

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス

**非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発**

平成 17 年度～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 奥田 晴宏

平成 20 年 (2008) 年 4 月

## 目 次

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| <b>I. 総合研究報告書</b> .....          | 1   |
| 非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発<br>奥田晴宏  |     |
| <br>                             |     |
| <b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b> ..... | 6 9 |
| <br>                             |     |
| <b>IV. 研究成果の刊行物・別刷</b> .....     | 7 7 |

**厚生労働科学研究費補助金**  
**(創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究事業)**  
**総合研究報告書**

**非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発**

主任研究者 奥田晴宏 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部長

**研究要旨**

医薬品候補化合物の安全性の早期予測ならびに詳細なメカニズム予測には、医薬品開発におけるトキシコゲノミクス (TG) 研究で得られた情報に加えて、当該物質の毒性に基づく細胞環境変化 (内因性物質の代謝変動) の情報が必須である。本研究は新規メタボロミクス・プロテオミクス高感度安全性予測技術を確認し、尿サンプルのような非侵襲試料を活用することにより、本予測系のヒトへの外挿性を高め、医薬品開発におけるヒトを対象とした早期安全性予測ならびに詳細なメカニズム予測を実現することを目的とする。

本研究班は、1) NMRを用いたメタボノミクス解析、高感度化技術の開発、2) メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立、3) LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発、4) メタボロミクスと病理の関連性についての解析、5) メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発、6) 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、7) 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発。なお、研究3) および4) は一連の実験プロトコールのもとで共同研究として実施されたことから、一括として報告する。

**I NMRを用いたメタボノミクス解析、高感度化技術の開発**

医薬品の開発・安全性研究における新しい毒性評価手法を確認し、毒性学的バイオマーカーを探索することを目的として、<sup>1</sup>H NMRによる尿成分のメタボロミクス解析手法の検討をおこない、APAPによるラット肝障害のモデルのメタボロミクスを実施した。メタボロミクス解析手法としては、主成分分析によるスペクトル全体の網羅的解析によって代謝物総体の変化を明らかにし、さらに毒性を特徴づける主成分軸上の特徴的なピークについてはNMR SUITEで解析することにより、代謝物の同定・定量が可能であることがわかった。この手法を用いて、APAPのラット肝障害モデルの尿のメタボロミクスを行ったところ、クエン酸や2-オキシグルタル酸などのエネルギー代謝系からの内因性代謝産物が肝障害のバイオマーカー候補となることが明らかとなった。これらの結果から、非侵襲試料を用いた医薬品の安全性予測系に資する手法として、<sup>1</sup>H NMRによる尿成分のメタボロミクス解析手法を確認し、肝障害のバイオマーカー候補を明らかにすることができた。

**II メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立**

**II-1 トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序解明：**

トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合による毒性発現機序及びその防御の機序の解析手法を確認することを最終目的として胆汁鬱滞型の肝障害を誘発するlithocholic acid (LCA) の毒性発現及びその防御の機序を解析した。経時的な変化や毒性を軽減させる薬物、pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (PCN) 併用下、多面的に網羅的遺伝子発現解析を実施した。また、脂質代謝を変動させ、胆汁酸の胆汁排泄を変化させると考えられるsoyasapogenol誘導体の22  $\beta$ -methoxyolean-12-ene-3 $\beta$ , 24 (4 $\beta$ )-diol (ME3738) とprobucoをLCAと併用して肝障害の防御の機序を解析した。これらの網羅的遺伝子発現解析と脂質動態解析を組み合わせることにより、胆汁中へのコレステロールやリン脂質の排泄を亢進させることにより、LCA誘発肝障害を防御でき

ることが示唆され、これらの機序が胆汁鬱滞型の肝障害の治療に応用出来る可能性が示された。

## II-2 ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序解明:

前立腺癌治療薬 flutamide はヒト特異的に遅延型の肝障害を誘発することが知られている。flutamide の加水分解で生じる主代謝物の 5-amino-2-nitrobenzotrifluoride (FLU-1) と TCPOBOP を用いてマウスによる肝障害モデルを作製し、代謝の面から flutamide 誘発肝障害の機序の解析を実施した。FLU-1 の N-水酸化代謝物はタンパクとの反応性を有し、肝障害誘発に関与することが示唆された。GSH 存在下での FLU-1 N-OH の FLU-1 への還元は FLU-1 N-OH の解毒機構の一つであると考えられ、flutamide による肝障害誘発に、肝臓における FLU-1 N-OH の生成増加と肝内 GSH 枯渇の両方が重要であることが示唆された。

## III LC/MS/MS を用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発

### IV メタボロミクスと病理の関連性についての解析

質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発:

ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を用いた新規メタボロミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、ヒトで肝障害の発症が報告されているアセトアミノフェン (APAP) のラット肝障害モデルについて、質量分析計を用いた尿サンプルのメタボロミクス解析を行った。

簡便な前処理法で得られた質量スペクトルを統計学的手法の組み合わせにより網羅的に解析することで、APAP 誘発肝障害時のバイオマーカー候補となる代謝物ピークを抽出することに成功した。以上のように非侵襲試料のメタボロミクス手法による解析から新規肝障害マーカーの探索法を検討し、尿成分から薬物性肝障害のバイオマーカー候補を特定する解析手法を確立した。

### V メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発研究として、フラーレンのイオン化のしやすさをペプチドのソフトイオン化に利用することを考え、ペプチドのアミノ基にフラーレンを温和な条件で導入する試薬を開発した。ペプチドのアミノ基に重水素化したピリジン環を導入する試薬も開発し、合成した誘導体化試薬を用いることにより、リン酸化ペプチドの検出や PSD モードによるアミノ酸配列解析が可能であることを見出した。

また、化学物質の構造修飾が毒性発現に及ぼす影響の解析について、活性酸素消去作用を持ち脳梗塞急性期治療薬として認可されているエダラボンをモデル化合物として選び研究を行い、エダラボンの副作用として知られている腎毒性を軽減する目的で、脂溶性/水溶性を制御する種々の置換基を導入したピラゾロン誘導体を合成し、活性酸素消去能と構造との相関を解明した。

### VI 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

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。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。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 測定を行うと手法を開発し、網羅性の高い高感度プロテオミクス解析法を確立した。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判明し、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。

### VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

細胞レベルでの薬剤による毒性の予測を行うため、細胞試料を用いた NMR によるメタボロミクス技術の開発を目的とし、以下の研究を行った。1. マウス病態モデルを用いて、採取した尿試料

のNMR解析を行い、薬剤による毒性マーカーと病態時のマーカーとの相互比較に利用できるマーカー検索を実施し、病態特異的なマーカー検出を行った。2. 細胞（各種臓器由来）のメタボローム解析に必要なサンプル調製法（特にアルブミン除去などの前処理法）の検討を行い、超音波破碎試料を用いたNMRによるメタボローム解析を実施した。3. 細胞への薬剤暴露時の網羅的遺伝子発現解析を実施するとともに、同じサンプルを用いたNMRによるメタボローム解析の検討を行い、メタボローム解析が遺伝子発現解析によるトキシコゲノミクスデータを補完するのに有効な方法であることを明らかにした。

これらの研究を通じて、acetoaminophen投与肝障害動物尿より複数のバイオマーカー候補が見出されると共に、肝障害を肝障害軽減薬物の併用試験がバイオマーカーの探索に有効であることが判明した。また、ヒト特異的に肝障害を惹起するflutamideの肝障害動物モデルにおいて障害防御遺伝子群の存在が確認された。さらに、新たな活性酸素毒性軽減薬を開発、プロテオミクス手法の確立と解析ソフトウェアの開発、細胞系を対象とするNMRを用いるメタボロミクスの有用性も示すことが出来た。

#### 分担研究者

- 奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・部長）  
宮田 昌明（東北大学大学院・薬学研究科・助教）  
堀 弥（杏林製薬株式会社・創薬研究所・動態安全性研究部・薬物動態研究室・副主任研究員）  
矢本 敬（三共株式会社・安全性研究所・研究第七グループ・第七グループ長）  
宮田 直樹（名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授）  
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）  
小原 有弘（独立行政法人医薬基盤研究所・生物資源研究部・細胞資源研究室・研究員）

#### 研究協力者

- 福原 潔（国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・室長）  
山添 康（東北大学大学院・薬学研究科・教授）  
押澤 正（国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・主任研究官）  
Suresh Thirupathi（国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・流動研究員）

#### A. 研究目的

医薬品の開発ならびに安全性研究において、現在トキシコゲノミクス手法を導入した研究が進められており、毒性発現時の遺伝子発現情

報と既存毒性試験情報の組み合わせにより、毒性発現に関して多くの情報が得られてきた。しかし、安全性予測を行う上で未解決の課題が複数存在する。一つは、トキシコゲノム情報と病理学的情報との連関に伴う問題である。即ち、トキシコゲノミクス研究においては機能タンパクmRNAレベルの変動を網羅的に測定し、毒性予測を試みているが、細胞内機能の変化は、必ずしもmRNAレベルに反映されない。しかも機能タンパクレベルが変化しなくても、GSHや補酵素のような機能維持やβ酸化系等のエネルギー産出に関わる分子の変動によって、細胞内オルガネラの障害が起こり、毒性を現すことがある。従って機能タンパクの変動と共に機能性小分子の変化を経時的に捉えることが出来る手法が毒性発現の機序を知るには必要である。もう一つは実験動物で得られたトキシコゲノム情報をヒトの毒性予測に用いる際に、ヒトでは有効に利用できるサンプルが血液、尿等に限定されることから、その予測には限界が存在することである。これらのことから、トキシコゲノム情報のみから種差のあるヒトの毒性を詳細に予測することには大きな困難が存在する。

この困難を克服するためには、トキシコゲノミクス研究で得られた遺伝子の発現情報に加えて、毒性によって生じた細胞環境の変化を高感度に検出する手法の組み合わせによる、細胞維持・エネルギー代謝系に関わる内因性物質の代謝変動の経時的な情報が必須である。加えて、ヒト毒性予測を目的とするためには、非侵襲的試料からそれら情報を得る必要がある。

そこで本研究事業では、ヒトへの応用が簡便

な、尿などの非侵襲試料を中心として用いた新規メタボロミクス・プロテオミクス高感度安全性予測系を確立することで、既存手法および実験動物データからでは予測不可能であった毒性マーカーを新たに見出し、毒性の早期予測ならびに詳細なメカニズム予測を実現することを目的とした。

昨年度はプロテオミクス・メタボロミクスを実施するための技術的課題の解決に取り組むと共に、数種の動物実験モデルを作成した。これらの成果を踏まえ以下の観点から本年度は研究を遂行した。

- 1) NMRを用いたメタボロミクス解析、高感度化技術の開発
- 2) メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立
- 3) LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発
- 4) メタボロミクスと病理の関連性についての解析
- 5) メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発
- 6) 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
- 7) 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

## B. 研究方法

### B-I NMRを用いたメタボロミクス解析、高感度化技術の開発

#### 1. 1H NMR測定に供する尿サンプル

動物の尿は、三共製薬安全性研究所より供与していただいたラットの尿を用いた。実験動物、被験物質・投与方法、尿サンプル採取は以下の通りである。

実験動物：8週齢の雄性F344/DuCriCrljラットを1週間環境に馴化させた後、9週齢で試験に使用。APAP投与後はラット用ステンレス製メタボリックケージに移して個別飼育。

被験物質・投与方法：PBは0および100mg/kg、APAPは0、500および800mg/kgを強制経口投与。投与スケジュールは、前処置としてPBを4日間投与し、PB投与4日目にAPAPを単独投与。

尿サンプル採取：1%Na<sub>3</sub>で処理したコニカルチューブに、APAP投与後24時間で排泄される

尿を採取。遠心分離(3000rpm, 5min)して上清を尿サンプルとした。

#### 2. 1H NMR測定

装置：600MHz Varian NMR システムに1H-NMR専用コールドプローブを装備。

サンプル調整：ラット尿540μlに内部標準物質として5mMTSP/D<sub>2</sub>O溶液を60μl、およびpHインジケーターとして1Mイミダゾール/D<sub>2</sub>O溶液を6μl添加して1H NMR用サンプルとした。

測定モード：Presat NOESY 1st Increment, 100ms mixing time, 9615.4Hz spectra width, 5s acquisition time, 96154 number of point, 1s d1, 32 transients

#### 3. NMRの解析

Chenomx社製NMR SUITEで尿の1H NMRスペクトルの0.5ppm～10.0ppmを0.04ppmの幅でbinningした。binningしたテキストファイルは軽水の観測領域(5.6～6.0ppm)を削除した後、Excelでデータシートに作成し、Umetrix社製SIMCA-P+で主成分分析を行った。なお、APAP代謝物を含めた主成分分析はデータシートをそのまま使用し、内因性代謝物の主成分分析はAPAPおよびその代謝物の観測領域をデータシートから削除してから行った。

### B-II メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立

#### B-II-1 トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序解明：

##### 1. 試薬

ME3738は、明治製薬株式会社にて合成した。Probulcol、LCA、PCNはSigma-Aldrichより購入した。

##### 2. 動物と薬物処理

9週齢のC57BL/6N雌性マウスに、LCA (0.6%あるいは0.75%)、ME3738 (0.15%)、probulcol (0.5%)を混餌で、PCN (100 mg/kg)は腹腔内投与した。Probulcol、PCN併用実験は9日間、ME3738併用実験は6日LCAを摂取させて行った。PCNは後半の3日間処理した。

##### 3. 肝臓、血清、胆汁の採取

エーテル麻酔下で開腹し血液を下大静脈より採取し、肝臓を単離後、遺伝子発現解析のため

め肝臓の一部をRNAlater (Ambion) 中に保存した。胆汁はエーテル麻酔下で胆管カニューレーションを施し、5分間の平衡化後、胆汁を30分間採取した。

#### 4. 肝障害マーカー、脂質の測定

AST、ALT活性はトランスアミナーゼCII-テストワコー (和光純薬) を用いてALP活性測定はアルカリ性ホスファターゼCII-テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。総胆汁酸量は総胆汁酸-テストワコー (和光純薬) を用い、リン脂質、遊離脂肪酸、トリグリセリドはそれぞれリン脂質C-テストワコー、NEFA C-テストワコー、トリグリセリドE-テストワコー (和光純薬) を用いた。

#### 5. 胆汁酸組成の分析

胆汁酸組成は、HPLCカラムにて分離した溶出液をNAD<sup>+</sup>と混和し、3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素カラムを通過する際に生じる反応生成物 (nicotinamide-adenine dinucleotide reduced form, NADH) を蛍光検出器にて検出した。

#### 6. 遺伝子発現解析

Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を用いて網羅的遺伝子発現解析を実施した。またreal-time PCRにより解析した。

### B-II-2 ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序解明:

#### 1. 試薬

Flutamide, 2-hydroxyflutamide (OH-flutamide), 4-nitro-3-(trifluoromethyl) phenylamine (FLU-1), は Schering-Plough (Bloomfield, NJ) より供与された。FLU-1N-OH, flutamideハプテン抗体は日本化薬 (株) で作製されたものを供与された。組換えヒトCYP (CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4) を発現させたヒトB lymphoblastoid 細胞のミクロゾーム画分はGentest Corp (Woburn, MA) より取得した。ヒト肝臓のミクロゾーム画分は (Jpn J Cancer Res 79, 1159-1167, 1988) に記載してある方法により取得した。

#### 2. 動物処理

9~10週齢の雄マウスに、0.5%

carboxymethylcellulose sodium (CMC-Na) に懸濁させたflutamideまたはFLU-1を200 mg/kg、5日間強制経口投与した。TCPOBOPはcorn oilに懸濁させ、3 mg/kgを前半3日間腹腔内投与した。後半2日絶食を行った。最終投与の4時間後に解剖を行い、血液、肝臓を採取した。

#### 3. LC/MSによる解析

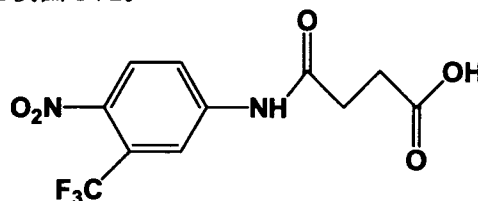
LC/MSシステムはGULLIVER SERIES PU-980 (Jasco International), PLATFORM (Micromass,) とCAPCELL PAK C18 SG-120 column (4.6  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m, Shiseido) から構成された。Methanol と ammonium-acetate buffer (25 mM, pH 5) のグラジエントにより代謝物を分離した。

#### 4. Flutamide代謝物のタンパク相互作用

タンパクモデルとしてBSAを用いて検討した。BSA (0.1-1.0 mg/ml) を flutamide、OH-flutamide、FLU-1、FLU-1 N-OH (各10  $\cdot$  M) と24時間反応させた。反応終了後、2倍量の冷却 methanol と internal standard (umbelliferone) を加えた後、3,000 g、4 $^{\circ}$ C、5分遠心してタンパクと強く相互作用した化合物を沈殿させた。上清をサンプルとして、HPLCにてflutamideおよび各代謝物の濃度を求めた。

#### 5. 抗flutamide抗体を用いた薬物-タンパク複合体の検出

抗flutamide抗体は日本化薬株式会社、長井より供与された。Keyhole limpet hemocyanin (KLH) に以下のハプテンを結合させ、抗原 (Hapten-KLH conjugate) を作成した。この抗原をウサギに免疫し、抗血清 (抗flutamide抗体) を得た。Flutamide、OH-flutamide、FLU-1、FLU-1 N-OH (500  $\cdot$  M) と肝ミクロソーム (2 mg/ml) を0.1 M KCl/Kpi (pH 7.4) 中で37 $^{\circ}$ C、2時間反応させた。上記の抗flutamide抗体を用いてWestern blot法により、薬物-タンパク複合体を検出した。



#### 7. Ames試験

Salmonella typhimurium TA98, TA100, YG1024,

TA102と・-naphthoflavone (100 mg/kg)を3日間腹腔内投与したマウス肝S9を用いて実施した。

#### 8. 統計処理

各実験で得られた値は平均値および標準偏差を算出した。統計パッケージPRISM4.0を使用し、二群間の有意差検定にはstudent's t検定を、多群間の場合は一元配置分散分析(one-way ANOVA)を行った後、有意な場合にはTukey型およびDunnet型の多重比較検定をそれぞれ行った。

### B-III LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発

### B-IV メタボロミクスと病理の関連性についての解析

質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発:

#### 1. 試験施設および所在地

##### 1-1. 動物実験、MS測定および解析

試験施設: 三共株式会社 安全性研究所  
所在地: 静岡県袋井市堀越717

##### 1-2. MS測定および解析

試験施設: 杏林製薬株式会社 創薬研究所  
所在地: 栃木県下都賀郡野木町 2399-1

#### 2. 試薬

アセトアミノフェン (APAP: シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社)

アンドロスタノール (AND, Steraloids)

ケトコナゾール (KCZ, シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社)

#### 使用機器

自動分析装置 TBA-2000FR (東芝メディカル株式会社)

LCシステム Ultra high performance liquid chromatography (UPLC) (ACQUITY)

ToF MSシステム LCT Premier XE (Waters)

データ処理装置 MassLynx 4.0 (Waters)

LC-MS/MSシステム

MS/MS Quattro Ultima (Micromass)

データ処理装置 MassLynx 4.0

Infusion pump Model 100 (NEUROSCIENCE, INC.)

#### 3. 実験動物

9週齢の雄性F344/DuCr1Cr1jラット(日本チャールス・リバー株式会社)で試験を実施した。APAP単独投与実験の投与用量は100、500および800 mg/kgとし経口投与した。併用実験ではAPAP投与量は800 mg/kgとし、併用投与するANDの投与用量は0、100および200 mg/kgで、APAP投与後2回(10:00, 13:30)腹腔内投与した。併用投与するKCZの投与用量は100 mg/kgとし、前処置としてKCZを4日間経口投与した。

#### 3. 尿サンプル採取

アジ化ナトリウムを1%になるように注射用水に溶解した。この溶液1 mLを防腐剤として50 mL遠心分離用コニカルチューブ(ベクトンディッキンソン)に分注し、メタボリックケージの尿回収ロート部の下端にチューブを固定した。チューブをドライアイスで冷却した状態で、APAP投与後24時間で排泄される尿を採取した。

#### 4. 採血および組織サンプル採取

APAP投与24時間後に各個体の体重を測定した。次いで、エーテル麻酔下で、腹大動脈から全採血することにより安楽死させた。解剖して肉眼的観察を行った後、肝臓および腎臓を採取し、重量を測定した。

#### 5. MS用試料の調製

対照群およびAPAP投与群のラット尿各4サンプルを融解後、13,000 rpmで5分間遠心し、上清を脱イオン水で4倍希釈したものをMS測定試料とした。

#### 6. UPLC/ToF MSの測定条件

1) Ultra high performance liquid chromatography (UPLC)

システム: ACQUITY UPLC

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18, 50×2.1 mm, 1.7 μm

流速: 0.5 mL/分

移動相: A: 0.1%ギ酸水溶液, B: 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

勾配: 0~20% B: 3分, 20~100% B: 4分

注入量: 2 μL

サンプル温度: 10°C

カラム温度: 40°C

2) Time of flight mass spectrometry (ToF MS)



システム：LCT Premier XE  
TOFモード：Wモード  
イオン化モード：Electrospray ionization (ESI) ポジティブ  
キャピラリー電圧：3600 V  
コーン電流：50 V  
ソース温度：100℃  
脱溶媒ガス温度：300℃  
スキャン範囲：100～1000 m/z  
スキャン時間：0.2秒  
データ処理装置 MassLynx V4.1

#### 7. MS/MS Quattro Ultimaの測定条件

MS測定試料をシリンジに150  $\mu$ L採取し、以下の条件でMSスペクトルを採取した。

Infusion rate 10  $\mu$ L / min  
Ion source Electrospray ionization (ESI)  
Ion mode Positive (PIM) and negative ion mode (NIM)  
Resolution power Unit mass  
Scan mode Full scan mode (Q1)  
Scan range m/z 100 ~ 1,000  
Scan speed 900 amu / lsec  
Scan time 30 sec  
Data points 14,303  
Data mode MCA  
Capillary voltage 3.0 (-) / 3.5 (+) kV  
Cone voltage 50 V  
Source temp. 90  $^{\circ}$ C  
Desolvation temp. 120  $^{\circ}$ C  
Cone gas flow 72 L/hr  
Desolvation gas flow 650 L/hr

#### 8. MSスペクトルデータ解析

UPLC/ToF MSで取得したピークデータは、MarkerLynx V4.1 (Waters) を用いて、各ピークのイオン強度と全ピークのイオン強度との比を計算することにより標準化した。対照群に比較し、APAP投与群で平均値が1.5倍を超える増加、あるいは0.67倍を下回る低下を示し、統計的に有意（有意水準5%）であったピークをAPAP投与により変動した内因性代謝物のピークとして抽出した。このように抽出されたピークに関して、MarkerLynx V4.1を用いて主成分分析（PCA）を実施した。

#### 9. 統計学的方法

体重、器官重量、臓器/体重比、尿量および血液化学的検査値は、統計解析パッケージ SAS® System Release 8.2 (SAS Institute Inc.) を用いて処理した。対照群（APAP非投与群）とAPAP投与群との平均値の有意差検定は、Dunnett検定を用いて実施し、いずれも有意水準を1%および5%とした。

MSスペクトルデータ解析については、対照群とAPAP投与群とのピークデータの有意差検定は、Microsoft EXCEL 2003のF検定およびStudent's t検定を用いて実施し、有意水準を5%とした。また、ピークデータとLog変換したALT値との相関は、Microsoft EXCEL 2003を用いてSpearman順位相関係数を算出し、有意水準5%で検定した。

#### B-V メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

##### 1. メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高度化試薬の開発

C60に代表されるフラーレンは、グラファイト（黒鉛）とダイヤモンドに次ぐ第三の炭素同素体であり、1985年にその存在が初めて実験的に示され、5年後の1990年に多量合成が報告された。フラーレンはまったく新しい形をもつ炭素の物質群であり、その魅力的な球状幾何学により、フラーレン研究は多くの科学者の興味を集めている。C60は、炭素60原子からなる直径約7 Åの球状化合物で、表面は60個のp軌道（30個の共役した $\pi$ 結合）で覆われている。フラーレンの物理化学的性質としては、電子欠損性、光増感作用、ラジカル補足作用などが知られている。このような物性に起因して、C60のTOF-MS測定では、matrix（気化補助剤）支援なしで測定が可能であること、アニオン検出（ネガティブモード測定）が容易であることが知られている。よって、C60をペプチドに結合させれば、ソフトイオン化による質量分析が容易になると考えられ、フラーレン構造をペプチドに導入する化合物は、ユニークなソフトイオン化用の誘導体化剤になると考えられる。そこで、C60をペプチドのアミノ基に緩和な条件で効率良く導入することのできる誘導体化試薬の開発を行った。アミノ基修飾官能基としてはカルボン酸を、また、カルボン酸の活性化はヒドロキシコハク酸（NHS）エステルおよびペンタフルオロフェニル（PFP）エステル化が適切と考

え、数種のNHSエステルおよびPFPエステルを合成した。

次に、合成したフラーレン構造を有する活性カルボン酸を用いて、アミノ酸やペプチドの誘導体化反応を行った。誘導体化反応は、数種のアミノ酸およびペプチドを用いて行い、アミノ基へのフラーレンカルボン酸の導入反応性を調べた。次に、フラーレンカルボン酸が付加した化合物のイオン化しやすさを確認するために、マトリックスの存在下/非存在下、ポジティブモード/ネガティブモードでTOF-MS測定を行った。さらに、分子量の大きなペプチドの測定に使用できるかどうかの確認実験を行った。また、複数のペプチド混合物の測定に適用したときの定量性を調べるための実験も行った。次に分子量が5異なる誘導体化試薬を用いてTOF-MS測定における定量性を調べた。次に、今回開発した誘導体化剤の定量的測定範囲を確かめるための実験を行った。最後に、検出限界を調べるための実験を行った。

また、新規N末端修飾試薬としてピリジン環をもつ7種類の化合物を合成した。また、ピリジンと塩基性が異なり、アルキル化によりカチオン性とし、さらに、同位体標識することを考えたベンズイミダゾール誘導体とイミダゾール誘導体も合成した。合成した化合物を用いて、種々のペプチドのN末端修飾反応を行い、修飾効率を調べるとともに、ソフトイオン化法を用いる質量分析により修飾ペプチドの検出効率を調べた。次に、MALDI-TOF/MSのPSD (post source decay) モードを用いてアミノ酸配列解析への利用を検討した。

## 2. 毒性軽減構造修飾法の開発

エダラボンの基本骨格であるピラソ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、一連の化合物を合成した。次に、これらの化合物について、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調べた。次に、エダラボン誘導体の膜界面での活性酸素消去活性を評価する目的で、ピラソロン骨格に長鎖アルキル基を導入した化合物を合成した。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。

## B-VI 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

### 1. 尿サンプル

<ラット>

共同研究機関の第一三共(株)より提供されたラット尿サンプルのうち、コントロールとして蒸留水を10ml/kg強制経口投与したラット由来の0-24時間尿、およびアセトアミノフェン500および800mg/kgを投与したラット由来の0-24時間尿を使用した。一群5匹のラットを用い、採尿はステンレス製代謝ゲージにて、1%アジ化ナトリウム水溶液1mlを採尿管に添加後採取し、3000rpm, 5min遠心後に分注し、-80℃で保存した。

<マウス>

日本環境変異原学会MMS研究会におけるトキシコゲノミクス共同研究に使用した動物より、強制排尿により採取した尿を用いた。薬物処理に関する情報は以下のとおりである。

遺伝子傷害性肝発癌物質

Quinoline

N-nitrosomorpholine

非遺伝子傷害性物質

clofibrate

1,4-dichlorobenzene

and

1-naphthylisothiocyanate

採尿は薬物投与48時間後に、強制的に排尿させることにより行った。

<ヒト>

株式会社ケー・エー・シーより購入した正常ヒト男性由来尿サンプルを使用した。本サンプルは、BIOPREDIC international社にて研究目的の使用について同意を得られたドナーより採取後凍結保存されたものである。

(還元アルキル化)

未処理の尿サンプル200 $\mu$ lとともに、100 $\mu$ lの15mM DDTを加え、60℃30分間反応させて還元後、室温に戻した後、100 $\mu$ lの60mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて30分間反応させた。

(トリプシン消化)

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液を1 $\mu$ l(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)加え、37℃で60分消化した。そして、Monotip C18カラム(ジーエルサイエンス)を用いて脱塩精製を行った

## 2. ナノLC

本研究にはナノLCとしてSplitless Nano HPLC System DiNa (KYA テクノロジーズ)を使用した。配管には内径50 $\mu$ mのヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18逆相カラム (KYA、W-3) およびトラップカラムを使用した。移動相はA (2% アセトニトリル, 0.1% ギ酸), B (80% アセトニトリル, 0.1% ギ酸) の2種類の組成の溶媒を用い、A100%からB100%へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた (図1)。

### 3. 質量分析装置

本研究に使用した質量分析装置は、ESI-Q/TOF型LC-MS/MS QSTAR-XL-PF (Applied Biosystems) であり、前述のナノLCとオンライン接続し、LC-MSとしての測定を行った (図2)。通常の測定は、ポジティブモードを使用した。ESIナノスプレー用チップとして、KYA社製スプレーチップを使用した。Valco社製チタニウムユニオンを使ってチップをカラムと接続し、ナノスプレーインターフェースにて質量分析装置へと挿入した。この際、スプレー電圧は1400Vから2000Vの間でスプレーチップの劣化に応じて変更し、安定したスプレーを得ることを確認した。

質量分析装置の設定に関しては、基本的に以下のTOF-MS測定条件をデフォルト値として使用した。

- TOFマス質量範囲 ; 350-1400m/z
- Total Analysis Time 80 min
- Accumulation time 4 sec.
- Spray Voltage 1600V

その他のパラメーターは、測定を行いながら最適化した。

### 4. 安定同位体ラベル (ICAT) による定量的解析

基本的にアプライドバイオシステム社より提供されたcICATラベリングキットとそのプロトコールに従って行った。

(変性と還元)

タンパク質溶液5 $\mu$ lを、Denaturing Bufferを75 $\mu$ l入れたエッペンチューブに加え、2 $\mu$ lのReducing Reagentを添加、混和し、10分間煮沸した。

(ICAT反応)

cICATチューブ (Light, Heavy) に20 $\mu$ lのアセトニトリルを加え、Votexで混合し、遠心。

サンプルA溶液、B溶液を全量をcICAT-Light、Heavyのチューブに移し、混合して遠心後遮光下、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させ、Reducing Bufferを3 $\mu$ l加えて反応を停止させた。

(Trypsin処理)

Light (サンプルA) とHeavy (サンプルB) を混合し、trypsin溶液を加え37 $^{\circ}$ Cで15時間 (overnight) 反応させた後、Cation Exchange Buffer-Load (CEX Buf-Load) を2 mL加え、Votexで混合、遠心し、反応を停止した (pH2.5-3.3に調整)。

(カラムによる精製)

陽イオン交換カラムに、CEX Buf-Loadを2 ml通して平衡化し、前処理後のサンプルをゆっくりとカラムに注入し、1 mlのCEX Buf-Loadでカラムを洗浄後、500 $\mu$ lのCEX Buf-Eluteにてペプチドを溶出させた。

(ビオチン化ペプチドの回収)

Avidine affinity column に Affinity Buffer-Elute (Aff Buf-Elute) を2 ml流して活性化し、Aff Buf-Loadを2 ml通して平衡化した。陽イオン交換カラムで溶出したフラクションに、等量 (500 $\mu$ l) のAff Buf-Loadを加えて中和し、カラムに載せた。Aff Buf-Loadを500 $\mu$ lを流してICATラベルされていないペプチドの除去した後、Aff Buf-Wash1および2、1 mlずつにてカラムを洗浄し、Aff Buf-Eluteを800 $\mu$ lにてICATラベルペプチドを溶出させた。

(ビオチンタグの除去)

Cleaving Reagent A 95 $\mu$ l と Cleaving Reagent B 5 $\mu$ lを混合し、溶出液に加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。遠心濃縮機にて30-60分乾燥させた。

(LC-MS/MSによる解析)

DiNAナノLCを用い、300 nl/min、50分間のグラジエントによりペプチドを溶出させ、Qstar-XLにてMS/MS測定を行い、ProICATソフトウェアにより同定と定量を行った。

### 5. TOFマス測定とデータ処理

QSTAR-XLによる質量分析データは、基本的に付属のソフトウェアであるAnalystQSを用いて解析される。TOFマス依存的解析を行う場合には、積算時間は4秒と長めに設定した。

Rawデータの解析のため、Analystにて作成されるWiff形式ファイルの加工のため、mzXMLへの変換ツールとして、Systems Biology Instituteより提供されているmzStarというソ

フトウエアを利用した。さらに、mzXML形式ファイルを、Pep3Dというソフトウェアを利用することで、LC-MSデータとしての3Dグラフによる可視化を行った。また、独自の定量解析ソフトとして“mzMore”と名付けたソフトウェアの開発を進めた。

#### 6. フォーカス測定による候補ペプチドの同定

TOFマスデータの比較により選択したマーカー候補ペプチドに対し、質量誤差100ppm、リテンションタイム幅10分間のウィンドウを設定し、これをMS/MSS測定の際のインクルージョンリストとして設定し、これらのペプチドを優先的にMS/MS測定に移行させた。

#### 7. 抗体結合磁気ビーズの前処理による高発現タンパク質の除去

LC-MS/MSによる同定データおよび二次元電気泳動法とMALD-TOFマス (AB4700) による同定により、ラット尿中の高発現タンパク質としてMajor Urinary Protein precursorおよびUrinary protein precursor1-3を同定した。これら高発現量のタンパク質を除去する目的で、合成ペプチドを用いたウサギポリクローナル抗体を作成した。この抗体を市販の磁気ビーズDynabeads® ProteinA (Invitrogen)へ結合させ、尿サンプルを直接処理することにより、高発現たんぱく質の除去を行った。

#### 8. データ解析ソフト「mzMore」の開発

ソフトウェアシステムの開発は、アイルランド、レターケニー工科大学所属のRushmore社システムエンジニアでもあるRamesh Kanagapathy氏の協力の下、進められた。今年度は、日本公定所協会の支援事業により、Ramesh氏を2週間日本へ招聘し、直接問題点に関してディスカッションを行うことにより相互理解を深め、ピーク検出アルゴリズムに関する改良を加えた。

### B-VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

#### <細胞に関して>

THP-1 (急性単球性白血病)

毒性試験に非常によく用いられる細胞。

培地: RPMI1640 medium with 5% fetal calf

serum.

継代方法: Dilution.

#### <薬剤処理に関して>

1: Control (DMSO 0.1%)

2: アセトアミノフェン (APAP) 200  $\mu$ M

3: メトトレキサート (MTX) 120  $\mu$ M

4: オメプラゾール (OPZ) 120  $\mu$ M

5: チオアセタミド (TAA) 2000  $\mu$ M

6: シスプラチン (CSP) 8  $\mu$ M

7: ジエチルニトロソアミン (DEN) 10000  $\mu$ M

で細胞を処理し、24時間暴露した。24時間後にDNA/RNAを抽出し、遺伝子発現解析に用いた。

#### <GeneChipによる遺伝子発現解析に関して>

GeneChipによる遺伝子発現解析には、各被験物質処理を行った細胞より調製したtotalRNA 5  $\mu$ gを使用した。

・ 使用したRNAの濃度測定にはNanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies社製)を用いてサンプル1  $\mu$ Lを用いて測定した。

・ 純度・品質の検定にはAgilent 2100 バイオアナライザシステム (Agilent社製)を用いRNAの断片化が起こっていないことを確認した上で研究に使用した。

GeneChip測定に用いるサンプルの調製はAffymetrix社のマニュアルに基づいて行い、作成したサンプルを用いてGeneChip HG-U133A Arrayを用いてハイブリ、ウォッシュ、測定を行った。

#### <超音波破碎>

細胞を酵素安定化バッファー中で氷冷し、マイクロソーム微量超音波細胞破碎機XL2000にて細胞を超音波破碎した。

#### <試料の前処理>

Albumin Segregation Kitを用いて、培養液中の血清成分 (特にアルブミン) を除去し、サンプルとした。

#### <NMR測定に関して>

ブルカーバイオスピニング社製AVANCE II 800 US2型により<sup>1</sup>H-NMRを測定した。

### 倫理面の配慮

B-I ~ B-VIIの研究の実施に際しては、動物愛護の問題はもちろんのこと、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」等に従って行った。その他各研究機関等で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行した。あらかじめ当該研究機関の長等の承認等が必要な研究につ

いては研究開始前に所定の手続きを行った。

## C. 研究結果及び考察

### C-I NMRを用いたメタボミクス解析, 高感度化技術の開発

#### 1. 測定条件の検討

ラットの尿について、メタボミクス解析が可能な<sup>1</sup>H NMRスペクトルデータの測定方法について検討を行った。ラットの尿540 $\mu$ lに内部標準物質として5mM TSP のD<sub>2</sub>O溶液60 $\mu$ l、pHインジケータとして1M イミダゾールのD<sub>2</sub>O溶液 6 $\mu$ lを添加してNMR用サンプルを調整した。<sup>1</sup>H NMR測定は<sup>1</sup>H NMR専用高感度プローブを装備したNMRによって行った。軽水シグナルの消去方法および積算回数について検討した結果、presaturation NOESYのパルスシーケンスを用いて32回積算することによりメタボミクス解析に利用可能なスペクトルが得られることがわかった。なお、この条件で測定した尿のスペクトルパターンの採取条件による影響は少ないことから、尿採取から測定までの一連の操作に技術的な問題はないことがわかった。

#### 2. APAP投与による内因性代謝物の変動とPBの影響

APAPを500mg/kgおよび800mg/kg投与したラット尿の<sup>1</sup>H NMRを測定して、APAP投与による内因性代謝物の変動について解析を行った。また、フェノバルビタール (PB) を100mg/kg前処理して代謝活性を亢進させたラットについても同様の解析を行い、PBの影響について検討を行った。測定した尿の<sup>1</sup>H NMRスペクトル (図1) はNMR SUITE上でbinningを行った後、SIMCA-P+で主成分分析を実施した。なお、主成分分析はAPAP未変化体およびAPAP代謝物の影響を除く為、これらのピークエリアを全て削除してから行った。その結果、APAPとPBの影響は第1主成分と第2主成分によってクラスタリングでき、第1主成分はAPAP投与量によって大きく変化することがわかった (図2)。ローディングプロットから第1主成分が大きく変化しているスペクトル領域を特定し (図3)、NMR SUITEによって対応する内因性代謝物を同定したところ、第1主成分に大きな変動がみられた2.70、2.58ppmはクエン酸、2.42、2.98、3.02ppmは2-オキソグルタル酸、3.94、3.98、7.54、7.62、7.82ppm

は馬尿酸、3.02、4.06ppmはクレアチニン、3.26ppmはTMAO、5.38、6.06ppmはアラントインであることがわかった。これらの領域について試料毎の積分値変化をトレンドプロットで解析してみたところ、APAP500mg投与群で低下がみられ、800mg投与群ではさらに低下することがわかった。この結果は、NMR SUITEを用いた代謝物の定量結果と一致した。

一方、第2主成分はPB前処理によって変化がみられ、PB前処理群とPB非処理群では異なるクラスターが形成された。特にその傾向はAPAP非投与群で明らかとなった。ローディングプロットより第2主成分が大きく変化しているスペクトル領域 3.42ppmについて代謝物の同定をNMR SUITEで行ったところタウリンであることがわかった。トレンドプロットにより、タウリンはPB投与群にのみ増加していることがわかった。

#### 3. APAP代謝物の変動とPBの影響

APAP代謝物の構造を尿の二次元NMRによって解析したところ、尿中にはAPAPの硫酸抱合体、グルクロン抱合体、メルカプトール酸抱合体およびAPAPの未変化体が含まれていることがわかった。そこで、これらのスペクトルを含む0.5ppm~10.0ppmをbinningしたデータについて主成分分析を実施した。その結果、全試料は第1主成分と第2主成分でクラスタリングできた。また、ローディングプロットにより、第1主成分の変化に対応するスペクトルは全てAPAPの抱合体およびAPAP未変化体であることがわかった。これらのピークについて試料毎の変化をトレンドプロットで調べたところ、第2主成分に大きな変化がみられたグルクロン酸抱合体のピーク強度はAPAP投与量の増加とともに大きくなり、APAP800mg投与では尿中にグルクロン酸抱合体が大量に含まれていることがわかった。また、硫酸抱合体は、APAP500mg投与と800mg投与では殆ど尿中排泄量が変わらなかった。一方、APAP未変化体は、APAPの投与量と共に増加しているが、未変化体の濃度はPB前処理によって薬物代謝活性を増加させると低下することがわかった。

#### 考察

メタボミクスを医薬品の開発・安全性研究に利用することによって新しい毒性評価法を確立し、毒性的に意味のある安全性バイオマ

ーカーの探索を行う為には、まずメタボロミクスの手法について代謝物総体の解析および個々の代謝物の同定・定量が可能な方法を検討することが必要である。本研究ではメタボロミクスの解析手法として、<sup>1</sup>H NMRの利用を検討した。<sup>1</sup>H NMRは<sup>1</sup>H核を含むほぼ全ての代謝物のシグナルが検出されるため網羅性に優れているが、<sup>1</sup>H NMRは質量分析法と比べて感度が低く、微量代謝物の検出には適していなかった。しかしながら、近年開発された<sup>1</sup>H専用高感度プローブにより従来のNMRと比べて数倍の感度が得られるようになった。また、Chenomx社が開発したソフトウェア(NMR SUITE)により、尿中スペクトルパターンから内因性代謝物の同定・定量が可能となった。実際、本研究で<sup>1</sup>H高感度プローブを利用することにより、メタボロミクスに利用可能なスペクトルが数分で得られ、NMR SUITEにより尿中の主要な代謝物が容易に同定・定量できることがわかった。しかしながら、毒性評価に有効なバイオマーカーを探索するためには、微量成分も含めた網羅的解析を行い、ほぼ全ての成分について毒性との相関を明らかにすることが必要である。

本研究では代謝物総体と毒性との相関を主成分分析法によって解析し、変動成分についてはNMR SUITEによって同定・定量法を行った。本方法により、尿中のほぼ全ての尿中代謝物から薬物によって変動する代謝物の探索が可能となり、従来のスペクトルパターンによるメタボロミクスに加えて、個々の代謝物情報からなる毒性発現機構に基づいた安全性評価が可能となった。

そこで本方法を用いて、APAPのラット肝障害モデルの尿の<sup>1</sup>H NMRスペクトルから肝毒性の評価に有効なバイオマーカーの探索を行った。その結果、APAP投与によってクエン酸、2-オキソグルタル酸、フマル酸などのエネルギー代謝に関連する化合物および馬尿酸、TMAOの濃度が顕著に減少することを明らかにした。この結果はNicholsonらによって報告された肝障害物質ヒドラジン投与で減少する尿中代謝物と一致した。また、共同研究者によって同時に行われた生化学試験では、APAP投与によって肝障害マーカーのアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性の顕著な増加がみられたことから、今回の内因性代謝物濃度の低下は肝障害の発症と相関していることがわかった。以上、APAP投与によって低下した内因性代謝物は肝障害

のバイオマーカー候補になることが予測された。

<sup>1</sup>H NMRで内因性代謝物のメタボロミクスを行う際には、APAP未変化体およびAPAP代謝物に由来するシグナルを削除することが必要であるが、これらのシグナルを削除せずに全領域の主成分分析を行うとAPAPの代謝物の変動について解析できることがわかった。その結果、APAPのグルクロン酸抱合体はAPAP投与量とともに増加するが硫酸抱合体は一定濃度以上に増加することはなかった。また、PB前処理するとAPAP未変化体の濃度低下がみられることから、薬物代謝活性がPB処理によって向上していることが示された。

今後はAPAP以外の肝障害モデルについてもバイオマーカー候補の探索を行い、肝障害に対して高選択的で鋭敏なバイオマーカーの絞り込みを行う。また、尿以外の非侵襲試料についてもメタボロミクスを実施することによって、毒性評価におけるメタボロミクスの可能性と有用性について検討を行う。

## C-II メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立

### C-II-1 トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序解明：

1. LCA/PCN併用と肝障害マーカー-0.6%LCAを雌性C57BL/6マウスに摂取させるとまずALT活性の上昇が認められて、それから胆道系の障害マーカーであるALP活性の上昇が認められた。PCNを併用することで、ALT、ALP活性の上昇は抑制された。

### 2. LCA/PCN併用と網羅的遺伝子発現解析

LCA、PCN単独投与、LCA/PCN併用マウス肝臓の網羅的遺伝子発現解析を実施したところ、毒性変動に伴って脂質関連遺伝子の顕著な発現変動が認められ、毒性パラメータと遺伝子発現変動に良好な相関がみとめられた。Control群とLCA単独投与群との比較、LCA単独投与群とPCN併用群との比較により遺伝子発現変動パターンを場合分けすることにより、LCA誘発肝障害の防御因子(CYP3A, SULT2A)と同様な遺伝子発現変動を示す脂質関連遺伝子(CD36, fatty acid elongase, stearoyl-CoA desaturase, Mrp3)を同定した。これらは肝内triglyceride

レベルの増加や胆汁酸レベルの減少に関与すると考えられた。

### 3. LCA/PCN併用と脂質動態

遺伝子発現解析の結果よりLCA誘発肝障害と脂質動態との関連が示唆されたため、LCA/PCN併用実験による肝臓、血清中、胆汁中の脂質レベルを解析した。LCA投与により肝内リン脂質、triglyceride濃度の減少が認められ、リン脂質と胆汁酸の胆汁中への排泄も減少した。PCNは単独あるいはLCAとの併用により肝内リン脂質、triglyceride濃度を増加させた。またPCN併用により胆汁中へのリン脂質、胆汁酸の排泄を増加させた。

4. ME3837併用によるLCA 誘発肝障害の変動  
C57BL/6N雌性マウスに0.15% ME3738を0.75% LCAと併用すると血清中ALT活性、ALP活性の、有意な減少が求められた。またこれらの活性の減少はME3837の濃度に依存して認められた。本結果から、ME3738はLCA誘発肝障害を防御することが明らかとなった。

### 5. ME3738投与による脂質の胆汁排泄

ME3738は単独投与によりあるいはLCAとの併用により胆汁中へのコレステロールの排泄を亢進させた。LCA投与により減少した胆汁中への胆汁酸排泄はME3738併用により回復した。ME3738はコレステロール排泄トランスポーターであるAbcg5/8のmRNA、タンパクレベルの発現を増加させた。

### 6. ME3738投与による胆汁中へのコレステロールと胆汁酸排泄量の関係

LCA群に比べME3738併用群で、胆汁中への胆汁酸及びコレステロールの排泄の有意な上昇が認められたことから、胆汁中へのコレステロールと胆汁酸の排泄量の相関性を検討した。胆汁中へのコレステロール排泄量と胆汁酸排泄量の関係をLCA/ME3738モデルで解析すると正の相関性 ( $r^2=0.840$ ) が認められた。また、胆汁中へのコレステロールとリン脂質の排泄量の相関性を検討した結果、 $r^2=0.877$ の良好な正の相関性が認められた。

### 7. Probuco1併用によるLCA 誘発肝障害と肝内胆汁酸レベル

LCA投与による肝障害に対して、probuco1を

併用すると、血清中ALT とALP活性が有意に減少した。また肝内胆汁酸レベルもprobuco1併用により有意に減少した。

### 8. Probuco1併用による脂質レベルの変動

Probuco1は単独投与あるいはLCAとの併用により血清中コレステロール、トリグリセリド濃度を減少させた。一方胆汁中へのリン脂質、胆汁酸の排泄は、増加させた。

### 考察

LCA誘発肝障害における網羅的遺伝子発現解析等の結果からLCA誘発肝障害の機序あるいはその防御の機序と脂質代謝変動との関連が示唆された。肝内脂質レベルや脂質胆汁排泄速度が障害の認められるLCA群で有意に減少し、PCN併用により障害が軽減する時には、これらのレベルが回復したことより網羅的遺伝子発現解析からの仮説は支持された。さらに脂質動態を変動させることが予想されるME3738とprobuco1をLCAと併用して解析した。ME3738とprobuco1併用はともにLCA誘発肝障害を軽減させ、同時に肝内胆汁酸のレベルを低下させた。ME3738は胆汁へのコレステロール排泄に関わるトランスポーターのAbcg5/8の発現を亢進することで、胆汁へのコレステロール排泄を亢進させ、結果的に胆汁酸排泄の低下を防ぐことにより肝内胆汁酸レベルの上昇を防いで、障害を軽減している可能性が示された。一方、probuco1においては、リン脂質の胆汁排泄を亢進することにより、胆道系での疎水性胆汁酸の細胞障害性を軽減する、あるいは胆汁酸排泄を促進することでLCA誘発肝障害を軽減する可能性が示された。これらの結果は胆汁鬱滞時での胆汁生成、胆汁酸排泄促進には、リン脂質やコレステロールの排泄を亢進させることが重要であることを示唆する。PCNとLCA併用の場合においても薬物代謝酵素の誘導だけでなく、肝内脂質 (triglyceride、リン脂質) 合成を亢進することで胆汁酸排泄を維持し、肝障害を軽減することが示唆された。PCN、ME3738およびprobuco1によりリン脂質やコレステロールの胆汁排泄亢進がLCA誘発肝障害の防御に関与する可能性が示された。

### C-II-2 ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序解明

#### 1. Flutamide代謝物を用いた肝障害モデルの

## 構築

C57BL/6N雄性マウスを2日間絶食させたとき、肝内GSHは約60%減少した。TCPOBOPおよびFLU-1単独投与群では対照群に比べALT値の上昇は認められなかったが、FLU-1・TCPOBOP併用投与群では対照群、およびFLU-1単独投与群に比べ有意なALT値の上昇が認められた。FlutamideとTCPOBOPの併用投与についても検討を行ったが、ALT値の有意な上昇は認められなかった。

### 2. 肝障害モデルにおける絶食の影響

肝障害モデルにおける肝内GSH濃度は、FLU-1・TCPOBOP併用群で対照群、およびFLU-1単独投与群と比べ有意に減少した。絶食をさせたFLU-1・TCPOBOP併用群は絶食を行わなかった群に比べ有意に高いALTを示した。

### 3. ヒト肝マイクロソーム、ヒト組み換え酵素を用いた検討

ヒト肝マイクロソームでFLU-1からFLU-1-N-OH体が生成された。FLU-1からFLU-1-N-OH体への代謝速度は0.1 nmol/mg/min以下でFLU-3生成速度より低かった。ヒト組み換え酵素発現細胞マイクロソームを用いた解析によりFLU-1からFLU-1-N-OHへの代謝は基質濃度1・MではCYP3A4とCYP1A2のみで認められ、CYP3A4がCYP1A2に比べて約10倍高かった。

### 4. マウス肝マイクロソーム中FLU-1 N-水酸化活性

マウス肝マイクロソーム中のFLU-1 N-水酸化活性を測定したところ、TCPOBOPを投与した群ではFLU-1 N-水酸化活性が対照群と比較して約5倍上昇した。FLU-1単独投与群においても対照群と比較して約2倍の活性上昇が認められた。

### 5. 抗flutamide抗体を用いたflutamide-タンパク複合体の検出

Flutamideにkeyhole limpet hemocyanin (KLH)を結合させたflutamide抗原をウサギに免疫し、抗flutamide抗体を作製した。Flutamide、OH-flutamide、FLU-1、FLU-1 N-OHをそれぞれマイクロソームタンパクと反応させた後、薬物-タンパク複合体を抗flutamide抗体を用いてWestern blot法により検出した。FLU-1 N-OHと反応させたマイクロソームタンパ

クでは37-75 kDaの間に複数の強いバンドが認められた。その他の化合物と反応させたタンパクではほとんどバンドは検出されなかった。

### 6. FLU-1 N-OHの解毒代謝におけるGSHの役割

FLU-1 N-OHをマウス肝細胞質画分、GSHとともに反応させ、その反応液をHPLCを用いて解析した。その結果、FLU-1 N-OHの親化合物であるFLU-1が代謝物として検出された。FLU-1 N-OHのFLU-1への還元反応は反応時間依存的に進行し、FLU-1の生成はFLU-1 N-OHの減少のうち約40-60%を占めた。FLU-1 N-OHのFLU-1への還元はGSH存在下であっても細胞質画分未添加時には進行せず、また熱失活した細胞質画分を添加しても反応は進行しなかった。

FLU-1 N-OHのFLU-1への還元は、glutathione S-transferases (GSTs)の代表的な基質である1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)を反応系に加えると、CDNBの濃度依存的に、最大で約90%阻害された。

### 7. Flutamide代謝物の変異原性

FLU-1、FLU-1 N-OHを用いてAmes試験を行った。酵素源には、-NFを前処理したマウスから無菌的に調整した肝S9を用いた。試験には代表的な菌株であるSalmonella typhimurium TA98、TA100に加え、O-acetyltransferase過剰発現株YG1024、および酸化物質の変異原性を高感度に検出できるTA102を用いた。FLU-1およびFLU-1 N-OHはいずれの菌株においても変異復帰コロニー数に有意な増加を示さなかった。

## 考察

絶食下のマウスにFLU-1とTCPOBOPを併用投与することで、in vivo肝障害モデルを作製した。本肝障害モデルマウスは軽度なALT値(91 ± 25 IU/L)の上昇を示し、ヒトにおける肝障害誘発初期の軽度な肝毒性を再現したと考えられる。ALT値の上昇にはTCPOBOPの前処理が必要であり、FLU-1より派生した活性代謝物が肝障害を誘発した可能性が考えられた。肝マイクロソーム中のFLU-1 N-OHの生成はTCPOBOP投与により促進され、FLU-1 N-OHには他の代謝物に比べ強力なタンパク結合性が認められた。また、FLU-1 N-OHは強い細胞毒性を示すことも報告されている。以上の結果はFLU-1 N-OHの肝障害誘発への関与を示唆している。FLU-1 N-OHの細胞内タンパクへの結合は、flutamideによる肝



障害誘発の一つの機序として考えられる。

本研究において、肝内GSHが低下する絶食時にはFLU-1による肝障害が強く認められた。肝内GSHは加齢により減少することが報告されている。高齢者では肝内GSHが低下しやすく、flutamideによる肝障害を発症しやすいのかもしれない。Flutamideの加水分解により生じたFLU-1は肝にてN-水酸化されタンパク結合能を有するFLU-1 N-OHへ代謝される。FLU-1 N-OHはGSTs存在下でGSHによりFLU-1へ還元される。肝内GSH枯渇時には、FLU-1 N-OHはGSHによる解毒代謝を免れ、細胞内タンパクに結合することで肝障害を誘発する可能性が考えられた。

本研究はFLU-1 N-OHがタンパク結合を介して肝障害誘発に関与していることを示唆した。本研究により見出されたFLU-1 N-OHのFLU-1への還元反応はFLU-1 N-OHの重要な解毒代謝機構の一つであると考えられる。Flutamide誘発肝障害において、肝臓でのFLU-1 N-OHの生成増加と肝内GSH枯渇の両方が重要であることが示唆された。

### C-III LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発

### C-IV メタボロミクスと病理の関連性についての解析

質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発：

#### 1. アセトアミノフェン投与試験

APAP800 mg/kg投与群では、ASTおよびALTに顕著な増加が認められ、ALPおよびT. BILにも有意な増加が認められた。また、500 mg/kg投与群においてもAST、ALTおよびT. BILの増加傾向が認められた。アンドロスタノール(AND)・アセトアミノフェン(APAP)併用試験ではANDの用量依存的にALT、ASTおよび肝細胞壊死が軽減される傾向が観察され、APAP肝障害の軽減が認められた。ケトコナゾール(KCZ)・APAP併用試験ではKCZ投与により、ALT、ASTおよび総ビリルビンの有意な低下が観察され、APAP肝障害の軽減が認められた。

#### 2. APAP単独投与サンプルのMSピークデータの抽出1 (UPLC/ToF MS解析)

APAP投与群(100、500および800 mg/kg)および対照群の尿サンプルにおけるポジティブイオンモードによるUPLC/ToF MS解析では、1372ピークが対照群の4例中2例以上で検出さ

れたことから、これらのピークを内因性の代謝物として解析の対象とした。APAP投与群では、対照群に対して108ピークが増加( $P < 0.05$ , Fold change  $> 1.5$ )、233ピークが減少( $P < 0.05$ , Fold change  $< 0.67$ )を示した。APAP投与群において有意な増減を示したこの341ピークに関してPCA解析を実施した。Loadings plotにおいて、サンプルのクラスタリングと分離に強く寄与するピーク6個を抽出した。

#### 3. APAP単独投与サンプルのMSピークデータの抽出2 (UPLC/ToF MS解析)

UPLC/ToF MS解析により対照群において検出された1372ピークに関して、肝障害マーカーである血清ALT活性に相関性の高いピークの抽出を行った。その結果、175ピークに有意な相関性(Spearman順位相関、 $P < 0.05$ )が認められ、このうち92ピークは、APAP投与により有意な増加( $P < 0.05$ , Fold change  $> 1.5$ )を示したピークと共通していた。ALT活性との相関が認められた175ピークに関してPCA解析を行った結果、クラスターの形成と分離に強く寄与する8ピークを抽出した。この8ピークと抽出1の方法で得られた6ピークのうち2ピークが共通に認められた。

#### 4. APAP単独あるいは併用投与サンプルからのMSピークデータの抽出

APAP単独投与、APAP/ANDあるいはAPAP/KTZの併用実験で得られた尿サンプルのマススペクトルを取得した。障害マーカーであるALT活性(Log)とマススペクトル強度の相関性を解析して、高い相関が認められる、代謝物ピークを抽出した。APAP単独投与サンプルより負イオンモードで3種の、正イオンモードで3種の代謝物ピークが得られた。一方APAP/AND併用実験の尿サンプルからは負イオンモードで6種の、正イオンモードで6種の代謝物ピークを得た。

#### 5. 新規バイオマーカーの探索

これまでに上記研究で抽出されたバイオマーカー候補の質量数は、負イオンモードで9種(2005年度3, 2007年度6)、正イオンモードで11種(2005年度3, 2006年度2, 2007年度6)であった。これらの質量数のピーク強度についてAPAP投与群とKCZ併用群の平均値の有意差検定(t検定 有意水準: 0.1%, 1%および5%)を実施した。その結果、KCZ併用群の正イオンモ

ードで5種の質量数 ( $m/z$  313.60 \*\*\*, 345.48 \*\*, 347.56 \*\*, 347.62 \*, 388.43 \*) において、logALT と同様に有意な減少が認められた。

## 考察

メタボロミクス手法を用いた肝障害のバイオマーカー探索において、毒性マーカーのALT値と質量スペクトルの強度の相関性、質量スペクトル強度の有意な変動、さらにPCA解析によるクラスター形成と分離に対する寄与等を指標として組み合わせることにより、バイオマーカー候補を抽出出来ることが明らかとなった。また薬物投与による代謝物プロファイルの変化には、内因性代謝物の変化以外に、薬物に由来する成分の変化が強く影響することが、薬物誘発肝障害モデルを用いた初期の研究において明らかとなった。したがって、内因性代謝物に絞った解析の一手法として、薬物を投与しないラットの尿において検出される代謝物ピークに関して、薬物投与により変動する尿代謝物プロファイルの取得を行うことが有効であることが示された。

また単独投与と実験、併用実験などいくつかの実験を組み合わせ、バイオマーカー候補を抽出することで、バイオマーカー候補の一般性や特異性を評価出来ると考えられた。

このように、対照群において検出される内因性代謝物のピークへの絞り込みや、既存の肝障害マーカーとの相関性に基づく絞り込みを行い、PCA解析によりクラスターの形成と分離に強く寄与するピークを抽出することから、バイオマーカー候補を探索することが可能であった。

## C-V メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

### 1. メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高度化試薬の開発

C60をペプチドのアミノ基に緩和な条件で効率良く導入することのできる誘導体化試薬の開発を行った。アミノ基修飾官能基としてはカルボン酸を、また、カルボン酸の活性化はヒドロキシコハク酸 (NHS) エステルおよびペンタフルオロフェニル (PFP) エステル化を用いた。合成したフラレン構造を有する活性カルボン酸を用いて、アミノ酸やペプチドの誘導体化反応を行った結果、アミノ基へのフラレンカ

ルボン酸の導入反応が、室温下収率良く進行することがわかった。次に、フラレンカルボン酸が付加した化合物のイオン化しやすさを確認するために、マトリックスの影響を調べた。その結果、予想通り、フラレンカルボン酸が付加したアミノ酸やペプチドでは、マトリックス非存在下でも効率良くネガティブモードでTOF-MS測定できることがわかった。特に、 $\beta$ -アラニン、4-アミノブタン酸、6-アミノヘキサン酸、N-Z化ロイシンなどでは、マトリックスなし(LD)で優れたイオン化能が確認できた。ただし、ペプチドを誘導体化した化合物などの測定では、シアノヒドロキシ桂皮酸などのマトリックスを共存させた方が良い結果が得られた。また、ガティブモードとポジティブモードの比較では、ペプチド (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) を、両モードで測定した結果、ネガティブモードの方が感度良く分子イオンピークが観測できることが明らかになった。また、分子量の大きなペプチドの測定に使用できることは、分子量1819のBradykininを用いて誘導体化後TOF-MS分析を行い、確認した。次に、複数のペプチド混合物の測定に適用したときの定量性を調べた結果、いずれの誘導体化試薬を用いた場合でも、TOF-MS測定により、それぞれの分子イオンピークを確認できることを確認した。次に分子量が5マス異なる誘導体化試薬を用いて混合物のTOF-MS測定における定量性を調べた。濃度が異なる混合物溶液をそれぞれの誘導体化試薬で誘導体化した後、両液を混合してそれぞれの化合物の誘導体化体の比率を調べた結果、すべてにおいて、期待値にほぼ一致する値が得られた。この結果は、混合物においても定量的測定が可能であることを示す。次に、今回開発した誘導体化剤の定量的測定範囲を確かめるために、濃度の異なる化合物を用いて実験を行った。その結果、20倍の範囲で定量性のある測定が可能であった。最後に、分子量554のロイシンエンケファリンを用いて、検出限界を調べ、検出限界は現時点で約6pmolであることがわかり、TOF-MS測定のための誘導体化試薬として十分な感度が得られることがわかった。

また、重水素化体が容易に得られるピリジン環をもつ誘導体化試薬を合成し、それを用いてTOF-MS測定を行った結果では、新規に合成した誘導体化剤は、すでにMSによるタンパク質の同定や定量に用いられている誘導体化剤と比べ

て同程度の反応性を示し、同位体分布を利用したアミノ酸配列解析では2倍以上反応性が良いことが分かった。N末端のアミノ酸がArg, His, Thr, Tyrにおいて定量的に反応すること、また、Lysの側鎖のアミノ基とも反応することが示された。リン酸化ペプチドの検出も容易にでき、新規誘導体化剤は、N末端修飾試薬として有効であると考えられる。つぎに、Bradykinin を用いてMALDI-TOF/MSのピーク強度を比較することでペプチドの相対的定量ができるかどうか検討し、ピーク強度比が、ペプチド濃度により変化することを確認した。ピークの変化から相対的に定量することが可能と考えられる。N末端修飾試薬を用いてタンパク質の変動解析を行った場合、タンパク質の発現量が20%以上あれば定量が可能であるという知見を得た。

## 2. 毒性軽減構造修飾法の開発

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調べた。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がわかった。次に、ピラゾロン骨格に長鎖アルキル基を導入した化合物を合成し、エダラボン誘導体の膜界面での活性酸素消去活性を評価する目的で、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、 $\gamma$ -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。

## 考察

### 1. メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高度化試薬の開発

フラーレン骨格の物理化学的特性がペプチドのソフトイオン化に有用と考え、ペプチドのアミノ基にフラーレンを温和な条件で導入する試薬の設計を行い、フラーレン構造を有する活性カルボン酸誘導体の合成を達成した。合成した一連の活性カルボン酸誘導体(アミノ基修飾試薬)を用いてアミノ酸類、ペプチド類の誘導体化反応を行い、定量的に誘導体反応が完結

するための条件を確立できた。また、フラーレンを導入したペプチド類のTOF-MS分析を行い、誘導化体が効率良く検出できることも確認した。これらの結果は、フラーレン構造導入試薬がペプチドのソフトイオン化測定に有用であることを示す。

新規に合成した誘導体化剤は、すでにMSによるタンパク質の同定や定量に用いられている誘導体化剤と比べて同程度の反応性を示し、同位体分布を利用したアミノ酸配列解析では2倍以上反応性が良い。リン酸化ペプチドの検出も容易にでき、新規誘導体化剤は、N末端修飾試薬として有効であると考えられる。

## 2. 毒性軽減構造修飾法の開発

1位に2-ピリジル基を導入した化合物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。また、長鎖アルキル基を導入したエダラボン誘導体は、細胞内局在性を制御できるすぐれた活性酸素種消去剤として有用である。

## C-VI 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

### 1. LC-MSの測定条件の検討

KYA社ナノLCとアプライドバイオシステム社QSTAR-XLをオンラインにて接続し、図2に示すようなLC-MS/MSシステムを構築した。分析カラムとスプレーチップをValco社のユニオンを用いて接続することにより、デッドボリュームを最小化し、ナノスプレーインタフェース上に設置した。各社より販売されているスプレーチップを種々検討した結果、使用する測定条件においてスプレーの安定性および耐久性に優れ、かつ比較的安価であったNewObjective社のPicoTipおよびKYA社製のスプレーチップを使用した。通常毎分数百ナノリットルの流速で測定を行うが、チップにかかるスプレー電圧は、新品の場合1400V程度から安定したスプレーが可能であり、劣化とともに2000V程度まで電圧を上げることにより、使用可能であった。

LCの流速に関しては、流速を遅くするほど感度は上げられるが、現実的に100  $\mu$ l/min以下に落とすと安定したスプレーが得られにくいため、200-300  $\mu$ l/minを標準的に用いる

こととした。また、グラジエントに関しては、その所要時間を長くするほどペプチド溶出時間を長くすることができ、特に複雑な混合物の測定においては有効であった。しかし、多検体を測定する場合には、各測定にかかる時間が長くなる程解析に時間を要する事から、60-90分程度とするのが最も効率が良いと考えた。BSA消化物の様なそれほど複雑性のサンプルでは、30分のリニアグラジエントでも十分な結果が得られた。また、測定に際し、定期的に標準BSAサンプルを使って質量分析計のキャリブレーションを行った。

通常のLC-MS/MS測定においては、TOFマスをを使って質量を正確に測定したのち、そのピークの荷数をソフトウェアにて判断して親イオンとしてのペプチドを選択し、データ依存的なMS/MS測定を行う。これは、MS/MS測定を行うための親イオンの荷数を二価以上と測定する事により可能であり、一度のTOFマス測定に対し通常二つの親イオンを選択してMS/MS測定を行う。この際に、各測定に要する積算時間は通常1秒が用いられるが、この積算時間を伸ばすことによりピーク強度が増し、感度を上げることができるが、測定時間が増えるため、解析可能なペプチド数が減ることになる。十分なMS/MSシグナルを得るためには、最低1秒程度の積算時間が必要なことからこの測定時間が解析可能なペプチド数を限定することとなる。また、効率的にペプチドを親イオンとして選択するためのシグナル強度の最低値としてはデフォルト値である10を使用した。この場合、かなり低用量のペプチドシグナルまで検出可能となるが、MS/MS測定によりデータベースサーチで同定可能なペプチドは、25-30程度の強度が必要であった。

MS/MS測定の際に、ペプチドの分解の程度を決める衝突ガスのcollision energyの値は、0を入力することにより親イオンの $m/z$ に応じた最適なエネルギーが選択されるため(Rolling Collision Energy)、通常はこの値を用いた。

同じ親イオンを連続的に選択することを防ぐための機能として、一定期間同じ親イオンの選択を避けることができ、この時間を変化させながらカバー率を指標に最適化を行ったところ、30秒程度の期間を設定することにより効率的な親イオンの選択が可能となった。通常ペプチドの溶出時間は30秒以上の幅を持つため、

この程度の時間を設定してもピークの取り逃がしの可能性は低いと考えられる。

## 2. 質量分析装置の限界

複雑性の高いヒトサイトゾルを使った解析から、同定されるタンパク数はある程度信頼性の低いものを含めて最高で142個であった(表1)。この際、同定されたペプチドの数は数百に上るが、タンパク質の同定数をさらに増やすためには、物理的な障壁が存在することがわかった。通常、一度のTOFマス測定に対し、二つの親イオンを選択し、それぞれの測定に一秒間の積算時間をかけて分析が行われるが、この測定条件では、最高で一分間に40回のMS/MS測定が可能である。仮にすべての測定で異なるペプチドが同定できたとしても、30分のペプチド溶出時間中に同定可能なペプチド数は1200となる。同定の効率を考えると検出可能なペプチドは半分程度である、一つのタンパク質の同定に複数のペプチドを要することから、2-300程度のタンパク質の同定が上限であると予想される。積算時間はこれ以上短くできないことから、ペプチドの溶出時間すなわちグラジエント時間を長くすることが検出数を増やす上で重要となるが、一解析に要する時間が長くなり、多検体の解析を必要とする場合には、解析時間がかかりすぎるという問題が生じる。

## 3. 検出ペプチド数を増やすための方針

複雑なサンプルになればなるほど、TOFマス測定には含まれるが、親イオンとしての選択には漏れるペプチドピークが増える事になる。MS/MS測定に依存した同定法においては、こうした取りこぼしが避けられないが、すべてを同定することをあきらめ、TOFマス中に検出されるペプチドピークに注目して、その変化を追うことでより多くのペプチドを解析の対象とできる。TOFマスでのペプチドイオンピークの変化を比較することにより、発現の変動したペプチドのみに着目し、次の測定時にそれらのみをMS/MS測定して同定することにより、より効率的な解析ができると期待できる。このような方針に基づいて、我々はまずTOFマスデータを可視化し、ペプチドシグナルの検出状況を把握する事をめざした。残念ながらQstarに付属のAnalyst QSでは、そのような表示機能は付随していないため、rawデータの取りだしを含めその他の利用可能なツールを検討することに