低メチオニンタンパク質飼料で飼育した雄ラット初代肝細胞における γ -glutamyltransferase 活性のグルコルチコイドへの応答能

広井 祐三^{*1}, 大下 健幸^{*2}

^{*1}中村学園大学栄養学部栄養科学科栄養生化学教室, ^{*2}尚絨女学院短期大学生活科学科

Response of γ -Glutamyltransferase Activity to a Glucocorticoid Treatment in the Hepatocytes of Weanling Male Rats Fed on a Low-methionine Diet

^{*1} Yuzo Hiroi and ^{*2} Takayuki Ohshita

^{*1} Department of Nutritional Biochemistry, Faculty of Nutritional Science, Nakamura Gakuen University ; ^{*2} Division of Food and Nutrition, Shohkei Women's Junior College

Weanling male rats fed on a low-methionine diet showed elevated hepatic γ -glutamyltransferase (GGT) activity, in contrast to those fed on a methionine-sufficient diet. The direct action of dexamethasone response to GGT activity in primary cultured hepatocytes was studied. The dexamethasone response to GGT activity was high in cultured hepatocytes prepared from weanling male rats, while the response gradually diminished while the rats were being fed on a methionine-sufficient diet. However, in the hepatocytes of rats fed on a low-methionine diet, the response remained as high as that in the hepatocytes of weanling rats. Both cycloheximide and actinomycin D inhibited the elevation of GGT activity, suggesting that the elevation of GGT activity was accompanied by the synthesis of both GGT protein and GGT mRNA. These findings indicate that methionine is an important determinant of the developmental change in hepatic GGT activity, and that its level modulates the glucocorticoid response.

Jpn. J. Nutr. Diet., 61 (6) 363～369 (2003)

Key words : γ -glutamyltransferase, glucocorticoid, hepatocyte, soybean protein isolate, rat

緒 言

γ -glutamyltransferase (GGT : EC 2.3.2.2.) は, γ -グルタミル化合物を加水分解し, また γ -グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドに転移する反応を触媒する酵素である¹⁾。肝臓 GGT 活性は, 胎生末期に一過性の著しい上昇を示し, 誕生時をピークにして新生仔期に急速に低下し²⁾, 成育したラットでは著しく低い。新生仔, 離乳期及び雌性ラットでは, 肝臓 GGT 活性はグルコルチコイドにより誘導されるが, 成育した雄ラットでは副腎摘出やグルコルチコイドの1つであるヒドロコルチゾン投与の影響を受けない^{3, 4)}。このように肝臓 GGT 活性のグルコルチコイド応答性は週齢や性差によって影響を受ける^{1, 4)}。一方, 雄性ラットを離乳期から10%分離大豆タンパク質 (soybean protein isolate ; SPI) 飼料で数週間飼育を行うと, GGT mRNA の増加を伴い GGT 活性が高く維持される^{5, 6)}。このように, 成長に伴

う肝臓 GGT 活性の生理的な減少が, メチオニンの摂取不足によって活性の上昇をきたす結果になる。

本研究は, 生後6週齢を過ぎたラットではヒドロコルチゾンの影響を直接的に検討できないことから, 離乳期より10%SPI飼料で飼育したラット肝臓から分離した初代肝細胞を用いて, 肝臓 GGT 活性のグルコルチコイドに対する応答能を検討して, メチオニンの離乳期直後からの摂取の重要性を検討したものである。

実 験 方 法

1. 試薬

SPI (Fujipro-R) は不二製油(株)よりの恵与による。ビタミンを含まないカゼインはICN Biomedicals, Inc より, ミネラル混合 (AIN 76) 及びビタミン混合 (AIN 76) はオリエンタル酵母(株)より購入した。固形飼料 (CE2) は日本クレア社より, Eagle's minimum essen-

キーワード : γ -glutamyltransferase, グルコルチコイド, 肝細胞, 分離大豆タンパク質, ラット

(連絡先: 広井祐三 〒814-0198 福岡市城南区別府5-7-1 中村学園大学栄養学部栄養科学科栄養生化学教室 電話 092-851-2531 (内線268)ダイヤルイン 092-851-5941 FAX 092-841-7762 E-mail yhiro@cc.nakamura-u.ac.jp)

Table 1 Composition of experimental diets (%)

Ingredient	SPI	SPI+MET
SPI	10.0	10.0
Methionine	—	0.15
Mineral mixture	5.0	5.0
Vitamin mixture	1.0	1.0
Choline chloride	0.15	0.15
Cellulose powder	2.0	2.0
Corn oil	5.0	5.0
Dextrin	to 100	to 100

Soybean protein isolate (SPI) was used to provide a low methionine diet. SPI containing methionine (SPI+MET) was used to provide a methionine sufficient diet. The essential amino acid content (g/16g nitrogen) of SPI (Fujipro-R) was as follows: valine 4.8, leucine 8.0, isoleucine 4.8, lysine 6.3, threonine 3.8, tyrosine 3.8, phenylalanine 5.8, tryptophan 1.3, methionine 1.3, cystine 1.4, histidine 2.7 and arginine 7.9.

tial medium (MEM) 培地は日水製薬(株)より購入した。新生仔牛血清はGibco社, collagenはフナコシ(株)より購入した。aprotininとinsulinはSigma社より購入した。collagenaseは和光純薬工業(株), dexamethasoneは生化学工業(株)より購入した。試薬はすべて特級のものを用いた。離乳直後のウイスター系雄性ラット(約50g)は九動(株)から購入した。

2. ラットの飼育条件

離乳直後のウイスター系雄性ラットを前報^{5, 6)}同様, 10%SPI飼料, 0.15%のメチオニンを含む10%SPI飼料, または固形飼料で3~8週間自由摂取させて飼育した。すなわち, 朝7時から夜7時を明時間として, 明暗のサイクルは12時間として, 20~22℃の条件で個別のケージで飼育した。午前9時~午後12時の間に肝実質細胞の調製を行った。飼料の組成はTable 1に示した。また, 実験に用いたラットの匹数は結果の説明欄に記述した。

3. 初代肝細胞の単離と培養

ラット初代肝細胞は各種飼料で3~8週間飼育したラットより, Nakamura等のコラゲネース法⁷⁾を用いてin situ灌流法で調製した。肝細胞の生存率は各飼料間で差はなく, 80%以上のものを実験に用いた。細胞は5%新生仔牛血清を含むMEM培地で 5×10^5 細胞/mlの濃度に懸濁し, それをコラゲン処理した60mmのディッシュに4mlをまいた。2時間培養後吸着されない細胞を洗い流した。その後, 仔牛血清は含まず, インスリン(10^{-9} M), aprotinin (1 μ g/ml)と, 各濃度のデキサメタゾンを含むMEM培地で培養した。5%CO₂と空気の混合の下, 37℃で培養した。培地(MEM)は24時間毎に交換した。

4. 初代肝細胞のホモジネートの調製

初代肝細胞をPBS (138mM NaCl, 2.67mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1mM Na₂HPO₄)で3回洗った後, 5mM Tris-HCl (pH7.4)と0.1mMのEDTAを含む0.25Mスクロース1mlを加えてゴム製のポリスマンでかき集め, ポリトロンを用いて60秒間ホモゲナイズし, そのホモジネートを酵素液として用いた。

5. 酵素活性の測定

肝細胞ホモジネートのGGT酵素活性はBarouki *et al.*の方法⁸⁾で行った。alkaline phosphatase活性はRabito *et al.*及びOhkubo *et al.*の方法で行った^{9, 10)}。GGT活性及びalkaline phosphatase活性は1分間に1 μ moleのp-nitroaniline, または β -nitrophenolをそれぞれ遊離する酵素量を1unitとした。

6. タンパク質の定量

タンパク質の定量はLowry法¹¹⁾で牛血清アルブミンを標準として測定した。

結 果

1. 各種飼料で飼育したラット初代肝細胞におけるGGT活性の経時的変化

低メチオニンタンパク質飼料である10%SPI飼料, または固形飼料(CE-2)で5週間飼育したラットより初代肝細胞を調製して, 10^{-7} Mデキサメタゾンを含むMEMで培養し, GGT活性のデキサメタゾンに対する応答能について検討した。また, 対照実験として細胞膜酵素のアルカリホスファターゼ活性の経時的変化をFig.1.AとFig.1.Bに示した。

固形飼料で飼育したラットの初代肝細胞ではプレーティング後2日までGGT活性上昇はみられず, 3日後から活性は上昇した。4日後の活性は1日後の7.8倍になり, それ以後も6日後まで上昇しつづけた。10%SPI飼料で飼育したラット初代肝細胞では, プレーティング後24時間までGGT活性の上昇はみられないが, 20%カゼイン飼料飼育ラット群に比較してそれ以降は急激に上昇しはじめ, 4日まで著しく上昇しつづけて24時間後の16倍になった。しかし, 4日後を最大にそれ以上の活性の上昇はみられなかった。

同様の実験をGGTと同じ細胞膜酵素のアルカリ性ホスファターゼについて行った結果, その酵素活性の経時的変化には両群間で差がなかった(Fig.1.B)。

2. 低メチオニンタンパク質飼料へのメチオニンの添加効果

動物実験⁶⁾では, SPI飼料群のGGT活性は, 10%カゼイン飼料群の約5倍, 固形飼料群の3倍から5倍上昇する。また, 10%SPI飼料にメチオニンを0.15%添加すると, GGT活性は10%カゼイン飼料群と同じレベルま

Fig. 1 Changes in activities of GGT and alkaline phosphatase in primary cultured hepatocytes.

Each hepatocyte was prepared from rats fed a SPI (●) or laboratory chow (○) for 5 weeks as in "Materials and Methods", and allowed to attach to plastic dishes for 2 hr in MEM containing 5% newborn calf serum. The medium was changed to MEM containing 10^{-7} M dexamethasone, and the medium was changed once each day for 3 days, after which cells were harvested for measurement of activities of GGT (A) and alkaline phosphatase (B). Points indicate the averages, and bars represent the S.D. from 4 rats. Specific activities of GGT (mU/mg protein) at 0 time are as follows; 10% SPI: 0.92 ± 0.6 , laboratory chow: 0.55 ± 0.26 .

でになる。本実験で用いた10% SPI飼料のメチオニン含量は1.4g/16g nitrogenで10%カゼイン飼料の約半量である。固形飼料中のメチオニン含量は1.9g/16g nitrogenである。飼料摂取量は、10% SPI飼料群は固形飼料群の約半分である。

10% SPI飼料に100g当たり0.15gのメチオニンを添加し、10%カゼイン飼料と同じメチオニン含量とした飼料を用い、GGT活性に及ぼすメチオニンの補足効果を調べた。その組成を Table 1に示した。Fig.2に示したように、メチオニン添加飼料群のGGT活性は4日間の培養後でみると、10% SPI飼料群のGGT活性の約1/2まで減少した。

Fig. 2 Change in GGT activity during culture of hepatocytes prepared from rats fed a SPI, a SPI+MET (a SPI diet containing 0.15 % methionine), or laboratory chow.

The experimental design was as in Fig. 1 (A) except that cells were prepared from rats fed a SPI (●), a SPI+MET (■), or laboratory chow (○) diets. Specific activities (mU/mg protein) of GGT at 0 time are as follows; SPI: 1.3, SPI+MET: 0.37, laboratory chow diet: 0.50. Points signify means from 2 rats.

Fig.1及びFig.2の結果から、飼料中のメチオニン含量がGGT活性に対するデキサメタゾンの応答能に大きく関与することが示唆される。SPI飼料へのメチオニンの添加量は、動物実験では固形飼料群の肝臓GGT活性のレベル以下に抑制する量である。SPI飼料へのメチオニンの添加群では固形飼料群に比較して、GGT活性が約1/2までしか減少しないことは、動物体内ではメチオニン以外にも他の因子が、GGT活性の抑制に関与している可能性がある。

3. GGT活性のデキサメタゾン濃度依存性

GGT活性のデキサメタゾン濃度依存性について調べた。各種飼料で飼育したラットより調製した肝細胞を 10^{-9} M ~ 10^{-6} M のデキサメタゾンを含むMEMで3日間培養してGGT活性を測定した。Fig.3.A及びFig.3.Bに示したように、離乳直後のラットから調製した肝細胞では、デキサメタゾン濃度に応じてGGT活性は上昇し、 10^{-7} M デキサメタゾンで最大活性を示した。 10^{-9} M デキサメタゾンに対し 10^{-7} M では10倍高い値を示した。次に離乳直後から低メチオニン飼料で3または5週間飼育したラットより調製した肝細胞では、デキサメタゾン濃度増加に伴い 10^{-6} M の濃度までGGT活性は著しく上昇した。10% SPI飼料飼育ラット肝細胞ではこのように高いデキサメタゾン応答能がみられた。

Fig. 3 Dose-response curves of GGT activity to dexamethasone.

Hepatocytes were isolated as described in "Materials and Methods" and allowed to attach to plastic dishes for 2hr in MEM containing 5% newborn calf serum. The medium was changed to MEM containing various concentrations of dexamethasone, and the medium was changed once each day for 3 days. GGT activity was measured as described in "Materials and Methods".

A : Hepatocytes prepared from rats fed a SPI diet for 3 weeks (○), for 5 weeks (■), or weanling rats (●).

B : Hepatocytes from rats fed laboratory chow. Symbols are the same as A. Specific activities of GGT (mU/mg protein) at 10^{-9} M are as follows : 5.8 for an SPI diet and 2.7 for laboratory chow for 3 weeks ; 2.2 for an SPI diet and 1.3 for laboratory chow for 5 weeks ; or 2.2 for weanling rats. Points are averages from 2 rats.

Fig. 4 Ontogenic response of GGT activity to dexamethasone.

Weanling rats were fed on SPI (●), SPI+MET (■), or laboratory chow (○) for the times shown, and thereafter hepatocytes prepared from these rats were incubated for 3 days as in Fig. 1. Values are averages and S.D. from 2 or 4 rats. Specific activity (mU/mg protein) of GGT at 0 time is as follow : 23.2 ± 3.3 .

一方, Fig.3.Bに示したように, 離乳直後から固形飼料で3または5週間飼育したラットより調製した肝細胞では, いずれの細胞でも 10^{-9} Mと 10^{-6} Mデキサメタゾンによる GGT 活性の上昇はほとんどなく, 離乳直後のラットから調製された肝細胞にみられた GGT 活性のデ

キサメタゾンに対する著しい応答能は観察されなかった。

4. 成長過程での肝細胞における GGT 活性のデキサメタゾンに対する応答能の変化

離乳直後のラットに0, 3, 5または8週間, 10% SPI 飼料, 10% SPI 飼料にメチオニンを添加した飼料または固形飼料でそれぞれ飼育したラットから調製した肝細胞を, 10^{-7} Mデキサメタゾンを含む MEM で3日間培養した時の GGT 活性を離乳後の日数に対してプロットした (Fig.4)。

固形飼料群の場合, GGT 活性のデキサメタゾンに対する応答能は週齢に伴い低下して, 5週間後には離乳期の約 1/10の活性になった。一方, 10% SPI 飼料飼育群の場合, 8週間飼育後も離乳期と有意差はなく, 高い GGT 活性が維持された。しかし, メチオニン添加群では固形飼料飼育群と同様, 週齢に伴い GGT 活性は著しく低下した。

このように, 飼料中のメチオニン含量はラットの発育過程における肝臓 GGT 活性の変動に重要な因子であること, さらにグルココルチコイドの応答能を変化させることが示唆された。

5. デキサメタゾンによる GGT 活性上昇に及ぼすシクロヘキシミドまたはアクチノマイシン D の影響

デキサメタゾンによる GGT 活性の変化が GGT タンパク質及び RNA の誘導を伴うかどうか調べるため, タン

Fig. 5 The effect of actinomycin D or cycloheximide on GGT activities induced by dexamethasone.

The culture procedure was as in Fig. 2. After preincubation of cells for 54 hr in the presence of 10^{-7} M dexamethasone, the medium was changed. Monolayers were further cultured in MEM in the presence of dexamethasone (10^{-7} M) (●); or containing actinomycin D ($1\mu\text{g/ml}$) (▲), or cycloheximide ($20\mu\text{g/ml}$) (■). Specific activities of GGT (mU/mg protein) at 59 hr as follows: SPI in the presence of dexamethasone alone: 2.86; with dexamethasone plus actinomycin D: 2.86; or weanling rats: 2.86. Specific activities of GGT (mU/mg protein) for a laboratory chow at 59 hr as follows: laboratory chow in the presence of dexamethasone alone: 1.83. Dexamethasone plus actinomycin: 1.83; or weanling rats: 1.83. Points are averages from 2 rats.

パク合成阻害剤であるシクロヘキシミドまたはRNA合成阻害剤であるアクチノマイシンDの添加効果を調べた。

10% SPI飼料で飼育したラットまたは固形飼料飼育ラットより調製した肝細胞をプレーティングし54時間後、 10^{-7} Mデキサメタゾンを含むMEMにシクロヘキシミドまたはアクチノマイシンDを添加した。その後24時間の活性の変化を比較した (Fig.5)。

10% SPI飼料飼育ラット肝細胞でみると、シクロヘキシミド添加は非添加群に比較してGGT活性の上昇の著しい抑制がみられた。アクチノマイシンDについてもGGT活性の上昇が著しく抑制された。

一方、固形飼料飼育ラット肝細胞におけるGGT活性では、いずれの阻害剤でも10% SPI飼料で飼育したラット肝臓のような顕著な抑制効果はみられなかった。

考 察

雄成熟ラット肝GGTは副腎摘出やハイドロコルチゾン投与しても活性上昇は認められない⁴⁾。本研究では、固形飼料で飼育したラットから分離した初代肝細胞系で、プレーティング後2日以降、デキサメタゾンによって5倍から10倍までGGT活性が上昇した。この結果はEdwards等の実験結果と一致する¹²⁾。この活性の維持は培養細胞系で細胞が胎仔肝の表現形に復帰したことが原因とされている¹³⁾。これに対して、10% SPI飼料で飼育したラット肝細胞ではプレーティング後2日で明らか

な活性上昇がみられ、それ以降も固形飼料群に比較してGGT活性は固形飼料群よりもさらに約5倍の上昇が観察された。これらのことから、固形飼料で飼育したラット肝臓から調製された初代肝細胞系が表現形を変え、デキサメタゾン応答能を回復するのに対し、10% SPI飼料で飼育したラット肝臓の場合、細胞を分離する以前からデキサメタゾン応答能を有していたと推察される。

10% SPI飼料で飼育したラットの肝細胞では培養1日目から4日目のGGT活性上昇率は固形飼料飼育ラット肝細胞より著しいが、4日目以降はそれ以上の活性上昇はみられなかった。データは示さないが、尿素合成能は固形飼料飼育ラット肝では4日目に比べ5日目は80%に低下し、10% SPI飼料飼育ラット肝では60%まで低下がみられた。10% SPI飼料飼育ラットは固形飼料群に比べ、低栄養条件で飼育されているため、培養4日以降は細胞維持の点で、固形飼料飼育ラット群と差が生じ、これがGGT活性に影響したと考えられる。培地により培養肝細胞のGGT活性は異なるので¹²⁾、4日間以上の長期の変化を比較するには、細胞の維持に優れた培地を選択する必要がある。

培養細胞系におけるGGT活性の上昇がGGTタンパク質、またGGT mRNAの合成を伴うかどうかを確かめるため、シクロヘキシミドまたはアクチノマイシンD添加の影響を調べた。Edwards等はGGT活性の上昇はシクロヘキシミドにより完全に抑制され、アクチノマイシンDにより部分的に抑制されると報告している¹²⁾。本実

験においても、10%SPI群及び固形飼料群ともシクロヘキシミドによりGGT活性の上昇は抑制された。アクチノマイシンDによる阻害実験では、固形飼料飼育ラット肝細胞は影響がみられなかったが、10%SPI飼料で飼育したラット肝では顕著な活性上昇の阻害がみられた。

以上の実験結果から、デキサメタゾンによる活性上昇はGGTmRNA合成を伴った、GGTタンパクの*de novo*合成を伴うものと推察される。

10%SPI飼料にメチオニンを添加して飼育すると、デキサメタゾンに対するGGT活性の応答能は10%SPI飼料群の約50%まで低下した。このことは飼料中のメチオニンのレベルによってデキサメタゾン応答能が影響されることを示唆する。しかし、10%SPI飼料へのメチオニン添加量は、動物実験では10%カゼイン飼料または、固形飼料群のGGT活性と同じレベルにまで抑制する量である。このことは固形飼料群の動物体内ではGGT活性の抑制に他の因子が関与しているかもしれない。10%SPI飼料で飼育したラット肝臓ではS-アデノシルメチオニンの含量が低いことが明らかにされている¹⁴⁾。S-アデノシルメチオニンはDNAメチル化の際のメチル基の供与体である。DNAのメチル化がGGT活性変動に影響することが報告された¹⁵⁾。脱メチル化剤である5-アザシチジンを含む飼料で飼育したラットでは、肝臓DNA中のメチル化されたシトシンが脱メチルされ、5-メチルシトシン含量が低下しGGT活性は上昇する。同じように、低メチレーションがGGT活性の発現に関与していることが報告されている¹⁶⁾。本実験における10%SPI飼料で飼育したラットの肝臓における5-メチルシトシン含量の変化、さらに肝GGT活性上昇におけるデキサメタゾンへの応答能とDNAの脱メチル化との相互関係は今後の課題である。

GGTの詳しいゲノミックDNAの報告がされ¹⁷⁾、胎仔肝臓ではmRNAIIIが発現していること、さらに、5'側上流域にグルココルチコイドのレセプターに対応する領域が存在することも報告された。本研究によってタンパク質飼料中のメチオニン含量が、グルココルチコイドの応答領域でなんらかの影響を与えていることが示唆される。

メチオニンの重要性は、妊娠ラットを用いて行った実験で明らかのように、タンパク質・エネルギー摂取をほぼ対照並みとした場合はほとんど過剰アミノ酸の悪影響はみられないが、摂食量の減少を伴うメチオニン投与群においては、母体体重の減少、受胎産物の成長遅延、さらには胎仔の脳及び肝細胞の有意な減少がみられる¹⁸⁾。人では2~6歳に特に多発するクワシオコールの例がある。このクワシオコールの患者の血清のメチオニン濃度が平均の約60%も減少し、成長の著しい遅延を引き起

こすことが報告されている¹⁹⁾。

以上、妊娠期間、さらに発育期には、メチオニンの十分な摂取は種々の器官の発育過程に重要な因子であり、またグルココルチコイドの応答能を変化させることが示唆された。

要 約

離乳直後の雄性ラットを10%SPI飼料で3~8週間飼育し、その初代肝細胞系を用いてデキサメタゾンに対するGGT活性の応答能を比較し、次の結果を得た。

1) 10%SPI飼料で飼育したラットでは、8週間飼育まで離乳期直後と同様のデキサメタゾンに対する応答能がみられ、GGT活性が上昇する。10%SPI飼料にメチオニンを添加した飼料群では、5週間飼育でみるとGGT活性のデキサメタゾンに対する応答能は10%SPI飼料で飼育したラット肝臓の約40%に低下した。固形飼料で飼育したラットの肝細胞のデキサメタゾンに対するGGT活性の応答能は成長に伴い著しく減少した。

2) 10%SPI飼料で飼育したラットの初代肝細胞系におけるデキサメタゾンによるGGT活性の上昇は、シクロヘキシミド及びアクチノマイシンD添加により完全に阻害されることから、GGTmRNA合成量の増加による、GGTタンパクの*de novo*合成を伴うものと推察できる。

3) 以上のことから、飼料中のメチオニンはラット肝臓の発育過程に重要な因子であること、またグルココルチコイドの応答能を変化させることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに際し、肝実質細胞の調製に当たり御指導をいただきました大阪大学医学部バイオメディカル教育改善センター腫瘍生化学研究部 中村敏一教授に心より感謝いたします。また、中村学園大学名誉教授 谷口己佐子先生に実験から論文の構成に至るまでご尽力いただき、心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Barouki, R., Chobert, M.N., Finidori, J., Billon, M.C. and Hanoune, J. : The hormonal induction of gamma-glutamyltransferase in rat liver and in a hepatoma cell line, *Mol. Cell. Biochem.*, **53/54**, 77-88 (1983)
- 2) Tsuchida, S., Hoshino, K., Sato, T., Ito, N. and Sato, K. : Purification of gamma-glutamyltransferases from rat hepatomas and hyperplastic hepatic nodules, and comparison with the enzyme from rat kidney, *Cancer Res.*, **39**, 4200-4205 (1979)

- 3) Tongiani, R., Paolicci, A. and Chieli, E. : Gamma-glutamyltranspeptidase induction by cortisol in liver parenchyma of unweaned rats, *Biosci. Repts.*, **4**, 203-211 (1984)
- 4) Igarashi, T., Satoh, T., Ono, S., Iwashita, K., Hosokawa, M., Ueno, K. and Kitagawa, H. : Gamma-glutamyltranspeptidase induction by cortisol in liver parenchyma of unweaned rats, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **45**, 225-232 (1984)
- 5) Taniguchi, M. and Inoue, M. : Ontogenic changes in metabolism and transport of glutathione in the rat, *J. Biochem.*, **100**, 1457-1463 (1986)
- 6) 広井祐三, 岡 達三, 谷口己佐子 : 低分離大豆たんぱく質飼料による離乳期ラット肝臓の γ -glutamyltransferase 遺伝子発現の変化, *日本栄養・食糧学会誌*, **50**, 261-265 (1997)
- 7) Nakamura, T., Yoshimoto, K., Aoyama, K. and Ichihara, A. : Hormonal regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lipogenesis in primary cultures of rat hepatocytes, *J. Biochem.*, **91**, 681-693 (1982)
- 8) Barouki, R., Chobert, M.N., Billon, M.C., Finidori, J., Tsapis, R. and Hanoune, I. : Glucocorticoid hormones increase the activity of γ -glutamyltransferase in a highly differentiated hepatoma cell line, *Biochim. Biophys. Acta.*, **721**, 11-21 (1982)
- 9) Rabito, C.A., Kreisberg, J.I. and Wight, D. : Alkaline phosphatase and γ -glutamyl transpeptidase as polarization markers during the organization of LLC-PK1 cells into an epithelial membrane, *J. Biol. Chem.*, **259**, 574-582 (1984)
- 10) Ohkubo, A., Langerman, N. and Kaplan, M.N. : Rat liver alkaline phosphatase, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7174-7180 (1974)
- 11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 12) Edwards, A.M. : Regulation of γ -glutamyl transpeptidase in rat hepatocyte monolayer cultures, *Cancer Res.*, **42**, 1107-1115 (1979)
- 13) Sirica, A.E., Richards, W., Tsukada, Y., Sattler, C.A. and Pitot, H.C. : Fetal phenotypic expression by adult rat hepatocytes on collagen gel/nylon meshes, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **76**, 283-287 (1979)
- 14) Henning, S.M., Mckee, R.W. and Swendseid, M. E. : Hepatic content of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocystein and glutathione in rats receiving treatments modulating methyl donor availability, *J. Nutr.*, **119**, 1478-1482 (1989)
- 15) Suzuki, K., Sugiyama, T., Ookawara, T., Kurosawa, T. and Taniguchi, N. : High sensitivity to 5-azacytidine in LEC rats, a strain with a metabolic predisposition to hepatitis and hepatoma : possible involvement of DNA methylation in the expression of cytochrome P-450 and γ -glutamyltranspeptidase, *Biochem. Int.*, **23**, 9-14 (1991)
- 16) Mohamed, E.L.Y., Visvikis, A., Siest, G. and Wellman, M. : Depelomental- and tissue-specific DNA methylation and expression of rat gamma-glutamyl transpeptidase, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **36**, 257-264 (1995)
- 17) Brouillet, A., Darbouty, M., Okamoto, T., Chobert, M-N., Lahuna, O., Garlatti, M., Goodspeed, D. and Laperchel, Y. : Functional characterization of the rat γ -glutamyltranspeptidase promoter that is expressed and regulation in the liver hepatoma cells, *J. Biol. Chem.*, **269**, 14878-14884 (1994)
- 18) Mori, M., Yamashita, Y., Hiroi, Y., Shinjo, S., Asato, L., Hirai, K., Suzuki, K. and Yamamoto, S. : Effect of single essential amino acid excess during pregnancy on dietary nitrogen utilization and fetal growth in rats, *Asia Pacific J. Clinical Nutr.*, **8**, 251-257 (1999)
- 19) Roediger, W.E.W. : New views on the pathogenesis of kwashiorkor : methionine and other amino acids, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **130**, 130-136 (1995)

(受付：平成14年12月2日，受理：平成15年8月29日)