

Fig. 2 MR imaging result of an opened porcine aorta strip stained with 10 mM aqueous EB-DTPA-Gd solution. (a) Schematic illustration of the blood vessel sample. (b) Photograph of the blood vessel stained with EB-DTPA-Gd. (c) and (d) MR images of the surface of the inner wall and the cross section of the blood vessel sample, respectively, of the sample (TR/TE = 400/14 ms). The signal intensity profile is also shown in (d).

desired product was obtained as a pale-yellow solid (1.91 g, 43%). The chemical structure was determined with $^1\text{H-NMR}$ and elemental analysis.

Synthesis of 2,2'-dimethylbenzidine-DTPA (DMB-DTPA)

N-tert.butoxycarbonyl-2,2'-dimethylbenzidine (0.281 g, 0.899 mmol) and DTPA anhydride (0.481 g, 1.35 mmol) were dissolved in dry DMSO (15 ml). The mixture was stirred at 40°C. After 3 h, the reaction mixture was poured into cold water (500 ml). The precipitate was collected by filtration. The collected solid was put into water (2.8 ml), and the pH of the suspension was then adjusted to 7 with sodium carbonate. After neutralization, the solid was dissolved completely and then purified by ODS column chromatography using water-acetonitrile (3:1). The desired fraction was collected and then freeze-dried. The obtained solid was redissolved in TFA (5 ml), followed by stirring at r.t. for 1 h. This solution was poured into cold ether. The deposited solid was collected by filtration and dried under reduced pressure to obtain a colorless solid (0.133 g, 14%). The chemical structure was characterized as TFA salts (DMB-DTPA-4TFA) by $^1\text{H-NMR}$ and elemental analysis.

Synthesis of EB-DTPA

All reactions were performed in an ice bath. DMB-DTPA-4TFA (51.1 mg, 49.0 μmol) was dissolved in water (1 ml) containing HCl (147 μmol). Sodium nitrite (3.38 mg, 49.0 μmol) was then added in small portions, followed by stirring for 20 min. A diazonium salt solution was added dropwise into 1 ml of an aqueous 1-amino-8-naphtol-2,4-disulfonic acid (16.7 mg, 49.9 μmol) solution containing sodium bicarbonate (16.5 mg, 196 μmol), and then stirred for 3 h. The reaction mixture was lyophilized. The concentrate was redissolved in water (1 ml), and the desired product was precipitated by conc. hydrochloric acid (36.5 mg, 81%). The precipitate was collected and dried under reduced pressure. The chemical structure was determined by $^1\text{H-NMR}$ and elemental analysis.

MRI experimental procedure

An aqueous MRI contrast agent solution was prepared as follows. EB-DTPA was dissolved in deionized water to be 1 - 15 mM, and a 1 M aqueous gadolinium chloride solution containing equimolar gadolinium ion to EB-DTPA was added.

The pH of the solution was adjusted to 7 with a 1 M aqueous sodium hydroxide solution.

An extracted porcine aorta was opened to a flat sheet. The endothelium in the left-half area from the center axis was then removed with a scalpel, while the right-half area was allowed to remain intact (Fig. 2a). The aorta section was dipped with the MRI contrast agent solution for 10 s, and then washed with saline. The aorta section was evaluated by MR Imaging (1.5T MAGNETOM VISION system (SIEMENS, Germany), T1-weighted Spin Echo, TR/TE=400/14 ms, 3 mm slice thickness, field-of-view 50 mm and dot matrix 128*256). The obtained MRI image was analyzed with the NIH image.

Results and Discussion

The MRI contrast agent was successfully obtained as a pure compound by the preparation protocol described in the experimental section. We therefore investigated whether the molecule selectively bound to an endothelium-broken site in a blood-vessel sample.

A photograph of the porcine aorta stained with 10 mM aqueous MRI contrast agent, EB-DTPA-Gd, is shown in Fig. 2b. Although a slight nonspecific binding of the agent was observed in the intact endothelium region, a clear accumulation of the synthesized contrast agent was observed in the endothelium-removed region. Figure 2c shows an MRI image, giving a top view. The endothelium-intact area and the damaged area can be distinguished by T1-weighted MR imaging. Figure 2d shows an MRI image of the same aorta section, but a side view, and a histogram of the MR signal intensity on the inner-surface region of the aorta section. The stained section shows that the MRI signal enhancement can only be seen in the inner-surface area of the aorta wall, which means that EB-DTPA-Gd did not permeate the tissue from the endothelium barrier-injured site. This result is quite important because the MR imaging agent for blood vessels should be excreted rapidly after the MR image is taken; otherwise, an undesired effect might result. In the localization of the agent at the surface area, the polar group in the Evans Blue-related structure may be requisite. Actually, the MR-signal using DMB-DTPA-Gd, which lacked the 2,4-disulfonyl-1-amino-8-naphtol unit from EB-DTPA-Gd, was seen even in the smooth

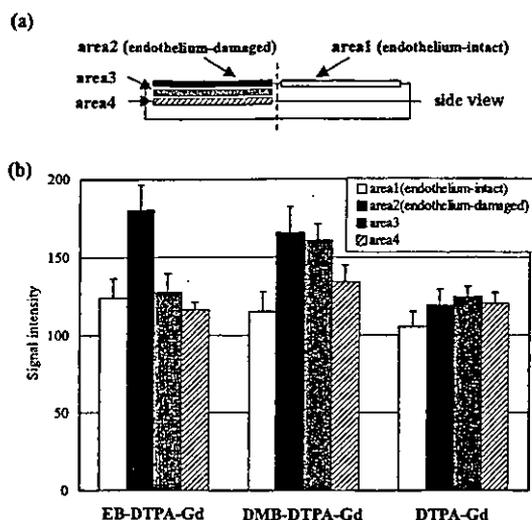


Fig. 3 Structural effects of the tissue absorption in the DTPA-type MRI contrast agents (10 mM). (a) Schematic illustration of the aorta section in the side view. (b) MRI signal was measured from four areas indicated by area 1 - 4 in the figure, separately. The error bars represent the standard deviation.

muscle layer of the aorta strip due to infiltration of the compound (Fig. 3b). In contrast, an ordinary MRI-contrast agent, DTPA-Gd, which had no hydrophobic unit, did not adsorb on the inner surface of the aorta sample. These results indicate that the endothelium lesion-selective contrast agent should have a chemical structure that is hydrophobic, but that at the same time has some hydrophilic groups.

For the next experiment, the concentration dependency of the MRI signal of the EB-DTPA-Gd of endothelium lesion was evaluated to determine the minimal dose. First, the contrast agent was evaluated (Fig. 4). The MRI signal intensity was gradually increased in the endothelium-damaged area along with increases in the EB-DTPA-Gd concentrations. In contrast, the MRI signals of the endothelium-intact area were found to be independent of the agent concentrations. The increment of the signal intensity was nearly saturated at agent concentrations of 10 mM on the lesional area. Thus, we determined that 10 mM is sufficient to detect the target area. The signal increment when using of 10 mM EB-DTPA-Gd was nearly 1.5-times that of the intact area.

Endothelium lesions often cause vascular diseases. For the diagnosis of such an endothelium-damaged site, we tried to design an MRI-contrast agent that can bind to such a vascular injury site.

After a wide range of screening, we finally found some organic azo-dyes that could potentially be used as a probing unit for endothelium lesions, and Evans Blue was found to be the best candidate among these dyes. Thus, we designed a new MRI contrast agent, EB-DTPA-Gd, having an Evans Blue-related structure. Newly synthesized EB-DTPA-Gd showed endothelium lesion-specific adsorption in an *in vitro*

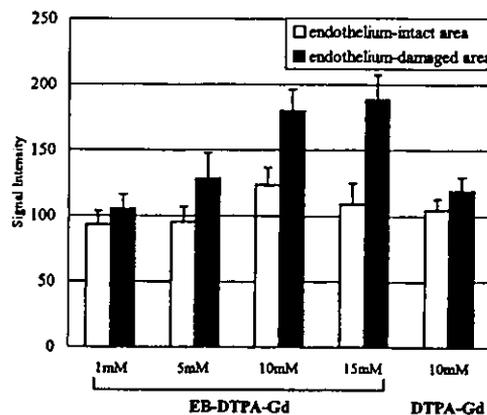


Fig. 4 Dose dependence of the MRI-signal in the endothelium lesion and the intact region using EB-DTPA-Gd or DTPA-Gd. The error bars represent the standard deviation.

experiment. The reagent was also able to detect the lesional site using T1-weighted MR-imaging. This compound would potentially be able to be used as an MR imaging probe to detect vascular damage. We are now investigating the use of this compound in *ex vivo* and *in vivo* trials. These results will be reported in due course.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan and also from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.

References

1. R. Ross, *Nature*, **1993**, *362*, 801.
2. X. Yu, S. K. Song, J. Chen, M. J. Scott, R. J. Fuhrhop, C. S. Hall, P. J. Gaffney, S. A. Wickline, and G. M. Lanza, *Magn. Reson. Med.*, **2000**, *44*, 867.
3. H. Maaheimo, R. Renkonen, J. Turunen, L. Penttila, and O. Renkonen, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, *234*, 616.
4. M. Lewin, N. Carlesso, C. H. Tung, X. W. Tang, D. Cory, D. T. Scadden, and R. Weissleder, *Nature Biotech.*, **2000**, *18*, 410.
5. H. R. Wabinga, *East Afr. Med. J.*, **1996**, *73*, S19.
6. J. R. Woods, Jr. and H. Maibach, *Obstet. Gynecol.*, **1979**, *53*, 602.
7. N. A. Dezutter, R. M. Sciote, T. J. de Groot, G. M. Bormans, and A. M. Verbruggen, *Nucl. Med. Commun.*, **2001**, *22*, 553.
8. B. C. Christensen, J. Chemnitz, and I. Tkocz, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.: A*, **1976**, *84*, 355.
9. S. Citi, *J. Cell. Biol.*, **1993**, *121*, 485.



Mass-tag technology for monitoring of protein kinase activity using mass spectrometry

Tatsuhiko Sonoda,^a Syuhei Shigaki,^a Takeyuki Nagashima,^b Osamu Okitsu,^b Yasuhiro Kita,^b Masaharu Murata^a and Yoshiki Katayama^{a,*}

^aDepartment of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

^bAdvanced Technology Platform Laboratory, Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd, 2-3 Tokodai, Tsukuba 300-2698, Japan

Received 7 October 2003; revised 27 November 2003; accepted 4 December 2003

Abstract—Monitoring of intracellular protein kinase activity is very important for fields involving diagnosis and drug screening. However, current methods, such as radiometry using ³²P, or ELISA, are laborious and time-consuming. We have developed high-throughput assay system of protein kinase activity using mass-tagged substrate peptide probes and mass spectrometry. This assay system can easily evaluate target kinase activity and will potentially be able to simultaneously profile many protein kinase activities. © 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Cells possess an intracellular signal transduction system with which they can precisely respond to their outer environment. The system consists of many chemical reaction cascades, and many proteins are associated with these reactions. Intracellular signals are primarily transduced by protein activation (or inactivation) caused by the conformation changes in proteins. Protein phosphorylation is one of the most versatile reactions in cells that can cause protein-conformational change. This reaction is catalyzed by protein kinases and controls various cellular functions, including gene expression,¹ cellular proliferation,² and cell death.³ Therefore, if the enzymatic activity of a protein kinase rises abnormally, this rise can be directly related to various diseases.^{4–6} It will therefore be useful to develop an assay system for protein kinases activities in cellular samples for fields involving diagnosis, evaluation of gene-functions, and drug development. Radiometry⁷ using ³²P, or ELISA^{8–10} well known as such an assay system. Although these assays are quite sensitive, they are laborious and time-consuming. Therefore, the development of high-throughput assay systems is required to profile all the protein kinase activity of many samples.

Keywords: Protein kinases; Protein phosphorylation; High-throughput screening; Mass spectrometry.

* Corresponding author. Tel.: +81-926-424-206; fax: +81-926-423-606; e-mail: ykataicm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

We report herein the use of a mass-tag strategy in an assay system for protein kinase activity using mass spectrometry. Figure 1(a) shows the basic concept of this detection system. Two cellular samples representing two different states are homogenated, respectively, and two types of peptide probes are separately added to each cell lysate. These probes possess the same substrate peptide sequences for the target protein kinase, while one of these peptide probes is isotopically heavier than the other due to the incorporation of deuterium into acetyl groups in the peptide probe. Therefore, two peptides can be distinguished in the mass spectrum. The *m/z* values of these probes increase by +80 with phosphorylation by the target protein kinase, so that protein kinase activities between different cellular states can be compared directly by calculating the phosphorylated ratio in each probe using the peak intensity in the mass spectrum after the both probe solutions were combined.

According to this concept, the peptide probes, PKA-H₆ and PKA-D₆, which possessed the substrate sequence of protein kinase A (PKA) and the His-Tag sequence, R₂-KHHHHHGLRRASLKC-NH₂ (R=CH₃CO- or CD₃CO-), were designed and synthesized. In these probes, two normal acetyl groups or deuterated acetyl groups were incorporated into the lysine residue at the amino-terminus. Thus, the difference between the mass numbers of these probes is 6. We chose protein kinase A

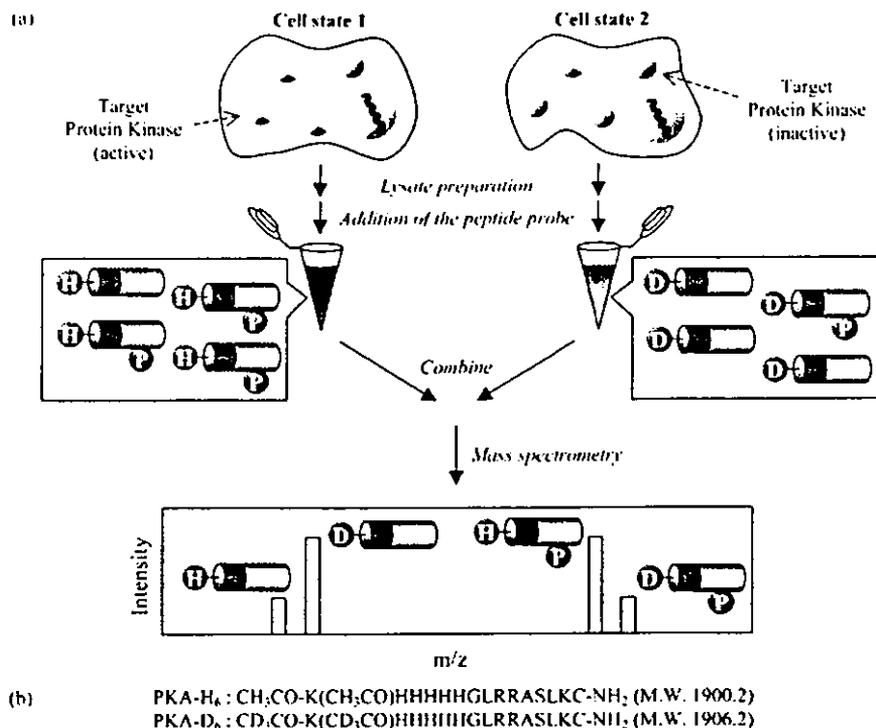


Figure 1. (a) Schematic outline of the protein kinase activity assay system using mass spectrometry. (b) Amino acid sequences of PKA substrate peptide probes.

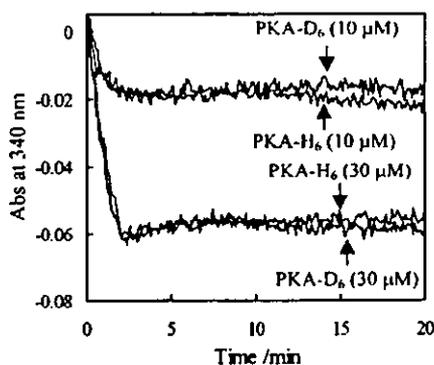


Figure 2. The time-dependent decrease in the absorbance at 340 nm based on the oxidation of NADH, which was led by the phosphorylation of the peptide probes by PKA in the coupled enzyme assay. The experiment was performed with 10 or 30 μM of each peptide probe in PBS(-) (pH 7.2) containing 0.2 mM ATP, 10 mM MgCl_2 , 1 mM phosphoenolpyruvate, 0.3 mM NADH, 12 units of lactate dehydrogenase, 4 units of pyruvate kinase, and 60 units of PKA C-subunit at 24°C.

(PKA) as the first target protein kinase because the enzyme is one of the most important protein kinases and controls many cellular functions such as gene expression,¹¹ hormone secretion,¹² and cell differentiation.¹³ Meanwhile, the His-Tag sequence was introduced in peptide probes to purify them from the cell lysate in case pre-purification of the probes was required. Acetylated peptide probes were synthesized with automatic peptide synthesizer by Fmoc chemistry using corresponding Fmoc-amino acids and Fmoc-Lys(Fmoc)-OH as the N-terminal amino acid [Fig. 1(b)]. In the case of deuterated peptide synthesis, acetic

anhydride-*d*₆ was used as the N-terminal acetylation reagent.

We first investigated whether deuterium labeling of the peptide influenced the kinetics of phosphorylation with PKA. The phosphorylation of these probes was monitored spectrophotometrically with a coupled enzyme assay reported by Cook et al.¹⁴ In this assay, the production of ADP, which is derived from ATP as a byproduct of the phosphorylation, finally brings about an oxidation of NADH using pyruvate kinase and lactate dehydrogenase. The phosphorylation can therefore be monitored as the decrease in absorbance at 340 nm. As shown in Figure 2, the profile of the absorbance-decrease accompanying phosphorylation of the heavy probe (PKA-D₆) showed good agreement with that of the light probe (PKA-H₆), meaning that neither of the peptides differed in their ability to function as a substrate to PKA.

For the next experiment, we examined whether the mass spectra arising from both the peptide probes could be differentiated from each other. Phosphorylated or non-phosphorylated peptide probe solution was prepared separately and mixed together, then analyzed by MALDI-TOF MS. As a result, four peaks were distinctly observed. The following experiment was then performed to confirm that the phosphorylation processes of the peptide probes could be monitored by mass spectrometry. Two sample solutions of PBS(-) containing 4 U/mL PKA, 0.2 mM ATP, and 10 mM MgCl_2 were prepared. PKA-H₆ and PKA-D₆ were added separately to each sample to a final concentration of 2

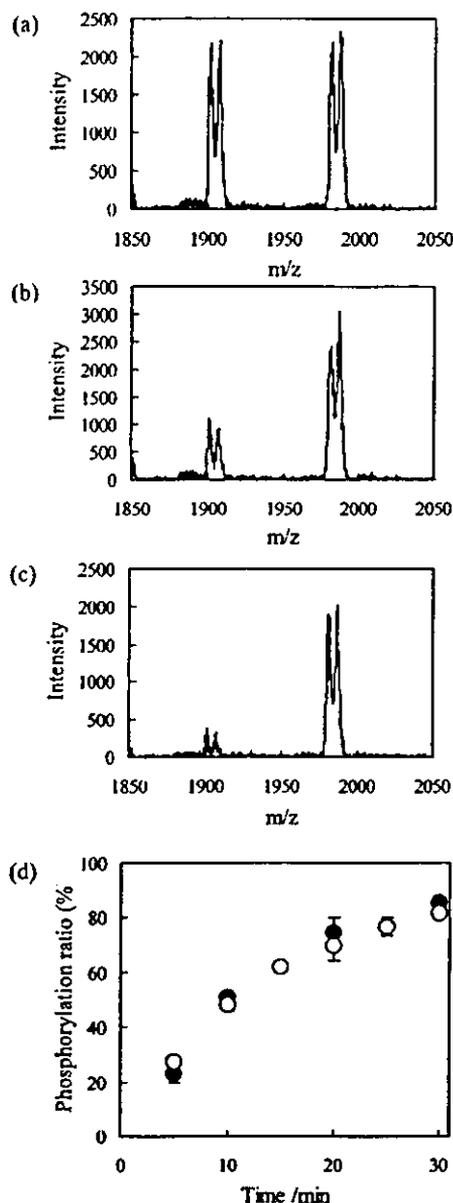


Figure 3. Mass spectra (a) 10 min, (b) 20 min, and (c) 30 min after adding the PKA C-subunit. (d) The time-dependent increase in the phosphorylation ratio calculated from the intensities of the mass peaks (open circle: PKA-H₆, closed circle: PKA-D₆).

μM , and the sample was then incubated at 37°C . Next, $1\ \mu\text{L}$ of each probe solution was taken in every 5 min after addition of the peptide probe, and the two solutions were combined, followed by analysis with MALDI-TOF MS. Figure 3 shows the typical mass spectra and time-dependence of the phosphorylation ratio calculated from the intensities of these mass peaks. The intensities of the mass peaks arising from nonphosphorylated probes (m/z : 1900.99 for PKA-H₆ and 1906.03 for PKA-D₆) gradually decreased with the reaction time, and those from phosphorylated probes (m/z : 1980.43 and 1986.44 for PKA-H₆ and PKA-D₆, respectively) increased at the same time. The time course of the phosphorylations showed good coincidence in the

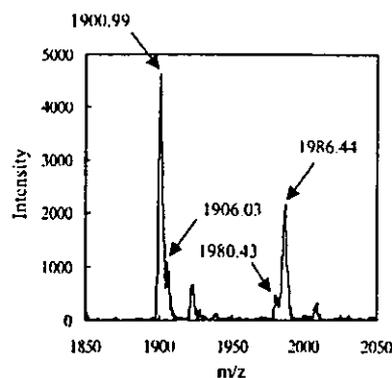


Figure 4. The mass spectrum from the mixture of two samples that contained different PKA activities. The concentration of PKA in PKA-H₆ and PKA-D₆ solutions were 30 U and 6 U, respectively. Each solution was combined to measure MALDI-TOF MS, after 3 h incubation at 37°C .

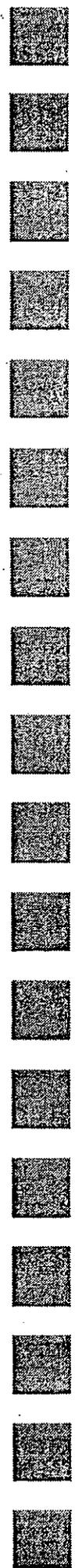
two probes. These results suggested that the phosphorylation processes with PKA could be evaluated by the assay system using mass spectrometry.

For the last experiment, we investigated whether the difference in the PKA activities of the two samples, which contained different amounts of activated PKA, could be evaluated using this assay system. Thus, PKA-H₆ or PKA-D₆ (each $100\ \mu\text{M}$ at a final concentration) was added to the PBS(-) containing $0.2\ \text{mM}$ ATP and $10\ \text{mM}$ MgCl_2 and activated PKA. The PKA activity in each probe solution was $6\ \text{U/mL}$ and $30\ \text{U/mL}$ for PKA-H₆ and PKA-D₆, respectively. After incubating for 3 h at 37°C , these solutions were combined and analyzed by MALDI-TOF MS. The obtained mass spectrum (Fig. 4) shows that PKA-D₆, which was added to the sample with higher PKA activity, was more phosphorylated than the PKA-H₆. The peak height of the nonphosphorylated PKA-H₆ was nearly 5 times higher than that of nonphosphorylated PKA-D₆. On the other hand, the peak height of phosphorylated PKA-D₆ was approximately 5 times higher. These results reflect the differences in PKA activity between the two sample solutions quite well. Thus, this assay system was found to be potentially useful for evaluating PKA activity.

We are now attempting to apply this system to the measurement of PKA activity in cellular lysates. Moreover, the mass-tag strategy reported here can easily be applied to the probe peptides for monitoring other protein kinase activities. In this assay system, dozens of peptide probes can be detected simultaneously if each probe is designed to have a distinct mass number. As such, this system will potentially be able to simultaneously profile many protein kinase activities.

References and notes

1. Treisman, R. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 205.
2. Kato, Y.; Tapping, R. I.; Huang, S.; Watson, M. H.; Ulevitch, R. J.; Lee, J. D. *Nature* **1998**, *395*, 713.
3. Hartmann, A.; Hunot, S.; Michel, P. P.; Muriel, M. P.; Vyas, S.; Faucheux, B. A.; Mouatt-Prigent, A.; Turmel, H.; Srinivasa, A.; Ruberg, M.; Evan, G. I.; Agid, Y.; Hirsch, E. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 2875.
4. Kim, S. H.; Forman, A. P.; Mathews, M. B.; Gunnery, S. *Oncogene* **2000**, *19*, 3086.
5. Nabel, G. J.; Nabel, E. G.; Yang, Z. Y.; Fox, B. A.; Plautz, G. E.; Gao, X.; Huang, L.; Shu, S.; Gordon, D.; Chang, A. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 11307.
6. Page, C.; Huang, M.; Jin, X.; Cho, K.; Lilja, J.; Reynolds, R. K.; Lin, J. *J. Oncol.* **2000**, *17*, 23.
7. Chinery, R.; Brockman, J. A.; Dransfield, D. T.; Coffey, R. J. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30356.
8. Tamaskovic, R.; Forrer, P.; Jaussi, R. *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 569.
9. Lehel, C.; Daniel-Issakani, S.; Brasseur, M.; Strulovici, B. *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 340.
10. Ross, H.; Armstrong, C. G.; Cohen, P. *Biochem. J.* **2002**, *366*, 977.
11. Montminy, M. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 807.
12. McCusker, R. H.; Clemmons, D. R. *J. Cell. Physiol.* **1998**, *174*, 293.
13. Bertolotto, C.; Abbe, P.; Hemesath, T. J.; Bille, K.; Ficher, D. E.; Ortonne, J. P.; Ballotti, R. *J. Cell Biol.* **1998**, *142*, 827.
14. Cook, P. F.; Neville, M. E.; Vrana, K. E.; Hartl, F. T.; Roskoski, R. *Biochemistry* **1982**, *21*, 5794.



Bio Medical Quick Review Net

No. 4009

血管内皮障害部位を特異的に診断できる造影剤

片山 佳樹¹・山本 竜広²・下川 宏明³

九州大学工学研究院応用化学部門 教授¹

九州大学大学院工学研究科²

九州大学医学研究院循環器内科 助教授³



株式会社メディカル ドウ

Medical Do Co., Ltd.

本Reviewの内容を無断で複製、転載すると、著作権、出版権侵害となる場合がありますのでご注意ください。

血管内皮障害部位を特異的に診断できる造影剤

片山 佳樹¹・山本 竜広²・下川 宏明³

九州大学工学研究院応用化学部門 教授¹

九州大学大学院工学研究科²

九州大学医学研究院循環器内科 助教授³

動脈硬化やバルーン療法後に引き起こされる血管炎症部位は、循環器系疾患の原因部位である。これまで、このような部位を特異的に診断できる有効な手法は存在しなかった。われわれは、このような病変部位が炎症性に内皮が傷害されていることに着目し、色素分子を利用することで、安価でかつ高性能に当該部位に吸着し、MRI法により画像診断できる新しい造影剤を開発した。本造影剤は、摘出血管およびラット体内において内皮障害モデル部位に特異的に吸着し、検出することが可能であった。

Key
Words

核磁気共鳴イメージング, MRI, 血管造影剤, 有機色素,
動脈硬化, 循環器系疾患, ガドリニウム錯体, 臨床診断, プラーク

はじめに

社会の高齢化が進み、動脈硬化を起因とする循環器系疾患は、今後ますます重要な診断・治療対象になると考えられる。血管の攣縮は血管のある部分が過収縮を起こして血流を妨げる現象であるが、血管のどの部分でも起こりうるというのではなく、動脈硬化が促進することにより血管壁に進入したマクロファージなどが原因で起こる炎症部分で特異的に発症する。従って、このような炎症部位をあらかじめ

診断できれば、発作を起こす前に治療が可能となる。しかしながら、現在そのような実用的診断法はなく、発作後に血管を造影して攣縮箇所を診断するしかないのが現状である。また、血管が閉塞した箇所は、カテーテルを挿入してバルーン処置などにより血管を拡張させるが、その際、血管内面を傷害してしまい、これが炎症や内皮肥厚の原因となる。そこで、われわれは最近、このような血管障害部位を特異的に造影できるMRI血管造影剤の開発を進めており、簡単なモデルではあるが、良い性能を有して

Yoshiki Katayama, Tatsuhiko Yamamoto, Hiroaki Shimokawa
Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu University, Professor¹
Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Associate Professor²
MRI contrast agent that can recognize endothelium lesion
E-mail: ykatatcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

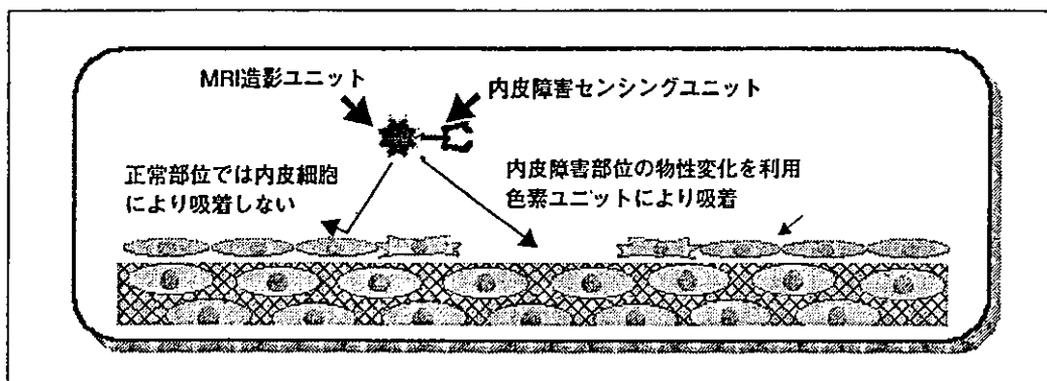


図1 内皮障害部位認識型MRI造影剤の概念

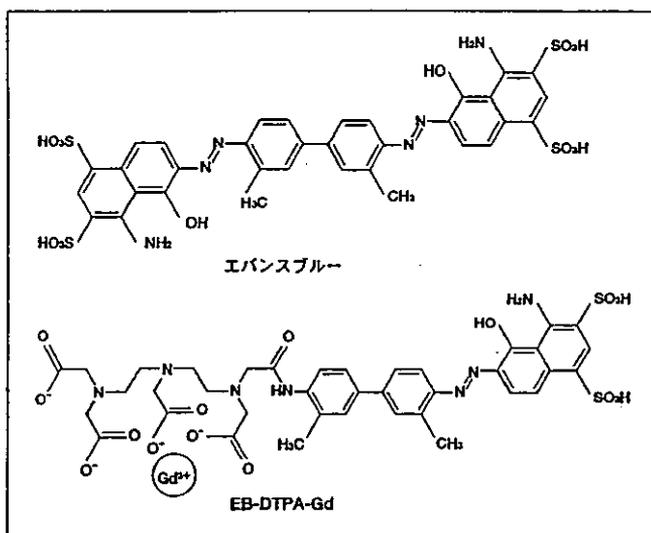


図2 エバンスブルーと新規造影剤 (EB-DTPA-Gd) の構造

いることを見出している。ここでは、その造影剤に関する設計と性能に関してご紹介する。

I. 血管障害部位特異的造影剤の設計

ここで開発したのはMRI造影剤である。MRIは、各組織周囲の水分子の磁気による緩和現象の差を利用して組織をイメージングする手法である。体内において特定箇所を特異的にMRI造影する試みは、血管新生部位の造影として抗インテグリン抗体を連結したもの²⁾、脳炎症部位に対して抗ICAM抗体を連結したもの³⁾など種々の造影剤が報告されている。一方、血管障害部位を造影するためには、当該箇所を何らかの方法で認識しなくてはならない。例えば血栓を画像化するために抗フィブリン抗体やRGDペプチドを結合したものや^{3,4)}、MRI測定条件の設

定によりブランクを可視化する試みなどが報告されている⁵⁾。

ここで標的とするブランクや内皮障害部位は炎症箇所であるから、当然、E-セレクトリンなどの標的分子に対する抗体や糖、ペプチドなどの結合分子を用いるのが通常の見方である。しかしながら、例えば冠状動脈などでは非常に大きな血流量を有し、用いる造影剤は極めて大量に必要であるため、このような高価な生体分子を用いることは実用的観点からは困難である。また、実際に大量の血流にさらされた場合、その結合力あるいは結合速度が十分でなく、一度クランプにより血流を停止させて造影剤を結合させるという手法がとられる場合も多い。一方、血管が攣縮を起こす炎症箇所やバルーン障害箇所では、血管内面を覆う内皮細胞が傷害を受けており、これに伴う血管内面のマクロな物性変化を指標とすれば、新たな認識戦略が考えられる(図1)。

この発想に基づき、われわれは単離したブタ大動脈片を展開し、その半分の領域の内皮細胞を物理的に傷害した系を用い、組織染色などで用いられる種々の有機色素をスクリーニングした。その結果、いくつかの構造を有するアゾ系の色素が、内皮が傷害された部位にのみ吸着し、正常内皮部位には吸着しないことを見出した。これらの色素のなかで、最もその性能に優れていたエバンスブルーを元に、図2のようなMRI造影剤(EB-DTPA-Gd)を設計した。この分子は、エバンスブルー類似骨格とMRI造影ユニットであるDTPA-Gd錯体を有している⁶⁾。



図3 摘出血管サンプルでの内皮剥離部位の造影結果

II. Gd錯体によるMRイメージングの原理

ガドリニウムイオンはランタノイド系列に属し、核磁気共鳴測定時において周辺部の水分子プロトンに対し強力な緩和促進作用を有する。従って、当該イオンの存在箇所においては緩和時間が減少する。この緩和作用は、T1（縦緩和）に顕著に現れるため、これを画像化するのがMRI法におけるT1強調画像である。ガドリニウムイオンは、生体内においてカルシウムイオンなどと似た挙動を示すため、毒性を有する。DTPAは、強力なキレート剤であり、極めて強力にガドリニウムイオンを結合するため、その毒性は抑えられ、臨床試験でも安全性は確認されている。

III. 血管片を用いた内皮障害部位の検出

合成したEB-DTPA-Gdを用いて、まず単離血管片を用いての内皮障害部位への造影剤の吸着を検討した。まず、ブタ大動脈を2~3cmの長さに切断し、メスによりこれを展開して内皮面を露出させ、左半分の内皮を物理的に傷害した。これを10mMのEB-DTPA-GdあるいはDTPA-Gdの生理食塩水溶液に浸し、その後、生理食塩水で洗浄したところ、EB-DTPA-Gdは、内皮を傷害した部分にのみ選択的に吸着していることがわかった（図3a）。また、この血管片を生理食塩水に浸した状態でMRIでT1強調像を測定したところ、図3bのように、EB-

DTPA-Gdが吸着した標的的内皮障害部位にシグナルが得られた。また、断面の像から、本造影剤は血管表面に限局していることも明らかとなった。造影剤が血管内に浸潤することは造影剤が長く体内にとどまることを意味し、好ましいことではないから、この結果は本化合物の造影剤としての用途に期待をもたせるものである。

また、本造影剤の性質と構造の相関を調べるため、EB-DTPA-Gdから、ナフタレン部分を除去したDMBDTPA-Gdとさらにエバンスブルー関連骨格をすべて除去した通常のDTPA-Gdにより、同様に血管片での実験を行い、また、3者での血管断面の深さ方向のMRシグナル強度を計測した（図4）。その結果、EB-DTPA-Gdでは、分子は内皮剥離部位の表面のみに存在し、その下の細胞間マトリックス層や平滑筋層には全く存在しなかった。一方、DMBDTPA-Gdでは、いくぶん内皮剥離部位への優先的結合がみられるものの、分子は血管組織内部にまで浸潤し、平滑筋層を含む全体にシグナルがみられた。エバンスブルー骨格要素を全くもたないDTPA-Gdでは、当然のことながら全く血管への吸着はみられなかった。これらの事実より、血管内皮剥離部位への結合にはある程度の疎水性部分が必要であるが、疎水性が高いとそのまま組織内へ浸潤してしまうことがわかる。内皮剥離部位を認識しつつ、表面のみへの吸着を実現するには、エバンスブルーにみられるスルホン酸基のような極性基も同時に必要であることがわかる。元来、

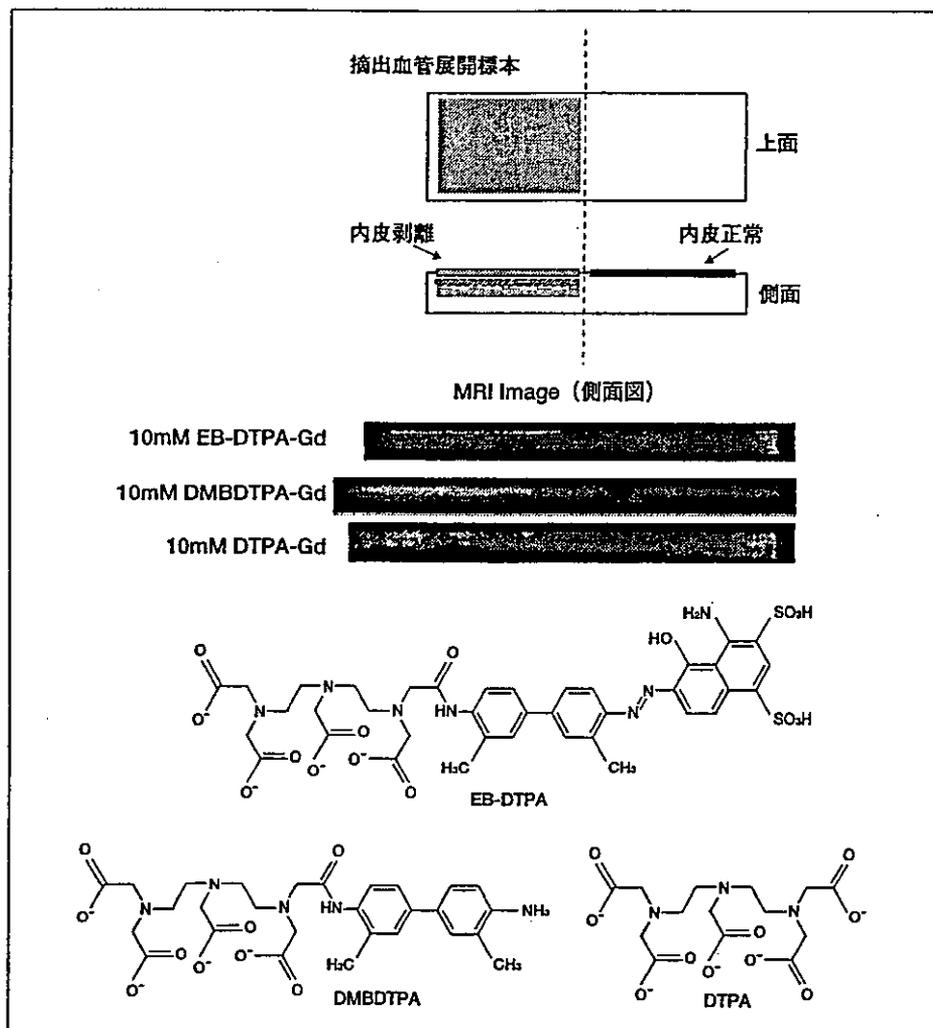


図4 造影剤の構造と血管への吸着能

このような色素は通常の組織では非常によく吸着する性質を有しているが、高度に水溶性の官能基が疎水環境にある組織内部に浸透することを抑制しているものと考えられる。また、内皮細胞層は、一般に血管への物質の無制限の透過を抑制するバリアとしても働いており、内皮が正常な部位ではこのような色素の吸着を許さないであろう。

また、EB-DTPA-Gdに基づく内皮剥離部位でのMRIシグナル強度は、濃度依存性であり、数mM以上の濃度ではその強度増大は飽和したことから、使用濃度を10mMとしている。

エバンスブルーは、通常のタンパクへの吸着力も大きいと考えられる。特に、血管造影剤に適用した場合には、血液中のアルブミンなどへ吸着が

大きい。実際、エバンスブルー自体は、静注により投与するとアルブミンと結合し、尿排泄されることが知られている。これを利用して、全血量の測定などを行う手法は古くからヒトにおいても適用されている。

EB-DTPA-Gdのアルブミンへの吸着が内皮障害部位への吸着を阻害する可能性を評価するために、同様の血管片を用いた実験で、生理食塩水ではなく血清を用いてMRI造影を試みた。その結果、生理食塩水中と同様の、標的部位におけるシグナル増強を認め、本造影剤が血液存在下でも妨害されることなく、標的部位に結合できることを確認した。

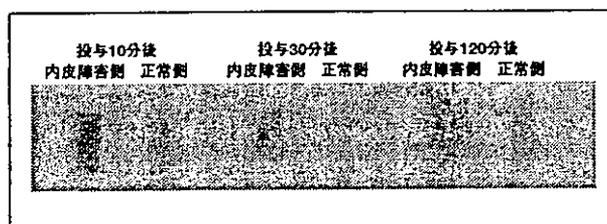


図5 造影剤静注後の両側頸動脈展開標本 (ex vivo実験)

IV. Ex vivo, in vivoでの評価

EB-DTPA-Gdが摘出血管において、内皮障害部位特異的造影剤としての性能を有していることが明らかになったため、次にラットを用いて実際に静注したEB-DTPA-Gdが血管の内皮障害部位に結合できるのかを検討した。まず、大腿動脈からカテーテルを挿入し、バルーンにより左総頸動脈部分で内皮障害を作製し、次いで右頸静脈からEB-DTPA-Gdを10mM濃度で静注した。種々の時間が経過後、ラットを殺し両方の総頸動脈を摘出して展開したところ、投与10分後でバルーン障害を施した左頸動脈でのみ造影剤の吸着が顕著にみられた(図5)。このことは、本造影剤が、体内の血流循環時においても、内皮障害部位に特異的に吸着できることを示している。また、内皮障害部位への吸着も時間とともに減少し、投与2時間後では、ほぼ正常血管と同レベルに戻った。すなわち、EB-DTPA-Gdは、実際に血管を造影できる程度の時間、標的部位に滞留する結合力を有しており、しかし、その結合は可逆的であり、血流により剥離し、ついには標的部位から除かれることを示しており、これも実際に造影剤として適用する場合には好ましい性質といえる。

EB-DTPA-Gdの静注後のファーマコキネティクス(体内動態)も検討している。すなわち、投与後、30分と2時間の時点での各臓器を処理し、含まれるガドリニウムの量をICPにより定量したところ、本造影剤は各種臓器にはほとんど分配されず、血液と腎臓にのみ分配していた。この結果は、本造影剤が血液中を循環後、主として腎排泄され、その他の臓器への移行は無視できることを示している。データが未公表であるため詳細はご紹介できないが、これらの事実を踏まえ、実際に生きた

ラットでの血管障害モデルを用いたin vivo MRIにおいても、本造影剤が標的血管障害部位を特異的に造影できることも確かめており、EB-DTPA-Gdの実用性を支持している。

おわりに

血管内皮障害を引き起こす炎症部位、特に動脈硬化に伴う不安定プラーク部位の特異的診断は、現在よい方法が存在しないが、もし可能になればその恩恵は非常に大きいものがある。今回開発した造影剤は、実際に静注により体内で内皮障害部位を特異的に診断できることが示されており、体内動態、標的部位への結合性、その後の滞留性などにほぼ理想的な性質を有している。実用性をさらに検証していくことで、さらに分子の改良を含めての最適化が必要となることは考えられるが、非常に興味深い基本構造であるといえる。今後は、動脈硬化モデルや大型動物を用いての検討を加え、実用性を追求していきたいと考えている。また、それと同時に、本造影剤の標的部位への結合のメカニズムの解明も急務である。内皮障害血管部位での本造影剤の結合標的分子の探索を進めているところである。

参考文献

- 1) Anderson SA, Rader RK, et al : Magn Reson Med 44, 433-439, 2000.
- 2) Sipkins DA, Gijbels K, et al : J Neuroimmunol 104, 1-9, 2000.
- 3) Flacke S, Fischer S, et al : Circulation 104, 1280-1285, 2001.
- 4) Johansson LO, Bjomerud A, et al : J Magn Reson Imaging 13, 615-618, 2001.
- 5) Fayad ZA, Fuster V : Circ Res 89, 305-316, 2001.
- 6) Yamamoto T, Ikuta K, et al : Anal Sci, in press.

著者プロフィール

片山佳樹：
 1987年 九州大学大学院工学研究科博士課程修了(工学博士)
 (株)同仁化学研究所入社
 1988年 同研究部主任研究員
 1990年 英国王立医学研究所客員研究員(～1992年)
 1994年 (株)同仁化学研究所研究部チーフ
 1996年 九州大学工学研究院助教授
 1999年 科学技術振興事業団PRESTO研究員兼任(～2002年)
 2003年 九州大学工学研究院教授
 科学技術振興機構CREST研究代表兼務
 現在に至る

ケミストからみた ポストゲノム 10

～プロテオミクスにおける質量分析～

九州大学工学研究院応用化学部門

片山佳樹

1. はじめに

これまでも繰り返し述べてきたように、ポストゲノム研究においては、タンパク機能を研究するプロテオミクスが中心課題である。タンパクについての研究では、まずタンパクの同定、発現量変化、翻訳後修飾とその量的変化、タンパク間相互作用などを明らかにしなくてはならない。しかし、遺伝子と異なりタンパクは増幅することが困難であるから、その分析は、感度、分解能、精度が要求される。質量分析は、得られる分析値がデジタルであり、しかも高感度な分析であるから、この種の研究には非常に有効である。もちろん、非常に複雑な混合物であるプロテオームのような研究に質量分析法を適用するには、種々の制約が存在した。しかし今では、これらを克服するための種々の手法が開発され、質量分析はプロテオミクスには不可欠な手段となっている。今回は、同位体タグに代表されるような、プロテオミクスにおける新しい質量分析法に関してご紹介する。

2. 質量分析について

質量分析においては、対象はまず何らかの手法でイオン化され、そのイオンの質量/荷電比(m/z)とその質量のイオン量を計測する。したがって質量分析は、イオン化とイオン計測法により種々の組み合わせが存在し、それぞれ特色がある。イオン化法では特に Electrospray ionization (ESI) と Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) が有用である。ESI は、タンパクの溶液を微細なノズルから噴射しイオン化する方法で、MALDI では、マトリックスとよばれる物質と混合して測定基板上に結晶化させ、照射したレーザー光をマトリックスが吸収することでタンパクを一緒に気化させイオン化する。前者では、溶液をそのまま用いることができ、液体クロマトグラフィーのような精製法を直接組み合わせる際に有用である。一方、MALDI 法は、測定試料の断片化(フラグメント化)や多価イオン化が起こりにくく、解析が容易である。イオン化された試料を解析するアナライザーとしては、イオントラップ法、飛行時間法(TOF)、四重極法、フーリエ変換法などがある。イオントラップは、感度が高く安価である反面、捕捉されるイオン数が限られるため、正確さが他の方法に比べ劣る。フーリエ変換型では、高真空下、高磁場でイオンを捕捉し、感度、精度、分解能に優れ、ダイナ

ミックレンジも広いなどの利点を有するが、高価で操作が複雑である。TOF や四重極法は、感度、精度、分解能、操作性などの観点から最も利用例が多い。TOF は、MALDI 法と組み合わせで用いられることが多く、精度、感度、分解能に最も優れているため、精製したタンパクの同定には極めて有用である。一方、液体クロマトのような精製法と組み合わせる場合には、いちいちフラクションを基板上に結晶化させる必要があり、自動化が難しく、ESI の方が優れているともいえる。四重極法は、ESI と組み合わせられることが多いが MALDI との組み合わせでも用いられる。特にタンパクの同定では、後述するようにプロテアーゼで限定消化する代わりに、質量分析計内でタンパクを断片化し、各フラグメントをさらに質量分析で解析していくために、アナライザーを2つ連結し、その間に、高エネルギーのアルゴンなどの気体を衝突させてタンパクを断片化させるための衝突誘起解離装置(CID)を設けたタンデム型質量分析装置が用いられる。

3. 質量分析によるタンパクの同定

3.1 ペプチドマスフィンガープリント¹⁻⁵⁾

ある状態における細胞が有する全タンパク質の発現パターン(プロテオーム)は、2次元電気泳動で各タンパクを分離することで評価できるが、各スポットのタンパクを同定するのに通常、質量分析(特に MALDI-TOF) が用いられる。もちろん、2次元電気泳動で分離されたタンパクをそのまま質量分析しても得られる情報は少なく、同定には至らない。そこで、タンパクを特定のプロテアーゼで限定消化すると、得られるペプチド断片の質量のセットは各タンパクに固有(フィンガープリント)であり、そのデータベースを作成すれば、同定に用いることができる。この場合、AspN と LysC など異なるプロテアーゼで切断したプロフィールを複数用いると精度は向上する⁶⁾。

しかしながら、2次元電気泳動で分離されたスポットは、必ずしも単一のタンパクである訳ではなく、むしろ複数のタンパクの混合物である場合のほうが多い。その様な場合の解決法としては、酸素の安定同位体を用いる方法がある。例えば2つの異なる状態の細胞のプロテオームをそれぞれ2次元電気泳動分離し、それぞれから得られる標的スポットをプロテアーゼで限定分解する際に、片方は通常の水中、もう一方は、¹⁸Oを含む水(H₂¹⁸O)中で分解すると、各断片のC末は、¹⁶Oあるいは¹⁸Oが取り込まれ同位体標識される(Fig.1)⁷⁾。この2つのサンプルを混合すると、各ペプチド断片は、質量が2つずつ離れた2重線で得られる。スポット中に複数のタンパクが含まれていても、タンパクによって2つの細胞の状態間での発現量変化は異なるので、各ペプチド断片の存在比が同じものが同一のタンパク由来の断片となり、識別可能となる。酸素同位体標識は、後述の配列分析に用いるペプチドシーケンスタグとしても利用できる。

タンパクを酵素で限定消化する方法は、最も一般的な方法であるが、酵素類はタンパクが pmol レベルまでは迅速に消化できるが、fmol 以下になると非常に分解速度が小さくなってしまいうため、得られる試料が極めて少量の場合は、酵素限定消化は困難になる。この様な場合には、直接質量分析計の中でCIDなどの手法により分解させる方法も提唱されている⁸⁾。

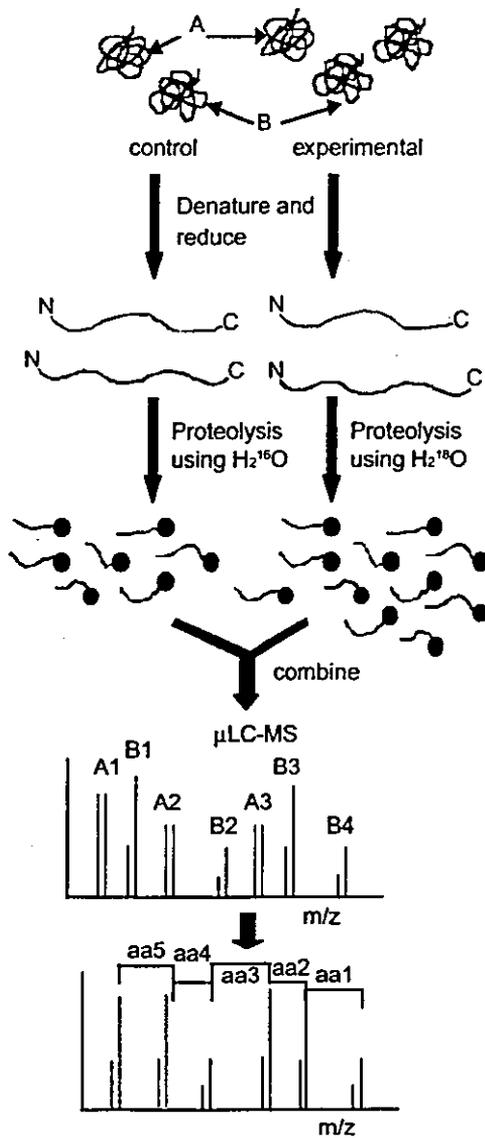


Fig. 1 Enzymatic labeling of stable isotope coding of proteomics
 Proteins from two distinct proteome are digested with protease in normal water or isotopically labeled water. Isotope code is labeled in every C-terminus of the digested peptides. Then, two samples are combined and analyzed by LC-MS/MS. Expression level of proteins between two states can be estimated. Amino acid sequence of selected peptide fragment can be identified, too.

3.2 配列分析 (ペプチドシーケスタグ)⁹⁾

タンパクの同定においては、酵素消化などで得られるペプチドフィンガープリントだけでは情報量が少ない。そこで、タンデムマスをを用い、初めのアナライザーで解析後、特定のペプチドイオンを選び、CIDでさらに分解後、そのペプチドの配列を解析することでさらに情報量を増やすことができる。すなわち、断片化は各アミノ酸でランダムに起こるから、最も質量の近い断片間の質

2D-electrophrogram of proteome in two distinct states

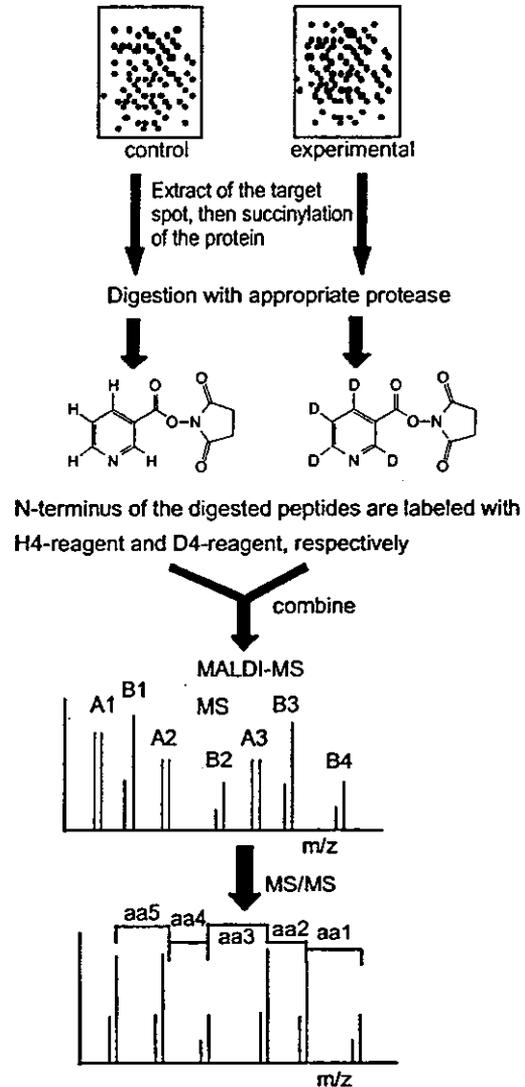


Fig. 2 N-terminus chemical labeling of stable isotope coding of proteomics
 Proteins from two distinct proteome are digested with protease, then the digested peptides in each sample are labeled with H4-reagent or D4-reagent, respectively. Then, two samples are combined and analyzed by MALDI-MS/MS. Expression level of proteins between two states can be estimated. Amino acid sequence of selected peptide fragment can be identified, too.

量差が、各アミノ酸に由来するため、配列が分かる。しかし、CIDで分解されたフラグメントは、ペプチドのN末由来のb系列フラグメントとC末由来のy系列フラグメントが混在しているため、両者を区別しなければ配列解析は極めて困難である。この様な場合に、b系列とy系列を識別するためのタグがシーケスタグである。前述の¹⁸Oを用いる標識もそのひとつである (Fig.1)。すな

わち、CIDスペクトルは、 ^{18}O 標識を用いることで、y 系列フラグメントのみが 2 重線で得られるため、容易に配列解析が可能となる。一方、b 系列、すなわち N 末側の配列解析をするための N 末の同位体標識としては、化学修飾を利用する方法が報告されている。この場合、リシン残基への修飾を抑制するため、まずタンパクを無水コハク酸で処理し、リシン残基側鎖のアミノ基を潰し、限定消化後、一方の細胞由来のタンパク試料はニコチン酸活性エステルで N 末を標識し、別の細胞由来のタンパク試料は、芳香族水素を重水素化したニコチン酸活性エステル(D₄NicNHS)で標識して、両試料を混合する。これをタンデムマスで分析すると、CID スペクトルは、b 系列のみが質量が 4 異なる 2 重線となる (Fig.2)。

4. 定量プロテオーム (安定同位体タグ標識)

細胞は周囲の環境や情報の変化に対応して機能変化することで生命を維持している。また、疾患細胞は、それ自体正常細胞と機能が変化している。このような細胞の 2 つの異なる状態における細胞の機能変化に伴う各タンパクの発現量や翻訳後修飾量がどの程度変化しているのかを調べることは、機能プロテオミクスの中心課題である。これを質量分析で調べる場合、質量分析の定量性の乏しさや、計測毎のシグナル強度のばらつきが無視できないため、2 つの状態の試料を別個に計測して比較することは不可能である。そこで、両者を混合して直接比較することが必要となるが、相当する各タンパク (フラグメントペプチド) を見分けるため、質量に差をつける必要が生じる。この目的のため、開発されたのが安定同位体標識法である。

4.1 *in vivo* 同位体標識 (Fig.3)

細胞を培養する際に一方の培地に ^2H 、 ^{15}N 、 ^{13}C などを含むものを用い、他方は通常の同位体を用いると、細胞中のタンパクは、それぞれの同位体で標識されるので、両者を混合しても、同一タンパクが質量分析で識別可能となり、質量スペクトルのピーク高さの比から存在比が評価できる¹⁰⁻¹²⁾。このような手法では、培地中の窒素の同位体標識は、最も一般的である。一方、Ong らは、重水素化ロイシン(d_3Leu)を標識に用い細胞中のタンパク発現量変化を評価する手法を SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell Culture) と名づけている¹³⁾。同様の手法は数多く報告されている。すなわち、重水素化したメチオニン(d_3Met)¹⁴⁾、チロシン(d_2Tyr)¹²⁾ を用いたり、セリン(d_3Ser)¹⁵⁾ を用いてヒストンのリン酸化量変化を同定したり、あるいは、 ^{13}C で標識されたアルギニン($^{13}\text{C}_6\text{Arg}$)やリシン($^{13}\text{C}_6\text{Lys}$)を用いて酵母のプロテオーム解析をした例がある¹⁶⁾。*In vivo* 標識は簡単であり、後述する翻訳後修飾の解析にも有効であるが、高価であり、動物への適用ができないといった制限がある。

4.2 Isotope-coded Affinity Tag (ICAT)法

In vivo 同位体標識の制限を克服するためには、タンパクを化学的に安定同位体で標識する必要がある。このような戦略として最初に開発されたものが Aebersold らの ICAT 法である (Fig.4(a))¹⁷⁾。ICAT 法では、チオール標識用ピオチン型標識剤のリンカー部分の水素 8 個を水素あるいは重水素としたものを使用する。すなわち、2 つの細胞や組織からの試料から別個にタンパクを抽出後、それぞれ H 型あるいは D 型のピオチン標識剤で標識後、両試料を混合し

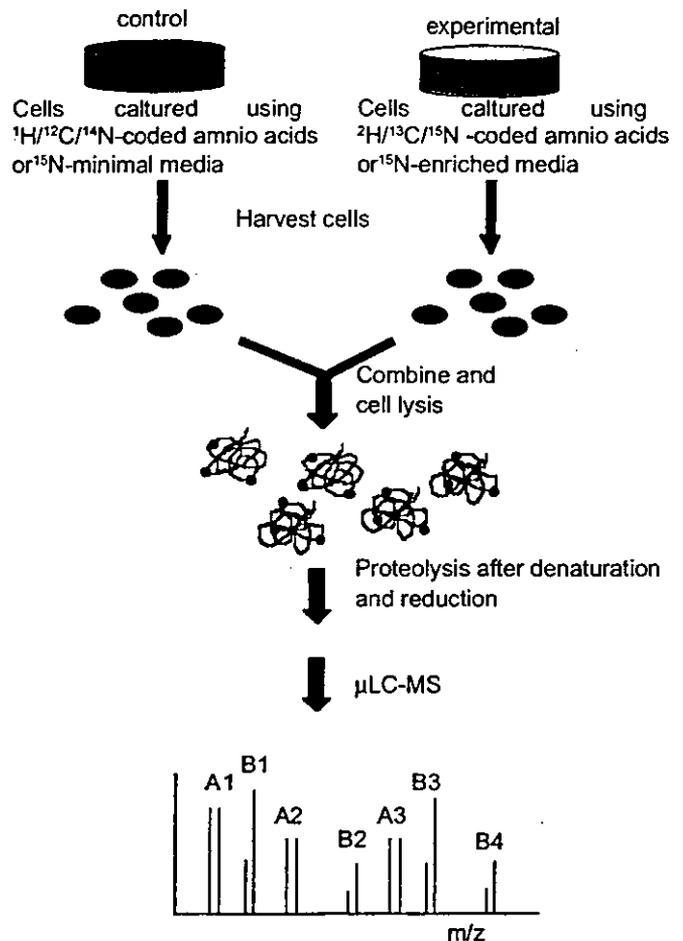


Fig. 3 *in vivo* stable isotope labeling of proteome sample
Cells are grown in normal media or isotopically labeled media. Mass tags are incorporated into every protein. An equivalent number of cells for each sample are combined and processed for MS.

てトリプシンなどで限定消化する。その後、アピジンカラムでピオチン標識されたペプチド (すなわちシステインを含むペプチド断片) のみを取得して質量分析する。通常のタンパク混合物では、膨大なペプチド断片が生じ、各タンパクを精製してからでないと、存在比の比較ができる状態ではないが、ICAT法ではシステインを含むペプチドに限定されるため、混合物内における種々のタンパクの存在比を比較可能となる。各タンパクの同定は、CID 分解により行う。ICAT法は、動物や真核生物のプロテオーム分析を可能とするだけでなく、2次元電気泳動などによるタンパクの精製を必要としないという利点も有する。ヒトミエロイド表面タンパクの分化による変化¹⁸⁾や神経細胞のタンパク発現量の薬物 (カンプトテン) 投与による影響¹⁹⁾、酵母のメタボローム解析²⁰⁾など多くの適用例が報告されている。

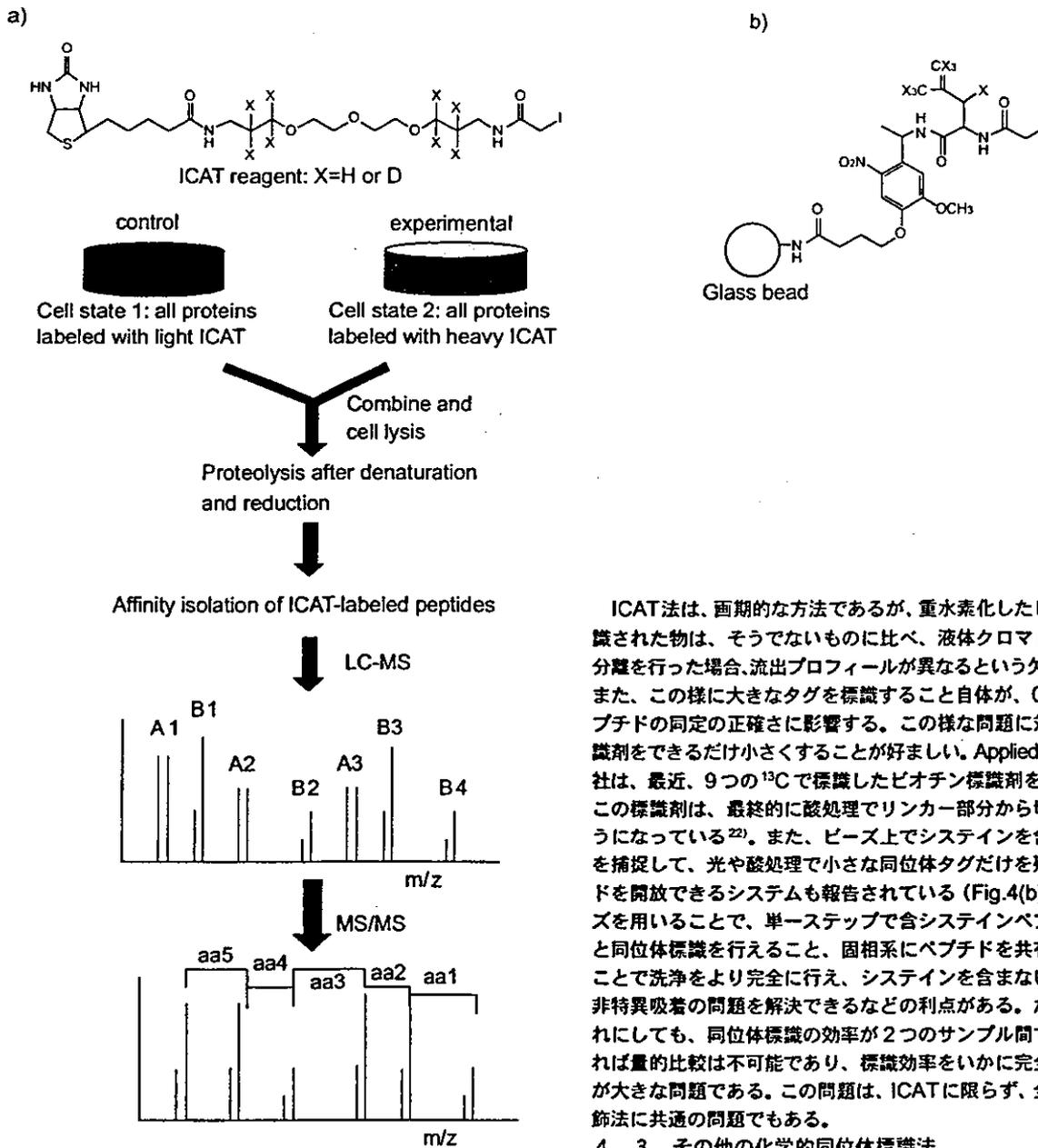


Fig. 4 ICAT-strategy

(a) Structure of ICAT-reagent, and strategy for quantifying differential protein expression.

Two proteomes representing two different cell states have been treated with isotopically light and heavy ICAT-reagents, respectively. ICAT-reagent are introduced into cystein-contained peptide fragment. These cystein-peptide can be isolated by avidine-column.

(b) Example of solid phase ICAT-reagent

ICAT法は、画期的な方法であるが、重水素化したビオチンが標識された物は、そうでないものに比べ、液体クロマトなどによる分離を行った場合、流出プロフィールが異なるという欠点がある²¹⁾。また、この様に大きなタグを標識すること自体が、CIDによるペプチドの同定の正確さに影響する。このような問題に対しては、標識剤をできるだけ小さくすることが好ましい。Applied BioSystems社は、最近、9つの¹³Cで標識したビオチン標識剤を開発したが、この標識剤は、最終的に酸処理でリンカー部分から切断できるようになっている²²⁾。また、ビーズ上でシステインを含むペプチドを捕捉して、光や酸処理で小さな同位体タグだけを残してペプチドを開放できるシステムも報告されている (Fig.4(b))^{23,24)}。ビーズを用いることで、単一ステップで含システインペプチドの精製と同位体標識を行えること、固相系にペプチドを共有結合で固定することで洗浄をより完全に行え、システインを含まないペプチドの非特異吸着の問題を解決できるなどの利点がある。ただし、いずれにしても、同位体標識の効率が2つのサンプル間で同一でなければ量的比較は不可能であり、標識効率をいかに完全にできるかが大きな問題である。この問題は、ICATに限らず、全ての化学修飾法に共通の問題でもある。

4. 3 その他の化学的同位体標識法

ICAT法は、システインを含むペプチドにしか適用できない。そこで、H型とD型の酢酸の活性エステルを用いペプチドの1級アミンをアセチル化したり²⁵⁾、H型とD型のメタノールでペプチドのカルボキシル基をエステル化したりする方法²⁶⁾が報告されている。後者では、アニオン性のカルボキシル基がエステル化されることで、質量分析でイオン化されるペプチドが増加して計測を容易にする効果もある。また、H型とD型の無水コハク酸を用いる方法も報告されており、これらの手法は、Global Internal Standard Technology (GIST)と呼ばれる²⁷⁾。

5. タンパク間相互作用解析

例えば、あるタンパクをコードする遺伝子を発現ベクターに組み込み、さらにその末端に非常に短いエピトープタグを融合して細胞に導入し、発現後、細胞を溶解して、エピトープタグに特異的な抗体で免疫沈降して、当該タンパクを単離すると、それに結合したタンパクも同時に沈降してきており、これを質量分析することによって、そのタンパクに相互作用するタンパクを解析することができる (Fig.5(a))²⁸⁾。この方法では、細胞内での相互作用を直接評価できるため、種々の状態での細胞内での相互作用の変化を捉えることも可能である。また、これに先の同位体標識法を適用して、種々の状態間での相互作用の変化を量的に比較することもできる。例えば、細胞をそれぞれ¹³Cで標識したアルギニンと通常のアルギニンをそれぞれ含む培地で培養し、片方をEGFで刺激して両試料を混合後、活性化したEGF受容体が自己リン酸化し

ていることを利用して、このリン酸化部分に結合する Grb2 の SH2ドメインをGSTに融合したものでアフィニティー分離し、結合するタンパクを同時に得る方法が報告されている¹⁰⁾。この場合、得られる両試料で存在比が異なるタンパクは刺激により受容体に対する結合性が変化したものであることがわかる。

これら以外の手法としては、タンパク複合体を同位体標識 (重水素化) した架橋剤で架橋してしまい、その後、限定消化して架橋されたペプチドを解析することで、相互作用するタンパクの同定と同時に、相互作用するサイトを決定してしまう方法 (Fig.5(b))²⁹⁾ や、エピトープタグを連結したユビキチンにシステイン反応サイトを結合し、システインプロテアーゼである脱ユビキチン化酵素の活性サイトにアフィニティー結合させてから、エピトープに対する抗体で免疫沈降させて、未知の脱ユビキチン化酵素を探索する試み (Fig.5(c))³⁰⁾ などが報告されている。

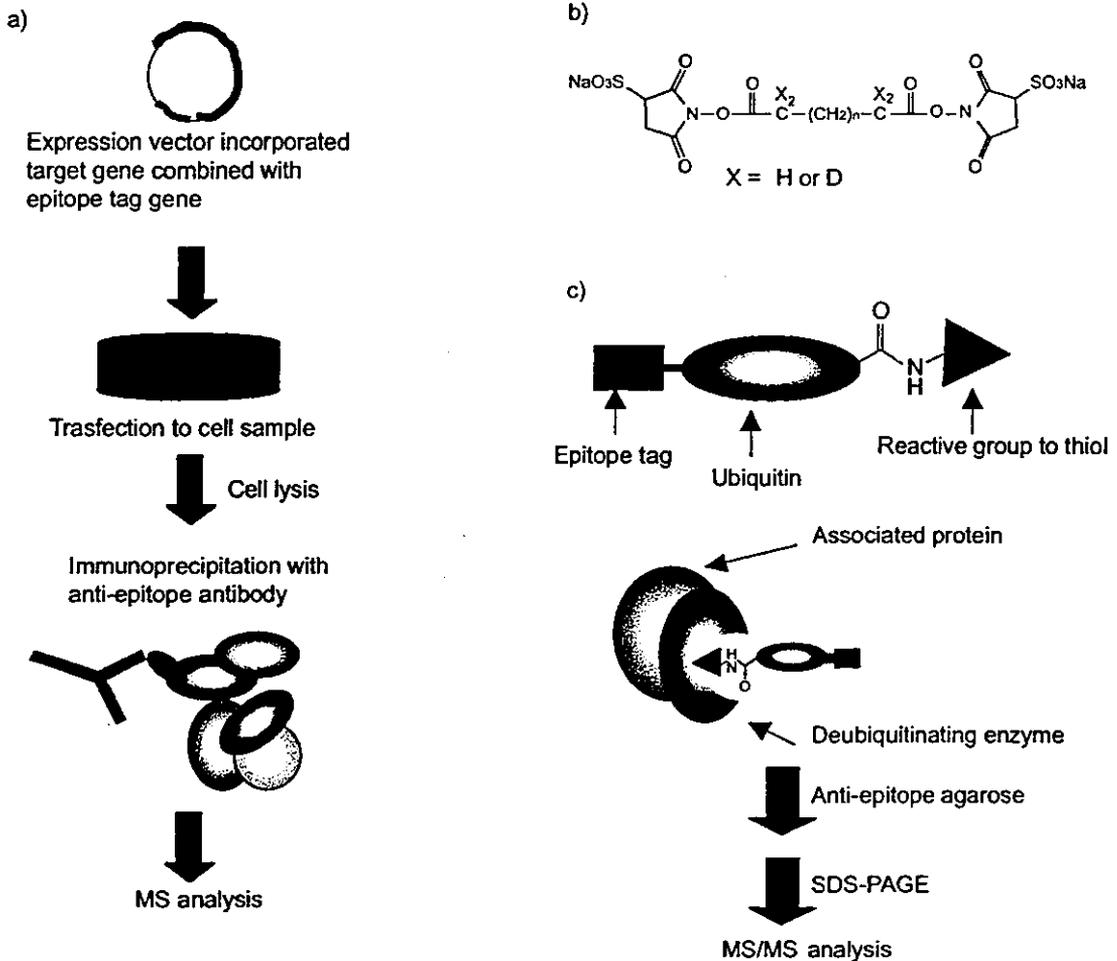


Fig.5 Strategies for evaluation of protein interaction

- a) General strategy for investigating intracellular protein interaction using MS analysis.
- b) Structure of stable isotope-coded cross-linker.
- c) Structure of ubiquitin derivative that can covalently bind to deubiquitination enzyme through the cysteine in the catalytic center, and the strategy to explore unknown deubiquitination enzyme.

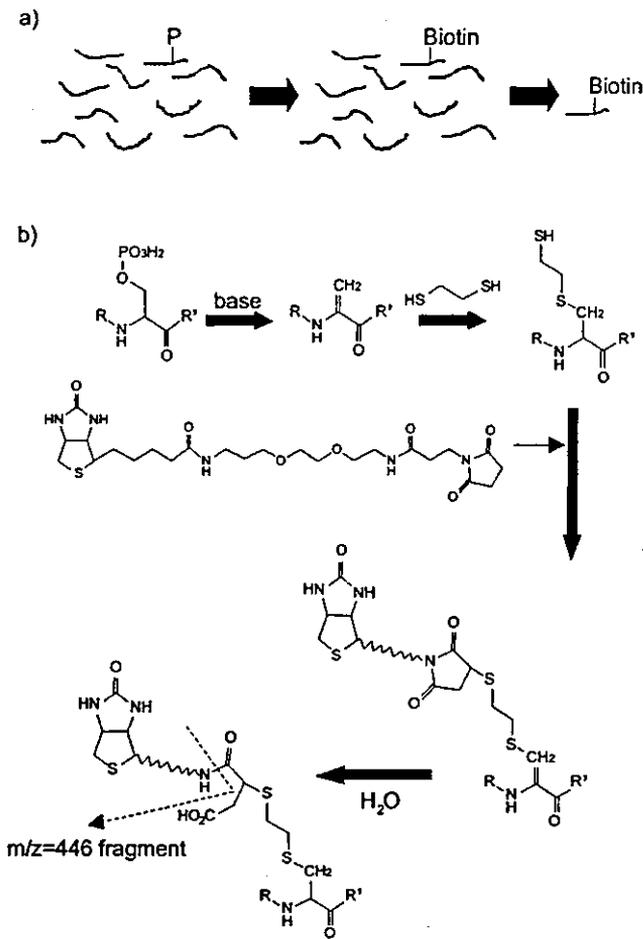


Fig.6 a) Scheme of isolating phosphorylated peptides.
b) Reaction scheme of the chemical conversion of phosphoserine residue to a biotinylated moiety.

6. 翻訳後修飾の評価

タンパクは、遺伝子から発現後、種々の細胞機能に応じて糖化、リン酸化、アセチル化、脂質化などの修飾を受ける。これを翻訳後修飾といい、タンパクの機能に極めて重要な情報であるが、mRNA量の評価する遺伝子チップからは決して解析することができず、プロテオミクスの重要な分析対象である。翻訳後修飾の量的変化を知るには、前述の安定同位体標識の手法が適用できる。すなわち、例えば、*in vivo*標識で2つの細胞試料を標識して混合すると、2つの異なる試料中における同一タンパクのペプチド断片の存在比は全て同じはずであるが、それが異なるペプチド断片は、翻訳後修飾されたものであると分かる。また、その存在量変化より、修飾量の変化も評価できる。

また、Odaらは、リン酸化されたセリン部位を、塩基存在下でオレフィンとし、エタンジチオールを付加してチオールを導入し、これにチオール反応性のビオチン標識剤を結合してリン酸化セリンを含むペプチドを選択的に濃縮、精製する手法を開発した (Fig.6)³¹⁾。これにより、リン酸化サイトの配列まで同定できる。また、ビオチン標識剤として、前述の ICAT 試薬を用いて、2つの状態の細胞試料間に同位体標識すると、2つの状態間でのリン酸化の程度の変化を評価することができる。リン酸化ペプチドは、金属錯体カラムでも濃縮できるが、この方法では、種々の刺激に伴うタンパクのリン酸化の変化を直接評価できる。

7. 細胞内シグナル解析

個別のタンパクにおけるリン酸化の程度変化を知る代わりに、タンパクをリン酸化する個々のプロテインキナーゼの活性変化を知ると、細胞機能を直接制御している細胞内シグナル活性の変化を知ることができる。我々は最近、種々のプロテインキナーゼに特異的な基質ペプチドを用いることで、2つの状態間にある細胞の特定のプロテインキナーゼ活性変化を直接比較できる手法を開発している (Fig.7(a))³²⁾。即ち、基質ペプチドのN末にリシンを導入し、アミノ末端と側鎖のアミノ基をアセチル化したものと、重水素化アセチル基にしたものを用い、2つの異なる細胞試料を溶解後、各々のライセート的一方に、通常のアセチル化プローブ、もう一方に重水素化アセチル化プローブを添加して所定時間反応後、両溶液を混合して質量分析すると、未反応のプローブと、リン酸化されたプローブがそれぞれ2重線が得られ、そのピーク高さ(正確には面積)から双方の状態間での標的プロテインキナーゼの活性が直接比較できる (Fig.7(b))。例えば、プロテインキナーゼAの場合、これを活性化するフォルスコリン (アデニル酸シクラーゼ活性化剤) 処理した場合、確かに本法で活性上昇が見られ、逆に阻害剤である PKI 処理では、活性の低下が認められた (Fig.7(c))。また、CREB 由来の遺伝子発現は、種々の薬物処理後の本法での活性測定結果と完全に一致したことから、確かにこの方法により、細胞内の標的プロテインキナーゼ活性変化を評価できることがわかった。

これまでに、プロテインキナーゼCやSrcなどの他のキナーゼに関しても、測定に成功しており、複数のプローブを同時にライセートに添加することにより、複数のプロテインキナーゼ活性変化を同時にプロファイリングできる可能性がある。これまで、細胞内シグナルは単一の活性に関して、その細胞内での詳細な分布と時間変化をモニタリングするプローブの開発に主眼がおかれており、それはもちろん非常に重要なことである。一方、本法は、一度細胞を破碎するため、刺激後、特定時間後の活性の状態しか評価できず、その意味では詳細さに欠ける。しかしながら、例えば、薬物スクリーニングのような、多検体を迅速に評価する場合、このような手法は、非常に簡便迅速に行え、複数の酵素活性変化を一度に計測して、パターンとしてデータ化できるため、今後の新薬探索や副作用解析、遺伝子機能解析などに、有用な手段を提供するのではないかと期待している。

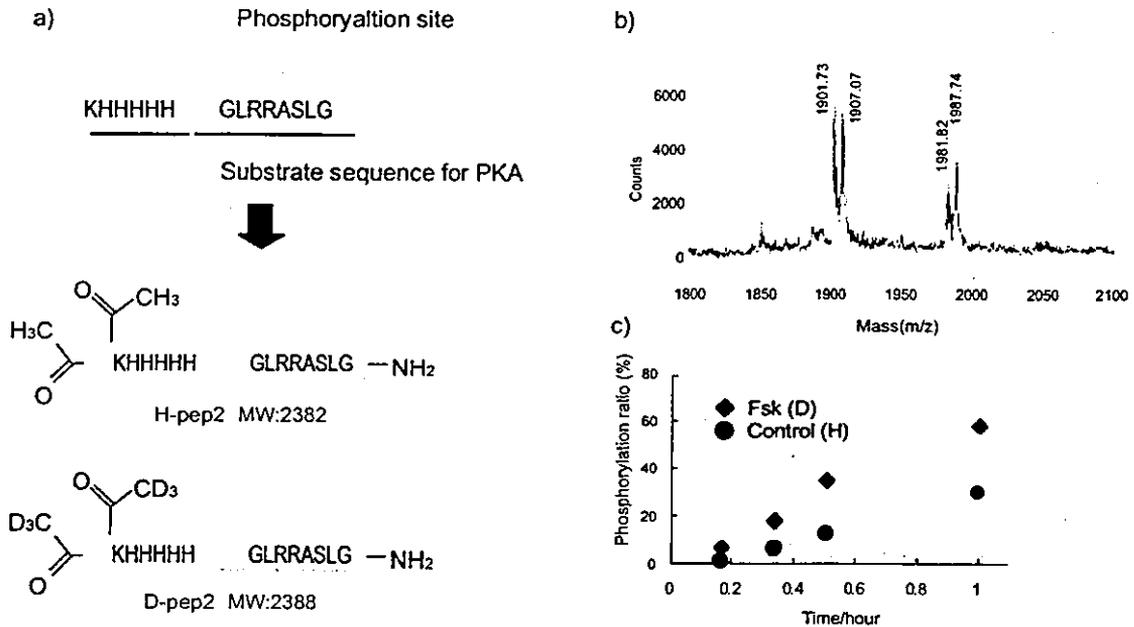


Fig.7 a) Structure of Mass-tagged probe for Protein kinase A.
 b) Mass spectrum of cell lysate containing mass-tagged probes. In this case, H-type probe and D-type-probe were added to two lysates from different cell sample, respectively. After 2h, two lysate were combined, and analyzed with MALDI-TOF MS.
 c) Development of mass signal for phosphorylated probe in cell lysate in the presence of or absent from forskolin.

8. おわりに

今回は、プロテオミクスにおける質量分析法に関する技術についてご紹介した。質量分析は、測定値がデジタルであり、高感度で迅速に計測が可能であり、タンパクの同定や機能評価には、今後、ますますその重要性が増すものと考えられる。このような細胞試料中のタンパクを扱う場合、特に、発現量や活性変化を比較、定量する場合、最も重要なことは試料の調製法にある。すなわち、もし、2つの状態の細胞間での試料調製や、標識効率に差があれば、どんなに優れた計測を行おうと、得られる値に全く意味がなくなってしまう。今後は、計測法の開発とともに、試料調製法の開発と情報の共有が必要となるであろう。

以上、これまで、化学の立場から俯瞰した、ポストゲノム技術についてご紹介してきたが、このシリーズも今回で終わりとなった。ポストゲノム技術は日進月歩であり、ここではご紹介できなかった多くの技術がまだまだ存在する。例えば、*in vitro* ウイルスやリボソームディスプレイなどに代表される遺伝子とタンパクをカップルで扱う手法や、遺伝子の導入法など、新技術を挙げれば枚挙に暇がない。また、これまでにご紹介してきたカテゴリーでも、その後、さらに新しい技術が次々に報告されている。ゲノム研究は、これまで異分野とされてきた多くの分野間の融合を真に必要としている。自分の技術は、全く関係がないと感じている技術が実は、非常に重要な技術に発展する可能性が大いにある。その様な中で、最も必要とされるのは、実際のポストゲノム研究の

現状と潜在ニーズを理解しながら、多くの工学的、化学的技術をも理解する目を育てることであろう。また、ゲノム研究は、体力にもものを言わせて絨毯爆撃をするような、特にアメリカの産業国家戦略に基づく方法論に関係している。企業規模や体力的に比肩できない我国においては、ゲノム研究の見方を理解し、利用しつつも、さらに効率の良い、独自の技術と方法論を構築していくときに来ているのではないかと思考する。本シリーズが、ポストゲノム技術を考えるにあたって、些少なりともご参考になれば幸いである。

著者紹介

氏名：片山 佳樹 (Yoshiki Katayama)
 所属：九州大学工学研究院応用化学部門 教授
 連絡先：〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
 TEL: 092-642-3608 FAX: 092-642-3611
 E-mail: ykatatcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp
 出身校：九州大学大学院工学研究科合成化学専攻
 学位：博士 (工学)
 趣味：ドライブ、イラスト

参考文献

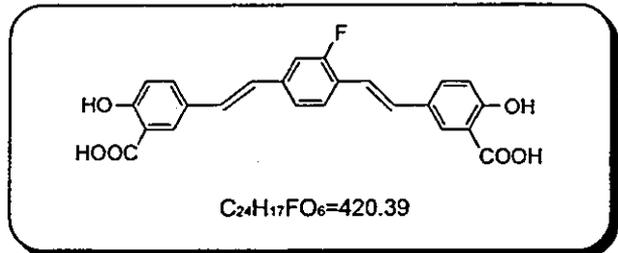
- 1) D. J. C. Pappin, P. Hojrup, A. J. Bleasby, *Curr. Biol.*, **3**, 327 (1993).
- 2) M. Mann, P. Hojrup, P. Roepstorff, *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 338 (1993).
- 3) W. J. Henzel, T. M. Billeci, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley, C. Watanabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5011 (1993).
- 4) P. James, M. Quadroni, E. Carafoli, G. Gonnet, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 58 (1993).
- 5) J. R. Yates III, S. Speicher, P. R. Griffin, T. Hunkapiller, *Anal. Biochem.*, **214**, 397 (1993).
- 6) P. James, M. Quadroni, E. Carafoli, G. Gonnet, *Protein Sci.*, **3**, 1347 (1994).
- 7) T. Kosaka, T. Takazawa, T. Nakamura, *Anal. Chem.*, **72**, 1179 (2000).
- 8) M. W. Senko, J. P. Speir, F. W. MacLafferty, *Anal. Chem.*, **66**, 2801 (1994).
- 9) M. Mann, M. S. Wilm, *Anal. Chem.*, **66**, 4390 (1994).
- 10) B. Blagoev, I. Kratchmarova, S-E. Ong, M. Nielsen, L. J. Foster, M. Mann, *Nature Biotechnol.*, **21**, 315 (2003).
- 11) T. P. Conrad, K. Alving, T. D. Veenstra, M. E. Belov, G. A. Anderson, D. J. Anderson, M. S. Lipton, L. Pasa-Tolic, H. R. Udseth, W. B. Christer, B. D. Thrall, R. D. Smith, *Anal. Chem.*, **73**, 2132 (2001).
- 12) T. C. Hunter, L. Yang, H. Zhu, V. Majidi, E. M. Bradbury, X. Chen, *Anal. Chem.*, **73**, 4891 (2001).
- 13) S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 376 (2002).
- 14) X. Chen, L. M. Smith, E. M. Bradbury, *Anal. Chem.*, **72**, 1134 (2000).
- 15) H. Zhu, T. C. Hunter, S. Pan, P. M. Yau, E. M. Brudbury, X. Chen, *Anal. Chem.*, **74**, 1687 (2002).
- 16) S. Martinovic, T. D. Veenstra, G. A. Anderson, L. Pasta-Tolic, R. D. Smith, *J. Mass Spectrom.*, **37**, 99 (2002).
- 17) S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nature Biotechnol.*, **17**, 994 (1999).
- 18) D. K. Han, E. J. Zhou, R. Aebersold, *Nature Biotechnol.*, **19**, 946 (2001).
- 19) L. R. Yu, M. D. Johnson, T. P. Conrads, R. D. Smith, R. S. Morrison, T. D. Veenstra, *Electrophoresis*, **23**, 1591 (2002).
- 20) H. Lee, T. J. Griffin, S. P. Gygi, B. Rist, R. Aebersold, *Anal. Chem.*, **74**, 4353 (2002).
- 21) R. Zhang, C. S. Sioma, R. A. Thompson, L. Xiong, F. E. Regnier, *Anal. Chem.*, **74**, 3662 (2002).
- 22) <http://www.applied biosystems.com>
- 23) H. Zhou, J. A. Ranish, J. D. Watts, R. Aebersold, *Nature Biotechnol.*, **20**, 512 (2002).
- 24) Y. Qui, E. A. Sousa, R. M. Hewick, J. H. Wang, *Anal. Chem.*, **74**, 4969 (2002).
- 25) M. Munchbach, M. Quadroni, G. Miotto, P. James, *Anal. Chem.*, **72**, 4047 (2000).
- 26) D. R. Goodlett, A. Keller, J. D. Watts, R. Newitt, E. C. Yi, S. Purvine, J. K. Eng, P. von Haller, R. Aebersold, E. Kolker, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 1214 (2001).
- 27) S. Wang, X. Zhang, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, **A 949**, 153 (2002).
- 28) D. Figeys, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **4**, 210 (2002).
- 29) D. R. Muller, P. Schindler, H. Towbin, U. Wirth, H. Voshol, S. Hoving, M. O. Steinmetz, *Anal. Chem.*, **73**, 1927 (2001).
- 30) A. Borodovsky, H. Ovaa, N. Kolli, T. Gan-Erdene, K. D. Wilkinson, H. L. Ploegh, B. M. Kessler, *Chemistry & Biology*, **9**, 1149 (2002).
- 31) Y. Oda, T. Nagasu, B. T. Chait, *Nature Biotechnol.*, **19**, 379 (2001).
- 32) T. Sonoda, S. Shigaki, T. Nagashima, O. Okitsu, Y. Kita, M. Murata, Y. Katayama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 847 (2004).

新製品 4月1日発売

アミロイド染色用蛍光色素(1% FSB in DMSO)

FSB solution

化学名 1-Fluoro-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl)benzene,
1% DMSO solution



<特長>

- ・アミロイドに対して高い親和性をもつ。
- ・従来の色素に比べ検出感度が高い(蛍光強度が従来のBSBの約2倍)。
- ・溶液タイプのため、染色が容易である。

現在、厚生労働省が特定疾患に認定している難病の「アミロイドーシス」とは、βシート構造で線維状に凝集したアミロイドと呼ばれる異常タンパク質が臓器や組織細胞の外に沈着して、これらの臓器や組織の働きを阻害する病気です。日本人に多い疾患として免疫細胞性アミロイドーシス(ALアミロイドーシス)、反応性AAアミロイドーシス、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)、透析アミロイドーシス(DRA)があげられ、国内に約数百人の患者がいると推定されています。これらのアミロイドーシスは上記の疾患のような全身の様々な臓器にアミロイドが沈着する「全身性アミロイドーシス」と、アルツハイマー病のように脳など特定の臓器のみにアミロイドが沈着する「限局性アミロイドーシス」と大きく2つに分類されます。アルツハイマー病は日本でも約100万人の患者がいるといわれており、年齢を重ねると誰もが発症する可能性のある疾患であり、原因究明及び診断・治療など、世界各国で様々な研究が成されています。

小社で販売しているBSBは、アルツハイマー病の原因アミロイドであるアミロイドβペプチド(Aβ)へ高い親和性を持ち、Aβのアミロイド前駆体タンパク質(APP)を発現するトランスジェニックマウスTg2576に静注することで、18時間後の脳組織の老人斑(SP)に色素が集積することをSkovronskyらにより確認されています¹⁾。Aβに限らず、安東らは、様々な全身性アミロイドーシスの沈着アミロイド(AA, AL, ATTR, Ascr, Aβ2Mなど)に対しても従来の色素より鋭敏に染色することを報告し^{2,3)}、さらにin vivoの系においても二次性アミロイドーシスを誘起したトランスジェニックマウスに静注すると、沈着アミロイド部分にBSBが集積することを確認しています^{2,3)}。また、BSBは染色だけでなく、FAPのアミロイド前駆体TTRのアミロイド形成を阻止する働きがあることもわかっています³⁾。