

飢餓状態および糖尿病ラットにおける血漿 glutathione の代謝回転

成 瀬 明 子

The Turnover of Rat Blood Plasma Glutathione under Starved and Diabetic Condition.

Akiko NARUSE

Received April 30, 1986

抄録 肝 glutathione 代謝回転速度との関連から、飢餓状態および streptozotocin 誘発糖尿病ラットにおける血漿 glutathione の代謝回転速度を調べた。正常ラット自由摂食群に比べ、絶食24時間、絶食48時間および糖尿病では、血漿 glutathione 代謝半減期の短縮が観察された。各群ラットの血漿 glutathione の代謝半減期は、正常動物自由摂食群、2.67分、絶食24時間、1.25分、絶食48時間1.75分、糖尿病自由摂食群1.80分であった。絶食状態および糖尿病では、糖新生に必要な材料アミノ酸の要求が増大し、その結果、末梢組織による血漿 glutathione の利用が亢進していることが推察される。

索引語 血漿グルタチオン、代謝半減期、飢餓状態、糖尿病、ラット

Abstract. The effect of starvation and streptozotocin-induced diabetes on the turnover of glutathione in rat plasma was assessed. In diabetic rats on the 8th day after injection of streptozotocin and in rats starved for 24 hrs or 48 hrs, the apparent biological half-life of plasma glutathione was estimated. The half-life of plasma glutathione was shortened from 2.67 min in normal fed rats, to 1.25 min in 24hr-starved, 1.75 min in 48hr-starved, and to 1.8 min in diabetic rats. In starved rats and diabetic rats may be stimulated in peripheral tissues utilization of plasma glutathione to supply its constituent amino acids.

KeyWords. plasma glutathione; turnover rate of fasted rat; diabetes.

緒 言

従来 glutathione は、細胞内で材料アミノ酸, glutamic acid, glycine, cysteine から、その細胞に必要な量が合成され代謝されると一般に考えられて来た。近年 glutathione の細胞外への放出に関する研究が多数蓄積され¹⁻⁸⁾、細胞内で合成された glutathione は、細胞内で機能するとともに酸化型のみならず還元型も細胞外へ放出されることが明らかになった^{2,3)}。体内での glutathione

合成の中心である肝の場合、血中および胆管へ放出されることが示された^{4~10)}。1984年 LAUTERBURG⁹⁾らは、肝流入前後の血漿中の glutathione 量と、肝の血流量を計測し、肝で合成される glutathione の80%が血中に放出されると報告している。著者らは、肝 glutathione の生理的役割の解明を目的として研究を行い、肝 glutathione が肝におけるたんぱく質合成との関連^{11,12)}において、cysteine の一時的な貯蔵型ないしは輸送型として機能していることを明らかにした。その過程で肝 glutathione の代謝回転速度を、食餌中の cysteine を ^{35}S で標識し摂食開始後16時間からの、肝 glutathione に取り込まれた ^{35}S 標識の経時的な減衰を追跡する方法により測定し、肝 glutathione には、代謝速度の異なる二つの pool があり、代謝回転速度の速い易動性 pool が、cysteine の貯蔵型であり、飢餓状態や、糖尿病動物では、この易動性 pool の代謝回転速度が、みかけ上正常動物より遅延することを示した。肝で合成された glutathione の80%が、血中に放出されるならば、その放出速度は、当然肝 glutathione の代謝回転速度を左右する重要な因子となる。肝からの glutathione 放出を調節するメカニズムはまだ解明されていないが、血漿中の glutathione レベルおよびその代謝速度も、これに関与することが予想される。すでに肝 glutathione の代謝速度において、正常動物との差が観察された絶食および糖尿病ラットの血漿 glutathione の代謝回転速度を測定し、glutathione 代謝動態の一層の解明を意図した。

実 験

○材料および方法

呑龍系雄ラット、体重180~200 g のものを用いた。25℃空調下、12時間明暗サイクルで飼育した。条件を負荷した場合を除き、水と餌は自由に与えた。餌は市販固型飼料（オリエンタル酵母株式会社製 MF）を用いた。

糖尿病は、streptozotocin を、投与直前に0.1M citrate buffer (PH4.1) に溶解し、kg体重当り 68mg の割合で、頸静脈より投与し発症させた。streptozotocin 投与直後の不安定な時期をさけ8日間自由摂食飼育後実験に供した。

ラットは次の4群に分けた。

第1群：正常動物自由摂食、第2群：正常動物絶食24時間、第3群：正常動物絶食48時間、第4群：糖尿病自由摂食。

各群ラットを軽く ether 麻酔し、glutathione を頸静脈より投与した。glutathione の投与量は生理的濃度範囲内と考え、一匹当たり 0.6mg とし投与直前に滅菌蒸留水1ml に還元型 glutathione 4mg, NaHCO_3 3mg の割合で溶解し作製した。glutathione 投与後20秒経過時点より、ほぼ1分間隔にて、5分間、反対側の頸静脈より一回0.2ml の採血を行い、常法により血漿を得た。得られた血漿中の総 glutathione (酸化型+還元型) を glutathione-reductase/DTNB を用いる TIETZE¹⁵⁾法により測定し、投与した glutathione の血中からの消失を経時的に対数目盛に plot し、血漿 glutathione の代謝半減期を求めた。

結 果

各群ラットの血漿 glutathione の経時的な減衰を図1~4に示した。各群ラットとも、plot し

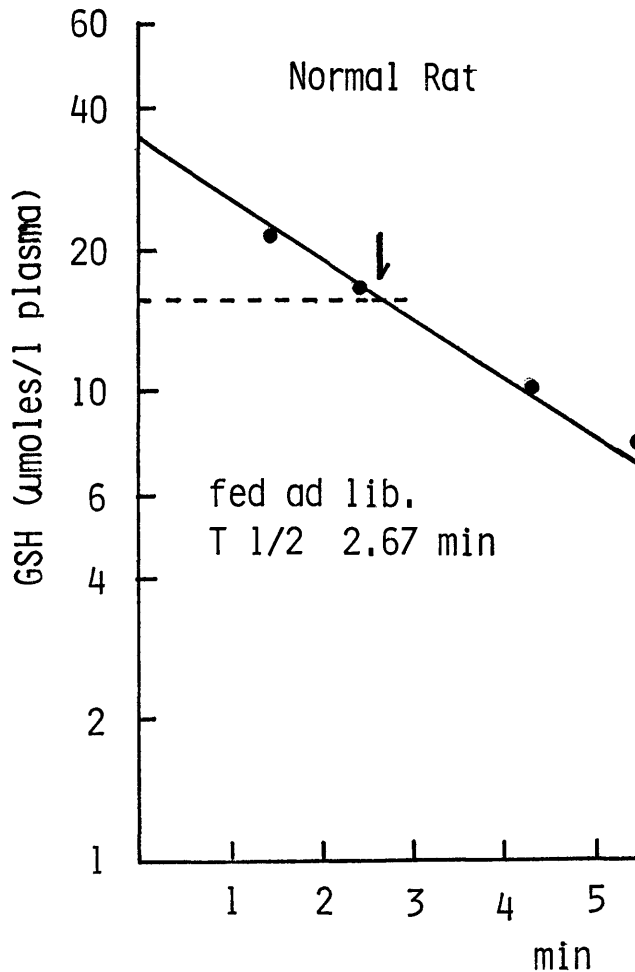


図1 正常ラット血漿 GSH の turnover rate の測定

た点は、ほぼ一直線上になり、これより代謝半減期 $T_{1/2}$ 値を求めると、正常自由摂食ラット2.67分、絶食24時間ラット1.25分、絶食48時間ラット1.75分、糖尿病ラット1.80分となった。同様に個々の動物の $T_{1/2}$ 値を求め、群別に平均し、各群間の有意差の検定を行い体重、血糖値とともに表1に示した。正常動物自由摂食群に比べ、絶食群は、24時間群、48時間群ともに血漿 glutathione の代謝速度に有意の短縮が観察された。絶食24時間群の $T_{1/2}$ 値は、摂食群の1/2に短縮されていたが、さらに絶食を延長した48時間群では、逆に遅延の方向に転じ、絶食24時間群との間に有意の差が認められた。また糖尿病摂食群は、正常摂食群との間に有意の差があり、絶食群と近似した値を示した。

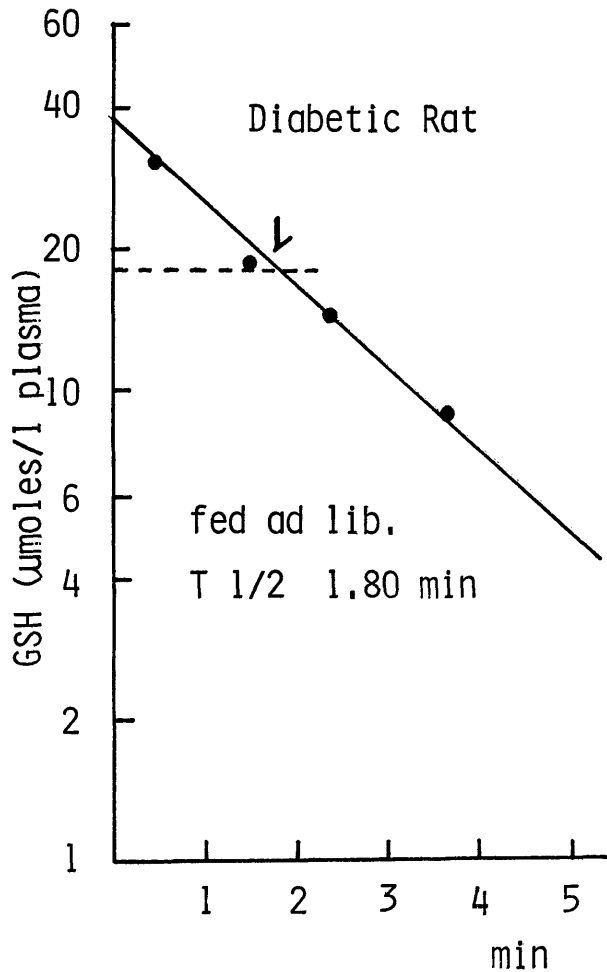


図2 糖尿病ラット血漿 GSH の turnover rate の測定

考 察

ラット肝臓の glutathione は、絶食24時間で、正常摂食条件の動物の $1/2 \sim 1/3$ 迄急減し、さらに絶食を延長すると、48時間では逆に増加の方向に転じる。LAUTERBURG⁹⁾らによると、肝から血中への glutathione の放出は、摂食群に比べ、絶食群では顕著に促進される。その放出量は、1 g 肝当り 1min 当り、自由摂食群 12.4 ± 1.4 nmoles であるのに対し、絶食48時間では 25.4 ± 4.4 nmoles と約2倍に上昇する。また一方彼等は、肝 glutathione 合成の指標として、 ^{35}S -Methionine を門脈内に投与し、15分後の肝 glutathione への ^{35}S の取り込みを観察し、glutathione の specific radioactivity が、絶食群では摂食群の10倍に近いことを認めている。絶食に伴う肝重量の減少を考慮しても絶食群においては、glutathione 合成速度が明らかに上昇している。摂食、絶食という条件に対応して顕著に変動する肝から血中への glutathione 放出速度を調節する

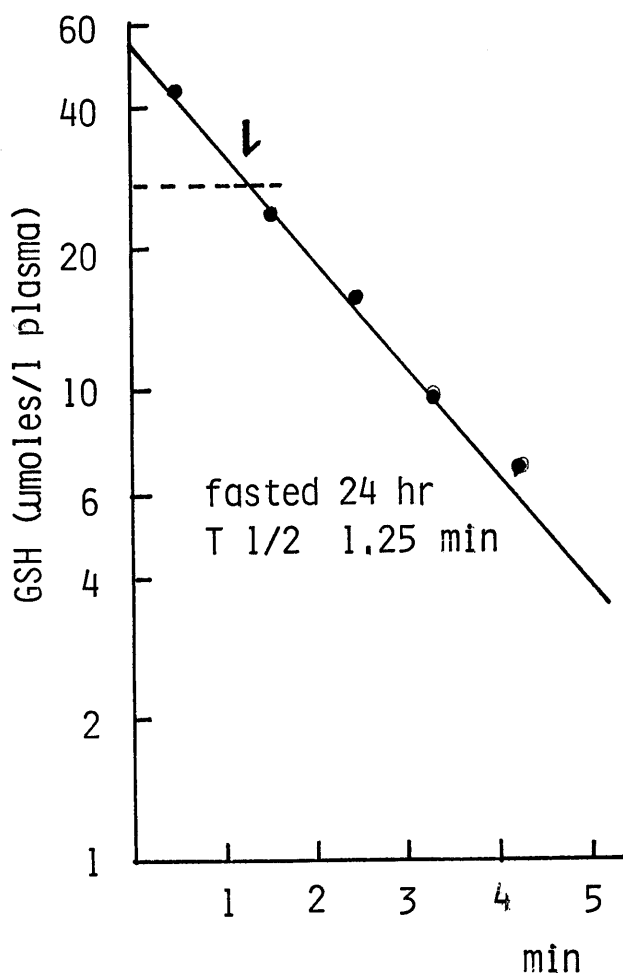


図3 絶食24時間ラット血漿 GSH の turnover rate の測定

機構は不明であるが、絶食状態では、糖新生の材料アミノ酸の要求が高まり、これが肝 glutathione の放出を促進している可能性が考えられる。血中へ放出された glutathione は70%近くが腎に運ばれ、そのうちの80%が腎尿細管腔内の r-glutamyl-transpeptidase, aminopeptidase, dipeptidase, によりアミノ酸にまで分解され、再吸収されて血中に入り、血流によって肝やその他の組織に還流し再利用されるものと思われる。先に報告した飢餓状態や糖尿病動物肝でみられた肝 glutathione 代謝回転のみかけ上の遅延は、この様な再利用の亢進を反映しているものと考えれば、LAUTERBURG らの結果や本実験でみられたこれら動物血漿 glutathione の消失速度短縮とも矛盾しない。絶食状態における糖新生の速度は、血液中の素材、アミノ酸の濃度にほぼ比例する。¹⁹⁾ 飢餓初期には、インスリン濃度の低下によって、筋肉からのアミノ酸の放出が増加する。^{20, 21)} 糖新生の主材料となるアミノ酸の動員は、飢餓の初期が最も強く、飢餓が長期化するにつれ、生体は体窒素排出を出来るだけ節約する方向へ適応し、尿中窒素量は正常時の $\frac{1}{4}$ に迄減少する。²²⁾

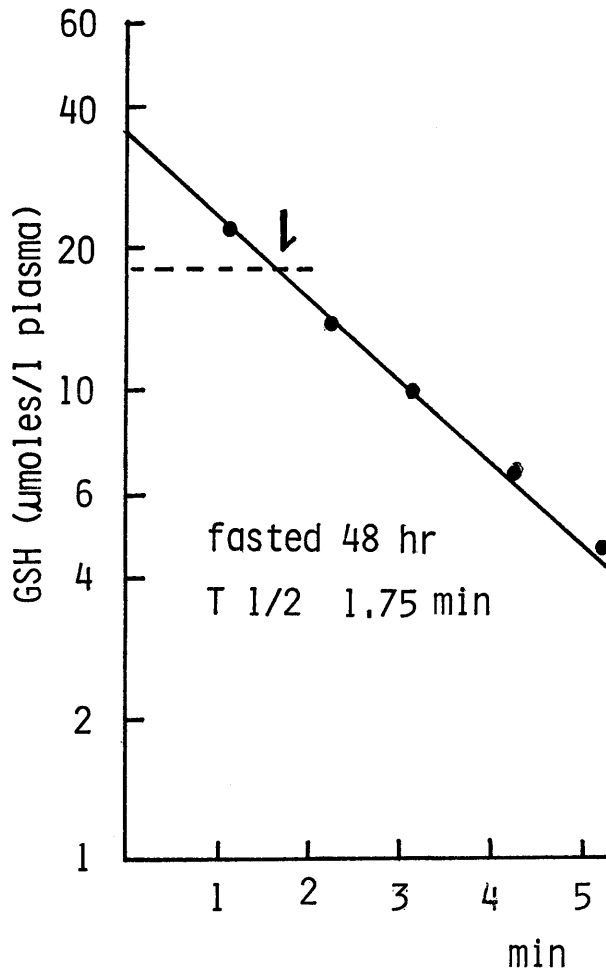


図4 絶食48時間ラット血漿 GSH の turnover rate の測定

表1. 絶食開始時, または STZ 投与時体重, 実験時体重, および血漿 GSH 代謝速度

	匹 数	体 重(g) 絶食開始時	重(g) 実験時	T 1/2 (min)	血 糖 値 (mg/dl)
正常自由摂食	7		226±34	2.76±0.24 ^a	
絶食24時間	6	210±8	185±10	1.25±0.09 ^b	
絶食48時間	5	218±18	184±21	1.75±0.10 ^c	
STZ 投与時					
糖尿病自由摂食	5	201±14	196±35	1.80±0.13 ^d	330±145

b vs a $p < 0.001$, d vs a $p < 0.001$, c vs a $p < 0.02$, e vs b $p < 0.001$,

従ってアミノ酸を主材料とする糖新生は、低下の方向へ向う。血糖節約反応として血糖の代りに貯蔵脂肪を利用する比率を高める方向への代謝の流れが切り替²³⁾る。本実験において絶食24時間に血漿 glutathione の代謝が促進されたことは、飢餓初期の最もアミノ酸の動員が激しい時期を意味し、さらに絶食を続けた絶食48時間では、血漿 glutathione の代謝半減期が遅延の方向に転じていたが、これは血糖節約反応による代謝の流れの切り替りを反映していると考えられる。また摂食条件下ではあっても、インスリン分泌低下により、糖の利用能が低下し、代謝的に飢餓状態と類似した糖尿病群において、絶食群と同様に血漿 glutathione の代謝回転速度に短縮が見られたことも、血漿中の glutathione の代謝が、その構成アミノ酸の生体の必要緊急度により変化することを示している。絶食時や糖尿病では、ホメオスタシス維持のため、肝 glutathione の放出が促進され、腎での分解も早まり、アミノ酸の消費の要求増大に対応していることが推察される。

ま と め

一定量の還元型 glutathione を静脈内投与し、その血中からの消失を追う方法により肝等の組織から血中に放出された glutathione の代謝速度を検討した。正常ラット自由摂食群、絶食群、糖尿病自由摂食群、いずれも血漿 glutathione の代謝半減期は3分以内であったが、絶食群、糖尿病群では、正常摂食群に比べ、代謝半減期が有意に短縮していた。

終りに、本研究に当り、終始御懇切な御指導と御助言を賜りました大阪大学医学部腫瘍生化学教室、坂本幸哉・東胤昭両先生に深謝致します。

文 献

- 1) Anderson, M. E., Bridges, R. J., Meister, A. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, p848.
- 2) Kaplowitz, N., Eberle, D. E., Petrini, J., Touloukian, J., Corvasee, M., Kuhlenkamp, J. (1983) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 224, p141.
- 3) Adams, J. D., Lauterburg, B. H., Mitchell, J. R. (1983) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 227, p749.
- 4) Bartoli, G. M., Sies, H. (1978) *FEBS Lett.* 6, p89.
- 5) Lauterburg, B. H., Adams, J. D., Mitchell, J. R. (1984) *Hepatology* 4, p586.
- 6) Sies, H., Bartoli, G. M., Burk, R. F., Waydas, C. (1978) *Eur J. Biochem.* 89, p113.
- 7) Akerboom, P. M., Bilzer, M., Sies, H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, p4248.
- 8) Anudi, I., Hogberg, J., Vahter, M. (1982) *FEBS Lett.* 145, p285.
- 9) Luaterburg, B. H., Smith, C. V., Hughes, H., Mitchell, J. R. (1984) *J. Clin. Invest.* 73, p124.
- 10) Krieter, P. A., Ziegler, D. W., (1985) *Biochem. Pharmacol.* 34, p955.
- 11) Higashi, T., Tateishi, N., Naruse, A., Sakamoto, Y. (1977) *J. Biochem.* 82, p117.
- 12) Tateishi, N., Higashi, T., Naruse, A., Nakashima, K., Shiozaki, H., Sakamoto, Y. (1977) *J. Nutr.* 107, p51.
- 13) Naruse, A. (1982) *Bull. Kyoto Univ of Education B* 61, p29.
- 14) Wendel, A., Cikryt, P. (1980) *FEBS Lett.* 120, p209.
- 15) Tietze, F. (1967) *Anal. Biochem.* 27, p502.
- 16) Tate, S. S., Grau, E. M., Meister, A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, p2715.
- 17) Ormstap, K., Orrenius, S. in "Glutathione" eds Sakamoto, Y., Higashi, T., Tateishi, N. Japan Scientific Societies Press VNU SciencePress BV, (1982) p107.
- 18) Inoue, M. in "Glutathione" eds Kinoshita, S., Sakamoto, Y. Kodansha Scientific, (1985) p43.
- 19) Exton, J. H., Mallette, L. E., Jefferson, L. S., Friedman, E. H. A. N., Miller, T. B., Rarr, C. R. (1970) *Recent. Progr. Horm. Res.* 26, p411

- 20) Pozefsky, T., Feilig, P., Tobin, J. D., Soeldner, J. S. Cahill, G. F. Jr. (1969) *J. Clin. Invest.* 48,p2273.
- 21) Blackshear, P. J., Holloway, A. H., Alberti, K. G. A. M. (1974) *FEBS Lett.* 48,p310.
- 22) Felig, P., Marliss, E., Pozefsky, T. Cahill, G. F. Jr. (1970) *Amer. J. Clin. Nutr.* 23,p986.
- 23) Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., Newsholme, E. A., Denton, R. M., Posgson, C. I.,
in "*Recent Progress in Hormone Research*" Vol 22 eds Pincus, G. Acadmic Press New York (1966)
pl.