

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「内分泌かく乱物質」
研究課題「高感度質量分析計の開発と内分泌
かく乱物質の分析」

研究終了報告書

研究期間 平成12年11月～平成17年10月

研究代表者：交久瀬五雄
(大阪大学、名誉教授)

1 研究実施の概要

本プログラムの申請時にはダイオキシン類の内分泌かく乱作用がマスコミで大いに話題になり、どのような内分泌かく乱物質が何処にどの程度存在しているかを知りたいという要求が自治体や個人から多数あった。当時、ダイオキシン類の測定にかかる費用は1件あたり100万円程度であった。この費用の大部分は測定器(質量分析計)にかかるようにするための前処理の煩雑さからきている。例えば、Genomic actionの代表的な物質で、エストロゲン様活性を示すビスフェノール A (BPA) は缶詰の内張りに使われているプラスチックから溶出すると言われていたが、いきなり缶詰の内容物をすりつぶし、質量分析計にかけるわけにはいかない。BPAを質量分析計にかけるようにするには30に近い処理が必要である。また、内分泌かく乱物質の代表格のように言われているダイオキシン類ではサンプルの形状によっても処理の方法が違う。ダイオキシン類の前処理の一例を交久瀬グループの報告の図1に示す。ガスクロマト質量分析計の測定時間はせいぜい20分であるが、試料の前処理にはその10倍以上の時間がかかる。

多くの内分泌かく乱が疑われる物質(例えば旧厚生省がリストアップした67種の物質)は、その質量数が1000以下である。抗原-抗体反応、吸光分析等は特定の物質に高感度であるが、広範囲の化学物質を高感度で測定する方法はガスクロマト質量分析法である。ここで、ガスクロマト質量分析計の感度が10倍になると、使用するサンプル量も試薬も1/10になり前処理の時間や労力が大幅に軽減されることが期待される。また、同じだけの量のサンプルを使用する場合でも、簡単な前処理で回収率が1/10に悪くなくても十分測定可能である。新生児の血液や臍帯血のように非常に少量のサンプルしか利用できない場合にも高感度が不可欠である。

私たちは大阪大学で培ってきた質量分析計開発のノウハウを用いて市販の質量分析計の10倍以上の感度を持つ質量分析計を開発目標に研究を行ってきた。さて、質量分析計には磁場型、飛行時間型、フーリエ変換型、四重極型等多くのタイプがあるが、日本ではダイオキシンのデータは磁場型で測定したものが正式なデータとして認められているため、私たちは磁場型質量分析計の高感度化を行う事にした。磁場型質量分析計ではイオン源で生成されたイオンは電場と磁場で質量別に分離される。従来方法では、異なった種類のイオンは磁場強度を掃引し、スリットに入ってきたイオンを2次電子増倍管で電気信号に変え検出する。ある瞬間を考えるとスリットに入ってきているイオンの情報のみが得られ、スリットにこない質量のイオンの情報は無駄に捨ててしまっていることになる。これに対して、写真乾板のような位置検出器を用いれば同時にある範囲の m/z (m : 質量, z : 電荷) のイオンが検出され、高感度化期待される。近年の検出器の発展により、イオンの位置と強度を同時に検出できるマイクロチャンネルプレート(MCP)、蛍光板(FOP)とデジタルカメラ(CCD)を組み合わせた2次元位置検出器が使えるようになった。CCDはある時間にきた光を蓄積し電気信号に変換できるので、CCDの転送時間以外は有効にイオン信号を利用できる。私たちはこのデジタル機器を使って、ある程度の質量範囲のイオンを同時に検出し、時間積分できるようにして感度向上を図った。

質量分析計は時間と費用の節約のため、電場磁場等の主要部分は日本電子(株)のJMS700のものを使用した。JMS700は磁場先行型のため位置検出器を装着するのに不都合があったため、イオンを逆方向に走らす電場先行型にした。阪大で開発されたイオン軌道計算プログラムを用いて場(電場、磁場、四重極レンズ等)の配置を決定した。

分解能を向上させるために縮小レンズ系を用い、また一度に観測できる質量域を変えるためにズームレンズ系も挿入した。その結果理論分解能20000程度の分解能が得られた。ガスクロマト質量分析計として用いた場合の感度はステアリン酸メチルでは0.1ppb(0.1pg/ μ l)程度であった。これ以下の濃度ではガスクロマトグラフのメモリー効果

公開資料

やカラムバックというカラムから出てくる特定の物質から来る迷走イオンにより信頼できるデータを得る事が難しかった。

質量分析計の開発と同時にダイオキシン受容体関連分子の高感度プロテオーム解析を行った。内分泌かく乱物質が生物活性を示し、細胞機能をかく乱するためには受容体への結合が必要である。ダイオキシン受容体 AhR の新しい結合分子の同定とその生理活性の解明を目的とし、AhR 複合体の網羅的解析を行った。

そのために、ゲル電気泳動をベースとする高感度化をはかり、視覚的感度限界である1ナノグラムまで検出できる技術を開発した。ゲル分離したたん白質の同定にはインゲル酵素消化し、精製したペプチドを回収し、ペプチドの質量を決定した。得られた質量データと既存のデータベースと比較し元のたん白質を同定した。この方法では検出限界は質量分析計の検出限界によっている。質量分析計の検出限界はゲルから来る不純物の信号の大きさによっているので、通常使われている1mm厚のゲルから0.5mm厚のゲルを用いることによってS/N比が10倍程度向上させることが出来た。また、ゲル部分の長さを2倍の11cmに伸ばすことによってたん白分離能を向上させた。

これらの技術を使ってAhRに関するプロテオーム解析を行った。AhR 会合分子探索法としてFLAG-HA タグを利用したプルダウン法によるAhR複合体の精製とプロテオームによる網羅的解析を行った。その結果、AhRが核内、ミトコンドリア膜や細胞質で会合する分子群を同定した。これらの研究でも質量分析計は有力な手法であることがわかった。

内分泌かく乱をするメカニズムのうち核内のホルモン受容体に直接結合し、ホルモンと類似の作用をする(アゴニスト)またはホルモンを阻害する物質(アンタゴニスト)について、性ホルモン受容体生理活性の検討を行った。物質本体の内分泌かく乱性だけでなく代謝物のホルモン受容体活性を見ることも大切である。以下の4点について研究した。

- 1) DDT 類縁体およびその代謝物の性ホルモン受容体結合活性
- 2) メトキシクロル代謝物のエストロゲン受容体結合活性および高感度 GC-MS による活性代謝物の測定
- 3) エストラジオールの表面プラズモン共鳴センサーによる定量法ならびにそれを利用したエストロゲン受容体結合活性測定法の開発
- 4) 内分泌かく乱物質の予測へ向けた構造活性相関

1についてはさまざまな構造を有する DDT 類縁体について測定した結果、ほとんどの物質はエストロゲン受容体結合活性を示さず、DES の 1/1000 以下であった。しかし、ベンゼン環置換基としてメトキシ基およびエトキシ基のようなエーテル構造をもつ類縁体の活性が顕著であった。2については第 I 相代謝物によって上昇したメトキシクロルの内分泌かく乱物質としての活性が第 II 相代謝反応で抑えられ全体としてはメトキシクロルの内分泌かく乱物質としての生体内でのリスクが低下したと思われ。合成物の内分泌かく乱物質だけではなくヒトや家畜の糞尿に含まれる天然エストラジオール (E2) も問題である。表面プラズモン共鳴センサー (SPR センサー) 法を用いて種々の物質の影響下での E2 の測定を行った。構造と生理活性の相関は現在のところ定性的な評価しか出来ないが、化合物の物理化学的なパラメーターと活性との相関関係を解析する定量的構造活性相関や受容体の立体構造のモデリング手法を用いたリガンド結領域と化合物とのドッキングによる親和力の定量的な算出などを行うことによって、今後新たに合成される様々な化合物の内分泌かく乱性の予測に役立つ基礎データを得た。

内分泌かく乱を示す物質の簡易テストとして遊走子を使った実験を行った。遊走子は優れたセンサーであることがわかった。

2 研究構想及び実施体制

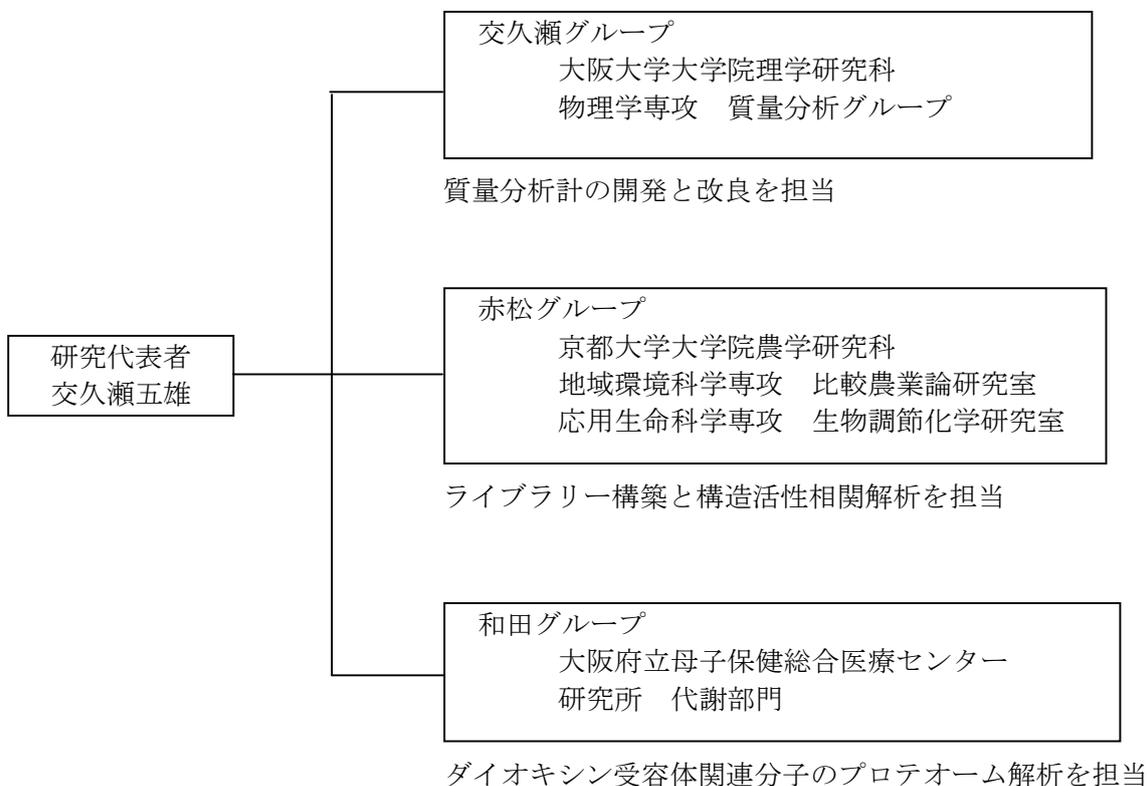
(1) 研究構想

交久瀬グループでは高感度 GC-MS の開発を行った。市販の装置の 10 倍以上の感度を目指して開発を行った結果、当初の目標以上の高感度を得た。その結果見えてきたものは GC のメモリー効果とカラムバックと称されるカラム由来のピークの問題である。メモリー効果は GC インレットでのガラス表面とサンプルの結合の問題であると思われる。1～2 層目の結合形態とそれ以上の層の結合の仕方が違うため、1-2 層目のサンプルは簡単に洗い流せない。今後、この結合をきる試薬が開発されないと一度濃いサンプルを測定するとその後のデータの信頼性は著しく低下する。カラムバックの減少にはもっと小さなキャピラリーの開発が必要である。近年発達してきているナノテクを用いた 10 ミクロン以下のキャピラリーの開発が待たれる。また、試薬にはすでにある種の内分泌かく乱をする不純物があり、微量分析には自前での精製が必要であることもわかった。

和田グループではダイオキシン受容体関連分子のプロテオーム分析を網羅的にを行い、相当数のたん白質を同定した。ゲル分離ではゲル層を薄くすることによってゲルから来るバックグラウンドを 1/10 以下にする技術を開発した、またゲル長を長くしたたん白の分離をよくする手法も開発した。

赤松グループでは DDT 類縁体の多くの化合物の内分泌かく乱作用を測定し、ベンゼン環上の OH 基や 2 つのベンゼン環をつなぐ炭素上の疎水性構造が活性発現に重要であり今後合成される新種の化学物質の内分泌かく乱性を予測する手がかりを得た。また、遊走子が内分泌かく乱性を検出する簡便ではあるが有効な手法である事を発見した。

(2) 実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 内分泌かく乱物質測定用高感度ガスクロマト質量分析計の開発（交久瀬グループ）

大阪大学理学研究科物理学専攻

交久瀬五雄、豊田岐聡、石原盛男、市原敏雄、栄欧樹

(1)研究実施内容及び成果

1) はじめに

旧厚生省がリストアップした内分泌かく乱が疑われる 67 種の物質は、その質量が 1000 以下の物質がほとんどである。またその後の研究で出てきた内分泌かく乱が疑われる多くの物質も、同様に質量数が 1000 以下の物質である。化学物質を感度良く測定するには、抗原-抗体反応、吸光分析法のような方法があるが、これらの方法はある特定の物質に対してのみ有効で、不特定多数の物質に対しては無効である。質量数 1000 以下の低分子物質の種類を問わず、感度良く測定する方法にはガスクロマト質量分析法がある。しかしながら、如何に高感度とはいえサンプルを直接測定することはできず、装置にかけられるようにするための濃縮、精製等の前処理に大部分の労力が費やされているのが現状である（図 1 参照）。ここで、測定器の感度が 10 倍になると、使用するサンプル量も試薬も 1/10 になり前処理の時間や労力が大幅に軽減されることが期待される。また、同じだけの量のサンプルを使用できる場合でも、簡単な前処理でよく、回収率が 1/10 に悪くなくても十分測定可能である。新生児の血液や臍帯血のように非常に少量のサンプルしか利用できない場合にも高感度が不可欠である。

さて、質量分析計には磁場型、飛行時間型、フーリエ変換型等多くのタイプがあるが、新装置開発にあたって、日本ではダイオキシンのデータは磁場型で測定したものが正式なデータとして認められているため、磁場型についてのみ考えた。磁場型質量分析計ではイオン源で生成されたイオンは電場と磁場で質量別に分離される。異なった種類のイオンは磁場強度を掃引し、スリットに入ってきたイオンを 2 次電子増倍管で電気信号に変え検出する。ある瞬間を考えるとスリットに入ってきているイオンの情報のみが得られ、スリットに来ない質量のイオンの情報は無駄に捨ててしまっていることになる。これに対して、写真乾板のような位置検出器を用いれば同時にある範囲の m/z (m : 質量、 z : 電荷) のイオンが検出され、高感度化が期待される。従来のような写真乾板では、現像や黒化度測定等煩雑な処理が必要で、しかもリアルタイムでデータが得られないという欠点があった。このような欠点を補うものとして近年、イオンの位置と強度を同時に検出できるマイクロチャンネルプレート (MCP)、蛍光板とデジタルカメラに使われている CCD を組み合わせた 2 次元位置検出器が発達してきている。CCD はある時間にきた光を蓄積し電気信号に変換できるので、CCD の転送時間以外は有効にイオン信号を利用できる。私たちはこのデジタル機器を使って、ある程度の質量範囲のイオンを同時に検出し、時間積分できるようにして感度向上を図った。図 2 にスリット検出器と位置検出器の検出方法の違いを模式的に示した。

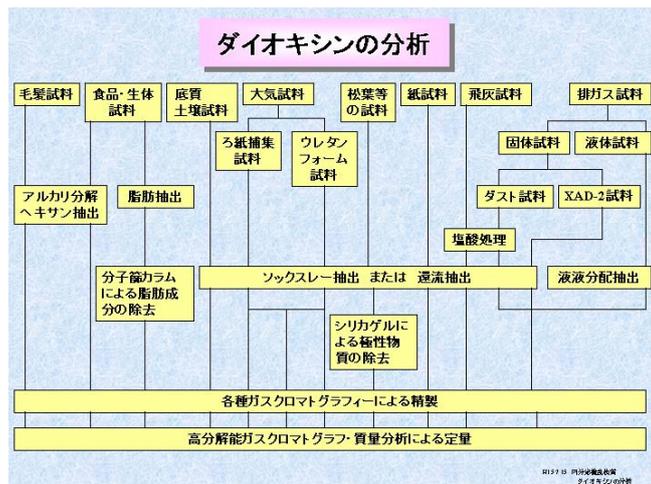


図 1 ダイオキシンの測定

図 2 にスリット検出器と位置検出器の検出方法の違いを模式的に示した。



スリット検出器の場合

- 1) スリットを通過したイオンのみ検出。
- 2) スリット上だけでイオンは2重収束していれば良い。

位置検出器の場合

- 1) 位置検出器全面に到達した全部のイオンの情報が得られる。
- 2) 2重収束性が検出器全面にわたって必要でありスリット検出器の条件より厳しい

図2 スリット検出器と位置検出器の比較

2-1) 全体のイオン光学系

磁場型質量分析計では主スリットから出たある幅のエネルギー $E = E_0(1 + \delta)$ と角度(方向) α をもったイオンを検出器上で収束させ、質量の分散だけを得るようになっている。この場合、エネルギーと方向の収束性を持つため、2重収束質量分析計という。2重収束を得るためにはどうしても電場と磁場が必要である。最近の2重収束質量分析計はイオンを狭い磁場を先に通してイオン透過率をよくするために、イオン源→磁場→電場→検出器の順に並べたものが主流になっている。歴史的には電場先行型が主であったために、磁場先行型を私たちは逆配置と呼ぶ。位置検出器を用いる場合は横方向に広い場が得られる磁場を後に持つてくる方が有利である。

質量分析計の製作にかかる時間と費用を考えて、市販されている日本電子(株)のJMS-700をベースに考えた。これによって磁場制御回路、電場電圧制御回路、コンピュータソフト等は既製品が使えることになった。しかし、JMS-700は磁場先行型であるため、イオンを通す方向を逆にして正配置に並び替えなければならなかった。ところが、これによって以下に述べるような不都合が生じたので、レンズ系を挿入して改善した。

1) 正配置にすることによって分解能が1/5になってしまうので、JMS-700と同等な分解能が得られるように縮小(ターボ)レンズ系をイオン源出口に設けた。

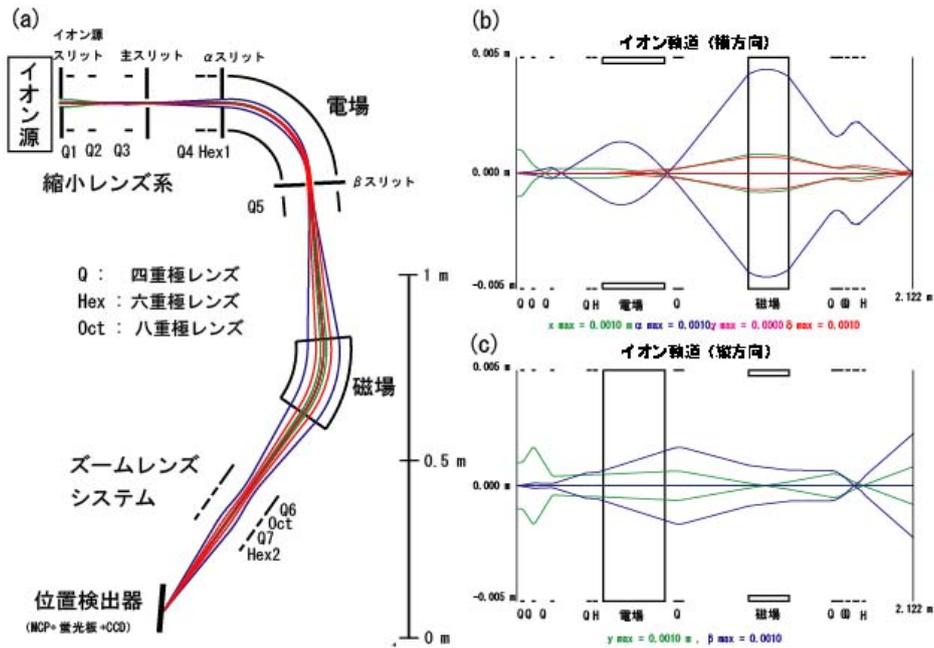
2) 位置検出器を採用することによって、同時に検出できる質量範囲は決まってしまう。これではある狭い質量域を詳しくみたいとか、広い質量域を見渡したいとか言う場合に不便である。そこで、私たちはズームシステムと呼ばれる質量分散を変えられるレンズ系を磁場出口の後に挿入し、同時に見られる質量域を変えられるようにした。これらのイオン光学的设计、シミュレーションには阪大で開発した計算機ソフトTRIO-DRAWを用いた。これらのレンズ系については以下で個々に述べる

結局全体の質量分析計の場の配置はQQQQHEMQQQHになった。ここでQはQ(4重極)レンズ、H;ヘキサポール(6重極)レンズ、E;扇型電場、M;一様磁場、0;オクタポール(8重極)レンズをあらわす。電場の中心半径は223mm、偏向角は85度、磁場中心半径310mm、偏向角40度である。図3は計算機シミュレーションによるイオン軌道である。

また、図4にガスクロマト質量分析計を示す。

2-2) ターボレンズ系

JMS-700のイオン光学系でイオンの進行方向を逆にして正配置にした場合十分な分解能が得られない。逆配置の質量分散を A_{γ} 、像倍率を A_x とし、正配置の質量分散を A_{γ}' 、像倍率を A_x' とすると次のような関係になる。



- (a) r 方向 (上から見た) イオン軌道。イオン源スリットからいろいろな方向とエネルギーの広がりを持ったイオンの質量分析計中での広がりを出す。緑色: 位置 $x = \pm 1$ mm から平行に出たイオンの軌跡、青: 位置 $x=0$ から角度 ± 0.001 rad の広がりをもって出たイオンの軌跡、赤: 加速エネルギーより $\pm 0.1\%$ 持ったイオンの軌跡
- (b) イオン源において位置 $x = \pm 1$ mm (緑)、方向 $\alpha = \pm 0.001$ rad (青)、エネルギー $\pm 0.1\%$ (赤) を持ったイオンが中心軌道から r 方向にどの程度広がるかを示した図。
- (c) C: 縦方向に $y = \pm 1$ mm (緑)、方向 $\beta = \pm 0.001$ rad (青) 持ったイオンが上下方向にどの程度ずれるかを示した図。上下方向に狭い磁場の透過率を良くするために磁場中で上下に広がらないようにしてある。

図3 計算機シミュレーションによるイオン軌道

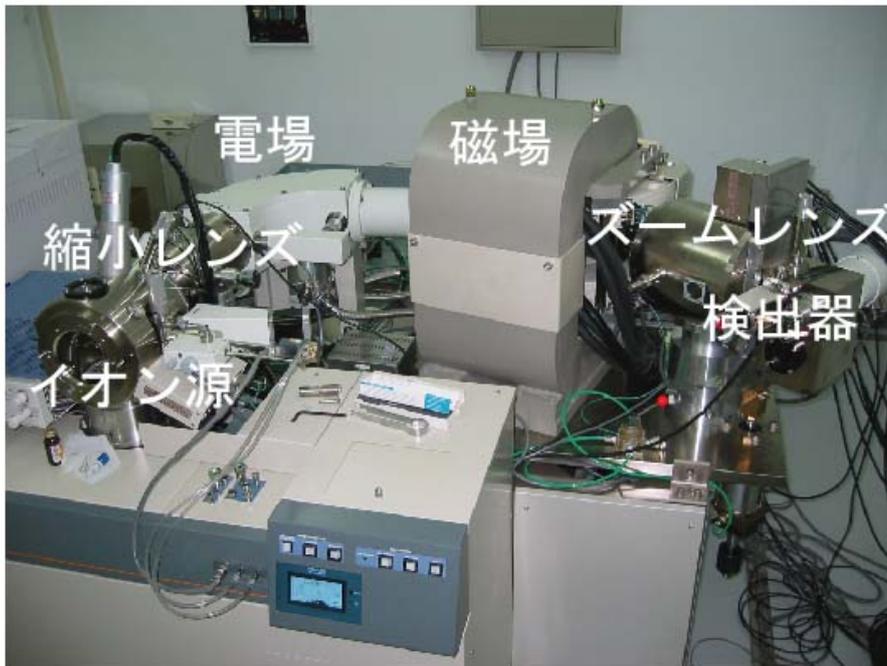


図4 新しく開発したガスクロマト質量分析計

公開資料

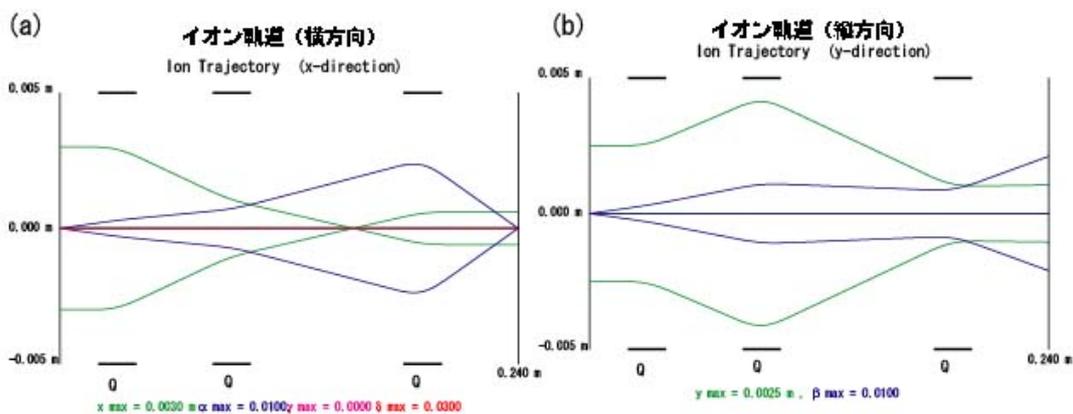
$$A_x' = \frac{1}{A_x} \quad A_y' = \frac{A_y}{A_x}$$

磁場型質量分析計では [(質量分散) / (像倍率)] が大きければ大きいほど質量分解能は高くなる。JMS-700 を正配置にした場合、この値は

$$\frac{A_y'}{A_x'} = -A_x \frac{A_y}{A_x}$$

となり逆配置の場合の A_x 倍になる。-(マイナス)は分散の方向が逆である

ことをあらわす。JMS-700 は像倍率が 0.2 であるため、主スリット幅を 1/5 にしなければ同等の分解能が得られない。別な言い方をすれば、同じイオン源スリット幅を用いて同等の感度を得ようとするとき分解能が 1/5 になってしまう。そこで、同じスリット幅で同じ分解能を得るためにはイオン源出口直後に 1/5 の縮小レンズ系 (ターボレンズ系) を挿入する必要があった。ターボレンズ系は 3 つの四重極レンズ (Q レンズ) 系からなり、Q レンズに適当な電圧をかけることによって 1/5 の縮小率が得られる。これまで横方向の角度収束を満足するような縮小レンズ系はあったが、今回縦方向も並行に入ったイオンは平行に出て行くような光学系を見出した。これによって縮小レンズ通過後に縦方向に広がることなくなくなった。図 5 に縮小レンズのイオン軌道を示す。



- (a) 入り口で位置 $x = \pm 3$ mm から平衡に出たイオン (緑色) は出口で 0.6 mm の広がりを持った平行ビームになる。位置 $x=0$ から広がりを持ったイオンは出口で再び位置 $x=0$ になる。出口での角度は像倍率の逆数(この場合 5 倍)になるのは物理法則で避けられない。エネルギーに幅を持ったイオン (赤) はエネルギー分散がないので、中心軌道を通る。
- (b) 縦方向も平行に入ったイオンは(緑)は平行に出て行く。

図 5 ターボレンズ系内のイオン軌跡

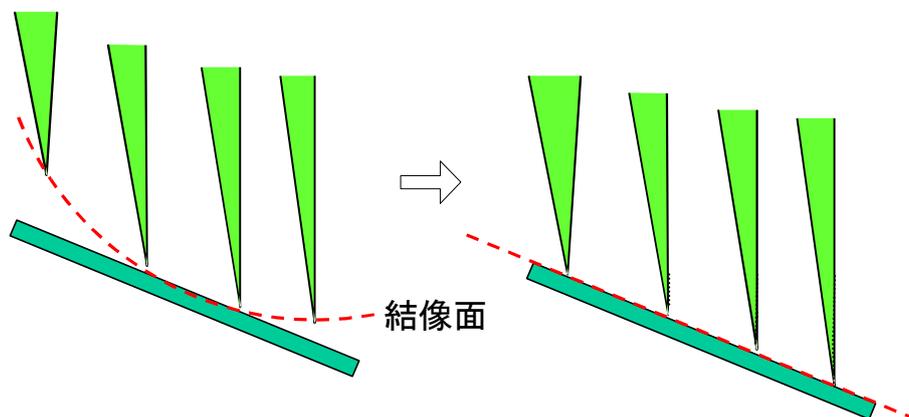
2-3) ズーム光学系

従来の質量分析計ではイオン源で生成されたイオンは電場と磁場で質量別に分離される。このイオンは磁場強度を掃引し、スリットに入ってきたイオンを 2 次電子増倍管で電気信号に変え検出する。ある瞬間を考えるとスリットに入ってきているイオンの情報のみを得られ、スリットに来ない質量のイオンの情報は無駄に捨ててしまっていることになる。私たちは上述のように検出器をイオンの位置と強度を同時に検出できるマイクロチャンネルプレート (MCP) と CCD 検出器を組み合わせた 2 次元検出器を使って、ある程度の質量範囲のイオンを同時に検出し、時間積分できるようにして感度向上を図った。

さて、ここで位置検出器特有の問題が発生する。ある質量範囲を詳しく見るためには拡大像が必要であり、広い質量範囲を見渡すには縮小像が必要である。そこで、磁場を通った後に質量分散が変えられる四重極 (Q6) - 八重極 (Oct) - 四重極 (Q7) - 六重極 (Hex2) からなるズームレンズシステムを取り付けた。普通のデジタルカメラでいう光学ズーム

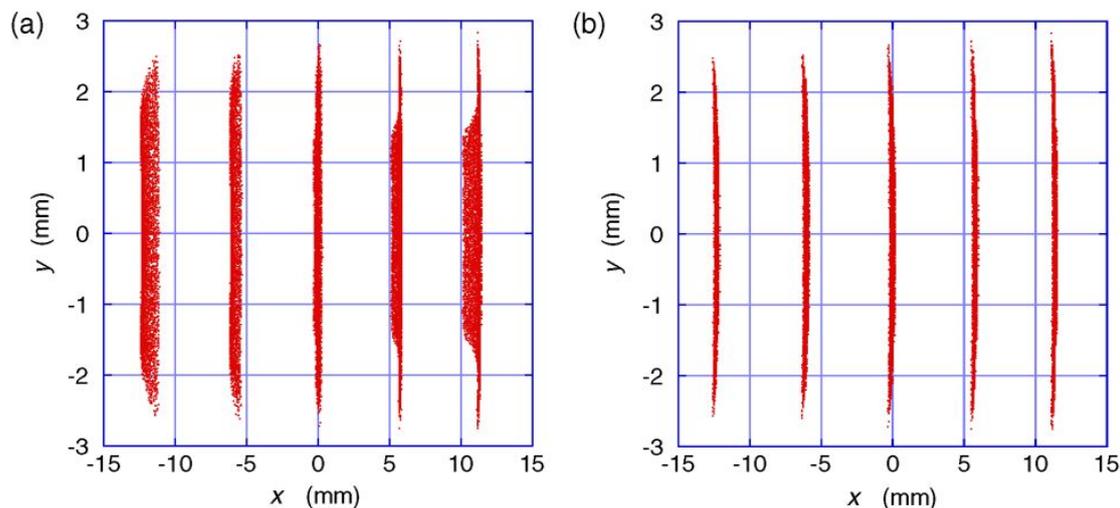
公開資料

に相当する。Q6 と Q7 の電圧を変えることによって質量分散を変え、すなわち観測できる質量域を 5~20% の範囲で変えることができる。Oct レンズは 3 次項の影響でフォーカス面が湾曲するのを補正して MCP 表面とフォーカス面が一致させるために挿入した。図 7 に 8 重極レンズによる補正の有無の違いを示す。八重極レンズを用いない場合 (a) と、八重極レンズによって適当に補正した場合 (b) のコンピューターシミュレーションである。補正しなかった場合には中心位置以外はスペクトルが太くなっている (ピンボケ状態) が、補正した場合全体にピントが合っている。



一般に収束面は曲線 (左図の点線) 様になっていて、平面の検出器とは一致しない。八重極レンズの電圧を調整する事によって収束面 (結像面) を平面に出来る (右図)。

図 6 八重極レンズの機能



- (a) 8 重極レンズによる補正がない場合、
- (b) 補正がある場合。

初期条件は x (主スリット幅) = $\pm 100 \mu\text{m}$ 、 α (横方向の分散角) = ± 0.005 、 γ (質量) = ± 0.02 、 δ (エネルギーの広がり) = ± 0.001 、 y (主スリットの縦方向の幅) = $\pm 1\text{mm}$ 、 β (縦方向の分散角) = ± 0.002

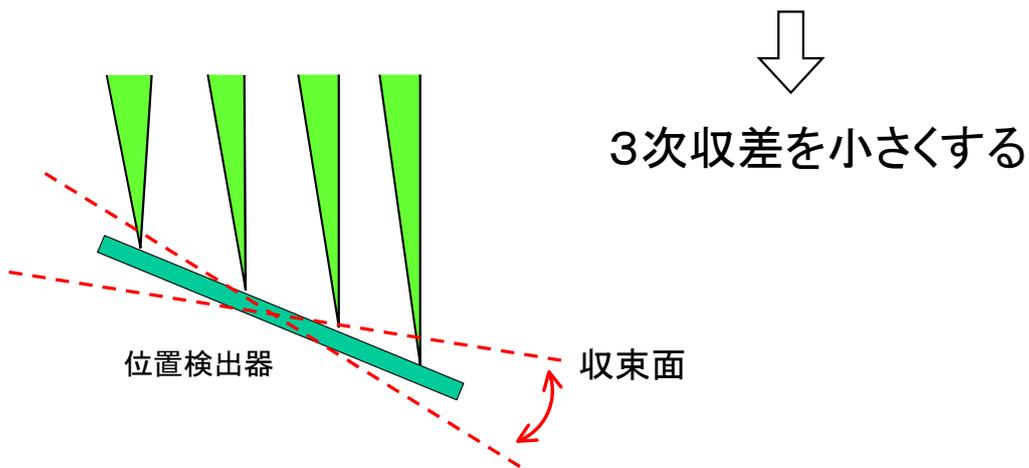
図 7 TRIO-DRAW による検出面での像のコンピューターシミュレーション

公開資料

8重極レンズで収束面が直線になっても、イオン軌道に対して収束面は約15度の角度を持つ。この角度は、Q6とQ7を調整して検出する質量範囲を変えれば変わる。したがって、一般にMCP面と収束面は一致しない。MCP面を真空中で機械的に変えるのは難しいので、電氣的に角度を変えることが重要になる。そこでHex2レンズによって収束面を軌道に対して回転させ、収束面とMCP面を一致させる。また、イオン軌道に対して収束面(=MCP面)との角度が小さいと、測定できる質量範囲が狭くなるのみでなく、検出器への入射角が小さくなり、感度が落ちてしまう。入射角は最高感度が得られる約45度にするのが望ましい。と

Hex2の機能

Hex1の機能



Hex2によって収束面を回転する事ができ、検出器に一致させる事ができる。Hex1はHex2によって大きくなった3次収差を補正する機能がある。

図8 六重極レンズの機能

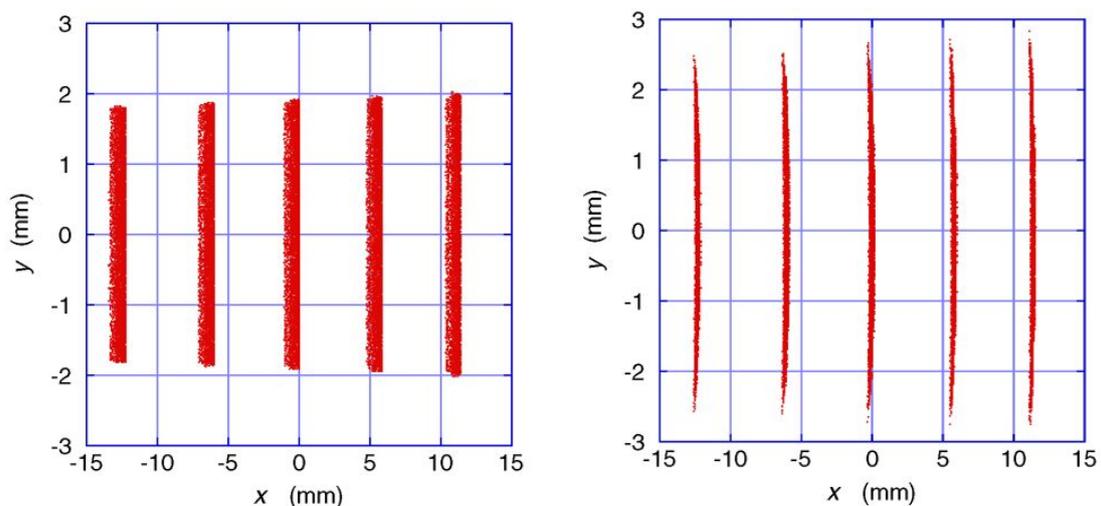


図9 Hex1を用いない場合(a)と用いた場合(b)の検出面でのスペクトルのシミュレーション

公開資料

ころが Oct2 だけで 45 度近くにまで収束面を回転させると 3 次項 ($x|\alpha\alpha\gamma$) が大きくなり、分解能が落ちてしまう。そこで電場の前にもう 1 つ Hex1 を入れることによって 3 次項の補正を行った。図 9 に Hex1 を用いない場合 (a) と用いた場合 (b) の検出面でのスペクトルのシミュレーションを示す。全面に渡って分解能が改善されていることがわかる。

3) 検出器

検出部は MCP+蛍光面+CCD の組み合わせを用いた位置検出器と従来型のスリット検出器を用意した。この 2 つのタイプの検出器の取り替えは、上下にスライドさせることによって真空を破らないで行うことができる。検出器部分の写真を図 10 に示す。上方に従来のスリット検出器、下方に位置検出器がついている。検出器の交換は全体を上下することによって真空を破らないで出来る。

位置検出器は蛍光体が塗布してあるファイバーオプティクスプレート (FOP) がカップリングした MCP (4301-04、浜松ホトニクス社) と同じく FOP がカップリングしてある CCD (S7175F、浜松ホトニクス) の組み合わせからなる。質量分析されたイオンは MCP に入射し、そこで 2 次電子に変換される。2 次電子は MCP によって $10^4 \sim 10^6$ 倍に増幅される。この増幅された 2 次電子は加速され蛍光体に衝突し発光する。光は FOP により CCD に送られて電気信号に変換される。CCD を駆動するタイミングはデジタル I/O ボード (PCI-2472、インターフェース(株)) にて制御し、CCD 出力は 12-bit A/D コンバーター (PCI-3525、インターフェース(株)) を通してパソコンに取り込む。MCP の有効面積は $55\text{mm} \times 8\text{mm}$ で CCD は $49.152\text{mm} \times 6.144\text{mm}$ 、画素数は 1024×128 である。図 11 に位置検出器の模式図を示す。CCD の制御の仕方によって 2 次元像と従来の 1 次元スペクトルのいずれかを得ることができる。位置検出器と軌道とのなす角は 0 から 45 度まで真空外から回転させることができる。

MCP に入射したイオンは 2 次電子に変換され、 $10^4 \sim 10^6$ 倍に増幅される。この電子が蛍光面を照射して光に変換される。FOP によって光は広がることなく CCD に搬送される。CCD からの電気信号を計算機処理して 2 次元像を得る。

スリット検出器は磁場中の軌道半径が 310mm のイオンが検出できるところに設置してある。

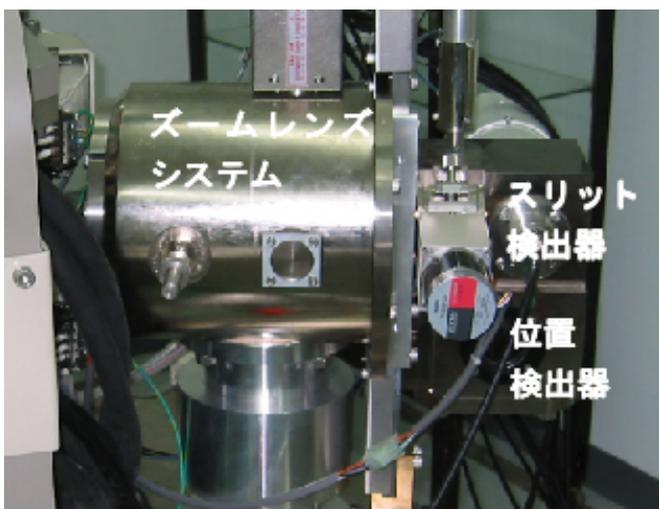


図 10 検出器部分の外観

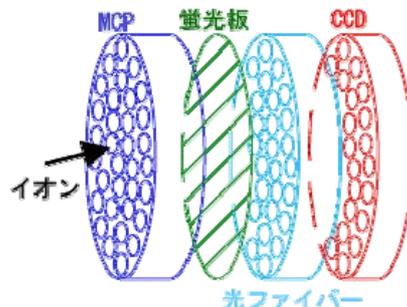


図 11 2次元位置検出器の模式図

4) 性能評価

4-1) スリット検出器を用いた場合の分解能

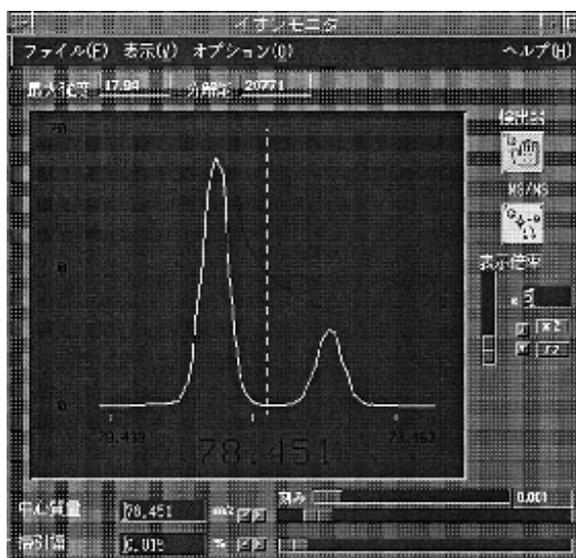
設計分解能は主スリット幅 $7\mu\text{m}$ で 21000 である。スリット検出器を用いた場合の分解能を以下のようにして確認した。ピリジン-ベンゼンを電子衝撃 (EI) でイオン化した時生ずるイオン、 $^{12}\text{C}_5^1\text{H}_5^{14}\text{N}$ ($m/z=79.0422$) と $^{12}\text{C}_5^{13}\text{C}^1\text{H}_6$ ($m/z=79.0503$) の 2 重線の質量スペクトルを図 1 2 に示す。このスペクトルは以下の条件でとられた。イオン源スリット巾; $35\mu\text{m}$ 、主スリット巾; 開放、 α スリット巾; $240\mu\text{m}$ 、コレクタースリット巾; $d=7\mu\text{m}$ 、質量分散 A_y は 0.3m になるようにズームレンズを設定した。このとき像倍率は $A_x = 0.2$ で高次収差を無視した理論分解能は

$$R = \frac{A_y}{A_x s + d} = 21500 \quad \text{である。}$$

上記 2 重線を分解するには質量分解能 $\frac{M}{\Delta M} = 10000$ 必要である。

実際に得られたスペクトルはピーク幅 1 つ分わかれているので分解能は 20000 でほぼ理論通りである。

ターボレンズが正常に作用しているか確認するために、主スリットの所でのイオンビーム巾を求めた。イオン源スリット $35\mu\text{m}$ に設定し、主スリット巾を狭めていくと約 $7\mu\text{m}$ までイオン強度はほぼ一定であった $7\mu\text{m}$ 以下に狭めていくとイオン強度は低下した。このことからターボレンズにより $1/5$ まで縮小されていることが分かる。また、コレクタースリットを $7\mu\text{m}$ より広げていくとフラットトップピークが得られた。このことからコレクタースリットのところのビーム幅は約 $7\mu\text{m}$ であり、イオン源スリットの $1/5$ になっていることが確認できた。



完全に分かれたときの分解能は 10000 である。
ピーク幅 1 個分余計に分かれているので分解能は約 20000 である。

図 1 2 $^{12}\text{C}_5^1\text{H}_5^{14}\text{N}$ ($m/z=79.0422$) と $^{12}\text{C}_5^{13}\text{C}^1\text{H}_6$ ($m/z=79.0503$) の 2 重線の質量スペクトル。

4-2) 位置検出器の場合のズーム機能

ズーム機能を位置検出器で検証した。用いたサンプルは Xe ガスである。位置検出器は軌道と 30 度になるように設定した。図 1 3 に示すように Q6、Q7 を調節することによって分解能がほとんど等しいが、分散だけを変えられることを確認した。質量分散は Q6 と Q7 の電圧値から求めた分散と一致した。下のスペクトルは 2 次元スペクトルを縦方向に足し合わせて 1 次元スペクトルにしたものである。比較のために、Xe の同位体比からシミュレーションで求めたスペクトルである。実際のスペクトルは見かけ上、 ^{132}Xe 等はピーク高が小さく見えているが、面積では理論値にほとんど近いことがわかった。

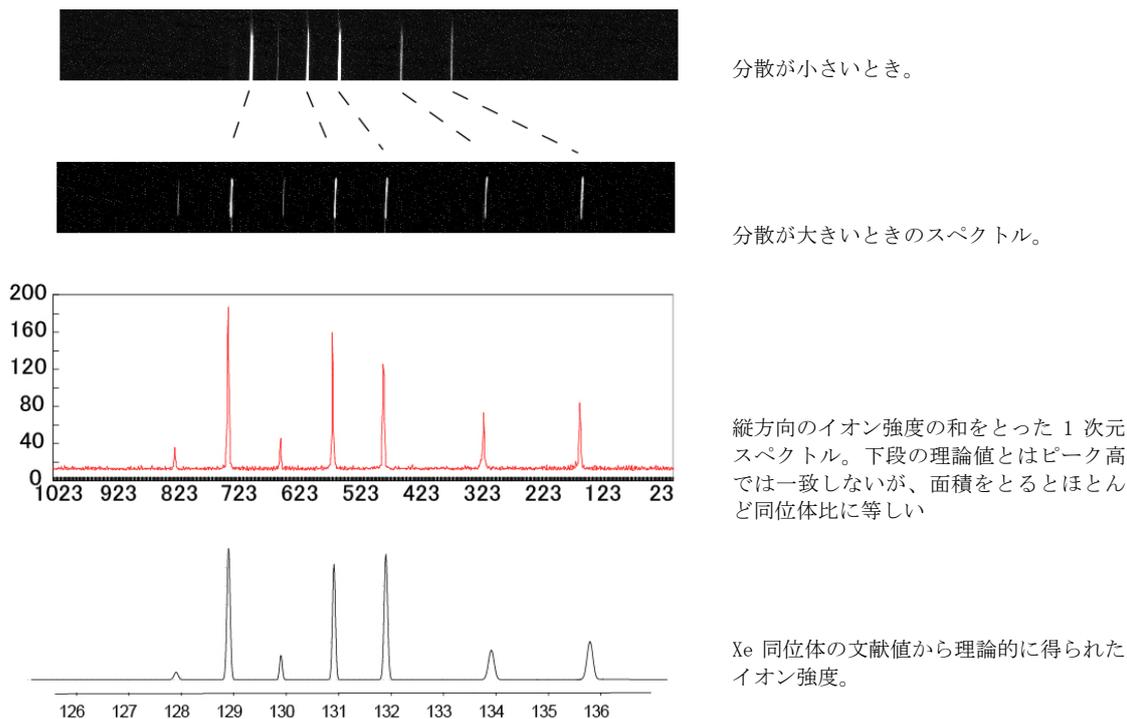


図 1 3 Xe の 2 次元スペクトル。

5) GCMS として用いた場合の感度

このガスクロマト質量分析計がどれくらいの感度を持っているか検証するためにいくつかの標準サンプルを用いて感度を測定した。ここでは 2 つの例について示す。

5-1) ステアリン酸メチル

GCMS の感度を求める標準試料としてよく使われるステアリン酸メチルを用いて較正曲線を求めた。x pg/ μ l (x=0.1、0.3、1、3pg) の濃度の試料を 1 μ l ガスクロマトグラフに注入した。図 1 4 にその較正曲線を示す。横軸に濃度、縦軸にイオン量を対数表示したものである。最小濃度として 0.1pg までは直線関係がある。0.1pg 以下の濃度を測定するためにはいくつかの問題がある。1 つはメモリー効果である。2 桁以上濃いサンプルをガスクロマトグラフに注入した場合、なかなか信号がゼロにならない。これはサンプルが壁面に吸着する場合、1 ~ 2 層目と多層目では吸着力が違い、洗い出すことが困難なためであろう。2 つ目はいわゆるカラムバックというカラムから出てくる特定質量の信号である。近くにサンプル信号の 10^4 倍以上のピークがあれば、そのピークからくる雑音のためにサンプルの信号が雑音に隠れてしまう。質量分析計の感度は十分あるが、現在使っているカラムからくる雑音のために 0.1pg 程度が信頼できる最小濃度である。10pg 以上の濃度では 100ng まで良い直線関係が得られた。

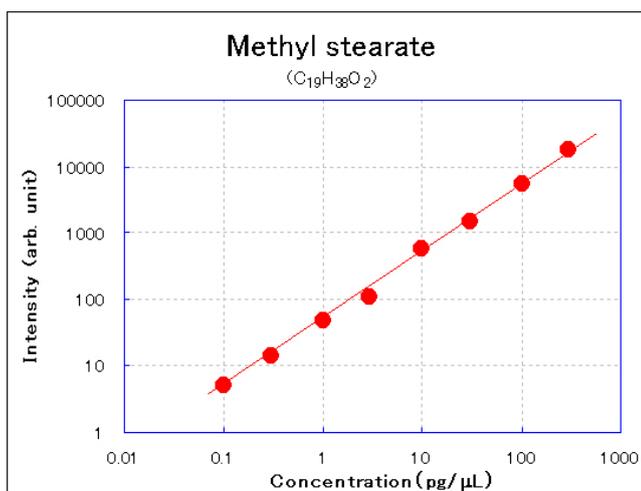


図 1 4 ステアリン酸メチルの較正曲線。

5-2) ビスフェノール A

ビスフェノール A は通常 TMS 化してガスクロマトグラフの出現温度を下げるのであるが、今回そのままどこまで感度があるかを調べた。最初に高濃度のビスフェノール A をガスクロマトに打ってしまったので、メモリー効果による信号があり、なかなか信号がゼロにならなかった。そこで、D 体であるビスフェノール A-d14 で較正曲線を求めた。その結果を図 1 5 に示す 1pg までは直線関係があるが、0.3pg では少し上がっている。これはメモリー効果のためと思われる。TMS 化しないで測定すると、ステアリン酸メチルの時に比べてメモリー効果が大きそうである。

結局、実用として使える濃度は 1pg 程度で、それ以下の濃度を測定する場合、質量分析計の感度は十分あるが、メモリー効果、カラムバックからくる信号の嵩上げ、試薬からくるコンタミネーション等、従来の測定より注意深い測定が必要であることが分かった。

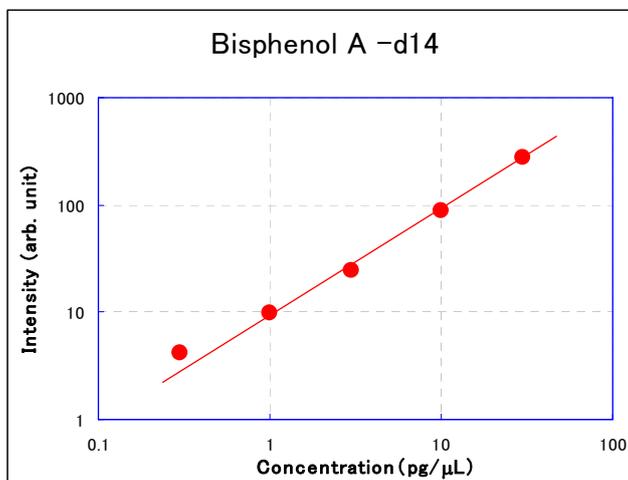


図 1 5 ビスフェノール A-d14 の較正曲線

(2) 研究成果の今後期待される効果

質量分析計の高感度にともなって、内分泌かく乱物質の試料からの回収率が悪くても簡単な精製法の開発がなされると時間費用の節約になると思われる。一方、本プロジェクトで開発された縮小レンズ系を既存の質量分析計に挿入することによって感度の向上が期待される。適当なイオン化法、例えば FAB、でペプチドをイオン化すれば分子量 3000 程度までの測定が出来る。これを用いてプロテオーム解析やたん白質のミューテーションの位置を同定できる。近年、糖尿病の検査として利用されている HbA1C の検出ではグロビンたん白質内でのアミノ酸置換(ポイントミューテーション)が頻繁に検出されている。この置換アミノ酸の種類と位置を同定するのにこの質量分析計は威力を発揮するであろう。問題のヘモグロビンからグロビンたん白をはずし、酵素消化して質量分析計にかける。正常なスペクトルと比べ、どのペプチドの質量が違っているか、質量佐賀いくらかであるかがわかればミューテーションの位置とアミノ酸が同定できる。

ズームレンズ系の利用法としては同位体比の測定に使われているダブルもしくはトリプル検出器への利用が考えられる。これは複数個のコレクタースリットを同時に働かせて同位体比を正確に測定する方法である。コレクタースリットの位置は元素ごとに違っている。従来、機械的にコレクタースリットを動かしていた。真空中で機械的に動かすということは技術的に難しいと同時にメカニズムが複雑になり、真空度が上がらない。ズームレンズ系を用いれば質量分析計の分散を電气的に変え固定されたスリット上にイオンビームをもっていける。このように有機物分析だけではなく宇宙科学や半導体工学にも利用が広がる可能性がある。

3. 2a DDT 類縁体および代謝物の性ホルモン受容体結合活性(京都大学 赤松グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1991年にシーア・コルボーン, ピート・マイヤーズら多方面の科学者が一堂に会し, 外因性内分泌かく乱物質, 通称, 環境ホルモンについて「ウィングスプレッド宣言」を公にして以来, 内分泌かく乱物質については, さまざまな研究が行われてきた. 内分泌かく乱物質の作用様式には主に以下の2種類に大別できる.

- (1) 核内のホルモン受容体に直接結合し, ホルモンと類似の作用を引き起こす (アゴニスト) あるいはホルモン作用を阻害する (アンタゴニスト).
- (2) ホルモンの生合成あるいは分解過程の阻害など, ホルモン受容体には結合せず, 間接的に作用する.

本研究では, 特に, 上記の(1)の物質に焦点を当て, 内分泌かく乱作用を示す疑いのある化合物の性ホルモン受容体結合活性を検討した.

内分泌かく乱作用を示す疑いのある化合物の中には, その代謝物や関連混在物が高い性ホルモン受容体結合活性を示すと報告されているものも存在する. 例えば, マラリア防止のため, 世界各地で未だ使用されている農薬の一つである DDT の混在物および代謝物が性ホルモン受容体結合活性を有すると報告されている. また, DDT 類縁体であるメトキシクロルの代謝物は, 本体よりも高い受容体結合活性を示す (図 1). 外来性の物質は, 生体内で必ず代謝を受けるため, 物質本体のみならず, そのさまざまな代謝物のホルモン受容体結合活性を正確に見積もることは, その物質のリスクを評価する上できわめて重要である.

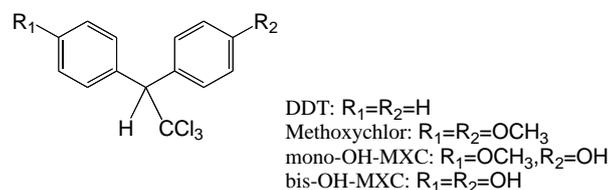


図 1. DDT およびメトキシクロルとその代謝物の構造

このように DDT 類縁体には, 化合物本体が性ホルモン受容体結合活性を示すものが含まれているだけでなく, 代謝された後に活性を示すようになる化合物もあることから, 生体内代謝反応を考慮した性ホルモン受容体結合活性の構造活性相関研究を行う上で, 得られる情報量の多い化合物群であるといえる. そこで, 本グループでは, 化学物質の内分泌かく乱作用予測のための基盤となる情報を収集することを目的として, DDT 類縁体のエストロゲン受容体結合活性を中心に, 主に以下の4点について研究を進めた.

- 1) DDT 類縁体およびその代謝物の性ホルモン受容体結合活性
- 2) メトキシクロル代謝物のエストロゲン受容体結合活性および高感度 GC-MS による活性代謝物の測定
- 3) エストラジオールの表面プラズモン共鳴センサーによる定量法ならびにそれを利用したエストロゲン受容体結合活性測定法の開発
- 4) 内分泌かく乱物質の予測へ向けた構造活性相関

以下に, それぞれの詳細について述べる.

1) DDT 類縁体およびその代謝物の性ホルモン受容体結合活性

これまで内分泌かく乱物質の研究から、*o,p'*-DDT などの DDT 類縁体が性ホルモン受容体と結合することが示されている。我々の所属研究室においては、殺虫剤の定量的構造活性相関研究の一環として合成された多数の DDT 類縁体を保有している。この化合物ライブラリーを用いることにより、性ホルモン受容体結合活性の発現に寄与する構造上の要因について明らかにすることができると考え、DDT 類縁体の性ホルモン受容体結合活性の測定を行った。

さまざまな構造を有する数十種類の DDT 類縁体をリストアップし、それぞれの純度を TLC で検定した。不純物を含んでいないことが確認された 37 個の化合物 (図 2) について、東洋紡社製の内分泌かく乱物質研究用アッセイキットを用いてエストロゲンおよびアンドロゲン受容体結合活性を測定した。

また、この化合物ライブラリーの中にもメトキシクロルの場合と同様に、化合物本体はエストロゲン受容体結合活性を示さないが、生体内で代謝されることにより、初めて活性を示すようになる (代謝活性化される) 化合物も含まれていると考えられる。そこで、代謝活性化を受ける構造についての知見を得ることを目的として、同じ化合物セットにおいて、それぞれの化合物をラット肝ホモジネート S-9 mix を用いて代謝反応に供し、得られた混合物のエストロゲンおよびアンドロゲン受容体結合活性を測定した。結合活性の測定結果を図 3 に示す。

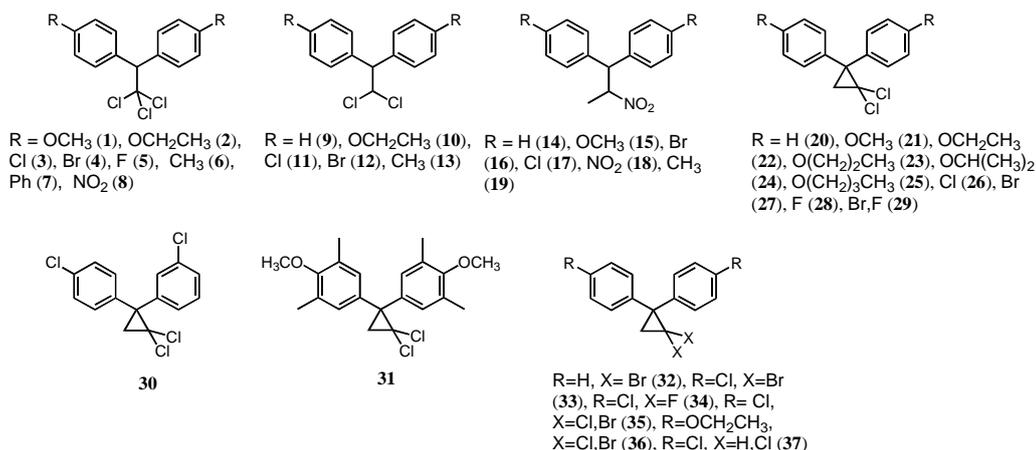


図 2. 活性測定に用いた DDT 類縁体の構造

活性測定の結果、ほとんどの DDT 類縁体はエストロゲン受容体結合活性を示さず、ジエチルスチルベストロール (DES, 強いエストロゲン受容体結合活性を示す化合物の一つ) の 1/1000 以下であった。一方、多くの類縁体が 38mM という高濃度ではあるがアンドロゲン受容体結合活性を示した。これらの化合物には、ベンゼン環上の置換基に Cl, F, Br などのハロゲンや、ニトロ基を有するものが多く含まれ、いずれの骨格構造においても活性を示した。しかしながら、いずれの化合物も、ミボレロン (強いアンドロゲン受容体結合活性を示す化合物の一つ) の 1/200 以下の弱い活性であった。ラット S9 を用いた代謝反応後の混合物の活性では、エストロゲン受容体に対する結合活性の増大を示す化合物が多く、特に、ベンゼン環置換基としてメトキシ基あるいはエトキシ基のようなエーテル構造を有する類縁体の活性の増大が顕著であった。これらのアルコキシ基が OH 基に変換されることにより、活性が増大したと考えられる。それに対し、アンドロゲン受容体に対する結合活性は、ほとんどの化合物において S-9 mix との処理によりほとんど変化しないか、やや減少する傾向が見られた。

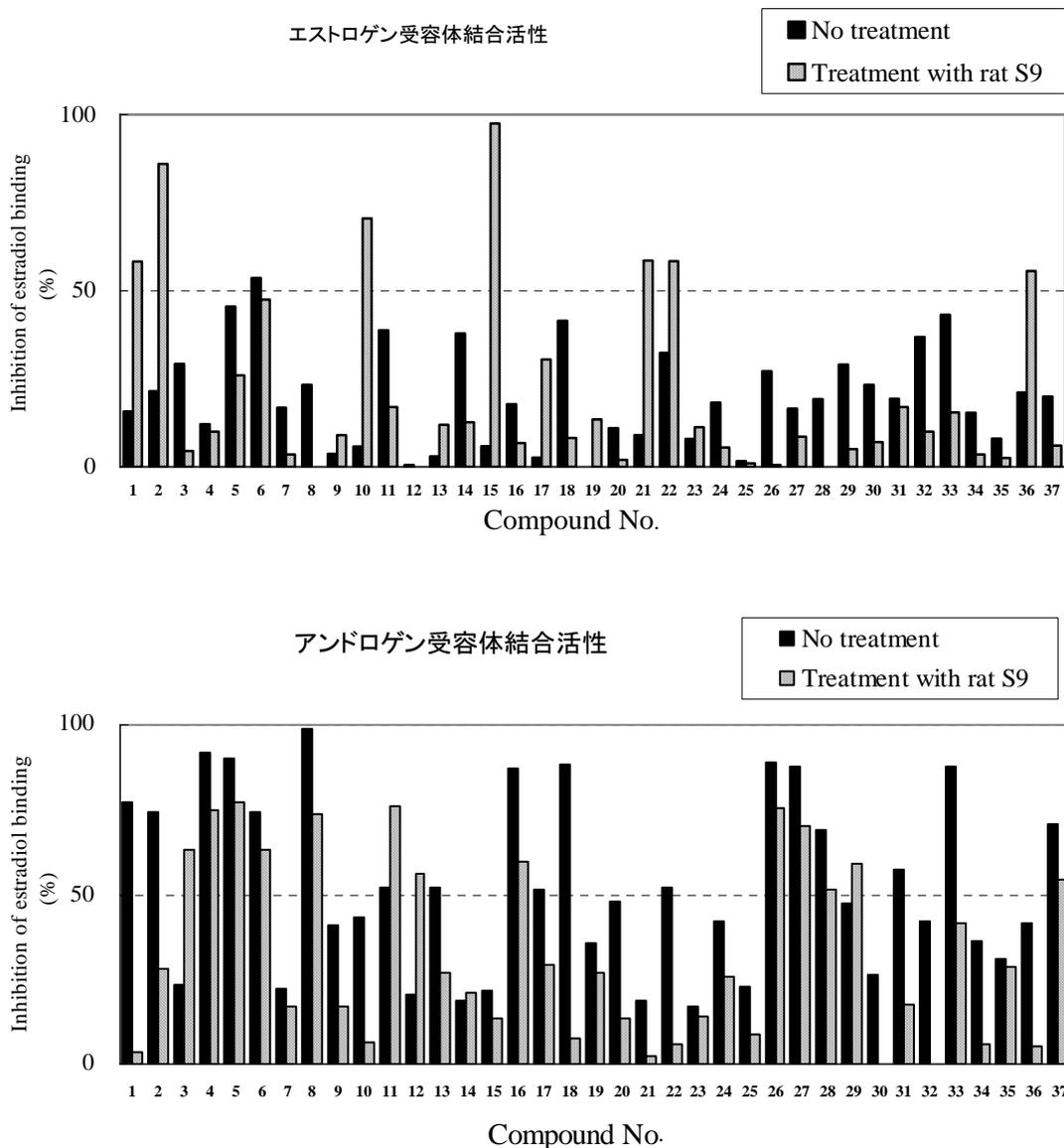


図3. DDT 類縁体およびその代謝混合物のエストロゲンならびにアンドロゲン受容体結合活性 (測定濃度=38 μ M)

そこで、DDT 類縁体の代謝反応後の活性の変化が特に顕著であったエストロゲン受容体結合活性について、さらに詳細に検討した。代謝反応後の混合物の活性が元化合物よりも増大した7化合物 (図4, 化合物の骨格構造は異なるが、いずれも2個のベンゼン環置換基として、メトキシ基あるいはエトキシ基を有している。) についてさらに、その活性本体となる代謝物の構造を同定することを目的として、推定代謝物を合成し、それらのエストロゲン受容体結合活性を測定した。

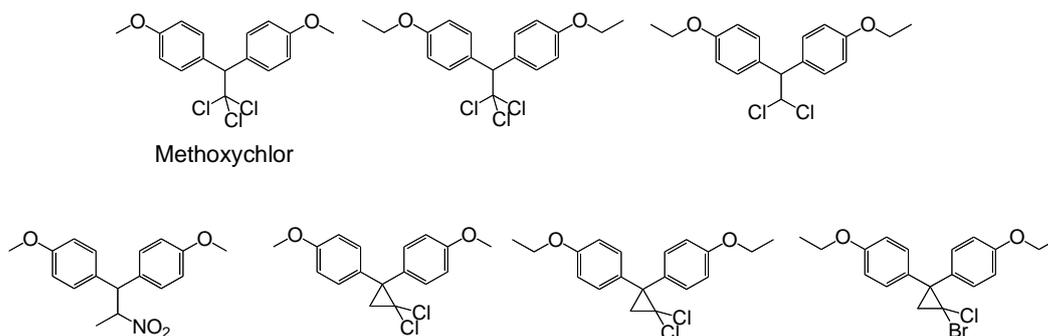


図 4. 代謝反応後にエストロゲン受容体結合活性の増大を示した化合物

代謝反応後に活性の増大した化合物は、いずれもメトキシクロルと同様にベンゼン環置換基としてアルコキシ基を有していることから、片方のアルコキシ基が OH 基に変換された化合物 (mono-OH 体) および両方のアルコキシ基が OH 基に変換された化合物 (bis-OH 体) が代謝物であると推定した。これらの代謝物は代謝実験において、きわめて微量にしか得ることができないため、推定代謝物を化学合成し、そのエストロゲン受容体結合活性を測定した。推定代謝物である OH 体は、いずれも元化合物をジクロロメタン中で PBr_3 と反応させることによって得られ、最終的な精製は HPLC によって行った。活性測定の結果、いずれの化合物も Bis-OH-MTX と同等～6 分の 1 程度の活性を示し、これらの化合物が代謝混合物中の活性本体の一つであることが示され、ベンゼン環上の OH 基、および二つのベンゼン環を連結する炭素上の疎水性の構造 (例えば $-CCl_3$ 基) が活性発現に重要であることが明らかとなった。

表 1. 活性の増大を示した DDT 類縁体の推定代謝物のエストロゲン受容体結合活性

Compounds	IC ₅₀ (μM)	Compounds	IC ₅₀ (μM)	Compounds	IC ₅₀ (μM)
	0.26		0.12		0.23
	0.15		0.26		0.30
	0.093		0.31		0.16
	0.63		0.34		0.12

2) メトキシクロルの代謝物のエストロゲン受容体結合活性

メトキシクロルの第 I 相代謝生成物の一つである、ベンゼン環置換基のメトキシ基が OH 基に変換された化合物 (mono-OH-MTX と bis-OH-MXC) は高いエストロゲン受容体結合

公開資料

活性を示すことが知られている。Mono-OH-MTX には不斉炭素があり、光学活性の *R*、*S* 体が存在するが（図 5）、これまでにそれぞれの活性についての報告例は無い。哺乳動物の代謝酵素は多くの場合、異なる割合でそれぞれの光学異性体を生成するため、それぞれの異性体の活性を求めることは生体内での代謝後の活性を予測する上で重要である。メトキシクロルから mono-OH-MTX への代謝反応において、ヒトおよびラットでは *S* 体を優先的（>80%）に生成することが報告されており、*S* 体の光学異性体の活性が高い場合、生体内においてはラセミ体の活性より高い活性を示すこととなる。そこで、mono-OH-MTX のラセミ体から光学異性体を分離し、それぞれのエストロゲン受容体結合活性を測定した。

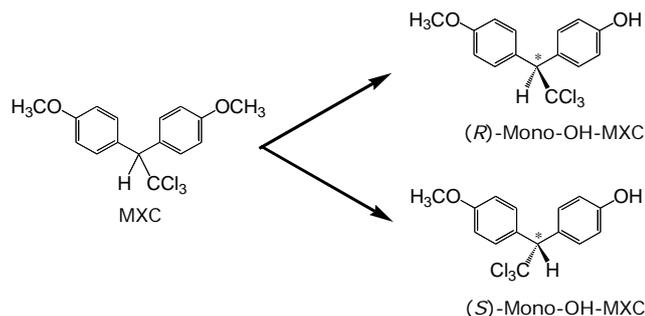


図 5. メトキシクロルおよび mono-OH-MTX の構造

ラセミ体を *d*あるいは ℓ -menthoxyacetic acid と反応させてエステル体を得た。このエステル体は 2 種のジアステレオマーの混合物であり、再結晶法にてジアステレオマーの分離を行った。得られた結晶を加水分解して *R* 体および *S* 体を得た。

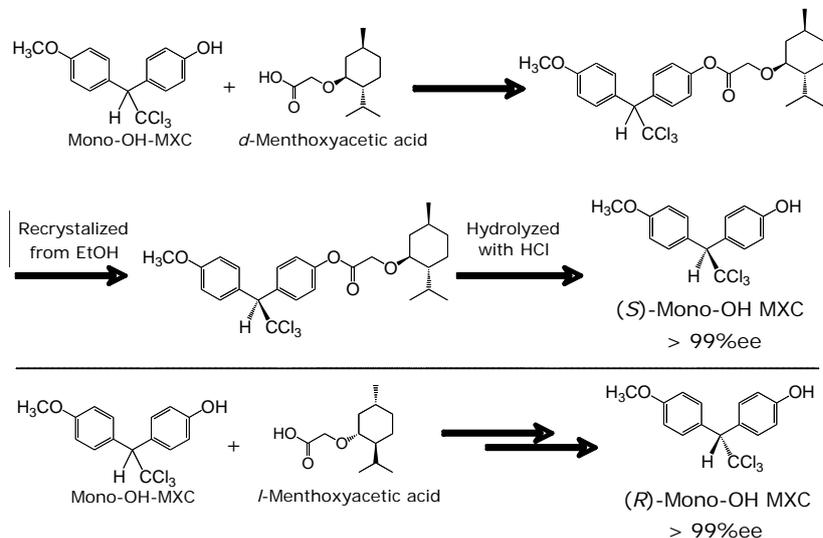


図 6. Mono-OH-MXC の光学分割

東洋紡社製のアッセイキットを用いてそれぞれの光学異性体のエストロゲン受容体結合活性を測定した結果、*S* 体が *R* 体に比べ約 3 倍高活性であることが分かった（表 2）。ヒト肝を用いた代謝実験では *S* 体が優先的に生成することが報告されていることから、生体内ではラセミ体を用いて予測されるよりも高活性を示す可能性のあることが示唆された。また、両方のメトキシ基が OH 基に代謝された化合物（bis-OH-MTX）の活性も測定したところ、この化合物は mono-OH-MTX の *S* 体よりやや高い活性を示した。

表 2. mono-OH-MXC の光学異性体のエストロゲン受容体結合活性

Compound	IC ₅₀ (μM)
(R)-mono-OH-MXC	0.47
(S)-mono-OH-MXC	0.15
Racemic mono-OH-MXC	0.26
Bis-OH-MXC	0.09

第 I 相代謝反応で生成したこのような代謝物はさらに、グルクロン酸や硫酸による抱合化を受ける（第 II 相代謝反応，図 7）。これらの多くは尿中に排泄されるが，一部は体内に残るものと考えられる。しかしながら，これらの抱合体について，エストロゲン受容体結合活性の報告例はこれまでに無い。そこで，メトキシクロルの代表的な第 II 相代謝生成物である硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体を数種合成し，それらのエストロゲン受容体結合活性を測定した。

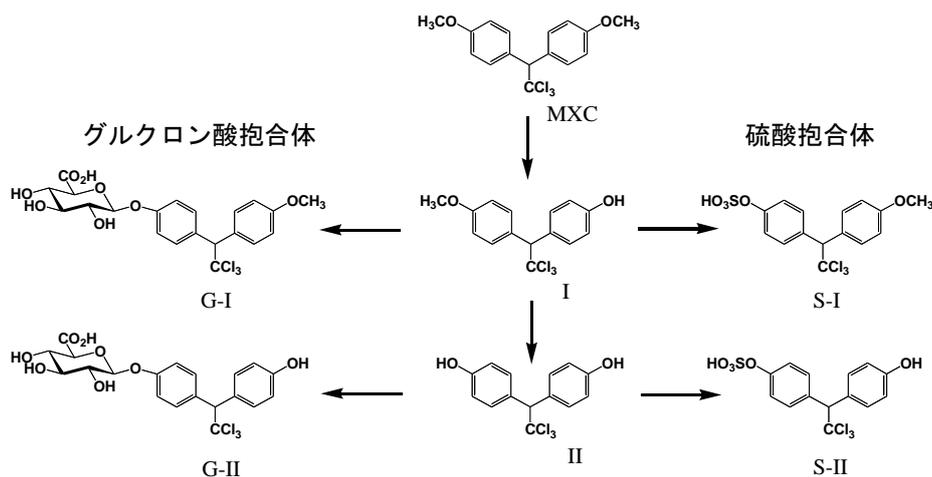


図 7. メトキシクロルの第 I 相および第 II 相代謝反応生成物

Mono-OH 体および bis-OH 体の硫酸抱合体(S-I, S-II)は，I あるいはIIにクロロスルホン酸を反応させて合成し，ナトリウム塩として単離・精製した。グルクロン酸抱合体(G-I, G-II)は，I あるいはIIと 1,2,3,4-テトラ-O-アセチル-β-D-グルクロン酸メチルエステルを縮合させた後，アセチル基およびメチル基を除去し，ナトリウム塩として単離・精製した。精製はいずれも HPLC を用いて行った。それぞれのエストロゲン受容体結合活性を測定した結果，合成した抱合体はすべて第 I 相代謝生成物に比較して，著しい低活性を示した。（図 8）

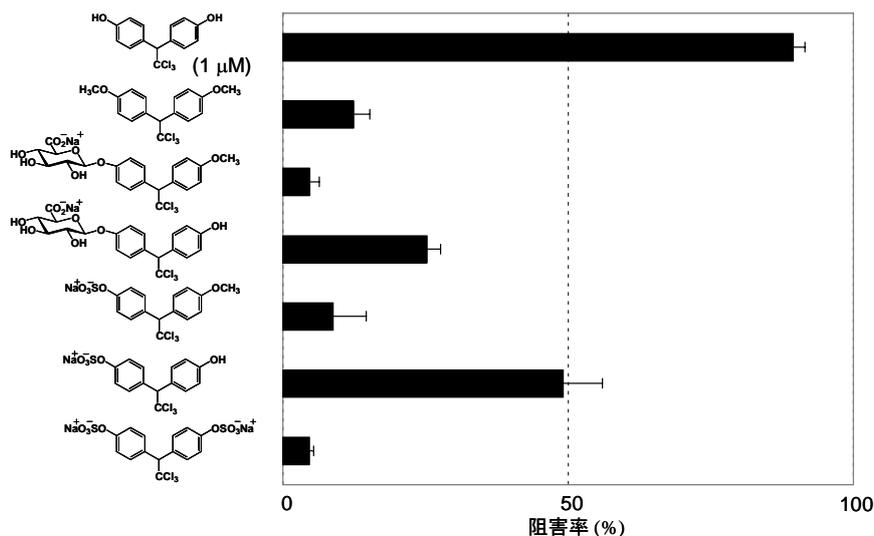


図8. メトキシクロル第Ⅱ相代謝反応物のエストロゲン受容体結合活性（メトキシクロルは1μM, それ以外は10μMの濃度で測定）

第Ⅰ相代謝物Ⅰ, Ⅱは, 生体内において第Ⅱ相代謝反応を受けやすいことが報告されているので, 生体内において第Ⅰ相代謝反応によって上昇したメトキシクロルの内分泌かく乱物質としての活性が, 続く第Ⅱ相代謝反応によって抑えられ, 全体としては, メトキシクロルの内分泌かく乱物質としての, 生体内におけるリスクの低下することが示唆された。

内分泌かく乱物質には極めて低濃度でも活性を示す化合物があるが, このような微量にしか存在しない化合物を検出することは, 血液のように大量に準備することができない生体サンプルにおいては特に難しい。そのため, そのような化合物をできるだけ高感度に検出・定量する技術や装置が求められている。本プロジェクトでは, 交久瀬グループにより高感度質量分析装置の開発が行われており, ここでは, エストロゲン受容体結合活性を示す第Ⅰ相代謝生成物の bis-OH-MXC をテストサンプルとして, 既設の質量分析装置および新たに開発された質量分析装置による分析を行い, その感度ならびに性能を比較・検討した。まず既設の装置 (ESI-LC-MS) を用いて分析を行った結果, 分析感度が悪いため高濃度でも良好なスペクトルは得られず, 効率的に構造決定や定量を行うためにはさらなる高感度が必要であることがわかった。また, 既設の GC-MS を用いて, アセチル誘導体化した bis-OH-MXC 分析を行った結果, LC-MS より分析感度は高かったものの, 微量分析用に用いられる質量分析計ではないこともあり, 検出感度はあまり高いものではなかった。一方, 本プロジェクトで開発された高感度質量分析計 (GC-MS) を用いて, アセチル誘導体化した bis-OH-MXC を測定したところ, 0.1 ppb という低濃度においても検出が可能であり, この化合物に対して, 市販の質量分析計よりも高感度で分析できることがわかった。通常, 市販の微量分析用 GC/MS では, 農薬などの分析における検出感度は 0.01 ppm (10 ppb) 程度であるとされており, 本プロジェクトで開発された高感度質量分析計は, 既存の装置を大きく上回る感度を有していることが示された。

3) エストラジオールの表面プラズモン共鳴センサーによる定量法ならびにそれを利用したエストロゲン受容体結合活性測定法の開発

環境中に放出される内分泌かく乱物質として, 合成化学物質だけではなく, ヒトや家

畜から出る尿に含まれる天然エストロゲンであるエストラジオール (E_2) も問題とされている。そのため環境中での E_2 濃度を簡便かつ正確に測定することが求められている。 E_2 の定量法として、本プロジェクトの研究課題である質量分析に加えて、抗原抗体反応を利用したイムノアッセイ法がすでに知られている。イムノアッセイ法は、精度に関して質量分析法より劣るが、操作が簡便で一度に多数のサンプルを測定することが可能であることから、主に一次スクリーニングとして用いられる。近年、新しいイムノアッセイ法の一つとして、表面プラズモン共鳴センサー (SPR センサー) をその検出系として用いた方法が広く知られるようになった。これまでのイムノアッセイ法では、抗原と抗体の結合の検出は主に、抗体あるいは抗原に結合させた酵素による発色反応によって間接的に行うため、夾雑物による影響が大きいという問題があり、ある程度の前処理が必要とされていた。一方、SPR センサーは直接的に抗体と抗原の結合を測定できるため、酵素反応のような間接的な測定による影響が少ない。そこで本研究においても、 E_2 の簡便な定量法として、SPR センサーを用いたイムノアッセイ法について検討した。また、環境中における内分泌かく乱化学物質をスクリーニングする際、構造が未知の場合はエストロゲン受容体結合活性を測定することによって検出する必要がある。エストロゲン受容体結合活性を測定する方法として、放射性同位体 (RI) 標識したエストラジオールを用いた方法が多く使用されている。また RI を用いない方法としては、本研究 1), 2) で用いているような、供試化合物を E_2 存在下で受容体結合させた後に、遊離 E_2 濃度を ELISA 法により定量し、化合物の受容体結合活性を求める方法が知られている。そこで本研究では、新たに開発した SPR センサーによる E_2 のイムノアッセイ法を用いて、エストロゲン受容体結合活性を測定する方法を開発した。

SPR センサーを用いたイムノアッセイ法には、抗体をセンサーチップに固定する方法と、抗原をチップに固定する方法がある。そこでまず、抗 E_2 抗体をチップ上に固定化し、抗原である E_2 -BSA 結合体をセンサーに注入して抗体との結合を測定した。その結果、 E_2 -BSA 結合体は全く抗体と結合しないことが分かったため、次に抗原である E_2 -BSA 結合体をセンサーチップ上に固定化する方法を検討した。市販の E_2 -BSA 結合体は水への溶解性が極めて低いため、 E_2 と BSA の結合比率を変えて溶解性を改善した E_2 -BSA 結合体を新たに合成した。 E_2 -BSA 結合体をセンサーチップ (CM5) 上に固定化し、抗 E_2 抗体をセンサーに注入したところ、抗原である E_2 -BSA 結合体と再現性良く結合することがわかった。(図 9)

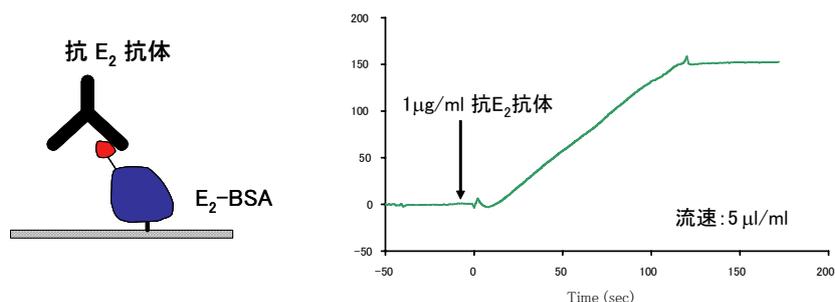


図 9. SPR センサーによる E_2 -BSA 結合体と抗 E_2 抗体との結合の測定

抗 E_2 抗体に種々の濃度の E_2 を加えてインキュベートした後、 E_2 -BSA 結合体を固定化した SPR センサーによって測定したところ、抗 E_2 抗体の E_2 -BSA 結合体への結合が E_2 の濃度依存的に阻害され、SPR センサーによる測定から nM (ppb) オーダーで E_2 濃度を定量できることが分かった (図 10)。この感度は、RI 標識化合物を用いたラジオイムノアッセイに比べるとやや低感度ではあるが、一般的なイムノアッセイとは異なり、洗浄操作が不要で簡便であるという利点がある。

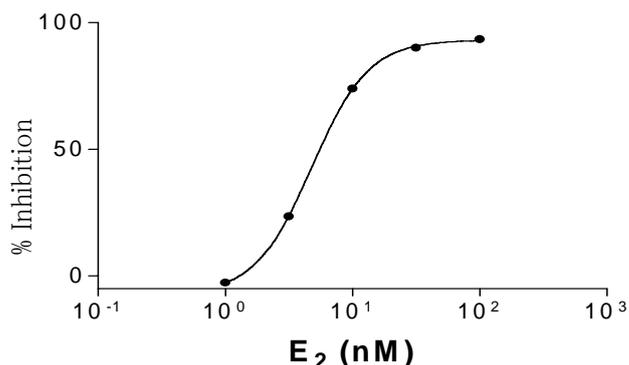


図 10. E₂ による抗 E₂ 抗体と E₂-BSA 結合体との結合阻害

この方法のエストロゲン受容体結合活性の測定法への応用を検討するため、エストロゲン受容体の共存下での遊離の E₂ 濃度の測定を行った。種々の濃度のエストロゲン受容体と E₂ を一定時間インキュベートした後、抗 E₂ 抗体を加え、SPR センサーによって E₂-BSA 結合体に対する抗体の結合を測定した。その結果、受容体の濃度が上がるにつれて、抗体の結合量が上昇した (図 11)。このことから、受容体が増えることにより、E₂ が受容体と結合して遊離の E₂ 濃度が減少し、その結果、抗体と E₂-BSA 結合体との結合量が増加するということが示された。受容体および E₂ の存在下で、さらに人工エストロゲンであるジェチルスチルベストール (DES) を加えると抗体の結合量は減少した。このことは、E₂ の受容体に対する結合が DES によって阻害され、遊離の E₂ 濃度が増加したことを示している。

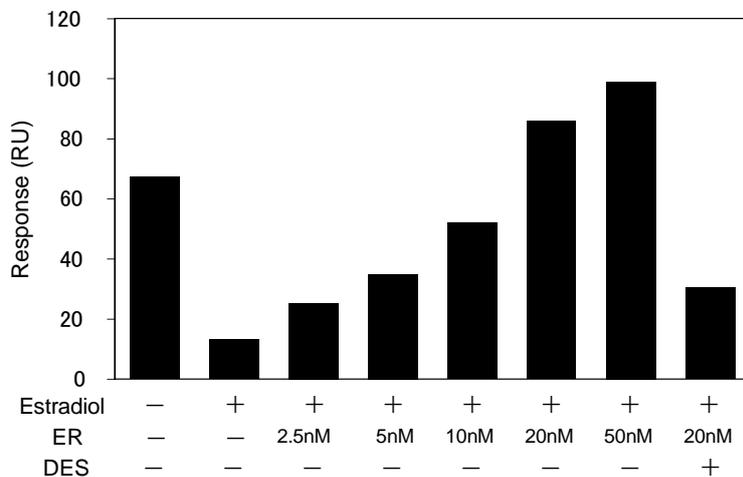


図 11. SPR センサーによるエストロゲン受容体存在下での遊離 E₂ 濃度の変化の測定

さらに、種々の濃度の DES を E₂ の存在下で受容体 (20nM) とインキュベートした後、抗 E₂ 抗体を加え、SPR センサーによって E₂-BSA 結合体に対する抗体の結合量、つまり遊離の E₂ 濃度を測定した。その結果、DES の濃度が高くなるにつれて遊離の E₂ 濃度が増加し、エストロゲン受容体結合活性を再現性よく求めることができた (図 12)。

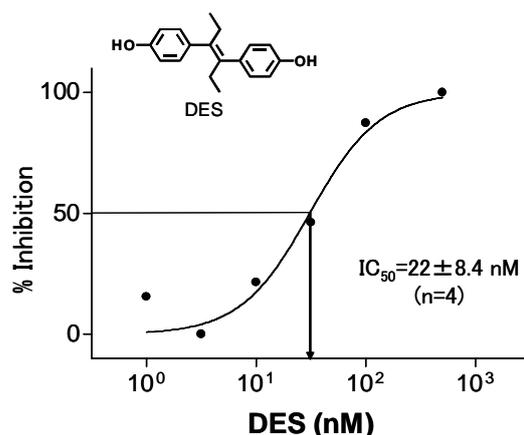


図 12. SPR センサーを用いたエストロゲン受容体結合活性の測定

SPR センサーは対象とする物質とチップ上に固定した物質との特異的な結合を直接測定するため、RI 標識したリガンドを用いる受容体結合活性測定法のように、結合したリガンドと遊離のリガンドを分離し、洗浄する操作を必要としない。そのため、測定を比較的効率的に行うことができるという利点がある。また、本研究では受容体結合の競合物質としてエストラジオールを用いているが、RI などで標識する必要がないため簡便であるだけでなく、構造を修飾せずにそのまま用いることができ、より厳密に受容体との相互作用が測定できるという利点もある。

4) 内分泌かく乱物質の予測へ向けた構造活性相関

これまでの性ホルモン受容体結合活性の構造活性相関研究についての報告から、どのような構造の化合物が高活性を示すかについての情報を収集し、我々の得た DDT 類縁体に関する結果との比較を行った。我々の所属研究室では、アメリカ合衆国・ポモナ大学において開発された、膨大な医薬品の構造活性相関データベースにアクセスすることが可能である。このデータベースを参照して、性ホルモン受容体結合活性の構造活性相関に関する検索を行った。構造活性相関データベースから、約 30 の研究データが得られ、研究に用いられた化合物の構造を再検討して、化合物が高活性を示すための必要構造を抽出した。すなわち、女性ホルモン受容体（エストロゲン受容体）との結合においては、天然の女性ホルモンである 17-β-エストラジオールを例にとれば、A 環 3-位および D 環 17-位の OH 基が重要であること、ある程度の疎水性が必要であることなどがわかった (図 13)。また、男性ホルモン受容体との結合に関しては、A 環 3-位のカルボニル基酸素と、D 環 17β-位の OH 基が、水素結合において重要であった。

1) の研究において我々は、種々の DDT 類縁体の中でも、ベンゼン環上に OH 基を有し、二つのベンゼン環を連結する炭素上に疎水性の構造（例えば -CCl₃ 基）を有する化合物がエストロゲン受容体結合活性を示すことを明らかにした。つまり、ベンゼン環上の OH 基は 17-β-エストラジオールの A 環 3-位および D 環 17-位の OH 基に対応して受容体と水素結合を形成し、-CCl₃ 基のような疎水性基も疎水性相互作用に関与していると考えられる (図 13)。しかしながら、骨格構造に三員環構造を有する化合物は、活性を示した化合物の中では比較的低活性で、mono-OH 体と bis-OH 体の活性間に差が見られなかった。これは、この化合物の骨格構造が他の化合物に比較してより固定された構造を有しているため、エストロゲン受容体の結合部位に適切に結合できず、結果として 2 個存在する OH 基の片方のみしか受容体との水素結合による相互作用に関与することができないことに起因するものと思われた。

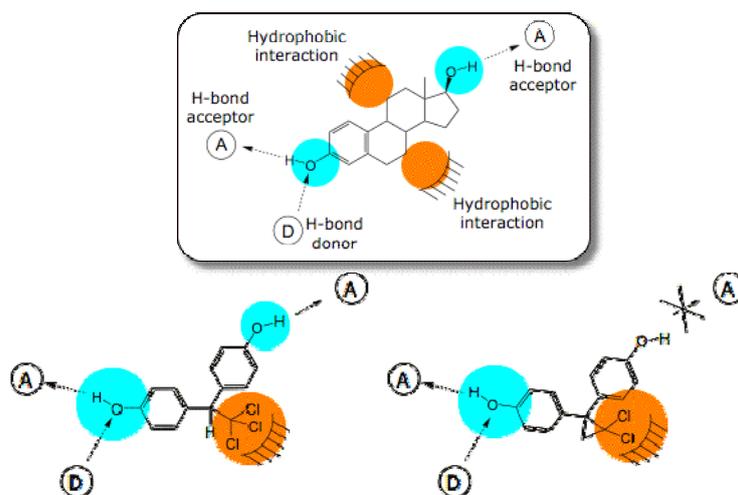


図 13 エストロゲン受容体と DDT 類縁体の推定相互作用モデル

また、2)の研究においては、mono-OH-MXC の光学異性体間に約 3 倍の活性の差があることを示した。Mono-OH-MXC は、1 つの OH 基と $-CCl_3$ 部分が受容体との相互作用に参与すると考えられるが、この場合 OH 基は、特に重要とされるエストラジオール 3-位の OH 基による水素結合をミミックすると考えられる (図 14)。このとき、*R*-体においては、OH 基が水素結合を形成すると、*S*-体 비해、その $-CCl_3$ 部分の立体的な配置が疎水性相互作用にとって不適切となるため、受容体との親和力が低下し、その結果光学異性体間で活性差が生じたものと考えられた。また、bis-OH-MTX は、2 つの OH 基が水素結合に、 CCl_3 部分が疎水性相互作用に参与していると考えられるが、bis-OH-MTX と (*S*)-mono-OH-MXC との活性差が小さかったことから、エストラジオール 3-位の OH 基に相当する水素結合が大きく関与し、もう一方の水素結合の寄与は小さいことが推察された。

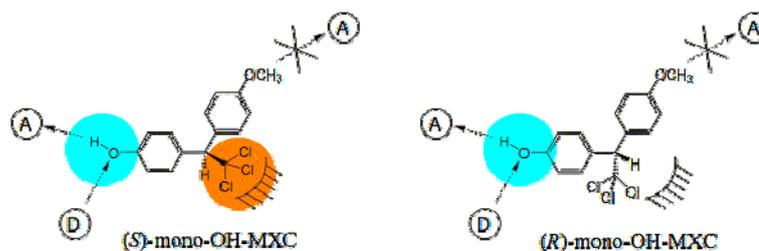


図 14 Mono-OH-MXC の光学異性体とエストロゲン受容体の推定相互作用モデル

これらの結果から、DDT 類縁体のエストロゲン受容体との相互作用にとって重要な構造因子について以下のことが明らかとなった。

- 1) 1 つ以上のフェノール性水酸基による水素結合
- 2) 二つのベンゼン環の間に位置する疎水性基による疎水性相互作用
- 3) 二つの水酸基と疎水性基との適切な空間配置により高活性を発現
- 4) ベンゼン環上のメトキシ基、エトキシ基は生体内で容易にフェノール性水酸基へと代謝されて活性を発現

エストロゲン受容体タンパク質とリガンドとの複合体の立体構造に関しては、X 線結

晶構造解析により明らかにされている。エストロゲン受容体におけるリガンド結合領域の高次折りたたみ構造は他の核内受容体と極めて類似しており、12 個の α -ヘリックスと一対の β -シートから構成され、強固な三層の α -ヘリックスサンドイッチ構造をとっている。リガンドである 17- β -エストラジオールはヘリックス 3, ヘリックス 6, ヘリックス 11 の形成する疎水性ポケットにはまりこみ、A 環 3-位の OH 基は Glu353, Arg394, および水分子と強固な水素結合を、D 環 17-位の OH 基は His524 と水素結合を形成している。この 2 ヶ所の水素結合および側面のヘリックスとエストラジオールの環との疎水性相互作用が重要であることが示されている。B 環 α -面 と C 環 β -面にはリガンドによって占有されていない大きな空間があり、さまざまな構造の化合物が結合可能であることが知られている。

このような受容体側からの情報を利用するため、エストロゲン受容体タンパク質とリガンドとの複合体の結晶構造座標を Protein Data Bank から入手し、分子モデリングソフトウェア, Sybyl を用いて、コンピュータ上にその立体構造を視覚化した。コンピュータ上に視覚化された受容体-リガンド複合体構造に基づき、受容体におけるリガンド結合部位のアミノ酸残基についての前述の情報を確認した。コンピュータ上で、ホルモン受容体リガンド結合部位に、本研究で活性を測定した DDT 類縁体およびその代謝物の構造を当てはめてみたところ、これまでの構造活性相関情報と矛盾しない結果が得られた。

以上の研究で得られた構造と生物活性に関するデータは、現在のところ定性的な評価にとどまっているが、化合物の物理化学的なパラメータと活性との相関関係を解析する定量的構造活性相関や、受容体の立体構造のモデリング手法を用いたリガンド結合領域と化合物とのドッキングによる親和力の定量的な算出などを行うことにより、今後新たに合成されるであろう様々な化合物およびその代謝物の内分泌かく乱活性の予測に役立つものと考えられる。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究では、DDT 類縁体およびその代謝物の性ホルモン受容体結合活性を測定し、構造活性相関の考察を行った。また、DDT 類縁体の微量代謝物の分析を、本プロジェクトにおいて開発された高感度質量分析計を用いて行った。

性ホルモン受容体結合活性を示す化合物は環境中に多数存在するが、結合活性を示すというだけで動物の生殖器官に即座に影響を及ぼすとは限らない。我々がそれらの化合物に曝露されている程度、また、化合物が仮に体内に取り込まれたとしても受容体までの輸送過程や生体内での代謝変換を考慮しなければならない。我々の研究で明らかになったように、代謝変換は解毒や活性化、すなわち、活性の増減を伴う。これらの過程のすべてを評価し、化合物の生体に対する曝露量を見積もって、初めてその化合物のリスクを評価することができるのである。

今回は、現在、農薬としては既に使用されていないものの、マラリア蚊の防除といった衛生上の目的で未だ世界で使用されている DDT 類縁体に焦点を絞り、それぞれの代謝物のホルモン受容体結合活性および生成量を評価したが、DDT 類縁体の「リスク」という観点から、社会に対する効果はきわめて大きい。また、ここで用いた手法を、内分泌かく乱作用を示す疑いのある他の化学物質に応用することは可能であり、今後新たに合成されるであろう様々な合成物質の、生体内代謝による影響も含めた内分泌かく乱作用の予測に大いに役立つものと考えられる。本研究では、「代謝」を扱っているが、我々は化学物質の生体内への「透過性」および「輸送」に関しても検討を始めている。これらすべてを明らかにすることにより、内分泌かく乱物質を含む外来性の化学物質の「リスク」をより高精度に評価することができるであろう。

近年、多数の研究が行われてきているにもかかわらず、内分泌かく乱化学物質については未だ不明な点が多く残されている。自然界の繁栄を維持し、安全性を確保していくためには、内分泌かく乱化学物質の挙動を一つずつ明確にし、それらを統合して全体的な視野で眺めることが必須である。

3. 2b 上野グループ成果 (大日本除虫菊株式会社 中央研究所)

1. 研究実施の概要

内分泌かく乱物質作用を示す可能性が報告されている化合物のなかには、多種に及ぶ農薬が知られており、それらの環境での拡散や動態の追跡は内分泌かく乱物質の環境負荷の実態を論議する上で最も重要な研究課題の一つである。このような状況の中で、われわれのグループは農業害虫あるいは衛生害虫の駆除のために用いられている内分泌かく乱作用を示す薬剤の環境中での動態を一括分析できるシステムの構築を目指して、①糸状菌(卵菌類)遊走子を用いる新しい生物検定法の創出と②内分泌かく乱物質の機器分析法として質量分析法を適用して、マススペクトルデータシステムの構築に着手して、その目的を一応達成した。さらに、その結果上に述べた新しい生物検定法を適用して、③内分泌かく乱作用を示さない殺虫成分の天然有機化合物から探索に着手して、内分泌かく乱作用を示さない新規な殺虫剤開発のための幾つかのリード化合物を植物成分から見出して、現在それらの構造の確定を進めている。

①「糸状菌遊走子を用いた内分泌かく乱物質の生物検定法の確立」

卵菌類をはじめとする糸状菌の配偶子とくに遊走子は、ヒト精子と同様に、光学顕微鏡下での運動能力と挙動の観察することによって、種々の化学物質が正の走化性(誘引反応)と負の走化性(忌避反応)および発芽に及ぼす影響を判定することが出来る。このことは、内分泌かく乱物質が卵菌類遊走子の挙動に及ぼす影響を顕微鏡下で観察することによって、自然界での内分泌かく乱物質の影響を直接判定できる生物検定法を確立出来ることを示している。さらに、この方法は複成分からなる試料でも有効に適用できるので、実際の環境中における内分泌かく乱物質の分布を測定するための前試験として役立つものである。

卵菌類遊走子が化学物質に対して忌避あるいは誘引反応などの走化性を示す現象を利用した生物検定法として、テンサイ黒根病菌(*Aphanomyces cochliodes*)の遊走子を内分泌かく乱物質の検定に適用しようとする試みがすでに報告されている^{1,2)}。われわれはやはり卵菌類に属するビート苗立枯病菌(*Pythium aphanidermatum*)の遊走子を用いて、内分泌かく乱作用を示すとされている6種の化学物質(I:estriol, II:estrone, III:17β-estradiol, IV:17α-estradiol, V:bisphenol-A, VI:diethylstilbesterol)に対する宿主植物への正負の走化性を定量的に観察することにより、内分泌かく乱物質の生物的検出法の開発を目指した。その結果、IとIIIはそれぞれ検出限界濃度1000ppmと100ppmで正の走化性を促進し、VとVIはそれぞれ検出限界濃度5ppmで正の走化性を促進を阻害した。

さらに本研究では、*P. aphanidermatum*の遊走子を用いて、天然のエストロゲンや種々の内分泌かく乱物質が遊走子の走化性と発芽に及ぼす影響を定量的に評価する方法を考案した。また、この方法を用いて数種の内分泌かく乱物質が与える影響を調査した結果、予測されたように、エストロゲン作用を示す物質の検定に本生物検定法が有効に適用できることが判明した^{3,4)}。*A. cochliodes*遊走子を用いた研究例^{1,2)}がBisphenol A(I), Estrone(II), 17β-Estradiol(III), 17α-Estradiol(IV), Estriol(V)およびDES(VI)のいずれの内分泌かく乱物質に対しても、忌避的な反応を示すことを報告している結果とわれわれが得た結果を比較考察すると、卵菌種の相違により化合物に対する化成の走化性の挙動と検出濃度の限界に多少の差異があることが認められる。けれども、本研究で確立した卵菌類遊走子の挙動を顕微鏡下で定量的に観察する方法は、内分泌かく乱物質の簡易生物検定法として非常に有効な手段であると確信する。

②「内分泌かく乱関連物質のキャピラリーGCとHPLCおよびそれらのMSとの結合による超微量化学検出システムの構築」

ピレスロイドは除虫菊殺虫成分であるピレトリンI, シネリンI, ジャスモリンI, ピレトリンII, シネリンII, ジャスモリンIIに加えて、アレスリンをはじめとする近年開発された合成ピレスロイドを含む殺虫性化合物の総称である。これらピレスロイドは人畜に

対する低毒性と害虫に対する高い選択毒性から衛生害虫殺虫剤および農業害虫防除剤として世界に広く普及している。その第一次殺虫作用点は節足動物の神経伝達系（軸索）のNa-Kイオンチャンネルに対する選択的かく乱作用によるとされている。けれども、このピレスロイドに対しても、その一部の化合物、例えば、fenvalerate, d-phenothrinなどに対して、Gareyら(1998)およびGoら(1999)によってエストロゲンあるいは抗エストロゲン作用の疑いが指摘された^{5,6)}。これに対し、fenvalerate, d-phenothrinなどのピレスロイドにはエストロゲン受容体を介する作用部位では、エストロゲンあるいは抗エストロゲン作用をがないこともSaitoら(2000)によって報告されている⁷⁾。

このような状況にあつて、環境中でのピレスロイドの拡散と動態を高感度で把握することは依然として重要な研究課題と考えて、機器分析とくに各種クロマトグラフ法による一括分析法をシステムとして確立することを考えて、分析法の検討を行った。用いた装置は主として液体クロマトグラフとガスクロマトグラフでこれらを質量分析計に直結した液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)とガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)である。各種分析法を用いてピレスロイド標品の一括分析について検討を加えた結果、液体クロマトグラフにおけるUV検出は各種ピレスロイドは紫外線を強く吸収するので、有効な検出手段であるものの構造情報が少ない欠陥を有しているうえ、LC-MSにおいても、種々のイオン化法を適用してもイオン化効率が悪いために有効な検出法とはならないことを認めた。一方、GC-MSでは、各種ピレスロイドは電子衝撃法(EI)で極めて有効に強度の高い特性イオンを与えるので、これら特性イオンを有効に活用することによって高感度で一括分析や選択的検出が可能であることを確認した。代表者交久瀬五雄の本研究課題「高感度質量分析計の開発と内分泌かく乱物質の分析」が示すように、開発された質量分析計が活用されるためには、内分泌かく乱作用を示す化学物質のマススペクトルデータの蓄積とその有効な活用の基盤となるデータシステムの構築が必須である。そこで、ここでは入手可能なピレスロイドのスペクトルデータの集積を目指すとともに、電子衝撃によるマススペクトルにおけるフラグメントイオンの生成機構と各ピレスロイドの構造特性を反映する特性イオンの選択を中心にデータを集積した。その結果は、研究実施内容及び成果の図1ピレスロイドの一般的開裂様式に示すように、ここで生成する各種ピレスロイドの特性イオンであるaイオンとZイオンおよびZ-COイオンは、各化合物の質量スペクトルの中質量部に高感度で特異的に出現するので、このCREST戦略的創造研究推進事業で交久瀬らが開発した質量分析計の位置選択検出器では特に有効に活用できるものと確信する⁸⁾。

③「内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分の探索」

天然除虫菊が産生する殺虫成分ピレトリンをリードとする合成ピレスロイドのいくつかについては内分泌かく乱作用の疑いが指摘されているので^{5,6)}、内分泌かく乱作用を示さない殺虫性天然リード化合物の発見に大きな期待が寄せられている。この目的を達成するために以下の研究テーマを掲げて研究を展開中である。①で確立された「糸状菌遊走子を用いた内分泌かく乱物質の生物検定法」を適用して、内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分を探索して単離して構造を確定しつつある。

民間で伝承されている生薬や殺虫性植物および新たにランダムに採集した多種の植物をメタノールに浸漬して、メタノール抽出成分に対してアカイエカの幼虫（ボウフラ）、ヤマトシロアリ、イエバエ幼虫（ウジ）などに対する殺虫効果を指標にして1次殺虫性のスクリーニングを行うとともに、上述の生物検定法を用いて内分泌かく乱作用の有無を判定した。殺虫性を示すとともに内分泌かく乱作用を示さない場合は、その植物をさらに採集して、大量のメタノール抽出液をえた。このメタノール抽出液を酸性、中性、塩基性画分に分画して、そのそれぞれに上記の殺虫性試験と内分泌かく乱生物検定法を適用して、新規殺虫性化合物の単離を目指して、各種調製用クロマトグラフを適用した。得られた殺虫性成分の純度を高速液体クロマトグラフで検討しながら再結晶などの精製操作によっていくつかの殺虫性化合物の単離に成功した。ここでえられた化合物に対して魚毒性などの更なる安全性試験を終えてから公表する予定である。

2. 研究構想

研究開始当初の13年度の研究実施報告書には、上野は、平成13年4月より内分泌かく乱作用が疑われている化合物にたいして、一つの簡易生物検定法の開発を目指した。単一成分からなる合成化合物だけでなく、自然界から採集される複合成成分系資料がしめす内分泌かく乱活性を判定するためである。その目的とするところは以下の2点にある。

1) 複合成成分からなる資料をいたずらにガスまたは液体クロマトグラフ法で成分分析し、活性のない資料の分析のための時間の浪費を避ける。

2) 内分泌かく乱作用を示す可能性のある未知の化合物を検出するためである。

と記載されている。1 **研究実施の概要**で述べたように、平成13年から15年の間は大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 東條元昭講師との共同研究により、主として①「糸状菌遊走子を用いた内分泌かく乱物質の生物検定法の確立」を目指して集中的に研究を展開した。一方、平成14年からタカラバイオ大学・橋本圭二講師の協力のもとにCRESTで購入設置した液体クロマトシステムとガスクロマトグラフシステムを活用しながら、大日本除虫菊(株)中央研究所における平成15年のガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)と平成16年の液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)の設置を待って、②ピレスロイド殺虫剤の環境における一斉分析のシステム化に取り組んだ。①と②で得られた成果を適用しつつ、上野は平成15年から③植物界から新規殺虫性化合物の単離を目指して研究を展開した。

①の成果は現在種々の殺虫成分の内分泌かく乱作用の有無の簡易判定に有効に適用しておりさらなるデータの集積を行っている。②の成果は交久瀬らが開発した質量分析計の位置選択検出器を用いれば、ピレスロイドの環境中での挙動の追跡に特に有効に活用できるものと確信している。③の成果としては殺虫性を示す幾種かの新規リード化合物の探索に成功した。以上の成果は当初の目標の80%以上の達成を示すものであり、今後成果の公表によってさらに成果の達成率は向上するものと考えている。

3. 研究実施内容及び成果

①「糸状菌遊走子を用いた内分泌かく乱物質の生物検定法の確立」

i) 研究担当者

大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 東條元昭, 島田智弓
大日本除虫菊(株)中央研究所・顧問(京都大学名誉教授) 上野民夫

ii) 研究目的

内分泌かく乱物質(EDCs)の生物検定法としては、すでにハーシュバーガー試験や28日間連続投与試験など数種の試験法は案出されているが、より簡便で正確なEDCsの試験法が求められている。さらに、自然界における内分泌かく乱物質の分布状況とその存在量を高精度で予測できる生物検定法を確立するため、卵菌類に属する糸状菌の遊走子の内分泌かく乱物質に対する反応を調べた。このような生物検定法では、自然界から採集される試料を前処理やクリーンアップ操作を要せずに、試験生物への影響を簡便かつ迅速に予測できる可能性がある。

卵菌類に属する *Aphanomyces cochlioides* の遊走子が、各種の内分泌かく乱物質に忌避的な反応を示すことが報告されている^{1,2)}。卵菌類は畑地や湖沼などから容易に分離され、また、遊走子の形成法も容易である。ここでは、遊走子を最も容易に多量に形成する卵菌類として知られる *Pythium aphanidermatum* を用い、その遊走子のビート葉片の栄養分に対する走化性と発芽に及ぼす内分泌かく乱物質の影響を調べた³⁾。

iii) 方法

研究材料:6種の内分泌かく乱物質としてはBisphenol A(**I**), Estrone(**II**), 17 β -Estradiol(**III**), 17 α -Estradiol(**IV**), Estriol(**V**), Diethylstilbestrol(DES)(**VI**)を選抜し、供試菌には苗立枯れを起こしたビートの根より分離された *Pythium aphanidermatum* OPU506株を用いた。本菌をシャーレに分注した10%V8ジュース寒天培地に接種して31°C

の暗黒下で 4 日間培養した。伸長した菌そうの表面にペトリ液を加え、25°Cの暗黒下で 6 時間培養し、遊走子懸濁液を得た。

遊走子の走化性の程度の評価と遊走子の発芽率の測定：播種後 2~3 週間のビートの幼植物の第一本葉から、直径 3mm の円盤状の葉片を切り取り、上記の内分泌かく乱物質 (I から VI) を 1,000ppm 含む 1%poly-carboxymethyl cellulose 水溶液中に浸漬後スライドガラス上に置き、クリーンベンチ内の送風に 15 分間さらして、風乾させた。25°Cの実験室内で、*P. aphanidermatum* 遊走子の懸濁液 (約 300,000 個/) 100 μ l を葉片上に滴下し、カバーガラスで覆った。2 時間後に光学顕微鏡で観察し、ビート葉周縁部の蓄積した遊走子の密度を調べることによって、遊走子走化性の程度を評価した。また、ビート葉片の周縁から約 1mm 離れた付近の遊走子の発芽率を求めた。実験は 5 反復で行った。データは Kruska-Wallis 検定で差を比較し、Scheffe の対比較によって有意差を検定した。

P. aphanidermatum の遊走子の走化性に EDCs が及ぼす影響の評価方法

手順を Fig.1 に示す。シャーレに 0.8%アガロース 10ml を分注した。0.2%アガロースとビート農の抽出液を 1:1 の割合で混合させ、シャーレの中心に 60 μ l 滴下し、クリーンベンチ内で風乾させた。ビート葉抽出液を含むアガロースを滴下した上に、コルクボーラー (直径 7mm) を押し当て、円の印をつけた。その後、0.4%のアガロースと EDCs を溶解させたアセトン液を、1:1 の割合で混合させ、印の上に 60 μ l 滴下し、ビート葉抽出液を含むアガロースを完全に覆った。また、アセトンと 0.4%アガロースを 1:1 の割合で混合し、印の上に滴下した区をコントロール区とした。その後、遊走子懸濁液 (5×10^4 zoospores/ml) 3ml をシャーレに注入した。遊走子の運動性をできるだけ早く失わせるため、*P. aphanidermatum* の遊走子のシスト化が最も早く起こる、35°Cにシャーレを静置した。ほぼ全ての遊走子がシスト化する 9 時間後に、光学顕微鏡で印の内側を観察した。この光学顕微鏡の接眼レンズの片方を、試料上で 0.7mm 四方を示す方眼入りの接眼マイクロメーターとし、方眼内のシスト化した遊走子を、手動カウンターで計数した。計数は無作為に 10 か所を選んで行い、そのデータを平均して、密度 (zoosporos/mm²) に換算した。その後、Mann-Whitney 検定を用いて、コントロール区と各種 EDCs 添加区間で、データを比較した。

iv) 結果

P. aphanidermatum 遊走子のビート葉片への走化性に及ぼす内分泌かく乱物質の影響

6 種の EDCs のなかで、Bisphenol A (I), Estriol (V) および DES (VI) では、無添加比較対照区に較べてビート葉周縁での遊走子の蓄積密度が有意に低く、遊走子の走化性の阻害が認められた。一方、Estrone (II), 17 β -Estradiol (III), 17 α -Estradiol (IV) では、遊走子の走化性に対する阻害は認められなかった。さらに阻害濃度を定量的に求める検定法を開発して精査した結果、I と III はそれぞれ検出限界濃度 1000ppm と 100ppm で正の走化性を促進し、V、と VI はそれぞれ検出限界濃度 5ppm で正の走化性を促進を阻害した。

P. aphanidermatum 遊走子のビート葉片周辺での発芽に及ぼす内分泌かく乱物質の影響

Bisphenol A (I), Estriol (V) および DES (VI) では、無添加比較対照区に較べて、ビート葉周縁での遊走子の発芽率が有意に低かった。これらの物質添加区では、ビート葉片から数 mm 離れた部位では遊走子の発芽が見られた。

しかし、発芽形態は異常であり、幅広く帯状に奇形した発芽管による発芽や彼のう化していない遊走子からの発芽が見られた。一方、Estrone (II), 17 β -Estradiol (III), 17 α -Estradiol (IV) では、遊走子の発芽に対する阻害や異常な発芽は認められなかった。

v) 考察

P. aphanidermatum 遊走子の走化性および発芽は、Bisphenol A (I), Estriol (V) および DES (VI) によって阻害されることがわかった。これらが阻害される状況は、遊走子を滴下してから遅くとも 2 時間後に顕微鏡下で明瞭に観察できたことから、内分泌かく乱物質の分布を迅速に測定するための前試験として利用できることがわかった。一方、Estrone (II), 17 β -Estradiol (III), 17 α -Estradiol (IV) では、*P. aphanidermatum* 遊

公開資料

走子の走化性および発芽に対する阻害は見られなかった。このことから、本菌の遊走子は、これらの内分泌かく乱物質の検出には利用できないと考えられた。Islam and Tahara は、*Aphanomyces cochlioides* の遊走子が、Bisphenol A (I), Estrone (II), 17 β -Estradiol (III), 17 α -Estradiol (IV), Estriol (V) および DES (VI) のいずれの内分泌かく乱物質に対しても、忌避的な反応を示すことを報告している^{1,2)}。本試験の結果との相違から、同じ卵菌類に属する糸状菌でも、種によって内分泌かく乱物質に対する遊走子の反応が異なることを示唆された。また、Islam and Tahara の実験方法は遊走子の動きによってEDCsが遊走子に及ぼす影響を評価したが^{1,2)}、今回考案した方法では遊走子の密度によって評価するため、その影響をより明瞭に評価できる。今後、遊走子の反応性を、卵菌類種と内分泌かく乱物質の種類の関係について明らかにすることにより、より迅速で正確な内分泌かく乱物質の生物検定法に発展する可能性が高い^{3,4)}。

vi) その他

①で開発した「糸状菌遊走子を用いた内分泌かく乱物質の生物検定法の確立」をピレスロイド系殺虫剤の検定に適用し、構成元素の1つとしてケイ素を含有する合成ピレスロイドの Silafluofen が、内分泌かく乱作用を示さないあたらしい船底防汚塗料成分として高い有効性を示すことが示唆された。現在その有効性について検討中である。また、本生物試験法を用いて、天然植物成分から単離した幾種かの殺虫性化合物の構造を確定中である。

②「内分泌かく乱関連物質のキャピラリーGC と HPLC およびそれらの MS と結合による超微量化学検出システムの構築」

ピレスロイドとは、除虫菊の殺虫性有効成分ピレトリンをリード化合物として開発されてきた一連の合成殺虫剤の総称である。その特性は、高い選択的毒性と人畜に対する低毒性と環境における易分解から、現在では、多種の殺虫性農薬や衛生殺虫剤の有効成分として多用されている。とくに、最近では、衛生殺虫剤として種々の揮発性の高い薬剤が登場し、環境におけるピレスロイドの動態の把握は衛生科学上重要な課題となっている。今回、多用なピレスロイドの（異性体を含む）一括分析法の確立を目指して、キャピラリーGC/MS による分析条件に検討を加えて、当研究室における以下の標準的な分析条件のもとで、EI-MS (70eV) での開裂機構を検討し、一般的な特性イオンは図1のフラグメントに由来することを確認した。

検出器：FID EI-MS、カラム：DB-1 内径 0.25mm 長さ 30M 膜厚 0.25 μ m、カラム温度：160 $^{\circ}$ C \rightarrow 2 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 240 $^{\circ}$ C、キャリアーガス：He、カラム流量：2.3mL/min、スプリット比：1：20

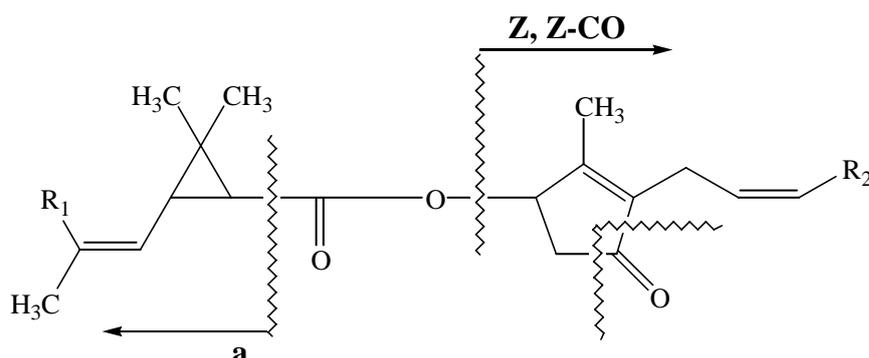


図1 ピレスロイドの一般的開裂様式

③「内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分」

ここで開発した「糸状菌遊走子を用いた内分泌かく乱物質の生物検定法による試験結果をふまえて、本生物検定法とボウフラを用いた生物試験の結果、本分担研究課題である「内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分」としてある特定の植物の生葉がニコチンより殺虫活性の高いアルカロイドを含有することを新たに見出した。その結果、平成17年度に大量の本植物種を採集して、その茎部、葉部よりいく種かの殺虫成分を単離した。目

下の化学構造の確定を急いでいる。

引用文献

- 1) Isam, M. T. and Tahara, S. (2001). Repellent of activity of estrogenic compounds toward zoospores of the phytopathogenic fungus *Aphanomyces cochlioides*. *Z. Naturforsch.* **56 c**: 253-261.
- 2) Islam, M. T. and Tahara, S. (2001). Chemotaxis of Fungal Zoospores, with Special Reference to *Aphanomyces cochlioides*. *Biosci. Biotechnol. Biochem. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65 (9)**, 1933-1948.
- 3) 島田智弓(2004). 外因性内分泌攪乱物質が *Pythium aphanidermatum* の遊走子の走化性に及ぼす影響. 大阪府立大学卒業論文.
- 4) 島田智巳, 東條元昭, 上野民夫. 藻菌類の遊走子を用いた内分泌かく乱物質の簡易検定法, 第6回領域シンポジウム講演要旨集, 55 ページ.
- 5) Garey, J., and Wolff, M. S. (1998). Estrogenic and antiestrogenic activities of pyrethroid insecticides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 855-859.
- 6) Go, V., Garey, J., Wolff, M. S., and Pogo, B. C. (1999). Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ. Health Perspect.* **107**, 173-177
- 7) Saito, K., Tomigahara, Y., Ohe, N., Isobe, N., Nakatsuka, I., and Kaneko, H. (2000). Lack of significant estrogenic and antiestrogenic activity of pyrethroid insecticides in three *in vivo* assays based on classic estrogen receptor α -mediated mechanisms. *Toxicological Sciences*, **57**, 54-60.
- 9) 横尾涼子, 上野民夫(2005). ピレスロイドのマススペクトロメトリー, 内分泌かく乱物質, 第6回領域シンポジウム講演要旨集, 56 ページ

4. 研究成果の今後期待される効果

1) 「糸状菌遊走子を用いた内分泌かく乱物質の生物検定法の確立」

ここで開発した生物検定法は, 環境中での内分泌かく乱物質の分布と動態を把握するための第1次生物検定法として広く提要で切るものとする。Islam and Tahara の実験方法は遊走子の動きによって EDCs が遊走子に及ぼす影響を評価したが, 今回考案した方法では遊走子の密度によって評価するため, その影響をより明瞭に評価できる。われわれは, 本法を「内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分」の検索やピレスロイドの内分泌かく乱作用の予備的な検出に用いている。この成果は, 一部研究担当者である島田智弓の卒業論文として公表しているが, さらなるデータを加えて近く学会誌に投稿の予定である。

植物保護だけでなく人類の生存環境の改善から, 「内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分」の開発に強い期待が寄せられている。③「内分泌かく乱作用を示さない新しい天然殺虫成分」については, 引続き研究を進展させて社会的な要請に応えるべく安全な殺虫剤の開発に取り組む。

3.3 ダイオキシン受容体関連分子の高感度プロテオーム解析

(大阪府立母子保健総合医療センター 和田グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

内分泌かく乱物質が生物活性を発揮し細胞機能 (phenotype) に影響を与える (かく乱する) には受容体への結合が必須である。このグループでは, ダイオキシン受容体 (AhR) が細胞内で生理活性を発揮するために必要な蛋白複合体の静的動的プロファイリングを目指し AhR の新規会合分子の同定とその生理機能の解明を目的とした。これまで AhR 複合体に

ついて網羅的解析が行われたことはなく、これがはじめての本格的探索研究となった。

まずゲル電気泳動をベースとするプロテオーム解析技術に関して視覚的感度限界である 1 ナノグラムを検出できるまで高感度化させ、ゲルをベースとするプロテオーム解析（タンパク同定）の効率を上げるための工夫を次のように施した。

ゲルによって分離したタンパク質の同定には、ゲル内のタンパク質を酵素消化（インゲル消化という）した後に生成するペプチドを回収し、得られたペプチド群の各質量を測定する。その質量データセットを既存のデータベースにあてて、もとのタンパク質を同定するという方法が用いられている。この方法の感度はマスペクトルにおけるペプチドイオンシグナルの検出によっており、それはマスペクトルにおける SN に依存する。銀染色の検出感度限界である数 ng のタンパクを同定する場合のノイズの起源は多くがゲルに由来し、それは、タンパクが包埋されるゲル量に反比例する。従って、高感度に検出同定する手だてのひとつは電気泳動ゲルを薄くすることである。例えば一次元 SDS-PAGE の場合、ゲルを薄くすれば、投入できる試料量が減少する。このことを解決するために試料投入部は従来と同じ 1mm 厚であり、分離部において 0.5mm 厚であるゲルを作製することにした。これは従来市販のゲル作製板に 1 枚の 0.5mm 厚板を貼り付けるだけで実現する。このゲルで銀染色による視覚的検出限界量である数 ng タンパクを分析したところ、分離能は全く損なわれず、大きな障害となっていた SN の改善によって検出感度は 2 倍でなく 10 倍程度に向上することがわかった。さらに、分離ゲル部分を通常使用しているものの約 2 倍の長さである 11cm で作成できるゲル板をつくりタンパク分離能の向上を実現した。これらの技術を用いて AhR に関するプロテオームを次のように行った。

AhR はダイオキシンをはじめとする芳香族炭化水素の受容体として知られており核内受容体ファミリーに属する。細胞内では HSP90 (heat shock protein90), XAP2/AIP(AhR-interacting protein)といった分子シャペロンと会合することによってコアコンプレックスを形成し細胞質に局在している。リガンドが結合した AhR 複合体は核内へ輸送された後にコアコンプレックスからの AhR の解離、さらには ARNT (AhR Nuclear Translocator) と AhR-ARNT ヘテロ二量体形成を誘導し標的 DNA 配列へ結合、下流遺伝子の発現をドライブすることが知られている。また活性化状態にある AhR-ARNT 複合体は核外へ輸送されユビキチン-プロテアソーム系を介した分解を受けることが報告されている。

AhR 会合分子の探索法としては、FLAG-HA タグを利用したプルダウン法による AhR 複合体の精製とプロテオームによる網羅的解析を試みた。細胞内に遺伝子導入した FLAG-HA-AhR をコアコンプレックスのメンバーである HSP-90、XAP2 が共沈してくる条件を探り免疫沈降法による精製を試みる。次に細胞を AhR のリガンドで刺激して AhR の活性化を誘導する。活性化複合体の中心的メンバーである ARNT を効率良く共沈させる条件を探り無刺激条件（静的）と活性化状態（動的）の比較を行い新規の会合分子の探索、静的動的プロファイリングを試みた。

まず FLAG-HA タグの AhR への付加であるが、AhR 遺伝子のアミノ末端に PCR を利用して FLAG-HA タグを付加させたものをクローニングした。次に付加部分への変異とフレームシフトがないことをシーケンスで確認した後にエントリークローンへ全長クローニングを行った。更にほ乳細胞用の発現ベクターへ L-R reaction を利用して FLAG-HA-AhR を移し替え、293 細胞に一過性にトランスフェクションを行った。FLAG-HA-AhR の発現を確認するためにトランスフェクション 24 時間後の細胞を可溶化し細胞抽出液の調製を行い抗 AhR 抗体および抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。細胞内で発現することを確認した FLAG-HA-AhR は L-R reaction を利用して更にレンチウイルス用のベクターへ移し替えた。

このレンチウイルスベクターは CMV プロモーターで挿入遺伝子の発現をドライブしている。さらに下流に IRES (internal ribosome entry site) とピューロマイシン耐性遺伝子のカセットを挿入してある。このため一つのプロモーターで二種類の遺伝子の発現をドライ

づることが可能であり、ウイルス感染後にピューロマイシンを培地に添加することにより目的遺伝子と薬剤耐性遺伝子を発現している細胞のみを選択することが可能である。この工夫によって低 MOI で感染させた場合でも目的遺伝子を発現している細胞群のみを効率よく選択することが可能であり、MOI を変化させることによって目的遺伝子の発現量を調節するだけでなく非発現細胞の除去も可能となり、挿入する目的遺伝子に応じてより純度の高い均一な発現細胞群を作成できることが期待される。さらにはレンチウイルスを用いることにより通常では安定発現株を得るために必要とされる日数（1 - 2 か月）が大幅に短縮され感染後約 1 週間で導入遺伝子の安定発現細胞群を得ることができるところが利点の一つである。

293T 細胞を用いて作成したレンチウイルスを精製後ヒト肝癌由来細胞 HePG2 およびヒト胎児腎臓由来細胞 HEK293 に感染させ細胞への遺伝子導入を行った。ウイルス添加 16 時間後に培地を交換、感染 48 時間後にピューロマイシンを添加し更に 48 時間培養を継続して FLAG-HA-AhR 発現細胞群を選択した。次に感染させた細胞が FLAG-HA-AhR を発現していることをウエスタンブロット法で確認した。感染細胞を氷冷 PBS で洗浄後 NP-40 を含む可溶性剤を用いて調製した細胞抽出液を SDS-PAGE で展開しニトロセルロース膜に転写後 FLAG-HA-AhR の発現を抗 AhR 抗体あるいは抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、ウイルス添加量に依存して FLAG-HA-AhR 発現量が増加していることが確認された。このことから発現量が一定した純度が高く且つ安定した FLAG-HA-AhR 発現細胞群を得ることが出来たと考えられる。

AhR はリガンドの一種である β -NF (β -naphthoflavone) によって核内への移行とコアコンプレックスからの解離および ARNT との会合が誘導され下流遺伝子の転写を行うことが知られている。そこで我々が作成した FLAG-HA-AhR が内在性の AhR と同様に機能するかどうかの確認を行った。Flag-HA-AhR 発現細胞を $1 \mu\text{M}$ の β -NF で各時間 (0, 5, 15, 30 min) 刺激を行った後に氷冷 PBS で洗浄後回収して核抽出物を調製した。各サンプルのタンパク定量を行った後に SDS-PAGE による展開とニトロセルロース膜への転写を行った。抗 AhR 抗体と抗 FLAG 抗体でウエスタンブロットを行ったところ、FLAG-HA-AhR は内在性の AhR と同様に β -NF 刺激 5 分後から核内へ移行し始めており、刺激後 15 分でピークに達していた。さらに核内への移行は刺激後 60 分が経過しても持続していることが明らかとなった。

次にリガンド刺激によって FLAG-HA-AhR がコアコンプレックスからの解離と ARNT とのヘテロ二量体形成が誘導されるかどうかについて確認を行った。 β -NF 刺激を行った後に細胞抽出液を調製し、anti-FLAG M2 agarose を用いた免疫沈降法により FLAG-HA-AhR 複合体の回収を行った。10 cm dish 一枚の細胞から調製した細胞抽出液を遠心し不溶性画分を除去した後に $15 \mu\text{l}$ の anti-FLAG M2 agarose を加え 4°C で 2 時間転倒混和を行った。遠心操作により FLAG-HA-AhR 複合体の回収と洗浄を行った後に回収した複合体を SDS-PAGE で展開しニトロセルロース膜に転写した。抗 FLAG 抗体および抗 ARNT 抗体によるウエスタンブロットを行ったところ、 β -NF 刺激後 30 分で FLAG-HA-AhR は ARNT とのヘテロ二量体形成がピークに達していた。また AhR-ARNT の複合体形成は刺激後 1 時間まで継続すること、二時間後にはヘテロ二量体形成が認められなくなることが明らかとなった。これらの結果より細胞内に発現させた FLAG-HA-AhR はリガンド刺激によって核内への移行と ARNT とのヘテロ二量体形成を誘導していたことが明らかとなり内在性の AhR と同様に機能すると考えられた。

また抗 HSP90 抗体によるウエスタンブロットによって AhR-HSP90 複合体がリガンド刺激に応じて解離するかどうかについて検討したところ、FLAG-HA-AhR からの HSP90 の解離は検出できなかった。これは HSP90 が細胞内に豊富に存在する分子シャペロンタンパクであり細胞内に定常状態で存在する AhR-HSP90 複合体と活性化複合体である AhR-ARNT 複合体の絶対的な量に差があるため検出が困難であったと考えられる。

活性化複合体である AhR-ARNT ヘテロ二量体は下流遺伝子の発現をドライブした後は速やかにユビキチン-プロテアソーム系を介して分解を受けることが報告されている。本研究で

公開資料

は AhR 複合体の静的動的プロファイリングを行うことを目的の一つとしているため活性化複合体の中心的メンバーである ARNT の効率の良い精製が動的プロファイリングを行う上で重要であると考えておりその精製法が必須となってくる。そこでリガンド刺激によって活性化した AhR 複合体の分解をプロテアソーム阻害剤によって防ぐことができるかどうかを次に検討した。プロテアソーム阻害剤 MG132 で前処理した細胞から細胞抽出液の調製を行い抗 AhR 抗体、抗 ARNT 抗体でウエスタンブロットを行った。MG132 非存在下では β -NF 刺激により AhR, ARNT 共にタンパク量が減少しており分解が促進されていることが示唆された。これに対し MG132 で前処理したものでは β -NF 刺激による AhR, ARNT の分解が部分的ではあるが抑えられていた。次に MG132, β -NF で同様の処理を行い回収した細胞抽出液から抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行い Flag-HA-AhR 複合体を回収した。抗 AhR 抗体によるウエスタンブロットを行ったものでは AhR のタンパク量は MG132 及び β -NF の刺激の有無によらずほぼ一定であったのに対し、AhR に会合している ARNT の分解が MG132 存在下では特に抑制されていることが明らかとなった。また他のプロテアソーム阻害剤である ALLN についても MG132 と同様に β -NF 処理によって促進される AhR-ARNT の分解を部分的に抑制することが出来ることを確認した。これらの結果から細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 および ALLN で前処理することにより β -NF によって促進されるユビキチン-プロテアソーム系を介した AhR-ARNT の分解を抑制することが出来、活性化複合体の中心的メンバーである AhR-ARNT 複合体を効率良く精製することが出来ると考えられた。

次に 15 cm dish 10 枚分の HepG2, および 293 細胞を氷冷 PBS で洗浄後細胞抽出液を調製した。15000 rpm で 20 分遠心して不溶性成分を除去し anti-FLAG M2 agarose を 200 μ l 加え 4 $^{\circ}$ C で 2 時間転倒混和を行った。anti-FLAG M2 agarose 結合画分はプロテアソーム阻害剤を添加した氷冷 PBS で洗浄後に 100 μ g/ml に調製した 3xFLAG peptide を用いて溶出、300 μ l ずつ計 6 分画を回収した。回収した溶出画分はそれぞれ 3 倍量の氷冷アセトンを加え -30 $^{\circ}$ C で一晩放置した後に遠心してタンパクの沈殿を行った。得られた沈殿は SDS-PAGE サンプルバッファーで溶解し SDS-PAGE 展開後に銀染色とウエスタンブロットを行った。抗 AhR 抗体を用いたウエスタンブロットによって精製の確認を行ったところ 3xFlag peptide を用いた溶出では溶出分画 2 および 3 に AhR 複合体の溶出が濃縮されていることが明らかとなった。

銀染色像から非発現細胞 (コントロール) と比較して FLAG-HA-AhR 発現細胞から調製したサンプルに特異的に出現しているバンドを切り出し DTT とヨードアセトアミドによる還元・アルキル化を行った。更に重炭酸アンモニウムで洗浄とアセトニトリルで脱色・脱水反応を行った後にゲルを乾燥させトリプシン溶液を添加してゲル内消化反応を一晩行った。反応終了後消化ペプチド群の回収・脱塩を行い得られたペプチド群を濃縮したものにマトリクスを添加し MALDI-Tof-MASS 解析を行った。得られたスペクトル群からペプチドマスフィンガープリント法によるタンパク同定を試みたところ、FLAG-HA-AhR 特異的に会合しているバンドの中には AhR への会合が報告されている HSP90 や XAP2 といった分子を同定することが出来た。また他の FLAG-HA-AhR 会合分子として分子シャペロンである BiP/GRP/HSP78 や HSP70、細胞内のシグナル分子である Protein phosphatase 1B (PP2Cbeta) や serine/threonine kinase 38 (NDR1) などを候補分子として同定した

しかしながら抗 FLAG M2-agarose を用いた精製のみでは抗体に非特異的に会合しているタンパクがかなり多く活性化複合体のメンバーである ARNT は銀染色像で視認することが出来なかったため同定は至らなかった。動的プロファイリングを行う為には ARNT が同定できるレベルまで精製すること必要であるが現段階では難しいことから AhR の静的動的プロファイリングを行う為にはさらなる精製のスケールアップと追加ステップが必要であると考えられた。

そこで更に anti-HA 抗体を用いた追加精製を行った。anti-FLAG M2 agarose 結合分画を氷冷 lysis buffer で洗浄後 3xFLAG peptide で溶出した。溶出分画 2-5 を一つにまとめこれに anti-HA-agarose を 150 μ l 加え 4 $^{\circ}$ C で 2 時間転倒混和を行った後に結合画分を洗浄し

た。溶出は 0.1 M グリシン (pH2.5) を用いて 150 μ l で 6 画分に分けて回収を行った。溶出画分のアセトン沈殿後 SDS-PAGE 展開しウエスタンブロットと銀染色により精製の確認を行ったところ FLAG-HA-AhR 複合体は溶出分画 2 にほとんどが濃縮されていることが明らかとなった。また非発現細胞では抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体を用いた二段階精製によって結合タンパクが銀染レベルでほとんど消失していた。

銀染色像から特異的に会合しているバンドを切り出してインゲル消化・MALDI-tof-MS 解析・データベースサーチを行い FLAG-HA-AhR に会合するタンパク群を同定したところ HSP90 α/β や XAP2、 β -NF 処理を行ったサンプルからは ARNT1/3 を同定することが出来た。他の会合分子としては分子シャペロンである BiP/GRP/HSP78 や HSP70-9B/mortalin/MTHSP75, Chaperonin/HSP60 が、シグナル分子としては serine threonin kinase 38/ NDR1 が FLAG 抗体による精製の時と同様に同定することが出来た。更に今回の二段階精製で FLAG-HA-AhR に特異的に会合する分子として EF-1, P43/mitochondrial elongation factor Tu, SSA1/52kDa Ro-SSA autoantigen, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase, S3 ribosomal protein, RPS4X protein/ribosomal protein S4 X-linked などが候補分子として同定することが出来た。

近年になって AhR がリン酸化を受けその転写活性に影響を及ぼすことが報告されてきたことから、核内に存在する serine threonin kinase 38/ NDR1 が AhR のリン酸化に関与することが今回の研究で示唆された。また AhR が P43/mitochondrial elongation factor Tu や HSP70-9B/mortalin/MTHSP75 と会合する可能性があることから AhR の新機能としてミトコンドリアで何らかの役割を担っている可能性も考えられる。

(2)研究成果の今後期待される効果

今回の研究によって、AhR が核内を始めとしてミトコンドリア膜や細胞質でアソシエートする分子群を同定したことで、今後、AhR の下流において転写活性に関わる研究や AhR の新機能を明らかにする研究を加速できるものと期待できる。古くから多くの研究者に利用されてきた yeast two hybrid 法では膜貫通タンパクには応用出来ないなど利用できる遺伝子に制約があり、更に偽陽性が多いことが問題点としてあげられてきた。一方タグを利用した遺伝子導入によるプルダウン法は目的遺伝子の細胞内の局在や膜貫通部位の有無によらずほとんどの遺伝子に関して応用することが可能であることが特徴の一つとしてあげられる。また今回利用した FLAG-HA タグは TAP タグや GFP、GST タグと比べてサイズが極めて小さくまた His タグの用にチャージも持たない為、付加した遺伝子の機能に対する影響が少ないことも容易に想像できる。更に二種類の異なるタグを利用することによって従来時間と手間のかかる生化学的な精製法を行う必要がなくなり、簡便な操作で非特異的な結合タンパクを効率よく排除することができ擬陽性を大幅に削減することに成功した。今回の精製では細胞内に数%しか存在しないと考えられているシグナル分子をいくつか同定できたことからその精製度が極めて高い事が示唆される。これらのことから二種類のタグを付加した遺伝子の細胞内への導入とプロテオームを組み合わせる手法は細胞内の複雑なネットワークを解き明かすための強力なツールの一つとなりえることを今回の成果で示すことが出来た。今回の研究でプロテオーム手法が環境研究においても強力なツールであることを示すことができたと考える。

さらにレンチウイルスを利用した遺伝子導入法はリポフェクション法やリン酸カルシウム法といった通常の遺伝子導入法では導入が困難であった初代培養系や ES 細胞、非増殖細胞や終末分化細胞に対しても効率よく発現させることが可能である。さらに薬剤耐性遺伝子との組み合わせにより非感染細胞の除去を可能にしたため、従来法に比べて極めて短期間（一週間前後）で目的遺伝子を恒常的に発現する細胞群を作成することが可能となった。これらの利点からレンチウイルスを利用した遺伝子導入法とタグを利用したプルダウン法からプロテオーム解析に至るまでの一連の操作は今後様々な局面で注目を集める技術であると考えられる。

公開資料

4 研究参加者

①交久瀬グループ(内分泌かく乱物質測定用高感度ガスクロマト質量分析計の開発)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
交久瀬五雄	大阪大学大学院理学研究科	名誉教授	質量分析開発と改良	平成12年11月～ 平成17年10月
石原盛男	同上	助教授	同上	同上
伊藤啓行	同上	助手	同上	同上
豊田岐聡	同上	助手	同上	同上
市原敏雄	同上	技官	同上	同上
荒川隆一	関西大学	教授	イオン源開発と測定	同上
中野 武	兵庫県立公害研究所	研究員	分離精製	平成12年11月～ 平成15年3月
田村 淳	日本電子(株)	研究員	質量分析開発と改良	平成12年11月～ 平成17年3月
井口昌彦	浜松ホニクス(株)	研究員	検出器開発	平成12年11月～ 平成15年3月
柴 欧樹	大阪大学大学院理学研究科	CREST 技術員	質量分析開発と改良	平成12年11月～ 平成15年3月
中野和郎	同上	研究補助 員	同上	平成15年5月～ 平成16年3月
佐藤貴弥	同上	院生	同上	平成12年11月～ 平成14年3月
公文代康祐	同上	同上	同上	平成12年11月～ 平成16年3月
奥村大輔	同上	同上	同上	平成12年11月～ 平成17年3月
真部善宏	同上	同上	同上	平成12年11月～ 平成14年3月
萩原拓郎	同上	同上	同上	平成14年4月～ 平成16年3月
藤垣美奈子	同上	同上	同上	平成14年4月～ 平成16年3月
西口 克	同上	同上	同上	平成15年4月～ 平成17年10月
内田 智	同上	同上	同上	平成16年4月～ 平成17年3月
上野民夫	大日本除虫菊(株)中央研究所	顧問	新規植物性殺虫成分の 探索と分析	平成12年11月～ 平成17年10月
東條元昭	大阪府立大学大学院農学生命研究科	助手	糸状菌遊走子を用いた 内分泌かく乱物質の生 物検定法の確立と応用	平成14年4月～ 平成16年3月

公開資料

橋本圭二	タカラバイオ 大学	講師	内分泌かく乱関連物質 のキャピラリーGCと HPLCおよびそれらのMS とのけつごうによる超 微量化学検出システム の構築	平成13年3月～ 平成16年3月
櫻井喜子	大阪大学大学 院理学研究科	研究補助 員	チーム事務	平成12年12月～ 平成17年10月

②赤松グループ (DDT 類縁体および代謝物の性ホルモン受容体結合活性)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
赤松美紀	京都大学大学 院農学研究科	助教授	内分泌かく乱物質代謝 物のライブラリー構築 および構造活性相関解 析	平成12年11月～ 平成17年10月
宮下正弘	同上	助手	内分泌かく乱物質代謝 物の既存MSによる比較 データ作成	同上
中神静香	同上	研究補助 員	内分泌かく乱物質およ び代謝物のホルモン受 容体結合活性測定、代 謝物の単離	平成13年4月～ 平成15年3月
島田誉弘	同上	院生	内分泌かく乱物質およ び代謝物の単離・ホル モン受容体結合活性測 定	平成15年4月～ 平成17年10月

③和田グループ (ダイオキシン受容体関連分子の高感度プロテオーム解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
和田芳直	大阪府立母子 保健総合医療 センター研究 所 (大阪大学大 学院医学系研 究科分子病態 医学専攻)	所長 (教授)	ダイオキシン受容体関 連分子の高感度プロテ オーム解析	平成12年11月～ 平成17年10月

公開資料

中野法彦	大阪府立母子保健総合医療センター研究所	主任研究員	同上	平成12年11月～平成16年3月
吉水朋美	同上	研究員	同上	平成13年4月～平成14年3月
渋川直幸	同上	研究員	同上	平成16年4月～平成17年10月
中村織江	同上	流動研究員	同上	同上
金子理奈	大阪大学大学院医学系研究科分子病態医学専攻	院生	同上	平成12年11月～平成16年3月
中野友和	同上	同上	同上	同上
吉田周美	同上	同上	同上	平成14年4月～平成17年10月
田中勝啓	大阪府立大学大学院農学生命科学研究科	同上	同上	平成16年4月～平成17年10月

5 成果発表等

(1) 論文発表 (国内 22 件、海外 47 件)

交久瀬グループ (国内 2 件、海外 3 件)

1. R. Arakawa, K. Abe, M. Iwai, T. Fukuo, and Y. Nakabayashi, Analysis of Photochemical Reactions of Bis(1,10-phenanthroline) diamineruthenium(II) Complexes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 49(5), 183-187 (2001)
2. 交久瀬五雄, 内分泌かく乱物質測定用高感度ガスクロマトー質量分析計の開発, 生産と技術, Vol. 55, No. 2 43-46 (2003)
3. M. Ishihara, T. Toyoda, H. Sakae, T. Ichihara, I. Katakuse, Development of GC-MS System with an Array Detector System for Endocrine Disruptor Analysis, Environmental Science, 11, 1, 15-24 (2004)
4. Daisuke Okumura, Michisato Toyoda, Morio Ishihara and Itsuo Katakuse, Application of a Multi-Turn Time-of-Flight Mass Spectrometer, 'MULTUM II', to organic compounds ionized by MALDI, J. Mass. Spectrom. 39, 86-90 (2004)
5. Daisuke OKUMURA, Michisato TOYODA, Morio ISHIIHARA and Itsuo KATAKUSE, A compact sector-type multi-turn Time-of-Flight Mass Spectrometer 'MULTUM II', Nucl. Instrum. Meth. 519/1-2, 331-337 (2004)

赤松グループ (国内 1 件、海外 3 件)

1. 赤松美紀, 内分泌かく乱化学物質の構造活性相関, 環境保全 No. 17, p. 41-51
2. Miyashita, M., Shimada, T., Nakagami, S., Kurihara, N., Miyagawa, H. and Akamatsu, M.: Enantioselective Recognition of Mono-demethylated methoxychlor metabolites by the estrogen receptor, Chemosphere, 54, 1273-1276 (2004)

3. Miyashita, M., Shimada, T., Miyagawa, H., and Akamatsu, M.: Surface plasmon resonance-based immunoassay for 17 β -estradiol and its application to the measurement of estrogen receptor-binding activity. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 666-673 (2005)
4. Miyashita, M., Shimada, T., Nakagami, S., Kurihara, N., Miyagawa, H., and Akamatsu, M.: Evaluation of estrogen receptor binding affinity of DDT related compounds and their metabolites. In: *Environmental Fate and Safety Management of Agrochemicals* (Eds. J.M. Clark and H. Ohkawa), 159-166 (2005)

上野グループ (国内 7件、海外 3件)

1. Tamio Ueno, Hisashi Miyagawa, Masahiro Miyashita Masakazu Okada and Ippei Uemura, "Two Host-specific Toxins from *Alternaria* as Targetstowards Selective Potent Phytotoxic Chemicals" Review of personal works, Proceeding of International Symposium on Natural Pesticide from Forest Resources Seoul 2001, pp47-67 (2001)
2. Ippei Uemura, Ken Yamada, Kayo Sugiura, Hisashi Miyagawa, and Tamio Ueno. Efficient Stereoselective Synthesis of a 1-hydroxyl-2-methylglycidol Derivative, *Tetrahedron Asymmetry*, 12, 943-947 (2001)
3. Ippei Uemura, Hisashi Miyagawa, and Tamio Ueno, Asymmetric Total Synthesis of AK-toxins, *Tetrahedron*, 58, 2351-2358 (2002)
4. 上野民夫, 「栽培植物と遺伝学の発展」, 学術の動向, 2002, 7(2), 33-36 (2002)
5. 上野民夫, 活動報告「シンポジウム: 生物生産とポスト石油化学時代の産業科学」, 学術の動向, 2002, 7(9), 88-90 (2002)
6. 上野民夫, 「科学(論)のパラダイム転換と新しい学術体系」, 学術の動向, 2003, 8(10), 19-22 (2003)
7. 上野民夫, 「田中耕一氏の業績」, 学術の動向, 2003, 8(1), 68-69 (2003)
8. 上野民夫, 巻頭言「創造性とは何か」, 化学と生物, 41(5), 277 (2003)
9. 上野民夫, 植物-病原菌相互作用の天然物化学, 化学工業, 55(8), 634-639 (2004) 2004(9)
10. 上野民夫, 「食糧生産と植物保護の変貌-第10回 IUPAC 植物防疫国際会議に出席して」, 学術の動向, 2004, 9(1), 88-91 (2004)

和田グループ (国内 12件、海外38件)

1. Nakamura N and Wada Y "Properties of DNA fragmentation activity generated by ATP depletion" *Cell Death Differ.* 7, 477-484 (2000)
2. A.H.M. Mawjood, G. Miyazaki, R. Kaneko, Y. Wada and K. Imai "Site-directed mutagenesis in hemoglobin: test of functional homology of the F9 amino acid residues of hemoglobin α and β chains" *Protein Engng.* 13, 113-120 (2000)
3. Y. Wada, M. Hisada, R. Kaneko, H. Naoki and T. Matsuo "Tandem mass spectrometric analysis of ^{13}C -containing ions from a mixture of homologous peptides differing by one mass unit at a residue" *J. Mass Spectrom.* 35(2), 242-250 (2000)
4. T. Nakano and Y. Wada "Hemoglobin Tokyo II [α 89(FG1) His-->Asn]: a new hemoglobin variant characterized by endoproteinase Asp-N digestion and collision-induced dissociation" *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 48, 341-345 (2000)
5. M. Tsuda, N. Egashira, N. Niikawa, Y. Wada and K. Honke "Cancer-associated alternative usage of multiple promoters of human CalCer sulfotransferase gene" *Eur. J. Biochem.* 267, 2674-2679 (2000)
6. Hirahara, Y., Tsuda, M., Wada, Y. and Honke, K. "cDNA cloning, genomic cloning, and tissue-specific regulation of mouse GalCer sulfotransferase" *Eur. J. Biochem.* 267, 1909-17 (2000)
7. 和田芳直、特集「ニューロサイエンス」新しい手法による脳疾患の遺伝子診断. 化学工業 51, 508-513 (2000)
8. T. Nakano, Y. Wada, and S. Matsumura "Membrane lipid components associated with increased

- filtrability of erythrocytes from long-distance runners” *Clin Hemorheol Microcirc* 24, 85-92, (2001)
9. Honke K, Tsuda M, Koyota S, Wada Y, Iida-Tanaka N, Ishizuka I, Nakayama J, Taniguchi N. "Molecular cloning and characterization of a human beta-Gal 3'-sulfotransferase which acts on both type 1 and type 2 (Galbeta1,3/1,4GlcNAc-R) oligosaccharides." *J Biol Chem.* 276, 267-274 (2001)
 10. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. "Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), placental growth factor (PIGF), and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathological conditions." *Hum Pathol*, 33(11):1069-1077 (2002)
 11. Kaneko R, Wada Y. "Mass spectrometric features of S-nitrosylated peptides" *J Mass Spectrom Soc Jpn*, 50, 223-225 (2002)
 12. Wada Y. "Advanced analytical methods for hemoglobin variants" *J Chromatogr B*, 781, 291-301 (2002)
 13. Ihara Y, Yasuoka C, Kageyama K, Wada Y, Kondo T. "Tyrosine Phosphorylation of Clathrin Heavy Chain under Oxidative Stress." *Biochem Biophys Res Commun*, 297, 353-360 (2002)
 14. Kumazaki K, Ozono K, Yahara T, Wada Y, Suehara N, Takeuchi M, Nakayama M. "Detection of cytomegalovirus DNA in human placenta" *J Med Virol*, 68, 363-369 (2002)
 15. Honke K, Hirahara Y, Dupree J, Suzuki K, Popko B, Fukushima K, Fukushima J, Nagasawa T, Yoshida N, Wada Y, Taniguchi N. "Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids" *Proc Nat Acad Sci USA*, 99, 4227-4232 (2002)
 16. Kumazaki K, Nakayama M, Sumida Y, Ozono K, Mushiake S, Suehara N, Wada Y, Fujimura M. "Placental features in preterm infants with periventricular leukomalacia" *Pediatrics*, 109, 650-655 (2002)
 17. Y. Wada "Detection and characterization of protein mutations by mass spectrometry" in "The Protein Protocol Handbook, 2nd ed." (ed. J.M. Walker), pp681-692, Humana Press, Totowa 2002
 18. Nishiuchi R, Murayama O, Fujiwara H, Gu J, Kawakami T, Aimoto S, Wada Y, Sekiguchi K. "Characterization of the ligand-binding specificities of integrin alpha3beta1 and alpha6beta1 using a panel of purified laminin isoforms containing distinct alpha chains" *J Biochem (Tokyo)*. 134:497-504 (2003)
 19. 和田芳直、MSによるゲノム解析の基礎 – SNPを中心として – *J Mass Spectrom Soc Jpn* 51, 368-373 (2003)
 20. 和田芳直、DNA解析のための基礎、化学フロンティア⑩ポストゲノム・マススペクトロメトリー、化学同人、京都 pp75-84 (2003)
 21. 吉田周美、和田芳直. 動脈硬化の胎内プログラミング. 母子医療センター雑誌 19, 14-18 (2003)
 22. Kaneko R, Wada Y. "Decomposition of protein nitrosothiols in matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry" *J. Mass Spectrom.* 38, 526-530 (2003)
 23. Wada Y, Kadoya M. "In-gel digestion with endoproteinase LysC" *J Mass Spectrom*, 38, 117-118 (2003)
 24. Okuno S, Nakano M, Matsubayashi GE, Arakawa R, Wada Y. "Reduction of organic dyes in matrix-assisted laser desorption/ionization and desorption/ionization on porous silicon." *Rapid Commun Mass Spectrom.* 18, 2811-2817 (2004)
 25. Wada Y, Tajiri M, Yoshida S. "Hydrophilic affinity isolation and MALDI multiple-stage tandem mass spectrometry of glycopeptides for glycoproteomics." *Anal Chem.* 76, 6560-6565 (2004)
 26. Sekiya S, Wada Y, Tanaka K. "Improvement of the MS/MS fragment ion coverage of acidic residue-containing peptides by amidation with ¹⁵N-substituted amine" *Anal Chem* 76, 5894-5902 (2004)
 27. 福山裕子, 和田芳直, 山崎雄三, 尾島典行, 山田真希, 田中耕一, MALDI-QIT-TOFMSを用いた糖タンパク質の新規構造解析手法: リボヌクレアーゼBへの適用, *J Mass Spectrom Soc Jpn* 52, 328-338 (2004)
 28. 奥野昌二, 下前幸康, 小原一真, 藤原博樹, 大山淳, 大本将義, 和田芳直, 荒川隆一, DIOS法を利用した合成高分子の質量分析 – DIOSチップ作成の最適化 –, *J Mass Spectrom Soc*

- Jpn 52, 142-148 (2004)
29. Nakano N, Higashiyama S, Ishiguro H, Taniguchi N, Wada Y. "The N-terminal region of NTAK/neuregulin-2 isoforms has an inhibitory activity of angiogenesis" *J Biol Chem* 279, 11465-11470 (2004)
 30. Ogita K, Kimura T, Nakamura H, Koyama S, Tsjiie T, Tomiie M, Tsutsui T, Shimoya K, Wada Y, Koyama M, Nomura S, Murata Y. "Differential expression and localization of decorin in human choriodecidual membrane during preterm and term pregnancy" *Am J Reprod Immunol* 51, 204-210 (2004)
 31. Ido H, Harada K, Futaki S, Hayashi Y, Nishiuchi R, Natsuka Y, Li S, Wada Y, Combs AC, M. Ervasti J, Sekiguchi K. "Molecular dissection of the α -dystroglycan- and integrin-binding sites within the globular domain of human laminin-10" *J Biol Chem* 279, 10946-10954 (2004)
 32. 荒川隆一, 奥野昌二, 和田芳直, "ソフトレーザー脱離イオン化質量分析法(LDI-MS)の最近の進歩" *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 52, 33-38 (2004).
 33. Wada Y, Nakano N. "Technical aspects of gel-based proteomics designed for elucidating an aryl hydrocarbon receptor complex" *Env. Sci.* 11, 25-31 (2004)
 34. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. "Immunohistochemical distribution of toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas for normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis" *Hum Pathol* 35, 47-54 (2004)
 35. Hirahara Y, Bansal R, Honke K, Ikenaka K, Wada Y. "Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: development in sulfatide-null mice" *GLIA* 45, 269-277 (2004)
 36. 和田芳直、プロテオミクス、医学を学ぶための生物学（改訂第2版） pp423-428、南江堂 2004
 37. 和田芳直、フォスファチジルセリン露出と補体—抗リン脂質抗体とアポトーシス—、*Annual Review 免疫* 2004、pp277-283 中外医学社
 38. Nishiuchi R, Sanzen N, Nada S, Sumida Y, Wada Y, Okada M, Takagi J, Hasegawa H, Sekiguchi K. "Potentiation of the ligand-binding activity of integrin α 3 β 1 via association with tetraspanin CD151." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 1939-1944 (2005)
 39. Okuno S, Arakawa R, Okamoto K, Matsui Y, Seki S, Kozawa T, Tagawa S, Wada Y. "Requirements for laser-induced desorption/ionization on submicrometer structures." *Anal Chem* 77, 5364-5369 (2005)
 40. Sekiya S, Wada Y, Tanaka K. "Derivatization for stabilizing sialic acids in MALDI-MS" *Anal Chem* 77, 4962-4968 (2005)
 41. "Clinical applications" Y. Wada in "The Encyclopedia of Mass Spectrometry" (eds. R.M. Caprioli, M.L. Gross) Elsevier (in press)
 42. Okuno S, Wada Y. "Measurement of serum salicylate levels by solid-phase extraction and desorption/ionization on silicon mass spectrometry" *J Mass Spectrom.* 40, 1000-1004 (2005)
 43. Daimon E, Wada Y. "Role of neutrophils in matrix metalloproteinase activity in the preimplantation mouse uterus" *Biol Reprod* 73, 163-171 (2005)
 44. Nishiuchi R, Sanzen N, Nada S, Sumida Y, Wada Y, Okada M, Takagi J, Hasegawa H, Sekiguchi K. "Potentiation of the ligand-binding activity of integrin α 3 β 1 via association with tetraspanin CD151." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 1939-1944 (2005)
 45. Yoshida S, Wada Y. "Transfer of maternal cholesterol to embryo and fetus in pregnant mice" *J Lipid Res* (in press)
 46. Tajiri M, Yoshida S, Wada Y. "Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: Application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment." *Glycobiology* (in press)
 47. 和田芳直. 生体分子の質量分析. 実験化学講座、丸善、東京、(in press)
 48. 和田芳直. 疾患関連糖鎖解析の現状と将来展望. 特集. 微量糖鎖解析の現状と将来. 臨床化学. (in press)
 49. 和田芳直、田尻道子. グリコプロテオームのMS解析 —部位特異的な糖鎖構造解析—. 実験化学講座、羊土社、東京、(in press)
 50. 和田芳直. 糖タンパク質糖鎖合成障害疾患CDG. 糖鎖科学の新展開 (谷口直之、伊藤幸成監修) エヌ・ティー・エス 東京、2005

公開資料

(2) 口頭発表（国際学会発表及び主要な国内学会発表）

① 招待、口頭講演（国内 40 件、海外 7 件）

交久瀬グループ（国内 3 件、海外 0 件）

1. 交久瀬五雄（大阪大学大学院理学研究科）、内分泌かく乱化学物質分析のための高性能質量分析計の開発、日本化学会・環境動態研究会、日本化学会会館（東京御茶ノ水）平成 13 年 1 月 29 日
2. 豊田岐聡（大阪大学大学院理学研究科）、内分泌かく乱物質測定用高感度ガスクロマトグラフ質量分析計の開発、日本質量分析学会創立 50 周年記念若手講演会、東京大学安田講堂、平成 14 年 11 月 14 日－15 日（発表は 11 月 15 日）
3. 交久瀬五雄（大阪大学大学院理学研究科）、内分泌かく乱物質の研究と質量分析、防虫科学第 30 回講演会、京大会館、平成 16 年 3 月 10 日

赤松グループ（国内 6 件、海外 0 件）

1. 中神静香（科学技術振興事業団）、宮下正弘（京都大学大学院農学研究科）、西村勁一郎（大阪府立大学先端科学研究所）、赤松美紀（京都大学大学院農学研究科）、DDT 類縁体とその代謝物の estrogen および androgen 受容体結合活性の評価、日本農薬学会第 27 回大会、茨城県稲敷郡茨城大学農学部、3 月 31 日～4 月 2 日（発表は 4 月 2 日）
2. 島田誉弘（京都大学大学院農学研究科）、中神静香（科学技術振興事業団）、宮下正弘（京都大学大学院農学研究科）、栗原紀夫（日本アイソトープ協会）、赤松美紀（京都大学大学院農学研究科）、光学活性を有する methoxychlor 代謝物の estrogen 受容体結合活性の評価、日本農薬学会第 28 回大会、平成 15 年 3 月 22 日－3 月 24 日、名城大学（発表は 3 月 24 日）
3. 島田誉弘（京都大学大学院農学研究科、科学技術振興事業団）、中神静香（科学技術振興事業団）、宮下正弘（京都大学大学院農学研究科、科学技術振興事業団）、宮川恒（京都大学大学院農学研究科）、赤松美紀（京都大学大学院農学研究科、科学技術振興事業団）、DDT 類縁体代謝物のエストロゲン受容体結合活性、日本農薬学会第 29 回大会、平成 16 年 3 月 24 日～3 月 26 日、神戸国際会議場（発表は 3 月 25 日）
4. 宮下正弘、島田誉弘、中上静香、宮川恒、赤松美紀（京大院農、科技機構・CREST）、DDT 類縁体代謝物のエストロゲン受容体結合活性、日本農芸化学会関西支部 第 433 回講演会、京大会館、平成 16 年 2 月 7 日
5. 宮下正弘（京都大学・院農）、Biacore によるエストラジオールのイムノアッセイおよびそのエストロゲン受容体結合活性測定への応用、Biacore Symposium Japan 2003、東京コンファレンスセンター、平成 15 年 9 月 12 日
6. 島田誉弘（京都大学大学院農学研究科）、宮下正弘（京都大学大学院農学研究科）、宮川恒（京都大学大学院農学研究科）、赤松美紀（京都大学大学院農学研究科）、「メトキシクロル第Ⅱ相代謝物のエストロゲン受容体結合活性」、日本農薬学会第 30 回大会、明治大学、2005. 3. 20

上野グループ（国内 3 件、海外 1 件）

1. 上野民夫（京都大学教授）、招待講演“私たちの食生活と環境ホルモン”，日本学術会議第 6 部等主催シンポジウム「食の安全性」，長崎大学中央講堂，平成 12 年 6 月 29 日
2. 上野民夫（京都大学名誉教授）、招待講演“生物資源とポスト石油時代の産業化学”，日本農学アカデミー第 3 回シンポジウム，日本学術会議講堂，乃木坂，2001 年 6 月 6 日
3. * Tamio Ueno, Hisashi Miyagawa, Masahiro Miyashita Masakazu Okada and Ippei Uemura “Two Host-specific Toxins from *Alternaria* as Targetstowards Selective Potent

公開資料

Phytotoxic Chemicals” International Symposium on Natural Pesticide from Forest Resources Seoul ,2001

4. 上野民夫 (大日本除虫菊(株)中央研究所), 招待講演 “農薬デザインに架けた夢と現実”
日本農薬学会主催: 農薬デザイン研究会, メルパルク大阪, 平成 16 年 11 月 12 日

和田グループ(国内 28 件、海外 6 件)

1. 和田芳直. 次世紀が迎える医療とMS. 第 27 回BMS コンファレンス, 00.7: 神戸, 基調講演
2. 本家孝一、平原幸恵、和田芳直、谷口直之. 糖脂質硫酸化の生理機能. 第 21 回日本糖質学会, 00.7; 名古屋, シンポジウム
3. 本家孝一、平原幸恵、和田芳直、谷口直之. 糖脂質の硫酸化はミエリン機能と精子形成に必須である. 第 73 回日本生化学会, 00.10: 横浜, シンポジウム
4. 本家孝一、平原幸恵、和田芳直、谷口直之. 糖脂質硫酸転移酵素(CST)欠損マウスが教えてくれたこと. 第 23 回日本分子生物学会, 00.12: 神戸, シンポジウム
5. 和田芳直. 最先端質量分析がもたらしたパラダイム変換「最新MS 技術の医学への応用」. 日本化学会第 79 春季年会, 01.3: 神戸, シンポジウム
6. Wada Y. Mass spectrometric strategy for characterizing molecular abnormality. Summer Course on Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, 01.08: クロアチア・ドブロブニク、招待講演
7. Wada Y. The role of proteomics in medicine" Summer Course on Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, 01.08: クロアチア・ドブロブニク、招待講演
8. 中野法彦、和田芳直、谷口直之、石黒啓司、東山繁樹. 受容体型チロシンキナーゼ ErbB リガンド NTAK/neuregulin-2 の血管内皮細胞増殖抑制活性および血管形成阻害活性. 第 74 回日本生化学会大会, 01.10: 京都、シンポジウム
9. 熊崎香織、平原幸恵、中山雅弘、末原則幸、和田芳直. ヒト胎盤における VEGF,PIGF, およびその受容体 Flt-1,KDR の発現—病理所見との関連. 第 9 回日本胎盤学会、01.10: 大阪、一般講演
10. K. Kumazaki, K. Ozono, Y. Wada, N. Suehara, M. Nakayama. Detection of cytomegalovirus DNA in human placenta. 8th Meeting of International Federation of Placenta Associations, 2002.10: Melbourne, 一般講演
11. K. Kumazaki. Placental features in preterm infants with periventricular leukomalacia. Pediatric Academic Societies 2002 Annual Meeting, 2002. 5, Baltimore, 一般講演
12. 和田芳直. ゲノムMS の現状と将来. 第 2 9 回BMS コンファレンス, 2002. 7: 山梨, シンポジウム
13. 和田芳直. ペプチドマスフィンガープリントによる生理活性タンパク分子探索. SHIMADZU BIOTECH セミナー, 2002. 8: 大阪, 特別講演
14. 和田芳直. プロテオーム基盤技術としてのMS. 第 27 回日本医用マススペクトル学会年会, 2002. 9: 久留米, シンポジウム
15. 金子理奈, 和田芳直. Sニトロシル化タンパク質・ペプチドの質量分析. 第 27 回日本医用マススペクトル学会年会, 2002. 9: 久留米, シンポジウム
16. 和田芳直、田尻道子. グリコプロテオームの技術基盤開発、第 2 回日本ヒトプロテオーム機構; 東京、2004.5.19、一般講演
17. 奥野昌二、中野元裕、松林玄悦、荒川隆一、和田芳直 MALDI および DIOS における顔料の還元 第 52 回質量分析総合討論会 2004.6.4 名古屋 一般講演
18. DIOS-MS による PPG 混合物の定量 奥野昌二、荒川隆一、和田芳直 第 52 回質量分析総合討論会 2004.6.4 名古屋 一般講演
19. 関谷禎規、和田芳直、田中耕一 窒素元素同位体 ^{15}N を用いたアミド化による酸性アミノ酸含有ペプチドの MS/MS fragment ion coverage の向上 第 52 回質量分析総合討論会 2004.6.4 名古屋 ポスター

公開資料

20. Nakamura, O. "Relationships Between Fetal Loss and IGF-I Overexpression during Murine Implantation" 24th Annual Meeting of the American Society For Reproductive Immunology, 2004. 6.5 St Louis MO, USA 一般講演
21. Wada Y, Tajiri M, Yoshida S. "Hydrophilic affinity isolation and MALDI multiple tandem MS of glycopeptides for glycoproteomics" Human Disease Glycomics/Proteome Initiative, 1st Workshop 2004 2004.8.23 大阪 招待講演
22. Sekiya S, Wada Y, Tanaka K. "New method for stabilization of sialic acid" Human Disease Glycomics/Proteome Initiative, 1st Workshop 2004 2004.8.23 大阪 招待講演
23. 和田芳直、田尻道子. ペプチドマスフィンガープリントの成功率を上げるためのいくつかの考察－薄いゲルの利点とその作製法－ 日本医用マススペクトル学会年会 2004.9.10 出雲 一般講演
24. 和田芳直、奥野昌二. DIOS-MS によるサリチル酸定量－ハイスルーブット薬剤血中濃度測定をめざして－ 日本医用マススペクトル学会年会 2004.9.9 出雲 一般講演
25. 吉田周美、和田芳直. 安定同位体を用いたマウス胎盤のコレステロール移行解析－1－ 日本医用マススペクトル学会年会 2004.9.9 出雲 一般講演
26. 田尻道子、吉田周美、和田芳直. グリコプロテオームを指向する糖鎖・ペプチド構造解析法. 日本医用マススペクトル学会年会 2004.9.9 出雲 一般講演
27. 奥野 昌二・荒川 隆一・和田 芳直, "MALDI-MS/MS によるポリエーテルの解析 " 日本分析化学会第 53 回年会 2004.9.1 千葉 一般講演
28. Y. Wada "Hydrophilic affinity isolation and MALDI MS of glycopeptides for elucidation of site-specific glycan structures of glycoprotein" The HUPO 3rd Annual World Congress 2004.10.27 北京 招待講演
29. Y. Wada "To open the era of molecular mass diagnostics" International Symposium on Stereodynamics of Chemical Reactions 2004 2004.10.30 大阪 特別セッション招待講演
30. 和田芳直、岡本伸彦、谷口直之. 糖タンパク質糖鎖合成障害 C D G の分子診断プログラム. 第 1 回近畿先天代謝異常症研究会. 2005.6.25 : 大阪 一般講演
31. 和田芳直. 比較グライコプロテオミクス／疾患グライコプロテオミクス. 日本ヒトプロテオーム機構第 3 回大会. 2005.8.1 : 横浜 シンポジウム
32. Wada Y, Kondo A, Narimatsu H, Nakamura K, Taniguchi N. HGPI pilot study on the analytical method of glycans. 4th HUPO, Munich, Germany. 2005.8.28
33. 和田芳直. MS 診断法を創る－わが国発の HUPO 活動 HGPI など－. 第 30 回日本医用マススペクトル学会年会. 2005.9.9 : 大阪 会長講演
34. 田尻道子、吉田周美、和田芳直. グリコプロテオームを指向する糖鎖・ペプチド構造解析法－その 2－. 第 30 回日本医用マススペクトル学会年会. 2005.9.9 : 大阪 一般講演

②ポスター発表 (国内 36 件、海外 15 件)

交久瀬グループ (国内 9 件、海外 1 件)

1. 柴欧樹¹、豊田岐聡²、市原敏雄²、石原盛男²、交久瀬五雄² (¹CREST, ²大阪大学大学院理学研究科)、内分泌かく乱物質測定用 GC-MS の性能評価、第 50 回質量分析総合討論会 (2002) (平成 14 年 5 月 15 日 - 17 日)、京都工芸繊維大学 (発表は 5 月 16 日、2-P-12)
2. 柴欧樹¹、豊田岐聡²、市原敏雄²、石原盛男²、交久瀬五雄² (¹CREST, ²大阪大学大学院理学研究科)、内分泌かく乱物質測定用 GC-MS の開発、第 50 回質量分析総合討論会 (2002) (平成 14 年 5 月 15 日 - 17 日)、京都工芸繊維大学 (発表は 5 月 17 日、3-01-05)
3. Hiroki Sakae (CREST), Michisato Toyoda (Osaka University), Morio Ishihara (Osaka University), Itsuo Katakuse (Osaka University), Development of GC-MS with an Array Detector System for Endocrine Disruptor Measurements, The 50th ASMS Conference

on Mass Spectrometry and Allied Topics (平成 14 年 6 月 2 日 - 6 日), Marriott World Center, Orlando, Florida, USA (発表は 6 月 4 日, TPP394)

4. 豊田岐聡¹⁾、榮 欧樹²⁾、市原敏雄¹⁾、石原盛男¹⁾、交久瀬五雄¹⁾ (¹⁾ 大阪大学大学院理学研究科、²⁾ 科学技術振興事業団)、Development of a High Sensitivity Gas Chromatograph Mass Spectrograph with a CCD Array Detector、第 51 回質量分析総合討論会、独立行政法人産業技術総合研究所 (つくば本部・つくばセンター)、平成 15 年 5 月 14 日 1-P-47
5. 稲葉健夫、西口 克、豊田岐聡、榮 欧樹、市原敏雄、石原盛男、交久瀬五雄、位置検出器を用いた高感度ガスクロマトグラフ質量分析機器の開発Ⅱ、第 52 回質量分析総合討論会、名古屋、2004. 6. 4、ポスター (大阪大学大学院理学研究科・CREST)
6. 交久瀬五雄、豊田岐聡、石原盛男、市原敏雄、榮欧樹、内分泌かく乱物質測定用高感度ガスクロマト質量分析計の開発、「内分泌かく乱物質」第 6 回領域シンポジウム、品川、2005. 9. 21
7. 豊田岐聡¹⁾、A. E. Giannakopoulos²⁾、A. W. Colburn²⁾、P. J. Derrick²⁾、交久瀬五雄¹⁾、(¹⁾ 大阪大学大学院理学研究科、²⁾ Department of Chemistry, University of Warwick, UK)、マルチターン・タンデム飛行時間型質量分析計の開発、「内分泌かく乱物質」第 6 回領域シンポジウム、品川、2005. 9. 21
8. 市原敏雄、内田智、豊田岐聡、石原盛男、交久瀬五雄、超小型ポータブル多重周回飛行時間型質量分析計 'MULTUM S' の開発、「内分泌かく乱物質」第 6 回領域シンポジウム、品川、2005. 9. 21
9. 西口克、豊田岐聡、石原盛男、交久瀬五雄、月・惑星探査用小型二重収束質量分析器の開発、「内分泌かく乱物質」第 6 回領域シンポジウム、品川、2005. 9. 21
10. 石原盛男、宮村拓也、豊田岐聡、交久瀬五雄、マルチターン飛行時間型質量分析計の質量決定法、「内分泌かく乱物質」第 6 回領域シンポジウム、品川、2005. 9. 21

赤松グループ (国内 2 件、海外 1 件)

1. Masahiro Miyashita^{1), 2)}、Takahiro Shimada¹⁾、Shizuka Nakagami²⁾、Norio Kurihara³⁾、Hisashi Miyagawa¹⁾、Miki Akamatsu^{1), 2)} 1) Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan 2) CREST, Japan Science and Technology Corporation 3) Koka Laboratory, Japan Radioisotope Association, Shiga 520-3403, Japan, Evaluation of estrogen receptor affinity of DDT related compounds and their metabolites, 第 3 回環太平洋農薬科学会議, ホノルル, ハワイ, 2003 年 6 月 1-4 日
2. 宮下正弘、島田誉弘、中神静香、赤松美紀、DDT 類縁体の生体内代謝によるエストロゲン受容体結合活性の変化、「内分泌かく乱物質」第 6 回領域シンポジウム、品川、2005. 9. 21
3. 島田誉弘、宮下正弘、赤松美紀、メトキシクロル代謝物のエストロゲン受容体結合活性、「内分泌かく乱物質」第 6 回領域シンポジウム、品川、2005. 9. 21

上野グループ (国内 2 件、海外 0 件)

1. 島田智巳、東條元昭、上野民夫. 藻菌類の遊走子を用いた内分泌かく乱物質の簡易検定法、「内分泌かく乱物質」第 6 回領域シンポジウム、品川、2005. 9. 21 (講演要旨集 55 ページ)
2. 横尾涼子、上野民夫(2005). ピレスロイドのマススペクトロメトリー、内分泌かく乱物質、「内分泌かく乱物質」第 6 回領域シンポジウム、品川、2005. 9. 21 (講演要旨集 56 ページ)

和田グループ (国内 23 件、海外 13 件)

1. 金子理奈. チオール基定量の意義. 第 27 回 BMS コンファレンス, 00.7 : 神戸, 進歩講座

2. 平原幸恵、杉山紀之、本家孝一、和田芳直. 硫酸化糖脂質セミノリピドは精子形成に必須である. 第 21 回日本糖質学会, 00.7 : 名古屋
3. 平原幸恵、杉山紀之、本家孝一、和田芳直. 精子形成における硫酸化糖脂質セミノリピドの役割. 第 73 回日本生化学会, 00.10 : 横浜
4. 大門江津子、石川元春、和田芳直、関口清俊. ヒトとマウスの子宮内膜におけるインテグリン $\beta 3$ の発現. 第 46 回日本不妊学会, 00.11 : 東京
5. Kaneko R, Wada Y. Repertoire of thio-presenting proteins in human plasma. 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 01.5 : 米国シカゴ
6. 金子理奈、和田芳直. ヒト血清アルブミン Cys34 チオール基の生理的状态. 第 49 回質量分析総合討論会, 01.06 : 東京
7. Wada Y, Kaneko R. Major thiol-bearing proteins in human plasma, Fifth International Symposium on Mass Spectrometry in the Health & Life Sciences: Molecular & Cellular Proteomics, 01.08 : 米国サンフランシスコ
8. 西内涼子、村山 洋、顧 建国、藤原裕展、川上 徹、相本三郎、和田芳直、関口清俊. ラミン結合性インテグリンの精製とリガンド結合特異性の解析. 第 74 回日本生化学会大会, 01.10 : 京都
9. 金子理奈、和田芳直. ニトロソ化タンパク質の質量分析. 第 50 回質量分析総合討論会, 2002. 5 : 京都
10. 和田芳直、角谷真知子. インゲル消化ペプチドマスフィンガープリント法におけるリジン特異的切断酵素の利用. 第 50 回質量分析総合討論会, 2002. 5 : 京都
11. R. Kaneko, Y. Wada. Investigation of S-nitrosoproteins by Mass Spectrometry. 50th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2002. 6: Orlando
12. 金子理奈、和田芳直. ニトロソ化タンパク質の質量分析—第 2 報—. 第 51 回質量分析総合討論会, 2003. 5 : 筑波
13. 和田芳直、金子理奈. 血中タンパク質の混合ジスルフィド形成におけるニトロシル化経路. 第 51 回質量分析総合討論会, 2003. 5 : 筑波
14. Okuno S, Nakano M, Matsubayashi G, Arakawa R, Wada Y. Reduction of organic dyes in matrix-assisted laser desorption/ionization and desorption/ionization on porous silicon. 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry, Nashville TN, USA; 2004.5.24
15. Tajiri M, Wada Y. Systematic analysis of glycan and peptide backbone of glycopeptides with MALDI QITTOFMS. 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry, Nashville TN, USA; 2004.5.26
16. Improvement of MS/MS fragment ion coverage of the peptide including acidic residues by amidation with amine constituent composed of ^{15}N . ASMS Conference on Mass Spectrometry, Nashville TN, USA; 2004.5.27
17. Tanaka K, Fukuyama Y, Wada Y, Ojima N, Yamazaki Y, Yamada M. A new analytical method for glycoprotein structure analysis using MALDI QIT-TOFMSⁿ: an application to ribonuclease B. 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry, Nashville TN, USA; 2004.5.27
18. 田尻道子、和田芳直. グリコプロテオームにおける糖ペプチドの MALDI QITTOFMS による糖鎖/ペプチド系統的配列解析. 第 52 回質量分析総合討論会 2004.6.3 名古屋
19. 和田芳直、田尻道子. 泳動ゲル分離タンパクの同定感度と精度を改善するいくつかの試み—薄層アクリルアミドゲルなど— 第 52 回質量分析総合討論会 2004.6.4 名古屋
20. 荒川隆一、奥山洋平、奥野昌二、和田芳直、右手浩一 MALDI-PSD および MS/MS によるアクリル樹脂の解析 第 52 回質量分析総合討論会 2004.6.2 名古屋
21. 奥野昌二、荒川隆一、和田芳直 サブマイクロメーターオーダーの構造を持つ試料板におけるマトリックスレスイオン化 第 52 回質量分析総合討論会 2004.6.2 名古屋
22. 奥野昌二、岡邦彦、和田芳直、荒川隆一 DIOS におけるフェロセン誘導体の酸化 第 52 回質量分析総合討論会 2004.6.2 名古屋
23. 田中耕一、福山裕子、和田芳直、尾島典行、山崎雄三、山田真希 MALDI-QIT-TOF MSⁿ

公開資料

- を用いた糖蛋白質の構造解析：リボヌクレアーゼ B への適用 第 52 回質量分析総合討論会 2004.6.3 名古屋
24. 田尻道子、吉田周美、和田芳直. 効率的グリコプロテオーム解析手法とその応用、第 53 回質量分析総合討論会 (2005)、さいたま、2005.5.26
 25. 田尻道子、奥野昌二、竹田康弘、和田芳直. シアル酸含有糖鎖・糖脂質分析におけるカチオン化マトリックスの効用、第 53 回質量分析総合討論会 (2005)、さいたま、2005.5.26
 26. 関谷禎規、和田芳直、田中耕一. 新規シアル酸安定化修飾法、第 53 回質量分析総合討論会 (2005)、さいたま、2005.5.26
 27. 田中勝啓、竹中重雄、津山伸吾、和田芳直. FT-ICR-MS によるアミノ酸置換の解析、第 53 回質量分析総合討論会 (2005)、さいたま、2005.5.27
 28. 和田芳直、角谷真知子. 糖タンパク質糖鎖合成異常症 CDG 診断法の構築—HUPO イニシアティブ・フィールド活動、第 53 回質量分析総合討論会 (2005)、さいたま、2005.5.27
 29. Okuno S.; Arakawa R, Okamoto K, Matsui Y, Seki S, Kozawa T, Tagawa S, Wada Y. Matrix-free laser desorption/ionization of peptides on sub-micrometer structures : grooves on silicon and metal-coated porous alumina. 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry, San Antonio Tx, USA; 2005.6.6.
 30. Sekiya S, Wada Y.; Tanaka K. Novel derivatization for stabilizing sialic acids in MALDI-MS. 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry, San Antonio Tx, USA; 2005.6.9.
 31. Takeuchi T, Akiuchi S, Kiyama R, Tajiri M, Wada Y. Theoretical Study on the Fragmentation Mechanisms in Protonated and Sodium-adducted Cations of Glycopeptides Using Molecular Orbital Methods. 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry, San Antonio Tx, USA; 2005.6.9.
 32. Tanaka K. Takenaka S, Tsuyama S, Wada Y. Precise measurements of peptide mass shift by FT-ICR-MS uniquely determine the type of amino acid substitution. 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry, San Antonio Tx, USA; 2005.6.9.
 33. Tajiri M, Yoshida S, Wada Y. An efficient method of elucidating site-specific glycan heterogeneities in very large glycoproteins. 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry, San Antonio Tx, USA; 2005.6.8.
 34. Tajiri M, Yoshida S, Wada Y. Characterization of site-specific glycans of large glycoproteins, fibronectin and apolipoprotein B-100, using a method of hydrophilic affinity isolation of glycopeptides and maldi mass spectrometry. 4th HUPO, Munich, Germany. 2005.8.27
 35. 渋川幸直、山崎奈津子、和田芳直、ダイオキシン受容体の新規会合分子の探索、「内分泌かく乱物質」第 6 回領域シンポジウム、品川、2005.9.21
 36. 和田芳直、プロテオームを高感度化するための改良型アクリルアミドゲル電気泳動、「内分泌かく乱物質」第 6 回領域シンポジウム、品川、2005.9.21

(3) 特許出願

①国内出願 (1 件)

1. 発明の名称：イオンビーム用像縮小レンズ系、イオンビーム用ズーム装置、及び質量分析装置

発明者：石原盛男、豊田岐聡、交久瀬五雄

出願人：財団法人新産業創造研究機構

出願日：平成14年6月

出願番号：特願2002-157152

その他 0 件

②海外出願 (0 件)

その他 0 件

公開資料

(4) 受賞等

① 受賞

Masahiro Miyashita, Poster Award, 1st prize:
第3回環太平洋農薬科学会議, ホノルル, ハワイ, 2003年6月

② 新聞報道 なし

③ その他 なし

(5) その他特記事項 なし

6 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
14. 12. 20	途中経過報告会	大阪大学 共通教育物 理学棟 物理談話室 (264号)	10人	3グループの研究の進歩状 況を報告し、お互いにサポ ートする方法を討論した。

(2) 招聘した研究者等 なし

7 結び

磁場型質量分析計はすでに数十年の歴史を持った完成された技術であるといわれているが、近年のデジタル技術の発展により測定器を新規のものにすることによってますます高感度になると思われる。現在、本装置の分解能はMCPの大きさによって制限されているが、今後2-3年で開発されると予想される7 μ mの位置分解能を持つMCPが開発されるとスリット検出器と同等の分解能が得られる。また感度が1桁上がると今まで見えてこなかったメモリー効果、カラムバックの問題や試薬に含まれている不純物等の1-2つの研究室では解決できない問題が見えてきた。

このプロジェクトが始まったころは“環境ホルモン”がマスコミの話題にならない日はなかったが、最近下火になってきているのが残念である。しかし、この問題は現に今生きているヒトの問題だけでなく将来生まれてくる子供たちの問題であるという点で重要である。各自治体にも質量分析計が行き渡り、質量分析計を作っているメーカーも新規装置にあまり興味を示さないのが残念である。しかしながら、この高感度質量分析計はボトムアッププロテオームに力を発揮するであろうし、このプロジェクトで開発された技術は宇宙科学、半導体工学や生命科学に役立つと期待している。

私たちのグループは物理家であり、生体内の生理活性や作用等については素人であります。しかし測定器としてのハードウェアの開発も重要であると思うし、われわれのグループがこの分野で少しでも役に立つことが出来て幸いに思う。

最後に、このような毛色の違ったグループを取り上げていただいた鈴木先生はじめ他のアドバイザーの先生、JST事務所の方々、本部の方々に深く感謝申し上げます。ただ1つ残念なことは宮本先生が途中でなくなられたことで、この結果を報告できなかったことです。