

## 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25年6月28日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580353

研究課題名（和文） 自己抗体抗原の網羅的高感度検出によるBSE生前血清診断法の開発

研究課題名（英文） Highly Assay of Autoantigens in BSE Sera for a Diagnosis

## 研究代表者

横田 博 (YOKOTA HIROSHI)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：90137414

## 研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、BSE 血液中に逸脱する神経蛋白質を高感度に検出し、生前診断の一助にする事である。生体試料には類似する夾雑物が非常に多く存在するので、安定した結果を導き出すには夾雑物を予め出来る限り取り除くことが重要である。しかしながら、網羅的解析を行うためにはなるべく多種類の生体成分を同時に分析することも必要なことである。我々のこれまでの研究により、予め抗体を検出しておくことでターゲットを絞り込むことが出来る。そのために目的蛋白質に応じて生体試料の前処理法を工夫することが出来る。実際には、当研究室が開発した C8 および C6 固相カラムを用いたペプチド吸着の改良法を用いて、前年度特定された抗原蛋白質それぞれに関して添加回収試験を行い、吸着および溶出溶媒の検討を行い、高回収率で定量的な生体試料前処理法を確立し、LC-MS による高感度検出を可能にした。

## 研究成果の概要（英文）：

Our objective is to detect a serum biomarker Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) by the Selected Reaction Monitoring (SRM) of quadrupole MS analysis from a bovine serum. SRM conditions were determined from the data of MS/MS fragmentation and identification of the protein by data dependent MS/MS analysis of Q-pole MS. An additive GFAP was highly recovered by the preparation method using alkylation of the proteins and removal of the albumin from the sera. SRM methods reported in this study could identify protein and peptide with high selectivity and sensitivity, therefore this method was useful for screening of known proteins and peptides.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：BSE、生前診断、GFAP、血清蛋白質、質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

イギリス獣医学中央研究所より分与いただいた BSE 50 頭と BSE 疑似患畜 50 頭、さらに日本健康牛 1100 頭、ウシ鉛中毒牛 15 頭の血清およびイヌ脳炎脳脊髄液は既に本学生産動物外科学教室の鈴木一由准教授との共同研究により収集済みである。更に、今後その他種々の血清を収集している。ウシの病態毎の血清は当大学の臨床頭数が多いことによりどこよりも多く収集できている（協同研究者の鈴木らによる）。

**2. 分析技術と機器** --- 本研究の主分析技術であるウエスタンブロッティングと TOF-MS による BSE 血清蛋白質解析技術は既に当研究室研究員宮庄（連携研究者）や野村らにより成果を上げてきた（Nomura 2009, *Proteomics* 9, 4029）。さらに、試料前処理法と LC-MS 分析技術は当研究室研究生の前田（食肉科学研究所）が開発している。

## 2. 研究の目的

BSE はウシのみならず人への感染（変異型 CJD）が推察され、ウシの生前に血液診断出来るようになることが畜産や獣医臨床現場での安全を守る為に緊急に必要とされている。さらに、食品加工や流通現場においても残留血液を用いて二重のチェックが可能となり食品の安全性や担当者の保護の為に重要な意味を持っている。最近、様々な疾病において、障害を受けた臓器細胞の崩壊に伴い内在性蛋白質が血液中に逸脱し、その蛋白質に対する自己抗体が生じていることが分かってきた。そこで、自己抗体を高感度で検出できれば将来の疾患リスクを推し量る事が出来ると予測されている（Hal-Scotfield 2004, *Lancet*）。我々は BSE 血液中に神経蛋白質 GFAP の抗体およびその抗原を検出する事に成功した（Nomura ら, 2009 年 *Proteomics*）。そこで、BSE 血液中の自己抗体を網羅的高

感度ウエスタンブロッティングにより検出し、さらにその抗原を対象を絞って高性能四重極質量分析器を用いて検出/定量する。よって、従来の網羅的方法では絞り込めない BSE 特異的な自己抗体と抗原を検出定量し、診断することを可能とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 自己抗体の高感度検出

イギリス BSE 50 頭分の血清を一次抗体とし、二次抗体を用いたウエスタンブロッティング法により、ウシ神経細胞内蛋白質を細胞分画法により分離し、それぞれの蛋白質を抗原ライブラリーとして、自己抗体の網羅的高感度検出を行う。BSE 血清中におよそ 13 個の自己抗体候補（内 3 個は既に解析済み）を見出しているが、更に多くの抗原を検出する。その後、目的スポットを含んだゲルを切り出し、トリプシンによるゲル内消化後、TOF-MS を用い PMF 解析および MS/MS 解析し、抗原蛋白質を全て特定する。

### 2) 得られた抗原蛋白質の高感度検出

上記で特定された抗原蛋白質のみを質量分析機により選択的に効率よく検出定量する。従来は只網羅的に血清中発現蛋白質のピークを特定しプロファイルを作成し診断へ応用しようとしていたが、プロファイルのパターンの形状が多義にわたっているために到底診断への応用には適しなかった。本研究では、予め網羅的に抗体を検出しその抗原を特定することで、次に血液中からその抗原蛋白質つまりターゲットを絞り込むことが出来る。よって、高感度で確実に検出することができる。さらに、自己抗体の生じる機序を基礎とし、これまでの病態解析データを参考にして、抗原蛋白質の逸脱の病態との関連性も考察でき、確実な診断への応用できる。

1. 自己抗体の高感度検出 --- BSE 血清の自己抗体検出は従来法のウエスタンブロッティング法を更に改良

して、二次抗体を蛍光標識し、より高感度検出を行う。前項の図-1に示したように、BSE 血清中におよそ13個の自己抗体候補（内3個は既に解析済み）を見出している。

- LC-MS による目的蛋白質の高感度検出 --- 上記で特定された抗原蛋白質のみを四重極タンデム質量分析機により選択的に検出定量する。従来の網羅的蛋白質発現プロファイルでは病態の特徴が検出されにくかったが、予め抗体を用いてターゲットを絞り込むことによって、高感度で確実に検出できる。さらに、図-2の機序から病態との関連性も考察できる。

nano-LC MS により更に高感度網羅的解析の自動化 --- リニアイオンスペー法を用いた網羅的血液中蛋白質解析する。そのプロファイル結果と上記抗原蛋白質マップの結果から病態毎の特徴を導き出す。

#### 4. 研究成果

ウシの血液から血清を採取し、アルブミンなどの主要タンパク質の除去、還元アルキル化したのち、トリプシンによる溶液内消化を行い、LC MS/MS によるタンパク質の同定をおこなった。Fig. 1に示すように、一番目に高いpeakと二番目に高いpeakを自動的にMS MSにかけ測定した。Fig. 2にスタンダードGFAPの測定結果を示した。上位4つのペプチドからそれぞれ2つのプロダクトイオンを測定し、検出限界は1nMであった。

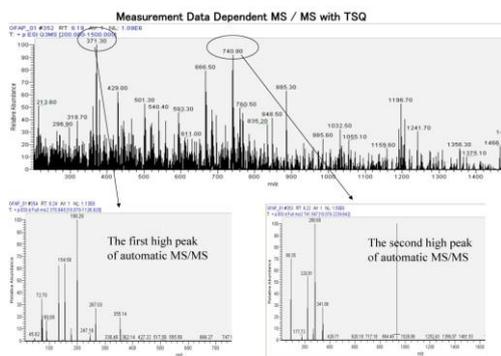


Fig. 1 Assay of MS/MS with TSQ

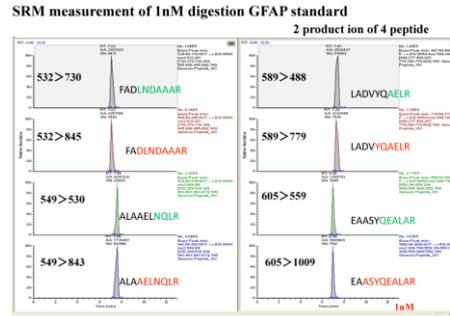


Fig. 2 GFAP standard assay with SRM

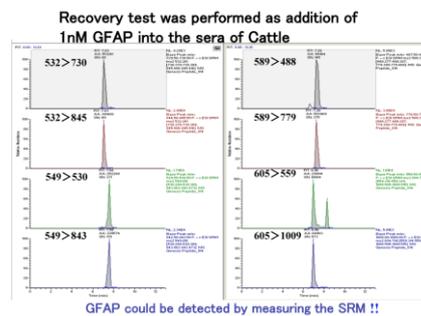


Fig. 3 Serum GFAP assay with SRM

Fig. 3に血清中のGFAP測定結果を示した。結果が示すように、SRMによる測定では、mascot searchで同定されないものからも選択したペプチド全てのスペクトラムを得ることができた。これは、スキャンスピードが四重極のDependent MS/MSだと約4秒かかるのに対してSRMだと0.005秒で測定が可能であり、Dependent MS/MSだと埋もれてしまっていたものも拾い出すことができた結果であると思われる。

<まとめ>

四重極型によるData DependentMS/MSは定性を目的とした質量分析計と比べて分解能が低く、精度に欠けているがSRMによる選択的分析によってペプチドを検知することができた。今後、さらに高感度で検知する方法を開発する必要があるが、予めわかっている目的タンパク質やペプチドを検知する場合

にはSRM法が有効な手段の一つであると思われる。そしてより夾雑物の多い血中や血清からのバイオマーカー検知にはSRM測定が有効であり、将来的には生前血清診断へ応用できる。

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 10 件)

1. Nakamura K, Miyasho T, Nomura S, Yokota H, Nakade T. Proteome Analysis of Cerebrospinal Fluid in Healthy Beagle Dogs and Canine Encephalitis. *J Vet Med Sci.* **74**,751-756 (2012) 査読有り
2. Kazuyuki Suzuki & Jun Noda & Makio Yanagisawa & Isao Kawazu & Kouichiro Sera & Daisuke Fukui & Mitsuhiro Asakawa & Hiroshi Yokota Particle-Induced X-ray Emission Analysis of Elements in Plasma from Wild and Captive Sea Turtles (*Eretmochelys imbricata*, *Chelonia mydas*, and *Caretta caretta*) in Okinawa, Japan *Biol Trace Elem Res*, 2012. 査読有り
3. Suzuki K, Noda J, Yanagisawa M, Kawazu I, Sera K, Fukui D, Asakawa M, Yokota H. Relationships between Curved Carapace Sizes and Plasma Major and Trace Element Status in Captive Hawksbill Sea Turtle (*Eretmochelys imbricata*). *J Vet Med Sci.* (2012) Aug 6. In press. 査読有り
4. Yunlan Li, Kanako Okumura, Sachiko Nomura, Naoyuki Maeda, Taku Miyasho, Hiroshi Yokota Oxidatively Damaged Proteins in the Early Stage of Testicular Toxicities in Male Rats by Orally Administered with a Synthetic Oestrogen, Diethylstilbestrol *Reproductive Toxicol.* **31**, 26-34 (2011) 査読有り
5. Miyasho T, Nakamura K, Nomura S, Kawasako K, Nakade T, Yamada S, Yokota H High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Protein Is Present in the Cerebrospinal Fluid of Dogs with Encephalitis. *J Vet Med Sci.* **73**(7), 917-922. (2011) 査読有り
6. Higuchi H., Iwano H., Kawai K., Ohta T., Obayashi T., Hirose K., Ito N., Yokota H., Tamura Y. and Nagahata H. A Simplified PCR Assay for Fast and Easy Mycoplasma Mastitis Screening in Dairy Cattle. *J. Vet Science* **12**,(2) 191-193 (2011) 査読有り
7. Emi Y, Nomura S, Yokota H, Sakaguchi M. ATP-binding cassette transporter isoform C2 localizes to the apical plasma membrane via interactions with scaffolding protein. *J Biochem.* (2011) **149**:177-189. 査読有り
8. Hirayama K, Miyasho T, Ohmachi T, Watanabe T, Yokota H, Taniyama H. Biochemical and immunohistochemical characterization of the amyloid in canine amyloid-producing odontogenic tumor. *Vet Pathol.* **47**, 915-922 (2010) 査読有り
9. Miyu Nishikawa<sup>1</sup>, Hidetomo Iwano<sup>1\*</sup>, Risa Yanagisawa<sup>1</sup>, Nanako Koike<sup>1</sup>, Hiroki Inoue<sup>2</sup> and Hiroshi Yokota<sup>1</sup> Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat fetus. *Environ. Health Perspect.* **118**, 1196-1203 (2010) 査読有り
10. Suda K, Takeuchi H, Hagiwara T, Miyasho T, Okamoto M, Kawasako K, Yamada S, Suganuma K, Wada N, Saikawa Y, Fukunaga K, Funakoshi Y, Hashimoto S, Yokota H, Maruyama I, Ishizaka A, Kitagawa Y Neutrophil elastase inhibitor improves survival of rats with clinically relevant

sepsis.Shock. May;33(5):526-531 (2010)  
査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木智和<sup>1</sup>・田中絵美<sup>1</sup>・前田尚之<sup>1,2</sup>・  
宮庄 拓<sup>2</sup>・横田 博<sup>2</sup>(<sup>1</sup>食肉科研・<sup>2</sup>  
酪農大獣生化) Selected Reaction  
Monitoring (SRM)を用いた牛血中グリ  
ア纖維性酸性蛋白質の検知 第59回日本質  
量分析学会(大阪)

〔図書〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横田 博 (YOKOTA HIROSHI)

酪農学園大学獣医学群獣医学類 教授

研究者番号: 90137414