

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | ヒト赤血球アルデヒド脱水素酵素に関する研究  |
| Author(s)    | 井上, 和美   |
| Citation     | 大阪大学, 1982, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/33460">https://hdl.handle.net/11094/33460</a>  |
| rights       |  |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【7】

|         |   |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 井 上 和 美   |
| 学位の種類   | 薬 学 博 士   |
| 学位記番号   | 第 5 8 4 3 号   |
| 学位授与の日付 | 昭 和 57 年 12 月 4 日   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当  |
| 学位論文題目  | ヒト赤血球アルデヒド脱水素酵素に関する研究   |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教 授 岩田平太郎<br><br>(副査)<br>教 授 近藤 雅臣 教 授 青沼 繁 教 授 三浦 喜温 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒 言

生体内に摂取されたエタノール(EtOH)はアセトアルデヒド(AcH)に代謝され、さらに酢酸にまで至る経路で酸化される。EtOH→AcH, AcH→酢酸両者の酸化反応は、NADを補酵素とするアルコール脱水素酵素(ADH), アルデヒド脱水素酵素(ALDH)により各々触媒され、これら2つの酵素に関する研究はアルコール代謝活性の最も高い肝臓について行われており、特にADHに関しては以前から多くの報告がある。

一方、摘出臓器や組織標品等を使った *in vitro* の実験結果から AcH は EtOH より毒性、薬理作用が強いと考えられ、<sup>1)</sup> *in vivo* の知見としては嫌酒薬を投与されたアルコール症患者が飲酒時に感ずる不快感、脈拍数上昇や嘔吐感は EtOH ではなく、AcH の作用であることが知られている。<sup>2)</sup> AcH は EtOH と同様、生体内に非特異的に分布し、様々な作用を及ぼすため主たる AcH 代謝器官である肝臓以外における動態を知ることは重要と思われるが、未だその報告は少ない。

そこでヒト組織のうち、体中に占める割合が大きく、さらに新鮮な試料を得易い血液に着目したが、従来血液中には EtOH, AcH を酸化する機構はないものと報告されていた<sup>3,4)</sup> しかし、血中の AcH 濃度を測定する際除蛋白操作することよりも、高い回収率が得られるとの報告<sup>5)</sup> があり、血液中に何らかの AcH 代謝活性の存在が期待され、その可能性についての検討に着手した。

### 本 論

#### 第1章 ヒト血液のアセトアルデヒド代謝能

全血試料を EtOH 又は AcH とインキュベートすると、AcH のみの減少が認められ、血液を血漿と赤

血球に分離し、AcH代謝能の分布を次にみると赤血球にのみ活性が存在した。無傷赤血球にみられたAcH代謝能は溶血、透析処理により活性を失うが、NAD添加により回復し、溶血試料を膜及び可溶性画分に分離し、各々の活性をみると、可溶性画分中のみ活性が認められた。赤血球可溶性画分中のNAD依存性活性はSH阻害剤により阻害され、特にALDHの特異的阻害剤であるdisulfiramによる顕著な効果がみられ、ヒト赤血球中にALDHの存在することが強く示唆された。

## 第2章 赤血球アルデヒド脱水素酵素の精製と基礎的性質

### 1. 精製

赤血球中に存在すると考えられるALDHの性質を知る目的で精製を試みた。イオン交換クロマトグラフ、硫酸分画、アフィニティクロマトグラフ、さらにゲルろ過クロマトグラフの段階を通じ、ポリアクリルアミドディスク電気泳動像で単一な蛋白にまで精製された。ゲルろ過クロマトグラフ、SDS-ディスク電気泳動の結果からALDHが4つの同一サブユニットからなる分子量約20万の蛋白であることが示されヒト、<sup>6)</sup>ウマ<sup>7)</sup>肝臓から精製されたALDHと分子性状の面での差異は認められなかった。

### 2. 基質特異性

赤血球ALDHはaliphatic aldehydeからaromatic aldehydeまでの広範囲にわたるアルデヒドの酸化能を持ち、補酵素に関してはNADに対し親和性が高く、NADPに対する $K_m$ 値は非常に高い値であった。aliphatic aldehydeであるAcHとpropionaldehyde 2つの基質濃度範囲を広くとり、double-reciprocal plotをとると直線を示さず、propionaldehydeに対しては2相性の、AcHでは多相性の反応性がみられた。AcHの濃度域を0~70 $\mu$ M、0.8~20mMの2つにとると、 $K_m$ 値は17及び830 $\mu$ Mと計算され、赤血球ALDHが低濃度のAcHをも酸化しうると考えられた。

反応の多相性は上記2種以外の他のアルデヒド、補酵素に対しては認められず、使用した酵素標品が均一なものであること、またヒト肝ALDH isozymeの一つであるcytosolic ALDH(c-ALDH)も同様の性質を持つこと<sup>6)</sup>からこの種酵素に特有な性質と思われる。

### 3. ALDH活性に対する2価カチオンの影響

赤血球ALDHは2価カチオンにより阻害を受け、すでに報告されている肝臓ミトコンドリアALDHの2価カチオンによる活性化<sup>7)</sup>とは全く異った性質を示した。使用した2価カチオン中、ALDHは $Zn^{2+}$ により最も強く阻害され、他のカチオン( $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ )とは異なり還元型グルタチオン(GSH)による阻害の拮抗がみられることから、 $Zn^{2+}$ 阻害にALDH分子のSH基との相互作用が関与すると考えられる。

## 第3章 赤血球アルデヒド脱水素酵素の阻害機構

### 1. 抱水クロラール、disulfiram阻害の阻害様式

抱水クロラールはアルデヒドに対し拮抗的にALDH活性を阻害し、 $K_i$ 値は170 $\mu$ Mと計算された。一方disulfiramはより低濃度で顕著な阻害効果を示し、阻害様式はNADに対するnon-competitive typeであった。

disulfiramの濃度上昇に伴うALDH活性の減少をみると、50%阻害に達するdisulfiram量は酵素1分子当たり1.1~1.2分子で以後次第に感受性の低下がみられた。disulfiramはdiethyldithiocarbamate

(DDC) 2分子がdisulfide結合したものであり, SH基との強い反応性を持つ<sup>8)</sup>が, ALDH阻害作用が急速に完了し, かつ阻害された酵素が透析処理, 高濃度GSHの添加によっても活性の回復がみられないことから, disulfiram阻害がDDC分子とALDH分子の活性SH基との間に非可逆性の強いmixed disulfideを形成し生起すると示唆される。

さらに各種濃度のGSH存在下, 阻害効果を検討すると, disulfiramの10倍量のGSHがALDHと共存しても活性は50%阻害され, ALDHの活性基上のSH基がGSHに比して高い反応性をdisulfiramに対し有すると考えられた。

## 2. in vitroにおけるDDCの阻害作用

disulfiramの還元生成体であるDDCは単独ではin vitroで阻害効果を示さない。しかし低濃度のhorseradish peroxidase, catalase等のヘム蛋白共存下, ALDHとDDCとのインキュベーションを行うと顕著にALDHは阻害された。ヘム蛋白とDDCとのインキュベーション後ALDHを添加すると先の条件に比して得られる阻害度が非常に低くなることから, ヘム蛋白が2DDC→disulfiramの酸化過程を触媒し, 生成されたdisulfiramが選択的にALDHの活性SH基と反応し, 不活性化酵素が蓄積すると考えられる。in vivoにおいてはDDCはdisulfiramと同程度のALDH阻害効果があり, 両者共に投与20~40hrに最大効果を発揮すること<sup>9)</sup>が, 先の非活性化酵素の蓄積によって説明されるかもしれない。

## 第4章 赤血球アルデヒド脱水素酵素活性と飲酒後の生理反応との関係

AcHに起因する生理反応として顔面紅潮, 脈拍数上昇等があげられる<sup>2)</sup>が, ALDH活性の変動は飲酒後に出現するAcH量, ひいては上記の生理反応に影響を与えうる。<sup>10)</sup>赤血球ALDH活性と飲酒後の脈拍数上昇率との関係を検討すると, 有意な負の相関関係( $r = -0.73$ )が得られ特に顔面紅潮者群の間で際立っていた。

最近日本人を含む東洋人の約半数がミトコンドリアに局在するALDH isozyme(m-ALDH)を持たず飲酒時の顔面紅潮等の反応の原因となることが報告された。<sup>9)</sup>m-ALDHはc-ALDHと共に肝臓中に見出される2つのmajor isozymeの1つであり, AcHに対する高い親和性から生体内AcHは主にm-ALDHにより酸化されると考えられている。<sup>1)</sup>

顔面紅潮者群間で特にALDH活性と反応度との関係が見出されたことは, m-ALDH欠損者の場合AcHに対する生理反応度が赤血球ALDH活性に何らかの形で調整される可能性を示唆する興味深い知見と考える。

## 結 論

1. ヒト赤血球中に新たにAcH代謝活性が見出され, この活性が可溶性画分中に存在するNAD依存性のアルデヒド脱水素酵素であることが示された。
2. 赤血球ALDHを精製し, その性質を検討したところ, 肝cytosol中に存在するALDHと同一の基質特異性を示し, さらに2価カチオンにより阻害を受け, disulfiram等のSH基に作用する薬物に対し, 高い感受性のあることが明らかとなった。
3. disulfiramのALDH阻害は酵素蛋白活性基上のSHとの非可逆的反応により生起し, 生体内での

disulfiram阻害機作の一つの可能性として、disulfiramの還元生成物であるDDCがヘム蛋白の存在下ALDHを阻害することが示された。

4. 赤血球ALDH活性値と、飲酒後AcHを介して起こる生理反応の反応度との関係を検討したところ両者間に有意な負の相関関係が得られ、これは赤血球ALDH活性が生体内AcH代謝に関与する可能性を示唆する興味深い知見と思われる。

#### 引用文献

- 1) K. O. Lindros, Research Advances in Alcohol and Drug Problems, vol 4, pp111-176, Plenum Press(1978)
- 2) E. B. Truitt and M. J. Walsh, The Biology of alcoholism, vol 1 pp161-195, Plenum Press(1971)
- 3) R. A. Deitrich, Biochem. Pharmacol. **15** 1911-1922(1966)
- 4) K. W. Smalldon, Nature **245** 266-267 (1973)
- 5) C. J. P. Eriksson, H. W. Sippel and O. A. Forsander, Anal. Biochem. **80** 116-124 (1977)
- 6) N. J. Greenfield and R. Pietruszko, Biochim. Biophys. Acta **483** 35-45 (1977)
- 7) K. Takahashi and H. Weiner, J. Biol. Chem. **255** 8206-3209 (1980)
- 8) T. M. Kitson, J. Stud. Alcohol **38** 96-113 (1977)
- 9) H. W. Goedde, S. Harada and D. P. Agarwal, Human Genet. **51** 331-334 (1979)

#### 論文の審査結果の要旨

本論文は、ヒト赤血球可溶性画分中にアセトアルデヒド脱水素酵素が存在することを発見し、当酵素の各性質について明らかにし、飲酒後にアセトアルデヒドを介して起こる生理反応度との関係を検討したもので、薬学博士の称号を与えるに値するものであると考える。