

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07877

研究課題名(和文) 乾燥ろ紙血を用いた疾患原因蛋白質の一斉検出法の開発

研究課題名(英文) Development of detection method for multiple disease-causative proteins using dried blood spots

研究代表者

中島 大輔(Nakajima, Daisuke)

公益財団法人かずさDNA研究所・ゲノム事業推進部・研究員

研究者番号：30370935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：炭酸ナトリウム沈殿法を用いた乾燥ろ紙血からの蛋白質抽出を検討し高深度プロテオーム解析に適したサンプル調製法を確立した。また、乾燥ろ紙血から抽出した蛋白質の解析に特化したLC-MS条件を整えた。その結果、1検体1測定で乾燥ろ紙血から1,000以上の疾患原因蛋白質を含む3,000以上の蛋白質を同定・定量することができた。更に、疾患原因蛋白質の定量に必要な38種類の安定同位体標識ペプチドを大腸菌由来の無細胞発現系と多重共発現系を組み合わせで一斉に作成できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児スクリーニングは先制医療としてその重要性を増している。しかしながらターゲットとなる代謝物や酵素をそれぞれ個別の方法で検出しているため検査項目が増えるにつれコストや時間が嵩むという問題を抱えている。本研究で確立した炭酸ナトリウム沈殿法を用いた乾燥ろ紙血由来の蛋白質濃縮法を用いれば1,000以上の疾患原因蛋白質を含む3,000以上の蛋白質を同定・定量することができる。これにより安価で迅速かつ網羅的な新生児スクリーニング法の開発が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Protein extraction from dried blood spots using the sodium carbonate precipitation method was investigated and a sample preparation method suitable for deep proteome analysis was established. We have also established LC-MS conditions specifically for the deep analysis of proteins extracted from dried blood spots. As a result, more than 3,000 proteins, including more than 1,000 disease-causing proteins, could be identified and quantified from dried blood spots by one shot LC-MS analysis. Furthermore, we have confirmed that 38 stable isotope-labelled peptides required for the quantification of disease-causing proteins can be produced cheaply and simultaneously by combining a cell-free expression system from E. coli with a multiplex co-expression system.

研究分野：胎児医学および小児育成学関連

キーワード：乾燥ろ紙血 新生児スクリーニング プロテオーム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新生児スクリーニングは先制医療としてその重要性を増している。しかしターゲットとなる代謝物や酵素をそれぞれ個別の方法で検出しているため検査メニューが増加するにつれコストや手間暇が嵩むという問題を抱えている。乾燥ろ紙血は被験者への負担が小さく輸送や保存も常温できることから新生児スクリーニングに適している臨床検体である。もしこの乾燥ろ紙血から疾患原因タンパク質が一斉に検出できればコストや手間暇の問題を解決できると考えられるが、乾燥ろ紙血を用いたタンパク質の一斉解析による臨床検査は国内外でほとんど行われていない。その原因は血液の99%を占める高含有タンパク質による疾患原因タンパク質を含む微量タンパク質の検出阻害効果にある。血液中のタンパク質の濃度はダイナミックレンジが 10^{10} 以上に及び、ヘモグロビン、アルブミン、免疫グロブリン、トランスフェリン、フィブリノーゲンなどに代表される数10種類の高含有タンパク質が血液タンパク質全体の99%を占めていることが知られている。そのため、疾患に關与する微量なタンパク質がこれらの高含有タンパク質により検出阻害され検出が困難である。実際に他グループによる乾燥ろ紙血を用いた最新の報告でもタンパク質同定数は350程度に留まっておりにそこには疾患原因タンパク質はほとんど含まれていなかった。一般的に高含有タンパク質の除去についてはそれらに特異的な抗体が用いられているが高価であり特異性や製造の安定性に問題があった。

2. 研究の目的

乾燥ろ紙血からできるだけ多くの疾患原因タンパク質を検出するため、より安価かつ簡便に血液中の高含有のタンパク質を除去する方法の開発を目指した。血液中のタンパク質の物性に着目したところ、ヘモグロビン、アルブミン、免疫グロブリン、トランスフェリン、フィブリノーゲンなどの血液中の高含有タンパク質は比較的親水性が強く、疾患の原因タンパク質となる膜タンパク質などの血球由来するタンパク質は比較的疎水性が強いことに気が付いた。安価で一般的な化学試薬である炭酸ナトリウムは古典的に膜タンパク質の抽出に利用されてきたが膜タンパク質のような疎水性が強いタンパク質を不溶化させ、親水性が強いタンパク質はよく溶かす性質をもつ。この性質をうまく利用すれば血液中に高含有の親水性タンパク質を簡便に除去できると考えた。また、申請者等は一般的に行われているデータ依存性解析(DDA)よりも感度や定量性が優れるデータ非依存性解析(DIA)を用いたMSMS取得法に着目し、分析パラメータの最適化やデータ解析に必要な独自のプロテイン-ペプチドライブラリーを構築することにより、基準サンプルであるヒト由来の培養細胞HEK293の抽出物からこれまで3,000程度であったタンパク質同定数を8,000を越えるまで飛躍的に引き上げることに成功している[Kawashima Y, Watanabe E, Umeyama T, Nakajima D, et al., (2019) International Journal of Molecular Sciences 26;20(23):5932]。この最先端のプロテオーム解析技術を用いれば、世界トップレベルの乾燥ろ紙血の高深度プロテオーム解析が実現すると考えた。更に臨床検査に応用する上で検査対象の疾患原因タンパク質を正確に定量する必要があるが、定量にはそれぞれのタンパク質に対応した濃度既知の安定同位体標識した内部標準ペプチドが必要となる。これを化学合成すると膨大な時間とコストがかかるため、迅速性と低コストが常に求められる新生児スクリーニングにおいては大きな問題となる。申請者等が開発した大腸菌由来の無細胞発現系を利用すれば多種類の安定同位体標識した内部標準ペプチドが低コストで迅速に一斉作成出来るようになり検査応用が加速すると考えた。

3. 研究の方法

(1)令和3年度～令和4年度前半は炭酸ナトリウム溶液を用いたタンパク質抽出を検討し高深度プロテオーム解析に適したサンプル調製法を確立する。炭酸ナトリウム溶液は親水性が強いヘモグロビン・アルブミン・免疫グロブリン・トランスフェリン・フィブリノーゲンなどの高含有タンパク質は溶かす一方、診断に利用できる血球由来の膜タンパク質などの疎水性タンパク質は不溶化することが可能である。各操作を最適化し簡便かつ効果的なプロトコルを完成させる。

(2)令和3年度後半～令和4年度は乾燥ろ紙血から抽出したタンパク質に特化した高深度プロテオーム解析法を開発を行う。血液タンパク質はこれまで解析してきた培養細胞や生体組織とタンパク質の種類や濃度のダイナミックレンジが大きく異なるためシステムを再構築する必要がある。LC-MSのLCシステムについては、カラム充填剤の種類、カラム長、流速などを最適化する。MS部分についてはより多くの乾燥ろ紙血タンパク質を観測する為のデータ非依存性解析法(DIA法)のMSレンジ、Isolation window幅、フラグメントイオンの蓄積時間などのパラメーターやノイズ除去の為にイオンモビリティの電圧条件を最適化する。さらに人工知能を用いたプロテイン-ペプチドライブラリーの構築やターゲットタンパク質をより高感度に検出するためのparallel reaction monitoringあるいはmultiple reaction monitoring分析用のデータベースを作成する。最終的に1検体1測定により乾燥ろ紙血から500以上の疾患原因タンパク質を含む3,000以上のタンパク質の同定・定量することを目指す。

(3)令和4年度後半から令和5年度は疾患原因タンパク質の定量に用いる安定同位体標識ペプチドを作成する。大腸菌由来の無細胞発現系と多重共発現系を組み合わせただけ多種類の安

定同位体標識ペプチドを一斉に作成する。最後に乾燥ろ紙血から抽出したタンパク質にスパイクインし、実際に疾患原因タンパク質が精度よく安定的に定量できることを確認する。研究代表者の中島大輔は(1)の課題に主として取り組むと共に全ての研究およびその総括を担当、研究分担者のかずさ DNA 研究所の川島祐介は(2)を担当する。大腸菌を用いた標準ペプチド多重共発現系を磨いてきた研究協力者の太陽日酸株式会社の横山順は(3)を担当し、もう一人の研究協力者である佐藤裕範は小児科専門医としての立場からスクリーニング対象となる疾患原因タンパク質の選抜ならびに検査手順書の整備を担当する。

4. 研究成果

(1)令和3年度～令和4年度前半は炭酸ナトリウム溶液を用いたタンパク質抽出を検討し高深度プロテオーム解析に適したサンプル調製法を確立した。各操作を最適化し簡便かつ効果的なプロトコルを完成させた。

(2)令和3年度後半～令和4年度は乾燥ろ紙血から抽出したタンパク質に特化した高深度プロテオーム解析法の開発を行った。血液タンパク質はこれまで解析してきた培養細胞や生体組織とタンパク質の種類や濃度のダイナミックレンジが大きく異なるためシステムを再構築する必要があった。LC-MSのLCシステムについては、カラム充填剤の種類、カラム長、流速などを最適化し、MS部分についてはより多くの乾燥ろ紙血タンパク質を観測する為のDIA法のMSレンジ、Isolation window幅、フラグメントイオンの蓄積時間などのパラメーターやノイズ除去の為のイオンモビリティの電圧条件を最適化した。最終的に1検体1測定により乾燥ろ紙血から1,000以上の疾患原因タンパク質を含む3,000以上のタンパク質を同定・定量することができた。

(3)令和4年度後半から令和5年度は疾患原因タンパク質の定量に用いる安定同位体標識ペプチドを作成した。13種類の疾患関連タンパク質由来の38種類のペプチドを大腸菌由来の無細胞発現系と多重共発現系を組み合わせ一斉に作成し、12種類の疾患関連タンパク質由来の33種類が検出できることを確認した。実際にヒトの乾燥ろ紙血から抽出したタンパク質にスパイクインし疾患原因タンパク質が精度よく安定的に定量できることを確認した。検出できなかったペプチドについてはタンパク質の発現レベルが低い、あるいはイオン化効率の良いペプチド候補がなかったことなどが原因である。

本研究を開始した時点において他グループによる乾燥ろ紙血を用いたタンパク質同定数は350程度に留まっておりにそこには疾患原因タンパク質はほとんど含まれていなかったが、本研究により1検体1測定により乾燥ろ紙血から1,000以上の疾患原因タンパク質を含む3,000以上のタンパク質を同定・定量することができた。本研究の成果により乾燥ろ紙血を用いたタンパク質の一斉解析による新たな新生児スクリーニング法の開発が加速すると考えられる。研究成果については論文発表や学会発表で公表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawashima Yusuke, Ishikawa Masaki, Konno Ryo, Nakajima Daisuke, Ohara Osamu	4. 巻 22
2. 論文標題 Development of a Simple and Stable NanoESI Spray System Using Suction Wind from the MS Inlet	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 1564 ~ 1569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.3c00146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Daisuke Nakajima, Osamu Ohara, Yusuke Kawashima	4. 巻 2420
2. 論文標題 Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry-Based Deep Proteome Analysis for Hydrophobic Proteins from Dried Blood Spots Enriched by Sodium Carbonate Precipitation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 39-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1936-0_4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Daisuke Nakajima, Osamu Ohara, Yusuke Kawashima	4. 巻 -
2. 論文標題 Toward proteome-wide exploration of proteins in dried blood spots using liquid chromatography-coupled mass spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proteomics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pmic.202100019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島 大輔、小原 収、川島 祐介
2. 発表標題 乾燥ろ紙血を対象とした高深度プロテオーム解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会 JHUP0第20回大会 JPrOS2022 (20th JHUP0)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島大輔、小原収、川島祐介
2. 発表標題 臨床プロテオミクスを目指した炭酸ナトリウム沈殿法を用いて調製した乾燥ろ紙血由来のタンパク質の簡便かつ高感度な解析法の開発
3. 学会等名 第70回質量分析総合討論会(2022)
4. 発表年 2022年

〔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	川島 祐介 (Kawashima Yusuke) (30588124)	公益財団法人かずさDNA研究所・ゲノム事業推進部・グループ長 (82508)	

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
---------	---------