

ラット肝酸化型 Glutathione 定量と絶食、 再給餌による変動

成 瀬 明 子

Determination of Oxidized Glutathione in the Liver of Fasted and Refed Rats.

Akiko NARUSE

Received September 30, 1984

抄録 1. 細胞内で還元型 Glutathione (以後 GSH と略記) に比べて、微量にしか存在しない酸化型 Glutathione (GSSG) が、生理的に独自の役割を有するか否かを実証するためには、生理的条件下で、組織内 GSSG 量を、正確に把握する必要がある。GSSG 定量の第一の問題点は、生体試料調製法にあると考えられたので、従来一般に用いられている二つの方法、(I)、(II)、と新しく工夫した方法(III)を、実験的に比較検討した。

2. 方法(III)の特徴は、軽いエーテル麻酔下で開腹し、動物の肝試料を直接液体窒素中に採取し、瞬時に凍結後、磨砕し、生きている時の状態を出来るだけ保つ様に工夫した点にある。従来法は、動物を頸椎脱臼により屠殺後、肝試料を採取するため、呼吸停止に伴って、組織に酸素欠乏状態が生じ組織中の GSSG が、試料採取迄に還元され、実際より低い測定値を呈する危険性がある。

3. 方法(III)による自由摂食ラットの肝 GSSG 量は、肝 1 g 当り 374 n moles で、従来法(I)、(II)、夫々 26, 123 n moles より顕著に高い値が得られた。これは総 Glutathione に対して 5.2%を占める。

4. 肝 GSH 量の顕著な変動が観察される絶食、再給餌条件下で、GSSG の量的変動を(III)法により測定した。肝の GSSG が、総 Glutathione (GSH+GSSG) に占める比率は、絶食時に高く、再給餌後低下し、GSSG による蛋白合成抑制作用が、ラット肝で実際に機能している可能性が示唆された。

索引語 酸化型グルタチオン、試料調製法、絶食、再給食、ラット肝

Abstract. We have validated a method to assess the content of oxidized glutathione in rat liver. Three methods, (I) (II) and (III) of preparation of acid extract for assay of oxidized glutathione were critically examined. Methods (I) and (II) have been generally used, and (III) is newly developed. The peculiarity of the new Method (III) is that thin pieces of rat liver was cut off and dropped into liquid nitrogen under light anesthesia and frosted samples were ground with frozen perchloric acid. Oxidized glutathione content in acid extract of liver, prepared by those three methods (I) (II) and (III) was calculated as 26, 123, 374 nmoles per g

liver, and ratio of oxidized glutathione to total glutathione was 0.4, 1.7, 5.2% respectively. The third method of preparation successfully prevented oxidized glutathione from its postmortem reduction by glutathione reductase system under hypoxic condition.

Key Words. Oxidized glutathione, method of preparation, fasted, refed, rat liver,

結 言

Glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) は、生体内に広く分布する SH 基を有する Tripeptide であり、動物組織や、細胞における非蛋白性 SH 化合物の大半をしめる。その生理的役割は、酸化還元緩衝作用、助酵素、解毒、眼球レンズの透明度保持¹⁾ 等、多岐にわたるが、その作用は SH 基による所が大きい。またこうした働きとは別に、含硫アミノ酸 Cysteine の一時的な貯蔵や輸送型としても機能している事を、著者らは実験的に明らかにして来た^{2,3,4)}。動物では肝臓に多く、ラットで 1 g 肝当り、5~8 μ mole と云う高濃度に存在し、その大部分が還元型である。その為か哺乳動物における Glutathione の研究は、長い間、GSH に視点が置かれ、GSSG の生理的意味については、余り考えられる事なく経過して来た。1971年 Kosower 等^{5,6)}、1973年 Nolan 等⁷⁾ が GSSG による赤血球における蛋白合成阻害について報告して以来、GSSG にも研究者の関心が寄せられる様になって来ている。最近は、解毒の過程における肝 Glutathione の胆汁放出、及びその時の還元型、酸化型の量的動向も明らかにされつつある^{8,9,10)}。また細胞内 GSSG が増加すると細胞内蛋白質の SH 基の disulfide 結合が増加し、両者間に $\text{prot-SH} + \text{GSSG} \rightleftharpoons \text{prot-SSG} + \text{GSH}$ の反応があり、絶食や、c-AMP 投与により、肝 GSH レベル低下が起る。この時右に反応が進むが、可逆的である事等が明らかにされ^{11,12)}、この機構が、生理的に意味を持つかと云う点に研究者の関心が集まっている。微量に存在する GSSG が生理的意味を持ち得るかどうかを実証するためには、先ず細胞内の GSSG 濃度を、出来るだけ、生活している状態に近い生理的条件下で、正確に把握する必要がある。生理的条件ではないが、還流肝についての、Sies, Akerboon¹³⁾、等の測定では、還元型と酸化型の細胞内存在量は、1 g 肝当り、GSH, 5.5 μ moles に対し、GSSG は 18 n moles で、その比は 300 となっている。従って、GSH 量の実測は容易であるが、GSSG の正確な定量は、困難を極める。なぜならば、実験操作中の少量の GSH の酸化は、GSSG 値に大きな誤差となって現われるからである。また逆に僅かに存在する GSSG が、Glutathione Reductase により還元されてしまう事も考えられる。そして肝臓、赤血球、水晶体等、生体組織の Glutathione の存在する所には、これを酸化する酵素も、還元する酵素も、共存しているのが一般である。普通の実験条件、例えば、動物の肝臓の採取に当って、動物を頸椎脱臼により屠殺すると、肝臓等の組織では、呼吸停止に伴って、酸素欠乏状態が生じ、組織中の GSSG が還元され、実際の値より低く測定される危険性がある。こうした観点から、生体試料中の、GSSG の測定につき、その試料調製法を中心に検討を行い、その結果に基づき、最適と考えられる方法を用いて、絶食、再給餌時におけるラット肝臓の GSSG の量的変化

を調べた。

実 験

材料および方法

1. 動 物

S. D 系雄ラット，体重 200 g～400 g 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。餌は市販固型飼料 MF（オリエンタル酵母株式会社）を用いた。動物は，実験条件を揃えるため，実験に先だって，24時間絶食後，一匹当たり 15 g を与え，摂食開始後15時間で実験に供した。

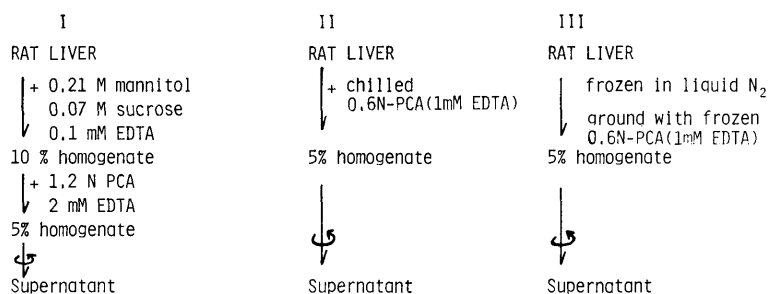
2. 肝酸可溶性画分の調製

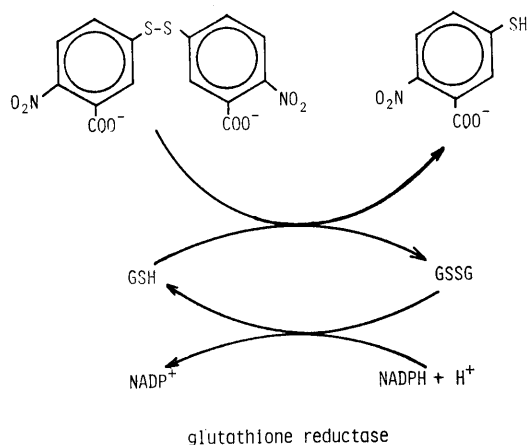
(I)法，ラットを軽いエーテル麻酔下で，頸椎脱臼により屠殺し，直ちに開腹，肝を切除し冷食塩水にて洗い濾紙上にとって，附着水を除去後，秤量する。肝 1 g に 9 ml の medium (0.21 M Mannitol, 0.07 M Sucrose, 0.1 m M EDTA) を加えて，モーター駆動，Potter 型，テフロンガラスホモジェナイザーにより磨砕（10回上下）して肝ホモジェネートを作り，これに等量の 1.2 N-PCA (2 m M EDTA) を加えて，よく混合した後 700 × g，10分遠沈し，上澄を得た。

(II)法，(I)法と同様にして秤量した肝に，直接 0.6 N-PCA (1 m M EDTA) を加えて，同様に磨砕し，終末が5%，PCA 濃度 0.6 N になる様に調製し遠沈上澄を得た。

(III)法，ラットを麻酔のみで開腹し，直ちに腹腔内より肝の細片を，ハサミで直接液体窒素中に切り落とし，瞬時に凍結，内部まで十分凍結する迄数分待つて，手早く秤量，直ちに液体窒素を入れた乳鉢内で磨砕し粉状にする。別に 0.6 N-PCA を液体窒素入りの乳鉢に滴々に落として，粒状に凍結後，磨砕し粉状晶とする。この両者を合わせてさらによく混合磨砕し，重量で，終末5%，PCA 濃度 0.6 N になるように調整し，すみやかに解凍後，モーター駆動，ガラス製ホモジェナイザーにて磨砕（10回上下）し，

PREPARATION PROCEDURE OF ACID EXTRACT

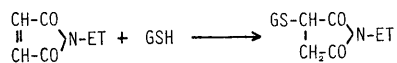




ENZYMATIC DETERMINATION OF GLUTATHIONE

SAMPLE	
POTASSIUM PHOSPHATE BUFFER PH 7.1	200 μ moles
ETHYLENDIAMINETETRAACETATE	10 μ moles
DTNB*	0.3 μ moles
STAND FOR 2 MIN.	
YEAST GLUTATHIONE REDUCTASE IN 0.1M PHOSPHATE BUFFER CONTEINING DTT (10^{-4} M)	0.45 units
NADPH	0.44 μ moles
TOTAL VOLUME	2.35 ml
	25°C 3 min
	AT 412 nm

* 5,5'-DITHIOBIS-(2-NITROBENZOIC ACID)



Masking procedure of GSH with N-ethylmaleimide

Acidic extracts (GSSG + GSH) 2 ml

↓

+ 0.01 M NEM 2 ml

↓

+ 3 N KOH $\longrightarrow$ pH 7.0

↓

+ 0.1 M K-phosphate buffer (5 mM EDTA; pH 7.1)

↓

8 ml

↓

stand for 15 min at room temp.

↓

extracted with 3 volumes of ether 3 times

↓

Water layer

↓

removed ether by bubbling with air

↓

GSSG + masked GSH

遠沈して上澄を得た。

(Ⅰ)(Ⅱ)(Ⅲ)法共、常時、試料は 4°C 以下に保った。夫々の方法で得た上澄を、総 Glutathione 及び GSSG の測定試料とした。

3. 定量法

○総 Glutathione (GSSG+GSH)

Glutathione のみ特異的に測る Tietze 等¹⁴⁾の方法を用いた。この方法は 1 μg 以下の微量定量が可能で、その原理は図に示す様に、Ellman 試薬、5-5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) が、SH 基により還元され、412 nm に吸収極大を持つイオンを生じると同時に、GSH 自らは、酸化型となる。従って SH 基が GSH の場合、生じた GSSG を NADPH 存在下で、Glutathione Reductase により、再び GSH に戻してやると、DTNB は還元され続ける事になる。DTNB 還元速度が Glutathione 量に比例する範囲の Glutathione を用いる事により総 Glutathione 量を測定することが出来る。

○酸化型 (GSSG)

GSSG のみを測るには、あらかじめ試料に masking 試薬を加えて、GSH を mask し、mask されない GSSG を前記の総 Glutathione と同様に測定する。masking には、N-Ethylmaleimide (NEM) を用いた。

NEM 処理、試料の酸可溶性画分に同量の 0.01 M NEM 溶液を加え、KOH で中和する。中和後15分間反応させた後、過剰の NEM をエーテルで除去した。3 倍容のエーテルを加えて十分攪拌混合後、静置して分液するのを待ってエーテル層を除去した。

エーテル洗浄を 3 回くり返し、最後に水層中に残ったエーテルを、細いガラス管を通して、空気を送り込むことにより完全に除去した。この水溶液を GSSG 測定に供した。

結 果 と 考 察

○(Ⅰ)(Ⅱ)(Ⅲ)の試料調製方法による結果の比較

3 つの方法により調製した試料の測定結果を表 1 に示した。GSSG 量は、(Ⅰ)(Ⅱ)(Ⅲ)法による試料において、夫々 26, 123, 374 n moles となった。総 Glutathione に対する酸化型の比率は、夫々、0.4, 1.7, 5.2%となり、最も生活状態に近い条件で調製した(Ⅲ)法による値が、(Ⅰ)(Ⅱ)法の従来の方法に比べ高い値を示した。同一条件の動物で、試料調製法の違いにより、この様に大きな差の生じた原因として、従来法では、ラットを頸椎脱臼により屠殺した後に肝を採取しているのに対し、(Ⅲ)法では、軽い麻酔のみの、呼吸をしている生きた状態で肝を採取し瞬間凍結した事、凍結後も、液体窒素中で磨砕した事等があげられる。従来、実験中の GSH の酸化による減少のみが問題とされ、酸化型の還元は問題にされていなかったのが実情である。また(Ⅰ)法では、等張液でホモジェナイズする間に、Glutathione Reductase が作用して、GSSG 値を

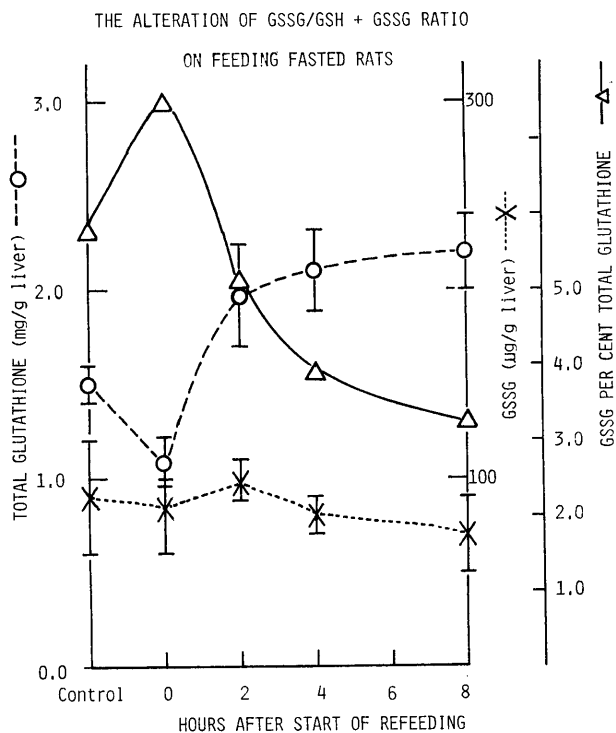
HEPATIC CONTENTS OF GSH AND GSSG
DEPENDENCE ON THE PREPARATION PROCEDURE OF ACIDIC LIVER EXTRACT

	I HOMOGENIZED WITH ISOTONIC MEDIUM	II HOMOGENIZED WITH CHILLED PCA	III FROZEN IN LIQUID N ₂	Reported by Tietze ¹⁴⁾
NO. OF RATS	(6)	(4)	(6)	
GSSG* (nmoles/g liver)	26±4**	123±23	374±46	254
TOTAL GLUTATHIONE (μmoles/g liver)	7.16±0.62	7.58±0.22	7.16±0.65	6.54
GSSG/TOTAL GLUTATHIONE (%)	0.4	1.7	5.2	3.8

*=S.D.

**=nmoles as GSH

引き下げる要因となった可能性もある。(Ⅲ)法により、GSSG が総 Glutathione の5.2%を占めると云う値が得られた事は、生理的条件下で、GSSG が、蛋白合成抑制等の生理的役割をになっていると考えるのに支障のない量ではなかろうか、Kosower⁵⁾ が、0.2 mM の GSSG 濃度で、うさぎ赤血球における ¹⁴C-Alanine のとり込みが、抑制された事を報告しているが、この時の GSSG/GSH は5.9%である事を考えると、その可能性が十分考えられる。



○絶食・再給餌時における肝 GSSG レベルの動向

(Ⅲ)法により、生理的条件下で、肝の GSSG が総 Glutathione の 5.2 %を占める結果を得たので、GSSG が生理的に何らかの役割を果たしている可能性が、より現実性のある問題として浮上して来た。そこで、絶食、再給餌時の肝の総 Glutathione が、顕著に変動する時、GSSG は、どのような動きを示すかを調べた。あらかじめ摂食条件を整えたラット（動物の項参照）を、24時間絶食し、一匹当たり 15 g の餌を再給餌し、その間の肝臓の GSSG、総 Glutathione 量を、(Ⅲ)法により、試料を調製して測定した。結果を図-1に示す。総 Glutathione は、絶食により急減し、再給餌開始後 2 時間で、増加を示しその後は、ゆっくり増加している。GSSG は、絶対量としては、大きな変動はないが、総 Glutathione に対する割合は、絶食時に 7 %と高く、再給餌開始後 2 時間に 5 %、4 時間 4 %、8 時間 3 %と減少を示す。肝臓の蛋白合成は、絶食時には抑制され、再給餌により材料が揃うと活発化する。GSSG の総 Glutathione に占める比率が、絶食時に高く、再給餌により低下する事は、Kosower⁵⁾ らが赤血球で示した GSSG による蛋白合成の initiation 段階の抑制作用が、実際に、ラット肝の、絶食、再給餌時における蛋白合成の調節に関与している可能性を示唆している。

終りに、本研究に当たり、終始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) H. Hirai,; In "Glutathione in Medicine" eds H. Hirai, Y. Sakamoto, p. 1 (1972).
- 2) N. Tateishi, T. Higashi, A. Naruse, K. Nakashima, H. Shiozaki, and Y. Sakamoto: J. Nutrition, 107 p. 51 (1977).
- 3) N. Tateishi, T. Higashi, S. Shinya, A. Naruse, and Y. Sakamoto: J. Biochem., **75** p. 93 (1974).
- 4) T. Higashi, T. Tateishi, A. Naruse, and Y. Sakamoto: J. Biochem., **82** p. 117 (1977).
- 5) N. S. Kosower, G. A. Vanderhoff, B. Benerofe, and T. Hunt: Biochem. Biophys. Res. Commun., 45 p. 816 (1971).
- 6) N. S. Kosower: Glutathion VIII; Biochem. Biophys. Acta., **1272** p. 623 (1972).
- 7) R. D. Nolan, and M. B. Hoagland: Biochem. Biophys. Res. Commun., **51** p. 444 (1973).
- 8) B. H. Lauterburg, C. V. Smith, H. Hughes, and J. R. Mitchell: J. Clin. Invest., **73** p. 124 (1984).
- 9) B. H. Lauterburg, and J. D. Adams, J. R. Mitchell: Hepatology, **4** p. 586 (1984).
- 10) N. Kaplowitz, D. E. Eberle, J. Petrini, J. Touloukian, M. C. Corvasce, and J. Kuhlenskamp: J. Pharmacol. Exp. Ther., **224** p. 141 (1983).
- 11) G. M. Bartoli, and H. Sies: FEBS LETTERS- **86** p. 89 (1978).
- 12) H. Sies.; In "Glutathione" eds Y. Sakamoto, T. Higashi, N. Tateishi: Japan Scientific Societies Press, Vns Science Press BV p. 63 (1982).
- 13) P. M. Akerboom, M. Bilzer, and H. Sies: J. Biol. Chem., **257** p. 4248 (1982).
- 14) F. Tietze, Anal. Biochem., **27** p. 502 (1967).