

# 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

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: 緒方正名教授)

劔 持 堅 志

(昭和52年11月8日受稿)

## 1 緒 言

カドミウムによる慢性中毒は神通川下流域におけるイタイタイ病の発生以来注目を集めている。カドミウムによる慢性中毒症状としては、アミノ酸尿、低分子蛋白尿、高カルシウム尿症などが認められている<sup>1)</sup>さらにイタイタイ病は骨軟化症及び高カルシウム尿症を主症状としている<sup>2)</sup>

一方生体にカドミウムを投与した場合、まず肝臓中のカドミウム量が増加し、ついで腎臓中のカドミウム量が増加すると報告されている<sup>3)</sup>長期間カドミウムをラットに経口投与した場合、肝臓には対照群の約1000倍、腎臓には約800倍のカドミウムが蓄積したと報告されている<sup>4)</sup>またラットの腹腔内にカドミウムを注射した場合、肝臓に投与量の約40%、腎臓に約7%のカドミウムの蓄積が見られたという例もある<sup>5)</sup>一方カドミウムを投与したラットに<sup>45</sup>Caを投与した場合、カドミウム投与群のラットにおいて $Mg^{2+}+Ca^{2+}$  ATPase 活性の減少とともに血清中<sup>45</sup>Ca濃度の減少が見られるという報告<sup>6)</sup>があり、カドミウムはカルシウム代謝に対して何らかの影響をおよぼしているものと思われる。

我々はこのような事例に着目し、ラットの肝臓に対してカドミウムが如何なる作用をおよぼすかをまず肝ミトコンドリアにおける ATPase 活性<sup>7)</sup>を測定することにより検討を加えた。その結果カドミウムとカルシウムがミトコンドリアの ATPase 活性に対して強い相互作用を持つことを見出したのでここに報告する。

## 2 実験方法

### 2-1 ミトコンドリアの分離

体重200g前後のドンリュウ系ラットの肝よりミトコンドリアを分離して実験に供した。ミトコンドリアの分離は Hogeboom, Schneider の変法<sup>8)</sup>で分離した。分離液には0.25 M sucrose, 3 mM tris-HCl (pH 7.5) buffer, 0.1 mM EDTA 溶液を用いた。そして最終的に0.25 M sucrose, 3 mM tris-HCl (pH 7.5)に懸濁し実験に供した。なおミトコンドリアの蛋白量の測定は Biuret 法によった。

### 2-2 試薬

試薬は全て特級を使用し、金属塩には塩化物を使用した。ルテニウムレッドは和光純薬製を、ATP はシグマ社製を使用した。

### 2-3 ATPase 活性の測定

ATPase 活性の測定は0.15 MKCl, 10 mM tris-HCl (pH 7.5) buffer の反応液中に終末濃度2.5 mM の ATP 及び約3 mg のミトコンドリア試料を添加し、25℃10分間インキュベートした後、終末濃度8%の氷冷過塩素酸を添加して反応を停止させた。そして反応液を遠心分離した後、上清中の無機リン酸を高橋氏の方法<sup>11)</sup>で比色定量した。

## 3 実験結果

### 3-1 ATPase 活性に対するカドミウムの作用

潜在性 ATPase 活性に対して Cd<sup>2+</sup>がどのような作用を有するか検討した。反応液中に CdCl<sub>2</sub> を終末濃度 1~10 μM になるように添加し、その ATPase

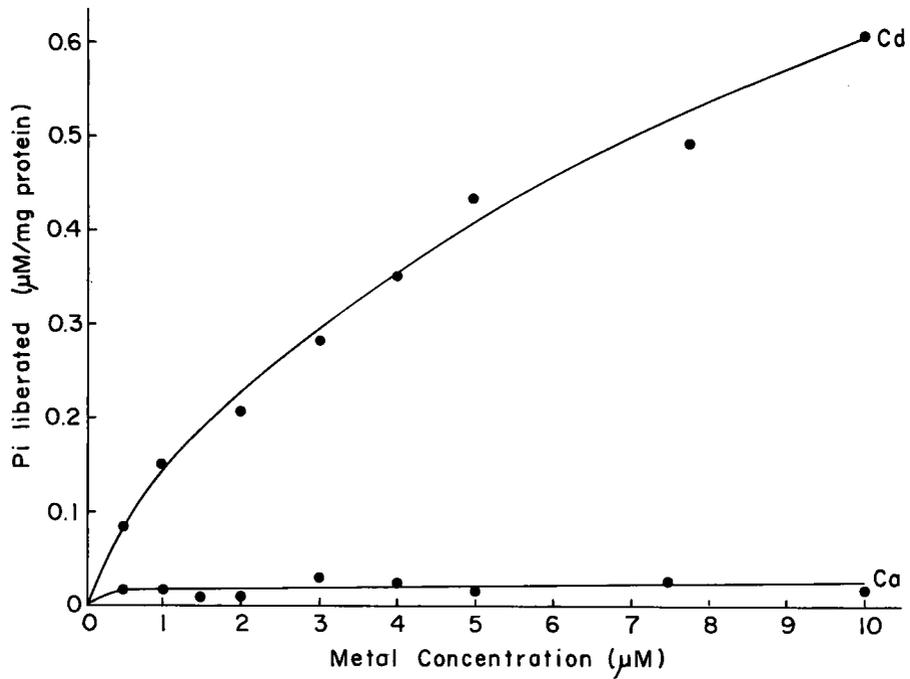


Fig. 1 The effects of cadmium and calcium on the latent ATPase activity.

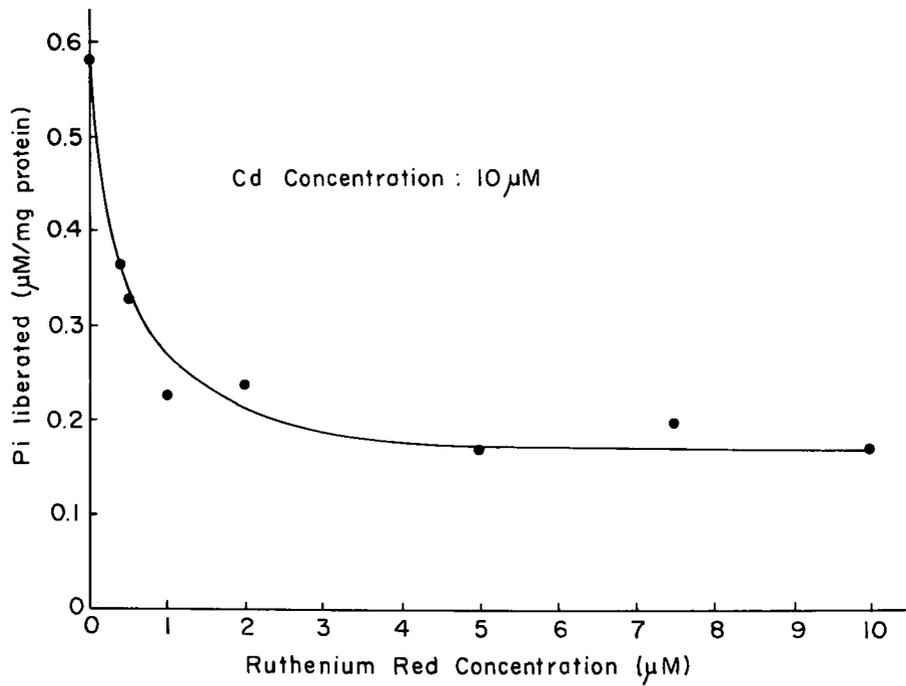


Fig. 2 The effect of ruthenium red on the ATPase activity induced by cadmium.

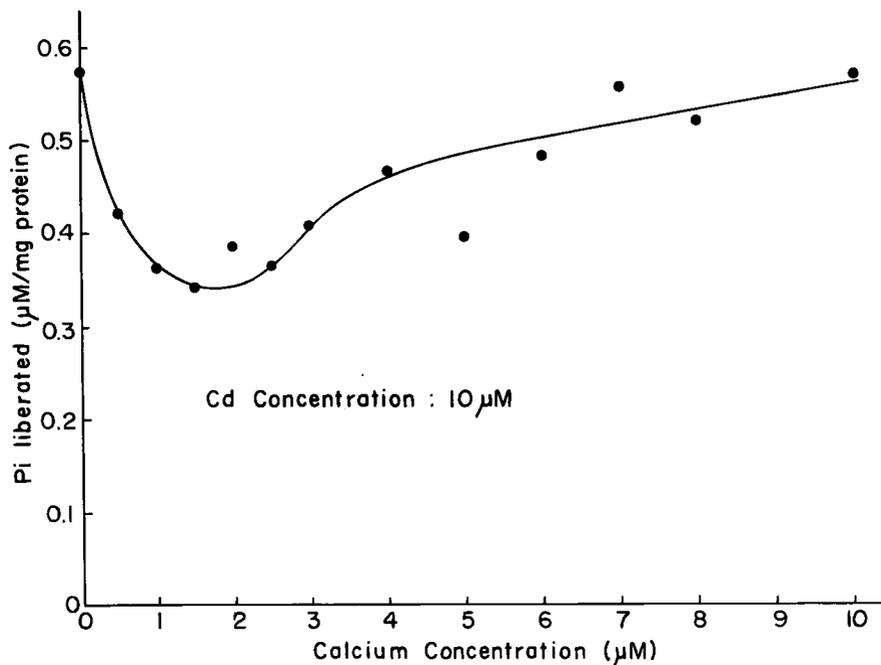


Fig. 3 The effect of calcium on the ATPase activity induced by cadmium.

活性を測定した。その成績は図1に示す如くである。すなわち  $\text{Cd}^{2+}$ による ATPase 活性は  $\text{Cd}^{2+}$ 濃度の増加とともに増加している。このことから  $\text{Cd}^{2+}$ はミトコンドリアの潜在性 ATPase 活性を活性化させる作用を有することが確認された。また  $\text{Cd}^{2+}$ によって活性化される ATPase 活性は  $\text{Cd}^{2+}$ 濃度に対して濃度依存性を持つことが確認された。

### 3-2 ATPase 活性に対するカルシウムの作用

同様の方法で潜在性 ATPase 活性に対する  $\text{Ca}^{2+}$ の作用を検討した。その成績は同じく図1に示す如くである。すなわち  $1 \sim 10 \mu\text{M}$ の濃度範囲において、 $\text{Ca}^{2+}$ は潜在性 ATPase 活性に対してほとんど作用を示さない。

### 3-3 ATPase 活性に対するカドミウムとルテニウムレッド(RR)の相互作用

$\text{Cd}^{2+}$ と  $\text{Ca}^{2+}$ のミトコンドリアに対する相互作用を検討するため、 $\text{Cd}^{2+}$ によるミトコンドリアの酸化的リン酸化の脱共役作用を完全に抑制すると言われているルテニウムレッド(RR)<sup>12)</sup>を用いて ATPase 活性を測定した。すなわち  $\text{Cd}^{2+}$ 濃度を  $10 \mu\text{M}$ 一定に定め、RRの濃度を  $1 \sim 10 \mu\text{M}$ まで増加させ、 $\text{Cd}^{2+}$ によって活性化された ATPase 活性に対して RRがどのような作用を有するか検討した。その成

績は図2に示す如くである。

$\text{Cd}^{2+}$ によって活性化される ATPase 活性は RRの濃度の増加に従って抑制される。しかし  $5 \mu\text{M}$ 以上の濃度においては、その抑制は一定値を示した。以上の成績によって  $\text{Cd}^{2+}$ によって活性化された ATPase 活性は  $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位修飾剤である RR<sup>13)</sup>によって阻害を受けることが明らかとなった。

### 3-3 ATPase 活性に対するカドミウムとカルシウムの相互作用

上述の実験により  $\text{Cd}^{2+}$ による ATPase 活性は  $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位と関連があることが示唆されたので、 $\text{Cd}^{2+}$ による ATPase 活性に対する  $\text{Ca}^{2+}$ の直接相互作用を検討する意味で、 $\text{Cd}^{2+}$ 濃度を  $10 \mu\text{M}$ 一定に定め、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を変動させてその ATPase 活性を測定した。その成績は図3に示す如くである。

すなわち  $\text{Cd}^{2+}$ による ATPase 活性は  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増加とともに抑制され、その抑制は  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度  $2 \mu\text{M}$ で最大となり、その後  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増加とともに ATPase 活性が回復することが見いだされた。

## 4 考 察

慢性カドミウム中毒において見られる高カルシウム尿症、骨塩の体謝異常、またイタイイタイ病にお

ける骨軟化症など、カルシウムとカドミウムの生体に対する相互作用の存在を伺わせる例は多い<sup>14)</sup>しかしその生理的メカニズムはいまだ不明の点が多く更に一層の検討が必要とされている。この点に関してカドミウムが肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化を脱共役させ、また $K^+$ を遊出させる作用を有していることが報告されている<sup>15)</sup>更にこの事実を明らかにする意味で酸化的リン酸化の逆反応である ATPase 活性を測定した。

今回の実験によりカドミウムはミトコンドリアの潜在性 ATPase 活性を脱共役させ、またカルシウムと強い相互作用を営むことが示された。以下詳述すれば次の如くである。

図 2 において、カドミウムによる ATPase 活性は  $Ca^{2+}$  結合部位修飾剤であるルテニウムレッドによって抑制されている。この結果はカドミウムの酸化的リン酸化に対する脱共役作用をルテニウムレッドが抑制する<sup>16)</sup>という事実と一致する。このことは  $Cd^{2+}$  の ATPase 活性作用部位が  $Ca^{2+}$  結合部位と関連していることを示唆するものと思われる。

$Cd^{2+}$  による ATPase 活性はルテニウムレッドによって完全には抑制されなかった。このことは  $Cd^{2+}$  の ATPase 活性作用部位が  $Ca^{2+}$  結合部位以外にも存在しているためと思われる。(例えば長谷川の報告した SH 基などが考えられる<sup>17)</sup>)

図 3 において  $Ca^{2+}$  によって  $Cd^{2+}$  による ATPase 活性が抑制されているが、このことは  $Ca^{2+}$  の結合部位と  $Cd^{2+}$  の ATPase 活性作用部位が関連してい

ることを一層強く示唆するものである。これに関連して呼吸による  $Ca^{2+}$  の能動輸送が  $Cd^{2+}$  によって抑制されるという事実を野上が見出したが<sup>18)</sup>この結果の詳細は現在検討中である。また図 3 において  $Ca^{2+}$  濃度の増加によって ATPase 活性が再び増加しているが、この事実については現在検討中である。

## 5 結 論

潜在性 ATPase 活性に対するカドミウムとルテニウムレッド及びカルシウムの相互作用を検討し次の成績を得た。

- (1)  $Cd^{2+}$  による ATPase 活性は  $Cd^{2+}$  の濃度に依存して活性化された。そして  $Cd^{2+}$  はミトコンドリアの酸化的リン酸化を脱共役させる作用を有することが確認された。
- (2)  $Cd^{2+}$  による ATPase 活性は  $Ca^{2+}$  結合部位修飾剤であるルテニウムレッドにより阻害された。
- (3)  $Cd^{2+}$  による ATPase 活性は  $Ca^{2+}$  により阻害された。
- (4) これらの結果からミトコンドリアにおける  $Cd^{2+}$  の ATPase 活性作用部位は  $Ca^{2+}$  結合部位と密接な関係があることが示唆された。

本論文を撰筆するに当り、御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜った恩師緒方正名教授に深甚の謝意を表します。また本実験を行なうに当り懇切なる指導を賜った岡山大学公衆衛生学教室長谷川亨先生に厚く感謝いたします。

## 6 文 献

- 1) 三浦豊彦他, :「新労働衛生ハンドブック」, :労働科学研究所, 東京, 787-789, 1974.
- 2) Thines, C. H. and Haley, T. J.: Clinical Toxicology, : Lea & Febiger, Philadelphia, 187-188, 1972.
- 3) 4) 5) 早津彦哉他, :生体濃縮, :講談社, 東京, 41-42, 1975.
- 6) 菅原直毅, 菅原千枝子, 三宅浩次, :小腸刷子緑酵素とカルシウム吸収に対するカドミウムの作用, :産業医学, 23, 29-30, 1974.
- 7) Cereiyo-Santaro, R: Mitochondrial permeability and ATPase activity, :Canad. J. Biochem. 45, 897-909, 1967.
- 8) Cereiyo-Santaro, R: Monovalent Cations and mitochondrial ATPase activity, :Canad. J. Biochem. 46, 55-61, 1968.
- 9) Utsumi, K: Reaction between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of  $P^{32}$  in mitochondrial Pi fraction, : Acta Med. Okayama. 17, 259-271, 1963.

- 10) Layne, E: Method in Enzymal., Ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. Academic Press, New York : 3, 447, 1963.
- 11) 高橋, : 組織中の無機リン酸値と Creatine 麟酸の定量法及び豚精子の phosphamidas Creatine phosphakinase の作用について, : 生化学, 26, 690—698, 1955.
- 12) 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に対して, : 岡山医学会雑誌, 投稿中.
- 13) Utsumi, K: Acta Med. Okayama, 17, 259—271, 1963.
- 14) 三浦豊彦他, : 「新労働衛生ハンドブック」, : 労働科学研究所, 東京. 787—789, 1974.
- 15) 長谷川亨, : 環境汚染物質の生体膜に対する作用, : 岡山医学会雑誌, 89, 1—8, 1977.
- 16) 長谷川亨, 野上祐作, 緒方正名, : 環境汚染物質(重金属など)の生体膜への作用, 第3報: 岡山医学会雑誌, 投稿中.
- 17) 長谷川亨, : 岡山医学会雑誌, 89, 1—8, 1977.
- 18) 野上祐作, : 未発表.

**The mutual effects of Cd<sup>2+</sup>, ruthenium red and Ca<sup>2+</sup>  
on the mitochondrial latent ATPase activity**

**by**

**Katashi KENMOTSU**

**Department of Public Health, Okayama University Medical School**

**(Director : Prof. Masana Ogata)**

The mutual effects of Cd<sup>2+</sup>, ruthenium red and Cd<sup>2+</sup> on the rat liver mitochondrial latent ATPase activity were studied and the following results were obtained.

- (1) The mitochondrial latent ATPase activity was stimulated by Cd<sup>2+</sup>, and higher concentration of Cd<sup>2+</sup> added to the reaction mixture showed higher ATPase activity.
- (2) The ATPase activity induced by Cd<sup>2+</sup> was inhibited by ruthenium red, having the high affinity for the Ca<sup>2+</sup>-binding site of mitochondria.
- (3) The ATPase activity induced by Cd<sup>2+</sup> was also inhibited by Ca<sup>2+</sup>.
- (4) In conclusion, the site of mitochondria, on which Cd<sup>2+</sup> activates latent ATPase, will be related with the Ca<sup>2+</sup>-binding site of mitochondria.