ラット肝可溶性画分のミクロゾーム脂質過酸化におよぼす影響

佐藤正基, 網蔵雄三, 鈴木修司, 村田敏郎

静岡薬科大学¹⁾

Effect of the Soluble Fraction of Rat Liver on the Microsomal Lipid Peroxidation

MASAKI SATO, YUZO AMIKURA, SHUJI SUZUKI and TOSHIRO MURATA

Shizuoka College of Pharmacy¹⁾

(Received December 22, 1977)

Effect of the soluble fraction of rat liver on lipid peroxidation in hepatic microsomes was investigated. The soluble fraction markedly accelerated the lipid peroxidation in microsomes, even in the presence of $40 \mu\text{M}$ Fe^{2+} and/or $10 \mu\text{M}$ L-ascorbic acid. However, the soluble fraction effectively inhibited the NADPH-dependent lipid peroxidation in microsomes, especially in the presence of both glucose-6-phosphate and glucose-6-phosphate dehydrogenase. The inhibitory effect on the microsomal lipid peroxidation induced by NADPH-regenerating system was reduced by heating the soluble fraction. The addition of Zn^{2+} , an inhibitor of glutathione reductase, to the reaction mixture weakened the anti-peroxidative action of the soluble fraction on the lipid peroxide formation in microsomes together with NADPH-regenerating system and, inversely, oxidized glutathione enhanced the action of this fraction. In addition, presence of oxidized glutathione and glutathione reductase preparation was as effective as reduced glutathione in depressing lipid peroxidation in microsomes stimulated by NADPH-regenerating system.

These findings suggest that both the activation of glutathione reductase system by NADPH and a heat-stable factor(s) take part in the inhibitory effect of the soluble fraction on the NADPH-linked lipid peroxidation in microsomes.

This soluble fraction also inhibited the microsomal lipid peroxidation stimulated by L-ascorbic acid at the concentration of $50 \mu\text{M}$ or above, and the inhibitory effect was slightly increased by heating of this fraction. It is assumed that the inhibitory effect of the soluble fraction on L-ascorbic acid-dependent lipid peroxidation might be due to the mechanism different from that acts on the NADPH-dependent lipid peroxidation.

Keywords—soluble fraction of rat liver; microsomal lipid peroxidation; NADPH; L-ascorbic acid; anti-peroxidative action; glutathione reductase system

Kamataki ら²⁾ は, reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) 生成系によって誘起されるラット肝ミクロゾーム (Ms) の脂質過酸化が, 肝可溶性画分 (SF) によって抑制されることを見出し, SF 中には脂質過酸化阻害物質が存在すると報告している. Talcott ら³⁾ もまた, マウス肝の SF 中に脂質過酸化阻害物質の存在することを報告している.

一方, NADPH, あるいは L-ascorbic acid (AsA) によって促進される Ms の脂質過酸化は, reduced glutathione (GSH) によって抑制されるという報告⁴⁾ があり, また, ラット肝ホモジネートの上清画分には NADPH 依存性 glutathione reductase が存在することが知られている.⁵⁾

著者らは前報⁶⁾ において, SF 存在下では NADPH がラット肝 Ms 脂質過酸化の抑制因子にもなり得ること

1) Location: 2-1, Oshika 2-chome, Shizuoka-shi.

2) a) T. Kamataki, N. Ozawa, M. Kitada, H. Kitagawa, R. Sato, *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2485 (1974);

b) T. Kamataki, K. Aikawa, N. Ozawa, H. Kitagawa, *Jpn. J. Pharmacol.*, **25**, 793 (1975); c) T. Kamataki, O. Sugita, N. Ozawa, H. Kitagawa, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **40**, 283 (1977).

3) R.E. Talcott, H. Denk, R. Eckerstorfer, J.B. Schenkman, *Chem.-Biol. Interns.*, **12**, 355 (1976).

4) a) B.O. Christophersen, *Biochem. J.*, **106**, 515 (1968); b) E.D. Wills, *Biochem. J.*, **113**, 315 (1969); c) P.B. McCay, D.D. Gibson, K.-L. Fong, K.R. Hornbrook, *Biochim. Biophys. Acta*, **431**, 459 (1976).

5) M. Dixon, E.C. Webb, "Enzymes," Academic Press, New York, 1964, p. 627.

6) 佐藤正基, 網蔵雄三, 相本太刀夫, 木村良平, 村田敏郎, 薬誌, **98**, 757 (1978).

を示し、SF 中の glutathione reductase が NADPH によって活性化し、その結果生成する GSH が脂質過酸化を抑制するものであろうと報告した。

以上の点をより明らかにする目的で、次の実験を行なった。

実験材料および方法

1) **Ms および SF の調製** Wistar 系雄性ラット (体重 170—230 g) から摘出した肝臓を、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を含む 150 mM KCl で門脈より灌流したのち、Ms および SF を前報⁶⁾の方法で調製した。Ms 画分は上記 KCl 溶液の懸濁液とし、また、105000×*g* 上清を SF として用いた。Ms を洗浄する場合には、さきの Ms 懸濁液を再度 105000×*g*, 60 分間遠心分離し、そののち Ms 画分を上記の KCl 溶液に懸濁させた。SF の加熱処理には、沸騰水浴中で 2 分あるいは 5 分間加熱し、氷で急冷後、容量を精製水で補正し、テフロンガラスホモジナイザーで懸濁した。Ms および SF のタンパク量は Lowry らの方法⁷⁾に従って測定した。

2) **脂質過酸化の測定** 反応液 (全量 2.0 ml) の基本組成は、Ms 懸濁液, 90 mM KCl, 5 mM MgCl₂ および 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) からなるものを用い、目的に応じて Fe²⁺ (FeSO₄) 40 μM, NADPH 0.3 mM, AsA, あるいは NADPH 再生系 (NADPH 0.3 mM + glucose-6-phosphate (G6P) 5 mM + G6P dehydrogenase (G6PDH) 1 unit) を添加した。これを 37° で 30 分間 incubation したのち、反応液 1.0 ml を用いて、脂質過酸化の測定を 2-チオバルビツール酸 (TBA) を用いる前報の方法⁶⁾で行なった。なお、532 nm における吸光度を TBA 値 (OD₅₃₂/2.0 ml of reaction mixture) としてあらわした。

3) **Glutathione Reductase 活性の測定** 反応液は、SF あるいは Ms 懸濁液, 90 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM NADPH, 0.33 mM oxidized glutathione (GSSG) および 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) からなり、全量を 3.0 ml とした。反応は 25—26° のセル内で行ない、NADPH の 340 nm における吸光度の減少を測定した。この吸光度の減少分から NADPH 酸化量を求め、GSSG を添加しないときの NADPH の消費分を補正した。

4) **試薬** NADPH, NADP はオリエンタル酵母 (株) 製, G6P, G6PDH, GSH, GSSG, glutathione reductase はベーリンガー社製のものを用い、その他の試薬はすべて市販の試薬特級品を用いた。

結 果

1. Ms の脂質過酸化に対する SF の影響

種々の条件下の Ms 脂質過酸化に対する SF の影響を検討した結果を Table I に示す。Ms のみを 37° で 30 分間 incubation するとき、SF (タンパク量として 6.48 mg) を添加すると、TBA 値は 5.3 倍増加した。Fe²⁺ 40 μM, AsA 10 μM, あるいは Fe²⁺+AsA によって脂質過酸化を促進させた条件下でも、SF は Ms の TBA 値をさらに上昇させた。一方、NADPH 0.3 mM 添加によって約 4 倍上昇した TBA 値は、SF によって 16% 減少した。しかし、G6P 5 mM+G6PDH 1 unit を加えた NADPH 再生系では、TBA 値は NADPH 単独によるよりも著しく増加し、SF はこの TBA 値を 73% 低下させた。なお、G6P+G6PDH のみを添加した系で

TABLE I. Effect of Soluble Fraction (SF) on Lipid Peroxidation in Rat Liver Microsomes under Various Conditions

Addition ^{a)}	TBA value		Effect (%)
	Control	SF (6.48 mg of protein)	
None	0.084	0.446	+431
Fe ²⁺	0.214	1.516	+608
AsA	0.354	0.658	+ 86
Fe ²⁺ +AsA	0.790	1.748	+121
NADPH	0.330	0.276	- 16
NADPH+G6P+G6PDH	1.518	0.414	- 73
G6P+G6PDH	0.184	0.886	+382

The reaction mixture containing microsomes (1.93 mg of protein), 90 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) in a total volume of 2.0 ml was incubated at 37° for 30 min.

a) Fe²⁺: 40 μM, AsA: 10 μM, NADPH: 0.3 mM, G6P: 5 mM, G6PDH: 1 unit.

7) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

は SF はむしろ増加を示した。

2. NADPH による Ms 脂質過酸化に対する SF の影響

1. に述べた NADPH, あるいは NADPH 再生系存在下の Ms 脂質過酸化に対する抑制効果と SF 添加量との関係について検討した。Fig. 1 に示すように, NADPH 再生系存在下では, Ms 脂質過酸化抑制は SF 量に依存するが, NADPH 単独系ではその抑制は SF 量を増しても大きな変化は認められなかった。

また, この NADPH 再生系存在下の, Ms 脂質過酸化の SF による抑制効果は, SF を加熱処理することによって減弱することが認められた (Fig. 2)。すなわち, タンパク量として 3.43, 6.86 mg の SF によって, TBA 値はそれぞれ 34, 68% 減少するのにに対し, 2 分間加熱処理した SF で 22, 33%, 5 分間処理の SF では 28, 41% 減少した。

3. AsA による Ms 脂質過酸化に対する SF の影響

次に AsA 添加濃度と, SF による Ms 脂質過酸化抑制との関係を検討した (Table II)。Ms 脂質過酸化は, AsA の添加濃度に対応して増加するが, AsA 50 μM 以上添加の場合には SF (7.15 mg タンパク量) は, 約 40—50% の抑制を示した。

Fig. 1. Effect of SF on NADPH-Dependent Lipid Peroxidation in Rat Liver Microsomes in the Presence or Absence of G6P and G6PDH

The experimental conditions were the same as those of Table I except that 0.3 mM NADPH was added.

—●—: in the absence of G6P and G6PDH.
—○—: in the presence of 5 mM G6P and 1 unit G6PDH.

Fig. 2. Effect of Heat Treatment of SF on Lipid Peroxidation in Rat Liver Microsomes in the Presence of NADPH-Regenerating System

The reaction mixture containing microsomes (1.67 mg of protein), 90 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.3 mM NADPH, 5 mM G6P, 1 unit G6PDH, and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) in a total volume of 2.0 ml was incubated at 37° for 30 min.

a) SF was heated in boiling water. Treatment time: 2 min; 5 min.

TABLE II. Effect of SF on AsA-Induced Lipid Peroxidation in Rat Liver Microsomes

AsA (μM)	TBA value		Effect (%)
	Control	SF (7.15 mg of protein)	
Nil	0.072	0.370	+414
10	0.382	0.576	+ 51
20	0.620	0.602	— 3
50	1.096	0.646	— 41
100	1.374	0.640	— 53
200	1.630	0.754	— 54

The experimental conditions were the same as those of Table I except that 2.06 mg of microsomal protein were added.

この場合、SF 添加量と脂質過酸化抑制作用とに対応がみられ、また加熱処理によって SF の抑制作用は、むしろ増強する傾向がみられた(Fig. 3).

4. Ms 標品の Glutathione Reductase 活性

著者らの調製した Ms 標品中に、SF に存在する glutathione reductase が混入しているか否かについて検討を加えた。Table III-A) に示すように、未洗浄 Ms には、SF の 12% に相当する glutathione reductase 活性が認められた。しかし、Ms を 1 回洗浄することによってその活性はほとんど無視し得るものとなった。

次に、NADPH 再生系による脂質過酸化に対する GSSG の影響を調べた。Table III-B) に示すように、未洗浄 Ms を用いた場合 GSSG 0.1 mM は TBA 値を明らかに低下させた。しかし、glutathione reductase 阻害剤 Zn^{2+} (8) ($ZnSO_4$) 50 μM を添加した系、あるいは 1 回洗浄した Ms を用いた系では、GSSG は TBA 値をわずかに低下させるのみであった。

これらの結果から、未洗浄 Ms には SF 由来の glutathione reductase が混入していることが判明したので、以後の実験には、1 回洗浄した Ms 標品を用いた。

5. Glutathione Reductase 系の関与について

NADPH 依存性の Ms 脂質過酸化に対する SF の抑制機序に glutathione reductase 系が関与しているか否か

Fig. 3. Effect of Heat Treatment of SF on AsA-Induced Lipid Peroxidation in Rat Liver Microsomes

The experimental conditions were the same as those of Table I except that 200 μM AsA and 1.46 mg of microsomal protein were added.

□: fresh SF.

▨: SF which was heated in boiling water for 2 min.

TABLE III. Activity of Glutathione Reductase and NADPH-Regenerating System-Induced Lipid Peroxidation in Rat Liver Microsomes

A) Activity of glutathione reductase

Source of enzyme	Protein (mg)	NADPH oxidation (nmol/mg protein /min)
Soluble fraction ^{a)}	1.22	34.4
Unwashed microsomes	1.78	4.2
Washed microsomes	1.28	0.2

a) 105000 × g supernatant fraction.

B) Effect of GSSG on lipid peroxidation

Microsomes	50 μM Zn^{2+}	TBA value		Decrease (%)
		Control	0.1 mM GSSG	
Unwashed	—	1.052	0.420	60
	+	1.248	1.148	8
Washed	—	1.360	1.234	9
	+	1.254	1.152	8

A) The reaction mixture consisted of SF or microsomes, 90 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM NADPH, 0.33 mM GSSG, and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) in a total volume of 3.0 ml.

B) The experimental conditions were the same as those of Fig. 2 except that protein contents of unwashed and washed microsomes added to the reaction mixture were 2.11 mg and 1.67 mg, respectively.

8) R.G. Langdon, *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 432 (1958).

TABLE IV. Effect of SF on NADPH-Regenerating System-Induced Lipid Peroxidation in Washed Microsomes of Rat Liver with Zn^{2+} or GSSG

SF (mg of protein)	Per cent of TBA value		
	—	50 μM Zn^{2+}	0.1 mM GSSG
Nil	100 ^{a)}	100 ^{b)}	100 ^{c)}
1.08	76	109	32
2.17	63	94	31
3.25	42	60	30
4.34	35	49	29

The experimental conditions were the same as those of Fig. 2 except that washed microsomes (1.66 mg of protein) were employed.
TBA value in the absence of SF: a) 1.260; b) 1.154; c) 1.210.

TABLE V. Effects of GSSG, GSH and/or Glutathione Reductase on NADPH-Regenerating System-Induced Lipid Peroxidation in Washed Microsomes of Rat Liver

Addition ^{a)}	TBA value	%
None	1.180	100
GSSG	1.028	87
Glutathione reductase	1.114	94
GSSG + Glutathione reductase	0.308	26
GSH	0.300	25
GSH + Glutathione reductase	0.316	27

The experimental conditions were the same as those of Fig. 2 except that washed microsomes (1.65 mg of protein) were employed.
a) GSSG: 0.1 mM, glutathione reductase: 0.3 unit, GSH: 0.2 mM.

を知るために、NADPH 再生系存在下の Ms に Zn^{2+} および GSSG を添加したときの SF の影響を検討した。Table IV に示すように、 Zn^{2+} 50 μM を添加すると SF の TBA 値低下作用が減弱し、これに対して、GSSG 0.1 mM を加えた系では、SF による TBA 値低下が強められた。

次に、SF の代わりに glutathione reductase 標品を加えたとき (Table V)、NADPH 再生系における Ms の TBA 値は、GSSG 0.1 mM および glutathione reductase 0.3 unit 各々単独では明らかな変化を示さないが、両者の共存によっては 74% 減少した。また、この TBA 値の減少は GSH 0.2 mM、あるいは GSH + glutathione reductase 共存によるものと同程度であった。

考 察

肝 SF は、NADPH および NADPH 再生系による肝 Ms の脂質過酸化を抑制した。とくに後者に対してはより強い抑制を示した (Table I, Fig. 1)。

この抑制の機作として、SF 中に含まれる glutathione reductase の関与を検討した。洗浄によってほぼ完全に glutathione reductase を除去した Ms を用い、glutathione reductase 阻害剤 Zn^{2+} および GSSG 添加系で検討した結果 (Table IV)、SF は glutathione reductase 供給源として関与することが示唆された。SF の代わりに glutathione reductase 標品を添加した系において (Table V)、このことは裏づけられ、NADPH によって活性化された glutathione reductase が、GSSG $\rightarrow$ GSH の反応を行ない、生成した GSH が Ms の脂質過酸化を抑制するものであることが示された。

しかし、SF を加熱処理して glutathione reductase 活性を失活させても (データ省略)、なお Ms 脂質過酸化

抑制作用の残ることは (Fig. 2), 熱に安定な因子も関与することを示唆している. Ishiguro ら⁹⁾ は, 肝ホモジネートを 70°, 5 分間加熱処理して単離精製した SF 中のタンパク性因子が, ラット肝 Ms の NADPH 生成系による脂質過酸化を抑制すると報告している. 前述の熱安定因子は, これに相当するものかもしれない.

また, SF の Ms 脂質過酸化抑制が, NADPH によって誘起された脂質過酸化に対するよりも, NADPH 再生系による脂質過酸化に強くはたらいたことは, Kamataki ら²⁾ あるいは Talcott ら³⁾ の, NADPH 生成系存在下で, SF が Ms の脂質過酸化を抑制するという報告に一致している. これは, NADPH の濃度を維持することができるためと考えられる.

SF は, AsA 50 μ M 以上の添加によって引き起された Ms の脂質過酸化の抑制をも示した (Table II). この結果は, Grinna と Barber ら¹⁰⁾ の結果と一致する. この場合は, SF を加熱処理することによって, むしろ抑制作用が増強すること (Fig. 3) から, 少なくとも glutathione reductase の関与はなく, NADPH 依存性の脂質過酸化とは異なる因子が関与するものと考えられる.

9) a) I. Ishiguro, J. Naito, R. Shinohara, A. Ishikura, T. Terai, *Biochim. Biophys. Acta*, **365**, 148 (1974);

b) 石黒伊三雄, 篠原力雄, 石倉明弘, 内藤純子, 薬誌, **94**, 1240 (1974).

10) L.S. Grinna, A.A. Barber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 773 (1973).