

●—生体内ジスルフィド基の還元電位とその役割

間違った3次元構造に折りたたまれたタンパク質は、アルツハイマー病などの神経変性疾患を引き起こすと考えられているが、その構造を正す役割を持つのが、チオール-ジスルフィド酸化還元酵素である。様々なタンパク質内に存在するジスルフィド結合を開裂(還元)、形成(酸化)、または異性化するこの酵素の活性部位は、シスチンのジスルフィド基であるが、活性部位が同じシスチンであるにもかかわらず、還元を触媒する酵素や、酸化を触媒する酵素などに分かれる原因は未解明であった。近年、シスチンの生体内における様々な役割がジスルフィド基の還元電位によって決定されることなど、その物理化学的背景も明らかとなってきた。

Protein disulfide isomerase や、チオレドキシシン、バクテリアに存在する DsbA といった様々なチオール-ジスルフィド酸化還元酵素は、システイン (N 末端側)-アミノ酸 X-アミノ酸 Y-システイン (C 末端側) という共通の C_NXYC_C 触媒活性部位を持っている。このジスルフィド活性部位が、disulfide shuffling というメカニズムによりタンパク質のジスルフィドを開裂、形成、異性化しているが、この役割の違いは $C_N C_C$ ジスルフィド基の還元電位の違いによるところが大きい。例えば、DsbA は還元電位が約 -0.12 V で、還元しやすい。よって、タンパク質内の二つのシステインをシスチンに酸化する役割がある¹⁾。それに対して、チオレドキシシンは還元電位が -0.27 V であり、還元力が強く、タンパク質のジスルフィド結合を二つのチオール基に還元する役割を持つ。同じシスチンであるにもかかわらず、還元電位に違いが生じる原因は、 α ヘリックスによる双極子モーメントや酵素内水素結合、周辺官能基との静電相互作用による C_N チオラートの安定化度合いによるところが大きいことが明らかとなってきた²⁾。

さらに、Rains らが、量子化学計算 (M062x/6-311+g (2d,p)) により、3次元構造が既知で、 C_NXYC_C を持つ七つのタンパク質の Natural Bond Orbital を計算したところ、すべての C_NXYC_C において硫黄の孤立電子対 (n) が隣接するカルボニル基の反結合 (π^*) と重なっており、硫黄の電子密度をカルボニル基に流すことによって安定化する $n \rightarrow \pi^*$ 相互作用が見られた³⁾。また、 $n \rightarrow \pi^*$ 相互作用が強ければ、還元電位が下がるという相関性を明らかにした。

今後、研究が積み重なることによって、隣接基とジス

ルフィド基の静電相互作用を利用した新しい神経変性疾患治療薬の開発や、シスチンを含むタンパク質の酸化還元電位を測定することによって、タンパク質の生体内における働きを予測する分析方法の確立などが期待されている。

- 1) S. Quan, I. Schneider, J. Pan, A. V. Hacht, J. C. A. Bardwell: *J. Biol. Chem.*, **282**, 28823 (2007).
- 2) F. Hatahet, L. W. Ruddock: *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 2807 (2009).
- 3) H. R. Kilgore, R. T. Raines: *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 17606 (2018).

〔岐阜薬科大学 山本拓平〕

●—食品中の残留物質分析における QuEChERS 法の新展開

アメリカや EU の残留農薬公示試験法ともなっている QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) 法の原型は、2002 年の第 4 回 European Pesticide Residue Workshop において Anastassiades らにより発表された。その試料前処理は、10 g の試料に 10 mL のアセトニトリルを加えて農薬を振とう抽出し、無水硫酸マグネシウム ($MgSO_4$) と塩化ナトリウム ($NaCl$) を加えて分液したアセトニトリル層を一部採り、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル (primary secondary amine, PSA) などの微粒子粉末を加えて分散固相抽出 (dispersive solid-phase extraction, d-SPE) により精製する方法である¹⁾。使用する器材が安価で柔軟性が高い手法であることから、抽出溶媒への酸添加 (酢酸, ギ酸)、分液時の緩衝作用を持つ塩の使用 (クエン酸塩, 酢酸塩)、d-SPE 精製の追加 (C_{18} , グラファイトカーボン) などの様々な改良がなされてきた。近年、食品以外の試料、農薬以外の分析対象化合物にもその適用範囲は広がり、分析の高速化、小型化、自動化も進んでいる。本稿では、その最新の動向として、2020 年に Monteiro らが発表した “QuEChERS-ER” (more than QuEChERS) と呼ばれる分析法について紹介する²⁾³⁾。

試料として牛肉とナマズを検討し、農薬、動物用医薬品、PCB を分析対象化合物とした。オリジナル法よりも少ない試料 (2 g) を用い、抽出溶媒としてアセトニトリルの代わりにアセトニトリル/水 (4:1) 混液 10 mL を用いた。極性の異なる分析対象化合物を同時に抽出して、抽出液の一部 (204 μ L) を水で希釈して超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (UHPLC-MS/MS) に供し、残りの抽出液は $MgSO_4$ と $NaCl$ を加えて分液した後、アセトニトリル層の一部 (300 μ L) をカラム固相抽出 (column solid-phase extraction, c-SPE) で精製して、低圧ガスクロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LPGC-MS/MS) により分

析する枝分かれ試験法“mega-method”とした。c-SPEはロボット型X-Y-Zオートサンプラーにより自動化し、MgSO₄/PSA/C₁₈/CarbonX(20:12:12:1)45mgの小型固相カートリッジを用いることで、使用溶媒量は数百μLと少量でありながら、余分な水分と脂肪酸やコレステロールなどの脂質を効率的に除去することが可能であった。

牛肉で、161農薬、63動物用医薬品およびその24代謝物、14環境汚染物質(PCBs)の計262化合物(クロマトグラフィーで分離可能であった259化合物群)を対象として、4濃度の添加濃度でn=10、2日間の繰り返し試験(n=80)により本法のバリデーションを行った結果、真度70~120%、日間再現性≤25RSD%となった化合物は全体の85%(221/259)と良好な結果が得られた。本法は、c-SPEによる精製を自動化し、

UHPLCとLPGCで高速分離を行うことで、徹底した時間の短縮と省力化が図られている。また、使用する有機溶媒が少なくて済み、環境負荷の低減の観点からも評価される。今後、残留農薬をはじめとする食品危害物質の効率的なモニタリング試験法として普及することが期待される。

- 1) M. Anastassiades, S. J. Lehotay: *J. AOAC Int.*, **86**, 412 (2003).
- 2) S. H. Monteiro, S. J. Lehotay, Y. Sapozhnikova, E. Ninga, A. R. Lightfield: *J. Agric. Food Chem.*, ASAP <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00710>.
- 3) E. Ninga, Y. Sapozhnikova, S. J. Lehotay, A. R. Lightfield, S. H. Monteiro: *J. Agric. Food Chem.*, ASAP <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00995>.

〔岐阜県保健環境研究所 南谷臣昭〕

原稿募集

トピックス欄の原稿を募集しています

内容：読者の関心をひくような新しい分析化学・分析技術の研究を短くまとめたもの。

執筆上の注意：1) 1000字以内(図は1枚500字に換算)とする。2) 新分析法の説明には簡単な原理図などを積極的に採り入れる。3) 中心となる文献は原則として2年以内のものとし、出所を明記する。

なお、執筆者自身の文献を主として紹介する

ことは御遠慮ください。又、二重投稿は避けてください。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区西五反田1-26-2
五反田サンハイツ304号

(公社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会
〔E-mail: bunseki@jsac.or.jp〕