



Flux of the L-serine metabolism in rabbit, human, and dog livers-Substantial contributions of both mitochondrial and peroxisomal serine : pyruvate / alanine: glyoxylate aminotransferase

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 薛, 海暉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1170

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 317号	学位授与年月日	平成12年 3月27日
氏 名	薛 海 暉		
論文題目	Flux of the L – serine metabolism in rabbit, human, and dog livers – Substantial contributions of both mitochondrial and peroxisomal serine : pyruvate / alanine : glyoxylate aminotransferase (ウサギ、ヒトおよびイヌ肝臓におけるセリン代謝の流れ—セリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素はミトコンドリアに存在しようとペルオキシソームに局在しようと実質的にセリン代謝に関与する)		

博士(医学) 薛 海 暉

論文題目

Flux of the L-serine metabolism in rabbit, human, and dog livers—Substantial contributions of both mitochondrial and peroxisomal serine : pyruvate / alanine : glyoxylate aminotransferase

(ウサギ、ヒトおよびイヌ肝臓におけるセリン代謝の流れ—セリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素はミトコンドリアに存在しようとペルオキシソームに局在しようと実質的にセリン代謝に関与する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

肝臓のセリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素(SPT/AGT)はSPT活性とAGT活性を持ち、また草食動物とヒトではペルオキシソーム、肉食動物では大部分がミトコンドリア、齧歯類ではこの両方のオルガネラというように動物種によりその食習性に基づいて異なる細胞内部位に局在する。原発性高尿酸尿素1型ではSPT/AGTの欠損のため尿酸過剰生産が起ることから、ペルオキシソームのSPT/AGTの役割の一つは同オルガネラでグリコール酸(植物における光呼吸の中間体)から生産されるグリオキシル酸の代謝(AGT活性)であることが明らかである。一方、本酵素はL-セリンに働く唯一のアミノ転移酵素(SPT活性)であり、セリン代謝への関与も推定されていた。しかし、それぞれのオルガネラのSPT/AGTが実質的にセリン代謝に関与しているのか否か、どれだけ貢献しているのかは不明であった。

肝臓におけるセリン代謝経路には、SPT/AGTに始まる経路以外に、セリンデヒドラターゼ(SDH)経路とセリンヒドロキシメチル転移酵素(SHMT)－グリシン開裂酵素(GCS)経路がある。本研究では、SPT/AGTの種特異的なオルガネラ局在の生理的意義を解明するために、ラットを用いて確立した研究方法を用い、草食動物、肉食動物の代表として選んだウサギ、イヌ、およびヒトの肝臓におけるセリン代謝へのSPT/AGTの関与を定量的に査定し、SDH経路、SHMT－GCS経路によるセリンの代謝量と比較した。

[方法]

1. *In vitro*での実験 ——— 再構成細胞質画分(可溶性画分と600xg－25,000xg間の沈殿の混合液)あるいは可溶性画分をL-[1-¹⁴C]Serおよび非標識L-Serとインキュベートし、個々の代謝経路によるセリン代謝量をそれぞれの産物を測定することで査定した。SDH経路の査定には可溶性画分によるピルビン酸生成量を、SPT/AGT経路の査定には再構成細胞質画分によるヒドロキシピルビン酸(OH-pyr)蓄積量とピルビン酸添加による¹⁴CO₂生成量の増加を、SHMT－GCS経路の査定には再構成細胞質画分によるグリシン蓄積量とピルビン酸非存在下での¹⁴CO₂生成量を用いた。
2. *In vivo*での実験 ——— L-[3-³H]Serからの糖新生がピルビン酸を経由する時(SDH経路)には³Hはフマラーゼによる水との交換で大部分除かれるが、OH-pyrを経由する時(SPT/AGT経路)にはほぼそのままグルコースに取り込まれるという原理に基づきセリンからの糖新生へのSPT/AGTとSDHの関与を査定した。

〔結果〕

1. *In vitro*系での実験 ———— ウサギ、ヒト、イヌのいずれの肝臓においても、セリン代謝へのSDHの関与は検出感度以下であり、生理的に近い条件(L-セリンとピルビン酸の初濃度: 1 mMと0.25mM、pH7.5)でのセリン代謝へのSPT/AGT経路とGCS経路の関与はウサギでは~96%と~4%、ヒトでは~88%と~12%、イヌでは~57%と~43%と査定された。
2. *In vivo*のウサギ肝臓におけるセリンからの糖新生へのSPT/AGTとSDHの関与の査定 ———— 48時間絶食させたウサギの門脈にL-[3-³H, ¹⁴C]Ser、D-[³H, ¹⁴C]glycerate、L-[³H, ¹⁴C]lactateをそれぞれ投与し、15分後に肝臓から単離したグルコースの³H/¹⁴C比を測定した。その結果、[³H, ¹⁴C]Ser由来のグルコースの³H/¹⁴C比はD-[³H, ¹⁴C]glycerate由来の³H/¹⁴C比よりやや低く、L-[³H, ¹⁴C]lactate由来の³H/¹⁴C比より高いという結果が得られ、比列配分からウサギ肝臓におけるセリンからの糖新生の約90%はSPT/AGT経路を経由していると計算された。

〔結論ならびに考察〕

本研究の結果、肝臓におけるセリン代謝のパターンが動物種により著しく異なることが明かになった。ラットではSDHがセリン代謝に関与する主な酵素であったが、ウサギとヒトではSPT/AGT、イヌではSPT/AGTとGCSがセリン・グリシンプールの主な“metabolic exit”である。したがって、SPT/AGTはミトコンドリア、ペルオキシソームのいずれに存在する場合にもセリン代謝に関与し、ペルオキシソームのSPT/AGTはグリオキシル酸代謝とセリン代謝において二役を演じていることになる。肉食動物でSPT/AGTがミトコンドリアに存在することの必然性は現時点では推測の域を出ないが、グリオキシル酸はヒドロキシプロリンの代謝でも生産され、生成部位はおそらくミトコンドリアであることや動物の総蛋白質の約30%を占めるコラーゲンの13%(w/w)がヒドロキシプロリンであることを考慮するとミトコンドリアのSPT/AGTもグリオキシル酸代謝とセリン代謝の二役を演じている可能性がある。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の肝臓におけるセリン代謝経路には、1)セリン:ピルビン酸/アラニン:グリオキシル酸アミノ転移酵素(SPT/AGT)経路、2)セリンデヒドラターゼ(SDH)経路、3)セリンヒドロキシメチル転移酵素(SHMT)-グリシン開裂酵素(GCS)経路がある。SPT/AGTは動物種の食習性により細胞内局在が異なること、またSDH活性は動物種の体表面積に反比例して極度に減少することにより、セリン代謝のパターンは動物種により異なることが推察される。申請者らは、SPT/AGTがペルオキシソームに局在するヒトと草食動物としてのウサギ、ミトコンドリアに局在する肉食動物としてのイヌの肝臓におけるセリン代謝へのSPT/AGT、SDH、SHMT-GCS経路の関与を定量的に比較検討した。

方法としては、L-[1-¹⁴C]Serと非標識L-Serを用い、(1)SDH経路の査定では肝臓可溶性画分と反応させ、ピルビン酸生成量を、(2)SPT/AGT経路の査定では再構成細胞質画分と反応させ、ヒドロキシピルビン酸(OH-pyr)蓄積量とピルビン酸添加による¹⁴CO₂生成量の増加を、(3)SHMT-GCS経路の査定では再構成細胞質画分によるグリシンの蓄積量と¹⁴CO₂生成量を測定した。また、(4)ウサギの門脈にL-[3-³H, ¹⁴C]Ser、D-[³H, ¹⁴C]glycetate、L-[³H, ¹⁴C]lactateを各々投与し、15分後に肝臓から単離したグルコースの³H/¹⁴C比を測定することにより、セリンからの糖新生へのSPT/AGTとSDHの関与を検討した。得られた主な結果は以下の通りである。

(1)SDH経路：ウサギ、ヒト、イヌの肝臓におけるセリン代謝へのSDHの関与は検出感度以下であった。(2)SPT/AGT経路と(3)SHMT-GCS経路のセリン代謝への関与は、L-セリンとピルビン酸の初濃度が生理的条件下でウサギでは各々、～96%と～4%、ヒトでは～88%と～12%、イヌでは～57%と～43%であった。(4)In vivoのウサギ肝臓におけるセリンからの糖新生へのSPT/AGTとSDHの関与の検討では、L-[3-³H, ¹⁴C]Ser由来のグルコースの³H/¹⁴C比とD-[³H, ¹⁴C]glycerate、およびL-[³H, ¹⁴C]lactate由来の³H/¹⁴C比を比べることにより、約90%がSPT/AGT経路を経由していることが判明した。以上より、申請者は肝臓におけるセリン代謝のパターンは動物種により著しく異なることを示した。すなわち、ラットではSDHが主にセリン代謝に関与するが、ウサギとヒトではSPT/AGT、イヌではSPT/AGTとSHMT-GCSがこれに関与することを明らかにした。このことにより、SPT/AGTはミトコンドリア、ペルオキシソームのいずれに局在する場合もセリン代謝に関与することを示した。さらに、原発性高尿酸血症1型の研究から、ペルオキシソームのSPT/AGTはグリオキシル酸代謝にも関与することが知られているので、少なくともペルオキシソームに局在する場合は、セリン代謝とグリオキシル酸代謝の二役を演ずることを示唆した。

審査委員会では、詳細な研究により、肝臓におけるセリン代謝のパターンが動物種により異なることを初めて明らかにした点、およびSPT/AGTは細胞内局在に拘わらずセリン代謝に関与することを示し、ペルオキシソームのSPT/AGTがセリン代謝とグリオキシル酸代謝の二役を演ずる可能性を示唆した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) 研究に用いた動物は全て絶食状態にしたのか
- 2) 使用したSDHに対する抗体はラットに特異性を示すか。
- 3) 抗体によるSDHの枯渇法は
- 4) SPT/AGT経路の査定でピルビン酸の添加量を増加すると¹⁴CO₂生成量がプラトーになるのは何故か
- 5) SPT/AGT経路の査定でイヌでは添加ピルビン酸量に対して、S字型曲線の反応を示すのは何故か
- 6) 検討した酵素活性は全て肝実質細胞由来か
- 7) ³H/¹⁴C二重標識の方法論について
- 8) ミトコンドリアとペルオキシソームの分離は可能か
- 9) L-セリンからの糖新生にはSDHとSPT/AGTのみが関与するのか
- 10) セリンとグリシンの相互変換におけるcSHMTとmSHMTの役割について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 小 出 幸 夫

副査 菅 野 剛 史 副査 宮 嶋 裕 明