sup>2+</sup> 添加による free radical の変化に対する oligomycin の影響

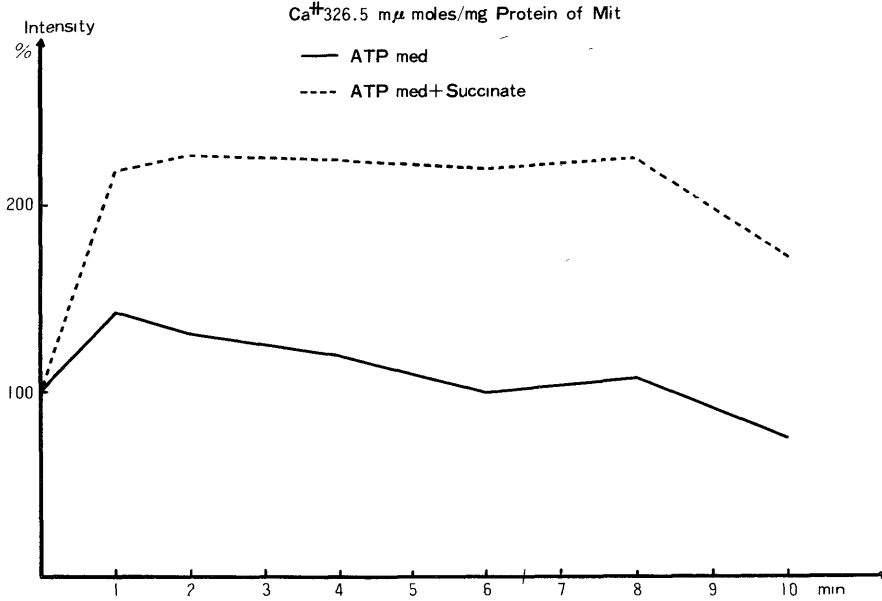
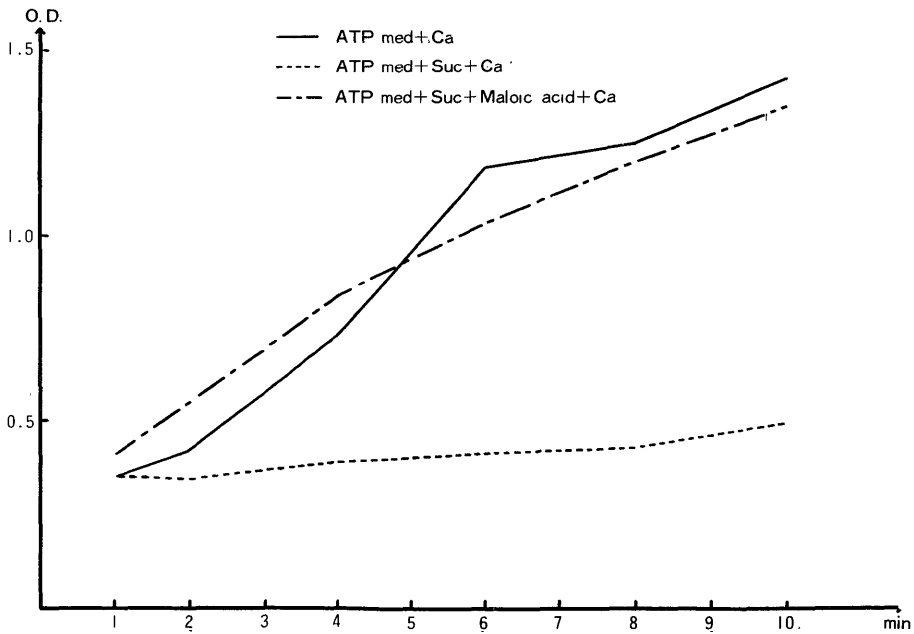


図18 大量 Ca<sup>2+</sup> 投与による ATP ase 活性に対する Maloic acid の影響



れ、ATPのみ存在する場合と同じ結果を得た。

### 考 察

一般に生体細胞あるいはその細胞内小器官はその膜を境として内外のイオン環境を一定に保持しており、このイオン分布はその機能維持に極めて重要である。従って、生体膜系はその構造の微妙な変化によって膜を介しての各種イオンの能動透過を制御し、その機能を巧みに調節している。例えば、亢奮性細胞である神経細胞の $K^+$ の流出 (efflux) 傾向は細胞膜静止電位を規定し、膜構造変化による $Na^+$ の瞬時の流入 (influx) は活動電位の発生の原因である。

近年、この様な膜のイオン能動透過における $Ca^{++}$ の役割が注目されている。すなわち、 $Ca^{++}$ は膜に作用し $Na^+$ 、 $K^+$ などの透過性を変え、又、細胞内に流入した $Ca^{++}$ は細胞内の各種代謝過程を変動させる trigger 機構に関与しており、従って、細胞の機能維持に関連して細胞内 $Ca^{++}$ 濃度が問題となる。この際、特に細胞内にあるカルシウム結合体としてのミトコンドリア及び $Ca^{++}$ による細胞内 trigger 機構の一つとしてのミトコンドリアの代謝活性の変動が重要であろう。

ミトコンドリアによる $Ca^{++}$ の取りこみは、その呼吸機能と共範して行われ、そのエネルギー源は酸化的磷酸化過程において産出される中間高エネルギー状態であると考えられている。ミトコンドリアの呼吸機能について、あるいは $Ca^{++}$ 取りこみの機作について、数多くの報告<sup>1)-17)</sup>がなされているが、現在のところ、定説はなく、想像の域を脱しない部分が多い。ミトコンドリアの free radical と呼吸機能の関係を解析した小田島らの報告<sup>22) 23)</sup>をもとに、ミトコンドリアに対する $Ca^{++}$ の作用を free radical を中心に検討した。

ミトコンドリアの free radical は、state I, state II, state III, state IV の各呼吸状態で変化し、又種々の呼吸阻害剤によっても free radical は著明に変化する。すなわち、succinate はミトコンドリアの free radical を増加させるが、 $P_i$ は特異的に減少させる。ADPからATPを形成する state III 呼吸状態では、free radical が消費され、経時的に減少するが、ADPを消費して呼吸が state IV に移行すると、free radical は増加し、定常状態にもどる。

ミトコンドリアの free radical は、この様な正常範囲内での変化以外に、aging, sonication, DNP など膜障害によっても著しい減少を示す。

呼吸機能の低下と free radical 量との間には明らかな平行関係があることから、呼吸機能の維持、特

に酸化的磷酸化維持の為にはある程度以上の free radical の存在が必要であり、同時に膜構造の維持と free radical との間には密接な関係があるものと考えられる。

ミトコンドリアに対する $Ca^{++}$ の作用は、大きく二つの現象に分けられる。その一つは能動的取りこみであり、もう一つはミトコンドリア膜に対する障害作用、すなわち、脱共役、ミトコンドリアの膨潤、ATPase の活性化などの作用である。

state I 呼吸状態のミトコンドリアに 275  $\mu$ moles の $Ca^{++}$ を添加すると、free radical は減少し、10 分后には30%となる。この場合 $Ca^{++}$  uptake は全くないと考えられるので、この free radical の減少はミトコンドリアの膨潤、あるいは脱共役など、いわゆる $Ca^{++}$ の膜構造への直接作用によるものと考えられる。

succinate を添加したミトコンドリアに $Ca^{++}$ を添加する場合、その濃度変化、時間変化による free radical の減少は抑制され、むしろ増加の傾向を示す。succinate 存在下で微量 (100  $\mu$ moles 以下) の $Ca^{++}$ を加えると呼吸は促進され、ADPによる state III 呼吸の様な動態を示すが、free radical の変化は明らかにADPによる state III 呼吸との違いを示している。すなわち小田島らによれば、state IV 呼吸から state III 呼吸へ移行する際に、free radical の消費が見られるが、 $Ca^{++}$ による呼吸促進では、その様な時間変化に伴う free radical の減少は見られない。

$Ca^{++}$ の取りこみには、エネルギー供給源として“高エネルギー中間体”が必要であり、この高エネルギー中間体は呼吸基質の酸化によってもATPの分解によっても作られる。ミトコンドリアにATPと $Ca^{++}$ を添加すると、free radical は著明に減少し、ATPase 活性もそれに伴って増加する。更に succinate を添加すると、この free radical の減少は抑制され、ATPase 活性も又抑制される。高エネルギー中間体を供給するという意義からは、succinate もATPも同じであると考えられているが、free radical の維持という点からはATPと succinate とは全くその作用を異にする。free radical の減少がミトコンドリアの膜構造の変化と関係するという事実をも考慮すると、基質 (succinate) の酸化によって生じた free radical はミトコンドリアの膜構造の維持に重要な役割を果たしていることを示すものであろう。 $Ca^{++}$ によるATPase 活性の増加が、 $Ca^{++}$  uptake に必用な高エネルギー中間体を供給するためであるか、あるいは

は、 $\text{Ca}^{++}$ による膜構造変化に伴う二次的なものであるかは、なお明らかでないが、succinate 添加によって、その活性が抑制される事実は、エネルギー供給に際し、succinate の酸化による高エネルギー中間体が ATP に優先する事を示していると同時に、succinate により生じた高エネルギー状態が膜の形態維持に重要であることを示している。

F. D. Vasington らの報告<sup>2)</sup>によれば、ATP、 $\text{Mg}^{++}$ 、succinate の存在下では、 $\text{Ca}^{++}$ の取りこみ量は Pi 濃度 4  $\mu\text{moles/mg protein of mit.}$  までは Pi 濃度に比例する。図10は ATP、succinate、 $\text{Ca}^{++}$  の存在下で Pi の濃度変化に伴う free radical の変化を示しているが、Pi の濃度によってあまり著明な変化は認められない。従って、この free radical はミトコンドリアの $\text{Ca}^{++}$ 取りこみ機構に直接関与していることは考え難い。massive  $\text{Ca}^{++}$  uptake には Pi の他に  $\text{Mg}^{++}$  の存在が必要である。この理由として一般には  $\text{Mg}^{++}$  がミトコンドリアの膜構造を保護するためだろうと推定されている。

ミトコンドリアを  $\text{Mg}^{++}$  含有 medium I、あるいは  $\text{Mg}^{++}$  含有 ATP medium に浮遊し、 $\text{Ca}^{++}$  の濃度変化、時間変化における free radical の動向を観察すると、 $\text{Mg}^{++}$  の存在しない medium で認められた free radical の減少は認められない。すなわち、

ATP、succinate、 $\text{Mg}^{++}$  存在下で、ミトコンドリアに大量の  $\text{Ca}^{++}$  を添加しても、free radical の著明な減少は認められず、ATP、succinate のみの場合より free radical 量は増加している。この事実は、 $\text{Mg}^{++}$  が明らかに  $\text{Ca}^{++}$  によるミトコンドリアの free radical の減少を抑制すること、すなわち、ミトコンドリアの膜構造を定常状態に保つ作用を持つことを示している。

ミトコンドリアの  $\text{Ca}^{++}$  による呼吸促進と ADP のそれとの違いは、 $\text{Ca}^{++}$  の場合には、エネルギー転移阻害剤である oligomycin の阻害を受けないことであり、この事実から、 $\text{Ca}^{++}$  の取りこみには oligomycin 阻害部位より呼吸鎖に近い高エネルギー中間体が使用されていると考えられている。又、ミトコンドリアの ATPase 活性と oligomycin との関係は、ATPase が可溶化された状態とミトコンドリア膜に結合している場合とで全く異なっている。

膜から離れて可溶化された ATPase の活性は oligomycin による阻害を受けないが、ミトコンドリア膜と結合していれば、老化や脱共役剤の処理で顕性化されても oligomycin によって阻害される。

ATP を含む medium にミトコンドリアを浮遊さ

せ、oligomycin と  $\text{Ca}^{++}$  を添加すると、 $\text{Ca}^{++}$  の取りこみは起らず、free radical の著明な変化も認められない。これに呼吸基質である succinate を添加すると、 $\text{Ca}^{++}$  は取りこまれ、free radical は2倍以上に増加する。この事実はミトコンドリア呼吸系における  $\text{Ca}^{++}$  添加による state IV 呼吸から state III 呼吸状態の移行に伴う free radical の増加と同じ機序によるものであろう。

又、ミトコンドリア ATPase 活性と free radical についてはなお明らかではないが、その反応過程あるいはミトコンドリアの ATPase 活性化状態 (conformation を含めて) と重要な関係があることを示している。

ミトコンドリアは呼吸によって生ずるエネルギー、ATP のエネルギーを利用して  $\text{Ca}^{++}$  を能動的に uptake する。この場合、エネルギー源として、いわゆる高エネルギー中間体の役割が重要であると考えられているが、更に  $\text{Ca}^{++}$  の massive uptake における  $\text{Mg}^{++}$  及び ATPase 活性化状態におけるミトコンドリアの free radical の変化を考慮すると、ミトコンドリアにおける膜の状態の恒常性も又重要な役割を果たしており、特に呼吸基質によるエネルギー産生と膜の動態について、なお多くの検討すべき問題があると考えられる。

## 結 論

ミトコンドリアに  $\text{Ca}^{++}$  を添加すると、ATPase 活性の増加、脱共役、膨潤などの変化がみられる。一方、ミトコンドリアは呼吸によるエネルギーを利用して  $\text{Ca}^{++}$  の能動透過 (limited uptake)、更に ATP、 $\text{Mg}^{++}$ 、Pi の存在下で  $\text{Ca}^{++}$  の大量取りこみを行う (massive uptake)。電子スピン共鳴吸収による free radical を指標として、 $\text{Ca}^{++}$  能動透過におけるミトコンドリアのエネルギー状態を中心に検討した。

1. ミトコンドリアの state I 呼吸状態に  $\text{Ca}^{++}$  を添加すると、ATPase 活性の増加、膨潤に伴って free radical の減少が認められた。

2. ミトコンドリアの state IV 呼吸状態 (呼吸基質として succinate) に  $\text{Ca}^{++}$  (100  $\mu\text{M Ca}^{++}/\text{mg protein of mit.}$  以下) を添加すると、呼吸はいわゆる ADP による state III 呼吸と類似の変化を示すが、free radical の減少は認められなかった。又、 $\text{Ca}^{++}$  大量の添加では (100  $\mu\text{M Ca}^{++}/\text{mg protein of mit.}$  以下)、呼吸は著明に増大し、uncoupling state を示したが、free radical の減少は見られず、むしろ増加の傾向を示した。

3. ATPの存在下でミトコンドリアにCa<sup>++</sup>を作用させると, free radical は著明に減少し, それと平行してATPase活性の増加が見られた.

4. この状態に呼吸基質である succinate を添加すると, free radical の減少はみられず, むしろ増加の傾向を示し, ATPase活性の増加もみとめられなかった.

5. massive Ca<sup>++</sup> uptake におけるPi濃度変化の影響と free radical の変化との間に相関関係はみとめられなかった.

6. Mg<sup>++</sup>はCa<sup>++</sup>によるミトコンドリアの free radical の減少及びATPase活性の増加を抑制した.

7. ミトコンドリアのエネルギー転移阻害剤である oligomycin はCa<sup>++</sup>による free radical の減少を抑制した.

稿を終るに臨み, 御懇篤なる御指導, 御校閲を賜った恩師石川大刀雄教授ならびに小田島肅夫助教授に衷心より謝意を表するとともに, 実験装置の使用に際して, 特別に御配慮いただいた日本電子長谷川研究員, 実験の御支援をいただいた教室員西岡幸子さんに心から感謝致します.

## 文 献

- 1) Siekevitz, P. & Potter, V. R. : J. Biol. Chem., 201, 1 (1953).
- 2) Vasington, F. D. & Murphy, J. V. : J. Biol. Chem., 237, 2670 (1962).
- 3) Vasington, F. D. & Murphy, J. V. : Fed. Proc., 20, 146 (1961).
- 4) Vasington, F. D. : J. Biol. Chem., 238, 1841 (1963).
- 5) Vasington, F. D. & Greenwalt, J. W. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 15, 133 (1964).
- 6) Carafoli, E., Rossi, C. S. & Lehninger, A. L. : J. Biol. Chem. 239, 3055 (1964).
- 7) Carafoli, E. & Lehninger, A. L. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 16, 66 (1964).
- 8) Carafoli, E., Rossi, C. S. & Lehninger, A. L. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 19, 609 (1965).
- 9) Carafoli, E., Rossi, C. S. & Lehninger, A. L. : J. Biol. Chem., 240, 2254 (1965).
- 10) Rossi, C. S. & Lehninger, A. L. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 11, 441 (1963).
- 11) Rossi, C. S. & Lehninger, A. L. : Biochem. Z., 338, 698 (1963).
- 12) Rossi, C. S. & Lehninger, A. L. : J. Biol. Chem., 239, 3971 (1964).
- 13) Lehninger, A. L. : Fed. Proc., 19, 952 (1960).
- 14) Lehninger, A. L. : Phys. Rev., 42, 467 (1962).
- 15) Lehninger, A. L., Rossi, C. S. & Greenwalt, J. W. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 10, 444 (1963).
- 16) Lehninger, A. L. : The mitochondrion, New York Benjamin, 1964.
- 17) Chance, B. : J. Biol. Chem., 240, 2729 (1965).
- 18) Slater, E. C. : Nature, 172, 975 (1953).
- 19) Chance, B. & Williams, G. R. : Nature, 176, 250 (1955).
- 20) Boyer, P. D. : J. Biol. Chem., 241, 5384 (1966).
- 21) Mitchell, P. : Nature, 191, 144 (1961).
- 22) 小田島肅夫・阿部博子・米沢恵子・宮本悦子・石川大刀雄 : Symposia. cell. Biol., 22, 217 (1971).
- 23) 小田島肅夫・阿部博子・北川恵子・石川大刀雄 : 第61回日本病理学会総会. 東京. (1972)
- 24) Utsumi, K. : Acta. Med. Okayama, 17, 259 (1963).
- 25) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. : J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 26) Chance, B. & Williams, G. R. : J. Biol. Chem., 217, 383 (1955).
- 27) Hagihira, B. : Biochim. Biophys. Acta., 46, 134 (1961).
- 28) Chance, B. & Williams, G. R. : Adv. Enzymology, 17, 65 (1965).
- 29) Odashima, S., Abe, H. & Ishikawa, T. : in preparation.
- 30) Bonting, S. L., Simon, K. A. & Hawkins, N. M. : Arch. Biochem. Biophys., 95, 416 (1961).

## A b s t r a c t

The free radical of mitochondria plays an important role in the process of electron transport and oxidative phosphorylation system. The change of respiratory function or the conformational change of the mitochondrial membrane is shown to cause a decrease or increase of the free radical of mitochondria. Effect of  $\text{Ca}^{+}$  ion upon the membrane or the respiratory function of mitochondria was studied by means of electron spin resonance (ESR).

1. Addition of  $\text{Ca}^{+}$  ion to mitochondria showed a decrease of the free radical accompanied with an increase of ATPase activity and the swelling.

2. In the presence of succinate, the decrease of the free radical by the addition of  $\text{Ca}^{+}$  ion was not observed.

3. The free radical of mitochondria was remarkably decreased by  $\text{Ca}^{+}$  ion in the medium containing ATP, however the ATPase activity was increased simultaneously.

4. In the presence of ATP and succinate, the decrease of the free radical by  $\text{Ca}^{+}$  ion was not observed, moreover the ATPase activity was not increased.

---