

微量タンパク質の質量分析技術開発とその食品・医薬品への応用

山田 尚之

第1章 序論.....	1
第1節 はじめに.....	1
第2節 食品の安全・安心を支えるための食品用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質分析法の開発.....	3
第3節 微量タンパク質同定のための質量分析基盤技術開発.....	5
第4節 微量タンパク質同定のためのタンパク断片化技術開発.....	7
第5節 断片化技術のタンパク質2次構造情報抽出への応用.....	10
第6節 タンパク質断片化技術の相互作用部位解析への応用.....	11
第2章 食品用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質検出法開発.....	14
第1節 はじめに.....	14
第2節 ドットプロットー蛍光染色法の概略.....	16
第3節 標準タンパク質による検出下限と定量性.....	18
第4節 食品添加物用アミノ酸及び核酸製品中のタンパク質分析.....	19
第5節 結論.....	24
第3章 微量タンパク質同定のための質量分析基盤技術開発.....	26
第1節 はじめに.....	26
第2節 タンパク質同定のための高耐久性ナノESIエミッターの開発.....	27
第1項 高耐久性ナノESIエミッターの設計.....	27
第2項 流速の検討評価.....	30
第3項 サンプル濃度の評価検討.....	32
第4項 イオン化安定性の評価.....	35
第5項 キャピラリーLC-MS/MSへの応用と耐久性評価.....	36
第6項 ナノLC-MS/MSへの装着と高感度タンパク質同定への応用.....	37
第3節 結論.....	40
第4章 微量タンパク質同定のためのタンパク質断片化技術開発.....	41
第1節 はじめに.....	41
第2節 FT-ICRMSの構造と特徴.....	42
第3節 熱補助ノズルスキマーCID法及び熱補助IRMPD法によるタンパク質断片化と帰属.....	45
第1項 熱補助ノズルスキマーCID法によるタンパク質の断片化.....	45
第2項 熱補助IRMPD法によるタンパク質の断片化.....	49
第3項 熱補助ノズルスキマーCID法及び熱補助IRMPD法によるリゾチームの断片化.....	54
第4項 熱補助ノズルスキマーCID法による牛血清アルブミンの断片化.....	57
第5項 熱補助ノズルスキマーCID法及び熱補助IRMPD法によるモノクローナル抗体の断片化.....	59
第4節 結論.....	61

第5章	タンパク質断片化技術の2次構造情報抽出への応用.....	62
第1節	タンパク質断片化スペクトルからの2次構造抽出.....	62
第1項	IL-6の断片化スペクトル測定と帰属.....	62
第2項	ユビキチンの断片化スペクトル測定と帰属.....	65
第3項	ミオグロビンの断片化スペクトル測定と帰属.....	66
第4項	carbonic anhydraseの断片化スペクトル測定と帰属.....	68
第5項	アルコール脱水素酵素の断片化スペクトルデータと立体構造モデルとの比較 73	
第2節	結論.....	77
第6章	タンパク質断片化技術の相互作用部位解析への応用.....	78
第1節	タンパク質固定化によるタンパク質-タンパク質相互作用解析法.....	78
第2節	IL-6中和抗体のエピトープの解析.....	81
第1項	はじめに.....	81
第2項	rhIL-6のH/D交換反応.....	82
第3項	rhIL-6-MH166複合体形成の条件検討.....	88
第4項	rhIL-6-MH166複合体のH/D交換反応.....	92
第3節	結論.....	105
第7章	総合討論と今後の展望.....	106
第8章	結論.....	113
第1節	食品用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質検出法開発.....	114
第2節	微量タンパク質同定のための質量分析基盤技術開発.....	114
第3節	微量タンパク質同定のためのタンパク質断片化技術開発.....	115
第4節	タンパク質断片化技術の2次構造情報抽出への応用.....	116
第5節	タンパク質断片化技術の相互作用部位解析への応用.....	117
実験方法.....		118
参考文献.....		130
謝辞.....		136

略語表

MS	Mass Spectrometry
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
ESI	Electrospray Ionization
FAB	Fast Atom Bombardment
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
NanoESI	Nano Electrospray Ionization
rhIL-6	Recombinant human Interleukin-6
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
TOFMS	Time of Flight Mass Spectrometry
FT-ICRMS	Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry
ISD	In-source Dissociation
CID	Collision-induced Dissociation
MSAD	Multipole Storage Assisted Dissociation
IRMPD	Infrared Multi Photon Dissociation
HANS-CID	Heat Assisted Nozzle-skimmer Collision-induced Dissociation
HA-IRMPD	Heat Assisted - infrared Multi Photon Dissociation
ECD	Electron Capture Dissociation
ETD	Electron Transfer Dissociation
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
H-D	Hydrogen / Deuterium
BSA	Bovine Serum Albumin
IgG	Immunoglobulin G
MH166	Anti human IL-6 Neutralizing Monoclonal Antibody MH166
IL-6R	α -IL-6 Receptor (gp80)
gp130	IL-6 Signal-transducing Receptor gp130

アミノ酸は、3文字表記あるいは1文字表記で記載した

序論

第1節 はじめに

ゲノム配列解析技術の著しい発展により、近年、多くの生物種で全遺伝子配列が明らかにされ、その膨大な配列情報はデータベースとして蓄積された。この蓄積された遺伝子データベースは、遺伝子あるいはその発現に関する大規模解析から、生命現象を解明するゲノミクスという新しいアプローチの発展に大きく寄与している。ゲノム(遺伝子の総和)を対象としたゲノミクスに対して、タンパク質の総和(プロテオーム)を包括的に解析する手法は、プロテオミクスと呼ばれている。これは、上記遺伝子データベースに加えて、質量分析を中心とした微量タンパク質解析技術を基盤としている。生命現象の直接の担い手であるタンパク質を包括的に解析するプロテオミクスは、基礎生命科学のみならず、基礎・臨床医学、創薬、農学即ち発酵等の生物生産、食品科学、酵素学などの幅広い分野で重要な役割を果たし始めている。昨今ではプロテオミクスは、特に医薬品開発や医療分野において、創薬ターゲットタンパク質や疾患関連マーカーの新しい探索方法として期待されている。特定の疾患患者あるいは疾患モデル動物の生体試料と健常サンプルを比較することにより、疾患バイオマーカーを見つけ出すことが、創薬分野のプロテオミクスの主たる目的である。この場合、測定対象である生体試料が血液や尿などの体液や組織、または培養細胞などであり、非常に多くの種類のタンパク質が様々な量含まれている非常に複雑な試料である。この中から、重要なタンパク質を見つけ出すための微量タンパク質解析技術は、2次元電気泳動や蛍光染色法といった生化学的手法と生体高分子の質量分析技術からなり、タンパク質の分離、検出、同定、定量がプロテオミクスの基本要件である。

基盤となるタンパク質の質量分析は、1960年のBiemannらの先駆的研究から始まる¹。MALDI法やESI法が発明される以前に、揮発性誘導体にしたペプチドをEI-MS/MSで測定し配列解析を行った。その後、FAB法と高性能磁場型タンデムMSが登場し、プロテアーゼ消化との組み合わせによるペプチドマスマッピングが実現することにより、現在のプロテオミクスの基礎が出来

上がった。これに先駆的に関わってきたのが、Genentech 社の Stults^{2,3}、Smith Kline and French 社の Carr⁴、日本では大阪大学の下西、松田、そして味の素の平山⁵らであった。Frit-FAB(連続試料導入可能な FAB)法が開発され、LC-MS/MS によるペプチドマッピングの基礎も完成した⁶。HPLC の微量化とイオントラップ MS の登場により、タンパク質同定及び一次構造解析技術の高感度化は、その後著しく発展してきた。我々も、LC-MS/MS を確立することで、抗体の全アミノ酸配列解析と糖鎖構造解析⁷、MHC 分子に結合する HIV 抗原ペプチド⁸や舌癌抗原ペプチドの同定⁹など、医学・免疫学に関わる研究を行ってきた。1993年に Stults らが 2 次元電気泳動ゲルを用いたプロテオミクスを、1995年に Mann らが NanoESI と In gel Digestion の技術を確立し高感度化に成功することにより¹⁰、質量分析のプロテオミクスへの応用が加速し始めることになった。2 次元電気泳動を中心とした高感度のタンパク質分離・検出技術の発展もこれを支えている。

このような最先端のプロテオミクス技術は、医学・薬学のみならず、食品分野、例えば、健康食品の開発や通常の食品の安全・安心の実現など、幅広く人類のために応用できると考えられる。その中でも食品アレルギーを引き起こす抗原タンパク質を高感度に検出する優れた技術は本研究以前には未だなく、微量タンパク質を検出、定量、同定する技術は、このような食品の安全・安心に貢献できる筈である。

一方、質量分析による微量タンパク質同定技術の進展は著しいが、包括的かつ大規模解析には、高感度であることに加えて、耐久性と堅牢性が高いことが重要な課題となってきた。

さらに、プロテオミクスやその他の方法論で見出した創薬ターゲットタンパク質の立体構造や相互作用部位を解析することは、ターゲットタンパク質の機能解析や低分子薬剤の設計を行う上で大変重要な研究である。X 線結晶構造解析や NMR を用いたタンパク質の構造解析技術は、これを解決する強力な手法であるが、解析に必要な試料量と時間に課題があり、より簡便で高感度の手法開発の必要性が高まっている。

このような背景のもと、本研究では、①食品の安全・安心を支えるための食品用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質分析法の開発、②微量タンパク質同定のための耐久性と堅牢性の

高い質量分析基盤技術及びタンパク断片化技術の開発、③タンパク質 2 次構造及び相互作用部位解析技術の開発の都合項目の研究開発を実施し、食品・医薬品に対して具体的に実用的化することが目的である。食品、医薬品への具体的応用としては、各々、食品用アミノ酸・核酸の食品アレルギー対策用分析技術開発、リウマチ治療薬開発基盤としての意義があるサイトカイン、即ち、抗ヒト・インターロイキン-6(ヒト IL-6)中和抗体のエピトープ解析法開発を実施した。特に、タンパク質断片化技術は、立体構造情報や相互作用情報をも含む点で極めて重要である。

第2節 食品の安全・安心を支えるための食品用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質分析法の開発

近年、先進諸国において食品アレルギーの問題は、食品の安全と安心の観点から大変重要である。特に、卵、落花生、乳、ごま、そばや小麦や大豆などのグルテンを含む穀物による食品アレルギーは、重篤な症状を引き起こす例があり、深刻な問題である。食物アレルギーを有する消費者保護の観点から、日本国内においては平成 14 年度より、アレルギー物質を含む食品にはその表示が義務化された¹¹。食品アレルギーの主たる原因物質はタンパク質である。抗原タンパク質の種類については、発症数、重篤度から勘案して表示する必要性の高い特定原材料5品目(卵、乳、小麦、そば、落花生)についてはその表示が義務化されている。特定5品目に加え、「あわび、いか、いくら、えび、オレンジ、かに、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、鶏肉、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン」の19品目についてもできる限りの表示が推奨されている。

健康危害防止の観点から、食物アレルギーを誘発する量を考える際には、抗原(特定タンパク)量ではなく、食品中の特定原材料等の総タンパク質量に重きを置くことが望まれている。アレルギー症状を誘発する抗原量に関しては、総タンパク質量として数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度レベルではアレルギーの誘発に個人差があり、 ng/ml 濃度レベルでは、ほぼ誘発しないであろうと考えられている。これを受けて、食品中に含まれる特定原材料等の総タンパク質量が、数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度レベル又は数 $\mu\text{g}/\text{g}$ 含有レベルに満たない場合は、表示の必要性はないこととなった¹¹。

食品中のアレルゲンタンパク質を高感度で検出する方法として、現在、最も一般的に使われているのが、抗原-抗体反応を用いた ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay) である。日本においては、厚生労働省が定めた特定5品目 (卵、牛乳、小麦、落花生、そば) の ELISA 法が公定法として開発されているが、これ以外のアレルゲンに対する抗体や ELISA 法は未だにない¹²。また、食物アレルギーの実態及びアレルギー誘発物質の解明に関する研究の今後の発展により、この種類は増加することが推察される。しかしながら、この19品目に対する分析法でさえ、現在でも開発途上である。

一方、米国においては、遺伝子組み換え技術を応用した食物・食品が一般的に受け入れられている。最近では、ヨーロッパ諸国や日本においても遺伝子組み換え技術を用いた食品が一部で流通するようになったが、未だに消費者の不安が大きく残っている。もっとも心配されるのが遺伝子組み換え体由来のタンパク質の残存であり、これは抗原性を有する可能性が危惧されている。従って、今後著しく増加すると予想される遺伝子組み換え技術応用食品についても、残存タンパク質が数 ppm 以下であることを示すことは、食品の安心と安全を確保するために大変重要である。

一方、天然のうま味成分であるグルタミン酸、イノシン酸、グアニル酸は、うま味調味料として世界中で使われている。また、近年、アミノ酸は、いろいろな効果が見いだされ、種々のサプリメントとして用いられることが多くなってきている。現在、食品・医薬用途のアミノ酸・核酸は、L-Ala, L-His, L-His-HCl, L-Ile, L-Leu, L-Lys-HCl, L-Thr, L-Val, L-Alg+L-Glu, L-Cys-HCl-H₂O, L-Ser, Gly, L-Arg, L-Pro, DL-Ala, L-theanine, L-Asp, (L-Cys)₂, L-Glu, L-Trp, L-Gln, L-Asp-Na H₂O, L-Glu-Na H₂O, L-Phe, L-Tyr, GMP, IMP などおよそ30種類以上の製品が存在している。

このようにアミノ酸、核酸はうま味調味料を代表とした食品用途として広く摂取されている。また、非代償期肝硬変治療薬である分岐鎖アミノ酸製剤や輸液、栄養剤など、医療用途としてもアミノ酸は用いられている。これら食品・医薬用のアミノ酸・核酸は、主に発酵法で生産され、その後、非常に高度に精製され、最終製品となる。従って、これらの製品中には、タンパク質の残

存はほとんどないと考えられる。しかしながら、このような社会的背景の下、残存総タンパク質量を数 $\mu\text{g/g}$ 含有レベル(数 ppm レベル)で検出できる測定法を開発し、分析することは、食品の安心と安全を支える上で、非常に意味のある研究である。

第3節 微量タンパク質同定のための質量分析基盤技術開発

前述の通り、質量分析による微量タンパク質同定技術の進歩は著しいが、包括的かつ大規模解析であるプロテオミクスにおいては、高感度に加えて、耐久性と堅牢製が重要な課題となってきた。質量分析は、測定対象分子の質量を求める手法であり、直接得られる情報は質量のみで非常に単純である。装置の構成は、大きくイオン化部と質量分析部の2つから成る。測定対象となる分子がイオンとならなければ質量分析を行うことができないことから、イオン化法は非常に重要である。1980年代初頭に、高速原子衝突イオン化法(Fast atom bombardment:FAB イオン化法)の登場により、それまで低分子量しか測定できなかった質量分析計は、分子量数千のペプチド・タンパク質などの生体高分子を測定対象とすることができるようになった。しかし、感度、質量範囲の限界などにより、広く一般的な解析法とはならなかった。その後、2001年ノーベル化学賞受賞対象となった2種類の原理の異なるソフトイオン化の登場により、より高分子量のタンパク質の質量分析が可能となった¹³。一つは田中耕一のレーザーイオン化法¹⁴であり、もう一つはFennのエレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization : ESI 法)¹⁵である。レーザーイオン化法は、その後多くの研究者により改良され、現在はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(Matrix-assisted laser desorption ionization: MALDI 法)としてタンパク質などの生体高分子の測定に広く実用化されている。

これらソフトイオン化の登場と質量分析計の発展により、生体中に存在する微量のペプチド・タンパク質を測定できるようになってきた。これが質量分析の最大の特徴であり、サブフェムトモルの極微量ペプチド・タンパク質の質量を高い精度で求めることができる。現在もっとも標準的なタンパク質同定法は、試料をトリプシンやリシルエンドペプチダーゼなどの特異性の高い消化酵

素を用いてペプチド断片とし、これを液体クロマトグラフィー(LC)とタンデム質量分析計(MS/MS)を組み合わせた LC-MS/MS で測定解析することにより行われる。ゲノム DNA 塩基配列の解読とデータベース化の著しい発展により、これら酵素消化して得られたペプチドのマスペクトルと MS/MS 解析により、比較的容易にタンパク質を同定することができるようになってきた。

プロテオミクスにおいて質量分析に求められていることは、1)測定スピード、2)高感度、3)自動化、4)翻訳後修飾情報の取得、である。遺伝子の数は有限であるが、遺伝子が転写・翻訳されて生成するタンパク質は、選択的スプライシングや翻訳後修飾により、遥かに多種多様である。また、生命活動に伴うタンパク質の発現や翻訳後修飾、相互作用の変化を捉えることを目標とするプロテオミクスでは、多くの実験が必要となるために、測定のスPEEDと自動化が重視される。さらに、遺伝子は、ポリメラーゼ連鎖反応法(polymerase chain reaction : PCR)を用いる事により、増幅することができるが、タンパク質を増幅することはできない。そのため、極微量に存在しているタンパク質を同定するためには、高感度の解析手段が求められる。

質量分析を用いたタンパク質解析で、高感度に寄与する項目は、1)試料を質量分析計に導入する前、2)試料のイオン化、3)イオンの質量分析の3つに大別できる。1)の試料を質量分析に導入する前の工程では、タンパク質の精製や酵素消化、脱塩工程などがある。2)試料のイオン化については、主に MALDI 法や ESI 法などのソフトイオン化が用いられる。内径が数十 μm の極細管を用いた ESI は、ナノ ESI と呼ばれており、数十～数百 nl/min の極低流量でイオン化が可能となり、ESI の高感度化と微量化がなされている¹⁰。この3つの項目がすべて揃うことにより、高感度化が実現される。

LC/MS を行う場合、LC の流量とカラムの内径を細くすることにより、試料の濃縮倍率が向上し、質量分析計の感度が向上する。一般的な分析用 HPLC カラムの内径は、4.6mm であるのに対し、プロテオミクスにおいては、内径 0.3mm のキャピラリーカラムや内径 50-75 μm のナノカラムが用いられる。カラム内径が細くなることに対応し、流量も削減しなくてはならなくなり、キャピラリーカラムで 1-2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、ナノカラムでは 50-200 nL/min と低流量の HPLC システム

で行われる。このナノHPLCとナノESI法との組み合わせであるナノLC-MS/MS法により、高感度化と自動化を同時に達成することができるようになった。しかし、一般的なナノESIエミッターは、金属薄膜あるいは伝導性高分子薄膜を被覆した内径1~10 μm のガラス製あるいはフューズドシリカ製のものであるが、耐久性の問題点を抱えていた。物理的な強度が弱いことに加え、ナノESIでは千数百eVの高電圧を印加するため、金薄膜や伝導性ポリマー薄膜の剥離により、長期にわたり安定したイオン化能を維持することが困難であり、これは連続自動測定での大きな課題であった。そこで、本研究では、高感度を維持しつつ、耐久性に優れた実用性の高いナノESI用エミッターの開発を行った。

第4節 微量タンパク質同定のためのタンパク断片化技術開発

ESI法とMADLI法は、タンパク質などの生体高分子を分解することなくイオン化することのできるソフトなイオン化法である。これらは、微量タンパク質同定法の核となる技術として、プロテオミクスやタンパク質相互作用解析に活用されるようになった。しかしながら、その手法は対象タンパク質をプロテアーゼで消化し、生成したペプチドの質量とMS/MSを測定するものである。従って、タンパク質をそのままイオン化できるESI法とMADLI法の恩恵を十分に発揮しているとはいえない。1990年代に市販機が世に登場したフーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析計(FTICR-MS)は、高分解能かつ高質量精度であると同時に、タンパク質をそのまま断片化できる能力を有した質量分析計である。生体高分子であるタンパク質を酵素消化等の前処理なしにMSの中で断片化することは、迅速かつ高感度なタンパク質同定につながる重要な要素技術である。このタンパク質を直接MS内で断片化して同定しようとする新しい方法論は、“トップダウン・プロテオミクス”(図1)と呼ばれている¹⁶。

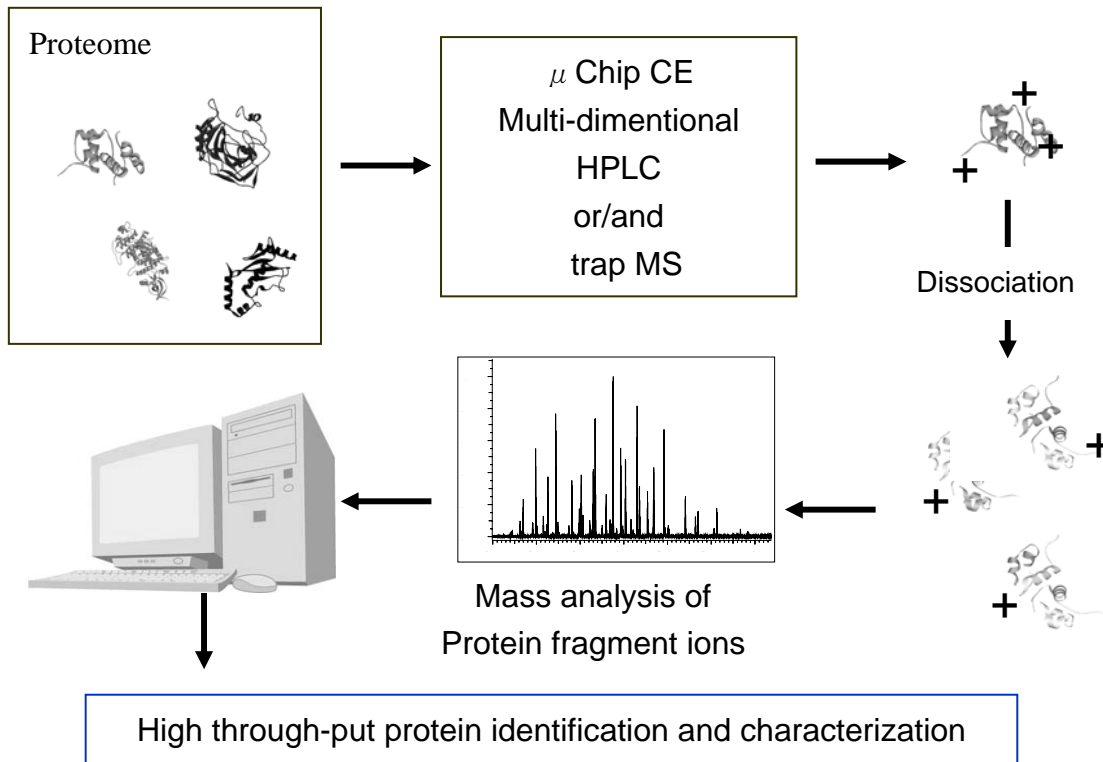


図 1 トップダウン・プロテオミクスの概念図

タンパク質を HPLC や MS などの手法を用いて分離後、質量分析でタンパク質全体の質量を測定するとともに、質量分析内で断片化 (Dissociation) を起こさせ、タンパク質の断片化イオンを観測する。その質量情報からデータベース検索により、同定する方法論

トップダウン・プロテオミクスは、①タンパク質を分離する工程、②タンパク質のイオン化 (主として ESI 法)、③タンパク質の断片化と MS スペクトルの測定、④データベースサーチ、の 4 つからなる。①のタンパク質の分離には主に HPLC が用いられ、LC/MS としてシステムを構築することにより、全自動のタンパク質同定装置が完成する。現在のプロテオミクスの手法では、タンパク質の分離と酵素消化がオフラインとなっているため、操作が煩雑でかつサンプルのロスが生

じるなどの問題点があるが、トップダウン・プロテオミクスは、この課題を解決する方法である。

このようにトップダウン・プロテオミクスは次世代のタンパク質同定法として期待されているが、断片化可能なタンパク質の分子量に制限があることが最大の課題である。分子量の大きなタンパク質を直接断片化するためには、大きなエネルギーを必要とする。現在、30kDa程度のタンパク質を直接断片化できる方法としては、MALDI-TOFMSを用いたインソース分解法(in-source dissociation :ISD)と FTICR-MS を用いたいくつかの方法がある。ISD 法¹⁷は、イオン化時または直後にイオン化室で開裂を起こす方法である。しかし、解裂の効率が低く、ノイズのようなイオンを詳細に解析しなくてはならない為、極めて高い純度の試料と高い測定技術を要求する。FTICR-MS による断片化方法としては、①イオン化後の加熱キャピラリーとスキマーレンズ間の電圧差を利用したノズルスキマーCID 法(または、キャピラリースキマーCID 法、ヘキサポール CID 法)、②スキマーに続く rf-only multipole 内にイオンを蓄積することで開裂を推進する multipole storage assisted dissociation 法(MSAD 法¹⁸)、③multipole 内^{19,20,21}または ICR セル内²²にトラップしたイオンに対して CO₂ 赤外レーザーを照射する infrared multi photon dissociation 法(IRMPD 法)、④ ICR セル内のイオンに対して電子を捕捉させ、ラジカル誘起により開裂が生じる electron captured dissociation 法(ECD 法)^{23,24,25}などがある。分子量の大きなタンパク質としては、これまでにヒト・アポトランスフェリン(79kDa)²⁶をノズルスキマーCID 法で、また大腸菌由来の *ThiC* 遺伝子産物 (74kDa)を IRMPD 法で断片化している例がある²⁷。しかし、この2つ以外は 30kDa 以下の限られたタンパク質の報告しかない。また、分子内に多くジスルフィド結合を持つ、牛 α -ラクトアルブミンや卵白リゾチームを断片化することができない²⁸。この問題点を解決するために、本研究では、プロテオミクス用に開発した金属製のナノESIエミッターの高い耐久性に注目し、イオン源付近の温度を 250°C以上に加熱することでタンパク質の断片化を促進させることを着想した。タンパク質に限らず、質量分析においては、イオンにエネルギーを与え解離させる衝突誘起解離(CID)が構造解析に大変有用な方法として用いられる。代表的な方法は、運動しているイオンを He や Ar などの不活性ガスと衝突させることにより、その衝突エネルギーによりイオンが解離するもので

ある。イオンの内部エネルギーを増加させることにより、イオンを解裂させる。即ち、分子イオンに蓄積された内部エネルギーが分子内の共有結合のエネルギーより大きくなることにより、フラグメンテーションが起こるのである。本研究では、イオン源付近を加熱し、分子イオンに熱エネルギーを与えることにより、内部エネルギーを増加させ、断片化効率を向上させることを試みた²⁹。

第5節 断片化技術のタンパク質2次構造情報抽出への応用

タンパク質は、DNA の遺伝情報に基づいてアミノ酸が一行に並べられたものであるが、その機能発現にはタンパク質の高次構造形成が必須である。従って、タンパク質の機能を理解するためには、タンパク質の高次構造を理解することが重要である。X線結晶構造解析、NMR、電子顕微鏡による立体構造解析は、タンパク質の機能を原子レベルで解明することができる。さらに、リガンドとの複合体の立体構造を明らかにすることができれば、機能改変やドラッグデザインなどの応用が可能となり、医薬品開発に大変有用な技術となる。しかしながら、依然としてタンパク質の結晶化、濃縮、構造解析には、多くの労力がかかることから、これを補う形としてタンパク質の立体構造モデリングという手法が用いられる。立体構造未知のタンパク質のアミノ酸配列から、その立体構造を予測することは、そのモデル構造から機能を類推することだけでなく、機能ドメインを予測することにより、ドメインを対象とした NMR や X 線結晶構造解析に活用されている。

しかしながら、計算化学により構築された立体構造モデルや2次構造予測は実験による検証がまったくなされていない。そこで、分解能は低いながらも、簡便に2次構造情報が得られる技術には大きな期待があり得る。本研究では、質量分析でタンパク質を断片化した際に、 α ヘリックスや β シートなど、しっかりとした構造を持つ部分が切断されにくい傾向があることを複数のタンパク質で見出した。断片化スペクトルを詳細に解析することにより、これらの部分的立体構造情報を抽出できる可能性が示唆され、予測構造の評価が可能か検討を行った。

第6節 タンパク質断片化技術の相互作用部位解析への応用

タンパク質は単独で静的に存在するだけで機能することはなく、低分子あるいはタンパク質などの生体高分子と動的に相互作用することで機能を発現する。医薬品開発のターゲットタンパク質の機能や低分子薬剤の設計を行うためには、相互作用部位を明らかにする必要がある。リガンドとタンパク質の相互作用を原子レベルで解析する方法は、X線結晶解析、NMRがある。しかし、これらの解析を行うためには、大量発現系を構築し、研究対象タンパク質を大量に調製する必要がある。また、X線結晶解析では結晶化が必須であり、解析に耐えうる結晶を得るには多大な労力と時間を費やすことがある。NMRにおいても高濃度の試料溶液の調製や安定同位体標識が必要であったり、解析可能な分子量の限界がある場合がある。

これに対して、質量分析法は得られる構造情報は、X線結晶解析やNMRに比べて遥か及ばないものの、測定に必要な試料量が極めて少なく、測定からデータ解析までに要する時間が短いことが最大の利点である。質量分析法を用いて、タンパク質の相互作用部位情報を得る方法は大きく2つに分けることができる。一つは、マイルドな条件下で側鎖の特定の官能基を化学修飾し、ペプチドマスマッピングにより修飾部位を同定する方法である³⁰。もう一つは、タンパク質の主鎖のアミド水素の重水素交換(H-D 交換)を用いる方法である^{31, 32, 33, 34, 35}。タンパク質の表面に存在するアミノ酸側鎖の交換性水素(H)は、重水に溶解すると直ちに重水素(D)に置き換わる。一方、主鎖のアミド水素の場合はその環境により重水素への交換速度が異なる。タンパク質分子の外側や水素結合に関与していないアミド水素は、中性付近で比較的短時間で重水素に置き換わる(H/D 交換)。一方、タンパク質分子内部に埋もれている部分や水素結合を形成しているアミド水素のH/D 交換速度は遅い。この違いを検出することでタンパク質の構造情報を得ることができる。NMRを用いた方法が主流であるが、1993年にSmithらがH/D 交換とMSを用いた実験法を確立し³⁶、その後いくつかのタンパク質について、H/D 交換とMSを用いた高次構造解析が報告されている。図2にその手法について示した。はじめに、中性付近の重水溶液にタンパク質を溶解

し、H/D 交換反応を行う。その後、pH を 2-3 付近に下げ、温度を 0°C にして、H/D 交換反応速度を低下させる。重水素化したタンパク質を酸性・氷温条件下ペプシン消化を行い、得られたペプチド断片の質量変化を経時的に追跡し、各ペプチドフラグメントの H/D 交換速度を求める方法である。最近では、ペプシンを使わずに capillary skimmer CID 法により MS 内で断片化させる方法もある³^{5,37}。このようにして得られた情報から、タンパク質のアミノ酸配列上でのアミド水素の環境情報を得ることができる。この技術をまた、タンパク質-タンパク質、タンパク質-リガンドの相互作用部位解析に応用する際には、遊離の場合と複合体の場合とを比較することにより、相互作用部位を同定することが可能である。

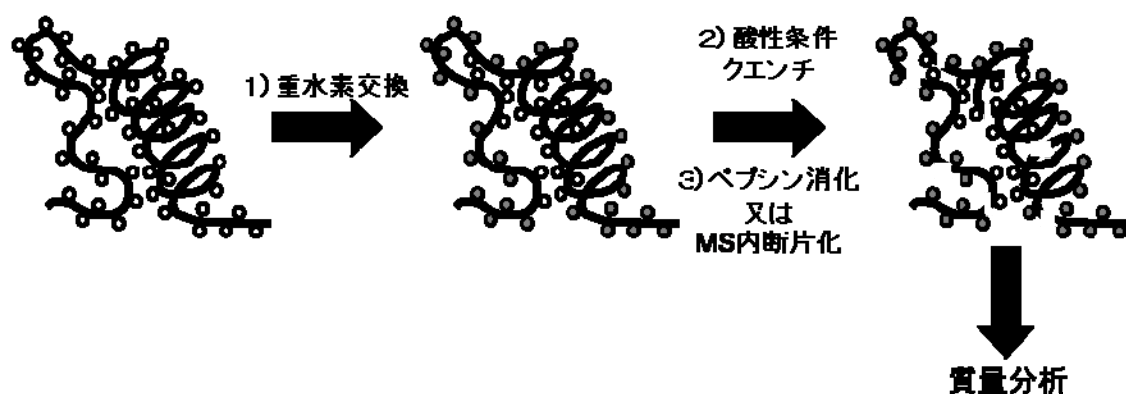


図 2 H/D 交換反応を用いたタンパク質立体構造解析法のご概念図

○: 交換性主鎖アミド水素、 ●: 重水素化したアミド水素

しかしながら、分子量の大きいタンパク質同士の複合体の場合は、生成する断片ペプチドあるいはフラグメントイオンの数が膨大となり、帰属が極めて困難となる。

本研究では、上記課題を解決するために、水素／重水素交換(H/D 交換)、アフィニティークロマトグラフィーとタンパク質断片化技術を組み合わせることにより、タンパク質-タンパク質相互作用部位情報を得る方法を検討した。さらに、この方法をサイトカインであるインターロイキン-6 (IL-6)とその中和抗体の相互作用部位解析へ応用し、その実用性の検証を行った。

IL-6 は、B 細胞が抗体産生細胞へ分化誘導する際の B 細胞分化因子として 1986 年にクローニングされた³⁸。IL-6 は免疫応答だけでなく、造血系及び神経系の細胞増殖・分化に関与している複数の機能を持ったサイトカインである^{39,40,41}。特に、血小板増加作用があり、近年まで増血剤として、医薬品開発研究がなされていた。一方、リウマチ⁴²、ミエローマ^{43,44}、エイズ⁴⁵などの免疫疾患において、生体内の IL-6 の過剰発現が観察されており、生体内で IL-6 の機能制御は、これら免疫疾患の治療法として有望視されている。実際には、抗 IL-6 中和抗体や抗 IL-6 受容体抗体は、IL-6 阻害剤としてのリウマチ治療薬として、開発研究が検討されている^{46,47,48,49,50,51,52}。本研究で用いた IgG1 産生マウスハイブリドーマ MH166 細胞上清から精製された抗ヒト IL-6 マウスモノクローナル抗体 MH166 は、in vitro 及び in vivo において中和活性を持つことが知られている^{53,54}。しかしながら、MH166 のエピトープは明らかではなかった。IL-6 の生理活性は、IL-6 と IL-6 受容体システムによって制御されている。IL-6 受容体は、 α サブユニット (IL-6R:gp80)とシグナル伝達機能を持つ β サブユニット(gp130)の 2 種類のタンパク質から構成されている。IL-6 ははじめに低親和性の IL-6R に結合し、その後 IL-6/IL-6R/gp130 複合体を形成し、細胞内にシグナルが伝達される⁵⁵。従って、MH166 は、IL-6 分子上の IL-6R 結合部位あるいは gp130 結合部位のどちらかを認識し、結合することにより、中和活性を発現していると考えられる。本研究では、前述の方法を用いて、rhIL-6とMH166の結合部位の同定を行うことにした。用いる抗体が中和抗体であることから、これらの結合部位は、rhIL-6とそのレセプターとの結合部位付近であることが示唆される。

第2章 食品用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質検出法開発

第1節 はじめに

食品アレルギーの問題は、食品の安全と安心の観点から大変重要である。特に、卵、落花生、乳、ごま、そばや小麦や大豆などのグルテンを含む穀物による食品アレルギーは、重篤な症状を引き起こす例があり、深刻な問題である。食品アレルギーの主たる原因物質はタンパク質であり、健康危害防止の観点から、食物アレルギーを誘発する量を考える際には、抗原(特定タンパク)量ではなく、食品中の特定原材料等の総タンパク質量に重きを置くことが望まれている。アレルギー症状を誘発する抗原量に関しては、総タンパク質量として、数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度レベルではアレルギーの誘発に個人差があり、 ng/ml 濃度レベルでは、ほぼ誘発しないであろうと考えられている。これを受けて、食品中に含まれる特定原材料等の総タンパク質量が、数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度レベル又は数 $\mu\text{g}/\text{g}$ 含有レベルに満たない場合は、表示の必要性はないこととなった¹¹。

したがって、食品中のアレルゲンタンパク質を数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (数 ppm) の高感度で検出する方法の開発が望まれている。最も一般的に使われている方法は抗原-抗体反応を用いた ELISA 法である。日本においては、厚生労働省が定めた特定5品目(卵、牛乳、小麦、落花生、そば)の ELISA キットが公定法として開発されているが¹²、これ以外のアレルゲンに対する抗体や ELISA 法はいまだにない。また、食物アレルギーの実態及びアレルギー誘発物質の解明に関する研究の今後の発展により、食物アレルギーの抗原の種類は増加することが予想される。

一方、米国においては、遺伝子組み換え技術を応用した食物・食品が一般的に受け入れられている。最近では、ヨーロッパ諸国や日本においても遺伝子組み換え技術を用いた食品が一部で流通するようになった。しかしながら、未だに消費者の不安が大きく残っている。もっとも心配されるのが遺伝子組み換え体由来のタンパク質の残存であり、これは抗原性を有する可能性がある。従って、今後著しく増加すると予想される遺伝子組み換え技術応用食品についても、残存タンパク質が数 ppm 以下であることを示す必要が生じると考えられる。

一方、食品には、調味料、食品素材から加工食品まで、その種類と形態は多種多様である。その中で、調味料や食品素材は、多くの加工食品の中に添加されている。例えば、天然のうま味成分であるグルタミン酸、イノシン酸、グアニル酸は、うま味調味料として世界中で使われている。また、近年、アミノ酸は、いろいろな効果が見いだされ、種々のサプリメントとして用いられることが多くなってきている。

現在、食品・医薬用途のアミノ酸・核酸は、L-Ala, L-His, L-His-HCl, L-Ile, L-Leu, L-Lys-HCl, L-Thr, L-Val, L-Alg+L-Glu, L-Cys-HCl-H₂O, L-Ser, Gly, L-Arg, L-Pro, DL-Ala, L-theanine, L-Asp, (L-Cys)₂, L-Glu, L-Trp, L-Gln, L-Asp-Na H₂O, L-Glu-Na H₂O, L-Phe, L-Tyr, GMP, IMP などおよそ30種類以上の製品が存在している。

このようにアミノ酸、核酸はうま味調味料を代表とした食品用途として広く摂取されている。また、分岐鎖アミノ酸 BCAA 製剤やアミノ酸輸液、栄養剤など、医療用途としてもアミノ酸は幅広く用いられている。これら食品・医薬用のアミノ酸・核酸製品は、主に発酵法で生産され、その後、非常に高度に精製され、最終製品となる。食品用途のアミノ酸・核酸製品は、非常に高度に精製されているが、我々は、このような社会的背景の下、残存総タンパク質を数 $\mu\text{g/g}$ 含有レベル(数 ppm レベル)で検出できる測定法を開発し、分析することは、食品の安心と安全を支える上で、非常に意味のある研究である。

本研究では、生化学やプロテオミクスにおける微量タンパク質検出技術を応用し、食品用途のアミノ酸・核酸製品中に残存する超微量タンパク質検出法の開発を行った⁵⁶。

分析法の開発に際しては、残存する微量タンパク質をできる限り高感度に検出しなくてはならない。タンパク質の定量には、ELISA 法のほかにブラッドフォード法、ビジンコニン酸(BCA)法、ピロガロールレッド-モリブデン錯体法、ドットマトリックス法などがあるが、いずれの方法も感度が十分ではなく、また大量のアミノ酸が分析に影響を与える。

最近のバイオサイエンスの世界では、網羅的なタンパク質解析技術(プロテオミクス)の進歩が著しく、微量タンパク質を検出する手法の開発が精力的になされている。プロテオミクスでは、微

量のタンパク質をロスすることなく高感度に解析する必要があり、その結果、高感度なタンパク質用蛍光染色試薬が開発されたり、ハンドリングの技術の向上が図られたりしてきた。このプロテオミクス用試薬と微量タンパク質ハンドリングのノウハウといったプロテオミクス技術を食品中の微量アレルゲン測定に応用することにした。

第2節 ドットプロットー蛍光染色法の概略

分析法の開発に際しては、残存する微量タンパク質をできる限り高感度に検出しなくてはならない。特に重要な点は以下の2点である。

1. 試料は完全にかつできる限り高濃度で溶解すること
2. 容器や器具への吸着を極力回避すること

製品中に含まれる正確なタンパク質量を測定するためには、試料を完全に溶解することが望ましい。また、可能な限り高濃度で溶解することにより、試料重量あたりの検出感度が向上する。アミノ酸と核酸の溶解度を表1に記載した。アミノ酸の溶解度(H₂O,0°C)は、最もよく溶けるプロリンで127g/dlであるが、チロシンではその溶解度が0.02g/dlと極めて低く、中性付近ではほとんど水に溶けない。しかし、塩酸酸性にすることにより、チロシンの溶解度は7.93g/dl(1N 塩酸)と著しく向上する。同じくL-シスチンの水に対する溶解度は、0.0112g/dl(H₂O,25°C)とアミノ酸中で最も低いが、3.6%塩酸での溶解度は、8g/dlに向上する。このように水に対する溶解度はアミノ酸の種類により大きく異なるが、1N 塩酸では、いずれも溶解度が向上するとともに差が減少していることがわかる。また、核酸についても、GMP でおおよそ25g/dl、IMP でおおよそ13g/dlでありアミノ酸と同等の溶解度であった。したがって、1N 塩酸酸性に溶解することにより、全てのアミノ酸・核酸について、試料重量あたりのタンパク質検出感度の増加が期待できる。即ち、中性付近での溶解度が低いL-TyrやL-Cys₂などは、1N塩酸水溶液にすることにより、溶解度は各々0.04g/dl、0.01g/dlからおおよそ8g/dlと大幅に向上する。従って、水溶液試料の場合よりも200-800倍の感度向上が期待できる。ところが、ELISA 法では抗原-抗体の結合が酸性で乖離してしまう

ため、酸性溶液に溶解した試料を測定することができない。そこで、まったく異なる手法、ドットプロット法—蛍光染色法を考案した。

ドットプロット法の概略は、まず、タンパク質吸着用 PVDF 膜を装着したドットプロッター（図3）に溶液試料を供し、吸引することにより、溶液試料を PVDF 膜を通過させる。このときに、試料溶液中に含まれるタンパク質は PVDF 膜に吸着される。膜を1N 塩酸と純水で洗浄後、ドットプロッターから外し、蛍光染色試薬で膜上のタンパク質を染色し、これを蛍光イメージング装置で検出・定量する方法である。蛍光染色試薬は、多くの種類が開発され、市販されている。本研究では、プロテオミクスで用いられる SYPRO Ruby を用いた。SYPRO Ruby は有機遷移金属が電氣的な相互作用によりタンパク質に直接結合する試薬であり、高感度でかつ定量性が高い試薬である

57, 58。

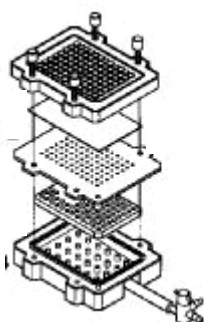


図3 ドットプロッター

通常96個のサンプル導入口があり、間に PVDF 膜を挟んで使用する。アスピレータなどで減圧吸引することで、溶液サンプルを PVDF 膜に通過させる装置

第3節 標準タンパク質による検出下限と定量性

ドットプロット法により PVDF 膜上に吸着させたタンパク質の蛍光染色試薬 SYPRO Ruby による検出感度と定量性について検討を行った。タンパク質は、溶液中の試料濃度が低くなると、容器や計量器具への吸着により、消失してしまう。高感度の分析をするためには、低濃度のタンパク質試料を取り扱わなくてはならない。そのために容器への吸着を最小限にするために、シリコン処理を施したマイクロテストチューブとチップを用いた。また、試料の希釈段階も最小限に留めた。標準タンパク質として、牛血清アルブミン(以下 BSA、66kDa)、卵白リゾチーム(14kDa)、ユビキチン(8.6kDa)、牛インスリン(5.7kDa)及び酸化型インスリン B 鎖(3.5kDa)を用いて、検出下限の検討を行った。これら標準タンパク質を $25\mu\text{g}/\text{ml}$ (1N 塩酸)に調製した。この標準溶液を1N 塩酸を用いて各々、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に一段階で希釈を行った。希釈した溶液 $350\mu\text{L}$ (各濃度4点毎)を予め洗浄及び活性化した PVDF 膜を装着したドットブロッターに供した。アスピレータで吸引し、試料溶液を通過させることにより、溶液中のタンパク質を PVDF 膜に吸着された後、1N 塩酸と純水を同様に吸引することにより、PVDF 膜の洗浄を行い、その後ドットブロッターより PVDF 膜を取り外し、乾燥させた。PVDF 膜上には、35~175ngの標準タンパク質が吸着していることになる。続いて、蛍光試薬 SyproRuby で染色を行い、レーザースキャナー (Typhoon Fluoroimager8600) で蛍光イメージを取り込み、イメージ画像を画像処理ソフト (ImageQuant) で処理、蛍光強度の数値化を行った。分子量の異なる5種類の標準タンパク質の結果を図4に示した。横軸が添加したタンパク質濃度、縦軸が検出された蛍光強度である。全ての標準タンパク質において、最低量の35ng/ウエル(0.1ppm)でも蛍光を観測することができた。分子量が大きいタンパク質の方がより、PVDF膜への吸着効果が高い傾向であった。以上の結果から、ドットプロット-蛍光染色法は、分子量3.5kDa以上のペプチドやタンパク質を0.1ppmの感度で検出することができることがわかった。また、タンパク質の種類により、傾きは異なるものの、個々のタンパク質においての直線性は非常に高く、また、同一膜上に同じサンプルを4ウエル分析した結果では、変動係数CVは2-15%であり、比較的精度の良い結果である。

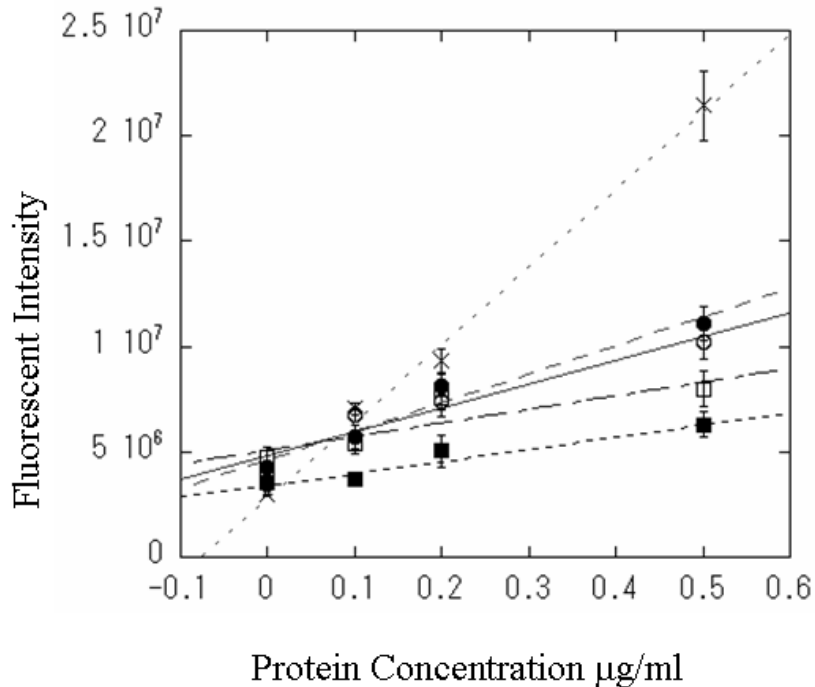


図 4 標準タンパク質測定時のドットプロット—蛍光染色法の検出下限と直線性

■:酸化型インスリン B 鎖、□:インスリン、●:牛血清アルブミン、○:ユビキチン、×:リゾチーム

第 4 節 食品添加物用アミノ酸及び核酸製品中のタンパク質分析

食品添加物用のアミノ酸及び核酸は、主に発酵法により生産された後、非常に高度に精製されているため、タンパク質が残存する可能性は極めて低い。一般的なタンパク質定量法であるBCA法やBradford法では、厚生労働省が求める重量あたり10ppmの感度を得ることは極めて困難である。可能な限り、アミノ酸重量あたりのタンパク質検出感度を上げるためには、可能な限り、アミノ酸を溶解する必要がある。水に対するアミノ酸の溶解度は、アミノ酸の種類により、大きく異なっている(表1)。しかしながら、3.6% 塩酸酸性にすることにより、その違いは軽減さ

れるとともに、全てのアミノ酸について溶解度が向上する。そこで、全てのアミノ酸について、3.6%塩酸で溶解することとした。比較的溶解度が低い、L-Asp, L-Cys₂, L-Glu, L-Trp, L-Gln, L-Asp-NaH₂O, L-Glu-NaH₂O, L-Phe及びL-Tyrは、70mg/mlの濃度になるように溶解した。一方、比較的溶解度の高いL-Ala, L-His, L-His-HCl, L-Ile, L-Leu, L-Lys-HCl, L-Thr, L-Val, L-Arg:L-Glu, L-Cys-HCl-H₂O, L-Ser, Gly, L-Arg, L-Pro, DL-Ala及びL-theaninについては120mg/mlの濃度になるように溶解した。GMP及びIMPについても同様に120mg/mlの濃度になるように溶解した。

分析の精度を高めるために標準添加法を用いた。標準添加法は未知試料に一定量の既知濃度の標準物質を添加して検量線の系列を作成し、この関係線から未知試料の濃度を定量する方法である。タンパク質定量の標準タンパク質としてもっとも良く用いられているBSAを標準物質とした。膜間の誤差を削減するために、分析の際は、同一膜上に外部標準としてBSAを分析することとした。

外部標準としてのBSAとL-Leuを分析したときの蛍光イメージ画像を図5に示した。外部標準のBSAの蛍光強度は、サンプルの濃度に依存して増加することがわかる。0.1 μ g/ml (0.1 ppm)のBSAでも明確にスポットを検出することができた。BSAを標準物質として、0.1、0.2及び0.5 μ g/mlとなるように添加したL-Leuの場合は、中心部にBSA由来のスポットが観測された。また、PVDF膜に浸潤したL-Leuが中心のスポットの周りに同心円状に蛍光が観測された。これは、アミノ酸がPVDF膜を通過し、その後に塩酸や純水を通過させることにより、膜に浸潤したアミノ酸の一部であると考えられる。しかし、ドーナツ状になっていることから、ドットプロッターのサンプル供与部については、アミノ酸が除去洗浄されていることがわかる。0.1 μ g/mlのBSAを添加したL-Leuの4つのスポットともに蛍光を観測することができ、その強度は外部標準の0.1 μ g/mlのBSAとほぼ同じであった。L-Leuの濃度が120mg/mlであることから、L-Leu重量換算でおよそ0.8 ppmのタンパク質(BSA)を検出できる能力があることが明らかとなった。定量分析をする際は、このスポット部分の蛍光強度の積(蛍光面積強度)を採用することとし

た。同一膜で測定したBSAの検量線において、ブランク(BSA無添加)のY軸(蛍光面積強度)交点を通る線を基準として、標準添加法による各アミノ酸の検量線との交点をタンパク質濃度とした(図6)。

表 1 Solubility of amino acids in water

Amino acids	solubility g/dl		
	H ₂ O, 0°C*	25°C*	3.6% HCl, RT
L-Asp		0.45(20°C)	14
L-Cys2		0.0112	8
L-Ile	3.79	4.12	18
L-Leu	2.27	2.426	13
L-Phe	1.98	2.96	13
L-Tyr	0.02	0.045	8
L-Val	8.34	8.85	21

RT: Room temperature

*The MERCK INDEX 12th edition Susan Budavari Editor, Merck & CO., Inc. (1996)

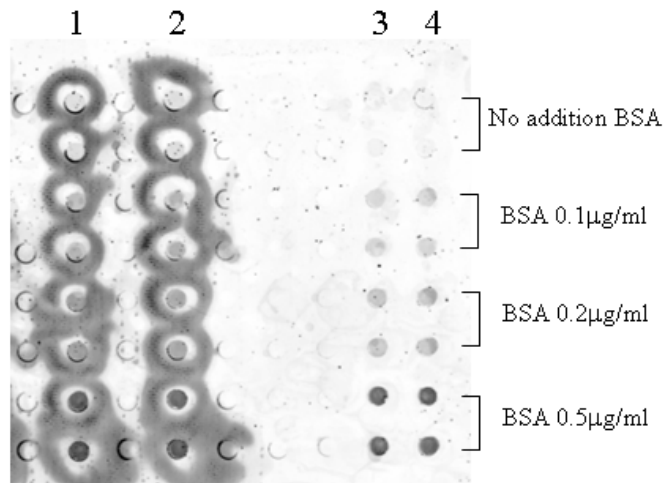


図5 ドットプロット-蛍光染色後の PVDF 膜の蛍光イメージング画像.

レーン1及び2:0, 0.1, 0.2, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の BSA を添加した L-Leu
 レーン3及び4:0, 0.1, 0.2, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の BSA 標準タンパク質として分析した BSA は、0.1 $\mu\text{g/ml}$ でも検出できている。L-Leu の場合は、PVDF 膜に浸潤したものが円状に観測されているが、中央には存在しておらず、十分に洗浄されている。

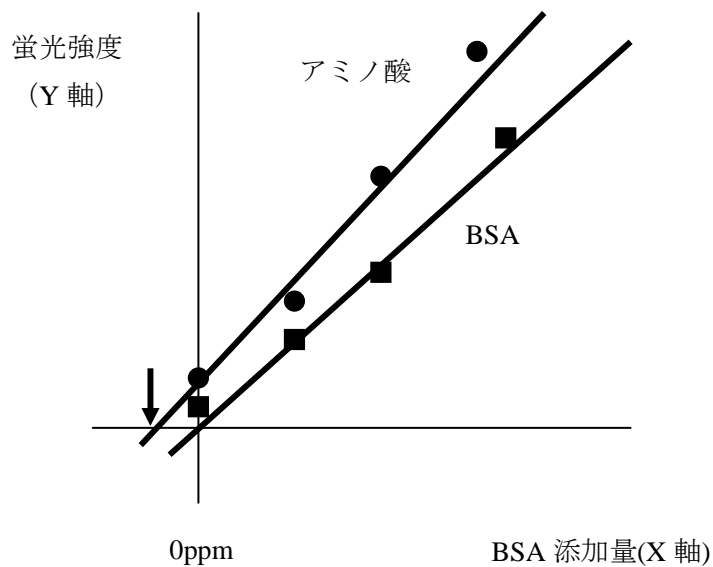


図6 標準添加法によるアミノ酸中のタンパク質濃度算出法

矢印のX軸交点の値をアミノ酸溶液中のタンパク質濃度とした。

本法を用いて、食品添加物用アミノ酸25品目及び核酸2品目の分析を実施した。同一膜上に濃度毎にN=4で分析を行った。4点の値の平均値をグラフ化したものが図7である。

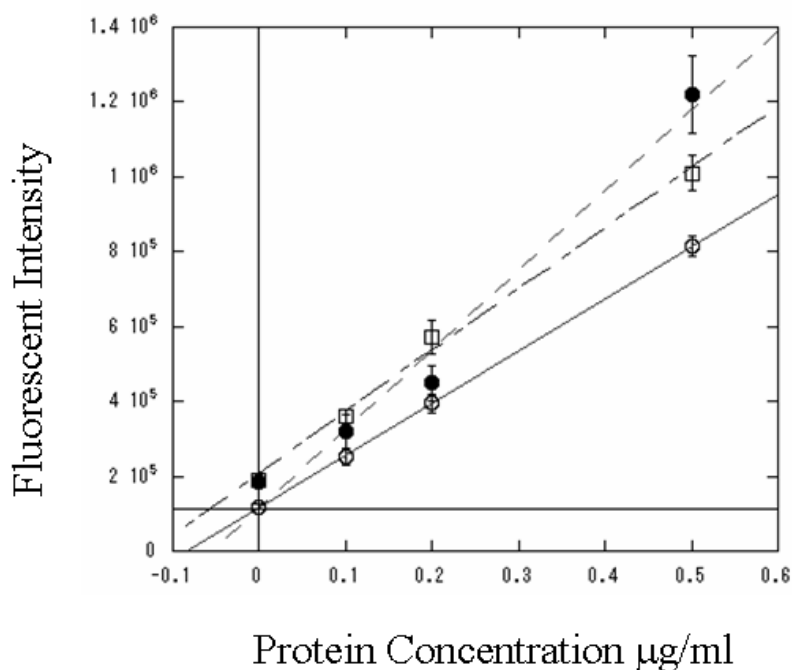


図 7 食品添加物用アミノ酸製品のドットプロット—蛍光染色法の結果(標準添加法).

●: BSA(外部標準)、□: monosodium L-glutamate monohydrate、○: L-theanine

外部標準のBSA及びBSA標準添加した実試料においていずれも高い直線性が得られた。またCVも2-13%と良好であった。全てのアミノ酸及び核酸試料において、X軸との交点は0-0.1ppmの値であった。アミノ酸または核酸重量あたりのタンパク質の検出限界は、各アミノ酸及び核酸の溶解濃度に依って、それぞれ1または1.4ppmとなる(表2)。

表2 ドットブロットー蛍光染色法の結果：食品添加物用アミノ酸及び核酸製品中の残存タンパク質量

samples	sample concentration	BSA detection limit	detection limit per sample weight	results
L-Ala	120mg/ml	0.1µg/ml (0.1ppm)	0.1µg of BSA / 120mg of sample = 0.8 ppm	blow detection limit
L-His				
L-His HCl				
L-Ile				
L-Leu				
L-LysHCl				
L-Thr				
L-Val				
L-ArgL-Glu				
L-CysHClH ₂ O				
L-Ser				
Gly				
L-Arg				
L-Pro				
DL-Ala				
L-Theanine				
L-Asp (L-Cys) ₂	70mg/ml	0.1µg/ml (0.1ppm)	0.1µg of BSA / 70mg of sample = 1.4 ppm	blow detection limit
L-Glu				
L-Trp				
L-Gln				
L-AspNaH ₂ O				
L-GluNaH ₂ O				
L-Phe				
L-Tyr				
GMP IMP	120mg/ml	0.1µg/ml (0.1ppm)	0.1µg of BSA / 120mg of sample = 0.8 ppm	blow detection limit

第5節 結論

本章では、プロテオミクスの技術を、食品の安心・安全を確保するための応用として、食品添加物用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質検出法の開発研究を行った。タンパク質化学の手法である、PVDF膜を利用したドットブロット法と超高感度タンパク質蛍光染色試薬(SyproRuby)を組み合わせること、アミノ酸の溶解度が高い酸性条件にすることにより、実試料での感度向上を検討した。以下に、要約を記載する。

1)ドットブロットと超高感度タンパク質蛍光染色試薬を用いることにより、幅広いサイズの標準タンパク質(牛血清アルブミン:66kDa、卵白リゾチーム:14kDa、ユビキチン:8.6kDa、牛インスリン:5.7kDa、酸化型インスリン B鎖:3.5kDa)を検出下限0.1ppmで検出できる超高感

度なタンパク質検出法(ドットブロットー蛍光染色法)を確立した。

2) 本法を、食品添加物用アミノ酸及び核酸試料に適用した。アミノ酸の溶解度が高い1N塩酸に溶解することにより、アミノ酸重量あたりのタンパク質検出感度の向上を図った。標準添加法を採用することにより、対重量あたり1ppmの検出下限で微量の残存タンパク質の検出を行うことが可能となった。実試料として食品添加物用のアミノ酸及び核酸製品25品目を測定した結果、全て検出下限(1ppm)以下であった。

3) 本章で開発したドットブロットー蛍光染色法の検出下限は、アミノ酸の場合、1ppmである。これは、アレルギー症状を誘発すると危惧される数ppmよりも低い。したがって、食品添加物用アミノ酸・核酸の食品アレルギーの懸念を除くに十分な性能を持つ手法である。

また、本法はタンパク質を PVDF 膜に固定して検出する方法である。何らかのタンパク質が検出された場合は、次章の微量タンパク質同定技術を用いることにより、残存しているタンパク質を同定することが可能である。

第3章 微量タンパク質同定のための質量分析基盤技術開発

第1節 はじめに

質量分析の大きな特徴は、その高い感度にある。生体中に極微量に含まれるタンパク質をあるいは、貴重なタンパク質、さらには、全章記載のような食品中に残存する微量のタンパク質を分析し、かつ同定できる数少ない分析法である。ドットブロットー蛍光染色法は、PVDF膜上にタンパク質を固定化させて、蛍光染色試薬を用いて発色・定量する方法である。即ち、なんらかのタンパク質が試料中に残存し、検出された場合は、これをプロテオミクスの手法を用いて同定することが可能である。タンパク質が検出されたPVDF膜を切り出し、膜上に吸着しているタンパク質をトリプシンなどの消化酵素で切断し、生成したペプチドを微量タンパク質同定技術により同定することが可能と考えられる。しかしながら、ドットブロットー蛍光染色法の検出下限が 1ppm と高感度であるために、対応する同定技術もさらなる高感度化が必要である。

一方、大規模なタンパク質同定すなわちプロテオミクスにおいて質量分析に求められていることは、1)測定スピード、2)高感度、3)自動化、4)翻訳後修飾情報、である。遺伝子の数は有限であるが、遺伝子が転写・翻訳されて生成するタンパク質は、選択的スプライシングや翻訳後修飾により、遥かに多種多様である。また、生命活動に伴うタンパク質の発現や翻訳後修飾、相互作用の変化を捉えることを目標とするプロテオミクスでは、多くの実験が必要となるために、測定のスピードと自動化が重視される⁵⁹。

質量分析の感度において、そのイオン化はもっとも重要な要因である。ESI法においては、内径数～数十マイクロンのガラス製細管をESIエミッターとして使用することにより、数十から数百 nl/minの超低流量のESIを可能としたナノESIが非常に革新的であった¹⁰。これにより、流量を極限まで低くしてイオン化の効率を高め、さらに質量分析計の差動排気部への距離を近づけることを可能にした。この2つの効果により、効率よく生成したイオンをできるだけ損失なく質量分析計に導くことができるようになり、通常のESIよりも高感度化を達成することができ、極微量のタンパク質のMS測定と同定が可能となった。

タンパク質をプロテアーゼ消化して得られたペプチド混合物を測定する際に、脱塩とペプチド分離を同時にできる LC/MS が用いられることが多い。LC/MS を行う場合、LC の流量とカラムの内径を細くすることにより、試料の濃縮倍率が向上し、質量分析計の感度が向上する。一般的な HPLC カラムの内径は、4.6mmであるのに対し、プロテオミクスにおいては、内径0.3mmのキャピラリーカラムや内径50–75 μm のナノカラムが用いられる。カラム内径が細くなることに対応し、流量も削減することになる。キャピラリーカラムで1–2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、ナノカラムでは50–200 nL/min と低流量の HPLC システムで行われる。特に、ナノ HPLC とナノ ESI 法との組み合わせにより、ナノ LC-MS/MS 法として、高感度化と自動化を同時に達成することができるようになった。

しかしながら、一般的なナノ ESI エミッターは、金属薄膜あるいは伝導性高分子薄膜を被覆した内径1–10 μm のガラス製あるいはフューズドシリカ製のものであり、その耐久性に問題を抱えていた。物理的な強度が弱いことに加え、ナノ ESI では千数百 eV の高電圧を印加するため、金薄膜や伝導性ポリマー薄膜ものの耐久性が低い。放電現象が起こったときや通常の測定中においても、これらの薄膜は容易に剥離し、長期間安定したイオン化を行うことが困難であり、これは連続自動測定での大きな課題であった。本研究では、内径 30 μm の金属製細管を作成し、ナノ ESI エミッターとして用いることで高い耐久性を付与することを試みた。

第2節 タンパク質同定のための高耐久性ナノ ESI エミッターの開発

第1項 高耐久性ナノ ESI エミッターの設計

物理的強度高く、通電性を確保するために、金属であるステンレス SUS304 で、内径 30 μm の細管をガラス製またはフューズドシリカ製ナノ ESI 用エミッターの代わりに用いることとした。これまで、ケミカルエッチングの技術を用いて作成した内径 20–76 μm のテーパーSUS 製ニードルをナノ ESI 用エミッターとして用いた報告がある⁶⁰。この文献では、内径 20 μm の場合、テーパ型で 20–40nL/min で安定にイオン化したが、テーパ型で無い場合は安定にイオン化することができなかったと報告している。しかしながら、テーパ加工を安定に、同じ品質で行うことは、技

術的に困難である。また、完全に先端をテーパ型にすると、先端効果により、非常に高い電位が集中し、表面形状が変化することが危惧される。そこで、均一な品質のナノESIエミッター作成を目指して、先端を数 μm ほどの端面を残す設計とした。さらに、通常のナノESI用エミッターでは、内部の構造もテーパ型が一般的であるが、エミッターの詰まる主たる原因であることと、背圧がかかる不都合が生じることから、ストレートパイプ型にすることとした(図8)。内径 $30\mu\text{m}$ 、外径 $100\text{--}120\mu\text{m}$ 及び長さ 300mm のSUS304製ストレートパイプの作成は、金属加工メーカー栄商金属株式会社(東京都大田区)で行った。以降、このナノESI用エミッターを $\mu\text{MetalTip}$ と呼ぶ。

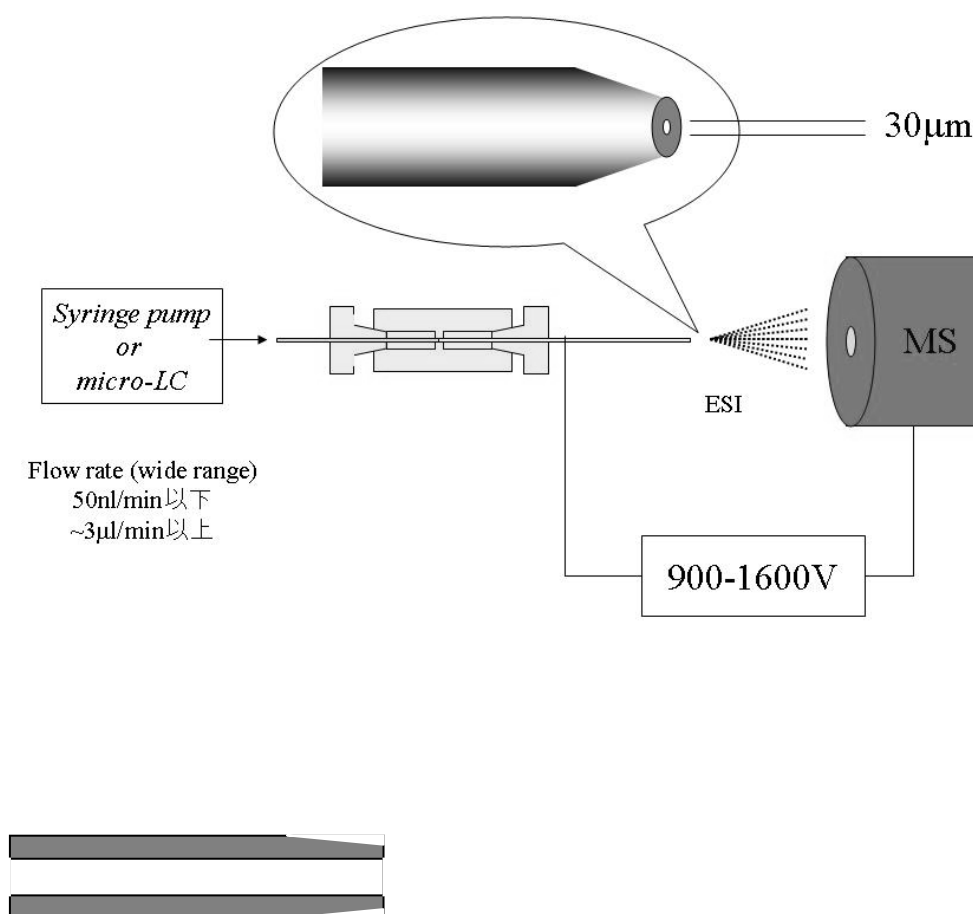


図8 ナノESI用エミッターとしての内径 $30\mu\text{m}$ SUS製ニードル($\mu\text{MetalTip}$)の仕様

内径 $30\mu\text{m}$ 外径 $100\text{--}120\mu\text{m}$ 、材質SUS304で作成。内管はストレートで先端をテーパ加工してある。およそ $900\text{--}1600\text{V}$ の電圧でイオン化をおこなう。

連続注入測定による μ MetalTip の性能評価するために、ナノ ESI-イオントラップ型質量分析計 ESI-ITMS(LCQ、サーモエレクトロン社製)にこれを搭載した(図9)。ナノ ESI イオン源は、NewObjective 社のものを採用した。また、同じ SUS 製ニードルをナノ ESI-Q-TOFMS(QTOF2、Micromass 社製)にも搭載し、性能評価を行った。

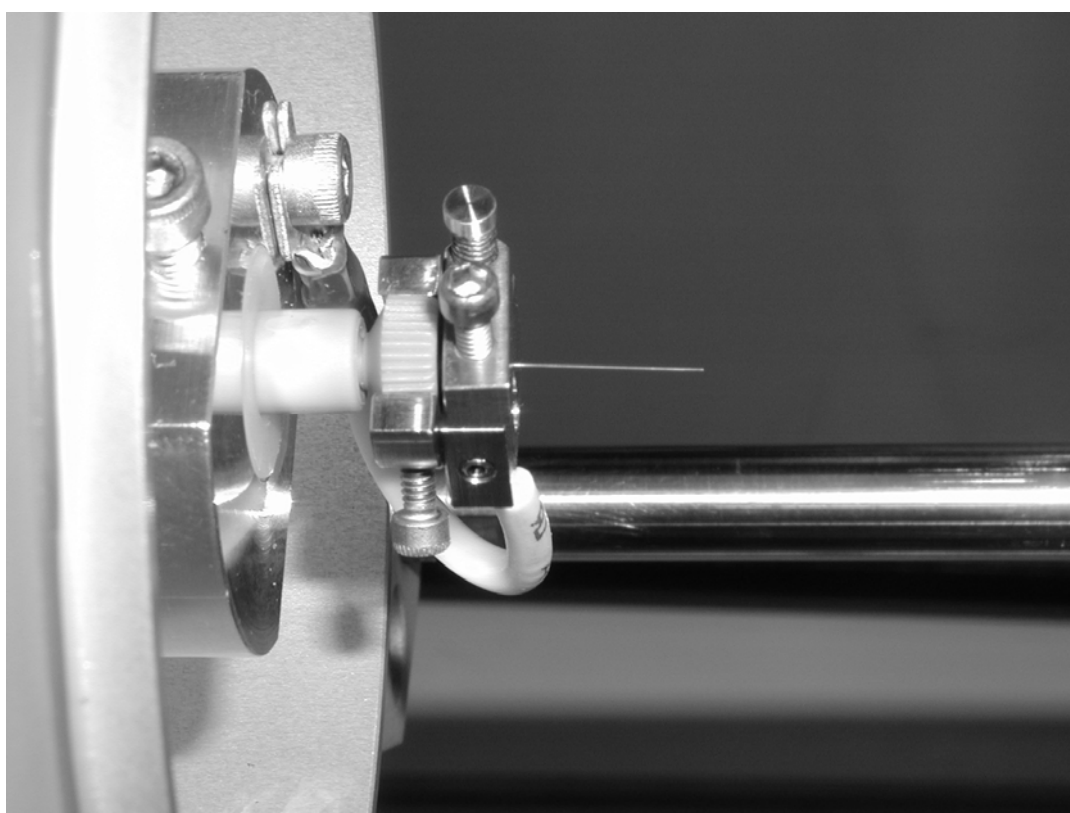


図 9 SUS 製ニードル μ MetalTip を搭載したナノ ESI イオン源(NewObjective 社)

第2項 流速の検討評価

濃度 $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ のレセルピン溶液を用いて流速 $10\text{nl}/\text{min}\sim 3\mu\text{l}/\text{min}$ で測定を行った。 μ MetalTip を搭載した ESI-ITMS で測定したときのスペクトルを図10に示す。

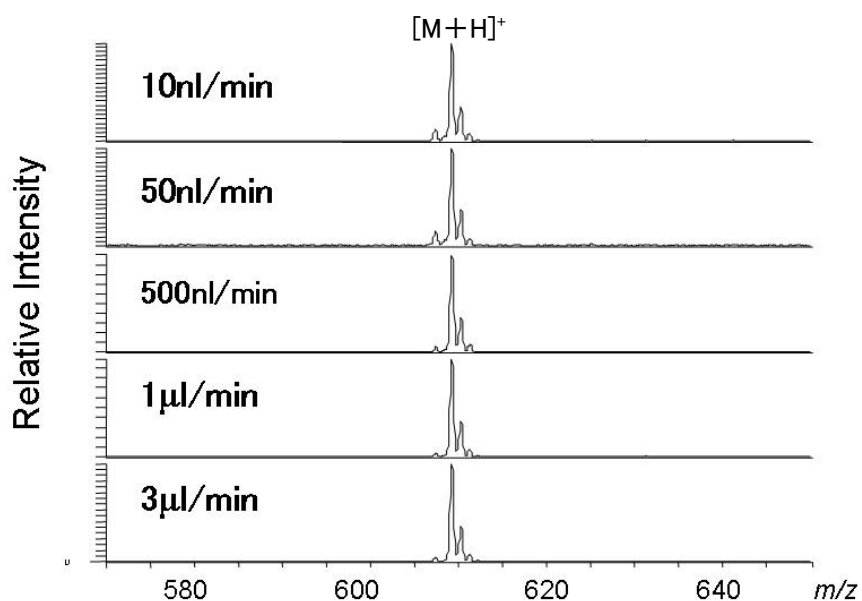


図 10 流速評価： μ MetalTip 搭載のナノ ESI-ITMS を用いた $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ レセルピンの MS スペクトル

装置: ESI-ITMS LCQ (サーモエレクトロン製)、積算時間 30秒

図10の通り、 $10\text{nl}/\text{min}$ から $3\mu\text{l}/\text{min}$ まで、非常に幅広い流量でレセルピン由来のイオンが観測された。

続いて、別の機種であるナノ ESI-Q-TOFMS (Q-TOF2、Micromass 社製) に搭載して流速の評価を実施した。 $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ のレセルピン溶液、及び牛インスリン溶液を用いて流速 $1.8\text{nl}/\text{min}\sim 50\text{nl}/\text{min}$ で測定を行った。

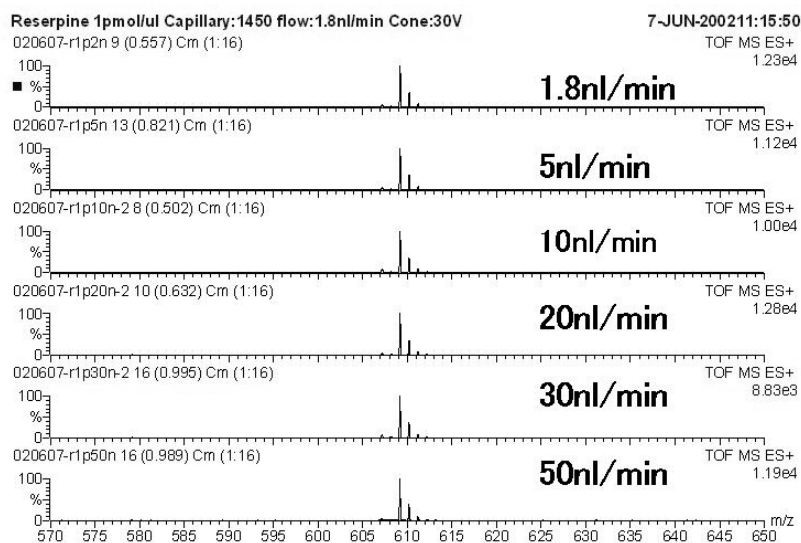


図 11 流速評価: μ MetalTip 搭載のナノ ESI-QTOFMS を用いた1pmol/ μ l レセルピンの MS スペクトル

装置: ESI-QTOFMS QTOF2(マイクロマス製)、積算時間 60秒

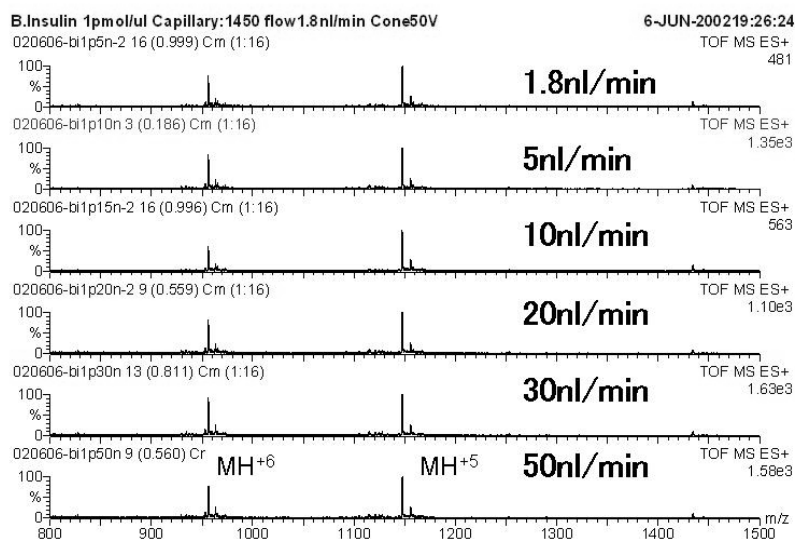


図 12 流速評価: μ MetalTip 搭載のナノ ESI-QTOFMS を用いた1pmol/ μ l インスリンの MS スペクトル

装置: ESI-QTOFMS QTOF2(マイクロマス製)、積算時間 60秒。流速 1.8~50nl/minまで幅広い流領域でインスリンのイオンを観測。

図 11、12 に示したように、レセルピン溶液、牛インスリン溶液共に 1.8nl/min の極低流量においても、サンプル由来のイオンを観測できることがわかった。SUS製ニードルは、ナノ流量からマイクロリッターの流量まで幅広く使用できることが明らかとなった。

第 3 項 サンプル濃度の評価検討

μ MetalTip を搭載した ESI-ITMS を用いて、流速 50nl/min の連続注入法で、濃度範囲 4fmol/ μ l \sim 1pmol/ μ l のレセルピン溶液の測定を行った。

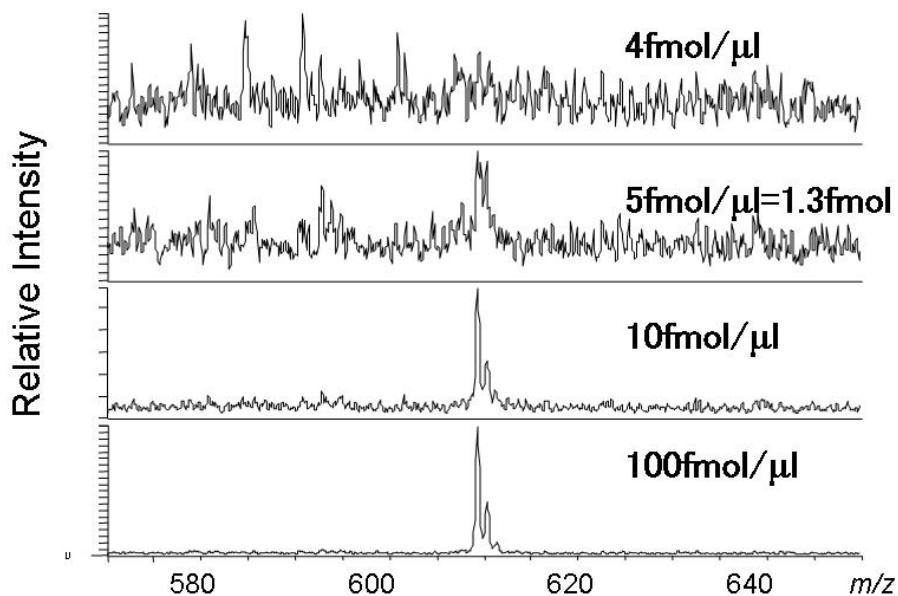


図 13 感度評価:各濃度のレセルピンの μ MetalTip 搭載ナノ ESI-ITMS スペクトル

装置:ESI-ITMS LCQ(サーモエレクトロン製)、積算時間 30秒

図13に示したように、5fmol/ μ l の低濃度サンプルにおいても、レセルピン由来イオンが観測され、非常に高感度であった。

別の機種であるナノ ESI-Q-TOFMS(Q-TOF2、Micromass 社製)に搭載して、同様に測定を実施した。流速 50nl/min で 1fmol/ μ l~1pmol/ μ l のレセルピン溶液、及び牛インスリン溶液の測定を行った。

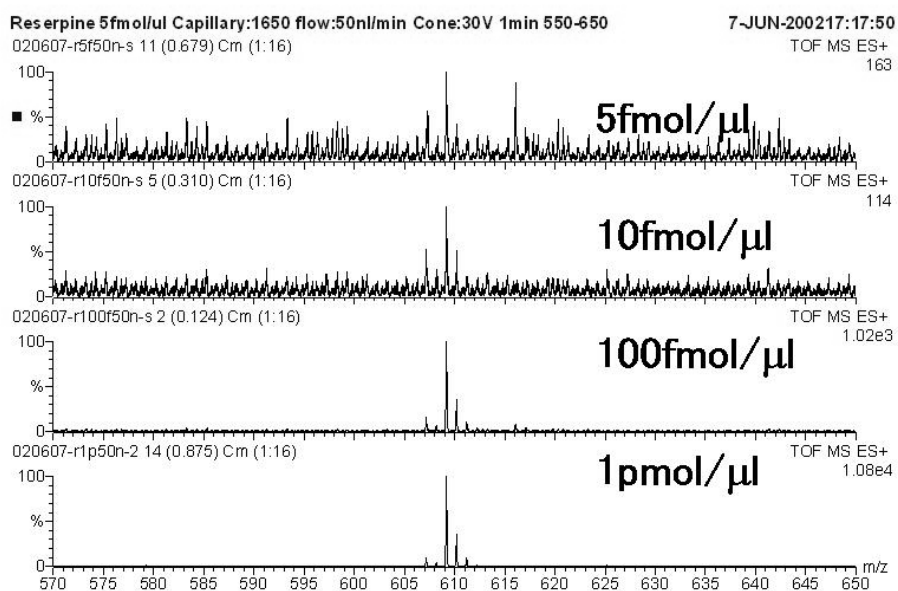


図 14 感度評価:各濃度のレセルピンの μ MetalTip 搭載ナノ ESI-QTOFMS スペクトル

装置:ESI-QTOFMS QTOF2(マイクロマス製)、積算時間 60秒

5fmol ~1pmol/ μ l の間で、レセルピン由来のイオンを観測することができた。

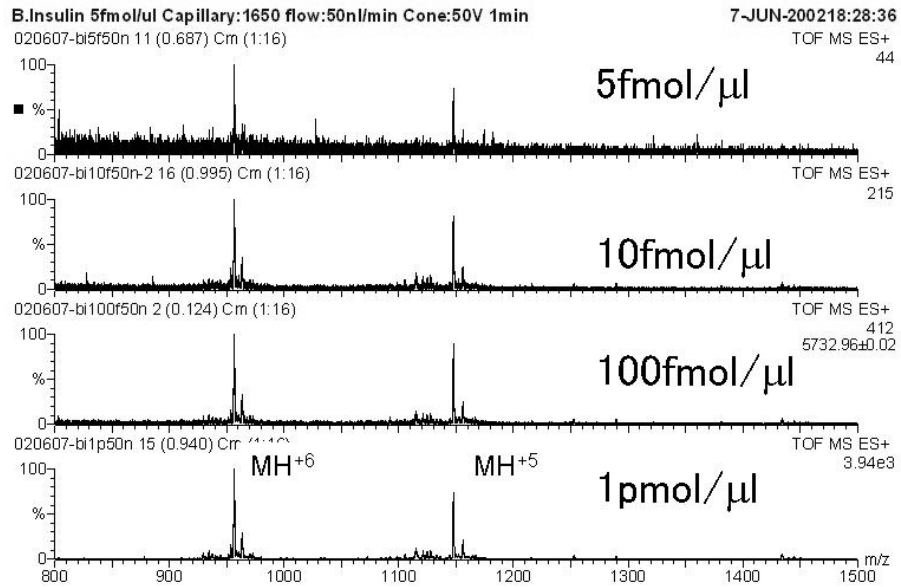


図 15 感度評価:各濃度のインスリンの μ MetalTip 搭載ナノ ESI-QTOFMS スペクトル

装置:ESI-QTOFMS QTOF2(マイクロマス製)、積算時間 60秒

5fmol ~1pmol/ μ l の間で、インスリン由来のイオンを観測することができた。

図 14、15に示したように、レセルピン溶液、牛インスリン溶液共に 5fmol/ μ l でサンプル由来のイオンを観測でき、市販のフューズドシリカ製ナノ ESI 用エミッターと遜色のない、非常に高感度の分析が可能であることが明らかとなった。

第4項 イオン化安定性の評価

キャピラリー温度 30°C、150°Cそれぞれにおけるイオン化の安定性を調べるために、1pmol/ μ lのレセルピン溶液を10分間連続測定を行った。流速は50nl/minとした(図16)。プロテオミクスでは、通常50–200nl/minの流量の領域が用いられるが、もっともイオン化が不安定となる低流量域 50nl/min においても、イオン強度の振れ幅は非常に少なく、両温度においても、安定にイオン化できることが確認できた。

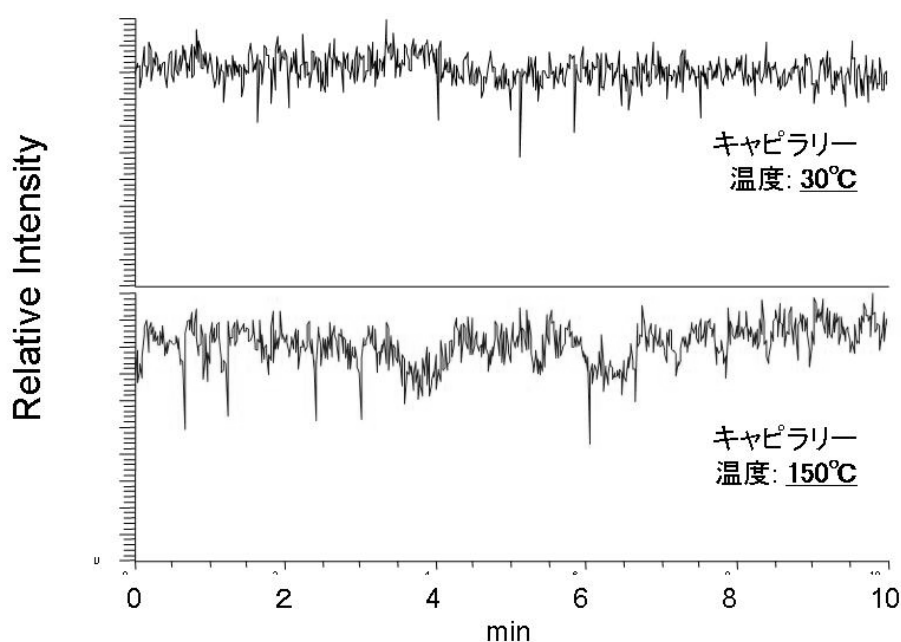


図16 μ MetalTip のイオン化安定性の評価: 1pmol/ μ lレセルピン溶液の連続測定

装置: ESI-QTOFMS QTOF2(マイクロマス製)、流速 50nl/min で測定。キャピラリー温度の違いに関らず、イオン強度の振れ幅は小さく、安定していることがわかる。

第5項 キャピラリーLC-MS/MS への応用と耐久性評価

NewObjective 社のナノESIイオン源に作製したステンレス製ナノESIエミッターを装着し、イオントラップ型質量分析計(LCQ、サーモエレクトロン社製)と内径 300 μm のキャピラリーカラム(内径 0.3mm 長さ 150mm、LC パッキングス社製)と微量オートインジェクターからなる HPLC システム(Ultimate、LC-packing 社製)を構築した。グルカゴンのトリプシン消化物の連続測定を行うことにより、システムの耐久性の評価を行った。連続分析2回目と180 回目(354 時間)のマスキロマトグラムを図 17 に示した。

350時間以上連続測定を実施しても、イオン強度に差が全く見られなかった(共に 3×10^9)。フューズドシリカ製のナノESIエミッターを用いた場合は、連続測定により、エミッター先端表面の金属コーティングが剥がれたり、詰まりが生じたりすることにより、イオン化能が変化し、イオン強度の低下や流量の低下が生じる。作成したステンレス製エミッターは、エミッター自身が導電性であることにより、長期間にわたって安定した電流値となることから、イオン強度の変化がないと考えられる。これにより、課題であった LC-MS/MS の耐久性を著しく向上することができた。

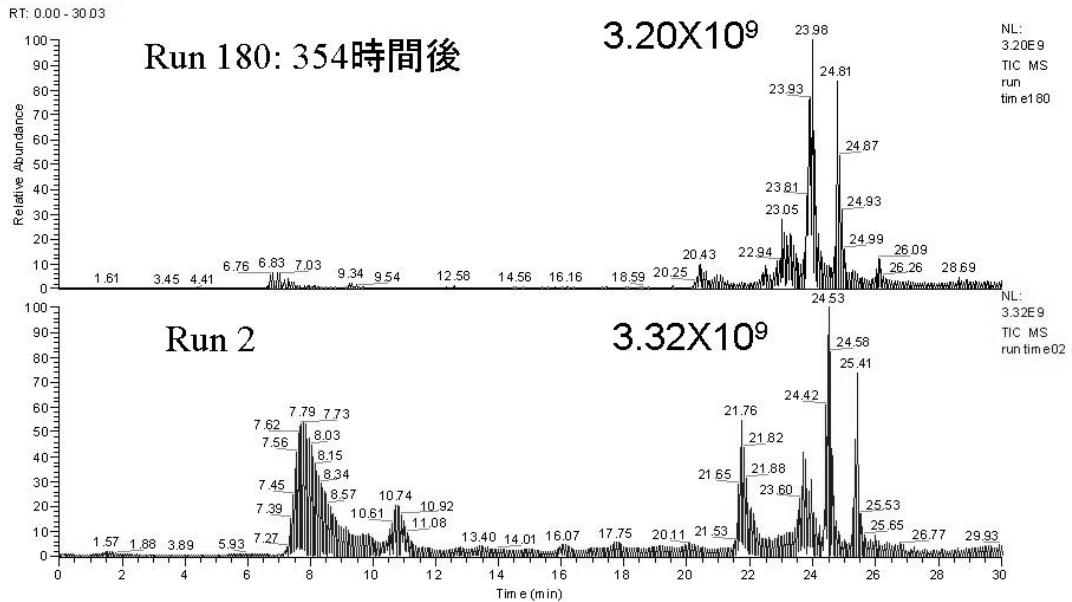


図 17 μ MetalTip を装着したナノ LC-MS/MS によるゲルカゴントリプシン消化物の連続分析

上段：連続運転 180 回目（354 時間後）の MS クロマトグラム

下段：連続運転開始 2 回目の測定時の MS クロマトグラム

ともに、イオン強度が等しく、連続測定でもイオン化が安定していることがわかる

第 6 項 ナノ LC-MS/MS への装着と高感度タンパク質同定への応用

さらに、内径 $75 \mu\text{m}$ のナノカラムを用いたナノ LC-MS/MS での感度の評価を行った。内径 $75 \mu\text{m}$ 長さ 50mm のモノリスナノカラムと流速 $200\text{nl}/\text{min}$ のグラジエント溶出が可能なナノ HPLC を装着したイオントラップ型質量分析計 (LTQ、サーモエレクトロン社製) に内径 $30 \mu\text{m}$ 長さ 50mm のステンレス製ナノ ESI エミッターを装着した。

100フェムトモルの Ovalbumin、Amylase、IgG、Lactic dehydrogemase 及び牛血清アルブミンの 5 種類のトリプシン消化物をナノ LC-MS/MS で測定して得られたマスキロマトグラムを図 18 に示した。非常に分離良く、かつ感度の良いクロマトグラムが得られた。

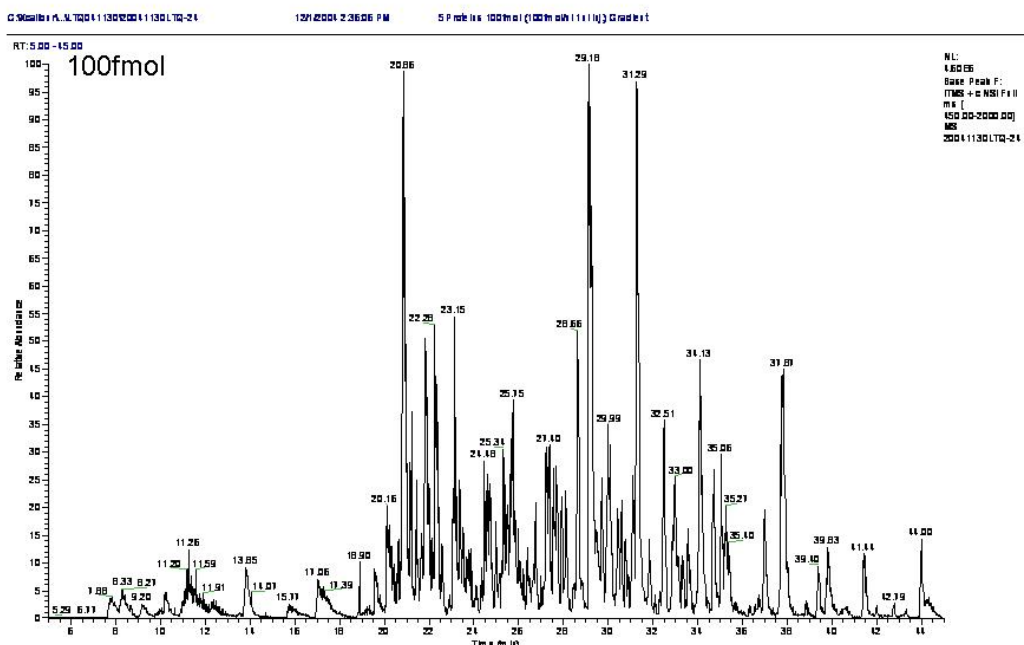


図 18 μ MetalTip を装着したナノ LC/MS/MS による 5 種類のタンパク質トリプシン消化物のベースピークマスキロマトグラム

得られたデータをデータベースプログラム (Mascot、MatrixScience 社製) にてデータ解析した結果、全アミノ酸配列の 60–85% の配列を帰属、同定することができ、タンパク質同定に十二分な感度を有していることがわかった。

同じ試料で注入量をさらに少なくして測定した結果を図 19 に示した。10フェムトモルという非常に微量の試料でも十分にペプチドを分離、検出することができた。

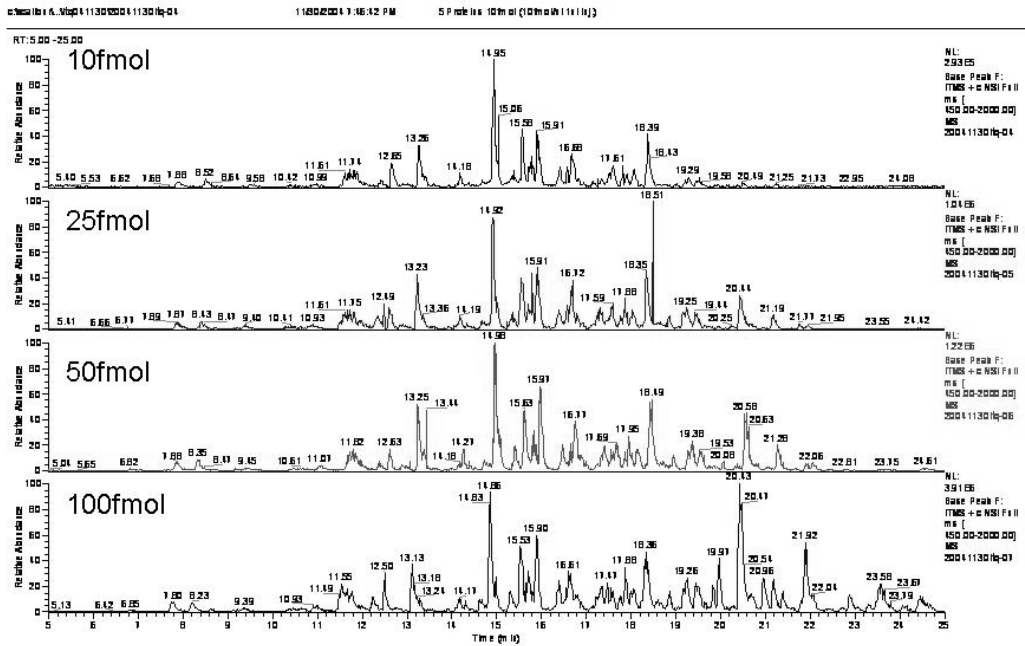


図 19 μ MetalTip を装着したナノ LC/MS/MS による 5 種類のタンパク質トリプシン消化物のベースピークマスキロマトグラム

10~100fmol のサンプルでも高感度に測定できている

第3節 結論

本章では、微量タンパク質同定に必要な高感度かつ耐久性の高いステンレス製ナノ ESI 用エミッターの作成を検討した。フューズドシリカ製と比べて、感度や低流量などの性能は維持したまま、課題であった耐久性を著しく向上することに成功した。多検体を分析しなくてはならないプロテオミクス研究において、安定しかつ耐久性の高い質量分析計は、極めて有効である。以下に、要約を記載する。

1) 耐久性の高いナノ ESI 用エミッターとして、内径 30 μm 、先端外部テーパ加工したステンレス製 (SUS304) ストレート細管を設計し作成した。これを市販 2 機種 (ITMS: サーマエレクトロン社製 LCQ、Q-TOFMS: マイクロマス社製 Q-TOF2) に搭載し、流速、感度、イオン化の安定性を評価した。流速は、1.8 nl/min ~ 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ と幅広い流量域で使用できた。感度は、レセルピン及び牛インスリンで、5 $\text{fmol}/\mu\text{l}$ であった。イオン化の安定性も良好で、流速域、感度ともに、市販のフューズドシリカ製ナノ ESI 用エミッターと同等以上の性能であった。

2) オートインジェクター付きキャピラリー LC-MS/MS (カラム内径 300 μm 、流速 3 $\mu\text{l}/\text{min}$) とナノ LC-MS/MS (カラム内径 75 μm 、流速 150 nl/min) にステンレス製ナノ ESI 用エミッターを搭載し、タンパク質のプロテアーゼ消化物を測定し、耐久性と感度の評価を行った。キャピラリー LC-MS/MS の場合、連続 180 回測定 (354 時間) でも、イオン強度に差がなく、高い耐久性により、安定した測定が可能であることがわかった。ナノ LC/MS/MS の場合、オポアルブミン、アミラーゼ、IgG、Lactic dehydrogenase 混合物のトリプシン消化物を測定した結果、10 fmol でも十分なイオンを検出することができ、全アミノ酸配列の 60-85% の配列を帰属、同定することができた。

以上のように、本章で設計開発したステンレス製ナノ ESI 用エミッター (μ MetalTip) は、従来のフューズドシリカ製と同等以上の感度を維持したまま、高い耐久性を持つことが明らかである。

第4章 微量タンパク質同定のためのタンパク質断片化技術開発

第1節 はじめに

2002年のノーベル化学賞受賞者3人のうち2人は、質量分析において革新的なソフトイオン化法を開発した田中と Fenn であった。彼らの業績は、ポストゲノム研究が生物学の中で重要な地位を占めるようになった現代において、大きな貢献を果たしている。田中のレーザーイオン化から発展した技術 MALDI 法(matrix assisted laser desorption ionization)¹⁴と Fenn の ESI 法(electrospray ionization)¹⁵は、タンパク質などの生体高分子を分解することなくイオン化することのできるソフトなイオン化法である。しかしながら、現在のプロテオミクスは対象タンパク質をプロテアーゼで消化し、生成したペプチドの分子量と MS/MS を測定するものである。従って、タンパク質をそのままイオン化できる MALDI 法と ESI 法の恩恵を十分に発揮しているとはいえない。FTICR-MS は、高分解能かつ高質量精度であると同時に、30kDa程度のタンパク質を断片化できる能力を有した最先端の質量分析計である。生体高分子であるタンパク質を酵素消化することなく MS の中で直接断片化することで、微量タンパク質を同定する方法論は、“トップダウン・プロテオミクス”と呼ばれている。

トップダウン・プロテオミクスは次世代のタンパク質同定法として期待されているが、いくつかの課題がある。一つ目は、どんなタンパク質でも効率よく断片化する技術が未だ確立されていないことである。分子量大きなタンパク質を直接断片化するためには、高いエネルギーを必要とする。これまでに報告されている最も大きなタンパク質のフラグメンテーションとしては、ヒト・アポトランスフェリン(79kDa)をノズルスキマーCID 法²⁶で、また大腸菌由来の *ThiC* 遺伝子産物(74kDa)を IRMPD 法²⁷で断片化している例がある。しかし、この報告以外は 30kDa 以下の限られたタンパク質の報告しかない。また、分子内に多くのジスルフィド結合を持つ、牛 α -ラクトアルブミンや卵白リゾチームを断片化することができない²⁸。

この問題点を解決するために我々は、金属製のイオン源 μ MetalTip を用いる新しい手法

を検討した。 μ MetalTip は、耐久性の優れたナノESI用のエミッターとして開発したもので、内径 30 μ m 程度のステンレス製極細針である。従来のフューズドシリカ製ナノESI用エミッターと比較して、機械的及び物理的強度を含めて耐久性が飛躍的に向上している。この μ MetalTip の高い耐久性に注目し、イオン源付近の温度を 250°C 以上に加熱することでタンパク質の断片化を促進させる手法を考案した。イオン源付近を加熱し、分子イオンに熱エネルギーを与えることにより、内部エネルギーを増加させ、断片化効率を向上させることを期待して詳細に実験を行った。その結果、従来では断片化しにくかったリゾチームや BSA も高感度で断片化することができるようになり、さらに 150KDa の高分子量タンパク質の断片化も可能となった²⁹。

第 2 節 FT-ICRMS の構造と特徴

FT-ICRMS は、これ以外の磁場型、四重極型、イオントラップ型、飛行時間型の質量分析計と構造と性能で大きく異なる最新鋭の質量分析計である⁶¹。FT-ICRMS のもっとも大きな特徴は、他の型と比べて格段に高分解能であることと質量精度が高いことである。10万を超える質量分解能を有していることから、高分子量のタンパク質であっても、同位体ピークを分離することが可能である。また、質量精度が高いため、低分子においては精密質量分析により組成式を求めることが可能である。

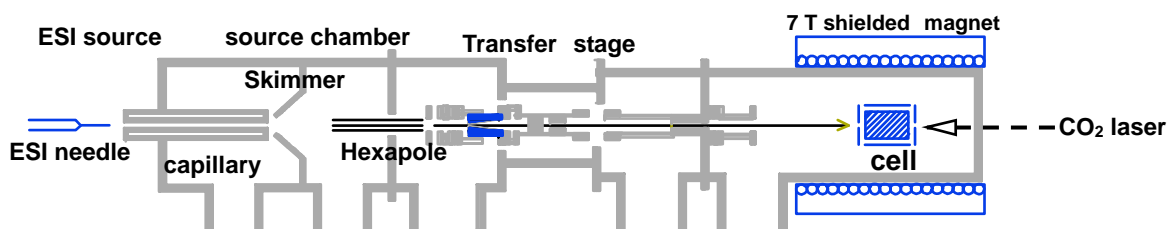


図 20 FT-ICRMS 概略図

図20は、ESI イオン源を装着した FT-ICRMS の概略図である。図の左側から ESI needle

でイオン化された分子は、キャピラリーを經由して真空系へ運ばれる。イオンを検出する Cell 内へはパルスで導入する必要があるため、生成したイオンは Hexapole 内で一定時間貯められる。その後、複数のレンズからなる transfer stage を経て、超伝導マグネットの中心に存在する高真空の Cell 内へイオンは導かれる。

図 21 では、FT-ICRMS でのイオンの検出の原理を示す。静磁場中のイオンは、ローレンツ力を受けて磁場に直交する面で回転運動をする。回転運動の周波数 (f) は、磁場強度 (B) とイオンの電荷 (q) に比例し、質量 (m) に反比例する。そこで、磁場と平行においた電極に交流電流をパルスで加えると交流電流の周波数に一致した固有の周波数を有するイオンが励起され、位相のそろった回転運動(これをイオンサイクロトロン共鳴と呼ぶ)をする。交流電流を停止したのち、もう一对の検出電極に流れる誘導電流を測定することにより、共鳴しているイオンの周波数を測定することができる。実際の測定では、まず交流電流の周波数を掃引して測定対象のイオンを全て励起した後、時間とともに減衰する誘導電流信号 (transient signal) を観測する。これは、全てのイオンの誘導電流信号の和となっている。これをフーリエ変換することで周波数スペクトルを得て、さらに、イオンの質量電荷比 (m/z) と周波数との関係式 ($f = qB / 2\pi m : q = ze$) を用いて質量スペクトルに変換する (図 21)。

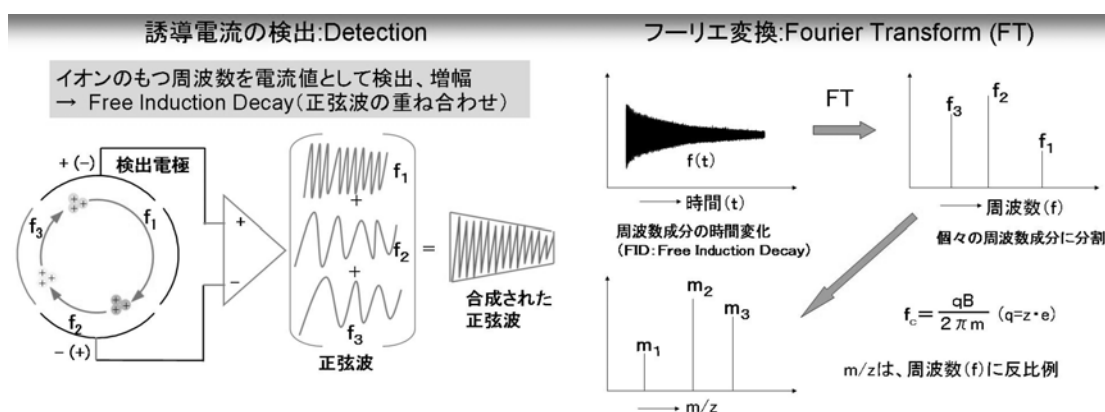


図 21 FT-ICRMS による質量測定 の原理

- 左) イオンサイクロトロン運動しているイオンの周波数を誘導電流として観測
- 右) 得られた正弦波をフーリエ変換し、さらに質量スペクトルに変換する過程

FT-ICRMS は、静磁場中のイオンの回転運動の周波数のみを測定するため、他の質量分析計と比べて外部要因(電源電圧、温度、外部磁場など)の変動による影響を受けにくいことから、高い質量精度が得られる。また、信号観測時間を増やすことにより、感度の低下を伴わずに非常に高い分解能が得られる。

FT-ICRMS で測定できるフラグメンテーションの手法は、大きく SORI-CID 法、キャピラリースキマーCID 法、IRMPD 法、ECD 法の 4 種類に分類される。SORI-CID 法(sustained off-resonance irradiation CID:持続性非イオンサイクロロン共鳴照射衝突誘起解離)は、四重極イオントラップ型質量分析計の MS/MS 法に類似した低エネルギー衝突誘起解離(low energy collision-induced dissociation / low energy CID)である。Cell 内にトラップしたイオンを励起して運動エネルギーを与え、Cell 内に導入した不活性ガス(Ar など)と衝突させて イオンを分解させる。キャピラリースキマーCID 法は、図21 のキャピラリーの出口とつづくスキマーレンズとの間の電位差により、イオンを分解させる方法である。スキマーレンズに続く Hexapole 内でのイオンのトラップ時間を長くすることでフラグメンテーションの効率を向上させることができる。これを Multipole storage assisted dissociation 法(MSAD 法)と呼ぶ¹⁸。これにより、SORI-CID 法のような低エネルギー衝突誘起解離では分解できないタンパク質のような大きな分子を壊すことが可能である。IRMPD 法(Infrared multiphoton dissociation 赤外多光子解離)は、赤外レーザーをイオンに照射する方法である。図20中の Cell に対してイオン導入経路の対向からレーザーを入射する。Cell 内にトラップしたイオンに赤外レーザー(10.6 μmCO_2 レーザー)を照射する方法²²と Hexapole にトラップしたイオンに照射する方法^{19 20 21}がある。ECD 法(Electron captured dissociation 電子捕獲解離)は、Cell 内で発生させた電子を用いてイオンを分解する方法である^{22,23,24,25}。SORI-CID 法、IRMPD 法、ECD 法は、Cell 内でイオンを分解する方法であるため、特定のイオンを選択してフラグメンテーション(MS/MS)を行うことが理論的に可能である。また、キャピラリースキマーCID 法、IRMPD 法、ECD 法は新しい手法であり、タンパク質などの生体高分子の分解法としては未知の部分が多い。

第3節 熱補助ノズルスキマーCID法及び熱補助IRMPD法によるタンパク質断片化と帰属

第1項 熱補助ノズルスキマーCID法によるタンパク質の断片化

通常のESI法は、2～数十 $\mu\text{l}/\text{min}$ とサンプル流量速度が高く、単位時間当たりの溶媒量が多くなり、イオン源付近の加熱エネルギーは主に溶媒気化熱として消費される。イオン源加熱を分子イオンのフラグメンテーションに効率的に利用させるためには、流速が数十～数百 nl/min と通常のESI法よりも100分の一の流量のナノESI法が適していると考えられる。従来のフューズドシリカ製のナノESIエミッターは、金コーティングをしており、加熱に対する耐久性が低い。一方、 μ MetalTipはステンレス製(SUS304)であるために加熱に対する耐久性も高い。そこで、ナノESI-FTICR-MSに μ MetalTipを搭載して、タンパク質の断片化に対する加熱効果を検討した。

図22に0.01 mg/ml のユビキチンのノズルスキマーCIDスペクトルを示した。流速は50–150 nl/min で測定し、キャピラリー出口電圧(CapExit)290Vに設定して、ノズルスキマーCIDを行った。脱溶媒用窒素ガス(Drying gas)の温度設定をすることにより、イオン源周辺の温度を調整した。100 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $^{\circ}\text{C}$ での測定では、分子量関連イオンが主に観測されており、フラグメントイオンはほとんど生じていない。200 $^{\circ}\text{C}$ と温度を上昇させることにより、分子量関連イオンの強度が低下し、フラグメントイオンが増加することがわかった。測定は積算せずに、1スキャンのみであり、測定時間はおよそ10秒である。1.2 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ (=0.01 mg/ml)の試料を流速100 nl/min で測定している為、およそ20 fmol タンパク質のマススペクトルである。温度を250 $^{\circ}\text{C}$ まで上げるとフラグメントイオンの数が低下した。

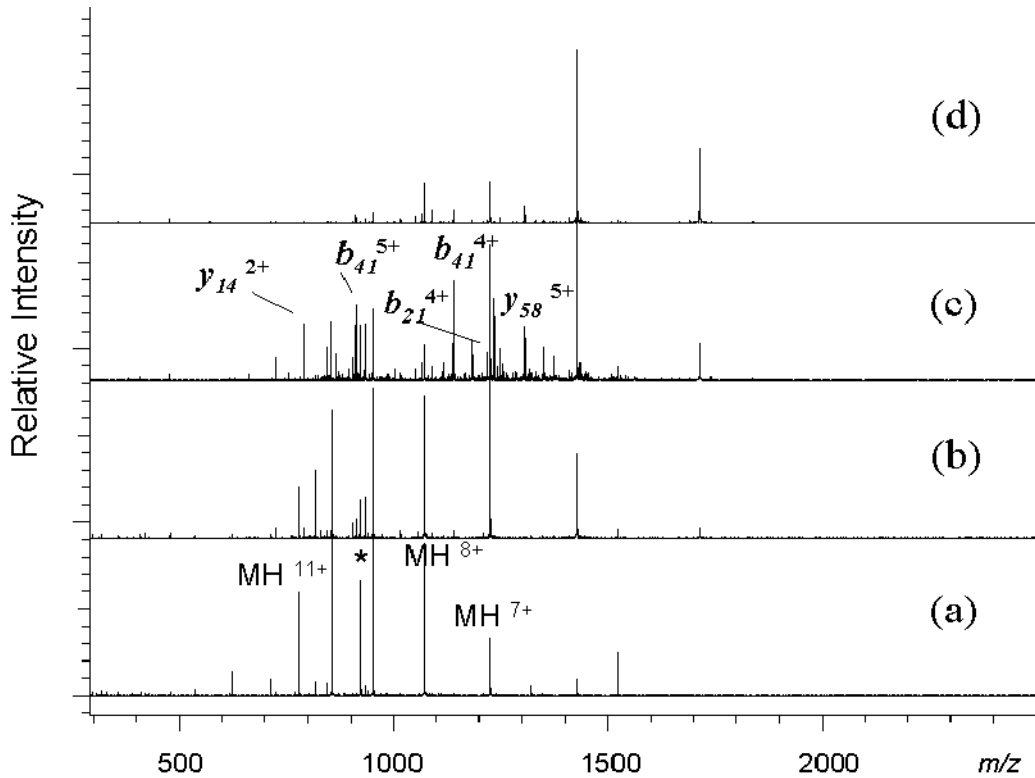


図 22 各温度におけるユビキチン(0.01mg/ml)のノズルスキマーCID スペクトル

イオン源: μ MetalTip 搭載ナノESI、* : 内部標準としてのリゾチーム

CapExit 電圧: 290V

Drying gas 温度 a)100°C、b) 150°C、c) 200°C、d) 250°C

温度上昇により、断片化イオンが観測されるようになる。

また、Drying gas 温度 300°C、スプレー電圧-1.7kV と一定にし、種々の CapExit 電圧で測定したときの FTICR-MS スペクトルを図23に示した。CapExit 0V 及び 25V では、ユビキチンのフラグメンテーションは起こっておらず、90V で断片化が生じた。すなわち CapExit 電圧が低いとき

は、加熱自身では断片化が生じていない。また、CapExit 電圧0Vで、キャピラリー温度 100–250°Cで測定したスペクトルを図24に示す。いずれの温度でもフラグメンテーションは生じていない。以上の結果から、本方法は、熱エネルギーを与えることにより、ノズルスキマーCID を増強しているものと考えられた。そこで、本方法を熱補助ノズルスキマーCID 法と名づけた(heat assisted nozzle skimmer -CID:HANS-CID)。

次に、温度を 250°C、CapExit を 250V と固定し、スプレー電圧を 1.4kV–1.7kV まで変えたときのユビキチンの HANS-CID スペクトルを測定した(図25)。スプレー電圧が 1.4–1.45V と低い時にはフラグメントイオンは観測されないが、スプレーイオンの電圧が上昇するに従い、断片化が進行することが明らかとなった。これはイオン化エネルギーが分子イオンに反映されていることを示唆している。

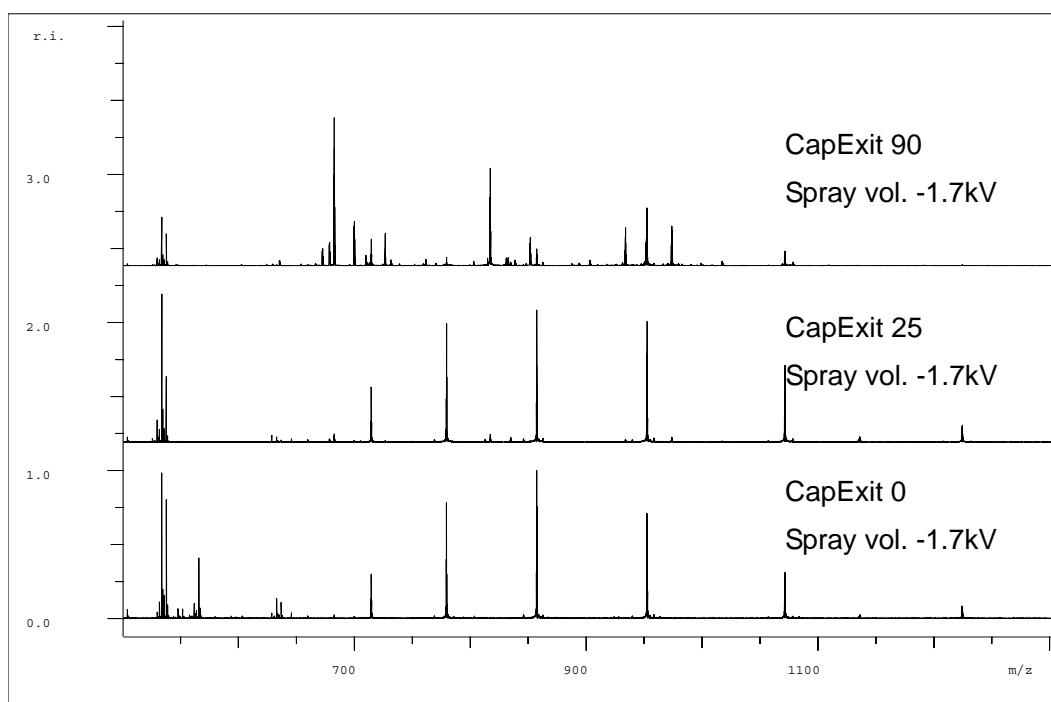


図 23 CapExit 電圧を変化させた時のユビキチン(0.01mg/ml)の HANS-CID スペクトル

Spray 電圧: -1.7kV、Drying gas 温度:250°C

上段:CapExit電圧90V、中段:25V、下段:0V

CapExit 電圧が断片化には必須である

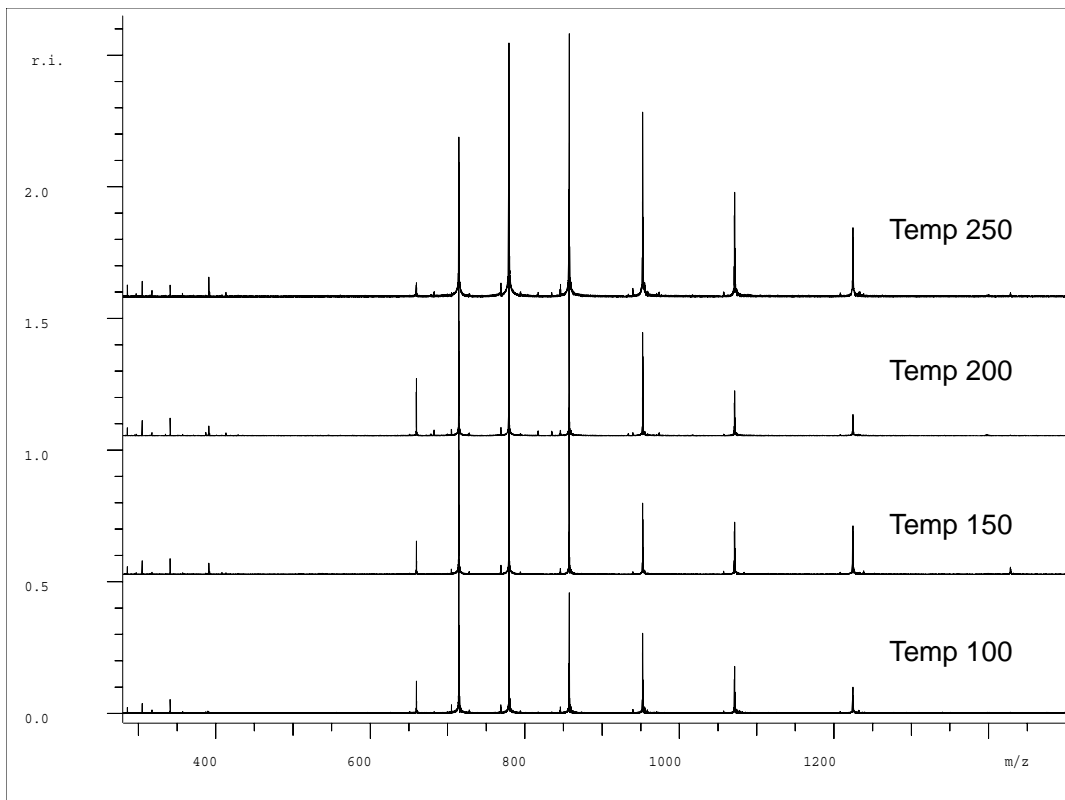


図 24 Drying gas 温度を変化させた時のユビキチン(0.01mg/ml)の FTICR-MS スペクトル

CapExit 電圧が0V の場合は、Drying gas 温度を 250°C にしても、ユビキチン分子イオンのみ観測され、断片化は生じていない

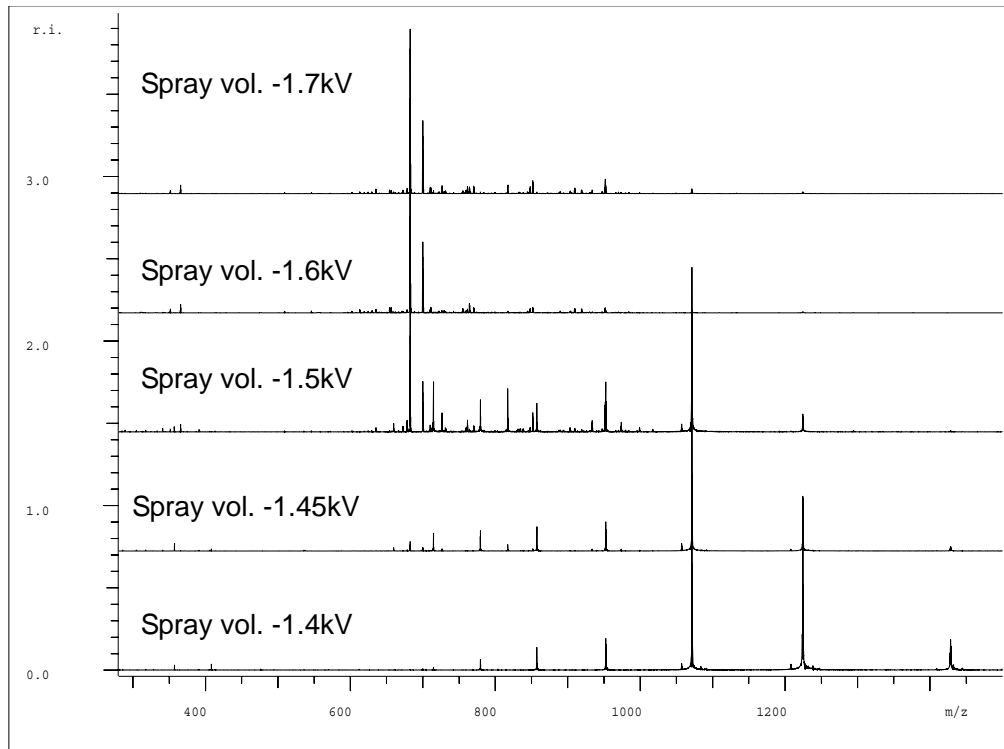


図 25 スプレー電圧の影響: ユビキチン(0.01mg/ml)の HANS-CID スペクトル

Dry gas Temp 250°C、CapExit 250V

スプレー電圧: 上段より、-1.7、-1.6、-1.5、-1.45、-1.4Vとスプレー電圧が高いと断片化効率が向上する

第2項 熱補助 IRMPD 法によるタンパク質の断片化

HANS-CID 法と同様に、IRMPD 法への加熱効果について検討した。IRMPD 法は、イオンに CO₂ レーザーを照射することにより、開裂誘起を行う方法である。CapExit200V、レーザーパワー20%(8W)、レーザー照射時間 300msec の条件でユビキチンの IPMPD スペクトルを測定した。このとき、キャピラリー温度 150°C、200°C、250°Cとし、フラグメンテーションの変化を観察した(図26)。IRMPD 法の場合は、低温度でも既に断片化が生じているが、温度上昇によりその断片化イ

オンの数が増加していることが分かった。以上の結果から、本法を熱補助 IRMPD 法 (heat assisted - IRMPD 法;HA-IRPMD)と呼ぶこととした。

IRMPD 法は、ICR セル内でトラップしたイオンに対してレーザーを照射することが可能である。したがって、ノズルスキマーCID 法ではできない MS/MS 法が可能である。そこで、はじめに HANS-CID 法で断片化したイオンのうち、任意のイオンを選択し、その後 IRMPD 法による MS/MS を行った(図27)。キャピラリー温度 250℃、スプレー電圧-2.0kV、CapExit40V で、HANS-CID スペクトルを測定した(図27下段)。断片化イオンの中で m/z 817.49 を SWIFT 法で ICR セル内に単離、トラップした(図27中段)。続いて、レーザーパワー40%(16W)、照射時間 200msec で IRMPD 法を行い、わずかではあるが断片化イオンを観測することができた(図27 上段)。この結果、HANS-CID スペクトル(図27 下段)で観測されたフラグメントイオンのうち、 m/z 817.49 由来のイオンを同定することができた。

同様に、HANS-CID(CapExit90V)で生成した m/z 682.65 に対する IRMPD スペクトルを図28(下・中段)に示した。これとは別に、HA-IRMPD 法で生成した同じイオン(m/z 682.65)のみを ICR セルにトラップし、このイオンに対して、IRMPD 法を行った時の IRMPD/IRMPD スペクトルを図28上段に示した。その結果、HANS-CID/IRMPD 法と同等のスペクトルが観測された。このように、HA-IRMPD/IRMPD 法、HANS-CID/IRMPD 法は、MS/MS 法として利用できる可能性を示すことができた。また、いずれのタンデム MS の手法も、熱エネルギーを利用した開裂であることから、得られる断片化スペクトルは、非常に良く一致している。

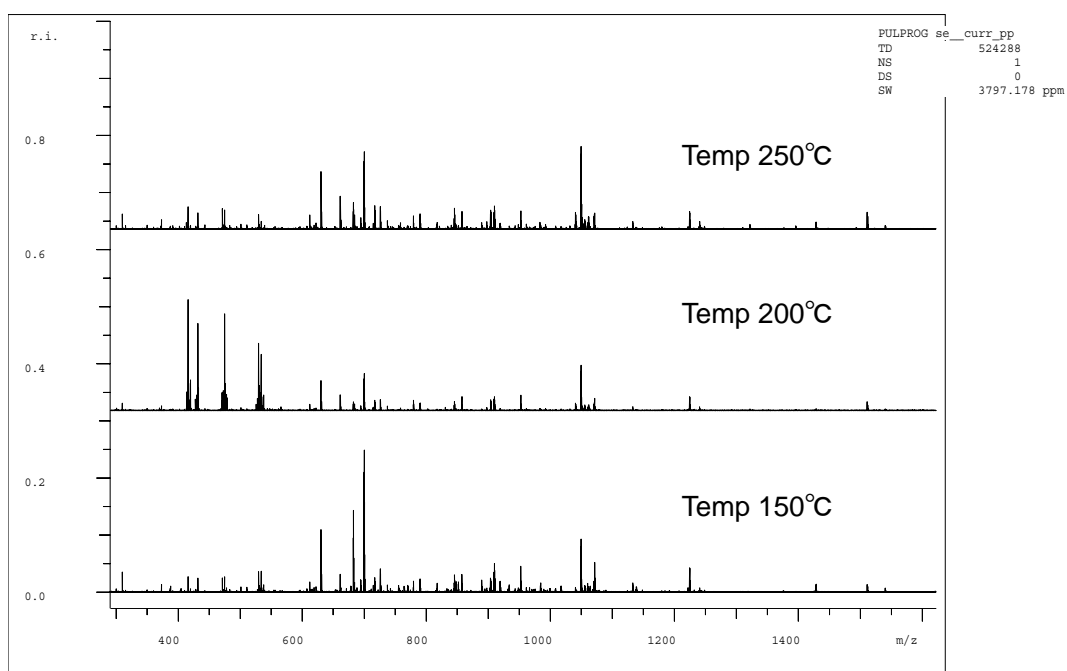


図 26 各Drying gas 温度におけるユビキチン(0.01mg/ml)の IRMPD スペクトル

下段より、Drying gas 温度 150°C、200°C、250°C。IRMPD の場合は低温度でも断片化イオンが観測される。

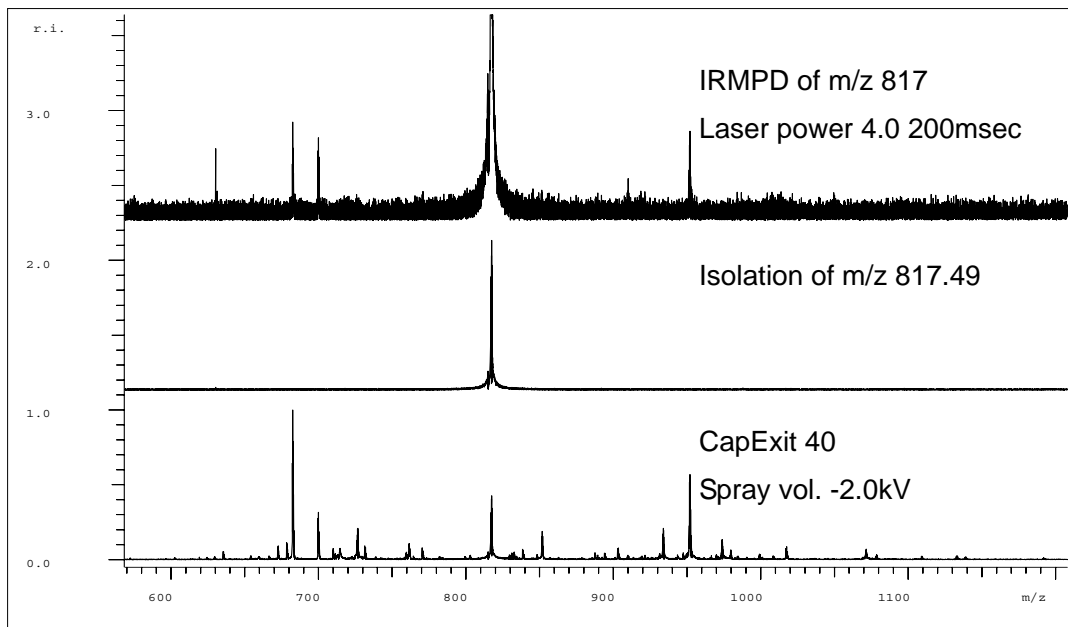


図 27 ユビキチン(0.01mg/ml)の HANS-CID/IRMPD スペクトル

下段: HANS-CIDスペクトル、中段: m/z 817.49 イオンを選択したスペクトル、上段: 中段で選択した m/z 817.49 イオンの IRMPD スペクトル

FT-ICRMS 内で、ユビキチンのタンデム MS を実施した例

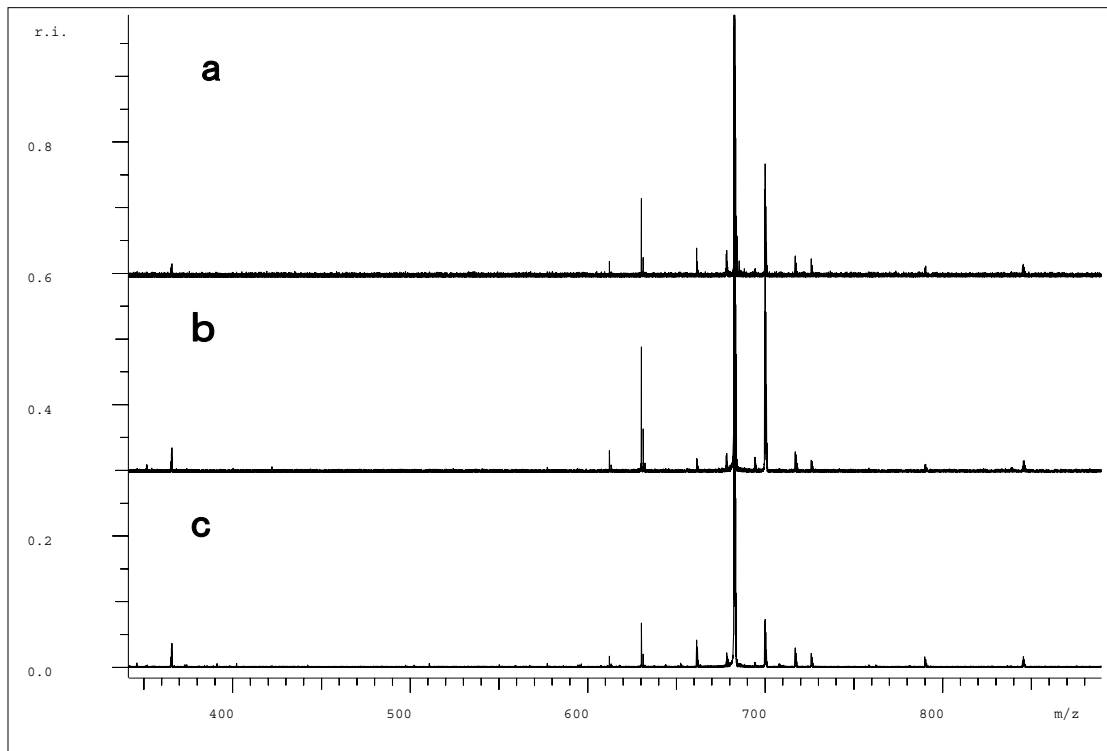


図 28 ユビキチン(0.01mg/ml)の HANS-CID スペクトル及び HA-IRMPD/IRMPD スペクトル

プリカーサーイオン:m/z 682.65

a: HA-IRMPD/IRMPD スペクトル、CapExit 電圧0V、レーザーパワー4、レーザー照射時間
1段目200msec、2段目500msec

b: HANS-CID/IRMPD スペクトル、CapExit 電圧90V、レーザーパワー4、レーザー照射時間
2000msec

c: HANS-CID/IRMPD スペクトル、CapExit 電圧90V、レーザーパワー4、レーザー照射時間
500msec

タンデム MS の例

第3項 熱補助ノズルスキマーCID 法及び熱補助 IRMPD 法によるリゾチームの断片化

リゾチームは、分子内に4つのジスルフィド結合を有する分子量約 14,000 のタンパク質である。一分子内に多くのジスルフィド結合を形成している為、非常に安定で硬い構造を持っている。これまでは、還元し、分子内ジスルフィド結合を切断した状態でなければ、リゾチームを質量分析計で直接断片化することはできなかった²⁸。このように還元しなければ断片化できないタンパク質が多く存在する為に、網羅的なトップダウン・プロテオミクスにおいては、サンプルをあらかじめ還元処理をすることが必須となっている。しかし、還元処理をすることにより疎水性残基が露出し、沈殿が生じたり、HPLC での回収率が著しく低下することなどが大きな問題となっている。この課題を解決する為に、 μ MetalTip を用いた熱補助ノズルスキマーCID 法及び熱補助 IRMPD 法により、リゾチームの断片化を試みた。図29にリゾチームの HANS-CID スペクトル及び図30と図31に HA-IRMPD スペクトルを示した。スペクトルは全て、0.1mg/ml (7pmol/ μ l)、流速 100nl/min で測定したものである。還元処理なしに、高感度でフラグメントイオンを観測した初めての例である。Drying gas 温度上昇に伴い、断片化が進行していることがわかり、特に HA-IRMPD 法の方が効率的に断片化することができた。図29では、CapExit 電圧を300V としても、Drying gas 温度が 150°C (通常測定温度) では断片化が生じないことがわかった。また、スペクトルの質も非常によく、安定同位体の分布を観測できる分解能であった。

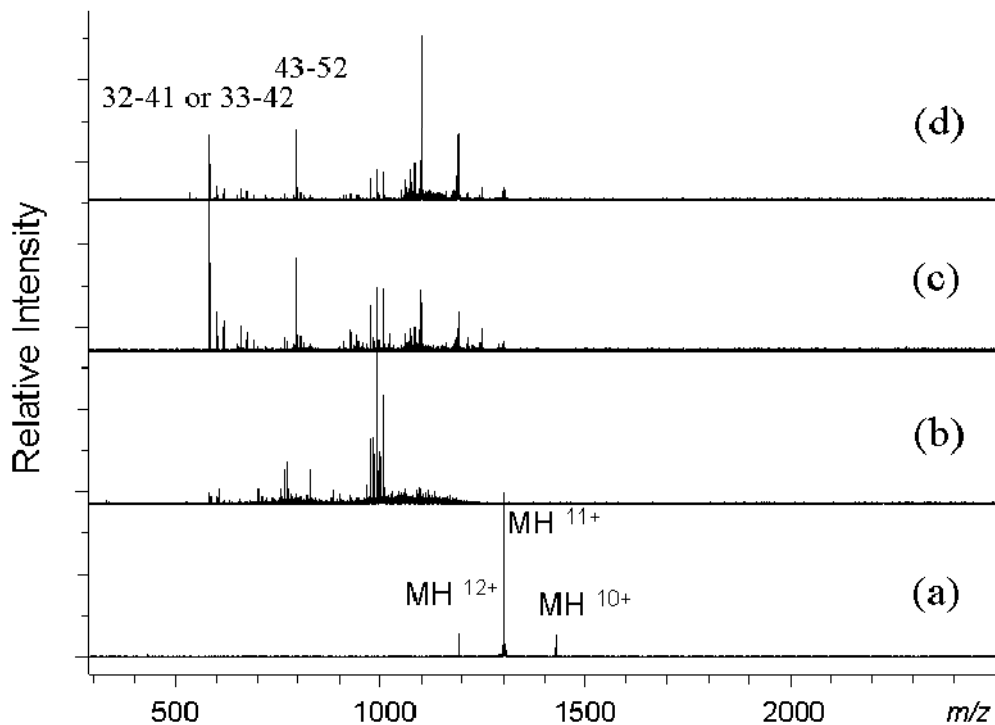


図 29 リゾチームの HANS-CID スペクトル: Drying gas 温度の影響

a: drying gas 温度150°C、CapExit 電圧300V

b: drying gas 温度200°C、CapExit 電圧300V

c: drying gas 温度250°C、CapExit 電圧150V

d: drying gas 温度300°C、CapExit 電圧150V

Drying gas 温度が低い場合、CapExit 電圧を高くしてもリゾチームの断片化は起こらない。

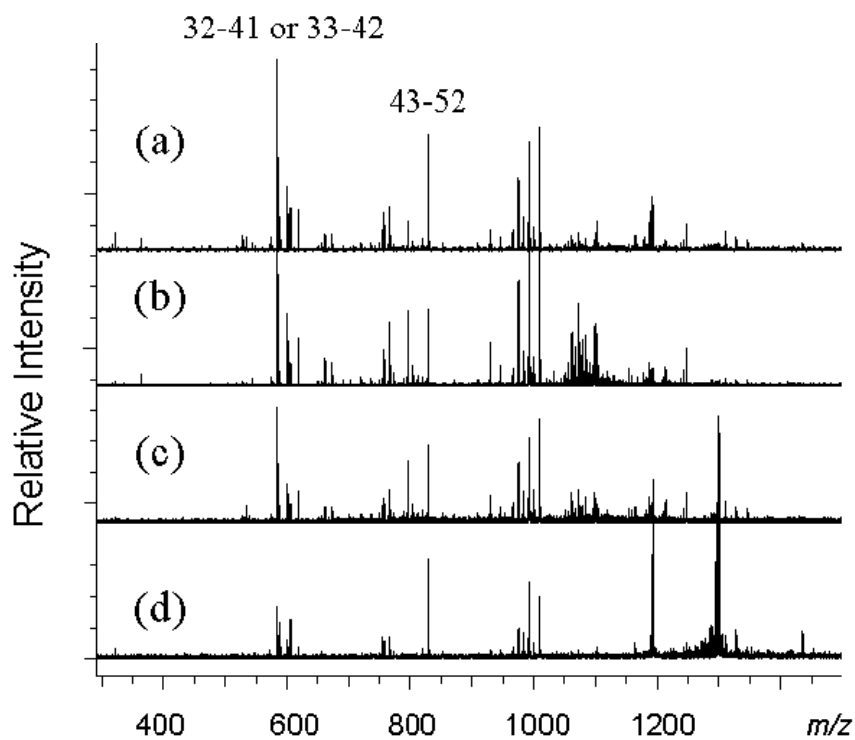


図 30 リゾチームの HA-IRMPD スペクトル: Drying gas 温度の影響

a; Drying gas 温度 150°C、CapExit 電圧 300V、レーザーパワー1.8、

b; Drying gas 温度 200°C、CapExit 電圧 220V、レーザーパワー1.3、

c; Drying gas 温度 250°C、CapExit 電圧 120V、レーザーパワー1.5、

d; Drying gas 温度 300°C、CapExit 電圧 50V、レーザーパワー1.5、

Drying gas 温度上昇により、CapExit 電圧が低くとも、リゾチームの断片化が観測された

第4項 熱補助ノズルスキマーCID法による牛血清アルブミンの断片化

牛血清アルブミン(BSA)は、分子内に17個のジスルフィド結合を持つ分子量およそ66kDaの球状タンパク質である。BSAのHANS-CIDスペクトルとデコンボリューション後のスペクトルをそれぞれ図31、図32に示した。このようにHANS-CID法を用いることにより、還元処理をなくとも効率的に断片化することが可能であった。測定に要したサンプル量は166fmolと非常に微量であり、トップダウン・プロテオミクスに十分な感度に達成している。デコンボリューション処理をしたスペクトルからアミノ酸配列を読むことができる。L/I V L/I L/I A F S Q Y L/I Q Qあるいはこの逆の配列が可能性として考えられる。両方の配列をデータベース検索することにより、BSAと同定することができた。

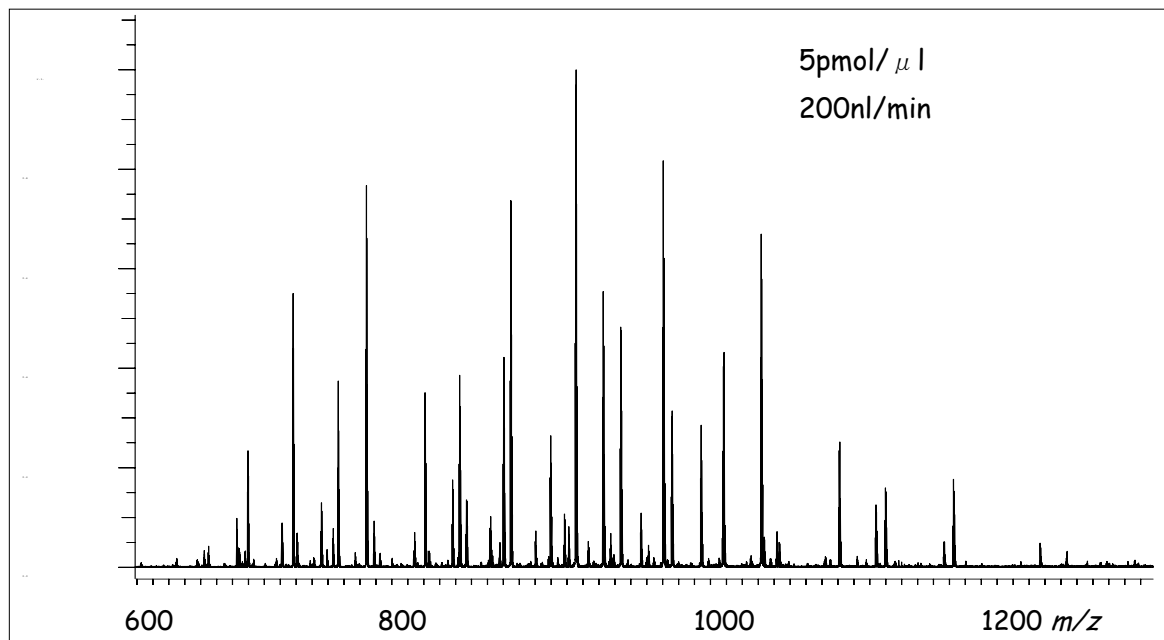


図 31 BSA の HANS-CID スペクトル

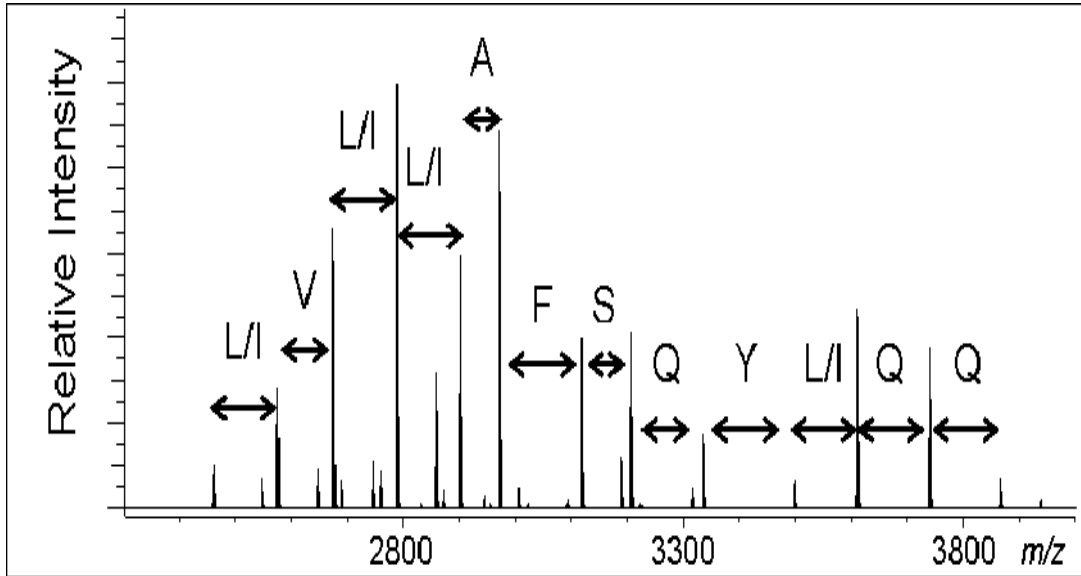


図 32 BSA の HANS-CID スペクトル(図31のデコンボリューション後)

得られた各イオンの質量差からアミノ酸残基を特定できる。この配列をデータベース検索することにより BSA と同定できた

第5項 熱補助ノズルスキマーCID法及び熱補助IRMPD法によるモノクローナル抗体の断片化

モノクローナル抗体IgGは、2本のH鎖と2本のL鎖からなるヘテロヘキサマーを形成し、分子量およそ150kDaの巨大な糖タンパク質である。IgGにはいくつかのサブクラスがあるが、マウス抗ダンシル抗体IgG2bの断片化を行った。タンパク質濃度1.5mg/ml(およそ10pmol/ μ l)の試料をHANS-CID法で測定を行った。マウス抗ダンシル抗体IgG2bのHA-IRMPDスペクトルを図33に示した。IgGのMSによる断片化は、1992年と1993年にいずれもFenn(ノーベル化学賞受賞者)が報告しているが、断片化効率が非常に悪く、ノイズのようなS/Nの悪いスペクトルであった。本研究で得られたスペクトルは、非常に質が高く、すべての断片化イオンは、同位体分離可能であり、質量を求めることができた。各イオンの質量を図33に示した。質量およそ12500程度のフラグメントイオンが複数観測され、IgGも断片化可能であることがわかった。IgGは、分子量約5万のH鎖2本と約2万のL鎖2本からなる。更に、H鎖は、 V_H 、 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} ドメインから構成されている。またL鎖は、 V_L と C_L のドメインから構成されている。これらのドメインは、同程度のサイズである。観測されたイオンの質量は、ちょうどドメイン1つ分に相当する。MS内で断片化できたタンパク質で、これまでに報告されているもっとも大きなものは、ヒト・アポトランスフェリン(79kDa)である。我々の方法は、分解可能なタンパク質の分子量を大きく拡大できることがわかった²⁹。

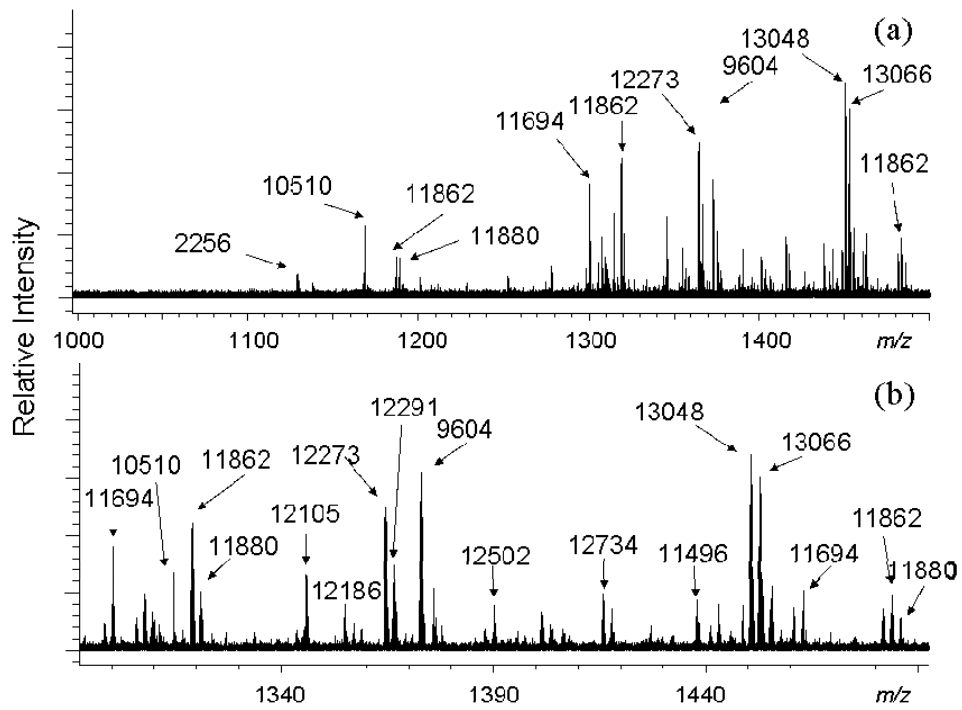


図 33 マウス抗ダンシル モノクローナル抗体 IgG2b の HA-IRMPD スペクトル

a) HA-IRMPD スペクトル、b) デコンボリューション後のスペクトル

第4節 結論

本章では、前章で開発した耐久性の高いステンレス製ナノ ESI 用エミッター (μ MetalTip) を採用することにより、イオン源周辺を加熱することで高分子量タンパク質の断片化効率の向上を検討した。

1) ノズルスキマーCID 法及び IRMPD 法において、イオン源領域を250–350°Cに加熱することにより、タンパク質の断片化が向上することができた。イオン源の温度を250–350°Cにしても、キャピラリーとスキマー間の電圧が25V 以下と低いときには断片化が起こらないことから、加熱はノズルスキマーCID 法の効率を上げることに役立っていることが示唆された。このことから、熱補助ノズルスキマーCID (Heat assisted nozzle skimmer [CID:HANS-CID](#)) 法及び熱補助 IRMPD 法 (HA-IRMPD) とした。

2) 本法により、これまで断片化が困難であったジスルフィド結合を有するリゾチームや分子量 150kDa の IgG2b の断片化にも成功した。これまで74kDa であった測定限界分子量を更新した。

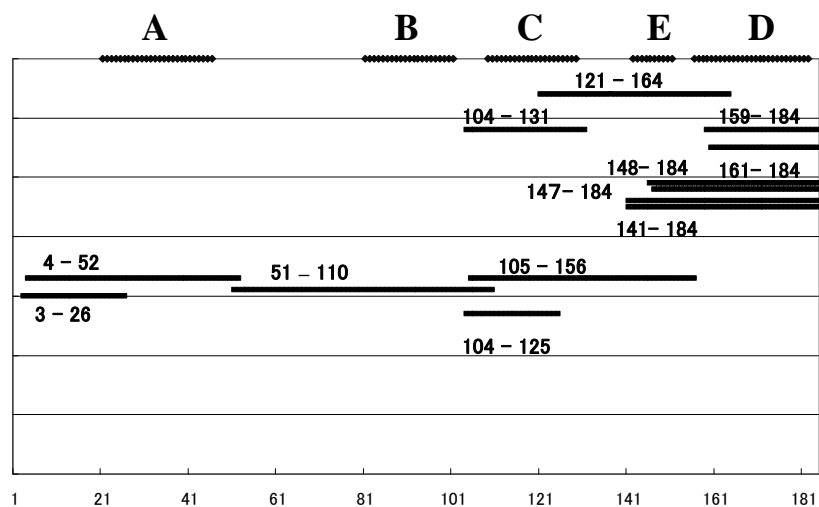
しかしながら、全てのタンパク質で同定に十分な配列情報を得ることはできなかった。他の断片化法との組み合わせによる、更なる検討が必要である。

第5章 タンパク質断片化技術の2次構造情報抽出への応用

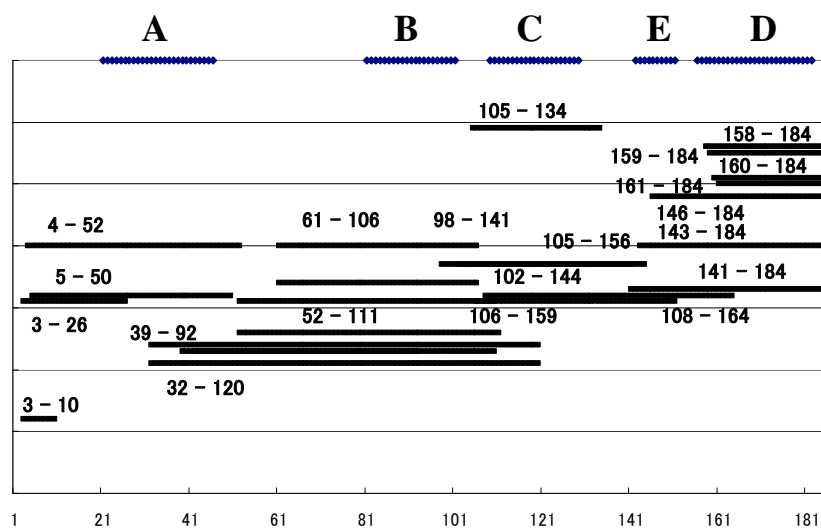
第1節 タンパク質断片化スペクトルからの2次構造抽出

第1項 IL-6の断片化スペクトル測定と帰属

IL-6は、4本のメインの α ヘリックス(A,B,C,Dヘリックス)と1本の短い α ヘリックス(Eヘリックス)からなる球状タンパク質である。1%酢酸水溶液中に溶解したIL-6のIRMPDスペクトルとHACS-CIDスペクトルの帰属した結果(断片イオン)を図34に記載した。図34より、切断されやすい部位、切断されにくい部位が存在することがわかる。図34の上部にヘリックスの位置を記載したが、 α ヘリックス領域では切断が起りにくく、ヘリックスの末端部分あるいはヘリックス間のループ部分で切断が生じる傾向が見られる。この切断部位をIL-6の立体構造上へ黄色で表示することにより、より視覚的に理解することができる(図35)。IRMPD法とノズルスキマーCIDともに切断部位は非常に良く似ており、 α ヘリックスが断片化されずに残ることにより検出される傾向が見出された。以上の結果から、IRMPD法及びノズルスキマーCIDスペクトルから、壊れにくいフラグメント情報が得られること、さらに、この情報は2次構造(α ヘリックスの範囲)を反映していることが示唆された。



Number of amino acid residue

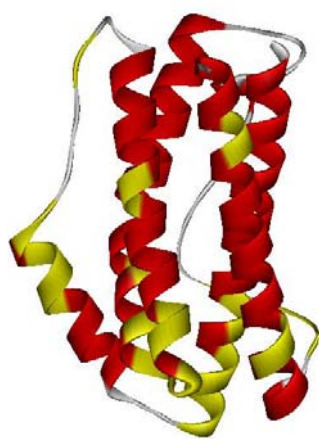


Number of amino acid residue

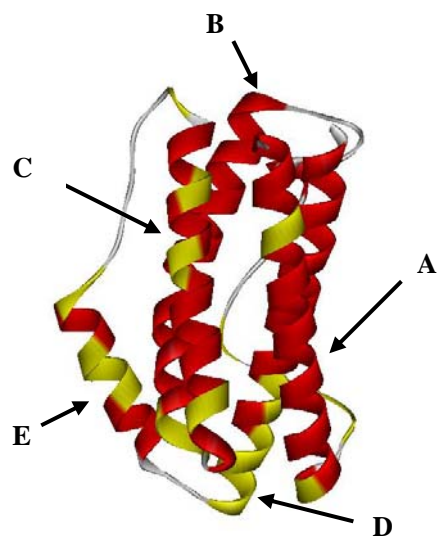
図 34 IRMPD スペクトル及びノズルスキマーCID スペクトルにより観測された IL-6 断片化イオンの帰属結果

上:IRMPD スペクトル、下:ノズルスキマーCID スペクトルの結果

太線が観測されたペプチド断片。数字はアミノ酸残基番号を記載。各図上段には、4つの α ヘリックスの位置を記載した。



IRMPD 法



ノズルスキマーCID 法

図 35 IL-6 の立体構造上に MS による切断部位を表示した図

赤色で α ヘリックス、黄色で切断部位を表示した。ヘリックスの両末端付近で切断が生じている傾向がある。

第2項 ユビキチンの断片化スペクトル測定と帰属

ユビキチンは、分子量 8.5kDa の立体構造既知のタンパク質である。1本の α ヘリックスと β ストランドからなる。1%酢酸-50%メタノール水溶液に溶解した 5pmol/ μ l のユビキチンのノズルスキマーCID スペクトルを図36に示した。得られた断片化スペクトル(37 ピーク)をデータ解析ソフト MIDAS と FragInfo を組み合わせてアミノ酸配列を帰属した。帰属されたペプチドのN末端アミノ酸とその1つ前のアミノ酸との間及びC末端アミノ酸とその次のアミノ酸との間が切断部位となるため、切断部位を挟む2つのアミノ酸をユビキチンの立体構造上(1UBI)に表示した(図37)。赤色が α ヘリックス、水色が β ストランド、黄色で示した部分が切断部位である。黄色で示した切断部位は、 α ヘリックスや β ストランドの末端部分に多い傾向があることがわかった。

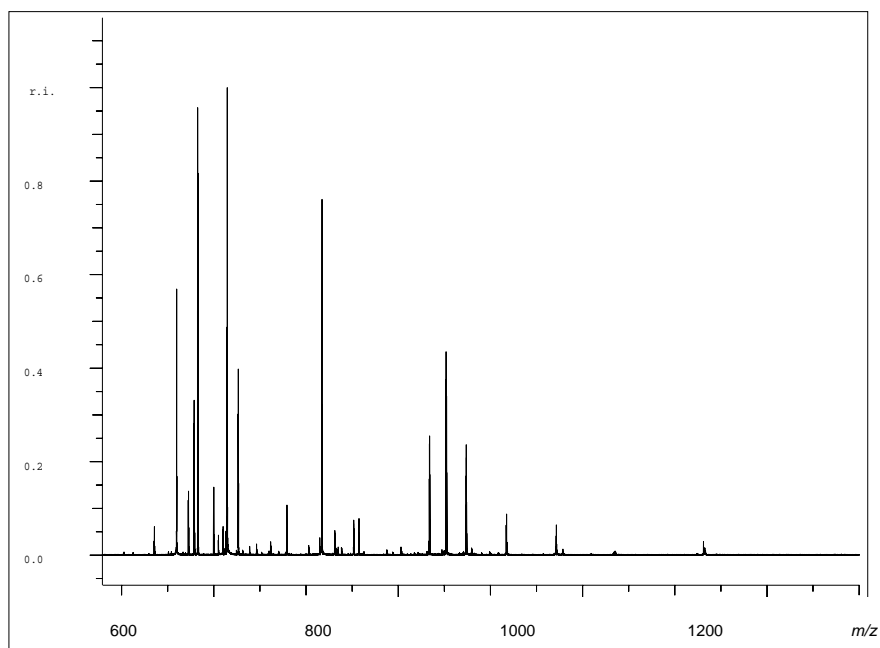
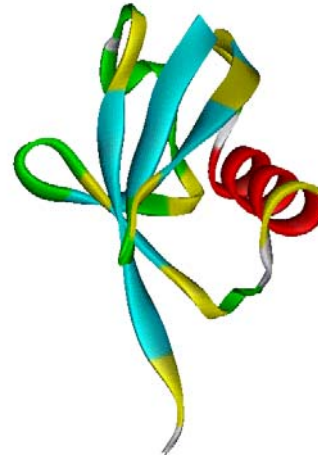
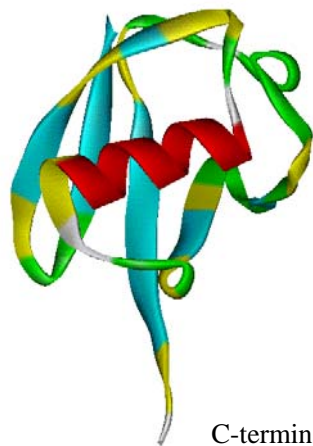


図 36 ユビキチンのキャピラリースキマーCID スペクトル

N-terminal



C-terminal

図 37 ユビキチンの立体構造上に切断部位を表示した図

赤: α ヘリックス、水色: β ストランド、黄色: 切断部位

α ヘリックス及び β ストランドの両末端で切断されやすい傾向にある

第3項 ミオグロビンの断片化スペクトル測定と帰属

ミオグロビンは、 α ヘリックスのみからなる分子量 17kDa の立体構造既知のタンパク質である。1%酢酸-50%メタノール水溶液に溶解した 5pmol/ μ l のミオグロビンのノズルスキマー CID スペクトルを図38に示した。得られた断片化スペクトル(30 ピークを検出)をソフトウェア MIDAS 及び FragInfo を用いて帰属した。帰属されたペプチドのN末端アミノ酸とその1つ前のアミノ酸及びC末端アミノ酸とその次のアミノ酸の間が切断部位となるため、切断部位を挟む2つのアミノ酸をミオグロビンの立体構造上(1DWR)に表示した(図39)。赤色が α ヘリックス、黄色で示した部分が切断部位候補である。黄色で示した切断部位は、 α ヘリックスの末端部分に多い傾向があることがわかった。

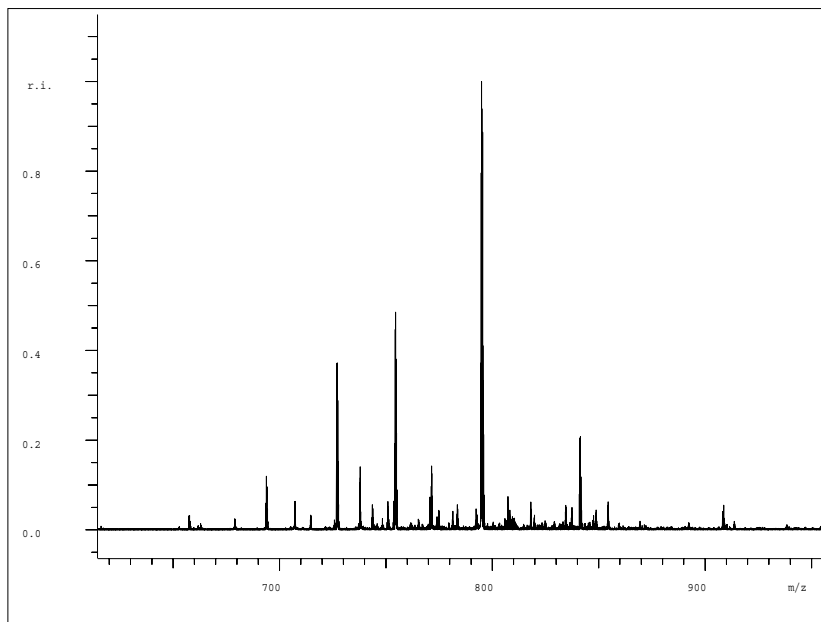


図 38 ウシミオグロビンのキャピラリースキマーCID スペクトル

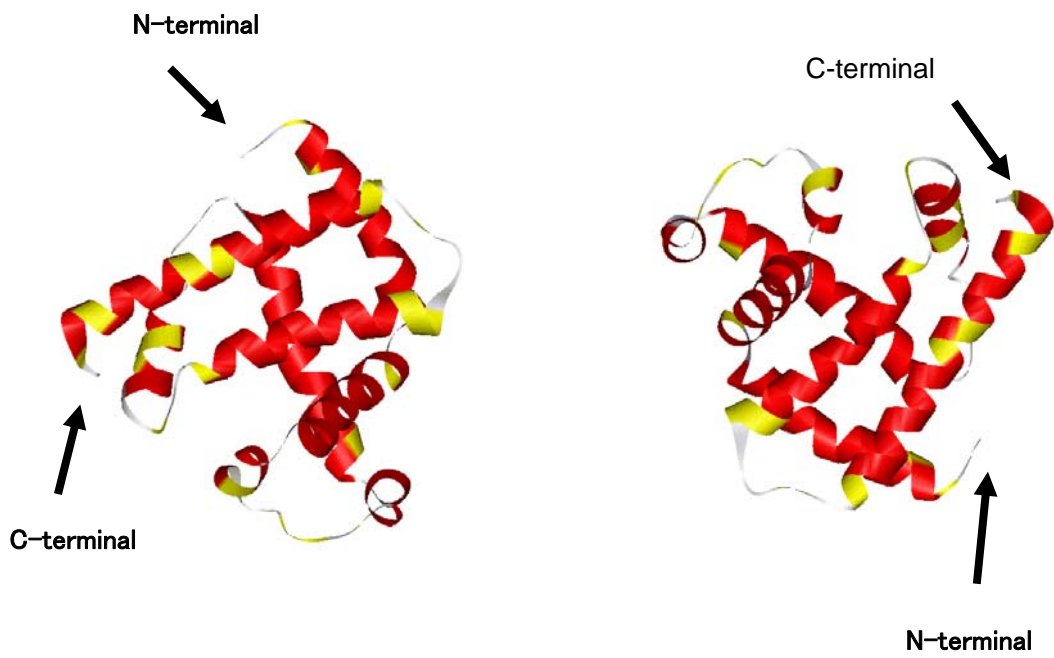


図 39 ウシミオグロビンの立体構造上に切断部位を表示した図

赤: α ヘリックス、黄色: 切断部位

第4項 carbonic anhydrase の断片化スペクトル測定と帰属

carbonic anhydrase は、29kDa の α ヘリックスと β ストランドからなる立体構造既知のタンパク質である。1%酢酸-50%メタノール水溶液に溶解した 5pmol/ μ l の carbonic anhydrase のノズルスキマーCID スペクトルを図40に示した。Bovine carbonic anhydrase のアミノ酸配列データには(PIR:CRBO2,SWISS-PROT P00921)、一部BやZの表記がある。出典論文⁶²を調べた結果、Bは還元アルキル化システイン、Zは未同定のアミノ酸であった。そこでBをC(システイン)に変換した。Zについては、最もホモロジーの高い human carbonic anhydrase のアミノ酸配列(PDB:1UGD)に対して、BLAST によるアライメントを行い。相当するアミノ酸に置換した(表4)。また、bovine carbonic anhydrase は天然由来であることから、アミノ酸配列データ上のN末端の開始コドン由来 Met を削除した。さらに、N末端の Ser がアセチル化されていることを考慮して、アミノ酸配列データを再構築した。このようにして作成したアミノ酸配列データに対して、得られた断片化スペクトルを帰属した結果を表5に示した。帰属されたペプチドのN末端アミノ酸とその1つ前のアミノ酸及びC末端アミノ酸とその次のアミノ酸の間が切断部位となるため、切断部位を挟む2つのアミノ酸を human carbonic anhydrase(PDB:1UGD)の立体構造上に表4のアライメントを参照し対応する部位を色分けして表示した(図41)。赤色が α ヘリックス、水色が β ストランド、黄色で示した部分が切断部位候補である。黄色で示した切断部位は、 α ヘリックスや β ストランドの末端部分に多い傾向があることが示された。

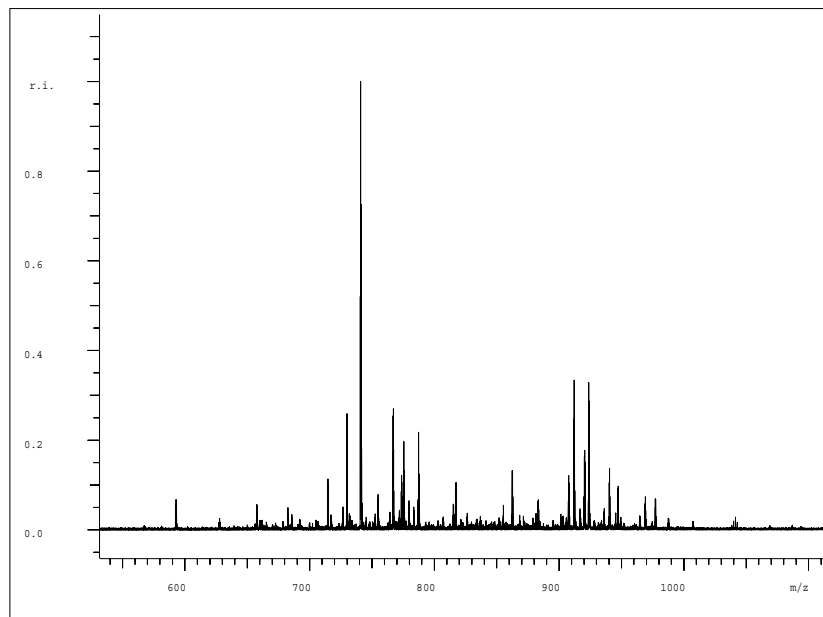


図 40 bovine carbonic anhydrase のキャピラリースキマーCID スペクトル

表4 bovine carbonic anhydrase と human carbonic anhydrase のアミノ酸配列アライメント

Alignment: P00921 vs 1UGD (+Ser)

80.0% identity in 255 residues overlap; Score: 1147.0; Gap frequency: 0.0%

```

CAH2_BOVIN    1 SHHWGYGKHBGPZHWHKDFPIANGERQSPVNI DTKAVVQDPALKPLALVYGEATSRRMVN
1UGD,         1 SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDI DHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILN
                ***** ** ***** ***** **          ** ** * ** * *

CAH2_BOVIN    61 NGHFSNVEYDSDQKAVLKDGPLTGTYRLVQFHFHWGSSBBQGSEHTVDRKKYAAELHLV
1UGD,         61 NGHFSNVEFDDSDQKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGGGSEHTVDKKKYAAELHLV
                ***** ***** ** ***** *****          ***** *****

CAH2_BOVIN    121 HWNTKYGDFGTAAQQPDGLAVVGVFLKVG DANPALQKVL DALDSIKTKGKSTDFPNFDPG
1UGD,         121 HWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGI FLKVGSAK PGLQKVVDV LDSIKTKGKSADFTNFDPR
                ***** * ***** * ***** * * ***** * ***** ** *****

CAH2_BOVIN    181 SLLPNVLDYWTYPGSLTTPPLLESVTWIVLKEPISVSSQMLKFRTLNFNAEGEPELLML
1UGD,         181 GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEPEELMV
                *** ***** ***** ***** * ***** ***** **

CAH2_BOVIN    241 ANWRPAQPLKNRQVR
1UGD,         241 DNWRPAQPLKNRQIK
    
```

表5 bovine carbonic anhydrase のノズルスキマーCID スペクトルの帰属結果

No	charge	m/z(mono)		sequence	m/z calc.	error	b	y	切断部位			
									N末		C末	
1	5	592.8453	1	((b124 - y161)26)5+	592.89433	0.04903	124	161	123	124	97	98
2	7	657.455	1	((b139 - y162)42)7+	657.46288	0.00788	139	162	138	139	96	97
4	5	685.514	1	((b128 - y161)30)5+	685.53567	0.02167	128	161	127	128	97	98
5	12	714.4704	1	((b243 - y92)76)12+	714.45522	-0.01518	243	92	242	243	166	167
			2	((b97 - y239)77)12+	714.45079	-0.01961	97	239	96	97	19	20
			3	((b237 - y99)77)12+	714.45846	-0.01194	237	99	236	237	159	160
			4	((b175 - y164)80)12+	714.45343	-0.01697	175	164	174	175	94	95
7	9	726.4485	1	((b152 - y167)60)9+	726.47233	0.02383	152	167	151	152	91	92
10	4	740.8482	1	((b124 - y161)26)4+	740.86595	0.01775	124	161	123	124	97	98
11	5	752.3443	1	((b123 - y168)32)5+	752.36228	0.01798	123	168	122	123	90	91
12	6	766.8913	1	((b139 - y162)42)6+	766.87206	-0.01924	139	162	138	139	96	97
			2	((b150 - y151)42)6+	766.90305	0.01175	150	151	149	150	107	108
			3	((b198 - y103)42)6+	766.89909	0.00779	198	103	197	198	155	156
14	6	773.5647	1	((b238 - y62)41)6+	773.58553	0.02083	238	62	237	238	196	197
			2	((b180 - y124)45)6+	773.5843	0.0196	180	124	179	180	134	135
15	5	775.3615	1	((b131 - y163)35)5+	775.37388	0.01238	131	163	130	131	95	96
16	11	779.3433	1	((b243 - y92)76)11+	779.31408	-0.02922	243	92	242	243	166	167
			2	((b97 - y239)77)11+	779.30924	-0.03406	97	239	96	97	19	20
			3	((b237 - y99)77)11+	779.31761	-0.02569	237	99	236	237	159	160
			4	((b175 - y164)80)11+	779.31212	-0.03118	175	164	174	175	94	95
17	8	783.25	1	((b97 - y217)55)8+	783.27391	0.02391	97	217	96	97	41	42
			2	((b124 - y190)55)8+	783.26388	0.01388	124	190	123	124	68	69
19	5	786.8344	1	((b168 - y130)39)5+	786.84035	0.00595	168	130	167	168	128	129
			2	((b169 - y129)39)5+	786.84035	0.00595	169	129	168	169	129	130
20	4	815.1607	1	((b162 - y130)33)4+	815.20332	0.04262	162	130	161	162	128	129
22	4	883.1773	1	(b30)4+	883.17126	-0.00604	30		29	30	258	259
24	5	916.7289	1	((b179 - y124)44)5+	916.6953	-0.0336	179	124	178	179	134	135
26	4	935.9963	1	((b197 - y96)34)4+	935.97717	-0.01913	197	96	196	197	162	163
27	4	940.255	1	((b157 - y138)36)4+	940.23942	-0.01558	157	238	156	157	20	21
			2	((b169 - y127)37)4+	940.27728	0.02228	169	127	168	169	131	132
28	9	947.1062	1	(b75)9+	947.13124	0.02504	75		74	75	258	259
			2	((b114 - y221)76)9+	947.13722	0.03102	114	221	113	114	37	38
29	4	969.022	1	((b235 - y58)34)4+	969.01239	-0.00961	235	58	234	235	200	201
			2	((b237 - y56)34)4+	969.01239	-0.00961	237	56	236	237	202	203
30	7	977.1089	1	((b77 - y244)62)7+	977.06577	-0.04313	77	244	76	77	14	15
31	11	754.7652	1	((b208 - y129)78)11+	754.76603	0.00083	208	129	207	208	129	130

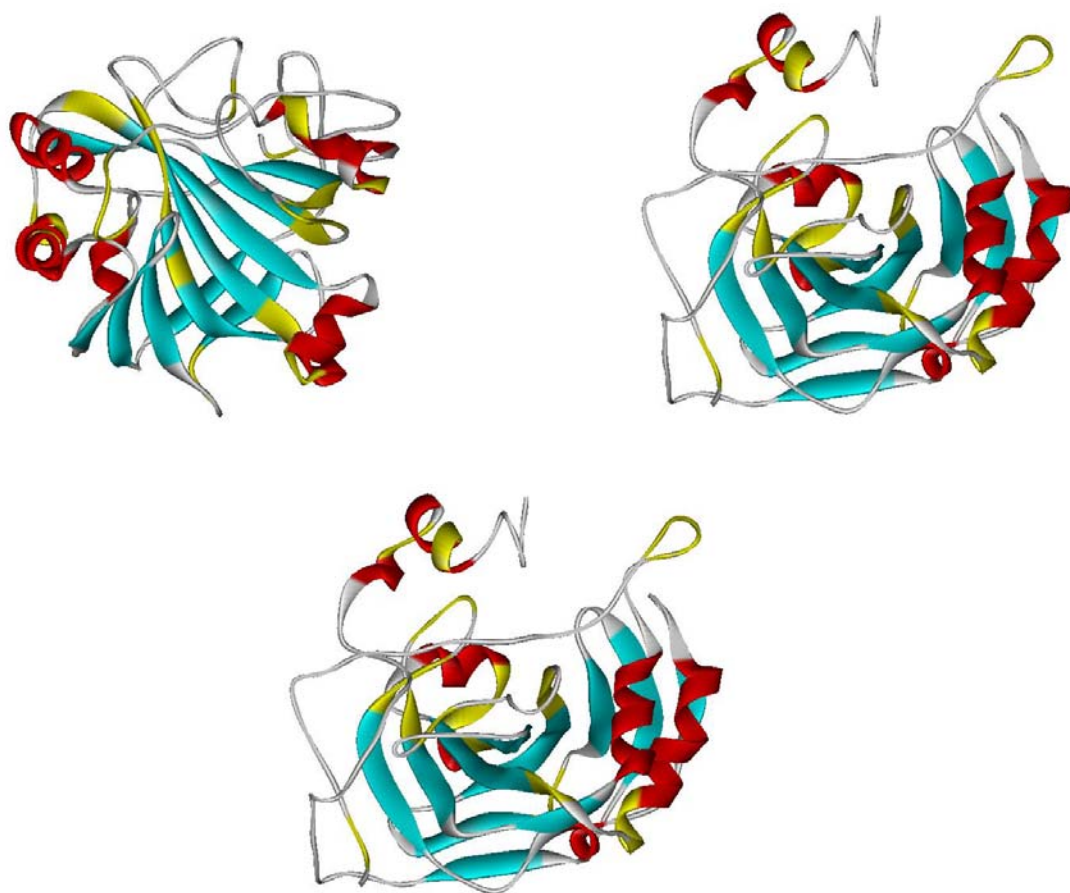


図 41 human carbonic anhydrase の立体構造上に MS による切断部位を表示した図

赤: α ヘリックス、水色: β スtrand、黄: 切断部位

第5項 アルコール脱水素酵素の断片化スペクトルデータと立体構造モデルとの比較

これまでの結果から、質量分析計によるタンパク質の断片化は、二次構造を反映している可能性があることが示唆された。すなわち、二次構造を有している α ヘリックスや β ストランドは断片化されにくく、それらの末端で切断されたイオンが残存する。すなわち、 α ヘリックスや β ストランドを形成し、安定した構造を保っている部分は、断片化イオンとして残存し、観測されやすい傾向にあった。従って、質量分析によるタンパク質の断片化スペクトルから、二次構造情報やかたい部分(ドメイン)情報を得ることができる可能性が示唆された。

質量分析は数百フェムトモルから数ピコモルといった超微量の試料があれば、数分で断片化スペクトルを測定することができる。また、測定は、1-5分、データ解析も1-2時間程度で終了する。このように本手法は、モデリングの検証に非常に適した感度とスループットを有した方法論であると考えた。そこで、この有用性をアルコール脱水素酵素を例題として以下の様に検証した。

アルコール脱水素酵素(酵母)は、分子量 36kDa のタンパク質である。1%酢酸-50%メタノール水溶液に溶解した5pmol/ μ lのアルコール脱水素酵素のノズルスキマーCIDスペクトルを図42に示した。得られた断片化スペクトルを帰属した結果を表6に示した。酵母のアルコール脱水素酵素の立体構造は未知であるが、最も類縁で立体構造が既知のタンパク質であるアルコール脱水素酵素(Archaeon *Sulfolobus Solfataricus*) (PDB:1JVB)であってもアミノ酸配列のホモロジーは30%である。そこで、北里大学で開発されたホモロジーモデリングソフトFAMS^{63, 64}を用いて、立体構造モデルを作成したところ、 α ヘリックスと β ストランドからなる構造が予測された。断片化スペクトルから帰属できた切断部位を挟む2つのアミノ酸をこの予測立体構造上に表示した(図43)。赤色が α ヘリックス、水色が β ストランド、黄色で示した部分が切断部位候補である黄色で示した切断部位は、 α ヘリックスや β ストランドの末端部分に多い傾向があり、モデル構造を支持する実験結果となった。

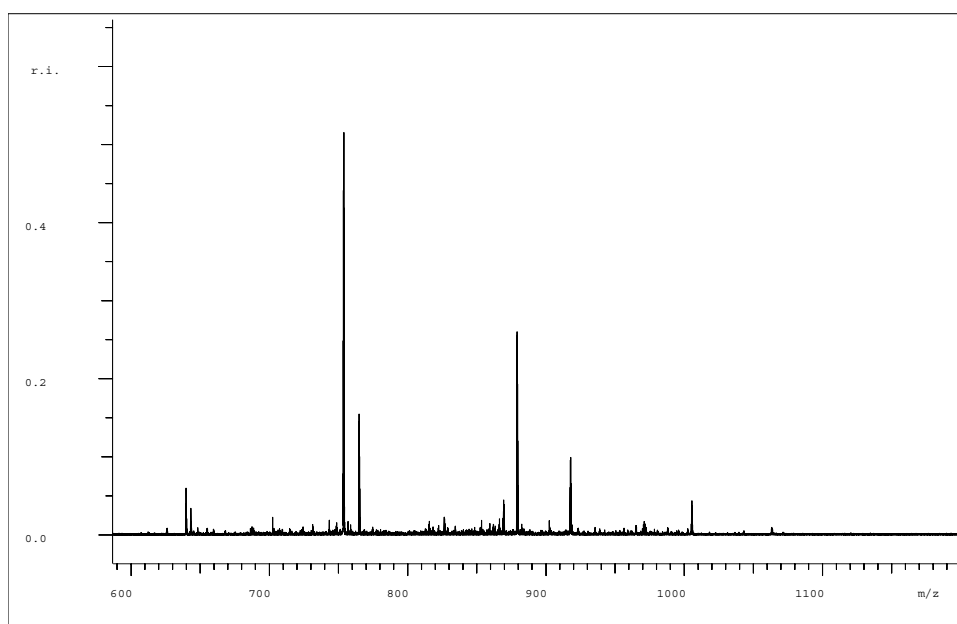


図 42 酵母アルコール脱水素酵素のキャピラリースキマーCID スペクトル

表6 酵母アルコール脱水素酵素のノズルスキマーCID スペクトルの帰属結果

No	charge	m/z(mono)	sequence	m/z cal.	error	モデル構造用					
						b	y	AA(N)	AA⊙	AA(N)	AA⊙
1	4	625.8321	((b83 - y289)25)4+	625.84333	0.01123	83	289	83	59	77	53
3	4	643.2203	((b113 - y257)23)4+	643.25665	0.03635	113	257	113	91	107	85
4	7	748.4596	((b340 - y54)47)7+	748.41185	-0.04775	340	54	340	294	334	288
			((b341 - y53)47)7+	748.41185	-0.04775	341	53	341	295	335	289
			((b342 - y52)47)7+	748.41185	-0.04775	342	52	342	296	336	290
5	7	753.6033	(y47)7+	753.56311	-0.04019		47		301	-6	295
6	6	764.7939	(y41)6+	764.76574	-0.02816		41		307	-6	301
8	7	861.8411	((b119 - y286)58)7+	861.82338	-0.01772	119	286	119	62	113	56
			((b234 - y172)59)7+	861.88805	0.04695	234	172	234	176	228	170
			((b273 - y134)60)7+	861.88228	0.04118	237	134	237	214	231	208
10	9	869.6048	((b159 - y262)74)9+	869.61939	0.01459	159	262	159	86	153	80
			((b306 - y118)77)9+	869.56035	-0.04445	306	118	306	230	300	224
			((b252 - y173)78)9+	869.57203	-0.03277	252	173	252	175	246	169
			((b254 - y171)78)9+	869.56799	-0.03681	254	171	254	177	248	171
12	7	918.4753	((b308 - y100)61)7+	918.46334	-0.01196	308	100	308	248	302	242
			((b323 - y86)62)7+	918.48933	0.01403	323	86	323	262	317	256
13	6	1,005.37	((b234 - y172)59)6+	1,005.37	-0.00181	234	172	234	176	228	170
			((b269 - y137)59)6+	1,005.37	0.00235	269	137	269	211	263	205
			((b273 - y134)60)6+	1,005.36	-0.00855	273	134	273	214	267	208
15	6	879.0883	((b306 - y91)50)6+	879.11773	0.02943	306	91	306	257	300	251

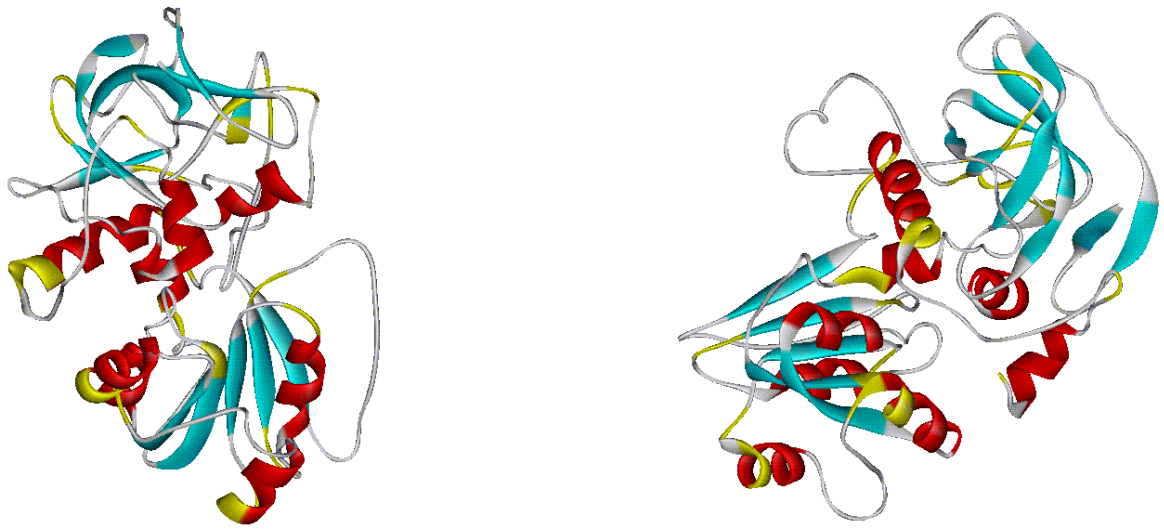


図 43 FAMS で構築した酵母アルコール脱水素酵素のモデル構造上に切断部位を表示した図

赤: α ヘリックス、水色: β ストランド、黄色: 切断部位

第2節 結論

立体構造未知のタンパク質アミノ酸配列から、その立体構造を予測することは、機能の類推だけでなく、NMR や X 線結晶構造解析の研究対象とする機能ドメインの選定に活用されている。しかし、計算化学により構築された立体構造モデルや 2 次構造予測は実験による検証がまったくなされていない。そこで、分解能は低いながらも、簡便に 2 次構造情報得られる技術には大きな期待があり得る。本研究では、FT-ICRMS を用いたノズルスキマーCID 法や IRMPD 法で得られたタンパク質の断片化スペクトルを詳細に帰属したところ、 α ヘリックスや β シートなど、しっかりとした構造を持つ部分が断片化を受けにくい傾向があることを複数のタンパク質 (IL-6、ユビキチン、ウシミオグロビン、carbonic anhydrase) で見出した。断片化スペクトルを詳細に解析することにより、これら 2 次構造を形成している部分の情報を抽出できる可能性が示唆された。本手法は、数ピコモルといった超微量の試料で分析可能であり、極めて高感度である。また、測定時間 1-5 分、データ解析は 1-2 時間程度と迅速な手法である。

第6章 タンパク質断片化技術の相互作用部位解析への応用

第1節 タンパク質固定化によるタンパク質-タンパク質相互作用解析法

質量分析法で得られるタンパク質高次構造情報は、X線結晶解析やNMRに比べて遥か及ばないものの、測定に必要な試料量が極めて少なく、測定からデータ解析までに要する時間が短いことが最大の利点である。質量分析法を用いて、タンパク質の高次構造情報を得る方法は大きく2つに分けることができる。一つは、マイルドな条件下で側鎖の特定の官能基を化学修飾し、ペプチドマスマッピングにより修飾部位を同定する方法である³⁰。もう一つは、タンパク質の主鎖のアミド水素の重水素交換(H/D交換)を用いる方法である。タンパク質の表面に存在するアミノ酸側鎖の交換性水素(H)は、重水に溶解すると直ちに重水素(D)に置き換わる。一方、主鎖のアミド水素の場合はその環境により重水素への交換速度が異なる。タンパク質分子の外側や水素結合に関与していないアミド水素は、中性付近で比較的短時間で重水素に置き換わる(H/D交換)。一方、タンパク質分子内部に埋もれている部分や水素結合を形成しているアミド水素のH/D交換速度は遅い。この違いを検出することでタンパク質の構造情報を得ることができる。NMRを用いた方法が主流であるが、1993年にSmithらがH/D交換とMSを用いた実験法を確立し³⁶、その後いくつかのタンパク質について、H/D交換とMSを用いた高次構造解析について報告されている。一般的な方法は、まずはじめに、中性付近の重水溶液にタンパク質を溶解し、H/D交換反応を行う。その後、pHを2-3付近に下げ、温度を0°Cにして、H/D交換反応速度を低下させる。重水素化したタンパク質を酸性・氷温条件下ペプシン消化を行い、得られたペプチド断片の質量変化を経時的に追跡し、各ペプチドフラグメントのH/D交換速度を求める方法である。ペプシンを使わずにノズルスキマーCID法によりMS内で断片化させる方法もある。このようにして得られた情報から、タンパク質の一次構造上でのアミド水素の環境情報を得ることができる。このような化学修飾法やH/D交換法は、タンパク質-タンパク質、タンパク質-リガンドの相互作用部位解析へ応用

可能である。即ち遊離の場合と複合体の場合を比較することにより、相互作用部位を同定することが可能である。

これまでに報告されている上述の H/D 交換反応と質量分析計を用いた一般的な手法ではいくつかの問題点がある。H/D 交換反応を用いたタンパク質-低分子、タンパク質-タンパク質相互作用部位解析のこれまでの方法は、複合体を形成させた後、H/D 交換を行い、経時的に pepsin 消化し、断片を LC/MS/MS でペプチドの質量変化を追跡する方法である⁶⁵。相互作用している 2 種類のタンパク質を分離して測定できないため、ペプチドの帰属が困難になること、分子量の大きなタンパク質ではデータ解析が膨大になることが手法の課題として挙げられる。本研究ではこれを解決するために、即ち一方のタンパク質の質量情報だけを得るために、一方のタンパク質をゲルに固定化し、タンパク質-タンパク質複合体形成と H/D 交換反応をカラム内で行い、その後酸性酸性溶媒を用いて、H/D 交換速度を低下させるとともに、複合体を解離させ溶出し、これを質量分析の測定・解析の対象とした。

さらに、各々別々に重水素化した状態でタンパク質複合体を形成させた後、軽水で洗浄、D→H 交換を行うことで、結合部位の D 化率を相対的に濃縮する方法をとった。これにより、データ解析の量を軽減することが可能となった。

言い換えればこの方法は、アフィニティークロマトグラフィーと H/D 逆交換反応を組み合わせた手法である(図44)。具体的に説明すると、一方のタンパク質 A(図の場合、抗 IL-6 中和抗体)をアガロース・ビーズに固定化したものと、もう一方のタンパク質 B(図の場合、rhIL-6)を別々に重水溶媒に置換して、H/D 交換反応を行う。続いて、両者を混ぜて、D 化されたままで複合体を形成させた。複合体を形成させた状態で、軽水溶媒で洗浄することにより、結合部位を除く、交換速度の速い水素を D から H へ逆交換を行う。これと同時に複合体を形成していないタンパク質 B を系から排除した。この工程により、複合体を形成していないタンパク質 B のノイズデータを削除することができる。続いて、酸で H/D 逆交換反応をクエンチすると同時に複合体を解離させて、結合部位のみが D 化されたタンパク質 B を溶出し、FT-ICRMS の測定を行った。以下に IL-6 とその

中和抗体で実施した結果を詳細に記載する⁶⁶。

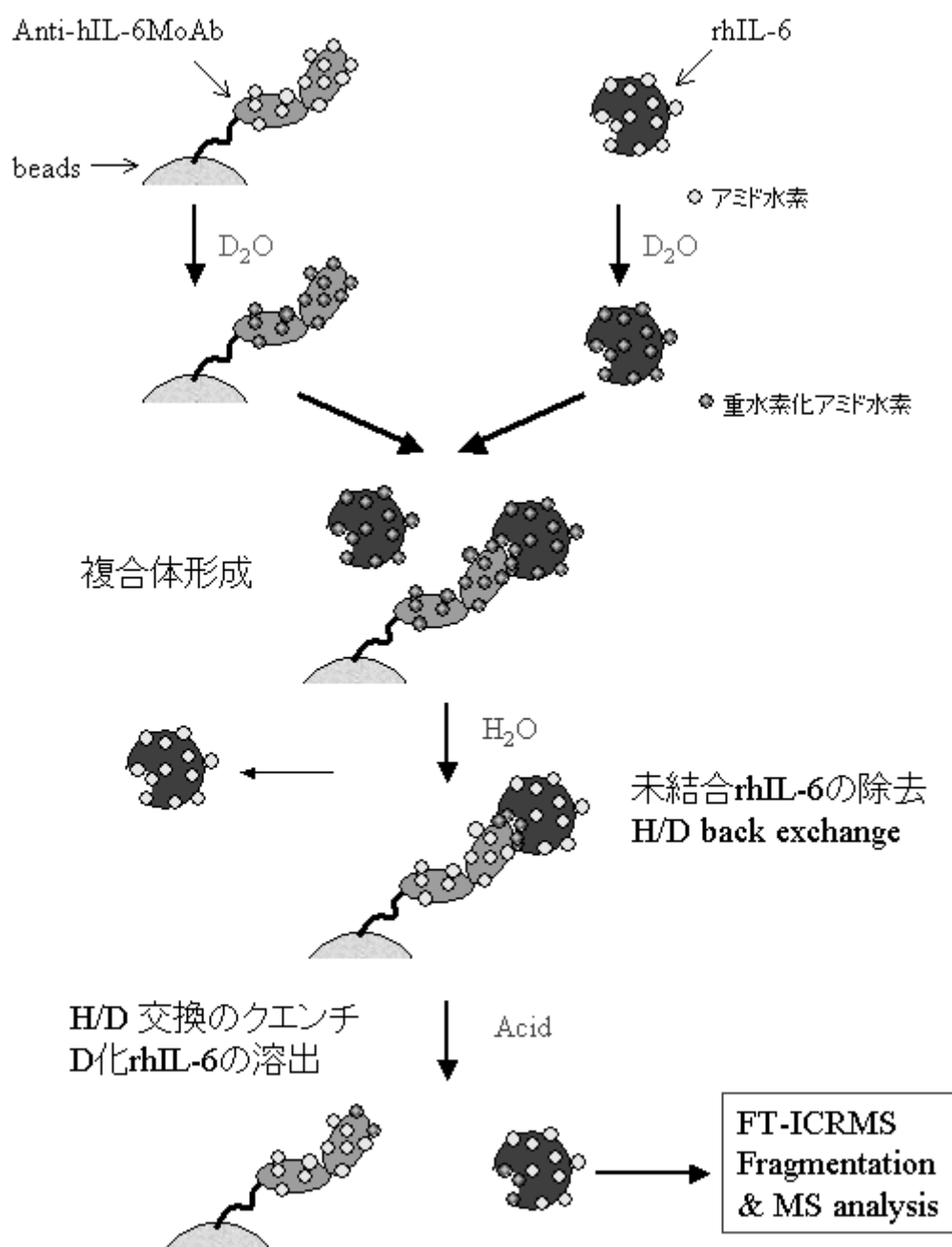


図 44 H/D 交換反応、アフィニティークロマトグラフィー及び MS によるタンパク質断片化技術によるタンパク質相互作用部位解析法 (rhIL-6 - MH166 複合体を例に)

第2節 IL-6 中和抗体のエピトープの解析

第1項 はじめに

IL-6 は、B 細胞が抗体産生細胞へ分化誘導する際の B 細胞分化因子として 1986 年にクローニングされた。IL-6 は免疫応答だけでなく、造血系及び神経系の細胞増殖・分化に関与している複数の機能を持ったサイトカインである。特に、血小板増加作用があり、近年まで増血剤として、医薬品開発研究がなされていた。一方、リウマチ、ミエローマ、エイズなどの免疫疾患において、生体内の IL-6 の過剰発現が観察されており、生体内で IL-6 の機能制御は、これら免疫疾患の治療法として有望視されている。実際には、抗 IL-6 中和抗体や抗 IL-6 受容体抗体は、IL-6 阻害剤としてのリウマチ治療薬として、開発研究が検討されている。本研究で用いる、IgG1 産生マウスハイブリドーマ MH166 細胞上清から精製された抗ヒト IL-6 マウスモノクローナル抗体 MH166 (anti-hIL-6MoAb) は、in vitro 及び in vivo において中和活性を持つことが知られている。しかしながら、MH166 のエピトープは明らかではなかった。図 45 に示したように、IL-6 の生理活性は、IL-6 と IL-6 受容体システムによって制御されている。IL-6 受容体は、 α サブユニット(IL-6R)とシグナル伝達機能を持つ β サブユニット(gp130)の 2 種類のタンパク質から構成されている。IL-6 ははじめに低親和性の IL-6R に結合し、その後 IL-6/IL-6R/gp130 複合体を形成し、細胞内にシグナルが伝達される。また、rhIL-6 は 4 本の α ヘリックスからなる 4 ヘリックスバンドルと呼ばれる立体構造であり、多くの変異実験により、受容体との結合部位が 3 種類存在することが明らかとなっている(図45)。従って、MH166 は、IL-6 分子上の IL-6R 結合部位あるいは gp130 結合部位のどちらかを認識し、結合することにより、IL-6 の中和活性を発現していると考えられる。そこで我々は、FT-ICRMS と H/D 交換反応を用いて、rhIL-6 と MH166 の結合部位の同定を行うことにした。用いる抗体が中和抗体であることから、これらの結合部位は、rhIL-6 とそのレセプターとの結合部位付近であることが示唆される。

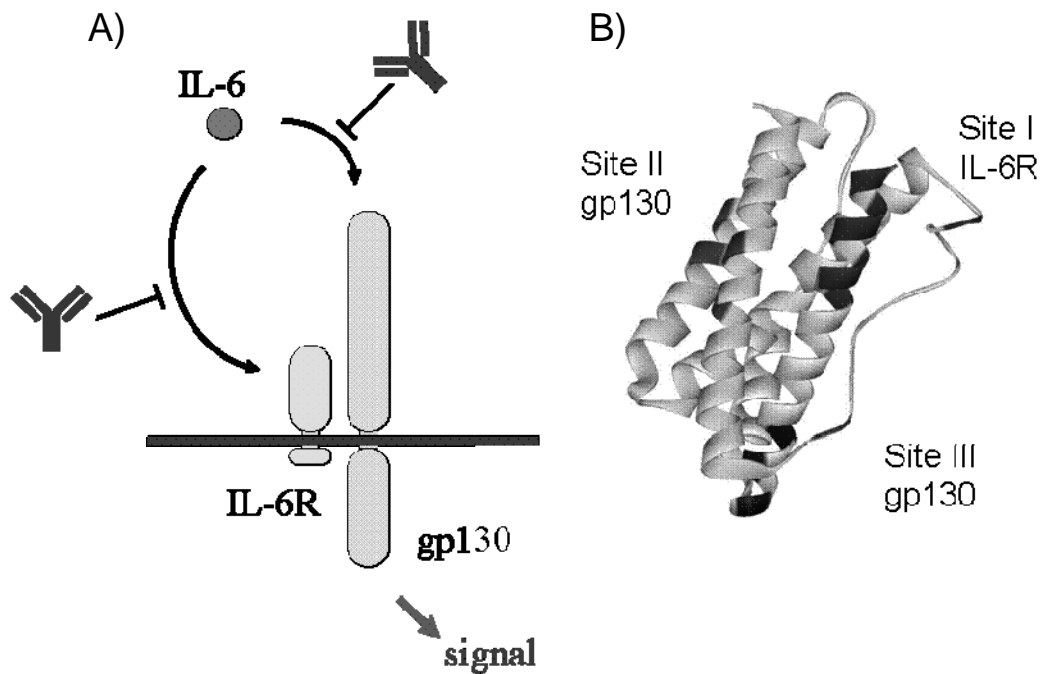


図 45 IL-6 と IL-6 受容体結合メカニズムと受容体結合部位

A) IL-6 と IL-6 受容体 IL-6R および gp130 の結合様式。IL-6 は、2 種類の受容体と結合し、細胞内にシグナルが伝達される。中和抗体は、IL-6R あるいは gp130 のどちらかの結合を阻害することで中和活性を発現する。 B) IL-6 の立体構造と受容体結合部位

第 2 項 rhIL-6 の H/D 交換反応

rhIL-6 は 184 残基のアミノ酸から成る分子量約 20906 の可溶性タンパク質である。ESI-MS で測定した場合、多価イオンが生成するために rhIL-6 の ESI-MS スペクトルは図46のよ

うなスペクトルが得られる。 m/z 1162 付近を拡大したスペクトルを図47に示した。同位体の存在による質量差を分離して検出することができる。隣り合わせのイオンの m/z 差が 0.055 であることから、このイオンの価数は18価 ($[M+18H]^{+18}$) であることがわかり、これにより質量 20905.5509 を求めることができる。また、デコンボリューションを行ったスペクトルを図48に示した。rhIL-6 の組成式は、C914 H1478 N254 O287 S9 である。通常の質量分析計では分解能が低いため、質量の大きな分子の場合は同位体ピークを分離することができないため、平均質量 (Average mass) として質量を決定する。しかし、FT-ICRMS は高分解能 (図48では分解能 101758) であることから、分子量 200000 の分子でも同位体ピークを分離して検出することができる (図48デコンボリューション)。rhIL-6 の組成式から、各原子の質量と同位体存在比を考慮して計算した分子量分布から、最も存在比の高い分子の相対分子量 (relative molecular mass : Mr) は 20905.6681 である (図48上段)。これに対して、測定値は 20905.5509 (図48下段) でありその誤差は 5.6ppm (0.00056%) と高精度の質量を求めることができた (外部標準による測定)。

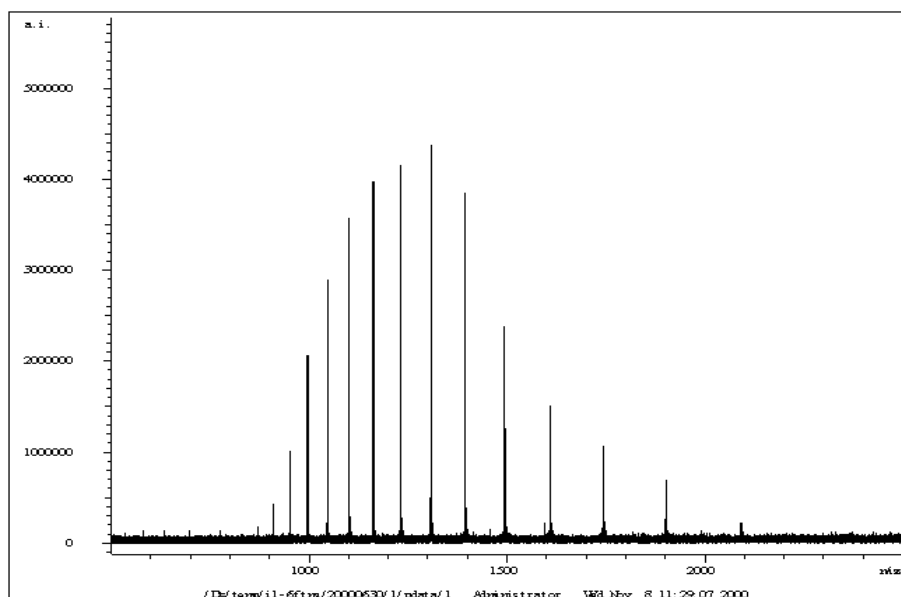


図 47 rhIL-6 の ESI-FT-ICRMS スペクトル

ESI 特有の多価イオンとして観測

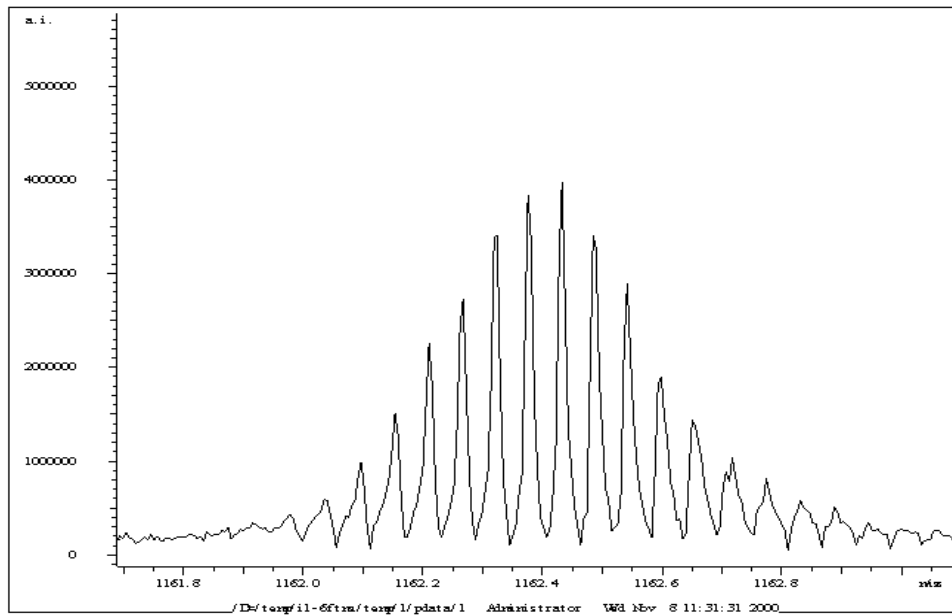


図 48 rhIL-6 の ESI-FT-ICRMS スペクトル 図 47 の m/z 1162 付近の拡大図

高分解能であり、安定同位体イオンを分離して観測できる。各イオンの質量差の逆数から価数を計算可能

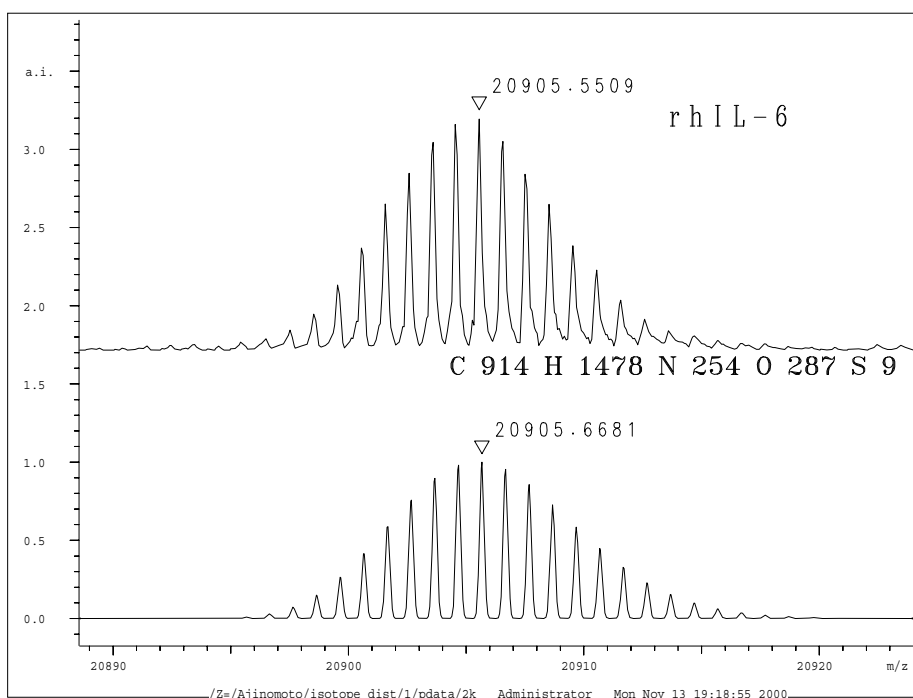


図 48 rhIL-6 の FT-ICRMS スペクトル(デコンボリューション後)

上段: 実測した MS スペクトル、

下段: 組成式から計算したシミュレーションの MS スペクトル(分解能 10 万で計算)

次に、rhIL-6 の H/D 交換反応を行った。これまで報告されている H/D 交換反応の手法は、凍結乾燥試料を重水で溶解するか、タンパク質濃度の高い軽水溶液サンプルを重水緩衝液で希釈する方法である。しかし、活性(高次構造)を保ったまま凍結乾燥や濃縮ができないタンパク質も多く存在する。そこで、迅速に低容量でバッファー交換をするために MicroSpin カラムを用いて、4°C で 5mM 酢酸アンモニウム重水緩衝液へ置換することとした。このようにして、重水緩衝液中で H/D 交換反応を行い、その後、2%酢酸-49%アセトニトリル-49%D₂O または、2%酢酸-49%アセトニトリル-49%H₂O で 10 倍希釈後、2、6、18、24、29 分毎に FT-ICRMS スペクトルを測定した(図49)。2%酢酸-49%アセトニトリル-49%D₂O で希釈した場合(図49上段)、酸性条件下でも D 化がゆっくりと進行しているのに対して、2%酢酸-49%

アセトニトリル-49% H_2O で希釈した場合は(図49下段)、逆にゆっくりと D が H に置き換わっていく様子を観測することができた。

この結果から、アセトニトリルを含む酸性溶媒では、rhIL-6 の立体構造変化が起こり、内部に埋もれていた部分が露出することが懸念された。そこで、アセトニトリルを含まない溶媒(2%酢酸- H_2O)で希釈した場合と比較した。H/D 交換後、2%酢酸-48% D_2O で希釈した時のスペクトルと D 化率の変化を追跡した結果を図50、51に示す。アセトニトリルを含まない場合でも、ゆっくりと D 化が進行しているがアセトニトリルを含む場合よりも 5%程低いことがわかる。この結果から、アセトニトリルにより rhIL-6 の構造の一部が変化し、内部に埋もれていた部分が露出することにより H/D 交換が起こっていることが示唆された。従って、H/D 交換反応を用いたタンパク質-タンパク質相互作用部位の解析を行う場合は、有機溶媒を極力加えない条件を選択することとした。

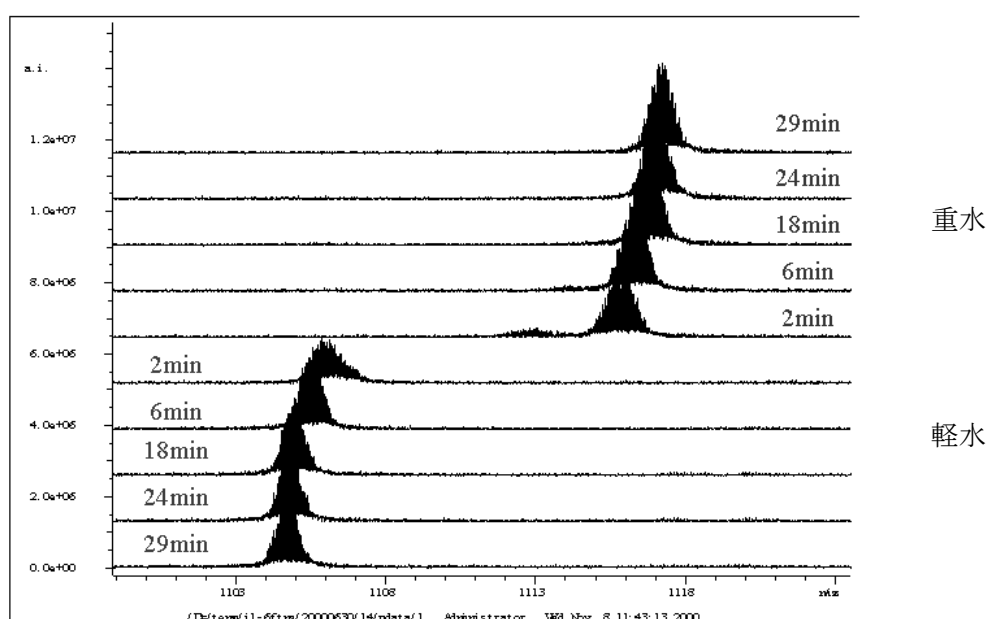


図 49 H/D 交換後の rhIL-6 の有機溶媒を含む重水中及び軽水中での経時変化

上段: 重水、下段: 軽水、時間経過と共に H/D 交換が進行し、質量変化が起こっている

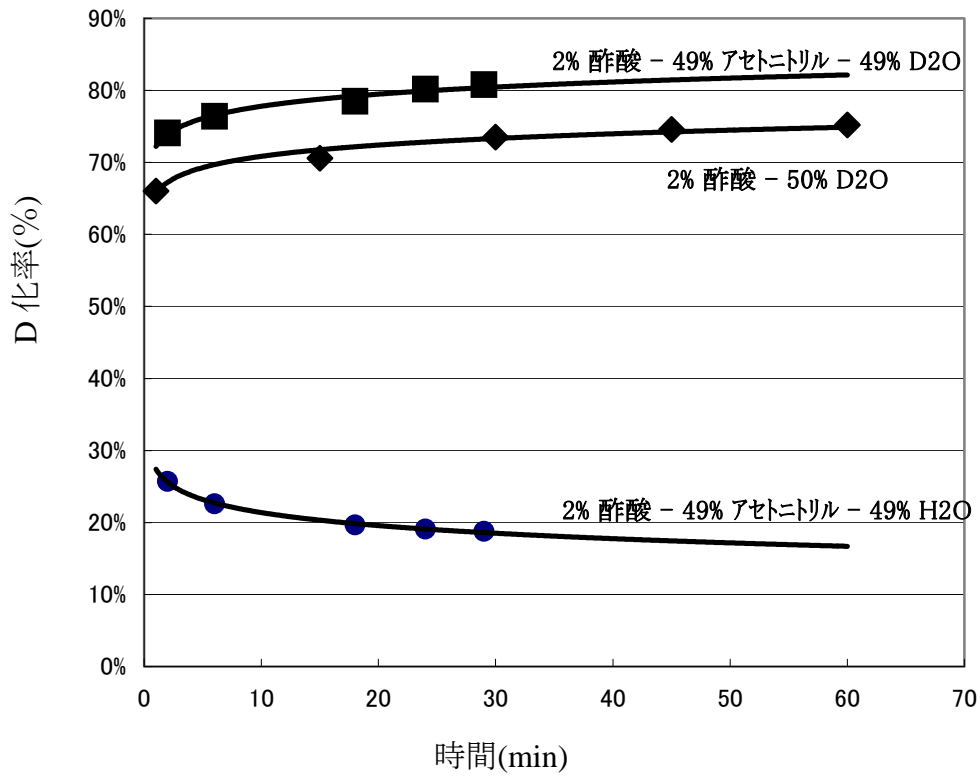


図 50 H/D 交換後 rhIL-6 の各溶媒中での D 化率の経時変化

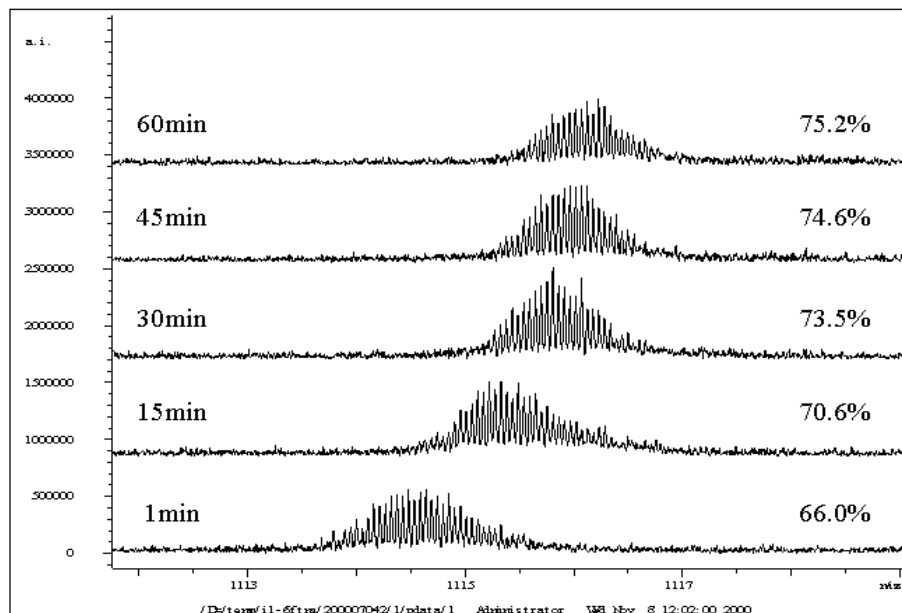


図 51 H/D 交換後の rhIL-6 の有機溶媒を含まない重水中での経時変化

第3項 rhIL-6-MH166 複合体形成の条件検討

図44に示したように、タンパク質-タンパク質相互作用部位の解析を容易にするために、アフィニティークロマトグラフィーの技術を応用することにした。しかし、一般的なアフィニティーで用いられる溶媒は、塩化ナトリウムなどの不揮発性の塩を多く含んでいるため、そのまま ESIMS を測定することができない。そこで揮発性の塩からなる緩衝液でのアフィニティークロマトグラフィー及びその溶出画分の、ESI-FT-ICRMS の測定条件の検討を行った。

MS 測定に適した溶媒として、吸着・平衡化には、吸着溶液 A:5mM 酢酸アンモニウム(pH 6.5)を、溶出には、溶離液 A:2% 酢酸-H₂O を用いた。図52に吸着溶液 A,溶離液 B を用いた時の UV280nm のクロマトグラムを示したが、rhIL-6 を吸着・溶出することができた。続いて、UV 吸収ピークを3つの分画し、各々FT-ICRMS を測定した。

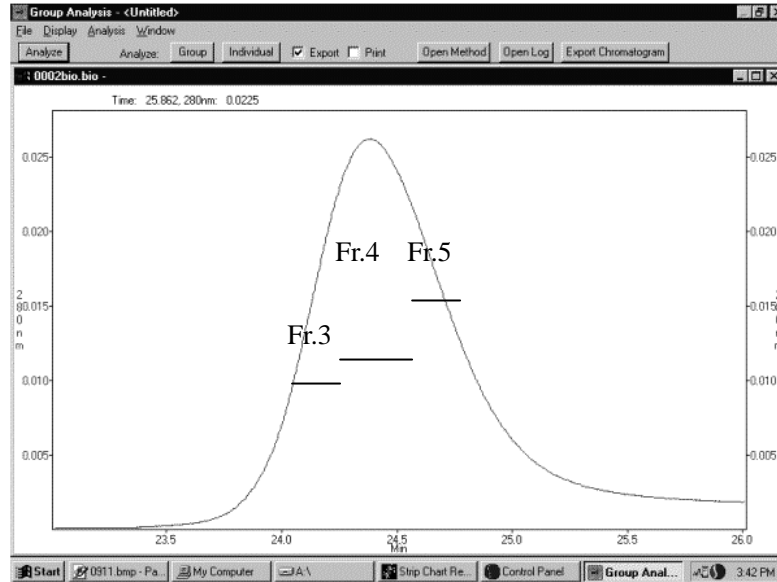


図 52 rhIL-6 -MH166 アフィニティークロマトグラム

検出:UV280nm Fr.3-5 を分取して、FT-ICRMS を測定

Fr.3,4,5 とともに、質の良い MS スペクトル(図53、54)が得られた。フラクション後半になると Na クラスターが多く生成する傾向にあったが、IRMPD 法(図55)のスペクトル上では差が見られなかった。以上の結果から、吸着・平衡化に、吸着溶液 A:5mM 酢酸アンモニウム(pH 6.5)を、溶出は、溶離液 A:2% 酢酸-H₂O を用いることで、アフィニティークロマトグラフィーが可能でかつ、そのまま FT-ICRMS を測定できることがわかった。以上の結果からこの条件で、H/D 交換反応を行うこととした。

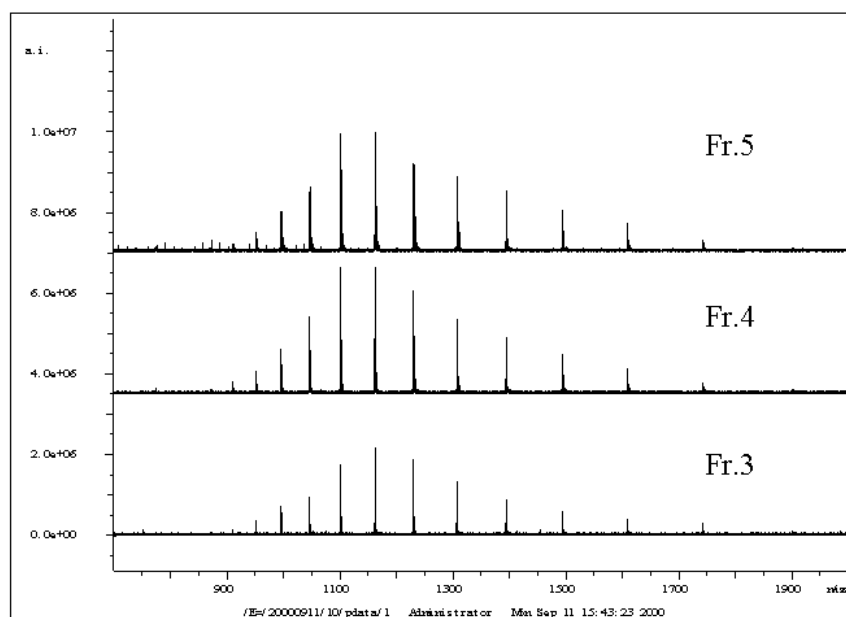


図 53 アフィニティークロマトグラフィー溶出画分の FT-ICRMS スペクトル

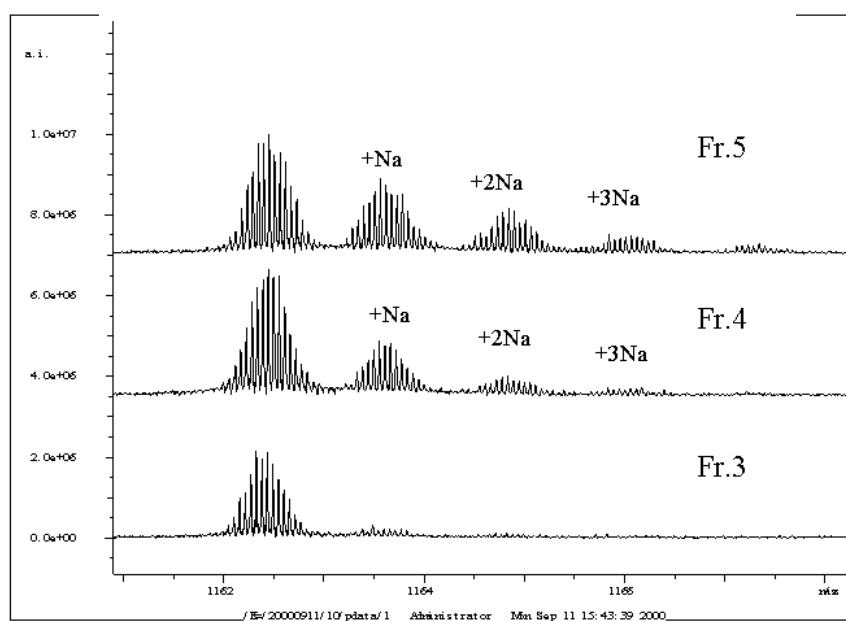


図 54 アフィニティークロマトグラフィー溶出画分の FT-ICRMS スペクトル

図53の m/z 1162 付近の拡大。Fr.4 及び 5 は Na 付加イオンが観測。

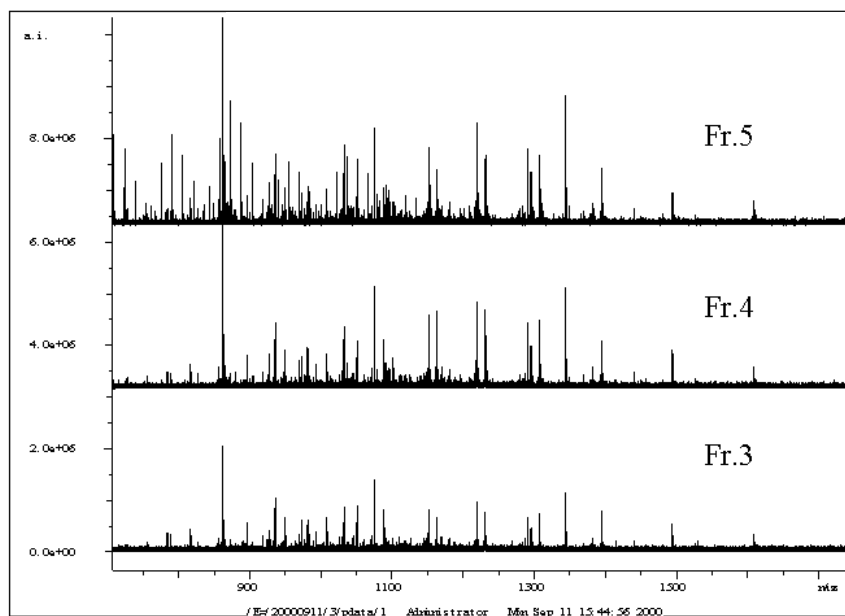


図 55 アフィニティークロマトグラフィー溶出画分の FT-ICRMS-IRMPD スペクトル

Fr.3-5 とともに良好な断片化イオンが観測された。Na 付加イオンの影響はない。

第4項 rhIL-6-MH166 複合体の H/D 交換反応

前項で設定したアフィニティークロマトグラフィーの条件を用いて、H/D 交換反応による rhIL-6-MH166 複合体相互作用部位の解析を行った。MicroSpin カラムで5mM 酢酸アンモニウム／軽水溶液(pH 7)に置換した rhIL-6 をリファレンスとした。同じく MicroSpin カラムで5mM 酢酸アンモニウム／重水溶液(pH 7)に置換し、30 分間 H/D 交換を行った。同じ溶液を IL-6 中和抗体固定化アフィニティークラムに流し、同じ時間抗体の H/D 交換を行った。その後、H/D 交換反応後の rhIL-6 をアフィニティークロマトグラフィーに供し、吸着させた後、H/D 逆交換反応を行うために、5mM 酢酸アンモニウム水溶液(pH7)でアフィニティークラムの平衡化を行った。このとき、抗体に結合しない rhIL-6 はカラムから溶出される。rhIL-6-MH166 複合体の H/D 逆交換反応を H/D 交換反応と同じ 30 分間実施した。その後、2%酢酸-H₂O をアフィニティークラムに供することで H/D 逆交換反応のクエンチと rhIL-6 の溶出を同時に行った。得られた rhIL-6 画分(以下 D 化 rhIL-6)の FT-ICRMS スペクトルを図56に示した。FT-ICRMS スペクトルの結果から、D 化 rhIL-6 と rhIL-6 の質量差は、6.9 であった。H/D 逆交換反応を行っているため、交換速度の速い側鎖の交換性プロトンは全て H に交換していると考えられる。従って、主鎖アミド水素 184 個のうち 6.9 個が D 化していることがわかり、D 化率を 3.75%と求めた。

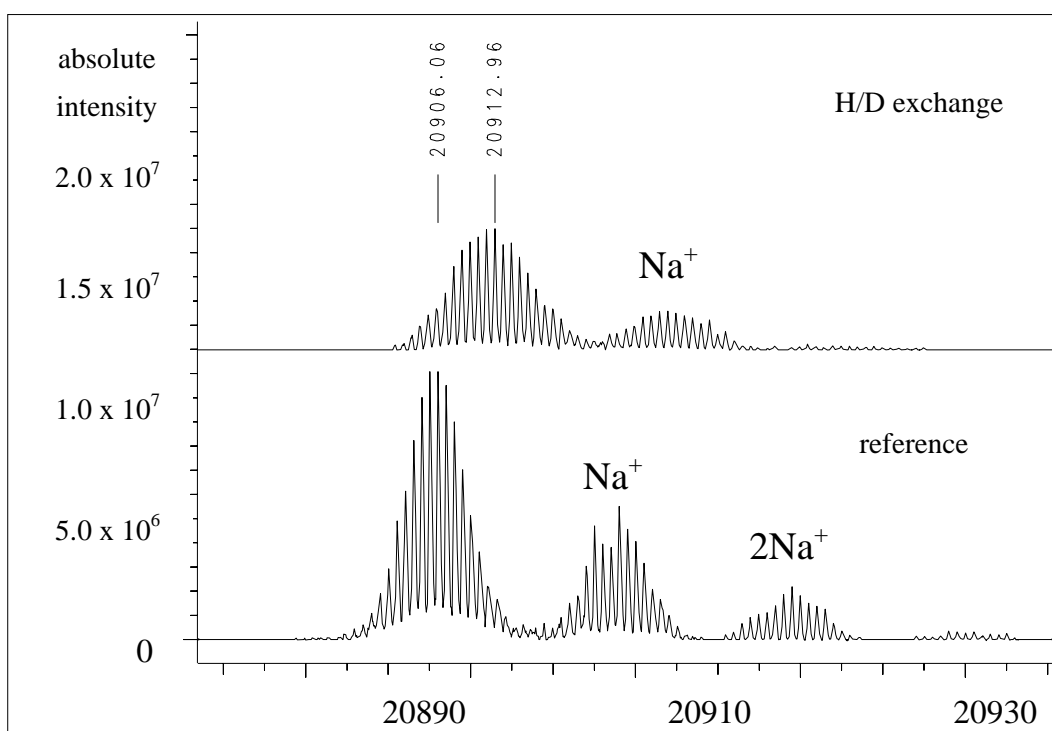


図 56 アフィニティークロマトグラフィー溶出画分の rhIL-6 の FT-ICRMS スペクトル

上段:D 化 rhIL-6、下段:コントロール

H/D 交換により、僅かに高質量側にイオンがシフトしている。この質量差から D 化率を求めた。

H/D 交換前後の IRMPD スペクトルを図57に示した。フラグメントのパターンは非常に良く一致していた。ひとつひとつのイオンを拡大すると図58に示したように D 化されたことによる質量変化を観測することができた。ノズルスキマーCID スペクトル(図59, 図60)も同様であった。リファレンスである D 化されていない IL-6 のスペクトルから、各フラグメントイオンの帰属を行い、続いて、各フラグメントの同位体ピークの m/z とイオン強度から、重心を計算して m/z の平均値を求めた。これらの数値は D 化率算出式を使って、各フラグメントの D 化率を計算した(表7, 8)。リファレンスにおいて、検出されたフラグメントイオン数は、IRMPD 法で 70 個、ノズルスキマーCID で 62 個であった。そのうち、配列由来のフラグメントイオンとして帰属できたものは、IRMPD 法で 33 個、ノズルスキマーCID で 25 個であった。

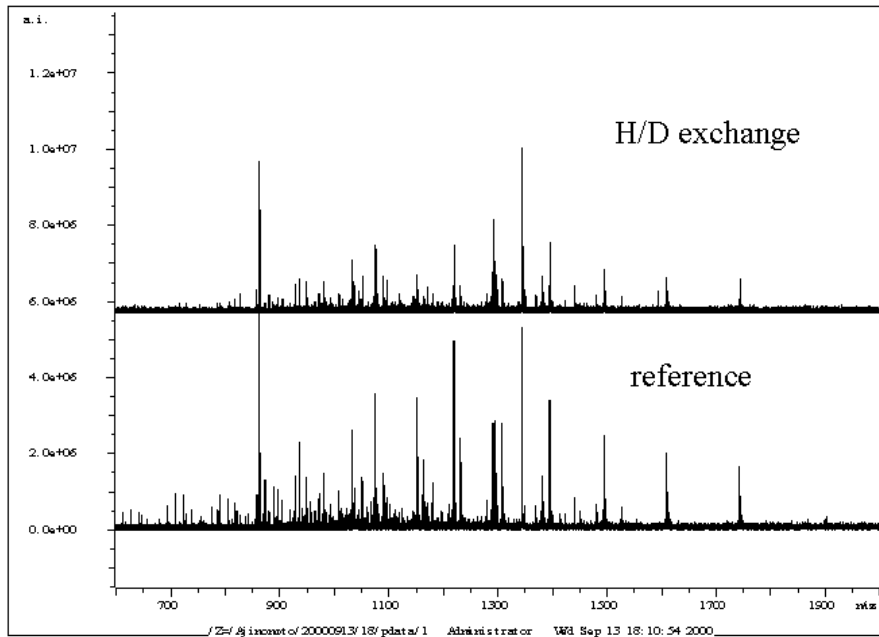


図 57 アフィニティークロマトグラフィー溶出画分の rhIL-6 の IRMPD スペクトル

上段:D化 rhIL-6、下段:コントロール

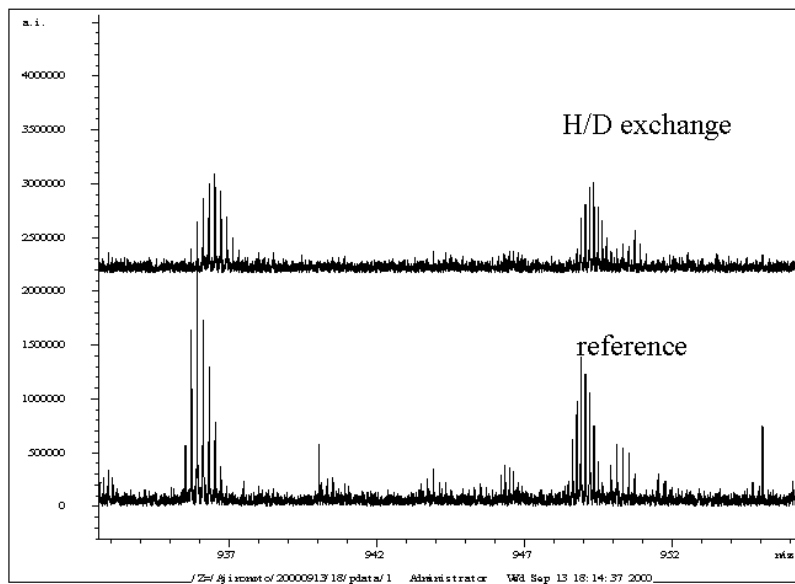


図 58 アフィニティークロマトグラフィー溶出画分の rhIL-6 の IRMPD スペクトル

上段:D化 rhIL-6、下段:コントロール、D化による質量変化が観測できる

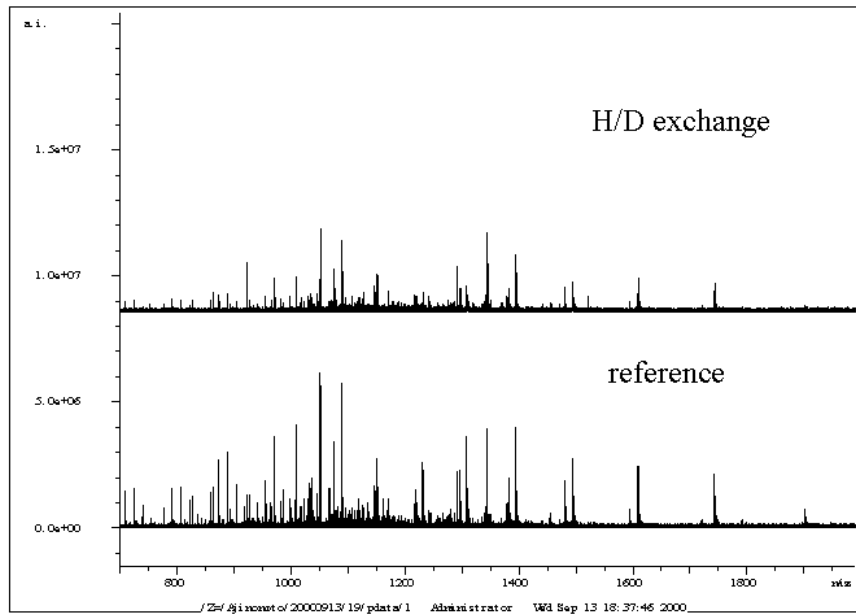


図 59 アフィニティークロマトグラフィー溶出画分の rhIL-6 のノズルスキマーCID スペクトル
 上段:D 化 rhIL-6、下段:コントロール

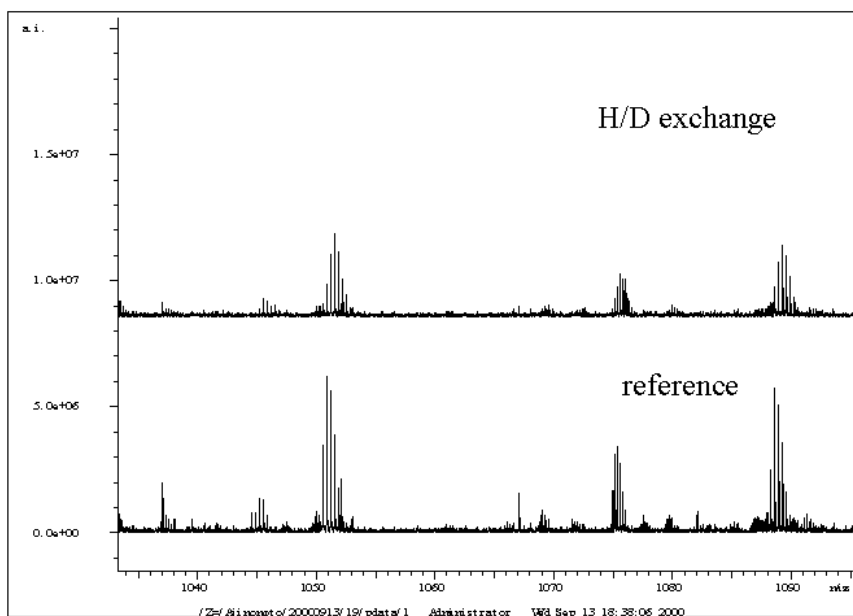


図 60 アフィニティークロマトグラフィー溶出画分の rhIL-6 のノズルスキマーCID スペクトル
 上段:D 化 rhIL-6、下段:コントロール、D 化による質量シフトが観測できる

IRMPD スペクトルの一部のイオンを抽出し図61に、ノズルスキマーCID スペクトルは図62に示した。このようにいずれのイオンも D 化による僅かな質量変化を観測することができた。D 化率の計算は、帰属した各イオンについて行った。D 化した rhIL-6 由来イオンとリファレンスのイオンの質量重心を求め、帰属した配列から計算した主鎖のアミドプロトンの数から、D 化率を求めた。具体的には、リファレンスの重心と H/D 交換後の重心の差を D 化による m/z の変化として、以下の計算式(式1)を用いてD 化率を求めた。また、側鎖の交換性プロトンの H/D 交換速度は非常に早いため、この方法論では比較的 H/D 交換速度の遅い主鎖アミド水素のみをデータ解析対象とした。従って、交換可能なプロトンの数はアミノ酸残基数と等しくなる¹²。

$$D \text{ 化率}(\%) = [(m/z_D - m/z_H) \times n / A] \times 100 \quad \dots\dots\dots \text{式1}$$

m/z_H : リファレンス のフラグメントイオンの m/z の重心

m/z_D : H/D 交換後のフラグメントイオンの m/z の重心

n : フラグメントイオンの価数

A : アミノ酸残基数 (=主鎖アミド水素の数)

D 化 rhIL-6 で検出できたフラグメントイオンについて、D 化率をプロットしたものを図63、64 にまとめた。H/D 逆交換反応の場合、各アミドプロトンの環境により、D 化率は影響を受ける。複合体形成により、環境変化が起こらない場合には、H/D 交換反応の条件と H/D 逆交換反応の条件が等しいため、D 化率はゼロになる。一方、相互作用界面においては、H/D 逆交換反応が進行しにくいいため、D 化率が高くなる。従って、D 化率が高い部位が、rhIL-6 と MH166 の相互作用界面すなわちエピトープであると推察される。

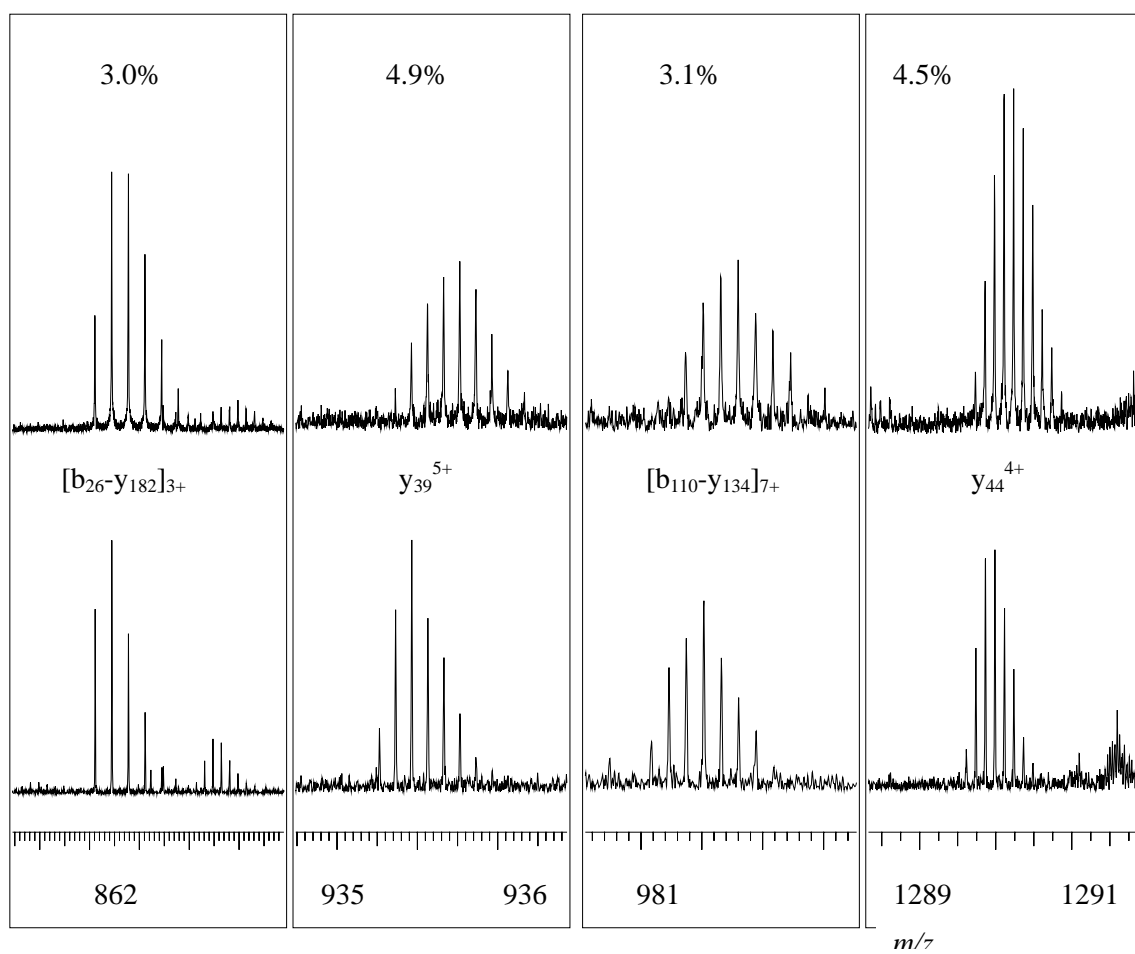


図 61 アフィニティークロマトグラフィー溶出画分の rhIL-6 の IRMPD スペクトル

上段:H/D 交換反応、下段:リファレンス(H/D 交換反応なし)

%記載は、D 化率を示す

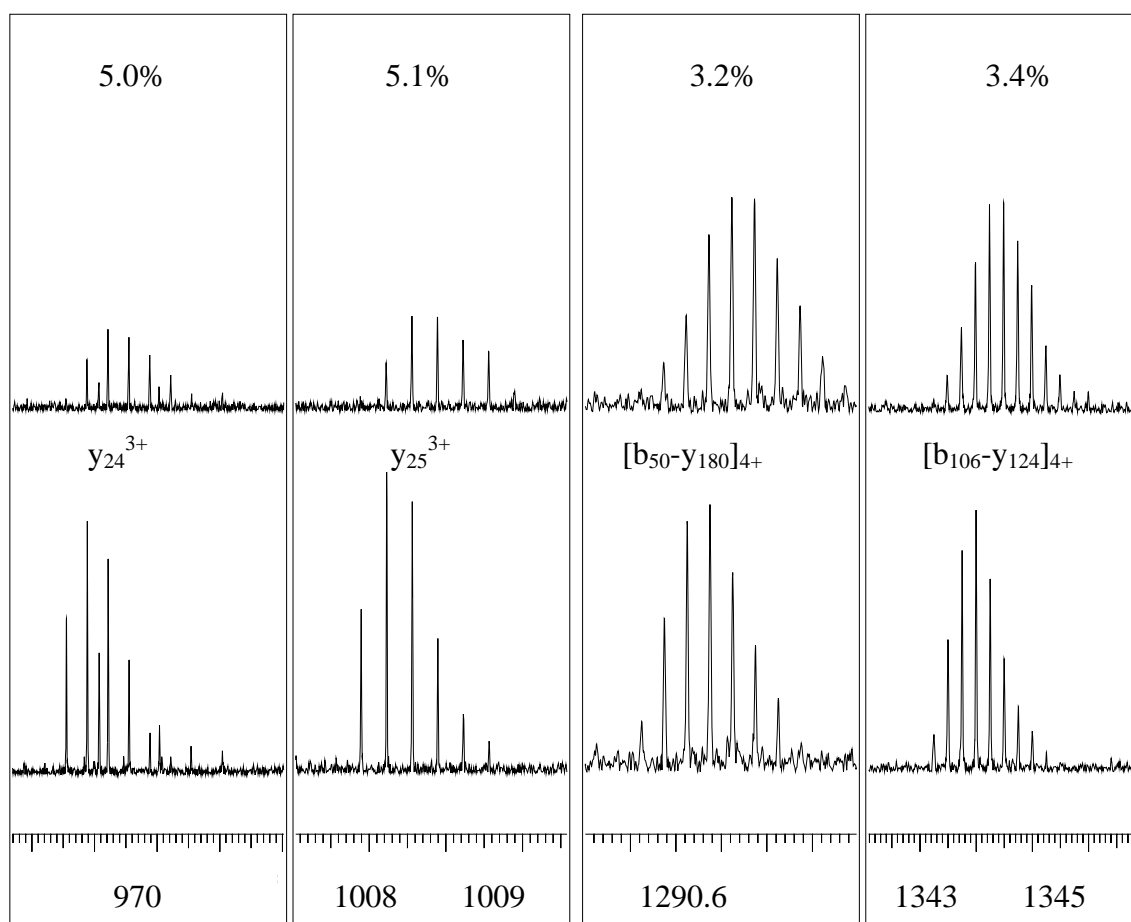


図 62 アフィニティークロマトグラフィー溶出画分の rhIL-6 のノズルスキマーCID スペクトル

上段: H/D 交換反応、下段: リファレンス (H/D 交換反応なし)

%記載は、D 化率を示す

表7 rhIL-6 のノズルスキマーCID スペクトルで観測されたフラグメントイオンの帰属と D 化率

peak no.	observed m/z	charge number	assigned fragment ion	assigned sequence	deuterium incorporation
1	826.3691	1	<i>b10-y182</i>	3-10	1.2%
2	862.4451	3	<i>b26-y182</i>	3-26	3.1%
3	932.7655	7	<i>b79-y163</i>	22-79	-
4	964.5014	6	<i>b103-y132</i>	53-103	2.0%
5	969.8847	3	<i>y24</i>	161-184	5.0%
6	981.5122	7	<i>b110-y143</i>	42-110	2.3%
7	986.0078	6	<i>b159-y79</i>	106-159	3.1%
8	997.8514	6	<i>b92-y146</i>	39-92	2.3%
9	1008.2282	3	<i>y25</i>	160-184	5.1%
10	1029.3716	5	<i>b184-y44</i>	141-184	-
11	1032.7751	5	<i>y44</i>	141-184	3.3%
12	1050.9156	3	<i>y26</i>	159-184	5.5%
13	1069.0527	6	<i>b164-y77</i>	108-164	3.2%
14	1075.3909	5	<i>b106-y124</i>	61-106	4.0%
15	1087.1175	9	<i>b136-y132</i>	53-136	-
16	1088.6114	3	<i>y27</i>	158-184	5.6%
17	1102.6838	9	<i>b155-y117</i>	68-155	-
18	1117.1340	9	<i>b120-y153</i>	32-120	2.1%
19	1144.9012	6	<i>b110-y133</i>	52-110	3.1%
20	1144.7662	6	<i>b111-y133</i>	52-111	2.6%
21	1150.6396	3	<i>b134-y80</i>	105-134	5.9%
22	1169.6583	4	<i>y39</i>	146-184	4.8%
23	1187.9862	3	<i>b39-y177</i>	8-39	-
24	1193.6676	3	<i>b65-y152</i>	33-65	-
25	1216.1843	4	<i>b144-y83</i>	102-144	3.7%
26	1241.1922	4	<i>y42</i>	143-184	4.0%
27	1256.6541	8	<i>b120-y153</i>	32-120	2.4%
28	1266.7075	4	<i>b141-y87</i>	98-141	3.7%
29	1290.9733	4	<i>b50-y180</i>	5-50	3.2%
30	1319.7250	4	<i>b56-y175</i>	10-56	4.3%
31	1343.9973	4	<i>b106-y124</i>	61-106	3.4%
32	1369.2533	4	<i>b52-y181</i>	4-52	4.0%
33	1440.3002	4	<i>b156-y80</i>	105-156	3.8%

表8 rhIL-6 の FT-ICR IRMPD スペクトルで観測されたフラグメントイオンの帰属と D 化率

peak No.	observed m/z	charge number	assigned fragment ion	assigned sequence	Deuterium Incorporation
1	784.1724	4	<i>b184-y26</i>	159-184	5.8%
2	856.4421	3	<i>b125-y81</i>	104-125	2.7%
3	862.4466	3	<i>b26-y182</i>	3-26	3.0%
4	868.1404	6	<i>b54-176</i>	9-54	-
5	895.9021	5	<i>y37</i>	148-184	4.9%
6	896.3274	6	<i>b106-y124</i>	61-106	-
7	918.5211	5	<i>y38</i>	147-184	4.8%
8	924.0071	4	<i>b38-y179</i>	6-38	-
9	926.2059	3	<i>y23</i>	162-184	-
10	935.9293	5	<i>y39</i>	146-184	4.9%
11	958.8754	8	<i>b129-y121</i>	64-129	-
12	969.8870	3	<i>y24</i>	161-184	4.9%
13	981.5150	7	<i>b110-y134</i>	51-110	3.1%
14	989.5520	5	<i>b136-y90</i>	95-136	-
15	993.3551	5	<i>b164-y64</i>	121-164	6.4%
16	994.1485	5	<i>b140-y87</i>	98-140	-
17	1008.2310	3	<i>y25</i>	160-184	5.5%
18	1019.9565	5	<i>b182-y46</i>	139-182	-
19	1032.7778	5	<i>y44</i>	141-184	4.6%
20	1060.9830	7	<i>b133-y115</i>	70-133	-
21	1088.9484	3	<i>b131-y81</i>	104-131	5.8%
22	1119.6329	4	<i>y34</i>	151-184	-
23	1290.7268	4	<i>y44</i>	141-184	4.5%
24	1369.2559	4	<i>b52-y181</i>	4-52	3.3%
25	1440.5577	4	<i>b156-y80</i>	105-156	3.3%

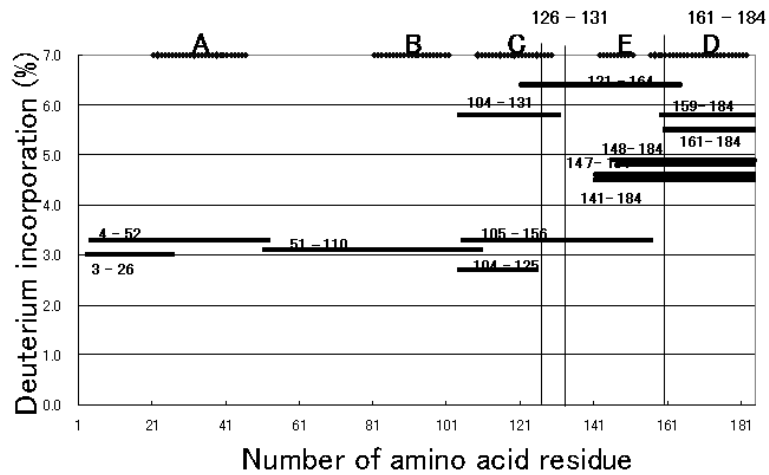


図 63 rhIL-6 の FT-ICR IRMPD 法-CID スペクトルのフラグメントイオンの帰属と D 化率

太線は帰属された断片化イオン、数字はアミノ酸残基番号、上段にヘリックスの位置を記載 C 末端側の D 化率が高いことがわかる

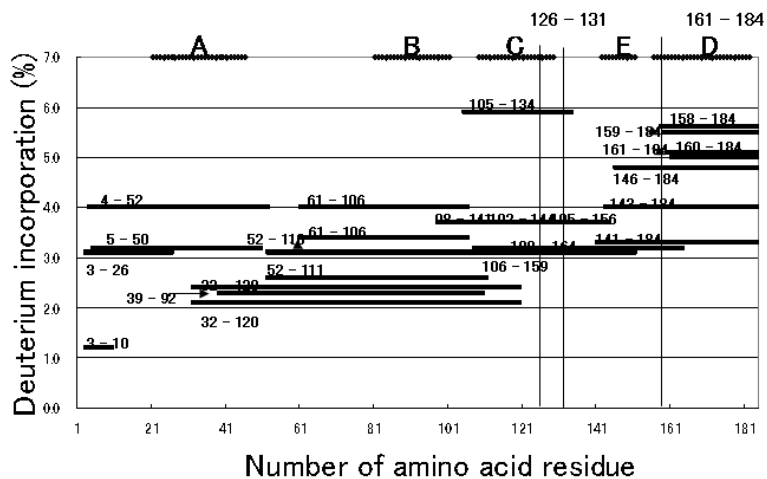


図 64 rhIL-6 の FT-ICR ノズルスキマー-CID スペクトルのフラグメントイオンの帰属と D 化率

太線は帰属された断片化イオン、数字はアミノ酸残基番号、上段にヘリックスの位置を記載 C 末端側の D 化率が高いことがわかる

IRMPD 法の実験から、Leu 126 – Lys 131 と Asp 160 – Met 184 の2つの領域の D 化率が高いことがわかった。一方、104–125 と 141–158 残基の領域は、タンパク質全体の平均値 3.5%よりも低かった。さらに、Arg 104 – Lys 131とArg 104 – Phe 125 のD化率から、Leu 126 – Lys 131 の D 化率が 17%と計算された。同様に、ノズルスキマーCID の実験から、105–134 と 162–184 残基の領域の D 化率が高い結果が得られ、IRMPD 法の実験と一致した。一方、32–60 と 141–162 残基の領域の D 化率は低かった。また、Pro 3 – Asp 26 と Pro 3 – Asp 10 の D 化率から、Val 11 – Asp 26 残基の領域の D 化率は僅かに 3.5%よりも高いことがわかった。

以上、IRMPD 法とノズルスキマーCID 法の結果を統合すると、Val 11 – Asp 26, Leu 126 – Lys 131, Asp 160– Met 184 の3つの領域でD化率が高い、すなわち rhIL-6 と hIL-6 中和抗体 MH166 の相互作用界面であることがわかった。

次に、これを既に明らかになっている hIL-6 の立体構造上にマップした(図64)。

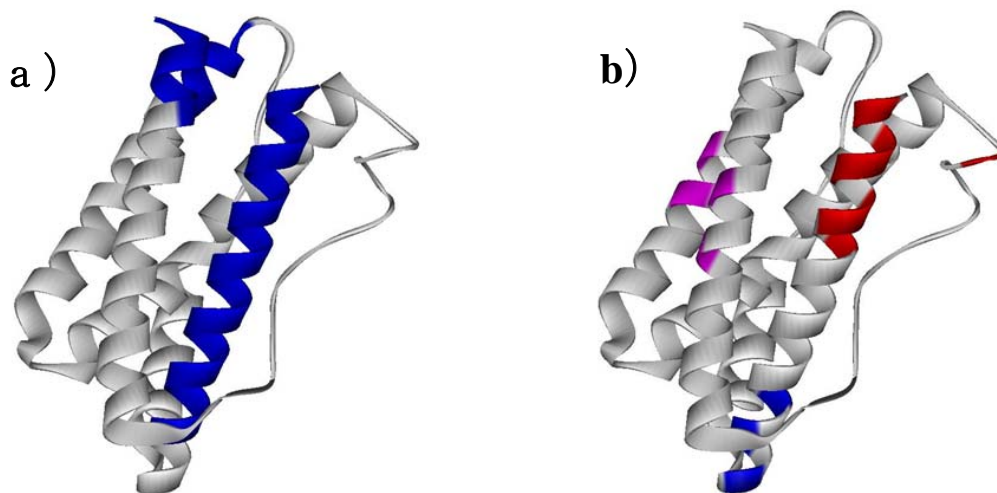


図 65 アフィニティークロマトグラフィー溶出画分の rhIL-6 のノズルスキマーCID スペクトル及び IRMPD スペクトルから求めた D 化率の結果を hIL-6 立体構造上にプロットした図(a)と 受容体結合部位(b)

- a) 青:ノズルスキマーCID 及び IRMPD スペクトルから帰属した D 化率が高い部位
- b) 赤: Site I (IL-6R 結合部位)、マゼンダ: Site II (gp130 結合部位)、青: Site III (gp130 結合部位)

前述のように、rhIL-6 は 4 本の α ヘリックスからなる 4 ヘリックスバンドルと呼ばれる立体構造である(図65)。N 末端側から、A,B,C,D ヘリックスと一般的に命名されている。D 化率の高い部分は、A ヘリックスの N 末側と D ヘリックスの C 末側に分布しており、この部分が抗体結合部位と推察された。

第3節 結論

本章においては、質量分析を用いた高分子量タンパク質-タンパク質相互作用部位の測定法について検討を行った。H/D 交換反応とアフィニティークロマトグラフィーと質量分析によるタンパク質断片化技術を組み合わせることにより、データ解析の負担を軽減した分析法となった。この手法をリュウマチ治療薬創製に関わる rhIL-6 とその中和抗体の相互作用部位解析で検証・応用した。以下に、本章で得られた知見を要約する。

1) 相互作用部位のみをD化させるH/D 逆交換反応とアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせるために、H/D 交換反応とアフィニティークロマトグラフィーの至適条件を設定した。アフィニティークロマトグラフィーは、ESI-MS の測定に適した溶媒として、吸着溶液を5mM 酢酸アンモニウム(pH 6.5)、溶出溶液を2%酢酸水溶液とした。

2) H/D 逆交換反応後、溶出した rhIL-6 をノズルスキマーCID 法及び IRMPD 法で断片化し、得られたスペクトルを帰属し、D 化率を求めた。その結果、Val 11 - Asp 26, Leu 126 - Lys 131, Asp 160 - Met 184 の3つの領域においてD 化率が高く、すなわち rhIL-6 と hIL-6 中和抗体 MH166 の相互作用界面であることがわかった。

第7章 総合討論と今後の展望

質量分析による微量タンパク質の一次構造解析及びこれを利用した同定法は、プロテオミクスにおいて、主要な技術であることは確実である。この分野の発展により、質量分析技術の進歩への期待は、今後益々増大していくことであろう。この基盤となるタンパク質の質量分析は、1960年のBiemannらの先駆的研究から始まる。MALDI法もESI法もまだないころ、揮発性誘導体にしたペプチドをEI-MS/MSで測定し、配列解析を行った。その後、FAB法と高性能磁場型タンデムMSが登場し、プロテアーゼ消化との組み合わせによるペプチドマスマッピングが実現し、現在のプロテオミクスの基礎が出来上がった。これに日米の先駆的な研究者が精力的にかかわることで、今日の技術発展に至っている。筆者の所属する味の素もその中心的な役割を担ってきた。ESI法及びMALDI法以前のFABMSの時代より、タンパク質の一次構造解析及び高次構造解析の先駆的な研究を進めてきた。このような歴史の中で、筆者もLC-MS/MSを用いて抗体の全アミノ酸配列解析と糖鎖構造解析、MHC分子に結合するHIV抗原ペプチドや舌癌抗原ペプチドの同定など、医学・免疫学に関わる研究を行ってきた。

このような微量タンパク質解析技術は、医学・薬学のみならず、食品分野、例えば、健康食品の開発や通常の食品の安全・安心の実現など、幅広く人類のために応用することができると考える。食品アレルギーを引き起こす可能性があるタンパク質を高感度に検出する優れた技術は未だない。微量タンパク質を検出、定量、同定する技術は、このような食品の安全・安心に貢献できるものと考え、本研究では、アレルギー誘発の心配がないタンパク質量(1ppm)まで検出可能なドットブロット-蛍光染色法を確立した。この技術を活用することにより、世界中に流通している食品添加物用アミノ酸・核酸には、タンパク質が存在していないことを示すことができ、安心と安全に繋げることができた。

本方法は、タンパク質を含む一般的な食品に応用することはできないが、アミノ酸以外にも、

スターチ、糖類、甘味料、健康素材など、精製された食品素材に応用することが可能な方法である。また、食品アレルギーを起こす抗原量については、未だ確実な実験データはない。厚生労働省の指針では、アレルギー反応を誘発する抗原量(残存抗原タンパク質量)として数 $\mu\text{g/g}$ (数ppm)レベルと示されている。現在、公定法であるELISA法としては特定原材料である卵、牛乳、小麦、落花生、そばの5つに対するものしかなく、その他食品アレルギーが報告されている大豆などの原材料については、数ppmの感度で検出できる方法は未だ存在しない。先進諸国を中心にアレルギーの問題は年々深刻となり、その原因となる原材料の種類も増加している。抗体を用いた検出法は、感度と特異性の高さが大きな特徴の優れた方法であるが、性能の良い抗体を見出すには多くの時間と手間がかかる。一方、ドットブロットー蛍光染色法は総タンパク質量を高感度に測定することから、その分析結果が数ppm以下という結果が得られれば全てのアレルゲンが数ppm以下であることを保証できる点において優れている。

さらに、食品アレルギーの分野では、遺伝子組み換え作物や遺伝子組み換え技術を用いた食品に残存するタンパク質も注目されている。本法を用いることにより、遺伝子組み換え技術由来のタンパク質残存の有無もあわせて、検出することが可能であり、製品の品質と安全性を示すことができることから、今後は多くの製品に活用されるであろう。

また、本方法は、PVDF膜上にタンパク質を固定化させて、それを蛍光染色試薬を用いて発色・定量する方法である。即ち、なんらかのタンパク質が試料中に残存し、検出された場合は、これをプロテオミクスの手法を用いて同定することが可能である。具体的には、タンパク質が検出されたPVDF膜を切り出し、膜上に吸着しているタンパク質をトリプシンなどの消化酵素で切断し、生成したペプチドを微量タンパク質同定技術を用いて同定することができる。製品中に残存するタンパク質が明らかとなれば、混入原因の究明と対策を講じることができる。

一方、微量タンパク質解析技術は、高感度化に加えて、大規模解析に耐えうる安定性と全自動化が要求されるようになってきた。これを解決するために、本研究では、ステンレス製ナノESI

用エミッターを開発し、高感度でかつ耐久性の高いプロテオミクスを実現した。安定にかつ耐久性の高いイオン源は、プロテオミクスが多くの研究者の間に広く普及する上、重要であり、生命科学の発展に寄与するものと信じる。

さらに、タンパク質酵素消化することなく、質量分析計の中で直接断片化し、同定するトップダウン・プロテオミクスの主要な課題を解決するために、この耐久性の高いステンレス製エミッターを活用した。耐久性の高い μ MetalTip を採用することにより、イオン源周辺を加熱することでこれまで断片化が困難であった高分子量タンパク質の断片化効率を著しく向上することに成功した。本法により、分子量 150kDa の IgG2b の断片化が可能となり、測定限界分子量を大きく更新した。これにより、トップダウン・プロテオミクスの実現に大きく近づいた。

しかし、課題も同時に明らかとなった。高分子タンパク質の断片化の場合、得られたイオンの質量から、タンパク質を同定することは今のところ不可能である。その理由は、断片の質量だけでは情報量が少ないことに加え、プロテアーゼ消化と異なり切断の特異性がないことから、データベース検索を行っても、タンパク質を絞り込むことができない。即ち、精度良くタンパク質を同定するためには、タンデム MS による部分アミノ酸配列情報が必要である。本研究においも、タンデム MS (MS/MS) を検討し、一部成功しているが、配列を規定するに十分な情報は得られなかった。この理由は、次のように考えている。大きな内部エネルギーを与えることにより、タンパク質を断片化した場合、得られたフラグメントは非常に安定な(硬い)フラグメントとなる。したがって、IRMPD 法で MS/MS をおこなっても、これ以上容易に断片化することはできない。これは、レーザー照射による IRMPD 法と HANS-CID 法も同じ熱エネルギーを使った手法であるからだと考えられる。これらとは全く異なるメカニズムの ECD 法⁶⁷を、あるいは最近実用化に成功した ETD 法^{68,69,70}を用いることにより、効率の高い MS/MS が可能となると期待している。即ち、HANS-CID 法あるいは HA-IRMPD 法で高分子量タンパク質を大まかに断片化した後に、様式の異なる ECD 法あるいは ETD 法により MS/MS を行うことで、精度の高いタンパク質同定を行う方法である。この

HANS-CID/ECD 法による巨大タンパク質の MS/MS 法が完成するとタンパク質の同定精度が飛躍的に実現に近づき、トップダウン・プロテオミクスの革新的な進歩がなされるものとする。また、筆者らは、トップダウン・プロテオミクスをより高感度に行うために、 μ チップ電気泳動と質量分析計を組み合わせたシステムを構築している⁷¹。この装置に、本研究の成果を応用することにより、更なる高感度化が可能になることを期待している。

感度とスループットに優れた質量分析は、タンパク質の一次構造解析だけでなく、高次構造や相互作用解析⁷²にも活用されてきた。質量分析によるタンパク質の高次構造解析の手法は、H/D 交換や化学修飾により、表面に露出している部位のアミノ酸の質量変化を観測するものである。本研究では、質量分析内でタンパク質を断片化した際に、 α ヘリックスや β スtrand など構造的に安定な部分が切断されずに観測されることを見出した。安定な構造ドメインの情報を得る質量分析では新しい手法である。溶液中では、プロテアーゼを用いて、構造ドメインを解析する方法が古くから知られている。本法は気相での反応であり、厳密には溶液構造ではないが、X 線結晶構造と良く相関が見られている。質量分析のフラグメンテーションの歴史は長く、低分子化合物、天然物、ペプチドの構造解析などに非常に有力な構造情報を与える方法である。ソフトイオン化の発展により、タンパク質のような生体高分子をイオン化できるようになってきたが、フラグメンテーションは、質量数千以下のペプチドの配列解析に利用されているおり、得られる情報は全て一次元の情報でしかない。ところが、本研究により、単に一次元の構造情報だけでなく、2次元、3次元の構造情報がフラグメンテーションにより得られる可能性が示唆された。すなわち、質量分析の分野においては、次元がひとつ追加されるという意味を持つと考えられる。本研究では、切断されずに観測されたフラグメントと立体構造を単純に比較したが、 α -ヘリックスの途中で切断が生じている部位が多数観測された。X 線結晶構造解析で得られる温度因子や基準振動計算結果との比較を予備的に実施したところ、切断部位がこれらの結果と一致する傾向にあった。即ち、運動性の高い部分で切断が進行しやすい傾向にある可能性が示唆された。より詳細に解析するこ

とで、これまで以上の情報を得ることができる可能性がある。

一方、タンパク質の構造解析の観点からすると、X 線結晶構造解析や NMR、電子顕微鏡などと比べると遥かに空間分解能の低い情報である。しかしながら、感度とスピード、タンパク質濃度の観点から見ると、3桁、4桁以上も優れた方法である。このような高感度／高速で低分解能情報を効率よく活用するためには、計算科学によるモデリングとの組み合わせがもっとも有効であると考えられる。タンパク質の基本構造(フォールディング)を網羅的に解析する「構造ゲノミクス」が日欧米で戦略的な国家プロジェクトとして進められていおり、多くの基本構造があきらかにされはじめた。これにより、立体構造モデルの精度も向上し、その有用性は今後も拡大していくであろう。ゲノム配列データベースの進歩が、包括的なタンパク質同定を実現化したことと同じく、タンパク質立体構造データベースの進歩と、モデリング技術と本技術の融合により、迅速でかつ信頼性の高い大規模なタンパク質構造解析が可能であると考えられる。

さらに、本研究を進めることでタンパク質の動的な立体構造変化を捉えることができるかもしれない。タンパク質 A とタンパク質 B が相互作用している場合と各々単独のときの断片化スペクトルを比較することにより、相互作用による構造情報の変化を捉えることも可能であると推察される。

質量分析によるタンパク質相互作用の研究は、先に述べたように、H/D 交換反応と組み合わせられた方法が用いられている。本研究では、アフィニティークロマトグラフィーの技術をこれに組み合わせることにより、データ解析の省力化と対象タンパク質の分子量範囲の拡大を行った。質量分析によるタンパク質相互作用部位解析も、得られる分解能は X 線結晶解析や NMR に遠く及ばないものの、大きな分子同士の相互作用部位を短時間にかつ微量で同定することが可能であることが示された。特に、一方の立体構造が解かれていた場合は、本手法で得られた相互作用部位情報を使って、複合体の結晶化条件を検討することなく、相互作用部位解析を詳細に行い、ドッキングデザインやタンパク質の機能改変も可能であると考えられる。また、変異体を作成して、より詳

細に相互作用部位を明らかにするとしても変異体の作成数を大幅に削減することができる。

先に述べたように、構造プロテオミクスの進展により、多くのタンパク質の立体構造が明らかになり、またモデリングの精度も向上してきた。次の段階として、これらのタンパク質がどんなタンパク質とどのような相互作用をしているかを理解することが非常に重要に成ってきた。タンパク質-タンパク質間相互作用を検出する方法は、現在最も注目を浴びている技術分野である。Yeast two-hybrid 法、phage-display 法、BIAcore 法などが用いられているが、いずれの方法もまだ問題点を抱えている。しかし、これらの技術の発展により、網羅的にタンパク質-タンパク質相互作用が明らかにされてくると考えられる。さらにその次の段階として、ターゲットとしたタンパク質の機能改変やドラッグデザインを行う場合、そのタンパク質の相互作用部位を明らかにする必要がある、この場合、本技術が役立つと考える。本解析法は、これまでの H/D 交換反応と FT-ICRMS による解析法の問題点を解決することにより、分子量の大きいタンパク質-タンパク質相互作用部位情報を得ることに成功した。これは、抗体-抗原反応だけでなく、受容体-リガンドタンパク質、酵素-基質タンパク質など幅広い応用が可能である。低分子リガンドの場合でも、応用可能であると考えられる。

医薬品への応用として、本研究では IL-6-抗体の相互作用部位解析を行った。hIL-6 の A ヘリックスの N 末付近と D ヘリックスの C 末付近に抗体が結合することがわかった。本研究で用いたモノクローナル抗体 MH166 は、IL-6 の中和活性を持つことが知られている⁷³。従って、本抗体は hIL-6 とその受容体との結合部位を含む領域に結合している可能性が高い。IL-6 の受容体には、IL-6R と gp130 の 2 種類が存在し、各 2 分子ずつで 6 量体を形成していると言われている。IL-6 の受容体結合部位は、多くの変異体研究により明らかにされている⁵⁵。大きく 3 つのサイトに分類され、site I が IL-6R との結合部位 (図 64 赤)、site II と site III が gp130 との結合部位である (図 64 マゼンダ、青) である。また、最近 IL-6 と受容体複合体の立体構造も明らかとなった^{74, 75}。本研究の実験結果と統合すると、モノクローナル抗体 MH166 は、hIL-6 上の IL-6R との結

合部位 site I を認識することにより中和活性を獲得していることが示唆される。このように、H/D 交換反応と FT-ICRMS を用いたタンパク質-タンパク質相互作用部位解析法は、大きなタンパク質同士の相互作用部位情報を提供することができることが示された。しかし、変異体による解析結果に比べて、本研究の結果は広い範囲を結合部位として提示している。抗体が IL-6R よりも広い範囲を認識することは特に問題ではないが、本法の位置分解能が悪いことを考慮する必要がある。その主因は D ヘリックスの細かいフラグメントイオンが観測されていないことにある。D 化率の高い部位をさらに絞り込むためには、D ヘリックスの MS/MS による分解が必要となる。そのためには、前述と同じく IRMPD 法と NS-CID 法とは全く異なるメカニズムの ECD 法あるいは ETD 法とのタンデム MS が有効と考える。

第8章 結論

質量分析を中心とした微量タンパク質解析技術と遺伝子の塩基配列データベースを基盤とし、生命現象の直接の担い手であるタンパク質を包括的に解析するプロテオミクスは、基礎生命科学のみならず、基礎・臨床医学、創薬、農学即ち発酵学等の物質生産、食品科学、酵素学などの幅広い分野で重要な役割を果たし始めている。昨今では特に医薬品開発や医療分野において、創薬ターゲットタンパク質や疾患関連マーカー探索の新しい方法論として期待されている。

プロテオミクス技術は、医学・薬学のみならず、健康食品の開発や食品の安全・安心の実現など、幅広く人類のために応用することができると思う。中でも食物アレルギーを引き起こす抗原タンパク質を高感度に検出する技術は未だなく、微量タンパク質解析技術は、このような食品の安全・安心に貢献できるものと思う。

一方、包括的かつ大規模解析には、高感度であることに加えて耐久性と堅牢性が重要な課題となってきた。また、プロテオミクス等で見出された創薬ターゲットタンパクの機能解析や低分子薬剤の設計を行う上で、立体構造解析や相互作用解析の重要性が増している。X線結晶構造解析やNMRを用いたタンパク質の構造解析技術は、これを解決する強力な手法であるが、解析に必要な試料量と時間に課題があり、より簡便で高感度の手法開発の必要性が高まっている。

このような背景のもと、本研究では、①食品の安全・安心を支えるための食品用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質分析法の開発、②微量タンパク質同定のための耐久性と堅牢性の高い質量分析基盤技術及びタンパク断片化技術の開発、③タンパク質2次構造及び相互作用部位解析技術の開発を行い、具体的に食品・医薬品へ応用することが目的である。食品への応用としては、食品用アミノ酸・核酸の食品アレルギー対策、医薬品への応用としては、リウマチ治療薬開発の基礎研究として、サイトカインであるヒト・インターロイキン-6(ヒトIL-6)に対する中和抗体のエピトープ解析について検討を行った。

以下に、本研究で得られた知見を総括する。

第1節 食品用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質検出法開発

プロテオミクスの技術を、食品の安心・安全を確保するための応用として、食品添加物用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質検出法の開発研究を行った。タンパク質化学の手法である、PVDF 膜を利用したドットブロットと超高感度タンパク質蛍光染色試薬を用いることにより、幅広いサイズの標準タンパク質(牛血清アルブミン:66kDa、卵白リゾチーム:14kDa、ユビキチン:8.6kDa、牛インスリン:5.7kDa、酸化型インスリン B 鎖:3.5kDa)を検出下限0.1ppmで検出できる超高感度なタンパク質検出法(ドットブロットー蛍光染色法)を確立した。

本法を、食品添加物用アミノ酸及び核酸製品に適用した。アミノ酸の溶解度が高い1N 塩酸に溶解することにより、アミノ酸重量あたりのタンパク質検出感度の向上を図った。標準添加法を採用することにより、対重量あたり1ppmの検出下限で微量の残存タンパク質の検出を行うことが可能となった。実試料として食品添加物用のアミノ酸及び核酸25品目を測定した結果、全て検出下限(1ppm)以下であった。

開発したドットブロットー蛍光染色法の検出下限は、アミノ酸の場合、1ppmである。これは、アレルギー症状を誘発すると危惧される数ppmよりも低い。したがって、食品添加物用アミノ酸・核酸の食品アレルギーの懸念を除くに十分な性能を持つ手法である。また、本法はタンパク質をPVDF 膜に固定して検出する方法である。何らかのタンパク質が検出された場合は、次章の微量タンパク質同定技術を用いることにより、残存しているタンパク質を同定することが可能である。
(第2章)

第2節 微量タンパク質同定のための質量分析基盤技術開発

微量タンパク質同定に必要な高感度かつ耐久性の高いステンレス製ナノ ESI 用エミッターの作成を検討した。内径 30 μ m、先端外部テーパーツ加工したステンレス製(SUS304)ストレ

ート細管を設計し作成した。これを市販 2 機種 of ナノ ESI-MS (ITMS: サーマエレクトロン社製 LCQ、Q-TOFMS: マイクロマス社製 Q-TOF2) に搭載し、流速、感度、イオン化の安定性を評価した。流速は、1.8 nl/min ~ 3 μ l/min と幅広い流量域で使用できた。感度は、レセルピン及び牛インスリンで、5 fmol/ μ l であった。イオン化の安定性も良好で、流速域、感度ともに、市販のフューズドシリカ製ナノ ESI 用エミッターと同等以上の性能であった。

オートインジェクター付きキャピラリー LC-MS/MS (カラム内径 300 μ m、流速 3 μ l/min) とナノ LC-MS/MS (カラム内径 75 μ m、流速 150 nl/min) にステンレス製ナノ ESI 用エミッターを搭載し、タンパク質のプロテアーゼ消化物を測定し、耐久性と感度の評価を行った。キャピラリー LC-MS/MS の場合、連続 180 回測定 (354 時間) でも、イオン強度に差がなく、高い耐久性により、安定した測定が可能であることがわかった。ナノ LC/MS/MS の場合、オボアルブミン、アミラーゼ、IgG、Lactic dehydrogenase 混合物のトリプシン消化物を測定した結果、10 fmol でも十分なイオンを検出することができ、全アミノ酸配列の 60-85% の配列を帰属、同定することができた。

以上のように、設計開発したステンレス製ナノ ESI 用エミッター (μ MetalTip) は、従来のフューズドシリカ製と比べて、感度や低流量などの性能は維持したまま、課題であった耐久性を著しく向上することに成功した。多検体を分析しなくてはならないプロテオミクス研究において、安定かつ耐久性の高い質量分析計は、極めて有効である。(第 3 章)

第 3 節 微量タンパク質同定のためのタンパク質断片化技術開発

次世代のプロテオミクス技術であるトップダウン・プロテオミクスは、酵素消化せずに質量分析計の中でタンパク質を断片化し、同定する迅速かつ高感度の手法として期待されている。その実現には、高分子量タンパク質を効率よく断片化するための技術開発が大きな課題である。微量タンパク質同定用に開発した耐久性の高いステンレス製ナノ ESI 用エミッター (μ MetalTip) を FT-ICRMS に搭載し、イオン源周辺を加熱することで高分子量タンパク質の断片化効率の向上を

検討した。

ノズルスキマーCID法及びIRMPD法において、イオン源領域を250–350°Cに加熱することにより、タンパク質の断片化効率を向上することができた。イオン源の温度を250–350°Cにしても、キャピラリーとスキマー間の電圧が25V以下と低いときには断片化が起こらないことから、加熱はノズルスキマーCID法の効率を上げることに役立っていることが示唆された。このことから、熱補助ノズルスキマーCID(Heat assisted nozzle skimmer [CID:HANS-CID](#))法及び熱補助IRMPD法(HA-IRMPD)とした。

本法により、これまで断片化が困難であったジスルフィド結合を有するリゾチームや分子量150kDaのIgG2bの断片化にも成功した。これまで74kDaであった測定限界分子量を更新した。

しかしながら、全てのタンパク質で同様に十分な配列情報を得ることはできなかった。他の断片化法との組み合わせによる、更なる検討が必要である。(第4章)

第4節 タンパク質断片化技術の2次構造情報抽出への応用

立体構造未知のタンパク質アミノ酸配列から、その立体構造を予測することは、機能の類推だけでなく、NMRやX線結晶構造解析の研究とする機能ドメインの選定に活用されている。しかし、計算化学により構築された立体構造モデルや2次構造予測は実験による検証がまったくなされていない。そこで、分解能は低いながらも、簡便に2次構造情報得られる技術は有用である。本研究では、FT-ICRMSを用いたノズルスキマーCID法やIRMPD法で得られたタンパク質の断片化スペクトルを詳細に帰属したところ、 α ヘリックスや β シートなど、しっかりとした構造を持つ部分が断片化を受けにくい傾向があることを複数のタンパク質(IL-6、ユビキチン、ウシミオグロビン、carbonic anhydrase)で見出した。断片化スペクトルを詳細に解析することにより、これら2次構造を形成している部分の情報を抽出できる可能性が示唆された。(第5章)

第5節 タンパク質断片化技術の相互作用部位解析への応用

タンパク質は単独で機能することはなく、低分子あるいはタンパク質などの生体高分子と相互作用することで機能を発現する。医薬品開発のターゲットタンパク質の機能や低分子薬剤の設計を行うためには、相互作用部位を明らかにする必要がある。最も有効な手段は、X線結晶構造解析やNMRによる複合体の構造解析である。一方、H/D交換反応と質量分析計を用いた手法は、情報は少ないものの簡便かつ迅速な手法である。質量分析を用いた高分子量タンパク質-タンパク質相互作用部位の測定法について検討を行い、リュウマチ治療薬創製に関わる rhIL-6 とその中和抗体の相互作用部位解析で検証・応用した。

相互作用部位のみをD化させるH/D逆交換反応とアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせるために、H/D交換反応とアフィニティークロマトグラフィーの至適条件を設定した。アフィニティークロマトグラフィーは、ESI-MSの測定に適した溶媒として、吸着溶液を5mM酢酸アンモニウム(pH 6.5)、溶出溶液を2%酢酸水溶液とした。

H/D逆交換反応後、溶出した rhIL-6 をノズルスキマーCID法及びIRMPD法で断片化し、得られたスペクトルを帰属し、D化率を求めた。抗体を固定化することにより、IL-6のみが分析対象とすることが可能となり、データ解析が容易となった。さらに、複合体を形成していないIL-6を除去することが可能となり、ノイズデータを削減する効果がある。その結果、Val 11 - Asp 26, Leu 126 - Lys 131, Asp 160 - Met 184の3つの領域においてD化率が高く、この領域が rhIL-6 と hIL-6 中和抗体 MH166 の相互作用界面であることがわかった。IL-6の立体構造と本研究の知見から、抗IL-6中和抗体MH166は、ヒトIL-6のC末端付近(Dヘリックス)を認識することで、受容体IL-6Rとの結合を阻害し、中和活性を持つことが示唆された。(第6章)

実験方法

第1節 ドットブロットー蛍光染色法

1-1 実験材料器具

微量 96 検体同時濾過装置(アトー(株)AE-6190 型)

蛍光画像解析装置(アマシャム・バイオテック製 Fluor Imager 595 または Typhoon8600)

PVDF 膜(ミリポア製 PVDF SEQUENCING MEMBRANE Immobilon-P^{SQ})

振とう機(東京理化(株)MULTI SHAKER MMS)

1-2 試薬

蛍光染色液(モレキュラープローブ社 Ruby protein blot stain 200ml 入り)

BSA STD(SIGMA 製 PROTEIN STANDARD 1000ppm)

塩酸 (関東化学(株) 超高純度試薬 250ml 入り)

酢酸 (純正化学(株) 特級 500ml 入り)

メタノール (純正化学(株) 高速液体クロマト用 3L 入り)

1-3 試薬の調製

3.6%塩酸:36%塩酸から、マイクロピペッターで 10ml 採取し、100ml ポリメスフラスコに入れ純水で 200ml にメスアップした。固定液:メタノール 10ml と*酢酸 7ml をマイクロピペットでとり、100ml ポリメスフラスコに入れ、純水で 200ml にメスアップする。

1-4 試料調製

アミノ酸及び核酸の秤量と溶解:アミノ酸または核酸を 120mg/ml になるように、1.5ml シリコナイズ エッペンを用いて 3.6%塩酸で溶解する。但し、L-Asp, (L-Cys)₂, L-Glu, L-Tyr, L-Trp, L-Gln, L-Asp-Na, L-Glu-Na 及び L-Phe は、70mg/ml になるように、3.6%塩酸に溶解する。

標準試料(BSA)の調製:0,0.1,0.2,0.5ug/ml になるように、BSA を 3.6%塩酸で希釈する。希釈操作は、以下の手順で行なう。

シリコナイズト処理した 1.5ml のエペンドルフチューブに BSA 原液を 35 μ l 採取し、3.6% 塩酸を 1365 μ l 加えて混合し、25 μ g/ml 溶液を作成する。上記溶液を 50,125,250 倍希釈し、0.5,0.2,0.1 μ g/ml BSA 溶液を作成した。尚、0 μ g/ml は、3.6%塩酸とした。

BSA 添加サンプル溶液の調製:測定試料中の BSA 濃度が、0,0.1,0.2,0.5ug/ml になるように、アミノ酸または核酸溶液で希釈した。シリコナイズト処理した 1.5ml のエペンドルフチューブに BSA 原

液を 35 μ l 採取し、3.6%塩酸を 1365 μ l 加えて混合し、BSA 25 μ g/ml 溶液を作成した。上記溶液をアミノ酸または核酸溶液で 50,125,250 倍希釈し、BSA 濃度が 0.5,0.2,0.1 μ g/ml のアミノ酸または核酸溶液を作成した。尚、BSA 濃度が 0 μ g/ml の試料は、アミノ酸溶液とした。

1-5 ドットプロット

PVDF 膜を約 12cmX9cm になるようにハサミで切り、裏表がわかるように右上と鉛筆で書く。専用容器に、メタルを入れ 1 分間浸漬して、PVDF 膜の活性化を行う。続いて、メタノールを除いた後に、3.6%塩酸に 30 分間以上浸漬する。PVDF 膜をプロッターセットし、3.6%塩酸 350 μ l をアプライし、アスピレータで吸引しながら PVDF 膜を洗浄する。液が、完全になくなるまで吸引する。続いて、試料溶液 350 μ l をアプライし、アスピレータで完全になくなるまで吸引し、次に 3.6%塩酸 350 μ l をアプライし、アスピレータで吸引後、純水 350 μ l をアプライし、アスピレータで吸引しながら洗浄する。膜をプロッターから外し、クリーンドラフト内で12時間以上十分に乾燥させる。乾燥後、以下の手順でタンパク質を PVDF 膜に固定させる。固定液を専用用器に入れ、乾燥した膜の転写面を下にして固定液に浮かべる。(膜を沈めないように、慎重に行なう)。振とう機を用いて 15 分間固定を行ない、その後、同様の手順で5分間純水で洗浄する。純水による洗浄は 5 回行う。続いて、染色液(SyproRuby)を専用容器に入れ、膜の転写面を下にして染色液に浮かべる。振とう機を用いて15分間染色を行なったのちに、純水に置換して1分間振とうさせて、過剰の染色薬を除く。膜を取り出し容器の純水を交換後洗浄する作業を 2 回行う。

1-6 蛍光画像装置にて測定と解析

蛍光画像処理装置の条件:

Emission Filter :Rox610BP30

PMT :415

Laser :Green(532nm)

Sensitivity :Normal

Pixel size : 200

Focal Plane : Platen

画像処理:

ImageQuant(GE ヘルスケア社)を用いて、画像データの処理を行った。各スポットを選択し、バックグラウンド補正後、蛍光強度の面積値を算出した。

第2節 タンパク質の酵素消化とナノ LC/MS 測定

2-1 試料及び試薬

- ・ レセルピン: SIGMA 製 LotNo.16H1177
- ・ 牛インスリン: SIGMA 製 LotNo.66C-0395
- ・ 酢酸アンモニウム: 小宗化学薬品製
- ・ 酢酸: 純正化学製
- ・ メタノール: 純正化学製
- ・ ギ酸: 和光純薬製 アミノ酸配列分析用(約 99%)
- ・ アセトニトリル: 純正化学製 高速液体クロマト用

2-2 試料溶液の調製

レセルピン、インスリンを 1%酢酸-50%メタノール溶液に溶解し、各測定に応じた濃度に調製した。

2-3 質量分析装置

ESI-ITMS: サーマエレクトロン社 製 エレクトロスプレーイオン化/イオントラップ質量分析計 LCQ

ESI-Q-TOFMS: マイクロマス製 エレクトロスプレーイオン化/四重極-飛行時間型質量分析計 Q-ToF2

2-4 キャピラリーLC/MS/MS 法によるグルカゴントリプシン消化物の測定

(1) キャピラリーLC/MS/MS 測定条件

ポンプ: Applied Biosystems 製 Model 140B Dual Syringe Solvent Delivery System

検出器: KONTRON INSTRUMENTS 製 Capillary Detector 433

オートサンプラー: FAMOS LC-Packings 製

カラム: Inertsil ODS-3 Vydac 製 C18、300 Å、5 μm、320 μm I.D × 300mm

検出波長: UV 210nm

レンジ: 0.5

流速: 120 μl/min

ミキサー&スプリッター: LC-PAKINGS 製 ACURATE により流速を 120 μl/min→2.4 μl/min、30 μl/min→0.8 μl/min に低下させてキャピラリーカラムに送液

溶離液: A 液 0.1% ギ酸水溶液

B 液 0.1% ギ酸 / 80% アセトニトリル水溶液

溶 離 条 件 :

時間(分)	A	B	カラムへの送液流速(・ l)
0	90%	10%	2.4
1	90%	10%	2.4
5	70%	30%	2.4
8	70%	30%	0.8
28	30%	70%	0.8
33	0%	100%	2.4
38	0%	100%	2.4

質量分析装置: サーモエレクトロン 製 エレクトロスプレーイオン化/イオントラップ質量分析計 LCQ

キャピラリー電圧: 36V

キャピラリー温度: 220°C

コリジョンエネルギー: 50%

測定質量範囲: [LC/MS 測定時] m/z 300-2000

[LC/MS/MS 測定時]

LC/MS/MS は、full scan と MS/MS を 1 scan ごとに交互に測定した。この際、MS/MS は、dependent scan (full scan で最も強く観測されるイオンを自動的にプリカーサーイオンとして選び、MS/MS を測定する方法)、または予め入力した質量をプリカーサーイオンとして測定する方法で行った。

2-5 データ解析

タンパク質、ペプチドの分子量の理論値を計算するには、ソフトウェア GPMAW を用いて行った。LC/MS/MS の解析には、タンパク質のデータ解析用ソフト Mascot (MatrixScience 社) を使用した。

第3節 FTICR-MS によるタンパク質断片化とデータ解析

3-1 実験材料

ユビキチン、ミオグロビン(ウマ)、カルボニックアンヒドラーゼ(ウシ)、アルコールデヒドロゲナーゼ(酵母)はシグマアルドリッチ社製を用いた。また、アセトニトリルと純水は HPLC グレードの試薬を使用した。

3-2 FTICR-MS によるタンパク質の断片化スペクトル測定

測定は、Gas assisted dynamic trapping (GADT) 法と Dynamic trapping (DT) 法で行った。

DT 法は、イオンをセル内にトラップする際に、一時的にトラップ電圧を上げて効率よくイオンを溜め込む方法である。このとき、イオンの運動エネルギーを低下させるために不活性ガス(Ar)を cooling gas としてパルスでセル内に導入する方法が GADT 法である。

質量分析計:7 テスラー セルフシールド超伝導マグネット フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析計 Apex II(Bruker Daltonics 社製)

イオン源:Bruker Daltonics 社製ナノESI イオン源に、内径 30 μ m、長さ 30mm のステンレス製ニードル(μ MetalTip 栄商金属社製)を装着した。

流速:200nl/min

溶媒:1%酢酸-H₂O または、1%酢酸-50%メタノール

Drying gas:5-10psi 100-250°C、ヘキサポール蓄積時間:1 秒

データ取り込みポイント:256K

断片化スペクトルは、キャピラリー電圧を上げることにより行う、キャピラリースキマーCID 法と CO₂ レーザーを照射する IRMPD 法で行った。

3-3 断片化スペクトルの帰属

FTICR-MS の断片化スペクトルから、 m/z と価数を自動的に抽出し、モノアイソトピック質量を計算するソフト MIDAS ver.3.08 (Modular FT-ICR MS Data Acquisition System)を使用した。MIDAS は、National High Magnetic Field Laboratory で開発された FTICR MS のデータ解析用プログラムである (<http://magnet.fsu.edu/~midas/>)。このソフトの一部を利用することで、各断片化イオンの価数とモノアイソトピック質量を容易にリスト化することができる。得られたリストは、タンパク質帰属ソフト FragInfo を用いて帰属した。FragInfo は、アミノ酸配列を入力し、予測されるペプチド断片イオンを計算し、実測値(モノアイソトピック質量と価数)の照合を行い、帰属するソフトであり、インフォコム株式会社にプログラミングを外注し作成したソフトウェアである。使用したアミノ酸配列は、PIR(Protein Information Resource; <http://pir.georgetown.edu/>)よりダウンロードして用いた。各タンパク質に関する情報を表9にまとめた。

表9 タンパク質に関する情報

タンパク質名	PIR コード	Swiss-Prot コード	PDB コード	分子量
IL-6 (human)	IVHUB22	P05231	1ALU	21kDa
ユビキチン	UQHU	P02248	1UBI	8.6kDa
ミオグロビン(bovine)	MYHO	P02188	1DWR	17kDa
carbonic anhydrase(bovine)	ARBO2	P00921	1UGD(human)	29kDa
アルコール脱水素酵素(yeast)	DEBYA2	P00331		36.6kDa

MIDAS と FragInfo の 2 つのソフトを用いて、断片スペクトルを帰属する手順を以下に示した。

MIDAS と MSFragInfo を用いた FTICR-MS タンパク質断片化スペクトルの帰属方法

1. MIDAS による FTICR データの解析

- (ア) MIDAS を立ち上げ、File を Open。Bruker file で FTICR-MS の FID スペクトルファイル(acuq または fid)を開く。
- (イ) Ctrl+F で FID スペクトルのフーリエ変換を行う。
- (ウ) Ctrl+T で Thrash を開始する。質量範囲、チャージ範囲、Peak Level、Threshold などを設定してから、Thrash をスタートする(図66)。
- (エ) Plot Distribution でピークのアサインを確認する(図67)。自動で行ったピーク帰属が誤っている場合はリストより削除し、マニュアルで帰属作業を行い、リストに追加する。
- (オ) No. charge Mono Mass Abun Mass Mono m/z Abun m/z のカラムを選択して、コピー後、Excel にペーストする。

Peak List

	Charge	Mono Mass	Abun Mass	Mono M/Z	Abun M/Z	Assignment	Mass Diff	RL
1	3	1804.6124	1805.6197	602.5447	602.8805	N/A	N/A	0.9999
2	3	1835.5795	1836.5867	612.8671	613.2028	N/A	N/A	0.9942
3	1	618.5364	618.5364	618.5436	619.5436	N/A	N/A	0.9946
4	2	1247.1475	1247.1475	624.5810	624.5810	N/A	N/A	1.0000
5	3	1885.7380	1886.7432	629.5859	629.9217	N/A	N/A	1.0000
6	3	1902.7496	1903.7569	635.2571	635.5929	N/A	N/A	0.9999
7	3	1903.7386	1904.7459	635.5868	635.9226	N/A	N/A	0.9959
8	4	2612.4177	2613.4249	654.1117	654.3635	N/A	N/A	0.9627
9	3	1966.7399	1967.7471	656.5872	656.9230	N/A	N/A	0.9917
10	14	9221.5192	9226.5555	659.6872	660.0470	N/A	N/A	0.9962
11	3	1982.8863	1983.8936	661.9694	662.3051	N/A	N/A	0.9991
12	3	1996.8112	1997.8185	666.6110	666.9468	N/A	N/A	1.0000
13	3	2014.8590	2015.8662	672.6269	672.9627	N/A	N/A	0.9999
14	2	1348.2567	1348.2567	675.1356	675.1356	N/A	N/A	1.0000
15	3	2031.8820	2032.8893	678.3013	678.6370	N/A	N/A	0.9995

Identify Protein Save Peaklist Delete Row Plot Distribution Export Peaklist Close

図66 MIDAS の Thrash により自動的にイオンを帰属したリスト表示画面

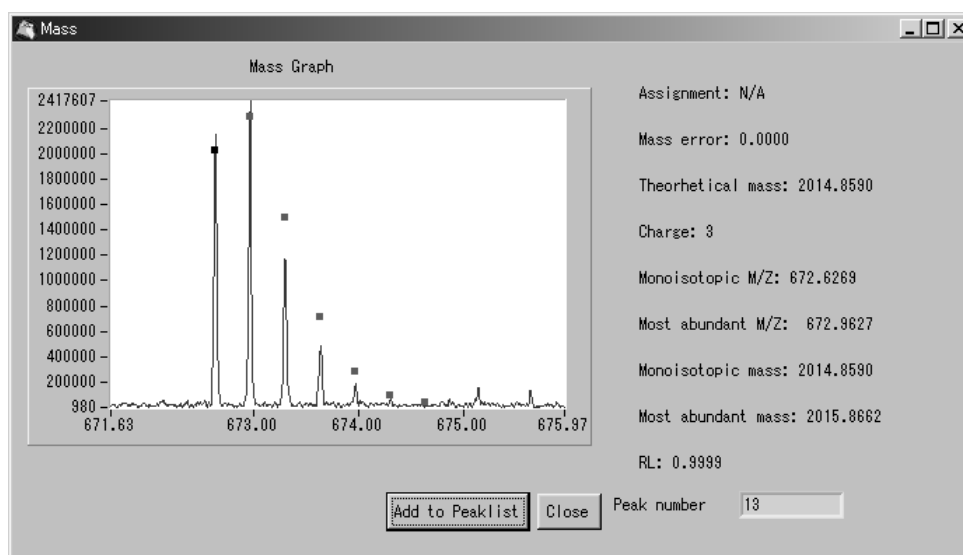


図67 MIDAS の THRASH で帰属したイオンのスペクトル表示画面

(カ) Excel にはヘッダーとして、最初の 3 行にタンパク質名、実験条件、データ番号などのコメントを入力する。次に、Mono(モノアイソトピック質量)あるいは Abun(モストアバンダンス質量)の m/z とチャージ(z)、イオン強度(Rel.Int.)のみを残した下記のような Excel ファイルを作る。

#Each comment(non-data) line must start with a #.

#Cluster data of Ubiquitin Hexapole-CID mono

#No.	m/z	z	Rel. Int.
1	602.5447	3	1805.62
2	612.8671	3	1836.587
3	619.5436	1	618.5364
4	624.581	2	1247.148
5	629.5859	3	1886.743
6	635.2571	3	1903.757

(キ) .CSV 形式で保存する。

2. MSFragInfo による断片化イオンの帰属

MS で得られたイオンと価数の情報をもとに、タンパク質のアミノ酸配列上のどの部分由来のイオンに当てはまるか検索・帰属するアプリケーションソフトをインフォコムに委託して作成した。本ソフトは、末端を含む y シリーズ及び b シリーズのイオンだけでなく、インターナル・フラグメントイオンを帰属することができる。本ソフトウェアは Visual Basic.net を用いて作成し、Windows 上で起動することができる。以下にこのソフトを用いた解析方法について記載する。

(ア) MSFragInfo を立ち上げ、PIR ファイルを開く。解析対象タンパク質のアミノ酸配列情報を含む PIR ファイルは、PIR (Protein Information Resource; <http://pir.georgetown.edu/>)よりダウンロードして用いた。MIDAS で解析したデータにあわせ、モノアイソトピックイオンであれば、Mono (Abun の時は Relative)を選択する。

(イ) C-terminal にプロトン 2 つ分の質量 2.01565 を入力する(プログラムのバグ対応)。

(ウ) Cluster ボタンで 4.3.1 で作成した csv ファイルを開き、検索する。質量精度 error は、0.05 とする。候補が多い場合は、error を小さくして絞り込む。

(エ) データの一覧表画面をコピーし、Excel にペーストして帰属結果を保存する。

3-4 立体構造上への切断部位の表示

タンパク質の立体構造表示ソフト ViewerLite(Accelrys 社)を用いて、PDB ファイルをもとに立体構造を表示させた。これに、切断部位の色を変えて表示した。アルコールデヒドロゲナーゼは、立体構造が解かれていないため FAMS を用いてモデリングを行った。また、温度因子については、立体構造表示ソフト iMol(<http://www.pirx.com/iMol>)を用いて立体構造上に色を変えることにより表示した。

第4節 H/D 交換実験方法

4-1 実験材料

rhIL-6: 遺伝子組換え大腸菌で生産した rhIL-6 精製品をイオン交換クロマトグラフィーでさらに精製した。抗 hIL-6 マウスモノクローナル抗体 MH166 (anti hIL-6 MoAb) : IgG1 産生マウスハイブリドーマ MH166 細胞培養上清より精製した (Lot.S-19)。抗体カラム: HiTrap NHS-Activated カラム 1ml (アマシャム・ファルマシアバイオテク社)、重水(Deuterium oxide): 99.9 atom %D, Lot.No.CL 2440-3 (ISOTEC Inc., USA)。

4-2 MH166 固定化カラムの作成

添付のプロトコルに従い、MH166 を固定化した。1mg/ml の抗体溶液を 4°C で 1 時間カップリングを行った。

4-3 rhIL6 の H/D 交換反応

400 μ g/100 μ l の rhIL-6 溶液を予め 5mM 酢酸アンモニウム/重水溶液 (pD 7) で充分平衡化した Micro Spin column (アマシャム・ファルマシアバイオテク社) に供し、4°C、2000rpm、1min 間遠心し、バッファー交換を行った。バッファー交換後、経時的にサンプリングし、氷冷上で 2% 酢酸になるように酢酸を添加し、その後、測定用バッファーを添加して FT-ICRMS の測定を行った。

4-4 MH166 カラムによる rhIL-6 溶離条件検討

HPLC: 多次元クロマトグラフィー Integral (PE バイオシステムズ社)

吸着溶液 A: 5mM 酢酸アンモニウム (pH 6.5)

吸着溶液 B: 75mM Tris-HCl (pH 7.5)

溶離液 A: 2% 酢酸

溶離液 B: 0.1M グリシン, 0.5M NaCl (pH 2.7)

カラム: MH166 固定化カラム

流速: 1.0 l/min UV: 280nm

カラム温度: 氷冷、バッファー温度: 4°C

吸着溶液 A(または B)で MH166 固定化カラムを十分に平衡化した後に、HPLC からカラムを外し、1ml のテルモシリッジで $400 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ の rhIL-6 をアプライした。アプライ後、HPLC に装着し、氷冷にて 30 分間放置した。その後吸着溶液 A(または B)でカラムを洗浄し、未吸着の rhIL-6 を洗い流した。続いて、溶離液 A(または B)で溶出し、UV280nm でモニターしながら、分画した。各画分をそのままあるいは前処理を行って FT-ICRMS で測定した。前処理は、POROS カラム (0.3mm i.d.X1mm) を用いてオンライン脱塩・濃縮を行い、そのまま FT-ICRMS の ESI イオン源へと導入した。

4-5 rhIL-6-MH166 複合体の H/D 交換反応

HPLC: 多次元クロマトグラフィー Integral (PE バイオシステムズ社)

重水素化溶液: 5mM 酢酸アンモニウム重水溶液 (pD 6.5)

吸着溶液: 5mM 酢酸アンモニウム軽水溶液 (pH 6.5)

溶離液: 2% 酢酸

カラム: MH166 固定化カラム

流速: 0.7 l/min

UV: 280nm

カラム温度: 氷冷、バッファー温度: 4°C

4-6 rhIL-6 の重水素化反応

5-7 に記した方法で、 $50 \mu\text{l}$ の rhIL-6 溶液を重水素化溶液に置換した後、 $950 \mu\text{l}$ の重水素化溶液を加えて H/D 交換反応を 30min、室温で行った。

4-7 MH166 固定化カラムの重水素化反応

2 ml の重水素化溶液をテルモシリッジでゆっくりと MH166 固定化カラムに供した。10 分間室温で放置した後、さらに 2 ml の重水素化溶液を注入し、トータル 30 分間室温で放置することにより、H/D 交換反応を行った。

4-8 rhIL-6-MH166 複合体形成と H/D 逆交換反応

H/D 交換反応後に rhIL-6 溶液 1 ml を MH166 固定化カラムにテルモシリッジでゆっくりと注入した後、カラムを HPLC に接続した。氷冷で 30 分間静置して複合体を形成させた。その後、吸着溶液を流して未吸着の rhIL-6 を洗い流すとともに、軽水溶液に置換して H/D 逆反応を 30 分間行った。H/D 逆交換を行った後に、 $0.5 \mu\text{l/min}$ で溶離液を流して rhIL-6 を溶出した (約 $180 \mu\text{l}$)。分取した rhIL-6 は直ちに FT-ICRMS 測定を行った。

4-9 rhIL-6 の FT-ICRMS 測定

全ての測定は、gas assisted dynamic trapping 法 (GADT) で行った。GADT 法は、イオンを Cell 内にトラップする際に、一時的にトラップ電圧を上げてかつイオンの運動エネルギーを低下させるために Ar ガスを cooling gas としてパルスでセル内に導入する方法である。これにより、効率よくイオンを Cell 内にトラップすることが可能となり、感度が向上する。パルスシーケンスを図 68 に示す。

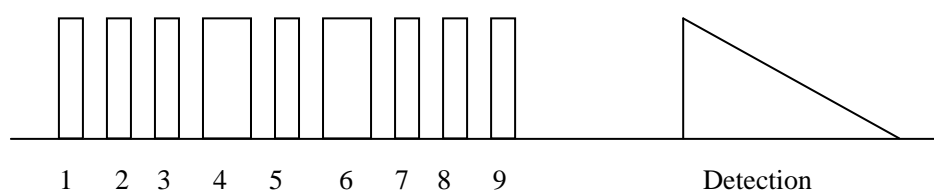


図 68 FT-ICRMS の GADT 法測定パルスシーケンス

1. ESI source quench, 2. ICR cell quench, 3. raise trap potential
4. hexapole accumulation, 5. ion generation, 6. trap gas & ion accumulation into cell
7. lower trap potential, 8. pumping delay, 9. excitation for ICR,

質量分析計: 7T セルフシールド超伝導マグネット フーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析計 ApexII (Bruker Daltonics 社製)

流速: 60 $\mu\text{l}/\text{h}$

Drying gas: 20psi, 150°C Nebulizing gas: 30psi

Ar gas : 7.8 Torr Hexapole accumulated time: 1 sec

Capillary exit voltage : 106.5 kV (normal scan) 、 150 kV (IRMPD 法) 、 220kV (HACS-CID)

Data point: 512K

4-10 IRMPD 法及びキャピラリースキマーCID 法による rhIL-6 の断片化

IRMPD 法は、ICR-Cell 内に閉じ込めたイオンに対して、300msec 間 CO₂ レーザーを照射した (図 69)。また、HACS-CID 法は、通常の測定と同じパルスシーケンスを用いて、CapExit の電圧を上げることと、Hexapole accumulation time を 1-3sec にした。

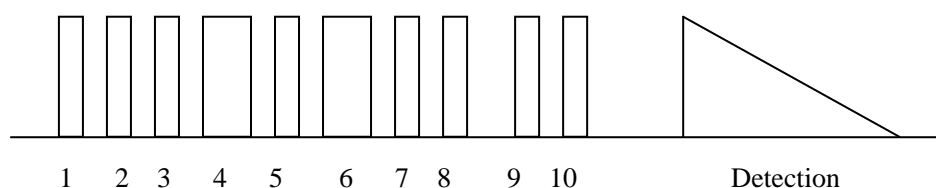


図 69 FT-ICRMS の GADT-IRMPD 法測定パルスシーケンス

1. ESI source quench, 2. ICR cell quench, 3. raise trap potential
4. hexapole accumulation, 5. ion generation, 6. trap gas & ion accumulation into cell
7. CO₂ laser irradiation, 8. lower trap potential, 9. pumping delay, 10. excitation for ICR

4-11 データ解析法

FT-ICRMS スペクトルは全て、付属ソフトウェア Xmass で解析を行った。フラグメントの帰属は、ソフトウェア Frag-Pro を用いた。各フラグメントは、同位体分布を持つため、Excel(マイクロソフト社)を用いて重心計算を行った。リファレンスの重心と H/D 交換後の重心の差を D 化による m/z の変化として、以下の計算式を用いて D 化率を求めた。また、側鎖の交換性プロトンの H/D 交換速度は非常に早いため、この方法論では比較的 H/D 交換速度の遅い主鎖アミド水素のみをデータ解析対象とした。従って、交換可能なプロトンの数はアミノ酸残基数と等しくなる¹²。

$$D \text{ 化率}(\%) = [(m/z_D - m/z_H) \times n / A] \times 100$$

m/z_H : リファレンスのフラグメントイオンの m/z の重心

m/z_D : H/D 交換後のフラグメントイオンの m/z の重心

n : フラグメントイオンの価数

A : アミノ酸残基数 (=主鎖アミド水素の数)

参考文献

- 1 Biemann K., et. al., *Biochem. Biophys. Research Communs* (1960) 3, 578–584.
- 2 Henzel W, Rodriguez H, Singer A, Stults J, Macrides F, Agosta W, Niall H, *J. Biol. Chem.* (1988) 263, 16682–16687.
- 3 Johnson R, Martin S, Biemann K, Stults J, Watson J, *Anal. Chem.* (1987) 59, 2621–2625.
- 4 Samy T, Hahm K, Modest E, Lampman G, Keutmann H, Umezawa H, Herlihy W, Gibson B, Carr S, Biemann K, *J. Biol. Chem* (1983) 258, 183–191.
- 5 Hirayama K, Takahashi R, Akashi S, Fukuhara K, Oouchi N, Murai A, Arai M, Murao S, Tanaka K, Nojima I, *Biochemistry* (1987) 26, 6483–6488.
- 6 Furuya M, Akashi S, Hirayama K, *Biochem. Biophys. Res. Communs.* (1989) 163, 1100–1106.
- 7 Hirayama K, Yuji R, Yamada N, Kato K, Arata Y, Shimada I, *Anal. Chem.*, (1998) 70, 2718–2725.
- 8 Tomiyama H, Yamada N, Komatsu H, Hirayama K, Takiguchi M, *Eur. J. Immun.* (2000) 30, 2521–2530.
- 9 Kondo H, Sahara H, Miyazaki A, Nabeta Y, Hirohashi Y, Kanaseki T, Yamaguchi A, Yamada N, Hirayama K, Suzuki M, Hamuro J, Torigoe T, Takahashi N, Kohama GI, Ikeda H, Sato N, *Jpn. J. Cancer Res.* (2002) 93, 917–924.
- 10 Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, Mann M, *Nature* (1996) 379, 466–469.
- 11 「アレルギー物質を含む食品に関する表示について」厚生労働省医薬局食品保健部 平成16年12月27日付食安基発第1227001号、食安監発第1227004号
- 12 Matsuda R, Yoshioka Y, Akiyama H, Aburatani K, Watanabe Y, Matsumoto T, Morishita N, Sato H, Mishima T, Gamo R, Kihira Y, Maitani T, *J AOAC Int* (2006) 89, 1600–1608.
- 13 Mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) applied to biological macromolecules, *Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002*, 9 October 2002 KUNGL. VETENSKAPSAKADEMIEN The Royal Swedish Academy Of Sciences.
- 14 Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida Y, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1988) 2, 151–153.
- 15 Fenn J, Mann M, Meng C, Wong S, Whitehouse C, *Science* (1989) 246, 64
- 16 Meng F, Cargile B, Patrie S, Johnson J, McLoughlin S, Kelleher N., *Anal. Chem.* (2002) 74, 2923–2929.
- 17 Reober D., et.al., *Anal. Chem.* (1998) 70, 673.
- 18 Loo J, Edmonds C, Smith R, *Science* (1990) 248, 201–204.
- 19 Hofstadler S, Sannes–Lowery K, Griffey R, *Anal. Chem.* (1999) 71, 2067–2070.
- 20 Sannes–Lowery K, Hofstadler S, *J Am Soc Mass Spectrom* (2003) 14, 825–833.

- 21 Hofstadler S, Drader J, Gaus H, Hannis J, Sannes-Lowery K, *J Am Soc Mass Spectrom* (2003) 14, 1413–1423.
- 22 Little D, Speir J, Senko M, O'Connor P, McLafferty F, *Anal. Chem.* (1994) 66, 2809–2815.
- 23 McLafferty F, Horn D, Breuker K, Ge Y, Lewis M, Cerda B, Zubarev R, Carpenter B, *J Am Soc Mass Spectrom* (2001) 12, 245–249.
- 24 Zubarev R, *Curr Opin Biotechnol* (2004) 15, 12–16.
- 25 Cooper H, Hakansson K, Marshall A, *Mass Spectrom Rev* (2005) 24, 201–222.
- 26 Thevis M., Loo R, Loo J, *J Am Soc Mass Spectrom* (2003) 14, 635–647.
- 27 Kelleher N, Taylor S, Grannis D, Kinsland C, Chiu H, Begley T, McLafferty F, *Protein Sci.* (1998) 7, 1796–1801.
- 28 Lennon J, Walsh K, *Protein Sci.* (1997) 6, 2446–2453.
- 29 Yamada N, Suzuki E, Hirayama K, *Anal. Biochem* (2006) 348, 139–147.
- 30 Miyano H, Suzuki E, Akashi S, Furuya M, Tsuji T, Hirayama K, *Anal. Sciences* (1989) 5, 759–761.
- 31 Wu Q, Van Orden S, Cheng X, Bakhtiar R, Smith R, *Anal. Chem.* (1995) 67, 2498–2509.
- 32 Wang F, Tang X, *Biochemistry* (1996) 35, 4069–4078.
- 33 Wang F, Li W, Emmett M, Hendrickson C, Marshall A, Zhang Y, Wu L, Zhang Z, *Biochemistry* (1998) 37, 15289–15299.
- 34 Wang F, Li W, Emmett M, Marshall A, Corson D, Sykes B, *J Am Soc Mass Spectrom* (1999) 10, 703–710.
- 35 Akashi S, Takio K, *Protein Sci.* (2000) 9, 2497–2505.
- 36 Zhang Z, Smith D, *Protein Sci.* (1993) 5, 522–531.
- 37 Eyles J, Speir J, Kruppa G, Gierasch L, Kaltashov I, *J. Am. Chem. Soc.* (2000) 122, 495–500.
- 39 Hirano T., et al., *Nature* (1986) 324, 73–76.
- 40 Van Damme J, Opdenakker G, Simpson R, Rubira M, Cayphas S, Vink A, Billiau A, Van Snick J, *J. Exp. Med.* (1987) 165, 914–919.
- 41 Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T, *J. Exp. Med.* (1988) 167, 332–344.
- 42 Tosato G, Seamon K, Goldman N, Sehgal P, May L, Washington G, Jones K, Pike S., *Science* (1988) 239, 502–504.
- 43 Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, Sato K, Shimizu M, Maini R, Feldmann M, Kishimoto T, *Eur. J. Immun.*, (1988) 18, 1797–1801.
- 44 Kawamoto M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K., Asaoku H, Bo Tang, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A, Kishimoto T, *Nature* (1988) 332, 83–85.
- 45 Zhang X, Klein B, Bataille R, *Blood* (1989) 74, 11–13.
- 46 Nakajima K, Martinez-Maza O, Hirano T, Breen E, Nishanian P, Salazar-Gonzalez J, Fahey J,

- Kishimoto T, *J. Immun.* (1989) 142, 531–536.
- 47 Kalai M, Montero-Julian F, Brakenhoff J, Fontaine V, De Wit L., Wollmer A, Brailly H, Content J, Grotzinger J, *Eur J Biochem* (1997) 249, 690–700.
- 48 Klein B, Wijdenes J, Zhang X, Jourdan M, Boiron J, Brochier J, Liautard J, Merlin M, Clement C, Morel-Fournier B, *Blood* (1991) 78, 1198–1204.
- 49 Haddad E, Paczesny S, Leblond V, Seigneurin J, Stern M, Achkar A, Bauwens M, Delwail V, Debray D, Duvoux C, Hubert P, de Ligny B, Wijdenes J, Durandy A, Fischer A, *Blood* (2001) 97, 1590–1597.
- 50 Racadot E., Audhuy B, Duvernoy H., Thyss A, Lang J, Wijdenes J, Herve P, *Cytokines Mol Ther.* (1995) 1, 133–138.
- 51 Emilie D, Wijdenes J, Gisselbrecht C, Jarrousse B, Billaud E, Blay J, Gabarre J, Gaillard J, Brochier J, Raphael M, *Blood* (1994) 84, 2472–2479.
- 52 Wijdenes J, Racadot E, Wendling D, *J Interferon Res* (1994) 14, 297–298.
- 53 Wijdenes J, Heinrich P, Muller-Newen G, Roche C, Gu Z, Clement C, Klein B, *Eur J Immunol.* (1995) 25, 3474–3481.
- 54 Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, *Eur J Immunol.* (1988) 18, 951–956.
- 55 Mihara M, Koishihara Y, Fukui H, Yasukawa K, Ohsugi Y, *Immunology* (1991) 74, 55–59.
- 56 Simpson R., Hammacher A., Smith D, Matthews J, Ward L., *Protein Sci.* (1997) 6, 929–955.
- 57 Yamada N, Ozawa S, Kageyama N, Miyano H, *J Agric Food Chem.* (2004) 52, 5329–5333.
- 58 Lopez M, Berggren K, Chernokalskaya E, Lazarev A, Robinson M, Patton W, *Electrophoresis* (2000) 21, 3673–3683.
- 59 Yan J, Harry R, Spibey C, Dunn M, *Electrophoresis* (2000) 21, 3657–3665.
- 60 Yamada N, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* (2000) 48, 187–210.
- 61 Ishihama Y., Katayama H., Asakawa N., Oda Y., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2002) 16, 913–918.
- 62 中村健道 タンパク質・核酸・酵素、(2000) 45, 1773 – 1780.
- 63 Sciaky M, Limozin N, Filippi-Foveau D, Gulian J, Laurent-Tabusse G, *Biochimie* (1976) 58, 1071–1082.
- 64 Ogata K, Umeyama H, *J Mol Graph Model* (2000) 18, 305–6.
- 65 Takeda-Shitaka M, Terashi G, Takaya D, Kanou K, Iwadate M, Umeyama H, *Proteins* (2006) 61 Suppl 7, 122–127.
- 66 Ehring H, *Anal. Biochem.* (1999) 267, 252–259.
- 67 Yamada N, Suzuki E, Hirayama K, *Rapid Commun Mass Spectrom* (2006) 16, 293–299.
- 68 Ge Y, Lawhorn B., ElNaggar M., Strauss E., Park J-H., Begley T, McLafferty F, *J. Am. Chem. Soc.* (2002) 124, 672–678.
- 69 Huang T, Emory J, O'hair R, McLuckey S, *Anal. Chem* (2006) 78, 7387–7391.
- 70 Mikesch L, Ueberheide B, Chi A, Coon J, Syka J, Shabanowitz J, Hunt D, *Biochim Biophys Acta*

(2006) 1764,1811–1822.

71 Swaney D, McAlister G, Wirtala M, Schwartz J, Syka J, Coon J, Anal. Chem. (2007) 79, 477–485.

72 Akashi S, Suzuki K, Arai A, Yamada N, Suzuki E, Hirayama K, Nakamura S, Nishimura Y, Rapid Commun Mass Spectrom (2006) 20,1932–1938.

73 Akashi S, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. (2000) 48, 94.

74 Shimamura T, Taki S, Honda H, Yokota M, Ito S, Takahara Y, Mol. Immunol.(1991) 28,1155–1161.

75 Skiniotis G, Boulanger M, Garcia K, Walz T, Nat Struct Mol Biol. (2005) 12, 545–551.

76 Augustyniak D, Majkowska-Skrobek G, Basiewicz-Worsztynowicz B, Jankowski A, Postepy Biochem (2006) 52,194–203.

原著論文リスト:

1. 食品用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質検出法開発

Yamada N, Ozawa S, Kageyama N, Miyano H.

Detection and quantification of protein residues in food grade amino acids and nucleic acids using a dot-blot fluorescent staining method

J. Agric Food Chem. 2004, 52(17):5329-33.

2. 微量タンパク質同定のための質量分析基盤技術開発

(ア) アミノ酸配列解析の微量化と自動化

Yamada N.

The Forefront of Amino Acid Sequencing by Mass Spectrometry

-Scaling Down and Automation-

J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 2000, 48(2):187-210.

3. 微量タンパク質同定のためのタンパク質断片化技術

(ア) タンパク質断片化新技術

Yamada N, Suzuki E, Hirayama K.

Effective novel dissociation methods for intact protein: Heat-assisted nozzle-skimmer collisionally induced dissociation and infrared multiphoton dissociation using a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer equipped with a micrometal electrospray ionization emitter

Anal. Biochem. 2006, 348(1):139-47.

4. 断片化技術の2次構造解析及びタンパク質相互作用部位解析への応用

(ア) タンパク質断片化スペクトルからの2次構造情報抽出

(イ) H/D 交換反応と質量分析を用いた IL-6 中和抗体のエピトープの解析

Yamada N, Suzuki E, Hirayama K.

Identification of the interface of a large protein-protein complex using H/D exchange and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry

Rapid Commun Mass Spectrom. 2002, 16(4):293-9.

特許出願:

1. 食品用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質検出法開発

国際公開番号WO2004/011948

「タンパク質の分析方法」公開日2004年2月5日

2. 微量タンパク質同定のための質量分析基盤技術開発

特許公開2004-317469

「質量分析用ナノ・スプレーイオン化用極細管」公開日 2004年11月11日

3. 断片化技術の2次構造解析及びタンパク質相互作用部位解析への応用

(ア) タンパク質断片化スペクトルからの2次構造情報抽出

国際公開番号WO2003/091720

「タンパク質構造解析方法、タンパク質構造解析装置、プログラム、及び、記録媒体」公開日2003年11月6日

(イ) H/D 交換反応と質量分析を用いた IL-6 中和抗体のエピトープの解析

特許公開2002-214195

「複合体の界面を同定する方法」公開日2002年7月31日

参考論文:

Akashi S, Suzuki K, Arai A, Yamada N, Suzuki E, Hirayama K, Nakamura S, Nishimura Y.

Top-down analysis of basic proteins by microchip capillary electrophoresis mass spectrometry

Rapid Commun Mass Spectrom. 2006, 20(15):2368

謝辞

本研究を行うに際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました平山和雄博士ならびに味の素株式会社 鈴木榮一郎理事に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、有益な御助言と御便宜を賜りました横浜市立大学明石知子準教授に心より感謝致します。

本研究に際し、有益な御助言と御協力を頂きました味の素株式会社 三輪清志執行役員、宮野博博士、安東敏彦博士、江島大輔博士、高原義之博士に深謝致します。

タンパク質のモデリングに際し、有益なご助言とご鞭撻を賜りました北里大学薬学部 梅山秀明教授に心より感謝致します。

ステンレス製エミッター作成に際し、多大なご協力を頂きました佐山社長他栄商金属株式会社の皆様に心より感謝いたします。

本研究を行う上で、FT-ICRMS の IRMPD 法、HACS-CID 法について、有益なディスカッションをしてくださいました Bruker Daltonics 社 Gary Kruppa 博士と Ibis Therapeutics 社 Steven Hofstadler 博士に深謝いたします。また、島津製作所田中耕一フェローには、今日に至るまで折節に貴重な御議論を頂きましたことを感謝申し上げます。

本研究を行うに際し、御協力頂いた小澤真一氏、陰山直子氏、嵐田直子氏、湯地玲子氏、田上宇乃氏はじめ味の素株式会社ライフサイエンス研究所の諸氏に心から感謝致します。

本論文作成に際し、有益な御教示と御便宜を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 田之倉 優教授に心から感謝致します。

最後に、ここまで私を支えてくれた両親ならびに妻 陽子、長女 夕季子と長男 大樹に心から感謝致します。

-
- ¹ Biemann K., et. al., *Biochem. Biophys. Research Commun* (1960) 3, 578–84.
- ² Henzel W, Rodriguez H, Singer A, Stults J, Macrides F, Agosta W, Niall H, *J Biol Chem.* (1988) 263,16682–16687.
- ³ Johnson R, Martin S, Biemann K, Stults J, Watson J, *Anal Chem.* (1987) 59, 2621–2625.
- ⁴ Samy T, Hahm K, Modest E, Lampman G, Keutmann H, Umezawa H, Herlihy W, Gibson B, Carr S, Biemann K, *J Biol Chem* (1983) 258,183–191.
- ⁵ Hirayama K, Takahashi R, Akashi S, Fukuhara K, Oouchi N, Murai A, Arai M, Murao S, Tanaka K, Nojima I, *Biochemistry* (1987) 26,6483–6488.
- ⁶ Furuya M, Akashi S, Hirayama K, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(1989), 163, 1100–1106.
- ⁷ Hirayama K, Yuji R, Yamada N, Kato K, Arata Y, Shimada I, *Anal. Chem.*, (1998) 70, 2718–2725.
- ⁸ Tomiyama H, Yamada N, Komatsu H, Hirayama K, Takiguchi M, *European Journal of Immunology* (2000) 30,2521–2530.
- ⁹ Kondo H, Sahara H, Miyazaki A, Nabeta Y, Hirohashi Y, Kanaseki T, Yamaguchi A, Yamada N, Hirayama K, Suzuki M, Hamuro J, Torigoe T, Takahashi N, Kohama GI, Ikeda H, Sato N, *Jpn. J. Cancer Res.* (2002) 93, 917–924.
- ¹⁰ Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, Mann M, *Nature* (1996) 379,466–469
- ¹¹「アレルギー物質を含む食品に関する表示について」厚生労働省医薬局食品保健部 平成16年12月27日付食安基発第 1227001 号、食安監発第 1227004 号
- ¹² Matsuda R, Yoshioka Y, Akiyama H, Aburatani K, Watanabe Y, Matsumoto T, Morishita N, Sato H, Mishima T, Gamo R, Kihira Y, Maitani T, *J AOAC Int* (2006) 89, 1600–1608
- ¹³ Mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) applied to biological macromolecules, *Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002*, 9 October 2002 KUNGL. VETENSKAPSAKADEMIEN The Royal Swedish Academy Of Sciences.
- ¹⁴ Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida Y, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1988) 2, 151–153
- ¹⁵ Fenn J, Mann M, Meng C, Wong S, Whitehouse C, *Science* (1989) 246, 64
- ¹⁶ Meng F, Cargile B, Patrie S, Johnson J, McLoughlin S, Kelleher N., *Anal. Chem.* (2002) 74, 2923–2929
- ¹⁷ Reober D., et.al., *Anal. Chem.*, (1998) 70, 673
- ¹⁸ Loo J, Edmonds C, Smith R, *Science* (1990) 248, 201–204,
- ¹⁹ Hofstadler S, Sannes–Lowery K, Griffey R, *Anal Chem* (1999) 71,2067–2070
- ²⁰ Sannes–Lowery K, Hofstadler S, *J Am Soc Mass Spectrom* (2003) 14, 825–833
- ²¹ Hofstadler S, Drader J, Gaus H, Hannis J, Sannes–Lowery K, *J Am Soc Mass Spectrom* (2003)

14, 1413–1423

²² Little D, Speir J, Senko M, O'Connor P, McLafferty F, *Anal Chem* (1994) 66, 2809–2815

²³ McLafferty F, Horn D, Breuker K, Ge Y, Lewis M, Cerda B, Zubarev R, Carpenter B, *J Am Soc Mass Spectrom* (2001) 12, 245–249

²⁴ Zubarev R, *Curr Opin Biotechnol* (2004) 15,12–16

²⁵ Cooper H, Hakansson K, Marshall A, *Mass Spectrom Rev* (2005) 24,201–222

²⁶ Thevis M., Loo R, Loo J, *J Am Soc Mass Spectrom* (2003) 14,635–647

²⁷ Kelleher N, Taylor S, Grannis D, Kinsland C, Chiu H, Begley T, McLafferty F, *Protein Sci* (1998) 7, 1796–1801

²⁸ Lennon J, Walsh K, *Protein Sci.*, (1997) 6,2446–2453

²⁹ Yamada N, Suzuki E, Hirayama K, *Anal Biochem* (2006) 348, 139–147

³⁰ Miyano H, Suzuki E, Akashi S, Furuya M, Tsuji T, Hirayama K, *Anal. Sciences* (1989) 5, 759–761

³¹ Wu Q, Van Orden S, Cheng X, Bakhtiar R, Smith R, *Anal Chem* (1995) 67, 2498–2509

³² Wang F, Tang X, *Biochemistry* (1996) 35, 4069–4078

³³ Wang F, Li W, Emmett M, Hendrickson C, Marshall A, Zhang Y, Wu L, Zhang Z, *Biochemistry* (1998) 37, 15289–15299

³⁴ Wang F, Li W, Emmett M, Marshall A, Corson D, Sykes B, *J Am Soc Mass Spectrom* (1999) 10, 703–710

³⁵ Akashi S, Takio K, *Protein Sci* (2000) 9, 2497–2505

³⁶ Zhang Z, Smith D, *Protein Sci.*, (1993) 5, 522–531

³⁷ Eyles J, Speir J, Kruppa G, Gierasch L, Kaltashov I, *J. Am. Chem. Soc.*, (2000) 122, 495–500

³⁸ Hirano T., et al., *Nature* (1986) 324, 73–76

³⁹ Van Damme J, Opdenakker G, Simpson R, Rubira M, Cayphas S, Vink A, Billiau A, Van Snick J, *J. Exp. Med.* (1987) 165, 914–919.

⁴⁰ Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T, *J. Exp. Med.* (1988) 167, 332–344.

⁴¹ Tosato G, Seamon K, Goldman N, Sehgal P, May L, Washington G, Jones K, Pike S., *Science* (1988) 239, 502–504.

⁴² Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, Sato K, Shimizu M, Maini R, Feldmann M, Kishimoto T, *Eur. J. Immun.*, (1988) 18, 1797–1801.

⁴³ Kawamoto M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K., Asaoku H, Bo Tang, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A, Kishimoto T, *Nature*, (1988) 332, 83–85.

⁴⁴ Zhang X, Klein B, Bataille R, *Blood*, (1989) 74, 11–13.

⁴⁵ Nakajima K, Martinez-Maza O, Hirano T, Breen E, Nishanian P, Salazar-Gonzalez J, Fahey J, Kishimoto T, *J. Immun.*, (1989) 142, 531–536.

-
- ⁴⁶ Kalai M, Montero-Julian F, Brakenhoff J, Fontaine V, De Wit L., Wollmer A, Brailly H, Content J, Grotzinger J, Eur J Biochem (1997) 249, 690–700.
- ⁴⁷ Klein B, Wijdenes J, Zhang X, Jourdan M, Boiron J, Brochier J, Liautard J, Merlin M, Clement C, Morel-Fournier B, Blood (1991) 78, 1198–1204.
- ⁴⁸ Haddad E, Paczesny S, Leblond V, Seigneurin J, Stern M, Achkar A, Bauwens M, Delwail V, Debray D, Duvoux C, Hubert P, de Ligny B, Wijdenes J, Durandy A, Fischer A, Blood (2001) 97, 1590–1597.
- ⁴⁹ Racadot E., Audhuy B, Duvernoy H., Thyss A, Lang J, Wijdenes J, Herve P, Cytokines Mol Ther (1995) 1, 133–138.
- ⁵⁰ Emilie D, Wijdenes J, Gisselbrecht C, Jarrousse B, Billaud E, Blay J, Gabarre J, Gaillard J, Brochier J, Raphael M, Blood (1994) 84, 2472–2479.
- ⁵¹ Wijdenes J, Racadot E, Wendling D, J Interferon Res (1994) 14, 297–298.
- ⁵² Wijdenes J, Heinrich P, Muller-Newen G, Roche C, Gu Z, Clement C, Klein B, Eur J Immunol. (1995) 25, 3474–3481
- ⁵³ Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Eur J Immunol. (1988) 18, 951–956.
- ⁵⁴ Mihara M, Koishihara Y, Fukui H, Yasukawa K, Ohsugi Y, Immunology (1991) 74, 55–59.
- ⁵⁵ Simpson R., Hammacher A., Smith D, Matthews J, Ward L., Protein Sci. (1997) 6, 929–955.
- ⁵⁶ Yamada N, Ozawa S, Kageyama N, Miyano H, J Agric Food Chem (2004) 52, 5329–5333
- ⁵⁷ Lopez M, Berggren K, Chernokalskaya E, Lazarev A, Robinson M, Patton W, Electrophoresis (2000) 21, 3673–3683
- ⁵⁸ Yan J, Harry R, Spibey C, Dunn M, Electrophoresis (2000) 21, 3657–3665
- ⁵⁹ Yamada N, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. (2000) 48, 187–210
- ⁶⁰ Ishihama Y., Katayama H., Asakawa N., Oda Y., Rapid Commun. Mass Spectrom. (2002) 16, 913–918
- ⁶¹ 中村健道 タンパク質・核酸・酵素、(2000) 45, 1773 – 1780
- ⁶² Sciaky M, Limozin N, Filippi-Foveau D, Gulian J, Laurent-Tabusse G, Biochimie (1976) 58,1071–1082
- ⁶³ Ogata K, Umeyama H, J Mol Graph Model (2000) 18, 305–6
- ⁶⁴ Takeda-Shitaka M, Terashi G, Takaya D, Kanou K, Iwadate M, Umeyama H, Proteins (2006) 61 Suppl 7, 122–127
- ⁶⁵ Ehring H, Anal. Biochem. (1999) 267, 252–259
- ⁶⁶ Yamada N, Suzuki E, Hirayama K, Rapid Commun Mass Spectrom (2006) 16, 293–299
- ⁶⁷ Ge Y, Lawhorn B., EINaggar M., Strauss E., Park J-H., Begley T, McLafferty F, J. Am. Chem. Soc. (2002) 124, 672–678
- ⁶⁸ Huang T, Emory J, O'hair R, McLuckey S, Anal Chem (2006) 78,7387–7391
- ⁶⁹ Mikesh L, Ueberheide B, Chi A, Coon J, Syka J, Shabanowitz J, Hunt D, Biochim Biophys Acta (2006) 1764,1811–1822

-
- ⁷⁰ Swaney D, McAlister G, Wirtala M, Schwartz J, Syka J, Coon J, *Anal Chem* (2007) 79, 477–485
- ⁷¹ Akashi S, Suzuki K, Arai A, Yamada N, Suzuki E, Hirayama K, Nakamura S, Nishimura Y, *Rapid Commun Mass Spectrom* (2006) 20,1932–1938
- ⁷² Akashi S, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* (2000) 48, 94
- ⁷³ Shimamura T, Taki S, Honda H, Yokota M, Ito S, Takahara Y, *Mol. Immunol.*(1991) 28,1155–1161
- ⁷⁴ Skiniotis G, Boulanger M, Garcia K, Walz T, *Nat Struct Mol Biol.* (2005) 12, 545–551
- ⁷⁵ Augustyniak D, Majkowska-Skrobek G, Basiewicz-Worsztynowicz B, Jankowski A, *Postepy Biochem* (2006) 52,194–203