

Title	質量分析を基盤とした除草剤の代謝物探索のための方法論の開発
Author(s)	高橋, 政友
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/72353">https://doi.org/10.18910/72353</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 高橋 政友 )

## 論文題名

質量分析を基盤とした除草剤の代謝物探索のための方法論の開発

## 論文内容の要旨

## 第一章 緒論

除草剤の代謝経路および代謝物の特定は、古くから質量分析 (MS) を用いて行われてきた。具体的には、薬剤処理検体と非処理検体 (コントロール検体) のMSスペクトルの差分解析に基づいた代謝物探索が主流であった。しかしながら、この手法には次のような問題点が挙げられる。第一に、従来法では除草剤を処理することで生じる内生の代謝物変動による偽陽性ピークと除草剤の代謝物を区別することが困難である。第二の問題点として、仮に候補となる代謝物を検出できたとしてもその代謝物の化学組成や化学構造の推定は容易ではない。これらの問題点から、除草剤の代謝物を網羅的に検出し、検出された代謝物の化学構造を推定できる方法論が求められている。そこで本研究では、除草剤の代謝物探索のための方法論の開発および実用性の評価を目的とした。

## 第二章 除草剤の代謝物探索のための方法論の開発

提案する除草剤の代謝物探索手法は、 $^{13}\text{C}$ および $^2\text{H}$ 安定同位体標識体の利用、液体クロマトグラフィー四重極オービトラップ型高分解能質量分析 (LC/HRMS/MS)、データマイニング技術、*in silico*代謝物予測、代謝物プロファイリングの工程からなる。はじめに、従来法である2,4-DをシロイヌナズナT87培養細胞に処理した試料と非処理試料を用いて2,4-D代謝物を探索したところ、645種の代謝物候補が得られた。次に、当該手法である安定同位体および非標識体2,4-DをシロイヌナズナT87培養細胞に処理し、得られたLC/HRMSデータを各種データマイニング技術によって解析した結果、83種の2,4-D代謝物候補の選定に成功した。これらの結果から、本手法は従来法と比較して偽陽性代謝物を大幅に低減できる可能性が示唆された。さらに、第I相代謝反応 (酸化、還元、加水分解など)、第II相代謝反応 (糖や硫酸、グルタチオンなどとの抱合反応)、および第III相代謝反応 (第II相代謝反応で生じた抱合体のさらなる抱合反応) を網羅した*in silico*代謝物予測情報、各代謝物候補の経時プロファイル情報、および HRMS/MSスペクトル情報を統合して解析することで、これまでに報告のある10種の代謝物に加えて、16種の新規2,4-D代謝物の推定に成功した。

## 第三章 除草剤の代謝物探索手法の実用性評価

除草剤の代謝物探索研究に使用されているシロイヌナズナ植物個体を用いて、第二章で開発した代謝物探索手法の実用性について検証した。シロイヌナズナ植物個体における2,4-D代謝物の探索を実施したところ、合計で28種類の2,4-D代謝物 (17種が新規) が推定された。2,4-D処理葉および非処理部での経時的2,4-D代謝物プロファイルの結果から、2,4-Dの転流や、いくつかの2,4-D代謝物が細胞壁の構成成分として利用されていることを示唆する生理現象を捉えることができた。これらの結果から、開発した本手法はシロイヌナズナ植物個体でも適用できると結論づけた。

## 第四章 総括と展望

本研究では除草剤の代謝物探索のための方法論の開発および実用性の評価を実施したところ、植物生体内における2,4-Dの代謝物およびそれらの代謝経路に関する情報を包括的に把握することに成功し、開発した手法の有用性が示された。当該手法は、安定同位体標識薬物および非標識薬物に由来する代謝物ペアーの精密質量差分に基づいた代謝物探索手法であることから、安定同位体標識位置を除草剤の母核に施すことで、その他の除草剤でも植物生体内で起こる異物代謝反応によって生じる代謝物探索が可能であることが示唆される。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (高橋 政友)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	内山 進
	副 査	教授	松田 史生
	副 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	永井 健治
<b>論文審査の結果の要旨</b>			
<p>植物生体内での除草剤の代謝物探索は、効率的な除草剤の開発や農作物の安全性評価を実施するために必要不可欠である。従来の代謝物探索手法では、除草剤を処理することで生じる内生の代謝物変動による偽陽性ピークと除草剤の代謝物を区別することが困難であった。また、候補となる代謝物を検出できたとしてもその代謝物の化学組成や化学構造の推定は容易ではなかった。これらの問題を解決するために、本研究では除草剤の代謝物探索のための新たな方法論の開発および実用性の評価を目的とした。</p> <p>第二章では、<math>^{13}\text{C}</math> および <math>^2\text{H}</math> 安定同位体標識体の利用、液体クロマトグラフィー四重極オービトラップ型高分解能質量分析 (LC/HRMS/MS)、データマイニング技術、<i>in silico</i> 代謝物予測、代謝物プロファイリングを駆使した新規の除草剤の代謝物探索手法を開発した。除草剤のモデルとして古くから使用されている 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) を処理したシロイヌナズナ T87 培養細胞中で生成した 2,4-D 代謝物の構造推定を行い、得られた代謝物候補の種類と数を指標に開発した方法論の有用性を検証した。その結果、本手法は、従来法と比較して偽陽性代謝物を大幅に低減できる可能性が示唆された。また、これまでに報告のある 10 種の 2,4-D 代謝物に加えて、16 種の新規 2,4-D 代謝物の化学構造の推定に成功した。以上の結果から、当該手法の有用性が示された。</p> <p>第三章では、除草剤の代謝物探索研究に使用されているシロイヌナズナ植物個体を用いて、第二章で開発した代謝物探索手法の実用性について検証した。シロイヌナズナ植物個体における 2,4-D 代謝物の探索を実施したところ、合計で 28 種類の 2,4-D 代謝物 (17 種が新規) が推定された。2,4-D 処理葉および非処理部での経時的 2,4-D 代謝物プロファイルの結果から、2,4-D の転流やいくつかの 2,4-D 代謝物が細胞壁の構成成分として利用されていることを示唆する生理現象を捉えることができた。これらの結果から、開発した本手法はシロイヌナズナ植物個体でも適用することができると結論づけた。</p> <p>第四章では、本研究の総括および展望について述べるとともに、2,4-D だけでなくその他の除草剤でも植物生体内で生じる代謝物の探索が可能であることについても考察している。</p> <p>以上、本論文で開発した除草剤の代謝物探索手法は、従来の代謝物探索手法の問題点を解決した手法であることが示されており、効率的な除草剤の開発や農作物の安全性評価において今後活用されることが期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。</p>			