

高リン食摂取がラット腎ミトコンドリアの 膨潤に及ぼす影響

岸本三香子, 松浦 寿喜, 市川 富夫
(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

Effect of high phosphorus diet on the renal mitochondrial swelling of rats

Mikako Kishimoto, Toshiki Mathuura and Tomio Ichikawa

*Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan*

Five-week-old rats were fed on a diet containing phosphorus either at 0.3% (control diet) or at 1.5% (high p diet) for 21 days. Mitochondrial fraction was obtained from the kidney by the usual method. We investigated mitochondrial function as the indicator of mitochondrial swelling. When the substrate was not added to medium, mitochondria of rats fed a control diet or rats fed a high p diet showed swelling at 15% each in 60 minutes. When 5mM glutamate and 0.5mM malate were added, mitochondria of rats fed a control diet showed swelling. But the mitochondrial swelling was not observed in rats fed a high p diet and cytochrome C content in this group was lower than that of the control group. The possibility of mitochondrial functional disorder by excessive calcium was suggested.

緒言

ラットでは、高リン(P)食摂取はカルシウム(Ca)代謝に影響を及ぼし、腎におけるリン酸カルシウムの沈着である腎石灰化を起こす^{1,2,3,4)}。高P食摂取による腎機能への影響は多くの報告があるが、腎臓無細胞画分への報告は少ない。我々は、腎臓のミトコンドリア(Mt)画分のミネラル量を測定し、多量のCa, マグネシウム(Mg), Pが蓄積されていることを明らかにした⁵⁾。細胞において高濃度Ca²⁺は細胞毒であり、細胞質内のCa²⁺濃度の上昇が持続的に続くと、MtへCa²⁺が蓄積され、やがて呼吸が抑制されて、ATP産生が低下する。細胞膜のCa²⁺ポンプはATPにより駆動されているため、このことがさらなるCa²⁺の上昇を招くが、やがて様々なCa²⁺依存性プロテアーゼが活性化され、細胞死が

招来される⁶⁾。また、Mtは障害によりMt permeability transition(MPT)状態となり、細胞死へと進展していく。MPTはMt膨潤と密接に関連していることが示されている。そこで、高P食による高Ca腎状態が腎臓Mtに及ぼす影響をMt膨潤状態により検討したので報告する。

実験方法

1. 飼育飼料

実験飼料組成をTable 1.に示す。対照食はCa:0.5%, P:0.3%, 高P食はCa:0.5%, P:1.5%とし、Mgはどちらも0.05%とした。作製した飼料のCa, P, Mgの実測値の平均値は、対照食0.6, 0.3, 0.03, 高P食0.6, 1.5, 0.03であった。カゼイン, コーンスターチ, セルロースパウダー, ミネラルミックス, ビタミンミックスはオリエンタル酵母

Table 1. Composition of Hi-P diet.

	(g/100g diet)	
	Control	Hi-P
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn starch	15.0	15.0
Corn oil	5.0	5.0
Cellulose powder	5.0	5.0
Vitamin mix ¹⁾	0.8	0.8
Choline chloride	0.2	0.2
Mineral mix ²⁾	3.5	3.5
CaCO ₃	1.25	1.25
KH ₂ PO ₄	0.70	5.97
Sucrose	48.3	43.0
Ca(%)	0.5	0.5
P(%)	0.3	1.5
Mg(%)	0.05	0.05

¹⁾According to AIN-76 Vitamin mixture.

²⁾According to AIN-76 Mineral mixture, without Ca, P sources.

(株)製を用いた。コーン油はナカライテスク(株)製を用い、その他の試薬は和光純薬(株)から購入した。

2. 実験動物および飼育方法

4週令SD系雄ラットを日本クレア(株)より購入し、個別ゲージにて、室温23±1℃、湿度55±7%、12時間ごとの明暗サイクル(8:00am~8:00pm, 8:00pm~8:00am)の環境下で飼育した。対照食で1週間予備飼育した後、各飼料で3週間飼育した。試験期間中の飼料、およびイオン交換水は自由摂取とした。飼育終了日にネブタール麻酔下のラット腹部大動脈よりヘパリン処理した注射器で採血して脱血後、腎臓を摘出した。摘出後ただちに腎Mt画分を分離した。

3. Mt画分の調製

腎臓に9倍量の分画緩衝液210mMマンニトール、70mMシヨ糖、1mM EGTA、5mM HEPES溶液(pH7.2)を加えホモジナイズ後、1500×gで5分間遠心分離し、上清をさらに8000×gで15分間遠心分離し、得られた沈殿を再度分画緩衝液(EGTA free)に溶解後、8000×gで15分間遠心分離して得られた沈殿をMt画分とした。分離操作は4℃で行った。タンパク量はLowry法⁷⁾により定量した。

4. 測定項目および測定方法

4.1 Mtの膨潤実験1

調製したMtは測定に使用するまで水中に置いた。

Mtは0.15M KCl-0.02M Tris緩衝液(pH7.4)の中に、タンパク濃度が0.3mg/mlになるように懸濁し、Lehninger⁸⁾の方法に従い520nmの吸光度を、0, 5, 10, 20, 30, 40, 60分にわたり経時的に測定した。測定は腎摘出当日に行った。

4.2 Mtの膨潤実験2

阻害剤を用いMt膨潤形態を推測した。Mtは測定に使用するまで水中に置いた。Mtは5mMグルタミン酸ナトリウム・0.5mMリンゴ酸ナトリウムを含む70mMシヨ糖、214mMマンニトール、5mM Hepes緩衝液(pH7.4)の中に、タンパク濃度が0.5mg/mlになるように懸濁し、540nmの吸光度を0, 5, 10, 20, 30分にわたり経時的に測定した。Mtはあらかじめ2.5μMサイクロスポリンA(CsA)、1μMロテノン、20μM N-エチルマレイミド(NEM)、1μMルテニウムレッド(Rured)のいずれかの阻害剤と共に25℃で5分間インキュベートした後測定を開始した。測定は腎摘出当日に行った。

4.3 総チトクロームCの測定

Mtのタンパク濃度は2mg/mlに調製した。70mMシヨ糖、214mMマンニトール、5mM HEPES緩衝液(pH7.5)中で、5mMグルタミン酸ナトリウム・0.5mMリンゴ酸ナトリウム存在下におけるMtのチトクロームC量を測定した。総チトクロームC量はMtを1%トリトンX-100で溶解後測定した。Mtは37℃で3分間インキュベート後、1mMフェリシアン化カリウムで酸化後、1mMアスコルビン

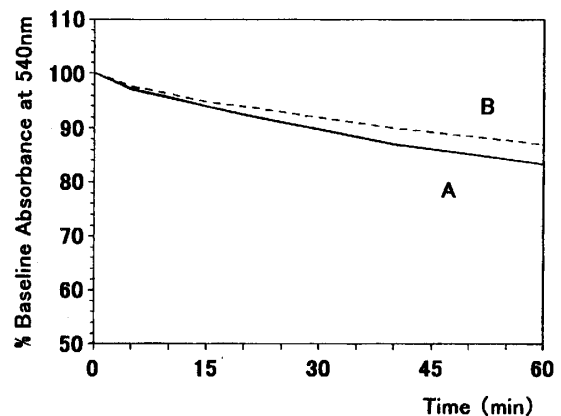


Fig. 1. Effect of high phosphorus diet on kidney mitochondrial swelling.

(A)Control diet. (B)High phosphorus diet. Rat kidney mitochondria(0.5mg/ml) was used. Mt were incubated in medium containing 0.15M KCl, 20mM Tris, pH7.4.

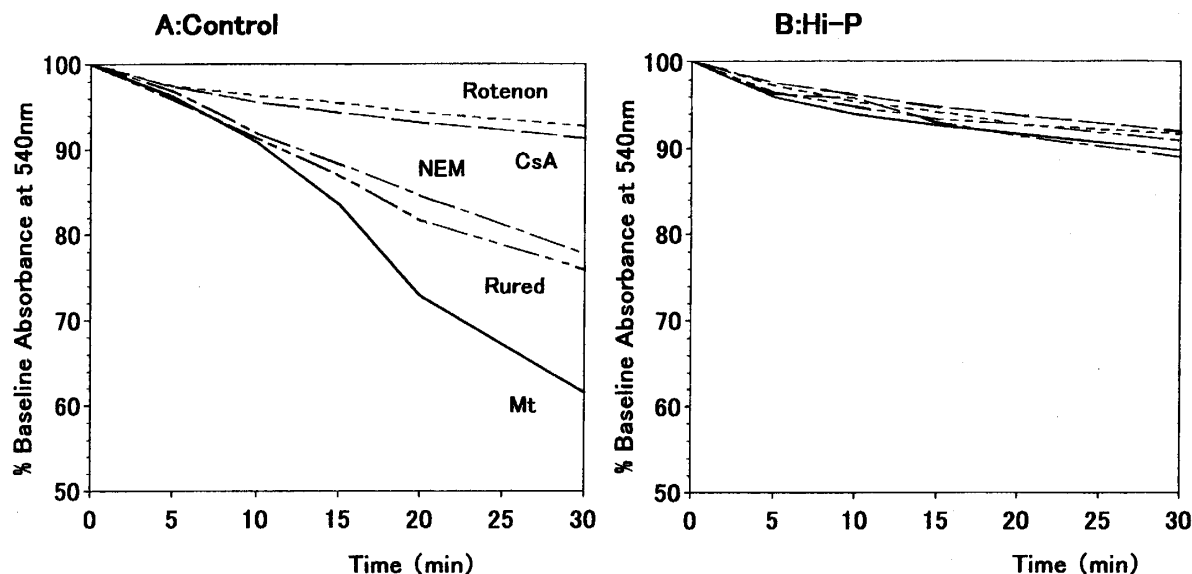


Fig. 2. Effect of high phosphorus diet on kidney mitochondrial swelling.

(A) Control diet. (B) High phosphorus diet. Rat kidney mitochondria (0.5mg/ml) was used. Mt were incubated in medium containing 70mM sucrose, 214mM mannitol, 5mM Hepes, pH7.4.

Mitochondrial swelling was initiated by the addition of 5mM glutamate and 0.5mM malate with or without 2.5 μM CsA or 1 μM rotenon or 20 μM NEM or 1 μM Rured.

酸ナトリウムで十分に還元し、吸光光度計(島津 Biospec-1600)で差スペクトルを記録した。チトクローム C 量は、還元-酸化である波長 550nm/535nm の吸収の差を $\epsilon = 18.5 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ を用いて定量した。

実験結果

1. Mt 膨潤実験 1

緩衝液として 0.15M KCl-20mM Tris-HCl 溶液を用い、時間経過に伴う Mt 膨潤状態を測定した (Fig. 1)。対照食投与、高 P 食投与 Mt はいずれも 60 分で 15% の膨潤率と、ほとんど膨潤せず、また両者間で差は見られなかった。

2. Mt 膨潤実験 2

緩衝液として 70mM ショ糖, 214mM マンニトール, 5mM HEPES (pH7.4) を用い、内部基質として 5mM グルタミン酸ナトリウム・0.5mM リンゴ酸ナトリウムを添加して測定した (Fig. 2)。対照食投与 Mt は、Mt のみで膨潤が起こり、CsA, ロテノン, NEM, Rured により膨潤は押さえられた。一方、高 P 食投与 Mt は、膨潤そのものが起こらず、先の阻害剤による変化は起こらなかった。

3. チトクローム C の測定

Mt 画分のチトクローム C 量を Table 2. に示し

Table 2. Contents of cytochrome C of mitochondrial fraction in kidney.

n=6	Control	Hi-P
Cytochrome C	0.46 ± 0.04	0.31 ± 0.11*

Date expressed as mean (nmol/mg protein) ± SD.

*Statistically significant at the P < 0.05 level each when compared with control.

た。高 P 食投与 Mt は、対照食の 69% であり有意に低値を示した。

考 察

生きた細胞における Mt の形や大きさは固定したものではなく、その代謝状態に応じて変動することが観察されている。Mt はある種の影響により、膨潤を起こす。その "Swelling agent" として活性酸素種、Ca²⁺, Pi, 脂肪酸, グルタチオン, 毒物などが多く報告されている。これらの膨潤は Mt の呼吸及び酸化的リン酸化反応と密接に関係している。

緩衝液として 0.15M KCl-20mM Tris-HCl 溶液を用いた場合、対照食投与、高 P 食投与 Mt はいずれも 60 分で 15% の膨潤率であり、差は見られなかった。緩衝液として 70mM ショ糖, 214mM マンニトール, 5mM HEPES (pH7.4) を用い、内部基質として 5mM グルタミン酸ナトリウム・0.5mM リン

ゴ酸ナトリウムを添加して測定した場合、対照食投与 Mt は膨潤が起こり、障害を受けているであろう高 Ca 腎状態である高 P 食投与 Mt においては、膨潤そのものが起こらなかった。Chance & Williams は酸素電極を用いて Mt の生理的状态を分析し、6 つの Mt の状態(State)を記載し、Mt の生理的定状態の表現に使用している⁹⁾。Mt 懸濁液に呼吸基質を加えて State4 の呼吸が行われると、Mt は膨潤し、ADP を加えて State3 になると収縮する。State 3 は呼吸基質と ADP を添加して得られる状態であり、酸化リン酸化反応が最もスムーズに進行し、Mt の呼吸活性が著しく増大するとされている。筆者らは、酸素電極法による Mt の呼吸および酸化リン酸化の測定を行った結果、高 P 食投与 Mt においては基質をグルタミン酸ナトリウム・リンゴ酸ナトリウムとして測定した場合、State3 は誘発されず、State4 も低値を示した(データ省略)。これは膨潤が起こらなかったことと関連があると思われた。また、Washington ら¹⁰⁾は、大量の Ca^{2+} 取り込みによって Mt 内に Amorphous なリン酸カルシウムの沈殿が生じることによる、Mt の膨化、リン酸化能の消失、呼吸調節能の消失を報告している。高 P 食投与による高 Ca 腎状態は、これを支持するかもしれない。一方、Mt は何らかの障害により大きなタンパク様の穴により Mt permeability transition (MPT) を起こし、膨潤、さらにはタンパクの漏出、チトクローム C の放出が起こる^{11,12)}。これらは、Mt 細胞死の可能性をも示唆する。対照食投与 Mt で起きた膨潤は、MPT 抑制剤の CsA^{13,14)}、電子供給抑制剤ロテノン¹⁵⁾、Pi の Mt 内転移阻害剤 NEM¹⁶⁾、膜透過性阻害剤 Rured^{17,18)} により押さえられた。これらは、MPT を抑制することからも、高 P 食投与 Mt による膨潤欠如ならびにチトクローム C 含量の減少は、MPT をすでに起こしていることが示唆される。これらの結果から、Mt の重要な機能の 1 つである MPT が正常に作動していないことが明らかとなった。

要 約

体重約 90g の SD 系雄ラットに P レベル 0.3% (標準食)と 1.5% (高 P 食)を自由摂取させ 3 週間飼育した。解剖時に腎臓器を摘出し、Mt を分離後実験に使用した。Mt 機能として膨潤状態を測定した。緩衝液として 0.15M KCl-20mMTris-HCl 溶液を用いた場合、標準食投与、高 P 食投与 Mt はいず

れも 60 分で 15% の膨潤率であり、差は見られなかった。緩衝液として 70mM ショ糖、214mM マンニトール、5mM HEPES (pH7.4)を用い、内部基質として 5mM グルタミン酸ナトリウム・0.5mM リンゴ酸ナトリウムを添加して測定した場合、標準食投与 Mt は膨潤が起こり、障害を受けているであろう高 Ca 腎状態である高リン食投与 Mt においては、膨潤そのものが起こらなかった。また、Mt のシトクローム C 含量も低値を示した。Mt の重要な機能の 1 つである MPT が正常に作動していないことは明らかとなり、細胞の障害性が示唆された。

文 献

- 1) Hoek, A.C., Lemmens, A.G., Mullink, J.W.M.A., and Beynen, A.C., *J. Nutr.*, **118**, 1210-1216(1988)
- 2) Mars, Y.W.H.M., Lemmens, A.G., and Beynen, A.C., *Nutr. Rep. Int.*, **38**, 249-258 (1988)
- 3) Woodard, J.C. and Jee, W.S.S., *J. Nutr.*, **114**, 2331-2338(1984)
- 4) Al-Modhefer, A.K.J., Atherton, J.C., Garland, H.O., Singh, H.J., and Walker, J., *J. Physiol.*, **380**, 405-414(1986)
- 5) 岸本三香子, 倉本周子, 川口真規子, 松浦寿喜, 市川富夫, 武庫川女子大学紀要 **45**, 67-72 (1997)
- 6) 宇井理生編, 細胞内シグナル伝達, 現代化学増刊 **34**, 東京化学同人, 東京. pp.121-127(1998)
- 7) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., and Farr, A.L., Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951)
- 8) Lehninger, A.L., *J. Biol. Chem.*, **234**, 2187-2195(1959)
- 9) 小沢高将, 浅井淳平, 内海高髓ミトコンドリアその分子構築と生理化学, 南江堂, 東京. pp.191-194(1971)
- 10) Washington, F.D., and Murphy, V., *J. Biol. chem.*, **237**, 2670-2677(1960)
- 11) Cassarino, D.S., Parks, J.K., Parker, W.D.J., and Bennett, J.P.J., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1453**, 49-62(1999)
- 12) Borutaite. V., Morkuniene, R., and Brown, G. C., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1453**, 41-48 (1999)

- 13) Davidson, AM., and Halestrap, A.P., *Biochem. J.*, **268**, 147-152(1990)
- 14) Davis, S.C., Janice, K.P., Davis, P.J., and James, P.B.J., *Biochim, Biophys, Acta.*, **1453**, 49-62(1999)
- 15) Katz, R., Kilpatrick, L., and Chance, B., *European J. Biochem.*, **21**, 301-307(1971)
- 16) Constantini, P., Chernyak, B.V., Petronilli, V., and Bernardi, P., *FEBS Lett.*, **362**, 239-242(1995)
- 17) Hjerten, S., and Johansson, K.E., *Biochim. Biophys. Acta.*, **288**, 312-25(1972)
- 18) Broekemeier, K.M., Krebsbach, R.J., and Pfeiffer, D.R., *Mol. Cell. Biochem.*, **139**, 33-40(1994)