

グルタチオン代謝の制御機構と
関連酵素系の生理的役割に
関する研究

1985年

五十嵐 隆

目次

緒言	1
第1編 ラット肝グルタチオン代謝と関連酵素系	5
第1章 成熟ラット肝 γ -GTPの精製とその性質	7
1-1-1 成熟ラット肝 γ -GTPの精製法	7
1-1-2 精製肝 γ -GTPと腎酵素との免疫化学的比較	9
1-1-3 肝 γ -GTPのKineticsによる解析	15
第2章 ラット周産期における γ -GTPの臓器内分布と活性変動	16
1-2-1 妊娠期および授乳期における肝臓および 腎 γ -GTP活性の変動	17
1-2-2 妊娠期間における胎盤, 子宮壁, 羊水の γ -GTP活性の変動	19
1-2-3 胎仔肝ならびに胎盤 γ -GTPのKineticsと免疫学的解析	20
第3章 アミノピリン投与によるラット肝 γ -GTPの誘導機構	22
1-3-1 肝, 腎 γ -GTP活性に及ぼす影響	23
1-3-2 血清GOT, GPTおよび γ -GTP活性に対する影響と 病理組織学的知見	24
1-3-3 肝 γ -GTPの細胞内分布	25
第4章 ラット肝グルタチオン代謝における関連酵素系の 生理的役割	26
1-4-1 肝臓および血漿中グルタチオン量の変動	29
1-4-2 γ -GTP活性の変動とシステイン量との相関性	31
1-4-3 GSH-Px活性に及ぼすAM投与の影響	33
第5章 考察	34

第2編	ラット, マウス, モルモットおよびハムスターにおける	
	肝グルタチオン代謝の種差と関連酵素系	38
第1章	肝GSH量の種差とGSH合成および	
	分解酵素活性との関連性	40
第2章	血漿および胆汁中GSH量の種差	43
第3章	GSH酸化還元酵素活性および抱合酵素活性の種差に及ぼす	
	絶食の影響	45
第4章	脂質過酸化反応の種差に及ぼす絶食の影響	47
第5章	考 察	49
第3編	ラット肝グルタチオン代謝と関連酵素活性の性差	53
第1章	雌雄ラット肝GSH量および γ -GTP活性の日内変動	54
第2章	肝GSHおよび γ -GTP活性の性差に及ぼす絶食の影響	57
第3章	ラット肝グルタチオン代謝系の性差と週令差	62
第4章	γ -GTP, GSTおよびGSH-Px 活性の性差に及ぼす	
	性ホルモンの影響	65
第5章	雌雄ラット肝GSTおよびGSH-Px アイソザイムと性差	68
3-5-1	GSTおよびGSH-Px 活性の性差における基質依存性	70
3-5-2	Se-GSH-Px およびnon-Se-GSH-Px 活性の性差	71
3-5-3	Basic および Neutral / acidic GST活性の性差	74
3-5-4	GSTアイソザイムのクロマトフォーカシングにおける	
	溶出パターンの性差	75
3-5-5	雌雄ラット肝GSTサブユニットに関する Kinetics	
	による解析	77
3-5-6	雌雄ラット肝GSTのサブユニットの構成比の違いと	
	免疫学的検討	80

3-5-7 GST活性の性差の薬物抱合能および GSH量に及ぼす影響	83
第6章 考察	85
総括	88
謝辞	90
掲載雑誌目録	91
引用文献	93

緒 言

グルタチオンはグルタミン酸、システインおよびグリシンから成るトリペプチドであり哺乳動物のみならず、動植物、微生物に至るまで広く分布している。グルタチオンの生体内における存在様式には還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) とが知られている。また、生体内グルタチオンを基質として利用する関連酵素系のうち、グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) は GSH から GSSG への変換を触媒する。GSSG は生理学的には不活性型であり、グルタチオン還元酵素 (GR) により GSH へ変換してはじめて種々の生理活性を発現する。

GSH の合成は γ -グルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素の両者により行なわれる。一方、細胞内グルタチオンは GSH あるいは GSSG として細胞外へ放出されるが、そのままの形で細胞内へ取り込まれることはない¹⁾。

グルタチオンの分解に関しては、GSH が γ -カルボキシル基の関与したペプチド結合であるため、通常のペプチダーゼでは水解されず、専ら γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP) により水解される。その分解段階としては、はじめに γ -グルタミル基が離脱し²⁾、次いでジペプチダーゼによりシスティニルグリシンが開裂し、個々の構成アミノ酸になる。 γ -GTP は腎臓に最も高い活性が認められ³⁾、本酵素を遺伝的に欠損している患者⁴⁾、また *in vivo* において本酵素活性を阻害した動物モデル⁵⁾ では著明なグルタチオン尿症がみられることから、グルタチオン量の変動には γ -GTP 活性が直接大きく寄与するものと考えられている。本酵素に関する従来の研究において、成熟動物の肝臓では γ -GTP 活性が極めて低いことから³⁾、肝 γ -GTP に関してはほとんど注目されなかった。しかし、肝 γ -GTP はヒトおよび動物の発達過程において特異的な活性変動パターンを示し、胎生末期に異常に高い活性を示すことが報告されている⁶⁾。これに関連して、Tateishi らは肝 GSH の生理的役割の一つとしてシステインの貯蔵型としての役割⁷⁾ を提唱し、胎生末期にみられる肝 γ -GTP 活性の高騰は、胎仔期に不足する

システインをGSHから安定に供給するためであると報告している⁹⁾。従って、周産期における母体-胎仔間の γ -GTP活性の変動はGSH代謝に大きな影響を及ぼすものと考えられる。一方、成熟動物における肝 γ -GTPの誘導に関しては、種々の薬物投与により見られることが報告されている^{9) 10)}。1975年 Bartelsら¹¹⁾はリウマチ様関節炎でアミノピリン (AM) を連用している小児の血清 γ -GTP活性が異常な高値を示すことから、ラットにAMを連続投与し活性変動を検討したところ、肝 γ -GTPの総活性が約30倍にも著増することを報告した。この知見はフェノバルビタールなど他の誘導剤による肝 γ -GTP活性の上昇が、約2~3倍に過ぎない^{9) 10)} ことと対比して極めて大きいことを示している。従って、AM投与時にみられるこの様な肝 γ -GTP活性の激増は、肝GSH代謝機構にも大きく影響を及ぼすことが予想される。

GSHは生体内非蛋白性SH化合物の大部分を占め、哺乳動物の肝臓は最も高い組織の1つである¹²⁾。ラット肝GSH量は24~48時間の絶食により約50%まで減少する¹³⁾が、決してゼロにはならないことから、ラット肝には代謝回転の異なる2つのGSHプールの存在が提唱されている¹⁴⁾。一方、絶食によるこの様なGSH量の減少はハムスターでは48時間絶食条件下においてもみられない¹⁵⁾。このことは肝GSHプールの存在様式あるいはGSH関連酵素系によるGSH制御機構における種差の存在を示唆するものである。

絶食条件下においては、アセトアミノフェンなど種々の薬物による肝毒性が著しく増強する¹⁶⁾ ことから、薬物投与による肝毒性発現機構には生体内肝GSH量が密接に関与している。従って、肝GSHの調節機構およびGSH関連酵素系の生理的役割の追求は、薬物による肝毒性発現機構を解明する上で重要な課題と考えられる。

一方、肝GSH関連酵素系としてのグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) およびGSH-Px は、生体内GSHを基質として異物の代謝過程において重要な役割を果たすことが知られている。すなわち、GSTは異物あるいは、そ

の活性代謝物とGSHとの結合を触媒し、GSH抱合体を生成する^{17, 18)}。

GSH抱合体はそのまま尿中に排泄されるか、 γ -GTP、ジペプチダーゼおよびN-アセチルトランスフェラーゼの一連の酵素反応により最終的にメルカプトール酸となった後排泄される。また、生体内において異物が代謝されて生成する過酸化物および過酸化脂質の還元にはGSH-Pxが優先的に作用する¹⁹⁾。

近年、肝GSTは一種類ではなく、少なくとも複数のアイソザイムの存在が明らかになった^{20, 21)}。さらにGSH-Pxにおいても、従来のセレン酵素の他にセレンを含まないアイソザイムが存在することが確認され²²⁾、それはGSTのある種のアイソザイムと酵素化学的に同一であることが証明された²³⁾。また、ラット肝において、これらGST²⁴⁾およびGSH-Px活性²⁵⁾には著明な性差がみられるが、その性差発現機構および調節機構について未だ不明な点が多い。

上述の様に肝GSH代謝機構には、種々のGSH関連酵素系が密接に関与している可能性が極めて大きい。さらに、その肝GSH代謝は、関連酵素系の種差、性差により大きく影響を受けるものと推察される。そこで著者は次の様な検討を行い、興味ある新知見を得た。

- (1)成熟ラット肝 γ -GTP活性は極めて低いことに関して、それが腎酵素との酵素的性質の違いによるのか否かを明らかにする目的で、成熟ラット肝より γ -GTPを精製し、その諸性質について検討した。さらに、蛍光抗体法により肝 γ -GTPの細胞内分布を組織学的に検討した。
- (2)ラット周産期における母体、胎仔、新生仔の肝臓と腎臓、さらに胎盤、羊水および子宮壁の γ -GTP活性の変動を比較検討した。また、これら各器官の γ -GTPのGSH代謝における生理的役割を検討した。
- (3)AM投与によるラット肝 γ -GTPの誘導機構を検討した。さらにAM投与時におけるGSH関連酵素系による肝GSH代謝の制御機構を提唱した。
- (4)GSH関連酵素系による肝GSH代謝の制御機構は、ラット、マウス、モルモットおよびハムスターにおいて違いがあるか否かを比較検討した。さらに毒性指標

の一つと考えられる脂質過酸化反応に対するGSHあるいは関連酵素系の関与を明らかにした。

(5)GSH関連酵素系の中で、 γ -GTP、GSTおよびGSH-Px活性は、ラット肝において著明な性差を示した。さらに、これらの酵素活性はGSH量の調節機構にも重要な影響を及ぼすことを明らかにした。

(6)ラット肝 γ -GTP、GSTおよびGSH-Px活性の性差は、性ホルモンによりどのような調節を受けるかを検討した。

(7)ラット肝のGSTおよびGSH-Pxは有機過酸化物に対して共通の酵素活性を示すにもかかわらず、全く異なる性差を示した。GST活性は雄性が高いのに対し、GSH-Px活性は雌性ラットが有意に高い。この両者の酵素活性の性差はGST、GSH-Px各アイソザイムのいずれに起因するのか、酵素化学的および免疫化学的に解明した。

第1編 ラット肝グルタチオン代謝と 関連酵素系

グルタチオン量の変動に直接影響を及ぼす因子としては、GSH合成系酵素の量的変化と分解酵素である γ -GTP活性が挙げられる。 γ -GTP活性の臓器内分布は腎臓において最も高く³⁾、従ってその生理的役割に関する研究も主として腎臓においてなされてきた。 γ -GTPのGSH代謝における生理的意義として、Meister²⁶⁾は本酵素が“ γ -グルタミルサイクル”の一員としてGSHと共役して細胞外のアミノ酸を細胞内に輸送するという仮説を提唱した (Fig. 1-1)。しかしながら、 γ -GTP活性をアフィニティラベルにより消失させた細胞は未処理の細胞とアミノ酸輸送能において全く差がみられないこと^{27, 28)}、さらに本酵素活性を

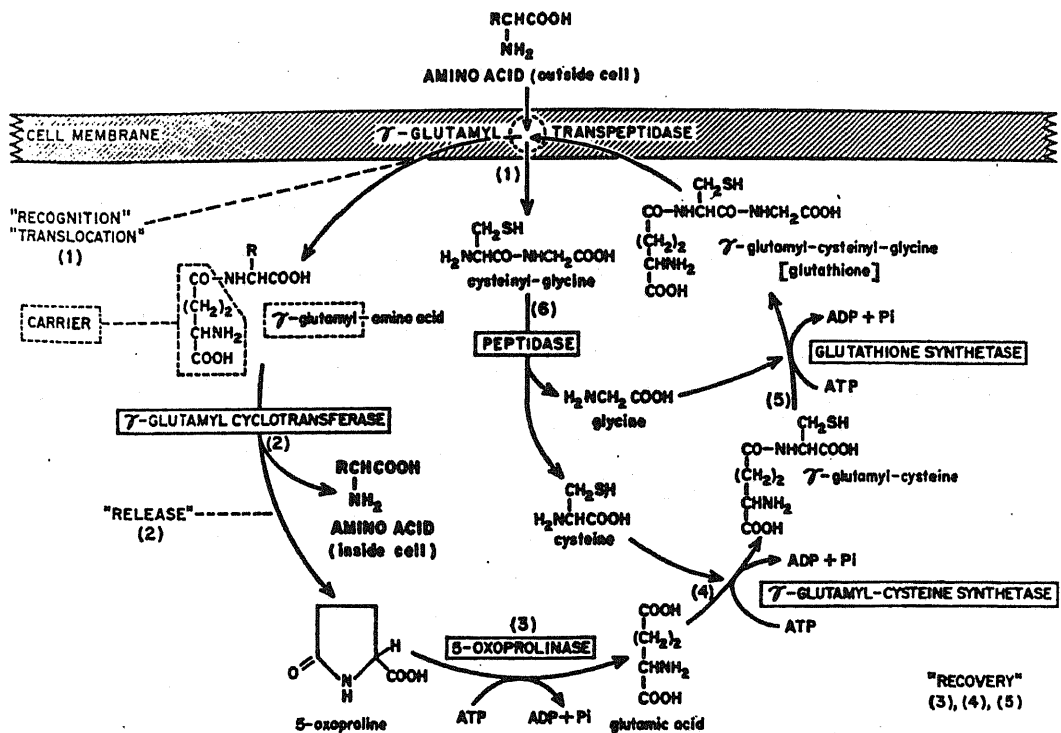


Fig. 1-1 γ -Glutamyl cycle.

遺伝的に欠損している患者の培養線維芽細胞も正常なアミノ酸輸送能を有することが報告されている^{4, 29)}。これらの事実は、Meisterにより提唱されている本酵素のアミノ酸共役輸送説と相容れない結果であり、その仮説の正否をめぐる論争が続いている。

一方、肝 γ -GTP活性は成熟動物においては極めて低い³⁾にもかかわらず、胎生末期⁶⁾、肝癌³⁰⁾において異常な高値を示すことから、本酵素は癌胎児性蛋白質の性質³¹⁾を有している。さらに血中の γ -GTPは肝臓由来である³²⁾ことから、血中 γ -GTP活性の変動は臨床上、肝障害あるいは肝癌診断の際の有用なマーカーの一つとして有望視されている。従って、肝 γ -GTPの生理機能を解明する上で、その局在性、酵素的諸性質を腎酵素と比較検討することは重要と考えられる。そこで、著者は成熟ラット肝臓より γ -GTPの精製を試み、両臓器に由来する本酵素の性質の異同を酵素化学的、免疫化学的に検討した。また、ラットにおいて胎生末期にみられる γ -GTP活性の高騰は肝臓に特異的なものか否かを周産期の母体、胎仔、新生仔の各組織の γ -GTP活性の変動を詳細に検討した。また、胎生末期の肝 γ -GTPの成熟肝あるいは腎 γ -GTPとの性質上の異同に関して検討した。

成熟ラット肝 γ -GTP活性はAM投与により著増することから、AMの誘導機構を検討した。さらに、AM投与による他の関連酵素活性の変動をも追跡し、得られた結果から肝グルタチオン代謝における関連酵素系による制御機構の存在を提示した。

第1章 成熟ラット肝 γ -GTPの精製 とその性質

1-1-1 成熟ラット肝 γ -GTPの精製法

【実験方法】

1. 動物

Sprague-Dawley 系雄性ラット (体重196-230g) を用いた。

2. γ -GTP活性の測定

基質としてはL- γ -グルタミル p-ニトロアニリドを用い、Orlowski と Meister の方法³³⁾を若干改良した方法³⁴⁾により測定した。酵素活性の1単位 (1 unit) は37℃で1分間あたり1 μ mole の p-ニトロアニリンを生成するに要する酵素量と定義した。なお、比活性は1mg 蛋白あたりの unit 数で表示した。

3. 蛋白定量

蛋白量は Lowry らの方法³⁵⁾により測定した。

4. 使用した緩衝液

Buffer A ; 50mM Tris-HCl, pH8.0

Buffer B ; 50mM Tris-HCl, pH8.0 / 0.2mMMgCl₂/ 0.2mM CaCl₂/ 0.5M NaCl

Buffer C ; 10mM Tris-HCl, pH8.0

【実験結果】

肝 γ -GTPの精製は下記の手順に従って行った。動物は頸動脈を切断し放血致死後、直ちに開腹し in situ にて1.15%KCl 溶液で灌流して血液を除去した。得られた肝臓 (910g) は冷 Buffer Aを加え、Potter-Elvehjem 型テフロンホモジナ

イザーにより33%ホモジネートを調製した。ホモジネートは2層のガーゼで濾過した後、105,000xg 30分超遠心分離を行った。得られた沈渣を Buffer Aで再懸濁し、さらに最終濃度 20mMになる様に2-メルカプトエタノールを加えた後、肝重量の1/50のパパインを添加し攪拌しながら、37℃ 6時間可溶化した。その後、105,000xg 60分遠心し、上清を可溶性画分とした。次に、これを50-95%飽和硫酸分画を行い、透析により脱塩後、Sephadex G-200 (4.2×76cm) カラムクロマイグラフィーを2回行い活性画分を得た。次に、BufferBで平衡化した Con. A-Sepharose 4 B カラムに apply し、BufferB で十分に洗った後、20mg/ml の α -methyl-D-glycoside を含む BufferBで溶出させた。活性画分を集め、濃縮後 BufferCで平衡化したDEAE-cellulose カラムに applyした。BufferCで十分カラムを洗った後、0.3M NaCl を含む BufferCで溶出し、ここで得られた活性画分を精製 γ -GTP 標品とした。Table 1-1 には各精製段階における総活性、比活性および収率を示した。なお、最終標品は、比活性で約 450倍に精製され、回収率は13%であった。

Table 1-1 Purification of γ -glutamyltranspeptidase from rat liver.

Step	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Yield (%)	Fold
105000xg precipitate	1080	62100	159.8	0.003	100.0	1.0
Papain treatment	920	—	96.6	—	60.5	—
50-95% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	200	5200	86.2	0.017	53.9	6.5
Sephadex G-200						
1st	25	1384	64.3	0.046	40.2	18.1
2nd	23	436	62.3	0.143	39.0	55.6
Con A-Sepharose	13	31	29.1	0.953	18.2	370.8
DEAE-Cellulose	6	18	20.6	1.156	12.9	449.9

1-1-2 精製肝 γ -GTP と腎酵素との免疫化学的比較

【実験方法】

1. 抗体作製

γ -GTP 抗体の作製にはラット腎より、肝臓の場合と同様にパパイんで可溶化して得られた精製標品を用いた。この精製標品は電気泳動的にはほぼ単一であった。また、その比活性は1304.6units/mg 蛋白であり、Hughey と Curthoys³⁶⁾ の精製標品 (693units/mg 蛋白) に比べ高い活性を示した。抗血清産生法は Noshiro と Omura の方法³⁷⁾ に準拠し、Fig. 1-2 の様に行った³⁸⁾。

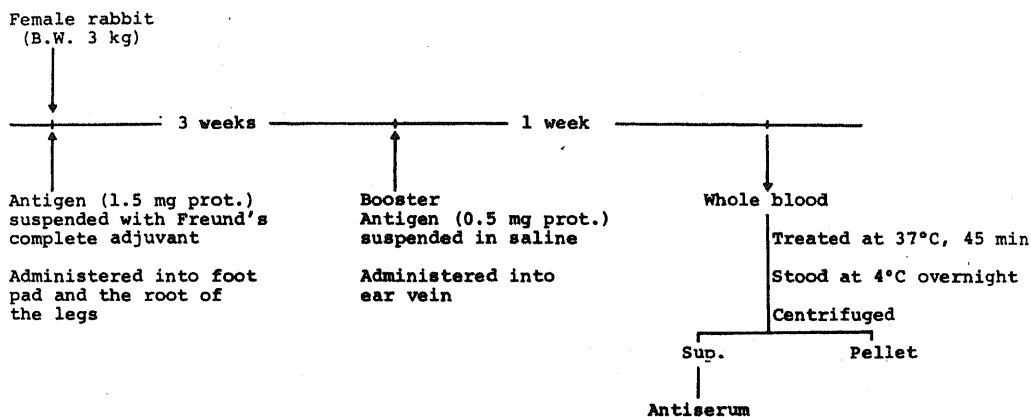


Fig. 1-2 Standard procedure for preparation of γ -GTP antiserum.

また、抗血清より IgG の作製は Noshiro と Omura の方法³⁷⁾ に従い、抗血清を 25-50% 飽和硫酸で 2 回分画した後、DEAE-cellulose カラムにより void に溶出される分画を非特異的 IgG とした。一方、 γ -GTP 特異抗体は抗血清を材料

として、Cuatrecasas の方法³⁹⁾により作製した CNBr-活性化 Sepharose 4 B カラムを用い、immunoabsorbent 法⁴⁰⁾に従って行った (Fig. 1-3)。

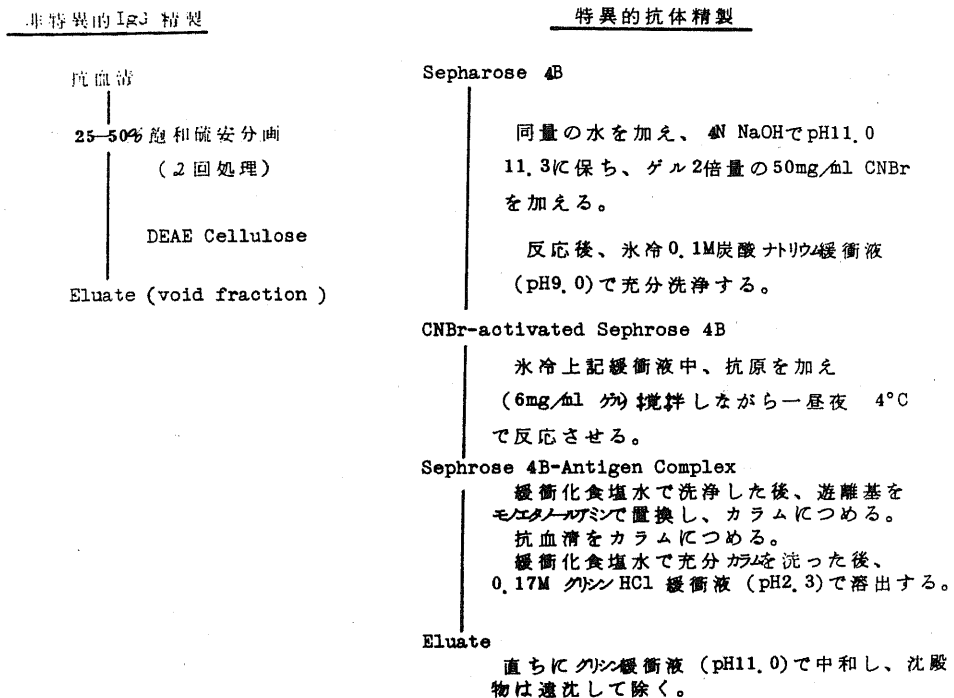


Fig. 1-3 Procedure for preparation of specific antibody against γ -GTP.

2. 阻害実験

肝臓または腎臓の精製 γ -GTP に種々の濃度の抗体を添加し、37°C で10分間インキュベートし、さらに4°C で1晩放置後、10,000xg 10分間遠心した。ここで得られた上清の γ -GTP 活性を測定し、control の IgG 存在下の活性を 100 としてパーセントで表示した。

3. 蛍光抗体法による細胞分布

蛍光抗体法は Nakane らの改良法⁴¹⁾に従い、以下の様に行った。肝臓および腎

臓組織を液体窒素中で凍結させ、クリオスタットで超薄切片（厚さ6 μm ）を作製した後アセトンで固定した。次に、この切片に腎 γ -GTP の特異抗体を反応させ、過剰の特異抗体を洗浄により除去した後、抗ウサギ（ヤギ IgG）-フルオロセイン Complex を反応させて結合したフルオロセインを螢光顕微鏡を用いて検鏡した。なお、抗ウサギ IgG（ヤギ IgG）-フルオロセイン Complex は千葉大学医学部附属環境疫学研究施設免疫研究部、矢野明彦博士（現、信州大学医学部寄生虫学教室）より御恵与頂いたものを用いた。

4. 肝細胞膜の単離

Coleman らの方法⁴²⁾に従って、ショ糖密度勾配遠心分画法により単離した。

5. 腎近位尿細管刷子縁 (Brush Border Membrane ; B B M) の単離

Booth と Kenny の方法⁴³⁾に従って、腎皮質より遠心分画法により単離した。

6. シアル酸の定量

Warren の方法⁴⁴⁾に従って行った。

7. ノイラミニダーゼ処理

γ -GTP 標品を 10mM CaCl₂ を含む 100mM Acetate buffer (pH 5.5) で透析後、1mg 蛋白あたり 2 unit のノイラミニダーゼを添加し 37°C 3 時間インキュベートした。このノイラミニダーゼ処理後の γ -GTP 標本にはシアル酸は検出されず、asialo型に変換していることが確認された。

【実験結果】

IgG および特異抗体を用いて、 γ -GTP の阻害活性を比較した結果、Fig. 1-4 から明らかな様に IgG と特異抗体では、その阻害度において著明な差がみられた。

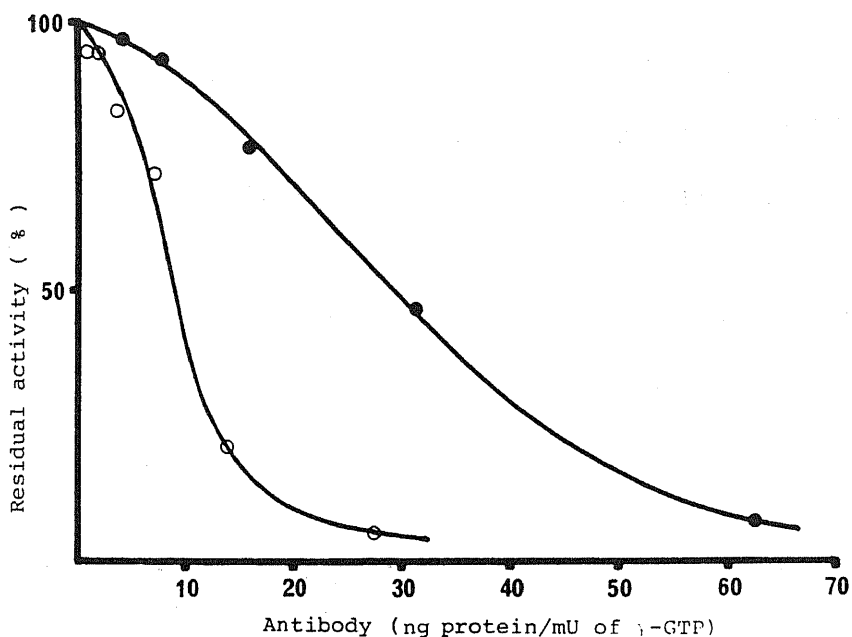


Fig. 1-4 Inhibition of γ -GTP activities by kidney γ -GTP IgG and specific antibody.

また、抗腎 γ -GTP抗体は、Ouchterlony 法において腎酵素および肝酵素に対して単一の沈降線を示し、完全に融合した。このことは肝酵素は腎酵素と共通の抗原決定基を有しており、免疫学的には両者に差異がないことを示している。

さらに、肝臓、腎臓の精製酵素標品について、ノイラミニダーゼ処理前と処理後における特異抗体による阻害度を比較した (Fig. 1-5)。その結果、ノイラミニダーゼ処理により、肝、腎 γ -GTP間の阻害率の差が短縮した。すなわち、シアル酸量の減少により肝 γ -GTPは腎型へ近づくことが示唆された。また、肝臓と腎臓から得た本酵素のシアル酸含量は、それぞれ 143.8および 50.2nmole/mg 蛋白であり、肝酵素の方が腎臓のそれより約3倍高値を示した。さらに、シアル酸は負に荷電していることから、電気泳動上において両者の易動度が異なり肝酵素は腎臓に比較して、より陽極側に活性ピークを示した。しかし、ノイラミニダーゼ処理により、肝酵素の活性ピークは腎臓のそれと同一位置に移動した。

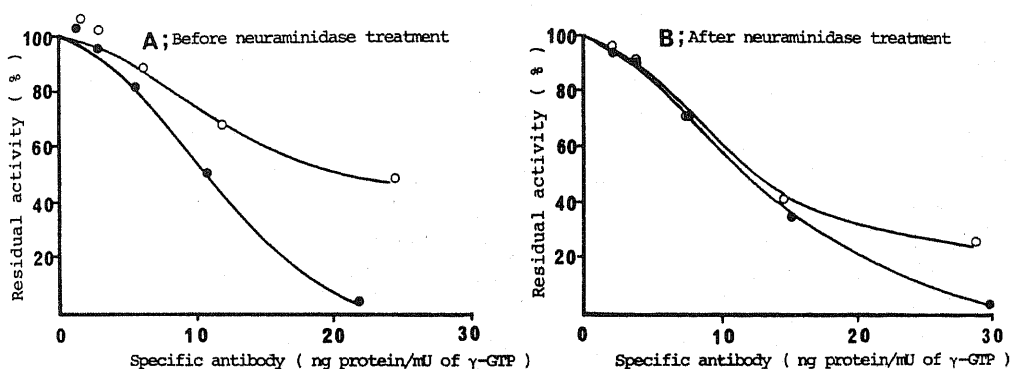


Fig. 1-5 Effect of neuraminidase treatment on inhibition of kidney and liver γ -GTP activities by specific γ -GTP antibody.

Open symbol represents liver γ -GTP and filled symbol indicates kidney γ -GTP. The enzyme and its antibody were incubated at 37°C for 10 min. After these mixtures were left overnight at 4°C and then centrifuged at $10,000\times g$ for 10 min, the activities of the supernatants were assayed. 1 mU of kidney and liver γ -GTP activities are 0.85 ng and 980 ng protein, respectively, before neuraminidase treatment, and 1.39 ng, 497 ng protein, respectively, after neuraminidase treatment.

一方、 γ -GTPの組織内分布について、腎酵素は近位尿細管の刷子縁に局在することが報告されている⁴⁵⁾。しかし、肝 γ -GTPに関してはほとんどの活性がミクロゾーム画分に局在するという報告⁴⁶⁾、また細胞膜画分に局在する¹⁰⁾という報告もあり明確な結論は得られていない。そこで、蛍光抗体法による肝、腎 γ -GTPの細胞内分布を検討した (Photo 1-1, 1-2)。Photo 1-1 より明らかな様に、腎 γ -GTPは近位尿細管に局在していることが確認された。また細胞分画法による活性分布においても皮質ホモジネートと腎近位尿細管刷子縁 (B. B. M) とで、それぞれ 1.41と 14.11 units/mg 蛋白であり B. B. M に活性が局在していることが確認された。一方、肝 γ -GTPに関しては Photo 1-2 に示す様に、細胞膜上に明白な γ -GTPの局在がみられた。また、ショ糖密度勾配法による細胞膜標品ではホモジネートレベルの約55倍の活性 (34.4 units/mg 蛋白) が認められた。

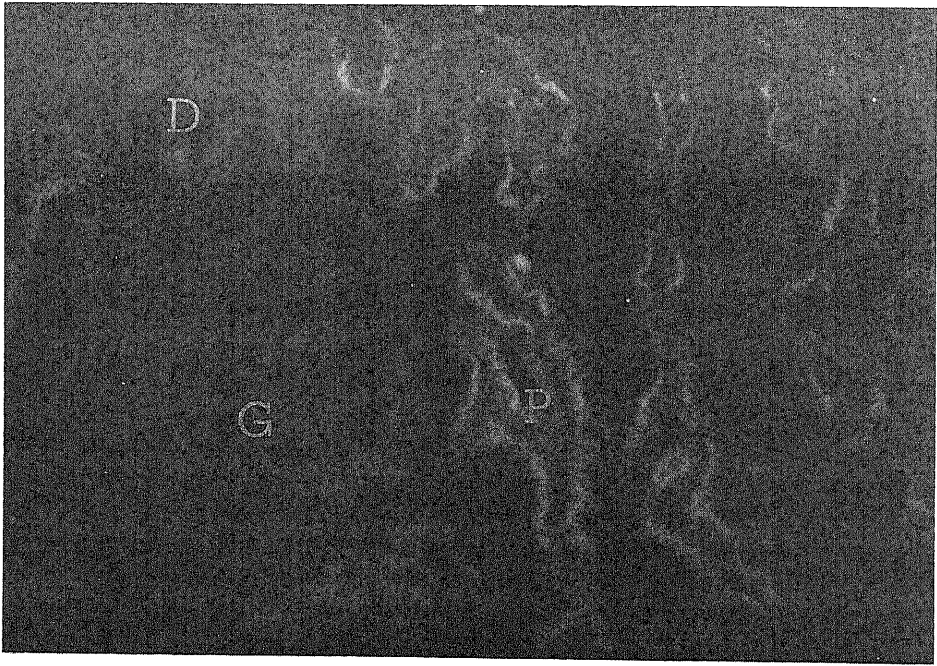


Photo 1-1 Localization of renal γ -GTP in normal rats.

D: 遠位尿細管, P: 近位尿細管, G: 糸球体

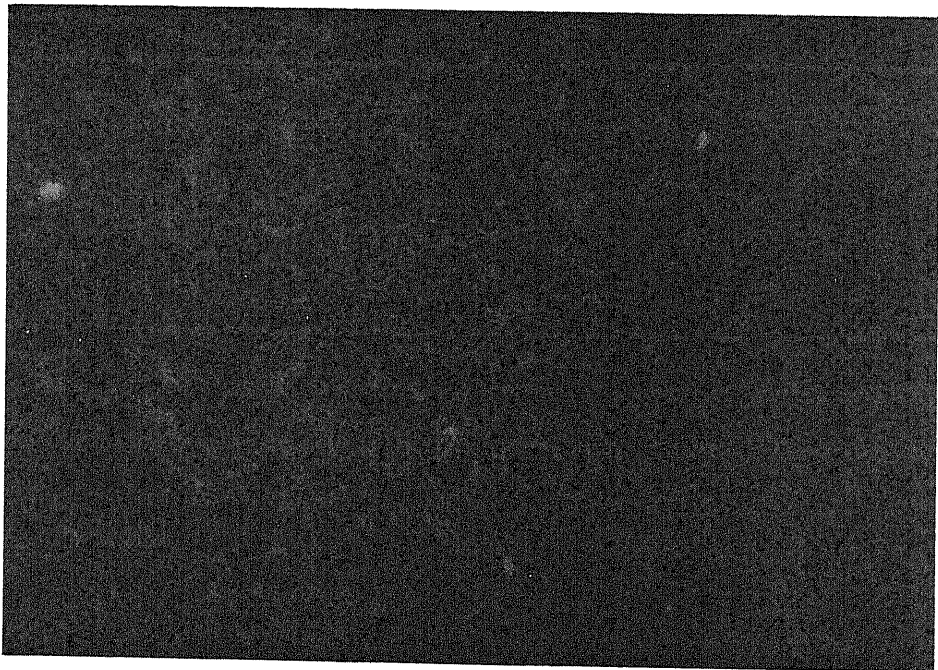


Photo 1-2 Localization of hepatic γ -GTP in normal rats.

1-1-3 肝 γ -GTP の Kinetics による解析

【実験結果】

γ -GTP は活性部位として γ -グルタミルペプチドと反応する donor site およびアミノ酸、ペプチドを結合する acceptor site の両者より構成されていることが知られている^{47, 48, 49}。そこで、肝、腎両酵素の donor 基質である γ -glutamyl p-nitroanilide に対する K_m 値を Lineweaver-Burk plot により求めた。

さらに donor 基質と競合的に拮抗する anthglutin (1- γ -L-glutamyl-2-(2-carboxyphenyl) hydrazine)⁵⁰ に対する K_i 値を Dixon plot により算出した (Table 1-2)。

Table 1-2 Kinetics of γ -GTP from kidney and liver in rats.

Properties	Kidney	Liver
K_m for γ -glutamyl p-nitroanilide (M)	1.04×10^{-3}	1.35×10^{-3}
K_i for anthglutin (M)	6.5×10^{-6}	5.5×10^{-6}

The values of K_m for L- γ -glutamyl p-nitroanilide and K_i for anthglutin were determined by Lineweaver-Burk plots and Dixon plots, respectively.

その結果、 γ -glutamyl p-nitroanilide に対する見かけ上の K_m 値および anthglutin に対する K_i 値は、両酵素共ほぼ同じであった。従って、 γ -GTP の donor site に対する親和性については肝、腎臓間に有意な差のないことが明らかとなった。

第2章 ラット周産期における γ -GTPの臓器内分布と 活性変動

【実験方法】

1. 動物

Sprague-Dawley系雌雄ラット(9週令)を購入し、雌雄を別々に1ケージに2~3匹入れ、約1週間予備飼育した。その後、夕方雄、雌一匹ずつを交配し、妊娠は翌朝、膣栓の有無を調べて確認した。また、膣栓の存在が確認された日を妊娠第0日とした。妊娠ラットについて経日的に犠殺し、帝王切開により胎仔、胎盤、子宮壁および羊水を摘出した。同時に母ラットの肝臓および腎臓も取り出した。なお、同腹の胎仔の肝臓と腎臓はそれぞれプールして用いた。以上の各組織は1.15% KCl溶液で10%ホモジネートにし活性測定に用いた。また、胎仔肝ホモジネートを105,000 \times g 60分遠心し、沈渣と上清をそれぞれ膜結合性と可溶性 γ -GTP画分として実験に供した。

2. γ -GTP抗体による阻害実験

反応液の組成は、各酵素溶液(50mU/ml) 0.25ml, 抗腎 γ -GTP IgG 0.125ml さらにBSA溶液を加え全量0.5mlとし、それを4℃1晩、放置後10,000 \times g 10分間遠心して得られた上清の γ -GTP活性を測定した。抗体による阻害度はcontrolのIgG(0.5mg 蛋白)存在下の残存活性のパーセントで表示した。

3. ノイラミニダーゼ処理

胎盤 γ -GTPおよび胎仔肝の膜結合性 γ -GTPは、第1章の成熟ラット肝 γ -GTPの場合と同様、パピンで可溶化後、DEAE-Sephadexカラムにより部分精製して用いた(比活性;胎盤 γ -GTP, 0.324;胎仔肝膜結合性 γ -GTP, 7.23U/mg蛋白)。また、胎仔肝可溶性 γ -GTPはDEAE-Sephadexにより部分

精製した (比活性 ; 7.53mU/mg 蛋白)。以上の各 γ -GTP 標品と成熟ラット肝 γ -GTP 精製標品を 1-1-2 の方法に従ってノイラミニダーゼ処理した。

1-2-1 妊娠期および授乳期における肝臓および腎 γ -GTP 活性の変動

【実験結果】

Fig. 1-6 に妊娠期間および授乳期間における胎仔と新生仔の肝, 腎 γ -GTP 活性の変動を示した。これから明らかな様に, 腎 γ -GTP 活性は成長に伴って漸

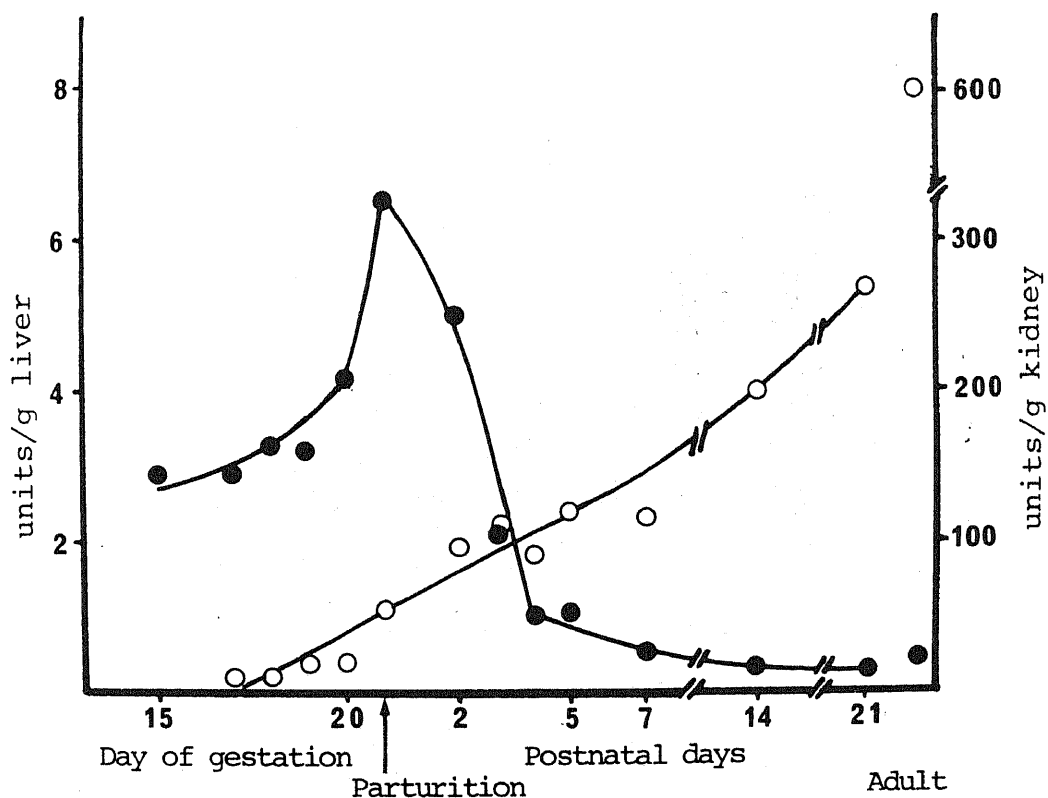


Fig. 1-6 Changes in γ -GTP activities of rat liver and kidney during development.

The left and right ordinates indicate γ -GTP activities in the liver (●) and Kidney (○), respectively. γ -GTP activities of rat liver and kidney during development were measured in homogenates ranging in age from day 15 and 17 of gestation to 11 weeks after birth, respectively.

次上昇したのに対し、肝 γ -GTPは出生時に最大活性を示し、成熟ラット肝レベルの約30倍の高値を示した。しかし、生後、急速に活性は減少し、僅か1週間で成熟ラット肝のレベルまで減少した。また、新生仔肝にみられる生後急速な活性の低下は、血中 γ -GTP活性の経日的減少とよく相関した($r=0.873$)。この様な肝、腎 γ -GTP活性変動を両者の割合で示すとFig. 1-7の様になる。すなわち、

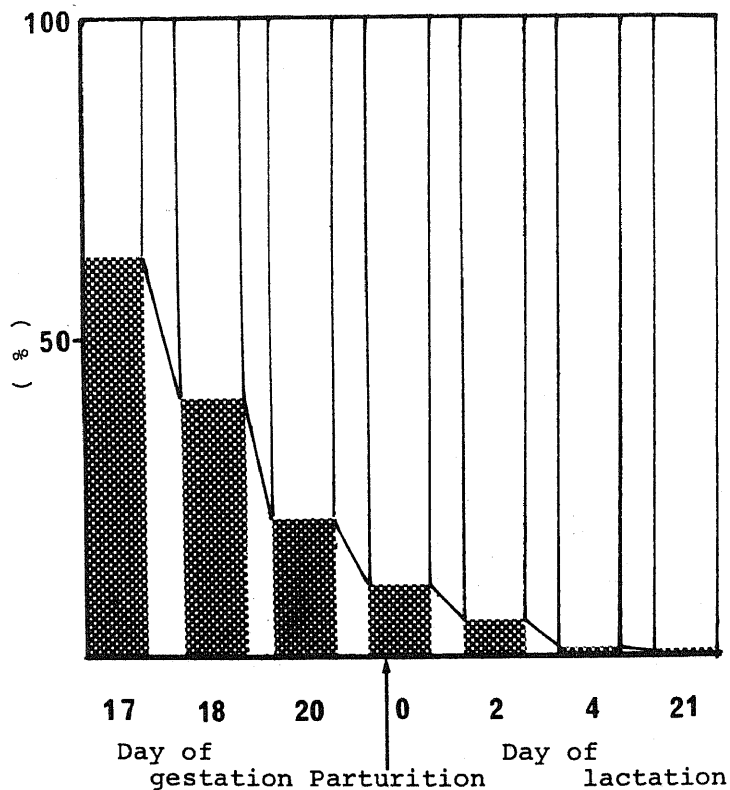


Fig. 1-7 Ratio of specific activities of liver and kidney γ -GTP in rats during development. Liver (■), Kidney (□).

胎生17日目では肝活性の方がむしろ高いが成長に伴い、肝活性の占める割合は減少し、3週令で腎活性の1/1000まで減少してしまう。

一方、母体の肝、腎 γ -GTP 活性は、妊娠期間および授乳期間いずれもほとんど一定で有意な変動はみられなかった。

1-2-2 妊娠期間における胎盤、子宮壁、羊水の γ -GTP 活性の変動

【実験結果】

Fig. 1-8 に示す様に羊水中の γ -GTP 活性は胎仔肝 γ -GTP 活性の変動と同様に、胎生末期に高値を示した。しかし、胎盤の γ -GTP 活性は逆に、妊娠初期に高く、末期になるにつれて減少した。さらに子宮壁の γ -GTP 活性は母体の γ -GTP 活性を反映して一定であった。

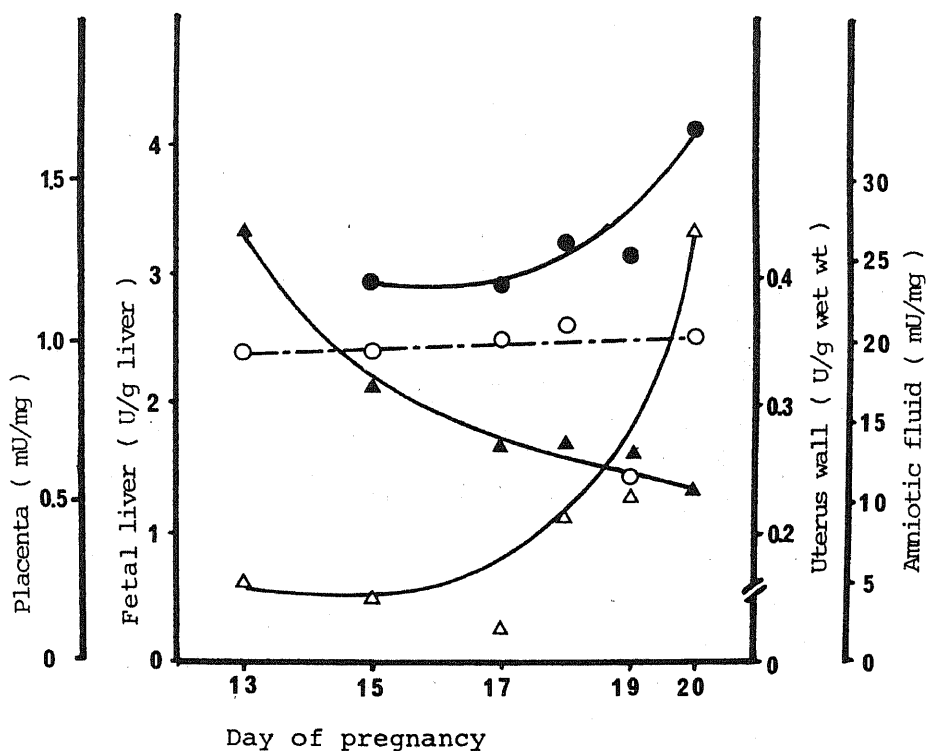


Fig. 1-8 Changes of γ -GTP activities of various tissues during pregnancy in rats. Placenta (\blacktriangle), uterus wall (\circ), amniotic fluid (\triangle), fetal liver (\bullet).

1-2-3 胎仔肝ならびに胎盤 γ -GTP の Kinetics と免疫学的解析

【実験結果】

Table 1-3 に γ -glutamyl p-nitroanilide に対する K_m 値および anthglutin に対する K_i 値を示したが、いずれも有意な差異はみられなかった。

Table 1-3 Some properties of γ -GTP from adult, fetal liver and placenta.

Properties	Adult liver M.B.	Fetal liver M.B.	Fetal liver Sol.	Placental M.B.
K_m for γ -glutamyl p-nitroanilide (mM)	1.35	0.86	1.39	1.0
K_i for anthglutin (μ M)	5.5	6.1	---	---

The values of K_m for L- γ -glutamyl p-nitroanilide and K_i for anthglutin were determined by Lineweaver-Burk plots and Dixon plots, respectively.

The abbreviation used is : M.B., membrane-bound enzyme. Sol., soluble enzyme

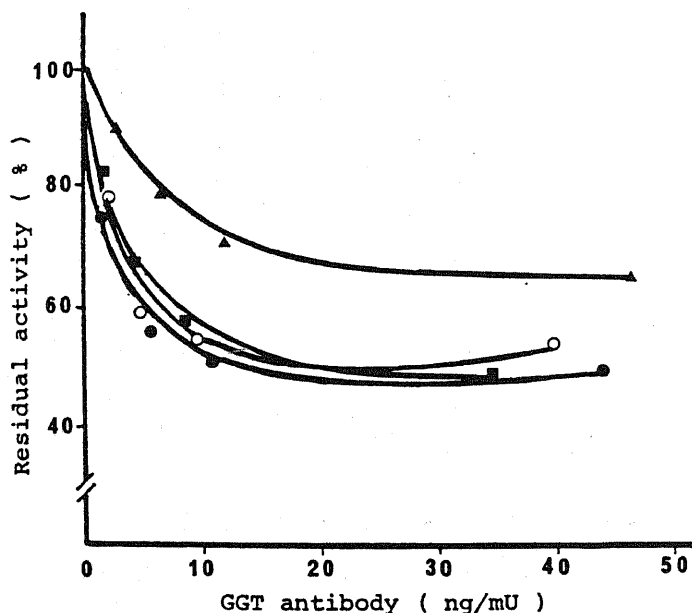


Fig. 1-9 Inhibition of γ -GTP activities of fetal and placental membrane-bound, fetal liver soluble and adult liver membrane-bound enzymes by γ -GTP antibody in rats. Membrane-bound: fetal (■), placental (●), adult liver (○); fetal liver soluble (▲).

成熟肝では可溶性 γ -GTP 活性はほとんど認められないが胎仔肝においては、肝臓の総括性の約16%を占めた。さらに、 γ -GTP 抗体による阻害実験では、胎仔肝可溶性 γ -GTP のみが他の膜結合性酵素に比較して阻害程度が低かった (Fig. 1-9)。

そこで、胎仔肝可溶性 γ -GTP をノイラミニダーゼ処理により asialo 体にし、同様な阻害実験を行った (Fig. 1-10)。その結果、可溶性 γ -GTP は asialo 体に変換すると阻害度が増強され、膜結合性のそれにほぼ近づくことが認められた。

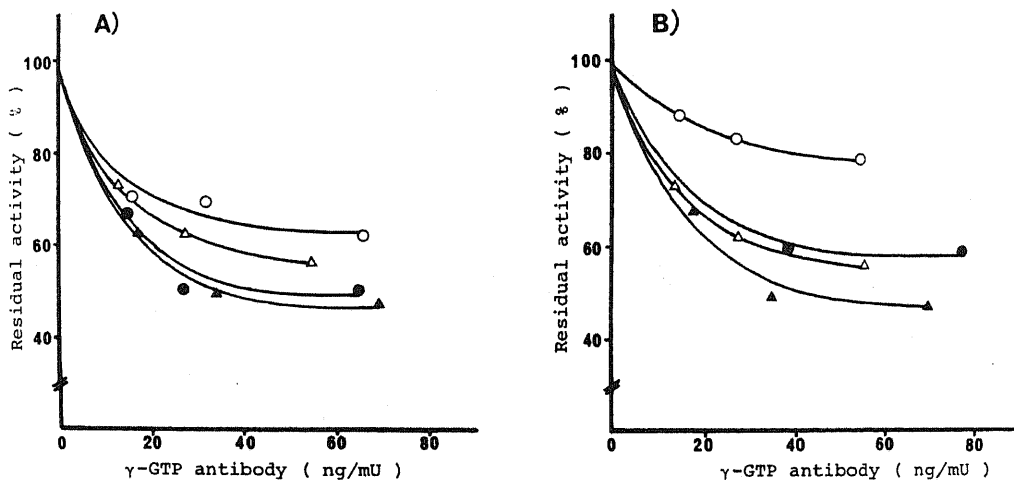


Fig. 1-10 (A) Inhibition of membrane-bound γ -GTP activities of adult liver and placenta by γ -GTP antibody before and after neuraminidase treatment. Circles and triangles indicate placenta and adult liver, respectively. (B) Inhibition of γ -GTP activities of fetal liver soluble and adult rat liver by γ -GTP antibody before and after neuraminidase treatment. Circles and triangles indicate fetal liver soluble and adult liver, respectively. On both (A) and (B), open and closed symbols are for residual activity before and after neuraminidase treatment, respectively.

第3章 アミノピリン投与によるラット 肝 γ -GTPの誘導機構

【実験方法】

1. 動物および投与方法

Sprague-Dawley 系雄性ラット（体重120-160g）を用いた。動物は無作為に4群に分け、第1群は control 群として5%アラビアゴムを100g体重あたり0.5ml投与した。第2群はアミノピリン（AM）を600mg/kg 1日1回20日間連続投与した。第3群と第4群は各々、アミノアンチピリン（AA）とアセトアミドアンチピリン（AC）をAM600mg/kg当量、すなわち、525と635mg/kgを同様に連続投与した。なお、すべての薬物は5%アラビアゴムに懸濁し、経口投与した。

最終投与24時間後に、ラットを犠殺し1.15% KCl で灌流して肝臓の血液を除去した後、直ちに肝臓と腎臓を摘出し、1.15%KCl でホモジネートとして実験に供した。血清は犠殺前に眼底採血により集め、10分間遠心して血清を得た。

2. γ -GTP活性の測定

γ -GTP活性は1-1-1に記した方法により測定した。

3. 血中GOT, GPTの測定

GOT, GPTはヤトロン社（東京）製のキットを用いて測定した。

4. 病理組織学的検索

肝組織を10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、常法によりH-E染色を行った。

1-3-1 肝, 腎 γ -GTP 活性に及ぼす影響

【実験結果】

アミノピリン (AM) は生体内において肝ミクロゾームの薬物代謝酵素系により代謝され, アミノアンチピリン (AA) となり, さらにアセチル化を受けアセトアミドアンチピリン (AC) まで代謝されることが知られている。そこで, AMとその代謝物であるAAならびにACの連続投与による γ -GTP活性の変動を検討した。Table 1-4 に示す様にAM投与群では肝臓において著明な γ -GTPの誘導がみられ control 群の約13.1倍に達した。また, AA投与群では約2倍の活性増加が

Table 1-4 Effect of pretreatment of rats with AM, AA or AC for 20 days on γ -GTP activities in the whole homogenates of liver and kidney.

Treatment	N	Liver γ -GTP activity			Kidney γ -GTP activity		
		munit/mg prot.)	(unit/g liver)	(unit/whole liver)	(unit/mg prot.)	(unit/g kidney)	(unit/whole kidney)
Control	8	2.62±0.31 ^a	0.486±0.055	3.37±0.38	4.14±0.17	509±28	873±40
AM	8	24.90±5.40 ^b	3.730±0.920 ^c	44.20±8.07 ^b	4.24±0.41	468±25	1009±68
AA	10	4.57±0.84	0.690±0.107	6.68±1.22 ^d	4.34±0.23	504±17	983±60
AC	7	3.64±0.31 ^d	0.519±0.030	3.98±0.33	4.30±0.17	481±25	917±38

^a Mean ± S.E.

^b P<.001 vs. control.

^c P<.01 vs. control.

^d P<.05 vs. control.

みられ, AC投与群では活性の上昇は最も小さかった。これらの知見より, AM投与による肝 γ -GTPの誘導は, AM自身あるいは, 少なくともAAに変換される前の代謝物による誘導効果に起因するものと考えられる。一方, 腎 γ -GTPに関しては, いずれの投与群でも有意な活性の変動はみられなかった。

1-3-2 血清GOT, GPTおよび γ -GTP活性に対する影響と 病理組織学的知見

【実験結果】

AMおよびその代謝物を20日間連続投与することにより、血清GOTおよびGPTはいずれの投与群でも増加は認められず、逆に減少した。一方、血清 γ -GTP活性はAM投与群において著明な上昇がみられた (Table 1-5)。肝ミクロゾーム酵素を誘導することが知られているフェニトイン⁵¹⁾、エタノール⁵²⁾を連続投与した場合も血清 γ -GTP活性の上昇が報告されている。従って、薬物投与により肝 γ -GTP活性が上昇する際に、血清 γ -GTP活性の上昇を伴うことから、血清 γ -GTPは肝ミクロゾーム酵素の誘導時の優れた指標になると考えられている⁵³⁾。

Table 1-5 Effect of pretreatment of rats with AM, AA or AC for 20 days on serum γ -GTP and GPT and GOT activities.

Treatment	N	γ -GTP (munit/ml)	GPT / GOT (Karmen unit/ml)	
			GPT	GOT
Control	8	1.29 \pm 0.16 ^a	28.9 \pm 1.5	122.0 \pm 6.9
AM	8	4.09 \pm 0.69 ^b	24.4 \pm 1.3 ^c	89.5 \pm 7.1 ^b
AA	10	2.68 \pm 0.41 ^c	24.5 \pm 1.8	91.1 \pm 5.3 ^b
AC	7	1.64 \pm 0.05	22.3 \pm 1.9 ^c	85.1 \pm 5.9 ^b

^a Mean \pm S.E.

^b P<.01 vs. control.

^c P<.05 vs. control.

また、AM20日間投与後のラット肝臓のH-E染色による病理組織学的検索では、特に異常は認められなかった。

1-3-3 肝 γ -GTP の細胞内分布

【実験結果】

AMによる肝 γ -GTP活性の著増に関して、細胞分画法による各細胞下画分とシヨ糖密度勾配法による細胞膜標品について各々 γ -GTP活性を比較検討した (Table 1-6)。その結果、細胞膜に局在する γ -GTPがAM投与により著明に誘導されることが明らかとなった。

Table 1-6 Subcellular distribution of hepatic γ -GTP activity after repeated administration of AM to rats for 7 consecutive days.

Subcellular fraction	γ -GTP activity (mU/mg protein)		Fold
	Control (3)	AM-treated (3)	
Homogenate	1.61 \pm 0.20 ^a	3.79 \pm 0.48 ^b	2.4
Mitochondria	0.68 \pm 0.03	1.20 \pm 0.05 ^c	1.8
Microsomes	2.15 \pm 0.03	4.92 \pm 0.85 ^b	2.3
Cytosol	0.74 \pm 0.05	0.96 \pm 0.01 ^b	1.3
Plasma membrane	4.94 \pm 1.26	96.85 \pm 24.59 ^b	19.6

Enzyme activity was assayed 24 hr after the last administration of AM.

^aMean \pm S.E. Values in parentheses represent the number of animals used.

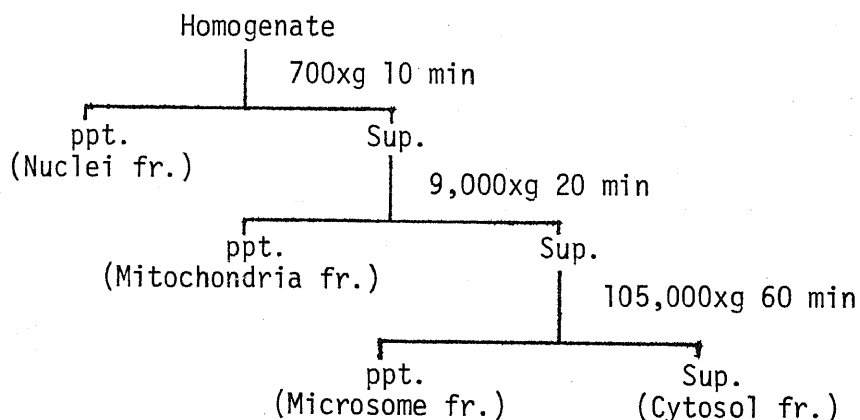
^bP < 0.05 vs control; ^cP < 0.001 vs control.

第4章 ラット肝グルタチオン代謝における関連酵素系の生理的役割

【実験方法】

1. 動物と投与方法

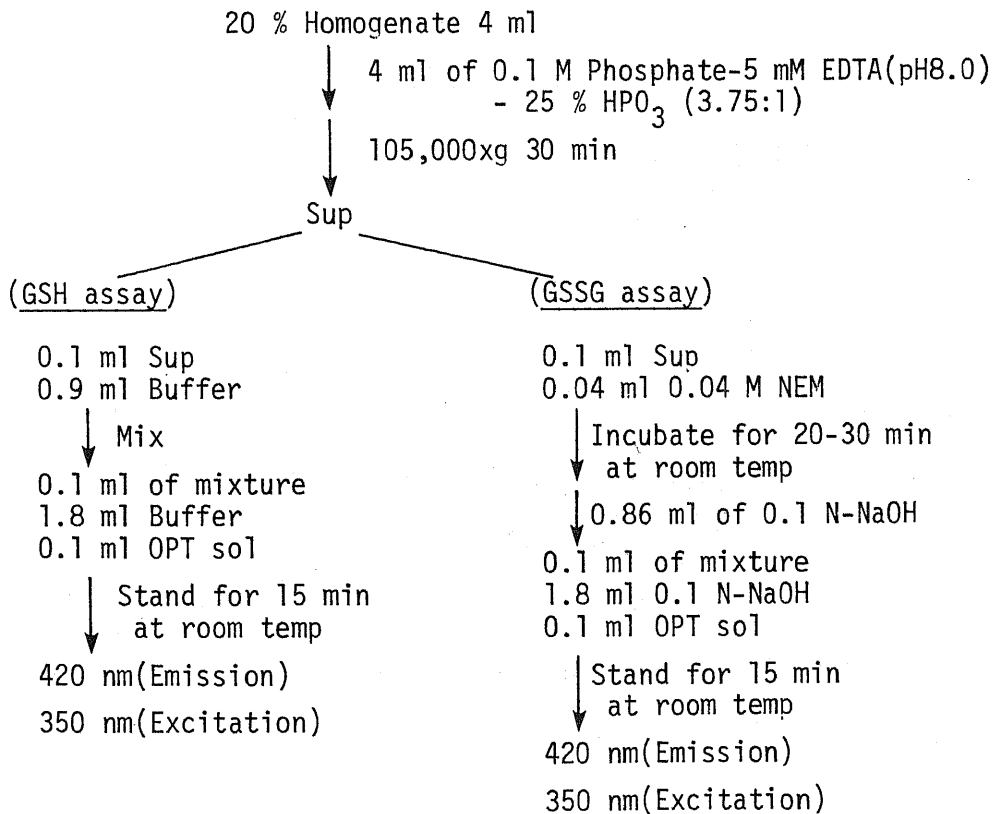
Sprague-Dawley 系雄性ラット (105-170g) を用い、約1週間の予備飼育後、動物は無作為に2群に分けた。第1群は control 群とし、他の1群はアミノピリン (AM) (600mg/kg) 投与群とした。AMは5%アラビアゴム溶液に懸濁し、1日1回経口投与した後、最終投与24時間目に犠殺した。犠殺時間は肝GSHの日内変動の影響を避けるために午前9時から10時の間に行った。血液はエーテル麻醉下、眼底採血により得た。肝臓は灌流瀉血後、直ちに冷1.15% KCl にて20%ホモジネートとし、ガーゼを通して濾過した後、一部は γ -GTP活性、システイン量およびGSHとGSSG量測定に用いた。細胞下分画は下記の通り行った。



各分画の γ -GTP活性を測定すると共に、GSH-Px活性および γ -グルタミルシステイン合成酵素活性は cytosol 分画について測定した。

2. GSH, GSSG量の測定

肝グルタチオン量の定量は, Ellman により開発されたDTNB (5,5 -dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) 法⁵⁴⁾がよく知られている。本法は non-protein SHを定量する方法であり, 肝臓においては non-protein SH量を肝GSH量とて表示する場合がある。しかし, 肝臓におけるグルタチオンは, 実際にはGSHの他GSSGとしても存在する。従って, GSHとGSSGを特異的にしかも同時に測定できる方法が要求され, それに応じて開発されたのが Hissin と Hilf による螢光法⁵⁵⁾である。そこで, 本実験では Hissin と Hilf の方法に準じて下記の様に行った。20%ホモジネート 4 ml に可及的速やかに冷 0.1Mリン酸-5mM EDTA (pH 8.0) と 25%メタリン酸 (3.75:1) 混合液 4 mlを加え, 105,000xg 30分遠心後, その上清画分のGSH, GSSG量を個々に螢光光度計により測定した。



Buffer ; 0.1 M Na-phosphate-5 mM EDTA (pH 8.0)

OPT sol ; 10 mg o-Phthalaldehyde/10 ml in MeOH

3. システイン量の測定

ホモジネートに4倍量の冷5%HC10₄を加え、2,800xg 60分遠心後、得られた上清中のシステイン量を Gaitonde の方法⁵⁶⁾に準じてニンヒドリン試薬を用いて測定した。

4. γ -GTP活性の測定

1-1-1 に記した方法により測定した。

5. γ -グルタミルシステイン合成酵素活性の測定

Griffith らの方法⁵⁷⁾に従い、下記の様に行った。反応液(1ml)は0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.2), 5mM ATP-Na, 20mM MgCl₂, 10m M L-sodium glutamate, 10mM L- α -aminobutyrate, 2mM EDTA, 0.02mg BSA, cytosol とし、反応開始はATP添加により行い、37℃15分インキュベートした。冷10% TCA 1ml添加して反応を停止し、遠心して得られた上清中の無機リン酸量を Fiske と SubbaRow の方法⁵⁸⁾により測定した。

6. GSH-Px 活性の測定

Paglia とValentine の方法⁵⁹⁾を若干改良して⁶⁰⁾測定した。反応液組成(1ml)としては、0.1M Tris-HCl buffer (pH7.2), 1mM GSH, 0.2mM NADPH, 2 IU GSSG reductase, cytosol を含み、これに基質として0.25mM H₂O₂ あるいは1.2mM Cumene hydroperoxide (CHP) を添加した。活性は分子吸光係数 $6.22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて1分間あたりに酸化されるNADPHのnmole 数で表示した。

1-4-1 肝臓および血漿中グルタチオン量の変動

【実験結果】

AM連続投与による経日的な変動としては、15日間連続投与により肝GSH量は有意に増加したが (Table 1-7)、GSSG量およびGSSG/GSH比には有意な変動はみられなかった。

Table 1-7 Effect of repeated administration of aminopyrine on hepatic reduced and oxidized glutathione levels and glutathione redox ratio in rats.

Item	Administration period (days)			
	5		15	
	Control (10)	AM (8)	Control (5)	AM (4)
GSH				
nmole/mg prot	37.4±2.3	34.4±1.5	32.8±2.1	39.5±1.0*
μmole/g liver	5.2±0.2	5.3±0.3	5.2±0.2	6.2±0.3*
GSSG				
nmole/mg prot	2.49±0.14	2.14±0.15	1.78±0.07	1.96±0.03
μmole/g liver	0.36±0.02	0.33±0.02	0.28±0.01	0.31±0.01
[GSSG]/[GSH]				
molar ratio	0.070±0.002	0.062±0.003	0.055±0.003	0.051±0.003

All values indicate mean±S.E. Numbers in parenthesis are the numbers of animals used. *P<0.01 vs control

また、肝GSH量の増加が認められたAM15日間連続投与時において、GSH合成の律速酵素である⁶¹⁾γ-グルタミルシステイン合成酵素活性に有意な変動はみられなかった (Table 1-8)。

Table 1-8 Effect of repeated administration of aminopyrine for 15 days on hepatic contents of glutathione and the activity of γ -glutamyl cysteine synthetase.

	Control (7)	AM (10)	P
GSH			
nmole/mg prot	25.1 \pm 1.9	33.8 \pm 1.0	0.01
μ mole/g liver	4.1 \pm 0.2	5.3 \pm 0.2	0.01
GSSG			
nmole/mg prot	1.96 \pm 0.14	2.04 \pm 0.05	n.s.
μ mole/g liver	0.32 \pm 0.02	0.32 \pm 0.01	n.s.
γ -Glu-Cys synthetase			
nmole/min/mg prot	24.7 \pm 1.6	26.4 \pm 3.1	n.s.
μ mole/min/g liver	2.03 \pm 0.12	2.49 \pm 0.24	n.s.

Results are means \pm S.E. n.s.: not significant
For details, see the legend to Table I.

一方、血漿中のGSSG量は、AM投与により顕著に増加した (Table 1-9)。

Table 1-9 Plasma levels of reduced and oxidized glutathione after repeated administration of aminopyrine for 15 days.

	Control (5)	Aminopyrine (5)
GSH		
nmole/ml	0.28 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01
GSSG		
nmole/ml	4.1 \pm 0.7	16.9 \pm 2.8*

All values are means \pm S.E. Numbers in parenthesis are the numbers of animals used.

* P<0.01 vs control For details, see the legend to Table I.

1-4-2 γ -GTP活性の変動とシステイン量との相関性

【実験結果】

Fig. 1-11 はAM投与による各細胞下画分の γ -GTP活性の変動を示した。ホモジネートにおける γ -GTP活性はAMの投与日数に比例して増加した。さらに、その活性変動パターンは核分画のそれによく反映したが、ミトコンドリア分画、ミクロソーム分画、cytosol分画では、ほとんど有意な活性変動はみられなかった。

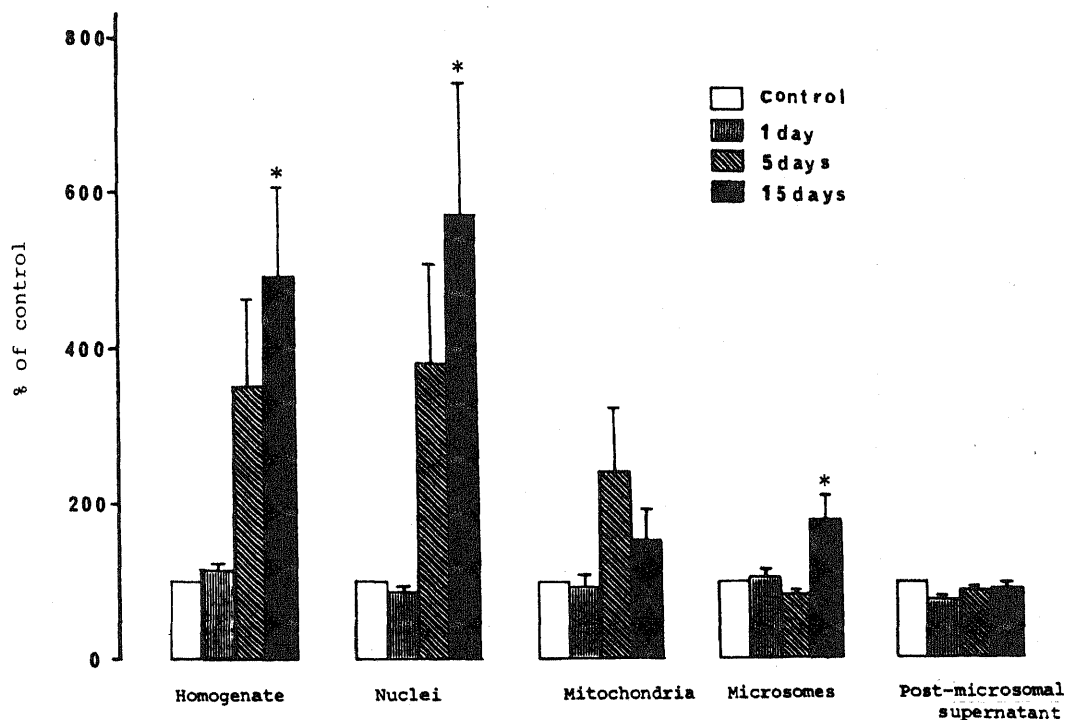


Fig. 1-11 Hepatic subcellular distribution of γ -glutamyl transpeptidase activities in rats after administration of aminopyrine for 1, 5 and 15 days.

γ -GTP activity was measured 24 hr after aminopyrine administration for 1, 5 and 15 days. The activity of the control in each fraction is as follows, mean \pm S.E. (mU/mg prot): 2.04 ± 0.10 (n=10) in homogenates, 2.82 ± 0.23 (n=10) in nuclei, 1.91 ± 0.13 (n=10) in mitochondria, 2.94 ± 0.21 (n=10) in microsomes, 0.78 ± 0.04 (n=4) in post-microsomal supernatant. The half bars are 1 S.E. * $p < 0.05$ vs control

また、AM投与時にみられる肝 γ -GTP活性の上昇と肝システイン量の増加との間には高い相関性 ($r=0.8854$) が認められた (Fig. 1-12)。

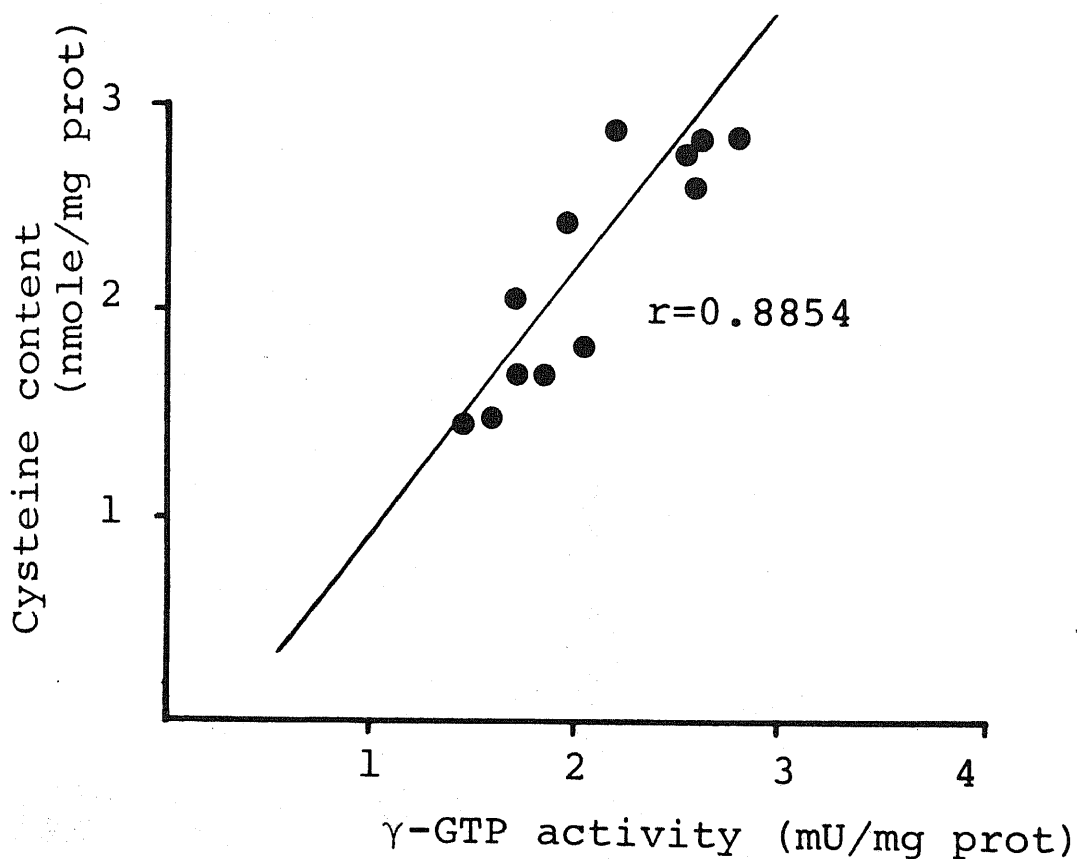


Fig. 1-12 Relationship between hepatic γ -GTP activities and cysteine contents after repeated administration of aminopyrine to rats.

1-4-3 GSH-Px 活性に及ぼすAM投与の影響

【実験結果】

Table 1-10 に示す様に, H₂O₂ を基質とした場合には単回投与の場合を除いてほとんど活性の変動はみられなかった。それに対して, CHPを基質としたGSH-Px 活性は著明な増加を示した。

Table 1-10 Effect of repeated administration of aminopyrine on hepatic glutathione peroxidase activities in rats.

Substrate	Administration period (days)					
	1		5		15	
	Cont(10)	AM(10)	Cont(10)	AM(10)	Cont(7)	AM(10)
	μmole/min/g liver					
Cumene hydroperoxide (1.2mM)	16.8 ±0.9	21.3* ±0.9	21.1 ±0.9	29.6* ±0.8	18.6 ±0.8	27.2** ±1.1
Hydrogen peroxide (0.25mM)	7.7 ±0.8	11.8* ±1.2	10.3 ±0.8	10.9 ±0.5	8.3 ±0.9	6.6 ±0.6

Results are means±S.E. *P<0.01, **P<0.001 vs control
For details, see the legend to Table I.

第5章 考察

γ -GTPの精製に関しては比活性の最も高い腎臓を用いた方法が多く報告されているが、肝臓からの精製については Ding ら⁶²⁾の報告があるのみである。今回、用いた著者の方法は Ding らの方法に比較してより簡易で、しかも得られた精製標品の比活性や収率の点でも優れている。肝酵素の donor substrate に対する Kinetics の解析の結果、 K_m 値および K_i 値は腎酵素のそれと同じであった。また、免疫化学的検討においても、肝酵素と腎酵素は完全に融合した。しかし、抗体阻害実験において肝酵素の方が若干阻害されにくかった。このことは γ -GTPの糖鎖を修飾しているシアル酸の含量の差によると考えられ、事実ノイラミニダーゼ処理後の肝酵素では抗体阻害活性は腎酵素のそれにほぼ近づいた。これらの知見から肝 γ -GTPと腎 γ -GTPの相違点は蛋白部分の一次構造よりは、むしろ修飾部位のシアル酸含量の量的な差に起因することが推定される。

γ -GTPは大部分が膜結合性であるが、可溶性の形で存在する場合もあり、例えば胎仔肝ではその上清中に含まれる酵素活性は肝臓中 γ -GTPの総活性の約16%にも達した。免疫学的検討から胎仔肝可溶性酵素は成熟肝酵素より、さらにシアル酸を多く含む分子種であると考えられる。Kottgen ら⁶³⁾はラットの発達過程において肝 γ -GTPの分子形態として2種類あり、シアル酸に富んだ胎仔型とシアル酸量の少ない成熟型とに分類されるとしている。このようなシアル酸含量の差に基づく γ -GTPの分子多様性は、腎 γ -GTP自体に関しても認められ、Matsuda ら⁶⁴⁾は γ -GTPの heterogeneity はシアル酸含量の違いに起因することを報告している。

γ -GTPの周産期における活性の変動パターンは、成熟動物への発達に伴って極めて興味ある知見を示した。成熟動物では腎臓の酵素活性は肝臓の約1000倍高いが、胎仔の場合はむしろ肝臓の方が高かった。また、胎仔肝の膜結合性と可溶性ならびに胎盤 γ -GTPは、すべて成熟ラット腎酵素と交差したことから、これらの

γ -GTPは免疫学的に共通の抗原決定基を有しているものと考えられる。

Tateishi ら⁷⁾は肝GSHにはシステインの一時的貯蔵型としての役割があることを示唆している。また、胎生末期の胎仔肝では主として蛋白合成のためのメチオニンの消費が増加するため、メチオニンからシスタチオニン経路を介してのシステインへの転換が減少する。従って、出生直前にみられる胎仔肝 γ -GTP活性の特異的な上昇は、胎仔のシステイン要求性の増加に対応してGSHの分解が促進したものと理解されている⁸⁾。Fig. 1-8より、妊娠初期では胎仔肝が未成熟のため、胎仔へのシステイン供給は主として胎盤 γ -GTPによるGSHの分解に依存し、妊娠末期になるにつれてGSHからのシステイン供給は胎仔肝 γ -GTP自身により行なわれるものと推測される。

一方、成熟ラットにアミノピリン (AM) を連続投与した場合、肝 γ -GTPでは著明な誘導がみられたが、腎 γ -GTP活性はほとんど変動しなかった。腎 γ -GTPは一般に誘導されにくく、エポキシ樹脂の一種である Epidian 5 による誘導の報告があるのみである⁶⁵⁾。AM投与により肝 γ -GTP活性が著増した際に、血液生化学的および組織学的所見において何ら肝臓の障害は認められなかったことは、AMによる肝 γ -GTPの誘導は肝障害⁶⁶⁾あるいは肝癌⁶⁷⁾に伴ってみられる活性上昇とは異質のものであると考えられる。

また、AM投与による肝 γ -GTP活性の激増はショ糖密度勾配法による細胞分画の実験結果より細胞膜に存在する γ -GTPの誘導に起因することが明らかとなった。最近、 γ -GTPは細胞膜表面に存在し⁶⁸⁾、その活性部位は細胞外側に面している¹⁾との報告がある。

AM投与時における細胞内GSH status の変動では、GSH量は有意に増加したが、GSSG量は変化がみられなかった。しかし、血漿中GSSG量は著明に増加し、肝GSH-Px 活性は有意に上昇するのが認められた。Sies ら^{69, 70)}によれば、灌流肝においてGSH-Px 反応の促進に伴い灌流液中への明らかなGSSGの放出がみられることから、GSSGの放出速度はGSH-Px の反応速度に依存

することを示唆している。さらに灌流肝を用いた実験においてAM添加によりGSHおよびGSSGの細胞外への放出が増加することが報告されている^{71, 72)}。従って、Table 1-9 にみられるAMによる血漿中GSSGの増加はGSH-Px 活性の亢進に起因するものと考えられる。この様なAM投与によるGSH-Px の促進により細胞内GSH量の減少が考えられるが、予想に反して細胞内GSH量は逆に増加した。この原因として2つの可能性が考えられる。その1つはグルタチオン還元酵素活性のAMによる促進である。しかし、細胞内GSSG量には何ら変化がみられないことから、この可能性は少ないと考えられる。他の可能性としては γ -GTPの関与である。Jones ら⁷³⁾は γ -GTPの生体内基質はGSHではなくGSSGであり、GSSG代謝の最初の段階は γ -GTPにより触媒されると報告している。従って、AM投与により増加した細胞外GSSGは細胞膜に局在する γ -GTPにより分解され、システインとなって細胞内に取り込まれるものと推定される。この様な γ -GTPの機能は、Hahn ら¹⁾が提唱している様に γ -GTPの生理機能は細胞外GSSGの reclamation であるという仮説を支持するものである。 γ -GTP 次いでジペプチダーゼにより生成したシステインはGSHの再合成に利用される。GSHの合成において、その材料である3種のアミノ酸の中でシステインの肝内濃度は他の2種に比較して1桁低く 10^{-4} M 程度であり、しかもGSH合成酵素系のシステインに対するみかけの K_m 値は 2.5×10^{-3} M とされている⁷⁴⁾。従って、成熟動物ではシステインの肝内濃度がGSH合成反応の律速因子と考えられる。

以上の諸知見を総合的に考察すると、成熟ラット肝におけるGSH代謝には Fig. 1-13 の様な制御機構の存在が推定される。

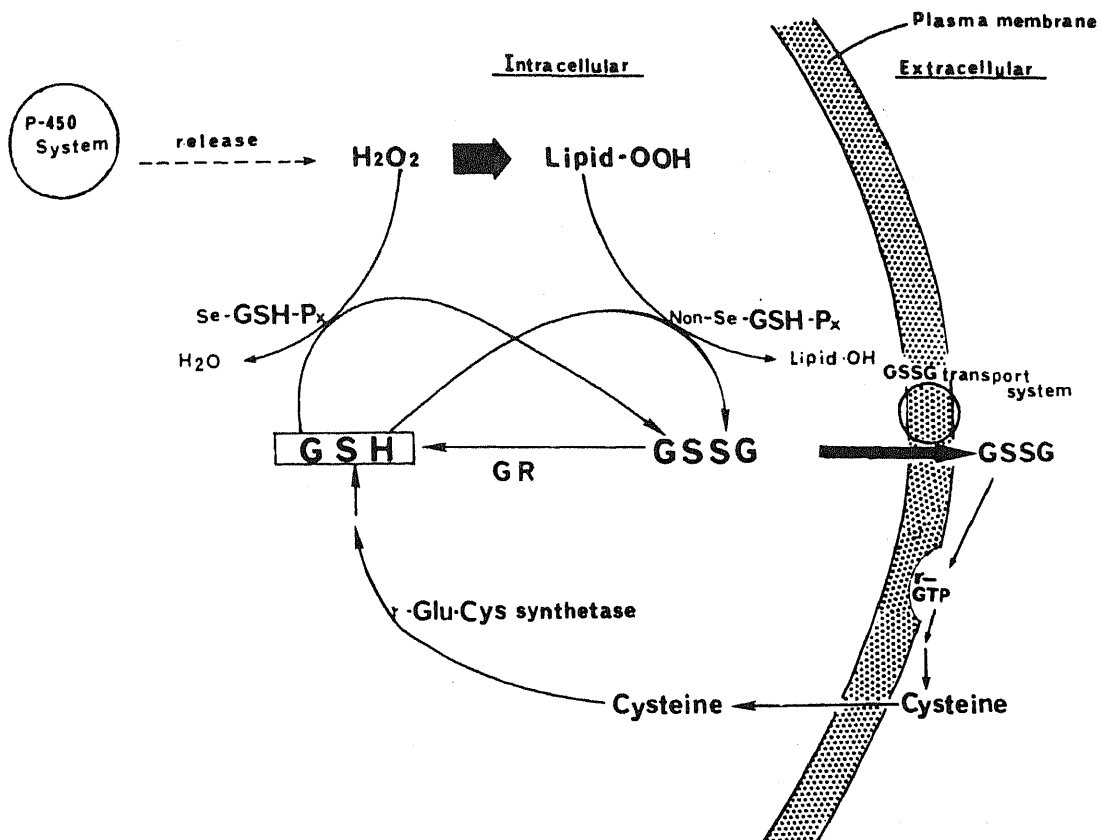


Fig. 1-13 Possible interrelationships among glutathione metabolism and glutathione-related enzyme activities during repeated administration of aminopyrine. Abbreviations. γ -GTP, γ -glutamyl transpeptidase. Lipid-OOH, Lipid peroxides. Se-GSH-Px, selenium-dependent glutathione peroxidase. Non-Se-GSH-Px, selenium-independent glutathione peroxidase. GR, glutathione reductase.

第2編 ラット，マウス，モルモット およびハムスターにおける 肝グルタチオン代謝の種差と 関連酵素系

アセトアミノフェンやブロムベンゼンの様な種々の化合物は肝臓において活性代謝物に生体内変換され、それが蛋白に共有結合して肝壊死の原因となることが知られている⁷⁵⁾。これに対して生体はこれら活性代謝物とGSHとの反応により抱合体を生成して排泄する防御機構を備えている。異物とGSHとの抱合体の生成は非酵素的にあるいはグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) を介して行なわれる。

一方、アセトアミノフェンにより惹起される肝毒性には著明な種差がみられる。すなわち、ハムスターやマウスは起こり易い動物種であるが、ラットやモルモットは比較的抵抗性が高い⁷⁶⁾。Aikawaらはアセトアミノフェンの共有結合と脂質過酸化との間に高い相関性がみられることを報告した⁷⁷⁾。事実、脂質過酸化は細胞障害の指標の一つと考えられている⁷⁸⁾。また、GSHは脂質過酸化反応を強力に阻害することが知られている⁷⁹⁾。さらに、肝ミクロゾームにおける脂質過酸化反応には著明な種差がみられることが報告されている⁸⁰⁾。これらのことより、肝GSH量は異物の毒性発現機構において重要な防御因子と考えられるが、これまでGSH代謝の種差に関する報告はほとんどみあたらない。

生体内肝GSH代謝系は第1編で述べた様に関連酵素系により強く影響を受けている。さらに、絶食により肝GSH量が著しく減少することも知られている^{13, 15)}。

そこで、本編においてはラット、マウス、ハムスターおよびモルモットについて肝GSHとGSSG量ならびに種々の関連酵素活性を検討した。さらに、GSH代謝系に及ぼす絶食の影響も検討した。また、脂質過酸化反応の種差とGSH代謝系との相関性の有無について究明した。

〈使用動物〉

Sprague-Dawley 系雄性ラット (体重約 200 g), ICR系雄性マウス (体重約 30 g), Hartley 系雄性モルモット (体重約 350 g), Golden 系雄性ハムスター (体重約 100 g) を用いた。各動物はすべて使用前, 1 週間予備飼育した。また, 動物は肝グルタチオン量の日内変動を避ける為に, 午前 9 時から10時の間に犠殺した。

第1章 肝GSH量の種差とGSH合成 および分解酵素活性との関連性

【実験方法】

1. 肝GSHとGSSG量の測定

肝GSHおよびGSSG量の測定は第1編第4章と同様に行った。

2. γ -グルタミルシステイン合成酵素活性の測定

第1編第4章に述べた方法に準じて行った。

3. γ -GTP活性の測定

肝ホモジネート中の γ -GTP活性を測定する場合、その活性が低くしかもバックグラウンドが高いため、時には正確な値が得られないことがある。そこで著者は下記の様な変法を用いることにより正確な transpeptidation 活性を求めることが可能であることを見出した。

Substrate buffer A ; 50mM Tris-HCl, 5mM γ -glutamyl p-nitroanilide,
20mM Glycylglycine, 10mM MgCl₂, 7.5% NIKKOL NP-15(pH8.0)。

Substrate buffer B ; 50mM Tris-HCl, 20mM Glycylglycine, 10mM MgCl₂,
7.5% NIKKOL NP-15(pH8.0)。

反応停止発色試薬 ; 4.76mM p-dimethylaminocinnamaldehyde in
50% ethanol : 0.36N HCl = 2 : 1 の混合液

Buffer AおよびB (各1ml) にサンプル(ホモジネート0.02ml) を添加して反応を開始し、37°C 30分インキュベートする。反応停止は反応停止発色試薬3ml を加えて攪拌後、室温で10分から1時間以内に565nmの吸光度を測定する。Buffer AとBの吸光度の差を Reagent Blank で補正して transpeptidation 活性とする。この方法における standard としては、p-nitroaniline(6.0mM in 1N-HCl) を用いる。本

法では、インキュベーション時間として40分まで、蛋白量として 1.0mg/ 反応液までは直線性が認められた。酵素活性 1 unitは 1 分間あたり、 $1\mu\text{mol}$ の p-nitroaniline の生成量を示している。

【実験結果】

Table 2-1 に示す様に、48時間絶食により各動物において体重および肝重量の著明な減少が認められた。しかし、ハムスターでは体重の減少は最も小さく有意な変動はみられなかった。また、肝GSH量では著しい種差がみられ、マウス、ラット、ハムスター、モルモットの順に減少した。モルモットのGSH量はマウスの約50%であった。また、GSSG量では著明な種差はみられなかった。さらに、48時間絶食することによるGSH、GSSG量への影響としては、ラット、マウス、モルモットにおいて30~50%の減少が認められたが、ハムスターでは同条件下で肝GSH量は減少せず、むしろ増加の傾向を示した。

GSHの合成と分解に関与する律速酵素活性を検討した結果、 γ -グルタミルシステイン合成酵素活性はいずれの動物種においても、ほとんど有意な差はみられなかった。また、48時間絶食の影響もモルモットにおいて減少した以外は著明な変動は認められなかった。一方、 γ -GTP活性はラット、マウス、ハムスターではほぼ同じ活性を示したが、絶食によりマウスのみ著明に減少した。また、モルモットは他の動物種に比較して2桁高い活性を示し、絶食条件下では、さらに著明に活性は増加した。

Table 2-1 The hepatic glutathione levels, γ -glutamyl-cysteine synthetase and γ -GTP activities, and the effect of fasting for 48 h in the rat, mouse, guinea pig and hamster.

		Rat	Mouse	Guinea pig	Hamster
Body weight (g)	Fed	202.0 \pm 3.4	31.0 \pm 0.6	359.4 \pm 13.0	111.2 \pm 5.8
	Fasted	153.6 \pm 1.6 ^{***} (76)	20.9 \pm 0.8 ^{***} (67)	291.9 \pm 13.1 ^{**} (81)	101.4 \pm 3.8 (91)
Liver weight (g)	Fed	9.3 \pm 0.3	1.9 \pm 0.1	13.5 \pm 0.9	5.0 \pm 0.3
	Fasted	4.5 \pm 0.1 ^{***} (48)	1.0 \pm 0.1 ^{***} (53)	10.4 \pm 0.7 [*] (77)	3.3 \pm 0.1 ^{***} (66)
GSH (μ mole/g liver)	Fed	7.14 \pm 0.39	7.80 \pm 0.49	3.48 \pm 0.49	5.43 \pm 0.18
	Fasted	2.49 \pm 0.33 ^{***} (35)	4.12 \pm 0.15 ^{***} (53)	1.28 \pm 0.19 ^{**} (37)	6.00 \pm 0.25 (110)
GSSG (μ mole/g liver)	Fed	0.46 \pm 0.02	0.36 \pm 0.01	0.30 \pm 0.02	0.45 \pm 0.01
	Fasted	0.20 \pm 0.01 ^{***} (46)	0.25 \pm 0.02 ^{**} (69)	0.17 \pm 0.02 ^{**} (57)	0.39 \pm 0.02 [*] (87)
γ -Glu-Cys Synthetase (nmole/min/mg)	Fed	19.09 \pm 1.45	28.13 \pm 1.08	12.90 \pm 0.95	11.75 \pm 0.42
	Fasted	22.07 \pm 1.73 (116)	23.09 \pm 3.15 (82)	9.01 \pm 1.03 [*] (70)	10.46 \pm 0.64 (89)
γ -GTP (mU/mg)	Fed	0.78 \pm 0.06	0.75 \pm 0.05	20.35 \pm 0.88	0.73 \pm 0.01
	Fasted	0.82 \pm 0.03 (105)	0.47 \pm 0.03 ^{**} (63)	31.49 \pm 3.49 [*] (155)	0.78 \pm 0.08 (107)

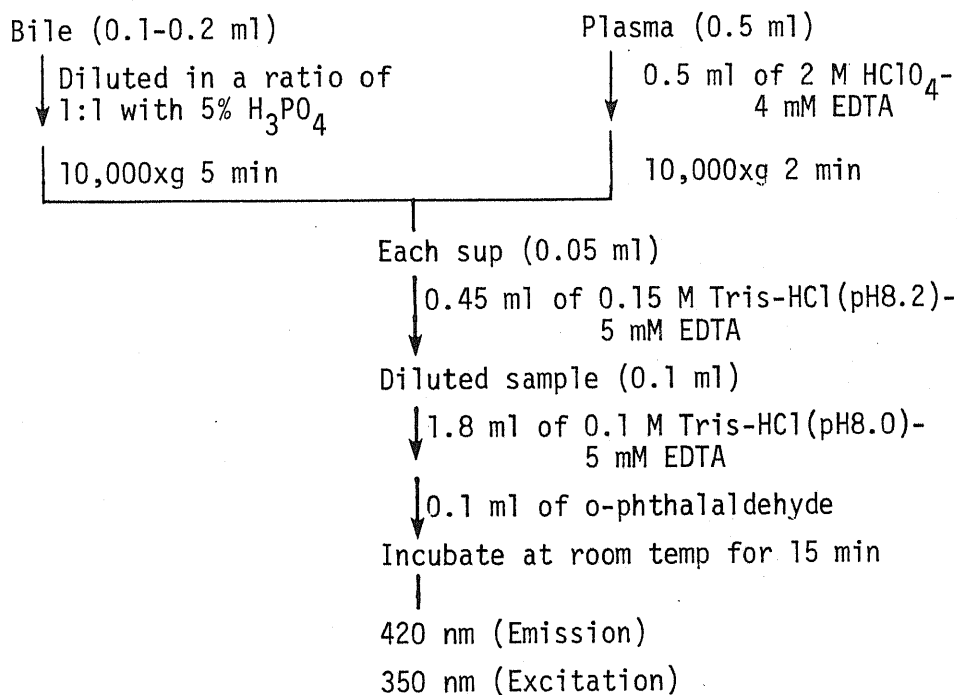
All values represent mean \pm S.E.M from five experiments.
 The number in parenthesis indicates the percent of fed animals.
^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01, ^{***} p<0.001 vs fed animals.

第2章 血漿および胆汁中GSH量の種差

【実験方法】

胆汁はラット以外の他の動物種の場合は、直接胆嚢から採取した。ラットの場合は胆汁管に PE-10 のチューブをカニューレーションし、初めの15分間は捨て、その後約20分採集した。血液 (1.5-2.0ml) は下大動脈より採取し、1,000 U/ml ヘパリン 0.02ml を含むマイクロキャップに入れ、10,000xg 1.5 分遠心して血漿を得た。

胆汁および血漿中のGSH量は Hissin と Hilf の方法⁵⁵⁾ を若干改良して下記の様に行った。



【実験結果】

48時間絶食によりラット、モルモットにおいて胆汁中のGSH量は約60%減少した。一方、血漿中のGSH量の変動ではハムスターにおいてのみ48時間絶食により著明な低下がみられた (Table 2-2)。

Table 2-2 Effect of fasting for 48 h on the GSH concentrations in plasma and bile in several animal species.

GSH		Rat	Mouse	Guinea pig	Hamster
Bile (mM)	Fed	1.59±0.25	N.D.	0.021±0.002	N.D.
	Fasted	0.64±0.25 [*]	N.D.	0.009±0.002 ^{**}	N.D.
Plasma (mM)	Fed	0.043±0.009	0.02±0.01	0.038±0.002	0.025±0.004
	Fasted	0.030±0.001	0.01±0.01	0.044±0.006	0.016±0.001 [*]

All values represent mean±S.E.M from four to five experiments.

^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01 vs fed animals. N.D. ; not determined.

第3章 GSH酸化還元酵素活性および 抱合酵素活性の種差に及ぼす 絶食の影響

【実験方法】

GSH-Px 活性は第1編第4章に述べた方法に準じて測定した。また、GST 活性は Habig らの方法²⁰⁾に準じて 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) を基質として測定した。グルタチオン還元酵素 (GR) 活性は Massey と Williams の方法¹¹⁾により測定した。

【実験結果】

各動物種における GST, GSH-Px および GR 活性は Fig. 2-1 に示した。これらいずれの酵素活性にも著明な種差が認められた。GST 活性はモルモットが最も高く、次いでハムスター、マウス、ラットの順であった。絶食による活性の変動は、ラットにおいて若干減少する以外は、ほとんど著明な変動は認められなかった。

CHP を基質とした場合の GSH-Px 活性ではマウス、ハムスターはラットあるいはモルモットの約2倍の活性を示した。しかしながら、 H_2O_2 を基質とした場合にはラット、マウス、ハムスター間でほとんど活性の差はなかった。また、モルモットでは H_2O_2 に対する活性は認められなかった。さらに、絶食による影響はマウスにおいて著明な活性上昇を示したのに対し、モルモットでは減少した。

GR 活性はハムスターが最も高く、次いでモルモット、ラット、マウスの順であった。また、絶食による活性の変動としてはマウスとハムスターにおいて増加し、ラットでは減少した。

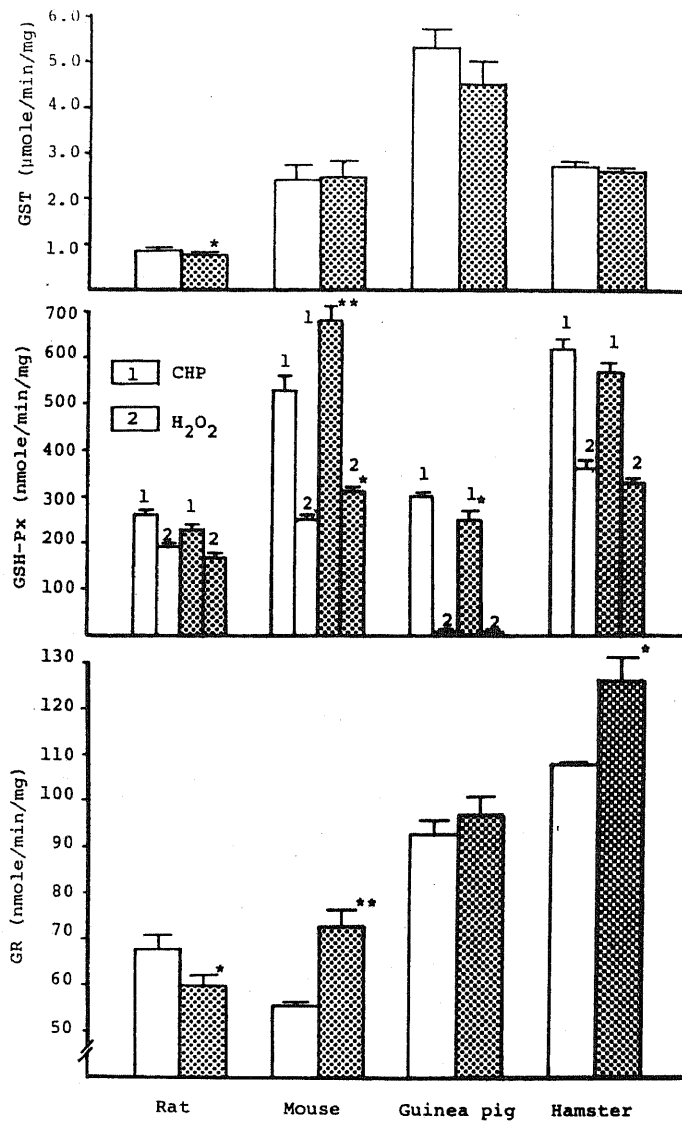


Fig. 2-1 Species difference in hepatic GST, GSH-Px and GR activities, and the effect of fasting for 48 h on their activities in rats, mice, guinea pigs and hamsters.

The vertical line indicates standard error.

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$, vs. fed animals.

□ fed animal, ▨ fasted animal. 1; CHP, 2; H₂O₂.

第4章 脂質過酸化反応の種差に及ぼす 絶食の影響

【実験方法】

1. 肝 S-9, ミクロゾームの調製

肝臓を1.15% KCl で灌流瀉血後, 冷1.15% KCl を用いて, マウスでは10%ホモジネートとし, その他の動物はすべて20%ホモジネートとした。ホモジネートはガーゼで濾過後, 9,000xg 20分遠心し, その上清を S-9 分画とした。S-9 分画はさらに105,000xg 60分遠心して得られた沈渣をミクロゾームとした。

2. 脂質過酸化反応

脂質過酸化反応はNADPH生成系による酵素的な方法と ascorbate 系による非酵素的な方法の両者について検討した。反応液 (1 ml) は0.1M Na, K-phosphate (pH 7.4), 20 μ M FeSO₄ および0.33mM NADPH生成系から成り, S-9 あるいはミクロゾーム (いずれも約1.0mg 蛋白) を添加して反応を開始し, 37°C 30分インキュベートした。なお, 0.33mM NADPH生成系の組成は0.33mM NADP, 8mM G-6-P, 0.1U G-6-P dehydrogenase および6mM MgCl₂ とした。なお, 反応は冷 10%トリクロル酢酸を1ml 添加して停止した。10分間遠心後, その上清 (0.5ml) に0.67%チオバルビツール酸 (TBA) 溶液を3ml 加え, 95°C10分間煮沸した後, 室温に戻し, TBA反応生成物を532nm にて測定した。計算には分子吸光係数 $1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ を用いた⁸²⁾。非酵素的脂質過酸化反応の場合は, 上記反応液中のNADPH生成系を0.5mM ascorbate に置きかえて同様に行った。

【実験結果】

Table 2-3 に示す様に, 脂質過酸化反応は各動物種間および S-9 とミクロゾーム間で著明なちがいがみられた。また, NADPHと Ascorbate 依存性脂質過酸化

反応のいずれも各動物種間で著しい差がみられた。S-9での脂質過酸化反応は酵素的、非酵素的ともにハムスター以外の動物種ではほとんどみられなかった。ハムスターでは、ミクロゾームでの脂質過酸化反応の約50%であった。48時間絶食によりS-9の脂質過酸化反応はラット、モルモットにおいて著明に促進した。すなわち、ラットでは酵素的、非酵素的反応いずれも80倍増強され、モルモットでは酵素的および非酵素的反応は各々4倍と70倍に増加した。マウスとハムスターでは絶食による影響はほとんどみられなかった。一方、ミクロゾームの脂質過酸化反応はラットにおける非酵素的反応を除いては、絶食によりS-9でみられた様な著明な促進はみられなかった。このことは脂質過酸化反応に対する絶食の影響は、S-9とミクロゾームとで全く異質のものであることを示唆している。

Table 2-3 The effect of fasting for 48 h on lipid peroxidation in vitro in hepatic S-9 fractions and microsomes in several animal species.

		Rat	Mouse	Guinea pig	Hamster
		Lipid peroxidation (nmole MDA / 30 min / mg)			
<u>S-9 fraction</u>					
enzymatic	Fed	0.21±0.09	0.30±0.03	1.67±0.96	6.02±1.13
	Fasted	16.24±1.32 ^{***}	0.30±0.27	6.77±0.06 ^{**}	10.65±0.31 ^{**}
non enzymatic	Fed	0.22±0.08	0.13±0.04	0.03±0.01	11.39±0.84
	Fasted	17.98±0.73 ^{***}	0.13±0.07	2.00±0.74 [*]	13.44±0.56
<u>Microsomes</u>					
enzymatic	Fed	17.98±1.62	27.16±2.93	13.54±0.82	14.90±0.84
	Fasted	28.38±0.86 ^{***}	29.73±1.33	15.72±1.00 ^{**}	21.99±0.82 ^{***}
non enzymatic	Fed	1.23±0.44	14.76±4.65	10.25±1.22	18.60±1.49
	Fasted	23.40±0.61 ^{***}	15.68±8.70	13.56±1.13	23.01±1.10

All values show mean±S.E.M from five experiments.
^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01, ^{***} p<0.001 vs fed animals.

第5章 考察

Table 2-1 から明らかな様に、肝GSH量には著明な種差が存在することが認められた。肝GSHは絶食により速やかに減少するが、再給飼により数時間内に正常値に回復することから、肝GSHは摂飼量に依存すると言われている⁷⁴⁾。本研究において、48時間絶食によりラット、マウス、モルモットでは50-60%のGSH減少がみられた。絶食条件下においても、肝GSH量が各動物種間で明白に変動することから考えて、GSH量の種差は単に動物の栄養状態にのみ依存するものではないことが明らかとなった。

一方、肝GSHは種々の薬物投与により減少することが知られている。Davisら⁷⁶⁾はアセトアミノフェン投与に起因するGSHの減少程度は動物種により異なり、マウス、モルモット、ラットに比較して、ハムスターで最も顕著で、コントロールの約10%まで減少することを報告している。さらに、アセトアミノフェンにより惹起される細胞壊死とGSHの減少とは高い相関性がみられるとしている。また、アセトアミノフェン誘導性肝細胞壊死の程度と共有結合量はGSHが絶食により減少した場合に増強されることが報告されている¹⁶⁾。一方、本研究において48時間絶食条件下、ラットの肝GSH量は約40%減少したのに対し、ハムスターでは変動しなかった。これらの知見から絶食によるGSHの変動はアセトアミノフェンの様な薬物投与によるGSHの変化とは異なることを示している。

Higashiら¹⁴⁾は、肝GSHには半減期の異なる2種の存在様式があることを報告している。さらに半減期の短いGSHプールは不安定型で、絶食により影響を受けシステインの貯蔵型としての生理機能を有することを示唆している⁷⁾。従って、本研究でみられるGSHの種差および絶食に対する対応性の違いから、GSHのプールサイズあるいは性質が動物種間で各々異なる可能性が考えられる。

一方、GSHの胆汁および血中への放出は肝GSH量の維持調節において重要な因子である。Kaplowitzら⁸³⁾によれば、ラットにおける胆汁中へのGSHの放出

は肝GSH量と直接、比例関係にあるとしている。Table 2-2 に示す様に、ラットではモルモットに比べ胆汁中に2桁も高いGSH量がみられるが、肝GSH量ではモルモットはラットの半量である。モルモットはラットに比較して著明に高い γ -GTP活性を有するために、モルモットにおいては肝GSH量の調節には細胞外へのGSHの放出よりはむしろ γ -GTPによる分解が重要な因子と考えられる。また、ラットとモルモットの胆汁中のGSHは絶食により約60%減少したが、血漿GSHはほとんど変動しなかった。このことは、絶食により影響を受けるのは胆汁中のGSHであることを示唆している。

Table 2-1 に示した様に、各動物種間で最も低い肝GSH量がみられたモルモットは、その原因として γ -glutamylcysteine 合成酵素活性が低いことに加えて γ -GTP活性が非常に高いことに起因すると考えられる。さらに、ラットおよびマウスでは絶食により肝GSHは50-60%減少したが、この場合ラットの γ -glutamylcysteine 合成酵素活性と γ -GTP活性は絶食によりほとんど変動せず、マウスでは γ -GTP活性はむしろ減少した。これらのことから絶食による肝GSHの減少には食飼性要因のみならず γ -GTP活性の変動が関与している可能性が考えられる。

一方、グルタチオン関連酵素活性に関してはGSH-Px, GRおよびGST活性に著明な種差がみられた (Fig. 2-1)。ラット肝臓においては、GSH-Px に少なくとも2種のアイソザイムの存在が知られている²²⁾。1つはセレン酵素 (Se-GSH-Px) であり、基質として有機過酸化物と同様に H_2O_2 も利用することが出来る。他の1つはセレンを含まない非セレン酵素 (non-Se-GSH-Px) であり、これは H_2O_2 を基質とはしない。モルモットにおいて H_2O_2 に対する活性が認められないことは、Se-GSH-Px が存在しないことを示している。事実、Lawrence と Burk²⁴⁾ もモルモットにはセレン酵素がないことを報告している。

ハムスターは他の動物種に比較してGSH-Px とGRいずれの活性も最も高い。このことはハムスターにおけるGSHの酸化還元速度は他の動物種より速いことを

示している。また、マウスでは48時間絶食によりGSH-Px とGR両者の活性が上昇したことより、GSHの酸化還元速度も促進されたものと考えられる。一方、ハムスターのGR活性は絶食により20%増加したが、GSH-Px 活性の変動はみられなかった。従って、ハムスターでは絶食条件下、肝GSHの減少がみられないのは、一部はGR活性の亢進と血液中へのGSHの放出の抑制によることが考えられる。

一般に、GSHは過酸化による組織障害に対して防御的效果を有している。すなわち、GSH-Px の関与により生成した H_2O_2 や有機過酸化物を還元したり⁸⁵⁾、GSTの作用により脂質過酸化に導かれる親電子性の中間体を捕捉する⁸⁶⁾。Younes と Siegers⁸⁷⁾ は肝GSH量と脂質過酸化反応とは密接な関連性があり、肝GSH量が1mM 以下になると脂質過酸化反応は著明に促進されるとしている。一方、Levine⁸⁸⁾ はGSH depletor である Phorone 投与16時間後に肝GSH量はcontrol の67% (5.6mM) に減少し、この時、脂質過酸化反応は明らかに促進されたと報告している。このことは脂質過酸化反応において、Younesと Siegers⁸⁷⁾ が提唱したGSH 1mM は必ずしも臨界濃度を示すものではないことを示唆している。本研究において、S-9 での脂質過酸化反応と肝GSH量との間に相関性はみられなかった。また、絶食条件下、ラット、マウス、モルモットでは肝GSH量の顕著な減少がみられた。この時、ラットとモルモットでは脂質過酸化反応が著明に促進されたが、マウスでは変動がみられなかった。この結果から、絶食による脂質過酸化反応の促進は肝GSHの減少とは相関しないことが明らかである。

Se-GSH-Px は脂質過酸化反応を阻害することが報告されている^{89, 90)}。さらに、Burkら⁹¹⁾ はラット肝 cytosol は脂質過酸化反応を阻害し、それは少なくとも部分的にはGSTのある種のアイソザイムによるものであると報告している。最近、ある種のGSTアイソザイムがGSH-Px 活性をも有することが報告されている⁹²⁾。従って、絶食により肝GSHの著明な低下がみられるところのラット、マウス、モルモットでは in vitro の脂質過酸化反応の程度は、肝GSH量よりむしろ、

GSH-Px あるいはGST活性の高低に起因すると考えられる。絶食マウスでは、S-9の脂質過酸化反応の促進がみられないのは、ラットよりGSH-Px活性が非常に高いことによるものと思われる。

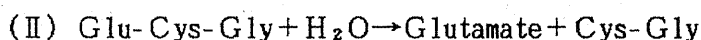
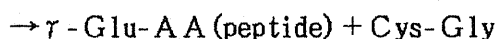
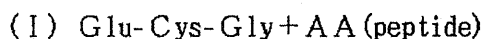
第3編 ラット肝グルタチオン代謝と 関連酵素活性の性差

成熟ラット肝においては、グルタチオン関連酵素系に著明な性差がみられることが知られている。GSH量の変動に影響する重要な因子である γ -GTP活性は雌性の方が雄性に比較して有意に高い⁹³⁾。一方、GSTに関しては1,2-Dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) に対する活性は雄性ラットが顕著に高いが、1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) を基質とした場合には、ほとんど性差がみられない⁹⁴⁾。また、ある種のGSTはGSH-Px活性をも有することが知られているが²³⁾、ラット肝 cytosolにおけるGSH-Px活性は雌性の方が著明に高い^{95, 96)}。ラット肝cytosolのGSTに関しては、Jakoby一派の精力的な研究による種々のアイソザイムの同定^{20, 21)}に始まり、次々とそれらのアイソザイム間の性質の異同が明らかになってきている。さらに、GSTアイソザイムのすべてが同様にGSH-Px活性を示す訳ではないことも報告されている^{97, 98)}。これらの知見から、ラット肝 cytosol でみられるGST活性の性差は特定のGSTアイソザイムに起因する可能性が考えられる。また、この様な関連酵素系は肝GSH代謝における重要な因子の一つであることから、GSH関連酵素系の性差は肝GSH代謝機構においても重大な影響を及ぼしていると考えられる。これまで、肝GSH量の変動に関する報告の多くは雄性ラットに限定されており、性差に関してはほとんどない。

著者は第1編において雄性ラット肝におけるGSH代謝機構を明らかにしたが、本編では雌雄ラット肝GSH代謝機構における関連酵素系への影響の差異を明らかにした。さらに、ラット肝グルタチオン関連酵素活性の性差に対する性ホルモンの影響を検討した。また、GSTおよびGSH-Pxは、共通のペルオキシダーゼ活性を有するにもかかわらず、全く逆の性差を示すことから、ラット肝 cytosol においてみられる酵素活性の性差は、GSTとGSH-Px それぞれどのアイソザイムに起因するのかを詳細に検討した。

第1章 雌雄ラット肝GSH量および γ -GTP活性の日内変動

肝GSHは日内変動を示すことが知られている^{99, 100)}。そこで、ラット肝GSHの日内変動パターンにおいて雌雄間で差異があるか否かを検討した。さらに、GSHを生理的基質として、その分解を触媒する γ -GTP活性について雌雄ラット間での日内変動パターンを同時に比較検討した。 γ -GTPのGSHに対する触媒反応様式には acceptor としてアミノ酸あるいはペプチドが存在する場合と非存在の場合の2通りがある。前者は acceptor にGSHからの γ -glutamyl 基を転移する、いわゆる transpeptidation 反応である (I) が、後者の場合にはH₂Oを acceptor としてGSHはグルタミン酸とシステイニルグリシンになることから水解活性も有しており、時には hydrolase 活性 (以前は glutathionase 活性^{101, 102)}) と呼ばれることがある (II)。



【実験方法】

1. 肝GSHおよびGSSG量の測定

Sprague-Dawley 系雌雄ラット (12~13週令) を用い、8時、12時、16時および19時の各時刻に犠殺した後、肝臓を取り出し灌流瀉血し、冷 1.15% KCl で20% ホモジネートを調製した。その後の操作は第1編第4章に述べた方法に準じて行い、肝GSHおよびGSSG量を測定した。

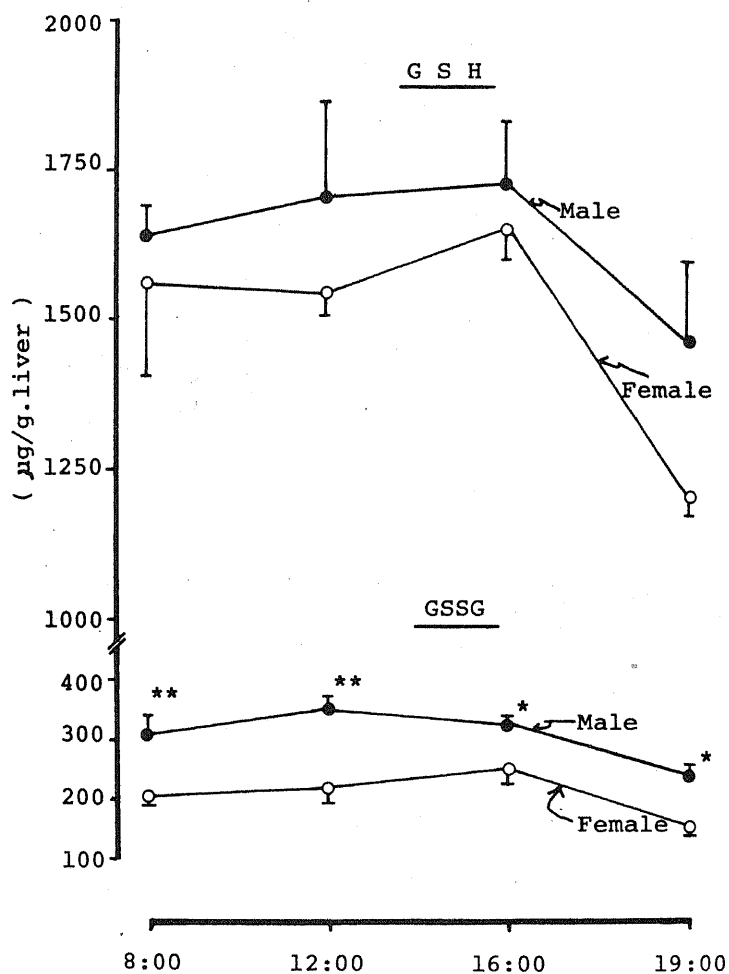
2. 肝 γ -GTP活性の測定

ホモジネートにおける肝 γ -GTP活性に関して、transpeptidation 活性は第2

編第1章に示した方法により、また hydrolase 活性は acceptor としての glycylglycine を除いた系について同様に行い測定した。

【実験結果】

雌雄ラット共、肝GSHは昼間において高く、夜になると減少する日内変動を示した (Fig. 3-1)。また、どの時間帯においても雄性の方が雌性よりGSH量は高い傾向を示した。肝GSSG量の日内変動はGSHに比較して雌雄共、低値であった。



* p < 0.05 ** p < 0.01 vs Female rat.

Fig. 3-1 Diurnal variations of hepatic GSH and GSSG levels in male and female rats.

一方, Fig. 3-2 に示す様に肝 γ -GTP活性においては, 有意な日内変動はみられなかったが, 日中における transpeptidation 活性は, 雌性ラットの方が雄性ラットに比較して高い傾向にあった。hydrolase 活性に関しては, どの時間帯においても雌雄間でほとんど差はみられなかった。

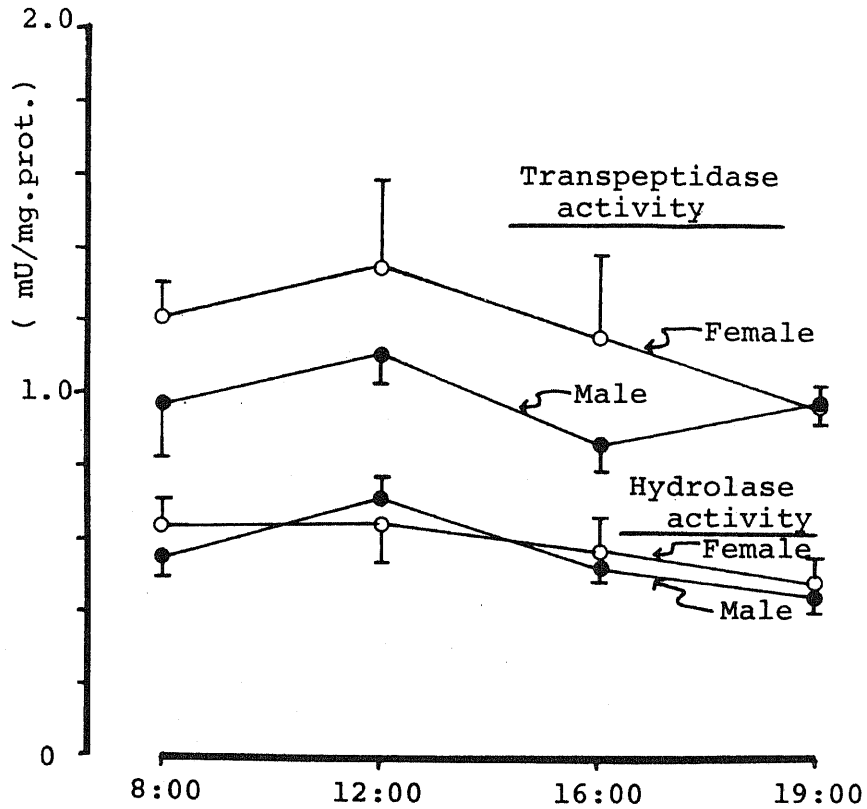


Fig. 3-2 Diurnal variations of hepatic γ -GTP activity in male and female rats.

第2章 肝GSHおよび γ -GTP活性 の性差に及ぼす絶食の影響

肝GSH量は絶食という非生理的条件下で有意に減少することが知られている。そこで、絶食条件下における肝グルタチオン量の変動と γ -GTP活性との関連性を知る目的から、雌雄ラットを用いて比較検討した。

【実験方法】

1. 動物

Sprague-Dawley系雌雄ラット(12~13週令)を用いた。

2. 肝グルタチオン量および γ -GTP活性の測定

GSHおよびGSSG量さらに γ -GTP活性の測定は第3編第1章と同様に行った。なお、総グルタチオン量は $GSH + 2GSSG$ として表示した。

3. 肝システイン量の測定

第1編第4章に記した方法により定量した。

【実験結果】

Table 3-1には総グルタチオン量の絶食(18時間)による変動を示した。すなわち、絶食により、総グルタチオン量は雌雄ラット共、著明に減少し、雌性ラットの方が雄性ラットに比し、減少程度は大きく、性差は絶食により顕著となった。

Table 3-1 Effect of fasting for 18 h on hepatic total glutathione (GSH+GSSG) levels in male and female rats.

	Male		Female	
Fed	2050 ± 167	(100)	1750 ± 37.9	(100)
Fasted	1539 ± 94*	(75)	1154 ± 49.9**#	(66)

Values represent mean ± SE, µg/g liver.

Number in parenthesis shows percent.

* p < 0.05 ** p < 0.01 vs Fed group.

p < 0.05 vs Male rats.

次に、この様な絶食ラットにみられる総グルタチオン量の減少は、GSH量あるいはGSSG量のいずれの変動に起因するのかを検討した。Table 3-2 は絶食ラットにおけるGSH量およびGSSG量の変動を示したものである。GSH量は絶食により雌雄ラット共に著明に減少し、雌性ラットにおいて、その程度は大きく肝GSH量の性差は絶食群において顕著であった。

Table 3-2 Effect of fasting for 18 h on hepatic GSH or GSSG concentrations in male and female rats.

	GSH (µg/g liver)		GSSG (µg/g liver)	
	Male	Female	Male	Female
Fed	1700 ± 165 (100)	1534 ± 24.8 (100)	350 ± 21.1 (100)	216 ± 14.8** (100)
Fasted	1364 ± 92 (80)	989 ± 52.7## (65)	175 ± 4.0## (50)	165 ± 6.6# (76)

* p < 0.05 ** p < 0.01 vs Male rat.

p < 0.05 ## p < 0.01 vs Fed group.

一方、GSSG量は飽食群では雌性ラットの方が雄性ラットに比較して有意に少ないが、絶食によりいずれも減少し、絶食群においてはGSSG量の性差は認められなかった。この様なGSH量およびGSSG量の性差において、絶食による変動の違いはGSH/GSSG比では、より一層明らかである。すなわち、Table 3-3に示す様に、雄性ラットでは絶食によりGSSG量が著明に減少し、GSH/GSSGは約1.5倍になる。一方、雌性ラットにおいては絶食による影響はGSSG量に比し、GSH量の方が大きく雄性ラットとは逆にGSH/GSSGは減少する。

Table 3-3 Effect of fasting for 18 h on hepatic glutathione redox ratio in male and female rats.

	Male	Female
Fed	4.91 ± 0.60	7.18 ± 0.40 ^{##}
Fasted	7.78 ± 0.46 ^{**}	6.03 ± 0.49 [#]

** p < 0.01 vs Fed group.

p < 0.05 ## p < 0.02 vs Male rat.

次に肝 γ -GTP 活性の絶食による変動を雌雄ラットについて検討した (Table 3-4)。肝 γ -GTP 活性における性差は、絶食条件下において、より顕著に認められた。すなわち、絶食により雄性ラットでは体重あたりの γ -GTP 活性は有意に減少したが、雌性ラットのそれは体重の著しい減少にもかかわらず活性の変動はみられなかった。このことは比活性で比較すると、より一層明白になり、雄性ラットの肝 γ -GTP 活性は絶食によりほとんど活性の変動は認められないのに対し、雌性ラットにおいては絶食により肝 γ -GTP 活性の有意な増加が認められた。これらの知見から、絶食による肝 GSH の減少が雌性の方が顕著であるのは、雌性肝 γ -GTP 活性の亢進に起因するものと考えられ、ラット肝におけるグルタチオン代謝と γ -GTP 活性との密接な相関が示唆された。

Table 3-4 Effect of fasting on the transpeptidation activity of hepatic γ -GTP in male and female rats.

GGTP Activity	Fed		Fasted	
	Male	Female	Male	Female
mU per B.W.	2344 \pm 156	1932 \pm 398	1783 \pm 104 [#]	1930 \pm 130
mU per g.liver	209 \pm 9.56	221 \pm 36.6	208 \pm 5.01	314 \pm 6.77 ^{**}
mU per mg.prot.	1.10 \pm 0.078	1.34 \pm 0.257	0.96 \pm 0.023	1.61 \pm 0.093 [*]

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs Male rat.

$p < 0.05$ vs Fed group.

γ -GTP は transpeptidation と hydrolytic action の両者を触媒する性質を有していることから、acceptor 非存在下における γ -GTP 活性 (hydrolase 活性) に及ぼす絶食の影響を雌雄ラットについて検討した (Table 3-5)。transpeptidation 活性とは異なり、絶食による活性の増加は認められなかったが、hydrolase 活性も雌性ラットの方が雄性ラットに比べより高い傾向にあった。

Table 3-5 Effect of fasting on the hydrolysis activity of hepatic γ -GTP in the absence of acceptor substrate in male and female rats.

Hydrolase Activity	Fed		Fasted	
	Male	Female	Male	Female
mU per B.W.	1539 \pm 92.1	907 \pm 131 ^{**}	1464 \pm 168	1050 \pm 155
mU per g.liver	138 \pm 8.6	107 \pm 18.4	170 \pm 16.1	136 \pm 37.5 ^{**#}
mU per mg.prot.	0.73 \pm 0.58	0.64 \pm 0.10	0.78 \pm 0.59	0.87 \pm 0.10

** p < 0.01 vs Male rat.

p < 0.05 vs Fed group.

さらに、グルタチオンの γ -GTPによる分解代謝物であるシステインの量的変動を検討した (Table 3-6)。絶食ラットにおいて肝システイン量は雌性の方が雄性より有意ではないが高い傾向にあった。また、絶食により雌雄ラットいずれの肝システイン量も有意に増加した。

Table 3-6 Effect of fasting on hepatic cysteine contents in male and female rats.

	Male	Female
Fed group	0.174 \pm 0.007	0.196 \pm 0.010
Fasted group	0.283 \pm 0.020 ^{**}	0.308 \pm 0.014 ^{**}

(μ moles/g.liver)

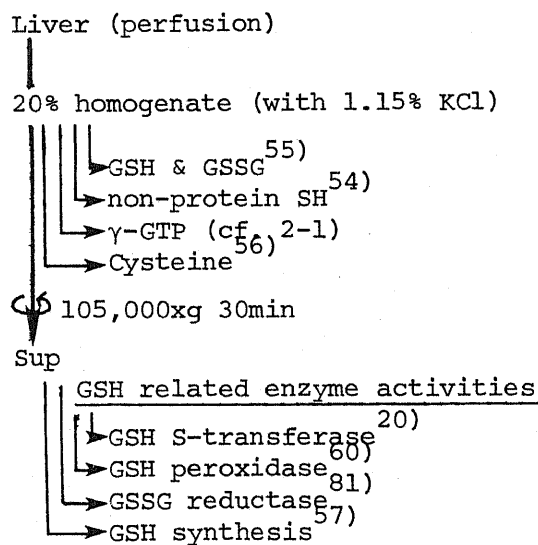
** p < 0.01 vs Fed group.

以上の結果より、ラット肝GSH量における性差は、絶食条件下においても明らかに認められることから、単に摂餌量の違いに起因するものではなく、 γ -GTP活性が大きく寄与しているものと考えられる。

第3章 ラット肝グルタチオン代謝系の性差と週令差

【実験方法】

肝GSH量, GSSG量および複数のGSH関連酵素活性を同一サンプルから短時間内に測定する場合は, 下記の様な操作手順で行った。この様にして得られたGSHとGSSG量あるいは non-protein SH量さらにシステイン量はいずれも原法に従って得られた値とほとんど同じである(誤差10%未満)ことが確認している。これらの assay の中で, 少なくともGSHとGSSG, システインおよび non-protein SHはサンプルを調製した当日, 可及的速やかに測定した。



【実験結果】

Table 3-7 に示す様に, 12週令ラットにおける肝GSH量は雄性の方が有意に高値を示したが, 7週令ラットでは有意な性差はみられなかった。また, このGSHの変動は non-protein SH量にも反映され, 同様の成績が得られた。一方, GSSG量はいずれの週令においても雌雄間で有意な差は認められなかった。

Table 3-7 Sex-related differences of hepatic glutathione contents and related enzyme activities in rats.

Item	7 weeks of age		12 weeks of age	
	Males (n=10)	Females (n=10)	Males (n=10)	Females (n=10)
GSH μmole/g liver	5.84±0.18	5.44±0.09	5.95±0.21	5.10±0.15 ^a
GSSG μmole/g liver	0.30±0.01	0.29±0.01	0.38±0.02	0.35±0.03
Non-protein SH nmole/mg protein	52.3±1.3	50.3±1.2	50.0±1.0	44.6±1.3 ^{b,e}
μmole/g liver	8.5±0.2	8.2±0.1	8.8±0.3	7.7±0.2 ^b
γ-GTP activity mU/mg protein	0.50±0.04	0.83±0.06 ^c	0.62±0.07	0.79±0.11
mU/g liver	80±7	136±10	108±11	137±19
GSH-Px activity nmole/min/mg protein				
CHP	348±14	545±18 ^c	346±16	611±12 ^{c,f}
H ₂ O ₂	196±9	381±16 ^c	203±12	456±11 ^{c,f}
GST activity nmole/min/mg prot	915±35	844±25	967±26	835±22 ^c
Cysteine content nmole/mg protein	0.87±0.03	1.23±0.05 ^c	1.08±0.03 ^f	1.11±0.04 ^d
μmole/g liver	0.14±0.06	0.20±0.01 ^c	0.19±0.01	0.19±0.01
GSH synthesis rate nmole/min/mg prot	8.3±0.5	15.3±0.3 ^c	17.0±0.3	15.3±0.3 ^c
GSSG reductase activity nmole/min/mg prot	---	---	60.1±1.56	45.5±1.26 ^c

a; p<0.05, b; p<0.01, c; p<0.001 vs Males
d; p<0.05, e; p<0.01, f; p<0.001 vs 7-week old rats

肝γ-GTP活性に関しては、7週令ラットにおいて著明な性差がみられ、雌性ラットは雄性ラットに比し、約1.7倍の活性を示した。システイン量は7週令ラットにおいて雌性が有意に高かったが、12週令ラットでは雌雄間で差はみられなかった。そこで、7および12週令ラットについて雌雄肝γ-GTP活性とシステイン量との相関性を検討したところ、Fig. 3-3に示す様に相関係数 $r=0.429$ ($p<0.01$)であり、正の相関が認められた。

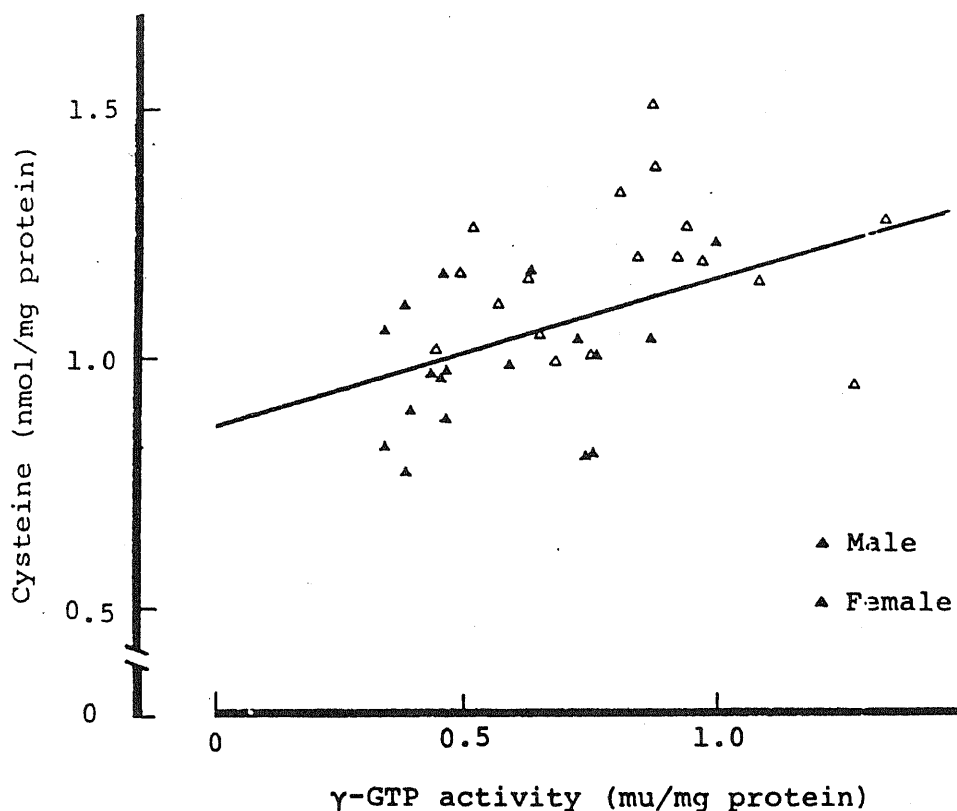


Fig. 3-3 Relationship between γ -GTP activities and cysteine contents in rat liver.

GSH-Px 活性は、いずれの週令においても雌性の方が有意に高かった。それに対し、GST活性は12週令ラットにおいてCDNBを基質とした場合、雄性の方が有意に高く、7週令ラットでも同様の傾向を示した。また、GSH合成酵素活性はいずれの週令ラットでも雄性の方が有意に高かった。

第4章 γ -GTP, GSTおよび GSH-Px活性の性差に およぼす性ホルモンの影響

【実験方法】

1. 動物と投与方法

Sprague-Dawley 系雌性および雄性ラットを用いた。Testosterone propionate (TS, 5 mg/kg) あるいは Estradiol benzoate (ED, 0.5 mg/kg) を6週令時のラットに6日間1日1回皮下投与した。ここで用いたTSおよびEDの投与用量は Kato ら¹⁰³⁾の報告に従って設定した。control 群にはコーン油を同量、同様に投与した。性腺摘除は5週令時にエーテル麻酔下で行い、性腺摘除後14日目から6日間上記と同様にTSあるいはEDを投与した。なお、動物はホルモンの最終投与24時間後に犠殺した。

2. γ -GTP, GSTおよびGSH-Px 活性の測定

γ -GTP 活性は第2編第1章に述べた方法により、GSH-Px 活性は第1編第4章に述べた方法に準じて測定した。また、GST活性は Habig らの方法²⁰⁾に準じて 1,2-Dichloro-4-nitrobenzene(DCNB)を基質として測定した。

【実験結果】

Fig. 3-4 に示す様に、雌性ラット肝 γ -GTP活性は雄性のそれに比し、約1.5倍高い値を示した。しかし、正常あるいは睪丸摘除雄性ラットにEDを投与すると、著明な活性の増加がみられ、正常雌性ラットの活性の約1.2倍まで上昇した。また、正常雄性ラットおよび睪丸摘除ラットにTSを投与しても γ -GTP活性の変動はみられなかった。一方、雌性ラットの γ -GTP活性はTSあるいはED投与により有意な変動はみられなかった。それに対し、卵巣摘除により約25%の活性低

下がみられたが、卵巣摘除+EDでは正常雌性ラットの活性レベルまで回復した。これらの知見から、肝 γ -GTP活性はTSよりはむしろ主としてEDにより制御されていると考えられる。

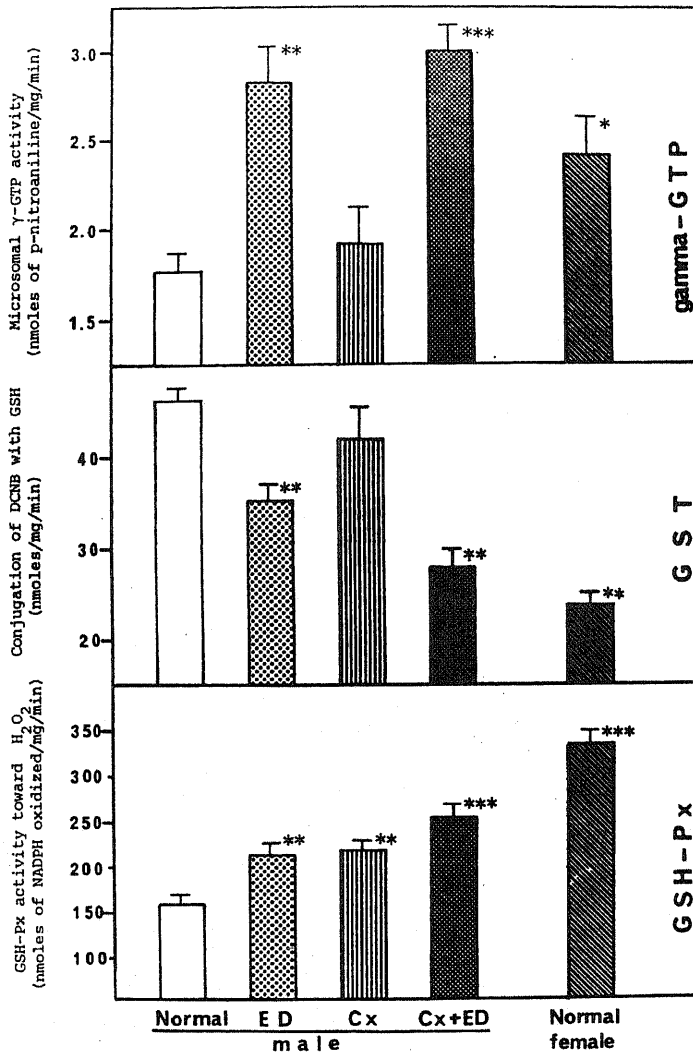


Fig. 3-4 Effect of castration and/or estradiol administration on the activities of hepatic γ -GTP, GST and GSH-Px in rats.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs normal male rat. Cx; castration, ED; estradiol treatment.

一方、GST活性の性ホルモンによる影響に関しては、ED投与は正常雄性ラットおよび睾丸摘除ラットいずれにおいても著明な活性の低下がみられたのに対し、睾丸摘除ラットにTSを投与した場合には活性の変動はほとんどみられなかった。また、雌性のGST活性は卵巣摘除により上昇し、卵巣摘除+TS投与により、さらに増加したが、ED投与では逆に減少した (control群, 23.87 ± 0.52 ; 卵巣摘除群, 35.80 ± 1.06 ; 卵巣摘除+TS群, 42.73 ± 2.12 ; 卵巣摘除+ED群, 28.80 ± 0.85 mU/mg 蛋白)。これらの成績から、ラット肝GST活性の性差発現は、雌性ラットのGST活性がEDにより抑制されていることが一因と考えられる。雄性ラットのGSH-Px活性は睾丸摘除およびED投与により著明に増加した。一方、TS投与の影響に関しては Table 3-8 に示す様に正常雌性ラット、睾丸摘除雄性ラット、卵巣摘除雌性ラットいずれにおいてもTS投与により、有意な減少がみられた。このことから、GSH-Px活性に関しては、 γ -GTP活性と同様、EDによる活性の亢進がみられたが、TSは逆に抑制的に作用することが示唆された。

Table 3-8 Effect of testosterone administration on the GSH-Px activities in normal female, castrated male and ovariectomized female rats.

Treatment	Normal female	Cx male	Ox female
None	336.1 ± 15.1	220.3 ± 10.4	321.9 ± 18.9
TS	295.9 ± 11.9	129.3 ± 15.9	218.8 ± 22.5

The values are mean \pm S.E. The activity of GSH-Px towards H_2O_2 is expressed as mU per mg protein.

以上の知見より、 γ -GTP、GSTおよびGSH-Pxのいずれの酵素活性も、性ホルモンにより明らかな調節を受けていることが明らかとなった。

第5章 雌雄ラット肝GSTおよび GSH-Pxアイソザイムと 性差

GSTは1種類でなく、少くとも複数のアイソザイムが存在することはよく知られている。Habigら^{20, 21)}はラット肝可溶性分画より、各々個々のGSTアイソザイムを分離精製した。彼等はCM-cellulose カラムの溶出パターンからGST各アイソザイムをA, B, C, D, E, およびAAと命名し, ligandin はGST-Bと同一であると報告した。しかし, Hayes ら¹⁰⁴⁾はCM-cellulose カラムの溶出条件を変えることにより, ligandin とGST-Bとを別々に分離精製することに成功した。現在, ラット肝 cytosol 中のGSTは basic な酵素 (pI 7.5-10.0) と neutral/acidic な酵素 (pI 7.5以下) とに分類され, 前者には ligandin, GST-D, -C, -B, -A および -AA が含まれる^{105, 106, 107)} のに対し, 後者は GST-E および -M が知られている^{108, 109, 110)}。Neutral/acidic な GST に関しては, まだ不明な点も多く, 明確な結論は得られていない。

一方, GSTのサブユニット構造に関しては, 免疫学のおよび基質特異性の面から Ya (Mr=22,000), Yb (Mr=23,500), Yb' (Mr=23,500) および Yc (Mr=25,000) の4種が確認され, GST各アイソザイムはそれらサブユニットの組み合わせによる2量体であることが知られている^{111, 112)}。最近, Mannervik と Jansson¹¹¹⁾はサブユニットに基づく新しいGST命名法を提唱した。すなわち, サブユニット Ya, Yb, Yb' および Yc を各々, L, A, C および B とすることにより, basic な酵素である GST-A, -B, ligandin, -C, -D および -AA は各々 A₂, BL, L₂, AC, C₂ および B₂ となる。さらに彼等は, 下記に示す様にこれら6種のGSTはBL型とAC型の免疫学的に異なる2群に分類されるとしている。

Enzyme (New nomenclature)	Peak no. in chromatofocusing	Subunit structure ^a	Precipitin reaction with antitransferase antibodies ^b		Previous nomenclature ^c
			BL	AC	
Glutathione S-transferase L ₂	I	Y _a Y _a	+	-	-
Glutathione S-transferase BL	II	Y _a Y _c	+	-	B
Glutathione S-transferase B ₂	III	Y _c Y _c	+	-	AA
Glutathione S-transferase A ₂	IV	Y _b Y _b	-	+	A
Glutathione S-transferase AC	V	Y _b Y _b	-	+	C
Glutathione S-transferase C ₂	VI	Y _b Y _b	-	+	-

^aThe subunits are named according to size as suggested by Bass et al. . . Y_a = 22,000; Y_b = 23,500; and Y_c = 25,000 dalton. Y_b can be distinguished from Y_c primarily on the basis of differences in catalytic properties.

^bAntibodies against glutathione S-transferases BL and AC were raised in rabbits.

^cIn the previous nomenclature . . . transferases L₂ and C₂ were not recognized.

そこで、本研究においてはGSTアイソザイムの名称は MannervikとJensson¹¹¹⁾の命名法に準じた。

GSTは、その触媒能においてペルオキシターゼ活性を示すことも知られている。それは、のちにセレン非依存性GSH-Px (non-Se-GSH-Px) 活性であることが証明された²³⁾。しかし、すべてのGSTアイソザイムが non-Se-GSH-Px 活性を有する訳ではない^{97, 98)}。組織中のGSH-Px 活性はセレン酵素 (Se-GSH-Px) と non-Se-GSH-Px の両者を含有する^{22, 23)}。Se-GSH-Px は有機過酸化物とH₂O₂の両者の還元を触媒するが、non-Se-GSH-Px はH₂O₂を基質としない¹¹³⁾。

第3編、第3および4章において、ラット肝 cytosol のGSTおよびGSH-Px 活性には著明な性差がみられることを示した。その中で、GST活性とGSH-Px 活性の性差は全く逆であることを見出した。

そこで本章においては、ラット肝 cytosol でみられるGST活性の性差は、どのGSTアイソザイムに起因するかを知る目的で各アイソザイムに分離精製して詳細に検討した。さらに、GSH-Px 活性の性差はSe-GSH-Px あるいはnon-Se-GSH-Px いずれに由来するのか、またGST活性の性差とGSH-Px 活性とにどのような関連性が存在するのかを検討した。

3-5-1 GSTおよびGSH-Px 活性の性差における基質依存性

【実験方法】

1. 動物

Sprague-Dawley 系雌雄ラット(7週令)を用いた。犠殺後、直ちに肝臓を1.15% KClで灌流瀉血後、冷 1.15% KCl で20%ホモジネートを調製した。ホモジネートは 9,000xg 20分遠心し、その上清をさらに 105,000xg 60分遠心後、得られた上清を cytosol として以下の実験に用いた。

2. GSTおよびGSH-Px 活性の測定

GST活性およびGSH-Px 活性はそれぞれ第2編第3章および第1編第4章に述べた方法により測定した。

【実験結果】

Table 3-9 は雌雄ラット肝 cytosolのGST活性およびGSH-Px 活性を示した。DCNBを基質とした場合、雄性ラットは雌性に比し、約 1.6倍高い活性を示したが、CDNBに対する活性では雌雄間で有意差はみられなかった。

CDNBのDCNBに対する活性の比は雌性ラットの方が約1.5倍高かった。一方、GSH-Px 活性は、 H_2O_2 とCHPいずれの基質を用いても雌性の方が約2倍高い活性を示した。さらに、CHPに対する活性と H_2O_2 に対する活性の差においても雌性の方が有意に高かった。

Table 3-9 The activities of glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in male and female rat liver cytosol.

Substrate	Male (M)	Female (F)	M/F
CDNB	927.3 ± 9.3	847.9 ± 30.1	1.09
DCNB	46.5 ± 1.0	29.8 ± 1.1**	1.56
CDNB/DCNB	20.0 ± 0.6	28.6 ± 1.4**	- -
H ₂ O ₂ (1)	128.3 ± 9.3	214.1 ± 7.7**	0.60
CHP (2)	209.3 ± 16.9	343.4 ± 14.9**	0.61
(2)-(1)	81.0 ± 10.3	129.3 ± 9.6*	0.63

Enzyme activities were assayed as described in the text, and the figures are expressed in munits per mg of cytosolic protein. Values are means ± S.E.M. from five animals, with evaluation by Student's t-test. * p<0.05, ** p<0.01 vs males.

3-5-2 Se-GSH-Px および non-Se-GSH-Px 活性の性差

【実験方法】

肝cytosolのGSH-Px はGST精製の際に繁用される affinity カラムクロマトグラフィーにより容易にSe-GSH-Px と non-Se-GSH-Px とに分離される。GSH-affinity matrix の調製は Simons と Van der Jagt の方法¹¹⁴⁾ に準じて行い、溶出は Koskelo らの方法¹¹⁵⁾ で行った。方法の概略は以下に示す通りである。

Epoxy-activated Sepharose 6B

↓ wash with H₂O

↓ wash with 44mM Na, K-phosphate
(pH 7.0)

Suspension

↓ bubble with N₂ gas for 5 min

↓ added 100mg/ml GSH (pH 7.0)

Shake (ca. 60 rpm) at 37°C for 24 hr

↓ wash with H₂O

↓ 1M Ethanolamine

Stand for 4 hr

↓ wash with 0.5M KCl in 0.1M Acetate
(pH4.0)

↓ wash with 0.5M KCl in 0.1M Borate
(pH8.0)

Suspend with starting buffer

Starting buffer : 20mM Na, K-phosphate (pH7.0)
containing 20% (v/v) glycerol

Elution buffer : 50mM Tris-HCl (pH9.6)
containing 15mM GSH,
20% (v/v) glycerol

【実験結果】

Fig. 3-5 に示す様に, GSH-affinity カラムを用いることにより, GSH-Px は Se-GSH-Px と non-Se-GSH-Px とに分離され, Se-GSH-Px は吸着されず, void分画に回収された。GSH含有 buffer で溶出される GST 分画は CHP に対する活性を示したが, H₂O₂ に対する活性は認められなかった。この知見は, 明らかに GST はペルオキシダーゼ活性を有することを示している。

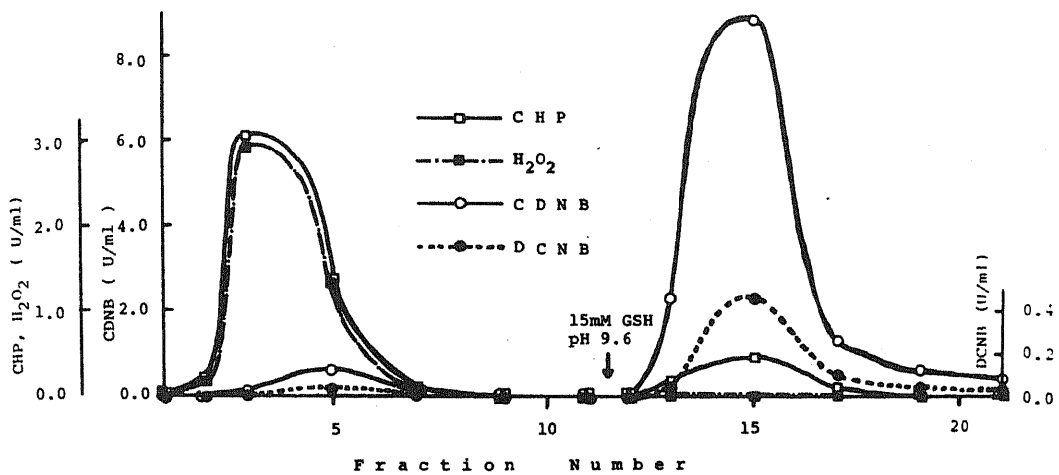


Fig. 3-5 Separation of cytosolic GSH-Px into Se-dependent and Se-independent GSH-Px by GSH-affinity column chromatography.

Affinityカラムから得られた Se-GSH-Px と non-Se-GSH-Px 両分画をそれぞれ合して、 H_2O_2 と CHP に対する活性を測定した (Table 3-10)。その結果、Se-GSH-Px は H_2O_2 、CHP いずれの基質に対しても雌性の方が約 2 倍高い活性を示し、non-Se-GSH-Px 活性に関しても雌性の方が高いことが明らかになった。

Table 3-10 The activities of Se-dependent and Se-independent GSH-Pxs separated from rat hepatic cytosol by GSH-affinity column chromatography.

Substrate	Se-GSH-Px			Non-Se-GSH-Px (GSTs)		
	Male	Female	F/M	Male	Female	F/M
(Units / mg of protein)						
CHP	0.146	0.263	1.80	1.055	1.265	1.20
H_2O_2	0.146	0.232	1.59	N.D.	N.D.	

N.D.; not detected.

Male and female cytosol equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 20 % (V/V) glycerol was mixed with GSH-Sepharose 6B matrix, and filtrated. Se-GSH-Px was obtained in the unbound fractions. After washing the matrix, the elution of non-Se-GSH-Px (=GSTs) was carries out by 50 mM Tris-HCl (pH 9.6) containing 15 mM GSH and 20 % (V/V) glycerol.

3-5-3 Basic および Neutral/acidic GST活性の性差

【実験方法】

GSH-affinity カラムより溶出したGST分画は濃縮後、10mM Tris-HCl (pH 8.0) で透析し、そのサンプルをDE-52 (10mM Tris-HCl, pH 8.0) にapplyした後、10mM Tris-HCl (pH 8.0) でGST活性が認められなくなるまで洗滌した。この非吸着画分に回収されるGSTを basic GSTとし、吸着したGSTは 100mM KClを含む Tris-HCl (pH 8.0) で溶出し、neutral/acidic GSTとした。

【実験結果】

Table 3-11 に示す様に、basic GST 活性はCDNBを基質とした場合、雌性の方が高かったが、DCNBに対する活性では逆に雄性の方が高かった。それに対して neutral/acidic GSTはCDNB、DCNBいずれの基質に対しても雄性の方が高い活性を示した。一方、CHPに対する活性では basic と neutral/acidic いずれのGSTにおいても雌性の方が高いことが認められた。

Table 3-11 The activities of basic and neutral/acidic glutathione S-transferases from rat liver cytosol.

Substrate	Basic transferases			Neutral/acidic transferases		
	Male	Female	M/F	Male	Female	M/F
	(Units / mg of protein)					
CDNB	8.30	11.23	0.84	13.50	8.12	1.66
DCNB	0.29	0.18	1.61	0.92	0.47	1.96
CHP	1.28	1.91	0.67	0.27	0.39	0.69

Glutathione S-transferases fractions eluted from GSH column were dialyzed against 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The dialyzed sample (23.0 and 28.6 mg of protein in males and females, respectively) was applied to a column (2.6 cm x 7.0cm) of DE-52 equilibrated and eluted with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The basic transferases did not bind and eluted in the flow-through fractions from the column. The transferases eluted by 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 100 mM KCl were named as neutral/acidic transferases.

3-5-4 GSTアイソザイムのクロマトフォーカシングにおける 溶出パターンの性差

【実験方法】

3-5-2 に述べた方法により, GSH-affinity カラムから得られたGST画分を濃縮後, 10mM Tris-HCl (pH 8.0)で透析した。そのサンプルをあらかじめ25mM トリエチルアミン (pH 11)で平衡化したクロマトフォーカシングゲルPBE 118 (ファルマシア ファインケミカル)カラム (1.0cm×30cm)にapplyした。溶出は, ファルマライト (pH 8-10.5) (ファルマシア, ファインケミカル; 80倍に希釈し pH 8.0に調製したもの)360mlで行った。各分画のGST活性はCDNBを基質として測定した。AcidicなGSTの溶出は1M NaCl を用いて行った。

【実験結果】

雌雄ラット肝cytosolicGSTのクロマトフォーカシングにおける溶出パターンを Fig. 3-6 に示す。図から明らかな様に, 6種のGSTアイソザイムの溶出パターンは, 雌雄間で著しく異なることが認められた。この様な basic GSTが溶出した後, 1M NaClで溶出するGST活性画分を acidic GSTとした。

クロマトフォーカシングによるGST総活性の回収率は, 雄性で97.4%, 雌性で96.9%であった。各GSTアイソザイム画分の活性を雌雄間で比較すると Table 3-12 に示す様に著明な差異がみられた。BL型のGST活性は雌性の方が有意に高く, 中でもGST-BLは雄性の約5倍の活性を示した。一方, AC型のGSTは逆に雌性の方が高く, GST-A₂は雌性に比較して3倍高い活性を示した。また, Neutral/acidic GSTに関しては 3-5-3 に示したDE-52 カラムの場合と同様, 雄性の方が雌性に比し, 高い活性を示すことが認められた。

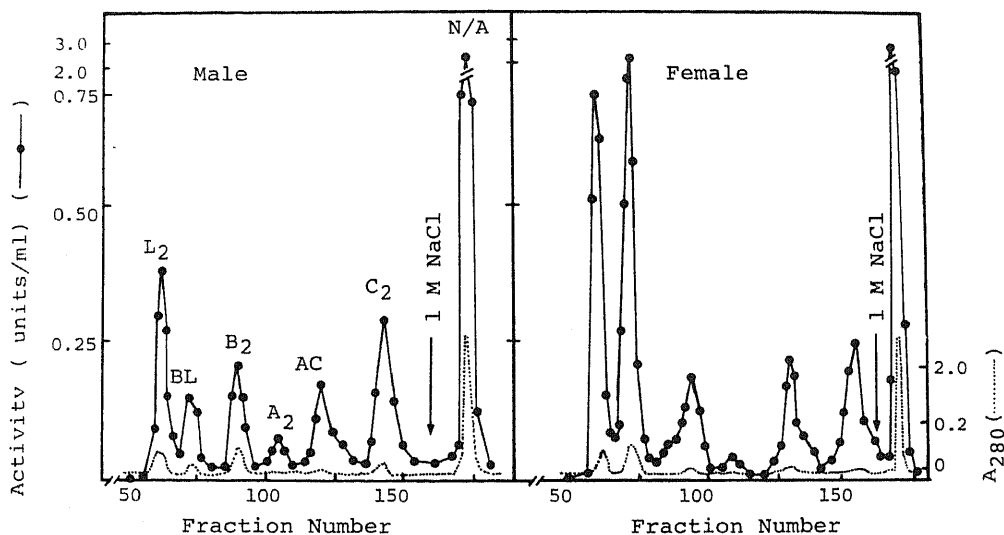


Fig. 3-6 Separation of basic glutathione S-transferases obtained from affinity column chromatography on glutathione-linked Sepharose 6B of male and female rats by chromatofocusing. Transferase activity was measured with CDNB as substrate. Equal amounts of proteins of male and female (4.91 mg) were loaded onto the chromatofocusing column. Total activities with CDNB of male and female transferases applied were 29.7 and 37.9 units, respectively.

Table 3-12 Distribution of male and female glutathione S-transferase activities of each isozyme fraction separated by chromatofocusing.

	Basic GST isozymes						Acidic GSTs
	L ₂	BL	B ₂	A ₂	AC	C ₂	
Male (%)	10.4	5.6	8.4	2.7	12.4	18.2	42.3
Female (%)	15.9	25.0	8.9	0.9	9.5	13.0	26.8
<u>Male</u> Female	0.65	0.22	0.94	3.00	1.31	1.40	1.58

Each isozyme fraction of transferases obtained from chromatofocusing as shown in Fig.2 was pooled as follows and measured the each pooled transferase activity with CDNB as a substrate. Male: L₂ (Fr No 58-67), BL (68-76), B₂ (84-93), A₂ (99-107), AC (113-133), C₂ (134-153), Acidic GSTs (158-175). Female: L₂ (59-68), BL (69-82), B₂ (88-106), A₂ (108-114), AC (123-142), C₂ (143-164), Acidic GSTs (165-171). Total recovery of transferase activities of each isozyme fraction separated by chromatofocusing from male and female was 97.4% and 96.9%, respectively.

3-5-5 雌雄ラット肝GSTサブユニットに関するKinetics による解析

【実験方法】

雌雄ラット肝 cytosolic GSTのCDNB, DCNBおよびGSHに対する K_m 値, V_{max} 値を Lineweaver-Burk plot により求めた。さらに, 精製したGST-L₂, -A Cおよび-B₂についても同様に K_m 値, V_{max} 値を求めた。

【実験結果】

Fig. 3-7 に示す様に, 雄性肝cytosolのGSTのDCNBに対する活性の V_{max} 値は雌性のそれに比し, 約 2.5倍高かったが, K_m 値については雌雄間で差はみられなかった。CDNBに対する活性に関しては, 雌雄共に low K_m と high K_m が得られたが, 雌雄差はみられなかった。CDNB濃度として0.25mM以上では V_{max} 値において雌雄間で差はみられなかったが, 0.25mM以下では雄性の V_{max} は雌性のそれより明らかに高かった。一方, GSHに対する V_{max} 値はDCNBを用いた場合に雄性の方が雌性に比し, 約 2 倍高かった。基質としてCDNB (1mM), DCNB (1mM)いずれを用いた場合にもGSHに対する K_m 値は雌雄共, 0.152mMであった。この値は Jakoby ら¹¹⁶⁾のDCNB (1mM)を用いた場合, GSHに対する K_m 値は 0.1~0.2mM であるという報告と近似している。これらの K_m 値に関する知見から, GSTのGSHに対する結合部位の方が, CDNBあるいはDCNBの結合部位よりも親和性が高いことが考えられる。このことは, GSTの生理機能の1つとしてGSHと非共有結合することによりGSHのreservoirとしての働き¹¹⁷⁾と関連ある可能性が示される。

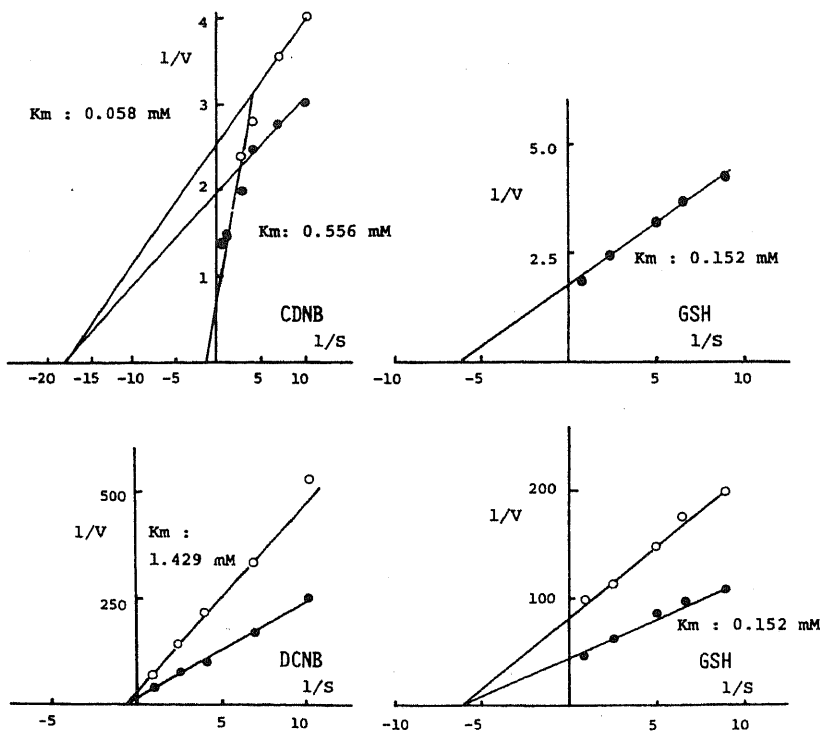


Fig. 3-7 Lineweaver-Burk plots showing the effect of substrate concentration on the reaction rate of male and female rat liver GSH S-transferase activity.

Upper panel : CDNB and GSH as substrate variables respectively (the second substrate concentrations were fixed at 1 mM). Lower panel : DCNB and GSH as substrate variables respectively (for the left graph the GSH concentration was fixed at 5 mM, for the right one the DCNB concentration was fixed at 1 mM). $1/S$ is expressed as mM^{-1} ; $1/V$ is expressed as units mg^{-1} . (●; male, ○; female)

GSTは Ya, Yb, Yb', Yc サブユニットの組み合わせによる 2 量体であることから、CDNBおよびDCNBに対する K_m 値はこれらのサブユニットの K_m 値に対応することが考えられる。Habig ら^{20, 21)}によれば、GST-Aと-CはCDNBに対して各々 0.06と0.1 mM の K_m 値を示すのに対し、GST-AAと-Bは 0.4と0.8 mMと比較的高い K_m 値を示すと報告されている。Table 3-13から明らか様に、CDNBを基質とした場合、Ya に対する K_m 値はYb のそれと全く異なることが判明した。Yc のCDNBに対する K_m および V_{max} 値はYa のそれとほぼ近似した。

Table 3-13 Apparent kinetic parameters of various isozymes of purified basic GSH S-transferase composed of each different subunit in rat liver.

	CDNB-Activity			DCNB-Activity
	L_2 (YaYa)	AC (YbYb')	B_2 (YcYc)	AC (YbYb')
Km (mM)	0.526	0.062	1.111	1.429
Vmax (Units/mg)	5.000	11.760	3.333	6.667

CDNB as substrate variables when GSH concentrations were fixed at 0.5 mM. DCNB as substrate variables when GSH concentrations were fixed at 1 mM.

これらの知見より, cytosolのGSTにおいてCDNBに対して得られた2つの Km 値はYa(あるいはYc)とYbサブユニットの Km 値に起因するものと思われる。それに対して, DCNBに対する Km 値は Yb サブユニットのみに対応するものと考えられる。

3-5-6 雌雄ラット肝GSTのサブユニットの構成比の違いと 免疫学的検討

【実験方法】

1. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法

Laemmli の方法^{11B)} に準じて、12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。

2. 阻害実験

抗GST-AC抗体はGST-ACに対しては単一の沈降線を示したが、GST-BLとは交差しなかった。さらに、抗GST-BL抗体はGST-ACとは交差せず、BLに対して単一の沈降線を示した。また、活性阻害実験は下記の通り行った。すなわち、雌雄肝 cytosol 0.03ml (蛋白量; 雄性67, 雌性 63 μ g) と抗血清 0.01 ~ 0.2ml を加え、さらに 10mM Na-phosphate-0.9% NaCl (pH 7.4) にて全量 0.23mlとした。4℃一夜放置後、12,000rpm 5分間遠心し、その上清についてCDNB に対する活性を測定した。抗体による阻害率は同量の control 血清存在下での活性のパーセントで表示した。

【実験結果】

3-5-2 で述べたGSH-affinity カラムより得られたGST分画を雌雄について SDS-PAGEを行った (Fig. 3-8)。その結果, Ya, Yb, Yc サブユニットの構成比において雌雄間で明白な差異がみられた。すなわち, 雄性ではYbが最も多く次いで Yc, Ya であるのに対し, 雌性では Yb が最も少なかった。

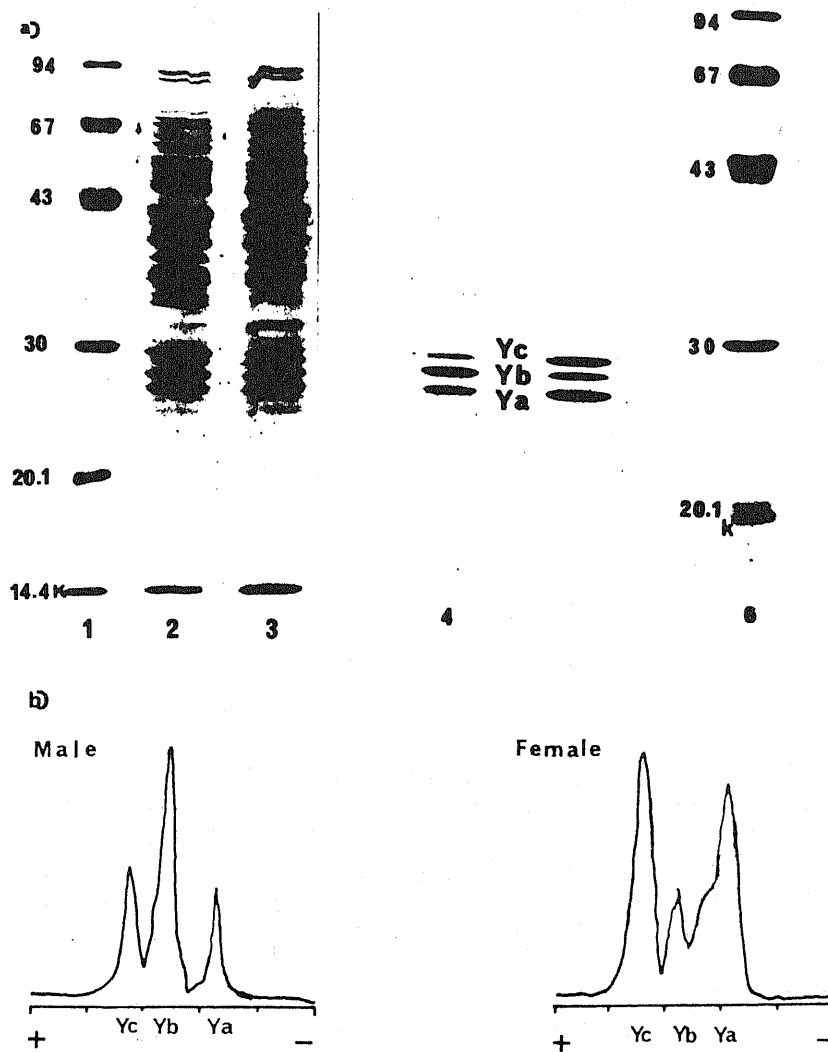


Fig. 3-8 SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis of transferase fractions obtained after GSH-affinity chromatography of male and female hepatic cytosol in rats.

(a) Electrophoresis was carried out by using a 12.5% acrylamide resolving gel. Lane 1 and 6, standard; 2 and 3, male (9.8 μ g) and female (10 μ g) cytosol, respectively; 4 and 5, male and female transferases obtained from GSH-affinity column, respectively. The Ya, Yb and Yc bands are indicated. (b) The densitometric scanning of Lanes 4 and 5 was performed at 550 nm.

また、肝 cytosol における抗GST-AC抗体および抗GST-BL抗体による阻害活性では雌雄間で明らかな差がみられた(Fig. 3-9)。抗GST-AC抗体添加により、雄性 cytosol では雌性より阻害程度は著明に大きかったのに対し、GST-BL抗体では逆に雌性の方がより強く阻害された。

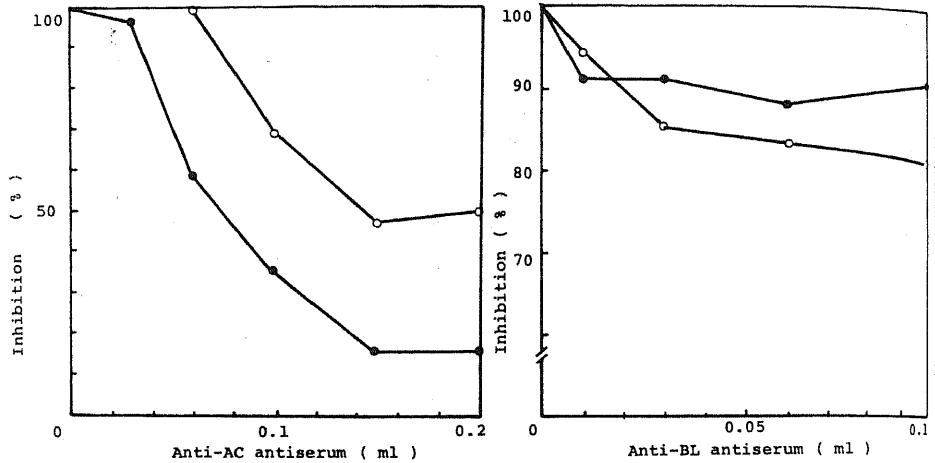


Fig. 3-9 Immunotitration of GST activities from male and female rat hepatic cytosol by anti-GST-AC and -BL antibodies.

Both cytosol from males and females was diluted with 10 sodium phosphate-0.9% NaCl, pH 7.5. Portions of diluted cytosol (0.03 ml) were incubated with indicated volume of antiserum (total volume, 0.23 ml) overnight at 4°C. The remaining activities in the supernatants obtained by centrifugation at 12000 rpm for 5 min were determined. The activity was measured with CDNB as a substrate. The degree of inhibition of the activity by the antibody was expressed as percentage of the activity remaining in the presence of control serum from a nonimmunized rabbit. The protein concentrations of male and female cytosol were 67 µg and 67 µg, respectively. —●—, males; —○—, females.

3-5-7 GST活性の性差の薬物抱合能およびGSH量に及ぼす影響

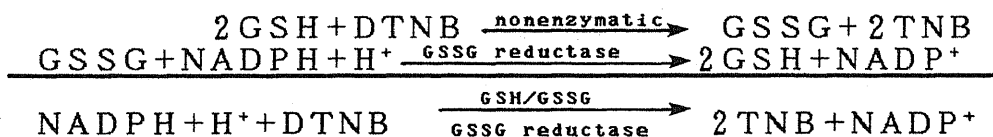
【実験方法】

1. GSH抱合体の定量

反応液の組成(1 ml)は100mM K-phosphate(pH 6.5), 0.5mM GSH, 0.5mM CDNBおよび cytosol(0.38mg蛋白)とし 37℃インキュベート後の生成した(2,4-dinitrophenyl) glutathione を 340nm で測定した。なお, DCNB-G抱合体の場合には反応液(1 ml)は100mM K-phosphate (pH 7.5), 1mM GSH, 1mM DCNBおよび cytosol(8mg蛋白)とし 37℃インキュベート後, 生成した抱合体を 345nm にて測定した。

2. GSHの定量

反応液中のGSH量の測定は 5,5'-dithiobis(nitrobenzoate)とグルタチオン還元酵素による recycling 法¹¹⁹⁾を用いて行った。本法は次の様な反応により成する 5-thio-2-nitrobenzoate(TNB)を 412nm にて測定するものである。



本法は Ellman 法と異なり, システインの過剰量でも影響されずGSHおよびGSSGに特異的である¹¹⁹⁾。

反応液組成は 0.1M Na-phosphate-1mM EDTA, pH 7.0, 0.2mM NADPH, 0.6mM DTNBおよび試料からなり, GSSG reductase 1 unit添加して412nmで反応開始とし, 1分間あたりの吸光度変化より求めた。

【実験結果】

GST活性の性差がGSH抱合体生成量およびGSH量などにどのような影響を及ぼすかを検討した。Fig. 3-10 に示す様に、GSH抱合体の増加に伴い、GSH量の著明な減少が経時的にみられた。そこで、雌雄肝 cytosol とGSHおよびDCNB共存下、抱合体生成量とGSH減少量を検討したところ、雄性では雌性に比し、有意な抱合体の生成と、それに伴いGSH量の減少が認められた。

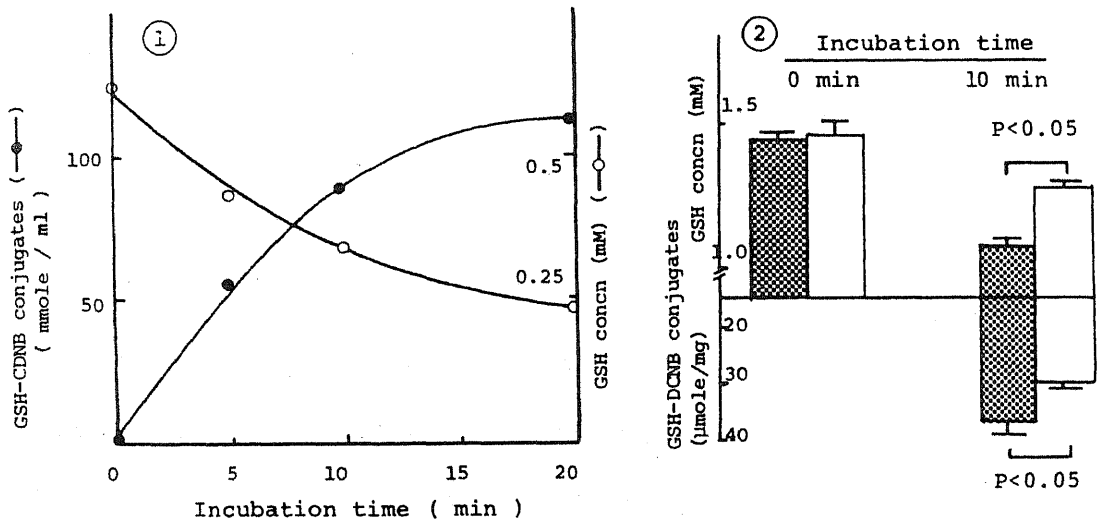




Fig. 3-10 Relationship between the decrease of GSH and the formation of GSH conjugates during the incubation.

① The mixture consisting of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), 0.5 mM GSH, 0.5 mM CDNB and cytosol (0.38 mg of protein) from male rat liver was incubated at 37°C. At the indicated time, the GSH-CDNB conjugating activity and the concentration of GSH were determined.

② The mixture containing 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 1 mM GSH and cytosol (8 mg of protein) was incubated at 37°C.  Male;  Female. Vertical line indicates S.E. from four rats.

第6章 考察

ラット肝GSH量は週令により異なり、12週令では雄性の方が雌性に比し有意に高い。また、肝GSHは日内変動を示すことが知られているが^{99, 100)}、雌雄共ほぼ同じ日内変動を示し、どの時間帯においても雄性の方が高い傾向を示した。さらに、この肝GSHの性差は18時間絶食条件下においても認められることから、肝GSH量の性差は単に食飼性因子に起因するとは考え難い。絶食条件下では、肝GSH量の性差と共に γ -GTP活性での雌雄差が著明になった(第2章)。この絶食下でみられる肝 γ -GTP活性の性差は、transpeptidation 反応において顕著であるが、hydrolase 反応では有意差はみられなかった。 γ -GTPの in vivo における生理機能はグルタチオン分解酵素としての hydrolytic actionである^{120, 121)}と考えられていたが、最近 in vivo において transpeptidation 反応も行うとの知見^{122, 123)}が報告されている。

絶食時にみられる肝 γ -GTP活性の性差は、肝システイン量に反映され、肝 γ -GTP活性とシステイン量との間に極めて高い相関性がみられる。また、7~8週令の比較的若いラットでは肝GSH量には性差はみられないが、肝 γ -GTP活性および肝システイン量は雌性の方が有意に高い。これらの知見から、肝GSHの週令差に伴う性差には肝 γ -GTP活性が大きく関与しているものと考えられる。

一方、関連酵素系の中で著明な性差は γ -GTP、GSTおよびGSH-Px活性において認められ、肝 γ -GTPは雌性ラットの方が雄性ラットに比し著明に高い活性を示した。さらに、性ホルモン投与の実験から、 γ -GTPはTSよりはむしろEDによる調節支配が大きいことが示唆された。GST活性とGSH-Px活性は互いに逆の性差を示し、性ホルモンの影響も異っていた。すなわち、GSH-Px活性に対してEDは促進的に作用し、TSは抑制的効果を示すことが考えられる。それに対しGST活性では、逆に活性の上昇、EDは活性の低下を誘導するものと示唆される。

GSTは基質時異性が広い蛋白群である。CDNBは種々のGSTアイソザイムに対して優れた基質であるが、DCNBはYbサブユニットを有するAC型のアイソザイムにのみ作用すると報告されている^{20, 111)}。Table 3-10に示す様に雄性ラット肝GSTはDCNBに対する活性では雌性ラットに比し、著明に高いが、CDNBに対する活性ではほとんど雌雄差はみられない。この知見はラットにおいては、DCNBに対するGST活性に性差がみられるという報告^{24, 124)}と一致する。

一方、GSH-Px活性はCHPおよびH₂O₂いずれの基質に対しても雌性ラットの方が高い (Table 3-10)。Lawrence と Burk²²⁾はH₂O₂を基質とした場合のGSH-Px活性はSe-GSH-Pxを反映し、CHPに対する活性とH₂O₂に対する活性の差はnon-Se-GSH-Pxの活性に対応すると報告している。従って、Table 3-10に示した結果は、GSH-Px活性の性差はSe-GSH-Pxのみならずnon-Se-GSH-Pxにもみられることを示唆している。さらに、GSH-Px活性の性差に関して直接的な証拠を得る目的でaffinityカラムによりSe-GSH-Pxとnon-Se-GSH-Pxとに分離して検討したところ、ラット肝cytosolで見られるGSH-Px活性の性差は主にSe-GSH-Pxに起因するが、一部はnon-Se-GSH-Pxにも依存することが明らかとなった。non-Se-GSH-PxはGSTのある種のアイソザイムと同一である⁶⁾ことから、GSH-Px活性を示すGSTアイソザイムは雌性の方が雄性に比し高いと考えられる。

Table 3-12から明らかな様に、basic GSTに関しては、CDNBとCHPに対する活性は雌性の方が高いが、DCNBに対する活性は逆に雄性の方が高い。さらに、Kineticsによる解析結果から、雌雄肝GSTには質的な違いがないことが示された。これらの事実はbasic GSTアイソザイムの量的分布が、雌雄間で明らかに異なることを示唆している。Fig. 3-8に示す様に、SDS-PAGEにおいてGSTサブユニットの構成比が雌雄間で明らかに異なることが判明した。

Hales と Neims¹²⁵⁾は抗GST-B抗体を用いて免疫沈降反応による検討から雄

性ラット肝 cytosol の GST-B は雌性のそれに比し、少ないことを報告した。しかし、彼等は Habig らの方法²⁰⁾により GST-B を精製し、ligandin は GST-B と同一であると結論している。従って、彼等の成績は GST-B あるいは ligandin に関するものであり、他の GST アイソザイムの性差に関して明確な結論は得られていない。本研究において、ラット肝 basic GST を 6 種に分離することに成功し、そのクロマトフォーカシングにおけるそれらアイソザイムの溶出パターンは雌雄間で明らかな相異が認められた。その中で、GST-BL と -L₂ の活性は雌性に高いのに対して、AC 型の GST アイソザイムは雄性において高い活性が認められた。このことは GST-BL と -AC の抗体を用いた阻害実験においても確認された。

GST が有するペルオキシダーゼ活性は Y_a と Y_c サブユニットに起因することから、雌性の basic GST に関して DCNB および CHP に対する活性が雄性より高いのは、雌性の方が GST-BL および -L₂ が多いことに起因するものと思われる。

さらに、肝 cytosol における DCNB 抱合体生成量およびそれに伴う GSH 量の減少は、雄性ラットの方が雌性に比し有意に高かった。この事実は、ラット肝 cytosol にみられる GST 活性の性差は薬物の GSH 抱合能および肝 GSH 代謝とに密接な関連性を有し、生理的機能を考える上で極めて重要な示唆を与えている。

総 括

肝グルタチオン代謝と関連酵素系との関連性について、第1編ではラット肝臓におけるGSH代謝の制御機構、第2編ではラット、マウス、モルモット、ハムスターにおける肝GSH代謝系の種差、また、第3編ではラット肝GSH代謝および関連酵素系の性差に関して検討した。これらを要約して以下に示す。

- (1) 生体内グルタチオンの唯一の分解酵素である γ -GTPは、成熟肝においては極めて低い活性を示すが、細胞膜に局在していることからGSHあるいはGSSGの局所的な水解活性はかなり高いと考えられる。また、その酵素的性質は免疫学的検討およびKineticsの解析から、腎 γ -GTPと違いはみられず、 γ -GTPを修飾しているシアル酸が多い分子種であることが判明した。
- (2) 肝 γ -GTP活性の変動とシステインの量的変化とに高い相関性がみられたことから、 γ -GTPはGSH量の変動に極めて重要な役割を担っていると考えられる。
- (3) ラット周産期における胎盤および胎仔肝 γ -GTPは胎仔のGSHあるいはシステインの不足を補給する目的で、母体からのGSHを効率よく分解利用するものと示唆される。
- (4) 成熟ラットにおける肝 γ -GTPの著明な誘導は細胞外に増加したグルタチオン（主にGSSG）を効率よく分解し、GSHの再合成に利用する役割を果たすことが明らかにされた。
- (5) 肝グルタチオン代謝および関連酵素活性には著明な種差が認められ、ハムスターはGSHの酸化還元速度が速い動物種であり、マウスにおいても絶食条件下において同様にGSHの酸化還元速度が促進されることが明らかにされた。
- (6) 肝臓における脂質過酸化反応は肝GSHレベルとは相関せず、むしろGSH-PxあるいはGST活性の脂質過酸化反応における生理的重要性が示唆された。

- (7) ラット肝GSH量の性差は絶食条件下においても認められることから、単に食餌由来の因子に起因するものではなく、むしろ γ -GTPを中心とした関連酵素系が重要な性差発現因子であることが明らかにされた。
- (8) ラット肝 γ -GTP、GSTおよびGSH-Px活性の性差は、いずれも性ホルモンにより制御されることが明らかにされた。
- (9) ラット肝GSTおよびGSH-Px活性の性差は各アイソザイムを分離精製した結果、GSTおよびGSH-Pxの各アイソザイムの量的変化に起因することが判明した。
- (10) ラット肝GST活性の性差は、そのGSH抱合能およびGSH量の変化にも顕著な影響を示した。このGSH抱合の際のGSH減少は不可逆的なGSHの変化である。従って、もしGSH抱合を受ける薬物あるいは代謝物が生体内に存在した場合に、肝GSH量の変動にも明らかな性差を示すものであり、GST活性の性差は肝グルタチオン代謝において重大な生理的重要性を有すると考えられる。

謝 辞

終りに臨み、本研究の機会を与えていただき本論文作成に際して、終始御懇篤なる御指導と御助言をいただき、さらに本論文の御校閲を賜りました恩師千葉大学薬学部 北川晴雄教授に対して衷心より感謝致します。

また、本研究遂行に際して適切なる御指導、御鞭撻を賜りました元千葉大学薬学部 佐藤哲男助教授(現東京薬科大学教授)に対して深甚なる謝意を表します。

さらに本研究を通して御協力いただきました千葉大学薬学部 上野光一講師、大森栄教務職員に深く感謝致します。

最後に、本研究に協力して下さった広田孝司、小野聡各修士、および玉川(現、増村)佳子、矢野和子、浜本理恵子、岩下敬子各学士を初め、千葉大学薬学部薬物学研究室の皆様に深く感謝致します。

掲載雑誌目録

1. 第1編, 第1章の内容は, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 32, 381-384 (1981) に下記表題で掲載されたものである。

Purification of liver gamma-glutamyltranspeptidase from the rat.

2. 第1編, 第2章の内容は, Life Sci., 29, 83-491 (1981) に下記表題で掲載されたものである。

Changes of gamma-glutamyltranspeptidase activity in the rat during development and comparison of the fetal liver, placental and adult liver enzyme.

3. 第1編, 第3章の内容は, J. Pharmacol. Exp. Ther., 221, 795-800 (1982) に下記表題で

Induction of hepatic γ -glutamyl transpeptidase in rats by repeated administration of aminopyrine.

さらに, Developments in the Science and Practice of Toxicology, pp459-462, (A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya eds), Elsevier Science Publishers B.V. (1983) に下記表題で掲載されたものである。

Induction of hepatic γ -glutamyl transpeptidase in rats by repeated administration of aminopyrine.

4. 第1編, 第4章の内容は, Life Sci., 31, 2655-2665 (1982) に下記表題で掲載されたものである。

Perturbation of hepatic glutathione level and glutathione-related enzyme activities by repeated administration of aminopyrine in rats.

5. 第2編の内容は, J. Pharm. Dyn., 6, 941-949 (1983) に下記表題で掲載されたものである。

Species difference in glutathione level and glutathione related enzyme activities in rats, mice, guinea pigs and hamsters.

6. 第3編, 第3章の内容は, J. Biochem., 93, 33-36 (1983) に下記表題で掲載されたものである。

Sex-related difference in the hepatic glutathione level and related enzyme activities in rats.

7. 第3編, 第4章の内容は, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 45, 225-232 (1984) に下記表題で掲載されたものである。

Effect of steroidal sex hormones on the sex-related differences in the hepatic activities of γ -glutamyltranspeptidase, glutathione S-transferase and glutathione peroxidase in rats.

8. 第3編, 第5章の内容は, J. Biochem., に下記表題で投稿中である。

Sex difference in the subunit composition of hepatic glutathione S-transferase in rats.

引用文献

1. Hahn, R., Wendel, A. and Flohé, L.: *Biochem. Biophys. Acta*, 539, 324 (1978)
2. Meister, A.: *Metabolism of Sulfur Compounds; Metabolic Pathways*, 3rd ed., vol. VII, (ed. by Greenberg, D.M.), pp. 102, Academic Press, New York (1975)
3. Albert, Z., Orlowski, J., Orlowski, M. and Szewczuk, A.: *Acta Histochem.*, 18, 78 (1964)
4. Schulman, J.D., Goodman, S.I., Mace, J.W., Patrick, A.D., Tietze, F. and Butler, E.J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65, 68 (1975)
5. Griffith, O.W. and Meister, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 268 (1979)
6. Tateishi, N., Higashi, T., Nomura, T., Naruse, A., Nakashima, K., Shiozaki, H. and Sakamoto, Y.: *Gann*, 67, 215 (1976)
7. Tateishi, N., Higashi, T., Naruse, A., Nakashima, K., Shiozaki, H. and Sakamoto, Y.: *J. Nutr.*, 107, 51 (1977)
8. Sakamoto, Y., Higashi, T. and Tateishi, N.: *Sulfur-containing Amino Acids*, 2, 201 (1979) (in Japanese)

9. Rosalki, S.B., Tarlow, D. and Rau, D.: *Lancet*, 2, 376 (1971)
10. Ratanasavanh, D., Tazi, A., Galteau, M.M. and Siest, G.: *Biochem. Pharmacol.*, 28, 1263 (1979)
11. Bartels, H., Houck, W. and Vogel, I.: *J. Pediatr.*, 86, 293 (1975)
12. Kosower, N.S.: *Int. Rev. Cytol.*, 54, 109 (1978)
13. Maruyama, E., Kojima, K., Higashi, T. and Sakamoto, Y.: *J. Biochem.*, 63, 398 (1968)
14. Higashi, T., Tateishi, N., Naruse, A. and Sakamoto, Y.: *J. Biochem.*, 82, 117 (1977)
15. Brooks, R.R. and Pong, S.F.: *Biochem. Pharmacol.*, 30, 589 (1980)
16. Pessayre, D., Dolder, A., Artigou, J-Y., Wandscheer, J-C, Descatoire, V., Degott, C. and Benhamou, J-P.: *Gastroenterology*, 77, 264 (1979)
17. Boyland, E. and Chasseaud, L.F.: *Adv. Enzymol.*, 32, 173 (1969)
18. Jakoby, W.B.: *Adv. Enzymol.*, 46, 383 (1978)
19. Eklöw, L., Moldéus, P. and Orrenius, S.: *Eur. J. Biochem.*, 138, 459 (1984)
20. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: *J. Biol. Chem.*, 249, 7130 (1974)
21. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 175, 710 (1976)

22. Lawrence, R.A. and Burk, R.F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 952 (1976)
23. Prohaska, J.R. and Ganther, H.E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 437 (1977)
24. Darby, F.J. and Grundy, R.K.: *Biochem. J.* 128, 175 (1972)
25. Capel, I.D. and Smallwood, A.E.: *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.*, 40, 367 (1983)
26. Meister, A.: *Science*, 180, 33 (1973)
27. Inoue, M., Horiuchi, S. and Morino, Y.: *Eur. J. Biochem.*, 78, 609 (1977)
28. Inoue, M., Horiuchi, S. and Morino, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79, 1104 (1977)
29. Pellefigue, F., Butler, E.J., Spielberg, S.P., Hollenberg, M.D., Goodman, S.I. and Schulman, J.D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 73, 997 (1976)
30. Taniguchi, N., Tsukada, Y., Mukuo, K. and Hirai, H.: *Gann*, 65, 381 (1974)
31. Boelsterli, U.: *Trends Pharmacol. Sci.*, 1, 47 (1979)
32. Jacyszyn, K. and Laursen, T.: *Clin. Chim. Acta*, 19, 345 (1968)
33. Orłowski, W. and Meister, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 679 (1963)

34. Satoh, T., Takenaga, M., Kitagawa, H. and Itoh, S.:
Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol., 30, 151 (1980)
35. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and
Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
36. Hughey, R.P. and Curthoys, N.P.: J. Biol. Chem.,
251, 7863 (1976)
37. Noshiro, M. and Omura, T.: J. Biochem., 83, 61
(1978)
38. 五十嵐隆、広田孝司、佐藤哲男、北川晴雄：生化学、
52, 837 (1980)
39. Cuatrecasas, P.: J. Biol. Chem., 245, 3059 (1970)
40. 尾上薫：免疫実験操作法A（日本免疫学会編），pp. 66,
日本免疫学会（1976）
41. Mazurkiewicz, J.E. and Nakane, P.K.: J. Histochem.
Cytochem., 20, 969 (1972)
42. Coleman, R., Michell, R.H., Finean, J.B. and
Hawthorne, J.N.: Biochim. Biophys. Acta, 135, 573
(1967)
43. Booth, A.G. and Kenny, B.J.: Biochem. J., 142, 575
(1974)
44. Warren, L.: J. Biol. Chem., 234, 1971 (1959)
45. Curthoys, N.P. and Lowry, O.H.: J. Biol. Chem.,
248, 162 (1973)
46. 田中健一：日消誌, 70, 1170 (1973)
47. Tate, S.S. and Meister, A.: J. Biol. Chem., 249,
7593 (1974)

48. Elce, J.S. and Broxmeyer, B.: *Biochem, J.*, 153, 223 (1976)
49. London, J.W., Shaw, L.W., Fetterole, D. and Garfinkel, D.: *Biochem. J.*, 157, 609 (1976)
50. Minato, S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 192, 235 (1979)
51. Bartels, H., Evert, W., Hauck, W., Petersen, C., Putzkil, H. and Schulze, W.: *Neuropaediatric*, 6, 77 (1975)
52. Ishii, H., Yasuraoka, S., Shigeta, Y., Takagi, S., Kamiya, T., Okubo, F., Miyamoto, K. and Tsuchiya, M.: *Life Sci.*, 23, 1393 (1978)
53. Goldberg, D.M.: *Clin, Chem.*, 26, 691 (1980)
54. Ellman, G.L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70 (1959)
55. Hissin, P.J. and Hilf, R.: *Anal. Biochem.*, 74, 214 (1976)
56. Gaitonde, M.K.: *Biochem. J.*, 104, 627 (1967)
57. Griffith, O.W., Larsson, A. and Meister, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79, 919 (1977)
58. Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925)
59. Paglia, D.E. and Valentine, W.N.: *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 158 (1967)

60. Reddy, C.C., Tu, C-PD., Burgess, J.R., Ho, C-Y., Scholz, R.W. and Massaro, E.J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101, 970 (1981)
61. Meister, A.: *Glutathione: Metabolism and Function* (ed. by I.M. Arias and W.B. Jakoby) pp. 35, Raven Press, New York (1974)
62. Ding, J.L., Smith, G.D. and Peters, T.J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 657, 334 (1981)
63. Köttgen, K., Rewtter, W. and Gerok, W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72, 61 (1976)
64. Matsuda, Y., Tsuji, A. and Katsunuma, N.: *J. Biochem.*, 87, 1234 (1980)
65. Woyton, J., Szacki, J., Woyton, A., Warwas, M. and Debryczycka, W.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32, 5 (1975)
66. Orlowski, M. and Szewezuk, A.: *Clin. Chim. Acta*, 7, 755 (1962)
67. Sakakibara, K. and Tsukaka, Y.: *Gann*, 71, 679 (1980)
68. Cheng, S., Nassar, K. and Levy, D.: *FEBS Lett.*, 85, 310 (1978)
69. Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H. and Flohe, L.: *FEBS Lett.*, 27, 171 (1972)
70. Sies, H., Noack, H. and Holder, K.M.: *Eur. J. Biochem.*, 38, 247 (1973)

71. Oshino, N. and Chance, B.: *Biochem. J.*, 162, 509 (1977)
72. Sies, H., Bartoli, G.M., Burk, R.F. and Waydhas, C.: *Eur. J. Biochem.*, 89, 113 (1978)
73. Jones, D.P., Moldéus, P., Sted, A.H., Ormstad, K., Jornvall, H. and Orrenius, S.: *J. Biol. Chem.*, 254, 2787 (1979)
74. Tateishi, N., Higashi, T., Shinya, S., Naruse, A. and Sakamoto, Y.: *J. Biochem.*, 75, 93 (1974)
75. Mitchell, J.R. and Jollow, D.J.: *Gastroenterology*, 68, 392 (1975)
76. Davis, D.C., Potter, W.Z., Jollow, D.J. and Mitchell, J.R.: *Life Sci.*, 14, 2099 (1974)
77. Aikawa, K., Satoh, T., Kobayashi, K. and Kitagawa, H.: *J. Pharm. Dyn.*, 1, 22 (1978)
78. Plaa, G.L. and Witshi, H.: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 16, 125 (1976)
79. Reddy, C.C., Scholz, R.W., Thomas, C.E. and Massaro, E.J.: *Life Sci.*, 31, 57 (1982)
80. Kamataki, T. and Kitagawa, H.: *Biochem. Pharmacol.*, 23, 1915 (1974)
81. Massey, V. and Williams, C.H.: *J. Biol. Chem.*, 240, 4470 (1965)
82. Wills, E.D.: *Biochem. J.*, 113, 315 (1969)

83. Kaplowitz, N., Eberle, D.E., Petrini, J.,
Touloukian, J., Corvasch, M.C. and Kuhlenkamp,
J.: J. Pharmacol. Exp. Ther., 224, 141 (1982)
84. Lawrence, R.A. and Burk, R.F.: J. Nutr., 108,
211 (1978)
85. Burk, R.F., Nishiki, K., Lawrence, R.A. and
Chance, B.: J. Biol. Chem., 253, 43 (1978)
86. Jakoby, W.B.: Adv. Enzymol., 46, 383 (1978)
87. Younes, M. and Siegers, C.P.: Chem.-Biol.
Interact., 34, 257 (1981)
88. Levine, W.G.: Life Sci., 31, 779 (1982)
89. McCay, P.B., Gibson, D., Fong, K-L. and
Roger, K.: Biochim. Biophys. Acta, 431, 359
(1976)
90. Flohé, L.: Oxygen Free Radicals and Tissue
Damage, "Ciba Foundation Symposium," vol, 65 (new
series), ed. by D.W. Fitzsimons, Excerpta Medica,
Amsterdam, pp. 95 (1979)
91. Burk, R.F., Trumble, M.J. and Lawrence, R.A.:
Biochim. Biophys. Acta, 618, 35 (1980)
92. Prohaska, J.R.: Biochim. Biophys. Acta, 611, 87
(1980)
93. James, S.P. and Pheasant, A.E.: Xenobiotica, 8,
207 (1978)

94. Darby, F.J. and Grundy, R.K.: *Biochem. J.*, 128, 175 (1972)
95. Pinto, R.E. and Bartley, W.: *Biochem. J.*, 112, 109 (1969)
96. Burk, R.F., Lawrence, R.A. and Correia, M.A.: *Biochem. Pharmacol.*, 29, 39 (1979)
97. Saneto, R.P., Awasthi, Y.C. and Srivastava, S.K.: *Biochem. J.*, 191, 11 (1980)
98. Awasthi, Y.C., Duo, D.D. and Saneto, R.P.: *Biochem. J.*, 191, 1 (1980)
99. Hassing, J.M, Rosenberg, H. and Stohs, S.J.: *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.*, 25, 3 (1979)
100. Boyd, S.C., Sasame, H.A. and Boyd, M.R.: *Science*, 205, 1010 (1979)
101. Binkley, F. and Nakamura, K.: *J. Biol. Chem.*, 173, 411 (1948)
102. Binkley, F.: *J. Biol. Chem.*, 236, 1075 (1961)
103. Kato, R., Takahashi, A. and Omori, Y.: *Endocrinol. Japon.*, 16, 653 (1969)
104. Hayes, J.D., Strange, R.C. and Percy-Robb, I.W.: *Biochem. J.*, 181, 699 (1979)
105. Jakoby, W.B. and Habig, W.H.: in *Enzymatic Basis of Detoxication* (Jakoby, W.B., ed.), vol. 2, pp. 63, Academic Press, London and New York (1980)

106. Scully, N.C. and Mantle, T.J.: *Biochem. J.*, 193, 367 (1981)
107. Hayes, J.D. and Clarkson, G.H.O.: *Biochem. J.*, 207, 459 (1982)
108. Gillham, B.: *Biochem. J.*, 121, 667 (1971)
109. Fjellstedt, T.A., Allen, R.H., Duncan, B.K. and Jakoby, W.B.: *J. Biol. Chem.*, 248, 3702 (1973)
110. Pabst, M.J., Habig, W.H. and Jakoby, W.B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52, 1123 (1973)
111. Mannervik, B. and Jensson, H.: *J. Biol. Chem.*, 257, 9909 (1982)
112. Tu, C-P.D., Weis, M.J. and Reddy, C.C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 108, 461 (1982)
113. Lawrence, R.A., Parkhill, L.K. and Burk, R.F.: *J. Nutr.*, 108, 981 (1978)
114. Simons, P.C. and Van der Jagt, D.L.: *Anal. Biochem.*, 82, 334 (1977)
115. Koskelo, K., Valmet, E. and Tenhunen, R.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 41, 683 (1981)
116. Jakoby, W.B., Habig, W.H., Keen, J.H., Ketley, J.N. and Pabst, M.J.: in *Glutathione ; metabolism and function* (Arias, I.M. and Jakoby, W.B., ed.), pp. 189, Raven Press, New York (1976)
117. Kaplowitz, N.: *Am. J. Physiol.*, 239, 439 (1980)
118. Laemmli, U.K.: *Nature (Lond)* 227, 680 (1979)

119. Tietze, F.: *Anal. Biochem.*, 27, 502 (1969)
120. Elce, J.S. and Broxmeyer, B.: *Biochem. J.*, 153, 223 (1976)
121. McIntyre, I.M. and Curthoys, N.P.: *J. Biol. Chem.*, 254, 6499 (1979)
122. Griffith, O.W., Bridges, R.J. and Meister, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2777 (1981)
123. Allison, R.D. and Meister, A.: *J. Biol. Chem.*, 256, 2988 (1981)
124. Kaplowitz, N., Kulenkamp, J. and Clifton, G.: *Biochem. J.*, 146, 351 (1975)
125. Hales, B.F. and Neims, A.H.: *Biochem. J.*, 160, 223 (1976)