

コイ血合肉と肝臓ミトコンドリアにおける18:1 ω9酸の酸化 による3:0酸生成の検討

誌名	日本水産学会誌
ISSN	00215392
著者	村田, 寿
巻/号	47巻1号
掲載ページ	p. 79-83
発行年月	1981年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



コイ血合肉と肝臓ミトコンドリアにおける 18:1 ω 9 酸の酸化による 3:0 酸生成の検討^{*1}

村 田 寿

(1980年8月23日受理)

Studies on 3:0 Acid Formation from 18:1 ω 9 Acid by Oxidation in Carp Dark Muscle and Hepatopancreas Mitochondria^{*1}

Hisashi MURATA^{*2}

In order to elucidate the pathway of unsaturated fatty acid oxidation in carp, *Cyprinus carpio*, dark muscle and hepatopancreas mitochondria, the products formed by oxidation were studied using U-¹⁴C-18:1 ω 9 acid as substrate.

Although O₂ uptake due to oxidation of 3:0 acid was clearly observed in carp dark muscle mitochondria, as well as those of 2:0, 4:0 and 18:1 ω 9 acids, 3:0 acid and methylmalonic acid were not detected as the oxidation products of 18:1 ω 9 acid in carp dark muscle and hepatopancreas mitochondria; whereas acetic, fumaric and succinic acids were formed. Moreover, addition of HCO₃⁻ to the medium did not increase the difference in O₂ uptake due to oxidation between 18:1 ω 9 and 16:0 acids both in carp dark muscle and hepatopancreas mitochondria.

This suggested that 3:0 acid was not formed during the oxidation of unsaturated fatty acid in carp dark muscle and hepatopancreas mitochondria. Consequently, the author concluded that the oxidation of unsaturated fatty acid as energy source in carp essentially fell under the category of β -oxidation.

高等動物体内における不飽和酸は、二重結合の位置まで β -酸化でアセチル CoA および Δ^2 -*cis*-アシル CoA あるいは Δ^2 -*trans*-アシル CoA に分解される。ついで、 Δ^2 -*cis*-アシル CoA は Δ^2 -*trans*-アシル CoA に異性化された後、 Δ^2 -エノイル CoA ヒドラターゼの作用で L-(+)- β -ヒドロキシアシル CoA となる。他方、 Δ^2 -*cis*-アシル CoA も水和化およびエピマー化されて L-(+)-(β -ヒドロキシアシル CoA となる。これら L-(+)- β -ヒドロキシアシル CoA も β -酸化によりアセチル CoA に分解される。すなわち、不飽和酸も原則的には飽和酸と同様に完全にアセチル CoA に分解されるとする不飽和酸の β -酸化説が定説である¹⁾。これに対し、SINCLAIR は Δ^2 -*cis*-アシル CoA の二重結合で水和化が起り、3:0 酸の生成があるとする不飽和酸の酸化説を提唱している²⁾。他方、魚類における不飽和酸の酸化経路に関する報告は見当たらない。

筆者は、前報においてコイ血合肉と肝臓から調製したミトコンドリアで β -酸化活性の脂肪酸による差異を認めた^{3,4)}。 β -酸化活性の脂肪酸による差異について、DUPONT and MATHIAS⁵⁾ は、SINCLAIR の提唱した経

路では、不飽和酸から生じたプロピオニル CoA がメチルマロン酸、コハク酸を経て TCA サイクルを通じて酸化されることから、オキサロ酢酸が炭水化物に依存しなくても生成されるため、SINCLAIR の説は不飽和酸が飽和酸より酸化されやすいことを論理的に説明し得ると指摘している。したがって、コイにおける不飽和酸の酸化経路を明らかにすることが、脂肪酸による酸化活性の差異の原因を解明する上でも重要であると考えられる。本研究では 3:0 酸の酸化および脂肪酸の O₂ 吸収に及ぼす炭酸の影響について検討した後、18:1 ω 9 酸の酸化による生成物を調べた。その結果、コイ血合肉と肝臓では 18:1 ω 9 酸から 3:0 酸およびメチルマロン酸の生成はなく、不飽和酸も原則的には β -酸化で分解されると判明したので、報告する。

実験方法

供試魚 宮崎市近郊養魚場産のコイ *Cyprinus carpio* (体重 452~764 g) を学内の池 (水温 18~24°C) で市販の配合飼料ペレットを与えて飼育し、随時用いた。即殺 15 時間前からコイには餌を与えなかつた。

*1 魚類の脂肪酸代謝に関する研究—IX (Studies on the Metabolism of Fatty Acid in Fish—IX).

*2 宮崎大学農学部水産環境学講座 (Lab. Fish. Envir., Fac. Agr., Miyazaki Univ., Miyazaki 880, Japan).

基質の調製 前報と同様に BJÖRNTORP 法でアルブミン複合体とした 18:1 ω 9 酸を U-¹⁴C-18:1 ω 9 酸 (700 mCi/mmol) に添加溶解し, pH を 7.40 に調整してこれを基質とした⁹⁾。

脂肪酸の酸化による O₂ 吸収量の測定法 SCHNEIDER 法にしたがって分別遠心法でコイ血合肉と肝臓からミトコンドリアを調製し, 基質添加反応系での O₂ 吸収と基質無添加反応系での内部呼吸によるその量の差から, 酸化に基づく O₂ 吸収を測定し, μ l/mg of mitochondria-N/60 min で表示した。詳細は前報に記してある⁶⁻⁸⁾。

脂肪酸の酸化による生成物の同定法 1N KOH による反応停止後, アシル CoA, アセチル CoA, スクシニル CoA などの CoA エステル化合物をアルカリ加水分解し, これに標準有機酸とアセトンを加え, ホモジナ

イズし, ろ過した。このろ液を濃縮し, これをシリカゲルカラム (12 \times 250 mm) に注加し, 溶出剤として *tert*-ブタノール-クロロホルムを用い, *stepwise elution* により分画採取した。溶出液の一定量を液シンバイアルに採り, 各フラクションの放射能活性を測定した。他方, 各フラクションの残液中の溶出された標準有機酸量を N/100 NaOH で定量した。すなわち, クロマトグラム上における放射能のピークと標準有機酸に対する NaOH の滴定値のピークとの一致から生成物を同定した。詳細は前報に記してある⁹⁾。

結 果

コイ血合肉ミトコンドリアにおける 3:0 酸の酸化
コイによる 3:0 酸の酸化を明らかにするため, 体重 532 g のコイの血合肉から調製したミトコンドリアにお

Table 1. The difference of O₂ uptake due to oxidation of 2:0, 3:0, 4:0 and 18:1 ω 9 acids in carp dark muscle mitochondria

Substrate	Concentration (mM)	O ₂ uptake* ¹ (μ l/mg of mitochondria-N/60 min)
2:0	1	24
2:0	5	29
3:0	1	21
3:0	10	26
4:0	1	64
18:1 ω 9 (Free)	0.3	358 226

Carp weighed 532 g. 0.44 mg of mitochondria-N was used.

*¹ O₂ uptake due to oxidation of fatty acid was obtained by subtracting the amount of O₂ uptake due to endogenous respiration in substrate free medium from the amount of O₂ uptake due to oxidation of fatty acid and endogenous respiration in complete medium.

Table 2. Effect of NaHCO₃ on oxidation of 18:1 ω 9 acid and that of 16:0 acid in carp dark muscle and hepatopancreas mitochondria

Tissue	NaHCO ₃ Concentration (mM)	Fatty acid	O ₂ uptake (μ l/mg of mitochondria-N/60 min)			Relative O ₂ uptake (%)		
			Complete	Substrate free	Oxidation	Complete	Substrate free	Oxidation
Dark muscle	Free	18:1 ω 9	318	123* ¹	195	100	100	100
	10		353	86	267	110	70	140
	20		230	90	140	72	73	72
	40		70	35	35	22	28	18
	Free	16:0	438	142* ²	296	100	100	100
	10		464	94	370	110	66	130
	20		214	68	146	49	48	49
	40		82	0	82	19	0	28
Hepatopancreas	Free	18:1 ω 9	121	66* ³	55	100	100	100
	10		140	83	57	120	130	100
	Free	16:0	114	66* ³	55	100	100	100
	10		131	83	48	120	130	100

*¹ Carp weighed 720 g. 0.84 mg of mitochondria-N was used.

*² Carp weighed 718 g. 0.59 mg of mitochondria-N was used.

*³ Carp weighed 764 g. 0.73 mg of mitochondria-N was used.

ける各脂肪酸の酸化に基づく O₂ 吸収量を測定した。その結果を Table 1 に示す。3:0 酸の酸化による O₂ 吸収は 1 および 10 mm で、4:0 酸の 1 mm での 0.33~0.41 倍、18:1ω9 酸の 0.3 mm での 0.06~0.07 倍に

とどまつたが、2:0 酸の 1 および 5 mm だとほぼ同一レベルとなり、血合肉ミトコンドリアには 3:0 酸の酸化に基づく O₂ 吸収が明らかに認められた。

18:1ω9 と 16:0 酸の酸化に及ぼす炭酸の影響 3:0 酸の酸化においては、3:0 酸がメチルマロニル CoA となるために炭酸化が必要である¹⁰⁾。したがって、炭酸は、3:0 酸を生成する脂肪酸の酸化でのみ大きな役割を果たすと考えられる。炭酸の 18:1ω9 と 16:0 酸の O₂ 吸収への影響を調べた結果を Table 2 に示す。血合肉ミトコンドリアにおいて重炭酸は、10 mm で 18:1ω9 酸の O₂ 吸収を無添加の 1.4 倍としたのみでなく、16:0 酸の O₂ 吸収も 1.3 倍とし、飽和酸のβ酸化に対しても僅少な促進効果を示した。他方、肝臓ミトコンドリアでは、18:1ω9 と 16:0 酸のいずれの脂肪酸の O₂ 吸収も重炭酸による影響はなかつた。すなわち、O₂ 吸収への炭酸の影響には、不飽和酸と飽和酸の間に顕著な差

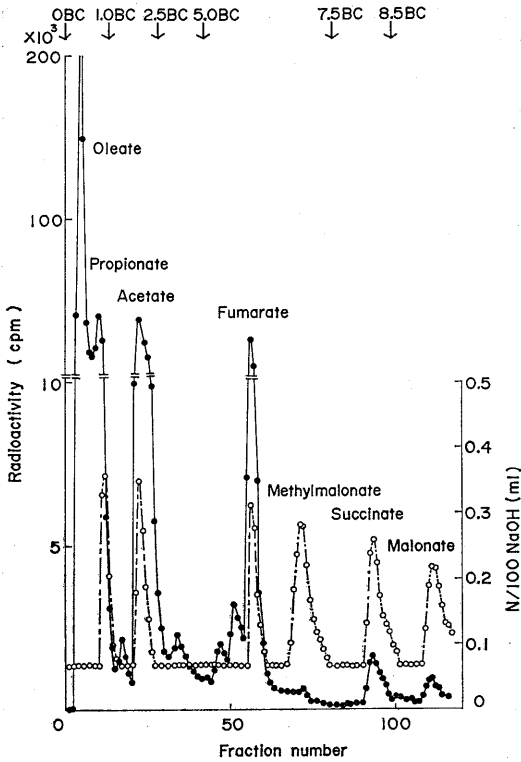


Fig. 1. Oxidation products of U-¹⁴C-18:1ω9 acid by oxidation in carp dark muscle mitochondria.

Carp weighing 711 g was used. Mitochondria corresponding to 1.12 mg of protein and 0.30 mm 18:1ω9 acid containing 1.8×10^8 cpm of U-¹⁴C-18:1ω9 acid (700 mCi/mmol) were incubated with cofactors (MgCl₂, ATP, CoA, carnitine, FAD, NAD, α-ketoglutarate and cyt. c) for 40 min at 25°C. O₂ uptake due to oxidation and endogenous respiration was 170 μl/mg of mitochondria-N/40 min and 79 μl, respectively. Oxidation products were fractionated by stepwise elution on the column of acidified silicic acid (12×250 mm) with a solvent mixture of *tert*-butanol and chloroform at flow rate of 1.3 ml/min. Oxidation products were identified by coincidence of their radioactivities and titration values of NaOH for standard organic acids on the chromatogram. Radioactivity of each fraction was counted with a liquid scintillation counter. 1.0 BC represents 1.0% *tert*-butanol solution in chloroform.

—●— radioactivity, —○— titration

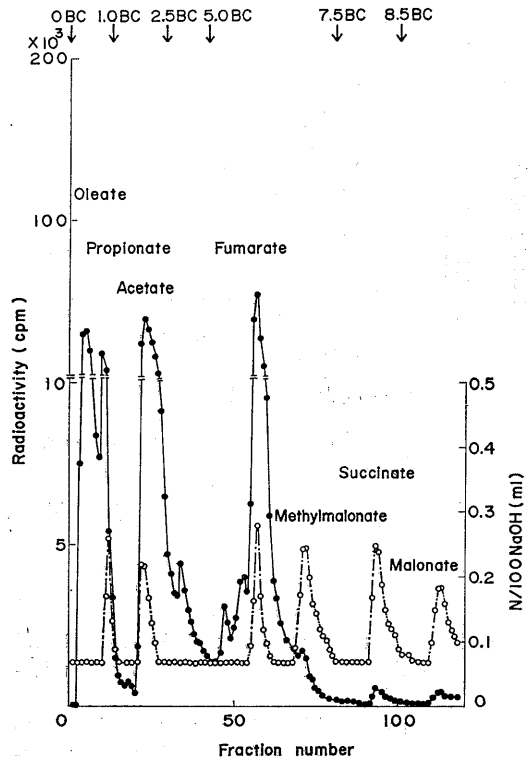


Fig. 2. Effect of NaHCO₃ on oxidation products of U-¹⁴C-18:1ω9 acid by oxidation in carp dark muscle mitochondria.

Experimental conditions were the same as shown in Fig. 1 except that 10 mm NaHCO₃ was added to medium. O₂ uptake due to oxidation and endogenous respiration was 223 μl/mg of mitochondria-N/40 min and 66 μl, respectively.

—●— radioactivity, —○— titration

異は認められなかつた。

コイ血合肉と肝膵臓ミトコンドリアにおける $U-^{14}C-18:1\omega9$ 酸の酸化による生成物 コイの血合肉ミトコンドリアにおける $U-^{14}C-18:1\omega9$ 酸を含む $18:1\omega9$ 酸の酸化による生成物をシリカゲルカラムクロマト法で分画した結果を Fig. 1 に示す。前報⁹⁾の $16:0$ 酸の β -酸化による生成物と同様に $18:1\omega9$ 酸からも酢酸、フマル酸およびコハク酸の生成が明らかに認められた。これに対し、Fig. 1 でのクロマトグラムで添加標準 $3:0$ 酸に対する NaOH 滴定値のピーク付近に一つの生成物が認められたが、その放射能のピークは標準 $3:0$ 酸に対する NaOH 滴定値のピークと一致しなかつた。その上、

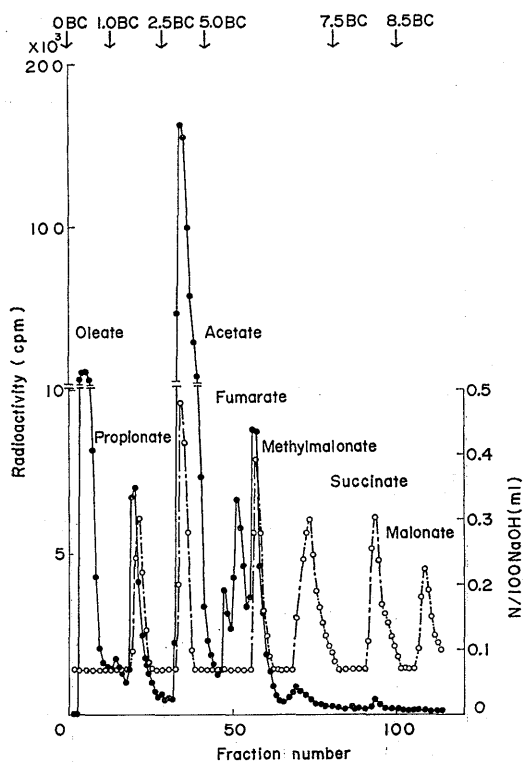


Fig. 3. Oxidation products of $U-^{14}C-18:1\omega9$ acid by oxidation in carp hepatopancreas mitochondria.

Carp weighing 452 g was used. Mitochondria corresponding to 0.87 mg of protein and 0.15 mm $18:1\omega9$ acid containing 9×10^5 cpm of $U-^{14}C-18:1\omega9$ acid (700 mCi/mmol) were incubated with cofactors for 60 min at $25^\circ C$. O_2 uptake due to oxidation and endogenous respiration was $65 \mu l$ /mg of mitochondria-N/60 min and $96 \mu l$, respectively. Oxidation products were fractionated and identified as shown in Fig. 1.

—●— radioactivity, —○— titration

メチルマロン酸の放射能のピークも明瞭には認められなかつた。このため、この酸化反応系にさらに炭酸 (10 mm NaHCO_3) を添加し、Fig. 1 と同一のミトコンドリアにおける $18:1\omega9$ 酸からの酸化生成物を調べた。その結果を Fig. 2 に示す。しかし、メチルマロン酸の生成は Fig. 2 でも認められなかつた。これらの結果および前述した O_2 吸収への炭酸の影響には、不飽和酸と飽和酸の間に顕著な差異のないことを明らかにした Table 2 の結果とを考え合せると、血合肉ミトコンドリアでは $18:1\omega9$ 酸からメチルマロン酸だけでなく、 $3:0$ 酸の生成もないものと判断した。

肝膵臓ミトコンドリアにおける $18:1\omega9$ 酸の酸化による生成物も、前述の血合肉でと同様に酢酸、フマル酸およびコハク酸は $18:1\omega9$ 酸から明らかに生成されたが、 $3:0$ 酸とメチルマロン酸の生成は認められなかつた (Fig. 3)。

考 察

DUPONT and MATHIAS⁵⁾ は、ラット心臓ミトコンドリアで、 $18:2\omega6$ 酸からのメチルマロン酸の生成が $16:0$ 酸での 20 倍であると報告し、SINCLAIR の不飽和酸の酸化経路説を強く支持している。しかし、このほかには SINCLAIR の説を支持する報告は見当たらない。

コイ血合肉と肝膵臓から調製したミトコンドリアを試料として $18:1\omega9$ 酸の酸化による生成物を調べた本報で、酢酸、フマル酸およびコハク酸の生成は確認されたのに対し、 $3:0$ 酸とメチルマロン酸の生成は認められず、ミトコンドリアによる不飽和酸の酸化中に $3:0$ 酸の生成がないことが判明した (Figs. 1~3)。すなわち、ANTONY and LANDAU¹¹⁾ が、ラット肝臓スライスで、 $10-^{14}C-18:1\omega9$ 酸から酢酸が優先的に生成されることを明らかにし、 $18:1\omega9$ 酸は β -酸化のみによつて完全に酸化されると指摘しているように、コイ血合肉と肝膵臓ミトコンドリアでは $18:1\omega9$ 酸も、 β -酸化でアセチル CoA となり、ついで TCA サイクルで分解されると判断した。それ故、コイ血合肉と肝膵臓における不飽和酸の酸化経路も、高等動物で一般的に言われているそれと同様に原則的には β -酸化によると結論された。

なお、コイにおける β -酸化活性の脂肪酸による差異の原因については、前述したように不飽和酸も飽和酸と同様に完全にアセチル CoA に分解されると判明したことで、DUPONT and MATHIAS⁵⁾ が述べている不飽和酸の特異的な酸化経路という観点から論及できなかつた。したがつて、その原因解明は今後の重要な課題と考えられる。

要 約

コイ血合肉と肝臓ミトコンドリアにおける不飽和酸の酸化経路を明らかにする目的で、 $U-^{14}C-18:1\omega 9$ 酸の酸化による生成物を調べた。

(1) コイ血合肉ミトコンドリアには 3:0 酸の酸化に基づく O_2 吸収が明らかに認められた。

(2) コイ血合肉と肝臓における O_2 吸収への炭酸の影響には、18:1 $\omega 9$ と 16:0 酸の間に顕著な差異は認められなかった。

(3) コイ血合肉と肝臓のいずれでも 18:1 $\omega 9$ 酸から酢酸、フマル酸およびコハク酸の生成は確認されたが、3:0 酸とメチルマロン酸の生成は認められず、不飽和酸の酸化中に 3:0 酸の生成のないことが判明した。したがって、コイ血合肉と肝臓における不飽和酸の酸化経路は、原則的には β -酸化と同一であると結論された。

(4) それ故、コイ血合肉と肝臓における β -酸化活性の脂肪酸による差異の原因については、不飽和酸の特異的な酸化経路という観点から論及できなかった。

終りに本研究を遂行するに当り脂肪酸の酸化生成物の分析に便宜を与えていただいた宮崎大学農学部助教授下

川敬之博士に深謝致します。

文 献

- 1) H. A. HARPER, V. W. RODWELL, and P. A. MAYES: *Physiological Chemistry*, 16 ed., Maruzen, Tokyo, 1977, p. 297.
- 2) H.H. SINCLAIR: in "Nutrition" (ed. by G.H. BEATON and E. W. MCHENRY), Vol. 1, Academic Press, New York, 1964, p. 84.
- 3) 村田 寿・東 敏春: 日水誌, **45**, 211-217 (1979).
- 4) 村田 寿: 日水誌, **45**, 379-383 (1979).
- 5) J. DUPONT and M. M. MATHIAS: *Lipids*, **4**, 478-483 (1969).
- 6) 村田 寿・豊水正道: 九大農学芸誌, **26**, 227-231 (1972).
- 7) 村田 寿・豊水正道: 日水誌, **38**, 1293-1298 (1972).
- 8) 村田 寿・豊水正道: 日水誌, **39**, 801-807 (1973).
- 9) 村田 寿: 日水誌, **45**, 585-590 (1979).
- 10) Y. KAZIRO, L.F. HASS, P.D. BOYER, and S. OCHOA: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1460-1468 (1962).
- 11) G. J. ANTONY and B. R. LANDAU: *J. Lipid Res.*, **9**, 267-269 (1968).