

セレン欠ニワトリヒナ肝における
グルタチオン合成活性の亢進

安 本 教 傳

(京都大学食糧科学研究所*)

Variation of Glutathione Level and Synthesis Activity in Chick Liver
by Selenium and Vitamin E Deficiencies

Kyoden YASUMOTO

Research Institute for Food Science, Kyoto University

Chicks were fed an amino acid mixture-based diet (basal diet) or one supplemented with Se and/or vitamin E. The group receiving the basal diet presented a symptom of exudative diathesis after 4 weeks. Supplementation of the basal diet with Se or vitamin E prevented the chicks from such a deficiency disease. The hepatic GSH level and GSH synthesis activity were about three times as much in the Se- and vitamin E-deficient group as in the control. This was also the case with the *in vivo* sulfur incorporation from [^{35}S] methionine into hepatic GSH. Not only synthesis but also turnover of GSH appeared to be raised in the Se- and vitamin E-deficient group.

セレンは動物にとって必須の微量元素であり、その生体での機能は含セレン酵素グルタチオンペルオキシダーゼ (EC 1, 8, 4, 2) の作用によって説明することができる。動物を低セレン食で長期間飼育すると、動物組織や体液にはセレン欠乏にもとづく諸症状が現われ、その発現はビタミンE欠乏によって増悪する^{1), 2)}。ニワトリヒナはとくにセレン及びビタミンE欠乏に罹り易く、欠乏飼料で飼育すると比較的短期間のうちに浸出性素因症のような欠乏症状を呈

*所在地：京都府宇治市五ヶ庄 (〒611)

する³⁾。このとき、グルタチオンペルオキシダーゼの活性はかなり低下し、各細胞は酸化的損傷をうけ易い状態になっている。

一方、グルタチオンは、それ自身であるいは酸化還元系に関与する酵素の基質として、細胞内の還元状態維持に重要な役割を果たしているが¹⁾、最近、セレン欠乏によってメチオニンの代謝、とくにメチオニンからシステインへの転換経路に重大な支障が生じることが報告された⁵⁾。つまり、従来から知られているセレン欠乏症状はシステイン欠乏症状の合併したものである可能性が指摘された。グルタチオン量は含硫アミノ酸供給の程度に応じて増減し、とくに肝中のグルタチオンの多くはシステイン貯蔵型としての機能も有すると云われている。

本研究では、ニワトリヒナを用いて、肝グルタチオンレベルおよびその合成活性がセレンおよびE欠乏によってどのような影響を受けるかを調べた。

実験には、孵化1日目の白色レグホン系ニワトリ雄ヒナを用い、ヒヨコ専用ケージでシステインを含まないアミノ酸混合飼料で自由摂取法により飼育した。この基本飼料のセレンおよびビタミンE含量は、各々、 $0.01\mu\text{g/g}$ および $10\mu\text{g/g}$ 以下であった。基本飼料にセレンとして $0.2\mu\text{g/g}$ の亜セレン酸を、ビタミンEとして $100\mu\text{g/g}$ の α -トコフェロールを添加した。基本飼料で4週間すると、ヒナは脚や翼のつけ根が膨れ、薄青色の体液を出す“浸出性素因”の症状を示した。

セレン欠乏によって体重減少の傾向がみられたが、個体差が大きく、各群間に有意な差は認められなかった。肝重量も、セレンまたはビタミンE欠乏で低い傾向がみられたが、有意差はなかった。セレン添加飼料群ヒナの肝セレン含量 ($0.26\sim 0.28\mu\text{g/g}$) は、無添加群より数倍高く、ビタミンE欠乏によってほとんど影響を受けなかった。肝グルタチオン含量は、ビタミンE欠乏よりむしろセレン欠乏によって増加する傾向を示し、セレン、ビタミンE欠乏群で最も高かった。TBA値は⁴⁾、細胞の酸化的損傷の程度を示す指標としてよく使われるが、セレンまたはビタミンEの一方が欠乏しても対照に比して若干高い程度で、有意差は認められなかった。これに対して、セレン、ビタミンE両欠乏群では明らかなTBA値の増加を示した。この傾向は、セレン、ビタミンE欠乏群のみ浸出性素因の症状を示したこととよく一致する。

肝中に見られるセレンのすべてがグルタチオンペルオキシダーゼのものとは限らないが、各飼料群間におけるグルタチオンペルオキシダーゼ活性とセレン含量の関係を図1に示した。ビタミンE欠乏の有無にかかわらず、肝中セレン含量が高い場合には、グルタチオンペルオキシダーゼ活性も高く、両者の間にはきわめて密接な相関関係が認められた。ビタミンEそのものは強い抗酸化能を有するので、セレンが欠乏してもビタミンEが作用し(ただし作用部位は異なる)、またビタミンEが欠乏しても十分量のセレンが存在すればグルタチオンペルオキシダ

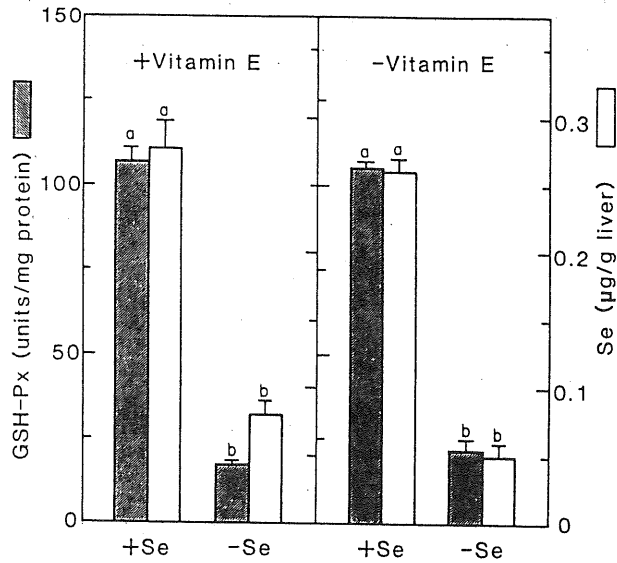


Fig. 1. Hepatic Se content and GSH-Px activity in chicks fed diets with and without Se and/or vitamin E supplements. A unit of GSH-Px activity was expressed as nmol NADPH oxidized per min per mg protein. Band heights and bars represent means $\pm$ SEM ($n=5$); means without a common letter in the Figure differ significantly ($p < 0.05$).

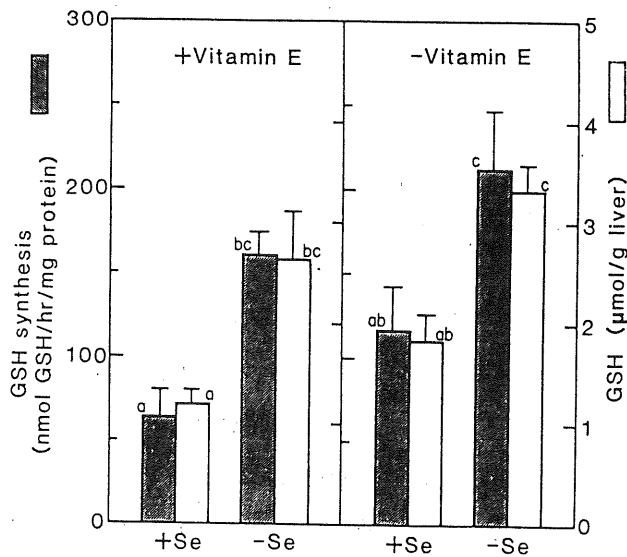


Fig. 2. GSH synthesis activity and GSH content in chick liver. The activity of GSH synthesis was estimated by measuring the [^{14}C] glycine incorporation into GSH as described in text. Band heights and bars represent means $\pm$ SEM ($n=5$); means with a different letter in the Figure differ significantly ($p < 0.05$).

ーゼの形態で酸化防止的に働き、TBA値の上昇を抑えていると考えられる。

図2にはグルタチオン合成活性とグルタチオン含量の関係を調べた結果を示した。ここでグルタチオン合成活性は、肝ホモジネートをグリシン、グルタミン酸、システインを含む反応液中に37℃、pH 8.5で反応させ、単位時間当りに $[^{14}\text{C}]$ グリシンがグルタチオンへ取込まれる量から求めた。合成されたグルタチオンはカドミウムメルカプチドの沈殿として集め、いったん2N硫酸に溶かしたあと中和し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した^{6), 7)}。グルタチオン合成活性も、ビタミンE欠乏よりむしろセレン欠乏によって高まり、各飼料群間におけるグルタチオン含量の変化は、グルタチオン合成活性の変化をよく反映していた。このようなセレン欠乏によるグルタチオン合成活性の亢進は、ラット分離肝細胞を用いた実験においても認められている⁸⁾。

セレン欠乏によってメチオニンからシステインへの転換に異常が生じることが事実とするならば、その経路の中心的酵素であるシスタチオニン γ -リアーゼ(EC 4.4.1.1)に何らかの変化が起きていると想定したが、シスタチオニン γ -リアーゼ活性には各飼料群間で有意な差異は見出されなかった。一方、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ(EC 2.3.2.2)活性は、セレン、ビタミンE欠乏群のみ有意な低下を示した。肝細胞外に漏出したグルタチオンは腎に運ばれ、そこで脱グルタミル化されると云われているが、セレンおよびビタミンE欠乏による肝 γ -グルタミルトランスフェラーゼ活性の低下は、その局在性を考慮するとき、グルタチオン分解機能の低下というより肝細胞膜における構造変化の一つのあらわれであると理解できる。

次に、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンを腹腔内に投与し、グルタチオン分子内への $[^{35}\text{S}]$ 取込みから、インビボ条件下でのメチオニン転換とそれに伴うグルタチオン合成に及ぼすセレン、ビタミンE欠乏の影響を調べた。

グルタチオン合成活性が高められた場合でも、トランススルフィレーション過程にきわめて重大な支障が生じれば、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンのグルタチオンへの転入は著しく妨げられるはずである。図3は、セレンおよびビタミンE欠乏食で4週間飼育したニワトリの雄ヒナの腹腔に $[^{35}\text{S}]$ メチオニンを投与後、10時間目、20時間目におけるグルタチオンおよび肝タンパク質への $[^{35}\text{S}]$ 転入量を対照のそれと比較した結果である。投与後10時間目における肝グルタチオンへの $[^{35}\text{S}]$ 取込み量は、対照に比べてほぼ3倍高く、この傾向は肝グルタチオン含量やインビトロ系でのグルタチオン合成活性増加の割合とほぼ等しかった。BunkとCombsは⁵⁾、セレン欠乏ニワトリヒナのシスチン要求性が高まり、メチオニンによって代替されないことを述べているが、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンからグルタチオンへの硫黄の取込みでみる限り、メチオニンから

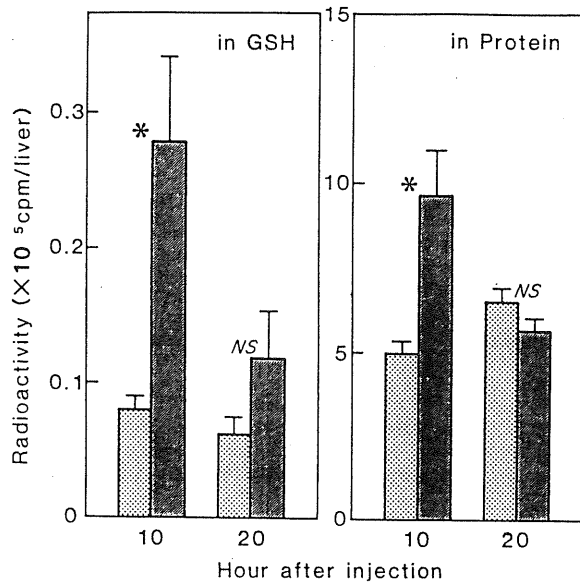


Fig. 3. Amount of [^{35}S] methionine incorporation into hepatic GSH (A) and protein (B) for 10 and 20 hours post-injection in chicks fed diets with and without Se and vitamin E supplements. Chicks were sacrificed at 10 and 20 hours after intraperitoneal injection of [^{35}S] methionine (total radioactivity, 1.5×10^7 cpm). Immediately the liver was excised, homogenized in 2 mM NaBH_4 , and divided into the TCA-soluble and -insoluble fractions. These fractions were further treated as mentioned above, and then, were subjected to radioactivity measurement. Band heights and bars represent means $\pm$ SEM ($n=4$): dotted bars, non-deficient (control); hatched bars, Se- and vitamin E-deficient. Significant difference between the two groups was noted in the Figures; *, $p<0.05$; NS, not significant ($p>0.1$).

システイン転換に至るトランススルフィレーション過程に重大な支障が生じているとは考え難い。一方、 ^{35}S メチオニン投与後20時間目の測定では、肝中放射活性グルタチオンの残存量は著しく低下し、放射群のレベルとあまり変わらなくなった。このことは、グルタチオン合成のみならずその代謝回転もセレン、ビタミンE欠乏によってかなり亢進していることを示唆している。 ^{35}S メチオニンの肝タンパク質への ^{35}S 取込みについても、程度の差こそあれ、類似の傾向が認められた。

セレン、ビタミンE欠乏によって細胞内および細胞膜が酸化状態に傾けば、どうしてグルタチオン合成活性が高まるのか(その引き金は何か)という問題は、物質の膜透過性と併せて今後さらに検討すべき問題である。

文 献

1. SIES H., A. WÄHLLANDER, C. WAYDHAS, S. SOBOLL and D. HÄBERLE (1979) Adv. Enz. Regl. 18:303
2. SUNDE R. A. and W. G. HOEKSTRA (1980) Nutr. Rev. 38:265
3. GRIES C. L. and M. L. SCOTT (1972) J. Nutr. 102:1287
4. UCHIYAMA M. and M. MIHARA (1978) Anal. Biochem. 86:271
5. BUNK M. J. and G. F. COMBS, Jr. (1981) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 167:87
6. MOOZ E. D. and A. MEISTER (1971) In *Method in Enzymology*, Vol. XVIII B (ed. H. Tabor and C. W. Tabor), Academic Press, New York, pp. 483—500
7. IWAMI K., A. NAKAMURA, M. HIGUCHI, K. YASUMOTO and K. IWAI (1983) Agric. Biol. Chem. 47:2555
8. HILL K. E. and R. F. BURK (1982) J. Biol. Chem. 257:10688