Adenine と α -Hydroxyaldehyde との発蛍光反応

朴 萬基, 伊勢村晴子, 由岐英剛, 滝浦 潔

大阪大学薬学部¹⁾Fluorogenic Reaction of Adenine with α -Hydroxyaldehyde

MANKI PARK, HARUKO ISEMURA, HIDETAKA YUKI, and KIYOSHI TAKIURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University¹⁾

(Received May 30, 1974)

It was found that a series of α -hydroxyaldehydes produce a fluorescence by reaction with adenine in acetic acid solution, and its intensity decreases with increasing number of carbon atoms of the aldehydes. This reaction is specific for α -hydroxyaldehydes and not for simple aldehydes. It is also specific for adenine derivatives in which the primary amino group in position 6 is not substituted, and other nucleic acid bases do not give fluorescence by this method. This fluorogenic reaction is due to the formation of a double bond of Schiff bases, and it was assumed that oligomers of glyoxal exhibit the fluorescence by reaction with adenine after fission of its ring structure, resulting in an aldehyde group.

著者らは、先に adenine が glyoxal trimer hydrate (以下 GTH と略す) と反応して Ex. max 328 nm, Em. max 382 nm の蛍光を生じ、それにより adenine が微量定量されること²⁾ およびこの反応は、adenine に特異的で guanine その他の核酸塩基の影響を受けないため、desoxyribonucleic acid (DNA) および ribonucleic acid (RNA) 中の adenine 含量を他の塩基と分離することなしに簡単に定量できること³⁾ を報告した。その後 GTH の他の一連の α -hydroxyaldehyde すなわち glycol aldehyde, glyceraldehyde 等が特異的に同様な発蛍光反応を示し、adenine の定量が可能であることを見出し、また adenine と GTH および他の α -hydroxyaldehyde との反応生成物の構造について検討したので報告する。

Glycol aldehyde 5 mg または glyceraldehyde 6 mg を氷酢酸 4 ml に溶解させ adenine の水溶液 1 ml を加えて沸騰水浴上 6—8 時間加熱し、冷後蛍光スペクトルを測定すると、Fig. 1 のごとく glycol aldehyde の場合は励起および蛍光の極大波長はそれぞれ 330 nm と 380 nm, glyceraldehyde の場合は 330 nm と 400 nm にあり、GTH の場合と類似の蛍光スペクトルを示した。この際反応溶媒につき種々検討したが先に報告した GTH の場合と同様希酢酸がもっともよくその濃度が濃くなるほど、蛍光強度も急速に増大した (Fig. 2)。

なお市販の特級氷酢酸もわずかに蛍光を有するので、蒸留して除去した後に使用した。試薬の glycol aldehyde の量は 4 ml 酢酸中、10 mg まであげると、試薬そのものから副生する蛍光のため adenine の測定が妨害され、また 1 mg まで下げると反応が充分進行せず、4 mg が定量条件としてもっとも好ましかった。Glyceraldehyde の場合は 5 mg であった。反応は沸騰水浴上 100° で行なったが、その時の蛍光強度を経時的に追ってみると、glycol aldehyde の場合は 8 時間 glyceraldehyde の場合は 10 時間で最大に達し、以後徐々に減少したが、定量には実際面を考慮し、glycol aldehyde の場合は 6 時間 glyceraldehyde の場合は 8 時間とした (Fig. 3)。

以上のような条件で得られた adenine の検量線を Fig. 4 に示す。Glycol aldehyde の場合 adenine 濃度 0.2—1.0 $\mu\text{g/ml}$ および 2.0—10.0 $\mu\text{g/ml}$, glyceraldehyde の場合 2.0—10.0 $\mu\text{g/ml}$ の間で蛍光強度との間に直線関係がみられ定量が可能であることを示す。この感度は GTH 法にはおよばないが glycol aldehyde の場合は紫外線吸収 (UV) 法よりすぐれている。

1) Location: 1-1, 6-chome, Toneyama, Toyonaka-shi, Osaka.

2) H. Yuki, C. Sempuku, M. Park, K. Takiura, *Anal. Biochem.*, **46**, 123 (1972).3) H. Yuki, C. Sempuku, M. Park, H. Isemura, K. Takiura, *Anal. Biochem.*, **57**, 290 (1974).

Fig. 1. Fluorescence Spectra of Reaction Mixture of Adenine with Glycol aldehyde and Glyceraldehyde

—: glycol aldehyde
- - -: glyceraldehyde

Fig. 2. Effect of Acetic Acid Concentration on Fluorescence Intensity of Reaction Mixture of Adenine with Glycol aldehyde and Glyceraldehyde

—: glycol aldehyde
- - -: glyceraldehyde

Fig. 3. Influence of Reaction Time on Fluorescence Intensity of Reaction Mixture of Adenine with Glycolaldehyde and Glyceraldehyde

—: glycol aldehyde
- - -: glyceraldehyde

Fig. 4. Calibration Curves of Adenine

●—●: 0.2—1.0 μg adenine (by glycol aldehyde)
○—○: 2.0—10.0 μg adenine (by glycol aldehyde)
●—●: 2.0—10.0 μg adenine (by glyceraldehyde)

Fig. 5. Effect of Other Nucleic Acid Bases on Fluorescence Intensity of Adenine

One μg of each base was used.

でも adenine を分離することなく定量が可能であることが示された。Glyceraldehyde の場合も同様であった。

このように glycol aldehyde, glyceraldehyde が adenine と発蛍光反応をすることが認められたので、これが一般的に α -hydroxyaldehyde の反応であることをたしかめるために、さらに炭素数の多い erythrose より glucose にいたる一連の化合物につき同様に検討を行なった。その結果を Table I にまとめて示す。

生じた蛍光は反応後 1 時間以内は、その強度にほとんど変化はない。

本 adenine 定量法におよぼす他の核酸塩基の影響について検討した結果を glycol aldehyde につき Fig. 5 に示す。Adenine, cytosine, guanine, thymine および uracil を同一濃度で反応させた結果、adenine 以外の塩基はほとんど蛍光を生じなかった。Adenine 以外の 4 種の塩基の混合物も同様に蛍光を生じなかったが、それに adenine を加えると、adenine のみの場合と同じ強度の蛍光を与えた。したがってこの場合も、GTH の場合と同様に他の塩基との混合物のまま

TABLE I. Fluorogenic Reaction of α -Hydroxyaldehyde with Adenine

α -Hydroxyaldehyde	Solvent (% AcOH)	Quan- tity of reagent (mg)	Reaction time (at 100°) (hr)	Ex (max) (nm)	Em (max) (nm)	Linear range for determination (μ g)
Glycol aldehyde	80	4	6	330	380	0.2—10.0
Glyceraldehyde	60	6	8	330	400	2.0—10.0
Erythrose	60	3	6	356	400	20.0—100.0
Ribose	60	1	6	350	398	—
Arabinose	60	1	6	356	400	—
Glucose	60	1	6	340	380	—
Galactose	60	1	6	340	380	—

TABLE II. Relationship between Fluorescence Intensity and Carbon Number of α -Hydroxyaldehydes

α -Hydroxyaldehyde	Carbon number	Relative fluorescence intensity (%)	Ex(max) (nm)	Em(max) (nm)
Glycol aldehyde	2	73.0	322	370
Glyceraldehyde	3	28.6	322	370
Erythrose	4	15.2	356	400
Ribose	5	7.1	356	400
Glucose	6	1.1	356	400

Table I にみられるごとく、炭素数 2 の glycol aldehyde より炭素数 6 の glucose, galactose にいたるまでほぼ同様な反応条件で類似した蛍光スペクトルを与える。しかしながらその場合の反応溶液の蛍光強度は炭素数が増加するにしたがって急激に低下して行なった。これをたしかめるため、各 α -hydroxyaldehyde を同一モル数とり同一条件で反応を行なった結果の蛍光の相対的強度を Table II に示す。Table I の場合と反応条件が多少異なるので励起および蛍光の極大波長は Table I と少しずれるが、炭素数が増すにつれて蛍光強度が低下していることがわかる。反応液を BuOH-AcOH-H₂O (2.5:1:1) で薄層クロマトグラフィー (TLC) を行ない、254 nm の UV ランプで見たとこ、炭素数が増すにつれて未反応の adenine 量が多く残っているので、この蛍光強度の低下は主として反応性の低下によるものと思われる。 α 位に hydroxyl 基のない formaldehyde, acetaldehyde, propion aldehyde を同様に処理してみたが、これらの場合はいずれも蛍光を生ぜずまた TLC でみてもほとんど反応していないので、adenine との発蛍光反応には α 位の hydroxyl 基がその反応性に関与しているといえる。

以上のごとく、一般に α -hydroxyaldehyde は酢酸溶液中 adenine と反応して、特異的な蛍光を生ずることが認められたが、その際の蛍光強度は結局 glyoxal がもっとも強く、adenine の定量には先に報告した GTH 法が最高の感度を示した。そこでこの GTH と adenine との発蛍光性反応生成物につき検討を行なった。まず adenine の種々の位置にメチル基の導入された誘導体につき GTH との反応を試み、発蛍光性をしらべた。その結果を Table III に示す。

Adenine の 1, 7, 9 位に置換基を有する場合はいずれも蛍光を生じたが、6 位に置換基のある N⁶-methyl- および N⁶,N⁶-dimethyl adenine のみ蛍光はみられなかったので、GTH は adenine の 6 位一級アミノ基と反応していることがわかった。Leonard⁴⁾ らは chloroacetaldehyde と adenine を反応させ 6 位 N と 1 位 N との間に閉環した発蛍光性化合物を得ているが、GTH との反応の場合は 1, 7, 9 位を methyl 基で抑えても同様な蛍光を与えているので 6 位より 1 位または 7 位への閉環反応は考えられない。したがって蛍光物質は 6 位アミノ基と GTH との縮合物と思われる。

4) J.R. Barrio, J.A. Serist III, N.J. Leonard, *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **46**, 597 (1972).

TABLE III. Fluorogenic Reaction of Adenine Derivatives with Glyoxal Trimer Hydrate

Compounds	Fluorescence
Adenine	+
1-Methyladenine	+
N ⁶ -Methyladenine	—
N ⁶ ,N ⁶ -Dimethyladenine	—
7-Methyladenine	+
9-Methyladenine	+
2'-Deoxyadenosine	+
Adenosine	+
Adenosine monophosphate	+
Adenosine diphosphate	+
Adenosine triphosphate	+

Fig. 6. Paper Chromatography of Fluorescent Reaction Products

paper: Whatman No. 1 filter paper
solvent: BuOH-AcOH-H₂O (5:2:10)

つぎにこの蛍光物質を単離すべく, adenine 0.5 g と GTH 1.5 g を 80% 酢酸中反応させ, 溶媒を留去し, 活性炭カラムに吸着させた後, 水で過剰の GTH を溶出して除き, つぎに 20% 酢酸で蛍光性物質を溶出した. これを BuOH-AcOH-H₂O (5:2:10) でペーパークロマトグラフィー (PPC) にかける, UV ランプ (360 nm) で観察すると Fig. 6 のときクロマトグラムが得られ蛍光性反応生成物が多様であることを示すが, その内 F のみで全蛍光強度の 84% を示したのでこの部分を切り取り水で抽出, 濃縮したのち, 再び同様に PPC にかける操作をさらに 2 回くり返して精製した.

精製法としてこの他, シリカゲル, アルミナ, イオン交換樹脂によるクロマトグラフィー, 溶媒抽出等を行なってみたが, 結局 PPC がもっとも好ましい結果を与えた. 得られたものは褐色の粉末であった. このものは PPC および手製の TLC では 1 スポットを示したが分離のよい Merck 社製の PreCoated TLC plates silica gel を用いると, 隣接した 3 スポットとなって現われた. しかしそれらの単離はできなかったので以下の実験にはそのまま使用した.

このようにして得られた蛍光性反応生成物を N,O-bis-trimethylsilylacetaimide と 150° 1 hr 加熱し trimethylsilyl (TMS) 化した後, ガスクロマトグラフィー (GC)-質量スペクトル (MS) でそのピークの解析を試みた. カラムは OV-1 を使用し, 50° より 1 分 10° の割合で昇温し 260° に達したところで一定にしたところ保持時間 21 分 45 秒, 23 分 50 秒, 25 分 50 秒に試薬とは異なる 3 つのピークが得られた. これは TLC で見られた 3 スポットに相当すると思われる. それらの M⁺ はそれぞれ 629, 687, 745 であった. これらは Chart 1 に示した 3 種の化合物つまり glyoxal の dimer, trimer, および tetramer の 1 つの環が開き α-hydroxyaldehyde の形となって adenine と脱水縮合したものの TMS 化物 (IV, V, VI) の分子量に一致する (Chart 1). 蛍光性

Chart 1. Structures of Fluorescent Products

物質を TMS 化せずそのまま MS を測定すると、イオン化電圧 20 eV で m/e 58 と 29 に大きな peak が現れるがその他の peak はほとんど見られない。これは $(\text{CHO})_2^+=58$, $\text{CHO}^+=29$ であると考えられる。これによっても蛍光性物質には glyoxal 分子が極めて脱離しやすい形、すなわち 2 分子以上重合した oligomer の形で adenine に結合していることが示され、I, II, III の構造が支持される。

さらにこのことを確かめるため分光学的に検討を行なった。この蛍光性物質の 95% エタノール中での UV 吸収スペクトルは 308 nm に極大を示した。Adenine は 263 nm に極大を有するがこれが大きく長波長側に shift

VII

している。N⁶-Methyl adenine と N⁶,N⁶-dimethyl adenine の極大吸収は、それぞれ 265 および 274 nm であるが Zemlicka ら⁵⁾ は 6 位アミノ基が schiff base 型をもつ N⁶-dimethylaminomethylene 誘導体 (VII) が 312 nm に極大を有し、しかも発蛍光性であると報告しているので、GTH との発蛍光性反応生成物も adenine の 6 位アミノ基が GTH と脱水縮合し schiffbase 型の結合を有していることが考えられる。

つぎにこの蛍光物質の赤外線吸収 (IR) スペクトルを nujol 法で測定したところ、3300 cm^{-1} から 3100 cm^{-1} に ν_{OH} と ν_{NH} の重複したと思われる吸収帯が見られ C=O の吸収はなく、1500 cm^{-1} 付近の C=C, C=N の吸収および 1070 cm^{-1} のエーテル結合の吸収が著明であるのでこのことも I, II, III の構造に合致する。蛍光物質が有機溶媒にはとけないので D_2O 中で核磁気共鳴 (NMR) スペクトルの測定を行なった結果では遊離の -CHO 基の存在はみられず、8.3 と 8.5 ppm に adenine の 2 位と 8 位の H が現われたが、その他 5—6 ppm に数十本の signal が現れ、極めて複雑な組成であることが示され、各ピークの帰属はできなかった。GTH を D_2O にとかし、NMR スペクトルを測定してみると同様に 5 ppm から 6 ppm の間に数十本のシグナルを示し、極めて多様な平衡混合物であることが示された。Glyoxal が水溶液中で monomer, dimer 等種々の平衡状態で存在することは Whipple⁶⁾ らがすでにその水溶液の NMR スペクトルの研究より報告している。GTH は一般に VIII の形で存在するとされているが、水溶液中では実際にはさらに多くの異性体が存在するはずである。このことは GTH を adenine との反

VIII

Fig. 7. Gas Chromatogram of Glyoxal Trimer Hydrate

応条件と同じく 60% 酢酸と加熱、乾固後、TMS 化して GC にかけたところ、Fig. 7 のごとく単一のピークを示さず複雑な平衡混合物であることを示すことによって認められた。したがってこれが adenine と反応した場合、平衡混合物の中の dimer, trimer, tetramer がそれぞれ I, II, III を形成したものと考えられる。それ以上の oligomer および monomer との反応生成物の存在も考えられるが恐らく ppc による精製の段階で除かれたものであろう。Fig. 6 には主な蛍光帯のみを記したが、この外にも数多くの弱い蛍光帯が認められた。これらは恐らく glyoxal の oligomer 部分の立体異性体によるものであろう。

Chart 2

5) J. Zemlicka, A. Holy, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, 32, 3159 (1967).

6) E.B. Whipple, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 7183 (1970).

Whipple⁶⁾ は dimer でさえも 5 種の立体異性体が存在することを述べている。Trimer の場合につき反応式を示すと (Chart 2) その環の 1 つが開き, α -hydroxyaldehyde の形となり, これが adenine と脱水縮合して schiff base を形成したものであろう。

つぎに glycol aldehyde および glyceraldehyde につき同様に adenine と反応させた。反応混合物の ppc で多数の発蛍光性生成物の存在を示したので, これを活性炭カラムおよび ppc で精製したが glyoxal の場合よりさらに精製は困難で純粋なるものは得られなかった。しかしその混合物の UV 吸収は 260 nm の吸収極大を示したが, 310 nm に明らかな shoulder を示し, IR スペクトルによってもエーテル結合の存在が顕著に示されることから似たような構造であろうと推定される。TMS 化して GC を行なってみたがピークは得られなかった。Glycol aldehyde も GTH の場合と同様に水溶液中では monomer, dimer 等の平衡状態で存在し, それを TMS 化したものの GC にも複数のピークが観察されることが報告されている。⁷⁾

以上のごとく, adenine と GTH との反応生成物は UV が 306 nm にあることにより, schiff base 型の結合が推定され, IR よりエーテル結合が顕著であること, adenine の 6 位のみが反応に関与していること, MS で $(\text{CHO})_2^+$ と CHO^+ が強く出てくること, TMS 化物の GC-MS による M^+ の値等より, dimer, trimer, tetramer が開環し, α -hydroxyaldehyde の形をとって脱水縮合し, I, II, III のごとき化合物を生じたものと推定される。

実験の部

試薬および機器 Glycol aldehyde, glyceraldehyde, arabinose, ribose, galactose, glucose は和光純薬, アミノ酸は味の素株式会社, β -nicotinamide adenine dinucleotide はオリエンタル酵母株式会社, adenine, uracil, thymine, cytosine, guanine, は興人株式会社, その他の核酸塩基誘導体および GTH は Sigma chemical Co. Ltd. のものを使用した。但し, 7-methyl adenine および 9-methyl adenine は大阪大学薬学部 池原教授より寄贈されたものを使用した。水はすべてイオン交換樹脂を通した後蒸留したものを使用した。

蛍光は日立分光蛍光光度計 MPF-3 型, UV スペクトルは日立 EPS-3T 型, IR スペクトルは日立 MPI-2 型, NMR スペクトルは日立 R-20 型 (60 MHz), GC は日本電子 JGC-20K 型, MS は JMS OISG-2 型をそれぞれ使用した。

Adenine と Glycol Aldehyde および Glyceraldehyde との反応混合物の蛍光スペクトルの測定 Adenine 溶液 1 ml (10 μg), glycolaldehyde (5 mg) の酢酸溶液 4 ml の混合物を沸騰水浴上 6 時間加熱し, 冷後蛍光スペクトルを測定した。Glyceraldehyde の場合は 6 mg を水 1 ml にとし酢酸 3 ml を使用した。

酢酸濃度の影響 最終酢酸濃度 60% までのものは 1, 4, 7, 10, 13, 16.6N の酢酸を調製し, その 3 ml をとり adenine (0.3 $\mu\text{mole/ml}$) 1 ml, glycol aldehyde (2 mg/ml) 1 ml を加え, 100° で 3 時間加熱後 Ex. 320 nm, Em. 360 nm で蛍光強度を測定した。最終酢酸濃度 70% と 80% のものは glycol aldehyde 2 mg を 87.5% 酢酸および氷酢酸 4 ml にとした後に同様に行なった。Glyceraldehyde の場合は 5 mg を用い Ex. 330 nm, Em. 400 nm で測定した。以下すべてこの波長を使用した。

蛍光強度におよぼす反応時間の影響 Glycol aldehyde 75 mg を酢酸 60 ml にとし, adenine 溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$) 15 ml と共にすり合わせフラスコに入れ, 沸騰水浴上加熱した。4 時間目までは 1 時間毎に, それ以後は 2 時間毎にその一部を採取し, Ex. 330 nm, Em. 384 nm で蛍光強度を測定した。Glyceraldehyde の場合は 100 mg/ml 溶液 10 ml, 酢酸 45 ml を用いた。

検量線の作成 Adenine 水溶液 (0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 $\mu\text{g/ml}$ および 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\mu\text{g/ml}$) 1 ml と glycol aldehyde の酢酸溶液 (5 mg/4 ml 酢酸) 4 ml の混液を 100°, 6 時間加熱した。冷後 Ex. 330 nm, Em. 380 nm で蛍光強度を測定した。Glyceraldehyde の場合は 6 mg/ml の水溶液 1 ml と酢酸 3 ml を用いた。

他の核酸塩基の影響 Adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil の各 1 $\mu\text{g/ml}$ の溶液, adenine 以外の 4 種の塩基の混合溶液 (各 1 $\mu\text{g/ml}$) および adenine を含む 5 種の塩基の混合溶液 (各 1 $\mu\text{g/ml}$) を調製し, glycol aldehyde による検量線作成の場合と同一の条件で行なった。

蛍光物質の精製 Adenine 0.5 g, GTH 1.5 g を 80% 酢酸 70 ml と共に沸騰水浴上加熱し, 反応後溶媒を減圧で留去し, 残渣を水約 50 ml にとした。不溶物は遠心分離によって除去し上澄を活性炭カラム (3×30 cm) に通し過剰の GTH を水 1 liter を用いて流し出した。次に 20% 酢酸 1 liter で蛍光物質を流し出させた。この溶液を濃縮し, Whatman 3MM ろ紙を用い, 展開溶媒 BuOH-AcOH-H₂O (5:2:10) を用いて展開した。乾燥後 360 nm の UV ランプを照射し蛍光の量も強い部分を切り取り水で抽出した。抽出液は濃縮した後同様な PPC を更に 2 回くり返して精製した。

蛍光物質の GC-MS 上述のごとくして得られた蛍光性物質 3 mg を BSA 0.5 ml で封管中 150°, 1 時間加熱して TMS 化し, その 1 μl を注入した。条件は次の通りで行なった。ガラスカラム 3×1000 mm. Gaschrom

7) A.H. Heiss, H. Tambawala, *J. Chromatog. Sci.*, **10**, 120 (1972).

Q 100—120 メッシュ, 3% OV-1, カラム温度 50° より 10°/min で昇温し 250° より恒温. キャリヤーガス He. 0.8 kg/cm². イオン化電圧 50 eV, 加速電圧 9 kV. 検出器 TIM.

α -Hydroxyaldehyde の Adenine との反応性 Glycol aldehyde, glyceraldehyde, erythrose, ribose, および glucose の 25 m M 水溶液を調整し, この溶液 1 ml, adenine 水溶液 (50 μ g/ml) 1 ml および酢酸 3 ml を加え 100°, 6 時間加熱. 各反応液の Ex. max および Em. max を測定し, その波長で蛍光強度を比較した.

GTH の GC GTH 5 mg を 60% 酢酸 1 ml と 3 時間, 沸騰水浴上加熱した後, 溶媒を減圧で完全に除去した. これに hexamethyldisilazane 0.1 ml と trimethylsilyl chloride 0.1 ml を加え常温で 30 分放置した後ガスクロマトグラフィーにかけた. 条件は次の通りである. ガラスカラム 3 $\times$ 1000° mm, 3% OV-1, 80° より 200° まで 10°/min で昇温. 注入温度 250°. キャリヤーガス N₂, 流速 40 ml/min. 検出器 FID.

謝辞 終りに本研究に際し貴重なサンプルの御提供を賜った大阪大学薬学部 池原教授に感謝します. また GC-MS の測定に御協力下さった日本電子株式会社ならびに実験の一部を担当された本学学生 広田容子嬢に感謝します.