

ほうれん草から検出されたグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性

中川 一夫*, 中島 寛子*, 伊地知玲子*, 西澤由利子*

Glutathione S-transferase activity in spinach.

Kazuo Nakagawa, Hiroko Nakajima, Reiko Ijichi
and Yuriko Nishizawa

1. 緒 言

グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) は親電子性化合物と還元型グルタチオンとの抱合反応を触媒し、疎水性化合物を水溶性の増加した物質に変換する。GST は広く生物界に分布しているが、哺乳動物の肝 GST は、食物等を介して摂取される生体異物や体内で生じる有害な中間代謝産物の解毒に関ることがその機能的役割の一端と考えられている^{1,2)}。とうもろこしなどの栽培植物からも GST は分離されているが^{3,4)}、その生理的役割については明らかではない。Mozer ら⁵⁾は、とうもろこしの GST が農薬に対する植物用解毒剤により誘導されることを報告しているが、動物肝における解毒効果に類似した働きとして興味がある。

GST のもう1つの基質であるグルタチオンは各種野菜類に含有されており、ほうれん草可食部中には平均値として 15.5 mg/100 g 存在する⁶⁾。従って、ほうれん草中にも GST が存在する可能性があるので、今回、ほうれん草から GST 活性を検出することを試みた。

2. 実験方法

1. ほうれん草中の GST 活性の検出

1) 抽出液の調製

新鮮な市販のほうれん草を購入し、実験材料として用いた。品種は特定していない。ほうれん草を水洗し、根部を除いて 100 g 秤量した。細切した後、冷 0.1 M

リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) 120 ml を加えてミキサーに30秒間かけ、破砕液を作製した。10枚重ねのガーゼで破砕液をろ過し、ろ液を 70,000×g で60分間遠心分離した。

2) 硫酸アンモニウム分画

分離した遠心上清に氷冷下で硫酸を少量ずつ加えながら攪拌溶解させ、30%飽和濃度とした。次いで 10,000×g で10分間遠心分離した。得られた上清に硫酸を添加し、60%飽和濃度とした後、10,000×g で10分間遠心分離した。沈殿物を冷15%グリセリン-0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (0.5 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 含有, pH 7.4) に溶解した。

3) Sephadex G-25 を用いたゲルろ過

15%グリセリン-0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した Sephadex G-25 をガラスカラムに充てんし (ゲル層 1.5 cm×30 cm)、これをゲルろ過に用いた。上記硫酸沈殿の溶解液をカラムにかけ、15%グリセリン-0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で溶出を行い (0.5 ml/min)、2 ml ずつ分画採取した。

ここで得た溶出液を用いて GST 活性を検討し、また、8-Anilinonaphthalene-1-sulfonate (ANS) との結合についても検討を加えた。

4) GST 活性の測定

GST 活性の測定は、Booth ら⁷⁾の方法を一部改変して行った。反応液の基本組成は、0.3 M 酢酸緩衝液 (pH 5.4) 1.0 ml、蒸留水 1.2 ml、30 mM 還元型グルタチオン溶液 0.5 ml、30 mM 1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) エタノール溶液 0.1 ml、酵素標品溶液 0.2 ml であり、CDNB を添加することにより反応を開始した。30°C で15分間反応を行った後 2 N HCl 0.5 ml

* 京都女子大学家政学部食物学科衛生学第1研究室

を加えて反応を停止し、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を 0.2 ml 加えて5分間静置した。次いで 500×g で遠心分離し、その上清を用いて波長 340 nm での吸光度を測定した。非酵素的反応量 (空試験) は、酵素標品の代りに15%グリセリン-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用い、上記と同様の操作を行って測定した。酵素活性は Habig ら⁹⁾の報告による分子吸光係数 $9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて算出した。

2. ANS 結合能の測定

ANS が蛋白質の疎水部と結合して出す蛍光 (ANS 蛍光) の測定は、Kettley ら⁹⁾の方法に準じて測定した。

ANS 蛍光測定用反応液 (1.0 ml) は、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、6%グリセリン、0.2 mM EDTA、1 mM 還元型グルタチオン、50 μM ANS および試料液から成り、室温で反応させた後、日立分光蛍光光度計 (650-10型) を用いて励起波長 405 nm (スリット巾 5 nm)、蛍光波長 470 nm (スリット巾 5 nm) で蛍光強度を測定した。

3. 蛋白質の定量

蛋白質の定量は、牛血清アルブミンを標準品として Lowry ら¹⁰⁾の方法に従って行った。

3. 実験結果

1. GST 粗酵素標品の分離

ほうれん草破砕液の 70,000×g 上清を酵素標品として用いても GST 活性はほとんど検出できなかったが、硫酸分画 (30-60%) を行ったところ沈殿物から活性が検出できた。この沈殿物から検出された GST 活性は $0.3 \text{ nmol/mg protein/30 min}$ であった。次に硫酸分画で得た試料について Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィーを行うと、比活性が10倍以上に増加した画分が得られた。図1に Sephadex G-25 ゲルろ過により得られた GST 活性の分離図を示した。

280 nm での吸光度をモニターして検出される最初の溶出ピークからは GST 活性が検出されたが、2番目のピークからは検出されなかった。以下の実験においては、最初のピークの溶出液を合一し、粗酵素標品として用いた。

2. GST 粗酵素標品の反応性

図2には Sephadex G-25 ゲルろ過により得られた粗酵素標品の反応性について検討した結果を示した。時間経過とともに反応生成物は増加し、20分まではほぼ直線的な増加を示した。酵素標品を加えない場合にお

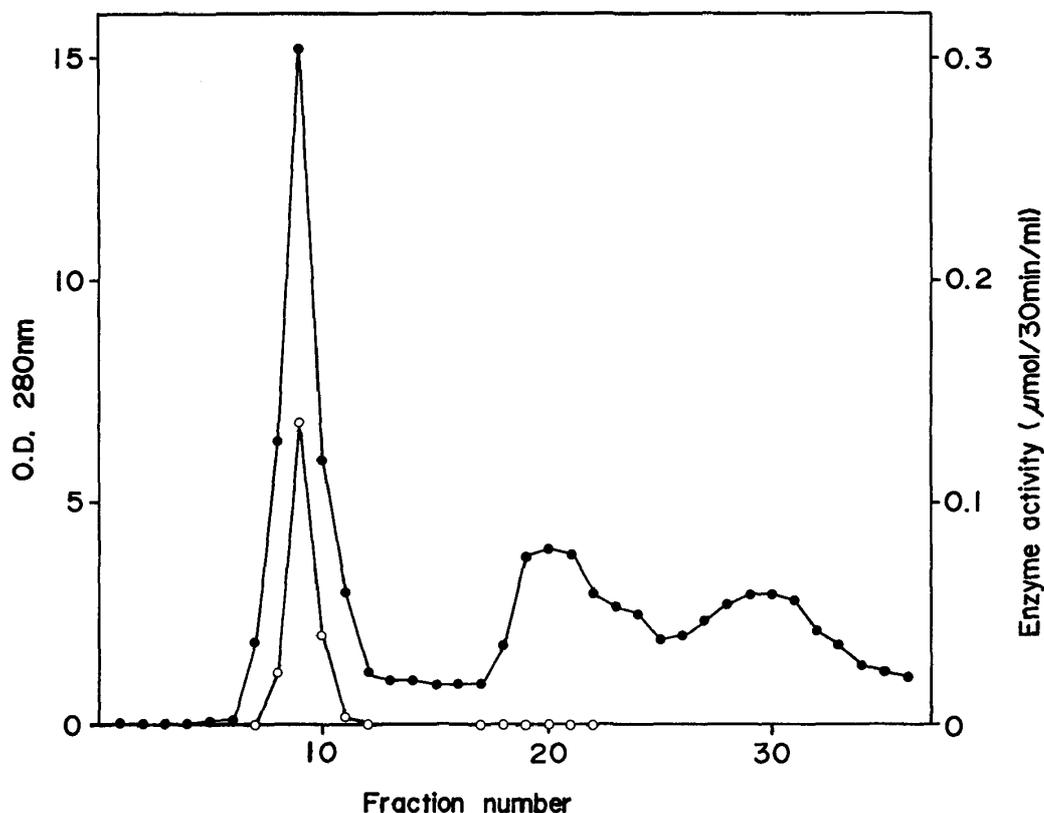


図1 Sephadex G-25 を用いたほうれん草抽出液のゲルろ過

●—●: 吸光度 (280 nm), ○—○: グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性

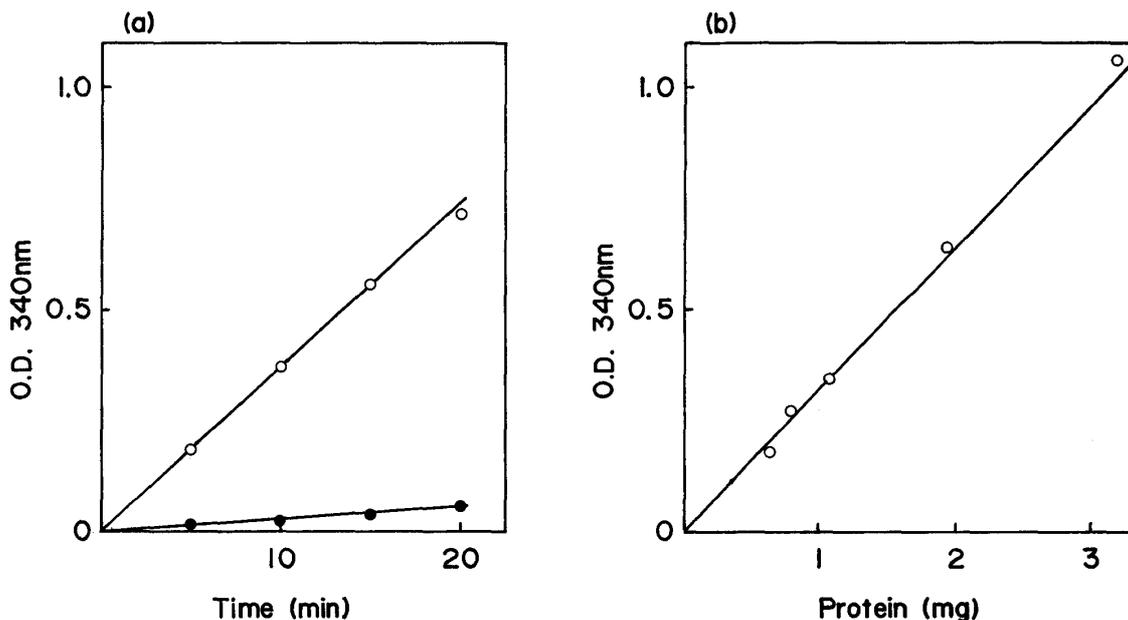


図2 グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性測定条件の検討

- (a) ○—○ : Sephadex G-25 ゲルろ過液添加,
●—● : 非添加
- (b) Sephadex G-25 ゲルろ過液を使用

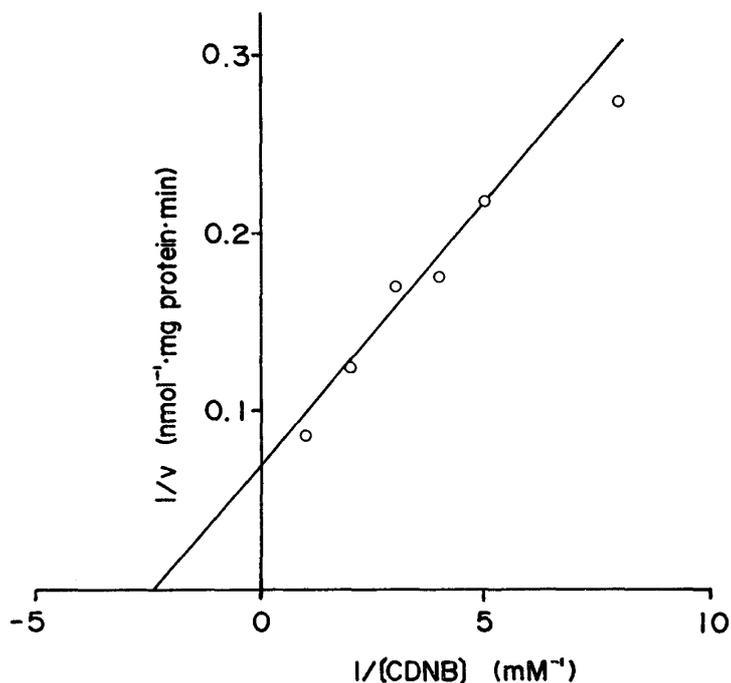


図3 CDNB に対するグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性の両逆数プロット (還元型グルタチオン : 5 mM)

いても非酵素的に反応が起り、この場合にも20分まで直線的に反応は進んだ (図 2 (a))。従って真の酵素活性は、両者の差の吸光度から算出した。また、酵素標品の添加量を変えて反応を行ったところ、蛋白質量として 3 mg まで反応は直線的に進んだ (図 2 (b))。

基質として CDNB を選び、その 0.125~1 mM の濃度範囲での酵素活性を測定し、両者に関して逆数プロットをとった(図 3)。この場合、グルタチオン濃度は 5 mM に固定した。概算的な K_m 値は 0.43 mM, V_{max} 値は 14.3 nmol/mg protein/min となった。ま

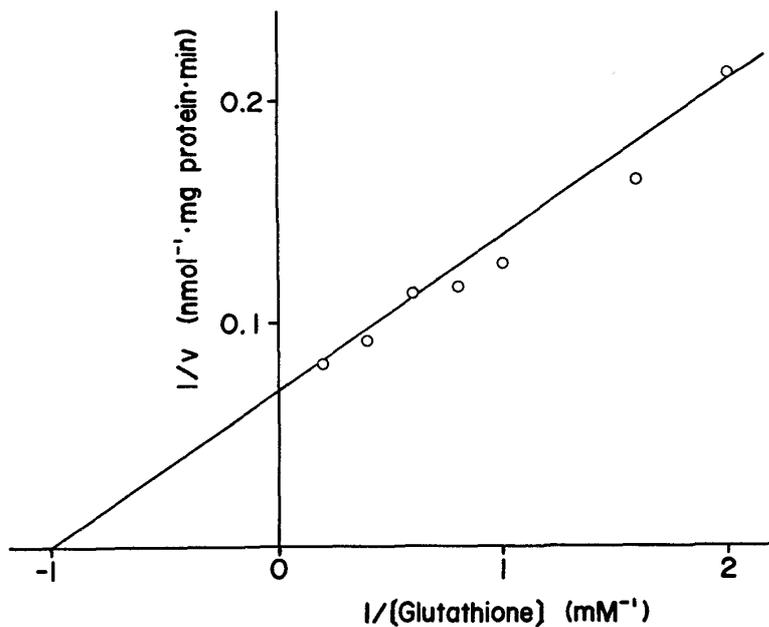


図4 還元型グルタチオンに対するグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性の両逆数プロット (CDNB: 1 mM)

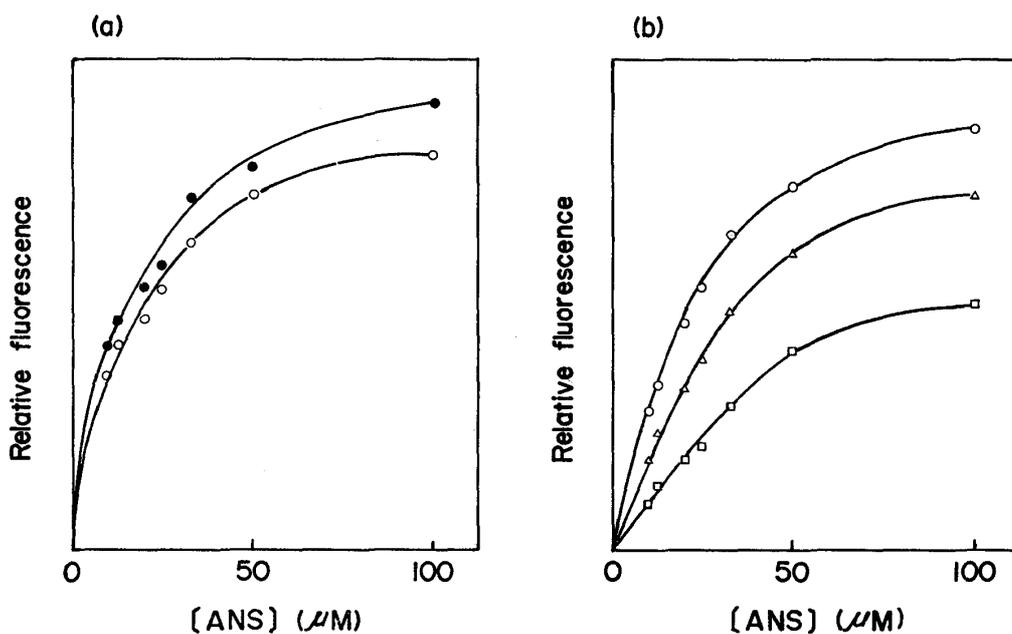


図5 ANS 蛍光に対する還元型グルタチオンおよび CDNB 添加の影響

- (a) ○—○: 対照,
●—●: 1 mM 還元型グルタチオン添加
- (b) ○—○: 対照,
△—△: 0.1 mM CDNB 添加,
□—□: 1 mM CDNB 添加

た, CDNB を 1 mM に固定し, 0.5~5 mM 還元型グルタチオンに対する酵素活性を測定し, 両逆数プロットをとったところ, みかけの K_m 値は 1.0 mM, V_{max} 値は 14.3 nmol/mg protein/min となった (図4)。

3. ANS 結合能の検討

ANS は疎水領域蛍光プローブであり, また, 動物組織から得られた GST の特定の分子種に高い親和性を示すことが報告されている⁹⁾。

今回用いた GST 粗酵素標品は ANS 結合性を示し, ANS 濃度の上昇とともに蛍光強度は増加した。

表1 グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性および ANS 蛍光におよぼす各種化合物の影響

Chemicals (M)		GST activity*	ANS fluorescence*
Cysteine	10^{-3}	85	112
	10^{-4}	99	—
Oxidized Glutathione	10^{-3}	83	101
	10^{-4}	108	—
N-Ethylmaleimide	10^{-3}	55	—
	10^{-4}	113	—
Penicillamine	10^{-3}	93	—
	10^{-4}	97	—
Dithioerythritol	10^{-3}	105	—
	10^{-4}	110	—
Bilirubin	2×10^{-5}	78	—
	5×10^{-5}	—	35
	2×10^{-6}	89	74
Crystal Violet	2×10^{-5}	87	—
	5×10^{-6}	—	41
	2×10^{-6}	90	—
Rose Bengal	2×10^{-5}	21	—
	5×10^{-6}	—	22
	2×10^{-6}	26	—
Erythrosine	5×10^{-6}	31	32
	5×10^{-7}	74	74
Phloxine	5×10^{-6}	18	24
	5×10^{-7}	63	51

* % of Control

さらに、反応液にグルタチオン (1 mM) を添加すると、ANS 蛍光強度はグルタチオンの存在しない場合にくらべて増加した (図 5 (a))。また、ANS 蛍光強度は GST の基質である CDNB を添加すると減少し、添加した CDNB の濃度が高いほど減少効果は大きかった (図 5 (b))。

4. GST 活性および ANS 蛍光に対する諸種化合物の影響

表 1 に各種化合物添加による GST 活性および ANS 蛍光への影響を検討した結果を示した。システイン (1 mM) および酸化型グルタチオン (1 mM) は軽度 GST 活性を抑制したが、SH 試薬である N-エチルマレイミド (1 mM) は GST 活性を約 50% 低下させた。ビリルビンは 2×10^{-5} M で約 20% 活性を抑制した。キサントン系合成色素であるクリスタルバイオレット、ローズベンガル、エリスロシンおよびフロキシシはいずれも GST 活性を抑制し、特にローズベンガル、エリスロシン、フロキシシは低濃度で著しく抑制することがわかった。

ANS 結合による蛍光はシステイン (1 mM) の添加で増加したが、ビリルビン、クリスタルバイオレット、ローズベンガル、エリスロシンおよびフロキシシはい

ずれも低濃度で顕著に ANS 蛍光を減弱させることが判明した。

4. 考 察

本実験で得た結果はほうれん草中に GST が存在することを十分に予期させる。GST 反応は親電子性化合物と還元型グルタチオンの 2 基質を必要とする反応であるが、一方の基質濃度を固定し、他方の基質濃度を変えて反応を追い、動力学的解析を行った。本反応にミカエリス-メンテンの式を適用することは反応速度論としては適切ではないが、反応性の概要を知る手段としては有効と考えられる⁹⁾。この様に 1 基質反応に近似させて得たみかけのミカエリス定数は、還元型グルタチオンに対して 1.0 mM, CDNB に対して 0.43 mM となった。グルタチオンのほうれん草中の存在量はおよそ 0.5 mM 程度であり⁹⁾、基質濃度から見る限りほうれん草で GST 酵素は十分働き得る。

Sephadex G-25 ゲルろ過液中に GST 酵素蛋白質が存在することは、ANS 蛍光測定からも推察することができる。ANS 蛍光が還元型グルタチオンの添加により増大したことは、直接的には、グルタチオンの添加により蛋白質の疎水領域の拡大が起り ANS の結合数が増加したことを物語るのであろうが、GST 酵素蛋白質が還元型グルタチオンの結合により立体構造に変化を生じたことをうかがわせる。また、酵素反応の基質として用いた CDNB が ANS 蛍光を減弱させたことは、ANS 結合性をもつ蛋白質と GST 酵素蛋白質が重なり得ることを示す。ラット肝などの動物組織から得られた GST にはアイソザイムが存在し、1 つ以上の酵素分子種においてリガンディン活性が認められる¹⁰⁾。リガンディンは疎水性化合物と非共有結合により結合する蛋白質を指すが¹²⁾、ANS は動物組織由来のリガンディンとを結合することが明らかにされており⁹⁾、今回ほうれん草から得た粗酵素標品は、動物組織由来の GST と類似した性質を有する成分を含むことになる。さらに、他生物種の GST との類似性は、酸化型グルタチオンや N-エチルマレイミドなどの SH 試薬により GST 活性が阻害されること⁹⁾、あるいはビリルビンやローズベンガルなどに見られる GST 活性の阻害や ANS 結合性蛋白質との結合⁹⁾にも求めることができる。

GST は生物界に広く分布する酵素であるが、その特徴の 1 つは、グルタチオンに対する基質特異性はかなり高いが、グルタチオンと抱合する親電子性の基質に対する特異性はそれほど厳しくないことである。そ

の基質の多様性故に動物肝の GST は有効な解毒酵素に位置づけられている。基質特異性の低さに着目したとき、ほうれん草中 GST に期待される働きの1つは、GST が組織に入り込んだ農薬や環境汚染物質等の代謝あるいは不活化に寄与することである。ほうれん草中での本来の生理的機能は元より、この様な衛生学的役割を明らかにするためには、GST を精製単離しその酵素学的性質を詳細に検討する必要がある。

5. 要 約

ほうれん草中から GST 活性を検出することを試み、次の結果を得た。

ほうれん草破砕液の 70,000×g 上清を硫酸アンモニウム (30~60%) で分画し、その沈殿物を Sephadex G-25 でゲルろ過すると、その蛋白質含有画分に CDNB を基質とする GST 活性が検出できた。さらにこの粗酵素標品は ANS と結合しリガンディン様の性質を示した。酵素活性は、酸化型グルタチオン、N-エチルマレイミド、ビリルビン、クリスタルバイオレット、ローズベンガル、エリスロシンあるいはフロキシンの添加により阻害された。また、CDNB、ビリルビン、クリスタルバイオレット、ローズベンガル、エリスロシンおよびフロキシンは ANS 蛍光を著しく減弱させた。これらの結果は、ほうれん草中に GST 酵素蛋白質が存在することを示唆する。

文 献

- 1) W. B. Jacoby: *Adv. Enzymol.*, **46**, 383 (1978)
- 2) 高橋健治, 浅岡一雄: 代謝, **17**, 2139 (1980)
- 3) D. S. Frear and H. R. Swanson: *Pest. Biol. Physiol.*, **3**, 473 (1973)
- 4) M. B. Guddewar and W. D. Dauterman: *Phytochemistry*, **18**, 735 (1979)
- 5) T. J. Mozer, D. C. Tuiemeier and E. G. Jaworski: *Biochemistry*, **22**, 1068 (1983)
- 6) 中川一夫, 池内真理, 次田陽子: 食品衛生学雑誌 **27**, 425 (1986)
- 7) J. Booth, E. Boyland and P. Sims.: *Biochem. J.* **79**, 516 (1961)
- 8) W. H. Habig, M. J. Pabst and W. B. Jakoby: *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130 (1974)
- 9) J. N. Ketley, W. H. Habig and W. B. Jakoby: *J. Biol. Chem.*, **250**, 8670 (1975)
- 10) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 11) D. L. Vander Jagt, S. P. Wilson, V. L. Dean and P. C. Simons: *J. Biol. Chem.*, **257**, 1997 (1982)
- 12) G. Litwack, B. Ketterer and I. M. Arias: *Nature*, **234**, 466 (1971)