

## 2. 生体成分・酵素活性の分析・測定技術

### 1) 生体成分の分析・定量法

#### (1) 組織・血清からの脂質抽出法

十文字学園女子大 井手 隆

#### はじめに

組織、血清からの脂質抽出法としては Bligh-Dyer 法および Folch 法が広く用いられている。得られた脂質抽出液は脂質成分の種々の分析に用いることができる。ここでは、Folch 等によって論文に記載された方法を実際の操作で使いやすいように改変した手法での脂質抽出法について記述する。また、原報には記載されていない細かな注意点についても記載した。

#### 準備するもの

##### 1. 実験器具

- ・ガラスチューブ(20～30 ml 容量)
- ・有栓メスシリンダー(50 ml)
- ・メスフラスコ (50 ml)
- ・ガラスロート (11 cm)
- ・定性濾紙 (No.2, 10 cmφ, アドバンテック東洋)
- ・恒温水槽
- ・ホモジナイザー (ポリトロンタイプ)

##### 2. 試薬

- ・メタノール
- ・クロロフォルム

#### プロトコール

##### 1. 組織からの抽出

組織約 0.5 g からの脂質抽出法について記載する。操作はドラフトの中で行う。

- 1) メスシリンダー中に 16 ml のメタノールおよび 32 ml のクロロフォルムを計量する。
- 2) ガラスチューブ(20～30 ml 容量)を用いて、凍結した組織を約 0.5 g 秤量する(正確な値をノートに記載する, A)。
- 3) 計り取ったメタノールの約半分量(7～8 ml)をガラスチューブにいれ、ポリトロンタイプホモジナイザーを用い組織をホモジナイズする。
- 4) ホモジネートはガラスロートを用い、50 ml 容量のメスフラスコに移す(移す前にホモジナイザーは計り取ったメタノールの少量を用い洗浄する)。メスフラスコにホモジネート

を移した後、ロートは計りとったメタノールの少量を用い、直ちに洗浄する。

- 5) 残った、メタノールおよびクロロフォルムを用い、ホモジナイザーとガラス容器の洗浄を 2~3 回行い、洗液は全て 50 ml 容量のメスフラスコに移す。
- 6) 計り取ったメタノールおよびクロロフォルムを全て、メスフラスコ中に移した後、ガラス栓を付ける。
- 7) 穏やかに攪拌後恒温水槽にいれ (37~40 °C)、約 30 分間の抽出を行う。
- 8) ホモジネートが室温にもどった後、クロロフォルム/メタノール混液 (2:1, v/v) を用いて、50 ml に定容する。
- 9) 穏やかに攪拌後 No.2 濾紙を用いて、有栓メスシリンダー (50 ml) 中に濾過する。濾液量を記録する (約 45 ml, B)。
- 10) 濾液量の 20 % 容量の水を加え (厳密である必要は無い、全てのサンプルで 9 ml の水を加えて支障ない)、穏やかに攪拌後、一夜放置する。
- 11) 抽出液は二層に分離する。上層と下層の間に、分離不完全な白い中間層が出現することが多い。上層を可能な限り、アスピレーターやパストゥールピペットを用い取り除く。中間層は取らないように注意する。
- 12) 上層を出来る限り除去した後、メタノールを加え 40 ml に定容し、脂質抽出液とする。
- 13) 抽出液 1 ml は  $(1/40 \times A \times 50/B)$  g 組織量に相当する。

## 2. 血清からの抽出

血清 2 ml からの抽出について記載する。操作はドラフトの中で行う。

- 1) メスフラスコ (50 ml 容量) 中に 16 ml のメタノールを入れる。別に、32 ml のクロロフォルムをメスシリンダー中に計量しておく。
- 2) 血清 2 ml をメスフラスコ中に加え、直ちに攪拌分散させる。
- 3) 直ちに 32 ml クロロフォルムを加え、栓をして穏やかに攪拌する。
- 4) 後は、組織からの抽出操作 7) 以降に従って抽出操作を行う。
- 5) 濾液量を B とし、最終的に 40 ml に定容すると、脂質抽出液 1 ml は  $(1/40 \times 2 \times 50/B)$  ml 血清量に相当する。

## プロトコールのポイント、注意点等

1. 原報によれば、抽出に用いる溶媒の量 (クロロフォルム/メタノール混液 (2:1, v/v) ) は組織、血清量の 20 倍量で十分である。しかし、組織を用いる場合 20 倍量では実際の定量的操作が難しく、組織を用いた場合の記述では 100 倍量の溶媒を用いている。
2. 原報ではクロロフォルム/メタノール混液を直接用いて、組織をホモジナイズしている。しかし、この方法ではタンパクの変性が著しく、操作が困難である。記載した方法では組織のホモジナイズはメタノールを用い最終的に溶媒組成がクロロフォルム/メタノール混

液 (2:1, v/v) となるように改変している。

3. 血清からの抽出の場合、血清をメタノール中に加え、直ちにクロロフォルムを入れることが重要である。メタノール中で放置するとガラス壁にタンパク質が凝固、付着し、定量的抽出が困難となる。またあとのガラス器具の洗浄も困難となる。
4. 水を加え、二相分離後の組成は上相でクロロフォルム/メタノール/水の比率が 3:48:47, 下層では 86:14:1 となり、水溶性物質は上層に脂質成分は下層に分配される。試料が大量の水溶性物質(塩など)を含む場合、あるいは放射性同位元素を用いた実験で放射性の水溶性物質を完全に除きたい場合は **blank upper phase** (クロロフォルム/メタノール/水混液 (3:48:47, v/v/v)) を用い、下層を洗浄する必要がある。詳細については原報を参照のこと。通常はこの洗浄操作は必要ない。

#### 参考文献

- 1) Folch, J., Lees, M. and Sloane, S. G.H., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).

## (2) 血清リポタンパク質の超遠心法による分離

十文字学園女子大学 井手 隆

### はじめに

血清リポタンパク質は密度によって、キロミクロン ( $d < 0.95$ )、極低密度リポタンパク質 (VLDL,  $0.95 < d < 1.006$ )、低密度リポタンパク質 (LDL,  $1.006 < d < 1.063$ ) および高密度リポタンパク質 (HDL,  $1.063 < d < 1.21$ ) に分類される(さらに、より細かく密度によって分類する場合もある)。キロミクロンは小腸で合成されるリポタンパク質であり、吸収された脂質はキロミクロンの形で、組織に運ばれる。一方、VLDL と HDL は肝臓で合成されるリポタンパク質であり、VLDL は血液中で LDL に転換する。各リポタンパク質は異なった脂質組成とアポタンパク質組成を持っている。血液中の脂質・脂溶性物質をリポタンパク質レベルで解析することにより、脂質代謝の変化や脂溶性物質の体内輸送に関して、有益な情報を得ることができる。血清リポタンパク質の分析のための調製は Havel 等が 1955 年に発表した、超遠心法による分離が基本となり、この変法が幾つかの実験書に記載されている。分離のために、長い超遠心操作が必要であるため、回転数を原報より上げ分離時間を短縮する試みも行われているが、得られたリポタンパク質画分が原報で得られるものと同一である保証は無い。従って、ここでは Havel 等の方法に従い、日立工機製微量超遠心機およびローター (S100AT5) を用いた方法について記載する。HPLC でリポタンパク質サイズの違いに基づいての分離も可能であるが、分析に十分なだけの標品を得るのには不適である。

### 準備するもの

#### 1. 実験器具

- ・超遠心機 (日立工機)
- ・超遠心機用ローター (日立工機, S100AT5)
- ・ディスポーザブルシリンジ (針付き, 2.5 ml 程度が使いやすい)
- ・チューブスライサーおよび 5 ml シールチューブ用パッキン (ベックマン社製)
- ・超遠心用チューブ (日立工機, 5 ml シールチューブ)
- ・チューブシーラー (日立工機)

#### 2. 試薬

- ・ $d=1.006$  溶液: 11.4 g の NaCl と 0.1 g EDTA $\cdot$ 2Na 塩を 500 ml の水に溶かし, 1 ml の 1N NaOH を加え, 1,000 ml に定容する。冷蔵保存。
- ・ $d=1.478$  溶液: 78.32 g の NaBr を 100 ml の  $d=1.006$  溶液に溶かす。常温保存。

- ・ d=1.063 溶液: 4 ml の d=1.006 溶液と 0.549 ml の d=1.478 溶液を混合する。冷蔵保存。
- ・ d=1.21 溶液: 4 ml の d=1.063 溶液と 2 ml の d=1.478 を混合する。常温保存。

## プロトコール

### 1. キロミクロンの分離

- 1) 3~3.5 ml の血清をパスツールピペットを用い超遠心チューブに入れる。注意深く、1.5~2 ml の d=1.006 溶液を重層後、同じく d=1.006 溶液でチューブを満たす。チューブをチューブシーラーでシールする。漏れないことを確認する。
- 2) 16 °C, 2,6000 x g (S100AT5 ローターを用いた場合 22,000 rpm) で 30 分間遠心する。回転を止めるのにブレーキは用いないようにする。
- 3) 注意深く、チューブを取り出し、チューブスライサーに装着する。通常、分離したキロミクロンは白い固まりとして、チューブの上部に見ることが出来る。
- 4) チューブ上部 (5 mm 程度の所で) をカットする。空気抜きのため、注射針をチューブ上部に刺した後に、針付き注射シリンジでキロミクロン部分を手早く吸い取る。
- 5) カットされた、チューブ上部を取り除き、スライサーの刃の部分やチューブ上部を d=1.006 溶液で良く洗い、前に採取したキロミクロン画分と合わせる。採取した、キロミクロン画分の容量を記録しておく。分析まで冷凍保存。

### 2. VLDL の分離

- 1) キロミクロン採取後に残った溶液を新しい超遠心チューブに移す。少量の d=1.006 溶液でチューブを洗い、洗液を新しいチューブに合わせる。d=1.006 溶液でチューブを満たし、1. の 1) で記載したと同様にチューブをシールする。
- 2) 16 °C, 114,000 x g (46,000 rpm) で 16~18 時間遠心する。
- 3) 1. の 3) ~ 5) で記載した要領に従って、VLDL を採取する。分析まで冷凍保存。

### 3. LDL の分離

- 1) VLDL 採取後に残った溶液の容量を計測し、4 ml の溶液に対し 0.549 ml の d=1.478 溶液を加え攪拌し、密度を 1.063 に調整する。調整した溶液を新しい超遠心チューブに入れる。全量入れることが出来なければ、超遠心チューブに入れた量を記録しておく。d=1.063 溶液でチューブを満たし、1. の 1) で記載したと同様にチューブをシールする。
- 2) 16 °C, 114,000 x g (46,000 rpm) で 20~24 時間遠心する。
- 3) 1. の 3) ~ 5) で記載した要領に従って、LDL を採取する。分析まで冷凍保存。

#### 4. HDL の分離

- 1) LDL 採取後に残った溶液の容量を計測し、4 ml の溶液に対し 2 ml の  $d=1.478$  溶液を加え攪拌し、密度を 1.21 に調整する。調整した溶液を超遠心チューブに入れる。全量入れることは不可能であるので、超遠心チューブに入れた量を記録しておく。 $d=1.21$  溶液でチューブを満たし、1. の 1) で記載したと同様にチューブをシールする。
- 2)  $16^{\circ}\text{C}$ ,  $114,000 \times g$  ( $46,000 \text{ rpm}$ ) で 40 時間遠心する。
- 3) 1. の 3) ~ 5) で記載した要領に従って、HDL を採取する。HDL 採取後に残った画分( $d>1.21$  画分)も分析する必要があるのであれば、その容量を記録し、凍結保存する。

#### プロトコールのポイント、注意点等

1. リポタンパク質の粒子が破壊されることを避けるために攪拌操作でボルテックスは用いないこと。
2. VLDL 分離以降は、血清中タンパク質がチューブの下に固まり、遠心直後は容易に均一にすることが出来ない。しかし、リポタンパク質画分採取後しばらく時間がたてば、容易に均一にすることが出来るようになる。
3. リポタンパク質画分の脂質成分の分析は、脂質を Folch 法に従い、抽出し、抽出液を用いて行う。しかし、 $d>1.21$  画分では抽出液に大量の塩が混入するので分析に当たっては Folch 法による脂質抽出の原報に記載された blank upper phase による抽出液の洗浄が最低 1 回は必要である。成分分析を行った後、試料の容量等の補正を行い、各リポタンパク質画分に含まれる脂質・分量を計算する。
4. 脂質分析では必須ではないが、アポタンパク質の組成を分析するためには、超遠心によるリポタンパク質画分の洗浄、純化を最低 1 回は行う必要がある。特に、HDL 画分には大量のアルブミンが混入する。

下に、実際の実験・分析例を示す。この実験ではラットにゴマリグナン(セサミンとセサモリン)を経口投与 8 時間後に屠殺し、血清を得、リポタンパク質画分を調製した。トリアシルグリセロールは約 94 %がキロミクロンと VLDL 画分に分布した。一方、リグナンはリポタンパク質画分特に、キロミクロンと VLDL 画分に多くが見出されるが、50~60 %は  $d>1.21$  画分に回収された。トリアシルグリセロールは主に、キロミクロンと VLDL の形で血液中を輸送されるのに対し、リグナンの多くはアルブミンのようなタンパク質に結合して血流中で輸送されていることを強く示唆している。血清からのリポタンパク質画分への回収率はリグナンで 83~87 %、トリアシルグリセロールで 90 %であった。

表 1 ゴマリグナンを経口投与8時間後のリポタンパク質画分でのリグナンとトリアシルグリセロール濃度

|                       | Lignans (μg/dL) |              | Triacylglycerol |
|-----------------------|-----------------|--------------|-----------------|
|                       | Sesamin         | Sesamolol    | (μmol/dL)       |
| Serum                 | 164.0 ± 18.0    | 459.0 ± 32.0 | 163.0 ± 10.0    |
| Lipoprotein fractions |                 |              |                 |
| Chylomicron (d<0.95)  | 29.2 ± 4.5      | 86.9 ± 13.8  | 84.2 ± 10.6     |
| VLDL (0.95<d<1.006)   | 10.4 ± 1.7      | 36.2 ± 6.2   | 52.5 ± 4.90     |
| LDL (d=1.006-1.063)   | 2.11 ± 0.28     | 4.86 ± 0.7   | 2.48 ± 0.34     |
| HDL (d=1.063-1.21)    | 12.6 ± 1.6      | 35.8 ± 3.6   | 2.90 ± 0.38     |
| d>1.21                | 88.4 ± 11.4     | 216.0 ± 20.0 | 3.93 ± 0.51     |

#### 参考文献

- 1) Havel, R.J., Eder, H.A. and Bragdon, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1345-1353 (1955).
- 2) 斯波真理子, 山本章, 新生化学実験講座 4 巻, 脂質 I 中性脂質とリポタンパク質, 日本生化学会編 (東京化学同人, 東京), pp.181-206 (1993).

### (3) 脂質成分分析 (コレステロール, トリアシルグリセロール, リン脂質)

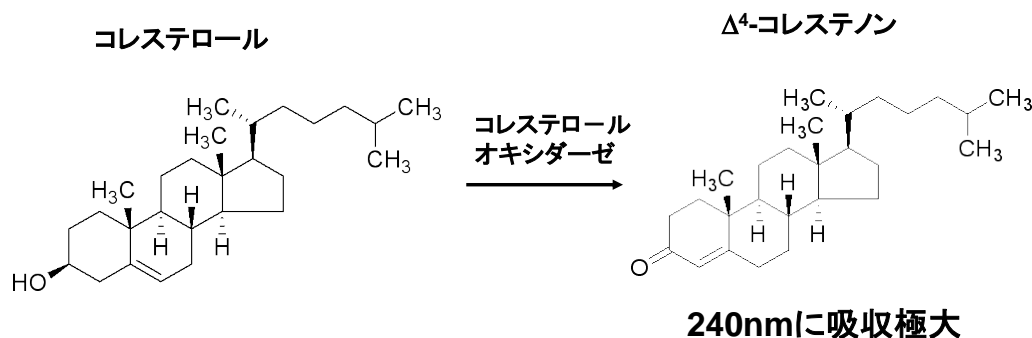
十文字学園女子大学 井手 隆

#### はじめに

現在, 血清中の脂質濃度の分析には主に酵素法によるキットが種々入手可能であり, 迅速簡便に脂質濃度を測定することが出来る. 市販のキットを組織中の脂質濃度測定に使用した例が最近数多くの論文で見出される. しかし, これらのキットは血清中の脂質濃度測定用に開発されたものであり, 組織脂質濃度測定に適用するためには注意深い考慮が必要である. 不適切な使用をしている例も数多くあるものと思われる. 例えば, 市販のリン脂質濃度の測定キットはコリンの酵素的測定が基本原理となっている. 血清に存在するリン脂質はそのほとんどがフォスファチジルコリンやスフィンゴミエリンなどのコリンリン脂質であり, コリンの測定により血清中リン脂質のほとんどをカバーできる. しかし, 組織リン脂質ではフォスファチジルエタノールアミンを初めとするコリンを含まないリン脂質が大量に含まれるため, 市販キットで得られる値は実際の値を過小評価することになる. また, 市販のトリアシルグリセロール測定キットはグリセロールの酵素的定量が基本原理となっている. ほとんどのキットでの測定値はトリアシルグリセロールに由来するグリセロールとともに, 血清中に存在する遊離グリセロールの値が含まれていることにも留意する必要がある(ただし, 血清中遊離グリセロール濃度は通常 0.1 mM 以下と考えられるので, 多くの場合大きな誤差は生じないと思われる). ここでは, 組織・血清脂質抽出液を用いた酵素法あるいは化学法によるコレステロール, トリグリセリドおよびリン脂質の測定法について記載する.

#### <コレステロール>

コレステロールにコレステロールオキシダーゼを作用させ, 生じる $\Delta^4$ -コレステノンに基づく 240 nm の吸光度増加量からコレステロール量を算出する.





## 準備するもの

### 1. 実験器具

- ・ ガラスチューブ (10~15 ml 容量, 密栓出来るもの)
- ・ ガラスチューブ (10 ml 容量)
- ・ 恒温水槽
- ・ 分光光度計

### 2. 試薬

- ・ 4 N 水酸化カリウム
- ・ エタノール
- ・ n-ブタノール
- ・ 分析用緩衝液: 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) を調製し, 1 リットル当たり 0.5 ml のトリトン X-100 を加え良く混合する.
- ・ コレステロール標準液 (50 µg/ml) : コレステロールを 50 µg/ml になるように, クロロフォルム/メタノール混液 (2 : 1) に溶かす. 共栓付き容器に入れ, 蒸発を防ぐために -20 °C で保存する.
- ・ コレステロールオキシダーゼ溶液 (20 unit/ml) : コレステロールオキシダーゼ (凍結乾燥品, Toyobo) を 20 unit/ml の濃度になるように分析用緩衝液に溶かす.

## プロトコール

1. 共栓あるいはスクリーキャップ付き試験管に生体試料からの脂質抽出液 (コレステロールを 10~50 µg 含む) をサンプリングし, 窒素ガス気流下で乾固する.
2. 2 ml エタノールを加え激しく混和し, 脂質成分を溶解する. 続いて 0.2 ml の水酸化カリウム溶液を加え, 密栓後, 恒温水槽を用い 60~70 °C で 20 分間ケン化する.
3. 2 ml の水を加えた後, 約 4 ml のヘキサンで不ケン化物を抽出する. 分離したヘキサン層は別の試験管に移す. 抽出操作は 3 回繰り返す, 定量的に不ケン化物を回収する.
4. ヘキサン抽出液は窒素ガス気流下で乾固する. 0.125 ml の n-ブタノールを添加し, 激しく混和し不ケン化物を溶解する.
5. 3 ml の分析用緩衝液を加え, 激しく混和する.  
分光光度計で 240 nm の吸光度を測定する (OD1). なお, 対照セルには n-ブタノールを含む分析用緩衝液を入れて測定すること.
6. 測定した試料は試験管に戻し, 25 µl (0.5 unit) のコレステロールオキシダーゼ溶液を加え 37°C で 1 時間インキュベーションする.
7. 再び 240 nm の吸光度を測定する (OD2).
8. コレステロールスタンダード溶液 (0~1 ml, 0~50 µg) について, 4. 以降の操

作を行う。

9.  $\Delta\text{OD}$  ( $\text{OD2}-\text{OD1}$ )を用いて計算を行う。スタンダード溶液 (0~50  $\mu\text{g}$ ) により測定した $\Delta\text{OD}$  値により、検量線を作成し、試料中のコレステロール含量を計算する。

#### プロトコルのポイント、注意点等

1. n-ブタノールと分析用緩衝液は混和し難いので、激しく混和し、液が均一になっているのを確認する(5.)。
2. 分析用緩衝液に含まれるトリトンと n-ブタノールは共に紫外部に強い吸収を示す。よって、対照セルにブタノールを含む分析用緩衝液を入れないと、測定値が非常に高くなってしまう(6.)。
3. スタンダードでは OD1 はほとんど 0 であるが(マイナス値を示す場合も多い)，サンプルによっては OD1 がかなり高い値を示すことがある。しかし、 $\Delta\text{OD}$  の形で計算を行えば正確な値を得ることができる(6.)。
4. 極微量 (1  $\mu\text{g}$  以下) のコレステロール定量にはコレステロールオキシダーゼ反応により生成する $\Delta^4$ -コレステノン を HPLC により分離し、測定する方法がある。文献 2) と 3) を参照されたい。

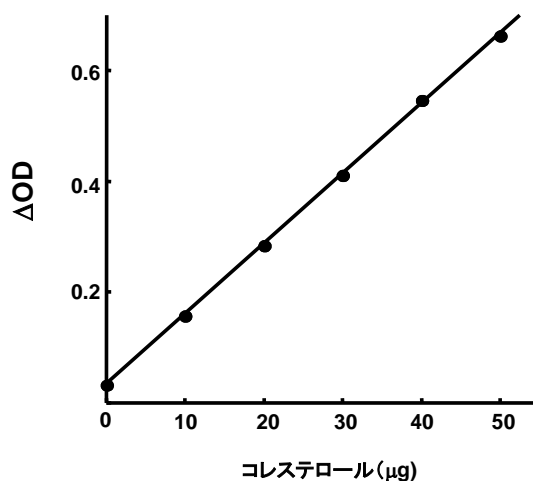


図 1 標準曲線の一例

#### 参考文献

- 1) Ide, T., Oku, H. and Sugano, M., Reciprocal responses to clofibrate in ketogenesis and triglyceride and cholesterol secretion in isolated rat liver. *M. Metabolism* **31**, 1065-1072 (1982).
- 2) 井手隆, 食品機能研究法, コレステロールオキシダーゼを用いた生体試料中のコレステロール定量法, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一 編(光琳, 東京),

pp.128-132 (2000).

- 3) Murata, M. and Ide, T., Determination of cholesterol in sub-nanomolar quantities in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatograph.* **579**, 329-333 (1992).

### <トリアシルグリセロール>

脂質抽出液中のリン脂質をクロロフォルム中でケイ酸処理することにより、リン脂質を除去する。ついで、トリアシルグリセロールをケン化した後、グリセロール部分を過ヨウ素酸により酸化し、フォルムアルデヒドに転換する。フォルムアルデヒドをアンモニアおよびアセチルアセトンと反応させ、生じる黄色の色素 (3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine) の吸光度を分光光度計により計測し、試料に含まれるトリアシルグリセロール量を算出する。

### 準備するもの

#### 1. 実験器具

- ・ 共栓付きガラス遠沈管 (10 ml 容量)
- ・ 共栓付きあるいはスクリーキャップ付きガラスチューブ (10~20 ml 容量)
- ・ 恒温水槽
- ・ 分光光度計

#### 2. 試薬

- ・ ケイ酸：カラムクロマトグラフ用，100 メッシュ (Mallinckrodt 社製)。使用前に，115°C で 3~5 時間加熱し活性化する。デシケーター中に保存する。
- ・ イソプロパノール/水混液 (90:10, v/v) (室温保存)。
- ・ イソプロパノール/水混液 (40:60, v/v) (室温保存)。
- ・ 25 mM 過ヨウ素酸ナトリウム：0.535 g/dl (冷凍保存)。
- ・ 1 N 酢酸：5.703 ml の氷酢酸を水で希釈し，100 ml に定容することにより調製する (室温保存)。
- ・ 水酸化カリ溶液：5 g の水酸化カリを 100 ml のイソプロパノール/水混液 (40:60, v/v) に溶解する。実験当日に必要量を調製。
- ・ 3 mM 過ヨウ素酸ナトリウム溶液：12 ml の過ヨウ素酸ナトリウム原液 (25 mM)，20 ml のイソプロパノールおよび 1 N 酢酸の 68 ml を混和する。実験当日に必要量を調製する。
- ・ アセチルアセトン溶液：0.75 ml のアセチルアセトン (2,4-pentadione)，2.5 ml のイソプロパノールおよび 100 ml の 2 M 酢酸アンモニウム溶液を混合する。冷凍保存。2 M 酢酸アンモニウム溶液は 15.418 g の酢酸アンモニウムを水に溶かし，

100 ml に定容することにより調製する。

- ・ トリアシルグリセロール標準液：トリオレインを 1,250  $\mu\text{g/ml}$  の濃度になるようにクロロフォルム/メタノール混液 (2:1, v/v) に溶かす(ストック溶液)。この溶液をクロロフォルム/メタノール混液 で 10 倍に希釈したものをを用いてスタンダードを調製する(125  $\mu\text{g/ml}$ )。密栓し、冷凍保存。

## プロトコール

1. トリアシルグリセロールを 500~1,000  $\mu\text{g}$  を含む容量の脂質抽出液を共栓付きガラス遠心チューブ (10 ml 容) にサンプリングし、窒素ガス気流下で乾固する。
2. 正確に 5 ml のクロロフォルムを加え、脂質を溶解する。クロロフォルム添加後、容量変化を避けるために直ちに密栓する。
3. ついで、約 0.4 g のケイ酸を添加し、激しくボルテックスすることによりケイ酸にリン脂質を吸着させる。
4. 2,000 rpm で 10 分間遠心し、ケイ酸を沈殿させる。
5. トリアシルグリセロールを 100~250  $\mu\text{g}$  含む容量の上清液をサンプリングし、ガラスチューブ (10~20 ml 容、密栓できるもの) に移し、窒素ガス気流下で乾固する。
6. 2 ml のイソプロパノール/水混液 (90:10, v/v) を加えた後、0.6 ml の水酸化カリ溶液を加える。ボルテックス後密栓し、恒温水槽中 60~70°C で 15~20 分間加温し、ケン化する。
7. 常温にもどった後、1 ml の 3 mM 過ヨウ素酸ナトリウム溶液を加え、ボルテックスする。
8. ついで、0.5 ml アセチルアセトン溶液を加え、ボルテックス後、密栓し、恒温水槽中 50 °C で 30 分間加温する。
9. 放冷後、405 nm の吸光度を測定する。
10. トリアシルグリセロール標準液 (0~2 ml, 0~250  $\mu\text{g}$ ) について 5. 以降の操作を行い、標準曲線を作成する。
11. 標準曲線を用い、試料中のトリアシルグリセロールの量を計算する。

## プロトコールのポイント、注意点等

1. ここでは、標準曲線は 0~250  $\mu\text{g}$  の範囲で作成するが、少なくとも 0~500  $\mu\text{g}$  の範囲で OD 値は良好な直線性を示す。
2. 動物実験において、組織・血清のトリアシルグリセロールのレベルには個体差が甚だしい。試料中のトリアシルグリセロールレベルが標準曲線から大きく外れた場合は、5. のステップから、再測定を行う。この際、トリアシルグリセロール

のレベルが標準曲線内に収まるように、サンプリングする上清液の容量を変化させる。

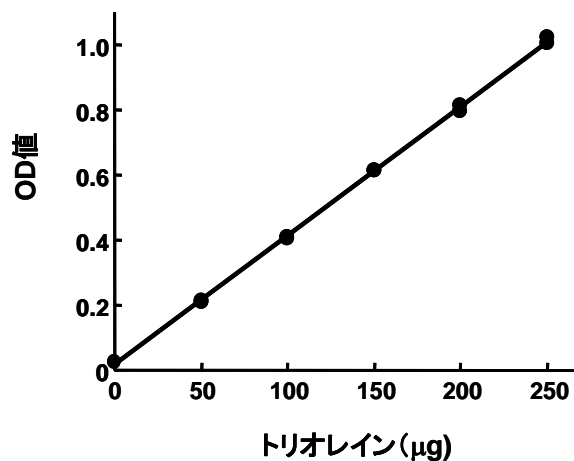


図 2 標準曲線の一例

#### 参考文献

- 1) Fletcher, M.J., A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin. Chim. Acta.* **22**, 393-397 (1968).

#### <リン脂質>

脂質抽出液中のリン脂質を酸分解し、無機リンをモリブデン酸アンモニウムと反応させる。青色を呈するのでこの吸光度を測定し、リン脂質量を算出する。

#### 準備するもの

1. 実験器具
  - ・ガラスチューブ(15 ml 容量)
  - ・ドライブロック恒温槽(200 °C 程度まで使用可能なもの)
2. 試薬
  - ・70 % 過塩素酸
  - ・2.5 % モリブデン酸アンモニウム溶液
  - ・10 % アスコルビン酸溶液
  - ・無機リンスタンダード溶液：リン酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) を 110 °C で 1 時間乾燥し、デシケーター内で放冷する。439.4 mg の乾燥した  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を水に溶かし、100 ml に定容する。この溶液は無機リン濃度が 1 mg/ml となる。実際の操作にあたってはこの溶液を 100 倍希釈したものを用いる (10 μg/ml) いずれのスタン

ダード溶液も冷凍保存する。

#### プロトコール

1. リン脂質を 25~175  $\mu\text{g}$  (無機リンとして, 1~7  $\mu\text{g}$  に相当する) を含む容量の脂質抽出液をガラスチューブ (15 ml 容) にサンプリングし, 窒素ガス気流下で乾固する。
2. 0.9 ml の 70 % 過塩素酸を加え, ドライブロック恒温槽を用いて, 180~190  $^{\circ}\text{C}$  で約 90 分間の灰化を行う (ドラフト中で操作) 。
3. 放冷後, 5 ml の水を加える。
4. 無機リンスタンダード溶液 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を用いて, 0~10  $\mu\text{g}$  のスタンダード系列を作成する。すなわち, 0~1 ml のスタンダード溶液をガラスチューブにサンプリングし, 水で容量を 1ml に調整する。ついで, 0.9 ml の 70% 過塩素酸と 4 ml の水をスタンダード系列のチューブに添加する。
5. 試料およびスタンダードに 1 ml の 2.5 % モリブデン酸アンモニウム溶液を加え, ボルテックスする。
6. ついで, 1 ml の 10 % アスコルビン酸溶液を加え, ボルテックスする。
7. 沸騰水中で, 5 分間加温する。放冷後, 820 nm の吸光度を測定する。
8. 標準曲線を用い, 試料中の無機リン量を計算する。得られた値に 25 を掛けリン脂質量とする。

#### プロトコールのポイント, 注意点等

1. 過塩素酸は腐食性が強いので, 衣服, 器機にこぼさないように気を付ける。
2. ここに記述した方法は, もともとは薄層クロマトグラフィー (TLC) を用い, 総脂質を種々のリン脂質種に分画した後の, 各種リン脂質の定量操作のために記載されていたものである。シリカゲルを用いた TLC でリン脂質を分画し, フォスファチジルコリン, ファスファチジリエタノールアミンを初めとする, 各種リン脂質のスポットをカミソリでかきとり, ガラスチューブに入れ, 70%過塩素酸を加え灰化後, 同様に発色操作を行う (吸光度測定の前にシリカゲル除去のため遠心操作を加える)。これにより, 生体組織中のリン脂質の組成を知ることが出来る。この詳細については文献 2) と 3) を参照されたい。

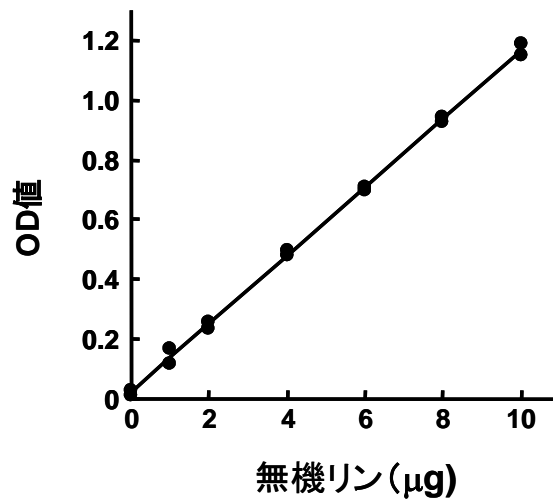


図 3 標準曲線の一例

#### 参考文献

- 1) Gomori, G. J., A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *Lab. Clin. Med.* **27**, 955-960 (1942).
- 2) Rouser, G., Siakotos, A.N. and Fleischer S., Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids*. **1**, 85-86 (1966).
- 3) Rouser, G., Fkeischer ,S. and Yamamoto A., Two dimensional then layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*. **5**, 494-496 (1970).

#### (4) 血清・組織中の $\alpha$ -トコフェロール，レチノールの定量

十文字学園女子大学 井手 隆

##### はじめに

$\alpha$ -トコフェロール，レチノールは主要な脂溶性ビタミンである。いずれも酸化されやすく，組織・血清中での濃度は食品成分の抗酸化能等を評価する上での指標ともなる。ここでは，HPLC による測定法について簡単に記載する。

##### 準備するもの

1. 実験器具
  - ・ 褐色試験管 (10 ml 容，スクリーキャップ付き)
  - ・ 恒温水槽
2. 試薬
  - ・ 3 %ピロガロール (エタノール溶液)
  - ・ 4 N 水酸化カリウム
  - ・ ヘキサン

##### プロトコール

1. 脂質抽出液 ( $\alpha$ -トコフェロールを 1~4  $\mu$ g 含む) をスクリーキャップ付き褐色試験管にサンプリングし，窒素ガス気流下で乾固する。血清の場合は，脂質抽出液ではなく，血清そのままをサンプリングしても差し支えない (0.5 ml)。
2. 2 ml の 3 %ピロガロール (エタノール溶液) と 0.2 ml の 4 N 水酸化カリウム溶液を加え 70  $^{\circ}$ C で 30 分加温し，ケン化する。
3. 放冷後，2 ml の水を加える (血清 0.5 ml をサンプリングした場合は 1.5 ml の水を加える)。
4. 約 4 ml のヘキサンを用い，3 回抽出する。抽出液は新しい褐色試験管に合わせる。
5. ヘキサン抽出液は窒素ガス気流下で乾固する。 $\alpha$ -トコフェロール測定のためには抽出物は 1~1.5 ml のヘキサンで溶解する。レチノール定量のためには抽出物は 0.25 ml のメタノールに溶解する。10~20  $\mu$ l を HPLC により，分析する。
6. HPLC の条件は以下の通りである。
  - ・  $\alpha$ -トコフェロール  
カラム：順相シリカカラム 4.6 x 250 mm (例えば，日本分光 FinePak Sil)  
流速：1 ml/min  
カラム恒温槽の温度：40  $^{\circ}$ C



移動相: イソプロパノール/酢酸/ヘキサン(0.5 : 0.5 : 99, v/v/v)

検出器: 蛍光検出器, 励起波長 290 nm , 検出波長 325 nm

スタンダード溶液: 2  $\mu\text{g/ml}$  の  $\alpha$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコフェロールを含むヘキサン溶液

保持時間:  $\alpha$ -トコフェロール, 約 8 分 ;  $\gamma$ -トコフェロール, 約 14 分

・ レチノール

カラム: 逆相 ODS カラム 4.6 x 250 mm (例えば, 資生堂 Capcell Pak AG120)

流速: 1 ml/min

カラム恒温槽の温度: 40 °C

移動相: アセトニトリル/エタノール/50 mM 酢酸アンモニウム/2 % 酢酸  
(3:1:0.92:0.08, v/v/v/v)

検出器: UV 検出器, 325 nm

スタンダード溶液: 1  $\mu\text{g/ml}$  のレチノールを含むメタノール溶液

保持時間: 約 7.5 分

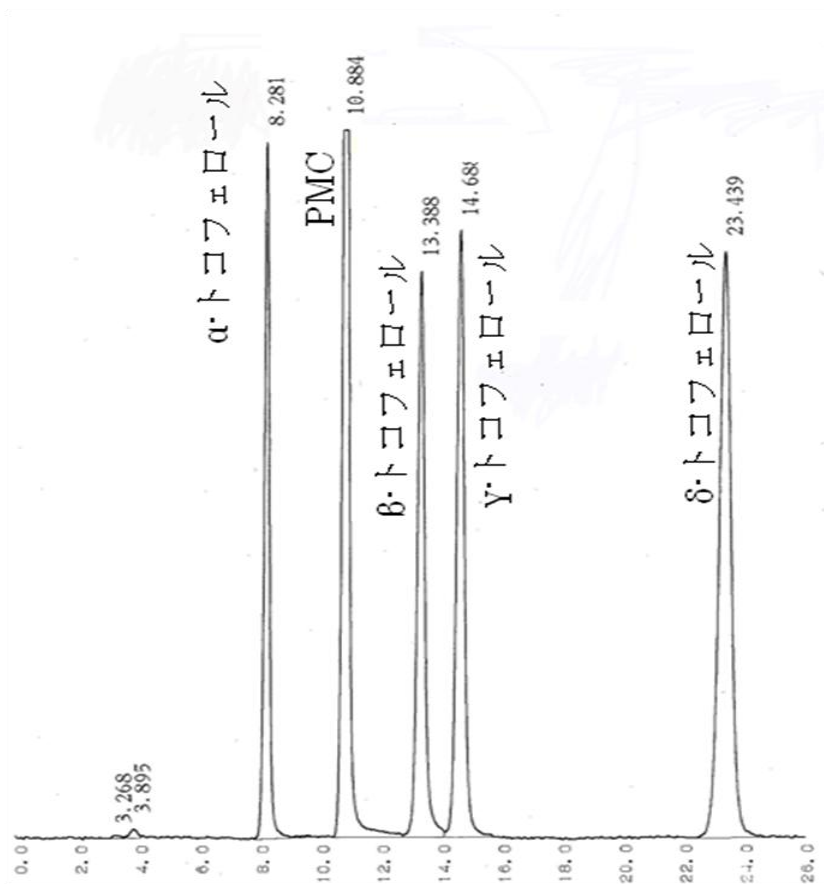


図 1 順相カラムによるトコフェロール類の HPLC による分析例

### プロトコールのポイント、注意点等

1. 検出されるトコフェロールは  $\alpha$ -トコフェロールが最も多いが、食餌条件により、 $\gamma$ -トコフェロールをはじめとする種々のトコフェロールが検出される場合もある。
2. エーザイ（株）より発売されている、ビタミン E 定量用標準試薬には各種トコフェロールおよび HPLC 分析で用いる内部標準物質（PMC, 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxychroman）が含まれている。この試薬セットを用いることにより、内部標準物質添加による信頼性のあるトコフェロール分析が可能となる。
3. トコフェロール分析での典型的クロマトグラムを図 1 に示した。
4. トコフェロールを分析した後、ヘキサンを窒素気流下除去し、メタノールに再溶解してレチノールを測定すれば、抽出操作を繰り返す必要がない。
5.  $\alpha$ -トコフェロール、レチノール両者とも酸化されやすいので、用いるガラス器具は褐色試験管とする。操作全般にわたって、酸化分解されないように気を付ける。



この反応では GSH は 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid, DTNB)により GSSG に酸化され、DTNB は黄色色素 5-thio-2-nitrobenzoic acid(5-チオ-2-ニトロ安息香酸 TNB)に転換する(1)。GSSG は反応系に加えるグルタチオン還元酵素の働きで NADPH により還元され、GSH に再転換する(2)。この反応が次々に繰り返され、反応系には TNB が蓄積されることになる。TNB の生成速度は反応系に存在するグルタチオン量に比例するので、TNB の生成速度を 412 nm の吸光度変化で測定することにより、グルタチオン量を定量することができる。この方法で測定される値は還元型と酸化型の総和である。

## 準備するもの

### 1. 実験装置・器具

- ・ホモジナイザー (ポリトロンタイプ)
- ・冷却遠心機
- ・分光光度計 (恒温セルホルダー, カイネティクスソフトウェアが装備されたものが望ましい)
- ・その他: 冷却遠心機用遠心チューブ, 遠心ガラスチューブ, ピペットマン, 分光光度計セル(1~1.5 ml 容量)

### 2. 試薬

- ・8% 過塩素酸(w/v): 市販の 70% 過塩素酸(w/w)を水で希釈して調製する。市販 70% 過塩素酸は重量%であるので注意。57g の 70% 過塩素酸(w/w)を秤量し、500 ml に定容する(発熱するので冷却しつつ希釈する)。常温保存。
- ・3M 炭酸カリウム(K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)水溶液: 常温保存。
- ・測定用緩衝液: 10 mM EDTA を含む 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5), 冷凍保存しておけば長期に渡って使用できる。
- ・6 mM DTNB 溶液: 23.8 mg の DTNB を 10 ml の測定用緩衝液に溶かす。用時調製。
- ・4 mM NADPH 水溶液: NADPH(4Na 塩, オリエンタル酵母)を 3.33 mg/ml の濃度になるように水に溶解。用時調製。使用まで氷冷保存。
- ・グルタチオン還元酵素溶液(25 unit/ml): 市販のグルタチオン還元酵素(50% グリセロール溶液, 1000 unit/ml, オリエンタル酵母)を 2 倍希釈した測定用緩衝液で 40 倍希釈する。用時調製。使用まで氷冷保存。
- ・グルタチオン標準液: 還元型グルタチオンを 3.07 mg/ml(10 μmol/ml)の濃度になるように水に溶解する。これをストック溶液として冷凍保存しておく。使用時に水で希釈し、スタンダード系列の溶液を作成する(0.05 ml に 0.5~5 nmol を含むようにする)。

## プロトコール

### 1. 組織抽出液の調製

組織を過塩素酸でホモジナイズすることにより除タンパクし，炭酸カリウムで中和することにより，測定試料の調製を行う．組織は解剖後，直ちに処理を行うのが望ましいが，無理であれば解剖後速やかに冷凍保存(−80°C)した組織を用いてもよい(経験的に冷凍保存による含量変化はそれほど大きくないように思える)．

- 1) 約 1.5g の組織を秤量し(正確な値を記録)，4.5 ml(3 倍量)の氷冷した 8%過塩素酸でポリトロンタイプホモジナイザーを用いホモジナイズする．
- 2) ホモジネートを遠心チューブに移し，4°C，12,000 rpm で 20 分間遠心する．
- 3) 上清 3 ml をガラス製遠心チューブ(約 10 ml 容量)に移し，氷冷下 3M 炭酸カリウムにて中和する．約 0.28 ml の添加が必要である．pH 試験紙で確認しつつ，少量ずつ炭酸カリウム水溶液を添加していく(添加した炭酸カリウムの容量を記録しておく)．発泡するので，噴きこぼれないように注意する．白色沈殿が生成する．
- 4) 中和後，5 分程度氷冷し，4°C，2000～3000 rpm で 10 分間遠心する．上清を冷凍保存し，測定試料とする．

### 2. 測定

- 1) 0.05 ml 中にグルタチオンが約 2 nmol 含まれるように，試料溶液を水で希釈する(肝臓の場合 40 倍程度に希釈する)．
- 2) 0.05 ml 中に，0.5，1，1.5，2，3，4 および 5 nmol のグルタチオンを含む標準液の系列を調製する(ストック溶液を水で希釈)．
- 3) 分光光度計セル(1～1.5 ml 容量)に 0.4 ml の測定用緩衝液，0.1 ml の DTNB 溶液，0.05 ml の NADPH 水溶液，0.05 ml の希釈した試料溶液あるいは標準溶液を添加し，さらに 0.35 ml の水を加え最終容量を 0.95 ml とする．
- 4) 試薬を添加した，分光光度計セルは 30°C に設定した恒温セルホルダーに入れ，保温する．
- 5) 0.05 ml のグルタチオン還元酵素溶液を添加，よく混合し反応を開始する．412 nm の吸光度変化を記録し，カイネティクスソフトウェアにより吸光度変化率を求める( $\Delta OD$ /分)．
- 6) 標準溶液により，検量線を作成し，試料中のグルタチオン量(nmol)を求める．
- 7) 処理した組織の重量，試料の希釈率，過塩素酸抽出液の中和に要した炭酸カリウムの容量などを補正し，組織中のグルタチオン量を求める．

下記に，検量線の一例を示した(図 2)．0.5～5 nmol の範囲で良好な直線性を示す．

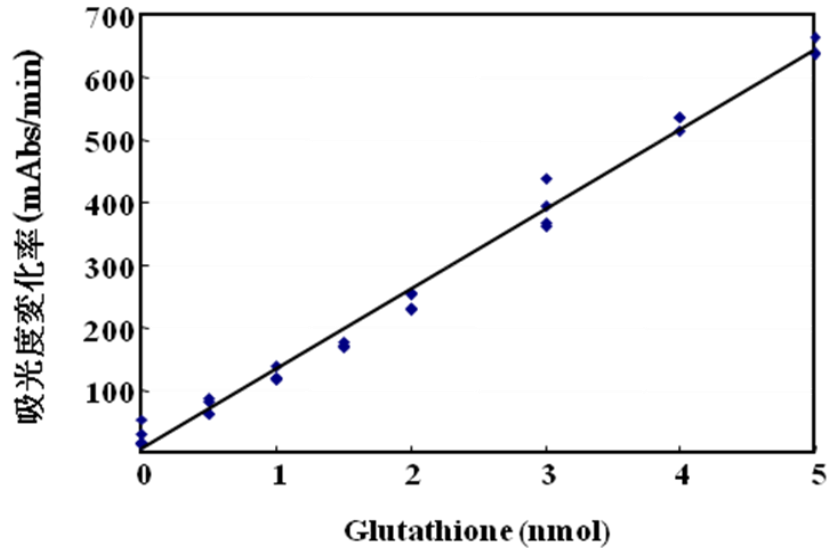


図 2 グルタチオンの標準曲線

#### プロトコールのポイント，注意点等

あまり，反応が早すぎると反応の直線部分が短くなる．吸光度変化率は 5 nmol グルタチオン添加で 0.5~0.7/分になるように，グルタチオン還元酵素溶液の添加量（希釈率）を適宜調整すると良い．

#### 参考文献

- 1) Griffith, O.W., Glutathione and glutathione disulfide. In “Method Enzymatic Analysis, 3<sup>rd</sup> ed. (VCH Publishers, Deerfield Beach, FL) vol. 8, pp.521-529 (1985).
- 2) Anderson, M.E., Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Method Enzymol.* **113**, 548-555 (1985).

## 2) 酵素法による組織カルニチンの定量

(独) 農研機構 食品総合研究所 井手 隆

### はじめに

カルニチン(carnitine)はリジンとメチオニンから生合成されるヒドロキシアミノ酸である(図1)。体内でのカルニチンの合成は主に肝臓と腎臓で行われると考えられている。カルニチンはミトコンドリアの脂肪酸β-酸化に必須な役割を果たしている。β-酸化経路において脂肪酸はまずミトコンドリア外でアシル-CoA に転換される。長鎖脂肪酸のβ-酸化はミトコンドリアマトリックス(mitochondrial matrix)内で進行する。従って、脂肪酸はβ-酸化を受けるためにはミトコンドリアマトリックスに輸送される必要がある。しかし、アシル-CoA はミトコンドリア外膜(outer mitochondrial membrane)を通過出来るが、内膜(inner mitochondrial membrane)を通過出来ない。ミトコンドリア内膜での脂肪酸輸送にはカルニチンが関与している。カルニチンが関与する脂肪酸のミトコンドリアマトリックス内への輸送は3段階で行われる。1.ミトコンドリア外膜に存在するカルニチンパルミトイル転移酵素I(carnitine palmitoyl transferase I), がアシル-CoA をアシルカルニチンに転換する。2.ミトコンドリア内膜での交互輸送機構(カルニチンアシルトランスロケースが関与する)により、アシルカルニチンはミトコンドリアマトリックス内へ輸送される。3.マトリックス内に存在するカルニチンパルミトイル転移酵素II(carnitine palmitoyl transferase II)はアシルカルニチンをアシル-CoA に再転換する。生成した、アシル-CoA はミトコンドリアマトリックス内でβ-酸化を受ける(図2)。カルニチンパルミトイル転移酵素Iによって触媒される、アシルカルニチン合成の段階が、ミトコンドリアでの脂肪酸酸化の重要な制御段階と考えられている。脂肪酸合成の中間体であるマロニル-CoA は強力なカルニチンパルミトイル転移酵素Iの阻害剤であり、脂肪酸合成が活発な栄養条件下ではアシルカルニチン合成が低下し、脂肪酸酸化活性が減少する。また、肝臓において、β-酸化が亢進する条件下では組織内のカルニチン濃度が増加することが観察されているので、組織カルニチン濃度変化は脂肪酸酸化を制御する大きな要因と思われる。

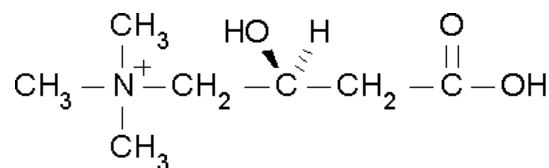


図1 カルニチンの構造

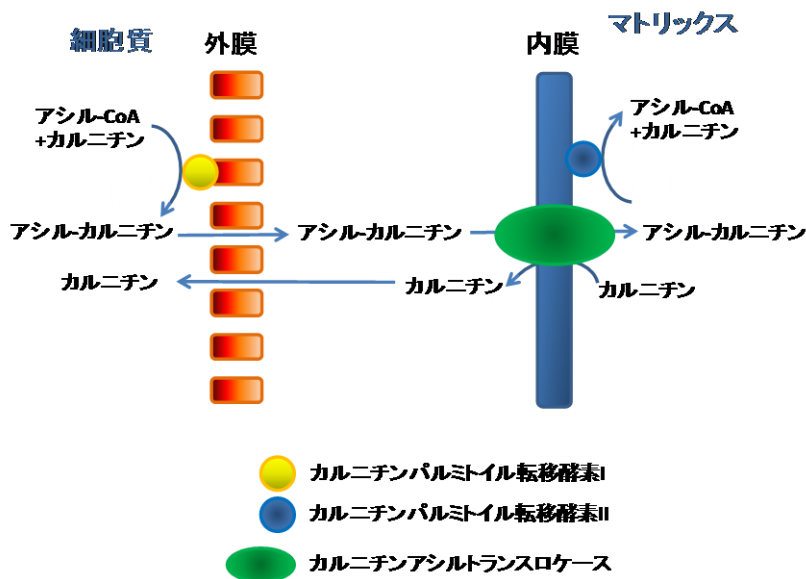


図2 ミトコンドリアへの脂肪酸輸送におけるカルニチンの役割

ここでは、カルニチンアセチル転移酵素を用いた、カルニチン定量法について記載する。試料の処理によって、遊離カルニチン、短鎖アシルカルニチンおよび長鎖アシルカルニチンを分別定量する。原理は以下のようなものである。反応液に存在するカルニチンにカルニチンアセチル転移酵素の働きにより、アセチル-CoA からアセチル基が転移し、アセチル-カルニチンを生成し、アセチル-CoA から CoA を遊離する。CoA は 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), DTNB) と反応し黄色色素 5-thio-2-nitrobenzoic acid (5-チオ-2-ニトロ安息香酸 TNB) に転換する。その生成量を 412 nm の吸光度で測定し、カルニチン量を求める。

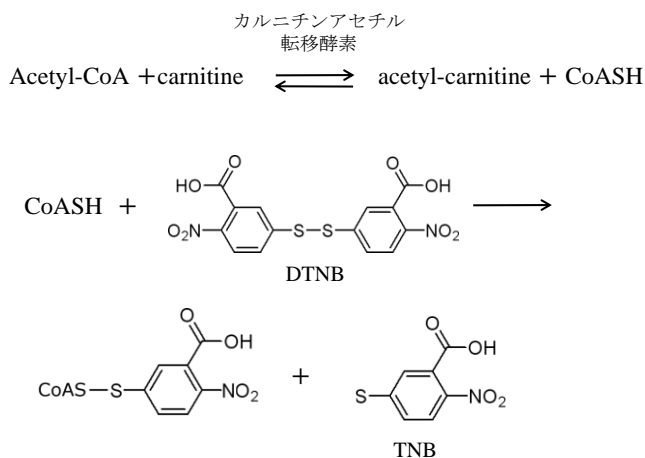


図3 カルニチンアセチル転移酵素を用いたカルニチンの定量



## 準備するもの

### 1. 実験装置・器具

- ・ホモジナイザー (ポリトロンタイプ)
- ・冷却遠心機
- ・分光光度計
- ・恒温水槽
- ・アルミブロック恒温槽
- ・その他：冷却遠心機用遠心チューブ，遠心ガラスチューブ，ピペットマン，目盛り付き試験管(10 ml 容量)，小容量ガラス試験管(3~4 ml 容量)，エッペンンドルフチューブ(1.5 ml 容量)，分光光度計セル(0.5 ml 容量ブラックセル)

### 2. 試薬

- ・8%過塩素酸 (w/v)：市販の 70%過塩素酸(w/w)を水で希釈して調製する。市販 70%過塩素酸は重量%であるので注意。57g の 70%過塩素酸(w/w)を秤量し，500 ml に定容する(発熱するので冷却しつつ希釈する)。常温保存。
- ・6%過塩素酸(w/v)
- ・12%過塩素酸(w/v)
- ・3 M 炭酸カリウム( $K_2CO_3$ )水溶液：常温保存。
- ・2.4 M 水酸化カリ溶液
- ・測定用緩衝液：10 mM EDTA を含む 0.5 M HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン -N'-2- エタンスルホン酸， N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid) (pH 7.5)，冷凍保存しておけば長期に渡って使用できる。
- ・2.7 mM DTNB: 5.35 mg の DTNB を 5 ml の測定用緩衝液に溶かす。用時調製。
- ・DTNB/過酸化水素溶液: 2.7 mM DTNB 溶液 1 ml と 0.1 ml の 30%過酸化水素溶液を混合する。用時調製。
- ・10 mM アセチル-CoA 溶液：2mM 塩酸にアセチル-CoA を溶解し，冷凍保存。
- ・カタラーゼ溶液：市販の酵素標品(ロシュ・ダイアグノスティックス 106 810, 250 mg/12.5 ml)を水で 13 倍希釈する。用時調整。使用まで氷冷保存。
- ・カルニチンアセチル転移酵素溶液：市販の酵素標品(ロシュ・ダイアグノスティックス 10 103 241 001, 5 mg/ml)を水で 6 倍希釈する。用時調整。使用まで氷冷保存。
- ・L-カルニチン標準液：L-カルニチン塩酸塩を 19.8mg/ml の濃度になるように溶解し(100 mM 溶液)，ストック溶液とする(冷凍保存)。ストック溶液を 0.1 mM 濃度になるように希釈し，測定時のスタンダード溶液として用いる。

## プロトコール

### 組織抽出液の調製

#### 1. 遊離カルニチン測定試料

組織を過塩素酸でホモジナイズすることにより除タンパクし、測定試料の調製を行う。アシルカルニチンは組織の凍結・融解によって加水分解されてしまうため組織は動物の解剖後、直ちに処理を行う必要がある。

- 1) 約 1.5g の組織を秤量し(正確な値を記録)、4.5 ml(3 倍量)の氷冷した 8% 過塩素酸でポリトロンタイプホモジナイザーを用いホモジナイズする。
- 2) ホモジネートを遠心チューブに移し、4°C, 12,000 rpm で 20 分間遠心する。
- 3) 上清を除去した後の沈殿は、冷凍保存し、後日長鎖アシルカルニチン測定試料の調製に用いる。
- 4) 上清 3 ml をガラス製遠心チューブ(約 10 ml 容量)に移し、氷冷下 3M 炭酸カリウムにて中和する。約 0.28 ml の添加が必要である。pH 試験紙で確認しつつ、少量ずつ炭酸カリウム水溶液を添加していく(添加した炭酸カリウムの容量を記録しておく)。発泡するので、噴きこぼれないように注意する。白色沈殿が生成する。
- 5) 中和後、5 分程度氷冷し、4°C, 2000~3000 rpm で 10 分間遠心し、上清を採取する。
- 6) この上清はかなり濁っているので、実際の分析の際の吸光度測定で高いブランク値を与える。よって、この上清をさらに超遠心処理し(4°C, 200,000 x g, 3 分)、濁りを除去する。超遠心処理した上清は冷凍保存し、測定試料とする。この試料の測定により遊離カルニチン濃度が測定できる。

#### 2. 遊離カルニチン+短鎖アシルカルニチン測定試料

上記で調製した抽出液中には遊離カルニチンと短鎖アシルカルニチン両者が存在する。短鎖アシルカルニチンをアルカリ処理によって加水分解し、遊離カルニチンと短鎖アシルカルニチンの総量を測定する試料とする。

- 1) 1.の操作で得られた、抽出液 1.35 ml に 0.15 ml の 2.4 M 水酸化カリ溶液を加え、56°C で 15 分間加温後、氷冷する。
- 2) 反応液を 12% 過塩素酸溶液で中和する。pH 試験紙で確認しつつ、少量ずつ過塩素酸溶液を添加していく(添加した容量を記録しておく)。
- 3) 中和後、5 分程度氷冷し、4°C, 2000~3000 rpm で 10 分間遠心し、上清を凍結保存し、測定試料とする。

#### 3. 長鎖アシルカルニチン測定試料

1.の操作において、長鎖アシルカルニチンはタンパク質とともに沈殿する。

遠心後の沈殿をアルカリ処理し、長鎖アシルカルニチンを加水分解することにより、長鎖アシルカルニチン測定試料を調製する。

- 1) 1.の操作で得られた、遠心後の沈殿を 4~5 ml の氷冷した、6%過塩素酸溶液で懸濁する(葉さじを用いてなるべく均一にする)。懸濁後、よくボルテックスする。
- 2) 懸濁液を 4°C, 12000 rpm で 20 分間遠心し、上清は捨て沈殿を洗う。
- 3) 遠心チューブに 1.5 ml の水を加え、沈殿を葉さじを用いて細かく破碎・懸濁し、目盛り付き試験管に移す。さらに、0.8 ml の水で遠心チューブに残った沈殿を懸濁し、これに合わせる。もう一度、0.8 ml の水を加え、同様の操作を繰り返す。最終的に、懸濁液の容量を水で 4 ml とする。
- 4) 目盛り付き試験管に 0.444 ml の 2.4 M 水酸化カリウム溶液を加え、56°C で 15 分加温する。
- 5) タンパク質が溶解均一な粘稠溶液となる。これを再び遠心チューブに戻し、0.24 ml の 70%過塩素酸(w/w)を添加し、ボルテックスする。
- 6) 約 10 分間氷冷後、4°C, 12,000 rpm で 20 分間遠心する。
- 7) 上清 2.5 ml をガラス遠沈管にとり、3M 炭酸カリウム溶液で中和する。pH 試験紙で確認しつつ、少量ずつ炭酸カリウム溶液を添加していく(添加した容量を記録しておく)。
- 8) 約 5 分間氷冷後、4°C, 2,000~3,000 rpm で 10 分間遠心する。上清は凍結保存し、測定試料とする。

## 測定

試料には測定を妨害するチオール化合物(主にグルタチオン)が含まれるので、これを過酸化水素により分解し、実際の測定試料とする。

1. カルニチンを 5-50 nmol 含む試料(長鎖カルニチン測定試料では 0.5 ml, 遊離および遊離+短鎖アシルカルニチン測定試料では 0.2~0.5 ml)を小容量のガラスチューブ(3~4 ml 容量)にサンプリングし、水で容量を 0.5 ml に合わせる。標準液として、L-カルニチンを 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 nmol を含む試料を調製し、同じく最終容量を 0.5 ml に合わせる。
2. 0.05 ml の DTNB/過酸化水素溶液を添加、混合し、室温で約 10 分間放置する。
3. 次に、0.02 ml のカタラーゼ溶液を添加、混合する(発泡する)。室温で 30 分間放置(時々ボルテックスで混合)。
4. 2000~3000 rpm で 10 分間遠心し、測定試料とする。測定時まで冷蔵保存する。
5. 0.03 ml の 10 mM アセチル-CoA 溶液を添加、混合後、1.5 ml 容量のエッペン

- ドルフチューブに移す。アセチル-CoA 溶液添加後、吸光度のわずかな増加が見られる。
6. アルミブロック恒温槽で 37°C, 15 分間加温後, 412 nm の吸光度を測定する (OD1)。吸光度測定後直ちに氷冷する。
  7. 0.01 ml のカルニチンアセチル転移酵素溶液を標準試料および測定試料に, 1 サンプル, 正確に 30 秒おきに添加し, 混合する(ストップウォッチを使用)。37°C に加温したヒートブロックでインキュベーションを行う。
  8. 正確に 15 分後チューブ内容液を分光光度計セルに移し, 吸光度を測定する (OD2)。
  9. OD2 から OD1 を差し引いた値 ( $\Delta OD$ ) で計算を行い, 標準曲線から試料中のカルニチン濃度を計算する。
  10. 処理した組織の重量, 試料の採取料, 過塩素酸抽出液の中和に要した炭酸カリウム, 過塩素酸の容量などを補正し, 組織中のカルニチン濃度を計算する。下記に標準曲線の一例を示した。

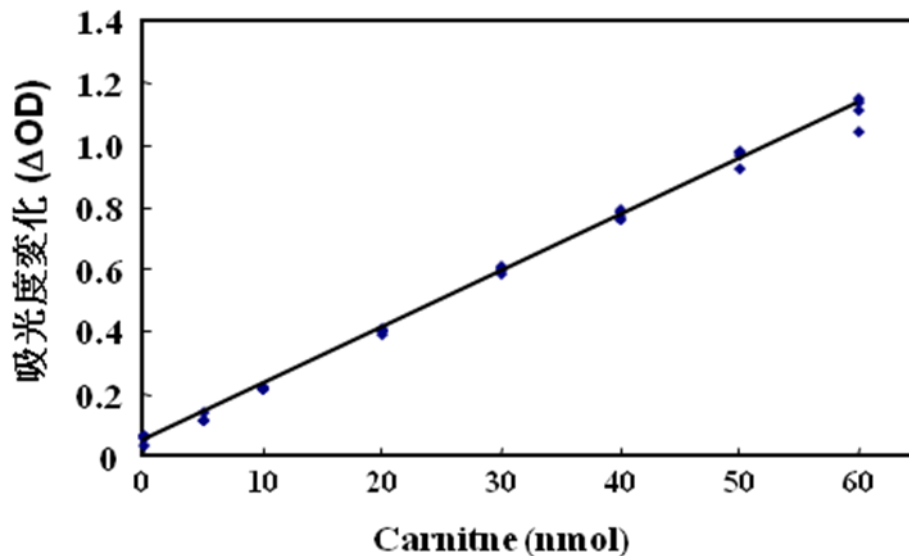


図 4 カルニチンの標準曲線

#### プロトコールのポイント, 注意点等

カタラーゼ溶液を添加時に発泡するので, 吹きこぼれないように注意すること (3.). アセチル-CoA 添加後, 吸光度上昇がわずかに認められる。室温に放置しておくと, 少しずつ上昇するので吸光度 (OD1) 測定後, カルニチンアセチル転移酵素添加まで氷につけておく。カルニチンアセチル転移酵素添加後の吸光度の急激な上昇が認められるが, 長時間追跡しても明確な終点が認められないので, 正

確に 15 分後の値を終点としている。このやり方で、標準曲線には良好な直線性が観察される。本法で測定した結果の一例では、肝臓の総カルニチン濃度は通常の栄養条件下では 100 nmol/g 程度。脂肪酸酸化誘導剤をラットに与えた場合、4～5 倍に増加した。このうち、遊離カルニチンが 55～65%，短鎖アシルカルニチンが 30～40%を占めた。長鎖アシルカルニチン濃度はきわめて低い(2～5%)。本法では長鎖アシルカルニチンでは正確な値を得るのは困難であった。これに関して、より感度の高い手法として放射性同位元素を用いる方法が報告されている (McGary and Foster, 1985)。

#### 参考文献

- 1) Wieland, O.H., Deufe, T. and Paetzke-Brunner, I.G. 3.5 Carnitine and acylcarnitine. 3.5.2 Colorimetric method. In “Method Enzymatic Analysis, 3<sup>rd</sup> ed. (VCH Publishers, Deerfield Beach, FL) vol. 8, pp. 481-488 (1985).
- 2) McGary, J.D. and Foster, D.W. 3.5 Carnitine and acylcarnitine. 3.5.1 Radiometric method. In “Method Enzymatic Analysis, 3<sup>rd</sup> ed. (VCH Publishers, Deerfield Beach, FL) vol. 8, pp. 474-481 (1985).
- 3) Pearson D.J., Chase J.F.A. and Ttmbbs, P.K., The Assay of (-)-Carnitine and its O-acyl derivatives. *Method Enzymol.* **14**, 612-622 (1969).

### 3) 酵素-HPLC 法による血清グリセロールの定量

(独) 農研機構 食品総合研究所 井手 隆

#### はじめに

グリセロールは、3 価のアルコールであり、トリアシルグリセロールおよびリン脂質の骨格をなす化合物である。トリアシルグリセロールおよびリン脂質の生体での合成はミクロゾームで行われる。まず、グリセロールがリン酸化されグリセロール 3-リン酸に転換する。さらに、グリセロール 3-リン酸に脂肪酸やコリンが転移することにより、トリアシルグリセロールやリン脂質が合成される(図 1)。トリアシルグリセロールがエネルギー源として利用される場合、トリアシルグリセロールは脂肪酸とグリセロールに分解され、血流中に放出される。グリセロールは糖新生あるいは解糖系の中間体として重要である。グリセロールは図 2 に示した経路により、糖新生・解糖系中間体(ジヒドロキシアセトンリン酸やグリセルアルデヒド 3 リン酸)に転換し、代謝される。血清のグリセロール値は生体の脂質代謝や糖代謝変化を理解する上でのパラメーターとして重要である。また、血清のグリセロール値の測定は以下の観点から、重要な脂質代謝パラメーターである血清トリアシルグリセロール値の正確な評価に必要となる。現在、血清のトリアシルグリセロールの測定には市販の臨床キットが多用されている。これはトリアシルグリセロールをリポタンパク質リパーゼにより加水分解し、遊離するグリセロールを酵素的に測定することが原理となっている。従って、測定されたトリアシルグリセロール量には血清中に含まれるグリセロールの値も含まれていることになる。通常、血清に含まれるグリセロール量はトリアシルグリセロールに由来するグリセロール量よりはるかに低い。栄養条件によっては測定されたトリアシルグリセロール量のかなりの量は実際には遊離グリセロールに由来する可能性がある。従って、血清遊離グリセロールを測定し、市販キットで測定されたトリアシルグリセロール量から差し引くことによって正確な値が算出される。実際に、血清から脂質を抽出し、そのトリアシルグリセロール量を測定した値は血清全体を用いて市販キットで測定した値よりも低値を示す。

ここでは酵素-HPLC 法による血清グリセロールの測定法について記載する。原理は図 2 に示した酵素反応を利用したものである。まず、グリセロールをグリセロールキナーゼによりグリセロール 3 リン酸に転換する。ついで、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素の反応により、グリセロール 3 リン酸をジヒドロキシアセトンリン酸に転換する。この際、生成する NADH を HPLC により分離定量する。NADH は 340 nm に強い吸収を示すため、分光光度計での測定も可能であるが、

感度が低く、大量の試料が必要であった。HPLC による分析を導入することにより、飛躍的に感度が上がり、血清として 0.01~0.02 ml に相当する量での分析が可能となった。本測定法は当研究室で開発されたオリジナルなものである。

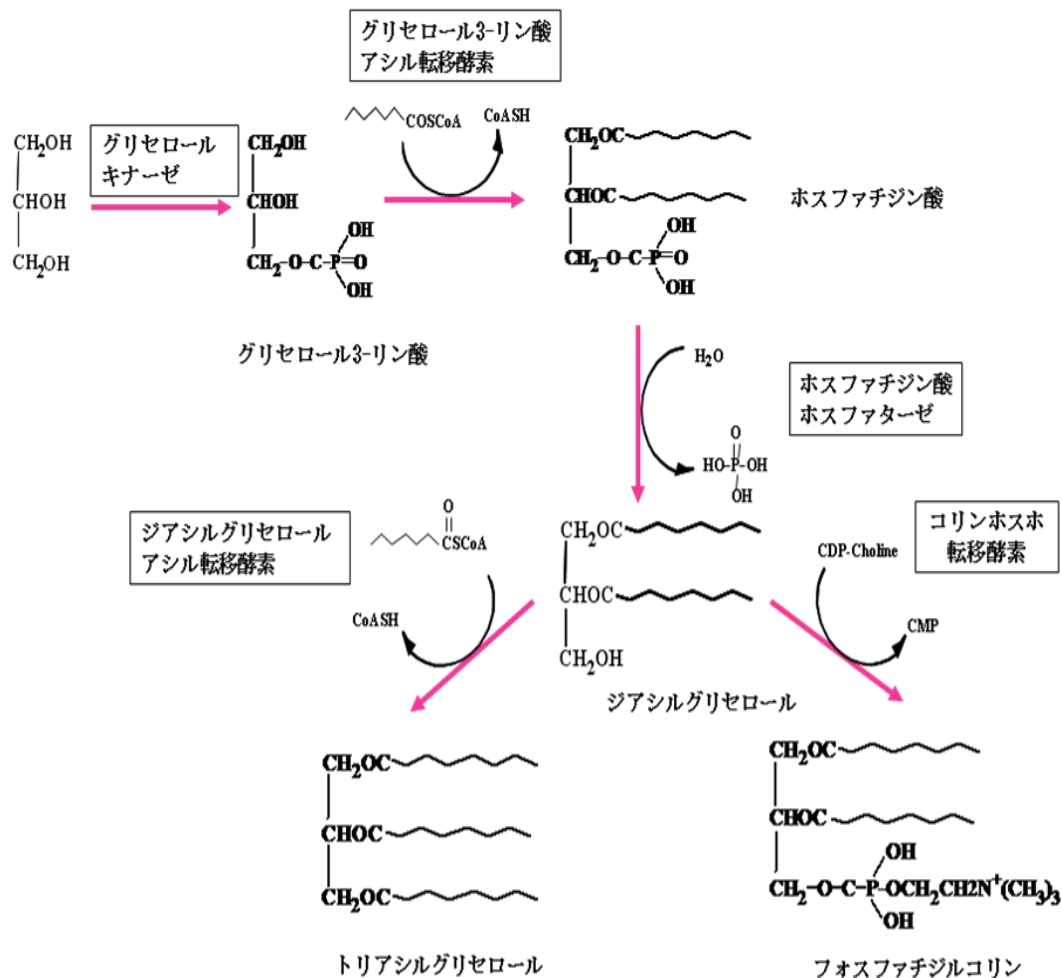


図 1 ミクロゾームでのトリアシルグリセロールおよびリン脂質の生合成

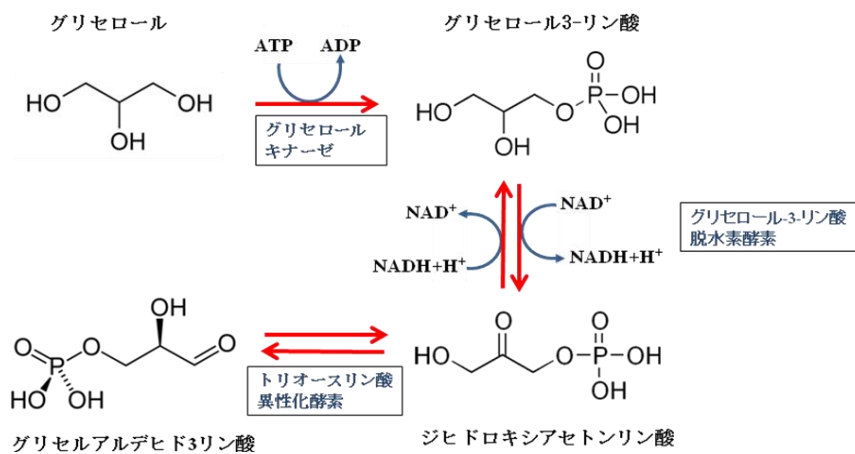


図 2 グリセロールの解糖・糖新生系中間体への転換

## 準備するもの

### 1. 実験装置・器具

- ・冷却遠心機
- ・その他：エッペンドルフチューブ (1.5 ml 容量)、ピペットマン、小容量ガラス試験管 (3~4 ml 容量)

### 2. 試薬

- ・30%過塩素酸 (w/v)：市販の 70%過塩素酸 (w/w) を水で希釈して調製する。市販 70%過塩素酸は重量%であるので注意。42.9 g の 70%過塩素酸 (w/w) を秤量し、100 ml に定容する(発熱するので冷却しつつ希釈する)。常温保存。
- ・3 M 炭酸カリウム ( $K_2CO_3$ ) 水溶液：常温保存。
- ・40 mM ATP 水溶液：ATP (二ナトリウム塩, オリエンタル酵母工業 309-50513) を 22.0 mg/ml の濃度になるように水に溶かす。冷凍保存。
- ・60 mM NAD 水溶液：NAD (オリエンタル酵母工業 308-50441) を 39.8 mg/ml の濃度になるように水に溶かす。冷凍保存。
- ・200 mM システイン溶液: システイン (塩酸塩 1 水和物) 35 mg を 1 ml の 0.4 N 水酸化ナトリウムに溶かす。用時調製。
- ・分析緩衝液：1.5 mM の塩化マグネシウムを含む 1 M ヒトラジン-HCl 緩衝液 (pH 9.4)。冷蔵保存。
- ・グリセロールキナーゼ溶液：*Bacillus stearothermophilus* 由来 (ロシュ・ダイアグノスティックス 691836, 500 uit/ml)。
- ・グリセロール-3-リン酸脱水素酵素溶液：ウサギ筋肉由来 (ロシュ・ダイアグノスティックス 127752, 10 mg/ml)。
- ・グリセロール標準液：100 nmol/ml
- ・混合試薬：0.7 ml 分析緩衝液, 0.1 ml ATP 溶液, 0.1 ml NAD 溶液, 0.1 ml システイン溶液, 0.004 ml グリセロールキナーゼ溶液および 0.01 ml のグリセロール-3-リン酸脱水素酵素溶液を混合。用時調製。使用まで氷冷保存。

## プロトコール

### 血清除タンパク試料の調製

測定試料は下記の操作により過塩素酸で血清を除タンパクした抽出液を用いる。

1. 血清 1 ml を 1.5 ml 容量のエッペンドルフチューブに入れ 0.25 ml の 30%過塩素酸を添加し、ボルテックスする。
2. 氷上で 10 分間放置後、4°C, 14,000 rpm で 20 分間遠心する。



3. 上清を少容量(3~4 ml)ガラス試験管に移し、氷冷下 0.125 ml の 3 M 炭酸カリウム溶液を添加する。
4. 激しく発泡する。泡が収まった時点で、pH を pH 試験紙でチェックし、中性であることを確認する。
5. pH が中性でなかった場合には過塩素酸溶液あるいは炭酸カリウム溶液の添加により調整する。
6. 氷上に 10 分間放置後、2000~3000 rpm で 10 分間遠心する。上清は冷凍保存し、測定試料とする。

## 測定

1. 1.5 ml 容量のエッペンドルフチューブに、グリセロールを 1~5 nmol 含む測定試料あるいは標準液を入れる。容量は 0.05 ml 以下とする。血清抽出液の場合は 0.02 ml が適当である。
2. 容量を水の添加により 0.05 ml に合わせる。
3. 0.025 ml の混合試薬を添加・混合後、小容量(0.1 ml)の HPLC オートサンプラー用ガラス容器に移す。
4. 室温に 1 時間放置後、HPLC のオートサンプラーに試料をセットし、分析する。冷却装置がついている場合はオートサンプラーの温度は 4°C に設定する。
5. 生成した、NADH は蛍光検出器(励起波長 350, 測定波長 458 nm)あるいは UV 検出器(340 nm)で検出・定量する。
6. HPLC の条件は以下の通りである。
  - 1) カラム：逆相 ODS カラム 4.6 x 250 mm(例えば、例えば、資生堂 Capcell Pak AG120)
  - 2) 流速：1 ml/分
  - 3) カラム恒温槽の温度：40°C
  - 4) 移動相：160 mM リン酸二水素アンモニウム(pH 6.0), トリブチルアミン, メタノール(80/0.13/20, v/v/v)。160 mM リン酸二水素アンモニウムの pH はメタノール添加前に、アンモニウム水で 6.0 に合わせておく。
7. 上記の条件での NADH の保持時間は 5~6 分である。NADH 以外に溶出されるピークはほとんどなく、全体で 8~10 分間の分析時間で充分である。
8. 除タンパクに使用した過塩素酸(0.25 ml)および中和に用いた炭酸カリウム(0.125 ml)を補正し、血清中濃度を計算する。

以下に標準曲線の一例を示した。蛍光検出器での測定例である。蛍光検出器は UV 検出器に比べて、感度は高い。通常の場合は UV 検出器を用いても、感度の

面で支障はない。

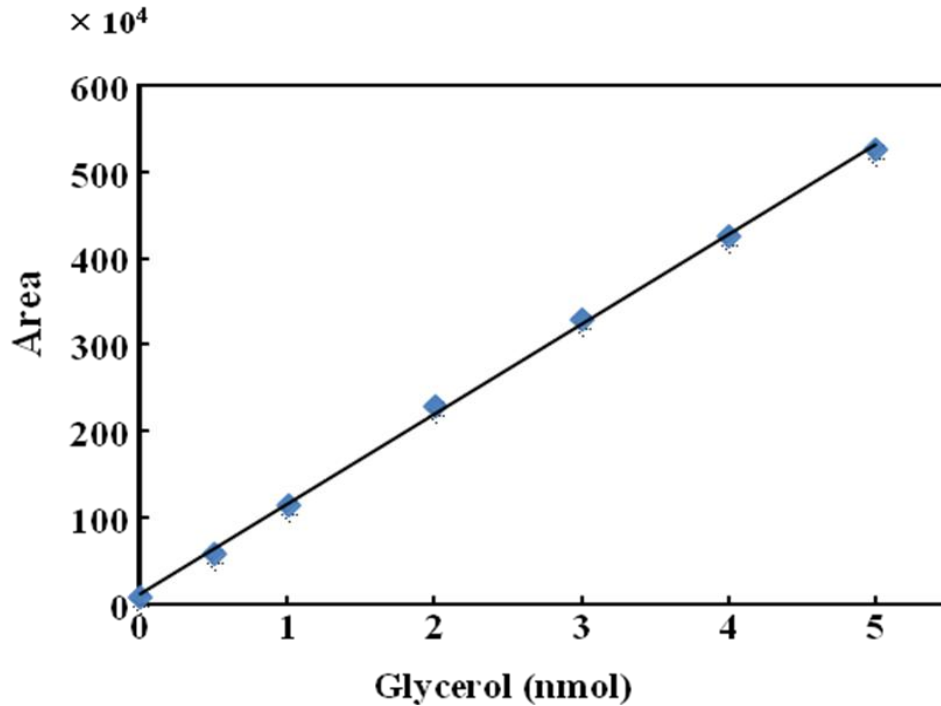


図3 グリセロールの標準曲線

#### プロトコールのポイント、注意点等

調製した、試料の安定性(NADH)の安定性については、厳密な確認を行っていない。少なくとも、調製後 10 時間程度まではシグナル値に変化はないようである。可能であれば、分析時までオートサンプラーを低温に保つなど、低温に保存した方が安全と思われる。グリセロールが含まれない試料でも、わずかに NADH のピークが認められるので、ブランク試料を必ず分析し、差し引く必要がある。本法で分析した、ラット血清のグリセロール値は 0.1~0.2 mM 程度であった。これに対し、市販の酵素法キットで測定した、トリアシルグリセロール濃度は栄養条件により 0.7~1.8 mM であった。市販の酵素法キットで測定したトリアシルグリセロール濃度は平均で 12%、最大で 25%程度実際の値より多く見積もられていると思われた。

#### 4) 酵素-HPLC 法による血清 3-ヒドロキシ酪酸(ケトン体)の定量

(独) 農研機構 食品総合研究所 井手 隆

##### はじめに

ケトン体とは、アセト酢酸、3-ヒドロキシ酪酸、アセトンの総称である。β 酸化で生産されたアセチル-CoA はクエン酸回路により酸化され、電子は NADH と FADH<sub>2</sub> そして、電子伝達系に受け渡され、大量の ATP が産生する。しかし、肝臓において β 酸化の亢進により過剰のアセチル-CoA が産生され、クエン酸回路での処理能力を超えるとミトコンドリア中でアセチル-CoA は 3-ヒドロキシ酪酸あるいはアセト酢酸に変換され、血流中に放出される。ケトン体は肝臓では代謝されないが、末梢組織はケトン体を取り込み、エネルギー源あるいは脂質再合成の材料として活用する。肝臓でのケトン体の合成経路を図 1 に示した。まず、2 分子のアセチル-CoA がアセトアセチル-CoA チオラーゼの反応により縮合し、アセトアセチル-CoA を生成する。次いで、3-ヒドロキ-3-メチルグルタリル-CoA (HMG-CoA)合成酵素により、アセトアセチル-CoA は HMG-CoA に転換される。HMG-CoA はついで HMG-CoA リアーゼによりケトン体の一種であるアセト酢酸に転換される。アセト酢酸は 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素により、3-ヒドロキシ酪酸に転換されるが、これは可逆的な反応であり、3-ヒドロキシ酪酸の生成量は細胞内の NADH/NAD の比率を反映する(NADH が多い場合細胞内の 3-ヒドロキシ酪酸量はアセト酢酸量より多い)。通常、3-ヒドロキシ酪酸は血清中の主要なケトン体でありアセト酢酸量よりはるかに多い。脂肪酸酸化が亢進した条件下では血清ケトン体濃度は高く、また細胞内 NADH/NAD 比も高くなるので、血清中 3-ヒドロキシ酪酸量は肝臓の脂肪酸代謝変化の良い指標となる。また、アセト酢酸は非酵素的反応によりアセトンに転換する。アセトンは抹消組織で利用されず、尿中に排泄される。

ここでは酵素-HPLC 法による血清 3-ヒドロキシ酪酸の測定法について記載する。原理は図 1 に示した 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素の酵素反応を利用したものである。血清試料に存在する 3-ヒドロキシ酪酸は反応系に添加する 3-ヒドロキシ酪酸脱水素によりアセト酢酸に転換される。この際、等モル量の NADH が生成するので、これを HPLC により分離定量する。酵素反応以外の方法の詳細は“酵素-HPLC 法による血清グリセロールの定量”で記載されたものと同じであるが、再度記載する。このように、記載された方法は酵素反応により NADH を生成する数多くの物質の定量に一般的に応用できると期待される。

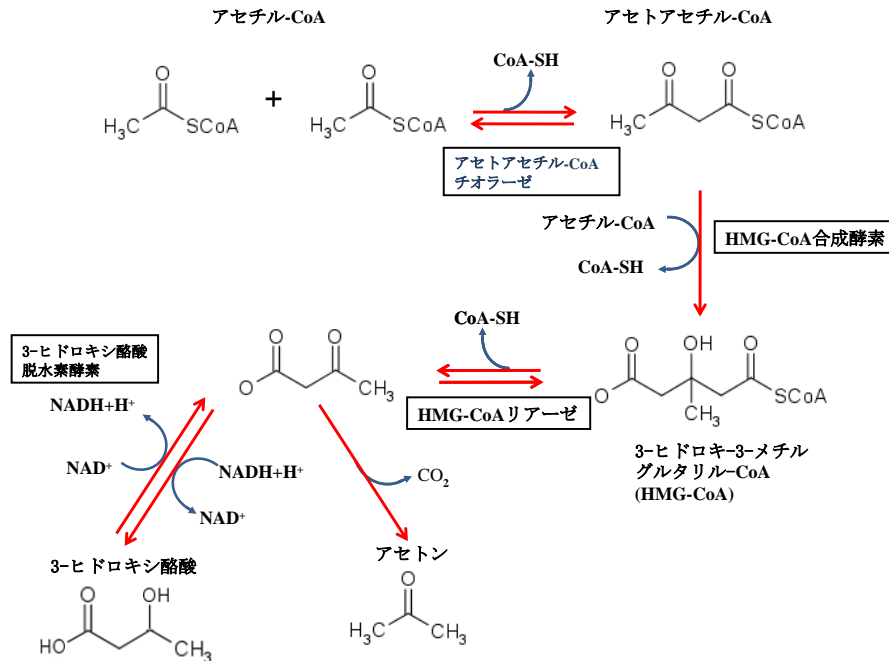


図 1 肝臓におけるケトン体の合成

## 準備するもの

### 1. 実験装置・器具

- ・冷却遠心機
- ・その他：エッペンドルフチューブ (1.5 ml 容量), ピペットマン, 小容量ガラス試験管 (3~4 ml 容量)

### 2. 試薬

- ・30%過塩素酸 (w/v)：市販の 70%過塩素酸 (w/w) を水で希釈して調製する。市販 70%過塩素酸は重量%であるので注意。42.9 g の 70%過塩素酸 (w/w) を秤量し, 100 ml に定容する(発熱するので冷却しつつ希釈する)。常温保存。
- ・3 M 炭酸カリウム (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 水溶液：常温保存。
- ・60 mM NAD 水溶液：NAD (オリエンタル酵母工業 308-50441) を 39.8 mg/ml の濃度になるように水に溶かす。冷凍保存。
- ・分析緩衝液：0.1M のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを含む 1 M ヒトラジン-HCl 緩衝液 (pH 8.5)。冷蔵保存。
- ・3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素：*Rhodobacter sphaeroides* (*Rhodopseudomonas sphaeroides*) 由来 (ロシュ・ダイアグノスティックス 127 833, grade II, 5 mg/ml)。
- ・NADH 標準液 (100 nmol/ml)：NADH (オリエンタル酵母工業 (株) 305-50451, 二ナトリウム塩) を 3.547 mg/ml の濃度になるように水に溶解する (5 μmol/ml)。この溶液をさらに 50 倍希釈する。用時調製。使用まで氷冷保存。本分析で

は、標準として、3-ヒドロキシ酪酸ではなく NADH を用いた。3-ヒドロキシ酪酸は Sigma(166898) から入手可能である。ただし、合成品であるため DL 型の混合物である。酵素反応では生体に含まれる D 型のみが基質となるので、この製品を用いる場合は 2 倍濃度で標準液を作成する。

- ・混合試薬：0.9 ml 分析緩衝液，0.1 ml NAD 溶液および 0.02 ml の 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素を混合。用時調製。使用まで氷冷保存。

## プロトコール

### 血清除タンパク試料の調製

測定試料は下記の操作により過塩素酸で血清を除タンパクした抽出液を用いる。

1. 血清 1 ml を 1.5 ml 容量のエッペンドルフチューブに入れ 0.25 ml の 30% 過塩素酸を添加し、ボルテックスする。
2. 氷上で 10 分間放置後、4°C，14,000 rpm で 20 分間遠心する。
3. 上清を少量(3~4 ml) ガラス試験管に移し、氷冷下 0.125 ml の 3 M 炭酸カリウム溶液を添加する。
4. 激しく発泡する。泡が収まった時点で、pH を pH 試験紙でチェックし、中性であることを確認する。
5. pH が中性でなかった場合には過塩素酸溶液あるいは炭酸カリウム溶液の添加により調整する。
6. 氷上に 10 分間放置後、2000~3000 rpm で 10 分間遠心する。上清は冷凍保存し、測定試料とする。

### 測定

1. 1.5 ml 容量のエッペンドルフチューブに、3-ヒドロキシ酪酸を 1~5 nmol 含む測定試料あるいは標準液を入れる。容量は 0.05 ml 以下とする。血清抽出液の場合は 0.02 ml が適当である。
2. 容量を水の添加により 0.05 ml に合わせる。
3. 0.025 ml の混合試薬を添加・混合後、小容量(0.1 ml)の HPLC オートサンプラー用ガラス容器に移す。
4. 室温に 1 時間放置後、HPLC のオートサンプラーに試料をセットし、分析する。冷却装置がついている場合はオートサンプラーの温度は 4°C に設定する。
5. 生成した、NADH は蛍光検出器(励起波長 350nm，測定波長 458 nm)あるいは UV 検出器(340 nm)で検出・定量する。

6. HPLC の条件は以下の通りである。

- 1) カラム：逆相 ODS カラム 4.6 x 250 mm(例えば、例えば、資生堂 Capcell Pak AG120)
- 2) 流速：1 ml/分
- 3) カラム恒温槽の温度：40°C
- 4) 移動相：160 mM リン酸二水素アンモニウム(pH 6.0)，トリブチルアミン，メタノール(80/0.13/20, v/v/v)。160 mM リン酸二水素アンモニウムの pH はメタノール添加前にアンモニウム水で 6.0 に合わせておく。
7. 上記の条件での NADH の保持時間は 5~6 分である。NADH 以外に溶出されるピークはほとんどなく、全体で 8~10 分間の分析時間で充分である。
8. 除タンパクに使用した過塩素酸(0.25 ml)および中和に用いた炭酸カリウム(0.125 ml)を補正し、血清中濃度を計算する。

下に分析試料である血清抽出液を 0.005~0.05ml 用いた場合の分析例を示した。検出には蛍光検出器を用いた。0.05 ml の分析で約 3 nmol の NADH が生成した。

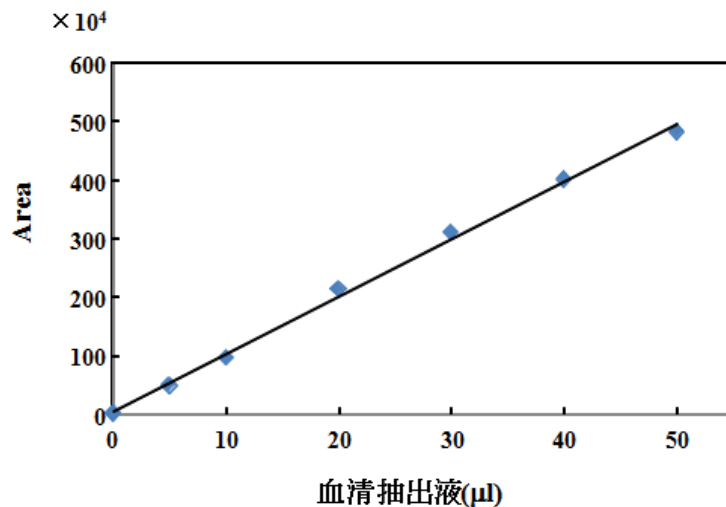


図 2 血清抽出液を用いた 3-ヒドロキシ酪酸の分析

#### プロトコールのポイント、注意点等

分析時の注意点については、“酵素-HPLC 法による血清グリセロールの定量”の項を参照されたい。本法で分析した、精製飼料を与えたラット血清の 3-ヒドロキシ酪酸値は通常の条件では 0.1~0.15 mM 程度であり、β-酸化誘導剤の投与により、0.17~0.18 mM に増加した。アセト酢酸濃度は低く、3-ヒドロキシ酪酸値の約 1/10 であった(アセト酢酸濃度は分光法により測定した)。

## 5) HPLC による血清, 肝臓のマロンジアルデヒドの定量

(独) 農研機構 食品総合研究所 井手 隆

### はじめに

マロンジアルデヒドは活性酸素によって引き起こされる脂質過酸化の最小産物であり, 酸化ストレスのマーカーとして使用されている. マロンジアルデヒドは 2-チオバルビツール酸(TBA)と反応し, 蛍光を持つ赤色の物質を生成するので, これを比色あるいは蛍光分析により定量することが一般的に行われている. ここでは, より特異性の高い方法として, HPLC を用いた, マロンジアルデヒドの定量法について紹介する.

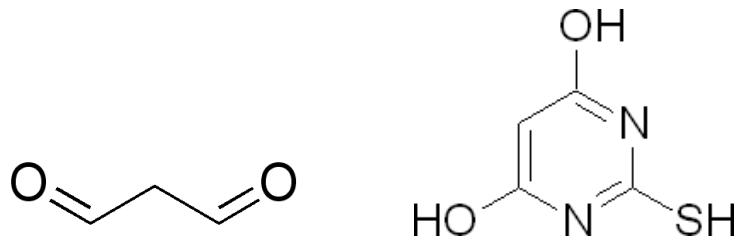


図 1 マロンジアルデヒド(左)と 2-チオバルビツール酸(右)の構造

### 準備するもの

#### 1. 実験装置・器具

- ・冷却遠心機
- ・ポリトロンタイプホモジナイザー
- ・アルミブロック恒温槽
- ・その他: エッペンドルフチューブ (1.5 ml 容量), ピペットマン, 小容量ガラス試験管 (3~4 ml 容量)

#### 2. 試薬

血清の分析と肝臓の分析に使うものについて, 分けて記載する.

##### 1) 血清分析用

- ・TBA 溶解液: 0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH3.5). 凍結保存.
- ・TBA 試薬: 0.4% (w/v) 濃度になるように TBA を TBA 溶解液に溶かす. 溶液は遮光, 冷蔵保存で 2 ヶ月程度安定である.
- ・アルカリ性メタノール溶液: メタノールと 0.8N 水酸化ナトリウムを 440:60 (v/v) の比率で混ぜ合わせる. 用時調製.

- ・ 標準液：27.5 mg の 1,1,3,3-テトラエトキシプロパン (1,1,3,3-tetraethoxypropane, TEP) をメタノールに溶解し、50 ml に定容する (25  $\mu\text{mol/ml}$ )。これを、ストック溶液とする (冷凍保存)。使用時にこの 0.1ml をとり、水で 25ml に定容し、標準液として使用する (10 nmol/ml)。
- ・ 酪酸ヒドロキシトルエン (butylated hydroxytoluene, BHT) エタノール溶液：15.4 mg の BHT を 25 ml のエタノールに溶解する (2.8 mmol/L)。

## 2) 肝臓分析用

- ・ 1.15 % (w/v) 塩化カリウム (KCl) 水溶液
- ・ TBA 溶解液：10% (v/v) 酢酸溶液。pH を水酸化ナトリウムにより 3.5 に調整する。冷凍保存。
- ・ TBA 試薬：0.4% (w/v) 濃度になるように TBA を TBA 溶解液に溶かす。溶液は遮光、冷蔵保存で 2 ヶ月程度安定である。
- ・ 8.1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) 水溶液
- ・ ブタノール:ピリジン混液 (15:1, v/v)
- ・ 標準液：27.5 mg の 1,1,3,3-テトラエトキシプロパン (1,1,3,3-tetraethoxypropane, TEP) をメタノールに溶解し、50 ml に定容する (25  $\mu\text{mol/ml}$ )。これを、ストック溶液とする (冷凍保存)。使用時にこの 0.1 ml をとり、水で 25 ml に定容し、標準液として使用する (10 nmol/ml)。
- ・ アルカリ性メタノール溶液：メタノールと 0.8N 水酸化ナトリウムを 440:60 (v/v) の比率で混ぜ合わせる。用時調製。
- ・ 標準液：27.5 mg の 1,1,3,3-テトラエトキシプロパン (1,1,3,3-tetraethoxypropane, TEP) をメタノールに溶解し、50 ml に定容する (25  $\mu\text{mol/ml}$ )。これを、ストック溶液とする (冷凍保存)。使用時にこの 0.1 ml をとり、水で 25 ml に定容し、標準液として使用する (10 nmol/ml)。
- ・ 酪酸ヒドロキシトルエン (butylated hydroxytoluene, BHT) エタノール溶液：15.4 mg の BHT を 25 ml のエタノールに溶解する (2.8 mmol/L)。

## プロトコール

同様に、血清と肝臓の分析にわけて記載する。

### 血清

1. 血清 0.02~0.05 ml (あるいは標準液) を 1.5 ml 容量のエッペンドルフチューブに入れ、水を添加し、総容量を 0.23 ml とする。
2. 0.25 ml の TBA 試薬と 0.02 ml の BHT 溶液を添加し、ボルテックスする。
3. アルミブロック恒温槽にて 95°C で 1 時間加熱する。



4. 氷上で 10 分間冷却し, 0.5 ml のアルカリ性メタノール溶液を加え, さらに 10 分間氷上にて放置.
5. 14,000 rpm で 20 分間遠心.
6. 上清を HPLC オートサンプラー用バイアルに移し, HPLC で分析する. 注入量は 0.02 ml とする.

## 肝臓

1. 動物を解剖後, 肝臓は小分けして,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存しておく. 凍結肝臓約 0.5g (採取量の正確な値を記録)を 2.5 ml の 1.15%塩化カリウム溶液でポリトロンタイプホモジナイザーを用いホモジナイズする.
2. 0.02~0.05 ml の肝臓ホモジネート(あるいは標準液)1.5 ml 容量のエッペンドルフチューブに入れ, 水を加えて総容量を 0.14 ml とする.
3. 0.04 ml の SDS 溶液を加え, ボルテックスする.
4. さらに, 0.6 ml の TBA 試薬と 0.02 ml の BHT 溶液を添加し, ボルテックスする.
5. アルミブロック恒温槽にて  $95^{\circ}\text{C}$  で 1 時間加熱する.
6. 氷上で 10 分間冷却する.
7. 小容量ガラス試験管(3~4 ml 容量)に内容物を移す. エッペンドルフチューブに 0.2 ml の水を加え, 洗浄し, ガラス試験管内溶液に合わせる.
8. 1 ml のブタノール:ピリジン混液を加え, 激しくボルテックスし, TBA-マロンアルデヒド付加物を抽出する.
9. 2000~3000 rpm で 10 分間遠心し, 上清を HPLC オートサンプラー用バイアルに移し, HPLC で分析する. 注入量は 0.02 ml とする.

## HPLC の条件

血清, 肝臓サンプルとも共通である.

1. カラム: 逆相 ODS カラム 4.6 x 250 mm (例えば, 例えば, 資生堂 Capcell Pak AG120)
2. 流速: 1 ml/分
3. カラム恒温槽の温度:  $40^{\circ}\text{C}$
4. 移動相: 30% (v/v)メタノール
5. 検出: 蛍光検出器(励起波長 515nm, 測定波長 553 nm)
6. 上記の条件での TBA-マロンアルデヒド付加物の保持時間は 6~7 分である. TBA-マロンアルデヒド付加物以外に溶出されるピークはほとんどなく, 全体で 12~15 分間の分析時間で充分である.

下記に、標準曲線の一例を示す。0.2~1 nmol まで、良好な直線性を示した。

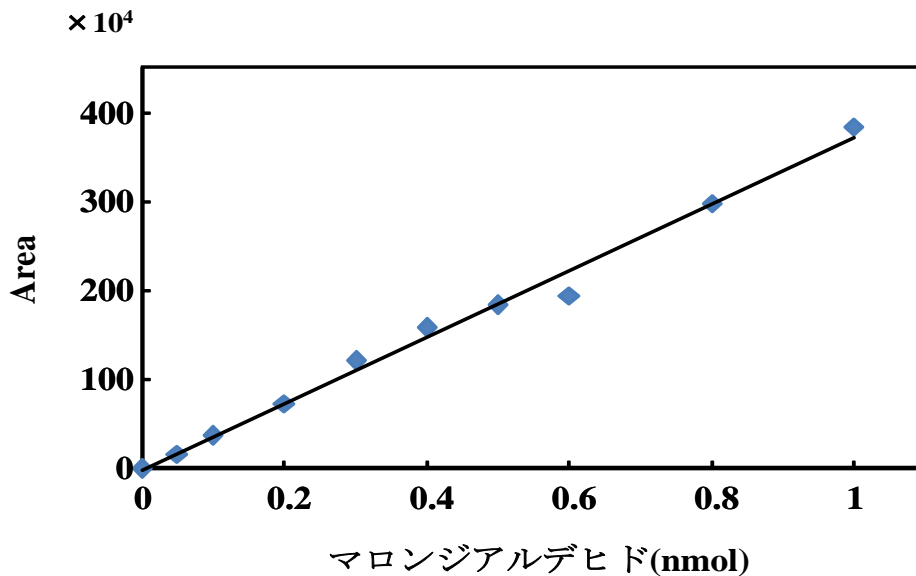


図2 マロンジアルデヒドの標準曲線

#### プロトコールのポイント、注意点等

調製した試料の安定性についてはきっちりしたデータを取ってはいないが、 $-20\sim 30^{\circ}\text{C}$  で保存しておけば、約 1 週間は測定値、ピーク形状に変化はないようである。HPLC によるマロンジアルデヒドの定量については数多くの報告がある。血清での分析については簡便な方法として Fukunaga 等の報告(1998)を主に参照した。原報ではアルカリによる試料の中和を行っていないが、中和を行わないと急激にカラムを損傷し、使用不可となることがわかった。肝臓の分析では Nielsen 等の報告(1997)を主に参照した。

#### 参考文献

- 1) Nielsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R. and Grandjean, P., Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.*, **43**, 1209–1214(1997).
- 2) Khoschsorur, G.A., Winklhofer-Roob, B.M., Rabl, H., Auer, Th., Peng, Z. and Schaur R.J., Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia*, **52**, 181-184(2000).
- 3) Fukunaga, K., Yoshida M. and Nakazono, N., A Simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, **12**, 300–303(1998).

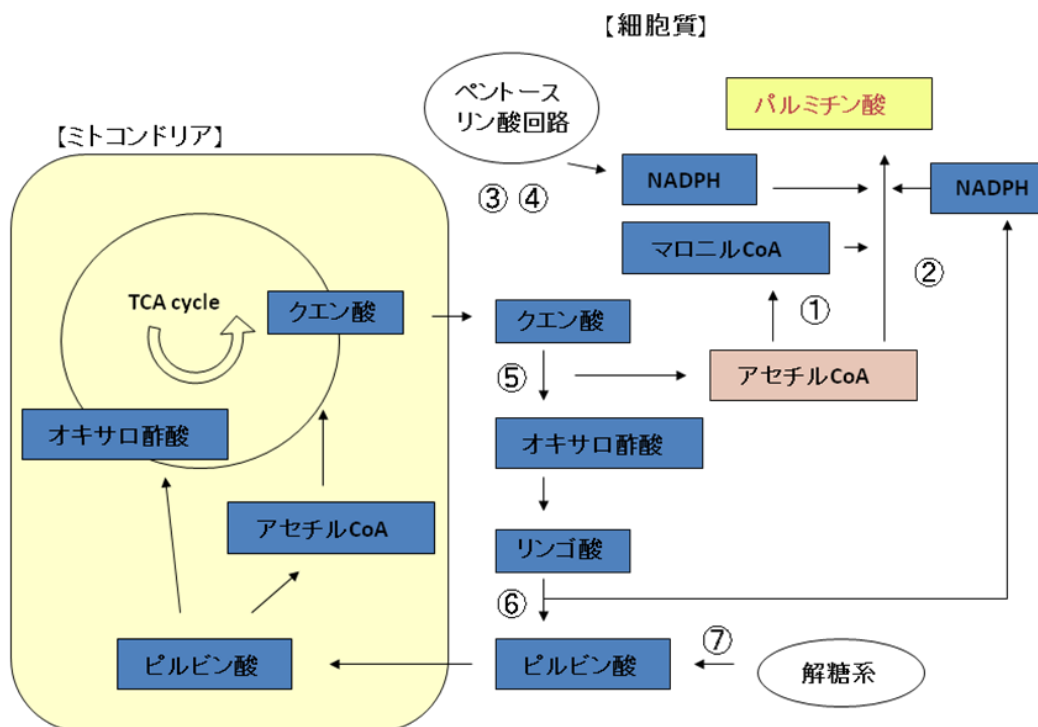
### 3. 酵素活性の測定技術

#### 1) 脂肪酸合成系酵素活性測定のための酵素源の調製法

(独) 農研機構 食品総合研究所 井手 隆

#### はじめに

脂肪酸合成系は細胞質に存在する代謝経路であり、アセチル-CoA を前駆体として脂肪酸を合成する(パルミチン酸が最終産物となる)。代謝系の全体像について図 1 に示す。



①アセチル-CoAカルボキシラーゼ②脂肪酸合成酵素③グルコース 6-リン酸脱水素酵素④6-フォスホグルコン酸脱水素酵素⑤ATP クエン酸リアーゼ⑥リンゴ酸酵素⑦ピルビン酸キナーゼ

図 1 脂肪酸合成の制御に関与する酵素群

アセチル-CoAカルボキシラーゼはアセチル-CoAをカルボキシル化し、マロニル-CoAを生成する(①の反応)。脂肪酸合成酵素は脂肪酸の炭素鎖の延長反応を行う酵素であり、マロニル-CoA(およびアセチル-CoA)が炭素鎖の供与体となる(②の反応)。酵素分子中にアシルキャリアータンパク質(ACP)を有し、一連の反応(縮合・還元・脱水・還元)はACPに結合した形で行われる。炭素鎖16のパルミチン酸が最終産物となる。脂肪酸合成はこのアセチル-CoAカルボキシラーゼと脂肪酸合

成酵素で行われるが、その他の数多くの酵素が脂肪酸合成の制御に関与している。脂肪酸の炭素鎖の延長反応には大量のNADPHが必要となる。細胞質において、NADPHを生成する酵素としてペントースリン酸経路のグルコース 6-リン酸脱水素酵素(③)および6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(④)、またリンゴ酸を酸化的脱炭酸反応によりピルビン酸に変換するリンゴ酸酵素(⑥)が脂肪酸合成に重要な役割を果たしている。脂肪酸合成に使われるアセチル-CoAは細胞質においてクエン酸からATPクエン酸リアーゼの働きによって、生成する。アセチル-CoAはミトコンドリアでも生成するが、ミトコンドリア膜はCoA化合物を透過出来ないので、ミトコンドリアで作られたアセチル-CoAは脂肪酸合成に使われない。また、脂肪酸合成の前駆体としてはグルコースが最も重要であるが、解糖系酵素であるピルビン酸キナーゼ(ホスホエノールピルビン酸をピルビン酸に転換する)の活性は脂肪酸合成と連動して、制御されることが知られている。アセチル-CoAカルボキシラーゼの活性測定には $^{14}\text{C}$ で標識した、重炭酸塩を用いた炭酸固定反応を用いることが多い。放射性同位元素を用いることから、一般の研究室では測定が難しい。しかし、他の酵素については分光法により簡便に活性を測定することが可能である。本項では肝臓からの酵素源の調製法を記載し、次項では、分光法による脂肪酸合成酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素、ATPクエン酸リアーゼ、リンゴ酸酵素およびピルビン酸キナーゼの活性測定法について記載する。酵素源としてはラット(Sprague-Dawley系)およびマウス(ICR系)肝臓を用いた。

## 準備するもの

### 1. 実験装置・器具

- ・ホモジナイザー(ポッター型)：ペストルはテフロン製。大きめの容量のものを使用した方が、操作が早い。ホモジナイザー用攪拌機(例えば、アズワン5-4039-01)を用い、モーター駆動にて操作する。
- ・冷却遠心機あるいは超遠心機
- ・その他：解剖用ハサミ、遠心機用チューブ等

### 2. 試薬

- ・ホモジナイズ用緩衝液：1mM EDTA, 3mM トリス塩酸緩衝液を含む0.25M スクロース液。希塩酸によりpH7.2に調整する。冷蔵保存。

## プロトコール

酵素活性は細胞質画分に定量的に回収される。肝臓をホモジナイズ後、超遠心処理により細胞質画分を調製する。

1. ラットを屠殺後、約 1.5g の肝臓を秤量し(正確な値を記録)、氷冷下 10ml のホモジナイズ用緩衝液でホモジナイズする。マウスの場合、得られる肝臓の重量が少ないので、約 0.5g の肝臓を 5ml のホモジナイズ用緩衝液でホモジナイズする。
2. ホモジネートを遠心チューブに移し、4°C、105,000 x g で 60 分間遠心する(時間短縮のため、210,000 x g で 30 分間遠心でも良い)。
3. 上清はチューブに小分けし、測定時まで-30°C で保存する。
4. 上清のタンパク質濃度を適当な方法で測定する。

#### プロトコールのポイント、注意点等

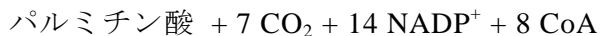
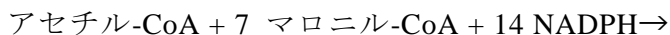
1. 超遠心処理により、組織に含まれる油脂が一番上に分離・浮上する。この油と沈殿の間の中間層を取り酵素源とする。
2. 超遠心上清は濁りが無く、分光光度計での酵素活性測定の際ノイズが少ない。しかし、超遠心が使用できない場合、10,000 x g 以上の遠心上清で通常の場合測定に大きな支障はない。
3. 凍結上清を繰り返し凍結-融解すると酵素が失活するおそれがある。原則的には測定当日に、凍結上清を溶かし酵素活性測定に使用し、使用後破棄する。繰り返し凍結-融解した酵素源は使わない方が安全である。酵素の凍結-融解に対する安定性については事前にチェックしておくことが望ましい。本稿で紹介する脂肪酸合成系酵素の中で、脂肪酸合成酵素は不安定であり、繰り返し凍結-融解により大きな活性低下が起きる。他の酵素は比較的安定である。
4. 以上の操作で、上清画分のタンパク質濃度はラットで 10mg/ml、マウスの場合 6mg/ml 程度になる。

## 2) 脂肪酸合成系酵素の活性測定法

(独) 農研機構 食品総合研究所 井手 隆

### (1) 脂肪酸合成酵素

前項目に記載したように脂肪酸の炭素鎖の延長反応を行う酵素であり、最終産物は炭素鎖 16 のパルミチン酸である。酵素反応を要約すると以下の式で表すことができる。



このように、酵素反応の過程で大量の NADPH が消費されるので、アセチル-CoA 存在下においてのマロニル-CoA 依存性の NADPH の減少速度を 340nm で測定することにより、活性値を求めることができる。

### 準備するもの

#### 1. 実験装置・器具 (全ての酵素活性測定に共通)

- ・分光光度計：恒温セルホルダーを装着したもの。また、カイネティクスソフトウェアを備えたものが望ましい。
- ・その他：分光光度計用セル(1~1.5ml 容量)、ピペットマン等

#### 2. 試薬

- ・0.4mM EDTA を含む 0.2M リン酸カリ緩衝液(pH7.0)：凍結保存しておけば長期にわたって使用できる。
- ・10mM アセチル-CoA：Sigma-Aldrich A2056(sodium salt)。2mM 塩酸で溶解し、微酸性溶液として凍結保存。
- ・10mM マロニル-CoA：Sigma-Aldrich M4263(lithium salt)。2mM 塩酸で溶解し、微酸性溶液として凍結保存。
- ・10mM NADPH：オリエンタル酵母工業 305-50473。測定当日必要な分だけばかり取り、純水に溶かし調製する。長期保存不可。

### プロトコール

#### 1. 反応液の最終組成(1ml)は以下のようなになる

- ・0.2mM EDTA
- ・0.1M リン酸カリ緩衝液(pH7.0)
- ・0.15mM アセチル-CoA

- 0.2mM マロニル-CoA
  - 0.3mM NADPH
  - 0.02~0.1ml 酵素源
2. 分光光度計用セルに 0.5ml の測定用緩衝液(0.2M リン酸カリ緩衝液, 0.4mM EDTA (pH7.0)), 0.015ml の 10mM アセチル-CoA, 0.03ml の NADPH, 0.02~0.1ml 酵素源(活性値に応じて増減する)を添加し, 水を加えて最終容量を 0.98ml とする.
  3. ミクروسーパーテルを使ってよく攪拌後, 30°C に保温した恒温セルホルダーにセルをセットし, 340nm の波長でブランク反応を 120~150 秒程度チェースする(OD は減少する). OD のフルスケールは 0.2 程度にセットする.
  4. ブランク反応は内因性に含まれる基質のため, 最初は速いが徐々に減少し, 一定の値を示すようになる.
  5. この時点でマロニル-CoA (0.02ml)を加え反応を開始する. 反応は 150 秒程度チェースする. 反応の直線部分を計算に用いる(ブランク反応を差し引いて最終値を算出). NADPH の減少速度で活性値を表示する. NADPH の分子吸光係数は  $6,220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  である.

下図に脂肪酸合成酵素活性をカイネティクスソフトウェアUV Probe (島津)で解析した例を示す. 赤線はブランク反応, 黒線はマロニル-CoA 添加後の反応曲線である. 画面左に, OD 変化率が mAbs/分で表示されている.

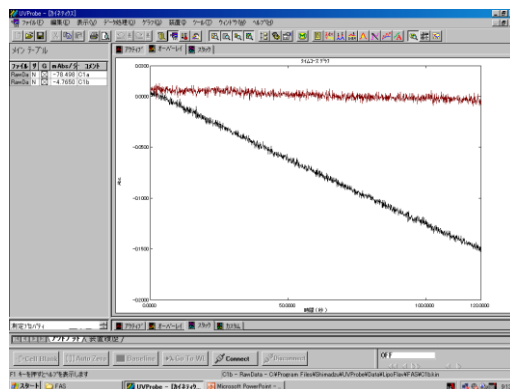


図 2 脂肪酸合成酵素活性の測定例

#### プロトコールのポイント, 注意点等

1. 前述のように, 不安定な酵素である. 凍結-融解により確実に失活するので, 凍結-融解を繰り返した酵素源は測定に使用しない.
2. ブランク反応は酵素源を添加したすぐは速く, やがて一定の値をとるようになる. 緩衝液, アセチル-CoA, NADPH, 水を混合した溶液を分光光度計用セル

内にいくつか作っておき、前のサンプルの測定反応の間(マロニル-CoA 添加後)に酵素源を前もって添加しておく、安定したブランク値を得ることができる。

3. ラットとマウスの活性値はほぼ等しい値を示す。

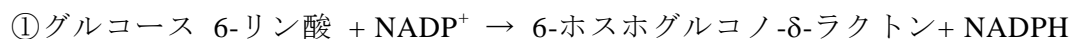
## 参考文献

- 1) Kelley, D.S., Nelson, G.J. and Hunt, J.E., Effect of prior nutritional status on the activity of lipogenic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.*, **235**, 87-90(1986).

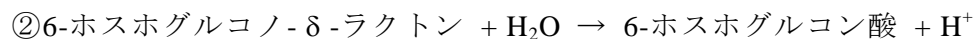
### (2) グルコース 6-リン酸脱水素酵素

ペントースリン酸経路の酵素であり、脂肪酸合成に必要な細胞質での NADPH の生成に役割を果たす。ペントースリン酸経路でのグルコース 6-リン酸の代謝は以下のように行われる。

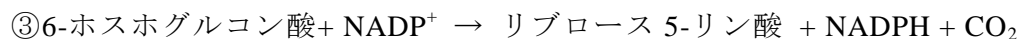
グルコース 6-リン酸脱水素酵素



非酵素的



6-ホスホグルコン酸脱水素酵素



このように、グルコース 6-リン酸脱水素酵素反応によりグルコース 6-リン酸は 6-ホスホグルコノ- $\delta$ -ラクトンに転換し、NADPH が生成する(①)。生成した、6-ホスホグルコノ- $\delta$ -ラクトンは非酵素的に 6-ホスホグルコン酸に転換し(②)、ついで 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素によりリブロース 5-リン酸に転換する(③)。この過程でさらに 1 分子の NADPH が生成する。本酵素の測定に当たっては反応系に過剰の 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素を添加し、グルコース 6-リン酸脱水素酵素反応により生成した 6-ホスホグルコノ- $\delta$ -ラクトンを強制的にリブロース 5-リン酸にまで転換する。反応は NADPH の生成による 340nm での OD 値の上昇により計算できるが、得られた値を 2 で除し、グルコース 6-リン酸脱水素酵素活性値とする。



## 準備するもの

### 1. 試薬

- 60mM MgCl<sub>2</sub> を含む 0.32 M トリス緩衝液 (pH 7.6) : 凍結保存しておけば長期にわたって使用できる.
- 66mM グルコース 6-リン酸 : オリエンタル酵母工業 307-50531 (disodium salt hydrate). 純水にとかし, 凍結保存.
- 24mM NADP : オリエンタル酵母工業 308-50463. 純水にとかし, 凍結保存.
- 20unit/ml 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素溶液 : オリエンタル酵母工業 302-50704 (硫安懸濁液, *Leuconostoc Mesenteroides* 由来). 測定当日, 必要量のみ調製. 純水にて希釈. 長期保存不可.

## プロトコール

### 1. 反応液の最終組成 (1ml) は以下のようになる

- 30mM MgCl<sub>2</sub>
  - 0.16M トリス緩衝液 (pH7.6)
  - 3.3mM グルコース 6-リン酸
  - 1.2mM NADP
  - 0.5unit 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素
  - 0.02~0.1ml 酵素源
2. 分光光度計用セルに 0.5ml の測定用緩衝液 (0.32M トリス緩衝液, 60mM MgCl<sub>2</sub> (pH7.6)), 0.05ml の 24mM NADP, 0.02ml の 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素溶液, 0.02~0.1ml 酵素源 (活性値に応じて増減する) を添加し, 水を加えて最終容量を 0.95ml とする.
3. 続いて, 0.05ml の 66mM グルコース 6-リン酸を添加する. ミクロスパーテルを使ってよく攪拌後, 30°C に保温した恒温セルホルダーにセルをセットし, 340nm の波長で OD の上昇を 180 秒程度チェースする. OD のフルスケールは 1.5~2.0 程度にセットする (ラットの場合).
4. 反応はラグがあり, 最初の部分は OD の上昇速度が遅く, 後半になって上昇速度が増加する. 後半の直線部分を活性値の計算に用いる.
5. NADPH の生成速度で活性値を表示する. NADPH 分子吸光係数は  $6, 220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  である. 前述のように得られる値は反応系に添加した 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素の値を含むので, 2 で割ってグルコース 6-リン酸脱水素酵素の活性値とする.

下図に UV Probe での解析例を示した. 酵素活性の違う 2 つのサンプルにつ

いて表示している。記載したように、反応にラグがあることがわかる。

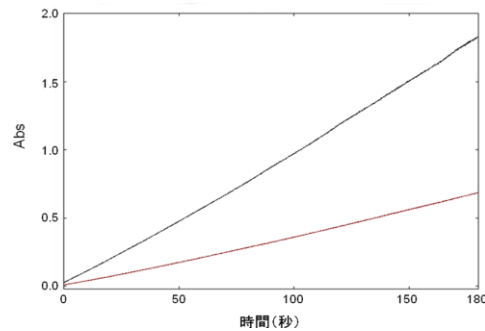


図3 グルコース 6-リン酸脱水素酵素活性の測定例

#### プロトコールのポイント、注意点等

1. 比較的安定な酵素であり、凍結-再融解での活性値低下は少ない。
2. 動物の系統でも異なると思われるが、SD ラットと比較して ICR マウスの活性値はかなり低い(約 1/10)。マウス酵素源では測定に用いる量を増やし(0.05ml 以上)とし、OD のフルスケールは 0.2 程度にセットする。

#### 参考文献

- 1) Kelley, D.S., Kletzien, R.F., Ethanol modulation of the hormonal and nutritional regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.*, **217**, 543-549 (1984).

#### (3) 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素

本酵素の触媒する反応については、グルコース 6-リン酸脱水素酵素の項ですでに記述した。活性値は 6-ホスホグルコン酸添加に依存した、NADPH の生成速度で見積もることができる。

#### 準備するもの

##### 1. 試薬

- 20mM MgCl<sub>2</sub> と 1mM EDTA を含む 0.2M トリス塩酸緩衝液(pH8.0)：凍結保存しておけば長期にわたって使用できる。
- 12mM 6-ホスホグルコン酸：Sigma-Aldrich P7877(trisodium salt)。純水にとかし、調製。凍結保存。
- 24mM NADP：オリエンタル酵母工業 308-50463。純水にとかし、調製。凍結保存。

## プロトコール

1. 反応液の最終組成 (1ml) は以下のようになる
  - ・ 10mM MgCl<sub>2</sub>
  - ・ 0.5mM EDTA
  - ・ 0.1M トリス緩衝液 (pH8.0)
  - ・ 0.6mM 6-ホスホグルコン酸
  - ・ 1.2mM NADP
  - ・ 0.02~0.1ml 酵素源
2. 分光光度計用セルに 0.5ml の測定用緩衝液 (0.2M トリス塩酸緩衝液, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA (pH 8.0)), 0.05ml の 24mM NADP, 0.02~0.1ml 酵素源 (活性値に応じて増減する) を添加し, 水を加えて最終容量を 0.95ml とする.
3. 続いて, 0.05ml の 12mM 6-ホスホグルコン酸を添加する. ミクロスパーテルを使ってよく攪拌後, 30°C に保温した恒温セルホルダーにセルをセットし, 340nm の波長で OD の上昇を 150~180 秒程度チェースする. OD のフルスケールは 0.5 程度にセットする (ラットの場合).
4. NADPH の生成速度で活性値を表示する. NADPH 分子吸光係数は 6,220 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> である.

下図に UV Probe での解析例を示した. 酵素活性の違う 2 つのサンプルについて表示している. 活性の高いサンプル (黒線) では後半部分の反応速度が低下している. 前半の直線部分を用いて活性を計算する.

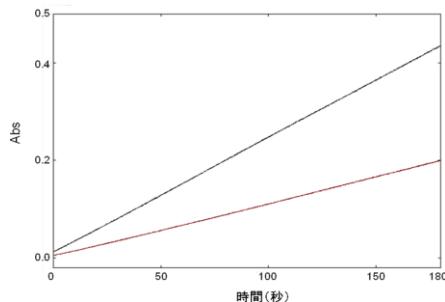


図 4 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素活性の測定例

## プロトコールのポイント, 注意点等

1. 比較的安定な酵素であり, 凍結-再融解での活性値低下は少ない.
2. グルコース 6-リン酸脱水素酵素同様, マウスでの値はラットと比較し約 1/10 と低い. マウス酵素源では測定に用いる酵素源の量を 0.05ml 以上と多くし, OD のフルスケールは 0.1~0.2 程度にセットする.

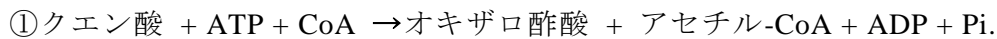
## 参考文献

- 1) Beutler, E. and Kuhl, W., Limiting role of 6-phosphogluconolactonase in erythrocyte hexose monophosphate pathway metabolism. *J.Lab.Clin.Med.*, **106**, 573-577 (1985).

### (4) ATP クエン酸リアーゼ

細胞質において、クエン酸からアセチル-CoA を合成する酵素。脂肪酸合成やコレステロール合成に必要なアセチル-CoA を供給する役割を持っている。ATP クエン酸リアーゼの酵素反応および酵素活性の測定原理を下記の式で示した。

#### ATP クエン酸リアーゼ



#### リンゴ酸脱水素酵素



ATP クエン酸リアーゼは ATP と CoA の存在下でクエン酸を開裂し、オキザロ酢酸、アセチル-CoA, ADP, オルトリン酸を生成する。酵素活性の測定に当たっては反応系にリンゴ酸脱水素酵素を添加する。リンゴ酸脱水素酵素は NADH 存在下で、オキザロ酢酸をリンゴ酸に転換する。NADH は酸化され、NAD となるので、NADH の酸化速度を 340nm の OD 値減少をチェースすることにより求め、酵素活性値とする。

## 準備するもの

### 1. 試薬

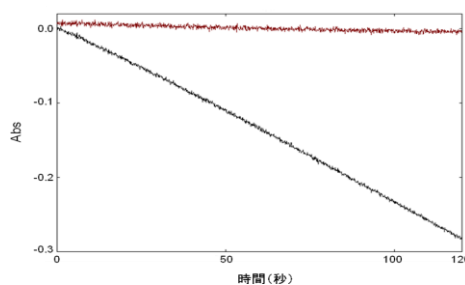
- 20mM MgCl<sub>2</sub> を含む 0.4M トリス塩酸緩衝液 (pH8.4) : 凍結保存しておけば長期にわたって使用できる。使用当日、本緩衝液 10ml に対して、2-メルカプトエタノールを 14μl 添加する (20mM 濃度となる)。
- 200mM クエン酸三カリウム : 純水にとかし、調製。凍結保存。
- 4mM CoA : 和光純薬工業 035-14061 (trisodium salt)。純水にとかし調製。凍結保存。
- 200mM ATP : オリエンタル酵母工業 309-50513 (disodium salt)。純水にとかし調製。凍結保存。
- 4mM NADH : オリエンタル酵母工業 305-50451 (disodium salt)。使用当日必要量のみ純水にとかし調製。長期保存不可。
- 20units/ml リンゴ酸脱水素酵素 : オリエンタル酵母工業 (硫安懸濁液、酵母由

来)。測定当日、必要量のみ調製。純水にて希釈。長期保存不可。

## プロトコール

1. 反応液の最終組成 (1ml) は以下のようになる
  - ・ 10mM MgCl<sub>2</sub>
  - ・ 0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH8.4)
  - ・ 10mM 2-メルカプトエタノール
  - ・ 20mM クエン酸
  - ・ 0.2mM CoA
  - ・ 10mM ATP
  - ・ 0.2mM NADH
  - ・ 0.2unit リンゴ酸脱水素酵素
  - ・ 0.02~0.1ml 酵素源
2. 分光光度計用セルに 0.5ml の測定用緩衝液 (0.4M トリス塩酸緩衝液, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM 2-メルカプトエタノール (pH8.4)), 0.1ml の 200mM クエン酸, 0.05ml の 200mM ATP, 0.05ml の 4mM NADH, 0.01ml のリンゴ酸脱水素酵素, 0.02~0.1ml 酵素源 (活性値に応じて増減する) を添加し, 水を加えて最終容量を 0.95ml とする。
3. ミクروسパーテルを使ってよく攪拌後, 30°C に保温した恒温セルホルダーにセルをセットし, 340nm の波長でブランク反応を 120~150 秒程度チェースする (OD は減少する)。OD のフルスケールは 0.3~0.5 程度にセットする。
4. ブランク反応は内因性に含まれる基質のため, 最初は速いが徐々に減少し一定の値を示すようになる。
5. この時点で 4mM CoA (0.05ml) を加え反応を開始する。反応は 120~150 秒程度チェースする。反応の直線部分を計算に用いる (ブランク反応を差し引いて最終値を算出)。NADH の減少速度で活性値を表示する。NADH の分子吸光係数は  $6,220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  である。反応にはラグがあり, 前半部分で反応速度が遅い。後半部分で計算を行う。

以下に UV Probe での解析例を示す。赤線はブランク反応, 黒線は CoA 添加後の反応曲線である。



## 図 5 ATP クエン酸リアーゼ活性の測定例

### プロトコールのポイント、注意点等

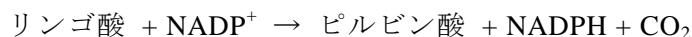
1. 比較的安定な酵素であり、凍結-再融解での活性値低下は少ない。
2. マウスでの値はラットと比較し約 1/5~1/6 と低い。マウス酵素源では測定に用いる酵素源の量を 0.05ml 程度と多くし、OD のフルスケールは 0.1~0.2 程度にセットする。
3. 脂肪酸合成酵素の稿でも述べたが、ブランク反応は酵素源を添加したすぐは速く、やがて一定の値をとるようになる。緩衝液、クエン酸、ATP、NADH、リンゴ酸脱水素酵素および水を混合した溶液を前もっていくつか作っておき、前のサンプルの測定反応の間 (CoA 添加後) に酵素源を前もって添加しておくこと、安定したブランク値を得ることができる。

### 参考文献

- 1) Takeda, Y., Suzuki, F. and Inoue, H., ATP Citrate Lyase (Citrate-Cleavage Enzyme). *Method Enzymol.*, **13**, 153-160 (1969).

### (5) リンゴ酸酵素

6-ホスホグルコン酸脱水素酵素およびグルコース 6-リン酸脱水素酵素と同じく、細胞質での NADPH の産生に関与する酵素である。酵素反応は下の式で示すことができる。



活性値はリンゴ酸添加に依存した、NADPH の生成速度で見積もることができる。

### 準備するもの

#### 1. 試薬

- ・ 8mM MnCl<sub>2</sub> を含む 0.128M トリエタノールアミン緩衝液 (pH7.4) : 凍結保存しておけば長期にわたって使用できる。
- ・ 30mM L-リンゴ酸 : 純水にとかし、KOH にて中和。凍結保存。
- ・ 24mM NADP : オリエンタル酵母工業 308-50463。純水にとかし、調製。凍結保存。

### プロトコール

1. 反応液の最終組成 (1ml) は以下のようなになる
  - ・ 4mM MnCl<sub>2</sub>
  - ・ 64mM トリエタノールアミン緩衝液 (pH7.4)

- 1.2mM L-リンゴ酸
  - 1.2mM NADP
  - 0.02~0.1ml 酵素源
2. 分光光度計用セルに 0.5ml の測定用緩衝液(0.128M トリエタノールアミン緩衝液, 8 mM MnCl<sub>2</sub> (pH7.4)), 0.05ml の 24mM NADP, 0.01~0.1ml 酵素源(活性値に応じて増減する)を添加し, 水を加えて最終容量を 0.96ml とする.
  3. 続いて, 0.04ml の 30mM L-リンゴ酸を添加する. ミクロスパーテルを使ってよく攪拌後, 30°C に保温した恒温セルホルダーにセルをセットし, 340nm の波長で OD の上昇を 60~90 秒程度チェースする. OD のフルスケールは 0.2 程度にセットする.
  4. NADPH の生成速度で活性値を表示する. NADPH 分子吸光係数は  $6,220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  である.

下図に UV Probe での解析例を示した. 酵素活性の違う 2 つのサンプルについて表示している. 活性の高いサンプル(黒線)では後半部分の反応速度が低下している. 前半の直線部分を用いて活性を計算する.

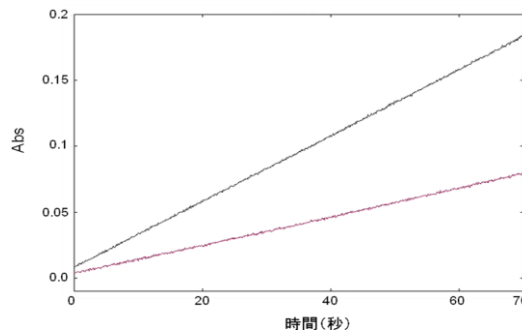


図 6 リンゴ酸酵素活性の測定例

#### プロトコールのポイント, 注意点等

1. 比較的安定な酵素であり, 凍結-再融解での活性値低下は少ない.
2. マウスの活性値はラットとほぼ同程度, あるいはマウスで若干高い.
3. 反応速度はかなり速いので, 緩衝液, NADP および水をセル中で混合したものをいくつか作っておき, 前もって 30°C に暖めておく. 酵素源およびリンゴ酸の添加により, 酵素反応を開始する.

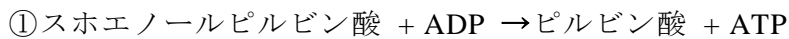
#### 参考文献

- 1) Hsu, R.Y. and Lardy, H.A., Malic enzyme. *Methods Enzymol.*, **13**, 230-235 (1969).

## (6) ピルビン酸キナーゼ

解糖系に位置する酵素で、ホスホエノールピルビン酸をピルビン酸に転換する。他の種々の脂肪酸合成に関与する酵素と協調的に制御されている。ピルビン酸キナーゼの酵素反応および酵素活性の測定原理を下記の式で示した。

ピルビン酸キナーゼ



乳酸脱水素酵素



ピルビン酸キナーゼは ADP 存在下でホスホエノールピルビン酸をピルビン酸に転換する(①)。酵素活性の測定に当たっては反応系に乳酸脱水素酵素を添加する。乳酸脱水素酵素は NADH 存在下で、ピルビン酸を乳酸に転換する(②)。NADH は酸化され、NAD となるので、NADH の酸化速度を 340nm の OD 値減少をチェースすることにより求め、酵素活性値とする。

### 準備するもの

#### 1. 試薬

- 0.4M KCl, 40mM MgCl<sub>2</sub>を含む 0.4M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) : 凍結保存しておけば長期にわたって使用できる。
- 4mM NADH : オリエンタル酵母工業 305-50451 (disodium salt)。使用当日必要量のみ純水にとかし調製。長期保存不可。
- 16mM ADP : オリエンタル酵母工業 306-50501 (disodium salt) 純水にとかし、調製。凍結保存。
- 60mM ホスホエノールピルビン酸 : 和光純薬工業 160-14763 (monopotassium salt)。使用当日、必要量のみ純水にとかし、直ちに少量の 5M NaOH を用いて中和。長期保存不可。
- 300units/ml L-乳酸脱水素酵素 : Roche Applied Sciences 127221 (50% グリセロール溶液 (v/v), 550U/mg, ブタ筋肉由来)。測定当日、必要量のみ調製。純水にて希釈。長期保存不可。

### プロトコール

1. 反応液の最終組成 (1ml) は以下のようなになる



- 20mM MgCl<sub>2</sub>
  - 0.2M KCl
  - 0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)
  - 0.8mM ADP
  - 0.2mM NADH
  - 3mM ホスホエノールピルビン酸
  - 6unit 乳酸脱水素酵素
  - 0.005~0.05ml 酵素源
2. 分光光度計用セルに 0.5ml の測定用緩衝液 (0.4M トリス塩酸緩衝液, 0.4M KCl, 40mM MgCl<sub>2</sub> (pH8.0)), 0.05ml の ADP, 0.05ml の NADH, 0.02ml の乳酸脱水素酵素, 0.01~0.05ml 酵素源 (活性値に応じて増減する) を添加し, 水を加えて最終容量を 0.95ml とする.
  3. ミクロスパーテルを使ってよく攪拌後, 30°C に保温した恒温セルホルダーにセルをセットし, 340nm の波長でブランク反応を 120~150 秒程度チェースする (OD は減少する). OD のフルスケールは 0.4~0.5 程度にセットする.
  4. ブランク反応は内因性に含まれる基質のため, 最初は速いが徐々に減少し一定の値を示すようになる.
  5. この時点で 60mM ホスホエノールピルビン酸 (0.05ml) を加え反応を開始する. 反応は 120~150 秒程度チェースする. 反応の直線部分を計算に用いる (ブランク反応を差し引いて最終値を算出). NADH の減少速度で活性値を表示する. NADH の分子吸光係数は  $6, 220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  である. 反応にはわずかにラグがある. 反応の直線部分を選び活性値を計算する.

下図に UV Probe での解析例を示す. 赤線はブランク反応, 黒線は CoA 添加後の反応曲線である.

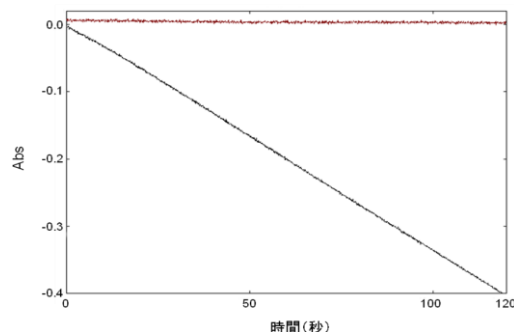


図7 ピルビン酸キナーゼ活性の測定例

プロトコールのポイント, 注意点等

1. 比較的安定な酵素であり、凍結-再融解での活性値低下は少ない。
2. マウスでの値はラットと比較し、ほぼ同等あるいはいくらか低い。ほぼ同一条件で測定することが出来る。
3. 緩衝液，クエン酸，ADP，NADH，乳酸脱水素酵素および水を混合した溶液を前もっていくつか作っておき，前のサンプルの測定反応の間（ホスホエノールピルビン酸添加後）に酵素源を前もって添加しておくこと，安定したブランク値を得ることができる。

#### 参考文献

- 1) Noguchi, T., Inoue, H. and Tanaka, T., Regulation of rat liver L-type pyruvate kinase mRNA by insulin and by fructose. *Eur. J. Biochem.*, **128**, 583-588 (1982).