

ラット胎仔肝ミトコンドリアの membrane permeability transition と酸素ストレス時における生物学的意義

吉田 孝

胎児の組織は出生前後に著しい酸素ストレス下におかれる。胎児から新生児への適応過程においてはこの酸素ストレスに対して何らかの生体防御機構が存在することが推定される。新生児肝においては少ないスーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼなどの抗酸化酵素が産時や酸素ストレスに対する防御に関与していることが知られている。しかし、これらの抗酸化酵素が誘導される前（出生前後）に酸素ストレスに対してどのような防御機構が存在するかということに関しては不明である。最近の研究により、酸素ストレスが細胞のアポトーシスを誘導することが明らかとなった。胎児肝のミトコンドリアでは電子伝達反応に関与する構成成分が未成熟であり、様々な点で成人のものとは異なることが報告されている。

本研究では、胎仔、新生仔および成獣ラットの肝ミトコンドリアを用いて、その代謝特性と酸素ストレスによるアポトーシスとの関係を解析し、周産期医学的意義を考察した。その結果、胎仔肝のミトコンドリアでは membrane permeability transition (MPT) が起こりにくく、シトクローム C が流出されず、酸素ストレスによる肝実質細胞のアポトーシスが回避される機構が存在することが判明した。胎仔の他の臓器でも類似の機構で酸素ストレスに抵抗している可能性が考えられる。ミトコンドリアはエネルギー産生を介して細胞の生を保証すると同時に、アポトーシスを介して細胞の死を演出している。胎仔のミトコンドリアは成獣ラットのそれに比べて組織のミトコンドリア依存性アポトーシスを抑制するという特性がある。この機構が出生直後の酸素ストレスに対する防御反応に大きな役割をはたしているものと考えられる。

(平成13年8月1日受理)

Suppression of Membrane Permeability Transition in Fetal Rat Liver Mitochondria and Its Role in Oxidative Stress

Takashi YOSHIDA

Because neonates are exposed to various hazards, such as oxidative stress during and immediately after labor, protective mechanisms should exist. However, to date, few have been identified. The aim of this study was to clarify the role of mitochondrial membrane permeability transition (MPT) in protection of the fetus and the neonate against the hazards arising during the perinatal period.

Mitochondria were isolated from livers of fetal (FM) and adult (AM) rats by the method of Hogeboom. Cytochrome content and rates of oxidative phosphorylation were measured by

spectrophotometric and polarographic methods, respectively. Mitochondrial MPT was measured by large amplitude swelling monitored by absorption at 540 nm and by depolarization of membrane potential monitored by fluorescence change in a cyanine dye, diS-C3-(5). Cytochrome c (Cyt. c) release from mitochondria was measured by Western blot analysis using anti-cytochrome c antibody. Caspase-3 activity was measured in a cell free system using a fluorogenic peptide substrate.

No typical absorption spectrum of reduced Cyt. c was observed in FM although Cyt. c was detected by Western blotting. The rates of oxidative phosphorylation and the respiratory control ratio were lower in FM than in AM. Similarly, both mitochondrial MPT and Cyt. c release from FM induced by Ca^{2+} yielded lower values than those of AM. However, triton-treated FM supernatant activates caspase-3 like protease. These low levels of oxidative phosphorylation and MPT activity gradually became high after birth. The speed with which the high levels of oxidative phosphorylation and MPT were attained very rapid after exposure to oxygen stress. These results indicate that the low levels of MPT in FM might protect the fetus the apoptotic action of oxidative stress during the process of birth.

The present results suggest that low levels of mitochondrial MPT and Cyt. c release and the consequent decrease in the activation of caspase-3, which induces chromosomal DNA fragmentation and apoptosis in liver cells, might contribute to protection of the tissues of both the fetus and the neonate against the various hazards experienced during the perinatal period. (Accepted on August 1, 2001) *Kawasaki Igakkaishi 27(3): 181-191, 2001*

Key Words ① Rat liver mitochondria ② Swelling and membrane potential
③ Membrane permeability transition ④ Cytochrom c
⑤ Caspase 3 activity

緒 言

発生過程におけるエネルギー代謝の特色のひとつとして解糖系から呼吸系へと変動することがあげられる。従って、呼吸中枢としてのミトコンドリアは成長に伴って、特にその初期過程ではかなりの形態ならびに機能的変化が起こることが予想され、これらの変化と呼吸の確立とは深い関係があることは充分予知されることである。これまでの研究でも、胎仔肝ミトコンドリアは成獣のそれと比較してかなり異なっており、電子伝達系をはじめ生化学的にも、形態的にも未成熟な特性を持つことが報告されている^{1),2)}。ミトコンドリアの機能低下は様々な現象を誘導するが、その一つとして、membrane permeability transition (MPT) が注目されてい

る³⁾。MPTとは、 Ca^{2+} 濃度依存的にミトコンドリア膜透過性を変化させる現象であり、膜電位の低下、ミトコンドリアの膨潤、マトリックスタンパク質の漏出などが引き起こされている。MPTの正確な分子機構はまだ十分に解析されていないが、ミトコンドリアの内外膜の接近した部位に形成されるporeの開口や閉口によってアポトーシス誘導分子の流出の調節がはかられていることが、解明されてきた^{4),5)}。このような近年のアポトーシスに関する分子機構の解析の結果から、ミトコンドリアがアポトーシスに大きく関与していることが明らかになってきた⁶⁾。

胎児の動脈血酸素分圧は、出生と同時に25 mmHgから100 mmHgに跳ね上がり、出生直後の全臓器は著しい酸素ストレスを受ける⁷⁾。すなわち出生と共にすべての臓器の代謝は、羊

水中から大気中での生活環境に適応すべく著しい変化がおこる。肝細胞でも他の細胞同様に出生に伴う酸素ストレスに対する激しい防御反応が起こっていると考えられる。胎仔肝ミトコンドリアは、電子伝達系をはじめ、生化学的に幼弱な特性を持っていることが報告されてきた^{1), 8)~10)}。

本研究では、そのような幼弱なミトコンドリアの持つ機能が周産期の適応過程における酸素ストレスの防御にどのように関わっているかについて解析することを目的とした。

材料と方法

ウィスターラットの胎仔（妊娠20日目）、新生仔（生後1時間、生後2日目、生後2週間目）及び成獣の肝ミトコンドリアを使用した。

1) 肝ミトコンドリアはHogeboom-Schneiderの変法によって分離した¹¹⁾。

2) ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応は酸素電極法によった。反応液には、0.2 M ショ糖、10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 を使用し、2 mM 無機リン酸、5 mM コハク酸添加に続いて 200 μM ADP 添加により、呼吸調節能 (state 3/state 4) および ADP/O 比を求めた¹²⁾。

3) ミトコンドリアのMPTは0.15 M KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4 液中での膨潤度、及び膜電位変化から求めた¹³⁾。膨潤度合は540 nm の吸光度変化により、また膜電位変化は、反応液にシアン色素の一種 diS-C₃-(5) 0.2 μg/ml 存在下で650 nm の励起光による672 nm の蛍光変化により測定した。

4) ミトコンドリアからのシトクロム c の流出は、ミトコンドリア及び反応液中のシトクロム c を SDS-PAGE 後、抗シトクロム c 抗体を用いたイムノプロット法により検索した¹⁴⁾。

5) シトクロム c の吸収曲線、及び含有量はミトコンドリアのフェリシアン化カリ酸化型対アスコルビン酸還元型の差スペクトルから求めた。すなわち特定の方法でミトコンドリアの酸化型

と還元型をつくり、その差スペクトルで示される各々のシトクロムの特異吸収の極大波長 (peak) と谷 (trough) によりその含有量を求めた¹⁵⁾。

6) カスパーゼ-3の活性測定は肝細胞の細胞質分画 (100,000 xg 上清) を酵素液とした。反応液は、20 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM dATP, 10 μM 合成ペプチド acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-MCA (Ac-DEVD-MCA) に細胞質 0.1 mg protein/ml を添加して、37°C, 60分反応、遊離する蛍光物質 MCA の蛍光強度から測定した^{3), 16), 17)}。

実験結果

1. 胎仔、新生仔、成獣ラット肝細胞ミトコンドリアの酸化的リン酸化活性

正常成獣ラット肝ミトコンドリアはコハク酸酸化による呼吸では、呼吸調節率 (RCR) stage 3 / stage 4 は4と高い値を示し、ADP/O 比も2に近い。これに比べて胎仔肝ミトコンドリアの RCR は極めて低く、ADP 添加による stage 3 呼吸は、しばらくの time lag をもってゆるやかに呼吸速度を増すといた状態である。また、ADP/O 比も極めて低値であった。このように胎仔肝ミトコンドリアでは、呼吸調節能は極めて低い値を示し、ATP 合成活性も極めて低い状態であった。しかし、生後2日目には RCR は1.8に上昇し、ADP/O 比も1程度にまで上昇した。この傾向は、出生後は急速に高くなり、生後2週間では成獣のミトコンドリアに見られる値と同じ程度の呼吸調節能となった (Fig. 1, Table 1)。

2. 肝ミトコンドリアの膨潤と膜電位低下

ミトコンドリアの膨潤には、ミトコンドリアの呼吸やATP形成に共役した比較的程度の低い small amplitude swelling¹⁸⁾と、脱共役剤や無機リン、Ca²⁺ などによる程度の大い large amplitude swelling と呼ばれるものがある¹⁹⁾。後者の膨潤 (swelling) は、ミトコンドリアのMPTやイオン

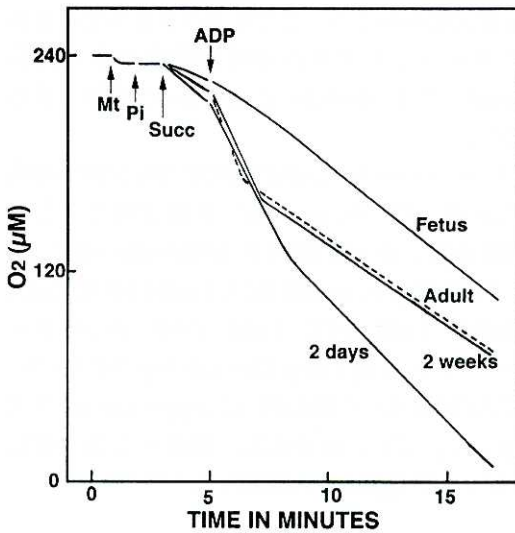


Fig. 1. Oxidative phosphorylation and respiratory control activities of fetal and adult rat liver mitochondria. Oxidative phosphorylation of mitochondria was measured in a medium containing 0.2 M sucrose, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂ and 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 25 °C. The rates of oxidative phosphorylation and the respiratory control ratio were lower in FM compared to AM. Concentration of added Pi, Succinate and ADP were 2 mM, 5 mM, and 200 μM, respectively.

Table 1. Oxidative phosphorylation and respiratory control activities of fetal and adult rat liver mitochondria (n=6)

	Fetus	2days	2weeks	Adult
ADP/O	0	1.07 ± 0.13	1.76 ± 0.33	1.92 ± 0.16
RCR	1	1.83 ± 0.21	4.11 ± 0.93	4.01 ± 0.31

ウムにより MPT の pore が開口して、ミトコンドリアの膨潤と膜電位低下をもたらすことが知られている。

Figure 2 は、成獣ミトコンドリアの MPT の pore 開口による変化を示す。すなわち、無機リン存在下、コハク酸のような呼吸基質が存在すれば、添加カルシウムは呼吸活性に依存して形成された膜電位を消費して、active transport 機構によってミトコンドリア内に取り込まれる。このため一過的な膜電位の低下に続いてミトコンドリアの膨潤が誘起される。その膨潤による内膜のイオンに対する区画性、特にプロトンに対する区画性が低下し、再び強い膜電位の脱分極が誘導される。この膨潤に続く内膜の脱分極は電子伝達反応の強度に依存し、強い電子伝達反応が存在するときは後から誘導される脱分極が遅延する²¹⁾。

3. Ca²⁺ によるミトコンドリアの膨潤

ミトコンドリアのエネルギー転換反応が低い場合にはミトコンドリア内へのカルシウムイオンの取り込みも低下していることが予想される^{22)~24)}。そこで Ca²⁺ による胎仔肝ミトコンドリアの MPT について検討した。その結果、**Figure 3-A, B** に示すように胎仔肝ミトコンドリア (**B**) の Ca²⁺ による MPT は成獣のそれ (**A**) と比較して膨潤度が著しく低下していた。

Adult

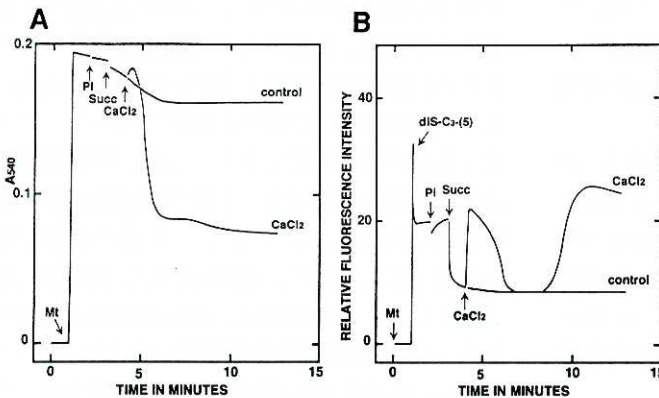


Fig. 2. CaCl₂-induced depolarization and swelling of AM. Isolated AM were incubated in 0.15 M KCl containing 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). CaCl₂ induced swelling (A) and transient depolarization (B). After a certain time, a sustained depolarization was induced. Concentration of added CaCl₂ was 50 μM.

透過に関係して起こることが知られている²⁰⁾。また MPT の関与するミトコンドリアの膨潤は膜電位低下が同時にみられることが知られている⁴⁾。すなわち、分離ミトコンドリアはカルシ

4. ミトコンドリアからのシトクロム c の流出
ミトコンドリア内および反応液中のシトクロム c をイムノプロット法により検出した。その結果は、**Figure 3-C** に示すとおりであり、Ca²⁺

を添加しない場合は成獣のミトコンドリアも胎仔のミトコンドリアも反応液中にシトクロムcは流出しないが、 Ca^{2+} を添加すると成獣のミトコンドリアは膨潤してシトクロムcをミトコンドリアから反応液中に流出したが、胎仔のミトコンドリアでは反応液中へのシトクロムcの流出は殆ど認められなかった。しかし、分離ミトコンドリア中のシトクロムcを比較すると、胎仔肝ミトコンドリアにも抗シトクロムcと反応するシトクロムc蛋白質は存在し、その含有量は成獣のそれと殆ど変わらなかった。

5. ミトコンドリア中のシトクロムc+c₁の含有量

胎仔肝ミトコンドリアの酸化リン酸化やMPTが低下を示すのは電子伝達反応に関するシトクロム含有量、ホロ酵素の形態やその複合体の不完全性による可能性が高い。先のFigure 3-Cでアポトーシスに参与するシトクロムcの含有量は成獣のそれと大差ないことが判明した。しかしアポトーシスに参与するシトクロムcには鉄イオンの結合が必要であり²⁵⁾、胎仔肝ミトコンドリアのシトクロムcが正常な成獣肝ミトコンドリアのそれと変化がないか否かについて吸収スペクトル解析を行った。その結果はFigure 4に示す如く、胎仔肝ミトコンドリアのシトクロムc+c₁には成獣のそれに見られるような吸収曲線、すなわち550 nmと

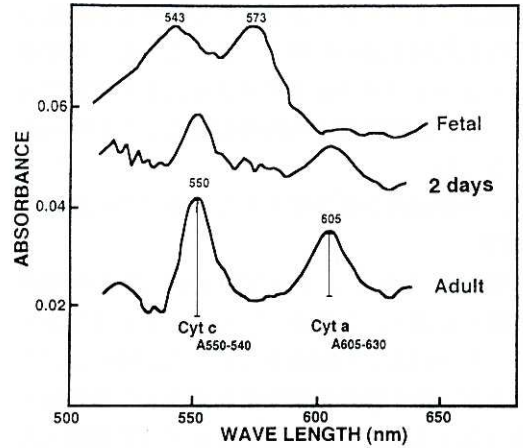


Fig. 4. Absorption spectrum of Cyt.c isolated from fetal and adult mitochondria. To examine the biochemical properties of Cyt.c in FM absorption spectrum of mitochondria were measured. The absorption peak of Cyt.c at 550 nm was shifted to 543 nm in FM.

605 nmといった特異的なスペクトルが見られず、543 nmと573 nmに最大波長が見られた。しかし、生後1日目の新生仔では、成獣と同様な吸収曲線が認められた。しかもその含有量はなお少なく、生後日数の増加に伴ってその量も増加した。

この結果は、胎仔肝ミトコンドリアのシトクロムcはカスパーゼ3の活性化作用が欠損している可能性を示唆した。

6. シトクロムcによるカスパーゼ3様プロテアーゼの活性化

そこで先の実験3でみられた抗シトクロムc抗体に陽性な蛋白質がカスパーゼ3を活性化するか否かを検討した。すなわち、ラット肝より分離した100,000 xg上清に含まれるカスパーゼ3を酵素液として、TritonX-100処理して遊離されるシトクロムcによりカスパーゼ3が活性化されるか否かをdATP及び蛍光合成ペプチドAc-DEVD-MCA存在下に検討した。その結果はFigure 5に示す如く、胎仔肝ミトコンドリアのカスパーゼ3様プロテアーゼ活性化作用は

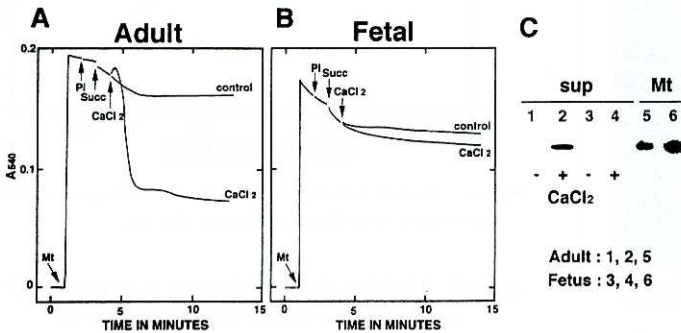


Fig. 3. CaCl_2 -induced swelling and Cyt.c release of FM and AM. Both AM and FM contained the same amount of Cyt.c detected by western blot analysis. Following Ca^{2+} -induced swelling of AM (A), Cyt.c was released from mitochondria (C). However, no swelling was induced in FM by Ca^{2+} (B). Thus Cyt.c was similar to that AM. Experimental conditions were as described in Fig. 2.

成獣ラット肝ミトコンドリアのそれと同程度の活性化作用が認められた。このことは、胎仔肝ミトコンドリアのシトクロムcにも十分にカスペーゼ3を活性化作用があることが明らかになった。

7. 分娩直後の新生仔ミトコンドリアの呼吸とMTP

胎仔肝ミトコンドリアはCa²⁺によるMPTの開口が弱く、したがってミトコンドリアからのシトクロムcの遊離がないことが明らかにされたが、新生仔肝は出生を起点として肺呼吸の確立にともなってそのミトコンドリア機能も大きく変化していることは十分考えられる^{8)~10)}。そこで出生直後のミトコンドリアの機能を見るために、帝王切開にて胎生20日目のラットを出生させ、母体に同時にはいていた1/2の数のラットを胎仔のミトコンドリアを材料として使用し、あとの1/2の数のラットは大気圧下、37℃、1時間インキュベーターに入れておき、自然に呼吸を開始させた後、肝ミトコンドリアを取り出して実験に使用した。

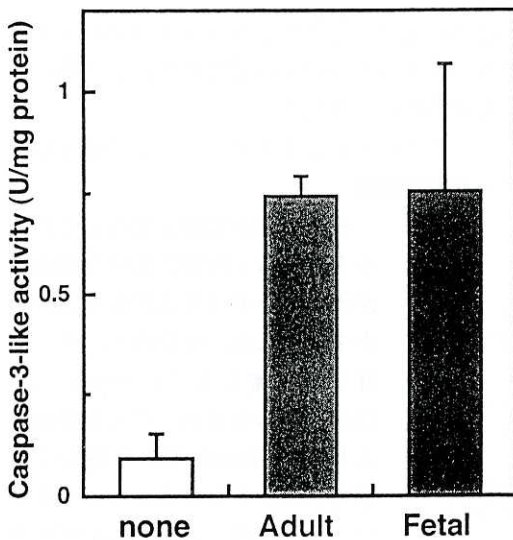


Fig. 5. Activation of caspase-3 like protease by Cyt.c.

The ability of FM lysate to activate caspase-3 like protease was tested in a medium containing synthetic caspase substrate, dATP and S-100 fraction of liver homogenate at 37℃ for 60 min. Both lysates of AM and FM showed a similar ability to activate caspase-3 like protease.

Figure 6, Table 2は、呼吸調節能をみたものである。結果は胎仔肝ミトコンドリアではADP添加に伴うRCR及びADP/O比は低値であったが、1時間大気中で呼吸をした新生仔肝ミトコンドリアはADP/O比は低いものの、ADP添加による呼吸調節が認められるようになった。しかし、その値は成獣の値の50%以下であった。

Figure 7は、肝ミトコンドリアの膨潤と膜電位の出生後の変動をみたものである。胎仔肝ミトコンドリアでは先にもみたように、Ca²⁺添加による膨潤や脱分極の度合いは小さかった。これは、コハク酸酸化による電位形成が弱い為だと考えられる。従ってCa²⁺の取り込みは殆ど認められない状態であり、その為、Ca²⁺添加によるMPTも極めて弱いと推測される。しかし、生後1時間経過した新生仔肝ミトコンド

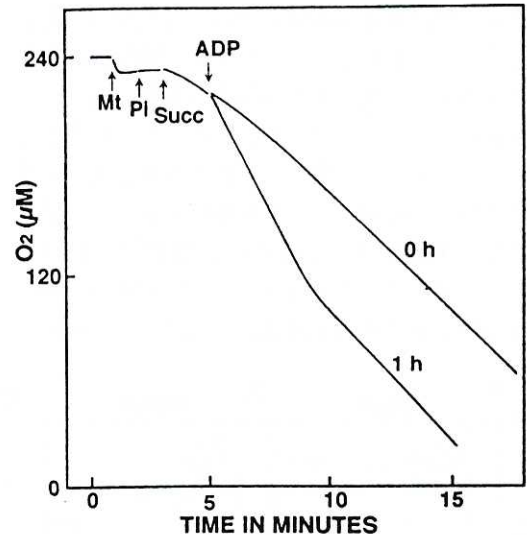


Fig. 6. Time dependent changes in oxidative phosphorylation of fetal rat liver mitochondria after delivery

Table 2. Oxidative phosphorylation and respiratory control activities of fetal and adult rat liver mitochondria

	Oh	1h	Adult
ADP/O	0	1.05 ± 0.16	1.92 ± 0.16
RCR	1	1.89 ± 0.21	4.01 ± 0.31

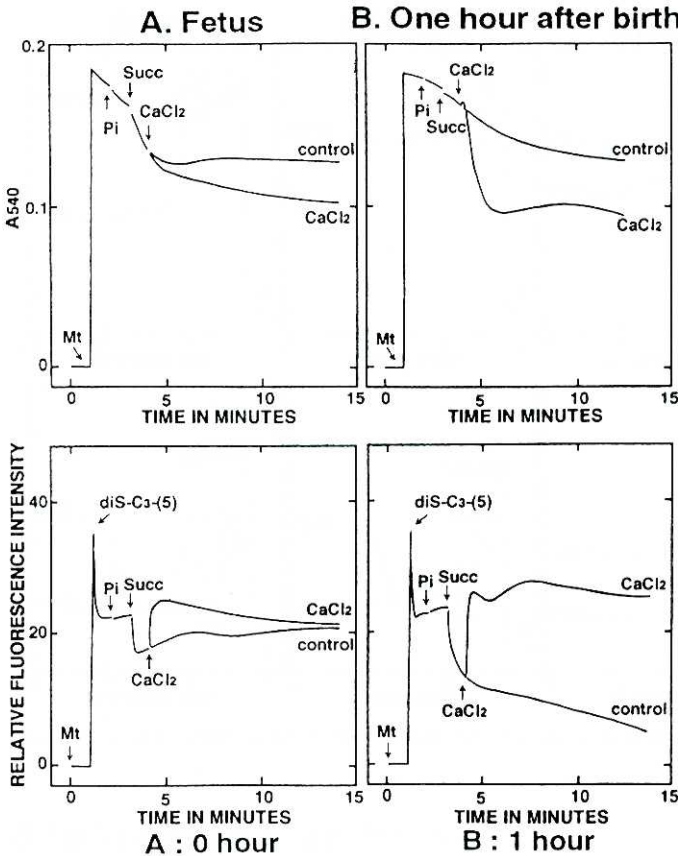


Fig. 7. Time dependent changes in Ca^{2+} -induced MPT of FM after delivery

リアでは Ca^{2+} による膨潤や脱分極が誘導されるようになっており、 Ca^{2+} の取り込みによる電位低下も顕著であった。しかし Ca^{2+} 取り込み後でみられる電位形成は極めて弱く、僅かな分極に続く脱分極が誘導された。これらの成績により、胎仔肝ミトコンドリアでは呼吸活性が十分働いていないけれども、出生1時間経過すると呼吸活性は急激に上昇していくことが判明した。

さらに、同様の観察を生後引き続き行った。結果は、生後2日目、2週間目と生後の経過とともにこれらは成獣のそれに近づいていくことが判明した。(Fig. 8)

考 察

胎仔肝ミトコンドリアは成人のそれと比べる

と、電子伝達系を初めとして、生化学的にも形態的にも未成熟な特性をもっていることが報告されてきた^{1), 2), 8)~10)}。

近年アポトーシスの研究が進むにつれて、酸素ストレスの作用の1つに活性酸素分子種によるアポトーシスがあることが判明した²⁶⁾。

胎仔は出生により肺呼吸を開始するとともに全身を環流する血液によって4倍近い高酸素圧に曝され、強い酸素ストレスを受けることになる⁷⁾。このため、酸素ストレスのもとら生物作用は極めて大きいと考えられている。酸素ストレスの作用の1つに、種々の活性酸素分子種によるアポトーシスの誘導が報告されている²⁶⁾。現在アポトーシスの機構はかなり詳細に解析され、活性酸素によるアポトーシス誘導は一般に認められるところとなった。しかし、活性酸素がどのような機構でアポトーシスを誘導するのか、一部の分子種

を除いてその詳細な分子機構はなお明らかでない²⁷⁾。

アポトーシスの過程では、カスパーゼと呼ばれるシステインプロテアーゼファミリーがその実行段階で重要な役割を果たしていることが明らかになった。ヒトの場合、現在10種類以上のカスパーゼ遺伝子が報告されている²⁸⁾。

カスパーゼは、不活性である前駆体タンパク質として合成され、これがプロテアーゼの作用により切断され活性型となり、カスケードにより順次下流のプロカスパーゼを切断し、活性型にする²⁹⁾。カスパーゼ-3は、アポトーシスの実行段階である下流のカスパーゼであり、その活性化の機構においてミトコンドリアが重要な役割を果たしている^{3), 4)}。すなわち、ミトコンドリアから様々な機構により放出されるシトクロムcによるカスパーゼ-3活性化経路であ

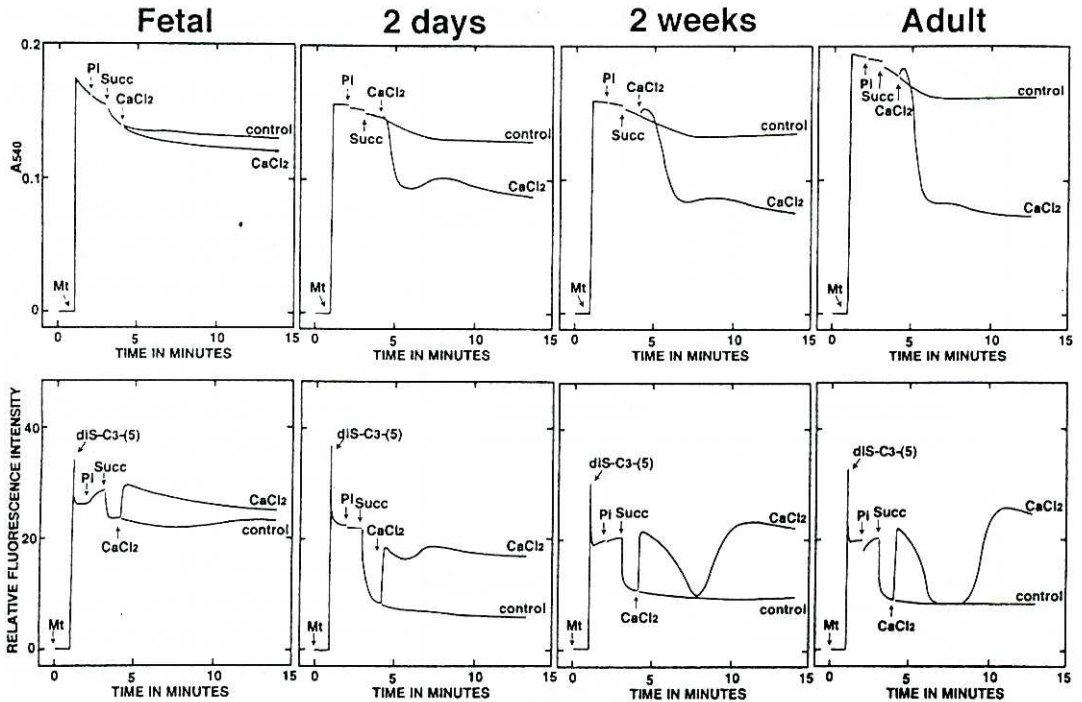


Fig. 8. Time dependent changes in Ca^{2+} -induced MPT of fetal mitochondria after birth. Ca^{2+} -induced MPT of FM was increased after birth and reached maximum in two weeks.

る^{23), 28)}.

ミトコンドリアから細胞質へと遊離したシトクロム c は、細胞質に存在する Apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) と呼ばれる因子と会合し、dATP の存在下、プロカスペーゼ 9 と複合体を形成して活性化し、活性化されたカスペーゼ 9 がプロカスペーゼ 3 を切断、カスペーゼ 3 を活性化する^{3), 30)}。また、細胞表面レセプターを介して活性化されたカスペーゼ 8 によって切断される Bid の切断断片がミトコンドリアに作用して、ミトコンドリアからシトクロム c を遊離させることも明らかになり³¹⁾、細胞表面レセプターを介したシグナル伝達経路の一部がミトコンドリアを経由していることも報告されている。このようにアポトーシスの制御においてミトコンドリアは中心的役割を果たしている。

また、ミトコンドリア内膜には約 -150 mV 膜電位があり、これはミトコンドリア内膜内外のプロトン勾配により形成されている³²⁾。そし

てミトコンドリアは、この膜電位により酸化的リン酸化などの機能を正常に保っている。さらに、ミトコンドリアの膨潤は、ミトコンドリアの呼吸や ATP 形成と共役した比較的小さいものと¹⁸⁾、脱共役剤や Pi, Ca^{2+} などによる度合いの大きい large amplitude swelling と呼ばれるものであり¹⁹⁾、後者はミトコンドリアの MPT やイオン透過に関係して起こることが知られている。前者は主に光散乱変化により、後者は吸光度変化によって測定されている³³⁾。また、MPT の関与するミトコンドリアの膨潤は、膜電位の低下が共役して見られることが知られている³⁴⁾。

アポトーシス開始の機構としては、膜電位の低下と密接な関係にある MPT 開口が考えられる²³⁾。AIF (apoptosis-inducing factor)³⁵⁾ やシトクロム c などのミトコンドリアタンパク質は MPT を通して細胞質に放出され、これらの因子によりアポトーシス実行へ導かれるものと考えられている。

このようにミトコンドリアはエネルギー産性
の場であるとともに、アポトーシスにも深く関
与しているという観点から、胎仔、新生仔、成
獣のそれと比較検討した。

まず、呼吸機能については、胎仔肝ミトコン
ドリアの呼吸調節率もADP/O比も成獣に比べ
極めて低い値を示しており、ATP合成活性
も極めて低い。しかし、出生後2日目の新生仔
の肝ミトコンドリアでは、呼吸調節能は上昇し、
生後2週間目には成獣のそれと大差ないまでに
上昇した。

またアポトーシス関連でみたCa²⁺添加にお
ける膨潤と膜電位の低下については、胎仔肝ミ
トコンドリアのMPTは成獣のそれと比較して
膨潤の度合いは著しく低値を示していた。この
ことは、成獣肝ミトコンドリアが種々の要因に
より細胞内Ca²⁺を増加した場合には、MPTの
関与する膨潤は充分機能して、ミトコンドリア
からシトクロムcが流出することが証明された
が、胎仔肝ミトコンドリアではそのような流出
は殆ど認められなかった。とはいっても、胎仔
肝ミトコンドリアには抗シトクロムcと反応す
るシトクロムcタンパク質は存在しており、そ
の反応で求められた含有量は成獣のそれと殆ど
変わらなかった。しかし電子伝達系に関する
シトクロムc + c₁の比較では、胎仔肝は成獣
のそれと比べてその吸収極大も異なっており、
含有量も少なかったことからみて、胎仔のミト
コンドリア内に含まれるシトクロムは、その複
合体形成能の不完全性や、アポ酵素の形態によ
る可能性が考えられる²⁵⁾。さらに、ミトコンド
リア内シトクロムcのイムノブロット法による
解析の結果でアポトーシスに関するシトクロ
ムcの含有量は成獣と大差ないことが証明され
た。また胎仔肝ミトコンドリアのシトクロムc
がカスパーゼ-3を活性化するかどうかを検討
したところ、この活性は成獣のそれと同じ程度

の活性が認められた。

これらの結果は、今後さらにシトクロムcの
含量やその物理化学的特性について研究する必
要のあることを示唆する。経時的に胎仔から成
獣に至るまで肝ミトコンドリアのMPTの変化
を検討したところ、胎仔や生後1時間の新生仔
のミトコンドリアのCa²⁺による膨潤や膜電位
の低下は弱い、生後2週間目の新生仔では成
獣のそれに近い値を示した。これらの結果より、
胎仔の肝ミトコンドリアはミトコンドリアに依
存するアポトーシスが成獣に比べて抑制されて
いることを示唆している。このことは、出生時
における酸素ストレスの最も高い時期でも肝は
アポトーシスから保護されつつ、急速に呼吸機
能を獲得するものと考えられる。すなわち肺呼
吸の開始にともなって肝細胞はアポトーシスを
防御しながら電子伝達系の発達により呼吸系
の確立をはかっていることが判明した。

ただ今回検討したミトコンドリア依存性のア
ポトーシスについては、MPTを介さない膨潤
なしのミトコンドリアからのシトクロムc遊
離経路も報告されており³⁶⁾、今後さらにBcl-
xLやBaxの遺伝子発現の関与についても解析
を行う必要があると考えている。

謝 辞

本研究にあたり、川崎医科大学産婦人科学教室の河
野一郎教授、倉敷成人病センター病院長吉岡 保博士、
同医科学研究所の菅野智子博士に御指導を受けたこと
に謝意を表します。また、論文作成にあたっては、倉
敷成人病センター医科学研究所の内海耕穂所長、大阪
市立大学大学院医学研究科分子病理学教室の井上正康
教授の御指導を賜りましたことに感謝の意を表します。

なお本論文の要旨は第24回日本産科婦人科栄養代謝
研究会（2000年、名古屋）および第16回FIGO世界産科
婦人科研究会（2000年、Washington）にて発表した。

文 献

- biochemical studies of isolated mitochondria from fetal, neonatal, and adult liver and from neoplastic tissues. *J Cell Biol* 34 : 513-523, 1967
- 2) Nakai A, Taniuchi Y, Asakura H, Oya A, Yokota A, Koshino T, Araki T : Developmental changes in mitochondrial activity and energy metabolism in fetal and neonatal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 121 : 67-72, 2000
 - 3) Reed JC : Cytochrome c : can't live with it-can't live without it. *Cell* 91 : 559-562, 1997
 - 4) Skulachev VP : Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanism to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* 397 : 7-10, 1996
 - 5) Tatton WG, Olanow CW : Apoptosis in neurodegenerative diseases : the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1410 : 195-213, 1999
 - 6) Liu X, Kim CN, Yang J, Jemerson R, Wang X : Induction of apoptotic program in cell-free extracts : requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86 : 147-157, 1996
 - 7) 佐藤英介, 山耕誠一, 白石一郎, 井上正康 : 周産期肝細胞社会と造血の場の変化. 生命誕生と生物の生存戦略 (井上正康, 内海耕健監修). 日本アクセル・シュプリンガー出版. 1998, pp 117-123
 - 8) 吉岡 保, 尾原広子, 内海耕健, 片山 滋, 関場 香 : ラットの発生に伴う肝ミトコンドリア性状の変化 - とくにその形態と比重について. *医学のあゆみ* 101 : 492-493, 1977
 - 9) 吉岡 保, 川田清弥, 片山 滋, 小川達博, 江口勝人 : 胎仔肝ミトコンドリアに関する研究, (i) 呼吸と形態変化について. *日本新生児学会雑誌* 14 : 438-445, 1978
 - 10) 関場 香, 片山 滋, 小川達博, 江口勝人, 吉岡 保, 小池秀爾 : 胎児新生児肝ミトコンドリアの呼吸調節. *医学のあゆみ* 99 : 567-568, 1976
 - 11) Hogeboom GM : Fractionation of cell components of animal tissues. *Methods in Enzymology* 1 : 16-19, 1955
 - 12) Utsumi T, Okuma M, Kanno T, Takehara Y, Yoshioka T, Fujita Y, Horton AA, Utsumi K : Effect of the antiretroviral agent hypericin on rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol* 50 : 655-662, 1995
 - 13) Zoratti M, Szabo I : The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241 : 139-176, 1995
 - 14) Yabuki M, Tsutsui K, Horton AA, Yoshioka T, Utsumi K : Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor. *Free Rad Res* 32 : 507-514, 2000
 - 15) Chance B : Techniques for the assay of the respiratory enzymes. *Methods in Enzymol* 4 : 273-329, 1957
 - 16) Ishisaka R, Utsumi T, Yabuki M, Kanno T, Furuno T, Inoue M, Utsumi K : Activation of caspase-3-like protease by digitonin-treated lysosomes. *FEBS Lett* 435 : 233-236, 1998
 - 17) Stennicke HR, Salvesen GS : Biochemical characteristic of caspase-3, -6, -7 and -8. *J Biol Chem* 272 : 25719-25723, 1997
 - 18) Mustafa MG, Utsumi K, Packer L : Damped oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. *Biochem Biophys Res Commun* 24 : 381-385, 1966
 - 19) Wojtczak L, Lehninger AL : Formation and disappearance of an endogenous uncoupling factor during swelling and contraction of mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 51 : 442-456, 1961
 - 20) Petit PX, Susin SA, Zamzami N, Mignotte B, Kroemer G : Mitochondria and programmed cell death : back to the future. *FEBS Lett* 396 : 7-13, 1996
 - 21) 内海耕健 : ミトコンドリアの電解質 - 特に無機イオンについて *日本臨床* 27 : 1107-1119, 1969
 - 22) 内海耕健, 小田琢三 : ミトコンドリアの能動透過とイオン蓄積 : 蛋白質, 核酸, 酵素 10 : 1658-1668, 1965
 - 23) Yang JC, Cortopassi GA : Induction of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome c. *Free Radic Biol Med* 24 : 624-631, 1998
 - 24) Kantrow SP, Piantadosi CA : Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun* 232 : 669-671, 1997
 - 25) Hampton MB, Zhivotovsky B, Slater AF, Burgess DH, Orrenius S : Importance of the redox state of cytochrome c during caspase activation in cytosolic extracts. *Biochem J* 329 : 95-99, 1998

- 26) Mates JM, Sanchez-Jimenes FM : Role of reactive oxygen species in apoptosis : implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32 : 157 - 170, 2000
- 27) Freemerman AJ, Powis G : A redox-inactive thioredoxin reduces growth and enhances apoptosis in WEHI7.2 cell. *Biochem Biophys Res Commum* 274 : 136 - 141, 2000
- 28) Nicholson DW, Thornberry NA : Caspase : killer protease. *Trends Biochem Sci* 22 : 299 - 306, 1997
- 29) Nagata S : Apoptosis by death factor. *Cell* 88 : 355 - 365, 1997
- 30) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X : Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 : 479 - 489, 1997
- 31) Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X : Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94 : 481 - 490, 1998
- 32) Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C : Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett* 378 : 107 - 110, 1996
- 33) 内海耕髓：ミトコンドリアの膨潤-収縮と脂質代謝. *生化学* 37 : 749 - 765, 1965
- 34) Dey R, Moraes CT : Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-xL in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 275 : 7087 - 7094, 2000
- 35) Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G : Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184 : 1331 - 1341, 1996
- 36) Zhuang S, Demirs JT, Kochevar IE : p38 mitogen-activated protein kinase mediates Bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 275 : 25939 - 25948, 2000