

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

ゲノム創薬を支援する高感度分析・解析技術の開発・ 応用に関する研究

所 属 東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室
研究者 今井 一洋

分担研究者

- | | |
|----------------------|-----------------|
| (1) 東京大学大学院薬学系研究科 | 三田 智文、福島 健、角田 誠 |
| (2) 国立医薬品食品衛生研究所 | 林 譲 |
| (3) 昭和大学薬学部 | 前田 昌子 |
| (4) 東北大学大学院薬学研究科 | 後藤 順一 |
| (5) 静岡県立大学薬学部 | 豊岡 利正 |
| (6) 武田薬品工業（株）開拓第1研究所 | 北田 千恵子、石橋 祥弘 |
| (7) 三共（株）バイオメディカル研究所 | 春山 英幸 |
| (8) 第1製薬（株）創薬代謝研究所 | 須藤 賢一 |
| (9) 中外製薬（株）薬物動態研究所 | 河西 武彦 |
| (10) 杏林製薬（株）研究センター | 鳥海 千冬 |
| (11) 林純薬（株）品質管理部 | 岩上 猛 |
| (12) 日本分光（株）開発部 | 真砂 央 |

要旨

蛋白質や機能性生体ペプチドなどの微量高分子分析法の開発のため、生物発光・化学発光分析法、クロマトグラフ分析法、質量分析法を取り上げ、その高性能化を検討し、それらの応用も行った。又、投与薬物の生体系への影響を精査する系の検討も行った。

1. 研究目的

ゲノム創薬及びポストゲノム創薬の過程に於いては、ゲノム情報に基づき発現させた微量受容体蛋白質、或いは翻訳後修飾により生成した蛋白質や機能性生体ペプチドなどの極微量高分子、或いは生体への刺激応答に関与する機能性分子等の、精製法、分離法、検出・同定法及び微量定量法が必須である。しかし現在までのところその要求に応えられる高い技術は開発されていない。そこでそれに代るべく高感度且つ簡便な分析・解析技術の開発・応用を行うことが本研究の目的である。

又、ゲノム創薬及びポストゲノム創薬によって創製された拮抗薬などの薬物分子の体内動態解析のための高感度分析技術も、従来にもまして必要とされる状況にある。そこでこれらの開発を行い、これら技術の評価法の確立・普及を行うことも目的とする。

更に、薬物の適正使用のためには、投与した薬物が生体系にどのような影響を及ぼすかを検討しておくことも重要な事項であると思われる。そこで、個体レベル並びに *in vitro* の系に於ける検討を行う。

本年度は以下のことを目的とした。

1-1. ベンゾフラザン蛍光試薬は長波長側に励起・蛍光波長を有するため、生体試料中の妨害物質の影響を受けにくく、誘導體化した目的対象物質の高感度検出が可能である。蛋白質、ペプチドの高感度定量のためのベンゾフラザン骨格を有する水溶性蛍光試薬の設計・合成ならびに応用を行う。これら試薬をインスリンに適用し HPLC を用いて高感度定量する方法を開発する。

1-2. 微量空間内に固定相を作製した分離法（キャピラリー電気クロマトグラフィー法、CEC）、及び固定相を利用しないマイクロチップを用いた分析法（マイクロチップ電気泳動法）の開発を行う。

1-3. 10^{-20} モルレベルの酵素活性測定が可能な生物発光検出酵素イムノアッセイ（BL-EIA）を、2成分同時検出イムノアッセイに応用するための検討を行う。

1-4. 蛋白質の機能解析のための LC/MS/MS、nanoLC/MS、MALDI-TOFMS 等の更なる高感度化を検討する。これらを用いて、リガンド刺激に応じてシグナル伝達に関連する分子複合体の局在化が生じることが報告されているカベオラ様膜ドメインの解析、デオキシコール酸刺激細胞内の蛋白質の変動の追求などを行う。

1-5. 創薬ターゲットとして有望な新規オーファンレセプターのリガンドを見つけ、その活性必須部位を特定したペプチドをリードとして高活性化並びに生体内安定化を図るため、各種誘導体の定量方法を確立する。

1-6. 抗体医薬品開発のため、抗体特有の機能である ADCC 活性（抗体依存性細胞障害活性）や CDC 活性（補体依存性細胞障害活性）の、機能部位ごとの生物活性（抗体の Fab 部分の抗原結合能と Fc 部分の免疫細胞活性化能）を分析することにより、生物活性に影響を与える構造変化部位の検索を行う。

1-7. 分析法の信頼性を表す指標である分析精度を、1 回の測定で算出する FUMI 理論を実用化すべく、 17α -hydroxyprogesterone の酵素免疫測定法である ELISA 法、並びにアセトアミノフェンの開発および製造の各段階における分析法に適用し評価する。

1-8. 薬物及び化学物質が生体系にどのような影響を及ぼすかを検討するため、血圧のホメオスタシスを維持する機能に関与するカテコールアミンの高感度分析計の開発を行い、各種薬物投与後のマウス血中ノルエピネフリン動態を検討する。in vitro の系では、蛍光偏光分析法を利用し、各種化学物質のエストロゲン受容体に対する簡易・迅速親和性解析法を確立する。そのための測定装置の高感度化も行う。

2. 研究方法

2-1. ベンゾフラザン骨格の 4 位側鎖にスルホン酸基を導入することにより、三種類の新規水溶性ベンゾフラザン発蛍光試薬（ES-ABD-F、*p*-BS-ABD-F 及び *m*-BS-ABD-F）を設計・合成し、これらを生理活性ペプチドの誘導体化に適用した後、HPLC 分離後、検出・定量した。又、カルボキシル基を有する化合物を分析対象とし、キャピラリー電気泳動レーザー励起蛍光検出（CE-LIF）法に適用可能な新規蛍光誘導体化試薬（NBD-PZ-NH₂）を開発した。これは蛍光団としてアルゴンレーザーの励起波長と一致する NBD 骨格、官能基のカルボキシル基と反応性の高いアミノ基、電荷部位としてさらに窒素原子を導入したものである。又、これを用い、CE-LIF 法により脂肪酸の分離・検出を行った。

ラット、マウスは 2 種のインスリンアイソマー（I 及び II 型）を有するため、これらを SBD-F にて誘導体化、HPLC にて高感度検出・定量するための検討を行った。

2-2. ゴル・ゲル法を用いて CEC 用の分離カラムを作製し、分離条件を変化させたときの溶質の溶出挙動の変化を調べることでカラムの分離特性を評価した。検出には紫外吸光、及びレーザー蛍光検出を用いた。

マイクロチップ電気泳動実験は、倒立型蛍光顕微鏡と電源とを組み合わせ制作した装置で行った。マイクロチップは i-チップ DNA を用いた。蛍光誘導体化したアミノ酸の溶出時間を異なった分離条

件で調べることで、アミノ酸分離の最適化を行った。505nm のダイクロイックミラーと 460-490nm の励起フィルターとを透過した水銀灯の光を i-チップの検出部に照射し、515nm の吸収フィルタを透過した発光を光電子増倍管に導入して検出した。

2-3. ATP 産生酵素である Acetate kinase (AK) と Pyruvate phosphate dikinase (PPDK) が異なる基質から ATP を産生すること、両酵素の反応条件がほぼ同一であることに着目し、AK と PPDK の高感度同時測定法の開発を行い、両酵素を標識酵素とする 2 成分同時検出イムノアッセイに応用した。本測定原理を用いて高血圧関連の生理活性物質であるアンジオテンシン I とエンドセリン-1 の同時検出 BL-EIA の確立も検討した。AK 及び PPDK の同時生物発光検出法では、第一に AK 活性を測定し、次いで PPDK 活性の測定を行った。第一段階では AK によりアセチルリン酸と ADP から ATP を産生させ、それをルシフェリン-ルシフェラーゼ反応により発光させた。

2-4. MS/MS のイオン化にはイオンスプレー又はターボイオンスプレー法を用いた。ペプチドは 13 種の 4~62 残基ペプチドを用い、蛋白質としては Thermolysin を用いた。

nanoLC/MS 解析システムの測定高感度化のため、nanoLC カラムからエレクトロスプレーチップまでの試料導入部の改良を行った。さらに二次元 nanoLC/MS システムの構築を行った。

又、インスリン刺激前後のカベオラ様膜ドメインを調製し、インスリンシグナル伝達に伴う蛋白質の局在化およびリン酸化の解析を行った。即ち、カベオラ様膜ドメイン中の膜蛋白質成分を nanoLC/MS あるいは二次元 nanoLC/MS で解析するとともに、リン酸化 Tyr 抗体を利用した免疫沈降法と組み合わせて蛋白質リン酸化の挙動をリガンド刺激の有無で解析を行った。

50 μ M のデオキシコール酸を添加した培養液を調製し、HeLa 細胞を 72 時間培養した。細胞分画して得られた試料を、二次元ゲル電気泳動法によりマップ化した。

翻訳後修飾を受けたリン酸化ペプチドは、セリン、トレオニン、チロシンの側鎖水酸基を介して結合したリン酸により、極端にイオン化効率が減少する。そこで、アルカリホスファターゼを用いたゲル内脱リン酸化条件を検討した。次に、リン酸結合部位を特定するため、カルボキシペプチダーゼまたはアミノペプチダーゼを用いるペプチドラダーシークエンス法の検討を行った。カラムとして逆相分配系 HPLC により各ペプチドピークを分取した後、それぞれにつき MALDI-TOFMS により分析し、リン酸化ペプチドを特定した。次いで先に確立した条件を用いて、リン酸化ペプチドを酵素水解し、ペプチドラダーを調製した。

2-5. 各種合成ペプチドをマウス、ラット、ヒトの血漿中に添加し、37°C で保持した。一定時間ごとに採取し、除蛋白処理等を行った後に LC/MS で定量した。体内代謝安定性を調べるために、各種合成ペプチドを生理食塩水に溶解、マウス又はラットに静脈内投与し、5 分後に断頭又は尾静脈より血液を採取した。これを先と同様に処理し定量した。

2-6. ADCC 活性を有する抗体及びその強制劣化品 (C6-60-2W 及び C7-60-2W) を用いた。抗体の Fab 部分の抗原結合能測定には BIACORE 1000 を使用した。抗体の Fc 部分の免疫細胞活性化能測定には THP-1 細胞 (IFN- γ 存在下で 48 時間培養し、活性化したもの) を用いた。培養後の細胞を遠心し、培養上清中の IL-8 量を IL-8 ELISA kit にて測定した。

2-7. 17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP) の IgG 抗体を固相化したプレートの各ウェルに標準 17-OHP 溶液、アルカリ性ホスファターゼ標識 17-OHP 溶液及び抗 17-OHP 抗血清溶液を加え 4°C で一夜放置した。プレートのウェルを洗浄・タッピング後、基質液として p-ニトロフェニルフォスフェート溶液を加え酵素反応を行い、405nm の吸収を測定した。精度 vs 吸光度の実験は、96 穴プレートをそれぞれ 1 回スキャンするという操作を 30 回行なった。競合 ELISA 法の測定値の相対標準偏差 (RSD) を記述する理論式を導いた。

アセトアミノフェンの純度試験は HPLC を用いて 1 日 6 回、7 日間、同一条件で行った。これら

のデータをクロマト解析ソフトを用いて解析し、くり返し測定によるピーク高さの標準偏差と FUMI 理論で求めたピーク高さの標準偏差を得た。これら標準偏差の信頼性を比較・検討した。

2-8. 本研究者は既に、血圧降下薬をラットに投与したとき、圧受容体反射を介して興奮した交感神経末端より血中に放出されるカテコールアミン量が、血圧降下度と良い相関を示すことを明らかにした。これをマウスのような小動物で同様の実験を行うために、セミマイクロカラムを用いるカテコールアミンの高性能分離を行い、分析計の高感度化を行った。更に、本法を薬物投与前後のマウス血中カテコールアミン動態の検索に適用し、その実用性を評価した。

化学物質の中にはエストロゲン受容体に結合し内分泌攪乱作用を有するものがある。蛍光偏光分析法を利用した簡便かつ迅速なそれらのスクリーニング法の開発を行った。エストロゲン受容体に対して高い親和性を有しかつ検出感度の高い蛍光標識エストラジオールを新規に合成し、最も高い親和性を示した蛍光標識エストラジオールを選択し研究に用いた。さらに、合成して得られた蛍光標識エストラジオールと各化合物とでエストロゲン受容体への結合を競合させ、得られた阻害曲線から各化学物質のエストロゲン受容体への親和性を算出した。

3. 研究成果

3-1. ES-ABD-F によるアンジオテンシン類、ブラジキニン及びサブスタンス P の蛍光誘導体は ODS カラムにより良好に分離された。*m*-BS-ABD-F を誘導体化試薬とし、ラット尿管より採取した尿中ブラジキニンの定量を試みたところ、陽イオン交換ならびに ODS カラムを組み合わせたカラムスイッチング HPLC を用いることにより定量でき、本法のバリデーションデータは直線性、回収率、再現性の全てについて良好であった。

NBD-PZ-NH₂ は縮合剤存在下、室温で脂肪酸と容易に反応した。生成した誘導体は、pH4 以上では蛍光団と窒素原子の間で動的消光が起きたが、pH3 以下の水溶液で強い蛍光性を示した。CE による分離では、窒素原子がプロトン化され、誘導体が強い蛍光性を示し分子全体が正電荷を有する pH3 以下で行うこととした。その泳動液に有機溶媒を添加し飽和脂肪酸の分離を検討したところ、炭素鎖 4 から 20 までの飽和脂肪酸を 8 分以内に一齐分離・検出することができた。検出限界は 6.5nM であり極めて高感度な検出が可能となった。

インスリンの酸化型チオール基を還元する条件について調べた結果、アルカリ性条件下 0.7 mM 以上の TCEP によって全ての酸化型チオール基を還元型チオール基にすることができた。SBD-F の反応には界面活性剤が必須であり、*n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DM)の添加により蛍光誘導体化が大きく促進された。HPLC ではラットの SBD 化インスリンアイソマー (I 及び II 型) の分離も可能となり、その検出限界は 2-3fmol (S/N=3) と高感度であった。そのため、ラット及びマウスのランゲルハンス島の single islet 中のインスリンアイソマーの定量が可能であり、その結果、ラットでは I 型が、マウスでは II 型が多く存在することが明らかとなった。

3-2. methacryloxypropyltrimethoxysilane (MPTMS)を塩酸で加水分解した後、トルエンとラジカル開始剤(Irgacure 1800)とを添加した溶液を、中空キャピラリー (内径 75 μ m) に充填し、紫外光 (350nm)を 20 分間照射することで固定相が形成されていた。

市販 HPLC 用充填剤 ((S)-*N*-3,5-dinitrobenzoyl-1-naphthylglycine を化学修飾した粒径 5 μ m の球形アミノプロピルシリカ粒子) を中空キャピラリー (内径 75 μ m) に充填し、光学分割用カラムを調製した。これを用いて、NBD-Fで標識化したアミノ酸の光学分割を試みた結果、16種類のNBD-アミノ酸が、分離度 1.21 から 8.29 の範囲で光学分割された。

製作コスト、物理的な耐久性等の点で優れているアクリル製マイクロチップで NBD-アミノ酸の分離を試みた。移動相に 5%のアセトニトリルを含む 5mM リン酸緩衝液を用いることで6種の NBD-アミノ酸 (アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、セリン、テアニン) が約 3 分で分離された。この分析条件では、蛍光誘導体化される官能基 (アミノ基、チオール基、フェノール性水酸基等) を有し、pH5.5 の移動相条件で負の電荷を有する溶質のみが分離、検出されるため、

優れた分析法であると考えられる。

3-3. 種々の条件検討を行った結果、第 1 段階の AK の測定は、共存する PPKK の影響はみられず単独測定と同様な感度（最少検出感度 1.02×10^{-20} mol/assay, CV=4.0-5.2%, n=8）が得られた。PPKK の検出感度は単独測定と同様な結果（最少検出感度 2.05×10^{-20} mol/assay, CV=1.6-5.7%, n=8）が得られた。

インスリンと C-ペプチドの両成分とも非競合法による免疫反応の後、C-ペプチドは AK により、インスリンは PPKK によりそれぞれ検出し、測定したところ、C-ペプチドは検出限界が 3.0×10^{-16} mol/assay (mean+3SD) であり、インスリンは 9.9×10^{-17} mol/assay (mean+3SD) であった。日内同時再現性も C ペプチドで 1.9-6.7%、インスリンは 2.9-5.8% (CV%, n=8) と良好な結果を得た。また日間再現性は C-ペプチドが 14.4-25.9%、インスリンが 9.4-25.1% (CV%, n=4) であった。この結果は日常分析法と比較して、ともに約 10 倍高感度であった。

3-4. ESI/MS によりペプチド（4~62 残基；分子量約 500~7000）の分子量にほぼ相関した価数の多価イオンが認められた。最大強度を示す多価イオンをプリカーサーイオンとし、衝突活性化により分解生成したプロダクトイオンを検出して 1000~1 nM の濃度範囲で検量線を作成した。その結果、感度の高いペプチドでは、定量限界として 1 nM(10 fmol)が得られた。Thermolysin の ESI マススペクトルでは多数のピークが確認されたが、最大強度を示したのは 28 価のイオン (m/z 1227.1) であった。Thermolysin の溶出はカラム温度 20~50°C の範囲で、温度の上昇とともにピーク幅は減少したが、保持時間はほとんど変化しなかった。

高感度化 nanoLC/MS 解析システムの、ゲル分離を介さない直接蛋白質解析への応用するため、マウスの肝臓上清画分を、還元アルキル化後プロテアーゼ処理を行い、消化物を直接 nanoLC/MS へ導入し解析を行った。しかし、ペプチドとして回収されてはいるものの、同一時間に溶出するペプチドの数が多すぎるため MS/MS 測定時間が足りず、その結果、ペプチドの MS/MS 測定が行われずに同定できなかった蛋白質が数多くあることが示唆された。そこで、強カチオン性イオン交換充填剤と逆相充填剤をタンデムに詰めた 2D-tip column の作成を行ったが、更にペプチドの分離能を向上させる等の検討が必要であった。

インスリン受容体を発現した CHO 細胞からインスリン刺激の有無でカベオラ様膜ドメインの調製を行なった。得られた膜蛋白質成分は可溶化後、酵素消化し nanoLC/MS 解析によるダイレクトプロテオミクスの方法により蛋白質のプロファイル分析を試みたが、膜画分中に含まれる脂質などの夾雑物の影響のためかデータの取得ができなかった。

二次元ゲル電気泳動法を用いて分離したスポット中に含まれる蛋白質を、トリプシンを用いるゲル内消化法により、ペプチドに断片化した。得られたペプチドフラグメント混合物を、マトリックスとして α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸 (α -CHCA) を用いるマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-TOFMS) により、ペプチドマスマッピングに付した。その結果、19 個のスポットから調製した試料で良好なマススペクトルが得られ、それらをデータベース検索したところ、それらすべてを同定することができた。

デオキシコール酸添加により、発現が顕著に増大した蛋白質は、酸化ストレスに関与するペルオキシレドキシニン I であることが判明した。このリン酸化部位を調べるために、アルカリホスファターゼによるペプチドラダー法を検討したところ、アルカリホスファターゼによる酵素消化を行わない場合と比較して、リン酸 1 分子に相当する 80 マスユニットのシフトが確認され、リン酸化ペプチドの特定が可能であることが判明した。

3-5. 癌転移抑制活性を持つ Metastin の活性部位を中心とした小分子化に成功し、安定性向上が期待できた。

3-6. pH6 及び pH7 で劣化させた抗体 (C6-60-2W 及び C7-60-2W) の ADCC 活性は、pH6 で著しい

活性の低下が認められ、monomer 抗体の抗原結合能は C7-60-2W で低下が起きていることが示された。強制劣化抗体は Fc 部位の活性も低下していることが判った。ADCC 活性の強さは、標準品 (99A01) >C7-60-2W>C6-60-2W であったと同様に、Fc 部位の活性も 99A01>C7-60-2W>C6-60-2W であった。抗体の構造を考慮すると C6-60-2W では Fc 部位の構造が C7-60-2W よりも変化している可能性が高いと考えられた。

3-7. 本研究では、1 回の測定で、ピペット誤差と測定の誤差から 17α -hydroxyprogesterone を対象とした競合 ELISA 法の精度を予測した結果、理論と実験は良く一致した。

アセトアミノフェンのくり返し測定を 1 日に 6 回行ない、1 つの SD 推定値を得た。一方、FUMI 理論では、1 つのクロマトグラム (または 1 回の測定) から 1 つの SD 推定値を得た。その結果、SD 推定値のバラツキは、その求め方に依らず、カイ 2 乗分布が示すバラツキにほぼ一致することが判明した。

3-8. カテコールアミン分析計のセミマイクロ化を行い最適化を行った結果、従来法の 3 倍以上の高感度化が達成され、必要血漿量は $10\mu\text{l}$ とすることができた。本法を用いることにより、これまで困難であったマウス血漿中カテコールアミンの定量が可能となった。更に、降圧薬 (ミノキシジル) 投与時の血中カテコールアミン濃度の増加を捉えることが出来た。

励起蛍光波長が長波長であり水中でも強い蛍光を発する蛍光物質として種々の蛍光物質を検討した結果、フルオレセインが最も優れていた。 17α 位に蛍光標識したエストロゲンはエストロゲンレセプターと高い親和性を有することが明らかになった。エストロゲンレセプターと相互作用することが報告されている種々の化学物質を用いて、標識化エストロゲンとの競合実験により IC50 を求めた結果、本研究でも既報とほぼ同等の値が得られることが明らかになった。

装置の高感度化については、測定方式は強度変調方式とすること、光源は青色フォトダイオードとし、フィルタを併用すること、ロックインアンプの小型化し内蔵すること、溶媒(水)ラマン補正機能を持たせること、などの改良すべき点が明らかとなった。

4. 考 察

4-1. 本研究で合成した水溶性蛍光試薬の ES-ABD-F と *m*-BS-ABD-F は、既存の蛍光試薬 DBD-F と同等またはそれより高感度を示し、これらの試薬がペプチドの高感度定量に有用であることが確認できた。*m*-BS-ABD-F を使用することにより SD ラットの尿中ブラジキニンが定量でき、定量値は ELISA 法による報告値とよく一致した。このような水溶性蛍光誘導体化試薬を用いる HPLC-蛍光検出系は生理活性ペプチドの高感度定量法として有用であろう。

NBD-PZ-NH₂ はキャピラリー電気泳動用試薬として使用可能であり、今後、カルボキシル基を有する生体分子あるいは薬物の高感度分析に繁用されると思われる。

本研究により開発されたインスリンの分別定量法は、ラット・ランゲルハンス島の single islet におけるインスリンの分別定量が可能であり、今後応用面での展開が期待される。

4-2. 光重合反応を利用することで微小空間内に簡便かつ再現性良く、逆相分配能と光学分割能を有する分離カラムをそれぞれ作製出来ることが分かった。このような固定相調製法はマイクロチップ用固定相の作製法としての応用が期待される。

4-3. C-ペプチド及びインスリンともに、従来の蛍光酵素免疫測定法 (アルカリホスファターゼと 4-メチルウンベリフェルリン酸の反応により生じた蛍光物質を検出する測定法) により得られた値と良好な相関を示したため、本法の今後の応用が期待される。

4-4. 各ペプチドから生じる多価イオンを用いて高感度 (10 fmol 以下) に定量できる可能性が示唆されたことにより、蛋白質消化反応に定量性を持たせれば、LC-ESI/MS/MS による蛋白質の高感度定

量も可能であると考えられた。

細胞分画法及び硫安分画法の二次元ゲル電気泳動法との組み合わせは、デオキシコール酸を用いる刺激培養細胞内変動蛋白質の解析に応用したところ、酸化ストレスに関与するペルオキシレドキシン I を同定できたことから、蛋白質のマッピングに有用であることが明らかとなった。

リン酸化部位の同定法として、ペプチダーゼを用いるラダーシークエンス法を検討し、これが結合部位の解析に有用であることが判明した。本法は、負イオン検出モードで測定することでリン酸化ペプチドを感度よく検出できることも示唆された。本法をペルオキシレドキシン I に適用することで、そのリン酸化を質的・量的に解析できるものと期待できる。

4-5. 合成ペプチドの体内安定性を高める研究の支援に LC/MS 定量を実施した。現状の活性誘導体ではこの方法で定量できるが、さらに活性が向上したときにはより高感度の検出が必要となる。

4-6. 抗体の機能領域ごとの生物活性を高感度定量法等を用いて評価することにより、抗体の機能に影響する構造変化部位を推察可能であることが分かった。

4-7. 本研究で明らかになったように、サンプル濃度が低いとき (10ng/mL 以下) は、分析全体の誤差は主にサンプル、第 1 抗体、標識抗原の注入によるものであり、濃度が高いとき (10ng/mL 以上) はこれらの調製誤差に測定誤差が加わる。測定誤差は、測定器のノイズとウェル自体の吸収のバラツキに起因する。各実験操作の分析全体への寄与の割合は、本研究で用いた実験装置などに特有のものである。実験装置、実験者が異なるとその寄与の割合は本研究のものとは異なったものとなるであろう。又、FUMI 理論を利用すれば、試薬開発・製造の各段階における分析システムの評価のための操作を簡略化でき、コスト、試薬などの削減にもつなげることが出来る。

4-8. 高感度カテコールアミン分析計の開発により、マウス血漿中カテコールアミンの変動を捉えることが初めて可能となった。本分析計を用いることにより、従来困難であったマウスにおける薬物投与による交感神経系への影響をより詳細に調べることが可能になると考えられる。

本研究により内分泌攪乱物質の簡便かつ迅速なスクリーニング法を開発することができた。本法はマイクロプレートを用いた多検体処理にも適しており、薬物と受容体、化学物質と核酸など、薬物と生体高分子の相互作用解析にも応用でき、分子生物学研究に大きく貢献すると思われる。

5. まとめ

5-1. 本研究で新規合成した水溶性ベンゾフラザン蛍光試薬 ES-ABD-F は生理活性ペプチドの蛍光誘導体化に適用でき、又 *m*-BS-ABD-F を誘導体化試薬として用いて HPLC-蛍光検出法を行うと、ラット尿中ブラジキニンの高感度分離定量が可能となった。更に、NBD-PZ-NH₂ は長鎖脂肪酸類の蛍光誘導体化に用いることができ、長鎖脂肪酸類の蛍光誘導体化・キャピラリー電気泳動分離による一斉分析法を開発できた。

開発したインスリンの HPLC 定量法の検出限界は 2-3 fmol であり、single islet 中インスリン濃度の定量が可能となった。ラットでは I 型が、マウスでは II 型がランゲルハンス島中に多く存在することが明らかとなった。

5-2. 本研究で開発された分離法は、汎用されている HPLC 法と比較して高分離能を示すと共に、短時間分析が可能であった。

5-3. 生物発光検出による AK と PDK の高感度同時測定法を両酵素を検出酵素とするアンジオテンシン I とエンドセリン-1 の 2 成分同時 BL-EIA を検討したところ、高感度で試料量も少なく省力化された方法であった。

5-4. ESI-MS/MS を用いた高分子タンパク質の分子量推定における有用性と、ESI-MS/MS によるペプチドの高感度定量の可能性が示唆された。

2D-nanoLC/MS システムの測定感度の改善、coverage map および蛋白質同定能の向上のため、イオン交換クロマトやカラムの作成など最適化条件のさらなる検討が必要であった。

細胞分画法並びに硫安分画法と、二次元ゲル電気泳動法を組み合わせる試料調製法を確立した。デオキシコール酸刺激変動蛋白質はベルオキシレドキシシン I であることが明らかとなった。ゲル内アルカリホスファターゼ水解を組み合わせることにより、容易にリン酸化ペプチドの特定が可能であることが判明した。 α -CHCA をマトリックスとして用いる負イオン検出 MALDI-TOFMS 分析により、リン酸化ペプチドは、正イオン検出モードよりはむしろ負イオン検出モードの方が高感度に検出できる可能性が示唆された。

5-5. ゲノム情報から見つかったオーファンレセプターのリガンドについて、癌転移抑制作用を期待して実施している誘導体合成を支援する目的で、血液中の活性ペプチド誘導体の定量方法を確立し、血中安定度を評価した。次にラット、マウスへ iv 投与時の血中濃度測定と代謝物の同定を行い、安定化誘導体のデザインを支援し、安定化誘導体取得に寄与した。

5-6. ADCC 活性の低下には、主に Fe 部位が強く影響していることが分かった。抗体の機能領域ごとの生物活性を高感度定量法等を用いて評価することにより、抗体の機能に影響する構造変化部位を推察可能であることが分かった。

5-7. 代謝異常症のスクリーニングの対象物質である 17α -hydroxyprogesterone の競合 ELISA 法の分析精度を幾つかの実験操作の誤差から予測した。この結果より、マイクロタイタープレートに第 2 抗体を固相化してあるエンドポイント競合 ELISA 法の多くは、その分析精度を、くり返し測定なしに理論的に予測できると考えられる。

HPLC システムは安定であり、測定値の SD で表せる機器の調子は、日毎に変化しないと結論できた。FUMI 理論では、くり返し測定なしに、分析システムの評価に必要な精度を求められるので、時間、経費、溶媒、試薬などを削減できるため、環境問題にも対応できると思われた。

5-8. 血圧維持機能に関与するカテコールアミンの高感度分析計の開発を行った結果、マウス血液 $10\ \mu\text{l}$ にて解析可能となり、各種薬物投与後のマウス血中ノルエピネフリン動態を精査することができた。

蛍光偏光分析法を利用したエストロゲン受容体に対する各種化学物質の簡易・迅速親和性解析法を確立できた。

蛍光偏光分析装置の高感度化の検討は更に行う必要があった。

6. 研究発表

- 1) M.Tsunoda, K.Takezawa, T.Yanagisawa, M.Kato and K.Imai: Determination of catecholamines and their 3-O-methyl metabolites in mouse plasma. *Biomed.Chromatogr.*, **15**, 41-44 (2001).
- 2) N.Okiyama, T.Santa, A.Toriba and K.Imai: BF_3 -Methanol as a Cyclization/Cleavage/Conversion Reagent for Suppression of Amino Acid Racemization in Edman Sequencing and D/L-Configuration Determination Method. *Anal.Chim.Acta*, **429**, 293-300 (2001).
- 3) T.Kajiro, T.Fukushima and K.Imai: Determination of Bradykinin in Rat Urine by Coupled-Column High Pressure Liquid Chromatography with Precolumn Derivatization with a Water-Soluble Fluorogenic Reagent. *Anal.Biochem.*, **297**, 52-59 (2001).
- 4) S.Uchiyama, T.Santa, N.Okiyama, T.Fukushima and K.Imai: Fluorogenic and Fluorescent Labeling Reagents with a Benzofurazan Skeleton. *Biomed.Chromatogr.*, **15**, 295-318 (2001).
- 5) T.Iida, T.Santa, A.Toriba and K.Imai: Amino Acid Sequence and D/L-configuration

Determination Methods for D-amino acid-containing Peptides in living Organisms: Biomed.Chromatogr., **15**, 319-327 (2001).

6) M. Kato, M.T. Dulay, B.D. Bennett, J.P. Quirino, and R.N. Zare. "Photopolymerized sol-gel frits for packed column in capillary electrochromatography" J. Chromatogr. A **924**, 187-195(2001).

7) M.T. Dulay, J.P. Quirino, B.D. Bennett, M. Kato, and R.N. Zare. "Photopolymerized sol-gel monolithic for capillary electrochromatography" Anal. Chem. **73**, 3921-3926(2001).

8) M. Kato, and T. Toyo'oka. "Enantiomeric separation by CEC using chiral stationary phase" Chromatography **22**, 159-170 (2001).

9) H.Arakawa, M.Shiokawa, O.Imamura, A.Kokado and M.Maeda: New bioluminescent assay of alkaline phosphatase using adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate as substrate and luciferin lusiferase reaction. Biolum. Chemilum., **16**, 261-264 (2001)

10) A.Kokado, H.Arakawa, and M.Maeda: Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase using dihydroxyacetone phosphate as substrate with lucigenin. Biolum. Chemilum., **16**, 319-322 (2001)

11) K.Ito, K.Nishimura, S.Murakami, H.Arakawa, and M.Maeda: Development of bioluminescent assay for pyruvate phosphate dikinase and its application to bioluminescent enzyme immunoassay Biolum. Chemilum., **16**, 353-356 (2001)

12) A.Kokado, H. Arakawa and M. Maeda: Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase using dihydroxyacetone phosphate as substrate detected with lucigenin. Luminescence, **16**, 1-6 (2001)

13) 前田昌子: 化学発光・生物発光反応を免疫化学測定法検出へ応用する. 化学と生物, **39**, 132-139 (2001),

14) 前田昌子: 生物発光反応を検出に用いた生体成分の免疫化学的測定法. けんさ, **31**, 3-13 (2001)

15) J.Goto, M.Nagata, N.Mano, N. Kobayashi, S. Ikegawa, S. and R.Kiyonami: Bile Acid Acyl Adenylate: a Possible Intermediate to Produce a Protein-Bound Bile Acid. Rapid Commun. Mass Spectrom., **15**, 104-109, (2001).

16) S.Ikegawa, N.M.R. Isriyanthi, M Nagata, K Yahata, H. Ito, N Mano and J.Goto: The Enantioselective Immunoaffinity Extraction of an Optically Active Ibuprofen-Modified Peptide Fragment. Anal. Biochem., **296**, 63-72, (2001).

17) N.Mano, M. Uchida, H. Okuyama, I Sasaki, S.Ikegawa and J.Goto: J. Simultaneous Detection of Cholyl Adenylate and Coenzyme A Thioester Utilizing Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Anal. Sci., **17**, 1037-1042 (2001).

18) 四方田千佳子, 田頭洋子, 勝峰万里, 岩木和夫, 松田りえ子, 林 譲: クロマトグラフィー分析における適切なデータ取り込み間隔の推定. 分析化学, **49**, 225-231 (2000).

19) 松田りえ子, 林 譲, 四方田千佳子, 田頭洋子, 勝峰万里, 岩木和夫: クロマトグラフィー分析における適切なデータ取り込み間隔とデータ処理に関する考察. 分析化学, **49**, 233-238 (2000).

20) Y.Hayashi, R.Matsuda, K.Ito, M Maeda and K.Imai: Deductive prediction of precision and detection limit in bioluminescent measurement systems, Anal.Chim.Acta, **441**, 243-248 (2001).

21) R.Matsuda, Y.Hayashi, C.Yomota, Y.Tagashira, M.Katsumine and K.Iwaki,: Statistical and probabilistic approaches to confidence intervals of linear calibration in liquid chromatography, Analyst, **126**, 2061-2065 (2001).

22) 岩木和夫, 大羽宏, 勝峰万里, 小澤さやか, 松田りえ子, 林 譲: ダイオキシン類の GC/HRMS 測定における検出下限の推定法の比較. 環境化学, **11**, 173-180 (2001).

7. 知的所有権の取得状況

特許取得 特になし

実用新案登録 特になし

その他 特になし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社