

グルタチオンペルオキシダーゼを利用した ヒドロペルオキシドの蛍光定量法

A Fluorometric Method for the Determination of Hydroperoxides Using Glutathione Peroxidase

高橋 哲夫

Tetsuo Takahashi

近年、生体内で生成する様々な過酸化脂質が循環器や肝などの疾患、或いは老化現象などと密接な関係のあることが明らかとなり、臨床的にも大きな注目を浴びるようになった。従って、生体試料中の過酸化脂質を正確に測定することは臨床的にも極めて重要なことである。

良く知られている様に、生体試料中の脂質の過酸化度を測定する方法としては、TBA法¹⁾が用いられているが、ヒドロペルオキシドなど過酸化物そのものを測定の対象とした分析法は少ない。Tappelら²⁾は、粗製のグルタチオンペルオキシダーゼ (GSHpex) —グルタチオンレダクターゼ (GSHred) 共役反応系 (Fig. 1) を利用したヒドロペルオキシドの酵素的分析法を報告しているが、生体試料の分析に応用するには致っていない。

著者は、GSHpex 反応と HPLC—蛍光検出法を組合せたヒドロペルオキシド類の微量分析法を検討したので、その結果を報告する。

使用した試薬および機器は以下のとおりである。GSHpex (東洋紡, grade III), 還元型グルタチオン (GSH; シグマ), 酸化型グルタチオン (GSSG; シグマ grade III), 0-フルアルデヒド (OPA; 半井, 蛍光分析用), クメンヒドロペルオキシド (CHP; 半井)。その他の試薬は特級品を使用した。水は Milli-Q (ミリポア社) により精製したものを用了。リノール酸ヒドロペルオキシド (LHP) は Gardner の方法³⁾ により調製した。CHP および LHP の試料原液は Matsu-shita らの方法⁴⁾ により標準し、それらを希釈して標準試料溶液とした。高速液体クロマトグラフは日立 638-30 型, 分析カラムは TSK ODS-120 T (東洋曹達) をステンレスカラム (250×4 mm I. D.) に充てんしたもの, 検出器は日立 650-10 LC 型分光光度計を各々用了。

酵素反応

GSHpex (GSH; H_2O_2 oxidoreductase; E. C. 1. 11. 1.

9) は, Fig. 1 に示すように GSH を水素供与体としてヒドロペルオキシド (ROOH) を水酸化体 (ROH) へと還元するが⁵⁾、基質特異性は比較的 low、 H_2O_2 のみならず高度不飽和脂肪酸の過酸化物⁶⁾ など多くの有機過酸化物を還元する。

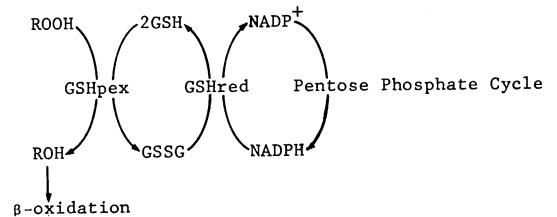


Fig. 1 Reduction of lipid peroxide by GSHpex and related enzyme system.

Tappelら²⁾は、GSHpex-GSHred 反応系での NADPH の減少量を測定することにより ROOH を定量しているが、本研究では GSHpex 反応により生成する GSSG を HPLC で分離後、OPA を用いて発蛍光させ定量することを試みた。

まず、今回使用した酵素標品について、Tappel らの方法²⁾ に準じて、ROOH 量と NADPH の減少量との相関性を調べた。CHP および LHP を基質とした場合、いずれも 50~200 nmol の範囲で良好な直線関係が認められ、本酵素標品の分析試薬としての有用性が確認された。

GSSG の定量法

GSSG (GSH) の特異的微量定量法として、Cohnら⁷⁾ および Hilfら⁸⁾ が、一級アミンの発蛍光試薬である OPA を用いる方法を報告している。そこで著者は、OPA を用いるポストカラム法により GSSG を分析するために、Fig. 2 に示すような装置を用いて分析条件を種々検討した。

まず、反応混合液の pH と蛍光強度の関係を調べたところ、Fig. 3 に示すように、反応混合液の pH が 12.5 付近のとき蛍光強度は最大となった。ここで pH が低下するとともに

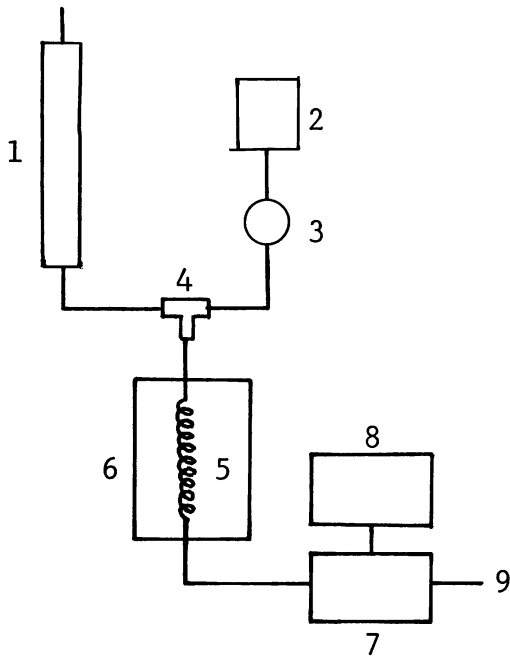


Fig. 2 Schematic diagram of the HPLC system with post-column derivatization
 1: analytical column, 2: reagent reservoir
 3: micro tube pump, 4: tee, 5: reaction coil,
 6: thermostated water-bath, 7: fluorescence detector, 8: recorder, 9: wast.

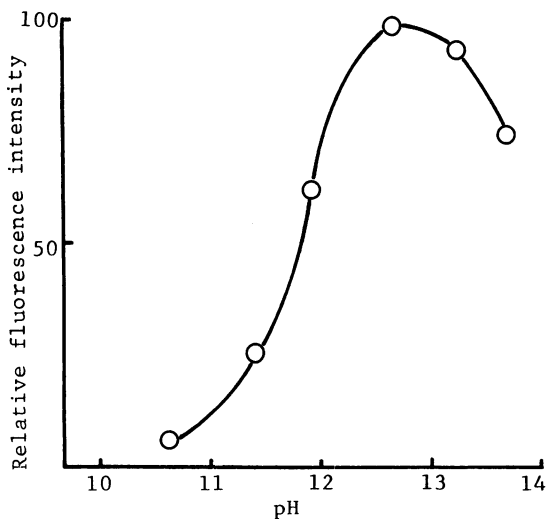


Fig. 3 Effect of pH of the mixed solution on the derivatization reaction.

蛍光強度が低下するのは、GSSGからGSHへの変換が不完全なためと推定される。

つきに、発蛍光反応を行わせる温度と蛍光強度の関係を

調べた結果、Fig. 4に示すように、温度の上昇とともに蛍光強度は増加したが、60°C以上ではほぼ一定となった。反応温度の上昇とともにベースラインノイズも増大したが、その傾向は60°C以上で顕著だった。さらに、反応コイルの長さを変えて、蛍光強度の変化を調べた結果、0.5 mm I. D.のテフロンチューブを用いた場合、反応コイルの長さが4 m以上で蛍光強度はほぼ一定となった。

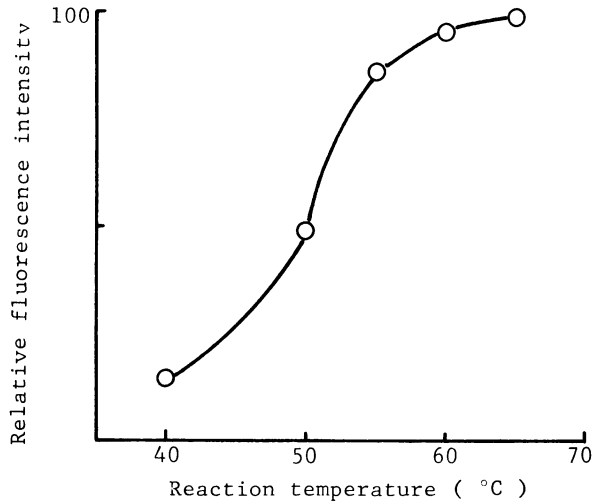


Fig. 4 Effect of reaction temperature on the derivatization reaction

以上の実験結果より、GSSGの分析条件を以下のように設定した。溶離液：1%ペンタンスルホン酸ナトリウムおよび2%アセトニトリルを含む5 mMリン酸塩緩衝液(pH 3.0)、OPA試液：OPA 80 mgを0.4 Mホウ酸塩緩衝液(pH 13.0) 100 mlに溶解したもの、溶離液流量：0.7 ml/min、OPA試液流量：0.4 ml/min、反応コイル：テフロンチューブ(5 m×0.5 mm I. D.)、反応温度：60°C。蛍光検出器は励起波長350 nm、蛍光測定波長450 nm、スリット幅は各々10 nmで使用した。

過剰のGSH共存下でのGSSGのクロマトグラムの例をFig. 5に示した。逆相イオンペアクロマトグラフィーによりGSHとGSSGとは完全に分離され、過剰のGSH共存下でのGSSGの定量が可能となった。本法はGSSG(GSH)に特異性が高く、血清試料においても、簡単な除タンパク操作を行うだけで、共存物質の妨害が少ない安定したクロマトグラムが得られた。検量線は、HPLCへの注入量として0.5~10 pmolの範囲で良好な直線関係が認められた。

ROOHの定量

GSHpexによるROOHの還元反応と、OPA-ポストカラム法によるGSSGの分析法を組み合わせることでROOHの定量を行った。試験管に、1 mM EDTAを含む0.1 Mリン酸塩緩

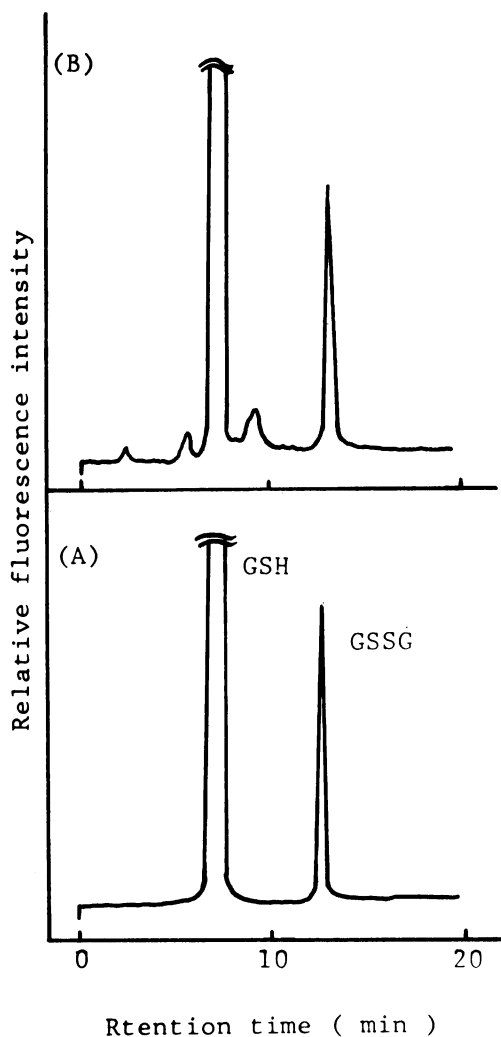


Fig. 5 Chromatograms of GSH and GSSG
 (A) $10\mu\text{l}$ of the standard solution of GSH ($10\mu\text{M}$) and GSSG ($0.5\mu\text{M}$) were injected.
 (B) Human serum (0.2 ml) spiked with GSH (4 nmol) and GSSG (0.2 nmol) were deproteinized with 10% TCA (0.2 ml). $10\mu\text{l}$ of the resulting supernatant were injected.
 HPLC condition were described in the text.

衝液 (pH 7.0) 0.2 ml , 1 mM GSH 0.1 ml , GSHpex (50 U/ml) 0.02 ml を加え 25°C で 2 分間プレインキュベート後, ROOH の標準試料溶液 0.05 ml を加えた。 25°C でさらに 15 分間インキュベート後, 0.5 N HCl 0.1 ml を加えて酵素反応を停止し, 反応液 $10\mu\text{l}$ を HPLC に注入した。 LHP についての検量線は $1\sim 10\text{ nmol}/0.05\text{ ml}$ の範囲で原点を通る直線となり, 各点における変動係数は $2.1\sim 5.7\%$ ($n=10$) であった。

本法により数 nmol オーダーの LHP の定量が可能となったが, GSHpex は LHP の他多くの不飽和脂肪酸やステロイド⁹⁾などの過酸化物を還元することが知られており, 広範な脂質過酸化物の分析に適用可能と考えられるので, 血液等生体試料への応用についても今後検討したい。

文 献

- 1) K. Yagi: *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976)
- 2) R. L. Heath and A. L. Tappel: *Anal. Biochem.*, **76**, 184 (1976)
- 3) H. W. Gardner: *Lipids*, **10**, 248 (1975)
- 4) T. Asakawa and S. Matsushita: *Lipids*, **15**, 965 (1980)
- 5) T. C. Stadtman: *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 93 (1980)
- 6) a) C. Little et al.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 3632 (1970)
 b) C. Little and P. J. O'Brien: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **31**, 145 (1968)
- 7) V. H. Cohn and J. Lyle: *Anal. Biochem.*, **14**, 434 (1966)
- 8) P. J. Hissen and R. Hilf: *Anal. Biochem.*, **74**, 214 (1976)
- 9) C. Little: *Biochim. Biophys. Acta.* **284**, 375 (1972)