

アルコール脱水素酵素(ADH) 活性に及ぼす阻害剤及び アミノ酸, ペプチドの影響

林 あつみ, 木元 幸一

(平成9年10月2日受理)

Effects of Inhibitors, Amimo Acids and Peptide on Alcohol Dehydrogenase (ADH) Activity

Atsumi HAYASHI and Koichi KIMOTO

(Received on October 2, 1997)

諸 言

酒は古来より人類の貴重な文化として生まれ、地球の様々な民族が、その地方の主農産物を原料としてアルコールの製法を独自に開発してきた。

そして戦後、高度経済成長による酒類生産量の増加と個人の購買力の増大により、過去30年間にアルコールの消費量も倍増した¹⁾。飲酒人口の増加に伴い、大量飲酒者もまた倍増している²⁾。このことは、社会環境の急激な変化によるストレスの増加など、病的飲酒を促進させるような社会的要因が増加したことを示唆する。その結果、急性アルコール中毒やアルコール依存症そして、脂肪肝、アルコール性肝炎のような肝臓の疾病、事故、犯罪の増加が深刻な社会問題となっている。

また近年、女性の社会進出等による女性の飲酒の機会が増えてきた。女性は男性に比べ酒の害を受けやすく、少ない飲酒量及び短飲酒期間で依存症及び肝硬変を発症する³⁾。その理由として、女性は男性より体が小さく、同じ体重でも脂肪量が多いためにアルコールの分布する体液量が少ないこと、加えて、女性ホルモン(エストラジオール)がアルコール代謝を抑制するため、血中アルコール濃度が高くなりやすいと考えられている¹⁾。さらに、妊娠中の飲酒は胎児の発育不全、特に脳の発育不全につながるなど大きな社会問題となっている。

エタノールは、熱量7.1 kcal/gの飲食物であり、経口的に取り込まれた後、胃および小腸から吸収され、門脈を通過して肝臓に運ばれる。ここで一部はアルコール脱

水素酵素(ADH)により代謝分解を受けるが、大部分は未分解のまま血液循環によって全身に分布される。その後、エタノールは肝臓を通過するごとに代謝されながら、次第に体内から除去される。

肝臓において、エタノールは肝ADHによりアセトアルデヒドに酸化された後、アルデヒド脱水素酵素(ALDH)により酢酸に酸化される。酢酸は、さらにアセチルCoAとなってTCAサイクルで通常の栄養代謝を受け、最終的には、炭酸ガスと水になり、体外へ排泄される。

そこで今回、エタノールの代謝系のうち、第一段階で作用する酵素であるADHについて、その酵素的性質の挙動を検討した。

実験方法

1. 実験動物及び試薬

スナネズミは日本医科大学実験動物管理室で飼育繁殖した10週齢雄、雌を用いた。マウスはddY系7週齢雄、雌、ラットはSprague-Dawley(SD)系7週齢雄、雌、そしてモルモットはHartley系7週齢雌を埼玉実験動物供給所より購入して用いた。飼料(オリエンタル酵母社製標準固型飼料)および飲料水(水道水)は実験に供するまで自由に摂取させ、エーテル麻酔下、心臓採血後、肝臓と胃を摘出し、酵素試料とした。 β -nicotinamide adenine dinucleotide(β -NAD)、4-methylpyrazole(4-MP)はシグマ社より、エタノールは残留農薬試験用特級、N-ethylmaleimide(NEM)、コーンペプチドは和光純薬工業(株)より、trans-2-hexen-1-ol(ヘキセノール)、hexanoamide(カプロン酸アミド)はアルドリッチ社より購入した。

2. 粗酵素液の調製

肝臓及び胃を、その重量の5倍量の5mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5, 0.5mM NADおよび0.25Mショ糖を含む)中でヒスコトロン(株式会社日立計測器製作所)を用いてホモジナイズし、100,000 × gで60分の遠心分離により得た上清を酵素試料とした。これらの抽出操作は、水中または4℃下で行った。

3. ADH活性測定法

酵素反応は、1mM NADを含む0.1Mグリシンナトリウム緩衝液(pH 10.7), あるいは0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)に、阻害剤あるいは各種アミノ酸またはコーンペプチドを加えた後、酵素液を加え、基質として各濃度のエタノールまたはヘキセノールを添加し、37℃におけるNADHの産生速度を日立分光光度計(100-10型)を用いて340nmで測定した。酵素の活性単位は、1μmol NADH/minを1 unitとした。

4. タンパク量測定法

タンパク量は、Bio-Rad protein assay 法⁴⁾により、牛血清アルブミン(BSA)を標準として、595nm で測定した。

結果および考察

1. 阻害剤の影響

1) 4-methylpyrazole(4-MP)およびhexanoamide(カプロン酸アミド)による阻害

従来、哺乳類ADHには種々のアインザイムが報告されており、現在ではその組織分布、等電点やピラゾール

による阻害度およびエタノールに対するKm値等の違いにより、4つのクラス(I, II, III, IV)に分類されている。クラスI ADHはアルカリ側に等電点(9.0以上)を有し、エタノールに対して低いKm値をもち、ピラゾールに阻害されやすい。アルコール代謝の鍵酵素であり、主に肝に局在している。一方、クラスIII ADHは、酸性側に等電点(5.3~6.4)を有し、エタノールに対して極めて高いKm値を有し、ピラゾールに阻害されにくいアインザイムであり、ほぼ全身の臓器に分布し、アルコール代謝への一定の寄与が示唆されている^{9, 10)}。クラスII ADHは、その緒性質がクラスIとクラスIIIの中間の性質を示す。また、クラスIV ADHは、胃粘膜に局在し、経口的に摂取された比較的高濃度のアルコールを代謝すると考えられており^{11)~13)}、この酵素の働きによる代謝は、初回通過効果(first-pass metabolism)と呼ばれている。

そこで今回スナネズミ、マウス、ラットおよびモルモットにおける肝ADH活性を、15mMエタノールまたは5mMヘキセノールを基質として測定し、阻害剤として1mM 4-MPまたは2mMカプロン酸アミドを添加し、ADH活性に及ぼす影響を検討した(Fig.1)。

今回検討を行った阻害剤である4-MPは、従来よりADHの阻害剤として知られており、クラスIを完全に阻害し、基質の種類によりクラスIIIも多少阻害することが報告されている¹⁴⁾。また、カプロン酸アミドは、クラスIの特異的阻害剤であり、クラスIIIはその濃度によりむしろ活性化することが報告されている¹⁵⁾。そこで

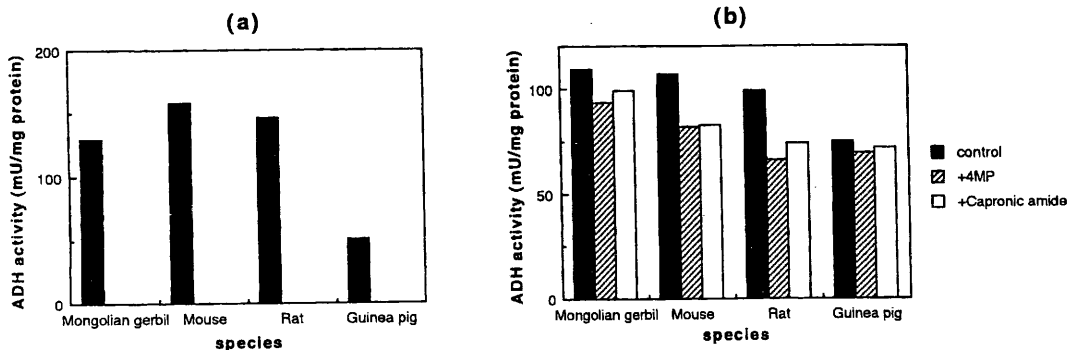


Fig.1 Effect of inhibitors on liver ADH activities of various rodents.

ADH activity of the liver extract was assayed at 37 °C in 0.1M glycine buffer (pH10.7) containing 1mM NAD and 15mM ethanol or 5mM hexenol by measuring the rate of NADH production at 340nm. To test the inhibitory effect of 1mM 4-methylpyrazol (4MP) or 2mM capronic amide, the enzyme was preincubated with the inhibitors for 1min. Protein concentration was determined by the method of Bio-Rad protein assay. (a)15mM ethanol as substrate. (b)5mM hexenol as substrate.

エタノールおよびすべてのアイソザイムの活性が検出されるヘキセノールを基質として, 各動物種の肝ADH活性に及ぼす阻害剤の影響を確認した. エタノールを基質とした場合 (Fig.1(a)), いずれの動物種においても4-MP, カブロン酸アミドにより, 100%阻害されることより, クラスI依存の活性であることが示唆された. また, ヘキセノールを基質とした場合 (Fig.1(b)) は各動物種とも残存活性が見出されており, 4-MPを阻害剤として用いた場合, スナネズミにおいては86%, ラットは67%, マウスは77%, モルモットは93%, また, カブロン酸アミドの場合スナネズミは91%, ラットは75%, マウスは77%, そしてモルモットは95%の活性が残存した. スナネズミとモルモットにおいては, ヘキセノールを基質として測定される肝ADH活性においては, 総活性の約5~9%, マウスとラットにおいては約24%がクラスIに依存する活性であることが推察された. これはエタノールを基質とした時に測定されるADH活性においては, ほぼ100%がクラスIに依存するのに対して明確な違いを見せている. 粗抽出液においてクラスIとクラスIIIが混在していても, エタノールを基質とした場合はクラスI ADHを, ヘキセノールを基質とした場合はクラスIIIを測定することが可能と思われる. つまり, 混在していても基質を換えることにより, 各々のADHアイソザイム活性を測定できるということが示唆された.

2) モノヨード酢酸 (MIAA) による阻害

ADHはSH酵素であり, SH酵素はSH基に特異的に結合するSH試薬によりその活性が阻害されると言われている¹⁶⁾. そこで, SHブロック試薬であるモノヨード酢酸¹⁷⁾を用いて, マウス肝ADH活性に及ぼす影響を15mMエタノールを基質として確認した結果を, Fig.2に示した. 反応液中, モノヨード酢酸30%濃度において, マウス肝ADH活性は51%残存したが, それ以上の濃度では急速に失活し, 35%濃度においてADH活性はほぼ100%阻害された.

3) N-ethylmaleimide(NEM) による阻害におけるL-システインの影響

次に, 15mMエタノールを基質として同様にSH基のブロック試薬であるNEMを5mM濃度に添加したところ, ラット肝ADH活性をほぼ100%阻害した. そこで今度は阻害の後, SHアミノ酸であるL-システインを添加し活性の変化を観察した (Fig.3).

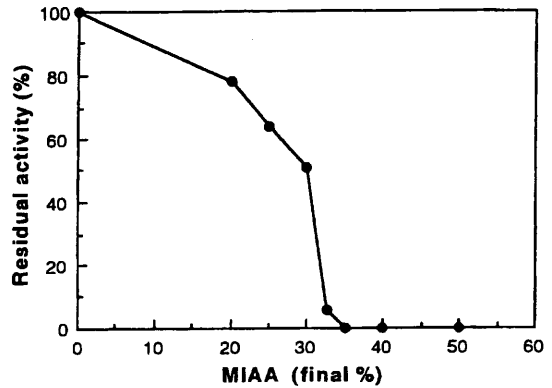


Fig.2 Effect of monoiodoacetic acid (MIAA) on mouse liver ADH activity. Mouse liver ADH activity was assayed by the same method as described in Fig.1. 15mM ethanol was used for substrate. Reaction was performed by adding various concentrations monoiodoacetic acid as inhibitor.

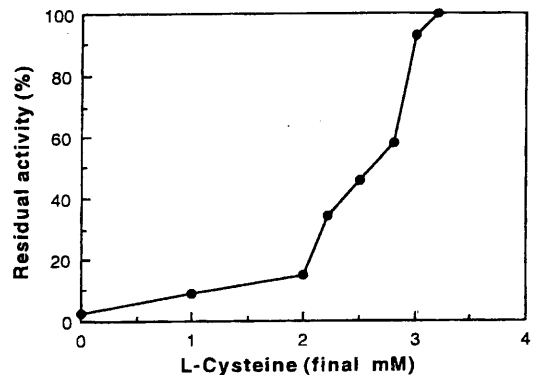


Fig.3 Effect of L-cysteine on rat liver ADH activity after inhibition by N-ethylmaleimide(NEM). Rat ADH activity was assayed by the same method as described in Fig.1. After ADH activity was inhibited by addition of 5mM NEM, various concentrations of L-cysteine was added and ADH activity was measured.

反応液中のL-システイン濃度 2mM付近からADH活性は急速に上昇し, L-システイン濃度 3.2mMで肝ADH残存活性はほぼ100%となり, SH試薬の有効性が確認された.

ADH活性の抑制については, 古来, 食用の根である葛根からの抽出液が, アルコールによる酔いを軽減するために中国で用いられた. Keung¹⁸⁾は, 葛根からの抽

出液中に存在するADHを阻害する成分であるイソフラボンについて報告し、Linら¹⁹⁾は、実験動物に3種のイソフラボンを投与することにより、アルコールの摂取量が減少することを報告した。このことは、ADH活性を阻害することにより、アルコールの分解が進行せず、アルコールを受け付けなくなることによるものと考えられ、天然物質に由来するADH活性阻害剤は、アルコール中毒患者の治療における有効性が期待できることになる。

2. アミノ酸の影響

アルコールとアミノ酸およびタンパク質間の相互作用については多くの報告がある。Tsukamotoら²⁰⁾は、ICRマウスのエタノール胃内投与前に、D-システイン、L-システインおよびL-アラニンの腹腔内投与を行うことにより、エタノールの酸化と体内からのエタノールの消失が促進されることを報告した。また、Tabokoffら²¹⁾は、マウス、ラットそしてヒトにメチオニンを投与することにより、循環アセトアルデヒド量が低下すること、そしてHansgensら²²⁾、Doratoら²³⁾は、L-リジンがエタノールの吸収と排泄を促進し、血中エタノール濃度を低下させることを報告した。また、Youngらは1993年、SHRSP(脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット)がプロリン、リジンそしてスレオニンを含むエタノール溶液をエタノールだけの溶液よりも多く飲むことから

プロリン、リジン、スレオニンがアルコール代謝に何らかの重要な役割を果たしていることを見出し²⁴⁾、1994年、プロリン、リジンのエタノール代謝への関与を詳細に報告した²⁵⁾。正木ら²⁶⁾は、急性アルコール性肝障害ラットにアラニンとグルタミンを同時投与することにより肝機能の回復を促進することを見出し、エタノールの肝における代謝には、糖原性アミノ酸からの糖新生および筋と肝とによるグルコース・アラニンサイクルの役割が重要であることを明らかにした。その他、エタノール代謝における各種アミノ酸の効果は、Beaugeら²⁷⁾により報告された。

以上のように、エタノール代謝の促進におけるアミノ酸の効果に関する報告は数多い。このようなアミノ酸によるエタノール代謝の促進は、エタノール代謝の第一段階であるADH活性の上昇による可能性が考えられる。そこで、ラット肝および胃からの抽出粗酵素液に各種アミノ酸を添加して、種々の条件によりADH活性を測定した。エタノールの基質濃度は、肝に存在するクラスI ADH活性の測定に適した15mMと、胃のクラスIV ADH活性の測定に適した855mM、またヘキサノールは、すべてのクラスの活性が測定できる5mM濃度を用いた。アミノ酸の濃度は、0.05%と0.1%の最終反応液濃度で行った。反応pHについては、種々のpHでADH活性の測定を行った結果、最も高い活性値が得られたpHで活性測定を行った。Table 1に選択した条件と使用した

Table 1 Experimental conditions for examination of effects of amino acids on rat liver and stomach ADH activities.

| | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------|---------------|
| Buffer | 0.1M Glycine-Na buffer, pH10.7 | | |
| Sample | Rat Liver | Rat Stomach | |
| Substrate | 15mM EtOH | 855mM EtOH | |
| | 5mM Hexenol | 5mM Hexenol | |
| L-amino acid | Alanine | Leucine | Isoleucine |
| | Threonine | Cysteine | Glutamine |
| | Glutamic acid | Proline | Aspartic acid |
| amino acid final concentration | 0% | 0.05% | 0.1% |

アミノ酸を示したが、何れの条件においてもADH活性に影響は示さなかった。今回の実験からは、アミノ酸によるエタノール代謝の促進がADH活性の上昇に起因するものであるとの証明は得られなかった。

3. コーンペプチドによる影響

コーンペプチドによるエタノール代謝の促進効果については、山口ら^{28)~31)}により報告されている。コーンペプチドは、とうもろこしタンパク質に特殊なセリン型プロテアーゼを作用させて精製したもので、遊離アミノ酸をほとんど含まないオリゴペプチドである。構成アミノ酸として、アラニン、グルタミン酸および分岐鎖アミノ酸を比較的多く含んでいる²⁹⁾。エタノール投与とSHRSPを用いて、このコーンペプチドを前投与することによりエタノール代謝促進効果が認められた^{30), 31)}。また、ヒトにおいても同様の効果が観察された²⁹⁾。そこで、種々の条件により、ラット肝および胃より抽出した粗酵素液にコーンペプチドを添加してADH活性を測定した。基質の種類と濃度は、アミノ酸の場合と同様にし、コーンペプチドの濃度を種々変えてみた。また、pHについては、10.7以外に生体中のpHであるpH7.4においても活性を測定してみた。Table 2 にその条件を示したが、何れの場合もアミノ酸の場合と同様に、有意な活性の上昇は観察されなかった。

山口²⁸⁾によると、ラットにコーンペプチドを経口的に前投与あるいは同時投与した場合は、コントロール群に比較して血中エタノール濃度の低下が見られたが、コーンペプチドを腹腔内投与した場合にはコントロール群

との差は認められなかったという。このことは、コーンペプチドがエタノールの胃あるいは腸管での吸収を遅らせていることによるものと推察された。食物によるエタノールの胃内排出速度の遅延については、ココナッツ油による報告³²⁾があるが、コーンペプチドについてもエタノールの胃内排出速度あるいは腸管での吸収等における影響について検討する必要がある。

また、生体内におけるエタノールの代謝には細胞内に存在するADHのうちクラスI ADHが最も大きな役割を占めているが、ADH以外にもアルコールの酸化経路が存在すると考えられ、non-ADH pathwaysと呼ばれる。non-ADH pathwaysには、小胞体中存在するチトクロームP-450を介したマイクロソームエタノール酸化系 (MEOS) と、ペルオキシソームにあるカタラーゼの2経路が知られている。さらに、クラスIII ADHが高濃度エタノールを代謝することも示唆されている⁹⁾。その他、脂肪酸のエチルエステルを生成するエタノールの非酸化的な代謝系も報告されている³³⁾。因みに、P-450は薬物代謝酵素であり、そのためアルコール中毒患者や大酒家では種々の薬物の代謝速度が影響を受け、酒に強くなったり薬物代謝が阻害されたり亢進したりする。大酒家に薬剤を投与する場合には、アルコールと薬剤との相互作用を常に念頭に置かなければならない³⁴⁾。

このように、生体内においては種々のエタノール代謝経路が存在し、ADH以外の酵素がアミノ酸、コーンペプチドの投与により影響を受けている可能性もある。また、消化吸收段階での影響も考慮すると共に、アミノ酸

Table 2 Experimental conditions for examination of effect of corn peptide on rat liver and stomach ADH activities.

| | | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|------|-------------|------|
| Buffer | 0.1M Glycine-Na buffer, pH 10.7 | | | |
| | 0.1M Phosphate buffer, pH 7.4 | | | |
| Sample | Rat Liver | | Rat Stomach | |
| Substrate | 15mM EtOH | | 855mM EtOH | |
| | 5mM Hexenol | | 5mM Hexenol | |
| Corn peptide final concentration | 0% | 0.3% | 0.5% | 0.7% |

やペプチドのさらに広い範囲の濃度や反応条件の検討も現在行っている。

要 約

ADH活性に及ぼす阻害剤および活性化物質について *in vitro* における影響を検討した。

- 1) ADHの阻害剤である4-MP, クラスI ADHの阻害剤であるカプロン酸アミドを用いて, 4種の齧歯類の肝ADH活性に及ぼす影響を観察した。15 mMエタノールを基質とした場合, いずれの阻害剤においても100%阻害された。また, 5mMヘキセノールを基質とした場合, スナネズミとモルモットにおいてはクラスI ADH依存の活性がほとんど検出されていないことが判り, 基質を換えることにより, クラスI, クラスIIIが混在した粗抽出液においても両アイソザイムを別々に検出できる可能性が示唆された。
- 2) SH酵素であるADHにSH試薬であるモノヨード酢酸を添加して酵素活性を測定したところ, 反応液中モノヨード酢酸35%濃度でADH活性は100%阻害された。また, 同様にSH試薬であるNEMを加えてADH活性を100%阻害した後, SHアミノ酸であるシステインを反応液中3.2mMになるように加えることにより, ADH活性はほぼ100%回復することが確認された。
- 3) *in vivo* におけるエタノール代謝促進効果が報告されているアミノ酸について, *in vitro* でのADH活性を測定したところ, 今回の条件では有意な活性の上昇は確認されなかった。
- 4) 同様にコーンペプチドにおいても, 今回の条件においては有意な活性の上昇は確認されなかった。

謝 辞

本研究を行うにあたり, ご指導いただきました日本医科大学法医学教室長谷場健先生に心より深く感謝致します。また, 実験にご協力いただきました, 平成7年度本学栄養学科栄養学専攻栄養コース卒業の小野純子さん, 平成8年度本学栄養学科管理栄養士専攻卒業の野崎朋絵さんに御礼申し上げます。

この研究の一部は, 本学特別研究費の使用において行われたものであり, 関係各位に深謝する。

文 献

- 1) 長谷場健: *Pharm.Tech.Japan*, **12**, 93 (1996)
- 2) 河野裕明: わが国のアルコール関連問題の現状(厚生省医療局精神保健課監修), 厚健出版(東京), 1993, pp.5-41
- 3) M.Frezza, c.d.Padova, G.Pozzato, M.Terpin, E.Baraona and C.S.Lieber: *N.Engl. J. Med.*, **95** (1990)
- 4) J.A.Jonson and J.A.Lott: *Clin.Chem.*, **24**, 1931(1978)
- 5) R.Parizek, J.Kovar and L.skursky: *Collect. Czech.Cem.Comm.*, **46**, 798 (1981)
- 6) T.L.Seeley, P.B.Mather and R.S.Holmes: *Comp. Biochem. Physiol.*, **78**, 131 (1984)
- 7) R.S.Holmes, R.A.H.van Oorschot and J.L.VandeBerg: *Biochem.Genet.*, **30**, 215 (1992)
- 8) K.England and W.Maret: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 47 (1993)
- 9) T.Haseba, I.Yamamoto, H.Kamii, Y.Ohno and T.Watanabe: *Biochem. Genet.*, **33**, 349 (1995)
- 10) T.Haseba, S.Sato, M.Ishizaki, I.Yamamoto, M.Kurosu and T.Watanabe: *Biomed.Res.*, **12**, 199 (1991)
- 11) R.J.K.Julkunen, C.D.Padva and C.S.Lieber: *Life Sci.*, **37**, 567 (1985)
- 12) 大畑充, 山内真義, 平川淳一, 水原裕治, 中山一, 中島尚登, 中原正雄, 木村和夫, 北原敏久, 小倉和雄, 藤沢冽, 亀田治男: アルコール代謝と肝, **9**, 18 (1990)
- 13) A.Moreno and X.Pares: *J.Biol.Chem.*, **266**, 1128 (1991)
- 14) T.Haseba: *Jpn J. Alcohol & Drug Dependence.*, **20**, 333 (1985)
- 15) 長谷場健: Acidic ADH(ClassIII)のアルコール代謝への寄与に関する研究, 平成5年度科学研究費補助金(一般研究B)研究成果報告書, **27** (1994)
- 16) 西沢一俊, 木村憲助: 入門酵素科学, 南江堂(東京), 1967, pp.91-92

- 17) K.A.Walsh, D.L.Kauffman, K.S.V.Sampath Kumar and H.Neurath:*Proc.N.A.S.*, **51**, 301 (1964)
- 18) W.M.Keung: *Alcohol.Clin.Exp.Res.*, **17**, 1254 (1993)
- 19) R.C.Lin, S.Guthrie, C.Y.Xie, K.Mai, D.Y. Lee, L.Lemeng and T.K.Li: *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **20**, 659 (1996)
- 20) S.Tsukamoto, T.Kanegae, T.Nagoya, M. Shimamura, Y.Mieda, M.Nomura, K.Hojo and H.Okubo: *Jpn.J. Alcohol Drug Depend.*, **25**, 429 (1990)
- 21) B.Tabokoff, C.J.Eriksson and J.P.von Warburg:*Alcohol.Clin.Exp.Res.*, **13**, 164 (1989)
- 22) H.E.S.T.Hansgens, A.J.Meijer, J.r.Williamson, J.A.Gimpel and J.M.Tager:*Biochem.J.*, **170**, 699 (1978)
- 23) M.A.Dorato, V.D.Lynch and C.O.Ward:*J. Pharm. Sci.*, **66**, 35 (1977)
- 24) S.-C.Yang, M.Ito, F.Morimatsu, Y.Furukawa and S.Kimura:*J.Nutr.Sci. Vitaminol.*, **39**, 55 (1993)
- 25) S.-C.Yang, M.Ito, S.Budijanto, Y.Furukawa and S.S.Kimura : *J.Clin.Biochem.Nutr.*, **16**, 151 (1994)
- 26) 正木久典, 荒井弘光, 鳥居邦夫 : アルコール代謝と肝, **9**, 122 (1990)
- 27) F.Beauge, M.Mangeney, J.Nordmann and R. Nordmann:*Adv.Exp.Med.Biol.*, **132**, 393 (1980)
- 28) 山口孫一 : *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, **162**, 62 (1994)
- 29) 山口孫一 : バイオサイエンスとインダストリー, **53**, 701, (1995)
- 30) M.Yamaguchi, M.Takada, O.Nozaki, M.Ito and Y. Furukawa : *J.Nutri.Sci. Vitaminol.*, **42**, 219 (1996)
- 31) M.Yamaguchi, F.Nishikiori, O.Nozaki, M.Ito and Y.Furukawa:*J.Nutri.Sci. Vitaminol.*, **42**, 567(1996)
- 32) 立屋敷かおる, 今泉和彦, 原田咲織, 森章子 : 栄食誌, **46**, 233 (1993)
- 33) E.A.Laposta and L.G.Lange: *Science*, **231**, 497 (1986)
- 34) 丸山博, 笠谷知宏 : 医学のあゆみ, **154**, 842 (1990)