

「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

平成14年度も4つのグループ（交久瀬、赤松、和田、上野グループ）で研究を進めた。交久瀬グループでは完成した質量分析計の感度、検量線の直線性等基本的な性能を調べた。赤松グループではDDT類縁体のエストロゲン受容体結合活性を調べた。和田グループではダイオキシン受容体AhRの細胞内蛋白複合体を明らかにするため、AhR結合蛋白質群のプルダウンを2つの方法を試みた。上野グループでは環境中で化学物質が生物の生殖作用に及ぼす影響を簡便に予測・検出する生物検定法の開発とピレスロイドに代わる新規天然殺虫成分の探索をした。

2. 研究実施内容

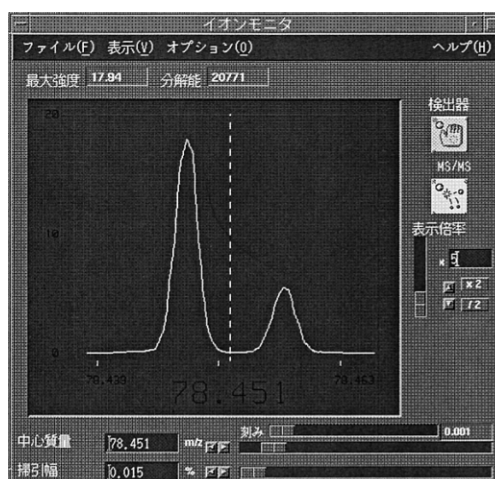
交久瀬グループ（大阪大学大学院理学研究科）

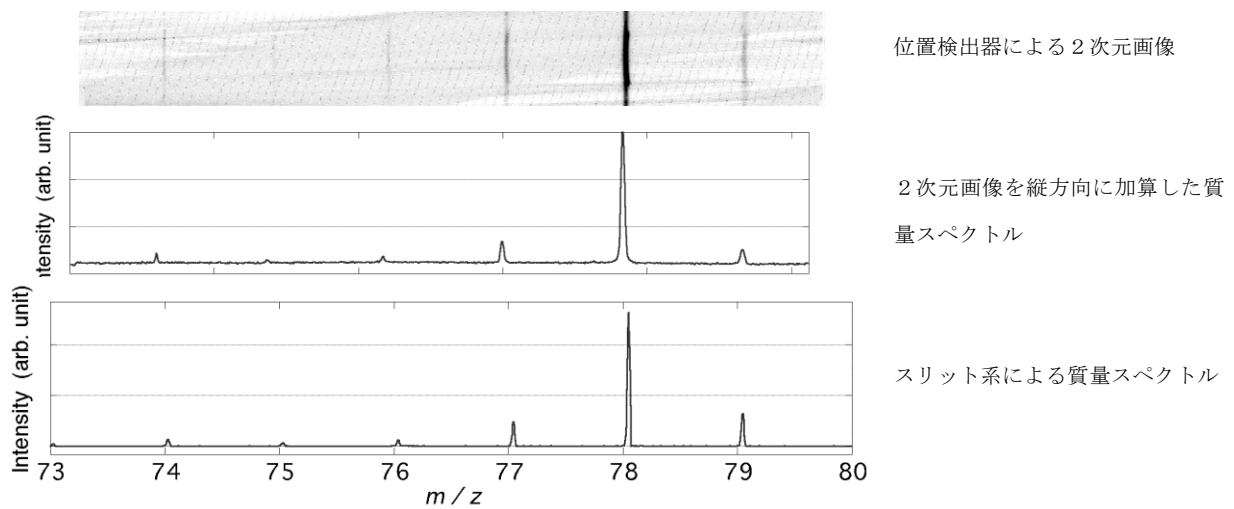
本装置は感度を向上させるための位置検出器と従来型のスリット系検出器の両方を装着している。

①スリット系による分解能の確認。イオン軌道計算によると、分解能 R は $R=A_y/(A_x s+d)$ である。ここで A_y は質量分散係数、 A_x は像倍率、 d は検出スリット幅、 s はイオン源スリット幅である。 $s=35\mu\text{m}$ で像幅 $9\mu\text{m}$ となり分解能2万程度になるはずである。ピリジン-ベンゼンの2重線により、分解能を確認すると、分解能2万像幅 $9\mu\text{m}$ で理論値とよくあった。右にピリジン-ベンゼンの2重線スペクトルを示す。

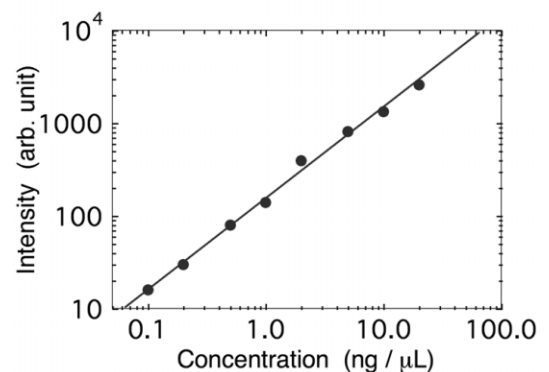
②位置検出器とスリット検出器のスペクトル比較。

従来のスリット検出器で得たスペクトルと位置検出器によるスペクトルと比較し、よい一致を見た。





③検量線の直線性 検体に含まれる内分泌かく乱物質の量を決めるには検量線を求めることが重要である。位置検出器でもスリット系と同様な検量線が引けるかステアリン酸メチルを用いて検証した。その結果 から まで直線性が得られた。濃度の低いところで直線からずれているのは器具その他から来る汚染のためである。



赤松グループ（京都大学大学院農学研究科）

内分泌かく乱作用を示す疑いのある化合物の中には、その代謝物がより高いホルモン受容体結合活性を示すものも存在する。世界各地で未だ使用されている農薬の一つであるDDT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。

今年度は、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、不純物を含んでいた類縁体の一部について化合物を精製後、化合物本体およびそのラットS-9 mixによる代謝混合物のエストロゲン受容体結合活性を測定した。これまでに測定した化合物の内、代謝物が元化合物より高い結合活性を示したのは、ベンゼン環置換基としてmethoxy基あるいはethoxy基を有する類縁体であった。これらのalkoxy基がOH基に代謝されることにより、活性が高くなったと考えられる。また、活性が測定された代謝物を、高速液体クロマトグラフィーを用いて単離精製し、ELISAキットで活性の確認を行った。活性が測定された代謝物の、高速液体クロマトグラフィーによるいくつかの分画は受容体結合活性を示した。質量分析計により、これらの画分に含まれる化合物の構造を決定する予定である。

さらに、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により、受容体と活性の存在した化合物との相互作用を詳細に検討し、エストロゲン受容体結合活性を測定する方法を確立した。この測定方法を用いて、DES, methoxychlor代謝物を含むいく

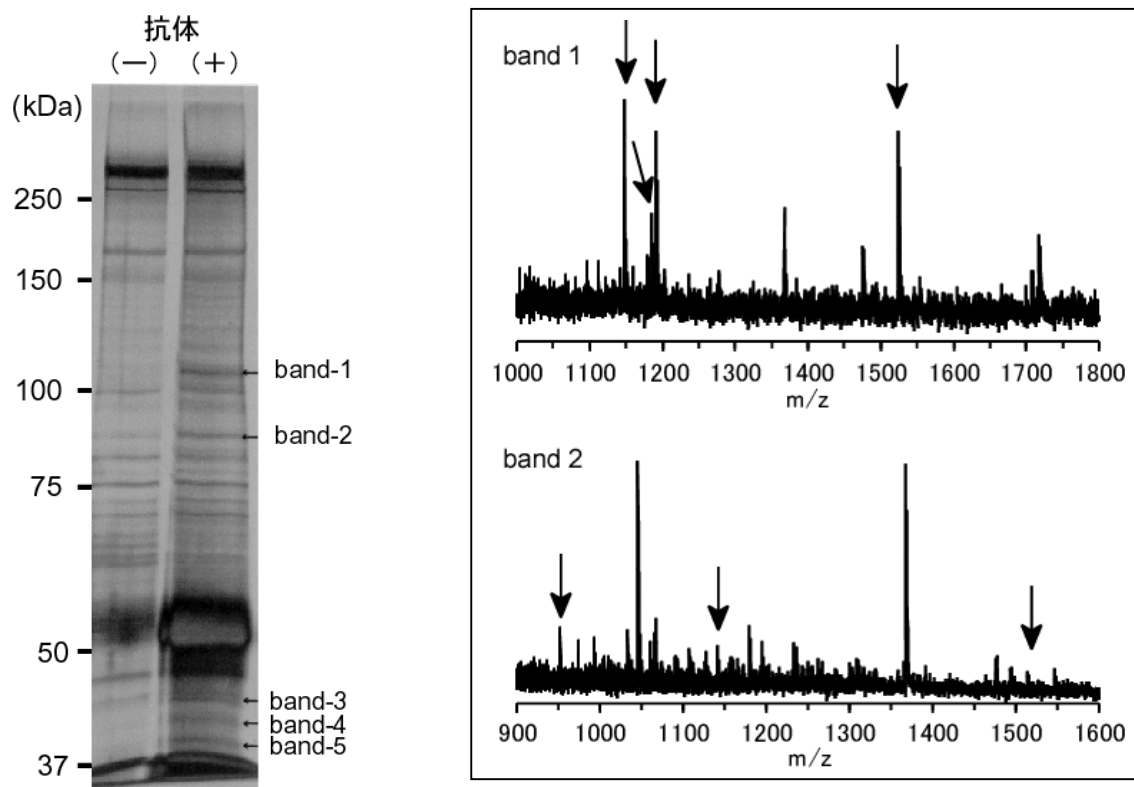
つかの化合物の活性を測定した。

和田グループ（大阪府立母子保健総合医療センター）

質量分析法を用いたプロテオーム解析によってダイオキシン受容体AhRの細胞内タンパク複合体を明らかにすることを目的として、AhR結合タンパク質群のプルダウンを2つの方法によって試みた。

まず、酵母細胞で実績のあるTAP（Tandem Affinity Purification）ベクターをヒト乳癌細胞株MCF7にトランスフェクトし、TAPタグに仕組んだ高純度精製のための配列（プロテインA配列、TEVプロテアーゼ認識配列、及び、カルモジュリン結合ペプチド配列）を利用して精製することを試みた。トランスフェクタントでは、TAPベクターの発現は認められるものの、非特異結合およびTEVプロテアーゼの切断効率が低いため、結合タンパクを同定するに至らなかった。TAPタグの配列が哺乳類細胞では非特異結合を起こしやすいためと考えられた。

一方、ヒト肝癌細胞株HepG2ライセートに対して、抗AhR抗体とプロテインA固相化セファロースを加えることで、単純に精製する方法では、非特異結合や免疫グロブリンの混入を避けたいが、抗体あり／なしの結果を比較することにより、細胞内で結合している可能性のあるタンパクのリストを作成することができた。90mmディッシュ20枚の細胞を材料として得られたタンパクを電気泳動し、ペプチドマスフィンガープリントを行った結果、AhR（band-1）、HSP90 β （band-2）を確認した。ゲル上に得られたこれらのタンパク量は10-20ng（約100 fmol）と推定された、今後、免疫グロブリンとの重なりを避け、50kD以下の分子の同定を容易にするために二次元電気泳動を行う予定である。



上野グループ（大日本除虫菊（株）中央研究所）

[研究目的]

除虫菊の有効殺虫性成分であるピレトリンをリード化合物とする合成化学物質のいくつかについてはすでに内分泌かく乱作用の疑いがかけられている。したがって、自然界から内分泌かく乱作用を示さない殺虫性リード化合物を発見することが期待されている。

1. そのためには、環境中で化学物質が生物の生殖作用に及ぼす影響を簡便に予測・検出する生物検定法の開発

2. ピレスロイドに代わる新規天然殺虫成分の探索

が求められている。

[研究方法]

上記1. については、環境における化学物質の内分泌かく乱作用を的確に検定できる生物検定法の確立を目指して、大阪府立大学の東條元昭助手の協力を得て、平成13年度から引続き藻菌類の遊走子の走化性に及ぼす化学物質の影響を定量的に評価する方法についてさらに検討をすすめた。

また、上記2. については、アカイエカの幼虫(ボウフラ)を用いて、植物から天然殺虫成分を見出して、1の生物検定法を用いて、植物殺虫成分の内分泌かく乱作用を示さない殺虫性天然化学物質の探索に着手して、新規植物性天然殺虫成分を見出した。

[研究の結論と結果]

ここに見出された新規殺虫成分の有効成分は数種のアлкаロイドの混合物であるが、各アルカロイドを液体クロマトグラフィーを用いて大量に精製・単離中である。

この新規天然殺虫成分は応用面も含めて非常に有望視されるので、今後、単離された各成分アルカロイドの構造を決定するとともに、殺虫作用の発現機構について検討を加える。

3. 研究実施体制

交久瀬グループ

① 研究分担グループ長：交久瀬 五雄（大阪大学大学院理学研究科、教授）

② 研究項目：質量分析法による内分泌かく乱物質の高感度測定

赤松グループ

① 研究分担グループ長：赤松 美紀（京都大学大学院農学研究科、助教授）

② 研究項目：DDT類縁体および代謝物のホルモン受容体結合活性

和田グループ

① 究分担グループ長：和田 芳直（大阪府立母子保健総合医療センター、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 研究項目：ダイオキシン受容体(AhR)関連分子の高感度プロテオーム解析

上野グループ

① 究分担グループ長：上野 民夫（大日本除虫菊（株）中央研究所、顧問）

- ② 研究項目：環境中で化学物質が生物の生殖作用に及ぼす影響を簡単に予測・検出する生物検定法の開発とピレスロイドに代わる新規天然殺虫剤成分の探索

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Wada Y, Kadoya M. “In-gel digestion with endoproteinase LysC” J Mass Spectrom, 38, 117-118 (2003)
- Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. “Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), placental growth factor (PlGF), and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathological conditions.” Hum Pathol, 33(11):1069-1077 (2002)
- Kaneko R, Wada Y. “Mass spectrometric features of S-nitrosylated peptides” J Mass Spectrom Soc Jpn, 50, 223-225 (2002)
- Wada Y. “Advanced analytical methods for hemoglobin variants” J Chromatogr B, 781, 291-301 (2002)
- Ihara Y, Yasuoka C, Kageyama K, Wada Y, Kondo T. “Tyrosine Phosphorylation of Clathrin Heavy Chain under Oxidative Stress.” Biochem Biophys Res Commun, 297, 353-360 (2002)
- Kumazaki K, Ozono K, Yahara T, Wada Y, Suehara N, Takeuchi M, Nakayama M. “Detection of cytomegalovirus DNA in human placenta” J Med Virol, 68, 363-369 (2002)
- Honke K, Hirahara Y, Dupree J, Suzuki K, Popko B, Fukushima K, Fukushima J, Nagasawa T, Yoshida N, Wada Y, Taniguchi N. “Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids” Proc Nat Acad Sci USA, 99, 4227-4232 (2002)
- Kumazaki K, Nakayama M, Sumida Y, Ozono K, Mushiake S, Suehara N, Wada Y, Fujimura M. “Placental features in preterm infants with periventricular leukomalacia” Pediatrics, 109, 650-655 (2002)

（2）特許出願

H14年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：1件）