Studies on Glucose-6-Phosphatase in Liver and Kidney

II. Relationship between Thyroid Hormones and Glucose-6-Phosphatase in Rat Liver and Kidney

Hirokazu SUGIYAMA

2nd Department of Internal Medicine, Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan
(Director : Professor S. HAYASE M.D.)

Variation of glucose-6-phosphatase (G6Pase) activity in rat liver and kidney under thyroidal dysfunctioning was investigated on the groups of experimental animals treated as follows:

- a) Potassium iodide administration; 10 γ per day for a week
- b) 3,3',5'-Triiodothyronine administration; 5 γ per day for a week
- c) L-Thyroxine administration; 30 γ per day for a week
- d) Mercazole administration; 10 mg per day for a week
- e) Thyroidectomy; more than 4/5 of the thyroid gland removed
- f) Thyroxine administration (30 γ per day for a week) after thyroidectomy

Materials and Methods

Male Wistar rats, with an average weight of 180 g, fed with Oriental solid food (CE-II), were used. Each experimental group and control group consisted of 5 animals each. Two per cent liver or kidney homogenate was centrifuged down at 1500 $\times$ g for 5 minutes and 0.1 ml of the supernatant was used as an enzyme source. Sodium salt of glucose-6-phosphate as substrate and citrate buffer, pH 6.5, were employed. The enzyme activity was determined according to Swanson's method and the specific activity was expressed by γ P/ γ protein (determined by Cu-Folin method)/30 min. at 37°C.

For histochemical examinations, liver and kidney were sliced continuously with Lirde Kryostat as soon as possible after bleeding the animal, and the G6Pase activity was detected by Wachstein-Meisel's method. Histological examination of the Langerhans' islets of the pancreas was performed by Gomori's PHE staining.

Results

1. Groups with potassium iodide, triiodothyronine and thyroxine administration: A significant increase in the G6Pase activity of both liver and kidney, in comparison with that of the control group, was observed in triiodothyronine- and thyroxine-treated groups, whereas no such influence was revealed in potassium iodide-administered group. The effects of triiodothyronine and of thyroxine on this enzyme activity under the present ex-

perimental condition were almost in the same order (Table 1.).

2. Mercazole-treated and thyroidectomized groups: Both groups showed a significant fall of the G6Pase activity in both liver and kidney as compared to the activity found in control animals (Table 2.).

3. Group with thyroxine administration after thyroidectomy: Decreased level of the G6Pase activity, as observed following thyroidectomy, was restored almost to the normal value (Table 3.).

Histochemical investigation revealed no particular tissue region responsible for the variation of the G6Pase activity. The principal site of the activity variation in the kidney appears to be in the cells of proximal tubule, while glomerulus has nothing to do with it (Photo. 1,2.).

Histological examinations on the Langerhans' islets of the treated animals revealed no remarkable change in comparison with the control animals, suggesting that the influence of thyroid hormones on the islets is a mild one (Photo. 3.).

From all these results, variation of the liver and kidney G6Pase activity appears to reflect the increased gluconeogenesis in hyperthyroidism and the decreased gluconeogenesis in hypothyroidism. Thus, the kidney enzyme, too, with a behavior similar to that of the liver enzyme, is presumed to contribute to *in vivo* metabolism. (pp. 769~774)

肝, 腎 glucose-6-phosphatase に関する研究

(Ⅱ) 甲状腺ホルモンと肝, 腎 glucose-6-phosphatase について*

岐阜大学医学部第二内科 (担当: 早瀬正二教授)

杉 山 弘 和

(昭和43年2月28日受付)

ホルモン環境変動下におけるラット肝, 腎 G-6-Pase 活性の変動をヨードカリ, T_3 , T_4 , mercazole 各投与群, 甲状腺剔除群, 甲状腺切除後 T_4 投与群等について, 甲状腺ホルモンの面より検討し, 合わせて組織化学的検索, 臍ラ氏島の態度の検索も行なった. 肝, 腎 G-6-Pase の態度は甲状腺機能亢進状態においては糖新生の亢進を, 甲状腺機能低下時には糖新生の低下を反映しているものとみなされた.

緒 言

著者は前報¹⁾において肝, 腎 glucose-6-phosphatase (以下 G-6-Pase と略) の基本的性状を明らかにし, 腎においても肝同様に適 pH6.5 を有する特異的な phosphatase である G-6-Pase の存在を確認し, 肝と同程度の活性値を有することを認めた. 本報においてはホルモン環境変動下におけるラット肝, 腎 G-6-Pase 活性の変動を甲状腺ホルモンの面より眺め検討した.

実験材料および実験方法

実験動物はすべてオリエンタル固型飼料 (CE-II 型) で飼育した雄性ウィスター系成熟ラット体重 180gm. 前後のものを使用した.

実験動物は potassium iodide, triiodothyronine, thyroxine, mercazole の各投与群と甲状腺剔除群, 甲状腺剔除後 thyroxine 投与群を作り, potassium iodide は 10 γ /日, 3,5',5'-triiodothyronine は 5 γ /日, l-thyroxine は 30 γ /日, mercazole は 10mg/日を連続1週間投与した. 甲状腺剔除群は頸部切開後直視下に剔除し, 剔除した甲状腺を秤量し, 1週間後残存甲状腺を秤量し4/5以上剔除できたものを実験に使用した. 甲状腺剔除後 thyroxine 投与群は甲状腺剔除後 l-thyroxine 30 γ /日連続1週間投与後の動物を使用した. 対照, 実験動物群はすべて5匹用意し各々について肝, 腎 G-6-Pase 活性の変動を検討した.

酵素: 前報¹⁾に述べた方法にしたがつた.

基質: 0.1M glucose-6-phosphate Na 塩 pH6.5 を使用した.

緩衝液: 0.1Mクエン酸緩衝液 pH6.5 を使用した.

酵素活性測定法ならびに酵素活性値の表現 (γ P/ γ protein/30min./37°C), G-6-Pase の組織化学的検索は前報¹⁾に詳述した方法によつた.

臍ランゲルハンス氏島の態度は Gomori の PHE 染色により検討した.

実 験 成 績

肝, 腎 G-6-Pase 活性値

1. potassium iodide, triiodothyronine, thyroxine 投与群

* 本論文の要旨は第37回日本内分泌学会総会 (昭. 39. 6. 東京), 第13回日本内分泌学会西日本地方会 (昭. 40. 10. 大阪)にて発表した.

triiodothyronine, thyroxine 投与群では肝, 腎ともに対照群に比し有意な活性の増加を認めた. Table 1. に示すように対照群肝活性値 0.217 ± 0.024 , 対照群腎活性値 0.262 ± 0.015 に対し, triiodothyronine 投与群肝活性値は 0.330 ± 0.025 , 同腎活性値は 0.322 ± 0.032 , thyroxine 投与群では肝活性値は 0.360 ± 0.027 , 腎活性値は 0.329 ± 0.052 で, 腎も肝と同様の態度をとった. 肝, 腎 G-6-Pase 活性に及ぼす triiodothyronine, thyroxine の効果は本実験条件下では同程度であつた. potassium iodide 投与群では肝 (0.248 ± 0.023), 腎 (0.283 ± 0.46) とも活性値に有意な変動を認めなかつた.

2. mercazole 投与群, 甲状腺剝出群

Table 2. に示すように mercazole 投与群では肝活性値 0.105 ± 0.012 , 腎活性値 0.216 ± 0.024 , 甲状腺剝出群では肝活性値 0.227 ± 0.015 , 腎活性値 0.234 ± 0.023 を示し, 対照群肝活性値 0.262 ± 0.016 , 腎活性値 0.271 ± 0.014 に比し有意な活性低下を認めた.

Table 1. Effects of potassium iodide, triiodothyronine and thyroxine on liver and kidney G-6-Pase activity in rats

Group Animal No.	Liver				Kidney			
	Control	KI	T ₃	T ₄	Control	KI	T ₃	T ₄
1	0.205	0.236	0.365	0.343	0.264	0.269	0.310	0.336
2	0.194	0.254	0.315	0.348	0.242	0.300	0.299	0.399
3	0.248	0.281	0.305	0.344	0.256	0.349	0.300	0.264
4	0.204	0.225	0.325	0.404	0.281	0.244	0.328	0.338
5	0.234	0.245	0.338	0.360	0.267	0.251	0.372	0.308
$\bar{x} \pm SD\#$	0.217 ± 0.024	0.248 ± 0.023	$0.330 \pm 0.025^{**}$	$0.360 \pm 0.027^{**}$	0.262 ± 0.015	0.283 ± 0.046	$0.322 \pm 0.032^{*}$	$0.329 \pm 0.052^{**}$

Activity: γ phosphorus liberated per γ protein per 30 minutes at 37°C.

Control: control normal rats, KI: potassium iodide treated rats, T₃: triiodothyronine treated rats, T₄: thyroxine treated rats.

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$

Table 2. Effects of mercazole and thyroidectomy on liver and kidney G-6-Pase activity in rats

Group Animal No.	Liver			Kidney		
	Control	Mercazole	THY X	Control	Mercazole	THY X
1	0.244	0.090	0.231	0.278	0.180	0.199
2	0.276	0.104	0.211	0.286	0.216	0.258
3	0.261	0.122	0.242	0.256	0.235	0.231
4	0.250	0.104	0.238	0.276	0.218	0.240
5	0.279	0.105	0.214	0.258	0.232	0.240
$\bar{x} \pm SD\#$	0.262 ± 0.016	$0.105 \pm 0.012^{**}$	$0.227 \pm 0.015^{**}$	0.271 ± 0.014	$0.216 \pm 0.024^{**}$	$0.234 \pm 0.023^{*}$

Activity is expressed as shown in Table 1.

Control: control normal rats, Mercazole: mercazole treated rats,

THY X: thyroidectomized rats.

#: mean with standard deviation.

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$

Table 3. Effect of thyroxine after thyroidectomy on liver and kidney G-6-Pase activity in rats

Animal No.	Liver	Kidney
1	0.362	0.328
2	0.310	0.349
3	0.322	0.317
4	0.336	0.334
5	0.353	0.306
$\bar{x} \pm SD \ddagger$	$0.337 \pm 0.023^{**}$	$0.327 \pm 0.007^{**}$

Activity is expressed as shown in Table 1.
 $\ddagger$: mean with standard deviation.

** : $p < 0.01$, compared with thyroidectomized rats (Table 2).

Table 4. Summary of histochemical study on liver and kidney G-6-Pase activity in rats

	Liver	Kidney
Potassium iodide	unchanged	unchanged
Triiodothyronine	increased	increased
Thyroxine	increased	increased
Mercazone	decreased	decreased
Thyroidectomy	decreased	decreased
Thyroidectomy + Thyroxine	increased	increased

Compared with normal rats.

Photo. 1. Distribution of G-6-Pase in thyroidectomized rat kidney. ($\times 100$)

The enzymatic activity decreased, compared with that of normal rat kidney. Incubated for 15 minutes in G-6-P, adjusted to pH 6.5.

Photo. 2. Distribution of G-6-Pase in thyroxine treated rat kidney after thyroidectomy. ($\times 100$)

The enzymatic activity increased, compared with that of normal and thyroidectomized rat kidney.

Photo. 3. Islet of Langerhans' in thyroxine treated rat.
No appreciable change in islet was observed,
compared with those in normal rat. (PHE, $\times 100$)

3. 甲状腺剔除後 thyroxine 投与群

肝, 腎の活性値は Table 3. に示されるごとく各々の活性値は 0.337 ± 0.023 , 及び 0.327 ± 0.007 である. これらの活性値は Table 2. の甲状腺剔除群, 対照群に比して有意な活性の復活を示した.

肝, 腎 G-6-Pase の組織化学的検索

Table 4. に示すように組織化学的検査においても活性測定値の変動と同一の態度をとつた. Photo. 1. に甲状腺剔除動物の, Photo. 2. に甲状腺剔除後 thyroxine 投与動物の腎 G-6-Pase を示したが, 正常対照群に比しこれらの群では前者では明らかに活性の低下を, 後者では活性の復活を認めている. 各処置群における腎における組織上の活性変動の部位的特徴は認められなかつた. 腎における活性変動の主要部位は近位尿細管組織化学的変動の肝, 管細胞で糸球体はまったく関与していなかつた.

甲状腺機能変動時の膵ランゲルハンス氏島の態度

上述の実験に供した thyroxine 投与群, 甲状腺剔除群, 甲状腺剔除後 thyroxine 投与群の膵ランゲルハンス氏島を Gomori の PHE 染色によつて対照群と比較検討したが, 膵ランゲルハンス氏島の態度はいずれの群においても対照群に比し著変を認めず, 正常ラット膵ランゲルハンス氏島所見と変ることがなかつた. Photo. 3. これらの群の代表例として thyroxine 投与動物の膵ランゲルハンス氏島所見を示した. 正常対照群の膵ランゲルハンス氏島所見と何んら変るところがない.

考 案

甲状腺ホルモンは酸化に大きな作用を示す他, 脂質, 蛋白質代謝にも多彩な影響を及ぼすが, 糖代謝における効果としては Wertheimer ら²⁾³⁾は少量の thyroxine は肝糖原を増加させ, 過量の thyroxine はそれを減少させとし, 糖原の代謝との密接な関係を指摘した. また Necheles ら⁴⁾の赤血球の実験では甲状腺ホルモンが直接解糖系に作用する可能性をのべている.

甲状腺機能亢進時の変化としては Spiro ら⁵⁾はラットで嫌気性ならびに好気性解糖がともに促進することを認めた. その他, 糖利用の促進⁶⁾, 腸管からの糖吸収の促進⁷⁾, 肝 glycogenesis の減少⁸⁾, glycogenolysis

の増加⁹⁾などが認められ、肝 G-6-Pase に関しては thyroxine 投与による活性の増加が報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。

甲状腺機能低下時の変化としては腸管からの糖吸収の遅延が知られているが、藤田¹²⁾、坂本¹³⁾らは肝 G-6-Pase 活性の減少と肝糖原の増加を認めている。

本研究の結果についてまとめてみると G-6-Pase は甲状腺ホルモン投与で活性上昇し、抗甲状腺剤の投与や甲状腺切除で活性低下が認められた。甲状腺機能の異常に G-6-Pase が敏感に反応して変動していることが認められる。甲状腺ホルモン過剰においては糖原の減少と酸化の亢進が著明であり、正常の血糖を維持するにはより多く糖新生系に依存しなければならないであろう。また甲状腺機能低下時には肝糖原は減少せず代謝が全体として低下するので血糖の維持に対する糖新生系の依存度も減少するものと思われる。このように考えると本研究の G-6-Pase 活性の動きはよく糖新生系の態度を反映しているものと思われる¹⁴⁾。著者の成績は肝 G-6-Pase の動きについては Glock¹⁰⁾、Harper¹¹⁾、Freedland¹⁵⁾、藤田¹²⁾、坂本¹³⁾らの成績と一致する結果であるが、腎 G-6-Pase が肝のそれと全く同じ態度で変動していることが注目される。従来糖代謝の中枢臓器として肝のみ重視され腎のこの方面の機能はほとんど顧みられなかった。本実験成績は腎においても肝と同じく甲状腺機能失調時に生体内糖代謝に寄与しているのであろうことを G-6-Pase の消長から強く示唆する。

なお上記の G-6-Pase の変動に関する甲状腺ホルモン作用機序については不明であり、その解明は *in vitro* でのホルモン効果を知る必要があるが、本酵素の失活防止の問題が解決されない限り *in vitro* の研究は困難である。

また甲状腺機能亢進における insulin response の亢進の報告¹⁶⁾もあるので腓ランゲルハンス氏島の組織学的な検索を試みたのであるが、正常と著変のない結果であつた。形態と機能は必ずしも一致しないが cortisol 投与の場合などの著明な変化¹⁷⁾から考えると甲状腺ホルモンの腓ランゲルハンス氏島に対する影響は緩和なものと推測される。

結 語

ラットにおける肝、腎 G-6-Pase 活性を甲状腺機能失調の条件下に検索し次の結果を得た。

1. triiodothyronine, thyroxine 投与群では肝、腎ともに対照群に比し有意な活性の増加を認めた。potassium iodide 投与群では肝、腎とも有意な変動を認めなかった。
2. mercazole 投与群、甲状腺切除群では肝、腎ともに対照群に比し有意な活性低下を認めた。
3. 甲状腺切除後 thyroxine 投与群は甲状腺切除群、正常対照群に比して有意な活性の復活を示した。
4. 組織化学検討においても活性測定値の変動と同一の態度をとつた。各処置群における組織化学的変動の肝、腎における組織上の活性変動の部位的特徴は認められなかった。糸球体は活性変動に関与せず腎での活性変動の主要部位は近位尿細管細胞であつた。
5. 甲状腺機能変動時の腓ランゲルハンス氏島の態度はいずれの実験群においても対照群に比し著変を認めず正常ラット腓ランゲルハンス氏島所見と変ることがなかった。

肝、腎 G-6-Pase の態度は甲状腺機能亢進状態においては糖新生の亢進を、甲状腺機能低下時には糖新生の低下を反映しているものとみなされ、腎においても肝と同様の態度を G-6-Pase はとり生体内反応に寄与しているものと思われる。

終りに臨み、御校閲を賜つた早瀬正二教授、御助言を賜つた木島滋二前教授、法医学教室須山弘文教授に深謝するとともに、終始御指導御鞭撻を賜つた竹内三郎講師に深謝する。また法医学教室前岡勇夫博士、中央検査室青木敦学兄の御教示、御助言に感謝する。

文 献

- 1) 杉山弘和：日内分泌誌，44：760，(1968)。
- 2) WERTHEIMER, E. and V. BENTOR：Metabolism，

- 2 : 536, (1953). 3) WERTHEIMER, E., V. BENTOR and M. WURZEL : Biochem. J., 56 : 297, (1954). 4) NECHELES, T., and E. BEUTLER : J. Clin. Invest., 38 : 788, (1959). 5) SPIRO, M.J. and E.G. BALL : J. Biol. Chem., 231 : 31, (1958). 6) AMATUZIO, D.S., A.L. SCHULTZ, M.J. VANDERBILT, E.D. RAMES and S. NESBETT : J. Clin. Invest., 33 : 97, (1954). 7) ALTHAUSEN, T.L. and M. STOCKHOLM : Amer. J. Physiol., 123 : 577, (1938). 8) JOHN, H.J. : Ann. Int. Med., 4 : 501, (1930). 9) LONG, C. Jr., C. KILO and L. RECANT : Diabetes, 13 : 127, (1964). 10) GLOCK, G.E., P. MCLEAN and J.K. WHITEHEAD : Biochem. J., 63 : 520, (1956). 11) HARPER, A.E. : Biochem. J., 64 : 14, (1956). 12) 藤田輝雄 : 日内分泌誌, 38 : 565, (1962). 13) SAKAMOTO, K. : Jap. Arch. Int. Med., 12 : 387, (1965). 14) 竹内三郎, 細川禎正, 杉下 功, 杉山弘和 : 診療, 18 : 43, (1965). 15) FREEDLAND, R.A. : Endocrinology, 77 : 19, (1965). 16) ELRICK, H., C.J. Jr. HLAD and Y. ARAI : J. Clin. Endocr., 21 : 387, (1961). 17) 翠川 修 : 最新医学, 19 : 543, (1964).