

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月20日現在

機関番号：82505  
研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：平成20年～平成23年  
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

## 研究成果の概要（和文）：

モデル酵素を用い、ショットガンプロテオミクスの手法を用い、有機リン系化合物が結合する部位の特異的検出法を確立した。実資料への適用のために、混合ペプチドから有機リン結合ペプチドを精製する方法を開発した。

## 研究成果の概要（英文）：

To explore the novel target enzymes for organophosphorous compound, we established the analytical method for specific detection of OP-combined peptide, using the shotgun proteomics procedure. To apply this method for the complicated sample such as serum, we adopted the purification procedure using TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub> pre treatment column.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	900,000	0	900,000
平成21年度	700,000	0	700,000
平成22年度	700,000	0	700,000
平成23年度	600,000	0	600,000
年度		0	
総計	2,900,000	0	2,900,000

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. 研究開始当初の背景

有機リン系農薬、化学兵器等による中毒の直接の主要な毒性発現機構は、中枢神経系のアセチルコリンエステラーゼの阻害によるものであることは疑いようの余地はない。しかしながら、死に至らない低量曝露の場合、これ以外にも阻害を受ける酵素が存在し、これによって農業従事者や地下鉄サリン事件の被害者の方の慢性的な病状をもたらして

いる可能性が考えられる。そこで、本研究では、コリンエステラーゼ以外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を探索する必要があるものと考えられた。

## 2. 研究の目的

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。

### 3. 研究の方法

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し、特異抗体の作成を計画した。

さらに、質量分析法（ショットガンアプローチによるプロテオーム的タンパク質同定法）を用いた標的タンパク質のスクリーニング法の開発を行なう計画とした。

### 4. 研究成果

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が、合成がうまく進行しなかったことから、当初より予定されていた第二の手法である質量分析法（ショットガンアプローチによるプロテオーム的タンパク質同定法）を用いた標的タンパク質のスクリーニング法の開発に注力して研究を行った。Thermo Fisher Scientific 社製 LTQ/Orbitrap 質量分析計と、神経ガスが結合するモデル酵素である  $\alpha$ -キモトリプシンおよびヒト血漿リルコリンエステラーゼと有機リン系化合物を用い、質量分析計の測定条件とデータベース検索による神経ガス付加部位自動検出のためのパラメータ設定を行った。

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 TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub> 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。

処理前の有機リン結合ペプチドの精製前の量を LC-MS/MS で分析することにより定量した上で、精製各画分の定量をおこなった。その結果、精製カラム規定通りの溶出条件で、素通り画分、洗浄画分、溶出画分の和が精製前の 10%未満であったことから、有機リン結合ペプチドが比較的強固にカラムに結合しているものと推察された。したがって、溶出すれば精製度が高いものが得られると考えられたことから、溶出条件を種々検討したが、塩濃度と pH を変化させることで溶出量がやや改善したものの、十分な回収をすることは不可能であった。

### 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）

- 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）

- ① 46th 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 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 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0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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：