

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号：82505
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2011
課題番号：20599022
研究課題名（和文） サリン・メタミドホス等の有機リン系毒物の新規ターゲット酵素の探索に関する研究
研究課題名（英文） Research for exploring of novel target enzymes of organophosphorous compounds.
研究代表者
柘 浩一郎（TSUGE KOUICHIRO）
科学警察研究所・法科学第三部・主任研究官
研究者番号：90356204

研究分野：分析化学、法中毒学、生化学

科研費の分科・細目：環境系薬学 6805

キーワード：神経ガス、サリン、メタミドホス、質量分析法、プロテオーム、中毒

1. 研究計画の概要

本研究では、サリンをはじめとする神経ガス、およびメタミドホスなどの有機リン系農薬類の毒性に関与する新規ターゲット酵素の探索により、新たな毒性発現機構を解明することを目的とし、さらに、この新規ターゲット酵素について質量分析法を用いた構造解析を行ない、これら有機リン系化合物による曝露の新たな証明法を開発し、農業従事者や中毒患者等の有機リン系化合物曝露の指標とすることを目的とする。

2. 研究の進捗状況

当初の研究計画では、第一に神経ガス結合セリン残基に特異的なモノクローナル抗体を作製する目的で、各種アルキルホスホニルセリンを合成し、各種セリンエステラーゼ類のアミノ酸配列の相同性を勘案し、これを含む 10 残基程度の合成アミノ酸を作成する計画であった。本年はリン酸骨格部分の合成のうち、第一段階目の反応が終了したものの、第二段階目の反応がうまく進行せず、現在、条件を種々再検討して実験を継続している。

一方、第二の計画である有機リン結合ペプチドのショットガンプロテオミクス的手法を用いた検出法の開発に関しては、モデル酵素を用いた検討で、LC-MS/MS（ニュートラルロス分析）を用いた有機リン結合ペプチド特異的な検出法が確立されたが、実際の未知タンパク質の分析に近い状態の混合タンパク質資料を分析した場合、夾雑する多量の有機リン非結合ペプチドにより特異的な検出が困難になることが分かった。これは、FT モード、IT モードどちらの分析方法でも同様であり、原因としては、夾雑タンパク質のペプチド断片の強度が強いため、第一段階（MS1

分析）、第二段階（MS2 分析）でこれらの夾雑ペプチドが優先的に検出され、強度の低い有機リン結合ペプチドが最初の段階から検出されていないためであることが判明した。そこで、有機リン結合ペプチドをあらかじめ精製・濃縮をおこなっておく必要があると考え、リン酸化ペプチドの精製に有効と考えられている TiO₂、ZrO₂ 担体を用いた精製・濃縮法を検討し、特異的な精製をおこなった。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

第一計画の化学合成を利用した抗体作成については顕著な結果を得られておらず、当初計画のとおり、第二計画の質量分析をもちいた探索に注力することとした。質量分析法を用いた方法では、基本的な分析法を確立し、モデルタンパク質を用いての特異的な検出が可能となっている。実資料を用いた分析法もほぼ達成可能と考えている。

4. 今後の研究の推進方策

質量分析法を用いた有機リン骨格結合断片の分析法がほぼ確立できたことから、血液や臓器等のホモジネートを用いて分析をおこなう計画であり、その後、動物を用いた曝露実験およびその試料の分析を行う計画である。

5. 代表的な研究成果

（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）

① Mass Spectrometric Identification of Chemical Warfare Agent Adducts

with Biological Macromolecule for
Verification of Their Exposure.

Kouichiro Tsuge, Yasuo Seto
J. Health Sci. **55**, 879-886 (2009)

[学会発表] (計 1 件)

①46th International Congress on
Forensic Toxicology (TIAFT) at
Geneva.

Annales de Toxicologie Analytique,
21 (Suppl 1), S1-17, 2009

Kouichiro Tsuge, Mieko
Kanamori-Kataoka, Isaac Ohsawa,
Shintaro Kishi, Takeshi Ohmori,
Yasuo Seto, Hirofumi Fukushima
Development of mass spectrometric
method for identifying novel enzymes
targeted by anti-cholinesterase
organophosphorus compounds using
shotgun proteome strategies.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]