

NO を *in vivo* ESR で検出したい

使用製品

DTCS Na [D465]

解析装置



I はじめに

NO は、反結合性軌道に一つの不対電子を有するラジカルであり、常磁性であるので、理論的には ESR 法で検出が可能である。しかしながら、NO は非常に不安定な物質であるため、これを感度良く捉えるためには、NO を一度安定な他のラジカルに変換して、これを検出するテクニック (スピントラッピング法) が必要である。NO は、鉄イオンと非常に迅速かつ強固に結合する性質があり、これを利用すれば NO のスピントラッピングが可能である。すなわち、何らかの鉄錯体を用い、これと NO が結合して生じる安定な鉄-ニトロシル錯体を ESR で検出するものである。この様な鉄錯体として最も一般的なものはヘモグロビンである¹⁾。しかし、ヘモグロビン法には幾つかの欠点がある。鉄上に酸素が結合していないデオキシヘモグロビンは NO を極めて迅速に捕捉するが、酸素が結合したオキシヘモグロビンは、NO をそのまま酸化して NO₃⁻ としてしまう²⁾。また、血中の NO ヘモグロビンの全ての起源が NO にあるのではなく、NO₂⁻ も NO ヘモグロビンを形成し得るし、NO は、メトヘモグロビンも形成してしまう³⁾。小坂らは、より安定な CO ヘモグロビンを用いることで、NO₂⁻ の影響を軽減している⁴⁾ が、調製法、使用法が容易でないことに加え、シグナルがシンプルでないなど必ずしも満足のできるものではない。

ジエチルジチオカルバメートは、鉄と 2 : 1 錯体を形成し、NO を捕捉することで鉄-ニトロシル錯体の ESR シグナルを示す。しかしながら、ジエチルジチオカルバメート-鉄錯体は水溶性が低いため、投与法を工夫する必要があり、水溶性の高い鉄錯体を形成できる配位子としてこれまで MGD(Code: M323) が用いられてきた。

MGD はカドミウム中毒の解毒剤として用いられてきた水溶性のジチオカルバメートであり、Lai らは、MGD の鉄錯体を NO の検出に応用し、ニトロプルシッドを投与して体内で発生する NO⁵⁾ や LPS 投与下のショック時に産生する NO を *in vivo* ESR で検出している⁶⁾。MGD-鉄錯体は、高水溶性で生理的条件下で NO を検出でき、溶存酸素が検出感度に影響しないため、優れた NO 検出剤である。

一方、DTCS(Code: D465) は従来 Zn の比色分析における、Cu などのマスキング剤として用いられて来た物質である⁷⁾ が、その鉄錯体 Fe-(DTCS)₂ が水溶性であり NO と錯体を形成した NO-Fe-(DTCS)₂ も水溶性となるため、特に *in vivo* で NO をトラップしようとする場合に、始めから鉄錯体 Fe-(DTCS)₂ を投与することができるという長所を持つ。従来の DTCS はアンモニウム塩であるために、LD₅₀=765 mg/kg (マウス) と毒性が高いが、ナトリウム塩の DTCS(DTCS Na) は LD₅₀=1942 mg/kg⁸⁾ と毒性が低減されている。

水溶性の NO-Fe-(DTCS)₂ 錯体は通常の X-band (9 GHz) ではもちろん、L-band ESR で 700 MHz に、DETC や MGD と同様のニトロシル Fe 錯体の窒素の核スピンに基づく鋭い 3 本線を与える。DTCS は他のジチオカルバメートに比べて、空気中、溶液中でかなり安定である⁹⁾ ので、水溶性の Fe 錯体は生化学的にも有効なスピントラップ剤である。

吉村らはマウスの腹腔内で LPS 投与によって誘導された iNOS からの NO を Fe-(DTCS)₂ を用いて、トラップし L-band ESR による *in vivo* イメージングを報告している。

ここでは DTCS Na を用いた鉄-ジチオカルバメート錯体の調製法について述べる。*in vivo* ESR によるイメージングについては文献¹⁰⁾ を参照されたい。

II DTCS Na を用いた Fe-(DTCS)₂ の調製例

1 試薬

- DTCS Na(Code: D465)
- 硫酸第一鉄 (FeSO₄ · 7H₂O)
- 蒸留水または pH7 以上の緩衝液

2 操作

- 1) 30 分以上窒素パージした蒸留水に硫酸第一鉄を溶解する。
- 2) DTCS Na を蒸留水または pH7 以上の緩衝液に溶解し、30 分以上窒素パージする。ここへ、(1) の溶液を DTCS Na と鉄の比が 5 : 1 となるように加える (溶液は褐色になる)。
 - ※ Fe²⁺-(DTCS)₂ は水溶液中で不安定であるため、錯体溶液は用時調製すること。
 - ※ 錯体溶液は厳密な嫌気条件下では無色であるが、通常の窒素パージでは褐色を呈する。この色は Fe³⁺ 錯体によると考えられるが、Fe 錯体でも NO 捕捉には問題無く使用できる。DTCS Na は pH7.0 以下では徐々に分解して二硫化炭素を放出するので注意が必要である。

III DTCS Na を用いた NO-Fe²⁺-(DTCS)₂ 錯体の調製例¹¹⁾

1 試薬

- DTCS Na
- 硫酸第一鉄 (FeSO₄ · 7H₂O)
- 蒸留水または pH7 以上の緩衝液
- NO ガス
- 窒素またはアルゴンガス

2 操作

- 1) 以下の操作は全て窒素またはアルゴン雰囲気下で、NO ガスの処理系を持ったラインを用いてドラフト中で行う。必要な濃度になるよう硫酸第一鉄水溶液を調製する。この溶液に NO ガスを 15 分通気したのち、NO ガスを通気したまま鉄との比が 1 : 2 になるよう DTCS Na 水溶液 (要ガス置換) を添加する。
- 2) DTCS Na 添加後さらに 5 分 NO ガスを通気したのち、窒素またはアルゴンで過剰の NO ガスをパージする。
- 3) 試料を必要とするだけガスタイトシリンジで取り出す。
 - ※ 本溶液は嫌気条件下では長期 (数ヶ月) に渡り安定で凍結保存も可能だが、酸素があると徐々に酸化されていくため用時調製し、窒素置換して使用していただきたい。

参考文献

- 1) U. Westenberger, S. Thanner, H. H. Ruf, K. Gersonde, G. Sutter, O. Trenz, *Free Radic. Res. Commun.*, **1990**, *11*, 167.
- 2) M. Kelm, J. Schrader, *Circ. Res.*, **1990**, *66*, 1561.
- 3) J. Iwamoto, J. A. Krasney, F. C. Morin III, *Respiration Physiol.*, **1994**, *96*, 273.
- 4) H. Kosaka, M. Watanabe, H. Yoshihara, N. Harada, T. Shiga, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1992**, *184*, 1119.
- 5) A. Komarov, D. Mattson, M. M. Jones, P. K. Singh, C. -S. Lai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**, *195*, 1191.

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

6) C. -S. Lai, A. M. Komarov, *FEBS Lett.*, **1994**, 345, 120.
 7) a) V. W. Byr' ko, *et al.*, *Soobshch. Akad. Nauk. Gruz. SSSR*, **1973**, 70, 81.
 b) 境 幸夫, 黒木佳津子, *分析化学*, **1979**, 28, 429.
 c) 渡辺寛人, 山口信夫, 田中裕晃, *分析化学*, **1979**, 28, 366.
 d) C. G. Halliday, *Analyst*, **1987**, 112, 329.
 8) S. Fujii, G. Miyakoda, M. Chihiro, T. Yoshimura and H. Kamada, *Chem. Lett.*, **1996**, 1055.
 9) Y. Sakai, *Talanta*, **1980**, 27, 1073.
 10) T. Yoshimura, H. Yokoyama, S. Fujii, F. Takayama, K. Oikawa and H. Kamada, *Nature Biotech.*, **1996**, 14, 992.
 11) O. A. Ileperuma, R. D. Feltham, *Inorg. Synth.*, **1976**, 16, 5.

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