Studies on Liver and Muscle Phosphorylases

II. Effects of Diet

Takeshi ITO

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

In the previous paper, alternations of glycogen metabolism under various hormonal conditions were studied by the measurement of liver and muscle phosphorylase activities, and an evidence suggested that various hormones showed the direct and indirect effects on this enzyme activity. In this report the effects of fasting and feeding on a high carbohydrate or high lipid diet upon the phosphorylase activity are described and the mechanism producing the apparent changes are also discussed.

Materials and Methods

Phosphorylase activity and glycogen content were determined as described in the preceding paper. Fasting was continued for 72 hours with the normal rats and at intervals each entity was determined. Experimental diet which contained a high proportion of carbohydrate or lipid was given for 2 weeks to the normal or alloxan diabetic animals (1 week after a single intramuscular injection of 30 mg. of alloxan monohydrate).

Results and Discussions

(1) Fasting for 12 hours caused a marked decrease in the liver glycogen content. Liver phosphorylase activity increased up to 12 hours of fasting and then decreased. In muscle, phosphorylase activity as well as glycogen content was gradually decreased during fasting for 72 hours. (2) A high carbohydrate diet increased liver phosphorylase activity in the normal rats. It caused, however, no change in alloxan diabetic animals, implying that insulin might be concerned with the alterations observed in the normal rats. (3) Normal animals fed on a high lipid diet showed a decrease in liver glycogen. Phosphorylase activity was increased in liver, but decreased in muscle. Alloxan diabetic rats fed on the same diet had a remarkably low phosphorylase activity in liver. This fact suggests the participation of insulin in the glycogen controlling system.

Based on the results described above, dynamic aspects of glycogen metabolism and thier modifications under such various feeding conditions as fasting, high carbohydrate or high lipid diets were discussed.

(See pp. 236~240)

肝, 筋 Phosphorylase に関する研究

(Ⅱ) 食 餌 の 影 響

岐阜大学医学部第二内科 (担当: 早瀬正二教授)

伊 東 毅

(昭和44年1月13日受付)

肝, 筋 phosphorylase 活性を絶食動物, 高糖食飼育動物, 高脂肪食飼育動物において測定し, その変動を観察すると共に糖原量を合せて測定し, 本酵素活性の変動の意義および機序について論じた. 絶食は早期に phosphorylase 活性の上昇を示し糖原分解の促進が考えられ, 又高糖食は肝 phosphorylase 活性の上昇, 糖原量の変動を示し, 糖原合成, 分解の促進を思わしめた. 高脂肪食では phosphorylase 活性の上昇がみられた. それらの変動は insulin, glucagon の介在が反映しているものと考えられた.

緒 言

前報¹⁾においては著者はホルモン環境変動下の糖原系の動きを肝, 筋 phosphorylase 活性の変動を中心とし種々ホルモンの本酵素に及ぼす直接, 間接作用について論じてきたが近年食餌組成にもとづく糖代謝異常も多く報告され²⁾³⁾⁴⁾, 二次的なホルモン作用が問題となつている. 本報においては絶食動物の肝, 筋について phosphorylase 活性を測定するとともに糖原量, 血糖値を測定し糖原系の動きを絶食後経時的に観察し, さらに正常動物, 実験的糖尿病動物について高糖質食飼育, 高脂肪食飼育の影響を同様に観察した.

対象および方法

実験動物はすべてオリエンタル固型飼料 (CE-II) で飼育した200g 前後のウィスター系雄性ラットを使用し絶食の影響は6時間, 12時間, 24時間, 48時間, 72時間絶食した1グループ5匹のラットを使用した. 実験的糖尿病動物は alloxan monohydrate 30mg. 1回筋注後1週間に尿糖陽性なものを用いた. 使用した実験食は Table 1 に示す如く蛋白質量をほぼ一定とした脂肪, 糖質に変化をあたえた. 摂取カロリーはほぼ一定になる条件で正常ラット, alloxan 糖尿病ラットにそれぞれの実験食で2週間飼育し実験に使用した.

Table 1. Constitution of experimental diets

	100gm		
	control	high fat	high carbohydrate
carbohydrate	56	50	70
protein	24	20	20
fat	5	20	5
cellulose	4.5	2	
mineral	4	5	3
vitamin powder	2	3	2

実験動物は10℃の室温でエーテル酔麻下で断頭し、すみやかに血糖測定するとともに出来るだけ放血し、肝、筋を取り出し、前報¹⁾と同じ方法により phosphorylase 活性、糖原含有量、血糖値を測定した。測定値については phosphorylase 活性は $\Delta D/\text{min}/\text{gm. wet. w.}$, $\Delta D/\text{min}/\text{total liver wet. w.}$ 、糖原量は mg/gm 、血糖値は mg/dl の単位で表わした。

成 績

(1) 絶食実験：

Fig. ①上段に示す如く肝重量は12時間、24時間と減少し、24時間では約1/3と低下した。肝糖原量も12時間までに急速な低下を示した。肝 phosphorylase 活性は6時間で約2倍、12時間で3倍と上昇し、その後時間の経過とともに下降した。筋においては Fig. ①下段に示し如く糖原含有量、phosphorylase 活性とも著変を示さないが48時間、72時間では低下の態度を示した。

(2) 高糖食飼育実験 (Table 2)

i) 正常ラット：それぞれ対照に比し血糖値は上昇傾向を示し、肝では糖原量は不変、phosphorylase 活性は有意の上昇、筋では糖原量は有意の上昇、phosphorylase 活性は不変の成績を得た。

ii) alloxan 糖尿病ラット：血糖値は対照に比しさらに高値を示しており、肝については糖原量は減少を

Fig. 1. Effect of starvation on liver weight, and on glycogen content and phosphorylase activity of liver and muscle in normal rats.

*Each vertical line show mean and standard deviation of five rats.

Table 2. Effect of high carbohydrate diet on body weight, liver weight, blood sugar, and on phosphorylase activity and glycogen content of liver and muscle in normal and alloxan diabetic rats.

Experimental group	Body Wt. (gm.)	Liver Wt. (gm.)	Glycogen		Phosphorylas			Blood sugar (mg/dl)
			Liver	Muscle	Liver		Muscle	
			(mg/gm.)		U./gm. liver	U./total liver	U./gm. muscle	
Control	295 ±10	10.6 ±1.6	37.0 ±4.2	7.5 ±1.5	0.29 ±0.04	3.40 ±0.26	13.2 ±1.65	120 ±16
High carbohydrate diet	230* ±20	7.8* ±0.9	40.0 ±4.6	12.6** ±2.6	0.60** ±0.05	4.67** ±0.18	11.5 ±1.08	140 ±12
Alloxan	220 ±14	9.0 ±1.3	23.0 ±3.5	8.0 ±1.8	0.31 ±0.11	2.78 ±0.72	12.0 ±1.25	289 ±36
Alloxan + High carbohydrate diet	165** ±16	7.7* ±1.2	15.0** ±2.6	6.0 ±0.9	0.32 ±0.08	2.47 ±0.29	10.5 ±1.00	410** ±23

Each group describes the average values of five rats. (Mean values ± Standard deviation)

** Significantly different from control values $P < 0.01$

* Idem $P < 0.05$

Control : control diet fed normal rats. High carbohydrate diet : high carbohydrate diet fed normal rats.

Alloxan : control diet fed alloxan diabetic rats. Alloxan + High carbohydrate diet fed alloxan diabetic rats.

示した, phosphorylase 活性については有意の変動は認めない. 筋では対照に比し変化はみられない.

(3) 高脂肪飼育実験 (Table 3)

i) 正常ラット: 高脂肪食飼育の影響は血糖値の軽度上昇であつた. 肝では糖原量は対照に比し減少を示し, phosphorylase 活性は対照に比し有意の上昇を示した. 筋では糖原量は変化なく, phosphorylase 活性は有意の低下を示した.

Table 3. Effect of high fat diet on body weight, liver weight, blood sugar, and on phosphorylase activity and on phosphorylase activity and glycogen content of liver and muscle in normal and alloxan diabetic rats.

Experimental group	Body Wt. (gm.)	Liver Wt. (gm.)	Glycogen		Phosphorylase			Blood sugar (mg/dl.)
			Liver	Muscle	Liver		Muscle	
			(mg/gm.)		U./gm. liver	U./total liver	U./gm. muscle	
Control	295 ±10	10.2 ±0.8	45.0 ±6.2	5.2 ±1.9	0.26 ±0.02	2.65 ±0.32	15.5 ±1.80	116 ±20
High fat diet	310 ±20	11.3 ±1.2	30.2* ±7.6	6.4 ±1.8	0.37** ±0.02	3.20* ±0.28	11.2* ±1.03	135 ±18
Alloxan	225 ±26	9.2 ±1.6	15.0 ±3.8	4.6 ±1.3	0.23 ±0.08	2.12 ±0.19	11.8 ±2.08	207 ±10
Alloxan+High fat diet	240 ±32	10.8 ±0.7	19.0 ±2.4	3.8 ±0.8	0.08** ±0.03	0.87** ±0.24	9.82 ±1.60	290** ±40

Each group describes the average values of five rats. (Mean values±Standard deviation)

** Significantly different from control values $P<0.01$

* Idem $P<0.05$

Control: control diet fed normal rats. High fat diet: high fat diet fed normal rats.

Alloxan: control diet fed alloxan diabetic rats. Alloxan+High fat diet: high fat diet fed alloxan diabetic rats.

ii) alloxan 糖尿病ラット: 高脂肪食飼育の成績は血糖値については対照に比して上昇を示した. 肝においては糖原量は不変, phosphorylase 活性は対照に比して有意の低下を示した. 筋糖原量, 筋 phosphorylase 活性はそれぞれ対照にくらべて有意の変化は示さなかった.

考 察

phosphorylase 活性は食餌の影響を受けて活潑に反応し, 特に肝においては反応著明であり, 糖原系の調節に大きく関与しているものと思われる. 著者¹⁾はすでに本酵素活性のホルモン支配について述べてきたが, 以下は本酵素活性の変動を中心に, 糖原量の成績を総合し, 糖原素の動きを類推し, Phosphorylase 活性変動の意義およびその機序について各食餌条件に考慮を加えた.

(I) 絶食の影響について

絶食による肝酵素活性の変動についてはこれまでの報告をみると肝 G-6-Pase²⁾⁶⁾ phosphoglucoisomerase phosphoglucomutase⁷⁾などの活性は時間的なちがいがあがるが上昇がみられる. phosphorylase 活性については低下あるいは上昇と報告されている⁷⁾⁸⁾. 本研究についてみると Fig. ①にみられるように絶食後12時間迄に肝重量, 肝糖原量のあきらかな低下をみとめ, これに対し肝 phosphorylase 活性の著明に上昇し12時間で約3倍の活性上昇がみられる. 絶食後12時間で糖原は著明に減少, 殆んど固濁し以後その値を持続する. 故にこの絶食12時間以後は糖原に依存して血糖を維持するとは考えられず, 糖新生に依存するものと推論される.

(II) 高糖質食飼育の影響

正常動物を高糖質食で飼育すると, Table 2の如く肝 phosphorylase 活性の著明な上昇をみとめ肝糖原分解の促進が考えられる. しかし肝糖原量は不変であり糖原合成もまた亢進しているものと推測される. 一

方 alloxan 糖尿病動物を同じ食餌で飼育すると肝 phosphorylase 活性上昇は認められない。このことから高糖質食は薛ラ氏島 β 細胞の健全な状態で肝 phosphorylase 活性上昇に健くものと考えられる。さらに正常動物でみられた筋糖原量の増加は alloxan 糖尿病動物ではみられず、これもまた insulin の関与が考えられる。すなわち正常動物に高糖質食を投与すると insulin の過分泌を起し肝、筋での糖系合成を促進すると推測される。

(Ⅲ) 高脂肪食飼育の影響

一般に高脂肪食飼育の場合は血中脂質の増加⁹⁾がみられ、エネルギー源として糖質、糖原系への依存度が減少するものと考えられる⁹⁾。高脂肪食飼育の本酵素への影響であるが、Table 3 に示す如く、正常動物では肝糖原は減少し、phosphorylase 活性は上昇し糖原分解の促進が考えられる。筋では逆に phosphogylase 活性の低下を示した。alloxan 糖尿病動物を同じ食餌で飼育すると、肝の phosphorylase 活性の著明な低下がみられた。正常動物にみられた phosphorylase 活性の上昇が alloxan 糖尿病動物でみられないという著者の成績は insulin の関与を考えさせる。

(Ⅳ) 肝、筋 phosphorylase 活性変動様式について

著者は前報¹⁾において phosphorylase 活性の直接支配ホルモンの作用の相違点に注目し、肝、筋ともに本酵素活性上昇する場合を epinephrine 型変動、肝でのみ活性上昇をみる場合を glucagon 型変動と仮称して 2~3 のホルモン投与の成績を検討した。本研究の結果について同様の見方を試みると、絶食、高糖質食飼育、高脂肪食飼育でいずれの場合も glucagon 型を示している。絶食時のホルモン環境の変化については Unger R.H.¹⁰⁾ 等は飢餓72時間で末梢静脈血中の glucagon は約3倍に増加したと報告している。絶食時に本酵素活性上昇に glucagon の介在する可能性が考えられる。次に高糖質食飼育の場合、本酵素活性上昇は既述のように insulin の関与を必要とするようである。insulin と phosphorylase 活性上昇との関係については前報において、相当大量の外來性 insulin 投与の場合は肝、筋ともに本酵素活性上昇をみとめ epinephrine 型であるのに cortisol 投与では内因性 insulin の過分泌が考えられ¹⁾、肝でのみ活性上昇し glucagon 型の動きであることを述べて来た。本実験の高糖質飼育による場合も同じく insulin の過分泌が考えられ、上述の如く glucagon 型の変動とみなされる。このような見方にはホルモンの定量の裏付けが必要であるが1つの可能性として glucagon の関与が考えられた。

総括並びに結語

ラットにおける肝、筋 phosphorylase 活性、糖原量を絶食、高糖質食、高脂肪食飼育の条件下に検索し次の結果を得た。

- 1) 絶食による肝糖原量は12時間までに著減し、肝 phosphorylase 活性は6時間12時間と上昇し、その後下降した。筋 phosphorylase 活性、筋糖原量はともに48時間、72時間と低下の態度を示した。
- 2) 高糖質食飼育により正常動物では、肝 phosphorylase 活性の上昇、筋糖原量は上昇を示し、alloxan 糖尿病動物では正常動物でみられた変化は認められなかった。
- 3) 高脂肪食飼育により正常動物では肝糖原量の減少、肝 phosphorylase 活性の上昇、筋 phosphorylase 活性の低下がみられ、alloxan 糖尿病動物では肝 phosphorylase 活性が著明に低下した。

以上の結果から各食餌条件による糖原系の動きについて考察を加え phosphorylase 活性の変動に与えるホルモンの関係について論じた。

本論文の要旨は一部第14回日本内分泌学会西日本地方会(昭和41年)、第41回日本内分泌学会総会(昭和43年)京都にて発表した。

稿を終るにあたり、恩師早瀬正二教授のご稿閲ならびに種々ご助言を賜わった木島滋二前教授に深謝し、本研究に終始ご指導をいただいた京都大学老年医学講座竹内三郎助教授に深謝します。また研究に際しての法医学教室須山弘文前教授のご援助にあつくお礼申し上げます。

文 献

- 1) 伊東 毅 : 日内分誌. 45, 2, 229, (1969). 2) DOROTHY, F., E.A. NIEDLE. : Metabolism, 8 : 762, (1959).
3) NIEMEYER, H., N. PÉKES, J. RODOJKOVIC, T. URETA. : Arch Bioch. Biophysics, 96 : 662, (1962). 4) 山田弘三 : 糖尿病, 9 : 112, (1966). 5) LANGDON, R.G., D.R. WEUKLEY. : J. Biol. Chem., 214 : 167, (1955). 6) WEBER, G., A. CANTERO. : Science, 120 : 851, (1954).
7) WILLMER, J.S. : Candian, J. Biochem. physiol., 38 : 1095, (1960).
8) NIEMEYER, H., C. GONZALEZ, R. ROZZI, J. Biol. Chem., 236 : 610, (1961). 9) DAVID, R.H., P.H., JOHN, V.N. LUCIL : Am. J. Phy. 199 : 1041, (1960). 10) UNGER, R.H., A.M. EISENTRANT : Diabetes 13 : 563, (1964).