

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

本間 啓子 菅原 清* 加藤 聖* 馬渡 一浩

KEY WORDS

Adenine nucleotide, HPLC, Anion-exchange, Chloroacetaldehyde, fluorometry

はじめに

Barrioらは、アデニンをクロロアセトアルデヒドと反応させると、蛍光性の1, N⁶-エテノアデニンを生ずることを報告している¹⁻³⁾。これまで、これらのアデニンヌクレオチドの1, N⁶-エテノ誘導体は、逆相カラムを用いる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法で測定されてきた³⁻⁶⁾。ところが、ATP, ADP, AMPはそれぞれリン酸基の数が異なるため、陰イオン交換カラムにより分離できると考えられる。しかし、イオン交換カラムを用いる方法については報告がない。

そこで今回、我々はATP, ADP, AMPを同時定量する目的で、これらをクロロアセトアルデヒドと反応させ、生成する1, N⁶-エテノ誘導体を陰イオン交換カラムを用いるHPLC-蛍光検出法で分析する方法について検討した。さらに、この方法の培養細胞系への適用についても調べたので報告する。

実験方法

1. 試薬

リン酸一水素二カリウム (特級), リン酸二水素一カリウム (特級), 過塩素酸 (特級) はナカライテスク製を, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (特級), 炭酸カリウム (特級), 40%クロロアセトアルデヒド (化学用), トリパンプルーは和光純薬製を用いた。アデノシン三リン酸二ナトリウム (ATP), アデノシン二リン酸二ナトリウム (ADP), アデノシン一リン酸二ナトリウム (AMP) はオリエンタル酵母製を用いた。ダルベッコ変法イーグル

培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) はGIBCO社, 牛胎仔血清はSEBAK社のものを使用した。試料の調整, 移動相の調整などに必要な水はすべてミリポア社のMILLI-Qシステムで精製したのものを使用した。

2. 機器

励起および蛍光スペクトルは、日立F-2000型分光蛍光光度計で測定した。

HPLCはシリカ系陰イオン交換用カラム (Shim-pack WAX-1, 4.0mmφ×5 cm) を用い、送液ポンプは東ソーCCPM, 蛍光検出器は東ソーFS-8010, データ処理装置に日立D-2000を使用した。

3. HPLC条件

移動相は、A液 (50mMリン酸カリウム緩衝液, pH7.0) とB液 (500mMリン酸カリウム緩衝液, pH6.8) を脱気して用いた。カラムの平衡化はA液で行い、溶出はB液の直線勾配 (0%→100%) で行なった。まず、0分から8分で、B液の割合を0%から100%まで上昇させ、その後13分までB液100%を流した。次の7分間はA液を流し、カラムを再平衡化させた。移動相の流速は1 ml/分、分析温度は45°Cでサンプルの注入量は20 μlとした。

4. アデニンヌクレオチドの蛍光化

種々の濃度 (0-50 μM) のアデニンヌクレオチド (ATP, ADP, AMP) をエッペンドルフチューブに100 μl採り、0.1M酢酸緩衝液pH5.0を250 μl, 水100 μl, 4%クロロアセトアルデヒド50 μlを加えて、80°Cで30分間反応させ、1, N⁶-エテノ誘導体化した⁶⁾。

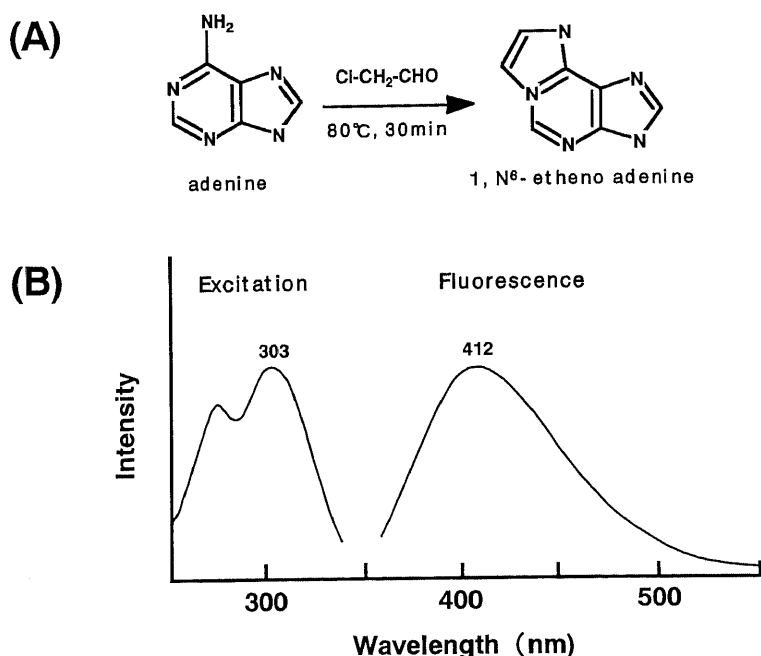


図1-A アデニンとクロロアセトアルデヒドとの反応
 図1-B 1, N⁶-エテノアデニン三リン酸の励起・蛍光スペクトル
 100 μMのATP標準液を4%クロロアセトアルデヒドと80°Cで30分間反応させ、生成物を50mMリン酸緩衝液で20倍に希釈し測定した。励起スペクトルは蛍光波長412nmで、蛍光スペクトルは励起波長303nmで測定した。

5. C6細胞の培養

ラット由来C6グリオーマ細胞は、10%牛胎仔血清加DMEMにて、10%CO₂存在下で35mm培養皿に2×10⁵個/ml密度で培養した^{7,8)}。

6. C6細胞からのアデニンヌクレオチドの抽出

C6細胞は培養後約72時間経過したものを、シャーレからはがして、懸濁後、トリパンブルー法で細胞数を計測した⁹⁾。4 mlの細胞浮遊液をリン酸緩衝食塩水,pH7.4で1回洗浄後、1 mM-EDTAを含む0.6 N過塩素酸 1 mlを加え、30分間氷水中に放置した。3 M炭酸カリウム溶液を100 μl加え中和し、氷水中でさらに10分間放置後、10000回転で10分間冷却遠心した。その上清100 μlに、0.1M酢酸緩衝液pH5.0を250 μl、水100 μl、4%クロロアセトアルデヒド50 μlを加えて、80°Cで30分間反応させた。反応終了後、直ちに氷水中で冷却し、20 μlをHPLCで分析した。

結果および考察

図1-Aにアデニンとクロロアセトアルデヒドとの反応式を示した。この反応の結果生成する1, N⁶-エテノアデニンは蛍光性であることが知られ

ている¹⁾。そこで、HPLC測定条件下での1, N⁶-エテノ誘導体の励起波長と蛍光スペクトルのピーク波長を調べた。図1-Bに、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)中で測定した1, N⁶-エテノATPの励起および蛍光スペクトルを示した。この結果から、HPLC検出には励起波長303nm、蛍光波長412nmを用いることにした。

これらの波長を用いて、ATP, ADP, AMPの1, N⁶-エテノ誘導体混合物を陰イオン交換カラム-HPLCで分析した結果を示した(図2)。3本のピークの溶出時間は各々、2.85分、5.85分、8.77分であった。一方、AMPの1, N⁶-エテノ誘導体を単独分析したところ、溶出時間は約2.85±0.005分であった。同様にADPとATPの1, N⁶-エテノ誘導体の単独分析の結果から溶出時間は各々約5.85±0.01分、約8.78±0.02分であった。これらのことから、3種類の1, N⁶-エテノ誘導体混合物を分析したとき出現した3つのピークは溶出時間の短いものから順にAMP, ADP, ATPであることがわかった。従って、溶出順序はリン酸基の数または負の荷電の多いものほど遅く、陰イオン交換カラムの特性から予測される順序と一致した。

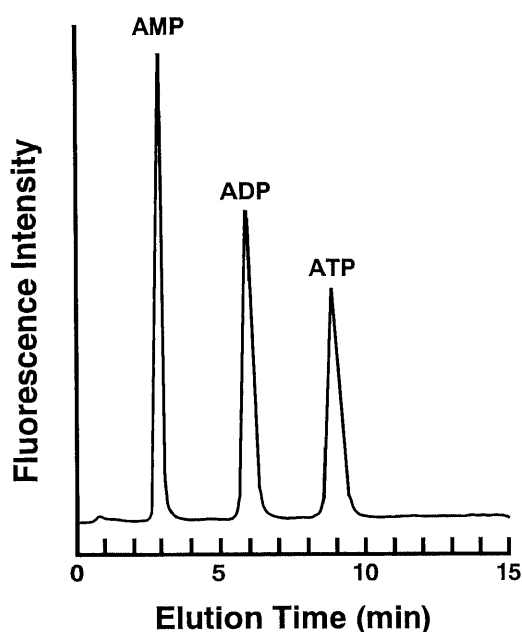


図2 アデニンヌクレオチドの1, N⁶-エテノ誘導体混合物のHPLC溶出パターン

50 μ MのATP, ADP, AMPの1, N⁶-エテノ誘導体の等量混合物20 μ lをHPLCで分析した。

カラム: Shim-pack WAX-1

流速: 1 ml/min

温度: 45°C

励起波長: 303nm

蛍光モニター波長: 412nm

溶出はリン酸濃度の直線勾配法 (50mM→500mM) により行った。

次にATP, ADP, AMPの定量性について検討した。種々の濃度のアデニンヌクレオチド (ATP, ADP, AMP) をクロロアセトアルデヒドと反応させ、その20 μ lをHPLCで分析した。図3にHPLC分析結果から求めた各ピークの高さ (蛍光強度) と濃度との関係をプロットした。ATPは0.5 μ M~50 μ M, ADPとAMPは0.25 μ M~50 μ Mの範囲でピークの高さと濃度との間に直線関係が認められた。

以上の結果から、アデニンヌクレオチドをクロロアセトアルデヒドと80°Cで30分間反応させた後、陰イオン交換カラムを用いるHPLC法で、ATP, ADP, AMPの1, N⁶-エテノ誘導体のピークを分離・検出できることがわかった。さらに、これらのピークの高さが濃度に比例することから3種のヌクレオチドを同時定量できることもわかった。

そこで、この方法の有効性を調べるために培養細胞系に適用してみた。図4にラット由来C6グリオーマ細胞抽出液をクロロアセトアルデヒド処理し、そ

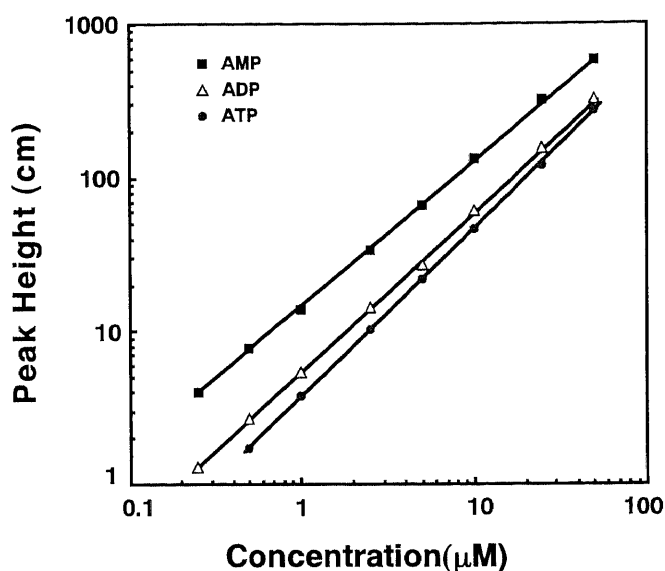


図3 ATP, ADP, AMPの検量線

HPLCピークの高さの平均値 (n = 3) を濃度に対してプロットした。標準誤差はいずれも5%以下であった。

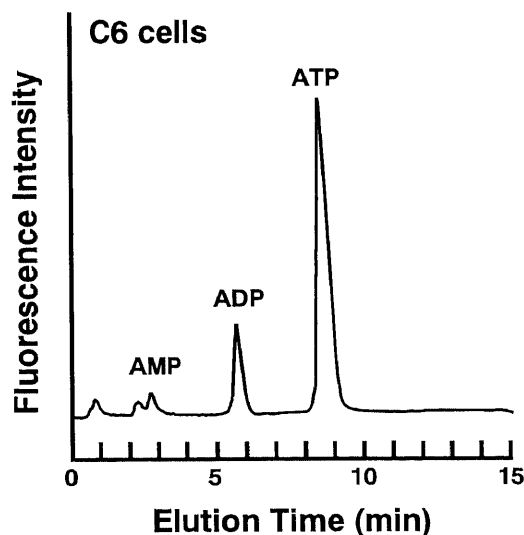


図4 C6グリオーマ細胞抽出液のHPLC溶出パターン
C6細胞 (60万) を過塩素酸処理し、炭酸カリウムで中和後、クロロアセトアルデヒドと80°Cで30分間反応させた。反応液20 μ lをHPLCで分析した。HPLC分析条件は図2と同じ。

の反応物をHPLC分析した結果を示した。図3の検量線から求めたATP量は7 nmoles/10⁶細胞であり、生物発光法¹⁰⁾で求めた値7.5 nmoles/10⁶細胞とほぼ同じレベルであった。一方、ADPは2 nmoles/10⁶細胞、AMPは0.4 nmoles/10⁶細胞であった。また、これらのアデニンヌクレオチドの分析は5~10万程度の細胞数でも十分に可能であった。

これらのことから、培養細胞系に、この方法が適用できることがわかった。さらに、この方法では逆相カラムを用いる従来の方法と異なり、移動相にメタノール、アセトニトリル、イオンペアー試薬などを使用しない。したがって廃液処理も簡便であることから、有用な方法であると考えられる。

まとめ

アデニンヌクレオチドをクロロアセトアルデヒドと反応させ、陰イオン交換カラムを用いるHPLC-蛍光法で分析することにより、ATP, ADP, AMPを同時定量できることがわかった。

文 献

- 1) Barrio, J.R. et al. : Fluorescent adenosine and cytidine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46 : 597-604, 1972.
 - 2) 渡辺光夫 : ケイ光分析, 第二版, 161-166, 廣川書店, 東京, 1977.
 - 3) G. シュベット, 一瀬典夫, F.-M. シュネペル共著 :
- 蛍光分析化学 (蛍光HPLCの生物化学・医化学への応用), 培風館, 東京, 1987.
- 4) Yoshioka, M. and Tanaka, Z. : Fluorimetric determination of adenine and adenosine and its nucleotides by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 123 : 220-224, 1976.
 - 5) Kuttesch, J.F. et al. : Analysis of adenosine and other adenine compounds in patients with immunodeficiency diseases. *J. liq. chromatogr.*, 1 : 97-109, 1978.
 - 6) Ramos-Salazar, A and Baines, A.D. : Fluorometric determination of adenine nucleotides and adenosine by ion-paired, reverse-phase, high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 145 : 9-13, 1985.
 - 7) 安井裕子 他 : アミノ酸交換輸送系を介するグルタミン酸細胞死と活性酸素種. *神経進歩*, 40 : 875-884, 1996.
 - 8) 馬渡一浩 他 : グリア毒 (DL- α -アミノアジピン酸と6-アミノニコチン酸アミド) の細胞毒性機序の比較検討. *神経化学*, 35 : 454-455, 1996.
 - 9) 本間啓子 他 : 細胞毒性測定のための乳酸脱水素酵素アッセイ法. *金大医保紀要*, 21 : 69-71, 1997.
 - 10) 馬渡一浩 他 : 発光分析法によるアデノシン三リン酸 (ATP) の測定条件の検討. *金大医短紀要*, 18 : 151-154, 1994.

Simultaneous Determination of Adenine Nucleotides (ATP, ADP, AMP) by High Performance Liquid Chromatography

Keiko Homma, Kiyoshi Sugawara, Satoru Kato, Kazuhiro Mawatari