

ヒト血清メタロチオネインの N-(9-アクリジニル)マレイミド 蛍光検出による HPLC 超高感度分析

鎌田 恒夫¹⁾, 山口 政人²⁾, 目黒 熙²⁾
(¹⁾十文字女子大学人間生活学部*, ²⁾東北福祉大学**)

Highly Sensitive Analysis of Metallothionein in Human serum by HPLC with N-(9-acridinyl) maleimide fluorometry

Tsuneo KAMATA¹⁾, Masato YAMAGUCHI²⁾ and Hiroshi MEGURO²⁾

¹⁾ Faculty of Human Sciences, Jumonji University,

²⁾ Department of Industrial Welfare, Tohoku Hukushi University

Summary

The quantitative analysis of sulfhydryl group of Metallothionein was developed in the human serum for the biomarker of the stresses toward the environments. The serum was treated by diluted hydrochloric acid and the reducing agent under the precise conditions, and analyzed by HPLC with N-(9-acridinyl) maleimide fluorometry. Sulfhydryl group was detected in pico (10–12) mole level easily and sensitively.

メタロチオネイン (MT) は、芳香族アミノ酸を含まない 61 個のアミノ酸から構成される分子量約 6000 の小さいタンパク質である。そのうちの 20 個がシステインであるが、生体中において一部は遊離スルフィドリル (SH) 基として、また一部は Zn, Cd, Cu, Ag あるいは Hg などの金属と結合している。これらの性質から、MT の生理作用として重金属の毒性軽減と蓄積、必須金属の代謝調節などが知られている。また種々の環境因子、すなわち物理的的刺激 (高温や低温, 放射線, 強制運動など), 化学的的刺激 (重金属, 炎症物質, 活性酸素生産剤, 生理活性物質など), 生物学的刺激 (細菌汚染, 癌, 炎症, 過敏症, 絶食など) で誘導合成されるので、MT は環境の抗ストレス物質と考えられ、それらの生物指標として応用される¹⁾。さらに Zn 摂取によって MT は増加し、特にストレス時には顕著に MT が増加することが報告されるので²⁾、精神的ストレスと MT との関係も調べられている³⁾。

MT の分析法として、Cd を含む場合 Cd-S 結合に由来する 250 nm 付近にある吸収 (肩) を観測する方法 (検出限界 0.265 μg)、また放射免疫法、免疫組織染色法、キャピラリーゾーン電気泳動法、ポーラログラフィー法などが報告されているが、現在では HPLC-原子吸光法が一般的である⁴⁾。本研究では HPLC の検出に SH 基検出試薬である N-(9-アクリジニル)マレイミド (NAM) を用い、シス

テイン SH 基の定量を原理とする MT の新規分析方法を開発した。

NAM は pH 5.5 以上の水溶液中で低分子 SH 化合物と瞬間的に反応して非常に強い蛍光を発する SH-NAM 複合体を生成する。この蛍光強度は SH 化合物の種類によって同一であり、SH のモル数に比例するので SH 基の定量分析ができる。第 2 の特長は空試験値がゼロであるため、測定感度が非常に高い。これはアクリジニル基の蛍光は直結したマレイミド基によって消光されているので、NAM 自体は全く蛍光を発せず、SH と結合して始めて蛍光を発するからである。第 3 に NAM 自体が嵩張った化合物であるため、高分子タンパク質とは反応し難いが、分子量が 6000 程度の小さいタンパク質である MT とは複合体を形成する。

MT の SH 基には、ジスルフィドに酸化された SH 基と、金属と結合する SH 基とがあり、それぞれに測定方法は異なる。第一法はジスルフィドを還元して SH 基を定量する方法だが、これについてはすでに報告した⁵⁾。還元方法としては電気還元法と化学還元法とがあり、我々は装置の必要としない水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) による還元を用いてきた。第一法では MT 成分に結合する金属数によって分離したと考えられる複数のピークが検出されるため、MT I~IV の異性体のクロマトグラムは複雑になり、それらの同定は困難であることが予想される。既報では

*所在地: 2-1-28 Sugasawa, Niiza Japan, 352-8510

**所在地: 1-8-1 Kunimi, Aobaku, Sendai, 981-8522

MT 異性体を分離しないオクタデシル 4PW カラム (東ソー 株) を用いた。

第二法は金属と結合する SH 基を定量する方法であるが、そのためには金属を外すことが必要である。金属の結合力は Hg, Ag, Cu, Cd, Zn の順で、Zn や Cd は容易に外れると言われるが、完全に外すことは難しい。一方 Hg は強固に結合しており、それを外す条件は知られていないので、もしすべての MT が完全に Hg で封鎖されていれば MT の測定値はゼロになる。本報告では特に亜鉛によって誘導合成される精神的抗ストレスタンパク質と考えられる MT の定量分析法について検討した。

実験方法

1. 試料と試薬の調整

- ① MT 標準体：標準試料として SIGMA 社から入手したウマ腎臓 MT (M-4766), ウサギ肝臓 MT (M-7641) およびウサギ肝臓 MT-I (M-5267) を用いた。
- ② ヒト血清：健康な 2 人の血清 (No1 と No2) を 1 ml ずつ小分けし、 -40°C の冷凍庫に保存した。血清 0.01 ml を純水 2.5 ml で希釈して分析試料としたが、希釈液は冷蔵庫で 1 ヶ月間は保存できた。
- ③ 酸化型グルタチオン (検量線)。
- ④ 水素化ホウ素ナトリウム：アミノ酸分析用 NaBH_4 0.1 g (2.64 mmol) を、湿気の吸収を避けて手早く蓋付き 2 ml 容量ガラス瓶に摂り、 -10°C 以下の冷凍庫に保存した。この状態で 2, 3 ヶ月は劣化しない。2 mM 水酸化ナトリウム 0.5 ml に溶解して使用したが、溶液は冷凍庫で 2 週間は保存できた。
- ⑤ 10% n-オクタノール：メタノール希釈液で、室温保存した。
- ⑥ 4% メタリン酸：固形メタリン酸を水に溶かして 4% 液を調製し、メンブランフィルター (Cellulose nitrate, 孔径 0.45 μm , アドバンテック東洋株) で濾過し、室温で保存した。
- ⑦ 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5)。
- ⑧ NAM: シグマ社から入手した NAM (5 mg, 18.23 μmol) をアセトンに溶解し、1.0 μmol ずつ褐色ガラス瓶に小分けした。窒素ガスを吹き込んで溶媒を除去し、密栓をして -10°C 以下の冷凍庫で保存した。アセトン 1 ml に溶解して使用するが、溶液は冷蔵庫で約 2 週間保存できた。
- ⑨ メタノールとアセトンは HPLC 用である。
- ⑩ 他の試薬は超特級である。

2. HPLC-NAM 法による MT の分析 (第二法)

0.04 N 塩酸 0.1 ml に希釈したヒト血清 0.05 ml を加え、pH 1.5, 20°C で 30 分静置した。次いで氷水で冷却しながら 0.1 N 水酸化ナトリウム 0.05 ml を加えて中和し、さらに pH 8.0 を確認した。反応液に消泡剤として 10% n-オクタノール 0.01 ml, 還元剤として NaBH_4 水溶液 0.02 ml

(NaBH_4 160 μmol) を加え、窒素ガスを封入し、pH 12.5-13.0, 50°C で 30 分加温した。次いで氷冷下、4% メタリン酸 0.09 ml を発泡に注意して静かに加え、過剰の還元剤を分解した。0.1 M リン酸緩衝液 0.06 ml を加え pH 6.5 に調整し、NAM アセトン溶液 0.02 ml を加えた。NAM は室温、約 30 分で MT の SH 基と完全に反応して蛍光を発し、2 時間は安定であった。反応液 (全量 0.4 ml) 0.02 ml を HPLC に注入した (HPLC に注入された血清は 10 nano l)。

HPLC 装置は蛍光検出器 (励起波長 360 nm, 測定波長 435 nm) を付属した東ソー株製 HPLC, カラムは同社製オクタデシル 4PW (逆相カラム 4.5 mm \times 150 mm) を使用した。分離用溶媒として 35% メタノールを 1 ml/min, カラム圧 120 Kg/cm² で溶出させた。測定時間は約 12 分であった。

NAM 蛍光複合体の蛍光強度は SH 化合物によって変わらないので、MT の SH 基を定量するために、酸化型グルタチオンを還元して検量線を作成した。0~500 pico mol の範囲で蛍光強度との間に直線関係があり、SH 基 1 pico mol 当たりの蛍光強度は 18.7×10^4 であった。

結果と考察

MT に結合する金属を塩酸処理しただけでは NAM 蛍光複合体はつくられなかったが、塩酸処理後に還元すると、ほぼ単一の大きいピークが得られた。塩酸処理後、反応液から金属塩化物を除去するため透析とゲル濾過を検討したが、MT の損失が大きく操作が煩雑になった。実際には塩酸処理に引き続く pH 12.5~13.0 でおこなわれる還元条件下で、金属塩化物は MT と再結合しないことを確認したので、反応液から金属塩化物を除去する操作を省略した。また金属を除去した MT は還元され難く、 50°C 30 分の還元条件を要した。1 個の金属に対して 3-4 個の SH 基が結合しているため、1 個の金属が外れれば 3-4 個の SH 基が遊離することになり、すべての金属が外れれば、MT に含まれるすべての SH 基を検出できる。したがって第二法が MT の定量分析に適していると考えられる。

第二法 (酸処理—還元法) で得られた 3 種類の動物の標準 MT のクロマトグラムは特徴的なピークを示した (Fig. 1)。始めの 2 つの大きいピーク (RT1.67 と 1.98) はグルタチオンなどの低分子 SH 化合物に由来する。第一法 (還元法) で得られる MT に由来する RT2.98, 3.43, 4.39 の P1~P4 のピークは、第二法によって減少し、それに伴って 6.59 の P4 は著しく増加した。したがって P1~P3 は金属を結合する MT, P4 は金属を含まない MT と推定した。第二法で得られた動物組織の MT 測定値を Table-1 に示した。第一法と第二法で得られたヒト血清 MT のクロマトグラムを Fig. 2 に示し、また第二法で得られたヒト血清 1 μl 当たりの MT の SH 基の測定値を Table-2 に示した。

謝 辞

本研究は東北福祉大学・感性福祉研究所におけるプロジェクト「生命科学を基礎とする感性和環境の相互作用に関する学際的研究」の一部を担うものであり、研究を支持していただいた東北福祉大学に感謝します。

参考文献

- 1) Shinji Koizumi (2007), Stress Responses via Metallothioneins: Roles in the Biological Defense Mecanism,, Yakugaku Zassi Vol 27, No 4, pp 663-664.
- 2) Wei-Qiang Chen, Yi-Yong Cheng, Xiao-Ling Zhao (2006), Effect of Zinc on the Induction of Metallothionein Isolation in Hippocampus in Stress Rats, Experimental Biology and Medicine 231, pp 1564-1568.
- 3) Masuo Kondoh, Daisuke Kodama, Yoshiteru Watanabe and Masao Sato (2004), Classical Conditioning of Metallothionein Synthesis in Mice, Journal of Health Science, 50(4) pp 413-416.
- 4) Curtis D. Klaassen and Lois D. Lehman (1991), Separation and Quantification of Isometallothioneins by High-Performance Liquid Chromatography-Atomoc Absorption Spectrometry, Method in Enzymology, Vol 205, pp 190-197.
- 5) Tsuneo Kamata, Masato Yamaguchi and Hiroshi Meguro (2008), Assay of Metallothionein by HPLC with N-(9-Acridinyl)maleimide Fluorometry. The Problems of Biogeochemistry and Geochemical Ecology (Russ) 4(8), pp 57-61.

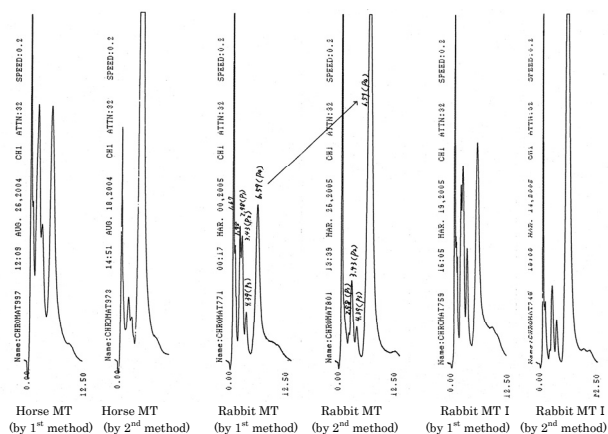


Fig. 1 HPLC Chromatogram of Standard MT of Animals

Table 1 Detected SH and Composition of MT Components of std. Animal MT

Source		SH by the 2 nd method				
		P1	P2	P3	P4	total SH
Horse kidney MT	n=15	49 ± 1 7.9	24 ± 1 3.9	550 ± 14	623 ± 16 88.3	100
Rabit liver MT	n=13	13 ± 0 0.7	87 ± 3 4.4	50 ± 1 2.6	1809 ± 21 92.4	1959 ± 25
Rabit liver MT I	n=22	113 ± 4 4.8	74 ± 2 3.2	2173 ± 32	2759 ± 32 92	100

Upper value : SH pico mol / μ g of animal MT, calculated from FI (Peak area) 18.7×10^4 pico mol of std. GSH
Lower value : Composition (%) of MT components.

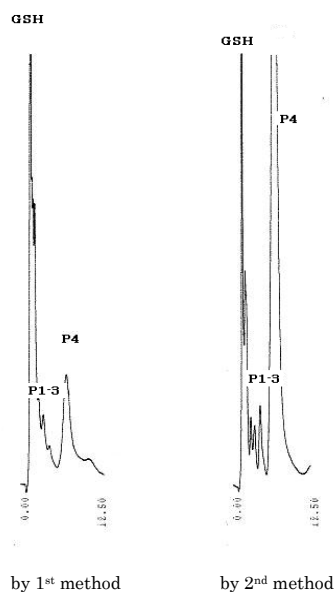


Fig. 2 HPLC Chromatograms of MT of Human Serum

Table 2 Detected SH and Composition of MT Components of Human Serum

Sample		SH by the 2 nd method				
		P1	P2	P3	P4	total SH
Plasma (No1)	n=18	29.8 ± 0.8 2.0	24.4 ± 1.0 1.6	34.5 ± 1.2 2.3	1418 ± 22 94.1	1507 ± 26 100
Plasma (No2)	n=16	20.3 ± 1.8 1.7	22.0 ± 1.2 1.8	21.4 ± 0.8 1.8	1135 ± 23 94.7	1199 ± 24 100

Upper value : SH pico mol / micro litle of serum
Lower value : Composition (%) of MT components