

ミトコンドリアの電子スピン共鳴吸収による研究

—とくに呼吸状態を中心として—

金沢大学医学第二病理学教室(主任: 石川大刀雄教授)

種 村 明 夫

(昭和45年10月17日受付)

一般に好氣的細胞では、必要なエネルギーの大部分をミトコンドリアで行なわれる電子伝達系に共役した酸化的磷酸化系によって獲得している。即ち、TCA回路由来の各種の呼吸基質はそれぞれの脱水素酵素の作用で脱水素され、この2Hが呼吸鎖中の電子伝達成分に移され、それ以後はH(水素イオン)またはe(電子)が呼吸鎖を移動し各種の電達成分が酸化還元をくり返して最後に酸素(O₂)に渡されてこれを水に還元する。この酸化還元反応の際に生ずる遊離のエネルギーが化学的エネルギーに合成される(磷酸化)。この磷酸化反応は無機リン(Pi)とアデノシン2磷酸(ADP)から高エネルギー化合物アデノシン3磷酸(ATP)を合成する反応である。

このような電子伝達系と酸化的磷酸化系の二つの複合酵素系はミトコンドリア膜を基盤として構造性をもって組織化されていると考えられているが、その複雑性のために、きわめて多くの研究が行なわれているにもかかわらず、その細部については不明の点が多い。

ミトコンドリアの電子伝達経路の概略は

基質→フラビン酵素→チトクローム→酸素

であるが、2個の水素あるいは電子が酸素に伝達される過程で一電子系のチトクローム系を径由する。二電子系から一電子系に移る過程にセミキノンを生じ易いフラビン酵素が位置し、その反応を円滑にしていると考えられラジカルの測定¹⁾²⁾が行なわれているがその反応過程はなお不明である。

また、電子伝達系と酸化的磷酸化系の共役機構についても明確に把握されておらず、全く立場を異にしたflow sheet説、chemi-osmotic説で代表される二つの機構が提出されている。

flow sheet説はLipman³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾によって提示されたもので、共役因子、X、Yなどの仮定物質を推定している。一方chemi-osmotic説の機構(Michell

7))は電子伝達のエネルギーが高エネルギー化合物を作り、これがATP合成をもたらすという連続的の化学反応を否定し、電子伝達によってミトコンドリア内の異なった部位にH⁺およびOH⁻が偏存して蓄積し、この化学ポテンシャルがATP合成の原動力になる。したがって、この場合には高エネルギー中間体の代りに一種の高エネルギー状態を想定している。

一方Wang⁸⁾は、phospholipid-protein膜におけるradical機構の可能性を指適し、小田島ら⁹⁾はミトコンドリアの電子状態の研究から、フラビン酵素におけるセミキノンradicalの生成を重要視し、共役過程でのfree radicalの関与を観察し、さらに、これら電子伝達系、酸化的磷酸化系の複合酵素が膜を基盤として、一定の構造を保持している事実から、膜に存在する蛋白の活性基などが共役過程に重要な役割を演じているであろうと推定している。

この一連の研究の一端として、ミトコンドリアの電子伝達、酸化的磷酸化過程におけるfree radicalの動態を中心にさらに、各種阻害剤による共役過程とfree radicalの関係について吟味し、free radicalのミトコンドリア機能における意義について検討した。

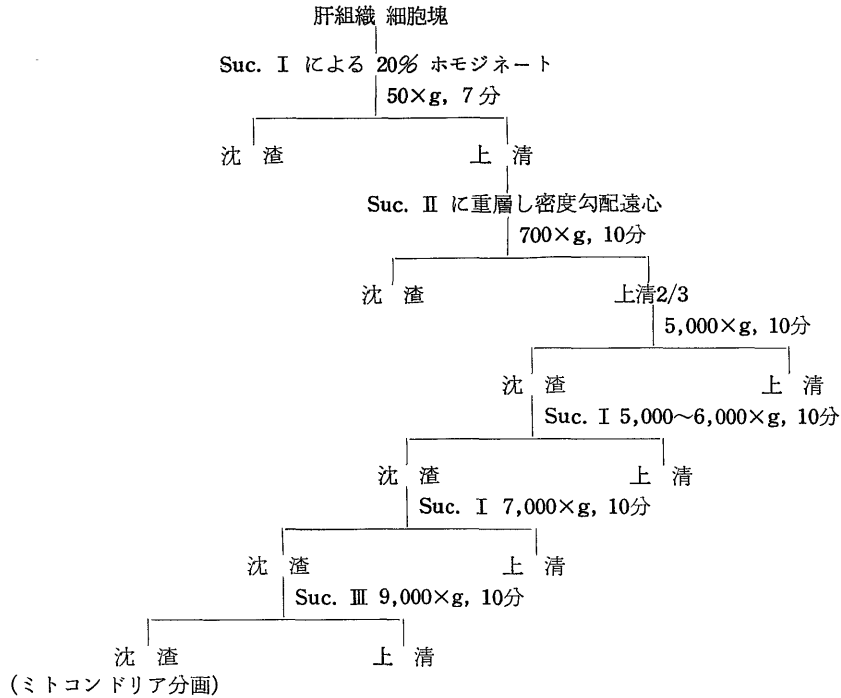
実験材料および実験方法

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¹⁰⁾の方法に従った(表1)。即ち、成熟ラットを無麻酔下で暫首、瀉血し、すばやく肝臓を剔出した。氷冷状態で(以下の操作はすべて0°~4°Cで、できるかぎり迅速に行なった)肝臓を1~2mm³の細片とし、Sucrose I液(0.25M sucrose, 0.1mM EDTA, 0.01~0.02M Tris-HCl buffer, pH 7.2)に浮遊させ、血液成分を取り除くために溶液を数度変えて洗滌した。ついで、肝組織に5倍量のsucrose I液を加え、Potter-Elvehjem型ガラスホ

ESR Study on Rat Liver Mitochondria. Teruo Tanemura, Department of Pathology (II) (Director: Prof. T. Ishikawa) School of Medicine, Kanazawa University.

表1. ミトコンドリア分画法



モジナイザー、テフロンモジナイザーを用いて20%ホモジネートとした。このホモジネートは50g, 7分間遠心し、その上清をSucrose II液(0.34M sucrose, 0.1mM EDTA, 0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.2)に重層し、700g, 10分間遠心して粗大夾雑物を除いた。この上清を5000g, 10分遠心し、比較的顆粒の大きいミトコンドリア分画を得た。このミトコンドリア分画をSucrose I液に再度浮游し、6000g 10分、さらに7000g, 10分遠心洗滌した。最後に得られたミトコンドリア分画をSucrose III液(0.25M sucrose, 0.01M Tris-HCl buffer, pH 7.2)に浮游し、9000g, 10分遠心洗滌した。洗滌したミトコンドリア分画を200mg wet weight/mlになるようにSucrose III液に浮游させ実験に用いた。なお、この浮游液はミトコンドリア蛋白量にして20mg/mlに相当する(Lowry法¹¹⁾)。

このように調整されたミトコンドリアはできるだけ敏速に実験に供したが、さらに、ESR測定前後にオキシメーターによって呼吸能(電子伝達能ならびに酸化的磷酸化能)に異常のないことを確かめた。また、すべての同一系統の実験はできるかぎり同一ミトコンドリアについて行なうようにした。

II. ミトコンドリアの機能の測定

ミトコンドリアの酸素消費量を測定するため、反応

液中に溶存する酸素張力の変化を記録するChance¹²⁾、荻原¹³⁾等考案による半閉鎖式回転白金電極法を用いた。反応容器は石英ガラス製で容量は2.0mlである。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ようにした。陰極には先端が球状(球の直径は約1mm)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。

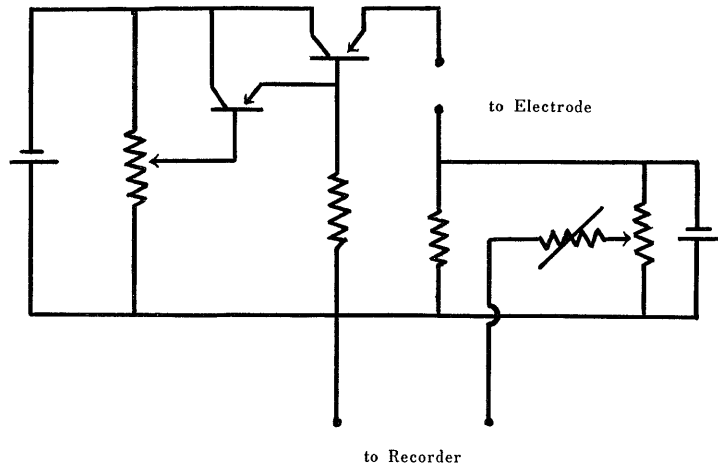
図1は測定装置の概略図で、陽-陰極電圧は0.7Vとし、反応液の温度は25°Cとした。反応液はstandard mediumとして0.05M sucrose, 0.02M KCl, 0.1mM EDTA, 1.0mM MgCl₂, Tris-HCl buffer, pH 7.2を使用した。

この装置は電氣的に安定で、0.6V~0.8Vまでの電圧変化に対して陰極電流はほぼ一定で、この間の電圧による電流はmediumに溶存する酸素張力に比例すると考えてよい。電流の記録には東亜電波(株)製Poly recorder Model EPR-3T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して、ほとんど無視してもよいことを確かめた。

III. ESR測定装置ならびに測定条件

free radicalの測定は日本電子株式会社製電子ピン共鳴装置, JES-ME-3Xを用いた。本装置の主な仕様は次の通りである。

図1. 酸素電極法の Block diagram



1. 検出感度: 5×10^{13} spin/gauss (100KHz変調)
2. 分解能: 1×10^{-5} 以上
3. 信号周波数: 9,400M Hz
4. 磁界変調: 0.02~20 gauss
5. 磁界掃引: $\pm 0.25 \sim \pm 5000$ gauss
6. 磁場可変範囲: ~ 6000 gauss
7. 磁界設定精度: Coarse 10 gausse, fine 0.1 gauss
8. 磁界均一度: 1×10^{-5}
9. 空洞共振器: TE₀₁₁

測定条件は小田島ら⁹⁾の方法に従った。即ち、

1. マイクロ波

クライストロンの周波数は約 9400Mc/秒 (波長3.0 cm) でX帯を用いた。但し、温度可変装置を用いた場合は約 9150Mc/秒である。

2. 測定磁場掃引範囲

free radical 測定のために、3270 gauss を中心に ± 100 gauss の磁場掃引を行なった。測定磁場を正確に規定するために、磁場マーカーとして MnO を用いた。

その他、modulation, power, 掃引時間等は小田島ら¹⁴⁾の方法を参考にした。なお、特殊な測定を行なったものについてはその都度条件を記入するようにした。

3. 資料管

石英硬質ガラス製の内径 0.45cm の資料管を用い、あらかじめ異常信号のないことを確かめた。

4. 測定温度

誘電損失の大きい水溶液系の測定では空洞の Q が低下し、検出感度が著明に低下する。

そのため水溶液系の測定では温度が問題になる。

この実験では附属の温度可変装置を用い、主に -80°C で測定した。

なお、小田島ら¹⁴⁾によると、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)、反応一定時間後に凍結することにより、そのときの spin 量の同定が可能となる利得がある。また、ミトコンドリアの free radical の測定では $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ と温度の低下と平行して、spin 量は増加するが、 -80°C 以下では signal の波形や spin 量に著しい変化のないことを確認している。

5. 波形の解析

電子スピン共鳴装置で得られるのは微分波形であるが、これを積分波形に変換し、その面積を測定した。一方あらかじめ spin 数の決まった質量と対比して相対的 spin 量を算出した。

また、資料管内に封入されたミトコンドリア濃度と実際に測定された容積からミトコンドリア mg 蛋白量あたりの spin 数を算出した。

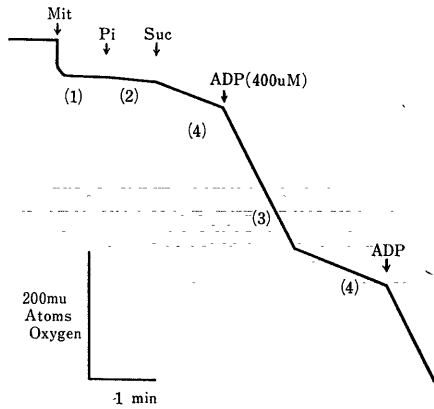
実験結果

- I. 正常ラット肝ミトコンドリアの酸素消費量, ADP/O比, 呼吸調節率 (RCI)

図2は正常ラット肝より得られたミトコンドリアの酸素電極法による呼吸機能を測定したものである。medium 1 ml 中に 490 m μ atoms の酸素が溶存しているものとして記録を行なった。

陽-陰極間に 0.7V の電圧を負荷し、電流が安定するのをまって氷冷下で保存したミトコンドリア浮游液を medium 1 ml あたり 100 μ l (2.0 mg 蛋白量のミトコンドリアに相当する) を加えると、急激な温度

図2. 正常ラット肝ミトコンドリアの呼吸機能



変化やミトコンドリア浮游液の無酸素状態のための酸素消費につづいて、内部呼吸による酸素消費(Chanceら¹⁵⁾の state I呼吸)がみられる(2図の(1)~(4)は Chance らの state I~IV 呼吸に相当する). 3 mM Pi を添加すると 1~2 mμ atoms oxygen/mg protein/min. の酸素消費がみられる (state II呼吸).

これに呼吸基質として 3 mM succinate を加えると酸素消費は促進され (20 mμ atoms oxygen/mg. protein/min. Chance の state IV呼吸), さらに, ADP (400μm) を添加すると呼吸は state III 状態になり, 酸素消費量は著明に増加もる (100 mμ Atoms 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 比が計算される (ADP/O=1.85).

また, 呼吸調節率 (RCI) は state III/state IV で示されるが (この例では RCI=5.0) ESR の測定に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.

なお, 基質, Pi, ADP の添加順序を変えても呼吸機能に異常はなく, また, ミトコンドリアの濃度に比例して単位時間あたりの酸素の消費量は増加するが, ADP/O 比, 呼吸調節率は程んど変化しない.

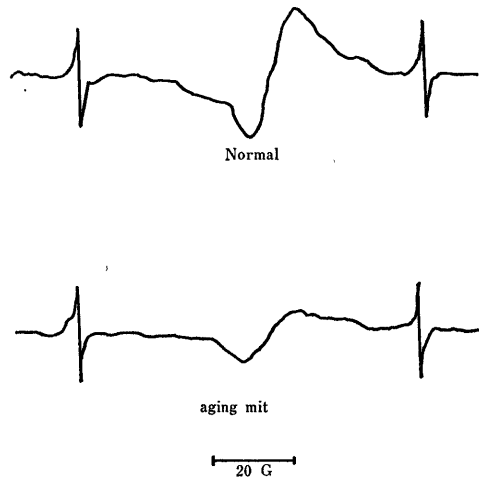
II. free Radical の測定

1. 正常ラット肝ミトコンドリアの free radical

測定 medium などは呼吸機能測定の場合と同じ条件で行なった. ミトコンドリア濃度は Medium 0.8 ml に対して 20 mg protein/ml のミトコンドリア浮游液を 200 μl 添加し, 測定時の最終濃度が 2 mg protein Mit/ml となるようにした (Chance の state I呼吸に相当する).

図3はその実測例で, ほぼ 3300 gauss を中心に

図3. ミトコンドリアの電子スピン共鳴吸収



40~60 gauss の拡がりをもつ微分波形が観察される. この g 値は 2.0055, ΔHmsl は 9.0 gauss である. この状態での測定値の平均は表2に示されるように, それぞれ g=2.0056, ΔHmsl=10.1 gauss で誠に相対的な spin 数を概算すると 6.0±0.15×10¹³spin /mg · protein · Mit である.

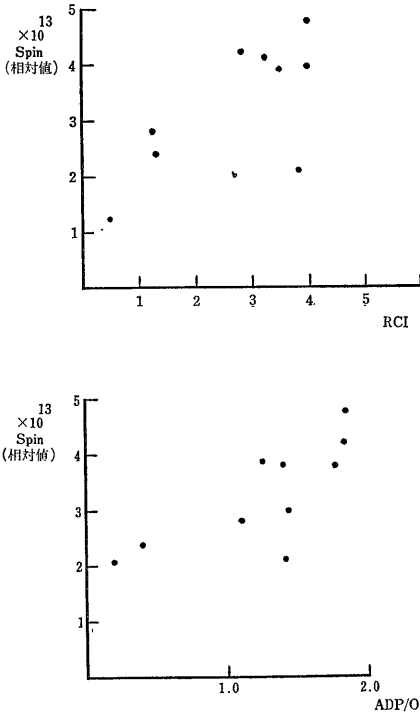
室温放置によって, 呼吸機能 (電子伝達能, 酸化的磷酸化能) が失なわれたいわゆる aging ミトコンドリアでは g 値=2.0049, ΔHmsl は 10gauss で spin 量はほぼ 1/3 に低下する. また, 図4に示すようにミトコンドリアの state I呼吸における free radical

表2. 正常ラットミトコンドリアの Spin (相対値) g-Values, ΔHmsl

Spin の相対値	g-Values	ΔHmsl (gauss)
4.75	2.0046	10.0
5.38	2.0052	12.0
3.311	2.0061	9.0
3.88	2.0061	9.0
4.14	2.0056	10.0
4.18	2.0046	10.0
3.825	2.0055	13.0
2.025	2.0058	10.0
1.995	2.0064	8.0
4.33	2.0061	10.0
(4.14)	(2.0056)	(10.1)

() 内は平均値表

図4. 呼吸機能と free radical



は ADP/O 比, 呼吸調節率の異常とはっきりした相関を示さないことが知られている¹⁶⁾. 従って, ミトコンドリアには呼吸機能に関与しない free radical の存在が考えられるので, 以後の呼吸状態における free radical の減少あるいは増加は相対値で記載するようにした.

2. 呼吸状態と free radical

state I 呼吸のミトコンドリア浮游液に 3 mM Pi を加えると酸素消費が僅かに増加して state II 呼吸に移行する. この状態では g 値, ΔHmsl, 微分波形の型には変化はないが, spin 数は著明に減少し, state II /state I の比は 0.39 である.

つぎに, 基質として 3mM の succinate を添加すると呼吸は進み state IV 呼吸となる. free radical は急激に増大し, state I 呼吸に対する比は 1.6 で, g 値は 2.0056, ΔHmsl は 12.56 gauss で僅かに増加する (表 3).

さらに ADP を添加した state III 呼吸では, 図 4 にみられるように酸素消費は急激に増加し, ADP を消費すると, 再び state IV 呼吸に移行する. ADP 添

3. State IV 呼吸による g-Values, ΔHmsl および Spin 相対値

g-Values	ΔHmsl (gauss)	StateIV/State I
2.0058	10.0	1.66
2.0052	14.0	1.75
2.0058	14.0	1.50
2.0055	13.0	1.60
2,0052	13.5	2.264
2.0055	12.0	1.134
2.0058	14.0	1.12
2.0055	12.0	1.60
2.0058	11.0	1.76
2.0058	13.0	1.60
(2.0055)	(12.6)	(1.60)

加量によっても異なるが, この実験系では ADP 消費までの時間は約 4 分である. そこで, 図 5 に示すように ADP 添加後, 1 分, 2 分, 3 分 (図 5 の A, B, C, に相当する) でそれぞれ反応液を液体窒素で凍結し, その時の free radical を測定した. 表 4 に示すように spin 量は state IV 状態に比して, 反応 1 分では 10%, 2 分では 30%, 3 分では約 50% まで減少する. また, 反応の初期では g 値, ΔHmsl に異常はないが, 反応 3 分では g 値は 2.0061, ΔHmsl は 20

図5. ミトコンドリアの state III 呼吸

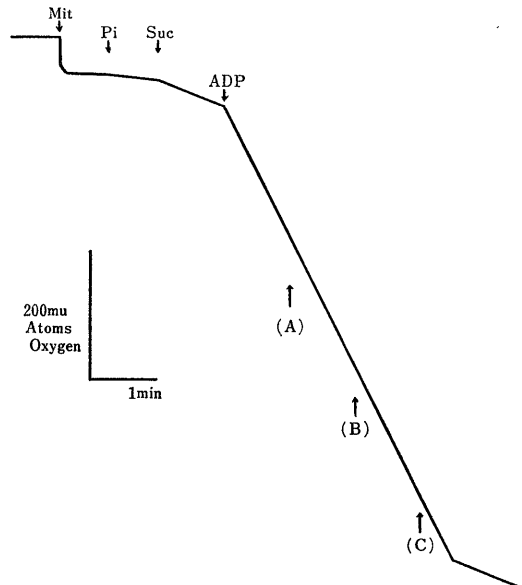


表 4. State III 呼吸による時間経過と g-Values, ΔHmsl, 相対 Spin. 量の変化

Reaction time	g-Values	Δ Hmsl (gauss)	相対 Spin 量
1.0分	2.0055	12.0	0.947
2.0分	2.0058	12.0	0.736
3.0分	2.0061	20.0	0.562

gauss となる。

ADP 消費後の state IV 呼吸では spin 量の増加はなく、ADP 添加以前の約 1/2, 即ち, state III 呼吸の最終状態と同じ呼吸機能と必ずしも一致しないことを示している。

III. ミトコンドリアの呼吸系阻害剤と free radical

次に各種の呼吸系阻害剤を用いて、ミトコンドリアの state I~IV 呼吸状態における阻害効果を中心に free radical の動態を検討した。

図 6, 7, 8, はミトコンドリア呼吸機能に対する各阻害剤の効果を図化したものである¹⁷⁾。

電子伝達系阻害剤としてはアンチマイシン A (10⁻⁸ M), Na₂S (10⁻³M), マロン酸 (10⁻³M), 脱共役剤としては DNP (10⁻⁵M), エネルギー転移阻害剤としては塩化トリブチルチン (TBTC) (10⁻⁶M) を用いた。これら阻害剤の阻害濃度は測定ミトコンドリアについてあらかじめ酸素電極法によって確かめたものである。

1. 電子伝達系阻害剤の作用

図 6 にみられるように電子伝達阻害剤は磷酸化との共役とは無関係に、基質から酸素への 2 H あるいは電子の伝達を阻害するものである。

ミトコンドリアの state I 呼吸にマンチマイシン A を作用させると spin 量は 1/2 以下に低下し、g 値には異常はないが、ΔHmsl は 16 gauss と増加する。

state IV 呼吸では g 値は 2.0058, ΔHmsl 14.8 gauss で、spin 量は約 1/2 以下となる。しかし、state III 呼吸にアンチマイシン A を作用させた場合は free radical に著変はなく、spin 量は僅かに増加する(表 5, 6, 7)。

サイトクロームオキシダーゼに作用する Na₂S はアンチマイシン A とほぼ同じ傾向を示すが、SDH 拮抗剤であるマロン酸は呼吸阻害とは無関係に spin 量の変化はみられない。

2. 脱共役剤の作用

正常ミトコンドリアに呼吸基質を添加すると、state IV 呼吸になるが、さらに ADP を加えて磷酸化を行なわせると、state III 呼吸に移行する。DNP はこの

磷酸化系と電子伝達系を脱共役させるため、電子伝達は磷酸化と無関係に進み、ATP の合成は停止する。即ち、図 7 に示されるように、state IV 呼吸に DNP を添加すると、state III 呼吸と同じ程度に呼吸は増加する。

state I 呼吸に DNP を作用させても呼吸の増大はみられないが、free radical は著しく変化し、spin 量は約 1/2, g 値は 2.0061, ΔHmsl は 12 gauss と増加する。state IV 呼吸に対する作用は表 7 に示すように g 値は 2.006, ΔHmsl 11.8 gauss で spin 量は約 60% 低下する。

図 6. 電子伝達系阻害剤によるミトコンドリア呼吸機能の阻害

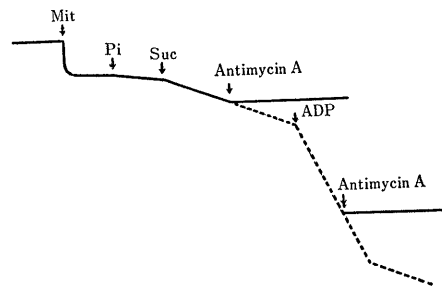


図 7. 脱共役剤によるミトコンドリア呼吸機能の阻害

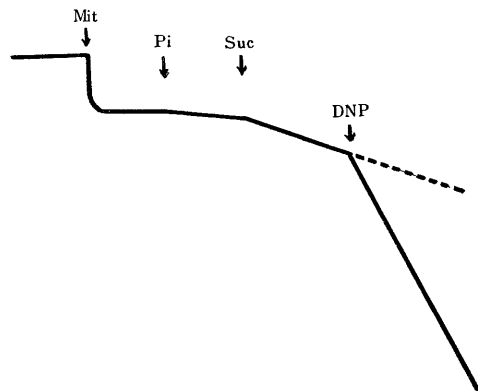


表 5. State I 呼吸に対するミトコンドリア呼吸系阻害剤の影響

	g-Values	Δ Hmsl (gauss)	相対 Spin 量
Normal	2.0056	10.1	1.0
Antimycin A	2.0056	16.0	0.331
DNP	2.0061	12.0	0.55
TBTC	2.0056	12.56	1.0

表 6. State III 呼吸に対するミトコンドリア呼吸系阻害剤の影響

	g-Values	Δ Hmsl	
Normal	2.0058	12.0	1.0
Antimycin A	2.0058	12.0	Spin 低下阻止
DNP	—	—	—
TBTC	2.0056	12.8	Spin 低下阻止

表 7. State IV 呼吸に対するミトコンドリア呼吸系阻害剤の影響

	g-Values	Δ Hmsl	
Normal	2.0055	12.6	1.0
Antimycin A	2.0058	14.8	0.435
DNP	2.0060	11.83	0.34
TBTC	2.0058	12.0	1.024

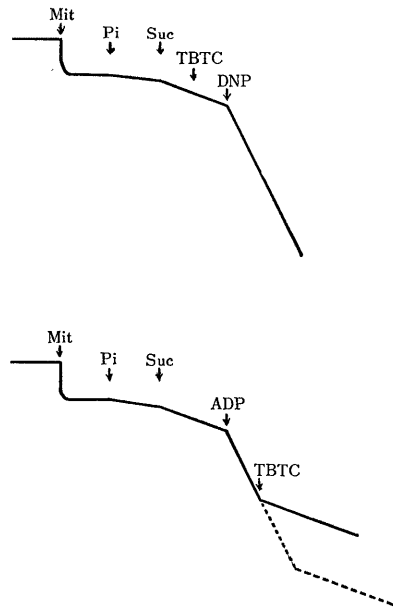
3. エネルギー転移阻害剤の作用

TBTC は磷酸化と共役した呼吸のみを阻害し、電子伝達系は阻害しない。図 8 にみられるように、state IV 呼吸に TBTC を加えても呼吸の促進はなく、ADP 添加によっても state III への移行はみられないが、DNP によって脱共役される。また、ADP を添加した state III 呼吸に TBTC を作用させると、直ちに呼吸は抑制され state IV 呼吸となる。すなわち、TBTC は DNP と異なり磷酸化反応を直接阻害するためである。

TBTC は state I, IV 呼吸に対しては全く作用せず free radical も有意の差はみられない。また、state IV 状態に TBTC を添加し、さらに ADP を作用させても state III 呼吸への移行はないが、free radical の波形、g 値、 Δ Hmsl、spin 量などの変化はみとめられない。

正常ミトコンドリアの state III 呼吸では、表 4 に示すように ADP 添加の時間と共に spin 量は低下し、g 値、 Δ Hmsl は増加する。同じように、ADP を添加し、1 分、2 分、3 分後にそれぞれ TBTC を

図 8. エネルギー転移阻害剤によるミトコンドリア呼吸機能の阻害



添加すると、それ以後時間と平行しての free radical の変化はみとめられない。

表 5, 6, 7 は呼吸系阻害剤の作用を要約したものである。

考 察

正常ラット肝臓から分離したミトコンドリアを -80°C で凍結し、電子スピン共鳴装置で測定すると、磁場 3270 gauss 附近に軽度の異方性を示す特有な signal が観測される。この条件での測定では超微構造はみとめられず、 $g=2.0056$, ΔH_{msl} は 10.0 gauss である。理想的な free radical ($g=2.0023$) の中心磁場より幾分低磁場であるが、 ΔH_{msl} 値やミトコンドリアの複雑性 (TCA 回路系酵素, 電子伝達酵素, 酸化的磷酸化系酵素が特殊な構造性をもって組織化されている) から考えて、この吸収曲線 (signal) は free radical と同定してもよいと考えられる。

この吸収曲線はこれまでの Bienert ら¹⁸⁾ によって測定されたサブミトコンドリア粒子の磁場 3300 gauss を中心とした Cu^{2+} による (g 値 = 2.0046) 吸収曲線や Fe^{2+} による g 値 = 1.94 の信号とは ΔH_{msl} 値などから明らかに異なるものである。この測定系では、 Cu^{2+} , Fe^{2+} の吸収曲線は観測されていない。これは測定条件、とくに測定におけるミトコンドリアを対象とする私共の実験系では Cu^{2+} , Fe^{2+} 等の重金層の直接の関考をとくに考慮する必要はない。

測定された吸収波形から free radical の絶対 spin 量を算出することは困難であるが、試みに、あらかじめ spin 量の計測された free radical の標準質量と対比して、ミトコンドリア mg protein 当りの spin 量を概算すると、 $6.0 \pm 0.2 \times 10^{13}$ spin でかなり多くの free radical が存在していることを示している。

しかし、表 I に示すように、同じように分画されたミトコンドリアでも Chance のいわゆる state I 呼吸では spin 量の相対値、 g 値、 ΔH_{msl} はかなりのバラつきがみられる。教室同人阿部¹⁹⁾ は free radical の相対 spin 量とミトコンドリア呼吸機能 (ADP/O 比, RCI) の関係について検討し、両者の間にはっきりした比例関係のないことを指摘している。

また、ミトコンドリアの aging を検討した三井¹⁶⁾ の実験によると、室温放置の時間経過と共に呼吸機能は 1. 電子伝達系と酸化的磷酸化系の脱共役。2. state IV 呼吸の促進。3. 呼吸機能停止. の順で aging は進む。spin 量は室温放置時間と共に減少するが、基質や呼吸系阻害剤添加に対して、増加あるいは減少がみられる。しかし、呼吸機能停止の状態では spin

量は正常に比して約 1/3 以下に減少し、基質、呼吸系阻害剤の添加による増加あるいは減少はみられない。

これらの事実は、電子スピン共鳴装置で観測されたミトコンドリアの吸収曲線には、呼吸機能に直接関与しない free radical がかなり含まれていることを示すもので、state I 呼吸状態による相対 spin 量のバラつきはこの原因によるものと推定される。

state I 呼吸状態のミトコンドリアに Pi, 呼吸基質として succinate を添加すると、呼吸は促進し state IV 呼吸に移行する。この酸素消費の増加に平行して free radical は約 1.6 倍、 ΔH_{msl} も 13.0 gauss と増加するが、 g 値は 2.0056 で程んど変化しない。このことは、free radical が呼吸系の電子伝達反応に関与していることを示すものである。この free radical が電子伝達系のいずれの酸化、還元過程に関与しているかについては多くの問題を含んでいる。Hollocher ら²⁰⁾ はコハク酸脱水素酵素 (SDH) によるコハク酸の脱水素反応は free radical を伴うことをみとめ、Ehrenberg²¹⁾ はフラビン酵素の還元過程で生ずるセミキノンの free radical を確認している。また、単離されたチトクローム C の酸化型や還元型での free radical は確認されていない⁹⁾。このように単離された酵素系の実験をそのままミトコンドリアの複合酵素系反応に適用できないが、呼吸系に由来する free radical が、SDH の脱水素の過程やフラビン酵素の反応過程で生ずるセミキノンに由来することは吸収波形の g 値、 ΔH_{msl} 値からほぼ確実であるとしても、電子伝達系の後半に存在するチトクローム系の酸化還元過程に関しては、なお検討を要する。

ADP を添加した state III 呼吸状態では、時間と共に free radical は急激に減少する。反応時間は液体窒素温度による凍結までの時間によって多少のずれはあるが、ADP 添加後 1 分以内の反応では $g=2.0058$, $\Delta H_{msl}=12.0$ gauss, 相対 spin 量は state IV 呼吸に比して 10% 程度の減少である。反応時間 2 分では、 g 値、 ΔH_{msl} に変化はなく相対 spin 量は 30% の減少を、反応時間 3 分では、 g 値は 2.0048, ΔH_{msl} は 20 gauss で、相対 spin 量は更に減少して約 50% となる。

ミトコンドリアの機能測定では ADP 添加によって、酸素消費は時間に対してほぼ直線的に増加するが、これとほぼ平行して free radical が減少する。このことは電子伝達系に共役しての磷酸化過程に radical 反応が関与していることを示すものである。しかし、時間と共に free radical が減少する現象は、これまでに提示された共役因子 (X, Y) による磷酸

化機構^{3)・6)}や Wang⁸⁾の radical を含む共役因子のスキームでは説明困難である。基本的にはエネルギーの一時的な蓄積を考慮した Michel⁷⁾の高エネルギー状態における ATP 合成の機構や膜をエネルギー蓄積の場と考える小田島⁹⁾らの結果に関連して追求されるべきものであろう。

次に各種の呼吸系阻害剤について検討する。

電子伝達系阻害剤であるアンチマイシン A を state I 呼吸状態のミトコンドリアに作用させると, free radical は約 1/2 に低下する。state IV 呼吸では $\Delta Hmsl$ が増加し, free radical の相対 spin 量はほぼ 1/2 に低下するが, state III 呼吸ではむしろ増加する。傾向を示す。

Na_2S を state I 呼吸, state IV 呼吸に対して作用させても, g 値, $\Delta Hmsl$, 相対 spin 量は程んど変化しない。

アンチマイシン A は電子伝達系のチトクローム b とチトクローム C₁ 間の阻害であり, チトクローム b より基質側の電子伝達系は還元状態となり, 酸素の存在下ではチトクロームより酸素側の成分が酸化型となって電子伝達は停止する²²⁾。 Na_2S はチトクロームオキシダーゼを阻害し, ミトコンドリアが好氣的条件におかれても電子伝達系の全成分は還元状態で電子の流れは停止する。

この点を考慮して, ミトコンドリアの free radical は電子伝達系の還元状態に関係するが, 一方, 電子伝達系を阻害し, 電子の伝達を停止させても相対 spin 量には変化がない。従って, ミトコンドリアの free radical はミトコンドリアにおける反応の process ではなく state に関係があと考えられる。アンチマイシン A は state I 呼吸に作用して, 相対 spin 量を減少させるが, これまでのチトクローム b とチトクローム c 間の阻害のみでは説明が困難でなお検討を要する。

脱共役剤である DNP の作用機序はなお明らかではないが, 磷酸化系の中間体を水解して, ATP の生成を阻害すると考えられ, 膜の脂質溶解性²⁴⁾, 蛋白結合²³⁾などが論じられている。DNP は state I, state IV 呼吸に対して, ほぼ同様に作用し, 吸収波形の中心は低磁場 ($g=2.0061$) に移動し, $\Delta Hmsl$ の増加, spin 量の低下がみられる。アンチマイシン A では, state IV 呼吸に作用し電子伝達を阻害し, DNP は脱共役によって呼吸を促進するが, 結果的には同じように相対 spin 量の低下を示す。また, エネルギー転移阻害剤である TBTC²⁵⁾ は, site I, II, III に共通に作用して ATP を阻害するが, state IV 呼吸に作

用させても free radical には異常はなく, ADP 添加による state III 呼吸に作用させると, 呼吸は state IV に移行し, 呼吸の時間的経過に対する free radical の減少を阻止する。

以上の結果を統一的に理解することは困難である。ミトコンドリアの free radical は単に電子伝達系や酸化化系の反応過程のみに関係するとは考えられず, 電子伝達系で誘起された free radical が何らかの形で蓄積されて, 磷酸化系によって ADP から ATP を合成するのに重剛な役割を演じているものであろう。

結 論

正常ラット肝より分離したミトコンドリアについて, 電子スピン共鳴吸収の測定を行い, ミトコンドリアの呼吸状態 (state I~IV) における free radical の動態, および各種の呼吸系阻害剤による呼吸阻害とそれによる free radical の変化を中心に, 電子伝達系, 酸化的磷酸化系における free radical の役割を検討した。

1. 正常ラット肝ミトコンドリアでは, 磁場 3270 gauss を中心に, 特有な吸収波形が観測され, g 値は 2.0055, $\Delta Hmsl$ は 10.0 gauss であった。ミトコンドリアの mg. protein 量に対する spin 量を概算するとほぼ $6.0 \pm 0.2 \times 10^{13}$ spin であった。

2. この吸収波形は中心磁場, $\Delta Hmsl$ から free radical であることが解った。

3. ミトコンドリアに呼吸基質を添加した state IV 呼吸では free radical の相対 spin 量は増加したが, g 値, $\Delta Hmsl$ には著しい変化はなかった。

4. ミトコンドリアの state III 呼吸では, ADP 添加後の時間に比例して相対 spin 量が低下し, 全反応過程で spin 量は 1/2 以下に減少した。

5. 電子伝達系阻害剤であるアンチマイシン A を作用させると, ミトコンドリアの state I, state IV 呼吸で free radical は著明に減少した。

6. 脱共役剤 DNP をミトコンドリアの種々の呼吸状態に作用させると, 呼吸状態に無関係に free radical は減少した。

7. エネルギー転移阻害剤 TBTC では free radical の減少はみられないが, ADP 添加による state III 呼吸の経時的な相対 spin 量の低下を阻害した。

稿を終るに臨み, 御懇篤なる御指導, 御校閲を賜わった恩師石川大刀雄教授ならびに小田島壽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田縁幸子さんに心から感謝致します。

文 献

- 1) **Beinert, H. & Sands, R. H.** : Biochem. Biophys. Res. Commun., **3**, 41 (1960). 2) **Rajagopalan, K. V., Aleman, V. & Handler, P.** : Biochem. Biophys. Res. Commun., **8**, 220 (1962). 3) **Lipman, F.** : Currents in Biochemical Reseach, p. 137, New York, London, Interscience, 1946. 4) **Lehninger, A. L.** : Harvey Lecture, **49**, 176 (1955). 5) **Slater, E. C.** : Nature, **172**, 975 (1953). 6) **Chance, B. & Williams, G. R.** : Nature, **176**, 250 (1955). 7) **Michell, P.** : Nature, **191**, 144 (1961). 8) **Wang, Jui. H.** : Proc. Nat. Acad. of Sci., **58**, 37 (1967). 9) 小田島肅夫, 阿部博子, 米沢恵子, 宮本悦子, 石川大刀雄 ; 第23回細胞生物学会, 三島, (1970) 10) **Utsumi, K.** : Acta, Med. Okayama, **17**, 259 (1963). 11) **Lowry, O. H., Rosenbough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J.** : J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951). 12) **Chance, B. & Williams, G. R.** : J. Biol. Chem., **217**, 383 (1955). 13) **Hagihara, B.** : Biochim. Biophys. Acta., **46**, 134 (1961). 14) **Odashima, S., Abe, H. & Ishikawa, T.** : inpreparation. 15) **Chance, B. & Williams, G. R.** : Adv. Enzymology, **17**, 65 (1965). 16) 三井国敬 : 未発表. 17) 小林茂保, 田川邦夫 : 蛋白質核酸酵素, **10**, 1596 (1965). 18) **Beinert, H. & Lee, W.** : Biochem. Biophys. Res. commun., **5**, 40 (1961). 19) 阿部則行 : 未発表. 20) **Hollocher, T. C. Jr. & Commoner, B.** : Proc. Natl. Acad. Sci., **47**, 1355 (1961). 21) **Ehrenberg, A.** : Arkiv. Kemi., **19**, 97 (1962). 22) **Chance, B.** : J. Biol. Chem., **233**, 1223 (1958). 23) **Parker, V. H.** : Biochem. J., **69**, 306 (1958). 24) **Tongeans-Sickler, N. E., Kemp, A. & Van Noordwick, J.** : J. Biochem. Pharmacol., **6**, 263 (1961). 25) **Sone, N. & Hagihara, B.** : J. Biochem., **56**, 151 (1964).

Abstract

The electron spin resonance of the intact rat liver mitochondria was studied mainly as to the respiratory function.

1) In the intact rat liver mitochondria, the E.S.R. signal was observed with magnetic field = 3270 gauss as the center.

The g -value was 2.0055 and ΔH_{msl} was 10 gauss.

It was proved from the analysis of g -value and ΔH_{msl} that this signal was a free radical.

2) The relative spin value of free radical was markedly increased in the state 4 by adding respiratory substrates.

3) In the state 3 by adding ADP, free radical was decreased with time and at the end of the whole reaction, the spin volume was less than one half of the state 4.

4) The electron transfer inhibitor and the uncoupler of the respiratory function led to a remarkable decrease of the free radical and the energy transfer inhibitor prevented the decrease of spin volume in the state 3.