

## 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 5月31日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21710070

研究課題名（和文） 表面促進レーザー脱離イオン化質量分析法を応用した新規有害物質生物  
検定法の開発研究課題名（英文） Developing a novel bioassay method using surface-enhanced laser  
desorption/ionization mass spectrometry for detecting toxic materials.

研究代表者

青木 元秀（AOKI MOTOHIDE）

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30418917

研究成果の概要（和文）：表面エンハンス型レーザー脱離イオン化質量分析（SELDI-MS）法を、環境中の有害物質を特定する手段として応用し、化学物質のリスク評価管理の効率的な実施に資する技術へと発展させることを目的に技術開発を行った。SELDI-MS法により環境指標生物である微細藻類のタンパク質組成の有害物質に対する応答パターンを収集する手法を確立し、これにより得られた有害物質に対するタンパク質組成変化パターンから新規の有害物質検定バイオマーカーを検出可能であることを実証した。

研究成果の概要（英文）： For more effective and efficient chemical risk management, a novel bioassay method for detecting toxic materials in the environment using surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry (SELDI-MS) was developed. The established SELDI-MS protocol for collecting the response patterns to toxic materials in the protein profile of microalgae as a biological indicator of environment allows to efficiently searching for biomarkers responding to toxic materials and to detecting the hazardous substances.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境分析、質量分析法、環境評価、バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

重金属、変異原（発癌性）物質や内分泌攪乱（ホルモン類似作用）物質などの生態系破壊を引き起こす一連の環境汚染物質群は、主に工業排水や燃焼生成物を汚染源として水圏や土壌、大気環境中に放出される。有害物質による環境汚染が発生した際には、汚染の環境影響を評価し、汚染に対する最適な除染法を決定するために、その汚染物質を正確かつ迅速に特定することが必要不可欠である。従来、特定の環境汚染原因物質は、定性分析、

元素分析や各種クロマトグラフィーなどの分析化学的な試験や分析を通じて、同定、定量する方法が主として用いられてきた。これらの方法では、一般に各種の試験に必要なとされる量の分析試料を得るために、分析対象成分毎に溶媒抽出や誘導体化をはじめ少なくとも半日を要する煩雑な試料の前処理が必要となるものの、精度良く分析対象物質の同定、定量が可能となっている。しかしながら被疑物質が広範にわたる時には、それらの中から環境汚染原因物質を特定するのに、場合

によっては数日間から数カ月間におよぶ分析作業が必要であったり、分析者にかんがりの専門的な知識や経験が要求されたりするといった問題がある。

上述した分析化学的手段の問題点を補完し、未知の環境汚染物質の特定を迅速かつ簡便に行うことができる実用的な環境汚染物質のモニタリング手段として、バイオアッセイ（生物検定）法が挙げられる。バイオアッセイ法は、微生物や培養細胞および生物個体の化学物質に対する応答を利用して化学物質の作用を検出・定量する方法である。これを用いれば、煩雑な試料前処理を行うことなく、構造が未知であっても生理活性から化学物質の定量化が可能である。一方で、既存の手法は様々な有害物質の生理作用を一斉に検出することは難しく、検知対象物質毎に適切なアッセイ法を選択する必要がある。そこで、新たなバイオアッセイ手法の開発が望まれていた。表面エンハンス型レーザー脱離イオン化質量分析（SELDI-MS）法は、生体成分を一斉に高感度で検出可能なプロテオーム解析手段であり、医科学分野でタンパク質疾病バイオマーカーの開発などに多数の実績を挙げている。その分析手法は環境中の有害物質を特定する手段として応用可能であると考えられる。しかしながら、同法を環境中の有害物質の同定法として評価した先行研究はなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、新規に SELDI-MS 法を化学物質の環境モニタリングに適用して、環境指標生物のモデルとして微細藻類のタンパク質組成における既知の有害物質への応答パターンを収集して、環境バイオマーカー（生体指標）を探索し、その実用性を評価する。本研究の最終目標は、環境指標生物において既存の主な有害物質にたいする応答を SELDI-MS 法によりそのパターンを解析して、環境中の有害物質の同定方法として SELDI-MS 法を発展させることである。また、環境汚染物質が微細藻類におよぼす影響について、バイオマーカータンパク質を同定することによりそのメカニズムを解明する為の基礎的な知見を提供することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 生物試料と培養

環境評価生物のモデルとする微細藻類として、全ゲノム配列が公開されているラン藻 *Synechocystis* PCC6803 を用いた。細胞は BG-11 液体培地を用いて、34°C、30  $\mu\text{Ein}/\text{m}^2\text{s}$  の照射条件下で振盪培養を行なった。細胞の生育は 730 nm の濁度測定によりモニターした。

### (2) タンパク質の抽出と分画前処理

細胞からのタンパク質抽出にはビーズ破砕法を用いた。遠心分離回収した細胞をタンパク質抽出バッファー [1M Urea, 50 mM Tris-HCl pH8, 0.2% CHAPS] に懸濁して、 $\phi 0.1$  mm ジルコニアビーズを加えて、4°C で 20 分間攪拌することにより破砕した。細胞残渣を 20,000  $\times g$  で 15 分間の遠心分離により除き、粗抽出タンパク質試料とした。

タンパク質の分画前処理にはスピンカラム不連続分画法を用いた。強イオン交換樹脂（UNOsphere Q, BIO-RAD）を充填したマイクロスピカラムに粗抽出タンパク質試料を注入し、4°C で 30 分間、振盪しながらインキュベートすることにより、タンパク質を樹脂に吸着させた。カラムに吸着したタンパク質は、pH9 から pH3 までの 5 段階の緩衝液系列 [buffer 1: 50 mM Tris-HCl pH9, 0.1% OGP, buffer 2: 50 mM HEPES-NaOH pH7, 0.1% OGP, buffer 3: 100 mM sodium acetate pH5, 0.1% OGP, buffer 4: 100 mM sodium acetate pH4, 0.1% OGP, buffer 5: 50 mM sodium citrate pH3, 0.1% OGP] で溶出した後に、有機溶媒 [33%イソプロパノール, 17%アセトニトリル, 0.1%取りフルオロ酢酸] でさらに溶出することにより分画した。

### (3) SELDI-MS によるタンパク質組成プロファイリング

試料中のタンパク質は、SELDI-MS 法によりプロファイルした。SELDI 用の残留クロマトグラフィーチップ（プロテインチップ）として、表面化学修飾が異なる弱陽イオン交換チップ（CM10, BIO-RAD）および固定化金属相互作用チップ（IMAC30, BIO-RAD）を準備した。CM10 チップを用いたプロファイリングでは、100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH4 中でタンパク質試料をチップに吸着させた。IMAC30 チップを用いたプロファイリングでは、チップには予め銅イオンの固定化処理を施して銅イオンとの親和性を持たせた後に、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7 中でタンパク質を吸着させた。タンパク質の吸着したチップは緩衝液で濯ぎ、さらに超純水で濯ぎ脱塩して乾燥した後に、レーザーイオン化マトリックスとしてシナピン酸（SPA）飽和 50%アセトニトリル溶液 1  $\mu\text{L}$  をサンプルスポットに 2 回添加し乾燥させた。チップ上のタンパク質の質量スペクトルはプロテインチップリーダー（PCS3000, BIO-RAD）を用いて、Matrix attenuation 250D、sampling rate 400 MHz の条件で取得した。

### (4) プロファイルデータの解析とバイオマーカー探索

取得された質量スペクトルは、ProteinChip software Ver. 3.2 (BIO-RAD) および Biomarker Wizard software Ver. 3.1 (BIO-RAD) を用いて解析し、そのプロファイ

ルから特徴的な質量ピークを探索した。

#### 4. 研究成果

##### (1) タンパク質プロファイリング条件の検討

有害物質に対するタンパク質組成変化パターンを特徴づける上で、検出可能なタンパク質の数を最大化することが重要である。SELDI-MS法では、質量スペクトル中のピーク数をより多くとらえることが可能となる様に解析対象生物種ごとに最適なプロファイリング条件を見いだす必要がある。そこでラン藻 *Synechocystis* PCC6803 のタンパク質プロファイリング条件を変えたときの質量スペクトルの特徴と質量ピーク数について検討を行った。

##### ① プロテインチップ表面修飾の違いが微細藻類タンパク質量スペクトルに与える影響

*Synechocystis* PCC6803 の粗抽出タンパク質を弱陽イオン交換チップおよび銅固定化金属相互作用チップを用いて低質量側 (1500-15000 m/z) のプロファイリングを行った結果を図1に示した。同じタンパク質粗抽出試料をプロファイリングしたにもかかわらず、用いたチップの表面修飾が変わることによって質量スペクトルが大きく変化し、CM10 と Cu-IMAC30 チップでそれぞれ 73 本と 48 本の明確なピークが認められた (表1)。また、検出された質量ピークの内およそ9割が異なる質量を持つタンパク質に由来していることが明らかとなった。すなわち、タンパク質プロファイリングに用いるチップの表面修飾の種類を変えることで、*Synechocystis* PCC6803 のタンパク質発現量変化をより多くとらえることができることが示された。

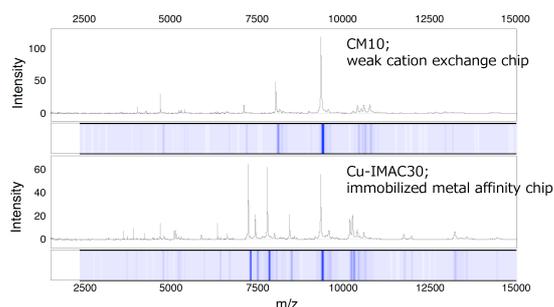


図1 *Synechocystis* PCC6803 の粗抽出タンパク質の質量スペクトル 粗抽出タンパク質を (A) 弱陽イオン交換チップ (CM10) および (B) 銅固定化金属相互作用チップ (Cu-IMAC30) を用いて SELDI-TOF MS にてプロファイリングを行った。

##### ② タンパク質分画前処理が質量スペクトル中の検出ピーク数に及ぼす影響

粗抽出タンパク質のプロファイリング時に得られる質量スペクトル中では、質量が近

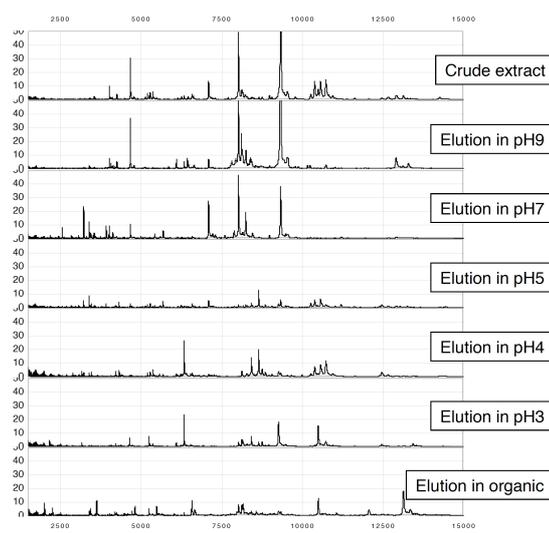


図2 分画前処理したタンパク質のプロファイル *Synechocystis* PCC6803 の粗抽出タンパク質を Q 強陰イオン交換マイクロスピナラムもちいて pH 緩衝液系列および有機溶媒で溶出して分画し、各分画を弱陽イオン交換チップ (CM10) を用いて SELDI-TOF MS にてプロファイリングを行った。

接しており分離が不完全なタンパク質が同一のピークとして認識される可能性がある。その結果バイオマーカーの見落としや混同が発生することが予見された。そこで、タンパク質をプロファイリング前に分画することで、より多くのタンパク質に由来するピークシグナルの検出が可能になるかを検討した。タンパク質の分画には、ヒト血清のタンパク質分画で実績のある Q 強陰イオン交換樹脂カラムを用いる系を用いた。pH9 から pH3 までの5段階の緩衝液系列および有機溶媒で分画した *Synechocystis* PCC6803 のタンパク質を CM10 チップでプロファイリングした結果を図2に示した。隣り合う画分の質量スペクトル中には同一のタンパク質由来だと推定されるピークシグナルが一部認められるが、分画処理を施すことにより粗抽出サンプルのプロファイルでは検出されなかった新たなピークシグナルが各分画サンプルのスペクトル中に数多く認めることが可能になった。この結果、検出されるピークシグナル数は CM10 の低質量側スペクトル中だけでも 73 本からのべ 422 本へと大幅に拡大した (表1)。画分間の重複を除いても粗抽出試料で検出可能なピーク数に比べ

表1 分画前処理が検出ピーク数に与える影響  
Low: 1500-15000 m/z, High: 10000-25000 m/z

	Number of Peak Clusters			
	CM10 pH4		Cu-IMAC30	
	Low	High	Low	High
Crude	73	40	48	-
Fraction 1	56	36	44	-
Fraction 2	66	27	61	-
Fraction 3	83	32	62	-
Fraction 4	79	21	61	-
Fraction 5	66	20	52	-
Fraction 6	72	30	34	-

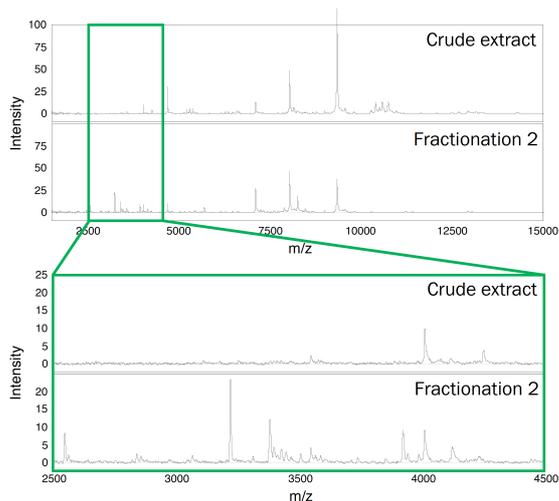


図3 分画前処理が低存在量タンパク質の質量スペクトルに与える影響 (A and C)粗抽出、および(B and D)強陰イオン交換カラム分画の第2画分のサンプルを弱陽イオン交換チップ(CM10)を用いてプロファイリングした。

ておよそ4倍に増加させることが可能となった。特にタンパク質の分画前処理は低存在量タンパク質の検出力を大幅に強化することが質量スペクトル解析の結果から明らかとなった(図3)。この効果は、低存在量タンパク質中のバイオマーカーを探索する上で非常に有効に働くものと考えられた。また、どの画分にタンパク質ピークが検出されたのかという情報は、タンパク質の等電点や疎水性と密接に関連があり、検出されたバイオマーカーを精製する際に有用となる。

以上の様に、SELDI-MSによる*Synechocystis* PCC6803 タンパク質のプロファイル手法を標準分析法として確立した。

## (2) ストレスバイオマーカーの探索

開発された SELDI-MS 法による *Synechocystis* PCC6803 のタンパク質プロファイリング方法を用いて、重金属ストレスに応答するタンパク質の探索を試みた。はじめに標準分析法に従って、六価クロムに対する応答プロファイルを収集した。コントロールと六価クロム曝露した細胞から2連で抽出したタンパク質について、それぞれ分画して SELDI-MS 法によりプロファイリングした。第4画分(pH4)をCM10チップを用いてプロファイリングしたときの低質量側の質量スペクトルの解析例として示した(図4)。2連で取得したスペクトルは非常に良く一致しており、再現性よく定量が可能であることが示された。図4Bでコントロールと六価クロム曝露したサンプルの拡大した質量スペクトルを見ると、ストレスにより発現量が増加したタンパク質のシグナル(赤マーカー)を捉えることに成功している。さらにこのときのピークシグナル強度をコントロールと比較して、Log<sub>2</sub> Normalized Intensity

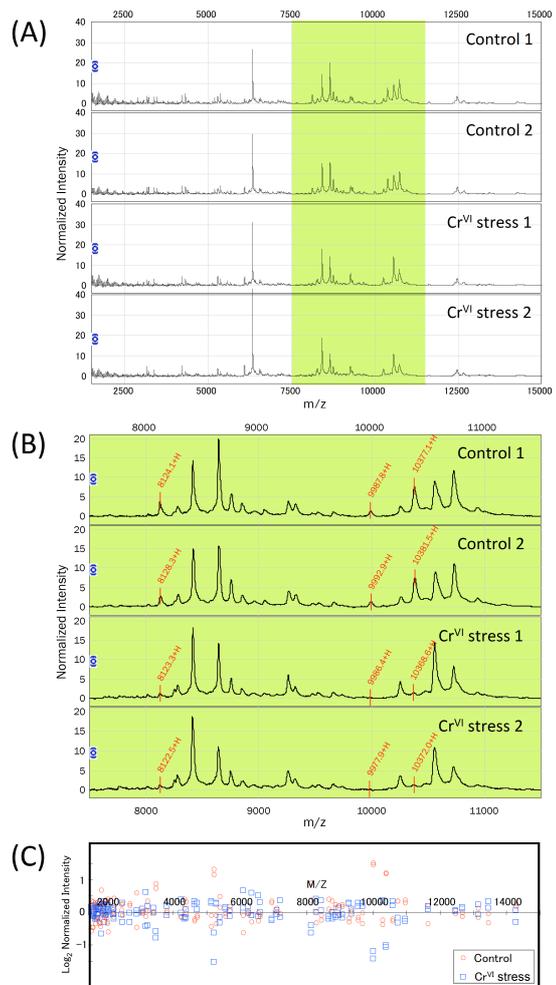


図4 *Synechocystis* PCC6803 の六価クロムバイオマーカーの探索解析例 分画前処理サンプルの第4画分を弱陽イオン交換チップ(CM10)でプロファイリングした(2連)。(A)1500-15000 Daの質量ピーク強度の変化からバイオマーカー候補の抽出を行なった。

plotとして示したものが図4Cである。このプロット方法を用いることで試料中のタンパク質組成の差異を効率的に見いだすことが容易になっている。この様にして各画分のタンパク質プロファイルから六価クロムを検出可能な環境指標バイオマーカーの候補を探索したところ、発現量が増加するものと

表2 *Synechocystis* PCC6803 から見いだされた六価クロム検出バイオマーカーの数 ストレス条件で生育した細胞のタンパク質を弱陽イオン交換チップ(CM10)および銅固定化金属相互作用チップ(Cu-IMAC30)を用いて SELDI-TOF MSにてプロファイリングし、発現量が増加するピークを検出した。

	Number of specific peaks			
	CM10 pH4		Cu-IMAC30	
	Up	Down	Up	Down
Crude	12	5	1	1
Fraction 1	3	5	6	0
Fraction 2	0	2	5	0
Fraction 3	0	4	0	5
Fraction 4	0	5	4	5
Fraction 5	3	1	0	3
Fraction 6	5	6	0	0
Total	23	28	16	14

(Threshold, log<sub>2</sub> > 0.5)

して 39 個、減少するものとして 42 個を見出すことができた (表 2)。

今回のバイオマーカー探索例で示した様に、タンパク質分画前処理を組み合わせた SELDI-MS によるタンパク質プロファイル解析方法は、微細藻類のタンパク質組成を定量的に評価して、バイオマーカーを探索する上で、非常に効率的な方法であることが実証された。本法は特に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法では検出感度が低下する 25 kDa 以下のタンパク質領域におけるバイオマーカーを感度よく検出することが可能であることから、有害物質生物検定において有用な新規のバイオマーカーを数多く発見できる可能性を秘めていると思われる。

#### 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 4 件)

- ① M. Aoki, H. Matsumoto, T. Takahashi, K. Sato, H. Kumata, K. Fujiwara, Thallium induces morphological changes in the photosynthetic apparatus of *Synechocystis* sp. PCC6803, Proceedings of 15th International Congress on Photosynthesis, Beijing, China 2010, 査読無, in press.

[学会発表] (計 18 件)

- ① 青木元秀、藤原祺多夫、SELDI-MS を用いたシアノバクテリアの環境ストレスバイオマーカーの探索、第 53 回日本植物生理学会年会、2012/03/16-18、京都産業大学
- ② 高尾有希乃、青木元秀、熊田英峰、藤原祺多夫、低 pH 条件における三価クロム曝露はクロレラの葉緑体膜の異常を引き起こす、第 53 回日本植物生理学会年会、2012/03/16-18、京都産業大学
- ③ K. Takenaka, A. Kikuchi, M. Aoki, H. Kumata, K. Fujiwara, Gene expression analyses of putative chromate transporters and stress response factors under chromate exposure condition in a cyanobacteria, 11th European Meeting on Environmental Chemistry, 2010/12/8-11, Portoroz, Slovenia
- ④ H. Matsumoto, M. Aoki, T. Takahashi, K. Sato, H. Kumata, K. Fujiwara, Thallium induces morphological changes in the photosynthetic membrane of *Synechocystis* sp. PCC6803, 15th International Congress of Photosynthesis, 2010/8/22-27, Beijing, China

- ⑤ T. Takahashi, M. Aoki, K. Fujiwara, Analysis of proteins responded to thallium exposure in *Synechocystis* sp. PCC6803, 10<sup>th</sup> European Meeting on Environmental Chemistry, 2009/12/2-5, Limoges, France
- ⑥ N. Sa-ai, M. Midorikawa, M. Aoki, K. Fujiwara, Toxicity of cobalt complex isomers to micro-algae, 10<sup>th</sup> European Meeting on Environmental Chemistry, 2009/12/2-5, Limoges, France
- ⑦ 高橋達矢、末松仁、青木元秀、熊田英峰、藤原祺多夫、*Synechocystis* sp. PCC6803 におけるタリウムストレス応答タンパク質の解析、日本植物学会第 73 回大会、2009/9/18-20、山形大学

[その他]

ホームページ等

<http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~aoki/seldi/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 元秀 (AOKI MOTOHIDE)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30418917