シンポジウム 疾患におけるhomeostasis

（5） 酵素からみた homeostasis

東京大学医学部第一内科
岡 博

SYMPOSIUM ON HOMEOSTASIS IN DISEASE STATES

（5） ENZYME REGULATION IN HOMEOSTASIS

Hiroshi Oka

The First Department of Internal Medicine,
University of Tokyo Faculty of Medicine

生体には外的環境の変化に応じて内的要因をそれに対応するように変化させることによつて、生体の内部環境の重要な部分をなるべく一定のレベルに維持しようとする機構、すなわちhomeostasisが働いている。homeostasisを保つため生体はその全機能を動員するが、代謝の調節による恒常性維持の機構はの中で極めて重要な役割を演じている。ヒトあるいは高等動物の代謝調節機構としては、

1. 精神性調節
2. 神経性調節
3. ホルモン性調節
4. 膜の選択透過性による調節
5. 酵素による調節

などがある。これらは何れも相互に関連をもつており、神経調節がホルモン分泌の変化を介して働くとか、ホルモン性調節が細胞膜透過性の変化を通じて働くとかいうことがみられる。酵素による調節も、神経性刺激、ホルモンの影響を非常に強くうけていることが明らかになつている。酵素による調節は微生物でもみられるが、高等動物の神経性、ホルモン性調節も酵素活性の変動を介して働くものが多く、代謝調節における意義は大き

なものがある。酵素による調節の機構として、

1. 酵素の絶対量の増減によるもの
2. 活性型酵素と非活性型酵素の変換
3. 種々の物質による酵素の活性化と阻害
4. アイソザイムによる代謝分担
5. 補酵素による調節

などがある。1の酵素量の増減には生合成の促進（誘導）または阻害（抑制）と、分解速度の変化によるものがある。肝の幾つかの酵素（tryptophan pyrrolaseなど）はホルモンや基質の投与により酵素量の増加が、またある種のホルモン投与では逆に減少が認められる。これらの変化は一般に数時間乃至数日かかつて行なわれる。したがつてこれはゆつくりとした粗な調節といえる。2の代表的な酵素はglycogen phosphorylaseであり、活性型と非活性型が可逆的に変化し、その変化はホルモン性の支配をうけており、そしてそれは分単位の時間でみられる。この相互変換を触媒するのも酵素である。3の酵素活性の調節は温度、pH、イオン強度、基質濃度などによる活性の変化の他に、ある種の物質、たとえばその反応系の終末産物が酵素に働いて阻害をかけたり、逆にある物質がその酵素に働いて活性化することが知られてお

り、その機構としてallosteric効果（ある物質が酵素蛋白と結合することにより酵素蛋白の立体構造の可逆性変化をおこし、基質に対する親和性などが変ることにより活性に変化をもたらす効果をいう）が重要であり、代謝上重要な酵素には多くの場合このような活性化または阻害がみられている。これらの調節は素早いそしてきめ細かい調節といえる。4のアイソザイムによる代謝分担には細胞内の局在を同じくするもの（後に述べるhexokinaseとglucokinaseなど）、細胞内局在の異なるもの（GOTsとGOTmなど）、組織における局在の異なるもの（pyruvate kinaseなど）などがあり、触媒する反応は同一であつてもそれぞれの代謝調節上の意義は異なっており、その一方の活性のみが変化することにより代謝を調節している。5の補酵素による調節にはflavin nucleotide, pyridoxal phosphate, biotinなどによるものと、pyridine nucleotideによるものとがあり、前者では絶対量が、後者では主として酸化型と還元型との比が活性調節に重要な意義がある。以下、血糖の調節とも密接な関連のある肝の糖質代謝の調節機構の内、三つの酵素または酵素系をとり上げその酵素活性がどのようにして調節されているかを論ずることとする。

1. 肝のglucokinase

グルコース利用の第一段階であるリン酸化を触媒する酵素のhexokinaseには少なくとも4種のアイソザイムがあり、肝にはI, II, IIIおよびIV型の何れもが存在するが、その中ではIV型の活性が高い。I～III型はグルコースに対する K_m が $10^{-4}M$ ～ $10^{-6}M$ と低く、IV型は $10^{-2}M$ と高く、glucokinaseとよばれている。glucokinaseは肝に特異的な酵素である。

肝はグルコースをほぼ自由に通すため、肝細胞内のグルコース濃度は血糖値にほぼ等しく、空腹時でも50mg/dl（約3mM）程度であり、この濃度ではI～II型のhexokinaseはG 6 Pによる阻害を別とすれば活性は最高となつている筈であり、一方glucokinaseは K_m が200mg/dl前後であるため、肝

内のグルコース濃度の変動によりその活性は著しく変動する。肝には食後には腸より吸収されたグルコースが門脈を通じて流れこむため、肝内のグルコース濃度は50から200mg/dl以上にまで上昇する。肝のglucokinaseおよびhexokinaseの活性より考えて、正常肝では空腹時には両者の活性はほぼ等しいが、食後に血糖値が上昇するときはG 6 Pの増加をも考慮に入れると主としてglucokinaseによりグルコースはリン酸化されると考えてよい。このように肝糖質代謝の調節に重要な役割を演じているglucokinaseは飢餓や糖尿病などでは活性の減少が認められ、それは糖質投与やインスリン投与により回復する。そして、これらの際のglucokinaseの活性上昇は、actinomycin Dの投与により阻害されることから、酵素蛋白合成の増加、すなわち誘導によるものとされている。糖尿病肝でのglucokinase活性の低下も本酵素の絶対量の減少によるものである。糖尿病肝ではglucokinaseを含む蛋白分画への ^{14}C -leucineのとりこみ低下が、肝総蛋白へのとりこみ低下よりはるかに著しいことも、これを支持する成績といえる。

図1. グルコース負荷のグリコーゲン合成酵素におよぼす影響

糖尿病肝ではこのようにglucokinaseの減少により、血糖の変動に対応して糖利用を調節する機構が障害されている。

2. 肝glycogen synthetase

肝のグリコーゲン量は非常に大きく変動するものであり、シロネズミでは絶食により0.1%以下にまで減少し、食餌投与により5%以上にまで増加

する。糖尿病肝では、この変動の幅がせまく、絶食時でも1~2%前後に保たれており食餌投与により始めは正常と同様に増加を認めるが、糖質投与を続けると、正常では10%以上にまで増加するのに対し、糖尿病では5%前後で頭打ちとなる。グリコーゲン合成経路の律速段階はglycogen synthetaseとされているが、この酵素にはG 6 Pがない時には活性のみられないdependent type(D型)と、G 6 Pにより活性は促進されるがG 6 Pがなくても活性を示すindependent type(I型)との2型が存在する。この両者は相互に変換しうるもので、前者は後者がリン酸化された酵素であり、そのリン酸化を触媒する酵素はcyclic AMPにより活性化されることが知られている。糖尿病肝ではglycogen synthetaseの活性は正常と比べて大きな差は認められないが、I型の比率は低下がみられている。正常シロネズミを24時間絶食させた後、グルコースを負荷すると、肝グリコーゲンは前述のように増加するが、この時のglycogen synthetaseの変動をみると、グルコース投与後60分をピークとして活性の上昇がみられ、とくにI型酵素の活性上昇が著しく、この時期にD型→I型の変換がおこっていることを示している。これはグルコースの刺激によるインスリン分泌の時期とほぼ一致することから、内因性インスリンによるものと考えられる。アロキサン糖尿病シロネズミにグルコースを投与した時には、このような著明な変化のみられないことも上記の考えを支持するものである。正常シロネズミにインスリンを注射することによってもglycogen synthetaseの活性上昇、D型→I型の変化が認められている。なお、インスリンにはglycogen synthetaseの酵素蛋白の生合成そのものを誘導する作用もあり、この両者の機構がインスリンによるglycogen synthetase活性上昇に働いているものと考えられる。グルカゴンはエピネフリンと共に肝グリコーゲンの分解に働き、それはcyclic AMPの増加→phosphorylase kinaseの活性化→inactive phosphorylaseのactive phosphorylaseへの変換、を介するものであるこ

とがSutherlandらにより明らかにされている。glycogen synthetaseに対してはグルカゴンはインスリンと逆にI型→D型の変換を促進する。すなわちグルカゴン注射により、glycogen synthetase活性の低下がみられ、とくにI型の減少が著明である。なお、前述のグルコース負荷によるI型酵素活性の上昇も、グルカゴンを同時に投与することにより阻害される。グルコルチコイドは肝の解糖系、糖新生系ではインスリンと拮抗することが知られているが、グリコーゲン合成に関しては、インスリンと同様に合成促進の方向に働く。正常シロネズミにプレドニソロンを投与すると、glycogen synthetase活性の上昇が認められ、この場合もインスリンと同じようにI型酵素の上昇が著明であり、やはりD型→I型の変化がおこっていることを示している。glycogen synthetaseのD型、I型の相互変換に、cyclic AMPが働いていることは既に述べたが、in vitroにcyclic AMPを添加すると、 10^{-8}M ~ 10^{-4}M の高濃度ではI型→D型の変換がおこることが認められている。以上述べたように、グリコーゲン合成の律速段階であるglycogen synthetaseには、D型、I型の2型があり、後者の方が生物学的に活性な酵素であり、その相互変換によりグリコーゲン合成の調節が行なわれており、インスリン、グルカゴン、グルコルチコイドなどのホルモンによるグリコーゲン合成の調節は主としてこれを介して行なわれている。この変化は何れも分単位でみられるものである。このようにグリコーゲン合成の重要な一つの調節部位はここにあるが、それ以外の因子も無視することは出来ない。肝細胞内のG 6 P濃度は、食餌条件、インスリンその他のホルモンの分泌状態により変動する。hexokinaseおよびglucokinase、G6Pase、解糖系諸酵素の活性、hexose monophosphate pathwayの活性、グリコーゲン代謝活性など多くの因子が肝のG 6 P濃度に関係するが、G 6 PはD型には必須の活性化物質であると共に、I型でもG 6 Pにより酵素活性は上昇し、UDPGに対するKmの低下が認められている。したが

- 1) 50μg のグルカゴン腹腔内注射（屠殺前30および60分）
- 2) 1mg のプレドニゾロン腹腔内注射（屠殺前1時間，又は1，2，3時間前に）
- 3) 0.2u のインスリン腹腔内注射（屠殺前30および60分）

図2. 肝グリコーゲン合成酵素におよぼすホルモンの影響

って肝内G 6 P濃度が上昇した時にはglycogen synthetase活性も上昇し，グリコーゲン合成が促進されるが，低下した時には同じ量の酵素が存在しても合成量は減少する．また，電解質もglycogen synthetaseに影響を与えることが知られており，

正常シロネズミ肝切片を Krebs-Ringer 重曹緩衝液pH 7.4に30分インキュベートした後，3'-5'cyclic AMP と共に30分インキュベートした後に切片の酵素活性を測定した．

図3. 肝グリコーゲン合成酵素におよぼす 3'-5' cyclic AMP の影響 (in vitro)

この酵素の活性の調節は2型の相互変換以外に，allosteric効果の影響も強くうけているものと考えられる．

3. 肝のglucuronic acid pathway

アスコルビン酸の合成が行なわれないヒトで

は，グルクロン酸代謝経路は，生理的に余り重要でないものとされている．しかし，近年，糖尿病患者でこの代謝経路に何らかの代謝異常があることを示唆する成績が報告され，それと糖尿病にみられる血管障害との間に何か関連があるのではないかという推測もなされている．インスリンの絶対的欠乏，すなわち実験の糖尿病動物でこの経路がどうなっているのか検討した．シロネズミ肝切片を用いてglucuronolactone-6- ^{14}C よりの $^{14}CO_2$ 発生を測定することによりこの代謝経路（glucuronolactone→l-xylulose）の活性をみると，アロキサン糖尿病肝では明らかな低下が認められ，これはインスリン投与により部分的にはあるが回復する．同じくインスリン欠乏状態であると考えられる飢餓シロネズミ肝でも，糖尿病肝と同様の低下が認められ，これも糖質の投与により回復する．これらの事実，インスリン欠乏はこの代謝経路の活性低下をもたらすことを示しているが，その阻害点を明らかにするため，肝ホモジェネートを用い，同様にglucuronate-6- ^{14}C よりの $^{14}CO_2$ の発生を測定した．反応系にこの代謝経路の補酵素であるNADPHおよびNADを十分量に加え

表1. グルクロノラクトン-6- ^{14}C よりの $^{14}\text{CO}_2$ 生成
(肝切片による実験)

	$^{14}\text{CO}_2$ 生成量 ($\mu\text{moles/hr/g}$)
対 照 群	4.20 $\pm$ 0.19
アロキサン糖尿病群	2.21 $\pm$ 0.28
インスリン治療糖尿病群	3.11 $\pm$ 0.20
対 照 群	4.06 $\pm$ 0.16
72時間絶食群	1.77 $\pm$ 0.20
グルコース投与 2 時間	3.01 $\pm$ 0.23
同 18時間	3.43 $\pm$ 0.33

表2. グルクロン酸-6- ^{14}C よりの $^{14}\text{CO}_2$ 生成
(肝ホモジェネートによる実験)

NAD	+	-	+	-	+
NADPH	+	-	-	+	-
G6P+G6PDH	-	-	-	-	+
正 常 群	21.1	1.6	10.8	2.5	29.2
糖 尿 病 群	27.2	0.9	8.7	1.8	35.2

(μmoles/hr/g protein)

て $^{14}\text{CO}_2$ の発生をみると、切片の時と異なり、糖尿病肝および飢餓肝では $^{14}\text{CO}_2$ の発生は正常よりもむしろ増加が認められ、この代謝経路の酵素活性そのものはこれらでむしろ上昇していることを示している。しかし、NADPH、NADの両者または一方を除いた条件で測定すると、糖尿病肝および飢餓肝での $^{14}\text{CO}_2$ の発生は切片の時と同様に正常よりも減少していた。上記の成績は、これらの肝ではこの経路の酵素 (D-glucuronate reductase, L-gulonate dehydrogenase, 3-keto-L-gulonate decarboxylase) の活性または酵素量は増加しているが、補酵素であるNADPH、NADが減少しているために切片では代謝経路の活性が低下していることを示すものと考えられる。

NADPHを除いた系では糖尿病肝ホモジェネートの $^{14}\text{CO}_2$ 発生は正常よりも減少しているが、これに十分量のG6PおよびG6P dehydrogenaseを添加し、反応液中のNADPを常にNADPHに還元するようにしておくと、糖尿病肝の方がより多くの $^{14}\text{CO}_2$ を発生するようになる。この成績から、補酵素の絶対量よりも、その酸化、還元バランスがこの酵素の代謝活性を支配しているものといえる。糖尿病肝での脂酸合成阻害の原因としてNADPHの低下が問題とされたが、現在ではむしろその律速酵素であるacetyl CoA carboxylaseの減少が主因とされている。しかし、glucuronic acid pathwayでは、至適条件で測定した酵素系の活性は明らかに上昇しているのであるから、少なくとも切片にみられた代謝活性の低下はこのpyridine nucleotideの酸化、還元両型のバランスがこの経路に不利となつているためといえる。

結 語

以上述べたように生体のhomeostasisを維持するため、代謝的には多くの酵素活性の調節が行なわれており、しかも、その調節には幾つかの機構があり、時には複数の機構が同一の酵素に働いて代謝活性の調節を行なっている。そして、これには神経性、ホルモン性の調節が密接に関連し、また膜透過性の変化による基質濃度の変化も加わり、更には食餌性の要因も大きな影響を与える。正常な状態ではこれらが極めて合理的に働いて生体のhomeostasisが維持されるのであるが、疾患時、たとえば糖尿病ではその調節に必要なインスリン作用の欠乏のため、これらの調節機構にひずみが生じ、生体内部環境を正常のレベルに維持することが出来なくなり、そのために種々の病状が出現することになる。