

## 2020年度 北陸大学特別研究助成【 挑戦的・基盤的研究 】 報告書

代表者	所属	医療保健学部*・准教授	氏名	周尾卓也
-----	----	-------------	----	------

※採択時は薬学部

研究課題名	タンパク質の量的な変化をグローバルに捉える 高速液体クロマトグラフ・ハイブリッド質量分析システムのプラットフォーム構築
-------	--

交付額	1,000,000 円
-----	-------------

## 研究成果の概要

本研究では、最終的に、生体試料中に含まれる標的分子を絶対定量するために、高分解能で高精密な測定を可能とする四重極飛行時間型質量分析 (Q-q-ToF) 装置LCMS-9030, および高選択能で高感度な測定を可能とする三連四重極型質量分析 (Q-q-Q) 装置LCMS-8045を活用する手段を確立した。実際に、モデル生体分子の題材として、ノナペプチドオキシトシン, トリプトファン代謝物, ビタミンD代謝物を解析した。本研究成果は、令和3年度科学研究費助成事業の基盤研究 (C) と挑戦的研究 (萌芽) に採択された2つの課題『糖尿病黄斑浮腫に対する閾値下レーザー治療のモニタリングマーカー確立』と『妊婦のレストレスレッグス症候群はビタミンDで改善の可能性を見出せるか?』に発展している。

## 研究目的

私たちヒトとしての生命体を構成する細胞の数は40兆個にのぼると推定されている。60億個のDNA塩基からなるゲノム情報の解読を背景として、細胞が発現するmRNAやタンパク質の網羅的な解析が実行できうる研究環境となり、これらの分子群の動態と疾患を含む様々な生命現象との相関が解明されはじめている。

昨今、5万個のmRNAは、DNAマイクロアレイの技法によって、その全体像を把握することが可能となっており、企業の受託解析を利用したとしても費用は十数万円程度である。一方で、生命現象の直接的な担い手と考えられるタンパク質の総体を質量分析するプロテオーム解析は、民間サービスにおいて百数十万円の高額な対応である。したがって、プロテオーム解析を足掛かりとした研究内容は年間の教育研究費では実施しがたい状況にある。さらに、もっとも本質的で重要なタンパク質の発現量を正確に絶対定量する方策は、技術的な課題も多い現状にある。

翻って、本学には、高速液体クロマトグラフ・ハイブリッド質量分析システムがあたらしく設置された。

この研究装置は、複雑な混成成分を分画できる液体クロマトグラフに、飛行時間型および三連四重極型の異なる測定原理を有する質量分析計が直結した体系である。質量分析を担う部分は、飛行時間型 (LCMS-9030) が高分解能な高精密の測定を、三連四重極型 (LCMS-8045) が高選択能な高感度の測定を可能とする。すなわち、前者ではタンパク質内部のペプチド配列をアミノ酸分子レベルで定性でき、後者では微量の特定ペプチドをピコグラム重量レベルで定量できる。

そこで本研究では、高速液体クロマトグラフ・ハイブリッド質量分析システムを活用することによって、網羅的タンパク質の相対比較解析、およびそれに引き続く、標的タンパク質の絶対定量解析とのシームレスな方法を確立することを目的とする。将来的には、タンパク質の量的な変化をグローバルに捉える先進技術の学内外への提供を目指す。

## 研究の方法

申請者はこれまでに、レーザー照射した網膜色素上皮細胞で、全遺伝子の発現データをDNAマイクロアレイにより取得し、発現変動の顕著な3つの遺伝子 (HSPA1A, HSPA6, CXCL8) について、mRNAをリアルタイムPCRで、タンパク質をELISAで、経時的に個別に定量している。そこで本研究では、DNAマイクロアレイ・リアルタイムPCR・ELISAのデータセットを参照情報として、網膜色素上皮層における網羅的タンパク質の相対比較解析と標的タンパク質の絶対定量解析を試みる。

具体的には、まず、レーザー照射前後の培養ヒト網膜色素上皮細胞から尿素およびSDS抽出緩衝液で調製した細胞可溶化物を、二次元の電気泳動で分画、あるいは同重体で標識した後に、LCMS-9030でMascot測定することで、発現変動のある標的タンパク質を特定する。つぎに、コムギ胚由来無細胞タンパク質人工合成系で同位体標識した標的タンパク質を、上述した細胞可溶化物とともにトリプシンでペプチドにまで断片化した後に、LCMS-8045でSkyline測定することで、発現変動のある標的タンパク質を定量する。なお、尿素およびSDS抽出緩衝液による細胞可溶化物の調製は亀山らの報告 [J Electrophoresis 48:71 (2004)] に則って作業する。また、二次元電気泳動による分画はATTO社、同重体Tandem Mass Tagによる標識はThermoFisher Scientific社、コムギ胚由来無細胞タンパク質人工合成系による同位体標識はNUProtein社、トリプシンによるタンパク質の断片化はIntegrale社、MascotはMatrix Science社、SkylineはMacCoss Lab Softwareワシントン大学、それぞれの説明書に従う。

## 研究成果

本研究では、高分解能で高精度な測定を可能とする四重極飛行時間型質量分析 (Q-q-ToF) 装置LCMS-9030, および高選択能で高感度な測定を可能とする三連四重極型質量分析 (Q-q-Q) 装置LCMS-8045を活用して、モデル生体分子の定性方法ならびに定量方法を確立した。

### 第一段階：Q-q-ToF装置による分子構造解析

質量分析における標的分子の定性および定量は、イオン化させた標的分子の質量電荷比 $m/z$ から解析されるが、複雑な生体試料中に含まれる、標的分子を特異的に定量するためには、最終的に、Q-q-Q装置を用いて、多重反応モニタリングMRMと呼ばれる、特定質量をもつイオンを通過させる質量フィルターQ1とガス衝突誘起開裂CIDによって生じる断片 (フラグメントイオン) を通過させる質量フィルターQ3の組み合わせを設定 (MRMトランジション) し、この2つの質量フィルターを通過できるイオンを検出しなければならない。MRMに先立って、CIDによって生じる種々のフラグメントイオンが標的分子に由来するかの定性は、小数点以下3桁まで質量分析できるQ-q-ToFで確定する必要がある。【図1】は、標的分子の構造式に基づいて、標的分子から派生するフラグメントイオンをMS Fragmenterソフトウェア [ADC/Labs社] で網羅的に予測し、標的分子の構造部位を測定したマススペクトルに帰属した結果である。これによって、MRMに適用可能な標的分子を定性する手段を確立した。【図1】は、ノナペプチドのオキシトシンを定性した内容の一部で、2つのフラグメントイオン ( $m/z$  285.192,  $m/z$  723.259) と標的分子イオン ( $m/z$  1007.444) が理論値との誤差0.01以下で測定され、フラグメントイオンに該当する分子構造を定性できた。

### 第二段階：Q-q-Q装置による多分子同時定性解析

生体試料中の標的分子群を一度に検出するためには、試料を前処理と液体クロマトグラフィーによって分画し、予め設定したMRMトランジションで多重反応モニタリングする必要がある。【図2】は、上述した第一段階と同様の作業で、標的分子群に由来するフラグメントイオンの定性に続いて、前処理、液体クロマトグラフィー、MRMトランジションの各条件を至適化した後に、1回の測定で、標的分子群のマススペクトルを同時に解析した結果である。これによって、多数の分子をMRMで一斉に定性する手段を確立した。【図2】は、トリプトファン代謝物の3-ヒドロキシキヌレニン3-HK、キノリン酸QUIN、キノレン酸KYN、トリプトファンTRP、キヌレン酸KYNAを同時に定性した内容の一部で、それぞれのMRMトランジション (標的分子イオン>フラグメントイオン) が $m/z$  225.0 > 208.1,  $m/z$  166.2 > 122.0,  $m/z$  209.2 > 192.1,  $m/z$  205.2 > 188.1,  $m/z$  190.1 > 144.5と設定され、ある細胞培養上清検体に含有されるトリプトファン代謝物が定性できた。

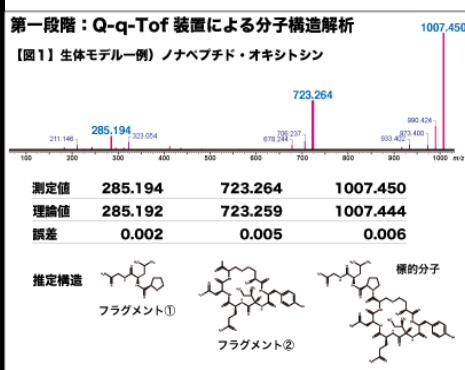
### 第三段階：Q-q-Q装置による多分子絶対定量解析

生体試料中の標的分子群を正確に定量するためには、最終的に、各標的分子に対する標準品希釈系列を調製し、予め作成した各検量線に外挿する必要がある。【図3】は、上述した第一段階から第二段階を経て、検量線の範囲を最適化した後に、1回の測定で、標的分子群のマススペクトルを多重反応モニタリングし、それぞれのピーク面積を算出した結果である。これによって、MRMと外部標準法で絶対定量する手段を確立した。【図3】は、ビタミンD代謝物の25-ヒドロキシビタミンD3と25-ヒドロキシビタミンD2を同時に定量した内容の一部で、検量線範囲0.97 ng/mLから31.25 ng/mLの6ポイントにおいて、決定係数 $r^2$ が0.999以上の良好な直線性のもとで、ある血清検体が含有するビタミンD代謝物がそれぞれ11.84 ng/mLと7.97 ng/mLと定量できた。

以上、本課題の挑戦的研究から、質量分析プラットフォームの基盤技術を習得することができ、より発展的な定性・定量研究を見据える段階となっている。実際に、本研究の成果を活用する新しい2つの取り組みである『糖尿病黄斑浮腫に対する閾値下レーザー治療のモニタリングマーカー確立』と『妊婦のレストレスレッグス症候群はビタミンDで改善の可能性を見出せるか?』が令和3年度科学研究費助成事業の基盤研究 (C) と挑戦的研究 (萌芽) に採択されている。

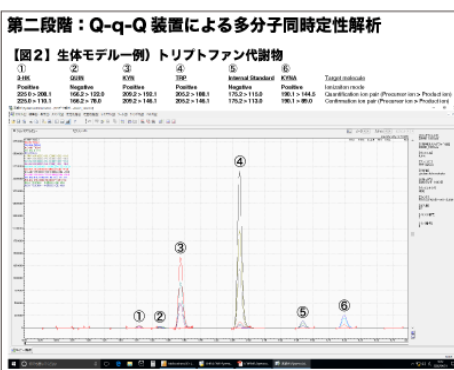
### 第一段階：Q-q-ToF装置による分子構造解析

【図1】生体モデル例) ノナペプチド・オキシトシン



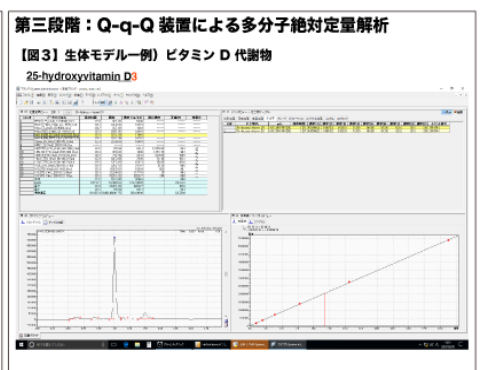
### 第二段階：Q-q-Q装置による多分子同時定性解析

【図2】生体モデル例) トリプトファン代謝物



### 第三段階：Q-q-Q装置による多分子絶対定量解析

【図3】生体モデル例) ビタミンD代謝物



## 主な発表論文等

### 【論文】

- Assessing urine ammonium concentration by urine osmolal gap in chronic kidney disease  
Takuya Fujimaru, Takuya Shuo, Masahiko Nagahama, Fumika Taki, Masaaki Nakayama, Yasuhiro Komatsu  
Nephrology (2021) DOI: 10.1111/nep.13937 Online ahead of print
- Effects of epidural anesthesia on postpartum maternity blues and fatigue and its relation to changes in oxytocin  
Eri Shishido\*, Takuya Shuo, Kazuyuki Shinohara, Shigeo Horiuchi  
Japan Journal of Nursing Science (2021) DOI: 10.1111/jjns.12406 Online ahead of print