

脳 mitochondria の T.C.A. cycle に関する研究

第 3 編

家兎大脳皮質 mitochondria による citrate の酸化に関する研究補遺

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34年1月6日受稿〕

第1章 緒言および文献

組織に於ける pyruvate 酸化の様式としては、まず pyruvate は acetyl-CoA となり、condensing enzyme により oxalacetate と縮合し citrate を生じ、これが、T.C.A. cycle, すなわち oxalsuccinate, α -ketoglutarate, succinate, fumarate, malate を経て、再び oxalacetate となる。この過程をくり返すことにより pyruvate は完全に酸化される。この T.C.A. cycle は各臓器共通の反応様式であるとし Krebs¹⁾ も脳はその例外でないと記載しており、この T.C.A. cycle の脳における存在は諸家の間で定説となつていようである。^{1) 2) 3) 4)}

しかし T.C.A. cycle の脳髄内における活動を実証した実験例はきわめて乏しく、paperchromatography によつて T.C.A. cycle member の各員を証明したものなど⁵⁾ がわずかに有力な手掛りとなつていくくらいである。

最近杉田⁶⁾ は citrate が脳髄の酸素消費を増加させぬことをモルモットの slice および homogenate を用いて実験的に確認している。このことから杉田は脳髄における T.C.A. cycle の存在を否定している。

私は本論文第1編において正常家兎および潜在性脳局「ア」家兎の脳 mitochondria による T.C.A. cycle member の酸化の様子を検索し、さらに第2編において人脳例について、真正癲癇患者大脳皮質 mitochondria について同様の実験を行なつたが、そのさい人間例については各 member とも量的には変動があり、とくに citrate では少なかつたが、まったく酸化されないものはなかつた。しかし潜在性脳局「ア」家兎においては（私の場合は mitochondria を用いたのであるが）citrate, malate, fumarate はほとんど酸化が認められない。

このさい、この事実をもつてただちに T.C.A.

cycle の存在を否定するわけにはいかず、実験条件の検討が行われなければならない。すなわち in vitro における実験をもつてただちに in vivo における反応方式にあてはめるわけにはゆかない。

私はまず Co-factor として、本実験に不足しているものはないかと考へてみた。すなわち本実験系に使用した反応系の物質を列記すると

0.6ml 0.1M phosphate buffer pH 7.3

0.3ml 0.01M ATP-Na 塩

0.2ml 0.02M MgCl₂

0.5ml 10⁻⁵M cytochrome C

0.2ml 0.1M substrate (T.C.A. cycle member)

0.2ml 2N KOH

1.0ml mitochondria 分散液

であり、このうち T.C.A. cycle を完全に廻転させるために不足している物質は何であろうかと考へてみた。私の実験は家兎で mitochondria 分画について行つており、杉田はモルモットで homogenate および slice を用いているが、いずれも DPN は用いていない。したがつて DPN が不足しているのではないかと考へて、DPN を添加して実験をおこなつてみた。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

体重 2.5kg 以上の健康な成熟白色家兎を使用した。

第2節 実験材料

まず予備実験として第1編と同様の反応系の1.0ml mitochondria 分散液の代りに家兎脳の10% homogenate 0.5ml をもちいて citrate を基質とする実験を行い、次に第1編と同じ反応系に DPN（純度90%以上）0.01M, 0.2ml を加えてもちいた。

第3節 実験装置および方法

第1編と同様に行なつた。

第3節 実験成績

第1節 脳 homogenate による酸化について

まず対照として杉田のモルモットにおける実験を家兎においても果してそうであるかを確かめるために DPN を用いず homogenate で行ってみた。すなわち、表1に示すごとく、citrate は脳 homogenate によつてまったく呼吸が促進されないことがわかった。

表1 脳 homogenate による citrate の酸化について

No.	citrate		呼吸増加	平均上昇率
	(-)	(+)		
1	8.8	8.8	0	
2	7.9	8.1	0.2	
3	12.3	12.0	-0.3	
4	10.6	10.8	0.2	
5	6.8	7.1	0.3	
6	7.1	7.2	0.1	
7	9.2	9.2	0	
8	7.3	7.5	0.2	
平均	8.75	8.83	0.08	1%

第2節 脳 mitochondria による酸化について

その結果は表2に示すごとくであり、まず基質を添加しない場合には、DPN の添加によつて呼吸の増加はほとんど認められない。つぎに citrate を基質とした場合には、DPN を添加しない場合には脳 mitochondria によつて citrate は平均 7.2 μ l 程度では

第2表 脳 mitochondria による citrate の酸化について

基 質		(－)		citrate			
No.	DPN		呼吸 增加	DPN		呼吸 增加	
	(－)	(＋)		(－)	(＋)		
1	8.6	9.3	0.7	5.6	12.5	6.9	
2	6.9	7.6	0.7	4.7	10.1	5.4	
3	9.3	9.8	0.5	9.5	12.9	3.4	
4	9.0	9.3	0.3	9.3	11.9	2.6	
5	11.2	11.7	0.5	8.4	15.2	6.8	
6	10.9	11.8	0.9	8.0	13.6	5.6	
7	7.8	8.3	0.5	6.3	13.1	6.8	
8	8.1	8.9	0.8	5.7	10.5	4.8	
平 均	9.0	9.6	0.6	7.2	12.5	5.3	

ほとんど酸化を受けないが、これに DPN を添加すると平均 12.5 μ l となり、citrate は脳 mitochondria によつて DPN の存在のもとに酸化するようになることがわかる。

第4章 総括ならびに考按

第1編において T.C.A. cycle の member のうち、citrate のみは特異な態度をとり、脳 mitochondria によつて酸化されないことが知られた。そこで私は本編緒言において述べたように、この反応系に DPN を加えたならばどうなるかということを見る目的で本編の実験を試みた。すなわちまず予備実験として、citrate を基質とする家兎脳 homogenate の組織呼吸を検した所、やはり杉田の実験と同様にまったく酸化されなかつた。ついで DPN を加えて脳 mitochondria の組織呼吸を検したところ、まず citrate を添加しない場合には DPN による影響はほとんど認められないが、citrate を基質として DPN を添加すれば、citrate は相当に酸化されるようになることを見出した。

以上の事実から citrate がモルモット脳においては酸化されないと報告している杉田⁶⁾の実験、あるいは私が第1編において行なつた家兎脳 mitochondria を用いた実験の citrate が酸化されない理由は、DPN が不足しているためであろうと考えられる。

いま T.C.A. cycle で DPN を要求する酵素としては oxalosuccinic dehydrogenase, α -ketoglutaric acid dehydrogenase, succinic dehydrogenase, malic dehydrogenase などが考へられる。

citrate の酸化はその第1段階においては DPN を必要としないけれども、何故 citrate を基質とする呼吸には DPN が必要なのであろうか。この問題の説明については現在のところではなんらその根拠となるべき理論をもちあわせていない。

また citrate はモルモット、家兎では酸化されにくい、人では succinate に比較すればその量は少いけれど、かなり酸化の傾向が認められるので、動物の種類によることも考えられる。

第5章 結 論

第1編にて T.C.A. cycle の member 中、citrate は脳 mitochondria によつて酸化されない理由が DPN の不足にあるのではないかと考へて、これを確かめるために正常家兎について citrate を基質とする酸素消費を測定して次のことを明らかにした。

1) 脳 homogenate でも citrate を基質とする組織呼吸はほとんど認められない。

2) 脳 mitochondria では citrate を添加しない場合にはDPNを加えても影響がないが, citrateを附加して, DPNを加えると citrate の組織呼吸は著明に上昇する。

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

文 献

- 1) Krebs, H. A. : chemical pathway of metabolism I. 1951.
- 2) Coxan, R. V. : Metabolism and function in the nervous tissue Chambrige, 1952.
- 3) Himwich, H. E. : Brain metabolism and cerebral disorders. Baltimore Williams and Wilkins, 1951.
- 4) McIlwain, H. : Biochemistry and the central nervous system. London J. and A. churchil, 1955.
- 5) Frohman, C. E., Orten, J. M., and Smith, A. F. : J. Biol. Chem., 193, 2777, 1951.
- 6) 杉田幸雄 : 日本外科会雑誌, 58, 248~257, 1957,

Studies on the TCA cycle in Brain mitochondria

1st Department of Surgery. Okayama University Medical School.

(Director: Prof. D. Jinnai)

Part III. Addition on the oxidation of the citrate

By

Shinnosuke HIGUCHI

The normal rabbit brain mitochondria or homogenate dose not oxidize the citrate in the experimental system generally used, but the brain mitochondria can oxidize the citrate on addition of DPN.