

学位論文題名

Analytical Study on the Detection of Some Organic Pollutants Based on the Interaction with the Binding Sites of Biomolecules

(生体分子の結合サイトとの相互作用に基づく
有機汚染物質の検出に関する分析的研究)

学位論文内容の要旨

1960年代以降、世界各地で人や野生生物の生殖機能の異常などが観察されている。中でも、かつて流産防止の目的などに多用されていた、合成エストロゲンであるジエチルスチルベストロールを胎児期に暴露された女性に遅発性の癌が確認されたこと、野生生物の生殖行動などの異常が有機塩素系化合物による環境汚染による疑いが指摘されたこと、また、実験中に用いた実験器具から溶出したノニルフェノールからエストロゲン作用が認められたことなどを受けて、環境中の物質の生体内における内分泌攪乱作用が懸念されるようになってきた。そこで環境省は、1998年に専門家による検討結果に基づいて、「-環境ホルモン戦略計画SPEED'98-」をとりまとめ、これに従い、内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の環境中の濃度の測定、生物の生体内で内分泌系への作用を介した各種の影響について検討を進めてきた。結果としては、検討された多くの物質は内分泌攪乱作用を示さないが、ノニルフェノール等いくつかの物質については、人の細胞核の数種類のレセプターに結合することが確認された。また、内分泌攪乱作用の疑われるPCB、アルキルフェノール類、ビスフェノールA、17 β -エストラジオールが水質調査地点の半数以上で検出されるという結果も示された。このため、これら環境汚染物質のより高感度かつ選択的な新規分析法の開発が必要となっている。

一方、生体内における様々な機能の発現や制御は、抗体-抗原、レセプター-ホルモン、酵素-基質といったタンパク-リガンドあるいは核酸-インターカレーターなどのように、生体分子の有する結合サイトにおける高い分子認識能力と強い相互作用に基づいているものが多い。これらの相互作用は、有害性が指摘されている様々な化学物質の検出法や除去法の開発にも応用されうる。

本研究では、このような生体内における分子認識能力に着目し、抗体-抗原、DNA-インターカレーターの持つ高い分子認識能力や結合サイトにおける強い相互作用を利用することで、有害化学物質や天然のホルモン物質などの検出法の開発を行った。

本論文は6章から構成されている。第1章では、内分泌攪乱物質に関する背景と経過、質量分析を利用した方法との比較、電気化学的手法の利点と改善点、そして本研究の目的とその概要について記述した。第2、3章では、極低濃度でも生物のホルモン系を乱すと疑われているエストラジオール(E2)に対するエンザイムイムノアッセイ(EIA)法の開発を行い、環境中のE2濃度の測定を試みた。第4~6章では、DNAへの平面構造を有する物質のインターカレーションやグルーブ結合を利用して、環境汚染物質の電気化学的検出について検討した。本実験では、水

溶性で機械的強度の低いDNAを機能性材料として用いるために開発された、DNA-アルギン酸複合体、UV照射DNAに着目し、これらのフィルムを電極上に作製し、このDNAへの集積を利用した環境汚染物質の電気化学的検出について検討を行った。以下、第2章から6章までの概要を述べる。

第2章では、ビオチン化エストラジオールをプローブリガンドとして用いた均一反応によるE2の新規蛍光EIAの開発について記述した。現在市販されているアッセイキットの多くは固相に固定化した抗体に対し、酵素を修飾したリガンドとE2との競争に基づいてE2の定量を行なっている。しかしながら酵素のような巨大分子を直接リガンドに修飾することは、エストラジオールの抗体への反応性に影響を与える恐れがあると考えられる。そこで、本研究では低分子であるビオチンを修飾したビオチン化エストラジオールを合成し、このリガンドとE2を競争させた後、このビオチン部位に特異的に結合する酵素を修飾したアビジンを添加することでE2の定量を行なった。さらに抗体には特異性の高いモノクローナル抗体、検出には蛍光基質を用いることで、高感度かつ高選択的なEIAの開発に成功した。

第3章では、抗体を固定化した96ウェルマイクロタイタープレートを用いるEIAにおいて、第2章で述べたビオチン化エストラジオールを用い、さらに簡便なアッセイ法の開発に取り組んだ。そして本法を環境庁の定める外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアルに従った固相抽出法と組み合わせることで、河川水中のE2の定量に応用した。調査地点からは0.06 - 67pMのE2が検出され、この際の添加実験の回収率、それぞれの結果の相対標準偏差、および再現性は良好であった。

第4章では、カルシウムイオンを架橋材として、水溶性のDNAをアルギン酸膜に閉じ込めて不溶化した、DNAアルギン酸複合体フィルムを電極上に作製し、このフィルムに平面構造を有する電極活性な臭化エチジウム(EtBr)をインターカレートさせた時のサイクリックボルタメトリー(CV)を測定することで、DNAとEtBrとの相互作用について検討した。EtBrのDNAへの集積時の電位印加による集積速度の変化は観察されなかったが、集積後のフィルムの洗浄時に、+700 mVよりも正の電位を印加することでDNAからEtBrを排出することができ、DAFの再生利用が可能であることが示唆された。これは有機溶媒等を用いずに、DNAからインターカレーターの排出を可能としたものであり、インターカレーションの電気化学的コントロールの可能性をも示した。

第5章では、紫外線照射によりフィルム化したDNAフィルムを用いて有害物質の検出法について検討した。電極活性なEtBrをインターカレートさせた時のCVを測定し、EtBrのDNAフィルムへの集積挙動について検討を行い、平面構造を有するジベンゾフラン(DBF)の検出に応用した。ダイオキシンの骨格物質としても知られるDBFは、他の多くの有害物質と同様に電極不活性物質ということが知られているが、EtBrとDBFをDNAに対して競争的に反応させ、そのとき得られるEtBrの電極応答の変化からDBFの集積を検出可能であることが確認された。このことからDNAへの結合サイトに対する競争反応によりDBFのような電極不活性物質であっても、電気化学的検出が可能であることが示唆された。

第6章では、さらに、この紫外線照射DNAフィルム電極をエストロゲン物質に応用した。本実験では最も強いエストロゲン活性を示すE2と、合成女性ホルモンのDESを用いて検討を行った。この結果、DESにおいて明らかなDNAとの相互作用に基づく電極応答が確認され、掃引速度依存性の結果からも、この応答はDESのDNAへの吸着に基づく応答であることが確認された。そこで、DESとDNAとの相互作用の結合様式を明らかにするため、代表的なインターカレーターとグループバインダーを用いて、DESとDNAとの相互作用について電気化学的に検討した。その結果、この相互作用はグループ結合の寄与が大きいことが示唆された。

以上の研究から、抗体-抗原、アビジン-ビオチンといったタンパク質-リガンド相互作用を利用することで、天然のホルモン物質であるE2の高選択的かつ高感度な測定が可能となり、DNA-インターカレーター、ある

いはグ鲁班ダイダーの結合サイトとの強い相互作用を利用することで、DBFやDESといった有害物質の検出が可能となった。このように生体分子の分子認識能およびその反応を利用することで、環境汚染物質の選択的な検出の可能性が示唆され、環境汚染物質の定期的なモニタリング法の1つとしての利用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 俊 逸
副 査 教 授 嶋 津 克 明
副 査 教 授 坂 入 信 夫
副 査 准教授 沖 野 龍 文

学 位 論 文 題 名

Analytical Study on the Detection of Some Organic Pollutants Based on the Interaction with the Binding Sites of Biomolecules

(生体分子の結合サイトとの相互作用に基づく
有機汚染物質の検出に関する分析的研究)

現代においては多種多様な人工、天然の化学物質が我々の生活を支えている。しかしこれらの化学物質の中には人間の健康や生態系に影響を与える恐れがあるものもあり、特に内分泌攪乱作用が疑われている化学物質は、非常に低濃度で生体へ影響を及ぼすことが報告されている。このため、これら環境汚染物質を高感度かつ選択的、そして迅速、簡便に分析できる手法の開発が求められている。一方、生体内における様々な機能の発現や制御は、抗体-抗原、レセプター-ホルモン、酵素-基質といったタンパク-リガンドあるいは核酸-インターカレーターなどのように、生体分子の有する結合サイトにおける高い分子認識能力と強い相互作用に基づいているものが多い。これらの相互作用はまた、有害性が指摘されている様々な化学物質の検出法や除去法の開発にも応用されうる。

本博士論文は、このような生体内における分子認識能力に着目し、抗体-抗原、DNA-インターカレーターの持つ分子認識能力や結合サイトにおける強い相互作用を利用することで、有害化学物質や天然のホルモン物質などの検出法を開発を行ったものである。主に二つの手法が検討されており、一つは極低濃度でも生物のホルモン系を乱すと疑われているエストラジオール(E2)に対するエンザイムイムノアッセイ(EIA)法の開発であり、開発した検出法を用いて環境中のE2濃度の測定を行ったものである。また、もう一つの手法は、電極上に構築したDNAフィルムを用いて、DNAへのインターカレーションやグループ結合などの相互作用を利用して、環境汚染物質の電気化学的検出について検討したものである。

女性ホルモン物質の一つであるエストラジオール(E2)の生体や環境中の濃度を測定するには、エンザイムイムノアッセイ法(EIA)が用いられているが、市販されているEIAキットの多くは固相に固定化した抗体に対し、酵素を修飾したリガンドとE2との競争に基づいてE2の定量を行なっている。しかし酵素のような巨大分子を直接リガンドに修飾することは、E2の抗体への反応性に影響を与え、交差反応を増大させる恐れ

がある。そこで、本研究では低分子であるビオチンを修飾したビオチン化エストラジオールを合成し、このリガンドとE2を競争させた後、このビオチン部位に特異的に結合する酵素を修飾したアビジンを添加することでE2の定量を行なう方法を開発している。さらに抗体に特異性の高いモノクローナル抗体、検出には蛍光基質を用いることで、高感度かつ高選択的なEIAの開発に成功している。本法を環境庁の定める外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアルに従った固相抽出法と組み合わせ、札幌市内を流れる河川及び湖沼水中のE2の定量に応用した。その結果、調査地点から0.06 - 67pMのE2が検出され、特に下水処理場からの排出水が流入する河川において比較的高濃度のE2を検出している。この結果は、他の手法による報告や海外での報告例と一致しており、天然の女性ホルモン物質からの汚染を示す貴重なデータとなっている。この際の添加実験の回収率、それぞれの結果の相対標準偏差および再現性も良好なものである。

次に、水溶性のDNAをアルギン酸膜に閉じ込め不溶化したDNAアルギン酸複合体フィルムを電極上に作製し、このフィルムに平面構造を有する電極活性な臭化エチジウム(EtBr)をインターカレートさせた時の電気化学的応答を測定することで、DNAとEtBrとの相互作用について検討している。EtBrのDNAへの集積時の電位印加による集積速度における変化は観察されなかったが、集積後のフィルムの洗浄時に正電位を印加することでDNAからEtBrを容易に排出することができ、DNA膜の結合サイトの再生利用が可能であることを示唆した。このことはDNAからインターカレーターを有機溶媒等の溶離剤を用いずに排出できることを示したものであり、インターカレーションの電気化学的コントロールの可能性を示唆することに成功している。さらに、電極上に紫外線照射によりフィルム化したDNA膜を用いて、電極活性なEtBrとダイオキシンの骨格構造を有するジベンゾフラン(DBF)を、DNAの結合サイトに対して競争的に反応させ、そのとき得られるEtBrの電極応答の変化からDBFの集積を検出することに成功している。また、この紫外線照射DNAフィルム電極をエストロゲン物質に応用し、強いエストロゲン活性を示すE2と、合成女性ホルモンのDESを用いて検討を行い、DESにおいて明らかにDNAとの相互作用に基づく電極応答の変化を確認するとともに、代表的なインターカレーターとグルーブバインダーを用いて、DESとDNAとの相互作用について電気化学的に検討し、DESとDNAとの相互作用はグルーブ結合の寄与が大きいことを明らかにしている。

以上の研究から、抗体-抗原、アビジン-ビオチンといったタンパク-リガンド相互作用を利用することで、天然のホルモン物質であるE2の高選択的かつ高感度な測定を可能とし、また、DNA-インターカレーターあるいはグルーブバインダーの結合サイトとの強い相互作用を利用することで、DBFやDESといった有害物質の検出を可能とした。このように生体分子の分子認識能およびその反応を利用することで、環境汚染物質の選択的な検出の可能性が示唆され、開発した手法は環境汚染物質のモニタリング法の1つとしての利用が期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。