

博士論文要録

生物試料の多元素分析と化学形態別分析に関するメタロミクス研究

長谷川 拓也

学位授与：名古屋大学 (2007 年 1 月 31 日)

生体中には、濃度レベルが 100 ppm 以下である必須微量元素が多く存在している。必須微量元素は、造血、DNA・RNA 合成、タンパク質合成などのほか、多様な生体内反応や生理活性に関与している。そのため、微量元素の生体内動態や元素間相互作用の解明が求められている。近年、このような生体金属に関連した学問分野としてメタロミクス (Metallochemistry, 生体金属支援機能科学) という新しい学問分野が注目されている。メタロミクスの研究領域のうち、生体中元素の濃度分布測定、生体中金属の化学形態別分析、金属タンパク質・金属酵素の検索、金属含有生体関連物質の代謝機構の解明、病態解析・医学診断・無機医薬品開発・化学治療法の開発などに関連する課題について、今回研究を行った。

血清には微量元素も含めた生体成分を各臓器・器官に輸送する役割がある。そのため、体内で起こった疾患は、血清中元素濃度に反映されと考え、病態診断のためのヒト血清の多元素濃度相関解析を行った。また、生命発生の基幹細胞である卵細胞中の重金属の化学形態を調べるために、サケ卵細胞内液中 Hg の化学形態別分析を行った。更に、金属酵素の探索として、エネルギーの産出に関係がある Zn 酵素アルカリフォスファターゼ (ALP) の検出を行った。この研究のために使用した化学形態別分析システムには、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) をオンラインで結合した、複合分析システムを使用した。分離カラムには市販の SEC カラムと、高分子態と低分子態の迅速分離が可能である胆汁酸誘導体 (CHAPS) 被覆 ODS カラムを使用した。最後に、血清中 As 化合物の直接導入による化学形態別分析を行うために、リン脂質被覆固定相を開発した。

第 1 章は序論である。まず、生体微量元素、メタロミクス研究、本研究で使用したプラズマ分光分析法 (ICP-AES, ICP-MS) について概説をした。

第 2 章では、ヒト血清の多元素濃度相関解析を病態診断に用いるために、Na, K, P, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Se, Rb, Sr, Mo, Cs, Ag の 14 元素の定量を行った。本法によって、健康人及び血液のがんである非ホジキン性リンパ腫患者の血清中多元素定量を行い、その結果を比較して、疾患患者の血清中元素濃度分布の相関と特異性に関する

考察を行った。その結果、非ホジキン性リンパ腫患者では、常量元素や Zn などは健康人と同じ程度の濃度であるのに対して、Cu, Se, Mo, Ag の濃度は高かった。その中で、Cu, Se は、スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシターゼという抗酸化酵素の活性中心金属であり、抗酸化作用機能のバランスが崩れた結果ではないかと考えられる。ヒト血清の多元素濃度相関解析によって、病態診断が可能であることが示唆された。

第 3 章は、CHAPS 被覆 ODS 固定相 HPLC/ICP-MS 複合分析システムによるサケ卵細胞内液中 Hg の化学形態別分析を行った。その結果、サケ卵細胞内液中には、高分子態結合 Hg が 8 ppb, システイン結合 Hg が 4 ppb 存在することが分かった。更に、CHAPS 被覆 ODS カラムを用いて分取した高分子態画分を、SEC/ICP-MS 複合分析システムを用いて分析した。紫外吸収クロマトグラムから、サケ卵細胞内液の高分子態には、分子量 >300 kDa, 50 kDa, 12 kDa の 3 つの画分が存在し、その 3 つの画分のいずれにも S, Se, Hg を含有していることが分かった。以前の研究で、Se と Hg は複合体として海洋生物の肝臓等に存在していることが知られており、サケ卵細胞中でも同様な複合体が存在する可能性が示唆された。つまり、サケ卵細胞内液中の Hg は、タンパク質中に存在する S や Se を含むアミノ酸残基と結合していると考えられる。

第 4 章では SEC/蛍光検出/ICP-MS 複合分析システムによるサケ卵細胞内液中 Zn 酵素 ALP の検出について記述した。SEC カラムを用いてサケ卵細胞内液中成分の分子量分画をし、その溶出液に含まれる ALP と 4-methylumbelliferyl phosphate から生成する 4-methylumbelliferone の蛍光強度を検出することにより、ALP の間接的検出をオンラインで行った。まず、サケ卵細胞内液を 0.1 M Tris 緩衝液で 10 倍希釈した溶液について蛍光検出による酵素活性を測定したところ、分子量 >300 kDa と 100 kDa に相当する溶出位置にピークが観測された。更に、この溶液中の Zn を SEC/ICP-MS により検出したところ、分子量 >300 kDa に相当する溶出位置に大きな Zn のピークが観測された。一方、サケ卵細胞内液試料を 0.01 M Tris 緩衝液で 10 倍希釈して疎水性成分の除去を行った溶液の蛍光検出クロマトグラムでは分子量 >300 kDa のピークが失われ、100 kDa のピークのみが検出された。このピークは Zn の元素選択的クロマトグラムのピークと一致しており、100 kDa の親水性 ALP が存在していることが明らかとな

った。また、分子量>300 kDa の ALP は疎水性が高いリポタンパク質であることが分かった。

第5章では、リン脂質被覆 ODS カラムの開発とその分離特性に関して述べた。リン脂質被覆固定相は、ダイナミックコーティング法を用いて、リン脂質を ODS 表面に被覆した。得られた新規カラムは、生体試料を直接導入でき、高分子態と低分子態を迅速に分離可能であることが分かった。また、CHAPS 被覆 ODS カラムよりも耐久性の面で優れていた。

第6章では、第5章で開発したリン脂質被覆 ODS カラムを ICP-MS とオンラインで結合したリン脂質被覆 ODS・HPLC/ICP-MS 複合分析システムを用いた血清中 As の化学形態別分析について記述した。移動相に 5 mM クエン酸+5 mM ドデカンスルホン酸+5 mM 水酸化テトラメチルアンモニウム (pH 4.0) を用いると、尿中のヒ酸、亜ヒ酸、モノメチルアルソン酸 (MMA)、ジメチルアルシン酸 (DMA) 及びアルセノベタインの5種類の As 化合物を5分以内でベースライン分離することができた。しかし、血清を直接導入するとカラム内へのタンパク質の吸着が確認されたので、タンパク質可溶化剤として CHAPS を移動相に添加して、血清中5種類の As 化合物の分離を行った。その結果、30 回連続測定した後でも、各 As 化合物の保持時間及びピーク形状に変化はなく、安定した測定が可能であった。また、亜ヒ酸の投与治療を受けている白血病患者の血清を本法を用いて分析した結果、MMA や DMA などメチル化された有機 As 化合物のみが観測され、投与された無機 As が生体内で有機 As に変換されている

ことが観察された。本固定相は、血清の直接導入分析が可能であるので、血清や生体内における As 化合物の代謝機構の解明に大きな役割を果たすと期待される。

第7章は、結論及び今後の展望である。メタロミクス研究を更に推し進めるための将来展望として、生体試料の全元素分析を行うこと、生体試料中の金属タンパク質、金属酵素の探索をすること、検索した金属タンパク質・金属酵素のアミノ酸配列の決定という3つの課題を挙げた。

公表論文

- 1) T. Hasegawa, K. Inagaki, H. Haraguchi: *Anal. Sci.*, **17**, i979 (2001).
- 2) T. Hasegawa, H. Matsuura, K. Inagaki, H. Haraguchi: *Anal. Sci.*, **19**, 147 (2003).
- 3) T. Hasegawa, T. Umemura, A. Koide, K. Chiba, Y. Ueki, K. Tsunoda, H. Haraguchi: *Anal. Sci.*, **21**, 913 (2005).
- 4) T. Hasegawa, M. Asano, K. Takatani, H. Matsuura, T. Umemura, H. Haraguchi: *Talanta*, **68**, 465 (2005).
- 5) T. Hasegawa, M. Sugita, K. Takatani, H. Matsuura, T. Umemura, H. Haraguchi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **79**, 1211 (2006).
- 6) T. Hasegawa, Y. Fukumoto, J. Ishise, R. Hattori, Y. Zhu, T. Umemura, H. Haraguchi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 329 (2007).
- 7) T. Hasegawa, J. Ishise, Y. Fukumoto, H. Matsuura, Y. Zhu, T. Umemura, H. Haraguchi, K. Yamamoto, T. Naoe: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 498 (2007).
- 8) T. Hasegawa, Y. Wakita, Y. Zhu, H. Matsuura, H. Haraguchi, T. Umemura: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 503 (2007).



Digest of Doctoral Dissertation

Metallomics Research on Multielement Analysis and Chemical Speciation of Biological Samples

Takuya HASEGAWA

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University,

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi 464-8603

(Awarded by Nagoya University dated January 31, 2007)

In relation to metallomics research, the multielement determination and chemical speciation of major-to-ultratrace elements in biological samples were investigated by ICP-AES and ICP-MS with the aid of HPLC. First, the determination of multielements in human blood serum donated from healthy volunteers and disease patients was carried out. As a result, it has been suggested that a multielement analysis of serum may be available for the medical diagnosis of specific diseases. Next, the chemical speciation of mercury and the assay of ALP in salmon egg cell cytoplasm were performed using CHAPS-coated ODS and the SEC columns. The existence of some protein-binding mercury and cysteine-binding mercury in salmon egg cell cytoplasm was confirmed. The analytical results indicate that Hg in salmon egg cell cytoplasm binds with proteins containing selenocysteine and/or cysteine residues. In an ALP assay study, the existence of hydrophilic ALP and hydrophobic conjugated proteins of ALP in salmon egg cell cytoplasm was found. Finally, a phosphatidylcholine-coated ODS column was newly developed and applied to a speciation analysis of arsenic compounds in human blood serum. As a result, it was found that arsenite dosed in the vein of a leukemia patient for therapeutic treatment was converted mainly to monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid.

(Received June 6, 2007)

Keywords : metallomics; mercury; arsenic; alkaline phosphatase; multielement analysis; ICP-MS; phosphatidylcholine-coated ODS column.