

平成15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

目 次

課題番号

KH11001

ハイスループットスクリーニングを指向した細胞機能解析法の
開発研究

川西 徹 …… 1

KH11002

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

今井一洋 …… 11

KH11003

疾患モデル動物の開発および保存のための高度発生工学技術の
確立

小倉淳郎 …… 19

KH11004

トランスジェニックラットの作成とその公共利用のための胚バ
ンクの検討

小林英司 …… 25

KH11005

癌細胞の標的化を可能にするベクターの開発；単クローン抗体
からペプチドへの展開

石坂幸人 …… 32

KH11006

遺伝子改変動物をもちいたGタンパク質共役型受容体の機能解
析

田上昭人 …… 37

KH11007

新しい白血球の機能制御手法を適用したガン細胞の浸潤・転移
抑制方法の開発研究

鈴木和博 …… 53

KH11008

多剤耐性結核の診断と創薬探索技術としてのゲノム解析に関す
る研究

切替照雄 …… 65

KH12079

超機能性核酸類縁体（BNA）を用いたアンチセンス医薬品の開
発とその実践的応用

今西 武 …… 78

KH12084

コンディショナルノックインによる受容体機能変換マウス作成
と情報伝達機構の解析

笹岡俊邦 …… 82

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 共立薬科大学研究開発センター
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 | 市川 公久 |
| (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 |

研究要旨 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た。方法の評価法も検討した。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。

A. 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. タンパク質、ペプチドの高感度定量のための蛍光試薬の設計・合成・応用を行う。
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。
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、ペプチドの二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。
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。

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。

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。

7. 蛋白質-低分子生理活性物質間の相互作用解析を目指して反応性基質を作成し検討する。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簡易・迅速親和性解析法を確立し、結合能及び作用様式を解析する。そのための測定装置の高感度化も行う。カテコールアミンのメチル化代謝酵素と血圧維持機能との関連を調べる。

B. 研究方法

1. ペンゾフラザン骨格を有する新規水溶性チオール基用試薬 7-chloro-4-(dimethylaminoethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole (DAABD-Cl) を開発し、チオール基含有タンパク質・ペプチドの定量に利用した。即ち、本試薬とチオール基含有分子との反応条件を精査し、それを基にタンパク質・ペプチド混合物を DAABD-Cl で蛍光誘導体化後、逆相分配 (ODS) カラムにて HPLC 分離と蛍光検出法にて定量する方法を検討した。

HPLC-蛍光検出法による D-および L-乳酸の高感度定量法の開発と応用を行った。D, L-乳酸の蛍光誘導体化は、そのカルボキシル基を蛍光試薬 NBD-PZ により誘導体化した。次いで、オクチルおよびアミロース型キラルカラム (CHIRALPAK AD-RH) を用いるカラムスイッチング HPLC により、健康人ならびに糖尿病患者の血清中濃度を調べた。

2. マイクロチップには i-chip 3DNA (日立化成) を用いた。サンプル注入時には各リザーバーに 100V (SR)、-90V (BR)、-500V (SW)、0V (BW) の電圧を印加し、分離時には 500V (SR)、900V (BR)、500V (SW)、0V (BW) の電圧を印加することでマイクロチップ電気泳動を行った。

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二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、アンジオテンシン I は競合法、エンドセ

リン I は非競合アッセイにより免疫反応及び酵素反応を行い、標識に用いた両酵素から生成する ATP をホタルのルシフェリン-ルシフェラーゼで検出する。即ちヤギ抗家兔 IgG 抗体と抗エンドセリン I 抗体を固相化したマイクロタイタープレートの各ウェルに、アンジオテンシン I、エンドセリン I 溶液、家兔抗アンジオテンシン I 抗体、FITC 標識抗エンドセリン-I 抗体、ビオチン化アンジオテンシン I 溶液各を加え、一晩放置する。洗浄後 AK 標識 Streptavidin (AK-SA) と PPDK 標識抗 FITC-Fab' 抗体の混合溶液、家兔 IgG 抗体溶液を加え反応させる。再洗浄後 AK 用発光基質溶液を添加しインキュベート後、生じた発光をルミノメーターで測定し固相上の AK の活性を測定することによりアンジオテンシン I を定量する。次いで PPDK 用基質溶液を加え反応させ、生じた発光をルミノメーターで測定し、固相上の PPDK 活性測定をすることによりエンドセリン I を定量した。

4. LC/MS/MS におけるペプチドのイオン化の検討にはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用いた。多価イオン測定及び MS 条件最適化、HPLC 分離への移動相添加物の影響、カラムによる濃縮効果の検討を行い、血漿中 Nociceptin の定量の最適条件を見出した。

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。流速を毎分約 200 nl とした nanoLC システムと接続し、また、溶融シリカキャピラリーよりナノエレクトロスプレーニードルを自作し、その先端に逆相樹脂を詰めたスプレーニードルをナノカラムとして使用した。本測定システムを用いて、蛋白同定および蛋白トッパダウン解析を行い、その有用性を評価した。

5. CDR 近傍の Asp を脱アミド化した変異抗体発現ベクターを構築し、COS 細胞と CHO 細胞を用いて抗体を発現させ精製した。各変異抗体の抗原結合能を、標識したオリジナル抗体とのコンペティティブ ELISA により比較した。

6. 血中の甲状腺刺激ホルモン (TSH) を測定するキット (クレチン TSH ELISA II, 栄研) を用いた。標準 TSH 溶液と酵素標識抗体溶液をマイクロピペットを用いてウェルに採取し放置した後、洗浄液でウェルを洗浄・タッピングを行った後、発色液を加え室温で放置した。硫酸溶液を加え酵素反応を停止させた後、マイクロプレートリーダーを用いて 490nm の吸収を測定した。サンドウィッチ ELISA 法の測定値の RSD を記述する理論式を導いた。式の誘導はプレート内の誤差を考慮して行った。測定はプレートを 1 回

スキャンすることでそのウェルの測定値となる。測定精度は異なったウェル間の測定値の SD または RSD に相当する。検出器のノイズの影響は無視した。

7. デオキシコール酸 (DCA) をモデルリガンドとして用い、そのアシルアデニレート (DCA-AMP) の反応性に検討を加えてきた。その結果、アシルアデニレートは水溶性が高く、かつきわめて反応性が高い上、反応液の pH をコントロールすることにより、ラベル化反応の選択性を制御可能なことが判明している。今回、リガンド (DCA) に対して親和性を有するモデル蛋白質として抗 DCA モノクローナル抗体を用い、その抗原認識部位 (低分子相互作用部位) への特異的なラベル化について検討した。

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開発し、蛍光標識エストラジオールと内分泌攪乱作用が疑われる化合物とでエストロゲン- α 受容体への結合を競合させ、蛍光偏光度測定を用いて得られた阻害曲線から化合物のエストロゲン受容体への親和性 (IC₅₀) および協同性 (Hill 係数) を評価してきた。本年度は、男性生殖器などに発現しているエストロゲン- β 受容体への結合親和性を検討した。ホルモン、薬物、工業化学物質、植物エストロゲン等の各種化合物のエストロゲン- β 受容体への 50% 阻害濃度および Hill 係数を求めた。

血圧降下薬を投与すると、圧受容体反射-交感神経系による血圧調節機能が惹起され、交感神経末端より血中にカテコールアミンが放出される。その放出程度は血圧降下度と良い相関を示すことを明らかにしてきた。更に前年度に於いて、新規開発した高感度カテコール-O-メチル転移酵素 (COMT) 活性測定法を自然発症高血圧ラットに適用し検討したところ、当該ラットでは COMT によるメチル化代謝能が低下していることが判明した。そこで、全身の COMT の内、どの組織の COMT が主たる代謝を司っているかを明らかにするため、自然発症高血圧ラットと正常血圧ラットにおける COMT 活性の比較を行い、血圧維持機能における COMT の役割解明を試みた。

実験動物を使用した in vivo での機能評価実験を行う必要があるため、各研究機関に於ける動物実験倫理規定を初めとした幾つかの基準に配慮して研究を行った。

C. 研究成果

1. DAABD-Cl は塩基性条件下、40℃、20 分で

システイン、ホモシステイン、グルタチオン等の生体内チオール化合物と定量的に反応した。蛍光誘導体は酸性及び中性条件下プラスに荷電していることが判明した。これらの HPLC-蛍光検出法による検出限界は数十フェムトモルであった。更に、タンパク質・ペプチドの誘導体化を検討したところ、pH9.0 のホウ酸緩衝液中、界面活性剤、タンパク質変性剤 (グアニジン) 及び還元剤 (TCEP) の存在下、40℃、30 分間にて初めて定量的な反応が達成された。これらの蛍光誘導体は HPLC-蛍光検出法により良好に分離、検出され、その検出限界は 0.5-30 フェムトモルであった。

D,L-乳酸の NBD-PZ 誘導体は、アミロース型キラルカラムにより良好に光学分割されたので、オクチルおよびアミロース型キラルカラムを用いるカラムスイッチング HPLC を構築し、これをヒト血清に応用した結果、D-および L-乳酸が同時に検出でき、糖尿病患者において血清中 D-乳酸濃度が有意に上昇していることが判った。

2. 基質として、アミノ酸誘導体として 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) で蛍光誘導体化した L-arginine ethyl ester (NBD-Arg-ethylester)、ペプチドとして NBD-bradykinin、タンパク質として 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diazas-indacene-3-propionic acid で誘導体化した casein (BODIPY-casein) を用いて検討を行った。基質をマイクロチップ上の試料溜め (SR) に載せ、各リザバーに電気を印加すると、試料は電気浸透流と電気移動度により泳動され、トリプシンを含むゲル内を通過した。その過程で各試料はトリプシンによって加水分解され、生成したペプチド断片や未反応の原料は、マイクロチップ上の分離流路で分離検出された。NBD-Arg-ethyl ester の場合は、生成物である NBD-Arg と未反応物である NBD-Arg-ethyl ester とが 2 分以内に分離され、検出された。キャピラリー内に固定化したトリプシンでは、加水分解及び分離検出ができなかった、タンパク質試料の分析がマイクロチップを用いることで可能となった。

3. アンジオテンシン I の検量域は 7.82~1000 pg/mL、同時再現性は 4.7~9.7% (CV, n=8)、検量線での 50% 阻害濃度は 33.1 pg/mL であった。エンドセリン-I の検量域は 15.6~1000 pg/mL、同時再現性は 7.4~11.0% (CV, n=8)。最小検出感度は 3.72 pg/mL (mean+3SD) であった。添加回収率にはばらつきが多く認められたため前処理を施すこととした。前処理は逆相樹脂を用いて検討したところ、Oasis HLB 10 mg

カートリッジを用い、溶出に 86%エタノール/4%酢酸を用いる方法が至適であった。この時、ラット血漿からの回収率は、アンジオテンシン I が $80.4 \pm 10.8\%$ (mean \pm SD)、エンドセリン-I が $73.5 \pm 8.2\%$ (mean \pm SD) であった。本前処理法を用い、SHR (高血圧自然発症ラット)、SHRSP (重症度が高いモデル) 及び WKY ラット (正常ラット) の血漿中アンジオテンシン I とエンドセリン-I 濃度を測定した SHRSP のアンジオテンシン I 濃度は WKY に比較し、各週齢とも高値を示した。また 20 週齢雄の SHRSP のアンジオテンシン I 濃度は、 515.5 ± 338.2 pg/mL (mean \pm SD, n=6) であり、同週齢の WKY のアンジオテンシン I 濃度 176.0 ± 34.1 pg/mL (mean \pm SD, n=3) に比較し、有意に高値を示した。HR は WKY に対し、各週齢の収縮期血圧値において 35~80 mmHg 程度の上昇を示すが、アンジオテンシン I 濃度において有意の差を示さなかった。すべてのラットにおいてエンドセリン-I は、検出限界以下のため検出することができなかった。

4. モデルペプチド Nociceptin の HPLC 分離に C₃₀ カラムと共に酢酸を移動相添加剤として用いる ESI-LC/MS/MS で高感度化が可能であると判断された。

ペプチドに比較して、蛋白イオンからは複雑な MS/MS スペクトルが得られるが、FT-ICR MS の高い質量分解能、質量精度を利用して、nanoLC 測定システムにより、ラット肝臓サイトソルより精製したジアセチル還元酵素 (DAR) の蛋白同定を試みた。すなわち、各種クロマトグラフィーで精製した DAR の SDS-PAGE ゲルバンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化を行なった試料について、測定を行なった。その結果、通常測定と IRMPD 測定との類似したトータルイオンカレントクロマトグラム (TIC) が得られた。

5. 抗体 A の抗原との結合に N55 は重要な役割を果たしていることが明らかとなり、さらに抗体 A の N55 脱アミド化体は加速試験で生じることが確認されていることから、今回の加速試験での抗体 A の活性低下の主な要因の一つとして、N55 の脱アミド化が強く示唆された。また、各脱アミド化変異抗体 A の陰イオン交換クロマトグラフィーでの溶出位置が異なっていたことから、陰イオン交換クロマトグラフィーによって、脱アミド化体の検出が可能と考えられた。

6. 競合法では測定値と濃度推定値の精度プロファイルはその濃度依存性が異なることは既に報告済みであるが、サンドウィッチ法では検量線が原点を通る直線のため、測定値と濃度推定値の精度プロファイルは同じであった。測定値の RSD と

濃度推定値の RSD は低濃度では大きく、濃度が高くなるに従って小さくなった。低濃度の場合最も重要な誤差原因はウェル自体の吸収のバラツキであり、高濃度では試料の注入誤差であることが推測された。

7. DCA-AM の抗 DCA モノクローナル抗体と相互作用部位を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) により分析したところ、 m/z 2128.3 に明確なペプチド由来のピークが認められた。次に、ハイブリッド型の MS/MS 装置を用い、2価イオンに相当する m/z 1063.6 のプロダクトイオンスキャンを行った結果、 m/z 1055 及び 1045 に、それぞれ水分子が 1 つあるいは 2 つ脱離した 2 価のフラグメントイオンが観測された。これを解析したところ、アミノ酸配列は N 末端から 4 番目のリジン残基側鎖の ϵ -アミノ基に DCA が付加し、11 番目のメチオニンが酸化されたペプチド (DNAKNILYLQMGSLR) であることが明らかとなった。このように、アシルアデニレートを活用するアフィニティーラベル化剤を用いると相互作用部位近傍に特異的にラベル化することが可能であり、アフィニティー抽出法と質量分析法を組み合わせることでその結合部位を容易に解析できることが判明した。

昨年度用いたエストロゲン- α 受容体と相互作用す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、既報とほぼ同等の値が得られた。結合における協同性の指標である Hill 係数はエストロゲン- α 受容体で得られた結果と同様、Agonist, Partial-agonist, Antagonist など作用様式の異なる化合物で Hill 係数が大きく異っていた。このことは今回初めて得られたデータである。

COMT には膜結合性と可溶性の 2 種類が有ることが知られている。赤血球膜、肝、腎の COMT 活性を調べたところ、自然発症高血圧ラットにおいては、肝膜結合性 COMT の活性が正常血圧ラットに比して低下していた。更に、COMT の抗体を用いて検索したところ、自然発症高血圧ラットでは肝膜結合性 COMT 量も正常血圧ラットに比し低下していた。

D. 考 察

1. DAABD-Cl は水溶性試薬であるため、反応後に得られる蛍光誘導体は溶液中で電荷を有し親水性であり、容器への付着が少ない。従って、疎水性の高いタンパク質・ペプチドの高感度分析に繁用されると思われる。又、プロテオーム解析にも使用可能であり、今後の更なる応用への検討が期

待される。

本研究により開発されたヒト血清中 D-および L-乳酸の高感度定量法は、糖尿病合併症の原因と考えられているメチルグルオキサールの代謝物 D-乳酸を定量できるので、糖尿病の臨床診断、特に合併症の診断に有用であると思われる。

2. 基質として、アミノ酸誘導体 (NBD-L-Arg-ethylester)、ペプチド (NBD-bradykinin)、タンパク質 (BODIPY-casein) を用いたところ、全ての基質が酵素消化され、生成物と未反応物との分離がマイクロチップ上で行うことが可能となった。トリプシンの活性はトリプシンが固定化されたため、自己消化が抑制され、溶液状トリプシンと比較して耐久性が大幅に向上することが判明した。また一回の分析に必要なトリプシンや基質量の大幅な削減が可能となったことも本方法の特徴である。

3. 従来免疫アッセイは、1回の測定で1つの対象成分の分析が一般的であったが、本研究では高感度な生物発光検出法を用い、同時2成分検出免疫アッセイを可能にした。本法は、血清中インスリンと C-ペプチド及びアンジオテンシン I とエンドセリン I の測定に応用可能であったが、ゲノム創薬研究において発現した複数のタンパク質の測定等に応用可能と思われる。

4. Nociceptin の多価イオンをプレカーサーイオンとして選択して MS/MS 測定することにより、血漿中 Nociceptin を高感度に定量することが可能であった。今回の検討で得られた定量下限 (5pM) は免疫学的手法 (radioimmunoassay 法) の定量下限 (約 2pM) と比較して若干劣るものの、免疫学的手法に匹敵する高感度定量法の確立が可能であると考えられた。加えて、ESI-LC/MS/MS を用いた測定は、特異的抗体等を必要とする免疫学的手法と比較して非常に簡便であり、前処理も含めた測定時間の短縮が可能である。また、ペプチド及びタンパク質の血漿中安定性を簡便に評価可能なことから、血漿サンプル等の適切な操作条件の設定も容易であることが判明した。

本研究で構築した交互スキャン nanoLC/FT-ICR MS 測定システムは、高感度かつ高精度に蛋白の解析ができることから、プロテオミクス研究における有用な解析アプローチの一つとして位置付けできると考えられる。

5. 抗体 A の抗原結合能の変化に着目して、抗体の構造変化を調べた結果、抗体 A の抗原結合に関与していると考えられる N55 を同定し、N55 の脱アミド化により抗原結合活性の低下が引き起こされることが示された。

6. 分析精度はくり返し測定から推定することが

多いが、FUMI 理論を用いると、くり返し測定なしにピペット誤差と測定の誤差から血中の甲状腺刺激ホルモン (TSH) を対象としたサンドウィッチ ELISA 法の精度を予測できる。測定対象物質濃度が高いとき (0.1 μ IU/assay 以上) は、分析誤差は試料溶液の注入に由来し、濃度が低いとき (0.1 μ IU/assay 以下) はウェル自体の吸収のバラツキに由来することが初めて明らかになった。7. アシルアデニレートは極めて反応性の高い混合酸無水物であり、しかも液性のコントロールによりリガンドを相互作用部位特異的に、高い収率でラベル化できることが判明した。しかも得られたラベル化蛋白質を酵素消化した後、リガンドに特異的なイムノアフィニティー抽出を行うことにより、ラベル化ペプチドを抽出することが可能であり、複雑なペプチド混合物中の標的ペプチドの特定に極めて有用であることが明らかとなった。また、アフィニティー抽出したラベル化ペプチドを LC/ESI-MS/MS 分析し、そのプロダクトイオンスペクトルを解析することにより、容易にラベル化部位の同定が可能であることが明らかとなった。今回の結果から、相互作用部位付近に選択的にラベル化するには、リガンドの親和性のみならず、ラベル化剤の反応性や水溶性が重要であることが判明した。今回創製したアフィニティーラベル化剤の活用と質量分析法の組み合わせは、蛋白質-低分子相互作用解析に極めて有用であると考えられた。

今回得られた各種化合物とエストロゲン- β 受容体との相互作用の解析結果は、昨年度に得られたエストロゲン- α 受容体を用いて得られた結果とほぼ同様であり、本法が内分泌攪乱物質の簡便かつ迅速なスクリーニング法として使用可能であることが示唆された。

本研究で開発した NE を基質とする COMT 活性測定法は、従来の非生理的基質を用いた方法よりも生体内での代謝挙動をより反映した結果を得ることができると明らかとなった。即ち、本法を用いることにより、初めて自然発症高血圧ラットの肝膜結合性 COMT 活性が減弱していることが明らかとなり、肝膜結合性 COMT 量の減少の結果と併せて、カテコールアミンのメチル化代謝酵素が血圧調節に関与していることが示唆された。

E. 結論

ベンゾフラザン骨格を有する水溶性蛍光試薬 DAABD-Cl の設計・合成した。これを用いてタンパク質・ペプチドの定量が可能であった。

D, L-乳酸の高感度定量法を開発し、これを健

常人および糖尿病患者血清に応用した結果、糖尿病患者における血清中 D-乳酸濃度の有意な上昇を見出した。

トリプシンを固定化したマイクロチップを作製し、マイクロチップ上で酵素反応と分離検出とを行うことに成功した。酵素の固定化には、生理的条件下、1段階反応で生成する高含水ゲルを利用しているため、任意な形状の空間に様々な生体分子の固定化が可能であった。したがって様々な酵素反応をマイクロチップ上に集積化するのに利用できると予想される。さらにマイクロチップに集積化することで、全自動で極微量な多検体を解析することが可能になると考えられ、多数の化合物ライブラリーから新薬候補物質を探索する創薬研究の効率化に役立つと期待される。

本研究で開発された二成分同時検出イムノアッセイ法の高感度化及び極少量の試料から1回のアッセイでより多くの情報が得られれば、マンパワー、試薬及び試料の省エネ化、コストの低減化に貢献することが期待される。

ペプチド及びタンパク質の微量定量においてESI-LC/MS/MSが有用であることが確認された。

FT-ICR MS の高分解能、質量精度を利用した精度の高い蛋白解析を行うため、IRMPD を使用した交互スキラン nanoLC/FT-ICR MS 測定システムを構築した。本測定システムを用いた解析により、ラットジアセチル還元酵素の精度の高い蛋白同定が可能であった。また、翻訳後修飾の確認に有効な蛋白のトップダウン解析において、本測定システムが適応可能であることを示した。

分子生物学的手法を駆使することにより、抗体の抗原結合部位の脱アミド化（構造変化）が及ぼす、抗体の活性変化を調べることが可能であった。従って、脱アミド化を抑制することにより、より安定な抗体医薬品の供給が可能になると考えられた。

マイクロタイタープレートを用いるエンドポイント競合 ELISA 法とサンドウィッチ 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た。また、本研究の理論的精度推定は定量限界、検出限界を求めるための非常に有用な方法であることが結論できた。

今回、アシルアデニレートを利用するアフィニティーラベル化剤を開発し、相互作用部位へのラベル化条件を検討したところ、液性のコントロールのみで相互作用部位選択的なラベル化が可能であることが判明した。しかも、リガンドに特異的なイムノアフィニティー抽出を組み合わせることが、ラベル化ペプチドの解析に極めて有用であることが明らかとなった。

蛍光偏光分析法を利用したエストロゲン-β 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し、本法が内分泌攪乱物質の結合能のみならず作用様式も解析できることが示唆された。

COMT 活性測定法の高感度で簡易な測定法を開発し、それを用いて COMT の血圧維持への関与を明らかにした。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) C.Toriumi and K.Imai: Altered expression of insulins I and II and their mRNAs in the islets of Langerhans in dexamethasone-induced diabetic rats. *Biomed.Chromatogr.*, **17**, 26-32 (2003).
- 2) C.Toriumi and K.Imai: An Identification Method for Altered Proteins in Tissues Utilizing Fluorescence Derivatization, Liquid Chromatography, Tandem Mass Spectrometry, and a Database- Searching Algorithm. *Anal.Chem.*, **75**, 3725-3730 (2003).
- 3) H.Hasegawa, T.Fukushima, J-A.Lee, K.Tukamoto, K.Moriya, Y.Ono and K.Imai: Determination of serum D-lactic and L-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization. *Anal.Bioanal.Chem.*, **377**, 886-891 (2003).
- 4) M.Masuda, M.Tsunoda and K.Imai: High-performance liquid chromatography-fluorescent assay of catechol-o-Methyltransferase activity in rat brain. *Anal.Bioanal.Chem.*, **376**, 1069-1073 (2003).
- 5) M.Tsunoda, J.Tenhunen, C.Tilgmann, H.Arai and K.Imai: Reduced Membrane-Bound Catechol-O-Methyltransferase in the Liver of Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertens. Res.*, **26**, 923-927 (2003).
- 6) K.Ohno, S.Suzuki, T.Fukushima, M.Maeda, T.Santa and K.Imai: Study on interactions of endocrine disruptors with estrogen receptor using fluorescence polarization. *Analyst*, **128**, 1091-1096 (2003).
- 7) K.Ito, K.Nakagawa, S.Murakami, H.Arakawa and M.Maeda: Highly sensitive simultaneous measurement of acetate kinase and pyruvate phosphate dikinase activities using a firefly luciferase-luciferin reaction and its application to a tandem bioluminescent enzyme immunoassay. *Anal.Sci.*, **19**, 105-109 (2003).
- 8) M.Maeda: New label enzymes for bioluminescent

- enzyme immunoassay. *J.Pharm.Biomed.Anal.*, **30**, 1725-1734 (2003).
- 9) M.Kato, N.Matsumoto, K.Sakai-Kato and T.Toyo'oka: Investigation of chromatographic performances and binding characteristics of BSA-encapsulated capillary column prepared by the sol-gel method. *J.Pharm.Biomed Anal.*, **30**, 1845-1850 (2003).
- 10) N.Mano, A.Nishijima, S.Saito, S.Ikegawa and J.Goto: Synthesis and characterization of deoxycholyl 2-deoxyglucuronide: A water-soluble affinity labeling reagent. *Lipids*, **38**, 873-879 (2003).
- 11) N.Mano, T Goto, A Nikaido, T.Narui and J.Goto: Inhibition of the rat hepatic microsomal flurbiprofen acyl glucuronidation by bile acids. *J.Pharm.Sci.*, **92**, 2098-2108 (2003).
- 12) K.Toda, S.Ishida, K.Nakata, R.Matsuda, Y.Shigemoto-Mogami, K.Fujishita, S.Ozawa, J.Sawada, K.Inoue, K.Shudo and Y.Hayashi: Test of significant differences with a priori probability in microarray experiments. *Anal.Sci.*, **19**, 1529-1535 (2003).
2. 学会発表
- 1) 角田誠、長山雅俊、細田瑛一、今井一洋：カテコールアミン及びメチル代謝物の動態と血圧－高速液体クロマトグラフィー・化学発光検出法による検討－、第 26 回日本高血圧学会総会（宮崎）、2003 年 10 月 31 日
- 2) 鈴木祥子、大野賢一、三田智文、小野田優、鳥羽陽、木津良一、早川和一、今井一洋：蛍光偏光度測定法を用いた多環性芳香族炭化水素モノヒドロキシ体とエストロゲンレセプターとの相互作用解析、第 16 回バイオメディカル分析科学シンポジウム（富士吉田）、2003 年 8 月 3 日
- 3) 増田真裕美、鳥海千冬、三田智文、今井一洋：ペプチド・タンパク質解析を指向した LC-MS/MS 用高感度新規蛍光誘導体化試薬の開発、日本分析化学会第 52 年会（仙台）、2003 年 9 月 25 日
- 4) 鳥海千冬、三田智文、今井一洋：ベンゾセレナジアゾールおよびベンゾチアジアゾール骨格を有する新規蛍光誘導体化試薬の開発、日本分析化学会第 52 年会（仙台）、2003 年 9 月 25 日
- 5) 内野絵里香、福島健、角田誠、三田智文、今井一洋：HPLC-蛍光検出による S-D-ラクティルグルタチオンの高感度定量法の開発、第 16 回バイオメディカル分析科学シンポジウム（富士吉田）、2003 年 8 月 3 日
- 6) 角田誠、青山のぞみ、増田真裕美、三田智文、今井一洋：catechol-O-methyltransferase(COMT) 活性測定法の開発と生体試料への適用、第 16 回バイオメディカル分析科学シンポジウム（富士吉田）、2003 年 8 月 3 日
- 7) 橋本謙二、福島 健、清水栄司、小松尚也、渡邊博幸、篠田直之、中里道子、熊切 力、岡田真一、長谷川久紀、今井一洋、伊豫雅臣：統合失調症患者における血清中 D 型セリン濃度の減少：NMDA 受容体機能低下仮説の証明、第 30 回日本脳科学会（久留米）、2003 年 6 月 7 日
- 8) 福島 健、仲秋栄美、川合順子、Xingjie Guo、Famei Li、Tineke Vankeirsbilck、Willy R.G. Baeyens、今井一洋、豊岡利正：抗うつ薬フルオキセチン投与後のラット脳マイクロダイアリシスサンプルの分析、第 16 回バイオメディカル分析科学シンポジウム（富士吉田）、2003 年 8 月 4 日
- 9) Takeshi Fukushima, Kenji Hashimoto, Masaomi Iyo, Toshimasa Toyo'oka, Kazuhiro Imai : Serum levels of D- and L-serine in the patients with schizophrenia. 8th International Congress on Amino Acids and Proteins (Rome, Italy)、September 7, 2003.
- 10) Takeshi Fukushima、Junko Kawai、Kenji Hashimoto、Masaomi Iyo、Kazuhiro Imai、Toshimasa
- 11) Toyo'oka: Simultaneous determination of D- and L-serine in rat brain microdialysis sample. 15th International Symposium on Chirality (Shizuoka, Japan)、October 20, 2003
- 13) 福島 健：キラル分離を活用した生体内 D-アミノ酸およびD-乳酸の分析研究、第172回 液体クロマトグラフィー研究懇談会（千葉）、2003 年 11 月 10 日
- 14) 福島 健、川合順子、橋本謙二、伊豫雅臣、今井一洋、豊岡利正：マイクロダイアリシスを用いるラット脳内 D-および L-セリンの分析、第 14 回クロマトグラフィー科学会議（東京）、2003 年 11 月 11 日
- 15) Kenji Hashimoto, Takeshi Fukushima, Eiji Shimizu, Naoya Komatsu, Hiroyuki Watanabe, Naoyuki Shinoda, Michiko Nakazato, Chikara Kumakiri, Shin-ichi Okada, Kazuhiro Imai, Masaomi Iyo: Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the NMDA receptor hypofunction hypothesis of

schizophrenia. The 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, (New Orleans, USA), November 11, 2003.

- 16) 前田昌子：生物発光反応の臨床分析への応用、2003 年度日本農芸化学会大会シンポジウム、2003 年 4 月
- 17) 伊藤克敏、大脇健太郎、荒川秀俊、前田昌子：生物発光を用いる Angiotensin I と Endoserin I の 2 成分同時検出酵素イムノアッセイ、第 16 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2003 年 8 月
- 18) Masaru Kato, Kumiko Sakai-Kato, Toshimasa Toyo'oka: On-line Protein Microreactor Using the Sol-Gel Method Integrated into Capillary Electrophoresis and Microchip Electrophoresis, 27th Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Nice, France), July 17, 2003
- 19) 酒井くみ子、加藤 大、豊岡利正：プラスチック製マイクロチップを用いたタンパク質のトリプシン消化・ペプチド分析システムの集積化、第 16 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(富士吉田)、要旨集、2003 年 8 月 4 日
- 20) Masaru Kato, Kumiko Sakai-Kato, Toshimasa Toyo'oka: Enantioseparation of drugs by protein-encapsulated capillary electrochromatography column, 15th International Symposium on Chirality (Shizuoka), October 20, 2003
- 21) 眞野成康、飯島摂子、春日紀恵、後藤順一：アルカリホスファターゼを活用するリン酸化蛋白質の解析、第 16 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (富士吉田)、2003 年 8 月 4 日
- 22) 後藤貴章、佐藤義明、眞野成康、後藤順一：ラット脳における胆汁酸生合成、第 16 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (富士吉田)、2003 年 8 月 4 日
- 23) 池川繁男、山本哲志、伊藤裕美、石渡俊二、眞野成康、後藤順一、前田昌子：肝疾患の病態プロテオミクスに用いる分子標的機能性素子の創製、第 16 回バイオメディカル分析化学シンポジウム (富士吉田)、2003 年 8 月 4 日
- 24) 眞野成康、永治陽子、小林典裕、後藤順一：アシルアデニレートを利用するカルボン酸のアフィニティーラベル化、日本分析化学会第 52 年会 (仙台)、2003 年 9 月 23 日
- 25) 松田りえ子、林 譲、今井一洋、西村和香、伊藤克敏、前田昌子：競合法イムノアッセイ

における検出限界の定義と求め方、日本分析化学会第 52 年会、2003 年 9 月 23 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

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15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16年9月30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