

## 薬学研究科・生体分子解析学研究室

### 1. 研究課題名

「ステロイド骨格を有する生理活性物質の体内動態解析に基づいた創薬研究」

### 2. 研究メンバー

池川繁男 近畿大学薬学部生体分子解析学研究室・教授  
三田村邦子 近畿大学薬学部生体分子解析学研究室・准教授  
堺 俊博 ハイテクリサーチセンター・研究支援者

### 3. 研究成果

2002年のノーベル賞は、「生体分子の同定および構造解析のための手法の開発」であり、このうち、「生体高分子の質量分析法の開発」は、John B. Fenn氏および田中耕一氏によるものである。両氏が開発したエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization、ESI) 法およびソフトレーザー脱離イオン化 (soft laser desorption) 法は、いずれも難揮発性かつ不安定なタンパク質をイオンとして気相中に取り出すことを可能とし、タンパク質の解析技術を飛躍的に向上させた。今日では、プロテオーム、メタボローム、トランスクリプトームなど、オーム研究に必須の分析法であり、医薬品開発における各種化合物の構造解析や薬物動態研究に有力な手段となっているばかりか、各種疾患関連分子の分析にもとづく化学診断、癌の早期発症メカニズムの解明など様々な場面で貢献している。

我々は、医学との接点における薬学という観点から、ステロイド骨格を有する胆汁酸、コルチコステロイド、オキシステロールなどの生理活性物質を対象に取り上げ、病因の解明、病態の解析に向けた体内動態の質量分析法による解析と、得られた知見を基にした創薬研究に取り組んだ。

#### 3-1. 胆汁酸の体内動態解析に基づいた肝・胆・消化機能改善薬としてのプロドラッグの創製

近年、胆汁酸の腸肝循環に関わる分子生物学が大きく進展し、胆汁酸による核内受容体を介する代謝酵素や輸送タンパク質の発現、さらには胆汁酸をリガンドとする G タンパク質共役型受容体による細胞内情報伝達機構など、胆汁酸が“chemical messenger”としての機能を持つシグナル分子であることが明らかにされ、胆汁酸を標的とするタンパク質との分子間相互作用に着目した癌や生活習慣病に対する新規医薬品の創製が活発に進められている。その一方では、胆汁うっ滞や各種消化器癌における胆汁酸輸送タンパク質の発現異常や遺伝的欠損、胆汁酸の代謝活性中間体によるタンパク質付加体の生成など、異常タンパク質の出現が肝胆道疾患と深く関わることも指摘されている。我々は、こうした胆汁酸に関する周辺学問領域の進展を見据えながら、胆汁酸の体内動態解析を進めるとともに、得られた知見を基にした肝・胆・消化機能改善薬の創製研究に着手した。

##### 3-1-1. 肝細胞内リトコール酸-タンパク質共有結合付加体の捕捉と構造解析

胆汁酸は、腸肝という閉鎖的な系内を循環し、かつ厳密な調節を受けて腸管からの脂質の吸収に重要

な役割を果たしている。そのほとんどは側鎖カルボキシル基におけるグリシン、タウリンなどのアミノ酸との抱合体として存在しているが、ステロイド核上水酸基を介するエーテルグルクロニドや *N*-アセチルグルコサミニド、硫酸エステルのほか、24位カルボキシル基を介するエステル型グルクロニドの存在も知られる。エステル型グルクロニドの生成は、すでに $\alpha$ -アリールプロピオン酸系抗炎症薬をはじめ、分子内にカルボキシル基を有する多くの薬物でも知られており、本グルクロニドを前駆体とする薬物修飾タンパク質の生成がアレルギー疾患の一因と考えられている。胆汁酸についてもエステル型グルクロニドや、アミノ酸抱合における代謝活性中間体であるアシルアデニレートがタンパク質のアミノ基と反応して共有結合付加体を与える。こうした胆汁酸が結合したタンパク質は、最も脂溶性の高い胆汁酸であるリトコール酸 (LCA) が肝細胞内のタンパク質に結合した付加体として存在することが示され、肝障害と深く関わることを推測されている。このため、肝疾患時における LCA-タンパク質共有結合付加体 (LCA protein adduct: LPA) の存在を明らかにし、それらの精密構造を解析することが病因を解明し、病態を把握する上で重要となる。そこで、胆管結核ラットを胆汁うっ滞のモデルとして取り上げ、肝細胞内の LPA の捕捉と構造解析を試みた。すなわち、LPA の分子表面に露出したステロイド核に相補的で特異性を有するポリクローナル抗体を作成

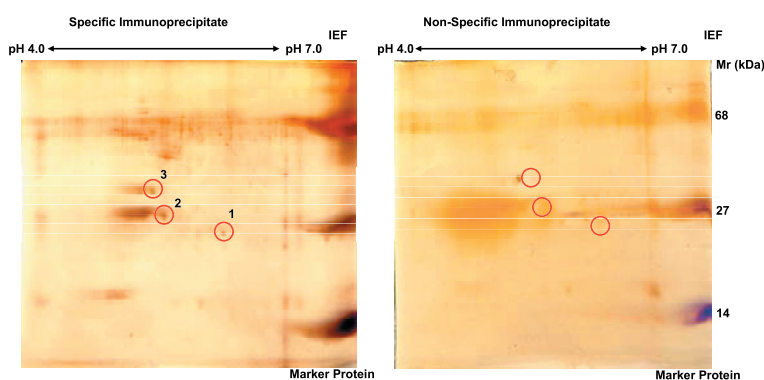


Fig. 1 Two-dimensional pattern of (left) specific immunoprecipitates and (right) nonspecific immunoprecipitate

し、これを用いて肝臓内の LPA を免疫沈降反応によって捕捉した。引き続き、2次元電気泳動 (2-DE) でタンパク質を展開・分離し、銀染色後の泳動パターンをコントロールとのディファレンシャルディスプレイによって吟味した。その結果、細胞質画分に再現性のよい3つのタンパク質のスポットが認められ (Fig. 1)、これらを切り出して DTT による S-S 結合の還元とヨードアセトアミドによるアルキル化を行い、トリプシンによる限定分解後、得られたペプチド混合物を MALDI-TOFMS 分析に付し、LCA の質量数を加味しながらデータベース検索 (<http://prospector.ucsf.edu/>) を試みた。その結果、スポット1のタンパク質は Rab-3と M-Ras、スポット2は Rab-3と Rab-16、スポット3は Rab-3、Rab-12と Rab-16のリシンまたはアルギニン残基に LCA が1分子または2分子結合した LPA であることが判った (Table 1)。因みに、いずれのスポットにも LCA 修飾 Rab-3の存在が認められたが、これは、LCA の結合数や結合位置が異なるため、分子量や等電点の異なる LCA 修飾タンパク質が2-DE 上で異なる位置に展開・分離されたものと推測される。

Rab は、GTPase 活性を有する G タンパク質の一種であり、細胞内ではタンパク質の輸送に深く関わっている。こうした Rab が LCA によって修飾されると、タンパク質の輸送機能が低下して肝細胞の機能が損なわれ、各種肝疾患を惹起するものと推測される。今回同定した LCA 修飾 Rab は、肝疾患に対する補完代替型医薬品を開発してゆく上で、有効性と安全性を評価する有用なバイオマーカーになることが期待される。

Table 1 Calculated and observed ions of trypsin digests of reduced and alkylated proteins

Spot No.	Protein name	Peak No	Amino acid sequence		Sequence	m/z [M+H] <sup>+</sup>	
			From	To		Calculated	Observed
1	Rab-3 (33.5) <sup>a)</sup>	1	84	93	YRTITTAYYR	1307.7	1308.1
		2	13	24	DAADQNFDYMFK	1464.6	1463.9
		3	122	136	TYSWDNAQVILVGNK	1707.9	1707.8
		4	63	70	TVYR*HDK*R or VYR*HDKR* or TVYRHDK*R*	1791.2	1792.2
		5	84	93	YR*TITTAYYR*	2024.2	2022.9
		6	187	219	M <sup>†</sup> NESLEPSSSPGSGNGKGPALGDTPPPQPSSC <sup>#</sup> GC <sup>#</sup>	3315.4	3314.1
	M-Ras (43.2) <sup>a)</sup>	1'	106	112	FHQLILR	926.6	972.4
		2'	136	147	VTRDQGGKEMATK	1379.7	1379.8
		3'	128	138	VDLM <sup>†</sup> HLRKVTR	1383.9	1383.7
		4'	148	158	YNIPYIETSAK*	1656.9	1658.5
		5'	194	202	GDR*ATGTHK*	1659.1	1658.5
		6'	128	138	VDLM <sup>†</sup> HLR*KVTR or VDLM <sup>†</sup> HLRK*VTR or VDLM <sup>†</sup> HLRKVTR*	1742.1	1741.7
2	Rab-3 (43.8) <sup>a)</sup>	1	84	93	YRTITTAYYR	1307.7	1308.8
		2	122	136	TYSWDNAQVILVGNK	1707.9	1708.8
		3	63	70	TVYR*HDK*R/VYR*HDKR* or TVYRHDK*R*	1791.2	1792.5
		4	73	85	LQIWDTAGQER*YR or LQIWDTAGQERYR*	1994.1	1994.1
		5	84	93	YR*TITTAYYR*	2024.2	2023.7
		6	42	60	YADDSFTPAFVSTVGIDFK	2080.0	2081.4
		7	187	219	M <sup>†</sup> NESLEPSSSPGSGNGKGPALGDTPPPQPSSC <sup>#</sup> GC <sup>#</sup>	3315.4	3313.5
	Rab-16 (46.1) <sup>a)</sup>	1'	63	72	YRTITTAYYR	1307.7	1308.8
		2'	101	115	TYSWDNAQVILVGNK	1707.9	1708.8
		3'	42	49	TVYR*HDK*R or VYR*HDKR* or TVYRHDK*R*	1791.2	1792.5
		4'	52	64	LQIWDTAGQER*YR or LQIWDTAGQERYR*	1994.1	1994.1
		5'	63	72	YR*TITTAYYR*	2024.2	2023.7
3	Rab-12 (44.8) <sup>a)</sup>	1	81	88	ETFDDLK*	1322.7	1321.6
		2	142	152	DNFNVDEIFLK	1353.7	1352.6
		3	15	25	FTDDTFC <sup>#</sup> EAC <sup>#</sup> K	1393.5	1394.1
		4	81	91	ETFDDLKWM <sup>†</sup> K	1425.7	1427.0
		5	126	134	FAQQITGM <sup>†</sup> R*	1425.8	1427.0
		6	80	88	K*ETFDDLK or KETFDDLK*	1450.8	1451.2
		7	96	109	YASEDAELLAGNK	1493.7	1494.5
		8	117	125	EISR*QQGEK*	1791.1	1792.5
		9	96	116	YASEDAELLAGNKLDCESTR	2383.1	2384.9
		10	153	167	LVDDILK*K*M <sup>†</sup> PLDVLR or LVDDILK*KM <sup>†</sup> PLDVLR* or LVDDILK*KM <sup>†</sup> PLDVLR*	2500.6	2502.2
		Rab-3 (44.7) <sup>a)</sup>	1'	84	93	YRTITTAYYR	1307.7
2'	153		167	LAGDLGFEFFESAK	1601.8	1602.2	
3'	122		136	TYSWDNAQVILVGNK	1707.9	1707.5	
4'	63		70	TVYR*HDK*R or TVYR*HDKR* or TVYRHDK*R*	1791.2	1792.5	
5'	25		41	LLIGNSSVGK*TSFLFR or LLIGNSSVGKTSFLFR*	2210.4	2212.4	
6'	187		219	M <sup>†</sup> NESLEPSSSPGSGNGKGPSLGDTPPPQPSSC <sup>#</sup> GC <sup>#</sup>	3315.4	3314.3	
Rab-16 (47.1) <sup>a)</sup>	1''	63	72	YRTITTAYYR	1307.7	1308.6	
	2''	132	146	LAGDLGFEFFESAK	1601.8	1602.2	
	3''	101	115	TYSWDNAQVILVGNK	1707.9	1707.7	
	4''	42	49	TVYR*HDK*R or TVYR*HDKR* or TVYRHDK*R*	1791.2	1792.5	
	5''	4	20	LLIGNSSVGK*TSFLFR or LLIGNSSVGKTSFLFR*	2210.4	2212.4	
	6''	166	198	M <sup>†</sup> NESLEPSSSPGSGNGKGPSLGDTPPPQPSSC <sup>#</sup> GC <sup>#</sup>	3315.4	3314.3	

\* Presumed binding site of LCA; <sup>†</sup> Oxidated; <sup>#</sup> Carbamoylmethylated

a) % of covered amino acids

### 3-1-2. LPA のモデフィコプロテオミクスに用いる分子標的機能性基材の創製

上述したポリクローナル抗体は、抗原分子が持つ複数個の抗原決定基に対して、種々の抗体産生細胞から分泌される様々な特異性をもつ分子種の異なる抗体集団である。このため、一つの免疫原に対して複数個の抗体が反応でき、強い結合能力があるが、血清から得ているため供給量に限度がある。一方、モノクローナル抗体は、均一の抗体分子であり、ハイブリドーマを培養することで半永久的に同一品質の抗体を得ることができ、供給量に限度があるというポリクローナル抗体の短所を克服できる。しかも、免疫原に対する特異性はポリクローナル抗体よりも高い。そこで、LPA のモデフィコプロテオミクスに用いる分子標的機能性基材の創製を目的として抗LCAモノクローナル抗体を調製することとした。すなわち、先に

考案したLCAの24位カルボキシル基を介する6-アミノカプロン酸誘導体と牛血清アルブミンとの結合物をBALB/cマウスに繰り返し免疫し、その脾細胞をSP2/0ミエローマ細胞と融合させ、HAT選択を経てLCAの特異抗体産生株を樹立した。得られたモノクローナル抗体は、LCA-N<sup>α</sup>-BOC-lysineを用いる競合型ELISAにおいて、用量作用曲線が良好な感度 (midpoint:213 ng) を示した。また、LCA並びにそのアミノ酸誘導体とは高い交差反応性 (109.1 ~ 444.3%) を示す一方、近縁胆汁酸との反応性は5.9%以下であり、本抗体がLCAの母核構造をよく認識していることが判った (Table 1)。引き続き、LCAの代謝活性中間体であるLCAアシルアデニレートとリゾチームとの反応によって生成した付加体をイムノブロットによって検出した (Fig. 2)。その結果、付加体に由来する単一のバンドが認められ、本モノクローナル抗体がLCA-タンパク質共有結合付加体の検出に有用なことが判った。

今回調製した抗LCAモノクローナル抗体は、LCA修飾タンパク質を標的分子とするモデフィコプロテオミクスの有用なツールになるものと期待される。

### 3-1-3. グルタチオン抱合型胆汁酸の生成と胆汁排泄

高脂血症治療薬クロフィブリン酸や非ステロイド性抗炎症薬ナプロキセンなどの分子内にカルボキシル基を持つ酸性薬物では、生体内代謝によってエステル型グルクロニドやCoAチオエステルに誘導され、これらがグルタチオン (GSH) のチオール基と反応してチオエステル型GSH抱合体に変換され解毒排泄される。胆汁酸についても上述した活性代謝物とGSHとが反応してチオエステル型GSH抱合体に変換される代謝経路の存在が推察される (Fig. 3)。そこで、ヒト主要胆汁酸5種のGSH抱合体を合成し、これらの正及び負イオン検出ESI-MS/MSにおいて生成する特徴的イオンを明らかにするととも

Table 1 Binding ability of the monoclonal antibody as determined by competitive ELISA

Bile acid derivatives	Cross-reactivity <sup>a</sup> (%)
LCA-N <sup>α</sup> -BOC-Lysine	100
LCA	146.5
GLCA	109.1
TLCA	214.2
LCA-HS	444.3
UDCA	5.5
CDCA	2.1
DCA	5.9
CA	<0.01

<sup>a</sup>Calculated by the 50% displacement method

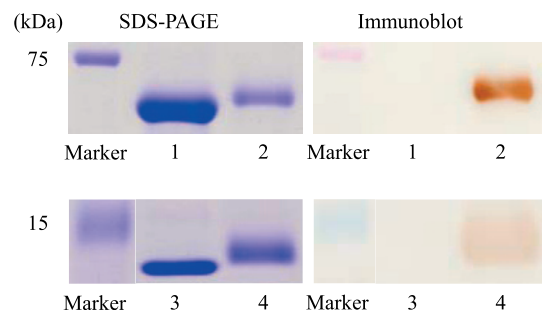


Fig. 2

SDS-PAGE and immunoblot analysis of LCA anchored on proteins. Lane 1, BSA; Lane 2, LCA-HA-BSA adduct; Lane 3, lysozyme; Lane 4, LCA-lysozyme adduct.

に、本法によってコール酸 (CA) の CoA チオエステル (CA-CoA) とアシルアデニレート (CA-AMP) が非酵素的のみならずグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ(GST)の作用を受けて GSH 抱合体に変換されることを明らかにした。また、肝毒性が知られる LCA と肝機能改善薬であるウルソデオキシコール酸 (UDCA) をラットに投与すると、これらが GSH 抱合体として胆汁中に排泄されることも実証し、胆汁酸の GSH 抱合という新規代謝経路の存在を示すことが出来た。

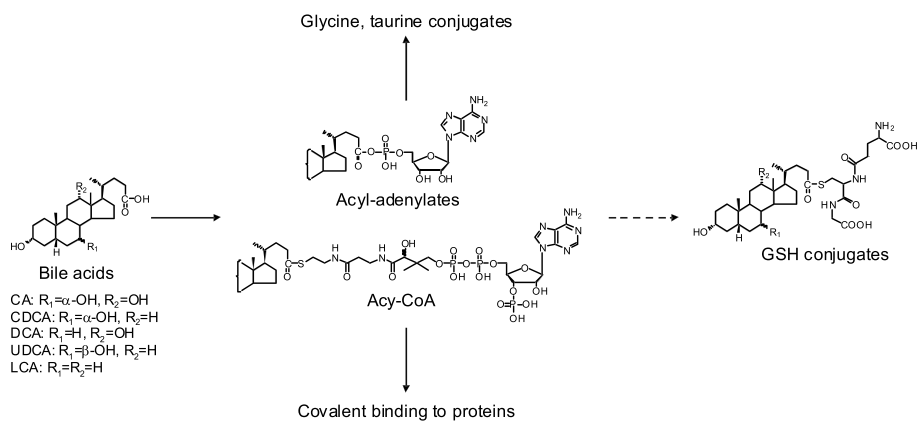


Fig. 3 Potential metabolic routes of bile acids and reactions of acyl-adenylates and acyl-CoA

### 3-1-4. 胆汁酸の *N*-アセチルシステイン抱合と尿中排泄

薬・毒物のGSH抱合体は、肝内あるいは腎内でγ-グルタミルトランスぺプチダーゼやジペプチダーゼによってシステイン抱合体に誘導された後、*N*-アセチルトランスフェラーゼの作用を受けて *N*-アセチルシステイン (NAC) 抱合体へと変換され、尿中に排泄されることが知られる。一方今日、NACはアセトアミノフェンを初めとする薬物性肝障害の解毒薬として用いられるばかりか、米国ではサプリメントとしても服用されている。このため、NACのチオール基の反応性を考えると、投与されたNACが胆汁酸の代謝活性中間体と反応して、NAC抱合型胆汁酸に変換され、尿中、胆汁中に排泄されることが推測される (Fig. 4)。そこで、ヒトにおける主要胆汁酸5種のNAC抱合体を合成し、LC/ESI-MS/MSによる高感度直接測定法を開発した。さらに、本法によって胆汁酸の代謝活性中間体が非酵素的のみならず、GSTの作用を受けてNAC抱合体に変換されるばかりか、胆汁うっ滞モデルラットにNACとLCAを投与すると、尿中にNAC抱合型LCAが排泄されることを明らかにした。

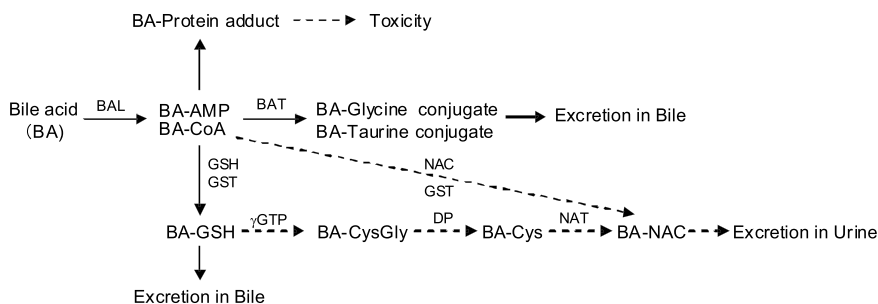


Fig. 4 Proposed scheme for the metabolic activation of bile acids followed by reaction of these activated bile acids with GSH and the pathway in the degradation of BA-GSH in vivo

BAL, bile acid:CoA ligase; BAT, bile acid:amino acid transferase; γGTP, γ-glutamyltranspeptidase; DP, dipeptidase; NAT, *N*-acetyltransferase

### 3-1-5. 肝・胆・消化機能改善薬としてのプロドラッグの開発

今日、バイオアベイラビリティの向上を目的として数多くのプロドラッグが開発され、臨床に適用されている。これらは、それ自身に薬理効果を持たないが、生体内で活性体に変換されて始めて作用を発現する。こうした体内変換に重要な役割を演じている加水分解酵素としてカルボキシルエステラーゼ (CES) が知られる。本酵素は、カルボン酸エステルをカルボン酸とアルコールに変換する酵素であり、肝をはじめとして小腸上皮細胞、腎、肺、脳、脂肪組織、筋肉など多くの臓器に発現しているばかりか血漿中にも存在する。このため、CES の加水分解能に着目したエステル型、アミド型、チオエステル型誘導体をプロドラッグとする開発研究が積極的に進められている。

一方今日、UDCA は肝機能改善薬として、また C 型慢性肝炎の治療薬として臨床で幅広く用いられている。しかしながら、UDCA は水に難溶性のため、錠剤、顆粒剤、散剤に限られ、胃の摘出患者、末期がん患者、消化機能低下時等の外科系の患者または手術直後の内服が困難な患者には投与できない。このため、水溶性に優れる UDCA

のプロドラッグの開発が強く求められてきた。先に合成した NAC 抱合型胆汁酸のうち、UDCA-NAC は、水溶性に富み、肝機能改善薬として用いられている UDCA と NAC がチオエステル結合したものである。このため、UDCA-NAC が CES によって加水分解を受けて、UDCA と NAC に分解されるとすれば、肝機能改善作用と解毒作用の2つの効果が期待できる。そこで、UDCA-NAC をプロドラッグとして開発すべく、CES による BA-NAC の加水分解反応を他の NAC 抱合型胆汁酸を含めて吟味した。

その結果、モノヒドロキシ体である LCA-NAC は、6時間インキュベートするとほぼ完全に加水分解され、ジヒドロキシ体である CDCA-NAC、UDCA-NAC 及び DCA-NAC は、インキュベート24時間後には90%が加水分解された。これに対して、トリヒドロキシ体である CA-NAC は、インキュベート24時間後においても40%が残存しており、最も加水分解されにくいことが判った (Fig. 5)。これらの知見は、UDCA-NAC が、肝・胆・消化機能改善薬としてのプロドラッグとして期待しうることを示すものである。

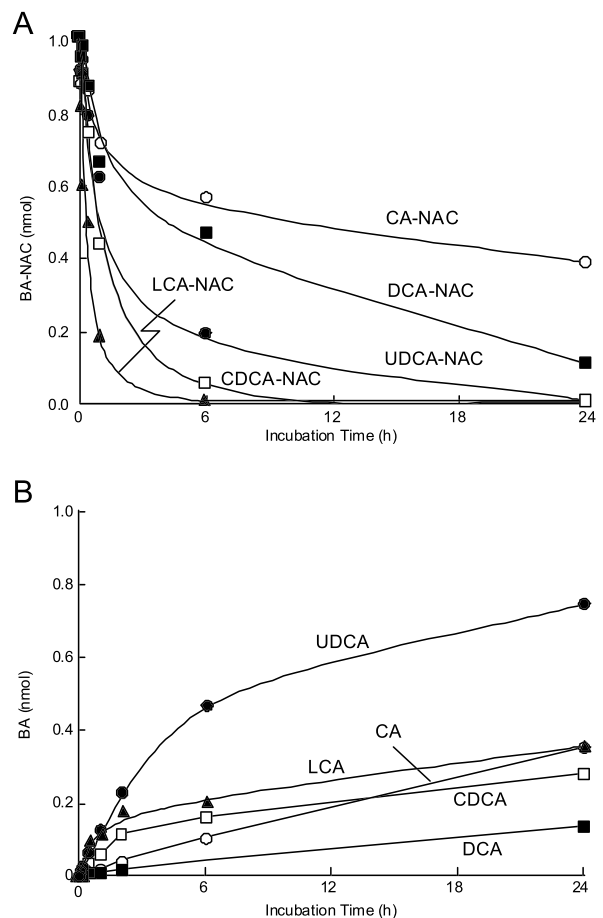


Fig. 5 Time course for hydrolysis of BA-NACs (A) and production of unconjugated BAs (B) by incubation with carboxylesterase isolated from rabbit liver. A mixture of 2  $\mu$ M each of CA-NAC ( $\circ$ ), CDCA-NAC ( $\square$ ), DCA-NAC ( $\blacksquare$ ), UDCA-NAC ( $\bullet$ ), and LCA-NAC ( $\blacktriangle$ ) was incubated with carboxylesterase (2 units) at 37°C for 24 h. Values represent the average of duplicate incubations.

### 3-1-6. ラット肝細胞内胆汁酸アシルアデニレート生成酵素の特性解析

胆汁酸の代謝活性中間体による胆汁酸修飾タンパク質の生成とGSH抱合を代謝反応の全貌として捉えるには、胆汁酸アシルアデニレートの生成を触媒する酵素の特性を明らかにすることが重要となる。そこで、CA、ケノデオキシコール酸 (CDCA)、デオキシコール酸 (DCA)、UDCA、LCAのカリウム塩を基質として用い、ラット肝細胞内のミトコンドリア、細胞質、ミクロソーム画分とインキュベートし、生成するアシルアデニレートをUV検出HPLCによって追跡した。その結果、ミクロソーム画分が最も高い活性を示し、また、酵素反応は至適pHが7.0付近であり、第3周期のMg<sup>2+</sup>を要求し、第4周期のCa<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>では酵素活性が著しく低下することが判った(Fig. 6)。

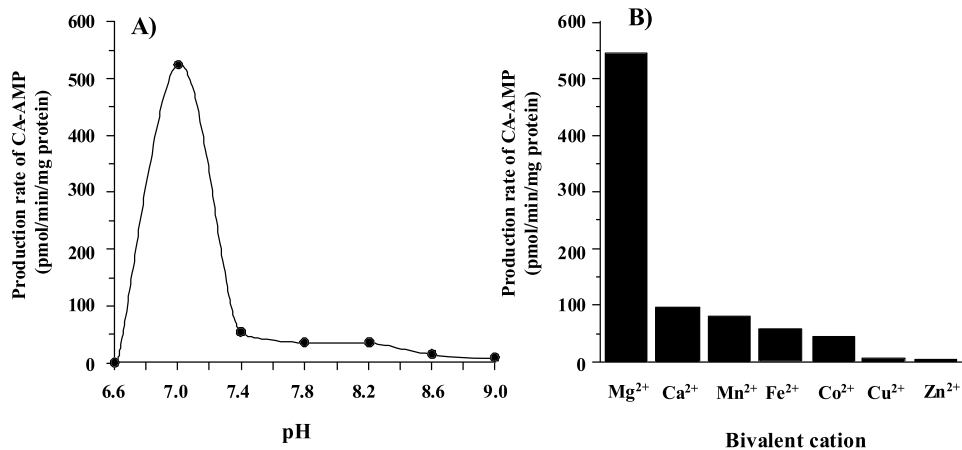


Fig. 6 Effect of (A) pH or (B) divalent cations on the formation of CA-AMP by the microsomal fraction.

CA (1 mM) was incubated with 250 µg of microsomal fraction at 37 °C for 30 min. Metal ions were added at a concentration of 21 mM.

引き続き、各胆汁酸の Michelis 定数 (Km) と最大速度 (Vmax) を Lineweaver-Burk プロットによって求めたところ、Km は CDCA (10.91) > UDCA (7.38) > DCA (7.25) > CA (5.76) > LCA (3.40)、Vmax (pmol/min/mg protein) は CA (318.0) > UDCA (256.2) > CDCA (224.7) > DCA (145.0) > LCA (31.3) であり、最も脂溶性の高い疎水性胆汁酸である LCA に対する親和性が最も高いことが判った (Table. 2)。さらに、CA-AMP 生成に及ぼす各種酸性化合物の影響に検討を加えたところ、近縁胆汁酸によって優位に阻害される一方、バルプロ酸およびイブプロフェンなどの薬物では殆んど阻害されず、脂肪酸であるパルミチン酸では 34% の阻害率を示した。これらの知見は、今後、胆汁酸のアシルアデニレートを前駆体とする各種アミノ酸並びにグルタチオンとの抱合反応とタンパク質付加体生成との関連を統合的に解析してゆく上で大きく役立つものと期待される。

Table 2 Apparent kinetic parameters for the acyl-AMP formations of bile acids in microsomal fraction

Bile acid	$K_m$	$V_{max}$	$V_{max}/K_m$
	(mM)	(pmol/min/mg protein)	
CA	5.8	318	55.2
CDCA	10.9	224	20.6
DCA	7.3	145	20.0
UDCA	7.4	256	34.7
LCA	3.4	31	9.2

Calculations of  $K_m$  and  $V_{max}$  values were performed using Lineweaver-Burk plot.

The values are expressed as the mean of triplicate determinations.

3-1-7. リトコール酸固定化アフィニティー担体を用いる疾患関連タンパク質の捕捉と構造解析  
 今日におけるプロテオーム研究では、生体分子間の特異的相互作用を利用したアフィニティークロマトグラフィー (AFC) が広く用いられ、組織・細胞内の膨大なタンパク質群からリガンド特異的なタンパク質を選択的に分離・精製するツールとして威力を発揮している。そこで本法の有用性に着目し、肝毒性や大腸癌発症のプロモーターとして知られる LCA を不溶性担体に固定化して用いる AFC によって、LCA に親和性を持つ肝細胞内の疾患関連タンパク質の捕捉と構造解析を試みた (Fig. 7)。

すなわち、LCA の 24-アミノブタン誘導体 (ligand 1) と 3 位アミノエチルエステル誘導体 (ligand 2) を、それぞれスクシンイミジル修飾アガロース (Affi-gel 10) に活性エステル法によって固定化し、これらを用いてラット肝細胞内ミトコンドリア画分のタンパク質を捕捉し、8 M 尿素 (A 液) と 7 M 尿素含有の 2 M チオ尿素 (B 液) でタンパク質を

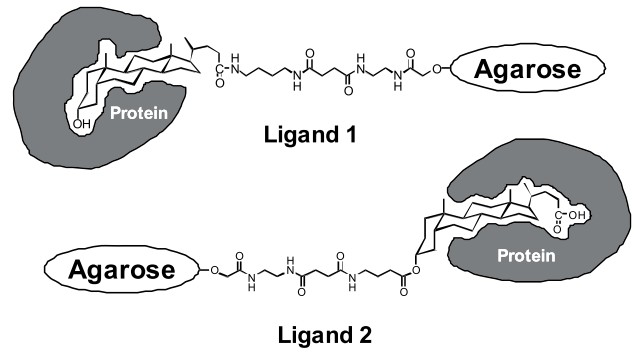


Fig. 7 Affinity extraction of specific proteins with immobilized LCA

順次溶出した。引き続き、非吸着画分と吸着画分を 12% SDS-PAGE で展開・分離後、特定した吸着画分のスポットを切り出し、還元アルキル化後、トリプシン分解して得られるペプチド混合物を LC/ESI-MS/MS 分析に付し、Bioworks Browser を用いてタンパク質を同定した。その結果、いずれの担体を用いても carbamoyl phosphate synthase I (CPSI) が再現性良く捕捉されることが判った。因みに、CPSI は LCA-24 位固定化担体からは A 液、B 液いずれを用いても溶出されるのに対して、LCA-3 位固定化担体からは B 液によってのみ溶出されることが判った。この結果は、担体表面に露出した LCA の部分構造に対する CPSI の親和力の差を反映したものである。

CPSI は、ミトコンドリア内で毒性の強いアンモニアをカルバモイルリン酸に変換する酵素である。LCA が本酵素に親和性を持つという今回得られた知見は、LCA によって CPSI の酵素活性が阻害されてアンモニアを蓄積して毒性を発現するという仮説の成立を示唆するものであり、CPSI と LCA との分子間相互作用に着目した新規肝機能改善薬の開発が期待される。

### 3-2. LC/ESI-MS/MS による硫酸抱合型オキシステロール高感度測定法の開発

コレステロールは、細胞膜の重要な構成成分であるばかりか、ステロイドホルモンや胆汁酸の合成原料ともなっているが、高脂血症や高コレステロール血症では重篤な動脈硬化性疾患をもたらす。動脈硬化巣には酸化 LDL が多量に存在し、特異的な受容体を介してそれらを際限なく取り込み、泡沫細胞化したマクロファージが動脈硬化症の進展に重要な役割を果たしているものと考えられている。酸化 LDL の中で最も多くみられるのは 27-hydroxycholesterol、7-ketocholesterol、7-hydroxycholesterol、5,6-epoxycholesterol などのオキシステロールである。我々は、7-ketocholesterol が 293T 細胞に強い毒性を示す一方、SULT2B1b によって硫酸抱合を受けてサルフェートに変換され細胞外に排出されることを明らかにするとともに、LC/ESI-MS/MS によって動脈硬化部位に 7-ketocholesterol sulfate が存在することを実証した。これらの知見を考え合わせると、アテローム性動脈硬化症を初めとする脂質代謝異常



症の病因、病態を解析する上で、硫酸抱合型オキシステロールの体内動態を解析することが重要な課題であり、これには的確な標品の確保と信頼度の高い高感度測定法が必須となる。そこで、ジオキシランによるコレステロール側鎖 C-25 位の遠隔水酸化をキー反応とする 25-並びに 26-ヒドロキシコレステロールの簡易合成法を開発するとともに、これらを原料として他のオキシステロールを含めて 3-サルフェート 6 種を標品として合成した。引き続き、これらオキシステロールサルフェートの同位体希釈 LC/ESI-MS による信頼度の高い一斉分析法を構築し、本法によってヒト血中にこれらサルフェートが 0.5 ~ 1250 ng/mL のレベルで存在することを明らかにした (Fig. 8)。

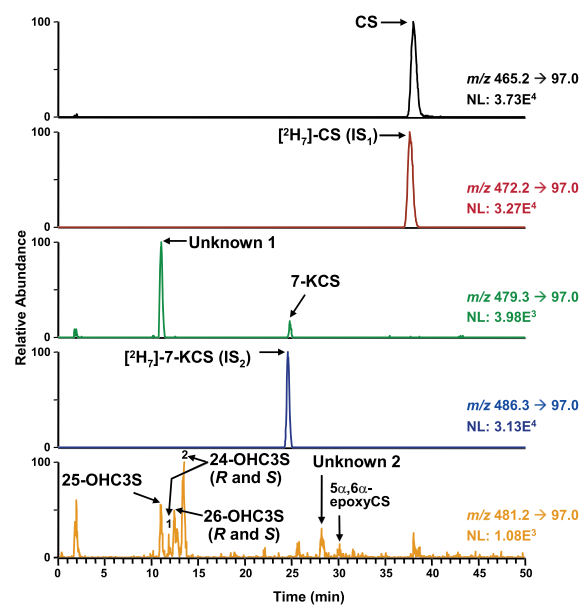


Fig. 8 Typical SRM chromatograms of CS and oysterol sulfates in human serum

### 3-3. LC/MS による内分泌代謝疾患の科学診断へのアプローチ

下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH, adrenocorticotrop hormone) の支配下に副腎皮質の束状層から分泌されるコルチゾールは、11β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 2 によって不活性なコルチゾンに誘導され、前駆体である 11-デオキシコルチゾールとともに、肝において第 I 相代謝反応を受けてテトラヒドロ体 (テトラヒドロコルチコステロイド: THC) へと代謝された後、その一部はさらに 20 位カルボニル基の還元を受けてヘキサヒドロ体へと代謝される。これら還元代謝体は、ウリジンジホスホグルクロニルトランスフェラーゼ (UDP-glucuronosyltransferase: UGT) やスルホトランスフェラーゼによって、グルクロン酸、硫酸との抱合を受けて、グルクロニドやサルフェートに変換され遊離型とともに、血中、尿中に排泄される。このため、視床下部-下垂体-副腎皮質系疾患では、血中のコルチゾールとともに、尿中に排泄される抱合型 THC の動態が下垂体-副腎皮質系疾患を初めとする各種内分泌・代謝疾患の診断指標として有用と考えられる。そこで、テトラヒドロコルチゾール (THF)、

テトラヒドロ-11-デオキシコルチゾール (THS)、テトラヒドロコルチゾン (THE) 並びにそれらの 5α

立体異性体である

Allo-THF、Allo-THS、Allo-THE の 3-及び 21-グルクロニド (G) 12 種 (Fig. 9)

を採り上げ、リニアイオン

トラップ型 LC/ESI-MS<sup>n</sup> システムによるそれらの高感度測定法を構築し、本法が内分泌代謝疾患の科学診断に有用なことを示した。

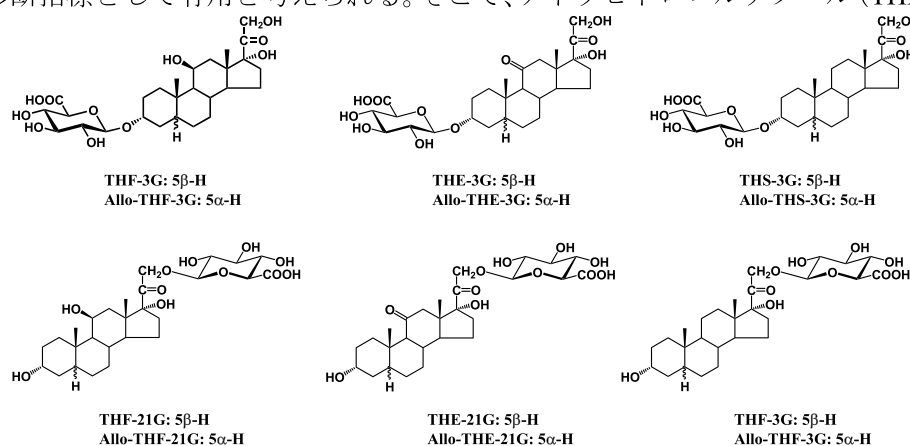


Fig. 9 Chemical structures of tetrahydrocorticosteroid glucuronides

## 引用文献

- 1) Mitamura K., Sogabe M., Sakanashi H., Watanabe S., Sakai T., Yamaguchi Y., Wakamiya T., Ikegawa S.: Analysis of bile acid glutathione thioesters by liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **855**, 88-97 (2007).
- 2) Fuda H., Javitt N. B., Mitamura K., Ikegawa S., Strott C. A.: Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase. *J. Lipid Res.*, **48**, 1343-1352 (2007).
- 3) 堺 俊博、三田村邦子、多賀 淳、本田 進、池川繁男: リトコール酸固定化担体を用いるアフニティークロマトグラフィーによるラット肝細胞内タンパク質の捕捉と液体クロマトグラフィー質量分析法による同定. *分析化学*, **56**, 713-720 (2007).
- 4) Ikegawa S., Yamamoto T., Ito H., Ishiwata S., Sakai T., Mitamura K., Maeda M.: Immunoprecipitation and MALDI-MS identification of lithocholic acid-tagged proteins in liver of bile duct-ligated rats. *J. Lipid Res.*, **49**, 2463-2473 (2008).
- 5) Ikegawa S., Yamamoto T., Miyashita T., Okihara R., Ishiwata S., Sakai T., Chong R. H., Maeda M., Hofmann A. F., Mitamura K.: Production and characterization of a monoclonal antibody to capture proteins tagged with lithocholic acid. *Anal. Sci.*, **24**, 1475-1480 (2008).
- 6) Ogawa S., Kakiyama G., Muto A., Hosoda A., Mitamura K., Ikegawa S., Hofmann A. F., Iida T.: A facile Synthesis of C-24 and C-25 oxysterols by in situ generated ethyl(trifluoromethyl)dioxirane. *Steroids*, **74**, 81-87 (2009).
- 7) Mitamura K., Watanabe S., Mitsumoto Y., Sakai T., Sogabe M., Wakamiya T., Ikegawa S.: Formation and biliary excretion of glutathione conjugates of bile acids in the rat as shown by liquid chromatography/electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **384**, 224-230 (2009).
- 8) Ikegawa S., Ito H., Ohshima M., Maeda M., Hofmann A.F., Mitamura K.: Chemical synthesis of bile acid acyl-adenylates and formation by a rat liver microsomal fraction. *Steroids*, in press.
- 9) Mitamura K., Watanabe S., Sakai T., Okihara R., Sogabe M., Wakamiya T., Hofmann A. F., Ikegawa S.: Chemical synthesis of *N*-acetylcysteine conjugates of bile acids and in vivo formation in cholestatic rats as shown by liquid chromatography/electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, in press.