

「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測定」

1. 研究実施の概要

このチームは交久瀬、赤松、和田、上野の4グループから成っている。交久瀬グループでは多種多様な内分泌かく乱物質を高感度で測定できる汎用性のある質量分析計の開発を目指している。この質量分析計は平成13年度に一応の完成をみた。本質量分析計の特徴はイオン源スリットの縮小実像を分析電場の前で作りイオンの透過率の向上と分解能の向上を同時に実現しているところにある。併せて、検出器に位置検出器を採用し、スリット検出系では無駄に捨てていたイオンを有効に検出し、高感度を実現している。

赤松グループでは DDT 類縁体およびその代謝物のホルモン受容体結合活性を調べた。東洋紡社製の内分泌かく乱物質研究用 ELIS キットを用いて、赤松研究室において過去に合成された DDT 類縁体の内、不純物を含んでいないことが確認された 39 個の化合物のエストロゲンおよびアンドロゲン受容体活性を測定した。また、ラット肝ホモジネート S-9 mix による代謝混合物のエストロゲンおよびアンドロゲン受容体結合活性を測定した。

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。

上野グループは、平成13年4月より内分泌かく乱作用が疑われている化合物に対して、一つの簡易生物検定法の開発を目指した。単一成分からなる合成化合物だけでなく、自然界から採集される複合成成分系資料がしめす内分泌かく乱活性を判定するためである。その目的とするところは以下の2点にある。

- 1) 複合成成分からなる資料をいたずらにガスまたは液体クロマトグラフ法で成分分析し、活性のない資料の分析のための時間の浪費を避ける。
- 2) 内分泌かく乱作用を示す可能性のある未知の化合物を検出するためである。

2. 研究実施内容

交久瀬グループ

13 年度前半に予備実験として位置検出器の性能、特性を知るために、既存の質量分析計(HX110)にマルチチャンネルプレート(MCP)と蛍光板(FP)からなる位置検出器を装着し、MCP が焦

点からずれたときに像がどれだけぼけるか、イオン量が信号出力とどのような関係にあるか等をチェックした。図1に質量分析計の焦点面と MCP の位置関係を示す。スペクトルのフォーカス性を見るために、焦点面と MCP の角度はわざとずらしてある。図2は Xe ガスの質量スペクトルを位置検出器でとったときの写真である。Xe の同位体は 124, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 134, 136 の 9 本あるが、写真には 128 から 136 までの 7 本が写っている。焦点は 130 あたりに合っていて、そこから離れるに従ってフォーカスは悪くなっていることが分かる。図3はこの二次元のスペクトルを一次元にしたときの質量スペクトルである(赤線)。CCD の縦の各ピクセルの和をイオン強度として表した。同じ図中に Xe の同位体存在度から計算したスペクトルを黒で示す。両者の比較から直線性は数%以内で合致しており、内分秘かく乱物質の定量には問題がないことがわかった。

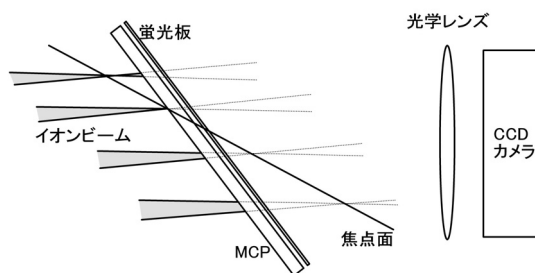


図1. 焦点面とMCPの関係

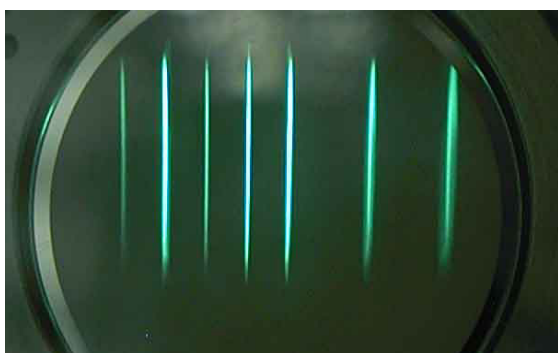


図2. Xe の蛍光板上のスペクトル

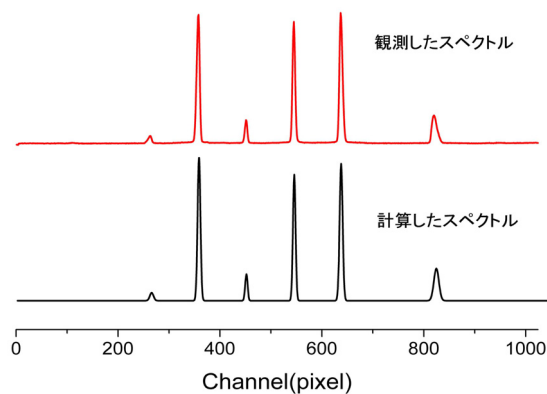


図3. Xe スペクトルの測定値と理論値の比較

続いて、年度末にかねてより開発していた位置検出器を装着した高感度質量分析計が完成した。図4にその写真を示す。質量分析計は一般に主スリットの質量分解した像を検出器の場所に結ばすようになっている。従って分解能は同じ装置であれば、主スリットの幅に逆比例する。分解能を良くしようとして主スリットを細くすると、イオンの透過率が悪くなるというジレンマに陥る。本装置はイオン源を出たところに第2の主スリットを置き、その縮小像を本来の主スリットの位置に



図4a. 高感度質量分析計の全体

結ばすようになっている。分解能は縮小像の像幅で決まるので分解能があがる。同時にイオンの透過率は第2のスリットで決まるのでイオンの透過率も向上する。

本装置は位置検出方式であるので、質量の検出範囲を変えるためには装置の質量分散を変えなければならない。スペクトルの全体を見るためには、質量分散を小さくする必要がある。又、ある狭い範囲を詳しく見るためには分散を大きくしなければならない。これは光学でいうズームシステムに相当する。これを実現するために磁場と検出器の間にQレンズからなるズームシステムを挿入した。又、焦点面の位置調節に2つの6極レンズを挿入している。

所定の分解能が出ているか見るためにピリジン-ベンゼンの2重線を測定し、所定の分解能を得た。今後、本装置を使いやすいものにするためのソフト開発が必要である。

赤松グループ

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、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、本研究室において過去に合成されたDDT類縁体のうち、不純物を含んでいないことが確認された39個の化合物のエストロゲンおよびアンドロゲン受容体結合活性を測定した。また、同じ化合物セットにおいて、ラット肝ホモジネートS-9 mixによる代謝混合物のエストロゲンおよびアンドロゲン受容体結合活性を測定した。

いくつかのDDT類縁体は受容体結合活性を示した。また、エストロゲン受容体結合活性よりアンドロゲン受容体結合活性を有している化合物の方が多かった。しかし、いずれの化合物も、エストロゲン受容体に対して基準物質 diethylstilbestrol (DES)の1/1000以下、アンドロゲン受容体に対して mibolerone の1/200以下の活性しか示さなかった。代謝混合物の活性では、エストロゲン受容体に対する結合活性の増大を示す化合物が多く、特に置換基にエーテル構造を有する化合物の活性の増大が顕著であった。それに対し、アンドロゲン受容体に対する結合活性は、ほとんどの化合物においてS-9 mixとの処理により減少した。

また、活性が測定された化合物(あるいは代謝混合物)について、リアルタイム・ノンラベル生体分子相互作用解析装置BIACORE Xを用いて、受容体とそれらとの相互作用を詳細に検討するた



図4b. 高感度質量分析計の磁場と検出部

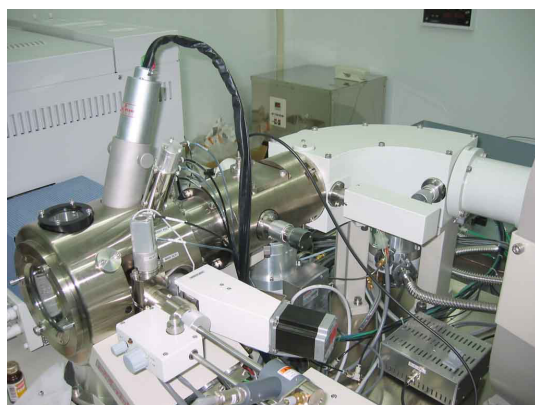


図4c. 高感度質量分析計のイオン源と電場部分

めの実験条件を検討した。抗エストラジオール抗体とエストラジオール-BSA 結合体との相互作用を調べたところ、BSA 結合体をチップに固定化した場合にのみ特異的な結合シグナルが得られた。今後、この測定に受容体と供試化合物を共存させて、迅速にエストロゲン受容体結合活性を測定できると考えられる。

和田グループ

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発揮に関わる細胞内分子、具体的にはダイオキシン受容体(AHR)に結合する細胞内分子群、の網羅的同定とそのための高感度分析技術開発を継続した。[内容]タンパク相互作用の研究において一般に用いられている酵母 Two-hybrid 法は基本的には 1:1 分子関係を見るものであり、ポストゲノムの基盤情報取得のための網羅的解析には適さない。一方、タンパク複合体を構成する既知分子に対する抗体を用いる免疫沈降法は非特異的結合によるノイズを除去できない。そこで、TAP (Tandem Affinity Tag)法を用いることにし、EMBL の Seraphin より TAP ベクターの供与を受け、ヒト AHR を組み込んでヒト培養細胞においてタグ付きリコンビナント AHR を発現させた。実験に適する細胞の選択を目的として AHR 発現をウェスタンブロッティングにより確認したところ、肝ガン由来の細胞や乳ガン細胞の他、血管内皮細胞に高い発現が見られた(図5)。肝ガン細胞を用いて AHR に結合する分子の同定を行っている。一方、高感度プロテオーム解析技術については、ペプチドマスフィンガープリントでタンパクを同定するためのインゲル消化法の改良を行い、ゲルからの消化ペプチド溶出法を改良することなどによって、アクリルアミドゲル電気泳動で分離し銀染色により視覚化した 10ng のタンパクを同定できるようになった。この試料調製法の改良は、高感度質量分析計によるタンパク解析感度向上のための基盤技術である。



図5. 種々の細胞における AHR の発現

上野グループ

化学物質の内分泌かく乱作用への影響は、動物の精子の密度と活動能力に対しても現れるとする研究例がある。藻菌類の遊走子が、動物の精子と非常に似た形態的・構造的特徴を有するばかりでなく、その活動においても化学物質に対して鞭毛による正負の俊敏な走化性を示すことに着目して、内分泌かく乱作用の簡易生物検定法の開発にチャレンジした。目下平成13年度に購入した光学顕微鏡を用いて、手持ちの藻菌類のカルチャーコレクションからこの目的に適合する遊走子を検索中である。また、光学顕微鏡下で遊走子の活動を定量的に評価できるソフトの開発にも取り組んでいる。しかしながら、光学顕微鏡下の考察では、遊走子の活動に対する光の影響(走光性)を補正できる状況には至っていない。

3. 研究実施体制

(1) 交久瀬グループ

- ① 交久瀬五雄（大阪大学大学院理学研究科、教授）
- ② 高感度質量分析計の開発

(2) 赤松グループ

- ① 赤松美紀（京都大学大学院農学研究科、助教授）
- ② DDT 類縁体および代謝物のホルモン受容体結合活性

(3) 和田グループ

- ① 和田芳直（大阪府立母子保健総合医療センター研究所、所長、
大阪大学大学院医学系研究科分子病態医学専攻(連携)・教授)
- ② 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

(4) 上野グループ

- ① 上野民夫（大日本除虫菊(株) 中央研究所、顧問）
- ② 遊走子を用いた内分泌かく乱作用の簡易生物検定法の開発

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- “Detection and characterization of protein mutations by mass spectrometry” Y. Wada in “The Protein Protocol Handbook, 2nd ed.” (ed. J.M. Walker), pp681-692, Humana Press, Totowa 2002
- “Membrane lipid components associated with increased filtrability of erythrocytes from long-distance runners” T. Nakano, Y. Wada, and S. Matsumura Clin Hemorheol Microcirc 24, 85-92, 2001
- “Molecular cloning and characterization of a human beta-Gal 3'-sulfotransferase which acts on both type 1 and type 2 (Galbeta1,3/1,4GlcNAc-R) oligosaccharides.” Honke K, Tsuda M, Koyota S, Wada Y, Iida-Tanaka N, Ishizuka I, Nakayama J, Taniguchi N. J Biol Chem. 276, 267-274 (2001)
- “Hemoglobin Tokyo II [α 89(FG1) His-->Asn]: a new hemoglobin variant characterized by endoproteinase Asp-N digestion and collision-induced dissociation” T. Nakano and Y. Wada J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 48, 341-345 (2000)
- “Cancer-associated alternative usage of multiple promoters of human GalCer sulfotransferase gene” M. Tsuda, N. Egashira, N. Niikawa, Y. Wada and K. Honke Eur. J. Biochem. 267, 2674-2679 (2000)
- “cDNA cloning, genomic cloning, and tissue-specific regulation of mouse GalCer sulfotransferase” Hirahara, Y., Tsuda, M., Wada, Y. and Honke, K. Eur. J. Biochem. 267, 1909-17 (2000)

- 和田芳直、特集「ニューロサイエンス」新しい手法による脳疾患の遺伝子診断. 化学工業 51, 508-513 (2000)
 - “Properties of DNA fragmentation activity generated by ATP depletion” Nakamura N and Wada Y Cell Death Differ. 7, 477-484 (2000)
 - “Site-directed mutagenesis in hemoglobin: test of functional homology of the F9 amino acid residues of hemoglobin α and β chains” A.H.M. Mawjood, G. Miyazaki, R. Kaneko, Y. Wada and K. Imai Protein Engng. 13, 113-120 (2000)
 - “MS/MS analysis of ^{13}C -containing ions from a mixture of homologous peptides differing by one mass unit at a residue” Y. Wada, M. Hisada, R. Kaneko, H. Naoki and T. Matsuo J. Mass Spectrom. 35(2), 242-250 (2000)
 - Studies of Complex Formation between Anthraquinones and Metal Ions by Electrospray Ionization Mass Spectrometry R. Arakawa, A. Sasao, T. Abura, T. Suzuki, and N. Fujitake Eur. J. Mass Spectrom., 7, 467-471 (2001)
 - Facilitated Ion-Transfer of Alkaline-Earth Metal Cations by Naphtho-15-crown-5 across the Water/1,2-Dichloroethane Interface: Voltammetric and Eelectrospray Ionization Mass Spectrometric Studies, Md. A. Rahman, H. Doe, N. Sakurada, and R. Arakawa Electrochimica Acta, 47, 623-631 (2001)
 - Studies on Solvation of Lithium Ions in Organic Electrolyte Solutions by Electrospray Ionization Mass Spectroscopy T. Fukushima, Y. Matsuda H. Hashimoto, and R. Arakawa Electrochemical and Solid-State Letters, 4(8), A127-A128 (2001)
 - Analysis of Photochemical Reactions of Bis(1,10-phenanthroline) diamineruthenium(II) Complexes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry R. Arakawa, K. Abe, M. Iwai, T. Fukuo, and Y. Nakabayashi J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 49(5), 183-187 (2001)
 - Studies on the Association of 2-Thiazolidinecarboxylic Acid and Antimony Potassium Tartrate. Chiral Recognition and Prediction of Absolute Configuration by Electrospray Mass Spectrometry R. Arakawa, M. Kobayashi, T. Fukuo, and T. Shiraiwa Rapid Comm. Mass Spectrom., 15(9), 685-689 (2001)
- (2) 特許出願
なし