

「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15年度も交久瀬、赤松、和田、上野の4つのグループで研究を進めた。交久瀬グループではズームレンズ系の動作確認を行った。続いて、ステアリン酸メチルを用いて位置検出器を使った場合の感度を求め、スリット系での感度に比べて約十倍程度向上したことを確認した。赤松グループではDDT類縁体metoxychlor代謝物の片方がOH基になった化合物についてエストロゲン活性について検討した。また、DDT類縁体で代謝反応後の活性が元の化合物より大きい7化合物についてエストロゲン活性について検討した。和田グループでは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の細胞内蛋白複合体を明らかにするためにAhR複合蛋白質群のプロテオーム解析を引き続き行った。上野グループでは内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分の探索を行った。引き続き周種の化合物について質量分析計等を使って構造を決定する予定である。

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)

位置検出器を使ったイオン検出では、質量分散が一定なら、一定の範囲の質量しか検出できない。ある範囲を詳しく見るためには質量分散係数を大きくする必要が生じるし、全体を見渡すには質量分散を小さくして多数のピークを同時に観測する必要がある。この目的のために磁場出口の直近にズームレンズ系を挿入した。一般にイオンのフォーカス面の並び(面)は図1aのように湾曲していて位置検出器の面と一致しない。そこで8重極レンズと6重極レンズを用いてフォーカス面を平面にし、しかも位置検出器と一致させることが必要になる(図1c参照)8重極レンズではフォーカス面を平面にすることができる(図1b参照)。6重極レンズではフォーカス面を回転することができる。そこで8重極と6重極レンズの電圧を調整してフォーカス面を位置検出器と一致させることができる。この技術は2つ以上のコレクターを使う(ダブルコレクター方式)同位体測定にも応用できる。質量分散を調整して2つのピーク位置を正確にコレクターの位置に持って行くことができる。フォーカス面調整は電氣的に行えるので、機械的にコレクターを

ピーク位置に持って行くより遙かに簡単である。図2はXeの異なる分散係数の時のスペクトルである。

標準物質としてステアリン酸メチルを使って質量分析計の感度測定を行った。ガスクロマトグラフは120℃より30℃毎分の昇温速度で300℃まで温度を上げた。ステアリン酸メチルは4.6分のところで出現した。図3はスリット系での較正線である。磁場は50-310uまでを0.1秒でスキャンした。10pg/ μ lまでは直線性良く検量線が求まった。スキャン範囲を狭くすると感度は良くなる。図4は位置検出器を用いたときの検量線である。1pg/ μ lまでの感度はあった。現在CCD出力にスパイク状のノイズが乗っているために1pg/ μ l以下では良いS/N比での測定が困難である。現在その原因を追及している。現在のところ、位置検出器を用いるとスリット系に比べて検出感度は10倍程度向上することが分かった。

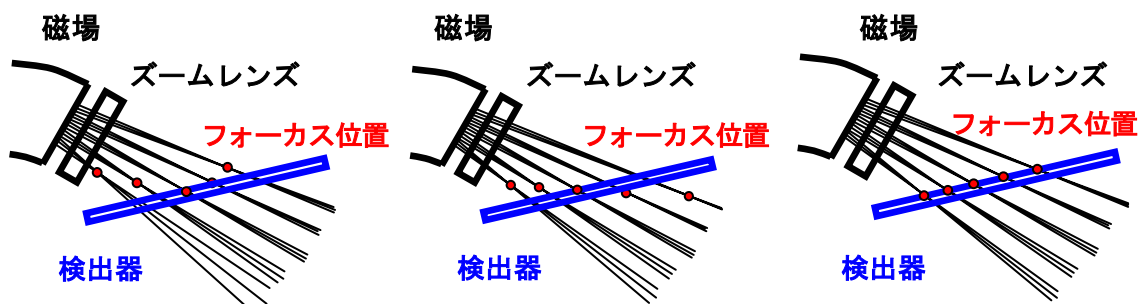


図1a オクタポールとヘキサポールに電圧をかけない場合

図1b オクタポールに適当な電圧をかけて、フォーカス面を一直線にする

図1c ヘキサポールによりフォーカス面を回転させ位置検出器上にフォーカス面を持つてくる

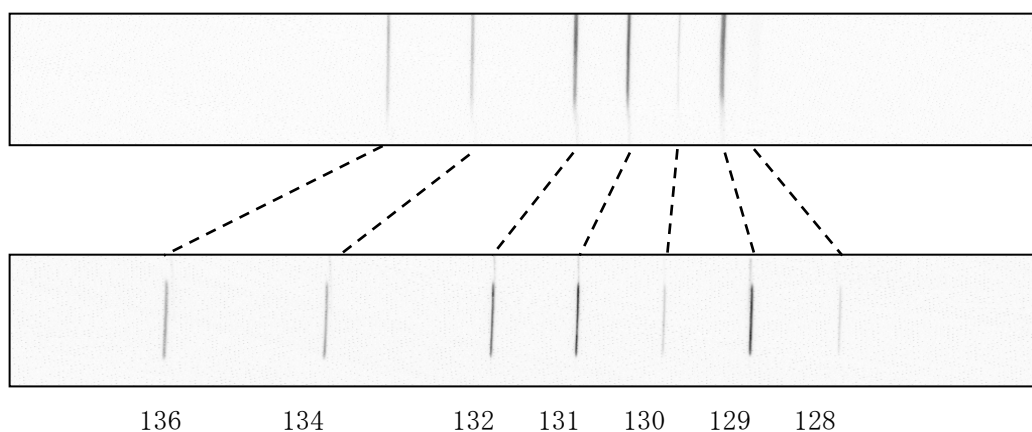


図2 異なった質量分散でのXeスペクトル

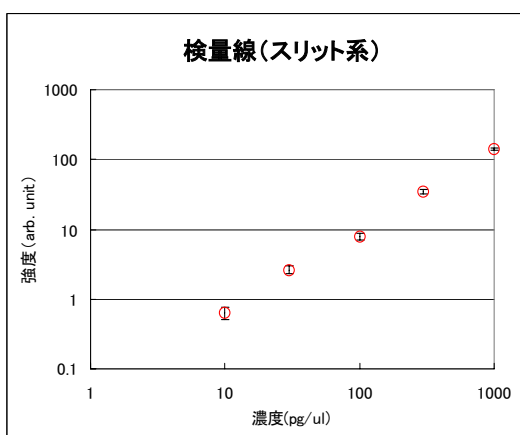


図3 スリット検出器での感度(校正線)

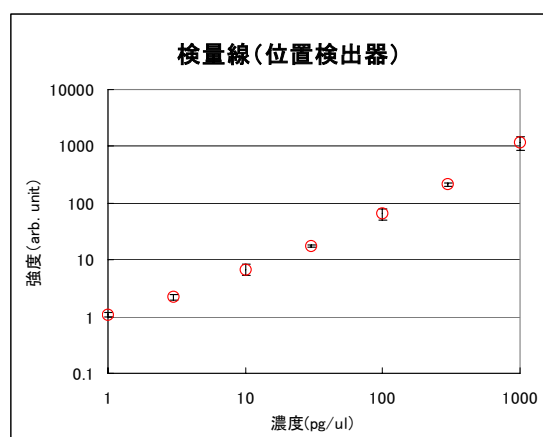


図4 位置検出器の校正線

赤松グループ（京都大学大学院農学研究科）

今年度は、DDT類縁体の中でも高いエストロゲン受容体結合活性を示したmethoxychlor代謝物の一つである、片方のmethoxy基がOH基に代謝された化合物（mono-OH-MTX）について詳細に検討を行った。Mono-OH-MTXには不斉炭素があり、光学活性のR-、S-体が存在する。哺乳動物の代謝酵素は異なる割合でそれぞれの光学異性体を生成するため、それぞれの異性体の活性を求めることは重要である。そこで、mono-OH-MTXのラセミ体からそれぞれの光学異性体を分離し、エストロゲン受容体結合活性を測定した。その結果、S-体がR-体に比べ約3倍高活性であることが分かった。ヒト肝を用いた代謝実験ではS-体が優先的に生成していることが報告されていることから、生体内ではラセミ体を用いて予測されるよりも高活性を示す可能性のあることが示唆された。また、両方のmethoxy基がOH基に代謝された化合物（Bis-OH-MTX）の活性も測定したところ、この化合物はmono-OH-MTXのS-体よりやや高い活性を示した。

また、DDT類縁体の中で、代謝反応後の混合物の活性が元化合物よりも増大した7化合物（化合物の骨格構造は異なるが、いずれも2個のベンゼン環置換基としてmethoxy基あるいはethoxy基を有している。）に焦点を当て、推定代謝物である片方のalkoxy基がOH基に代謝された化合物（mono-OH体）および両方のalkoxy基がOH基に代謝された化合物（bis-OH体）について検討した。具体的には、これらの推定代謝物を化学合成し、そのエストロゲン受容体結合活性を測定した。その結果、いずれもBis-OH-MTXの数分の1～10分の1程度の活性を示し、これらの化合物が代謝混合物中の活性本体の一つであることが示された。特に骨格に三員環構造を有する化合物は比較的低活性であったが、これは骨格構造が他の化合物に比べてよりかさ高いため、化合物とエストロゲン受容体との相互作用エネルギーが低下したことに起因するものと思われた。さらに、既設の質量分析装置によるDDT類縁体代謝物のLC/MS分析条件を確立した。

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ロテオーム解析を継続した。

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によって細胞内分子に結合する複合体の高度精製をめざすTAP（Tandem Affinity Purification）ベクターにAhRを組み込んで、ヒト乳癌細胞株MCF7で構成的に発現させた系では、プロテインAへの非特異結合蛋白とTEVプロテアーゼの切断不良を解決するさまざまな手段を講じたが、解決には至らなかった。ただ、AhR細胞内分子複合体のなかにHSP70が存在する可能性が示唆された。現在、TAPとは異なるタグを作成中である。

ヒト肝癌細胞株HepG2ライセートから抗AhR抗体によって単純に免疫沈降精製する方法では、抗体あり／なしの結果を比較することにより細胞内でAhRに結合している可能性のあるタンパクを一次元電気泳動で検出し、ペプチドマスフィンガープリントで同定した。上記のタグを使用する方法と同様に、やはりHSP70の複数アイソフォームが同定された（図）。しかし、この方法では50kDa以下のタンパクの同定が難しく、上記のごとく作成中の改良タグによる結果との照合が必要である。

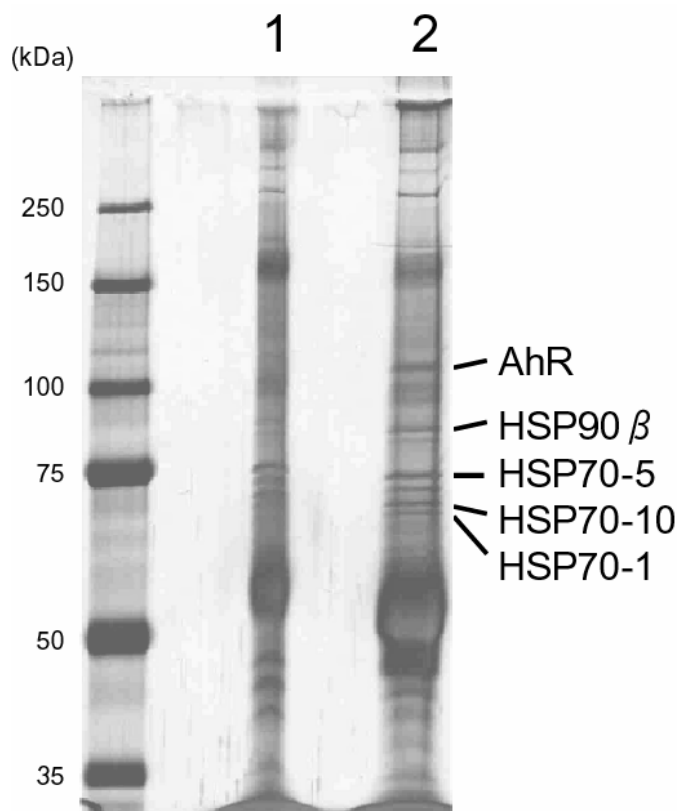


図 免疫沈降によるAhR蛋白およびその細胞内結合蛋白の検出
レーン1：抗体なし（コントロール）； レーン2：抗体あり

上野グループ（大日本除虫菊（株）中央研究所）

〔研究目的〕 「内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分の探索」

天然除虫菊が産生する殺虫成分ピレトリンをリードとする合成ピレスロイドのいくつかについては内分泌かく乱作用の疑いが指摘されているので、内分泌かく乱作用を示さない殺虫性天延リード化合物の発見に大きな期待が寄せられている。この目的を達成するために以下の研究テーマを掲げて研究を展開中である。

〔研究方法〕

1) 藻菌類をはじめとする糸状菌の配偶子とくに遊走子を用いた光学顕微鏡下での運動能力と挙動の観察に生物検定法を確立する。この方法は、複合成分からなる資料でも有効に提要できるので、実際の環境中の内分泌かく乱物質の分布を測定するための前試験として役立つものと確信している。

2) 内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分の探索して単離して構造を確定する。

3) 天然および合成ピレスロイドと探索中の新規天然殺虫成分の環境での挙動を追跡するために、GC/MSおよびLC/MSを主体とする微量分析法を確立する。

〔研究の結果〕

平成14年度研究実施報告書に記載したように、上記1)の生物検定法については、estriol、estrone、 17α -estradiol、 17β -estradiol、bisphenol Aと5種の合成ピレスロイドを用いてこの検定法の有用性について検討を加えて、本検定法が内分泌かく乱作用の観即には有効に適応できることを確認した。

この結果をふまえて、本生物検定法とボウフラを用いた生物試験の結果、本分担研究課題である上記2)「内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分」としてある特定の植物の生葉がニコチンより殺虫活性の高いアルカロイドを含有することを新たに見出した。平成15年度にはその結果、大量の本植物種を採集して、その茎部、葉部よりいく種かの殺虫成分を単離した。

一方、上記3)については、天然および多数の合成ピレスロイドに対して、GC/MSによりEIスペクトルを測定し、いかに示す特性イオンが一般に出現することを認めた。これらの特性イオンは天然および多数の合成ピレスロイドの定性・定量分析に際して極めて有効な情報を与えるものと確信する。

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：高感度ガスクロマト質量分析計の検量線の決定と試料測定

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：内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分の探索

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

- M. Ishihara, T. Toyoda, H. Sakae, T. Ichihara, I. Katakuse, Development of GC-MS System with an Array Detector System for Endocrine Disruptor Analysis, *Environmental Science*, 11, 1, 2004, 15-24
- Miyashita, M., Shimada, T., Nakagami, S., Kurihara, N., Miyagawa, H. and Akamatsu, M.: Enantioselective Recognition of Mono-demethylated methoxychlor metabolites by the estrogen receptor, *Chemosphere*, **54**, 1273-1276 (2004).
- Ogita K, Kimura T, Nakamura H, Koyama S, Tsjiie T, Tomiie M, Tsutsui T, Shimoya K, Wada Y, Koyama M, Nomura S, Murata Y. "Differential expression and localization of decorin in human choriodecidual membrane during preterm and term pregnancy" *Am J Reprod Immunol* 51, 204-210 (2004)
- Ido H, Harada K, Futaki S, Hayashi Y, Nishiuchi R, Natsuka Y, Li S, Wada Y, Combs AC, Ervasti JM, Sekiguchi K. "Molecular Dissection of the α -Dystroglycan- and Integrin-binding Sites within the Globular Domain of Human Laminin-10" *J Biol Chem* 279, 10946-10954 (2004)
- Wada Y, Nakano N. "Technical Aspects of Gel-Based Proteomics Designed for Elucidating an Aryl Hydrocarbon Receptor Complex" *Env. Sci.* 11, 25-31 (2004)
- Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. "Immunohistochemical distribution of toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas for normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis" *Hum Pathol* 35, 47-54 (2004)
- Hirahara Y, Bansal R, Honke K, Ikenaka K, Wada Y. "Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: development in sulfatide-null mice" *GLIA* 45:269 - 277 (2004)
- 和田芳直、フォスファチジルセリン露出と補体—抗リン脂質抗体とアポトーシス—、

Annual Review 免疫2004、pp277-283中外医学社

- Nishiuchi R, Murayama O, Fujiwara H, Gu J, Kawakami T, Aimoto S, Wada Y, Sekiguchi K. "Characterization of the ligand-binding specificities of integrin alpha3beta1 and alpha6beta1 using a panel of purified laminin isoforms containing distinct alpha chains" J Biochem (Tokyo). 134:497-504, 2003
- 和田芳直、MSによるゲノム解析の基礎 - SNPを中心として - J Mass Spectrom Soc Jpn 51, 368-373, 2003
- Kaneko R, Wada Y. "Decomposition of protein nitrosothiols in matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry" J. Mass Spectrom. 38, 526-530 (2003)
- Wada Y, Kadoya M. "In-gel digestion with endoproteinase LysC" J Mass Spectrom, 38, 117-118 (2003)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件 (CREST研究期間累積件数：1件)