

# ジギトニン処理 permeable 腹水肉腫細胞に おけるミトコンドリアの酸化的リン酸化

岡山大学医学部癌源研究施設生化学部 (指導: 小田琢三教授)

茂 原 嗣 也

(昭和58年1月24日受稿)

**Key words:** ミトコンドリア, 透過性細胞,  
酸化的リン酸化,  
ATPase, ジギトニン

## 緒 言

ミトコンドリアの酸化的リン酸化を調べるには、一般に組織細胞から分離したミトコンドリアが用いられている。しかし、少量の培養細胞や腹水細胞などの遊離細胞から無傷なミトコンドリアを収量よく分離して調べることはかなり困難なことが多い。ジギトニンはステロイド・グリコシドの一種で、コレステロールその他の $\beta$ -ヒドロキシステロールに選択的に結合し<sup>1-3)</sup>、細胞膜のイオン<sup>4-5)</sup>、代謝物質<sup>6,7)</sup>、酵素<sup>6,8,9)</sup>、蛋白質<sup>9)</sup>などに対する透過性を亢進することが知られている。真核細胞の細胞膜は他の内膜系よりコレステロール含量がはるかに多いので<sup>10)</sup>、細胞を低濃度のジギトニンで処理すれば、細胞膜の透過性を選択的に増大させることが出来る。Odaら<sup>11)</sup>は培養細胞を低濃度のジギトニンで処理することによって得られる基質透過性細胞 (permeable cell) において、効率のよいクロマチン DNA の *in vitro* 複製系を樹立した。私共はマウスの腹水肉腫細胞をモデルに選び、低濃度のジギトニン処理で基質透過性にした permeable 細胞について、ミトコンドリアの呼吸と酸化的リン酸化を酸素電極法を用いて簡便に調べる方法を開発した<sup>12)</sup>。

本研究では、マウス肝臓から分離したミトコンドリアと腹水肉腫細胞から分離したミトコンドリアを対照とし、ジギトニン処理透過性細胞について、酸素電極法を用いて、それぞれ呼吸と酸化的リン酸化の測定を行ない、呼吸速度

(respiratory rate)、呼吸調節率 (respiratory control ratio, RCR)、酸化的リン酸化能 (ADP/O 比)などを算出して比較検討した。さらに、この腹水肉腫細胞のジギトニン処理透過性細胞では、呼吸調節率が正常より幾分低いので、その原因について、ATPase, hexokinase, pyruvate kinase などの影響を調べ、検討を加えた。その結果、ジギトニン処理透過性細胞は、少量の whole cell でのミトコンドリアの酸化的リン酸化と呼吸阻害剤や脱共役剤の影響を簡便に調べることができ、さらに細胞内オルガネラの機能と代謝系の相関をなるべく *in vivo* に近い条件下において、*in vitro* で調べる上に極めて有用な実験系となり得ることがわかった。

## 材料と方法

### 1) マウス肝臓組織からのミトコンドリアの分離調整

ミトコンドリアの分離調整は Hogeboom ら<sup>13)</sup>の方法を改良した筆者らの研究室における常法を用いた<sup>14)</sup>。操作は 4°Cで行った。C3H/Heマウス 2 匹を 24 時間絶食後、断頭、開腹し、肝臓を取り出した。溶液 A (0.25M sucrose, 3mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) で洗浄後、再び溶液 A を加えて細切し、最終 20ml とした。これを粗テフロンホモゲナイザーを用いて、電動低回転数で 1 往復、次いで密テフロンホモゲナイザーを用いて電動低回転数で 3 往復ホモゲナイズした。これを 2 重のテフロン布でろ過し、ロ液を 50g、

7 分間遠沈, さらに上清を溶液 B (0.34M sucrose, 3mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1mM EDTA) に重層し, 700g, 10分間遠沈, さらに上清を 6000g, 10分間遠沈し, 沈渣を粗ミトコンドリア分画とし, 3 mg 蛋白質量/100 $\mu$ l となるように溶液 C (0.25M sucrose, 3mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1mM EDTA, 0.1%ウシ血清アルブミン (BSA)) に懸濁して実験に供した。

#### 2) マウス腹水肉腫細胞 (SR-C3H/He) の調整

マウス腹水肉腫細胞は当教室継代移植のマウス肉腫ウィルス誘発マウス腹水肉腫細胞 (SR-C3H/He)<sup>15)</sup> を用いた。C3H/He マウスに SR-C3H/He 腹水 0.05ml を腹腔に接種し, 7~10 日目の腹水約 10ml を採取し, これに D 液 (0.15 M sucrose, 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>) 40ml を加えて最終 50ml とし, 細胞数計算に 0.1ml を供し, 残りは 50g, 10分間遠沈し, 沈渣を D 液で  $4 \times 10^7$  腹水細胞/100 $\mu$ l となる様に懸濁して腹水肉腫細胞を調整した。これは氷水中で 6 時間安定である。

#### 3) マウス腹水肉腫細胞 (SR-C3H/He) からのミトコンドリアの分離

上記 D 液で 2 回洗浄分離した SR-C3H/He 細胞沈渣に先の A 液を加えて 10ml とし, 2%ジギトニン (digitonin) 200 $\mu$ l を添加し (終末 0.04%ジギトニン), Dounce ホモゲナイザー-20 往復手動でホモジナイズした。これを B 液に重層し, 700g, 10分間遠沈し, 上清を 6000g, 10分間遠沈し, 粗ミトコンドリア分画を採取した。これを C 液で 3 mg 蛋白質量/100 $\mu$ l となるように懸濁して実験に供した。

#### 4) 蛋白質の定量

マウス肝臓ミトコンドリアおよび SR-C3H/He 腹水肉腫細胞ミトコンドリアの蛋白質定量は BSA を標準として Biuret 法<sup>16)</sup> により測定した。

#### 5) 透過性細胞の調整と酸化的リン酸化の測定法

透過性細胞および分離ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応における酸素消費は, 共にガルバニ型電極を 3 ml の恒温反応容器に挿入し, 反応液をスターラーで攪拌しながら測定した。反応液 E (0.2M sucrose, 10mM リン酸緩衝液, pH 7.4, 10mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA) をあらかじめ 25°C の恒温槽中で保温して空気を

振盪し, 溶存酸素を平衡化して, 25°C 恒温環流保温した 3 ml の反応容器に注入し, 反応を行った。溶存酸素量は 25°C における sucrose 濃度による補正を差し引いて 95% 溶存酸素量 (245 $\mu$ M) として算出し用いた。分離ミトコンドリアの呼吸測定は反応液 E を注入後ミトコンドリアを加え, 20 秒後に基質としてコハク酸ナトリウム (0.5M sodium succinate, 30 $\mu$ l, 終末 5 mM) を添加し, 外気との接触を防ぐ目的で, 直径 1 mm の孔のある外栓を施した。腹水肉腫細胞の呼吸測定は  $4 \times 10^7$  細胞/100 $\mu$ l を加え, 20 秒後に 1%ジギトニン 30 $\mu$ l を添加して (終末 0.01%ジギトニン, 後述), 細胞を基質透過性とした。ジギトニン添加 20 秒後にコハク酸ナトリウムを添加し, 外栓を施した。この場合はコハク酸添加約 3 分後に安定な state 4 が得られる。ジギトニン添加だけでは約 3 分間で安定な state 1 が得られ, これに次々コハク酸添加で, 直ちに安定な state 4 が得られる。本実験ではジギトニンを添加し, コハク酸添加後, 約 3 分間待ち安定な state 4 が得られた後に実験を進めた。外栓後に添加する ADP その他の添加物はすべて外栓の孔を通してハミルトンのマイクロシリンジを用いて添加した。添加する ADP は分離ミトコンドリアでは 30mM, 30 $\mu$ l, 終末 300 $\mu$ M を, またジギトニン処理腹水肉腫細胞では 30mM, 20 $\mu$ l, 終末 200 $\mu$ M を用いた。

#### 6) 呼吸調節率および ADP/O 比の計算

呼吸調節率 (respiratory control ratio, RCR) は "state 3" / "state 4" の呼吸速度比と定義され Estabrook の方法<sup>17)</sup> で算出した。ADP/O 比は, "消費された ADP" / "消費された O" と定義され, Chance と Williams の方法<sup>18)</sup> で算出した。

#### 7) ATPase の反応速度の測定

ATPase の測定は基質として [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP を含む ATP を用い, 分解された <sup>32</sup>Pi を測定する方法<sup>19)</sup> を用いた。標準反応液はオキシグラフの反応液と同一のものをを用い, 1 tube につきオキシグラフの反応容量の 1/20 容量スケールで実験した。これに 1%ジギトニンを加え, 終末 0.01% とした。 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP は 0.1 $\mu$ Ci/tube を加え, 非標識 ATP (cold ATP) で 200 $\mu$ M と

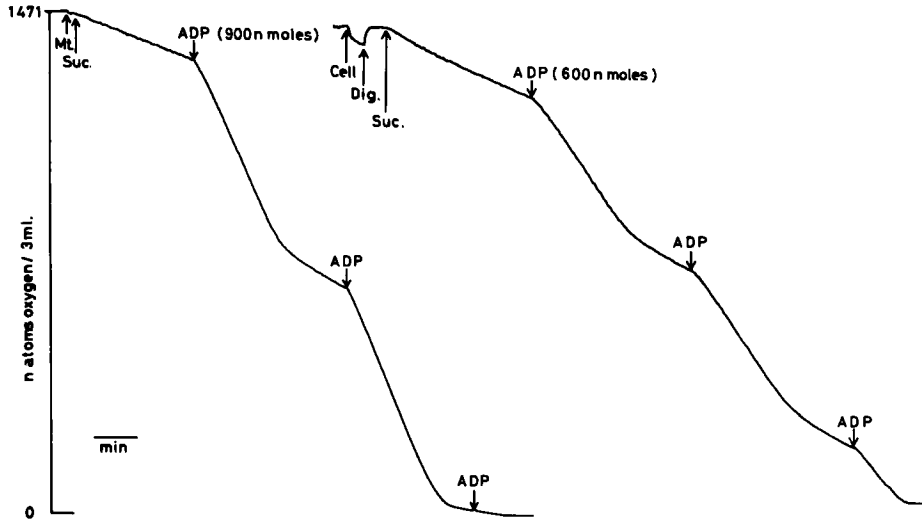


図1 分離肝ミトコンドリアとジギトニン処理透過性腹水肉腫細胞との基質添加後の呼吸の相違  
 分離肝ミトコンドリアでは基質添加後直ちに安定した state 4 が得られたが、腹水肉腫細胞にジギトニンを加え、直ちに基質を添加した場合は、はじめやや速い state 4 が出現し、2分後に安定した state 4 が得られた。これに ADP を添加すると、図2 と同等の state 3 呼吸を観察し得た。

なるように調整した。この ATP の濃度はオキシグラフでの 3 ml system 中に添加する ADP の濃度と同一にした。この反応液を 1 tube につき 150 $\mu$ l 用いた。反応は 25°C にあらかじめ温めた反応液に SR-C3H/He 腹水肉腫細胞を  $2 \times 10^6$  細胞加えることにより開始し、25°C、5 分間反応した。この反応は 30% TCA, 90 $\mu$ l を加えることで停止し、20% (W/V) Norit, 250 $\mu$ l を加え [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP を吸着させた。この混合液を激しく振盪し、さらに蒸留水 250 $\mu$ l を加え総量 740 $\mu$ l とし、1500g、5 分間遠沈した。この上清を 150 $\mu$ l 採取し、さらに Norit の汚染を除去するため 1500g、5 分間遠沈し上清 100 $\mu$ l の  $^{32}$ Pi の放射活性を Packard の液体シンチレーションでカウントした。ATPase 活性はオキシグラフと比較するため、n moles Pi 遊離/分/ $4 \times 10^7$  細胞に換算して表示した。

#### 8) 試薬

ジギトニン (digitonin) は Merck 社のものを 99.5% ethanol に溶かし 1% ethanol 溶液として用いた。コハク酸ナトリウムは片山化学社より購入し、0.5M 水溶液として用いた。adeno-

sine diphosphate (ADP) および adenosine triphosphate (ATP) は山佐社より購入し、それぞれ 30mM および 50mM 水溶液として用いた。2,4-dinitrophenol (DNP) は Sigma 社のものを 99.5% ethanol に溶かし終末  $2 \times 10^{-5}$  M としして用いた。[ $\gamma$ - $^{32}$ P] adenosine triphosphate ([ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP) は Amersham 社のを用いた。phosphoenolpyruvate は Beohringer 社より、また glucose は片山化学社より購入し共に 0.1 M 水溶液として用いた。

## 結 果

### 1) 酸化的リン酸化の標準オキシグラフ

標準のオキシグラフを図1に示した。前述のごとくミトコンドリアでは基質添加時より直ぐ state 4 が得られたが、腹水肉腫細胞ではジギトニン処理 3 分後に state 4 が得られた。これはジギトニン処理で基質透過性になるための時間と固在 ADP や ATPase の存在によるためと考えられた。state 4 で ADP を添加すると直ちに state 3 呼吸に移行して酸素消費が増大し、ADP の消費によって再び state 4 に移行した。

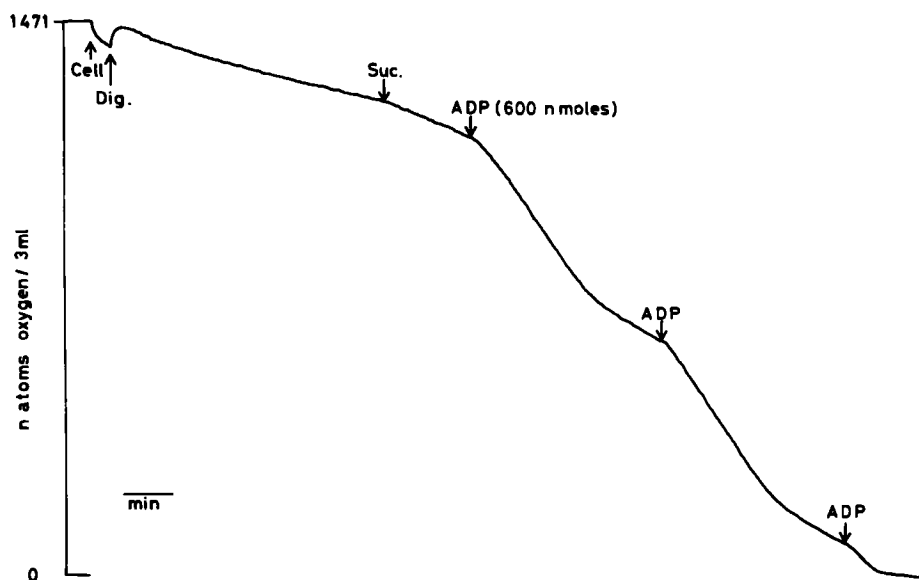


図2 ジギトニン、基質、およびADPの経時的添加による腹水肉腫細胞の呼吸の変化

細胞を反応容器中に加え、20秒後にジギトニンを添加した。約2分間はやや速いstate 1呼吸が認められるがその後安定したstate 1が得られ、これに基質を加えると直ちにstate 4が認められる。ADP添加と共にstate 3が出現し、ADPの消費により再びstate 4に移行する。このADP添加を繰り返して溶存酸素を消費した。

その後再びADPを添加し、この反応を溶存酸素のなくなるまで繰り返した。ジギトニン添加だけでは約3分後に安定なstate 1が得られ、これに次ぐコハク酸の添加で、直ちに安定なstate 4が得られることを図2に示した。ミトコンドリアではstate 3からstate 4への移行が鋭敏であるのに反して透過性細胞では、やや緩慢であった。

## 2) ジギトニンの至適濃度の決定

腹水細胞を基質透過性にするためのジギトニンの至適濃度を決定するために、この系でジギトニンの終末濃度を変えて呼吸調節率(RCR)、およびADP/0比の変化を調べ、これを図3に示した。ジギトニン濃度が0.0025%ではじめてADPの添加で呼吸の増大が認められ、すなわちRCRが1より大となり0.008%でプラトー(RCR≒2.42)となった。一方ADP/0比はジギトニン濃度が0.004%で認められはじめ、同じく0.008%でプラトー(ADP/0比≒1.42)となった。これはジギトニン処理により細胞膜が基質透過性となり、添加したADPによる酸化的り

ン酸化の酸素消費を酸素電極法で調べ得ることを示している。したがって以後の実験に用いるジギトニン処理は終末0.01%のジギトニン濃度とした。

## 3) 透過性細胞における酸化的リン酸化のオキシグラフによる解析

分離した肝ミトコンドリアと腹水肉腫細胞ミトコンドリア、およびジギトニン処理透過性細胞におけるコハク酸を基質にした場合のstate 4の呼吸速度、state 3の呼吸速度、RCR、ADP/0比、ジニトフェノールによる脱共役時の呼吸速度などを表1に示した。ミトコンドリアについては3mg蛋白質量を用い、また透過性細胞では腹水肉腫細胞ミトコンドリアと同程度のstate 3の呼吸速度を得るのに必要な細胞数、 $4 \times 10^7$ 細胞を用いた。このとき分離ミトコンドリアについては透過性細胞より5~7倍量の細胞材料を要した。腹水肉腫ミトコンドリアと肝ミトコンドリアとを比較してみると腹水肉腫ミトコンドリアでは肝ミトコンドリアよりRCR、ADP/0比が少し低いことがわかった。RCRが低い

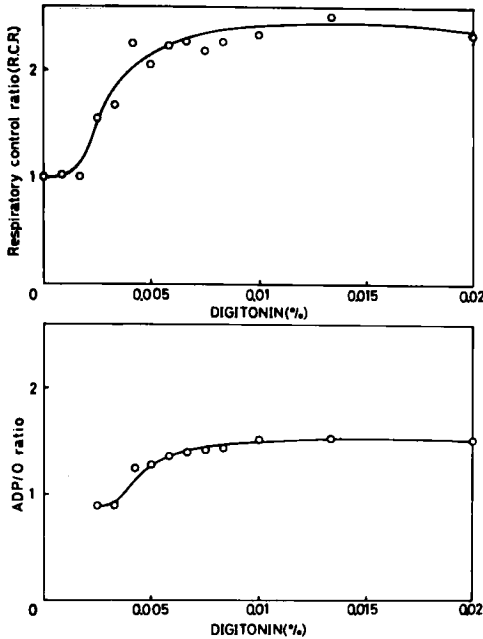


図3 ジギトニンの濃度変化による呼吸調節率(RCR) および酸化的リン酸化能(ADP/O比)  
 0.0025%ジギトニンで呼吸調節率が1以上となりはじめ、0.008%でプラトーとなった。(RCR≒2.42) ADP/O比は0.004%で認められはじめ、呼吸調節と同じく0.008%でプラトーとなった。(ADP/O比≒1.42)

のは state 3 が肝ミトコンドリアより低値であるため、これは腹水肉腫細胞のミトコンドリアの呼吸機能が、肝ミトコンドリアより低いことを示している。また腹水肉腫細胞ミトコンドリアと透過性細胞とを比較してみると透過性細胞では分離した腹水肉腫細胞ミトコンドリアより RCR, ADP/O 比が少し低いことが示された。透過性細胞で RCR の低い原因は、state 3 の呼吸速度を分離ミトコンドリアのそれとほぼ一致させているときに、state 4 の呼吸速度が、透過性細胞の方が分離ミトコンドリアより高値であるためと考えられる。透過性細胞ではミトコンドリアの機械的障害がないので、そのための脱共役は考えにくく、後に示すように添加した ADP から酸化的リン酸化で生成された ATP が他の ATP 消費系によって再び ADP を生成するためと考えられた。特に解糖系の酵素の残存と ATP

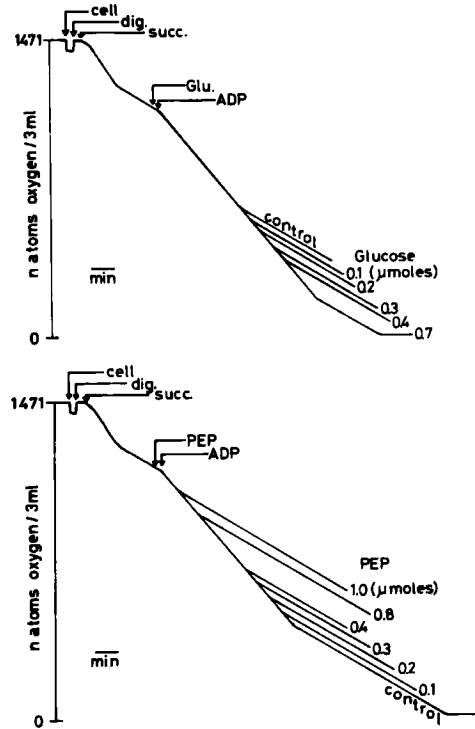


図4 ジギトニン処理透過性腹水肉腫細胞におけるグルコースおよびホスホエノールピルビン酸 (PEP) 添加の影響  
 コントロールにはグルコースおよび PEP は添加していない。グルコースをこの 3 ml の系に 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.7 μmoles とそれぞれ添加すると state 3 の時間の延長が認められたが、呼吸調節率の変化は認められなかった。一方、PEP を 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.8, 1.0 μmoles とそれぞれ添加すると呼吸調節率の変化は出現しないが、state 3 の時間の短縮が認められた。

ase の存在が示唆されるので、次にこれらの酵素の関与を調べた。

4) グルコースおよびホスホエノールピルビン酸添加の影響

解糖系の酵素については、基質としてグルコース (glucose) およびホスホエノールピルビン酸 (phosphoenolpyruvate, 以下 PEP と略す) を、このジギトニン処理透過性細胞の反応系に添加して調べた。この結果を図4に示した。グルコースを加えるとみかけ上の ADP/O 比は低下し、また PEP を加えるとみかけ上の ADP/O 比は上昇したが、共に RCR は変化しなかった。

Preparation	Respiratory rate state 4 (n atoms oxygen consumed /min)	Respiratory rate state 3 (n atoms oxygen consumed /min)	R.C.R.	ADP/O ratio	Respiratory rate (+DNP) (n atoms oxygen consumed /min)
Mouse liver mitochondria (3mg, prot.)	60±6	354±12	5.90±0.20	1.96±0.10	381±3
SR-C3H/He cell mitochondria (3mg, prot.)	55±7	179±11	3.28±0.30	1.80±0.18	not measured
SR-C3H/He permeable cell (4×10 <sup>7</sup> cells)	72±6	174±11	2.42±0.21	1.42±0.11	182±4

表1 マウス肝ミトコンドリア, 腹水肉腫細胞ミトコンドリア, およびジギトニン処理透過性腹水肉腫細胞における state 4, state 3 の呼吸速度, 呼吸調節率(RCR), 酸化リン酸化能(ADP/O 比), ジニトロフェノールによる脱共役時の呼吸速度

透過性腹水肉腫細胞は腹水肉腫細胞ミトコンドリア 3 mg蛋白質量と同程度の state 3 の呼吸速度を得るのに必要な細胞数, 4 × 10<sup>7</sup> 細胞を用いた。マウス肝ミトコンドリアと腹水肉腫細胞ミトコンドリアとを比較してみると腹水肉腫細胞ミトコンドリアの方が, RCR, ADP/O 比のどちらもマウス肝ミトコンドリアより低値であった。また腹水肉腫細胞ミトコンドリアと透過性腹水肉腫細胞とを比較すると透過性腹水肉腫細胞の方が腹水肉腫細胞ミトコンドリアより RCR, ADP/O 比のどちらも少々低い。

Preparation	ADP/O ratio (ADP added 900n moles)	Oxygen consumed state 3 (n atoms)	Respiration time state 3 (min)	Pi liberated /min (n moles)	ATP consumed (estimation) state 3 (n moles)	Pi liberated (estimation) state 3 (n moles)
Mouse liver mitochondria (3mg, prot.)	1.96	459	1.30	-	(~0)	-
SR-C3H/He cell mitochondria (3mg, prot.)	1.80	500	2.79	-	(73.8)	-
SR-C3H/He permeable cell (4×10 <sup>7</sup> cells)	1.42	634	3.64	45	(248.5)	(164)

表2 マウス肝ミトコンドリア, 腹水肉腫細胞ミトコンドリア, およびジギトニン処理透過性腹水肉腫細胞における ADP/O 比, state 3 における酸素消費量の増大から推定した ATP 消費量, および 1 分間に遊離された無機リン量から state 3 で遊離されたであろう無機リンの推定量

透過性腹水肉腫細胞ではマウス肝ミトコンドリアより 248.5 n moles の余計の ATP 消費量が推定された。また state 3 の時間内(3.64分)で遊離される無機リンの量は, 164 n mols と推定された。

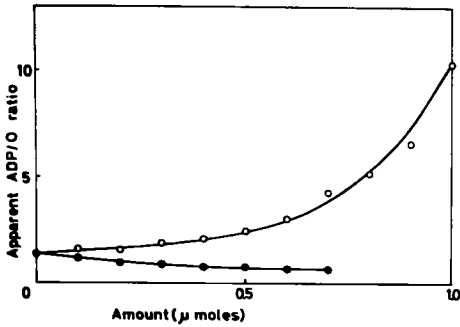


図15 添加したグルコースおよびホスホエノールピルビン酸 (PEP) の濃度とみかけ上の ADP/O 比の関係  
 グルコースが添加されるとみかけ上の ADP/O 比は減少し、PEPが添加されるとみかけ上の ADP/O 比は増加した。  
 ●—● : グルコース  
 ○—○ : PEP

添加したグルコースおよび PEP の濃度とみかけ上の ADP/O 比の関係を図 5 に示した。すなわちこのジギトニン処理透過性細胞には解糖系の酵素である hexokinase および pyruvate kinase が存在することが示された。しかしグルコース添加によりみかけ上の ADP/O 比の減少という結果は pyruvate kinase が存在していても PEP までは解糖系が連続していないことを示している。

##### 5) 透過性細胞の ATPase 活性

次いで透過性細胞の ATPase 活性をオキシグラフの 1/20 容量スケールを用い、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を基質として液体シンチレーションで測定した結果を表 2 に示す。この表にはそれぞれの材料における ADP/O 比、state 3 における酸素消費、およびその反応時間と ATPase により遊離した無機リンの量を示した。また state 3 における酸素消費増大から逆に ATP 消費の推定値および 1 分間に遊離された無機リン量から state 3 で遊離されたであろう無機リンの推定値を示した。マウス肝ミトコンドリアでは ADP/O 比が 1.96 であり、このときをほとんど intact だと仮定すると透過性細胞では state 3 に長く時間を要しておりこの間に消費した酸素は、マウス肝ミトコンドリアより、state 3 において 175 (634-459) n moles の酸素が余計に消費されている。ADP/O 比の減少

は ATPase の存在により酸化的リン酸化で生成された ATP を利用して再び ADP を産生したためと考えられる。余計の酸素消費は ADP も余計に消費されたことを示している。ADP/O 比は 1.42 であるから余計に生成され利用された ADP は 248.5 (175 × 1.42) n moles と算出され、基質である ATP の消費は同じく 248.5 n moles と推定された。ジギトニン処理透過性細胞の ATPase 活性測定では、オキシグラフと同一条件のもとで 45 n moles / 分 /  $4 \times 10^7$  細胞であり、これを state 3 の時間に相当させると 164 (45 × 3.64) n moles の測定計算値を得た。すなわち RCR と ADP/O 比の低下は、ほとんど ATPase による ATP から ADP への分解によるものと考えられた。state 3 における (248.5-164) n moles すなわち 84.5 n moles の ATP は測定上の誤差かまたは他のリン酸化に関与しているものと考えられる。

##### 考 察

ジギトニンは細胞膜のコレステロールや  $\beta$ -ヒドロキシステロールに結合し<sup>1,3)</sup>、無機イオン<sup>4,5)</sup>や代謝物質<sup>6,7)</sup>、酵素<sup>6,8,9)</sup>、蛋白質<sup>9)</sup>などを透過性にするが、低濃度(終末 0.01%)ではミトコンドリアなどの細胞内器官は細胞外に遊出しないとされている<sup>9)</sup>。腹水肉腫細胞のような遊離細胞はホモジナイザーで壊し難く、少量の材料よりミトコンドリアを分離してその機能を調べることが困難である。しかし低濃度ジギトニン処理により細胞膜を基質透過性とすればミトコンドリアを分離することなく酸化的リン酸化をオキシグラフの酸素消費より調べる事が出来る。分離した肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化は終末 0.01% のジギトニンの添加で影響がなかったため、同濃度のジギトニン処理で基質透過性とした腹水肉腫細胞内のミトコンドリアの酸化的リン酸化は障害のないものと考えられる。このジギトニン処理腹水肉腫細胞のオキシグラフによる呼吸測定では、RCR および ADP/O 比の低下、state 3 の反応時間延長、state 3 より state 4 への移行の遅延が認められたが、ATP を添加すると無機リンが遊離されることから、それらは主として ATPase が存在することによる現象

と解析された。オキシグラフより推定される余計のATP消費は248.5 n molesであり、また $^{32}\text{P}$ iの遊離より測定したATPaseによるATP消費は164 n molesであった。これらを比較すると差の84.5 n molesのATPは測定誤差、あるいは他のリン酸化系に消費されているものと考えられた。 $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase活性は一般にトランスフォームした細胞に高いといわれ<sup>20,21)</sup>、本実験で筆者らの用いた腹水肉腫細胞でも同様であった。マウス肝ミトコンドリアと腹水肉腫細胞ミトコンドリアとを比較すると、腹水肉腫細胞ミトコンドリアでは肝ミトコンドリアよりRCRおよびADP/0比が少し低いことがわかった。腹水肉腫細胞ミトコンドリアのRCRが低いのはstate 3が肝ミトコンドリアのそれより低値であるため、これは腹水肉腫細胞のミトコンドリアの呼吸機能が肝ミトコンドリアのそれより低いことを示している。一方腹水肉腫細胞ミトコンドリアのADP/0比(1.80)が肝ミトコンドリアのそれ(1.96)よりやや低い理由は、分離時にDounceホモゲナイザーでホモジナイズしたときに多少の機械的傷害が加わったためかも知れない。腹水肉腫細胞は等張液中ではホモゲナイザーで壊し難く、低張ではミトコンドリアが膨化して、呼吸調節能や酸化的リン酸化能が低下するが、ジギトニン処理すれば等張でも容易にホモジナイズされ、酸化的リン酸化能の比較的良好に保たれたミトコンドリアを得ることができる。透過性細胞と同程度の呼吸活性を示すミトコンドリア標品を得るためには、透過性細胞より5~7倍量の細胞材料を必要とするが、ホモジナイズし難い遊離細胞からのミトコンドリアの分離にはこのジギトニン処理法が有用な方法であると考えられる。

透過性細胞ではhexokinaseおよびpyruvate kinaseが存在しており他の解糖系の存在も示唆されたが、hexokinaseからpyruvate kinaseへは不連続であった。トランスフォームした細胞は一般にグルコースへのとり込みが高く<sup>22,23)</sup>、解糖系が亢進していると考えられている。この腹水肉腫細胞に比較的高いATPase活性が存在していることもそのことと関連があるかも知れない。

このようにこの系では低濃度ジギトニン処理により、少量のwhole cellでのミトコンドリアの酸化的リン酸化と呼吸阻害剤や脱共役剤の影響を簡便に調べることができ、さらに細胞内オルガネラの機能と代謝系の相関をもなるべくin vivoに近い条件下で調べることができる極めて有用な実験系であることがわかった。

## 要 約

ラウス肉腫ウィルス誘発腹水肉腫細胞(SR-C3H/He)を低濃度のジギトニン(終末0.01%)で処理し、基質透過性細胞とすることにより、少量の材料で簡単にミトコンドリアの呼吸速度、呼吸調節率(RCR)、酸化的リン酸化能(ADP/0比)などの機能を酸素電極法を用いて調べられることがわかった。この基質透過性腹水肉腫細胞ではマウス肝や腹水肉腫細胞から分離したミトコンドリアより、呼吸調節率や酸化的リン酸化能が幾分低い。この原因について種々なATPase活性を検討した結果、この透過性細胞では主にミトコンドリア以外の $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase活性がかなり高く存在し、これによって呼吸調節率や酸化的リン酸化能の低下が生じることが示唆された。また、この透過性細胞に解糖系の基質であるグルコースやホスホエノールピルビン酸を添加しhexokinaseやpyruvate kinaseの存在による呼吸調節への影響を認めたが、解糖系の一連の反応は不連続であり、呼吸調節率や酸化的リン酸化能の低下の主因であるとは考え難い。このように、低濃度のジギトニン処理透過性細胞は比較的少量のwhole cellでのミトコンドリアの酸化的リン酸化と呼吸阻害剤や脱共役剤の影響を簡便に調べることができ、さらに細胞内オルガネラの機能と代謝系の相関をin vivoに近い条件下で調べることのできるきわめて有用な実験系であると考えられる。



## 謝 辞

この稿を終えるに臨み、御懇意な御指導と御校閲を賜った恩師小田琢三教授に深甚の謝意を表します。

また本実験の遂行にあたり、終始懇切な御指導と御援助をいただいた癌研生化学部の諸先生方に深謝いたします。

なお、論文の要旨は、昭和56年第54回日本生化学大会において発表した。

## 文 献

1. Scallen, T.J. and Dietert, S.E.: The quantitative retention of cholesterol in mouse liver prepared for electron microscopy by fixation in a digitonin-containing aldehyde solution. *J. Cell Biol.* **40**, 802—813, 1969.
2. Elias, P.M., Goerke, J. and Friend, D.S.: Freeze-fracture identification of sterol-digitonin complexes in cell and liposome membranes. *J. Cell Biol.* **78**, 577—596, 1978.
3. Rosenqvist, E., Michaelsen, T.E. and Vistnes, A.I.: Effect of streptolysin O and digitonin on egg lecithin/cholesterol vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **600**, 91—102, 1980.
4. Dubinsky, W.P. and Cockrell, R.S.:  $Ca^{2+}$  transport across plasma and mitochondrial membranes of isolated hepatocytes. *FEBS (Fed. Eur. Biol. Soc. Lett.)* **59**, 39—43, 1975.
5. Murphy, E., Coll, K., Rich, T.L. and Williamson, J.R.: Hormonal effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **255**, 6600—6608, 1980.
6. Zuurendonk, P.F. and Tager, J.M.: Rapid separation of particulate components and soluble cytoplasm of isolated rat-liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* **333**, 393—399, 1974.
7. Siess, E.A. and Wieland, O.H.: Phosphorylation state of cytosolic and mitochondrial adenine nucleotides and of pyruvate dehydrogenase in isolated rat liver cells. *Biochem. J.* **156**, 91—102, 1976.
8. Mackall, J., Meredith, M. and Lane, M.D.: A mild procedure for the rapid release of cytoplasmic enzymes from cultured animal cells. *Anal. Biochem.* **95**, 270—274, 1979.
9. Fiskum, G., Craig, S.W., Decker, G.L. and Lehninger, A.L.: The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 3430—3434, 1980.
10. Colbeau, A., Nachbaur, J. and Vignais, P.M.: Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 462—492, 1971.
11. Oda, T., Watanabe, S., Hanakawa, S. and Nakamura, T.: Complete in vitro DNA replication of SV40 chromatin in digitonin-treated permeable cells. *Acta Med. Okayama* **34**, 409—413, 1980.
12. 茂原嗣也, 渡辺晰子, 小田琢三: ジギトニン処理 permeable 腹水肉腫細胞におけるミトコンドリアの酸化的リン酸化. *生化学* **53**, 750, 1981, (第54回日本生化学会大会, 仙台, 昭和56年9月).
13. Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. and Pallade, G.E.: Cytochemical studies of mammalian tissues. 1. Isolation of intact mitochondria from rat liver; Some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.* **172**, 619—636, 1948.
14. 小田琢三, 林 英生: ミトコンドリアの subfragments の調整法. *生体の科学*, **18**, 32—40, 1967.
15. Yamamoto, T. and Takeuchi, M.: Studies on Rous sarcoma virus in mice. 1. Establishment of an ascites sarcoma induced by Schmidt-Ruppin strain of Rous sarcoma virus in C3H/He mouse. *Jpn. J. Exp. Med.* **37**, 37—50, 1967.
16. Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M.: Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751—766, 1949.
17. Estabrook, R.W.: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:

- O ratios. *Methods Enzymol.* **10**, 41—47, 1967.
18. Chance, B. and Williams, G.R.: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. 1. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* **217**, 383—393, 1955.
  19. Yaginuma, K. and Koike, K.: Properties of a DNA-dependent ATPase from rat mitochondria. *Nucl. Acids Res.* **9**, 1949—1961, 1981.
  20. Ohnishi, T., Suzuki, T., Suzuki, Y. and Ozawa, K.: A comparative study of plasma membrane  $Mg^{2+}$ -ATPase activities in normal, regenerating and malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta* **684**, 67—74, 1982.
  21. Kitagawa, T. and Akamatsu, Y.: Control of passive permeability of chinese hamster ovary cells by external and intracellular ATP. *Biochim. Biophys. Acta* **649**, 76—82, 1981.
  22. Hatanaka, M., Huebner, R.J. and Gilden, R.V.: Alterations in the characteristics of sugar uptake by mouse cells transformed by murine sarcoma viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* **43**, 1091—1096, 1969.
  23. Hatanaka, M.: Transport of sugars in tumor cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **355**, 77—104, 1974.

**Oxidative phosphorylation of mitochondria in  
digitonin-treated permeable ascites sarcoma cells**

**Tsuguya SHIGEHARA**

**Department of Biochemistry, Cancer Institute,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director: Prof. T. Oda)**

Substrate-permeable cells were prepared by treatment of Rous Sarcoma virus-induced mouse ascites sarcoma cells (SR-C3H/He) with a low concentration of digitonin. Using relatively small amounts of the digitonin-treated permeable cells, mitochondrial functions such as a respiratory rate, respiratory control ratio(RCR), and ADP/O ratio of oxidative phosphorylation were easily measured by the oxygen electrode method. The permeable ascites sarcoma cell mitochondria had a slightly lower RCR and ADP/O ratio than mitochondria isolated from mouse liver and ascites sarcoma cells. This result was found to be mainly due to higher extramitochondrial  $Mg^{2+}$ -ATPase activity in the permeable ascites sarcoma cells. The effects of hexokinase and pyruvate kinase on the RCR and the ADP/O ratio were investigated by the additions of glucose and phosphoenolpyruvate as substrates, but these enzymes can not be the main factors in decreasing the RCR and the ADP/O ratio in the permeable ascites sarcoma cells since the glycolytic pathway was not continuous in these cells. The digitonin-treated permeable cell system is an extremely useful system for studying mitochondrial functions and their relations to other organelae and metabolic pathways under near *in vivo* conditions.