

学 位 論 文 題 名

STUDIES ON MITOCHONDRIAL AND MICROSOMAL PHOSPHOLIPIDS AND PHOSPHOLIPASE

A₂ IN HEART FROM RATS SUBJECTED TO PROLONGED EXERCISE

（ラット筋ミトコンドリア，マイクロソームの磷脂質と
磷脂質分解酵素A₂活性にたいする長時間連続運動の影響）

学位論文内容の要旨

緒言

生体の機能を支える内呼吸はミトコンドリアの呼吸酵素群によって維持されている。この呼吸酵素群はミトコンドリアの脂質二重層によって保持されているのであるから、脂質二重層の性状は内呼吸の活性に少なからぬ影響を与える筈である。ところがさきに私たちは、ラットを長時間運動させると心筋ミトコンドリアの磷脂質が著明に減少することを見いだした。これは脂質二重層と呼吸酵素との間の恒常性の維持に大きな影響を及ぼす恐れがあるので、減少した磷脂質の回復する時間経過と、この減少の機序を明らかにして置くことは重要であると考えた。そこで本研究ではミトコンドリア、マイクロソームの磷脂質濃度並びに磷脂質分解酵素A₂の活性、さらにその抑制剤と言われるquinacrineの効果を、長時間に亘って遊泳させたラットの心筋について、以下の二つの実験によって検討した。

方法

実験のプロトコール

八週令の雄性ウイスターラットを用いた。水にはいることによるストレスを減ずるためラットは予め四日間に亘り一日三十分づつ訓練した。第一日目は錘無し、二日目は体重の1%相当の錘、三日目は2%相当、四日目は3%相当の錘をつけ、35℃の温水中で遊泳させた。第五日目には体重の3%相当の錘をつけて長時間遊泳を行なわせた。

実験Ⅰ、各群四頭ずつの十群に分け、0.5, 1.5, あるいは3時間に亘って35℃の温水中で連続的に遊泳させた。運動終了直後、または3時間遊泳後6時間から240時間に亘る安静回復期間の終了時点で断頭し心臓を切り出した。心筋のミトコンドリアとマイクロソームとを採取し、磷脂質の組成、コレステロール含量、磷脂質分解酵素A₂活性を測定した。

実験Ⅱ、運動中に エタノールアミン磷脂質 (PE)、 コリン磷脂質 (PC) の減少した機序は磷脂質分解酵素の活性上昇にあると言う想定のもとに、磷脂質分解酵素A₂抑制作用を有すると言われる quinacrine 静注の効果を検討した。ラットを各群7頭ずつの三群に分けた。すなわち生理的塩類液を静注したのち安静条件に置いた対照群 (CS群)、生理的塩類液を尾静脈に注射した運動ラット群 (ES群)、quinacrine 10mg/kg静注運動ラット (EQ群)である。それぞれについて3時間遊泳後、磷脂質の分析とともに磷脂質分解酵素A₂の活性を測定した。

ミトコンドリアとマイクロソームの採取

Chance & Hagiharaの報告にしたがいアルカリプロテアーゼをもちいてミトコンドリアを分離した。上清を Kalofoutisらの方法により超遠心を繰り返してマイクロソームを採取した。

脂質抽出と分析

Bligh & Dyerの報文にしたがって抽出した。Chen & Chanの報告にしたがい高速液体クロマトグラフによって分析した。

磷の測定

Chen等の報告にしたがい高速液体クロマトグラフからの分画について蛍光光度計によって測定した。

コレステロールの測定

Heider & Boyettの報告にしたがい酵素蛍光法によって測定した。

蛋白量の測定

Lowry等のfolin-phenol法によった。

磷脂質分解酵素A₂活性の測定

Saito等によって合成された蛍光磷脂質、ピレン二分子を結合したエタノールアミン磷脂質を用い、Hendrickson & Raukの報告にしたがって測定した。1時間にアシル鎖を切断するPEのモル数を以て磷脂質分解酵素A₂の活性とした。各心臓の全心筋試料から得られた磷脂質分解酵素A₂活性をTAとし、蛋白量で除した値をSAとした。

呼吸活性の測定

Chance & Hagiharaの方法により、ミトコンドリアの酸素消費曲線を求め、呼吸調節比 (RCR) と ADP/酸素比を求めた。

有意差の検定

Studentの unpaired t-test によって検定し、 $p < 0.05$ のとき有意差ありとした測定値は $\text{mean} \pm \text{sem}$ で表わした。

結果

ESではミトコンドリアのPEとPCは運動時間の延長とともに減少し3時間運動群ではCS群の対照値、各々 159.7 ± 13.1 、 179.2 ± 18.7 から 99.4 ± 6.6 、 110.7 ± 9.8 nmol/mg蛋白へと強く減少した。3時間運動した後の安静回復期には12時間でやや回復し、48時間では再び減少を見せたのち、120時間ではほぼ対照値、240時間後には対照値より少し大きい値で安定した。コレステロールも減少したが回復は速やかであった。

マイクロソームにおいてもPE, PCは運動中に減少した。しかし回復はミトコンドリアより速やかで6-48時間後には対照値に戻って安定した。

これにたいしてEQ群のラットのミトコンドリアでは、PEの減少は有意差とならず、PCのみが 143.0 ± 13.4 へ減少して有意差となった。PE, PCの減少ともES群に較べ小さかった。この結果は長時間運動による磷脂質の減少がquinacrineによってある程度抑制されることを示している。

磷脂質分解酵素の全活性(TA)はミトコンドリアでは長時間運動しても大きな変化が現われなかった。ところがマイクロソームでは、ES群のTAがCS群の 0.41 ± 0.05 にたいし、 0.74 ± 0.11 nmol/h へと有意に上昇した。EQ群のTAは僅かに上昇したもののミトコンドリア、マイクロソームとも有意差とならなかった。TAを蛋白量で除したSA値は変化しなかった。これは長時間運動によって磷脂質分解酵素の活性型が増加すること、quinacrineはそれをある程度抑制することを示している。

呼吸活性の尺度となるRCRはCS群の 5.91 ± 0.37 から 8.49 ± 0.21 へと有意の増加を示した。EQ群でも上昇傾向を示したが有意差は得られなかった。

考察

ES群に於けるPE, PCの強い減少は前報に一致し、今回はマイクロソームにおいても同様な減少が認められた。長時間運動によって各種の心筋細胞内小器官

に於て磷脂質が減少すると考えられるに至った。このような磷脂質の減少と関連して、磷脂質分解酵素の活性が直接マイクロソーム分画で認められ、抑制剤である quinacrine の臨床使用量である程度抑えられた。このことは運動にともなう心筋活動の増強が細胞内の磷脂質分解酵素の活性を上昇させ、磷脂質を分解させたためと考えられる。激しい運動にともなう骨格筋細胞の損傷が磷脂質分解酵素 A₂ 抑制剤によって軽減されることから運動により細胞内の分解酵素活性の上昇することはかねてから推定されていた。しかし分解酵素活性の上昇が直接測定されたことはなかった。今回の研究により心筋細胞に於て直接的活性測定並びに抑制剤を用いた間接測定により活性の上昇が証明されたのは初めてである。こうして減少した磷脂質は安静回復期にミトコンドリアでは長時間を経て回復するが、マイクロソームでは比較的速やかに回復した。これは磷脂質合成酵素系がマイクロソームに存在することによるものと思われる。

R C R が P E, P C の減少した E S 群のミトコンドリアでむしろ上昇すると言う結果は予期しないものであった。しかしミトコンドリアの磷脂質を減少させると R C R が上昇すると言う報告があり、また運動させたラットの骨格筋のミトコンドリアで R C R の上昇傾向を報じた論文と一致している。磷脂質が減少することにより呼吸酵素相互の距離が短縮し電子伝達の能率の上昇することが想定されるのである。さらに強く磷脂質が減少すれば細胞内隔壁は破綻し細胞機能は損なわれるであろうが、適度の減少はむしろ呼吸機能を高めると考えられる。

結論

長時間遊泳させたラットにおいて心筋細胞のミトコンドリアならびにマイクロソームの磷脂質が著しく減少すること、マイクロソームの磷脂質分解酵素 A₂ 活性が上昇すること、quinacrine は分解酵素の活性をある程度抑制することが観測された。この結果は長時間の水泳によって磷脂質分解酵素の活性がマイクロソームで上昇し細胞内の磷脂質を減少させると解釈できる。ミトコンドリアの呼吸活性がむしろ上昇すると言う成績は示唆するところが大きい。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 山 富 康

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 助教授 牧 田 章

学位論文題名

STUDIES ON MITOCHONDRIAL AND MICROSOMAL PHOSPHOLIPIDS AND PHOSPHOLIPASE A₂
IN HEART FROM RATS SUBJECTED TO PROLONGED EXERCISE

(ラット心筋ミトコンドリア、マイクロソームの磷脂質と磷脂質分解酵素A₂活性
たいする長時間連続運動の影響)

磷脂質は生体膜の構築材料であるが有機的動的挙動を示すものであり、けして一定不変ではない。運動時にはエネルギー源の一部となり、変温動物が寒冷順化すると不飽和度が益すと言う。心・肝・小腸の虚血時には磷脂質分解酵素の活性化を含む代謝異常が生じ、細胞膜・マイクロソーム膜の不可逆な損傷の原因になるとみられている。本研究では8週令のウイスター雄ラットの心筋ミトコンドリアの磷脂質組成の変化を3時間までの遊泳、その後の240時間までの安静による快復過程並びに磷脂質分解酵素A₂活性の動き、同酵素の活性を抑えるキナクリンの静注の影響を検討した。

水に入ることによるストレスを緩和するため、ラットは予め4日間に亘り、連日30分間づつ35℃の温水中で遊泳訓練した。この際第一日目には錘なし、第2日には体重の1%相当の錘、第3日には2%、第4日には3%相当の錘を尾に取り付

けて遊泳させた。第5日に3%相当の錘を付けて、3時間に亘り連続遊泳させた。終了直後、あるいは任意時間安静休息させた後断頭して心臓を摘出した。Chance & Hagiharaの方法によって心筋のミトコンドリアを Kalofoutisの方法によりマイクロソームを採取した。Bligh & Dyerの方法により脂質を分離し、Chen & Chanの方法により定量した。Lowryらの方法により蛋白量を測定した。磷脂質分解酵素A₂活性は蛍光法により、呼吸活性はポーラログラフ法によって測定した。

遊泳時間の延長とともに、心筋ミトコンドリアのエタノールアミン、コリン磷脂質とも減少し、3時間ではそれぞれ遊泳開始前値の62.2、61.8%へ有意に減少した。磷脂質の量は遊泳終了後、120乃至240時間の安静を経てようやく前値へ回復した。心筋マイクロソームにおいても運動により磷脂質は強く減少したが、48時間で速やかに前値に復した。キナクリン静注後3時間遊泳させたときにも心筋ミトコンドリアの磷脂質は減じたが、生理的食塩水静注の対照群に比して減少の度合は小さく、コリン磷脂質の減少のみが有意差となった。ミトコンドリアの磷脂質分解酵素A₂活性は3時間遊泳によって変化しなかったが、マイクロソームでは生理的食塩水のみ静注した群で全活性が有意に増加した。この時蛋白量で除した特異活性が不変であることから、磷脂質分解酵素A₂の活性型が増加したと判断された。キナクリン静注群では全活性にも有意差は得られなかった。

このような磷脂質減少の呼吸生理学的意義を考察するべく、呼吸能を測定すると呼吸調節能は有意に上昇した。呼吸酵素系に於ける電子伝達能率の上昇することが示唆された。

口頭発表に当たり石橋教授より、脂質鎖により磷脂質量の減少に違いがあったかイノシトールリン酸、カルチオリピンの変動は如何、磷脂質分解酵素活性の上昇の原因は何か、牧田教授より磷脂質分解酵素Cの活性はどうか、この時生ずる脂肪酸は呼吸の基質となるか、生理学的意義はどうか、加藤教授より水泳運動を課しているが何故トレッドミル運動を採用しなかったか、斉藤教授より測定値の標準偏差の大きい理由、pyruvate代謝との関係は、阿部教授より磷脂質がこれほどに減じるとしたらミトコンドリアになんらかの形態変化が起こるのか等多くの質問を戴いた。日本語の表現能力に問題はあったがほぼ妥当な返事を為し得たと思われる。また、石橋、牧田両教授から個別に査問を戴き合格とのご返事を戴いた。本論文は運動医学の基礎に寄与するところ大きいので、博士の学位に値すると判定した。