マンガン代謝における肝ライソゾームの意義

The Significant Role of Liver Lysosomes on Manganese Metabolism

群馬大学医学部衛生学教室

鈴木 平 光・和田 攻・小 野 哲
山 本 昭 子・小 野 弘 子・松 井 寿 夫

Hiramitsu Suzuki, Osamu Wada, Tetsu Ono,
Akiko Yamamoto, Hiroko Ono and Hisao Matsui

Department of Hygiene, School of Medicine, Gunma University, Maebashi

It is generally accepted that excessive amounts of manganese absorbed into the body are excreted into the bile via the liver. However, intracellular manganese metabolism in the liver is a process which is quite unknown. The process of intracellular manganese metabolism in the liver and the process of the excretion of manganese into the bile appear to be important problems to clarify.

Male mice of the dd-strain were injected intraperitoneally with a single dose of 200 μmol Mn (OAc) $_2$ ·4H $_2$ O/kg. In order to clarify the intracellular distribution of manganese in the liver, the homogenate was subfractionated by differential and sucrose density gradient centrifugations, and manganese concentrations were determined by flameless atomic absorption spectroscopy. Furthermore, the nature and chemical form of manganese in the liver and bile were investigated.

The results were as follows:

1) Manganese in the liver was found to be mainly incorporated into the mitochondrial fraction, especially the mitochondria and lysosomes. Manganese concentrations were more varied in the lysosomes than in the mitochondria.

2) Manganese incorporated into the mitochondrial fraction was easily released into the suspension medium by incubation at 37°C, osmotic shock or freeze-thawing. Most of the released manganese coincided with inorganic manganese on Sephadex G-10 and ion-exchange chromatograms. Furthermore, the manganese in the bile was also of an inorganic form.

The results seem to suggest that in the liver, excessive amounts of absorbed manganese are incorporated mainly into the lysosomes and excreted in an inorganic form into the bile.

I. 緒 言

生体内における Mn 濃度の恒常性は、Mn の吸収を調節することよりも、むしろ排泄を調節することにより得られており¹⁾、通常、肝から胆汁への Mn の移行が主要排泄経路であると言われている^{2,3)}。また、投与された Mn は血中から急速に消失し、大部分、肝臓のミトコンドリアに取り込まれ、胆汁から腸管に排泄されると考えられている^{4,5)}。一方、生体内 Mn は、非常に移動しやすい状態で細胞内に結合している⁶⁾ことが知られているが、未だ詳しい検討はなされていない。そこで、著者は

肝細胞および胆汁における Mn の動態を調べ、肝から胆汁への Mn の移行過程について知ることが重要と考えた。本報では、Mn の肝内移行におけるライソゾームの役割について検討したので、その結果を報告する。

II. 実 験 方 法

A. 実験動物および投与法

dd 系雄性マウス (18~23 g) に酢酸マンガン Mn (OAc) $_2$ ·4H $_2$ O を 200 μmol /kg の投与量で、1 回、腹腔内に投与した。投与後、経時的に肝および胆汁を採取し実験に供した。

B. 肝細胞成分の分離

Hogeboom⁶⁾の方法に準じ Potter-Elvehjem 型 ホモジナイザーを用い、10倍量の 0.25 M ショ糖溶液にて肝ホモジネートを得、これを遠心により粗核画分(700×g, 10 min, ppt), ミトコンドリア画分(5,000×g, 10 min, ppt), ミクロゾーム画分(10⁵×g, 60 min, ppt), 上清画分(10⁵×g, 60 min, sup) に分離した。さらに、粗核画分を 2.4 M ショ糖溶液に懸濁後、52,000×g, 30分遠心し、その沈澱部を精製した核として得た⁷⁾。また、700×g, 10分遠心の上清を 10⁴×g, 25分遠心し、ミトコンドリア-ライソゾーム (M+L) 画分をその沈澱部として得た。この沈澱部を 0.25 M ショ糖溶液の懸濁後、Boocock ら⁸⁾の方法に準じ、60% w/v ショ糖 (1 ml) 上に、40~8.5% w/v ショ糖の連続密度勾配 (10 ml) を作成した遠沈管に重層 (1 ml) した。試料重層後、ただちに 1,050×g, 3時間遠心し、1 ml ずつ分取し、12画分を得た。なお、上記の操作はすべて 4℃以下の条件下にて行った。

C. 酵素活性の測定

上記の各遠心画分について、ミトコンドリア、ライソゾーム、ペルオキシゾームのそれぞれの標識酵素としてモノアミノオキシダーゼ、酸性ホスファターゼ、カタラーゼの活性を測定した。モノアミノオキシダーゼ活性は、ベンジルアミンを基質とした Schnaitman ら⁹⁾の方法で、酸性ホスファターゼ活性は、p-ニトロフェニルリン酸を基質に用いた Stahn ら¹⁰⁾の方法で、カタラーゼ活性は過酸化水素を基質とした Beers と Sizer¹¹⁾の方法で、それぞれ測定した。

D. DNA およびタンパク量の測定

核の標識物質として DNA をジフェニルアミン法¹²⁾にて測定し、また、タンパク量を Lowry 法¹³⁾にて測定した。

E. 肝 M+L 画分からの Mn の溶出

肝 M+L 画分を 37℃で、20, 40, 60, 80分間孵置したのち 30,000×g, 10分遠心し上清を得た。また、肝 M+L 画分を 0.25 M ショ糖溶液 (等張) または 10 mM リン酸緩衝液, pH 7.2 (低張) にて懸濁したのち、それぞれを 4℃にて 1日放置または -20℃にて凍結後融解し、30,000×g, 10分遠心の上清を得た。それぞれの上清および懸濁液の Mn 量を測定し、上清に溶出した Mn の百分率を求めた。

F. 溶出した Mn および胆汁中の Mn のクロマトグラフィー

上記の溶出した Mn, 胆汁中の Mn, 酢酸 Mn を 20 mM 食塩を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で平衡化した Sephadex G-10 (カラム: 300×15 mm) にて分離し、それぞれの Mn のクロマトグラムを比較検討した。さらに、凍結融解により溶出した Mn および酢酸 Mn を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.2) で平衡化した CM-セルロース (カラム: 250×10 mm) に吸着させ、食塩の濃度勾配 (0~1.0 M) により溶出する Mn のパターンをそれぞれ比較した。これらの操作はすべて 4℃にて行った。

G. Mn 量の測定

Mn 量の測定は、試料を 10~200 ng/ml の Mn 濃度に希釈したのち、無炎原子吸光法¹⁴⁾ (Drying; 80~100℃ 40 sec, Ashing; 700~1,200℃ 30 sec, Atomizing; 2,800~3,000℃ 8 sec, Ar 1.0 l/min, 10 μ l Injection) により測定した。

III. 実験結果

肝細胞内での Mn の分布を遠心分画法により検討した。マウス肝の遠心画分における Mn 量、ミトコンドリア、ライソゾーム、ペルオキシゾームの各標識酵素活

Table 1 Relative contents of Mn, marker enzymes, DNA and protein in isolated mouse liver fractions (2h after Mn injections)

(mean $\pm$ S. D.)

Fraction	Mn μ g/g tissue	AcPase* i.u./g tissue	MAO** m μ mol/min /g tissue	Catalase u./mg tissue	DNA mg/g tissue	Protein mg/g tissue
Whole liver	41.5 $\pm$ 3.5	3.8 $\pm$ 0.1	370 $\pm$ 20	20 $\pm$ 1	1.9 $\pm$ 0.2	160 $\pm$ 14
Nuclei	crude	16.3 $\pm$ 1.4	0.55 $\pm$ 0.33	130 $\pm$ 10	3.4 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.1
	purified	1.32 $\pm$ 0.06	N. D.	13 $\pm$ 1	N. D.	1.1 $\pm$ 0.2
Mitochondria	17.7 $\pm$ 1.2	0.95 $\pm$ 0.05	140 $\pm$ 10	12 $\pm$ 1	0.22 $\pm$ 0.2	33 $\pm$ 6
Microsomes	5.52 $\pm$ 0.72	0.77 $\pm$ 0.04	74 $\pm$ 2	3.9 $\pm$ 0.2		42 $\pm$ 7
Supernatant	3.56 $\pm$ 0.39	1.0 $\pm$ 0.2	N. D.	2.2 $\pm$ 0.1		49 $\pm$ 7

*AcPase: acid phosphatase

**MAO : monoamine oxidase

Fig. 1 Sucrose density gradient patterns of Mn and marker enzymes in the liver mitochondrial-lysosomal fraction (AcPase: acid phosphatase, MAO: monoamine oxidase)

Table 2 Comparison of Mn content in mitochondrial and lysosomal fractions as a function of time after the injection of Mn
(mean $\pm$ S. D.)

Fraction	Mn content ratio	
	1h to 5 min	1h to 2h
Lysosomal (fraction No. 2, 3)	4.04 $\pm$ 0.35	2.13 $\pm$ 0.15
Mitochondrial (fraction No. 9, 10)	3.30 $\pm$ 0.10	1.40 $\pm$ 0.06

性, DNA 量およびタンパク量を Table 1 に示した。この表から, Mn は主に粗核画分, ミトコンドリア画分に多く存在しているが, 精製した核では, Mn が少ないことを認めた。さらに, この粗ミトコンドリア-ライソゾーム (M+L) 画分をショ糖密度勾配遠心法にて分画した結果を Fig. 1 に示した。Mn 量のパターンは酸性ホスファターゼ活性およびモノアミンオキシダーゼ活性のパターンを合わせたものに一致し, Mn はライソゾームおよびミトコンドリアに取り込まれることを確認した。また, ライソゾーム画分 (Fig. 1 の fraction No. 2, 3) とミトコンドリア画分 (Fig. 1 の fraction No. 9, 10) の Mn 量について, Mn 投与後, 5 分目または 2 時間目に対する 1 時間目の比をとると, ライソゾーム画分の Mn 量の変動が大きいことが認められた (Table 2)。

次に, 肝および胆汁中の Mn の存在様式を検討した。

Fig. 2 Effects of incubation at 37°C on the release of Mn from the liver mitochondrial-lysosomal fraction (5 min, 30 min and 1 h after Mn injections)

Fig. 3 Effects of osmotic shock and freeze-thawing on the release of Mn from the liver mitochondrial-lysosomal fraction

肝 M+L 画分から 37°C 孵置により溶出する Mn は孵置時間と共に増加した。また, Mn 投与後, 5 分, 30 分, 1 時間と漸次, Mn の溶出率が増加する傾向にあった (Fig. 2)。さらに, Mn は M+L 画分から低張, 凍結融解により溶出し, 特に, 低張溶液中で凍結融解した場合, 溶出量が最大であった (Fig. 3)。また, この 37°C 孵置により溶出した Mn, 低張・凍結融解により溶出した Mn および

Fig. 4 Chromatograms on Sephadex G-10 of released Mn, Mn in bile and $\text{Mn}(\text{OAc})_2$

Fig. 5 Chromatograms on CM-cellulose of released Mn and $\text{Mn}(\text{OAc})_2$

胆汁中の Mn の Sephadex G-10 クロマトグラムを Fig. 4 に示した。これらの溶出パターンは、ほぼ酢酸 Mn と類似していた。さらに、M+L 画分から低張・凍結融解により溶出した Mn を CM-セルロースクロマトグラフィーに供した結果を Fig. 5 に示した。この Mn は、酢酸 Mn とほぼ同一の溶出パターンを示した。

IV. 考 察

生体内の Mn は一般に、ミトコンドリアの豊富な組織では高濃度であり、ミトコンドリアに濃縮される¹⁵⁾と言われている。著者らは、マウス肝を遠心分画した結果、粗核画分およびミトコンドリア画分に大部分の Mn が取り込まれる (Table 1) ことを認めた。しかしながら、精製した核画分では、Mn 量およびミトコンドリア、ライソゾームなどの標識酵素活性が、粗核画分に比べ、ほぼ 1/10 以下に減少していることから、この粗核画分はこれらの顆粒の混入により高い Mn 量を示したものと考えられ、肝内の過剰量の Mn は大部分、ミトコンドリア画分に取り込まれるものと思われる。かつて、ラット肝の核に Mn が多いこと^{16,17)}が報告されたが、核の精製が行われていないため、ライソゾームやミトコンドリアなどの混入による影響を受けている可能性が考えられる。一方、ミトコンドリアでの Mn の交換度が高いこと¹⁵⁾が知られているが、ミトコンドリアの精製はなされていない。著者らは、ミトコンドリア画分をさらに分画したところ、ミトコンドリア画分およびライソゾーム画分の Mn 濃度は、ほぼ同程度と思われる (Fig. 1) が、ミトコンドリアよりも、むしろライソゾームの Mn 量の変動が大きいことを認めた (Table 2)。また、ミトコンドリアとライソゾームの細胞内容積を考えると、Mn はミトコンドリアに比べ、ライソゾーム内に濃縮されて存在していると考えられる。体内 Mn 量が、主に、肝から胆汁への移行による排泄で調節される^{4,5)}ことを考慮すると、以上の結果は、過剰量の Mn は、大部分肝ライソゾームに取り込まれ、胆汁中に移行し、排泄されることを示唆するものと思われる。

ところで、ライソゾームは、一般に、細胞内に取り込まれた物質の分解を行っていると言われている。そこで、放射活性をもつ I または As でラベルしたタンパク質を動物に投与し、その肝顆粒画分を 37°C で孵置したとき、顆粒から溶出する非タンパク性の放射活性が投与後の経過時間および孵置時間とともに増加することから、このタンパク質がベジクルとして取り込まれ、ライソゾームと融合したのち、分解され溶出され则认为られている。

る¹⁸⁻²⁰⁾。Mn の場合も、37°C 孵置により顆粒から溶出する無機 Mn に似た Mn の溶出率が Mn 投与後の経過時間および孵置時間とともに増加する (Fig. 2, 4) ことから、Mn も同様な機序でライソゾームに取り込まれ溶出するものと思われる。また、ライソゾーム膜は、低張、凍結融解により破壊され、内容物が溶出すること²¹⁾が知られているが、Mn も、大部分が無機 Mn に似た Mn として低張、凍結融解により溶出する性質 (Fig. 3, 4, 5) を持っていた。さらに、胆汁中の Mn は低分子の胆汁に示唆されている^{22, 23)}が、我々の実験結果色素と結合からは、肝内に認められた Mn と同様の無機に似たものである (Fig. 4) と思われた。これらの肝細胞内および胆汁中における Mn の存在様式は、Mn が主に、ライソゾームに取り込まれ、分解または解離がおり無機 Mn に似た Mn となり移行することによるものと考えられる。

V. ま と め

生体内での Mn の代謝様式を知るために、過剰量の Mn をマウスの腹腔内に1回投与し、Mn の肝内および胆汁における動態について、次の如き結果を得た。

1. 肝細胞内において、Mn は大部分が、ミトコンドリアおよびライソゾームに取り込まれることをショ糖密度勾配遠心法により確認した。さらに、Mn の経時的変動はミトコンドリアよりもライソゾームに顕著であった。

2. いわゆるミトコンドリア (M+L) 画分に取り込まれた Mn は、37°C 孵置、低張、凍結融解により溶出する性質を持っていた。また、この溶出する Mn および胆汁中の Mn の形態は、無機 Mn に似た Mn と認められた。

以上の結果から、生体内に過剰に投与された Mn は、肝では主としてライソゾームに取り込まれ、大部分は無機 Mn に似た形態で胆汁中に移行するものと考えられ、Mn の代謝に肝ライソゾームが重要な役割を持っているものと思われた。

文 献

- 1) Britton, A. A. and Cotzias, G. C.: Dependence of manganese turnover on intake, *Am. J. Physiol.*, **211**, 203-206 (1966).
- 2) Papavasiliou, P. S., Miller, S. T. and Cotzias, G. C.: Role of liver in regulating distribution and excretion of manganese, *Am. J. Physiol.*, **211**, 211-216 (1966).
- 3) Bertinchamps, A. J., Miller, S. T. and Cotzias, G. C.: Interdependence of routes excreting manganese, *Am. J. Physiol.*, **211**, 217-224 (1966).
- 4) Borg, D. C. and Cotzias, G. C.: Manganese metabolism in man. Rapid exchange of Mn⁵⁶ with tissue as demonstrated by blood clearance and liver uptake, *J. Clin. Invest.*, **37**, 1269-1278 (1958).
- 5) Kato, M.: Distribution and excretion of radio-manganese administered to the mouse, *Quart. J. Exp. Physiol.*, **48**, 355-369 (1963).
- 6) Hogeboom, G. H.: Fractionation of cell components of animal tissues, in "Methods in Enzymology, Vol. 1", p. 16-19 (1955).
- 7) Chauveau, J., Moule, Y. and Rouiller, C. H.: Isolation of pure and unaltered liver nuclei morphology and biochemical composition, *Exp. Cell Res.*, **11**, 317-321 (1956).
- 8) Boocock, G., Danpure, C. J., Popplewell, D. S. and Taylor, D. M.: The subcellular distribution of plutonium in rat liver, *Rad. Res.*, **42**, 381-396 (1970).
- 9) Schnaitman, C., Erwin, V. G. and Greenawalt, J. W.: The submitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria, *J. Cell Biol.*, **32**, 719-735 (1967).
- 10) Stahn, R., Maier, K. P. and Hannig, K.: A new method for the preparation of rat liver lysosomes. Separation of cell organelles of rat liver by carrier-free continuous electrophoresis, *J. Cell Biol.*, **46**, 576-591 (1970).
- 11) Beers, R. F. and Sizer, I. W.: A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140 (1952).
- 12) Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid, *Biochem. J.*, **62**, 315-323 (1956).
- 13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).

- 14) Paynter, D. I.: Microdetermination of manganese in animal tissues by flameless atomic absorption spectrometry, *Anal. Chem.*, **51**, 2086-2089 (1979).
- 15) Cotzias, G. C.: Manganese in health and disease, *Physiol. Rev.*, **38**, 503-532 (1958).
- 16) Thiers, R. E. and Vallee, B. L.: Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver, *J. Biol. Chem.*, **226**, 911-920 (1957).
- 17) Smeyers-Verbeke, J., May, C., Drochmans, P. and Massart, D. L.: The determination of Cu, Zn, and Mn in subcellular rat liver fractions, *Anal. Biochem.*, **83**, 746-753 (1977).
- 18) Mego, J. L. and McQueen, J. D.: The uptake and degradation of injected labeled proteins by mouse-liver particles, *Biochim. Biophys. Acta*, **100**, 136-143 (1965).
- 19) Mego, J. L. and McQueen, J. D.: Heterolysosome formation in mouse liver, *J. Cell Physiol.*, **70**, 115-120 (1967).
- 20) Davidson, S. J.: Proteolytic activity within lysosomes and turnover of pinocytic vesicles. A kinetic analysis, *Biochim. Biophys. Acta*, **411**, 282-290 (1975).
- 21) de Duve, C.: The lysosomes in retrospect, In "Lysosomes in biology and pathology, Vol. 1" (Editor: Dingle, J. T. and Fell, H. B.) p. 3-40, North-Holland Publ. Company, Amsterdam (1969).
- 22) Cikrt, M. and Tichý, M.: Polyacrylamide gel disc electrophoresis of rat bile after intravenous administration of $^{52}\text{MnCl}_2$, $^{64}\text{CuCl}_2$, $^{203}\text{HgCl}_2$, and $^{210}\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, *Experientia*, **28**, 383-384 (1972).
- 23) Tichý, M., Cikrt, M. and Havrdová, J.: Manganese binding in rat bile, *Arch. Toxikol.*, **30**, 227-236 (1973).

(受付 1980年9月8日)