

糖代謝理解を目的とした グルコース-6-ホスファターゼ活性実験の再改良

山内 有信*

(受付 2021年4月22日)

【要 旨】

管理栄養士国家試験において、「骨格筋では糖新生が行われない」と「グルコース-6-ホスファターゼは糖新生系の律速酵素である」ことは、ほぼ毎年出題される頻出問題である。このことを確認・理解するための実験では、実験直前に実験動物から摘出された生体試料を用いることが望ましいが、管理栄養士養成施設によっては実験動物の飼養施設が整備されていない場合がある。その代替法として、市販食肉を用いることが可能であることをすでに報告している。しかし、実験手技が未熟な学生実験授業では、誤差が大きくなり明確な違いを得ることができないケースが多い。そこで、実験材料として鶏もも肉から脂質の少ない鶏むね肉への変更や、グルコースの添加量を増量してより実際に近づけるなどの改良を行った。その結果、学生が実施した結果の誤差の圧縮がみられ、より明確な酵素活性値の比較が可能となった。

【序 論】

栄養素のうち、糖質、脂質、たんぱく質は三大栄養素という区分名の他に、エネルギー産生材料になることからエネルギー源（熱量素）とも呼ばれる。エネルギー源は共通した異化（エネルギー産生）経路を持ち、その中心経路となるのが糖質の異化経路である。血液中のグルコースのことを血糖、その濃度を血糖値というが、消化管から吸収されたグルコース以外の糖質は、そのほとんどが肝臓においてグルコースに変換されて血糖として放出され、各組織細胞に取り込まれてエネルギー利用される。また、肝臓や筋肉においては、エネルギー産生のためのグルコース利用のためのグルコース需要に対して、食後血糖値が上昇している場合などグルコース供給が十分な場合には、肝臓や筋組織においてグルコースを連結させてグリコーゲンとして貯蔵される¹⁾。しかし、脳組織では脂肪酸が血液脳関門を通過できないことから原則としてグルコースのみをエネルギー源としている¹⁾。また嫌気的環境下にある網膜細胞や腎髄質、ミトコンドリアを持たない赤血球など解糖系によるエネルギー産生に頼っ

* 広島修道大学健康科学部健康栄養学科

ている組織においては、グリコーゲンも貯蔵していないことから、筋組織のようにグリコーゲンを分解して直接異化経路に合流させることはできないために血中から直接血糖を取り込む必要がある¹⁾。そのため、血糖値はある一定のレベルで維持される必要がある。この血糖値を一定レベルに維持するための方法として、糖以外の物質をグルコースに変換する糖新生が備わっている^{1,2)}。

解糖系には3か所の不可逆的な反応が存在するが、糖新生系はその反応部分をバイパスすること以外はほぼ解糖系の逆反応経路で進行する¹⁾。したがって、図1に示すように必ずグルコース6-リン酸（以後“G6P”とする）からグルコースに変換する必要がある。G6Pの6位の炭素骨格に結合しているリン酸基を脱リン酸化するためには、グルコース-6-ホスファターゼ（以後“G6Pase”とする）という酵素が必要であるが、G6Paseは肝臓に存在するものの筋組織には存在していない。したがって、筋組織では糖新生は行われないうこととなる。このことについては、表1に示す通り、管理栄養士国家試験において2020年3月に実施された第34回だけでなく過去10年間で毎年出題される内容であるため、生化学および基礎栄養学の講義において、必ず何度か重ねて触れるべき内容であるといえる。

管理栄養士の職務は、人々の健康の維持・増進、傷病からの回復のために食事（栄養）の分野からアプローチするものである。そのため、とくに栄養士・管理栄養士養成の学生は、食物（栄養）と健康の関係を、栄養素の体内代謝を通して理解しなくてはならない。したがって、講義で学んだ内容に関することを実際に実験で再現することは、知識定着を図るうえで効果的であることを踏まえると、生化学や基礎栄養学（栄養生理学）の実験授業にはできる限り栄養素代謝を理解するための内容を取り上げることが望ましい。また、傷病者への栄養ケア・マネジメントを行うためには、臨床的要素、例えば疾患モデル実験を組み込むことも望まれる。この場合、ほとんどヒトを対象とした実験は不可能であることから実験動物に肩

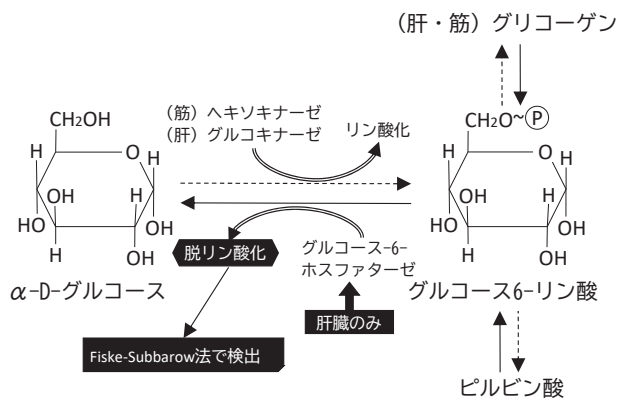


図1. 解糖系, グリコーゲン合成・分解, 糖新生系の概要

表1. 管理栄養士国家試験における肝臓と筋肉における糖新生に関する出題状況

試験回	出題分野 (科目)	選択肢の文章
第25回	基礎栄養	「食後には、肝臓におけるグルコースの利用が増大する。」
第26回	基礎栄養	「筋肉グリコーゲンは、グルコースとなって血中に放出される。」
	基礎栄養	「筋肉は、糖新生を行わない。」「肝臓のグルコース利用は、血糖値の影響を受けない。」
第27回	生化学	「グルコース-6-ホスファターゼは、解糖系糖新生系の律速酵素である。」
第28回	基礎栄養	「筋肉グリコーゲンは、脳のエネルギー源として利用されない。」
	生化学	「肝臓では、グルコース6-リン酸からグルコースが生成される。」
第29回	基礎栄養	「筋肉グリコーゲンは、分解されてグルコースにならない。」
	生化学	「肝臓のグリコーゲンは、血糖値の維持に利用される。」「糖新生は、筋肉で行われない。」
第30回	基礎栄養	「筋肉グリコーゲンは、血糖維持に利用されない。」
第31回	生化学	「グルコース-6-ホスファターゼは、筋肉に存在するしない。」
第32回	生化学	「筋肉は、糖新生を行わない。」
第33回	基礎栄養	「骨格筋は、グルコース6-リン酸からグルコースを生成するできない。」
第34回	基礎栄養	「筋肉グリコーゲンは、血糖維持に利用されない。」

代わりしてもらい必要があることに加え、他の代謝の比較を行う場合は、最短でも2～3週間の飼育が必要となる。栄養士・管理栄養士養成において行うこのような実験は、基本的にラットやマウスのような小動物を使用することから、医学部や薬学部のように中型以上のサイズの実験動物の飼養設備や、感染性微生物の利用が可能な高度な施設・設備は不要である。しかし、とくに医学部・薬学部等を有さない大学における新設管理栄養士養成施設では、一時的な小動物飼養のための施設・設備が備わっていないこともある。そこで、市販食肉を生体試料の代わりに用いて実験動物を使用したような代謝実験ができないかと考え、G6Pase活性の比較を以前に実施した³⁾。この実験では、実験Iとして、鶏レバーと鶏もも肉を用いてG6Pase活性を比較した結果、鶏もも肉におけるG6Pase活性は、鶏レバーと比較して有意に低く、市販食肉においても十分にその活性比較が可能であることを確認した(図2)。しかし、食後高血糖状態を想定した糖新生の律速として、鶏レバー粗酵素液を作成するための生理的食塩水へ5%濃度になるようにグルコースを添加した酵素液においても活性を比較した結果、グルコースを添加していない鶏レバー粗酵素と活性に差はなく、鶏もも肉に対して有意な高値を示した(図

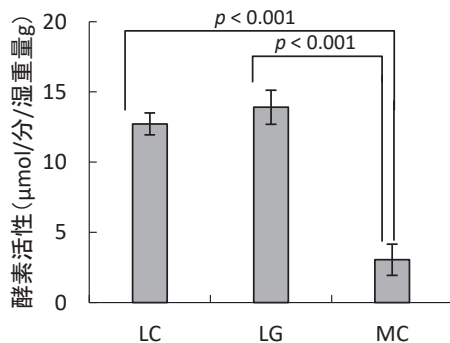


図2. 組織(粗酵素)別酵素活性の比較データは、平均±SD(各4本ずつ) LC:鶏肝臓ホモジネート, LG:鶏肝臓ホモジネート+グルコース(5%), MC:鶏骨格筋(モモ肉)ホモジネート 母平均の差の検定は、一元配置分散分析およびScheffeの多重比較検定で行った。

2)。そこで、添加するグルコース量を増量することを目的として、使用量の少ない粗酵素液ではなくより使用量の多いマレイン酸緩衝液の方に5%濃度になるようにグルコースを添加し、入手都合により豚レバー粗酵素液でグルコース添加の有無で比較した結果、グルコースを添加していないときの活性値 $13.4 \pm 1.1 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{湿重量g}$ に対して、グルコースを添加した時には $8.6 \pm 0.5 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{湿重量g}$ と有意に活性値が低下したことから、十分にG6Paseが糖新生の律速酵素として働くことの確認が可能であると判断した(図3)。

しかし、2018年度に初めて健康科学部健康栄養学科2年次生開講の「栄養生理学実験」において、鶏レバーならびに鶏もも肉を生体試料の代替として実際に実験を行った結果、グルコースをマレイン酸緩衝液に添加していない鶏レバーにおいてもG6Pase活性が全体に若干低く、グルコース添加マレイン酸緩衝液を使用した鶏レバーとの活性の差も、先の報告の豚レバーと豚もも肉よりも小さかった。このことから、先の報告では実験当日に店頭で直接最も新鮮な試料を購入したのに対して、本学の実験授業では数日前に納品された試料を用いたという鮮度の問題、言い換えるとそれぞれの試料中のグリコーゲン等も消費された状態である可能性が考えられた。また、本報告では示していないが、同じ粗酵素液を使用したにもかかわらず班によって数値のバラつきが大きく、とくに2019年度の実験授業における鶏もも肉では平均値の1.5~1.8倍と顕著であった(図4)。これについては、学生の手技の問題もあるが、鶏もも肉で大きかったことについては、脂質が多く学生が粗酵素が溶存した水分の箇所ではなく脂質層も採取した可能性も考えられた。そこで、多少の手技的誤差があってもある程度傾向が揃うようにと考え、マレイン酸緩衝液に添加するグルコースの増量、および筋組織モデルをもも肉からむね肉への変更などの再改良を試みた。

【方 法】

1. マレイン酸緩衝液に添加するグルコースの量の再検討(設定値の検討)

肝臓には、一般的には4%、状況によっては6%以上のグリコーゲンが蓄積されているが、12~18時間の絶食でほぼ枯渇するとされている⁴⁾。なお、マウスにおける実験であるが、初

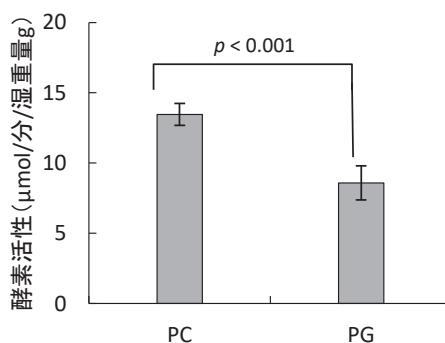


図3. G6Pase活性に及ぼすグルコースの影響
データは、平均 \pm SD(各4本ずつ)
豚肝臓ホモジネートを粗酵素液とし、通常の反応緩衝液(PC)と5%グルコース添加反応緩衝液(PG)で比較した。
母平均の差の検定は、対応のないt検定で行った。

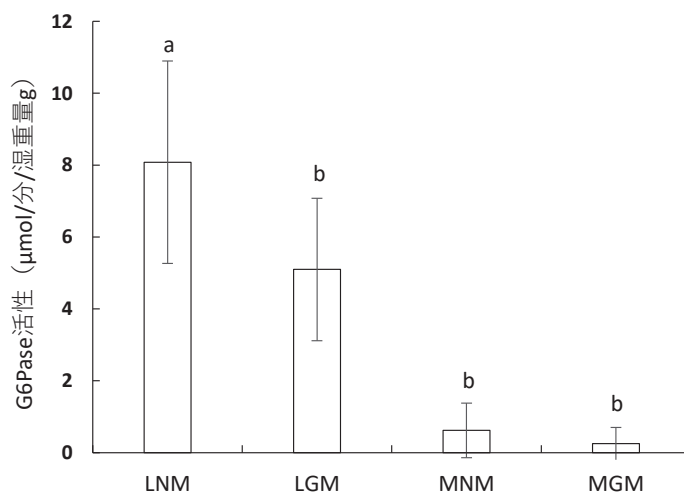


図4. グルコース6-ホスファターゼ活性の比較 (2019年度実験授業)
データは、平均値±SD (各反応液ごとに、反応16本×測定4本)。
粗酵素液は、鶏肝臓または鶏もも肉ホモジネート液。
反応液間の差の検定は、一元配置分散分析、および Scheffe の多重比較検定 (両側検定) で行い、 $p < 0.01$ をもって有意と判定し、同じアルファベットを持たない反応液間に有意な差があるとして表現した。

期肝臓グリコーゲン量約 50 mg/肝湿重量 g のマウスを16時間絶食させた場合、約 5 mg/肝湿重量 g で低下し、通常食を再摂取させたところ再摂取30分後で 20 mg/肝湿重量 g、4時間で約 60 mg/肝湿重量 g に回復したという報告⁵⁾ や、とくに絶食をさせていないラットでの実験において、低たんぱく質食 (高糖質食) 摂取後の肝臓グリコーゲン量が 120 mg/肝湿重量 g、普通食で約 80 mg/肝湿重量 g、高たんぱく質食摂取後で約 60 mg/肝湿重量 g という報告⁶⁾ がある。このグリコーゲン量をグルコースに換算 (換算係数1.11) すると、約 7%~13%となる。

一方、筆者の先行報告³⁾ における G6Pase 活性の反応液中グルコース濃度は、0.2 mL のグルコース 5% 添加マレイン酸を使用した実験 II の場合、後に記すが反応中の液量の合計が 0.5 mL であることから 2% であり、食後想定としてはグルコース量が少ないと考えられる。そこで、添加するグルコース量を 8% 相当に設定すると仮定して逆算し、今回の報告におけるマレイン酸緩衝液へのグルコース添加は、20% 濃度と決定した。

2. 試薬等

1) 基質 (0.1 M G6P)

3.042 g の G6P · 2Na (分子量304.2) を蒸留水に溶解し、100 mL に定容する。

2) マレイン酸緩衝液

マレイン酸 1.16 g を約 80 mL の蒸留水に溶解し、NaOH で pH6.5 に調整後、100 mL に定容する。

3) 20% グルコース添加マレイン酸緩衝液

2.0 g のグルコースを 10 mL のマレイン酸緩衝液に溶解する。

4) 0.01 M EDTA (エチレンジアミン四酢酸: エドト酸 分子量292.25) 液

マレイン酸緩衝液を用いて調整する。なお、EDTA は、アルカリホスファターゼの活性に必要な Mg^{2+} を錯体形成によって除去するために反応液に添加する。

5) 10% トリクロロ酢酸 (10% TCA)

6) 5N 硫酸

7) 2.5% モリブデン酸アンモニウム溶液

8) 2.5% ANSA 還元試薬液

1 g の1,2,4-アミノナフトールスルホン酸、6 g の $NaHSO_4$ 、6 g の $NaSO_4$ を粉碎混合し、遮光してデシケーターで保存する。この粉末 250 mg を実験当日に蒸留水 10 mL に溶解し、マグネットスターラーで攪拌しながら使用直前まで遮光保存する。

9) 0.5 μ mol/L 無機リン酸標準液 (0.5 mM KH_2PO_4)

1.3609 g の KH_2PO_4 (分子量136.09, 純度99%) を蒸留水に溶解し、1 L に定容して 10 mM とする。保存する場合は、この溶液にクロロホルムを数的添加して冷蔵する。使用標準液は、この無機リン酸標準保存液を蒸留水で20倍希釈調整する。

10) 肝粗酵素液 (約10% 肝臓ホモジネート液)

ハサミで細切した湿重量約 1 g の食肉用鶏レバーをホモジナイズ管に秤量し、予め冷却した生理的食塩水10 mL を加えてポッター型ホモジナイザーで肝細胞を粉碎して均質化し、3,000 rpm で10分間の遠心分離処理を行った上清を粗酵素液として使用する。

11) 筋粗酵素液 (約10% 骨格筋ホモジネート液)

ハサミで細切した湿重量約 1 g の食肉用鶏むね肉をホモジナイズ管に秤量し、予め冷却した生理的食塩水 10 mL を加えてポッター型ホモジナイザーで肝細胞を粉碎して均質化し、3,000 rpm で10分間の遠心分離処理を行った上清を粗酵素液として使用する。

3. 手順

①肝粗酵素液および筋粗酵素液を37℃の恒温槽で予備加温する。

②「粗酵素液+緩衝液」の組合せを「肝粗酵素液+マレイン酸緩衝液」(Liver+Normal Maleic anhydride: 以後“LNM”とする), 「肝粗酵素液+グルコース添加マレイン酸緩衝液」(Liver+Glucose added Maleic anhydride: 以後“LGM”とする), 「筋粗酵素液+マレ

イン酸緩衝液」(Muscle + Maleic anhydride：以後“MNM”とする)、「筋粗酵素液+グルコース添加マレイン酸緩衝液」(Muscle + Glucose added Maleic anhydride：以後“MGM”とする)の4通りとし、それぞれについて反応時間0分と反応時間15分で表2の手順に従って基質であるG6Pと反応させ、表2の手順に従って測定用の試料液を作成する。

- ③酵素反応液を3,000 rpmで10分間遠心分離した上清を測定試料液とし、図5の手順に従って遊離したリン酸量を定量する。なお、測定は1反応液ごとに4本とした。

表2. 試験液作成のための酵素反応手順

	反応0分(対照)	反応15分(試験)
基質	0.1 mL	0.1 mL
緩衝液*	0.2 mL	0.2 mL
0.01M EDTA	0.1 mL	0.1 mL
予備加温	氷冷	37°C 5分
冷10% TCA	1.0 mL	-
粗酵素液#	0.1 mL	0.1 mL
反応加温	氷冷	37°C 15分
冷10% TCA	-	1.0 mL
冷却	氷冷 5分	氷冷 5分
蒸留水	3.5 mL	3.5 mL

* マレイン酸緩衝液, またはグルコース添加マレイン酸緩衝液

肝粗酵素液, または筋粗酵素液

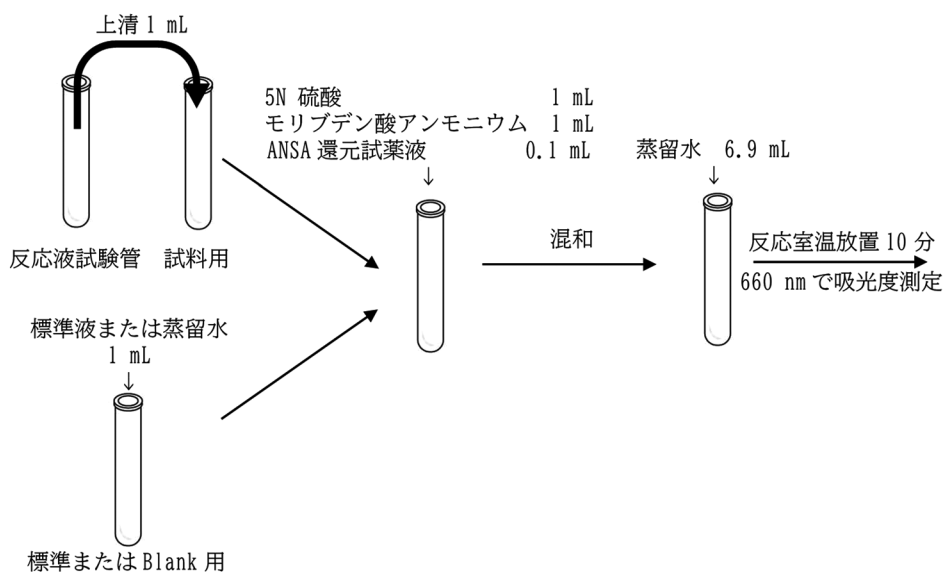


図5. 遊離リン酸量の測定(改良 Fiske-Subbarow 法)

4. データ処理

2020年11月の「栄養生理学実験」における16班の実験データのうち、明らかに操作ミス等によって測定値が信頼できない3班を除いた13班のデータを集約した。なお、吸光度測定値から G6Pase の酵素活性計算は下の式に従って算出した。

$$\begin{aligned}
 & \text{酵素活性} (\mu\text{mol}/\text{分}/\text{g}) \\
 &= \frac{\text{補正試料吸光度} - \text{補正対照平均吸光度}}{\text{補正標準平均吸光度}} \times 0.5 (\text{標準濃度}) \\
 & \times \frac{5 (\text{反応試料液全量})}{1 (\text{測定に供した液量})} \times \frac{20 (\text{初期粗酵素液全量})}{0.1 (\text{使用粗酵素液量}) \times \text{使用組織重量} (\text{g})} \\
 & \times \frac{1}{15 (\text{酵素反応時間})} \\
 &= \frac{\text{補正試料吸光度} - \text{補正対照平均吸光度}}{\text{補正標準平均吸光度}} \times \frac{500}{15 \times \text{使用組織重量} (\text{g})}
 \end{aligned}$$

※補正吸光度は、測定吸光度から Blank 平均吸光度を差し引いた数値。

なお、4種類の酵素と緩衝液の組合せ間の平均値の差の検定は、一元配置分散分析および Scheffe の多重比較検定（両側検定）で行い、 $p < 0.01$ でもって有意と判定し、同じアルファベットを持たない反応液間に有意な差があるとして表現した。

【結 果】

G6Pase の活性を比較した結果、図 6 に示す通り、空腹状態を想定した LNM の活性は $9.34 \pm 1.48 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{肝湿重量 g}$ （平均値 \pm SD）と高く、他のすべてに対して有意に高い活性を示した。次いで、食後を想定した LGM の活性が高く（ $3.35 \pm 1.02 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{肝湿重量 g}$ ）、筋粗酵素を添加した MNM および MGM に対して有意な高値を示した。

なお、LNM および LGM に対して有意な低活性であった MNM と MGM での比較においては、それぞれ $0.68 \pm 0.22 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{筋湿重量 g}$ と $0.39 \pm 0.27 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{筋湿重量 g}$ であり両反応液間に有意な差は認められなかった。

【考 察】

本報告における実験と先の報告³⁾の違いは、筋組織代替として先の報告ではもも肉を使用した、今回の実験では脂質の少ないむね肉を使用していることや、食後想定としてのグル

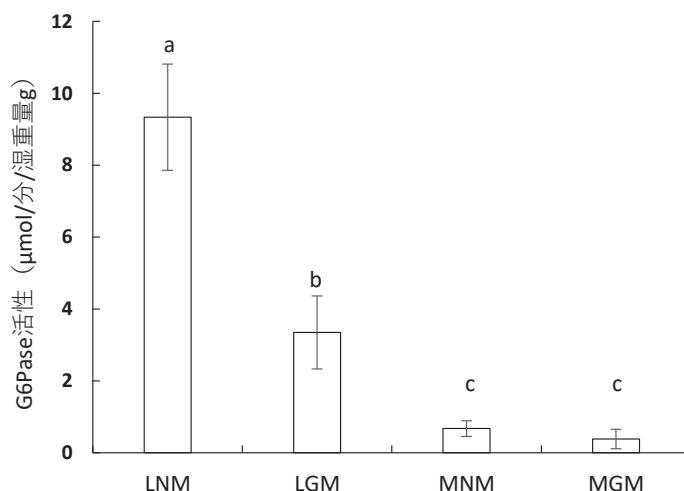


図 6. グルコース6-ホスファターゼ活性の比較

データは、平均値±SD（各反応液ごとに、反応16本×測定4本）。粗酵素液は、鶏肝臓または鶏むね肉。反応液間の差の検定は、一元配置分散分析、および Scheffe の多重比較検定（両側検定）で行い、 $p < 0.01$ でもって有意と判定し、同じアルファベットを持たない反応液間に有意な差があるとして表現した。

表 3. 先行報告研究と本報告での試料ならびにグルコース添加量等の違い

	先行報告	本報告
試料	実験Ⅰ：鶏レバー、鶏もも肉 実験Ⅱ：豚レバー	鶏レバー、 <u>鶏むね肉</u>
試料入手	実験直前（店頭購入）	2～3日事前購入
糖添加方法	実験Ⅰ：肝粗酵素液（5%濃度） 実験Ⅱ：マレイン酸緩衝液（5%濃度）	マレイン酸緩衝液（ <u>20%濃度</u> ）

コース添加の際の代替生体試料が先の報告では豚であったのに対して今回の実験は鶏であること、グルコースの添加量を増量したことなどがある（表3）。また、生体試料の代替として用いた市販食肉が先の報告では実験直前に店頭で最も新しいものを購入して使用したのに対し、今回の実験では数日前に納品されたという鮮度の違いもある。

まず、基本となる空腹状態を想定した時の鶏肝粗酵素液における G6Pase 活性について、先行報告の $12.7 \pm 0.8 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{湿重量 g}$ に比べて本報告では $9.3.1 \pm 1.4 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{湿重量 g}$ とやや低活性であった。このことについては、試料の鮮度違いも否定できないが、平均値に標準偏差の幅を考慮するとさほど差はなく、今回の実験の標準偏差が大きいことから、実験手技的な誤差であると思われる。

次に筋組織としての比較について、先行報告の $3.0 \pm 1.1 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{湿重量 g}$ に対して本報告では $0.6 \pm 0.2 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{湿重量 g}$ と低かった。なお、このことについては、平均値に対する標準偏差の幅から実験手技の問題も十分に考えられる。しかし、図3に示すように、先行報告と同じ鶏もも肉を使用した2019年度の結果の $0.6 \pm 0.8 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{湿重量 g}$ であったことと、試料の入手から実験に供するまでの時間的開きを考慮すると、糖新生が可能な肝臓に比べて糖新生ができない筋組織では、残存していたクレアチンリン酸等の消費が進んだ結果である可能性が高いと思われる。なお、2019年度と2020年度での比較では、実施した学生が異なるため一概には言えないが、肝粗酵素液に比べて筋粗酵素液での G6Pase 活性が顕著に低いという全体的傾向とその活性値も近似である一方で鶏むね肉を使用した2020年度の方が平均値に対する標準偏差の割合が低いことから、脂質層の誤採取の防止が容易であり、標準偏差の圧縮が望めると考えられる。

以上の結果から、今回の実験方法の改良によって、学生の手技による誤差の圧縮が期待できるとともに、テキスト等にも記されているグルコースを添加していないマレイン酸緩衝液における肝粗酵素液と筋粗酵素液における活性比較を通して骨格筋では糖新生が行われないことと、肝粗酵素液でのグルコース添加の有無における活性比較を通して G6Pase が糖新生系の律速酵素であることの確認がより明確になった。

【参 考 文 献】

- 1) 日比野康英：第9章 糖質の代謝，栄養科学イラストレイテッド 生化学 第3版（園田 勝 編），pp. 100-123（2018）羊土社，東京。
- 2) Peter A. Mayes: 20 Gluconeogenesis & the Pentose Phosphate Pathway, Harper's Biochemistry Twenty-first Edition (Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell), pp. 172-179 (1988) Lange Medical Publications, Norwalk.
- 3) 山内有信, 古田 歩, 阿部典子 (2016), 糖新生理解のためのグルコース6-ホスファターゼ活性比較実験の改良, 鈴峯女子短大研究集報 自然科学, 44, 1-12.
- 4) Peter A. Mayes: 19 Metabolism of Glycogen, Harper's Biochemistry Twenty-first Edition (Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell), pp. 165-171 (1988) Lange Medical Publications, Norwalk.
- 5) 三浦進司 (2014) 肝グリコーゲン量の変化による脂肪酸合成酵素発現調節, 公益財団法人三島海雲記念財団 平成26年度 (第52回) 受贈者および研究報告【自然科学部門】, <https://www.mishima-kaiun.or.jp/assist/2551-1.html> (2020年2月18日アクセス)
- 6) 出口佳奈絵, 保手濱由基, 国信清香, 中田麻衣, 佐野尚美, 加藤秀夫, 西田由香 (2011), 肝臓の糖代謝リズムに関する研究 (2) ～食餌蛋白質質量の影響について～, 県立広島大学人間文化学部紀要, 6, 35-43.

Abstract

Re-Improvement of Glucose-6-Phosphatase Activity Experiment for Understanding Glucose Metabolism

Arinobu YAMAUCHI*

In the national examination of registered dietitians, “no gluconeogenesis occurs in skeletal muscle” and “glucose-6-phosphatase is a rate-determining enzyme of the gluconeogenic system” are frequently asked questions almost every year. In experiments to confirm and understand this, it is desirable to use biological samples extracted from laboratory animals immediately before the experiment, but some registered dietitian training facilities do not have laboratory animal breeding facilities. It has already been reported that commercially available meat can be used as an alternative method. However, in student experiment classes where the experimental technique is inexperienced, there are many cases where the error becomes large and a clear difference cannot be obtained. Therefore, as experimental materials, we changed to chicken breast, which has less fat than chicken thigh, and made improvements such as increasing the amount of glucose added to bring it closer to reality. As a result, the error of the result performed by the students was reduced, and it became possible to compare the enzyme activity values more clearly.

* The Department of Health Nutrition, Faculty of Health Sciences, University of the Hiroshima-Shudo