

Development of selective chemiluminescence assay of biological quinones and their adducts for toxicological study

(毒性学的研究を目的とする生体キノン及びその付加体の選択的化学発光検出法の開発)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 Mohamed Saleh Elgawish

【はじめに】キノンは植物や動物の体内に広範囲に見出されている化合物であり、光合成や細胞呼吸などにおける電子伝達体としての重要な機能を有している。また、ドキソルビシンなどのように医薬品として臨床的に用いられているキノンも存在している。しかし最近では、キノンの有する潜在的な毒性が注目されつつある。高い反応性を有するキノンは、DNA の核酸塩基やタンパク質のアミノ基やチオール基に対して容易に付加反応を起こし、結果として DNA の修飾やタンパク質の構造変化をもたらすとされている。さらに、キノンは生体内で酸化還元サイクルに組み込まれることで、活性酸素 (ROS) を産生することが知られている。このキノンの酸化還元サイクルに伴って発生する ROS は生体成分に酸化的な傷害を与える一因であると考えられる。従って、生体試料中に存在するキノン及びその生体成分付加体の種類や濃度を明らかにすることは、その生体影響を評価するために重要であり、そのためのキノンの高感度かつ選択的な分析法が必要とされている。

そこで、本研究ではキノンに特徴的な性質を利用することで、高感度かつ選択的なキノンの化学発光定量法の開発を行った。さらに、開発した方法を生体試料へと応用し、その実用性を評価するとともに、キノン暴露後に生体内で生じるキノン付加体の解析へと応用した。

(1)パルス紫外線照射によるキノンのマイクロプレートリーダー/化学発光分析¹⁾

キノンの示す特徴的な性質を利用する高感度、簡便かつ迅速なキノンの新規化学発光定量法の開発を行った。本方法は、キノンに紫外線を照射することでキノンをセミキノンラジカルへと変化させ、これに伴って発生する活性酸素をルミノール誘導体により発光検出するという原理に基づく方法である (Fig. 1)。本研究では、測定操作の省力化と迅速化のために、キノンへのパルス紫外線照射とそれに続く発光検出を時間分解蛍光測定が可能なプレートリーダーを用いて行った。96 穴マイクロプレートのウェルにキノンの炭酸緩衝液溶液 (pH 9.4) 及びルミノール誘導体 L-012 の炭酸緩衝液溶液 (pH 9.4) を添加した後、プレートリーダーにセットし、波長 250 nm の紫外線をパルス照射する。紫外線照射後 500 μ s から 2000 μ s の間に生じる発光を波長 450 nm において測定する。この測定操作を 100 回繰り返して、得られた発光量について積算することにより定量を行った。

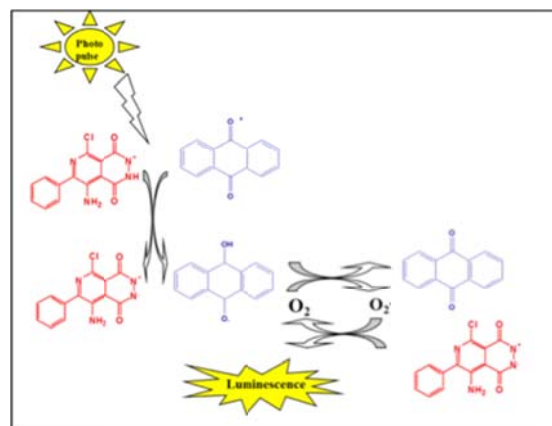


Fig 1. Suggested CL mechanism for quinones

キノン溶液と L-012 溶液を混合したウェルに対し、パルス紫外線照射を行うことにより、キノン濃度に比例して発光強度が増大した。本法においては、*p*-キノンでは強い発光が得られるのに対し、*o*-キノンは発光を示さないという結果となった。より高い感度を得る目的で各種反応条件の最適化を行った。その結果、最も高い発光が得られる紫外線の照射波長は 250 nm であり、この波長は用いたキノンの吸収波長とよく一致していた。したがっ

て、キノンが紫外線を吸収することによりセミキノンラジカルへと変化していることが示唆された。一方で、最適な測定発光波長は L-012 の発光波長である 450 nm 付近であったことから、本法で観察される発光は L-012 の酸化分解に由来するものだと考えられた。

各種測定条件の最適化を行った後、本法で高い発光を示した 3 種のキノン(9,10-アントラキノン、1,4-ナフトキノン及び メナジオン (MQ))について検量線を作成した結果、いずれのキノンについても 0.05-150 μM の濃度範囲で発光強度と濃度との間に相関係数 0.999 以上の直線関係が得られた。また、本法における MQ の検出下限 (Blank + 3SD) は 0.01 μM であり、他法と比較して 3-2000 倍程度高感度であった。また、本法の 1 試料あたりの測定時間は 5 秒と、他の方法よりも 10-480 倍短く、本法がキノンのハイスループット分析法として有用であることが明らかとなった。さらに、本法をヒト血清中の MQ の測定へと応用した結果、89%以上の良好な回収率で血清内在成分の影響を受けることなく、MQ を測定することが可能であった。

(2)メナジオン及びそのチオール付加体の高選択的 HPLC 化学発光定量法の開発とラット血漿試料への応用²⁾

生体内に取り込まれたキノンは *N*-アセチルシステイン (NAC) やグルタチオン (GS) といった生体チオールと結合して付加体を生じることで無毒化されると考えられている。しかし、これらのチオール付加体は依然として ROS 発生能を有しており、キノンと同様な有害作用をもたらすとも報告されている。そこで、生体内でのキノンの変化や毒性をより詳細に解析することを目的として、代表的なキノンである MQ とその NAC 及び GS との付加体 (MQ-NAC 及び MQ-GS) との同時分析が可能な HPLC 化学発光定量法の開発を行った。本法は、キノンをジチオスレイトール (DTT) のような化学的還元剤により還元することで、その酸化還元サイクルを誘起させ、これにより発生する ROS をルミノールにより化学発光検出するという原理に基づいている (Fig. 2)。この反応を組み込んだ HPLC システムにおいて、MQ、MQ-NAC 及び MQ-GS はいずれもその濃度の依存する化学発光ピークを与え、5-240 nM の濃度範囲で濃度とピーク高さとの間に良好な直線性が得られた。また、本法による MQ-NAC、MQ-GS 及び メナジオンの検出下限 (Blank+3SD) はそれぞれ 1.4, 0.8 及び 128 fmol/injection であった。

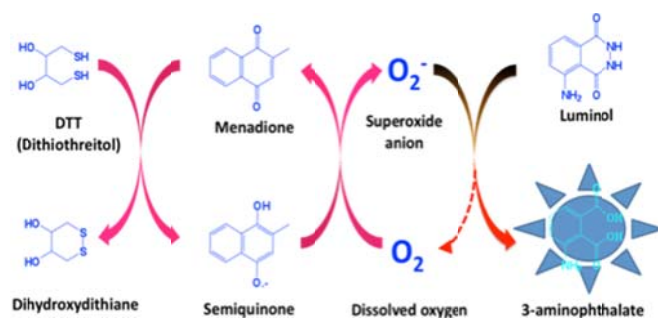


Fig 2. Redox cycling-based CL assay of quinone

開発した HPLC 定量法を、MQ 投与後のラット血清試料へと応用した。その結果、ラット血清より MQ-NAC 及び MQ-GS のピークが検出され、投与された MQ がラットの体内に存在する NAC 及び GS と反応することで MQ-NAC 及び MQ-GS が生成したと考えられた。また、ラット血清より得られたクロマトグラムには MQ-NAC 及び MQ-GS 以外にも MQ 投与後にはじめて検出される未知ピークが見出されており、これらが MQ-NAC 及び MQ-GS と同様に MQ が付加した生体成分だと考えられた。さらに本 HPLC 法は、キノンのチオール付加体の安定性や可逆性の調査にも応用することが可能であった。以上のように、本研究で開発した HPLC システムは生体内に存在するキノン付加体を選択的かつ一斉に測定することが可能であり、これら付加体の毒性や挙動を調査するために有用であると考えられる。

(3)キノンの酸化還元サイクルを利用する化学発光法によるキノン付加タンパク質の選択的解析法

キノンとタンパク質との結合による付加体の生成は糖尿病やアルツハイマー病などの疾患に関与すると考えられていることから、キノン付加タンパク質の生体内での存在や生成量を調査することは毒性学的に興味深い。しかしながら、複雑な成分より構成されている生体中から、キノン付加タンパク質を検出することは非常に困難である。そこで、(2)と同様にキノンの酸化還元サイクル化学発光を利用するキノン付加タンパク質の検出法の開発を行った。最初に、ヒト血清アルブミン (HSA) を MQ とインキュベートすることにより、MQ 付加 HSA の調製を行った。MQ 付加 HSA の精製は透析法により行い、その構造確認は吸収スペクトル測定や MALDI-TOF-MS 等により行った。調製した MQ 付加 HSA は本法において発光応答を示したのに対し、MQ 未処理の HSA では発光が観察されなかった。従って、MQ が共有結合を介して HSA に付加することにより、HSA が発光性を示すようになったと考えられた。種々の構造解析の結果、Cys34 の遊離チオール基に加えてリジン側鎖のアミノ基に対して MQ が Michael 付加することにより、MQ 付加 HSA が生成したと考えられた。次に、酸化還元サイクル化学発光反応を組み込んだゲルろ過 HPLC システムを用いて、MQ 投与後のラット血漿中に存在する MQ 付加タンパク質の解析を試みた。その結果、UV クロマトグラム (Fig. 3(A)) では、ラット血漿中に存在する様々なタンパク質に由来するピークが多数検出された。一方、キノン付加体のみが選択的に検出される化学発光クロマトグラム (Fig. 3(B)) では、保持時間約 17 分に一種類のタンパク質のみが検出された。この化学発光クロマトグラムのみで検出されたタンパク質は、他のタンパク質よりも高いキノンとの反応性を有していると考えられ、その構造の同定は現在進行中であるが、その保持時間からアルブミンが含まれていることが示唆されている。

本手法は、多数のタンパク質が共存する生体試料中からキノンが付加したタンパク質のみを選択的に検出可能であり、キノン付加タンパク質の性質やその生体影響を調査するための有用な手法になり得ると考えている。

【基礎となる学術論文】

1. M. S. Elgawish, C. Shimomai, N. Kishikawa, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda, *Analyst*, 2012, 137, 4802.
2. M. S. Elgawish, C. Shimomai, N. Kishikawa, K. Ohyama, M. Wada, N. Kuroda, *Chem. Res. Toxicol.*, 2013, 26, 1409.

【参考文献】

1. N. Kishikawa, M. Nakao, M. S. Elgawish, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda, *Talanta*, 2011, 85, 809.

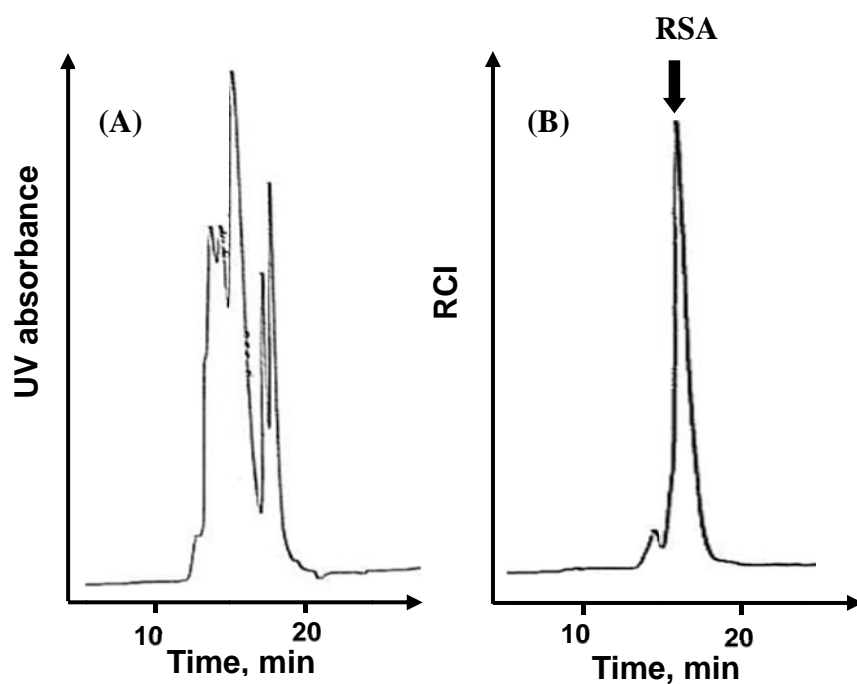


Fig 3. Chromatogram of rat plasma after 1hr of MQ administration (A) UV detection and (B) CL detection.