

平成22年 5月14日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790028

研究課題名（和文）同時多成分スクリーニングを指向した生理活性ペプチド定量法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel quantification method for simultaneous screening of bioactive peptides.

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）：

複数種のペプチドホルモンを同時に測定可能にする新規分析法の開発を行った。抗体の利用により共通の部分構造を持った対象ペプチド群のみを選択的に抽出可能であることを示すとともに、質量分析法との組み合わせた測定が可能であることを示した。本法は、抗体の入手可能な他のペプチドホルモンにも適用可能と考えられ、疾患との関連解明やバイオマーカー探索に有用であると期待される。

研究成果の概要（英文）：

A novel methodology to screen various target bioactive peptides has been examined. That is based on the group-specific immunoaffinity extraction followed by direct MALDI-TOF/MS analysis. This strategy can be used for any bioactive peptides as long as the antibodies are available. This could help for the efficient diagnostic/therapeutic marker discovery in a disease state.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：生理活性ペプチド、多成分スクリーニング、抗体、質量分析法、MALDI、アンジオテンシン、安定同位元素標識

1. 研究開始当初の背景

特定疾患に関連するタンパクやペプチドの病態との関連を明らかにするためには、標的分子の絶対定量をいかに行うかが極めて重要な課題である。しかし、網羅的な解析に主眼をおいた従来のプロテオーム解析法を基盤とした手法は、標的分子の量的な変動解析を多数症例で再現良く行う必要のある病態解析へと直接応用することが困難であると考えられていた。絶対的定量解析には、LC/MS(MS)が極めて重要な手法となっていたが、多検体の分析には分析効率の向上が大きな課題となっていた。UPLCの実用化などにより多少の分析時間短縮も見込まれたものの、根本的な問題解決には至らないものと考えられた。一方、古くより基礎、臨床の別を問わず広く用いられている免疫測定法は、操作も簡便で併行操作により多検体測定に有利である。しかし、複数成分の同時測定は困難であり、しばしばLC/MS(MS)との間に定量値の乖離が認められるなどの問題点も指摘されていた。

そこで、研究代表者は、生体内の低分子化合物のLC/MS(MS)による一斉定量法や抗原の置換反応を利用した新規免疫測定系を開発してきた経験から、質量分析法と免疫測定法を融合することにより、両者の利点を相補的に有した定量法が実現できるとの考えに至った。すなわち、抗体を利用した標的分子および内標準物質の選択的な捕捉と、これに続くMALDI-TOF/MSによる補足分子の直接検出により迅速な定量が可能になり、抗体の交差反応性あるいは複数抗体の利用により多成分の同時定量も実現可能と考えた。

2. 研究の目的

本研究は、抗体の優れた分子認識能を利用し、高い特異性を有する質量分析法と組み合わせることにより、高い検体処理能力を有した同時多成分の定量的解析を可能にする新たな分析法の開発を目的としたものである。スループットの向上が困難なクロマトグラフィーや電気泳動に依存しない定量法を実現するため、抗体による標的分子の高選択的捕捉とMALDI-TOF/MSによる迅速かつ特異的な検出、さらに内標準法を組み合わせ定量性の確保を目指す。MALDI法は、一般に多価イオンを生じにくく、極めてシンプルなスペクトルを与えることから定量に好都合である。しかし質量分析法では、イオン検出部における飽和が起りやすく、直線性の得られる範囲は限定される。この問題を解決するため、抗体の固定化密度を最適化し捕捉されるペプチド総量を一定範囲内に保つことによりイオン飽和を防ぎ、定量範囲の拡大を図る。さらに、抗体の交差反応性の利用

あるいは複数種の抗体併用によって、同時多成分定量への適用性を検討する。

ターゲットプレート上に固定化した抗体は、単なる試料のクリーンアップにとどまらず、試料の均一性向上によるイオン化の再現性向上が期待できる。また、抗体の分子認識能によって、質量分析法で識別困難な異性体も容易に区別可能である。さらに、捕捉分子の最大量を規定することでイオン飽和の抑制による高い定量性の実現に重要な役割を果たす。また、抗体の固定化密度を変えることにより定量範囲の拡大も図る。

本来定量性の低い質量分析法において絶対定量法を確立するためには、内標準物質の使用が必須である。これに競合型免疫測定法における標識抗原とは全く異なる役割を持たせることにより、対象分子を直接検出し高精度な定量を試みる。対象分子の検出手段として質量分析法を用いることにより、極めて特異性の高い検出が可能になる。このため、同一スポット上に複数の抗体を固定化し、異なる成分を同時に捕捉し、定量することも可能と期待される。

本手法の確立によって、酵素消化と組み合わせたペプチド断片の分析を行なうことにより、タンパクの定量にも応用が可能になる。本研究の成果は、特定疾患に関連したタンパク・ペプチドを末梢体液、組織、細胞レベルで解析することにより、バイオマーカー探索、病態診断、疾患の原因や発症機序の解明といった臨床の場への直接的な展開も期待でき、病態プロテオミクス・標的プロテオミクスにおけるブレイクスルーになるものと考えられる。本研究では、分析対象を各種の病態と直接的に関係する生理活性ペプチドに絞り、固定化抗体による対象ペプチドの捕捉と夾雑成分の洗浄除去、安定同位元素標識ペプチドを内標準として用いる同位体希釈法による定量性を検証する。

3. 研究の方法

測定対象ペプチドとして、高血圧症など各種心血管系疾患と深く関わるアンジオテンシン類をとりあげ、本方法論の基盤となる以下の検討を行った。すなわち、(1)安定同位元素標識ペプチドの調製法、(2)市販のELISA用抗体を用いた対象ペプチド群捕捉の検討および、(3)MALDI-TOF/MSによる検出条件、定量性の検討を行った。



(1) 安定同位元素標識ペプチドの調製

内標準物質として用いる安定同位元素標識ペプチドの調製は、標識アミノ酸誘導体を用いたペプチド合成が一般的であるが、本研究では調製コストの低減の観点から、 ^{18}O 標識水中でのエステル加水分解による標識法を検討した。対象ペプチドにはアンジオテンシン II (配列: DRVYIHPF)を用い、本ペプチドの2つのカルボキシル基への ^{18}O 導入を行った。アンジオテンシン II を ^{18}O 標識水に溶解し、3%塩酸メタノールと混合し、 37°C でインキュベートした。 ^{18}O 標識水とメタノールの混液中での酸触媒によるエステル化と加水分解の平衡反応を利用することで、反応途中で生成物を単離することなく標識反応を行った。 ^{18}O 導入率を測定は、経時的に採取した反応液の一部を逆相分配 HPLC により精製後、MALDI-TOF/MSにより行った。なお、測定は正イオン検出モードで行い、マトリクスには α -CHCA を用いた。

(2) 抗体による対象ペプチド群捕捉の検討

ELISA 用抗体として市販されている抗アンジオテンシン II 抗体を用い、アンジオテンシン類縁ペプチドに対する抗体の特性を評価した。検討には、市販のウサギ抗ヒトアンジオテンシン II 抗体を用い、試料としてアンジオテンシン II 並びにその類縁体を含むペプチド混合物を用いた。まず、対象ペプチドに対する結合特性を確認する目的で、競合 ELISA 法により各類縁ペプチドの交差反応性を評価した。次いで、抗体を活性化アガロースゲルに固定化し、対象ペプチドの捕捉条件並びに特異性を精査し、ELISA における交差反応性との比較を行った。また、対象ペプチドが抗体よりも過剰な条件で競合的に結合させた場合及び、抗体が過剰な条件で非競合的に結合させた場合の捕捉の様相も併せて検討した。

さらに、健康な成人の血清を用い、これに上記ペプチド混合物を添加した試料を用い、血清中の対象ペプチド捕捉時における夾雑成分の影響を検討した。実験は、抗体固定化ゲルを充填したカラムに血清添加試料を負荷し、洗浄液を通導し夾雑成分を溶出した後、抗体に捕捉されたペプチドを溶出し、UV 検出 HPLC により分析した。

(3) 検出条件ならびに定量性の検討

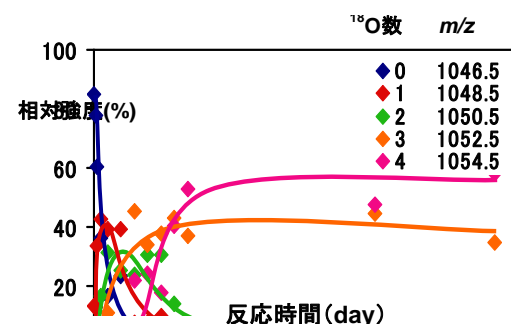
抗アンジオテンシン II 抗体を物理的または化学的に固定化し、抗体の結合活性の保持およびバックグラウンドシグナル低下の観点から固定化、ブロッキング条件を検討した。さらに、抗原捕捉、洗浄の諸条件を検討するとともに、各種マトリクスを用いて MALDI 法におけるイオン生成条件に検討を加えた。抗体の固定化基材には、ウェスタンブロット

用の PVDF 膜あるいは、ガラス板を用いた。これらに抗体を固定化後、導電性の両面粘着テープでステンレス製の MALDI サンプルプレートに貼付した。MALDI-TOF/MS による測定は、正イオン検出および負イオン検出の両モードで行い、抗体により捕捉された対象ペプチドのイオン化の様相を精査した。定量性の検討は、種々の濃度のアンジオテンシン II を内標準物質である ^{18}O 標識アンジオテンシン II と共に抗体を固定化した PVDF 膜あるいは、ガラス板に添加後、 4°C で一時間インキュベートし、それぞれ洗浄操作の後、マトリクスを添加し MALDI-TOF/MS により分析した。

4. 研究成果

(1) 安定同位元素標識ペプチドの調製

^{18}O 標識水とメタノールの混液中、塩酸触媒でのエステル化・加水分解の平衡反応を利用することにより、アンジオテンシン II 1 分子あたり最大 4 個の ^{18}O を導入可能であった。また、この反応により調製した ^{18}O 標識アンジオテンシン II 中に非標識体は検出されなかった。これが内標準物質として十分に使用可能であることが確認された。また、標識率の経時変化から、 ^{18}O 導入は、7 日間でほぼ平衡に達することが示された。

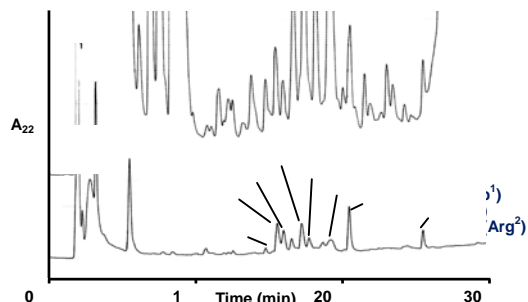


さらに、 ^{18}O 導入部位を確認するため、調製した標識アンジオテンシン II を MALDI-TOF/MS によるポストソース分解分析に付したところ、C 末端ならびにアスパラギン酸側鎖のカルボキシル基であることが確認された。これにより、簡便な操作でペプチド中のカルボキシル基をターゲットとした安定同位元素標識が可能であることが示された。

(2) 抗体による対象ペプチド群捕捉の検討

競合 ELISA により抗アンジオテンシン II 抗体の結合特性を精査したところ、共通の部分アミノ酸配列を有した各種類縁ペプチドに対し交差反応性を示すことが判明した。また、抗体の結合容量を上回るペプチド混合物を添加した場合には、交差反応性の高いペプチドが捕捉される一方、過剰量の抗体を用い

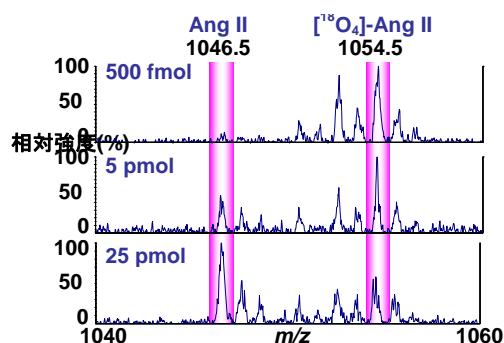
た場合には、比較的交差反応性の低いペプチドをも捕捉可能であった。血清添加試料を用いて夾雑成分の影響を検討した結果、血清添加による特異性の変化は認められず、多量の夾雑成分の影響を受けることなく、類縁ペプチドを群特異的に捕捉可能であることが示された。



この結果から、交差反応性を活用することにより、各ペプチドに対応する複数種の抗体を固定化することなく、類縁ペプチドを対象とした同時多成分スクリーニング可能であると考えられた。

(3) 検出条件ならびに定量性の検討

各種マトリクスを用いて、抗体により捕捉したアンジオテンシン II の検出条件を検討した結果、マトリクスに α -CHCA を用い、正イオン検出モードで行う時に、シグナル強度及び S/N とともに最も良好な結果を与えた。また、抗体結合基材としてガラス板を用いる時、PVDF 膜を用いた場合に比し、結合容量は低下するものの、MALDI-TOF/MS において安定してイオンが生成する傾向にあった。また、アンジオテンシン II の添加量に依存的なシグナル強度比の増大が確認され、 ^{18}O 標識ペプチドを用いた内標準法により、定量的な分析が可能であることを示した。



また、抗体固定化密度の検討により、実用域の感度を得るためには、結合活性を保持した有効な抗体の結合容量増大が必要であることが判明した。本法は、感度や精度面に未だ改善の余地はあるものの、今後、抗体の固定化方法などに詳細な検討を加えることで、より高精度な定量が可能になると考えられる。

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 3 件)

1. Tomoyuki Oe, Masamitsu Maekawa, Ryo Satoh, Seon Hwa Lee and Takaaki Goto; Combining [$^{13}\text{C}_6$]-phenylisothiocyanate and the Edman degradation reaction: a possible breakthrough for absolute quantitative proteomics together with protein identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (2010) **24**, 173-179. (査読有)
2. Seon Hwa Lee, Takaaki Goto and Tomoyuki Oe; A novel 4-oxo-2(*E*)-nonenal-derived modification to angiotensin II: Oxidative decarboxylation of N-terminal aspartic acid. *Chem. Res. Toxicol.*, (2008) **21**, 2237-2244. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. Takaaki Goto, Shota Kojima, Seon Hwa Lee and Tomoyuki Oe; Novel Strategy to Screen Various Chemical Modifications on a Target Peptide: Combination of Group-Specific Immunoaffinity Extraction and Mass Spectrometry. 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2 June 2009, Philadelphia, PA, USA.
2. 小島昌太、後藤貴章、李 宣和、大江知行 生体試料中化学修飾ペプチドの分別分析を目的とした群特異的イムノアフィニティ抽出法、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26 日、京都

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：