

亜硝酸ナトリウムのミトコンドリア ATPase 活性化作用

岡山大学医学部公衆衛生学教室

長谷川 亨・緒方正 名

(昭和52年10月1日受稿)

緒言

窒素酸化物の環境大気中の濃度は、ここ最近数10年間に倍以上の増加を示し、場所によっては硫黄酸化物濃度を上回っている¹⁾この窒素酸化物の生体影響に関する報文は最近になって増加しているとは言他の環境汚染物質に比して比較的少ない。

窒素酸化物の人体影響は古くからは職業性の高濃度曝露による人体被害が知られ、最近ではサイロ病として注目されている²⁾一方低濃度曝露による人体影響に関しては、まず感覚器への反応が示され、次いで呼吸器系への影響が認められている^{3,4)}また生化学的变化としては、血清脂質の変化⁵⁾血清酵素の変動⁶⁾(コリンエステラーゼ、セルロプラスミン、アスパラギンアミノトランスフェラーゼ等の酵素の変動)がある。窒素酸化物の人体への作用発現に関する実験には Dalhamn ら⁸⁾のせのせん毛運動に関するもの、Myrvic ら⁹⁾の肺マクロファージの食作用に関するものなどがあげられる。しかしながら、生体膜の機能に関する研究は少ないようである。我々は今回窒素酸化物の人体影響に関する基礎的研究として、窒素酸化物の生体膜に対する作用の検討を試みた。

実験方法

ミトコンドリアの分画

ドンリッ系ラット(体重200g前後)の肝より、Hogebon, Schneider の変法¹⁰⁾に従って分画し、分画後ミトコンドリアを0.25M sucrose, 3mM Tris-HCl (pH7.5)に0℃で懸濁し実験に供した。

ATPase 活性測定法

反応液0.15MKCl, 10mM Borate buffer (pH7.5)

あるいは0.15MKCl, 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)中にミトコンドリアを添加し、反応基質 ATP 2.5mM から遊離してくる無機リン酸を高橋氏法¹¹⁾により比色定量した、蛋白濃度はビューレット法に従った。反応温度25℃、反応容量2.0mlであった。

酸化リン酸化反応

反応液0.15MKCl 10mM Borate buffer (pH7.5) Pi 2.5mM, Na-succinate 5mM, ADP0.3mM中にミトコンドリアを添加し、反応液中溶存酸素消費を酸素電極を用いて経時的に測定し呼吸調節能(RCI)を算出した。

実験結果

亜硝酸ナトリウムのミトコンドリア ATPase 活性化に対する作用

本研究では、亜硝酸ナトリウムが α -アミノ酸のアミノ酸Nの定量に利用される¹²⁾事を考慮に入れて反応液中の緩衝液をアミノ基を有するトリス緩衝剤の代わりにアミノ基の有しないホウ酸緩衝剤を用いた。なお、緩衝剤の影響については後述する。

通常 intact なミトコンドリアは ATPase 活性をほとんど示さないが、膜のイオンに対する透過性の増大をはかる脱共役剤(DNP等)を添加する事とか、膜が何らかの原因で構造に損傷を受けるとかすると潜在化されていた ATPase 活性が活性化される¹³⁾今 intact なミトコンドリアに亜硝酸ナトリウムを添加すると、濃度依存的に ATPase 活性が活性化される事が認められた(図1)。そして15~20mM 付近より ATPase 活性は平衡に達した。これに反し、DNP 活性化 ATPase に対しては、亜硝酸ナトリウムは抑制的に作用する事が認められた。なお0~5mM の

亜硝酸ナトリウムについては現在検討中である。

亜硝酸ナトリウム活性化 ATPase に対する緩衝液の影響

亜硝酸ナトリウムは前述の如く、アミノ酸化修飾剤として知られているので、¹²⁾ 亜硝酸ナトリウムによる ATPase 活性に対し、アミノ基を有するトリス緩衝液とアミノ基を有しないホウ酸緩衝液とは如何なる影響を及ぼすかを検討した(図2)。明らかに、トリス緩衝液中の ATPase 活性の方が、ホウ酸緩衝液中の ATPase 活性よりも低い事が認められた。

亜硝酸ナトリウムの脱共役作用とミトコンドリア蛋白濃度との関係

上記の実験より、亜硝酸ナトリウムはミトコンドリア膜に何らかの傷害を与えその結果潜在 ATPase 活性を活性化させる脱共役作用を有する事が認められた。この脱共役作用を酸素電極を用いて呼吸現象から確認し、¹⁴⁾ 更にミトコンドリア蛋白濃度との関係をホウ酸緩衝液中で呼吸調節能を指標にして検討してみた。なおこの場合の呼吸調節能は state 3呼吸速度/state 4呼吸速度を示し、ミトコンドリアの脱共役度と比例したもので、脱共役を受けているものほど、呼吸調節能は低い値を示す。表1の結果より明らかな如く、蛋白濃度の高いものは、低いものより、共役度が浅く、この現象は蛋白濃度に無関係な DNPの脱共役作用¹⁵⁾とは作用機作が異なる事を示す。

表1. 蛋白濃度変化による呼吸調節能に対する NaNO₂ の脱共役作用変化

	mg protein/ml	
	1.3	2.6
control	4.6*	5.0*
+NaNO ₂	1.8*	2.5*
%of control	23	50

*呼吸調節能 (State 3呼吸速度 / State 4呼吸速度)

考 察

NO₂は不飽和脂肪酸を過酸化する事を Roehm¹⁶⁾によって報告されている。そしてこの過酸化反応には NO₂によりフリーラジカル基が生成される事に起因する事は Rowland¹⁷⁾によって見出されている。この事実より、NO₂は生体膜構成脂質に対しても過酸化反応を誘発させる可能性が考えられる。我々は、亜硝酸ナトリウムがミトコンドリア膜に何らかの傷害を与え、その結果潜在化されていた ATPase 活性を活性化させる事を見出した。この事実は、亜硝酸ナトリウムの酸化的リン酸化に対し脱共役作用を有する事実と一致する。¹⁴⁾

亜硝酸ナトリウムはアミノ基の酸化修飾剤¹²⁾であるので、ミトコンドリアのアミノ基に作用を及ぼしている事も推定され、事実ホウ酸緩衝液下の方がアミノ基の有しているトリス緩衝液下での ATPase 活性よりも高く出る事からも推定される。

以上の事実は、窒素酸化物が生体膜系に何らかの傷害を与える事を示唆し、窒素酸化物の生体影響を考える場合、興味ある知見を与えるものと思われる。

結 論

亜硝酸ナトリウムの生体膜に対する作用をミトコンドリアの ATPase 活性を指標として検討し以下の結果を得た。

- 1, 亜硝酸ナトリウムは濃度依存的にミトコンドリアの潜在 ATPase 活性を活性化させた。
- 2, 亜硝酸ナトリウムの ATPase 活性値は、アミノ基の有するトリス緩衝液下よりも、ホウ酸緩衝液下の方が高く測定された。
- 3, 亜硝酸ナトリウムのミトコンドリアに対する脱共役度は、ミトコンドリア蛋白濃度が高くなるにつれて低くなる事が認められた。

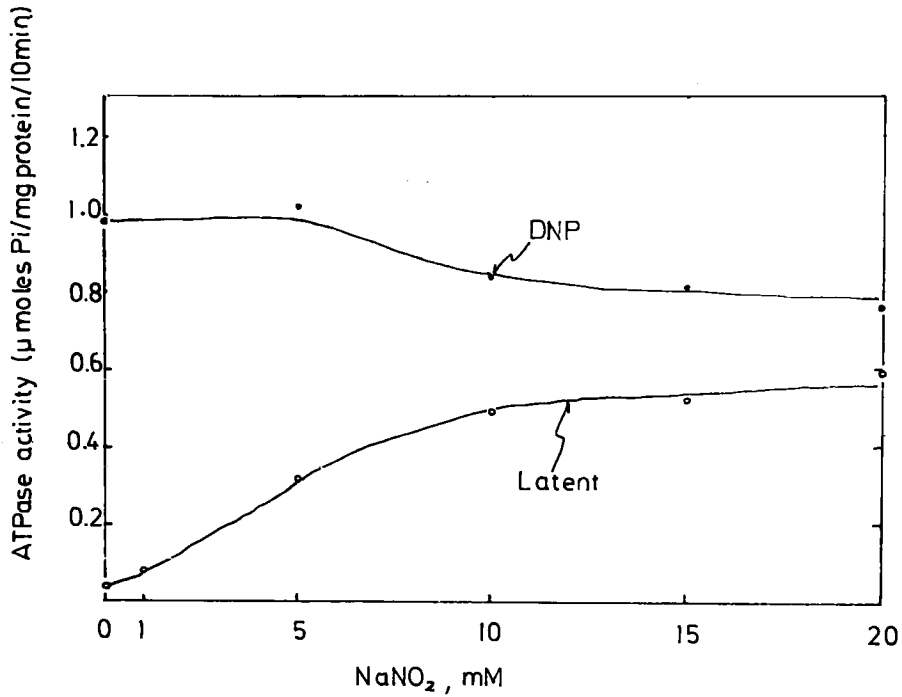


図1 亜硝酸ナトリウムのミトコンドリア ATPase 活性化に対する作用
 反応条件, 0.15MKCl Bovate buffer (pH7.5), ATP2.5mM ラット肝ミトコンドリア (1.6 mg Protein/ml), 反応時間10分間, DNP $2 \times 10^{-5}M$, 反応温度25℃, 反応容量2.0ml .

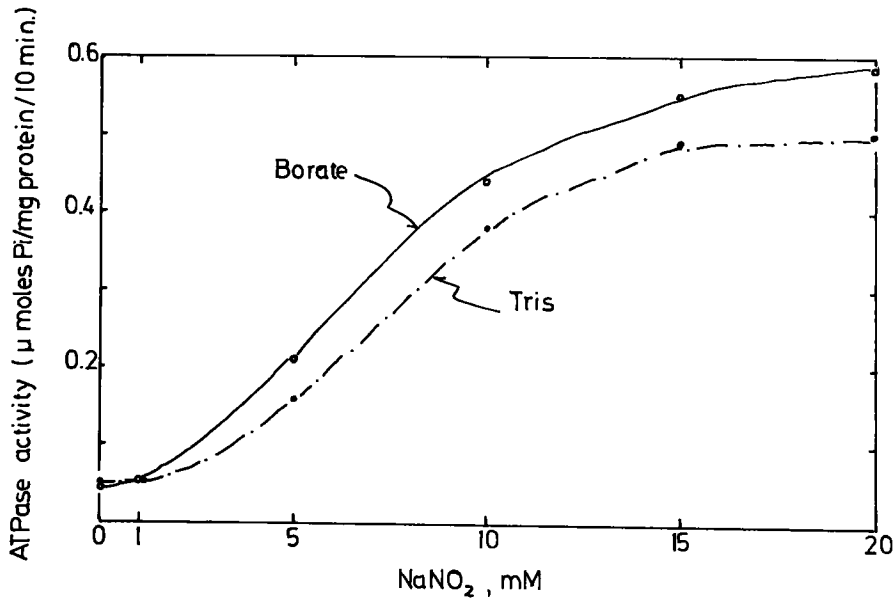


図2 亜硝酸ナトリウムの ATPase 活性化作用に対する緩衝剤の影響
 反応条件, 図1と同じ, 但し緩衝剤は10mMのBorate buffer (pH7.5)と10mMのTris-Hcl buffer (pH 7.5)を用いた。ATPase 活性は latentなものを示す。

文 献

- 1) 和田攻, 小野哲, 長橋捷, “窒素酸化物” pp1 - 2 文光堂, 東京, 1976.
- 2) 和田攻, 小野哲, 長橋捷, “窒素酸化物” pp45- 102 文光堂, 東京1976.
- 3) Shy, C, M, Keynote paper, “Air pollution Control Assoc, pp7 - 25, 1970.
- 4) Hackney J. D. Arch. Environ. Health. **30**, 385- 390, 1975.
- 5) Kosmider S and Misiewicz A. Inf. Arch Arbeitsmed. **31**, 249- 256, 1973.
- 6) Kosmiber, S. T. Wiad Lek. **8**, 729- 733, 1973.
- 7) Kosmiber, S. T. and Misiewicz A. Z. Gesamte Hyg., **19**, 108- 109, 1973.
- 8) Dalhamn T. Acta physiol. Scand. **58**, 287- 291, 1963.
- 9) Myrvic K. Q. N Arch Environ. Health. **14**, 92- 96, 1967.
- 10) Utsumi K Acta Med. Okayama **17**, 259- 271, 1963.
- 11) 高橋. 生化学**26**, 690- 698, 1955.
- 12) Means G. E. and Feeney R. E. “タンパク質の化学修飾法” pp. 227- 231, 広川書店. 東京. 1973.
- 13) 萩原文二. “ミトコンドリア” pp. 173- 192, 朝倉書店. 東京. 1971.
- 14) 井上堅太郎. 岡山医学会誌, 投稿中.
- 15) 寺田弘, 村岡三郎 “アンカップラー” 蛋白質. 核酸. 酵素. **18**, 911- 929, 1973.
- 16) Roehm. J, N Arch. Environ. Health. **23**, 142- 148, 1971.
- 17) Rowlands. J, R. and Gause E. M. Arch. Intern. Med. **128**, 94- 100, 1971.

**The effect of sodium nitrite
on the mitochondrial latent ATPase activity**

Tohoru HASEGAWA and Masana OGATA

The Department of Public Health, Okayama University Medical School of Okayama

The effect of sodium nitrite on the mitochondrial latent ATPase activity was studied and the following results were obtained.

1. Sodium nitrite stimulated the latent ATPase activity, and its stimulating activity was dependent on its concentration added to the reaction mixture.
2. The activity of the ATPase stimulated by sodium nitrite was lower in the tris buffer having the amino group than that in the borate buffer.
3. The ability of sodium nitrite on release respiratory control was lower in the high concentration of mitochondrial protein than that in the low concentration of protein.