

固定化酵素リアクターを利用した高速液体
クロマトグラフィーによる還元型及び酸化型
グルタチオンの同時蛍光定量

Simultaneous Fluorometric Determination
of Reduced and Oxidized Glutathione by
HPLC with Immobilized Enzyme Reactor

高橋 哲夫

Tetsuo Takahashi

緒 言

グルタチオンは生体内に広く存在する低分子チオール化合物であり、異物の解毒や活性酸素の除去など有害物質からの生体防御に重要な役割を果たしている。生体内でグルタチオンは還元型グルタチオン (GSH) 及び酸化型グルタチオン (GSSG) として存在するが、NADPH-グルタチオニレダクターゼにより GSSG は GSH へ還元されるため細胞内ではそのほとんどが GSH として存在している。細胞内での GSSG 濃度は通常総グルタチオン濃度の 1 ~ 2 % と言われているが¹⁾、栄養状態やホルモン環境²⁾、薬物や活性酸素による“酸化的ストレス”³⁾など生理的条件の変化により [GSSG] / [GSH] は大きく変動することが知られている。また、GSSG が酵素蛋白質と混合ジスルフィドを形成して酵素活性を変化させる例が数多く知られており、GSSG が細胞内の代謝調節に関与している可能性も示唆されている⁴⁾。このように生体内でのグルタチオンの生理的意義は GSH のみならず GSSG をも含めたかたちでとらえる必要があり、生体試料中の GSH、GSSG の高感度で選択性の高い同時分析法が求められている。最近、亜硫酸によるジスルフィドの還元をオンラインで行なうチオール、ジスルフィドの HPLC 同時定量法が報告されている⁵⁾が、GSSG の還元を酵素反応で行なえばより選択性の高い分析が期待できる。

本報では、グルタチオンレダクターゼ (GSSG レダクターゼ) を多孔性ガラスピーブーズに固定化し、これをカラムリアクターとして HPLC に組み入れて、GSSG の還元をオンラインで行なう GSH、GSSG の同時定量法について検討した。

実験方法

試薬

GSSG-レダクターゼはオリエンタル酵母社製 (From yeast, 170U/mg) を使用した。GSH 及び GSSG(Grade III) は Sigma 社製、NADPH は興人社製をそれぞれ使用した。酵素固定化用担体のガラスピーブーズは ENI 製アミノプロピル-CPG (120~200mesh, 515Å pore size, 110μ mol/g functional amino group) を使用した。2,3-ナフタレンジカルバルドヒド (NA) は三浦ら⁶⁾の方法に準じて 2,3-ジメチルナフタレンより合成した (mp 135~136°C, lit.⁶⁾ 134~135°C)。

機器

HPLC 装置は日立638-30型、試薬送液ポンプは日立655型、検出器は日立650-10LC 型分光蛍光光度計をそれぞれ使用した。

測定方法

Fig. 1 に本実験で使用した分析装置のフローダイヤグラムを示す。本法は HPLC による GSH、GSSG の分離、固定化 GSSG レダクターゼによる GSSG の GSH への還元、GSH と NA との発蛍光反応、および蛍光検出の各段階より成る。分離カラムには TSK ODS-80TM(東洋曹達)を長さ 15cm、内径 4 mm のステンレススチール製管に充填したものを使い、同じく TSK ODS-80TM を充填したカラム (長さ 5 cm、内径 4 mm) をガードカラムとして使用し

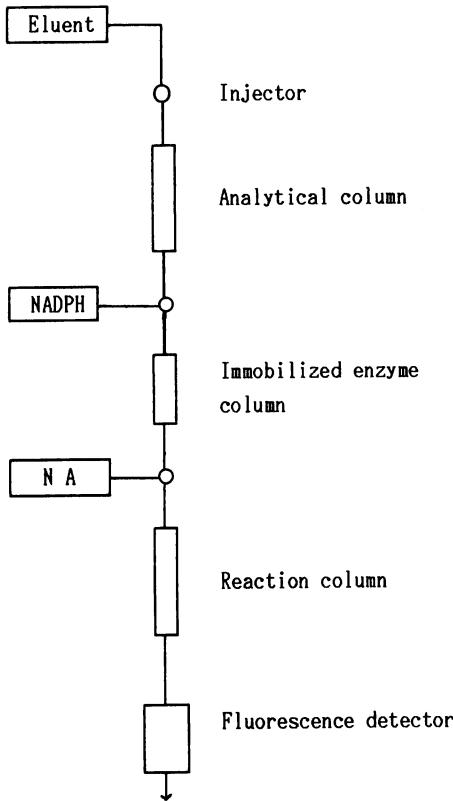


Fig. 1 Flow diagram of the HPLC system with an immobilized enzyme column reactor.

た。発蛍光反応を行なうための反応カラムにはガラスビーズ(ワットマン社製、粒径 $40\mu\text{m}$)を長さ25cm、内径4mmのステンレススチール製管に充填したものを用いた。分離カラム、固定化酵素カラム及び反応カラムの温度は水循環式恒温槽によって25°Cとした。

固定化 GSSG レダクターゼの調製

多孔性ガラスビーズ200mgを2.5%グルタルアルデヒド水溶液(5 ml)中で1時間室温に放置し、ガラスビーズ中のアミノプロピル基にアルデヒド基を導入した。このガラスビーズを蒸留水でよく洗い未反応のグルタルアルデヒドを除いた後、0.1M リン酸緩衝液(pH7.0)に溶解し調製した酵素溶液(1 mg/ml)2 mlを加え、2時間室温にて反応させ酵素を多孔性ガラスビーズに固定した。水洗にて未反応の溶性酵素を除いた後、固定化酵素を0.1M リン酸緩衝液(pH7.0)中4°Cで保存した。このようにして調製した固定化 GSSG-レダクターゼを長さ4 cm、内径2.1mmのステンレススチール製管に充填し固定化酵素リアクターとして使用した。酵素の固定化収率は、固定化前後の反応液中の蛋白質濃度の差から換算して求めた。蛋白質濃度の定

量は Lowry らの方法⁷⁾により行なった。固定化 GSSG レダクターゼの活性測定は “stirred-batch reactor” を用いる循環フロー法⁸⁾により行なった。0.1mM NADPH、1 mM GSSG、5 mM EDTA を含む0.1M リン酸緩衝液(pH7.0)に一定量の固定化 GSSG レダクターゼを加え、反応容器内で攪拌しながら反応溶液をペリスタルティックポンプで循環し、NADPH の減少にもとづく340nm の吸光度の減少を連続的に測定した。このようにして求めた酵素比活性を元の溶性酵素と比較して相対比活性を求めた。

分析試料の調製

Wistar 系の雄性ラット(体重約250g)を断頭放血後、肝臓を摘出した。肝臓は-80°Cにて保存し適時実験に供した。

i) 肝臓0.5gに5 mM EDTA を含む0.5M 過塩素酸5 mlを加え、ポリトロンにて氷冷下ホモジナイズした。ホモジネート1 mlに氷冷下2 M 炭酸カリウムを加えてpHを約4に調整後、3,000rpmで5分間遠心分離を行なった。上澄液0.5mlを蒸留水にて2倍に希釈し分析試料とした。

ii) 肝臓0.5gに5 mM EDTA、20mM N-エチルマレイミド(NEM)を含む0.5M 過塩素酸5 mlを加えポリトロンにて氷冷下ホモジナイズした。ホモジネート1 mlに氷冷下2 M 炭酸カリウムを加えてpHを約6に調整し、0°Cで10分間放置した。3,000rpmで5分間遠心分離を行なったのち、上澄液0.5mlを分取し、1 mlのエーテルで3回抽出して未反応のNEMを除いた。水層に残ったエーテルを窒素ガスを吹き付けて除き、蒸留水を加えて全量を1 mlとした。

結果及び考察

固定化 GSSG レダクターゼの性質

固定化酵素を HPLCなどのフローシステムに組み入れてカラムリアクターとして使用する場合には、常時ある程度の圧力が加わった状態で使用するため、固定化担体には物理的強度の大きいものを用いる必要がある。また、固定化酵素カラム内の反応時間は通常数秒~数十秒と短時間であるため、できるだけ活性の高い固定化酵素標品を用いることが望ましい。この点、多孔性ガラスビーズは物理的強度が大きく、また酵素結合容量も大きいため固定化担体として最も適したものと考えられた。Table 1に固定化 GSSG レダクターゼの固定化収率と酵素比活性を示した。

固定化酵素と元の溶性酵素とではpH-活性曲線が異なる場合がしばしば認められる。今回調製した固定化 GSSG レダクターゼの場合、至適pHは元の溶性酵素と同様7.0附近であったが、pH-活性曲線はわずかにアルカリ側で高い活性を示した(Fig. 2)。溶性および固定化 GSSG レダクターゼを0.1M リン酸緩衝液中、25°Cでインキュベートした

Table 1 Preparation and properties of Immobilized Glutathion reductase

Coupling yield : in%	75
in mg enzyme immobilized per g glass beads	3.0
Specific activity Units/g	210
Specific activity relative to that of soluble enzyme (%)	47

ときの両酵素の安定性を調べたところ、溶性酵素に比べて固定化酵素の活性の低下率は小さく、15日後においても85%の残存活性を有していた。これに対して溶性酵素の活性は15日後には20%に低下した(Fig. 3)。また、4°Cの保存条件では3ヵ月後においても固定化GSSGレダクターゼは95%以上の残存活性を有していた。

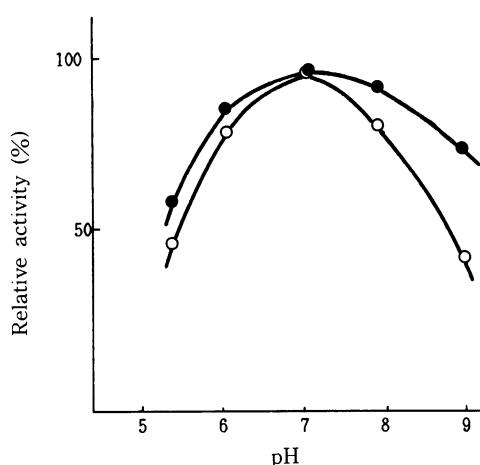


Fig. 2 pH-activity profiles of soluble and immobilized GSSG reductase.

—○— soluble enzyme ; —●— immobilized enzyme.

The enzyme assay was carried out under the standard conditions except for the buffers employed.

At pH 5.5-7.0, and pH 8.0-9.0 0.1M phosphate buffer, and 0.1M Tris-HCl buffer were employed, respectively.

NAとGSHの発蛍光反応

GSHの蛍光定量法としてオルトフタルアルデヒド(OPA)による発蛍光反応を利用する方法⁹⁾があるが、GSH-OPA発蛍光体の蛍光測定波長はNADPHの蛍光波長領域と重なるため、本法のように高濃度のNADPHが共存する系には適用できない。NAはOPAと同様にオルトジアルデヒド基を有する蛍光試薬であり⁶⁾¹⁰⁾(Fig. 4), 次式

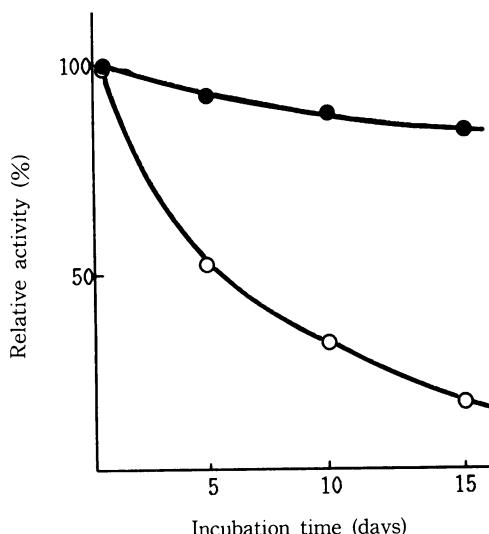


Fig. 3 Stability of soluble and immobilized GSSG reductase.

—○— soluble enzyme ; —●— immobilized enzyme.

The enzyme was incubated at 25°C for the indicated time in 0.1M phosphate buffer (pH 7.0).

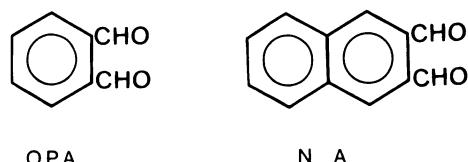


Fig. 4 Structures of OPA and NA.

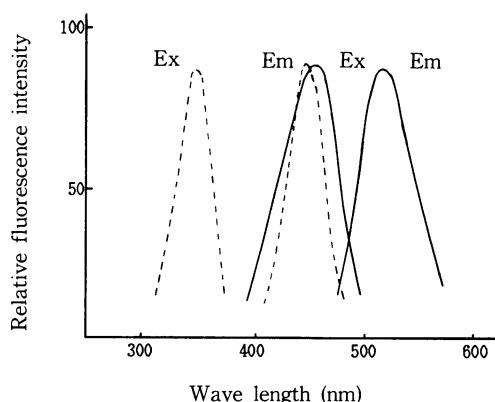


Fig. 5 Excitation and emission spectra of NA-GSH (—) and NADPH (----) in 0.1M phosphate buffer (pH 9.0).

に示すように GSH と反応して発蛍光体を生成するが、HPLC ポストラベル法への応用例は少ない。

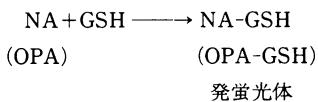


Fig. 5 に示すように、GSH と NA から得られる発蛍光体の蛍光波長領域は NADPH の蛍光波長領域と完全に分離しており、NADPH 共存下での蛍光測定が可能であった。GSH と NA との反応は、反応溶液の pH が高い程反応速度が増大したが、同時に反応生成物の分解速度も増大する傾向が見られた(Fig. 6)。GSH との発蛍光反応は pH9.0 では 2.5 分ではなく完結することから、ポストラベル法による蛍光定量への応用が可能と思われた。

測定条件の検討

TSK ODS-80TM カラムによる GSH, GSSG 相互の分離条件をリン酸緩衝液を用いて検討したところ、溶離液の pH が低い程分離が良くなる傾向が見られたが、保持時間は増大した。溶離液として 20mM リン酸緩衝液 (pH3.6) を用いることにより 12 分以内に良好な分離を行なうことができた。固定化 GSSG レダクターゼによる GSSG の還元反応を pH7.0 付近で、又 NA による発蛍光反応を pH9.0 付近でそれぞれ行なうために NADPH 溶液及び NA 溶液の緩衝液濃度、pH、送液流量についてそれぞれ検討し、Table 2 に示した測定条件を設定した。

蛍光強度に及ぼす NADPH 濃度の影響を調べたところ、0.3~0.6mM の範囲で最大蛍光強度が得られ、0.8mM 以上では蛍光強度が減少する傾向が見られた(Fig. 7)。又、

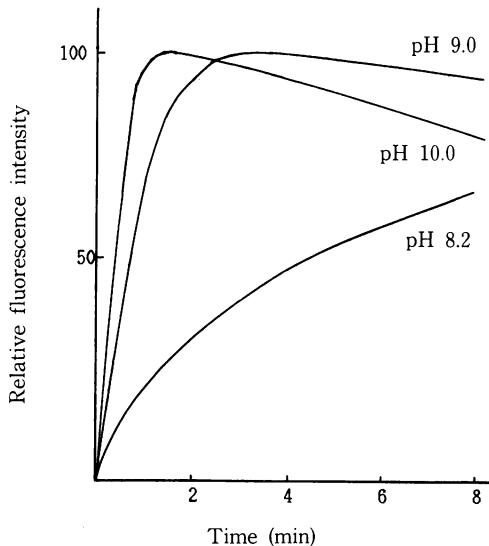


Fig. 6 Effect of pH on the reaction of GSH with NA.
10 μ l of 0.1mM GSH was added to the solution (3ml) of 0.5mM NA in 0.1M borate buffer of appropriate pH at 25°C, and the fluorescence development was measured at 522nm (ex 465nm).

NA 濃度と蛍光強度の関係では、NA 濃度が 3~5 mM ではほぼ一定の蛍光強度が得られ (Fig. 8)、NA 濃度が 5 mM 以上では NA 濃度の増大とともにベースラインノイズも増大した。

Table 2 Analytical condition

Separation condition	
Column	TSK ODS-80TM (15cm x 4.0mm I. D.)
Column temp.	25°C
Mobile phase	20mM Phosphate (pH3.6)
Flow rate	1.0ml/min
Detection condition	
a) NADPH soln.	0.4mM NADPH in 0.1M Borate (pH9.0) flow rate 0.4ml/min reaction temp. 25°C
b) NA soln.	4mM NA in 30% MeOH-0.2M Borate (pH9.5) flow rate 0.4ml/min reaction temp. 25°C
Detection	fluorescence (Ex.465nm, Em. 522nm)

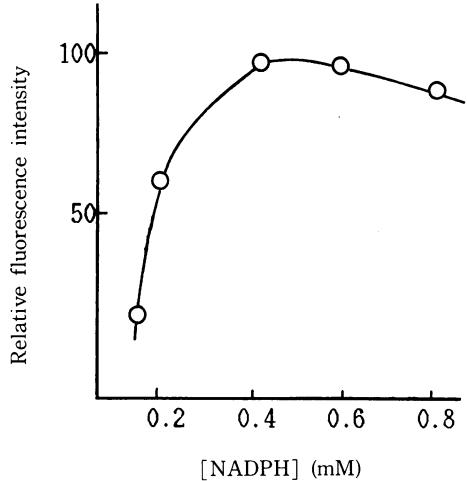


Fig. 7 Effect of NADPH concentration on the reduction of GSSG with immobilized GSSG reductase.

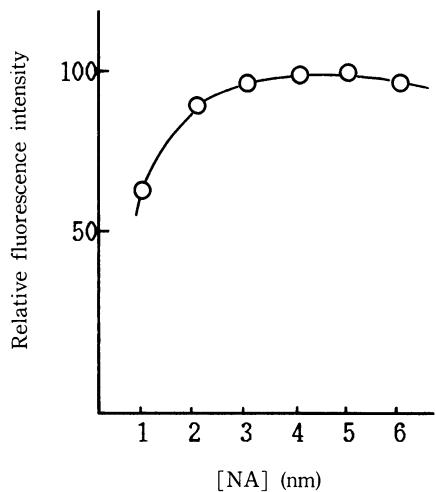


Fig. 8 Effect of NA concentration on the fluorescence intensity.

GSH, GSSG の定量

定量は絶対検量線法により行なった。GSH, GSSG の標準溶液を用いて検量線を作成したところ、HPLCへの注入量として GSH については 1-10 nmol の範囲で、又 GSSG については 0.1-1.0 nmol の範囲で検量線は直線であった。本法による検出限界 ($S/N = 3$) は GSH, GSSG いずれについても 50 pmol であった。Fig. 9 にラット肝臓試料について得られた HPLC クロマトグラムを示す。クロマトグラム上で GSH 及び GSSG 以外のピークは全く認められなか

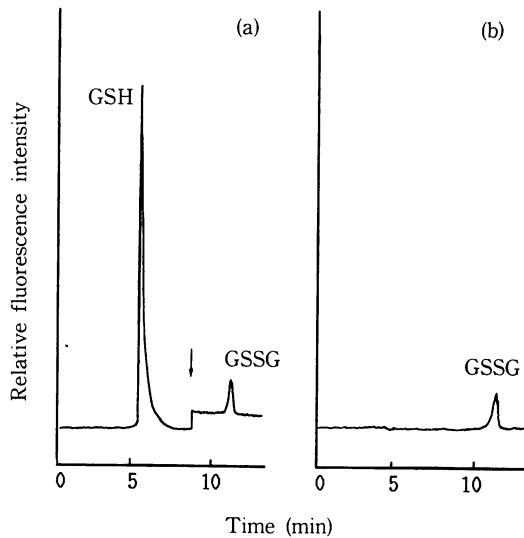


Fig. 9 Chromatographic profiles of perchloric acid extracts from rat liver.

Perchloric acid extracts were prepared as described under Materials and Methods in the presence (Panel b) and absence (Panel a) of NEM. At the arrow the sensitivity was increased eight-fold.

った。NEM 处理により GSH の SH 基をブロックした試料では GSH のピークが完全に消失する (Fig. 9-b) こと、固定化酵素カラムを取り除くと GSSG のピークが現れないことから、クロマトグラム上の各ピークが GSH および GSSG にそれぞれ由来するものであることが確認された。

ラット肝ホモジネート 1 ml に GSH を $0.2 \mu\text{mol}$ あるいは GSSG を $0.01 \mu\text{mol}$ 加えた試料についてそれぞれ添加回収率 ($n = 5$) を求めたところ、GSH では 96%、GSSG では 103% であった。

Table 3 に本法をラット肝臓試料に適用した結果を示す。

Table 3 GSH and GSSG contents of rat liver

GSH ($\mu\text{mol/g}$)	GSSG ($\mu\text{mol/g}$)	Ref.
5.72 ± 0.87	0.16 ± 0.06 (-NEM)	*
—	0.03 ± 0.01 (+NEM)	
6.5	0.15	(12)
6.28	0.13	(13)
—	0.02	(14)
5.5	0.018	(15)

* This work

試料の調製に際して NEM 処理によりチオール基をブロックしたものとしなかったものとでは GSSG の定量値に大きな違いが見られた。生体試料中の GSSG 濃度に関しては文献値の間でも大きな開きがあるが、これは分析方法の違い、とりわけ試料の調製法の違いによるものと考えられている¹⁵⁾。生体試料の分析に際しては試料の調製法が分析結果に大きく影響する場合があるが、特にチオール化合物の場合には条件によっては容易に酸化反応や SS 交換反応を起こすため、特別の配慮が必要とされる。今回の分析結果においても、NEM 処理、非 NEM 処理試料間での GSSG の定量値の差は、試料調製時における GSH の酸化に起因するものと思われ、試料の調製方法については更に検討が必要と思われる。

以上、HPLC ポストラベル蛍光法に固定化酵素リアクターを組み入れた GSH、GSSG の同時分析法について報告した。本法は GSH、GSSG に極めて選択性が高く、高感度で迅速な分析法であり、生体試料への応用が期待される。

最後に、本研究を行なうにあたり、有益な御助言をいただいた北海道大学医療短期大学部三浦敏明博士に深謝致します。

要　　旨

HPLC ポストラベル蛍光分析法に固定化酵素カラムリアクターを組み入れた GSH、GSSG の同時分析法を開発した。GSSG レダクターゼをグルタルアルデヒドにより多孔性ガラスビーズに固定化し、これをカラムに充填し酵素リアクターとして使用した。GSH、GSSG を逆相 HPLC にて溶離し、NADPH-固定化 GSSG レダクターゼによりオンラインで GSSG を GSH に還元した。

GSH は NA により蛍光性誘導体とし、蛍光検出された。本法は GSH、GSSG に選択性が高く、除蛋白操作のみでラット肝試料に適用できた。

文　　獻

- 1) N. S. Kosower and E. M. Kosower : Int. Rev. Cytol., 54, 109 (1978).
- 2) J. T. Isaacs and F. Binkley : Biochim. Biophys. Acta, 498, 29 (1977).
- 3) R. Brigelius : Oxidative Stress (H. Sies ed), Academic Press, London (1985).
- 4) 谷口直之：代謝, 23, 1057 (1986).
- 5) H. Nakamura and Z. Tamura : Anal. Chem., 54, 1951 (1982).
- 6) 三浦敏明他：分析化学, 30, 765 (1981).
- 7) O. H. Lowry, et al. : J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).

- 8) B. Mattiasson and K. Mosbach : Methods in Enzymology (K. Mosbach ed.) 44, 335, Academic Press (1976).
- 9) P. J. Hissin and R. Hilf : Anal. Biochem., 74, 214 (1976).
- 10) T. Miura, et al. : Anal. Biochem., 139, 432 (1984).
- 11) G. Harisch and J. Schole : Z. Naturforsch., 29C, 261 (1974).
- 12) F. Tietz : Anal. Biochem., 27, 502 (1969).
- 13) P. Sacchetta, et al. : Anal. Biochem., 154, 205 (1986).
- 14) T. P. M. Akerboom, et al. : Bull. Eur. Physiopathol. Respir., 17, 221 (1981).
- 15) T. P. M. Akerboom and H. Sies : Methods in Enzymology (W. B. Jakoby ed.), 77, 373, Academic press (1981).

英　文　要　約

A rapid, sensitive, and selective method for the simultaneous determination of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione was investigated. GSH and GSSG were separated by reversed-phase HPLC. After mixing with NADPH, the column eluent was passed through an enzyme column reactor packed with glutathione reductase immobilized on porous glass beads, and GSSG was converted to GSH. GSH was then reacted with 2,3-naphthalenedicarbaldehyde to form a highly fluorescent product, and monitored with a fluorescence detector ($\lambda_{ex} 465\text{nm}$, $\lambda_{em} 522\text{nm}$). The present method was highly selective for GSH and GSSG and the detection limit was 50pmol for both GSH and GSSG. The present method was applicable to the determination of GSH and GSSG in biological samples.

Key Words: determination of GSH and GSSG, HPLC; immobilized glutathione reductase, fluorescence detection; 2,3-naphthalenedicarbaldehyde; rat liver tissue.