

原 著

ヒヨコ成長時の肝臓脂肪酸合成増大について

進 藤 泰 子

信州大学医学部生化学教室

HEPATIC LIPOGENESIS OF NEONATAL AND POSTNATAL CHICK

Yasuko SHINDO

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Shinshu University

Key words: 脂肪酸合成 (fatty acid synthesis)

ピルビン酸脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase)

反応系の質量作用比 (mass-action ratio)

アセチル-CoA カルボキシルラーゼ (acetyl-CoA carboxylase)

アロステリック因子 (allosteric factor)

I 緒 言

ラット肝臓の脂肪酸合成速度は、胎児で非常に大であり、出生直前に低下し、出生時および哺乳時は著しい低値である。しかし離乳以後、摂食と対応して合成速度が高まる¹⁾。

ヒヨコでは孵化から成長するに従って、肝臓の脂肪酸合成が高まり ($^3\text{H}_2\text{O}$ のとりこみによる)、約1週間で一定値になる。この脂肪酸合成の促進は、餌の摂取と対応している²⁾。

今回、哺乳動物で得られた知見と鳥類で得られた知見の対応という比較生化学的立場と摂食に対応した代謝変化が代謝調節機構の解析に有用であることの2点からヒヨコの成長時におこる、いくつかの代謝系の変動について解析を行なった。

哺乳動物での脂肪酸合成は、肝臓と脂肪組織で行なわれているのに対して、鳥類は、肝臓だけで行なわれていると考えてよい³⁾。ことから本研究では、肝臓についてのみ解析を行なった。

脂肪酸合成の律速酵素であると考えられているアセチル-CoA カルボキシルラーゼの mass-action 比等の解析からその律速性について考察した。また脂肪酸合成の材料であるアセチル-CoA を供給するという点

からピルビン酸脱水素酵素の活性を解析し、本酵素の活性型の量的変動が脂肪酸合成促進と対応することを見出した。

II 実験材料および方法

(1) 動 物

朝、孵化した雄性白色レグホンを近くの養鶏場より入手し、幼すう育成用配合飼料 (炭水化物、約64%、脂肪2%) で飼育した。ただし孵化当日のものは摂食させず、直ちに実験に供した。摂食群は上記飼料を自由に摂食させておき、絶食群は水のみ与えて実験開始は朝9時~10時とした。

(2) 脂肪酸合成速度

体重100g 当たり、 $^3\text{H}_2\text{O}$ 、0.2mCi を含む生理的食塩水0.5ml を腹腔内投与し、30分後、エーテル麻酔下で開腹し、直ちに肝臓を摘出し、液体窒素であらかじめ冷却したアルミニウムブロックではさんで凍結した。肝臓をアルカリで水解し、総脂肪酸分画への放射能のとりこみを測定することによって合成速度を求めた⁴⁾。 $^3\text{H}_2\text{O}$ のとりこみ (μmol) を0.87で除した値がアセチル基 (μmol) のとりこみ量となる⁵⁾⁶⁾。

(3) ピルビン酸脱水素酵素活性

Wieland らの方法によった⁷⁾。

(4) 中間代謝物質の定量

ヒヨコは哺乳動物と異なり、構隔膜がないため開腹によって組織の低酸素状態になることが指摘されている⁸⁾。しかし開腹後4秒～60秒までの時間間隔において肝切除を行ないアデニンスクレオチドやTCA回路中間体量の測定を行なったところ、全く変動を認めなかった。このことから開腹後の人工呼吸は生理的条件からのずれを生じる可能性があるので、この操作は省略した。本実験では開腹後10秒以内に肝摘出を行なった。摘出した肝切片は直ちに凍結させ、過塩素酸で除蛋白し、水酸化カリウムで中和した。

CoA および、その誘導体、アデニンスクレオチドおよびクエン酸の測定は酵素法によった⁴⁾⁹⁾。無機リンは Martin と Dorty の方法⁹⁾で測定した。

(5) 酵素および試薬

アシルアミンアセチルトランスフェラーゼはハト肝より¹⁰⁾、オキシグルタル酸脱水素酵素はブタ心筋よ

り¹¹⁾、脂肪酸合成酵素は無脂肪食投与ラットの肝より¹²⁾、またビルビン酸脱水素酵素フォスファターゼはブタ心筋より¹³⁾精製した。

アセチル-CoA は京都大学医学部医化学教室、沼教授より供与をうけた。マロニル-CoA は Lynen の方法¹⁴⁾によって調製した。

中間代謝物質測定用の酵素および代謝物質は、ペーリンガー山之内より入手した。また $^3\text{H}_2\text{O}$ (208mCi/ml) はラジオケミカルセンター (英国) より入手した。

Ⅲ 実験結果

(1) 肝臓の総脂肪酸への $^3\text{H}_2\text{O}$ のとりこみ

孵化した日をHとし20日まで $^3\text{H}_2\text{O}$ の肝臓総脂肪酸分画へのとりこみを追った (図1)。脂肪酸合成速度は成長と共に増大し、1週間以内で最大となった。孵化当日の脂肪酸合成は非常に遅く ($<0.1\mu$ モル $^3\text{H}_2\text{O}/$

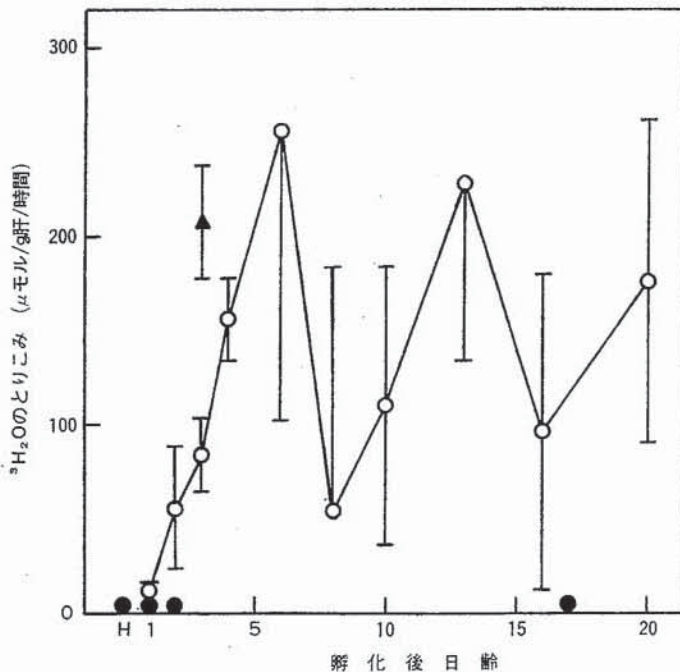


図 1 ヒヨコ孵化後の肝臓脂肪酸合成速度の変動

$^3\text{H}_2\text{O}$ (0.2mCi/ 体重 100g) を腹腔内投与し肝臓の総脂肪酸分画への $^3\text{H}_2\text{O}$ のとりこみを測定した。値は5羽の平均値±S.D. でありHは hatching (孵化) の日である。

○ 摂食群

● 絶食群 (H, 1, 2日は孵化から絶食したものであり17日は2日絶食した。)

▲ 絶食-摂食群 (孵化から2日絶食した後1日摂食させた。)

g 肝/時間), 1 日餌摂取をすると (1 日) 合成速度は 6.3μ モル $^3\text{H}_2\text{O}$ /g 肝/時間で, 2 日間の摂取 (2 日) では 55μ モル $^3\text{H}_2\text{O}$ /g 肝/時間となった。以後 4 日まで直線的に増大し約 160μ モル $^3\text{H}_2\text{O}$ /g 肝/時間に達した。即ち, 摂食開始と同時に脂肪酸合成が促進されるのではなく, 約 1 日の lag が認められた。この lag が存在することは Goodridge によっても認められている¹⁾。

絶食した場合には 2 日でもほとんど脂肪酸合成は増加しなかったが, 絶食 2 日間の後に 1 日餌を投与すると脂肪酸合成は著明な増大を示し, 摂食群と同じ値となった。このことから孵化後の脂肪酸合成は餌摂取と関係があると同時に絶食でも酵素合成が, ある程度進行しており餌摂取により脂肪酸合成がすぐに対応できると思われる。

なお脂肪酸合成が一定値となった 15 日のヒヨコを 2 日間絶食させると脂肪酸合成は非常に低値を示した。

鳥類は哺乳類と異なり, 餌摂取状態の変化に応じ, きわめて短時間に肝臓の脂肪酸合成速度が変化する。

たとえば自由に餌を摂取しているヒヨコから餌を除くと 2 時間以内に脂肪酸合成速度は $\frac{1}{10}$ になり, このものに餌を投与すると 1 時間以内に絶食状態のその数倍 ~ 10 倍にも高まる¹⁵⁾。このことが第 1 図にみられる個体差の大きいことの原因と考えられる。

(2) ビルビン酸脱水素酵素活性

ビルビン酸脱水素酵素はリン酸化されて不活性型となり, 脱リン酸化されて活性型となる¹⁶⁾。従って成長時の変化に対する本酵素の役割を解析するためには, 活性型酵素量と全酵素量 (活性型 + 不活性型) の両者の測定を行なう必要がある。全酵素量は不活性型酵素を活性型にすることによって測定できる。そこで肝ホモジエネートにブタ心筋より精製したホスファターゼを添加し, 活性化の条件を検索した。しかしヒヨコ肝臓のビルビン酸脱水素酵素は操作時の失活が著しいため全酵素量を求めることができなかった。凍結肝臓をホモジエネートし, 直ちに測定すれば活性型酵素量のみは得られた。

図 2 に示すように, 孵化当日のヒヨコおよび絶食 2

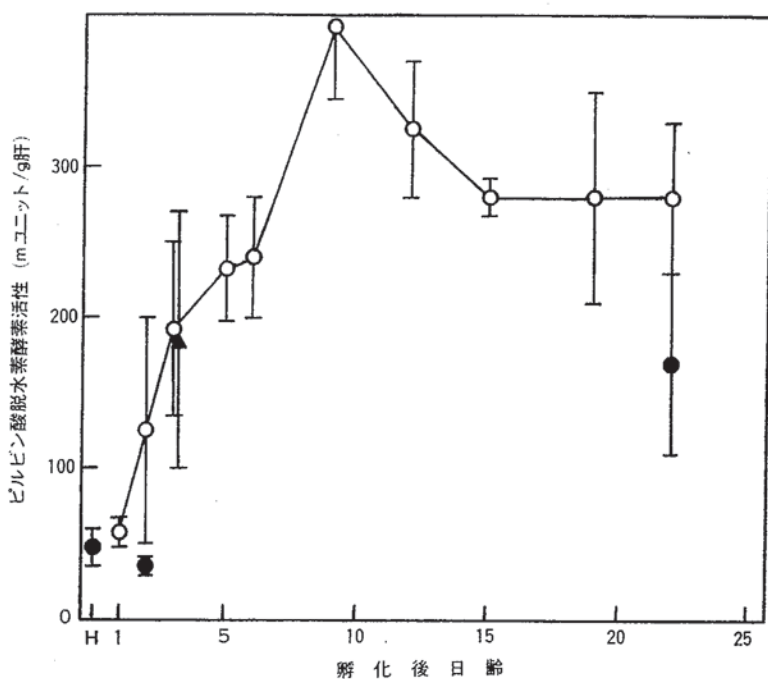


図 2 ビルビン酸脱水素酵素活性 (活性型) の変動

- 摂食群
 - 絶食群 (H, 2 日は孵化から絶食したものであり 22 日は 2 日絶食した。)
 - ▲ 絶食-摂食群 (孵化から 2 日絶食した後 1 日摂食させた。)
- 値は 5 羽の平均値 ± S. D. である。

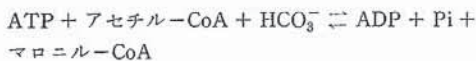
日のものは本酵素の増大はなく、餌摂取によって増大し、約1週間で一定値となった。なお脂肪酸合成速度で認められた1日のlagが本酵素量の増大の場合でも認められた。また孵化後2日絶食し1日餌投与では摂食群と同じ値を示した。脂肪酸合成の材料となるアセチル-CoA を供給するという点から、この酵素量が脂肪酸合成と対応していることは興味深い。

なお20日のヒヨコを2日絶食させると本酵素量は減少した。餌摂取と本酵素量の間に相関関係があることはラットでも認められている⁷⁾¹⁷⁾。

(3) アセチル-CoA カルボキシラーゼ

反応の mass-action 比

アセチル-CoA カルボキシラーゼ反応が脂肪酸合成系の律速酵素であることを解析する方法として、我々は mass-action 比を測定することを提案している⁹⁾。本反応は、



であり、本反応の mass-action 比は下の式で求められる。

$$\text{mass-action 比} = \frac{[\text{ADP}] [\text{Pi}] [\text{マロニル-CoA}]}{[\text{ATP}] [\text{アセチル-CoA}] [\text{HCO}_3^-]}$$

本反応の平衡定数は5.7¹⁸⁾と考えられる。

表1に示すように孵化後の mass-action 比は1.26であり、本反応は肝細胞内でも、ほぼ平衡状態に近い状態（非律速的）と考えられるが1日、2日と値が小さくなり3日以後は0.05~0.07と平衡定数に比べて非

常に低値で非平衡状態（律速的）に変わったことを示す。また孵化後2日絶食、1日餌投与のものも0.08と値は小さい。

表1にみられるように成長時の ATP, ADP, Pi の量的変動は認められなかった。なお AMP 量の変動も認められなかった。代謝調節上 'energy charge' 即ち $(\text{ATP} + \frac{1}{2}\text{ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$ が重要な役割をしていることが示唆されているが¹⁹⁾、少なくとも脂肪酸合成系にはこの考えはあてはまらず、本反応の mass-action 比は主にアセチル-CoA とマロニル-CoA の変動によって決定されていることがわかった。孵化後、アセチル-CoA が増量し、マロニル-CoA が減少した。孵化後1日摂取（1日）の mass-action 比は、0.65であったが孵化後2日絶食し1日餌投与した場合（3日）には餌投与が1日間であっても、その比は摂食群と同じ0.08となった。このことは孵化後1日間は mass-action 比の変化にも lag が存在することを示唆する。

なお15日のヒヨコを2日間絶食するとアセチル-CoA は減少するがマロニル-CoA は変化がなく、従って mass-action 比は増大した（表1）。このことはラット肝臓で認められる変化と逆である⁹⁾。

(4) クエン酸と長鎖脂肪酸-CoA

動物のアセチル-CoA カルボキシラーゼはクエン酸によって活性化を受け、長鎖脂肪酸-CoA により阻害を受ける（文献20参照）。

成長にともなう脂肪酸合成の増大とクエン酸、長鎖脂肪酸-CoA の2つのアロステリック因子との関係

表 1 アセチル-CoA カルボキシラーゼ反応系の代謝物質とその mass-action 比

中間代謝物質	H [*]	1日	2日	3日	4日	8日	12日	絶食2日 (孵化後)	絶食- 摂食 (孵化後)	絶食2日 (15, 16日 を絶食)
		μモル/g肝								
アセチル-CoA	0.030	0.058 ±0.020	0.052 ±0.016	0.085 ±0.011	0.061 ±0.007	0.092 ±0.016	0.090 ±0.015	0.060	0.062 ±0.008	0.048 ±0.007
マロニル-CoA	0.025	0.021 ±0.009	0.014 ±0.010	0.008 ±0.005	0.005 ±0.007	0.004 ±0.009	0.008 ±0.009	0.023	0.007 ±0.008	0.008 ±0.003
A T P	0.088	0.647 ±0.458	1.240 ±0.318	1.030 ±0.238	1.040 ±0.217	0.875 ±0.276	0.926 ±0.200	1.130	1.067 ±0.259	0.601 ±0.163
A D P	1.50	2.10 ±0.41	1.50 ±0.35	1.46 ±0.38	1.00 ±0.12	1.32 ±0.10	1.28 ±0.28	1.99	1.08 ±0.12	1.73 ±0.37
P i	8.90	5.53 ±0.80	4.58 ±0.49	5.52 ±0.36	6.80 ±0.98	7.82 ±0.97	7.35 ±0.96	5.95	6.71 ±0.50	8.29 ±0.41
mass-action 比	1.26	0.65	0.15	0.07	0.06	0.05	0.06	0.40	0.08	0.37

* 5羽をプールした測定値であり他は5羽の平均値±S.D.である。

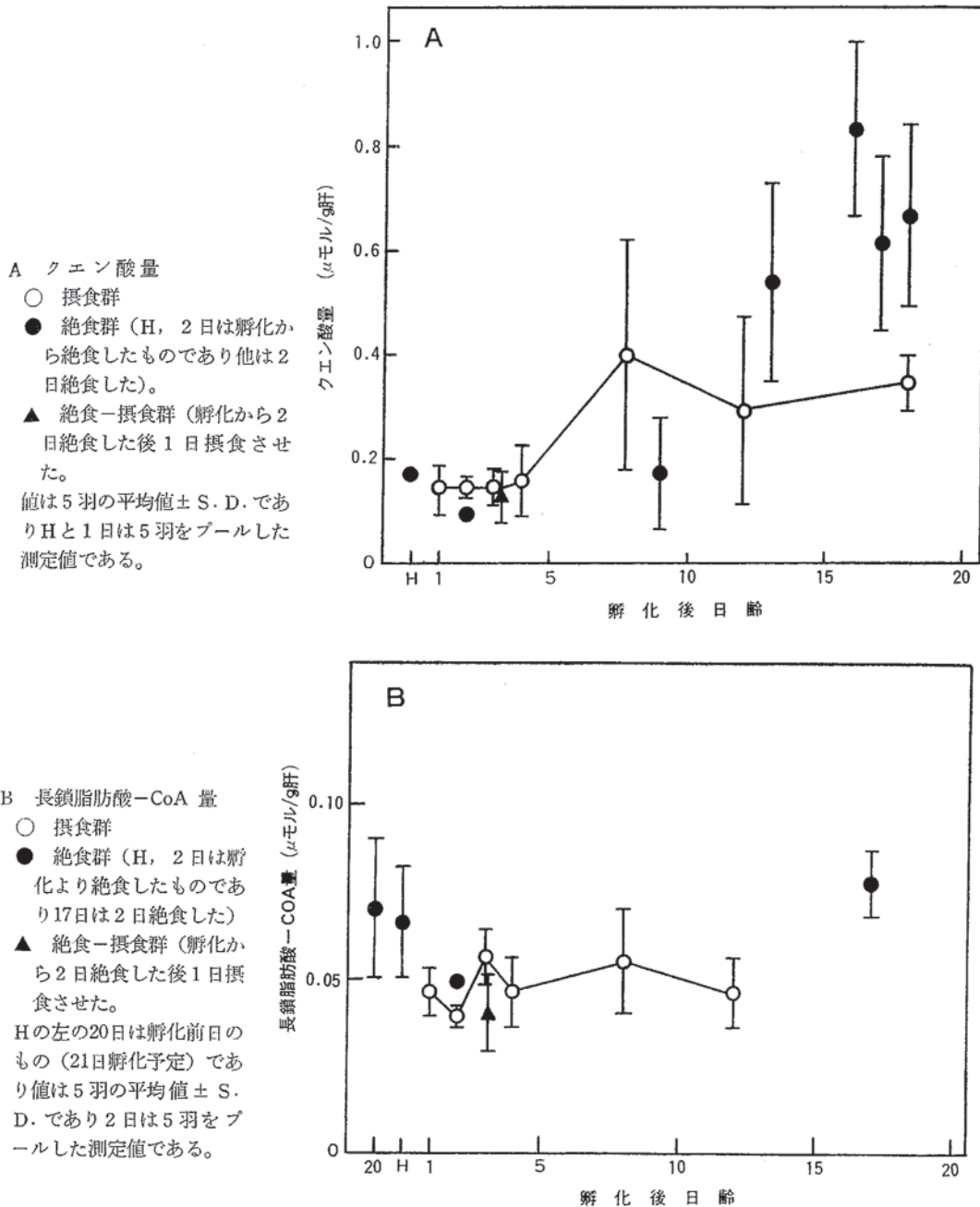


図3 アロステリック因子量の変動

について解析を行なった。クエン酸量は孵化後約1週間いずれの栄養条件でも変化がなかった。このことからクエン酸のアロステリック作用が大きく関与している可能性は考えられない。さらに脂肪酸合成が一定値

となる1週間以後のヒヨコでは、絶食によってクエン酸量は増加の傾向がみられた。

長鎖脂肪酸-CoA量は受精卵20日 (孵化1日前) と孵化当日は孵化後のそれに比べてやや高い値を示し

た。このことは孵化前後の脂肪酸代謝の差異を反映していると考えられる。孵化後2日間絶食群では長鎖脂肪酸-CoA 量の増量はないが、17日のヒヨコ（2日絶食）では増量が認められた。

Ⅳ 考 察

ヒヨコ肝臓の脂肪酸合成速度は孵化直後1日の lag があつた後、非常な促進をうけ約1週間で最大となった。この脂肪酸合成促進に、どの酵素反応段階が鍵となるかを解析するため、律速酵素と考えられているアセチル-CoA カルボキシラーゼ反応の mass-action 比を求めた。表1に示したように、mass-action 比からは孵化当日の時点では、本反応は律速的ではないが、成長にともなう脂肪酸合成増大過程で律速的な役割を果たすようになることがわかった。即ちこのことは、脂肪酸合成系の諸酵素反応の増大が一時的ではなく、アセチル-CoA カルボキシラーゼ反応の増大が他の反応に比し遅れていることを示唆する。

mass-action 比を決定しているのは、アセチル-CoA とマロニル-CoA である（表1）。孵化直後の摂食群、絶食群および餌再投与群のこれら代謝物の量的変動と成長ヒヨコを絶食させた時の変動も孵化直後と成長ヒヨコの脂肪酸合成の調節に差異があることを示唆する。

このアセチル-CoA カルボキシラーゼ反応の促進の遅れを本酵素活性のアロステリック因子による調節と酵素量の調節という2つの点から解析した。クエン酸と長鎖脂肪酸-CoA は共に成長の間ほぼ一定であったことから、細胞内の本酵素活性促進の遅れはこれらアロステック因子の量的変動に基づくとは考えられない。ヒヨコ成長時の諸酵素量はほぼ一律に増量するといわれているが、その増量のパターンは酵素によってやや異なる。

アセチル-CoA カルボキシラーゼと脂肪酸合成酵素の増大に関する Goodridge のデータ²¹⁾を表2に示す。孵化直後（H, 1日）はアセチル-CoA カルボキ

シラーゼは脂肪酸合成酵素の約 $\frac{1}{3}$ であるがその後約 $\frac{1}{9}$ と小さくなる。孵化後餌摂取群では脂肪酸合成促進に lag があること、mass-action 比の低下には2～3日を要するが、孵化後絶食（2日）1日の餌投与で脂肪酸合成の増大と mass-action 比の低下がある。このことは孵化後アセチル-CoA カルボキシラーゼのアポ酵素の蓄積があること、またホロ酵素になっても不活性型で存在すること²²⁾と関連があろう。このことは餌摂取のみが代謝変化をおこすものではなく、餌摂取とはある程度無関係に諸酵素の量的配分が異なってくることを示している。寺岡と沼²³⁾は孵化後の肝アセチル-CoA カルボキシラーゼの量的変動を免疫学的方法とアイソトープ標識ロイシンとの併用によって詳細な研究をし、餌摂取によって本酵素量の増量は酵素合成の促進に起因することを示した。しかし脂肪酸合成酵素は、餌摂取と無関係に増量することが認められている²¹⁾。この2つの酵素の量的調節に差を生ずることはどのような機構によるかは不明である。

Ⅳ 結 語

1. ヒヨコ成長にともなう脂肪酸合成速度の増加がみられた。
2. ビルビン酸脱水素酵素（活性型）も脂肪酸合成と対応して増大した。
3. 脂肪酸合成の律速酵素であるアセチル-CoA カルボキシラーゼの mass-action 比、アロステリック因子等の解析から、成長という長期的な調節にはアロステリック因子の関与は少なく酵素量の調節が主役を演ずること、アセチル-CoA カルボキシラーゼの律速の程度に変化がおこることについて考察した。

表2 アセチル-CoA カルボキシラーゼと脂肪酸合成酵素の量的変動

m ユニット/mg 蛋白量	H	1日	2日	3日	4日	10日
アセチル-CoA カルボキシラーゼ	1.3	1.8	2.5	6.2	7.0	7.2
脂 肪 酸 合 成 酵 素	4.2	6.0	20	44	65	70
比	0.31	0.30	0.13	0.14	0.11	0.10

本表は文献 21) のデータをもとに作成した。

最後に、終始指導をしてくださった橋本隆教授、また多くの面で援助および討論をいただいた桜井武彦教授（信州大学医療技術短期大学部）、宮沢昌子先生に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Ballard, F. D. and Hanson, R. W. : Changes in lipid synthesis in rat liver during development, *Biochem. J.*, 102 : 952-958, 1967
- 2) Goodridge, A. G. : Conversion of [U-¹⁴C] glucose into carbon dioxide, glycogen, cholesterol and fatty acids in liver slices from embryonic and growing chicks, *Biochem. J.*, 108 : 655-661, 1968
- 3) Goodridge, A. G. and Ball, E. G. : Lipogenesis in the pigeon : in vivo studies, *Amer. J. Physiol.*, 213 : 245-249, 1967
- 4) Sakurai, T., Miyazawa, S., Shindo, Y. and Hashimoto, T. : The effect of tryptophan administration on fatty acid synthesis in the liver of the fasted normal rat, *Biochim. Biophys. Acta*, 360 : 275-288, 1974
- 5) Jungas, R. L. : Fatty acid synthesis in adipose tissue incubated in tritiated water, *Biochemistry*, 7 : 3708-3717, 1968
- 6) Wadke, M., Brunengraber, H., Lowenstein, J. M., Dolhun, J. J. and Arsenault, G. P. : Fatty acid synthesis by the liver perfused with deuterated and tritiated water, *Biochemistry*, 12 : 2619-2624, 1973
- 7) Wieland, O. H., Patzelt, C. and Löffler, G. : Active and inactive forms of pyruvate dehydrogenase in rat liver. Effect of starvation and refeeding and of insulin treatment on pyruvate-dehydrogenase interconversion, *Eur. J. Biochem.* 26 : 426-433, 1972
- 8) Söling, H.-D., Kleineke, J., Willms, B., Jansson, G. and Kuhn, A. : Relationship between intracellular distribution of phosphoenolpyruvate carboxykinase. Regulation of gluconeogenesis, and energy cost of glucose formation, *Eur. J. Biochem.* 37 : 233-243, 1973
- 9) Miyazawa, S., Sakurai, T., Shindo, Y., Imura, M. and Hashimoto, T. : The effect of tryptophan administration on fatty acid synthesis in the livers of rats under some nutritional conditions, *J. Biochem.*, in press
- 10) Tabor, H., Mehler, A. H. and Stadtman, E. R. : The enzymatic acetylation of amines, *J. Biol. Chem.*, 204 : 127-138, 1953
- 11) Sanadi, D. R., Littlefield, J. W. and Bock, R. M. : Studies on α -ketoglutaric oxidase II Purification and properties, *J. Biol. Chem.*, 197 : 851-862, 1952
- 12) Burton, D. N., Haavik, A. G. and Porter, J. W. : Comparative studies of the rat and pigeon liver fatty acid synthetases, *Arch. Biochem. Biophys.*, 126 : 141-154, 1968
- 13) Linn, T. C., Pelley, J. W., Pettit, F. H., Hucho, F., Randall, D. D. and Reed, L. J. : α -Keto acid dehydrogenase complexes XV Purification and properties of the component enzymes of the pyruvate dehydrogenase complexes from bovine kidney and heart, *Arch. Biochem. Biophys.*, 148 : 327-342, 1972
- 14) Lynen, F. in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P., Kaplan, N. O., Chance, B., Lipman, F., Cori, C. F., Nord, F. F., Theorell, H. and Ochoa, S., eds) vol. 5 pp. 443-451, Academic Press, New York, 1962
- 15) Yeh, Y.-Y. and Leveille, G. A. : In vitro and in vivo restoration of hepatic lipogenesis in fasted chicks, *J. Nutrition*, 101 : 803-810, 1971
- 16) Reed, L. J. and Cox, D. J. : *The Enzymes* (Boyer, P. D. ed.) vol. I pp. 213-237, Academic Press, New York, 1970
- 17) 宮沢昌子, 進藤泰子 : 未発表
- 18) Kaziyo, Y., Grossaman, A. and Ochoa, S. : Metabolism of propionic acid in animal tissues. XI. Further studies on crystalline propionyl coenzyme A carboxylase, *J. Biol. Chem.*, 240 : 64-67, 1965
- 19) Atkinson, D. E. and Walton, G. M. : Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme, *J. Biol. Chem.*, 242 : 3239-3241, 1967
- 20) Numa, S., Nakanishi, S., Hashimoto, T., Iri-

- tani, N. and Okazaki, T.: Role of acetyl coenzyme A carboxylase in the control of fatty acid synthesis, *Vitamins Hormones*, 28 : 213-243, 1970
- 21) Goodridge, A. G.: On the relationship between fatty acid synthesis and the total activities of acetyl coenzyme A carboxylase and fatty acid synthetase in the liver of prenatal and early postnatal chicks, *J. Biol. Chem.*, 248 : 1932-1938, 1973
- 22) Ryder, E.: The presence of acetyl-coenzyme A carboxylase apoenzyme in the liver of newly hatched chicks, *Biochem. J.*, 128 : 183-185, 1972
- 23) Teraoka, H. and Numa, S.: Content, synthesis and degradation of acetyl-coenzyme A carboxylase in the liver of growing chicks, *Eur. J. Biochem.*, 53 : 465-470, 1975

(50. 7. 3 受稿)