

原著論文

ラット組織中グルタチオン及びその関連ペプチドの HPLC による同時定量法の開発

坪井 誠二, 守谷 智恵
就実大学 薬学部 生化学研究室

Development of HPLC method for the simultaneous quantitation of glutathione and related thiols in rat tissues

Seiji Tsuboi, Chie Moritani

*Laboratory of Biochemistry, Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy,
Shujitsu University*

(Received 11 December 2013; accepted 16 December 2013)

Abstract: A rapid and highly sensitive high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection has been developed for determination of glutathione and related thiols in rat tissues. A simple pre-column derivatization procedure with the thiol-specific, fluorogenic reagents 4-fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan (ABD-F) and 4-fluoro-7-sulfobenzofurazan ammonium salt (SBD-F) were employed. The separation of the derivatized glutathione and related thiols was performed using a mobile phase consisting of 75 mM sodium citrate (pH 2.9) – acetonitrile gradient (1-15 %) flowing at 1.0 mL/min. The eluted derivatives were fluorometrically detected at an excitation wavelength 380 nm and an emission wavelength 510 nm. Under the optimum chromatographic conditions, the calibration curve was linear over the range of 0.5 to 10.0 nmol/mL with the correlation coefficient of 0.9998. This method has been used to determine glutathione and related thiols concentrations in normal rats and streptozotocin-induced diabetic rats tissues.

Key words: glutathione, thiol, HPLC, streptozotocin

緒言

グルタチオン (γ -Glutamylcysteinyl- glycine) は種々の生物に高濃度に存在するトリペプチドであり、細胞内の主な非タンパク性チオールである。グルタチオンには還元型 (以下 GSH) と酸化型 (以下 GSSG) が存在し、ラジカルスカベ

ンジャー作用¹⁾、アミノ酸輸送²⁾、補酵素としての作用³⁾、及び生体外異物に対するの抱合反応による解毒作用⁴⁾等多くの生理作用をもつことが知られており、生体防御機構において重要な役割を果たしている。グルタチオンのみではなくその関連ペプチドの挙動を調べることは、グル

タチオンの恒常性を理解するだけでなく、生体防御機構を明らかにする上で重要なことである。

グルタチオンは分光光度法⁵⁾、HPLC法⁶⁾等、種々の測定法が報告されている。1983年今井らによるチオール基選択的蛍光誘導体化合物である4-fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan (以下 ABD-F) 及び 4-fluoro-7-sulfobenzofurazan ammonium salt (以下 SBD-F) を用いたチオール化合物の定量法が報告された⁷⁾。今回、ABD-F 及び SBD-F を用いてグルタチオン及びその関連ペプチドの同時定量法について検討した。

ストレプトゾトシンは実験的に糖尿病を引き起こす薬物として知られており、実験的糖尿病モデルの臓器は高血糖により常に酸化ストレスにさらされていてグルタチオンがその抗酸化に関与することが明らかとなっている⁸⁾。そこで、糖尿病におけるグルタチオンの生体防御機構への関与を検討する目的で、今回開発した定量法を用いてストレプトゾトシン糖尿病ラット臓器中のグルタチオン及びその関連ペプチドの定量に応用したので報告する。

方法

ラット各組織の処理：100 mg のラット各組織（肝臓、心臓、腎臓、大脳、小脳、水晶体）または網膜 2 眼分に 1 mL の酸化防止剤として 1 mM BAPS (Bathophenanthroline disulfonic acid)/0.1 M HCl を添加し、30 秒ホモジナイズした。15,000 rpm, 15 分、4°C で遠心し上清を回収した。上清 100 µL に 8.4 µL の 60% 過塩素酸を添加して攪拌後、15,000 rpm、15 分、4°C で遠心した。さらに 50 µL の 4 M K₂HPO₄ を添加して攪拌後、15,000 rpm、10 分、4°C で遠心して上清を回収し組織抽出液とした。

グルタチオン及び関連ペプチドの定量：細胞

抽出液 50 µL に 0.2% ABD-F 溶液 (5 mM EDTA を含む 0.7 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.3) に溶解) を 250 µL 加え、60°C、5 分間反応させ還元型を ABD 誘導体とした。冷却後、酢酸エチル 500 µL 加え攪拌し 15,000 rpm、4°C、1 分間遠心後酢酸エチル層を取り除いた。この操作を 3 回行い、未反応の ABD-F を除去した。水層に 2% SBD-F 溶液 (5 mM EDTA を含む 0.7 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.3) に溶解) 及び還元剤として 10% TBP (tri-*n*-butyl-phosphine) 溶液 (2-プロパノール/アセトニトリル (2 : 98) で希釈) をそれぞれ 25 µL ずつ加え、60°C、20 分間反応させ酸化型を SBD 誘導体とした。冷却後 4 M HCl を 50 µL 加え反応を停止させた。これを HPLC の試料とした。HPLC による分析には、ODS カラム (COSMOSIL 5C18-AR-II, 4.6 ID x 150 mm) を使用し、移動層は 75 mM クエン酸ナトリウム (pH 2.9)、アセトニトリルを用いた。移動層中のアセトニトリル濃度を 1% から 15% まで段階的に上昇させ、蛍光誘導体化したグルタチオン及び関連ペプチドを分離した。検出には、蛍光検出器 (励起波長 : 380 nm、蛍光波長 : 510 nm) を用いた。

ストレプトゾトシン糖尿病ラットの作製：5 週齢雄性 Wistar 系ラットを用いた。糖尿病群は 0.5 M クエン酸ナトリウム (pH 4.5) に溶解させたストレプトゾトシン (65 mg/kg) を、コントロール群には 0.5 M クエン酸ナトリウム (pH 4.5) を各々腹腔内投与した。飼料及び水は自由摂取、自由飲水とした。ストレプトゾトシン投与後 15 日間飼育した後、ペントバルビタール麻酔下開腹し、腹部大動脈より採血した。その後、直ちに各臓器を摘出した。血糖値はグルコーステストワコーを用いて測定した。なお、全ての動物実験に関しては就実大学薬学部動物実験指針に準じて計画、実施した。

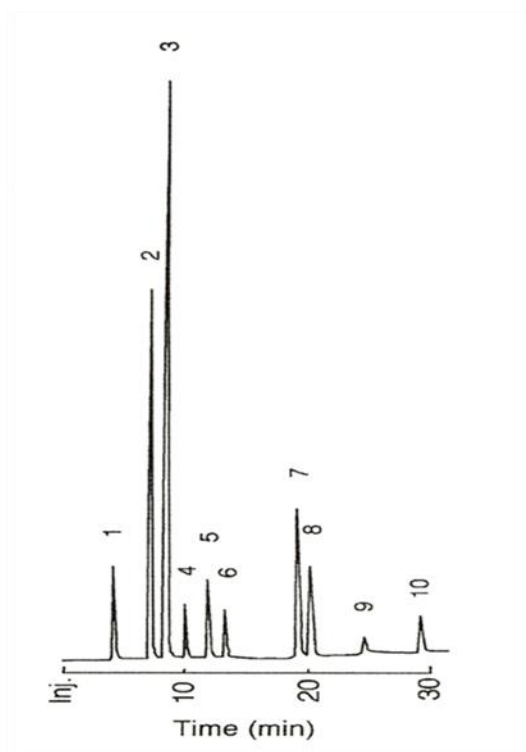


図1. 標準溶液のクロマトグラム
 1:Cystine, 2:Homocystine, 3:CysGly
 (oxidized),4:γ-GluCys(oxidized),
 5:GSSG,6:Cysteine,7:CysGly,
 8:Homocystine,9:γ-GluCys,10:GSH

	保持時間 (min)
SBD-Cysteine (Cystine)	5.2
SBD-Homocystine (Homocystine)	7.2
SBD-CysGly (oxidized form)	8.9
SBD-γ-GluCys (oxidized form)	10.5
SBD-GSH (GSSG)	13.4
ABD-Cysteine	14.0
ABD-CysGly	19.4
ABD-Homocystine	20.4
ABD-γ-GluCys	25.2
ABD-GSH	29.0

表1. グルタチオン及び関連ペプチド誘導体化合物の保持時間

結果

標準溶液クロマトグラム: グルタチオン, Cysteine, Cysteinylglycine (CysGly), γ-Glutamylcysteine(γ-GluCys)及び Homocystine の各々還元型, 酸化型の標準水溶液を, ABD-F 及び SBD-F 処理した標準溶液クロマトグラムを図1に示した. また, 各々の誘導体化合物の保持時間を表1に示した. すべてのピークを良好に分離することが出来た.

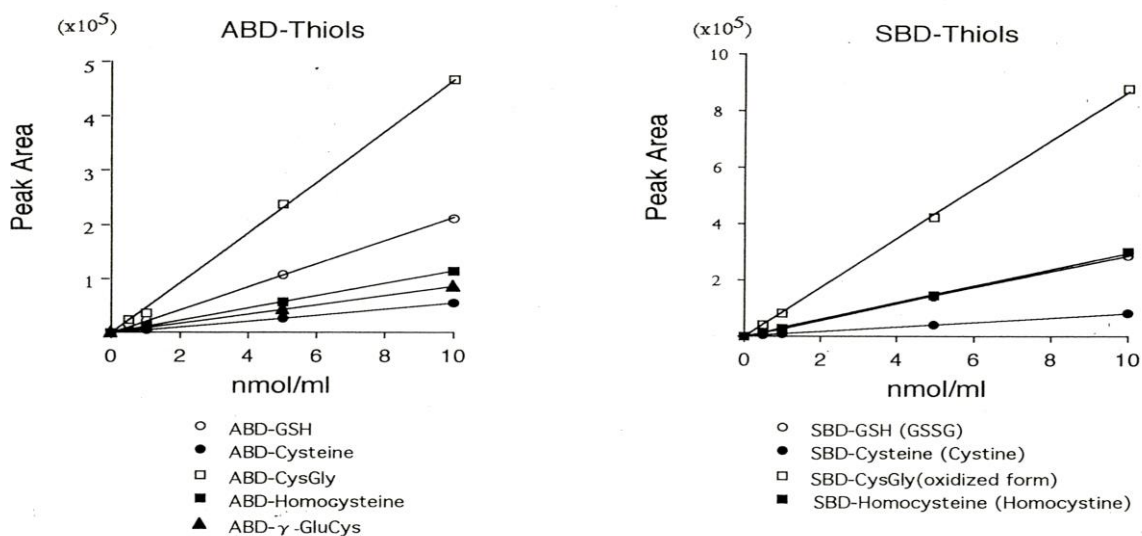


図2. グルタチオン及び関連ペプチドの ABD-F 及び SBD-F 誘導体の検量線

検量線: 図2に検量線を示した。全ての誘導体化物質について相関係数は 0.9998 であった。また、検出限界は、最も良い CysGly(oxidized form) で 30 fmol, また最も悪い Cysteine でも 1.3 pmol であった。

添加回収実験: ラット肝臓組織抽出液を用いて添加回収実験を行った。表2に添加回収率を示した。いずれの誘導体化物質においても良好な回収率を得ることが出来た。

ラット組織中及びストレプトゾトシン糖尿病ラット組織中のグルタチオン及び関連ペプチド

の定量: 図3に肝臓 (a)及び網膜 (b)から得られたクロマトグラム示した。両組織において、グルタチオン及びその関連ペプチドから由来するピークは他のピークと良好な分離を示した。また、血糖値を測定した結果、コントロールラットでは 153 ± 2.25 mg/dl, またストレプトゾトシン糖尿病ラットでは 334 ± 23.2 mg/dl でありストレプトゾトシン投与により血糖値は有意に上

	Mean \pm S.D. (%)	
GSH	99.3	\pm 6.6
Cysteine	100.5	\pm 1.1
CysGly	94.2	\pm 4.0
γ -GluCys	99.3	\pm 5.9
Homocysteine	95.8	\pm 4.8
GSSG	99.2	\pm 1.1
Cystine	95.7	\pm 8.3
CysGly (oxidized form)	100.2	\pm 1.9
γ -GluCys (oxidized form)	95.7	\pm 2.0
Homocysteine	102.9	\pm 3.1

表2. ラット肝臓ホモジネートにおけるグルタチオン及び関連ペプチドの添加回収率

昇していた。両群の間に有意な体重の差は認められなかった。ラット各組織中グルタチオン及び関連ペプチドを定量した結果を表3 (a), (b), (c) に示した。

肝臓: ストレプトゾトシン投与ラットにおいて、GSH (x1.2), GSSG (x1.5), Cysteine (x1.2), Cystine (x1.1), 還元型 CysGly (x1.1)及び酸化

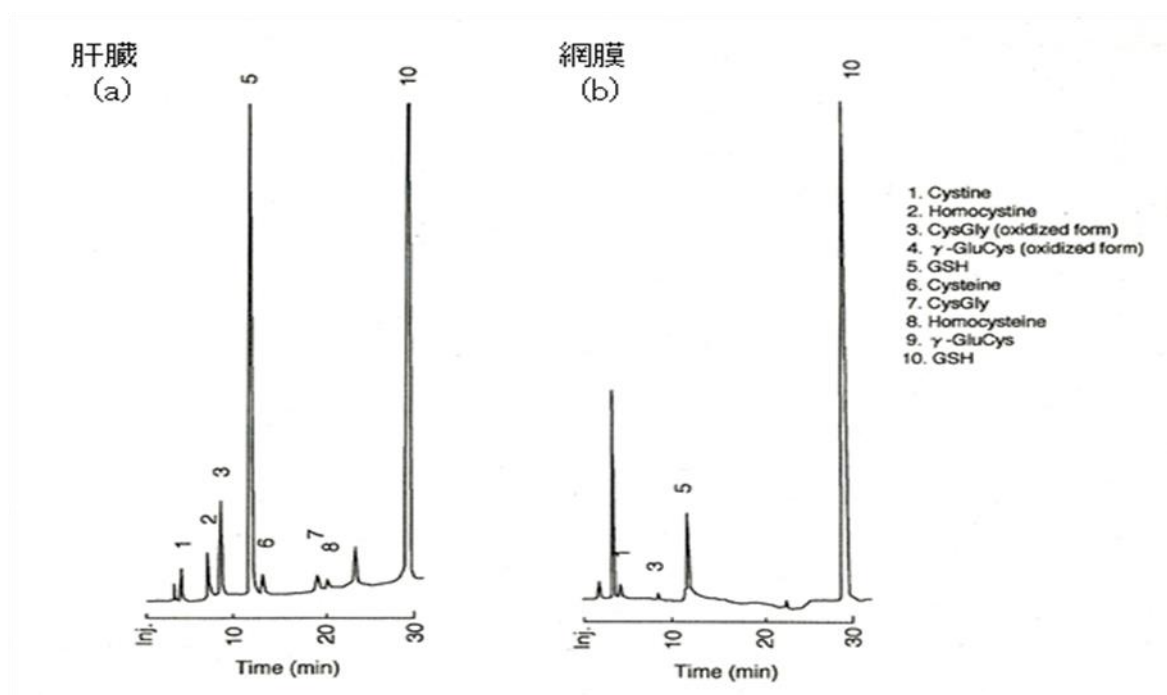


図3. 生体資料、(a)肝臓及び(b)網膜より得られたクロマトグラム

肝臓	正常ラット		糖尿病ラット	
GSH	5.03	± 0.36 ^a	6.04	± 0.21 ^a
GSSG	0.42	± 0.02 ^a	0.63	± 0.02 ^a
Cysteine	19.51	± 1.22 ^a	22.59	± 2.33 ^a
Cystine	29.22	± 0.97 ^a	32.66	± 1.74 ^a
CysGly	4.61	± 0.36 ^b	5.22	± 0.87 ^b
CysGly (oxidized)	0.09	± 0.01 ^b	0.12	± 0.01 ^b
γ -GluCys	N.D.		N.D.	
γ -GluCys (oxidized)	N.D.		N.D.	
Homocysteine	4.36	± 1.57 ^b	4.85	± 1.14 ^b
Homocystine	2.33	± 0.86 ^b	2.47	± 0.98 ^b

心臓	正常ラット		糖尿病ラット	
GSH	0.95	± 0.02 ^a	0.78	± 0.03 ^a
GSSG	0.19	± 0.01 ^a	0.21	± 0.01 ^a
Cysteine	N.D.		N.D.	
Cystine	0.057	± 0.002 ^a	0.056	± 0.001 ^a
CysGly	1.18	± 0.12 ^b	0.39	± 0.05 ^b
CysGly (oxidized)	0.39	± 0.01 ^b	0.32	± 0.03 ^b
γ -GluCys	N.D.		N.D.	
γ -GluCys (oxidized)	N.D.		N.D.	
Homocysteine	1.45	± 0.37 ^b	1.29	± 0.25 ^b
Homocystine	N.D.		N.D.	

腎臓	正常ラット		糖尿病ラット	
GSH	1.02	± 0.21 ^a	1.40	± 0.15 ^a
GSSG	0.05	± 0.01 ^a	0.07	± 0.01 ^a
Cysteine	0.10	± 0.01 ^a	0.15	± 0.01 ^a
Cystine	0.005	± 0.001 ^a	0.045	± 0.008 ^a
CysGly	6.82	± 1.23 ^b	6.00	± 1.77 ^b
CysGly (oxidized)	0.12	± 0.01 ^b	0.07	± 0.01 ^b
γ -GluCys	N.D.		N.D.	
γ -GluCys (oxidized)	N.D.		N.D.	
Homocysteine	0.52	± 0.09 ^b	0.63	± 0.15 ^b
Homocystine	N.D.		N.D.	

表 3 (a) 正常及びストレプトゾトシン糖尿病ラット臓器（肝臓，心臓，腎臓）中のグルタチオン及び関連ペプチド濃度 N.D.: Not Detectable ^a: μmol/g w.w. ^b: nmol/g w.w.

大脳	正常ラット			糖尿病ラット		
GSH	0.73	±	0.11 ^a	1.02	±	0.21 ^a
GSSG	0.03	±	0.00 ^a	0.03	±	0.01 ^a
Cysteine	0.058	±	0.009 ^a	0.06	±	0.01 ^a
Cystine	0.038	±	0.007 ^a	0.036	±	0.010 ^a
CysGly	1.73	±	0.45 ^b	2.55	±	0.95 ^b
CysGly (oxidized)	0.07	±	0.01 ^b	0.10	±	0.01 ^b
γ-GluCys	N.D.			N.D.		
γ-GluCys (oxidized)	N.D.			N.D.		
Homocysteine	0.18	±	0.07 ^b	0.13	±	0.09 ^b
Homocystine	N.D.			N.D.		

小脳	正常ラット			糖尿病ラット		
GSH	0.52	±	0.05 ^a	0.72	±	0.10 ^a
GSSG	0.02	±	0.01 ^a	0.03	±	0.00 ^a
Cysteine	0.072	±	0.01 ^a	0.06	±	0.00 ^a
Cystine	0.02	±	0.01 ^a	0.014	±	0.003 ^a
CysGly	0.71	±	0.06 ^b	1.18	±	0.10 ^b
CysGly (oxidized)	0.02	±	0.00 ^b	0.03	±	0.00 ^b
γ-GluCys	N.D.			N.D.		
γ-GluCys (oxidized)	N.D.			N.D.		
Homocysteine	0.11	±	0.05 ^b	0.19	±	0.03 ^b
Homocystine	N.D.			N.D.		

水晶体	正常ラット			糖尿病ラット		
GSH	1.82	±	0.16 ^a	1.90	±	0.33 ^a
GSSG	0.22	±	0.04 ^a	0.18	±	0.02 ^a
Cysteine	N.D.			N.D.		
Cystine	0.091	±	0.015 ^a	0.084	±	0.011 ^a
CysGly	1.13	±	0.26 ^b	0.42	±	0.06 ^b
CysGly (oxidized)	0.09	±	0.01 ^b	0.11	±	0.01 ^b
γ-GluCys	N.D.			N.D.		
γ-GluCys (oxidized)	N.D.			N.D.		
Homocysteine	N.D.			N.D.		
Homocystine	N.D.			N.D.		

表 3 (b) 正常及びストレプトゾトシン糖尿病ラット臓器 (大脳, 小脳, 水晶体) 中のグルタチオン及び関連ペプチド濃度 N.D.: Not Detectable ^a: μmol/g w.w. ^b: nmol/g w.w.

網膜	正常ラット		糖尿病ラット	
GSH	12.08	± 1.34 ^c	7.94	± 0.65 ^c
GSSG	9.02	± 2.03 ^c	6.22	± 1.33 ^c
Cysteine	N.D.		N.D.	
Cystine	0.29	± 0.02 ^c	0.32	± 0.03 ^c
CysGly	N.D.		N.D.	
CysGly (oxidized)	9.02	± 2.03 ^d	5.86	± 1.54 ^d
γ-GluCys	N.D.		N.D.	
γ-GluCys (oxidized)	N.D.		N.D.	
Homocysteine	N.D.		N.D.	
Homocystine	N.D.		N.D.	

表 3 (c) 正常及びストレプトゾトシン糖尿病ラット臓器（網膜）中のグルタチオン及び関連ペプチド濃度 N.D.: Not Detectable ^c: nmol/mg protein ^d: pmol/mg protein

型 CysGly (x1.3) について上昇した。しかし、γ-GluCys 及び Homocysteine については変動がなかった。（表 3 (a)）

心臓: GSH 及び還元型 CysGly が各々 86%, 32% に減少した。しかし、γ-GluCys 及び Homocysteine については変動がなかった。（表 3 (a)）

腎臓: GSH (x1.4), GSSG (x1.4), Cysteine (x1.5), Cystine (x9)が上昇した。しかし、還元型及び酸化型 CysGly については減少していた。しかし、γ-GluCys 及び Homocysteine については変動がなかった。（表 3 (a)）

大脳: GSH 及び還元型 CysGly が各々 1.4 倍に上昇した。γ-GluCys 及び Homocysteine については変動がなかった。（表 3 (b)）

小脳: GSH (x1.4), GSSG (x1.5), Cystine (x2), 還元型 CysGly (x1.6)及び酸化型 CysGly (x1.5) が上昇した。しかし、Cysteine は 83% に減少し、また、γ-GluCys 及び Homocysteine については変動がなかった。（表 3 (b)）

水晶体:還元型 CysGly が 37% に減少したが、

これ以外には殆ど変動はなかった。（表 3 (b)）

網膜: GSH, GSSG 及び酸化型 CysGly について各々 66%, 69%及び 65%に有意に減少した。しかし、肝臓同様 γ-GluCys 及び Homocysteine については変動がなかった。（表 3 (c)）

考察

グルタチオンは分光光度法⁵⁾, HPLC 法⁶⁾等、種々の測定法が報告されている。一般にグルタチオンの定量法としては DTNB を用いる分光光度法が広く用いられている⁵⁾。しかし、この方法は GSH 及び GSSG を測定するために二度の操作が必要であり、更に低感度であるという欠点がある。また、今まで報告されている HPLC 法は、分光光度法と同様に還元型及び酸化型物質を別々に定量するために二度の操作が必要であった。今回、還元型及び酸化型のグルタチオン及びその関連ペプチドの同時定量法について検討した結果、本定量法は約 30 分以内で 10 種類のグルタチオン及びその関連ペプチドの還元型及

び酸化型の同時定量が可能であり、分光光度法の約 100 倍の感度で測定できることが明らかとなった。

次に、この定量法を用いてストレプトゾトシン糖尿病ラット各組織中のグルタチオン及びその関連ペプチドの測定に応用した。一般に、糖尿病においてはグルコースの自動酸化で生じる $\cdot\text{OH}$ によりタンパク質の糖化が起こる。糖化タンパク質は酸素と反応し O_2^- を生成し、生じた $\cdot\text{OH}$ 及び O_2^- は脂質加酸化反応を惹起する。その結果種々の障害を引き起こすことが知られている⁸⁾。ストレプトゾトシン糖尿病ラットでは、肝臓、腎臓、脳、網膜及び水晶体で正常ラットと比較して GSH が減少すること⁹⁾、またこの減少は GSH の前駆体となるアミノ酸の取り込みの減少によるものであることが報告されており¹⁰⁾、これらの研究から水晶体における Cysteine プールの枯渇が GSH の枯渇に関与している可能性が示唆されている。

今回、ストレプトゾトシン投与によって生じる $\cdot\text{OH}$ 及び O_2^- の攻撃を受けやすい組織についてグルタチオン及びその関連ペプチドの酸化型及び還元型の変動について検討した。その結果、肝臓、腎臓、大脳及び小脳で GSH が上昇した。またこの時、GSSG 及び小脳を除く各臓器中で Cysteine に増加傾向が見られたことにより、GSH 合成系が活性化され活性酸素の除去が活発に起こっている可能性が示唆された。これは、ストレプトゾトシン投与により生じた $\cdot\text{OH}$ 及び O_2^- に対する防御機構として、親電子性物質の解毒化酵素であるグルタチオン S-転移酵素や NAD(P)H キノン還元酵素等の異物代謝酵素群、グルタチオン合成酵素やヘムオキシゲナーゼ 1 等の酸化ストレス防御遺伝子群等を統一的に誘導する Nrf2/Keap1 を介した防御機構が活性化さ

れたため酸化ストレスに対する応答が起こったと考えられる^{11,12)}。一方、網膜では GSH, GSSG だけでなく酸化型 Cysteine 及び CysGly の減少も見られた。 $\cdot\text{OH}$ 及び O_2^- の酸化ストレスが GSH 等を減少させ、その結果 Nrf2/Keap1 が活性化され、その後肝臓をはじめとする他の臓器と同様に GSH の上昇が起こると推察される。実際アセトアミノフェン投与による急性肝障害では、肝臓中 GSH の減少後の GSH の上昇が報告されている¹³⁾。

今回確立した定量法によって、ストレプトゾトシン糖尿病ラットにおける臓器内グルタチオン及び関連ペプチドの変動を知ることが出来た。この結果から、糖尿病に対する生体防御機構をグルタチオンの持つ抗酸化作用の面から考察することが出来た。グルタチオンは生体中の最も重要な抗酸化物質の一つであり、生体における防御機構を明らかにするうえで本定量法が重要であること、さらに酸化ストレスに対するグルタチオン合成・分解の解析にも応用できることが示唆された。

引用文献

- 1) Ji L.L., Fu R.: Response of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide., *Am. J. Physiol.*, 189 549-554 (1992)
- 2) Paulus C., Koller B., Jacobsen H.J.: Physiological and biochemical characterization of glyoxylase I, a general marker for cell proliferation, from a soybean cell suspension., *Planta.*, 189 561-556 (1993)
- 3) Meister A.: On the enzymology of amino acid transport., *Science*, 180 33-39 (1973)
- 4) Jakoby W.B.: Glutathione transferase: an overview. *Meth. Enzymol.*, 113 495-499 (1995)
- 5) Matsumoto S., Teshigawara M., Tsuboi S., Ohmori S.: Determination of glutathione disulfide in biological samples using acrylonitrile as a thiol-blocking reagent., *Anal. Biochem.*, 144

- 553-562 (1996)
- 6) Wang X., Chi D., Song D., Su G., Shao L.: Quantification of glutathione in plasma samples by HPLC using 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan as a fluorescent labeling reagent., *J. Chromatogr. Sci.*, 50 119-122 (2012)
- 7) Toyo'oka T., Imai K.: High-performance liquid chromatography and fluorometric detection of biologically important thiols, derivatized with ammonium 7-fluoro-2-oxo-1,3-diazole-4-sulfonate., *J. Chromatogr.*, 282 495-500 (1983)
- 8) 仁木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃 真: 抗酸化物質 フリーラジカルと生体制御, 学会出版センター 1994
- 9) Kowluru R., Kem T.S., Engerman R.L.: Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or galactosemia. II. Comparison of γ -glutamyl transpeptidase in retina and cerebral cortex, and effects of antioxidant therapy., *Curr. Eye. Res.*, 13(12) 891-896 (1994)
- 10) Lou M.F., Dickerson J.E., York B.M.: Glutathione depletion in the lens of galactosemic and diabetic rats., *Exp. Eye Res.*, 46 517-530 (1988)
- 11) 伊東 健: Nrf2/Keap1 を介した酸化ストレス防御機構, 生化学, 78(2) 79-92 (2006)
- 12) 伊東 健: Nrf2 酸化ストレス応答による病態制御, 生化学, 81(6) 447-455 (2009)
- 13) Rzucidlo S.J., Bounous D.I., Jones D.P., Brackett B.G.: Acute acetaminophen toxicity in transgenic mice with elevated hepatic glutathione., *Vet. Human Toxicol.*, 42(3) 146-150 (2000)