Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase の 肝糖脂質代謝に占める意義*

栗 生 進**

I. 緒 言

生体において糖脂質代謝の中心的役割を演ずる肝を主として観察対象とした。

一般に代謝を論ずる場合、動的にこれを把握する必要がある。中間代謝物質の量的推移のみからこれを論ずることはきわめて困難であつて、したがつて代謝 speed として眺めるためには必然的に酵素活性測定によらねばならない。このような立場に立ち著者はもつぱら酵素活性の変動値から肝糖代謝を眺めてみた。

代謝は糖・脂質・タンパク代謝が有機的な関連をもつて動く。したがつていずれの1つをも他から切り離して考えない。ことに前2者は1つの代謝として考察せねばならない。糖脂質代謝の緊密な関連の場合は代謝上いくつか求められるが、triglyceride (以下 TG) の基質である glycerol は3単糖に由来し、脂酸合成の1st step は acetyl CoA と acetyl CoA carboxylase [EC 6. 4. 1. 2] による maronyl CoA 生成に依存するとされている。また酵素がその活性を生体内で秩序正しく合目的に発揮するために必要な、ことに細胞の膜系においてタンパク合成、ATP 産生など生命に直接関係のある細胞活動の場を形成する phospholipid (以下 PL) もその基質の1つを3単糖に求めることができる。

* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in carbohydrate and lipid metabolism in liver.

要旨は第 62, 63, 64 回日本内科学会総会, 第 51, 52 回日本消化器病学会, および第 1 回日本肝臓学会西部会にて発表。

** S. Kuryu: 和歌山県立医科大学第1内科 (指導 溝口輝彦教授)

図 1. Ks pH 7.0

このように糖脂質代謝より眺めて生体にきわめて重要な3単糖の動きを観察する手段として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [EC 1. 2. 1. 12] (以下 GAPDH) を選んだ。

図1からもわかるように fructose-1,6-diphosphate (以下 FDP) が dihydroxyacetonephosphate (以下 DHAP) と glyceraldehyde-3-phosphate (以下 GAP) とに分けられてここに始めて3単糖ができる。できたこの2つの3単糖は triosephosphate isomerase [EC 5. 3. 1. 1] で相

互移行するが、その平衡常数が pH 7.0 において DHAP 側に 20 倍近くかたよっていることが知られている¹⁾。また、1-3-diphosphoglycerate より 3-phosphoglycerate へ phosphoglycerate kinase [EC 2. 7. 2. 3] により ATP 産生と couple するこの反応は平衡常数が pH 7.0 で 3.3×10^{-4} ときわめて小さく²⁾、Meyerhof 代謝系の1つの neck を形成している。したがって GAP より 1-3-diphosphoglycerate を触媒する GAPDH 活性の消長は Meyerhof 系代謝に影響を与えうると同時に、DHAP 量を左右する大きな因子になりうることは想像にかたくない。しか

も DHAP は TG あるいは PL の基質となりうる α -glycerophosphate (以下 α -GP) とは α -glycerophosphate dehydrogenase [EC 1. 1. 1. 8] (以下 GDH) を介してきわめて容易に相互移行する³⁾。本酵素による平衡常数は 1.4×10^4 ときわめて大きいからである。しかも DHAP より α -GP への移行が GAPDH ときわめて関係の深い今ひとつの理由として GAPDH によりできた NADH_2 がただちに利用されるということである。

このように考えるとき、TG の生合成あるいは PL の生合成と、糖代謝上に占める GAPDH と

図 2.

がいかに緊密に関連しているかが想像せられ、GAPDH の変動が糖・脂質代謝を関連づけて眺める上に1つの重要な point となり、したがって GAPDH 活性を左右する諸生体条件あるいは諸因子は糖質はもちろん脂質代謝にも大きな影響を及ぼすことが想像せられる。

また最近脂酸合成を regulate する大きな factor として acyl CoA carrier protein が問題になっているが^{4, 5)}、TG (あるいは di-or monoglyceride) に脂酸が ester 化されれば、acyl CoA の acetyl CoA carboxylase への negative feed back が減少し脂酸生合成が促進するものとの報告⁶⁾ もあり、また TG の生成には NEFA 量よりも α -GP 量が大きな役割をもつとする考え方^{7, 8)} から、GAPDH 活性の消長が脂酸 de novo synthesis を左右する1つの因子ともなりうるものが想像される。

著者は以上のような観点に立ち GAPDH 活性を中心に、さらに脂酸合成に必要な NADPH₂ の donor として意義をもつ glucose-6-phosphate dehydrogenase [EC 1. 1. 1. 49] (以下 G-6-PDH), NADP-isocitrate dehydrogenase [EC 1. 1. 1. 41] (以下 NADP-ICDH), NADH₂ の donor としても意義をもつ NAD-isocitrate dehydrogenase [EC 1. 1. 1. 42] (以下 NAD-ICDH), また GAPDH と NADH₂ を介して関連の深いとされている lactic dehydrogenase [EC 1. 1. 1. 27] (以下 LDH) などと関連せしめながら肝内糖脂質代謝を眺めた。

さらに3単糖は succinate などと同様、mitochondria (以下 Mt) の浮遊液にこれを添加すれば、その酸素消費が増大することが知られている⁹⁾。

すなわち3単糖は Mt 内でも代謝されることを意味している。事実、 α -glycerophosphate cycle の存在が Mt 内外を結ぶ electrone transport system として脚光をあげ始めている¹⁰⁻¹⁴⁾。すなわち3単糖 level での代謝を考える場合 Mt 内外の関連においてこれを眺める必要のあることは当然である。代謝を平面的に眺めて起こる種々の

誤りを解くためにも立体的な metabolic map が要求されねばならない(図2)。したがって本論文もその立場に立つて考察したことを附言する。

II. 基礎的実験

a) 硫安分画と酵素活性

1) 肝ならびに赤血球酵素液作成

肝: 10^{-3} M EDTA 加 0.05 M trisbuffer (pH 7.4) にて 10% 肝 homogenate を作り、おのおの硫安分画し、0.05 M trisbuffer (pH 7.4) に溶解して酵素液として実験に使用した。

また Mt 分画と Mt 外分画の分離には Schneider の方法に従い 0.25 M sucrose 液にて 10% 肝 homogenate を作り行ない、おのおの酵素液とした。なお Mt の膜破壊には 20% digitonin 溶液を使用した。

赤血球: 早朝空腹時に約 3 ml 採血し、heparin 溶液 0.1 ml 添加により凝固を阻止した。これを 5% glucose 液にて 3 回洗浄後、約 2 倍量の 10^{-3} M EDTA 加 0.05 M trisbuffer (pH 7.4) で溶血させ、肝と同様に硫安分画し、trisbuffer に溶解して酵素液とした。

以下の操作はすべて 0~4°C で行なった。

2) 酵素活性測定方法

GAPDH: W. S. Allison & N. O. Kaplan の方法¹⁵⁾ を modify して、基質である D-GAP を DL-GAP の diethylacetyl Barium 塩から Dowex-50 hydrogen form Resin を用い作り使用した。

従来の方法では本酵素を還元型にもどすために、*in vitro* で cysteine を用いている。したがって、真の意味の生体の本酵素活性を表わすとはいいたくない。かかる併害をのぞくために homogenate 作成に当り EDTA を用いて SH 基を保護した。また彼らの方法では基質として FDP に aldolase を作用させてできた triosephosphate (GAP と DHAP と同モル) を基質として使用している。彼らも指摘しているごとく、十分に純化されない粗酵素では両者互に移行して、また DHAP は medium 中の NADH₂ を消費し NADH₂ の増加による酵素活性測定を不可能にすることが考えられる。以上のような観点に立ち、著者は以下のような assay medium を使用した。

3.0×10^{-3} M pyrophosphate	0.6 ml
1.0×10^{-3} M NAD	0.6 ml
2.5×10^{-3} M D-GAP	0.5 ml
enzyme solution	0.7 ml

3.0×10^{-6} M arsenate 0.6 ml

final pH 8.5

G-6-PDH, NADP-or NAD-ICDH: C. A. Villee & D. D. Hagerman の方法¹⁰⁾を modify して行なった。

Assay medium は

0.05 M trisbuffer 1.8 ml

10 μ M Mg⁺⁺ 0.4 ml

1.5 μ M NAD or NADP 0.4 ml

6 μ M isocitrate or 3 μ M G-6-P 0.4 ml

enzyme solution 0.1 ml

final pH 7.4

(ただし NAD-ICDH の pH は 6.4)

LDH: Wróblewski 法¹¹⁾に準じて行なった。

3) 酵素活性単位

G-6-PDH, NAD or NADP-ICDH および GAPDH は $m\mu$ M NADH₂ or NADPH₂/min/mg protein or g Hb 25°C.

LDH は Wróblewski 単位/mg protein or g Hb 25°C で表した。なおタンパク量は biuret 反応, 血色素量は sahli 法より求めた。

4) 各硫安分画における酵素活性

Rat liver では GAPDH は 70~90% 硫安分画に G-6-PDH および NAD-ICDH は 30~50% 分画に NADP-ICDH と LDH はおのおの 50~70% 分画に最強の酵素活性を有することがわかる(図3)。なお NADP-

ICDH を Mt と Mt 外に分けてみても, 同様の傾向があり, Mt 内においても Mt 外でも本酵素には isozyme の存在の可能性を示している。

さらに NADP-ICDH の硫安分画別酵素活性変動を rabbit を用いて CCl₄ 肝障害 (20% CCl₄ オリーブ溶液 0.5 ml を 2 日間 2 回に分け背部筋注 20 時間後), alcohol 脂肝 (50% ethanol 12 ml/kg をゾンデで胃内に注入 12~20 時間目), alloxan 投与 (200 mg/kg 静注, 約 1 週間目で尿糖陽性のもの), HMD (synthetic anabolic steroid, 2-hydroxymethylene-17 α -methyl-dihydro-testosterone) 投与 (I: 2 mg/day 10 日目, II: 10 mg/day 90 日目), TATD (thiamine-3-(methyl-6-acetyl dihydrothiotate)-disulfid) (70 mg 静注 40 分後), で比較してみると CCl₄, alcohol, alloxan 投与時には 0~10%, 40~50% 硫安分画の本酵素活性はほぼ同様の活性低下を示すが HMD 大量長期投与による両者の活性変動を比較すると 0~10% 分画の活性低下がみられ, 40~50% 分画のそれはほとんど動いていない。それに反し TATD 投与時には 0~10% 分画のものは変化せず 40~50% 分画のものが著明に活性低下を示している。

これと類似のことが G-6-PDH にもみられ, 0~10% 分画のものは alcohol 投与で増強するのに反し 40~50% 分画のものは著明に減少した。また alloxan 投与時についても差異がみられ, 0~10% 分画のものは不変, 40~50% 分画の活性は著明に減少した (表1)。

図3. Enzyme activities of rat liver [fractionated with (NH₄)₂SO₄ saturation]

表 1. Enzyme activities of rabbit liver [fractionated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation]

Enzyme (NH_4) ₂ SO ₄ Saturation	ICDH				G-6-PDH			
	0~10%		40~50%		0~10%		40~50%	
	mμM NADH ₂	mμM NADPH ₂	mμM NADH ₂	mμM NADPH ₂	mμM NADH ₂	mμM NADPH ₂	mμM NADH ₂	mμM NADPH ₂
Control (1)	4	830	20	160	0	42	0	210
CCl ₄ (2)	12.5	354.5	37.5	78.5	0	52.5	0	247.5
Alcohol (1)	8	117	2.5	32	0	86	0	64
Alloxan (1)	5	253	4	49	0	43	0	83
TATD (2)	2	792.5	6	130.5	0	10	0	70
HMDI (1)	2	214	0	50	0	25	0	136
HMDI (2)	2	312	15	150	0	30	0	150

(): Number of animals

このように生体諸条件下で2つの硫安分画の酵素活性が相異なる動きを示すことも isozyme の存在の可能性を示唆し、生体代謝機構の複雑さを示している。したがって、ある1つの酵素活性がかかる条件下でかく変動したと断定する場合にもきわめて慎重でなければならない。

なお、各硫安分画における酵素活性を比較すると rat liver と同様の傾向が rabbit liver, human liver にも認められた。

Human erythrocyte では、G-6-PDH および LDH は liver と同様に 30~50%、50~70% 分画に最強の酵素活性を有するが GAPDH は 0~30% 分画に強い活性を示す(図4)。

図 4. Enzyme activities of human erythrocyte [fractionated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation]

b) 細胞内酵素活性分布

GAPDH は Mt 外に活性が強いが Mt 内にも認めら

れる。NADP-ICDH も Mt 外のほうが Mt 内に比し強い活性を示す。しかも G-6-PDH に比べきわめて活性の強いことから考えても NADP-ICDH が Mt 外で脂酸合成に必要な NADPH₂ の donor として意味をもつように思われる。NAD-ICDH は Mt のみに、G-6-PDH は Mt 外の方に、また LDH はほとんどが Mt 外に活性を認めた(図5)。

図 5. Enzyme activities of mitochondrial & extra-mitochondrial fraction from rat liver

e) GAPDH の作用機構

GAPDH 活性への substrate effect をみる目的で以下の生理的濃度に近い 2~3 物質を活性測定 medium に添加して活性変動を観察した。すなわち、添加 glucose 60 mg/dl, glucose-6-phosphate (以下 G-6-P), fructose-6-phosphate (以下 F-6-P), FDP はそれぞれ 50

mg/dl, inorganic P (以下 iP) は 5 mg/dl, isocitrate, acetone, pyruvate はおのおの 6.7 mg/dl である。なお同様の実験を ADP, ATP それぞれ 1 mM, parameruric benzoate (以下 PCMB) 1 g/dl 添加についても行なった。

GAPDH 活性は添加 glucose, G-6-P, F-6-P, FDP では変化はみられないが, isocitrate, acetone, iP ではわずかに, pyruvate は明らかな活性低下作用を示した。ADP, ATP は Mt 内の本酵素活性を特異的に低下させた。また PCMB は完全に本酵素活性を消失せしめた(図 6)。

現在本酵素の活性の部分は以下のごとく酵素タンパクのもつ SH 基と NAD によるとされている^{19, 20)}。

- 1) $2R-CHO + (HS)_2-E-(NAD^+)_2 \rightleftharpoons (R-CHOHS)_2-E-(NAD^+)_2$
- 2) $(R-CHOHS)_2-E-(NADH)_2 + 2NAD^+ \rightleftharpoons (R-COS)_2-E-(NADH)_2 + 2H^+$
- 3) $(R-COS)_2-E-(NADH)_2 + 2NAD^+ \rightleftharpoons (R-COS)_2-E-(NAD^+)_2 + 2NADH$
- 4) $(R-COS)_2-E-(NAD^+)_2 + 2HR' \rightleftharpoons 2R-COR' + (HS)_2-E-(NAD^+)_2$

また GAPDH の分子量は 140000 で 1 分子の酵素に 14~15 の SH 基があるという^{19, 20)}。

PCMB による本酵素活性の消失は活性部分である SH 基に Hg イオンが結合したためと思われる。

R. E. Amelunxen ら²¹⁾は *in vitro* の実験で、添加した $NADH_2$ が本酵素の 50% の SH 基を失わしめるが、そのさい aerobic な condition で本酵素を $NADH_2$ と incubate すると O_2 の uptake と H_2O_2 の形成がみられ失活するが、これに catalase を入れておくと失活を防ぐことができるという。また N_2 ガス下で incubate しても失活しないし、SH 基に変化がみられなかつた実験事実から H_2O_2 生成が本酵素活性を左右する 1 つの因子だとしている。しかし生体には、ことに肝では catalase 活性はきわめて強く、ただちに *in vivo* での本酵素活性変動を H_2O_2 に結びつけることは当をえないと考えられる。それに反し著者の実験で添加 pyruvate がよく本酵素活性を低下せしめた事実は、あるいは生体に産生せられた中間代謝物質による negative feed back 機構を考えさせられる。ことに最近 allosteric enzyme なる概念が導入せられ^{22, 23)}、allosteric site に allosteric effector としての pyruvate が結合して本酵素活性を変化せしめたと考えればきわめて好都合である。

後述するように、alcohol 脂肝では脂酸の生合成の増加、TG 生成の増加が証明せられているが^{24, 25)}、そのさい本酵素活性が明らかに低下することを知つた。しかも

図 6. Liver GAPDH activities influenced by several factors *in vitro*

alcohol 投与により肝内 pyruvate 量が増加し、それによる GAPDH 活性の低下、それに伴う DHAP ひいては α -GP の増加、したがって TG の増加をきたし脂酸 de novo synthesis も増強すると考えればこれもきわめて合目的である。

また投与 alcohol が NADH_2 を介して $\text{GAP} \rightleftharpoons 1,3$ diphosphoglycerate, また $\text{DHA} \rightleftharpoons \alpha\text{-GP}$ の反応様式を成立させる可能性も考えられる。したがって両者相俟つて alcohol 投与時の TG 生成増加が起こるのであろう (図 7)。

図 7. Metabolism of ethylalcohol and triglyceride formation in liver

次に本酵素は磷酸の ester 化酵素であり、次の段階の phosphoglycerate kinase をも含めて ATP 産生に関与する。したがって iP で活性化され、ATP で活性の抑制されることが想像されるが、本実験条件下で iP による活性化はみられず、ただ ADP, ATP いずれも活性を抑制した。しかもこれら活性の抑制は Mt 内本酵素活性にみられ、Mt 外の酵素が影響を受けなかつたことは Mt 内での ATP 産生と関連して興味ある事実と考えられる。すなわち Mt 外では本酵素は 3 単糖の保持に換言すれば、TG 生成と脂酸 de novo synthesis に意義をもち、Mt 内のそれは energy 代謝に意義をもつとも考えられる。

d) 小 括

1) 硫安分画によりえられた粗酵素分画を利用してその活性分布ならびに変動様式の差異より、肝には NADP-ICDH および G-6-PDH の isozyme の存在する可能性についてのべ、さらに GAPDH, NADP-ICDH, G-6-PDH の細胞内局在性およびその活性の強さから、こ

れら酵素の代謝上占める意義について考察を加えた。

2) GAPDH の作用機序 および regulator について観察し、本酵素の代謝上に占める意義についても考案した。

III. Hormone と肝酵素活性

糖・脂質代謝を control する因子として中間代謝物質相互間にみられる制御機構の他に神経性また体液性、ごとき hormone による調節が重要である。Hormone による代謝調節には次の場合が考えられる。すなわち

- 1) Hormone 自身が直接酵素タンパクに作用し、その活性に変化を与える場合
- 2) DNA また RNA level で作用し酵素タンパク合成に変化を与える場合
- 3) Hormone のもつ活性基または原子団が細胞の膜系あるいは細胞構成成分の活性部分に影響を与える場合

などである。

しかし、個々の hormone についてその作用機作は必ずしも解明されていない。ことに肝における糖・脂質代謝に hormone がどのような作用を及ぼしているのかはいまだ不明な点が多い。そこで糖・脂質に関連の深い hormone として insulin, glucocorticoid, ACTH をえらび、その replacement 実験より肝内での糖・脂質代謝に及ぼす hormone 作用を肝酵素活性面より検討した。

前述のごとく、酵素活性は Mt と Mt 外の細胞分画にわたった場合と硫安分画に分けた場合について測定した。

A) 実験方法

実験動物: wistar 系雄性 rat 150~200 g を使用し食餌はオリエンタル固形食を自由摂取せしめた。

実験条件: subtotal pancreatectomy (以下 Pan X) (Houssay の方法による。約 1 週間目), insulin 投与 (0.1 単位/100 g 背部筋注 20 分後), hypophysectomy (以下 Hypo X) (田中氏外耳道法による。約 1 週間目), Adrenalectomy (以下 Adre X) (約 1 週間目), それら処置 rat に対する hormone の replacement 実験は Hypo X rat に対し ACTH-Z 5 単位 3 日間, Adre X rat に対し hydrocortisone 5 mg 分 2 朝夕 3 日間筋注によつた。なお thyroxine は 30 γ 5 日間筋注, また testosterone は testosterone propionate 5 mg/100 g 3 日間筋注した。また硫安分画による場合は hydrocortisone 5 mg 1 回筋注のみで実験した。いずれも実験前

24 時間絶食とした。

B) 結果ならびに考察

1) Hormone と GAPDH (表 2-a, 図 8-左)。

a) Insulin : Pan X は Mt 外の本酵素活性を増強し, Mt の本酵素活性を低下せしめた。insulin の投与はちょうどその逆で Mt 外の本酵素活性を低下させ, Mt のそれを増強した。

前述したように Mt 内での本酵素活性は energy 代謝との関連が深く, Mt 外の本酵素活性は 3 単糖 level の調節, すなわち糖・脂質代謝の関連点としての意義をもつものと思われる。このような立場からすれば insulin は Mt 外の細胞分画で GAP ひいては α -GP を増加せしめ, TG の生成増加とそれによる脂酸合成を促進せしめるものと思われる。一方 Mt 内では本酵素活性の増強により ATP 産生を増加せしめるものと解される。

b) Glucocorticoid と GAPD 活性 : Adre X は Mt

外の本酵素活性を増加せしめる傾向にはあるが, 有意差はとりがたい。Mt の本酵素活性にはほとんど変化がない。これに glucocorticoid を replace する Mt と外の本酵素活性は増加し Mt のそれは低下したが, glucocorticoid による本酵素活性変動の意義はこの実験の範囲ではなお不明である。ACTH の replacement 実験でも ACTH の replacement により Mt 外で本酵素活性の増強したことは glucocorticoid の作用に類似する。

c) Thyroxine : Thyroxine の投与は Mt 内外両者の増加せしめた。

Thyroxine が 3 単糖 level の代謝に大きな影響をもっていることは, Va-Pin Lee ら²⁰⁾の実験からも想像せられるところである。すなわち hyperthyroidism では GDH 活性が増強し, いわゆる glycerophosphate cycle が刺激せられ, この糸を通じて electrone の Mt 外から Mt 内への転送が亢進する。しかもそのさい, 末梢血中にも

表 2.

a. Influences of several hormones on rat liver enzyme activities

	G-6-PDH	GAPDH		LDH		NAD-ICDH	NADP-ICDH	
	Extramt.	Mt	Extramt.	Mt	Extramt.	Mt	Mt	Extramt.
Control (24)	136± 9	129± 8	238± 23	22± 3	100± 6	51± 3	1,620± 55	2,740± 112
Hypophysectomy (9)	112± 12	110± 14	245± 55	155± 4	91± 23	140± 41	1,810± 507	2,490± 422
Adrenalectomy (4)	114± 14	95± 34	379± 95	17± 3	116± 18	77± 20	1,260± 120	2,550± 321
Pancreatectomy (5)	219± 49	64± 15	483± 66	15± 4	170± 43	33± 7	980± 177	2,560± 196
Hypo X+ACTH (4)	81± 24	122± 33	456± 138	23± 5	85± 30	53± 3	1,700± 281	2,520± 323
Adre X+glucocorticoid(4)	92± 12	81± 10	572± 95	22± 2	182± 18	46± 15	1,150± 506	2,790± 457
Cont.+insulin (5)	104± 12	280± 64	126± 36	14± 4	62± 12	68± 11	3,210± 805	3,380± 1,293
Cont.+thyroxine (4)	187± 29	186± 51	357± 91	28± 8	175± 24	146± 65	1,500± 92	2,460± 275

() : Number of animals, ± : Standard deviation

b. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation

	G-6-DH 30~50%	GAPDH 70~90%	LDH 50~70%	NAD-ICDH 30~50%	NADP-ICDH 50~70%
Control (7)	269± 22	986± 53	143± 19	106± 9	1,109± 180
Hypophysectomy (6)	113± 23	972± 68	127± 15	199± 27	1,123± 89
Adrenalectomy (5)	142± 24	937± 135	132± 9	239± 10	1,145± 53
Cont.+glucocorticoid (6)	270± 13	1,023± 63	206± 27	151± 13	902± 167
Hypo X+gluco. (5)	138± 22	624± 151	162± 12	240± 21	1,046± 108
Adre X+gluco. (2)	213	894	172	132	935
Hypo X+testosterone (1)	155	537	55	103	830
Adre X+testosterone (1)	149	345	65	78	840

() : Number of animals, ± : Standard deviation

図 8.

GDH 活性が増加し、この酵素は他の hormone の影響をほとんど受けないので、臨床上 hyperthyroidism の診

断にも役立つという²⁷⁾。thyroxine による G-6-PDH, NAD-ICDH 活性の上昇の他著者の実験結果を総合すると、以下のごとく Meyerhof 系の亢進もさることながら 3 単糖が直接 energy 代謝に関与するものと思われる (図 9)。

d) GAPDH と LDH : GAPDH は NAD を介して LDH, GDH と下図のごとく couple している。

図 9. Effects of thyroxine on carbohydrate metabolism in liver

したがって GAPDH, LDH, GDH 3 者は互いにその活性に影響し合うことが多いと推定せられる。このような意味で Mt 外 GAPDH と LDH 活性を比較してみると図 8 より分るようにきわめてよく似た変動を示すことが分る。すなわち LDH は 3 単糖 level の代謝に GAPDH を介して関与することを示している。

2) G-6-PDH, NADP-ICDH と hormone (表 2-a, 図 10)

NADP-ICDH および G-6-PDH は Mt 外で脂酸合成に必要な NADPH₂ の供与源として重要である。ことに後者に関しては古くより脂酸あるいは cholesterol 合成に必須な酵素として注目されている。すなわち hexo-

図 10.

semonophosphate (HMP) shunt pathway を経、さらに F-6-P より G-6-P に逆行し、再び HMP shunt を経由する 1 つの cycle を形成し、そのさい NADPH₂ が産生せられるという。事実副腎では steroid 合成が促進している時期に一致して副腎で本酵素活性の増強がみられ²⁸⁾、また肝で脂酸合成の亢進時には本酵素活性が増加するとされている²⁹⁾。しかし、最近 G-6-PDH は hormone によるよりはむしろ基質である G-6-P が活性を左右するとの報告³⁰⁾、あるいは本酵素活性と脂酸との関連を重視した文献³¹⁾にも接する。これらの新しい知見は G-6-PDH が必ずしも生体に欠くことのできない唯一の NADPH₂ 供与源であるか疑問がもたれる。

著者の実験では NADP-ICDH は G-6-PDH の約 20 倍にも及び、NADPH₂ 産生に重要な役割をもっていることがわかる。しかも hormone による影響をほとんど受けていない。最近、脂酸の合成に関しては acetyl CoA carboxylase およびその前段階で acetyl CoA を供与する citrate lyase [EC 4. 1. 3. 6] が注目され、それら酵素活性変動が脂酸合成を左右するものと考えられ始めている³²⁻³⁴⁾。すなわち Mt 外の NADPH₂ 量は肝障害のないかぎり、脂酸合成とは十分な量が hormone 作用とは無関係に保持されているものと思われる。しかし、一方、Mt 内 NADP-ICDH は hormone の作用

を受け Pan X は活性を低下させ、insulin の投与は活性を増強させた。Adre X も幾分活性を低下させ、glucocorticoid の replacement は活性を回復せしめている。Mt 内には transhydrogenase [EC 1. 6. 1. 1] があり³⁵⁾、生成せられた NADPH₂ の electron は NAD にそして cytochrome 系に移される。したがって Mt 内での本酵素活性は energy 代謝との関連が深いと思われる。一方 Mt 内でなされる脂酸の elongation に必要な NADPH₂ の供与源ともなりうるのであろう。すなわち insulin は TCA cycle の main pathway にあたる本酵素活性を増強し、energy 産生を高めさらに脂酸生合成にも深い関係をもつと解される。

さらに hormone による G-6-PDH 活性の変動をみると、Hypo X および Adre X で軽度活性低下し、その overdosis の replacement で活性低下が増強する。insulin 投与では活性はほとんど変わらないが、Pan X で活性上昇し、後述するように alloxan 糖尿では逆に活性低下をみた。このように G-6-PDH と hormone との関係はきわめて複雑で本実験範囲内ではその作用機作の本態は不明である。

3) hormone と NAD-ICDH (表 2-a, 図 11)

肝 NAD-ICDH のもつ意義に関してはいまだ不明な点が多い。本酵素は Mt 内に局在し、しかも isocitrate

図 11.

より α -ketoglutarate への移行を触媒し、逆反応には関与しないことから TCA cycle の rate limiting step と考えられていた。しかしその活性はきわめて低く、なお意義は不明といわねばならない。hormone による酵素活性変動は図のごとく、Pan X でやや低下、insulin は活性を幾分増強せしめる。また、Hypo X あるいは Adre X で活性増加し、ACTH あるいは glucocorticoid の replacement は異常増加した活性を正常化している。thyroxine は本酵素活性を増強させた。

この NAD-ICDH は ATP により活性低下し、ADP は活性を増加せしめることが知られており、Mt での ATP と ADP の量的関係が本酵素活性を左右する 1 つの因子と考えられている³⁰⁾。また NADH₂ も本酵素活性を低下せしめる³¹⁾。このような考え方からすれば、glucocorticoid は代謝ごとに electrone の transport と ATP 産生との coupling に影響をもつことを示唆している。すなわち glucocorticoid の不足時には electrone の transport は正常あるいは異常に亢進しても、ATP 産生に結びつきにくいのではないかと想像される。

表 2-b からわかるように硫酸分画した場合の酵素活性でみると、Hypo X に glucocorticoid を与えてみても活性の正常化がみられない。しかるに Hypo X に ACTH を replace すると活性が正常化されることから、ACTH は glucocorticoid よりも couple を正常化させ

るのに必要ではないかとも考えられる。

以上のように本酵素の代謝上も意義は不明であるが、後述するように、TCA cycle の by path としての意味もあるのではないかと考えており、従来いわれていた rate limiting enzyme とは考えがたい点が多い。

4) Testosterone と肝酵素活性 (表 1, 表 2-b)

Testosterone の投与は測定酵素活性を一過性にせよすべて低下せしめた。Testosterone の誘導体が anabolic steroid として、臨床一般に使用せられ、その可否が論ぜられているが、少なくとも本実験からは積極的な代謝亢進はみられず、むしろ代謝の slow down が NPN の低下をきたすのではないかとさえ考えられる。

事実糖尿病に anabolic steroid を使用して、耐糖能の低下がみられ³²⁾、さらに動物実験で脂肪肝の生成も報告されている。また、赤血球糖代謝より眺めた当教室御前³³⁾の実験は、本剤投与中一過性に糖代謝が悪化すると報告しているし、また同教室山本³⁴⁾は acetyl 化能の低下することを認め、この際脂酸が energy 源として多く利用せられることを実験的に証明している。

5) 小 括

以上、2~3 の hormone と肝酵素活性変動を観察した結果、insulin は energy 代謝および 3 単糖 level の代謝に関与して、脂酸・TG の生合成を、また glucocorticoid は energy 代謝を正常化することにより生合成を促進するものと考えられる。一方、testosterone による代謝変動はその slow down にあり、thyroxine は代謝回転の亢進によると考えた。

IV. 実験的肝障害と肝酵素活性

肝実質障害が前景に立ち、それに伴う肝酵素活性変動と、肝の代謝の乱れが前面に立ち、それに伴って起こる肝実質障害時の肝酵素活性変動を比較する目的で、前者を観察する手段として急性四塩化炭素肝障害 (以下 CCl₄ 肝障害)、後者を観察する手段として急性アルコール肝障害 (以下 alcohol 脂肪肝) を、また両者の合併した場合をみる目的で alloxan 糖尿を作成して、肝酵素活性を測定した。

なお substrate induction を合わせて観察する目的で glucose 負荷時の肝酵素活性をも測定した。

実験動物: 3 の場合と同様である。

実験条件: CCl₄ 肝障害 (20% CCl₄ オリーブ油溶液 0.2 ml を背部に筋注. 20 時間後), alcohol 脂肪肝 (50% ethanol 12 ml/kg 経口的に投与, 12~20 時間後),

alloxan 糖尿 (alloxan 180 mg/kg 腹腔内投与約 10 日目で尿糖陽性のもの), glucose 負荷 (glucose 1 g/kg 経口的投与 2 時間目).

A) 結果ならびに考案 (表 3)

1) CCl_4 肝障害

CCl_4 肝障害時には Mt 内外 GAPDH 活性が増強し G-6-PDH 活性も著明な活性増強がみられ, Mt の NAD-ICDH も活性増強傾向を示した, しかし Mt 外で NADPH_2 産生の場と考えられる NADP-ICDH 活性は低下した (表 3, 図 12, 13).

CCl_4 肝障害時, 代謝の main pathway の活性が低下することはよく知られている⁴⁰⁾. このような場合, HMP shunt pathway の代謝が亢進し, 代謝障害を代償しようとする生体の homeostasis の 1 つの現われとも解され

る. 一方 CCl_4 肝障害時にはまず Mt 外が障害せられ, 次いで Mt にも変化が及ぶといわれている⁴⁰⁾. Mt 内局在の NAD-ICDH 活性の増強は, すでに Mt 内で起こっている electrone transport と ATP 産生との couple の不十分さを反映したものと考えられ, 一方 Mt 内に起こる GAPDH 活性の増強も ATP 産生の主機構の低下を補う代償とも解される.

2) Alcohol 脂肝 (表 3, 図 12, 13)

急性アルコール肝障害時には明らかな脂肪肝がみられる. 一般に脂肝生成の原因を大別すれば, ①肝内 TG の生成増加, ② TG の肝外転送機構の障害, ③肝での脂酸の酸化抑制, ④肝外よりの脂酸の肝転入増加, などが考えられている. alcohol 脂肝の場合には, 肝での脂酸 de novo synthesis の増加, TG 生成の増加が証明せら

表 3. Rat liver enzyme activities when glucose was administered and when injured by CCl_4 , alcohol or alloxan

	G-6-PDH	GAPDH		LDH		NAD-ICDH	NADP-ICDH	
	Extramt.	Mt	Extramt.	Mt	Extramt.	Mt	Mt	Extramt.
Control (24)	136±9	129±8	238±23	22±3	100±6	51±3	1620±55	2740±112
Alcohol (6)	67±14	42±9	65±55	11±4	62±19	138±40	1180±261	1470±448
CCl_4 (6)	393±75	204±42	350±52	18±3	57±14	94±37	1370±451	1110±362
Alloxan (5)	67±16	87±18	630±229	13±3	284±153	37±7	1290±251	2630±141
glucose (5)	111±17	107±42	423±77	15±5	231±46	50±1	1630±370	2990±210

(): Number of animals. $\pm$: Standard deviation

斜線部分: Mt の酵素活性
点々部分: Mt 外の酵素活性

図 12.

斜線部分: Mt の酵素活性
点々部分: Mt 外の酵素活性

図 13.

れているが^{24, 25)}, その mechanism に関しては不明な点が多い。

脂酸 de novo synthesis を左右する因子が NADPH₂ にあるならば, G-6-PDH および NADP-ICDH 活性の低下する alcohol 脂肝の脂酸生成の増加を説明することができない。

最近 K. G. Hibbitt²⁶⁾ は脂酸の de novo synthesis を左右するのは acyl CoA であり, acyl CoA の acetyl CoA carboxylase への negative feed back が脂酸生成を regulate するのだという。したがって, acyl CoA が α -GP と結合して TG を形成すれば acyl CoA の acetyl CoA carboxylase への negative feed back 機構が減じ, 脂酸生成は促進するが, そのさい acyl CoA と α -GP との結合を容易にするのに protein を必要とする。その protein は microsome でもよければ, casein でもよいという。また最近 acyl CoA carrier protein ができた acyl CoA の転送にひいては脂酸生成を左右する主要な物質として脚光をあび始めている²⁷⁾。

いずれにせよ脂酸 de novo synthesis によりできた脂酸を TG に ester 化する基質である α -GP 量が問題になる。

E. A. Nliikkila ら²⁸⁾ は TG を生成するためには α -GP が NEFA の約 3 倍量必要とし, したがって TG を生成する 1 つの regulator になるには α -GP 量であ

るとしている。

Alcohol 脂肝のさいにみられた GAPDH 活性の低下は 3 単糖 level の停滞, したがって α -GP の肝内増加をきたし, TG 生成を容易にし, したがって acyl CoA の acetyl CoA carboxylase への negative feed back を減じ, 脂酸生成をも促進したものと考えられる。

肝内にできた TG の肝外への転送機転に関してはいまだ不明ではあるが, lipoprotein 生成低下, あるいは膜系を構成する PL の生成低下など²⁹⁾が推定せられ, ことに後者が再検討されようとしている。

α -GP, phosphatidic acid, diglyceride を経て, PL 生成に関与すると一般に考えられていた。しかし, 最近 G. L. Scherphof ら³⁰⁾ は [¹⁴C] palmitic acid と L-[³H] glycerol-3-phosphate を同時に用いた実験から生体のことに肝の lecithin は lysolecithine から合成せられ, α -GP は TG を生成するのが主経路と考えざるをえないとのべている。すなわち alcohol 投与により増加した α -GP はもつぱら, TG を生成し, PL の基質にはなりにくいことを意味している。したがって, alcohol 脂肝のさいには肝内 TG 生成の増加が TG 肝外転送能を上廻つた結果とも考えられる。

3) Alloxan 糖尿 (表 3, 図 12, 13)

Alloxan 投与時の GAPDH 肝活性は, Pan X の場合に類似し, Mt 外の活性増強, Mt 内では逆に低下し

た。しかし G-6-PDH のみは Pan X とは異なり活性が低下した。その mechanism については前述したように不明である。

4) Glucose 負荷 (表 3, 図 12, 13)

Mt 外 GAPDH 活性および LDH 活性の増強傾向の他は有意差は認められない。GAPDH 活性の増強は、体の適応機構の 1 つの現われとも思われる。しかし、そのさいの mechanism に関してはいまだ不明である。既述のごとく、glucose, G-6-P, F-6-P, FDP などそれら自身による substrate level での feed back によるものでないことはすでに証明した。ただしこのさい前述のごとく、pyruvate の増加が問題とはなるが、生体では pyruvate による negative feed back が行なわれているという証明はなされていない。

5) 小 括

肝障害時の肝酵素活性変動を通覧すると main pathway の代謝障害を by path が補うことがうかがわれ、この代謝機構に hormonal な、ことに insulin の関与が重要であろうと考えている。

V. ヒト肝・赤血球酵素活性変動

糖・脂質代謝に関連づける GAPDH を中心に 2~3 酵素活性面より、その意義について動物実験よりその重要性を強調してきた。しかし GAPDH 活性が臨床上実際に測定せられ診断、治療、予後の判定に利用せられた文献にまだ接していない。

教室野本ら⁴³⁾は人成熟赤血球の糖代謝活性を測定し、原因のいかんにかかわらず脂肝を有する患者赤血球の糖代謝が特異的に低下していることを発見し、その代謝障害部位が 3 単糖 level にあることを推定した。

このように赤血球糖代謝は生体のそれを反映する可能性がある。肝と赤血球の GAPDH 活性を比較すると、alcohol 脂肝 rabbit の肝と赤血球でよく似た変動を示し、他の実験条件でもほぼ類似の動きをすることがわかる (図 14) (ethanol, TATD は表 1 の実験条件と同一、2,4-dinitrophenol (DNP) は 40 mg/kg 腹腔内投与 4 時間後)。

このような観点から諸種代謝疾患時の赤血球酵素活性変動を観察し、また少数例ではあるがヒト肝切片より 2~3 酵素活性を測定し臨床像と対比した。

A) 結果ならびに考察

1) ヒト肝酵素活性と臨床 (表 4)

Alcohol 脂肝患者肝 GAPDH 活性は低下していた。

図 14. Effect of ethanol, TATD or DNP on rabbit liver and erythrocyte GAPDH activities

essential hypercholesteremia with triglyceridemia 患者 GAPDH 活性は低下し、G-6-PDH 活性は上昇した。hyperthyroidism を疑わせる lipodystrophy 患者肝酵素活性はすべて増強していた。いまだ例数が少なく今後に期待せねばならぬが、少なくともも検査しえた症例は比較的よく動物実験のそれと一致している。

2) 諸種代謝疾患時赤血球酵素活性変動 (表 4)

Alcohol 脂肝患者赤血球の GAPDH 活性は軽度低下し、G-6-PDH, LDH 活性の軽度増加傾向を認める。acute hepatitis, hyperthyroidism ではすべて酵素活性が上昇傾向にある。また糖尿病患者赤血球酵素活性と健康人との間に差異はみられなかつた。HMD 投与時 (30 mg/day 10 日間) には一過性にせよ測定全酵素活性の低下がみられた。

3) 小 括

以上より、赤血球の酵素活性変動が生体のことに、肝のそれを幾分かでも反映し得ることを知った。

臨床上、材料としてしやすい赤血球の酵素活性を測定することにより肝あるいは生体のそれを推定できれば一種の chemical biopsy としての意味をもち、今後臨床検査として用いられる可能性もあると考えられる。

VI. 総括ならびに結語

3 単糖が糖・脂質代謝を結ぶ重要な物質である

表 4. Enzyme activities in human liver and erythrocyte

a. Liver

(NH ₄) ₂ SO ₄ saturation	G-6-PDH 30~50%	GAPDH 70~90%	LDH 50~70%	NAD-ICDH 30~50%	NADP-ICDH 50~70%
Control (3)	46±8	740±134	345	27±8	520±99
Alcoholic fatty liver (1)	75	84		27	714
Lipodystrophy with hyperthyroidism (1)	162	495	1,030	86	1,344
Essential hypercholesteremia (1)	240	66	393	120	969

(): Operation cases

b. Erythrocyte

(NH ₄) ₂ SO ₄ saturation	G-6-PDH 30~50%	GAPDH 70~30%	LDH 50~70%
Control (7)	18±2	40±5	186±18
Potator (5)	21±5	34±3	214±41
Diabetes mellitus (7)	17±4	40±10	211±35
Hyperthyroidism (7)	25±2	45±8	240±14
Acute hepatitis (5)	24±2	53±8	228±17
HMD treat (7)	10±3	22±6	124±20

(): Number of cases, ± : Standard deviation

ことから、その動きの一端を代謝速度として把握する一手段として肝 GAPDH 活性を中心に、他 2~3 酵素活性面より検討した。

1) 同一肝内においても NADP-ICDH, G-6-PDH 活性が isozyme と思われる 2 つの硫酸分画で相異なる変動を示し、ことに GAPDH は Mt と Mt 外とで insulin に対しまつたく相反する活性変動を示し、また glucose 投与時には活性増強のみられたのは Mt 外のみであつたことは細胞 level で生体反応を再検討する必要があることを示している。さらに NADP-ICDH も Mt のものは insulin により活性化せられるのに、Mt 外のもは hormone の影響をほとんど受けないことを知つた。

2) Mt 内外の GAPDH 活性変動より、Mt 外のそれは TG の生成に、また Mt 内のそれは energy 代謝に関連を有するものと考えられる。

3) また一方 GAPDH は少なくとも *in vitro* では pyruvate を allosteric effector とする allosteric enzyme 様の性質を有することを知つた。

4) GAPDH および他 2~3 酵素活性変動から推測して insulin は 3 単糖 level および energy 代謝を介して脂酸, TG の肝内合成を促進し, glucocorticoid は Mt で ATP 産生と electrone transport との coupling を正常化せしめ energy 代謝を介して脂酸 de novo synthesis に関与するものと推定しうる。

5) 一方 alcohol 脂肝のさいの TG, 脂酸生成の増加は 3 単糖 level での停滞, それによる TG 生成の増加が主因と考えられる。それに反し, CCl₄ 肝障害では by path と考えられる諸酵素活性の増強がみられ, alcohol あるいは alloxan による肝障害時とは明らかな差異を示した。

6) 临床上, ヒト赤血球の GAPDH 活性変動も幾分かは肝あるいは生体のそれを反映しうることを知り, 今後臨床検査としても有要なものと思われる。ヒト肝での本酵素活性も例数は少ないが動物実験でえられた結果とほぼ同様の傾向を示した。

以上肝 GAPDH 活性を中心に実験的ならびに

稿を終るに臨み、ご指導、ご校閲を賜わった溝口輝彦教授に深謝するとともに、終始ご鞭撻、ご助力いただいた野本拓講師ならびに教室員諸氏に感謝する。

文 献

- 臨床的考察を加え糖・脂質代謝関連の場の1つとして本酵素が重要な役割をもつことを知った。
- 稿を終るに臨み、ご指導、ご校閲を賜わった溝口輝彦教授に深謝するとともに、終始ご鞭撻、ご助力いただいた野本拓講師ならびに教室員諸氏に感謝する。
- ### 文 献
- 1) Meyerhof, O. Junwicz-Kocholaly, R.: J. Biol. Chem., 149: 76, 1943. 2) 伊藤英治: 酵素ハンドブック, 第1版, 朝倉書店, 東京, p. 342, 1966. 3) Zoung, H. L., Pace, N.: Arch. Biochem. Biophys., 75: 125, 1958. 4) Lynen, F. (徳重正信訳): 蛋白質核酸酵素, 10: 591, 1965. 5) Goldman, P.: J. Biol. Chem., 239: 3663, 1964. 6) Hibbitt, K. G.: Biochem. Biophys. Acta, 116: 56, 1966. 7) Nikkila, E. A. & Ojara, K.: Acta Chem. Scand., 17: 544, 1963. 8) Fine, M., Michaels, G., Shah, S., Chai, B., Fukayama, G. & Kinsell, L.: Metabolism, 11: 893, 1962. 9) 萩原文二: 蛋白質核酸酵素, 10: 1578, 1965. 10) Griffiths, M. H.: Biochem. J., 99: 12, 1966. 11) 水上茂樹: 臨床科学, 2: 1531, 1966. 12) Dewan, J. G.: Biochem. J., 31: 2327, 1937. 13) Green, D. E.: Biochem. J., 30: 629, 1936. 14) Ringler, R. L., Singer, T. P.: J. Biol. Chem., 234: 2211, 1959. 15) Allison, W. S. & Kaplan, N. O.: J. Biol. Chem., 239: 2140, 1964. 16) Vilee, C. A. & Hagerman, D. D.: J. Biol. Chem., 233: 42, 1958. 17) 平木潔, 浅野健夫: 臨床酵素学, 第2版, 朝倉書店, 東京, 461頁, 1965. 18) Harris, I., Meriwether, B. P. & Park, J. H.: Nature, 197: 154, 1963. 19) Tayler, E. L., Meriwether, B. P. & Park, J. H.: J. Biol. Chem., 238: 734, 1963. 20) Segal, H. L. & Gold, A. H.: J. Biol. Chem., 238: 2589, 1963. 21) Amelunxen, R. E., Carr, D. O. & Grisolia, S.: Biochim. Biophys. Acta, 113: 184, 1966. 22) Monod, J., Changeaux, J. P. & Jacob, F.: J. Mol. Biol., 6: 306, 1963. 23) 弓狩康三: 代謝, 2: 16, 1965. 24) Lieber, C. S., Jones, D. P. & Decarbi, L. M.: J. Clin. Invest., 44: 1009, 1965. 25) Maling, H. M., Wakabayashi, M. & Horning, M. G.: Advances in Enzyme Regulation, p. 247, 1963 (織田敏次ほか: 代謝, 3: 93, 1966より). 26) Lee, Ya-Pin., Takemori, A. E. & Lardy, H.: J. Biol. Chem., 234: 3051, 1959. 27) Ruegamer, W. R., Newman, G. H., Richart, DANA. & Westerfeld, W. W.: Endocrinology, 77: 707, 1965. 28) 織田敏次, 尾形悦郎: 臨床酵素化学, 医学書院東京, 1版, 284, 1965. 29) d'Adamo, A. F., Jr.: Theoretical Biol., 4: 142, 1963. 30) Bonsignore, A., Pontemoli, S., Grazi, E. & Horecker, B. L.: J. Biol. Chem., 235: 1888, 1960. 31) 弓狩康三, 松田友宏, 須田正己: 生化学, 30: 221, 1964. 32) Bhadri A. & Strere, P. A.: Biochim. Biophys. Acta, 70: 221, 1963. 33) Spencer, A., Corman, L. & Lowenstein, J. M.: Biochem. J., 93: 378, 1964. 34) Kornacker, M. S. & Lowenstein, J. M.: Biochem. J., 44: 209, 1965. 35) Humphrey, G. F.: Biochem. J., 65: 456, 1957. 36) Plant, G. W. E. & Sung, S. C.: J. Biol. Chem., 207: 305, 1954. 37) 澳親武: 日内泌誌, 41: 204, 1965. 38) 御前千鶴子: 日内科誌, 54: 1043, 1965. 39) 山本博治: 結核, 40: 58, 1965. 40) 織田敏次ほか: 代謝, 3: 93, 1966. 41) 高橋忠雄, 藤沢洵: 代謝, 3: 26, 1966. 42) Sherphof, G. L. & van Deenen, L. L. M.: Biochim. Biophys. Acta, 113: 417, 1966. 43) 溝口輝彦, 野本拓: 日本臨床, 23: 178, 1965.

* * * * *

* * * * *