カテコールアミンの脂肪分解促進機構 奥田拓道*

セカンドメッセンジャー説への疑問

脂肪細胞におけるカテコールアミン(CA)の脂肪分解促進作用については、このホルモンがcAMPを介してホルモン感性リパーゼ(HSL)を磷酸化することによって発現するというセカンドメッセンジャー説が信じられている。しかし、HSLの磷酸化によって脂肪分解が促進するのは基質である脂肪滴の表面に磷脂質が存在しない場合のみであり、その表面に磷脂質の単層膜が存在する脂肪細胞内の油滴では認められない。これは、CAの作用がHSLの磷酸化を介していないことを示すものである。では、CAの真の作用とは？

脂肪細胞に種々のカテコールアミン(CA；ドーパミン、ノルエピネフリン、エピネフリン)を作用させると、脂肪分解反応が促進し、脂肪酸やグリセロールが遊離する現象は、よく知られている。このCAの作用機序は、現在、サイクリックAMP(cAMP)が関与するセカンドメッセンジャー説で説明されている⁽¹⁾。すなわち、CAは細胞膜にあるβ-レセプターに結合し、G蛋白質を介してアデニルシクラーゼを活性化する。この酵素の作用でATPから作られたcAMPはプロテインキナーゼを活性化する。プロテインキナーゼは次にホルモン感性リパーゼ(HSL)を磷酸化し、この酵素を活性化することで脂肪分解が促進するというのがこの説の骨子である。

すでに、757残基のアミノ酸から成るHSLの全構造が明らかにされ、磷酸化部位が563番目のSer残基であることも突き止められている^(2,3)。この他に565番目のSer残基も磷酸化部位として知られているが、この部位の磷酸化はHSLの活性に直接関係するわけではなく、Ser-563の磷酸化を阻害することで間接的にHSL活性の調節に関与していると考えられている。そこで、Ser-563が磷酸化され、HSLが活性化するためには、あらかじめSer-565の部位がホスファターゼによって脱磷酸されなければならない。このように、CAの脂肪分解促進機構に関する研究は、HSLの

磷酸化の調節を中心に展開されている。

ところで、HSLの磷酸化に伴う脂肪分解の活性化を測定するのに、トリオレインなどの人工基質が用いられている。当然のことながら、HSLの基質である脂肪は水に不溶であり、したがって酵素反応は基質の界面で行なわれることになる。人工基質の界面と生理的な基質である脂肪細胞内の油滴の界面とは、多くの点で異なっていると思われる。HSLの磷酸化によって、人工基質の加水分解反応が促進したといっても、それを直ちに生理的な基質の分解に結びつけてよいのかどうかは問題である。

人工基質と生理的基質の違い

筆者が脂肪細胞内の生理的基質である油滴を取り出すことを試みたのは約20年も前のことであった⁽⁴⁾。脂肪細胞を低張液(5mM Tris-HCl, pH 7.4)中で破裂させた後、0.025% Triton X-100を含む同じ緩衝液で1回だけ処理して油滴を取り出す。細胞内の油滴の界面構造をできるだけ破壊しないために、ホモジナイズなどの方法は用いなかった。しかし、このようにして脂肪細胞から取り出した油滴は決して純粋なものではなく、細胞膜の断片やミトコンドリアを含む粗標品であった。最も問題になったのは、この油滴標品にHSLが含まれていることであった。油滴がたとえ粗標品であったにしても、HSLが含まれていなければ生理的基質として取り扱うことができるが、HSLが含まれている場合には、基質としての取

Mechanism of Lipolytic Action of Catecholamines—A Doubt for Second Messenger Theory

* Hiromichi OKUDA, 愛媛大学医学部

図 1 ■ 脂肪細胞から調製した油滴の走査電顕像
バーは 270 μm .

り扱いはできない。

この油滴標品から HSL を除く条件は、十数年後に偶然の機会に発見されることとなった。それまで、Triton X-100 以外の界面活性剤を試みたり、油滴をプロテアーゼで処理したりして HSL を除こうとしたが、いずれも失敗であった。ある時、別の実験目的で、油滴を TES 緩衝液 (25 mM TES*, pH 7.4, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2) 中で 37°C 、10 分間放置し、遠心沈殿後上層の油滴画分を同じ緩衝液で洗うという簡単な操作で、油滴画分から HSL を除くことに成功したのである⁽⁵⁾。

図 1 は、このようにして調製した油滴の走査電顕像である。油滴のみを 37°C 、1 時間放置した時にはグリセロールの遊離はまったくみられないが、図 2 に示すように、HSL を添加すると脂肪分解が認められるようになり、特に CA の一つであるエピネフリン ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下では、より多くのグリセロールが遊離する。このような事実は、油滴には、少なくとも明らかな脂肪分解を起こすほどの HSL は存在していないことを示すものであり、生理的基質として用いることが可能に

* N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸

図 2 ■ 脂肪細胞から調製した油滴の分解に及ぼす HSL の添加効果

なったのである。

油滴の主要成分は中性脂肪であるが、他に磷脂質、コレステロール、糖、蛋白を少量含んでいる (表 1)。磷脂質、コレステロール、糖、蛋白などの微量成分は、いずれも水に対して親和性をもっているもので、中性脂肪の表面に存在し、水と接しているものと思われる。ただし、HSL を含まない油滴であるといっても、細胞膜やミトコンドリアなどが少量含まれているので、表 1 の結果は油滴自身の組成を正確に示したものでは決していない。しかし、粗標品ではあっても、HSL の基質として用いることは可能なので、この油滴を用いて、HSL の磷酸化によってその分解が促進されるかどうかを検討することにした。

HSL としては、ラットの副睪丸脂肪組織から調製したものと、ニワトリの腹腔内脂肪組織からのものの 2 種類を用いた。それぞれの抽出液をヘパリン-セファロースカラムにかけ、混在するリ

表 1 ■ 脂肪細胞から調製した油滴の化学組成

組成名	組成 (μmol または $\mu\text{g}/\text{g}$ 乾燥重量)
中性脂肪	870 μmol
磷脂質	0.71 μmol
コレステロール	0.52 μmol
コレステロールエステル	検出不能
糖	342 μg
蛋白	63 μg

表 2 ■ 人工基質と生理的基質を用いた時のホルモン感性リパーゼ (HSL) の脂肪分解

添加	ラット HSL		ニワトリ HSL	
	油滴 ($\mu\text{Eq}/\text{mg}/\text{h}$)	トリオレイン ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{h}$)	油滴 ($\mu\text{Eq}/\text{mg}/\text{h}$)	トリオレイン ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{h}$)
—	98 $\pm$ 40	192 $\pm$ 23	164 $\pm$ 7	627 $\pm$ 12
ATP, cAMP, プロテインキナーゼ	114 $\pm$ 49	275 $\pm$ 18*	186 $\pm$ 10	1,239 $\pm$ 10**
同上+プロテインキナーゼ阻害剤	138 $\pm$ 47	224 $\pm$ 24	191 $\pm$ 15	855 $\pm$ 26
エピネフリン	1,526 $\pm$ 138	185 $\pm$ 6	300 $\pm$ 33	656 $\pm$ 17
同上+プロテインキナーゼ阻害剤	1,536 $\pm$ 134	221 $\pm$ 24	261 $\pm$ 18	805 $\pm$ 28

* $p < 0.05$ (無添加に対して)

** $p < 0.01$ (無添加に対して)

が蛋白リパーゼを除いた画分を HSL 溶液として用いた。それぞれの HSL 溶液を ATP, cAMP, プロテインキナーゼとともに, 25°C, 10 分間反応させ HSL を磷酸化する。対照としては, この系にプロテインキナーゼ阻害剤を加えたもの, および系に ATP, cAMP, プロテインキナーゼを加えないものを用意した。これらは, いずれも HSL の磷酸化を阻止する条件である。このようにして, 磷酸化された HSL と対照の HSL を用意するとともに, 基質としては, 上述の脂肪細胞から調製した油滴の他に, トリオレインをアラビアゴムでエマルジョンにしたものの 2 種類を用意した。

以上の HSL 標品と基質を 30 分間, 37°C で反応させ, 遊離する脂肪酸を測定した結果を表 2 に示した。ラット脂肪組織の HSL を用いた場合, ATP, cAMP, プロテインキナーゼの作用で磷酸化された HSL は, 対照の HSL に比べて人工基質であるトリオレインの加水分解を有意に上昇させる。しかし, 意外なことに, 生理的基質である油滴の分解は促進されない。同様な現象は, ニワトリ脂肪組織の HSL の場合にも認められる。HSL の磷酸化はトリオレインの分解を上昇させるが, 油滴の分解を促進しないのである。

一方, 油滴と HSL の組合せでエピネフリン (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とともに反応させると, 脂肪分解反応は著明に促進される。ラットとニワトリのいずれの HSL についても同じようなエピネフリンの効果が認められる (表 2)。しかし, 人工基質であるトリオレインを用いた場合にはエピネフリンの効

果は認められない。CA が脂肪細胞に作用し, 脂肪分解が促進されるのは, 細胞内の油滴に存在する中性脂肪が HSL によって加水分解される反応の部分である。この油滴の分解が, HSL の磷酸化で促進されないのだから, CA $\rightarrow$ β -レセプター $\rightarrow$ アデニルシクラーゼ $\rightarrow$ cAMP $\rightarrow$ プロテインキナーゼ $\rightarrow$ HSL の磷酸化という経路は, CA による脂肪細胞内の油滴の分解には関与

していないことになる。さらに, HSL の基質として油滴を用いた時だけエピネフリンによる脂肪分解が促進されるのだから, このホルモンの作用に油滴が深く関わっていることが推測される。いずれにしても, HSL の磷酸化が CA の脂肪分解促進作用に関与していないということであれば, 過去 30 年にわたって行なわれたこの方面の研究は大半は無駄であったということになりかねない。

そこで, HSL の磷酸化によって油滴の分解がなぜ促進されないのかを検討することにした。トリオレインをアラビアゴムでエマルジョンにした人工基質と油滴の違いの中で重要な点は, HSL が作用する場である基質界面であろうと思われる。油滴の場合には, この界面に磷脂質, コレステロール, 糖, 蛋白が存在すると思われる。しかし人工基質では, その界面にこのような物質は存在していない。油滴画分に存在する磷脂質の中で, 75% はレシチンであり, 残りの 25% はホスファチジルエタノールアミンであった。また油滴の直径は $56.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ であることと, 表 1 のデータをもとにして油滴界面の磷脂質の量を計算すると, レシチンは $0.597 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ であり, ホスファチジルエタノールアミンは $0.200 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ であった。一方, トリオレインエマルジョンの直径は $4.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ であった。そこで, この人工基質に種々の量のレシチンを添加し超音波処理した後, 磷酸化された HSL とされていない HSL を作用させ, 脂肪分解活性を調べてみたのである。HSL としては, ニワトリから調製したもの

を用いた。

まず、レシチンを添加していない人工基質では、HSL の磷酸化によって脂肪分解活性の 上昇が認められる。ところが、レシチンの添加によって HSL の磷酸化の効果が抑制されることがわかった。この磷酸化の効果は、レシチンが人工基質に存在しない時には 82% (磷酸化によって上昇する 脂肪分解活性) であり、その界面に 0.71 nmol/cm^2 のレシチンが存在した場合には 34%, 1.43 nmol/cm^2 のレシチンでは 16%, 2.75 nmol/cm^2 のレシチンでは 0% であった。先に、油滴表面には 0.597 nmol/cm^2 のレシチンが存在すると述べたが、ほぼこの量に相当するレシチン量で HSL の磷酸化の効果が阻害されるのである。ただし、油滴や人工基質界面のレシチン量は、この物質がすべて界面に存在すると仮定して計算した量であり、実際のレシチン量は異なっていると思われる。

このような問題点はあるにしても、油滴の分解が HSL の磷酸化によって促進されない理由として、その界面に存在するレシチンが関わっていることは確かなように思える。というのは、レシチン以外の油滴中の微量成分 (ホスファチジルエタノールアミン、コレステロール、糖、蛋白) は、HSL の磷酸化の効果を阻害しないからである。このように見てくると、HSL によって触媒される脂肪分解反応において、人工基質を用いた時と生理的基質を用いた場合が同じであると速断した所に問題があったと考えざるを得ない。確かに HSL の基質となるトリオレインと油滴中の脂肪の化学構造は基本的に同じであるが、トリオレインエマルジョンと油滴の界面の性質が異なることに気づけなかったのである。CA の脂肪分解促進作用が HSL の磷酸化を介していないとすると、その作用機序はどのように考えたらよいのだろうか。

カテコールアミンと脂肪細胞内の油滴

脂肪細胞をアルブミンを含む緩衝液中で 37°C 、30 分間放置しても、脂肪酸の遊離はほとんどみられない。しかし、この系にエピネフリン ($1 \mu\text{g/}$

ml) を添加すると、 $807 \pm 10 \text{ nmol/g/30 min}$ の脂肪酸が遊離する。ところが、脂肪細胞をホモジネートと同じ条件で 30 分間放置すると、ホルモン (エピネフリン) なしでも $937 \pm 30 \text{ nmol/g/30 min}$ の脂肪酸が遊離するようになる。また脂肪細胞ホモジネートにエピネフリンを添加しても遊離脂肪酸量は $978 \pm 13 \text{ nmol/g/30 min}$ で、もはやホルモンの効果は認められなくなる。重要なことは、脂肪細胞をホモジナイズしただけで、脂肪の分解が高まったという事実である。一体、細胞をすりつぶすことによって何が起こったのだろうか? そこで、脂肪細胞から取り出した油滴にラットの脂肪組織から調製した HSL を添加した無細胞系を用い、この点を検討することにした。

この系をホルモンなしで 37°C 、1 時間放置すると $0.054 \pm 0.004 \text{ FFA } \mu\text{Eq/mg HSL/h}$ (FFA は遊離脂肪酸) の脂肪酸が遊離する。エピネフリンをこの系に加えると 10^{-7} M から脂肪酸の遊離は増加し、 10^{-5} M で最高に達し、 $0.854 \pm 0.025 \text{ FFA } \mu\text{Eq/mg HSL/h}$ の脂肪酸が遊離するようになる。実にホルモンによって脂肪酸の遊離は 16 倍にも増加するのである。ところで、この無細胞系で、油滴をホモジナイズした後、HSL とともに 37°C 、1 時間反応させると、ホルモンなしでも $0.842 \pm 0.028 \text{ FFA } \mu\text{Eq/mg HSL/h}$ の脂肪酸が遊離するのである。この値は、 10^{-5} M エピネフリンによって遊離する脂肪酸に匹敵する。また油滴をホモジナイズすると、ホルモンを加えても、もはやそれ以上の脂肪酸の遊離はみられなくなる。このような事実は、脂肪細胞をホモジナイズすることによって出現する脂肪酸の遊離やホルモンに反応しなくなる現象は油滴の破壊によってもたらされたものであることを示している。さらに、この無細胞系での HSL の量は、常に一定である。また油滴のホモジナイズによって HSL の活性化が起こったとも考えにくい。

以上のように考えてくると、油滴には HSL の作用を阻害するような何らかの機構が存在し、その阻害機構が油滴の破壊やエピネフリンの作用で除去されることによって脂肪分解が促進すると考えざるを得ない。ホルモンなしで油滴と HSL を

反応させた場合、油滴に HSL の作用を阻害する機構があるため、脂肪酸がほとんど遊離しないのであって、HSL が活性型であるとか、非活性型であるとかは関係ないのである。この無細胞系において、油滴の代わりに人工基質を用いると、ホモジナイズした油滴の場合と同様、高い脂肪分解がみられ、エピネフリンを添加しても脂肪分解の促進は認められない。したがって、トリオレインをアラビアゴムでエマルジョンにした人工基質には存在しない何かが、油滴中の阻害機構に関与していると思われる。油滴の直径は $56.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ であるが、ホモジナイズするとその直径は約半分に減少する。直径が半減すると脂肪滴の数が増加するので、界面面積は2倍に拡大することになる。界面面積が2倍に拡大すると、界面に存在する油滴中の微量成分の量は2分の1に減少する。一方、油滴と人工基質の違いは、油滴の界面に存在する微量成分にあると思われるので、HSL の反応を阻害するかどうかを、微量成分の各々について検討することにした。

まず、ホモジナイズした油滴にレシチン以下の微量成分を添加し、HSL とともに 37°C 、1時間反応させ脂肪分解が抑制されるかどうかを検討した。微量成分の中で、レシチンが最も強い阻害作用を示し、コレステロールはわずかに阻害し、ホスファチジルエタノールアミン、糖、蛋白には阻害作用はみられなかった。次に、油滴と HSL から成る無細胞系に種々の濃度のホスホリパーゼCを加えて反応させたところ、油滴をホモジナイズした時と同じように高い脂肪分解活性が出現した。油滴の代わりに、人工基質と HSL から成る系にホスホリパーゼCを加えても脂肪の分解はまったく促進されない。このことは、ホスホリパーゼCが油滴中のレシチンを分解することによって、HSL に対する阻害が解除されたことを示している。つまり、油滴の界面を覆うレシチンの単層膜が HSL の油滴への作用を阻害する本体だったのである。油滴をホモジナイズすると、その界面に存在するレシチンの濃度が半減するために HSL に対する阻害が解除され、脂肪分解反応が促進されたと考えられるのである。また人工基質の場合

は、その界面にレシチンが存在しないので、油滴にみられた HSL に対する阻害がかからなかったと考えられる。

辻田らは、一般にリパーゼの反応において、基質界面のリン脂質が加水分解反応を調節する重要な因子になっていることを明らかにしている⁽⁶⁾。たとえば、HSL とよく似た性質をもつ膵臓のカルボキシエステルリパーゼの場合、ジオレインとレシチンから成る単層膜に対して、レシチンとジオレインの比が 6:4 の時には、まったくジオレインの加水分解反応は認められないが、その比が 4:6 になると最高の分解活性を示すようになるのである。中性脂肪を分解するリパーゼにとって、基質とはなり得ないレシチンが、その加水分解反応の律速因子になっているのである。このように、油滴をホモジナイズすることによって上昇する HSL の加水分解反応は、油滴界面に存在するレシチン濃度の減少によることがわかったが、エピネフリンの脂肪分解の促進も同様な機序で行なわれているのであろうか？

確かに、このホルモンの作用に油滴界面に存在するレシチンが関わっているという成績は得られている。油滴をあらかじめホスホリパーゼCで処理すると、脂肪分解反応の促進はみられなくなるのである。先に油滴界面のレシチンをホスホリパーゼCで分解すると、HSL に対する阻害がなくなる現象について述べたが、エピネフリンの作用に関与するレシチンについては少し性質が異なるようである。というのは、前述の油滴中の HSL に対する阻害機構を破壊するホスホリパーゼCの濃度は 125 mU 以上であり、作用時間は 60 分であったが、エピネフリンの脂肪分解促進作用を阻害する濃度は 50 mU 前後でしかも作用時間は 10 分である。この時、エピネフリンを加えない状態での脂肪分解はまったく促進されない。つまり油滴界面には、作用の異なる2種類のレシチンが存在すると思われる。1つは、エピネフリンの作用とは無関係なレシチンで、HSL に対する阻害作用を除去するには、ホスホリパーゼCを十分に働かせる必要がある。もう1つは、エピネフリンの作用と関係の深いレシチンで、少量のホスホリパ

ーゼCを短時間(10 分間)作用させることで除去される。いわば、HSL の阻害に関わる非特異的なレシチンと、ホルモンの作用に深く結びついた特異的レシチンである。

後者の特異的レシチンは、油滴表面に存在する蛋白と複合体を作って存在している可能性がある。というのは、油滴をあらかじめトリプシンやキモトリプシンで処理した後、HSL とエピネフリンを加えて1時間反応させる系で検討してみると、ホスホリパーゼCだけではなく、このようなプロテアーゼ処理でも、ホルモンの作用は低下するからである。油滴界面に存在する特定のレシチンと蛋白がエピネフリンの作用に関与しているように思えるのである。そこで、油滴界面に存在しエピネフリンの脂肪分解促進作用に関与する物質(受容体)を、このホルモンと油滴との特異的結合を検討することで明らかにしようと試みた。

通常、特異的結合の測定には、放射能でラベルしたホルモンを細胞や細胞膜に結合させ、洗浄後になお結合しているホルモンをラベルしていないホルモンと置換する方法がとられる。この方法でホルモンの受容体を測定できるとすれば、受容体とホルモンとの結合は洗浄しても取れない結合でなくてはならない。洗浄しても取れないかどうかは、あくまで生理作用で判定する必要がある。放射能でラベルしていないホルモンと置換したからといって、生理作用に関与する特異的結合とは言えないのである。そこで、CA の1つであるノルエピネフリンを油滴と混合し、脂肪分解に関わる結合が洗浄したら取れるかどうかを調べてみた。

まず、このホルモンと油滴を4℃の緩衝液中で混合し、軽く遠心沈殿し、上層の脂肪層を取り、これにHSLを加えて、37℃で1時間反応させると脂肪酸が遊離する。これは脂肪層にあるホルモンによって、脂肪分解が起こったものと思われる。次にこの脂肪層に新しい緩衝液(4℃)を加え、遠心沈殿して得た脂肪層(洗浄した脂肪層)にHSLを加えて反応させてもまったく脂肪酸の遊離はみられない。これは、ノルエピネフリンの脂肪分解促進作用に関与する油滴との結合は、洗浄すれば取れる程度のゆるい結合であることを示

表 3■β-ブロッカー(プロプラノロール)によって阻害される³H-ノルエピネフリンの油滴への結合⁽⁷⁾

油滴の処理	脂肪層(油滴)の放射能(cpm)		
	ノルエピネフリン(6 μM)	ノルエピネフリン(6 μM) プロプラノロール(1 μM)	Δ
無処理	665±19	504±17	161
ホスホリパーゼC(125 mU/ml)	525±40	523±12	2
ホスホリパーゼD(125 mU/ml)	678±28	559±28	119
トリプシン(10 μg/ml)	638±47	394±50	244
キモトリプシン(100 μg/ml)	628±40	384±34	244
ノイラミニダーゼ(100 μg/ml)	620±44	484±45	136

すものである。したがって、従来の特異的結合法では測定できないことになる。

そこで考えたのが、ノルエピネフリンの脂肪分解促進作用の阻害剤であるβ-ブロッカー(プロプラノロール)を利用する方法である。このβ-ブロッカーは、CAの脂肪分解促進作用を10⁻⁶Mで阻害するが、α-ブロッカー(フェノキシベンズアミン)は阻害しない。ところで、油滴に³H-ノルエピネフリンを加え、遠心沈殿して得た脂肪層の放射能は、これにβ-ブロッカーを加えると低下することがわかった。α-ブロッカーではこのような低下は認められない。つまり、脂肪分解に関与するノルエピネフリンと油滴との結合は、β-ブロッカーで阻害されると思われるのである。そこで、このβ-ブロッカーで阻害されるホルモンと油滴との結合の実体を明らかにするために行なわれた実験成績が表3である。これは、油滴を種々の酵素で37℃、10分間だけ処理した後、β-ブロッカーで阻害される³H-ノルエピネフリンと油滴との結合を調べてみたものである。この結合は、ホスホリパーゼC処理で低下し、トリプシンやキモトリプシン処理で上昇、ホスホリパーゼDやノイラミニダーゼでは影響を受けないものであった。ここでも、油滴中の磷脂質と蛋白がCAの受容体として浮かび上がってきたのである。このような実験事実を総合して、現在、CAの脂肪細胞における脂肪分解促進作用を以下のように考えている。

図 3 ■ カテコールアミン (CA) の脂肪分解促進機構の仮説

油滴表面には、レシチンの単層膜から成る HSL の非特異的阻害機構と磷脂質と蛋白から成る特異的阻害機構が存在する。CA は後者の磷脂質の磷の部分にイオン結合することによって、その磷の周辺が親水性から疎水性に変わり、蛋白表面から離れ、油滴表面の疎水性部分に接着する。表面が露出した蛋白に HSL を含む膜画分 (油滴表面に存在する小胞) が結合することによって、HSL と油滴の脂肪部分が接触し、脂肪分解が始まる (図 3)。

この仮説のポイントは、CA の作用は HSL の磷酸化ではなく、HSL と油滴との接触の促進にあると考えていることである。最近、NIH の Londos らは、HSL の抗体を用いて、CA が油滴と HSL の結合を促進し、 β -ブロッカーがその結合を阻害することを明らかにしている⁽⁸⁾。しかし、上述の説を証明するためには、CA が細胞膜を通して油滴表面に達し得ること、油滴表面で磷脂質と複合体を形成する蛋白の実体、HSL を含む膜画分の油滴表面への結合様式などが解明されなければならない。

セカンドメッセンジャー説の落とし穴

CA の脂肪分解促進作用が HSL の磷酸化を介していないとすると、このホルモンが結合する細胞膜の β -レセプター、G 蛋白を介してのアデニ

ルシクラゼの活性化、cAMP によるプロテインキナーゼの活性化は、少なくとも脂肪分解促進作用とは無関係ということになる。しかし、これまで少数の研究者を除いて^(9~12)、多くの者が cAMP をセカンドメッセンジャーとする説に疑問を持たなかったのはなぜだろうか。理由は、上述のセカンドメッセンジャー説を一見支持する多くの証拠があったからである。まず、cAMP やその誘導体であるジブチリルサイクリック AMP (DBcAMP) に脂肪分解促進作用があることや、ホスホジエステラーゼを阻害して細胞内の cAMP を上昇させると言われているテオフィリンにも脂肪分解促進作用が認められることである。

しかし、このような成績は、一見上述のセカンドメッセンジャー説を支持しているようにみえるが、その作用機序を詳しく解析してみると必ずしもそうではないことがわかる。まず cAMP の脂肪分解作用は、 10^{-5} M ではまったくみられず、 10^{-4} M から出現し始め、 10^{-3} M で最高に達する。一方、cAMP によるプロテインキナーゼ (A-キナーゼ) の活性化は、 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ M で認められる。cAMP の脂肪分解促進作用とプロテインキナーゼ活性化との間には 1 万倍の濃度差がある。この現象に対して、cAMP は細胞膜を通過し難いのではないかとの推測が言い訳の口実に用いられるが、油滴と HSL から成る無細胞系でも

cAMP は、 10^{-6} M 以上の濃度でしか脂肪分解を促進しないのである。

さらに、DBcAMP も 10^{-4} M 以上で脂肪分解を促進するが、その作用は cAMP よりも強力である。にもかかわらず、プロテインキナーゼを活性化作用はまったくないのである。DBcAMP の脂肪分解促進作用が、この物質が cAMP に分解されて発現するのであれば、DBcAMP の作用は cAMP よりも低くなければならないが、事実は逆である。さらにテオフィリンも 10^{-4} M 以上で脂肪分解を促進するが、この時、脂肪細胞内の cAMP は上昇していないのである。CA によって、脂肪細胞内の cAMP の生成が高まっている時には、テオフィリンによるホスホジエステラーゼの阻害によって cAMP も上昇するが、脂肪細胞にテオフィリンだけを作用させた時には、cAMP の生成が低いので、テオフィリンによる上昇もみられない。にもかかわらず、CA に匹敵する脂肪分解が観察されるのである。

このようにみえてくると、cAMP、DBcAMP、テオフィリンの脂肪分解促進作用が、セカンドメッセンジャー説以外の機序で行なわれている可能性も考えてみる必要があるのではなかろうか。この3物質は、プリン骨格をもち、脂肪分解促進作用をもたない AMP よりも疎水性が高い点が共通している。また、イミダゾール基に由来する正電荷と疎水部位を持つ点も共通である。実は、これら3物質は CA と同様に油滴表面の磷脂質に結合し、しかもその結合は β -ブロッカーで阻害されるのである。つまり、cAMP、DBcAMP、テオフィリンは HSL の磷酸化ではなく、油滴表面の磷脂質-蛋白の複合体に作用し、HSL の油滴への結合を促進することで脂肪分解を促進しているのである^(13,14)。

これらの物質が、HSL の磷酸化を介さずに脂肪分解を促進しているとすれば、共通の性質をもつ他の物質も脂肪分解を促進する可能性が考えられる。事実、正電荷と疎水部位を持つことで共通している *p*-アミノフェノールや *n*-デシルアミンも脂肪細胞や油滴と HSL から成る無細胞系で脂肪分解を促進する⁽¹⁵⁾。さらに、*n*-デシルアミ

ンの作用は DBcAMP に比べて著しく低い、DBcAMP の作用は *n*-デシルアミンによって拮抗的に阻害されることが無細胞系で明らかにされている。これは、両物質が同じ部位に作用していることを示すものである。cAMP、DBcAMP、テオフィリンの脂肪分解作用が薬理作用である可能性を考えず、単にセカンドメッセンジャー説を支持する証拠として放置していたところに落とし穴があったように思えるのである。

Buchner の原罪

---

19 世紀末、Buchner は酵母をすりつぶしてもアルコール発酵が起こることを発見した。それまで、生きた菌のみで起こると信じられていたアルコール発酵が物質レベルで行なわれることを証明したのである。生命そのものだと思われていたアルコール発酵が物質(酵素)によって起こるのだから、酵素を研究することによって生命の詳細が明らかになると信じたのも当然である。20 世紀に入り、酵素の精製、その構造、作用機序や酵素蛋白の合成に関わるメッセンジャー RNA、DNA の実体が明らかにされ、酵素を中心とした分子生物学が花咲くこととなった。ホルモンの作用についても、酵素万能時代の当然の帰結として、酵素ですべて説明できると信じられてきた。

このような考え方に拍車をかけたのが Sutherland によって提唱されたセカンドメッセンジャー説である⁽¹⁾。肝細胞や脂肪細胞に作用した CA は、受容体を介して cAMP を上昇させ、この cAMP がセカンドメッセンジャーとなって、ホスホリラーゼやリパーゼ(HSL)などの酵素を磷酸化し、グリコーゲンや脂肪などのホルモン作用が発現するというのである。この説に従えば、cAMP をつくるアデニルシクラーゼや酵素を磷酸化するプロテインキナーゼの研究もホルモンの作用機序の解明を行なっていることになる。水に溶けていないグリコーゲン顆粒や油滴の表面で進むグリコーゲンや脂肪の分解など、現在の酵素学的手法では対応できないような複雑な系を扱わなくてはすむのである。その結果、CA の β -レセプター的全構造が明らかにされ、G蛋白を介してのア

デニルシクラーゼの調節機序, プロテインキナーゼによる酵素の磷酸化の詳細が解明されるに至った。しかし, CA によるホスホリラーゼの活性化は, cAMP を介する β -作用ではなく, カルシウムの関与する α -作用であることがわかり, Sutherland の説は否定されたのである⁽¹⁶⁾。さらに脂肪分解反応も, HSL の磷酸化ではなく, 油滴と HSL の接触の促進であることは, これまで述べてきた通りである。なぜ, このようなことになったのであろうか。2つの原因が考えられる。

1つは, 細胞内の酵素反応は, 試験管内で測定される酵素の変化のみで解決できるという思い込みであり, 他の1つはセカンドメッセンジャー説を信じるあまり, グリコーゲンの分解や脂肪の分解という生理作用との関連付けを怠ったことである。ホルモンによって発現する生理作用の多くは, 細胞をすりつぶすことによって消失する。これは, 細胞破壊によって失われるものがホルモン作用に関わっていることを示している。細胞内に存在する構造が破壊され, pH やイオンなどの環境が失われるのである。油滴の界面が, ホモジナイズによって破壊され CA の作用が消失するのがその例である。また細胞質の pH は 6.8 前後であり, ヘキソキナーゼ, ホスホフルクトキナーゼなどの解糖系酵素の最適 pH は 7.5 前後のアルカリ性である。インスリンによって Na^+/H^+ チャネルが活性化され, 細胞質 pH がアルカリシフトすることで解糖系が促進されるなどといったホルモン作用は, 細胞をすりつぶし, 最適 pH で酵素を測ってはいは解明できないのである。

Buchner は, 細胞をすりつぶすことで酵素学の発展のきっかけを作るといふ偉大な功績を残したが, 反面, 細胞破壊によって失われたものを見過してはならないように思われる。

文献

- 1) R. W. Butcher, R. J. Ho, C. H. Meng & E. W. Sutherland : *J. Biol. Chem.*, **240**, 4515 (1965).
- 2) C. Holm, T. G. Kirchgessner, K. L. Svenson, G. Heinzmann, R. S. Sparks, T. Mohandas, A. J. Lusis, P. Belfrage & M. C. Schotz : *Science*, **241**, 1503 (1988).
- 3) S. J. Yeaman : *Biochim. Biophys. Acta*, **1052**, 128 (1990).

- 4) H. Okuda & S. Fujii : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 680 (1973).
- 5) H. Ninomiya, C. Morimoto, T. Tsujita & M. Sumida : *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **43**, 112 (1990).
- 6) T. Tsujita, J. M. Muderikwa & H. L. Brockman : *J. Biol. Chem.*, **264**, 8612 (1989).
- 7) C. Morimoto, T. Tsujita & H. Okuda : *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **44**, 126 (1990).
- 8) J. J. Egan, A. S. Greenberg, M.-K. Chang, S. A. Wek, M. A. Moos & C. Londos : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
- 9) H. Okuda, I. Yanagi & S. Fujii : *J. Biochem.*, **59**, 438 (1966).
- 10) L. S. Wise & R. L. Jungas : *J. Biol. Chem.*, **253**, 2624 (1978).
- 11) Y. Oschry & B. Shapiro : *Biochim. Biophys. Acta*, **618**, 293 (1980).
- 12) H. Okuda, C. Morimoto & T. Tsujita : *J. Lipid Res.*, **33**, 225 (1992).
- 13) H. Okuda, C. Morimoto & T. Tsujita : *Brain Res. Bull.*, **27**, 483 (1991).
- 14) Y. Miyoshi, K. Uchida, E. Takeda-Hara, K. Nagai & H. Okuda : *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **14**, 701 (1981).
- 15) H. Okuda, K. Sekiya & H. Nakamura : *Pharmacol. Res.*, **21**, 255 (1989).
- 16) N. J. Huton, F. T. Brumley, F. D. Assimakopoulos, S. C. Harper & J. H. Exton : *J. Biol. Chem.*, **251**, 5200 (1976).

お知らせ

第3回 The KAO International Lecture David A. Tirrell 教授 講演会

“The New Science of Genetically Engineered Materials
—Artificial Protein Synthesis—”

今回はマサチューセッツ大学の Tirrell 教授に遺伝子工学を応用した人工蛋白質の合成とその材料化学への応用に関する話を中心にしていただく予定です。本講演会は講演2時間, 討論1時間です。参加ご希望の方は下記まで Fax または封書にてお申し込み下さい(お名前, 所属部署名, 連絡先, 懇親会への出欠, 電話および Fax 番号を記入のこと)。

主 催 : 花王株式会社 基礎科学研究所
日 時 : 1993年2月16日(火) 14:00~17:30
会 場 : 花王株式会社 東京事業場内 ソフトリサーチセンター1階(JR 総武線 亀戸駅下車徒歩15分)
墨田区文花 2-1-3

参 加 費 : 無料。講演会後懇親会あり
申 込 先 : 花王基礎科学研究所 担当: 太田
〒321-34 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606
Fax. 0285-83-7305 Tel. 0285-83-7306