博　士　論　文

D-乳酸を生じるメチルグリオキサールバイパスの生化学的意義について

平　成　11　年　3月

赤　木　晋　介

博　士　論　文

D-乳酸を生じるメチルグリオキサールバイパスの生化学的意義について

平　成　11　年　3月

赤　木　晋　介

【目次】

略語表 - 1

第一章　序論 - 2

第二章　マダコにおける D-乳酸を生じる MG bypass の生化学的意義
(マダコの足筋における *in vitro* での D-乳酸の生成源)

緒言 - 4
実験の部 - 4
結果の部 - 10
考察の部 - 18

第三章　ウズラにおける D-乳酸を生じる MG bypass の生化学的意義
(ウズラ肝臓における *in vivo* でのスレオニン代謝と D-乳酸)

緒言 - 24
実験の部 - 26
結果の部 - 34
考察の部 - 48

第四章　総括と展望 - 55

第五章　引用文献 - 58

謝辞 - 66

【略語表】

ADH	: Alchol dehydrogenase
AcAc	: Acetoacetate
D-LDH	: D-Lactate dehydrogenase
DH	: Diaphorase
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
F-1,6-P	: Fructose-1,6-diphosphate
GK	: Glycerol kinase
GSH	: Reduced glutathione
L-LDH	: L-Lactate dehydrogenase
MG	: Methylglyoxal
2-MQ	: 2-Methylquinoxanol
PALP	: Pyridoxal-5'-phophate
PFK	: Phosphofructokinase
PK	: Pyruvate kinase
S-LactoylGS	: S-Lactoylglutathione
TAD	: Threonine aldolase
TCA	: Trichloroacetic acid
TDG	: Threonine dehydrogenae
TDH	: Threonine dehydratase
Tris	: Trishydroxymethylaminomethane

酵素活性の単位について

酵素活性はすべて国際単位，U(ユニット) で表した。

一分間に 1 μmol の基質を生成物に転換する酵素活性を 1U とした。

第一章　序論

1900 年代の初めに Neuberg また，Dakin と Dudley 等は動物組織や酵母より MG が D-乳酸へ代謝される経路において触媒になるグリオキサラーゼ I, II の混合物を分離した。さらに彼らは，MG が動物，植物や微生物において，グルコース代謝の重要な代謝中間体であると提唱した [1-4]。1972 年になり，Cooper と Anderson は大腸菌からジヒドロキシアセトンリン酸が MG を経由し D-乳酸に代謝されることを発見し，このルートを解糖系の MG bypass と呼んだ [5]。次貢に示す左側の経路が MG bypass であり，右側が解糖系である。MG bypass は，化学的に反応性に富む物質である MG が，GSH 存在下でグリオキサラーゼ I の働きにより S-LactoylGS を経てグリオキサラーゼ II により D-乳酸へ代謝される経路である。

しかし，1932 年に，Embden や Meyerhof 等は F-1,6-P を筋肉抽出物で二つのトリオースリン酸に分解し，L-乳酸になる経路を報告した [6,7]。このことを契機に始まるいわゆる解糖系が確立されたために，MG とグリオキサラーゼ I, II の生化学的意義や重要性は，次第に人々から忘れ去られることになった。従って，MG bypass に関する生理的役割やその存在意義は，現在も解明されるには至っていない。

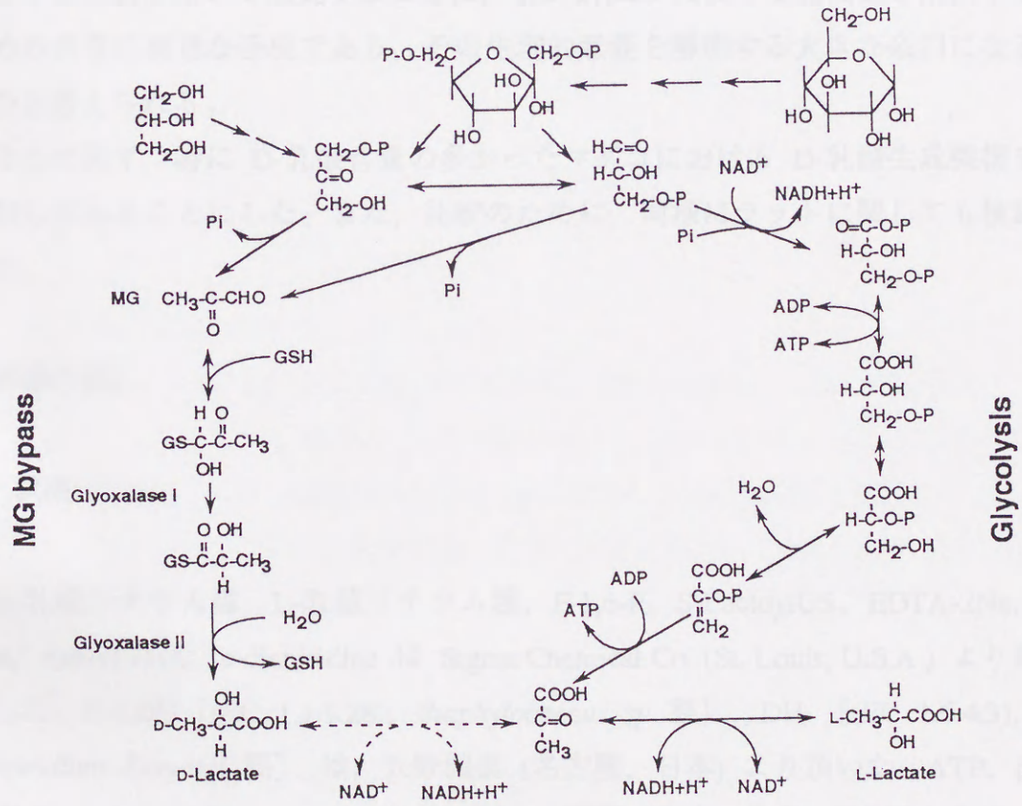
大森等は，MG bypass に関する研究を進め，これらの問題を徹底的に追及しようとした。そこで先ず，いままで不正確であった MG と D-乳酸の定量を改善し，これら二種の物質の高感度で特異的な定量法の開発に成功した [8-11]。この定量法を用いることにより生体内の MG や D-乳酸の研究を深く行うことが可能となり，大森等は以下に示すようなことを明らかにした。

1) D-乳酸は動物の各組織にかなりの濃度で存在し，ラット肝臓中では L-乳酸の約 1/6 の濃度で存在していた [12]。4)
2) 運動により人間の血漿中では L-乳酸だけでなくD-乳酸も増加していた [13]。
3) 飢餓，糖尿病態ラットの血漿及び肝臓では，MG と D-乳酸が正常の数倍増加し，肝臓ではグリセロールが最良の D-乳酸の生成源になっていた [14,15]。
4) ラット骨格筋，心筋におけるケトン体の増加に伴い D-乳酸の増加が見られ

た [15]。

これらの研究により MG bypass と D-乳酸生成は，糖代謝やエネルギー代謝に深く関わっていることが示唆された。さらにこれらの研究を発展させるために，様々な生物に関し D-乳酸含量のスクリーニングを行ってきた。その結果，哺乳動物より下等な生物や植物において L-乳酸に比べ多量の D-乳酸が含まれていることを見いだした。[特に海洋性の軟体動物であるマダコ (*Octopus vulgaris*)，植物ではタマネギ (*Allium cepa L.*)] [16]。これらの生物では特に，D-乳酸の生成系が発達している可能性が高いと思われる。

そこで，私は，このことに注目し下等な生物における D-乳酸の生合成経路に関する研究を行うことにした。



MG bypass と解糖系

第二章　マダコ (*Octopus vulgaris*) における D-乳酸を生じる MG bypass の生化学的意義
(マダコの足筋における *in vitro* での D-乳酸の生成源)

【緒言】

哺乳動物体内にも D-乳酸は存在するが，その量は L-乳酸より多いわけではない。D-乳酸に関する研究を進めていく過程で，ある種の動植物に多量の D-乳酸が存在することを明らかにした。これら動植物には L-乳酸より多量の D-乳酸が存在していた [16]。このことは，今までの常識を破る代謝系を有する生物が存在することを示唆するものである。従って，これらの多量の D-乳酸を含有する生物を用いて研究することは，MG bypass に関する諸問題を解決するための非常に有効な手段であり，その生理的意義を解明する大きな糸口になるものと考えられる。

そこで先ず，特に D-乳酸含量の多かったマダコにおける D-乳酸生成機構を検討してみることにした。また，比較のために，同様にラットに関しても検討した。

【実験の部】

1.　試薬

D-乳酸リチウム塩，L-乳酸リチウム塩，F-1,6-P，S-LactoylGS，EDTA-2Na，Tris，Acetyl-CoA，*o*-dianisidine は Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.) より購入した。D-LDH［(EC 1.1.1.28)，*Staphylococcus sp* 製］，DH ［(EC 1.6.4.3)，*Clostridium Kluyveri* 製］ は，天野製薬 (名古屋，日本) より頂いた。ATP，β-NADH，β-NAD^+，β-NADPH はオリエンタル酵母 (東京，日本) より購入した。D,L-6,8-チオクタミドと *o*-フェニレンジアミン，AcAc エチルエステルは東京化学工業 (東京，日本) より，L-システイン，硫酸マグネシウムは片山化学工業 (大阪，日本) より，F-kit for L-Lactic acid，F-kit for Glycerol は Boehringer

Mannheim Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より，Pyruvic aldehyde dimethylacetal は Aldrich Chemical Co., Inc. (Milwaukee, U.S.A.) よりそれぞれ購入した。2-MQ は当研究室で合成したものを用いた [8]。またグルコース CⅡ-テストワコー等その他のすべての試薬は和光純薬 (大阪，日本) より購入した。

2. 実験動物

今回の実験に用いたマダコ［(*Octopus vulgaris*), 1 - 1.5 kg)］は，坂田鮮魚店より購入した。これらマダコは早朝に瀬戸内海で捕獲されたものであり，捕獲後 5 - 6 時間経過したものを生きたまま実験に使用した。実験には，足の筋肉及び肝臓を使用した。また，購入したマダコは，0 ℃ に冷やした発泡スチロール容器に保存し我々の研究室に運んだ。

ラット (Male Wistar strain albino rat, 5 週令) を清水実験材料から購入し実験に使用した。

3. 装置

UV-HPLC

カラム	:	COSMOSIL PACKED COLUMN for HPLC 5C18-AR Waters 仕様 (4.6 mm × 150 mm, NACALAI TESQUE)
移動相	:	10mM H_3PO_4 – KH_2PO_4 (pH 2.1) containing CH_3CN [D-乳酸定量 (15 % CH_3CN), MG 定量 (20 % CH_3CN)]
流速	:	1.0 ml/min
カラム温度	:	45 ℃
ポンプ	:	Model 576-1A (GASUKURO KOGYO)
検出器	:	SPECTRO DETECTOR 502T (GASUKURO KOGYO)
測定波長	:	334 nm

分光光度計

SHIMADZU DOUBLE-BEAM SPECTROPHOTOMETER

(model UV-180)

4. *In vitro* での実験

生体試料の調製

マダコは生きたまま足を切断し足の筋肉を採取した。組織をハサミで細切し，5 倍容の 50 mM リン酸カリウム (pH 7.0) を加え，ワーリングブレンダーを用いて氷中で 10,000 rpm，5 分間ホモジナイズした。得られたホモジネートを冷凍遠心機 (KUBOTA KR-2000) で 6,000 ×g，4 ℃，15 分間遠心した。得られた 6,000 ×g 上清を 5 L の 50 mM リン酸カリウム (pH 7.0) で 4 ℃，2 時間透析した。その透析液を酵素源として使用した。

反応条件

近藤等の方法を応用した [15]。50 mM リン酸カリウム (pH 7.0)，0.5 mM 基質，0.2 mM cofactor (次頁に示す表を参照) 及びマダコの足の筋肉のホモジネート 6,000 ×g 上清の透析液 400 μl を含む反応系 (全量 2.0 ml) を，25 ℃，30 分間インキュベーションした。この反応液中の D-乳酸，MG を定量した。また，酵素源 400 μl のみを加え，0 分間または 30 分間インキュベーションしたものをコントロールとして使用した。この反応液中の MG 及び D-乳酸を定量した。

MG，AcAc の調製

MG は原料である pyruvic aldehyde dimethylacetal 250 μl に 5 % 硫酸 4.75 ml を加えて加水分解 (100 ℃，25 分) させ，炭酸ナトリウムで中和する。この溶液を実験に使用した [17]。

AcAc は原料である AcAc エチルエステル 1.3 ml に 2 M 水酸化ナトリウム 1.5 ml と 水 3.6 ml を加えて加水分解 (40 ℃, 1 時間) させ, 1 M 塩酸で pH 7.0 付近に合わせ, この溶液を実験に使用した。

反応系に加えた基質と cofactor

基質	反応に加えた cofactor
グルコース	ATP, Mg^{2+}
グリセロール	ATP, Mg^{2+}, NAD^+, Nicotinamide
F-1,6-P	ATP, Mg^{2+}
アセトン	NADPH, NAD^+, Nicotinamide
AcAc	NADPH, NAD^+, Nicotinamide
グリシン	Acetyl-CoA
L-スレオニン	NAD^+, Nicotinamide
MG	
S-LactoylGS	

S-LactoylGS 以外の全ての反応系に GSH を加えた。
Cofactor の終濃度は 0.2 mM (Nicotinamide は 1.0 mM)
MG と S-LactoylGS の終濃度は 0.15 mM

MG の定量 [10]

MG 生合成のためにインキュベーションした反応液 1 ml に, 等量の 1 M 過塩素酸と 1 % *o*-フェニレンジアミン 0.1 ml を加え, 室温で 1 時間反応させた。その後, 5 M 水酸化ナトリウム 0.2 ml を加え撹拌し, ジクロルメタン 3 ml でキノキサリンを抽出した。抽出液 1 ml をバイアルに分注し, 6 M 塩酸 50 µl を加えてよく撹拌し蒸発乾固させた。この残渣を HPLC 移動相 200 µl に溶解させて, このうち 10 µl を HPLC に注入した。

D-乳酸の定量

大森等の方法を用いて D-乳酸を定量した [8]。以下にその方法を示す。D-乳酸生合成のためにインキュベーションした反応液にメタノール 3 ml を加え反応を停止させ，1,700 ×g，15 分遠心し上清をとった。沈殿物は，70 % メタノール 4 ml で洗い，再び遠心し，得られた上清を前の上清と共にして，-20 ℃ で 2 時間以上放置した。これを遠心し，上清をバイヤルに分注し，SAVANT Speed Vac Concentrator (Model SUC-100H，New York) を用いて蒸発乾固させた。残渣を 100 mM リン酸カリウム (pH 7.0) 600 µl に溶解し，硫酸ヒドラジン (2.9 mg/ml) 100 µl を加えて 37 ℃，25 分間インキュベーションした。次に NAD^+ (8 mg/ml) 50 µl，D-LDH (5 mg/ml) 100 µl，DL-6,8-チオクタミド (5.3 mg/ml) 100 µl，DH (1 mg/ml) 50 µl の順に加え，37 ℃，2 時間インキュベーションし D-乳酸をピルビン酸に変換させた。その後，1 M 塩酸 300 µl と *o*-フェニレンジアミン (30 mg/ml) 200 µl を加え，50 ℃，1 時間インキュベーションしてピルビン酸を 2-MQ に誘導体化した。この反応液を 2 N リン酸三ナトリウム 300 µl で pH 4.0 付近にし，酢酸エチル 2 ml で 2 回抽出した。これらの抽出液を 5 ml のバイアルに入れて，SAVANT Speed Vac Concentrator を用いて蒸発乾固させた。この残渣を HPLC 移動相 200 µl に溶解し，このうち 10 µl を HPLC に注入した。

5. 化合物含量の測定

試料の調製

MG，D-乳酸，L-乳酸及び解糖系関連代謝物含量測定用として，採取した組織をハサミで細切し，5 倍容の 10 mM リン酸カリウム (pH 7.0) を加え，ワーリングブレンダーを用い 10,000 rpm で，5 分間 (マダコ足筋，ラット骨格筋) あるいは，glass Teflon homogenizer を用いて氷中で 1,000 rpm，30 秒間 (ラット肝臓) ホモジナイズした。このホモジネートを冷凍遠心機で 6,000 ×g，4 ℃，10 分間遠心し，得られた 6,000 ×g 上清について分析した。

グリシン，スレオニン含量測定用として，採取した組織をハサミで細切して，9 倍容の 1.15％KCl を加え，ワーリングブレンダーを用いて氷中で 10,000 rpm で，5 分間ホモジナイズした。このホモジネートを冷凍遠心機 (KUBOTA KR-2000) で 6,000 ×g，4 ℃，10 分間遠心し，得られた 6,000 ×g 上清について分析した。

測定法

MG 及び D-乳酸は，前述した大森等の方法に従い定量した [8,10]。L-乳酸定量は，F-kit for L-Lactic acid を用いた。グルコースは，グルコース CⅡ-テストワコーを用いた UV 法により定量した。グリセロールは，F-kit for Glycerol を用いた UV 法により定量した。グリシンは大森等の方法 [18]，L-スレオニンは当教室で開発した方法 [19] に従い測定した。

6. 酵素活性測定

試料の調製

PFK，PK，aldolase 及び GK 活性測定用として，採取した組織をハサミで細切し，4 倍容の 50 mM Tris-HCl (pH 7.4，0.1 M 塩化カリウム，5 mM 硫酸マグネシウム，1 mM EDTA) を加え，ワーリングブレンダーを用いて氷中で 10,000 rpm で，5 分間 (マダコ足筋，ラット骨格筋) あるいは，glass Teflon homogenizer を用いて氷中で 1,000 rpm，30 秒間 (ラット肝臓) ホモジナイズした。このホモジネートを冷凍遠心機 (KUBOTA KR-2000) で 8,000 ×g，4 ℃，10 分間遠心し，得られた 8,000 ×g 上清を酵素源として使用した。

グリオキサラーゼ I，II の活性測定用として，採取した組織をハサミで細切し，5 倍容の 10 mM リン酸カリウム (pH 7.0) を加え，ワーリングブレンダーを用いて氷中で 10,000 rpm，5 分間 (マダコ足筋，ラット骨格筋) あるいは，glass Teflon homogenizer を用いて氷中で 1,000 rpm，30 秒間 (ラット肝臓) ホモジナイズした。このホモジネートを冷凍遠心機 (KUBOTA KR-2000) で 6,000 ×g，

4 ℃, 15 分間遠心し，得られた 6,000 ×g 上清を酵素源として使用した。

TDG 及び amine oxidase の活性測定用として，組織をハサミで細切し，5 倍容の 50 mM リン酸カリウム (pH 7.0) を加え，ワーリングブレンダーを用いて氷中で 10,000 rpm，5 分間ホモジナイズした。このホモジネートを冷凍遠心機 (KUBOTA KR-2000) で 6,000 ×g, 4 ℃, 15 分間遠心し, 得られた 6,000 ×g 上清を酵素源として使用した。

活性測定

PFK 活性, PK 活性, aldolase 活性, グリオキサラーゼ I, II 活性及び GK 活性の測定は吸光度法によって測定した [20-24]。TDG 活性は生成するアミノアセトンを比色定量する事により測定した [25]。Amine oxidase 活性は，*o*-dianisidine を使用する吸光度法により測定した [26]。

7. タンパク定量

タンパク濃度は bovine serum albumin を標準として Biuret 法を用いて測定した [27]。

【結果の部】

1. D-乳酸及びその関連化合物の含量

表 1. には，マダコとラットの組織における D-乳酸及びその関連化合物の含量を示した。マダコの組織には D-乳酸が多量に存在し，その含量は L-乳酸に比べ足筋では約 100 倍，肝臓では約 2 倍であった。また，ラットの骨格筋及び肝臓と比べてみても，それぞれ約 500 倍，約 3 倍と非常に多量に存在していた。またその反対に，L-乳酸の含量は非常に少なく，ラット骨格筋及び肝臓と比べてそれぞれ約 1/12.5，約 1/1.3 であった。

D-乳酸生成のための前駆物質であり MG bypass の反応中間体である MG もマダコの足の筋肉中には存在しており，これはラット骨格筋の存在量に比べ約 6 倍も高いものであった。その他，糖代謝に関連する化合物であるグルコースもラット骨格筋と同程度存在していた。また，脂質の構成成分であるグリセロールも存在していた。

表 1. マダコとラットにおける D-乳酸及びその関連化合物の含量

	Octopus		Rat	
	Foot muscle	Liver	Skeletal muscle	Liver
D-Lactate*	22.9±0.22	1.32	0.049±0.004	0.469±0.044
L-Lactate*	0.238±0.022	N.D.	3.07±0.05	0.839±0.072
Methylglyoxal**	6.04±0.51	N.D.	1.15-1.77	7-18
Glucose*	3.07±0.19	N.D.	1.76±1.40	5.42±0.19
Glycerol*	0.277±0.018	N.D.	0.250±0.008	0.029±0.005

Values are means±S.E.M. , n=3 , * ; μmol/mg protein , ** ; nmol/mg protein
N.D. ; not determined
Ohmori et al. (1997) Zoological Science 14 : 429-434. より

表 2. マダコとラットにおける解糖系関連酵素の活性

	Octopus (U/mg protein)		Rat (U/mg protein)	
	Foot muscle	Liver	Skeletal muscle	Liver
Phosphofructokinase	0.457±0.052	N.D.	0.114±0.014	0.007±0.001
Pyruvate kinase	1.79±0.61	N.D.	4.73±0.68	0.070±0.008
Aldolase	1.21±0.17	N.D.	0.251±0.057	0.020±0.005
Glycerol kinase	0.046±0.007	N.D.	not detectable	4.3±0.5

All values are means±S.E.M. , n=3 , N.D. ; not determined
Ohmori et al. (1997) Zoological Science 14 : 429-434. より

表 3. マダコとラットにおける MG bypass の活性

	Octopus		Rat	
	Foot muscle	Liver	Skeletal muscle	Liver
Glyoxalase I*	0.412±0.067	N.D.	0.419±0.020	0.293±0.039
Glyoxalase II**	9.06±1.38	N.D.	5.12±0.50	0.101±0.014*

All values are means±S.E.M. , n=3 , * ; U/mg protein , ** ; mU/mg protein
N.D. ; not determined
Ohmori et al. (1997) Zoological Science 14 : 429-434. より

2. D-乳酸生成系に関連する酵素活性

2-1 解糖系の関連酵素の活性

表 2. に示すように，マダコの足の筋肉ホモジネート上清に解糖系関連酵素の活性が認められた。また，マダコの足の筋肉には微弱ではあるが GK の活性が認められた。

2-2 MG bypass 関連酵素の活性

表 3. にはマダコとラットの組織におけるグリオキサラーゼ I，II の活性を示した。マダコの足の筋肉ホモジネート上清には MG bypass を触媒するグリオキサラーゼ I，II の活性が認められた。また，その活性はラットの骨格筋とほぼ同程度の活性を有していた。

3. マダコの足の筋肉における MG と S-LactoylGS からの D-乳酸の生成

マダコの足の筋肉ホモジネート 6,000 ×g 上清の透析液を用い，D-乳酸生成のための前駆物質であり，MG bypass の中間代謝物である MG 及び S-LactoylGS を基質として添加し 25 ℃ で 30 分間インキュベーションした後の D-乳酸の生成量を検討した。その結果，図 1-1. に示すように，それぞれの基質から良い収率で D-乳酸が生成していた （MG からは 61.2 % ，S-LactoylGS からは 75.9 %）。

図 1-2. に示すように，マダコの足の筋肉ホモジネート 6,000 ×g 上清の透析液を用い MG の濃度を 0.1 mM - 1.0 mM の間で変化させて D-乳酸の生成量の変化を検討してみたところ D-乳酸は MG の濃度依存的に生成していた。また，図 1-3. に示すように，マダコの足の筋肉ホモジネート 6,000 ×g 上清の透析液を用い 0.5 mM MG を用いて 25 ℃ でインキュベーションする時間を変化させて D-乳酸の生成量を測定してみたところ，反応開始から 20 分まで D-乳酸の生成は増加し，その後は，30 分まで生成の増加は認められずほぼ一定

の生成量であった。

また，我々の研究室では，マダコの足から D-LDH を精製しその存在や性質を明らかにした [28]。さらに，前述したように，マダコの足には解糖系の関連酵素の存在が認められた (表 2.)。これらのことは，解糖系の最終生成物であるピルビン酸から D-LDH の触媒下 D-乳酸を生成する経路をマダコが持っていることを示すものである。従ってこれまでの結果と合わせて考えると，マダコには第一章の図に示す二つの経路を経由する D-乳酸の生成経路が存在することが判明した。

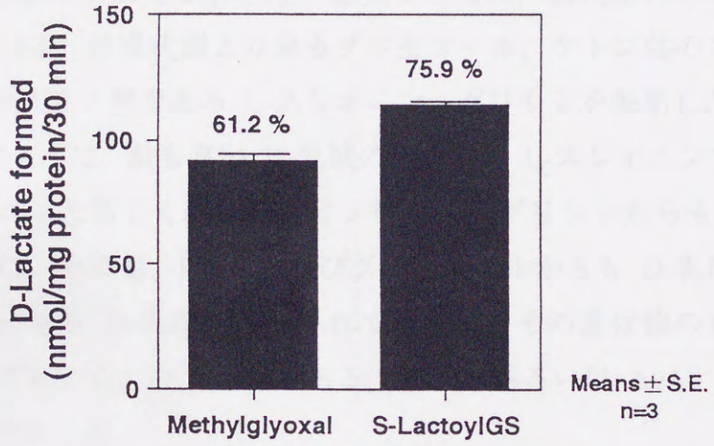


図 1-1. MG 及び S-LactoylGS からの D-乳酸の生成

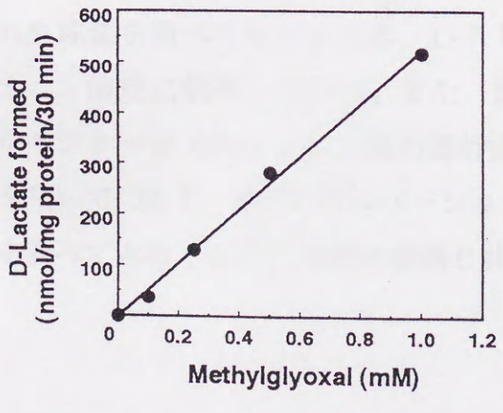


図 1-2. MG 濃度による D-乳酸生成量変化

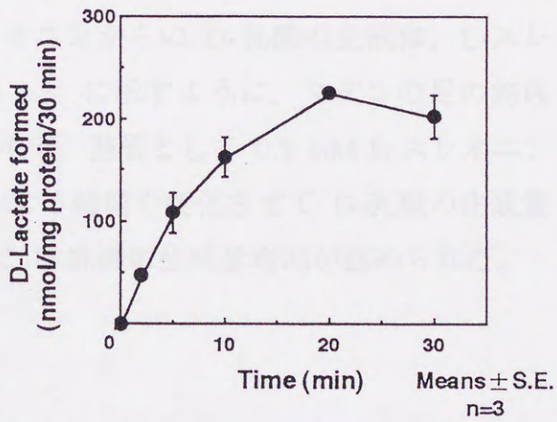


図 1-3. MG からの D-乳酸生成の経時的変化

4. マダコの足の筋肉における D-乳酸の生成源

4-1 マダコの足の筋肉における様々な物質による D-乳酸の生成変化

マダコには D-乳酸を生成する二種類の経路が存在することを明らかにした。では，どのような物質が効率よく D-乳酸生成に利用されているのか検討することにした。

図 2-1. には，マダコの足の筋肉ホモジネート 6,000 ×g 上清の透析液を用い，様々な基質となり得る物質を添加し 25 ℃ で 30 分間インキュベーションした後の D-乳酸の生成量を示した。基質としては，糖代謝の中間体であるグルコース，F-1,6-P，脂質代謝より来るグリセロール，ケトン体のアセトン，AcAc 及び糖原性アミノ酸である L-スレオニン，グリシンを使用した。

図 2-1. に示すように，最も良い D-乳酸の生成源は L-スレオニンであった。また，L-スレオニンと同じく糖原性アミノ酸であるグリシンからも D-乳酸の生成が認められた。その他，F-1,6-P 及びグリセロールからも D-乳酸が生成した。グルコースからも D-乳酸は生成されていたが，その量は他のものと比べると少ないものであった。ケトン体であるアセトンあるいは AcAc からは D-乳酸は生成されなかった。

図 2-2. に示すように，マダコの足の筋肉ホモジネート 6,000 ×g 上清の透析液を用い L-スレオニンの濃度を 0.1 mM - 1.0 mM の間で変化させて D-乳酸の生成量を調べてみたところ，L-スレオニンからの D-乳酸の生成は，L-スレオニン濃度に依存していた。また，図 2-3. に示すように，マダコの足の筋肉ホモジネート 6,000 ×g 上清の透析液中で，基質として 0.5 mM L-スレオニンを用いて 25 ℃ でインキュベーションする時間を変化させて D-乳酸の生成量を調べてみたところ，時間の経過と共に D-乳酸の生成量増加が認められた。

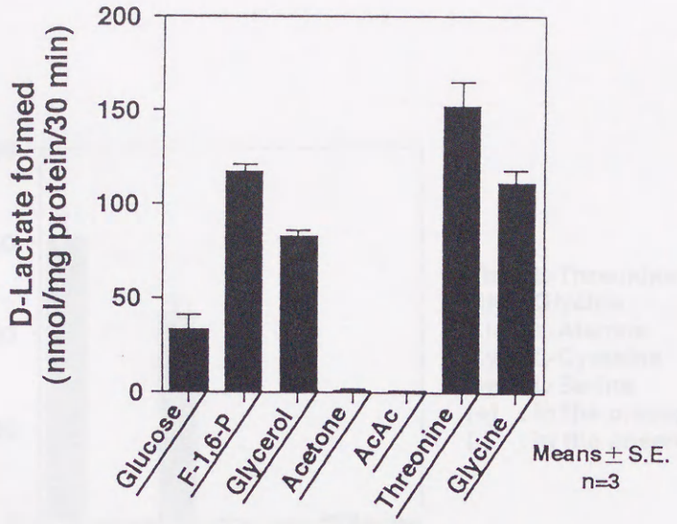


図 2-1. 様々な物質からの D-乳酸の生成

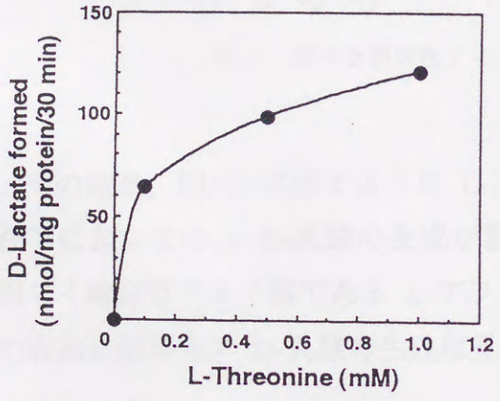


図 2-2. D-乳酸生成における L-スレオニン濃度の影響

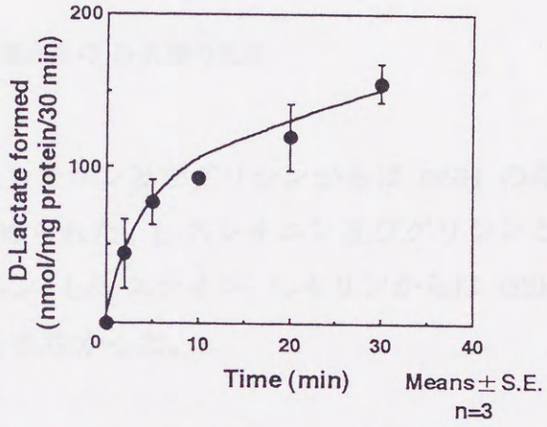


図 2-3. L-スレオニンからの D-乳酸生成の経時的変化

4-2 マダコの足の筋肉における様々な糖原性アミノ酸からの D-乳酸の生成

L-スレオニンやグリシンが D-乳酸の生成源になることが明らかになった。このことから，その他の糖原性アミノ酸についても検討してみた。

図 3. には，マダコの足の筋肉ホモジネート 6,000 ×g 上清の透析液を用い，様々な糖原性アミノ酸を基質として添加し 25 ℃ で 30 分間インキュベーションした後の D-乳酸の生成量を示した。基質として，L-アラニン，L-システイン及び L-セリンを使用した (反応系における終濃度は，各々 0.5 mM)。また，図中の + は，MG bypass の補酵素である GSH を添加したもの，- は添加していないものを表している。

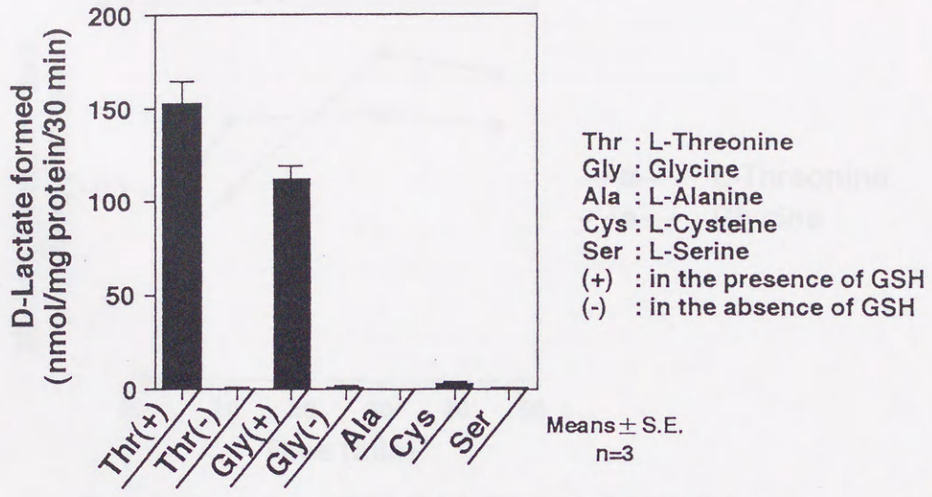


図 3. 様々な糖原性アミノ酸からの D-乳酸の生成

その結果，図 3. に示すように L-スレオニン及びグリシンからは GSH の存在下においてのみ D-乳酸の生成が認められた。L-スレオニン及びグリシンと同じく糖原性アミノ酸である L-アラニン，L-システイン，L-セリンからは GSH の有無に関わらず D-乳酸の生成は見られなかった。

4-3 マダコの足の筋肉における L-スレオニン及びグリシンからの MG 生成の経時的変化

図 3. の結果から，L-スレオニンとグリシンからの D-乳酸の生成には GSH が必要であることが明らかとなった。これは，スレオニンとグリシンが図 5. に示す経路を経由して D-乳酸へ代謝されることを示すものと思われる。

そこで，マダコの足の筋肉ホモジネート 6,000 ×g 上清の透析液を用い L-スレオニン及びグリシンを基質として添加し 25 ℃ でインキュベーションしたときの MG 生成の経時的変化を検討してみた。

その結果，図 4. に示すように，L-スレオニン及びグリシンから MG の生成が認められ，その生成量はともに 30 分前後で最大になっていた。

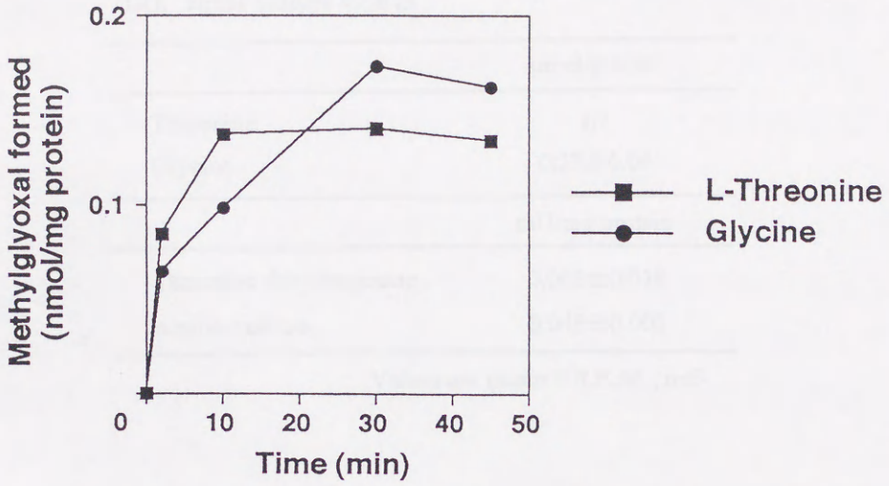


図 4. L-スレオニン，グリシンからの MG 生成の経時的変化

5. マダコの足の筋肉における L-スレオニンとグリシンの存在量及び TDG 及び amine oxidase の活性

先の結果において，L-スレオニンとグリシンから MG の生成が認められた。そこで， L-スレオニンとグリシンからの MG 生成経路に関し，さらに検討してみた。

図 5. に示す L-スレオニンとグリシンからの MG の生合成経路を触媒している TDG 及び amine oxidase の活性をマダコの足の筋肉ホモジネートを用いて測定した。また，マダコの足の筋肉中の L-スレオニン及びグリシン含量の測定も行った。

表 4. に示すように，マダコの足の筋肉中には L-スレオニン，グリシンが存在した。また，TDG 及び amine oxidase の活性も認められた。

これらの結果から，L-スレオニンとグリシンは図 5. に示す経路を経由して D-乳酸を生成することが示された。

表 4. マダコの足の筋肉における L-スレオニン，グリシンの含量及び TDG，amine oxidase の活性

	μmol/g w.w.
Threonine	1.7
Glycine	0.27±0.04
	mU/mg protein
Threonine dehydrogenase	0.063±0.018
Amine oxidase	0.045±0.002

Values are means±S.E.M. , n=3

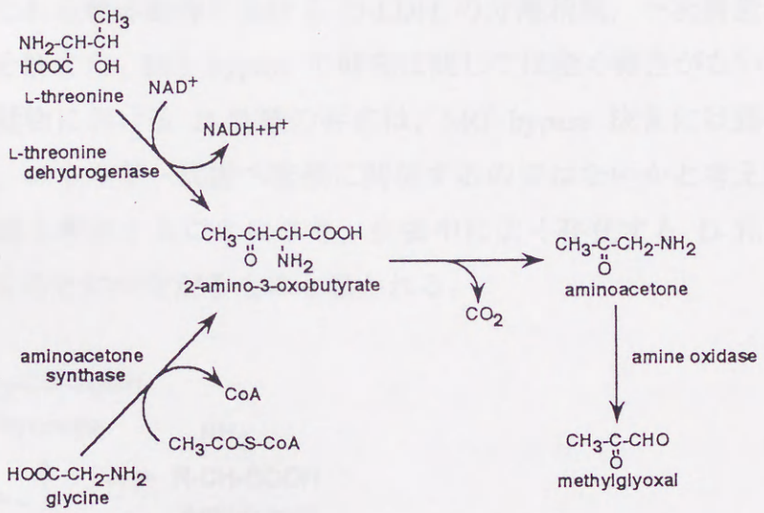


図 5. スレオニンとグリシンからのメチルグリオキサール生成経路

【考察の部】

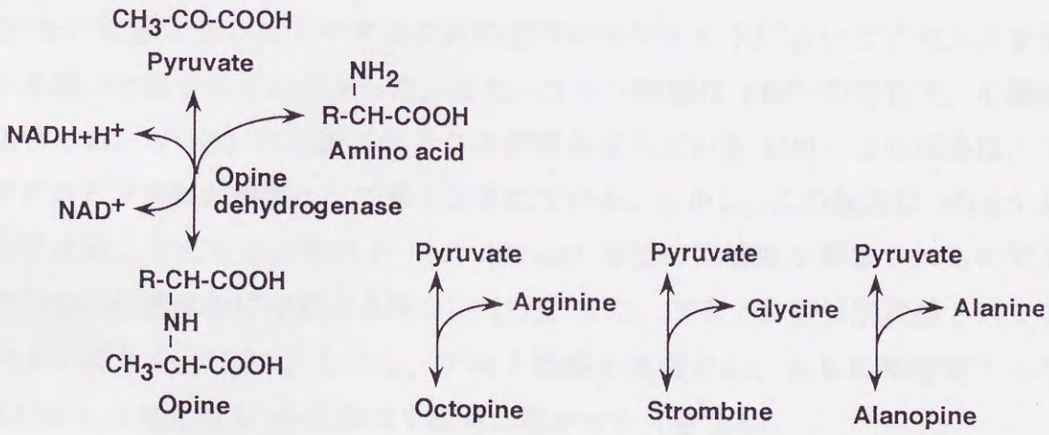
軟体動物における D-乳酸

軟体動物を含む無脊椎動物における LDH の研究は広く行われており，D-乳酸に特異的な LDH を持つタコやイカ等の存在が報告されている [29-34]。このように軟体動物には既に，D-乳酸の存在が知られており，専ら D-LDH により生成するものとして考えられている。また，これらの軟体動物においては，L-乳酸に特異的な LDH を持つものの存在 [35] や同一個体内に D-LDH 及び

L-LDH を持つものの存在も報告されている [36]。さらに，これらの軟体動物は，下図に示すようなオピン脱水素酵素によるオピン類生成機構を持つ。これらオピン類に関して，その存在意義は明確に結論づけられてはいないものの，生体内の酸化還元に関係し，高等動物において一般に知られている LDH と同様な役割を持つのではないかと考えられている [37-44]。

従って，軟体動物は，オピン脱水素酵素による嫌気的解糖反応を持つにも関わらず，なぜ D-LDH や L-LDH を持ち D-乳酸や L-乳酸を生合成する必要があるのかと言うことが問題となってくる。佐藤等は，この問題に関してオピン脱水素酵素は運動的要因により機能し，LDH は低酸素状態等の環境的要因により影響を受けると報告した [37]。

しかし，これら軟体動物における D-LDH の分離精製，一次構造決定，D-乳酸の生成，分解また，MG bypass の研究に関しては全く報告がない。そこで，私は，軟体動物における D-乳酸の存在は，MG bypass 抜きには語ることができず，また，エネルギー代謝へ密接に関係するのではないかと考えた。さらにこれらの問題を解決することにより，生物中に広く存在する D-乳酸の存在意義を解明することにつながるものと思われる。



軟体動物におけるオピン脱水素酵素によるオピン類の生成

マダコにおける D-乳酸の生成源

これまでに得た結果と我々の研究室で明らかにしたマダコの足における D-LDH の存在 [28] から，マダコが二つの D-乳酸生成経路，即ち，1) D-LDH に

よるピルビン酸からの D-乳酸生成経路，2) MG bypass による D-乳酸生成経路を持つことが明らかになった。これらの結果は，軟体動物における MG bypass の存在を初めて明らかにしたものである。

このことをふまえ，続いて私は更に，マダコの足の筋肉ホモジネートにおける D-乳酸の主要な生成源が何であるか検討した。

(糖代謝の中間体からの D-乳酸)

近藤等によるラット肝を用いた研究では，グルコースとグリセロールが主要な D-乳酸の生成源であった [15]。従って，私はマダコの足の筋肉においてもこれら解糖系の中間体やグリセロールが，D-乳酸生成の良質な生成源になると考えた。結果は，これらの予想を満足するものであった。また，グリセロールを基質とした時の D-乳酸の生成は，マダコの足の筋肉中の GK 活性によるものと考えられる (表 2.)。しかし，これらの基質は，D-乳酸の生成源になり得たものの，その他の基質に比べあまり良好なものではなかった (図 2-1.)。

(ケトン体からの D-乳酸)

ラット肝臓ではアセトンから MG になるという報告がある [45-47]。しかし，図 2-1. に示すように，マダコの足の筋肉ホモジネートにおいてアセトンから D-乳酸は生成されていなかった。また，アセト酢酸は Mn^{2+} の存在下，心臓抽出物において MG に代謝されることが報告されている [48]。この反応は，ミオグロビン自体が触媒として働くとされている。しかし，この反応は pH 6.5 以上では起こりにくく，その上 Mn^{2+} は mM 単位の高濃度が要求されるのでこの反応は生理学的には起こり得ない [12]。また，アセト酢酸は脱炭酸されてアセトンになる [45,46]。しかし，アセト酢酸を基質とし，さらに補酵素として NADPH を加えても D-乳酸は生成されなかった (図 2-1.)。

(糖原性アミノ酸からの D-乳酸)

図 2-1. に示したように，L-スレオニン，グリシンを基質とした時，マダコの足の筋肉ホモジネートにおいて D-乳酸が生成した。他の基質に比べて L-スレオニンからはより多くの D-乳酸が生成されており，今回検討した物質のな

かで最も効率の良い生成源であることが示された。このことは当研究室で報告したラット肝臓での結果 [16] と大きく異なっていた。

L-スレオニンやグリシン等の糖原性アミノ酸の炭素骨格の異化は，通常グリシン解裂酵素系あるいは，セリンヒドロキシメチルトラスフェラーゼの触媒下，ピルビン酸を経由して行われることが知られている。従って，これらアミノ酸からの D-乳酸の生成は，マダコに存在する D-LDH の作用によりピルビン酸を経由して生成されている可能性がある。もし，この経路を通り D-乳酸が生成されるなら，L-セリン，L-システイン，L-アラニン等の糖原性アミノ酸からも D-乳酸が生成するはずである。しかし，図 3. では，L-スレオニン，グリシン特異的に D-乳酸が生成するのみであり，その際，GSH が必須であった。そこで，この結果について更に検討してみた。

図 5. に示すように，L-スレオニンやグリシンは，ミトコンドリアに存在する TDG 及び aminoacetone synthase (2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase) により 2-アミノ-3-オキソ酪酸に代謝され，この物質は非酵素的に脱炭酸されアミノアセトンを生成する。アミノアセトンは amine oxidase の触媒下 MG にまで代謝されるとの報告がある [25,26,47]。この経路に関係する酵素活性，中間体含量，また，L-スレオニン，グリシンからの MG の生成を調べてみた。結果は，図 4.，表 4. に示すように，図 5. の経路を満足するものであった。また，TDG 及び amine oxidase の活性は，6,000 ×g 上清において認められたものである。通常，6,000 ×g 上清にはミトコンドリアは存在しないが，これは，ホモジナイズの操作によりミトコンドリアが破壊され内容物が流出したことが原因ではないかと考えられる。以上のことから，L-スレオニンとグリシンは，図 5. の経路と MG bypass を経由して D-乳酸へ代謝されることが示唆された。

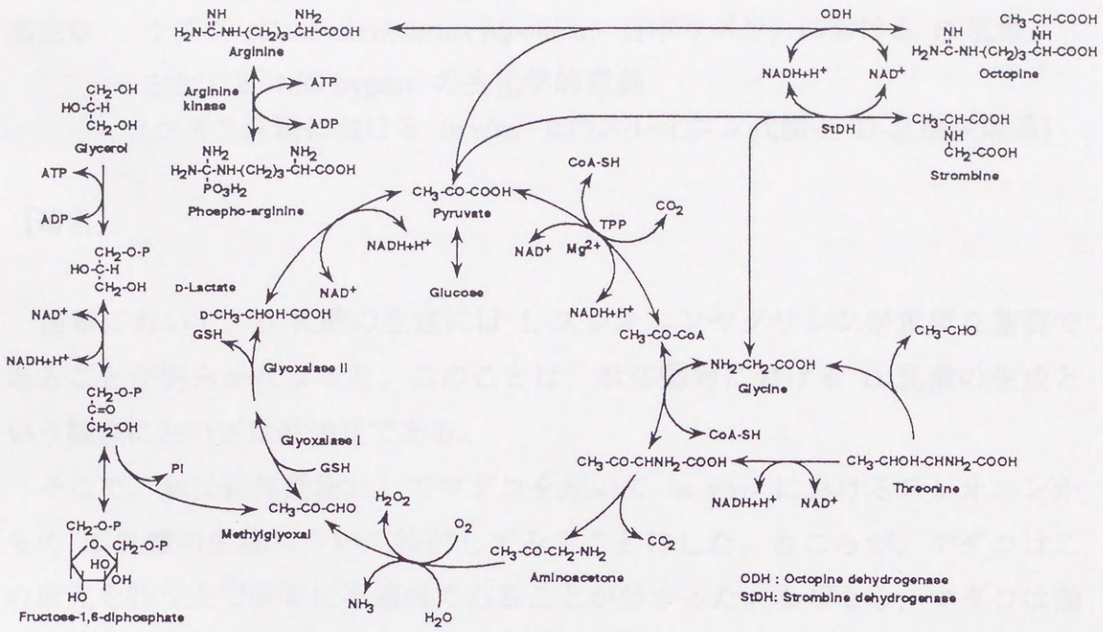
L-スレオニンとグリシンは MG bypass のみを通過して D-乳酸へ代謝される。しかし，グルコースや F-1,6-P 等の糖代謝の中間体は，解糖系と MG bypass の両方から D-乳酸を生成しうる物質である。このような糖代謝の中間体より L-スレオニン，グリシンは効率の良い D-乳酸の生成源であった。これは，解糖系より MG bypass の方が D-乳酸の生成に対して有利であることを示すものである。

まとめてみると，以下のようなことが推察される。軟体動物は，急激な水温

低下による運動能力の低下あるいは季節的な餌不足などの状況下，絶食状態に陥る。また，藤澤等の行った実験ではイイダコでは約一月もの絶食に耐える [50]。このような厳しい絶食状況を克服するために，軟体動物は自分自身の体を燃焼して，体内のエネルギー要求，言い換えれば，グルコース濃度を維持して生存しているものと思われる。このような状況下での軟体動物の重要な糖原性物質はアミノ酸であり，事実，軟体動物の体内中には，遊離のアミノ酸濃度が高く，また，豊富な筋肉組織がアミノ酸貯蔵の役割も果たしている [51]。この時，L-スレオニンやグリシンなどからの D-乳酸生合成経路が活性化しているものと考えられる。前述したように，L-スレオニンやグリシンなどの糖原性アミノ酸は，セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼによりセリンに変換されピルビン酸の供給源となる。しかし，これらを触媒する酵素は総てミトコンドリアの酵素であり，また，タコのような軟体動物にはミトコンドリアの存在量があまり多くない [54-56]，従って，一部はこれらの経路を経由して糖新生の基質として使用されるのであろうが，残りの一部はこれを補う形で D-乳酸生成経路を経由して糖新生の基質として使用されているものと考えられる。

また，我々の研究室では同時にマダコの足の筋肉から D-LDH を精製した [28]。マダコの足由来の D-LDH は D-乳酸に対する Km 値が低く哺乳動物における H-type の LDH に類似した性質を示した。従って，マダコの足における D-LDH はピルビン酸還元方向だけでなく乳酸酸化方向にも十分働きやすいものと考えられる。

これらのことを次貢に示す経路に置き換えてみるとさらに無理なく説明できる。また，この経路はエネルギー代謝という観点から見ると確かにあまり効率のよいものではない。あくまで，補足的なものではないかと考えられる。この経路において，1 モルの L-スレオニンが D-乳酸を経てピルビン酸にまで代謝される過程において 2 モルの NADH が生成する。また，1 モルのグリシンは 1 モルのアセチル CoA (この経路の回転によりアセチル CoA はまかなうことが可能である。) と結合し， D-乳酸を経てピルビン酸まで代謝される過程において 1 モルの NADH が生成する。これら NADH は糖新生のための補酵素となり，また，ピルビン酸は糖新生のための基質になる。



マダコにおけるスレオニンとグリシンからの D-乳酸生成経路

第三章　ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*, 日本ウズラ) における D-乳酸を生じる MG bypass の生化学的意義
(ウズラ肝臓における *in vivo* でのスレオニン代謝と D-乳酸生成系)

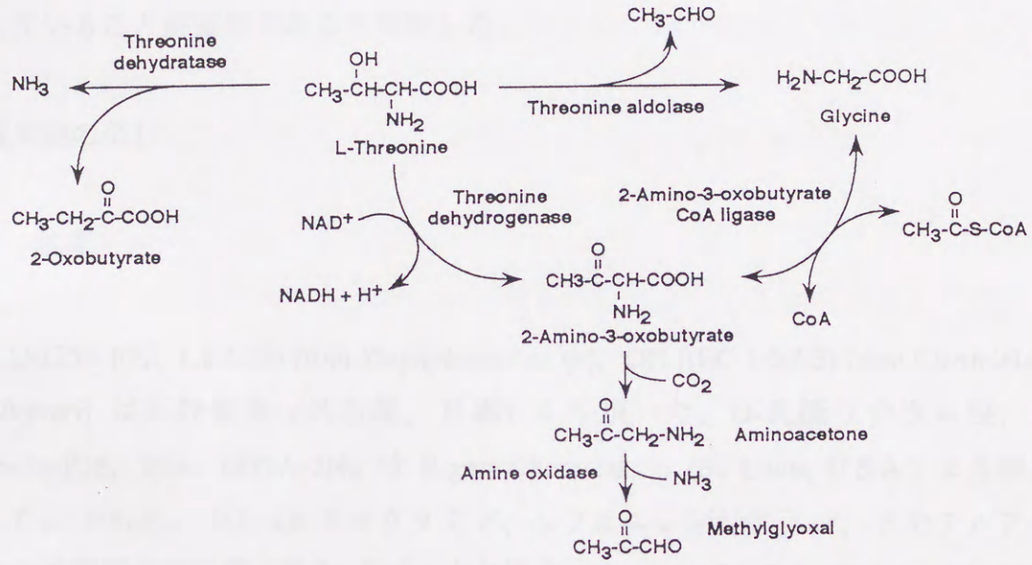
【緒言】

前章において，D-乳酸の生成には L-スレオニンやグリシンが重要な基質であることが明らかとなった。このことは，軟体動物における D-乳酸の生成という観点においては新知見である。

そこで，私は軟体動物としてマダコを用いて *in vivo* におけるスレオニンからの D-乳酸の生成について検討してみることにした。ところが，マダコはこの研究を行う上で非常に不適当であることが分かった。なぜなら，マダコは瀬戸内海から任意に捕獲されたものを使用しなければならず，雄，雌の判断，正確な年齢の把握が困難であり，また，季節変動，絶食及び飽食など，生物間のバラツキによる統一した実験系が組みにくい。また，タコ自体その全身に占める筋肉の割合が多く，生体内酸化反応に関する酵素活性が低い [55]。従って，出来るだけ下等な別の生物を使用する必要が生じた。また，スレオニン代謝とD-乳酸生成系とに重点を置き，詳細な研究を行う上で，よりスレオニン代謝の活性が強く，実験を均一な条件で行うことが可能であり，また，安定供給の可能な生物を使用することが望ましいと考えた。その過程で，私は，岡山大学農学部において継代されている閉鎖系無作為交配種である日本ウズラを使用することにした。研究の結果，この動物は，偶然にもスレオニン代謝の活性が強く，特徴的なスレオニン代謝機能を持つことが明らかとなった。

スレオニンの炭素骨格の異化反応の第一段階を触媒する酵素は，現在のところ三種類が知られている。それら三種の酵素を次頁の図に示した。1) TDH は，スレオニンから 2-オキソ酪酸とアンモニアを生成する反応を触媒する [56]。2) TAD は，スレオニンからグリシンとアセトアルデヒドを生成する反応を触媒する [57-61]。また，3) TDG は，NAD^+ を補酵素として 2-アミノ-3-オキソ酪酸を生成する反応を触媒する。この不安定な中間体は，さらに，非酵素的に脱炭酸してアミノアセトンを生成するか，あるいは，2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase の触媒下，グリシンとアセチル CoA を生成する [62-71]。また，第二章

で示したように 2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase は aminoacetone synthase と同一の酵素であると言われておりグリシンとアセチル CoA から 2-アミノ酪酸を経てアミノアセトンを生成する可逆的な酵素である [72]。しかし，脊椎動物においては専ら，2-アミノ-3-オキソ酪酸からのグリシンとアセチル CoA 生成側に主眼が置かれており，その可逆性に関しては十分知られていないのが現状である。



三種の酵素によるスレオニンの代謝経路

従来，これら三酵素のうちでは TAD が主要なスレオニン代謝酵素あり，この酵素の触媒下，スレオニンはグリシンに代謝されると考えられていた [57]。しかし，Bird 等は，従来の TAD 活性測定法には問題があるとして，TAD の活性測定法の見直しを行った。その結果，ラットにおいては，TAD 活性が非常に低いか，あるいは，全く認められず，スレオニンの主要代謝酵素は TDG であるとした [73-75]。しかし，スレオニン代謝に関しては，現在も様々な議論や報告があり，解明すべき点を多く残している。そこで私は 3) の経路，即ち，TDG の関与するスレオニンからの D-乳酸経路に重点を置き，その生理的重要性を解明することにした。このことは下等動物における D-乳酸の存在意義を解き明かすだけでなく，スレオニン代謝に関する問題をも解明する糸口になる

と考えられる。

以上のことから，スレオニン代謝と D-乳酸生成系及びそれらがどの様な相互関係を持つか，そして，それらがエネルギー代謝とどのように関わっているかを明らかにすることを目的として以下の検討を行った。また，本検討を行う上で，*in vivo* において絶食による糖新生条件等，様々な栄養条件について実験を行うことが望ましいと考えた。このことから，性的成熟が早く，栄養条件に敏感に反応し，そして，実験を行うにあたって適当な大きさであるウズラ [76] を用いることが適切であると判断した。

【実験の部】

1. 試薬

D-LDH [(EC 1.1.1.28) from *Staphylococcus sp*], DH [(EC 1.6.4.3) from *Clostridium Kluyveri*] は天野製薬 (名古屋，日本) より頂いた。D-乳酸リチウム塩，S-LactoylGS，Tris，EDTA-2Na は Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.) より購入した。PALP，D,L-6,8-チオクタミド，*o*-フェニレンジアミン，アセチルアセトンは東京化成工業 (東京, 日本) より購入した。β-NAD^+, β-NADH, L-LDH [(EC 1.1.1.27), from pig heart], ADH [(EC 1.1.1.1), from yeast] はオリエンタル酵母 (東京，日本) より購入した。DCPD (4,5-dichloro-1,2-phenylenediamine)，pyruvic aldehyde dimetylacetal は Aldrich Chemical Co., Inc. (Milwaukee, U.S.A.) より購入した。その他すべての試薬は和光純薬 (大阪，日本) より購入した。MG は pyruvic aldehyde dimethylacetal の加水分解により調製した [18]。MG の定量の際に使用する標準物質である DCMQ (6,7-dichloro-2-methylquinoxaline) 及び D-乳酸の定量の際に使用する標準物質である 2-MQ は当研究室で合成したものを使用した [8]

2. 動物

5 週令の雄のウズラ[Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*, 日本ウズラ)]を実験に使用。岡山大学農学部家畜機能調節学講座で閉鎖的に継代されている無作為交配種

生後 4 週令のウズラを，5 週になるまで 1 羽から 4 羽飼い用の木製飼育箱に移し慣れさせる。5 週になったら同体重のものを選出し実験に使用した。

飼育小屋の温度　　: 22 - 29 ℃,

飼育小屋の点灯時間　　: AM 6:00 から PM 8:00 (14 時間)

正常食群ウズラ

5 週令になったウズラに自由に餌と水を与えたものを正常食群として使用した。以下に示す各々の実験群に対するコントロールとして使用した。

72 時間絶食群

5 週令のウズラに，水のみを自由に与えたものを絶食群として使用。

絶食の期間 : 3 日間 (AM 10:00 から 3 日後の AM 10:00 まで)

絶食終了後すぐに実験に使用した。なお，同期間自由に餌と水を与えた正常食群をコントロールとして使用した。

実験直前の体重 :	正常食群	97.1±1.6 g
	絶食群	64.9±3.4 g
3 日間での体重変化 :	正常食	4.1±0.5 g 増加
	絶食群	27.3±3.5 g 減少

(Means±S.E. , 正常食群 ; n=12 , 絶食群 ; n=8)

1 % スレオニン添加餌群及び 5 % スレオニン添加餌群

5 週令のウズラに，正常食 100 g に対して 1 g のスレオニンを添加した餌 (餌中スレオニン含量 1.98 %) を与え，水を自由に飲ませたものを 1 % スレオニン添加餌群として使用した。

また，正常食 100 g に対して 5 g のスレオニンを添加した餌 (餌中スレオニン含量 5.71 %) を与え，水を自由に飲ませたものを 5 % スレオニン添加餌群として使用した。

投与期間 : 4 日間 (AM 10:00 から四日後の AM 10:00 まで)

投与期間終了後すぐに実験に使用した。なお，同期間自由に餌と水を与えた正常食群をコントロールとして使用した。

実験直前の体重 :	正常食群	93.1±1.3 g
	1 % スレオニン添加餌群	89.9±1.9 g
	5 % スレオニン添加餌群	96.1±3.0 g

(Means±S.E. , 正常食群 ; n=12 , スレオニン添加餌群 ; n=6)

4 日間平均餌摂取量 :	正常食群	15.4±0.4 g
	1 % スレオニン添加餌群	16.6±0.5 g
	5 % スレオニン添加餌群	14.0±0.1 g

(Means±S.E. , 正常食群 ; n=12 , スレオニン添加餌群 ; n=6)

ラット

雄の 5 週令のラット (Wistar strain albino rat) を使用。

自由に餌と水を与えた正常食群と 72 時間絶食群を実験に使用。

3. 餌

マル K 印うずら用配合飼料 (東海起業株式会社) を正常食としてウズラに与えた。

栄養成分量

粗タンパク質	25.8 %
粗脂肪	4.4 %
粗繊維	2.6 %
粗灰分	4.7 %

添加物

ビタミン A，ビタミン D_3，ビタミン E，ビタミン B_1，ビタミン B_2，ビタミン B_6，ニコチン酸，パントテン酸，葉酸，炭酸マンガン，炭酸亜鉛，硫化鉄，硫酸銅，葉酸カルシウム，エトキシキン，メチオニン

正常食中スレオニン含量 1.0 %

4. 動物の処理

実験には，肝臓を使用した。組織の摘出は AM 10:00 から PM 0:00 の間に行った。ウズラ，ラットの腹腔内に麻酔としてペントバルビタールを 50 mg/kg となるように注射した。麻酔後 5 分から 10 分後に腹部から肝臓を摘出し，氷冷した 0.9 % 生理食塩水で十分に脱血を行った。また，摘出した肝臓は使用直前まで氷中で保存した。

5. 装置

ECD-GC

検出器 : Shimadzu Gas Chromatograph Model GC-4CM PEE (Ni^{63})

カラム : ガラスカラム 3 mm (内径) × 2 m (長さ)

充填剤 : 1.5 % Silicone OV-17 Shimalite W Mesh 80 - 100

インジェクション及び検出器温度 : 270 ℃

カラム温度 : 200 ℃

キャリアガス : N_2 ガス

流速 : 50 ml/min

分光光度計

SHIMADZU DOUBLE-BEAM SPECTROPHOTOMETER (Model UV-180)

UV-HPLC

カラム : COSMOSIL PACKED COLUMN for HPLC 5C18-AR Waters

仕様 (4.6 mm × 150 mm) (NACALAI TESQUE)

移動相 : 10 mM H_3PO_4 – KH_2PO_4 (pH 2.1) containing 15 % CH_3CN

流速 : 1.0 ml/min

カラム温度 : 40 ℃

ポンプ : Model 576 - 1A (GASUKURO KOGYO)

検出器 : SPECTRO DETECTOR 502T (GASUKURO KOGYO)

測定波長 : 334 nm

6. 酵素活性測定

6-1 Threonine dehydrogenase.

Bird 等の方法により測定した [75]。

試料の調製

Bird 等の方法により試料の調製を行った [75]。

活性測定

0.1 M L-スレオニン, 2.5 mM NAD^+, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) 及び酵素源 (ウズラ : 0.3 - 1.5 mg protein, ラット : 0.4 - 1.7 mg protein) を含む反応系 (全量 2.0 ml) を 37 ℃ で 30 分インキュベーションした後 15 % TCA 1.0 ml を添加して反応を停止した。その後, 1,500 ×g, 15 分間遠心した。この上清中に含まれているスレオニンから TDG の触媒下に生成したアミノアセトンを Urata と Granick の方法により比色定量した [62]。

除蛋白遠心後に得られた上清 1.0 ml に等量の 1 M 酢酸ナトリウム (pH 4.6), 0.1 ml のアセチルアセトンを加え 100 ℃, 10 分間加熱した。室温で冷却後, 2.0 ml の Ehrlich's Hg reagent を加え, 室温で 15 分放置し 552 nm の吸光度 (モル吸光係数 7.4 × 10^4 $M^{-1}cm^{-1}$) を測定した。なお, 酵素源を添加していないも

のをブランクとして使用した。

Ehrlich's Hg reagent

168 ml of glacial acetic acid

40 ml of 70 % perchloric acid

4.0 g dimethylaminobenzaldehyde

0.7 g $HgCl_2$

H_2O

total 220 ml

6-2 Threonine dehydratase

Bird 等 [75], Morris 等 [77] の方法により測定した。

試料の調製

Bird 等 [75], Morris 等 [77] の方法により試料の調製を行った。

活性測定

0.1 M リン酸カリウム (pH 8.2), 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.2 mM PALP, 0.057 mM NADH, 5 U LDH 及び酵素源 (ウズラ : 0.1 - 1.0 mg protein, ラット : 0.2 - 0.5 mg protein) を含む反応系を, 37 ℃ で 5 分間プレインキュベーションし, スレオニン (終濃度 0.2 M) を加え全量を 1.0 ml とした。この反応液をさらに 37 ℃ で 10 分間インキュベーションした後, 340 nm における吸光度変化を測定した。

なお, 0.2 M スレオニンを添加していないものをブランクとした。

6-3 Threonine aldolase

Palekar 等の方法により測定した [78]。

試料の調製

酵素源は TDH と同じものを使用した。

活性測定

0.1 M リン酸カリウム (pH 7.3), 0.05 mM PALP, 1.0 mM DTT, 0.057 mM NADH, 0.7 U ADH, 0.1 M スレオニン及び酵素源 (ウズラ : 0.8 - 3.0 mg protein, ラット : 0.5 - 2.0 mg protein) を含む反応系 (全量 2.0 ml) を, 37 ℃, 10 分間インキュベーションした後, 340 nm の吸光度変化を測定した。

なお, 0.1 M スレオニンを添加していないものをブランクとした。

6-4 グリオキサラーゼ I, II

グリオキサラーゼ I, II ともに第二章に示したように, Racker の方法を参考にした [23]。

6-5 aminoacetone synthase

試料の調製

酵素源は, TDG と同じものを使用した。

活性測定

活性測定系は, Ray 等の方法に従った [72]。50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM グリシン, 0.3 mM アセチル CoA 及び酵素源 (ウズラ : 0.3 - 3.0 mg protein) を含む反応系 (全量 2.0 ml) を, 37 ℃, 30 分間インキュベーションした。このインキュベーション液中に生成したアミノアセトンを前述した比色定量法により分析した [62]。

7. MG の定量

大森等の方法に従い肝中 MG 含量を測定した [11]。

グリオキサラーゼ I, II 活性測定時に使用する 6,000 ×g 上清 1.0 ml に，氷令した 100 % メタノール 500 µl を加え撹拌後，除蛋白のために 1,700 ×g，15 分間遠心する。得られた上清 200 µl に，エタノールに溶解した 1 % DCPD 40 µl を添加し，25 ℃，1 時間反応させる。その後，反応液に n-hexane (25 ng/ml aldrin を含んだもの) 500 µl を加えよく撹拌した後，DCMQ を抽出し n-hexane 層中の DCMQ を ECD-GC により測定した。

8. D-乳酸の定量

肝臓 1.0 g に 5 倍容の 50 % メタノールを加え，glass Teflon homogenizer で，1,000 rpm，30 秒間ホモジナイズ後，6,000 ×g，15 分遠心した。得られた上清 0.4 ml に 100 % メタノール 1.5 ml を加えよく撹拌し，1,700 ×g，15 分遠心し上清を得た。沈殿物は 70 % メタノール 1.0 ml で洗い，再び遠心し，得られた上清を前の上清を合わせ，SAVANT Speed Vac Concentrator (Model SUC-100H，New York) を用いて蒸発乾固させた。

以後の操作は第一章に示したように大森等の方法を参考にして D-乳酸を測定した [8]。

9. ウズラ肝ミトコンドリアにおけるスレオニンからのグリシンとアミノアセトンの生成

<u>試料の調製</u>

ウズラ肝臓 1.0 g に 9 倍容の氷冷した 0.25 M ショ糖溶液 (3 mM リン酸カリウム，pH 7.4) を加え手動式の glass homogenizer を用いてホモジナイズした。このホモジネートを glass Teflon homogenizer に移し 1,000 rpm，3 往復ホモジナイズした後，700 ×g，4 ℃，15 分間遠心した。得られた上清をさらに 5,500

×g，4 ℃，15 分間遠心した。この沈殿物に 0.25 M ショ糖溶液 (3 mM リン酸カリウム，pH 7.4) 1.0 ml を加え懸濁したものを酵素源として使用した。

反応系

TDG の活性測定系と同様のものを使用した。また，合わせて終濃度として 0.1 mM となるように CoA を添加したものも用意した。

それぞれの反応系につきインキュベーションしていないものをコントロールとして使用した。反応系には，酵素源を 0.1 ml 加えた。

これら反応系におけるアミノアセトンを前述した比色定量法により，また，グリシンは第二章に示した比色定量法により分析した [18,62]。

10. タンパク定量

タンパク濃度は bovine serum albumin を標準として Lowry 法を用いて測定した [79]。

【結果の部】

1. スレオニンを添加した餌による体重，肝重量及び摂食量変化

図 1. 及び表 1. には，1 % 及び 5 % のスレオニン添加餌群及び正常食群ウズラの体重，肝重量及び摂食量変化を示した。

正常食群とスレオニン添加餌群では，図 1.に示すように体重及び摂食量に大きな差はなかった。これらの結果は，スレオニン添加餌群ウズラは正常色群より多量のスレオニンを摂取していることを示すものである。また，表 1. に示すように肝重量にも大きな差は認められなかった。

表 1.　スレオニン添加餌群及び正常食群ウズラの肝重量

Normal	2.1±0.1 (g)
1% Threonine	2.1±0.2 (g)
5% Threonine	2.3±0.1 (g)

Means±S.E. , Normal ; n=12 , 1% and 5% Threonine ; n=6

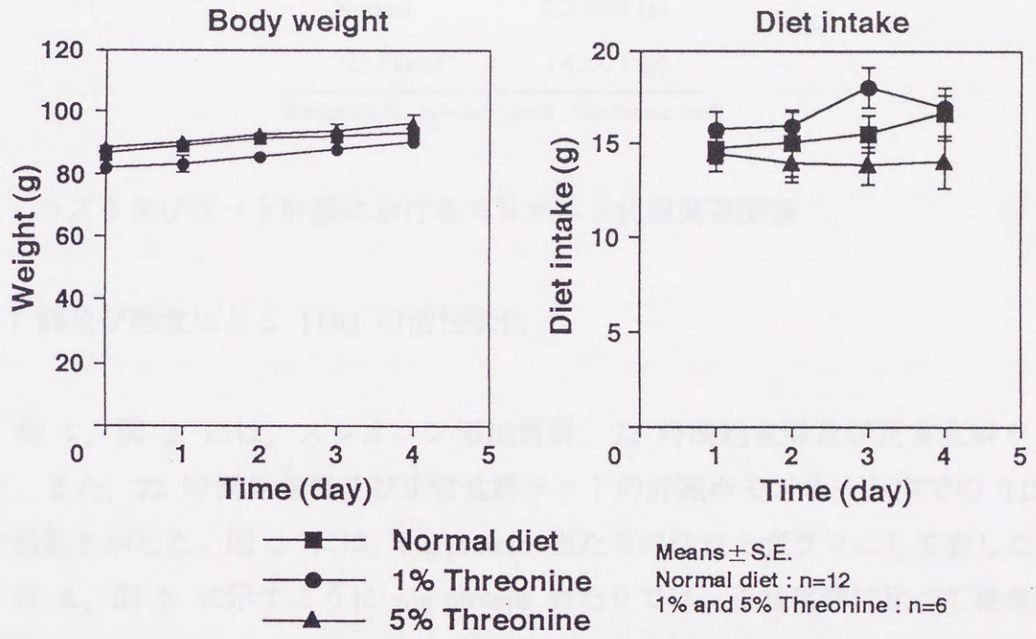


図 1.　スレオニン添加餌群及び正常食群ウズラの体重変化及び摂食量

2.　絶食によるウズラの体重，肝重量変化

表 2., 3. には，72 時間絶食群と正常食群ウズラとの体重変化と肝重量変化を示した。

表 2. より，正常食群では体重が約 4 g 増加していたのに対し，絶食群では約 27 g の体重減少が認められた。また，表 3. に示すように絶食群の肝重量は，正常食群の約 60 % であった。これらの結果は，明らかに絶食による影響をウズラが受けていることを示すものである。

表 2.　72 時間絶食群及び正常食群ウズラの体重変化

Day	0	3
Normal	92.6±1.2 (g)	97.1±1.6 (g)
72h Fasted	91.2±1.1 (g)	64.9±3.4 (g)

Means±S.E. , Normal ; n=12 , 72h Fasted ; n=8

表 3.　72 時間絶食群及び正常食群ウズラの肝重量

Normal	2.2±0.1 (g)
72h Fasted	1.4±0.1 (g)

Means±S.E. , Normal ; n=12 , 72h Fasted ; n=8

3.　ウズラ及びラット肝臓におけるスレオニン代謝関連酵素

3-1 餌及び絶食による TDG の活性変化

表 4., 図 2. には，スレオニン添加餌群，72 時間絶食群及び正常食群ウズラ，また，72 時間絶食群及び正常食群ラットの肝臓ホモジネート中での TDG の活性を示した。図 2. には，mg protein 当たりの活性をグラフにして表した。

表 4., 図 2. に示すように mg protein 当たりでは，正常食群に比べて絶食群で約 3 倍，5 % スレオニン添加餌群で約 2 倍の活性増加が認められた。g w.w. 当たりでは正常食群に比べて，絶食群で約 2.3 倍，5 % スレオニン添加餌群で約 1.7 倍活性が増加した。Whole liver 当たりでは正常食群に比べて，絶食群で約 2 倍，5 % スレオニン添加餌群で約 2.4 倍に活性が上昇した。1 % スレオニン添加餌群には，正常食群との間で有意の差が認められなかった。この結果から，ウズラでは，絶食により TDG を経由するスレオニン代謝が活性化していることが示唆された。

一方，ラットに関しては，正常食群と絶食群との間に有意の差は認められず，絶食により TDG の活性は影響を受けないことが示された。

ウズラ及びラットの正常食群を比較した場合，ウズラにおける TDG 活性はラットよりも高く mg protein, g w.w. 当たり約 11 倍，whole liver 当たり約 2.5 倍であった。

3-2 餌及び絶食による TDH の活性変化

表 5., 図 3. は，スレオニン添加餌群，72 時間絶食群及び正常食群ウズラ，また，72 時間絶食群及び正常食群ラットの肝臓ホモジネート中での TDH の活性を示した。図 3. には，mg protein 当たりの活性をグラフにして表した。

表 5., 図 3. に示すように mg protein 当たりの活性は，正常食群に比べ絶食群で約 2 倍，1 % スレオニン添加餌群で約 1.3 倍，5 % スレオニン添加餌群で約 1.5 倍の活性増加が認められた。g w.w. 当たりの活性は，正常食群に比べ絶食群のみで増加 (約 1.8 倍) が認められた。また，whole liver 当たりでは，活性に大きな差が認められなかった。

ラットに関しては正常食群に比べ絶食群で mg protein，g w.w. 及び whole liver 当たり約 2 - 3 倍の活性上昇が認められた。

ラットとウズラの正常食群を比較した場合，ラットはウズラより高い活性を持つことが分かった (mg protein，g w.w. 当たり約 14 倍，whole liver 当たり約 80 倍)。

3-3 餌及び絶食による TAD の活性変化

表 6., 図 4. は，スレオニン添加餌群，72 時間絶食群及び正常食群ウズラ，また，72 時間絶食群及び正常食群ラットの肝臓ホモジネート中での TAD の活性を示した。図 4. には，mg protein 当たりの活性をグラフにして表した。

表 8., 図 4. に示すように，ウズラでは，正常食群，絶食群及びスレオニン添加餌群で有意の差が認められなかった。

また，ラットにおいても正常食群と絶食群とで有意の差は認められなかった。

活性から考えて，ウズラとラットいずれにおいても，TAD によるスレオニンからグリシンの変換反応は生理的にそれほど意味があるものとは考えられない。

表 4. ウズラ及びラット肝臓ホモジネートにおける様々な栄養条件下での TDG 活性

		mU/mg protein	U/g w.w.	U/whole liver
Threonine dehydrogenase	Normal diet quail liver[a]	3.37±0.30	0.72±0.07	1.16±0.12
	72h Fasted quail liver[b]	9.83±0.68***	1.66±0.13***	2.43±0.24***
	1 % Threonine diet quail liver[c]	2.70±0.31	0.51±0.04	1.08±0.15
	5 % Threonine diet quail liver[d]	6.51±0.61***	1.22±0.12**	2.79±0.35***
	Normal diet rat liver[e]	0.31±0.02	0.07±0.01	0.47±0.07
	72h Fasted rat liver[f]	0.29±0.03	0.06±0.01	0.25±0.03*

All values are means±S.E.M. , [a] ; n=12 , [b] ; n=8 , [c] ; n=6 , [d] ; n=6 , [e] ; n=3 , [f] ; n=3
*** ; P < 0.001 , ** ; P < 0.01 , * ; P < 0.05

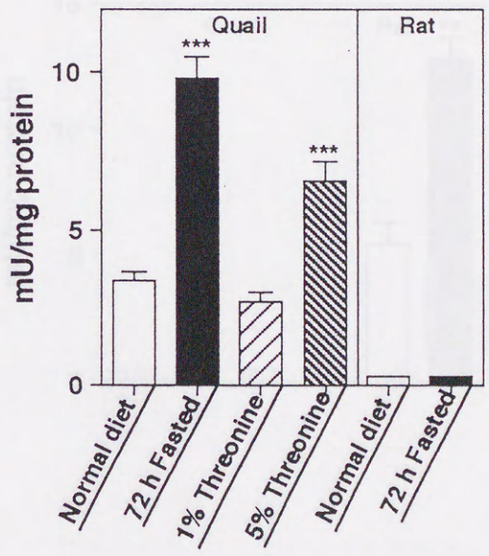


図 2. ウズラ及びラット肝臓ホモジネートにおける様々な栄養条件下での蛋白あたりの TDG 活性

表 5. ウズラ及びラット肝臓ホモジネートにおける様々な栄養条件下での TDH 活性

		mU/mg protein	mU/g w.w.	mU/whole liver
Threonine dehydratase	Normal diet quail liver[a]	0.36±0.03	28.23±2.23	57.66±5.41
	72h Fasted quail liver[b]	0.71±0.12**	48.86±9.56*	82.91±15.10
	1 % Threonine diet quail liver[c]	0.48±0.03*	29.09±1.43	62.34±4.06
	5 % Threonine diet quail liver[d]	0.55±0.02**	34.02±2.83	78.00±8.80
	Normal diet rat liver[e]	5.49±0.89	0.42±0.05[1]	3.00±0.39[2]
	72h Fasted rat liver[f]	12.83±0.82**	1.09±0.03[1] ***	4.96±0.21[2] *

All values are means±S.E.M. , [a] ; n=12 , [b] ; n=6 , [c] ; n=6 , [d] ; n=6 , [e] ; n=3 , [f] ; n=3
*** ; P < 0.001 , ** ; P < 0.01 , * ; P < 0.05 , [1] ; U/g.w.w. , [2] ; U/whole liver

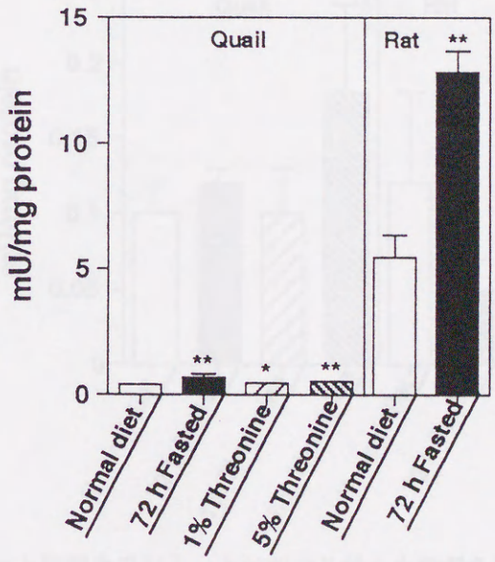


図 3. ウズラ及びラット肝臓ホモジネートにおける様々な栄養条件下での蛋白あたりの TDH 活性

表 6. ウズラ及びラット肝臓ホモジネートにおける様々な栄養条件下での TAD 活性

		mU/mg protein	mU/g w.w.	mU/whole liver
Threonine aldolase	Normal diet quail liver[a]	0.10±0.02	7.22±1.51	16.07±3.39
	72h Fasted quail liver[b]	0.12±0.01	6.21±0.75	11.53±1.83
	1 % Threonine diet quail liver[c]	0.10±0.03	5.79±1.74	13.98±4.46
	5 % Threonine diet quail liver[d]	0.18±0.06	11.07±3.46	25.00±7.88
	Normal diet rat liver[e]	0.12±0.06	6.97±3.23	47.60±22.10
	72h Fasted rat liver[f]	0.05±0.02	3.26±1.41	13.85±6.05

All values are means±S.E.M. , [a] ; n=11 , [b] ; n=3 , [c] ; n=3 , [d] ; n=6 , [e] ; n=4 , [f] ; n=4 , mU ; nmol/min

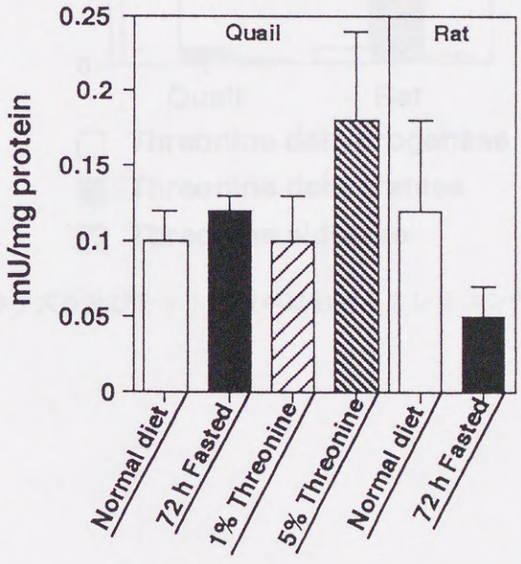


図 4. ウズラ及びラット肝臓ホモジネートにおける様々な栄養条件下での蛋白あたりの TAD 活性

3-4 スレオニン代謝関連酵素の相互関係

図 5. は，正常食群ウズラ及びラット肝臓ホモジネート中の三種のスレオニン代謝関連酵素の活性を mg protein 当たりで示した。

この結果の示すように，ウズラでは三種の酵素を合わせたものを 100 % とした場合，TDG の活性はその 88 % に当たりウズラ肝臓中でのスレオニン代謝の主要な酵素であることが示唆された。

また，ラットでも同様に三種の酵素の活性を合わせたものを 100 % とした場合，その 93 % が TDH の活性であり，ラット肝臓中での主要なスレオニン代謝酵素であることが示唆される。

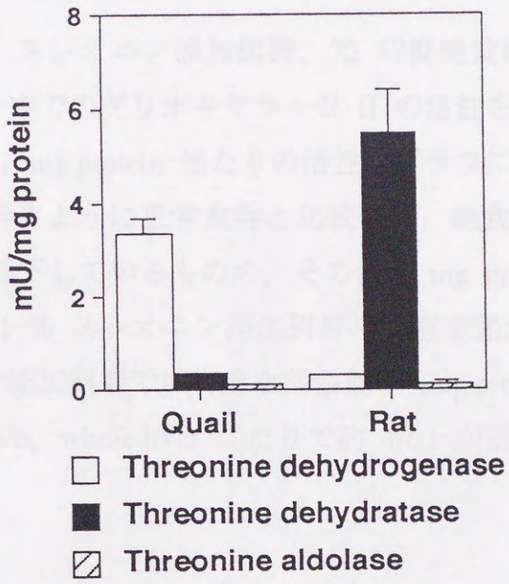


図 5. 正常食群ウズラ及びラット肝臓中におけるスレオニン代謝関連三酵素の活性

4. ウズラ肝臓におけるグリオキサラーゼ系関連酵素

4-1 餌及び絶食によるグリオキサラーゼ I の活性変化

表 7., 図 6. は，スレオニン添加餌群，72 時間絶食群及び正常食群ウズラの肝臓ホモジネート中でのグリオキサラーゼ I の活性を示した。

また，図 6. には，mg protein 当たりの活性をグラフに表した。

表 7., 図 6. に示すように正常食群と比較して，絶食群で若干の上昇，5％ スレオニン添加餌群で若干の減少傾向が認められるものの有意ではなかった。

4-2 餌及び絶食によるグリオキサラーゼ II の活性変化

表 8., 図 7. は，スレオニン添加餌群，72 時間絶食群及び正常食群ウズラの肝臓ホモジネート中でのグリオキサラーゼ II の活性を示した。

また，図 7. には，mg protein 当たりの活性をグラフに表した。

表 8., 図 7. に示すように正常食群と比較して，絶食群で whole liver 当たり約 1/2 に活性が低下しているものの，その他の mg protein あるいは g w.w. 当たり絶食群及び 1 % スレオニン添加餌群では有意差が見られなかった。また，5％ スレオニン添加餌群では有意な活性低下 (mg protein 当たりで約 1/7, g w.w 当たりで約 1/6，whole liver 当たりで約 1/6) が認められた。

表 7. ウズラ肝臓ホモジネートにおける様々な餌条件下でのグリオキサラーゼⅠの活性

		U/mg protein	U/g w.w.	U/whole liver
Glyoxalase I	Normal diet quail liver[a]	0.37±0.05	27.87±3.63	66.41±9.76
	72h Fasted quail liver[b]	0.50±0.05	27.48±3.66	41.92±5.80
	1 % Threonine diet quail liver[c]	0.45±0.07	32.78±4.75	76.99±14.82
	5 % Threonine diet quail liver[d]	0.26±0.05	16.01±1.27	37.27±2.43

All values are means±S.E.M. , [a] ; n=11 , [b] ; n=5 , [c] ; n=4 , [d] ; n=3

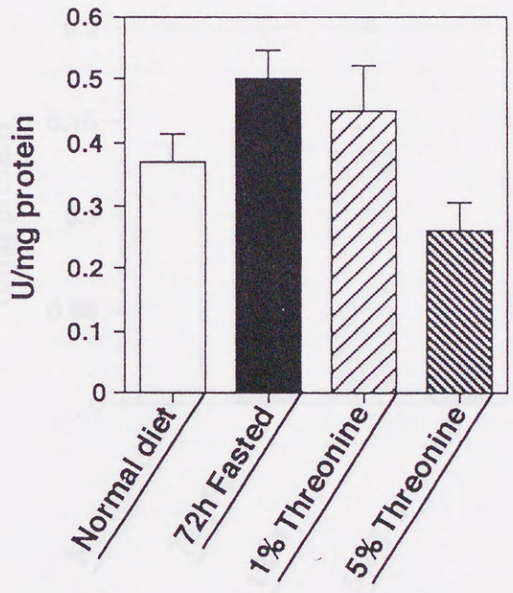


図 6. ウズラ肝臓ホモジネートにおける様々な餌条件下での
蛋白あたりのグリオキサラーゼⅠの活性

表 8. ウズラ肝臓ホモジネートにおける様々な餌条件下でのグリオキサラーゼ II の活性

		U/mg protein	U/g w.w.	U/whole liver
Glyoxalase II	Normal diet quail liver[a]	0.13±0.01	9.28±0.78	21.31±2.49
	72h Fasted quail liver[b]	0.15±0.02	7.75±1.56	11.94±2.59*
	1 % Threonine diet quail liver[c]	0.13±0.01	9.94±1.18	22.70±2.62
	5 % Threonine diet quail liver[d]	0.02±0.01***	1.66±0.024***	3.53±0.32**

All values are means±S.E.M. , [a] ; n=11 , [b] ; n=5 , [c] ; n=4 , [d] ; n=3
*** ; P < 0.001 , ** ; P < 0.01 , * ; P < 0.05

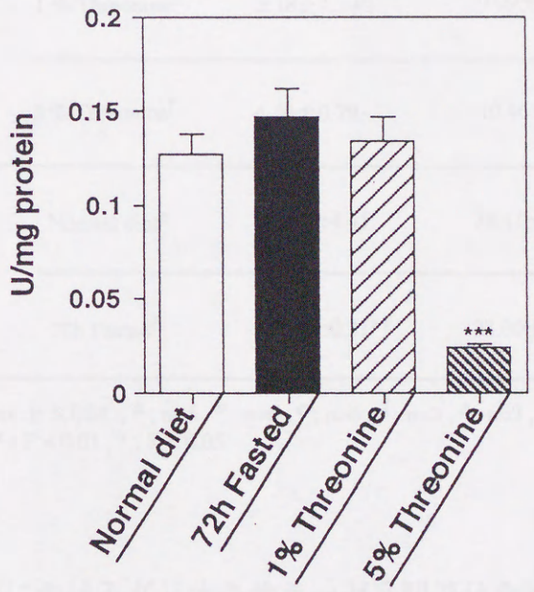


図 7. ウズラ肝臓ホモジネートにおける様々な餌条件下での
蛋白あたりのグリオキサラーゼ II の活性

表 9.　ウズラ肝臓中グリオキサラーゼ系関連化合物含量

		nmol/mg protein	nmol/g w.w.	nmol/whole liver
Methylglyoxal	Normal diet[a]	0.012±0.001	1.22±0.16	2.60±0.29
	72h Fasted[b]	0.018±0.001***	1.33±0.08	1.72±0.16*
		nmol/g w.w.	nmol/whole liver	
D-Lactate	Normal diet[c]	8.75±2.55	15.94±4.82	
	72h Fasted[d]	Not detectable	Not detectable	
	1 % Threonine[e]	5.18±1.740	9.09±2.87	
	5 % Threonine[f]	4.40±0.79	10.46±1.41	
Pyruvate	Normal diet[g]	32.50±4.41	74.41±7.39	
	72h Fasted[h]	14.96±0.31**	23.00±1.00***	

All values are means ± S.E.M. , [a] ; n=5 , [b] ; n=6 , [c] ; n=6 , [d] ; n=3 , [e] ; n=3 , [f] ; n=6 , [g] ; n=6 , [h] ; n=6
*** ; P < 0.001 , ** ; P < 0.01 , * ; P < 0.05

5.　ウズラ肝臓におけるグリオキサラーゼ系関連化合物

表 9., 図 8. は，スレオニン添加餌群，72 時間絶食群及び正常食群ウズラの肝臓中のグリオキサラーゼ系関連化合物であるメチルグリオキサール及び D-乳酸，並びにピルビン酸の含量を示した。

また，図 8. には，mg protein 当たりの肝臓中メチルグリオキサール含量と g

w.w. 当たりの肝臓中 D-乳酸及びピルビン酸含量をグラフとして表した。

表 9., 図 8. に示すように，ウズラ肝臓中メチルグリオキサール含量は正常食群に比べて絶食群で肝重量の減少のため whole liver 当たりでは約 2/3 に減少しているものの mg protein 当たりでは逆に約 1.5 倍に増加していた。

表 9., 図 8 に示すように，正常食群ウズラ肝臓中では 8.8 nmol/g w.w. の D-乳酸が検出されたのに対し絶食群ウズラ肝臓中 D-乳酸は検出することができず，D-乳酸代謝系の活性化を示唆する結果となった。スレオニン添加餌群においても，D-乳酸が減少していた。また，ピルビン酸に関しても，正常食群に比べ絶食群で g w.w. 当たり約 1/2，whole liver 当たり約 1/3 に減少していた。

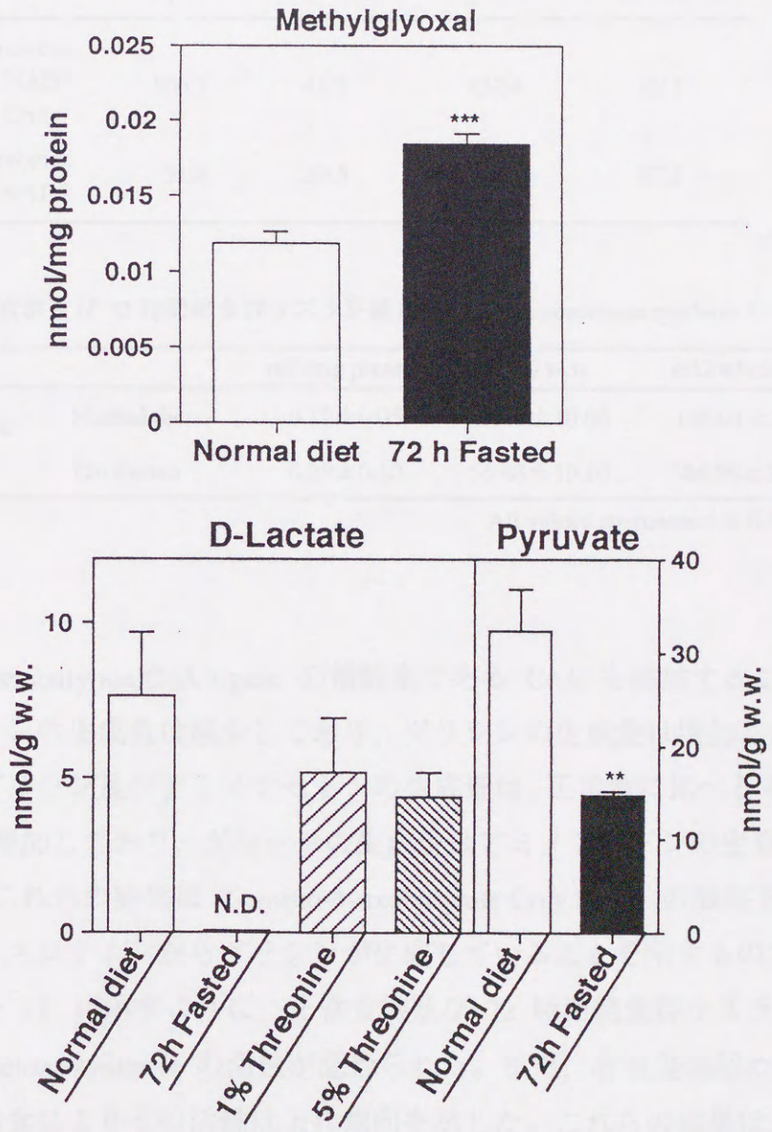


図 8. ウズラ肝臓中グリオキサラーゼ系関連化合物含量

6. ウズラ肝臓におけるスレオニンからのグリシンとアミノアセトンの生成及び aminoacetone synthase の活性

表 10. には，正常食群及び 72 時間絶食群ウズラ肝臓ミトコンドリアにおけるスレオニンからのグリシンとアミノアセトンの生成量を示した。

表 10. 正常食群及び 72 時間絶食群ウズラ肝臓ミトコンドリアにおける
スレオニンからのグリシンとアミノアセトンの生成

	Normal diet nmol/ml		72h Fasted nmol/ml	
	Glycine	Aminoacetone	Glycine	Aminoacetone
Threonine NAD^+ CoA	106.2	41.7	152.4	68.1
Threonine NAD^+	31.8	59.5	127.2	87.2

表 11. 正常食群及び 72 時間絶食群ウズラ肝臓における aminoacetone synthase の活性

		mU/mg protein	mU/g w.w.	mU/whole liver
Aminoacetone synthase	Normal diet	0.17±0.05	33.75±10.06	108.01±36.66
	72h Fasted	0.29±0.10	55.48±19.10	86.96±24.89

All values are means±S.E.M. , n=3

2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase の補酵素である CoA を添加することによりアミノアセトンの生成量は減少しており，グリシンの生成量は増加した。また，絶食によりグリシン及びアミノアセトンの生成量は，正常食に比べともに約 1.5 から 2 倍に増加しており，グリシンの生成量はアミノアセトンの生成量の約 2 倍であった。これらの結果は 2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase の触媒下，CoA を補酵素としてスレオニンからグリシンが生成していることを示すものである。

しかし，表 11. に示すように，正常食群及び 72 時間絶食群ウズラ肝臓において aminoacetone synthase の活性が認められた。また，有意差は認められなかったものの絶食によりその活性は上昇傾向を示した。これらの結果は，スレオ

ニンから TDG 及び 2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase の触媒下，グリシンが生成される一方，グリシンはアセチル CoA と結合しアミノアセトンへと代謝される逆反応も起こっていることを意味するものである。

【考察の部】

現在，様々な生物におけるスレオニン代謝の研究が行われている。ニワトリにおいて TDG が精製されたという報告 [66] やニワトリにおける主要なスレオニン代謝酵素は TDG であり，その他のスレオニン代謝酵素である TDH や TAD の活性は認められなかったとの報告がある [80,81]。これらの報告から，鳥類が特徴的なスレオニン代謝機能を持つと考えられる。また，鳥類は哺乳動物より下等であり，軟体動物より高等である。このように進化の過程で中間的な位置に存在する鳥類におけるスレオニンからの D-乳酸生成経路に私は非常に興味を持ち種々の検討を行った。そこで得られた結果に基づき，まず，ウズラにおけるスレオニン代謝に関して考察する。

スレオニン脱水素酵素

本章の図 2. 及び表 4. に示すように，正常食群に比べ絶食群で TDG の活性上昇が認められた。また，使用した絶食ウズラの肝臓中ピルビン酸含量は，正常食群に比べ減少していた (図 8.，表 9.)。ラットにおいても飢餓，糖尿病時にはピルビン酸含量が減少しており，これは，絶食による糖新生の活性化を示すものと思われる。つまり，ピルビン酸カルボキシラーゼの基質としてピルビン酸が使われたものと考えられる。従って，このような糖新生条件下におけるスレオニン利用に TDG が重要な役割を果たすことが示唆された。

また，1 % スレオニン添加餌群では，正常食群に比べ TDG の活性変化は認められなかった (図 2.，表 4.)。Davis 等の報告では，ニワトリに，通常より含量の高い 1.74 % のスレオニンを含んだ餌を与えた場合，TDG の活性変化は認められなかった [81]。彼らは，餌中のスレオニンとは異なったアミノ酸含量の変化により TDG 活性が変化すると報告した。本研究に用いた 1 % スレオニン添加餌中のスレオニン含量は 1.98 % であったことから考えると，1 % ス

レオニン添加餌群については Davis 等の報告と同様の結果であった。しかし，5 % スレオニン添加餌群 (餌中スレオニン含量は 5.71 %) における TDG の活性は，正常食群に比べ約 2 倍も高いものであった (図 2.，表 4.)。Davis 等はこのようにスレオニン含量が高い場合における TDG の活性を測定していない。このような過剰なスレオニン摂取による TDG の活性化は，TDG が生体内のスレオニン濃度の維持を司るとの Bird 等の報告 [75] により支持される。つまり，過剰なスレオニンを摂取した場合，生体は，それらスレオニンを正常な状態に保とうとする。したがって，本検討によって得られた結果のように，ウズラのスレオニン要求量をはるかに上回るようなスレオニン摂取による TDG の活性上昇は，スレオニン濃度の恒常性の維持に TDG が果たす役割が大きいことを意味するものである。

スレオニンデヒドラターゼ

TDH は，ラットにおいては絶食状態等の糖新生下に活性化する酵素であるとの報告がある [75]。また，ニワトリにおいて，本酵素活性が認められないと報告された [66,80]。本研究で私は，Bird 等が再検討し，より正確になった活性測定法 [75] を用いて TDH 活性の検討を行った。その結果，ウズラにおいて TDH の活性が認められた (図 3.，表 5.)。また，この活性は，絶食群やスレオニン添加餌群において正常食群に比べ有意な変化が認められた。しかし，この TDH 活性は，TDG 活性と比べてみるとかなり微弱なものであった。従って，ウズラ肝臓においては，TDH はスレオニン代謝に何らのか影響を持つものと考えられるが，主要な酵素であるとは言い難い。

スレオニンアルドラーゼ

TAD は，セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼとして知られている酵素であり，また，最近まで，スレオニン代謝の主要酵素であると考えられていた。事実，教科書には現在でもそのように記述してある。しかし，様々な研究者が種々の動物において，この酵素の活性は，全く存在しないか，存在しても大変微弱であると報告している [73-75,82]。これらの報告と同様，ウズラにおいてもその活性は大変微弱なものであり，また，栄養条件の違いによる活性変

化は認められなかった (図 4., 表 6.)。したがって，ウズラにおいては，TAD はスレオニン代謝の主要酵素ではない。

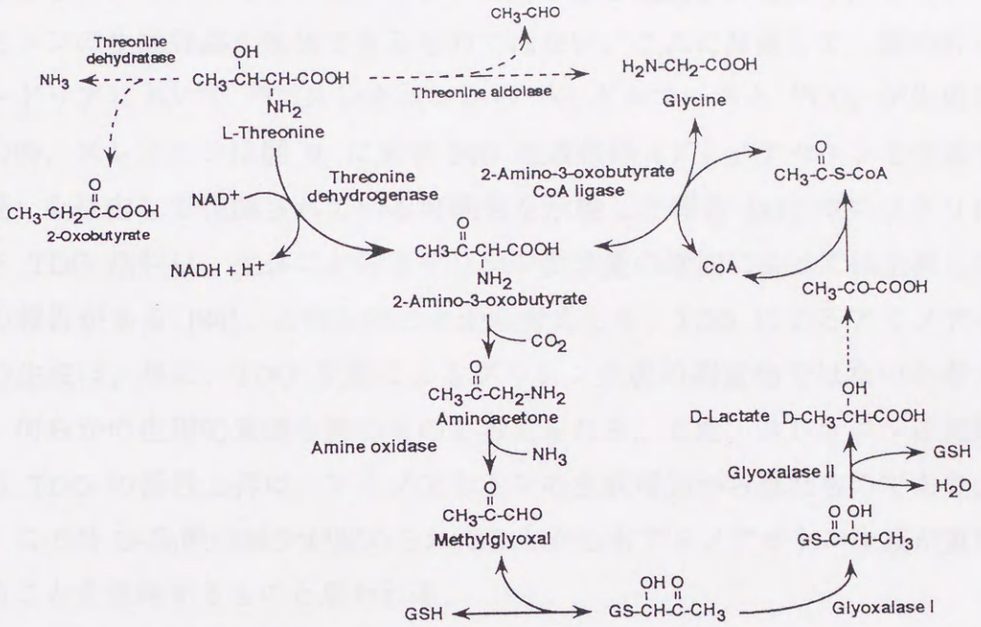


図 9. スレオニンとグリシンからの D-乳酸生成経路

ウズラにおけるスレオニン代謝

ウズラにおける主要なスレオニン代謝酵素は，TDG であることが示された。しかし，本研究における TDG 活性測定では，アミノアセトン生成のみを指標にしたものであり，TDG 反応のもう一つの副産物であるグリシンの検討は行っていない。図 9. に示すように，スレオニンからグリシンまでの代謝は TDG と 2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase の触媒によるものであり，Bird 等 [83], Davis 等 [80] 及び Aoyama 等 [66] によれば，ラット，ニワトリにおいて，スレオニンはミトコンドリアに存在する TDG と 2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase の二つの酵素により，CoA を補酵素としてグリシンとアセチル CoA へと代謝され，この経路がスレオニン異化反応の最も重要なものである。これらの報告にもあるように，表 10. の結果はウズラにおいても，2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase の触媒下，CoA を補酵素としてグリシンが生成したこと

を示すものである。また，スレオニンからのグリシンの生成量はアミノアセトンの約 2 倍であったことからも TDG と 2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase の関与するスレオニンからのグリシンの生成が重要であると示唆される。

しかし，アミノアセトンはグリシンの約半分も生成されており，このアミノアセトンの生成経路も無視できるものではない。これに関連して，猫の肝ミトコンドリアにおいて ^{14}C スレオニンから ^{14}C グルコースと $^{14}CO_2$ が生成し，この時，スレオニンは図 9. に示す MG 生成経路 (アミノアセトンを生成する経路) を経由して代謝されている可能性を示唆した報告 [81] やニワトリにおける TDG 活性は，生体におけるグリシン要求量の増加によっては上昇しないとの報告がある [84]。これらのことから考えても，TDG によるアミノアセトンの生成は，単に，TDG 反応によるグリシン生成の副産物ではないと考えられ，何らかの生理的意義を持つものと考えられる。また，スレオニン添加餌による TDG の活性上昇は，アミノアセトンの生成増加から見たものであり，また，この時 D-乳酸の減少が認められたことからもアミノアセトン生成が重要であることを意味するものと思われる。

さらに，表 11. に示すようにウズラ肝臓中に aminoacetone synthase 活性が認められた。これは，ウズラの生体内においてグリシンからアミノアセトンを経て D-乳酸が生成され得ることを示唆する結果である。

ラットにおけるスレオニン代謝

Bird 等は，ラットにおける主要なスレオニン代謝酵素が TDG 及び TDH であり，正常状態においては，TDG がスレオニン代謝を司り，飢餓や高蛋白食摂取状態においては，TDH がスレオニン代謝を司ると報告した [75]。本研究で得られた結果は，彼らの報告をほぼ満足するものであった。ただ，TDG 活性は予想していたものより低かった。これは，本研究においてアミノアセトンの生成しか検討してないことが原因と思われる。つまり，ラットにおいては，図 9 にも示すように，私が主眼においていた TDG によるスレオニンからのアミノアセトン生成方向ではなく，2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase の関与するグリシン生成方向が，より重い役割を果たしているための結果ではないかと考えられる。

本研究で得られた結果やこれまでの知見から考えると，ラットでは，TDG 及び TDH がスレオニン代謝に深く関わっていることが示唆される。また，この結果は，ラットにはウズラとは異なったスレオニン代謝系が存在することを示すものであった。

D-乳酸生成系

ウズラ肝臓におけるグリオキサラーゼの活性は，5 % スレオニン添加餌群のグリオキサラーゼ II の活性を除いて，絶食，1 % スレオニン及び 5 % スレオニン添加餌群で劇的な変化は認められなかった。しかし，絶食群 (U/mg protein 当たり) ではともに，上昇傾向を示しており (図 6.，7.，表 7.，8.)，TDG の活性変化と連動している傾向がある。

グリオキサラーゼの活性に関しては，以下のように考えることができる。グリオキサラーゼ I の基質である MG はエネルギー代謝に関係するとともに，細胞の増殖や分裂に関与する成長阻害因子であるとの報告がある [85]。MG は，非常に反応性に富むアルデヒドであり蛋白生合成阻害作用を持ち，生体にとっては，あまり好ましくない毒物である。従って，この高反応性の物質を，生体内においては素早く代謝しなければならない。事実，ラット等においてもその活性は大変高い。また，ウズラの肝臓においてもその活性は非常に高いものであった。これらのことから，ウズラ肝臓は，生成されてくる MG を代謝するのに十分なグリオキサラーゼ活性を持っていたため，劇的な活性変化が認められなかったのではないかと考えられる。残念ながら，5 % スレオニン添加餌群におけるグリオキサラーゼ II 活性の低下については，ここでは説明できない (図 7.，表 8.)。しかし，この活性低下は，過剰に摂取されたスレオニンが，D-乳酸生成系に何らかの影響を与えていることを明確に示唆するものである。

また，絶食群やスレオニン添加餌群では，正常食群に比べ D-乳酸含量が減少していた (図 8.，表 9.)。この結果は，D-乳酸消失系が存在する可能性を明示するものであり，また，スレオニン添加餌による D-乳酸含量減少の傾向は，過剰なスレオニンが，D-乳酸の生成系あるいは消失系に影響を与えたことを示唆するものである。そこで，実験結果には述べなかったが，ウズラの肝臓ホモジネート 700 ×g 上清に D-乳酸を添加し，30 分間インキュベーションした

後の D-乳酸含量を測定しその消失を検討してみた。その結果, 5 - 20 nmol の D-乳酸を添加した場合，インキュベーション前に比べ正常食群で約 80 %，絶食群で約 30 % に D-乳酸が減少していた。また，ウズラ肝臓ホモジネートにおけるスレオニンからの D-乳酸の生成も合わせて検討してみたが，用いた条件下で D-乳酸は生成しなかった。これらの結果から，ウズラの肝臓には D-乳酸消失系が存在し，絶食により促進する事が示唆される。また，D-乳酸消失系の存在を支持するものとして次のような報告がある。Brandt 等は，ラット肝臓では，L-乳酸に比べ D-乳酸の方がより速く代謝され，また，この代謝は，乳酸の一位の炭素を ^{14}C ラベルした場合，$^{14}CO_2$ の放出が見られたことから酸化的な代謝であり，この代謝には，2-hydroxy acid dehydrogenase が関与すると報告した [86]。従って，ウズラにおける D-乳酸の消失も酸化的なものと考えられる。しかし，この消失機構について詳細は不明である。この D-乳酸の消失に関しては，今後さらなる検討が必要であろう。

スレオニン代謝と D-乳酸生成系

得られた結果をまとめてみると，

- 72 時間の絶食により，アミノアセトンの生成増加から見た TDG の活性上昇，グリオキサラーゼ系酵素の活性上昇，MG の生成増加また，D-乳酸の含量減少
- 1 % 及び 5 % スレオニン添加餌により，アミノアセトンの生成増加から見た TDG の活性上昇，D-乳酸の含量減少
- aminoacetone synthase の活性がウズラ肝臓において認められ，絶食により上昇傾向を示した。

これらの結果は，図 9. に示すスレオニン，グリシンから D-乳酸生成経路に照らし合わせてみると無理なく説明することが可能である。絶食状態等，生体が糖新生を行いグルコース濃度を維持しなければならないような条件下，体内のあらゆる組織からスレオニンやグリシン等の糖原性物質が利用される。特にグリシンはコラーゲンの約 1/3 を占め，また，コラーゲンは生体の全蛋白質の約 1/4 に当たり，その糖原性物質としての重要性が示唆される。このような条件下，TDG 及び aminoacetone synthase の関与するスレオニン，グリシンから

の D-乳酸生成経路が何らかの生理的意義を持って活性化しているものと考えられる。

また，過剰なスレオニン摂取による生体内のスレオニン濃度の恒常性の維持に TDG の関与するスレオニンからの D-乳酸生成経路は重要な役割を果たすものと思われる。即ち，生体内における栄養バランスの変化に対応して，この経路が活性化するのではないかと私は考えている。

第四章　総括と展望

1930 年代に Embden や Meyerhof の研究をきっかけに解糖系が確立されて以来，糖代謝に深く関与するものと信じられていた MG bypass は半世紀の間忘れ去られてしまっていた。しかし，我々は，この MG bypass が生体内において何らかの重要な生理的意義を持つものと考えて研究を続けてきた。 その過程で MG bypass は哺乳動物においてエネルギー代謝や糖代謝に大いに関係していることを明らかにした。また，MG bypass の最終生成物である D-乳酸に関する研究も行い，その存在意義及び生化学的重要性を解明しようとした。以下にこの目的のために行った研究の結果を示す。

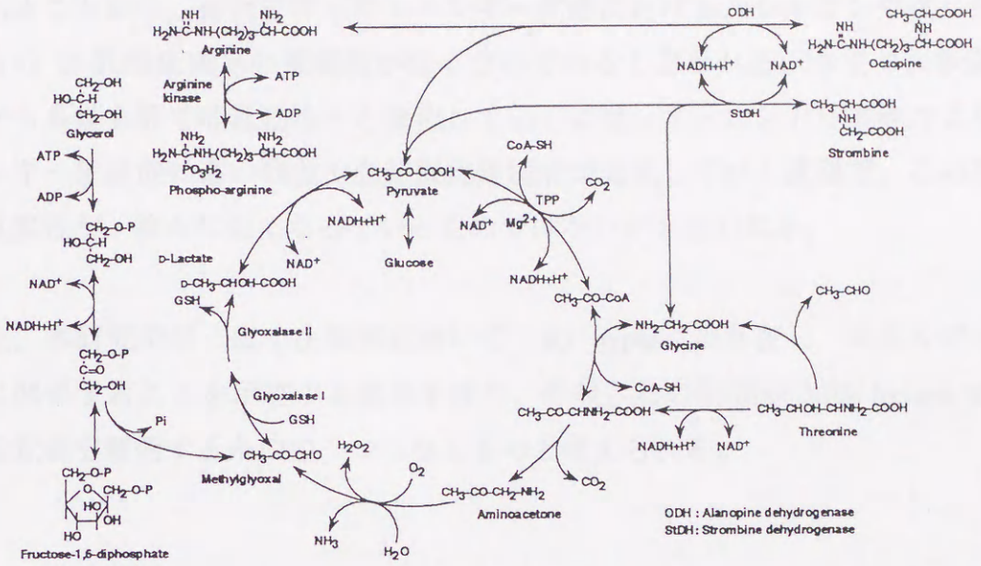
1) マダコにおける D-乳酸生成系の研究

海洋性軟体動物及びある種の植物中に多量な D-乳酸が存在することが明らかになった (特に，マダコでは L-乳酸の約 100 倍，タマネギでは L-乳酸の約 10 倍)。そこで，マダコを用いて D-乳酸生成系について検討したところマダコの足の筋肉における D-乳酸の生成源は，解糖系や脂肪酸代謝の中間体よりも，糖原性アミノ酸である スレオニンやグリシンの方が効率の良いものであった。また，このことが，マダコにおける多量の D-乳酸の存在の一要因であった。次貢にマダコの足におけるスレオニンとグリシンからの D-乳酸生成経路を示す。

2) ウズラにおける D-乳酸生成系の研究

進化の過程において，軟体動物と哺乳動物の中間的位置に存在する鳥類であるウズラを用いてスレオニン代謝と D-乳酸生成系の研究を行った。その結果，ウズラにおいては TDG が重要なスレオニン代謝酵素であることが明らかとなった。また，絶食条件下や過剰なスレオニン摂取条件下においてスレオニンからの D-乳酸生成系が活性化していることが明らかとなった。

Proposed pathway related to metabolism of threonine, glycine and D-lactate in octopus



これらの結果から，私は以下のように推察する。

マダコにおける D-乳酸生成系の研究から，下等な生物においては，スレオニンやグリシンからの D-乳酸生成系が重要であり，これら下等な生物におけるスレオニンやグリシンのエネルギー源としての利用のための重要な代謝経路ではないかと考えられる。通常，スレオニンやグリシンは，ミトコンドリアにおいてグリシン解裂酵素系あるいは，セリンヒドロキシトランスフェラーゼによりピルビン酸として供給され糖新生の基質として利用される。もちろん，この経路を経由してスレオニンやグリシンは代謝しているものと思われるが，この経路を補い，より効率よくこれらの糖原性アミノ酸を利用するため D-乳酸生成経路を持つものと考えられる。また，ウズラにおいて糖新生条件下及び過剰なスレオニン摂取によりスレオニンからの D-乳酸生成系が活性化していることを示す結果を得た。さらに，aminoacetone synthase の活性も認められグリシンからアミノアセトンが生成する経路が存在することが示された。両生類においても D-乳酸生成系に深く関与する TDG がスレオニン代謝に重要であることが指摘された報告もある [63]。これらのことは，広く生物界にスレオニンや

グリシンからの D-乳酸生成系が分布していることを示すものと考えられるが，ラットにおける最も効率の良い D-乳酸の生成源がグルコースやグリセロールであることから，進化に伴ってエネルギー代謝におけるスレオニンやグリシンからの D-乳酸生成系の重要度が低くなっていると思われる。つまり，軟体動物から鳥類を経て哺乳動物へと進化していくに従いミトコンドリア等のよりエネルギー生産能の高い機能や脂肪酸代謝機能が充実していく過程で，この経路の重要性が，徐々に低くなっていったのではないかと思われる。

以上，本研究では，広く生物界において MG bypass が存在し，エネルギー代謝に関係することを示唆する結果を得た。今後，この研究が MG bypass の生理的意義を解明する糸口の一つになるものと考えられる。

第五章　引用文献

[1] Neuberg, C. and Kobel, M. (1928) Die desmolytische bildung von methylglyoxal durch hefenenzym. Biochem. Z. 203 : 463-468.

[2] Neuberg, C. and Kobel, M. (1930) Über den kohlenhydratastoffwechsel der hoheren pflanzen. Die bildung von methylglyoxal durch enzyme der gekeimten samen. Biochem. Z. 229 : 433-442.

[3] Vogt, M. (1929) Bildung und isolierung von methylglyoxal bei der glykolyse durch tierisches enzym. Bochem. Z. 211 : 17-39.

[4] Dakin, H.D. and Dudley, H.W. (1913) On glyoxalase. J. Biol. Chem. 14 : 423-431.

[5] Cooper, R.A. and Anderson, A. (1970) The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 11 : 273-276.

[6] Embden, G., Deuticke, H.J. and Kraft, G. (1933) Über die intermediären vorgange bei der glykolyse in der muskulatur.Klin. Wochenschr. 12, 213-215.

[7] Meyerhof, O. and Lohmann, K. (1934) Über die enzymatische gleichgewichtsreaktion zwischen hexosediphosphorsaure und dioxyacetonphosphorsaure. Biochem. Z. 271 : 89-110.

[8] Ohmori, S. and Iwamoto, T. (1988) Sensitive determination of D-lactic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 431 : 239-247.

[9] Ohmori, S., Nose, Y., Ogawa, H., Tsuyama, K. and Hirota, T. (1991) Fluorimetric and high-performance liquid chromatographic determination of D-lactate in biological samples. J. Chromatogr. 566 : 1-8.

[10] Ohmori, S., Mori, M., Kawase, M. and Tsuboi, S. (1987) Determination of methylglyoxal as 2-methylquinoxaline by high-performance liquid chromatography and its application to biological samples. J. Chromatogr. 414 : 149-155.

[11] Ohmori, S., Kawase, M., Mori, M. and Hirota, T. (1987) Simple and sensitive determination of methylglyoxal in biological samples by gas chromatography

with electron-capture detection. J. Chromatogr. 415 : 221-229.

[12] Ohmori, S., Mori, M., Shiraha, K. and Kawase, M. (1989) Biosynthesis and degradation of methylglyoxal in animals. Enzymology and Molecular Biology of Calbonyl Metabolism. (Weiner, H. and Flynn, T.G., ed.) vol. 2, pp. 397-412, Alan R Liss, New York.

[13] Kondoh, Y., Kawase, M. and Ohmori, S. (1992) D-Lactate concentrations in blood, urine and sweat before and after exercise. Eur. J. Appl. Physiol. 65 : 88-93.

[14] Kondoh, Y., Kawase, M., Kawakami, Y. and Ohmori, S. (1992) Concentrations of D-lactate and its related metabolic intermediates in liver, blood, and muscle of diabetic and starved rats. Res. Exp. Med. 192 : 407-414.

[15] Kondoh, Y., Kawase, M., Hirata, M. and Ohmori, S. (1994) Carbon sources for D-lactate formation in rat liver. J. Biochem. 115 : 590-595.

[16] Ohmori, S., Ohsaki, Y., Akagi, S., Kondoh, C., Kawase, M. and Nagai, T. (1997) D-Lactate is present in much larger amount than L-lactate in cephalopods and gastropods. Zoological Science 14 : 429-434.

[17] Kellum, M.W., Oray, B. and Norton, S.J. (1978) A convenient quantitative synthesis of methylglyoxal for glyoxalase I assays. Anal. Biochem. 85 : 586-590.

[18] Ohmori, S., Ikeda, M., Watanabe, Y. and Hirota, K. (1978) A simple and specific determination of glycine in biological samples. Anal. Biochem. 90 : 662-670.

[19] 岡　一恵 (1997) ECD-GC によるスレオニンの定量法の開発. 岡山大学薬学部生理化学教室卒業論文.

[20] Kemp, R.G. (1975) Phosphofructokinase. Method. Enzymol. (Kaplan, N.O. and Colowick, S.P., ed.) vol. 42, pp. 71-77, Academic Press, New York

[21] Valentine, W.N. and Tanaka, K.R. (1966) Pyruvate kinase : clinical aspects. Method. Enzymol. (Kaplan, N.O. and Colowick, S.P., ed.) vol. 9, pp. 468-473, Academic Press, New York

[22] Gracy, R.W., Lacko, A.G., Brox, L.W., Adelman, R.C. and Horecker, B.L.

(1970) Structural relationships in aldolases purified from rat liver and muscle and novikoff hepatoma. Arch. Biochem. Biophys. 136 : 480-490

[23] Racker, E. (1955) Glyoxalases. Methods. Enzymol. (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., ed.) Vol. 1, pp. 454-460, Academic Press, New York

[24] Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. and Grassl, M. (1974) Glycerokinase. Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol. 1, pp. 468-469, Academic Press, New York

[25] Ray, M. and Ray, S. (1985) L-Threonine dehydrogenase from goat liver. J. Biol. Chem. 260 : 5913-5918.

[26] Ray, M. and Ray, S. (1987) Aminoacetone oxidase from goat liver. J. Biol. Chem. 262 : 5974-5977.

[27] Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T, Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfleiderer, G. (1953) Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforschg. 8b : 555-577.

[28] 河田　秀一郎 (1997) マダコ (*Octopus vulgaris*) における D- 及び L- 乳酸脱水素酵素の生成とその諸性質について. 岡山大学大学院薬学研究科修士論文.

[29] Scheid, M.J. and Awapara, J. (1972) Stereospecificity of some invertebrate lactic dehydrogenases. Comp. Biochem. Physiol. 43B : 619-626.

[30] Long, G.L. (1976) The stereospecific distribution and evolutionary significance of invertebrate lactate dehydrogenases. Comp. Biochem. Physiol. 55B : 77-83.

[31] Long, G.L., Ellington, W.R. and Duda, T.F. (1979) Comparative enzymology and physiological role of D-lactate dehydrogenase from the foot muscle of two gastropod molluscs. J. Exp. Zool. 207 : 237-248.

[32] Hammen, C.S. (1969) Substrate specificity of lactate dehydrogenase in some marine invertebrates. Am. Soc. Zool. 9 : 1105.

[33] Baccetti, B., Pallini, V. and Burrini, A.G. (1975) Localization and catalytic properties of lactate dehydrogenase in different sperm models. Exp. Cell Res.

90 : 183-190.

[34] Martin, A.W., Jones, R. and Mann, T. (1976) D-Lactic acid formation and D-lactate dehydrogenase in octopus spermatozoa. Proc. R. Soc. London. B. 193 : 235-243.

[35] Gade, G. (1979) L-Lactate specific, dimeric lactate dehydrogenase from the mantle muscle of the squid, *Loligo vulgaris* : Purification and catalytic properties. Comp. Biochem. Physiol. 63B : 387-393.

[36] Mulcahy, P., Cullina, A. and O'Carra, P. (1997) Both D- and L-specific lactate dehydrogenases co-exist in individual cephalopods. Comp. Biochem. Physiol. : 143-148.

[37] 佐藤　実 (1990) 軟体動物の嫌気的解糖とオピン類. 化学と生物. 28 : 82-90.

[38] Storey, K.B. and Storey, J.M. (1983) The mollusca. (Wilbur, K.R., ed.) vol 1 : pp. 110-111, Academic Press, New York

[39] Hochachka, P.W., Moon, T.W., Mustafa, T. and Storey, K.B. (1975) Metabolic sources of power for mantle muscle of a fast swimming squid. Comp. Biochem. Physiol. 52B : 151-158.

[40] Grieshaber, M. and Gade, G. (1976) The biological role of octopine in the squid, *Loligo vulgaris* (Lamarck). J. Comp. Physiol. 108 : 225-232.

[41] Grieshaber, M. and Gade, G. (1976) Die biologische bedeutung des octopins bei mollusken : The biological role of octopine in molluscs. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 69 : 222

[42] Storey, K.B. and Storey, J.M. (1978) Energy metabolism in the mantle muscle of the squid, *Loligo pealeii*. J. Comp.Physiol. 123 : 169-175.

[43] Storey, K.B. and Storey, J.M. (1979) Octopine metabolism in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. : Octopine production by muscle and its role as an aerobic substrate for non-muscular tissues. J. Comp. Physiol. 131 : 311-319.

[44] Baldwin, J. and England, W.R. (1980) A comparison of anaerobic energy metabolism in mantle and tentacle muscle of the blue-ringed octopus, *Hapalochlaena maculosa*, during swimming. Aust. J. Zool. 28 : 407-412.

[45] Casazza, J.P., Felver, M.E. and Veech, R.L. (1984) The metabolism of acetone in rat. J. Biol. Chem. 259 : 231-236.

[46] Landau, B.R. and Brunengraber, H. (1987) The role of acetone in the conversion of fat to carbohydrate. Trends. Biochem. Sci. 12 : 113-114.

[47] Kalapos, M.P., Garzo, T., Antoni, F. and Mandl, J. (1991) Effect of methyglyoxal on glucose formation, drug oxidation and glutathione content in isolated murine hepatocytes. Biochim. Biophys. Acta. 1092 : 284-290.

[48] Milligan, L.P. and Baldwin, R.L. (1967) The conversion of acetoacetate to pyruvaldehyde. J. Biol. Chem. 242 : 1095-1101.

[49] Ray, S. and Ray, M. (1983) Formation of methylglyoxal from aminoactone by amine oxidase from goat plasma. J. Biol. Chem. 258 : 3461-3462.

[50] 藤澤　智美 (1998) 軟体動物における D-乳酸及び関連物質の代謝について. 岡山大学大学院薬学研究科修士論文.

[51] O'Dor, R.K., Durward, R.D. and Wells, M.J. (1978) The protein-energy economy in cephalopods. Proc. Can. Soc. Zool. p. 48.

[52] Johansen, K., Redmond, J. R. and Bourne, G. B. (1978) Respiratory exchange and transport of oxygen in *Nautilus pompilius*. J. Exp. Zool. 205 : 27-36.

[53] Hochachka, P. W., French, C. J. and Meredith, J. (1978) Metabolic and ultrastructural organization in *Nautilus* muscles. J. Exp. Zool. 205 : 51-62.

[54] Fields, J.H.A., Guderley, H.E., Storey, K.B. and Hochachka, P.W. (1976) Octopus mantle citrate cynthase. Can. J. Zool. 54 : 886-891.

[55] Storey, K.B. and Storey, J.M. (1983) Carbohydrate metabolism in cephalopod molluscs. The mollusca. (Wilbur, K.R., ed.) Vol. 1, pp. 95-96. Academic Press, New York

[56] Freedland, R.A. and Avery, E.H. (1964) Studies on threonine and serine dehydrase. J. Biol. Chem. 239 : 3357-3360.

[57] Meltzer, H.L. and Sprinson, D.B. (1952) The synthesis of 4-C^{14}, N^{15}-L-threonine and a study of its metabolism. J. Biol. Chem. 197 : 461-474.

[58] Lin, S.C.C. and Greenberg, D.M. (1955) Enzymatic breakdown of threonine by threonine aldolase. J. Gen. Physiol. 38 : 181-196.

[59] Malkin, L.I. and Greenberg, D.M. (1964) Purification and properties of threonine or allothreonine aldolase from rat liver. Biochim. Biophys. Acta. 85 : 117-131.

[60] Karasek, M.A. and Greenberg, D.M. (1957) Studies on the properties of threonine aldolases. J. Biol. Chem. 227 : 191-205.

[61] Riario-Sforza, G., Pagani, R. and Marinello, E. (1969) Threonine aldolase and allothreonine aldolase in rat liver. Eur. J. Biochem. 8 : 88-92.

[62] Urata, G. and Granick, S. (1963) Biosynthesis of α-aminoketones and the metabolism of aminoacetone. J. Biol. Chem. 238 : 811-820.

[63] Hartshorne, D. and Greenberg, D.M. (1964) Studies on liver threonine dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 105 : 173-178.

[64] Green, M.L. and Elliott, W.H. (1964) The enzymic formation of aminoacetone from threonine and its further metabolism. Biochem. J. 92 : 537-549.

[65] Boylan, S.A. and Dekker, E.E. (1978) L-Threonine dehydrogenase of Escherichia coli K-12. Biochem. Biophys. Res. Comm. 85 : 190-197.

[66] Aoyama, Y. and Motokawa, Y. (1981) L-Threonine dehydrogenase of chicken liver. J. Biol. Chem. 256 : 12367-12373.

[67] Laver, W.G., Neuberger, A. and Scott, J.J. (1959) α-Amino-β-keto-acids. Part II. Rates of decarboxylation of the free acids and the behaviour of derivatives on titration. J. Chem. Soc. 1483-1491.

[68] McGilvray, D. and Morris, J.G. (1969) Utilization of L-threonine by a species of *Arthrobacter*. Biochem. J. 112 : 657-671.

[69] Linstead, D.J., Klein, R.A. and Cross, G.A.M. (1977) Threonine catabolism in *Trypanosoma brucei*. J. Gen. Microbiol. 101 : 243-251.

[70] Dale, R.A. (1978) Catabolism of threonine in mammals by coupling of L-threonine 3-dehydrogenase with 2-amino-3-oxobutyrate-CoA ligase. Biochim. Biophys. Acta. 544 : 496-503.

[71] Bird, M.I. and Nunn, P.B. (1979) Glycine formation from L-threonine in intact isolated rat liver mitochondria. Biochem. Soc. Trans. 7 : 1276-1277.

[72] Ray, S., Sarkar, D. and Ray, M. (1991) Aminoacetone synthase from goat liver.

Biochem. J. 275 : 575-579.

[73] Bird, M.I. and Nunn, P.B. (1979) Measurement of L-threonine aldolase activity in rat liver. Biochem. Soc. Trans. 7 : 1274-1276.

[74] Bird, M.I., Lord, L.A.J. and Nunn, P.B. (1982) Catabolism of L-threonine in rat and human liver : Importance of threonine dehydrogenase. Biochem. Soc. Trans. 10 : 130.

[75] Bird, M.I. and Nunn, P.B. (1983) Metabolic homoeostasis of L-threonine in the normally-fed rat. Biochem. J. 214 : 687-694.

[76] Vohra, P. (1971) A review of the nutrition of Japanese quail. Worlds. Poult. Sci. J. 27 : 26-34.

[77] Morris, J.M. and Peraino, C. (1976) Immunochemical studies of serine dehydratase and ornithine aminotransferase regulation in rat liver *in vivo*. J. Biol. Chem. 251 : 2571-2578.

[78] Palekar, A.G., Tate, S.S. and Meister, A. (1973) Rat liver aminomalonate decarboxylase. J. Biol. Chem. 248 : 1158-1167.

[79] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

[80] Davis, A.J. and Austic, R.E. (1994) Dietary threonine imbalance alters threonine dehydrogenase activity in isolated hepatic mitochondria of chicks and rats. J. Nutr. 124 : 1667-1677.

[81] Davis, A.J. and Austic, R.E. (1997) Dietary protein and amino acid levels alter threonine dehydrogenase activity in hepatic mitochondria of *Gallus domesticus*. J. Nutr. 127 : 738-744.

[82] Yeung, Y.G. (1986) L-Threonine aldolase is not a genuine enzyme in rat liver. Biochem. J. 237 : 187-190.

[83] Bird, M.I., Nunn, P.B. and Lord, L.A.J. (1984) Formation of glycine and aminoacetone from L-threonine by rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 802 : 229-236.

[84] Hammer, V.A, Rogers, Q.R. and Freedland, R.A. (1996) Threonine is catabolized by L-threonine 3-dehydrogenase and threonine dehydratase in

hepatocytes from domestic cats (*Felis domestica*). J. Nutr. 126 : 2218-2226.

[85] 木村　光 (1993) 第一回国際グリオキサラーゼシンポジウム見聞記. 化学と生物. 31, 399-402

[86] Brandt, R.B., Waters, M.G., Rispler, M.J. and Kline, E.S. (1984) D- and L-Lactate catabolism to CO_2 in rat tissues. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 175 : 328-335.

【謝辞】

終わりに臨み，本研究に際して終始御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました
大森　晋爾　岡山大学薬学部名誉教授　に深甚なる謝意を表します。

本論文を作製するにあたり，御懇篤なる御指導を賜りました
岡山大学薬学部　森山　芳則教授　に深甚なる謝意を表します。

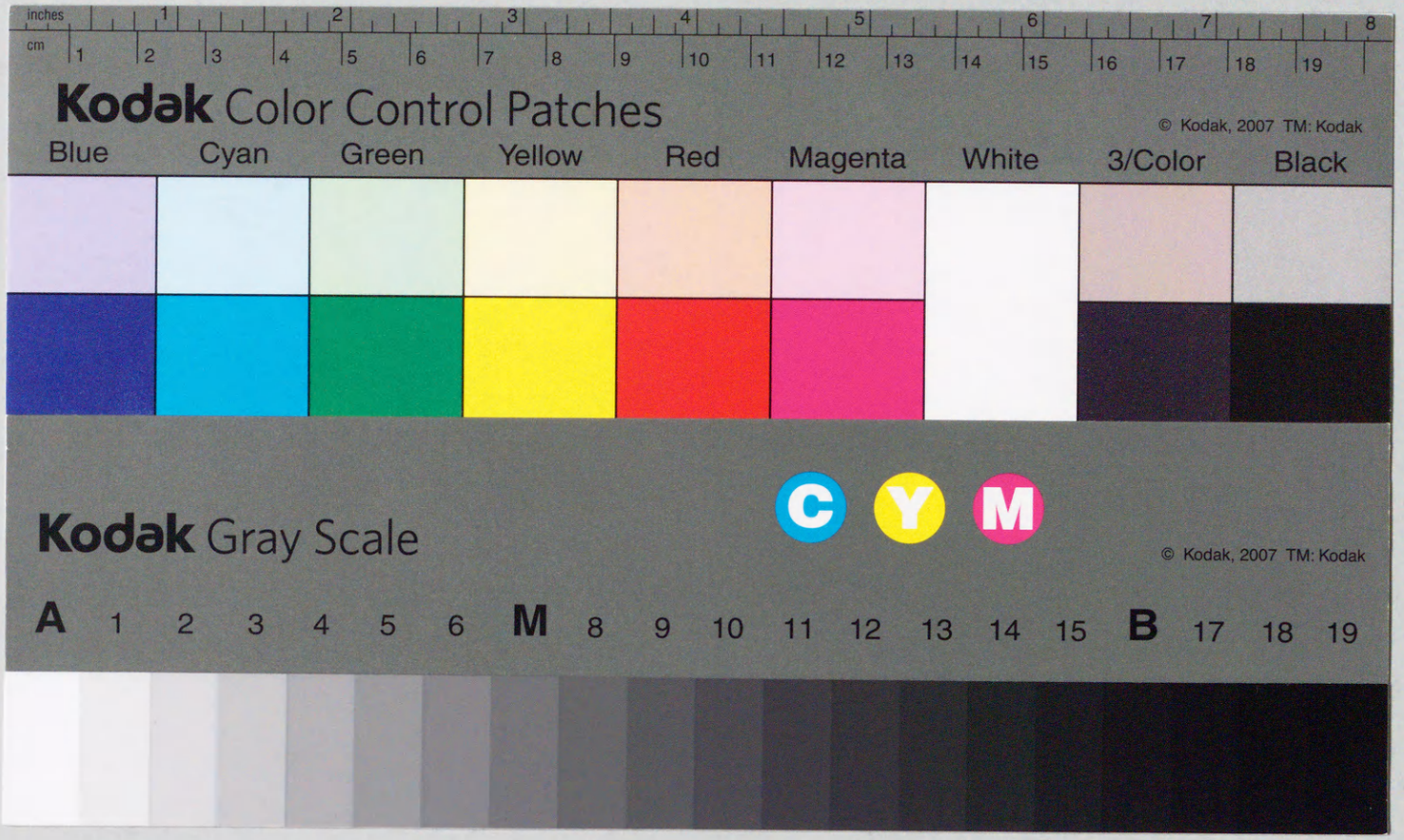
終始御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました
岡山大学薬学部　篠田　純男教授　に深甚なる謝意を表します。

また，本研究の遂行にあたり，終始御指導，御助言を頂きました
岡山大学薬学部　坪井　誠二助教授　に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり，研究材料を快く御提供して頂き，また，終始御指導，御助言を頂きました岡山大学農学部　佐藤　勝紀教授に深く感謝致します。

また，終始御協力頂きました岡山大学薬学部　河瀬美知技官，さらに，実験の一部に御協力頂きました河田秀一郎修士，藤澤智美修士，近藤知恵学士，長井利江学士，三好雅子学士，岡一恵学士，本江誠学士の諸氏に深く感謝致します。

最後になりましたが，岡山大学薬学部生理化学教室員一同の御協力に深く感謝致します。


inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19