

脂肪酸によるラット肝及び癌細胞 mitochondria の swelling と contraction について

岡山大学医学部癌源研究所代謝部門 主任：山本道夫教授

浦 上 博 之

〔昭和37年11月12日受稿〕

先に著者¹⁾はX線照射家兎肝より抽出した不飽和脂肪酸分画が正常ラット肝 mitochondria に対して極めて強い swelling 作用があり、同時に mitochondria の酸化的磷酸化を阻害する事を報告した。この現象と関連し教室の大原²⁾はX線照射家兎臓器の磷脂質に変動が起り、特に lysophosphatide が増加し、また lysolecithin が mitochondria の酸化的磷酸化を阻害する事を明らかにした。さらに又、教室の稲葉³⁾はX線照射担癌動物 (Ehrlich 腹水癌細胞) の腹水中に Ehrlich 癌細胞の酸化的磷酸化を阻害する物質が発生し、それが lipid fraction にある事を究明した。此る教室における一連の研究から明らかな如く脂質がもつ生物学的活性には極めて興味あるものがあり、これと癌細胞の内発呼吸の基質が脂質である事を考え併せ、脂質の生物学的作用を究明する事は癌細胞の代謝を知る上にも必要な事と考えられる。著者はこの脂質の生物作用の一側面である mitochondria の swelling 作用に注目し、種々脂肪酸のラット及びマウス肝、Ehrlich 腹水癌細胞の mitochondria の swelling に及ぼす影響について研究し、得られた結果について報告する。

材料及び方法

材料：実験に使用した mitochondria は Hogeboom & Schneider⁴⁾、あるいは萩原⁵⁾等の方法に基き、ラット肝、マウス肝及び Ehrlich 腹水癌細胞 (移植後9日目の腹水型、及び筋肉内移植後20日目の固型癌) より分離したもの、更に Lehniger⁶⁾等の方法に従い上記の方法で分離した mitochondria をさらに3回 0.25 M sucrose 液にて洗滌したもので、それ等 mitochondria を 0.25 M sucrose に suspend し (ラット肝は 1g 組織量の mitochondria を 2cc に Ehrlich 癌では 1g 細胞当りの mitochondria を 0.4cc に) stock mitochondrial suspension とした。

実験に使用した脂肪酸は東京化製の lauric acid,

myristic acid, stearic acid, parmitic acid, oleic acid, elaidic acid, richinoleic acid, linoleic acid, linolenic acid, docosanoic acid で、教室において更に精製したものであり、ATP は Sigma 社のもの、antimycin A は Sigma 社の、azide, KCN は片山化学の、amytal は山之内製薬のものを使用した。

これら試薬はすべて 0.15 M KCl-0.02 M Tris buffer にて (pH 7.4) 稀釈し、使用した。

又脂肪酸は Na 塩として使用した。

方法：

1. mitochondria の swelling test : 主として Lehniger⁶⁾の方法に基いた。即ち、0.25 M sucrose-0.02 M tris buffer、あるいは 0.15 M KCl-0.02 M Tris buffer pH 7.4 の液 4.85~4.4 ml 中に同じ液で稀釈した 1~4 mM 脂肪酸の 0.05~0.5 ml を加え (終末濃度 0.1~0.4 mM)、これに stock mitochondria 0.1 ml を加え、ただちに Bechman 分光光度計にて 520 m μ の波長で吸光度の変化を5分間隔で記録し、swelling test の測定曲線を求めた。なお、脂肪酸の濃度は実験目的に応じて変化せしめた。又吸光度測定時の温度は 37°C とした。脂肪酸による mitochondria の swelling 阻害の実験には amytal (1 mM) antimycin A (10 γ /5 cc) azide (5 mM) KCN (1 mM) を加え測定するか、あるいはツンベルグ管中で N₂ ガスで置換して測定した。又脂肪酸により swelling した mitochondria の contraction の実験には test system 中に 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 2 mg/ml の牛血清アルブミン (B. S. A.) を添加し 520 m μ の吸光度の変化を求めた。

2. 酸化的磷酸化阻害実験：分離 mitochondria の呼吸に対する脂肪酸の影響はワールブルグ検圧法にて次の incubation mixture 中で行なつた。

主室：1.92 ml mitochondrial suspension (1g 肝組織当りの mitochondria/5 ml)

0.3 ml, 0.04 M コハク酸ソーダ

0.3 ml Krebs Ringer phosphate solution
(KRP)

副室: 0.2 ml 20% KOH

側室: 0.28 ml 0.4~1 mM Na-oleate
(対照実験には生理的食塩水)

気相は空気 38°C にて測定した。

mitochondria の $\Delta 10P$ えの P^{32} の取込に対する脂肪酸の影響は次の incubation mixture 中にて test した。

2.6 ml 0.15 M KCl-0.02 M Tris buffer pH 7.4

2.5 ml stock mitochondrial suspension

0.6 ml 4~1 mM Na-oleate (対照には生食)

0.3 ml P^{32} を 10 μ C 含む KRP 液

気相は空気 20°C, 30 分 incubate し直ちに氷冷, 0°C において 14000×g にて遠心分離し, 0.25 M sucrose にて洗滌後沈渣に 5% TCA 3.0 ml を加え 0°C, 30 分放置し, 700×g にて遠心分離し, その上清 1 ml をとり高橋氏法⁷⁾ にて P_i 及び P^{32} の放射能を測定, さらに上清 1 ml に 1.5N H_2SO_4 1 ml を加え 100°C, 10 分加熱し, 高橋氏法にて P_i , P^{32} の放射能を測定し, $\Delta 10P$ の測定を行なった。

3. mitochondria 酸溶性磷酸化合物えの P^{32} の取込阻害: 脂肪酸による mitochondria の酸溶性磷酸化合物分画えの P^{32} の取込阻害を調べるためラット肝 mitochondria を次の incubation mixture にて 25°C, 30 分 incubate し, 寺田⁷⁾ の方法に従い, 酸溶性分画を分り Dowex 1 (×4, 200~400 mesh) の formate 型に吸着せしめ, 蟻酸, 蟻酸アンモンにて溶出し, 各分画をフラクションコレクターにて採取し, その中の P^{32} の放射能を測定した。

incubation mixture は

3 ml 0.25 M sucrose に suspend した 5 g 肝組織に相当する mitochondria

1 ml KRP 液 pH 7.4 (100 μ C の P^{32} を含む)

1 ml 0.2 M コハク酸ソーダ

5 ml 0.15 M KCl-0.02 M Tris buffer pH 7.4 にて希釈した 1~4 mM Na-oleate

(対照には Na-oleate を外いた液)

である。

5. 磷酸化合物えの P^{32} の取込阻害: Na-oleate による mitochondria の organic-phosphate compound えの P^{32} の取込阻害の実験には次の incubation mixture に 25°C 30 分間 incubate し, Schmidt-Thanhauser-Schneider⁹⁾ 法にて P_i +acid soluble phosphate compound, phospholipid, RN-phosphate,

phosphoprotein 分画に分け高橋氏法⁷⁾ 及び Allen⁷⁾ 法にて P_i の定量を, P^{32} の放射能は GM counter (神戸工業 131 型) にて測定した。

incubation mixture は

0.5 ml Na-oleate 10 mM (0.15 M KCl-0.02 M Tris にて希釈)

4.5 ml 0.15 M KCl-0.02 M Tris buffer pH 7.4

3 ml 0.25 M 中に suspend した 5 g 当りのラット肝 mitochondria

1 ml P^{32} 100 μ C を含む KRP 液

1 ml 0.2 M コハク酸ソーダ

を使用した。

6. mitochondria 内 K 含量の測定: 脂肪酸による mitochondria の swelling にもなう mitochondria 内 K 量の変動を測定する目的で次に示す incubation mixture に 25°C 30 分 incubate し, 0.25 M sucrose にて 2 回洗滌し, 沈渣 mitochondria を 2 ml の脱イオン水に suspend し, よく攪拌し, その 0.1 ml を tween 80, 0.08 ml と共に攪拌, 脱イオン水にて 5 ml に volume up し蛍光光度計にて K 量の測定を行なった。

incubation mixture は

2 ml 0.15 M KCl-0.02 M Tris buffer pH 7.4 に 400 mg ラット肝組織量の mitochondria を suspend したもの

2 ml 0.2 mM Na-oleate (0.15 M KCl-0.02 M Tris buffer にて希釈したもの, 対照には oleate を除いたもの)

である。

7. 血清蛋白と oleic acid の結合:

脂肪酸は蛋白と結合し lipoprotein を形成する事が考えられ, その結合状態を観察する目的で牛血清と Na-oleate を 10:1 の割合で混じ 25°C 30 分間マグネチックスターラーにてよく攪拌し (対照には牛血清と生食 10:1 の割合で混合し同様に攪拌する) pH 8.4 の veronal buffer ($\mu=0.1$) を泳動溶媒とし, 110 V にて濾紙電気泳動を行ない, BPB 及び Sudan black B にて染色し, デンシトメーターにて各蛋白分画の変化を調べた。

実験結果

1. 脂肪酸による正常ラット肝及び Ehrlich 腹水癌細胞 mitochondria の swelling:

脂肪酸は一般に mitochondria あるいは細胞の酸化的磷酸化を uncouple するといわれ, 又生物膜構造に

破壊的に作用する事が知られている¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。この事は mitochondria の swelling を誘起する事を示唆する。又炭素数12~22の飽和酸及び炭素数18の不飽和酸 (0.1 mM) による正常ラット肝 mitochondria の swelling の度合を比較して見ると、図1及び表1の如くである。即ち、飽和酸について見ると炭素数14の myristic acid が swelling 作用最も強く、lauric (C₁₂), palmitic (C₁₆), stearic (C₁₈), docosanoic (C₂₂) acid の順に作用は弱い。一方炭素数18の不飽和脂肪酸について比較すると、linoleic acid が最も作用強く、linolenic acid, richinoleic acid の順に作用は弱い。これらは cis 型であるが oleic acid の trans 型である elaidic acid は oleic acid よりさらに swelling 作用は弱い。然し、これら不飽和酸の cis 型, trans 型の差も 37°C 30 分の incubation においてはすべて同程度の swelling 作用が示され、各脂肪酸での kinetics を異にするといえる。又不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸を比較する時、明らかに不飽和脂肪酸の swelling 作用が強い事はすべての不飽和脂肪酸についての共通な所である。

今 oleic acid に例をとり、これら mitochondria

Fig 1. The mitochondrial swelling stimulating activities of saturated fatty acids as function of carbon chain length.

Standard test system (5cc) contained 0.25 M sucrose, 0.02 M Tris, pH 7.4, and 50 mg tissue equivalent rat liver mitochondria were added. Saturated fatty acids were added at 0.1 mM and the decrease of optical density at 520 m μ at 37°C was observed.

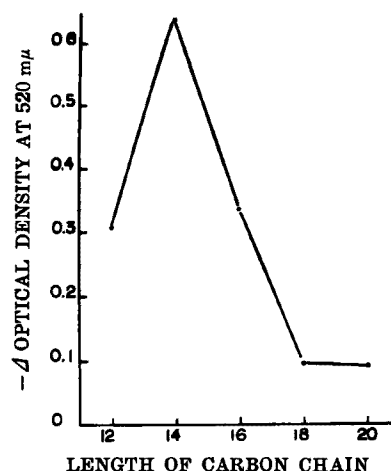


Table 1. The effect of unsaturation on mitochondrial swelling activity of C₁₈ fatty acids

Acid	Unsaturation	Rate of Δ OD at 520 m μ at 5 minutes		Rate of $-\Delta$ OD at 520 m μ at 10 minutes	
		0.1 mM	0.0025%	0.1 mM	0.0025%
Stearic	None	1.84	2.5	9.8	8.0
Oleic	9, cis	50.2	41.2	83.8	68.8
Elaidic	9, trans	10.3	8.5	60.0	49.2
Richinoleic	9,	56.1	40.6	76.7	63.8
Linoleic	9, 13, cis	92.1	76.3	93.4	77.6
Linolenic	9, 13, 17, cis	80.4	67.0	91.8	68.0

の swelling 作用をその濃度及び時間的 520m μ の吸光度変化で観察すると、図2, 3に示す如く oleic acid 濃度の増加にともない swelling 作用は強く、特に初速度が早くなる。然し Lehninger⁶⁾ 等も示す如く incubation medium を 0.25 M sucrose-0.02 M Tris buffer pH 7.4 にすれば swelling の度合は強く阻害され、0.15M KCl 中で 0.04 mM oleic acid により swelling する mitochondria も 0.25M sucrose 中ではほとんど swelling は示されない。次に glutathione, cysteine, Co-A の如き還元剤による swelling 以外の他の試薬による多くの mitochondrial swelling は ATP, Mg⁺⁺, B. S. A. で強い contraction を示す事が明らかにされているが¹³⁾¹⁴⁾, oleic acid

により swelling せしめられた mitochondria もこれら ATP, Mg⁺⁺, B. S. A. により contraction が示され(図4), 又あらかじめ B. S. A. や ATP を加えた medium 中では oleic acid 添加による swelling は阻害される。扱この様に oleic acid は正常ラット肝 mitochondria に対し強い swelling 作用を示すが正常マウス肝, Ehrlich 癌(腹水型, 固型癌) mitochondria に対する oleic acid の swelling 作用を比較して見ると、図5に示す如く、正常マウス肝 > 担癌マウス肝 > 腹水型 Ehrlich 癌 > 固型 Ehrlich 癌の順に swelling は強く、固型癌に於てはむしろ mitochondria の contraction が示される。勿論この様な mitochondria はそれぞれ吸呼活性を異にし癌

Fig 2. The effect of oleic acid on the mitochondrial swelling in the medium of 0.15 M KCl-Tris buffer (PH 7.4) solution at 20°C.

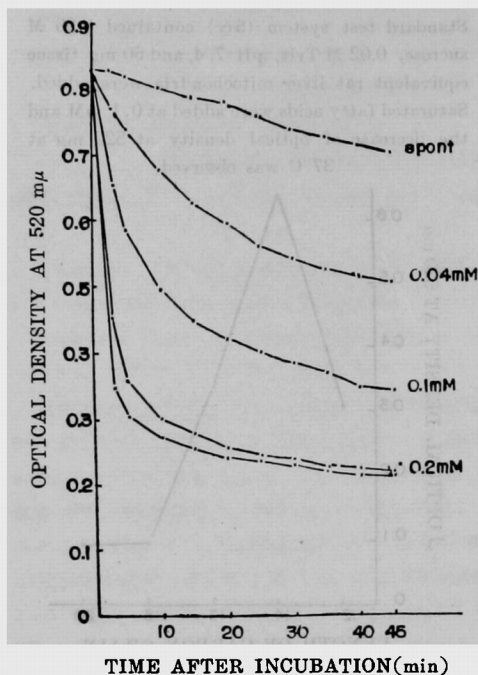
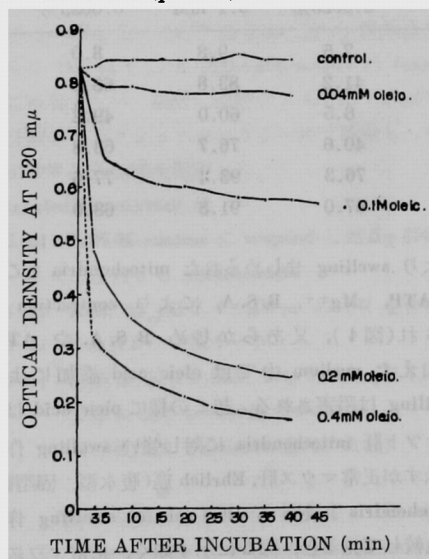


Fig 3. The effect of oleic acid on the mitochondrial swelling in the medium of 0.25 M sucrose-Tris buffer (pH 7.4) solution at 20°C.



細胞のそれは極めて弱く、一見呼吸活性と swelling の度合は平行している様である。この様な現象は多くの人々¹⁵⁾¹⁶⁾が示唆している如く、mitochondria

Fig 4. Reversal of oleic acid inducing swelling of mitochondria by ATP and serum albumin in KCl medium.

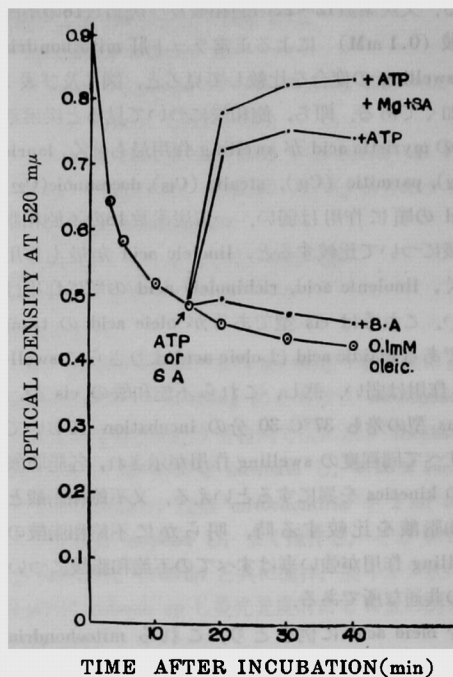
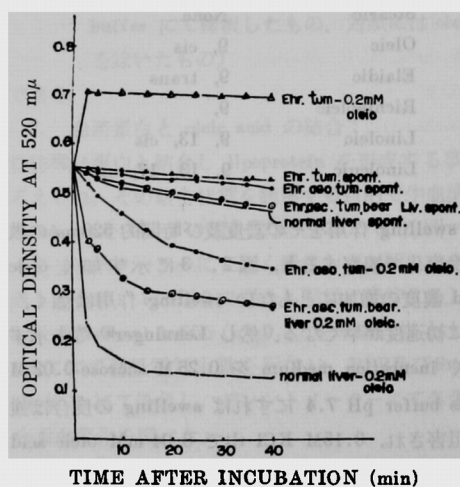


Fig 5. The effect of oleic acid (0.2mM) on the mitochondrial swelling of Ehrlich ascites tumor cell (solid and ascites types), tumor bearing mice liver and normal mice liver.



の swelling と呼吸は極めて密接に関係している事からも考え得る所である。この様な理由から oleic acid によるラット肝 mitochondria の swelling に対し呼吸阻害剤がどの様に作用するかを実験測定し

Table 2. Effects of respiratory inhibitors on the swelling of mitochondria in various substrates. The medium was consisted with 0.15 M KCl-0.02 M Tris pH 7.4 and 50 mg tissue equivalent rat liver mitochondria. Substrates and inhibitors present at zero time and incubated at 20°C 30 minutes. The data indicates the rate of absorbancy at 520 mμ.

substrate	non	amytal (1×10 ⁻³ M)	ant. A(107/5ml)	azide(5×10 ⁻³ M)	CN-(10 ⁻³ M)	anaerob.
non	89.0	79.5 (A)	89.0	92.0 (I)	92.0 (I)	
BOH (3×10 ⁻³)	73.1 (A)	95.2 (I)	79.5 (I)	88.5 (I)	86.2 (I)	
succinate (〃)	85.2 (A)	86.7 (I)	98.0 (I)	96.2 (I)	85.0	
glutam. (〃)	70.0 (A)	74.2 (I)	80.8 (I)	83.6 (I)	77.0 (I)	
αKG (〃)	64.9 (A)		81.3 (I)			
oleate(8×10 ⁻⁵ M)	26.1 (A)	16.0 (A)	28.2 (I)	41.2 (I)	27.6 (I)	29.5 (I)

* A...Activation. I...Inhibition

た結果表 2 に示す如く, azide, antimycin A, anaerobiosis, CN で swelling 阻害が示され, azide のそれは特に著しい事が明らかにされた。これに対し amytal はむしろ促進的であつた。又呼吸と swelling の関係に関連し呼吸基質, 例えば β -hydroxybutyrate(B-OH), succinate, glutamate, α -KG 等による swelling に対し呼吸阻害剤の作用を測定した結果, amytal, antimycin A, azide, CN 等すべてにより阻害が示された。

次に oleic acid による mitochondria の swelling が B. S. A. により阻害される原因として B. S. A. が oleic acid と結合し, 膜構造の変化を軽減するとか, あるいは呼吸基質になり易くする結果と考えられるので, 牛血清と oleic acid の結合状態を濾紙電

Fig 6. A paperelectrophoretic pattern of normal cow serum

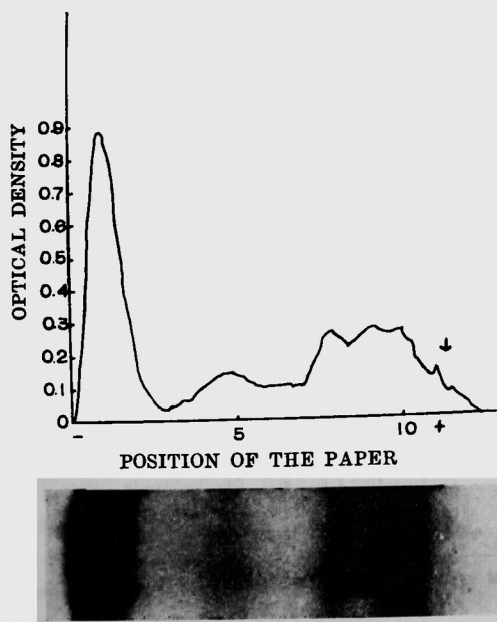
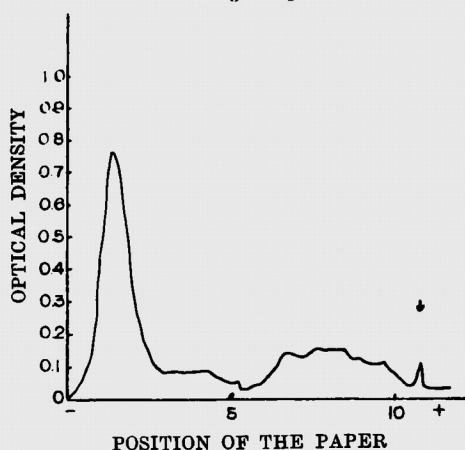


Fig 7. A paperelectrophoretic pattern of cow serum after mixed with 1/10 volum of oleic acid. Centrifuged supernatant.



気泳動法にて検索した結果図 6, 7 に示す如く, oleic acid が特にグロブリン分画中 γ グロブリンに結合する事が明らかにされた。然も結合した lipoprotein は泳動原点に存在し, Sudan black B にて濃染される。即ち明らかに oleic acid は protein と結合し lipoprotein の形を取るものと考えられる。

2. 酸化的磷酸化に対する oleic acid の作用: 先にのべた如く脂肪酸は一般的性格として細胞, あるいは mitochondria の酸化的磷酸化を阻害する。0.04mM の oleic acid によるラット肝 mitochondria の呼吸はコハク酸基質下 38°C の incubation において図 8 に示す如く反応初期においては呼吸の増大が示され, incubation 15 分以後では fall off の現象が

Fig 8. The effect of oleic acid on the respiration of normal rat liver mitochondria. Mitochondria was aged 3 hours at 0°C in 0.25 M sucrose solution

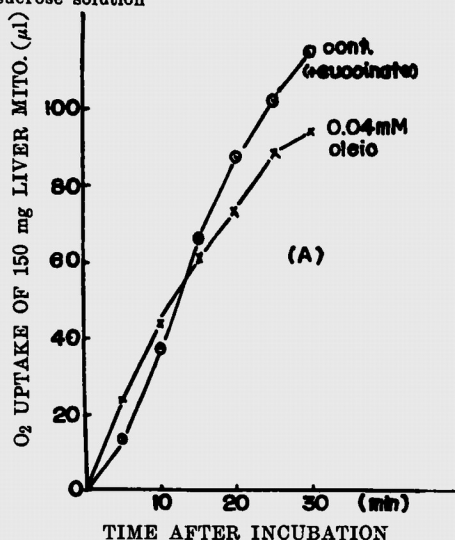
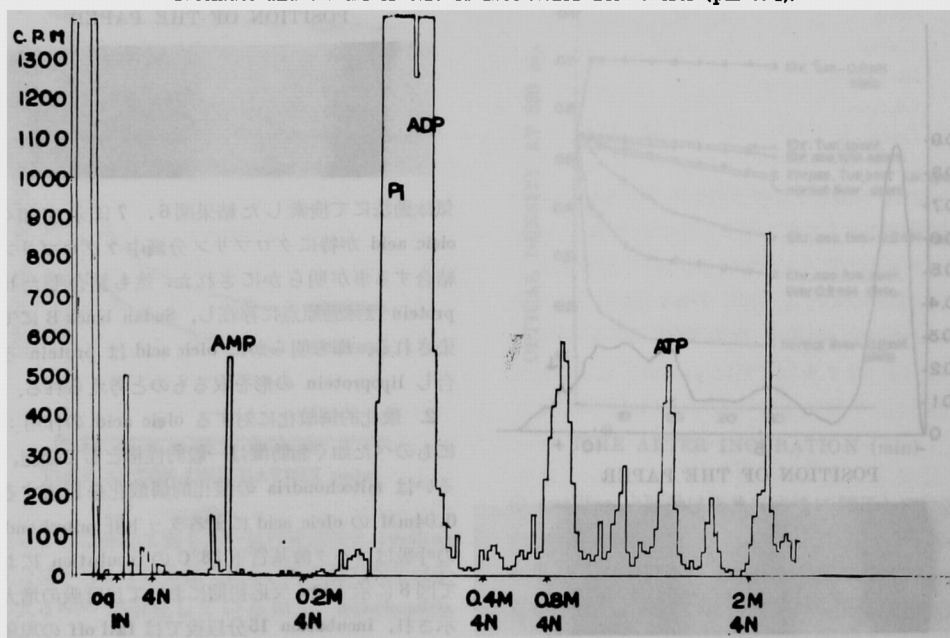


Table 3. The effect of oleic acid on the P³² incorporation into Δ10P fraction of rat liver mitochondria

	ratio of RA of Pi	ratio of RA of Δ10P	ratio of SA of Pi	ratio of SA of Δ10P
control	100	100	100	100
0.4 mM oleic acid	82.5	5.9	106	4.9
0.1 mM oleic acid	65.7	38.9	92	83.4

RA: Relative activity, SA: Specific activity

Fig 9. Incorporation of P³² into acid soluble fraction of rat liver mitochondria (500 mg) after incubation 30 minutes at 25°C. The incubation mixture consisted with 3 ml of mitochondrial suspension, 1ml of KRP solution (containing 100 μC P³²), 1.0 ml of 0.2 M sodium succinate and 5.0 ml of 0.15 M KCl-0.02M Tris buffer (pH 7.4).



示される。然しこの様な現象は respiratory control の高い mitochondria に限り示される現象である。

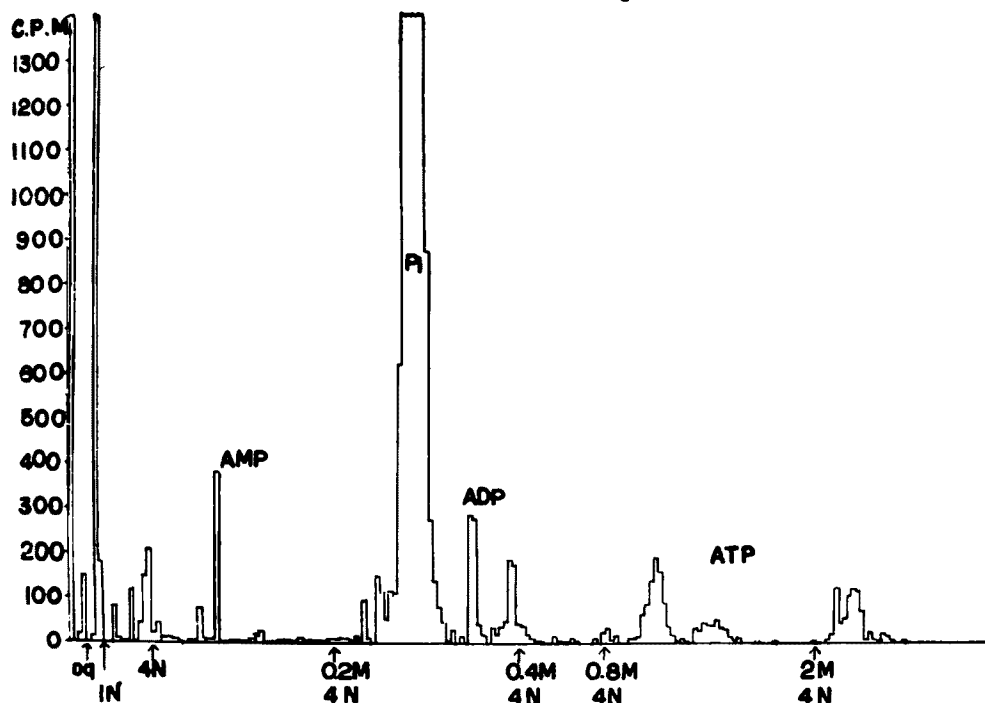
この様な条件下で mitochondria Δ10P への P³² の取込に対する oleic acid の作用を検討してみると表 3 に示す如く明らかに mitochondria の Δ10P への P³² の取込は oleic acid により著しい阻害が示されている。従つて上記呼吸活性が oleic acid により反応初期において増加した現象は respiratory release から uncoupling へと mitochondria の性格の変化が起つた事を示す。

(注 20°C 0.1 mM oleic acid の作用と 38°C 0.04 mM oleic acid の作用とほぼ等しい swelling 作用を示し呼吸と Δ10P の測定実験は比較出来る)

3. mitochondria の酸溶性磷酸化合物への P³² の取込阻害:

上記の如く oleic acid は mitochondria の Δ10P への P³² の取込を著しく阻害するが、これら labile

Fig 10. The effect of sodium oleate on the incorporation of P^{32} into acid soluble fraction of rat liver mitochondria. Incubation mixture containing 0.5 mM sodium oleate.



phosphate compounds 中どの物質への P^{32} の取込阻害が大であるかを明らかにする目的で 5g 当りのラット肝 mitochondria を使用し、反応液 10ml, 0.5mM Na-oleate にて 25°C 30 分間処理し mitochondria の酸溶性リン化合物分画をカラムクロマトグラフィーにて分画し各分画への P^{32} の取込を調べた結果図 9, 10 に示す如く ATP, ADP, UDPG, GTP 等の分画への P^{32} の取込は無処理対照群に比して著しい阻害が示されている事が明らかにされた。

4. mitochondria の phosphate compounds への P^{32} の取込阻害:

Judah¹⁷⁾ 等の研究によれば mitochondria の swelling は mitochondria 内 phosphoprotein の減少によるためであるといわれる。今ラット肝 500mg 当りの mitochondria を 0.02M コハク酸ソーダ基質下に 0.5mM Na-oleate にて 25°C 30 分作用せしめ、後 Schmidt, Thanhauser, Schneider 法により、酸溶性リン化合物, phospholipid, RNA-P, phosphoprotein 分画に分け、それら分画への P^{32} の取込を測定して見ると表 4 に示す如く oleic acid 処理により phosphoprotein への P^{32} の取込は 66% に、phospholipid への取込は 60% に低下せしめられ、然もこ

Table 4. The effect of sodium oleate on the incorporation of P^{32} into organic phosphate of rat liver mitochondria. The incubation mixture was 4.5 ml of 0.15 M KCl-0.02 M Tris pH 7.4, 3 ml of rat mitochondrial suspension containing 500 mg mitochondria, 1 ml of KRP solution containing 100 μC of P^{32} , 1 ml of 0.2 M sodium succinate and 0.5 ml of 0.01 M sodium oleate.

	fraction	Pi	counts (rate) c. p. m.
control	Pi & acid soluble.	—	536200(100)
	phospholipid	450 γ	14310(2.69)
	RNA phosphate	—	5450(1.02)
	phosphoprotein	132 γ	1970(0.39)
Na-oleate	Pi & acid soluble.	—	93015(17.4)
	phospholipid	318 γ	8520(1.59)
	RNA phosphate	—	5070(0.95)
	phosphoprotein	112 γ	1205(0.225)

れら分画の量も減少している。勿論この分画方法は完全なものではないが oleic acid 処理にともなう各分画の変化の傾向は明らかに示すものである。

5. mitochondria 内 K 量の変動:

mitochondria の swelling は active transport の

変動によるとする考え方があるが、その原因はイオンの active transport にともなう水の passive transport によるもので mitochondria 内 K 含量の変化が

示唆される。今 0.1 mM の oleic acid により swelling した mitochondria 内 K 量を測定して見ると表 5 に示す如く、0.15 M KCl 液中 25°C 30 分

Table 5. The effect of sodium oleate on the potassium concentration of mitochondria. The incubation mixture was 0.15 M KCl-Tris pH 7.4, containing 0.1 mM sodium oleate and 400 mg tissue equivalent mitochondria and incubated at 25°C 30 minutes.

	rate of O. D. at 520m μ	K meq rate of K cont.	rate of mit. volume	rate of K concent.
initial	100	15.6	100	1
control	100	22.0	133	1.33
0.1 mM oleate	33	44.0	266	0.887

incubation にともない spontaneous にはほとんど mitochondria の swelling が示されないにもかかわらず K 量は増加し、oleic acid 処理群においては著しい swelling と共に顕著な K 量の増加が示される。然し Lehninger¹⁸⁾ 等により示された如く、520 m μ で測定した swelling は mitochondria の容積とほぼ平行している事から mitochondria の容積に対する K 量を算出して見ると oleic acid 処理で swelling した mitochondria 内 K 量はむしろ減少しているが、無処理 mitochondria においては容積変化が起らない以前に K 量の増大が示されている事は興味ある現象といわねばならない。

考 按

形態と機能の研究で最も発展している mitochondria は細胞内エネルギー産生場として重要な細胞内小器官であり、その形態変化が細胞の代謝制御機構と関係している事はやうやく人々の注目する所となつて来た。即ち Kaufman¹⁹⁾, Corwin¹⁵⁾, Emmelot¹⁶⁾, Hunter^{20, 25)} 等は mitochondria の形態変化と呼吸活性、或いは酸化的磷酸化との関係について多くの研究を報告し、mitochondria の swelling は呼吸活性と極めて密接に関係を有している事が明かにされた。本研究に示した脂肪酸の mitochondrial swelling に対する作用は脂肪酸が mitochondria の酸化的磷酸化共役阻害をすると同時に mitochondrial swelling の作用を有する事に於て極めて興味ある問題を提出している。先づ種々の飽和脂肪酸及び炭素数 18 の不飽和脂肪酸の同一モル濃度によりラット肝 mitochondria の swelling について得られた結果は Presman & Lardy²¹⁾ らが latent ATPase 活性に対する種々脂肪酸の影響にいつて得た結果即ち、C₁₄ の myristic acid が最も latent ATPase 活性を stimulate し、又 trans 型

より cis 型不飽和脂肪酸がよりよく ATPase 活性を stimulate すると云う結果と全く一致し、ATPase 活性の stimulation と swelling 作用が平行するのは極めて興味ある現象であり、膜構造の変化が ATPase 活性を stimulate するとも考えられる。又 swelling した mitochondria は ATP, Mg⁺⁺, B.S.A. 等により contract する事は、最近大西^{22, 23)} 等により mitochondria 内にアクトミオシン様蛋白のある事が明らかにされ、Green²⁵⁾ 等の structure protein と関係し、mitochondria 構造に収縮性蛋白が一定の配列を取つて存在する事を示唆し、これら mechanoprotein は構造と密接に関係して swelling~contraction を行い、同時に酸化的磷酸化に関与している考が示される。即ち、Pullman & Racher^{26, 27)} らは酸化的磷酸化の coupling factor が ATPase 活性を有し、これが一部 swelling~contraction に関与するとも考えられる。又 mitochondria の swelling が呼吸と密接に関係している事はすでに述べた所であるが、これと関連して脂肪酸による mitochondria の swelling が呼吸阻害剤で部分的に阻害され、少なくとも脂肪酸が mitochondria 呼吸基質となつている事は確かである。又癌細胞の mitochondria は Emmelot¹⁷⁾, Arcos²⁸⁾ 等が示す如く一般に種々のラット肝 mitochondria に対する swelling agent で swelling しにくい事が明らかにされているが、脂肪酸によつても同様 swelling は軽度で、これが常法で分離した脳の mitochondria の呼吸活性の弱い事と関係している様に考えられる。次に phosphoprotein 量の swelling にともなう減少は Judah¹⁷⁾ により実験された結果であるが、oleic acid 処理による phosphoprotein の減少、或いは P₃₂ の取込低下は、ATP 合成の阻害に基く事も考えられ swelling と phosphoprotein の関係は明らかでない。又脂肪酸による mitochondria 内 K 含

量の増加は、ion active transport が脂肪酸による mitochondria の ATPase 活性増加の結果として起るものとの考えも成立するが、この ion transport は 10^{-4} M の ouabain で全く阻害されず swelling が ion active transport の結果であるか否かを決定し得ない。

結 論

種々脂肪酸によるラット肝及び Ehrlich 腹水癌細胞 mitochondria の swelling 及び contraction に関し種々の実験を行ひ次の結果を得た。

1) ラット肝 mitochondria は飽和脂肪酸中 C_{14} の myristic acid により最も著しく、又 C_{18} 不飽和脂肪酸に於ては cis 型のものにより強く swelling せしめられ、その度合はこれら脂肪酸の latent ATPase 活性の stimulation と全く平行する。

2) oleic acid によるラット肝 mitochondria の swelling は oleic acid の濃度に比列して増加し、その swelling した mitochondria は ATP., B. S. A.,

Mg⁺⁺ で再び contract し、又その swelling は anaerobic, CN⁻, azide, antimycin A で阻害的に作用される。

3) oleic acid による mitochondria の swelling の度合はマウス肝 > Ehrlich 担癌マウス肝 > Ehrlich 腹水癌 > Ehrlich 固型癌の順に強く、これらは呼吸活性と比例する。

4) oleic acid により swelling した mitochondria は処理直後呼吸の増大が示され、特に ATP 合成は著しく減少し、酸化的磷酸化の共役阻害が起る。

5) oleic acid 処理肝 mitochondria 内 K 量は swelling 初期に於て増加し、swelling 後はむしろ容積当りの量に於て減少する。

6) oleic acid により mitochondria による ATP, ADP, UDPG, GTP 合成が阻害される。

稿を終るに当り御懇切なる御校閲を戴いた山本教授並びに直接御指導を頂いた内海助教授に深甚の謝意を表します。

文

- 1) 浦上博之：X線照射家兎より抽出した高級不飽和脂肪酸分画により惹起された mitochondria の swelling に関する研究。岡山医学会雑誌。74, 307, 1962.
- 2) Ohara S.: Studies on the compound lipids from x-ray irradiated animal I. Characteristics of compound lipids from the organs of x-ray irradiated rabbits. Acta Med. Okayama, in press.
- 3) Inaba, K.: The effect of x-ray on the energy metabolism of Ehrlich ascites tumor cells. 日本医学放射線学会誌. in press.
- 4) Hogeboom, G. H.: "Method in Enzymology" vol. 1, 16, 1955.
- 5) 小林, 萩原, 増住, 奥貫. : HeLa 細胞からのミトコンドリアの調製と性質. 酸素化学シンポジウム. 17, 67, 1962.
- 6) Lehninger, A. L., Ray, B. L. and Schneider, M.: The swelling of rat liver mitochondria and its reversal, J. Biochem. Biophys. Cytol. 5, 97, 1959.
- 7) 高橋泰常：磷酸代謝実験法. 広川書店. 東京. 1959.
- 8) Terada, S.: Studies on the acid-soluble phosphorus compounds in rat liver, J. jap. Bio-

献

- chem. Society, 31, 795, 1959.
- 9) Volkin, E. and Cohn, W. E.: "Method of biochemical analysis", vol. 1, 287, 1954.
- 10) Lehninger, A. L. and Remmert, L. F.: An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation, J. Biol. Chem. 234, 2459, 1959.
- 11) Scholefield, P. G.: Studies on fatty acid oxidation VI. The effect of fatty acids metabolism of Ehrlich ascites carcinoma cells, Cancer Res. 18, 1026, 1958.
- 12) Creaser, E. H. and Scholefield, P. G.: The influence of DPN and fatty acids on the P₃₂ metabolism of Ehrlich ascites tumor cells, Cancer Res. 20, 257, 1960.
- 13) Lehninger, A. L. and Schneider, M.: Mitochondrial swelling induced by glutathione, J. Biochem. Biophys. Cytol. 5, 109, 1959.
- 14) Lehninger, A. L.: Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate, J. Biol. Chem. 234, 2465, 1959.
- 15) Corwin, L. M. and Lipsett, M. N.: Studies on stability of rat liver mitochondria II. Relation of the electron transport system to swelling.

- liag, J. Biol. Chem. 234, 2459, 1959.
- 16) Emmelot, P.: The effect of succinate on the glutathione and cysteine inducing swelling of liver and hepatoma mitochondria, *Exptl. Cell. Res.* 24, 280, 1961.
 - 17) Judah, J. D.: The action of antihistamine drugs *in vitro* I. Mitochondrial swelling, *Biochim. et Biophys. Acta*, 53, 375, 1961.
 - 18) Lehninger, A. L.: Reversal of thyroxine induced swelling of rat liver mitochondria by adenosine triphosphate, *J. Biol. Chem.* 234, 2187, 1959.
 - 19) Kaufman, B. T. and Kaplan, N. O.: Effect of substrates on the swelling and loss of pyridine nucleotides from rat liver mitochondria, *Biochim. et Biophys. Acta*, 32, 576, 1959.
 - 20) Hunter, F. E. et al.: Studies on the mechanism by which anaerobiosis prevents swelling of mitochondria *in vitro*, Effect of electron transport chain inhibitor, *J. Biol. Chem.* 234, 2176, 1959.
 - 21) Presman, B. C. and Lardy H. A.: Effect of surface active agents on the latent adenosine triphosphatase of mitochondria, *Biochim. et Biophys. Acta*, 21, 458, 1956.
 - 22) Ohnishi, T. and Ohnishi, T.: Extraction of contractile protein from liver mitochondria, *J. Biochemistry*, 51, 380, 1962.
 - 23) Ohnishi, T. and Ohnishi, T.: Extraction of actin- and myosin-like proteins from liver mitochondria, *J. Biochemistry*, 52, 230, 1962.
 - 24) Green, D. E. and Tisdale, H. D.: The structural protein and mitochondrial organization, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 51, 81, 1961.
 - 25) Hunter, F. E.: Ascorbate-induced lysis of isolated mitochondria. A phenomenon different from swelling induced by phosphate and other agents, Edited by Goodwin, T. W. "Biological structure and function" II, 53, Academic Press, London, 1961.
 - 26) Pullman, M. E., Rucker, E. et al.: Partial resolution of the enzymic catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble DNP-stimulated ATPase, *J. Biol. Chem.* 235, 3322, 1960.
 - 27) Pullman, M. E. Rucker, E. et al.: Partial resolution of the enzymic catalyzing oxidative phosphorylation II. Participation of a soluble ATPase in oxidative phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 235, 3330, 1960.
 - 28) Arcos, J. C. et al.: Fine structural alterations in cell particles during chemical carcinogenesis. II. Further evidence for their involvement in the mechanism of carcinogenesis. The swelling of rat liver mitochondria during feeding of amino azo dyes, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 49, 1960.

The effects of fatty acids on swelling and contraction of mitochondria taken from rat liver and Ehrlich ascites tumor cells.

By

Hiroyuki Urakami

Department of Biochemistry, Cancer Institute of Okayama University
Medical School. (Director. Prof. M. Yamamoto)

The effects of fatty acids on swelling and contraction of mitochondria taken from rat liver and Ehrlich ascites tumor cells are studied and the following results were obtained.

1. The swelling of rat liver mitochondria is induced most effectively by myristic acid (14carbon chain compound) among the saturated fatty acids and by *cis* form unsaturated fatty acids more than *trans* form. These effects are proportional to the degree of stimulation on

latent ATPase activity by fatty acids.

2. The degree of swelling of rat liver mitochondria is proportional to a concentration of oleic acid and is inhibited by anaerobiosis, cyanide, azide or antimycin A. These swollen mitochondria can be contracted reversibly by ATP, bovine serum albumin and magnesium ion.

3. The swelling action of oleic acid is stronger in the following order on mitochondria taken from mouse liver, liver of Ehrlich ascites tumor bearing mouse, Ehrlich ascites tumor cells and solid tumor. The degree of swelling parallel to respiratory activities in those mitochondria respectively.

4. The increase of respiration, decrease of ATP synthesis and inhibition of oxidative phosphorylation are observed in swollen mitochondria induced by oleic acid.

5. The amount of phosphoprotein and phospholipid in mitochondria decreases by oleic acid and the turnover of phosphate in both compounds also decreases.

6. The amount of potassium in mitochondria increases slightly soon after adding of oleic acid but rather decreases later on.
