

飢餓状態および糖尿病ラットにおける肝 GSH の代謝回転

成 瀬 明 子

The Turnover of Rat Liver Gultathione under
Starved and Diabetic Conditions

Akiko NARUSE

Received April 30, 1982

緒 言

糖尿病では、糖代謝のみならず、蛋白質、脂質、電解質および水の代謝にまで異常を来す事は良く知られている。殊に窒素平衡は負に傾き、体蛋白質の分解と合成のバランスが、正常から大きく逸脱する。そして、組織の消耗、続いて窒素排出の増大、血中アミノ酸濃度の上昇と云う経過をたどる^{1),2)}。この窒素の排出を、インスリンが抑制する事は、1920年代から知られているが、蛋白の合成・分解系のどの点に作用するのかと云うメカニズムの全容は、現在もまだ明らかにされていない。

哺乳動物肝の蛋白代謝については、streptozotocin 糖尿ラットを用いた E. C. ALBERTSE, P. J. GARLIC らの蛋白合成・分解に関する研究がある³⁻⁶⁾。肝の蛋白合成は、streptozotocin 投与による糖尿病発症1日で、対照群の75%前後に、4日後には、65%に低下する。組織構成蛋白よりも、分泌蛋白であるアルブミンの合成低下が著しく、一方肝蛋白の分解は、発症1日で110%と、正常時より促進されるが、4日後には、65%迄低下する事が明らかにされている。著者らは、肝に特に高濃度(ラットで7~8 mM)に存在する glutathione⁷⁾(以下 GSH と略記)の生理的役割を知る目的で研究を行ない、肝の蛋白合成の消長と GSH の合成分解とが、cysteine の供給を通じて、直接関係している事を示す証拠を得⁸⁾、肝 GSH の主要な役割が cysteine の一時的な貯蔵にあると云う説をたてるに至った⁹⁾。ラット肝 GSH には、代謝回転速度の異なる二つの pool があり、摂食行動を反映して、大きく速やかに増減する比較的 labile な pool が、cysteine の貯蔵型として機能している事も明らかにしている¹⁰⁾。糖尿病発症により蛋白代謝に大きな乱れが生ずるならば、肝 GSH にも、その影響がおよぶ事が予想され、このような条件で、GSH の代謝をしらべる事により、cysteine の貯蔵型としての役割が、より一層明確になることが、期待される。本報では、(1) streptozotocin 投与により誘導した糖尿病ラット、また(2)比較のため絶食(~96時間)したラットを用い、肝 GSH レベルの変化、代謝回転について検討した。

材料および方法

1. 動物および飼育条件

呑龍系雄ラットを用いた。25 °C 空調下, 12時間明暗サイクルで飼育した。水と餌は, 条件を負荷した場合を除き自由に与えた。実験前の動物は, 市販固型飼料 (オリエンタル酵母株式会社製 MF) にて飼育した。実験標準食は, 既報の通り調製した⁹⁾。

糖尿病は, streptozotocin を 0.1 M citrate butter (pH 4.1) に溶解したものを, 65 mg/kg 体重の割合で, 頸静脈より注射して発症させた。対照ラットには, 同一経路により, 等容の生理的食塩水を投与した。

2. 25%肝ホモジェネートの調製

肝 (中葉) 1 g に, 0.15 M KCl 3 ml を加え, motor driven Potter type Teflon-glass homogenizer により磨砕 (10 up and down strokes) し, 25%肝ホモジェネートを得た。

3. 肝酸可溶性画分の調製

肝 (左葉) 1 g に 0.5 N 過塩素酸を 4 ml 加え, 上記と同様の方法で磨砕し, 10,000×g, 10分遠沈した上澄を cysteine, glutathione の定量に用いた。

4. 定 量 法

(a) cysteine ; 3. の可溶性画分について, GAITONDE¹⁰⁾ 法により測定した。

(b) 還元型 glutathione ; 3. の酸可溶性画分について SAVILLE 法¹¹⁾ により求めた非蛋白性 SH 総量から, cysteine 量を差引いた値を, GSH 量とした。TIETZE 法¹²⁾ により得た値とよく一致していた。

(c) 蛋白質 2. のホモジェネートを用いて, 牛血清アルブミンを標準とし, LOWRY 法¹³⁾ により測定した。

(d) 血糖 ヘパリン処理した容器に採取した血液を遠心分離してえた血漿について, 市販キット, Glucomesser (東京臓器化学株式会社製) を用い glucose oxidase 法により定量した。

5. 放射活性の測定

MOOZ と MISTER の方法¹⁴⁾ に準じ, 緩衝液の pH を 4.1 にして 3.8 mA にて, 2 時間 30 分, 滷紙電気泳動を行い, 肝酸抽出液の GSH と cysteine を分離した。両物質の滷紙上の位置は ninhydrin で発色確認後, 滷紙片をはさみで切り分けた。夫々の滷紙片を, scintillator 溶液 (8 g の 2,5-diphenyloxazole, 0.1 g の 1,4 bis [2-(5-phenyloxazolyl)] benzene/1 liter toluene) に浸漬して放射活性を, Tri-Carb・Scintillation spectrometer, Model 3320 (Packard 社製) にて測定した。

6. 試 薬

L-[³⁵S]-Cysteine hydrochloride (40~122 mCi/m mol) Radiochemical Centre, Amersham, U. K. のものを, 日本アイソトープ協会を通じて購入した。

Streptozotocin は, Sigma Chemical 社 (St. Louis Missouri) 製を用いた。

その他の試薬は市販特級品を用いた。

結 果 と 考 察

○飢餓状態における肝 GSH の動向

動物を絶食させると、ホメオスタシス維持のために、ACTH、副腎ホルモン、グルカゴン等のホルモンが、協調的に作動して、飢餓型の代謝への切り替えを行う¹⁵⁾。飢餓初期には、インスリンの分泌が抑制され、血中濃度が低下するため、筋肉からのアミノ酸放出が増加する^{16~18)}。これはアミノ酸とり込み能と蛋白合成能が、いずれもインスリンに依存するためである^{19~21)}。飢餓時の血糖の補給は、糖新生によるが、その糖新生の速度は、血液中の素材の濃度にはほぼ比例する²²⁾。従って主要素材アミノ酸の筋肉からの放出速度に依存する²³⁾。筋肉からのアミノ酸放出は、飢餓の最初の数日間が最高で、その後、飢餓が長期化するにつれて低下し、それに伴って、糖新生も減少する。これは体蛋白質の消耗を、脂肪の動員により、出来るだけ節約する方向へ代謝が変る事を示している。飢餓では、蛋白合成は著明に減少する²⁴⁾。こうしたホメオスタシス維持の方向への代謝の切り替えに際して肝 GSH は、どの様な対応を示すであろうか。成熟前の若いラットを96時間にわたって、絶食させた時、摂食後正常ラット肝で、7~8 $\mu\text{mol/g}$ 肝含まれていた GSH が、絶食24時間で 4 $\mu\text{mol/g}$ 前後に迄急減したが、その後は、飢餓状態の持続にもかかわらず、4 $\mu\text{mol/g}$ 前後の値が保たれていた事を観察している⁸⁾。絶食により体外からの cysteine の供給を断っても、おそらくは、生命維持に必要と考えられる肝 GSH レベルを保つだけの cysteine が、体内でまかなわれた事になる。数日の絶食の後、時に急激に体重が減少した例がみられた。このような動物では、肝 GSH にもまた顕著な減少がみられた。

図1、表1では、飢餓の経過を追って、肝の GSH、蛋白質とともにさらに cysteine のレベルを測定し、三者間の関係を明らかにする事を試みた。肝 GSH は、絶食24時間で、正常時の半量に急減しているが、さらに48時間、96時間と絶食を続けても、これ以下に減少することなく、48時間で増加に転じ、72、96時間と漸増の傾向にある。cysteine 量も動きの中は小さいが、相似た動きを示し、初期の低下の後、プラトーを示す。一方、体重、肝重量は、絶食時間の延長に伴い減少しているので、肝内濃度としては、GSH、cysteine 共に、かなり高くなっている。総蛋白量はこの間減少を示したが、濃度としては、やや増加していた。絶食初期の GSH、cysteine の減少は、この間の cysteine の消費（肝内外）を示していると考えられる。しかし絶食の延長により、体蛋白が分解に傾いた時期には、(1) 蛋白合成に使われるアミノ酸の割合が減少し、cysteine の余剰、次いで肝 GSH の増加となって現われたものと思われ、(2) GSH の分解により生じた cysteine が再び肝 GSH の合成に再利用される率も高まっているものと推測される。(3) この実験の中期で

表1 屠殺時の体重、肝重量および肝総蛋白量

絶食日数 (日)	体 重 (g)	肝 重 量 (g)	肝総蛋白量 (mg)
0	172 $\pm$ 9*	8.0 $\pm$ 1.0	1612 $\pm$ 123
1	159 $\pm$ 3	5.1 $\pm$ 0.2	1218 $\pm$ 31
2	138 $\pm$ 6	4.4 $\pm$ 0.2	1043 $\pm$ 126
3	131 $\pm$ 11	4.6 $\pm$ 0.5	1103 $\pm$ 148
4	118 $\pm$ 8	3.7 $\pm$ 0.9	996 $\pm$ 100

* S. D.

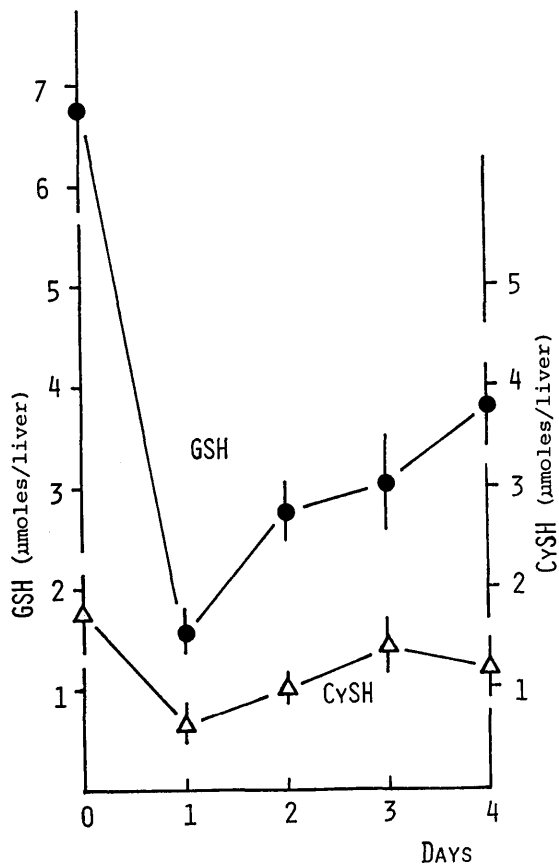


図-1 絶食条件下における肝 GSH, Cysteine 量の経時的変化

は、肝で蛋白-cysteine-GSH 間に平衡状態が成立しているように見える。

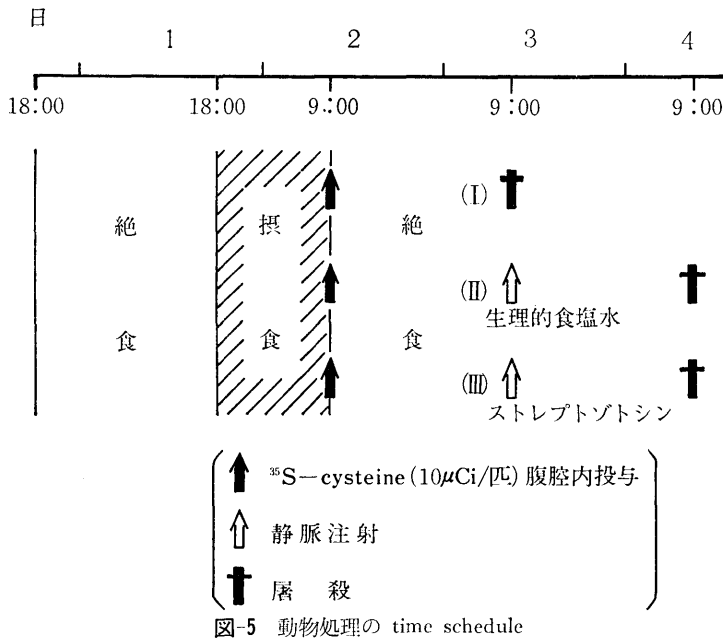
○急性糖尿病期の肝 GSH の動向

体蛋白質の分解と肝 GSH 増加との関係を、さらに明確にするために、糖新生のための体蛋白質の分解が一層強く要請され、しかも蛋白合成が抑制されている条件として、絶食動物に、急性糖

表 2 streptozotocin 投与による糖尿病発症時の体重、肝重量、肝総蛋白量

	匹数	絶食時間	体 重 (g)		肝 重 量 (g)	肝総蛋白量 (g)
			実 験 開始 時	屠 殺 時		
I control 群	7	24	228± 7*	197±7	5.7±0.5	1.32±0.13
II 生理的食塩水投与群	4	48	233±12	188±8	5.3±0.5	1.23±0.07
III streptozotocin 投与群	6	48	239± 8	187±9	6.4±0.3	1.36±0.09

* S. D.



尿病を発症させ、肝 GSH の動きを調べた。

正常ラットを、24時間絶食後、夕方6時に1匹当たり15gの市販飼料を与えた。翌朝9時に ^{35}S -cysteine を腹腔内投与して、肝のGSHを標識し、24時間絶食後、動物を3群に分けた。第1群は、対照群として、この時点で屠殺し、第2群には、生理的食塩水を、第3群には、streptozotocin を体重1kg 当り65mg 静脈内投与し、両群共さらに24時間絶食を続けた後屠殺した。

対照群に比べて、生理的食塩水投与群では、有意のGSH増加がみられたが、streptozotocin 投与の急性糖尿病群では、一層著しい肝GSHの増加が認められた。GSHに比べ量的には大きくないが、cysteine もまた両群で増加の傾向がみられ、cysteine の供給増加または利用低下が示唆される。 ^{35}S の標識により肝GSHの動きをみると、標識後24時間の絶食により、GSHのlabileな部分は消失するので、control 群の値は、見かけ上代謝的に比較的安定な部分を示している訳であるが、引続く24時間の絶食の間に、10数%の放射活性の減少が起きている。しかし streptozo-

表3 急性糖尿病期の肝GSHの増加

	匹数	絶食時間	血糖値 (mg/dl 血清)	肝総 Cysteine 量 (μmoles)	肝総 GSH 量 (μmoles)	肝 GSH 中の ^{35}S	
						cpm $\times 10^{-4}$	比活性 cpm/ μmoles
I control 群	7	24	120 $\pm$ 15	0.83 $\pm$ 0.10	22.5 $\pm$ 5.3 ^a	27.9 $\pm$ 5.5	1.22
II 生食投与群	4	48	88 $\pm$ 9	0.95 $\pm$ 0.11	28.4 $\pm$ 3.8 ^b	23.0 $\pm$ 2.6	0.81
III stz 投与群	6	48	339 $\pm$ 34	1.12 $\pm$ 0.19	39.8 $\pm$ 2.9 ^c	27.7 $\pm$ 0.34	0.69

^b or ^c Vs ^a $p < 0.001$

tocin 投与の糖尿群では、放射活性は、control 群の値に等しい。一方 GSH 量は、生理的食塩水投与群、streptozotocin 投与群ともに増加しているのに、 ^{35}S の比活性が低下している。この時両群の動物は、摂食していないので、比活性の低下は、内在性 cysteine によって、GSH が合成され希釈されたものと考えられる。streptozotocin 投与群では、GSH 中の ^{35}S の留保が顕著であったが、これは、(1) stable pool より安定になっているのか、(2) または分解された GSH 由来 cysteine の再利用による GSH 合成が著しいこと、によると考えられる。従って正常動物で食餌由来の cysteine が一時的に肝 GSH として捕捉されるのみでなく、絶食延長、急性糖尿期のように、決して cysteine が動物にとって余っているわけではないが、急激に内在性の source から動員され、蛋白合成にはしかし順調に利用されない場合においても、肝 GSH は、肝内 cysteine レベルの調節を兼ねた cysteine の一時的な貯蔵型として機能している事が確かめられた。cysteine の一時的な貯蔵型として機能しているのは、正常動物肝 GSH の二つの pool のうち、代謝回転の早い labile な pool であり、摂食後 2 時間ないし 10 数時間にわたって、肝 GSH レベルを押し上げているが、その後摂食の中断によって、材料としての cysteine が不足するにつれて、肝 GSH は分解され、蛋白合成にまわされる⁹⁾。絶食延長時や、糖尿病では、正常動物摂食条件下とは異なって、蛋白合成はかなり抑制されている。このような条件下で、labile な肝 GSH の代謝回転速度には、どのような変化が起きているかを次に検討した。

○肝 GSH の turnover rate

絶食動物、糖尿動物の肝 GSH turnover rate を測定するため、次に示す schedule により、絶食動物、および、streptozotocin 投与後、7 日間、ad libitum に摂食させた動物について、肝 GSH を測定した。実験が長時間にわたるため、本実験の streptozotocin 投与群は、薬剤投与直後の不安定な時期をさけた。(図-2, 3, 4)。

絶食群、糖尿群ともに、ラットを 9 時から 18 時まで、通常睡眠中で、あまり摂食していないと考えられる時間絶食し、18 時に、cysteine と tryptophan を夫々 gelatine の 1% 添加した 18% gelatine 食を 10 g $30 \mu\text{Ci}$ の $\text{L-}^{35}\text{S}$ -cysteine で標識し、3% 寒天溶液 10 ml でゼリー状に固めた食餌を与えた。また糖尿群は標識食投与後 24 時間毎に、標識していない市販飼料 15 g づつを与えている。

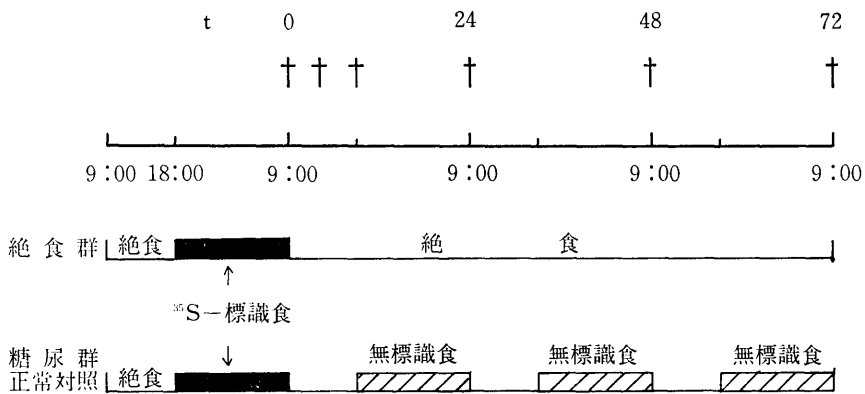


図-6 代謝回転測定の実験処置の time schedule

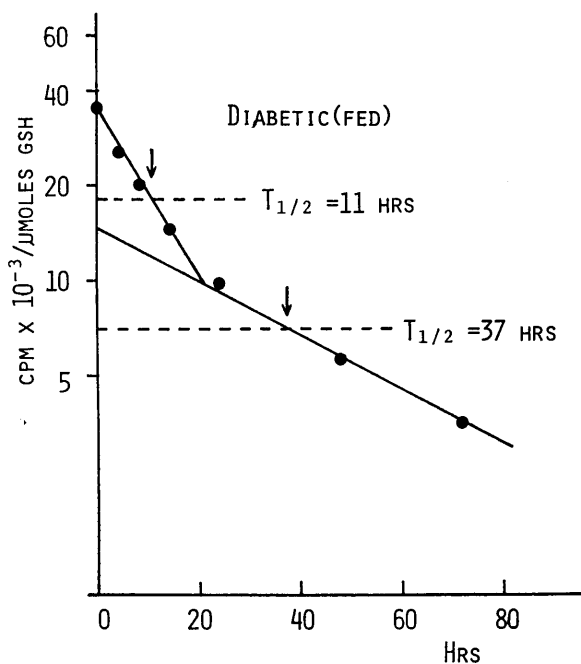


図-2 糖尿ラット肝 GSH の turnover rate の測定

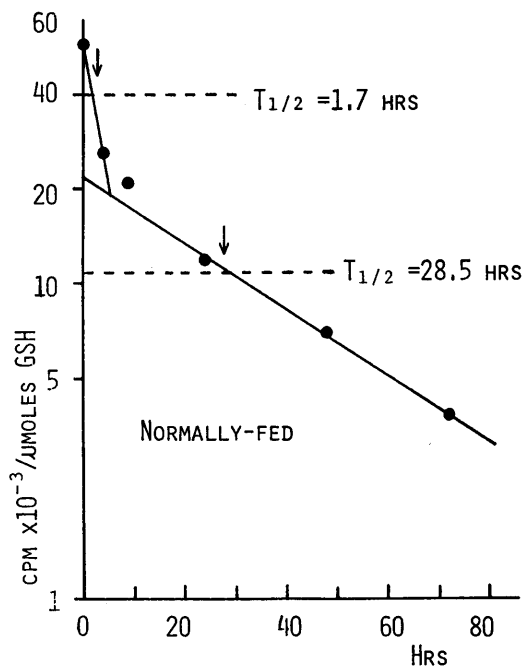


図-3 正常ラット肝 GSH の turnover rate の測定

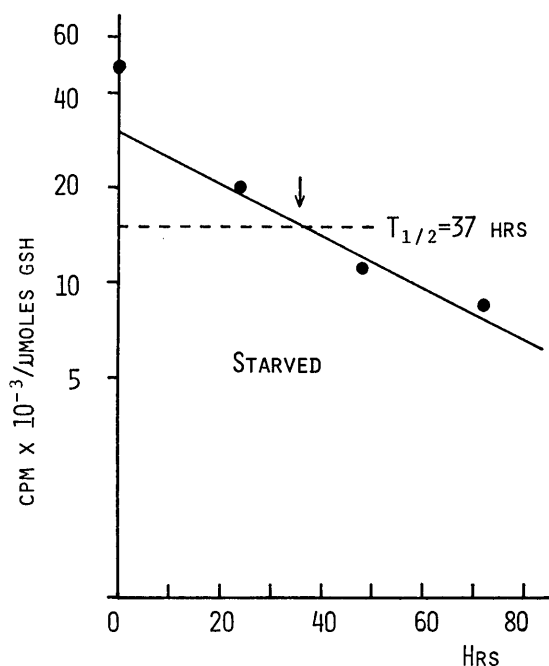


図-4 飢餓ラット肝 GSH の turnover rate の測定

両群共, ^{35}S 標識食を与え, 摂食開始時より15.5時間後の再給餌による肝 GSH 上昇が, ピークをやゝ越えたと考えられる時間を, 代謝回転測定の出発点として, 以後経時的に動物を屠殺して, 肝 GSH の放射活性の推移を調べ正常動物と比較した⁹⁾. 肝 GSH が示す ^{35}S の比放射能を, 対数目盛に plot し, その経時変化を追跡した. 糖尿動物では二本の直線を得た. turnover rate の比較的早い部分と遅い部分の2つの pool が, 糖尿動物でも存在する事を示している. これから見かけの半減期を求めると, 早い方の $T_{1/2}$ は11時間, 遅い方の $T_{1/2}$ は37時間となった. 二つの pool のいずれも, 正常動物それぞれ, 1.7時間, 28.5時間に比べて遅くなっている. 特に labile な pool の遅れが著しいが, これは蛋白合成が抑制されている事が大きく影響しているものと考えられる. これが, GSH の肝からの放出遅延によるものか, 分解速度の低下によるものか, また GSH 合成のための cysteine 再利用が促進されていることによるものか, この実験からは断定出来ない. また絶食延長の場合は, 体外からの栄養素補給がないので, ホメオスタシスの維持にとって, 時々刻々と, より厳しい条件に変化して行く情況にあり, 一定の代謝的定常状態ではなく, そのため, 肝 GSH の代謝半減期も, 時間経過と共に変化し, 例えば絶食24時間と96時間が, 代謝的に同じ条件下と考えて求める事には無理があると思われるが, 摂食動物に比べて, 見かけ上 GSH の Cys- ^{35}S の代謝回転に遅延がみられるのは, 図1にも示されているように, 体内からの cysteine の供給, その蛋白合成への利用低下に負う所が大きいと考えられる.

要 約

1. ラット肝 GSH には, cysteine の貯蔵型としての生理的役割がある事を示してきたが, これ

を一層明らかにする目的で、96時間におよぶ絶食条件下に置いたラット、および、streptozotocin を投与して、糖尿病を誘発したラットの肝 GSH の量的変動と、代謝回転を測定した。

2. 24時間の絶食で、急に急減した肝 GSH は、さらに絶食を続けることにより、48時間では増加に転じていた。肝 cysteine の増加も同時に観察された。

3. 24時間絶食した後、streptozotocin を静注して、急性糖尿病を誘発させたラットでは、肝 GSH の顕著な増加が観察された。この現象は、体蛋白分解の促進と、蛋白合成の抑制と関連していると考えられ、同時に肝内 cysteine レベルの上昇を防ぐ役割を果たしている事が伺われた。

4. 糖尿病動物では、肝 GSH の見かけの代謝回転が、遅延し、正常動物の labile pool 1.7時間、stable pool 28.5時間に対し、それぞれ11時間、37時間と測定された。肝蛋白合成と密接に関係している labile な pool のみかけの代謝回転の遅れがことに著しい。

cysteine の一時的な貯蔵型という肝 GSH の機能、即ち肝内 cysteine レベルを一定範囲に保ちつつ、蛋白合成の材料として、含硫アミノ酸を安定供給すると云う役割は、絶食、糖尿病と云う条件のもとで、一層明瞭に観察することが出来た。

終りに、本研究に当り、始終御懇切な御指導と御助力を賜りました大阪大学医学部腫瘍生化学教室、坂本幸哉、東胤昭、立石紀子の諸先生方に深謝致します。

文 献

- 1) L. S. JEFFERSON: Diabetes 29 p. 487 (1980).
- 2) P. FELING, J. WAHREN, R. SHERWIN, G. PALAILOGOS: Arch. Intern. Med. 137 p. 507 (1977).
- 3) E. C. ALBERTE, P. J. GARLICK, & V. M. PAIN: Nutr. Soc. 39 p. 50A (1980).
- 4) V. M. PAIN, M. A. McNURLAN, E. C. ALBERTSE, M. J. CLEMENS, & P. J. GARLICK: Nutri Soc. 37 Nutri Soc. 37 p. 104A (1978).
- 5) D. E. PEAVY, J. M. TAYLOR & L. S. JEFFERSON: Proc. Natl. Acad. Sci. 75 p. 5877 (1978).
- 6) V. M. PAIN, P. J. GARLICK: J. Biol. Chem. 249, p. 4510 (1974).
- 7) N. Tateishi, T. Higashi, S. Shinya, A. Naruse, Y. Sakamoto: J. Biochem. 75 p. 93 (1974).
- 8) N. TATEISHI, T. HIGASHI, A. NARUSE, K. NAKASHIMA, H. SHIOZAKI, Y. SAKAMOTO: J. Nutrition 107 p. 51 (1977).
- 9) T. HIGASHI, N. TATEISHI, A. NARUSE, Y. SAKAMOTO: J. Biochem. 82 p. 117 (1977).
- 10) M. K. GAITONDE: Biochem. J. 104 p. 627 (1967).
- 11) B. SAVILLE: Analyst 83 p. 670 (1958).
- 12) F. TIEZE: Anal. Biochem., 27 p. 502 (1969).
- 13) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: J. Biol. Chem., 193 p. 265 (1951).
- 14) E. D. MOOZ & A. MEISTER: "Methods in Enzymol" (H. Tabor & C. W. Tabor eds) Vol. XVII B p. 483. Academic Press New York (1971).
- 15) R. H. UNGER, L. ORCI: Arch. Intern. Med. 137 p. 482 (1977).
- 16) 林 伸一: 代謝 Vol. 13, p. 1313 (1976).
- 17) T. POZEFSKY, P. FELIG, J. D. TOBIEN, J. S. SOELDNER & G. F. CAHILL, Jr.: J. Clin. Invest., 48, p. 2273 (1969).
- 18) P. J. BLACKSHEAR, A. H. HOLLOWAY, K. G. A. M. ALBERTI: FEBSS Letters, 48, p. 310 (1974).
- 19) H. AKEDO & H. CHRISTENSEN: J. Biol. Chem., 237, p. 118 (1962).
- 20) W. S. STIREWALT & I. G. WOOL: Science, 154, p. 284 (1966).
- 21) V. R. YOUNG: "Mammalian Protein Metabolism" (H. N. Munro eds) Vol. 4, p. 585. Academic Press. New York & London (1970).
- 22) J. H. EXTON, L. E. MALLETT, L. S. JEFFERSON, E. H. A. WONG, N. FRIEDMANN, T. B. MILLER & C. R. PARK: Recent Progr. Horm. Res., 26, p. 411 (1970).
- 23) N. B. RUDERMAN: Ann. Rev. Med., 26, p. 245 (1975).
- 24) P. FELIG, E. MARLISS, T. PAZEFSKY & G. F. CAHILL, Jr.: Amer. J. Clin. Nutr., 23, p. 986 (1970).

Summary

The effect of streptozotocin-induced diabetes on the turnover of glutathione in rat liver was assessed.

In acute diabetic rats and rats starved for 2 days or longer, the amount of liver glutathione and cysteine increased. The increase of glutathione appears to be correlated with stimulated degradation tissue proteins under these conditions. The increased supply of cysteine from tissue proteins stimulated the synthesis of glutathione in the liver.

On the 7th day after injection of streptozotocin, the apparent biological half-lives of two pools of liver glutathione were estimated.

The half-life of 'labile' glutathione was prolonged from 1.7 h in normal rats to 11 h in diabetic rats, although those of 'stable' one were comparable with each other; 28.5 and 37 h, respectively.

The role of glutathione as a reservoir or mobilizable pool of cysteine was shown clearly under these conditions.