

# スナネズミ (*Meriones unguiculatus*) の肝および胃における アルコール脱水素酵素アイソザイムに関する研究 ——ラット・マウスおよびモルモットとの比較——

林 あつみ\*, 清水 真澄\*\*, 七戸 和博\*\*  
長谷場 健\*\*\*, 木元 幸一\*

\* 東京家政大学栄養学科

\*\* 日本医科大学実験動物管理室

\*\*\* 日本医科大学法医学教室

## Comparative Studies on Alcohol Dehydrogenase Isozymes in the Liver and Stomach of *Meriones unguiculatus*, Rat, Mouse and Guinea Pig

Atsumi HAYASHI,\* Masumi SHIMIZU,\*\* Kazuhiro SHICHINOHE,\*\*  
Takeshi HASEBA\*\*\* and Koichi KIMOTO\*

\* Department of Nutrition, Tokyo Kasei University, Itabashi-ku, Tokyo 173

\*\* Department of Laboratory Animal Science, Nippon Medical School, Bunkyo-ku, Tokyo 113

\*\*\* Department of Legal Medicine, Nippon Medical School, Bunkyo-ku, Tokyo 113

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 49, 321~329 (1996)

The multiplicity of alcohol dehydrogenase (ADH) isozymes was examined in the liver and stomach of Mongolian gerbils. Four ADH isozymes were resolved and distinguished on the basis of their electrophoretic mobilities, tissue distributions, and substrate and inhibitor specificities. Compared with the ADH isozyme systems reported previously in the mouse, rat and guinea pig, class I and II ADHs were identified in the liver and class IV ADH in the stomach of the Mongolian gerbil. Class III ADH was detected in both organs. Thus, the ADH systems of the Mongolian gerbil seem to be identical to those of other rodents. Liver ADH of the Mongolian gerbil showed similar activity to those of the mouse and rat, and was significantly higher than that of the guinea pig, towards either 15 mM ethanol or 5 mM hexenol. However, stomach ADH activity in the Mongolian gerbil, as well as that of the guinea pig, was much lower than those of the mouse and rat for both substrates. The activity in both species was also much lower than the liver ADH activities even at higher concentrations of ethanol, although ADH activities in the mouse and rat for 500 mM ethanol were about twice as high in the stomach as in the liver. Accordingly, the first-pass metabolism of alcohol in the stomach would appear to proceed to a lesser extent in the Mongolian gerbil and guinea pig. Furthermore, the lower activity of stomach ADH for hexenol found in the Mongolian gerbil and guinea pig seems to reflect the feeding habits of these animals.

**Key Words** alcohol dehydrogenase, mongolian gerbil, rodents, liver, stomach.

(Received November 30, 1995)

アルコール飲料は、人間にとって向精神薬的食品として食品のなかでも特別な位置を占めてきたと思われる。その主成分であるエタノールの代謝は、おもに肝内のアルコール脱水素酵素 (ADH) [EC 1.1.1.1] によって行われることが明らかとなっているが、その酵素的代謝メカ

ニズムについては未だ不明な部分も多い。

従来、哺乳類 ADH には種々のアイソザイムが報告されており<sup>1-4)</sup>、組織分布、等電点やピラゾールによる阻害度ならびにエタノールに対する  $K_m$  値等の違いにより、大きく四つのクラスに分類されている。クラス I はおもに肝に局在し、アルコール代謝の鍵酵素とされている。その酵素的性質は、アルカリ側に等電点を有し、エタノールに対して低い  $K_m$  値をもち、ピラゾールで強く

\* 〒173 東京都板橋区加賀 1-18-1

\*\* 〒113 東京都文京区千駄木 1-1-5

\*\*\* 〒113 東京都文京区千駄木 1-1-5

阻害される。ヒトでは  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ADH, マウスでは basic ADH がこのクラスに相当する。クラス III に分類される ADH は、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<sup>1)5)</sup>。その酵素的性質としては、酸性側に等電点を有し、エタノールに対してはきわめて高い  $K_m$  値 ( $>1 M$ ) をもち、ピラゾールで阻害されない。ヒトでは  $\alpha$ -ADH, マウスでは acidic ADH が相当する。クラス II に関しては、クラス I とクラス III の中間の性質を有し、ヒトでは  $\pi$ -ADH, マウスでは ADH- $\beta$  が相当する。最初、このクラスは肝と胃に存在するとされてきたが、1990 年 Parés ら<sup>6)</sup> により胃におけるこの ADH は、肝のクラス II とは異なるクラス IV に分類され、アルコール代謝における「初回通過効果 (first-pass metabolism)」に関与していることが示唆されている<sup>7-9)</sup>。ヒトにおいては胃 ADH の活性が低い、クラス IV 欠損の例が報告されており<sup>10)</sup>、このタイプの人飲酒時の血中アルコール濃度が高いことが知られている<sup>11)</sup>。

このように哺乳類の ADH はヒト、ウマ、ラット、マウス等の研究を通して現在では四つのクラスに分類されており<sup>12-16)</sup>、それらはそれぞれの酵素的性質および組織分布に応じて、アルコール代謝や生理的代謝に寄与しているものと予想される。これら、各クラスの ADH のアルコール代謝および生理的代謝における役割分担を明らかにするためには、種々の動物種におけるアルコール代謝能および生理的特徴と各 ADH アイソザイム活性との関係を検討することが重要である。たとえば、クラス I ADH を遺伝的に欠損した動物種 (ADH<sup>-</sup> deer mouse) では、正常種 (ADH<sup>+</sup> deer mouse) の約 50% のアルコール代謝能を示すことが知られている<sup>5)17)</sup>。また、われわれは以前、ヘキセノールを多く含む青葉等を食するディアマウスの胃の ADH が、マウスと同様ヘキセノールに高い活性を示すことを報告した<sup>9)</sup>。

ところで、スナネズミは分類上ラットやマウスと同様齧歯目に属するが、本来砂漠を生棲地とするため、他の齧歯類に比べ食性を異にし、また、水分摂取量ならびに尿排泄量の少ない水代謝を特徴とする<sup>18)</sup>。さらに、アルコールは抗利尿ホルモンの分泌を抑制することにより、水代謝に大きな影響を及ぼすことが知られている<sup>19)</sup>。

これらのことから、各 ADH アイソザイムの活性と食性、およびアルコール代謝と水代謝との関係を研究する上でスナネズミは興味ある対象であるが、この動物種のアルコール代謝および ADH に関する報告はまだ見当たらない。そこで本動物種の肝と胃における各クラスの ADH アイソザイムの分布様態およびそれらの活性を、すでに報告されているマウス<sup>20)</sup>、ラット<sup>21)</sup>、モルモット<sup>22)</sup> 等の齧歯類と比較検討し、各アイソザイムのアルコール代謝および食性における寄与について考察した。

## 実験方法

### 1. 動物および試薬

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 (体重  $60.1 \pm 3.5 g$ )、雌 ( $49.7 \pm 1.6 g$ ) 各 3 匹を用いた。マウスは ddY 系 7 週齢雄 ( $23.8 \pm 1.3 g$ )、雌 ( $19.6 \pm 0.8 g$ ) 各 3 匹、ラットは Sprague-Dawley (SD) 系 7 週齢雄 ( $238.2 \pm 18.9 g$ )、雌 ( $188.3 \pm 23.6 g$ ) 各 3 匹、そしてモルモットは Hartley 系 7 週齢雌 3 匹 ( $202.2 \pm 6.4 g$ ) を埼玉実験動物供給所より購入して用いた。餌 (標準固型飼料、オリエンタル酵母社製) および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。 $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide ( $\beta$ -NAD), 4-methylpyrazole, phenazine methosulfate (PMS) は Sigma 社より、エタノールは残留農薬試験用試薬特級を和光純薬工業<sup>株</sup>より、trans-2-hexen-1-ol (ヘキセノール), 3,3'-(4,4'-biphenylene) bis(2,5-diphenyl-2H-tetrazolium chloride) (ネオテトラゾリウム) は Aldrich 社より購入した。

### 2. 酵素液の調製

肝臓および胃を、その重量の 5 倍量の 5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5, 0.5 mM NAD および 0.25 M ショ糖を含む) 中でヒスコロン (株式会社音理科器械製作所) を用いてホモジナイズし、100,000 $\times g$  で 60 分の遠心分離により得た上清を酵素液とした。これらの抽出操作は水中または 4°C 下で行った。

### 3. ADH 活性測定法

ADH の活性は、1 mM NAD を含む 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.7) に酵素液を加え、基質として各種濃度のエタノールまたはヘキセノールを添加し、37°C における NADH の産生速度を日立分光光度計 (100-10 型) を用い 340 nm で測定した。酵素の活性単位は、1  $\mu$ mol 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<sup>23)</sup> により、牛血清アルブミン (BSA) を標準として 595 nm で測定した。

### 5. ディスク電気泳動法による ADH アイソザイムの検出

ADH アイソザイム検出のためのディスク電気泳動および活性染色は、Haseba ら<sup>4)</sup> の方法に準じて行った。0.1 M L-アルギニンと 0.76 mM NAD を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲル (pH 9.5)<sup>24)</sup> を作製し、3.5 mM L-アルギニンと 0.5 mM NAD を含む 38.4 mM  $\beta$ -アラニンの泳動用緩衝液 (pH 9.0) で、2°C にて約 2 時間電気泳動を行った。泳動後のゲルの活性染色は、2.2 mM NAD, 0.75

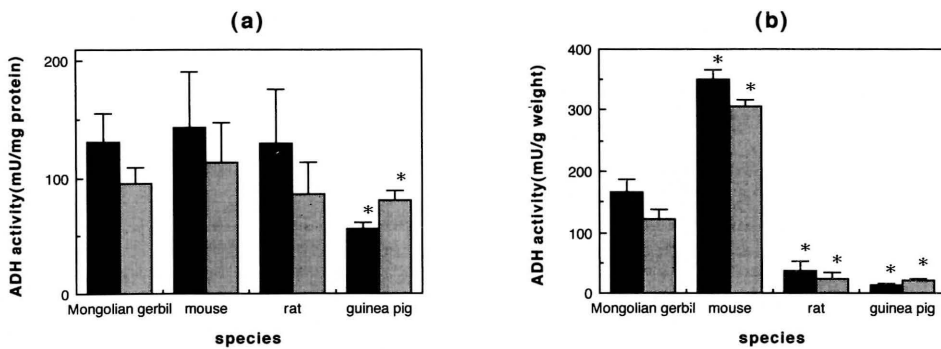


Fig. 1. Liver ADH activities of various rodents.

Liver from each rodent was homogenized individually in 5 vol (w/v) of extraction buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.5 mM NAD and 0.25 M sucrose). The homogenate was centrifuged at  $100,000\times g$  for 1 h. ADH activity of the extract was assayed at 37°C in 0.1 M glycine buffer (pH 10.7) containing 1 mM NAD and 15 mM ethanol or 5 mM hexenol by measuring the rate of NADH production at 340 nm. Production of 1  $\mu$ M NADH per min was defined as one unit of enzyme activity. a) Liver ADH activity was expressed as mU/mg of liver protein and the values are means  $\pm$  SD. b) Liver ADH activity was expressed as mU/g body weight. A significance of difference in the activity with ethanol or hexenol as substrate among animals was assessed by *t*-test ( $p < 0.05$ ). ■, 15 mM ethanol as substrate; □, 5 mM hexenol as substrate.

mm ネオテトラゾリウム, 1.38 mM PMS および, 基質として各種濃度のエタノールを含む 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.7) 中で 37°C 約 30 分間インキュベートすることにより行った (ネオテトラゾリウム法: NT 法)。また, ヘキセノールを基質として用いることにより, エタノールでは検出されにくい他のすべてのクラスの ADH アイソザイムも検出した。ADH の阻害剤である 4-methylpyrazole を用いる場合は, 0.1 M グリシン緩衝液に 2.2 mM NAD および 1.2 mM 4-methylpyrazole を添加し 37°C で 5 分間のプレインキュベーション後, 同様に染色した。

ADH アイソザイムの同定は, 電気泳動上の移動度, エタノールとヘキセノールに対する基質特異性および 4-methylpyrazole に対する阻害感受性などにより行った。

## 6. 統計処理

実験データ (Fig. 1, 3, 6) は, 平均値  $\pm$  標準偏差で示した。Fig. 1 および 3 の結果については, エタノールあるいはヘキセノールを基質としたときのスナネズミに対する各動物種のデータについて, また, 各動物種におけるエタノールとヘキセノールのデータ間で *F* 検定後, 等分散性を示したのものについては Student's *t*-test により, また等分散性を示さなかったものについては Welch's *t*-test により有意差を判定した。

## 結 果

### 1. 各種齧歯類における肝 ADH 活性の比較

スナネズミ, マウス, ラット, モルモットにおける肝 ADH 活性を, 15 mM エタノールまたは 5 mM ヘキセ

ノールを基質として測定した結果を Fig. 1 に示した。スナネズミの ADH 活性は, エタノールおよびヘキセノールのいずれを基質とした場合も, マウス, ラットと同様, モルモットより有意に高かった (Fig. 1(a))。また, 図には示さなかったが, 各動物種の両基質間の ADH 活性を有意差検定すると, スナネズミ, ラットについてはエタノールの方が有意に高く, マウスは有意差はみられなかったものの同様の傾向にあった。しかしモルモットは, ヘキセノールに対する活性の方が有意に高かった。また, 体重 g 当りの活性をみたところ, 体が小さい種ほど ADH 活性は高い傾向にあった (Fig. 1(b))。この結果は, アルコール代謝速度と各動物種の体重が反比例するという報告<sup>25)</sup> に相応した。

### 2. 肝 ADH アイソザイムの電気泳動

各動物種における肝 ADH のアイソザイムを電気泳動により検索し, それらの活性をデンシトメータで検討した。Fig. 2 には泳動パターンの写真を示した。

いずれの種においても, 108 mM エタノールを基質とした場合, 陰極側から順に ADH の活性バンド A, B が検出された (lane (1))。バンド A は, 4-methylpyrazole 添加で消失したが, バンド B は薄くなったが消失しなかった (lane (2))。また, すべてのクラスのアイソザイムが検出可能な 5 mM ヘキセノールを基質とした場合, エタノールで検出されたバンド A および B に加え, バンド C が明瞭に検出された (lane (3))。4-methylpyrazole はエタノールのときと同様, バンド A を強く阻害したが, バンド B および C はほとんど阻害されなかった (lane (4))。また, いずれの動物種においても, 活性バンド B

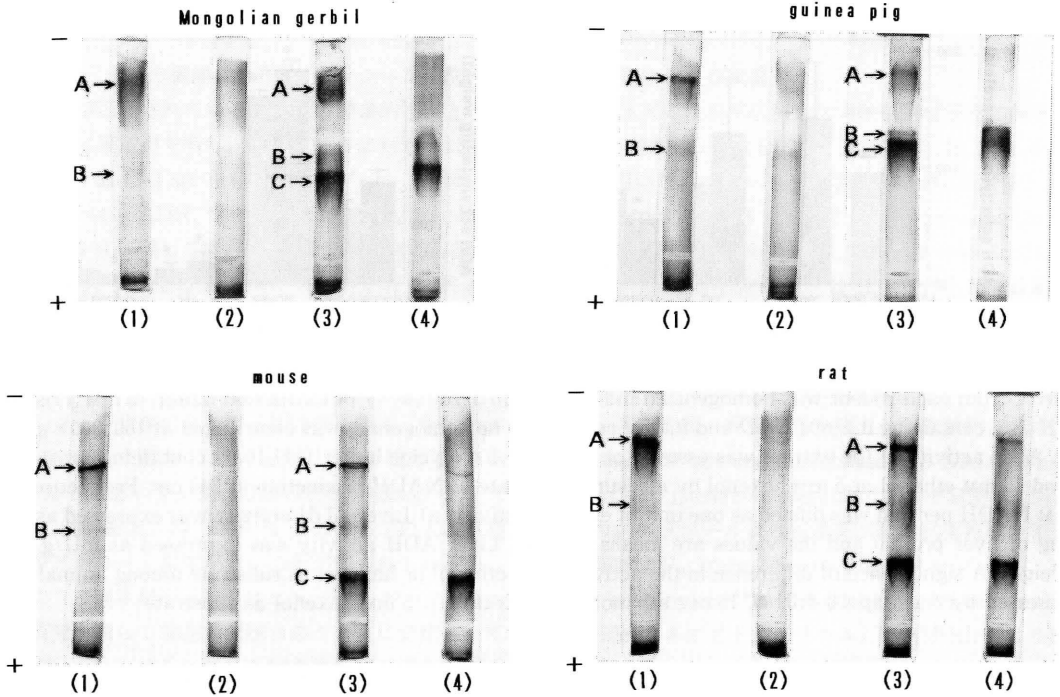


Fig. 2. Disc electrophoresis of liver ADH isozymes from various rodents.

Liver extract was subjected to electrophoresis on 7.5% acrylamide disc gel (0.1 M L-arginine buffer, pH 9.7) using 38.4 mM  $\beta$ -alanine/3.5 mM L-arginine buffer (pH 9.0) containing 0.5 mM NAD. The enzyme was stained in 0.1 M glycine buffer (pH 10.7) containing 2.2 mM NAD, 0.8 mM neotetrazolium, 1.4 mM phenazine methosulfate and alcohol. Lane 1, 108 mM ethanol; Lane 2, 108 mM ethanol+1.2 mM 4-methylpyrazole; Lane 3, 15 mM hexenol; Lane 4, 15 mM hexenol+1.2 mM 4-methylpyrazole.

およびCはエタノールよりもヘキセノールを基質とした場合の方が濃く検出された。この傾向は、とくにバンドCにおいて著しかった。

各クラスのADHアイソザイムの電気泳動上の移動度は動物種によってかなり異なるが、各ADHバンドの基質特異性および阻害剤特異性は、精製した各ADHアイソザイムの活性変化をほぼ反映していることが確認されている<sup>26)</sup>。したがって、各クラスのADHを電気泳動上のバンドで同定する場合、移動度のみならずアルコールに対する基質特異性、4-methylpyrazoleに対する阻害感受性および組織分布等を検討することにより、同定することが可能である。図2においてマウスのバンドA, B, Cは既報<sup>4)26)</sup>に照らし合わせて、それぞれクラスI, II, IIIと同定された。スナネズミの場合、バンドAは最も陽極側に位置し、108 mM エタノールを基質とした場合に強く検出され、4-methylpyrazoleによって最も強く阻害されることから、クラスIと推定された。バンドBは、移動度がAとCの間で、エタノールよりもヘキセノールを基質とした場合の方が活性が高く、4-methylpyrazoleで完全には阻害されないこと、また、肝にお

いて検出されたことより、クラスIIと推定された。バンドCは、最も陰極側に位置し108 mM エタノールでは検出されず、ヘキセノールを基質とした場合に著しく強く検出され、4-methylpyrazoleで阻害されないことより<sup>27)</sup>、クラスIIIと推定された。モルモットおよびラットにおいて検出されたADHバンドA, B, Cも、同様にそれぞれクラスI, II, IIIと推定された。

### 3. 胃ADH活性の比較

Fig. 3に示すように、スナネズミの胃ADH活性はエタノールおよびヘキセノールのいずれを基質とした場合も、マウス、ラットに比べてその活性は有意に低く、モルモットと同程度であった。また、いずれの種においても、胃のADH活性は、肝とは異なりエタノールよりもヘキセノールに対する活性が有意に高かった。

### 4. 胃ADHアイソザイムの電気泳動

次に、胃ADHアイソザイムを調べるために、電気泳動後、全クラスのADHアイソザイムが検出可能なヘキセノールを用いて活性染色を行い、アイソザイムパターンを観察した(デンストメータの結果は省略)。Fig. 4に示すようにいずれの齧歯類においても2本の活性バンドが

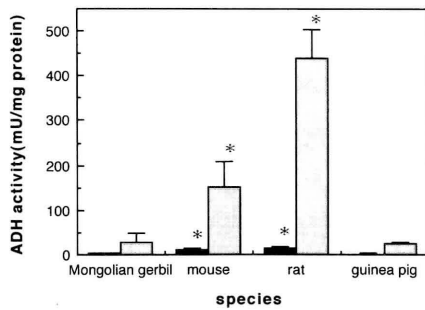


Fig. 3. Stomach ADH activities of various rodents.

Stomach ADH activity was assayed by the same methods as described in Fig. 1. ■, 15 mM ethanol as substrate ; □, 5 mM hexenol as substrate.

検出された (lane (1)). 4-methylpyrazole によりバンド E は阻害されなかったが、バンド D には影響がみられた (lane(2))。マウスの胃 ADH においては、組織分布、基質特異性および 4-methylpyrazole による阻害特性などから、陰極側のバンド D はクラス IV、陽極側のバンド E は

クラス III と同定されている<sup>5)26)</sup>。スナネズミの胃 ADH において陽極側のバンド E は、肝 ADH のバンド C と同じ移動度で (lane (1), (3)), 4-methylpyrazole により影響を受けない (lane (2)) ことから、クラス III と推定された。陰極側のバンド D は、マウスの場合と同様肝のバンド A より移動度が若干大きく (lane (1), (3)), 4-methylpyrazole による影響がみられた (lane (2)) ことから、胃に特異的なクラス IV と推定した。ラットやモルモットの胃 ADH のバンド D も、肝のバンド A (クラス I ADH) とバンド C (クラス III ADH) の中間の移動度を示し (lane (1), (3)), 4-methylpyrazole により活性の抑制が認められたこと (lane (2)), 胃に特徴的であることより、クラス IV と推定された。

5. スナネズミ肝および胃 ADH アイソザイムの活性に対するエタノール濃度の影響

哺乳類 ADH の各クラスのエタノールに対する  $K_m$  値はクラス I で数 mM またはそれ以下、クラス II で数十 mM、クラス IV で数百 mM およびクラス III で数 M であることが知られている<sup>4)21)28)</sup>。そこで、試料の量と反応時間を同じにして、基質のエタノール濃度を変化させるこ

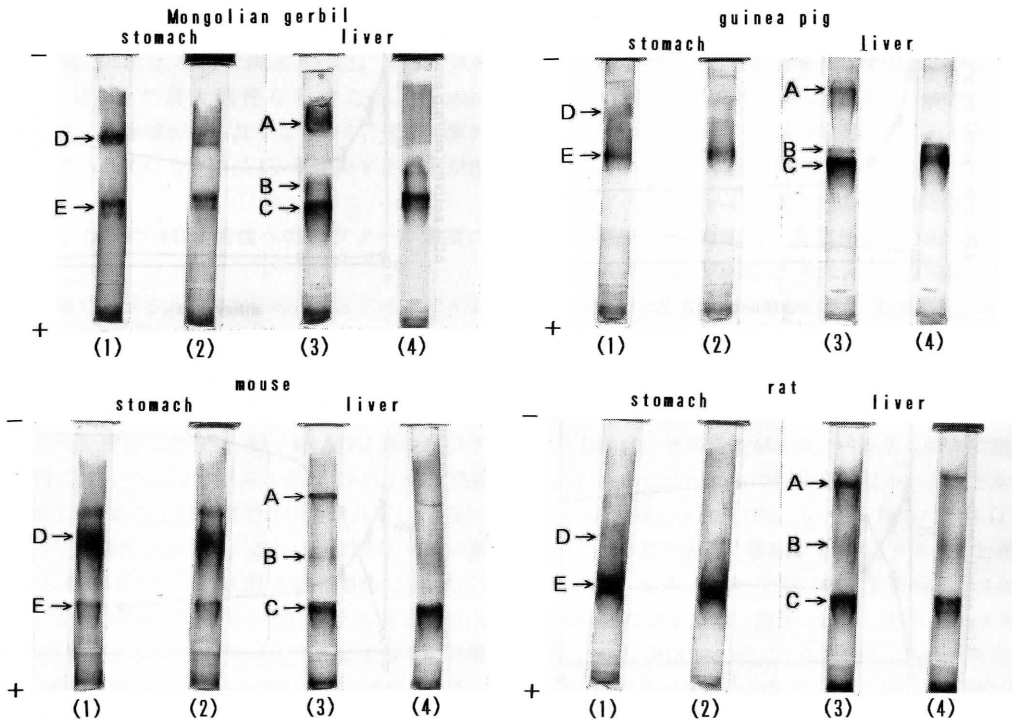


Fig. 4. Disc electrophoresis of stomach ADH isozymes of various rodents.

Disc electrophoresis and activity staining were performed by the same methods as described in Fig. 2 (hexenol was used as a substrate.). Lanes of (1) and (2) of each rodent showed ADH isozyme patterns of the stomach. Lane (2) was stained in the presence of 4-methylpyrazole. Lanes (3) and (4) were ADH isozyme patterns of the liver, as shown in Fig. 2.

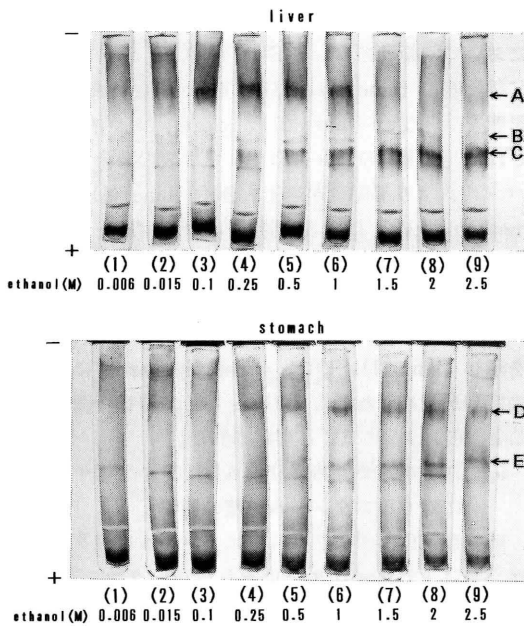


Fig. 5. Effects of ethanol concentrations on ADH isozyme activities in the liver and stomach of Mongolian gerbil.

Disc electrophoresis was performed by the same methods as described in Fig. 2. Activity was stained by using various concentrations of ethanol as a substrate. Lane (1), 0.006 M; lane (2), 0.015 M; lane (3), 0.1 M; lane (4), 0.25 M; lane (5), 0.5 M; lane (6), 1 M; lane (7), 1.5 M; lane (8), 2 M; lane (9), 2.5 M.

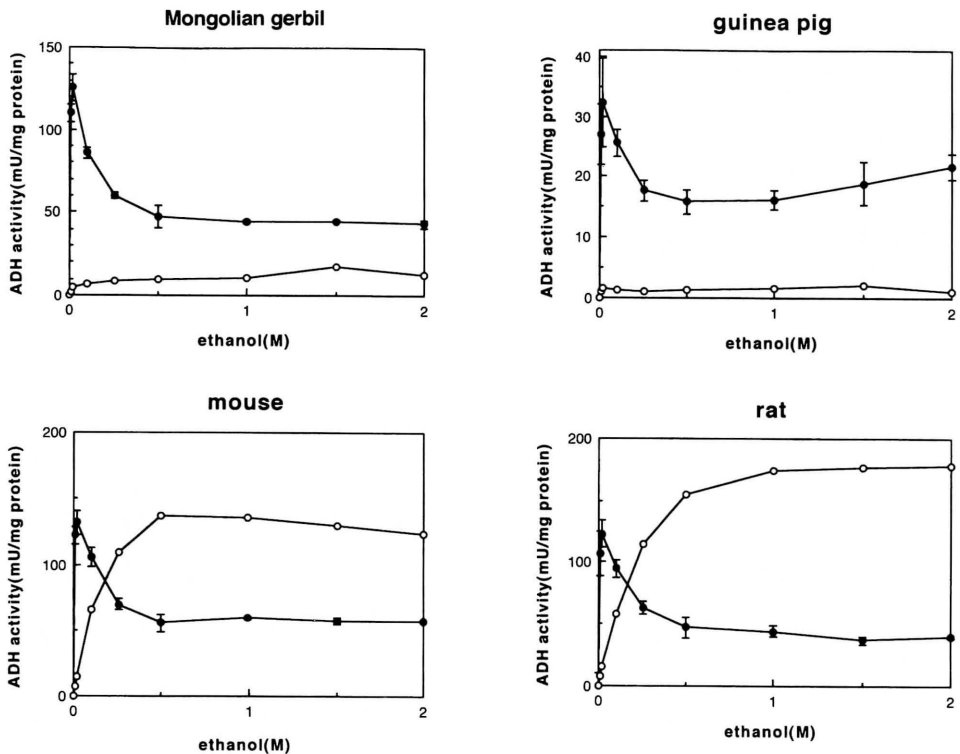


Fig. 6. Effects of ethanol concentrations on liver and stomach ADH activities of various rodents.

ADH activities of the liver and stomach were assayed by using various concentrations of ethanol (0, 0.006, 0.015, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 and 2 M) as a substrate. Liver ADH activity was expressed as mean  $\pm$  SD mU/mg of three animals. While, stomach ADH activity was obtained from mixed homogenate of the stomachs from three animals. ●, liver; ○, stomach.

とにより、スナネズミの3本の肝ADHバンドおよび2本の胃ADHバンドへの影響を検討し、デンシトメータにより観察した。Fig. 5には泳動パターンの写真を示した。

肝ADHのバンドAはエタノール濃度0.1M (lane (3))をピークとして活性の低下がみられ、バンドBは1~1.5M (lane (6), (7))の間で弱いながら活性が認められた。一方、バンドCは2.5M (lane (9))まで活性が上昇した。これらのことは、A, B, Cの順にエタノールに対する $K_m$ 値が高くなることを示している。したがって、Fig. 2の結果に加えて、スナネズミ肝ADHのバンドAはエタノールに対し最も低い $K_m$ 値を有することから、クラスIに相当することが確認された。また、バンドCはエタノールに対し最も高い $K_m$ 値を有することから、クラスIIIに相当し、バンドBは肝のみに検出され、エタノールに対する $K_m$ 値を含め、種々の酵素的性質がバンドAとCの間を示したことから、クラスIIに相当することがそれぞれ確認された。

また、胃ADHについては、バンドDは1M (lane (6))で最大活性を示したが、バンドEは2.5M (lane (9))まで活性の増大を示した。したがって、Fig. 4の結果と合わせて、バンドEは、高濃度エタノールでも活性が飽和せず、4-methylpyrazoleで阻害されないことより、肝のバンドCと同じくクラスIIIと同定された。またバンドDについては1Mで最大活性を示すこと、4-methylpyrazoleによる影響がみられたことから、胃に特異的な存在が報告されているクラスIVに相当することが確認された。

#### 6. 肝および胃のADH活性へのエタノール濃度の影響

肝および胃における、おのおののADHアイソザイムの活性は、その $K_m$ 値に応じてエタノール濃度の影響を強く受けることが、泳動バンドの強度変化により確認された。そこで、肝および胃におけるADH活性のエタノール濃度依存性を検討した(Fig. 6)。肝ADH活性はいずれの動物種においても、エタノール濃度15mM前後で最高活性を示し、それ以上の濃度では活性が低下し、0.5mM前後から一定の活性を示した。これは、エタノールの濃度が低いときにはクラスI ADHが高活性を示すが、15mM以上ではその活性が低下し、逆にクラスIIおよびクラスIIIの活性が反映する(Fig. 5)ことによるものと推察された。また、胃ADH活性においては、マウス、ラットではエタノール0.5mM前後の濃度を境にして、肝ADH活性よりはるかに高くなった。このことはこれらの種の胃では中および高濃度エタノールでよく働くクラスIVおよびIIIが高活性で存在する(Fig. 4, lane (1), (2))ことによるものと推察された。一方、スナネズミお

よびモルモットの胃ADHは著しく低活性で、高濃度エタノール下でも肝ADH活性を凌ぐことはなかった。したがって、これらの動物種は、胃ADH活性の低い種であることが明らかとなった。

#### 7. エタノールを基質とした場合のスナネズミ肝および胃ADHの $K_m$ 値

スナネズミの肝および胃の組織粗抽出液を用いてADHのエタノールに対する、見掛けの $K_m$ 値を求めた。肝ADHの $K_m$ 値は、Lineweaver-Burk plot解析から0.35mMと求められた。この値は、ラットの $K_m$ 値1.4mM<sup>21)</sup>よりも小さく、むしろマウスの $K_m$ 値0.15mM<sup>20)</sup>およびモルモットの $K_m$ 値0.29mM<sup>22)</sup>に近かった。一方、胃ADHについては、29.6mMと194.4mMという二つの $K_m$ 値が求められ、後者は、すでに報告されているマウス胃ADHの $K_m$ 値232mM<sup>20)</sup>およびラット胃ADHの $K_m$ 値340mM<sup>21)</sup>に近かった。

### 考 察

スナネズミは、水利用の効率がよく45日以上も水なしで暮らせるといわれており<sup>29)</sup>、その理由として、スナネズミの脳内の抗利尿ホルモンの濃度は、ラット等より約3倍も高い<sup>30)</sup>こと等が考えられている。アルコールは抗利尿ホルモンの分泌を抑制することにより、利尿効果を示し、水代謝に大きな影響を及ぼす<sup>19)</sup>。このように特徴的な水代謝を示すスナネズミのアルコール代謝およびアルコールの水代謝への影響を検討することを今後の目的として、今回まず本動物種の肝と胃におけるADH活性およびアイソザイムの分布を他の齧歯類と比較した。

スナネズミ肝において、電気泳動上、最も陰極側に見いだされたADHのバンドAは、他の齧歯類のバンドAと同様に低濃度エタノールで活性が高く、4-methylpyrazoleで最も強く阻害されたことから、クラスI ADHと同定された(Fig. 2)。また、最も陽極側に検出されたバンド(肝ではC, 胃ではE)は、他の齧歯類のバンドと同様、その活性がエタノール2.5Mまで飽和されず、4-methylpyrazoleで阻害されなかったことから、クラスIIIと同定された(Fig. 4, 5)。胃のバンドDは肝クラスIより若干大きい移動度を持ち、クラスIと異なり1M前後のエタノールで最大活性を示し、4-methylpyrazoleによる阻害は低かったことから、クラスIVと同定された(Fig. 4, 5)。このように、スナネズミにおけるADHアイソザイムシステムは、他の齧歯類と同様であることがわかった。また、それぞれのADHクラスの電気泳動における移動度は動物種によって異なっていたが、いずれの種でも陰極側からクラスI, IV, II, IIIの順であった(Fig. 4)。

スナネズミにおいて、アルコール代謝能の指標となる

肝 ADH 活性は、15 mM エタノールおよび 5 mM ヘキセノールのいずれの基質でもモルモットより有意に高く、ラットやマウスと同程度であった。一方、アルコール代謝の初回通過効果の指標となる胃 ADH 活性は、スナネズミとモルモットにおいてマウスやラットより著しく低かった。また、スナネズミの胃 ADH のエタノールに対する  $K_m$  値は、29.6 mM と 194.4 mM という二つの値が求められた。すでに報告されているマウス胃 ADH (232 mM<sup>20</sup>) および、ラット胃 ADH の  $K_m$  値 (340 mM<sup>21</sup>) と比較すると、今回のスナネズミ胃の 194.4 mM の方の  $K_m$  値はクラス IV ADH の  $K_m$  値を反映したものと推定される。しかしながら、クラス III のエタノールに対する  $K_m$  値は 1 M 以上であることから<sup>27</sup>、 $K_m$  値 29.6 mM は、いかなる ADH の活性を反映したものであるかは不明で、今後の検討課題である。

各動物種の胃 ADH アイソザイムであるクラス III と IV は、肝の主要な ADH アイソザイムであるクラス I よりいずれもエタノールに対する  $K_m$  値が高いことが知られており<sup>20,21</sup>、本研究におけるスナネズミ胃の ADH クラス III と IV のいずれの活性バンドも 0.25 M 以上のエタノールで明瞭に検出された (Fig. 5, stomach lane (4))。そこで、各動物種の肝と胃の ADH 活性をエタノール濃度を変えて比較すると、マウスとラットにおいては、低濃度エタノール (<0.1 M) の場合、肝 ADH 活性の方が高いが、高濃度になると明らかに胃 ADH 活性の方が高くなった (Fig. 6)。このことは、これらの齧歯類ではアルコール摂取後の消化管内での高濃度のエタノール代謝に、胃の ADH が大きな役割を果たすことを示唆する。一方、スナネズミおよびモルモットでは、胃の ADH 活性はエタノール濃度を上げてても上昇はそれほどみられず低値のままであり (Fig. 6)、これらの動物種ではアルコール代謝における胃の役割は小さいものと考えられた。さらに、マウスおよびラットにおいてクラス III および IV を含む胃の ADH 活性がヘキセノールに高活性を示した (Fig. 3) ことは、これらの動物種がディアマウス<sup>6</sup>) と類似した食性をもっていることが示唆された。一方、スナネズミおよびモルモットでは、胃 ADH 活性がエタノールのみならずヘキセノールに対しても著しく低かった (Fig. 3)。このことは、スナネズミが砂漠の植物の根や種を摂食するとされている<sup>30</sup>) ように、これらの齧歯類がマウスやラットと違った食性をもつことと関係していると考えられた。

以上のように、ヒトにおいても胃 ADH の活性が低いクラス IV 欠損の例が報告されている<sup>10</sup>) ことから、胃 ADH アイソザイムのアルコール代謝および栄養代謝における役割を研究するための動物モデルとして、スナネズミ (およびモルモット) は有用と思われる。

## 要 約

スナネズミの肝と胃における各クラスの ADH アイソザイムの存在ならびにそれら組織における ADH 活性をマウス、ラット、モルモット等の齧歯類と比較検討した。

スナネズミは、肝においては、電気泳動により 3 本の ADH バンド (A, B, C) が検出された。陰極側のバンド A は低濃度エタノールを基質とした場合に濃く染色され、4-methylpyrazole で強く阻害されたことから、クラス I と同定された。陽極側のバンド C はヘキセノールに対して強い活性を示し、エタノールを基質とした場合 2.5 M まで活性が飽和せず、4-methylpyrazole により阻害されないことより、クラス III と同定された。クラス I とクラス III の間にみられたバンド B は、肝に存在することおよび I と III の中間の酵素的性質を有することより、クラス II と同定された。胃においても 2 本のバンド (D, E) が検出された。陰極側のバンド D は、胃に特異的であること、エタノール 1 M で最大活性を示したこと、また 4-methylpyrazole による阻害感受性が肝のクラス I ADH より低いことより、クラス IV と同定された。陽極側のバンド E は肝のバンド C と同様の基質特異性および 4-methylpyrazole による阻害感受性および移動度より、クラス III と同定された。以上のように、スナネズミの ADH アイソザイムシステムは他の齧歯類と同様であった。

スナネズミの肝における ADH 活性は、マウスやラットと同様、15 mM エタノールおよび 5 mM ヘキセノールのいずれの基質でもモルモットより有意に高かった。一方、スナネズミの胃 ADH 活性は、いずれの基質でもモルモットと同様、マウスおよびラットに比べ著しく低かった。また、肝 ADH はいずれの種においても、15 mM 以上のエタノール濃度では活性の低下がみられたが、胃 ADH 活性はマウスやラットにおいては逆に上昇し、0.25 M 以上になると逆転し、肝の活性より高くなった。このことは、胃が摂取された高濃度のアルコールを代謝する場として重要であると考えられた。一方、スナネズミおよびモルモットにおける胃 ADH 活性は、高濃度エタノールでも有意な活性の上昇はみられず、低値のままであった。したがって、これらの動物種のアルコール代謝における胃の役割は小さいと考えられた。さらに、動物種間における各 ADH アイソザイム活性の相違は、とくに胃 ADH のヘキセノールに対する活性で著しく、各動物種の食性との関連が示唆された。

## 文 献

- 1) Strydom, D.J. and Vallee, B.L.: *Anal. Biochem.*, 123, 422 (1982)



- 2) Vallee, B.L. and Bazzone, T.J. : *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.*, **8**, 219 (1983)
- 3) Stephen, P.F., Miller, P., Giri, R. and Goldman, D. : *Prep. Biochem.*, **19**, 129 (1989)
- 4) Haseba, T., Sato, S., Ishizaki, M., Yamamoto, I., Kurosu, M. and Watanabe, T. : *Biomed. Res.*, **12**, 199 (1991)
- 5) Haseba, T., Yamamoto, I., Kamii, H., Ohno, Y. and Watanabe, T. : *Biochem. Genet.*, **33**, 349 (1995)
- 6) Parés, X., Moreno, A., Caderlund, E., Höög, J.O. and Jörnball, J. : *FEBS Lett.*, **277**, 115 (1990)
- 7) Julkunen, R.J.K., Di Padva, C. and Lieber, C.S. : *Life Sci.*, **37**, 567 (1985)
- 8) 大畑 充, 山内眞義, 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 洵, 亀田治男 : アルコール代謝と肝, **9**, 18 (1990)
- 9) Moreno, A. and Parés, X. : *J. Biol. Chem.*, **266**, 1128 (1991)
- 10) Baraona, E., Yokoyama, A., Ishii, H., Munoz, R.H., Tagaki, T., Tsuchiya, M. and Lieber, C.S. : *Life Sci.*, **49**, 1929 (1991)
- 11) アルコール医学生物学研究会(編) : アルコールと医学生物学, Vol. 14, 38 (1994), 東洋書店 (東京)
- 12) Parízek, R., Kovár, J. and Skursky, L. : *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **46**, 798 (1981)
- 13) Talbot, B.G., Qureshi, A.A., Cohen, R. and Thirion, J.P. : *Biochem. Genet.*, **19**, 813 (1981)
- 14) Seeley, T.L., Mather, P.B. and Holmes, R.S. : *Comp. Biochem. Physiol.*, **78**, 131 (1984)
- 15) Bosron, W.F., Gaither, J.W. and Magnes, L.J. : *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **9**, 228 (1985)
- 16) Dafeldecker, W.P., Liang, S.J. and Vallee, B.L. : *Biochemistry*, **24**, 6474 (1985)
- 17) Burnett, K.G. and Felder, M.R. : *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 125 (1980)
- 18) 佐藤徳光 : 動物実験の基本, 228 (1986), 西村書店 (東京)
- 19) 荒川泰行, 大久保仁 : 医学のあゆみ, 154, 859 (1990)
- 20) Alger, M.E., Seeley, T.L. and Holmes, S.R. : *Eur. J. Biochem.*, **137**, 139 (1983)
- 21) Juliá, P., Farrés, J. and Parés, X. : *Eur. J. Biochem.*, **162**, 179 (1987)
- 22) Wing-Ming Keung and Wing-Ping Fong : *Comp. Biochem. Physiol.*, **89B**, 85 (1988)
- 23) Jonson, J.A. and Lott, J.A. : *Clin. Chem.*, **24**, 1931 (1978)
- 24) 日本生化学会(編) : タンパク質の化学 I, 256 (1976), 東京化学同人 (東京)
- 25) Videla, L., Flattery, K.V., Sellers, E.A. and Israel, Y. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **192**, 575 (1975)
- 26) Haseba, T., Hirakawa, K., Tomita, Y. and Watanabe, T. : Electrophoresis '83, 393 (1984), Walter de Gruyter & Co. (Berlin, New York)
- 27) Haseba, T. : *Jpn. J. Alcohol Stud. Drug Depend.*, **20**, 333 (1985)
- 28) Parés, X. and Moreno, A. : *J. Biol. Chem.*, **266**, 1128 (1991)
- 29) 藤原公策, 前島一淑, 宮脇宏彰, 森脇和郎, 澤崎 坦, 横山 昭 : 実験動物学事典, 227 (1989), 朝倉書店 (東京)
- 30) Eggleton, M.C. : *J. Physiol.*, **101**, 172 (1942)

(1995年11月30日受理)