ラット肝ミトコンドリアの脂肪酸酸化に およぼすりボフラビン欠乏の影響

谷口巳佐子*, 山内亮子*, 中村元臣**

* 中村学園大学食物栄養科, ** 九州大学医学部循環器内科

Effect of Riboflavin Deficiency on Fatty Acid Oxidation of Rat Liver Mitochondria

Misako Taniguchi*, Ryoko Yamauchi*, Motoomi Nakamura**

* Division of Food and Nutrition, Nakamura Gakuen College, Fukuoka

** Research Institute of Angiocardiology and Cardiovascular Clinic,
Medical School, Kyushu University, Fukuoka

J. Jap. Soc. Food and Nutr., 25 (9), 681~685 (1972)

The effect of riboflavin on the oxygen consumption of rat liver mitochondria with derivatives of palmitic acid was studied. It was found that under riboflavin deficiency decrease of oxidation of palmityl-CoA in the presence of L-carnitine was greater than that of palmityl-L-carnitine.

When weanling rats were fed with riboflavin supplemented diet for 18 days and then with the deficient diet for following 31 days, the oxidative activity of palmityl-CoA with mitochondria in the presence of L-carnitine was reduced to the same level of that in rat fed with the deficient diet, whereas the reduction of that to palmityl-L-carnitine was less than that to palmityl-CoA in the presence of L-carnitine.

The respiratory control ratio of the mitochondria was decreased by feeding the deficient diet for 4 weeks with both derivatives of palmitic acid. However, the rate of oxidative phosphorylation was not affected by the deficiency, using palmityl-L-carnitine as a substrate.

(Received June 28, 1972)

リボフラビンは種々の酸化酵素の補酵素でその欠乏によって臓器中のフラビン酵素の活性が低下し¹⁾²⁾, ミトコンドリアによるコハク酸などの酸化活性が減少する。欠乏症状の一つである成長の阻止, 抑制はフラビン酵素の減少に伴うエネルギー代謝障害によるものと説明されるが, リボフラビンの欠乏症状が皮膚や粘膜に好発しやすいことや, 肝臓ミトコンドリアの巨大化³⁾などはエネルギー代謝障害の理由のみでは説明され難い。

リボフラビン欠乏症は食餌中の脂肪含量を高くすると現われやすいことが知られており⁴⁾, ミトコンドリアの膨化は *in vitro* の実験で脱共役物質たとえば脂肪酸などで誘発されること⁵⁾, 脂肪酸酸化酵素はフラビン酵素であることなどから, 成長阻止以外の欠乏症の発現に脂肪酸代謝機能の低下が関係していることが推定される。脂肪酸の酸化はミトコンドリア内膜内でアシル-CoA と

なって行なわれるが, この物質は膜を移転できないので外膜内でアシル-カルニチンとなり, 透過したのちに内膜で再び CoA 誘導体となって酸化される⁶⁾。リボフラビン欠乏によってマウスおよび白ネズミ肝臓ミトコンドリアの形態変化は著しく, 白ネズミでは外膜構造の変化が著者らによって見だされている⁷⁾。アシル-CoA およびアシル-カルニチンは膜移転の機構がことなるので, リボフラビン欠乏による膜変化がこれらの誘導体の酸化活性に及ぼす影響を検討する目的で基質として, CoA およびカルニチンのパルミチン酸誘導体を用い欠乏時の酸化活性を比較し, パルミチル-CoA の酸化はカルニチンのものより活性の低下がおこりやすいことが認められたので報告する。欠乏によって酸化活性の低下がおこることがよく研究されているコハク酸や β -ヒドロキシ酪酸についても成果の比較のため同じ調製ミトコンドリア

を用い酸化を測定した。

実験材料および方法

1. 白ネズミおよびリボフラビン欠乏食餌

離乳直後の Wistar-King 系雄白ネズミ (体重, 33.3 ± 4.2 g, 平均 $\pm$ S. D.) 50 匹を各個体別にケージに入れ, Tandler ら⁹⁾ のリボフラビン欠乏合成飼料と同じ組成のものを自由摂食させた。その組成は蔗糖 58.1%, ビタミンフリーカゼイン (NBR 社製) 28.1%, 塩類 3.1%, ビタミン・カゼイン混合物* 0.5%, コリン塩酸塩 0.15%, クリスコ 10.0% である。

対照白ネズミ (雄, 体重 31.8 ± 4.8 g (平均 $\pm$ S. D.) 20 匹) にはリボフラビン欠乏飼料 1 kg につきリボフラビン 40 mg を加えたものを与え, 同様に飼育した。欠乏食投与開始をおくらせた群 (雄, 体重 33.2 ± 3.5 g (平均 $\pm$ S. D.) 7 匹) には離乳後 18 日間正常対照飼料を与え, ついで 31 日間欠乏飼料を与え飼育した。

2. ミトコンドリアの調製

一定期間飼育後の白ネズミを断首瀉血し, ただちに肝臓をとり出し, Schneider 法⁹⁾ に準じてミトコンドリアを調製した。0.25 M 蔗糖 (EDTA 10^{-4} M 含有), pH 7.4 の $0 \sim 1^\circ\text{C}$, 冷却溶液中で肝臓をホモジネートし, $900 \times g$, 15 分間遠心後の上清を $6,000 \times g$, 20 分間遠心分離しその沈殿部を上記蔗糖溶液で再びホモジネート後, $10,000 \times g$, 10 分間遠心分離し, 沈殿部を肝臓 1 g につき 1 ml の 0.25 M 蔗糖溶液に懸濁し, $0 \sim 1^\circ\text{C}$ に冷却保存し調製後 3 時間以内に酸化活性の測定実験に用いた。ミトコンドリアのたん白量は Biuret 法⁹⁾ により定量した。

3. 酸化活性の測定

各基質の酸化の測定は東芝ベックマン生理用ガス分析計 160 形を用い, 溶液中の酸素減少量から算出した。反応基本液の組成は 0.225 M 蔗糖, 20 mM トリス塩酸塩, 20 mM リン酸カリ, 5 mM 塩化マグネシウム, 20 mM 塩化カリの pH 7.4 の溶液である。全容 1.85 ml のセルに基本溶液を加え, 22°C の恒温水をセル外部に循環させて恒温状態を保ち, ミトコンドリア懸濁液 0.1 ml (約 3~5 mg たん白) を加え, 基質添加 1 分後に ADP 1 μ mole を加え, 溶存酸素量を記録測定した。基質はコハク酸 5 μ mole, β -ヒドロキシ酪酸 5 μ mole, パルミチル-CoA 10 μ mole + L-カルニチン 100 μ mole および

* ビタミン混合物は, イノシトール 200 g, サイアミン塩酸塩 10 g, ピリドキシン塩酸塩 10 g, ナイアシン 40 g, パントテン酸カルシウム 40 g, メナジオン 6 g, ビチオン 60 mg, トコフェロール 20 g, 葉酸 5 g, アスコルビン酸 20 g, ビタミン A 2.5×10^6 I. U., ビタミン D 0.25×10^6 I. U. をビタミンフリーカゼインで 1 kg としたものである。

パルミチル-L-カルニチン 10 μ mole を用いた。パルミチン酸誘導体は反応液最終濃度が 1 % になるように牛血清アルブミンを同時に添加し, ミトコンドリアの溶解を保護した。

4. 酸化的リン酸化能の測定

Warburg マノメーターを用い酸素吸収量を測定した。反応液中の最終濃度は塩化カリ 80 mM, トリス塩酸塩 20 mM, 塩化マグネシウム 2 mM, EDTA 1 mM, リン酸カリ 15 mM, ヘキソキナーゼ 2.5 unit, ADP 10 mM, チトクローム c 0.5 mg で, 0.25 M 蔗糖 0.5 ml, 上記ミトコンドリア 0.5 ml (たん白量約 15~25 mg) をセルに加え, 基質をそれぞれ加え全容を 2.8 ml とした。基質はコハク酸 10 mM, 0.3 ml, またはパルミチル-L-カルニチン 10 mM (牛血清 10% 溶液にとかしたものの), 0.3 ml を加えた。中央室には苛性カリ 10% 溶液 0.2 ml を加えた。一定時間後反応液に 10% トリクロル酢酸 1.0 ml を加え反応を停止させ, 混合液を 0°C に冷却後遠心分離し, 上清中の無機リン酸を定量し¹⁰⁾, 反応期間中の無機リン酸の減少量を基質無添加のものとの差から算出し, 酸素吸収量より P/O 値を求めた。

パルミチル-L-カルニチン, L-カルニチンは大塚製薬, パルミチル-CoA (純度 90.5%) は大日本製薬よりご恵与賜わった。ヘキソキナーゼ (140 U/mg, yeast), ADP トリナトリウム塩は Boehringer 社製, 牛血清フラクシオン V は Armour 社製のものを使用した。

実験結果

1. 体重変化

Fig. 1 に示されるように, リボフラビン欠乏食飼育 5

Fig. 1. Growth of control, riboflavin-deficient, and recovered rats.

Each point and bar represents the mean and standard deviation.

○—○ control, ●—● deficient, ●---● rats fed control diet for 18 days, and then fed deficient diet from the time indicated by the arrow, ○---○ rats recovered by injecting riboflavin to the deficient rats at the time indicated by the arrow.

日後から体重増加が減少し始め、10日以後はほとんど増加が認められなかったが、50匹中約15%のものは7週間後に体重約70gでかつ皮膚などに現われる欠乏症状がみられず、4ヵ月飼育によって欠乏症状を呈するようになった。これらのものは酸化活性測定に際し欠乏群としては用いなかった。7週間飼育で約1/4は死亡した。4週間飼育実験では体重55g以下、また7週間飼育では65g以下のものを欠乏群として実験に用いた。

回復実験では飼育開始4週後に欠乏症状を呈した10匹に体重100g当たり、リボフラビン500 γ を腹腔内に注射した。これらはいずれも20時間後に体重増加が始まり、40時間後には6~8%の体重増加がみられた。臓器中とくに肝臓重量の増加が著しく、4週間欠乏飼育で体重当たりの肝臓重量が $6.07 \pm 0.57\%$ (平均 $\pm$ S.D., 10匹)のものがリボフラビン投与20時間後に $6.38 \pm 0.82\%$ (5匹)、40時間後では $7.20 \pm 0.64\%$ (5匹)であった。欠乏のものは対照にくらべて有意差はないが、欠乏のものにリボフラビンを与えた40時間後のものでは肝臓重量の著しい増加が認められた。体重増加量の約1/3は肝臓重量の増加に相当し、他の臓器での重量変化はあまりなかった。この結果は、リボフラビン投与2日後、体重増加の約半分が肝臓重量に相当することを示したKim²⁾らのものとだいたい同じであった。

飼育開始直後18日間リボフラビン添加対照飼料を与え、その後欠乏飼料を与えた群は5~7日間は対照群と同様の体重増加を示したが、約10日後より漸次体重の減少がみられた。

2. 酸化活性の変化

肝臓ミトコンドリアによる基質酸化活性は、Table 1に示されるように4週間欠乏飼育によって、どの

Table 1. Effect of riboflavin on oxidation activity of rat liver mitochondria.

Substrate Group	Succinate	β -Hydroxybutyrate	Palmityl-CoA + L-Carnitine	Palmityl-L-carnitine
Deficient ¹⁾	357 $\pm$ 71 (7)	159 $\pm$ 31 (7)	127 $\pm$ 17 (5)	110 $\pm$ 14 (5)
Recovered ²⁾	449 $\pm$ 30 (3)	227 $\pm$ 33 (3)	241 $\pm$ 28 (3)	155 $\pm$ 23 (3)
Control ³⁾	576 $\pm$ 48 (5)	276 $\pm$ 19 (5)	257 $\pm$ 22 (4)	185 $\pm$ 32 (5)

The enzyme activities are expressed as oxygen uptake μ l/min/mg of mitochondrial protein. Values represent means $\pm$ S.D. Values in parentheses are number of animals.

- 1) Rats were fed riboflavin deficient diet for 4 weeks.
- 2) The deficient rats were recovered by intraperitoneal injection of riboflavin (500 μ g/100 g body weight), and used after 40 hours.
- 3) Rats were fed a diet supplemented 20 mg of riboflavin to 450 g of the deficient diet for 4 weeks.

Table 2. Effect of previous feeding of riboflavin supplemented diet on oxidation activity.

Substrate Group	Succinate	β -Hydroxybutyrate	Palmityl-CoA + L-Carnitine	Palmityl-L-carnitine
Deficient ¹⁾	471 $\pm$ 27	143 $\pm$ 28	126 $\pm$ 18	143 $\pm$ 12
Control ²⁾	549 $\pm$ 22	236 $\pm$ 34	280 $\pm$ 45	198 $\pm$ 36

The expression of activity is the same as described in Table 1. Values represent mean $\pm$ S.D. of 3 rats.

- 1) The weanling rats were fed control diet for 18 days, and then riboflavin deficient diet for 31 days.
- 2) The rats were fed riboflavin-supplemented diet for 7 weeks.

Table 3. Respiratory control ratio of rat liver mitochondria.

Substrate Group	Succinate	β -Hydroxybutyrate	Palmityl-CoA + L-carnitine	Palmityl-L-carnitine
Deficient	4.50 $\pm$ 0.48 (4)	2.85 $\pm$ 0.28 (4)	2.22 $\pm$ 0.13 (4)	2.81 $\pm$ 0.16 (3)
Recovered	4.28 $\pm$ 0.35 (2)	3.43 $\pm$ 0.38 (2)	3.60 $\pm$ 0.33 (3)	2.51 $\pm$ 0.28 (2)
Control	5.03 $\pm$ 0.23 (4)	3.37 $\pm$ 0.18 (4)	3.99 $\pm$ 0.25 (4)	3.62 $\pm$ 0.37 (3)

Values represent mean $\pm$ S.D. of respiratory control ratios.

Values in parentheses are number of animals. Experimental conditions of the rats were the same as described in Table 1.

Table 4. Oxygen consumption and P : O ratios of mitochondria.

Substrate Group	Succinate		Palmityl-L-carnitine	
	Oxygen uptake	P/O	Oxygen uptake	P/O
Deficient	3.95 $\pm$ 0.15	1.88 $\pm$ 0.08	2.68 $\pm$ 0.08	2.56 $\pm$ 0.11
Control	4.03 $\pm$ 0.05	1.85 $\pm$ 0.11	2.94 $\pm$ 0.13	2.58 $\pm$ 0.04

Values are average of two experiments.

Deta of oxygen uptake are expressed as oxygen μ atom/hour/mg mitochondrial protein.

Experimental conditions of the rats were the same as described in Table 1.

基質のものも対照に比し著しく低下した。欠乏食飼育のものにリボフラビンを投与した回復期のものの活性は、いずれの基質についても正常対照のもの 80~90% に活性が復元したが、その比率はことなっていた。脂肪酸酸化は、投与後 40 時間で対照とほとんど同じ活性を示し、 β -ヒドロキシ酪酸の酸化は欠乏のものに比し有意に活性の増加が認められた。しかしコハク酸のものは増加の傾向が認められたが欠乏に対し有意差はなかった。

離乳後 18 日間正常食を、ついで欠乏食を与えたものでは Table 2 に示されるように各基質の酸化活性は低下したが、とくにパルミチル-CoA+L-カルニチンの酸化活性の低下が大であった。

3. Respiratory Control Ratio (R. C. R.)

基質のみの酸化による酸素吸収量と、ADP 添加時のそれとの比率 (R. C. R.) は欠乏食のミトコンドリアのもののほうが正常食のものより低い傾向にあったが (Table 3), コハク酸を基質としたときは差がなく、 β -ヒドロキシ酪酸では有意差が認められた。パルミチル-CoA+カルニチンおよびパルミチル-カルニチンの場合はいずれも R. C. R. の明らかな低下が認められた。リボフラビン投与による回復期のものではパルミチル-CoA+カルニチンではほとんど正常群のものの値にもどっていたが、パルミチル-カルニチンでは欠乏のものと差がなく、回復がおそいようであった。

4. 酸化的リン酸化

パルミチン酸誘導体の酸化はコハク酸の場合と異なり、R. C. R. の明らかな低下が認められたので、P/O 値を測定した。Table 4 に示されるように P/O は差がなかった。欠乏食飼育 4 週間では、ミトコンドリアたん白量当たりの酸素吸収量および R. C. R. が、パルミチル-カルニチンを基質とし低下しているが、P/O 値は差がなかったことは、ヘキソキナーゼ系のような ADP 再成系があれば、ATP 生成機構にはリボフラビン欠乏による阻害はおこっていないことが推定される。

考 察

離乳後の白ネズミをリボフラビン欠乏食で 4 週間飼育したとき、肝臓ミトコンドリアによる脂肪酸酸化はパルミチン酸の CoA およびカルニチン誘導体を基質としてともに著しく低下した。この条件のネズミにリボフラビンを腹腔内投与したものは、いずれも活性が回復した。一方、離乳後 18 日間リボフラビン含有対照食餌で飼育後、欠乏食を 31 日間与えた場合の酸化活性は、パルミチル-CoA とカルニチンを基質とした場合のほうが、パルミチル-カルニチンのものより減少の割合が大きく、離乳直後から欠乏食で飼育したものとほとんど同じ低下率を示した。

β -ヒドロキシ酪酸やコハク酸の酸化は、欠乏食飼育により低下し、Burch らりのリボフラビン欠乏食 8~10 週間飼育における結果とほとんど同じ程度の減少を示した。離乳後リボフラビン含有食餌で飼育し、その後欠乏食を与えた場合のコハク酸の酸化活性は、 β -ヒドロキシ酪酸のものにくらべその低下の割合が著しく少なかった。この理由としてコハク酸脱水素酵素のフラビンはたん白部と強く結合していて、プロテアーゼで分解するような操作を用いない限り、容易に離脱しがたいこと¹¹⁾から考え、肝臓のフラビン含有量が減少しても、この酵素に結合しているものは容易に解離されないことや、酵素合成の turnover がおそいことなどが推定される。

一方、パルミチル-カルニチンのほうがパルミチル-CoAのものより、リボフラビン欠乏食飼育によってその活性の低下が少なかった理由は、これらの酵素たん白とリボフラビンとの結合様式が明らかでないので、コハク酸の場合と比較はできないが、結合様式の問題以外にミトコンドリアの膜構造の変性に関与している可能性が考えられる。パルミチル-CoA は外膜内で一度カルニチンに変化し、内膜に移転後 CoA 誘導体となり酸化されるが、パルミチル-カルニチンはそのまま酸化部位に移転されうるので、欠乏による膜構造の変性による影響が少ないことが推定されるからである。

脂肪酸誘導体、コハク酸、 β -ヒドロキシ酪酸を基質とした場合、欠乏食飼育の肝臓ミトコンドリアの R. C. R. はコハク酸以外はいずれも有意に低下した。R. C. R. はミトコンドリアの構造と機能の完全性によって維持されているので、その低下は膜構造の変性を表わしている。肝臓切片の電子顕微鏡像は、著者らの白ネズミの欠乏食飼育、4~7 週間によってミトコンドリアの巨大化が、Tandler⁹⁾ らのマウスの実験でみられたと同様示されているので、リボフラビン欠乏によってミトコンドリアの形態変化がおこり、白ネズミでは外膜の不連続性が見いだされているので、膜構造の変性が明らかにおこっている。

リボフラビン投与による回復実験で、R. C. R. の復元がパルミチル-CoA とカルニチン系のほうが、パルミチル-カルニチンより早く正常化したことについては、肝臓ミトコンドリアではカルニチン非依存性の酸化や、ATP 非依存性の脂肪酸の活性化があり¹²⁾、またアシル-カルニチンはミトコンドリアに対して界面活性剤として働くために¹³⁾、本実験の結果だけで R. C. R. の差は論ぜられない。

以上の実験結果から、リボフラビン欠乏症状発現と脂質代謝との関係を考えると、まず欠乏によって脂肪酸の酸化活性が低下し、脂質濃度の変化や、質的变化がおこり、これがミトコンドリアの膜構造の変性をおこさせ、

このことが脂質代謝機能の低下を増幅させることが推察される。

要 約

白ネズミの肝臓ミトコンドリアによるパルミチン酸誘導体の酸化に及ぼすリボフラビンの影響をしらべ、リボフラビン欠乏によって、パルミチル-CoA と L-カルニチンとの酸化のほうが、パルミチル-L-カルニチンのものより減少が大きいことが見いだされた。

離乳ネズミをリボフラビン添加対照食で 18 日間飼育し、ついで 31 日間欠乏食で飼育したとき、ミトコンドリアのパルミチル-CoA と L-カルニチンの酸化活性は、欠乏食で飼育をはじめたものと同様の減少を示したが、パルミチル-L-カルニチンのものは欠乏食飼育前に対照食を与えたもののほうが酸化活性の減少が少なかった。

ミトコンドリアの呼吸調節率は、欠乏食で 4 週間飼育することにより、パルミチン酸の両誘導体ともに減少した。しかし、酸化のリン酸化の比はパルミチル-L-カルニチンを基質とし、欠乏による影響はなかった。

本研究にあたり、パルミチル-L-カルニチンおよび L-カルニチンをご贈与賜った大塚製薬、ならびにパルミ

チル-CoA をご贈与賜った大日本製薬に深謝いたします。

文 献

- 1) Burch, H. B., Hunter, F. E. Jr., Combs, A. M. and Schutz, B. A. : *J. Biol. Chem.*, **235**, 1540 (1960)
- 2) Kim, Y. S. and Lambooy, J. P. : *J. Nutr.*, **98**, 467 (1969)
- 3) Tandler, B., Erlandson, R. A., Smith, A. L. and Wynder, E. L. : *J. Cell. Biol.*, **41**, 477 (1969)
- 4) Hara, H. : *J. Vitamin.*, **6**, 24 (1960)
- 5) Lehninger, A. L. : *Physiol. Rev.*, **42**, 467 (1962)
- 6) Fritz, I. B. and Yue, K. T. N. : *J. Lipid Res.*, **4**, 279 (1963)
- 7) 谷口巳佐子, 山元寅男, 中村元臣 : シンポジウム“栄養食品領域におけるリビドの諸問題”, 日本農芸化学会発表, 昭和 46 年 9 月 4 日 (福岡)
- 8) Schneider, W. C. : *J. Biol. Chem.*, **176**, 259 (1948)
- 9) Gornall, A. G., Bardawill, C. S. and David, M. M. : *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949)
- 10) Sumner, J. B. : *Science*, **100**, 413 (1944)
- 11) Kearney, E. B. : *J. Biol. Chem.*, **235**, 865 (1960)
- 12) Bergh, S. G. van den : *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 442 (1965)
- 13) Fritz, I. B. and Marquis, N. R. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **54**, 1226 (1965)

(昭和 47 年 6 月 28 日受理)