

## 原 著

インスリンによるマウスピルビン酸脱水素酵素複合体の  
短期調節機構について

井 村 満 男

信州大学医学部生化学教室

SHORT TERM REGULATION OF MOUSE PYRUVATE  
DEHYDROGENASE COMPLEX BY INSULIN

Mitsuo IMURA

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,  
Shinshu University

Key words: ピルビン酸脱水素酵素複合体 (pyruvate dehydrogenase complex)  
アロキサン糖尿マウス (alloxan-induced diabetic mouse)  
リン酸化-脱リン酸化反応 (phosphorylation and dephosphorylation reaction)  
活性型-不活性型酵素の転換 (interconversion of active and inactive forms)

## I 結 言

ピルビン酸脱水素酵素複合体 (以下 PDC と略す) はピルビン酸を酸化し, アセチル CoA に変換する反応を触媒する。本反応は糖代謝と脂肪酸代謝との接点であり, その活性調節はエネルギー源利用の切り替えという重要な役割りを果たす。動物組織の PDC は図 1 に示すように, キナーゼによってリン酸化され不活性型となり, ホスファターゼによって脱リン酸化され活性型となる相互変換によって調節されている<sup>1)-3)</sup>。肝臓, 脂肪組織, 腎臓, 心臓から分離したミトコンドリアを用いた *in vitro* 実験の結果から, キナーゼとホスファターゼは  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ , ATP, ADP, ピルビン酸, CoA, アセチル CoA, NAD, NADH によって調節されている<sup>4)-12)</sup>。本酵素は絶食や糖尿状態で活性型が減少し, 不活性型が増加することが認められ, インスリン治療糖尿ではその活性が回復することが知られている<sup>13)-19)</sup>。

ラット腎臓, 心臓についての *in vivo* 実験<sup>13)</sup>あるいは脂肪組織についての *in vivo* および *in vitro* 実験<sup>20)-26)</sup>によると, インスリン投与あるいは添加は, 短期に本酵素の活性型を増加させることが報告されている。しかし, その活性型の増加はどのような機構に

よって起こるか明らかにされていない。特に, 糖尿状態時のインスリン投与による活性型 PDC 量とピルビン酸, CoA, アセチル CoA, NAD<sup>+</sup>, NADH との相関関係を示唆する *in vivo* 実験は得られていない。

今回, 著者は正常マウスとアロキサン糖尿マウスを非絶食群と絶食群に分け, PDC 活性のインスリンによる短期調節機構について解析した。

インスリン投与による PDC 活性化は正常マウスとアロキサン糖尿マウスとでは, 差異があること, PDC 活性化は代謝物質量変化と対応しないことから, 糖尿マウスでは正常マウスとは異なり, 従来知られている調節機構のみならず, 他因子の関与が大きいことを考察した。

## II 実験方法

## A 実験動物

7-10週令 ddN 系雄性マウスを用いた。16時間絶食後, マウスをエーテル麻酔し, アロキサン (半井化学薬品株式会社 MIR 7564) 0.1mg/g 体重量を 0.01 ml/g 体重量の生理食塩水に溶解し, 直ちに尾静脈より注射した。対照マウスは同等量の生理食塩水を注射した。アロキサン投与後24時間はインスリン放出による低血糖を防ぐ為に5%ブドウ糖を自由に飲用させ

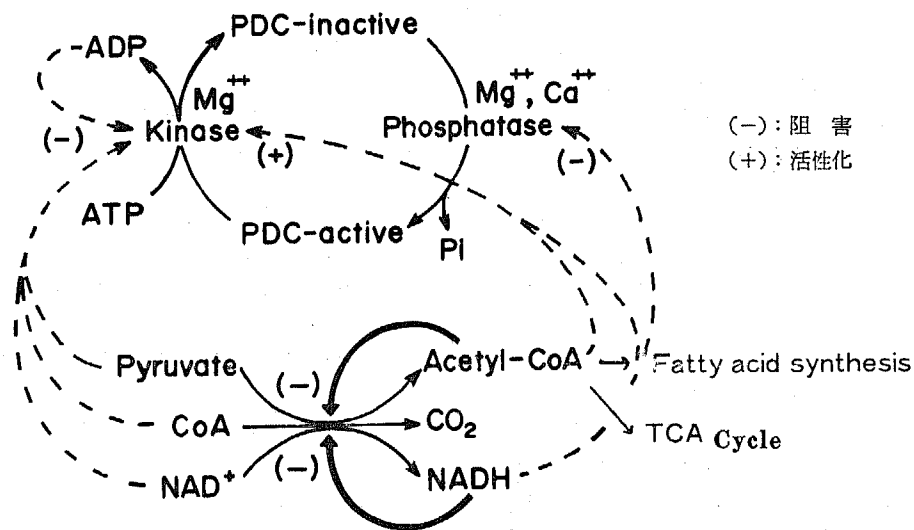


図1 PDCの活性調節機構

た。その後は水道水を自由に与えた。対照マウスも同様に5%ブドウ糖と水道水を与えた。アロキサンおよび対照液投与10日後より48時間絶食群と非絶食群に分けて実験に用いた。急性糖尿マウスの実験ではアロキサン投与から40時間後にマウスを屠殺し、実験に用いた。

インスリン(ウシ膵臓結晶インスリン, シグマ社 No. 1-500) 0.02単位/g 体重量を 0.01ml/g 体重量の生理食塩水に溶解し、腹腔内に注射し、10分、30分後に屠殺した。

B 組織および血液処理

実験動物は軽くエーテル麻酔し、後肢の皮膚を剝離し、大腿の上部より切断した。分離した後肢は予め液体窒素で冷却したアルミニウム・ブロックで急速凍結した。その後、肝臓、心臓、腎臓を順次可及的すみやかに摘出し、下肢筋と同様方法で急速凍結した。血液は大腿動静脈からヘパリン試験管に採取した。血液はすみやかに 0.6N HClO<sub>4</sub>-2.5MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> で除蛋白中和し、中間代謝物の測定に用いた。残部血液から血漿を分離し、インスリン定量に用いた。各臓器は -65°C で保存し、その PDC 活性と中間代謝物の測定を2週間以内に行なった。

PDC 活性測定のため組織抽出液を下記の通り作成した。骨格筋と心筋の場合には5倍量の 20mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.0 (含1%ルブロール, 40%グリセロール) を加え、ウルトラ・トラックス (Janke

and Kunkel 株式会社, タイプ 18-10) でホモジエネートした。つづいて、スーパーソニック・バイブレーター (富永製作所株式会社, モデル UR-150P) で1分間超音波処理した。この間、ホモジエネートをドライアイス-エチレングリコールで冷却し、温度を1°C以下に保った。ホモジエネートを2,000g, 5分間遠心し、その上清を PDC 活性に用いた。肝臓と腎臓の場合には5倍量の 20mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.0 を加えウルトラトラックスでホモジエネートした。つづいて、10,000g, 10分間遠心し、その上清を PDC 活性測定に用いた。

中間代謝物質量測定のために、肝臓の一部は 0.6N HClO<sub>4</sub>-2.5MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> で除蛋白中和した。

C 測定法

1. ピルビン酸脱水素酵素複合体活性の測定

PDC 活性はアシルアミンアセチルトランスフェラーゼ [EC 2. 3. 1. 5] 反応に共役させ、アセチル CoA のパラニトロアニリンへの転移反応から生成するパラニトロアセトアニリドを測定する Wieland らの方法<sup>14)</sup>で測定した。活性測定は 25°C で行った。1分間に 1μmole パラニトロアセトアニリドを生成する活性を 1 unit とした。新鮮組織抽出液の活性を活性型 PDC とした。抽出液をピルビン酸脱水素酵素ホスファターゼとインキュベートし、不活性型酵素を活性型酵素に転換させたホスファターゼ反応後の PDC 活性を全活性とした。ホスファターゼ反応液は 20mM リ

ン酸カリウム緩衝液 pH 7.0, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 5 units/ml ビルビン酸脱水素酵素ホスファターゼ標品および抽出液 (20-40 $\mu$ l) で、総量 100 $\mu$ l とし、25°C 10分間インキュベートした。

## 2. ビルビン酸脱水素酵素ホスファターゼ活性の測定

ビルビン酸脱水素酵素ホスファターゼは進藤の記載する方法<sup>27)</sup>に準じて測定した。不活性型 PDC 1 unit 相当を1分間で活性化するホスファターゼ活性を1 unit とした。

## 3. 各種中間代謝物質量の測定

血中ブドウ糖は標準グルコース・オキシダーゼ・キット (ベーリンガー・マンハイム山之内株式会社) を用いて測定した。血漿 Immunoreactive insulin (IRI) はインスリンリアキット (ダイナボット RI 研究所) を用いた2抗体法で測定した。ビルビン酸, アセト酢酸, 3-ヒドロキシ酪酸, ATP, ADP は酵素法<sup>28)</sup>で測定した。CoA とアセチル CoA は Allred と Guy の方法<sup>29)</sup>で測定した。抽出液の蛋白量はビュレット法で測定した。

## D 試 薬

アリルアミンアセチルトランスフェラーゼは Wieland らの方法<sup>14)</sup>によりハト肝臓より精製した。PDC ホスファターゼは Siess と Wieland の方法<sup>30)</sup>によりハト胸筋から精製した。ホスファターゼ活性測定の基質に用いた PDC 標品はブタ心筋より Cooper らの方法<sup>31)</sup>で精製した。CoA, NAD<sup>+</sup>, NADH は協和醗酵工業株式会社のもを用い、その他の中間代謝物質測定に用いた酵素類はベーリンガー・マンハイム山之

内株式会社のもを使用した。ルブロールは花王アトラス株式会社のエマルゲン 180<sup>®</sup>を用いた。その他の試薬は市販最良品を用いた。

推計学的検定法は Student's *t*-test を使用し、平均値 $\pm$ S. D. で表現した。

## II 実験結果

### A 血中ブドウ糖および総ケトン体の変化

表1に示すように、糖尿マウスの血中ブドウ糖は非絶食、絶食群ともに著明に増加した。正常マウスの血中ブドウ糖は絶食により有意に低下 ( $p < 0.01$ ) したが、糖尿マウスのそれは低下しなかった。インスリン投与によって、正常マウスの血中ブドウ糖は非絶食、絶食群ともに30分後に低下した。糖尿マウスの非絶食群では30分後に有意に低下したが、絶食群では10分後から低下した。

正常マウスの血中総ケトン体 (アセト酢酸+3-ヒドロキシ酪酸) は絶食により有意に増加したが、糖尿マウスの場合には、増加傾向が認められたが、正常マウス程の増加は見られなかった。インスリン投与によって、正常マウスの血中総ケトン体は非絶食群では不変であった。絶食群では10分後に増加したが、30分後には、すでに減少した。糖尿マウスの血中総ケトン体はいずれの群も不変であった。絶食による血中ブドウ糖と総ケトン体の変化は糖尿マウスに比べ正常マウスの方が大であった。表には示していないが、インスリン投与前の血漿 IRI は正常マウスは  $16 \pm 5 \mu$ units/ml, 糖尿マウスは  $6 \pm 3 \mu$ units/ml であった。

表 1 インスリン投与による血中ブドウ糖および総ケトン体の変化

インスリン投与前を0時間とし、10分、30分はインスリン投与後の時間を示す。結果は3-6匹のマウスの平均値 $\pm$ S. D. である。

	時間 (分)	正 常 マ ウ ス		糖 尿 マ ウ ス	
		非 絶 食	48時間絶食	非 絶 食	48時間絶食
ブドウ糖 (mg/100ml)	0	126 $\pm$ 27 (5)	62 $\pm$ 15 (6)	481 $\pm$ 114 (5)	360 $\pm$ 20 (6)
	10	117 $\pm$ 74 (4)	74 $\pm$ 9 (3)	350 $\pm$ 75 (4)	250 $\pm$ 50 <sup>a</sup> (4)
	30	68 $\pm$ 11 <sup>a</sup> (4)	39 $\pm$ 10 <sup>a</sup> (4)	219 $\pm$ 104 <sup>a</sup> (4)	80 $\pm$ 25 <sup>b</sup> (4)
総ケトン体 ( $\mu$ M)	0	163 $\pm$ 77 (5)	620 $\pm$ 293 (6)	294 $\pm$ 131 (5)	574 $\pm$ 227 (6)
	10	136 $\pm$ 56 (4)	1101 $\pm$ 161 <sup>a</sup> (3)	213 $\pm$ 91 (4)	491 $\pm$ 147 (4)
	30	147 $\pm$ 14 (4)	597 $\pm$ 164 (4)	224 $\pm$ 83 (4)	348 $\pm$ 160 (4)

(n): 匹数を示す。

a, b: 0分値に対する10分値および30分値との比較で a は  $p < 0.05$ , b は  $p < 0.01$  である。

B ピルビン酸脱水素酵素複合体活性の変化

表2で示すように、どの臓器の全 PDC 活性(活性型+不活性型)も絶食による変化は認めなかった。正常マウスの全 PDC 活性と糖尿マウスのそれとを比べた場合、肝臓、骨格筋、腎臓の活性には変化なかったが、心臓の活性は著明に減少した。

活性型 PDC 量はキナーゼの活性量とホスファターゼの活性量によって決定されると考えられる。従って、これら両反応の活性を考察する場合には活性型 PDC/全PDC 活性(%)というパラメーターを用いる。表3で示すように、正常マウスの肝臓、骨格筋の PDC 活性(%)は絶食によって有意に減少したが、心臓、腎臓の活性は不変であった。糖尿マウスの場合、絶食によって、骨格筋で減少し、腎臓で増加した。正常マウスの非絶食群の PDC 活性(%)と糖尿マウスのそれとを比べた場合、心臓のみが有意に増加した。

インスリン投与による活性型 PDC の変化を表4で

示す。全 PDC 活性は少なくとも30分後まではどの臓器においても変動しなかった。正常マウスの肝臓、骨格筋、心臓の活性型 PDC は非絶食、絶食のいずれの群でも30分後に増加したが、腎臓の活性型 PDC は変化はなかった。糖尿マウス非絶食群では、いずれの臓器においても活性型 PDC は変化しなかった。しかし、絶食群では、肝臓、骨格筋、心臓の活性型 PDC は10分後に増加し、30分後には0分値のレベルにもどった。この場合も腎臓の活性型 PDC は変化しなかった。なお、正常マウスに生理的食塩水のみ注射した対照実験ではどの臓器の活性型 PDC も変化しなかった。

C 肝臓におけるピルビン酸、CoA/アセチル CoA比、アセト酢酸/3-ヒドロキシ酪酸比の変化

活性型 PDC 量を調節するホスファターゼおよびキナーゼは図1で示した代謝物によって調節されている。すなわち、キナーゼはピルビン酸、ADP、CoA、

表 2 全 PDC 活性  
結果は4-6匹のマウスの 平均値±S.D. である。

組	織	正 常 マ ウ ス		糖 尿 マ ウ ス	
		非 絶 食	48時間絶食	非 絶 食	48時間絶食
(munits/mg 蛋白)					
肝	臓	1.99±0.41 (5)	2.73±0.96 (5)	2.36±0.98 (4)	3.72±0.74 (6)
骨	格筋	3.45±1.37 (5)	2.79±0.95 (5)	2.07±0.73 (4)	3.49±1.62 (5)
心	臓	15.7±3.45 (4)	15.3±2.57 (5)	5.68±2.69 <sup>a</sup> (4)	4.18±1.21 (6)
腎	臓	5.37±1.57 (5)	7.64±1.26 (5)	8.58±2.92 (4)	6.16±1.69 (5)

(n): 匹数を示す。

a: 正常マウス非絶食群と糖尿マウス非絶食群との比較で a は p<0.01である。

表 3 活性型 PDC / 全 PDC 活性 (%)  
結果は4-6匹のマウスの 平均値±S.D. である。

組	織	正 常 マ ウ ス		糖 尿 マ ウ ス	
		非 絶 食	48時間絶食	非 絶 食	48時間絶食
(%)					
肝	臓	41±10 (5)	20±4 <sup>a</sup> (5)	48±14 (4)	32±9 (6)
骨	格筋	21±8 (5)	10±3 <sup>a</sup> (5)	20±4 (4)	14±2 <sup>a</sup> (5)
心	臓	3±1 (5)	2±1 (5)	12±6 <sup>b</sup> (4)	14±4 (6)
腎	臓	40±16 (5)	29±5 (5)	39±12 (4)	75±25 <sup>a</sup> (5)

(n): 匹数を示す。

a: 非絶食群と48時間絶食群との比較で a は p<0.05。

b: 正常マウス非絶食群と糖尿マウス非絶食群との比較で b は p<0.01。

表 4

インスリン投与による活性型 PDC の変化  
結果は 3-6 匹のマウスの 平均値 ± S. D. である。

組	織	時間 (分)	正 常 マ ウ ス		糖 尿 マ ウ ス	
			非 絶 食	48時間絶食	非 絶 食	48時間絶食
(munits/mg 蛋白)						
肝	臓	0	0.82±0.25 (5)	0.54±0.25 (5)	1.12±0.49 (4)	1.20±0.42 (6)
		10	0.97±0.55 (5)	0.52±0.32 (5)	1.05±0.41 (4)	2.62±0.50 <sup>a</sup> (4)
		30	1.46±0.22 <sup>a</sup> (4)	1.14±0.32 <sup>a</sup> (4)	1.56±0.29 (3)	1.93±0.89 (3)
骨 格	筋	0	0.71±0.25 (5)	0.27±0.12 (5)	0.42±0.12 (4)	0.50±0.12 (5)
		10	0.75±0.09 (4)	0.22±0.05 (5)	0.70±0.35 (4)	1.39±0.42 <sup>a</sup> (4)
		30	1.02±0.25 <sup>a</sup> (4)	0.64±0.16 <sup>a</sup> (4)	0.53±0.19 (3)	0.45±0.05 (3)
心	臓	0	0.45±0.11 (4)	0.33±0.14 (5)	0.67±0.20 (4)	0.57±0.04 (6)
		10	1.17±0.48 (5)	0.31±0.05 (5)	0.68±0.21 (4)	1.14±0.25 <sup>a</sup> (4)
		30	1.63±0.55 <sup>a</sup> (3)	0.66±0.16 <sup>a</sup> (4)	0.68±0.25 (3)	0.30±0.04 <sup>a</sup> (3)
腎	臓	0	2.13±1.29 (5)	2.21±0.74 (5)	3.36±0.36 (4)	4.59±1.85 (4)
		10	2.87±0.79 (4)	2.30±1.56 (5)	3.91±0.68 (4)	6.19±1.25 (4)
		30	3.46±0.65 (4)	3.06±1.34 (4)	2.96±1.29 (3)	5.61±2.13 (3)

(n) : 匹数を示す。

a : 0 分値に対する10分値および30分値との比較で a は  $p < 0.05$  である。

NAD<sup>+</sup> によって阻害を受け、アセチル CoA, NADH により活性化される。ホスファターゼは NADH により阻害を受ける。また、ホスファターゼは Mg<sup>++</sup> の存在下で Ca<sup>++</sup> によって活性化される。従って、CoA/アセチル CoA 比およびアセト酢酸/3-ヒドロキシン酪酸比(ミトコンドリア内の NAD<sup>+</sup>/NADH 比を反映<sup>32)</sup>)の増加はキナーゼに対しては阻害的に、ホスファターゼに対しては促進的に働き、活性型 PDC 量の増加をもたらすものと考えられる。

表 5 A) で示すように、正常マウスでは、絶食によってビルビン酸量は増加した。CoA/アセチル CoA 比は絶食による変化はなかったが、アセト酢酸/3-ヒドロキシン酪酸比は著明に減少した。インスリン投与によって、活性型 PDC の増加と対応したビルビン酸量の増加が認められた。しかし、CoA/アセチル CoA 比は不変であり、アセト酢酸/3-ヒドロキシン酪酸比は非絶食群30分値では、活性型 PDC 量の変動とは逆に低下した。

表 5 B) で示すように、糖尿マウス非絶食群のビルビン酸量、CoA/アセチル CoA 比は正常マウスのそれ(表 5 A)) と比べ変化は認められなかったが、アセト酢酸/3-ヒドロキシン酪酸比は著明に減少した。糖尿マウスを絶食させた場合、ビルビン酸量は正常マウスで

見られた程の増加はなく、CoA/アセチル CoA 比、アセト酢酸/3-ヒドロキシン酪酸比は変化しなかった。糖尿マウスにインスリンを投与した場合、ビルビン酸量の増加はなく、CoA/アセチル CoA 比も変化しなかった。アセト酢酸/3-ヒドロキシン酪酸比は非絶食群の10分値は増加し、絶食群の30分値では低下した。

#### D ビルビン酸脱水素酵素ホスファターゼの変化

各臓器のホスファターゼ活性を表 6 に示す。いずれのマウスも各臓器の PDC ホスファターゼは絶食による変化を認めていない。糖尿マウス非絶食群の PDC ホスファターゼは正常マウスのそれと比べ変化を認めなかった。インスリン投与による正常マウス絶食群の心臓の PDC ホスファターゼは30分後に著明に増加している(0分値 27.9±9.91 munits/mg 蛋白, 30分値 68.4±7.42 で  $p < 0.001$ ) が、その他の臓器の PDC ホスファターゼは不変であった。正常マウス絶食群の骨格筋では30分後に増加傾向を示しているが、その他の臓器では不変であった。糖尿マウス非絶食群ではいずれの臓器も変化しなかったが、絶食群では肝臓の活性が経時的に減少傾向を認めた。その他の臓器では不変であった。

ピルビン酸脱水素酵素複合体

表 5 インスリン投与による肝臓のピルビン酸量, CoA/アセチル CoA 比  
アセト酢酸/3-ヒドロキシ酪酸比の変化

A) 正常マウス

活性型 PDC は表 4 で示した平均値のみを示す。その他の結果は 3-6 匹のマウスの  
平均値 ± S. D. である。

時間 (分)	活性型 PDC		ピルビン酸		CoA/アセチル CoA 比		アセト酢酸/3-ヒドロキシ酪酸比	
	非絶食	48時間 絶食	非絶食	48時間 絶食	非絶食	48時間絶食	非絶食	48時間絶食
	(munits/mg 蛋白)		(nmoles/g 湿重量)					
0	0.82	0.54	9 ± 2 (5)	28 ± 2 (5)	0.97 ± 0.33 (5)	1.25 ± 0.31 (5)	0.43 ± 0.14 (5)	0.07 ± 0.02 (5)
10	0.97	0.52	16 ± 2 <sup>b</sup> (5)	25 ± 3 (5)	1.14 ± 0.26 (5)	1.35 ± 0.33 (5)	0.32 ± 0.10 (5)	0.07 ± 0.01 (5)
30	1.46	1.14	19 ± 5 <sup>b</sup> (4)	36 ± 6 <sup>a</sup> (4)	0.65 ± 0.15 (4)	1.63 ± 0.41 (4)	0.12 ± 0.03 <sup>b</sup> (4)	0.08 ± 0.01 (4)

B) 糖尿マウス

時間 (分)	活性型 PDC		ピルビン酸		CaA/アセチル CoA 比		アセト酢酸/3-ヒドロキシ酪酸比	
	非絶食	48時間 絶食	非絶食	48時間 絶食	非絶食	48時間絶食	非絶食	48時間絶食
	(munits/mg 蛋白)		(nmoles/g 湿重量)					
0	1.12	1.20	14 ± 5 (5)	28 ± 7 (6)	1.42 ± 0.37 (5)	1.96 ± 0.69 (6)	0.08 ± 0.04 (5)	0.06 ± 0.02 (6)
10	1.05	2.62	21 ± 4 (5)	33 ± 7 (4)	1.03 ± 0.28 (5)	1.85 ± 0.55 (4)	0.32 ± 0.08 <sup>c</sup> (5)	0.04 ± 0.01 (4)
30	1.56	1.93	15 ± 1 (4)	39 ± 21 (3)	0.96 ± 0.45 (4)	1.45 ± 0.32 (3)	0.10 ± 0.05 (4)	0.03 ± 0.01 (3)

(n): 匹数を示す。

a, b, c: 0 分値に対する10分値および30分値との比較で a は  $p < 0.05$ , b は  $p < 0.01$ ,

c は  $p < 0.001$  である。

表 6 インスリン投与による PDC  
ホスファターゼの変化

非絶食群のデータは 3-6 匹のマウスの平均値を示す。48時間絶食群のデータは 3-6 匹のマウスの組織をプールしたもので測定した値を示す。

組織	時間 (分)	正常マウス		糖尿マウス	
		非絶食	48時間 絶食	非絶食	48時間 絶食
		(munits/mg 蛋白)			
肝 臓	0	8.93	8.35	6.83	7.30
	10	9.06	8.10	8.36	5.60
	30	6.96	8.10	8.79	3.75
骨格筋	0	17.9	16.2	11.5	16.7
	10	14.7	17.5	14.1	16.7
	30	12.7	20.0	12.9	12.5
心 臓	0	27.9	45.8	35.3	41.7
	10	34.0	41.7	41.1	41.7
	30	68.4	43.7	41.4	43.7
腎 臓	0	48.6	37.5	30.5	27.1
	10	44.7	35.4	37.9	37.5
	30	48.5	39.6	25.7	35.4

IV 考 察

動物組織の PDC 活性調節機構は 3つ考えられる (図 1 参照)。すなわち、

- 1) 酵素量による調節
- 2) リン酸化-脱リン酸化反応による活性型-不活性型の転換
- 3) 反応生成物 (アセチル CoA, NADH) による触媒活性阻害作用

慢性糖尿ラットの骨格筋で酵素量 (全 PDC 活性) はわずかに減少する<sup>33)</sup>こと、成長期の脳<sup>34)</sup>、授乳期乳腺<sup>35)</sup>のような特別な場合には酵素量が増加することが報告されているが、一般的には酵素量は栄養条件、ホルモン条件の変化による影響は受けない。

今回の実験では、表 2 で示したように、糖尿マウスの全 PDC 活性は肝臓、骨格筋、腎臓では変化を認めなかったが、心臓で著明な減少を認めた。慢性糖尿ラットの心筋、骨格筋でミトコンドリアのマーカー酵素が減少することが知られており<sup>36)-38)</sup>、ミトコンドリア量の減少が、骨格筋、心臓の全 PDC 活性の減少と関係があると思われる。この点に関して、ミトコン

ドリアのマーカーク酵素の1つであるコハク酸脱水素酵素 [EC 1. 3. 99. 1] の活性を骨格筋と心臓について検討した結果、骨格筋では、正常マウス  $4.81 \pm 1.52$  munits/mg 蛋白 (5匹の平均値  $\pm$  S. D.) に対し糖尿マウス  $2.37 \pm 0.99$  munits/mg 蛋白と減少した。心臓でも、正常マウス  $54.3 \pm 13.3$  munits/mg 蛋白に対し糖尿マウス  $20.2 \pm 3.87$  munits/mg 蛋白と有意の減少を認めた。

活性型 PDC 量の存在比は図 1 で示すように、ホスファターゼとキナーゼの相対的な活性によって調節される。インスリンによる短期の活性型 PDC 量の変化はホスファターゼの活性化かキナーゼの阻害あるいは両方の作用によるものと考えられる。キナーゼとホスファターゼの酵素量は活性型-不活性型の変換に影響を及ぼすと考えられる。しかし、キナーゼとホスファターゼは PDC と比較的強く結合していること、精製 PDC にはホスファターゼはないがキナーゼが残存すること、結晶ピルビン酸脱水素酵素 [EC 1. 2. 4. 1] 標品はキナーゼがないがキナーゼ反応を解析し得る十分な量の標品を精製することができないことから、いまだキナーゼとホスファターゼに関する報告は Mukkerjee と Jungas<sup>26)</sup> や進藤<sup>27)</sup> の報告以外にはない。本実験では、ホスファターゼ活性を測定したが、活性型 PDC と関連した有意の変化は正常マウス非絶食群の心臓のホスファターゼだけであった。

急性糖尿ラットの活性型 PDC/全 PDC 活性 (%) は肝臓、骨格筋、心臓で減少することが報告されている<sup>13)14)17)21)</sup>。慢性糖尿ラットでは骨格筋のみ減少することが報告されている<sup>17)</sup>。糖尿マウス非絶食群の活性型 PDC/全 PDC 活性 (%) は正常マウスのそれと比べ、心臓で著明に増加し、他の臓器には変化を認めていない (表 3)。本実験使用の糖尿マウスは慢性糖尿状態 (アロキサン注射後 12 日) である。尚、急性糖尿状態 (アロキサン注射後 40 時間) での各臓器の PDC 活性を調べた結果、腎臓以外の臓器の活性型 PDC/全 PDC 活性 (%) は著明な減少が認められた (肝臓: 正常マウス  $24 \pm 5$  対糖尿マウス  $5 \pm 2$ , 骨格筋: 正常マウス  $43 \pm 15$  対糖尿マウス  $7 \pm 2$ , 心臓: 正常マウス  $10 \pm 4$  対糖尿マウス  $2 \pm 1$ , 腎臓: 正常マウス  $52 \pm 17$  対糖尿マウス  $46 \pm 9$ )。これらの結果から、急性糖尿状態から慢性糖尿状態に移行するにつれ、活性型 PDC 量が正常群のレベルまで回復するものと考えられる。

急性糖尿状態あるいは絶食による活性型 PDC 量の

減少は血中遊離脂肪酸量の増加につづく組織内アセチル CoA の増量、 $NAD^+/NADH$  比の減少、長鎖脂肪酸 CoA によるミトコンドリア膜 ATP-ADP 交換阻害のためのミトコンドリア内 ATP/ADP 比の増大などに基づくホスファターゼの阻害あるいはキナーゼの活性化の為であろうと考えられている<sup>30)40)</sup>。本実験においては、正常マウスでは絶食によって、血中総ケトン体の増量と肝臓の  $NAD^+/NADH$  比の著明な減少が認められ、これに対応して活性型 PDC/全 PDC 活性 (%) の減少が認められた。急性糖尿マウスあるいは絶食に於ける PDC 活性の著明な減少は、これまでのラットについての報告と一致している。

しかし、慢性糖尿マウスでは正常マウスと比べ肝臓の  $NAD^+/NADH$  比の著明な減少があるにもかかわらず、活性型 PDC/全 PDC 活性 (%) は変化しない。正常マウス非絶食群にインスリンを投与した場合、活性型 PDC は増加した。しかしこの際、肝臓のピルビン酸は増量したが  $NAD^+/NADH$  比は逆に低下していた。糖尿マウスでは活性型 PDC の増加と対応した代謝物質量の変動はみられなかった。

肝臓 ATP/ADP 比は正常マウスと糖尿マウスで有意な差がなく (正常マウス:  $0.90 \pm 0.12$ , 糖尿マウス:  $1.01 \pm 0.30$ )、インスリン投与によっても変動はなかった。活性型 PDC 量調節因子とされている  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$  に関しては、ミトコンドリア内の  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$  の変動についての解析がある<sup>41)-43)</sup>が未だ不明の点が多い。

本実験では、骨格筋、心臓、腎臓の代謝物質量は測定しなかったが、慢性糖尿時、血中遊離脂肪酸量や高ケトン血症があることから CoA/アセチル CoA 比、 $NAD^+/NADH$  比の減少することが予測される。しかし、骨格筋、腎臓の活性型 PDC/全 PDC 活性 (%) は慢性糖尿状態でも対照正常群と変わらず、心筋では逆に著しく増加した。

測定した組織代謝物質量はミトコンドリア内のそれを反映するかどうかは不明であるが、少なくとも急性糖尿、絶食時の活性型 PDC 量の変動は、今まで言われて来ている諸代謝物によるキナーゼとホスファターゼの活性調節に基づくという仮説と矛盾しない。しかし、慢性糖尿マウスで得られた実験結果やインスリン投与実験の結果はこの仮説のみでは説明できない。最近、Kerbey ら<sup>44)</sup>のラット心臓のミトコンドリアの実験で、正常ラットの活性型 PDC 量は CoA/アセチル CoA 比、ATP/ADP 比、 $NAD^+/NADH$  比との対応

が認められたが、糖尿ラットでは対応関係がなかった。したがって、糖尿ラットおよび糖尿マウスでは CoA/アセチル CoA 比, ATP/ADP 比, NAD<sup>+</sup>/NADH 比のみならず他の因子も PDC の活性型-不活性型の変換に関与している可能性が考えられる。

### V 結 語

1) 正常マウスおよび糖尿マウスの各組織のピルビン酸脱水素酵素複合体レベルを測定した。

2) インスリン投与により、正常マウスと糖尿マウスの本酵素複合体活性は全く異なる反応性を示した。

3) インスリン投与により、正常マウスの PDC 活性は絶食群、非絶食群とも同様に増加した。しかし、糖尿マウスでは、非絶食群では全く変動がなく、絶食群で10分後に増加し30分後には0分値のレベルにもどった。

4) 肝臓ピルビン酸脱水素酵素複合体活性型量とその調節因子である代謝物質量を測定した結果、糖尿マウスでは両者の対応が認められなかった。

5) 糖尿マウスでは正常マウスとは異なり、従来知られている調節機構のみならず、他因子の関与が大きいことを考察した。

最後に本研究に際し、終始御指導下さった橋本隆教授と種々の援助をいただいた生化学教室諸氏に心より感謝いたします。

本研究は1977年10月第50回日本生化学会大会(東京)にて発表した。

### 参考文献

- 1) Linn, T. C., Pettit, F. H. and Reed, L. J.:  $\alpha$ -Keto acid dehydrogenase complex. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 62 : 234-241, 1969
- 2) Linn, T. C., Pettit, F. H., Hucho, F. and Reed, L. J.:  $\alpha$ -Keto acid dehydrogenase complex. XI. Comparative studies of regulatory properties of the pyruvate dehydrogenase complex from kidney, heart and liver mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 64 : 227-234, 1969
- 3) Siess, E. A., Wittman, J. and Wieland, O. H.

: Interconversion and kinetic properties of pyruvate dehydrogenase from brain. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352 : 447-452, 1971

- 4) Hucho, F., Randall, D. D., Roche, T. E., Burgett, M. W., Pelley, J. W. and Reed, L. J.:  $\alpha$ -Keto acid dehydrogenase complexes. XVII. Kinetic and regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and pyruvate dehydrogenase phosphate from bovine kidney and heart. Arch. Biochem. Biophys., 151 : 328-340, 1972
- 5) Martin, B. R., Denton, R. M., Pask, H. T. and Randle, P. J.: Mechanisms regulating adipose-tissue pyruvate dehydrogenase. Biochem. J., 129 : 763-773, 1972
- 6) Wieland, O. H. and Portenhausser, R.: Regulation of pyruvate dehydrogenase interconversion in rat-liver mitochondria as related to the phosphorylation state of intramitochondrial adenine nucleotides. Europ. J. Biochem., 45 : 577-588, 1974
- 7) Taylor, S. I., Mukherjee, C. and Jungus, R. L.: Regulation of pyruvate dehydrogenase in isolated rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 250 : 2028-2035, 1975
- 8) Cooper, R. H., Randle, P. J. and Denton, R. M.: Stimulation of phosphorylation and inactivation of pyruvate dehydrogenase by physiological inhibitors of the pyruvate dehydrogenase reaction. Nature, 257 : 808-809, 1975
- 9) Siess, E. A. and Wieland, O. H.: Regulation of pyruvate dehydrogenase interconversion in isolated hepatocytes by the mitochondrial ATP/ADP ratio. FEBS Lett., 52 : 226-230, 1975
- 10) Pettit, F. H., Pelly, J. W. and Reed, L. J.: Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase by acetyl-CoA/CoA and NADH/NAD ratios. Biochem. Biophys. Res. Commun., 65 : 575-582, 1975
- 11) Chiang, P. K. and Sacktor, B.: Control of pyruvate dehydrogenase activity in intact



- cardiac mitochondria. Regulation of the inactivation and activation of the dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 250 : 3399-3408, 1975
- 12) Hansford, R. G. : Studies on the effects of coenzyme A-SH: acetyl coenzyme A, nicotinamide adenine dinucleotide: reduced nicotinamide adenine dinucleotide, and adenine diphosphate: adenosine triphosphate ratios on the interconversion of active and inactive pyruvate dehydrogenase in isolated rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 251 : 5483-5489, 1976
- 13) Wieland, O. H., Siess, E.A., Schulze-Wethmar, F. H., Funcke, H. G. and Winton, B. : Active and inactive forms of pyruvate dehydrogenase in rat heart and kidney: Effect of diabetes, fasting and refeeding on pyruvate dehydrogenase interconversion. *Arch. Biochem. Biophys.*, 143 : 593-601, 1971
- 14) 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. *Europ. J. Biochem.*, 26 : 426-433, 1972
- 15) Weiss, L., Löffler, G. and Wieland, O. H. : Regulation by insulin of adipose tissue pyruvate dehydrogenase. A mechanism controlling fatty acid synthesis from carbohydrates. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 355 : 363-377, 1974
- 16) Kankel, K. F. and Reinauer, H. : Activity of the pyruvate dehydrogenase complex in the mammary gland of normal and diabetic rats. *Diabetologia*, 12 : 149-154, 1976
- 17) 井村満男: ストレプトゾトシン糖尿ラットおよびインスリン投与ラットにおける *in vivo*, 骨格筋の解糖系調節機構に関する研究. *糖尿病*, 19 : 318-325, 1976
- 18) Field, B. and Coore, H. G. : Control of rat mammary-gland pyruvate dehydrogenase by insulin and prolactin. *Biochem. J.*, 156 : 333-337, 1976
- 19) Hagg, S. A., Taylor, S. L. and Ruderman, N. B. : Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Pyruvate dehydrogenase activity in starvation, diabetes and exercise. *Biochem. J.*, 158 : 203-210, 1976
- 20) Jungas, R. L. : Effect of insulin on fatty acid synthesis from pyruvate, lactate, or endogenous sources in adipose tissue: Evidence for hormonal regulation pyruvate dehydrogenase. *Endocrinology*, 86 : 1368-1375, 1970
- 21) Jungas, R. L. : Hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase. *Metabolism*, 20 : 43-53, 1971
- 22) Denton, R. M., Coore, H. G., Martin, B. R. and Randle, P. J. : Insulin activates pyruvate dehydrogenase in rat epididymal adipose tissue. *Nature*, 231 : 115-116, 1971
- 23) Coore, H. G., Denton, R. M., Martin, B. R. and Randle, P. J. : Regulation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase by insulin and other hormones. *Biochem. J.*, 125 : 115-127, 1971
- 24) Weiss, L., Löffler, G., Schirmam, A. and Wieland, O. H. : Control of pyruvate dehydrogenase interconversion in adipose tissue by insulin. *FEBS Lett.*, 15 : 229-231, 1971
- 25) Taylor, S. I., Mukherjee, C. and Jungas, R. L. : Studies on the mechanism of activation of adipose pyruvate dehydrogenase by insulin. *J. Biol. Chem.*, 248 : 73-81, 1973
- 26) Mukherjee, C. and Jungas, R. L. : Activation of pyruvate dehydrogenase in adipose tissue by insulin. Evidence for an effect of insulin on pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem. J.*, 148 : 229-235, 1975
- 27) 進藤泰子: ハト胸筋ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性調節機構について. *信州医誌*, 25 : 58-71, 1977
- 28) Bergmeyer, H. U., edited: "Methods of Enzymatic Analysis." Academic press., New York and London, Vol 3 and 4, 1974
- 29) Allred, J. B. and Guy, D. G. : Determination of coenzyme A and acetyl CoA in tissue extracts. *Anal. Biochem.*, 29 : 293-299, 1969

- 30) Siess, E. A. and Wieland, O. H. : Purification and characterization of pyruvate-dehydrogenase phosphatase from pig heart muscle. *Europ. J. Biochem.*, 26 : 96-105, 1972
- 31) Cooper, R. H., Randle, P. J. and Denton, R. M. : Regulation of heart muscle pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochem. J.*, 143 : 625-641, 1974
- 32) Williamson, J. R. : Glycolytic control mechanisms. I. Inhibition of glycolysis by acetate and pyruvate in the isolated, perfused rat heart. *J. Biol. Chem.*, 240 : 2308-2321, 1965
- 33) 井村満男, 宮沢昌子, 橋本 隆 : 糖尿ラットのピルビン酸脱水素酵素複合体活性の調節について. *生化学*, 48 : 493, 1976
- 34) Cremer, J. E. and Teal, H. M. : The activity of pyruvate dehydrogenase in rat brain during postnatal development. *FEBS Lett.*, 39 : 17-20, 1974
- 35) Coore, H. G. and Field, B. : Properties of pyruvate dehydrogenase of rat mammary tissue and its changes during pregnancy, lactation and weaning. *Biochem. J.*, 142 : 87-95, 1974
- 36) Leader, D. P., Wool, I. G. and Castles, J. J. : Aminoacyltransferase I-catalysed binding of phenylalanyltransfer ribonucleic acid to muscle ribosomes from normal and diabetic rat. *Biochem. J.*, 124 : 537-541, 1971
- 37) Gollnick, P. D. and Ianuzzo, C. D. : Hormonal deficiencies and the metabolic adaptations of rats to training. *Am. J. Physiol.*, 223 : 278-282, 1972
- 38) Ianuzzo, C. D., Lesser, M. and Battista, F. : Metabolic adaptations in skeletal muscle of streptozotocin-diabetic rats following exercise training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58 : 107-111, 1974
- 39) Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., Newsholme, E. A., Denton, R. M. and Pogson, C. I. : Interactions of metabolism and the physiological role of insulin. *Recent Progr. Horm. Res.*, 22 : 1-48, 1966
- 40) Wieland, O. H., Jagow-Westermann, B. and Stokowski, B. : Kinetic and regulatory properties of heart muscle pyruvate dehydrogenase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 350 : 329-334, 1969
- 41) Denton, R. M., Randle, P. J. and Martin, B. R. : Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem. J.*, 128 : 161-163, 1972
- 42) Severson, D. L., Denton, R. M., Bridges, B. J. and Randle, P. J. : Exchangeable and total calcium pools in mitochondria of rat epididymal fat-pads and isolated fat-cells. Role in the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Biochem. J.*, 154 : 209-223, 1976
- 43) McDonald, J. M., Bruns, D. E. and Jarett, L. : The ability of insulin to alter the stable calcium pools of isolated adipocyte subcellular fractions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71 : 114-121, 1976
- 44) Kerbey, A. L., Radcliffe, P. M. and Randle, P. J. : Diabetes and the control of pyruvate dehydrogenase in rat heart mitochondria by concentration ratios of adenosine triphosphate/adenosine diphosphate, of reduced/oxidized nicotinamide adenine dinucleotide and of acetyl-Coenzyme A/Coenzyme A. *Biochem. J.*, 164 : 509-519, 1977

(52. 10. 31 受稿)