メタノールのマウス肝 δ -アミノレブリン酸合成酵素活性に対する影響

新垣光雄,^a 有吉敏彦^b

長崎県立女子短期大学,^a

長崎大学薬学部^b

Effect of Methanol on the Activity of Hepatic δ -Aminolevulinic Acid Synthetase in Mice

MITSUO ARAKAKI^a and TOSHIHIKO ARIYOSHI^b

Nagasaki Prefectural Women's Junior College,^a 1-4-1, Narutaki, Nagasaki 850

Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki

University,^b 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki 852 Japan

(Received February 26, 1986)

The effect of methanol on the activity of hepatic δ -aminolevulinic acid synthetase (ALA synthetase) was investigated in male mice.

The activity of ALA synthetase increased with increasing doses of methanol up to 100 mmol per kg of body weight injected intraperitoneally.

In both the methanol-treated mice and normal mice, the apparent biological half-life time of the enzyme was about 56 min after the administration of cycloheximide.

The increase of the enzyme activity by methanol was significantly inhibited by pretreatment with actinomycin D, an inhibitor of protein synthesis.

The apparent K_m value of the enzyme for glycine did not change but the V_{max} value increased in methanol-treated mice.

Pretreatment of mice with pyrazole, a potent inhibitor of alcohol dehydrogenase, significantly inhibited the methanol-induced increase of ALA synthetase, whereas pretreatment with either 3-amino-1,2,4-triazole or acetanilide, inhibitors of catalase, did not alter the increase of the enzyme activity by methanol.

It was concluded that methanol injected to fasted mice induces hepatic ALA synthetase and that the enzyme induction is associated with the oxidation of methanol by alcohol dehydrogenase.

Keywords— δ -aminolevulinic acid synthetase; methanol; pyrazole; 3-amino-1,2,4-triazole; cycloheximide; actinomycin D; alcohol dehydrogenase; catalase; mouse

緒 言

メタノールは塗料の溶剤、燃料、不凍液、ドライクリーニングや化成工業などに広く用いられていて、¹⁾ 誤用や誤飲による中毒ばかりでなく経皮的、経気道的にも吸収され健康障害を起こす可能性がある物質である。²⁾ また、メタノールはアルコール発酵の際、ペクチンなどから生成されるので、³⁾ ブドウ酒やリンゴ酒など果実酒の飲用により生体に取り込まれるほか、メチルエステルとして香料等の食品添加物にも存在し、摂取後は加水分解

されてメタノールを生じる。⁴⁾ したがって、メタノールの生体への影響を明らかにすることは産業衛生上ばかりではなく、食品衛生上からも重要であると思われる。メタノールの生体影響研究は主として視神経、網膜を対象にして行なわれ、^{2,5)} 肝臓の各種酵素特にヘム代謝系酵素に対する影響を検討した報告はほとんどない。

δ -アミノレブリン酸合成酵素 (δ -aminolevulinic acid synthetase; ALA synthetase と略す)⁶⁾ はヘム生合成系の律速酵素で、肝で生合成されたヘムの大部分は薬物

代謝の中心的役割を演じている チトクローム P-450 に利用されるといわれることから、もしメタノール投与によって ALA synthetase の活性に変動が起これば、薬物代謝酵素系の活性変動を介してメタノール自身及び生体に取り込まれる各種の xenobioticus の毒性にも影響する可能性が考えられる。

そこで今回、メタノールの肝 ALA synthetase に対する影響を検討し、メタノールが ALA synthetase 活性を増加させることを認めるとともに、更にその活性増加の機構についても検討を加え若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試薬 メタノールは和光純薬工業製の試薬特級を蒸留して用いた。トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris), ピラゾール (PZ) 及びシクロヘキシミド (CY) は和光純薬工業製, アクチノマイシン D (Act. D) は P-L Biochemical 社製, 3-アミノ-1,2,4-トリアゾール (AT) 及びピリドキサル-5'-ホスフェート (PALP) は半井化学薬品製, アセトアニリド (AA) は石津製薬製, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) は同仁化学研究所製のそれぞれ試薬特級, イオン交換樹脂 Dowex 1×8 (200—400 メッシュ) はダウ・ケミカル社製を使用した。その他の試薬は和光純薬工業製の試薬特級を用いた。

2. 実験動物 DDY 系雄性マウスを5—6週齢で購入し、室温約23℃の飼育環境に約5日間馴育し、発育順調なことを確かめたものを実験に供した。なお、飼育には日本クレア製 CE-2 固型飼料を用い、水は水道水を自由に摂取させた。

3. 投与液の調製並びに投与方法 メタノール, CY, Act. D 及び AT はそれぞれ注射用生理食塩液 (大塚製薬製) に溶解した。AA は 100 mg をあらかじめ 0.5 ml のメタノールに溶解し注射用蒸留水 (大塚製薬製) を加えて 10 ml とした。

各投与液の投与は、屠殺時間を午後1時—2時と一定にして、その前の一定時間に行なった。なお、動物はすべての実験において屠殺する前の24時間絶食させた。

3.1. Dose-Response 実験——メタノールを 10, 25, 50, 75 及び 100 mmol/kg で 1 回腹腔内投与後 3 時間目に屠殺した。

3.2. Time Course 実験——メタノールを 100 mmol/kg で 1 回腹腔内投与後 1, 3, 5, 8, 12, 24 及び 48 時間目に屠殺した。

3.3. ALA Synthetase の生物学的半減期 ($T_{1/2}$) を求める実験——メタノール 100 mmol/kg を腹腔内投与

後 3 時間目に CY 40 mg/kg を腹腔内投与し、その 0, 20, 40, 60 及び 80 分後に屠殺した。

3.4. ALA Synthetase の K_m 値及び V_{max} 値を求める実験——メタノール 100 mmol/kg を腹腔内投与後 3 時間目に屠殺して得た肝臓を用いて 25% ホモジネートを調製し、これを粗酵素液として種々の基質 (グリシン) 濃度における反応速度を求めた。

3.5. メタノール投与による ALA Synthetase 活性増加に対する Act. D 前処置の影響実験——Act. D (1 mg/kg) はメタノール (100 mmol/kg) を投与する 30 分前に腹腔内投与し、動物はメタノール投与後 4 時間目に屠殺した。

3.6. メタノール投与後の ALA Synthetase 活性増加に及ぼす PZ, AT 及び AA 前処置の影響実験——PZ (3.5 mmol/kg), AT (1 g/kg) 及び AA (100 mg/kg) は、メタノール (50 mmol/kg) を投与するそれぞれ 30 分前、60 分前及び 20 分前に腹腔内投与し、動物はメタノール投与後 4 時間目に屠殺した。

4. ALA Synthetase 活性の測定 25% 肝ホモジネートを粗酵素液として用い、Marver らの方法⁷⁾ に準じて比色法で測定した。すなわち、incubation mixture の組成はグリシン 200 μ M, EDTA 20 μ M, PALP 0.4 μ M, Tris-HCl buffer (pH 7.20) 150 μ M, 及びホモジネート 0.5 ml で全量を 2.0 ml とし、37℃ で 40 分間インキュベートした。インキュベート終了後 25% TCA 溶液 0.5 ml を加えて除タンパクし、その上澄液について Dowex 1×8 (酢酸型) を用いて ALA を精製し、modified Ehrlich reagent⁸⁾ を加えて発色させ、553 nm における吸光度を測定した。酵素活性は分子吸光係数 ($\epsilon_{mM}=53$)⁹⁾ を用いて算出した。

なお、活性値の差の有意性の検定は t 検定で行なった。

結果及び考察

メタノールの ALA Synthetase に対する用量-反応関係

メタノール 10, 25, 50, 75 及び 100 mmol/kg を腹腔内投与後 3 時間目に屠殺して ALA synthetase 活性を測定した結果を Table I に示す。

ALA synthetase 活性は投与量の増加とともに増加し、50 mmol/kg の投与量で対照群のおよそ 200%, 100 mmol/kg ではおよそ 300% の活性を示した。なお、100 mmol/kg の投与量はマウスにおける致死量¹⁰⁾ のおよそ 1/3 に相当する量であるので、それ以上の投与量については実験を行なわなかった。

TABLE I. Dose-Response Relationship between Methanol and ALA Synthetase Activity

Treatment	ALA synthetase activity (nmol/g liver/h)
Control	53.15 ± 6.26
Methanol	
10 mmol/kg	83.21 ± 13.76
25 mmol/kg	94.08 ± 20.57
50 mmol/kg	107.66 ± 5.12 ^{a)}
75 mmol/kg	135.68 ± 18.49 ^{a)}
100 mmol/kg	149.78 ± 25.69 ^{a)}

Mice were given methanol intraperitoneally at the indicated doses, and were killed 3 h later.

Values are the mean ± S.E. of four mice.

^{a)} significantly different from the control, $p < 0.05$.

Fig. 1. Time Course of Change in ALA Synthetase Activity after Methanol Administration

Mice were given methanol (100 mmol/kg) intraperitoneally at zero time, and were killed at the times indicated in the figure.

Values are the mean ± S.E. of four mice.

^{a)} significantly different from the control, $p < 0.05$.

メタノール投与後の ALA Synthetase 活性の経時的変化

Dose-Response 実験から活性が最も増加した投与量の 100 mmol/kg を用いて、メタノール投与後の ALA synthetase 活性の経時的変化を調べた結果を Fig. 1 に示す。

ALA synthetase 活性はメタノール投与後急速に増加し、3-5 時間後にピークに達したのち漸減し、投与後 24-48 時間の間に対照群のレベルに復帰した。

以上の実験よりメタノールが ALA synthetase 活性を増加させること、また、ALA synthetase 活性が最も増加するのは 100 mmol/kg のメタノール投与後 3-5

Fig. 2. Decay of ALA Synthetase in Liver of Control and Methanol-Treated Mice after Injection of Cycloheximide

Mice were given cycloheximide (40 mg/kg) intraperitoneally 3 h after the administration of methanol (100 mmol/kg) or saline solution, and were killed at the indicated times for enzyme assay.

Each point represents the mean value for four mice.

● : mice given saline solution.

■ : mice treated with methanol.

時間の間であることが明らかとなった。

ALA synthetase 活性の調節機構として、①酵素蛋白の生合成速度又は分解速度が変化し、酵素量が変化することによって活性が調節されるか、②酵素蛋白分子の構造が変化し、酵素と基質の親和性が変化することによって活性が調節されるか、③基質であるサクシニル Co A の供給能が変化することによって活性が調節されるかの 3 つが考えられる。

メタノール投与の ALA Synthetase の $T_{1/2}$ への影響

そこで、まず酵素蛋白の分解速度の変化による活性変化の可能性の有無を検討した。メタノール (100 mmol/kg) を投与して ALA synthetase を誘導させたマウスと、メタノールの代りに生理食塩液を投与した対照マウスに、CY (40 mg/kg) を投与して酵素蛋白の生合成を阻害し、その後の ALA synthetase の活性低下を経時的に調べた結果を Fig. 2 に示す。

Fig. 2 より ALA synthetase の見かけ上の $T_{1/2}$ を求めると、対照群で約 57 分、メタノール投与群で約 56 分となり、両群間に差は認められなかった。この事実はメタノール投与による ALA synthetase 活性の増加が、酵素蛋白の安定化ないしは分解速度の変化によって惹起されるのではないことを示唆している。

Fig. 3. Lineweaver-Burk Plots of ALA Synthetase Activity for Glycine

Mice were given methanol (100 mmol/kg) or saline solution intraperitoneally, and were killed 4 h later for enzyme assay. Reaction mixtures contained, in a final volume of 2.0 ml, 150 μ mol of Tris-HCl buffer (pH 7.2), 20 μ mol of EDTA, 0.4 μ mol of PALP, 0.5 ml of liver homogenates, and varied amounts of glycine.

S: glycine concentration (mM).

V: ALA formed (nmol/g liver/h).

●—●: mice given saline solution.

■—■: mice treated with methanol.

メタノール投与の ALA Synthetase の K_m 値及び V_{max} 値への影響

酵素活性の変化は酵素の量的な変化だけではなく、酵素と基質の親和性の変化によることも考えられるので、メタノール投与によって ALA synthetase の基質（グリシン）に対する K_m 値が変化するか否かを検討した (Fig. 3).

Fig. 3 から ALA synthetase のグリシンに対する K_m 値及び V_{max} 値を求めると、対照群ではそれぞれ 6 mM, 51.02 nmol/g liver/h, メタノール投与群では 6 mM, 80.00 nmol/g liver/h となり、メタノール投与によって K_m 値は変化せず、 V_{max} 値だけが増大した。この事実はメタノール投与による ALA synthetase 活性の増加が、酵素と基質の親和性の変化によるものではなく、酵素蛋白の生合成の亢進に基づくものであることを示唆している。

メタノール投与による ALA Synthetase 活性増加に対する Act. D 前処置の影響

メタノール投与による ALA synthetase 活性の増加が酵素蛋白の生合成の亢進に基づくものであることは、Table II に示すように、蛋白生合成阻害剤の Act. D を前処置するとメタノール投与による ALA synthetase 活性の増加が著しく抑制されることによっても支持され

TABLE II. Effect of Pretreatment with Actinomycin D on the Increase of ALA Synthetase Activity by Methanol

Treatment	ALA synthetase activity (nmol/g liver/h)
Control	61.13 $\pm$ 6.97
Actinomycin D	41.71 $\pm$ 1.93 ^{a)}
Methanol	195.76 $\pm$ 19.13 ^{a)}
Actinomycin D + methanol	80.42 $\pm$ 5.76

Mice were injected with actinomycin D (1 mg/kg, i.p.) 30 min before an administration of methanol (100 mmol/kg, i.p.), and were killed 4 h after the methanol administration. Values are the mean $\pm$ S.E. of five mice.

a) significantly different from the control, $p < 0.05$.

る。

アルコールは主に肝臓において、次の3つの系路で代謝されることが知られている。¹¹⁾ すなわち、第1はアルコール脱水素酵素 (alcohol dehydrogenase, ADH) による酸化系 (ADH 系)、第2は H_2O_2 とカタラーゼの関与による酸化系 (catalase 系)、第3は NADPH と O_2 、チトクローム P-450 関与の酸化系 (microsomal ethanol oxidizing system, MEOS) である。この3つの系の中でエタノールの代謝は主として ADH 系で行なわれ、¹²⁾ 一方、メタノールの代謝は catalase 系が重要な役割を演じているといわれる。¹³⁾

メタノール投与による ALA Synthetase 活性増加に対する PZ, AT 及び AA 前処置の影響

そこで、メタノール投与による ALA synthetase 活性の増加とメタノール代謝との関連を明らかにする目的で ADH 阻害剤 PZ,¹⁴⁾ catalase 阻害剤 AT¹⁵⁾ 及び AA^{13b)} を用いて、それぞれの代謝酵素系を阻害したときの ALA synthetase 活性への影響を検討した (Table III—V)。

ADH 阻害剤 PZ (3.5 mmol/kg) をメタノール (50 mmol/kg) を投与する30分前に投与すると、メタノールによる ALA synthetase 活性の増加は著しく抑制された (Table III)。しかし、catalase 阻害剤の AT (1 g/kg) 又は AA (100 mg/kg) を、メタノール (50 mmol/kg) を投与するそれぞれ60分前、20分前に投与してもメタノールによる ALA synthetase 活性の増加は抑制されなかった (Table IV, V)。この事実は、メタノール投与による ALA synthetase 活性の増加がメタノールの代謝と深く関係していることを示唆している。

メタノールの代謝系の中で catalase 系の抑制、すなわちカタラーゼ活性を阻害する AT 及び H_2O_2 プールを減少させることによってメタノールの酸化分解を抑制

TABLE III. Effect of Pretreatment with Pyrazole on the Increase of ALA Synthetase Activity by Methanol

Treatment	ALA synthetase activity (nmol/g liver/h)
Control	51.62 ± 7.57
Methanol	144.17 ± 22.70 ^{a)}
Pyrazole	61.13 ± 7.00
Pyrazole + methanol	75.91 ± 5.52 ^{a)}

Mice were injected with pyrazole (3.5 mmol/kg, i.p.) 30 min before an administration of methanol (50 mmol/kg, i.p.), and were killed 4 h after the methanol administration. Values are the mean ± S.E. of four mice.

a) significantly different from the control, $p < 0.05$.

TABLE IV. Effect of Pretreatment with 3-Amino-1,2,4-triazole on the Increase of ALA Synthetase Activity by Methanol

Treatment	ALA synthetase activity (nmol/g liver/h)
Control	51.62 ± 4.47
Methanol	130.59 ± 11.49 ^{a)}
Aminotriazole	57.40 ± 1.13
Aminotriazole + methanol	103.08 ± 7.23 ^{a)}

Mice were injected with aminotriazole (1 g/kg, i.p.) 60 min before an administration of methanol (50 mmol/kg, i.p.), and were killed 4 h after the methanol administration. Values are the mean ± S.E. of four mice.

a) significantly different from the control, $p < 0.05$.

TABLE V. Effect of Pretreatment with Acetanilide on the Increase of ALA Synthetase Activity by Methanol

Treatment	ALA synthetase activity (nmol/g liver/h)
Control	46.02 ± 4.03
Methanol	103.24 ± 9.92 ^{a)}
Acetanilide	69.28 ± 9.71
Acetanilide + methanol	106.30 ± 3.34 ^{a)}

Mice were injected with acetanilide (100 mg/kg, i.p.) 20 min before an administration of methanol (50 mmol/kg, i.p.), and were killed 4 h after the methanol administration. Values are the mean ± S.E. of four mice.

a) significantly different from the control, $p < 0.05$.

する AA の投与によってはメタノール投与による ALA synthetase 活性の増加は抑制されなかったこと、一方、ADH 系の抑制、すなわち ADH 阻害剤の PZ の投与によって ALA synthetase 活性の増加は抑制されたこと、また、メタノールの代謝に対する MEOS の役割はさほど大きくないこと、その上、サクシニル Co A 供給能は生理的にもかなり高いことが知られ、¹⁶⁾ サクシニル Co A 供給系に多少の変動があったとしても、これが直接に ALA 合成能を支配するほどの影響は持ち得ないと考えられることなどを考えあわせると、メタノール投与による ALA synthetase 活性の増加は、メタノールが ADH 系によって酸化される際に細胞内 NADH/NAD⁺ 比を変化させることが影響しているのではないかと考えられる。

なお、本研究の概要は、日本薬学会九州支部大会（昭和60年12月、福岡）において発表した。

引用文献

- 1) 化学大辞典編集委員会編，“化学大辞典 9,” 共立出版，東京，1962，p.138；堀口 博，“化学物質の安全性・危険性,” 共立出版，東京，1976，pp.234—235.
- 2) J.R. Cooper, M.M. Kini, *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 405 (1962)；韓 成珍，畑中利弘，綿谷正弘，下向博洋，広岡九兵衛，内間栄行，船橋一照，若杉長英，救急医学，**3**, 1209 (1979).
- 3) 相磯和嘉監修，“食品衛生学事典,” 医歯薬出版，東京，1972，p.694.
- 4) 藤原元典，渡辺厳一総編集，“総合衛生公衆衛生学,” 南山堂，東京，1978，pp.463—465.
- 5) 竹中祐典，衛生化学，**13**, 303 (1967).
- 6) S. Granick, S. Sassa, “Metabolic regulation,” Vol. 5, ed. by H.J. Vogel, Academic Press, New York and London, 1971, pp.77—141；S. Granick, S.I. Beale, “Advances in Enzymology,” Vol. 46, ed. by A. Meister, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1978, pp.103—111.
- 7) H.S. Marver, D.P. Tschudy, M.G. Perlroth, A. Collins, *J. Biol. Chem.*, **241**, 2803 (1966).
- 8) D. Mauzerall, S. Granick, *J. Biol. Chem.*, **219**, 435 (1956).
- 9) T. Miyakoshi, G. Kikuchi, *Tohoku J. Exper. Med.*, **79**, 199 (1963).
- 10) A. Hassan, M.I. Elghamry, F.M. Abdel-Hamid, *Experientia*, **22**, 85 (1966).
- 11) 藤原 洸，栗原宣夫，小島道夫，日本臨牀，**34**, 3159 (1976)；中西頼央，最新医学，**31**, 2086 (1976).
- 12) C.S. Lieber, *Gastroenterology*, **65**, 821 (1973)；藤沢 洸，肝胆脾，**2**, 141 (1981).

-
- 13) a) T.R. Tephly, R.E. Parks, Jr., G.J. Mannering, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **143**, 292 (1964) ;
b) A. Hassan, M.I. Elghamry, F.M. Abdel-Hamid, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **45**, 291 (1967).
 - 14) L. Goldberg, U. Rydberg, *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1749 (1969).
 - 15) G.J. Mannering, R.E. Parks, Jr., *Science*, **126**, 1241 (1959).
 - 16) 菊地吾郎, 代謝, **7**, 718 (1970).