

# クロロアセトアルデヒドによる アデノシン一リン酸 (AMP) の蛍光化反応条件の検討

本間 啓子 大寄 貴子\* 野口 弥生\* 周 震宇\*\*  
菅原 清\*\* 加藤 聖\*\* 馬渡 一浩

## KEY WORDS

AMP, chloroacetaldehyde, fluorescence, reaction conditions

### はじめに

アデニンは核酸 (DNA, RNA) に含まれるプリン塩基であり, アデノシン三リン酸 (ATP) のような高エネルギーリン酸化合物やニコチンアデニンジヌクレオチド (NAD) などの補酵素の構成成分でもある。さらに近年, ATP やアデノシンが神経系におけるシナプスの形成への関与, 神経伝達物質, モジュレーターとして注目されている<sup>1,2)</sup>。これらのことからアデニン誘導体の簡便でより高感度な分析法が求められている。

アデニンはクロロアセトアルデヒドと反応させると 1, N<sup>6</sup>-エテノアデニンに変化し, 蛍光性を示すことが知られている<sup>3)</sup>。我々は前報<sup>4)</sup>で, この反応により蛍光化したアデニン誘導体混合物を陰イオン交換を用いる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法で分離分析できることを報告した。しかし, この蛍光化の反応条件については, 詳細が明らかにされていない<sup>5,6,7)</sup>。そこで, 今回はアデノシン誘導体としてアデノシン一リン酸 (AMP) を用い, 反応液のクロロアセトアルデヒド濃度, pH, 温度と反応時間が蛍光化反応に及ぼす効果について検討した。

### 実験方法

#### 1. 試 薬

AMP, 過塩素酸, 炭酸カリウム, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム, 40%クロロアセトアルデヒド, 酢酸ナトリウム, 酢酸, クエン酸, クエン酸

ナトリウム, リン酸一水素二ナトリウム, リン酸二水素一ナトリウムは和光純薬製を使用した。水は, すべて超純水 (MilliQ) を使用した。

#### 2. 機 器

遠心機はマイクロ冷却遠心機は KUBOTA・1700 を, 蛍光分光光度計は日立 F-2000型, 恒温槽はタイテック THERMO MINDER EX を耐熱プラフドを用いて使用した。

#### 3. 蛍光化反応

1 mM AMP 500  $\mu$ l を 1 mM EDTA を含む 0.6 N 過塩素酸 500  $\mu$ l と混和し, 3 M 炭酸カリウム 50  $\mu$ l を加えて 0°C 10 分間中和した。その後, 1 万回転で 10 分間遠心した上清を AMP 試料として用いた。

マイクロテストチューブに AMP (0~1 mM) 25  $\mu$ l, 緩衝液 12.5  $\mu$ l, クロロアセトアルデヒド (7.5 mM~600 mM) 12.5  $\mu$ l, 水 75  $\mu$ l を加え, 一定温度 (0°C, 40°C, 60°C, 80°C) で反応させた。一定時間経過後, 反応液 20  $\mu$ l を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) 1.98 ml に入れ反応を停止させた。

#### 4. 蛍光強度測定

AMP の蛍光化誘導体の励起および蛍光スペクトルを測定した結果, 励起スペクトルのピークは 310 nm, 蛍光スペクトルのピークは 410 nm であった。そこで, 蛍光強度の測定は, 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) 中で, 励起波長 310 nm, 蛍光波長 410 nm, 光路長 1 cm の蛍光セルを用いて行った。

金沢大学医学部保健学科検査技術科学専攻

\* 金沢大学医学部保健学科検査技術科学専攻 1 回生

\*\* 金沢大学大学院医学研究科分子神経情報学

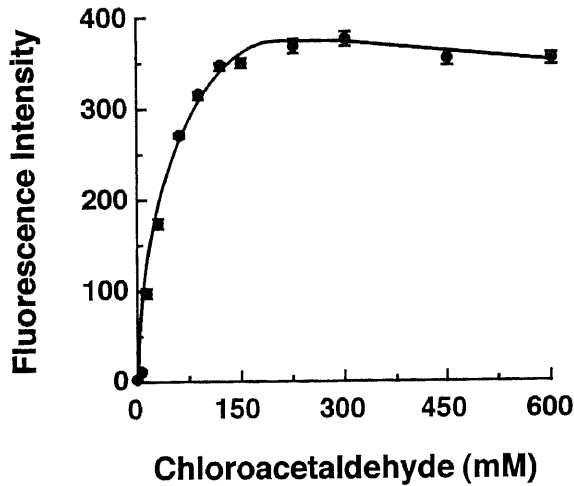


図1 クロロアセトアルデヒド濃度の反応に及ぼす効果

1 mM AMP 25  $\mu$ l を 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で、クロロアセトアルデヒド (0 ~ 600 mM) 存在下、80  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応液 20  $\mu$ l を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) で 100 倍希釈し、光路長 1 cm の蛍光用キュベットを用いて蛍光強度を測定した。測定値の平均値  $\pm$  標準偏差 (n = 3) をプロットした。

励起波長: 320 nm; 蛍光波長: 410 nm.

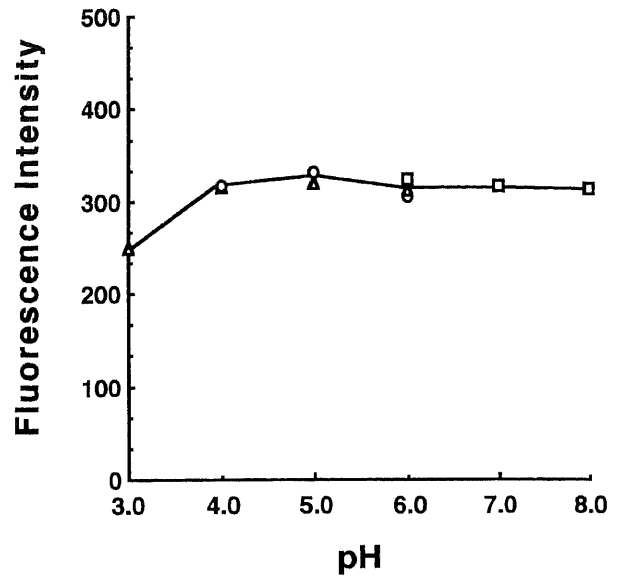


図2 pH の反応に及ぼす効果

1 mM AMP 25  $\mu$ l を pH の異なる緩衝液 (pH 3.0 ~ 8.0) 中で、225 mM クロロアセトアルデヒド存在下で、80  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応液 20  $\mu$ l を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) で 100 倍希釈し、蛍光強度を測定した。蛍光測定条件は図 1 に同じ。

$\Delta$ : クエン酸緩衝液 (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0)  
 $\circ$ : 酢酸緩衝液 (pH 4.0, 5.0, 6.0)  
 $\square$ : リン酸緩衝液 (pH 6.0, 7.0, 8.0)

### 結果および考察

#### 1. クロロアセトアルデヒド濃度の蛍光化反応に及ぼす効果

反応液中のクロロアセトアルデヒドの最終濃度を 0 ~ 600 mM と変えて、1 mM AMP を酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中、80  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、反応後に測定した蛍光強度とクロロアセトアルデヒド濃度との関係を図 1 に示した。クロロアセトアルデヒド濃度が 150 mM までは、濃度が高いほど蛍光強度が大きくなったが、225 mM 付近でピークに達した。それ以上にクロロアセトアルデヒド濃度を高くすると蛍光強度は緩やかに低下した。また、今回の測定条件下では、蛍光強度はブランクではほぼ 0 であり、 $N^6$ -エテノ AMP の生成量を反映するため、蛍光強度が大きいほど反応が進みやすい条件であると考えられる。したがって、クロロアセトアルデヒドの最終濃度は 225 mM が適切であることがわかった。

#### 2. pH の蛍光化反応に及ぼす効果

1 mM AMP を pH の異なる緩衝液中で、クロロアセトアルデヒド (最終濃度 225 mM) 存在下、80  $^{\circ}$ C 30 分間反応させ、蛍光強度を測定した。図 2 に反応液の pH と蛍光強度との関係を示した。pH 3 の蛍

光強度は小さかったが、pH 4 ~ 8 では蛍光強度がほぼ一定であった。今回検討した中では、酢酸緩衝液 pH 5.0 のときに蛍光強度が一番大きかったので、以後の蛍光化反応は 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いることにした。

#### 3. 温度の蛍光化反応に及ぼす効果

1 mM AMP と 50 mM 酢酸緩衝液 pH 5.0 を 4 本のマイクロテストチューブに入れ、各々のマイクロテストチューブを 0  $^{\circ}$ C, 40  $^{\circ}$ C, 60  $^{\circ}$ C, 80  $^{\circ}$ C で静置した。225 mM クロロアセトアルデヒドを入れて反応を開始し、15 分、30 分、60 分、90 分、120 分、180 分経過後の蛍光強度を測定した。異なる温度における蛍光強度の経時的変化を図 3 に示した。0  $^{\circ}$ C では、3 時間後でも全く反応は起こらなかった。しかし、40  $^{\circ}$ C, 60  $^{\circ}$ C, 80  $^{\circ}$ C と反応温度が高くなると、蛍光強度の増加が大きくなった。蛍光強度は 60  $^{\circ}$ C では約 120 分で、80  $^{\circ}$ C では約 30 分でほぼ一定になり、反応が終了していることが分かった。この結果から、反応温度は 80  $^{\circ}$ C、反応時間は 30 分が適切であることが分かった。また、蛍光化反応は 0  $^{\circ}$ C では起こらないことから、マイクロテストチューブを 0  $^{\circ}$ C (氷水中) に入れるだけでも反応が停止することも明らかになった。

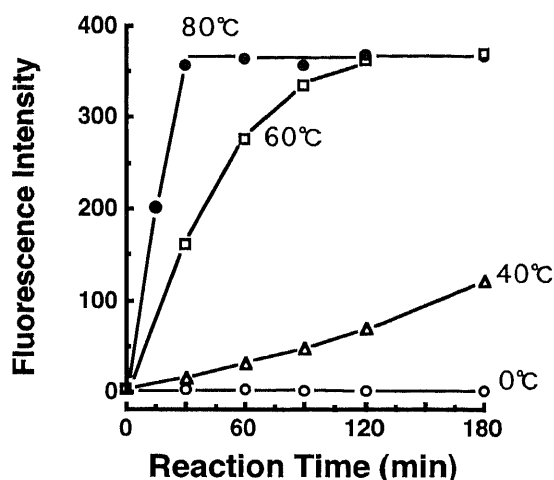


図3 温度の反応に及ぼす効果

1 mM AMP 25  $\mu$ l を 50 mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) 中, 0  $^{\circ}$ C, 40  $^{\circ}$ C, 60  $^{\circ}$ C, 80  $^{\circ}$ C で 225 mM クロロアセトアルデヒドと反応させた。反応開始から, 15分, 30分, 60分, 90分, 120分, 180分経過後, 反応液 20  $\mu$ l を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.8) で 100 倍希釈し, 蛍光強度を測定した。蛍光測定条件は図 1 に同じ。

○, 0  $^{\circ}$ C ; △, 40  $^{\circ}$ C ; □, 60  $^{\circ}$ C ; ●, 80  $^{\circ}$ C.

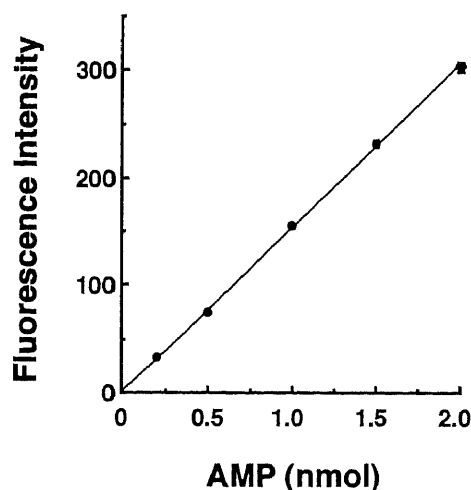


図4 AMP の検量線

AMP (0 ~ 100  $\mu$ M) に 225 mM クロロアセトアルデヒドを加え, 50 mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) 中で, 80  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応液 20  $\mu$ l (0 ~ 2.0 nmol) を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.8) で 100 倍希釈し, 蛍光強度を測定した。蛍光測定条件は図 1 に同じ。測定値の平均値  $\pm$  標準偏差 (n = 3) をプロットした。

#### 4. 検量線

AMP 量を 0 nmol から 2.0 nmol まで変えて, 50 mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) 中で 225 mM クロロアセトアルデヒド存在下, 80  $^{\circ}$ C 30 分間反応させた。反応後に測定した蛍光強度と AMP 量との関係を図 4 に示した。AMP 量と蛍光強度との間には直線関係が見られた。このことから, 蛍光強度の測定から AMP 量 (または AMP 濃度) が求められることが確かめられた。

#### まとめ

今回の実験から以下のことが分かった。

AMP を用いた時の蛍光化反応の最適条件は, クロロアセトアルデヒドの最終濃度は 225 mM, 緩衝液は 50 mM 酢酸緩衝液 pH5.0, 反応温度と反応時間は 80  $^{\circ}$ C で 30 分間であることが分かった。この反応条件下で, 反応液の蛍光強度と AMP 量 (0 nmol ~ 2.0 nmol) との間には直線関係が認められた。

#### 参考文献

- 1) 黒田洋一郎: 記憶のメカニズム, 石浦章一編, わかる脳と神経, 38-45, 羊土社, 東京, 1999.
- 2) ディビット G. ニコルス, 青島均訳: 神経情報伝達のメカニズム, 182-201, シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京, 1997.
- 3) Barrio, J.R. et al.: Fluorescent adenosine and cytidine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46: 597-604, 1972.
- 4) 本間啓子他: 高速液体クロマトグラフィーによるアデニンヌクレオチド (ATP, ADP, AMP) の同時定量. *金大医保紀要*, 22: 183-186, 1998.
- 5) Wojcik, W.J., Neff, N.H.: Adenosine measurement by a rapid HPLC-fluorometric method: Induced changes of adenosine content in regions of rat brain. *J. Neurochem.*, 39: 280-282, 1982.
- 6) Jacobson, M.K. et al.: Sensitive and selective assay for adenosine using high-pressure liquid chromatography with fluorometry. *Am. J. Physiol.*, 245: H887-H890, 1983.
- 7) Ramos-Salazar, A., Baines A.D.: Fluorometric determination of adenine nucleotides and adenosine by ion-paired, reverse-phase, high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 145: 9-13, 1983.

**A study on reaction conditions for fluorescent derivatization  
of adenosine-5'-monophosphate (AMP) with chloroacetaldehyde**

Keiko Homma, Takako Osaki, Yayoi Noguchi, Zhen-Yu Zhou  
Kiyoshi Sugawara, Satoru Kato, Kazuhiro Mawatari