

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22756

研究課題名（和文）分解後プロテオミクス：法医学からの新規プロテオミクス

研究課題名（英文）Postdegradation proteomics: A novel proteomics approach in forensic medicine

研究代表者

石井 晃（Ishii, Akira）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30252175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）： 法医鑑定においては、病歴や生理検査等の情報が得られないため、病理組織検査や薬毒物検査のみならず、法医化学的検査も施行される。今回、我々は、尿中ミオグロビン及び血中NT-proBNPを対象として、法医化学的応用の可能性と限界について検討した。

尿中ミオグロビンについては、腐敗尿サンプル中では、Western blotting によってミオグロビンのバンドが検出できなかった。しかし、腐敗尿サンプルでも、アセトニトリル沈殿後に再溶解とトリプシン/リシルエンドペプチダーゼ消化を行い、感度の減弱を認めたもののペプチド分析が可能であった。その原因は腐敗尿中の夾雑物によるイオン化等の阻害が想定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前述したように、法医解剖に付されるご遺体は、死亡に至る情報や検査結果が得られず、死後の腐敗変性が著明であることも多いため、より正確な鑑定を行うため、病理解剖では通常施行されない検査も応用することがある。特に、法医化学的検査は、種々の限界があるものの、場合によっては有効なものもある。本研究を進めることにより、ある種の生体中タンパクの高感度分析法が確立され、応用の限界等が明らかになれば、法医鑑定の制度が向上し、司法解剖のみならず、死因究明の解剖にも還元されるため、学術的のみならず、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）： Not only histological or toxicological examinations, but also some biochemical examinations have been applied to forensic autopsies. However, only a few biochemical tests could be useful for the purpose, because the enzymes released from cells (e.g. aspartate transaminase or alanine transaminase) are discharged from the cells after death. In the present research, we investigated the possibility and limitation of the application of myoglobin in urine and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in blood. Digested peptides of myoglobin were determined with high sensitivity after trypsin digestion; however, the bands of myoglobin were not detected in putrefied urine samples in Western blotting analyses. We finally succeeded in detecting and determining the peptides digested with trypsin/lysyl endopeptidase in putrefied urine samples; concomitantly in putrefied urine may have caused the suppression of the ionization of the peptide fragments.

研究分野：法医学

キーワード：法医学 法医鑑定 法医化学 ミオグロビン 質量分析 電気泳動 ペプチド分析 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

法医鑑定においては、死因の推定や、疾病、外力の作用、薬物等がヒトの死にどのように関与したかの推定や、他者による外力や薬物投与等の外因と既存の疾病の関与の割合などの判定が要求される。しかし、1)多くの事例では、被害者の病歴や受診歴がなく、生前の健康状態等が評価できないこと、2)その場合、死亡時点での薬物濃度や病理組織からしか情報が得られず、3)死後変化による血中薬物の再分配や組織の変性が存在し、4)その程度も大きく異なる等の理由から、法医鑑定はしばしば困難となる。

これらの問題を克服するため、法医学解剖においては、病理解剖では行われない種々の検査が施行される。薬毒物検査はよく知られているが、法医学解剖で行われる検査はそれだけではない。

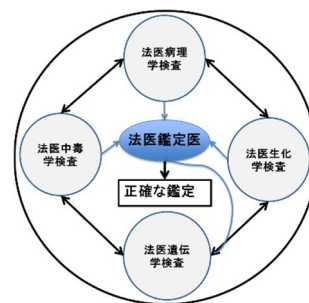


図1：法医鑑定と各種検査の関係

上の図1で示すように、法医鑑定においては、法医病理学的検査、法医遺伝学的検査、薬毒物検査と並んで、法医学生化学検査が応用されている。法医鑑定においては、病理解剖において活用されるような、経時的な生理検査、画像検査、生化学検査のデータを用いることができないため、いくつかの生化学マーカーが補助診断のために用いられている。なお、一般臨床で汎用される、アラントトランスアミナーゼ (ALT) やアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、トロポニン は、死後に細胞から逸脱するため、マーカーとはなりえない。死後、細胞膜の integrity は失われるためであり、ゆえに逸脱酵素は診断に用いることはできない。従って、法医鑑定に活用できる生化学検査は制限される。現在、補助診断としてよく用いられているのは、心不全のマーカーであるヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント (NT-proBNP)、炎症反応の際に上昇するC反応性タンパク (CRP)、敗血症において高値を呈するプロカルシトニン、糖尿病や飢餓で上昇するケトン体等である。これらのマーカーは、死後変動するものも多く、その解釈については注意を要するものの、適切に用いれば、補助診断として有用であり、検出法や解釈について、より詳細な検討が望まれ、そのための情報も必要となる。

2. 研究の目的

上述したように、法医学生化学的検査は、法医鑑定において一定の役割を果たしている。しかし、法医鑑定において、生化学検査を適切正確に適用するためには、測定法の正確性や再現性、当該検査の限界について、詳細に検討することが求められる。法医学解剖の対象となる遺体は、死因、既往歴、体格や栄養状態、保存状態も多様であり、少なくともこの点において、試料の種類や状態がほぼ同一である通常の生化学検査とは、注意すべき点は大きく異なると考えられる。特に、目的分子がタンパクである場合、プロテアーゼによる分解などにも考慮する必要があると考えられる。

今回、我々は、尿中ミオグロビンと血液中 NT-proBNP をターゲットとして、タンパクそのもの、ないし分解したペプチドを検出することにより、法医鑑定試料から、安定かつ再現性のある検出法を開発・確率することを目標とした。尿中ミオグロビンは、熱中症、悪性高熱症、挫滅症候群、横紋筋融解症等で上昇し、腎不全を惹起する。しばしば行われるのは、腎臓組織の免疫染色であり、尿細管に沈着したミオグロビンを検出することで診断を行う。その際、尿中ミオグロビンの定量は補助診断として有用と考えられるものの、外注検査ではラジオイムノアッセイを用い、必要尿量も6 ml と多く、大幅なスケールダウンが求められる。もし、ミオグロビンタンパクをトリプシンなどのタンパク分解酵素で分解し、得られたペプチドを液体クロマトグラフ (LC)-タンデム質量分析計 (MS/MS) で同定・定量すれば、より高感度かつ特異的にミオグロビンを検出できると予想される。心不全マーカーの一つである NT-proBNP については、慢性的な心疾患等で高値が予想されるにも関わらず、予想に反し、NT-proBNP の検出ができないか、存在しても低値であった事例が散見される。この場合においても、血液中 NT-proBNP をペプチドに分解後、LC-MS/MS で分析すれば、より高感度の検出が期待されるため、これらタンパクの高感度かつ特異的な検出及び同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 新鮮尿中ミオグロビンの挙動に関する SDS-PAGE ないし LC-MS/MS による予備的検討

まず、新鮮尿 100 μ L にヒトミオグロビン標準品 5 μ g を添加し、0、2、6、12、24、48 時間放置後、SDS-PAGE にてタンパクの減少について、Western blotting を用いてシグナルの減少を検討した。

同時に、標準ヒトミオグロビン添加尿について、トリプシン消化を行い、得られたペプチド断

片を、セミマイクロ LC ないしマイクロ LC で分離し、MS/MS システムで解析した。トリプシン消化を行う際、通常の還元及びアルキル化後にトリプシン消化を行ったもの、還元及びアルキル化は行わず、トリプシンカラムを使用し、カラム上で消化を行ったものを比較した。セミマイクロ LC システムは、島津 Prominence システム及び L column2 (150mm x 1.5 mm i.d., 粒子径 3 µm)、マイクロ LC システムは、Eksigent microLC システム及び Halo C18 (50 x 0.5 mm i.d., 粒子径 2.7 µm) を用い、移動相は A: 0.1% formic acid, 2% アセトニトリル、B: 0.1% formic acid, 95% アセトニトリルを用い、セミマイクロシステムでは流速 0.1 mL/min にて 15 分で A から B へ変化させ、マイクロシステムでは流速 10 µL/min にて 5 分で A から B に移行した。MS/MS 装置は高感度三連四重極システムである QTRAP6500 を用いた。

(2) Western blotting 解析の条件検討

上記 SDS-PAGE 及び Western blotting の条件検討に引き続き、Western blotting 解析時のサンプル調製法及び感度限界に関する検討を行った。標準尿に、終濃度が 0, 1, 2.5, 5, 10 ng/mL になるようヒトミオグロビンの標準品を添加し、添加尿 250 µL にアセトニトリル 1 mL を加えて 20 秒間 vortex を行い、その後遠心し、沈殿に再度添加尿 250 µL を加え、同様の処理を加え、沈殿を次の実験に供した。条件 1 では、沈殿を直接 SDS-PAGE のサンプルバッファーに溶解し、変性後、SDS-PAGE 及び Western blotting を行った。条件 2 では、沈殿を 500 µL の RIPA バッファーに溶解し、ウサギ抗ヒトミオグロビン抗体で免疫沈降 (IP) を行った。陰性対照としては、ウサギ抗ヒトミオグロビン抗体の代わりに正常ウサギ Ig G を用いた。精製したタンパクについて、SDS-PAGE 及び Western blotting を行った。

(3) 腐敗標準尿における添加ヒトミオグロビンの Western blotting 解析

多くの法医解剖例においては、試料が腐敗変性を受けていることが多いため、腐敗変性の影響について検討を行った。標準尿試料を 2 週間室温で放置して腐敗したものと、同一の新鮮な標準尿について、終濃度が 10 ng/mL になるようにヒトミオグロビン標準品を添加した。添加尿試料 250 µL に対し、1 mL のアセトニトリルを添加し、vortex 後、遠心して沈殿を回収した。タンパク沈殿について、25 µL の蒸留水ないしトリプシン溶液を添加し、直ちに SDS-PAGE のサンプルバッファーを添加して加熱変性したものを未処理サンプルとし、蒸留水ないしトリプシン溶液を添加後、37 度水浴で 60 分処理した後、SDS-PAGE サンプルバッファーを添加したものを処理サンプルとし、これらサンプルを SDS-PAGE 及び Western blotting に供した。

次いで、腐敗尿中ヒトミオグロビンの挙動をさらに検討した。まず、4 種類のサンプルを用意した。これらは、新鮮尿、新鮮尿を濾過滅菌したもの、腐敗尿、腐敗尿を濾過滅菌したもので、ヒトミオグロビンタンパク (20 ng/tube) をアセトニトリルで沈殿させ、沈殿を 40 µL の上記資料にそれぞれ溶解し、37 度のドライオープン中で 1 週間放置した。これら試料に SDS-PAGE のサンプルバッファーを添加し、加熱変性後、SDS-PAGE 及び Western blotting を行い、ミオグロビンタンパクの検出を試みた。

(4) 腐敗尿中ヒトミオグロビンタンパクのプロテオーム解析

この実験では、腐敗尿中のヒトミオグロビンの挙動をプロテオーム的に解析した。ヒト標準尿試料を 37 度のドライオープンで 2 週間放置したものと、同一尿を凍結保存したものについて、ヒトミオグロビン標準品をそれぞれ終濃度 0, 20, 50 ng/mL になるように添加し、各尿試料の 250 µL にアセトニトリル 1 mL を加え、vortex 後に氷上で 10 分間静置し、遠心後、沈殿を回収した。沈殿は、EasyPep mini MS sample kit 中の Lysis Buffer 110 µL に溶解し、そのうちの 100 µL について、trypsin 及び lysil-endopeptidase で消化し、精製後の試料について LC-MS/MS によるプロテオーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 新鮮尿中ミオグロビンの挙動に関する予備的検討

新鮮尿中のミオグロビン標準品を SDS-PAGE 後、Western blotting で検出を試みた。右図は、左から、分子量マーカー、ブランク、0、2、6、12、24、48 時間放置後のミオグロビンタンパクの泳動像を示す。時間経過によるタンパク量の減少について検討したところ、放置後 12 時間までは、おおむねタンパク量に有意な変化は確認できなかったものの、24 から 48 時間経過後では、ミオグロビンのバンド濃度は、約 8 割程度に減少した。これは、尿中の成分による分解や変性が考えられた。

また、ミオグロビンタンパクはトリプシン消化により 19 のペプチドフラグメントに分解され、各ペプチドは LC-MS/MS で検出された。

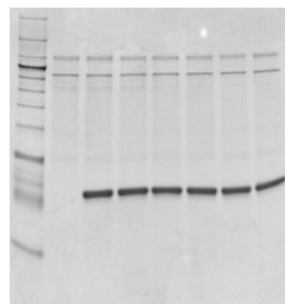


図 2 : ミオグロビンタンパクの Western Blotting

セミマイクロ LC の結果に比して、マイクロ LC を用いた場合、分析時間は 30 分から 10 分と大幅に短縮し、各ペプチドピークの大きさも、ピーク高さで比較すると 2.3 倍から 25 倍に、ピーク面積で比較すると 1.1 倍から 8.8 倍に上昇した。また、通常のトリプシン消化に比べ、トリプシンカラムを用いた場合、各ペプチドフラグメントの面積比は、二つのペプチドで約 3 倍程度の上昇

が認められた。

(2) Western blotting 解析の条件検討

(1)で行った SDS-PAGE 及び Western blotting の条件と比較すると、この実験におけるヒトミオグロビン濃度は、約 10000 分の 1 以下である。アセトニトリル沈殿による濃縮を行い、検出感度の向上を試みた。アセトニトリル沈殿を直接 SDS-PAGE 及び Western blotting に供した場合、終濃度 1 ng/mL でヒトミオグロビンが検出されたものの、IP を行った場合では、感度限界は 5 ng/mL であり、この条件では IP は有利とは言えなかった。しかし、腐敗変性が著しい資料では、IP が有利な場合も想定されるため、IP 条件のさらなる検討が必要と考えられた。

(3) 腐敗標準尿における添加ヒトミオグロビンの Western blotting 解析

方法で示したように、ヒト標準尿試料について、新鮮尿と腐敗尿にミオグロビン標準品を添加し、タンパクを沈殿させ、SDS-PAGE 及び Western blotting を行ったところ、新鮮尿に添加したヒトミオグロビンは検出が可能であった。しかし、腐敗尿に添加したミオグロビンは、未処理サンプル、処理サンプルのいずれにおいても検出できなかった。そこで、同様の実験を、終濃度が最大 200 ng/mL までミオグロビンを添加して行ったところ、腐敗尿では、感度限界が約 5 分の 1 程度に減少することが明らかとなった。

また、腐敗尿及び新鮮尿の濾過滅菌した後、ヒトミオグロビンを添加し、37 度 1 週間放置したものについて、SDS-PAGE 及び Western blotting を行ったところ、放置した場合、新鮮尿と腐敗尿のいずれの試料においてもミオグロビンのバンドは検出されず、尿中の物質が検出を阻害しているか、ないしは分解を促進していることが考えられた。

(4) 腐敗尿中ヒトミオグロビタンパクのプロテオーム解析

プロテオーム解析においては、新鮮尿、腐敗尿のいずれについてもヒトミオグロビン標準品を添加していないものからはペプチドフラグメントは検出されず、20 ないし 50 ng/mL 添加したものからは、ペプチドが検出された。しかし、腐敗尿のサンプルにおいては、新鮮尿のシグナルと比して、シグナル強度が 20 ng/mL で約 3 分の 1、50 ng/mL で約 40 分の 1 に減弱していた。これは、腐敗尿中の内在性物質が目的ペプチドのイオン化を阻害している可能性が示唆された。

これらの知見を踏まえると、ヒトミオグロビンを検出するためには、精製後にプロテオーム解析を行うのが有効と考えられ、今後剖検試料を用いてさらなる条件設定を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	名取 雄人 (Natori Yujin) (80610104)	名古屋大学・医学系研究科・助教 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関