

グルタチオン関連ペプチドの生理的意義

守谷 智恵, 川上 賀代子, 坪井 誠二*

就実大学 薬学部 生化学研究室

Physiological functions of glutathione-related peptides

Chie Moritani, Kayoko Kawakami, Seiji Tsuboi*

Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shujitsu University

(Received 13 October 2016; accepted 27 October 2016)

Abstract: Glutathione (GSH) with the structure γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine is a ubiquitous and predominant non-protein sulfhydryl compound in all kinds of living cells, bacteria, yeast and animal cells. It is well-known that GSH has several physiological functions like the antioxidant and regulator of intracellular redox state. Although glutathione-related peptides are also widely distributed in microorganism, plants and animals, its physiological functions are as yet unclear. S-(1,2-dicarboxyethyl) glutathione (DCE-GS), one of glutathione-related peptide was isolated from calf lens in 1963. It was found that DCE-GS inhibited blood coagulation and platelet aggregation, protected acetaminophen-induced hepatotoxicity and elevated GSH level in hepatocytes as physiological functions. In this paper, we report the physiological functions of glutathione-related peptide, especially DCE-GS.

Keywords: glutathione; glutathione-related peptide; redox regulation

1. はじめに

グルタチオンはグルタミン酸, システイン, グリシンの3つのアミノ酸からなる γ -グルタミルペプチドであり, 生体中に最も高濃度 (mMレベル) に存在する非タンパク性チオールである. 細胞中には還元型と2分子の還元型がジスルフィド結合でつながった酸化型として存在し, 通常, ほとんど (98%以上) が還元型として存在する. 生理活性については, 抗酸化作用, 解毒作用等,

多くの生理活性を有することが報告されている¹⁻⁴⁾.

また, γ -グルタミルペプチドを含むグルタチオン関連ペプチドは微生物及び動植物, 主にマメ科, ユリ科, 担子菌類に広く見出されており⁵⁻⁸⁾, 哺乳類についての報告は少ない. グルタチオン以外の γ -グルタミルペプチドの合成・分解経路, 及び生理機能はほとんど不明であり, 今後の大きな研究分野である. 本稿では, グルタチオン関連ペ

プチド (表 1) について現在までに得られている知見を紹介する。

2. グルタチオン関連ペプチドの生理活性

1) ホモグルタチオン

ホモグルタチオンは、1963年 Carnegie⁹⁾によって *Phaseolus aureus* に見出された最初のグルタチオン関連ペプチドである。マメ科の植物に広く分布しており、システイン残基の SH 基が存在することから抗酸化物質と考えられている。銅の負荷により葉や根における含量が上昇することからも抗酸化物質としての生理活性が推察されている¹⁰⁾。

2) グルタチオニルスペルミジン

グルタチオニルスペルミジンは、1963年 Carnegie により、定常期及び嫌気的狀態での大腸菌に検出された¹¹⁾。対数増殖期では、ほとんどのスペルミジンは遊離の状態であり、グルタチオニルスペルミジンとしては全グルタチオン量の約3%程度であるが、定常期になるとグルタチオンと共有結合しグルタチオニルスペルミジンとして約11%存在する。更に、嫌気的条件下の定常期においては、主要なチオールとなり全グルタチオン量の80%に達する¹²⁾。グルタチオニルスペルミジンは、ポリアミン類の貯蔵形態とも考えられるが、グルタチオンとポリアミン類がともに細胞増殖と関係していることから考えて、グルタチオニルスペルミジンにも同様な作用が期待される。

熱帯病の原因である寄生虫トリパノソーマではスペルミジン2分子がグルタチオンと共有結合したトリパノチオン、酸化型トリパノチオン、酸化型グルタチオニルスペルミジン及びグルタチオニルスペルミジンとグルタチオンのジスルフィド化合物等も検出されており¹³⁾、熱帯病の治療薬としての開発が期待されている。

3) オフタルミン酸

オフタルミン酸は、通常のグルタチオン合成反応系によって生合成され、システインの代わりに α -アミノ酪酸が使われる。このペプチドは1956

年 Waley によって仔牛水晶体に見出された¹⁴⁾。水晶体に局在し、他の臓器にはあまり含まれておらず、含まれていたとしても極微量である。近年、マウスのアセトアミノフェン誘導肝障害における血清中に上昇することが報告された。即ち、肝臓中のグルタチオンが毒物や異物に結合して消費されると、 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -GCS) が活性化されグルタチオンが合成される。同時に γ -GCS とグルタチオン合成酵素によって、2-アミノ酪酸を基質としてオフタルミン酸が肝臓内で生合成され血中に排泄される。肝臓内のグルタチオンが枯渇すると血中のオフタルミン酸が上昇するため、血中のオフタルミン酸は肝臓内のグルタチオンの枯渇を示すバイオマーカーとなることが示された^{15,16)}。

4) S-メチルグルタチオン

S-メチルグルタチオンは酵母¹⁷⁾、大腸菌¹⁸⁾及び脳組織¹⁹⁾に見出された。S-メチルグルタチオンの生合成は、酵母では通常のグルタチオン生合成系においてシステインの代わりに S-メチルシステインが基質となるが¹⁷⁾、大腸菌ではメチル基転移酵素によってグルタチオンが直接メチル化される¹⁸⁾。生理活性についてはあまり報告はないが、近年、 Ca^{2+} 感受性受容体において正のアロステリック因子であることが報告されている²⁰⁾。

5) S-スルホグルタチオン

S-スルホグルタチオンは、1959年 Waley により仔牛水晶体中に²¹⁾、また1964年 Robinson によりラット小腸において見出された²²⁾。生理活性は明らかになっていないが、無機硫酸代謝の重要な代謝物である²³⁾。

6) S-ラクトイルグルタチオン

S-ラクトイルグルタチオンはメチルグリオキサールとグルタチオンを基質としてグリオキサラーゼ I の触媒する反応により生合成される。S-ラクトイルグルタチオンの生理活性としては、ヒスタミン放出の促進²⁴⁾、及び、微小管の集合促進²⁵⁾等が報告されており多岐にわたっている。S-ラクトイルグルタチオンをはじめとするグルタチ

表1 微生物及び動植物中に存在するグルタチオン関連ペプチド

名称及び構造式	起源	生理活性
グルタチオン $\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}}{\text{CH}}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	酵母	補酵素 細胞膜の維持 ラジカルスカベンジャー作用 解毒作用 アミノ酸輸送等
ホモグルタチオン $\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}}{\text{CH}}-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH}$	<i>Phaseolus aureus</i>	抗酸化物質
グルタチオニルスペルミジン $\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}}{\text{CH}}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CONH}(\text{CH}_2)_4-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	<i>E. coli</i>	ポリアミン類の貯蔵 形態及び細胞増殖
オフタルミン酸 $\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}}{\text{CH}}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	水晶体	肝臓内グルタチオン枯渇の バイオマーカー
S-メチルグルタチオン $\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{S}-\text{CH}_3 \end{array}}{\text{CH}}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	酵母	Ca ²⁺ 感受性受容体における 正のアロステリック因子
S-スルホグルタチオン $\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{S}-\text{SO}_3\text{H} \end{array}}{\text{CH}}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	水晶体	無機硫酸代謝に関与
S-ラク トイルグルタチオン $\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{S}-\text{COCH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}}{\text{CH}}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	肝臓	ヒスタミン放出促進及び微 小管の集合促進
S-(2-Carboxypropyl) glutathione $\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}}{\text{CH}}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	玉ネギ, ニンニク	不明
S-(1, 2-Dicarboxyethyl) glutathione $\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{S}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}}{\text{CH}}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	水晶体	抗炎症・抗アレルギー作用 肝障害抑制作用 グルタチオン上昇作用

オンチオールエステルの生理機能の解明は今後の課題である。

7) S-(2-Carboxypropyl)glutathione

1960年 Virtanen によりタマネギ中に見出された²⁶⁾。その後、定量法が確立されニンニクをはじめとする植物中に存在することが確認された²⁷⁾。このペプチドはバリンとグルタチオンを基質として生合成されるが²⁸⁾、その生理活性については不明である。

8) S-(1,2-Dicarboxyethyl)glutathione (DCE-GS)

1963年 Calam により水晶体中に存在することが明らかとされた²⁹⁾。しかし、それ以降このペプチドに関しての報告はされていない。ここでは我々の研究結果を中心に本ペプチドの生理活性等について紹介する。

(1) 生体中の分布

ラットでは水晶体、肝臓、心臓中に存在し、特に水晶体には 119 nmol/g 組織と最も多く存在していた³⁰⁾。

(2) 生合成経路

本ペプチドはグルタチオンとリンゴ酸を基質として生合成されることから、合成酵素を精製し性質を検討したところ、今まで報告されていない新しいタイプのグルタチオン S-トランスフェラーゼであった³⁰⁾。

(3) 血液凝固及び血小板凝集抑制作用

DCE-GS は ADP, トロンビン, コラーゲン, アラキドン酸によって引き起こされる血小板凝集を抑制することを明らかにした³¹⁾。その作用機序は、DCE-GS の添加によりアデニル酸シクラーゼが活性化し、血小板中 cAMP 濃度が上昇することにより引き起こされることを証明した³²⁾。

(4) DNA 合成促進作用

ラット培養肝細胞において上皮成長因子による DNA 合成が、DCE-GS の添加により 1.5 倍に上昇した³³⁾。また、ラット肝再生中に、DNA 合成の促進に伴って肝臓中の DCE-GS 含量が 5 倍に上昇することも明らかにした³⁴⁾。

(5) 抗炎症及び抗アレルギー作用

DCE-GS が細胞内 cAMP 濃度を上昇させる作用を有することから、DCE-GS の抗炎症及び抗アレルギー作用について検討した³⁵⁾。

a ラットカラゲニン結膜浮腫形成に対する抑制効果

起炎剤として 1%カラゲニン液をラット右眼瞼結膜下に注射することによりカラゲニン浮腫を惹起した。DCE-GS は用量依存的に眼瞼結膜の浮腫形成を抑制した。10 mg/kg の投与で抑制率は 37.3%であった。

b ラット肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する抑制作用

ラット腹腔浮遊液を用いて Compound 48/80 の添加により、ヒスタミン遊離を誘導した。DCE-GS は濃度依存的にヒスタミン遊離を抑制し、1 mM で抑制率は 96.1%であった。

c ラット背部受動的アナフィラキシー反応に対する抑制効果

ラットの両大腿部の筋肉内に Chicken egg albumin を注射し、同時に百日咳・ジフテリア・破傷風混合ワクチンを腹腔内に投与して感作した後、採血し抗血清を得た。ラット背部受動的アナフィラキシー反応は、作製した抗血清をラット背部皮内に注射した後、抗原である Chicken egg albumin を尾静脈内投与することにより惹起した。DCE-GS は用量依存的に背部受動的アナフィラキシー反応を抑制した。30 mg/kg の投与で抑制率は 43.4%であった。

d ラット Compound 48/80 結膜炎に対する抑制効果

結膜炎は Compound 48/80 を両眼に点眼することにより惹起した。DCE-GS 点眼液は用量依存的に結膜炎反応を抑制した。5% DCE-GS 点眼液の投与で抑制率は 43.4%であり有意な効果を示した。

e 家兎角膜内皮培養細胞内の cAMP 量に対する上昇作用

DCE-GS の添加により家兎角膜内皮培養細胞内 cAMP 量は濃度依存的に有意に上昇し、上昇率は 2 mM DCE-GS の添加で 4.3

倍であった。前述したように DCE-GS による cAMP 上昇作用は血小板においてもみられた。

(6) 肝障害抑制作用

DCE-GS は肝細胞において上皮成長因子との併用により細胞増殖を相乗的に促進し³³⁾、また、肝再生中に DNA 合成促進とともに肝臓中の DCE-GS 含量が上昇する³⁴⁾ことから、DCE-GS が肝障害後の肝修復に何らかの役割を果たしていることが示唆された。そこで、DCE-GS の細胞内への移行性を高めるために DCE-GS のトリエステル体 Isopropyl S-(1,2-diethoxycarbonylethyl) glutathione (DCE-Et-GS iPr) を合成し (図 1)、アセトアミノフェン誘導急性肝障害に対する効果について検討した。500 mg/kg アセトアミノフェンの投与により血清中 AST 活性は約 62 倍に上昇した。DCE-Et-GS iPr はこのアセトアミノフェン投与による血清中 AST 活性の上昇を用量依存的に抑制した。抑制率は 2 mmol/kg の投与の場合 99.3%であった (表 2)。また、アセトアミノフェンの投与により肝細胞壊死や炎症性細胞が肝中心静脈周辺でみられた。しかし、DCE-Et-GS iPr の投与により、これらの細胞壊死や炎症性細胞はみられなくなり、ほぼ正常に近い像が得られた³⁶⁾。

アセトアミノフェンは、通常薬物代謝系酵素を介して代謝され、グルクロン酸あるいは硫酸抱合体として尿中に排泄される。しかし、アセトアミノフェンの大量投与により活性代謝物である N-acetylimidoquinone が過剰に生じると、肝臓中グルタチオンが枯渇し肝細胞壊死が引き起こされる。従って、アセトアミノフェン誘導肝障害は N-acetylcysteine のような細胞内グルタチオンレベルを維持する物質の投与により抑制されること

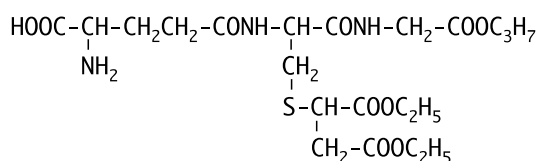


図 1 DCE-Et-GS iPr の構造

表 2 ラットアセトアミノフェン肝障害に対するDCE-Et-GS iPr の用量効果

DCE-Et-GS iPr (mmol/kg)	血清 AST (U/L)	抑制率 (%)
0	5359±12	—
0.125	2522±71	52.9
0.25	1162±52	78.3
0.5	402±24	92.5
2	37±3	99.3

値は平均±標準誤差 (n=3~5) を示す。

表 3 ラットアセトアミノフェン肝障害による肝グルタチオン減少に対するDCE-Et-GS iPr の効果

	Glutathione (μmol/g liver)	% of Control
Control	3.03±0.21	100
APAP alone	1.03±0.22	34.0
DCE-Et-GS iPr alone	4.51±0.15	149
DCE-Et-GS iPr and APAP	2.80±0.35	92.4

値は平均±標準誤差 (n=3~5) を示す。

が報告されている³⁷⁻³⁹⁾。DCE-Et-GS iPr の投与により肝障害が抑制されたことから、この投与の肝臓中グルタチオンレベルへの影響について検討した。アセトアミノフェンの投与により肝臓中グルタチオン量は減少したが、DCE-Et-GS iPr の投与によりこの減少はほとんど抑制された。また、DCE-Et-GS iPr を単独で投与した場合においても、肝臓中グルタチオン量の上昇がみられた (表 3)。

(7) グルタチオン上昇作用

次に、DCE-Et-GS iPr 投与により肝臓中グルタチオン量が上昇したことから、DCE-GS によるグルタチオン上昇機序について検討した。グルタチオンはγ-GCS 及びグルタチオン合成酵素の2つの酵素によって合成されるが、この生合成過程での律速酵素はγ-GCS であり、この酵素はグルタチオンによりフィードバック阻害を受けていることが明らかとなっている⁴⁰⁾。近藤らは 2,4-dinitrophenylglutathione のようなグルタチオン関連ペプチドにより、グルタチオンによるγ-GCS のフィードバック阻害が解除されることを報告した (図 2)⁴¹⁾。このことにより著者らは DCE-GS がグルタチオンによるγ-GCS のフィードバック阻害を解除するのではないかと考え検討し

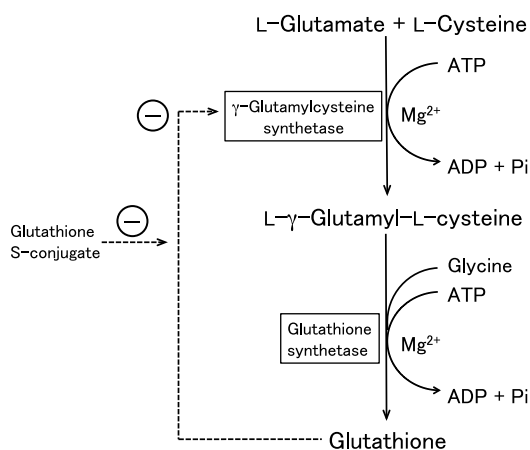


図2 グルタチオン関連ペプチドのグルタチオンによるγ-GCSのフィードバック阻害の解除

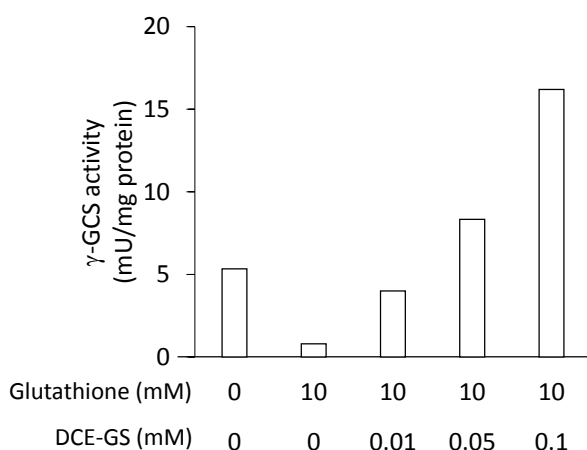


図3 グルタチオンによるγ-GCSのフィードバック阻害に対するDCE-GSの作用

た。その結果、DCE-GSはグルタチオンによるγ-GCSのフィードバック阻害を解除するだけでなく、γ-GCSそのものを活性化することが明らかとなった(図3)。しかし、DCE-GSのトリエステル体であるDCE-Et-GS iPrそのものにはこの効果は無いことから、DCE-Et-GS iPrは細胞内に取り込まれた後、加水分解されDCE-GSに変換された後に、γ-GCSを活性化しグルタチオン合成を促進することにより肝臓中グルタチオン量を上昇させることが示唆された⁴²⁾。

3. 終わりに

グルタチオン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。グルタチオンは抗酸化作用等種々の生理活性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¹⁻⁴⁾。しかし、グルタチオン関連ペプチドについては、存在は報告されているものの生理活性についてはほとんど検討されていない。

本稿では、今まで報告されているグルタチオン関連ペプチド、特に、DCE-GSが種々の生理活性を有することを紹介した。特に、細胞内cAMP量上昇作用による血小板凝集抑制作用^{31,32)}、また、抗炎症及び抗アレルギー作用³⁵⁾、更に、細胞内中グルタチオン量上昇作用による肝障害抑制作用^{36,37)}については注目すべきところである。実際、DCE-GSが血液房水柵破綻の防御作用を有することから、医薬品への応用として眼内灌流液としての評価が検討されている。

また、最近オフタルミン酸が肝臓内のグルタチオンの枯渇を示すバイオマーカーとして注目されており^{15,16)}、更に、S-メチルグルタチオンはCa²⁺感受性受容体において正のアロステリック因子であることが報告されている²⁰⁾。このように、グルタチオン関連ペプチドの研究はまだ端緒にすぎないばかりであり、今後の更なる生理活性の解明及び臨床への応用に期待が集まるところである。

引用文献

- 1) Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Davis, D.C., Gillette, J. R., and Brodie, B. B.: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **187**, 185-194 (1973).
- 2) Gibson, J.D., Pumford, N.R., Samokyszyn, V.M., Hinson, J. A.: Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress., *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 580-585 (1996).
- 3) Wallace, J. L.: Acetaminophen hepatotoxicity: NO to the rescue., *Br. J. Pharmacol.* **143**, 1-2 (2004).

- 4) Hinson, J.A., Reid, A.B., McCullough, S.S., and James L.P.: Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition., *Drug Metab. Rev.* **36**, 805–822 (2004).
- 5) Liao, D., Cram, D., Sharpe, A.G., and Marsolais, F.: Transcriptome profiling identifies candidate genes associated with the accumulation of distinct sulfur γ -glutamyl dipeptides in *Phaseolus vulgaris* and *Vigna mungo* seeds., *Front. Plant Sci.*, **4**, 1-12 (2013).
- 6) Kasai, T. and Larsen, P.O.: Chemistry and biochemistry of γ -glutamyl derivatives from plants including mushrooms (Basidiomycetes). *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **39**, 173–285 (1980).
- 7) Kasai, T., Shiroshita, Y. and Sakamura, S.: γ -Glutamyl peptides of *Vigna radiate* seeds., *Phytochemistry*, **25**, 679–682 (1986).
- 8) Giada, M.D.L.R., Miranda, M. T. M. and Marquez, U. M. L.: Sulphur γ -glutamyl peptides in mature seeds of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Food Chem.*, **61**, 177–184 (1998).
- 9) Carnegie, P.R.: Structure and properties of a homologue of glutathione., *Biochem. J.*, **89**, 471-478 (1963).
- 10) Price, C.A.: A new thiol in legumes., *Nature*, **180**, 148-149 (1957).
- 11) Tabor, H. and Tabor, C.W.: Isolation, characterization, and turnover of glutathionylspermidine from *Escherichia coli.*, *J. Biol. Chem.*, **250**, 2648-2654 (1975).
- 12) Smith, K., Borges, A., Ariyanayagam, M.R. and Fairlamb, A.H.: Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli.*, *Biochem. J.*, **312**, 465-469 (1995).
- 13) Fairlamb, A.H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B.T. and Cerami, A.: Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids., *Science*, **227**, 1485-1487 (1985).
- 14) Waley, S.G.: Acidic peptides of the lens., *Biochem. J.*, **64**, 715-726 (1956).
- 15) Soga, T., Baran, R., Suematsu, M., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakurakawa, T., Kakazu, Y., Ishikawa, T., Robert, M., Nishioka, T. and Tomita M.: Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption., *J. Biol. Chem.*, **281**, 16768-16776 (2006).
- 16) Geenen, S., du Preez, F.B., Snoep, J.L., Foster, A.J., Sarda, S., Kenna, J.G., Wilson, I.D. and Westerhoff, H.V.: Glutathione metabolism modeling: a mechanism for liver drug-robustness and a new biomarker strategy., *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 4943-4959 (2013).
- 17) Maw, G.A. and Coyne, C.M.: The metabolism of S-methylcysteine in yeasts., *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, 241-251 (1968).
- 18) Terwilliger, T.C., Bollag, G.E., Sternberg, D.W Jr. and Koshland, D.E. Jr.: S-methyl glutathione synthesis is catalyzed by the cheR methyltransferase in *Escherichia coli.*, *J Bacteriol.*, **165**, 958-963 (1986).
- 19) Kanazawa, A., Kakimoto, Y., Nakajima, T. and Sano I.: Identification of gamma-glutamylserine, gamma-glutamylalanine, gamma-glutamylvaline and S-methylglutathione of bovine brain., *Biochim. Biophys. Acta*, **111**, 90-95 (1965).
- 20) Broadhead, G.K., Mun, H.C., Avlani, V.A., Jourdon, O., Church, W.B., Christopoulos, A., Delbridge, L. and Conigrave, A.D.: Allosteric modulation of the calcium-sensing receptor by γ -glutamyl peptides: inhibition of PTH secretion, suppression of intracellular cAMP levels, and a common mechanism of action with L-amino acids., *J. Biol. Chem.*, **286**, 8786-8797 (2011).
- 21) Waley, S.D.: Acidic peptides of the lens. 5. S-

- Sulphoglutathione., *Biochem. J.*, **71**, 132-137 (1959).
- 22) Robinson, H.C. and Pasternak C.A.: The isolation of S-sulphoglutathione from the small intestine of the rat., *Biochem. J.*, **93**, 487-492 (1964).
- 23) Robinson, H.C.: The reduction of inorganic sulphate to inorganic sulphite in the small intestine of the rat., *Biochem. J.*, **94**, 687-691 (1965).
- 24) Gillespie, E.: Effects of S-lactoylglutathione and inhibitors of glyoxalase I on histamine release from human leukocytes., *Nature*, **277**, 135-137 (1979).
- 25) Gillespie, E.: Concanavalin A increases glyoxalase enzyme activities in polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes., *J. Immunol.*, **121**, 923-925 (1978).
- 26) Virtanen, A. and Matikkala, E.J.: Neue γ - Glutamylpeptide in Zwiebel (*Allium cepa*)., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **322**, 8-20 (1960).
- 27) Tsuboi, S., Kishimoto, S., Ohmori, S.: S-(2-Carboxypropyl)glutathione in vegetables of Liliflorae., *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 611-615 (1989).
- 28) Suzuki, T., Sugii, M. and Kakimoto, T.: Metabolic incorporation of L-valine-[¹⁴C] into S-(2-carboxypropyl)glutathione and S-(2-carboxypropyl)cysteine in garlic., *Chem. Pharm. Bull.*, **10**, 328-331 (1962).
- 29) Calam, D.H. and Waley, S.G.: Acidic peptides of the lens. 8. S-(alpha beta-dicarboxyethyl) glutathione., *Biochem J.*, **86**, 226-231 (1963).
- 30) Tsuboi, S., Kobayashi, M., Nanba, M., Imaoka, S. and Ohmori S.: S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione and activity for its synthesis in rat tissues., *J. Biochem.*, **107**, 539-545 (1990).
- 31) Tsuboi, S., Ohnaka, M., Ohmori, S., Sakaue, T., Ogata, K., Itano, T. and Hatase O.: Inhibition of platelet aggregation by S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione, intrinsic tripeptide in liver, heart, and lens., *Arch. Biochem. Biophys.*, **279**, 146-150 (1990).
- 32) Tsuboi, S., Fujiwara, E., Ogata, K., Sakaue, A., Nakayama, T. and Ohmori S.: Inhibitory effects of S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione on collagen-induced platelet aggregation; enhancements of cyclic AMP level and adenylate cyclase activity in platelets by S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1083-1086 (1993).
- 33) Miyazaki, M., Bai, L., Tsuboi, S., Ohmori, S., Ogata, K., Sato J. and Namba, M.: Enhancing effect of S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione on epidermal growth factor-stimulated DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes., *Res. Exp. Med.*, **190**, 381-387 (1990).
- 34) Tsuboi, S., Miyazaki, M., Kondo, Y., Kiyono, K., Fujiwara, E., Ogata, K., Sakaue, T., Namba, M. and Ohmori, S.: Increase of S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione in regenerating rat liver., *Res. Exp. Med.*, **192**, 281-286 (1992).
- 35) Sakaue, T., Ohhira, M., Ogata, K. and Ohmori, S.: Physiological activities of S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione as an intrinsic tripeptide present in liver, heart and lens., *Arzneimittelforschung.*, **42**, 1482-1486 (1992).
- 36) Sakaue, T., Matsumoto, S., Tsuboi, S., Ogata, K. and Ohmori, S.: Protective effect of S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione, an intrinsic tripeptide in liver, heart and lens, and its esters on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1216-1219 (1996).
- 37) Hinson, J.A., Pumford, N.R and Roberts D.W.: Mechanisms of acetaminophen toxicity: immunochemical detection of drug-protein adducts., *Drug Metab. Rev.*, **27**, 73-92 (1995).
- 38) Welty, S.E., Smith, C.V., Benzick, A.E., Montgomery, C.A. and Hansen, T.N.: Investigation of possible mechanisms of hepatic

- swelling and necrosis caused by acetaminophen in mice., *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 449-458 (1993)
- 39) Corcoran, G.B., Todd, E.L., Racz, W.J., Hughes, H., Smith, C.V. and Mitchell, J.R.: Effects of N-acetylcysteine on the disposition and metabolism of acetaminophen in mice., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **23**, 857-863 (1985).
- 40) Richman P.G. and Meister A.: Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione., *J. Biol. Chem.*, **250**, 1422-1426 (1975).
- 41) Kondo, T., Taniguchi, N. and Kawakami Y.: Significance of glutathione S-conjugate for glutathione metabolism in human erythrocytes., *Eur. J. Biochem.*, **145**, 131-136 (1984.)
- 42) Nakagawa, N., Tsuboi, S., Kaneko, N., Sakaue, T., Ogata, K. and Ohmori S.: S-(1,2-Dicarboxyethyl)glutathione, intrinsic tripeptide in liver, heart and lens, elevates γ -glutamylcysteine synthetase activity., *Prot. Pep. Let.*, **3**, 355-360 (1996).