

ラット血漿中遊離システインの定量

— HPLC用チオール蛍光誘導体化試薬ABD-Fを用いた試み —

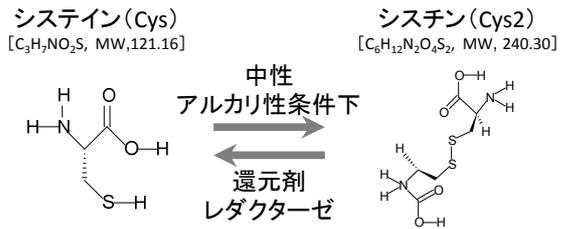
大谷 いら¹⁾, 小川 進也²⁾, 中澤 京子¹⁾, 趙 治磊¹⁾, 吉村 悦郎²⁾, 加藤 久典¹⁾, 梅原 俊介³⁾

¹⁾東京大学総括プロジェクト機構「食と生命」,

²⁾東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻, ³⁾プロテインケミカル株式会社

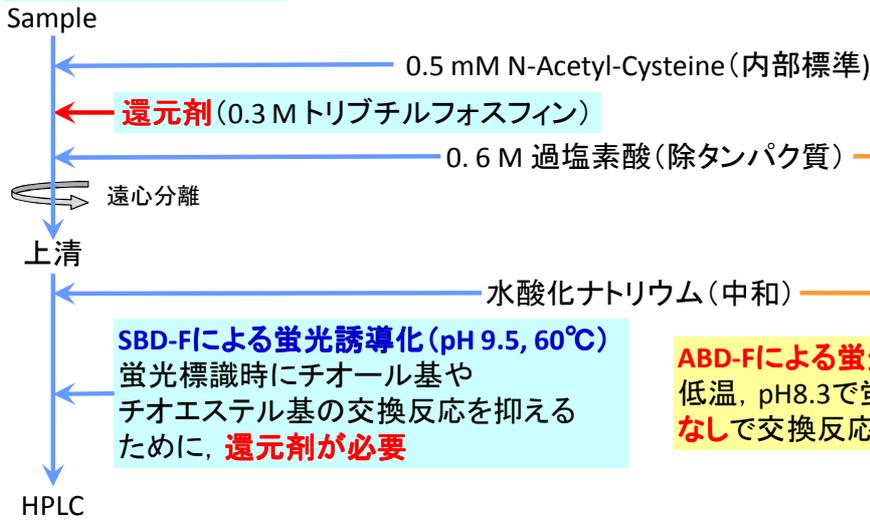
目的

チオール化合物の定量は誘導体化試薬7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate(SBD-F)等を用い蛍光HPLCで検出する方法が広く用いられている。蛍光標識時のチオール基の交換反応を抑えるために還元剤を使用する。そのため、酸化型のチオール基が還元されるために、血漿中の遊離のシステイン(Cys)とシスチン(Cys2)を区別して定量することは困難であった。本研究では、標識効率の高い4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-F)を用いて、低温条件下で還元剤を使用せずに蛍光標識することで、血漿中の遊離Cysの定量を試みた。



反応条件

SBD-Fを用いた反応



ABD-Fを用いた反応



Cys2からCysへの変換率

SBD-Fによる蛍光誘導化

生理食塩水にCys2を添加	73 ± 16 (%)
血漿にCys2を添加	112 ± 24 (%)

ABD-Fによる蛍光誘導化

生理食塩水にCys2を添加	3 ± 1 (%)
血漿にCys2を添加	13 ± 3 (%)

ラットへのCysおよびCys2の投与

実験動物: 雄性Wistarラット

投与量: 対照群 (0.08N HCl / 0.9% saline)
Cys (300 mg/kg in 0.08 N HCl / 0.9% saline)
Cys2 (300 mg/kg in 0.08 N HCl / 0.9% saline)

投与方法: 経口投与

抗凝固剤にEDTAを使用し、投与60分後に門脈と大動脈から採血した。遠心分離(1000 × g, 1 min)により血漿を得た。Cysの測定はABD-Fによる蛍光誘導化を行った。

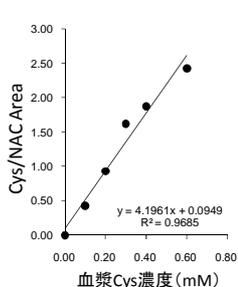


Fig. 1 検量線
血漿にCysを標準添加して作成

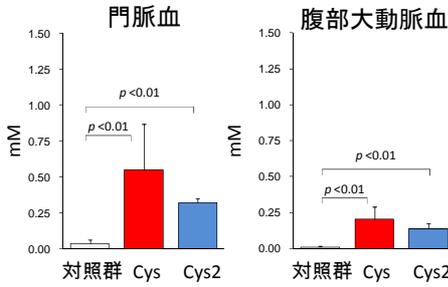


Fig. 2 ラットの血漿Cys濃度

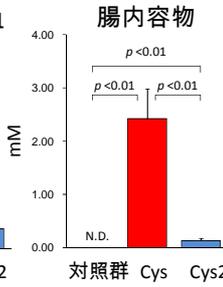


Fig. 3 腸内容物中のCys濃度

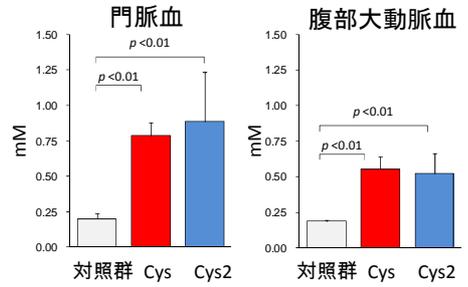


Fig. 4 血漿中のCysとCys2の総量

まとめ

- SBD-Fの場合、蛍光誘導化の反応時のチオール基の交換反応やCys2への酸化を抑えるために還元剤を使用する必要がある。そのために、試料中に含まれるCys2のほとんどはCysに還元された。
- ABD-Fの場合、蛍光誘導化の反応は4°C, pH 8.3の条件で行い還元剤を使用しなかった。そして、Cys2からCysの変換率を低く抑えることが可能となった。
- ABD-Fを用いた蛍光誘導化の反応により、血漿中のCysのみを測定することが可能となった。
- ラットにCysおよびCys2を投与し、血漿Cys濃度を測定した。その結果、Cys2の投与は血漿中Cys濃度を有効に上昇させた。このとき、血漿中のCysとCys2の総量は両投与群で同程度であった。
- Cys濃度は門脈血に比べ腹部大動脈血で低かったことから、Cysは肝臓である程度代謝されることが推測された。