

バタージェロー系色素長期投与時における
ラット肝臓ミトコンドリア酵素系の研究

成 瀬 明 子

Alteration of Enzymatic Pattern in Rat Liver
Mitochondria after Long-Term Administration
of a Carcinogenic Aminoazo Dye, 3'-Methyl-4-
Dimethylaminoazobenzene

Akiko NARUSE

Received June 30, 1972

緒 言

ミトコンドリアは、細菌のような一部の単細胞生物を除き、動植物のほとんどすべての好氣的細胞に存在する微小顆粒で、大きさ形態は細胞組織によって異っているが、基本的には、外膜、内膜の二重膜構造とそれらに囲まれたマトリックスと呼ばれる部分より成り立っている。その主な機能は呼吸即ち末端電子伝達系による電子伝達とこれに共役したATPの合成であり、中間代謝にも重要な位置をしめている。

ミトコンドリアの形成機構については現在まだ不明な点が多いが、ミトコンドリアの増殖が細胞分裂、即ち核分裂の周期と密接に関連しており、増殖の盛んな組織においては、ミトコンドリアの形成も盛んである事は良く知られている。ところが癌細胞においては、その異常な増殖にも係らず一般にミトコンドリアの数が少ない。この事実については有名なWARBURGの仮説があるが、現在では彼の説とは反対に、癌細胞においてミトコンドリアの数が少ないのは癌化の結果ではあっても原因ではないという見解が大勢をしめている。そこで著者は発癌性のバタージェロー系色素 3'-MeDAB をラットに長期にわたって投与することにより、肝臓に前癌状態を作り出し、ミトコンドリアの酸化還元酵素群について、ミトコンドリア内の局在を考慮しながら正常のものと比較検討する事によって、発癌間近い肝組織でミトコンドリアにどのような変化が起きているか、もしそこに正常組織からの偏倚が見られるとすれば、それは癌組織と比べどこに位置づけられるかを知る事を試みた。

-
- 略号 3'-MeDAB : 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene.
EDTA : Ethylenediamine tetra acetate.
NADP : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADH : Reduced nicotinamide adenine dinucleotide

細胞エネルギー代謝のパターンを決めている主要素はミトコンドリア系と、可溶性画分にある解糖系の両者の活性比であるので、後者についても検討を加えた。

また in vitro の系でミトコンドリアによるアミノ酸の蛋白質へのとりこみの大部分は、呼吸酵素ではなくて、⁴⁾「構造蛋白質」を含む分画におこるので、ミトコンドリア独自の蛋白合成系が特に関与している部分としての「構造蛋白質」についてもあわせて比較を行なった。

実験材料及び方法

1. 食餌及び試薬

食餌：オリエンタル酵母工業株式会社製マウス、ラット、ハムスター飼育用MF（固型）及び3'-MeDAB（0.06%含有、固型）飼料を用いた。

試薬：酵母 cytochrome c は三共株式会社より恵与のもの、benzylamine は市販特級品を減圧下にて蒸溜精製したものを用いた。

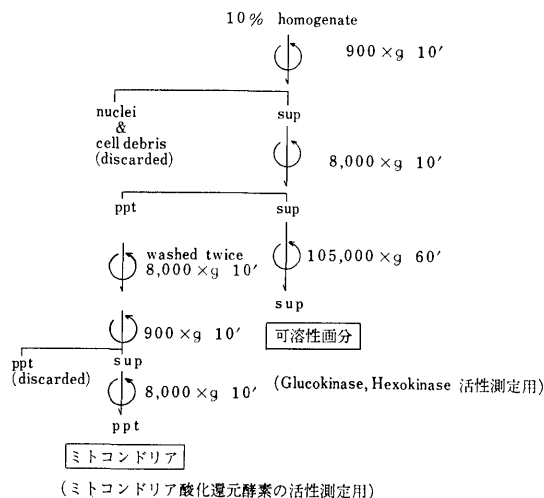
その他の薬品はすべて市販特級品を用いた。

2. 動物及び飼育条件

呑竜系雄ラットを用いた。生後約50日目（体重150～180g）のものを入手し食餌、水は自由に与えた。隔日に摂取食餌量、毎週体重を測定し、順調に育成しているもののみを用いた。3'-MeDAB 摂食期間が10週から11週のもの（平均体重 280g で肉眼的には肝癌の発生が認められぬもの）を実験群とし、同期間普通食にて飼育したもの（平均体重 350g）を対照群とした。

3. ミトコンドリアと可溶性画分の調製法

ラット肝を 0.21M mannitol + 0.07Msucrose + 0.1mM EDTA （但し構造蛋白質調製用は 0.25M sucrose）と共に Potter-Elvehjem 型ガラス製ホモナイザーですりつぶして、10%ホモジェネートをつくり、図1の通り調製して、それぞれの酵素活性測定用試料とした。



図一1 ミトコンドリアと可溶性画分の調製法

* 13～14週の 3'-MeDAB 食投与によって多くのラット肝に発癌をみとめる。

4. 構造蛋白質の調製法⁵⁾

GREEN らの方法を部分的に改良した方法によった。0.25M sucrose に浮遊させたミトコンドリア (10mg protein/ml) を16時間以上凍結し融解後、梅田電機製作所製超音波発生装置 Sonore 150S (周波数 20kc/s, 出力150W) で12分間超音波破碎し、105,000×g, 1時間遠心して可溶性画分を除き、沈殿を0.25M sucrose にて10mg protein/ml となるように浮遊させ、sodium deoxycholate, sodium cholate, をそれぞれ0.5mg/mg protein 加え、38℃に3分間保って、得られる透明溶液に、sodium chloride 200mg/ml を加え10,000×g, 10分遠心して構造蛋白質画分を得た。

5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法⁶⁾

高山らの方法によった。

泳動条件

ガラス管：直径5mm, 長さ65mm

ゲル濃度：7.5% acrylamide, 35% acetic acid, 5M urea

泳動用緩衝溶液：10% acetic acid

泳動時間・温度：2時間, 室温 (22~26℃)

泳動電流：ゲル1本当たり5mA

ゲル染色用試薬：1% amido black in 7% acetic acid

染色時間：1時間

試料蛋白は、phenol・acetic acid・water (2:1:1 w/v/v) に10mg protein/ml となるように溶解し、これに終末2Mになるように urea を加え、ゲル1本当たり0.1ml を用いた。

デンストメーターは東洋濾紙社製 DM-6D型を用いた。

6. 酵素活性測定法

(1) コハク酸チトクロームc還元酵素⁷⁾

TISDALE の方法を用いた。potassium ferricyanide で化学的に酸化した酵母 cytochrome c を用いた。

(2) NADHチトクロームc還元酵素⁸⁾

HATEFI, RIESKE の方法を用いた。(1)と同様にして得た cytochrome c を用いた。

(3) チトクロームc酸化酵素 (E.C. 1.9.3.1.)⁹⁾

WHARTON, TZAGOLOFF の方法を用いた。sodium dithionite で還元した酵母 cytochrome c を基質とした。

(4) モノアミン酸化酵素 (E.C. 1.4.3.4.)¹⁰⁾

TABER らの方法を用いた。

(5) リンゴ酸脱水素酵素 (E.C. 1.1.1.37.)¹¹⁾

STROMINGER, LOWRY の方法を用いた。

(6) グルコキナーゼ (E.C. 2.7.1.2.) 及びヘキソキナーゼ (E.C. 2.7.1.1.)¹²⁾

DARROW, COLOWICK の方法を用いた。

7. 蛋白定量法

^{13)・14)・15)} BIURET 法および ^{16)・17)} LOWRY らの方法により定量した。

結 果

1. 普通食餌群と 3'-MeDAB 食餌群の肝ミトコンドリア酸化還元酵素活性の比較

(1) 内膜局在酵素系

内膜局在酵素系としてコハク酸チトクローム c 還元酵素, NADHチトクローム c 還元酵素, チトクローム c 酸化酵素を選び, それぞれ普通食餌群と 3'-MeDAB 食餌群の酵素活性を比較した。コハク酸チトクローム c 還元酵素及びチトクローム c 酸化酵素に関しては差が認められず, NADHチトクローム c 還元酵素では幾分後者が低い傾向がみられた。

Table 1. Effect of Long-Term Administration of 3'-MeDAB Diet on Rat Liver Mitochondrial Enzyme Activities : Inner Membrane Enzymes

Diet	Normal		3'-MeDAB	
Enzyme	No. of Rat	Activity	No. of Rat	Activity
Succinate cytochrome c reductase	6	149±45	9	152±54
NADH cytochrome c reductase	4	532±84	9	358±69
Cytochrome c oxidase	6	1351±430	9	1428±362

Values are expressed as μ moles of substrate reduced or oxidized/minute/mg of mitochondrial protein, Mean±S. D.

(2) 外膜局在酵素系

外膜局在酵素系として, モノアミン酸化酵素を選び, 普通食餌群と 3'-MeDAB 食餌群について, その酵素活性を比較した。その結果実験群においては著しく活性が低下していた。

Table 2. Effect of Long-Term Administration of 3'-MeDAB Diet on Rat Liver Mitochondrial Enzyme Activities : Outer Membrane Enzyme

Diet	Normal		3'-MeDAB	
Enzyme	No. of Rat	Activity	No. of Rat	Activity
Monoamine oxidase	8	9.60±1.96	9	2.24±0.88

Values are expressed as μ moles of benzaldehyde formed/minute/mg of mitochondrial protein, Mean±S. D.

(3) マトリックス局在酵素系

ミトコンドリアマトリックス局在酵素として, リンゴ酸脱水素酵素を選び, その酵素活性を比較したところ, 両者の間に差は認められなかった。

Table 3. Effect of Long-Term Administration of 3'-MeDAB Diet on Rat Liver Mitochondrial Enzyme Activities : Matrix Enzyme

Diet	Normal		3'-MeDAB	
Enzyme	No. of Rat	Activity	No. of Rat	Activity
Malate dehydrogenase	8	2688±297	9	2917±592

Values are expressed as μ moles of NADH oxidized/minute/mg of mitochondrial protein. Mean±S. D.

2. 普通食餌群と 3'-MeDAB 食餌群の肝グルコキナーゼ、ヘキソキナーゼの活性の比較
ミトコンドリア外対照として、解糖系の酵素のひとつであるグルコキナーゼおよびヘキソキナーゼについて、その活性を比較した。その結果 3'-MeDAB 食餌群において前者は、著しく低下し、後者は上昇していた。

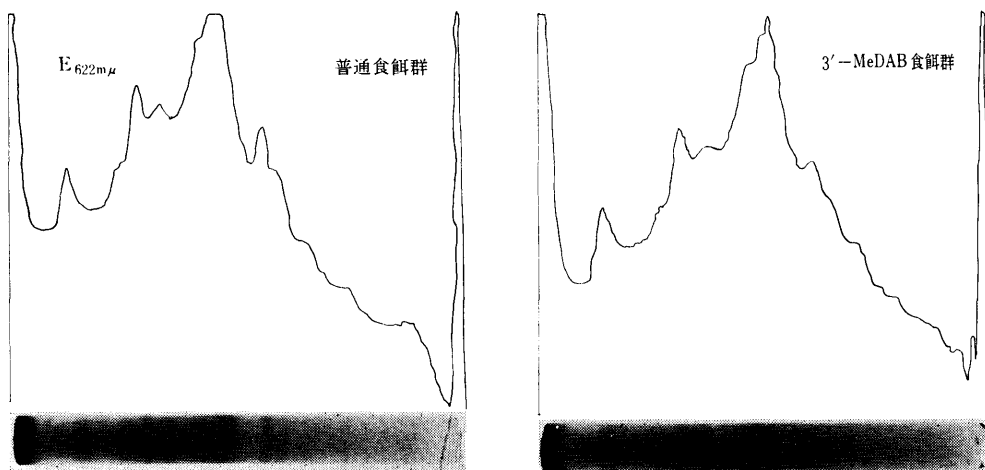
また両酵素活性の和は 3'-MeDAB 投与により高くなっていた。

Table 4. Effect of Long-Term Administration of 3'-MeDAB Diet on Rat Liver Glycolytic Enzyme Activities

Diet	Normal		3'-MeDAB	
Enzyme	No. of Rat	Activity	No. of Rat	Activity
Glucokinase	8	15.31±4.60	9	4.39±2.30
Hexokinase	8	1.81±0.86	9	4.11±1.12

Values are expressed as μ moles of NADP reduced/minute/mg of cytosol protein. Mean±S. D.

3. 普通食餌群と 3'-MeDAB 群間の肝ミトコンドリア構造蛋白質の比較



図一2

普通食餌群 3'-MeDAB 群からそれぞれ調製した構造蛋白画分のポリアクリルアミドゲル電気泳動図を図2に示した。両方共に5つの明確な濃いバンドと3～5個の淡いバンドがみられた。両群共バンドの位置はよく一致していて差は殆んどみられなかった。

考 察

普通食ラット肝と 3'-Me-DAB 食ラット肝とを比較すると内膜酵素系の比活性やマトリックスのリンゴ酸脱水素酵素のそれには、大差はみとめられなかった。また、内膜の成分である構造蛋白画分についても、両者の電気泳動パターンの間には明瞭な差を認める事は出来なかった。ここで測定した酵素は何れもエネルギー生産に直接つながりを持つものばかりであって、正常ラットにおいてこれらの酵素群が一組になって合成される機構は、3'-MeDAB の長期投与によっても攪乱されていなかった事になる。癌細胞¹⁸⁾にあって末端電子伝達系成分の量比、呼吸調節などは、正常に保たれている事が知られているので、内膜を中心とする呼吸、ATP生産系に関する限り癌化に際して変化があるとすれば、むしろ細胞内のミトコンドリアの数の調節という面で現われる可能性が高いといえよう。一方外膜局在酵素であるモノアミン酸化酵素は3'-MeDAB ラット肝において著しく活性が低下していた。一般にいわゆる「ミトコンドリアらしい」膜は、内膜であり、外膜は単なる外被と考えられているが、その機能、起源についてはまだ定説がない。3'-MeDAB ラット肝においてもモノアミン酸化酵素活性の急激な減少がみとめられるのは、外膜の構造の変化を示すと考えられ、その結果透過性が変化して、外界との相互作用に何らかの影響をおよぼしているものと思われる。ミトコンドリア外膜は小胞体膜と、化学的・酵素的な共通点を持っており構成成分の交換が起るという報告もある^{19)・20)・21)・22)・23)}。

また小胞体はバターイエロー系発癌色素に親和性がありその代謝に関与していることがわかっている²⁴⁾ので、ミトコンドリア外膜に 3'-MeDAB の影響が強くあらわれているという著者の結果は、外膜の起源、形成機構を考える上で興味深い。3'-MeDAB 食投与によって、グルコキナーゼの活性が減り、ヘキソキナーゼの活性が上昇することは、それだけ解糖系の活性が血中のぶどう糖濃度により調節を受け難くなることを示している。また総和として、グルコース-6-リン酸の産生能が上っていることは糖代謝の中で解糖や、六炭糖リン酸側路の比重が高まることを意味している。癌細胞のエネルギー代謝の特徴が個々の酵素活性よりも代謝系間の相互作用にあり、癌化に伴う変化が、この相互作用の変化にあるのではないかという観点に立つと、ヘキソキナーゼとグルコキナーゼの活性が著しい変化を受ける事と、外膜が変化することが、癌化の過程を追跡する上で看過できないものであらうと考えている。また同時に、これらの事実は、肝細胞のもっている機能上の特異性が失われて、組織が全体として脱分化の方向に向っている事をも示唆している。

要 約

1. 普通食投与ラット肝と 3'-MeDAB 食投与（長期：10～11週）ラット肝とからミトコンドリアを分離して、ミトコンドリアに局在する酸化還元酵素系の比較を行なった。
2. 細胞呼吸に直接関係している内膜系およびマトリックス系では、両者間に大差はなかった。内膜の構造を形造っている蛋白成分についても同様である。
3. これに反して外膜系の酵素（モノアミン酸化酵素）では、3'-MeDAB 食ラット肝で著

しい活性の低下がみられた。

4. ミトコンドリアのエネルギー産生に関連する酵素系としての解糖系に関しては、ヘキソキナーゼ活性は、3'-MeDAB 食群の方が高い値を示し、調節酵素であるグルコキナーゼでは、普通食群の方が高い値を示した。両者の和をみると、3'-MeDAB 食群が大であった。

5. 癌細胞のエネルギー代謝の特徴を代謝酵素系間の相互作用にあると考えると、外膜の構造変化による相互作用の変化が癌化の過程を知る上で重要であろう。

6. 前癌状態で肝ミトコンドリアならびに解糖系に、癌組織のエネルギー代謝に類似の特徴があらわれる事を示した。

終りに、本研究に当り、始終御懇切な御指導と御助力を賜りました大阪大学医学部腫瘍生化学教室 坂本幸哉、東胤昭、立石紀子の諸先生方に深謝致します。

文 献

1. 小川嘉誉, 大阪大学医学雑誌, 16, 45 (1964).
2. SHELTON, E., SCHNEIDER, W.C., and STRIEBICH, M.J., *Anat. Record*, 112, 388 (1952).
3. WARBURG, O., *Science*, 123, 309 (1956).
4. KADENBACH, B., *Biochem. Biophys. Acta*, 134, 430 (1966).
5. GREEN, D.E., *Proc. 5th Internat Cong. Biochem.*, Moscow, IX, 9 (1961).
6. TAKAYAMA, K., MACLENNAN, D.H., TZAGOLOFF, A., and STONER, C.D., *Arch. Biochem. Biophys.*, 144, 223 (1964).
7. TISDALE, H.D., *Methods in Enzymology*, Vol.10, Academic Press, New York, (1967), p.213.
8. HATEFI, Y., and RIESKE, J.S., *Methods in Enzymology*, Vol.10, Academic Press, New York, (1967), p.225.
9. WHARTON, D.C., and TZAGOLOFF, A., *Methods in Enzymology*, Vol.10, Academic Press, New York, (1967), p.245.
10. TABER, C.W., TABER, H., and ROSENTHAL, S.M., *J. Biol. Chem.*, 208, 645 (1954).
11. STROMINGER, J., and LOWRY, O.H., *Methods in Enzymology*, Vol.4, Academic Press, New York, (1957), p.379.
12. DARROW, A.R., and COLOWICK, S.P., *Methods in Enzymology*, Vol.5, Academic Press, New York, (1962), p.226.
13. GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.S., and DAVID, M.M., *J. Biol. Chem.*, 177, 751 (1949).
14. ROBINSON, H.W., and HOGDEN, C.G., *J. Biol. Chem.*, 135, 707 (1940).
15. WEICHELBAUM, T.E., *Am. J. Clin. Pathol. Suppl.*, 10, 40 (1946).
16. FOLIN, O. and CIOCALTEU, V., *J. Biol. Chem.*, 73, 627 (1927).
17. LOWRY, O.H., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
18. CHANCE, B., and HESS, B., *J. Biol. Chem.*, 234, 2404, 2413, 2416, 2421 (1959).
19. HOGEBOOM, G.H., *J. Biol. Chem.*, 177, 847 (1949).
20. HOGEBOOM, G.H., and SCHNEIDER, W.C., *J. Natl. Cancer Inst.*, 10, 983 (1950).
21. STRITTMATTER, C.F., in "Hematin Enzymes", Pergamon Press, London, (1961) p.461.
22. DRYSDALE, G.R., SPIEGEL, M.J., and STRITTMATTER, P., *J. Biol. Chem.*, 236, 2323 (1961).
23. BLOK, M.C., WIRT, K.W.A., and SCHERPHOF, G.L., *Biochem. Biophys. Acta*, 233, 61 (1971).
24. BOOTH, J., *Biochem. J.*, 66, 73 (1957).

Summary

Biochemical alteration in energy-yielding machinery was investigated in rat liver after long-term administration of a potent hepatic carcinogen, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-MeDAB) to the animals.

No significant change took place in terminal respiratory chain, associated dehydrogenases and structural components of mitochondrial inner membrane.

The carcinogen failed to affect the center of energy production but gave profound damage to outer membrane of the organelle : Considerably low activity of monoamine oxidase was found in precancerous state.

In cytosol fraction, lower glucokinase and higher hexokinase activities were resulted from azodye feeding for ten to eleven weeks.

All of these results consistently show that in precancerous state energy-yielding system of rat liver has already been changed its pattern to that generally observed in cancer cells.