

分離大豆たん白質飼育ラット肝臓の グルタチオン含量と γ -glutamyl transpeptidase 活性の変化

CHANGES OF GLUTATHIONE CONTENT AND γ -GLUTAMYL
TRANSPEPTIDASE ACTIVITY OF LIVERS OF RATS FED ON
ISOLATED SOY PROTEIN DIETS

谷口巳佐子 (中村学園大学)

Misako TANIGUCHI

Department of Food and Nutrition, Nakamura Gakuen College, Fukuoka 814

ABSTRACT

Weanling male rats (Wistar strain) were fed on the diet containing 10 or 20% SPI for 3 weeks, and glutathione content and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) activity of the livers were determined, comparing with those of control rats which were fed on the laboratory chow (Oriental CRF-1), respectively. Glutathione content of the livers of rats fed on 10% SPI diet decreased to about 40% of that of control rats, whereas that of kidney or blood plasma was not much changed by the diet. Supplement of cysteine or methionine to 10% SPI diet did not alter the glutathione content significantly, but the addition of methionine resulted in decrease of γ -GTP activity which was remarkably increased by 10% SPI diet. Close similarities between the changes of γ -GTP and alkaline phosphatase activities were shown among 10 and 20% SPI diet groups, except cysteine-supplemented diet group, in which γ -GTP activity remained at the high level and alkaline phosphatase activity decreased significantly towards the control value. No change of the activity of either glutathione reductase or glutathione peroxidase was observed in 10 and 20% SPI diet groups.

グルタチオン (GSH) は生体内に広く分布しているが、肝臓は特に含量が高く、また栄養条件 (低たん白質食, 低含硫アミノ酸食) によって速やかに減少する。このことから立石らは肝臓における GSH の生理機能の一つとして cysteine の貯蔵体としての役割を提案した¹⁾。絶食による GSH の減少も肝臓で顕著にみられ、cysteine の貯蔵体としての役割は肝臓に特有なものであることが示されている²⁾。GSH は細胞外に分泌されると外膜に結合している γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) により γ -glutamyl 基が水解、または移転され、ついで cysteinylglycine が分解され、それぞれのアミノ酸が細胞内にとりこまれ Meister により提案された γ -glutamyl cycle で再び GSH に合成されると考えられている³⁾。

本実験では含硫アミノ酸の少ない SPI (フジプロ R) をたん白質源として成長期のシロネズミを飼育し、GSH 含量ならびに γ -GTP 活性を測定し、臓器、ことに肝臓 GSH 濃度と γ -GTP 活性の関係をしらべ、これらの生理的濃度、役割を検討した。一方、SPI に cysteine または methionine を補足し、その GSH および γ -GTP への効果を比較した。

実験方法

1. 飼料と飼育条件

離乳直後の Wistar 系雄シロネズミ (初体重約 50 g) を Table 1 に示す組成の混合飼料の基本食で飼育した。SPI 試料中の粗たん白質量は 90.2% であったことから、11, 22% 添加のものを SPI 10, 20% とした。

Table 1. Composition of diets

	10% SPI	20% SPI
Dextrin	77.85	66.85
SPI	11.0	22.0
Vitamin mixture*	1.0	1.0
Salt mixture*	5.0	5.0
Choline chloride	0.15	0.15
Corn oil	5.0	5.0

* Harper's composition.

cysteine, methionine の補足は、それぞれの基本食に0.2%ずつを加えた。対照固型飼料はオリエンタル社 CRF-1 を用いた。動物は各個体別飼いで22±2℃で3週飼育した。給餌、給水は自由摂取とした。

2. GSH 濃度および酵素活性

断首、しゃ血後、直ちに肝臓を取り出し、秤量後、1～2gを5%トリクロロ酢酸溶液（0～4℃）中でhomogenizeし、3,000rpm、5分間遠心分離し、この上澄を用いて Tietze の酵素法⁴⁾、または DTNB 法で GSH を定量した。肝臓の一部は冷却した 0.25 M sucrose, 0.1mM EDTA, 5mM Tris-HCl buffer (pH7.5) 溶液中で homogenize し酵素試料とした。

γ -GTP 活性は γ -glutamyl α -naphthylamine と glycylglycine を基質とし、homogenate (10～20mg 肝臓重量相当) を37℃、30分間インキュベート後の α

-naphthylamine を定量し測定した。alkaline phosphatase (ALP) 活性は *p*-nitrophenylphosphate を基質とし、遊離 *p*-nitrophenol 量から測定した。たん白質は Lowry 法で定量した。

実験結果と考察

1. 成長

Table 2 に示されるように20% SPI に0.2% methionine を補足した飼料群では対照群とほとんど同様な体重増加がみられたが、他はいずれも十分な増加は得られなかった。

2. GSH 含量

10% SPI 群の肝臓、腎臓および血漿中の総 GSH 量を対照群と比較した結果を Table 3 に示す。肝臓で著しい減少がみられたが、腎臓、血漿中のものは対照と比べ変化がなく重量当たりで腎臓ではむしろ多い傾向であった。肝臓は血漿 GSH の供給臓器と考えられるが、肝臓 GSH 量の低下にかかわらず、血漿中のものが変わらなかったことは、肝臓から放出される GSH 量は肝臓濃度に一次的に比例するような機構によるものではなく、(1)調節された輸送機構による、(2)細胞外に放出された後 γ -GTP により分解される量で調節される、などの原因によることが推定される。

3. γ -GTP 活性

GSH 含量と対応して比較するため、Table 4 の γ -

Table 2. Body and liver weights of rats fed SPI diets

Diet	Added	Body weight (g)		Liver (g)
		Initial	Final	
10% SPI	—	53.4±0.5	90.4±5.4	4.6±0.7
	L-Cys*	55.0±0.4	91.4±5.4	4.5±0.3
	L-Met*	52.6±0.6	133.8±7.6	6.5±0.5
20% SPI	—	50.0±0.8	172.3±5.0	9.0±0.7
	L-Cys*	50.0±1.8	183.3±5.2	10.6±0.6
	L-Met*	49.3±1.1	202.1±5.3	9.7±0.5
Oriental CRF-1	—	49.1±1.1	208.5±10.0	10.6±0.8

Values are average ± SD of 4 rats.

* 0.2% added respectively.

Table 3. Glutathione contents in liver, kidney and blood plasma

Diet	Liver (a)	Kidney (a)	Blood plasma (b)
10% SPI	3.12±0.85	2.57±0.15	3.86±0.11
Oriental CRF-1	7.36±1.01	2.01±0.27	3.90±0.11

Values are average ± SD of 3 rats.

(a) μ mol/g of tissue wet weight.

(b) μ mol/100 ml

GTP 活性は肝臓重量 (g) 当たりで表した。二つの間には大体逆比例関係が認められた。しかし 10% SPI 群の GSH 量は 20% SPI 群のものと同濃度であるにもかかわらず γ -GTP 活性は高い値を示した。10% SPI に cysteine を補足した群も γ -GTP 活性は高い値であった。一方、10% SPI に methionine を補足した群のものは 20% SPI 群における GSH と γ -GTP 活性の相関を示す値であった。これらの結果は飼料中の含硫アミノ酸、特に methionine の少ない場合の cysteine、GSH の利用に γ -GTP が特有の働きをしていることを示唆するが、飼料中の cysteine 量、飼育期間などを変えて検討することが必要である。一方、腎臓の γ -GTP 活性はいずれの群も対照値と比べ差は認められなかった (データ省略)。

4. ALP 活性

ALP は膜酵素で γ -GTP と正相関を示す変動が、10%, 25% casein 飼料飼育のシロネズミ肝臓の実験で得られている (谷口ら; データー省略)⁵⁾。同様な結果は LLC-PK₁細胞の増殖 cycle においても認められており⁶⁾、細胞分裂時にこの二つは相伴って膜にくみ込まれていることが推定されている。Table 5 に示されるよ

うに SPI 飼育によっても γ -GTP と ALP との間には大体正の相関を示す関係が認められたが、10% SPI に cysteine を補足したものの ALP 活性は減少しているにもかかわらず γ -GTP 活性のみが高く、他の群と異なった関係が見られた。

GSH と γ -GTP 活性の間にも 10% SPI および 10% SPI に cysteine を添加したものでは他の群のものと異なった関係が示されていることから、細胞膜における γ -GTP と ALP のトポロジーは固定したものでなく、特に GSH 量の低下した場合の γ -GTP 活性の増加は、生物の環境適応現象としての働きによると思われる。これらは今後さらに実験データを増して証明してゆかねばならない興味ある問題であろう。

5. GR と GSHPox 活性

細胞内で生成した過酸化物は glutathione peroxidase (GSH Pox) により GSH を還元物質として分解され、酸化型 GSSG は glutathione reductase (GR) によって還元型となる。この機構を通じ生体は過酸化物からの保護を行っているので、GSH 量の減少した条件での過酸化物代謝の機能をしらべる目的で肝臓 cytosol の GR および GSH Pox 活性を測定した。Table

Table 4. Glutathione content and γ -GTP activity of livers of rats fed on SPI diets.

Diet	Added	GSH (μ mol/g)	γ -GTP (mM/g)
10% SPI	—	2.9 $\pm$ 0.6	101.0 $\pm$ 6.3
	L-Cys*	2.9 $\pm$ 0.9	164.1 $\pm$ 22.3
	L-Met*	3.2 $\pm$ 0.8	26.6 $\pm$ 6.4
20% SPI	—	2.8 $\pm$ 0.5	31.2 $\pm$ 5.3
	L-Cys*	5.0 $\pm$ 1.2	28.2 $\pm$ 1.1
	L-Met*	4.9 $\pm$ 0.7	18.8 $\pm$ 2.8
Oriental CRF-1	—	7.5 $\pm$ 0.6	13.2 $\pm$ 5.8

Values are average $\pm$ SD of 4 rats.

* 0.2% added respectively.

Table 5. Liver enzyme activities in rats fed on SPI diets

Diet	Added	γ -GTP (mU/mg)	ALP (U/mg)
10% SPI	—	0.55 $\pm$ 0.19	2.90 $\pm$ 0.60
	L-Cys*	0.57 $\pm$ 0.04	1.58 $\pm$ 0.26
	L-Met*	0.13 $\pm$ 0.04	1.45 $\pm$ 0.31
20% SPI	—	0.11 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.17
	L-Cys*	0.17 $\pm$ 0.05	1.05 $\pm$ 0.30
	L-Met*	0.13 $\pm$ 0.02	0.81 $\pm$ 0.09
Oriental CRF-1	—	0.09 $\pm$ 0.03	1.12 $\pm$ 0.19

Values are average $\pm$ SD of 4 rats.

* 0.2% added respectively.

Table 6. Liver enzyme activities related to GSH in rats fed on SPI diets

Diet	Added	GSH reductase (a)	GSH Pox (a)
10% SPI	—	72 ± 4	50 ± 8
	L-Cys*	68 ± 11	47 ± 9
	L-Met*	67 ± 12	44 ± 8
20% SPI	—	59 ± 4	48 ± 7
	L-Cys*	56 ± 8	45 ± 5
	L-Met*	58 ± 5	84 ± 7
Oriental CRF-1	—	63 ± 11	115 ± 12

Values are average ± SD of 4 rats.

0.2% added respectively. (a) mU/mg protein.

6に示されるように10%, 20% SPIで肝臓GSH量は低下しているが, GR, GSH Pox活性の差は認められなかった。対照群と比べ, GSH Pox活性はSPI飼料群で低下しているが, これはGSH PoxがSe酵素であるため, 飼料中のSe含量の差にもとづくものと思われる。

シロネズミ腎臓から精製した γ -GTPを用いて家兎に免疫して得られた抗 γ -GTP血清によるシロネズミの肝臓と腎臓, および10%と対照固型飼料飼育群の肝臓(前者に高い活性の増加が示されている)間の γ -GTP活性阻害結果では, 両者間に免疫構造的な区別は見いだされなかった(谷口ら; データ省略) ⁷⁾。

今回SPI飼育実験で得られた肝臓の γ -GTP活性の変化は, GSHの代謝と関連し, 肝臓での γ -GTPの生理機能, GSHの肝臓での生理的濃度を示すものとして意義がある。

文 献

- 1) Tateishi, N., Higashi, T., Naruse, A., Nakashima, K., Shiozaki, H. and Sakamoto, Y. (1977): Rat liver glutathione: Possible role as a reservoir of cysteine. *J. Nutr.*, **107**, 51-60.
- 2) Cho, E., Sahyoun, N. and Stegink, L.D. (1981): Tissue glutathione as a cyst(e)ine reservoir during fasting and refeeding of rats. *J. Nutr.*, **111**, 914-922.
- 3) Meister, A. (1978): Current status of the γ -glutamyl cycle. In "Functions of Glutathione in Liver and Kidney", edited by Sies, H. and Wendel, A., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, g, New York. pp. 43-59.
- 4) Tietze, F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, **27**, 505-522.
- 5) 谷口巳佐子, 本田弘美 (1984): たんぱく質摂取量によるラット肝臓の γ -glutamyl transpeptidase活性の変化. 日本農芸化学会講演要旨集, p. 22
- 6) Rabito, C.A., Kreiberg, J.I. and Wight, D. (1984): Alkaline phosphatase and glutamyl transpeptidase as polarization markers during organization of LLC-PK₁ cells into epithelial membrane. *J. Biol. Chem.*, **259**, 574-582.
- 7) 谷口巳佐子, 本田弘美 (1984): 低たん白質飼育ラット肝臓の γ -glutamyl transpeptidase活性の変化について. 生化学, **16**, 520.