

マンガンの生体影響に関する研究

第 4 編

マンガン及びバナジウムのラット肝ミトコンドリアの 酸化的リン酸化反応に及ぼす複合作用

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

森 田 啓 次 郎

（昭和58年11月30日受稿）

Key words：ミトコンドリア，酸化的リン酸化，
マンガン，バナジウム，
マグネシウム

緒 言

マンガン（以下 Mn）はピルビン酸カルボキシラーゼの中心金属として、また、他の酵素の活性因子として生体に必須の金属^{1,2)}である。反面産業暴露など過剰摂取で、いわゆる慢性 Mn 中毒症^{3,4,5)}がある。Mn の毒性発現濃度レベルは明らかでないが、他の重金属に比較して高く、その毒作用機構については不明な点が多い。最近、その成因について生体アミンの代謝異常^{6,7,8)}の面からも検討がなされている。著者は、前報⁹⁾において、Mn fume の吸入実験を行い、Mn が肝臓に多く蓄積されることを確認した。また、Mn の毒作用発現機序について、特に、生体膜影響に関する基礎的な知見を得るために、ラット肝ミトコンドリア（以下 Mt）のエネルギー転換反応（酸化的リン酸化反応）を指標として methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) と MnCl₂ の作用¹⁰⁾を比較検討した。その結果、両者とも State 4 の呼吸を促進し、脱共役作用を示すことが明らかになった。重油中に多量に含まれ、燃焼過程から大気環境中に排出されるバナジウム化合物（以下 V）と浮遊粒子状物質中に存在する Mn の同時吸入による複合作用を明らかにするための基礎実験として、ラット肝 Mt のエネルギー転換系に対する Mn と V の影響を調べ、若干の知見を得たので報告

する。

材料及び方法

1. ミトコンドリアの分離

ドンリュウ系ラット（体重約250g）の肝臓を摘出し、Hogeboom-Schneider¹¹⁾ の変法¹²⁾により Mt を分画し、氷冷した0.25M Sucrose、4mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 中に懸濁し、実験に使用した。

2. 試薬

MnCl₂、NaVO₃ は、いずれも試薬特級品を蒸留水に溶解し、0.1M 溶液を調製した。呼吸測定時にそれぞれ10~100mM の範囲で段階的に希釈し、使用した。

3. 呼吸活性の測定

0.15M KCl, 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 2.5mM Potassium phosphate buffer (pH 7.5) より成る反応液中にミトコンドリア (2.3mg 蛋白/ml) を添加し、呼吸基質として Na-Succinate (5 mM) リン酸化基質として Na-ADP (0.3mM) を加えて ATP 合成反応を行なわせ、これに伴う酸素消費をガルバニー酸素電極（給水化学）を用いて経時的に測定した。呼吸調節能 (RCI: state 3 呼吸速度/state 4 呼吸速度) 及び、リン酸化能 (ADP/O 比) は常法¹³⁾ または前報¹⁰⁾ により算出した。反応温度は25°C 反応液量は3.5ml で行った。

表-1 Effect of Mn^{2+} ($MnCl_2$), Mg^{2+} ($MgCl_2$) and V^{5+} ($NaVO_3$) on the respiratory activity of rat liver mitochondria

Concentration (mM)	Mn^{2+}		Mg^{2+}		V^{5+}	
	ADP/O	RCI	ADP/O	RCI	ADP/O	RCI
Control	1.90	5.34	1.84	5.28	1.88	5.30
0.10	1.83	5.05	1.82	5.14	1.85	5.12
0.25	1.76	4.72	1.83	5.12	1.80	4.86
0.50	1.40	2.80	1.80	5.00	1.77	4.50
0.75	1.00	1.46	1.80	4.95	1.72	4.54

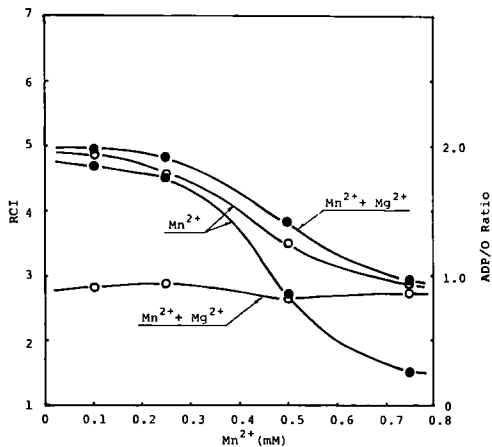


図-1 Effect of Mn^{2+} alone, cooperative effect of Mn^{2+} (0.10-0.75 mM) and Mg^{2+} (0.75 mM) on the respiratory activity of rat liver mitochondria. RCI: —●—, ADP/O: —○—

4. ミトコンドリアの蛋白質質量

ミトコンドリアの蛋白質質量はビヨレット法により行った。

実験結果と考察

ミトコンドリアの生理的状态を表わす場合、指標として通常その呼吸調節能と ADP/O 比¹⁴⁾が用いられる。それらは、コハク酸を呼吸基質に用いた場合、それぞれ 5~6、及び 2 に近い値を示す。これらは、ミトコンドリアの機能が正常に維持され、代謝調節能が強く働いている程高い値を示し、ミトコンドリアが何らかの機能障害をおこすと、上記の値は低下する。

以下に、ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する Mn^{2+} 及び V^{5+} の相互作用について述べる。表-1 に Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 及び V^{5+} 単独の

場合の ADP/O, RCI を示す。

1) Mn^{2+} の相互作用

Mn^{2+} は生体内に多量に存在し、リン酸交換反応に関するすべての反応において基礎的な役割¹⁵⁾を果している。また核酸の構造を安定化するための要素であると考えられている。

Mg^{2+} は必須量として生体内に約 12~20 mg 存在し、ATP と

金属-複合体の生物学的反応に関与¹⁶⁾している。これらの理由から、 Mn^{2+} の毒性に関し、先ず Mg^{2+} との相互作用について検討を行った。図-1 に Mn^{2+} 単独の場合の RCI と ADP/O 比を示す。 Mn^{2+} は 0.3 mM 以上で明らかに RCI を低下させ、膜傷害が示唆された。同時に ADP/O 比も減少の傾向を示した。これは典型的な脱共役現象である。しかし、この作用濃度は水銀、カドミウム及び鉛の 1~10 μ M と比較すると高い値である。 Mn^{2+} の微量は、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化反応への共役に必要であること、また過剰量は脱共役作用を示すことはすでに知られている。

Mg^{2+} 共存下における RCI と ADP/O を比を図-1 に示す。図-1 より Mn^{2+} の RCI 低下を Mg^{2+} が共存することによって抑制する傾向が認められる。それに反し、ADP/O 比は図-3 より Mg^{2+} 共存下であえて、 Mn^{2+} 単独よりも低下することが認められた。このことから、 Mn^{2+} が他の金属、特に Mg^{2+} の代りをし得ること¹⁷⁾が実験的に証明されたと考えられる。

以上の結果から、 Mn^{2+} と Mg^{2+} の拮抗現象は膜傷害作用に関してはみられたが、リン酸化能に関しては認められなかった。

2) Mn^{2+} と V^{5+} の相互作用

V^{5+} の主要な生体内作用は各種酵素の関与する代謝系に対するものであり、代謝(コレステロール、脂質、システイン、アミノ酸などの合成)阻害因子¹⁷⁾としての作用が注目されている金属である。

V^{5+} が酸化的リン酸化反応で脱共役作用を示すことはすでに報告¹⁸⁾されている。しかし、今回の実験濃度範囲(0.1~0.8 mM)では、表-1

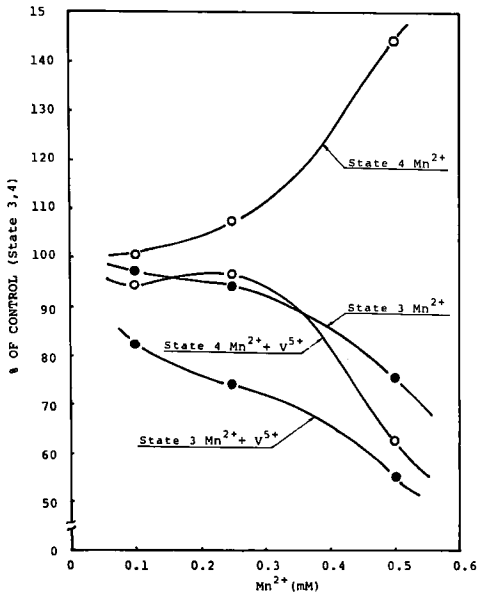


図-2 Effect of Mn^{2+} alone, cooperative effects of Mn^{2+} (0.1-0.5mM) and V^{5+} (0.14mM) on state 3 and state 4 respiration of rat liver mitochondria. State 3: —●—, State 4: —○—

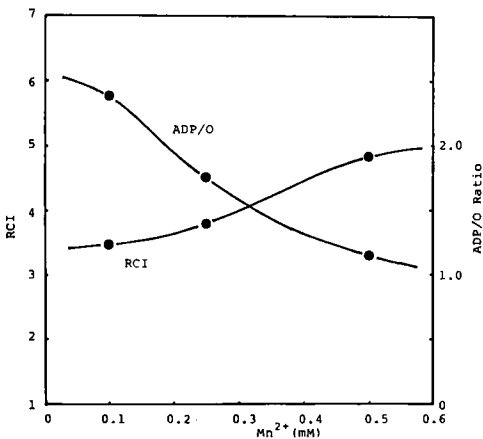


図-3 Cooperative effects of Mn^{2+} (0.1-0.5mM) and V^{5+} (0.14mM) on the respiratory activity of rat liver mitochondria

にみられるように影響を示さなかった。

V^{5+} の生理的役割の分子レベルの解明は充分でない。部分が多い。松井¹⁹⁾は、 V^{5+} 阻害作用について、 Na^+ , K^+ -ATPase 分子構造の面から解析を試み、 VO_4^{3-} と PO_4^{3-} との分子構造の類似性について考察を行っている。

V^{5+} が in vitro において、 Na^+ , K^+ -ATPase の強力な阻害剤であるとは、Cantley²⁰⁾ らによって報告されている。そして、阻害を受けるものには、リン酸化中間体を生成するものが多い。

しかし、ミトコンドリアの H^+ -ATPase (F_1 ATPase) は、まったく V^{5+} によって影響を受けない²¹⁾ としている。これらのことは、著者の実験結果を支持するものと考えられる。その濃度範囲内で Mn と共存させた場合の結果を図-2 に示す。即ち、0.14mM V^{5+} 共存の場合を示す。この場合、対照の活性を100として、それぞれに対する変動を図に示したものである。 Mn^{2+} 単独では、State 4 呼吸活性は上昇し、State 3 呼吸活性は抑制する。それに反し、 V^{5+} 共存下では、 Mn^{2+} 0.25mM まで脱共役、0.25mM 以上の濃度では、State 3, State 4 いずれも活性が低下し、作用が脱共役から呼吸阻害に転じたことが示唆される。

一般に脱共役が強まると呼吸阻害を呈することから、 Mn^{2+} の毒性が V^{5+} 共存により強まった可能性が考えられる。酸化リン酸化反応に関しては、図-3 にそれを示す。RCI は呼吸阻害により上昇し、ADP/O 比は単独よりも低下していることが認められ、Mn の毒作用が増強されることが示唆された。

結 論

Mn^{2+} の V^{5+} 及び Mg^{2+} との相互作用に関し、ラット肝ミトコンドリアのエネルギー転換反応を指標として検討を行い、次の結果を得た。

- 1) Mn^{2+} 単独では0.1~0.8mM で State 4 呼吸の促進及び state 3 呼吸の低下により、脱共作用が確認された。
- 2) V^{5+} 単独では0.1~0.8mM の濃度範囲で影響はみられなかった。
- 3) Mn^{2+} , V^{5+} の共存下で state 3, state 4 の呼吸はいずれも低下するが、その度合は、 Mn^{2+} の低濃度においては state 3 の呼吸に顕著であった。
- 4) Mn^{2+} 単独による state 4 呼吸の濃度が V^{5+} の存在下では state 4 呼吸の抑制に野じないことは、 Mn^{2+} , V^{5+} の共同作用による膜機能傷害の増強を示唆する。

5) Mn^{2+} と Mg^{2+} の共存下では, Mn による膜傷害作用を Mg^{2+} が抑制するが, リン酸化能に関しては毒性が増強された。即ち, Mn^{2+} と Mg^{2+} は一部拮抗する部分としない部分があることが本実験により明らかになった。

稿を終るに臨み, 終始ご懇篤なるご指導と, ご校閲を賜った, 恩師緒方正名教授に深く感謝の意を表します。また本研究にご協力いただいた公衆衛生学教室の緒兄に厚くお礼申し上げます。

文 献

1. 和田 攻, 稲葉 裕: 環境汚染物質の生体への影響, 東京化学同人, pp.79—86, 1977.
2. 環境庁環境保健部保健調査室: WHO 環境保健クライテリア17, pp.39—41, 1983.
3. Waldon, H.A.: *Metals in the Eenvironment*, Academic Press, N.Y. pp.206—215, 1980.
4. Patty, F.A.: *Industrial Hygiene and Toxicology*, vol. 2, Interscience Publishers, N.Y. pp.1082—1089, 1963.
5. Zenz, C.: *Occupational Medicine*, Year Book Medical Publishers. pp.661—667, 1977.
6. 和田 攻, 稲葉 裕: 環境汚染物質の生体への影響, 東京化学同人, pp.88—96, 1977.
7. 市川 晃, 西山敬太郎, 守 和子: マンガンばくろの尿中カテコールアミン排泄に及ぼす影響, 第52回産業医学会講演要旨集, pp.290—291, 1979.
8. 西山敬太郎, 鈴木泰夫, 河野通宣: マンガン作業における尿中ホモバリニン酸の分析について, 第50回産業医学会講演要旨集, pp. 350—351, 1977.
9. 森田啓次郎: マンガン生体影響に関する研究. 第2編, マンガンヒュームの生状と吸入動物による運命及び血清酵素の変動, 岡山医学会討掲載予定
10. 森田啓次郎: 有機及び無機マンガン中毒に関する研究. 第1報, 分離ラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する MMT 及び $MnCl_2$ の作用比較, 岡山医学会雑誌, **93**, 219—225, 1981.
11. Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. and Palade, G.H.: Cytochemical studies of mammalian tissues. I. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.* **172**, 619—635, 1948.
12. Utsumi, K.: Relation between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P^{32} in mitochondrial pifraction, *Acta Med. Okayama*, **17**, 258—271, 1963.
13. Hagihara, B.: Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochem. Biophys. Acta* **46**, 1342, 1961.
14. Ogata, M., Hasegawa, T. and Inoue, B.: Effects of environmental pollutants on the mitochondrial and red cell membranes. *J. Toxicol. Sci.* **8**, 205—212, 1983.
15. Lindberg, O. and L. Ernster: Manganese, a co-factor of oxidative phosphorylation. *Nature*. **173**, 1038—1039, 1954.
16. Ohnishi, T., Suzuki, T., Suzuki, Y. and Ozawa, K.: A comparative study of plasma membrane Mg^{2+} -ATPase activities in normal regenerating and malignant cells. *Biochim Biophys Acta*, **684**, 67—74, 1982.
17. 木村正己, 小野 哲, 和田 哲: 環境汚染物質の生体への影響(2) クロム・バナジウム, 東京化学同人, pp.185—190, 1977.
18. Hathcock, J.N., Hill, C.H. and Tove, S.B.: Uncoupling of oxidative phosphorylation by vanadate. *Can. J. Biochem.* **44**, 983—988, 1966.
19. 松井英男: バナジウムと Na^+ , K^+ -ATPase. 生化学, **53**, 246—250, 1981.
20. Cantley, L.C., Tosephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C. and Giudott, G.: Vanadate

- is a potent (Na, K) -ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* **252**, 7421—7423, 1977.
21. O'Neal, S.G., Rhoads, D.B. and Racker, F.: Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and other ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 845—850, 1979.

Studies on biochemical effects of manganese
IV; Cooperative effects of manganese
and vanadium on the energy transfer reaction
of rat liver mitochondria

Keijiro MORITA

Department of Public Health Okayama University Medical School

(Director: Prof. M. Ogata)

Cooperative effects of Mn^{2+} and V^{5+} on the energy transfer reaction of rat liver mitochondria were investigated.

Mn^{2+} (0.10–0.05 mM) increased State 4 respiration and decreased State 3 respiration, indicating an uncoupling action on the mitochondria.

V^{5+} alone at the concentration of 0.1–0.8 mM had no noticeable effect on mitochondrial respiration.

In the presence of V^{5+} , Mn decreased both State 3 and State 4 respiration. The degree of the inhibition was extreme in State 3 respiration at a low concentration of Mn.

The change from the acceleration of State 4 respiration by Mn^{2+} alone to its inhibition by Mn^{2+} and V^{5+} suggests an increase of deterioration in mitochondrial function by the cooperative action of Mn^{2+} and V^{5+} . Cooperative effects of Mn^{2+} and Mg^{2+} on the energy transfer reaction have been described. In the presence of Mg^{2+} , the uncoupling action of Mn^{2+} was not observed, suggesting that the injurious effect of Mn^{2+} on mitochondrial membrane was depressed by Mg^{2+} .

However, phosphorylation activity was more strongly inhibited with Mn^{2+} and Mg^{2+} together than with Mn^{2+} alone.