

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 |
| (7) 三共(株) バイオメディカル研究所 | 春山 英幸 |
| (8) 第一製薬(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

タンパク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タンパク質、或いは翻訳後修飾により生成したタンパク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。そこでそれに応え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、*in vitro* と *in vivo* の系に於ける検討を行う。

具体的には以下のことを目的とした。

1-1. タンパク質、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。

1-2. 微小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、ペプチドの2成分同時検出イムノアッセイに応用するための基礎検討、並びにそれらの応用を検討する。

- 1-4. 新規なプロテオーム解析法開発の一環として、ペプチド、タンパク質の解析のための LC/MS/MS、nanoLC/MS、MALDI-TOFMS 等の試料処理法を含めた更なる高機能化の検討を行う。
- 1-5. 生物活性に影響を与える構造変化部位の検索より抗体医薬品の安定性の評価を行う。
- 1-6. 従来、多数のくり返し実験から求めてきた分析法の精度 (SD と RSD) を、FUMI 理論を用いる一回測定で得るための検討を行う。17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP) 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の評価に適用する。
- 1-7. 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 *in vitro* と *in vivo* の系で検討する。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した 3 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) を合成し、これらを生理活性ペプチドの誘導体化に適用し、HPLC 分離後、検出・定量した。又、誘導体が溶液中で解離型として存在し得る、チオール基用試薬 (AcABD-F)、およびカルボキシル基用試薬 (DBD-PZ-NH₂、NBD-PZ-NH₂) を開発した。長鎖脂肪酸を NBD-PZ-NH₂ にて誘導体化し、キャピラリー電気泳動レーザー励起蛍光検出 (CE-LIF) 法により分離・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。遺伝的糖尿病ラット (GK ラット) のランゲルハンス島中インスリンアイソマーの分離・定量を行った。
- 2-2. ゾル・ゲル法を用いて CEC 用の分離カラムを作製した。生体分子 (BSA、オボムコイド、トリプシン) の細管内 (内径 75 μ m) への固定化には、ゾルーゲル法で作製される高含水ゲルを選択した。
- 2-3. ATP 産生酵素である Acetate kinase (AK) と Pyruvate phosphate dikinase (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。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。これらを用いてアンジオテンシン I とエンドセリン-1 の同時検出 BL-EIA を検討した。
- 2-4. LC/MS/MS におけるペプチド (分子量約 500~7000) のイオン化の基礎検討にはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用いた。血液中及び体内での活性ペプチド誘導体の LC/MS による定量法を確立し、その安定度を評価した。
- nanoLC/MS 解析システムの高感度化のため、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。
- 翻訳後修飾を受けたリン酸化ペプチドの同定においては、これらのイオン化効率が減少するため、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、酵素処理した試料と未処理の試料をそれぞれ負イオン検出-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) 分析した。リン酸結合部位を特定するため、ペプチドラダーシークエンス法の検討を行い、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 により分析した。
- デオキシコール酸 (DCA) -アシルアデニレート合成し、これを抗 DCA モノクローナル抗体に作用させ、生成物をトリプシンを用いて酵素消化し、得られたペプチド断片を抗 DCA モノクローナル抗体固定化ゲルを用いてイムノアフィニティー抽出した後、MALDI-TOFMS 分析に付した。
- 2-5. 抗体医薬の安定性を知るため、ADCC 活性 (抗体依存性細胞障害活性) を有する抗体及びその強制劣化品を用い、安定性の検討を行った。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。
- 2-6. 17-OHP の ELISA 法においては、96 穴プレートの各ウェルをそれぞれ 1 回測定するという操作を 30 回行った。その測定値の相対標準偏差 (RSD) を記述する理論式を導いた。HPLC によるアセトアミノフェンの純度試験は 1 日 6 回、7 日間、同一条件で行った。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。
- 2-7. 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、HPLC-化学発光検出自動分析計の高感度化を行った。更に、本法を薬物投与前後の小動物血中カテコールアミン動態の検索に適用

した。ビタミン E 代謝物の γ -CEHC を蛍光試薬 DBD-PZ で誘導体化した後、アセチル化し、フェニルカラムと ODS カラムを用いるカラムスイッチング HPLC にて分離した。光学分割にはキラルカラムを使用した。本 HPLC を利用してラットにビタミン E 前駆体 (γ -TDMG) を静注し、生成した γ -CEHC の血漿中濃度推移を調べた。

インスリン刺激前後のカベオラ様膜ドメインを調製し、その膜タンパク質成分を 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るタンパク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。

DCA を添加した培養液にて HeLa 細胞を培養した。細胞分画して得られた試料を、二次元ゲル電気泳動法に付しタンパク質を分離した。これ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後、MALDI-TOFMS によりペプチドマスマッピングに付した。

DCA-アシルアデニレートを合成し、これを抗 DCA モノクローナル抗体に作用させた。生成物をトリプシンを用いて酵素消化し、得られたペプチド断片を抗 DCA モノクローナル抗体固定化ゲルを用いてイムノアフィニティー抽出した後、MALDI-TOFMS 分析に付した。

蛍光標識エストロジオールを合成し、これとエストロゲン受容体への結合を競合させ、蛍光偏光分析法を利用して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。測定装置の試作機を組み立てた。

3. 研究成果

3-1. ES-ABD-F によるアンジオテンシン類、ブラジキニンの蛍光誘導体は逆相 HPLC により良好に分離された。ラット尿管より採取した尿中ブラジキニンは *m*-BS-ABD-F の誘導体化後、陽イオン交換ならびに逆相 HPLC を組み合わせたカラムスイッチング HPLC により定量できた。 β -アミロイドのような疎水性の高いペプチドでも、*m*-BS-ABD-F で誘導体化すれば通常の移動相（水-有機溶媒）で溶出・検出された。炭素鎖 4 から 20 までの飽和脂肪酸を NBD-PZ-NH₂ と縮合剤存在下、室温で反応させて得た誘導体は、酸性条件下で CE-LIF 法により 8 分以内に高感度（検出限界 6.5nM）に分離・定量することができた。界面活性剤存在下 SBD-F と反応して得られたラットの SBD 化インスリンアイソマーは HPLC-蛍光検出により高感度（検出限界 2-3fmol）に分離・検出された。遺伝的糖尿病ラット（GK ラット）ではアイソマー II 型含量低下が明らかとなった。

3-2. methacryloxypropyltrimethoxysilane を塩酸で加水分解した後、トルエンとラジカル開始剤とを添加した溶液を細管に充填し、紫外光を照射することで固定相が形成された。BSA 固定化細管では DL-Trp が良好に光学分割された。オボムコイド固定化細管では、塩基性薬物であるエペリゾンとクロルフェニラミンが光学分割された。固定化されたトリプシンの活性や安定性は、溶液に溶解させたトリプシンと比較して向上していた。

3-3. 第 1 段階の AK の測定は、共存する PPK 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）が得られた。PPDK 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）が得られた。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 PPK により測定したところ、それぞれの検出限界は 3.0×10^{-16} mol、及び 9.9×10^{-17} mol/assay であった。これは従来法に比し共に約 10 倍高感度であった。アンジオテンシン I の検量域は 7.82~1000pg/mL、エンドセリン I の検量域は 15.6~1000pg/mL、最小検出感度は 4.38pg/mL であった。

3-4. 分子量 7000 までのペプチドは ESI-LC/MS/MS の多価イオン検出により 10fmol まで定量可能であった。これをタンパク質の Edman 分解法に適用し、各ペプチドで 1pmol 以下の検出感度で 5 残基まで同定可能とした。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。

高感度化 nanoLC/MS 解析システムを用いて、マウス肝臓上清画分の還元アルキル化後プロテアーゼ処理試料のゲル分離を介さない直接タンパク質解析を試みたが、MS/MS 測定時間不足のため十分な解析は行われず、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。

マトリックス支援負イオン検出 MALDI-TOFMS 分析により、リン酸化ペプチドを高感度に検出できた。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。

イムノアフィニティー抽出したペプチド混合物を MALDI-TOFMS にて分析したところ、抗体に DCA 1 分子結合したペプチドと分子量の一致するフラグメントが得られ、DCA-アシルアデニレートのラベル化剤としての有用性が確認された。

3-5. 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 で活性の著しい低下が認められ、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 であったのと同様に、Fc 部位の活性も 99A01>C7-60-2W>C6-60-2W であった。

3-6. 1 回測定で競合 ELISA 法の精度を予測した結果、理論と実験は良く一致した。一方で、繰り返し測定と FUMI 理論との照合により、競合 ELISA 法においては主な誤差原因は粘ちゅうな第 1 抗体溶液のピペット操作であることが判明した。第 1 抗体の溶液の粘度を低下、ピペット操作の精度を上げることで、分析法の精度を改善できると結論できた。アセトアミノフェンの定量に関しては、HPLC の注入精度は高いため、注入誤差を相殺するために内部標準物質を用いても分析精度は向上しないことが分かった。

3-7. 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、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、マウスに降圧薬 (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。自然発症高血圧ラットに於いてカテコールアミンのメチル化代謝が減弱していることが判明し、補酵素 S_{AMe} 投与で血圧降下をもたらすことが出来た。蛍光試薬 DBD-PZ により γ -CEHC を蛍光誘導体化した結果、その検出限界は約 50fmol であり、カラムスイッチング HPLC により、ラット血漿中 γ -CEHC の高感度定量が可能であった。 γ -TDMG (25mg/kg) 静注後 15 分より γ -CEHC が生成し、1 時間でピークに到達した後、緩やかに減少した。生成した γ -CEHC は S 体であった。

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。得られた膜タンパク質成分は可溶化後、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タンパク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。

デオキシコール酸添加により、発現が顕著に増大したタンパク質は、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。

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。17 α 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。種々の化学物質を標識化エストロゲンと競合させ IC₅₀ を求めることが出来た。結合における協同性の指標である Hill 係数を各化合物で算出した結果、agonist, antagonist 等、作用様式の違いにより結合における Hill 係数が大きく異なることが明らかになった。測定装置は青色 LED を使用することにより従来より高機能化が可能となった。

4. 考察・まとめ

本研究では、タンパク質、ペプチドの高感度分離・定量やプロテオーム解析への応用可能な水溶性蛍光試薬類の新規調製、HPLC の高性能化、生物発光検出法と化学発光検出法の改良、微小空間内高含水ゲル調製法の開発、質量分析計の高機能化、それら方法の精度評価法の検討、並びに刺激細胞内タンパク質変動解析、タンパク質と活性低分子との相互作用解析法の開発と作用部位解析、抗体の安定性評価、薬物による生体への影響精査のための方法論及び装置の開発などを行った。これらは、更に改良を重ねてより実用性の高い方法として確立されると思われ、来年度の纏めの研究によりゲノム創薬を支援する技術となり得ると期待できる。

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) 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).
- 3) M.Kato and T.Toyo'oka: Enantiomeric separation by CEC using chiral stationary phase. *Chromatography*, **22**, 159-170 (2001).
- 4) 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).

- 5) 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).
- 6) J.Goto, M.Nagata, N.Mano, N.Kobayashi, S.Ikegawa, 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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) C.Toriumi and K.Imai: Determination of Insulin in a Single Islet of Langerhans by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Anal.Chem.* 74, 2321-2327 (2002).
- 11) J.Takata, R.Hidaka, A.Yamasaki, A.Hattori, T.Fukushima, M.Tanabe, K.Matsunaga, Y.Karube and K.Imai: Novel *d*- γ -Tocopherol Derivative as a Prodrug for *d*- γ -Tocopherol and a Two-step Prodrug for *S*- γ -CEHC. *J.Lipid.Res.*, 43, 2196-2204 (2002).
- 12) K.Kubota, C.Sakikawa, M.Katsumata, T.Nakamura and K.Wakabayashi: PDGF BB purified from osteoclasts acts as osteoblastogenesis inhibitory factor (OBIF). *J.Biomol.Tech.*, 13, 62-71 (2002).
- 13) M.Kato, K.Sakai-Kato, M.Matsumoto and T.Toyo'oka: A protein-encapsulation technique by the sol-gel method for the preparation of monolithic columns for capillary electrochromatography. *Anal.Chem.* 74, 1915-1921 (2002).
- 14) K.Sakai-Kato, M.Kato and T.Toyo'oka: On-line trypsin-encapsulated enzyme reactor by the sol-gel method integrated into capillary electrophoresis. *Anal.Chem.*, 74, 2943-2949 (2002).
- 15) N.Mano, K.Nishimura, T.Narui, S.Ikegawa and J.Goto: Characterization of rat liver bile acid acyl glucuronosyltransferase. *Steroids*, 67, 257-262 (2002).
- 16) 岩上猛, 植田泰輔, 木村良夫, 森本副吉, 松田りえ子, 林 譲, 今井一洋: システム適合性試験における精度の推定, *YAKUGAKU ZASSHI*, 122, 849-854 (2002) .
- 17) K.Ohno, T.Fukushima, T.Santa, N.Waizumi, H.Tokuyama, M.Maeda and K.Imai: Estrogen receptor binding assay method for endocrine disruptors using fluorescence polarization. *Anal.Chem.*, 74, 4391-4396 (2002).
- 18) T.Kajiro, Y.Nakajima, T.Fukushima and K.Imai: A Method To Evaluate the Renin-Angiotensin System in Rat Renal Cortex Using a Microdialysis Technique Combined with HPLC-Fluorescence Detection. *Anal.Chem.* 74, 4519-4525 (2002).
- 19) CZ.Huang, T.Santa and K.Imai: Development of 7-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-5-N-(4-N-aminoethyl)piperazino-2,1,3-benzoxadiazole as a water-soluble fluorogenic reagent for the sensitive liquid chromatographic determination of saturated carboxylic acids. *Analyst*, 127, 741-747 (2002).

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