

氏名(本籍)	高田彰	(滋賀県)
学位の種類	医学博士	
学位記番号	博甲第310号	
学位授与年月日	昭和60年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当	
審査研究科	医学研究科 生理系専攻	
学位論文題目	初代培養ラット肝細胞における含硫アミノ酸およびグルタチオンの輸送と代謝	
主査	筑波大学教授	医学博士 大菅俊明
副査	筑波大学教授	医学博士 滝田 齊
副査	筑波大学教授	医学博士 東 惠彦
副査	筑波大学教授	吉川靖三
副査	筑波大学教授	医学博士 内山安男

## 論 文 の 要 旨

glutathione (GSH) は生体内に最も多量に存在する thiol 化合物であり、生体内の酸化還元状態の調節や、毒物の解毒代謝、ならびに放射線障害に対する防禦など重要な機能をはたしている。肝臓は GSH 合成の主要な場であり、多量の GSH が貯蔵されている。GSH の合成は、肝細胞内の cysteine 濃度に依存しており、細胞外の methionine, cysteine, および cystine が cysteine の供給源として利用される。本研究においては、これらの含硫アミノ酸の細胞内への輸送という点に注目し、肝細胞における GSH 代謝と含硫アミノ酸の輸送活性の関係について検討した。特に、知見の乏しかった cystine 輸送について、cystine 輸送系の同定と、輸送系の活性を調節する因子について検討し、その生理的な意義について考察を加えた。

### (2)研究方法

体重150～200 g の Wistar 系 rat を用い、collagenase 灌流法により単離肝細胞を得た。これを10%の仔牛血清を含む Williams' E 培地中で初代単層培養した。培養は、55% CO<sub>2</sub>, 95% 空気の気相下でおこなった。

細胞内のアミノ酸および GSH の定量は、細胞を洗浄した後に 5% trichloroacetic acid (TCA) で、酸可溶画分を抽出し測定した。アミノ酸の輸送速度は、細胞を洗浄後、RI で標識されたアミノ酸 (2  $\mu$ Ci/ml) を含む取り込み液と一定時間 incubate させ、この後 RI を洗い流し、5% TCA で細胞内に取り込まれた RI を抽出して測定した。

### (3)結果および考察

#### (i)培養肝細胞内 GSH 量の変化

単離直後の肝細胞内 GSH量は低下していたが、培養開始後は急速に回復し、培養24時間までは高値を保った。しかし、培養48時間以降は GSH量は再度低下した。これは Williams' E 培地中に含まれる methionine 量が不足していることに起因することが、細胞内および培地中のアミノ酸分析より示唆された。

#### (ii)methionine, cysteine, および cystine の培地への添加と細胞内 GSH 量の上昇

培地中に methionine 又は cysteine を添加した場合には細胞内 GSH 量の急激な上昇が認められたが、cystine の添加では GSH 量上昇の程度は軽度であった。この原因は、cystine の細胞内への輸送が他の2つのアミノ酸に比して極めて遅く、肝細胞が十分に cystine を利用できないことに原因することが示された。

#### (iii)培養肝細胞における cystine 輸送系の同定

培養開始直後には cystine に対して高い特異性を示す輸送系は認められなかった。培養24時間以降、cystine に対して特異性が高く、 $\text{Na}^+$  非依存性の輸送系の活性が誘導され、培養48時間では、cystine は大部分この輸送系を介して輸送されるようになった。glutamate はこの  $\text{Na}^+$  非依存性の cystine 輸送を競合的に阻害したことから、誘導された輸送系は、坂内らが fibroblast において報告した輸送系 (Xc) と同等のものであると考えられた。

#### (iv)cystine 輸送系の活性を調節する因子

insulin と dexamethasone は濃度依存性に cystine 輸送系の活性を高めた。培養細胞の密度と輸送活性は逆相関関係にあり、低細胞密度において cystine 輸送の活性が高かった。また肝細胞を sul-fobromophthalein (BSP) などの親電子試薬の存在下で培養すると、cystine 輸送系の活性は著明に上昇した。

#### (v)cystine 輸送系による肝細胞内 GSH 量の調節

肝細胞を BSP の存在下で培養すると細胞内の GSH 量は一担低下するが、9～12時間後より、GSH 量の増加が認められた。この GSH 量の再上昇は、時間的に cystine 輸送系の活性上昇にひき続いておこり、又、高濃度の glutamate の添加で抑制されたことから、cystine 輸送系の活性上昇により、肝細胞の cystine 利用の効力が高まり、cystine が GSH 合成に利用されやすくなった結果と考えられた。

### (4)要 約

(i)培養肝細胞は methionine と cysteine を効率良く利用することができたが、cystine は細胞内への輸送速度が極めて遅いことから、その利用効率が悪かった。

(ii)しかし、培養肝細胞において cystine に対して高い特異性を持つ  $\text{Na}^+$  非依存性のアミノ酸輸送系が存在することが認められた。

(iii)この輸送系の活性は insulin, dexamethasone, 低細胞密度、および BSP などの親電子試薬で促進された。特に BSP による促進は著明であり、肝細胞の GSH 量の調節に cystine 輸送系の活性が密

接に関与している可能性が示された。

(iv)現在広く使用されている Williams 'E 培地に含まれる methionine の量は肝細胞内の GSH を長時間高値に保つには不足している。

## 審 査 の 要 旨

本申請論文は、dissertation 形式としては模範的なものと思われる。

論文内容も J. Biological Chemistry に採用されたことで明らかなように高水準のものである。すなわち、培養肝細胞の cystine 輸送にも特異的な  $\text{Na}^+$  非依存性機構の存在することを初めて明らかにし、さらにステロイドホルモン、インスリン、BSP にて本輸送機構が賦活されることを示した。本輸送系は肝細胞内 GSH 合成の調節に関与するという意味で、その生物学的意義が高い。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものとみとめる。