

(%control) を示した。その結果、不均一系の測定においてもすべての機能性官能基を導入したエダラボン誘導体において、DMP0-OH adduct のスペクトルの減少が観測され、既存の長鎖アルキル基をもつ抗酸化剤である γ -tocopherol よりも高いヒドロキシルラジカル消去活性を持つことを確認した。また長鎖アルキル鎖の各置換位置によりヒドロキシルラジカル消去活性に差が見られた。酸化電位の影響がないと思われる 1 位誘導体については、特に活性の悪かった 19 を除く、ほぼすべての化合物がエダラボンと同程度か、またはそれ以上の強い活性を示した。電子効果の受けやすい位置に長鎖アルキル鎖を導入した 4 位誘導体はエノレート型の存在比が減少し活性は落ちると予想されたが、意外にもほぼすべての化合物が 1 位誘導体と同様に強い活性を示した。また均一系で 4 が強い活性を示したのと同様に、4 位誘導体の中でピリジニル基をもつ 28 は最も強い抗酸化活性を示した。一方、3 位誘導体は他の誘導体に比べて明らかに抗酸化活性は悪くなった。カチオン性官能基を導入した水溶性誘導体 29 は脂溶性エダラボン誘導体に比べ抗酸化活性は悪くなった。

D. 結論と考察

1. 基本骨格ピラズロン環への置換基の導入による酸化電位に及ぼす影響

基本骨格ピラズロン環に様々な置換基を導入した化合物の酸化電位を CV 法により測定し、置換基が酸化電位に及ぼす効果を調べた (Figure 1)。ピラズロン環 1 位に様々な置換基を導入したエダラボン

誘導体を合成し、CV 法により酸化電位を測定したが、これらの化合物はその置換基の電子効果にかかわらずエダラボンと同等かそれよりもやや高い酸化電位を示した。一方、ピラズロン環 3 位に種々の置換基を導入した化合物については 5 ($E_{pa} = 673$ mV) で見られるようにトリフルオロメチル基のような電子求引性の置換基を導入すると酸化電位は高くなり、10 ($E_{pa} = 397$ mV) のように電子供与性のカルバミド基を導入すると酸化電位が低くなる傾向が見られた。ピラズロン環 4 位についても 3 位の置換基効果と同様な傾向が見られ、特定の置換基位置における電子効果により、酸化電位が大きく変化することが明らかとなった。エダラボンのフリーラジカル消去のメカニズム (Figure 1) から、アニオン型が活性種で、それがラジカルに一電子供与することで抗酸化能を示すと予測されるので、ピラズロン環の 3 位、4 位に電子供与基を導入することで環の電子密度を上昇させ、その結果、活性種であるエノレートの一電子供与が起りやすくなり酸化電位が低い値となったことが考えられる。

2. 均一系における酸化電位とヒドロキシルラジカル消去活性の関係について

CV 法で得られた各化合物の酸化電位の値を基に、特徴的な酸化電位を示した誘導体について ESR スピントラッピング法を用いてヒドロキシルラジカル消去能の測定を行った。H₂O₂-UV 系でヒドロキシルラジカルを発生させ、スピントラップ剤として DMP0 を用いることで定量的な測定を実現し各化合物の IC₅₀ 値を求めた。酸化電位は酸化されやすさの重要な要因で

あり、エダラボンの酸化電位 (483 mV) より低い誘導体は強い抗酸化活性をもつことが期待されたが、その酸化電位に関わらずエダラボンより強い活性は示さなかった。横軸に酸化電位、縦軸にヒドロキシラジカル消去能の IC_{50} 値をとりグラフを作成した結果を **Figure 3** に示した。この中で、酸化電位がエダラボンと同程度の 483 mV だった 1 位ピリジン誘導体 **4** ($IC_{50} = 18 \cdot M$) が、唯一エダラボン ($IC_{50} = 250 \cdot M$) より 10 倍以上強い活性を示した。

Figure 3 を見ると 500 mV 付近までは酸化電位が低くなるにつれヒドロキシラジカル消去活性は上昇していくが、それ以上酸化電位が低くなると逆にラジカル消去活性は下がってしまった。これはピラズロン環に電子供与性の置換基を導入することでピラズロン環、特に酸素原子の電子密度が上昇し電子を放出しやすくなるため酸化電位は下がり、一見抗酸化能が上昇するように思われるが、ある程度以上の電子をピラズロン環に供与することで活性種であるエノレートの存在比が減少することが原因として考えられる。またピラズロン環に電子求引基を導入することでエノレートの存在比は増加するが、逆にピラズロン環、特に酸素原子の電子密度を下げる結果となり酸化電位が高くなったと考えられる。つまり、エダラボン以上にエノレートの存在比を増やそうとしても酸化電位が高くなり、それ以上酸化電位を下げようとするエノレートの存在比が減少してしまったと考えられた。よってエダラボンが電子密度、エノレート量ともに最もバランスのとれ

た化合物であることがわかる。

その中で、2-pyridinyl 体 **4** がエダラボンを凌ぐ強い活性を示したことは非常に興味深い。**4** は酸化電位にほとんど影響が無いピラズロン環 1 位の誘導体であり、エダラボンと同程度の酸化電位を示すため、もう一つの要因であるエノレートが多いと推測できる。また溶媒に $CDCl_3$ を用いて 1H -NMR を測定したところエノール型が観測されており、これはピリジン環の窒素原子とエノール型の水素原子が分子内で水素結合することによるものだと考えられる。つまりピリジン環の窒素原子が分子内塩基として機能することでエノールのプロトンを引き抜きエノレート量が多いため極めて強い活性を示したことが考えられる。また **4** の電流量の値が他の誘導体に比べて非常に大きい値を示したこともエノール量が多いことを反映していると考えられる。エノレートのラジカルイニシエーターとして 2,2'-azobis(2,4-dimethyl-valeronitrile) を用いて MeOH または MeOH/buffer 中におけるエダラボンの消費を、溶液の pH を変化させ追跡したところ、pH 依存的に酸化速度が速くなったことが報告されている。この結果から非イオン型よりもアニオン型がより反応性が高いことが考えられ、本研究で見いだした分子内に塩基をもつような **4** は活性種エノレートの存在比が多い最も理想的な構造であると言える。

以上のことから高活性なエダラボン誘導体の設計としては、細胞内分布等の機能性官能基を導入する場合は酸化電位に影響が少ない 1 位への置換基の導入が望

ましい。またより高活性な化合物を設計する場合は、ピリジン環に電子供与性の置換基を導入し窒素原子の塩基性を上げることでさらに高活性な誘導体が開発できると考えられる。

3. 不均一系におけるエダラボン誘導体の酸化電位とヒドロキシルラジカル消去活性の関係について

基本骨格ピラゾロン環の1位、3位、4位にそれぞれ長鎖アルキル鎖を導入した化合物のリポソーム中における酸化電位をCV法により測定した (Table 3)。1位に長鎖アルキル基を導入した **18** (493 mV) についてはエダラボン (448 mV) に近い酸化電位を示したが、3位、4位に長鎖アルキル基を導入した **23** (528 mV), **24** (512 mV) については電位が高くなった。均一系において3位、4位にアルキル基のような電子供与性の置換基を導入するとピラゾロン環の電子密度が増加し、酸化電位が低くなるが、不均一系においては必ずしも均一系での傾向を反映しないことが明らかとなった。また、他の脂溶性エダラボン誘導体については酸化波を検出することができなかった。これは電子を供与することによりピラゾロン環の電子密度が上昇しエノール体の存在比が増加しているため、活性部である極性基までリポソーム膜に埋まりこみ、エノレート型が安定に存在できる状態にないため酸化電位が検出できなかったのではないかと考えられる。

ESR スピントラッピング法を用いてリポソーム中でのヒドロキシルラジカル消去能の測定を行った。その結果、Figure 5a, 5b に示したように、長鎖アルキル基を導

入したすべてのエダラボン誘導体において DMP0-OH adduct のスペクトルの減少が観測され、ほぼすべての誘導体が γ -tocopherol よりも高いヒドロキシルラジカル消去活性を持つことを確認した。また、長鎖アルキル基の各置換位置によりヒドロキシルラジカル消去活性に差が見られた。酸化電位に及ぼす影響がないと思われる1位脂溶性誘導体については、**19**を除く、ほぼすべての化合物がエダラボンと同程度か、またはそれ以上の強い活性を示した。無置換のエダラボンは水相、油相ともに存在するため溶液中に分散しているが、脂溶性エダラボン誘導体のピラゾロン環部はリポソーム膜表面に選択的に存在し集積効果によって効率的に抗酸化作用を示したと考えられる。また、**19**は長鎖アルキル基を持たない**5**が均一系においてヒドロキシルラジカル消去能が低かったのと同様に、3位に強い電子求引基を持つためエノレートの存在量が極端に少なく抗酸化活性が低くなったと考えられる。4位置換脂溶性誘導体についても1位誘導体と同様に強い活性を示した。特に、**28**はすべての誘導体の中で最も強い活性を示した。これは**4**が均一系において強い活性を示したように、4位に長鎖アルキル鎖を導入した**28**もピリジン環の窒素原子が分子内塩基として機能しエノレート量が多くなっているためであると予想された (**28**も CDCl_3 を用いて $^1\text{H-NMR}$ を測定したところエノール型が観測された)。一方、3位脂溶性誘導体**23**は他の誘導体に比べて明らかに抗酸化活性は悪くなった。これは検出された酸化電位が高かったことも一つの要因であると考えら

れるが、リポソーム調製時の安定性が低いことが主な理由として考えられる。リポソームが破裂してしまうことで化合物が分散し、集積性が落ちるために効率的な抗酸化能の発揮が抑制されていると予想される。カチオン性官能基を導入した水溶性誘導体 **29** は脂溶性エダラボン誘導体に比べ抗酸化活性は悪くなった。**29** の水溶液中での酸化電位は 482 mV でエダラボンと同程度であるが、エノレート型の存在比が少ないために活性が低くなっていると予想される。

以上、今年度は、構造活性相関に基づいた毒性軽減構造修飾法の開発研究を行った。構造修飾により毒性を軽減するには、活性を維持した状態でどのような構造修飾が可能であるかを解析する必要がある。このような観点から、活性酸素消去能を有する脳梗塞急性期治療薬エダラボンをモデル化合物として、構造修飾が活性酸素消去能に及ぼす影響を調べた。最初に、エダラボンの基本骨格であるピラゾロン環に種々の置換基を導入したとき、その構造修飾が活性酸素消去能にどのように影響するかを解析する目的で、**Scheme 1-6** に示す化合物を合成した。これらの合成化合物について、酸化電位とヒドロキシルラジカル消去活性 (ESR 法) を調べ、種々の置換基が活性酸素消去能に及ぼす影響を解析した。その結果、1 位への置換基導入が酸化電位への影響が少ないことがわかった。また、1 位に 2-ピリジル基を導入した化合物 **4** が、エダラボンに優るすぐれた活性酸素消去能を有することを見出した。化合物 **4** のすぐれた活性酸素消去能は、分子をエノレー

ト型に固定する効果によるものと考えられ、毒性を軽減した医薬品創製のためのキー化合物になると考えられる。次に、エダラボンの膜界面での活性酸素消去活性を評価する目的で、ピラゾロン骨格に長鎖アルキル基を導入した化合物 (**Scheme 8-10**) を合成した。これらの化合物をリポソーム膜に取り込ませ、細胞膜上での活性酸素種消去能を ESR 法により評価した。その結果、長鎖アルキル基を導入したほぼすべての化合物で、 γ -tocopherol よりもすぐれたヒドロキシルラジカル消去活性を有することが明らかになった。この結果は、長鎖アルキル基の導入がエダラボンの細胞内局在性を制御し、すぐれた活性酸素種消去剤として有用であることを示す。

以上、本研究において、エダラボンの活性酸素種消去能力を向上させるための置換基導入法、および、活性酸素種消去能力を維持した状態でエダラボンの細胞内局在性を制御するための知見が得られた。これらの研究成果は、毒性軽減構造修飾法の開発に大きく寄与すると考える。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiroki Tsumoto, Katsumasa Takahashi, Takayoshi Suzuki, Hidehiko Nakagawa, Kohfuku Kohda, Naoki Miyata, Preparation of C60-based active esters and coupling of C60 moiety to amines or alcohols, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 657-660, (2008).

- 2) Kiyoshi Fukuhara, Ikuo Nakanishi, Atsuko Matsuoka, Tomohiro Matsumura, Sachiko Honda, Mikiko Hayashi, Toshihiko Ozawa, Naoki Miyata, Shinichi Saito, Nobuo Ikota, Haruhiro Okuda, Effect of Methyl Substitution on the Antioxidative Property and Genotoxicity of Resveratrol, *Chem. Res Toxicol.*, 21, 282-287 (2008).
- 3) Yukihiro Itoh, Takayoshi Suzuki, Akiyasu Kouketsu, Nobuaki Suzuki, Satoko Maeda, Minoru Yoshida, Hidehiko Nakagawa, and Naoki Miyata, Design, Synthesis, Structure-Selectivity Relationship, and Effect on Human Cancer Cells of a Novel Series of Histone Deacetylase 6-Selective Inhibitors, *J. Med. Chem.*, 50, 5425-5438 (2007).
- 4) Ayako Kimata, Hidehiko Nakagawa, Ryo Ohyama, Tomoko Fukuuchi, Shigeru Ohta, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, New Series of Antiprion Compounds: Pyrazolone Derivatives Have the Potent Activity of Inhibiting Protease-Resistant Prion Protein Accumulation, *J. Med. Chem.*, 50, 5053-5056 (2007).
- 5) Shinya Usui, Hiroki Fujieda, Takayoshi Suzuki, N. Yoshida, Hidehiko Nakagawa, Michitaka Ogura, Makoto Makishima, Naoki Miyata, Synthesis and Evaluation of 2-Nonylaminopyridine Derivatives as PPAR Ligands, *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 1053-1059 (2007).
- 6) Takayoshi Suzuki, Shinya Hisakawa, Yukihiro Itoh, Nobuaki Suzuki, Katsumasa Takahashi, Masatoshi Kawahata, Kentaro Yamaguchi, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Design, synthesis, and biological activity of folate receptor-targeted prodrugs of thiolate histone deacetylase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 4208-4212 (2007).
- 7) Hiroki Fujieda, Shinya Usui, Takayoshi Suzuki, Hidehiko Nakagawa, Michitaka Ogura, Makoto Makishima, Naoki Miyata, Phenylpropanoic acid derivatives bearing a benzothiazole ring as PPARdelta-selective agonists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 4351-4357 (2007).
- 8) Hidehiko Nakagawa, Nobuko Komai, Mitsuko Takusagawa, Yuri Miura, Tosifusa Toda, Naoki Miyata, Toshihiko Ozawa, Nobuo Ikota, Nitration of specific tyrosine residues of cytochrome C is associated with caspase-cascade inactivation, *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 15-20 (2007).
- 9) Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, Ueda R, Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells, *Leukemia*, 21, 2344-53 (2007).
- 10) Hiroki Tsumoto, Chie Murata, Naoki Miyata, Kohfuku Kohda, Ryo Taguchi, Efficient identification and quantification of proteins using isotope-coded 1-(6-methylnicotinoyloxy)succinimides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 815-24 (2007).
- 11) Ikuo Nakanishi, Tomokazu Shimada, Kei Ohkubo, Sushma Manda, Takehiko Shimizu, Shiro Urano, Haruhiro Okuda, Naoki Miyata, Toshihiko Ozawa,

Kazunori Anzai, Shunichi Fukuzumi, Nobuo Ikota, Kiyoshi Fukuhara, Involvement of electron transfer in the radical-scavenging reaction of resveratrol, *Chemistry Letters*, 36, 1276-1277 (2007)

12) Linxiang Li, Yoshihiro Abe, Kiyotada Kanagawa, Tomoko Shoji, Tadahiko Mashino, Masataka Mochizuki, Miho Tanaka, Naoki Miyata, Iron-chelating agents never suppress Fenton reaction but participate in quenching spin-trapped radicals, *Analytica Chimica Acta*, 599, 315-319 (2007).

13) Kiyoshi Fukuhara, Shinji Oikawa, Nana Hakoda, Yasunori Sakai, Yusuke Hiraku, Takuji Shoda, Shinichi Saito, Naoki Miyata, Shosuke Kawanishi, Haruhiro Okuda, 9-Nitroanthracene derivative as a precursor of anthraquinone for photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 3869-3873 (2007).

14) Tomoko Shoji, Linxiang Li, Yoshihiro Abe, Masahiro Ogata, Yoshihisa Ishimoto, Ryoko Gonda, Tadahiko Mashino, Masataka Mochizuki, Michihisa Uemoto, Naoki Miyata, DMPO-OH radical formation from 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) in hot water, *Analytical Sciences*, 23, 219-221 (2007).

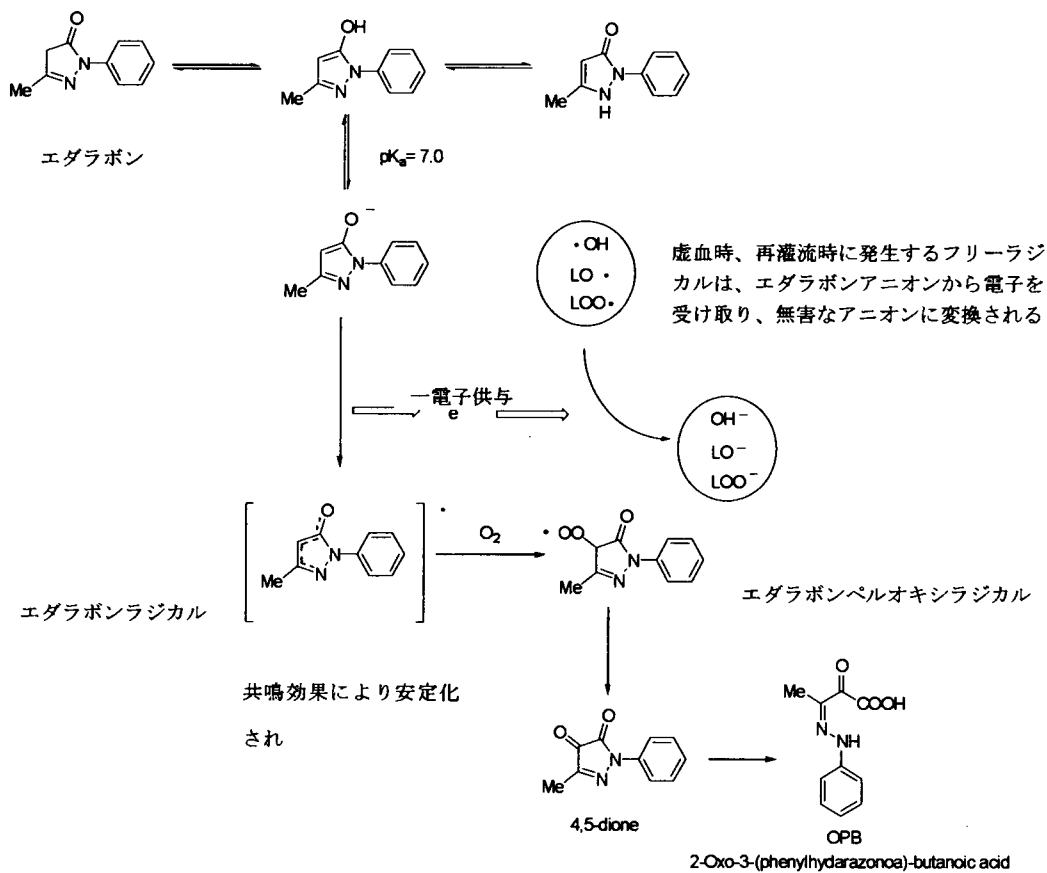


Figure 1 エダラボンのフリーラジカル消去メカニズム

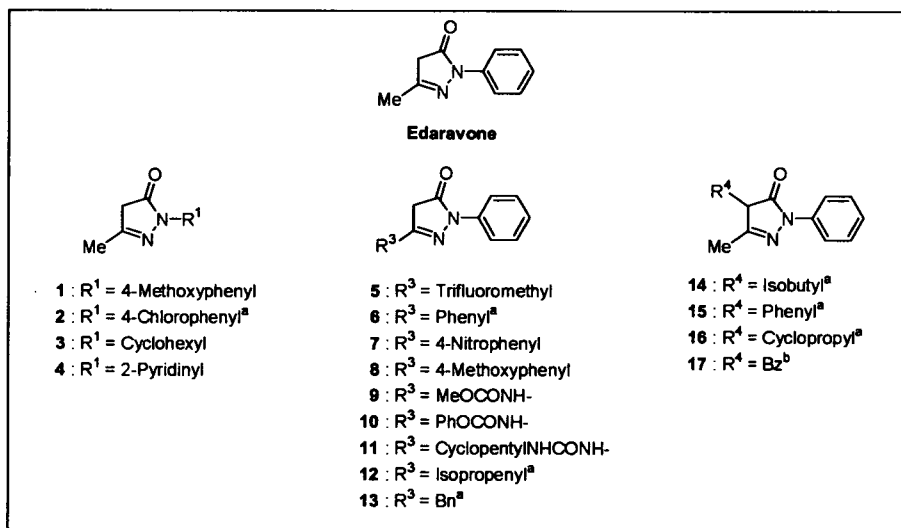


Figure 2 合成したエダラボン誘導体

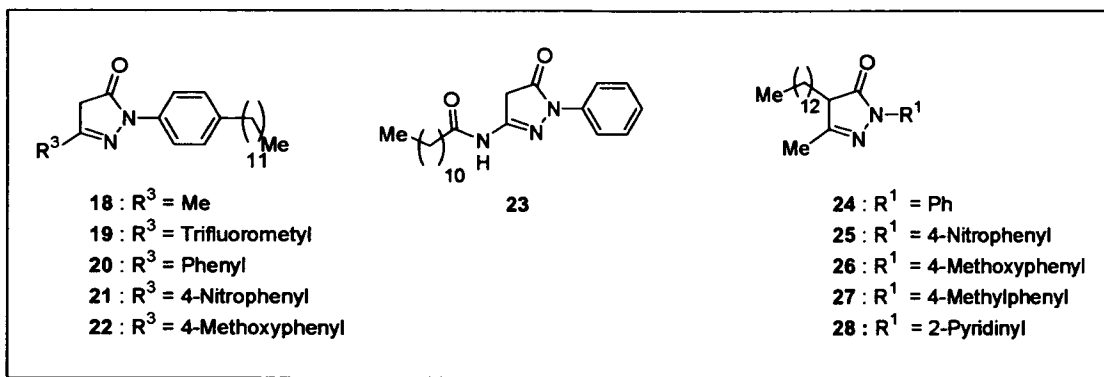


Figure 3 長鎖アルキル基を有する新規エダラボン誘導体

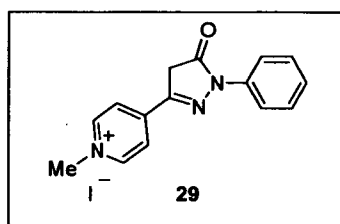
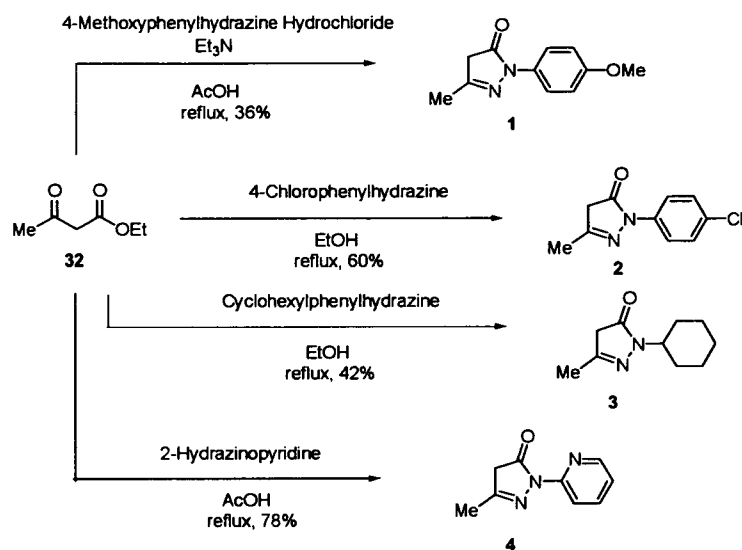
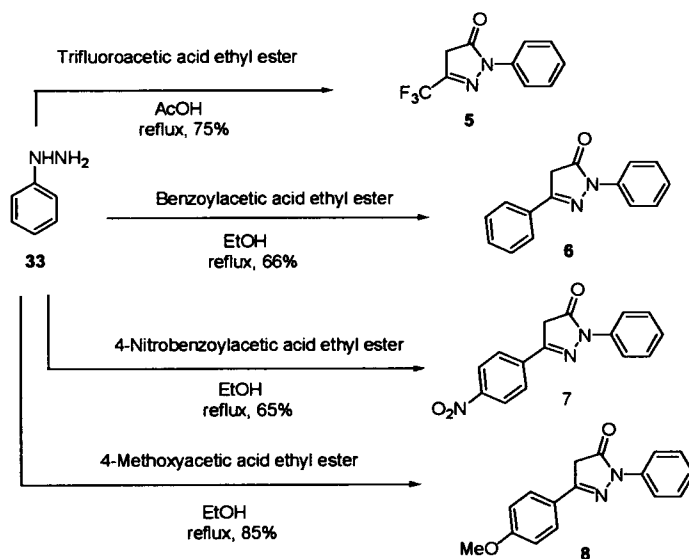


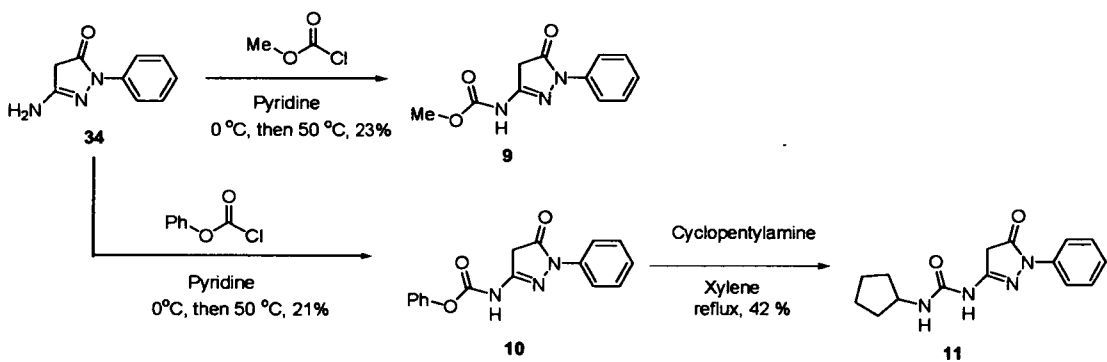
Figure 4 水溶性新規エダラボン誘導体



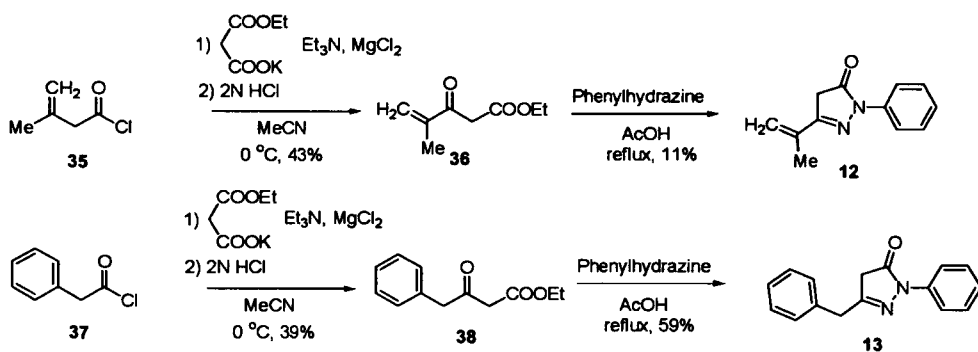
Scheme 1 化合物 1-4 の合成



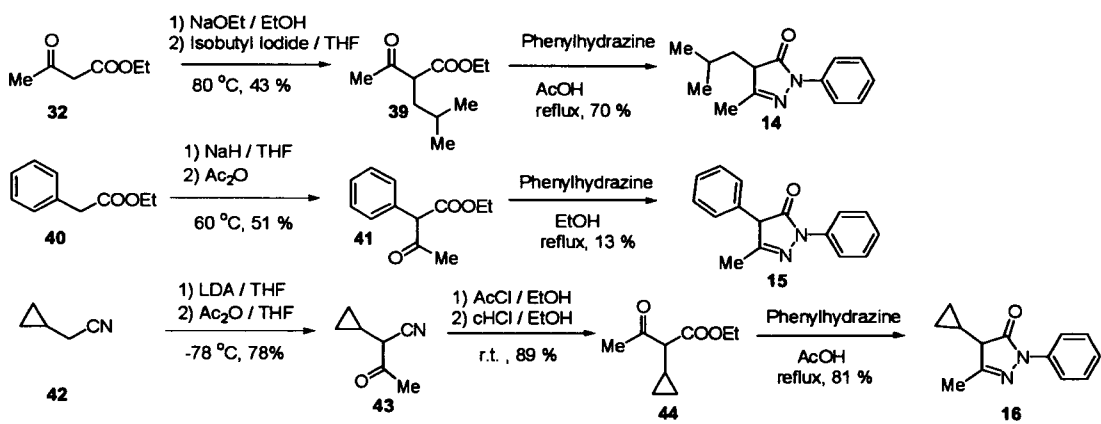
Scheme 2 化合物 5-8 の合成



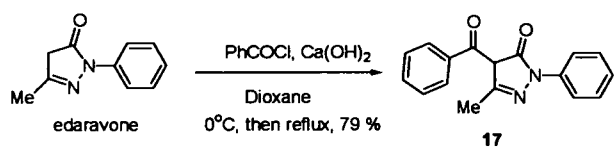
Scheme 3 化合物 9-11 の合成



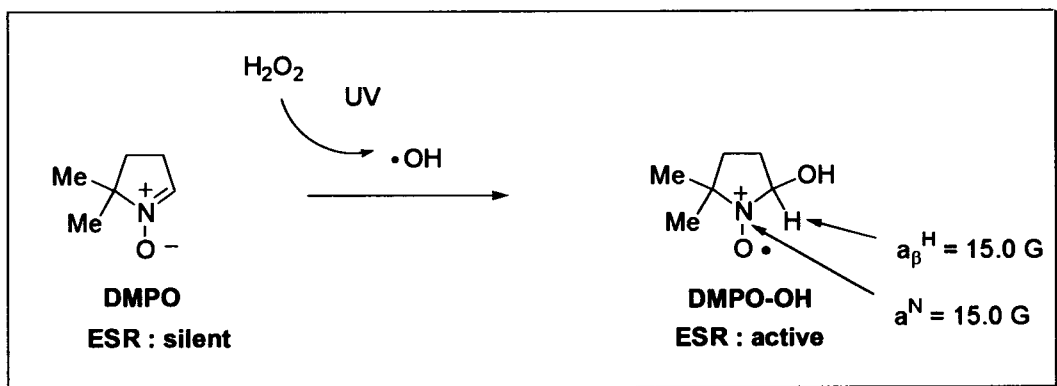
Scheme 4 化合物 12-13 の合成



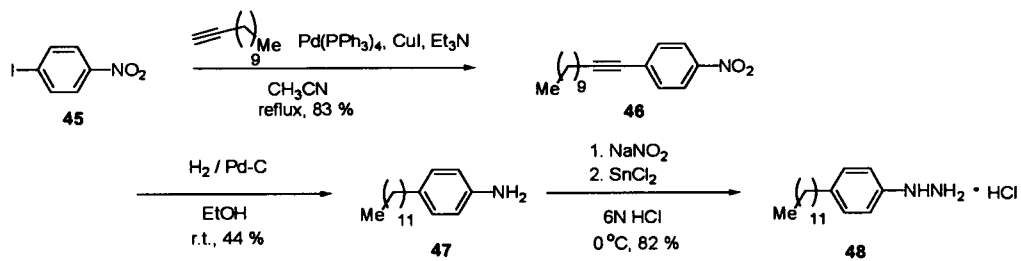
Scheme 5 化合物 14-16 の合成



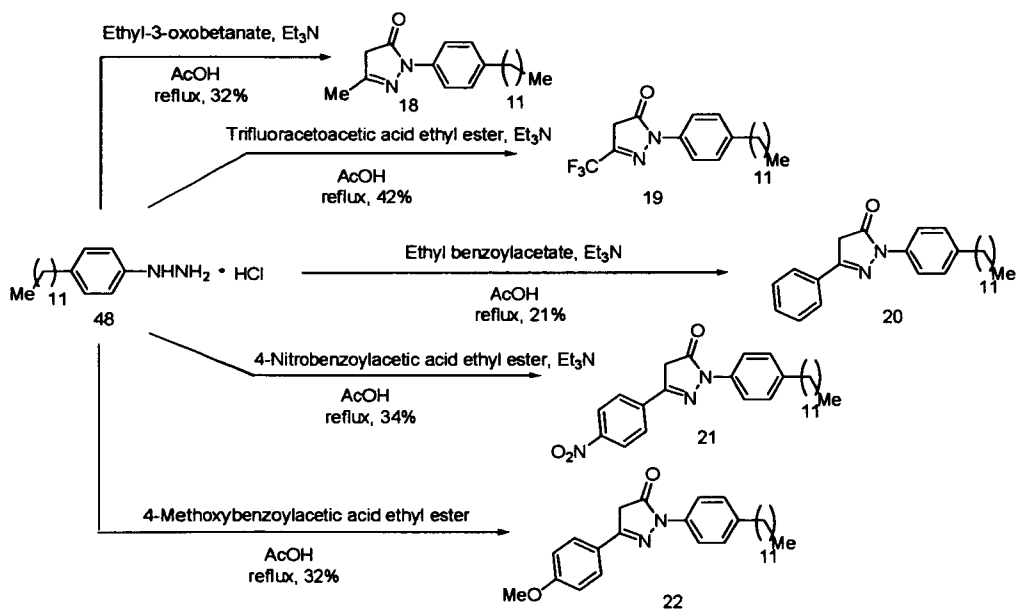
Scheme 6 化合物 17 の合成



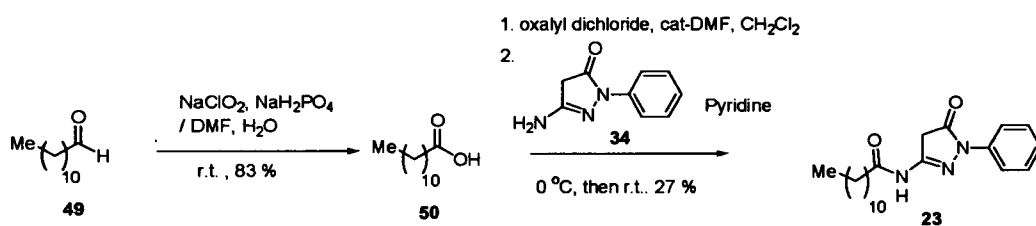
Scheme 7 DMPO と $\cdot\text{OH}$ の反応



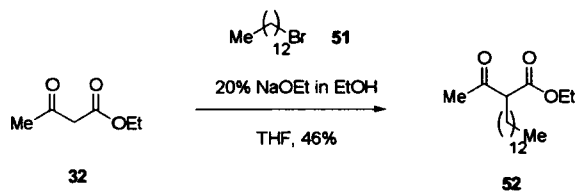
Scheme 8 中間体 48 の合成



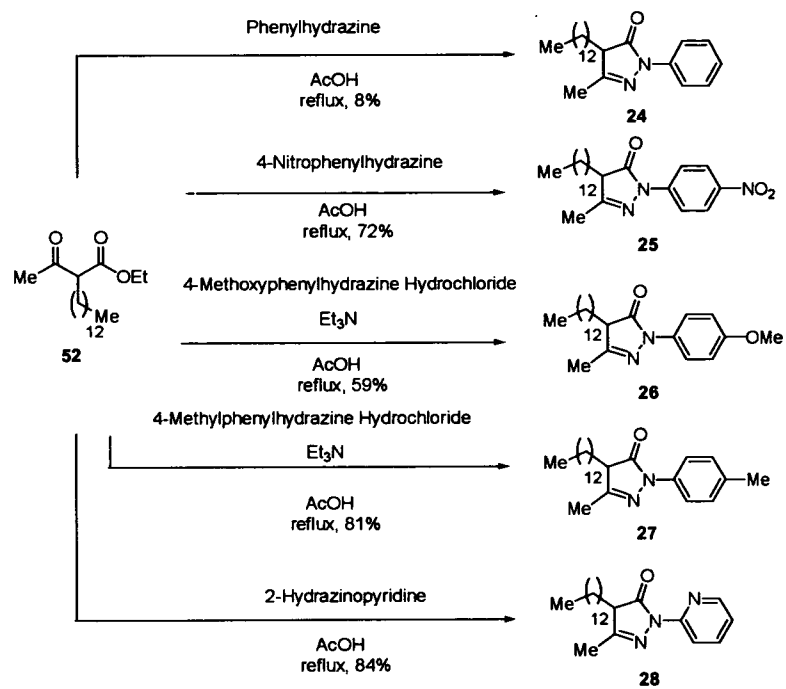
Scheme 9 化合物 18-22 の合成



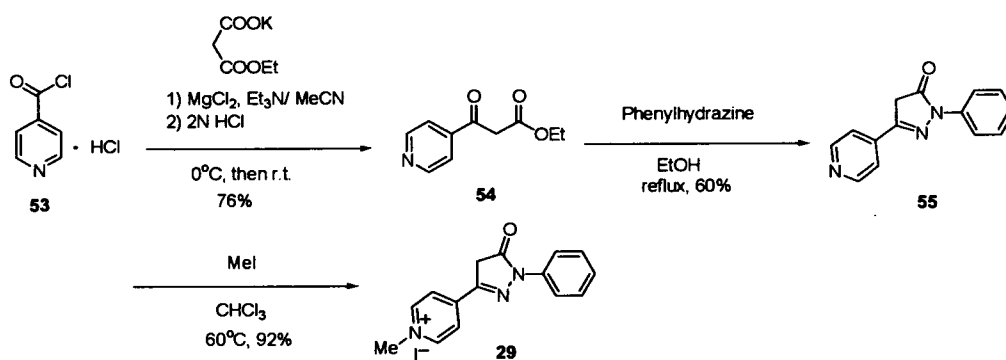
Scheme 10 化合物 23 の合成



Scheme 11 中間体 52 の合成



Scheme 12 化合物 24-28 の合成



Scheme 13 化合物 29 の合成

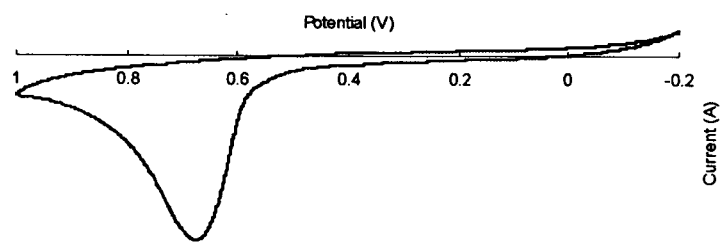


Figure 1 Cyclic voltammogram of compound 5

Conditions for oxidation potential : 10 mM sample in 50 mM NaCl. Working electrode ; Pt, reference electrode ; Ag⁺/AgCl, counter electrode ; Pt, scan speed ; 50 mV/sec, Scan range -0.2 V to 1.0 V

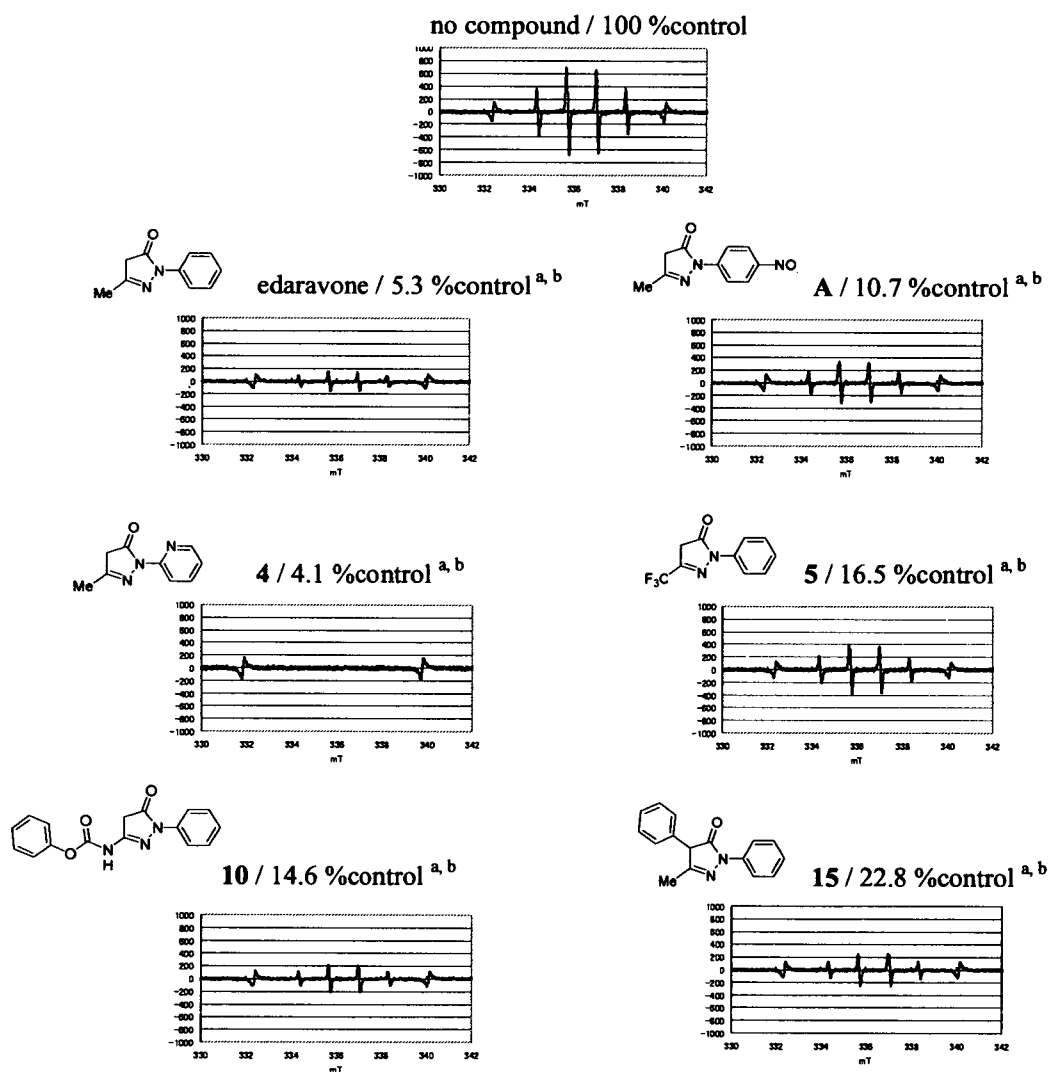
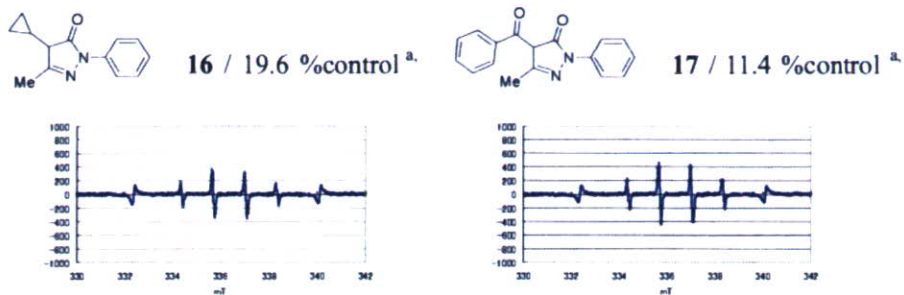


Figure 2a ESR spectra of DMPO-OH adduct in the presence of edaravone derivatives



^a%control = (The ratio^c of compound at 0.25 mM / The ratio of control)

^b Values are means of at least three experiments.

^c Ratio = (The peak of compound at 0.25 mM / The peak of Mn)

Figure 2b ESR spectra of DMPO-OH adduct in the presence of edaravone derivatives

The reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl (pH=7.4), 25 mM DMPO solution, 1mM of test compounds, and 25 mM H₂O₂. The mixture was irradiated by UV light (UV-crosslinker; 200 mJ/cm²), and ESR spectra of DMPO-OH spin adduct were recorded. Instrumental conditions: Microwave power, 10 mW; Frequency, 9.42 GHz; Field, 336.5 mT; Sweep width, 7.5 mT; Sweep time, 1 min; Modulation width, 0.063 mT; Gain, 320; Time constant, 0.03

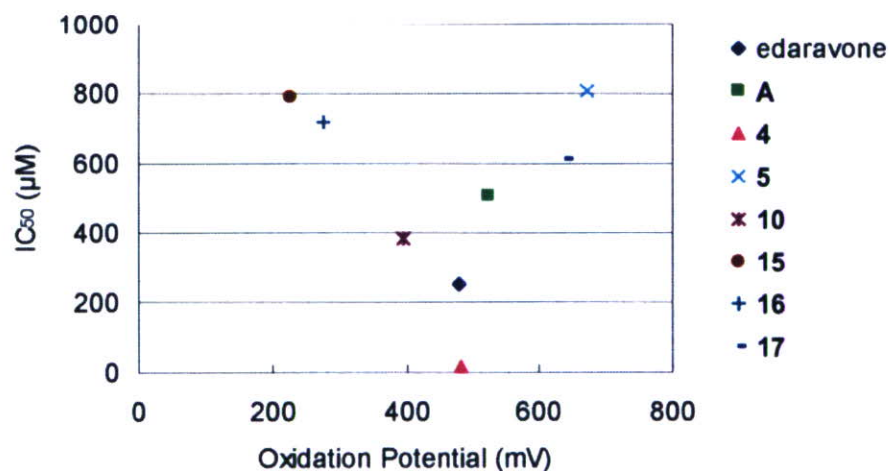


Figure 3 酸化電位と・OH 消去能の相関図

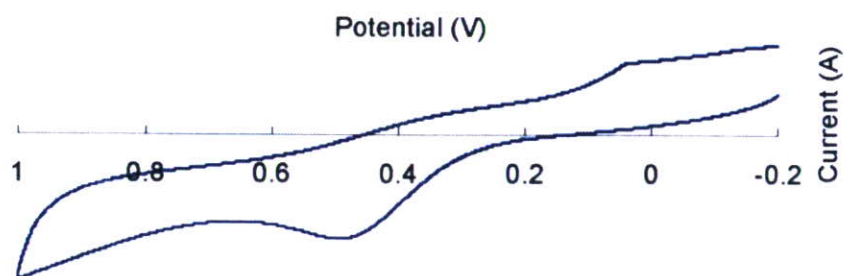


Figure 4 Cyclic voltammogram of **18**

Conditions for oxidation potential : Working electrode ; Pt, reference electrode; Ag^+/AgCl , counter electrode; Pt, scan speed; 50 mV/sec, Scan range -0.2 V to 1.0 V

no compound in liposome / 100 %control

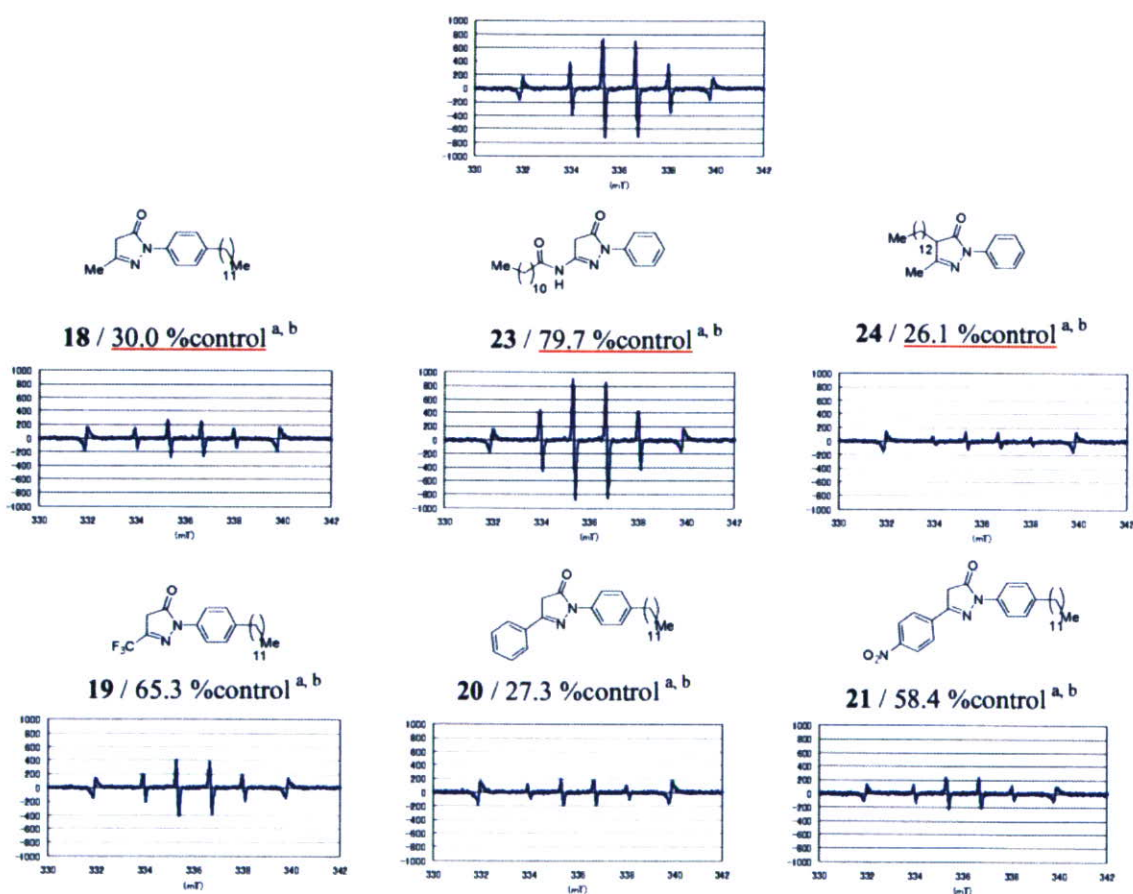
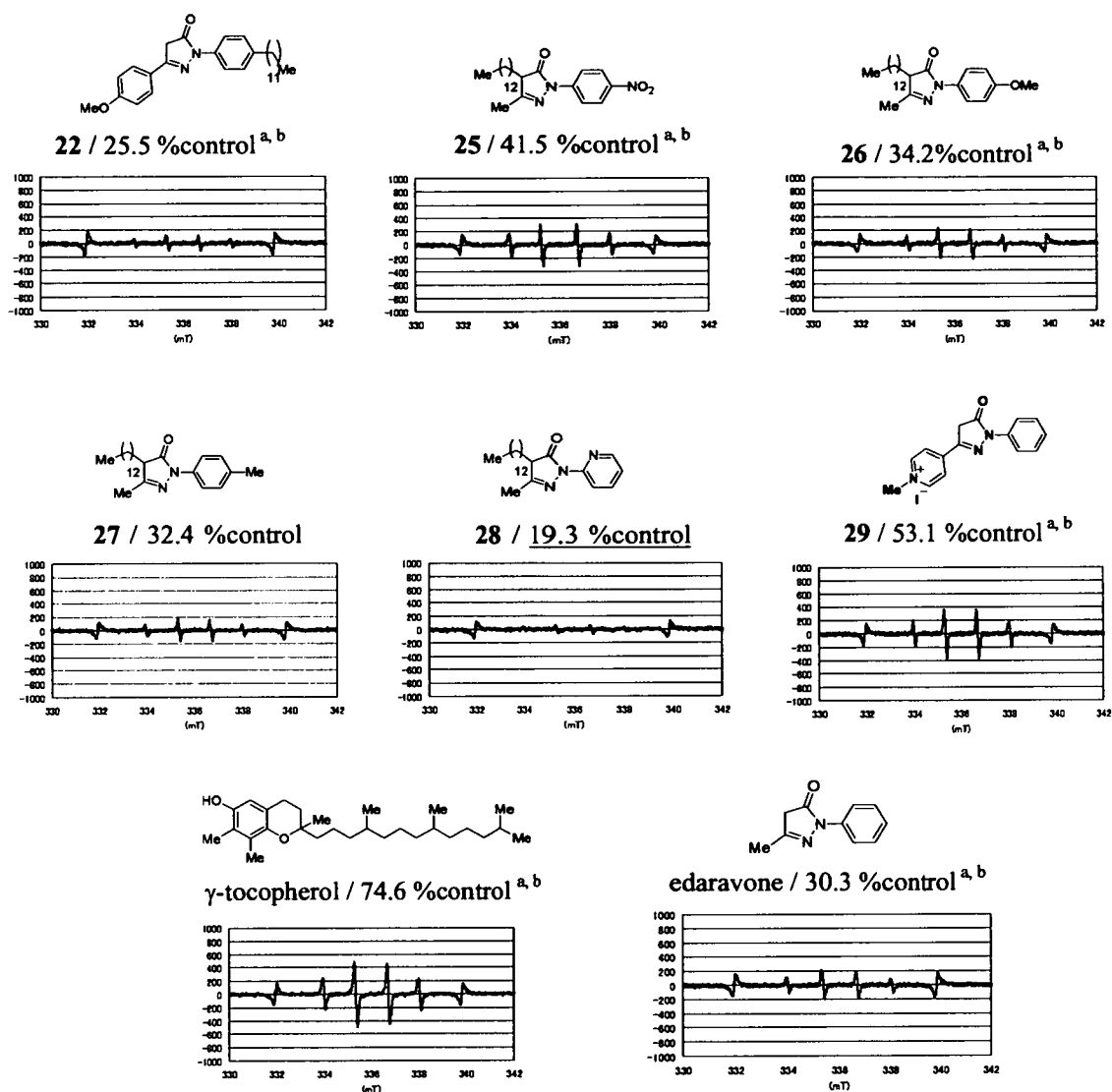


Figure 5a ESR spectra of DMPO-OH adduct in the presence of edaravone derivatives in liposome



^a %control = (The ratio^c of compound / The ratio of control)

^b Ratio = (The peak of compound / The peak of Mn)

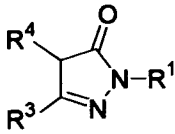
Figure 5b ESR spectra of DMPO-OH adduct in the presence of edaravone derivatives in liposome

The reaction mixture contained 30 mM Tris-HCl (pH7.4), 12.5 mM DMPO solution, prepared liposome in 10 mM Tris-HCl (pH7.4), and 25 mM H₂O₂. The mixture was irradiated by UV light (UV-crosslinker; 200 mJ/cm²), and ESR spectra of DMPO-OH spin adduct were recorded. Instrumental conditions: Microwave power, 10 mW; Frequency, 9.42 GHz; Field, 336.5 mT; Sweep width, 7.5 mT; Sweep time, 1 min; Modulation width, 0.063 mT; Gain, 320; Time constant, 0.03.

Table 1 Oxidation Potential (*Epa*)

Compound	R ¹	R ³	R ⁴	<i>Epa</i> (mV)		
				(vs Ag ⁺ /AgCl)	ip (A)	pH
edaravone	Ph-	Me-	H	483	-6.62E-06	7.0
edaravone	Ph-	Me-	H	480	-7.89E-06	7.8
A ^a	4-NO ₂ Ph-	Me-	H	525	-1.96E-07	7.6
1	4-MeOPh-	Me-	H	678	-3.57E-06	7.8
2	4-ClPh-	Me-	H	473	-1.11E-06	7.4
3	Cyclohexyl-	Me-	H	549	-4.85E-07	7.4
4	2-Pyridinyl-	Me-	H	483	-1.29E-05	7.0
5	Ph-	Me-	H	673	-7.73E-06	7.6
6	Ph-	Ph-	H	397	-3.94E-06	7.6
7	Ph-	4-NO ₂ Ph-	H	419	-1.61E-07	7.4
8	Ph-	4-MeOPh-	H	397	-3.25E-06	7.8
9	Ph-	MeOCONH-	H	454	-1.49E-05	7.8
10	Ph-	PhOCONH-	H	397	-1.54E-06	7.0
11	Ph-	CyclopentylNHCONH-	H	372	-4.38E-06	7.8
12	Ph-	Isopropenyl-	H	387	-4.02E-08	7.4
13	Ph-	Bn-	H	269	-1.14E-06	>8.0
14	Ph-	Me-	Isobutyl-	262	-2.24E-07	>8.0
15	Ph-	Me-	Ph-	227	-7.90E-07	7.6
16	Ph-	Me-	Cyclopropyl-	275	-1.61E-07	7.8
17	Ph-	Me-	Bz-	640	-4.98E-07	7.0

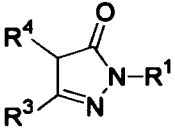
Table 2 Oxidation Potential and $\cdot\text{OH}$ scavenging activity (IC_{50})

				<i>Epa</i> (mV)	$\text{IC}_{50}^{\text{b}}$
Compound	R^1	R^3	R^4	(vs Ag^+/AgCl)	(μM)
edaravone	Ph-	Me-	H	483	250
A ^a	4- NO_2 Ph-	Me-	H	525	505
4	2-Pyridinyl-	Me-	H	483	18
5	Ph-	CF_3 -	H	673	807
10	Ph-	PhCONH-	H	397	383
15	Ph-	Me-	Ph-	227	790
16	Ph-	Me-	Cyclopropyl-	275	716
17	Ph-	Me-	Bz-	640	612

^a Compound A was purchased from Tokyo Kasei Kogyo.

^b Values are means of at least three experiments.

Table 3 Oxidation Potential (*Epa*)

				<i>Epa</i> (mV)	ip (A)
Compound	R^1	R^3	R^4	(vs Ag^+/AgCl)	
edaravone	Ph-	H	Me-	448	-6.84E-06
18	4- $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{C}_6\text{H}_4$ -	Me-	H	493	-1.43E-06
23	Ph-	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CONH}$ -	H	528	-1.19E-06
24	Ph-	Me-	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}$ -	512	-4.63E-07

LC/MS/MS を用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析

分担研究者 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長

研究要旨

低侵襲性の尿サンプルを用いた新しい毒性予測系の開発をめざし、質量分析(MS)によるプロテオミクス、ペプチドミクス高感度安全性予測系の確立を行ってきた。網羅的比較解析による安全性予測マーカーの検出のためには、MSにて検出可能なペプチドの数を増やすことが成功への第一条件であり、前処理および測定条件等の詳細な実験条件の検討により、数マイクロリットルの尿にて測定が可能なレベルまで到達した。また、更なる高感度化のためには、これまでの検討より、MS/MS 測定に頼らない TOF-MS データ依存的な解析法が有効であることがわかったため、ペプチドの検出と同定を分離した2段階でのアプローチ (TOF-MS dependent 2-step focussed identification) による検討を行った。すなわち、TOF マスにおける網羅性を高める事により、サンプル間のペプチドレベルの発現比較を行い、発現に差があったペプチドピークをターゲットングして同定のための MS/MS 測定を行うという方針で、ノンラベルによる比較及び安定同位体によるラベル法 (cleavable-ICAT) の検討を進めた。この解析の過程で、既存の質量分析装置の解析ソフトウェアには機能的限界があることがわかり、独自の手法に合わせた解析を可能とするために、オリジナルなソフトウェアの開発を平行して進めてきた。質量分析生データの加工と、3次元グラフによる可視化、3次元アルゴリズムに基づく自動ピーク検出、Fast Fourier Transform (FFT)法によるノイズリダクション、ペプチドピーク抽出などの機能を備えたソフトウェア「mzMore」を開発した。また、ラット尿の分析において、尿中に高濃度で存在する発現量の高い数種のタンパク質が網羅的解析上邪魔になっていることがわかり、これらのタンパクを同定するとともにこれらを前処理により除去するための手法の検討として、抗体結合ビーズを作製し、その効果を検討した。さらに、ヒトでの毒性マーカー検出へ向けた基礎データとして、ヒト尿サンプルに関するプロテオーム解析にも着手した。

研究協力者

押澤 正 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部