

氏 名 (本籍)	たか 高	はし 橋	ひろ 裕	あき 明
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農博第	241	号	
学位授与年月日	昭和54年	3月	27日	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻			
学位論文題目	生体中の遊離チオール・ジスルフィド・チオアルキル化合物のけい光微量分析法に関する研究			

論文審査委員 (主査)

助教授 目黒 熙 教授 柴崎 一雄

教授 金田 尚志

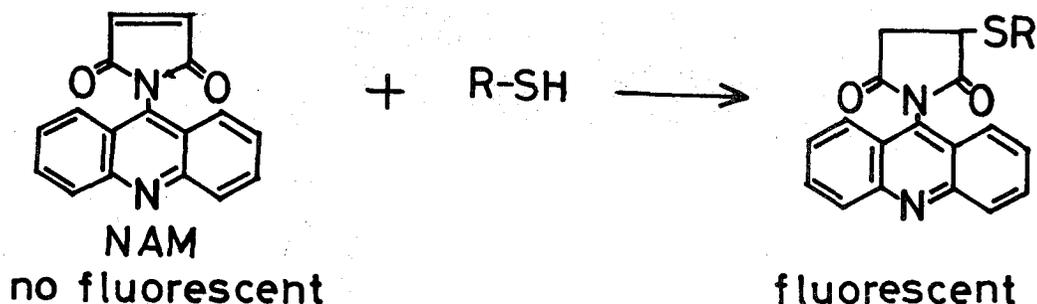
論文内容要旨

第1章 序 論

生体組織中で硫黄は存在様式の一つとしてシステイン (CySH), メチオニン (Met) などの形でとりこまれている。たん白質中では CySH 残基が酵素の活性発現やその三次構造の維持に寄与している。低分子 SH 化合物であるグルタチオン (GSH), コエンザイム A (CoA) は、生体内で補酵素としての機能をもつばかりでなく、そのほかの SH 化合物とともに解毒作用, 抗酸化作用などにも関与している。Met は生体内でメチル基転移反応の際の重要なメチル供与体であるばかりでなく、必須アミノ酸として栄養学的にも注目される化合物である。一方食品化学的には、3-メチル-2-ブテン-1-チオールがビールの日光臭の主成分であり、S-メチルシステインがニンニク, 蔬菜中のフレーバー成分となっている。したがって、これらの化合物の機能, 代謝などの研究においてはもちろん食品化学的な研究においてもその存在量を知ることはまことに有意義なことである。

そこで本研究の目的は血液, 内臓, 尿などの動物体および植物体中の SH, SS, S-アルキル化合物の分析法の確立である。これらの化合物の多くは生物体内に微量にしか含有されなかったり極微量の分析試料しか手に入らないことがあるため、これらの微量成分の研究は微量分析法の開発に負うところが大きい。そこで筆者は、けい光分析法に着目しその微量分析法を検討した。一般にけい光分析法は感度が高く、比色法に比べ100倍から1000倍という長所をもつ反面、けい光発現は種々の共存物質, 測定要因などによって妨害を受けることがあるなど定量分析においては定性分析とは違った障害があり一般に難しいところがある。

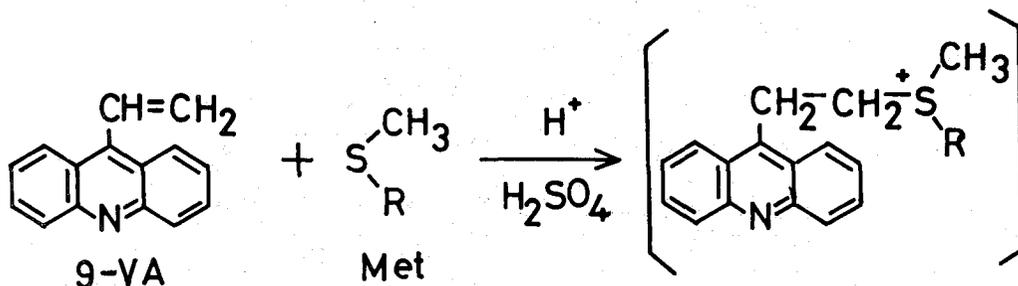
本研究の奈良らは SH 基のけい光微量分析試薬の研究をおこない SH 基と特異的に反応するけい光試薬 N-(9-アクリジニル) マレイミド (NAM) を合成し、SH 化合物の超微量分析の可能性を示唆した。しかし実際の分析法の開発をおこなうには至らなかった。筆者の研究は奈良らの研究を引継ぎ実際の分析法の開発をおこなうものである。そして筆者は次の手法による SH, SS 化合物のけい光微量分析法を確立した。



- ① NAM のけい光特性を利用し、TLC上の SH, SS 化合物を高感度で簡便に検出できるスプレー検出法。(第II章)

- ② SH 化合物を含む生物体試料をエチレンジアミン四酢酸ナトリウム塩溶液で処理し、さらに高度希釈することにより共存物質の影響を除き pH 8.8 での再現性の高い SH 化合物の微量定量法。(第 III 章)
- ③ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いることによる共存物質の除去と SH 化合物の NAM 誘導体の分離による SH 化合物の迅速な個別定量法。(第 IV 章)
- ④ KCN 還元法による尿中の SS 化合物の定量分析法。(第 V 章)

一方、もう一つの有機含硫化合物である S-アルキル化合物の分析法については、本研究室の浜松らが見出した 9-ビニルアクリジン (9-VA) と Met との高濃度硫酸中での発けい光反応を進展させ Met の定性、定量分析法への適用性について検討し次の点を明らかにした。(第 VI 章)



- ① 高濃度硫酸中での 9-VA の反応は S-アルキル化合物と特異的であること。
- ② S-アルキル化合物を TLC 上で確認する定性分析法を確立し、従来の数百倍の感度で Met を検出できた。
- ③ 反応溶液中から過剰の試薬を除くことにより Met の定量分析法への適用性を示唆した。

第 II 章 NAM スプレー法による TLC 上の SH, SS 化合物の けい光微量検出法

NAM はアルカリ性溶液中で SH 化合物と迅速に反応し、試薬自身はけい光をもたないためクロマトグラム上の SH 化合物の検出スプレー試薬としてきわめて有望なものであった。

確立した検出方法は Diagram 1 のとおりである。TLC 上で青いけい光スポットとして確認されるのは SH 化合物と、SS 化合物、チオラクトンであった。後者の場合は KCN 溶液スプレーによる還元操作を要した。セルロースあるいはシリカゲル上のスポットテストによる検出限界は数 10pmole であった。TLC 展開後の検出感度はスポットテストの場合より劣り、シリカゲル上では CySH, GSH がその 10分の 1 であった。しかし、セルロース TLC 上ではほとんどスポットテストと同程度の感度で検出できた。シスチン [(Cys)₂] などの SS 化合物の検出感度は nmole オーダーであり、SH 化合物のそれと比べ 100分の 1 の感度であった。これはクロマトグラム上での SS

Diagram 1. NAM Spray Procedure

Step	Treatment
1*	Spray with the spray solution (A): solution of 5% (W/W) KCN in 1 N NH ₄ OH. Let stand for a few minutes.
2	Spray with the spray solution (B): solution of pH 8.8, 0.1 M Na ₂ CO ₃ -H ₃ BO ₃ ·KCl buffer.
3	Spray with the spray solution (C): solution of 0.003% (W/V) NAM in acetone.
4	Observe under UV light.

* Step 1 is necessary for disulfides and thioesters, but not necessary for thiols.

化合物の還元反応が不完全であることと、過剰の KCN による試薬の分解のためと考えられる。

本法はセルロース TLC を用いた場合、SH 化合物の検出感度はことに鋭敏となり従来の DTNB 法に比べ100 倍は高く、簡便な微量定性分析法として有用であると考えられる (Table I)。

TABLE I. DETECTION LIMIT OF SULFUR-CONTAINING ORGANIC COMPOUNDS BY NAM SPRAY

Compound	Detection limit ($\times 10^{-11}$ mole)			
	Cellulose	TLC ^{a)} Silica gel	Cellulose	Spot test Silica gel
(Thiols)				
Cysteine	2.3 (III)	69 (III)	2.6	2.6
N-Acetylcysteine	1.0 (I)	20 (I)	2.7	2.7
Homocysteine	4.6 (III)	69 (III)	2.5	5.0
Glutathione	4.4 (III)	66 (III)	5.0	2.5
Thioglycolic acid	40 (IV)	100 (IV)	6.0	4.0
Thiomalic acid	61 (I)	20 (II)	1.1	5.4
Penicillamine	440 (III)	440 (III)	4.3	4.3
Thiosalicylic acid	86 (V)	220 (V)	25	51
Dithiothreitol (Disulfides) ^{b)}	—	—	3.3	1.7
Cystine	260 (II)	520 (III)	52	26
Glutathione oxidized (Thiolactone) ^{b)}	100 (II)	490 (III)	49	25
N-Acetylhomocysteine thiolactone	5.0 (V)	1.5 (VI)	1.5	1.5

The experimental conditions are described in the text.

^{a)} The developing solvents were: (I), methanol; (II)~(IV), methanol water mixtures; (V), ethanol and (VI), ethylacetate. (II)~(IV), methanol: water=1: 1, 4: 1 and 17: 3 respectively.

^{b)} These were detected after treatment with KCN solution.

第三章 動植物体中の遊離 SH 化合物の NAM によるけい光定量法

けい光法による微量定量法を確立するにあたって次の点を満足するような条件の検討をおこなった。

- ① けい光強度が高い。(微量分析)

② 発現したけい光が安定で測定時間内での変化が少ない。(再現性)

③ 反応時間が短い。(迅速性)

④ 広い範囲で定量が可能であり、試薬の添加量は定量に影響をおよぼさない。(簡便性)

SH 化合物の種類により NAM との反応性に違いが見られた。たとえば GSH の反応においては pH 8.8 で反応は速やかでけい光強度も強く、そのけい光も安定で反応 24 時間後もほとんど変化がなかった。一方、pH 3.5 での反応においては発現したけい光が弱いばかりでなく、反応経過時間とともに徐々に実質的なけい光の減少がおこった (Fig. 1)。

また、pH 3.5 では本来無けい光性である試薬が反応時間経過にしたがってけい光を帯びるためけい光測定の際のパラッキの原因となった。したがって定量条件としては、奈良らの提案した pH 3.5 の反応よりは pH 8.8 での反応が上記条件に適していた。そこで 0.5 M、炭酸ソーダー・ホウ酸緩衝液、pH 8.8 を反応緩衝液とし、反応 1 時間後にけい光強度を 435 nm (励起波長 360 nm) で測定することとした。この条件下で、SH 化合物が測定溶液中 $\mu\text{mole}/\text{ml}$ 以上で検量線が描け再現性の高い (変動係数 2~3%) 定量が期待された。

けい光発現は種々の要因に影響を受けやすいため、一般に定量分析においては標準添加法という手法がとられる。そこで血液、動物組織、尿中の SH 化合物の NAM による定量には GSH あるいは CySH を標準物質とする標準添加法を採用した。その結果、測定値は同時に行った DTNB 法とよく一致した (Table II)。

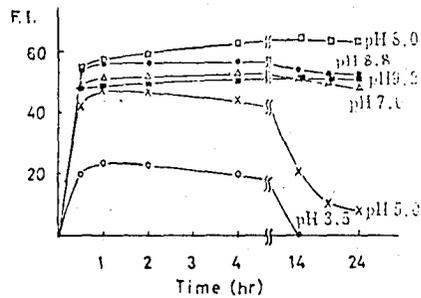


Fig 1 Fluorescence Development of the Reaction Mixture of GSH and NAM at Various pHs.

To 7.8 ml of buffer, 0.3 ml of GSH (6.2×10^{-3} mole) and 0.9 ml acetone solution of NAM (6.0×10^{-7} mole) were added. The following buffer systems were used: pH 3.5 (O—O), pH 5.0 (×—×); 1 M HCl-CH₂COONa pH 7.0 (Δ—Δ), pH 8.0 (□—□); 0.1 M NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 8.8 (●—●), pH 9.2 (■—■); 0.1 M Na₂CO₃-H₃BO₃·KCl.

Table II. TOTAL THIOL CONTENT OF BIOLOGICAL MATERIALS

Material and method	Thiol content found ^a	Recovery ^b	Amount of sample provided
Mouse liver	$\mu\text{mole/g}$		
NAM	4.11	100.2%	1.00 mg
DTNB	4.23	99.4	10.0
Mouse spleen			
NAM	1.37	103.3	1.98
DTNB	1.33	101.5	19.8
Mouse blood	nmole/liter		
NAM	0.97	102.8	2.60 μl
DTNB	0.93	106.7	52.0
Rat blood			
NAM	1.11	100.8	5.05
DTNB	1.11	95.0	50.5
Human urine	nmole/liter		
NAM	0.082	98.1	0.06 ml
	0.066 ^c	96.0	
DTNB	0.057	84.7	1.00
	0.056 ^c	87.2	

^a As GSH, on fresh weight basis.

^b Recovery of fluorescence intensity or light absorption of the added internal standard.

^c As cysteine which was used as an internal standard.

標準物質の回収率もほぼ 100% で試料中の共存物質によるけい光発現の妨害はないと考えられ、これらの試料においては SH 化合物の含量の算出は検量線から簡単に求められることが確認された。分析に必要な最低試料量は血液 $1.7 \mu\text{l}$ 、肝臓 0.07 mg であり同時に行った DTNB 法の 70 倍の感度で分析が可能であった。さらに植物体中の SH 化合物の定量に対しても、NAM 法の適用性が確かめられた。植物組織、果汁には有色のものが多くまた SH 化合物の含量も少ないため従来の比色法の適用は難しかった。この点 NAM 法では調製した試料液を希釈して分析できるため、そのけい光測定の際の妨害を排除でき、けい光分析法が有用な方法であることを確認できた。

第IV章 HPLC による生体中の SH 化合物の NAM を用いる個別けい光定量法

近年高速液体クロマトグラフィーは低揮性成分の迅速かつ高分離能の分離分析機器として多くの方面で使われている。NAM と SH 化合物の反応生成物はオクタデシルシリル化シリカゲル (25 ~ 35 μm) を固定相とする逆相カラムで分離できた。溶離条件(I); 0.06 M, 炭酸ソーダーホウ酸緩衝液, pH 8.8 : メタノール (13:1), 流速 0.6 ml/min で内部標準物質 6-アミノ-1, 3-ナフタレンニ硫酸ナトリウム塩 (ANS) と GSH, ホモシステイン (Homo CySH), CoA, CySH の NAM 誘導体がこの順で 12 分以内に分離できた。溶離条件(II); 0.1 M, 炭酸ソーダーホウ酸緩衝液, pH 8.8 : メタノール (15:1), 流速 0.8 ml/min で NAM-CoA と NAM-CySH が重なるが solvent front 付近のピークの分離がさらにすどくなり, ANS と GSH, HOMO CySH, CySH の NAM 誘導体がほぼ 15 分以内で分離できた (Fig. 2)。

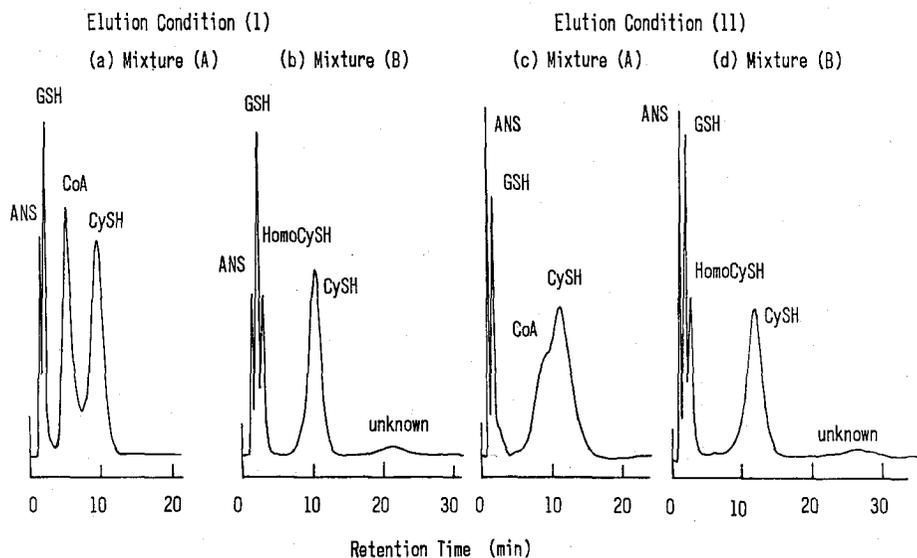


Fig. 2. High Performance Liquid Chromatograms of NAM-labeled Thiols

縦軸に ANS との GSH ではピーク高さ比を CySH ではピーク面積比をとり、注入した反応溶液中の SH 化合物の量を横軸にとり検量線の作成を行ったところ、GSH では 2.5 pmole から 2.5 nmole の範囲で、また CySH では 11 pmole から 2.7 nmole の範囲で直線関係が得られた (変動係数の平均値で 2.3 ~ 2.7%)。

ラットの血液、内臓中の SH 化合物の定量をおこなった結果、溶離条件(I), (II)において検量線から求めた値と標準添加による外そう法から求めた値が一致したこと、DTNB 法により求めた SH 化合物含量値とがほとんど一致したことより、分析法の正しさが確かめられた (Table III)。

Table III. Comparison of The Present Method with DTNB Method

Elution condition (I)					
Sample	Thiol Content				Unit
	Present Method*			DTNB Method**	
	GSH	CySH	Sum	Total	
Rat Liver	3.96	0.0	3.96	3.62	μmole/wet g
Rat Kidney	0.74	2.58	3.32	3.21	"

Elution condition (II)					
Sample***	Thiol Content				Unit
	Present Method*			DTNB Method	
	GSH	CySH	Sum	Total	
Rat Blood	1.14	0.0	1.14	1.22	mmole/l
Rat Liver	3.21	0.0	3.21	3.19	μmole/wet g
Rat Spleen	1.44	trace	1.44	1.61	"
Rat Kidney	trace	2.30	2.30	2.60	"

* The values were obtained by the calibration curve method.

** The values were obtained by a modified DTNB method.

*** Different samples were used in the elution condition (I) and (II).

一方、尿中には CySH の他に solvent front 付近に溶出される未知の SH 化合物が含まれていること、尿自身にもけい光物質が含まれているため ANS を内部標準物質として定量することはできなかった。しかしこの場合、solvent front のピークを基準ピークとし CySH を添加する標準添加法による外そう法から尿中の CySH の含量が定量できた (Table IV)。分析に用いた試料量は 1 回

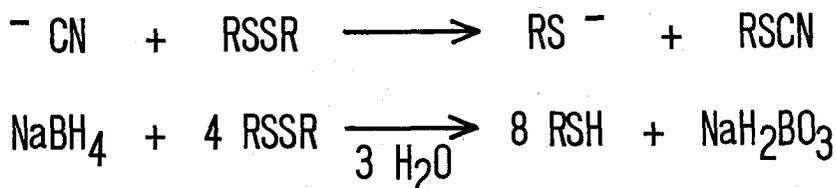
Table IV. Cysteine content in Human Urine

Method	HPLC			DTNB
	1 μl	2 μl	3 μl	1.2 ml
CySH Content (mmole/l)	0.046	0.047	0.047	0.061

(10 μl) 当りの注入量として血液 0.17 μl , 内臓 0.03~0.07 mg, 尿 1 μl であり, GSH あるいは CySH として 0.05~0.1 nmole であった。この感度はアミノ酸自動分析機を用いる SH 化合物の個別定量法と比べて 100 倍以上であった。

第 V 章 NAM による尿中の遊離 SS 化合物のけい光定量法

一般に SS 化合物の定量法としては, 還元処理によって生じる SH 化合物をその分析法に従って定量するのが普通である。



(Cys)₂ と酸化型 GSH (GSSG) の KCN あるいは NaBH₄ による還元反応条件を検討した結果, 両還元法において (Cys)₂ は GSSG に比べ還元され難く長い処理時間が必要だった。両還元法の最適条件による反応溶液のけい光強度を相対的に比べると, GSSG の場合 NaBH₄ 法が KCN 法の 2 倍となり理論と一致するが (Cys)₂ はその割合が逆に半分であり理論と一致しない。また GSSG と (Cys)₂ の測定値の比は, KCN 法では 100:80 で 1:1 に近かったが NaBH₄ 法では 100:18 とかけはなれた値であった。したがって, 両化合物を含む試料の分析の目的には KCN 法が適するものと思われた (Table V)。また, NaBH₄ による処理では測定値のバラツキも大きいため, 還元反

Table V. Relative Fluorescence Intensity of Disulfides

Reduction Method	Disulfide	F.I.	R.F.I.	
KCN	GSSG	41.5	100	
	(Cys) ₂	33.3	80	100
NaBH ₄	GSSG	85.3	206	100
	(Cys) ₂	15.4		46 18

応条件は 15% KCN 処理 45 分間おこなった。この条件下で SS 化合物の濃度とけい光強度との間には, 測定溶液中 GSSG が 10 pmole/ml から 5 nmole/ml , (Cys)₂ が 5 pmole/ml から 2.5 nmole/ml の範囲 (変動係数 2%) で直線関係が成立した。SH 化合物の共存下においても直線性は成立し, また SH 化合物は KCN 処理の有無にかかわらずけい光強度が同一であったことから, 試料中に共存する SH 化合物は SS 化合物の定量に影響をおよぼさないことが確かめられた。

尿中のSS化合物の定量は、(Cys)₂を標準物質とする標準添加法でおこなった。その結果をTable VIに示す。(Cys)₂の添加回収率はほぼ100%であり、分析供試量、標準物質の添加量を変

Table VI. Disulfide Content in Human Urine by NAM Method

(A) Sample Size μl	(B) Added Amount of (Cys) ₂ (nmole)	SS Ratio (B)/(A)	Recovery (%)	Standard Addition Method		Calibration Curve Method	
				SS Content (nmole/l)	c.v.* (%)	SS Content (nmole/l)	c.v.* (%)
2	1.48	2.5	95.1	0.291	1.7	0.292	2.2
	1.11	1.9	101.9	0.290	1.9		
	0.74	1.3	96.2	0.293	1.7		
1	1.48	5.1	99.8	0.295	1.4	0.293	1.4
	1.11	3.8	101.3	0.291	1.0		
	0.74	2.5	100.8	0.292	1.5		
	0.37	1.3	100.8	0.293	1.6		

* The c.v. means the coefficient of variation on the measurement.

えておこなった定量値も一致した。したがって、本分析法による尿中のSS化合物の定量が可能であることが証明され、さらにその他の分析試料への応用も可能であることが期待される。

第VI章 9-VAとS-アルキル化合物との発けい光反応と その分析法への応用

高濃度硫酸中でチオエーテル化合物がオレフィンと付加生成物を形成するように、9-VAとMetの反応も同様と推定された。その反応性は反応溶液中の硫酸濃度と反応温度によって異なり、反応溶液中の硫酸濃度が76% (W/W)で反応温度が45℃のとき反応生成物がほぼ1つであることがTLCで確認された。この条件下で反応性について検討したところ、Met以外のたん白質構成アミノ酸はもちろんアシルシステイン、ランチオニン、ピオチンなどのチオエーテル化合物は反応せず、エチオニン(Et)、S-メチルシステイン(SMCySH)などのS-アルキル化合物だけが反応陽性であったことから、S-アルキル化合物との反応特異性が確かめられた。これらの化合物のTLC上での検出限界はMet、Etが10 pmoleでSMCySHなどのS-アルキル化合物が0.5 nmoleであった(Table VII)。このMetの検出感度は従来の分析法の数倍の感度であった。この反応性の違いはチオ

Table VII. Detection Limits and Rf Values on Silica Gel TLC*

Compound	Detection Limit	Rf Value
Methione	10 pmole	0.41
Ethionine	"	0.26
S-Methylcysteine	0.5 nmole	0.47
S-Ethylcysteine	"	0.29
S-Propylcysteine	"	0.14

* development solvent : 20% H₂SO₄

エーテル化合物の求核性の強さに依存すると考えられた。つまり、S原子アルキル基などの電子供与性の置換基がつくと求核性が増し反応が陽性となり、カルボニル基などの電子吸引性の基がつき、その距離に近い程求核性が減少し反応性が弱められると考えられた。

9-VA はけい光性であるため、定量分析をおこなうには反応溶液から過剰の試薬を除く必要があった。この除去法としては、1.2gのシリカゲルをつめたガラス管(0.7cm I.D×15cm)で10倍にうすめた反応溶液を処理することによって簡単に達成できた。9-VA と Met の反応は76% (w/w) 硫酸中、45℃、2時間で完結し、この条件下で測定溶液中50 pmole/ml から15 nmole/ml の範囲で Met の濃度とけい光強度との間に直線性が得られ、定量性が確認された。

第七章 総括

けい光試薬 NAM を用いて、生体中の SH, SS 化合物の微量分析法の開発をおこない、従来の分析法に比べ約100倍の感度の再現性のような分析法を確立した。

- ① NAM のスプレー法による TLC の SH, SS 化合物の簡便な微量検出法。
- ② 動植物体中の低分子 SH 化合物の微量定量分析法。
- ③ SH 化合物の NAM 誘導体を HPLC で分離することによる生体中の SH 化合物の迅速な個別微量定量法。
- ④ シアノリンス還元法による尿中の SS 化合物の微量定量法。

また、高濃度硫酸中での9-VA と S-アルキル化合物との特異的な反応を見出し次の点を明らかにした。

- ① 76% (w/w) 硫酸中で9-VA と S-アルキル化合物が特異的に反応すること。
- ② S-アルキル化合物の TLC による微量検出法の確立。
- ③ Met の定量分析への応用の可能性を認証した。

審査結果の要旨

同君の研究は生体中に存在するシステイン, CoA, グルタチオン等の-SH化合物, -S-S-化合物の蛍光による超微量定量法を確立したこと, 及び-SRの定量法の基礎的な反応を明らかにした二点にある。

当研究室の奈良は, 先に新蛍光試薬N-(9-アクリジェル)-マレイミド(NAM)を合成し, これがSH基と反応して強い蛍光を示すことを見いだした。同君は, この反応を各種の生体成分中に存在する微量のSH化合物, -S-S-化合物の分析に応用することを試み, 数 μ lの血液, 尿, 各種組織及び数 μ gの穀物中における-SH及び-S-S-化合物の分離定量に成功した。

一般に, -SH化合物は酸化され易く, しかも微量なため, 加熱・濃縮等は困難であった。同君は組織中にEDTAを加え, この反応を触媒する金属を取り除き, さらに高度に希釈することにより問題を解決した。同君はシステイン, クツタレチオン, CoA等を高速液体クロマトグラフィーを用いて分離する方法を完成し, それぞれの成分の超微量個別定量法を完成した。

又, これらの酸化型である-S-S-化合物をKCNを用いて-SH化合物とし, NAMを用いて, 定量する総定量法及び高速液体クロマトグラフを用いる定量法を実用化した。さらに, メチオニン等のS-R化合物についても9-ビニル-アクリジンが硫酸の存在下で蛍光物質を与えることを利用したメチオニン定量法を検討し, 超微量分析法の可能性を明らかにした。

これらは, 食品分析化学, 栄養化学等の分野に寄与すること大きく, 農学博士の学位を与えるにふさわしい内容である。