

「内分泌かく乱物質」
平成12年度採択研究代表者

交久瀬 五雄

(大阪大学大学院理学研究科 教授)

「高感度質量分析計の開発と内分泌かく乱物質の分析」

1. 研究実施の概要

このチームは交久瀬、赤松、和田の3つのグループからなっている。多種多様な内分泌かく乱物質を高感度で測定するための質量分析計を開発し、微量のそれら物質を定量的に測定する。内分泌かく乱物質といえば、ダイオキシン、PCB等すでに確立された物質群というイメージが強いが、未だその毒性の存否が分かっていない物質の方が遥かに多い。また一度生物体を通った代謝物の方が毒性が強い場合もある。物質を特定した場合、抗原抗体反応を利用した測定法が高感度であるが、汎用性がない。交久瀬グループは汎用性のある質量分析計を開発する。一番定量性のある質量分析計は磁場型質量分析計であるが、スリットを用いているためにイオンがスリットを通過している時のみしか情報が得られない。イオンの検出部に位置検出器を用いて、それぞれの質量のイオン量の積分値を得ることによって感度を1桁以上向上させる事を目指す。一方この質量分析計が完成するまでの間、赤松グループはリアルタイム・ノンラベル生体分子相互作用解析装置を用いて、エストロゲン受容体と内分泌かく乱物質およびその代謝物との相互作用解析を行う。その後、高感度質量分析計が完成すれば、分子量を決定し、可能な限り化合物の同定を行う。和田グループではプロテオーム解析技術を用いてダイオキシン受容体関連タンパク群解析に適用し、その応答ネットワーク分子群を明らかにするとともに高感度質量分析計を用いてフェムトモルプロテオーム技術を開発する。

2. 研究実施内容

A) 種々の内分泌かく乱物質を測定するための高感度質量分析計の開発

質量分析計は磁場型で、場の配置はイオン源 - Q1 - Q2 - Q3 - Q4 - C - Q5 - B - Q6 - Q7 - Q8 - H - 検出器とした。ここで、QiはQレンズ、Cは円筒電場、Bは一樣磁場、Hはヘキサポールレンズを表す。内分泌かく乱物質の分子量は高々1000uであるのでイオン源はガスクロマトグラフを持った電子衝撃型イオン源にした。衝撃電子のエネルギーは選択的イオン化ができるようにエネルギー幅をできるだけ抑えた。一樣磁場から後のQレンズ、ヘキサポールレンズでズーム機能を持たせた。これによって像の拡大縮小が可能になった。検出器はスリットタイ

プ（スリット+2次電子増倍管）と位置検出タイプ（マイクロチャンネルプレート+蛍光板+ダイオードアレイ）の両方を装着する事にした。一方の方式で検出する場合は他方の検出器はイオン軌道から外れるように設計した。現在基本設計が終わった段階であり、今年度中に完成の予定である。

B) DDTとホルモン受容体結合活性

世界各地で未だ使用されている農薬の一つであるDDTは、その混在物および代謝物が性ホルモン受容体結合活性を有すると報告されている。本年度は、以前に研究室で合成されたDDT類縁体について、ホルモン受容体との相互作用を検討するための前準備を行った。また、これまでのホルモン受容体結合活性の構造活性相関研究から、どのような構造の化合物が高活性を示すかについての情報を収集した。近年、女性・男性ホルモン受容体タンパク質の結晶構造が報告されているので、受容体側からの検討も行った。

さまざまな構造を有する数10種類のDDT類縁体について、化合物名・構造式をリストアップし、純度をTLCで検定した。また、アメリカ合衆国・ポモナ大学の構造活性相関データベースを参照して、ホルモン受容体結合活性の構造活性相関に関する検索を行った。性ホルモン受容体タンパク質とリガンドとの複合体の結晶構造座標をPDB(Protein Data Bank)から入手し、分子モデリングソフトウェアSybylでコンピュータ上にその立体構造を視覚化した。

DDT類縁体について、化合物名・構造式のリストアップを完了した。ただし、純度検定から、一部の化合物については精製が必要であると思われた。不純物を含んでいないDDT類縁体については、東洋紡社製の内分泌かく乱物質研究用ELISAキットを用いてホルモン受容体結合活性を測定し、スクリーニングを行う予定である。構造活性相関データベースから、約30の研究データが得られ、研究に用いられた化合物の構造を再検討して、化合物が高活性を示すための必要構造を抽出した。コンピュータ上に視覚化された受容体-リガンド複合体構造に基づき、受容体におけるリガンド結合部位のアミノ酸残基についての情報をえた。

C) ダイオキシン受容体関連分子の高感度プロテオーム解析

ダイオキシン類の毒性（催奇形生、発がん、上皮細胞異形成、肝細胞障害、生殖機能低下、薬物代謝酵素の誘導など）発現の前提となる細胞内移送に関わる受容体等分子群の全体像を最新のプロテオーム技術により解析する研究を開始した。すなわち、ダイオキシン受容体（AHR）および細胞質内においてAHRと結合することがわかっている熱ショックタンパクHSP90を用いて、プルダウン等による複合体解析を行うべく、それぞれの遺伝子をPCRによって増幅し、数種のベクターに挿入して、大腸菌、哺乳細胞での発現系を作製した。解析技術的な準備としては、プルダウンあるいは免疫沈降物の二次元電気泳動スポットをゲル内消

化し、質量分析によってタンパクを同定する際に問題となる、感度・塩の除去・スペクトル上の混在シグナルなどに関して、検討を行った。以上の準備的な研究に随伴する生化学的成果としては、胎盤組織において発現するHSP90を解析するうち、HSP90が糖鎖と結合するレクチンであることが明らかとなった。

3．研究成果の発表（論文発表）

なし