



室蘭工業大学

学術資源アーカイブ

Muroran Institute of Technology Academic Resources Archive



タンパク質・ペプチドの定量分析法の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 室蘭工業大学地域共同研究開発センター 公開日: 2019-03-13 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/10258/00009762

タンパク質・ペプチドの定量分析法の開発

庭山 聡美*1, 黒野 定*2

1 はじめに

プロテオミクスという比較的新しい研究分野では、複雑なタンパク質混合サンプル中の一連のタンパク質（プロテオーム）を扱うが、その一連のタンパク質の同定や定量分析がメジャーな研究対象となる。そのためアプローチとして従来最もよく用いられていたのはいわゆる“ショットガン法”と呼ばれ、これは試料タンパク質をトリプシンなどの酵素によりペプチドに分解し、それを質量分析によって同定、定量分析する方法である。この方法は長年の間、いわゆる標準的な方法とされ、生物試料中の数百、数千という数のタンパク質を質量分析法により探知することも可能である。これは例えば血清などの試料からある疾病のバイオマーカーを発見するなどの臨床研究のために役に立っている。しかしこの“ショットガン法”の弱点としては感度が比較的低い事や、再現性に欠けることがある事などが挙げられ、これはシステム生物学などで複数の試料からプロテオームを扱う場合に問題となりうる。近年は“選択反応モニタリング (selected reaction monitoring (SRM))”と呼ばれる方法が“ショットガン法”の欠点を補う方法として用いられるようになってきた。この方法では標的ペプチドを決め、それをモニタリングする事でより正確な定量分析を行うものである。この方法ではより正確な相対定量分析や絶対定量分析が可能となる。

以前我々はシステインの—SH 基と特異的に反応する分子量の比較的小さい有機化合物と、それに対応する ^{13}C や D などの安定同位体標識体と質量分析法の組み合わせにより種々のペプチドやタンパク質の相対定量分析が可能であることをショットガン法によって示したが、本研究ではこのシステイン修飾試薬を選択反応モニタリング (SRM) 法に応用し、タンパク質の絶対定量を試みた。

2 実験及び結果

2.1 実験概略

システインの sulfhydryl (—SH) 基の特異的修飾試薬として iodoacetamide という市販の小さな有機化合物が知られている。SRM 法に用いる小有機化合物として、まずこの誘導体 iodoacetanilide (IAA, **1**)、とその ^{13}C ラベル体 $^{13}\text{C}_7$ -iodoacetanilide (**2**) を合成した (図 1)。

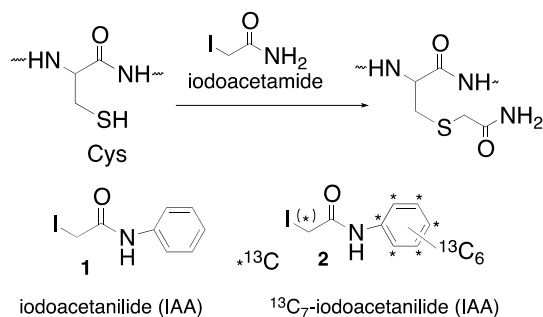


図 1 システインの特異的修飾試薬とその ^{13}C ラベル体

*1: 室蘭工業大学 暮らし環境系領域

*2: 和光純薬株式会社

合成は以下の図のようにして行った。

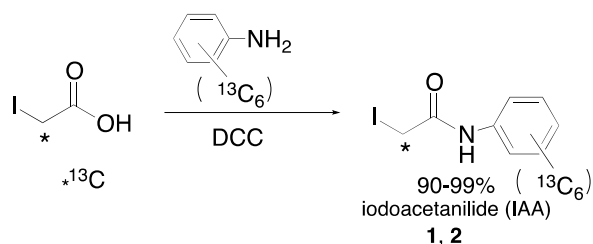


図2 システインの特異的修飾試薬と ^{13}C ラベル体の合成

以下の図には我々の SRM 法によるタンパク質の定量法を示す。タンパク質としては最初に bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OVA), α -lactalbumin (LCA) という 3 種類の市販のタンパク質を選んだ。質量分析は nano liquid chromatography/nanoelectrospray ionization ion trap mass spectrometry (nano LC/nano-ESI-IT-MS) を用いた。

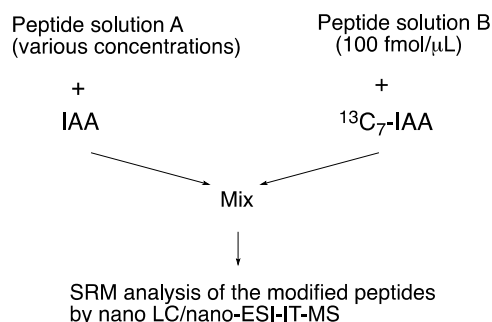


図3 我々の SRM 法によるタンパク質の定量法

この SRM 法ではまずモニタリングの標的となるペプチドを決めなければならないが、それぞれのタンパク質のトリプシン処理で得られたペプチドの MS 及び MS/MS スペクトルを観測することによって、感度が高く、安定したピークを与えるものをそれぞれのタンパク質について選んだ。それらのペプチドのアミノ酸配列は LCVLHEK (BSA)、CVSP (OVA)、CEVFR (LCA) であった。

それをもとに同位体非標識体 (IAA, 1) と反応したペプチドの濃度を変え、同位体標識体 ($^{13}\text{C}_7$ -IAA, 2) と反応した濃度一定であるペプチドとの間に観測された比を、理論比に対してプロットしたものが次のグラフである。これに示されているように理論比と観測比は 3 種類の市販タンパク質の全てにおいてよく一致した。

これらの結果から IAA (1) と $^{13}\text{C}_7$ -IAA (2) の組み合わせにより SRM 法が可能であることがわかる。この場合は一方のペプチドの濃度が既知であるため、この方法により絶対定量が行われたことになる。

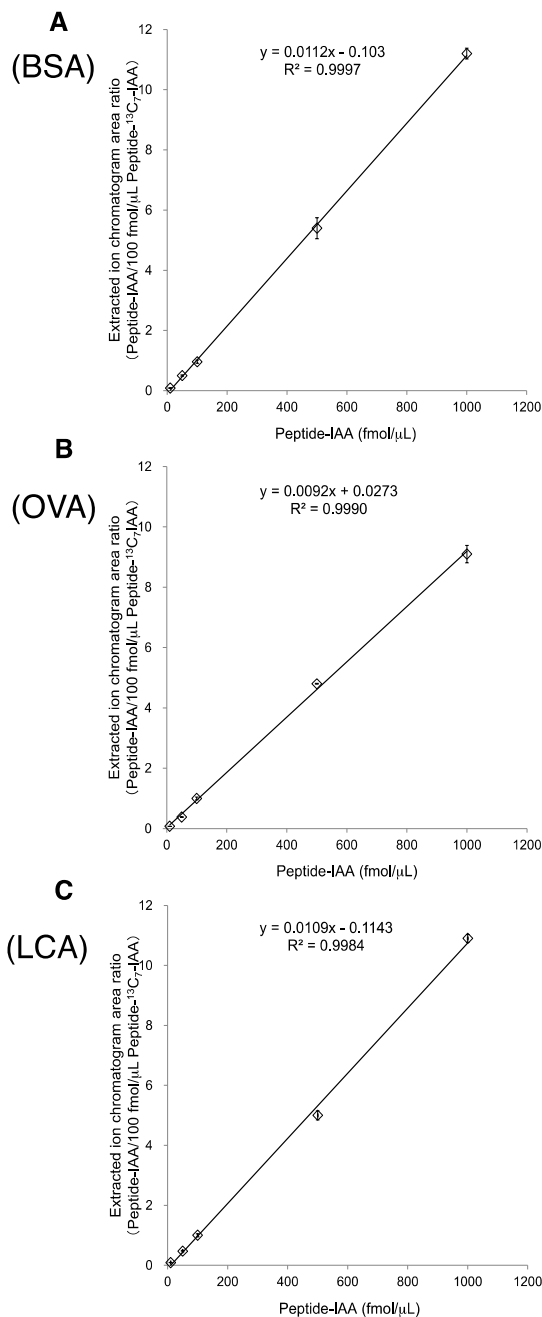


図4 SRM 法による市販タンパク質の定量結果
 A : bovine serum albumin (BSA),
 B : ovalbumin (OVA), C : α -lactalbumin (LCA)

次にこの方法をより複雑なタンパク質の混合体である乳頭分泌液中での定量分析に応用した。Ovalbumin (OVA) のモニタリングで用いたペプチド CVSP が最

も強いイオンピークを示したためこの定量分析にはこれを用いた。次の図のようなワークフローにあるように、乳がん患者の乳頭分泌液から抽出した一連のタンパク質（プロテオーム）サンプルの中に IAA (1) と反応したペプチド CVSP と $^{13}\text{C}_7$ -IAA (2) と反応した濃度既知のペプチド CVSP をスパイクし、同様の定量分析を行った。

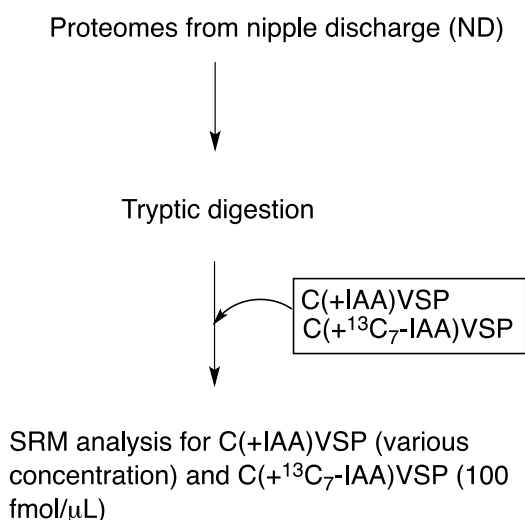


図5 乳頭分泌液からのプロテオーム中での SRM 法による定量分析

その結果が次のグラフである。やはり理論比と観測比はほぼ一致している。この結果から、我々の SRM 法は複雑なタンパク質の混合サンプルのような環境にあっても可能であることが示された。この方法により現在乳頭分泌液から乳がんのバイオマーカー候補のタンパク質を探索中である。

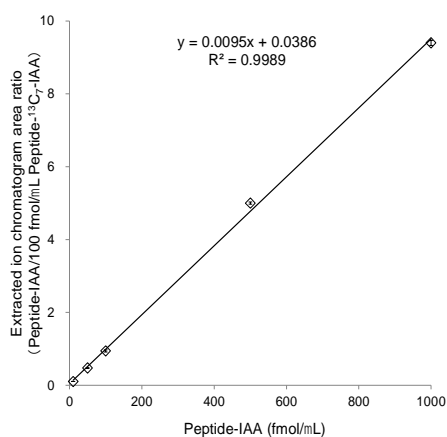


図6 乳頭分泌液からのプロテオーム中での SRM 法による定量分析の結果

3 おわりに

システインの *sulphydryl* (—SH) 基と特異的に反応する *iodoacetanilide* (IAA, 1) とその ^{13}C ラベル体 (2) ならびに質量分析器を用いて、選択反応モニタリング (SRM) 法によりタンパク質の定量分析が可能であることを示した。特定のアミノ酸と反応する有機小分子とその安定同位体標識体を、簡単な有機合成の手法により必要に応じて合成し、それとペプチドやタンパク質を反応させ、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を行う実用性が我々の方法の特徴である。これにより以前報告してきたようなショットガン法のみならず、選択反応モニタリング (SRM) 法も可能であることが本研究で示された。特に後者は絶対定量法により正確なタンパク質の定量分析を可能にするため、応用範囲が広がる。

本研究で観測された結果では、いずれの定量分析においても、ショットガン法による定量分析より広範囲にわたって誤差が小さくなっているが、これはショットガン法のように MS スペクトルで観測されたピークによってではなく、MS/MS スペクトルで観測されたピークによって定量分析を行うため、同一の m/z 値を持つ不純物が除かれるというメリットがあるためと考察している。

特に我々の方法によれば、安定同位体を小有機化合物と反応させることにより導入できるため、他に報告されている SRM 法のように、安定同位体で標識されたペプチドを別途合成する必要がないことがメリットとなる。また、他に報告されているアミノ基に特異的な修飾試薬は一般にシステインをブロックするなどの前処理が必要となるが、本方法は試料タンパク質にシステインが存在している限りその必要もない。

以上の結果をふまえ、本 SRM 法は例えば疾病のバイオマーカー候補の発見などに応用できるものと考えている。

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ます。

文 献

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

(2)Kurono, S.; Niwayama, S. 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), Honolulu, HI, U. S. A.