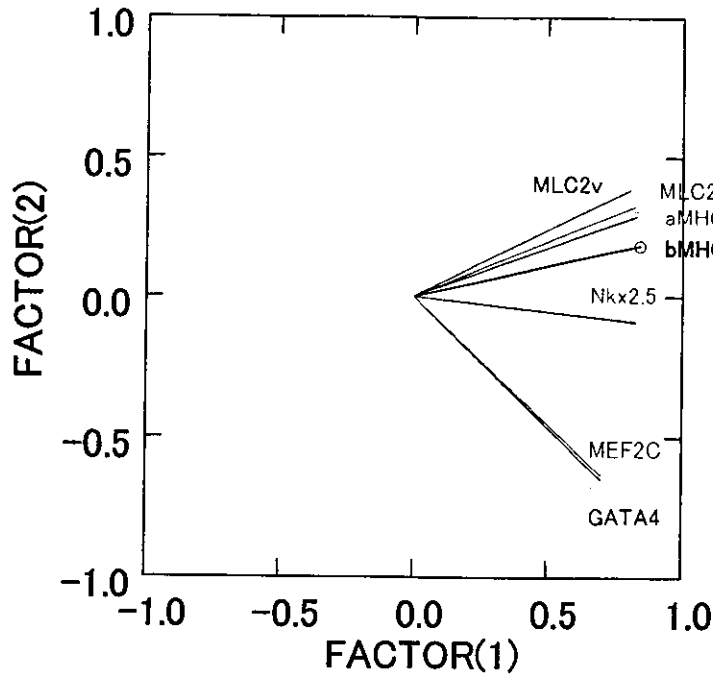


図16. P19由来細胞株における心筋細胞マーカー遺伝子の発現の時間経過
 サブコンフルエントのP19由来細胞株をトリプシン-EDTA処理により分散した後、
 1% DMSOを含むMEM α 溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導した。分化誘導開
 始から8, 12, 16, 20日目にtotal RNAを回収し、心筋細胞マーカー遺伝子の発現
 をリアルタイムRT-PCRで定量した。縦軸はmRNA/18S rRNAの値を成体マウス
 心筋と比較した場合の相対値。値は平均値 \pm S.E.M. (n=6)で示す。

A. Factor Loadings Plot



B. Scree Plot

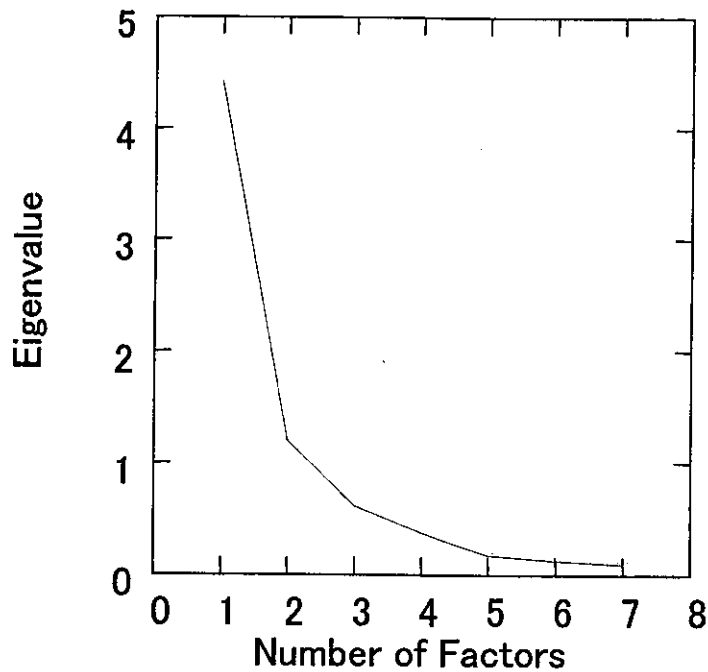


図17. P19由来細胞株の心筋細胞マーカー遺伝子の主成分分析

1% DMSOを含むMEM α 溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導したP19由来細胞株における心筋細胞マーカー遺伝子のmRNA発現量(図3中の全データ)を平均値および標準偏差により統計的標準化した後、主成分分析した。A) 第1主成分と第2主成分の変量プロットを示す。係数の傾向から第1主成分は心筋分化の指標、第2主成分は心筋成熟の指標と考えられる。B) 主成分の寄与率を示す。第1主成分の寄与率は7パラメータの65%、第2主成分の寄与率は7パラメータの15%であり、この2つの主成分で資料の80%の情報量をもつことが分かる。

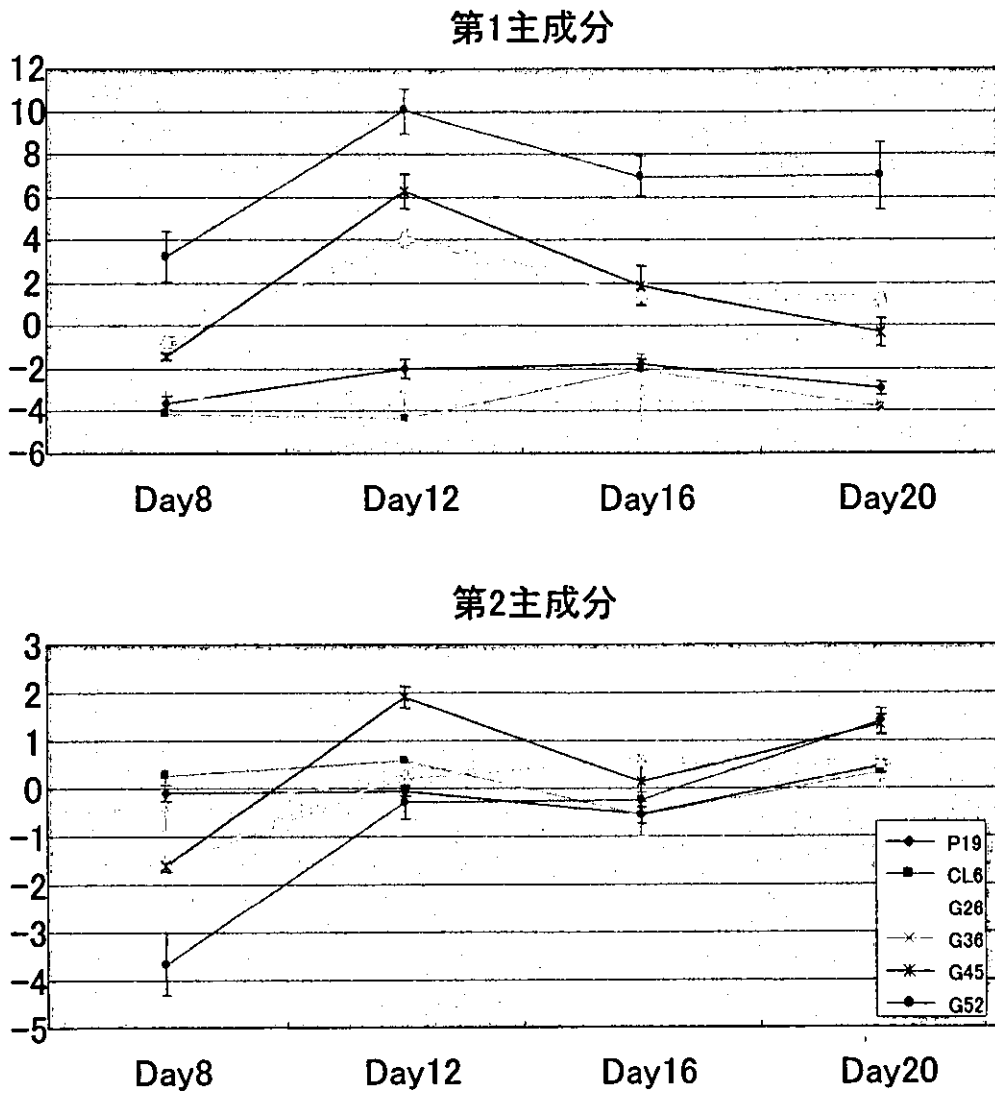


図18. P19由来細胞株の心筋細胞マーカー遺伝子の主成分得点

1% DMSOを含むMEM α 溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導したP19由来細胞株における心筋細胞マーカー遺伝子のmRNA発現量データを主成分分析した際の第1主成分および第2主成分の主成分得点。主成分得点とは、求めた主成分から個々の資料の値を見たものである。

表3, 心筋細胞分化と有意な相関のある「心筋細胞分化予測マーカー」候補遺伝子

Gene Name	Localization	1st Principal Component		2nd Principal Component		Onset		Colony#	
		r_s	p	r_s	p	r_s	p	r_s	p
CPC1	Soluble Protein	0.824	0.000	0.737	0.000	-0.493	0.006	0.438	0.015
CPC2	Soluble Protein	0.784	0.000	0.746	0.000	-0.542	0.002	0.415	0.022
CPC3	Membrane Protein	0.760	0.000	0.440	0.015	-0.833	0.000	0.645	0.000
CPC4	Membrane Protein	0.760	0.000	0.839	0.000	-0.488	0.008	0.420	0.021
CPC5	Membrane Protein	0.757	0.000	0.468	0.009	-0.888	0.000	0.688	0.000
CPC6	Membrane Protein	-0.720	0.000	-0.524	0.003	0.677	0.000	-0.591	0.001
CPC7	Membrane Protein	0.659	0.000	0.128	0.500	-0.492	0.006	0.600	0.000
CPC2	Soluble Protein	0.652	0.000	0.380	0.038	-0.804	0.000	0.787	0.000
CPC8	Membrane Protein	-0.625	0.000	-0.459	0.011	0.418	0.022	-0.382	0.037
CPC9	Soluble Protein	-0.590	0.001	-0.310	0.095	0.503	0.005	-0.516	0.003
CPC10	Soluble Protein	0.566	0.001	0.234	0.214	-0.615	0.000	0.646	0.000
CPC11	Soluble Protein	0.565	0.001	0.428	0.018	-0.631	0.000	0.588	0.001
CPC12	Membrane Protein	0.556	0.001	0.416	0.022	-0.398	0.029	0.417	0.022
CPC13	Membrane Protein	0.540	0.002	0.305	0.101	-0.430	0.018	0.432	0.017
CPC13	Membrane Protein	0.539	0.002	0.176	0.352	-0.586	0.001	0.682	0.000
CPC14	Soluble Protein	0.537	0.002	0.243	0.195	-0.467	0.009	0.501	0.005
CPC15	Membrane Protein	0.485	0.007	0.001	0.995	-0.673	0.000	0.781	0.000
CPC16	Membrane Protein	0.469	0.009	-0.119	0.532	-0.474	0.008	0.640	0.000
CPC17	Not Predicted	-0.456	0.011	-0.050	0.792	0.767	0.000	-0.831	0.000
CPC18	Membrane Protein	0.453	0.012	-0.063	0.739	-0.369	0.045	0.548	0.002
CPC19	Not Predicted	-0.440	0.015	-0.107	0.575	0.643	0.000	-0.712	0.000
CPC20	Soluble Protein	-0.426	0.019	0.004	0.985	0.421	0.020	-0.540	0.002
CPC21	Membrane Protein	0.397	0.030	-0.020	0.915	-0.581	0.001	0.683	0.000
CPC22	Soluble Protein	-0.392	0.032	-0.284	0.128	0.525	0.003	-0.458	0.011
CPC23	Soluble Protein	-0.392	0.032	0.109	0.566	0.698	0.000	-0.822	0.000
CPC24	Soluble Protein	-0.386	0.035	0.141	0.456	0.462	0.010	-0.803	0.000

分化誘導前の発現量と誘導後の心筋細胞分化の程度に有意な相関の認められたP19由来細胞株中の「心筋細胞分化予測マーカー」候補遺伝子。心筋細胞分化は、分化誘導後の「心筋細胞マーカー遺伝子」の発現の第1主成分、自動能出現までの日数、自動能を有する細胞コロニー数により評価した。黄色は第2主成分とも有意な相関の認められた遺伝子。

r_s : スピアマンの順位相関係数、p: スピアマンの順位相関係数のp-値

細胞治療薬の新規体内動態解析技術の開発研究

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長
協力研究者 小林 哲 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官

研究要旨

タンパク質の体内動態を解析する方法の開発の一環として、血液中の微量タンパク質を質量分析によって解析する方法の検討を行った。第一に、質量分析イムノアッセイ法（MSIA）において、磁性マイクロ粒子を使った場合に正常血清から検出可能なタンパク質を検討した。その結果、トランスフェリンやリゾチーム、 β_2 ミクログロブリンなどを検出することができたが、アルブミン等の夾雑物の影響が大きいため、微量タンパクの検出には更なる改善が必要であると考えられた。そこで、磁性マイクロ粒子のかわりに熱応答性磁性ナノ粒子を利用したところ、ナノモル濃度レベルの血中インスリンの検出が可能となった。第二に、微量タンパク質の質量分析において重要な課題である高感度化について検討した。トランスフェリンや BSA 等のタンパク質をマトリックス溶液に添加すると、MALDI におけるマトリックスの結晶を小型化させ、それに伴い目的タンパク質のシグナルを増強させること、ポリリジンやデキストランなどの各種合成高分子は、それ自身のシグナルを出すことなく目的タンパク質のシグナルを増強すること、さらにこれらの合成高分子は目的タンパク質によって増強する程度がそれぞれ異なることなどを明らかにした。これらの成果を組み合わせることで、血液中の微量タンパク質の MALDI-TOF MS による分析が可能になると思われる。

A. 研究目的

細胞治療においては、治療用細胞で生合成される機能性タンパク質によって、疾病治療を図ることが多い。そのため、細胞治療用細胞の評価においては、細胞を生体内に適用した場合の機能性タンパク質の体内動態解析は重要な評価項目の一つといえる。近年タンパク質の分析法として質量分析法が注目を浴びているが、特にマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析（MALDI-TOF MS）とエレクトロスプレーイオン化質量分析が大きく発展してきた。特に MALDI は酵素消化していないタンパク質の定性的・定量的分析にも使われる。本研究では主として MALDI を用い、タンパク質の体内動態解析、特に血中タンパク質解析への質量分析法の導入を

検討してきた。血液中のタンパク質を質量分析で解析する場合、主に二つの問題点が考えられる。

一つは血中に大量に存在するアルブミン等の夾雑物から、いかにして分析を妨害するタンパク質と目的タンパク質を分離し分析するか、ということである。この目的に適した方法としては、目的タンパク質特異的抗体を用いて粗精製して質量分析を行う質量分析イムノアッセイ法（Mass Spectrometric Immunoassay（MSIA））があげられる。MSIA では、従来特異的抗体と結合した目的タンパク質を血清から分離する方法として、抗体結合ゲル等を遠心分離によって沈降させる免疫沈降法が用いられることが多い。本研究では、MSIA における目的タンパク質の分離に、磁性マイクロ粒子の応用を試みた。ついで、目的タンパク質の

分離精製を改善するために、抗体を結合する固相の磁性粒子についても検討を加えることとした。これまで用いてきた磁性マイクロ粒子よりも粒子サイズが小さい磁性ナノ粒子を使えば、水溶液中での浮遊性が高く、表面積も大きいので、目的タンパク質をより効率的に精製濃縮して検出感度を高めることができると考えられる。通常の磁性ナノ粒子はブラウン運動のために磁石で集めることができないが、温度を変えれば凝集する性質を持ち、磁石で集めることができる熱応答性磁性ナノ粒子が開発されている。今回、幸いにもこの熱応答性磁性ナノ粒子を利用する機会があったので、これによって分離の改善が図れないかを、磁性マイクロ粒子と比較した。

血中タンパク質を質量分析する場合の二つめの問題点は、血中の微量タンパク質の解析手段として質量分析法の感度は現状では未だ十分ではなく、さらなる高感度化を図る必要がある、ということである。これについては、マトリックスの α -cyano 4-hydroxycinnamic acid (CHCA) に、あらかじめトランスフェリンやポリリジン等の高分子を添加することによってシグナルが増強されて検出感度が高められることを昨年度報告した。本年度は、高分子を添加したときの結晶構造を顕微鏡で観察して、シグナル増強のメカニズムについて考察するとともに、さらに各種合成高分子のシグナル増強作用について検討した。

B. 研究方法

1. 試薬：ヒトインスリン、血清、ビオチン標識抗マウス免疫グロブリン G (IgG) 抗体、抗 β_2 ミクログロブリンモノクローナル抗体 (クローン BM-63 由来)、CHCA、ヒトトランスフェリン、ウシ血清アルブミン(BSA)、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアルギニン、デキストランおよびポリエチレングリコール (平均分子量 3350 および 8000) は Sigma 社から購入した。抗インスリンモノクローナル抗体、抗トランスフェリンモノクローナル抗体、ウサギ由来抗トランスフェリン

抗体、抗 β_2 ミクログロブリンモノクローナル抗体 (クローン GJ14 由来)、抗インスリン様成長因子 (IGF) -I モノクローナル抗体、抗 IGF-II モノクローナル抗体、抗フェリチンモノクローナル抗体、ウサギ由来抗フェリチン抗体、抗腫瘍細胞成長因子 (TGF) β_1 モノクローナル抗体、および抗アクチピン A モノクローナル抗体は CosmoBio 社より購入した。ストレプトアビジン結合磁性マイクロ粒子、抗マウス IgG 抗体結合磁性マイクロ粒子、および抗ウサギ IgG 抗体結合磁性マイクロ粒子は QIAGEN 社より購入した。ビオチン結合熱応答性磁性ナノ粒子 (Therma-Max) はチッソ(株)よりアビジン処理した状態で供与されたものを用いた。ヒト IgG、ポリビニルピロリドン、およびポリエチレングリコール (分子量 15,000-25,000, 300,000-500,000, 1,500,000-2,000,000, 3,500,000-4,000,000) は和光純薬から、ポリビニルアルコールは Acros 社からそれぞれ購入した。

2. 磁性粒子による抗体結合タンパクの分離：10 μ l の抗インスリンモノクローナル抗体溶液 (0.1 mg/ml) を 1.5 ml チューブにとり、90 μ l の抗マウス IgG 抗体結合磁性粒子懸濁液を添加して攪拌後、室温で 10 分間静置した。チューブに磁石を当てながら上清を除去して、得られた粒子に 90 μ l の 50mM tris buffered saline (TBS, pH7.5) を添加して懸濁し、10 μ l ずつとって 0.2 ml チューブに分注した。90 μ l の TBS と 10-90 μ l の試料を添加して混和攪拌後、室温で 30 分間静置した。上清を除去し、粒子を洗浄した後、10 μ l の CHCA 溶液 (10 mg/ml in 50% acetonitrile, 50% 0.1% TFA) を添加して結合画分を溶出させ、質量分析の試料とした。なお、熱応答性磁性ナノ粒子には 37°C 以上に加熱すると凝集する型 (lower critical solution temperature: LCST) と 10°C 以下に冷却すると凝集する型 (upper critical solution temperature: UCST) がある。LCST を用いた場合には、42°C で 30 秒間の加温により粒子を凝集させてから上清を除去した。また、UCST を用い

た場合には、氷浴上で2分間の冷却により粒子を凝集させてから上清を除去した。

3. 質量分析：分析試料 2 μ l をスチール製ターゲットプレートの各ウェルに滴下し、室温で乾燥後、MALDI TOF MS 装置 AB4700 (アプライドバイオシステム社) にて質量分析を行った。レーザーは neodymium: yttrium aluminum garnet (Nd:YAG; 355nm) を使用し、リニアモードで、ポジティブイオンを検出した。50 回のレーザーショットの平均を取ってスペクトルを生成した。得られたスペクトルはデータプロセッサアプリケーション (アプライドバイオシステム社) によってバックグラウンド補正とノイズ低減化をかけてからシグナル強度を得た。このアプリケーションは、検出限界の決定にも用いた。

4. シグナル増強作用の検討：シグナル増強剤として、トランスフェリンその他の高分子をミリQ 水(脱イオン水)に溶解希釈し、2 μ l をとって 10 μ l の CHCA 溶液と混合後、さらにインスリン溶液またはその他の試料溶液 2 μ l を添加、混合した。このうち 2 μ l を質量分析の試料として、シグナル強度を測定した。また、別の 2 μ l をカバーガラスに滴下して、室温で乾燥させ、顕微鏡観察の試料とした。

5. 蛍光顕微鏡観察：マトリックス結晶は共焦点レーザー走査顕微鏡 LSM510 (カールツァイス社) でノマルスキー微分干渉像として観察した。また CHCA は蛍光を発するので、アルゴンレーザー ((488nm) で励起し、BP505 蛍光フィルターを用いて観察した。結晶の粒径は、LSM ソフトウェア (V2.5、カールツァイス社) で計測した。

C. 研究結果

1. 磁性マイクロ粒子を用いた MSIA による血清中微量タンパク質の検出

1-1. 正常血清についての検討

磁性マイクロ粒子を用いた MSIA によって正常血清からどのようなタンパク質を検出できるか検討した。各種の抗体原液を系列希釈して抗 IgG 抗

体結合磁性マイクロ粒子に結合させ、ヒト血清を 2 倍から 64 倍に TBS で希釈した試料とインキュベート後、洗浄して結合画分を質量分析で分析した。

まず、抗トランスフェリンモノクローナル抗体またはウサギ由来抗トランスフェリン抗体を用いた場合には、トランスフェリン (80 kDa) の 1 価イオンや 2 価イオン ($m/z = 80\ 000, 40\ 000$) に相当するシグナルをヒト血清から検出することができた (図 1)。血清濃度が高いほどトランスフェリンのシグナルは強い傾向にあったが、夾雑物のアルブミンに由来するシグナル ($m/z = 66\ 000, 33\ 000$) 等も強くなるので、ある程度希釈したほうがよいと考えられる。なお、モノクローナル抗体溶液 (タンパク質として 35 mg/ml) とウサギ由来抗体溶液 (IgG として 9.0 mg/ml) はそれぞれ 40 倍と 160 倍に希釈した場合にもっとも強いトランスフェリンシグナルを得ることができたが、後者のポリクローナル抗体を用いたときにはアルブミンに由来するシグナルが強く検出され、IgG に由来するシグナル ($m/z = 75\ 000$) も検出されたので、この場合は前者のモノクローナル抗体を用いたほうがよいと考えられた。

ついで、抗 β_2 ミクログロブリンモノクローナル抗体 (クローン BM-63 またはクローン GJ14 由来、IgG としてそれぞれ 1.6 または 1 mg/ml) を磁性マイクロ粒子に結合させた。その結果、それぞれ 40 倍と 20 倍に希釈した場合にもっとも強い β_2 ミクログロブリン (11.8 kDa) に相当するシグナルをヒト血清から検出することができた (図 2)。

その他、リゾチームや IGF-I、IGF-II、フェリチン、TGF- β_1 、アクチビン A、インスリン等についても正常血清から検出できないか、それぞれの抗体を用いて検討した。リゾチーム (14.6 kDa) については相当するシグナルを検出することができたが (図 3A)、その他の場合はトランスフェリン等と同様な条件では検出することができなかった。TGF- β_1 (12.8 kDa) に対する抗体を用い

た場合を一例としてあげた (図 3B)。

1-2. 熱応答性磁性ナノ粒子を用いた検討

磁性マイクロ粒子よりも浮遊性が高く、表面積も大きい熱応答性磁性ナノ粒子を応用することで MSIA における目的タンパク質の分離を改善できないか、インスリン添加血清 10 μl を試料として検討した。すなわち、アビジン処理したビオチン結合熱応答性磁性ナノ粒子 (LCST タイプまたは UCST タイプ) と、ビオチン標識抗インスリンモノクローナル抗体をインキュベートして、抗マウス IgG 抗体結合磁性粒子懸濁液を調製し、ストレプトアビジン結合磁性マイクロ粒子を同様に処理して調製した場合とインスリン検出感度を比較した。

その結果、LCST タイプの熱応答性磁性ナノ粒子を用いた場合は 10 nM 以下のインスリンを検出できなかったが、UCST タイプを用いた場合は、1 nM のインスリンを検出できた (図 4A)。LCST タイプでは 42°C まで加温して粒子を凝集させるため、インスリンタンパクの変性が加温によって促進されて検出できないと考えられた。逆に、UCST タイプでは氷浴で冷却して粒子を凝集させるため、インスリンの変性も抑制されている可能性がある。熱応答性ナノ粒子は貴重なサンプルであることから、まだ条件を十分検討できていないが、とくに UCST タイプの熱応答性磁性ナノ粒子については、血中微量タンパク質の前処理法として有望であると思われる。

一方、マイクロ粒子を用いた場合はインスリン以外のタンパク質によるシグナルが多数検出されるためにインスリンシグナルの検出が妨害されてしまい、粗精製法として不十分だった (図 4B)。昨年度報告したように、血清試料によっては界面活性剤等の洗浄条件を工夫することで夾雑シグナルを除くこともできるが、今回用いたロットの血清では十分に除去できなかったことから、少なくともインスリンの検出に関しては UCST タイプの熱応答性磁性ナノ粒子のほうが磁性マイクロ粒子よりも優れていると考えられた。

2. 高分子添加によるシグナル増強

2-1. タンパク質添加によるマスペクトルにおけるインスリンシグナルの増強メカニズムの検討

MALDI を利用した定量法について内部標準を用いた定量性の検討を進める過程で、内部標準としてウシインスリンをマトリックスに添加しておく、ヒトインスリンのシグナルが増強されることを見出し、トランスフェリンや血清アルブミンを添加した場合にとくに強く増強されることを昨年度報告した。そこでこのシグナル増強のメカニズムについて検討を行った。

MALDI におけるシグナル増強は、しばしばマトリックスの結晶構造の変化とリンクすることが知られている。そこでマトリックスの CHCA 溶液に 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ から 8 $\text{ng}/\mu\text{l}$ まで系列希釈したトランスフェリン溶液を 5 : 1 となるようにあらかじめ添加して乾燥させ、結晶を顕微鏡で観察した。その結果、添加したトランスフェリンの濃度に依存して結晶の粒径が小さくなっていることが明らかになった (図 5、図 6A)。このとき、0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ までのトランスフェリン溶液を添加した場合はインスリンのシグナルもトランスフェリンの濃度に依存して増強され、CHCA に由来する蛍光もほぼすべての結晶に均一に分布した。

一方、0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上のトランスフェリンを添加した場合にはシグナルは弱くなったが、同時に、蛍光性の不定形な塊と非蛍光性の結晶が増加していた。この蛍光性不定形塊と非蛍光性結晶は、それぞれ CHCA とトランスフェリンであると考えられることから、過剰量のトランスフェリンは、CHCA を析出させ、CHCA とトランスフェリン、そしておそらくは分析対象となるインスリンの分布が非均一になる結果、インスリンシグナルの低下を招くことが示唆された。同様な変化は、トランスフェリンのかわりに BSA をマトリックスに添加した場合にも観察された (図 6B)。

以上のように、インスリンシグナルの増強がタ

ンパク質の添加によって引き起こされ、このとき、結晶の粒径は小さくなっていた。適当量の高分子を添加するとマトリックス結晶が小さくなり、結晶の表面積が増えることによって、インスリンの脱離イオン化反応が促進された結果、シグナルが増強されると考えられた。

2-2. 合成高分子添加によるトランスフェリンシグナルの増強

適切な量のトランスフェリンや BSA を添加してシグナルを増強することは、微量のタンパクやペプチドを解析するうえで有用だと考えられるが、そのもの自身によってシグナルが発生するため、目的タンパク質のマスマスペクトルを複雑にする等の不利益も考えられる。特に IgG 等の高分子を解析するには目的タンパク質のシグナルを妨害する可能性が強い。そこで、トランスフェリンを試料として、合成高分子を CHCA に添加してシグナル増強剤として使えるかどうか検討した。インスリンシグナルと同様にトランスフェリンのシグナルも BSA の添加によって増強されるが、トランスフェリンの分子量は BSA の分子量に近いいため、添加した BSA 自体に由来するシグナルも目的タンパク質たるトランスフェリンのシグナルの近くに検出された (図 7B)。一方、ポリリジンやデキストラン等の合成高分子を添加した場合には、添加した高分子に由来するシグナルは検出されなかった (図 7C、D)。そのため、これらの合成高分子は BSA よりも望ましいシグナル増強剤になると考えられた。

次にこのような合成高分子によるシグナル増強現象が、結晶の大きさの変化で説明可能かどうか検討した (図 7E、F)。ポリリジン (分子量 150-300 kDa) またはデキストラン (平均分子量 200 kDa) をマトリックスに添加した場合にもインスリンシグナルの増強と結晶の微細化は観察されたが、トランスフェリンや BSA を添加した場合に比べると、結晶の粒径の変化は小さく、シグナル増強に最適な濃度もはっきりしなかった。その理由としては、ここで用いたポリリジンやデキ

ストランは分子量が一定ではなく、ある程度の幅を持っているために、濃度依存性も単一のタンパクを用いたときほどはっきり出なかったと考えられる。

2-3. 各種合成高分子化合物によるタンパク質シグナルの増強

フェリチン(20 kDa)や IgG (150 kDa)等のタンパク質を試料として、ポリリジンやデキストランを含む各種の合成高分子を CHCA に添加してシグナルにどのような影響を与えるか、検討した。その結果、フェリチンについてはポリリジンやデキストランを含む多くの合成高分子がシグナルを増強した (表 1)。一方、IgG のシグナルを二倍以上増強した合成高分子は、高分子量のポリリジンと低分子量のポリエチレングリコールのみであった。IgG は T 字ないしは Y 字型の構造をとり、フェリチンや BSA(66 kDa)、トランスフェリン(80 kDa)よりも分子量が大きいだけでなく独特の高次構造ゆえに、シグナル増強を受けにくいのかもしれない。

低分子ペプチドである ACTH フラグメント (18-39) (2 465 Da) のシグナルは、BSA またはトランスフェリンの添加では増強されなかったが、ポリリジンやデキストランの添加では増強された (表 2)。この現象は結晶の微細化による表面積の増大だけでは説明できないが、BSA やトランスフェリンは ACTH フラグメントの 100 倍以上ある巨大な球状タンパクであるため、物理的に低分子ペプチドの気化を妨害してしまう可能性がある。ポリリジンは分子全体がプラスの電荷を持ち、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基などは持たないので、球状タンパクであるトランスフェリンや BSA とは異なる形状をとっていると考えられ、低分子ペプチドの気化を妨害しないのかもしれない。糖分子の重合体であるデキストランについても、同様なことが考えられる。

一方、インスリン (5 808 Da) やシトクロム C (12 362 Da)、アポミオグロビン(16 952 Da)等は、トランスフェリンや BSA だけでなく、ポリリジ

ンやデキストラン添加によってもシグナル増強を受けたが、ポリビニルアルコールやポリエチレングリコールによってはあまり強いシグナル増強を受けなかった。なお、ポリビニルピロリドンは実験に用いたすべてのタンパク質、ペプチドについてシグナルを抑制した。分析対象物の分子量だけでなく、コンフォメーションや疎水性、電荷などの特性も脱離イオン化においては重要な役割を果たすと考えられており、ポリビニルアルコールやポリエチレングリコールを添加した場合には分子量以外の特性がシグナル増強作用に大きな役割を果たすと思われる。

D. 考察

本研究では、まず目的タンパク質の粗精製に磁性マイクロ粒子を利用する MSIA によって、血液中の内在性タンパク質の質量分析による検出を試みた。その結果、トランスフェリン、リゾチーム、 β_2 ミクログロブリンの検出に成功した。これらタンパク質については正常血中濃度がそれぞれ 25, 0.3, 0.08 μM 程度とされており、比較的高濃度存在する。一方 0.06, 0.09 μM 程度とされている IGF-I、IGF-II、9.2, 0.8, 0.4, 0.1 nM 程度とされているフェリチン、TGF- β_1 、アクチビン A、インスリンは検出できなかった。したがって、抗体の力価、あるいは共存するタンパク質の影響はあるものの、一般的にはサブ μM 程度の濃度が現状の磁性マイクロ粒子を用いた方法で検出可能と考えられた。

細胞治療用細胞から分泌される生理活性タンパク質の多くは生理的条件下では通常 nM オーダー以下の血液中濃度と考えられるので、磁性マイクロ粒子を用いた MSIA では測定は困難と思われる。そこで、さらにより大きな表面積を有し、精製濃縮効率の改善が期待される熱応答性磁性ナノ粒子の応用を試みた。その結果、nM オーダーの濃度のインスリンを検出することができた。この熱応答性磁性ナノ粒子は貴重なサンプルであることから、研究期間中これ以上の検討はできなかったが、

使用する抗体をさらに選別し、粗精製の条件を最適化することにより、サブ nM という実用的なレベルの感度を実現する方法になる可能性がある。

なお、アルコール中毒患者では長期飲酒の結果、トランスフェリンをはじめとする血清の糖タンパクについて糖鎖の形成不全が引き起こされることを利用して、アフィニティークロマト法などによる診断が行われている。本研究で確立した方法は煩雑な脱塩操作や凍結乾燥などが不要な簡便かつ迅速な方法であり、本法は簡便で迅速なアルコール中毒による糖鎖形成不全の診断に応用できるかもしれない。また血清 β_2 ミクログロブリン濃度は腎疾患や自己免疫疾患で上昇し、また、長期に体内に停滞することにより形成される糖化 β_2 ミクログロブリンが骨関節症の発症に深く関与している可能性が指摘されており、診断へも応用されている。 β_2 ミクログロブリンの MSIA についてもすでに報告があるが、抗体を共有結合で固相に結合するため、操作がやや煩雑である。われわれが開発した抗 IgG 抗体結合磁性マイクロ粒子を用いる方法は、より簡便という点で優れていると考えられる。

昨年度見出したトランスフェリンあるいは BSA の添加による MALDI-TOF のインスリンシグナル増強のメカニズムについては、マトリックスの結晶形の小型化によって説明可能であった。しかし一方、合成高分子の場合は、トランスフェリンや BSA ほど明瞭な結果は得られず、結晶形の小型化以外の要因もシグナル増強現象に関わる可能性も考えられ、今後の更なる検討が必要と思われる。

本研究によって様々な合成高分子化合物もタンパク質シグナルを増強することが明らかとなった。この増強現象は、高分子化合物の種類の違い、あるいはシグナル増強をうけるタンパク質の違いによって全く異なったものとなる。今現在、この違いを統一的に解釈することが可能な原理を見出すことはできていない。しかし、今後現象の整理をさらに進めることにより、例えば、特定のタンパ

ク質シグナルを増強するようなシグナル増強剤の設計が可能となるだろう。あるいは今現在検出が困難な高分子量のタンパク質のシグナルを増強する高分子化合物が開発できれば、MALDI-TOF MS のタンパク質研究における有用性をさらに大きく広げる技術となろう。

E. 結論

磁性マイクロ粒子を利用した質量分析イムノアッセイによって、血中のトランスフェリン、リゾチーム、 β_2 ミクログロブリンのMALDI-TOFによる分析を可能とする方法を確立するとともに、熱応答性磁性ナノ粒子を用いることによって、血中の微量なタンパク質の分析が可能であることを示唆する結果を得た。さらにタンパク質、あるいは各種合成高分子をマトリックス溶液に添加することにより、MALDI-TOF MSによる質量分析におけるタンパク質シグナルの増強が可能であることを見出した。これらを組み合わせることにより、血中の微量タンパク質の解析が可能になるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

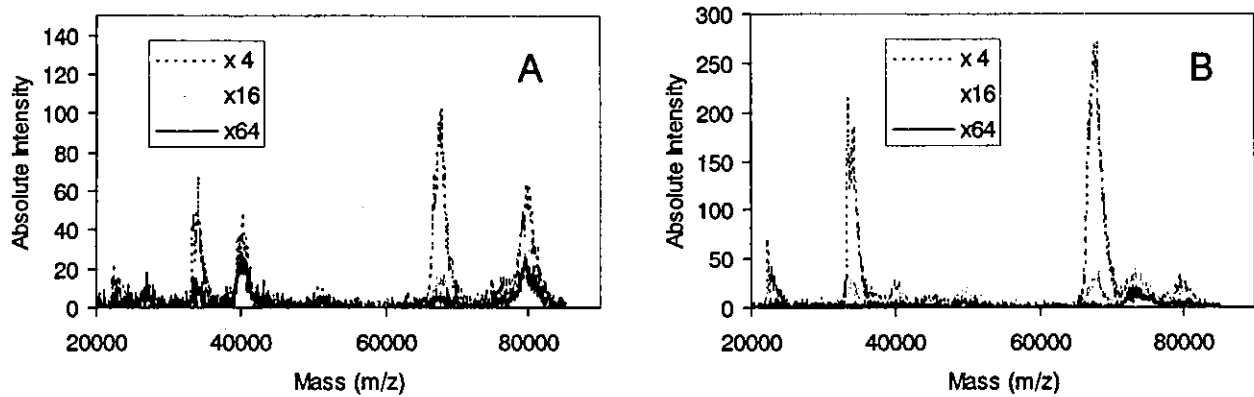
- 1) T. Kobayashi, H. Kawai, T. Suzuki, T. Kawanishi, and T. Hayakawa, Improved sensitivity of insulin in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by premixing α -cyano-4-hydroxy- cinnamic acid with transferrin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 1156-1160 (2004)
- 2) N. Kawasaki, N. Hashii, S. Itoh, M. Hhyuga, T. Kawanishi, T. Hayakawa: Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Electrophoresis*, **48**, 5-10 (2004) (Japanese)
- 1) S. Itoh, A. Harazono, N. Kawasaki, N.

Hashii, Y. Matsuishi, T. Kawanishi, and T. Hayakawa: Glucosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: analysis of glycosylation sites and of site-specific heterogeneity, *J. Electrophoresis*, **48**, 163-168 (2004) (Japanese)

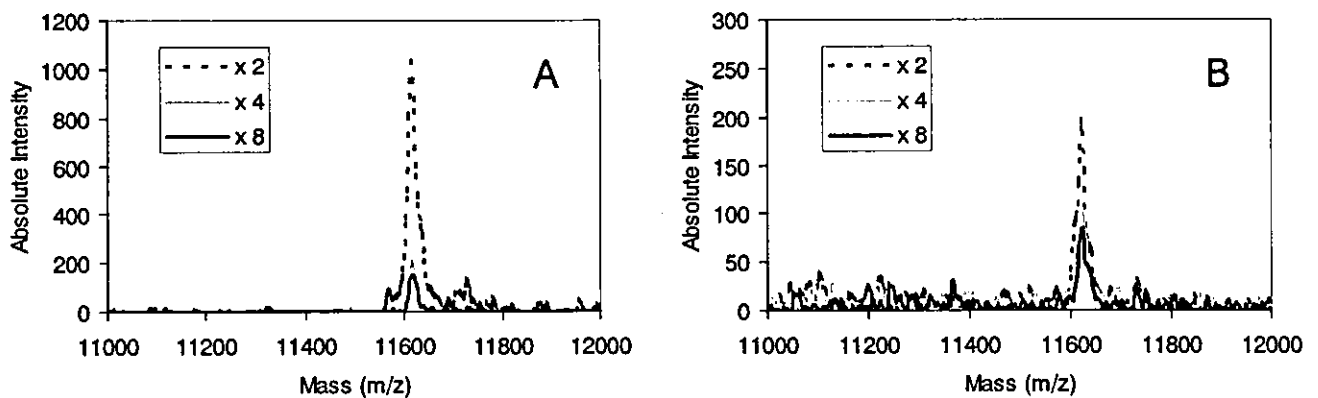
- 2) K. Takagi, R. Teshima, H. Okunuki, S. Itoh, N. Kawasaki, T. Kawanishi, T. Hayakawa Y. Kohno, A. Urisu, and J. Sawada: Kinetic Analysis of Pepsin Digestion of Chicken Egg White Ovomuroid and Allergic Potential of Pepsin Fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **136**, 23-32 (2005)
 - 3) J. Yuan, N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, T. Kawanishi, and T. Hayakawa: Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, (in press)
 - 4) A. Harazono, N. Kawasaki, T. Kawanishi, and T. Hayakawa: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Glycobiology*. (in press)
 - 5) T. Kobayashi, H. Kawai, T. Suzuki, T. Hayakawa, and T. Kawanishi, Crystal size reduction: Possible mechanism of signal enhancement of protein in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (Under submission)
- ##### 2. 学会発表
- 1) 小林 哲、河合 洋、鈴木琢雄、川西 徹、

早川堯夫：Protein signal enhancement in MALDI-TOF MS、第52回質量分析総合討論会、名古屋(2004,6)

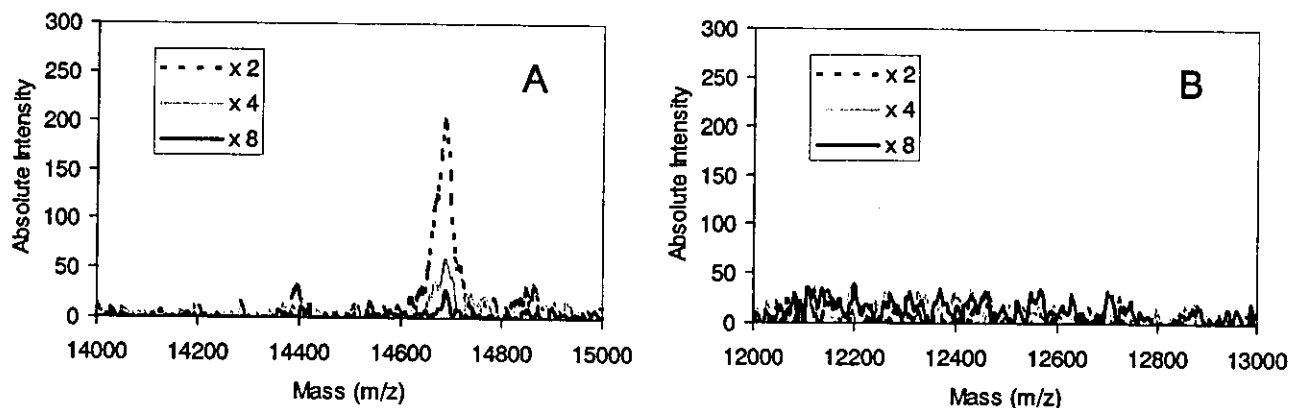
- 2) 小林 哲、河合 洋、鈴木琢雄、川西 徹、
早川堯夫：MALDI-TOF MSにおけるタンパク質のシグナル増強 Part2、日本薬学会第125年会、東京(2005,3 発表予定)
- 3) 小林 哲、河合 洋、鈴木琢雄、石井明子、
早川堯夫、川西 徹：Protein signal enhancement in MALDI-TOF MS Part2、第53回質量分析総合討論会、さいたま(2005,5 発表予定)



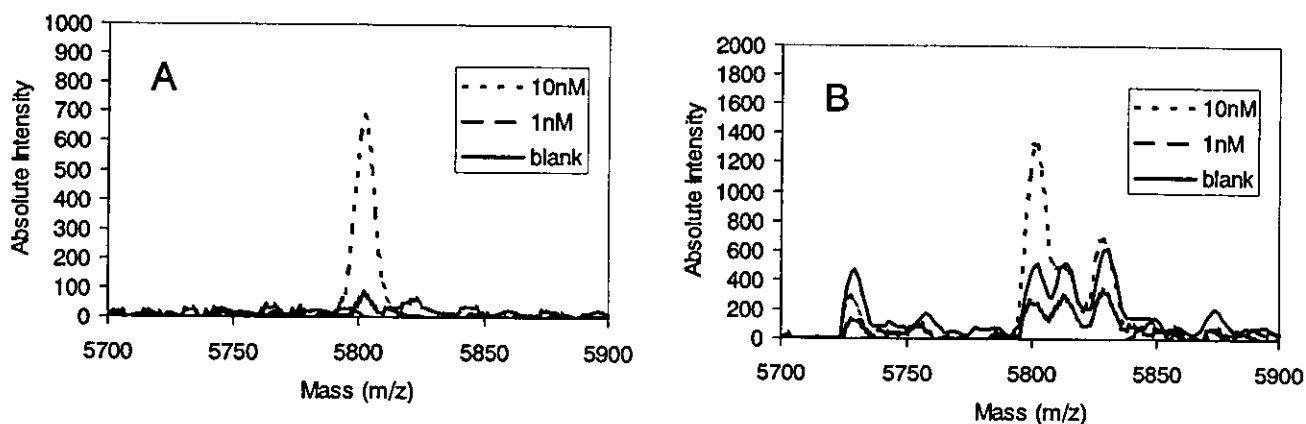
- 図1. (A) マウス由来モノクローナルまたは (B) ウサギ由来ポリクローナルの抗トランスフェリン抗体を結合した磁性マイクロ粒子で、4-64倍希釈正常ヒト血清を精製した場合における結合画分のマスペクトル



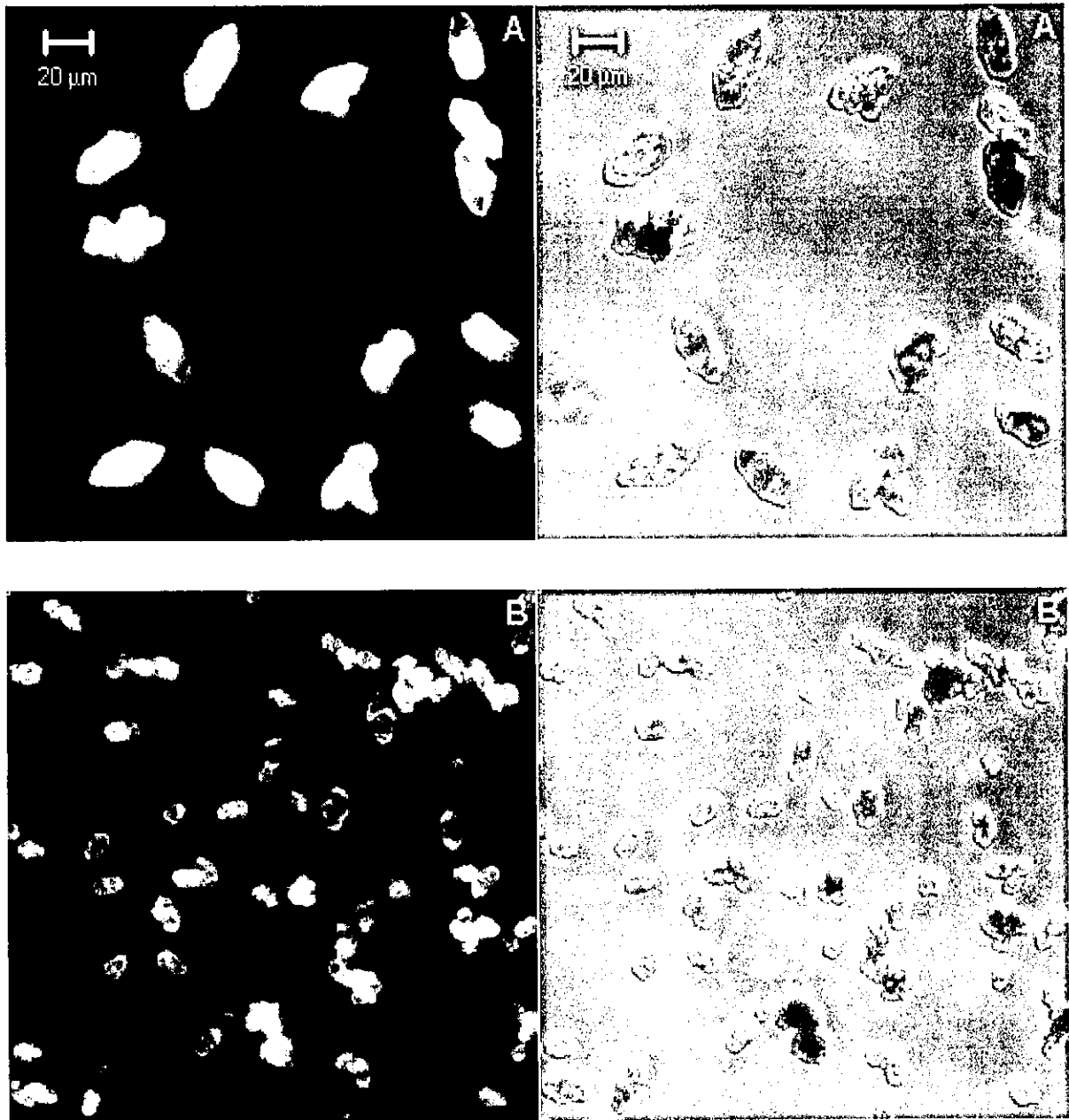
- 図2. (A) クローンBM-63または (B) GJ14の抗 β_2 ミクログロブリンモノクローナル抗体を結合した磁性マイクロ粒子で、2-8倍希釈正常ヒト血清を精製した場合における結合画分のマスペクトル



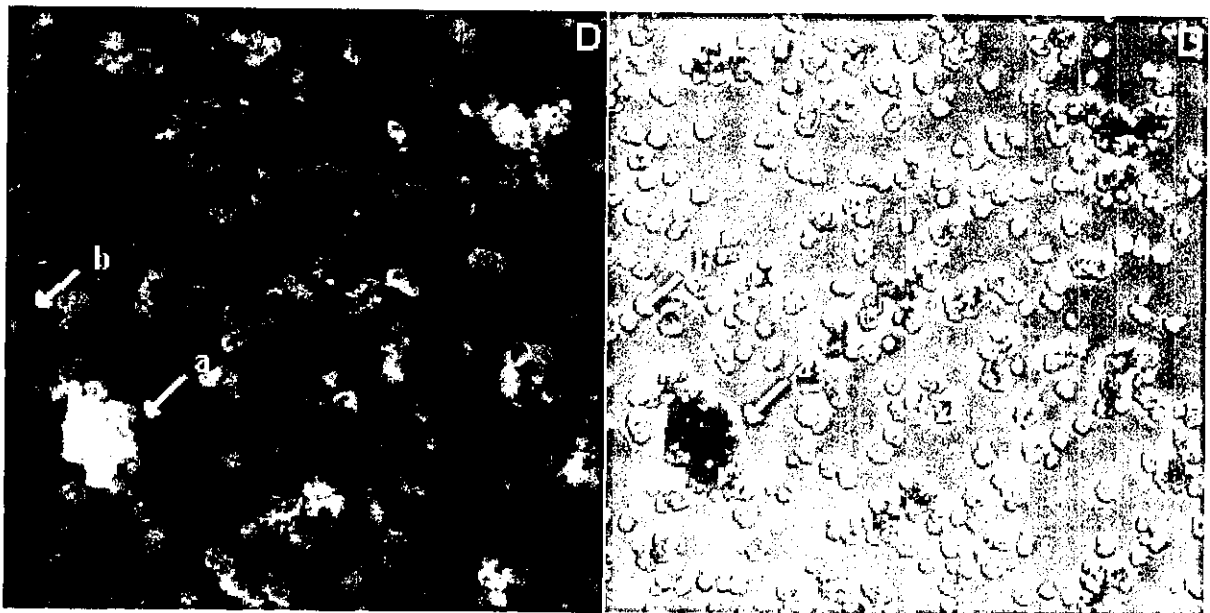
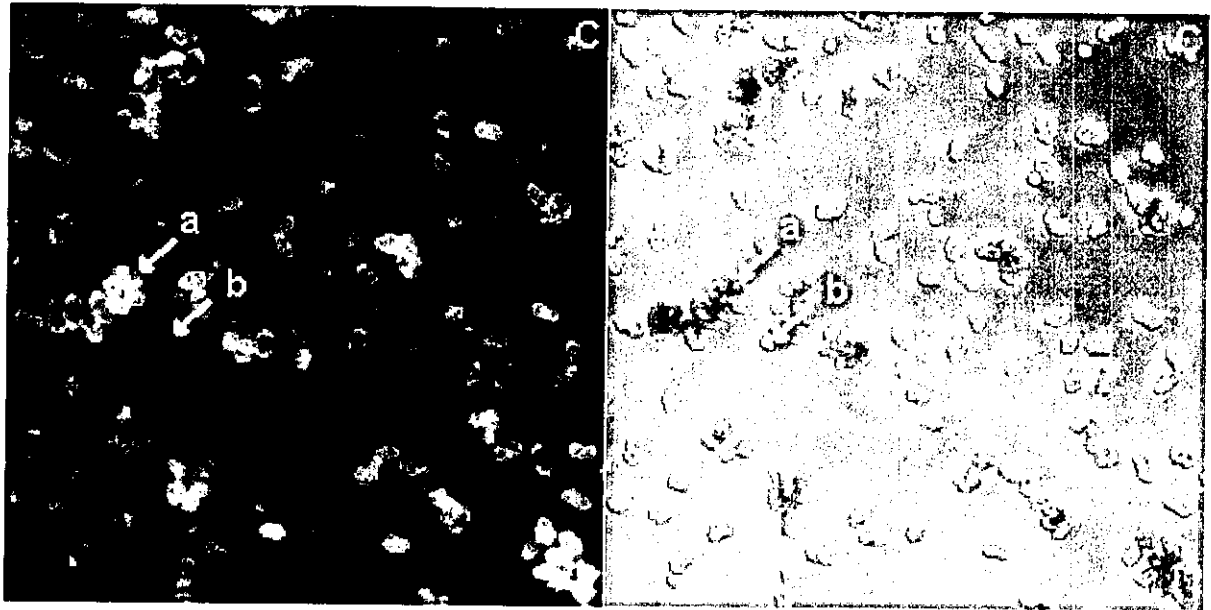
• 図3. (A) 抗リゾチン抗体または (B) 抗TGFβ₁抗体を結合した磁性マイクロ粒子で、2-8倍希釈正常ヒト血清を精製した場合における結合画分のマスペクトル



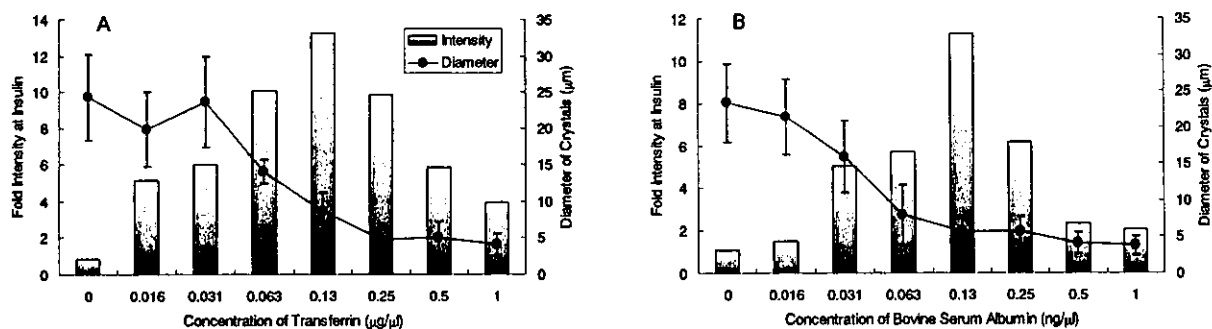
• 図4. 抗インスリン抗体を結合した (A) 熱応答性磁性ナノ粒子または (B) 磁性マイクロ粒子で、インスリン添加ヒト血清を精製した場合における結合画分のマスペクトル



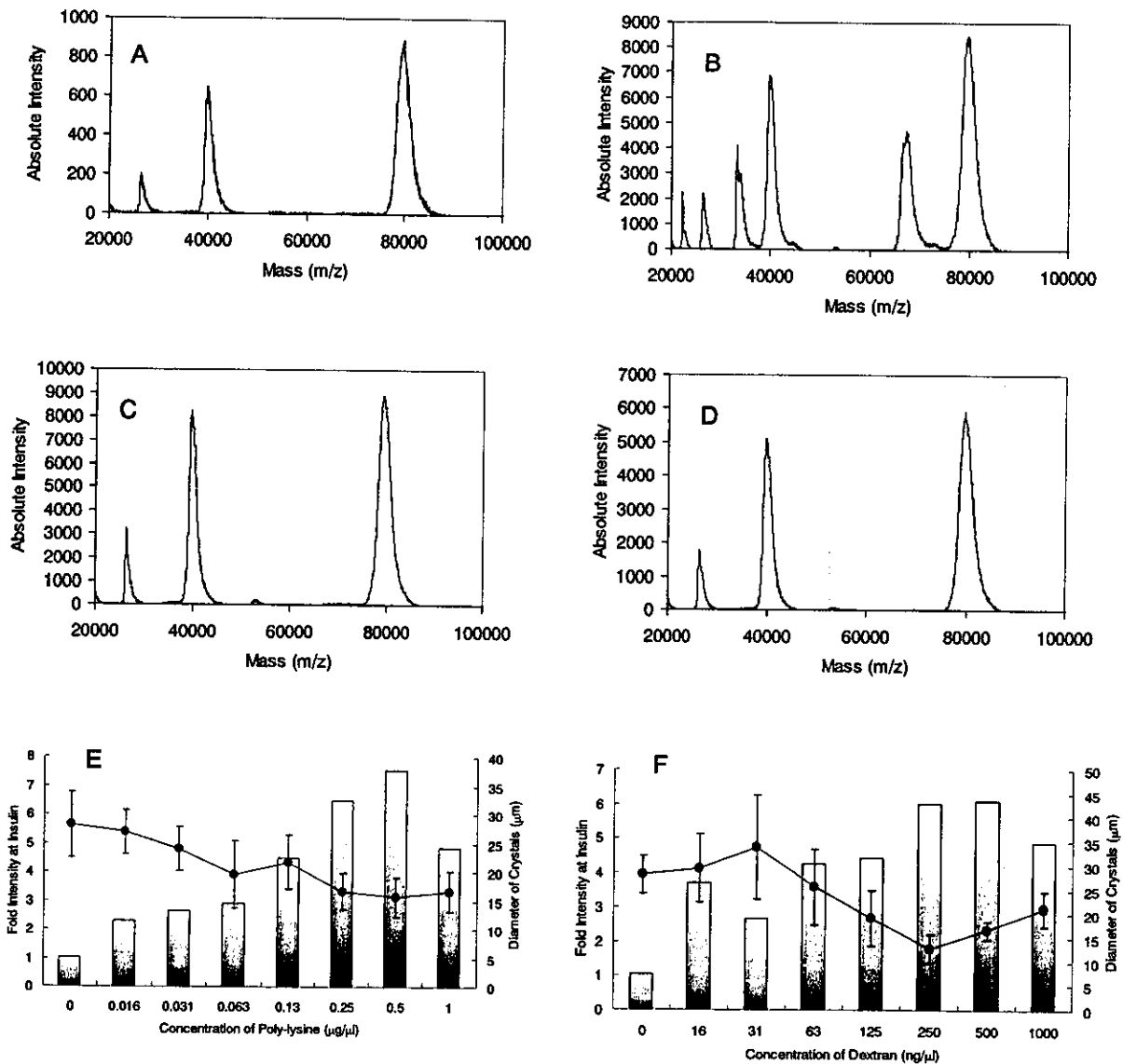
- 図5. CHCA溶液と (A) 脱イオン水、または (B、C、D) トランスフェリン溶液 (0.06, 0.13, 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) の 5:1 混合溶液から得られた結晶像
- それぞれ左側が蛍光像、右側が透化像
- (C、D) において (ア) 蛍光性の不定形塊と (イ) 非蛍光性の結晶を矢印で示した



• (図5. のつづき)



- 図6. (A) トランスフェリン添加CHCAまたは (B) BSA添加CHCAをマトリックスとした場合におけるインスリンシグナルの強度倍率と結晶径の添加物濃度に対する依存性
- 強度倍率は相当するコントロールに対するシグナル強度相対比の平均値 (N=3) 結晶径は平均値±標準偏差 (N=10)



- 図7. (A) コントロールCHCA (B) BSA添加CHCA (C) ポリリジン添加CHCA、または (D) デキストラン添加CHCA をマトリックスとした場合におけるトランスフェリンの質量分析スペクトル
- (E) ポリリジン添加CHCAまたは (F) デキストラン添加CHCA をマトリックスとした場合におけるインスリンシグナルの強度倍率と結晶径の添加物濃度に対する依存性

表1. 高分子添加CHCAマトリックスを用いたときの各種タンパク質
に由来するシグナルの強度倍率

macromolecule	[F1] +	[BSA] +	[T1] +	[IgG] 2+
poly-L-lysine (MW 500-2,000)	3.30 ± 2.09	8.75 ± 4.24	7.90 ± 3.87	1.62 ± 0.47
poly-L-lysine (MW 1,000-4,000)	6.11 ± 1.92	6.55 ± 1.03	23.00 ± 6.03	1.53 ± 0.41
poly-L-lysine (MW 4,000-15,000)	4.60 ± 3.27	11.13 ± 2.09	7.72 ± 4.97	1.13 ± 0.49
poly-L-lysine (MW 15,000-30,000)	7.62 ± 0.32	10.20 ± 1.68	7.89 ± 1.73	1.44 ± 0.33
poly-L-lysine (MW 30,000-70,000)	4.89 ± 0.83	12.41 ± 1.22	9.87 ± 4.22	2.55 ± 0.55
poly-L-lysine (MW 70,000-150,000)	7.25 ± 4.05	13.54 ± 2.13	11.08 ± 3.23	1.08 ± 0.40
poly-L-lysine (MW 150,000-300,000)	4.65 ± 0.99	10.64 ± 3.20	13.11 ± 2.97	2.47 ± 0.20
poly-L-lysine (MW >300,000)	5.15 ± 2.38	9.79 ± 0.53	6.99 ± 2.05	3.50 ± 1.68
poly-L-glutamic acid (MW 50,000-100,000)	3.62 ± 0.86	1.55 ± 0.87	5.20 ± 2.88	0.22 ± 0.13
poly-L-arginine (MW 70,000-150,000)	4.91 ± 1.80	2.90 ± 0.48	8.60 ± 2.31	0.88 ± 0.11
polyvinyl alcohol (average MW 16,000)	4.30 ± 1.38	6.03 ± 2.85	14.35 ± 2.10	1.84 ± 0.38
polyvinyl alcohol (average MW 95,000)	1.09 ± 0.62	0.70 ± 0.46	1.30 ± 1.27	0.84 ± 0.16
polyvinylpyrrolidone (average MW 40,000)	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00
polyvinylpyrrolidone (average MW 360,000)	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.00 ± 0.00
polyethylenglycol (average MW 3,350)	8.51 ± 3.76	13.33 ± 4.50	42.59 ± 19.36	4.73 ± 1.73
polyethylenglycol (average MW 8,000)	1.17 ± 0.69	3.17 ± 1.58	24.34 ± 9.77	2.82 ± 0.38
polyethylenglycol (MW 15,000-25,000)	2.73 ± 0.40	3.41 ± 1.23	13.74 ± 4.26	2.00 ± 1.09
polyethylenglycol (MW 300,000-500,000)	0.73 ± 0.36	3.38 ± 1.76	6.99 ± 1.87	1.19 ± 0.47
polyethylenglycol (MW 1,500,000-2,000,000)	0.90 ± 0.34	4.14 ± 2.28	11.21 ± 2.85	0.60 ± 0.16
polyethylenglycol (MW 3,500,000-4,000,000)	0.88 ± 0.50	5.17 ± 2.19	2.43 ± 0.51	0.19 ± 0.06
dextran (average MW 10,000)	5.27 ± 1.50	8.67 ± 1.61	11.45 ± 4.41	1.12 ± 0.15
dextran (average MW 40,000)	2.66 ± 1.18	16.25 ± 4.60	11.87 ± 3.34	1.33 ± 0.25
dextran (average MW 70,000)	5.01 ± 0.91	10.75 ± 2.65	13.08 ± 4.85	1.53 ± 0.22
dextran (average MW 200,000)	9.89 ± 4.03	12.98 ± 4.05	17.27 ± 2.38	0.98 ± 0.36
dextran (average MW 500,000)	2.93 ± 0.73	11.73 ± 1.26	16.37 ± 1.73	0.79 ± 0.24
dextran (average MW 20,000,000)	11.24 ± 3.84	19.32 ± 8.11	5.43 ± 0.93	1.14 ± 0.14

Each entry is the average of the most intense signal from three samples. nd: not determined.

表2. 高分子添加CHCAを用いたときのペプチドタンパク質混合試料
に由来するシグナルの強度倍率

macromolecule	[ACTH 18-39] +	[insulin] +	[cytochrome C] +	[apomyoglobin] +
poly-L-lysine (MW 4,000-15,000)	1.76 ± 0.30	0.97 ± 0.05	12.89 ± 5.76	3.84 ± 0.58
poly-L-lysine (MW 15,000-30,000)	1.62 ± 0.21	1.98 ± 0.87	38.16 ± 18.19	27.50 ± 14.02
poly-L-lysine (MW 30,000-70,000)	1.49 ± 0.27	1.15 ± 0.38	20.26 ± 7.30	4.75 ± 1.72
poly-L-lysine (MW 70,000-150,000)	1.83 ± 0.09	4.29 ± 1.03	33.40 ± 6.55	15.58 ± 6.35
poly-L-lysine (MW 150,000-300,000)	2.25 ± 0.25	3.74 ± 0.30	15.21 ± 3.81	2.56 ± 0.76
poly-L-lysine (MW >300,000)	1.49 ± 0.16	5.14 ± 0.63	19.07 ± 8.49	9.33 ± 6.13
poly-L-glutamic acid (MW 50,000-100,000)	1.49 ± 0.74	2.77 ± 1.01	1.50 ± 0.48	9.05 ± 1.73
poly-L-arginine (MW 70,000-150,000)	0.68 ± 0.33	9.65 ± 3.42	7.07 ± 2.98	11.78 ± 7.14
polyvinyl alcohol (average MW 16,000)	0.87 ± 0.30	1.57 ± 0.24	0.60 ± 0.31	0.31 ± 0.22
polyvinyl alcohol (average MW 95,000)	0.57 ± 0.36	0.47 ± 0.14	0.93 ± 0.65	0.62 ± 0.39
polyethylenglycol (average MW 3,350)	0.64 ± 0.09	1.25 ± 0.35	1.92 ± 1.02	2.04 ± 0.96
polyethylenglycol (average MW 8,000)	0.23 ± 0.02	1.06 ± 0.17	0.73 ± 0.34	1.18 ± 0.46
polyethylenglycol (MW 15,000-25,000)	0.14 ± 0.05	1.30 ± 0.64	1.37 ± 0.54	1.32 ± 0.38
polyethylenglycol (MW 300,000-500,000)	0.07 ± 0.04	1.11 ± 0.56	1.94 ± 0.98	1.06 ± 0.23
polyethylenglycol (MW 1,500,000-2,000,000)	0.24 ± 0.14	1.60 ± 0.71	1.44 ± 0.46	1.20 ± 0.57
polyethylenglycol (MW 3,500,000-4,000,000)	0.12 ± 0.10	1.62 ± 0.74	2.35 ± 1.30	1.34 ± 0.71
dextran (average MW 10,000)	0.80 ± 0.12	2.13 ± 0.91	13.79 ± 5.48	2.50 ± 0.67
dextran (average MW 40,000)	1.27 ± 0.24	3.36 ± 0.88	5.81 ± 2.61	1.40 ± 0.43
dextran (average MW 70,000)	1.24 ± 0.13	3.49 ± 0.64	10.75 ± 4.01	2.82 ± 0.88
dextran (average MW 200,000)	1.05 ± 0.21	5.32 ± 0.79	12.66 ± 3.29	3.68 ± 1.61
dextran (average MW 500,000)	0.86 ± 0.12	7.50 ± 1.03	17.30 ± 3.13	11.21 ± 2.02
dextran (average MW 20,000,000)	0.87 ± 0.25	12.23 ± 3.69	20.38 ± 7.31	5.44 ± 1.99

Each entry is the average of the most intense signal from three samples. nd: not determined.