

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24619012

研究課題名(和文) 生体マトリックス中タンパク質の高精度、高感度定量法の開発

研究課題名(英文) Development of highly accurate and sensitive quantification method for protein and peptide in biological matrix

研究代表者

絹見 朋也 (Kinumi, Tomoya)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号：90293125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析による血清中のタンパク質、ペプチドの高精度、高感度の定量は臨床検査などの測定結果を校正、比較するための基準を提供する技術である。質量分析を使った高精度のアミノ酸分析により高純度のC-ペプチド、C反応性タンパク質を定量、標準物質を整備した。さらに、血清中のこれらのタンパク質を質量分析で測定するための精製法、N末端化学修飾法を開発することで、低濃度の血清中C-ペプチド、C反応性タンパク質について、高精度、高感度で定量分析が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Highly accurate and sensitive quantification of serum protein and peptide by mass spectrometry is a key technology which provides the standard value to calibrate and compare the results in clinical chemistry and other research field related to quantification. We performed amino acid analyses of pure C-peptide and C reactive protein with high accuracy, and established certified reference materials of these proteins. To achieve highly accurate and sensitive quantification for serum C-peptide and C reactive protein, we also developed the quantification methods utilizing purification and N-terminal modification methods to enhance the signal intensity.

研究分野：分析化学・質量分析学・タンパク質化学

キーワード：質量分析 同位体希釈 タンパク質 ペプチド 血清 定量分析 化学修飾

1. 研究開始当初の背景

血清や尿など生体マトリックス中のタンパク質は、疾患や健康状態を反映するマーカーとして探索が進められ、多くのタンパク質が臨床検査等に应用されている。このため、生体マトリックス中のマーカータンパク質を高感度、高精度に定量することは、生化学やプロテオミクスなどの基礎研究から臨床への応用を含め非常に重要である。

しかし、一般的なタンパク質定量法は比色定量法や免疫化学測定法のようにあらかじめ濃度のわかっている標準物質が必要である。また、この方法はマトリックスによる定量結果の変化(マトリックス効果)や抗体の親和性への影響を受けやすい問題がある。このため、絶対定量を実現でき化学量論的に信頼できる、高感度かつ正確なタンパク質の定量方法が必要となっていた。

2. 研究の目的

生体マトリックス、特に血清中の特定のペプチド、タンパク質について、高精度、高感度に定量できる方法を開発する。また、これらの測定精度を担保するため、高純度のペプチド、タンパク質標品の高精度定量法の開発もあわせて行うことを目的とした。

主にプロテオミクスの分野では、安定同位体標識ペプチドを用い、質量分析によりその比を測定することで定量することが行われている。こうした方法は例えば AQUA 法などと呼ばれる定量法である。これらの方法は簡便で広く用いられているが、測定精度を考慮したものではない。

本研究は、精度と感度の両立を目指し、安定同位体標識化合物を内標準とした同位体希釈質量分析法を基盤とした定量法を確立、測定方法の妥当性についても十分な検証を行い信頼性の向上にも努めることを目的とする。試料の前処理にも改良を加え精度と感度を両立した測定方法を開発し、標準物質の開発や基準測定操作法として利用しうる測定法を確立する。

3. 研究の方法

本研究は、主に(1)アミノ酸分析による高純度タンパク質、ペプチドの定量法開発、(2)血清中 C - ペプチドの定量法開発、(3)血清中 CRP の定量法開発、の3つに関して行った。それぞれの研究の方法は以下のとおりである。

(1)アミノ酸分析による高純度タンパク質、ペプチドの定量法開発

安定同位体標識アミノ酸を内標準とした同位体希釈質量分析法によるアミノ酸分析法を実現するための測定方法開発を行った。試料をアミノ酸に完全に加水分解するための反応条件、およびアミノ酸を逆相クロマトグラフィー - 質量分析(LC-MS/MS)で測定するためのアミノ酸の化学修飾とその反応条件を検討した。確立した測定条件を利用して、

C - ペプチドおよびC反応性タンパク質(CRP)の認証標準物質の値付けを行った。

(2)血清中のC - ペプチドの定量法開発

安定同位体標識アミノ酸を組込んだ C - ペプチドをスパイクした血清から、C - ペプチドの精製法、および精製ペプチドの化学修飾について検討を行い高感度化を目指した。測定妥当性の確認とともに、免疫化学測定との比較も行った。

(3)血清中 CRP の定量法開発

血清中の特定のタンパク質を定量するため、定量対象タンパク質にアミノ酸残基の点変異を導入した組換え体タンパク質を内標準とする定量手法を検討した。この方法は、内標準タンパク質を血清に添加し、定量対象タンパク質(CRP)-内標準タンパク質(変異型CRP)を精製してプロテアーゼ消化したのち、試料由来ペプチド、および内標準由来ペプチドの比率を LC-MS/MS により求めて定量するものである。質量差を生むアミノ酸点変異を導入することで、安定同位体標識と同様の測定が可能と考えられる。

内標準タンパク質は大腸菌により産生した変異型 CRP を用いることとし、発現、精製条件の検討を行った。これを血清にスパイクし、血清由来の野生型 CRP と変異型 CRP を固定化抗体により回収、プロテアーゼ消化と LC-MS/MS 測定に関するこれらの条件を検討し、測定法の確立を目指した。

4. 研究成果

(1)アミノ酸分析による高純度タンパク質、ペプチドの定量法開発

アミノ酸分析法はタンパク質、ペプチドの濃度の絶対定量法として最も信頼性の高い方法である。アミノ酸分析は、試料を酸加水分解によりアミノ酸に完全に分解し、そのアミノ酸を定量する。そのため、測定の鍵は完全加水分解すること、および生じたアミノ酸を正確に測定することの2つである。

加水分解法として6 M 塩酸を用いた液相加水分解、気相加水分解の2つの方法により独立に加水分解して濃度を求めることで結果の信頼性を高めることにした。

アミノ酸は逆相系のクロマトグラフィーではほとんどが素通り画分に溶出されるため、LC-MS による測定を行うためには化学修飾により疎水性を高める必要がある。この化学修飾は N-ブチルニコチン酸スクシンイミドエステルによる N 末端修飾、および 1-プロモブタンによる C 末端修飾により行った。

アミノ酸分析は以下のようにして行った。アミノ酸認証標準物質を用いてアミノ酸標準液を調製した。内標準溶液には安定同位体標識アミノ酸を用いた。アミノ酸標準液と内標準溶液を混合して標準混合液、試料溶液と内標準溶液を混合して試料混合液をそれぞれ調製し、この2つの溶液を加水分解して LC-MS/MS による定量を行った。

C - ペプチドは31アミノ酸からなるペプチ

ドで、高純度の C-ペプチドについてアミノ酸分析により濃度を求めた。液相、気相ともに、加水分解時間および加水分解温度について検討し、加水分解で得られた各アミノ酸の濃度が最も高く、かつそれぞれの値が測定ばらつき範囲で一致した条件を決定した。各アミノ酸濃度から重み付平均して求めたペプチド濃度について、加水分解条件とともにその結果を示す。

液相加水分解

(33.32 ± 0.57) nmol/g (165 3 hr)

気相加水分解

(33.93 ± 0.43) nmol/g (130 24 hr)

独立に求めた2つの結果はたいへんよい一致を示した。この2つの結果を重み付平均し、C-ペプチドの濃度として

(33.67 ± 0.46) nmol/g (相対標準不確かさ 1.37%)

として求めた。この結果はフタル酸水素カリウムを内標準とした定量 NMR の定量結果

(34.32 ± 0.40) nmol/g

ともよく一致し、測定精度、信頼性の高さが示された。この結果を C-ペプチドの認証標準物質開発に用いた。

また、分子量 23000 のタンパク質である CRP についても同様にアミノ酸分析を行い、

(39.98 ± 0.76) nmol/g (相対標準不確かさ 1.90%)として、高い精度でのアミノ酸分析法を確立し、認証標準物質の値付けに用いた。

(2) 血清中 C-ペプチドの定量法開発

血清中 C-ペプチドの基準範囲は大変広く、LC-MS/MS による測定では低濃度域の感度の確保が難しい。これは C-ペプチドの等電点が 4 近い酸性のペプチドであることで正イオンモードでの感度が出にくいこと、分子量が 3020 と大きいためフラグメンテーションの効率が悪く、選択反応モニタリングでの感度が出にくいことが考えられる。血清由来の C-ペプチドの精製を従来法である固相抽出カラム、固定化抗体での比較、さらに 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) による修飾の有無について、LC-MS/MS によるシグナルの面積を図 1 のとおり比較した。

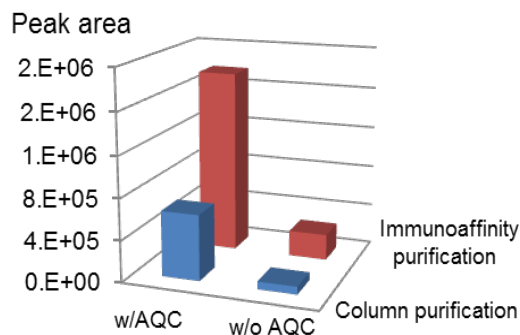


図 1 精製法と AQC 修飾の有無による C-

ペプチドのピーク面積の比較

抗体精製と AQC 修飾のどちらも感度向上に寄与し、これらを組み合わせることで従来法より 20 倍感度を向上できることがわかった。

この方法により検量線の直線性を確認したところ、0.003-2.8 ng (on column) の範囲で $r^2=0.999$ と高い直線性を示し、定量限界は既報よりさらに低い値であり、基準範囲をカバーする測定が可能であることがわかった。分析方法の妥当性確認は、基準範囲の上限、下限の目安である 0.5 ng/mL および 10 ng/mL の2つの濃度について行った。この血清試料は C-ペプチド除去血清に(1)で示したアミノ酸分析により定量した C-ペプチドを添加して調製した。分析は安定同位体標識 C-ペプチドを内標準として加えて行った。添加回収実験の結果を表 1 に示す。

表 1 C-ペプチドの添加回収実験結果

C-peptide added (ng/g)	Observed conc. (ng/g)	Mean recovery (%)
0	0	0
0.469	0.467	99.4
9.60	9.88	102.9

回収率は高濃度、低濃度ともに良好であった。繰返し測定の際は、0.5 ng/mL および 10 ng/mL の2つの濃度について、日内で 1% 前後、日間で 3.7% となり測定ばらつきは血清 C-ペプチド測定に十分な範囲であった。一方、LC-MS/MS による本測定方法と常用測定法である免疫化学測定との比較を行った。免疫化学測定は化学発光酵素免疫測定法によって行った。この結果を図 2 に示す。

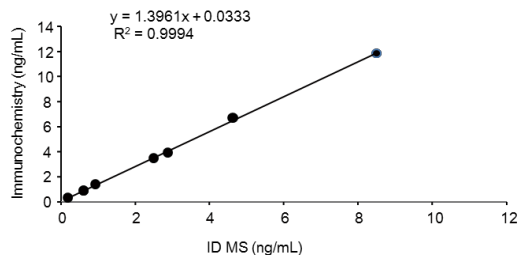


図 2 LC-MS/MS による測定結果 (ID MS) と免疫化学測定の結果の比較

0.19-8.49 ng/mL の範囲できわめて高い直線性が得られた。一方で、傾きは 1 とならず、免疫化学測定が約 40% 高い測定結果を与えることがわかった。この原因として、免疫化学測定に用いられる抗体の特異性に比べ、LC-MS/MS の選択性が高いことが考えられる。また、本法と免疫化学測定に用いた標準物質が異なることも、値の差を生み出す原因と考えられる。

本測定方法は抗体の特異性に左右されない普遍的な定量結果を得られることが特徴である。本法と種々の免疫化学測定による値の比較実験を進めることで測定の同等性の検証を行い、臨床検査の標準化へ応用すること

が可能である。

(3) 血清中 CRP の定量法開発

複雑なタンパク質の混合物である血清から CRP を LC-MS により選択的に定量する方法を検討した。

血清試料に添加する内標準タンパク質にはヒト CRP のアミノ酸配列に対して、V20L, S53T となる変異を導入した。この変異の導入によって野生型に対して m/z 15 の質量差を持たせ、安定同位体標識タンパク質と同様の内標準物質として利用する。pCold II 発現ベクターを用いて大腸菌により発現させた。発現産物(mCRP)は種々条件を検討したものの封入体として得られたため、8 M 尿素により可溶化しゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。7 %ウシ血清アルブミン溶液に対して 20 倍希釈して実験に用いた。

このようにして調製した mCRP を血清に添加し、野生型 CRP(wCRP)とともに固定化抗体によりアフィニティー精製し、トリプシン消化によりペプチドとした。

得られた CRP 部分ペプチドのうち、CRP(14-23)および CRP(48-57)に相当するペプチドを CRP1、CRP2 として、wCRP 由来および mCRP 由来のペプチドについて、LC-MS/MS により測定した。図 3 にそのクロマトグラムを示す。

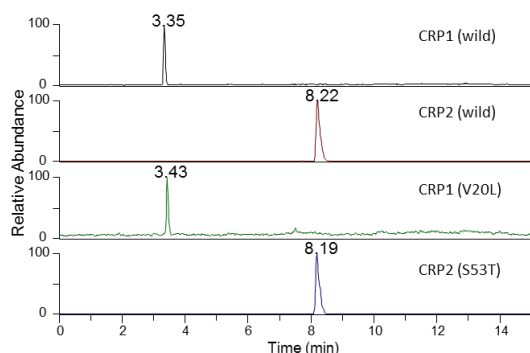


図 3 血清から回収した wCRP, mCRP のトリプシン消化物の SRM クロマトグラム

変異導入によって保持時間がほぼ同じで、野生型に対して質量差をもった内標準タンパク質を確立することができた。

wCRP と mCRP の混合比 0.05-4.8 (= wCRP/mCRP) の範囲で、wCRP1/mCRP1, wCRP2/mCRP2 をプロットした検量線はそれぞれ $r^2 = 0.999, 0.997$ とたいへん良好な直線性を示した。また、50 ng/mL-5 μ g/mL の範囲でピーク面積に対して CRP1, CRP2 とともに良好な直線性を示し、高感度 CRP の測定領域での測定が可能であることがわかった。調製濃度に対する本法での測定濃度が 2 倍程度高くなること、測定のばらつきが 10 %程度になることがあり、今後の条件の最適化が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Sakaguchi Y., Kinumi T., Yamazaki T., and Takatsu A, A novel amino acid analysis method using derivatization of multiple functional groups followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analyst.* (2015) 140, 1965-1973. (査読有)

DOI: 10.1039/C4AN01672F

Wu L., Takatsu A., Park S.R., Yang B., Yang H., Kinumi T., Wang J., Bi J., and Wang Y. Development and co-validation of porcine insulin certified reference material by high-performance liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* (2015) 407, 3125-3135. (査読有)

DOI: 10.1007/s00216-014-8385-4

Kato M., Kinumi T., Yoshioka M., Goto M., Fujii S., and Takatsu A. Development of C-reactive protein certified reference material NMIJ CRM 6201-b: optimization of a hydrolysis process to improve the accuracy of amino acid analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* (2015) 407, 3137-3146. (査読有)

DOI: 10.1007/s00216-014-8190-0

Nishioka T., Kasama T., Kinumi T., Makabe H., Matsuda F., Miura D., Miyashita M., Nakamura T., Tanaka K. and Yamamoto A. Winners of CASMI2013: Automated Tools and Challenge Data. *Mass Spectrom.* (Tokyo) (2014) 3, S0039. (査読有)

DOI: 10.5702/massspectrometry.S0039

Shigeri Y., Ikeda S., Yasuda A., Ando M., Sato H. and Kinumi T., Hydrazide and hydrazine reagents as reactive matrices for MALDI-MS to detect gaseous aldehydes *J. Mass Spectrom.* (2014) 49, 742-749. (査読有) DOI: 10.1002/jms.3408

Kinumi T., Mizuno R. and Takatsu A. Quantification of serum C-peptide by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Enhanced detection using chemical modification and immunoaffinity purification *J. Chromatogr. B* (2014) 953-954, 138-142. (査読有)

DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.02.019

Kinumi T., Goto M., Eyama S., Kato M., Kasama T. and Takatsu A. Development of SI-traceable C-peptide certified reference material NMIJ CRM 6901-a using isotope-dilution mass

spectrometry-based amino acid analyses.
Anal. Bioanal. Chem. (2012) 404, 13-21.
(査読有)
DOI: 10.1007/s00216-012-6097-1

[学会発表](計 7 件)

坂口洋平, 絹見朋也, 高津章子, カルボキシル基標識-LC-MS 分析による生理活性ペプチド定量法の開発, 第 25 回クロマトグラフィ-科学会議, 2014 年 12 月 10 日 京都大学(京都府・京都市)

Kinumi T et al., Toward standardization of C-peptide measurement: Development of reference material and serum C-peptide measurement by isotope-dilution mass spectrometry. 20th International Mass Spectrometry Conference, 2014 年 08 月 25 日, Geneva(Switzerland).

坂口洋平, 絹見朋也, 高津章子, タンパク質認証標準物質開発のための新規アミノ酸分析, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 03 月 28 日 熊本大学(熊本県・熊本市)

加藤愛, 絹見朋也 他, 同位体希釈アミノ酸分析を用いた C 反応性蛋白標準液 NMIJ CRM 6201-b の開発, 第 36 回日本分子生物学会, 2013 年 12 月 03 日 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

Kinumi T et al., Quantification of Serum C-peptide using Immobilized antibody and N-terminal modification by Isotope-dilution Mass spectrometry, 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2013 年 06 月 11 日, Minneapolis (USA)

加藤愛, 絹見朋也 他, アミノ酸分析を用いたタンパク質溶液の濃度決定, 第 2 回新アミノ酸分析研究会, 2012 年 10 月 26 日, 東京大学(文京区・東京都)

Kinumi T et al., Development of a high sensitive quantitation method for serum C-peptide by isotope-dilution mass spectrometry, 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012 年 09 月 19 日 京都国際会議場 (京都府・京都市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

絹見 朋也 (KINUMI, Tomoya)

産業技術総合研究所・計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号 : 90293125

(2)研究分担者

中島 芳浩 (NAKAJIMA, Yoshihiro)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・グループ長

研究者番号 : 10291080