「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１６年度は交久瀬、和田、赤松の３研究グループで研究を進めた。交久瀬グループでは主にＣＣＤ検出回路計のノイズ除去を行った。平成１５年度で、ステアリン酸メチルを用いてスリット系検出器の検出感度は市販の装置と同程度であることを確認した後、ＣＣＤ検出器を用いて感度向上を図ったが、ＣＣＤ検出器のノイズのため当初目指していた感度に達しなかった。ＣＣＤ検出器のノイズ除去の結果1pg/μl以下で良好なS/N比で測定できるようになった。赤松グループではメトキシクロルの代表的な第Ⅱ相代謝生成物である硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体を数種合成し、ELISAを用いた方法により、それらのエストロゲン受容体結合活性を測定した。その結果、合成した抱合体はすべて、著しい低活性を示した。和田グループではAhR複合体の網羅的解析を行うため、FlagHAタグをAhRに付加させレンチウイルスベクターを用いてHepG2細胞へ遺伝子導入を行い、発現させたFlagHA-AhRが内在性のAhRと同様の機能性を保持することを確認した。さらにHepG2細胞においてAhR複合体のプロファイリングを行った結果、リガンド非存在下でのAhR複合体メンバーであるHsP90やXAP2の他にも幾つかの候補分子を同定することができた。

2.研究実施内容

<u>交久瀬グループ（大阪大学大学院理学研究科）</u>

「位置検出器のノイズ処理と装置の操作性の向上」

１５年度において、完成したガスクロマト質量分析計のスリット系を用いた感度は標準物質ステアリン酸メチルを用いて実測すると市販の質量分析計と同程度である事を確認した。また、CCDを用位置検出器では感度はスリット系に比べて10-100倍程度であることが確認された。理論上はもっと感度がよくなるはずである。この原因はCCDからの出力に周期的ノイズが乗っているためにバックグラウンドが高くなっている為である。CCD回路を質量分析計の制御回路から独立させ、ノイズを除去した。その結果、1pg/μl のステアリン酸メチルで十分なS/N比が得られた。この作業に時間を取られた結果、装置の調整、データ処理のコンピュー化の開発は当初の目標の開発はできなかった。

赤松グループ（京都大学大学院農学研究科）

「DDT類縁体および代謝物のホルモン受容体結合活性」

内分泌かく乱作用を示す疑いのある化合物の中には、その代謝物や関連混在物の方がより高いホルモン受容体結合活性を示すと報告されているものも存在する。DDT類縁体であるメトキシクロルの代謝物は、その例である。

これまでの研究において、赤松らのグループでは、DDT類縁体を合成し、それらの化合物およびそのラット肝S-9による代謝混合物のホルモン受容体結合活性を測定してきた。また、予想されるメトキシクロルの第I相代謝生成物を合成し、その活性を測定してきた。今年度は、昨年度までの第I相代謝生成物の活性測定に引き続きメトキシクロルの代表的な第Ⅱ相代謝生成物である硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体を数種合成し、ELISAを用いた方法により、それらのエストロゲン受容体結合活性を測定した。その結果、合成した抱合体はすべて第I相代謝生成物に比較して、著しい低活性を示した。また、DDT類縁体代謝物の構造決定を行うため，代謝物が効率よく生成するような代謝反応条件の検討を行い、その条件を確立した。既存の質量分析装置（LC/MS）を用いて生成した代謝物の分析を行ったところ、代謝物のMSピークを得ることは可能であったが、分析感度はあまり高くなく、効率的に構造決定を行うためにはさらなる高感度が必要であることがわかった。今後，他研究室所蔵の質量分析計（GC/MS）を用いてDDT類縁体およびその代謝物の構造解析を行う予定である。

和田グループ（大阪府立母子保健総合医療センター）

「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」

内分泌かく乱物質が生物活性を発揮し細胞機能（phenotype）に影響を与える（かく乱する）には受容体への結合が必須である。このグループでは、ダイオキシン受容体(AhR)が細胞内で転写活性を発揮するために必要な蛋白複合体の静的動的プロファイリングをめざし、これまでに電気泳動ゲル分離をベースとするプロテオーム解析技術に関して視覚的感度限界である１ナノグラムを検出できるまで高感度化させてきた。

AhR複合体の網羅的解析を行うためにFlagHAタグをAhRに付加させレンチウイルスベクターを用いてHepG2細胞へ遺伝子導入を行った。発現させたFlagHA-AhRが内在性のAhRと同様の機能性を保持することを確認し、平行して抗FLAG抗体を用いたAhR複合体の精製系を確立した。さらにHepG2細胞においてAhR複合体のプロファイリングを行った結果、リガンド非存在下でのAhR複合体メンバーであるHsP90やXAP2の他にも幾つかの候補分子を同定することができた。

今年度はこれまでの研究で同定してきた候補分子に関して、細胞内でのAhRへの会合を検証するとともに、リガンド結合後の受容体核内移行・転写活性に対する影響や複合体構成蛋白メンバーの再構成についても明らかにする。

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：高感度質量分析計の開発

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 研究分担グループ長：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(連携)、教授）

② 研究項目：ダイオキシン受容体関連分子のプロテオーム解析

4.主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

○ Daisuke Okumura, Michisato Toyoda, Morio Ishihara and Itsuo Katakuse, Application of a Multi-Turn Time-of-Flight Mass Spectrometer, MULTUM II', to organic compounds ionized by MALDI, J. Mass. Spectrom. 39, 86-90(2004)

○ Daisuke OKUMURA*, Michisato TOYODA, Morio ISHIHARA and Itsuo KATAKUSE,A compact sector-type multi-turn Time-of-Flight Mass Spectrometer 'MULTUM II', Nucl. Instrum. Meth. 519/1-2, 331-337 (2004)

○ Miyashita, M., Shimada, T., Miyagawa, H., and Akamatsu, M.: Surface plasmon resonance-based immunoassay for 17β-estradiol and its application to the measurement of estrogen receptor-binding activity. Anal. Bioanal. Chem. 381, 666-673 (2005).

○ Okuno S, Nakano M, Matsubayashi GE, Arakawa R, Wada Y. ″Reduction of organic dyes in matrix-assisted laser desorption/ionization and desorption/ionization on porous silicon.″ Rapid Commun Mass Spectrom. 18, 2811-2817 (2004)

○ Wada Y, Tajiri M, Yoshida S.″ Hydrophilic Affinity Isolation and MALDI Multiple-Stage Tandem Mass Spectrometry of Glycopeptides for Glycoproteomics.″ Anal Chem. 76, 6560-6565, (2004)

○ Sekiya S, Wada Y, Tanaka K. "Improvement of the MS/MS fragment ion coverage of acidic residue-containing peptides by amidation with ^{15}N-substituted amine" Anal Chem 76, 5894-5902 (2004)

○ Nakano N, Higashiyama S, Ishiguro H, Taniguchi N, Wada Y. ″The N-terminal region of NTAK/neuregulin-2 isoforms has an inhibitory activity of angiogenesis″ J Biol Chem 279, 11465-11470 (2004)

○ Nishiuchi R, Sanzen N, Nada S, Sumida Y, Wada Y, Okada M, Takagi J, Hasegawa H, Sekiguchi K. ″Potentiation of the ligand-binding activity of integrin alpha3beta1 via association with tetraspanin CD151.″ Proc Natl Acad Sci U S A. 102, 1939-1944 (2005)

○ Ido H, Harada K, Futaki S, Hayashi Y, Nishiuchi R, Natsuka Y, Li S, Wada Y, Combs AC, M. Ervasti J, 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)

○ 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)

○ 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)

○ 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)

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：０件（CREST研究期間累積件数：１件）