

はじめに

近年、硫黄原子が連結したパースルフィドやポリスルフィドのようなサルフェン硫黄 (Sulfane Sulfur) を含む分子種が生体内に多く存在していることが明らかにされています。このような分子種は、硫化水素の産生や貯蔵、放出だけでなく、S-スルフヒドリル化などのタンパク質内チオールをターゲットとしたシグナル伝達にも関与していることが確認されており、非常に注目されています。また、パースルフィドやポリスルフィドは、一般的な還元物質であるシステインやグルタチオンよりも還元能が非常に高いため、生体内で高度な抗酸化物質として機能している可能性も示唆されています。

Sodium polysulfide (Na₂S_n) は、サルフェン硫黄を含む分子として最も単純な構造を有するサルフェン硫黄ドナーであり、水溶液中では pH に応じて種々の構造を有する Hydrogen polysulfide として存在します。本試薬類は、パースルフィドやポリスルフィドのようなサルフェン硫黄 (Sulfane Sulfur) を含む分子種の生体内機能の解明や解析に有用です。

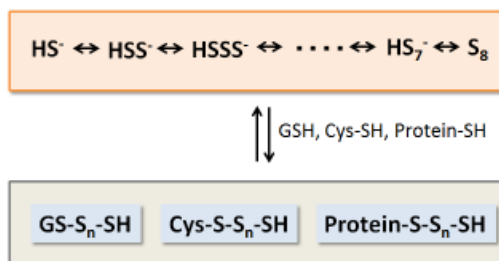
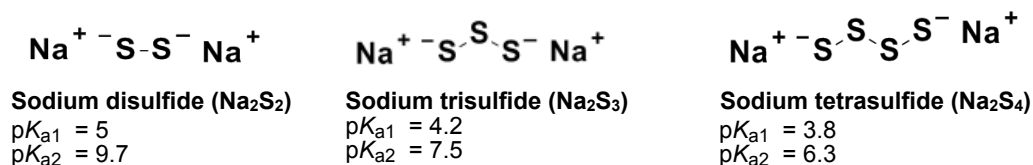


Fig. 1 サルフェン硫黄 (Sulfane Sulfur) を含む分子種



※ pK_a 値は下記の文献を参照しています。

J. Gun *et al.*, "Electrospray Ionization Mass Spectrometric Analysis of Aqueous Polysulfide Solutions", *Microchim. Acta*, **2004**, 146, 229

Fig. 2 Sodium polysulfide (Na₂S_n) の構造と pK_a 値

内容

- SB02 -SulfoBiotics- Sodium disulfide (Na₂S₂) : 100 mg x 5
 SB03 -SulfoBiotics- Sodium trisulfide (Na₂S₃) : 100 mg x 5
 SB04 -SulfoBiotics- Sodium tetrasulfide (Na₂S₄) : 100 mg x 5
 SB13 -SulfoBiotics- Sodium Polysulfide Set : Na₂S₂, Na₂S₃, Na₂S₄ 各 100 mg x 1

保存条件

0 ~ 5°Cで保存してください。

使用上の注意

本試薬類は非常に吸湿性が高いため、充分室温に戻してからご使用ください。
 開封後は、窒素封入し、なるべく早くご使用ください。

使用方法

- 1) Na₂S_n を秤量し、超純水（窒素バブリング処理済）を添加し、100 mmol/l Na₂S_n 水溶液を調製する。
 (例：100 mmol/l Na₂S_n 水溶液；Na₂S₂ 11 mg/ml, Na₂S₃ 14.2 mg/ml, Na₂S₄ 17.4 mg/ml)
 - 2) この溶液を実験に応じて超純水（窒素バブリング処理済）で希釈し、ご使用ください。
- ※超純水は使用前に 30 分以上、窒素バブリングを行ってください。溶存酸素によって酸化される可能性があります。
 ※調製した Na₂S_n 水溶液は、保存できません。溶液調製後、すぐにご使用ください。

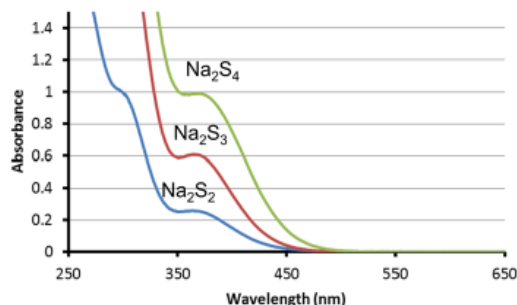


Fig. 3 1 mmol/l Sodium polysulfide (Na₂S_n) 水溶液の吸収スペクトル

実験例 1 - Hydrogen polysulfide の還元能測定 (WST-8 法) -

- 1) 20 $\mu\text{mol/l}$ WST-8 (PBS) 1ml に 10 mmol/l Na_2S_n 水溶液 10 μl を添加した (終濃度 Na_2S_n 100 $\mu\text{mol/l}$)。
- 2) 室温で 30 分間静置した後、96-well plate の各ウェルに 100 μl ずつ添加し、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm 吸光度を測定した。

* WST-8 は小社で開発した水溶性テトラゾリウム塩であり、還元されることによって黄色のホルマザンに変化します。

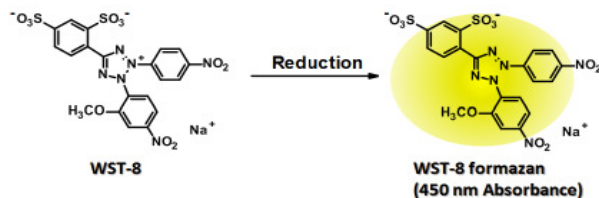


Fig. 4 WST-8 還元による発色

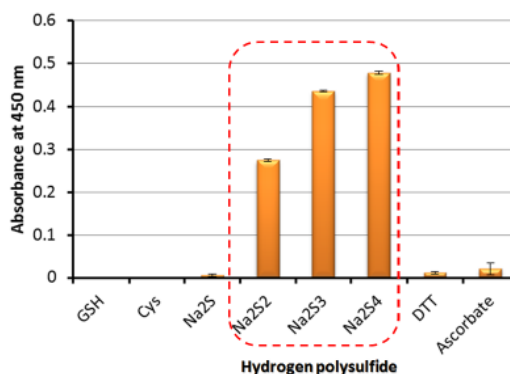


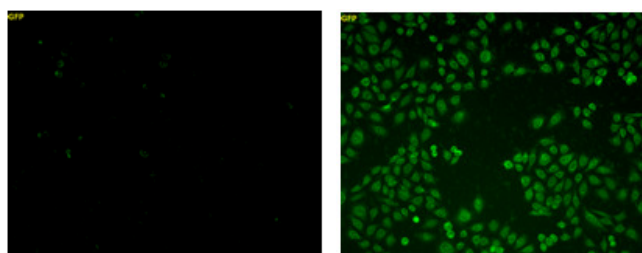
Fig. 5 各種還元物質によって生成された WST-8 formazan 由来の 450nm 吸光度

一般的な還元物質であるグルタチオン (GSH) やシステイン (Cys) では、還元反応による WST-8 formazan 由来の発色は観察されなかったが、Hydrogen polysulfide では発色が観察された。以上の結果から、Hydrogen polysulfide は、グルタチオン (GSH) やシステイン (Cys) よりも非常に高い還元能を有することが確認された。

実験例 2 - サルフェン硫黄ドナー (Na_2S_3) 添加による細胞内サルフェン硫黄量変化の解析 -

- 1) 血清入り培地 (DMEM) で調製した CHO 細胞懸濁液を 96-well black clear bottom plate に 10^4 cells/well となるように播種し、 CO_2 インキュベーター (37°C) 内で一晩培養した。
- 2) 上清を除去した後、無血清培地 (DMEM) で細胞を 2 回洗浄した。
- 3) 100 $\mu\text{mol/l}$ サルフェン硫黄ドナー Na_2S_3 (Sodium trisulfide) を含む無血清培地 (DMEM) 100 μl を各ウェルに添加し、 CO_2 インキュベーター (37°C) 内で 15 分間静置した。
- 4) 上清を除去した後、無血清培地 (DMEM) で細胞を 2 回洗浄した。
- 5) 20 $\mu\text{mol/l}$ SSP4 (無血清培地 (DMEM)) 100 μl をウェルに添加し、 CO_2 インキュベーター (37°C) 内で 15 分間静置した。
- 6) 上清を除去した後、PBS で細胞を 2 回洗浄した。
- 7) PBS 100 μl をウェルに添加した後、蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察した。

* SSP4 (SB10; -SulfoBiotics- SSP4) はサルフェン硫黄を選択的に検出するための蛍光プローブです。



未処理 (露光時間 1000 msec) Na_2S_3 (サルフェン硫黄ドナー) で処理した細胞内に強い蛍光が観察された。

参考文献

- 1) Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J. Oka, and H. Kimura, *FASEB J.*, **2013**, 27, 2451.
- 2) S. Koike, Y. Ogasawara, N. Shibuya, H. Kimura, and K. Ishii, *FEBS Lett.*, **2013**, 587, 3548.
- 3) T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai, M. Suematsu, H. Motohashi, S. Fujii, T. Matsunaga, M. Yamamoto, K. Ono, N. O. Devarie-Baez, M. Xian, J. M. Fukuto, and T. Akaike, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2014**, 111, 7606.

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

<開発元>
 Dojindo Molecular Technologies, Inc.
 30W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850 U.S.A.
 Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687
 URL: www.dojindo.com

<委託製造元>
 株式会社 同仁化学研究所
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202
 Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:www.dojindo.co.jp/
 ドージン・イースト (東京) Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650