

ストレプトゾトシン糖尿病ラット水晶体における 糖代謝に及ぼすバナデイトの影響

—ケトヘキソキナーゼおよびアルドラーゼ活性—

安達和彦

鳥取大学医学部眼科学教室・生化学教室

要 約

糖尿病ラット水晶体の糖代謝に対する5価バナジウム(バナデイト)の影響を検討した。5週齢Sprague-Dawley系雄ラットにストレプトゾトシン50 mg/kgを腹腔内投与して糖尿病を誘発し、その1週間後から0.2 g/l NaVO₃ -5 g/l NaCl溶液を2週間自由に飲用させた。その結果、①糖尿病ラットに対するバナデイトの血糖降下作用を確認した。②バナデイト投与により水晶体中フルクトース量は有意に低下した。③糖尿病ラットにバナデイトを投与すると、水晶体ケトヘキソキナーゼ活

性は上昇する傾向を示し、アルドラーゼ活性は有意に上昇した。以上の結果から、バナデイトはソルビトール径路から解糖系への代謝過程に対して促進的に作用することが明らかになった。(日眼会誌 99:34-39, 1995)

キーワード：バナデイト、ケトヘキソキナーゼ、アルドラーゼ、フルクトース、糖尿病ラット水晶体

Effects of Vanadate on Glucose Metabolism in the Lens of Rats with Streptozotocin-induced Diabetes —Ketohehexokinase and Aldolase Activity—

Kazuhiko Adachi

Department of Ophthalmology and Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Tottori University

Abstract

The effects of vanadate, an oxidized form of vanadium, on glucose metabolism of the lens in diabetic rats were studied. Five-week-old male Sprague-Dawley rats were rendered diabetic with intraperitoneal injection of streptozotocin (50 mg/kg). One week later, the diabetic rats were given 0.2 g/l NaVO₃ -5g/l NaCl solution in drinking water ad libitum for 2 weeks and biochemical parameters in their lenses were determined. Blood glucose levels significantly decreased in the vanadate-administered diabetic rats (DV group), compared with the diabetic rats given no vanadate

(D group). In the DV group, a significant decrease was observed in lens fructose content compared with the D group. Lens ketohehexokinase activity tended to be higher and lens aldolase activity was significantly higher in the DV group than in the D group. These results indicate that vanadate accelerates the metabolic reaction from sorbitol pathway to glycolysis. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:34-39, 1995)

Key words: Vanadate, Ketohehexokinase, Aldolase, Fructose, Diabetic rat lens

I 緒 言

バナデイトは原子番号23の元素であるバナジウムの5価イオンで、1977年にCantleyら¹⁾がNa⁺, K⁺-ATPaseの阻害物質であることを見出してから、以後急

速にその生物学的作用について多くの研究が行われてきた。糖代謝に関連しては、バナデイトがストレプトゾトシン(STZ)糖尿病ラットの血糖値をインスリン濃度が低下したままの状態でも正常化させたり²⁾、解糖系の酵素群に対して阻害または促進的に作用するとの報告があ

別刷請求先：683 鳥取県米子市西町86 鳥取大学医学部眼科学教室 安達 和彦
(平成6年6月1日受付, 平成6年7月26日改訂受理)

Reprint requests to: Kazuhiko Adachi, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago-shi Tottori-ken 683, Japan

(Received June 1, 1994 and accepted in revised form July 26, 1994)

る^{3)~5)}。

また、糖尿病ラット水晶体の糖代謝に対するバナデイトの作用について、遠藤⁶⁾はSTZ糖尿病ラットにバナデイトを投与すると水晶体のソルビトール脱水素酵素(SDH)活性が上昇し、糖尿病白内障の原因と考えられている水晶体ソルビトール量が減少することを報告している。本研究では、さらにソルビトールからSDHによって生成されるフルクトース以降の代謝に対するバナデイトの作用を明らかにするために、STZ糖尿病ラットにメタバナジウム酸ナトリウム(NaVO₃)を投与し、水晶体ケトヘキソキナーゼ活性、アルドラーゼ活性およびその代謝関連物質の変動について追究した。

III 実験方法

1. 動物実験

実験動物には5週齢Sprague-Dawley系雄ラット(体重116~135g; 125±6g, n=91)を用い、実験期間中市販の標準試料(CE-2, 日本クレア)と下記の飲料水とを自由に摂取させ、室温約23°C, 12時間サイクルの明暗(照明時間6:00~18:00)の環境で飼育した。細隙灯顕微鏡で水晶体に混濁がないことを確認したうえで、ラットを無作為に正常群(n=46)と糖尿病群(n=45)とに分け、さらに、正常群は正常対照群(N群; n=24)と正常バナデイト投与群(NV群; n=22)とに分けた。糖尿病群には一昼夜絶食後、2g/dl STZ (Sigma社)-10mMクエン酸緩衝液(pH 4.5)溶液を1回腹腔内投与(50mg/kg体重)し、両正常群には同容量の10mMクエン酸緩衝液を同じ条件下に投与した。STZ投与1週間後(6週齢)に空腹時血糖値を測定し、300mg/dl以上のものを糖尿病ラットとし、これを2群〔糖尿病対照群(D群; n=23)と糖尿病バナデイト投与群(DV群; n=22)〕に分けた。NV群とDV群には、Blondelら⁷⁾の方法に従い、0.2g/l NaVO₃ -5g/l NaCl溶液を2週間飲料水として与え、N群とD群には5g/l NaCl溶液を与えた。NV群のバナデイト摂取量は、NaVO₃として5.92±0.80mg/day(バナジウム換算量で2.47±0.33mg/day)、2週間で合計82.85±11.13mg(34.62±4.65mg)であった。DV群のバナデイト摂取量は、NaVO₃として14.69±3.26mg/day(6.14±1.36mg/day)、2週間で合計205.65±45.57mg(85.92±19.04mg)であった。

各群とも実験を開始してから3週間後に、ペントバルビタールナトリウム(ネプタール[®]) (50mg/kg体重、腹腔内注射)麻酔下に眼球を摘出した後、実体顕微鏡下に後部強膜を切開して水晶体を摘出し、ろ紙で硝子体、毛様体、血液など付着物を除去し、湿重量を測定した後-80°Cで保存し、以下の測定を行った。ただし、アルドラーゼ活性は水晶体摘出後直ちに測定した。なお、眼球摘出前の細隙灯顕微鏡検査において、各群とも白内障生成例はなかった。

2. 測定方法

1) 血糖値

6時間絶食後尾部末端切断により血液を採取し、3,000rpmで10分間遠心分離して得た血漿を用い、グルコースオキシダーゼ法(グルコースB-テストワコー, 和光純薬)により測定した。

2) 水晶体中フルクトース量

正常群では水晶体2個について、糖尿病群では水晶体1個について0.3N ZnSO₄ 1.0mlを加えてホモジナイズした後、0.3N Ba(OH)₂ 1.0mlを加えて混和し、3,000rpmで10分間遠心分離して得られる上清についてF-キット(ペーリンガー・マンハイム)を用いて測定した。

3) 水晶体ケトヘキソキナーゼ活性

水晶体1個について25mM HEPES緩衝液(pH 7.4; 0.1mM EDTA, 10.0mM MgCl₂を含む) 150μlを加えてホモジナイズし、20,000×gで1時間遠心分離した後の上清を試料として、Malaisseら⁸⁾の方法を一部改変して以下のように測定した。

5mM ATPおよび10mM KClを含む上記緩衝液75μlに、上清試料25μlとD-[U-¹⁴C]フルクトース溶液10μl(4.2nmol, 1.0μCi; Amersham)を加えて37°Cで60分間反応させた。これにエタノール400μlを加えて反応を停止させてから、40°C以下で窒素気流下に蒸発乾固し、その残渣を水50μlに溶解して薄層クロマトグラフィーによる分析の試料とした。薄層板(PEIセルロース, Merck)の下縁から2cmの所に2cmの長さの線状に試料を塗布し、n-プロパノール/28%アンモニア水/水(6:3:1; 0.5g/l Na₄EDTAを含む)を溶媒として原点から10cm展開し、フルクトースとフルクトース-1-リン酸とを分離した(R_F値: フルクトース0.55, フルクトース-1-リン酸0.15)。薄層板上の放射能の分布をラジオクロマナイザー(JTC-600, Aloka)によって測定して、D-[U-¹⁴C]フルクトースのフルクトース-1-リン酸への組み入れを調べ、その変換率(%)で酵素活性を表した。すなわち、¹⁴Cフルクトースの放射能をA、¹⁴Cフルクトース-1-リン酸の放射能をBとすると、変換率(%)はB/(A+B)×100となる。ただし、各群において水晶体に含まれるフルクトース量が異なるので、後述するようにこの基質濃度を補正して測定した(結果の項参照)。

4) 水晶体アルドラーゼ活性

水晶体1個につき50mM トリス緩衝液(pH 7.4, 10mM EDTAを含む) 150μlを加えてホモジナイズし、10,000×gで30分間遠心分離した後の上清を試料として、吉田ら⁹⁾の方法に準じて測定した。

5) 水晶体中フルクトース-1-リン酸量

水晶体2個につき6% HClO₄ 120μlを加えてホモジナイズし、氷冷後3,000rpmで15分間遠心分離した上

清を5 N KOHでpH 7.0に調整した。これを再び遠心分離して得られる上清を試料として、Eggleston¹⁰⁾の方法に準じてラット肝から調整したアルドラーゼ標品を用いて測定した。

6) 水晶体中タンパク質量

Lowry-Folin法¹¹⁾に従って測定した。

上記の1), 2), 5)および6)の測定には島津製作所製の分光光度計UV-150を、4)の測定にはギルフォード社2bD型の分光光度計を用いた。

測定値はすべて平均値±標準偏差で表し、平均値間の有意差の検定にはStudentのt検定を用い、危険率5%以下を有意とした。

III 結果

1. 血糖値

STZ投与前の血糖値はN群114±8 mg/dl (n=24), D群115±7 mg/dl (n=23), DV群113±9 mg/dl (n=22)で各群の間に差異は認められなかった。また、NV群の血糖値は116±8 mg/dl (n=22)で、N群との間に有意差はなかった。STZ投与1週間後の血糖値はD群358±62 mg/dl, DV群356±35 mg/dlで、両群ともN群125±11 mg/dlに比べて約2.9倍に上昇したが (p<0.001), 両群間に有意差は認められなかった。

図1に示すように、バナデイトを2週間投与した後(8週齢)のDV群では、血糖値は213±73 mg/dlとなり、バナデイトを投与しないD群の431±73 mg/dlに比べて2分の1まで低下したが、N群(123±7 mg/dl)と比

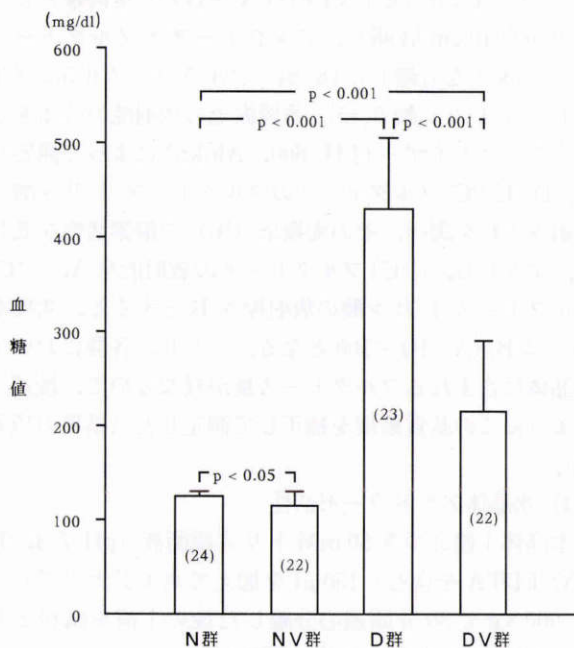


図1 バナデイト2週間投与後(8週齢)の血糖値。括弧内の数字はラット数を示す。N群：正常対照群, NV群：正常バナデイト投与群, D群：糖尿病対照群, DV群：糖尿病バナデイト投与群。

べると、なお有意に高値を示した。NV群のバナデイト2週間投与後の血糖値は115±13 mg/dlで、N群と比べて有意 (p<0.05) に低値を示した。

2. 水晶体湿重量

8週齢の水晶体湿重量は、D群(32.8±0.9 mg, n=7)では、N群(34.1±1.4 mg, n=10)に比べてやや低値を示したが有意差はなかった。DV群(32.7±1.2 mg, n=7)でもN群との間に有意差はなく、D群とも有意差はなかった。また、NV群は33.4±0.9 mg (n=5)であった。

なお、水晶体中タンパク質量を測定した結果では、各群の間で水晶体1個あたりのタンパク質量に有意差は認められなかった。

3. 水晶体中フルクトース量 (図2)

D群 [9.41±0.60 μmol/g ww (ww：湿重量)] では、N群 (0.85±0.05 μmol/g ww) に比べて約11倍に上昇していた。バナデイトを2週間投与したDV群 (6.59±2.22 μmol/g ww) でもN群に対し約7.8倍の高値を示したが、D群と比べるとその70%で有意に減少していた。NV群 (0.68±0.08 μmol/g ww) では、N群に比べて有意に低値を示した。

4. 水晶体ケトヘキシキナーゼ活性 (図3, 4)

この酵素活性を測定する際の反応基質として [¹⁴C] フルクトースを用いたが、水晶体中に存在する内因性のフルクトースの含有量は上述したように各群において異なり、特に正常群と糖尿病群とでは約8~11倍もの違いがあった。そこで、含有量が最も多かったD群を基準とし

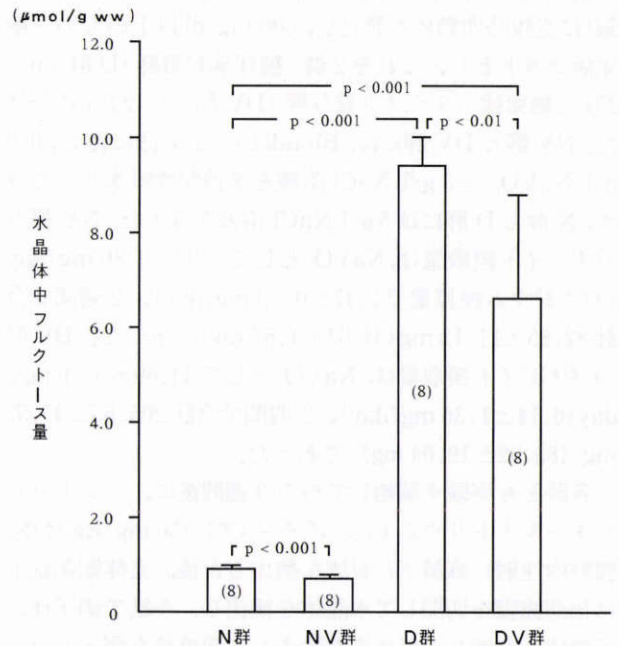


図2 8週齢における水晶体中フルクトース量の比較。括弧内の数字は測定水晶体数を示す。ww：湿重量。N群：正常対照群, NV群：正常バナデイト投与群, D群：糖尿病対照群, DV群：糖尿病バナデイト投与群。

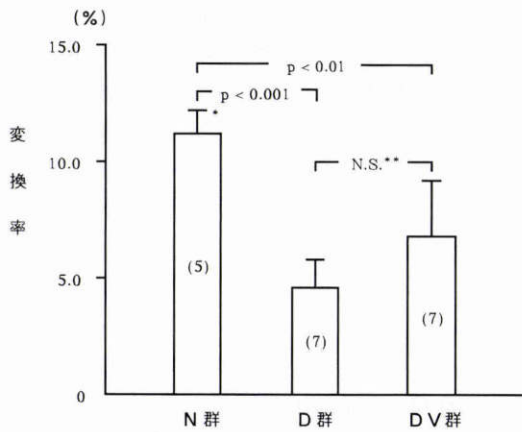


図3 8週齢における^[14C]フルクトースの^[14C]フルクトース-1-リン酸への変換率(N群, D群, DV群間の比較).

括弧内の数字は測定水晶体数を示す。N群:正常対照群, D群:糖尿病対照群, DV群:糖尿病バナデイト投与群。*:有意差なし (p<0.1)。

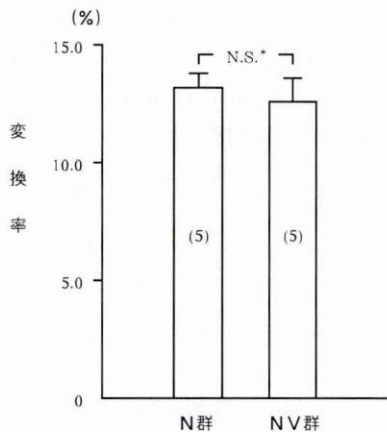


図4 8週齢における^[14C]フルクトースの^[14C]フルクトース-1-リン酸への変換率(N群, NV群間の比較).

括弧内の数字は測定水晶体数を示す。N群:正常対照群, NV群:正常バナデイト投与群。*:有意差なし (p>0.05)。

て、基質濃度を補正して測定した。すなわち、N群とDV群では水晶体をホモジナイズする際、水晶体1gあたりそれぞれ8.56 μmolおよび2.82 μmolのフルクトースを加えた。

活性を^[14C]フルクトースの^[14C]フルクトース-1-リン酸への代謝変換率(%)として表すと(測定方法の項参照), 図3に示すようにD群(4.5±1.3%)では、N群(11.1±1.1%)に比べて変換率は有意に低下した。DV群(6.7±2.5%)でも、N群に比べて変換率は有意に低下したが、D群と比べると危険率5%以下での有意差は認められなかった(p<0.1)ものの、上昇する傾向がみられた。

次に、N群とNV群との比較においても同様にN群

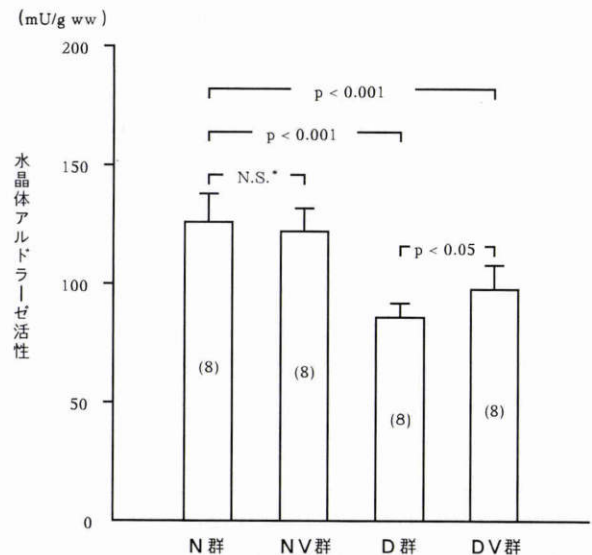


図5 8週齢における水晶体アルドラーゼ活性の比較.

括弧内の数字は測定水晶体数を示す。ww:湿重量。N群:正常対照群, NV群:正常バナデイト投与群, D群:糖尿病対照群, DV群:糖尿病バナデイト投与群。*:有意差なし (p>0.05)。

のフルクトース含有量を基準として、NV群には水晶体1gあたり0.17 μmolのフルクトースを加えて補正した上で測定した。その結果、図4に示すようにNV群(12.6±1.0%)では、N群(13.2±0.6%)と比べて酵素活性に有意差は認められなかった。

5. 水晶体アルドラーゼ活性 (図5)

D群(85±6 mU/g ww)では、N群(126±11 mU/g ww)に比べて30%以上低下し、DV群(98±10 mU/g ww)では、N群に比べて20%以上低かったが、D群と比べると有意に活性が高かった。NV群(122±9 mU/g ww)では、N群との間に有意差はなかった。

6. 水晶体中フルクトース-1-リン酸量

N群およびD群について、水晶体中のフルクトース-1-リン酸の測定を試みたが、含有量は測定限界濃度(1.8 μmol/g ww)以下で、測定不可能であった。

IV 考 按

糖白内障の原因には、糖代謝経路の一つであるソルビトール経路が関与していると考えられている。この経路は解糖系の側副路で、正常状態ではほとんど作動しないのに糖尿病状態では働きはじめる。そして、経路の中間代謝物のソルビトールは、細胞膜透過性が低いため、細胞内に蓄積して浸透圧の上昇を来し、この影響により細胞内への水の吸収、さらに水晶体膨潤を引き起こすといわれている¹²⁾¹³⁾。このような機序により生じる糖白内障の前段階に対して、遠藤⁹⁾は糖尿病ラットでバナデイトが著明に水晶体中ソルビトール量を低下させたと報告した。その機序については、ソルビトールのフルクトースへの変換を触媒する水晶体SDHの活性が上昇したため

であるとしている。一方、この酵素反応による生成物であるフルクトースの水晶体中含量は減少の傾向が認められたということから、さらにフルクトース以降の代謝過程へのバナデイトの関与が考えられた。本研究では、この代謝過程へのバナデイトの影響をそれに関与する酵素の活性や代謝産物の変動を測定することによって調べた。

この実験においても、糖尿病ラットにバナデイトを投与すると血糖値は有意に低下することが確認された。また、正常ラットへの投与でも軽度ではあるが、有意な血糖低下が認められた。Heyligerら²⁾は、糖尿病ラットでの血糖正常化をバナデイトのインスリン類似作用と考えている。同様に、血中インスリン濃度の正常なラットでもこの作用が多少現われたのではないかと考えられた。

さて、バナデイトには糖尿病水晶体中のフルクトース量を減少させる傾向があることが示されているが⁶⁾、これを追試したところ、バナデイトを投与したDV群ではD群と比べて有意に減少していることを認めた。この事実から、フルクトースの代謝反応を触媒する水晶体ケトヘキソキナーゼの活性に対し、バナデイトが促進的に作用する可能性が考えられた。そこで、その活性を測定したところ、正常ラットではNV群とN群との間に有意差はなかったが、糖尿病ラットではD群と比べてDV群に有意差は認められなかったものの、活性は上昇の傾向がみられた。このことはバナデイトの血糖低下作用とともに、水晶体中のフルクトース量減少の一因になると考えられた。バナデイトの作用について、これまでケトヘキソキナーゼなどのリン酸転移酵素に対して阻害的に作用するといわれている¹⁴⁾。その機序としては、リン酸-酵素複合体の構造と5価バナジン酸-酵素複合体のそれがよく類似しており、酵素のリン酸化中間体の形成を妨げるためと考えられている¹⁵⁾。しかし、上述の実験結果によれば、この酵素は正常群ではバナデイトの影響を全く受けなかったのに、糖尿病群では活性が促進される傾向がみられたことからすれば、それぞれ異なる機序による可能性も考えられる。西上¹⁶⁾はSTZ糖尿病ラットにインスリンを投与し、水晶体中のソルビトールおよびフルクトース量が減少したことを報告している。バナデイトの作用は、このインスリンの作用とよく類似しているのだから、バナデイトはソルビトール径路においてソルビトール以降の代謝径路の酵素に対して直接に作用すると仮定する他、現時点では機序不明のインスリン類似作用として理解すべきかも知れない。

次に、N群とD群についてフルクトースからケトヘキソキナーゼによって生成される水晶体中のフルクトース-1-リン酸の定量を試みたが、両群において測定限界濃度(1.8 $\mu\text{mol/g ww}$)以下であった。これは、D群の水晶体中フルクトース量(約9.4 $\mu\text{mol/g ww}$)と比べるときわめて少ない。この結果から、この代謝径路におけるフル

クトースから先の代謝が活発に行われていることが推定された。そこで、さらにフルクトース-1-リン酸の分解反応を触媒する水晶体アルドラーゼの活性を測定した。この活性は、糖尿病により低下するが、バナデイトの投与により有意に亢進し、バナデイトにアルドラーゼ活性を促進する作用があることが明らかになった。しかし、その作用機序については今のところ不明である。

フルクトース-1-リン酸はアルドラーゼの作用によりジヒドロキシアセトンリン酸とグリセルアルデヒドに開裂し¹⁷⁾、ジヒドロキシアセトンリン酸は直接解糖系に流入する。Ohrloffら¹⁸⁾によれば、グリセルアルデヒドは主にグリセリン酸に変換され、その後の代謝については不明で、解糖系に流れ込む可能性はないとしている。このことは、糖白内障で蓄積したソルビトール分子の一部分はジヒドロキシアセトンリン酸を経て解糖系に入ることを示す。そして、遠藤⁶⁾の報告と本実験成績から、バナデイトは糖尿病で抑制を受けるソルビトールからジヒドロキシアセトンリン酸への代謝分解過程に対し促進的に働き、水晶体中ソルビトールを減少させる方向に作用しているといえる。しかし、グリセルアルデヒドから先の代謝反応に対するバナデイトの作用は不明であり、解糖系に対する作用および白内障を生じさせる可能性のある Na^+ 、 K^+ -ATPase阻害作用を含め、今後の研究が必要であろう。

以上、本研究ではバナデイトには、糖尿病ラット水晶体におけるフルクトース-1-リン酸を基質とするアルドラーゼ活性を亢進させる作用があることを明らかにした。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました本学医学部医学科生化学教室小倉道雄教授および眼科学教室玉井嗣彦教授ならびに本学医学部生命科学科病態生化学教室著本英吉教授に深謝いたします。また、終始御助言、御協力いただきました生化学教室員各位に心より感謝申し上げます。

本論文の要旨は、第98回日本眼科学会総会(平成6年4月21日、横浜)において発表した。

文 献

- 1) Cantley LC Jr, Josephson L, Warner R, Yanagisawa M, Lechene C, Guidotti G: Vanadate is a potent (Na, K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J Biol Chem* 252: 7421-7423, 1977.
- 2) Heyliger CE, Tahiliani AG, McNeill JH: Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science* 227: 1474-1477, 1985.
- 3) DeMaster EG, Mitchell RA: A comparison of arsenate and vanadate as inhibitors or uncouplers of mitochondrial and glycolytic energy metabolism. *Biochemistry* 12: 3616-3621, 1973.
- 4) Choate GL, Mansour TE: Inhibition of sheep heart phosphofructokinase by ortho vanadate. *Fed Proc* 37: 1433, 1978.

- 5) **Gil J, Miralpeix M, Carreras J, Bartrons R**: Insulin-like effects of vanadate on glucokinase activity and fructose 2,6-bisphosphate levels in the liver of diabetic rats. *J Biol Chem* 263: 1868—1871, 1988.
- 6) **遠藤 実**: ストレプトゾトシン糖尿病ラット水晶体の糖代謝に対するバナデイトの影響. *日眼会誌* 97: 333—339, 1993.
- 7) **Blondel O, Bailbe D, Portha B**: *In vivo* insulin resistance in streptozotocin-diabetic rats—evidence for reversal following oral vanadate treatment. *Diabetologia* 32: 185—190, 1989.
- 8) **Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Davies DR, Schaffingen EV**: Presence of fructokinase in pancreatic islets. *FEBS Letters* 255: 175—178, 1989.
- 9) **吉田義弘, 井形昭弘**: アルドラーゼ. *臨床病理* 55: 181—192, 1983.
- 10) **Eggleston LV**: D-fructose 1-phosphate. In: Bergmeyer HU (Ed): *Methods of Enzymatic Analysis*, Third Edition, Vol. VI. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 328—334, 1984.
- 11) **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr LA, Randall RJ**: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265—275, 1951.
- 12) **Kinoshita JH**: Cataracts in galactosemia. The Jonas S. Friedenwald memorial lecture. *Invest Ophthalmol* 4: 786—799, 1965.
- 13) **Kinoshita JH**: Mechanisms initiating cataract formation. Proctor lecture. *Invest Ophthalmol* 13: 713—724, 1974.
- 14) **Aiton JF, Cramb G**: The effects of vanadate on rabbit ventricular muscle adenylate cyclase and sodium pump activities. *Biochem Pharmacol* 34: 1543—1548, 1985.
- 15) **Benabe JE, Echegoyen LA, Pastrana B, Martinez-Maldonado M**: Mechanism of inhibition of glycolysis by vanadate. *J Biol Chem* 262: 9555—9560, 1987.
- 16) **西上哲弘**: ストレプトゾトシン糖尿病ラット水晶体におけるアルドース還元酵素活性に及ぼすインシュリンの影響. *日眼会誌* 94: 128—134, 1990.
- 17) **Ohrloff C, Zierz S, Hockwin O**: Investigations of the enzymes involved in the fructose breakdown in the cattle lens. *Ophthalmic Res* 14: 221—229, 1982.
- 18) **Ohrloff C, Zierz S, Hockwin O**: Fructose, fructose 1-phosphate, and glyceraldehyde breakdown in carbohydrate metabolism. *Ophthalmic Res* 15: 19—23, 1983.