

博士（薬学）（課程）2001年3月

安定同位体標識ポリアミンを利用する方法論の開発と応用

許 泳 吉

放射性同位元素 (RI) 標識化合物は今日の各種研究の発展に大いに貢献してきたが、RI 法の欠点は、放射能汚染による制約があること、また放射能を測定するため別途に標識化合物を同定しなければならないことである。これに対して安定同位体 (SI) 標識化合物は通常の実験室で操作でき、検出はマススペクトロメトリー (MS) によるため、標識化合物の正確な同定が同時に行える。さらに近年のハード、ソフト両面における MS の目覚ましい進歩は、検出感度面でも RI に勝るとも劣らなくなっている。このような現状を背景にして、ポリアミン研究分野に SI 標識ポリアミンを利用する新しい方法論を導入し、新知見を得ることを目的とした。

第1章 イオンブレイイオン化マススペクトロメトリー (IS-MS) によるポリアミンの同時分析法の開発

本章では、プトレシン (Put)、スベルミジン (Spd)、スベルミン (Spm) を、HPLC や CE のような分離手段を用いずに、IS-MS で同時分析する新しい方法論の開発について記述した。ポリアミンは質量数が小さい上に複数の荷電を有しているため、直接 IS-MS での分析はできず、誘導体にならなければならなかった。誘導体としては種々検討した結果、HFB-誘導体が最もよかった。溶媒としては、0.5% AcONH₄ - 50% CH₃CN を用いて、正イオン検出で主ピークとして得られる NH₄⁺ の結合した偽分子イオンを測定対象イオンとした。試料の注入は、シリンジとイオン源の間に注入用バルブを装着して行い、それに伴って必要となる積算条件などを検討した結果、設定した条件下で測定時間は約3分、検出限界は10 fmol 程度であった。また、方法の信頼性を調べるため、ラット肝除タンパク上清を試料として、それに Put、Spd、Spm の標準溶液を添加し、内標準物質として ¹⁵N-Put、Spd、Spm を一定量加えた後、CMC 処理して得られたポリアミン分画を HFB 化して測定し、内標準物質に対するイオン強度比を基準に各ポリアミンについて定量の正確さ、精密さを調べた結果、十分満足できる検量線、変動係数を得ることができた。

第2章 限外ろ過を利用するラット肝ホモジネート中吸着形及び解離形ポリアミンの解析

Potter-Elvehjem ホモジナイザーでホモジナイズし、市販の分子量5000カット膜をつけた加圧型限外ろ過キットで得られる限外ろ液中のポリアミンを仮に解離型ポリアミンと定義し、吸着型ポリアミンと共に定量する方法を開発した。ホモジネート中に含まれる全ポリアミンのうち、本法で測定の対象になるポリアミンの割合を調べるため、¹⁵N-標識ポリアミンを添加し、天然と¹⁵N-標識体の比をホモジネートと限外ろ液で比較することにより、肝臓内ポリアミンの約90%が添加した¹⁵N-標識体と平衡

化することがわかった。次に、吸着形と解離形のポリアミン量を求めるためにはホモジネート中に含まれる限外ろ液量が必要であり、PBS と蒸留水による Spm の希釈実験からそれはホモジネート1g当たり0.25g であることがわかった。その値を用いて正常ラット肝ホモジネートに含まれる吸着ポリアミンと解離ポリアミンをそれぞれ計算したところ、全ポリアミンに占める解離ポリアミンの割合は、Put、Spd、Spm それぞれ約25%、8%、2%となった。さらに、本法を用いてラット再生肝ホモジネートの吸着ポリアミンと解離ポリアミンを測定し、細胞増殖から静止過程で両者がどのように変化するかを調べ新しい知見を得た。また、肝ホモジネート中アミノ酸や無機イオンなどの低分子化合物にも応用し、本法の有用性を示した。

第3章 15N-標識ポリアミンを利用するトレーサー実験法の開発

IS-MS 法を利用してポリアミントレーサー実験法を開発するために、内標準物質の高収率合成法を検討した。¹⁵N-Put、Spd、Spm をトレーサー化合物にするために、内標準物質としてそれらより質量2大きい¹³C、¹⁵N-Put、¹³C、¹⁵N-Spd、¹³C、¹⁵N-Spmを選んだ。基本化合物である ¹³C、¹⁵N-Put の合成は、新たに K¹³C¹⁵N を標識化合物として用い、得られる標識スクシノニトリルの接触還元により行った。¹³C、¹⁵N-Spd は、mono-Z-¹³C、¹⁵N-Put の高収率調製法とその mono-benzyl 体である mono-z-¹³C、¹⁵N-Put-Ben の成功により、満足し得る収率で得ることができた。¹³C、¹⁵N-Spd は従来法で行った。このようにして調製した内標準物質を、Put、Spd、Spm および ¹⁵N-Put、¹⁵N-Spd、¹⁵N-Spm を含む試料溶液に加え、IS-MS で同時分析して得られたイオン強度比から、それぞれCV 5~7%の信頼性で定量することができた。また、ラット肝の PCA 除タンパク上清への添加回収実験でもその信頼性を確かめた。

このようにして確立した方法の応用として、ラットに ¹⁵N-標識ポリアミンを経口投与して、小腸、肝、腎への取り込みを、対照群とトランス-4-メチルシクロヘキシルアミン (4MCHA) 処置群について調べた。その結果、消化器から体循環系を経て組織へのポリアミンの取り込みは常時行われており、対照群と4MCHA群では後者が若干多めであり、取り込まれ易さはSpd が最も大きく、ついで、Spm、Put であるなど興味ある結果が得られた。このように本法はポリアミンの生合成、吸収、相互変換を同時に調べることができる優れた方法であることが示された。