

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790032

研究課題名（和文）血中主要タンパク質の非酵素的翻訳後修飾の定量的プロファイリング法の構築

研究課題名（英文）Development of a novel method for quantitative profiling of non-enzymatic post-translational modifications on abundant serum protein

研究代表者

後藤 貴章（GOTO TAKAAKI）

東北大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：40344684

研究成果の概要（和文）：新たなバイオマーカー探索手法として質量分析法を基盤とした血清アルブミン上の非酵素的翻訳後修飾の一斉解析法を検討した。市販の高親和力抗体を活用した群特異的抽出法と切断特性の異なる複数のプロテアーゼによる酵素消化ならびに正負の各イオン検出モードの組合せと相補的データ解析を組み合わせることにより、血清試料中のアルブミン上における非酵素的翻訳後修飾の網羅的解析に応用可能な手法を構築した。

研究成果の概要（英文）：A novel methodology to profile various non-enzymatic post-translational modifications on serum albumin has been examined. This method is based on mass spectrometry combined with the group-specific immunoaffinity extraction, digestion by proteases with distinct specificity, and complementary data analyses in both positive and negative mode. This strategy can be used for profiling analyses of modifications on albumin in human serum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分析科学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：質量分析法、プロテオミクス、翻訳後修飾

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の非酵素的な翻訳後修飾は、酸化ストレスシグナルのみならず癌や神経変性疾患、生活習慣病などの疾患との関連からも多大な注目を集めていた。これら修飾に関わる活性化化学種は一般に短寿命であるため、臨床ではより安定な形で存在する修飾タンパク質が有用な疾患マーカー分子として期待されていた。特に血液は、各臓器や組織で発生する活性化化学種に常に曝されているた

め、血中には種々の非酵素的翻訳後修飾を受けたタンパク質が存在すると考えられた。しかし、一般に非酵素的な翻訳後修飾は、各種タンパク質に対し非特異的に起こり、多様な修飾タンパク質が生成するため、最新の機器とプロテオミクス手法を持ってしてもその解析は容易ではない。このため、酸化還元状態に限定したレドックスプロテオミクス研究も展開されていた（McDonagha *J. Proteomics* 2009 など）が、いずれもカルボ

ニル化やジスルフィド形成など特定の修飾を検出しているに過ぎない。また、モデル反応による血中タンパク質の修飾解析によりいくつかの修飾部位が明らかにされていた (Temple *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006 など) が、生体試料中の修飾タンパク質の解析はなお困難を極めていた。

こうした背景から申請者は、タンパク質や生理活性ペプチドの非酵素的な翻訳後修飾解析を通じ、従来のプロテオミクス技術を超えて解決すべき課題に取り組んでいた。まず修飾機構の観点から、単純な酸化や付加反応のみならず、転移や開裂を伴う機構の存在を明らかにし、多様な修飾体生成の可能性を示した (*Chem. Res. Toxicol.* 2008)。さらに、各種修飾体解析における試料調製の見地から、抗体の分子認識特性を活用した各種修飾体の群特異的抽出法を開発するとともに、質量分析法と組み合わせ、修飾体の選択的検出と修飾部位の決定に有用であることも報告した (2009 年米国質量分析学会)。一方、プロテオミクスの基盤技術として、正イオン検出および負イオン検出データの相補的解析の有用性を明示した (2009 年米国質量分析学会発表済)。さらに、N 末端アミノ酸分析による絶対定量的プロテオミクス手法を考案し、2009 年薬学会年会のトピックスとしても取り上げられた。また、抗体と MALDI-MS を巧みに利用したペプチドの定量的同時多成分スクリーニング法の開発 (2008-9 年度 科研費若手研究 (B) 採択課題) を行い、2009 年度に完了した。

こうした研究成果から、従来のプロテオミクス手法を基盤に、これら独自の手法を導入することにより、標的タンパク質上の非酵素的な翻訳後修飾情報を定量的かつ包括的に解析することが可能になるとの考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、血中主要タンパク質の多様な非酵素的な翻訳後修飾情報を定量的に解析可能な手法を確立することにある。本研究は、以下の3点が最重要な課題となる。

- ・ シークエンスカバー率の向上
- ・ 各種修飾タンパク質の包括的抽出
- ・ 修飾タンパク質の定量的解析

これらを実現するため、従来のプロテオミクス技術に加え、新たに以下に挙げた当研究室独自の技術の導入を試みる。

- ・ 正負両イオンの相補的解析
- ・ 抗体を活用した群特異的抽出
- ・ 末端アミノ酸分析による絶対定量的解析

これによって、バイオマーカー探索研究に、血中主要タンパク質の非酵素的な翻訳後修飾解析という新たな方向性を切り拓くものである。さらに、これらを組み合わせることに

より、実試料を用いて主要タンパク質の非酵素的な翻訳後修飾情報の定量的解析が可能であることを立証する。

疾患マーカー探索では、臨床試験による検証が必要となるが、倫理的な側面から、確固とした分析法が不可欠である。本研究の到達点は、血中主要タンパク質の非酵素的な翻訳後修飾情報の定量的かつ包括的解析手法の確立である。すなわち、先述の独自手法を導入することによって、従来のプロテオミクス技術を超えて解決すべき以下の課題を解決することである。

### (1) シークエンスカバー率の向上

正イオン検出および負イオン検出データの相補的解析に加え、複数種のプロテアーゼ消化物の解析を併用により検出ペプチド数の向上を図る。

### (2) 各種修飾タンパク質の包括的抽出

抗体の分子認識特性を活用した各種修飾体の群特異的抽出によって、夾雑成分を排除し解析効率の向上を図る。ポリクローナル抗体は HSA の特徴的部分構造を特異的に認識する一方で、多様な部位を認識する抗体の混合物であるため、タンパク質としての HSA を厳密に認識し、しかしその修飾に対しては寛容であるという、一見相反する要件を同時に満たすと考えられる。なお、各種修飾体の群特異的抽出における固定化ポリクローナル抗体の有用性については、生理活性ペプチドをモデルに実証済 (*Anal. Methods*, in press) である。

### (3) 修飾タンパク質の定量的解析

N 末端アミノ酸分析によりプロテオミクスへ絶対定量性の導入を図る。非酵素的な翻訳後修飾の多くは、不可逆的な反応であるが、システイン側鎖の酸化によるスルフェン酸化など、一部可逆的な修飾反応も存在する。こうした修飾は、活性シグナル伝達に極めて重要な役割を果たすと考えられているが、不安定であるため直接的な解析手法は未だ確立されていない。このため、可逆的修飾の定量的解析は困難を極めると予想される。本研究の目的がバイオマーカー探索にあることから、より安定に存在する不可逆的修飾を受けたタンパク質の解析意義が極めて大きいと考えられる。

## 3. 研究の方法

各臓器や組織で発生する活性化化学種に曝されている血中タンパク質は様々な修飾を受けていると考えられ、これらの解析が新たなバイオマーカー発見につながると期待される。しかし、こうした修飾は一般に特異性も低く、多様な修飾タンパク質を生成しうるため、その解析は容易ではない。そこで、従来のプロテオミクス手法を基盤に、新たに正負両イオンの相補的解析と各種修飾体を含

む群特異的な標的タンパク質抽出法の導入を試み、ヒト血清アルブミン (HSA) 上の修飾プロファイリング法を検討した。

### (1) 消化ペプチド検出効率向上の検討

プロテアーゼとしてトリプシン、エンドペプチダーゼ V8 を用いて、未修飾アルブミンの酵素消化条件を検討した。MALDI-TOF/MS を用い、正イオン検出ならびに負イオン検出の併用、ならびに異なるプロテアーゼによる消化物の相補的解析によるシーケンスカバー率向上効果、並びに誤切断や自己消化物混入低減の観点から評価を行った。

### (2) 各種修飾 HSA の包括的抽出

#### ① 修飾 HSA の調製と構造解析

市販の HSA を、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、Cu (II)/アスコルビン酸、ペルオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>)、次亜ハロゲン酸 (HOCl、HOBr)、グルコースなどとインキュベートし、それぞれ酸化修飾、糖化、ニトロ化、ハロゲン化などの各種修飾アルブミンを調製した。修飾アルブミンをモデル修飾アルブミン調製のための酸化反応トリプシンあるいはエンドペプチダーゼ V8 で酵素消化後、MALDI-TOF/MS ならびに LC/ESI-MS/MS により分析し、修飾位置の決定を行なった。

#### ② 血漿中 HSA の群特異的抽出検討

HSA 抽出には市販のポリクロノナル抗体固定化カラムの使用を検討した。本カラムは本来ディーププロテオームの解析を目的に開発されたもので、HSA の除去を本来の目的とする。本研究ではカラムに捕捉された HSA の回収による抽出カラムとしての利用を検討し、選択性等の評価を行った。また、市販のヒトブランク血漿に上記のモデル修飾 HSA を添加し、群特異的抽出の効果も検証した。

### (3) 修飾 HSA の定量的分析条件の検討

絶対的定量には、先に当研究室で調製した <sup>13</sup>C 標識エドマン試薬ならびに HSA 標品を用いて、N 末端アミノ酸分析条件の検討並びに定量性の評価を行った。まず、エドマン分解によりタンパク質 N 末端から生成する PTH-アミノ酸の同位体希釈 LC/ESI-MS/MS による分析を検討した。また、内標準物質の <sup>13</sup>C 標識 PTH-アミノ酸は、当研究室で調製した <sup>13</sup>C 標識エドマン試薬とアミノ酸混合液の反応により調製した。HSA を定法によりエドマン分解反応に付した。

## 4. 研究成果

### (1) 消化ペプチド検出効率向上の検討

まず、市販のヒト血清アルブミンを用い、2 種のプロテアーゼならびに正負の各検出モードの結果を相補的に解析することにより、全アミノ酸配列をカバーするペプチド群の

検出を可能にした。まず、HSA 標品を用いて、特異性の異なる二種の消化酵素並びに、MALDI-TOF/MS における正/負イオンモードの併用によって検出ペプチドの全配列に対する配列カバー率の向上を図った。測定は、マトリクスに 1%リン酸含有の DHB を用い、正イオン検出ならびに負イオン検出モードで行った。トリプシンとエンドペプチダーゼ V8 を用いて消化したペプチドを、それぞれ MALDI-TOF/MS で正イオンモード及び負イオンモードで測定することにより、HSA の全配列に相当するペプチドを検出可能であった (図 1)。

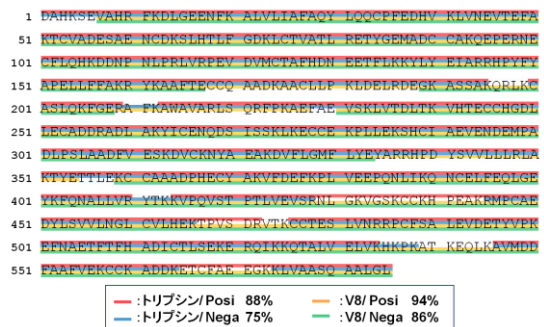


図 1 HSA 全配列と各法による配列カバー率

### (2) 各種修飾タンパク質の包括的抽出

#### ① 修飾アルブミンの調製と構造解析

本条件を用いて各種修飾反応に付した HSA を分析し、酸化、糖化、ニトロ化及び 4-HNE 修飾を含むペプチド断片を検出可能であった (図 2)。

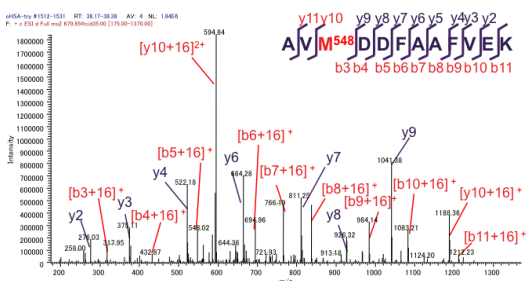


図 2 酸化修飾 HSA における修飾部位の特定

今回のモデル化学修飾 HSA の解析により、6 カ所の Met 酸化、26 カ所の Lys 糖化、2 カ所の Arg 糖化、7 カ所の His HNE 修飾、3 カ所の Cys HNE 修飾、5 カ所の Tyr ニトロ化が検出された。さらに、低濃度の活性化学種存在下では被修飾部位が限定された。これらにより、HSA の化学的ストレスによる被修飾部位が明らかとなった。

#### ② 血漿中アルブミンの群特異的抽出の検討

HSA 標品並びに市販のヒト血漿を用いて抽出条件を検討したところ、溶出に pH 2.0 のグリシン-塩酸緩衝液を用いることで HSA を回収可能であった。また、抽出した HSA を

還元アルキル化し酵素消化後、MALDI-TOF/MSにより分析したところ、標品 HSA から S/N $\geq$ 10 のピークがで 96 本検出された。血漿抽出物でも同様に 96 のピークが得られ、血漿中の夾雑タンパク質に由来するピークは検出されなかった (図 3)。このことから、HSA のみが抽出できていることが確認された。

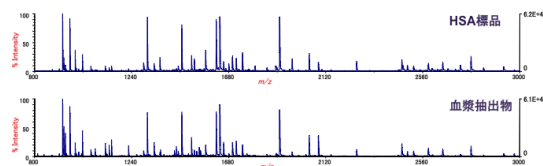


図 3 標品及び血漿抽出物のマススペクトル

また、各種修飾 HSA を添加した血漿試料を本法で抽出し同様に分析したところ、HSA 及び各種修飾 HSA を同一条件で抽出、検出することが可能であった (図 4)。さらに修飾 HSA について複数の修飾部位を同定可能であることを示した。これらの結果から、標的とするタンパク質上の非酵素的翻訳後修飾を網羅的に解析する上で本手法が有用であることが示された。

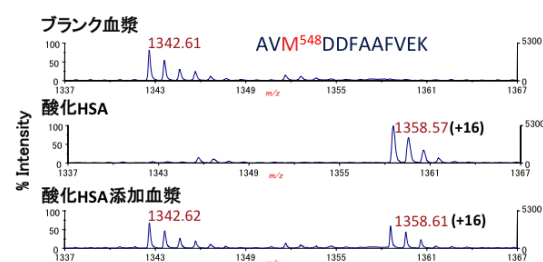


図 4 酸化 HSA 添加血漿試料のマススペクトル

### (3) 修飾アルブミンの定量的分析条件の検討

ESI 法におけるイオン化を考慮した酸性移動相と逆相系カラムを用いて PTH アミノ酸の LC 分離条件を設定した。さらに、各 PTH-アミノ酸のフラグメントパターンを精査し、選択的反応モニタリング (SRM) 条件を最適化した結果、13C 標識 PTH-アミノ酸と併せ、HSA 標品を N 末端由来の PTH-アスパラギン酸として同位体希釈分析できた。絶対的な定量性については検討の余地も残されたが、修飾体の定量へ応用するための課題を明確にできた。

HSA は、全身を循環する間に受けた様々な化学修飾を受けていると考えられる。体内で発生する各種活性化学種に関する情報を反映したこれら修飾は、生体の化学的ストレスやそれらの関与する病態のマーカーとしての利用を期待できる。絶対的な定量という点では未だ課題を残したものの、本研究の成果は血漿主要タンパク質の非酵素的翻訳後修

飾のプロファイリングという新たなバイオマーカー探索の方向性を切り拓くものである。また、非酵素的翻訳後修飾の解析法として、酸化ストレスや活性酸素シグナル、レドックス制御機構研究など、活性化学種が関与する種々多様な生理機能や病態の解明に資するものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Mass spectrometric characterization of modification to angiotensin II by lipid peroxidation products, 4-oxo-2(*E*)-nonenal and 4-hydroxy-2(*E*)-nonenal., Lee, S.H., Takahashi, R., Goto, T., Oe, T., *Chem. Res. Toxicol.*, **23**, 1771-1785 (2010), DOI: 10.1021/tx100228q, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 血清アルブミンの化学的ストレスによる被修飾部位解析、村田和之、後藤貴章、李宣和、大江知行、第 50 回日本薬学会東北支部大会、2011 年 10 月 29 日～30 日、仙台
2. バイオマーカー探索を指向したケミカルモディフィコクスへのアプローチ (依頼講演)、後藤貴章、平成 22 年度日本薬学会東北支部総会・学術講演会、2010 年 7 月 10 日、仙台

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 貴章 (GOTO TAKAAKI)  
 東北大学・大学院薬学研究科・講師  
 研究者番号：40344684

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：