

綜 説

アルデヒド脱水素酵素

中 西 顯 央

信州大学医学部薬理学教室

ALDEHYDE DEHYDROGENASE

Suehiro NAKANISHI

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
Shinshu University

Key words: アルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase)
アセトアルデヒド (acetaldehyde)
酵素誘導 (enzyme induction)
遺伝支配 (genetic control)

アルコールの酸化はアルコール→アセトアルデヒド, アセトアルデヒド→アセテートの2段階におこなわれ, それぞれに NAD^{+} -依存脱水素酵素が関与する。このうち, アルコール脱水素酵素 (Alcohol: NAD oxidoreductase, EC 1. 1. 1. 1) に関してはこれまで十分に研究されており, ウマ肝の酵素について, そのカイネティクス, 分子構造, アイソザイムなどが詳細に研究されている。一方, アルデヒド脱水素酵素 (Aldehyde: NAD oxidoreductase, EC 1. 2. 1. 3) については, このものがウシ肝に存在することが知られたのは25年も以前のことであるが¹⁾, 哺乳動物肝より精製されたのは1972年のことである²⁾。従ってその細胞内局在, 構造, 機能, 酵素反応機構などについて極めて最近研究が始ったばかりといえる。以下 NAD^{+} 依存アルデヒド脱水素酵素について, 最近の研究をまとめてみたい。

1. アルデヒド脱水素酵素の細胞内分布

この酵素は肝, 脳, 腎, 肺, 心など生体組織に広く分布している³⁾⁴⁾⁵⁾。酵素活性の肝細胞内分布については, これまでは可溶性画分に局在すると考えられてきたが³⁾⁴⁾⁶⁾, 近年この酵素活性は主としてミトコンドリア画分に局在することが明らかとなった。またミクロゾーム画分にも, かなり高い活性が認められることが報告されている⁷⁾⁸⁾⁹⁾ (Table 1)。

ラット肝細胞には少くとも4つの異なる NAD^{+} -依存アルデヒド脱水素酵素活性が認められる。ミトコンドリア画分に少くとも2つ, 可溶性画分に少くとも2つ認められる。

可溶性画分の酵素活性には, 1) phenobarbital によって誘導されるものと, 2) phenobarbital によって誘導されず, disulfiram に比較的抵抗性で, *p*-carboxybenzaldehyde を酸化するが, propionaldehyde を酸化できないものがある。この両者は熱安定性も異にする。後者については, このものは真の“細胞質酵素”ではなく, ホモジネート作製の過程で, ミトコンドリアから遊離されたものであるとの見解もある¹⁰⁾。Phenobarbital による酵素の誘導は遺伝支配を受けているという¹⁰⁾。Marselos and Hänninen¹¹⁾もラット肝細胞可溶性画分について, CMおよびDEAE Sephadex イオン交換クロマトグラフィーにより, 2つの異なるアルデヒド脱水素酵素活性を分離している。

Tottmar ら⁸⁾は, ラット肝アルデヒド脱水素酵素の kinetics から, 少くとも2つの特異性の低い NAD^{+} -依存アルデヒド脱水素酵素活性の存在することを報告している (Table 2)。いわゆる enzyme I 活性は, アセトアルデヒドに対する K_m が $10\mu\text{M}$ 以下で, ミトコンドリアマトリックスに局在し, enzyme II- NAD^{+} 活性は, アセトアルデヒドに対する K_m が

Table 1 Subcellular distribution of aldehyde dehydrogenase in rat liver
(percent of total activity)

Mitochondria	Microsomes	Supernatant	
35.0 ± 2.1	26.4 ± 2.4	4.2 ± 0.8	Tottmar <i>et al.</i> ⁸⁾
45 - 50	35 - 45	10 - 15	Koivula and Koivusalo ⁹⁾

Table 2 Apparent K_m for the different aldehyde dehydrogenases for acetaldehyde

	K_m (mM)
Mitochondria	
Enzyme I	10 ⁻⁸
Enzyme II-NAD ⁺	1.2
Enzyme II-NADP ⁺	0.5
Microsomes	
Enzyme II-NAD ⁺	0.9
Enzyme II-NADP ⁺	0.6

0.9~1.7mMで、ミトコンドリア外膜(20~30%)、小胞体(70~80%)、可溶性画分(<5%)に認められる。Tetraethylthiuram disulfideはenzyme Iの強力な阻害剤であり、50 μ Mの濃度で100%阻害する。Enzyme II-NAD⁺はこの濃度のdisulfiramで軽度阻害される。

著者ら¹²⁾のWistar系ラット肝についての研究では、アセトアルデヒドに対してミトコンドリア画分で、 K_m 0.015mMおよび0.79mMの2つ、可溶性画分で、 K_m 0.015および1.50mMの2つ、マイクロゾ-

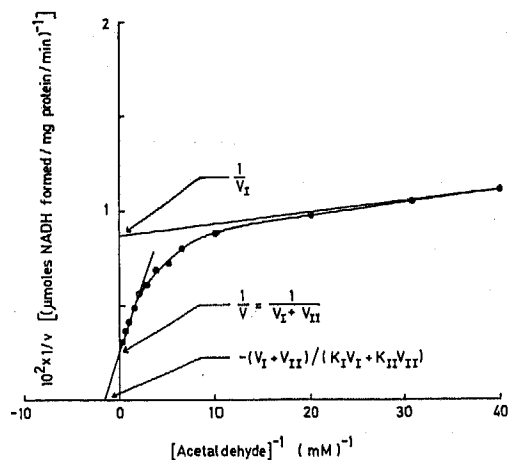


Fig. 1 Double reciprocal plot for the oxidation of acetaldehyde by mitochondria

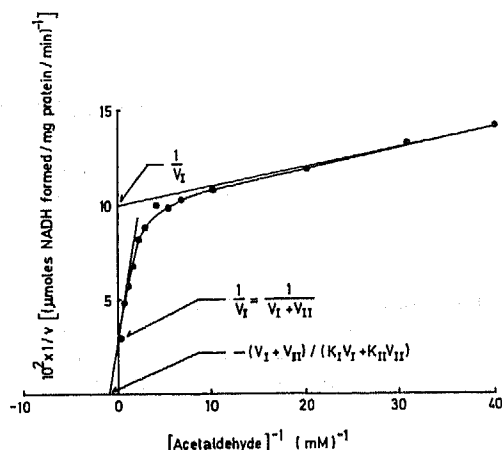


Fig. 2 Double reciprocal plot for the oxidation of acetaldehyde by soluble fraction

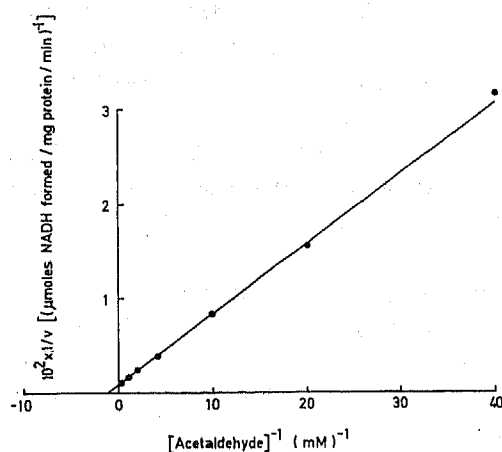


Fig. 3 Double reciprocal plot for the oxidation of acetaldehyde by microsomes

ム画分で K_m 1.25mM という成績が得られている (Figs 1~3)。

最近 Koivula and Koivusalo⁹⁾ は、イオン交換クロマトグラフィーなどにより部分精製したラット肝アルデヒド脱水素酵素について、数種の基質に対する Michaelis const. を調べ報告している (Table 3)。

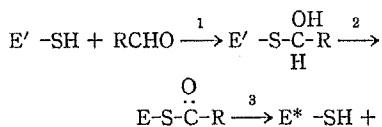
Table 3 Apparent Michaelis constants for partially purified rat liver aldehyde dehydrogenase fractions

Substrate	<i>K_m</i> (μM)				
	Cytoplasmic		Mitochondrial		Microsomal
	I	II	I	II	
Acetaldehyde	1000	0.7	0.7	2000	2000
Propionaldehyde	200	0.3	0.4	500	500
D-Glucuronolactone	5000	—	—	—	—
NAD ⁺ (with propionaldehyde)	20	40	30	30	30

アルデヒド脱水素酵素のアイソザイムについては、ウマ肝でサイトゾールに5つ、ミトコンドリア画分に2つ存在することが報告されており、このうち2つのアイソザイムが分離精製されている²⁾¹³⁾。Polyacrylamide gel isoelectric focusingによる研究で、サイトゾールの5つのアイソザイムは coenzyme として NAD⁺ を利用するが、うち2つは NADP⁺ の存在下で反応し、アセトアルデヒド、*p*-nitrobenzaldehyde が親和性の高い基質である。NADP⁺ 存在下の反応においては、基質としてはアセトアルデヒドよりは *p*-nitrobenzaldehyde の方が親和性が大である。ラット肝ではウマ肝よりも遙かに複雑で、サイトゾールに少なくとも17のアルデヒド脱水素酵素活性がみとめられ、ソニケートしたミトコンドリア上清に3つのアイソザイムが認められる⁹⁾。

2. 酵素反応機構

アルデヒド脱水素酵素はアルコール脱水素酵素と同じく、まず coenzyme binding, ついで substrate binding が起こる。しかしアルコール脱水素酵素反応と異なり、coenzyme release が律速段階ではない。律速段階は thiohemiacetal formation (step 1) と考えられる⁹⁾。



この反応で step 2 は極めて速くであり、step 3 のエステラーゼ反応は脱水素酵素反応の 1/3 の速さである。しかしながら NADH の存在下では step 3 の反応は脱水素反応の 1/4 となる¹⁰⁾。

3. 細胞内アセトアルデヒド酸化の場合

アルコール→アセテート酸化の場合については、これまでアルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素ともサイトゾールに局在すると考えられたので、アルコール代謝は cytosolic process であると長いこと考えられてきた。アルコール脱水素酵素がサイトゾールの酵素であることはまず間違いないと思われるが、近年アルデヒド脱水素酵素の細胞内分布について、これまでの考えと異なり、ミトコンドリアにおいて活性が著しく高いことが明らかになるにつれ、アセトアルデヒド酸化の場合がサイトゾールであることに疑問がもたれてきている。Tottmar ら⁹⁾ の enzyme I 活性が大部分ミトコンドリア画分に局在すること、この酵素がアセトアルデヒドに対して親和性が大であること、さらに後述のごとく、DBA マウスは C57BL マウスに比し、ミトコンドリア画分のアルデヒド脱水素酵素活性が低く、アルコールを腹腔内投与したさいの血中アセトアルデヒド濃度は、DBA マウスの方が高いことなどから、アセトアルデヒドは細胞内では主としてミトコンドリアにおいて酸化されるものと思われる。

アセトアルデヒドに対する *K_m* 値の高い、ミクロゾームならびにサイトゾール酵素の役割については、現在ははっきりしない¹⁰⁾¹⁴⁾。

Grunnet ら¹⁵⁾ は分離ラット肝細胞について、³H-ethanol を用いて、³H の lactate, β -hydroxybutyrate への取りこみを検討した。Pyrazole によって、アルコール脱水素酵素により触媒されるアルコールの酸化を抑制しておくと、³H は β -hydroxybutyrate へと取りこまれることから、アルコール脱水素酵素によって触媒されないアルコール酸化からのアセトアルデヒドは、ミトコンドリアで代謝されるとしている。Parilla ら¹⁶⁾ は、ラット肝細胞を低濃度のアセトアルデヒドとインキュベートしたさいみられるミトコンド

リアでの NAD の還元は、DL-cycloserine によって、malate-aspartate サイクルと共働したミトコンドリア外 transaminase を阻害しても変わらないことをみており、0.4mM 以下の濃度のアセトアルデヒドの酸化は、主にミトコンドリアで行なわれ、これより高い濃度のアセトアルデヒドの酸化はサイトゾールでも行なわれるとしている。

4. アルデヒド脱水素酵素の機能

この酵素の基質特異性は低く、その生理的役割は内因性アルデヒドの酸化にあると思われる。このものはまた、外来アルコール、アミン、長鎖脂肪酸 CoA 誘導体由来のアルデヒドの酸化に関与する。アセトアルデヒドは、この酵素による内因性アルデヒドの酸化を抑制し、これらの生体内濃度を上昇させ、生体機能の障害、組織障害をおこさせる可能性がある。

5. 酵素の遺伝支配

アルコール脱水素酵素活性の系統差は小である¹⁷⁾¹⁸⁾。これに対し、アルデヒド脱水素酵素活性には著しい系統差が認められる。

C57BL/6J マウスは水よりも10%アルコール水溶液

を好む (alcohol preference) ことが知られている。一方、DBA/2J マウスはアルコールを避ける (alcohol avoidance)。これらマウスのミトコンドリアのアルデヒド脱水素酵素を部分精製し、カイネティックな性質を調べてみると、基質アセトアルデヒドに対する K_m に2~3倍の差があり、 V_{max} も著しく異なる (Table 4)。アルコールを腹腔内投与し、血中アセトアルデヒド濃度を測定してみると、DBA/2J > C57BL/6J となっている。DBA/2J マウスでは、アルデヒド脱水素酵素活性が低いが、このことが、この系がアルコールを避けることの原因になっている可能性が考えられ、アルコールを好む、あるいは避けるという形質に対応するアルデヒド脱水素酵素の遺伝子型の存在が想定されている¹⁹⁾。

ラットについても、遺伝的にアルコールを好む系 (AA 系) とアルコールを避ける系 (ANA 系) とがあることが知られている。NAD⁺-依存アルデヒド脱水素酵素活性は、AA 系において、ANA 系に比し、ミトコンドリア、ミクロゾーム画分において高く、可溶性画分において低く、この差は雌においてとくに著しい。アルコール投与後の血中アセトアルデヒドレベルは、ANA 系の方が高い (Table 5)²⁰⁾。

Table 4 K_m and V_{max} for aldehyde dehydrogenase using various aldehyde dehydrogenase

Substrates	C57BL/6J		DBA/2J	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Acetaldehyde	$1.7 \cdot 10^{-7}$	0.52	$5.0 \cdot 10^{-7}$	0.35
Propionaldehyde	$1.0 \cdot 10^{-7}$	0.54	$3.3 \cdot 10^{-7}$	0.34
Butyraldehyde	$3.5 \cdot 10^{-7}$	0.49	$5.0 \cdot 10^{-7}$	0.34
Benzaldehyde	$2.5 \cdot 10^{-6}$	0.22	$6.0 \cdot 10^{-6}$	0.14
Indole-3-acetaldehyde	$3.3 \cdot 10^{-7}$	0.45	$5.0 \cdot 10^{-7}$	0.37

purified mitochondrial aldehyde dehydrogenase
micromoles NADH formed/min/mg protein

Table 5 Aldehyde dehydrogenase activities in liver of AA and ANA strains

	Aldehyde dehydrogenase activity			
	Females		Males	
	AA strain	ANA strain	AA strain	ANA strain
Soluble fraction	0.39±0.02	0.49±0.03*	0.50±0.03	0.48±0.01
Mitochondrial fraction	1.03±0.07	0.82±0.03*	0.94±0.12	0.81±0.05
Microsomal fraction	0.86±0.05	0.65±0.03**	0.78±0.05	0.59±0.06*

Activities : μ moles NADH/min/g-liver

*<0.025, **p<0.005 for differences between AA and ANA strains

酵素誘導

アルデヒド脱水素酵素は、phenobarbital など種々のいわゆる enzyme inducing agents によって誘導されることが知られている (Table 6)。Phenobarbital によって誘導されるのは可溶性画分の酵素で、ミトコンドリア画分の酵素は誘導されない。この酵素誘導は遺伝支配を受けており、single co-dominant autosomal gene の存在が考えられている。

著者らの Wistar 系雄ラットについての成績は Deitrich ら²¹⁾の成績と異なり、基質アセトアルデヒド濃度 0.05mM において、phenobarbital 処置群のミ

Table 6 Induction of aldehyde dehydrogenase activity

Compound	Daily dose (mg/kg)	Fold increase
Phenobarbital	100	10
Barbital	150	3.5
Pentobarbital	50	3.2
Diphenylhydantoin	200	5.7
3-Methylcholanthrene	250	2.9
Allylisopropylacetamide	300	3.8
2-Acetylaminofluorene	100	1.8

Table 7 Aldehyde dehydrogenase activities after phenobarbital treatment (Wistar strain)

	Acetaldehyde 0.05 mM		Acetaldehyde 5 mM	
	Control	Phenobarbital	Control	Phenobarbital
Mitochondrial fraction	6.6±0.6	12.0±1.3**	38.6±4.8	37.4±4.7
Soluble fraction	1.0±0.4	1.6±0.4*	4.2±1.7	6.2±0.8
Microsomal fraction	3.5±0.5	2.3±0.3*	86.9±9.8	64.2±6.3**

Activity : mμmoles NADH formed/mg protein/min

*p<0.05, **p<0.01 for differences between control and phenobarbital-treated rats

トコンドリア画分、可溶性画分の活性が増大し、ミクロゾーム画分の活性については、基質濃度 0.05mM, 5mM のいずれにおいても活性は低下している (Table 7)。誘導された酵素のカイネティックな性質については、ミトコンドリア画分のそれは無処置動物のそれと変わらないが、可溶性画分の酵素の見掛けの Km は変化している¹²⁾。

Barbiturates を連用している患者がアルコール飲料の作用に耐性を示すことが臨床的に知られている。Redmond and Cohen²²⁾はこの現象を barbiturates によるアルデヒド脱水素酵素の誘導の面より説明しようとしているが、難しいように思われる。アルデヒド脱水素酵素は生体には十分量存在し、アセトアルデヒドの酸化は速かに行なわれている。Deitrich and Siew²³⁾は phenobarbital 連用によりアルデヒド脱水素酵素が誘導されても、アセトアルデヒドの血中 half-life は変わらないことを報告している。

文 献

1) Racker, E.: Aldehyde dehydrogenase, a diphosphopyridine nucleotide-linked enzyme. J. biol. Chem. 177: 883-892, 1949

2) Feldman, R. I. and Weiner, H.: Horse liver aldehyde dehydrogenase. I. Purification and characterization. J. biol. Chem. 247: 260-266, 1972

3) Büttner, H.: Aldehyd- und Alkoholdehydrogenase-Aktivität in Leber und Niere der Ratte. Biochem. Z. 341: 300-314, 1965

4) Deitrich, R. A.: Tissue and subcellular distribution of mammalian aldehyde-oxidizing capacity. Biochem. Pharmacol. 15:1911-1922, 1966

5) Marjanen, L.: Intracellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver. Biochem. J. 127: 633-639, 1972

6) Lundquist, F.: The metabolism of ethanol. In "Biological Basis of Alcoholism". pp. 1-52, Eds. Israel, Y. and Mardones, J., Wiley-Interscience, New York and London, 1971

7) Smith, L. and Packer, L.: Aldehyde oxidation in rat liver mitochondria. Arch. biochem. Biophys. 148: 270-276, 1972

8) Tottmar, S. O. C., Pettersson, H. and Kies-

- sling, K-H.: The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenases in rat liver. *Biochem. J.* 135 : 577-586, 1973
- 9) Koivula, T. and Koivusalo, M. : Different forms of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochim. biophys. Acta* 397 : 9-23, 1975
- 10) Deitrich, R. A. : Genetic aspects of increase in rat liver aldehyde dehydrogenase induced by phenobarbital. *Science* 173 : 334-336, 1971
- 11) Marselos, M. and Hänninen, O. : Enhancement of D-glucuronolactone and aldehyde dehydrogenase activities in the rat liver by inducers of drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 23 : 1457-1466, 1974
- 12) Nakanishi, S., Shiohara, E., Tsukada, M. and Iijima, Y. : Induction of aldehyde dehydrogenase of rat liver by phenobarbital. *Jap. J. Stud. Alcohol* (in press)
- 13) Weiner, H., King, P., Hu, J. H. C. and Bensch, W. R. : Mechanistic and enzymatic properties of liver aldehyde dehydrogenase. In "Alcohol and Aldehyde Metabolizing System", pp. 147-160, Eds. Thurman, R. G., Yonetani, T., Williamson, J. R. and Chance, B., Academic Press, New York and London, 1974
- 14) Erriksson, C. J. P., Marselos, M. and Koivula, T. : Role of cytosolic aldehyde dehydrogenase in the oxidation of acetaldehyde during ethanol metabolism in vivo. Sixth Intern. Congress of Pharmacology, Abst. p. 136, 1975
- 15) Grunnet, N., Quistorff, B. and Thieden, H. I. D. : Intracellular location of acetaldehyde metabolism : non-NAD mediated ethanol oxidation as a tool. In "Alcohol and Aldehyde Metabolizing System". pp. 137-146. Eds. Thurman, R. G., Yonetani, T., Williamson, J. R. and Chance, B., Academic Press, New York and London, 1974
- 16) Parilla, R., Ohkawa, K., Lindros, K. O., Zimmerman, U-J. P., Kobayashi, K. and Williamson, J. R. : Functional compartmentation of acetaldehyde oxidation in rat liver. *J. biol. Chem.* 249 : 4926-4933, 1974
- 17) Deitrich, R. A., Hellerman, L. and Wein, J. : Diphosphopyridine nucleotide-linked aldehyde dehydrogenase. I. Specificity and Sigma-Rho function. *J. biol. Chem.* 237 : 560-564, 1962
- 18) Rodgers, D. A., McClearn, G. E., Bennett, E. I. and Hebert, M. J. : Alcohol preference as a function of its caloric utility in mice. *J. comp. Physiol.* 56 : 666-672, 1963
- 19) Sheppard, J. R., Albersheim, P. and McClearn, G. E. : Aldehyde dehydrogenase and ethanol preference in mice. *J. biol. Chem.* 245 : 2876-2882, 1970
- 20) Koivula, T., Koivusalo, M. and Lindros K. O. : Liver aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat strains genetically selected for their ethanol preference. *Biochem. Pharmacol.* 24 : 1807-1811, 1975
- 21) Deitrich, R. A., Collins, A. C. and Erwin, V. G. : Genetic influence upon phenobarbital-induced increase in rat liver supernatant aldehyde dehydrogenase activity. *J. biol. Chem.* 247 : 7232-7236, 1972
- 22) Redmond, G. and Cohen, G. : Induction of liver aldehyde dehydrogenase : Possible role in ethanol tolerance after exposure to barbiturates. *Science* 171 : 387-389, 1971
- 23) Deitrich, R. A. and Siew, C. : Localization and function of aldehyde dehydrogenase. In "Alcohol and Aldehyde Metabolizing System", pp. 125-135, Eds. Thurman, R. G., Yonetani, T., Williamson, J. R. and Chance, B., Academic Press, New York and London, 1974

(51. 3. 25 受稿)