

令和元年5月13日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08937

研究課題名(和文) 質量分析による肝炎ウイルス診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a mass spectrometry-based quantitative assay for hepatitis virus detection

研究代表者

武森 信暁 (Takemori, Nobuaki)

愛媛大学・学術支援センター・講師

研究者番号：40533047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：選択反応モニタリング質量分析を用いた標的プロテオミクスの手法を活用し、B型肝炎ウイルス(HBV)のHBs抗原を高感度に解析するための新規定量戦略を開発した。トリプシンによるHBs抗原消化産物のプロファイリングにより、選択反応モニタリングを用いたHBs抗原定量のための標的ペプチド配列を同定した。確立したアッセイは100ナノリットル血清試料においてサブピコグラムレベルでHBs抗原を検出可能であった。また標的ペプチド配列内の並列モニタリングによりHBs抗原の遺伝子型を迅速に決定できた。本研究により、従来の抗体に基づく診断の代替法として、HBV感染の質量分析に基づく診断の実現可能性が実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

質量分析をベースとした検査法を新たに開発することで、従来のイムノアッセイ法で問題とされてきたエスケープ変異体による感染リスクの低減が可能となり、肝炎ウイルス感染の拡大防止に寄与できる。将来的には、新規ウイルスや、イムノアッセイの確立されていないウイルスに対する質量分析ベースの血液診断法を確立することにより感染症一般への対策に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Serological diagnosis of hepatitis B virus is commonly performed with immunoassays against the HBV surface antigen (HBsAg). However, an alternative approach for HBsAg detection is currently required because of the emergence of immune-escape mutations, which cause false negative results in diagnostic tests. In this study, we developed an antibody-free strategy for HBsAg quantitation using targeted proteomics. By profiling tryptic HBsAg digests, we identified signature peptides that enabled the establishment of a reliable targeted assay for HBsAg quantitation, using selected reaction monitoring mass spectrometry. The established assay detected HBsAg at the sub-picogram level in a 100-nanoliter serum sample, and parallel monitoring of amino acid variations in signature peptides facilitated the determination of HBsAg genotypes. Our results demonstrate the feasibility of mass spectrometry-based diagnosis of HBV infection as an alternative method to conventional antibody-based diagnosis.

研究分野：分析化学

キーワード：質量分析 選択反応モニタリング バイオマーカー 肝炎ウイルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現行の肝炎ウイルス検査には、イムノアッセイ法が用いられているが、変異株の出現やサブタイプの多様性などによって正確な抗原検査が難しい場合がある。例えば、HBV の場合は主に HBs 抗原と呼ばれる HBV エンベロープタンパク質の血液検査によりおこなわれる。HBV は DNA ウィルスであるが、増殖時に逆転写過程があり RNA を複製中間体とする。そのため他の DNA ウィルスと比較して変異が生じやすく、市販 HBs 抗体のエピトープ領域 (99 番目から 170 番目のアミノ酸残基) に変異を持つ HBV 株が存在する。この変異が原因となり、CLIA 法に代表される現行のイムノアッセイによる検査技術では検出が困難となるケース (エスケープ変異体) が報告されている。また HCV の場合、検査法に用いられる抗エンベロープ抗体が取得されていないため、HCV エンベロープタンパク質の検査法は確立されていない。

イムノアッセイの代替的検査法として、偽陰性発生率が低い新規ウイルスタンパク質検出技術の開発が望まれている。選択反応モニタリング (SRM) とよばれるターゲット選択性の高い質量分析法を活用したマーカータンパク質の定量解析法は、イムノアッセイに代わるマーカー検査法として現在注目されている。近年では血中の微量マーカータンパク質を SRM で効率的に検出するための試みとして、SRM 用試料の前処理工程に免疫アフィニティ精製を活用するイムノ SRM 法も開発されており、検出感度の劇的な向上 (100 ~ 1000 倍) が報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、血中に含まれる微量な肝炎ウイルスタンパク質を高感度かつ高選択的に検出するための SRM アッセイ法および試料前処理法を開発を行う。期間内では、HBV を検査対象として設定し、HBs 抗原を具体的な測定対象としたイムノ SRM アッセイを構築する。培養ウイルス試料から独自に取得した質量分析情報と、各種バイオインフォマティクスに基づいて、イオン化効率が高く、変異の生じにくいモニタリング標的配列を明らかにする。その後、モニタリング標的配列およびその変異配列を網羅的に計測できる SRM アッセイを開発し、血清試料に含まれる目的エンベロープタンパク質の検出を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) トリプル四重極型質量分析による SRM アッセイ構築

培養細胞系により得られた HBV エンベロープタンパク質試料を、トリプシンで消化した後、消化ペプチドのタンデム質量分析 (MS/MS) をおこなった。得られた MS/MS 情報に基づいて、アッセイに最適なプローブ用ペプチドを選択し、トリプル四重極型質量分析計を用いてプローブペプチドの SRM アッセイを構築した。アッセイ構築と並行して、プローブペプチドの <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識体 (AQUA ペプチド) を、定量解析の内部標準として合成した。プローブ配列内のアミノ酸残基の変異に対応するためには、変異配列を有するペプチドを化学合成し、合成ペプチドの MS/MS 情報を用いて変異体解析用の SRM アッセイ構築をおこなった。AQUA ペプチド合成と併せて、プローブペプチドを選択的に濃縮するための抗ペプチド抗体カラムの作製を行った。

#### (2) 血中 HBs 抗原の検出

開発した SRM アッセイを用いて、血清試料に含まれる標的エンベロープタンパク質の計測を試みた。逆相液体クロマトグラフィ (LC) によりペプチドを分離した後、LC とオンライン接続したトリプル四重極型質量分析計を用いてターゲットタンパク質の定量 SRM 解析をおこなった。また既知の変異体および各種遺伝子型を網羅した多重モニタリング、および SRM よりも高選択的な質量分析法である MRM3rd 法を用いた解析も併せて試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) SRM および MRM3rd を用いた高感度アッセイの構築

B 型肝炎ウイルスの HBs 抗原を解析の対象として、HBs 抗原の各アイソフォーム (LHBs、MHBs、および SHBs) の発現量比を高精度に計測するためのアッセイ構築をおこなった。質量分析で HBs 抗原を検出するためのプローブペプチドの選択には、HBs 抗原を特異性の高いプロテアーゼで消化することにより再現性をもって生じるペプチドであること、ESI によるイオン化効率が高いこと、及び翻訳後修飾による質量数変化を回避するため、配列内にメチオニン残基が存在しない

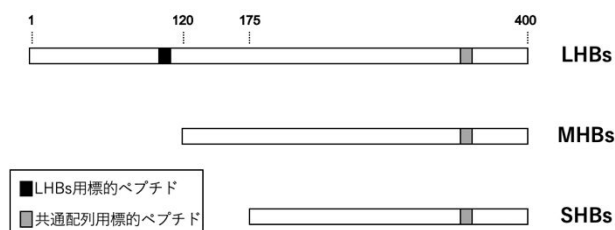


図 1. HBs 抗原の SRM アッセイ用プローブペプチド領域

こと等の条件を満たすことが好ましい。培養細胞由来のリコンビナント HBs 抗原を解析材料として、トリプシンおよびキモトリプシンを用いたペプチドマッピング解析の結果、全発現量推定用プローブペプチド配列および LHBs 特異的配列に由来するペプチド配列を同定することに成功した(図1)。現在までの解析で明らかになったプローブペプチドに関しては、ナノ流量 LC システムとトリプル四重極型質量分析計を用いて HBs 抗原検出用の SRM アッセイを確立した。また、血中微量 HBs 抗原の高感度検出に向けて、より高感度な検出手法である MRM3rd 法を導入した結果、検出感度の向上に成功した。

### (2) 構築したアッセイによる定量解析

確立したアッセイを用いて、ヒト血清試料中に含まれる HBs 抗原の定量解析を行った。その結果、~100 IU/mL 以上の HBs 抗原の検出は十分可能であるものの、血清試料に含まれる夾雑物(他の血清タンパク質成分)に由来する干渉が原因となり、現状の SRM アッセイではこれ以上の高感度化には至らなかった。そこで SRM よりも選択性の高い質量分析法である MRM3rd 法を用いて新たにアッセイ系を確立し、さらなる解析を試みた。その結果、MRM3rd 法では SRM 法に比べて検出感度を約 10 倍改善することが可能であった。アッセイのさらなる高感度化のためには、質量分析の高感度化に加えて、分析用試料の前処理段階におけるタンパク質成分の分画処理が有効である。そこで可溶性ポリアクリルアミドゲルを用いる新規の高分解能ゲル電気泳動法(BAC-PAGE 法)を新たに開発し、血清試料の迅速な分画処理のワークフローを確立することに成功した。現在は、血中微量 HBs 抗原の検出を目的とした BAC-PAGE ベースの試料前処理法の開発を進めている。

### (3) 変異体および遺伝子型解析のための SRM 解析基盤の構築

安価な粗精製ペプチドをアッセイ構築のための標準品として活用することにより、HBs 抗原の変異体および各種遺伝子型を多重モニタリングするための LC-SRM アッセイを開発した。さらに開発アッセイを用いた標的変異体の絶対量計測のために、内部標準となる安定同位体標識ペプチドのハイスルーブット合成系を確立した。具体的には、標的であるペプチド配列(変異体解析用 11 種類および遺伝子型解析用 8 種類)の連結体(QconCAT)を設計し、QconCAT の安定同位体標識体を生合成することでハイスルーブットな合成を試みた。全ての標的ペプチドは、2 種類の QconCAT 配列(分子量~30kDa)によりカバーすることが可能であった。次に設計した QconCAT 配列をコードする人工遺伝子を合成し、<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識 Lys および Arg を添加したコムギ無細胞合成系を用いて、安定同位体標識 QconCAT の生合成実験を行った。小スケール(240 μL)の反応槽における 20 時間の合成反応によって約 2 μg の合成量が得られた(図2)。設計した QconCAT 配列は疎水性が高く、全ての合成した QconCAT タンパク質は不溶化していたため、遠心分離後に SDS 溶液を用いて可溶化処理を行った。可溶性 QconCAT サンプルは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後に、ゲル内トリプシン消化を行い、MALDI 質量分析および SRM アッセイを用いて得られた消化産物の計測を行った。その結果、QconCAT の設計に用いた全ての標的ペプチドは、いずれの質量分析法でも感度良く検出された。SRM アッセイによる定量解析から、無細胞合成 QconCAT の <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識効率は >99% であり、高品質な内部標準として使用可能であることが明らかとなった。

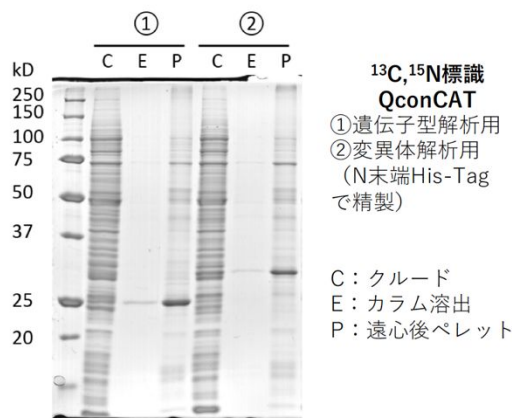


図2.無細胞合成QconCATのSDS-PAGE像

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Takemori A, Nakashima T, Ômura H, Tanaka Y, Nakata K, Nonami H, Takemori N. Quantitative assay of targeted proteome in tomato trichome glandular cells using a large-scale selected reaction monitoring strategy. *Plant Methods.* (2019) 15:40. 査読有  
doi: 10.1186/s13007-019-0427-7.

武森 信暁、コムギ無細胞合成法を利用した標準ペプチド多重共発現系の開発と定量プロテオミクスへの応用. *Proteome Letters* (2018) 3,23-30. 査読有  
doi:10.14889/jpros.3.1\_23.

Takemori N, Takemori A, Tanaka Y, Endo Y, Hurst JL, Gomez-Baena G, Harman VM, Beynon RJ. MEERCAT: Multiplexed Efficient Cell Free Expression of Recombinant QconCATs For Large Scale Absolute Proteome Quantification. *Mol Cell Proteomics.* (2017) 16(12):2169-2183. 査読有  
doi: 10.1074/mcp.RA117.000284.

Takemori N, Takemori A, Wongkongkathep P, Nshanian M, Loo RRO, Lermyte F, Loo JA. Top-down/Bottom-up Mass Spectrometry Workflow Using Dissolvable Polyacrylamide Gels. *Anal Chem.* (2017) 89(16):8244-8250. 査読有  
doi: 10.1021/acs.analchem.7b00357.

〔学会発表〕(計6件)

Takemori N, A multiplexed co-synthesis system for stable isotope-labeled peptide standards using wheat germ cell-free synthesis and its application to quantitative proteomics (JPrOS Award Lecture). *Mass Spectrometry and Proteomics 2018*, Osaka, 2018年

Takemori N, High-throughput biosynthesis of stable isotope-labeled internal standards for global proteome quantification. *Mass Spectrometry and Proteomics 2018*, Osaka, 2018年

Takemori A, Harman VM, Brownridge P, Loo JA, Loo RRO, Beynon RJ, Takemori N. High-speed recovery workflow for electrophoretically separated proteins in polyacrylamide gels and its applications to mass spectrometry. *HUPO 17th Annual World Congress, Orlando, USA*, 2018年

Takemori N, Takemori A, Wongkongkathep P, Nshanian M, Loo RRO, Lermyte F, Wu S, Loo JA. Proteomics workflow using dissolvable polyacrylamide gels. *Twelfth International Symposium on Mass Spectrometry in the Health & Life Science: Molecular & Cellular Proteomics*, San Francisco, USA, 2017年

Takemori N, Takemori A, Tanaka Y, Endo Y, Hurst JL, Gomez-Baena G, Harman VM, Beynon RJ. Multiple QconCAT biosynthesis in a cell-free protein synthesis system. *Twelfth International Symposium on Mass Spectrometry in the Health & Life Science: Molecular & Cellular Proteomics*, San Francisco, USA, 2017年

Takemori N, Takemori A, Wongkongkathep P, Nshanian M, Loo RRO, Lermyte F, Wu S, Loo JA. Top-down Mass Spectrometry using BAC-PAGE. *7th Asia-Oceania Mass Spectrometry Conference*, Singapore, 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 質量分析を用いたB型肝炎ウイルスの測定方法

発明者: 武森 信暁、武森 文子、鈴木 哲朗

権利者: 愛媛大学、浜松医科大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/071491

出願年: 2016

国内外の別: 国外

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.proteomicslaboratory.com>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 鈴木 哲郎

ローマ字氏名: SUZUKI, Tetsuro

所属研究機関名: 浜松医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00250184

### (2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。