

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6月12日現在

機関番号：82505

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790607

研究課題名（和文） 質量分析を用いたタンパクの迅速高感度同定・定量法の開発

研究課題名（英文） Rapid identification and quantitation of protein by using mass spectrometry

研究代表者

金森 美江子（KANAMORI MIEKO）

科学警察研究所・法科学第三部・主任研究官

研究者番号：80356203

研究成果の概要（和文）：モデルタンパクとしてリシン及びウシカゼインを用い、トリプシン溶液消化を行い、得られたペプチド溶液を液体クロマトグラフ/質量分析（LC/MS）またはマトリクス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型/MS（MALDI-TOF/MS）で分析し、各々のタンパク同定のためのマーカーペプチドを決定した。特に、リシンについては、簡易精製前処理法として、ラクトース固定化モノリスシリカスピナラムを作製し、複雑なマトリクスを有する試料からのリシン精製が可能であった。さらに、トリプシン消化や LC/MS 測定に進めることができ、リシンの高感度迅速同定を可能となった。

研究成果の概要（英文）：Ricin and bovine casein were used as model proteins for tryptic digestion and peptide identification by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) or matrix-assisted laser desorption ionization-(time-of-flight)/MS (MALDI-TOF/MS). Marker peptides for identification of each protein were selected. In case of ricin, extraction method based on lactose affinity was developed as a method for rapid and accurate determination of ricin. Lactose was immobilized on monolithic silica, was used as a capture ligand for ricin extraction from the sample solution, and the silica was supported in a disk-packed spin column. It took approximately 5 h to carry out the entire procedure through extraction, detection and identification of ricin from crude samples.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	700,000	0	700,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	0	2,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：蛋白質、プロテオーム、分析化学、LC/MS、MALDI-TOF/MS

1. 研究開始当初の背景

試料からの薬毒物及び代謝物の分析において、ガスクロマトグラフィー/質量分析（GC/MS）及び LC/MS 法が現在汎用されている。分子量 1,000 以下の低分子化合物が対

象となっているが、医療過誤や化学テロなどの事案においては、混入あるいは投与された微量のペプチドやタンパク質などの高分子化合物が分析対象となる可能性が高く、生体試料などの複雑なマトリクス含有試料から

ごく微量の原因タンパクの同定・定量を行う場合も想定される。

従来のタンパク検査・定量法としては、ELISAなどの免疫学的手法が主である。この手法は、検出感度が高い反面、判定までに時間がかかり、偽陽性、偽陰性が散見される。複雑なマトリクス含有試料においては検出妨害があることから、スクリーニング法の一つと見なされている。昨今、ESI法やMALDI法のようなソフトイオン化法の開発により、質量分析による高分子の構造解析が行われており、プロテオーム解析によるタンパク同定・網羅がその一例である。また、臨床現場においては、種々の標的タンパク質に対する抗体を並べタンパク質を一斉に捕獲できるプロテインマイクロアレイ法を質量分析とあわせて用いる手法などが報告されていることから、免疫学的手法による試料の精製及び迅速スクリーニングと、質量分析によるタンパク分析法とを組み合わせ、従来不可能であった、迅速かつ高精度な同定・定量法を確立することにより、鑑定に活用したいと考えた。

2. 研究の目的

医療過誤などの事案における、投与・混入された生体内の微量原因タンパクの検出・定量には、従来ELISAなどの免疫学的手法が使用されてきた。高感度である反面、判定までに時間がかかる、交叉反応による偽陽性やタンパク変性による偽陰性、試料中のマトリクスによる検出の妨害などの欠点があり、本手法のみでは明確なタンパク同定法とは言えない。本研究では、従来の手法の限界を克服し、犯罪などでの鑑定に用いることのできる新たな実践的手法として、質量分析法と、immunocaptureなどの特異的精製による前処理スクリーニングとを組み合わせ、微量原因タンパクの迅速かつ高精度な同定・定量法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) リシン

①リシンのトリプシン溶液消化ならびにLC/MS測定条件の最適化

モデルタンパクの一つであるリシンを用い、検出される消化ペプチドの種類や検出感度を調べるために、リシン(5 µg)を用いたトリプシン溶液消化を行い、得られた消化ペプチド溶液をナノLC/MSにより分析し、アミノ酸配列の一致率や検出ペプチドを確認し、その中からリシン同定のためのマーカーペプチドを選択することにした。また、タンパク変性、システイン残基の還元修飾の有無、トリプシン消化条件(トリプシン量、消化温度、消化時間、有機溶媒の有無)、消化溶液の脱塩濃縮など

の条件を最適化した。さらに、LC/MSの測定条件についても最適化し、以下の分析条件を使用した。ナノLC/MSの分析条件は以下の通りである。装置：Paradigm MS4 (Michrom Bioresources, Inc., LC)、LTQXL-Orbitrap MS (ThermoFisher Scientific Inc., MS); LCカラム：L-column Micro (L-column ODS, 50 × 75 µm i.d., 3 µm); トラップカラム：L-column Micro (L-column ODS, 5 × 0.3mm i.d., 5 µm); 注入量：2 µL; 移動相：[A] 0.1 % ギ酸 (アセトニトリル-水 (98 : 2)), [B] 0.1% ギ酸 (アセトニトリル-水 (10 : 90)), 5 % [B] → (20 min) → 45 % [B] → (1 min) 95 % [B] → (3 min) → 95 % [B] → 5 % [B] (15 min); 流速：300 nL/min; イオン化法：ポジティブ ESI; キャピラリー電圧：1.6-2.0 kV; キャピラリー温度：200°C; 質量分析：フーリエ変換 (FT-MS (分解能 60,000, *m/z* 400-1600)、イオントラップ (IT)-MS/MS (Data dependent 分析またはプロダクトイオン分析)。MS及びMS/MSスペクトルは、Bioworks ソフトウェア (ver. 3.3.1 SP1; ThermoFisher Scientific Inc.) 及び the UniProt Knowledge-base/Swiss-Prot (UniProtKB/Swiss-Prot) データベースを用いて解析した。消化から分析までの一連の条件を用いた場合のLC/MSでのリシンの検出限界などについて検討を行った。

②糖鎖固定化モノリススピンカラムを用いたリシン精製

夾雑物含有試料を想定した場合の、リシン精製前処理法として、リシンのレクチン特性を利用し、糖鎖固定化モノリスシリカスピンカラムを作製して、リシン精製・回収の検討を行った。リシンの回収率は、サンプル素通り、洗浄及び溶出画分を各々回収し、各画分のSDS-PAGEを行い、蛍光染色によるリシンのバンド強度から求めた。さらに、大量の夾雑タンパクまたは塩を含有するサンプルについてスピンカラム処理を行い、リシンの回収率を求め、夾雑物によるリシン回収への影響について確認した。

③ラクトース固定化モノリススピンカラム溶出液を用いたトリプシン消化及びLC/MS測定によるリシンの同定

スピンカラム溶出液を用いたトリプシン消化条件を検討し、ラクトース固定化モノリススピンカラム抽出による試料前処理から、トリプシン消化、ナノLC/MSに至る一連のラボ分析について検討を行った。さらに、この手法を様々な試料に適用

し、その有用性について検討を行った。

④抗体結合磁性ビーズを用いたリシン精製

もう一つのリシンの精製前処理法として、磁性ビーズを用いた免疫沈降法を応用し、様々な種類の抗リシン抗体を結合させた抗体結合磁性ビーズを作製し、リシン回収量を求め、その有用性を検討した。

(2) ウシカゼイン

①ウシカゼインのトリプシン消化ペプチドのMALDI-TOF/MS測定

モデルタンパクのウシカゼイン (α -、 β -、 κ -カゼイン含有) を使用し、カゼイン標準溶液のトリプシン消化を行い、MALDI-TOF/MS による検出を試み、アミノ酸配列の一致率や検出ペプチドを確認し、カゼイン同定のためのマーカーペプチドを選択した。

②抗体結合磁性ビーズを用いたウシカゼイン精製

Protein A または Protein G 固定化磁性ビーズを用い、様々な種類の抗ウシカゼイン抗体を結合させた抗体結合磁性ビーズを作製し、カゼイン回収率を求め、その有用性について検討を行った。

4. 研究成果

(1) リシン

①リシンのトリプシン溶液消化ならびにLC/MS測定条件の最適化

リシンを用いたトリプシン溶液消化を行い、得られた消化ペプチド溶液のナノLC/MS測定の結果、アミノ酸配列の一致率は、リシン A, B 鎖で各々92, 62%であり、2種類の糖鎖ペプチドの同定も可能であった。このうち、MSでの検出強度の高かった消化ペプチド6種 (m/z 537.8, 448.8, 586.8 (A鎖), m/z 701.3, 647.8, 616.8 (B鎖)) を、リシン同定のためのマーカーペプチドに設定した (図1)。マーカーペプチドのうち、 m/z 448.8 (VGLPINQR) と m/z 647.8 (DNCLTSDSNIR) は、タンパクのアミノ酸配列データベースのUniProtKB/Swiss-Prot検索により、各々リシン A, B 鎖のみに特有のアミノ酸配列を有するペプチドとして選択した。リシンのトリプシン消化条件として、熱変性及びシステイン残基の還元修飾後、有機溶媒なしでの37°C, 2 hでの消化が最適であり、消化ペプチド溶液は、C-Tip KT200により脱塩濃縮した。本条件で標品リシン消化ペプチドをナノLC/MS測定を行った場合のリシンの検出限界は、0.7 ngであった。

LC/MSを用いたリシンマーカーペプチドの同定手段として、FT-MSによる消化ペプチドの精密質量測定、IT-MS/MSによるマーカーペプチドのアミノ酸配列同定を用いることにした。

質量分析法を用いたプロテオーム解析を応用することで、より確度・精度の高いリシン検出・同定を行うことができ、他のタンパクの検出・同定への応用も十分可能であると結論づけた。

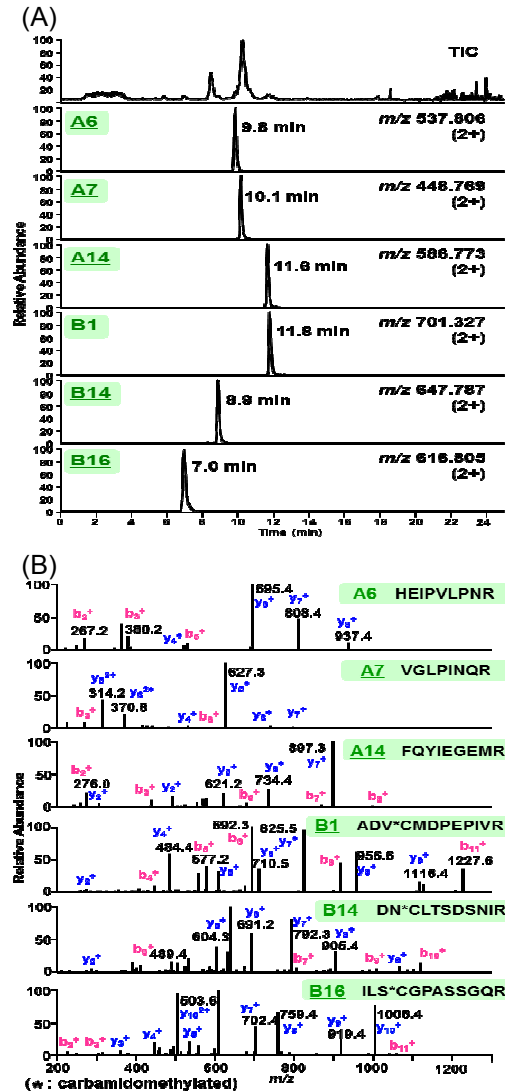


図1 (A) FT-MSでのトータルイオンクロマトグラムならびにマーカーペプチドの抽出イオンクロマトグラム、(B) IT-MS/MSによるマーカーペプチドのプロダクトスペクトル (50 ng 標品リシン使用、FT-MSでの質量許容範囲 5 ppm)。

②糖鎖固定化モノリスピンカラムを用いたリシン精製

リシンのレクチン特性を利用し、数種類の糖鎖を固定化し、リシンの回収率について検討を行ったところ、トリエチレングリコールをスパーサーとし、ラクトースを固定化した場合のモノリスでのリシンの回収率が最も高かった。ラクトース固定化モ

ノリスピンカラム (図 2) を使用した場合、標品リシンは溶出画分のみに回収され、回収率は約 50 % であった。対照として、ラクトースを固定していないモノリスシリカを用いた場合のリシンの回収についても検討を行ったところ、約 50 % のリシンがサンプル素通り画分に検出されたことから、残りのリシンはモノリスシリカに不可逆的に結合し、溶出されなかったと考えられた。また、0.5 mol/L 塩化ナトリウム溶液、またはリシンの 100 倍量ウシ血清アルブミン (BSA) 含有溶液についてスピнкаラム処理したところ、これらの夾雑塩や夾雑タンパクの影響を受けることなく、リシンは溶出画分に回収され、回収率はリシン標品溶液のみの場合とほぼ同等であった。

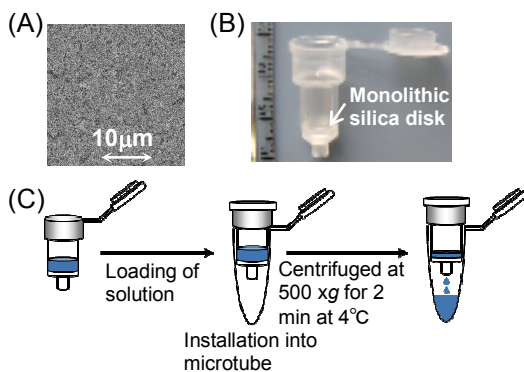


図 2 (A) モノリスシリカの電子顕微鏡写真, (B) モノリスシリカスピнкаラム外観, (C) ラクトース固定化モノリスシリカスピнкаラム抽出操作方法。

また、スピнкаラム溶出液は、ELISA や Western Blot などの別の同定手法にも適用可能であった。特に、Western Blot については、多種多様かつ複雑な夾雑物を含有するサンプルの精製・濃縮が可能となり、電気泳動へのロード量増加に伴う検出感度の向上が可能であった。

スピнкаラムを用いたサンプル前処理法は、操作が簡便で操作時間が 30 分と迅速であり、かつ同時に複数のサンプルを処理できることから、非常に効率がよく、特異性の高いリシン精製前処理法であると結論づけた。

③ ラクトース固定化モノリススピнкаラム溶出液を用いたトリプシン消化及び LC/MS 測定によるリシンの同定

スピнкаラム溶出液を使用した場合の、トリプシン消化ならびに LC/MS 測定へと進めるラボ分析系を確立した。スピнкаラム処理から LC/MS によるリシン同定までの一連の操作時間は最短 5 時間であり、高感度迅速同定が可能であった。

この方法を、大量夾雑タンパク (リシン

の 100 倍量 BSA) 含有試料、ならびにヒト血漿希釈溶液に適用した。大量 BSA 含有試料の場合、BSA の除去ならびに FT-MS, IT-MS/MS によりすべてのリシンマーカーペプチドの検出・同定が可能であった。さらに、最も複雑な夾雑物含有試料として、血漿 5 倍希釈試料 (100 ng リシン/mL 希釈血漿) 500 μL を使用したところ、99 % 以上の血漿タンパクがスピнкаラム処理により除去されてリシンが溶出画分に回収され、スピнкаラム処理は非常に有用な前処理法であった。この溶出液をトリプシン消化に進めたところ、FT-MS により、6 種類全てのマーカーペプチドの分子関連イオンが検出された。しかしながら、溶出画分に残留する血漿タンパクなどによるイオンサプレッションにより、マーカーペプチドのうちの 3 種類のみ MS/MS スペクトルが確認された。

糖鎖アフィニティを利用した夾雑物の除去ならびにリシンの特異的簡易精製は新しい試みであり、非常に有用な手法であると結論づけた。

④ 抗体結合磁性ビーズを用いたリシン精製

Protein A または Protein G 固定化、あるいはトシル基活性化磁性ビーズを使用し、複数のマーカーの抗リシン抗体 (モノクローナル (IgG1, IgG2a)、ポリクローナル) について試したところ、マーカーによっては抗体がほとんど磁性ビーズに結合しない場合が認められた。このうち、Protein G 固定化磁性ビーズ (0.75 mg) にモノクローナル抗体 (IgG1, 3.2 μg) を結合させた場合に最大約 500 ng のリシンを特異的に結合・回収することができ、操作も簡便であり、精製前処理法として有用であった。しかしながら、最適抗体が非常に高価であったため、さらに抗体の選択などについて改善の余地があると考えられた。

(2) ウシカゼイン

① ウシカゼインのトリプシン消化ペプチドの MALDI-TOF/MS 測定

α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (α-CHCA) をマトリクスとした際の MALDI-TOF/MS 測定により、ウシカゼイン消化ペプチドは良好に検出され、ペプチドの迅速分析が可能であった。カゼインはリン酸タンパク質であるため、同定可能な消化ペプチドが少なく、最も多く含有される α-カゼインで 25 % のペプチド一致率となった。このうち、検出強度の高かった消化ペプチド 3 種 (m/z 1759.8, 1267.6 (α-カゼイン)、 m/z 830.4 (β-カゼイン))

を、ウシカゼイン同定のためのマーカーペプチドに選定した。マーカーペプチドのうち、*m/z* 1759.8 (HQGLPQEVLENLLR) は、UniProtKB/Swiss-Prot データベース検索により、ウシ α -カゼインのみに特有のアミノ酸配列を有するペプチドであり、タンパクの同定精度を上げるために選択した。

②抗体結合磁性ビーズを用いたウシカゼイン精製

複数の抗ウシカゼインポリクローナル抗体を Protein A または Protein G 固定化磁性ビーズに結合させたところ、いずれの抗体も効率よく磁性ビーズに結合し、操作も非常に簡便であった。しかしながら、ウシカゼインの回収量が最大 150-200 ng (抗体 5 μ g, Protein G 固定化ビーズ 0.75 mg 使用の場合) であり、抗体の作製・選定などの必要性が考えられた。

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 M. Kanamori-Kataoka, H. Kato, H. Uzawa, S. Ohta, Y. Takei, M. Furuno, Y. Seto, Determination of ricin by nano liquid chromatography/mass spectrometry after extraction using lactose-immobilized monolithic silica spin column. *J. Mass Spectrom.*, 査読有, Vol. 46, 2011, pp.821-829
DOI 10.1002/jms.1953

[学会発表] (計 4 件)

- ① 金森美江子, 糖鎖結合モノリスチップ及び液体クロマトグラフー質量分析装置を用いた植物タンパク毒リシンの検出・同定, 日本分析化学会第 59 年会 (2010)
- ② M. Kanamori-Kataoka, Determination of ricin, the plant proteinous toxin by liquid chromatography-mass spectrometry, after pretreatment using sugar chain-probe monolithic solid phase extraction tip. PACIFICHEM2010 (The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), Honolulu, USA
- ③ M. Kanamori-Kataoka, Forensic Methodology for Plant Toxin Ricin. IUPAC International Congress on Analytical Sciences (ICAS) 2011, May 25, 2011, Kyoto, Japan.
- ④ M. Kanamori-Kataoka, Determination

of ricin, the plant proteinous toxin by liquid chromatography/mass spectrometry, after sugar chain-immobilized monolithic silica spin column extraction. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT2012), June 6, 2012, Hamamatsu, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金森 美江子 (KANAMORI MIEKO)
科学警察研究所・法科学第三部・主任研究官
研究者番号 : 80356203