ラット肝ミトコンドリアにおける脂質過酸化物の形成 (第1報)

藤田 直
大阪薬科大学¹⁾

Formation of Lipid Peroxide in Rat Liver Mitochondria. I

TADASHI FUJITA
Osaka College of Pharmacy¹⁾

(Received July 21, 1971)

- 1) *In vitro* experiment was made to clarify the interrelationship among lipid peroxidation, lipid compositions, and cytochrome oxidase activity in rat liver mitochondria.
- 2) Ascorbic acid and metal ions (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}) catalysed lipid peroxidation in mitochondria, but Ca^{2+} inhibited it.
- 3) Combined application of ascorbic acid with Fe^{2+} (or Fe^{3+}) markedly, increased the formation of lipid peroxide in mitochondria but that of ascorbic acid with Ca^{2+} or Cu^{2+} did not.
- 4) Linoleic acid and LAHPO did not affect the peroxidation process in liver mitochondria, *in vivo* or *in vitro*.
- 5) Lipid peroxidation *in vitro* promoted by ascorbic acid and Fe^{2+} was accompanied by the decrease of cytochrome oxidase activity and unsaturated fatty acid ($\text{C}_{18:2}$, $\text{C}_{20:4}$, $\text{C}_{22:6}$) content of mitochondria. Among the fatty acid compositions of phosphatidylserine and phosphatidylinositol, diminution of linoleic acid and arachidonic acid was predominant.
- 6) Relationship among lipid compositions, lipid peroxidation, and cytochrome oxidase activity in rat liver mitochondria was discussed.

油脂が酸化されるとその酸化生成物が毒性を示すので油脂の酸化は食品化学上注目しなければならない現象である。高等植物ではこの酸化は lipoxidase によって急速に進行するが、動物組織においてはその機序は不明である。Lipid の過酸化物の生体での作用としては特に細胞蛋白,²⁾ 酵素,³⁻⁵⁾ 生体活性物質⁶⁾ に対する影響が検討され、このような peroxide は一般に生体膜に対し障害をひき起こすことが重要視されてきた。⁷⁾ 一方生体での脂質代謝に対してはマイクロゾームとともにミトコンドリア (Mit) が大きな役割を占めており Mit の構造と機能から考え合わせると、この peroxide の形成が Mit に何らかの影響をおよぼすことが考えられる。そこで著者は Mit の脂質成分特に poly- 不飽和脂肪酸の状態および lipid peroxidation との関連性を明白にするために実験を行ない若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

実験材料および実験操作 ラット肝ミトコンドリア標品の調製——動物は wistar 系雄性白鼠 150—250 g のものより肝を摘出し、0.25 M sucrose で 10% homogenate をつくり、その調製は Hogeboom⁸⁾ らの方法に準じて行なった。Mit の pellet に対し新鮮な肝組織重量 1 g 当り 4 ml の割合で 0.25 M sucrose を加えて、テフロンホモジナイザーで軽く homogenize し pellet から Mit の suspension を得た。蛋白質の定量は Lowry⁹⁾ らの方法に準じて行なった。

- 1) Location: 504-Kawaicho, Matsubarashi, Osaka.
- 2) W.T. Roubal, A.L. Tappel, *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 5 (1966).
- 3) C. Little, P.J. O'Brien, *Biochem. J.*, **106**, 419 (1968).
- 4) R.C. Mcknight, F.E. Hunter, *J. Biol. Chem.*, **241**, 2757 (1966).
- 5) S. Matsushita, M. Kobayashi, Y. Nitta, *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 817 (1970).
- 6) W.T. Roubal, A.L. Tappel, *Biochim. Biophys. Acta*, **136**, 402 (1967).
- 7) R.O. Reckmagel, A.K. Ghoshal, *Federation Proc.*, **24**, 229 (1965).
- 8) G.H. Hogeboom, "Method in Enzymol" Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 16.
- 9) O.H. Lowry, N.H. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

ミトコンドリアのチオバルビツール酸 (TBA 法) 陽性物質の定量——Stancliff¹⁰⁾ らの方法を若干改変して行なった。すなわち Mit suspension 3 ml に 0.15 M KCl-0.02 M Tris HCl Buffer (PH 7.4) 2 ml を加えて全量 5 ml とする。これを 37° で incubation し反応終了後 40% (w/v) のトリクロル酢酸 (TCA) 1.25 ml と 5 N HCl 0.625 ml を添加し除蛋白を行なう。これに 1% 2-チオバルビツール酸 2.5 ml を加え 10 分間煮沸し水で冷却後 4000 rpm で 5 分遠心分離を行ない上澄をとり 532 mμ で吸光度を測定した。

脂肪酸の分析と Phospholipid の分離——総脂肪酸の定量は Stoffel¹¹⁾ らの方法に準じて行なった。用いた 5% 塩酸メタノール溶液は濃硫酸に濃硫酸を滴下し発生する塩化水素ガスを濃硫酸の槽を通して脱水しあらかじめ秤量したメタノール溶液中に導入してつくった。

Phospholipid の分離は次の方法によった。すなわち試料に 10 容のクロロホルム：メタノール (2:1 v/v) を加えて lipid を抽出し、抽出物に 1/5 容の 0.5% H₂SO₄ を加えて洗浄を行なう。洗浄後クロロホルム層をとり無水硫酸ソーダで脱水後窒素気流下 50° で蒸発濃縮する。この濃縮物を Silicagel H (Merck) の薄層板 (20×20 cm, 厚さ 1 mm) に塗布しクロロホルム：メタノール：酢酸：水 (85:15:10:4, v/v) で展開を行なう。展開後薄層板を窒素気流下で乾燥さす。そして total lipid は 18 N H₂SO₄ を噴霧して 250° 15 分間プレートを乾燥さす。また、リン、アミノ基還元糖、コリンはそれぞれ Dittmer 試薬、ニンヒドリン、アンスロン、ドラーゲンドルフ試薬による薄層クロマトグラフィー (TLC) 上での呈色反応によって検出し、各 phospholipid の band を同定した。各 Phospholipid の band はヨードガスに当てて検出し、得られた各種 phospholipid の band を razor blade で剥離し、30 容のクロロホルム：メタノール (1:2, v/v) でシルカゲルから lipid を抽出し、その抽出物を窒素気流下 50° で蒸発乾固さす。これに 5% 塩酸メタノール 10 ml を加えて 80—100° で 2 時間 transmethylation を行なって脂肪酸のメチルエステルを得、この crude なメチル化物 10 に対して 2 ml の水を加え水洗し、石油エーテル (bp. 40—60°) 10, 5, 5 ml でもって 3 回抽出し、抽出物を無水硫酸ソーダで脱水、常法により濃縮を行なって精製メチルエステルを得た。このメチルエステルをガスクロマトグラフィー (GLC, 島津 GC-IC) で分析を行なった。GLC 実施の条件は、カラムはガラスカラム (4 mm×1.86 m) 充填剤は 15% EGA (chromosorb W, 60—80 mesh), カラム温度 200°, detector 240°, inlet 250°, 検出器は水素炎イオン化検出器 (20 ml/min), キャリアガスは窒素ガス (50 ml/min) である。脂肪酸の同定には標準物質 (C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{20:4}, C_{22:6} のメチルエステル) を GLC にかけてクロマトグラムをつくりその retention time から nomogram を作製して未知物質を同定した。脂肪酸の定量値は半値幅法により算出し小数以下の値は痕跡として表示した。

Cytochrome Oxidase 活性の測定——Yeast の cytochrome C を用いて Cooperstein¹²⁾ らの方法にしたがって測定した。

Linoleic Acid Hydroperoxide (LAHPO) の生成——リノール酸 5 ml を 37° で 100 hr 空気の bubbling を行なった。生成した LAHPO の濃度は TBA 法,¹⁰⁾ POV 値¹³⁾ であらわしたが、それぞれ 500 μg/ml linoleic acid, 857 (meq/kg) であった。リノール酸, LAHPO は 0.1% Tween 80 で suspension をつくり実験に供した。

試薬——溶媒はすべて市販特級あるいは一級のを常法により蒸留して用いた。その他の試薬は特級あるいは分析用のものを用いた。

結 果

脂質過酸化物の最終産物はマロンアルデヒドであるが、各種の処置によって得た標品について吸収曲線を取り、Fig. 1 にその吸収スペクトルを示した。熱で変性したサラダオイル (1 ml), 2 hr incubation した Mit (protein 14 mg), LAHPO (0.02 ml) のスペクトルはそれぞれ標品の Malonaldehyde bis (dimethylacetal) (1 μg) の 532 mμ のスペクトルと同一の極大値を示した。このことからそれらの酸化生成物はマロンアルデヒドであることが推測された。

In vitro における脂質過酸化反応の促進因子といわれている¹⁴⁻¹⁶⁾ アスコルビン酸 (VC), Fe⁺⁺ (硫酸第一鉄アンモニウム), その他各種金属イオンを medium にそれぞれ単独あるいは同時に添加し 37° で incubation を行なった場合の経時的な脂質の過酸化反応をみた。その結果が Fig. 2 である。VC 単独による促進効果は速やかに出現し 30 分頃から直線的な上昇を示している。一方金属イオンのなかで Fe⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Cu⁺⁺ 単独は初期に軽度の促進を示し、その後 Fe⁺⁺ だけはさらに促進するが、VC の促進より遙かに軽度である。なお、Ca⁺⁺ は他の金属イオンと異なって抑制を示した。

10) R.C. Stancliff, M.A. Williams, K. Utsumi, L. Packer, *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 629 (1969).

11) W. Stoffel, F. Chu, E.H. Ahrens, *Anal. Chem.*, **31**, 307 (1959).

12) S.J. Cooperstein, A. Cazarow., *J. Biol. Chem.*, **189**, 665 (1951).

13) 石坂音治, 草味正夫, 中村勇蔵, 三橋 靖, “衛生化学および試験法 (2 版),” 広川書店, 1967, p. 361.

14) A.E. Kitabachi, R.H. Williams, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3248 (1968).

15) H. Hunter, A. Schneider, *J. Biol. Chem.*, **239**, 614 (1964).

16) W.G. Hanstein, Y. Hatefi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 87 (1970).

Fig. 1. Visible Spectra of TBA Chromogen

A: salad oil (heated)
B: malonaldehyde bis (dimethylacetal)
C: mitochondria
D: LAHPO

VC と Fe^{++} または Fe^{+++} を併用すると 10 分で著明な上昇をきたし 30 分以後にもその状態を持続した。これに対し Ca^{++} , Cu^{++} はともに VC による上昇に拮抗した。

Table I は *in vitro* における Mit の脂質の過酸化反応に対する VC, 各種金属イオンの影響を比活性で示したものである。Control を 100 とすると VC 添加では約 6 倍の促進を示し, Fe^{++} は 3.4 倍と VC の約 1/2 の促進であった。 Ca^{++} (40 μM) は Fe^{++} と同濃度で約 90% の抑制を示した。

つぎに, VC (0.1 mM) + Fe^{++} (40 μM), VC + Fe^{++} (40 μM) の存在下ではそれぞれ約 7.7 倍とほぼ同程度の著明な上昇をみた。

上述のように Mit における脂質酸化は VC と Fe^{++} (Fe^{+++}) イオンの共存により著しく促進されたので, この medium にリノール酸あるいは LAHPO を添加し 2 hr incubation 中の経過をみた (Fig. 3). まず対照としてこの medium から VC, Fe^{++} を除いたところ, 添加リノール酸あるいは LAHPO 濃度に平行して TBA chromogen の値が上昇したにすぎない。また Mit を加えずリノール酸あるいは LAHPO と VC, Fe^{++} だけで, incubate

Fig. 2. Comparison of the Effects of Metal Ions and Ascorbic Acid on Lipid Peroxide Formation in Rat Liver Mitochondria

A: control, B: Fe^{+++} 40 μM , C: Fe^{++} 40 μM , D: VC (0.1 mM), E: VC + Fe^{++} , F: VC + Fe^{+++} , G: Ca^{++} (40 μM), H: Cu^{++} (40 μM), I: VC + Ca^{++} , J: VC + Cu^{++}

TABLE I. Effect of Various Substances on Lipid Peroxide Formation in Rat Liver Mitochondria

Additions	TBA index (A 532 mμ)	Rate of lipid peroxide formation %
None (control)	0.037	100.0
Ascorbic acid (0.1 mM)	0.22	594.6
Ascorbic acid (0.04 mM)	0.04	108.1
Fe^{++} (0.1 mM)	0.075	202.7
Fe^{++} (0.04 mM)	0.127	343.3
Fe^{+++} (0.04 mM)	0.04	108.1
Cu^{++} (0.04 mM)	0.061	164.9
Ca^{++} (0.04 mM)	0.004	10.8
Ascorbic acid (0.1 mM) + Fe^{++} (0.04 mM)	0.284	767.6
Ascorbic acid (0.1 mM) + Fe^{+++} (0.04 mM)	0.286	772.9
Ascorbic acid (0.1 mM) + Cu^{++} (0.04 mM)	0.078	210.8
Ascorbic acid (0.1 mM) + Ca^{++} (0.04 mM)	0.091	245.9

TBA index: absorbance at 532 mμ/mg of protein/ml of incubation mixture in 1 hr

Fig. 3. Effects of Ascorbic Acid and Fe^{++} on TBA Chromogen Production from Linoleic Acid and LAHPO

LAHPO: $\square$ control, $\bullet$ VC (0.1 mM) + Fe^{++} (40 μM)
 Linol.: $\blacktriangle$ control, $\times$ VC (0.1 mM) + Fe^{++} (40 μM)

Fig. 4. Effects of LAHPO and Linoleic Acid on Lipid Peroxide Formation in Rat Liver Mitochondria

A: LAHPO or linol. (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of medium) + VC (0.1 mM) + Fe^{++} (40 μM), B: LAHPO + Mit + VC + Fe^{++} , C: linol. + Mit + VC + Fe^{++} , D: LAHPO + Mit, E: linol. + Mit

した場合にも全く同様な値を示し、VC、 Fe^{++} の影響は全くみられなかった。

しかるに Mit, VC, Fe^{++} , リノール酸あるいは LAHPO を共存させた場合は Fig. 2 と同じ傾向であった (Fig. 4). つぎに Mit にリノール酸, LAHPO を添加して incubate しその経時的な変化は対照とほとんど変わらず (Fig. 4, D, E) すなわち, リノール酸, LAHPO の Mit への影響は全くみられなかった。

次にリノール酸 (73 mg/kg), LAHPO (73 mg/kg as linoleic acid) の生体投与による影響を検した。これら脂質を 0.1% Tween 80 水溶液 (0.5—1 ml) としてそれぞれラットの腹腔内に投与し, 24 hr 後に撲殺, その肝の Mit を分離し, 上述の方法により Mit における脂質過酸化反応を経時的にみたが, 各投与群と対照群との間にはほとんど差はみられなかった。

また VC, Fe^{++} のような activator の存在下で 37° 2 hr incubation を行なうと Mit は 10 分で著明な TBA 陽性物質を示すことなどから (Fig. 2), Mit の酵素活性にもこの時点で対照と比較した場合, 何らかの影響がもたらされることが考えられる。そこで Mit の phospholipid と関連性の深い cytochrome oxidase の活性を 0 time (Mit 調製直後) と 10 分間 incubation (TBA 陽性物質形成の急激増加をみる初期の段階) の 2 点で測定した。

Fig. 5. Cytochrome C Oxidase Activity in Rat Liver Mitochondria (Incubation of Mitochondria with and without Activators)

A: control (0 Time), B: VC (0.1 mM) + Fe^{++} (40 μM), (0 Time), C: control (10 min), D: VC (0.1 mM) + Fe^{++} (40 μM), (10 min)

Fig. 5 は酸化型 cytochrome C の生成量¹²⁾を吸光度の減少量で示したものである。すなわち 0 time では activator の存在下でも対照とその活性はほとんど変わらないが 10 分後には対照側では (Fig. 5) その活性は 81.47% に低下, activator の存在下では 33.95% と著しい酵素活性の減少を示した。10 分後の対照を 100 とすると activator の存在下で

Fig. 6. Thin-Layer Chromatogram of Lipid extracted from Rat Liver Mitochondria

solvent: CHCl_3 :MeOH:HAC: H_2O (85:15:10:4)
 1: PI, 2: PS, 3: PC, 4: PE, 5: CL, 6: glycolipid, 7: neutral lipid

TABLE II. Fatty Acid Composition of Lipids Extracted from Rat Liver Mitochondria

Fatty acid chain length	Percentage of fatty acids											
	Total		CL		PE		PC		PS		PI	
C _{14:0}	+ ^{a)}	+ ^{b)}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C _{16:0}	21.4	22.5	4.2	5.8	24.4	25.4	25.5	29.5	28.2	49.9	31.9	48.4
C _{16:1}	+	+	4.6	3.8	+	+	+	+	+	+	+	+
C _{18:0}	17.9	21.3	1.0	1.8	29.1	27.8	23.7	24.9	33.9	39.0	39.9	39.4
C _{18:1}	12.6	12.9	15.6	14.8	6.4	5.5	8.8	9.9	6.7	4.4	7.9	5.3
C _{18:2}	23.8	27.5	74.5	73.8	8.9	11.1	19.3	18.8	14.4	6.7	8.6	6.9
C _{18:3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C _{20:4}	15.9	13.9	+	+	20.8	19.3	18.5	16.9	9.4	+	6.4	+
C _{22:6}	8.4	4.6	+	+	10.3	10.1	6.4	1.0	+	+	+	+

a) initial (0 time); b) after incubation (10 min) Plus sign expressed trace amount.

は 41.67% の低下となる。すなわち cytochrome oxidase の活性はこれらの activator を添加することによって約 2.5 倍の抑制がみられた。

このような条件下では、Mit における TBA 陽性物質の形成が促進されること、またそれに伴って cytochrome oxidase 活性の著明な減少がみられたことなどから Mit の機能を維持して行く上に重要な phospholipid、その phospholipid を構成する各種脂肪酸特に不飽和脂肪酸に何らかの変化を来たことが予想される。そこでまず TLC によって (Fig. 6) Mit から 5 種類の phospholipid すなわち、phosphatidyl inositol (PI), phosphatidyl serine (PS), phosphatidyl choline (PC), phosphatidyl ethanolamine (PE), cardiolipin (CL) を分離し、¹⁷⁾ それらの band を剥離して transmethylation を行ない脂肪酸の分析を行なった。その結果は Table II に示してある。

この表は Mit の phospholipid を構成する各種脂肪酸の量的な関係を相対比で示したものである。

総脂肪酸においては 10 分後は C_{22:6}, C_{20:4} 等不飽和度の高いものから減少を示している。Phospholipid の各分画においては CL は C_{18:2} が圧倒的に多く構成脂肪酸の 70% 以上を占めている。PE, PC は総脂肪酸と同様に量的な差はあるが、おおむね同じ傾向を示している。PS, PI はそれぞれ C_{16:0}, C_{18:0} が多く不飽和脂肪酸は相対的に少ない。いずれにしても 10 分後は不飽和度の高いものから逐次減少しているのが特徴である。

総脂肪酸、各 phospholipid を構成する脂肪酸の飽和、不飽和脂肪酸のそれぞれの総和を相対比で示すと (Fig. 7) CL は約 95% が不飽和脂肪酸であり飽和脂肪酸は約 5% にすぎない、逆に PS, PI は不飽和脂肪酸がそれぞれ 30.5%, 22.9% で飽和脂肪酸は 62.1%, 71.8% の値であった。これらの飽和、不飽和脂肪酸が 0 time と 10 分間 incubation 後どのような傾向を示すかを “sum of sat/sum of unsat” の ratio をとり histogram でみると、PI, PS に著明な変化がみられ、対照 (0 time) に比しそれぞれ明らかなる不飽

Fig. 7. Comparison of Relative Ratio of saturated and unsaturated Fatty Acids contained in Total Fatty Acid and Phospholipid Extracted from Rat Liver Mitochondria

Values are given as the ratio of saturated/unsaturated.
 □: control (0-time)
 ▨: after incubation (10 min)

17) I. Yano, Y. Furukawa, M. Kusunose, *J. Bacteriol.*, **98**, 124 (1969).

和脂肪酸の減少を示した。

考 察 お よ び 結 論

油脂の酸化された場合には酸化生成物が毒性を示す。特に脂質過酸化物をラットに経口投与すると腸粘膜の破壊,¹⁸⁾ 食欲の減退, 成長の減退,¹⁹⁾ 肝, 腎の肥大²⁰⁾ をきたすといわれ食品化学上注目しなければならない現象であるが, 動物組織における脂質過酸化物の形成機序は不明である。

In vitro での脂質の過酸化反応には分子状の酸素が必要であり, この酸化される基質としては 1,4-ペンタジエン型すなわち $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ の不飽和脂肪酸を含むことが要求される。したがって $\text{C}_{18:1}$ などの monoenoic 酸は基質となり得ないが $\text{C}_{18:2}$, $\text{C}_{18:3}$, $\text{C}_{20:4}$ 等を含む脂質はよく酸化されリノール酸に関する自動酸化 mechanism については種々報告されている。²¹⁾

生体試料を用いての酸化機構の研究にはマイクロゾームがよくつかわれているが²²⁻²⁴⁾ マイクロゾームは phospholipid の合成, 薬物の代謝機構に關与する点などから興味をもたれているのであろう。

一方著者は Mit の preparation を用いて脂質の過酸化反応と Mit の脂質成分, 酵素活性等に関し若干の相関々係をみい出した。Mit の脂質過酸化物の形成を促進する因子には VC, 金属イオンなどがあるがその中でも Fe^{++} はきわめて明らかな促進を示した。これに対し Ca^{++} は Fe^{++} と同濃度で約 90% の抑制をきたした。また Fe^{+++} は単独では明らかな促進作用を示さなかったが VC に Fe^{++} あるいは Fe^{+++} を添加すると促進作用の出現は速かで顕著となり, 両イオンは VC の存在下では反応の initial step を促進することが推察された。なお Ca^{++} , Cu^{++} にはそのような作用は全くみられず, むしろ VC による促進を抑制した。つぎに比較的脂質の酸化が進行しやすい条件すなわち activator の存在下でリノール酸, LAHPO をそれぞれ反応させたが全く変化がみられず, また Mit に対してもリノール酸, LAHPO の直接的な影響はみられなかった。これらの結果は VC と Fe^{++} がリノール酸, LAHPO との化学反応によって酸化を促進するものではないことを示している。むしろ Fig. 2 に示したように Fe^{+++} は単独では Fe^{++} と異なってあまり影響がないが, VC と併用すると始めて著明な促進を示すことから VC によって Fe^{+++} が Fe^{++} になりそしてその効果を發揮する。 Fe^{++} は VC によって酸化されないように防禦されていることが考えられる。また Mit の存在下で VC, Fe^{++} の効果が期待できることなどからマイクロゾームと同様²⁵⁾ 何らかの酵素系の関与が示唆されるとともに, 外因性のリノール酸, LAHPO は Mit の中に容易に transport されないが VC, Fe^{++} は Mit の中に容易にとりこまれ脂質成分の変化をきたし酸化が促進されるものと思われる。

ラットにリノール酸, LAHPO を投与し 24 hr 後の肝 Mit の TBA 陽性物質を測定したが, 対照とほとんど変わらず, またこの時の Mit の脂肪酸組成を飽和, 不飽和脂肪酸の総和およびそれらの比をとってみても (Table III) 対照との間にほとんど差異はみられなかった。なお個々の脂肪酸組成にも変化がみられなかったことから, 不飽和脂肪酸も飽和脂肪酸と同様体内で β -酸化を受けて代謝されるが, LAHPO も同じような経路で分解を受けるといふ報告²⁶⁾ もあり, β -酸化の基質として消費され *in vivo* においてリノール酸, LAHPO の投与による肝 Mit への影響は認められないとも考えられる。

Mit の酵素活性は少なくとも一部は phospholipid に dependent であるといわれている。²⁷⁾ また色々な生体化合物の中で分子状の酸素によって最も感受性の強い酸化は phospholipid の不飽和 fatty acyl 残基である²⁸⁾ こと

18) J. Glavind, N. Tryding, *Acta Physiol. Scand.*, **49**, 97 (1960).

19) S.M. Greenberg, A.C. Frazer, B. Roberts, *J. Nutr.*, **50**, 421 (1953).

20) H. Kaunitz, C.A. Slanetz, R.E. Johnson, S.F. Herb, *J. Am. Oil Chemist's Soc.* **38**, 301 (1961).

21) N.R. Artman, *Advan. Lipid Res.*, **7**, 245 (1969).

22) W.G. Niehaus, JR., B. Samuelsson, *European J. Biochem.*, **6**, 126 (1968).

23) E.D. Wills, *Biochem. J.*, **113**, 333 (1969).

24) M. Guarnieri, R.M. Johnson, *Advan. Lipid Res.*, **8**, 115 (1970).

25) P. Hochstein, L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 388 (1963).

26) N.R. Artman, *Advan. Lipid Res.*, **7**, 307 (1969).

27) D.E. Green, S. Fleischer, "Metabolism and Physiological Significance of Lipids," John Wiley and Sons LTD, London, 1964, p. 581.

28) Y. Hatefi, W.G. Hanstein, *Arch. Biochem. Biophys.* **138** 73 (1970).

TABLE III. Comparison of Relative Ratio of saturated and unsaturated Fatty Acids contained in Total Fatty Acid and Phospholipid extracted from Rat Liver Mitochondria (after Intraperitoneal Administration of LAHPO and Linoleic Acid)

	Total fatty acid		Percentage of fatty acids				
			CL	PE	PC	PS	PI
Saturated fatty acid	control	40.4	5.2	53.5	49.2	62.1	71.8
	linol.	39.6	6.7	53.9	48.3	77.2	67.3
	LAHPO	42.9	8.3	48.0	47.2	70.0	70.1
Unsaturated fatty acid	control	59.6	94.7	46.4	53.0	30.5	22.9
	linol.	60.4	93.3	46.4	51.7	22.7	32.7
	LAHPO	56.9	91.7	52.0	52.8	30.0	29.9
Sat/Unsat.	control	0.68	0.055	1.15	0.93	2.0	3.14
	linol.	0.66	0.07	1.16	0.94	3.4	2.06
	LAHPO	0.75	0.09	0.92	0.89	2.3	2.35

などから Mit の phospholipid と関係の深い cytochrome oxidase の活性を検したが、本活性は activator の存在下で 10 分間 incubation を行なうと約 60% の減少を示した。このような減少は TBA 陽性物質の形成ひいては Mit の phospholipid の conformation に変化をきたし酵素活性の低下を招くものと思われる。

この場合、脂肪酸組成に関する結果では総脂肪酸も phospholipid を構成する各種脂肪酸もそれぞれ不飽和度の高いものから漸次減少し飽和、不飽和脂肪酸の ratio の変化がみられた。さらに phospholipid の分画にも変化がみられ、特に PI, PS ではそれらを構成する脂肪酸に著明な変化がみられた。このような結果から TBA 陽性物質は不飽和度の高いものから、また phospholipid の分画では PI, PS の不飽和脂肪酸特に $C_{18:2}$, $C_{20:4}$ などが時間の経過とともに酸化されることがうかがわれた。

総 括

- 1) Mit の脂質成分特に poly-不飽和脂肪酸と lipid peroxidation との関連性を明白にするために実験を行ない、Mit の過酸化反応と Mit の脂質成分、酵素活性などに関し若干の関連をみい出した。
- 2) Mit における脂質の過酸化反応を促進する因子としては VC, 金属イオン特に Fe^{++} , Fe^{+++} , Cu^{++} などがあげられる。その中でも Fe^{++} と VC による促進は著しいが Ca^{++} は明らかな抑制を示した。
- 3) VC と Fe^{++} または Fe^{+++} の共存では Mit の TBA 陽性物質形成の著明な上昇をみたが、 Cu^{++} , Ca^{++} では VC の促進作用は抑制された。
- 4) リノール酸, LAHPO は *in vivo*, *in vitro* で肝の Mit における脂質過酸化反応に影響をおよぼさなかった。
- 5) VC, Fe^{++} 添加時 Mit の脂質過酸化反応は促進されるが、10 分間の incubation 後には、cytochrome oxidase 活性は約 60% の低下をきたした。この場合の Mit の脂肪酸のうち不飽和脂肪酸に著明な変化がみられ特に $C_{22:6}$, $C_{20:4}$, $C_{18:2}$ の減少が著明であった。
- 6) 肝 Mit の TBA 陽性物質の形成促進時には cytochrome oxidase の活性は低下する。またこの時において PS, PI の不飽和脂肪酸が主としてつかわれる。