ノ ー ト

グルタチオンを基質にした血清 γ -グルタミルトランスフェラーゼ 活性のアンペロメトリー

木 下 英 明*

Amperometric assay of γ -glutamyltransferase using glutathione as a substrate

Hideaki KINOSHITA*

*Department of Human Relations, Kwassui Women's College, 1-50, Higashi-yamate, Nagasaki 850-8515

(Received 5 July 2002, Accepted 26 October 2002)

The magnitude of the steady-state current by a sulfhydryl compound at a dialysis membrane (molecular cut off: 5000) covered cobalt phthalocyanine-embedded electrode was inversely proportional to the molecular weight. That is, the currents by 1 μ M glutathione (GSH), glutamylcysteine and cysteine at 200 mM and at pH 8.3 were 0.07, 0.14 and 0.39 nA, respectively. The activity of γ -glutamyltransferase (γ -GT) in serum was determined by measuring the current increase for a given time due to the degradation of GSH to cysteinylglycine in a 0.1 M tris buffer of pH 8.3 containing 1.2 mM GSH, 50 mM glycylglycine and 5 mM EDTA. The activities of γ -GT determined amperometrically using GSH as a substrate for sixteen serum samples were in good agreement with those determined by a colorimetric method using γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide (Glucana) as a substrate ($r = 0.98$).

Keywords : γ -glutamyltransferase; glutathione; amperometry; cobalt phthalocyanine; membrane-covered electrode; serum.

1 緒 言

試料中の高分子化合物による電極面の汚染を防止するため、安定した定常状態の電流を得る目的で、透析膜を電極に被覆することが行われている。この電極で測定される電流値は、電気化学的に同じ活性基を持つもの同士が同濃度で存在する場合は、膜透過速度の大きい、つまり分子量の小さいものほど一般的に大きい。このような電極を用いると、電気化学的に活性な基を持つ基質の分解反応では、電流値は時間とともに増大するので、簡便に反応を追跡できる¹⁾²⁾。 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GT) はじん臓、すい臓に多く存在する酵素であるが、血中のそれはほとんどが肝臓由来である。 γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド (Glucana) を基質に、グリシルグリシン (Gly-Gly) を γ -グルタミル基の受容体として、遊離

する 3-カルボキシ-4-ニトロアニリドを分光法で測定することで γ -GT 活性が算出され、その値は肝疾患の指標とされている。 γ -GT は生体内ではグルタチオン (GSH) の代謝にかかわると言われており、GSH を基質にした肝臓及びじん臓の γ -GT の活性が測定されているが、それらは放射性同位元素でグルタミル基を標識した基質を用いる³⁾、あるいは遊離するグルタミン酸を酵素法で測定する⁴⁾もので、簡便なものではない。一方、GSH を基質にした血清 γ -GT の測定については報告されていない。タンパク質共存下で GSH の測定が困難なことが、その理由の一つかと思われる。GSH が分解されてシスティニルグリシン (Cys-Gly) が生じると、被膜電極では電流は増加し、その時間変化から γ -GT 活性が簡便に測定できると考えられる。本報告では γ -GT の本来の基質と考えられている GSH を使用して、血清の γ -GT 活性を電気化学的に測定し、Glucana を基質にした分光法による値と比較したことについて述べる。本測定ができたことは、コバルトフタロ

* 活水女子大学人間関係学科: 850-8515 長崎県長崎市東山手町 1-50

シアニン (CoP) を練り込んだカーボンペースト表面に透析膜を被覆した電極⁵⁾が、血清成分のほとんどに対して電気化学的に不活性で、基底電流の小さい 200 mV でスルフィドリル化合物に応答することによっている。

2 実 験

2.1 試 薬

GSH, グルタミルシステイン (Glu-Cys), 及びシステイン (Cys) は興人製, Gly-Gly はナカライテスク製, γ -GT (ウシじん臓由来, 25°C, pH 8.5 で γ -グルタミル-L-プロアニリドを 1 μ M 分解するとき 1 ユニット) はシグマ製をそのまま使用した。

2.2 電 流

粉末グラファイト 300 mg, パラフィンオイル 100 mg, 及び Cop (東京化成製) 50 mg を練り合わせ, BAS 製のカーボンペースト電極の凹部に堅く詰め, 電極表面を滑らかにした後, 直径 6 mm に丸く切ったスペクトラム製の透析膜 (分画分子量 5000) を載せ, それをナイロンネットで覆い, 電極側面でナイロンネットをラボラトリーフィルムで固定し, 繰り返し使用可能な電極を作製した。

2.3 電気化学測定

柳本ポーラログラフィックアナライザー P1100, 及び東亜電波 tY レコーダー 151-A を用いて, 36°C で, 基質及び血清を含む 1.5 ml の 0.1 M トリス緩衝液 (pH 8.3) を直径 1 cm の磁気回転子でかきまぜながら, 200 mV の電流値を, 飽和カロメル電極を対極とする 2 電極方式で測定した。

3 結果と考察

3.1 電極表面に被覆する透析膜の選択

Fig. 1 にユニオンカーバイド製の分画分子量 3500 (A1, B1, C1), スペクトラム製の分画分子量 5000 (A2, B2, C2) 及びユニオンカーバイド製の分画分子量 8000 (A3, B3, C3) の透析膜を被覆した, 3 種類の電極 (UMWCO3500, SMWCO5000 及び UMWCO8000 電極) を使用して, 0.1 mM の GSH (分子量: 307, A1, A2, A3), Glu-Cys (分子量: 250, B1, B2, B3) 及び Cys (分子量: 121, C1, C2, C3) を, pH 8.3 のトリス緩衝液に矢印に示すところで添加したときの 200 mV での電流値の時間変化を示した。GSH, Glu-Cys 及び Cys に対する定常状態でのそれぞれの電流値は, UMWCO3500 電極では 9, 14 及び 31 nA, SMWCO5000 電極では 7, 14 及び 39 nA, UMWCO8000 電極では 32, 43 及び 90 nA であった。スペクトラム製の分画分子量 2000 の膜を被覆した電極では, 1 mM の GSH が存在しても電流はほとんど流れず, 1 mM の Cys に対しても数

Fig. 1 Current at 200 mV-time curves for 0.1 M GSH (A1 ~ A3), Glu-Cys (B1 ~ B3) and Cys (C1 ~ C3) added at the points indicated by the arrows in 0.1 M tris buffer of pH 8.3 using a membrane-covered cobalt phthalocyanine embedded carbon paste electrode

The electrodes covered with a dialysis membrane of cut off molecular weight 3500 made by Union Carbide Co., 5000 made by Spectrum Co., and 8000 made by Union Carbide Co., were used for A1-C1, A2-C2 and A3-C3, respectively.

nA しか流れず本測定には不向きであった。分画分子量が 10000 以上の透析膜を使用した場合は, GSH に対する感度は上昇するが, Cys に対する感度はさほどの上昇が見られなかった。 γ -GT の測定では, 基質である GSH と生成物である Cys-Gly に対する応答の比が大きいものほど望ましい。Cys-Gly の入手が困難でその測定ができなかったので, GSH に対して Glu-Cys 及び Cys による電流値の比が大きく測定できる SMWCO5000 電極が目的にかなっていると考え, 以後の実験からはこの電極を使用した。

3.2 GSH 溶液に血清を添加したときの電流値変化

Fig. 1 の A2 ~ C2 に示した 0.1 mM の GSH, Glu-Cys 及び Cys の電流値を縦軸に, 横軸にそれらの分子量をプロットするとほぼ直線となった。そのグラフ上で Cys-Gly の分子量に相応する電流値は 28 nA であった。これを Cys-Gly による電流値と仮定すると, 1 μ M の GSH が Cys-Gly に変換されると 0.21 nA の電流が増加すると考えられる。GSH を 1.2 mM, Gly-Gly を 50 mM, EDTA を 5 mM (GSH の自動酸化防止のため) 含む pH 8.3 のトリス緩衝液では, 70 nA (GSH による) ほどが既に出現している。この溶液に Glucana を基質として γ -GT 活性が測定された 3 種類の血清を 25 倍希釈になるように (そのとき A:0.6, B:11 及び C:37 U l^{-1}), またウシじん臓由来の γ -GT を 5(a), 10 (b) 及び 30(c) U l^{-1} になるように, 矢印に示したところで添加した。このときの電流値の時間変化を Fig. 2 に示した。血清あるいは酵素溶液を添加すると, 電流はまず直線

Fig. 2 Current increase when serum(A~C) and γ -GT(a~c) were added at the point indicated by an arrow in the tris buffer of pH 8.3 containing 1.2 mM GSH, 50 mM Gly-Gly and 5 mM EDTA

Samples of A, B and C contained 0.6, 11 and 37 UI^{-1} of γ -GT (Glucana as substrate) and, Samples of a, b, and c contained 5, 10 and 30 UI^{-1} of γ -GT (γ -Glutamyl-*p*-nitroanilido as substrate).

的に増加したが、数分で直線性が失われていった。複雑な GSH の代謝の中でなんらかの反応阻害が生じたことがその理由の一つかと考えられる。Gly-Gly が存在しない GSH 溶液に、16 種類の血清 (広い範囲の γ -GT 活性を持つ) を添加しても電流値の増加は見られなかったことから、ここでの電流値の増加は γ -グルタミル基の転移によるもので、GSH の加水分解によるものではないと判断した。合成基質を用いた場合は、このような短時間での直線性の消失は見られなかった¹⁾。電流が時間に対して直線的に増加する部分から、A, B, C 及び a, b, c の γ -GT 活性は 0.2, 6.1, 20.2 及び 1.8, 3.5, 14.2 UI^{-1} と算出され、これらの値は 2 種類の合成基質を用いた場合と絶対値は異なるものの、ほぼ相関した比であった。

3.4 GSH を基質にしたアンペロメトリー及び Glucana を基質にした分光法で測定した γ -GT 活性の比較

分光法で 15, 275 及び 925 UI^{-1} と測定された血清を等量採って混合したものを用いて、 γ -GT 活性と GSH 濃度あるいは Gly-Gly 濃度の関係を調べた。Gly-Gly が 50 mM 存

Fig. 3 Correlation between this method using GSH as substrate and the optical method using Glucana as substrate for the determination of γ -GT in human sera

在するときは、GSH が 1 mM で活性は飽和になった。一方、GSH が 1.2 mM 存在するときは、Gly-Gly が 30 mM で活性は飽和になった。このことを基に 16 種類の血清を、GSH を 1.2 mM, Gly-Gly を 50 mM, EDTA を 5 mM 含む pH 8.3 の溶液に添加し、1 分間に 0.21 nA の変化を 1 UI^{-1} として γ -GT 値を算出し、それと Glucana を基質にして分光法で得られた値の関係を Fig. 3 に示した。両者の相関係数は 0.98 で、回帰式は $Y = 0.47X + 17$ であった。本法で得られた γ -GT 値は Glucana を基質にした分光法による値とよく相関し、活性値はそれらのほぼ 1/2 であった。GSH に対する見掛けの K_M 値は 0.3 mM で、Glucana に対するその 1/2 であった⁶⁾。

(2002 年 2 月、日本臨床化学会九州支部総会で一部発表)

文 献

- 1) 木下英明, 白井敏明, 高山勝巳, 池田篤治: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 197 (1993).
- 2) 木下英明, 村上裕人, 中島直俊, 上平 憲, 池田篤治: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 401 (1996).
- 3) J. S. Elce, B. Broxmeyer: *Biochem. J.*, **153**, 223 (1976).
- 4) L. M. Shaw, D. A. Newnan: *Clin. Chem.*, **25**, 75 (1979).
- 5) 木下英明, 美矢豊文, 上平 憲: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **48**, 117 (1999).
- 6) L. M. Shaw: "Methods of Enzymatic Analysis Vol III", Edited by H. U. Bergmeyer, p. 439 (1987), (VCH Pub., Weinheim).