Developmental Changes of Lactate Dehydrogenase Isozymes in Bovine Fetal Tissues

Toshiho NISHITA

Department of Veterinary Physiology, School of Veterinary Medicine,
Azabu University, 1-17-71, Fuchinobe, Sagamihara, Kanagawa 229

(Received for publication May 28, 1980)

Abstract. Variation in lactate dehydrogenase (LDH) isozymes of bovine fetal tissues and placentae during fetal development was described. LDH isozyme patterns were determined in the heart, liver, kidney, lung, skeletal muscle, spleen, thyroid gland, thymus and placenta by thinlayer polyacrylamide-gel electrophoresis. All the samples examined had five forms of LDH isozymes. The LDH isozyme pattern changed progressively during fetal development, especially in the heart, liver, kidney, skeletal muscle, thyroid gland and placenta. No significant changes in the LDH isozyme pattern were shown in the spleen, lung or thymus.

ウシ各種胎仔臓器の LDH アイソザイムの 発生過程における変動について

西 田 利 穂

麻布大学生理学第一講座

乳酸脱水素酵素, lactate dehydrogenase (LDH, E. C. 1. 1. 1. 27) は L-乳酸のピルビン酸への可逆的酸化を触媒している解糖系における主要酵素の一つである。

LDH の分子量は約 140,000 で、4 個のサブユニット (分子量 35,000) よりなる 4 量体である。サブユニットには A と B の 2 種類があり [3], アミノ酸組成 [25], 免疫学的特性 [19] がそれぞれ相違していることから、別個の構造遺伝子座の LDH_A と LDH_B により調節されているとされる [2]。B と A の構成比は 4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4 の 5 種で、それぞれの構成比をもった LDH アイソザイムを電気泳動により、移動度の速い順から LDH₁ (B₄), LDH₂ (B₃A₁), LDH₃ (B₂A₂), LDH₄ (BA₃), LDH₅ (A₄) と呼ぶ。

LDH アイソザイムパターンの相違は、A と B の両サブユニットの量比が組織間で異なるためであると考えられている。Markert and Moller ら [12] がブタ心

臓の LDH アイソザイムパターンが胎仔と親とで異なることを報告して以来、生物の発生過程におけるアイソザイムパターンの変動に関する報告は多くなされてきた [7, 11, 17, 23]。LDH アイソザイムパターンは個体発生中のみでなく、成熟後も種々の条件の変化により変動することも広く認められている。

ウシ胎仔における LDH アイソザイムについては、Davis ら [4] の比較的詳細な報告以外は 2~3 の臓器のみについての報告が多い [10, 13, 14]。

そこで本報告は、各臓器の発育状態や機能面の一端を把握することを目的として、ウシ胎仔の臓器 8 種類と胎盤について、LDH アイソザイムの発生過程での変動を検索した。

材料および方法

1. 材 料

実験に供した材料は、厚木食肉センターに搬入され

た妊娠牛（ホルスタイン種，年齢 2～9 歳）から，と殺後 2 時間以内に採取した胎仔 22 頭の肺・心臓・肝臓・腎臓・脾臓・骨格筋・甲状腺・胸腺および胎盤である．腎臓は皮質を用い，骨格筋は大腿筋を用いた．

ウシ胎仔の月齢決定はケラー法を用いた．すなわち，頂尾長（ m cm）を測定し $m=X(X+2)$ の式に当てはめた． X は 28 日を 1 ヶ月とした時の月齢である．1 ヶ月齢から 3 ヶ月齢の胎仔は発生前期，4 ヶ月齢から 6 ヶ月齢の胎仔は発生中期，7 ヶ月齢から 9 ヶ月齢の胎仔は発生後期として分類した．

臓器材料の調製は以下の如くである．ろ紙で組織片より血液をできるだけ除いた後，0.5 g を秤り取り，10 倍容の生理食塩水を加え，テフロン製ホモジナイザーでホモジナイズし，3,000 rpm 15 分間遠心分離し上清を得た．

2. 実験方法

アイソザイムの泳動は萩田 [20] らの方法に準じ，5% 薄層ポリアクリルアミドゲルを用いた．泳動用緩衝液はホウ酸緩衝液，pH 8.2 を用いた．各臓器からえたホモジネート上清の $5 \mu\text{l}$ を $1 \times 5 \text{ mm}$ のろ紙片に添加し，支持体上にのせ試料が十分にゲル層にしみ込むのを待ちろ紙を取り除き， 4°C で薄層ゲルの幅 1 cm あたり 0.5 mA の定電流で泳動した．泳動用マーカーはブロムフェノールブルーを用い，添加位置から 6 cm 泳動された時点，およそ 2 時間で泳動を終了した．

LDH 活性染色は Matsuzawa ら [16] の方法で行なった．染色後はメタノールと酢酸で反応を停止し，ゲルをセロファンではさみ乾燥させた後，デンストメーター（コスモ，スーパーフリック 7570 nm）により，アイソザイムの染色濃度全体を 100% とし各分画値を算出した．さらに，各アイソザイムの分画値から B と A のサブユニットの比率を算出した [10]．なお，電気泳動による分離が悪く，デンストメーターにより分画値が正確に算出できなかった標本については，成績から除外した．

成 績

異なる胎齢の胎仔より得た 10 種類の臓器について， $\text{LDH}_1 \sim \text{LDH}_5$ の各バンドの出現率を Table 1 に示した．さらに A および B サブユニットの量比を計算し，また $\ln B/A$ を算出しその発生過程における変動を Fig. 1 に示した．

胎仔心筋における LDH アイソザイムの B サブユニ

ットの比率は，発生前期ですでに高く，発育に伴いさらに高くなった．

肺においては B サブユニットの比率は高く，発生前期，中期，後期において著しい変動は示さなかった．

腎臓における B サブユニットの比率は高く，発育に伴い増加した．10 種類の臓器のなかで腎臓の B サブユニットの比率は，いずれの時期でも最も高かった．

肝臓では，B と A サブユニットの量比は発生前期でほぼ等しい値を示すが，発育に伴い B サブユニットは著しい増加を示した．

脾臓においては，B サブユニットの比率は高いが発育に伴う変動は著明でなかった．

骨格筋においては，発生前期で B と A のサブユニットの比率はほぼ等しく，上記の臓器とは逆に発育に伴い A サブユニットが著しく増加した．骨格筋は，他の臓器よりも A サブユニットを最も多く含む臓器であった．

甲状腺では，A と B サブユニットは発生前期でほぼ等しく，発育に伴い A サブユニットが増加した．

胸腺では，発生前期で B と A サブユニットの値は等しく，発育に伴い A サブユニットの増加はあるが著しい変動を示さなかった．

母体胎盤においては，発生前期で B と A サブユニットはほぼ等しく，発育に伴い A サブユニットが増加した．

胎仔胎盤においては，母体胎盤と同様に発生前期で B と A サブユニットはほぼ等しく，発育に伴い A サブユニットが増加した．

考 察

マウスの卵細胞，未受精卵および胚においては，B サブユニットのみしか合成されていないが [1, 26]，ウシ，ブタ，ヒツジ，ネコ，イヌでは B と A の両サブユニットが合成されるといわれている [5, 27]．

本実験においても，各発生時期の各胎仔臓器すべてに 5 本のアイソザイムバンドが検出された．このことはウシの発生過程においては，A と B サブユニットの合成は常に行われていることを示している．また，発育に伴う LDH アイソザイムの B と A サブユニットの量比の変動は，8 種類の各臓器において同一なパターンを示さず，両サブユニットの合成能は胎仔の発育に伴い差が生じることが認められた．

これらの差は未分化な細胞から分化した細胞，すなわち臓器が特殊な機能を発現するにいたる過程でその

Table 1. LDH isozyme percentages in bovine fetal tissues

Tissue	Term of gestation	No. of cases	LDH1 %	LDH2 %	LDH3 %	LDH4 %	LDH5 %	B/A	I_n B/A
Heart	I	4	34.3±12.1	28.3±2.6	23.9±7.4	9.9±2.5	3.5±3.0	2.3	0.83
	II	8	43.9±6.9	32.1±3.2	18.3±3.6	4.4±3.2	1.0±1.7	4.0	1.39
	III	8	49.2±6.5	32.6±3.3	13.7±4.9	3.5±2.8	0.7±1.0	4.2	1.44
Lung	I	3	40.4±8.0	31.4±0.8	19.4±3.3	6.8±2.3	1.8±2.2	3.1	1.13
	II	10	49.2±5.9	28.0±2.8	17.9±4.3	4.3±2.3	0.4±0.8	4.1	1.41
	III	6	46.4±5.2	25.5±5.3	18.6±4.9	6.8±3.5	2.4±3.0	3.4	1.22
Kidney	I	3	46.6±10.7	26.9±5.1	18.6±2.6	7.1±3.5	0.5±0.5	3.5	1.26
	II	9	48.1±5.0	29.1±3.2	17.9±2.5	4.5±1.6	0.3±0.7	4.0	1.39
	III	8	54.0±7.5	25.8±5.9	14.2±3.8	4.8±1.9	1.0±1.3	5.0	1.61
Liver	I	4	19.0±8.4	21.7±5.2	32.8±3.2	16.7±6.3	9.6±6.0	1.3	0.24
	II	10	32.2±9.9	25.6±7.3	30.4±6.3	9.6±4.8	2.0±2.0	2.2	0.80
	III	6	39.5±8.9	31.2±8.7	22.1±7.1	5.6±5.4	1.4±1.6	3.1	1.13
Spleen	I	3	33.8±13.1	26.7±0.9	25.2±9.5	10.0±2.6	4.0±4.4	2.2	0.79
	II	9	24.2±3.5	28.6±5.2	28.6±3.0	13.7±2.6	4.8±3.3	1.7	0.55
	III	8	26.2±4.4	28.4±7.0	27.3±5.8	11.8±5.1	6.2±4.1	2.0	0.69
Muscle	I	3	16.5±5.5	23.3±4.0	27.9±1.4	18.4±4.6	13.5±5.9	1.1	0.10
	II	8	8.1±4.4	8.8±5.6	14.0±5.8	25.6±2.6	43.2±13.7	0.4	-0.94
	III	6	4.1±4.0	6.0±3.2	13.9±7.4	26.5±6.0	49.5±16.7	0.3	-1.21
Thyroid gland	I	1	23.9	24.2	26.3	15.2	10.2	1.4	0.37
	II	8	14.4±6.7	14.4±7.8	30.1±4.4	21.1±4.3	19.0±7.4	0.8	-0.23
	III	3	7.4±2.4	6.5±3.1	30.0±5.8	26.2±2.1	28.7±4.0	0.5	-0.67
Thymus	I	2	11.7±7.3	22.4±3.7	34.2±3.3	20.5±6.7	17.0±0.8	1.0	0.03
	II	10	7.5±3.2	15.2±4.5	32.2±3.7	23.9±3.0	21.0±5.8	0.7	-0.36
	III	8	13.2±5.0	22.1±4.7	30.0±3.3	19.3±2.0	14.6±4.3	0.9	-0.08
Maternal placenta	I	4	17.9±5.7	23.8±6.5	30.4±2.9	18.2±5.6	9.6±5.6	1.3	0.22
	II	6	8.0±4.8	10.9±5.7	38.3±4.5	25.8±4.9	16.7±6.3	0.7	-0.33
	III	5	6.2±7.0	10.7±6.4	33.8±8.7	26.6±4.9	22.5±1.3	0.6	-0.50
Fetal placenta	I	4	18.5±6.5	22.9±7.0	31.6±4.1	19.4±5.0	7.1±4.4	1.3	0.25
	II	7	9.6±6.3	12.1±7.2	29.3±3.5	27.3±7.3	21.5±4.9	0.7	-0.31
	III	4	8.1±6.7	9.1±7.3	28.1±4.0	27.9±4.5	26.4±6.9	0.6	-0.58

I : The first term of gestation.

(Mean ± SD)

II : The middle term of gestation.

III : The late term of gestation.

B/A : B subunit (%) / A subunit (%).

代謝系に変化を生じ、その変化に応じ両サブユニットの合成が調節される結果生じるものと考えられる。すなわち今回検索したうちの肺、胸腺、脾臓を除いた他の臓器においては、胎仔の発育過程において代謝系に大きな変化が生じていることが示唆された。

ヒト胎児の心臓と肝臓は発生前期、中期ではBとAのサブユニットはほぼ等しく合成され、発生後期の3ヶ月頃から急に組織の特有な制御機構により、肝臓ではAサブユニットが増加し、心臓ではBサブユニットが増加するといわれている[24]。成熟したヒトとウシの肝臓においては、サブユニットの存在比はまったく逆であるが、これは食性による差であるとも理解され

ている。

LDH アイソザイムの生理的意義は今なお明確でないが、比較的豊富に常時酸素が供給される心臓などの組織にはBサブユニットが多く存在し、酸素供給が一過性に変動する組織にはAサブユニットが多く含まれているということが広く認められている。

Everse and Kaplan [6] は、Anaerobic-Aerobic 説を唱え、LDH₅ はピルビン酸還元酵素として、LDH₁ は乳酸脱水素酵素として機能を果たしているとし、Bサブユニットは好気性代謝を行なう組織に多く、Aサブユニットは嫌気性代謝を行なう組織に多いとしている。この考え方だけでは、LDH アイソザイムの代謝

Fig. 1. Changes of subunit ratio of lactate dehydrogenase in bovine fetal tissues.

的意義のすべては説明不可能であるが、その機能を考える上には基礎となりうる仮説である。

今回の成績に上記の説を適用すると、胎仔の成長に伴いより好気性型へと変動したものは、心臓、腎臓であり、中間型から好気性型へは肝臓、中間型から嫌気性型へは骨格筋、母体胎盤、胎仔胎盤、甲状腺であり、好気性型を持続したのは肺、脾臓で、中間型を持続したのは胸腺であった。

成熟した心臓の LDH アイソザイムは、B サブユニットが多いことから好気性型パターンの典型とされ、一方骨格筋は嫌気性型の典型とされている。ウシ胎仔期の臓器パターンを見てみると、骨格筋に関しては発生中期からすでに典型的な嫌気性型といえるが、好気性型はむしろ腎臓があげられる。このことから、腎臓は早い時期において成獣の腎機能レベルに到達すべく分化していることが推察できる。

胎盤に関する LDH アイソザイムの存在比についての報告は、ヒトにおける報告に接するのみである [8, 9, 15, 21, 22]。すなわち、ヒトにおいては妊娠の進行に伴い中間型代謝パターンから好気性パターンへ変化したという報告 [21, 22]、好気性代謝パターンから

嫌気性型へ変化 [15]、全期間を通じ中間型パターンを示したという報告 [8, 9] がみられる。

今回の検索では、胎盤組織は中間型から嫌気性型へとヒトの場合とは異なった変化を示した。

ヒト胎盤の組織構造は血—絨毛型で、ウシのそれは結合絨毛型である。このような組織層の差と LDH アイソザイムが嫌気性型代謝パターンを示すことからみて、妊娠末期のウシ胎盤は酸素供給の能率が低下しているものと考えられる。

胎仔胎盤と母体胎盤の B と A のサブユニットの値の変動は非常に類似していることから、この両者については少なくとも LDH 活性においては機能的にも差がないことを示唆していると考えられる。

一方、臓器のアイソザイムパターンを検索するにあたっては、臓器ホモジネート上清で得られる値が、その臓器固有の値を表わしているかどうか常に問題となる。すなわち、臓器間での交雑を考慮に入れることであるが、胎仔血清の LDH 総活性値は低く [18]、臓器のそれに比べても非常に低いことから、ある臓器から遊出した酵素による交雑は考えられず、今回の成績は臓器固有の値を示しているものと考えられる。

要 約

ウシ胎仔の発生過程における LDH アイソザイムの変動を、5% 薄層ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用い検索した。

胎仔の心臓、肝臓、腎臓、肺、骨格筋、脾臓、甲状腺、胸腺そして胎盤において A と B のサブユニットは合成されており、検索した臓器には発生前期、中期、後期において 5 本のアイソザイムが検出された。

胎仔の発育に伴いアイソザイムパターンが変動した臓器は、心臓、腎臓、肝臓、骨格筋、甲状腺、胎盤であり、著明な変動を示さなかった臓器は肺、脾臓、胸腺であった。

謝辞：稿を終わるにあたり、御指導御校閲を賜りました麻布大学家畜衛生学教室、田中享一教授に深謝いたします。また、材料採取にあたり御協力を得ました厚木食肉センター職員各位に深謝いたします。さらに麻布大学家畜衛生学教室員各位に感謝します。

文 献

- [1] Averbach, S., and Brinster, R. L. (1967). Lactate dehydrogenase isozymes in the early mouse embryo. *Exp. Cell Res.* **46**, 89-92.

- [2] Boone, C., Chen, T., and Ruddle, F. H. (1972). Assignment of three human genes to chromosome (LDH-A to 11, TK to 17, and IDH to 20) and evidence for translocation between human and mouse chromosomes in somatic cell hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 510-514.
- [3] Cahn, R. D., and Kaplan, N. O. (1962). Nature and development of lactic dehydrogenase. *Science* **136**, 962-969.
- [4] Davis, R. M., Baetz, A. L., and Hubbert, W. T., and Graham, C. K. (1973). Age-related change of LDH activity and isoenzyme patterns in the bovine fetus. *Biol. Neonate* **22**, 64-77.
- [5] Engel, W. (1927). Lactate dehydrogenase isoenzymes in oocytes and unfertilized eggs of mammals. *Human Genet.* **15**, 355-356.
- [6] Everse, J., and Kaplan, N. O. (1975). Mechanisms of action and biological functions of various dehydrogenase isozymes. In *Isozyme*, II, Markert, C. L., ed., Academic Press Inc., New York, 29-43.
- [7] Fieldhouse, B., and Masters, C. J. (1966). Developmental redistribution of porcine lactate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 538-548.
- [8] 郡田義光 (1972). 人胎児付属物 LDH アイソザイムパターンの逐月的変動追究による胎生環境に関する研究. 日産婦誌 **24**, 1065-1070.
- [9] 林 耀東 (1968). 胎盤における乳酸脱水素酵素のアイソザイム型に関する研究. 日産婦誌 **20**, 431-438.
- [10] Hinks, M., and Masters, C. J. (1964). Developmental changes in ruminant lactate dehydrogenase. *Biochemistry* **3**, 1789-1791.
- [11] Hinks, M., and Masters, C. J. (1966). The ontogenetic variformity of lactate dehydrogenase in feline and cavian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 458-468.
- [12] Markert, C. L., and Moller, F. (1959). Multiple form of enzymes: Tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **45**, 753-763.
- [13] Masters, C. J. (1964). The developmental progression of ruminant lactate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 161-163.
- [14] Masters, C. J., and Mary, H. (1966). The regulation of lactate dehydrogenase biosynthesis during morphogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 611-613.
- [15] 松本隆史・米村幸男・和田俊一 (1977). 人胎盤絨毛組織における Glycolytic enzyme pattern の推移. 日産婦誌 **29**, 1523-1528.
- [16] Matsuzawa, T., and Takikawa, H. (1968). The alternation of isozymic patterns in lactate dehydrogenase during artificial maturation of rat ovary. *Endocrinol. Jpn.* **15**, 291-297.
- [17] Neble, E. J., and Conklin, J. L. (1963). Development of lactic dehydrogenase isozymes in the chick embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **115**, 532-536.
- [18] 西田利穂・田中享一 (1981). 牛の血清 LDH アイソザイムに関する研究. 生物物理化学 **24**, 313-318.
- [19] Nisselbaum, J. S., and Bodansky, O. (1961). Reaction of human tissue lactic dehydrogenase with antisera to human heart and liver lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **236**, 401-404.
- [20] 荻田善一・佐子山豊彦・千葉泰人・益沢 学 (1973). 簡易薄層電気泳動法による血清酵素蛋白成分の解析. 生物物理化学 **17**, 63-70.
- [21] 高山雅臣 (1969) 母体, 胎児および胎盤における LDH 活性と isozyme に関する研究. 東京医大誌 **27**, 425-439.
- [22] 鳥越 正 (1972). 胎児付属物ならびに新生児の生理, 病理に関する研究. 日産婦誌 **24**, 654-662.
- [23] Vesell, E. S., Philip, J., and Bearn, A. (1962). Comparative studies of the isozymes of lactic dehydrogenase in rabbit and man. *J. Exp. Med.* **116**, 797-806.
- [24] Werthamer, S., Freiberg, A., and Amaral, L. (1973). Quantitation of lactate dehydrogenase isozyme patterns of the developing human fetus. *Clin. Chim. Acta* **45**, 5-8.
- [25] Wieland, T. (1959). Ueber die Verschiedenheit der Milchsaeuredehydrogenasen. *Biochem. Z.* **332**, 1-10.
- [26] Wolt, V., and Engel, W. (1972). Gene activation in early development of mammals. *Human Genet.* **15**, 99-118.
- [27] Wright, R. W., Cupps, P. T., Watson, J. G., and Schaykin, S. (1976). Lactate dehydrogenase isozyme patterns in oocytes unfertilized eggs and embryos from mice and cattle. *J. Anim. Sci.* **43**, 613-616.