

Oct 14, 2008.

17. Soga, T., “CE-MS for Metabolomics” CE in the Biotechnology & Pharmaceutical Industries 10<sup>th</sup> Symposium (CE Pharm 2008), The Hotel Nikko, San Francisco, Oct 13, 2008.
18. Soga, T., “Metabolomics by CE-MS for Biomarker Discovery” 5<sup>th</sup> International Conference on Plant Metabolomics, Pacifico Yokohama, July 15-18, 2008.
19. 曾我朋義. メタボロミクスが解き明かす微生物の生存戦略. 第 82 回日本細菌学会総会、細菌のプロテオミクス、メタボロミクス、名古屋国際会議場、2009 年 3 月 13 日
20. 曾我朋義. メタボロミクスについて最近の研究から. 第 22 期 CAMM フォーラム 2 月例会、虎ノ門パストラル、2009 年 2 月 6 日
21. 曾我朋義. メタボローム解析によるバイオマーカー探索. BMB2008、神戸ポートアイランド、2008 年 12 月 11 日
22. 曾我朋義. メタボロームミクス：トランスポーター研究の手法. トランスポーターワークショップ in 鶴岡—トランスポーター研究のパラダイムシフト：今後の方向性の模索と新たな病態解析法の融合を目指して—, トランスポーター研究会、東北公益大ホール、2008 年 11 月 15 日-11 月 16 日
23. 曾我朋義. CE-MS 法によるメタボローム解析法と医薬への応用. 第 3 回メタボロームシンポジウム、慶應義塾大学先端生命科学研究所、2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日
24. 曾我朋義. メタボローム解析によるバイオマーカー探索. 第 33 回日本医用マスメクトル学会年会、東京大学医学部鉄門記念講堂、2008 年 9 月 25-26 日
25. 曾我朋義. メタボロームが解き明かす生命のシステム. 第 5 回慶應義塾大学薬学部ハイテクリサーチシンポジウム、芝共立キャンパス、2008 年 9 月 5 日
26. 曾我朋義. CE-MS によるメタボローム測定法と生命科学への応用. 第 48 回臨床化学学会年会、静岡文化芸術大学、浜松、2008 年 8 月 29-30 日

27. 曾我朋義. CE-MS を用いたメタボロミクスによるバイオマーカーの探索. 第 35 回 BMS コンファレンス、裏磐梯ロイヤルホテル、2008 年 7 月 6-9 日
28. 曾我朋義. CE-MS によるメタボローム測定法と生命科学への応用. 第 19 回東海北陸質量分析合同談話会、金沢医科大学、2008 年 6 月 28 日
29. Soga, T., Biomarker Discovery by Metabolome Analysis」 8<sup>th</sup> International Society for the Study of Xenobiotics Meeting, Sendai, Oct. 9-12, 2007.
30. Soga, T., Metabolomics by CE-MS for Biomarker Discovery」 Pharmaceutical Sciences World Congress 2007, Amsterdam, Apr. 22-25, 2007.
31. 曾我朋義. 最新のメタボローム解析技術と生命科学への応用. 富士山麓エリア都市エリア成果発表会-特別講演. 静岡県ブケ東海沼津、2008 年 3 月 4 日
32. 曾我朋義. 最新のメタボロームが切り拓く創薬研究. 創立 150 年記念事業 第 4 回慶應義塾先端科学シンポジウム. 慶應義塾大学三田キャンパス、2008 年 2 月 8 日
33. 曾我朋義. 最新のメタボローム解析によるバイオマーカーの探索法. 日本薬学会 薬学研究ビジョン部会. 第 9 回創薬ビジョンシンポジウム. 東京大学鉄門記念講堂、2008 年 1 月 24-25 日
34. 曾我朋義. メタボローム解析による酸化ストレスマーカーの探索とその生合成機序の解明. 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007). パシフィコ横浜、2007 年 12 月 13 日
35. 曾我朋義. 最新のメタボローム測定法と生命科学への応用. トランスポータ研究会第一回東北部会. 東北大学薬学研究科、2007 年 11 月 25 日
36. 曾我朋義. 最新のメタボローム測定法と生命科学への応用. マリンバイオテクノロジー学会 会員懇談会. 航空会館、新橋、2007 年 11 月 22 日
37. 曾我朋義. CE-MS によるメタボローム測定法と生命科学への応用. 第 27 回キャピラリー電気泳動シンポジウム. クリエート浜松、2007 年 11 月 15 日
38. 曾我朋義. メタボローム技術の最前線. BTJ プロフェッショナル

ルセミナー：メタボロームが  
拓くバイオ産業、日経ホール、  
2007年11月7日

39. 曾我朋義、メタボローム解析による酸化ストレスマーカーの探索、第2回メタボロームシンポジウム、東京大学医学部鉄門記念講堂、2007年11月5-6日
40. 曾我朋義、最新のメタボローム解析法と生命科学への応用、バイオインフラマティクスセミナー in 東北、長陵会館、仙台、2007年11月3日
41. 曾我朋義、最新のメタボローム解析によるバイオマーカーの探索、第24回関東腎研究会、関東腎研究会、クラブ関東、2007年7月7日
42. 曾我朋義、最新のメタボローム解析によるバイオマーカーの探索、特別講演 第8回腎とバイオロジー研究会、霞ヶ関ビル、2007年7月7日
43. 曾我朋義、最新のメタボローム解析と生命科学への応用・基調講演、第10回マリンバイオテクノロジー学会大会、マリンバイオテクノロジー学会、山形大学小白川キャンパス 2007年5月26日

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

#### 登録

1. 曾我朋義、「シースフロー方式のキャピラリー電気泳動-質量分析計法による陰イオン性化合物の測定装置」特許第4385171号、2009.
2. 富田勝、伊藤文、曾我朋義 「遺伝子産物の機能同定方法および結合物質同定法」特許第4114075、2008.

#### 出願中

1. 曾我朋義、杉本昌弘、末松誠、本間雅、山本武人、鈴木洋史「肝臓疾患マーカー、その測定方法、装置及び医薬品の検定方法」出願番号PCT/JP2009/069950.
2. 阿部高明、曾我朋義 「ヒトにおける新たな腎疾患マーカー物質」願2009-205033.
3. 曾我朋義 「哺乳類の体内時刻の新規なインジケーター、及びその利用」特願2009-111602、2009.
4. 曾我朋義 「シースフロー方式のキャピラリー電気泳動-質量分析計法による陰イオン性化合物の測定装置」特願 2009-056132、2009.

5. 曾我朋義、末松誠、本間雅、山本武人、鈴木洋史「薬剤性肝炎マーカー、並びに、それらの利用方法」特願 2008-328133.
  6. 本間雅、鈴木洋史、山本武人、千葉厚、辻省次、曾我朋義「肝疾患予防治療剤」特願 2008-322262.
  7. 阿部高明、曾我朋義「ヒト OATP-R 遺伝子導入モデル非ヒト動物」特願 2008-264674
  8. 辻彰、加藤将生、久保義行、金子周一、加賀谷尚史、曾我朋義「エルゴチオネインを利用したクローン病の診断および治療」特願 2008-033588.
2. 実用新案登録なし
  3. その他なし

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

メタボローム解析およびバイオマーカーを用いた化学物質の  
有害性評価手法の開発に関する研究

平成 19 年度 総括研究報告書

研究代表者 曾我 朋義 (慶應義塾大学環境情報学部)

平成 20 年 4 月

## 目次

### I. 総括研究報告書

メタボローム解析およびバイオマーカーを用いた化学物質の有害性

評価手法の開発に関する研究 ..... 23

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 96

### III. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総括研究報告書

メタボローム解析およびバイオマーカーを用いた化学物質の  
有害性評価手法の開発に関する研究

主任研究者 曾我朋義 慶應義塾大学 環境情報学部 先端生命科学研究所 教授

研究要旨

メタボローム解析によってグルタチオンの枯渇を示すバイオマーカーを発見した。このバイオマーカーを測定することにより、マウスに投与した化学物質あるいは化学物質が生体で代謝されて生じた物質が酸化活性毒性を持つ（親電子物質である）ことを評価するシステムを開発した。

A. 研究目的

化学物質は人類に多くの恩恵を提供するが、一部は予期せぬ被害をもたらす。ヒトの健康を傷害する原因には、生物的要因（細菌、ウイルス等）、物理的要因（放射線、熱、振動等）、化学的要因（各種化学物質）および社会心理学的要因がある。従来化学的要因は軽視される傾向にあったが、近年の化学工業の発展に伴い、各種化学物質の主体に及ぼす様々な影響が重要視されるようになってきた。

化学物質の構造情報から毒性を予想する方法として定量的構造活性相関（QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship）手法が開発された。QSAR手法は、化学物質の構造と薬学的あるいは毒性学的活性との間に相関関係があることを利用して、計算化学を用いて構造的に類似した化合物の薬効や毒性を予測するものであり大変有用である。しかし、化学物質は生体内で代謝されて別の構造に順次変換されるため、代謝されたすべての代謝物質の構造を把握できない限り QSAR 手法では代謝物の毒性を予測することはできない。

体内に取り込まれた化学物質の多くは肝臓で解毒的に代謝され、易溶性の代謝物となって

排泄される。しかし、数万種類ともいわれる化学物質およびそれらの代謝物の毒性を確認できる評価手法は未だ確立されておらず、そのリスク評価システムの早急な構築が望まれる。

本研究では、化学物質の中で酸化活性毒性を持つ化合物を探索するリスク評価システムを開発する。化学物質自体あるいは代謝で生じた物質が親電子物質である場合は生体に酸化活性毒性を示す。しかし、親電子物質が少量であれば、肝臓等の組織に高濃度に存在するグルタチオン（GSH）の抱合によって、解毒、排泄される。しかし親電子物質が大量の場合はグルタチオンが枯渇し、親電子物質が細胞内に蓄積してタンパク質等の生体高分子と反応する。その結果、細胞の機能が攪乱され、薬剤性肝炎などの病態を惹起することが知られている。

主任研究者らは、世界に先駆けてキャピラリー電気泳動-質量分析計（CE-MS）によるメタボローム測定法を開発し、細胞内に存在する数百から数千種類の低分子代謝物の一斉分析に成功した。これまでに、マウスに解熱鎮痛薬アセトアミノフェン（APAP）を過剰に投与すると、肝臓内の代謝で生じた親電子物質N-アセチルペ

ンゾキノニンイミン (NAQPI) を解毒するグルタチオンが消費されること、グルタチオンが枯渇すると肝炎が惹起されること、グルタチオンの枯渇に反比例して肝臓および血中のオファタルミン酸が急増することを発見した (Soga, T. et al., *J. Biol. Chem.* 281, 16768-16776, 2006)。

その機序は以下の通りである。図 1 に示すようにグルタチオン ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) とオファタルミン酸 ( $\gamma$ -Glu-2AB-Gly) は同じ酵素  $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素によって生合成されるトリペプチドであり、基質がシステイン (Cys) か 2-アミノ酪酸 (2AB) の違いである。通常還元状態では肝臓内にはグルタチオンが大量に存在し、最初の酵素である  $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素がフィードバック阻害されている (図 1A)。したがって、オファタルミン酸はほとんど生合成されない。しかし、図 1B に示すように親電子物質 (NAQPI) が存在すると解毒のためにグルタチオンが消費される。グルタチオンの減少と共にフィードバック阻害が解除され、 $\gamma$ -グル

タミルシステイン合成酵素が活性化し、グルタチオンとオファタルミン酸が生合成される。グルタチオンは解毒のために消費されるが、オファタルミン酸は肝臓内に蓄積する。このように親電子物質が存在すると肝臓や血液のオファタルミン酸が増加するため、オファタルミン酸は親電子物質の存在を示すバイオマーカーとなる。

本研究では、マウスの腹腔内に化学物質を注入し、CE-MS法で肝臓のグルタチオンとオファタルミン酸の濃度を測定する。化学物質の投与によりグルタチオンの濃度が大幅に減少し、オファタルミン酸の濃度が有意に増加すれば、投与物質あるいは化学物質から代謝で生じた物質が親電子物質である可能性が極めて高い。本法を親電子物質あるいは非親電子物質である事が判明している種々の化学物質に適用し、正しく親電子物質を測定できる方法が検討する。親電子物質の有無とオファタルミン酸の測定結果に高い相関関係があれば、本法は簡便に化学物質が酸化活性毒性を測定できる評価システムとなる。

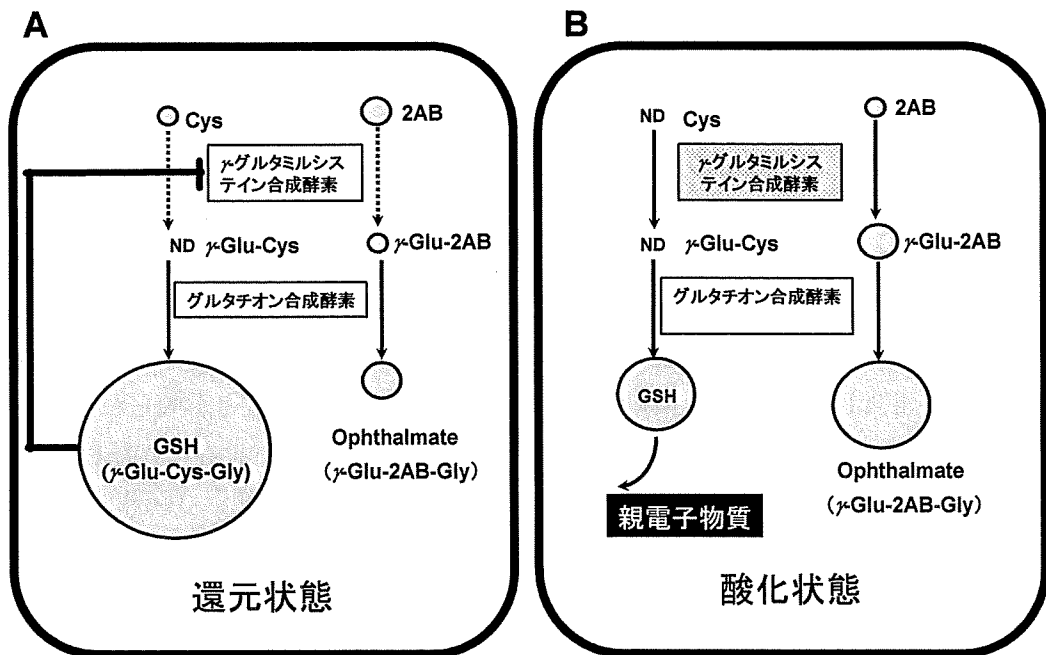


図1 親電子 (酸化活性) 物質によって肝臓のオファタルミン酸が生合成されるメカニズム



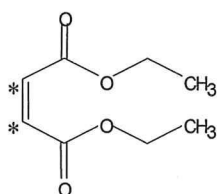
## B. 研究方法

化学物質の毒性評価試験はヒトではできないため、本研究では実験マウス Male C57BL/6 を用いる。主任研究者らが発見したバイオマーカーを用いて、各種化学物質(図2)とその代謝物のから毒性の高い親電子物質を探索する評価システムを構築する。研究手順を図3および以下に記述した。

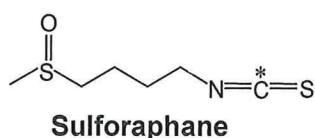
### 研究手順

1) それ自体が親電子物質である Diethylmaleate (DEM)、Sulphoraphane、代謝産物が親電子物質である Acetaminophen (APAP)、Butylated hydroxyanisole、肝毒性を示すと言われる Valproic acid、Diclofenac、Ethacrynic acid、Cisplatin、さらにコントロールとして Saline (生理食塩水) を準備した (図2)。

### ● 親電子物質

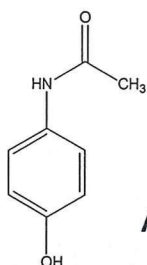


Diethyl maleate (DEM)

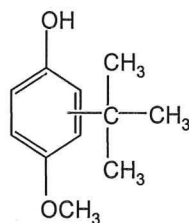


Sulforaphane

### ● 代謝物が親電子物質

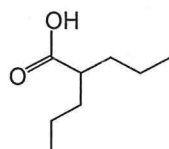


Acetaminophen (APAP)

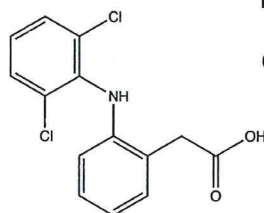


Butylated hydroxyanisole

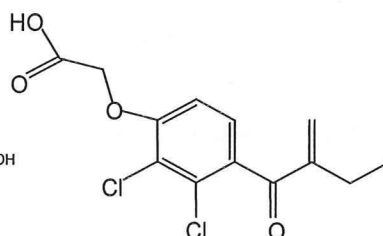
### ● 肝毒性を示す物質



Valproic acid



Diclofenac



Ethacrynic acid



Cisplatin

図2 本研究に用いる親電子物質および肝毒性を示す化学物質

2) 各化学物質をマウスの腹腔内に注入した。

3) 化学物質を投与後 1 時間に各マウスの肝臓 (約 300mg) を摘出した。

4) 肝臓から低分子代謝物質を抽出した。摘出した肝臓は瞬時に液体窒素で凍結後、直ちに内部標準物質入りのメタノール 1ml を加えホモジナイズした。この時点で酵素は失活し、代謝の亢進は止まる。タンパク質や脂質を除去するため 500  $\mu$  l の純水を加えた後、300  $\mu$  l の溶液を取り出し、200  $\mu$  l のクロロホルムを加え攪拌後、さらに 4°C で 15 分間、15000rpm で遠心した。静置後、分離した水-メタノール相 300  $\mu$  l を採取し、分画分子量 5 kDa の遠心限外ろ過フィルターを用いて除タンパクした。ろ液を凍結乾燥後、測定前に Milli-Q 水 50  $\mu$  l を加えて溶解した。

5) 抽出した肝臓の代謝物質をキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) で網羅的に測定した。

#### 5-1) 測定条件

- ①キャピラリー電気泳動 (CE) の分析条件  
キャピラリーには、フューズドシリカキャピラリー (内径 50  $\mu$  m、外径 350  $\mu$  m、全長 100cm) を用いた。緩衝液には、1M ギ酸 (pH 約 1.8) を用いた。印加電圧は、+30kV、キャピラリー温度は 20°C で測定した。試料は、加圧法を用いて 50mbar で 3 秒間注入した。
- ② 飛行時間型質量分析計 (TOFMS) の分析

#### 条件

正イオンモードを用い、イオン化電圧は 4kV、フラグメンター電圧は 75V、スキマー電圧は 50V、OctRFV 電圧は 125V に設定した。乾燥ガスには窒素を使用し、温度 300°C、圧力 10psig に設定した。シース液は 50% メタノール溶液を用い、質量較正用にレゼルピン (m/z 609.2807) を 0.5  $\mu$  M となるよう混入し 10  $\mu$  /min で送液した。レゼルピン (m/z 609.2807) とメタノールのアダクトイオン (m/z 83.0703) の質量数を用いて得られた全てのデータを自動較正した。

6) 肝臓のグルタチオンおよびオフトアルミン酸等のグルタチオン枯渇を示すバイオマーカーの濃度を定量し、コントロールの結果と比較する。グルタチオン濃度が極端に減少し、かつグルタチオンの枯渇を示すバイオマーカーの濃度が有意に増加した化学物質は、それ自身かあるいはその代謝物質が酸化活性毒性の高い親電子物質であることが推測される。

7) 化学物質あるいはその代謝物の既知の親電子物質の有無と本研究で得られた結果を比較し、良好な相関関係が得られれば、グルタチオンの枯渇を示すバイオマーカーの変動を測定する本法は、簡便に化学物質およびその代謝物の酸化活性毒性を測定できる評価システムとなる。

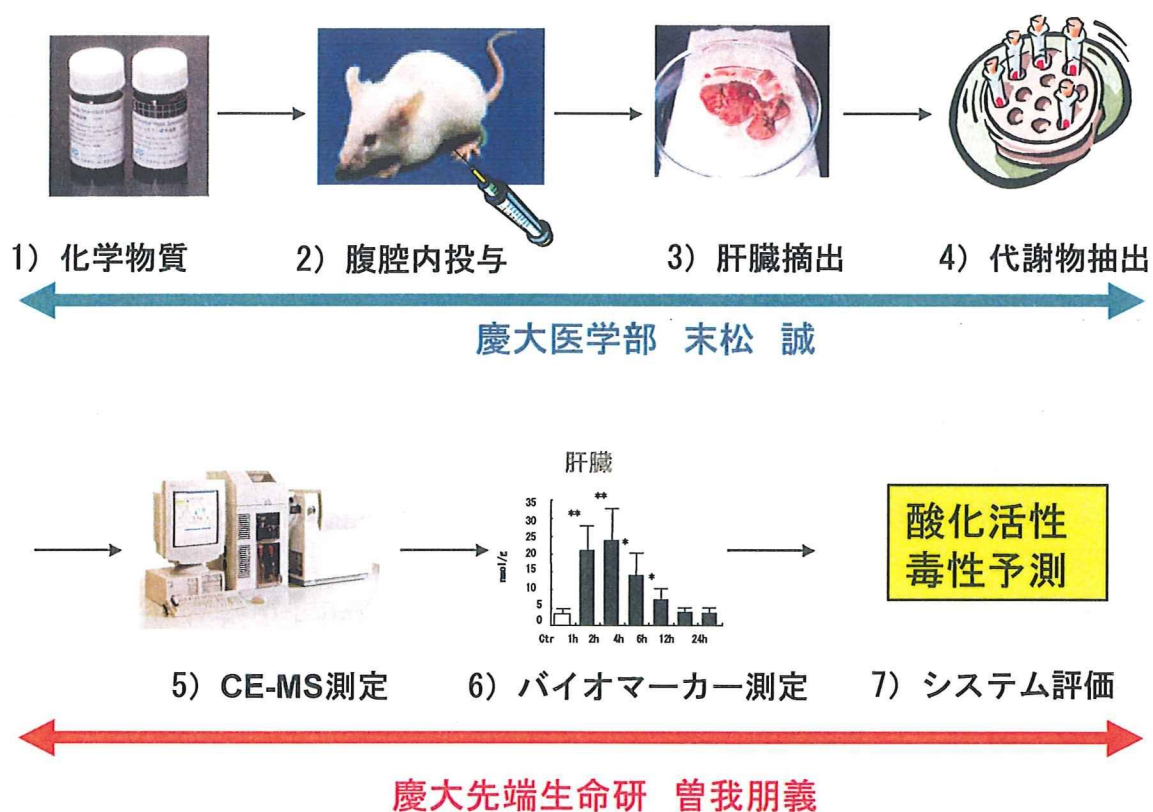


図3 化学物質およびその代謝物が親電子物質（酸化活性毒性）か評価する方法の手順

#### 倫理面への配慮

研究協力者の慶應義塾大学医学部医化学教室の末松誠教授が実験マウスへの化学物質の投与、肝臓、血液の摘出を担当する。

慶應義塾大学医学部動物実験委員会で定めた実験動物の愛護管理・実験プロトコールに関する指針に従い、実験マウスへの倫理的

配慮は十分行う。水はいつでも飲めるようにする。マウスに苦痛を与えないように、化学物質の腹腔内注射や肝臓の摘出は麻酔後に行う。また、実験担当者へ化学物質が飛散、付着する危険を最小限に抑えるため、化学物質の使用量および実験回数は必要最小限に抑える。

#### C. 研究結果

##### 1. 親電子物質を示す新規 $\gamma$ -Glu ペプチドバイオマーカーの発見

##### 1) 親電子物質 Diethylmaleate のマウスへの投与

図3に示したように一晩絶食させたオスのマウスにペントバルビタルナトリウム(体4mmol (888mg) を腹腔内に投与した(各 5

重 1kg 当たり 60mg) を腹腔内注射して麻酔後、親電子物質である Diethylmaleate (DEM) を体重 1kg 当たりそれぞれ 4mmol (688mg) 投与した。またコントロールとして生理食塩水を体重 1kg 当たり 150mg、 $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素 (GCS) 阻害剤である BSO を体重 1kg 当たり 匹)。投与 1 時間後にマウスから肝臓 (約

300mg) を採取し、代謝物質を抽出後、CE-TOFMS で網羅的に測定した。

図 4 に示したように、親電子物質である DEM 投与マウスでは、多くの  $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチド類が、コントロールマウスの濃度に比べ有意に増加した。図 4 は、左から各アミノ酸、そのアミノ酸に対応する  $\gamma$ -Glu-X ジペプチド、 $\gamma$ -Glu-X-Gly トリペプチド類の順に示した。また各化合物のグラフは、生理食塩水 (Ctrl)、BSO、DEM を投与したときの肝臓中の濃度を示した。なお、グラフが空白になっているものは、左側のアミノ酸を基質とした  $\gamma$ -Glu-X ジペプチドや  $\gamma$ -Glu-X-Gly トリペプチド類が検出されなかったことを示す。

例えば、図 4-1 の一番上は、Cys、 $\gamma$ -Glu-Cys、 $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (グルタチオン) の結果である。グルタチオン (GSH) の量はコントロールマウスに比較し、BSO、DEM 投与マウスでは急激に減少した。理由は、BSO 投与では  $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素が阻害されるためグルタチオンは減少し、親電子物質 DEM 投与マウスでは解毒のため消費されるからグルタチオンは減少するからである。

APAP 投与によって生じた親電子物質の解毒のためにグルタチオンが枯渇したことを

示したオフタルミン酸同様 (図 1) に、 $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチド類が、グルタチオン生合成経路で合成されているか以下の方法で確認した。

これらのペプチド類がグルタチオン生合成経路で合成されていれば、 $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチドは BSO 投与マウス ( $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素が阻害されるため) でコントロールマウスより減少し、DEM 投与マウス ( $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素が活性化されるため) で増加するはずである。

実際には、 $\gamma$ -Glu-Gly、 $\gamma$ -Glu-Gly-Gly、 $\gamma$ -Glu-Ala、 $\gamma$ -Glu-Ala-Gly、 $\gamma$ -Glu-2AB、 $\gamma$ -Glu-2AB-Gly (オフタルミン酸)、 $\gamma$ -Glu-Ser、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Thr-Gly、 $\gamma$ -Glu-Val、 $\gamma$ -Glu-Ile、 $\gamma$ -Glu-Leu、 $\gamma$ -Glu-Phe、 $\gamma$ -Glu-Taurine、 $\gamma$ -Glu-Homocysteine、 $\gamma$ -Glu-Homocysteine-Gly は、BSO 投与でコントロールより減少、DEM 投与で確かに有意に増加した。

一方、 $\gamma$ -Glu-Ser-Gly、 $\gamma$ -Glu-Lys などは、BSO 投与で減少しておらず、グルタチオン生合成経路以外の合成経路でも生合成されている可能性が高い。したがって、これらのペプチド類は親電子物質の存在を示すバイオマーカーにはならない。

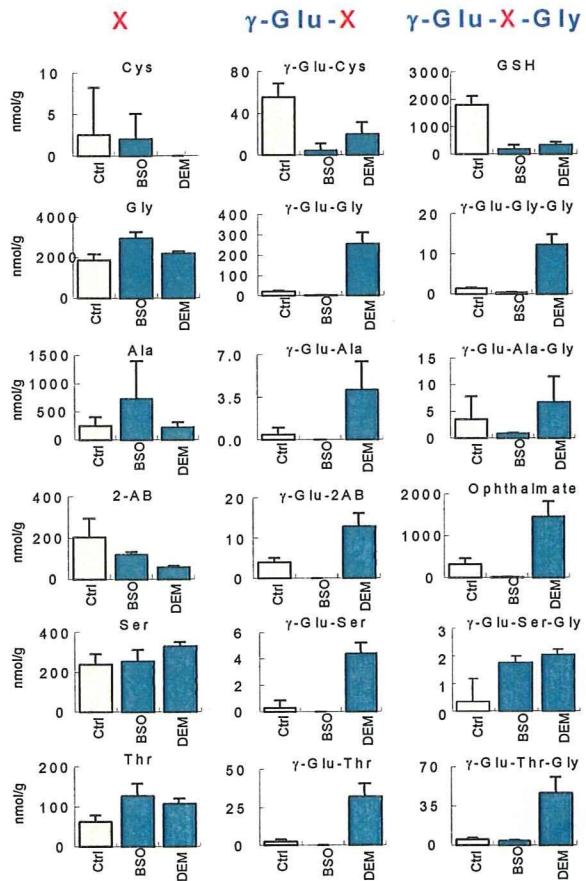


図 4-1 生理食塩水 (Ctrl)、BSO、DEM 投与後のマウス肝臓中のアミノ酸 (X)、 $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチド類の測定結果

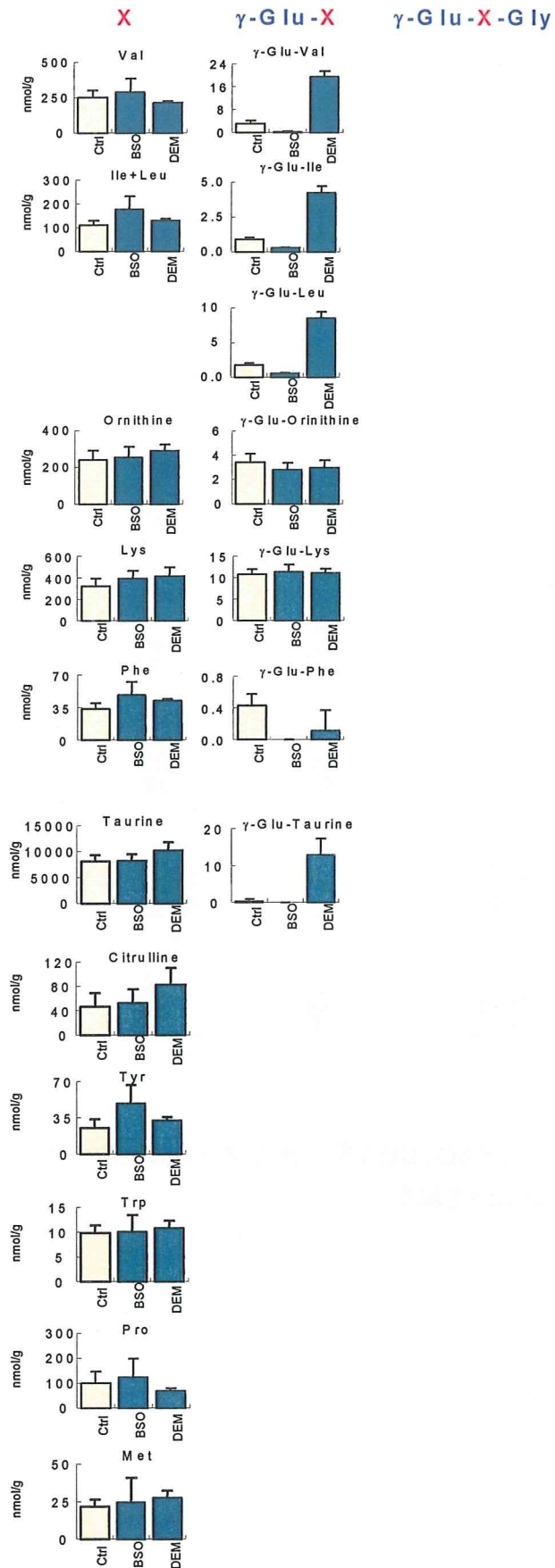


図 4-2 生理食塩水 (Ctrl)、BSO、DEM 投与後のマウス肝臓中のアミノ酸 (X)、 $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチド類の測定結果

## 2. Sulphoraphane, Valproic acid の投与結果

親電子物質である Sulphoraphane (Sulfo), 肝毒性を示すと言われる Valproic acid (VA) を体重 1kg 当たりそれぞれ、141mg, 115 mg を Saline に溶解後腹腔内投与し、1 時間後肝臓から抽出した  $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチド類およびその他の代謝物質の変動を CE-TOMS で測定した。図 5 に一部のアミノ酸と  $\gamma$ -Glu-X ペプチド類の結果を、補足資料図 1 に同定されたすべての代謝物質の測定結果を示した。何も投与していないマウス (Ctrl)、生理食塩水 (Sal)、VA、Sulfo 投与マウスの順に肝臓内の各物質の定量結果を

示した。

図 5A に示した様に何も投与していないマウス (Ctrl)、生理食塩水 (Sal)、VA、Sulfo 投与したマウス間で、アミノ酸などほとんどの代謝物質の濃度に大きな差はなかった。しかし、 $\gamma$ -Glu-Val、 $\gamma$ -Glu-Ser、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Leu、 $\gamma$ -Glu-Ala-Gly、 $\gamma$ -Glu-Phe 等の  $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチド類は、Sulfo を投与したマウスで有意に増加した (図 5B)。

一方、VA 投与マウスでは、図 5B に示したように  $\gamma$ -Glu ペプチド類の有意な増加は観察されなかった。

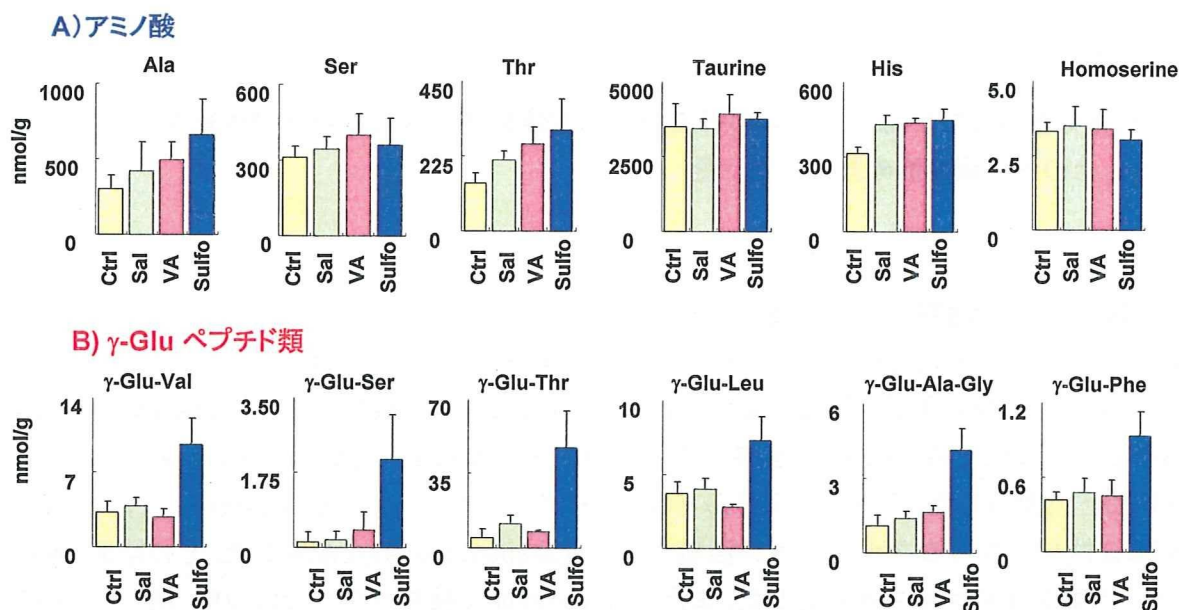


図 5 Sulphoraphane、Valproic acid 投与マウス肝臓の幾つかのアミノ酸、 $\gamma$ -Glu ペプチド類の定量結果

図 6 は、マウスに親電子物質である DEM、Sulphoraphane、代謝物が親電子物質である APAP、肝毒性を示す Valproic acid と生理食塩水を投与後、1 時間の肝臓から各代謝物質を定量し、何も投与していないマウスの肝臓

の代謝物質と比較した結果を示した。親電子物質を生じる DEM、Sulphoraphane、APAP 投与マウスでは、多くの  $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチド類が大幅に増加した。





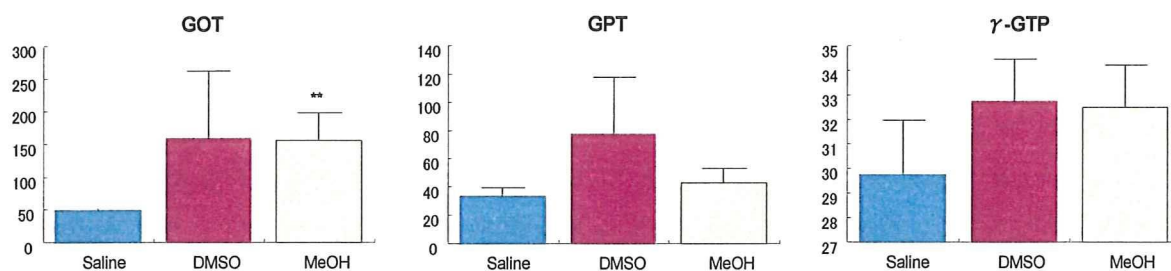


図7 Saline (生理食塩水)、DMSO、Methanol を投与したマウスの血清の GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP の変化量

#### D. 考察

$\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチド類の生合成経路の同定

BSO、DEM の投与によって、発見した  $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチド類がグルタチオン生合成経路で合成されることを示した。さらに、代謝経路の同定を確実にするために、APAP とアミノ酸の一つである Thr 同位体 (+5) を同時にマウスに腹腔内投与した。もし、本当に  $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Thr-Gly がグルタチオン生合成経路で合成されていれば  $\gamma$ -Glu-Thr (+5) および  $\gamma$ -Glu-Thr-Gly (+5) が肝臓から検出されるはずである。図 8 に示したように、投与後 0.5 時間から 4 時間の間に、肝臓に元来存在している天然同位体の Thr、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Thr-Gly の他に Thr (+5)、 $\gamma$ -Glu-Thr (+5)、 $\gamma$ -Glu-Thr-Gly (+5) の同位体が検出された。この結果は、

Thr から  $\gamma$ -Glu-Thr および  $\gamma$ -Glu-Thr-Gly が確かに生合成されていることを実証した。また、Thr から  $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Thr-Gly の順で同位体 (+5) の生成に時間を必要としているため、Thr、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Thr-Gly の順に生合成されていることが推測される。

Thr 同位体 (+5) と APAP を同時に投与した理由は、親電子物質投与によって、 $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素のフィードバック阻害を抑制し、グルタチオン生合成経路を活性化するためである。この実験により、 $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly は、各アミノ酸を基質にしてグルタチオン合成経路で生合成されたペプチド類であることが判明した。

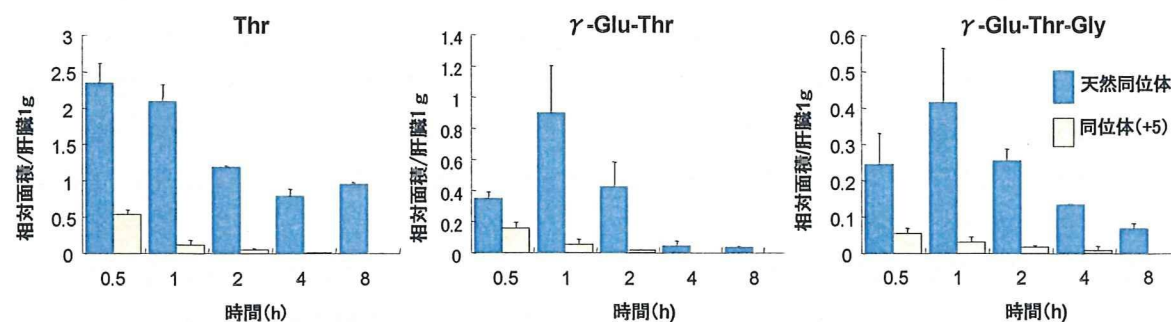


図8 APAP と Thr 同位体 (+5) を投与したマウスの肝臓中の Thr、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Thr-Gly の天然同位体とそれらの同位体 (+5) の経時変化量

### 親電子物質を示す $\gamma$ -Glu ペプチド類

図 6 に示したように、親電子物質である DEM、Sulphorapane および代謝産物が親電子物質である APAP では、肝臓内のグルタチオン濃度が 10 分の 1 以下に減少し、かつ多くの  $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチド類が大幅に増加した。特に  $\gamma$ -Glu-Taurine、 $\gamma$ -Glu-Ser、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Ala 等のペプチド類は投与していないマウスに比べて 10 倍以上濃度が増加した。

これに対して、Valproic acid や生理食塩水 (Saline) では、何も投与していないマウスと比較して、グルタチオンの減少や  $\gamma$ -Glu-X ペプチド類の増加がほとんど見られなかった。

以上の結果より、今回発見した  $\gamma$ -Glu-X、 $\gamma$ -Glu-X-Gly ペプチド類は、生体内で生じた親電子物質によってグルタチオンが枯渇する際に増加するバイオマーカーであることが示された。したがって、各種の化学物質を実験動物やヒト培養細胞等に投与して、これらのバイオマーカーの増減を測定することにより、投与した化学物質のみならず、生体内の代謝で生じる代謝物質が親電子物質であるか一度に予想することが可能である。

### 脂溶性化学物質の評価方法

平成 19 年度は、Butyrate Hydroxyanisol、Ethacrynic acid、Cisplatin 等の脂溶性物質は生理食塩水に不溶だったため DMSO 等の溶媒に溶解後、腹腔内投与した。しかし、DMSO 等の溶媒の投与のみでも肝障害を誘発したため、投与した化学物質が親電子物質であるか測定することができなかった。

そこで、様々な脂溶性の溶媒の半数致死量 ( $LD_{50}$ ) または半数致死濃度 ( $LC_{50}$ ) を調べ、毒性が低くかつ上記の化合物を溶解する溶媒を探索したところ、メタノールが最適の溶媒であることが判明した。そこでメタノールをマウスに投与し、血清中の GOT、GTP、 $\gamma$ -GPT を測定したが、図 7 に示したように GOT、 $\gamma$ -GPT 値が上昇し、メタノールでも肝毒性を示すことが判明した。

平成 20 年度は、脂溶性の化学物質については腹腔内投与ではなく、粉末のままか不溶でも生理食塩水等の液体を用いた経口投与方法でマウスに投与し、バイオマーカーを用いて各化学物質の毒性を評価するシステムを開発する予定である。

### E. 結論

平成 19 年度の本研究課題により、化学物質およびその生体内の代謝物が親電子物質であることを示す  $\gamma$ -Glu-X ジペプチド類 ( $\gamma$ -Glu-Gly、 $\gamma$ -Glu-Ala、 $\gamma$ -Glu-2AB、 $\gamma$ -Glu-Ser、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Taurine、 $\gamma$ -Glu-Val、 $\gamma$ -Glu-Leu、 $\gamma$ -Glu-Ile、 $\gamma$ -Glu-Phe、 $\gamma$ -Glu-Homocysteine) と  $\gamma$ -Glu-X-Gly トリペプチド類 ( $\gamma$ -Glu-Gly-Gly、 $\gamma$ -Glu-Ala-Gly、 $\gamma$ -Glu-Homocysteine-Gly) の 14 個の  $\gamma$ -Glu ペプチドバイオマーカーを発見した。これらの  $\gamma$ -Glu ペプチド類は、これまでに発見したオフタルミン酸と同じく、各アミノ酸がグルタチオンや  $\gamma$ -グルタミルシステインシテターゼ (GCS) によって N 末端に Glu が結合し、続いて  $\gamma$ -グルタチオンシテターゼ (GS) によって C 末端に Gly が結合して生合成されることも実験で証明した。

本研究で発見したグルタチオンの枯渇を示す $\gamma$ -Glu ペプチド類は、化学物質自体が親電子物質である Diethylmaleate (DEM)、Sulforaphane および生体内で代謝されて親電子物質を生じる AAP をマウスへ投与すると、1 時間後に肝臓内で有意に増加した。したがって、化学物質をマウスに投与し、 $\gamma$ -Glu-X ジペプチド類バイオマーカーの変動

をキャピラリー電気泳動-質量分析計で測定する本手法は、化学物質のみならず生体内で生じた代謝物が親電子物質であることを探索する有望な方法論である。今後他の親電子物質や脂溶性化学物質にも応用し、この酸化活性毒性の評価システムをさらに完成させる予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

\*Soga, T., Ishikawa, T., Igarashi, S., Sugawara, K., Kakazu Y., Tomita, M., "Analysis of Nucleotides by Pressure-Assisted Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry Using Silanol Mask Technique", *J. Chromatogr. A* 1159, 125-133, 2007.

Monton, R. M. N., Tomita, M., \*Soga, T., \*Ishihama, Y., "Polymer Entrapment in Polymerized Silicate for Preparing Highly Stable Capillary Coatings in CE and CE-MS", *Anal. Chem.* 79, 7838-7844, 2007.

Monton, M. R. N., \*Soga, T., "Metabolome Analysis by Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry" *J. Chromatogr. A* 1168, 237-246, 2007.

Toya, Y., Ishii, N., Hirasawa, T., Naba, M., Hirai, K., Sugawara, K., Igarashi, S., Shimizu, K., Tomita, M., \*Soga, T., "Direct Measurement of The Isotope Distribution of Intracellular Metabolites Using CE-TOFMS for

Efficient Metabolic Flux Analysis", *J. Chromatogr. A* 1159, 134-141, 2007.

曾我朋義：概論-メタボロームが解き明かす生命のシステム, 「実験医学」 Vol. 26 (1) pp. 1-6, 用土社, 2008.

曾我朋義、大橋由明、富田勝：メタボロミクスの医学への応用, 「臨床遺伝学 '07」最新医学 2007 9 月増刊号 pp. 56-63 (2040-2047), 最新医学社, 2007.

曾我朋義：CE-MS によるメタボローム解析とバイオマーカーの探索, 「最新プロテオミクス・メタボロミクス」細胞工学別冊 pp. 137-145, 秀潤社, 2007.

### 2. 学会発表

Soga, T., Biomarker Discovery by Metabolome Analysis」 8<sup>th</sup>

International Society for the Study of Xenobiotics Meeting, Sendai, Oct. 9-12, 2007.

Soga, T., Metabolomics by CE-MS for Biomarker Discovery」 Pharmaceutical Sciences World Congress 2007,

Amsterdam, Apr. 22-25, 2007.

曾我朋義. 最新のメタボローム解析技術と生命科学への応用. 富士山麓エリア都市エリア成果発表会-特別講演. 静岡県ブケ東海沼津、2008年3月4日

曾我朋義. 最新のメタボロームが切り拓く創薬研究. 創立150年記念事業 第4回慶應義塾先端科学シンポジウム. 慶應義塾大学三田キャンパス、2008年2月8日

曾我朋義. 最新のメタボローム解析によるバイオマーカーの探索法. 日本薬学会薬学研究ビジョン部会. 第9回創薬ビジョンシンポジウム. 東京大学鉄門記念講堂、2008年1月24-25日

曾我朋義. メタボローム解析による酸化ストレスマーカーの探索とその生合成機序の解明. 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007). パシフィコ横浜、2007年12月13日

曾我朋義. 最新のメタボローム測定法と生命科学への応用. トランスポータ研究会 第一回東北部会. 東北大学薬学研究科、2007年11月25日

曾我朋義. 最新のメタボローム測定法と生命科学への応用. マリンバイオテクノロジー学会会員懇談会. 航空会館、新橋、2007年11月22日

曾我朋義. CE-MSによるメタボローム測定法と生命科学への応用. 第27回キャピラリー電気泳動シンポジウム. クリエート浜松、2007年11月15日

曾我朋義. メタボローム技術の最前線. BTJ プロフェッショナルセミナー:メタボロームが拓くバイオ産業. 日経ホール、2007年11月7日

曾我朋義. メタボローム解析による酸化ストレスマーカーの探索. 第2回メタボロームシンポジウム、東京大学医学部鉄門記念講堂、2007年11月5-6日

曾我朋義. 最新のメタボローム解析法と生命科学への応用. バイオインフラマティクスセミナー in 東北、良陵会館、仙台、2007年11月3日

曾我朋義. 最新のメタボローム解析によるバイオマーカーの探索. 第24回関東腎研究会、関東腎研究会. クラブ関東、2007年7月7日

曾我朋義. 最新のメタボローム解析によるバイオマーカーの探索. -特別講演 第8回腎とバイオロジー研究会. 霞ヶ関ビル、2007年7月7日

曾我朋義. 最新のメタボローム解析と生命科学への応用-基調講演. 第10回マリンバイオテクノロジー学会大会、マリンバイオテクノロジー学会、山形大学小白川キャンパス 2007年5月26日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし