

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	https://doi.org/10.18910/72353
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

博士論文

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

2018年12月

大阪大学大学院 工学研究科
生命先端工学専攻 生物工学コース
生物資源工学領域

高橋 政友

目次

略号.....	3
第一章 緒論.....	7
1.1. 除草剤開発の歴史と異物代謝研究の背景.....	7
1.2. 生体内における外因性化学物質の異物代謝反応機構.....	9
1.3. 外因性化学物質の代謝物探索手法.....	14
1.4. 本研究の目的.....	16
第二章 除草剤の代謝物探索のための方法論の開発.....	17
2.1. 緒言.....	17
2.2. 実験方法.....	20
2.2.1. 試薬および供試化学物質.....	20
2.2.2. 実験植物および化学物質の処理.....	20
2.2.3. 試料調製方法.....	21
2.2.4. LC/HRMS/MS 分析条件.....	22
2.2.5. ピークアライメントおよびピーク検出.....	23
2.2.6. 統計解析.....	25
2.2.7. ペアードピークスフィルタリング.....	25
2.2.8. 2,4-D 代謝物のアノテーションおよび化学構造の推定方法.....	27
2.3. 結果と考察.....	27
2.3.1. LC/HRMS/MS 分析条件の最適化.....	27
2.3.2. 安定同位体ラベリングおよびデータマイニング技術による 2,4-D 代謝物の選定.....	37
2.3.3. Metabolizer および HRMS/MS スペクトルを用いた 2,4-D 代謝物の アノテーションおよび化学構造の推定方法.....	41
2.3.4. 代謝物プロファイリングを用いたさらなる 2,4-D 代謝物の推定.....	45
2.4. 小括.....	51

第三章 除草剤の代謝物探索手法の実用性評価.....	52
3.1. 緒言.....	52
3.2. 実験方法.....	53
3.2.1. 試薬および供試化学物質.....	53
3.2.2. 実験植物および化学物質の処理.....	53
3.2.3. 試料調製方法.....	53
3.2.4. LC/HRMS/MS 分析条件.....	54
3.2.5. ピークアライメントおよびピーク検出.....	54
3.2.6. 統計解析.....	54
3.2.7. ペアードピークスフィルタリング.....	55
3.2.8. 2,4-D 代謝物のアノテーションおよび同定方法.....	55
3.3. 結果と考察.....	55
3.3.1. 各薬剤処理による影響.....	55
3.3.2. 2,4-D 代謝物プロファイリング.....	56
3.4. 小括.....	62
第四章 総括と展望.....	64
謝辞.....	68
引用文献.....	69
論文目録.....	80
学会発表.....	83
付録.....	88
シトクロム P450 が触媒する Phase I 代謝反応様式とその機構.....	88
Phase II 代謝反応様式とその機構.....	90

略号

2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

2,4-D-Ala: 2,4-D-alanine

2,4-D-Asn: 2,4-D-asparagine

2,4-D-Asp: 2,4-D-aspartic acid

2,4-D-Gln: 2,4-D-glutamine

2,4-D-Glu: 2,4-D-glutamic acid

2,4-D-Gly: 2,4-D-glycine

2,4-D-Hex: 2,4-D-hexose

2,4-D-Hex-Hex: 2,4-D-hexose-hexose

2,4-D-His: 2,4-D-histidine

2,4-D-Ile: 2,4-D-isoleucine

2,4-D-Leu: 2,4-D-leucine

2,4-D-Phe: 2,4-D-phenylalanine

2,4-D-Ser: 2,4-D-serine

2,4-D-Thr: 2,4-D-threonine

2,4-D-Val: 2,4-D-valine

2,4-DCP: 2,4-dichlorophenol

2,4-DCP-acetyl Hex: 2,4-dichlorophenol-acetyl hexose

2,4-DCP-Hex: 2,4-dichlorophenol-hexose

2,4-DCP-Hex-dHex: 2,4-dichlorophenol-hexose-deoxyhexose

2,4-DCP-Hex-dPen-acetyl dPen: 2,4-dichlorophenol-hexose-deoxypentose-acetyl
deoxypentose

2,4-DCP-malonyl-Hex-dHex: 2,4-dichlorophenol-malonyl-hexose-deoxyhexose

2,4-DCP-SO₃ Pen: 2,4-dichlorophenol-sulfate pentose

AGC: automatic gain control

BgS: background subtraction

CID: collision induced dissociation

dHex: deoxyhexose

dPen: deoxypentose

FT-ICR: fourier transform ion cyclotron resonance

GC/MS: gas chromatography/mass spectrometry

GSH: glutathione

GST: glutathione *S*-transferase

GT: glycosyltransferase

HCA: hierarchical cluster analysis

HPLC: high performance liquid chromatography

HRMS: high-resolution mass spectrometry or high resolution mass spectrometer

LC/HRMS: liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry

LC/MS: liquid chromatography/mass spectrometry

LC/TOFMS: liquid chromatography/time-of-flight-mass spectrometry

M.W: molecular weight

m/z: mass-to-charge ratio

MCPA: 2-methyl-4-chlorophenoxy acetic acid

MS: mass spectrometry or mass spectrometer

NAT: *N*-acetyl transferase

NMR: nuclear magnetic resonance

OH-2,4-D: hydroxy-2,4-D

OH-2,4-D-malonyl-Hex: hydroxy-2,4-D-malonyl-hexose

OH-2,4-DCP: hydroxyl-2,4-dichlorophenol

OH-2,4-DCP-acetyl Hex: hydroxyl-2,4-dichlorophenol-acetyl hexose

OH-2,4-DCP-Hex: hydroxyl-2,4-dichlorophenol-hexose

OH-2,4-DCP-malonyl Hex: hydroxyl-2,4-dichlorophenol-malonyl hexose

OPLS-DA: orthogonal projection to latent structures discriminant analysis

PAPS: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate

PBS: phosphate buffered saline

Pen: pentose

PRM: parallel reaction monitoring

PTFE: polytetrafluoroethylene

RDBE: ring and double bond equivalent

RT: retention time

S/N: signal-to-noise ratio

SO₃-2,4-DCP: sulfate-2,4-dichlorophenol

SULT: sulfotransferase

TOF: time-of-flight

UDPG: uridine diphosphate glucose

UGT: uridine diphosphate glucuronosyl-transferase

第一章 緒論

1.1. 除草剤開発の歴史と異物代謝研究の背景

雑草は田や畑において、有用植物と同じ環境下で互いに競合し合いながら生育している。雑草による被害と防除の労力は非常に甚大であるため、有用植物を保護しながら雑草のみを効率的に防除する方法、すなわち除草剤の開発が進められてきた。除草剤は、「雑草の枯殺またはその正常な生育を阻害する目的で使用される化学物質」と定義され (Ahrens, W. H., 1994), 1941 年に植物ホルモンであるオーキシンの作用をもつ選択性有機除草剤 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) の開発に端を発する (Takematsu, T., 1982)。その当時, 2,4-D は様々な植物の成長調節を目的として使用されていた。その後, 2,4-D は薬剤処理量を上げることで選択的除草活性があることが分かり, 実用化された最初の除草剤となった (Ito, M., 2016)。現在では, 世界中で数百種類におよぶ除草剤が開発され, 各薬剤が有する選択的除草活性を利用した化学的防除が実施されている。

除草剤が有する選択的除草活性は, 植物生体内での異物代謝反応に強く依存していることが知られている (Suzuki, I., 1993a, Yu, Q., 2014, Yuan, J. S., 2006)。植物生体内に取り込まれた除草剤は, 各種異物代謝酵素の作用で構造的変化を受け, 薬理効果が低減する (Van Eerd, L. L., 2003, Coleman, J. O. D., 1997)。この異物代謝能力は, 植物種によって大きく異なっており, それゆえに選択的除草剤活性が発現すると考えられている。したがって, 雑草のみを選択的に枯殺する性能を有した除草剤開発において, 新規薬剤を効率的に開発していくためには, 植物種ごとの異物代謝能力の違いに基づいた薬物開発が必要であると考えられている (Suzuki, I., 1993a, Duke, S. O., 2011)。

除草剤の開発プロセスは, リードジェネレーションとリードオプティマイゼーションと呼ばれる2つの過程から構成される (図1-1) (Delaney, J., 2006)。リードジェネレーションは, リード化合物を選定する過程であり, ランダムスクリーニング, 既知生理

1. Lead generation

- ① Random screening
- ② Modification of chemical structure of known drugs
- ③ Design based on the 3D structure of enzymes and proteins

2. Lead optimization

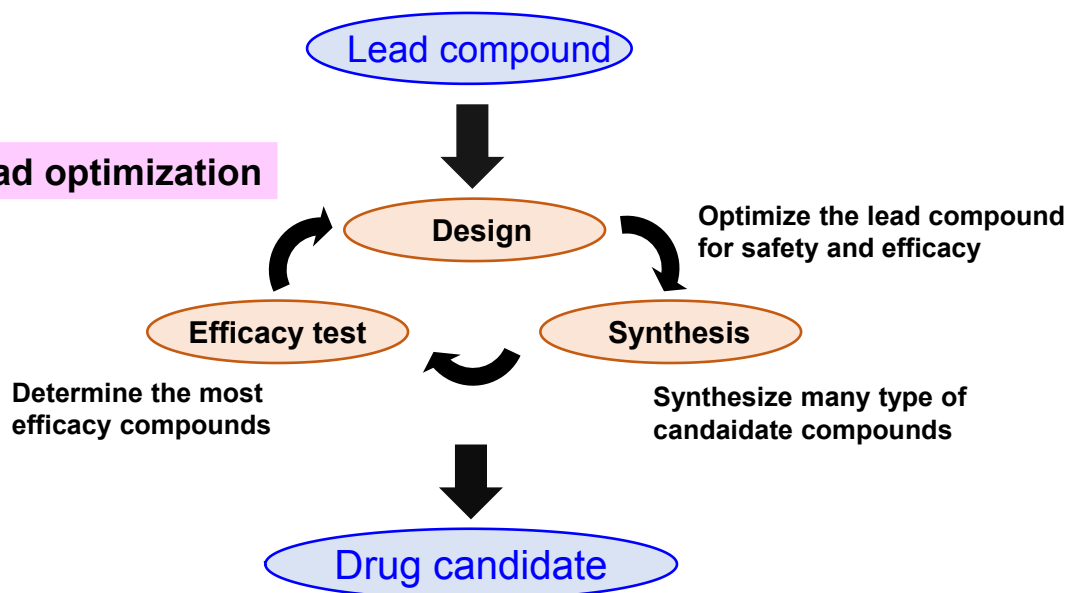


図 1-1. 薬物開発のスキーム

活性物質の化学構造をモデルとして選抜する手法，生体内の酵素やタンパク質の三次元構造を基にデザインする手法などが用いられる (Suzuki, I., 1993b). リード化合物が選抜されると，続いてリードオプティマイゼーションが実施される．この過程では，選抜したリード化合物の化学構造をモデルに数多くの誘導体を合成し，構造と活性の関係を解析しながらさらなる分子設計を行う．最終的には，薬効や安全性などの面から最適な構造を備えた候補化合物が選定される．従来の除草剤開発のスキームは異物代謝過程に基づいておらず，このスキームによって選定される新規除草剤は，実に約2~3万種類の候補化合物の中で1化合物であると言われており (Yamaguchi, I., 2013), 効率的かつ合理的な薬剤開発は未だ実施できていない．それゆえ，除草剤の開発過程で，有用植物，雑草における除草剤の代謝物および推定される代謝経路を包括的に捉え，両者の異物代謝能力の違いを評価する方法論が構築できれば，植物種間の選択性

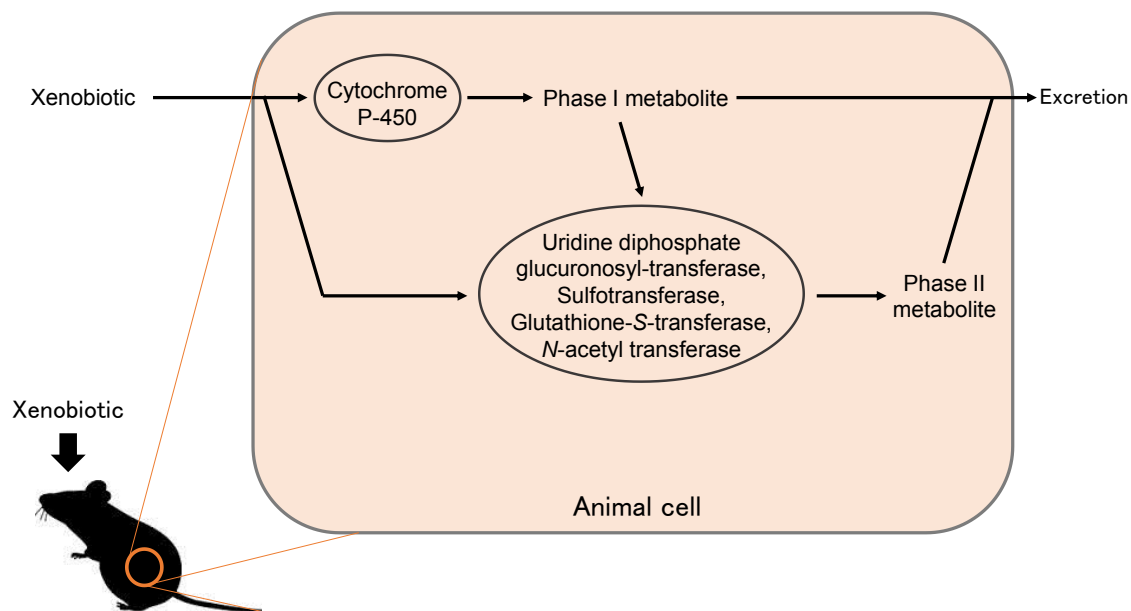
に基づいた候補化合物のデザインが可能になり、効率的な除草剤開発につながると考えられる。

また、生体内で代謝された除草剤の多くは、代謝される前のものと比較して薬理活性や毒性が弱くなると考えられているが、いくつかの除草剤は代謝されることで薬理活性や毒性がむしろ強くなることが知られている (Bavcon Kralj, M., 2007). そのため、農作物の安全性の観点から、除草剤そのものだけでなく異物代謝過程で生じる代謝物についても網羅的に評価する必要があるとの認識が広がってきている (EFSA panel on plant protection products and their residues, 2012). 以上の背景から、近年、除草剤の代謝物情報を網羅的に取得することは重要な課題となっている。

1.2. 生体内における外因性化学物質の異物代謝反応機構

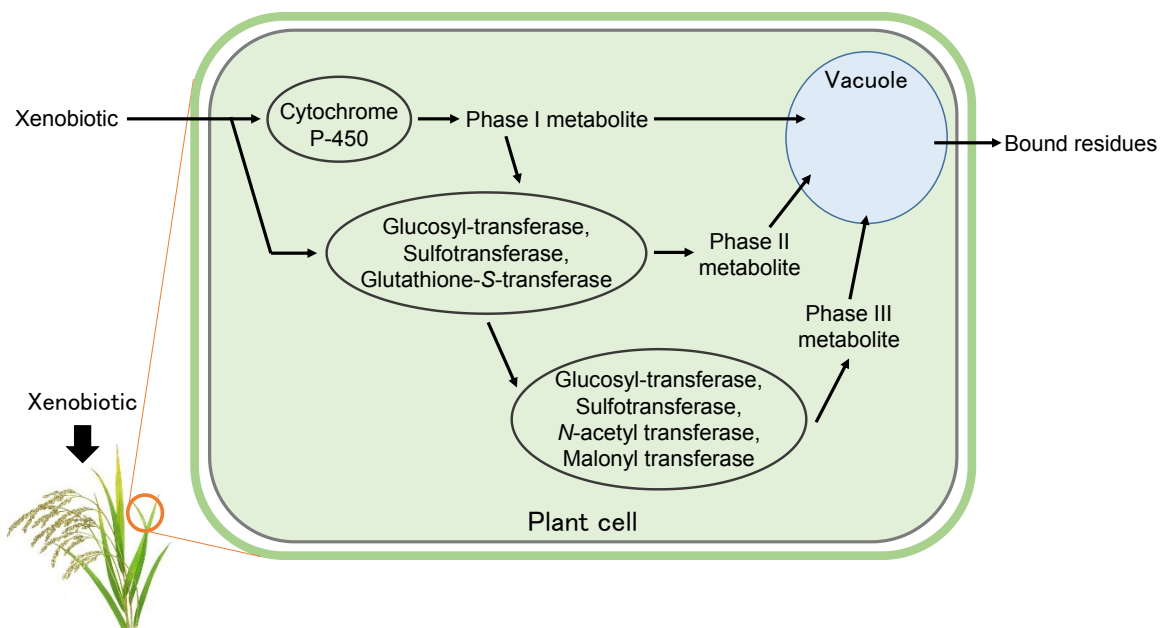
除草剤の代謝物情報を網羅的に取得するためには、生体内における各異物代謝反応について理解する必要がある。動物および植物生体内での外因性化学物質 [除草剤や殺虫剤などの農薬、低分子医薬品 (分子量が数十から数百程度の医薬品の総称)、環境汚染物質など、人工的に合成された化学物質の総称] の異物代謝反応様式をそれぞれ図 1-2, 図 1-3 に示す。動物では、生体内に取り込まれた外因性化学物質は、はじめに酸化、還元、加水分解などの第 I 相代謝反応により代謝される。これらはさらに抱合化反応 (第 II 相代謝反応) によって生体内の内在性代謝物 (グルクロン酸, 硫酸, グルタチオン, グリシンなど) との抱合体となって、尿, 胆汁中に排泄される (Ioannides, C., 2001, Iwabuchi, H., 1998) (図 1-2)。植物でも、生体内に取り込まれた外因性化学物質は、基本的に動物と類似した代謝反応によって水溶性の代謝物へと変換されるが、単糖類や各種アミノ酸類といった動物ではあまり知られていない内在性の代謝物と抱合体を形成する (Mine A., 1975, Hodgson, R. H., 1973, Frear, D. S., 1976, Hall, J. C., 2000)。また、植物では第 II 相代謝反応で生じた抱合体がさらなる抱合化反応によってより極性の高い代謝物へと変換される (第 III 相代謝反応) (Sandermann, H., 1992, Sandermann, H., 1997, Frear, D. S., 1985)。そして、これらの反応によって極性を増した

外因性化学物質の代謝物は最終的に液胞中に運ばれ貯蔵もしくは分解され、一部は細胞壁の構成成分として利用されると考えられている (Coleman, J. O. D., 1997, Brazier-Hicks, M., 2007, Van Eerd, L. L., 2003) (図 1-3). 第 I 相代謝反応のうち中心的な役割を果たしている代謝酵素群はシトクロム P450 と呼ばれるヘムタンパク質であり、



Phase I : Oxidation, hydrolysis, reduction
Phase II : Conjugation

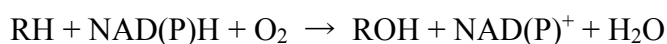
図 1-2. 動物における異物代謝反応様式



Phase I : Oxidation, hydrolysis, reduction
Phase II : Conjugation
Phase III : Secondary conjugation

図 1-3. 植物における異物代謝反応様式

主に細胞中の小胞体膜上に局在している (Anzenbacher, P., 2001, Lynch, T., 2007, Zimmerlin, A., 1990). すべてのシトクロム P450 は分子量約 50000 前後の膜結合性タンパクであり, 補欠分子族としてプロトポルフィリン IX が 1 分子存在している. シトクロム P450 が関与する代謝反応は NAD(P)H と酸素の存在下で進行する. NAD(P)H 由来の還元力を利用して酸素分子を活性化, 基質を酸化するという反応様式であり, 以下に示す化学反応式で示される.



R: Xenobiotics (外因性化学物質)

シトクロム P450 が触媒する反応を代謝様式別にまとめたものを図 1-4 に示す (代謝反応様式とその機構の詳細は付録に記載) (Hirobe, M., 1990, Van Eerd, L. L., 2003). シト

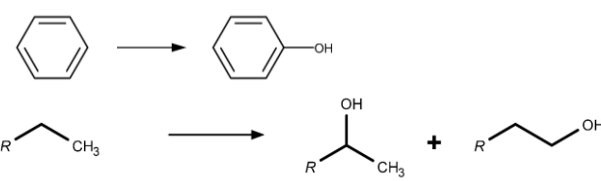

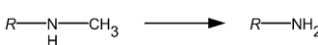
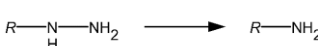

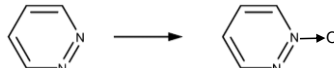
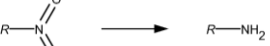
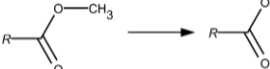
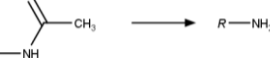
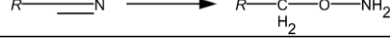
Phase	Description	Metabolic reaction
I	Oxidation, Reduction, Hydrolysis	
	1. Aryl/alkyl hydroxylation	
	2. O-dealkylation	
	3. N-dealkylation	
	4. Oxidative deamination	
	5. Sulfoxidation	
	6. Nitrogen oxidation	
	7. Nitroreduction	
	8. Hydrolysis (Ester)	
	9. Hydrolysis (Amide)	
	10. Hydrolysis (Nitrile)	

図 1-4. シトクロム P450 が触媒する異物代謝反応 (第 I 相代謝反応)

クロム P450 によって酸化された外因性化学物質は一般的に水溶性が増し、体外 (植物の場合、液胞) へ排泄される。シトクロム P450 が触媒する反応は、一酸素添加反応に分類され、非常に幅広い基質群を変換できる (Guengerich F. P., 2001)。基本的にはそのほとんどが酸化反応であるが、逆反応である還元反応や加水分解反応を触媒することも知られている (Guengerich F. P., 2001)。また、最近では、シトクロム P450 により見かけ上加水分解が起こる (厳密には酸化反応として分類される) ことが明らかとなっている (Guengerich, F. P., 1988)。シトクロム P450 以外にも様々な酵素が異物代謝反応に関与している (Gaweska, H., 2011, Decker, M., 2009, Meyer, M. R., 2015)。例えば、エステラーゼはエステル基を有する外因性化学物質の加水分解を触媒する (Decker, M., 2009, Meyer, M. R., 2015)。

これまで述べてきた各代謝反応様式とその機構は、主に第 I 相代謝反応におけるシトクロム P450 を中心とした代謝酵素群によって基質に極性官能基が導入された事例である。これら第 I 相代謝反応に対して生体内の内在性代謝物と抱合体を形成し、より極性の高い物質へと変換する代謝反応のことを抱合反応、あるいは第 II 相代謝反応と呼ばれている (代謝反応様式とその機構の詳細は付録に記載)。第 II 相代謝反応を触媒する酵素群として、動物では、グルクロン酸転移酵素 (uridine diphosphate glucuronosyl-transferase: UGT)、硫酸転移酵素 (sulfotransferase: SULT)、グルタチオン S-転移酵素 (Glutathione S-transferase: GST)、N-アセチル転移酵素 (N-acetyl transferase: NAT)、グリシンなどの一部のアミノ酸抱合を触媒する酵素群が知られている (図 1-5) (Ioannides, C., 2001, Iwabuchi, H., 1998)。

植物でも、動物と同じく第 II 相代謝反応として硫酸抱合反応、グルタチオン抱合反応、およびアミノ酸抱合反応により、外因性化学物質をより極性の高い物質へと変換する異物代謝反応が起こる。一方で一部、動物とは異なる異物代謝反応により外因性化学物質の代謝物を生成する。動物では第 II 相代謝反応の中でも特に中心的な役割を果たしているのがグルクロン酸転移酵素であるが、植物ではこの酵素による異物代謝反応はあまり知られておらず、その代わりに糖転移酵素 (glycosyltransferase: GT) によ

る第 II 相代謝反応が起こる (glucose conjugation). また, 第 II 相代謝反応によって生じた外因性化学物質の糖抱合体に糖, アセチル基, 硫酸, およびマロン酸などがさらに抱合する反応が存在する (第 III 相代謝反応) (図 1-5) (Sandermann, H., 1992, Sandermann, H., 1997, Frear, D. S., 1985) ことから, 植物生体内で観測される外因性化学物質の代謝物は動物に比べて多岐にわたる.

このように生体内での外因性化学物質の代謝物は, Phase I, Phase II (植物の場合はこれらに加えて Phase III 代謝反応も含む) に分類される各代謝酵素群による働きが複雑に組み合わさった結果の産物である. しかしながらこれまでの代謝研究では, 一部の代謝酵素による一段階反応の評価に留まっているのが現状である. 外因性化学物質の代謝物情報を網羅的に取得するためには, これら代謝酵素群による代謝反応が多段階で起こった場合の情報を整理し活用する必要がある.

Phase	Description	Metabolic reaction	Enzymes
II Conjugation			
1. Glucuronidation	$R-OH \longrightarrow R-O- \textit{glucuronic acid}$	$R-C(=O)OH \longrightarrow R-C(=O)O- \textit{glucuronic acid}$	UDP-glucuronosyltransferases
	$R-NH_2 \longrightarrow R-NH- \textit{glucuronic acid}$		
2. Sulfo conjugation	$R-OH \longrightarrow R-O- \textit{sulfate}$	$R-NH_2 \longrightarrow R-NH- \textit{sulfate}$	Sulfo transferases
3. Glutathione S-conjugation	$R-X \longrightarrow R- \textit{glutathione}$		Glutathione S-transferases
	X: Electrophilic substrate		
4. N-acetylation	$R-NH_2 \longrightarrow R-NH-C(=O)CH_3$	$R-NH-OH \longrightarrow R-NH-O-C(=O)CH_3$	N-acetyltransferases
5. Amino acid conjugation	$R-C(=O)OH \longrightarrow R-C(=O)S-CoA \longrightarrow R-C(=O)HN- \textit{amino acid}$		Acyl-CoA synthetases + amino acid N-acyltransferases
6. Glucose conjugation	$R-OH \longrightarrow R-O- \textit{glucose}$	$R-C(=O)OH \longrightarrow R-C(=O)O- \textit{glucose}$	Glycosyl transferases
	$R-NH_2 \longrightarrow R-NH- \textit{glucose}$		
	$R-SH \longrightarrow R-S- \textit{glucose}$		
III Secondary conjugation			
Glucose conjugation	$R- \textit{glucose}$	$R- \textit{glucose-glucose}$	Glycosyl transferases
Malonate conjugation	$R- \textit{glucose}$	$R- \textit{glucose-malonate}$	Malonyl transferases
Acetylate conjugation	$R- \textit{glucose}$	$R- \textit{glucose-acetyl}$	Acetyl transferases
Sulfate conjugation	$R- \textit{glucose}$	$R- \textit{glucose-sulfate}$	Sulfo transferases

図 1-5. 第 II 相, 第 III 相代謝酵素が触媒する異物代謝反応 (第 II 相, 第 III 相代謝反応)

1.3. 外因性化学物質の代謝物探索手法

生体内に取り込まれた除草剤をはじめとした外因性化学物質の代謝経路および代謝物の特定は, 主に質量分析 (mass spectrometry: MS) が使用されてきた. 1960 年代から 1990 年代にかけて, ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) が外因性化学物質の代謝物探索法の主流であった. しかし, 生体内で代謝されることにより極性が

増した外因性化学物質の代謝物を GC/MS で測定する場合、誘導体化などの煩雑な前処理操作が必要であり、より簡便な分析法が求められていた。1984年、John B. Fenn らによるエレクトロスプレーイオン化法が開発 (Yamashita, M., 1984) されたことで、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) が外因性化学物質の代謝物探索研究に使用されるようになった。LC/MS が開発されてから約 30 年が経過した今日では、高感度かつ精密質量を取得可能な高分解能質量分析計 (high-resolution mass spectrometry: HRMS) が各種開発されている。一般に HRMS は、1. 高い分解能 ($m/\Delta m > 30000$), 2. 高い質量確度 ($< 10 \text{ ppm}$) を有した MS と定義されており、飛行時間型 (time-of-flight: TOF), フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型 (fourier transform ion cyclotron resonance: FT-ICR), オービトラップ型 (orbitrap) などが知られている (Prasad, B., 2011)。近年では、HRMS を用いた外因性化学物質の代謝物を探索するための方法論が数種報告されている (Zhang, H., 2008, Macherius, A., 2014)。例えば、Zhang らは 血糖降下薬である Troglitazone を投与したラット (薬剤処理群) および非投与ラット (コントロール群) の血漿と肝臓試料を LC/HRMS で測定し、コントロール群で検出された代謝物のシグナル値を薬剤処理群から減算処理 (background subtraction: BgS) した。その結果、24 種類の Troglitazone 代謝物の推定に成功している (Zhang, H., 2008)。また、Macherius らは、環境汚染物質であるトリクロサンをホースラディッシュに曝露、代謝させた試料とコントロールを LC/HRMS で測定し、得られたデータを OPLS-DA (orthogonal projection to latent structures discriminant analysis) に供した。さらに、S プロットを描画し、トリクロサン曝露検体に強い相関 ($p(\text{corr}) > 0.5$) を有するイオンをピックアップすることで、23 種類のトリクロサン代謝物の推定に成功している (Macherius, A., 2014)。しかしながら、薬剤処理検体と非処理検体の MS スペクトルの違いに基づく BgS や OPLS-DA などの手法はいずれも、内生の代謝物変動に起因する偽陽性ピークと区別がつかず、正確な代謝物探索が困難となる。

1.4. 本研究の目的

植物生体内での異物代謝過程に着目することは、1. 効率的な除草剤開発、2. 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。これまでの除草剤をはじめとした外因性化学物質の代謝研究は、MS を用いて行われてきており、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手法が主流であった。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、外因性化学物質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外因性化学物質の代謝物を区別することが困難である。第二の問題点は、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。最も一般的な外因性化学物質の代謝物の推定は、推定される代謝物の化学合成標準物質を用いてクロマトグラフィーの保持時間、MS スペクトルおよび MS/MS スペクトルの一致度を指標に行われるが、多くの代謝物の標準物質を入手、合成することは困難であり、また合成のためには多くの時間と労力を要する。化学構造が推定されない代謝物および合成が不可能な代謝物は、動物や植物に処理することで得られる微量の代謝物を単離しなければならず、非常に煩雑な工程が必要となる。したがって、植物生体内での異物代謝過程に着目した効率的な除草剤開発や農作物の安全性評価を実施するためには、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するための手法が必要となる。

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。まず、第二章では、新規の方法論を構築するための除草剤のモデルとして古くから使用されている 2,4-D を使用した。さらに、2,4-D 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、得られた代謝物の種類と数を指標に、開発した方法論の新規性を検証した。第三章では、シロイヌナズナ植物個体を用いて、開発した方法論の実用性について評価した。

第二章 除草剤の代謝物探索のための方法論の開発

2.1. 緒言

第一章で述べたとおり，従来の MS を基盤とした除草剤の代謝物探索手法の問題点は，1. 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こと，2. 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とである。

第一の問題点である除草剤に曝露されることによって生じる内生の代謝物変動による偽陽性ピークの検出の低減化および包括的な代謝物探索を行うための戦略として，測定対象とする薬剤の安定同位体標識体の利用が考えられる．安定同位体標識体は，非標識体と物理・化学的特性が同じであるため，非標識体と標識体を曝露，代謝させ，取得した MS データの質量差分の情報を用いて代謝物を検出することが可能となる．すなわち，安定同位体ラベリングおよび LC/HRMS を併用することで内生の代謝物変動による偽陽性ピークを除去することが可能となる．これまでに，様々な安定同位体元素 (^{13}C , ^{15}N , ^{34}S , ^2H) を用いて化学合成された薬剤を利用した研究がなされており，代謝経路の特定やこれまで知られていなかった新規代謝物の検出，同定に成功している (Mutlib, A. E., 2008)．さらに，近年では，標識体および非標識体を含む膨大な MS スペクトルデータの中から外因性化学物質由来の代謝物を自動で探索できるソフトウェアが各種開発されてきており，代謝物探索法の高精度化や効率化が進んでいる (Bueschl, C., 2012, Kluger, B., 2013, Kluger, B., 2014, Leeming, M. G., 2015)．しかしながら，これらのソフトウェアを用いた代謝物探索においては， ^{13}C 安定同位体標識体および非標識体を 1:1 で混合した薬剤を用いることを前提としており，これらのソフトウェアを用いた報告は ^{13}C 安定同位体標識体に限られている． ^2H 安定同位体標識体は， ^{13}C 安定同位体標識体に比べてコストや合成の難易度が低いという点において比較的利用しやすいことから， ^2H 安定同位体標識体を用いた代謝研究はこれまでも数多く実施されている (Hemling, M., 1994, Liu, D. Q., 2001, Ohashi, N., 1998, Lam, W.,

2002). 一方で、逆相クロマトグラフィーにおいて、 ^2H 安定同位体標識体は通常、非標識体よりも早く溶出することが知られており (Fukusaki, E., 2005), 上述したソフトウェアでは ^2H 安定同位体標識体を用いた解析をする上での制限が存在する.

第二の問題点である除草剤の代謝物推定は、外因性化学物質の代謝反応を網羅した *in silico* 代謝物予測を実施することで達成できると考えられる. *in silico* 代謝物予測は、これまでに Meteor (Lhasa, UK) や MetabolExpert (CompuDrug, USA) に代表される様々なソフトウェアを利用することでが有料, 無料で提供されている (Langowski, J., 2002, Anari, M. R., 2005). これらのソフトウェアは設定した代謝反応に基づいて化学物質の構造情報からその代謝反応および代謝物を予測するソフトウェアであり, *in silico* 代謝物予測に基づいた外因性化学物質の代謝物の推定事例が報告されている. 例えば, Pelander らは, 検死体から採取した尿中における Quetiapine の代謝物について, 液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析 (LC/TOFMS) を用いて取得したデータと Meteor を用いて予測された Quetiapine の Phase I 代謝物 (酸化反応, 脱離反応, 加水分解反応) を比較解析することでいくつかの Quetiapine 代謝物の推定に成功している (Pelander, A., 2009). しかしながら, このようなソフトウェアを利用したこれまでの報告例 (Pelander, A., 2009) は, 主にヒトや動物における薬物の代謝反応に限られており, 植物体での除草剤の代謝物推定に適応した事例は未だ報告されていない. また, 植物生体内で生じる除草剤の代謝物は, Phase I, Phase II, および Phase III に分類される各代謝反応を触媒する代謝酵素群による働きが複雑に組み合わさった結果の産物であることから, 包括的な除草剤の代謝物推定を達成するためには, これら異物代謝反応の情報を複合的に捉えることが重要であると考えられる.

さらに, HRMS/MS スペクトルの利用は, 生体内分子の構造情報の特定に有用である. また, 除草剤および除草剤の代謝物プロファイルの経時的な変化を解析することは, 植物生体内での除草剤の代謝反応機構の理解につながる. それゆえ, *in silico* 代謝物予測に加えて, HRMS/MS スペクトルを用いた部分構造解析, および除草剤およびその代謝物プロファイルの経時変化の解析を併せて実施することで, 信頼性の高い

代謝物推定ならびに代謝反応機構の解明につながると考えられる。

そこで本章では、 ^{13}C および ^2H 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) によるプリカーサーイオン (MS) およびプロダクトイオン (MS/MS) の取得、データマイニング技術 (保持時間の補正, ピーク検出, ペアードピークスフィルタリング), 第 I 相代謝反応から第 III 相代謝反応までを網羅した *in silico* 代謝物予測, 代謝物プロファイルの経時的变化を解析することで, 除草剤の代謝物を高精度に推定するための新しい方法論の構築を目的とした (図 2-1)。提案する方法論は, 除草剤の代謝物候補を選定するための戦略 (2. LC/HRMS/MS 分析, 3.1 ピークアライメントおよびピーク検出, 3.2 統計解析, 3.3 ペアードピークスフィルタリング) と選定した代謝物候補の化学構造を推定するための戦略 (3.4 経時的な代謝物プロファイリング, 3.5 *in silico* 代謝物ライブラリーおよび HRMS/MS スペクトルを用いた化学構造推定) の 2 つから構成されている。当該方法論の構築と検証を行うためのモデル除草剤として, 2,4-D を選択した。2,4-D はフェノキシ系除草剤に分類され, 植物ホルモンであるオーキシンの作用を持ち, 分裂組織の活性化, 分裂異常, 形態異常など, 植物の基本的生理活性の攪乱現象により除草活性を有することが古くから知られている薬剤である (Lilienfeld, D. E., 1998, Terence, A. W., 2006, Song, Y., 2014, Eyer, L., 2016)。これまでに 13 種類の 2,4-D 代謝物がシロイヌナズナ, コムギやダイズ, 綿花など様々な植物体から同定されている (Chkanikov, D., 1976, Feung, C.-S., 1973, Eyer, L., 2016)。また, 生体試料の選別にあたっては, 植物個体に比べて実験サンプルの調製が容易であること, 生育ステージの違いによる影響を受けにくいことから安定した状態の細胞を回収できること, 培養のバッチ間のばらつきを押さえることができること, 薬剤の取り込み効率が安定していることなどの理由を鑑みてシロイヌナズナ T87 培養細胞を選択した。

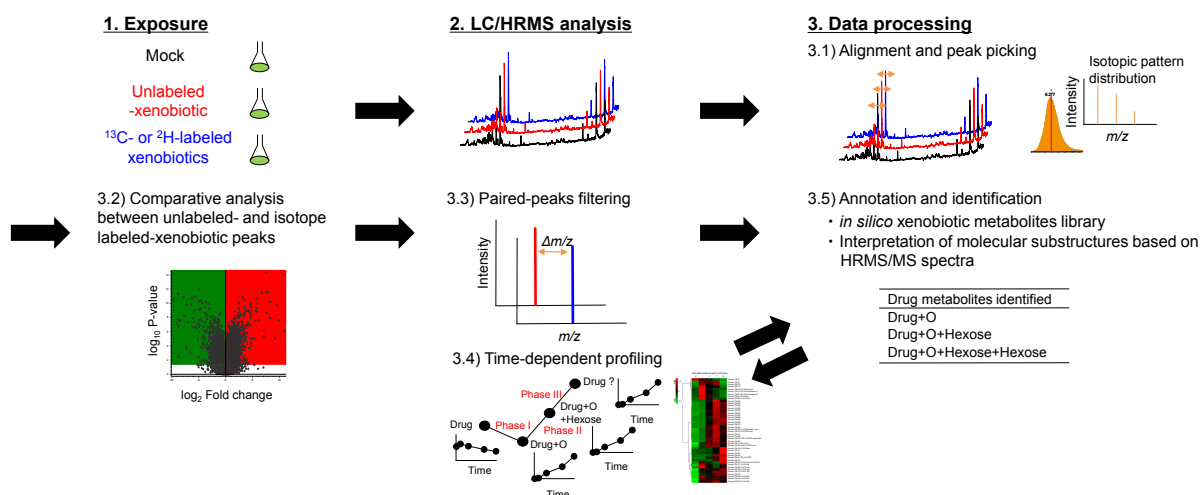


図 2-1. 本研究で提案する外因性化学物質の代謝物探索手法

2.2. 実験方法

2.2.1. 試薬および供試化学物質

LC-MS グレードのアセトニトリル, LC-MS グレードの酢酸アンモニウム, および LC-MS グレードの酢酸 (LC-MS grade) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した. LC-MS グレードの水は関東化学株式会社 (東京, 日本) から購入した. 2,4-D (純度 99.5 %) はナカライテスク株式会社 (京都, 日本) から購入した. (2,4-Dichlorophenoxy-d₃) acetic-2,2-d₂ acid (²H₅-2,4-D; 98 % D) はセントラル薬品株式会社 (東京, 日本) から購入した. ¹³C₈-2,4-D (98 % ¹³C) は ¹³C₂-chloroacetic acid と ¹³C₆-2,4-dichlorophenol を用いて独自に合成した (Narender, N., 2002). ¹³C₈-2,4-D の合成に利用した ¹³C₆-2,4-dichlorophenol は ¹³C₆-phenol を原料として独自に合成した (Wei, T.-B., 2000). ¹³C₆-Phenol および ¹³C₂-chloroacetic acid は大陽日本酸素 (東京, 日本) から購入した. 内部標準物質として使用したピリミカルブおよび 2-methyl-4-chlorophenoxy acetic acid (MCPA) は和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入した.

2.2.2. 実験植物および化学物質の処理

シロイヌナズナ T87 培養細胞は理化学研究所バイオリソース研究センター (筑波,

日本) から提供していただいた。シロイヌナズナ T87 培養細胞は 500 mL のフラスコに添加したムラシゲスコーグ (Murashige and Skoog) (Murasige, T., 1962) 液体培地 (Goda, H., 2002) (150 mL) で 25 °C, 24 時間明期条件で 1 週間培養した。供試化学物質の処理については, 2,4-D, $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D, および $^2\text{H}_5$ -2,4-D をそれぞれジメチルスルホキシドに溶解させた後, 終濃度が 0.1 % (体積比) になるように培養液中に添加した。またコントロール群として, ジメチルスルホキシドを終濃度が 0.1 % (体積比) になるように培養液中に添加した添加した培養液についても同様に調製を行った (図 2-1, Step 1)。化学物質暴露後, 培養液を 20 mL ずつ 5 本の 100 mL フラスコに分注し, 25 °C, 24 時間明期条件で 0, 1, 3, 7, 10 日間培養し回収した。回収した培養細胞は PBS で 3 回洗浄した後, 直ちに液体窒素で凍結させ一昼夜凍結乾燥に供した。細胞培養液は 1 mL 計量し, 培養細胞と同様に一昼夜凍結乾燥に供した。凍結乾燥後得られた培養細胞および培養液はサンプルの抽出時まで -80 °C で保存した。

2.2.3. 試料調製方法

サンプリング日ごとに回収した培養細胞は, 4 本の 2.0 mL 容のエッペンドルフチューブにそれぞれ 10 mg \pm 0.1 mg 計量した。各エッペンドルフチューブに 3 mm のジルコニアボール 1 個と 1 mL の抽出溶媒 (水/アセトニトリル 1:1 体積比) を加え, 20 Hz で 1 分間ボールミル (MM 301 Retsch, Haan, Germany) により破碎した。続いて, 超音波処理によって 5 分間代謝物を室温下で抽出した後, 16000 \times g, 4 °C の条件で 5 分間遠心分離した。その後, 上清 900 μ L を新しいエッペンドルフチューブに回収した。前述した条件で抽出操作を 3 度繰り返し, 上清をそれぞれ新しいエッペンドルフチューブに回収した。それぞれ回収した上清は遠心濃縮機に供し, アセトニトリルを除去した後, 1 本のエッペンドルフチューブに混合した。続いて, 一昼夜凍結乾燥に供し溶媒を除去した。内部標準物質として 20 ng の MCPA およびピリミカルブを含む 200 μ L の混合溶液 (水/アセトニトリル 2:1 体積比) に再溶解し, 0.2 μ m の PTFE シリンジフィルターに通したものを HPLC バイアルに回収した。各サンプルは LC/HRMS 分

析に供するまで-80 °C で保存した。

2.2.4. LC/HRMS/MS 分析条件

LC/HRMS 分析 (図 2-1, Step 2) および LC/HRMS/MS 分析 (図 2-1, Step 3.5) には, LC system (Prominence, Shimadzu, Kyoto, Japan) と Q Exactive plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。LC system はバイナリー高圧グラジエント送液ユニット, カラムオーブン, およびオートサンプラーから構成されており, システムコントローラーによって各装置を制御した。LC の分析条件を以下に示す。移動相 A には 0.05% (体積比) の酢酸, および 5 mM の酢酸アンモニウムを添加した水を使用し, 移動相 B には 0.05% (体積比) の酢酸, および 5 mM の酢酸アンモニウムを添加したアセトニトリルを使用した。インジェクション量は 10 μ L に設定した。流速は 0.4 mL/min に設定した。カラムオーブン温度は 40°C に設定した。グラジエント条件は, B 液 10 % (2 分間), B 液 10-90 % (2 分間), B 液 90 % (3 分間) 行った後初期状態に戻し 4 分間カラムの平衡化を行った。分析カラムは Inertsil ODS-4 (150 \times 2.1 mm i.d., 粒子径, 3 μ m; GL サイエンス, 東京, 日本) を使用した。また, プリカーサーイオンスキンの分析条件を以下に示す。分析は負イオンモードで実施した。シースガス流速は 40 arb, Aux ガス流速は 10 arb に設定した。スプレー電圧は 2.5 kV に設定した。キャピラリー温度は 275°C, ヒーター温度は 425 °C に設定した。S レンズレベルは 50 に設定した。質量分解能は 70000 に設定した。C-Trap に溜めるイオン量を制御するパラメーターである Automatic gain control (AGC) target は 1000000, Maximum injection time (MI) は 200 ミリ秒に設定した。スキャン幅は 100-700 に設定した。また, プロダクトイオンスキンの分析条件 (parallel reaction monitoring: PRM) の分析条件を以下に示す。分析は負イオンモードで実施した。シースガス流速は 40 arb, Aux ガス流速は 10 arb に設定した。スプレー電圧は 2.5 kV に設定した。キャピラリー温度は 275 °C, ヒーター温度は 425 °C に設定した。S レンズレベルは 50 に設定した。質量分解能は 17500 に設定した。AGC target は 2000000, MI は 100 ミリ秒に設定した。プリカーサーイオ

ンの分離幅は 4.0 Da, オフセットを 0.7 に設定した. プロダクトイオンスキャンの開始幅質量電荷比は 50 に設定した. 衝突エネルギーは最小値を 15 V, 最大値を 35 V に設定し, MS スペクトルを 10 V ごとに取得した.

2.2.5. ピークアライメントおよびピーク検出

保持時間の補正 (1. Retention time alignment), ピーク検出およびピークエリア値の算出 (2. Detect unknown compounds), ピークのグルーピング (3. Group unknown compounds, 4. Fill gaps), バックグラウンド減算 (mark background compounds) には Compound Discoverer 2.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いた (図 2-1, Step 3.1). Compound Discoverer 2.0 における各処理工程の名称は, 上記の括弧内に記載してあるとおりである. 処理工程のフローチャートおよびパラメーターの設定値を図 2-2, 図 2-3 に示す. Compound Discoverer 2.0 を用いたデータ解析は, 3 種類のタイムコースデータセット, すなわち 2,4-D 処理群とコントロール群, 2,4-D 処理群と $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D 処理群, および 2,4-D 処理群と $^2\text{H}_5$ -2,4-D 処理群について個別に実施した. それぞれのタイムコースデータセットには, 合計 40 のデータが含まれる [各薬剤処理群について 5 点のタイムコース (各 $n=4$)]. まず, 保持時間の補正 (1. Retention time alignment) をベースピーククロマトグラムに基づいて実施した. 次に, ピーク検出 (2. Detect unknown compounds) を行った. 設定した元素組成 (2,4-D および外因性化学物質の代謝反応で用いられる元素組成) に基づいてモノアイソトピックイオンおよび同位体イオンを探索し, 質量許容差 10 ppm および相対感度比 0.5 を満足した同位体イオンについてはモノアイソトピックイオンに統合した. 検出されたモノアイソトピックイオンのうち, 同位体イオンが 1 つも検出されていないものは解析対象から除外した. また, 得られたモノアイソトピックイオンについて, クロマトグラムを構成するデータポイント数が 3 ポイント未満のものについても解析対象から除外した. 続いて, 設定したアダクトイオン種の $\Delta m/z$ に基づいてアダクトイオン種を探索し, 質量許容差 10 ppm 以内を満たしたものは, 最もシグナル強度の強いアダクトイオン種に統合した後,

ピークエリア値の算出を行った。設定したアダクトイオン種は、分析条件 (移動相溶媒および添加剤の種類) および 2,4-D の物性情報を考慮して, $[M-H]^-$, $[M-H-HAc]^-$, $[M-H-H_2O]^-$ の 3 種類を用いた。データファイルごとに検出された各モノアイソトピックイオンについて, 設定した質量許容差 10 ppm および保持時間差 0.2 分に基づきピークのグルーピングを行った (3. Group unknown compounds)。あるピークグループについて, 検出限界などの理由によりエリア値が算出されていないデータファイルが存在した場合, ギャップフィリングを実施しエリア値を算出した (4. Fill gaps)。ギャップフィリングは, あるピークグループが有する保持時間およびモノアイソトピックイオンの精密質量近傍のノイズを探索し, そのエリア値を算出するアルゴリズムである。ギャップフィリングを実施することで, その後の統計解析に供するために必要なデータマトリクス作成が達成された。また, 2,4-D 処理群とコントロール群については, コントロール群で検出された化合物を用いてバックグラウンド減算を行った (Mark background compounds)。

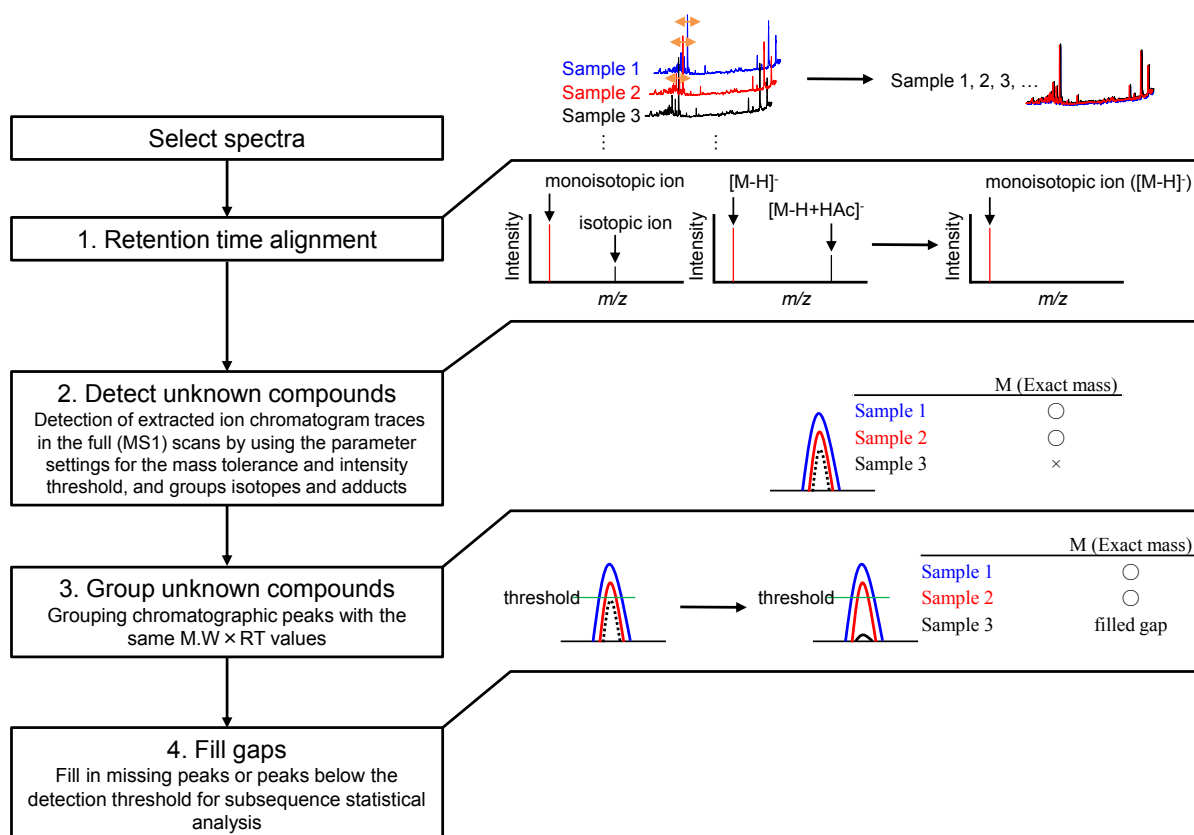


図 2-2. Compound Discoverer 2.0 を用いた処理工程のフローチャート

Align Retention Times node

Alignment Model : Adaptive curve
Mass Tolerance : 10 ppm
Max. Shift (min) : 0.2

Detect Unknown Compounds node

Mass Tolerance : 10 ppm
Intensity Tolerance (%) : 50
S/N Threshold : 3
Min. Peak Intensity : 10000
Ions : [M-H]⁻, [M-H-H₂O]⁻, [M-H+HAc]⁻
Min. Element Counts : C H N O Cl
Max. Element Counts : C60 H200 N10 O20 P10 S10 Cl3

Group Unknown Compounds node

Mass Tolerance : 10 ppm
Max. Shift (min) : 0.05

Fill Gaps node

Mass Tolerance : 10 ppm
RT Tolerance (min) : 0.05
S/N Threshold : 10

Predict Composition

1. Prediction Settings
Mass Tolerance : 10 ppm
Min. Element Counts : C H N O Cl
Max. Element Counts : C60 H200 N10 O20 P10 S10 Cl3
Min.RDBE : -1
Max.RDBE : 40
Min. H/C : 0.1
Max. H/C : 4
Max. # Candidates : 10
2. Pattern Matching
Intensity Tolerance (%) : 30
Intensity Threshold (%) : 0.1
Min # Isotopes : 2
Min. Spectral Fit (%) : 50

Mark Background Compounds

Max. Sample/Blank : 2

図 2-3. Compound Discoverer 2.0 における各種パラメーター

2.2.6. 統計解析

各検体において、比較対象とする 2 群 (例えば, 2,4-D 処理後 7 日の検体および ¹³C₈-2,4-D 処理後 7 日の検体) をヴォルカノプロット (\log_2 fold change > |1|, P -value < 0.05) に供することで, 2,4-D 代謝物候補を選定した (図 2-1, Step 3.2). ヴォルカノプロットの描画には Compound Discoverer ver. 2.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いた. 階層的クラスタ解析 (Hierarchical cluster analysis: HCA) には, MetaboAnalyst 3.0 (Xia, J., 2009) を用いた. また, クラスタ間の距離の算出にはウォード法を用いた.

2.2.7. ペアードピークスフィルタリング

統計解析によって選定された 2,4-D 代謝物候補について, ペアードピークスフィルタリングに供した (図 2-1, Step 3.3). ペアードピークスフィルタリングとは, シロイヌナズナ T87 培養細胞に非標識体 2,4-D, ¹³C₈-2,4-D, および ²H₅-2,4-D をそれぞれ処理することで生じた代謝物をペアーにして解析することで, 溶媒, システムノイズ, 夾雑成分に由来する偽陽性ピークの検出を大幅に低減することが可能なフィルタリング技術である. ペアードピークスフィルタリングは, マイクロソフトエクセル 2013 のビジュアルベーシックアプリケーションを用いて独自に作成した. 前提として, 非

標識体 2,4-D と $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D に由来する代謝物ペア、あるいは非標識体 2,4-D と $^2\text{H}_5$ -2,4-D に由来する代謝物ペアにおいては、次の 3 条件を満たす。1. クロマトグラフィーにおける保持時間が類似する、2. 質量分析計で観測される強度は同等である、3. 両者の $\Delta m/z$ は標識元素の種類 (例えば、 ^{13}C と ^{12}C の質量差、 ^2H と ^1H の質量差など) および標識数を反映する。 $\Delta m/z$ は、以下の式で表すことができる。

$$\Delta m/z = \text{同位体元素の質量差} \times \text{標識数}$$

例えば、2,4-D および $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D 処理したシロイヌナズナ T87 培養細胞において、求める $\Delta m/z$ は、 1.0034×8 すなわち 8.0272 と算出される。ゆえに、この値に質量許容差 (例えば 5 ppm) を考慮して算出される 8.0272 ± 0.0010 に相当する $\Delta m/z$ を有する代謝物ペアを探索すればよいことになる。さらにクロマトグラフィーにおける保持時間差 (ΔRT) および質量分析計での検出強度の差を設定することで、偽陽性を可能な限り低減することが可能となる。ペアードピークスフィルタリングにおける各パラメータの詳細な設定値は以下に記載する (表 2-1)。

表 2-1. ペアードピークスフィルタリングにおける各種パラメーター

Parameter	Unlabeled and $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D-treated samples	Unlabeled and $^2\text{H}_5$ -2,4-D-treated samples
$\Delta m/z$ values	-8.0262	-5.0314
	-6.0201	-4.0251
		-3.0188
		-2.0126
		-1.0063
Mass tolerance (ppm)	5	5
Intensity tolerance	-	-
ΔRT (min)	0.1	0.2

2.2.8. 2,4-D 代謝物のアノテーションおよび化学構造の推定方法

ペアードピークスフィルタリングに供することで得られた 2,4-D 代謝物候補について、Metabolizer (ChemAxon Ltd., Budapest, Hungary; <https://www.chemaxon.com/>) を用いて作成した 2,4-D 代謝物ライブラリーと質量誤差 5 ppm 以内で比較照合することでアノテーションを行った (図 2-1, Step 3.5)。Metabolizer は、植物生体内で起こることが知られている外因性化学物質の既知代謝反応様式をもとに、入力した親化合物から生じうる代謝物を *in silico* で予測するソフトウェアである。*in silico* 代謝物予測に用いた外因性化学物質の既知代謝反応様式は、Reactor (ChemAxon Ltd) を用いて独自に作成した (図 2-8)。作成した既知代謝反応様式を Metabolizer に登録することで、2,4-D 代謝物を予測した。また、ペアードピークスフィルタリングによって得られた全ての 2,4-D 代謝物についてプロダクトイオンスキャンを行い、得られた HRMS/MS スペクトルから構造情報の解析を行った。

2.3. 結果と考察

2.3.1. LC/HRMS/MS 分析条件の最適化

植物は 2 次代謝物を多種多様に産生する。植物界全体では 20000 種を超える代謝物が存在することが推計されており、他の生物種に比べるとはるかに多いことが知られている (Pichersky, E., 2000)。例えば、シロイヌナズナのロゼッタ葉 1 枚に含まれる代謝物数は、1 次代謝物、2 次代謝物あわせて 5000 種類存在すると言われている (Bino, R. J., 2004)。従って、植物中に含まれる膨大な内生の代謝物の中から除草剤の代謝物を正確にピックアップするためには、LC でのクロマト分離、あるいはクロマト分離が難しい代謝物については MS での分離を実施する必要がある。石橋らはこれまでに植物試料中に含まれる農薬の包括的なスクリーニングにおける質量分解能 ($m/\Delta m = 17500, 35000, 70000$) の影響を Q Exactive を用いて調査した (Ishibashi, M., 2015)。その結果、標的とする農薬成分を植物試料中の夾雑成分と分離分析を行うためには、質量分解能 70000 および質量精度 5 ppm 以内での分析が必要であると結論づけた。それ

ゆえ、本研究では質量分解能を 70000 に設定して分析を行った。質量分解能の設定に続き、LC/HRMS 測定条件の検討を行った。これまでに報告されている 13 種類の 2,4-D 代謝物のうち、シロイヌナズナ T87 培養細胞で検出された 10 種類の 2,4-D 代謝物情報を指標に検討を行った。検討に用いた 10 種類の代謝物は次のとおりである (表 2-2)。2,4-D 骨格を有する代謝物 (グループ 1) は 2 種類存在し、2,4-D-hexose (2,4-D-Hex) (M1 および M2) である。Hydroxy-2,4-D (OH-2,4-D) 骨格を有する代謝物 (グループ 2) は 1 種類存在し、OH-2,4-D (M7) である。2,4-dichlorophenol (2,4-DCP)骨格を有する代謝物 (グループ 3) は 7 種類存在し、それぞれ 2,4-D-alanine (2,4-D-Ala) (M9), 2,4-D-valine (2,4-D-Val) (M11), 2,4-DCP-hexose (2,4-DCP-Hex) (M13), 2,4-D-leucine (2,4-D-Leu), または 2,4-D-isoleucine (2,4-D-Ile) (M14), 2,4-D-aspartic acid (2,4-D-Asp) (M16), 2,4-D-glutamic acid (2,4-D-Glu) (M19), and 2,4-D-phenylalanine (2,4-D-Phe) (M23) である。10 種類の 2,4-D 代謝物の物理化学的性質 (LogPow, 0.79 ~ 3.18) (CAS: <https://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>) から、逆相カラムを分離担体として選定した。また、2,4-D はカルボキシル基を有する酸性物質であることから、エレクトロスプレーイオン化法における極性についてはネガティブイオンモードで実施した。続いて、移動相溶媒、添加剤、グラジエント条件などが LC 分離および HRMS/MS 分析に及ぼす影響について、10 ppm の 2,4-D を 7 日間処理したシロイヌナズナ T87 培養細胞からの抽出試料を用いて評価を行った。その結果、移動相とグラジエント条件の最適化を行うことで、10 種類の 2,4-D 代謝物すべてについて良好なピークで感度良く分離分析を達成できた (図 2-4)。さらに、これら 10 種類の 2,4-D 代謝物について HRMS/MS スペクトルを用いた構造解析を実施したところ、構造情報との間に矛盾がなかった (図 2-5a, 2-5b)。以上の結果から、最適化した LC/HRMS/MS 分析を用いることで、植物試料中に含まれる膨大な夾雑成分の中から除草剤の代謝物を高精度に分離分析することができると結論づけた。

表 2-2. 推定された 2,4-D 代謝物一覧

Metabolite ID	RT (min) ^a	Precursor ion	Measured precursor ion [M-H] ^{-b}	$\Delta m/z^c$	$\Delta m/z^d$	Predicted formula of molecular anion [M-H] ⁻ [deviation (ppm)]	Observed main fragment(s) m/z^b	Predicted formula of fragment anions [deviation (ppm)]	Estimated metabolites
Group 1: 2,4-D structure (C₈H₆O₃Cl₂)									
M1	7.35	[M-H] ⁻ , [M-H+HAc] ⁻	381.0154	8.0263 (8)	5.0317 (5)	C ₁₄ H ₁₅ O ₈ Cl ₂ (1.3)	101.0244, 119.0350, 160.9567, 161.0456, 218.9622	C ₄ H ₅ O ₃ (0.2), C ₄ H ₇ O ₄ (0.4), C ₆ H ₃ OCl ₂ (0.2), C ₆ H ₉ O ₅ (0.2), C ₈ H ₅ O ₃ Cl ₂ (0.2)	2,4-D-Hex (isomer 1)
M2	7.46	[M-H] ⁻ , [M-H+HAc] ⁻	381.0148	8.0269 (8)	5.0314 (5)	C ₁₄ H ₁₅ O ₈ Cl ₂ (-0.4)	101.0244, 119.0351, 160.9567, 161.0456, 218.9622	C ₄ H ₅ O ₃ (0.4), C ₄ H ₇ O ₄ (0.7), C ₆ H ₃ OCl ₂ (0.4), C ₆ H ₉ O ₅ (0.3), C ₈ H ₅ O ₃ Cl ₂ (0.3)	2,4-D-Hex (isomer 2)
M3	6.93	[M-H] ⁻	453.0364	8.0269 (8)	-	-	160.9566, 218.9620	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-0.5), C ₈ H ₅ O ₃ Cl ₂ (-0.7)	Unknown
M4	6.42	[M-H] ⁻	463.0935	8.0261 (8)	5.0306 (5)	-	160.9564, 218.9619	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.3), C ₈ H ₅ O ₃ Cl ₂ (-1.2)	Unknown
M5	6.90	[M-H] ⁻ , [M-H+HAc] ⁻	543.0679	8.0266 (8)	5.0307 (5)	C ₂₀ H ₂₅ O ₁₃ Cl ₂ (0.3)	101.0243, 119.0350, 160.9565, 161.0455, 179.0560, 218.9620	C ₄ H ₅ O ₃ (-1.0), C ₄ H ₇ O ₄ (-0.1), C ₆ H ₃ OCl ₂ (-0.7), C ₆ H ₉ O ₅ (-0.4), C ₆ H ₁₁ O ₆ (-0.7), C ₈ H ₅ O ₃ Cl ₂ (-0.7)	2,4-D-Hex-Hex
M6	6.46	[M-H] ⁻	554.1219	8.0267 (8)	5.0318 (5)	-	160.9566, 218.9621	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-0.3), C ₈ H ₅ O ₃ Cl ₂ (-0.2)	Unknown
Group 2: OH-2,4-D structure (C₈H₆O₄Cl₂)									
M7	7.13	[M-H] ⁻	234.9570	8.0269 (8)	4.0252 (4)	C ₈ H ₅ O ₄ Cl ₂ (-0.2)	176.9516	C ₆ H ₃ O ₂ Cl ₂ (0.3)	OH-2,4-D
Group 3: 2,4-Dichlorophenol (DCP) structure (C₆H₄OCl₂)									
M8	6.81	[M-H] ⁻	240.9134	6.0201 (6)	3.0186 (3)	C ₆ H ₃ O ₄ SCl ₂ (-0.2)	160.9566	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-0.3)	SO ₃ -2,4-DCP
M9	7.00	[M-H] ⁻	289.9992	8.0269 (8)	5.0312 (5)	C ₁₁ H ₁₀ O ₄ NCl ₂ (-0.2)	71.0139, 88.0405, 128.0354, 160.9567	C ₃ H ₃ O ₂ (0.5), C ₃ H ₆ O ₂ N (0.7), C ₅ H ₆ O ₃ N (0.7), C ₆ H ₃ OCl ₂ (0.4)	2,4-D-Ala
M10	6.13	[M-H] ⁻	305.9945	8.0268 (8)	5.0315 (5)	C ₁₁ H ₁₀ O ₅ NCl ₂ (1.1)	74.0247, 87.0087, 104.0353, 144.0301, 160.9565, 217.9779	C ₂ H ₄ O ₂ N (-0.3), C ₃ H ₃ O ₃ (-0.7), C ₃ H ₆ O ₃ N (-0.4), C ₅ H ₆ O ₄ N (-0.8), C ₆ H ₃ OCl ₂ (-0.7), C ₈ H ₆ O ₂ NCl ₂ (-1.1)	2,4-D-Ser
M11	8.20	[M-H] ⁻	318.0308	8.0264 (8)	5.0312 (5)	C ₁₃ H ₁₄ O ₄ NCl ₂ (0.8)	99.0452, 116.0717, 156.0666, 160.9567	C ₅ H ₇ O ₂ (0.5), C ₅ H ₁₀ O ₂ N (-0.1), C ₇ H ₁₀ O ₃ N (0.2), C ₆ H ₃ OCl ₂ (0.5)	2,4-D-Val

M12	6.55	[M-H] ⁻	320.0101	8.0268 (8)	5.0318 (5)	C ₁₂ H ₁₂ O ₅ NCl ₂ (1.0)	72.0091, 74.0247, 158.0459, 160.9565	C ₂ H ₂ O ₂ N (-0.1), C ₂ H ₄ O ₂ N (-0.6), C ₆ H ₈ O ₄ N (0.1), C ₆ H ₃ OCl ₂ (-0.8)	2,4-D-Thr
M13	6.53	[M-H] ⁻ , [M-H+HAc] ⁻	323.0096	6.0202 (6)	3.0189 (3)	C ₁₂ H ₁₃ O ₆ Cl ₂ (0.4)	101.0245, 119.0349, 160.9567, 161.0456	C ₄ H ₅ O ₃ (0.1), C ₄ H ₇ O ₄ (-0.4), C ₆ H ₃ OCl ₂ (0.1), C ₆ H ₉ O ₅ (0.1)	2,4-DCP-Hex
M14	8.90	[M-H] ⁻	332.0464	8.0267 (8)	5.0310 (5)	C ₁₄ H ₁₆ O ₄ NCl ₂ (0.5)	113.0608, 130.0875, 160.9567, 170.0825	C ₆ H ₉ O ₂ (0.2), C ₆ H ₁₂ O ₂ N (1.5), C ₆ H ₃ OCl ₂ (0.5), C ₈ H ₁₂ O ₃ N (1.2)	2,4-D-Leu or 2,4-D-Ile
M15	5.94	[M-H] ⁻	333.0054	8.0264 (8)	5.0315 (5)	C ₁₂ H ₁₁ O ₅ N ₂ Cl ₂ (1.0)	70.0298, 131.0461, 160.9565, 171.0410, 217.9779	C ₃ H ₄ ON (-0.7), C ₄ H ₇ O ₃ N ₂ (-0.9), C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.0), C ₆ H ₇ O ₄ N ₂ (-0.6), C ₈ H ₆ O ₂ NCl ₂ (-0.8)	2,4-D-Asn
M16	6.22	[M-H] ⁻	333.9889	8.0271 (8)	5.0310 (5)	C ₁₂ H ₁₀ O ₆ NCl ₂ (-0.4)	115.0037, 132.0303, 160.9567, 172.0252, 217.9782	C ₄ H ₃ O ₄ (0.3), C ₄ H ₆ O ₄ N (0.2), C ₆ H ₃ OCl ₂ (0.4), C ₆ H ₆ O ₅ N (0.2), C ₈ H ₆ O ₂ NCl ₂ (0.2)	2,4-D-Asp
M17	6.31	[M-H] ⁻	334.9735	8.0265 (8)	5.0309 (5)	-	160.9565	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-0.7)	Unknown
M18	6.02	[M-H] ⁻	347.0210	8.0268 (8)	5.0317 (5)	C ₁₃ H ₁₃ O ₅ N ₂ Cl ₂ (1.0)	128.0354, 160.9566, 185.0568	C ₅ H ₆ O ₃ N (-0.4), C ₆ H ₃ OCl ₂ (-0.3), C ₇ H ₉ O ₄ N ₂ (-1.2)	2,4-D-Gln
M19	6.31	[M-H] ⁻	348.0049	8.0271 (8)	5.0314 (5)	C ₁₃ H ₁₂ O ₆ NCl ₂ (0.5)	102.0561, 128.0354, 146.0460, 160.9567, 186.0408, 217.9781	C ₄ H ₈ O ₂ N (0.5), C ₅ H ₆ O ₃ N (0.7), C ₅ H ₈ O ₄ N (0.5), C ₆ H ₃ OCl ₂ (0.4), C ₇ H ₈ O ₅ N (-0.1), C ₈ H ₆ O ₂ NCl ₂ (0.2)	2,4-D-Glu
M20	5.82	[M-H] ⁻	356.0218	8.0266 (8)	5.0321 (5)	C ₁₄ H ₁₂ O ₄ N ₃ Cl ₂ (2.1)	154.0620, 160.9565, 194.0569	C ₆ H ₈ O ₂ N ₃ (-1.5), C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.1), C ₈ H ₈ O ₃ N ₃ (-1.4)	2,4-D-His
M21	6.56	[M-H] ⁻	362.0211	8.0263 (8)	5.0307 (5)	-	160.9565	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.0)	Unknown
M22	6.02	[M-H] ⁻ , [M-H+HAc] ⁻	365.0201	6.0199 (6)	3.0191 (3)	C ₁₄ H ₁₅ O ₇ Cl ₂ (0.1)	101.0243, 119.0348, 160.9564, 161.0453, 179.0558	C ₄ H ₅ O ₃ (-1.1), C ₄ H ₇ O ₄ (-1.5), C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.6), C ₆ H ₉ O ₅ (-1.7), C ₈ H ₁₁ O ₆ (-1.7)	2,4-DCP-acetyl Hex
M23	8.65	[M-H] ⁻	366.0303	8.0270 (8)	5.0310 (5)	C ₁₇ H ₁₄ O ₄ NCl ₂ (-0.6)	118.0664, 147.0453, 160.9568, 164.0716, 204.0667	C ₈ H ₈ N (1.2), C ₉ H ₇ O ₂ (0.8), C ₆ H ₃ OCl ₂ (0.7), C ₉ H ₁₀ O ₂ N (-0.9), C ₁₁ H ₁₀ O ₃ N (0.2)	2,4-D-Phe
M24	6.54	[M-H] ⁻	372.9565	6.0195 (6)	3.0184 (3)	C ₁₁ H ₁₁ O ₈ SCl ₂ (2.1)	96.9600, 113.0243, 131.0348, 160.9565	HSO ₄ (-1.5), C ₅ H ₅ O ₃ (-1.1), C ₅ H ₇ O ₄ (-1.7), C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.2)	2,4-DCP-SO ₃ Pen
M25	6.78	[M-H] ⁻	395.0306	6.0204 (6)	3.0190 (3)	-	160.9564	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.3)	Unknown
M26	6.34	[M-H] ⁻	395.0307	6.0206 (6)	3.0190 (3)	-	160.9564	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.6)	Unknown
M27	6.64	[M-H] ⁻ , [M-H+HAc] ⁻	424.0580	8.0263 (8)	5.0316 (5)	-	160.9565	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-0.7)	Unknown

M28	6.12	[M-H] ⁻ , [M-H+HAc] ⁻	466.0678	8.0264 (8)	5.0325 (5)	-	160.9564	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.6)	Unknown
M29	6.09	[M-H] ⁻ , [M-H+HAc] ⁻	469.0672	6.0200 (6)	3.0190 (3)	C ₁₈ H ₂₃ O ₁₀ Cl ₂ (-0.3)	101.0243, 119.0349, 160.9564, 161.0453, 163.0610, 323.0087	C ₄ H ₅ O ₃ (-1.1), C ₄ H ₇ O ₄ (-0.9), C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.5), C ₆ H ₉ O ₅ (-1.2), C ₆ H ₁₁ O ₄ (-1.1), C ₁₂ H ₁₃ O ₆ Cl ₂ (-2.3)	2,4-DCP-Hex-dHex (isomer 1)
M30	6.21	[M-H] ⁻ , [M-H+HAc] ⁻	469.0672	6.0205 (6)	3.0190 (3)	C ₁₈ H ₂₃ O ₁₀ Cl ₂ (-0.3)	101.0243, 119.0348, 160.9564, 61.0452, 163.0608, 179.0559, 307.1031, 323.0090	C ₄ H ₅ O ₃ (-1.4), C ₄ H ₇ O ₄ (-1.4), C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.3), C ₆ H ₉ O ₅ (-2.3), C ₆ H ₁₁ O ₅ (-2.3), C ₆ H ₁₁ O ₆ (-1.4), C ₁₂ H ₁₉ O ₉ (-1.0), C ₁₂ H ₁₃ O ₆ Cl ₂ (-1.4)	2,4-DCP-Hex-dHex (isomer 2)
M31	6.02	[M-H] ⁻	472.0056	6.0201 (6)	3.0188 (3)	-	160.9564	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.3)	Unknown
M32	6.02	[M-H] ⁻	494.0267	6.0198 (6)	3.0190 (3)	-	160.9564	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.8)	Unknown
M33	5.81	[M-H] ⁻ , [M-H+HAc] ⁻	511.0781	6.0201 (6)	3.0194 (3)	C ₂₀ H ₂₅ O ₁₁ Cl ₂ (0.3)	71.0139, 89.0245, 101.0244, 160.9567, 323.0086, 469.0675	C ₃ H ₃ O ₂ (0.4), C ₃ H ₅ O ₃ (0.7), C ₄ H ₅ O ₃ (-0.4), C ₆ H ₃ OCl ₂ (0.2), C ₁₂ H ₁₃ O ₆ Cl ₂ (-2.8), C ₁₈ H ₂₃ O ₁₀ Cl ₂ (0.2),	Nozzle-skimmer dissociation product of M36
M34	7.04	[M-H] ⁻	515.0732	8.0259 (8)	5.0314 (5)	-	160.9565	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-0.5)	Unknown
M35	6.21	[M-H] ⁻	532.0634	6.0198 (6)	3.0190 (3)	-	160.9564	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.5)	Unknown
M36	5.81	[M-H] ⁻	555.0681	6.0203 (6)	3.0195 (3)	C ₂₁ H ₂₅ O ₁₃ Cl ₂ (0.6)	71.0139, 89.0245, 101.0244, 160.9566, 323.0090, 365.0229, 469.0675, 511.0780	C ₃ H ₃ O ₂ (0.5), C ₃ H ₅ O ₃ (0.7), C ₄ H ₅ O ₃ (-0.5), C ₆ H ₃ OCl ₂ (0.1), C ₁₂ H ₁₃ O ₆ Cl ₂ (-1.4), C ₁₄ H ₁₅ O ₇ Cl ₂ (0.3), C ₁₈ H ₂₃ O ₁₀ Cl ₂ (0.3), C ₂₀ H ₂₅ O ₁₁ Cl ₂ (0.2)	2,4-DCP-malonyl-Hex-dHex
M37	6.02	[M-H] ⁻	597.1150	6.0207 (6)	3.0185 (3)	C ₂₄ H ₃₁ O ₁₃ Cl ₂ (0.5)	101.0243, 119.0349, 133.0505, 160.9565, 161.0454, 179.0560	C ₄ H ₅ O ₃ (-1.0), C ₄ H ₇ O ₄ (-1.1), C ₅ H ₉ O ₄ (-1.1), C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.2), C ₆ H ₉ O ₅ (-0.9), C ₆ H ₁₁ O ₅ (-0.8)	2,4-DCP-Hex-dPen-acetyl dPen
M38	5.81	[M-H] ⁻	618.0644	6.0198 (6)	3.0190 (3)	-	160.9564, 469.0669, 511.0772	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.5), C ₁₈ H ₂₃ O ₁₀ Cl ₂ (-1.0), C ₂₀ H ₂₅ O ₁₁ Cl ₂ (-1.4)	Unknown
M39	7.48	[M-H] ⁻	634.1109	6.0195 (6)	3.0190 (3)	-	160.9565	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.0)	Unknown

M40	5.98	[M-H] ⁻	653.1411	6.0200 (6)	3.0186 (3)	-	160.9564	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-1.5)	Unknown
M41	6.77	[M-H] ⁻	660.0907	6.0190 (6)	3.0181 (3)	-	160.9565	C ₆ H ₃ OCl ₂ (-0.9)	Unknown
Group 4: Hydroxy-2,4-dichlorophenol (OH-DCP) structure (C₆H₄O₂Cl₂)									
M42	6.68	[M-H] ⁻	339.0048	6.0201 (6)	2.0129 (2)	C ₁₂ H ₁₃ O ₇ Cl ₂ (1.3)	101.0244, 119.0349, 161.0454, 176.9514, 179.0558	C ₄ H ₅ O ₃ (-0.4), C ₄ H ₇ O ₄ (-0.9), C ₆ H ₉ O ₅ (-0.7), C ₆ H ₃ O ₂ Cl ₂ (-0.6), C ₆ H ₁₁ O ₆ (-1.6)	OH-2,4-DCP-Hex
M43	6.09	[M-H] ⁻	381.0153	6.0202 (6)	2.0126 (2)	C ₁₄ H ₁₅ O ₈ Cl ₂ (1.0)	101.0244, 161.0457, 176.9515, 339.0038	C ₄ H ₅ O ₃ (0.1), C ₆ H ₉ O ₅ (1.3), C ₁₂ H ₁₃ O ₇ Cl ₂ (-1.6), C ₆ H ₁₁ O ₆ (-1.6)	OH-2,4-DCP-acetyl Hex
M44	6.28	[M-H] ⁻	425.0057	6.0193 (6)	2.0119 (2)	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀ Cl ₂ (2.1)	101.0243, 119.0348, 161.0454, 176.9512, 381.0137	C ₄ H ₅ O ₃ (-0.9), C ₄ H ₇ O ₄ (-1.3), C ₆ H ₉ O ₅ (-1.0), C ₆ H ₃ O ₂ Cl ₂ (-1.7), C ₆ H ₁₁ O ₈ Cl ₂ (-3.3)	OH-2,4-DCP-malonyl Hex
Group 5: Unknown structure									
M45	6.34	[M-H] ⁻	190.9667	6.0201 (6)	-	-	-	-	Unknown
M46	6.54	[M-H] ⁻	213.9731	6.0201 (6)	-	-	-	-	Unknown
M47	8.04	[M-H] ⁻	213.9731	6.0202 (6)	2.0125 (2)	-	-	-	Unknown
M48	5.58	[M-H] ⁻	300.0284	8.0270 (8)	5.0315 (5)	-	-	-	Unknown
M49	8.25	[M-H] ⁻	304.0147	8.0271 (8)	-	-	-	-	Unknown
M50	9.50	[M-H] ⁻	310.9887	6.0199 (6)	2.0126 (2)	-	-	-	Unknown
M51	7.39	[M-H] ⁻	328.9752	6.0210 (6)	3.0189 (3)	-	-	-	Unknown
M52	10.24	[M-H] ⁻	339.9608	6.0210 (6)	2.0124 (2)	-	-	-	Unknown
M53	7.38	[M-H] ⁻	353.0204	6.0198 (6)	3.0190 (3)	-	-	-	Unknown
M54	6.52	[M-H] ⁻	358.9859	6.0208 (6)	3.0193 (3)	-	-	-	Unknown
M55	6.34	[M-H] ⁻	376.0270	6.0197 (6)	-	-	-	-	Unknown
M56	7.38	[M-H] ⁻	378.0150	6.0209 (6)	3.0191 (3)	-	-	-	Unknown
M57	7.28	[M-H] ⁻	382.0257	8.0270 (8)	5.0302 (5)	-	-	-	Unknown
M58	6.24	[M-H] ⁻	405.0631	8.0264 (8)	5.0318 (5)	-	-	-	Unknown
M59	7.01	[M-H] ⁻	410.0202	-	5.0311 (5)	-	-	-	Unknown

M60	7.35	[M-H] ⁻	416.9917	8.0270 (8)	5.0318 (5)	-	-	-	Unknown
M61	8.02	[M-H] ⁻	425.0412	6.0198 (6)	3.0183 (3)	-	-	-	Unknown
M62	6.02	[M-H] ⁻	444.9863	6.0202 (6)	3.0193 (3)	-	-	-	Unknown
M63	8.65	[M-H] ⁻	451.0471	8.0267 (8)	5.0314 (5)	-	-	-	Unknown
M64	6.63	[M-H] ⁻	460.0345	8.0263 (8)	5.0307 (5)	-	-	-	Unknown
M65	6.63	[M-H] ⁻	487.0532	8.0269 (8)	5.0310 (5)	-	-	-	Unknown
M66	6.38	[M-H] ⁻	503.0515	8.0261 (8)	5.0310 (5)	-	-	-	Unknown
M67	6.21	[M-H] ⁻	505.0444	6.0196 (6)	3.0188 (3)	-	-	-	Unknown
M68	6.63	[M-H] ⁻	509.0735	8.0270 (8)	5.0305 (5)	-	-	-	Unknown
M69	6.55	[M-H] ⁻	523.0332	-	3.0193 (3)	-	-	-	Unknown
M70	7.66	[M-H] ⁻	532.0784	8.0269 (8)	5.0306 (5)	-	-	-	Unknown
M71	6.36	[M-H] ⁻	533.0889	8.0268 (8)	5.0316 (5)	-	-	-	Unknown
M72	6.22	[M-H] ⁻	554.0844	6.0195 (6)	3.0192 (3)	-	-	-	Unknown
M73	6.56	[M-H] ⁻	561.1400	8.0267 (8)	5.0314 (5)	-	-	-	Unknown
M74	6.93	[M-H] ⁻	561.1401	8.0266 (8)	5.0309 (5)	-	-	-	Unknown
M75	6.21	[M-H] ⁻	567.0450	6.0202 (6)	3.0190 (3)	-	-	-	Unknown
M76	6.47	[M-H] ⁻	572.1097	8.0274 (8)	5.0319 (5)	-	-	-	Unknown
M77	6.90	[M-H] ⁻	579.0446	8.0269 (8)	5.0313 (5)	-	-	-	Unknown
M78	6.45	[M-H] ⁻	593.0993	8.0268 (8)	5.0314 (5)	-	-	-	Unknown
M79	6.90	[M-H] ⁻	606.0642	8.0262 (8)	5.0312 (5)	-	-	-	Unknown
M80	6.42	[M-H] ⁻	623.1097	8.0266 (8)	5.0311 (5)	-	-	-	Unknown
M81	6.90	[M-H] ⁻	628.0844	8.0269 (8)	5.0313 (5)	-	-	-	Unknown
M82	6.40	[M-H] ⁻	675.2573	8.0264 (8)	5.0311 (5)	-	-	-	Unknown
M83	6.39	[M-H] ⁻	681.2462	8.0268 (8)	5.0310 (5)	-	-	-	Unknown

^aRetention time (RT) value obtained from LC/HRMS analysis with unlabeled-2,4-D-treated sample.

^b*m/z* value obtained from LC/HRMS analysis with unlabeled-2,4-D-treated sample.

^cMass difference of isotope element (¹²C and ¹³C) × the number of labels.

^dMass difference of isotope element (¹H and ²H) × the number of labels.

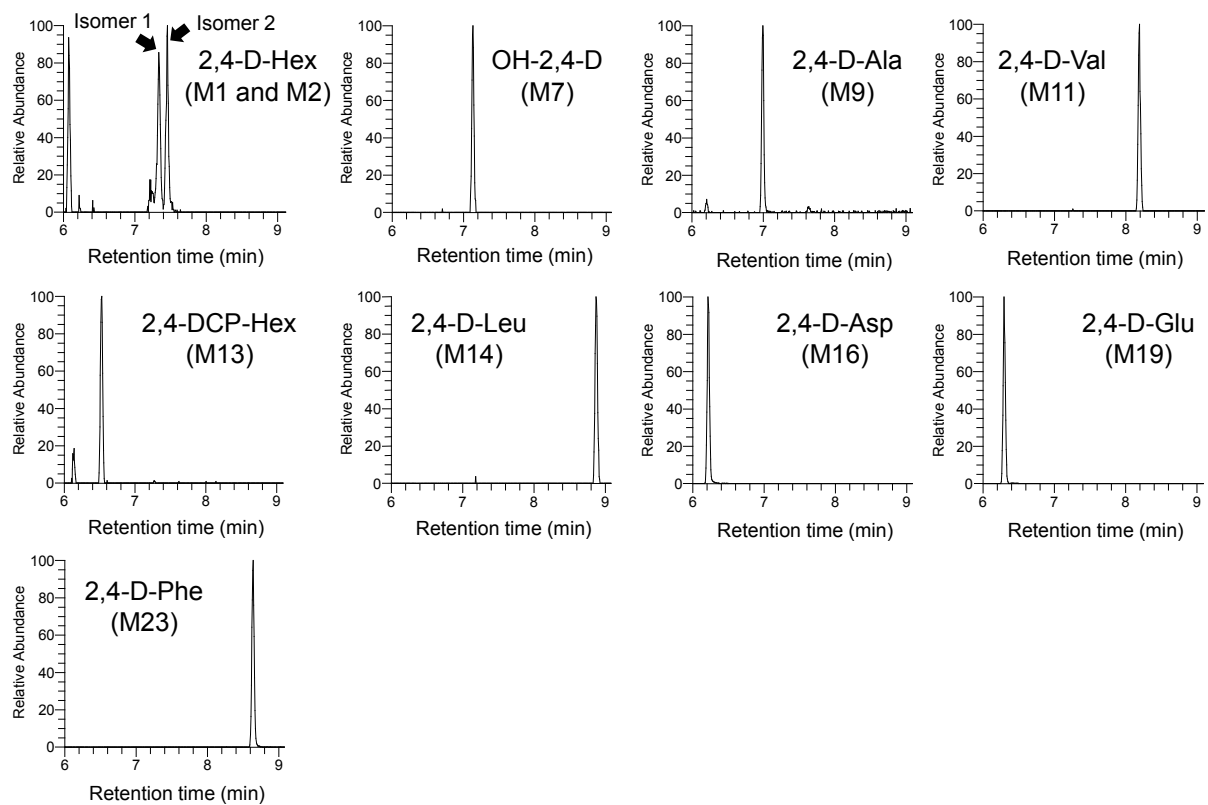


図 2-4.10 種類の 2,4-D 代謝物の LC/HRMS クロマトグラム

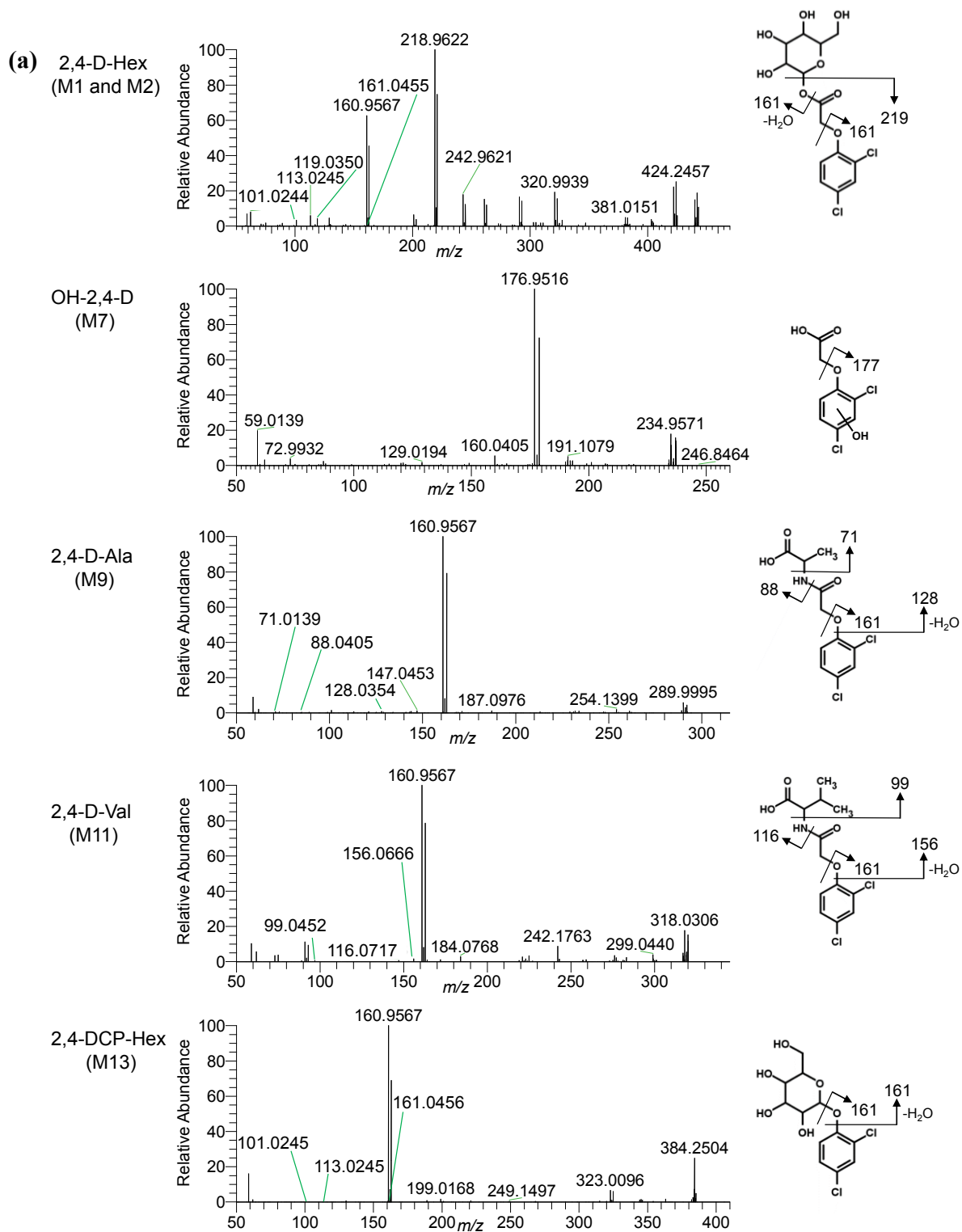


図 2-5a. 10 種類の 2,4-D 代謝物の HRMS/MS スペクトル

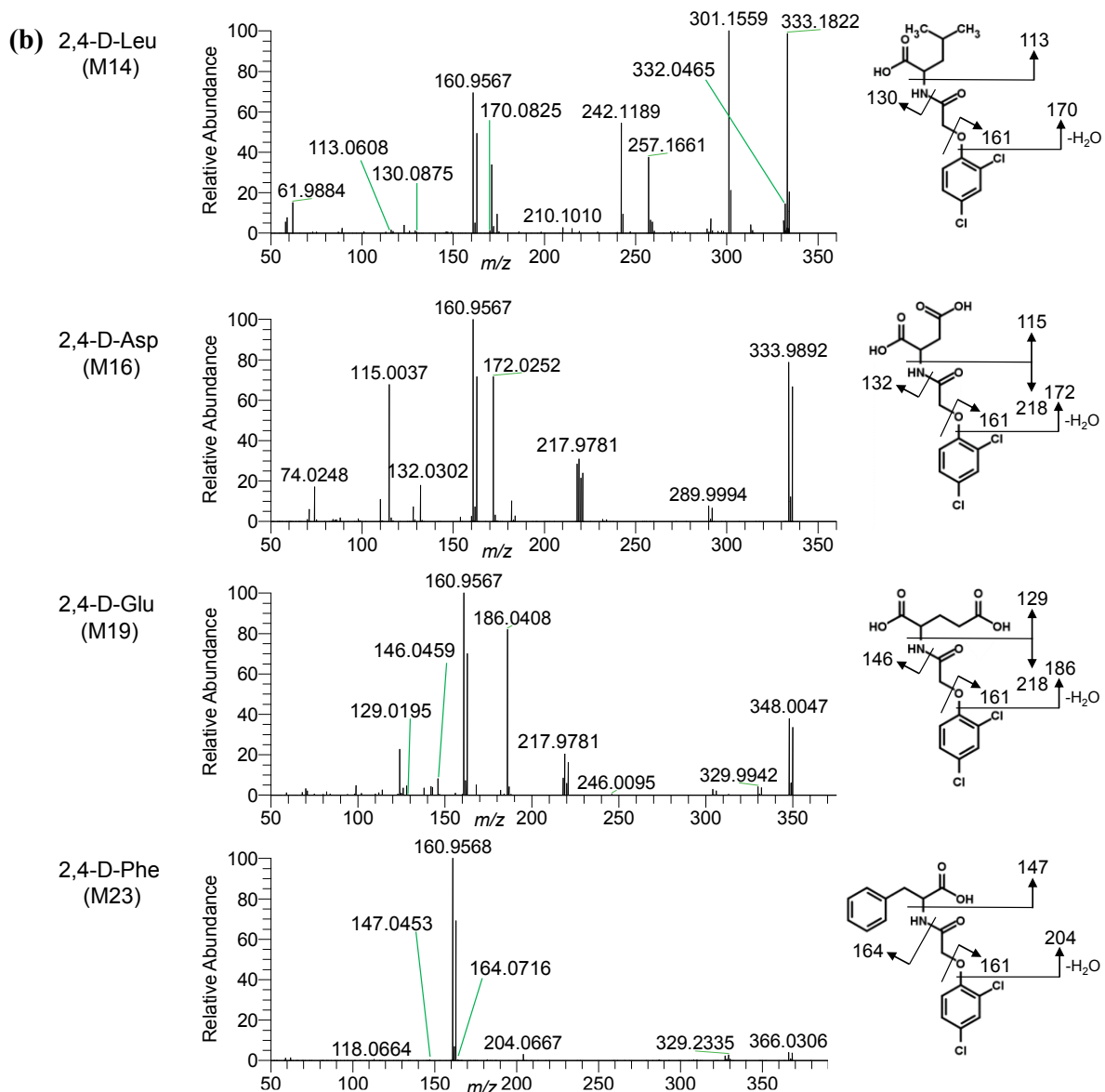


図 2-5b. 10 種類の 2,4-D 代謝物の HRMS/MS スペクトル

2.3.2. 安定同位体ラベリングおよびデータマイニング技術による 2,4-D 代謝物の選定

2,4-D 代謝物候補の探索について、3 種類のタイムコースデータセット、すなわち 2,4-D 処理群とコントロール群、2,4-D 処理群と $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D 処理群、および 2,4-D 処理群と $^2\text{H}_5$ -2,4-D 処理群を用いて安定同位体ラベリングおよびデータマイニング技術の有用性の評価を行った。まず、各タイムコースデータセットについて、Compound Discoverer 2.0 を用いて保持時間の補正 (retention time alignment)、ピーク検出およびピ

ークエリア値の算出を個別に実施した。コントロール群, 2,4-D 処理群について, どちらか一方もしくは両群ともに観測された代謝物数は合計で 30853 であった (図 2-6a)。次に, 従来から行われているバックグラウンド減算処理 (Zhang, H., 2008) を行うことで, 2,4-D 代謝物の探索を試みた。この手法は, コントロール群で検出された代謝物のシグナル値を 2,4-D 処理群から減算処理を行うことで, 2,4-D 処理群において特異的に検出される代謝物を探索する手法である。バックグラウンド減算処理を行うことで, 30853 代謝物から 4291 代謝物まで絞り込むことができたものの, 依然として候補となる代謝物数が非常に多く見られた。これは, 2,4-D 薬剤処理により内生の低分子代謝物の多くが変動していることを示唆するものであった。続いて, 2,4-D がその構造中に有する塩素元素の同位体パターンフィルタリングを用いることで, 内生の代謝物を除去することを試みた。2,4-D はその構造中に塩素元素を 2 個有することから, モノアイソトピックイオンおよび ^{37}Cl 元素を構造中に 1 個もしくは 2 個有するアイソトプマー由来のイオン (モノアイソトピックイオンからの $\Delta m/z$ はそれぞれ 1.9971, 3.9942) それぞれの強度比 (理論値: 67 %, 11 %) を考慮した同位体パターンフィルタリングを用いることで, 4291 代謝物の中から 645 代謝物まで絞り込むことができたものの, 候補代謝物の中に偽陽性ピークが依然として多く残っていると考えられた。また, 除草剤の構造中に含まれる塩素のようなハロゲン元素は, 植物生体内で酸化的脱ハロゲン化反応や加水分解反応により脱離することが知られており (Feung, C.-S., 1975), ハロゲン元素を用いた同位体パターンフィルタリングでは偽陰性を伴う

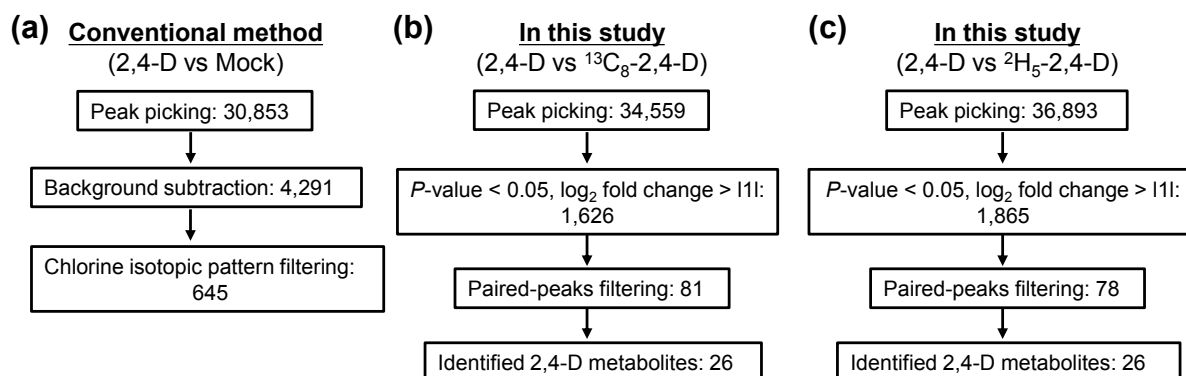


図 2-6. 2,4-D 代謝物探索手法の比較結果

可能性を否定できない。さらに、外因性化学物質の中にはその構造中にハロゲン元素を含んでいないものも数多くあることが知られていることから、バックグラウンド減算およびハロゲン元素を用いた同位体パターンフィルタリング手法では外因性化学物質の代謝物を包括的に探索することは難しいと言える。

2,4-D 処理群と $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D 処理群について、どちらか一方もしくは両群ともに観測された代謝物数は合計で 34559 であった (図 2-6b)。次に、内在性代謝物を除外するために、ヴォルカノプロット ($\text{Log}_2 \text{Fold change} > |1|$, $P\text{-value} < 0.05$) に供し、各群で有意な差を有した代謝物だけをピックアップしたところ、1626 代謝物が得られた。2,4-D 処理群と $^2\text{H}_5$ -2,4-D 処理群についても同様のデータ解析を行ったところ、36893 代謝物から 1865 代謝物代謝物が得られた (図 2-6c)。続いて、ペアードピークスフィルタリングを用いることで、さらなる偽陽性ピークの除去を行った。ペアードピークスフィルタリングの各種パラメーター設定値は、既知の 10 種類の 2,4-D 代謝物を用いて最適化を行った (表 2-1)。2,4-D 代謝物のクロマトグラムおよび HRMS/MS スペクトルの一例として 2,4-D, $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D, および $^2\text{H}_5$ -2,4-D それぞれのアスパラギン酸抱合体 (2,4-D-Asp, $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D-Asp, $^2\text{H}_5$ -2,4-D-Asp) を図 2-7 に示す。2,4-D-Asp, $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D-Asp, および $^2\text{H}_5$ -2,4-D-Asp について、いずれもピーク形状およびピーク幅は非常に類似したものであった。また、2,4-D-Asp と $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D-Asp のプリカーサーイオンの質量差および 2,4-D-Asp と $^2\text{H}_5$ -2,4-D-Asp のプリカーサーイオンの質量差を算出したところ、それぞれ 8.0266 Da (理論値からの質量差が -0.0012 Da), 5.0311 Da (理論値からの質量差が -0.0004 Da) であり、いずれも理論値と非常に近い値であった。また、いずれも ^{37}Cl 由来の同位体イオンがモノアイソトピックイオンとの相対感度比で理論値 $\pm 10\%$ で検出されており、2,4-D に特有の塩素イオンが 2 個付加したことに相当するスペクトルが観測された。また、他の 9 種類の 2,4-D 代謝物についてもこれと同様の結果が得られた。また、クロマトグラフィーにおける保持時間を比較したところ、 $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D 由来の代謝物については、2,4-D 由来の代謝物に比べてピークトップにおける保持時間差は最大で 0.02 分とほとんど差が見られなかったのに対し、 $^2\text{H}_5$ -2,4-D 由来の代謝

物については、2,4-D 由来の代謝物に比べて全ての代謝物で溶出時間が早くなる傾向が観測された。保持時間差の最大値は、 $^2\text{H}_5$ -2,4-D-Asp で観測され、2,4-D-Asp に比べて 0.05 分早く溶出していた。これは ^2H により形成される水素結合距離が ^1H のものと比較して短くなったことに起因し (Fukusaki, E., 2005), 化学物質の構造, ^2H の標識位置, および標識数によっては, LC カラムへの保持の低下が顕著に表れる。それゆえ, 2,4-D 処理群および $^2\text{H}_5$ -2,4-D 処理群においてペアードピークスフィルタリングの保持時間差分値を 0.2 分に設定した。各タイムコースデータセットで選定された 2,4-D 代謝物候補をまとめたところ, 合計で 83 種類の 2,4-D 代謝物候補が得られ, そのうち 76 種類が両データセットで共通して観測された。一方で, 7 種類の 2,4-D 代謝物候補についてはどちらか一方のデータセットでしか観測されていなかった。これら 7 種類の 2,4-D 代謝物候補は, 他の 76 種類の候補と比較していずれもプリカーサーイオンのシグナル強度が検出限界付近であり (2.0×10^4 以下), シロイヌナズナ T87 培養細胞間でのばらつきの影響を受けた結果, 片方のデータセットでは観測されなかったと

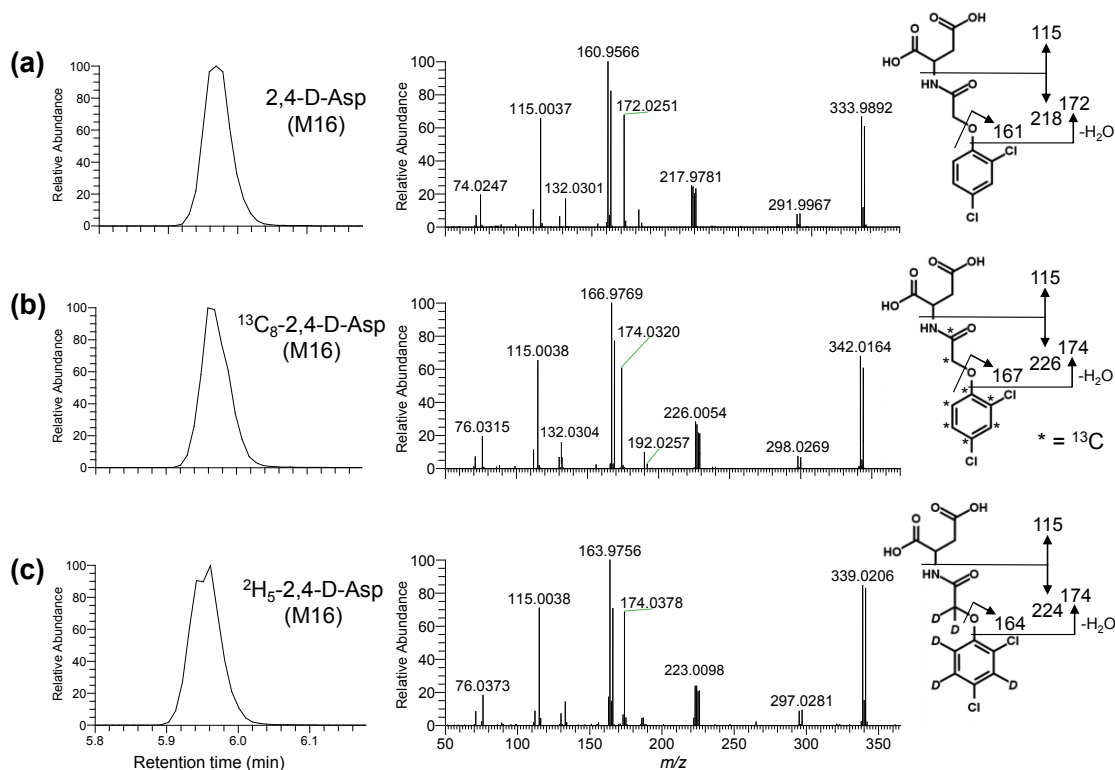


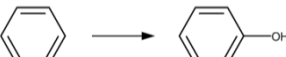
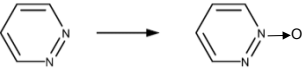
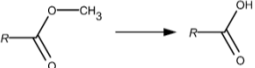
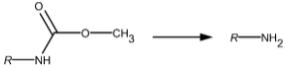

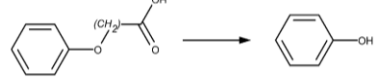
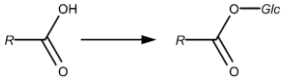
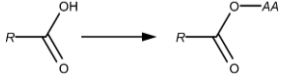
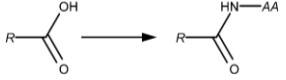
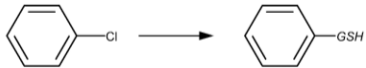
図 2-7. 2,4-D アスパラギン酸抱合体のクロマトグラムおよび HRMS/MS スペクトル

考えられた。以上の結果より、安定同位体ラベリングおよびデータマイニング技術を利用した 2,4-D 代謝物の選定手法は、従来利用されているバックグラウンド減算およびハロゲン元素を用いた同位体パターンフィルタリング手法と比較して移動相溶媒、システムノイズ、および内生の代謝物などの偽陽性代謝物を大幅に除去することができ、高精度の代謝物探索を可能にすることが示唆された。

2.3.3. Metabolizer および HRMS/MS スペクトルを用いた 2,4-D 代謝物の

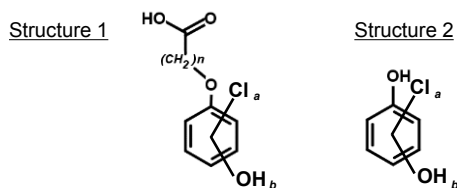
アノテーションおよび化学構造の推定

包括的な代謝物の推定を行うためには、第 I 相代謝反応 (酸化, 加水分解, 脱離) に続く第 II 相代謝反応 (ヘキソース, グルタチオン, アミノ酸や硫酸などとの抱合反応), その後の第 III 相代謝反応 (第 II 相代謝反応で生じた抱合体に起こるさらなる抱合反応) の情報を広く捉えることが重要である。そこで、様々な外因性化学物質を植物に曝露した際に起こることが知られている第 I 相代謝反応 (14 反応) (Macherius, A., 2014, Hamburg, A., 2001, Van Eerd, L. L., 2003), 第 II 相代謝反応 (7 反応) (Van Eerd, L. L., 2003), および第 III 相代謝反応 (4 反応) (Macherius, A., 2014, Van Eerd, L. L., 2003), について Reactor を用いて作成し, Metabolizer に登録した (図 2-8)。続いて, Metabolizer を用いて 2,4-D から生じる代謝物の予測を行った。まず, 第 I 相代謝反応の中で最大 3 段階の代謝反応によって生じる 2,4-D 代謝物を予測したところ, 計 24 種類の代謝物が得られた (異性体は 1 代謝物として計上)。得られた 24 種類の代謝物と生じた代謝反応について図 2-9 に示す。次に, 得られた 24 代謝物および 2,4-D について, 第 II 相代謝反応および第 III 相代謝反応のうち最大 3 段階の反応によって生じる代謝物を予測したところ, 合計で 7029 代謝物が得られた (異性体は 1 代謝物として計上)。得られた代謝物すべてを 2,4-D 代謝物ライブラリーに登録した。ペアードピークスフィルタリングで選定された 83 種類の 2,4-D 代謝物候補について, Metabolizer を用いて作成した 2,4-D 代謝物ライブラリーと質量誤差 5 ppm 以内で比較照合することでアノテーションを実施した。その結果, 既知の 10 種類の 2,4-D 代謝物を含む 20 種類の代

Phase	Description	Metabolic reaction	Enzymes
I Oxidation, reduction, hydrolysis, the others			
	Aryl/alkyl hydroxylation		Cytochrome P450s, peroxidases, Poly2 oxidases
	Oxidative dehalogenation	$R-X \longrightarrow R-OH$	Peroxidase
	O-dealkylation	$R-O-CH_3 \longrightarrow R-OH$	Cytochrome P450s
	N-dealkylation	$R-NH-CH_3 \longrightarrow R-NH_2$	Cytochrome P450s
	Oxidative deamination	$R-NH-NH_2 \longrightarrow R-NH_2$	Cytochrome P450s
	Sulfoxidation	$R-S-CH_3 \longrightarrow R-S(=O)-CH_3$	Cytochrome P450s
	Nitrogen oxidation		Cytochrome P450s
	Nitroreduction	$R-N(=O)_2 \longrightarrow R-NH_2$	Cytochrome P450s
	Hydrolysis (Ester)		Esterases, lipases, proteases
	Hydrolysis (Amide)		Esterases, lipases, proteases
	Hydrolysis (Nitrile)	$R-C\equiv N \longrightarrow R-C(=O)-NH_2$	Esterases, lipases, proteases
	Side chain elongation		No description
	Side chain degradation		No description
II Conjugation			
	O-glucose conjugation	$R-OH \longrightarrow R-O-Glc$	Glucosyl transferases
	N-glucose conjugation	$R-NH_2 \longrightarrow R-NH-Glc$	Glucosyl transferases
	Glucose ester conjugation		Glucosyl transferases
	Amino acid conjugation (ester)		No description
	Amino acid conjugation (amide)		Acyl-CoA synthetases + amino acid N-acyltransferases
	Glutathione conjugation		Glutathione S-transferases, Nonenzymatic conjugation
	Sulfate conjugation	$R-OH \longrightarrow R-O-Sulfate$	Sulfo transferases
III Secondary conjugation			
	Glucose conjugation	$Glc \longrightarrow Glc-Glc$	glucosyl transferases
	Malonate conjugation	$Glc \longrightarrow Glc-Mal$	Malonyl transferases
	Acetyl conjugation	$Glc \longrightarrow Glc-Ac$	Acetyl transferases
	Sulfate conjugation	$Glc \longrightarrow Glc-Sulfate$	Sulfo transferases

R, Aryl or alkyl; X, Halogen; Glc, Glucose; AA, Amino acid; GSH, Glutathione; Mal, Malonate; and Ac, Acetylate.

図 2-8. 植物生体内における外因性化学物質の異物代謝反応様式



No.	Structure	n	a (Cl)	b (OH)	The number of phase I reactions	Phase I reactions	Molecular formula	Exact mass	The total number of 2,4-D metabolites generated by phase II and III reactions
1	1	1	0	2	2	Oxidative dehalogenation	C ₈ H ₆ O ₃	184.0372	299
2	1	1	0	3	3	Oxidative dehalogenation, aryl/alkyl hydroxylation	C ₈ H ₆ O ₃	200.0321	342
3	1	1	1	1	1	Oxidative dehalogenation	C ₈ H ₇ O ₄ Cl	202.0033	423
4	1	1	1	2	2	Oxidative dehalogenation, aryl/alkyl hydroxylation	C ₈ H ₇ O ₄ Cl	217.9982	466
5	1	1	1	3	3	Oxidative dehalogenation, aryl/alkyl hydroxylation	C ₈ H ₇ O ₄ Cl	233.9931	466
6	1	1	2	0	0	-	C ₈ H ₆ O ₃ Cl ₂	219.9694	143
7	1	1	2	1	1	Aryl/alkyl hydroxylation	C ₈ H ₆ O ₄ Cl ₂	235.9643	385
8	1	1	2	2	2	Aryl/alkyl hydroxylation	C ₈ H ₆ O ₄ Cl ₂	251.9592	508
9	1	1	2	3	3	Aryl/alkyl hydroxylation	C ₈ H ₆ O ₄ Cl ₂	267.9541	513
10	1	2	0	2	3	Side chain elongation, Oxidative dehalogenation	C ₉ H ₁₀ O ₂	198.0528	299
11	1	2	1	1	2	Side chain elongation, Oxidative dehalogenation	C ₉ H ₁₀ O ₂ Cl	216.0189	423
12	1	2	1	2	3	Side chain elongation, Oxidative dehalogenation, aryl/alkyl hydroxylation	C ₉ H ₁₀ O ₂ Cl	232.0139	466
13	1	2	2	0	1	Side chain elongation	C ₉ H ₈ O ₃ Cl ₂	233.9850	143
14	1	2	2	1	2	Side chain elongation, aryl/alkyl hydroxylation	C ₉ H ₈ O ₄ Cl ₂	249.9800	385
15	1	2	2	2	3	Side chain elongation, aryl/alkyl hydroxylation	C ₉ H ₈ O ₄ Cl ₂	265.9749	508
16	1	3	2	0	2	Side chain elongation	C ₁₀ H ₁₀ O ₃ Cl ₂	248.0007	143
17	1	3	1	1	3	Side chain elongation, Oxidative dehalogenation	C ₁₀ H ₁₁ O ₃ Cl	230.0346	423
18	1	3	2	1	3	Side chain elongation, aryl/alkyl hydroxylation	C ₁₀ H ₁₀ O ₃ Cl ₂	263.9956	385
19	1	4	2	0	3	Side chain elongation	C ₁₁ H ₁₂ O ₃ Cl ₂	262.0163	143
20	2	-	0	2	3	Side chain degradation	C ₈ H ₆ O ₃	126.0317	18
21	2	-	1	1	2	Side chain degradation, Oxidative dehalogenation	C ₈ H ₆ O ₂ Cl	143.9978	26
22	2	-	1	2	3	Side chain elongation, Oxidative dehalogenation, aryl/alkyl hydroxylation	C ₈ H ₆ O ₃ Cl	159.9927	26
23	2	-	2	0	1	Side chain degradation	C ₈ H ₄ OCl ₂	161.9639	32
24	2	-	2	1	2	Side chain degradation, aryl/alkyl hydroxylation	C ₈ H ₄ O ₂ Cl ₂	177.9588	31
25	2	-	2	2	3	Side chain degradation, aryl/alkyl hydroxylation	C ₈ H ₄ O ₂ Cl ₂	193.9537	33

図 2-9. 第 I 相代謝反応により得られた 2,4-D 代謝物と代謝反応様式

謝物のアノテーションに成功した。アノテーションされた 20 種類の 2,4-D 代謝物のうち、これまでに報告のない 10 種類の代謝物の構造を推定するために、HRMS/MS スペクトルを用いて部分構造解析を実施した。その結果、それぞれの代謝物に特徴的なフラグメントイオンを観測することができた。一例として、2,4-D、¹³C₈-2,4-D、および ²H₅-2,4-D のグルタミン抱合体の HRMS/MS スペクトルを図 2-10 に示す。いずれの MS/MS スペクトルからもグルタミン由来の C₅H₆NO₃ ([M-H]⁻, m/z 128) が検出された。加えて、2,4-D のオルト位に付加しているカルボン酸とグルタミンがアミド結合でつながった構造に由来するフラグメントイオンが 2,4-D-Gln, ¹³C₈-2,4-D-Gln, および ²H₅-2,4-D-Gln それぞれの MS/MS スペクトルから検出された (各 m/z は 185, 187, 187)。さらに、ジクロロフェノール骨格がそれぞれの HRMS/MS スペクトルから検出された (各 m/z は 161, 167, 164)。観測されたフラグメントイオン間の質量差分は、安定同位体標識位置および数を考慮した場合妥当な結果であったことから、この代謝物は 2,4-D のグルタミン抱合体であると結論づけた。他の 9 種類のアノテーションされ

た代謝物についても同様にして部分構造解析を行ったところ、全ての代謝物の化学構造を推定することができた。推定された 2,4-D 代謝物は次のとおりである。2,4-D 骨格を有する代謝物 (グループ 1) は 1 種類存在し、2,4-D-Hex-Hex (M5) である。2,4-DCP 骨格を有する代謝物 (グループ 3) は 7 種類存在し、それぞれ sulfate-2,4-DCP (SO₃-2,4-DCP) (M8), 2,4-D-serine (2,4-D-Ser) (M10), 2,4-D-threonine (2,4-D-Thr) (M12), 2,4-D-asparagine (2,4-D-Asn) (M15), 2,4-D-Gln (M18), 2,4-D-histidine (2,4-D-His) (M20), および 2,4-DCP-acetyl Hex (M22) である。Hydroxyl-2,4,-dichlorophenol (OH-2,4-DCP) 骨格を有する代謝物 (グループ 4) は 2 種類存在し、OH-2,4-DCP-Hex (M42) および OH-2,4-DCP-acetyl Hex (M43) である。推定された 2,4-D 代謝物の一覧を表 2-2 に示す。

2,4-D 代謝物ライブラリーによってアノテーションできなかった 63 種類の代謝物について、HRMS/MS スペクトルを用いて部分構造解析を行ったところ 24 種類の代謝物から 2,4-D 薬剤由来の特徴的なフラグメントイオンが観測された。これら 24 種類の代謝物は、観測された特徴的なフラグメントイオンから 3 種類の代謝物群に分類することができた。2,4-D 代謝物の分類は次のとおりである。2,4-D 骨格を有する代謝物群 (グループ 1) に分類されたものは 3 種類存在し、M3, M4, および M6 であった。2,4-DCP 骨格を有する代謝物群 (グループ 3) は 20 種類存在し、M17, M21, および M24 から M41 までの代謝物であった。OH-2,4-DCP 骨格を有する代謝物群 (グループ 4) は 1 種類存在し、M44 であった。詳細を表 2-2 に示す。その他の 39 種類の代謝物についてはグループ 5 (構造情報なし) に分類された。この理由は、プリカーサーイオンの強度が非常に低かったことから (シグナル強度 1.0×10^4 – 4.0×10^4), 特徴的なフラグメントイオンが観測されなかったためであった。グループ 3 に分類された代謝物のうち、M33 および M36 は共通のフラグメントイオン (m/z 71, 89, 101, 161, 323, および 469) を有していたことに加えて、クロマトグラムにおける保持時間が一致していた。また、M33 のプリカーサーイオン (m/z 511.0777) は M36 のプロダクトイオン (m/z 511.0787) と非常に近い値であった (質量誤差は 5 ppm 以内)。以上のことから、M33 は M36 がノズル・スキマー衝突誘起解離によって脱炭酸したことで生じた代謝物で

あることが示唆された。

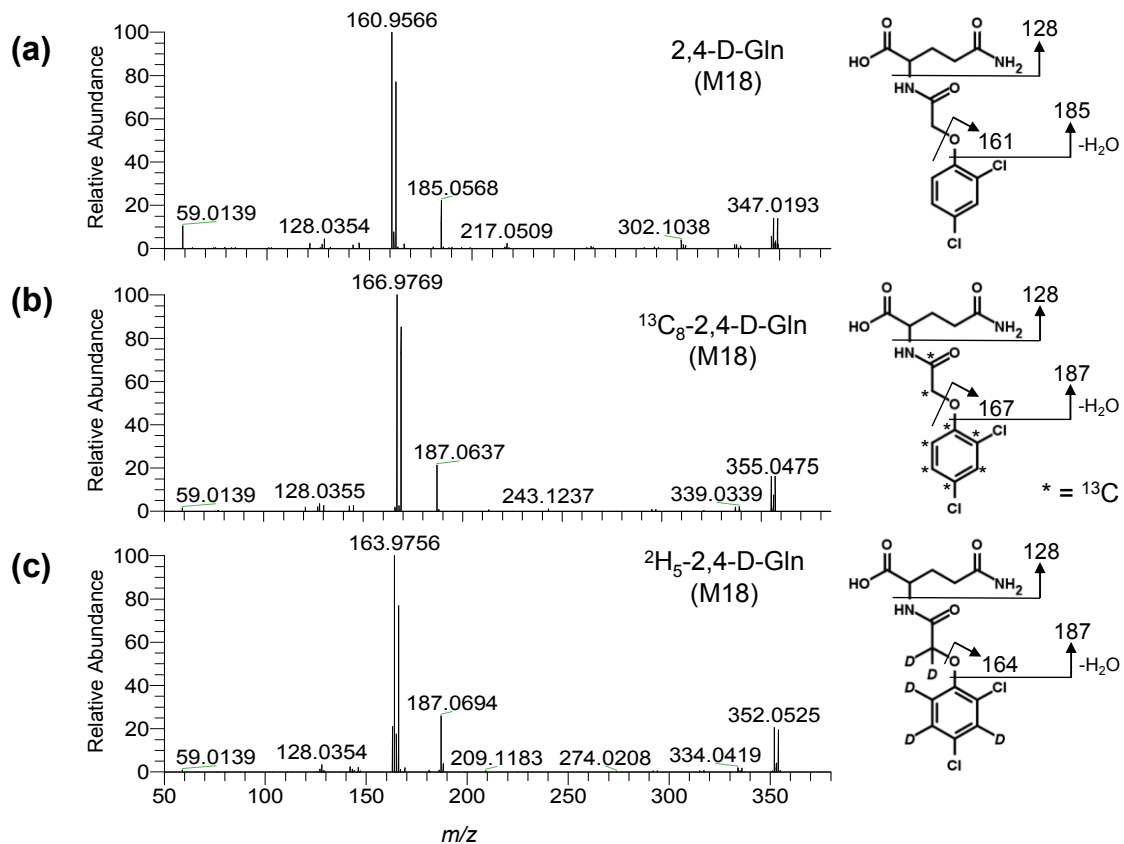


図 2-10. 2,4-D グルタミン抱合体の HRMS/MS スペクトル

2.3.4. 代謝物プロファイリングを用いたさらなる 2,4-D 代謝物の推定

シロイヌナズナ T87 培養細胞および培養液中で観測された 2,4-D 代謝物について、経時的な代謝物プロファイリングデータを推測される代謝パスウェイ上に投影した (図 2-11, 図 2-12). シロイヌナズナ T87 培養細胞において, SO_3 -2,4-DCP (M8), 2,4-D-Asn (M15), 2,4-D-Asp (M16), および 2,4-D-Thr (M12) を含む数種類の 2,4-D 代謝物は, 薬剤処理後経時的に増加していた. 一方で, OH-2,4-D (M7), OH-2,4-DCP-Hex, 2,4-DCP-Hex (M13), および 2,4-DCP-acetyl Hex (M22) は, 薬剤処理直後から 7 日目にかけて代謝物量が増加し, 処理後 7 日目から 10 日目にかけて代謝物量が減少する傾向にあった. 2,4-D-Hex (M1), 2,4-D-Hex-Hex (M5), 2,4-D-Ala (M9), および 2,4-D-Phe (M23) については, 薬剤処理後 0 日目から 1 日目にかけて代謝物量が顕著に増加する傾向にあった. また, 培養液で観測された 12 種類の 2,4-D 代謝物の経時的なプロフ

アイリングについても細胞で観測された同じ代謝物と同様の傾向が観測された (図 2-13). 細胞で観測された 2,4-D 代謝物が全体的に減少傾向にあるのは, これら 2,4-D 代謝物が培養液中に排出されたこと, またはさらなる代謝反応が起こった結果であることが示唆された. これまでに, 2,4-DCP や 2,4,5-trichlorophenol のような数種類の農薬において, その抱合体は細胞壁の構成成分として利用されるといった報告がなされている (Van Eerd, L. L., 2003, Scheel, D., 1981, Brazier-Hicks, M., 2007). それゆえ今回観測された 2,4-D 代謝物のいくつかは, 細胞壁の構成成分として利用された可能性が示唆された.

化学構造の推定に成功した 20 種類の 2,4-D 代謝物および 2,4-D 薬剤由来の特徴的なフラグメントイオンが観測された 24 種類の 2,4-D 未同定代謝物の経時的な代謝物プロファイリング情報を用いて, ウォード法による階層的クラスター解析を実施した (図 2-14). 各代謝物の経時変化における相関関係の有無については, ピアソンの相関係数をもとに判断した. その結果, それぞれの代謝物が示す経時変化の類似性により,

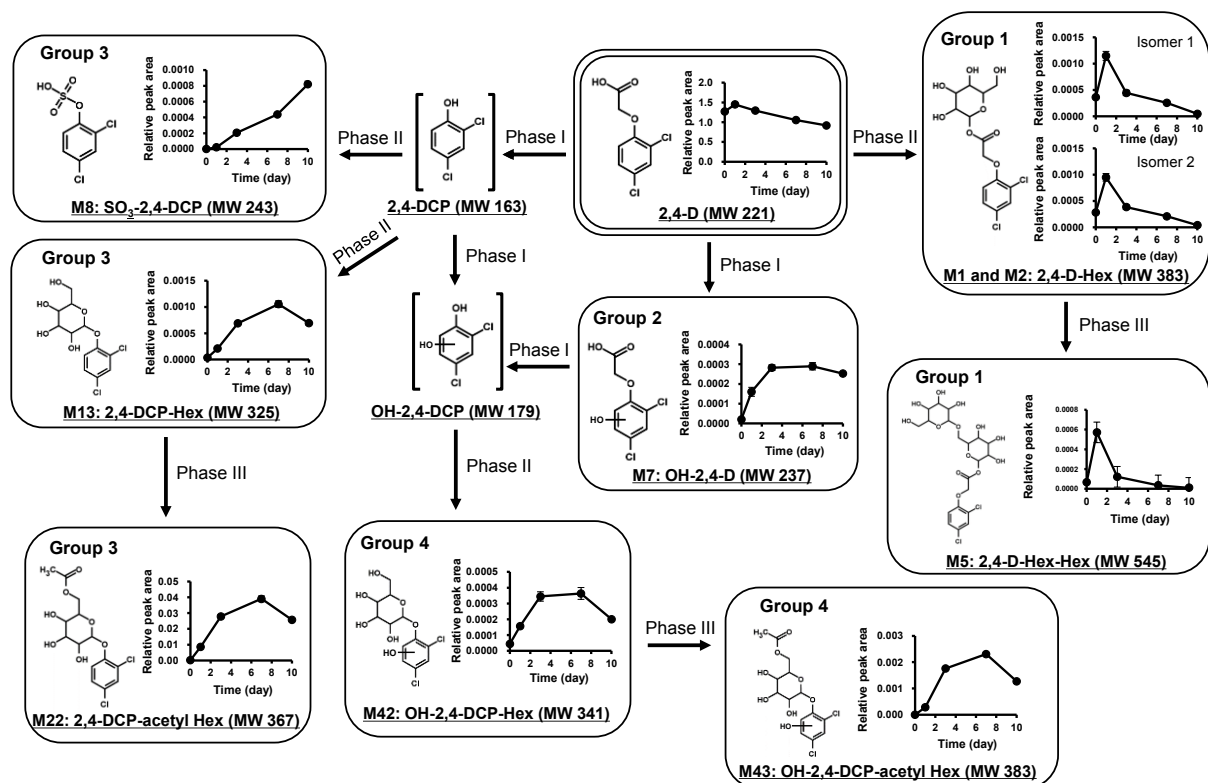


図 2-11. 2,4-D 代謝物の経時的な代謝物プロファイリングデータ (シロイヌナズナ T87 培養細胞) (Mean \pm SD, n=4)

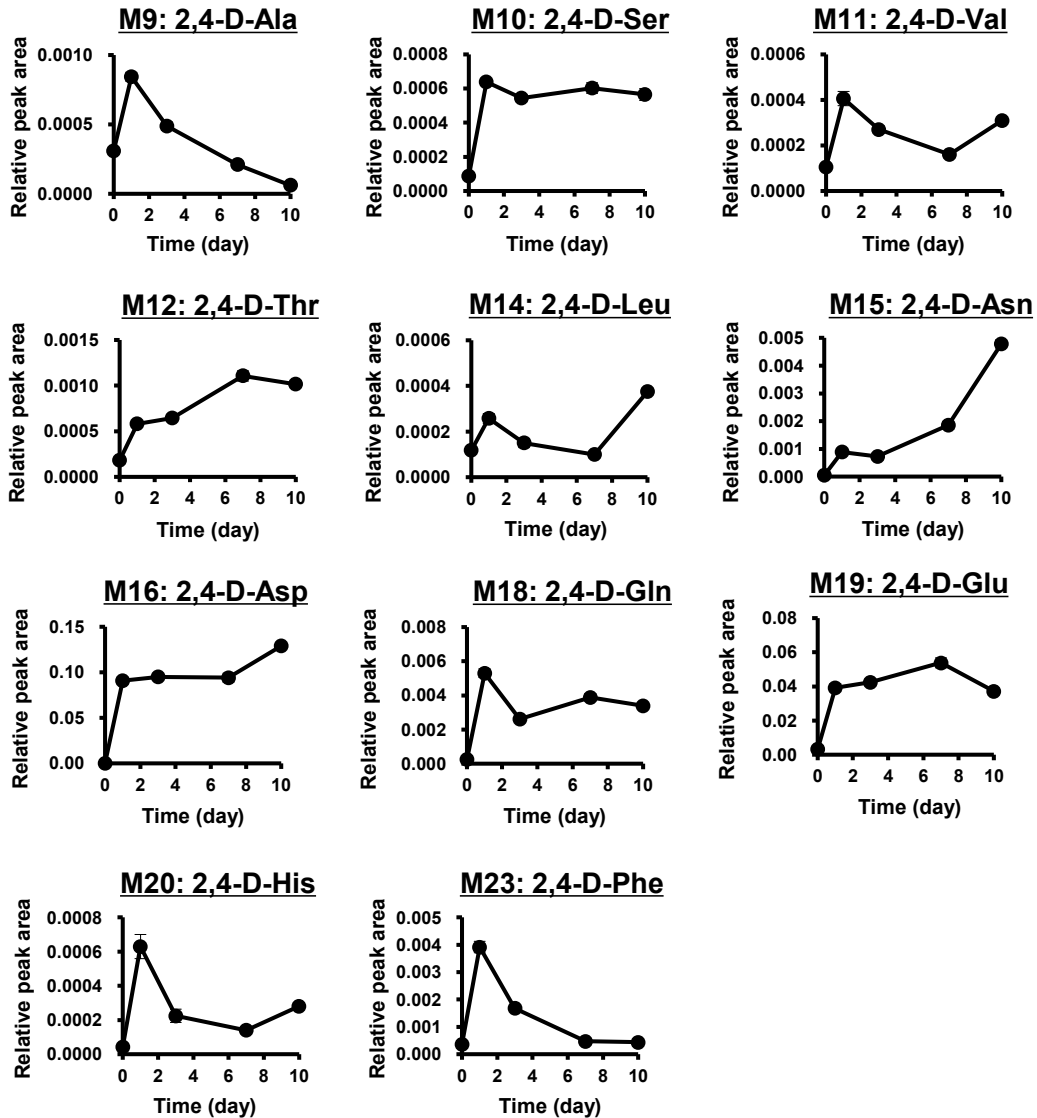


図 2-12. 2,4-D 代謝物の経時的な代謝物プロファイリングデータ (シロイヌナズナ T87 培養細胞) (Mean \pm SD, n=4)

係数をもとに判断した。その結果、それぞれの代謝物が示す経時変化の類似性により、44 種類の代謝物が A から F までの 6 種類のクラスターに分類された。化学構造の推定に成功した 20 種類の 2,4-D 代謝物に関して、図 2-11, 図 2-14 の結果から分かるように、代謝経路上での距離が近い代謝物間において同じクラスターに分類された。例えば、2,4-D-Hex および 2,4-D-Hex-Hex は、クラスター C に分類されており、また OH-2,4-D, OH-2,4-DCP-Hex, OH-2,4-DCP-acetyl Hex, 2,4-DCP-Hex, および 2,4-DCP-acetyl Hex はクラスター D に分類された。さらに、クラスター D に着目した

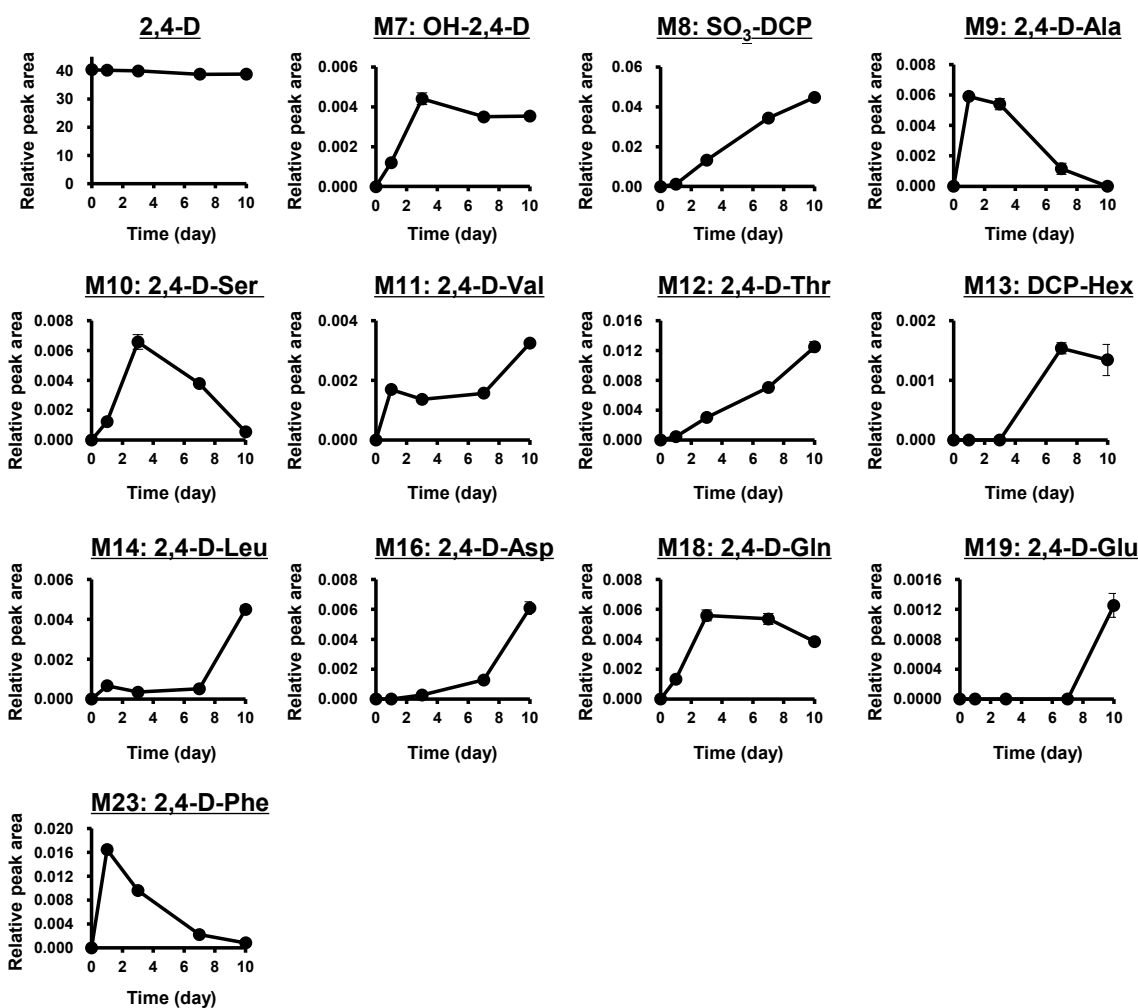


図 2-13. 2,4-D 代謝物の経時的な代謝物プロファイリングデータ (培養液) (Mean \pm SD, n=4)

ところ、15 種類の未同定代謝物 (M24–M26, M28–M33, M35–M39, および M44) は 5 種類の推定された代謝物 (OH-2,4-D, OH-2,4-DCP-Hex, OH-2,4-DCP-acetyl Hex, 2,4-DCP-Hex, および 2,4-DCP-acetyl Hex) の分子量と比べて大きい傾向が観測された。以上のことから、これら 5 種類の推定された代謝物がさらなる抱合化反応によって生じた代謝物である可能性が示唆された。フラボノイド配糖体やサポニンのような植物の配糖体は多様な構造異性体を有する代謝物群である。このような植物の配糖体において、近年 Qiu らはアグリコンと抱合する内在性の代謝物として、デオキシヘキソース (dHex) やペントース (Pen), またはウロン酸などが存在することを明らかにした (Qiu, F., 2016). そこで、デオキシヘキソース, ペントース, デオキシペントース (dPen),

およびウロン酸との抱合反応を Metabolizer に追加し、さらなる代謝物予測を行うことで2,4-D 代謝物ライブラリーを拡張した。プリカーサーイオンの精密質量 (実測値) と 2,4-D 代謝物ライブラリーに登録されている各代謝物の精密質量 (理論値) を質量誤差 5 ppm 以内で比較照合したところ、新たに 6 種類の 2,4-D 代謝物 (M24, M29, M30, M36, M37, および M44) のアノテーションに成功した。続いてアノテーションされた代謝物について、HRMS/MS スペクトルを用いた部分構造解析を行うことにより化学構造の推定を試みた。一例として M36 (2,4-DCP-Hex に dHex と Mal が抱合した代謝物と推定) について、2,4-D 薬剤由来 (m/z 555.0677), $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D 薬剤由来 (m/z

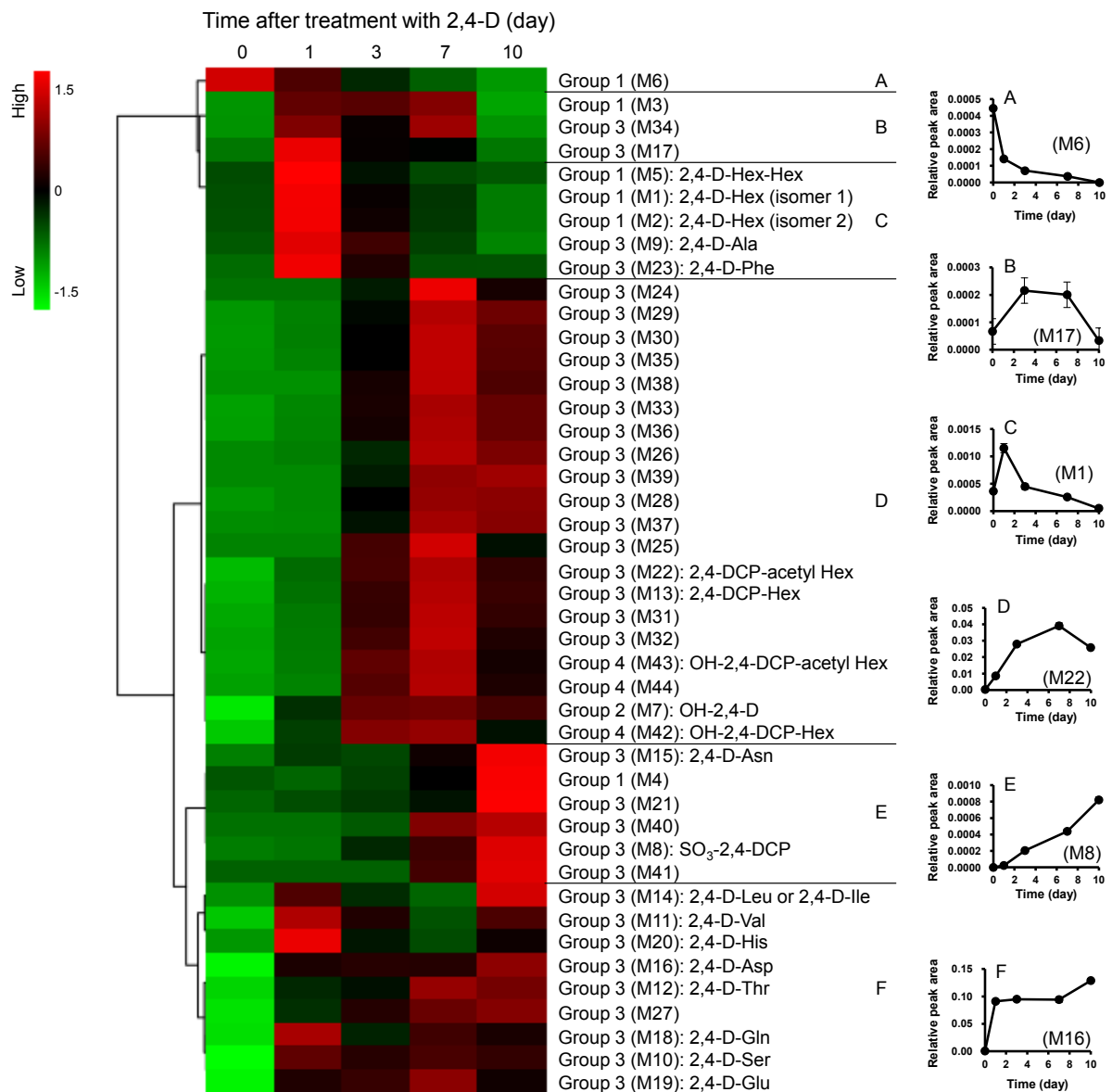


図 2-14. ウォード法を用いた階層的クラスター解析

561.0882), および $^2\text{H}_5$ -2,4-D 薬剤由来 (m/z 558.0870) の HRMS/MS スペクトルを用いて構造解析を実施した結果を図 2-15 に示す. 2,4-D 薬剤由来, $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D 薬剤由来, および $^2\text{H}_5$ -2,4-D 薬剤由来の HRMS/MS スペクトルいずれにおいても DCP-Hexose に相当するシグナル (各 m/z は 161, 167, 164) が検出された. また, それぞれのスペクトルにおいて, マロン酸 (Mal) のニュートラルロス, 炭酸 (CO_2) およびデオキシヘキソース (dHex) のニュートラルロスと一致するスペクトルが観測された. 以上の結果から, この代謝物はジクロロフェノール骨格に Hex, dHex, Mal が結合した代謝物 (2,4-DCP-malonyl Hex-dHex) であると結論づけた. M24, M29, M30, M37, および M44 についても同様に部分構造解析を実施することで, それぞれの代謝物の化学構造の推定に成功した [M24: 2,4-DCP-SO₃ Pen, M29: 2,4-DCP-Hex dHex (isomer 1), M30: 2,4-DCP-Hex dHex (isomer 2), M37: 2,4-DCP-Hex-dPen-acetyl dPen, M44: OH-2,4-DCP-malonyl-dHex] (表 2-2). dHex, Pen, dPen と除草剤との抱合体はこれまでに

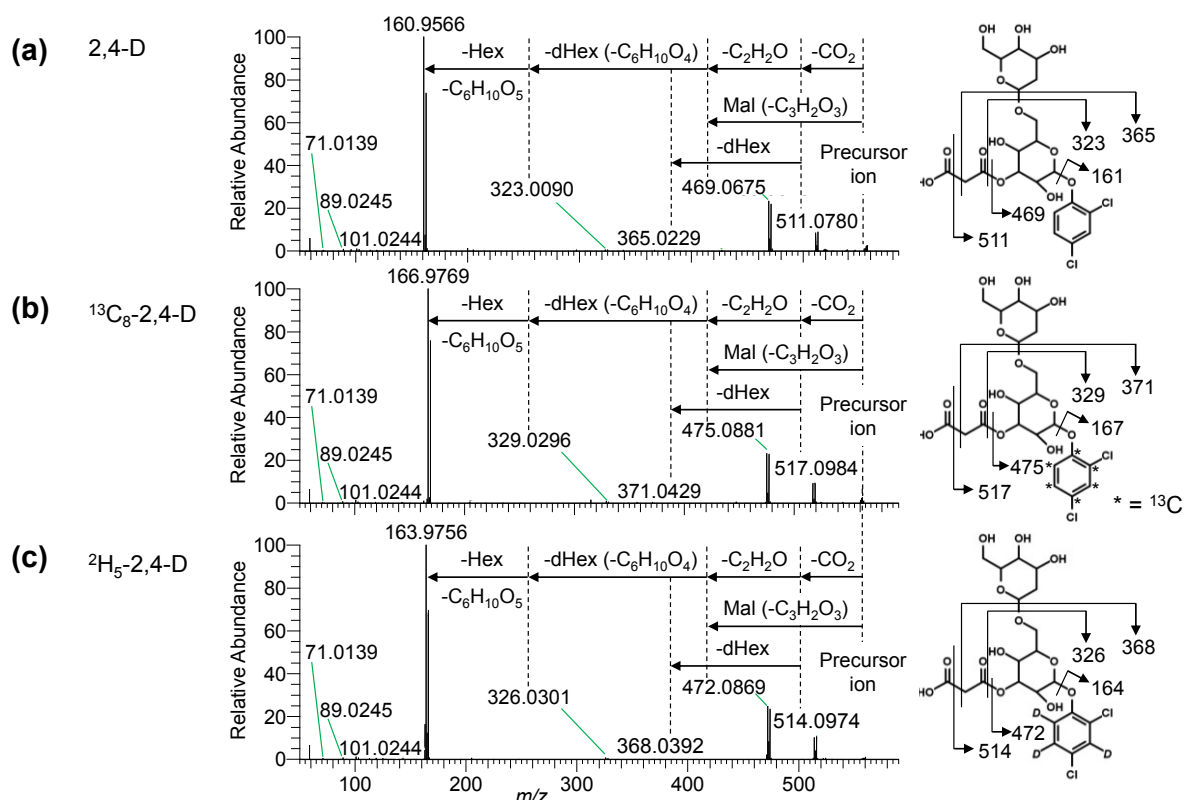


図 2-15. 2,4-DCP-malonyl Hex-dHex の HRMS/MS スペクトル (Mal と Hex, および Hex と dHex の結合様式は不明であるが, 各フラグメントイオンに相当する部分構造を説明するために平面構造を記載した.)

知られていなかったが、本研究で初めてこれら単糖類と2,4-Dが結合した6種類の代謝物推定に成功した。

以上の結果から、標準物質の入手が困難である代謝物の部分構造解析においても、安定同位体ラベリングは非常に強力なツールになることが示唆された。併せて、*in silico*での外因性化学物質の代謝物予測において、外因性化学物質の代謝反応のみならず内生の代謝反応についても考慮することで、これまでに知られていなかった代謝物を推定できる可能性が示唆された。

2.4. 小括

本章では、除草剤の代謝物を網羅的に推定するために、 ^{13}C および ^2H 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を組み合わせた新たな方法論の開発を除草剤の1種である2,4-Dを用いて行った。はじめに、従来法を用いて2,4-Dをシロイヌナズナ T87 培養細胞に暴露した際に生じる代謝物を網羅的に探索したところ、645種の代謝物候補が得られた。次に、安定同位体ラベリング、LC/HRMS/MS 分析、データマイニング技術を組み合わせた当該手法を用いることで、83種の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、本手法において第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, 各代謝物の経時的変化, および HRMS/MS スペクトル情報を解析することで、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。

以上より、シロイヌナズナ T87 培養細胞生体内における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、本手法の有用性が示された。

第三章 除草剤の代謝物探索手法の実用性評価

3.1. 緒言

第二章ではシロイヌナズナ T87 培養細胞を用いた除草剤の代謝物探索手法を開発してきたが、実際に除草剤の代謝物探索を実施している現場においてこの手法を適用するためには課題が残る。第一に、除草剤の代謝物探索を実施している現場では、第二章で使用したような培養細胞ではなく、モデル植物であるシロイヌナズナに加えて、イネやコムギ、ノビエといった植物個体が用いられている。一般に個体は異なった機能を有している複数の器官から形成されており、器官は一定の役割をおこなう組織、組織は一定の役割を担う細胞から形成されていると捉えることができる。それゆえに、植物個体は同じ性質を持ち均質であると考えられている培養細胞に比べて、複雑な形態を有している。また、培養細胞では温度や pH などの物理化学的環境条件および各種栄養素の濃度といった生理学的環境条件を制御することが可能である一方で、植物個体の場合、外乱要因が圧倒的に多くそれらをすべて制御することは事実上不可能である (Sumner, L. W., 2003)。これら培養細胞と植物個体における様々な違いにより、それぞれの代謝機能および内生の代謝物量が大きく異なることが知られている (Harada, K., 2006)。培養細胞を用いた試験では、安定同位体ラベリング, LC/HRMS/MS, および各種データマイニング技術を最適化することで、数万と存在する内生の代謝物やノイズなどに由来するピークの中から標的とする代謝物を高精度に選別することが可能であったものの、植物個体における適用性は不明である。

そこで、本章では除草剤の代謝物探索を実施している現場において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することを目的とした。

また、経時的な 2,4-D 代謝物プロファイリングの違いについて比較することで、2,4-D, $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D, および $^2\text{H}_5$ -2,4-D 薬剤処理における同位体効果 (Mutlib, A. E., 2008) についても検証を行った。

3.2. 実験方法

3.2.1. 試薬および供試化学物質

試薬および供試化学物質は 2.2.1.と同様のものを使用した.

3.2.2. 実験植物および化学物質の処理

シロイヌナズナの種子は理化学研究所バイオリソース研究センター (筑波, 日本) から譲渡していただいた. 種子はプラスチック製ポットに植え, 25 °C, 16 時間明期, 8 時間暗期条件で 2 週間栽培した. 供試化学物質の暴露については, 2,4-D, ¹³C₈-2,4-D, および ²H₅-2,4-D をそれぞれ *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解させた (各 90.5 mM ストック溶液) 各ストック溶液を, 0.1 %サントクテン 80 水溶液に溶解させた後 (各 4.5 mM), 第 7 葉目に 13 μg/g-新鮮重になるように薬剤処理を施した. またコントロール群として, 供試化学物質を溶解させていない *N,N*-ジメチルホルムアミドを 0.1 %サントクテン 80 に添加した水溶液を用いて同様に処理を施した.

薬剤処理後, 25 °C, 16 時間明期, 8 時間暗期条件で 0, 1, 3, 7 日間栽培した. 薬剤処理を施したロゼッタ葉 (処理葉) およびそれ以外の地上部 (非処理部) をそれぞれサンプリングした. サンプリングした処理葉および非処理部について重量を測定した. サンプルは 2.0 mL 容のエッペンドルフチューブに入れた後, 直ちに液体窒素で凍結させ一昼夜凍結乾燥に供した. 凍結乾燥後得られたサンプルは, 抽出時まで-80 °C で保存した.

3.2.3. 試料調製方法

サンプルが入っているエッペンドルフチューブそれぞれに 3 mm のジルコニアボール 1 個と 1 mL の抽出溶媒 (メタノール/クロロホルム/水= 10:4:4 体積比) を加え, 20 Hz で 1 分間ボールミル (MM 301 Retsch, Haan, Germany) により破碎した. 続いて, 超音波処理によって 5 分間代謝物を室温下で抽出した後, 16000 ×g, 4 °C の条件で 5 分間遠心分離した. その後, 上清 700 μL を新しいエッペンドルフチューブに回収し

た. 次に, クロロホルム 195 μL と水 195 μL を添加した後, 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した. 再び 16000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 5 分間遠心分離することで 2 層に分離させ, 上層 400 μL を新しいチューブに回収した. 回収した上清は遠心濃縮機に供し, メタノールを除去した後, 一昼夜凍結乾燥に供し溶媒を除去した. 内部標準物質として 20 ng の MCPA およびピリミカルブを含む 200 μL の混合溶液 (水/アセトニトリル 2:1 体積比) に再溶解し, 0.2 μm の PTFE シリンジフィルターに通したものを HPLC バイアルに回収した. 各サンプルは LC/HRMS 分析に供するまで -80°C で保存した.

3.2.4. LC/HRMS/MS 分析条件

LC/HRMS 分析および LC/HRMS/MS 分析は 2.2.4.と同様の条件で実施した.

3.2.5. ピークアライメントおよびピーク検出

保持時間の補正 (retention time alignment), ピーク検出およびピークエリア値の算出 (detect unknown compounds), ピークのグルーピング (group unknown compounds, fill gaps) には Compound Discoverer 2.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いた. 詳細なパラメーターは 2.2.5.と同じである.

3.2.6. 統計解析

各検体において, 比較対象とする 2 群 (例えば, 2,4-D 処理後 7 日の検体および $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D 処理後 7 日の検体) をヴォルカノプロット (\log_2 fold change $> |1|$, P -value < 0.05) に供することで, 各群で特異的に検出された代謝物をピックアップした. ヴォルカノプロットの描画には Compound Discoverer ver. 2.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いた. また, 2,4-D 処理群, $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D 処理群, $^2\text{H}_5$ -2,4-D 処理群, コントロール群それぞれのシロイヌナズナ植物個体における新鮮重の経時変化の統計学的有意差は, F 検定を実施した後, スチューデントの t 検定もしくはウェルチの t 検定を用いて決定した ($p < 0.01$, $p < 0.001$).

3.2.7. ペアードピークスフィルタリング

統計解析の結果、有意差が認められた各代謝物について、ペアードピークスフィルタリングに供した。ペアードピークスフィルタリングにおける各パラメーターの詳細な設定値は2.2.7.と同じである。

3.2.8. 2,4-D 代謝物のアノテーションおよび同定方法

ペアードピークスフィルタリングに供することで得られた 2,4-D 代謝物候補について、2.2.8.で作成した 2,4-D 代謝物ライブラリーと質量誤差 5 ppm 以内で比較照合することでアノテーションを行った。ペアードピークスフィルタリングによって得られた全ての 2,4-D 代謝物についてプロダクトイオンスキャンを行い、得られた HRMS/MS スペクトルから構造情報の解析を行った。

3.3. 結果と考察

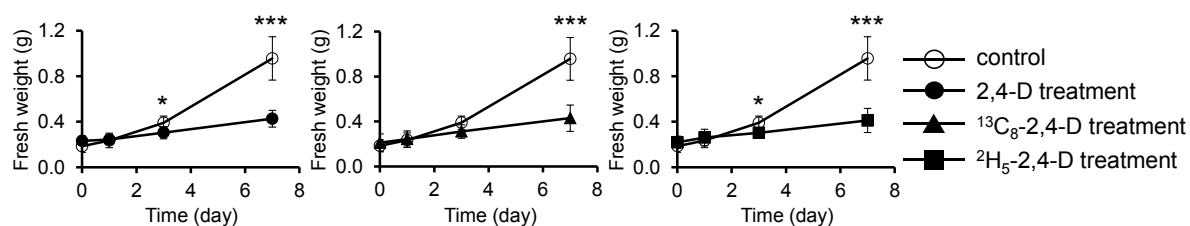
3.3.1. 2,4-D 処理による植物個体の表現型解析

開発した代謝物探索手法がシロイヌナズナ植物個体においても適用できるか否かについては、培養細胞と植物個体間の違い（代謝機能および内生の代謝物量の違い）だけではなく、植物個体間における各薬剤処理の違い（生体内への移行性、代謝される度合いなど）にも大きく依存すると考えられる。そこで、植物個体間における 2,4-D, $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D, $^2\text{H}_5$ -2,4-D 薬剤処理の違いを確認するために、新鮮重の経時変化および除草活性を算出した (図 3-1)。除草活性 (%) は、コントロール群に対する薬剤処理群の成長阻害度合いで定義され以下の式で表される。

$$\text{除草活性 (\%)} = 100 - \frac{\text{薬剤処理群の平均新鮮重 (g)}}{\text{コントロール群の平均新鮮重 (g)}} \times 100$$

2,4-D および $^2\text{H}_5$ -2,4-D 処理 3 日後、7 日後におけるシロイヌナズナの新鮮重は、いずれもコントロールと比較して有意に減少していた。また、 $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D 処理を施した

シロイヌナズナの新鮮重をコントロールと比較したところ、薬剤処理7日後において有意に減少していた。これらの結果からいずれの薬剤処理においても、シロイヌナズナの成長を阻害することが示唆された。また、2,4-D, $^{13}\text{C}_8$ -2,4-D, $^2\text{H}_5$ -2,4-D 薬剤処理ごとの除草活性について比較したところ、植物個体間で顕著な違いは確認されなかった。



P-values were calculated using an unpaired t-test. * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

	除草活性 (%)			
	薬剤処理0日後	薬剤処理1日後	薬剤処理3日後	薬剤処理7日後
2,4-D処理	-26	-3.4	22	55
$^{13}\text{C}_8$ -2,4-D処理	-15	-4.0	20	55
$^2\text{H}_5$ -2,4-D処理	-19	-11	23	57

図 3-1. 各薬剤処理における新鮮重の経時変化および除草活性 (Mean \pm SD, n=5)

3.3.2. 2,4-D 代謝物プロファイリング

処理葉について、第2章で開発した代謝物探索手法を用いて2,4-D代謝物を探索した結果、28種類の2,4-D代謝物の化学構造の推定に成功した。また、シロイヌナズナ非処理部についても同様にして2,4-D代謝物の探索を行なったところ、16種類の2,4-D代謝物の推定に成功した。非処理部で観測された代謝物は、全て処理葉で観測された代謝物であった。また、これら28種類の代謝物のうち、17種類はこれまでに報告されていない新規の代謝物であった。シロイヌナズナ植物個体で観測された代謝物について、シロイヌナズナ T87 培養細胞で観測された代謝物と比較した (図 3-2)。植物個体のみで観測された代謝物は6種類 [2,4-D-Hex (isomer 3), OH-2,4-D (isomer 2, 3), OH-2,4-D-Hex, OH-2,4-D-malonyl-Hex, 2,4-D-Gly] 存在した。一方で、培養細胞のみで観測された代謝物は4種類 [2,4-D-Hex-Hex, 2,4-DCP-Hex-dHex (isomer 2), 2,4-DCP-Hex-dPen-acetyl dPen, 2,4-DCP-SO₃-Pen] であった。植物個体または培養細胞

Estimated 2,4-D metabolite	Total number of reactions	The number of each reactions			New
		Phase I	Phase II	Phase III	
<u>Detected in <i>Arabidopsis</i> cells and plants</u>					
2,4-D-Hex (isomer1, 2)	1	0	1	0	
OH-2,4-D (isomer 1)	1	1	0	0	
SO ₃ -2,4-DCP	2	1	1	0	Yes
2,4-D-Ala	1	0	1	0	
2,4-D-Ser	1	0	1	0	Yes
2,4-D-Val	1	0	1	0	
2,4-D-Thr	1	0	1	0	Yes
2,4-DCP-Hex	2	1	1	0	
2,4-D-Leu or 2,4-D-Ile	1	0	1	0	
2,4-D-Asn	1	0	1	0	Yes
2,4-D-Asp	1	0	1	0	
2,4-D-Gln	1	0	1	0	Yes
2,4-D-Glu	1	0	1	0	
2,4-D-His	1	0	1	0	Yes
2,4-DCP-acetyl Hex	3	1	1	1	Yes
2,4-D-Phe	1	0	1	0	
2,4-DCP-Hex-dHex (isomer1)	3	1	1	1	Yes
2,4-DCP-malonyl-Hex-dHex	4	1	1	2	Yes
OH-2,4-DCP-Hex	3	2	1	0	Yes
OH-2,4-DCP-acetyl Hex	4	2	1	1	Yes
OH-2,4-DCP-malonyl Hex	4	2	1	1	Yes
<u>Detected in <i>Arabidopsis</i> cells</u>					
2,4-D-Hex-Hex	2	0	2	0	Yes
2,4-DCP-SO ₃ Pen	3	1	1	1	Yes
2,4-DCP-Hex-dHex (isomer 2)	3	1	1	1	Yes
2,4-DCP-Hex-dPen-acetyl dPen	5	1	1	3	Yes
<u>Detected in <i>Arabidopsis</i> plants</u>					
2,4-D-Hex (isomer 3)	1	0	1	0	Yes
OH-2,4-D (isomer 2, 3)	1	1	0	0	Yes
OH-2,4-D-Hex	2	1	1	0	
OH-2,4-D-malonyl-Hex	3	1	1	1	Yes
2,4-D-Gly	1	0	1	0	Yes

図 3-2. シロイヌナズナ T87 培養細胞および植物個体で観測された代謝物一覧

から観測された 32 種類の 2,4-D 代謝物のうち、14 種類の代謝物は Phase I, Phase II, Phase III に分類される異物代謝反応や内生の代謝物に対して起こる代謝反応 (dHex, Pen, dPen との抱合反応) が複合的かつ多段階で生じた代謝物であった (合計で 2~5 段階の代謝反応)。さらに、そのうちの 12 種類は新規の 2,4-D 代謝物であったことから、多段階の *in silico* 代謝物予測を実施することの有用性が示された。処理葉だけで観測された代謝物のうち、4 種類は 2,4-D 骨格に水酸基が導入された OH-2,4-D 骨格を有する代謝物であったことから、両者の違いの要因の一つとして、ベンゼン環に水酸基を導入する代謝反応を触媒するシトクロム P450 などの第 I 相代謝酵素の発現量が培養細胞のそれよりも多かったことが原因として考えられた。推定できた 2,4-D 代謝物について、経時的な代謝物プロファイリングデータを推測される代謝パスウェイ上

に投影した (図 3-3-図 3-6)。また、処理葉における 2,4-D は、薬剤処理直後から経時的に減少する傾向が観測された。一方で、シロイヌナズナ非処理部では、処理後 3 日目にかけて増加し、処理後 3 日目から 7 日目にかけて減少する傾向にあった。他の除草剤で報告されているように (Suzuki, I., 1993c), 薬剤処理した 2,4-D は、シロイヌナズナロゼッタ葉に取り込まれた後、そのうちの一部は非処理部に移行したと考えられた。さらに、非処理部における 2,4-D の量は、処理後 3 日目から 7 日目にかけて代謝物量が減少する傾向にあったことから、非処理部でも 2,4-D の代謝が行われていることが示唆された。処理葉での 2,4-D 代謝物の経時的な変化を確認したところ、SO₃-2,4-DCP, 2,4-D-Glu, および 2,4-D-Ser など多くの代謝物で、薬剤処理後経時的に増加する傾向が観測された。一方で、2,4-D-Asp や 2,4-D-His など一部の代謝物は、薬剤処理直後から処理後 3 日目にかけて代謝物量が増加し、処理後 3 日目から処理後 7 日目にかけて代謝物量が減少する傾向にあった。2,4-D-Hex は、薬剤処理後 0 日目から処理後 1 日目にかけて代謝物量が顕著に増加する傾向にあった。シロイヌナズナ非処理部において、2,4-D-Hex (isomer2, 3), および 2,4-D-Thr を除く全ての 2,4-D 代謝物は、薬剤処理直後から 3 日目にかけて代謝物量が増加し、処理後 3 日目から 7 日目に

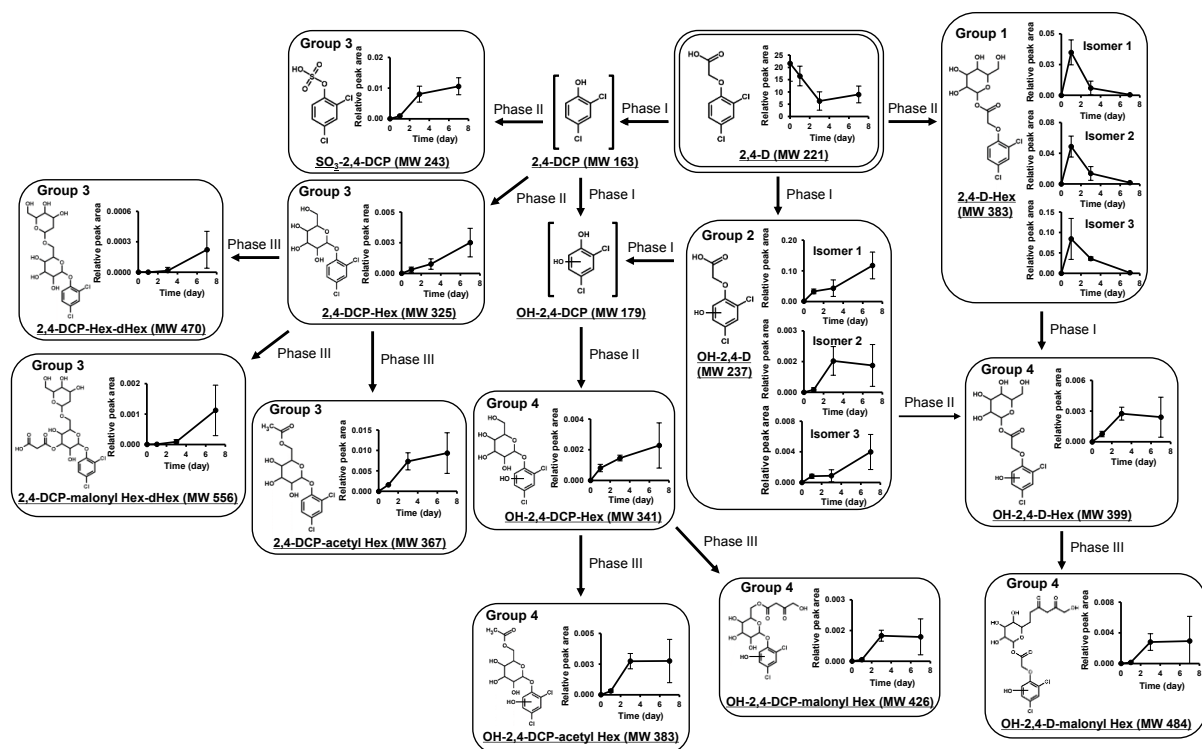


図 3-3. 2,4-D 代謝物の経時的な代謝物プロファイリングデータ (処理葉) (Mean ± SD, n=5)

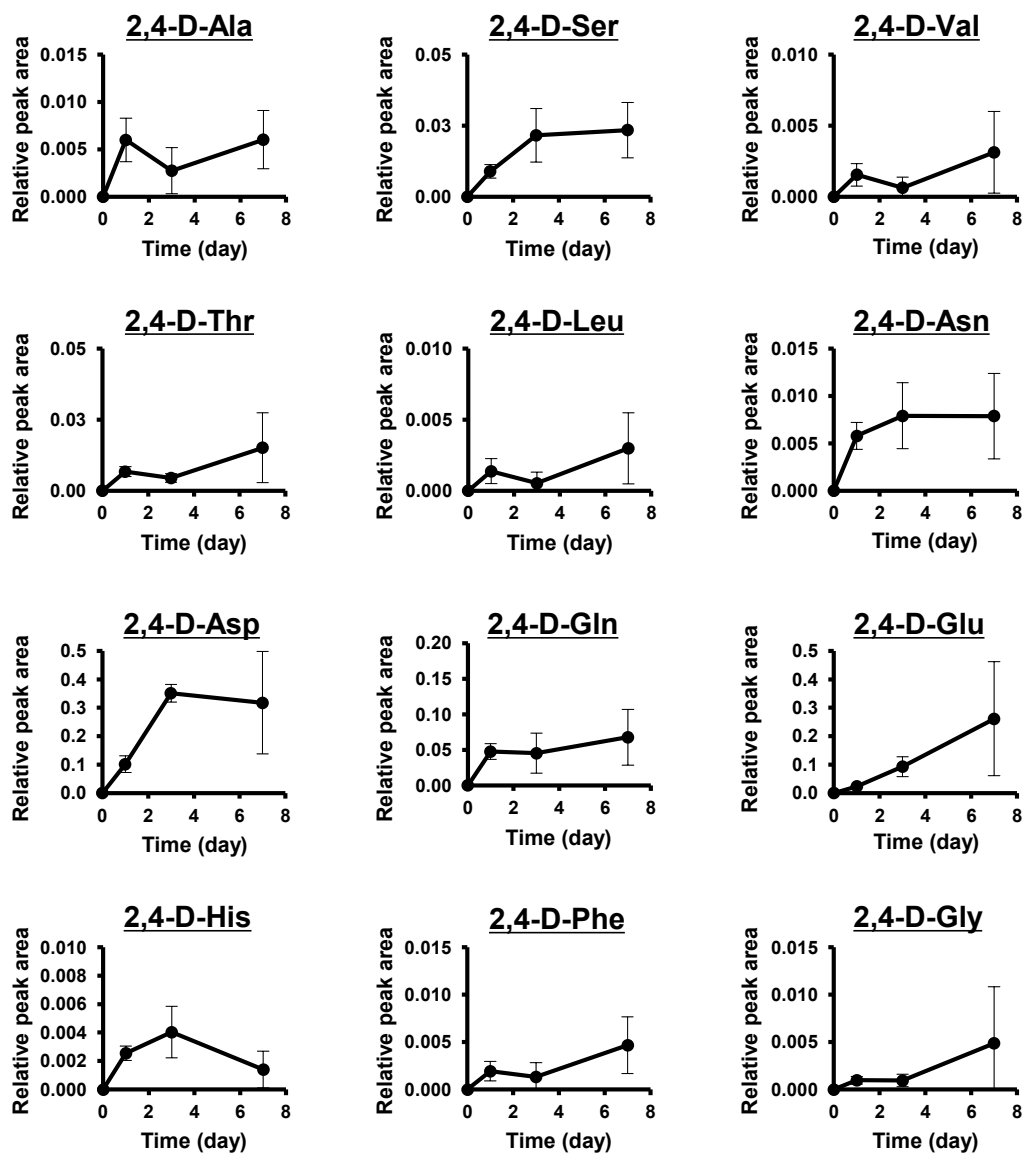


図 3-4. 2,4-D 代謝物の経時的な代謝物プロファイリングデータ (処理葉) (Mean \pm SD, n=5)

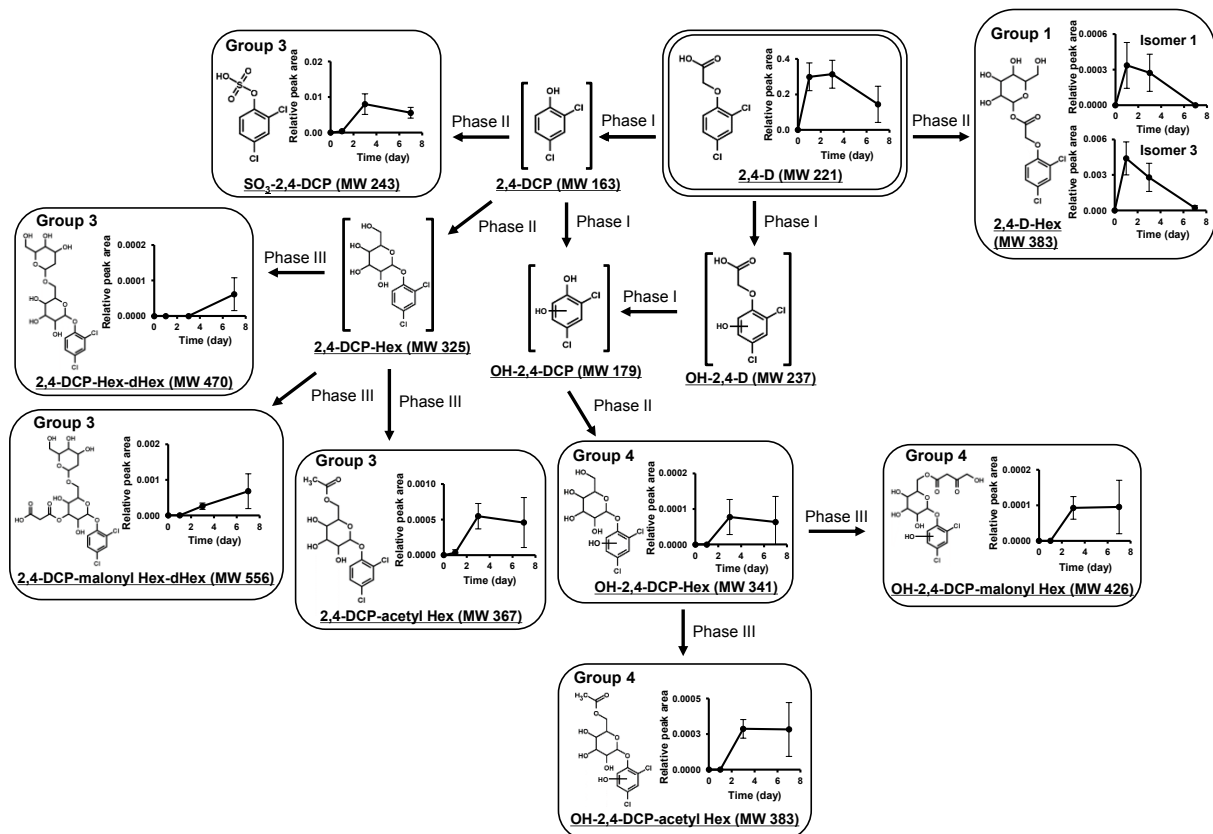


図 3-5. 2,4-D 代謝物の経時的な代謝物プロファイリングデータ (非処理部) (Mean ± SD, n=5)

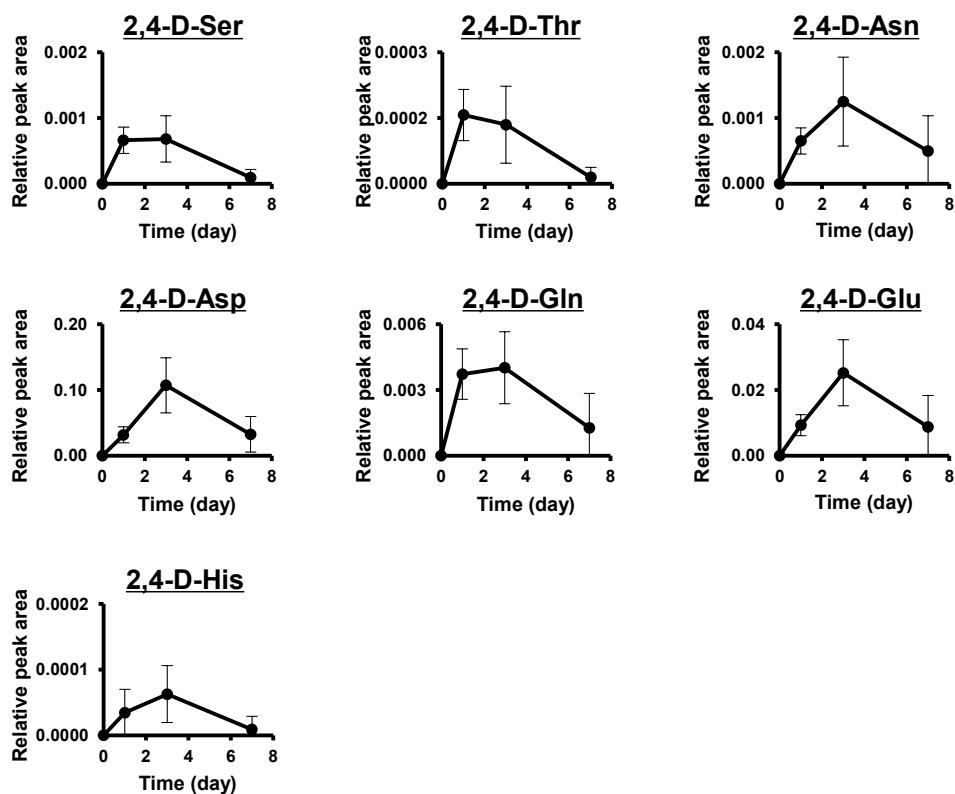


図 3-6. 2,4-D 代謝物の経時的な代謝物プロファイリングデータ (非処理部) (Mean ± SD, n=5)

かけて代謝物量が減少する傾向にあった。これらの結果は、シロイヌナズナ T87 培養細胞で観測された現象と非常に類似しており、今回観測された 2,4-D 代謝物のいくつかは、細胞壁の構成成分として利用された可能性が示唆された (Van Eerd, L. L., 2003, Scheel, D., 1981, Brazier-Hicks, M., 2007)。

^2H 安定同位体標識体は、 ^{13}C 安定同位体標識体に比べてコストや合成の難易度が低いという点で、現場における除草剤の代謝物探索において利用しやすいと考えられる。しかしながら、医薬品における ^2H 安定同位体標識体薬物は、非標識体薬物と比較して代謝反応速度が遅い (同位体効果) ことにより、生体内での異物代謝過程における挙動が異なることが数多く報告されている (Mutlib, A. E., 2008)。そこで、各薬剤処理における経時的な 2,4-D 代謝物プロファイリングの違いを比較することで、除草剤開発現場において ^2H 安定同位体標識体が利用できるかどうかを検証した。推定できた 28 種類の 2,4-D 代謝物について、各薬剤処理を施したシロイヌナズナのロゼッタ葉における経時的な 2,4-D 代謝物プロファイリングを比較した (図 3-7)。選択した 2,4-D 代謝物は、第 I 相代謝酵素だけではなく第 II 相および第 III 相代謝酵素によって代謝された結果生じた代謝物であり、異物代謝酵素における同位体効果を網羅的に評価できると考えられた。図 3-7 に示した各薬剤における 2,4-D 代謝物プロファイリング結果から、各薬剤処理における代謝物プロファイリングいずれにおいても有意な差は認められなかったことから、同位体効果は観測されていないと結論づけた。この結果はあくまでも一例に過ぎないが、除草剤の代謝物探索において、 ^2H 安定同位体標識体を利用できる可能性が示唆された。

以上の結果から、シロイヌナズナ T87 培養細胞で観測された異物代謝反応を植物個体でも捉えることができ、2,4-D 処理葉から非処理部への 2,4-D 薬剤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た可能性といった植物個体の生理現象も同時に観測することに成功した。さらには、培養細胞で観測された代謝物のほとんどが処理葉で確認されたことに加えて、培養細胞では観測されていなかった 5 種類の 2,4-D 代謝物を新たに推定することができたことから、第二章で開発した代謝物

探索手法は、シロイヌナズナ植物体においても適用できると結論づけた。

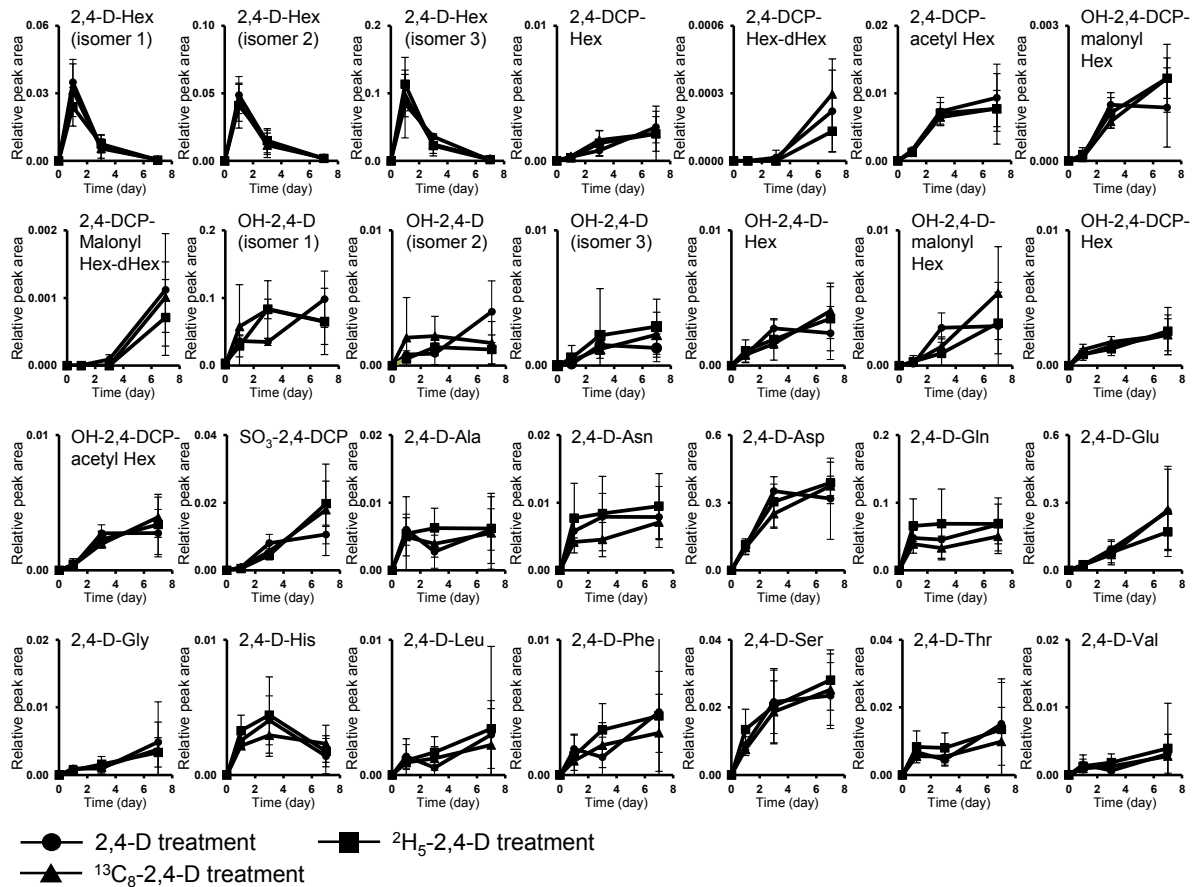


図 3-7. 各薬剤における 2,4-D 代謝物の経時的なプロファイリングデータ (処理葉) (Mean ± SD, n=5)

3.4. 小括

本章では、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適用性を評価した。第二章で開発した除草剤の代謝物探索手法を用いて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) の化学構造推定に成功した。植物個体または培養細胞から観測された 32 種類の 2,4-D 代謝物のうち、14 種類の代謝物は Phase I, Phase II, Phase III に分類される異物代謝反応や内生の代謝物に対して起こる代謝反応 (dHex, Pen, dPen との抱合反応) が複合的かつ多段階で生じた代謝物であった (合計で 2~5 段階の代謝反応)。さらに、そのうちの 12 種類は新規

の 2,4-D 代謝物であったことから、多段階の *in silico* 代謝物予測を実施することの有用性が示された。植物個体および培養細胞で共通して観測された 22 種類の 2,4-D 代謝物に関して、処理葉での経時的 2,4-D 代謝物プロファイルは T87 培養細胞での代謝物プロファイルと非常に類似していた。加えて、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 薬剤の転流や、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。また、各薬剤処理における除草活性の違いおよび経時的な 2,4-D 代謝物プロファイリングの違いについて比較することで、除草剤の代謝物探索を実施している現場において ^2H 安定同位体標識体が利用できるかどうかを検証したところ、同位体効果は観測されておらず、 ^2H 安定同位体標識体を利用できる可能性が示唆された。

第4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をおよび実用性の評価を実施した。第二章では、農薬の1種類である2,4-Dを処理したシロイヌナズナ T87 培養細胞中で生成する2,4-D代謝物を対象に、 ^{13}C および ^2H 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、代謝物プロファイルの経時的変化を解析することで、除草剤の代謝物を推定するための新しい方法論を開発した。開発した手法を用いて、シロイヌナズナ T87 培養細胞中の2,4-D代謝物を網羅的に探索したところ、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代謝物の化学構造の推定に成功した。そのうちの6種類の代謝物は、dHex, Pen, dPenとの抱合体であり、本研究で初めてこれら単糖類が除草剤と抱合することを明らかにした。また、提案する代謝物探索手法は既存の手法と比較して偽陽性代謝物を大幅に低減し、包括的な代謝物探索を可能にした。以上の結果から、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。

第三章では、除草剤の代謝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、開発した代謝物探索手法の実用性を評価した。開発した代謝物探索手法を用いて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。また、薬剤処理したロゼッタ葉および非処理部での経時的な2,4-D代謝物プロファイルの結果から、2,4-D薬剤の転流や、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 T87 培養細胞だけでなく、シロイヌナズナ植物個体でも適用できると結論づけた。

本研究で提案した除草剤の代謝物探索手法の特徴の一つは、LC/HRMS/MS および

安定同位体ラベリングを利用することで偽陽性を極限まで排除できることである。また、高い質量精度を有した HRMS スペクトルからの化学組成推定、HRMS/MS スペクトルでの非標識体および標識体薬剤代謝物の質量差分に着目した部分構造解析を実施することで、除草剤の代謝物の構造推定が可能となった。一方で、汎用装置として広く普及しているトリプル四重極型の MS を用いて除草剤の代謝物探索を実施する場合、あらかじめ測定対象とする除草剤代謝物の代表的な部分構造由来のフラグメントイオンを網羅的に予測できなければならない。仮にプロダクトイオンを予測できたとしても、得られるプリカーサーイオンは整数質量であることから、化学組成および化学構造の推定は困難を伴う。そのため、除草剤の代謝物を網羅的に探索するためには HRMS の利用が望ましい。

HRMS を基盤とした本手法を用いて、シロイヌナズナ T87 培養細胞から検出された 83 種類の 2,4-D 代謝物候補のうち、化学構造の推定ができた代謝物は 26 種類であった。化学構造推定ができなかった 57 種類の未知代謝物の化学構造推定を推進するためには、*in silico* 代謝物ライブラリーのさらなる拡張、すなわち、既知の異物代謝反応だけでなく生体内で起こる全代謝反応（例えば、メチル化、リン酸化など）を網羅し、全代謝反応を用いて多段階の *in silico* 代謝物予測を実施すればよいと考えられる。これまでに dHex, Pen, dPen のような単糖類と除草剤との抱合反応は知られていなかったが、本研究では初めてこれら単糖類と 2,4-D が抱合した 6 種類の代謝物の化学構造推定に成功した。これら代謝物は Phase I, Phase II, Phase III に分類される異物代謝反応と内生の代謝物に対して起こる代謝反応が複合的かつ多段階で生じた代謝物であった（合計で 3~5 段階の代謝反応）。本研究では、植物生体内での内生の代謝物に対して起こる代謝反応については、dHex, Pen, dPen のような単糖類およびウロン酸との抱合反応のみの評価に留まっているが、生体内に取り込まれた除草剤はその他の代謝酵素の作用によって構造的な変化を受けることが推測される。以上のことから、生体内で起こる全代謝反応を網羅した多段階の *in silico* 代謝物予測を活用することで、2,4-D 代謝物候補のさらなる化学構造推定を達成できることが示唆された。

シロイヌナズナ処理葉で検出された OH-2,4-D は 3 種類の異性体が確認された (シロイヌナズナ T87 培養細胞では 1 種類のみ検出) が、水酸基の置換位置を特定することはできなかった。効率的かつ合理的な除草剤開発を実施するためには、有用植物および雑草における除草剤の代謝物プロファイルの違いと、各代謝物生成に関与した代謝酵素が推定できればよいのかもしれない。しかしながら、各代謝物の毒性を評価することを目的とした農作物の安全性評価では、毒性は各代謝物の化学構造に大きく依存する上に、毒性が疑われる代謝物の評価を実施しようとした場合には、その代謝物を別途化学合成しなければならず、代謝物の化学構造の特定は必須となる。それゆえ、各代謝物を単離・精製し NMR に供するといった従来の代謝物構造解析を併用することも考えなければならない。また、本手法はエレクトロスプレーイオン化質量分析 (Electrospray ionization-mass spectrometry: ESI-MS) に基づいた代謝物探索手法であることから、ESI-MS でイオン化しない代謝物や検出感が悪い代謝物は検出することができない。このような代謝物を検出するためには、他のイオン化法 (EI, APCI など) を用いた分析が必要となる。*in silico* 代謝物予測で得られた化学構造をもとに ESI-MS で検出が困難な代謝物を予測し、予測した代謝物の構造情報に基づいて最適な分析手法を用いることで、さらなる包括性の向上が見込めると考えられる。

本研究では、除草剤のモデルとして 2,4-D を用いて植物生体内での除草剤の代謝物を探索するための方法論を構築してきたが、その他の除草剤で当該方法論を適用できるかどうかについては示せていない。除草剤はその母核の構造類似性から 32 化合物群に分類され、チオカーバメート系除草剤を除いた 31 化合物群の中で代表的な除草剤は、ベンゼン核やピリジン核のような複素環を有している (Terry, R. R., 1998)。これら環状構造は、植物生体内での異物代謝過程で開裂しないことが知られている (Terry, R. R., 1998)。当該手法は、非標識体薬物および標識体薬物に由来する代謝物ペアの質量差分に基づいた代謝物探索手法であることから、ベンゼン核やピリジン核を安定同位体で標識することで、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の探索が可能であると考えられる。一方で動物や微生物では

生体内でベンゼン核やピリジン核のような環状構造を開裂、分解する代謝酵素を有している (Van Eerd, L. L., 2003). 仮に、薬物が動物や微生物などの生体内で代謝されることで環状構造が開裂、分解したとしても、標識した元素が構造中に残る、すなわち、安定同位体標識部位が母核に残るようデザインすることができれば、薬物代謝物ペアを検出することは理論上可能であると示唆される。しかし、当該研究で提案した方法論の拡張性を示すためには、薬剤の種類 (低分子医薬品や環境汚染物質など) および解析対象となる生物種を変更して検証していくことも必要である。効率的な除草剤開発や農作物の安全性評価だけに限らず、ヒトや動物生体内での低分子医薬品の作用機構の解明や毒性評価、多種多様な内因性代謝物の包括的なプロファイリング手法であるメタボロミクスにおいて、代謝物推定は喫緊の課題である。当該手法を応用することで未知代謝物の構造推定が推進され、外因性および内因性の代謝反応を理解するための一助になることを期待して、本博士論文の結びの言葉とする。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、格別なる御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻の福崎英一郎教授ならびに九州大学生体防御医学研究所の馬場健史教授と和泉自泰准教授に謹んで感謝の意を表します。また、博士論文の副査を快諾して下さりました内山進教授と松田史生教授に深く感謝致します。大阪大学在学時に、同じく御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科の新聞秀一准教授、Sastia Prama PUTRI 助教に厚く御礼申し上げます。

本研究で使用したシロイヌナズナ T87 培養細胞およびシロイヌナズナ植物体検体を提供して下さり、活発な研究議論を賜りました住友化学株式会社健康農業関連事業研究所の岩橋福松博士、大和誠司博士に心から感謝致します。また、本研究で使用した供試薬剤を合成して下さった住友化学株式会社健康農業関連事業研究所の岩越光彦氏、ならびにペアードピークスフィルタリングの開発に協力していただいた九州大学生体防御医学研究所の中尾素直博士に深く感謝の意を表します。データ解析結果について活発な議論を賜りました崇城大学大学院究科応用微生物工学科の中山泰宗准教授に心より御礼申し上げます。その他、本論文に直接関与しないテーマも含め共同研究等でお世話になりました大学、民間企業、その他研究機関の方々に感謝致します。

研究活動のみならず、研究室生活全般において大変お世話になりました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻ならびに九州大学生体防御医学研究所の方々に深く感謝致します。

引用文献

- Ahrens, W. H.:** Herbicide Handbook 7 th Edition. pp.1-352. Weed Science Society of America (1994)
- Anari, M. R., Sanchez, R. I., Bakhtiar, R., Franklin, R. B., Baillie, T. A.:** Integration of knowledge-based metabolic predictions with liquid chromatography data-dependent tandem mass spectrometry for drug metabolism studies: Application to studies on the biotransformation of Indinavir. *Anal. Chem.*, **76**, 823-832 (2004)
- Anari, M. R., Baillie, T. A.:** Bridging cheminformatic metabolite prediction and tandem mass spectrometry. *Drug Discov. Today.*, **10**, 711-717 (2005)
- Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E.:** Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 737-747 (2001)
- Arrowsmith, J., Miller, P.:** Trial watch: phase II and phase III attrition rates 2011-2012. *Nat. Drug Discov.*, **12**, 569 (2013)
- Balazs, S.:** Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochem Rev.*, **5**, 445-458 (2006)
- Bavcon Kralj, M., Černigoj, U., Franko, M., Trebše, P.:** Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaoxon, and commercial malathion-Products and toxicity studies. *Water Res.*, **41**, 4504–4514 (2007)
- Bino, R. J., Hall, R. D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., Nikolau, B. J., Mendes, P., Roessner-Tunali, U., Beale, M. H., Trethewey, R. N., Lange, B. M., Wurtele, E. S., Sumner, L. W.:** Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Sci.*, **9**, 418–425 (2004)
- Brazier-Hicks, M., Offen, W. A., Gershater, M. C., Revett, T. J., Lim, E.-K., Bowles, D. J., Davies, G. J., Edwards, R.:** Characterization and engineering of the bifunctional *N*- and *O*-glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U.S.A., **104**, 20238–20243 (2007)

Brink, A., Fontaine, F., Marschmann, M., Steinhuber, B., Cece, E. N., Zamora, I., Pähler, A.: Post-acquisition analysis of untargeted accurate mass quadrupole time-of-flight MS^E data for multiple collision-induced neutral losses and fragment ions of glutathione conjugates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **28**, 2695-2703 (2014)

Bueschl, C., Kluger, B., Berthiller, F., Lirk, G., Winkler, S., Krska, R., Schuhmacher, R.: MetExtract a new software tool for the automated comprehensive extraction of metabolite-derived LCMS signals in metabolomics research. *Bioinformatics*, **28**, 736–738 (2012)

Chkanikov, D. I., Makeyev, A. M., Pavlova, N. N., Grygoryeva, L. V, Dubovoi, V. P., Klimov, O. V.: Variety of 2,4-D metabolic pathways in plants, its significance in developing analytical methods for herbicide residues. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **5**, 97–103 (1976)

Coleman, J. O. D., Blake-Kalff, M. M. A., Davies, T. G. E.: Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.*, **2**, 144–151 (1997)

Dagnino–Subiabre, A., Cassels, B. K., Baez, S., Johansson, A. S., Mannervik, B., Segura–Aguilar, J.: Glutathione transferase M2–2 catalyzes conjugation of dopamine and dopa o–quinones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **274**, 32-36 (2000)

Decker, M., Arand, M., Cronin, A.: Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Arch. Toxicol.*, **83**, 297-318 (2009)

Delaney, J., Clarke, E., Hughes, E., Rice, M.: Modern agrochemical research: a missed opportunity for drug discovery? *Drug Discov. Today*, **11**, 839-845 (2006)

Duke, S. O.: Why have no herbicide modes of action appeared in recent years? *Pest. Manag. Sci.*, **68**, 505-512 (2012)

Edmondson, E. D., Binda, C., Wang, J., Upadhyay, K. A., Mattevi, A.: Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases.

Biochemistry., **48**, 4220-4230 (2009)

EFSA panel on plant protection products and their residues: *Scientific opinion on evaluation of the toxicological relevance of pesticide metabolites for dietary risk assessment.* pp.1-187. EFSA Journal (2012)

Ellison, A. C., Tian, Y., Knaak, B. J., Kostyniak, J. P., Olson, R. J.: Human hepatic cytochrome P450-specific metabolism of the organophosphorus pesticides methyl parathion and diazinon. *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 1-5 (2012)

Evans, W. E., Relling, M. V.: Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutic. *Science*, **286**, 487-491 (1999)

Eyer, L., Vain, T., Pařízková, B., Oklestkova, J., Barbez, E., Kozubíková, H., Pospíšil, T., Wierzbicka, R., Kleine-Vehn, J., Fránek, M., Strnad, M., Robert, S., Novak, O.: 2,4-D and IAA amino acid conjugates show distinct metabolism in *Arabidopsis*, *PLoS One*, **11**, e0159269 (2016)

Feung, C.-S., Hamilton, R. H., Mumma, R. O.: Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. V. identification of metabolites in soybean callus tissue cultures. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 637–640 (1973)

Feung, C.-S., Hamilton, R. H., Mumma, R. O.: *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 373–376 (1975)

Frear, D. S.: *Pesticide conjugates-glycosides.* pp.35-54 American Chemical Society (1976)

Frear, D. S.: Alternate pathways of metribuzin metabolism in soybean: Formation of *N*-glucoside and homoglutathione conjugates. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **23**, 56-65 (1985)

Fukusaki, E., Harada, K., Bamba, T., Kobayashi, A.: An Isotope Effect on the Comparative Quantification of Flavonoids by Means of Methylation-Based Stable Isotope Dilution Coupled with Capillary Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 75–77 (2005)

Gaweska, H., Fitzpatrick, F. P.: Structures and mechanism of the monoamine oxidase family. *Biomol. Concepts*, **2**, 365-377 (2011)

- Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R. G., Windmill, K. F., Martin, J. L., McManus, M. E.:** Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol. Sci.*, **90**, 5-22 (2006)
- Glatt, H., Meinel, W.:** Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol.*, **369**, 55–68 (2004)
- Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S., Yoshida, S.:** Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **130**, 1919-1334 (2002)
- Guengerich, F. P., Peterson, L. A., Böcker, R. H.:** Cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation and carboxylic acid ester cleavage of Hantzsch pyridine esters. *J. Biol. Chem.*, **15**, 8176-8183 (1988)
- Guengerich, F. P.:** Common and uncommon cytochrome p450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, (2001)
- Guroff, G., Daly, W. J., Jerina, M. D., Renson, J., Witkop, B., Udefriend, S.:** Hydroxylation-induced migration: The NIH shift. *Science.*, **157**, 1524-1530 (1967)
- Gut, I., Nedelcheva, V., Soucek, P., Stopka, P., Tichavska, B.:** Cytochromes P450 in benzene metabolism and involvement of their metabolites and reactive oxygen species in toxicity. *Environ. Health Perspect.*, **104**, 1211- 1218(1996)
- Hall, J. C., Wickenden, L. S., Yau, K. Y. F.:** *Biochemical conjugation of pesticides in plants and microorganisms: An overview of similarities and divergences.* pp.89-118 American Chemical Society (2000)
- Hamburg, A., Puvanesarajah, V., Burnett, T. J., Barnekow, D. E., Premkumar, N. D., Smith, G. A.:** Comparative degradation of [¹⁴C]-2,4-dichlorophenoxyacetic acid in wheat and potato after foliar application and in wheat, radish, lettuce, and apple after soil application. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 146–155 (2001)
- Harada K., Fukusaki, E., Bamba, T., Sato, F., Kobayashi, A.:** *In vivo* ¹⁵N-enrichment of metabolites in suspension cultured cells and its application to metabolomics. *Biotechnol.*

Prog., **22**, 1003-1011 (2006)

Harada N., Omura, T.: Participation of cytochrome P-450 in the reduction of nitro compounds by rat liver microsomes. *J. Biochem.*, **87**, 1539-1554 (1980)

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R.: Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **45**, 51-88 (2005)

Hemling, M. E., Conboy, J. J., Bean, M. F., Mentzer, M., Carr, S. A.: Gas phase hydrogen/deuterium exchange in electrospray ionization mass spectrometry as a practical tool for structure elucidation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **5**, 434-442 (1994)

Hodgson, R. H., Frear, D. S., Swanson, H. R., Regan, L. A.: Alteration of dipheamid metabolism in tomato by ozone. *Weed Science.*, **21**, 542-549 (1973)

Ioannides, C.: *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. pp.1-566. Wiley (2001)

Iribame, C., Picart, D., Dréano, Y., Bail, Jean-Pierre, Berthou, F.: Involvement of cytochrome P450 3A4 in N-dealkylation of buprenorphine in human liver microsomes. *Life Sciences*, **60**, 1953-1964 (1997)

Ishibashi, M., Izumi, Y., Sakai, M., Ando, T., Fukusaki, E., Bamba, T.: High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 4457-4463 (2015)

Ishikawa, T.: ATP/magnesium-dependent cardiac transport system for glutathione S-conjugates. A study using rat heart sarcolemma vesicles. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17343-17348 (1989)

Iwabuchi, H.: Structure determination of metabolites and investigation of metabolic pathway using mass spectrometry in drug metabolism. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **46**, 184-190 (1998)

Jančová, P., Šiller, M.: *Topics on Drug Metabolism*. pp.35-60. InTech (2012)

Ji, L., Schüürmann, G.: Model and mechanism: N-hydroxylation of primary aromatic amines

by cytochrome P450. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 744-748 (2013)

Jollow, D. J., Roberts, S., Price, V., Longacre, S., Smith, C.: Pharmacokinetic considerations in toxicity testing. *Drug Metab. Rev.*, **13**, 983-1007 (1982)

Kitamura, S., Sugihara, K., Tatsumi, K.: A unique tertiary amine *N*-oxide reduction system composed of quinone reductase and heme in rat liver preparations. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 92-97 (1999)

Kluger, B., Bueschl, C., Lemmens, M., Berthiller, F., Häubl, G., Jaunecker, G., Adam, G., Kraska, R., Schuhmacher, R.: Stable isotopic labelling-assisted untargeted metabolic profiling reveals novel conjugates of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 5031–5036 (2013)

Kluger, B., Bueschl, C., Neumann, N., Stückler, R., Doppler, M., Chassy, A. W., Waterhouse, A. L., Rechthaler, J., Kamplleitner, N., Thallinger, G. G., Adam, G., Kraska, R., Schuhmacher, R.: Untargeted profiling of tracer-derived metabolites using stable isotopic labeling and fast polarity-switching LC-ESI-HRMS. *Anal. Chem.*, **86**, 11533–11537 (2014)

Knights, K. M., Sykes, M. J., Miners, J. O.: Amino acid conjugation: contribution to the metabolism and toxicity of xenobiotic carboxylic acids. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **3**, 159–168 (2007)

Kutsuno, Y., Itoh, T., Tukey, R. H., Fujiwara, R.: Glucuronidation of drugs and drug-induced toxicity in humanized UDP-glucuronosyltransferase 1 mice. *Drug Metab. Dispos.*, **42**, 1146-1152 (2014)

Lam, W., and Ramanathan, R.: In electrospray ionization source hydrogen/deuterium exchange LC-MS and LC-MS/MS for characterization of metabolites. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **13**, 345–353 (2002)

Lang, H. D., Yeung, K. C., Peter, M. R., Ibarra, C., Gasser, R., Itagaki, K., Philpot, M. R., Rettie, E. A.: Isoform specificity of trimethylamine *N*-oxygenation by human Flavin-Containing Monooxygenase (FMO) and P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, **56**,

1005-1012 (1998)

Langowski, J., Long, A.: Computer systems for the prediction of xenobiotic metabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 407-415 (2002)

Lee S. H., Kwon, Y.-C., Kim, D.-M., Park., C. B.: Cytochrome P450-catalyzed O-dealkylation coupled with photochemical NADPH regeneration. *Biotechnol. Bioeng.*, **110**, 383-390 (2013)

Leeming, M. G., Isaac, A. P., Pope, B. J., Cranswick, N., Wright, C. E., Ziogas, J., O'Hair, R. A. J., Donald, W. A.: High-resolution twin-ion metabolite extraction (HiTIME) mass spectrometry nontargeted detection of unknown drug metabolites by isotope labeling, liquid chromatography mass spectrometry, and automated high-performance computing. *Anal. Chem.*, **87**, 4104–4109 (2015)

Lessire, F., Gustin, P., Delaunois, A., Bloden, S., Nemmar A., Vargas, M., Ansay, M.: Relationship between parathion and paraoxon toxicokinetics, lung metabolic activity, and cholinesterase inhibition in guinea pig and rabbit lungs. *Toxicol. Appl. pharmacol.*, **138.**, 201-210 (1996)

Lilienfeld, D. E., Michael, D. G.: 2,4-D, 2,4,5-T, and 2,3,7,8-TCDD: An Overview. *Epidemiol. Rev.*, **11**, 19-58 (1989)

Liu, D. Q., Hop, C. E. C. A., Beconi, M. G., Maio, A., Chiu, S.-H. L.: Use of on-line hydrogen/deuterium to facilitate metabolite identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 1832–1839 (2001)

Liu, D. Q., Hop, C. E. C.A.: Strategies for characterization of drug metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization and on-line H/D exchange approaches. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **37**, 1-18 (2005)

Lynch, T., Pharm, D., Price, A.: The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am. Fam. Physician.*, **76**, 391-396 (2007)

Ma, S., Zhu, M.: Recent advances in applications of liquid chromatography-tandem mass

spectrometry to the analysis of reactive drug metabolites. *Chem. Biol. Interact.*, **79**, 25-37 (2009)

Macherius, A., Seiwert, B., Schröder, P., Huber, C., Lorenz, W., Reemtsma, T.: Identification of plant metabolites of environmental contaminants by UPLC-QToF-MS: The in vitro metabolism of triclosan in horseradish. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 1001-1009 (2014)

Meinl, W., Meerman, J. H., Glatt, H.: Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in *Salmonella typhimurium*. *Pharmacogenetics*, **12**, 677–689, (2002)

Meyer, M. R., Schutz, A., Maurer H. H.: Contribution of human esterases to the metabolism of selected drugs of abuse. *Toxicol*, **232**, 159-166 (2015)

Mine, A., Miyakado, M., Matsunaka, S.: The mechanism of bentazon selectivity. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **5**, 566-574 (1975)

Miyamoto, T.: Structure and function of Glutathione S-transferases. *J. Agric. Sci. Tokyo Univ. Agric.*, **57**, 247-260 (2013)

Murashige, T., Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, **15**, 473-498 (1962)

Mutlib, A, E.: Application of stable isotope-labeled compounds in metabolism and in metabolism-mediated toxicity studies. *Chem. Res.Toxicol.*, **21**, 1672-1689 (2008)

Narender, N., Srinivasu, P., Kulkarni, S. J., Raghavan, K. V.: Highly efficient, para-selective oxychlorination of aromatic compounds using potassium chloride and oxone. *Synth. Commun.*, **32**, 279–286 (2002)

Ohashi, N., Furuuchi, S., and Yoshikawa, M.: Usefulness of the hydrogen-deuterium exchange method in the study of drug metabolism using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18**, 325–334 (1998)

Ohkawa, H., Shiota, N., Imaishi, H. Yamada, T., Inui, H., Ohkawa, Y.: Cytochrome P450 monooxygenases metabolizing herbicides. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, **12**, 17-22 (1998)

Pelander A., Tyrkkö, E., Ojanperä, I.: *In silico* methods for predicting metabolism and mass fragmentation applied to quetiapine in liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry urine drug screening. *Rapid, Commun., Mass, Spectrom.*, **23**, 506-514 (2009)

Pichersky, E., Gang, D.: Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.*, **5**, 439–445 (2000)

Prasad, B., Garg, A., Takwani, H., Singh, S.: Metabolite identification by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **30**, 360–387 (2011)

Qiu, F., Fine, D. D., Wherritt, D. J., Lei, Z., Sumner, L. W.: PlantMAT: A metabolomics tool for predicting the specialized metabolic potential of a system and for large-scale metabolite identifications. *Anal. Chem.*, **88**, 11373–11383 (2016)

Reilly, S. J., O'Shea, E. M., Andersson, U., O'Byrne, J., Alexson, S. E., Hunt, M. C.: A peroxisomal acyltransferase in mouse identifies a novel pathway for taurine conjugation of fatty acids. *The FASEB Journal*, **21**, 99–107 (2007)

Rouguieg, K., Picard, N., Sauvage, F.-L., Gaulier, J.-M., Marquet, P.: Contribution of the different UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) isoforms to buprenorphine and norbuprenorphine metabolism and relationship with main UGT polymorphisms in a bank of human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 40-45 (2010)

Sandermann, H.: Plant metabolism of xenobiotics. *Trends, Biochem. Sci.*, **17**, 82-84 (1992)

Sandermann, H., Haas, Jr. M., Messner, B., Pflumacher, S., Schroder, P., Wetzel, A.: *The role of glucosyl and malonyl conjugation in herbicide selectivity.* pp.211–231 Kluwer Academic Publishers (1997)

Scheel, D., Sandermann, H.: Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max L.*) and wheat (*Triticum aestivum L.*): II. Evidence for incorporation into lignin. *Planta.*, **152**, 253–258 (1981)

Siddensa, K. L., Kruegerb, K. S., Hendersona, C. M., Williams, E. D.: Mammalian Flavin-Containing Monooxygenase (FMO) as a source of hydrogen peroxide. *Biochem.*

Pharmacol., **89**, 141-147 (2014)

Singh, A., Singh, U., Mittal, D., Grover, A.: Transcript expression and regulatory characteristics of a rice glycosyltransferase OsGT61-1 gene. *Plant Science.*, **179**, 114-122 (2010)

Song, Y.: Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *J. Integr. Plant Biol.*, **56**, 106–113 (2014)

Sumner, L. W., Mendes, P., Dixon, R. A.: Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 817-836 (2003)

Terry R. R., David H. H., Philip W. L., Peter H. N., Jack R. P.: *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part1: Herbicides and Plant Growth Regulators.* pp.1-850. Royal society of chemistry (1998)

Terence A. W., Roben N., Ann O. M., Mary H., Glenn R. H., Karen W., Wendy M., John P. D.: Mutations in an Auxin Receptor Homolog AFB5 and in SGT1b Confer Resistance to Synthetic Picolinate Auxins and Not to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid or Indole-3-Acetic Acid in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **142**, 542-552 (2006)

Trudell, R. J., Bösterling, B., Trevor, J. A.: Reductive metabolism of carbon tetrachloride by human cytochromes P-450 reconstituted in phospholipid vesicles: Mass spectral identification of trichloromethyl radical bound to dioleoyl phosphatidylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 2678-2682 (1982)

van Bladeren, P. J.: Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem. Biol. Interact.*, **129**, 61–76, (2000)

Van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablutowicz, R. M., Hall, J. C.: Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Sci.*, **51**, 472–495 (2003)

Wei, T.-B., Zhang, Y.-M., Xing, H.-Y.: Phase transfer catalyzed synthesis of amides and esters of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Synth. Commun.* **30**, 485–491 (2000)

Xia, J., Psychogios, N., Young, N., Wishart, S.: MetaboAnalyst: a web server for

metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res.*, **37**, W652-W660 (2009)

Yagi, H., Jerina, M. D., Kasperk, L. G., Bruice, C. T.: A novel mechanism for the NIH-shift. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **7**, 1985-1986 (1972)

Yamashita, M., Fenn, J. B.: Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451-4459 (1984)

Yu, Q., Powles, S.: Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. *Plant Physiol.*, **166**, 1106-1118 (2014)

Yuan, J. S., Tranel, P. J., Neal Stewart Jr, C.: Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci.*, **12**, 6-13 (2006)

Zhang, H., Ma, L., He, K., Zhu, M.: An algorithm for thorough background subtraction from high-resolution LC/MS data: application to the detection of troglitazone metabolites in rat plasma, bile, and urine. *J. Mass Spectrom.*, **43**, 1191-1200 (2008)

Zhang, H., Zhang, D., Ray, K., Zhu, M.: Mass defect filter technique and its applications to drug metabolite identification by high-resolution mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **44**, 999-1016 (2009)

Zimmerlin, A., Durst, F.: Xenobiotic metabolism in plants: Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P-450 enzyme from wheat. *Phytochemistry.*, **29**, 1729-1732 (1990)

伊藤 操子: 世界における除草剤の歴史:その誕生・発達・変遷. pp.3-11. 緑地雑草科学研究所 (2016)

鈴木 郁生: 続医薬品の開発 第18巻 農薬の開発II. pp.339-351. 廣川書店 (1993a)

鈴木 郁生: 続医薬品の開発 第18巻 農薬の開発II. pp.421-489. 廣川書店 (1993b)

鈴木 郁生: 続医薬品の開発 第18巻 農薬の開発II. pp.335-339. 廣川書店 (1993c)

廣部 雅昭, 鎌滝哲也: 医薬品の開発 第18巻 薬物の代謝. pp.37-45. 廣川書店 (1990)

山口 勇: 農薬概説. pp.100-103. 一般社団法人日本植物防疫協会 (2013)

竹松 哲夫: 除草剤研究総覧. pp.79-80. 博友社 (1982)

論文目録

本博士論文に關与する論文

1. **M. Takahashi, Y. Izumi, F. Iwahashi, Y. Nakayama, M. Iwakoshi, M. Nakao, S. Yamato, E. Fukusaki, T. Bamba**: Highly accurate detection and identification methodology of xenobiotic metabolites using stable isotope labeling, data mining techniques, and time-dependent profiling based on LC/HRMS/MS. *Anal. Chem.*, **90**, 9068-9076 (2018)

その他の論文

1. S. Minami, T. Yamamoto, Y. Takabatake, A. Takahashi, T. Namba, J. Matsuda, T. Kimura, J. Kaimori, I. Matsui, H. Takeda, **M. Takahashi**, Y. Izumi, T. Bamba, T. Matsusaka, F. Niimura, Y. Isaka: Lipophagy maintains energy homeostasis in the kidney proximal tubule during prolonged starvation. *Autophagy*, **13**. 1629–1647 (2017)
2. Y. Obata, S. Kita, Y. Koyama, S. Fukuda, H. Takeda, **M. Takahashi**, Y. Fujishima, H. Nagao, S. Masuda, Y. Tanaka, Y. Nakamura, H. Nishizawa, T. Funahashi, B. Ranscht, Y. Izumi, T. Bamba, E. Fukusaki, R. Hanayama, S. Shimada, N. Maeda, I. Shimomura: Adiponectin/T-cadherin system enhances exosome biogenesis and decreases cellular ceramides by exosomal release. *JCI Insight.*, **3**. 1-18 (2018)
3. H. Takeda, Y. Izumi, **M. Takahashi**, T. Paxton, T. Koike, Y. Ying, N. Kato, S. Horie, K. Nagase, M. Shiomi, T. Bamba: Widely-targeted quantitative lipidomics method by supercritical fluid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *J. Lipid Res.*, **59**. 1283-1293 (2018)
4. M. Kobori, Y. Takahashi, H. Takeda, **M. Takahashi**, Y. Izumi, Y. Akimoto, M. Sakurai, H. Oike, T. Nakagawa, M. Itoh, T. Bamba, T. Kimura: Dietary intake of

Curcumin improves eIF2 signaling and reduces lipid levels in the white adipose tissue of obese mice. *Scientific Reports*, **8**. 1-13 (2018)

総説等

1. 高橋政友, 和泉自泰, 馬場健史: 超臨界流体テクノロジーのフードメタボロミクスへの応用, *バイオインダストリー*, **32**, 17-24 (2015).
2. 高橋政友, 和泉自泰, 馬場健史: 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いたメタボリックプロファイリング, *日本農薬学会誌*, **41**, 260-266 (2016).

学会発表

国際学会

1. ○Y. Soma, T. Yamashita, K. Hata, M. Takahashi, K. Sugitate, T. Serino, H. Miyagawa, K. Suzuki, T. Kawamukai, T. Shiota, K. Yamada, Y. Izumi, T. Bamba
“Construction of Novel Calibration-Curve-Locking Database for Metabolomic Analysis by GC/MS”
65th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Indianapolis Indiana, USA, June, 2017
2. ○Y. Izumi, T. Suzuki, M. Takahashi, K. Nakatani, K. Oshikawa, M. Kimura, K. Takahara, M. Matsumoto, T. Bamba “Comprehensive Analysis of Hydrophilic Metabolites by Coupling Ion Chromatography and PFPP-based Liquid Chromatography Methods to High Resolution Mass Spectrometry”
65th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Indianapolis Indiana, USA, June, 2017
3. ○Y. Soma, T. Yamashita, M. Takahashi, K. Sugitate, T. Serino, H. Miyagawa, K. Suzuki, T. Kawamukai, T. Shiota, K. Yamada, Y. Izumi, T. Bamba “Automation of Sample Preparation Procedure for Hydrophilic Metabolomic and Lipidomic Analysis using a Robotic Platform”
65th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Indianapolis Indiana, USA, June, 2017
4. ○T. Bamba, Y. Soma, T. Yamashita, M. Takahashi, K. Hata, K. Sugitate, T. Serino, H. Miyagawa, K. Suzuki, K. Yamada, T. Kawamukai, T. Shiota, Y. Izumi
“Calibration-Curve-Locking database for metabolomics by GC/MS”
13th Annual Conference of the Metabolomics Society, Brisbane, Australia, June, 2017
5. ○H. J. Huebschmann, Y. Soma, T. Yamashita, M. Takahashi, K. Hata, T. Kawamukai, T. Shiota, K. Yamada, K. Sugitate, T. Serino, H. Miyagawa, K. Suzuki,

Y. Izumi, T. Bamba “Automation of sample preparation for metabolomics analysis using robotic platform”

13th Annual Conference of the Metabolomics Society, Brisbane, Australia, June, 2017

6. ○**Y. Izumi, M. Nakao, M. Takahashi, T. Bamba** “Evaluation of retention time behavior and separation of pesticides in reversed phase packed column SFC”

SFC Asia 2017, 11th International Conference on Packed-Column SFC, Suita Osaka, Japan, July, 2017

7. ○**M. Takahashi, Y. Izumi, T. Suzuki, K. Hata, K. Nakatani, K. Takahara, K. Oshikawa, M. Matsumoto, T. Bamba** “Metabolic profiling and footprinting of hydrophilic metabolites in cancer cells by ion chromatography coupled with high resolution mass spectrometry”

66th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Sandiego CA, USA, June, 2018

8. **K. Hata, T. Yamashita, M. Takahashi, K. Sugitate, T. Serino, H. Miyagawa, K. Suzuki, K. Yamada, T. Kawamukai, T. Shiota, Y. Izumi, ○T. Bamba** “Development of GC/MS based quantitative metabolome analysis methodology by Calibration-Curve-Locking database”

14th Annual Conference of the Metabolomics Society, Seattle Washington, USA, June, 2018

国内学会

1. ○生津慎, 松岡悠太, 和泉自泰, 高橋政友, 馬場健史, 山田健一

“HPLC-蛍光・質量分析システムによる脂質由来ラジカルの構造解析”

第 29 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 京都, 2016 年 9 月

2. 和泉自泰, 高橋政友, 鈴木隆弘, 押川清孝, 木村元一, 坂本茂, 松本雅記, ○馬場健史

“イオンクロマトグラフィー高分解能質量分析による陰イオン性代謝物分析手法の開発”

第 68 回日本生物工学会大会, 富山, 2016 年 9 月

3. ○相馬悠希, 山下俊幸, 高橋政友, 秦康祐, 杉立久仁代, 芹野武, 宮川浩美, 鈴木健一, 川向孝知, 塩田晃久, 山田佳代子, 和泉自泰, 馬場健史
“GC/MS メタボローム解析に資する calibration-curve-locking データベースの構築”
第 65 回質量分析総合討論会, 茨城, 2017 年 5 月
4. ○相馬悠希, 山下俊幸, 高橋政友, 秦康祐, 川向孝知, 塩田晃久, 山田佳代子, 宮川浩美, 鈴木健一, 杉立久仁代, 芹野武, 和泉自泰, 馬場健史
“メタボロミクスのための次世代多機能オートサンプラー/前処理ロボットによる自動前処理システムの構築”
第 65 回質量分析総合討論会, 茨城, 2017 年 5 月
5. ○和泉自泰, 鈴木隆弘, 高橋政友, 中谷航太, 押川清孝, 木村元一, 高原健太郎, 松本雅記, 馬場健史
“分離モード並列化による親水性代謝物の包括的メタボローム分析”
第 65 回質量分析総合討論会, 茨城, 2017 年 5 月
6. ○松岡悠太, 高橋政友, 和泉自泰, 馬場健史, 山田健一
“脂質由来ラジカルの選択的蛍光標識化法と構造解析・定量分析への応用”
日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回学会, 北海道, 2017 年 6 月
7. ○相馬悠希, 山下俊幸, 秦康祐, 高橋政友, 杉立久仁代, 芹野武, 宮川浩美, 鈴木健一, 川向孝知, 塩田晃久, 山田佳代子, 和泉自泰, 馬場健史
“GC/MS によるメタボローム解析に資する新規 calibration-curve-locking Database の構築”
第 69 回日本生物工学会大会, 東京, 2017 年 9 月
8. ○相馬悠希, 山下俊幸, 高橋政友, 秦康祐, 川向孝知, 塩田晃久, 山田佳代子, 宮川浩美, 鈴木健一, 杉立久仁代, 芹野武, 和泉自泰, 馬場健史
“次世代多機能オートサンプラー/前処理ロボットによるメタボロミクスに資する自動前処理法の構築”
第 69 回日本生物工学会大会, 東京, 2017 年 9 月

9. ○和泉自泰, 竹田浩章, 高橋政友, **Thanai Paxton**, 加藤紀子, 堀江真之介, 長瀬勝敏, 馬場健史
“超臨界クロマトグラフィー三連四重極質量分析によるワイドターゲット定量リポドミクス分析法の開発”
第11回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017年11月
10. 高橋政友, 和泉自泰, 岩橋福松, 中山泰宗, 岩越光彦, 中尾素直, 大和誠司, 福崎英一郎, 馬場健史
“LC/HRMS/MSを基盤とした外因性化学物質の代謝物探索法の開発”
第11回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017年11月
11. ○相馬悠希, 山下俊幸, 秦康祐, 高橋政友, 杉立久仁代, 芹野武, 宮川浩美, 鈴木健一, 川向孝知, 塩田晃久, 山田佳代子, 和泉自泰, 馬場健史
“新規 calibration-curve-locking Databaseを用いたガスクロマトグラフィー質量分析によるメタボローム解析”
第11回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017年11月
12. ○相馬悠希, 山下俊幸, 高橋政友, 秦康祐, 川向孝知, 塩田晃久, 山田佳代子, 宮川浩美, 鈴木健一, 杉立久仁代, 芹野武, 和泉自泰, 馬場健史
“メタボローム解析に資する次世代多機能オートサンプラー/前処理ロボットによる自動前処理法の開発”
第11回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017年11月
13. ○和泉自泰, 高橋政友, 鈴木隆弘, 押川清孝, 秦康祐, 中谷航太, 木村元一, 高原健太郎, 松本雅記, 馬場健史
“イオンクロマトグラフィー高分解能質量分析による動物培養細胞のメタボローム解析”
第11回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017年11月
14. 高橋政友, 和泉自泰, 岩橋福松, 中山泰宗, 岩越光彦, 中尾素直, 大和誠司, 福崎英一郎, 馬場健史
“高分解能質量分析計を基盤とした外因性化学物質に由来する代謝物の探索手法の

開発”

第 66 回質量分析総合討論会，大阪，2018 年 5 月

付録

シトクロム P450 が触媒する Phase I 代謝反応様式とその機構

外因性化学物質の中でも、直鎖のアルキル基や芳香環を有しているものは数多く存在し、いずれもシトクロム P450 によって酸化されることで基質の化学構造中に水酸基が導入される (Gut, I., 1996). 直鎖のアルキル基の場合、末端のメチル基もしくは末端の隣のメチルのどちらかに水酸基が導入される (それぞれ ω 酸化, $\omega-1$ 酸化と呼ばれる). 脂環式化合物についてもこれと同様の反応によって水酸基の導入が起こる. 芳香族化合物はエポキシ化, フェノール化反応によって水酸基が導入される. エポキシ化された化合物は通常不安定なため, 加水分解酵素 (エポキシドヒドロラーゼ) によって安定なジオールもしくは, フェノール化合物へと進行する. エポキシ体からフェノールへの転移反応は, NIH シフトと呼ばれる反応によって分解される (Guroff, G., 1967, Yagi, H., 1972) (1. Aryl/alkyl hydroxylation, 図 1-4).

エーテル, 2 級, 3 級アミンを含む外因性化学物質の主な代謝経路は *O*-, *N*-脱アルキル化反応である. 炭素鎖長に対応したアルデヒドが *O*-, *N*-脱アルキル化反応に伴って生成することが知られている (Lee, S. H., 2013, Iribame, C., 1997). いずれの場合も脱アルキル化によってより極性の高い化合物へと変換される. (2. *O*-dealkylation, 3. *N*-dealkylation, 図 1-4).

一級アミンの酸化的脱アミノ化反応はモノアミンオキシダーゼというフラビン酵素が主に担っている (Gaweska, H., 2011). この酵素はミトコンドリアおよびミクロソーム画分に局在しており基質特異性の違い等から A タイプおよび B タイプに分類されている (Edmondson, E. D., 2009). いずれも一級アミンからアルデヒドとアンモニアが生成する (4. Oxidative deamination, 図 1-4).

硫黄化合物の酸化反応様式はアミンやエーテルとは異なっている. 例えば, 代謝されることで *S*-オキシド体の生成などが広く知られている. また, チオリン酸エステル基を含んでいる化合物は有機リン系農薬として広く利用されてきたが, これらは代謝

されることでリン酸エステルに変換される (Ellison, A. C., 2012). この代謝によりコリンエステラーゼ阻害活性が親化合物より強くなり、代謝活性化の代表例として知られている (Lessire, F., 1996) (5. Sulfoxidation, 図 1-4).

アミンの代謝経路では上述した *N*-脱アルキル化反応以外にもシトクロム P450 による窒素原子の酸化反応が起こることが知られている (Kitamura, S., 1999, Ji, L., 2013). 一方で、三級アミンの *N*-オキシド化はシトクロム P450 よりもフラビン含有モノオキシゲナーゼという酵素が主に担っている (Lang, H. D., 1998). この酵素はミクロソーム画分に局在している (Siddensa, K. L., 2014) (6. Nitrogen oxidation, 図 1-4).

ニトロ基などの場合、還元反応を触媒することが知られている (Harada, N., 1980). 還元反応は嫌気的条件化および低酸素濃度においてのみ進行し、酸素濃度の上昇とともに反応は阻害される. また、四塩化炭素のようなポリハロゲン化物も還元的代謝を受けることが知られており、その際に生じるラジカル中間体が毒性発現に関与していると考えられている (Trudell, R. J., 1982) (7. Nitrogen oxidation, 図 1-4).

Phase II 代謝反応様式とその機構

第 II 相代謝反応の中でも特に中心的な役割を果たしているのがグルクロン酸転移酵素である (Kutsuno, Y., 2014). この酵素は小胞体膜内側に局在していることが知られており, ヒトでの第 II 相代謝反応全体の約 40 %を担っているという報告もある (Evans, W. E., 1999). グルクロン酸転移酵素の異物代謝反応様式 (1. Glucuronidation, 図 1-5) は, ウリジン二リン酸グルクロン酸 (Uridine diphosphate glucuronic acid) からグルクロノシル基を外因性化学物質に転移する化学反応を触媒し, その結果として体外への排泄が促進される. フェノール基やアルコール基に対しては, *O*-グルクロン酸抱合, カルボン酸に対してはエステル型グルクロン酸抱合, 第 1-3 級アミンに対しては, *N*-グルクロン酸抱合を触媒する. グルクロン酸転移酵素は一般に基質特異性が低いことが知られている (Rouguieg, K., 2010).

硫酸抱合反応を触媒する硫酸転移酵素は, 3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) が有している硫酸基を基質の水酸基やアミノ基に転移する反応 (2. Sulfo conjugation, 図 1-5) を触媒する. この酵素は, 細胞質中に存在しており (Gamage N., 2006), フェノール性水酸基を有する外因性化学物質 (Glatt, H., 2004), や数種類の芳香族アミンの異物代謝反応が知られている (Meinl, W., 2002).

グルタチオン *S*-転移酵素は, 求核性のグルタチオン (GSH) と求電子性の化合物との抱合反応 (3. Glutathione *S*-conjugation, 図 1-5) を触媒する酵素であり, 小胞体膜および細胞質中に存在している. グルタチオン *S*-転移酵素により GSH と抱合体を形成する化合物群は非常に幅広く, ケトン, キノン, スルホキシド, エステル, ペルオキシド, およびオゾニドなどが知られている (van Bladeren, P. J., 2000). グルタチオン *S*-転移酵素によって代謝を受けることが知られている外因性化学物質は非常に多く, ブスルファン, シスプラチン, エタクリン酸, およびシクロホスファミドのような医薬品やアクロレイン, リンデン, マラチオン, およびトリジファンに代表される農薬においても多数報告されている (Hayes, J. D., 2005). 他の抱合体形成に関わる酵素と大きく異なる点として, 他の酵素は水酸基, カルボキシル基, アミノ基, およびチオ

ール基などの極性官能基をもつ基質にのみ抱合反応を触媒するのに対して、グルタチオン *S*-転移酵素は、脂溶性ニトロ化合物、ハロゲン化アルキルやアリアル、不飽和カルボニル化合物、エポキシドなどの非極性化合物をも直接 GSH と抱合できる場所である (Miyamoto, T., 2013). また、グルタチオン *S*-転移酵素は、シトクロム P450 が触媒する代謝的活性化反応によって生じた反応性中間体 (反応性代謝物) とグルタチオンとの反応を触媒し、これら反応性代謝物が核酸やたんぱく質などの生体高分子と結合するのを防ぐ役割を担っている (Ishikawa, T., 1989). また、これら抱合反応の他にも、脂質や核酸の過酸化による酸化ストレスからの防御 (Ishikawa, T., 1989), 植物における種々のストレス応答に関与する抗酸化ストレス (Dagnino-Subiabre, A., 2000) など様々な機能が報告されているが、いずれも生理的意義が明確ではないものも多い。

N-アセチル基転移酵素は、アシル CoA が有しているアセチル基を基質のアミノ基に転移する反応 (4. *N*-acetylation, 図 1-5) を触媒する。この酵素は細胞質中に存在しており (Jančová, P., 2012), アリルアミンやヒドラジン部位を構造中に有する薬物, 食品, 香料などの外因性化学物質の代謝反応が知られている。

他の第 II 相代謝反応を触媒する酵素群と違って、アミノ酸抱合反応は 2 段階反応で進む (Reilly, S. J., 2007). アシル CoA 合成酵素およびアミノ酸 *N*-アシル転移酵素によりアミノ酸抱合体が形成される (5. Amino acid conjugation, 図 1-5). 第 1 段階目の反応では、CoA が基質のカルボニル炭素へ求核攻撃してアシル CoA が生成する。続く第 2 段階目の反応では、アシル CoA のアシル基がアミノ酸 *N*-アシル転移酵素によってアミノ酸とアミド結合することで抱合体を形成する。これらの酵素は、ミトコンドリアに存在するものだけでなく、ペルオキシソームや小胞体膜内側に局在している (Knights, K. M., 2007). 薬物, 除草剤, 殺虫剤, 食品添加物などに分類される多くの外因性化学物質はカルボン酸を有していることから、容易にアミノ酸抱合体が形成される。動物の生体内で観測されるアミノ酸抱合体は、グリシン抱合体である一方で、植物では、アスパラギン酸, グルタミン酸などの酸性アミノ酸やアラニン, バリン, ロ

イシン, およびフェニルアラニンなどの中性アミノ酸との抱合反応が知られている (Feung, C.-S., 1973). 植物においても, 動物と同じく第 II 相代謝反応として硫酸抱合反応, グルタチオン抱合反応, およびアミノ酸抱合反応により, 外因性化学物質をより極性の高い物質へと変換する異物代謝反応が起こることが知られている. 一方で一部, 動物とは異なる異物代謝反応により外因性化学物質の代謝物を生成することが知られている. 前述したとおり, 動物においては第 II 相代謝反応の中でも特に中心的な役割を果たしているのがグルクロン酸転移酵素であるが, 植物においてはこの酵素による異物代謝反応はあまり知られておらず, その代わりに糖転移酵素 (glycosyltransferase: GT) による第 II 相代謝反応が知られている. 糖転移酵素の代謝反応様式は, ウリジン二リン酸グルコース (uridine diphosphate glucose: UDPG) からグルコースを外因性化学物質に転移する化学反応 (6. Glucose conjugation, 図 1-5) を触媒する (Mine, A., 1975). 水酸基に対しては, *O*-グルコース抱合, カルボン酸に対してはエステル型グルコース抱合, 第 1-3 級アミンに対しては, *N*-グルコース抱合, チオール基に対しては, *S*-グルコース抱合を触媒する. この糖転移酵素により抱合化される糖類としてグルコース以外に, ラムノース, ガラクトース, キシロース, アラビノースなどが知られている (Singh, A., 2010).