カドミウムの生体作用に対する実験的研究

第　1　報

ラット肝ミトコンドリアのヌクレオタイドに対するカドミウムの作用，及びK^+-遊出に対するカドミウムとランタンの相互作用

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

野　上　祐　作

（昭和54年10月26日受稿）

Key words：ミトコンドリア，ヌクレオタイド，カドミウム，K^+-遊出，ランタン

緒　言

カドミウムの生体作用については，慢性中毒症として肺気腫[1,2]，尿細管機能障害[3]等が認められ，急性効果としては，吸入による肺疾患[4]，経口によるおう吐や胃腸の痙れん[5]を引き起すといわれる．

Diamond ら[6]はカドミウムを慢性的に注射により投与したラット肝ミトコンドリアの呼吸調節能が低下することを報告している．また，Southard ら[7]はカドミウムを5mg/kg注射により投与したラットの4時間後における肝ミトコンドリアにカルシウムの蓄積がみられることを示した．

一方，in vitro において，カドミウムがミトコンドリアの酸化的リン酸化を脱共役することは古くから知られている[8),9)]．また，K^+-遊出作用を引き起すこと[10]，ATP ase の活性化をもたらすこと[11),12)]も知られている．これらの現象と平行して，カドミウムが ATP の加水分解を促進する時，ミトコンドリア内の AMP を増加させること[12]が報告され，緒方ら[13]は，その原因としてミトコンドリア内の ATP-ase 及び adenylate kinase の関与を示唆した．

このようなミトコンドリアに対する一連のカドミウムの作用は，カドミウムが生体内におけるカルシウム結合部位と密接な関連を持つことに起因すると考え，著者らは先に，カルシウム輸送の阻害剤といわれるルテニウム・レッドを用いて，カドミウムとの相互作用を検討した[14]．その結果，カドミウムによる酸化的リン酸化の脱共役作用がルテニウム・レッドによって抑制されることが判った．今回，著者は，ラット肝ミトコンドリアに ADP を添加し，呼吸が促進する状態においてカドミウムがヌクレオタイドの変動にどのような影響を及ぼすかについて検討を加えた．また，カルシウム結合部位に高い親和性を示し，カルシウム輸送を阻害するといわれるランタナイド[15]とカドミウムとの相互作用について，K^+-遊出の側面から検討した．

方　法

ミトコンドリアの分離

ドンリュウ系ラット（体重200～250g）の肝臓から Hogeboom-Schneider の変法[16]を用いて分離した．すなわち，0.25M庶糖，3mMTris-HCl buffer (pH 7.5)，0.2mM EDTA を用い，遠心分画法により分離し，氷冷した0.25M庶糖，3mMTris-HCl buffer (pH7.5) 中に懸濁した．ミトコンドリアの蛋白量は，ビューレット法により測定した．

試薬

使用した試薬は全て特級を用い，使用時に図に示した濃度になるよう調製した．

アデニンヌクレオタイドの測定

アデニンヌクレオタイドの反応は，0.15M KCl，10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) 1mℓにミトコンド

リアを加え，ADP 3 mMを添加して行った(反応温度30℃)．反応停止には，冷50%エタノールを使用した．

反応液中のヌクレオタイドは，ヌクレオジード5 NH_2カラムを装着した高速液体クロマトグラフィー(HITACHI 635)を用いて測定した．分析条件は，カラム圧75kg/cm²，移動相0.5MKH_2PO_4，流速0.8mℓ/min，検出器 UVphotometer (254nm) である．

無機リンの定量

反応液中に遊離してくる無機リン (Pi) の測定は，高橋氏法[17]によって行った．

K^+-遊出の測定

0.15M Choline-Chloride, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) の反応液3mℓ中にミトコンドリアを添加し，反応液中に遊出してくるK^+-をカリウム電極 (Beckman 社製) で，経時的に測定した．反応温度は25℃とした．

実　験　結　果

アデニンヌクレオタイドへのカドミウムの作用

ラット肝ミトコンドリア (1.5mg蛋白/mℓ) に $CdCl_2$ 100μM を作用されたときのアデニンヌクレオタイド及び Pi の経時的変化について図1に示した．最初，添加された ADP は急速に減少し，ATP 及びAMP の増加がみられた．その後，ATP も減少傾向を

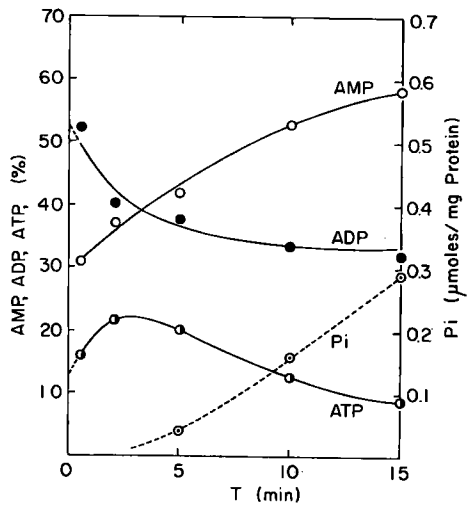


図1．Cd^{2+}によるアデニンヌクレオタイド及び Pi の経時的変化 ($CdCl_2$:100μM)
反応液，0.15M KCl, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) 1mℓに ラット肝ミトコンドリア (1.5mg Protein/mℓ) を加え，ADP 3 mMを添加した．反応温度は30℃とし，反応停止には，冷50%エタノール (V/V) を使用した．

示し，Pi の増加と共に ADP の減少割合が小さくなった．しかし，AMP の増加は継続した．なお，コントロールとの比較について，5分経過時点で表1

表1．反応5分後のヌクレオタイドの比較 (%)

	Control	$+Cd^{2+}$(100μM)
ADP	45.8	38.1
ATP	23.6	20.6
AMP	30.5	41.2

に示した．また，この現象がミトコンドリアの脱共役現象と共通したものであることが示唆されている[12]ため，典型的脱共役剤として知られる2,4-dinitrophenol(DNP)を用いて同様の実験を行った(図2)．DNP

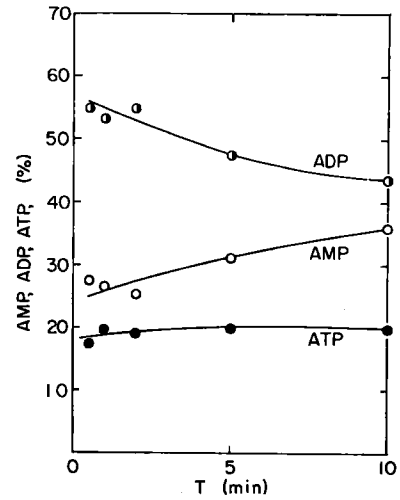


図2　DNPによるアデニンヌクレオタイドの経時的変化　反応条件は図1に同じ．

による AMP の増加現象は，同様にみられたが，カドミウムに比べて顕著ではなかった．

次に，アデニンヌクレオタイド及び Pi に対するカドミウムの濃度依存性について，図3に示す．AMP は，カドミウム濃度に依存して増加することが認められた．

K^+-遊出に対するカドミウムとランタンの相互作用

Cd^{2+}はミトコンドリア膜に作用し，ミトコンドリア内のK^+-を遊出させるが，生体膜に対するCd^{2+}の作用部位とCa^{2+}輸送に関連した部位とが密接に関係しているものと思われる．そこで，Ca^{2+}輸送を阻害するといわれるランタナイドのうち，La^{3+}とCd^{2+}とのミトコンドリア膜に対する相互作用を検討した (図4)．図4－AはCd^{2+}単独のK^+-遊出作用をみたもので，$CdCl_2$ 4.2μM/mg蛋白以上でのK^+-遊出速度は，

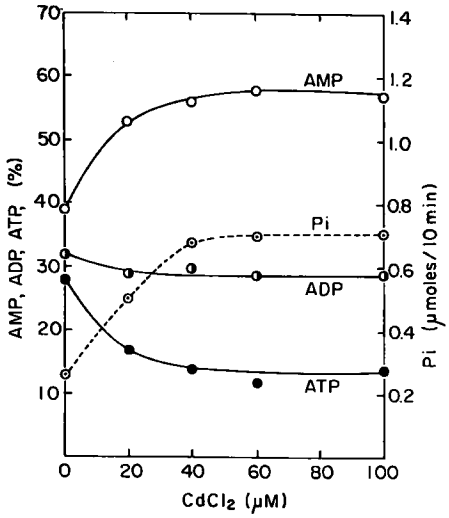


図3　アデニンヌクレオタイド及びPiに対するCd^{2+}の濃度依存性（反応時間：12分）反応条件は図1に同じ．

極めて速い．それに対して，$LaCl_3$を先に添加しておくと，図4－Bにみられる如く，遊出速度が遅くなることを示す．すなわち，先にミトコンドリア膜のCa^{2+}に親和性の高い結合部位にLa^{3+}が作用し，Cd^{2+}の作用を抑制していることが推定できる．

考　　察

アデニンヌクレオタイドへのカドミウムの作用

ミトコンドリア内の酵素系は，極めて複雑で，各種金属の作用も又，複雑と思われる．一方，ミトコンドリア内でのAMP生成機構に関しては，adenylate kinase系やGTP: AMP phosphotransferase系[18]などが考えられる．前者は，ミトコンドリア内に多量に存在し，しかも強い酵素活性を示すといわれている[19)20)]．カドミウムがAMPを生成促進するメカニズムとしては，このadenylate kinaseが関与することが十分考えられる．図1はADP添加時に，2ADP⇄ATP＋AMPによってATPとAMPが生

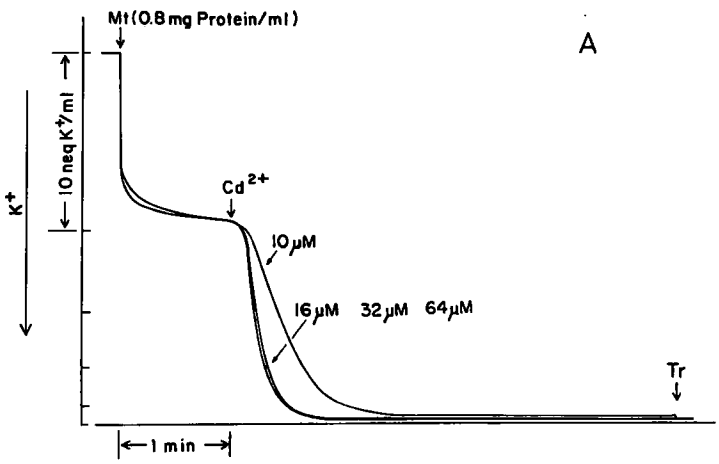
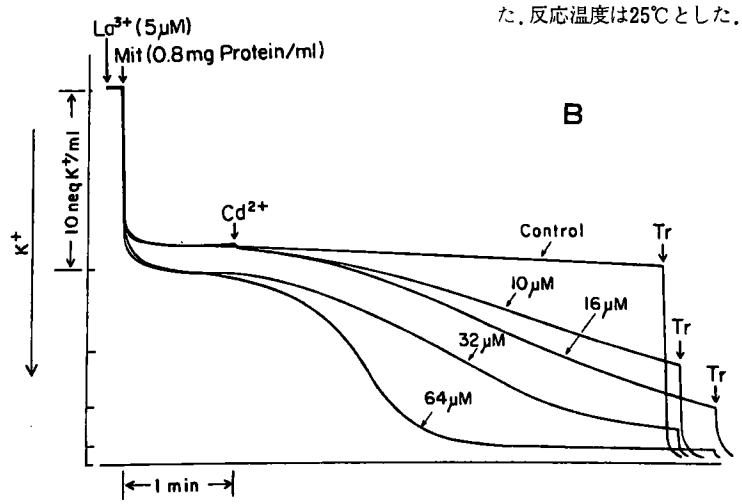


図4　Cd^{2+}によるK^+-遊出に対するLa^{3+}の作用
反応液，0.15M Choline chloride, 10mM Tris-HCl buffer（pH7.5）3 mℓにラット肝ミトコンドリア（0.8mgProtein/mℓ）を加えた．反応温度は25℃とした．



成することを示唆する．ATP が増加すると，活性化された ATPase が働き，，ATP→ADP+Pi により，ATP の減少，Pi の増加を伴うものと思われる．また，DNP による AMP の増加がカドミウムに比べ，顕著でないのは，DNP がGTP: AMP phosphotransferase を活性化すること[18]によって，AMP を減少させる方向に働くことなどが考えられる．このようにミトコンドリア内の adenylate kinase の活性化を考えることによって，AMP の生成促進現象を説明できるが，ATPase の活性化だけでも adenylate kinase 系の平衡のずれをひきおこし，AMP の生成は可能である．正確には，adenylate kinase の活性化と ATPase 活性による adenylate kinase 系の平衡のずれが同時に生ずるものと思われる．著者らが行った市販の筋肉 adenylate kinase を用いた実験では，Cd が AMP を増加する方向に平衡をずらす結果を得た[21]．このことから考えて，ATPase の活性化による平衡増加の他に adenylate kinase の活性化による平衡増加も否定できない．

しかし，ミトコンドリアの adenylate kinase がCd^{2+}によって活性化されるという直接の証明は，ミトコンドリアから adenylate kinase を抽出し，それを用いた実験結果を待たなければならない．

一方，AMP は解糖系における律速段階である hexokinase, phosphofructo kinase, pyruvate kinase の3段階のうち，phosphofructo kinase を活性化するといわれる[22]．Cd^{2+}によって，AMP が増加し，ATP, ADP, AMP などの存在比率が変動することは，一般的に，肝組織の代謝にも影響が及ぶものと考えられる[23]．従って，今後，生体内におけるアデニンヌクレオタイドの変動も検討する予定である．

K^+-遊出に対するカドミウムとランタンの相互作用

Ca^{2+}輸送を抑制するLa^{3+}がCd^{2+}によるミトコンドリア膜からのK^+-遊出作用を抑えることは，La^{3+}がCd^{2+}の生体膜に対する障害作用を抑制することを意味する．このことは，Cd^{2+}の生体膜に対する作用部位とLa^{3+}の作用部位に共通する部分が存在することを示唆する．

Mela[15]はランタナイドの高親和性の結合部位をランタナイドの特殊な機能により，ミトコンドリア膜のCa^{2+}キャリアと呼んでいる．ミトコンドリア内へのCd^{2+}輸送をLa^{3+}が阻止することによって，Cd^{2+}の障害作用を抑制するとすれば，Cd^{2+}輸送にCa^{2+}キャリアが関与していることは，十分予想される．

Ca 結合部位に親和性が高いといわれるルテニウム，レッドがやはりCd^{2+}によるK^+-遊出作用を抑制するという事実[24]と併せて考えると興味深い．また，酸化的リン酸化に対する検討もLa^{3+}自身の作用を考慮しながら，今後進める予定である．

結　　論

ラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応において，ADP 添加に伴う呼吸促進時におけるCd^{2+}によるミトコンドリアのアデニンヌクレオタイドに及ぼす影響を検討した．

その結果，

1）Cd^{2+}がミトコンドリア内の AMP を増大させること．

2）AMP の増加がCd^{2+}濃度に依存すること

3）この現象に，ミトコンドリアの ATPase, adenylate kinase の活性化が関与していると思われること

4）しかし，adenylate kinase の活性化については，ミトコンドリアからの adenylate kinase のの抽出を行い，さらに検討が必要であること

5）また，AMP の増加が解糖系の代謝変動を誘引するという新たな問題を提起すること

等が判明した．

6）また，ミトコンドリア膜のCa^{2+}結合部位に親和性の高いLa^{3+}とCd^{2+}の相互作用について，La^{3+}がCd^{2+}によるラット肝ミトコンドリア膜からのK^+-遊出作用を抑制すること

Cd^{2+}の生体膜作用にCa^{2+}輸送機構の関与が考えられること

等が判明した．

謝　　辞

稿を終わるにあたり御懇篤なる御指導，御校閲をいただきました恩師緒方正名教授に深甚の謝意を表します．また本実験を行うに当り御協力をいただいた教室員の方々に厚く感謝いたします．

なお，本論文の一部については，第52回日本産業衛生学会（1979）に於て発表した．

文　　献

1. Friberg, L.: Proteinuria and kidney injury among workman exposed to cadmium and nickel dust. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* **30**, 32−36, 1948.
2. Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G. F., and Kjellstrom, T.: *Cadmium in the Environment.* CRC Press, Cleveland, Ohio, 1974.
3. Friberg, L.: Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta Med. Scand.* **138**, Suppl. 240, 124, 1950.
4. Paterson, J. C.: Studies on the toxicity of inhaled cadmium. III. The pathology of cadmium smoke poisoning in man and in experimental animals. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* **29**, 294−301, 1947.
5. Nordberg, G. F.（訳：榎本悟）：カドミウム汚染による健康被害．公害と対策．**11**, 904−914, 1975.
6. Diamond, E. M., and Kench, J. E.: Effects of cadmium on the respiration of rat liver mitochondria. *Environ. Physiol. Biochem.* **4**, 280−283, 1974.
7. Southard, J., Nitisewojo, P., and Green, D. E.: Mercurial toxity and the perturbation of the mitochondrial control system. *Physiol. Adaptations Environ.* **33**, 2147−2153, 1974.
8. Jacobs, E. E., Jacobs, M., Sadani, D. R., and Bradley, L. B.: Uncoupling of oxidative phosphorylation by cadmium ion. *J. Biol. Chem.* **223**, 147−156, 1956.
9. Mustafa, M. G., and Cross, C. E.: Pulmonary alveolar macrophage. Oxidative metabolism of isolated cells and mitochondria and effect of cadmium ion on electron and energy-transfer reactions. *Biochemistry* **10**, 4176−4185, 1971.
10. 長谷川亨：環境汚染物質（重金属など）の生体膜に対する作用：第1報各種重金属イオンのミトコンドリア膜に対する作用，特にK^+区画性について，岡山医学会雑誌 **89**. 1−8, 1977.
11. 劒持堅志：ミトコンドリアのATPase活性に対するカドミウム，ルテニウムレッド及びカルシウムの相互作用．岡山医学会雑誌**90**, 251−256, 1978.
12. 飯田幸男：ミトコンドリアの酸化的燐酸化システムに関する研究II．諸種有機水銀化合物，及び重金属のラット肝臓ミトコンドリアへの影響についてのin vitroでの研究．日衛誌，**33**, 417−425, 1978.
13. Ogata, M., Hasegawa, T., Yamazaki, Y., and Nogami, Y.: Effect of cadmium on changes in concentration of adenine nucleotides induced by mitochondria. *Acta Med. Okayama* **32**, 387−392, 1978.
14. 長谷川亨，野上祐作，緒方正名：環境汚染物質（重金属など）の生体膜に対する作用，第3報カドミウムとルテニウムレッドの相互作用，特にミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対して，岡山医学会雑誌**89**, 1501−1505, 1977.
15. Mela, L.: Effect of Lanthanides and heavy metals on mitochondrial cation transport, In *Effects of metals on cells, subcellular elements, and macromolecules, ed.* Maniloff, J., Coleman, J. R., and Miller, M. W., Charles C Thomas Publisher, USA, pp235−251, 1973.
16. Utsumi, K.: Relation between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P in mitochondrial Pi fraction. *Acta Med. Okayama* **17**, 258−271, 1963.
17. 高橋泰幸：組織中の無機リン酸値とCreatine燐酸の定量法及び豚精子のphosphamidas Creatine phosphokinaseの作用について．生化学**26**, 690−698, 1955.
18. Tokumitsu, Y., and Ui, M.: The phosphorylaton of intramitochondrial AMP: A suggestion for the compartmentation of endogenous Pi pool. *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 325−339, 1973.
19. Sapico, V., Litwack, G., and Criss, W. E.: Purification of rat liver adenylate kinase isozyme II and comparison with isozymeIII. *ibid* **258**, 436−445, 1972.
20. Criss, W. E., Sapico, V., and Litwack, G.: Rat liver adenosine triphosphate: adenosine monophosphate phosphotransferase activity, I purification and physical and kinetic characterization of adenylate kinase III. *J. Biol. Chem.* **245**, 6346−6351, 1970.

21. 緒方正名，野上祐作，山崎吉郎，長谷川亨：各種重金属によるミトコンドリアのアデニンヌクレオタイドの変動．第52回日本産業衛生学会講演集，164－165，1979．
22. 中沢淳：ヌクレオチドによる調節．蛋白質核酸酵素22，1739－1748，1977．
23. Sporn, A., Dinu, I., and Stoenescu, L.: Influence of cadmium administration on carbohydrate and cellular energetic metabolism in the rat liver. *Rev. roum. Biochim.* **7**, 299－305, 1970.
24. 長谷川亨：環境汚染物質(重金属など)の生体膜に対する作用，第4報カドミウムによるミトコンドリアのK^+遊出作用及びカドミウムのミトコンドリア膜への結合に対するルテニウムレッドの作用．岡山医学会雑誌 89，1507－1510，1977．

The influence of cadmium on adenine nucleotide concentration and the effect of lanthanium on K^+-release of rat liver mitochondria induced by cadmium

Yusaku NOGAMI

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director : Prof. M. Ogata)

The influence of cadmium (Cd^{2+}) on adenine nucleotide concentration in a reaction mixture consisting of rat liver mitochondria and ADP was studied using high performance liquid chromatography. The results were as follows: An increase in AMP concentration was brought about by the addition of Cd^{2+}. This increase in AMP concentration occurred in parallel with increase in Cd^{2+} concentration. The appearance of AMP was thought to be due to an ATPase reaction and an adenylate kinase reaction stimulated by Cd^{2+} although further studies on the adenylate kinase reaction stimulated by Cd^{2+} are needed. An increase in AMP may influence metabolism via glycolysis. As lanthanium (La^{3+}) is related to Ca^{2+}-binding sites, the effect of La^{3+} on the K^+-release of rat liver mitochondria induced by Cd^{2+} was also studied. The results were: K^+-release induced by Cd^{2+} was inhibited by La^{3+}. The Cd^{2+}-binding site was thought to be related to the Ca^{2+} carrier of mitochondria.