

脳 mitochondria の T.C.A. cycle に関する研究

第 1 編

正常家兎および潜在性脳局所アナフィラキシー家兎大脳皮質 mitochondria の T. C. A. cycle に関する研究

岡山大学医学部第 1 (陣内) 外科教室 (指導: 陣内教授)

医学士 樋口 慎之助

(昭和 33 年 2 月 4 日受稿)

第 1 章 緒言および文献

脳髄で pyruvate がよく酸化されることは、1940 年 Peters¹⁾ によつてすでに報告されているところであり、ついには H₂O と CO₂ にまで酸化されるものである。pyruvate はまず TPP (thiamine pyrophosphate) と Mg⁺⁺ の関与により、decarboxylase により脱炭酸され、acetaldehyde-enzyme complex (active acetate) を生じ、Co A の存在において DPN を hydrogen-carrier として酸化をうけ、Co A の-SH 基と acetyl 基とは high energy bound で結ばれて acetyl-Co A を生ずると考えられている。次いでこれが縮合酵素のはたらきで oxalacetate と縮合して citrate を生じ、TCA cycle の流れにはいるわけである²⁾³⁾。

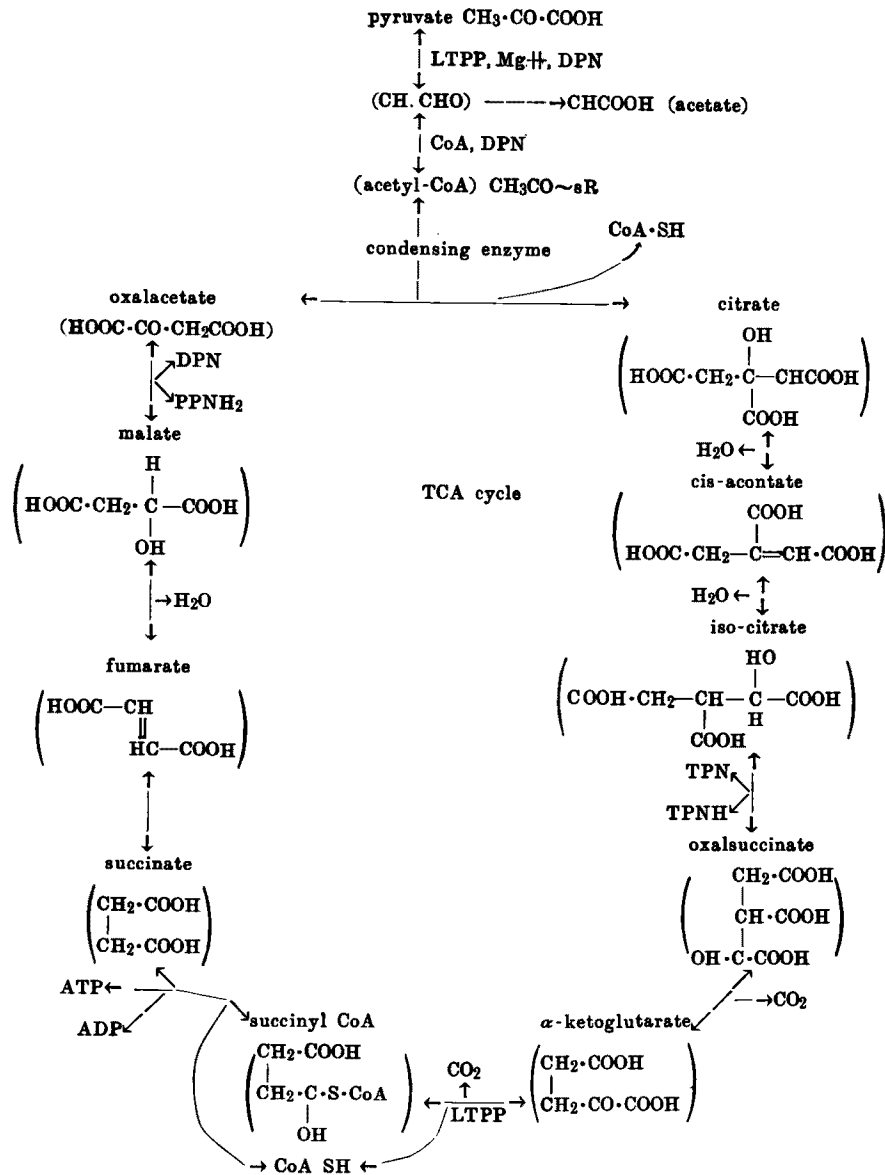
さて、動物組織の TCA cycle の理論は主として「ハト」の胸筋および肝臓の実験にもとづいている。脳についてはそれほど決定的な研究がなされていないが、fumarate などの 2-carboxylic acid-intermediate の酸化が行われること、および pyruvate 酸化における fumarate, oxalacetate などの TCA cycle member による促進作用が知られており、また、その際 citrate や α -ketoglutarate の蓄積することなどが明かになつている⁴⁾⁵⁾⁶⁾。一方 aconitase⁷⁾ および isocitric dehydrogenase⁸⁾ などの酵素の存在についても報告を見ている。malonate は succinic dehydrogenase の選択的な inhibitor であるため、これを与えると TCA cycle は中断され succinate が蓄積するわけであり、Quastel⁹⁾ および Greville¹⁰⁾ は脳でも malonate 阻害を観察しているが、Weil-Malherbe¹¹⁾ は homogenate では malonate 阻害があるが、脳皮質の slice は malonate

にたいして抵抗が強く、succinate の蓄積を認めないと報告している。これは杉田¹²⁾ が脳で citrate が酸化されないことを報告しているのと相まつて脳の TCA cycle の存在を否定する説¹³⁾の根拠となつていものであるが、これには種々の実験的条件も参与しており、これらをもつてただちに脳における TCA cycle を否定することはできず、さらに今後の検討にまたねばならぬ問題であろう。事実、われわれの行つた実験¹⁴⁾でも citrate は脳の homogenate および mitochondria の呼吸の sparker あるいは primer となりえぬが、この系に DPN を加えると充分酸化され得ることを観察している。

一方、Frohman らは¹⁵⁾ 脳の組織中に TCA cycle のすべての member の存在することを paper-chromatography で証明しているし、私も一応 Krebs¹⁶⁾ と同様に脳にも他の組織同様に TCA cycle が存在し、pyruvate は次図の如き経過を経て CO₂ + H₂O にまで酸化されるであろうと考えている。

次に、脳の mitochondria については Christie¹⁷⁾ らおよび Gallager¹⁸⁾ らによる報告があるが、一般に mitochondria 中には溶解性酵素としては単離できない succinic dehydrogenase や cytochrom C-oxidase および脂肪酸酸化酵素のほか、溶解性酵素として単離できる malic dehydrogenase, fumarase, aconitase および glutamic dehydrogenase などのごとき TCA cycle 上の中間代謝産物の酸化に関係した諸酵素が存在していて、組織の TCA cycle の研究には極めて好都合である。

さて私どもの教室で、てんかんの素因あるいは痙攣準備状態を付与されたことを実験的に証明された潜在性脳局所アナフィラキシー家兎 (以下脳局「ア」



家兎と略す)の大脳皮質の代謝について現在までになされた業績はすでに陣内教授¹⁹⁾²⁰⁾によつて発表されているところである。私もこれらの研究の一環として脳局「ア」家兎の TCA cycle について研究を行い、いささかの知見を得ることができたのでここに報告する。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

体重 2.5 kg 以上の健康な成熟白色家兎を使用し

た。

第2節 抗原の作成方法および感作の方法

第1項 牛血清の作成法

新鮮な牛血液を数時間室温に放置して後、遠心器にて血清を分離し、54°C、30 分間、重湯煎にて非働性となし、0.5% の割合に石炭酸を加えて作成した。

第2項 新鮮牛脳灰白質磷脂質(以下牛脳灰「ホ」と略記する)加牛血清の作成法

新鮮な牛脳の軟膜を脳表面の血管とともに剝離し、

次に表面の灰白質のみを取り、乳鉢にて摺磨して泥状とし、これに多量の局方酒精を加えて、時々攪拌しながら1週間室温に放置して後、遠心器で上澄を分離し、重湯煎にて40°Cにて減圧蒸溜すると、黄褐色の粘調な残渣となる。これに少量のエーテルを加えて振盪、溶解する。これの上澄をとり、アセトンを大量加えて白色の沈澱を得る。これを蒸発乾燥して、アセトン除去しさらにエーテルを加えて溶解し、その上澄に再び多量のアセトンを加え40°Cに加熱、冷却してアセトンを放出する。この白色沈澱物を褐色瓶に入れたアセトン中に保存し、用に臨んでデシゲーターで乾燥し、第1項で得た非働性牛血清2ccに10mgの割合に混合し、室温に数時間放置し時々まぜて牛脳灰「ホ」のエムulsionを作成する。

第3項 感作方法

家兔の耳静脈内に牛脳灰「ホ」を pro kg 1 cc の割合で2回2日間連続注射し、12日後にアルツス反応を検し、その陽性のもののみえらび、同量の牛脳灰「ホ」を2週間間隔で5回注射した。

第3節 mitochondria の酸化力測定に用いた基質

TCA cycle の中間代謝産物として、pyruvate, citrate, α -ketoglutarate, succinate, fumarate, malate, oxalacetate を用いた。濃度はいずれも0.1Mのものを用いた。

第4節 mitochondria の分離法

家兔の頭蓋骨を破壊し、可及的速かに(10~20秒以内)0°Cの生食液中に移し、脳軟膜、血管を剝離し、灰白質のみを取出し、0.25Mの蔗糖液を媒質として、Potter-Elvehjem の homogenizer を使用しておよそ10%の homogenate にし、冷凍遠心器で10分間、600×g で遠沈する。上澄を取り、さらにこの沈澱を蔗糖液で分散、遠心して上澄をとり、これらの上澄を集める(未破壊細胞、細胞核、血球、軟膜等は沈澱とし除去される)。これを8500×g, 10分間で遠沈して、沈澱を取り、蔗糖液で再分散し、さらに8500×g, 10分間遠沈して生じた沈澱をさらに0.25Mの蔗糖液で分散、浮游液として用いる。この沈澱は顕微鏡で検するとほとんど mitochondria のみを含有する。全経過を通じて0~3°Cの条件を厳守しなければならない。

第5節 呼吸測定の実験装置および方法

Warburg 検圧装置を用い、検圧計は単一検圧計を、容器は円錐状器を用い、恒温槽を37.5°C、振

盪速度1分間90回転、振盪時間60分、瓦斯腔は大気として、好気性瓦斯反応の変化を記録した。

反応系としては須田および原²¹⁾の方法に従い、次の如き試薬を用いた。

0.6 ml	0.1M phosphate buffer	pH 7.3
0.3 ml	0.01M ATP-Na	塩
0.2 ml	0.02M MgCl ₂	
0.5 ml	10 ⁻⁵ M cytochrome C	
0.2 ml	0.1M substrate	以上主室内
0.2 ml	2N KOH	中央副室内
1.0 ml	mitochondria 分散液	(最後に主室内に)

さらに中央副室内に3sq.cmの濾紙片を入れる。mitochondria は基質の存在によつて安定性を保持するから、基質は初めから主室に入れておき、分散液を加えて10分間空振りし、60分後の酸素消費を読む。空振り10分間の酸素消費量は最初の10分間の値に等しいとして計算する。1.0mlの浮游液の乾燥重量を化学天秤で秤量して、計算により mitochondria の乾燥重量100mgに対する酸素消費量をもつて成績とした。

第3章 実験成績

pyruvate および TCA cycle の中間代謝産物を基質として(第2章、第3節に述べた)脳の mitochondria の酸素消費量を正常家兔および脳局「ア」家兔について検索した結果、次のことが明らかになった。

1) とくに基質を附加しない場合の mitochondria の酸素消費量は第1表に示すごとくであつて脳局「ア」家兔においては正常家兔より一般に低下を示しており平均値において約1/2の値を示している。

2) pyruvate を基質として与えると第2表のごとく酸素消費量の上昇は正常家兔群では平均11.6 μ l であるが脳局「ア」家兔群では平均6.8 μ l にすぎない。

3) citrate を基質として与えると、第1表のごとく脳局「ア」家兔群および正常家兔群ともに酸素消費の増加を認めず、正常家兔群では逆に呼吸の抑制を認める。

4) α -ketoglutarate を基質にした場合では、第4表に示すごとく脳局「ア」家兔群および正常家兔群ともに酸素の消費が増大する。この場合、呼吸の増加は正常家兔群では平均20.9 μ l、脳局「ア」家兔では平均3.0 μ l であり、正常群の増大は著明で

表1 mitochondria による正常呼吸

正常家兎					局「ア」家兎				
家兎番号	実験月日	性	酸素消費量(μl)		家兎番号	実験月日	性	酸素消費量(μl)	
			体重					体重	
1	23/X	♂	2.8	6.1	1	25/X	♂	3.2	6.7
2	24/X	♂	3.0	6.3	2	1/XI	♂	2.6	3.1
3	25/X	♀	2.8	7.9	3	5/XI	♀	2.6	2.6
4	28/X	♂	3.5	12.8	4	7/XI	♂	3.5	7.2
5	31/X	♀	3.0	6.6	5	9/XI	♂	2.5	3.6
6	1/XI	♂	3.5	15.3	6	12/XI	♂	2.6	3.6
7	2/XI	♂	2.6	8.4	7	14/XI	♀	2.5	3.0
8	15/XI	♂	2.5	6.8	8	16/XI	♂	3.0	7.9
平均			8.8		平均			4.7	

表2 pyruvate 添加による呼吸変化

正常家兎				局「ア」家兎								
No.	基質		呼吸増加	平上昇均率	No.	基質		呼吸増加	平上昇均率			
	(-)	(+)				(-)	(+)					
1	6.1	17.2	11.1		1	6.7	13.4	6.7				
2	6.3	23.3	17.0		2	3.1	14.1	11.0				
3	7.9	20.7	12.8		3	2.6	11.6	9.0				
4	12.8	18.5	5.7		4	7.2	15.9	8.7				
5	6.6	16.6	10.0		5	3.6	8.7	5.1				
9	15.3	27.1	11.8		6	3.6	9.9	6.3				
7	8.4	17.7	9.3		7	3.0	8.5	5.5				
8	6.8	21.9	15.1		8	7.9	10.1	2.2				
平均				8.8	平均				4.7	11.5	6.8	145%

表3 citrate 添加による呼吸変化

正常家兎				局「ア」家兎								
番号	基質		呼吸増加	平上昇均率	番号	基質		呼吸増加	平上昇均率			
	(-)	(+)				(-)	(+)					
1	6.1	2.4	-3.7		1	6.7	2.6	-4.1				
2	6.3	1.7	-4.6		2	3.1	2.9	-0.2				
3	7.9	3.7	-4.2		3	2.6	3.5	0.9				
4	12.8	10.5	-2.3		4	7.2	11.5	4.3				
5	6.6	4.1	-2.5		5	3.6	3.9	0.3				
6	15.3	10.1	-5.2		6	3.6	4.1	0.5				
7	8.4	4.5	-3.9		7	3.0	3.8	0.8				
8	6.8	4.0	-2.8		8	7.9	3.5	-4.4				
平均				8.8	平均				4.7	4.5	-0.2	-4%

表4 α-ketoglutarate 添加による呼吸変化

正常家兎					局「ア」家兎								
No.	基質		呼吸増加	平上昇均率	No.	基質		呼吸増加	平上昇均率				
	(-)	(+)				(-)	(+)						
1	6.1	19.5	13.4		1	6.7	9.3	2.6					
2	6.3	23.7	17.4		2	3.1	7.3	4.3					
3	7.9	27.3	19.4		3	2.6	9.6	7.0					
4	12.8	36.5	23.7		4	7.2	11.4	4.2					
5	6.6	8.3	1.7		5	3.6	6.4	2.8					
6	15.3	54.0	38.7		6	3.6	4.9	1.3					
7	8.4	39.4	31.0		7	3.0	4.3	1.3					
8	6.8	28.6	21.8		8	7.9	8.7	0.8					
平均					8.8	平均				4.7	7.7	3.0	64%

あるに反し、脳局「ア」群では極めて少い。

5) succinate を基質にした場合は第5表のごとく両群ともに著明に増加し、正常群では平均42.1μl、脳局「ア」群では平均29.8μlである。

表5 succinate 添加による呼吸変化

正常家兎					局「ア」家兎								
No.	基質		呼吸増加	平上昇均率	No.	基質		呼吸増加	平上昇均率				
	(-)	(+)				(-)	(+)						
1	6.1	22.0	15.9		1	6.7	31.9	25.2					
2	6.3	20.6	14.3		2	3.1	38.5	35.5					
3	7.9	32.7	24.8		3	2.6	35.8	33.2					
4	12.8	63.2	50.4		4	7.2	47.0	39.8					
5	6.6	28.9	22.3		5	3.6	24.5	20.9					
6	15.3	91.8	76.5		6	3.6	24.5	20.9					
7	8.4	73.4	65.0		7	3.0	40.5	37.5					
8	6.8	74.8	68.0		8	7.9	33.2	25.3					
平均					8.8	平均				4.7	34.5	29.8	63%

6) fumarate を基質とした場合は第6表のごとく正常群においても酸素消費の増加は極めて少く(7.1μl)、脳局「ア」群ではほとんど増加を示さない。

7) malate を基質とした場合は第7表のごとく両群いずれも酸素消費の増加を認めない。

8) oxalacetate を基質とした場合は第8表のごとく正常群では平均13.0μl、脳局「ア」群では平均3.1μlの増加を示している。

表6 fumarate 添加による呼吸変化

No.	正常家兎			番 号	局「ア」家兎				
	基質		呼吸 増加		基質		呼吸 増加		
	(-)	(+)			(-)	(+)			
1	6.1	15.4	9.3	1	6.7	6.7	0		
2	6.3	20.7	14.4	2	3.1	6.4	3.3		
3	7.9	23.9	16.0	3	2.6	3.4	0.8		
4	12.8	13.8	1.0	4	7.2	5.6	- 1.6		
5	6.6	19.2	12.6	5	3.6	2.8	- 0.8		
6	15.3	17.5	2.2	6	3.6	3.2	- 0.4		
7	8.4	8.9	0.5	7	3.0	2.2	- 0.8		
8	6.8	7.9	1.1	8	7.9	5.9	- 2.0		
平均	8.8	15.9	7.1	81%	平均	4.7	4.5	- 0.2	-4%

表7 malate 添加による呼吸変化

番 号	正常家兎			番 号	局「ア」家兎				
	基質		呼吸 増加		基質		呼吸 増加		
	(-)	(+)			(-)	(+)			
1	6.1	4.8	- 1.3	1	6.7	1.3	- 5.4		
2	6.3	5.0	- 1.3	2	3.1	0.7	- 2.4		
3	7.9	9.3	1.4	3	2.6	4.4	1.8		
4	12.8	5.1	- 7.7	4	7.2	12.0	4.8		
5	6.6	7.3	0.7	5	3.6	3.4	- 0.2		
6	15.3	6.4	- 8.9	6	3.6	2.4	- 1.2		
7	8.4	3.0	- 5.4	7	3.0	2.3	- 0.7		
8	6.8	6.7	- 0.1	8	7.9	3.0	- 4.9		
平均	8.8	5.9	- 2.9	33%	平均	4.7	3.7	- 1.0	- 21%

表8 oxalacetate 添加による呼吸変化

No.	正常家兎			番 号	局「ア」家兎				
	基質		呼吸 増加		基質		呼吸 増加		
	(-)	(+)			(-)	(+)			
1	6.1	16.9	10.8	1	6.7	10.4	3.7		
2	6.3	18.6	12.3	2	3.1	5.1	2.0		
3	7.9	15.1	7.2	3	2.6	8.6	6.0		
4	12.8	14.1	1.3	4	7.2	14.2	7.0		
5	6.6	12.2	5.6	5	3.6	7.4	3.8		
6	15.3	52.1	36.8	6	3.6	5.2	1.6		
7	8.4	36.5	28.1	7	3.0	5.0	2.0		
8	6.8	9.4	2.6	8	7.9	6.9	- 1.0		
平均	8.8	21.8	13.0	148%	平均	4.7	7.8	3.1	66%

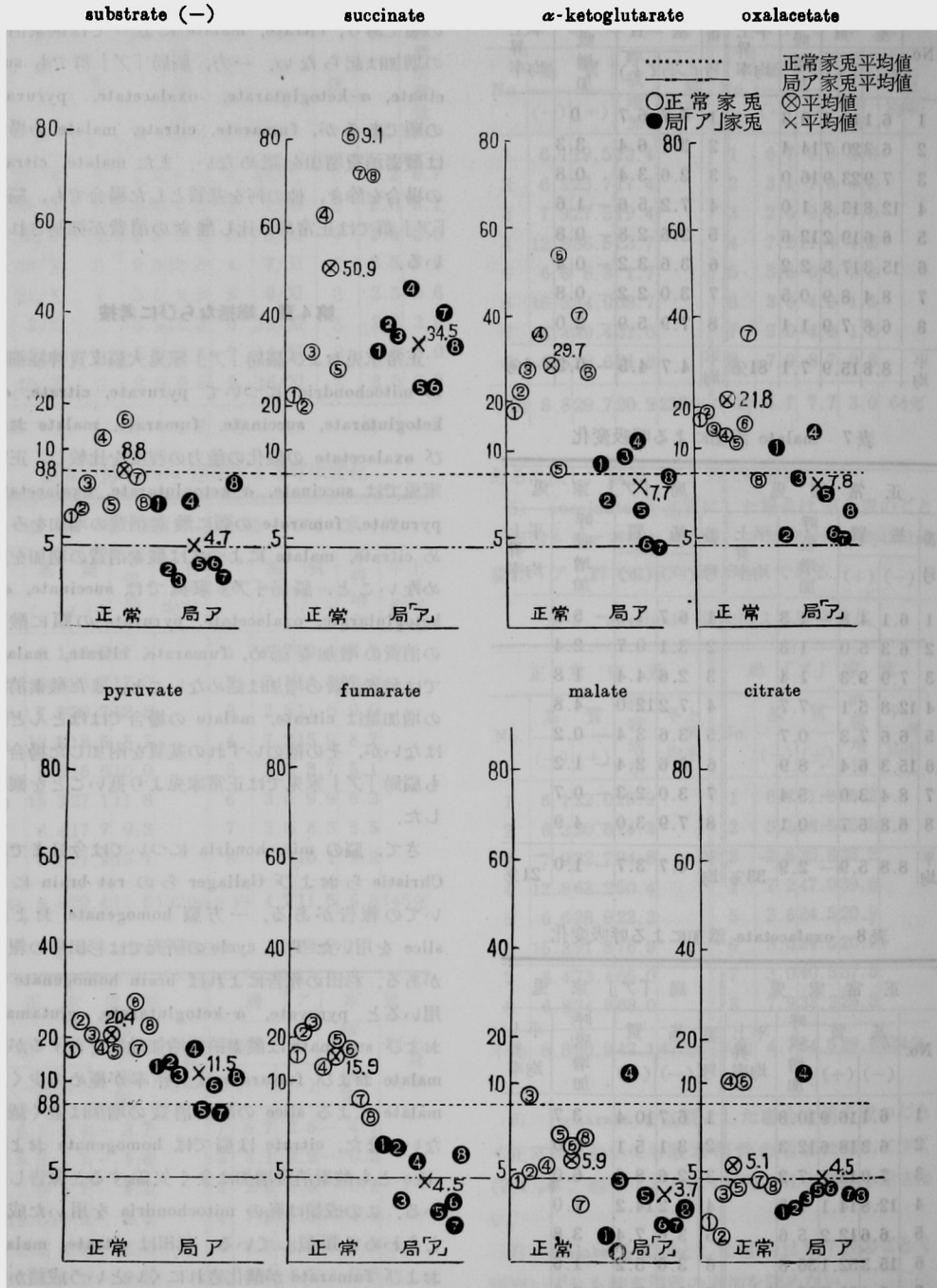
9) 以上総括して表示すれば第9表に示すごとくで、正常家兎群では酸素の消費の増加は succinate, α -ketoglutarate, oxalacetate, pyruvate, fumarate の順であり, citrate, malate によつては酸素消費の増加は起らない。一方、脳局「ア」群でも succinate, α -ketoglutarate, oxalacetate, pyruvate の順であるが, fumarate, citrate, malate の場合は酸素消費増加を認めない。また malate, citrate の場合を除き、他の何を基質とした場合でも、脳局「ア」群では正常群に比し酸素の消費が抑制されている。

第4章 総括ならびに考按

正常家兎および脳局「ア」家兎大脳皮質神経細胞の mitochondria について pyruvate, citrate, α -ketoglutarate, succinate, fumarate, malate および oxalacetate の酸化の能力の程度を比較し、正常家兎では succinate, α -ketoglutarate, oxalacetate, pyruvate, fumarate の順に酸素消費の増加を認め citrate, malate によつては酸素消費の増加を認めないこと、脳局「ア」家兎では succinate, α -ketoglutarate, oxalacetate, pyruvate の順に酸素の消費の増加を認め、fumarate, citrate, malate では酸素消費の増加は認めないこと、また酸素消費の増加量は citrate, malate の場合ではほとんど差はないが、その他のいずれの基質を附加した場合でも脳局「ア」家兎では正常家兎より低いことを観察した。

さて、脳の mitochondria については今日までに Christie らおよび Gallager らの rat brain についての報告がある。一方脳 homogenate および slice を用いた TCA cycle の研究では杉田¹²⁾の報告がある。杉田の報告によれば brain homogenate を用いると pyruvate, α -ketoglutarate, glutamate および succinate は酸素消費増加効果を有するが、malate および fumarate は上昇率が極めて少く、malate による slice の酸素消費の増加は全く認めない。また、citrate は脳では homogenate および slice とともに酸素消費増加は全く欠除すると報告している。この成績は私の mitochondria を用いた成績ときわめて類似している。杉田は citrate, malate および fumarate が酸化されにくいという成績から、脳における TCA cycle の存在をむしろ否定的に考えているが、脳の mitochondria は glucose および glycolysis の intermediate を酸化する酵素系をも

表 9 基質附加による酸素消費量



つなどの他の組織とは異つた態度を示すことが知られているし、また一方私の行つた実験系に DPN を附加すると citrate も酸化され酸素消費の上昇をきたすにいたる事実¹⁴⁾ から、やはり脳においても TCA cycle が存在していると思われる。この問題は脳の TCA cycle 存否に関する問題であり、さらに検討を要すると思われる目下検索を続けている。

一方、脳局「ア」家兎の glucose 代謝の問題については、教室の兼松²²⁾、清水²³⁾により解糖作用の低下すること、また pyruvate の酸化力も低下していることが明かにされており、最近、山田²⁴⁾によつて hexokinase 活性も低下していることが明かになった。これに私の成績をも加えて総括すれば、脳局「ア」家兎においては glucose 代謝は全般的に低下しているものと考えてよいと思う。

第5章 結 論

正常家兎および脳局「ア」家兎について pyruvate および TCA cycle の各 member を基質とする酸素消費を Warburg 検圧装置を用いて測定し、次のことを明かにした。

1) とくに基質を附加しない場合の mitochondria の酸素消費量は、脳局「ア」家兎においては正常家兎の約 $1/2$ で一般に低下を示している。

2) pyruvate を基質とする呼吸上昇は、脳局「ア」家兎では正常家兎の約 $1/2$ である。

3) citrate を基質とすると、脳局「ア」家兎、正常家兎ともに酸素消費の増加を認めない。正常家兎ではむしろ抑制的に作用する。

4) α -ketoglutarate を基質とした場合は、正常家兎では著しく呼吸の増加をみるが、脳局「ア」家兎ではきわめて少い。

5) succinate を基質とした場合は、両者とも著明に増加するが、正常家兎では脳局「ア」家兎より増加が著しい。

6) fumarate を基質とした場合は、正常家兎においても酸素消費増加は極めて少く、脳局「ア」家兎ではほとんど増加を示さない。

7) malate を基質とした場合は、両者とも酸素消費の増加を認めない。

8) oxalacetate を基質とした場合は、正常家兎でかなり著明に、脳局「ア」家兎ではわずかに増加を示す。

9) 一般に、脳局「ア」家兎では正常家兎にくらべ、呼吸の増加の割合が低下している。

稿を終るに当り、御懇篤なる御指導および御校閲を賜つた恩師陣内伝之助教授に深謝する。

文

- 1) Peters, R. A.: Chem. and Industry, **59**, 373, 1940.
- 2) 島菌順雄, 細谷憲政: 生体の科学, **6**, 254~262, 1955.
- 3) 陣内伝之助, 森昭胤: 日新医学, **44**, 243~249, 1957.
- 4) Elliot, K. A. C. and Libet, B.: J. Biol. Chem. **143**, 227, 1942.
- 5) Coxon, R. V., Liebecq, C. and Peters, R. A.: Biochem. J. **44**, X, 1952.
- 6) Brody, T. M. and Bain, J. A.: J. Biol. Chem. **195**, 685, 1952.
- 7) Johnson, W. A.: Biochem. J. **33**, 1046, 1939.
- 8) Adler, E., Euler, H., Günther, G. and Pluso, M.: Biochem. J. **33**, 1028, 1939.
- 9) Quastel, J. H.: Pysiol. Rev. **19**, 135, 1939.
- 10) Greville, G. D.: Biochem. J. **30**, 877, 1936.
- 11) Weil Malherbe, H.: Biochem. J. **31**, 299,

献

- 1937.
- 12) 杉田幸男: 日本外科会雑誌, **58**, 248~257, 1957.
- 13) 鈴木忠彦: 最新医学, **11**, 126, 昭31.
- 14) 樋口慎之助, 森昭胤: 岡山医学会雑誌.
- 15) Frohman, C. E., Orten, J. M. and Smith, A. F.: J. Biol. Chem. **193**, 277, 1951.
- 16) Krebs, H. A.: Chemical Pathway of Metabolism, **1**, 109~171, 1954.
- 17) Christie, G. S., Judah, J. D. & Rees, K. R.: Proc. Roy. Soc. B. **141**, 523, 1953.
- 18) Gallager, C. H., Judah, J. D. and Rees, K. R.: Biochem. J. **62**, 436, 1956.
- 19) 陣内伝之助: アレルギー, **3**, 209~225, 1954.
- 20) Jinnai, D.: Acta Medicine Okayama, **18**, 423~450, 1954.
- 21) 須田正巳, 原 勝: 標準生化学実験, 384~394, 1953.
- 22) 兼松武雄: 岡山医学会雑誌, **65**, 1271, 昭28.

23) 清水準也：岡山医学会雑誌, 65, 1159, 昭28. 24) 山田孝彦：岡山医学会雑誌.

Studies on the TCA Cycle in the Brain Mitochondria.

1.

On the Normal Rabbit Brain and the rabbit Brain with Latent Cerebral Local Anaphylaxis.

By

Shinnosuke Higuchi,

First. Dep. of Surg. School of Med. Okayama Univ.

(Director: Prof. D. Jinnai)

1. The respiration of mitochondria was measured by the Warburg's manometer and the intermediates of the TCA cycle were used as the substrates.
 2. The O₂-uptake of the normal rabbit brain mitochondria is about twice of the rabbit mitochondria with latent cerebral local anaphylaxis.
 3. On the stimulation of the substrate;
The succinate, α -ketoglutarate, oxalacetate and pyruvate accelerate the O₂-uptake in both cases, but the O₂-uptake of the normal brain is always more than that with anaphylaxis.
 4. Fumarate stimulates the O₂-uptake of the normal brain, but does not stimulate that with anaphylaxis.
 5. Citrate and malate do not accelerate in both cases.
-