室蘭工業大学
学術資源アーカイブ
Muroran Institute of Technology Academic Resources Archive

特定のアミノ酸残基と反応する試薬の開発

メタデータ	言語: Japanese
	出版者: 室蘭工業大学地域共同研究開発センター
	公開日: 2016-06-28
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 庭山, 聡美, 黒野, 定
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/10258/00008953

室蘭工業大学
学術資源アーカイブ
Muroran Institute of Technology Academic Resources Archive

特定のアミノ酸残基と反応する試薬の開発

著者	庭山　聡美，黒野　定
雑誌名	室蘭工業大学地域共同研究開発センター研究報告
巻	26
ページ	49-51
発行年	2016-02
URL	http://hdl.handle.net/10258/00008953

特定のアミノ酸残基と反応する試薬の開発

庭山　聡美[*1]，黒野　定[*2]

1　はじめに

プロテオミクスとはある特定の生理条件の下で発現された一連のタンパク質であるプロテオームを扱う研究分野である．このような概念では複数の異なった外的条件下で発現されたプロテオームを比較することにより生命現象を総括的に理解することが可能となる．プロテオミクスで最もさかんに行われている研究として，タンパク質の同定や，タンパク質の定量分析があり，後者では異なった外的条件の下で発現されたタンパク質の相対量を定量的にあらわすことが重要となる．これは例えば健康な細胞と疾病状態にある細胞のタンパク質の発現量を比較し，特定の病気の際に多く発現するタンパク質をバイオマーカー候補として同定すること等に応用できる．

特に安定同位体と質量分析の組み合わせによる定量分析法は，それまで報告されていた放射性同位体を用いる方法に比べて環境にも優しいため近年特に活発に研究されている領域である．

そこで我々は特定のアミノ酸に低分子量の有機化合物を反応させたものとその安定同位体ラベル体を質量分析法によって分析することによりタンパク質の定量法を開拓している．安定同位体でラベルされたものとラベルされていない修飾試薬は化学的に同一の反応性を示すため，質量分析におけるイオン化効率も同一であると予測し，サンプルのタンパク質とこれらの試薬を反応させた後，その対応するイオンピークの総面積の相対比を測ることでタンパク質の量の相対比がわかることになる．

*1：室蘭工業大学 くらし環境系領域
*2：和光純薬株式会社

2　実　験

2.1　実験概略

我々は ^{13}C や D などの安定同位体でラベルされたシスティンの—SH 基の特異的修飾試薬を数種類合成し，これとの反応で得られたタンパク質サンプルと，対応する安定同位体でラベルされてない修飾試薬との反応で得られたサンプルを合わせてこれらの比を質量分析により分析するという方法でタンパク質やペプチドの定量分析を行ってきた（図 1）．

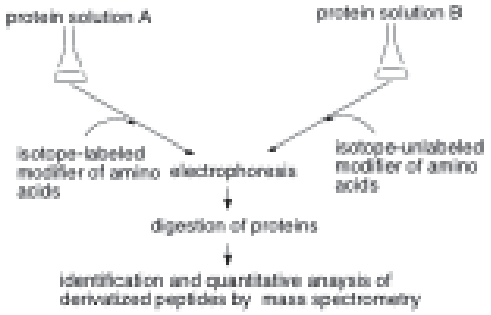

図 1　我々のペプチド，タンパク質の定量分析法概略

2.2　システィン修飾試薬

システィンの sulfhydryl (—SH)基の特異的修飾試薬としては *N*−ethylmaleimide や iodoacetamide のような市販の小さな有機分子は下の図 2 のように反応することが知られている．これらは疎水性も低く，−SH 基との反応性も高いことが知られているうえ合成も簡単であることから，これらの誘導体 iodoacetanilide (IAA), *N*-ethylmaleimide (NEM), *N*-β-naphthyliodoacetamide (NBN) とその D または ^{13}C ラベル体(**1**−**6**)を合成した．

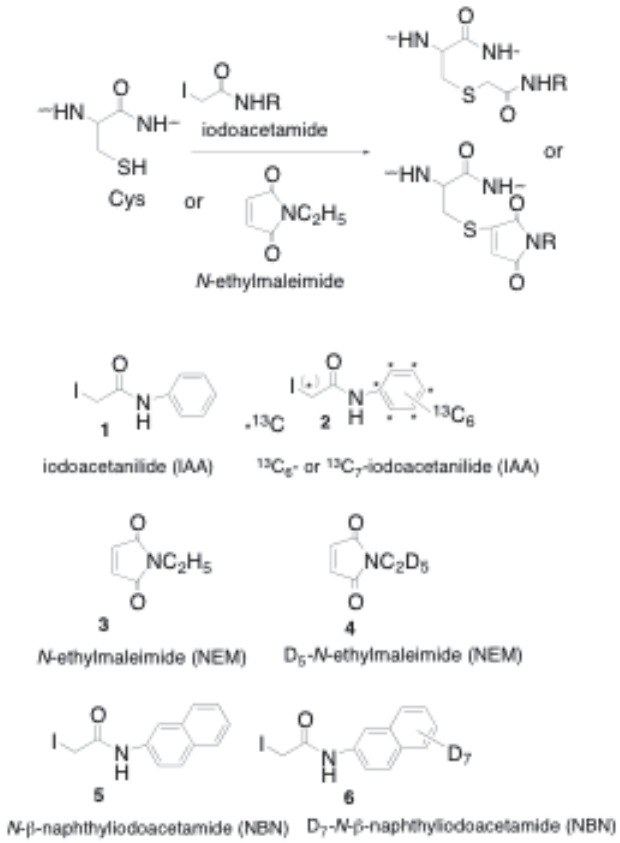

図 2　システィンの特異的修飾試薬とその安定同位体標識体

これらの試薬の合成は図 3 のようにして行った．

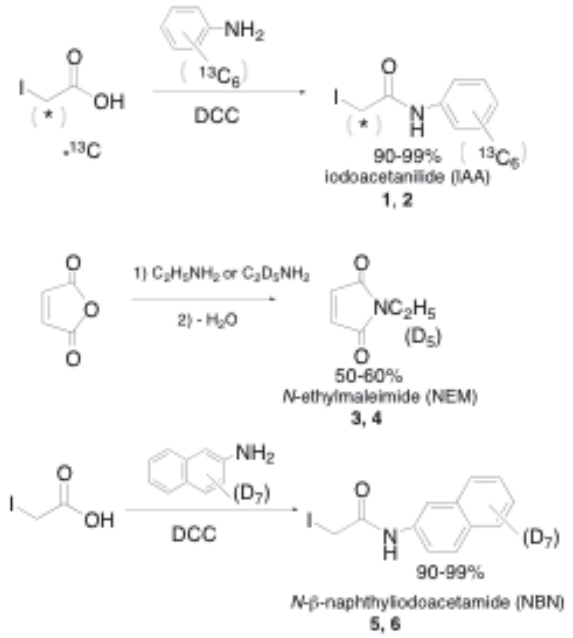

図 3　システィンの特異的修飾試薬の合成

3　結　果

まず我々はこの方法をペプチドを用いてテストした．システインを１つ含むペプチドを異なる量を含む水溶液を２種用意し，片方を同位体でラベルされていない修飾試薬（**1, 3,** または **5**），もう片方を同位体でラベルされている修飾試薬（**2, 4**, または **6**）と反応させた後，両者を混ぜてその量比を質量分析により定量した（図 4）．

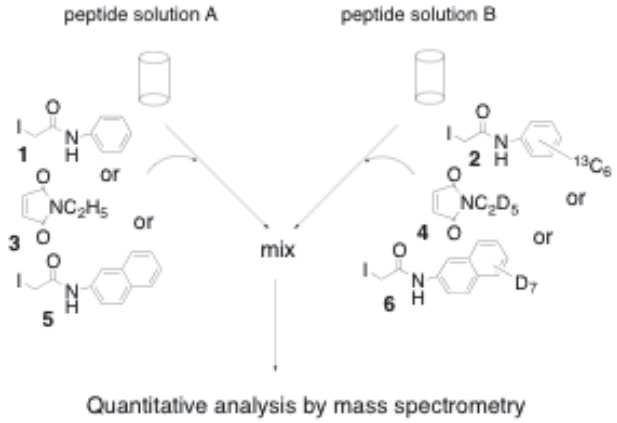

図 4　ペプチドの定量分析

それぞれのペプチドは自然界に存在する同位体のため一連のピークを示すが，その一連のピークの面積の総和の比をとることにより両者の総対比を求めた．その後横軸に理論比を，縦軸に観測比をとってグラフにプロットし，検量線を描いた．図 5 は IAA（**1**，**2**）によるその検量線のグラフである．３種のペプチドを用いて，いずれも理論比と観測比の間に非常に良い相関関係が見られている．

また我々はこの方法をハエの頭から抽出したタンパク質や乳頭分泌液などの臨床サンプルから得られたタンパク質の定量分析にも応用し，定量が可能である事を見いだしている．この際のタンパク質の分離精製には主として電気泳動法を用いたが，液体クロマトグラフィー(LC)法によっても可能である．また質量分析も MALDI と ESI のいずれでも可能である事を見いだしている．

これらの結果より，本法によりタンパク質やペプチドの定量分析が可能であることが示された．データベースサーチによりタンパク質の同定も可能であるため，本方法はプロテオミクスには強力なツールとなることが期待される．

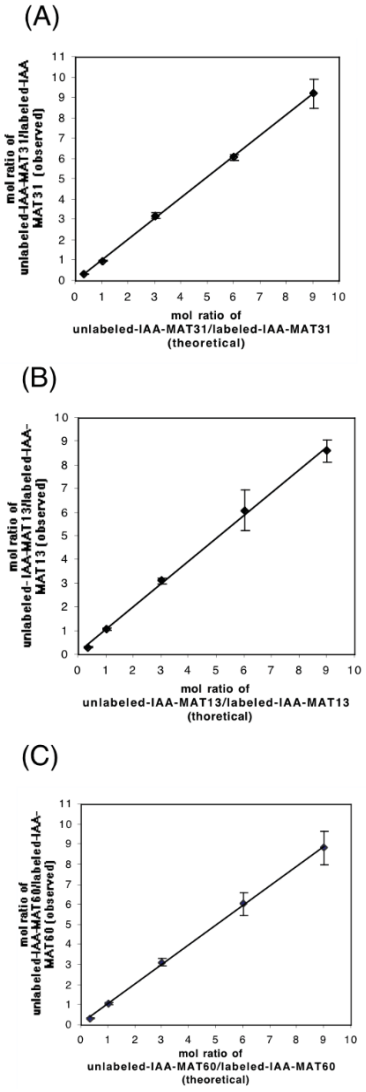

図 5　ペプチドの定量分析

4　おわりに

本方法では簡単な有機合成の手法により有機小分子とその安定同位体標識体を必要に応じて合成し，特別な機器を用いずにペプチドやタンパク質の定量分析が可能であるため，実用的な方法であると考えられる．さらにこのペプチドやタンパク質の相対的な定量法に加えて，一方のペプチドが既知量で，もう一方のペプチドが未知量である場合に，既知量と比較してそのペプチドの量を測定する，いわゆる絶対定量法にもこの方法が応用出来る事も見いだしている．これはより正確なタンパク質の定量分析を可能にする． 今後は種々の方向に応用して行きたい．

5　謝　辞

タンパク質やペプチドの定量分析にあたり，大阪大学医学部の実験室の場所を提供していただいた．この場を借りて感謝申し上げる．

文　献

1) Kurono, S.; Kaneko, Y.; Matsuura, S.; Niwayama, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, *25*, 1110-1116.