〔衛生化学〕
EISEI KAGAKU
27 (3) 175-178 (1981)

コバルトのラット肝ヘム代謝及び関連酵素におよぼす影響

福田照夫, 古茶友二, 瀬戸紀代子, 大西太子
昭和薬科大学

Effect of Cobalt on Heme Metabolism and
Related Enzymes of Rat Liver

TERUO FUKUDA, TOMOJI KOCHA
KIYOKO SETO, and TAKAKO ONISHI
Showa College of Pharmaceutical Sciences,
5-1-8 Tsurumaki, Setagaya-ku, Tokyo

(Received December 24, 1980)

Effect of cobalt on heme metabolism and its related enzymes were investigated and obtained the following results.

1. A single administration of cobaltous chloride dosing 40 mg/kg to rat caused an enlargement of the liver and reduction of the kidney and spleen weights.
2. Activity of heme oxygenase increased and contents of cyt. P-450 and activity of catalase decreased.
3. Activity of δ -aminolevulinic acid synthetase (ALAS) in cytoplasm increased but that of mitochondria decreased. These results suggest that cobalt inhibits the translocation of the newly synthesized ALAS from the cytosol to mitochondria.
4. Metabolic rate of aniline (Type 2) per nmol cyt. P-450 was not changed but that of aminopyrine (Type 1) increased.
5. Peroxidation rate of lipids did not change.

Keywords — heme oxygenase ; cytochrome P-450 ; catalase ; ALA synthetase ; aniline ; aminopyrine ; lipid

緒 言

コバルト (Co) はビタミン B₁₂ の構成成分として生理的に必須であり, Co 自体を利用できる反すう動物では欠乏症がみられるが, Co をビタミン B₁₂ に組み入れる能力のないヒトおよび単胃動物ではみとめられていない.¹⁾ また Co は甲状腺腫発生率と反比例の関係にあるとの報告²⁾ があり, 毒性については赤血球増加症³⁾ や, ビールを多量に飲む人での突然性心障害の促進因子ともなる⁴⁾ ことがいわれている. 更に脂質⁵⁾ および糖質⁶⁾ 代謝あるいは生体防御機転⁷⁾ にも影響をおよぼすとの報告もあるが, また量によっては利害相反した両面をもつともいわれ,⁸⁾ Co の生物学的作用には, まだ不明な点が多

い. 最近 Co のヘムに対する影響について, ヘモプロテインの損失,⁹⁾ 分解^{10,11)} (ヘモオキシゲナーゼの誘導による), 合成阻害等^{12,13)} についての報告がみられるが, 著者らも Co の生理的意義解明の一助として, ヘム合成およびこれと関連した生体への影響について検討した.

実 験 方 法

1. 動物 Sprague Dawley 系雄ラット, 体重約 200 g のものを 1 群 6 匹ずつ使用した.

2. 試料ならびに投与方法 CoCl₂ として 10, 20, 40 各 mg/kg になるように CoCl₂·6H₂O を 0.9 % NaCl 溶液に溶かし, 頸部皮下投与した.

3. 肝臓組織成分分析法 試料投与後 24 時間後に断

頭して殺し、摘出した肝臓を6倍量の0.1mM pyridoxal 5'-phosphate, 0.1mM EDTA, 0.02M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を含む0.25M ショ糖溶液 (A液) を用いてテフロンホモジナイザーでホモジネートを調製した。ホモジネートは800×g, 10分間遠心分離し、その上清を更に12000×g, 15分間遠心分離した。得られた沈渣はA液を用いて遠心洗浄した後、0.2mM pyridoxal 5'-phosphate を含む0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, B液) に懸濁してミトコンドリア画分とした。またその上清は更に78000×g, 90分間遠心分離し、得られた沈渣は冷1.15% KCl 溶液で洗浄後、同溶液で懸濁してミクロゾーム画分とした。また、その上清は可溶性画分とした。以上の操作はすべて4°以下で行った。

4. 酵素活性の測定 Heme oxygenase 活性は、Maines と Kappas の方法,¹⁴⁾ ALAS¹⁵⁾ 活性は Hayashi らの方法,¹⁶⁾ チトクローム P-450 量は Omura と Sato の方法,¹⁷⁾ カタラーゼ活性は Chance と Herbert の方法,¹⁸⁾ aniline hydroxylase と aminopyrine N-demethylase 活性は池田と和田の方法¹⁹⁾によりそれぞれ測定した。脂質過酸化活性は Hochstein と Ernster の方法²⁰⁾により測定した。

5. 脂質の抽出および定量 肝脂質は Folch らの方法²¹⁾に従い抽出した後、triglyceride は川出の方法,²²⁾ コレステロールは Rudel と Morris の方法,²³⁾ リン脂質は Allen の方法²⁴⁾によりそれぞれ定量した。

6. その他の測定 タンパク質は仔牛血清アルブミンを標準品として用い、Lowry らの方法²⁵⁾により定量した。

結果および考察

1. 臓器重量におよぼす影響

Table I にみるように、臓器重量におよぼす影響は、肝臓においてCoCl₂ (40 mg/kg, s. c.) で著明な増加がみられた。又、腎臓および脾臓においては減少傾向が認め

られた。本実験の結果では肝臓に主として影響が現われているので、以下 Co の効果を調べるのに肝臓を用いて実験を行った。

2. ヘム生合成経路への影響

Maines と Sinclair²⁶⁾により、Co が肝臓におけるヘム分解酵素 heme oxygenase を増加させることが報告されている。ヘム量に変動があれば当然ヘムタンパクであるチトクローム P-450 量、カタラーゼ量またヘム合成経路の律速酵素である ALAS 活性にも影響が考えられるので、これらへの影響をみた。

Fig. 1 に示すように、CoCl₂ 40 mg/kg 投与群においては著明な heme oxygenase 活性の上昇が認められた。ヘムタンパクであるチトクローム P-450 の量およびカタラーゼの活性は、20 mg/kg 投与群では対照群とほとんど差を示さないが、40 mg/kg 投与群では明らかに減少を示した。次にヘム合成系の律速酵素である ALAS 活性を、Ohasi と Kikuchi²⁷⁾が報告しているようにミトコンドリア型 ALAS と細胞質型 ALAS に分けてみると、Fig. 2 に示すように、CoCl₂ 40 mg/kg 投与量において細胞質型 ALAS 活性は増大するが、ミトコンドリア型 ALAS 活性の減少が認められた。このことは、ヘム量の減少により確かに ALAS の誘導はあるが、ALAS の誘導は細胞質で行われ、活性の場であるミトコンドリア内への移動がさまたげられたものと思われる。細胞質で誘導された ALAS は低分子化されてミトコンドリア内にとりこまれるとされているが、²⁷⁾Co はこの低分子化をさまたげるか、あるいは一旦低分子化された ALAS に働いて再び高分子化するかいずれかによるものと考えられる。

3. 薬物代謝への影響

薬物代謝で重要な役割を演ずるチトクローム P-450 量の減少が認められたので、2つのタイプの薬物すなわち、タイプ1としてのアミノピリン、タイプ2としての

TABLE I. Effect of Cobalt on Organ Weight in Rat

Dose (CoCl ₂ mg/kg bw)	Liver (g/100 g bw)	Kidney (g/100 g bw)	Spleen (g/100 g bw)	Adrenal (mg/100 g bw)
0	3.556±0.631 ^{a)} (100)	1.1976±0.1657 (100)	0.2681±0.0254 (100)	22.7±1.8 (100)
10	3.103±0.110 (-12.8)	0.9263±0.1072 (-22.7)	0.2546±0.0350 (-5.1)	22.6±2.5 (-0.4)
20	3.435±0.458 (-3.4)	1.0785±0.1159 (-10.0)	0.2351±0.0279 (-12.3)	22.2±2.6 (-2.2)
40	4.069±0.232 (+14.4)	0.9915±0.1943 (-17.3)	0.2257±0.0387 (-15.9)	22.5±3.9 (-0.9)

Numerals in parentheses the ratio (%) of the control.

a) S.D.

Fig. 1. Effect of Cobalt on Hepatic Heme Oxygenase, Catalase Activity and Cytochrome P-450 Content in Rats

—○—: cytochrome P-450.
 ...○...: catalase.
 —●—: heme oxygenase.

Fig. 2. Effect of Cobalt on ALA Synthetase Activity of Rat Liver

...○...: total activity.
 —○—: soluble fraction.
 —●—: mitochondrial fraction.

アニリンに対する代謝への調べ、同時に脂質過酸化能についても検討を加えた。

① Aminopyrine N-Demethylase 活性および Aniline Hydroxylase 活性におよぼす影響

Fig. 3 に示すように、CoCl₂ 40 mg/kg 投与によりア

Fig. 3. Effect of Cobalt on the Activities of Aminopyrine N-Demethylase and Aniline Hydroxylase of Rat Liver

○: nmol/nmol of P-450/30 min.
 ●: nmol/mg of protein/30 min.

Fig. 4. Effect of Cobalt on the Contents of Cholesterol, Triglyceride and Phospholipid of Rat Liver

...○...: P.
 ...●...: cholesterol.
 —●—: triglyceride mg/g of liver.
 —○—: triglyceride g/dl of blood.

ミノピリン、アニリンのタンパク量当りの代謝活性は共にチトクローム P-450の減少に相応して減少している。しかしその減少の度合はアニリンに比し、アミノピリンの方は小さい。一方、チトクローム P-450 当りの代謝活性をみると、アニリンはほとんど対照と差がないのに対し、アミノピリンにおいては対照に比し明らかに上昇しているのが判る。

② 脂質過酸化への影響

ミクロゾームの NADPH の電子は主にチトクローム P-450 に供給され一部が脂質の過酸化に使われる。Co

投与によりチトクローム P-450 が減少した条件下でのミクロゾームの脂質過酸化反応について検討したところ、対照とほとんど差は認められなかった。

4. 脂質への影響

Co 投与により肝臓重量の増加がみられたが (Table I), その原因の1つとして脂質代謝系への影響が考えられるので、脂質代謝に対する影響の指標として、コレステロール、トリグリセリド、リン脂質量を測定した。

Fig. 4 に示すように、リン脂質、コレステロール量はほとんど対照との差はみられなかったが、トリグリセリド量は著明な増加がみられた。この結果、Co は肝トリグリセリドの代謝系に何らかの影響を与えていることが示唆される。

結 論

1. Co 投与により肝臓重量の増加がみられるが、腎臓および脾臓ではやや減少の傾向が認められた。
2. Heme Oxygenase 活性の増大と、これによるチトクローム P-450 量、カタラーゼ活性の減少がみられた。
3. ALAS 活性は細胞質型 ALAS 量の増加がみられるが、ミトコンドリア型 ALAS 量は逆に減少した。Co は誘導の場である細胞質より活性の場であるミトコンドリアへの移行をさまたげるものと思われる。
4. チトクローム P-450 当りの代謝活性は Type 2 のアニリンではほとんど変化なく、Type 1 のアミノピリンで増加した。
5. 脂質過酸化に影響はみとめられなかった。

引用文献および注

- 1) E. J. Underwood, "Trace Elements in Human and Animal Nutrition," 3rd ed., Academic Press, New York (1971).
- 2) H. N. De, *Indian J. Med. Res.*, **37**, 301 (1949).
- 3) W. C. Grant, W. S. Root, *Physiol. Rev.*, **32**, 449 (1952).
- 4) C. S. Alexander, *Am. J. Med.*, **53**, 395 (1972).
- 5) 浅野聡平, 昭和医学会雑誌, **36**, 411 (1976).
- 6) 大道正義, 森田博行, 小沼洋子, 小池重夫, 日本衛生学雑誌, **29**, 532 (1974).
- 7) 石塚世志人, 北海道医学雑誌, **36**, 462 (1961).
- 8) E. E. Roginski, W. Mertz, *J. Nutri.*, **107**, 1537 (1977).
- 9) T. R. Tephly, P. Hibbeln, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 589 (1971).
- 10) Mahin D. Maines, Attallah Kappas, *J. Biol. Chem.*, **240**, 4171 (1975).
- 11) Mahin D. Maines, Attallah Kappas, *Biochem. J.*, **154**, 125 (1976).
- 12) M. Nakamura, Y. Yasukochi, S. Minakami, *J. Biochem.*, **78**, 373 (1975).
- 13) F. De Matteis, A. H. Gibbs, *Biochem. J.*, **162**, 213 (1977).
- 14) M. D. Maines, A. Kappas, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4171 (1975).
- 15) δ -Aminolevulinic acid synthetase.
- 16) N. Hayashi, B. Yoda, G. Kikuchi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 83 (1969).
- 17) T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 (1964).
- 18) B. Chance, D. Herbert, *Biochem. J.*, **46**, 402 (1950).
- 19) 池田千恵子, 和田文雄, 生化学, **45**, 234 (1973).
- 20) P. Hochstein, L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 388 (1963).
- 21) J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane-Stanley, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- 22) 川出真坂, 日本臨床, **20**, 2127 (1962).
- 23) L. L. Rudel, M. D. Morris, *J. Lipid Res.*, **14**, 1364 (1973).
- 24) J. E. L. Allen, *Biochem. J.*, **34**, 858 (1940).
- 25) O. H. Lowry, N. J. Resbrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 26) M. D. Maines, Peter Sinclair, *J. Biol. Chem.*, **252**, 219 (1977).
- 27) A. Ohashi, G. Kikuchi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 34 (1972).