

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14935

研究課題名(和文)『分子カルテ』：タンパク質を生体内イベントの記録媒体と考える網羅的修飾解析

研究課題名(英文) Use of abundant proteins as molecular recording media: Exhaustive screening strategies for chemical modifications

研究代表者

大江 知行(OE, Tomoyuki)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：10203712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は、病態由来の生理的・化学的ストレスにより様々な化学修飾(酸化、糖化、脂質化など)を受ける。とりわけ豊富に存在し、主標的となる主要タンパク質は、『生体内イベントの記録媒体』となる。申請者は、アルブミン、ヘモグロビン、ケラチン上の化学修飾解析システムの構築・分子カルテとしての利用を目的とし以下の研究成果を得た。アルブミン上の網羅的修飾解析法を確立し、個人により修飾状況が違う事を明らかにした。ヘモグロビン上の酸化・糖化・脂質化修飾の高感度同時解析法を確立した。表皮ケラチン上のUV照射による酸化状態の解析法を開発し、表皮のUVダメージを非侵襲的に評価可能な事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Proteins are exposed to higher physiological/chemical stresses in some biological events. The resulting chemical modifications on proteins (such as oxidation, glycation, and lipidation) can provide meaningful information about the biological events. Therefore, abundant proteins (such as albumin, hemoglobin, and keratin), that are major targets of chemical modifications, can work as molecular medical record. From the view point, following results have been obtained: i) Chemical modifications on albumin has been screened and found the difference between individuals, ii) A sensitive and simultaneous analytical method has been developed for oxidized, nitrated, lipidated, and glycated hemoglobin, iii) A sensitive and non-invasive analytical method has been developed to estimate UV irradiation-induced skin damage through keratin oxidation.

研究分野：臨床分析化学

キーワード：化学修飾 アルブミン ヘモグロビン ケラチン 分子カルテ

1. 研究開始当初の背景

背景1『タンパク質の化学修飾』: 酵素的修飾と異なり、分別が困難。

- 病態等の生理的・化学的ストレスにより各種化学修飾(酸化・糖化・脂質化・薬物付加など)を受ける。
- 予想困難かつ通常のプロテオミクス・免疫学的測定法では分別が困難である。

背景2『国内外の動向』: 網羅的な化学修飾解析の試みは、in vitro モデル実験を含め存在しない。

- 文献検索 (Scopus、keyword: human serum albumin, protein modification, mass spectrometry) でヒットする 44 報中、in vivo 研究は 10 報 (国内 3、国外 7) で「脂質化 (国内)」、「Cys34 上 (国外、国内)」、「糖化 (国外)」、「異性化 (申請者)」に特化。他はモデル実験にとどまる。糖化ヘモグロビンの例を除き、臨床応用例は僅か。

背景3『アバンダントプロテイン』: 生理的・化学的ストレスの主標的だが、多くは興味の対象外である。

- アルブミン (生体内半減期 19 日): 血清タンパク質の 6 割を占める。
- ヘモグロビン (生体内半減期 120 日): 血中で最も高濃度に存在する。
- ケラチン (28 日サイクルで置換): 表皮角質層の疎水性タンパク質である。

背景4『研究成果、着想に至った経緯』: 病因タンパク質の化学修飾を病態との関連で研究している。

- アミロイド^[1,2]、 α -シヌクレイン^[3]、アンジオテンシン^[4-6]など。その結果、以下の事が判明した:
- 化学修飾は容易に起こり、構造・機能・活性変化を惹起する。
- 臨床で病因タンパク質は主に ELISA で定量され、修飾情報は見逃されている。

それ故、『化学修飾解析を通じたバイオマーカー探索』の考えに至り『化学修飾オミクス^[7,8]』を提唱、そのコンセプトを確認した^[9]。今回、アバンダントプロテイン上の化学修飾を網羅的に解析するシステムを開発すれば、生体内イベントの記録媒体 (分子カルテ) として利用できるという着想に至った。

引用論文

- [1] Inoue, Garner, Ackermann, Oe et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 911 (2006).
- [2] Oe et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 3723 (2006).
- [3] Trostchansky, Lind, Hodara, Oe et al.: *Biochem. J.*, **393**, 343 (2006).
- [4] Lee, Takahashi, Goto, Oe: *Chem. Res. Toxicol.*, **23**, 1771 (2010).
- [5] Lee, Goto, Oe: *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 2237 (2008).
- [6] Lee, Masuda, Goto, Oe: *Anal.*

Biochem., **437**,10 (2013).

- [7] Oe: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **57**,167 (2009).
- [8] Oe: *Jpn. J. Clin. Chem.*, **38**, 177 (2009).
- [9] Goto, Kojima, Shitamichi, Lee, Oe: *Anal. Methods*, **4**, 1945 (2012).

2. 研究の目的

タンパク質は、病態由来の生理的・化学的ストレスにより様々な化学修飾(酸化、糖化、脂質化など)を受ける。とりわけ豊富に存在し、主標的となるアバンダントプロテインは、『生体内イベントの記録媒体』となる(図1)。そこで申請者は、アルブミン・ケラチン上の網羅的な化学修飾解析システム構築・分子カルテとしての利用を目的とする。

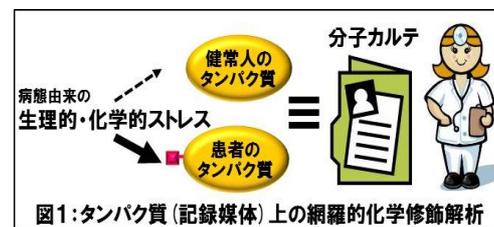


図1:タンパク質(記録媒体)上の網羅的な化学修飾解析

3. 研究の方法

(1) 化学修飾オミクスの分析基盤の確立

- 正・負両イオン検出と複数のプロテアーゼ (trypsin、V8) を併用し、再現性良く全アミノ酸修飾情報を俯瞰できる MALDI/TOF-MS システムを最適化した。
- *in silico* で予測した全ての修飾ペプチドを高感度スクリーニング可能な LC/ESI-predicted SRM (pSRM)/MS を最適化した。
- *in vitro* で見出した主修飾部位を含むペプチドの LC/ESI-SRM/MS による標的型超高感度定量系を構築した。
- 差異解析ソフトと組み合わせ、効率的に二群間の修飾ペプチドの消長を判別する方法を構築した。

(2) アルブミンの前処理法の最適化

- アルブミンを *in vitro* の修飾反応(酸化、糖化、脂質化など)に付し、モデル修飾体を調製した。
- 酸化には H_2O_2 、 Cu^{II} /アスコルビン酸、脂質化には 4-hydroxy-2(E)-nonenal (HNE)、糖化にはグルコースなどを用いた。
- ヒト血清試料に上記をスパイクし、抗アルブミン抗体(ポリクローナル)のイムノアフィニティーカラムを用い、単離・精製条件を最適化した。

(3) ヘモグロビンの修飾標的探索のための *in vitro* 化学修飾部位の特定

- ヘモグロビンを *in vitro* の修飾反応(酸化、ニトロ化、糖化、脂質化など)に付し、モデル修飾体を調製した。
- 酸化には H_2O_2 、 Cu^{II} /アスコルビン酸、ニト

ロ化には NaONO、脂質化には 4-hydroxy-2(E)-nonenal (HNE)、糖化にはグルコースなどを用いた。

- MALDI/TOF-MS で主な修飾位置を同定し、再現性の観点で分析候補として選択した。

(4) ヘモグロビン上の主修飾の高感度 LC/ESI-SRM/MS

- 上記で選択した主な修飾体を MS/MS 解析に付し、SRM 条件を最適化した。

(5) ケラチンの前処理法の最適化

- テープストリッピング法で皮膚角質層タンパク質を非侵襲的に採取し、可溶性条件、回収率なども含め最適化する。
- フィルター上での消化精製を、回収率なども含め最適化する。
- トリプシン、V8 による消化条件を最適化する。
- 問題となる操作過程の酸化を防ぐため、各種抗酸化剤(BHT)など検討する。

(6) 生体試料からのアルブミン化学修飾オミクス

- 健常人の喫煙・非喫煙ボランティア(20、50代)の血清を上記分析法で測定した。
- MALDI/TOF-MS あるいは LC/ESI-ion trap MS/MS により行った。
- 標的修飾の消長を対照群ごとに解析した。

(7) 生体試料からのヘモグロビン化学修飾オミクス

- 健常人ボランティア(20、50代)の全血を上記分析法で測定した。

(8) 生体試料からのケラチン化学修飾オミクス

- 健常人ボランティアの日焼け部位と非日焼け部位から試料を採取した。
- 上記の MALDI/TOF-MS および LC/ESI-SRM/MS により測定を行った。

4. 研究成果

タンパク質は、病態由来の生理的・化学的ストレスにより様々な化学修飾(酸化、糖化、脂質化など)を受ける。とりわけ生体中に豊富に存在し、主標的となるアバングメントプロテインは、『生体内イベントの記録媒体』となるため、その修飾解析は新たなバイオマーカー探索法となる。申請者は、血清アルブミン、ヘモグロビン、ケラチン上の網羅的修飾解析システム構築・分子カルテとしての利用を目的として以下の研究成果を得た。

血清アルブミン上の修飾解析法として、血漿中からのイムノアフィニティー精製法、LC/ESI-ion trap-MS/MS による網羅的修飾解析法、差異解析による効率的修飾スクリーニング法を確立し、個人差による修飾パターンの違いを確認した^[論文5;学会6]。更に薬物修飾に特化した Cys³⁴ 上の LC/ESI-SRM/MS 法^[学会1]、N末端異性化解析法^[学会3]も確立した。

ヘモグロビン上の高感度修飾解析法として、酸化・ニトロ化・糖化・脂質化ヘモグロ

ビンを *in vivo* で調製し修飾位置と共に同定し、前処理法を含め、主な修飾体の高感度一斉解析法としての LC/ESI-SRM/MS 法を確立し、健常人全血からも酸化修飾(-Met^{32,76}, -Met⁵⁵, -Trp¹⁵)、マロンジアルデヒドおよび糖付加体(-Val¹)を確認した^[論文4]。

表皮ケラチン上の UV 照射による酸化位置を同定(Met^{259,262,296} in K1) これらの感度選択性に優れた LC/ESI-SRM/MS 法を開発し、これらを指標とした表皮の UV ダメージおよびサンスクリーン剤の影響を非侵襲的に評価可能な事を明らかにした^[論文2,3;学会7]。またその過程で、on-tape 消化法が tape-stripping 法により採取したケラチンの回収率向上に効果的である事を見出した^[学会2]。現在、毛髪中ケラチンへも展開している^[学会8]。

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 5 件)

- [1] Seon Hwa Lee and Tomoyuki Oe: Oxidative stress-mediated N-terminal protein modifications and MS-based approaches for N-terminal proteomics. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **31**(1), 27-34 (2016). 総説 査読有 DOI: 10.1016/j.dmpk.2015.12.002
- [2] Seon Hwa Lee, Keita Matsushima, Kohei Miyamoto, and Tomoyuki Oe: Mass spectrometry data from proteomic analysis of human skin keratins after exposure to UV radiation. *Data in Brief*, **7**, 100-106 (2016). 査読有 DOI: 10.1016/j.dib.2016.02.008
- [3] Seon Hwa Lee, Keita Matsushima, Kohei Miyamoto, and Tomoyuki Oe: UV irradiation-induced methionine oxidation in human skin keratins: Mass spectrometry-based non-invasive proteomic analysis. *Journal of Proteomics*, **133**, 54-65 (2016). 査読有 DOI: 10.1016/j.jprot.2015.11.026
- [4] Koki Kojima, Seon Hwa Lee, and Tomoyuki Oe: An LC/ESI-SRM/MS method to screen chemically modified hemoglobin: simultaneous analysis for oxidized, nitrated, lipidated, and glycosylated sites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **408** (19), 5379-5392 (2016). 査読有 DOI: 10.1007/s00216-016-9635-4

- [5] 後藤貴章, 工藤裕太, 李 宣和, 大江知行: 血清アルブミン上の化学修飾解析の効率化: LC/MS/MS と差異解析ソフトの利用. *分析化学*, **64**(9), 653-659 (2015). 査読有
DOI: 10.2116/bunsekikagaku.64.653

〔学会発表〕(計 10 件)

- [1] 小澤真史, 久保貴史, 李 宣和, 大江知行: 反応性代謝物の *in vivo* スクリーニングを目的としたアルブミン Cys³⁴ 付加体の LC/ESI-MS/MS. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25~27 日, 仙台
- [2] 川瀬士瑛, 廣嶋佑亮, 大江知行, 李 宣和: On-tape 消化法を用いるヒト表皮ケラチン上の化学修飾スクリーニング. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25~27 日, 仙台
- [3] 藤本健人, 梶田遼, 後藤貴章, 李 宣和, 大江知行: 血清アルブミンの N 末端異性化解析: アルデヒドストレスマーカーとしての可能性. 第 55 回日本薬学会東北支部大会, 2016 年 9 月 25 日, 郡山
- [4] Tomoyuki Oe, Seon Hwa Lee: Alternative analytical approach for biomarker discovery through chemical modifications on a specific peptide or protein. (Invited lecture, Keynote speaker). KSMS Summer Conference, 2016 August 23-25, Gyeongju, Korea (招待講演)
- [5] 大江知行: 化学修飾オミクスを基盤としたバイオマーカー探索. 第 12 回 東北大学学際科学フロンティア研究所 FRIS セミナー, 2016 年 8 月 10 日, 仙台 (招待講演)
- [6] 工藤裕太, 後藤貴章, 李 宣和, 大江知行: 血清アルブミン上の網羅的化學修飾解析を目的とした LC/MS/MS 手法の開発. 新アミノ酸分析研究会 第 5 回学術講演会, 2015 年 12 月 7 日, 東京
- [7] 廣嶋佑亮, 松島慶太, 李 宣和, 大江知行: MS-based proteomic analysis of chemical modifications in human skin keratins. 第 54 回日本薬学会東北支部大会, 2015 年 9 月 26 日, 矢巾
- [8] 渡會理穂, 佐藤 涼, 李 宣和, 大江知行: 毛髪中ケラチンの化学修飾解析を目的とした酵素消化に関する研究. 第 54 回日本薬学会東北支部大会, 2015 年 9

月 26 日, 矢巾

- [9] 大江知行: タンパク質の化学修飾解析を基盤としたバイオマーカー研究. 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015 年 9 月 12 日, 船橋 (招待講演)
- [10] 大江知行: 生体高分子の化学修飾解析: バイオマーカー研究と毒性学研究的接点. 第 42 回日本毒性学会学術年会, 2015 年 6 月 30 日, 金沢 (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

- 東北大学大学院薬学研究科臨床分析化学分野 HP:
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~bunseki/bunseki.html>
- 東北大学研究者紹介 HP:
<http://db.tohoku.ac.jp/whois/>
- Research Gate
HP:https://www.researchgate.net/profile/Tomoyuki_Oe

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大江 知行 (OE, Tomoyuki)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 10203712

(2) 研究分担者

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

(平成 27 年度のみ)

李 宣和 (LEE, Seon Hwa)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号 : 60519776

佐藤 涼 (SATO, Ryo)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号 : 20757166
(平成 28 年度前期のみ)