

硫化水素を系の中に加えたい

使用製品

- SulfoBiotics- Sodium sulfide (Na₂S) [SB01]
- SulfoBiotics- GYY4137 [SB06]
- SulfoBiotics- H₂S donor 5a [SB07]
- SulfoBiotics- H₂S donor 8l [SB08]
- SulfoBiotics- H₂S donor 8o [SB09]

I はじめに

近年、硫化水素 (H₂S) が、血管拡張や細胞保護、インスリン分泌や神経伝達調節など様々な生理活性を示すことが明らかにされ、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) に続く重要なシグナル分子として注目されている。硫化水素は、NO や CO と同様にガス状分子として認知されているが、その pKa は約 7 であり、生理的 pH では約 80% が硫化水素イオン (HS⁻) の状態で存在する。また、硫化水素イオンは生体内で様々な結合形態や構造をとるため、その作用機序の詳細は未だ不明であり、硫化水素を中心とした硫黄の生体内機能の解明が待ち望まれている。硫化ナトリウム (Na₂S) は、最も一般的に使用されている硫化水素ドナーであり、水に溶解すると速やかに分解して硫化水素

を放出する^{1),2)}。

GYY4137 は、P. K. Moore らによって開発された徐放型の硫化水素ドナーであり、加水分解によって持続的に硫化水素を放出する試薬である³⁾。そのため、硫化ナトリウムや硫化水素ナトリウム添加のような一過性の刺激では観察されない血圧降下作用や抗がん作用などの効果を示すことが確認されている^{4,7)}。

H₂S donor 5a, 8l, 8o は、M.Xian らが開発した新規の硫化水素ドナーであり、生体内に存在する還元物質 (グルタチオンやシステインなど) に応答して硫化水素を発生する⁸⁻⁹⁾。水溶液中では安定であるが、血液や組織、細胞に添加するとチオールを有する還元物質によって分解され、硫化水素を放出する¹⁰⁾。

表 1 各 H₂S ドナー類の特徴

ドナー	基本骨格	放出機構	H ₂ S 発生場所	放出パターン	参考データ
Na ₂ S	無機質	-	細胞外	即座に	-
GYY4137	ローソン試薬	加水分解反応	細胞外	ゆっくりと持続的に	数時間~数日間持続 ³⁾
H ₂ S donor 5a	N-(Benzoylthio) benzamide	グルタチオンやシステインとの反応	細胞内	グルタチオンやシステインの濃度に依存	放出ピーク時間 20 分*
H ₂ S donor 8l	N-Acetyl-DL-penicillamine	グルタチオンやシステインとの反応	細胞内	グルタチオンやシステインの濃度に依存	放出ピーク時間 15 分*
H ₂ S donor 8o	N-Acetyl-DL-penicillamine	グルタチオンやシステインとの反応	細胞内	グルタチオンやシステインの濃度に依存	放出ピーク時間 40 分*

※ H₂S donor 5a, 8l, 8o のピーク時間は、100 μmol/l の各 H₂S donor が 5 mmol/l グルタチオンと反応した場合の値を示す。

II Sodium Sulfide (Na₂S) を用いた硫化水素の検出

1. 使用方法

- 1) 本試薬 7.8 mg を秤量し、超純水 (窒素バブリング処理済) 1 ml を添加して溶解し、100 mmol/l Na₂S 水溶液とする。
- 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。
 ※ 本試薬は溶解すると有毒な硫化水素を発生します。ご使用になる前に SDS をご参照ください。
 ※ 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 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。

2. HSip-1 を用いた硫化水素の検出

- 1) 100 mmol/l Na₂S 水溶液 20 μl に、超純水 980 μl を添加して 2 mmol/l Na₂S を調製した。
- 2) 1) で調製した溶液 100 μl に、超純水 900 μl を添加して 200 μmol/l Na₂S 溶液を調製した。
- 3) 2) で調製した溶液を順次 2 倍希釈し、Na₂S 標準液 (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 0 μmol/l) を調製した。
- 4) 調製した Na₂S 標準液 300 μl に、200 μmol/l HSip-1 working solution 350 μl を添加し、ボルテックスにより混合した (全量 650 μl)。

- 5) 30 分間室温でインキュベートした後、96 穴マイクロプレートに各溶液を 200 μl ずつ添加した。
- 6) マイクロプレートリーダーで、516 nm の蛍光強度 (Ex: 491 nm) を測定した。

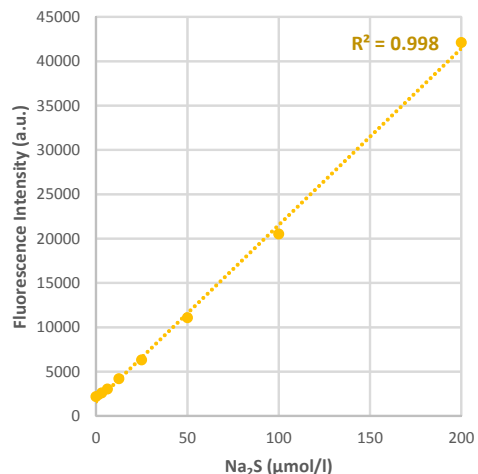


図 2 硫化水素濃度に依存した 516 nm の蛍光強度変化

III GYY4137 を用いた硫化水素の放出

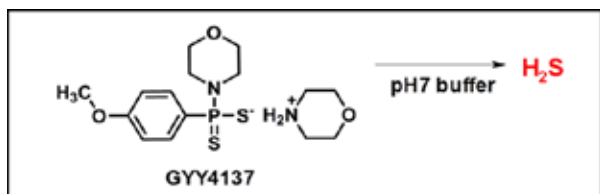


図3 GYY4137 の加水分解による硫化水素放出

1. 使用方法

1) 本試薬 3.8 mg を秤量し、超純水 0.5 ml を添加した後、ピペッティングにより溶解し、20 mmol/l GYY4137 Stock Solution とする。

※ この溶液を少量小分けし、-20℃以下で保存ください。約2ヶ月間は安定です。

2) 20 mmol/l GYY4137 Stock Solution を実験に応じて中性バッファや培地などに希釈してご使用ください。

※ 中性バッファや培地に添加すると有毒な硫化水素を発生します。ご使用になる前に SDS をご参照ください。

2. GYY4137 の PBS 中における硫化水素放出例

1) 20 mmol/l GYY4137 Stock Solution 10 μl を PBS 2 ml に添加して 100 μmol/l GYY4137 (PBS) 溶液とした後、密栓して室温でインキュベートした。

2) 各時間で溶液を分取し、メチレンブルー法によって硫化水素量を測定した。

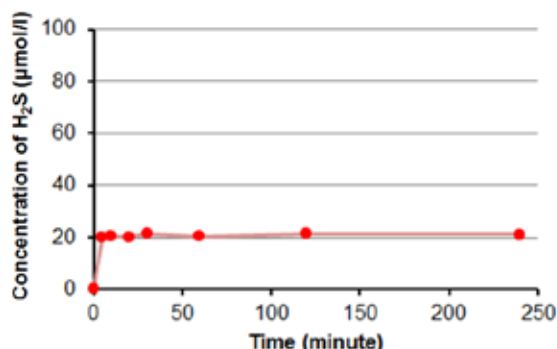


図4 GYY4137(100 μmol/l) の PBS 中における硫化水素放出パターン

IV H₂S donor 5a、8l、8o を用いた硫化水素の放出

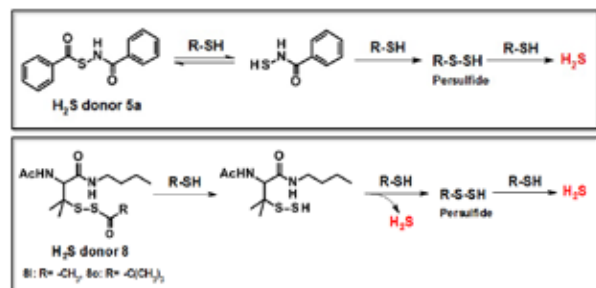


図5 H₂S donor 5a、8l、8o の還元物質による硫化水素放出

1. 使用方法

1) H₂S donor 10 mg に DMSO (5a: 1.95 ml, 8l: 1.56 ml, 8o: 1.38 ml) を添加した後、ピペッティングによって溶解し、20 mmol/l H₂S donor Stock Solution とする。

※この溶液を少量小分けし、-20℃以下で保存ください。約2ヶ月間は安定です。

2) 20 mmol/l H₂S donor Stock Solution を実験に応じてバッファや培地などに希釈してご使用ください。
※本試薬はグルタチオンやシステインなどの還元物質と反応すると有毒な硫化水素を発生します。ご使用になる前に SDS をご参照ください。

2. H₂S donor 5a、8l、8o のグルタチオン (GSH) 添加による硫化水素放出例

1) 20 mmol/l H₂S donor Stock Solution 10 μl を PBS 2 ml に添加して 100 μmol/l H₂S donor(PBS) 溶液とした。

2) GSH を終濃度が 5 mmol/l となるように添加した後、密栓して室温でインキュベートした。

3) 各時間で溶液を分取し、メチレンブルー法によって硫化水素量を測定した。

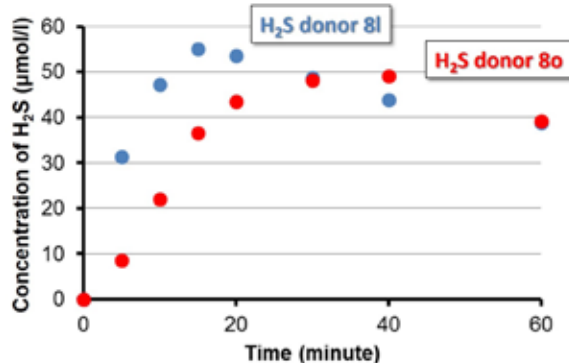
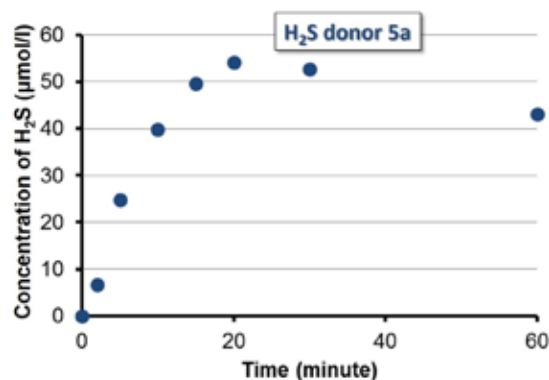


図6 100 μmol/l H₂S donor 5a (上図)、8l、8o (下図) の 5mmol/l GSH 添加による硫化水素放出パターン

参考文献

- 1) R. Greiner, Z. Palinkas, K. Basell, D. Becher, H. Antelmann, P. Nagy and T. P. Dick, "Polysulfides link H₂S to protein thiol oxidation", *Antioxid. Redox Signal.*, **2013**, *19*, 1749.
- 2) N. S. Lawrence, J. Davis and R. G. Compton, "Analytical strategies for the detection of sulfide: a review", *Talanta*, **2000**, *52*, 771.
- 3) L. Li, M. Whiteman, Y. Y. Guan, K. L. Neo, Y. Cheng, S. W. Lee, Y. Zhao, R. Baskar, C-H. Tan, and P. K. Moore, "Characterization of a Novel, Water-Soluble Hydrogen Sulfide-Releasing Molecule (GYY4137): New Insights Into the Biology of Hydrogen Sulfide", *Circulation*, **2008**, *117*, 2351.
- 4) M. Whiteman, L. Li, P. Rose, C-H. Tan, D. B. Parkinson, and P. K. Moore, "The Effect of Hydrogen Sulfide Donors of Lipopolysaccharide-Induced Formation of Inflammatory Mediators in Macrophages", *Antioxid. Redox Signal.*, **2013**, *19*, 1749.

細胞
増殖 / 毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

5) Z. W. Lee, J. Zhou, C-S. Chen, Y. Zhao, C-H. Tan, L. Li, P. K. Moore, and L-W. Deng, "The Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor, GYY4137, Exhibits Novel Anti-Cancer Effects *In Vitro* and *In Vivo*", *PLoS One*, **2011**, 6, e21077.

6) L. Li, B. Fox, J. Keeble, M. Salto-Tellez, P. G. Winyard, M. E. Wood, P. K. Moore, and M. Whiteman, "The complex effects of the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells", *J. Cell. Mol. Med.*, **2013**, 17, 365.

7) Z. Liu, Y. Han, L. Li, G. Meng, X. Li, M. Shirhan, M. T. Peh, L. Xie, S. Zhou, X. Wang, Q. Chen, W. Dai, C-H. Tan, S. Pan, P. K. Moore and Y. Ji, "The hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits anti-atherosclerotic activity in high fat fed apolipoprotein E^{-/-} mice", *Br. J. Pharmacology*, **2013**, 169, 1795.

8) Y. Zhao, H. Wang and M. Xian, "Cysteine-Activated Hydrogen Sulfide (H₂S) Donors", *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 15.

9) C-T. Yang, Y. Zhao, M. Xian, J-H. Li, Q. Dong, H-B. Bai, J-D. Xu, M-F. Zhang, "A Novel Controllable Hydrogen Sulfide-Releasing Molecule Protects Human Skin Keratinocytes Against Methylglyoxal-Induced Injury and Dysfunction", *Cell. Physiol. Biochem.*, **2014**, 34, 1304.

10) Z. W. Lee, J. Zhou, C-S. Chen, Y. Zhao, C-H. Tan, L. Li, P. K. Moore, and L-W. Deng, "The Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor, GYY4137, Exhibits Novel Anti-Cancer Effects *In Vitro* and *In Vivo*", *PLoS One*, **2011**, 6, e21077.

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を小社 HP にて掲載。ご興味のある方は、小社 HP にて最新情報をご確認下さい。

硫化水素 同仁