エピレナミンのホスホリラーゼ活性化と脂肪分解促進効果の
N-エチルマレイミドによる阻害¹⁾

高島英伍

長崎大学薬学部²⁾Inhibition by N-Ethylmaleimide of the Epinephrine-Induced
Phosphorylase and Lipolysis Activation

EIGO TAKABATAKE

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University²⁾

(Received March 30, 1970)

The effect of N-ethylmaleimide (NEM) on the epinephrine-induced activation of phosphorylase in diaphragm and that of lipolysis in epididymal fat pad in male rats was examined. When the isolated diaphragm was preincubated with NEM, 1 mM, epinephrine could not activate the phosphorylase. The activation of phosphorylase *b* kinase was also inhibited by the preincubation with NEM. The partially purified phosphorylase *b* kinase preparation was more rapidly inactivated by NEM than phosphorylase *b* crystals. The activation of lipolysis by *in vitro* epinephrine in adipose tissue or isolated fat cells was blocked by NEM or SH-blocking agents. The effect of ACTH was also inhibited by NEM. The inhibitory effect of NEM was not restored by the addition of glutathione 10 seconds after the fat cells were contacted with NEM. Thus, NEM probably changes the quality of tissue to block the action of epinephrine.

N-Ethylmaleimide (NEM) は代表的な SH 阻害剤であるが、モルモットの摘出心房³⁾や輸精管⁴⁾で抗エピレナミン (Epi) 作用を示す。また横隔膜⁵⁾、心臓⁶⁾、脂肪組織⁷⁾でのインシュリンや、膀胱⁸⁾でのバソプレシンの作用が NEM の前処置で阻害される。これらのホルモンのもつ S-S 基が受容体の SH 基と結合して、ホルモン作用が発揮されるものと推論された。しかし ACTH のような S-S 基も SH 基もないホルモンの作用も NEM で阻害される^{9,10)}と報告されている。

著者らは Epi の横隔膜ホスホリラーゼ活性化と脂肪組織での脂肪分解促進などの代謝に対する作用も NEM で抑制されるかどうか、またその機構を検討する目的で実験を行なった。

実 験 の 部

試薬 L-Epinephrine (Sigma), ACTH (第一), NEM (Sigma, 半井), グルタチオン (和光), 血清アルブミン (Fraction V, Armour) その他すべて特級品を使用した。

横隔膜での実験 Wistar 系雄ラット (150—200 g) を断頭後、横隔膜をとりほぼ 4 等分して、1) 対照、2) NEM、3) Epi、4) NEM+Epi として使用し、Krebs-Ringer bicarbonate buffer pH 7.4 (KRB) 3 ml 中、95%

- 1) 日本薬学会第 89 年会で一部発表、名古屋、1969 年 4 月。
- 2) Location: *Bunkyo-machi, Nagasaki*.
- 3) 上野 昭, 中沢与四郎, 日薬理, **63**, 60 § (1967); 上野 昭, 染木セツ子, 中沢与四郎, 日薬理, **64**, 128 § (1968).
- 4) 北野高史, 森元 邦, 工藤佳久, 口井正人, 山本博之, 村野 匡, 日薬理, **63**, 145 § (1967).
- 5) H. Carlin, O. Hechter, *J. Biol. Chem.*, **237**, PC 1371 (1962).
- 6) E. Cadenas, H. Kaji, C.R. Park, H. Rasmussen, *J. Biol. Chem.*, **236**, PC 63 (1961).
- 7) P.K. Dixit, A. Lazarow, *Am. J. Physiol.*, **213**, 849 (1967).
- 8) C.T.O. Fong, L. Silver, D.R. Christman, I.L. Schwartz, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **46**, 1273 (1960); H. Rasmussen, I.L. Schwartz, M.A. Schoessler, G. Hochster, *ibid.*, **46**, 1278 (1960).
- 9) J.M. George, J.M. Palmer, A.R. McCoy, *Biochim. Biophys. Acta*, **170**, 213 (1968).
- 10) D.G. Marsh, J.M. George, *J. Biol. Chem.*, **244**, 1381 (1969).

O₂-5% CO₂ 気流下に 37° で incubate した。前処置では、2) と 4) のフラスコに NEM を加え、10 分後に各々のフラスコの組織をとり出し新しい KRB で洗い、それぞれ別に用意した KRB 3 ml 中に入れた。この時 3) と 4) のフラスコには、直前に溶解した Epi 溶液を加え、再び 37° で 5 分 incubate した。組織をとり出し、濾紙で水分を除いて、直ちに液体窒素中に投入して凍結させ、ドライアイス中に保存した。

凍結組織 200 mg について 8 ml の 0.002M EDTA-0.02M NaF-0.05M Tris-HCl, pH 6.8 を加えてテフロン-ガラスホモジナイザーにかけ、冷時 10000 g で遠沈した上清について、phosphorylase と phosphorylase b kinase 活性を測定した。

Phosphorylase b 家兎骨格筋から Fischer, Krebs 法¹¹⁾ で精製再結晶したものを、使用前活性炭、セファデックス G-25 で処理し、紫外線吸収 (UV) スペクトルからヌクレオチドの存在を認められないものを使用した。

Phosphorylase b Kinase 家兎骨格筋から Krebs らの方法¹²⁾ で調製した 30-supernatant は用時室温において融解して使用した。

グリコゲン 市販品を活性炭、セファデックス G-25 処理してから、4% 溶液として凍結保存したものを使用した。

Phosphorylase 活性の測定 Glucose-1-phosphate 16 mM, 5'-AMP 0 (a) または 1 mM (t), グリコゲン 1% の存在で、Cori らの方法¹³⁾ に準じ 30° で 10 分間 incubate した。生ずる無機リンを Lowry, Lopez 法¹⁴⁾ で測定し、活性を a/t の % で表わした。

Phosphorylase b Kinase 活性の測定 Krebs らの方法¹⁵⁾ で pH 6.8 と 8.2 で測定し、その比を % で表わした。

副睾丸周辺脂肪組織での実験 Wistar 系雄ラット (150—200 g) を断頭後、脂肪組織をとり出し 4 等分し、横隔膜の場合と同様に incubate した。NEM の代わりに p-hydroxymercuribenzoate (PHMB) を用いた実験、NEM を加え 10 分後または同時にグルタチオン、システインまたは 2,3-dimercaptopropanol (BAL) を加えた実験、Epi の代わりに ACTH を加えた実験も行なった。NEM とのはじめの incubation は 30 分、Epi, ACTH との第 2 回の incubation は 2 時間とした。

脂肪組織から Rodbell 法¹⁶⁾ で単離した脂肪細胞では、NEM 添加 10 秒後にグルタチオンと Epi を加え 2 時間 incubate した。脂肪組織と細胞の場合はすべて 2% アルブミン-KRB を用いた。Incubate 終了後、全液をホモジナイズし、遊離脂肪酸 (FFA) を Itaya, Ui 法¹⁷⁾ で測定した。

TABLE I. Effect of N-Ethylmaleimide (NEM) on the Activation of Phosphorylase in Diaphragm by Epinephrine (Epi) *in Vitro*

Exp.	Preincubation with	Incubation with	Phosphorylase a activity % of total enzyme
1	none	none	13.8 ± 0.87
2	NEM 0.33 mM	none	16.7 ± 2.71
3	NEM 1 mM	none	7.58 ± 1.10
4	none	Epi 0.001 mM	23.2 ± 1.86
5	none	Epi 0.002 mM	40.2 ± 0.84
6	NEM 0.33 mM	Epi 0.001 mM	29.6 ± 3.11
7	NEM 1 mM	Epi 0.002 mM	14.0 ± 0.65

The diaphragm from male rat was divided into four pieces and each piece was incubated in 3 ml (final volume) of Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4, under 95% O₂-5% CO₂ at 37°. After preincubation for 10 min with or without NEM, the tissue was incubated in new medium with or without Epi for 5 min. After incubation, the tissue was immediately frozen in liquid nitrogen and the activity of phosphorylase was assayed in the absence (a) or presence (t) of 5'-AMP.

Values are mean ± standard error of 11 determinations for control or 6 for other groups.

statistical analysis: $p < 0.05$, Exp. 1 vs. Exp. 3; $p < 0.01$, Exp. 1 vs. Exp. 4, Exp. 1 vs. Exp. 6, and Exp. 5 vs. Exp. 7

- 11) E.H. Fischer, E.G. Krebs, *J. Biol. Chem.*, **231**, 65 (1958).
- 12) E.G. Krebs, D.S. Love, G.E. Bratvold, K.A. Trayser, W.L. Meyer, E.H. Fischer, *Biochemistry*, **3**, 1022 (1964).
- 13) G.T. Cori, B. Illingworth, P.J. Keller, "Methods in Enzymology," Vol. I, (32), p. 200.
- 14) D.H. Lowry, J.A. Lopez, *J. Biol. Chem.*, **162**, 421 (1946).
- 15) E.G. Krebs, E.H. Fischer, "Methods in Enzymology," Vol. V, (49b), p. 373.
- 16) M. Rodbell, *J. Biol. Chem.*, **239**, 375 (1964).
- 17) K. Itaya, M. Ui, *J. Lipid Res.*, **6**, 16 (1965).

結 果

横隔膜 Phosphorylase 活性化に対する NEM の影響 (Table I)

NEM 1 mM で横隔膜 phosphorylase 活性はやや低下するが, 0.33 mM では全く影響がない. Epi 0.001 mM による phosphorylase 活性化は, NEM 0.33 mM では抑制されないが, NEM 1 mM では Epi 0.002 mM の効果も全く阻害した.

横隔膜 Phosphorylase b Kinase 活性化に対する NEM の影響 (Table II)

TABLE II. Effect of N-Ethylmaleimide (NEM) on the Activation of Phosphorylase and Phosphorylase b Kinase in Diaphragm by Epinephrine (Epi) *in Vitro*

Preincubation with	Incubation with	Ratio of phosphorylase b kinase activity at pH 6.8 to activity at pH 8.2 %	Phosphorylase a activity % of total enzyme
none	none	1.85 ± 0.1	14.3 ± 3.9
NEM 1 mM	none	0	13.7 ± 1.0
none	Epi 0.002 mM	5.30 ± 1.6	34.6 ± 7.8
NEM 1 mM	Epi 0.002 mM	0	8.4 ± 7.5

The experimental conditions were as same as in Table I.
Values are mean ± standard error of 3 experiments.

Epi 0.002 mM は phosphorylase b kinase も phosphorylase 活性も上昇させる. NEM 1 mM で前処理すると phosphorylase b kinase 活性は抑制され, Epi による活性化も全くおこらなかった.

Phosphorylase b Kinase および Phosphorylase b の NEM による失活 (Fig. 1)

家兎骨格筋より調製した phosphorylase b kinase 画分および phosphorylase b 結晶をそれぞれ NEM とともに 37° で incubate し, 一定時間後に酵素活性を測定した. NEM 0.1 mM で phosphorylase b は 120 分, phosphorylase b kinase は 20 分間それぞれ incubate してもほとんど活性は変わらなかった. しかし NEM 濃度を 1, 10 mM とすると, kinase は急速に失活し, phosphorylase b も kinase に比べると緩やかではあるが活性を失った.

脂肪組織からの FFA 遊離に対する NEM の影響 (Table III, IV)

NEM 1 mM で脂肪組織を incubate すると, Epi 0.002 mM による lipolysis 亢進は完全に抑制された. NEM と接触させてから 10 分後にグルタチオンを加えても Epi の効果は回復しない. しかし, はじめから NEM とともにグルタチオンまたは BAL を加えておけば, Epi は対照と同じく反応した.

ACTH 2.7 mU/ml でも FFA 遊離は促進されるが, NEM と同時にシステインを添加しておけば ACTH の効果は明らかにみられた. NEM の代りに PHMB を用いても ACTH 効果は抑制された.

単離脂肪細胞での実験 (Table V)

脂肪組織から単離した脂肪細胞を用いても全く同様な結果を得た. すなわち NEM は 0.5 mM 以上を 10 秒間接触させると, グルタチオンを過剰に加えても Epi の FFA 遊離促進効果は完全に抑制された. しか

Fig. 1. Time Course of Inactivation by N-Ethylmaleimide of Phosphorylase b and Phosphorylase b Kinase

—: phosphorylase b; ----: phosphorylase b kinase
concentration of N-ethylmaleimide

●: 0, ○: 0.1 mM, △: 1 mM, □: 10 mM

Crystalline phosphorylase b or partial purified phosphorylase b kinase prepared from rabbit skeletal muscle was incubated with NEM. The enzyme activity at 0 min was 100%.

TABLE III. Effect of N-Ethylmaleimide (NEM) on the Release of Free Fatty Acids (FFA) from Adipose Tissue by Epinephrine (Epi) *in Vitro*

Preincubation with	Incubation with	FFA released $\mu\text{eq/g/hr}$	Relative activity %
none	none	0.46 ± 0.05	100
NEM 1 mm	none	0.38 ± 0.05	82
none	Epi 0.002 mm	2.25 ± 0.39	488
NEM 1 mm	Epi 0.002 mm	0.44 ± 0.08	95

Epididymal fat pads from rat were divided into four pieces and each piece was incubated in 3 ml (final volume) of Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 2% of bovine serum albumin, pH 7.4, at 37° under 95% O₂-5% CO₂. After preincubation for 30 min with or without NEM, the tissue was incubated in new medium with or without Epi for 2 hr. After incubation, the tissue was homogenized with the incubation medium and aliquots of them were assayed for FFA.

Values are mean $\pm$ standard error of 6 experiments.

TABLE IV. Effect of SH Blocking Agents on the Release of Free Fatty Acids (FFA) from Adipose Tissue by Epinephrine (Epi) or ACTH *in Vitro*

Exp.	Preincubation with	Incubation with	Relative release of FFA, %
1	none	none	100
2	none	Epi 0.002 mm	370
3	NEM 1 mm	Epi 0.002 mm	111
4	NEM 1 mm and glutathione 10 mm added 10 min later	Epi 0.002 mm	66
5	NEM 1 mm + glutathione 10 mm	Epi 0.002 mm	413
6	NEM 1 mm + BAL 10 mm	Epi 0.002 mm	381
7	none	ACTH 2.7 mU/ml	325
8	NEM 1 mm	ACTH 2.7 mU/ml	46
9	NEM 1 mm + cysteine 10 mm	ACTH 2.7 mU/ml	294
10	<i>p</i> -hydroxymercuribenzoate 0.2 mm	none	110
11	<i>p</i> -hydroxymercuribenzoate 0.2 mm	ACTH 2.7 mU/ml	204

The experimental conditions were as same as in Table III except using various SH agents for preincubation or ACTH for incubation.

In Exp. 4, glutathione was added 10 min after the addition of NEM.

In Exp. 5, 6, or 9, glutathione, BAL or cysteine was added simultaneously with NEM.

All values are mean of at least 3 determinations.

しグルタチオンをはじめに加えておけば NEM の阻害効果はみられなかった。

考 察

NEM がバソプレシン⁸⁾ やインシュリン^{5,6)} の作用を阻害することから、ホルモン作用の第一段階がホルモンの S-S と受容体の SH との結合であるのではないかと論ぜられた。ラット脂肪組織でグルコース代謝が NEM で抑制され、⁷⁾ SH も -S-S もない ACTH の脂肪動員効果も NEM で阻害される⁹⁾ ことが報告され、組織受容体そのものの NEM による変化がより大きく関与していると考えられてきた。

一方、NEM はモルモット摘出心房における Epi の収縮力増大および搏数増加効果を抑制し、³⁾ モルモット輸精管や心房標本でも抗カテコラミン作用⁴⁾ を示す。

著者らの実験結果から、Epi の phosphorylase 活性化や lipolysis 促進など代謝への効果も NEM で阻害されることは明らかである。Epi には SH も S-S も含まれないから、受容体との S-S による結合は考えられない。

TABLE V. Inhibition of Epinephrine (Epi) induced Lipolysis by N-Ethylmaleimide (NEM) in Isolated Fat Cells

Incubation	FFA release $\mu\text{eq/g/hr}$
Experiment 1	
control	1.35 ± 0.05
Epi 0.002 mM	4.17 ± 0.26
NEM 0.005 mM 10 sec and Epi 0.002 mM + glutathione 1 mM	4.02 ± 0.21
NEM 0.05 mM 10 sec and Epi 0.002 mM + glutathione 1 mM	4.72 ± 0.26
NEM 0.5 mM 10 sec and Epi 0.002 mM + glutathione 1 mM	1.48 ± 0.13
Experiment 2	
control	1.81 ± 0.17
Epi 0.002 mM	10.49 ± 0.63
glutathione 1 mM + NEM 0.5 mM 10 sec and Epi 0.002 mM	10.14 ± 0.87

Fat cells isolated from rat epididymal fat pads were incubated in 3 ml (final volume) of Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 2% of bovine serum albumin, pH 7.4, at 37° under 95% O₂-5% CO₂. In experiment 1, fat cells were treated with NEM for 10 second before the addition of Epi and glutathione. In experiment 2, fat cells were treated with both NEM and glutathione before the addition of Epi.

Values are mean $\pm$ standard error of at least 3 determinations.

しかも単離脂肪細胞の場合 10 秒間 NEM と接触すれば、そのあとでグルタチオンを加えても Epi の効果を回復できないから、SH 基の反応のみを考えることには難点がある。

Phosphorylase の活性化機構は複雑な過程を経るもので、Epi $\rightarrow$ adenylyl cyclase 活性化 $\rightarrow$ cyclic 3',5'-AMP 生成増加 $\rightarrow$ phosphorylase *b* kinase 活性化 $\rightarrow$ phosphorylase 活性化と考えられている。¹⁸⁾ Phosphorylase は SH 酵素で 18 個の SH 基のうち 4 個以上が NEM と結合するが、酵素活性は失われない。¹⁹⁾

Epi のいろいろな作用が phosphorylase 活性化を通してのみ起るといふことには否定的な報告が少なくない。たとえば Epi で心臓機能が亢進するとき、phosphorylase の活性化は収縮力増大より遅れておこるが、phosphorylase *b* kinase の活性化は Epi の適用 6—9 秒後におこり、収縮力が最高に達する以前であることから、この kinase や 3',5'-AMP の役割が重視されている。²⁰⁾ NEM は phosphorylase *b* より kinase の方により大きな阻害作用をもつ実験結果 (Table II, Fig. 1) からもうなずかれる。

Epi の脂肪組織に対する作用も phosphorylase 活性化と同じく adenylyl cyclase, 3',5'-cyclic AMP を経て lipase 活性の活性化がおこるとの説²¹⁾ と、Epi が組織中の脂質の形態をかえるとの説²²⁾ がある。脂肪組織でも単離脂肪細胞でも NEM は Epi の効果を阻害するが、どの段階で作用しているかは未だ明らかでない。

インシュリン、バソプレシン、Epi などはずべて adenylyl cyclase-3',5'-cyclic AMP 系の活性変化を経て作用をあらわす。¹⁸⁾ この酵素は細胞膜に密接についているもので、NEM も膜の SH あるいはその他の基と反応し、その性質を変化させ、多くのホルモンの効果を阻害するものと考えられる。

謝辞 本研究は長崎大学薬学部衛生化学教室で 4 年次学生の特別実習として、高松 薫、吉福正子、徳永邦子、原田正富、清益郁子、赤堀好子、梅田 薫、小川ひろみ、新垣光雄の諸君によって実験が積み重ねられたものを総括したものである。ここに衷心からの謝意を表する。

追記 (May 27, 1970) 本稿を投稿、受付けられた後、Calvert, Lech²³⁾ の単離脂肪細胞でノルエピネフリンによる lipolysis が NEM を含む SH 試薬で阻害されるとの報告に接した。

18) G.A. Robinson, R.W. Butcher, E.W. Sutherland, *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 149 (1968).

19) A. Kudo, R. Shukuya, *J. Biochem.* (Tokyo), **55**, 254 (1964).

20) G.I. Drummond, L. Duncan, E. Hertmen, *J. Biol. Chem.*, **241**, 5893, 5899 (1966).

21) B.B. Brodie, G. Krishna, S. Hynie, *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1129 (1969).

22) 藤井節郎, 奥田拓道, 蛋白質, 核酸, 酵素, **14**, 1294 (1969).

23) D.N. Calvert, J.J. Lech, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **171**, 135 (1970).