

リンゴ酸脱水素酵素のアイソザイムに関する研究

第 1 編

ヒト各種臓器のリンゴ酸脱水素酵素活性及びアイソザイムについて

岡山大学医学部平木内科教室（主任：平木 潔教授）

大学院学生 高 安 正 雄

〔昭和42年 3月28日受稿〕

内 容 目 次

第1章 緒 言

第2章 実験材料並びに実験方法

第1節 実験材料

第2節 実験方法

I 組織 MDH 活性及びアイソザイム測定法

1) 組織抽出液の作製

2) 組織 MDH 活性の測定法

3) 組織 MDH アイソザイムの測定法

II MDH アイソザイムの細胞内局在性

III PH の MDH アイソザイムに及ぼす影響

IV 染色液基質濃度の MDH アイソザイムに及ぼす影響

V PCMB の MDH アイソザイムに対する阻害作用

VI MDH アイソザイムの耐熱性

第3章 実験成績

第1節 各臓器の MDH 活性

第2節 各臓器の MDH アイソザイム

第3節 MDH アイソザイムの細胞内局在性

第4節 PH の MDH アイソザイムに及ぼす影響

第5節 基質濃度の MDH アイソザイムに及ぼす影響

第6節 PCMB の MDH アイソザイムに及ぼす影響

第7節 MDH アイソザイムの耐熱性

第4章 総括並びに考按

第5章 結 語

第1章 緒 言

近年酵素化学の著しい発展によつて約 700 種類の酵素が生化学的に検討され、また臨床的にも既に多数の酵素について診断や治療上の有用性が認められている。特に乳酸脱水素酵素 LDH についてアイソザイムの存在が発見され、その臓器特異性が明らかにされてから酵素に依る診断法も一層の正確さが期待されるようになった。それ以来アイソザイムに関する研究は急速に進展して、現在迄にアイソザイムを有する酵素が相次いで発見され、各方面よりその臨床的应用、存在理由等が追求され多大の成果が挙げられている。

ここにいうアイソザイムとは各組織や血清に分布する酵素で、その作用は同一であるが化学的免疫的または電気泳動的に区別される数種の酵素に対して与えられた概念である。

リンゴ酸脱水素酵素（以下 MDH と略す）のアイソザイムについては、1958年 Vesell ES & Bearn²⁾の報告以来主として生化学者に依り研究が進められ、種々の知見が得られてきているが未だ臨床的应用を目的とした詳細な研究は見当らない。茲において、今回ヒトの組織 MDH とそのアイソザイムについて基礎的並びに臨床的に2~3の検索を行い、興味ある知見が得られたので報告する。

第2章 実験材料並びに実験方法

第1節 実験材料

活性及びアイソザイム測定用には、剖検（死後 5~8 時間）諸臓器の組織片、手術切除胃粘膜及び健康人の新鮮血を使用した。但し病変のある臓器、胃粘膜は使用しなかつた。

アイソザイムの細胞内局在性に関する実験には、死後経過時間の少ない剖検体の、心筋及び肝組織片

を使用した。

第2節 実験方法

I. 組織のMDH活性及びアイソザイム測定法

1) 組織抽出液の作製

組織片は一旦 deep freezer に入れ、凍結させた後取出し、蒸留水数滴を加え、急速に融解させた。これは細胞及びミトコンドリアを破壊し易くするためである。組織片は細片とし湿重量で10%となる様1/4 M 蔗糖液を加え、氷水で冷却しながらテフロンホモジナイザーを用い、5分間、十分にホモジナイズした。この粗抽出液を3000 r. p. m. で15分間遠沈したものの上澄液をMDHの活性、及びアイソザイム測定に供した。

赤血球は、血清を分離した後、3回生理的食塩水で洗滌し、凍結融解を繰り返して溶血させたものを用いた。

2) 組織MDH活性の測定法

活性測定には、島津ベックマン型分光光度計を使用した。基質にオキザロ酢酸(シグマ社製)を用い、1分間にNADH(シグマ社製)の吸光度が0.001減少するときの活性を1単位として、組織湿重量1g当りに換算したものを specific activity とした。

(Wroblewski 単位) 赤血球の場合はヘモグロビン1g当りに換算した。

3) 組織MDHアイソザイムの測定法

アイソザイムの分離には Wieme の寒天ゲル電気泳動法³⁾を用いた。即ち、支持体にはペロナール緩衝液(PH=8.4 イオン強度 $\mu=0.05$)に寒天末を0.8%の割合に溶解したものを、デッキグラス上に2mmの厚さのゲルとしたものを用いた。

このゲルのほぼ中央に幅1mm、深さ1mm溝を切り、濾紙片で水分を十分に吸いおき、組織抽出液を皮内注射針で20滴、注入したものを直流80Vで、1時間泳動した。電気泳動は寒天ゲルを石油エーテルに浸し、氷室中で行った。

アイソザイム発色検出には下記の処方による染色液を使用し、光を遮り、水浴中で、38°C 40分間染色した。

基質染色液組成

- | | |
|--------------------------|----------------|
| (1) リンゴ酸ソーダ(東京化成) | 100 μ M/ml |
| (2) NAD(Sigma) | 0.3mg/ml |
| (3) PMS(Sigma) | 0.2mg/ml |
| (phenazine methosulfate) | |

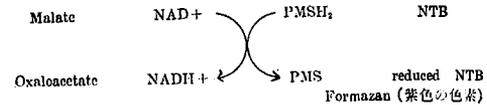
(4) NTB(Sigma) 0.4mg/ml
(nitro tetrazoriumblue)

(5) Na CN. (0.1M) 1ml

(6) phosphate buffer (PH=7.4) 3ml

(7) 蒸留水 全量15mlとする。

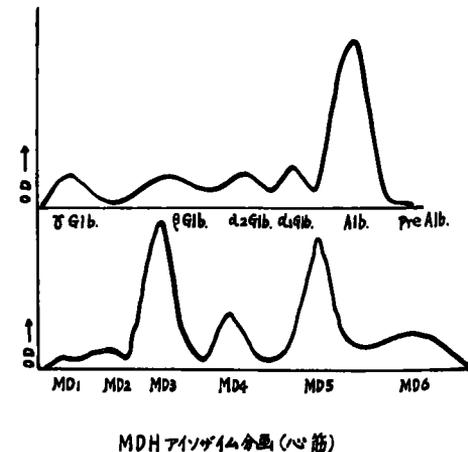
染色原理



染色の完了した寒天ゲルは、PH 4.5 醋酸性液に黄色調がなくなり、透明になるまで浸した。各アイソザイム分画は紫色調を呈した。固定した標本はデッキグラスに載せ乾燥させた後、光電濃度計(東京光電製)で、570m μ の波長のフィルターを用い、各分画の濃度を測定後百分比を計算した。

MDHのアイソザイムは泳動によつて6分画に分けられるが各分画を陰極側に最も早く泳動するものから順に、MD₁, MD₂, MD₃, MD₄, MD₅, MD₆と命名した。各分画を同時に泳動したヒト血清蛋白の各分画と比較したところ、MD₁, MD₂は γ グロブリン、MD₃は β グロブリン、MD₄は α_2 グロブリン、MD₅は α_1 グロブリン~アルブミンに、MD₆はアルブミン~プレアルブミンに夫々相当した。(図1)

図1 正常ヒト血清蛋白とMDHアイソザイムの電気泳動パターンとの比較



II MDHアイソザイムの細胞内局在性

新鮮なヒト心筋、及び肝組織片を細片とし、テフロンホモジナイザーを用い、氷冷下で0.88M蔗糖液に10%のホモジネートとした。このホモジネート10mlを先づ、冷凍下で600G~300Gで10分間遠沈

を行い、核及び未破壊細胞を除き次いで、24000Gで30分間遠沈上清を可溶性分画(細胞質分画)とした。沈渣は0.88M蔗糖液10mlに懸濁し再び24000Gで30分間遠沈した。

本操作を2回繰り返して、得た沈渣のアセトン乾燥粉末より、蒸留水1mlで20分間酵素を抽出し、ミトコンドリア分画とした。この際、アセトン処理をしない沈渣より抽出液を少量作製し、未処理ミトコンドリア分画とした。夫々の分画より既述の方法によりザイモグラムを作製し各分画を定量した。ミトコンドリアの分離法は、Hogeboom & Schneiderの方法⁴⁾に基づき超遠沈機は、日立40P型を使用した。

II PHのMDHアイソザイムに及ぼす影響

前記の基質染色液中のリンゴ酸ソーダ及び磷酸緩衝液を夫々、PH 6.4及びPH 9.0に調製したものを使用し、染色液をPH 6.4及びPH 9.0に補正した。心筋及び腎の組織抽出液(ホモジネート)よりPH 6.4, 9.0の2種の染色液を用いて、各々ザイモグラムを作製し、各分画を定量し、PH 7.4の染色液を用いた場合と比較検討した。

IV 染色液基質濃度のMDHアイソザイムに及ぼす影響

前記処方⁵⁾の基質染色液中、リンゴ酸ソーダを20μM/mlとしたもの、及び500μM/mlとしたもの、2種の染色液を調整し、心筋、腎組織のMDHザイモグラムを作り、各分画を測定し、リンゴ酸ソーダの濃度100μM/mlのものと比較した。

V PCMB (parachlormercuribenzoate) のMDHアイソザイムに対する阻害作用

心筋、腎組織抽出液(ホモジネート)に1mg/dlのPCMBを加え40°C、5時間 incubate したものを、MDHザイモグラムを作製、アイソザイムを定量した。乳酸脱水素酵素のアイソザイモグラムも同時に作製し、参考とした。

VI MDHアイソザイムの耐熱性

心筋、肝組織抽出液(ホモジネート)を50°C 30分間熱処理した後MDHアイソザイモグラムを作製各分画を定量した。

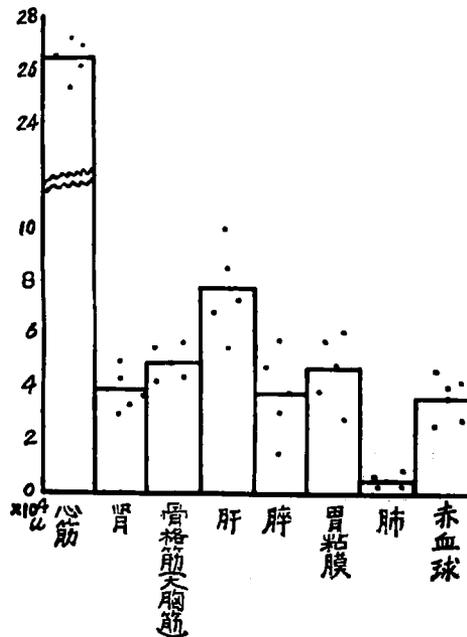
第3章 実験成績

第1節 各臓器のMDH活性

ヒトの臓器MDH活性では、心筋で最も高く、他臓器との間に大きな相違がみられる。次いで活性は肝で高いが、肝では測定に用いた剖検体により活性にかなり変動がみられた。骨筋、腎はこれらに次

いで高く、剖検体による活性の変動はなくて、一定した活性を示した。脾では剖検体により変動が大きい。成熟赤血球にはミトコンドリアが存在せず、TCAサイゲルも存在しないとされているが、比較的高いMDH活性が認められた。(図2)

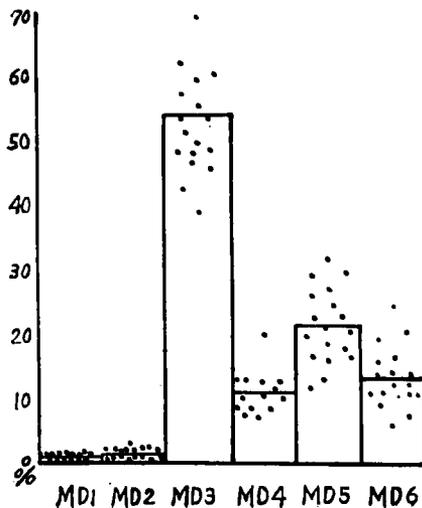
図2 各臓器のMDH活性



第2節 各臓器のMDHアイソザイム

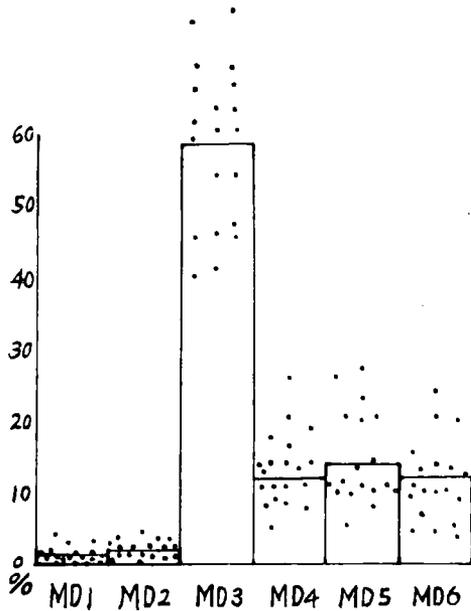
寒天ゲル電気泳動法により、心筋のMDHアイソザイムには6つの分画が認められたが、そのパターンの特徴としてMD₃が著しく高く、次いでMD₆が高い。(図3)

図3 心筋のMDHアイソザイムパターン



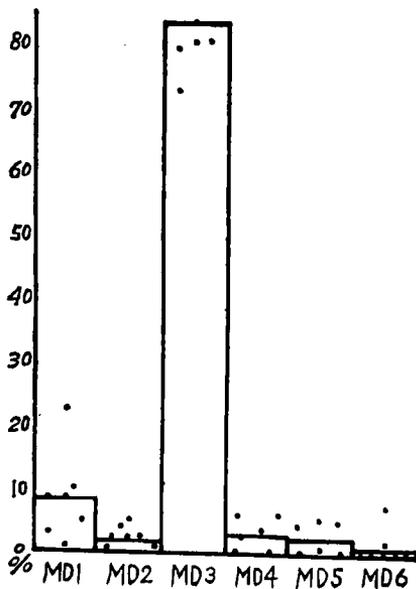
腎でも6分画が認められMD₃が支配的な分画であつたが、比較的心筋に似たパターンが得られた。(図4)

図4 腎のMDH アイソザイムパターン



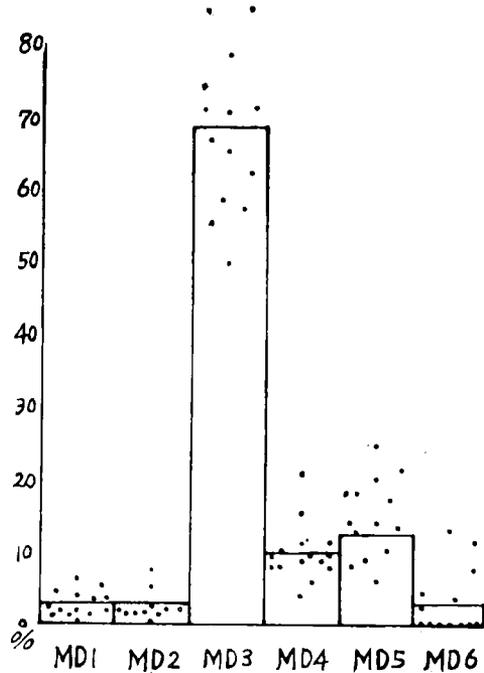
骨格筋は M. pect. maj. と M. rect. abd. について測定を行つたが両者のパターンには有意の差が認められた。即ち M. pect. maj. では多くの場合6分画が認められ、心筋に似たパターンを示すのに対し、M. rect. abd. では、6分画を認めることもあるが、多く

図6 M. rect. abd. のMDH アイソザイムパターン



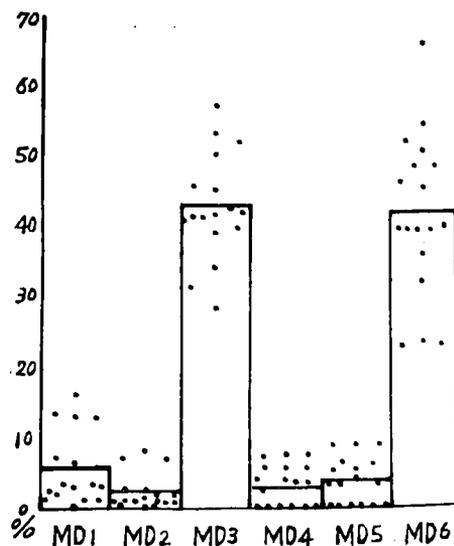
は、MD₄~MD₆が著しく低くて、MD₆を欠くことも多く、MD₁は前者に比べて高い比率を示した。(図5, 6)

図5 M. pect. maj. のMDH アイソザイムパターン



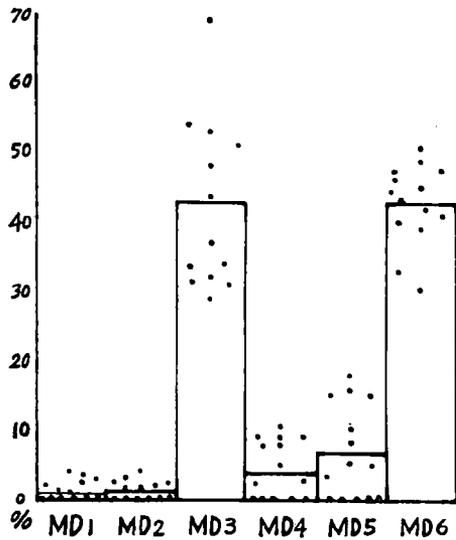
肝では6分画を認めることが多く、MD₆がMD₃とほぼ同程度の比率を示したが、MD₄, MD₅は欠如することもあり、またMD₁は比較的高い比率を示した。(図7)

図7 肝のMDH アイソザイムパターン



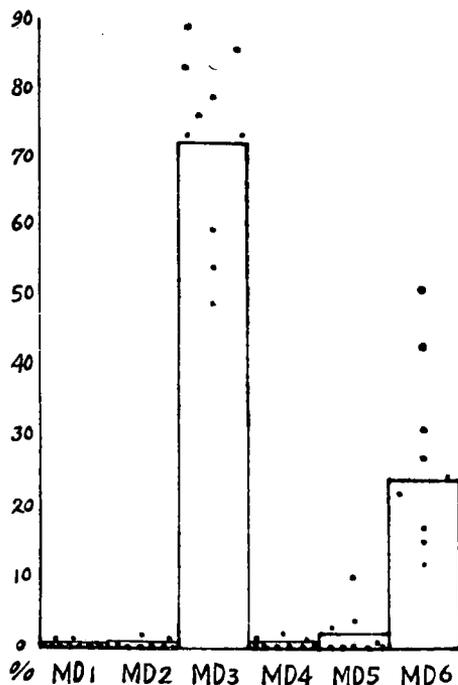
脾では肝と同じく MD₆ と MD₃ が同程度の比率を示すが、14例中7例においては6分画はみられず、2分画 (MD₃ と MD₆) が認められたに過ぎない。(図8)

図8 脾の MDH アイソザイムパターン



胃粘膜は手術切除胃より、部位別に採取して凍結融解することなく、ホモジネートを作製したものを測定に供した。54例中4例に6分画が、認められた

図10 胃粘膜(大彎)の MDH アイソザイムパターン



が、50例では MD₃, MD₆ の2分画が認められたに過ぎない。また胃の部位によるパターンの相違は認められなかつた (図9, 10, 11)。

図9 胃粘膜(小彎)の MDH アイソザイムパターン

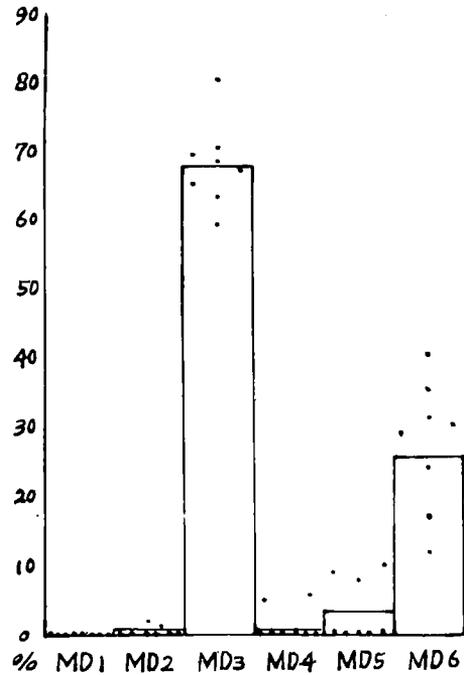


図11 胃粘膜(幽門部)の MDH アイソザイムパターン

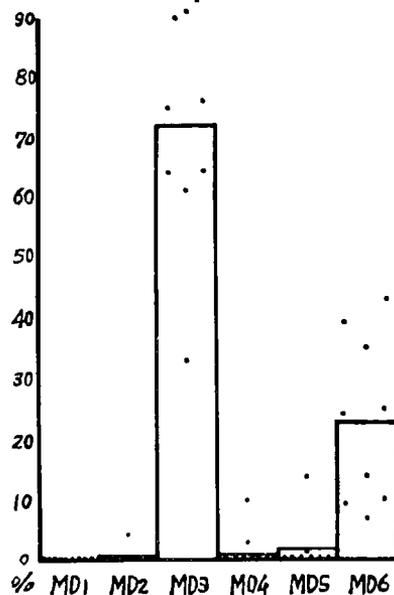
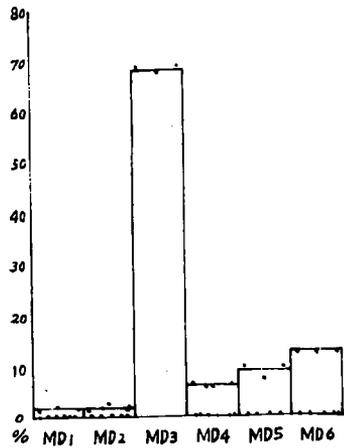


図12 肺の MDH アイソザイムパターン



肺では7例中3例に6分画が認められ4例においては、MD₃が認められたに過ぎなかつた(図12)。

リンパ腺には7例中1例のみに6分画が認められ、6例にはMD₃とMD₆の2分画のみが検出された。MD₆の比率は、心筋、腎、骨骼筋と、肝、脾の中間の値を示した(図13)。

脾では15例中5例に6分画が認められたが、他の例においては、MD₃とMD₆の2分画が認められたに過ぎない(図14)。

赤血球はMD₃、MD₄、MD₆の3分画を有するのみであり、MD₁、MD₂、MD₅の分画を欠く(図15)。

白血病細胞のMDH アイソザイムパターンでは5例全例に6分画が認められ、そのパターンは心筋、

図13 リンパ腺の MDH アイソザイムパターン

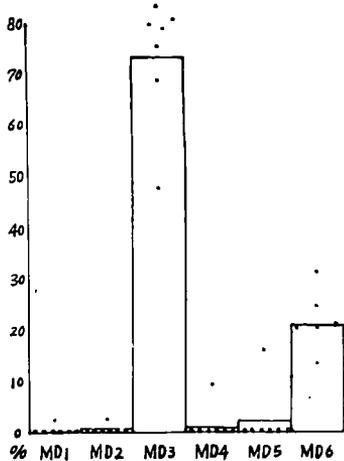


図15 赤血球の MDH アイソザイムパターン

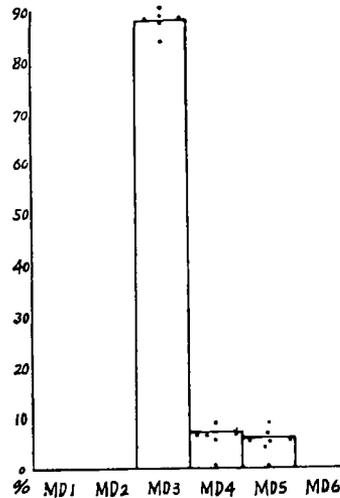


図14 脾の MDH アイソザイムパターン

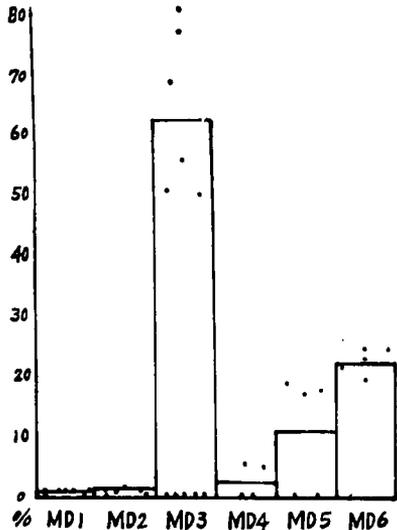
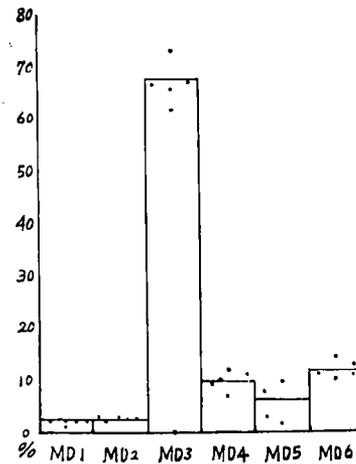


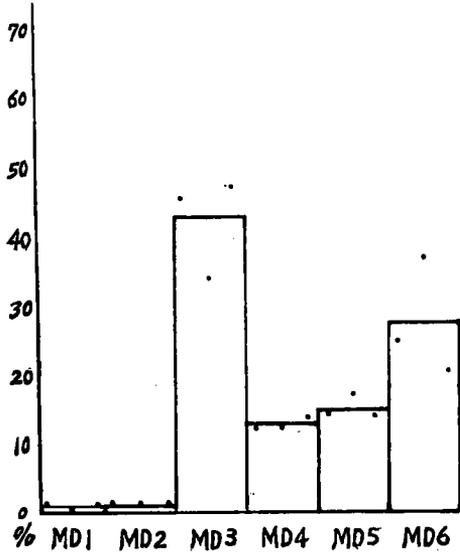
図16 白血病細胞の MDH アイソザイムパターン



腎のそれに似る (図16).

大脳皮質では3例中全例に6分画が検出されたが、MD₆の比率は心筋、腎より高く、肝、脾より低い値を示した (図17).

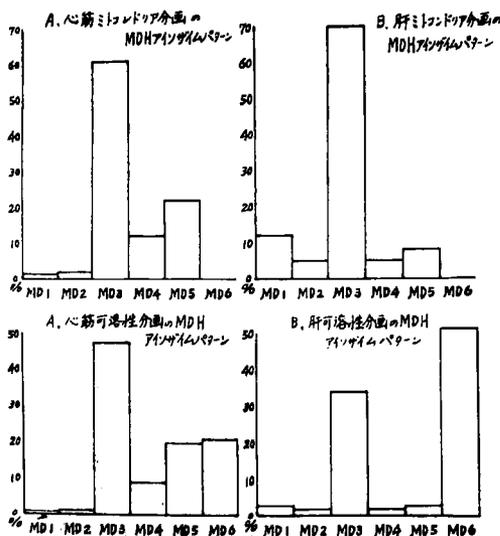
図17 大脳皮質のMDHアイソザイムパターン



第3節 MDHアイソザイムの細胞内局在性

心筋及び肝のミトコンドリア分画のアセトン乾燥粉末抽出液にはMD₁~MD₅が検出されたが、MD₆は欠如した。アセトン処理を行わない、ミトコンドリア分画にはMD₁~MD₆が強いが、MD₆も僅かに認められた。細胞質分画 (可溶性分画) では、両臓

図18 MDHアイソザイムの細胞内局在性



器共6分画が染色され、夫々のパターンはホモジネートのものに類似したが、両者共ややMD₆の比率に上昇がみられた (図18).

第4節 PHのMDHアイソザイムに及ぼす影響

心筋と腎のザイモグラム作製のための染色液のPHを6.4とすると、MD₃とMD₆の2分画が認められたに過ぎない。

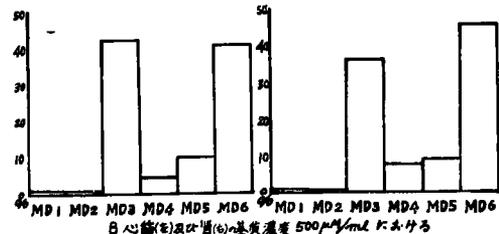
PH 9.0の場合では心筋、腎共に6分画を示しそのパターンにはPH 7.4の場合との間に有意の差が認められなかったが、染色液中に夥しい還元NBT粒子を生じ、紫色に混濁して、標本全体が紫色に着色した。従つて至適PHは7.4附近であると考えられた。

第5節 基質濃度のMDHアイソザイムに及ぼす影響

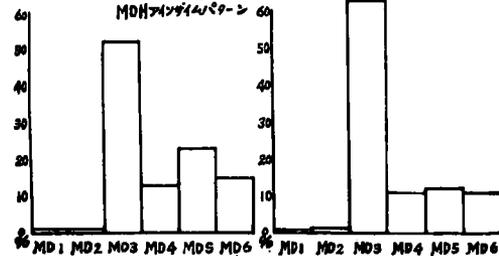
20μM/mlのリンゴ酸ソーダを基質に使用した場合は、100μM/mlの濃度のものを使用したものと比較してMD₁~MD₅特にMD₃の活性が低下しこれに比し、MD₆の活性上昇が観察された。500μM/mlの基質を使用した場合、心筋、腎共そのアイソザイムパターンは100μM/mlの基質を用いた場合の分画とほぼ一致した (図19).

図19 基質濃度のMDHアイソザイムに及ぼす影響

A. 心筋(左)及び腎(右)の基質濃度20μM/mlにおけるMDHアイソザイムパターン



B. 心筋(左)及び腎(右)の基質濃度500μM/mlにおけるMDHアイソザイムパターン

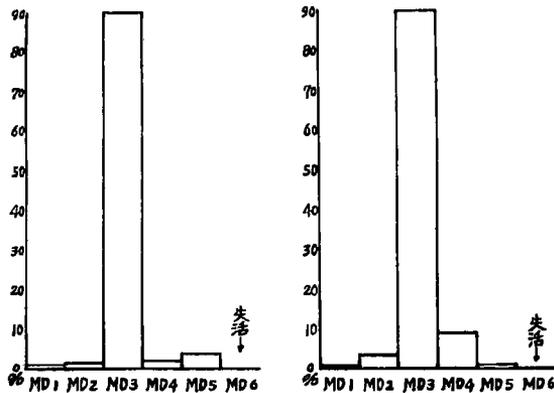


第6節 PCMBのMDHアイソザイムに及ぼす影響

心筋及び腎のホモジネートをPCMBで処理するとMD₁~MD₅の5分画は検出されるが、MD₆は消失し

た。一方対照として測定したLDH アイソザイムは全く検出されなくなつた(図20)。

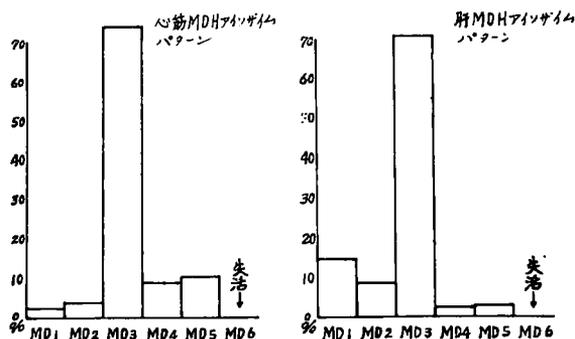
図20 PCMBの心筋(左)及び腎(右)MDH アイソザイムに対する阻害作用



第7節 MDH アイソザイムの耐熱性

心筋及び肝のホモジネートを50°C 30分間熱処理すると、MD₁~MD₅の5分画は検出されるがMD₆は失活した(図21)。

図21 MDH アイソザイムの耐熱性 (50°C30分熱処理)



第4章 総括並びに考按

リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) は Batelli & Stern (1910)⁵⁾ 及び, Thurnberg⁶⁾ により夫々独立に発見され, Wolfe⁷⁾ 等によつて, 1956年ブタ心筋より純粋な非結晶性のもので取り出された。

MDHはNADを補酵素として, *l*-リンゴ酸の脱水素によるオキサロ酢酸の生成を触媒するが, その他メソ酒石酸にも作用して, α -hydroxy dicarboxylic acid dehydrogenaseともいうことが出来るが⁸⁾, *d*-リンゴ酸に対しては全く酵素活性を示さないとされている。

またMDHは従来の報告によると殆んどすべての

臓器に分布し, ことに心筋に多量に含まれ, 肝, 骨格筋, 腎にも多いとされている⁹⁾ が, これは今回著者がヒトの組織について測定した成績とよく一致する。即ち, 心筋に最も高く, 肝, 骨格筋, 胃粘膜, 腎, 脾の順であつたが, 赤血球にも比較的高い活性が認められた。肺, 脾, リンパ腺は著しく低い活性を示した。肝, 脾の活性にバラつきが目立つのは autolysis によるものと考えられる。

MDHのアイソザイムは1958年, Vesell等²⁾により, ヒト血清中に発見された。starch gel electrophoresis により, 単位幅のブロックを取り出し, MDHを抽出して, 各分画の定量を行つた彼の成績によると, 正常人血清では, 3つの分画が認められ, 46%は β Glb., 26%は α_2 Glb., 28%は α_1 Glb. と Alb. の間に存在し, 心筋梗塞のとき血清MDHの活性の上昇と共に5つの分画が出現し, α_1 Peakの活性が, 著明に上昇するといわれる。

また, Lowenthal¹⁰⁾等¹⁾は, starch gel electrophoresis により, 羊の脳には6分画のMDHアイソザイムが存在することを認め, 陰極より3番目の分画に最大活性があり, 全体の2/3を超えることを報告した。

一方MDHには抽出の難易により2つの型のMDHが存在することがDelbrück¹¹⁾等によりラットの肝及び子宮のEpitheliomaを使用して明らかにされ, 夫々細胞質とミトコンドリアに存在することが確かめられて, 細胞質MDHはc-MDH, ミトコンドリアに存在するMDHはm-MDHと呼ばれた。これ等はThorne¹²⁾により更に詳しく検索され, クロマトグラフィー上で明らかに異つた態度を示すことが明らかにされた。

即ち, m-MDHはAmberlite樹脂にc-MDHはDEAEセルローズによつて別々に捕捉され, また電気泳動(PH8.6)によつてもm-MDHは原点にとどまるのに対し, c-MDHは陽極に移動して, 明らかに異つた性質を示すことが認められた。

その後牛心筋, ブタ心筋のc-MDH, m-MDHを精製することにより, 更に詳細に研究が行われた。¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾ これ等の報告によると, m-MDHはc-MDHに比し分子量が大きくて, 約62000であり, 高濃度のリンゴ酸により, 阻害されず, かえつて賦活されるが, オキサロ酢酸の濃度が上昇すると阻害される。電気泳動を行うと, c-MDHより陰極側に泳動され

等電点が小さい。PCMBにより、オキザロ醋酸を基質にするときは完全に阻害される。またm-MDHは、c-MDHに比し、アミノ酸組成で、アルギニン、アスパラギン酸、トリプトファンを多く含み、 $1/2$ シスチンを1分子に12個持つといわれる。

これに対し、c-MDHは、分子量が約52000で結晶として取り出されており¹⁵⁾、高濃度のリンゴ酸により阻害されるが、オキザロ醋酸によつては阻害されない¹⁷⁾。電気泳動により、陽極側に移動し、PCMBによつて、オキザロ醋酸を基質とするときは余り阻害されない。構成アミノ酸では、グリシン、プロリン、スレオニンを多く含み、1分子中に6個の $1/2$ シスチンを有する。

以上の如く、従来MDHアイソザイムは主として生化学者の手で研究され、臨床応用を目的とした研究はきわめて少い。即ち臨床的研究としては、1962年Yakulis¹⁸⁾等により、MDHアイソザイムの分離が寒天ゲル電気泳動法により試みられ、死後8時間の剖検組織のホモジネートについて、4分画のMDHアイソザイムが検出されたが、臓器特異性は認められなかつたという報告をみるにすぎない。

Yakulisはまた、血清MDHアイソザイムについても測定したが一定の傾向を認めていない。

本実験において、寒天ゲル電気泳動法により、ヒト諸臓器のアイソザイムの検索を行つた結果、心筋、腎、骨髄筋、肝、脾、脳、白血球において、大多数の例に、6分画のMDHアイソザイムが認められ、肺、リンパ腺、脾においては2~6分画が、胃では大部分に2分画、少数で6分画が検出された。赤血球では3分画が認められた。

ヒト諸臓器においておおむね6分画のMDHアイソザイムが検出されることを確かめたので続いて、MDHアイソザイムの細胞内局在性について実験を行つた。ミトコンドリア分画には、MD₁~MD₆迄認められ、MD₆を欠いたが、細胞質分画ではMD₆に比し、MD₁~MD₆の濃度が低いが、6分画が検出された。またミトコンドリアをアセトンで処理しないで、アイソザイムパターンを測定すると、6分画が得られた。ミトコンドリアより脱水素酵素を抽出する方法はDrysedale & Lardy¹⁹⁾によるものである。またPCMB阻害をMDHアイソザイムに適用し、MD₁~MD₆迄は阻害されず、MD₆が完全に阻害され、失活することを観察している。MDHアイソザイムの耐熱性についてみると、50°C 30分間の熱処理により、MD₆は失活するが、MD₁~MD₆は活性の低

下は認められるが、失活するには至らなかつた。但し、耐熱性testに使用する酵素標品が純粋なものでなく、組織粗抽出液(crude homogenate)であるので、他の因子の混入も否定は出来ない。以上の結果より、MD₁~MD₆はミトコンドリア分画に由来するもので、上清分画中に認められるMD₁~MD₅はcontaminationによるものと考えて、(後述)MD₁~MD₅をm-MDH、MD₆をc-MDHと結論した。

MD₃のみを認める場合は試料の活性の低い場合であることが確認され、MD₁、MD₂、MD₄、MD₅は活性が低く検出されないかまたは失活したものと考えられる。従つて、m-MDHは活性の高い場合は5分画に分れるものと考えられる。これは、Kaplan²⁰⁾のブタ心筋m-MDHについての所見と一致する。

m-MDHがMD₁~MD₅、c-MDHがMD₆に相当するとすると、超遠沈操作により得た細胞質分画中にm-MDHが多量に検出されるのは如何なる理由によるものであろうか。ホモジネート作製中、あるいは、超遠沈操作中にミトコンドリアが損傷を受け、m-MDHが漏出し、細胞質分画にcontaminationを起す可能性は十分に考えられる。

事実ミトコンドリアはその比重により、light layer ミトコンドリアとheavy layer ミトコンドリアに分けることが出来るが、light layer ミトコンドリアは破壊されたミトコンドリアよりなるといわれている。

ミトコンドリアは更に、electron transfer particle (ETP) 及び、phosphorylating electron transfer particle (PETP) に分解出来るが、このsubcomponentはリンゴ酸を酸化することが出来る²¹⁾。以上の事実よりみても、操作中に漏出したm-MDHにより、細胞質分画が汚染されていると考えるのが妥当であろう。更にアセトン処理を行わないミトコンドリアがc-MDHをもつことはc-MDHがミトコンドリアの表面にlooseに付着しているという推定を許す。

PHの影響に関する実験ではm-MDHとc-MDHの間に差は認められなかつた。PH 6.4の場合、染色時間を延長しても、十分な濃度のザイモグラムが得られず、反応速度の低下のためと考えられ、m-MDHは5分画に分れなかつた。PH 9.4における実験でも各分画の染色が遅延したが、m-MDHは5分画に分れ、各分画の比率はPH 7.4の場合の比率と異ならなかつた。

基質濃度を20 μ M/mlとすると、100 μ M/mlの時と比べ、m-MDHの染色が遅く、反応速度の低下が

enzyme であろう。

同様のことは、他の酵素でも認められる。即ち、ヘキソキナーゼとグルコキナーゼは heterozyyme であり、グルコキナーゼが regulatory enzyme となっている²⁷⁾。このような例は他にも見出されており、これから代謝調節機構の研究が進展するにつれ、ますます多くの事実が明らかにされるであろう。

MDH アイソザイムは LDH アイソザイムに比し確かに臓器特異性に乏しいが、m-MDH と c-MDH に分れ代謝調節機構に関与しているものと考えられるので、詳細な研究を行い、疾患別に検討を重ねると代謝のメカニズムに迫る重要なデータが得られるものと期待される。

m-MDH はミトコンドリアと結合しており、c-MDH は細胞質に存在する等の条件により、きれいなアイソザイモグラムを作製する上に困難な点もあるが、今後の努力で克服されるであろう。

血清 MDH アイソザイムの研究にもこうした困難が予想されるが、細胞の破壊の度合等の目安になり得ることも十分に考えれる。

第5章 結 語

ヒト臓器の MDH 活性及びそのアイソザイムを測定し、各臓器におけるアイソザイムパターンを検索するとともに、各アイソザイムの局在性、PH 基質濃度による変動、PCMB に対する感受性、耐熱性等の諸性質を調べた。

1) 活性は心筋に最も高く、肝、骨格筋、腎、脳の順でこれに次いだ。

2) 臓器の MDH アイソザイムは多くの例に6分

画が検出された。

3) MD₁~MD₅ は m-MDH, MD₆ は c-MDH であることが確認された。

4) m-MDH と、c-MDH の比率によつて、臓器 MDH アイソザイムパターンを3つのグループに分類した。

第1グループ (m-MDH が多く、c-MDH が少い。) 心筋、腎、骨格筋、白血球、赤血球、肺

第2グループ (c-MDH の比率が m-MDH のそれにほぼ等しい。) 肝、脾。

第3グループ (中間グループ) 脳、リンパ腺、脾、胃粘膜。

5) m-MDH はリンゴ酸→オキサロ醋酸を主として触媒し、c-MDH は逆の反応を主として解媒するものと推論された。リンゴ酸を基質とした際 PCMB は c-MDH のみを阻害する。

また 50°C, 30分間の熱処理では c-MDH のみが失活した。

6) MD₅ 及び MD₃ の活性の散布度をみると前者に変動が激しく、c-MDH は regulatory enzyme, m-MDH は constitutive enzyme であるものと推定された。

摺筆するに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わつた恩師平木教授、並びに浅野講師に深甚の謝意を表します。

(本論文の要旨は第12回臨床病理学会総会において発表した。)

(文献後掲)

Studies on Malic Dehydrogenese Isozyme

Part I.

A Study on Malic Dehydrogenese Activities and Isozymes
of Various Human Organs

By

Masao TAKAYASU

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Malic dehydrogenese (MDH) activities and isozymes of various human organs were measured. The assays of isozyme were carried out by means of agar-gel electrophoresis. The highest MDH activity was demonstrated in heart muscle. Liver, skeletal muscle, kidney and brain showed considerably high MDH activities. Six fractions were distinguished in many MDH isozymograms. In order of movility towards the cathod, each MDH isozyme was named MD₁, MD₂...MD₆.

Intracellular distribution of each MDH isozyme was investigated by means of cell fractionation, and MD₁~MD₅ were confirmed mitochondrial, MD₆ cytoplasmic, in origin.

MDH isozyme-patterns of human organs were divided into 3 groups according to the ratio of mitochondrial MDH (m-MDH) and cytoplasmic MDH (c-MDH).

Group I (m-MDH > c-MDH): heart muscle, kidney, skeletal muscle, white blood cell, red blood cell and lung-tissues.

Group II (m-MDH \doteq c-MDH): liver, pancreas.

Group III (This group situates between Group I and Group II): brain, gastric mucosa, and spleen.

Studies on inhibitory effect of p-chlor-mercuri-benzoate (PCMB) on each MDH isozyme and heat stability of each MDH isozyme demonstrated that m-MDH was not inhibited by PCMB and stable to a heat test at 50°C for 30,' when l-malate was used as substrate. It was also observed that m-MDH was activated by a high concentration of l-malate.

According to the standard deviation of MD₆ and MD₃ activites, c-MDH considered regulatory enzyme and m-MDH constitutive enzyme, respectively.
