

Streptozotocin 糖尿病ラットの肝 Glutathione 代謝

成 瀬 明 子

Liver Glutathione Metabolism in Streptozotocin Induced Diabetic Rats.

Akiko Naruse

抄録 糖尿病動物における代謝異常の観点から、正常ラットにみられる食餌中 cysteine 量と肝臓 glutathione 量の連携した変動のメカニズムに、何らかの異常がおきているかどうかを streptozotocin 誘発糖尿病ラットについて調べた。糖尿病ラットの肝臓 glutathione 量は、餌から摂取した cysteine 量が同じであるにもかかわらず、正常動物の70%にしか達しなかった。その要因を glutathione の増加および減少に寄与する機構に関して追求した。肝臓 glutathione 合成に、直接関与する材料アミノ酸の肝臓内濃度は、glutamate glycine は正常動物と差がなく、glutathione 合成を律速する cysteine は、糖尿病の方が僅かではあるが有意に高かった。 γ -glutamylcysteine synthetase 活性には、有意の差はなかった。一方肝臓からの glutathione の放出を、glutathione 合成阻害剤 L-buthionine-(S·R)-sulfoximine を投与して肝臓での glutathione 合成を抑制し、経時的に肝臓 glutathione 量を測定することにより計測した。肝臓からの glutathione 放出は糖尿病のほうが進んでいった。従って糖尿病動物で、肝臓 glutathione が低い要因は glutathione 合成に関与する条件の変化によるのではなく肝臓からの流出消費が進んでいることに起因することが示唆される。

索引語 肝臓グルタチオン、システイン、グルタチオン合成、糖尿病、ラット

Abstract The effect of dietary cysteine content on rat liver glutathione level in streptozotocin induced diabetes was assessed. In diabetic rats, who received the same cysteine intake as normal rats, on the 8th day after injection of streptozotocin, the liver glutathione level was lowered to about 70% of that of normal rats. There was not a significant change in the content of glutamate glycine. Of significance, however, cysteine level was slightly elevated. γ -glutamylcysteine synthetase activity was not changed. These results were indicated that the lowered glutathione level in diabetic rats may be attributed to the change of efflux and consumption of glutathione. The glutathione efflux from the liver was measured in the rats also. L-Buthionine-(S·R)-sulfoximine, an inhibitor of glutathione synthesis, was given to rats. The liver glutathione level was measured periodically. In diabetic rats, the efflux of glutathione from the liver increased more than in normal animals.

KeyWords liver glutathione, cysteine, glutathione synthesis, diabetes, rats

緒 言

正常ラットの肝臓 glutathione 量は、食餌中の含硫アミノ酸量およびタンパク質合成に必要な材料アミノ酸がすべて揃っているかなどの条件に対応して、定型のパターンで増減を示す¹⁾²⁾³⁾。これを一つの指標として、糖尿病動物における glutathione の量的変動を食餌との関連において明らかにし、糖尿病における代謝の乱れが glutathione 代謝にどのような影響を及ぼしているかを追求した。

方 法

1. 動物および飼育条件

呑龍系雄ラットを用いた。25℃に空調した動物室で飼育し、水と餌は特別の栄養条件を付加した場合を除き自由に与えた。実験標準食の組成は表 1 に示した。アミノ酸混合物の組成は表 3 に示したように、全卵のアミノ酸組成から methionine と cysteine tryptophan を除いたものを基本とした。これに cysteine を種々添加し実験食を調整した。

Table 1 標準食組成

素材	混合比 (重量)
corn oil	6
McCullum's salt mixture	1
vitamin mixture	0.5
choline chloride	0.5
amino acid mixture	18
cellulose	5
corn starch	60
agar	0.5

Table 2 アミノ酸混合物の組成比

amino acid mixture		組成比 (重量)	
ILu	0.33	Val	0.41
Leu	0.53	Arg	0.40
Lys	0.44	His	0.16
Met	—	Ala	0.35
Cys	—	Asp	0.57
Phe	0.32	Glu	0.79
Tyr	0.24	Gly	0.20
Thr	0.29	Pro	0.25
Trp	—	Ser	0.45

糖尿病は streptozotocin を 0.1M citrate buffer (PH 4.1) に溶解したものを 65mg/kg 体重の割合で、頸静脈より投与して発症させ、1 週間市販固形飼料にて飼育後、実験に供した。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. 肝臓酸可溶性画分の調製

肝臓 1 g に 0.5N 過塩素酸を 4 ml 加え、motor driven Potter type Teflon-glass homogenizer により磨碎し、10,000 × g, 10 分遠沈した上澄を cysteine, glutathione, 遊離アミノ酸の定量に用いた。

3. 定量法

- cysteine ; GAITONDE 法⁴⁾により測定した。
- 還元型 glutathione; SAVILLE 法¹⁵⁾によりもとめた非たんぱく性 SH 総量から、cysteine 量を差し引いた値を、glutathione 量とした。TIEZE 法⁶⁾により得た値とよく一致していた。

- (c) 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得た血漿について、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。
- (d) γ -glutamylcysteinesynthetase 活性
Meister ら⁷⁾の方法に準じ、活性は ATP からの Pi release 量を Fisk-Sabarow⁸⁾ 法により測定した。
- (e) 日立835型 amino acid analyzer により測定した。

4. 肝臓からの glutathione 放出速度の測定

ラットを24時間絶食後1匹あたり10gの市販固形飼料を与え、摂食開始16時間後に L-Buthionine-(S·R)-sulfoximine (以下 BSO と略記) を 0.1mmoles/100 g b. w. の割合で腹腔内に投与し、投与後30, 60, 90分にラットを殺し glutathione 量を定量した。BSO の投与量は文献値⁹⁾⁻¹²⁾により予備実験を行って適量を検討して用いた。

結果と考察

・食餌中の cysteine 量と肝臓 glutathione 量

食餌中の cysteine 量を種々変化させて与えた時の肝臓の glutathione 量を表3に示した。摂食条件を整えるため、ラットを24時間絶食後、実験食を与え、摂食による肝臓 glutathione 上昇が、ピークに達した直後の、摂食開始16時間後の値である。cysteine 無添加食、添加食のいずれの場合も、糖尿病の方が低く、正常ラットの約70%しかない。

肝臓の glutathione レベルは、肝臓での合成と肝臓から血中および胆道内への放出とのバランスにより決定されと考えられるので、摂食条件が同じであるにもかかわらず、糖尿病動物において glutathione レベルが低い要因を、glutathione 合成に関与する条件および glutathione 放出速度の二面から追求した。

Table 3 食餌中の Cysteine 量と肝臓 Glutathione 量

		Normal			Diabetes			
		Liver glutathione		No.	Liver glutathione		Blood	No.
		μ moles		of	μ moles		glucose	of
		/g liver	/100g b.w.	rats	/g liver	/100g b.w.	mg/dl	rats
CySH	0%	3.40±0.45 ^a	14.83±3.90 ^{a'}	(4)	2.40±0.71 ^d	11.53±3.63 ^{d'}	220±18	(4)
	0.09	4.62±0.36 ^b	20.02±2.19 ^{b'}	(4)	3.20±0.48 ^e	15.91±1.81 ^{e'}	275±30	(5)
	0.18	6.10±0.27 ^c	28.15±3.19 ^{c'}	(4)	4.40±0.60 ^f	22.39±3.11 ^{f'}	245±70	(6)

Significant differences were found ;

b vs e, c vs f, b vs c, a vs c, $p < 0.001$. a vs b, $0.02 < p < 0.05$

d vs f, e vs f, $0.001 < p < 0.01$.

a' vs c', b' vs c', $0.001 < p < 0.01$.

b' vs e', $0.01 < p < 0.02$, c' vs f', d' vs e', d' vs f', $0.05 < p < 0.02$.

・glutathione 合成に関与する条件の検討

肝臓の glutathione 合成能に関与する主な因子としては、材料アミノ酸の肝臓内濃度と, glu-

tathione 合成酵素活性が考えられる。この2つについて、糖尿病動物と正常動物とを比較した。

• 肝内の材料アミノ酸レベル

glutathione 合成の材料アミノ酸である glutamate, glycine, cysteine のうち, glutamate と glycine はその肝内濃度が, 10^{-3}M であるのに対し, cysteine は1桁低く 10^{-4}M しかなく, cysteine 量が glutathione 合成の律速因子となっている³⁾。正常動物の場合, 肝臓内 cysteine 量は摂取した食餌中のアミノ酸量に大きく依存する。糖尿病動物では, 正常動物と同量のアミノ酸を摂取しても何らかの要因により肝臓内 cysteine 量が低くその為 glutathione 合成が抑制されてレベルが低下している可能性も考えられる。この点を明らかにするため肝臓の遊離アミノ酸量を測定した。結果を表4に示した。

Table 4 肝臓中の遊離アミノ酸量

amino acid content ($\mu\text{moles/g liver}$)		
	control (4)	diabetes (4)
Asp	1.58 ± 0.44	2.51 ± 0.73
Thr	0.82 ± 0.07^a	0.38 ± 0.22^d
Ser	1.29 ± 0.27	0.96 ± 0.55
Glu	1.28 ± 0.21	1.55 ± 0.43
Gln	5.25 ± 1.02^b	3.06 ± 1.21^e
Gly	2.90 ± 0.46	2.70 ± 1.23
Ala	3.82 ± 0.64	2.95 ± 1.94
Met	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.03
CySH	0.05 ± 0.01^c	0.13 ± 0.01^f
blood glucoses (mg/dl)	146 ± 03	333 ± 97

() No. of rats

Significant differences were found ;

a vs d $p < 0.05$, b vs e $p < 0.05$, c vs f $p < 0.01$.

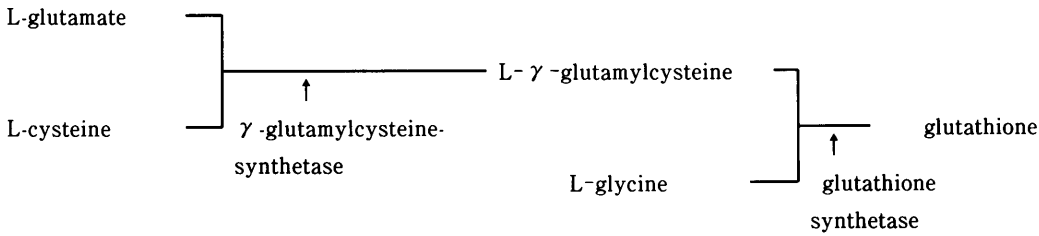
糖尿病動物肝でも glutathione, glycine については, 正常ラットとの間に有意の差は無く, cysteine は, 僅かではあるが糖尿病の方が有意に高い。両者とも cysteine 濃度が, glutathione 合成の律速因子であることに変わりはない。

• glutathione 合成酵素活性

glutathione 合成は図のように, glutamate と cysteine から γ -glutamylcysteine が合成され, これに glycine が付加される2段階で進行する。この最初の段階を触媒する酵素, 即ち γ -glutamylcysteine synthetase がこの系の key 酵素なのでこの酵素の活性を調べた。

表5に示したように両群ラット間に, 肝臓 cytosol の mg タンパク当りの活性には, 有意の差は認められなかった。

以上の結果から糖尿病ラットでは, glutathione 合成に抑制的に働く glutathione 自身の濃度が低く, cysteine のレベルがやや高めであることを考慮すると, 実際の glutathione 合成の速度は対照動物よりむしろ速いと考えられる。従って肝臓 glutathione の減少に寄与する要因, 即ち肝臓から血中や胆道内への放出に変化が生じている可能性が予想された。

**Table 5** γ -glutamylcysteine synthetase 活性

control (4)	diabetes (4)
(nmoles/min/mg protein)	
104.8 $\pm$ 8.1 ^a	96.0 $\pm$ 14.2 ^b

a vs b ; Not significantly different

• 肝臓からの glutathione の放出について

肝臓からの glutathione の放出速度を調べるために、一定時間、肝臓での glutathione の合成を、glutathione 合成阻害剤 BSO を用いて抑制し、その間に経時的に肝臓の glutathione 量を測定し、減少速度を計測した。

先ず正常ラットを用いて、BSO の投与量を検討した。

Table 6 BSO 投与量の検討

	No. of rats	Body weight g	Liver weight g	Glutathione μ moles/ g. liver		Cysteine μ moles/ g. liver	
				whole liver	g. liver	whole liver	g. liver
Control	(4)	117 $\pm$ 3	4.8 $\pm$ 0.5	3.33 $\pm$ 0.97	16.31 $\pm$ 6.10	0.09 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.14
BSO/100g b.w. 0.1mmoles	(4)	130 $\pm$ 11	5.0 $\pm$ 0.6	1.47 $\pm$ 0.20	7.25 $\pm$ 0.54	0.16 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.03
0.2mmoles	(5)	121 $\pm$ 14	4.7 $\pm$ 0.8	1.71 $\pm$ 0.20	8.19 $\pm$ 2.26	0.16 $\pm$ 0.04	0.72 $\pm$ 0.08

24時間絶食したラットに市販粉末飼料 1 匹あたり 10g を蒸留水 10ml にて均一に湿らせて与え、摂食開始 16 時間後に BSO を蒸留水に溶解し 100g 体重あたり、0.1 および 0.2mmoles 腹腔内に投与し、1 時間後の肝臓の glutathione 量 cysteine 量を比較した。

表 6 に示したように、肝 glutathione は BSO 投与により顕著に低下し、投与量 0.1mmoles, 0.2mmoles 共に、control の 50% 以下に抑制された。この結果から BSO の投与量は 0.1mmoles ですでに最大限 glutathione 合成が抑制されることが分かったので、この投与量で正常動物と糖尿病動物を比較した。

絶食再給餌条件下における glutathione の肝臓からの放出

24時間絶食ラット、および 24時間絶食後再給餌し、摂食開始後 16 時間のラットに BSO を 0.1mmoles/100g 体重、腹腔内に投与し、投与後経時的に肝臓の glutathione 量を定量した。

BSO 投与後 30 分で glutathione 合成が抑制され、それにとまって肝内 cysteine レベルが上昇している。肝からの glutathione の放出は再給餌の条件下では、BSO 投与後 60 分でみると、糖尿

Table 7 BSO 投与後の肝臓 Glutathione 量の経時的変化

		normal	diabetes	
		refed	fasted	refed
0 min	blood glucose(mg/dl)	163 ± 14	118 ± 21	341 ± 113
	GSH μ moles/liver	54.22±4.82	18.22±2.93	36.41±10.17
	CySH μ moles/liver	0.641±.118	0.386±.093	0.578±.075
	liver weight (g)	7.9±0.4	4.9±0.2	5.3±0.7
	No. of rats	(6)	(7)	(4)
30 min	blood glucose(mg/dl)	160 ± 3	121 ± 17	334 ± 56
	GSH μ moles/liver	42.45±6.96	16.52±4.16	31.41±2.88
	CySH μ moles/liver	1.149±.158	0.661±.122	0.825±.107
	liver weight (g)	7.8±0.6	5.2±0.4	5.6±0.4
	No. of rats	(6)	(6)	(6)
60 min	blood glucose (mg/dl)	167 ± 20	125 ± 12	324 ± 94
	GSH μ moles/liver	34.02± 3.75	13.22±4.10	22.20±2.08
	CySH μ moles/liver	1.113±.138	0.543±.081	0.601±.125
	liver weight (g)	7.5±0.4	5.0±0.6	5.2±0.3
	No. of rats	(6)	(6)	(4)
90 min	blood glucose (mg/dl)	156 ± 8	117 ± 27	324 ± 61
	GSH μ moles/liver	25.97±6.28	9.20±3.91	18.97±3.13
	CySH μ moles/liver	1.007±.086	0.386±.066	0.602±.125
	liver weight (g)	7.4±0.7	4.4±0.7	4.9±0.6
	No. of rats	(5)	(7)	(4)
GSH efflux rate				
	μ moles/min/liver	0.337		0.237
	μ moles/min/g liver	0.031		0.041

病ラットでは0.041 μ moles/min/g liver, 正常動物では, 0.031 μ moles/min/g liver と糖尿病動物の方が速くなっていた。抹消血の glutathione の消失速度が糖尿病動物の方が正常動物より速い事を既に明らかにしたが¹¹⁾ 本実験結果からも糖尿病動物では glutathione の消費が促進されており, そのため glutathione の肝内レベルが低くなっていることが推測される。糖尿病動物で glutathione ひいては cysteine の利用が亢進していることは, BSO 投与群で肝内 cysteine レベルの上昇が, それ程顕著でないことから推定される。

ま と め

糖尿病が glutathione 代謝にも何らかの変異をもたらしているかを, 食餌中 cysteine 量に対応して肝臓 glutathione がどのように変動するか調べる方法により追求した。糖尿病では正常動物と同量の cysteine を摂取しても肝臓 glutathione 量は, 正常の70%にしか達しなかった。その要因を glutathione 合成と肝臓からの放出の両面から調べた結果, 合成能には変化なく, 肝臓から

の放出が速くなっている可能性を示唆した。

終わりに、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付属バイオメデカル教育研究センター、坂本幸哉、東胤昭両先生に深謝致します。

文 献

- 1) Tateishi, N., Higashi T., Naruse A., Nakashima K., Shiozaki H., Sakamoto Y. (1988) J. Nutr. 107, p51.
- 2) Naruse A., (1977) Medical J. Osaka Univ. 29, P1
- 3) Tateishi N., Higashi T., Shinya s., Naruse A., Sakamoto Y., (1974) J. Biochem 75, p93
- 4) M. R. Gaitonde, (1967) Biochem. J., 104, p627
- 5) B. Saville, (1958) Analyst., 83, p670
- 6) F. Tietze, (1969) Anal. Biochem., 27, p502
- 7) G. F. Seeling, A. Meister, (1985) Methods in Enzymology, 113, p379
- 8) C. H. Fiske, Y. Subbarow, (1925) J. Biol. Chem. 66, p375
- 9) O. W. Griffith, A. Meister, (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, p5606
- 10) F. Romero, H. Sies, (1984) Biochem. Biophys. Res. Comm. 123, p1116
- 11) O. W. Griffith, (1982) J. Biol. Chem. 257, p13704
- 12) O. W. Griffith, (1981) Methods in Enzymology, 77, p59
- 13) Naruse A., (1986) Bull Kyoto Univ. of Education B69, p35