

氏名(本籍) いし 石 はら 原 のぶ 信 お 夫

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 医 博 第 4 8 2 号

学位授与年月日 昭 和 4 3 年 3 月 2 6 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専門課程 東北大学大学院医学研究所
(博士課程)生理学専攻

学位論文題目 Studies on the functional relationship
between the phosphoenolpyruvate synthesis
and the substrate-level phosphorylation
in guinea pig liver mitochondria
(モルモット肝ミトコンドリアにおける燐エ
ノールピリン酸生成と基質準位燐酸化反応
の関係)

(主 査)

論文審査委員 教授 菊 地 吾 郎 教授 吉 沢 善 作

教授 立 木 蔚

論 文 内 容 要 旨

ミトコンドリアにおける α -ケトグルタル酸(α -Kg)の酸化の際、グアノシン三リン酸(GTP)の生成がある事はすでに確認されている。このGTPは、①ADPと反応してATPを生成、②AMPと反応してADPを生成、③オキサロ酢酸と反応してリンエノールピルビン酸(PEP)を生成、④脂肪酸の活性化、等の四つの反応により消費される。このうち、脂肪酸活性化反応は無機リン酸により強く阻害されるので、その生理的意義は不明である。ところで、ウサギ肝ミトコンドリアを α -Kgを基質として2, 4-ジニトロフェノール(DNP)存在下で反応させると、DNP濃度変化に対してPEP生成が多相性に促進される事が報告されている。更にラット肝やモルモット肝ミトコンドリアにおいても同様の現象が報告されている。又、いずれの報告も、PEP生成が基質準位リン酸化反応と特異的關係を持つ事をのべている。然るに、ハト肝ミトコンドリアにおいては、PEP生成と基質準位リン酸化反応との間には特異的關係が存在しない事が最近報告された。更に、基質準位リン酸化反応由来のATPと呼吸鎖由来のATPとは交流し得ないという見解が提出されているが、これに対しては幾つかの有力な反論が提出されている。この様に、基質準位リン酸化反応をめぐる知見は必ずしも一致していない。そこで、我々はモルモット肝ミトコンドリアを用い、基質準位リン酸化反応とPEP生成反応との関係をより詳細に検討し、PEP生成反応が代謝調節上において果たす役割を解明しようとした。

材料としてハト、ウサギ、ニワトリ、ラット及びモルモットの肝臓を用い、所定の方法によりミトコンドリアを調製して用いた。反応は原則として25℃20分間、有気条件下において行つた。PEPの定量は、酵素的方法によるか、無機リン酸とピルビン酸に分解する方法によつた。Nucleosidediphosphate Kinase 活性は340m μ の吸光度増加を測定する方法によつた。

先ず、モルモット肝ミトコンドリアを用い、 α -Kgを基質としてDNP濃度とPEP生成量の関係を検討した。その結果、PEP生成量はDNP濃度 2.5×10^{-5} M及び 10^{-3} Mの時を最大とする多相性変化を示す事が判明した。この点は、すでに報告されている知見とほぼ一致する。又、この際酸素消費量もPEP生成量と平行して変化する事が判明した。そこで、我々は先ずDNPが $10^{-5} \sim 7.5 \times 10^{-5}$ Mの場合におけるPEP生成促進現象を解析する事にした。先ず、 $1-^{14}$ Cグルタミン酸(又は、 $1, 5-^{14}$ C- α -ケトグルタル酸) + マロン酸 + リンゴ酸なる系において、PEP生成量と α -Kg代謝量の比を検討した。その結果、PEP生成が最大になる条件では $\frac{\Delta \text{PEP}}{\Delta \alpha\text{-Kg}}$ の値がほぼ1になる事が判明した。同様の事実が、シクマロール、ペンタクロロフェノール、

A T P・ブドウ糖・ヘキソキナーゼ系を用いて P E P 生成を促進させた時にも見られた。即ち、P E P 生成が極大になる条件下では、 α -K_g代謝により生成された G T P がほとんど定量的に P E P 生成に利用される事が示された。次に、C₄-ジカルボン酸代謝と P E P 生成の関係を検討する為、1, 4-¹⁴C-フマル酸+マロン酸なる系において実験を行った。その結果、P E P 生成量と ¹⁴C O₂ 発生を指標として測定されたフマル酸代謝量は、 α -K_gと D N P を同時に添加する事によりいちぢるしく増加し、 $\frac{\Delta P E P}{\Delta ^{14}C O_2}$ の値が 1 に極めて近くなる事が判明した。又、1, 5-¹⁴C-クエン酸+マロン酸なる系においても全く同様の現象が観察された。すなわち、モルモット肝ミトコンドリアにおいては、 α -K_g代謝と C₄-ジカルボン酸代謝が P E P 生成反応を介してかなり密接に共役している事が示された。

次に、外部から添加した A T P や、呼吸鎖由来の A T P が P E P 生成にどの程度利用され得るのかという問題がある。この点を先ず、モルモット肝ミトコンドリアについて検討した。その結果、モルモット肝ミトコンドリアにおいては、 α -K_g又はリンゴ酸を基礎とした場合、P E P 生成に対する A T P の添加効果は極めて小さく、又、P E P 生成量も D N P 添加の場合にくらべてはるかに小さかつた。他方、ハト肝ミトコンドリアにおいては、既に報告されている知見と全く一致した結果が得られた。すなわち、リンゴ酸のみを基質とした時にいちぢるしい P E P 生成が見られ、A T P 添加により更に増加するが、D N P 添加によりいちぢるしく減少する事が確認された。又、ニワトリ肝ミトコンドリアにおいても、ハトの場合と同様な現象が観察された。以上の事実は、鳥類肝ミトコンドリアでは基質準位磷酸化反応由来の G T P と呼吸鎖由来の A T P とが極めて自由に交流し得るのに対して、モルモット肝ミトコンドリアにおいてはこの交流が極めて強く制約されている事を示す。この差異は、ミトコンドリアの Nucleosidediphosphate Kinase 活性の差にもとづく可能性が考えられるので、我々は、音波処理ミトコンドリアの 10 万 G 上清を用いて、Nucleosidediphosphate Kinase 活性を検討した。その結果この酵素活性はハト肝の場合が最も高く、ラット肝ではハト肝の約 1/3、モルモット肝は約 1/13、ウサギ肝は約 1/30 である事が判明した。又、同時に、G T P · A M P · Phosphate Transferase 活性を測定したが、本酵素の活性はいずれの動物でも大差がなかつた。したがって、P E P 生成において見られたハト肝とモルモット肝ミトコンドリアの差異は、Nucleosidediphosphate Kinase 活性の相違にもとづくものと結論出来よう。更に、この酵素活性がラット肝においてかなり高い事実は、ラット肝ミトコンドリアにおける P E P 生成量と G T P 生成量との比が 1 : 10 であるという報告をよく説明できる。

すなわち、Nucleosidediphosphate Kinase 活性がミトコンドリアにおけるヌクレオチドの交流を左右している事が明示された。又、モルモット肝ミトコンドリアにおいては、P E P 生成は G T P 消費によりクエン酸回路を調節する役割、及び、基質準位磷酸化反応で生じたエネルギーをミトコンドリア外に引き出す役割を果たしている事が推察された。

審 査 結 果 の 要 旨

ミトコンドリアにおける α -ケトグルタル酸酸化は基質単位磷酸化としてGTP生成を伴うことが特徴である。一方基質単位磷酸化由来のATPと呼吸鎖由来のATPとは容易に交流し得ないという見解も提出されている。したがってGDP供給の難易がミトコンドリアの呼吸およびクエン酸回路活動の調節にかなり大きな影響を持つ可能性がある。さらに肝ミトコンドリアにはGTPを利用してオキサロ酢酸から燐エノールピルビン酸(PEP)を生成するPEPカルボキシキナーゼが存在するので、この系の活性と基質単位磷酸化活性との共役が注目される。従来もこの点に着目して行われた研究があつたが、その結果は用いられた動物種差によつてまちまちであり、今日までその統一の見解は得られていない。

著者の研究はこの問題の統一的理解を目指して行われたものであつて、材料としてはハト、ウサギ、ニワトリ、ラット、モルモットを用い、広範な比較研究を行つている。その結果特にモルモット肝ミトコンドリアでは、呼吸促進等によりGTP生産を促進させると、生じたGTPは殆んど1:1の比率でPEP生成に転用させること、またミトコンドリアの外から添加したATPはPEP生成に殆んど利用されないことを示した。これに対してハトやニワトリではGTP・ATPの相互交流は自由であり、外部から加えたATPもPEP生成によく利用される。著者はこの矛盾を解くためにさらにGTP・ATPの交換を触媒するnucleoside diphosphate kinase およびGTP-AMP-phosphate transferase 活性を比較した。その結果nucleoside diphosphate 活性がハト肝ミトコンドリアでは著しく高く、モルモット肝ミトコンドリアでは極めて微弱であることを見出し、上記の差異は本酵素活性の差異に帰せられるべきことを明らかにした。

それらの研究により著者は(1)nucleoside diphosphate Kinase 活性が生理的なヌクレオチド交流を支配していること、(2)これによつてPEP生成に関する従来の矛盾が統一的理解されるようになったこと、(3)特にモルモット肝ではPEP生成はGTP消費を介してかなり直接的にクエン酸回路活動を調節し得ること、また(4)PEP生成は基質単位磷酸化のエネルギーをミトコンドリア外に引き出す役割を果すこと、などを推論している。

以上により、本論文は学位授与に値するものと判定する。