

機関番号：34517

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590047

研究課題名（和文） メタボリックシンドロームモデルラットのメタボローム解析

研究課題名（英文） Metabonomics analysis of the metabolic syndrome model rats

研究代表者

松永 久美（MATSUNAGA HISAMI）

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：70271418

研究成果の概要（和文）：

尿や血漿などの生体試料を分析することにより、代謝物が定常状態から変化することが確認できればメタボローム解析技術を投入することで、生活習慣病（高血圧、高脂血症、肥満、糖尿病）を会わせもつメタボリックシンドロームモデルラットの代謝物質の同定にも利用できることを考えた。そこで、リン酸化合物にターゲットをしぼり、リン酸化合物をキャッチするための分子インプリントポリマー（MIP）を調製した。MIP へのリン酸化合物の特異的認識に適用し、ターゲット分子を選択的に抽出することにより定量に用いた。これらの結果は、メタボローム解析への適用の可能性を示唆していた。

研究成果の概要（英文）：

We thought that we were available to the metabolic syndrome model rat which had a lifestyle-related disease in what we cast a metabonomics analysis into if we could confirm that a metabolism thing changed from a steady state by analyzing living body samples such as urine or the plasma. Therefore we squeezed a target to a phosphate compound and prepared molecular polymer (MIP) to imprint to catch a phosphate compound. we applied to the specific recognition of the phosphate compound to MIP and used it for fixed-quantity by extracting a target molecule selectively. These results suggest that in addition to their shape recognition, hydrogen bonding interactions could play an important role in retentivity and molecular recognition ability of derivatives of phosphoric acid. Furthermore, the MIPs could be successfully applied to specific recognition of phosphopeptides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：メタボリックシンドローム，リン酸化合物，血漿

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの全塩基配列の解読が完了し、トランスクリプトームやプロテオームと並んで、すべての代謝物質を網羅

的に解析するメタボローム解析の重要性が認識されはじめていた。遺伝子の発現からタンパク質や代謝物質までの網羅的な解析が、生命現象の理解には不可欠である

ことが再認識されつつあった。メタボローム解析の対象は多岐に及んでおり、糖代謝物質、有機酸、脂質代謝物質などの生体分子ばかりか、合成薬物や合成毒物などの種々の分子やその代謝物質もメタボローム解析の対象として研究が進められていた。

2. 研究の目的

1) 生活習慣病と総称する疾患である肥満、高血圧、高脂血症および糖尿病を併発したメタボリックシンドロームモデルラットとその起源ラットを用いてメタボローム解析を行う。2) 既存の生活習慣病治療薬の投与前後におけるメタボロームを比較することにより、生活習慣病関連代謝物質を同定する。3) これらの成果に基づき、活性化/不活性化した代謝物質の特定と量的変化の評価および治療効果との関連を明らかにして治療薬の有効性を解析する。4) メタボリックシンドロームモデルラットの疾患関連代謝物質の変動を既存薬物のそれと比較して新規治療薬の開発への基礎的検討を行うことにより、当初の目的を達成する。

3. 研究の方法

生体試料中のリン酸化合物の認識を目的に、1) テンプレート分子にリン酸ジフェニル (DPP) あるいはリン酸 1-ナフチル (1-NapP), 機能性モノマーに 4-ビニルピリジン (4-VPY), 架橋剤にグリセロールジメタクリレート (GDMA) あるいはエチレングリコールジメタクリレート (EDMA), 希釈剤にシクロヘキサノールあるいは 1-ヘキサノールを用い、50 °C で 24 時間の多段階膨潤重合法により重合した。また、比較のためにテンプレート分子を用いないで同一条件下で重合したノンインプリントポリマー (Non-imprinted polymer, NIP) も調製した。得られたポリマーをステンレス製カラムに充填し、リン酸化合物に対する保持能および分子認識能を HPLC により評価した。また、調製した MIP のアデノシン, AMP, ADP および ATP に対する保持能および分子認識能を評価した。2) リン酸化ペプチドの特異的認識に MIP を適用した。試料にリン酸化標準ペプチドとして、Waters 社のエノラーゼトリプシン消化物 T18 1P (NVPLpYK), T19 1P (HLADLpSK), T43 1P (VNQIGpTLSESIK), α -casein, β -casein, fetuin および phosphitin のトリプシン消化物を用いた。調製した MIP または NIP と ODS カラムを接続し、LC/MS システムにより、移動相として 2 mM 酢酸アンモニウムと 2 mM 酢酸アンモニウムを含む水 - アセトニトリルの混液を用い、グラジエント溶出した。検出は ESI 法により、正および負イオンモードの Q1 スキャンで測定し

た。リン酸化合物の取り込みと検出が可能であることが明らかになったことから代謝物質の同定に利用することを目的に肥満、高血圧、高脂血症および糖尿病を併発したメタボリックシンドロームモデルラット (SHR/NDmcr-cp/cp) および起源ラット (WKY/Izm) より代謝物質を抽出した。

SHR/NDmcr-cp/cp ラットおよび WKY/Izm ラットより採取した血液に抗凝固剤 (ヘパリンナトリウム溶液) を加え、遠心分離して細胞成分 (赤血球、白血球、血小板) を除き血漿成分を得た。また、細胞内成分を -20 °C から 4 °C で抽出し、75% 熱エタノール- 0.25 M HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 溶液で抽出し脱塩後、NBD-F を誘導体化試薬として用い、HPLC 蛍光法および LC/MS を用いてアミノ酸を定量し、目的成分をその固有の質量で検出した。また、陰イオン交換樹脂カラムを用い TCA 回路内の代謝物質である有機酸を分離し、解糖系代謝物質、ペントースリン酸回路代謝物質においては、いずれも糖骨格あるいはそれに由来する構造にリン酸基が結合しているため、陰イオン交換樹脂を用い、分離、溶出した。このようにして目的成分を抽出し、分子量を測定分析した集積データを代謝物質の網羅的解析に導いた。

各週齢の SHR/NDmcr-cp/cp ラットおよびその WKY/Izm ラットに薬物を投与し、経時的に採取した尿や血漿の ¹H-NMR を測定した。各種ラットに α -naphthyl isothiocyanate および 2-bromoethylamine hydrobromide を投与した後、24 時間毎に尿を採取し ¹H-NMR を測定した。得られたスペクトルについて、データの縮約を行いパターン化する。この代謝物プロファイルのパターンについて統計解析を行い、スコアプロットのバラツキをみて主成分を特定する。主成分が既存の物質であれば同定することは可能になってくるが、未知の代謝物質であれば、続いて 2 次元 NMR 分析を行うことや分取したのち構造解析へ進めることが考えられる。¹H-NMR では、¹H 核を含むほぼすべての化合物のシグナルが検出されることから、網羅性は高いと思われる。

4. 研究成果

我々は、メタボリックシンドロームモデルラットのプロテオーム解析を行ってきたが、それに加えて、網羅的なメタボローム解析技術を投入することができれば、新しいバイオマーカーの発見につながるものと期待される。そこで、生体試料中のリン酸化合物や、リン酸化ペプチドの認識を目的としてリン酸化合物に対する MIP を調製し、その保持能および分子認識能を評価するとともにリン酸化合物の特異的認識に適用した結果、い

ずれの MIP においても, アデノシン<AMP<ADP<ATP の順となり, 溶質のリン酸基の数が増すほど大きくなることがわかった。また, MIP は NIP と比較して, リン酸化合物を特異的に認識できることが明らかとなった。また試料より代謝物質を抽出し, 分析装置を使って網羅的に代謝物質を測定する。どのような条件のときにどのような物質がどのくらい生体内や細胞内に存在しているのかを調べる。調製した MIP のリン酸化合物に対する保持能を, 移動相 pH 3~6 の範囲で評価したところ, いずれの MIP においても移動相 pH が低くなるとともにリン酸化合物の保持が増加した。これらの結果は, リン酸化合物の保持および認識には, 形状認識に加えて, MIP との水素結合が重要な役割を果たしていることを示唆している。また, MIP は NIP と比較して, リン酸化合物を特異的に認識できることが明らかとなった。リン酸化ペプチドについては, リン酸化標準ペプチド (NVPLpYK, HLADLpSK, VNQIGpTLSESIK) を LC/MS システムにより分析したところ, 調製した MIP は, リン酸化ペプチドに対し認識能を示したことから, リン酸化プロテオーム解析に応用できる可能性が示唆された。また, MIP および NIP を用いて得られたクロマトグラムを比較し, NIP を用いた場合のみに検出されたピークを Q1 スキャンで測定したところ, α -casein, β -casein, fetuin および phosvitin のトリプシン消化物に含まれているリン酸化ペプチドを検出することができた。以上の結果より, 調製した MIP はリン酸化ペプチドの認識が可能であり, リン酸化ペプチドの検出および同定に適用できることが示唆された。細胞内有機物質の選択的な抽出などメタボローム解析への利用が期待される。経時的に採取したメタボリックシンドロームモデルラットおよび正常ラットの血漿にアセトニトリルを加え, 除タンパク後, 希釈して ^1H NMR 測定した。試料と 0.2 M リン酸塩緩衝液を 2:1 の比率で混合し, 約 10 分間室温で放置後, 13,000 rpm で 10 分間遠心し上清を試料とした。また, LC/MS を用いた測定方法およびモノリスカラムを用いた分離方法を検討した。NMR 測定では, スペクトルをパターン化し主成分を分析したが, NMR シグナルのパターンの変化や代謝物のパターンの変化の分類には至らなかった。種々の測定方法により模索し検討して得られた集積データを現存のデータベースにあわせ, SHR/NDmcr-cp/cp ラットおよびその WKY/Izm ラットの代謝物質の疾患に起因するものの変動を分析し, ついで, その代謝物質を検索・同定する。また, メタボローム解析による関連代謝物質の網羅的検索および同定を試みる。代謝産物の解析と代謝酵素や

レセプターのプロテオーム解析とを組み合わせる上でバイオインフォーマティクスによる解析を行うことにより, 新しい分野が発展してくるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

K. Hoshina, H. Matsunaga, J. Haginaka,
Molecularly imprinted polymers for simultaneous determination of antiepileptics in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 査読あり, 1216, 4957 - 4962, 2009.

[学会発表] (計 9 件)

① 松永久美, 萩中 淳 (2 人中 2 番目)

ニワトリ α_1 -酸性糖タンパク質を固定化したカラムによる光学分割: シリカ粒子充填カラムとシリカモノリスカラムとの評価, 第 21 回クロマトグラフィー科学会議, 2010 年 10 月 23 日, 武庫川女子大学

② 船谷典子, 松永久美 (4 人中 3 番目), 萩中 淳 (4 番目)

セファランチンに対する分子インプリントポリマーの調製およびセファランチンの選択的抽出への適用, 第 21 回クロマトグラフィー科学会議, 2010 年 10 月 23 日, 武庫川女子大学

③ 松永久美, 萩中 淳 (2 人中 2 番目)

ニワトリ α_1 -酸性糖タンパク質を固定化したカラムによる光学認識: シリカ粒子充填カラムとシリカモノリスカラムの比較, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山桃太郎アリーナ

④ 北島智子, 松永久美 (4 人中 3 番目), 萩中 淳 (4 番目)

沈殿重合法によるクルクミンおよびナプロキセンに対する分子インプリントポリマーの調製: 形状、保持能および分子認識能に対する機能性モノマーの影響, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山桃太郎アリーナ

⑤ 保科香織, 松永久美 (4 人中 3 番目), 萩中 淳 (4 番目)

浸透制限型-分子インプリントポリマーを用いる環境試料中の医薬品の LC-MS/MS 分析, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 25 日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター

⑥ 船谷典子, 松永久美 (4 人中 3 番目), 萩中 淳 (4 番目)

分子インプリントポリマーによる苦参中のマトリンおよびオキシマトリンの選択的分析, 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 27

日，国立京都国際会館

⑦ 保科香織，松永久美（4人中3番目），萩中 淳（4番目）

浸透制限型-分子インプリントポリマーを用いる環境水中の非ステロイド性抗炎症薬の高選択的分析法の開発，日本薬学会第129年会，2009年3月26日，国立京都国際会館

⑧ 松永久美，萩中 淳（3人中3番目）
分子インプリントポリマーを用いたリン酸化ペプチドの特異的認識，第21回バイオメディカル分析科学シンポジウム，2008年8月7日，札幌コンベンションセンター

⑨ 松永久美（3人中2番目），萩中 淳（3番目）

リン酸化ペプチドの認識を指向した分子インプリントポリマーの調製とその応用，第15回クロマトグラフィーシンポジウム，2008年5月31日，静岡県コンベンションアーツセンター

[その他]

ホームページ等

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 久美 (MATSUNAGA HISAMI)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：70271418

(2) 研究分担者

萩中 淳 (HAGINAKA JUN)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：20164759