

Nishimura, S., Tokukura, M., Ochi, J., Yoshida, M., Takeya, H.	Balance between exocytosis and endocytosis determines the efficacy of sterol-targeting antibiotics.	Chem. Biol.	21	1690-1699	2014
Yoshimura, A., Kishimoto, S., Nishimura, S., Otsuka, S., Sakai, Y., Hattori, A., Takeya, H.	Prediction and determination of the stereochemistry of the 1,3,5-trimethyl substituted alkyl chain in verucopeptin, a microbial metabolite.	J. Org. Chem.	79	6858-6867	2014

研究成果の刊行物・別刷

第9節 極微量タンパク質解析のための超高感度アミノ酸分析

はじめに

アミノ酸分析法は、遊離アミノ酸や、タンパク質・ペプチドのアミノ酸組成・アミノ酸含量を定量する手法である。プロテオミクスやエピジェネティクスなどの生化学・分析化学といった基礎研究から食品・工業品の分析などの産業利用、医薬品の試験・分析や、健康診断などの医療応用までアミノ酸分析法の応用範囲は広がっている。中でも、タンパク量の絶対定量に関しては、共存塩や結合水が存在するため秤量では難しく、色素結合法などタンパク質の呈色定量法は、構成アミノ酸の種類や配列に依存しタンパク質によって変動するため、現在、タンパク質の種類によらず正確にタンパク量を定量できるのはアミノ酸分析法のみである。また、プロテオミクス研究やエピジェネティクス研究においては、タンパク質の翻訳後修飾の定量的解析が重要であるが、標準物質があれば、アミノ酸分析を用いて翻訳後修飾アミノ酸などの異常アミノ酸の同定・定量も可能である。このようにアミノ酸分析法の定量性は、タンパク質分析において非常に強力なツールであり、ニンヒドリン法を用いた自動アミノ酸分析装置も市販されている。しかしニンヒドリン法は検出感度が低く、微量分析に活用するのは難しかった。微量のタンパク質を分析するためには、微量タンパク質を定量的に加水分解する技術、得られたアミノ酸を高分離で分離するシステム、アミノ酸を高感度で検出するための誘導体化試薬と検出器、すべての操作を環境からの汚染（コンタミネーション）なく行う技術、これらすべてが分析の成否を決める重要な要素となる。我々はそれらの要素を最適化することで、サブピコモルレベルのアミノ酸を定量できる、超高感度アミノ酸分析法を開発した¹⁾。本節では我々の開発した超高感度アミノ酸分析法と従来のアミノ酸分析法と比較しながら、極微量タンパク質を解析するために必要な、極微量加水分解技術、アミノ酸の誘導体化、クロマトグラフィー技術について概説する。

1. アミノ酸分析の歴史

アミノ酸分析の歴史は古く、1948年に、MooreとStein両博士がイオン交換クロマトグラフィーによるアミノ酸分離とニンヒドリンによる比色定量法を発表し²⁾、アミノ酸分析とアミノ酸配列分析を用い世界で初めて酵素（リボヌクレアーゼ）の構造を解析した³⁾。その功績により、両博士はノーベル化学賞を受賞した。1950年代にはアミノ酸自動分析装置が開発され、現在のアミノ酸自動分析計の原型となった^{4,5)}。また当初7日間かかっていた分析も、1970年代に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が登場し、2時間程度に短縮された。

Mooreの開発したニンヒドリン法のように、カラムでアミノ酸を分離してから誘導体化して検出する方法をポストカラムラベル化法という。この方法の利点は分離後に誘導体化するため夾雑物の影響を受けにくいこと、専用の装置が必要となるが分析を自動化できることから、得られるデータの信頼性が高くなることである。最近これらの方法については、イオン交換クロマトグラフィーを用いるため分離能が低く分析時間がかかる、ニンヒドリン検出による感度が低い、すなわち多量の試料を必要とする、といった欠点が指摘されている。感度に関しては、蛍光試薬 o-フタルアルデヒド（OPA）を用いたポストカラムラベル化法が開発され、1桁高感度化した⁶⁾。OPAはチオール化合物の存在下1級アミンと反応するが、2級アミンとは反応しない。しかし次亜塩素酸ナトリウムなどで酸化し誘導体化することで、プロリンなどの2級アミンの分析も可能になる。

もう一つの誘導体化法としてアミノ酸を分離する前に誘導体化するプレカラムラベル化法がある。プレカラムラベル化法の利点は、疎水性の高い誘導体化試薬を用いることで、分離能の高い逆相クロマトグラフィーでの分離が可能になるため、短い分析時間と高分離の両立ができる点と、蛍光誘導体化試薬を用いることで、ニンヒドリン法より3、4桁の感度向上ができることが挙げられる。そのためプレカラム法用の様々な蛍光誘導体化試薬が開発された⁷⁻¹¹⁾。一方欠点としては、誘導体化試薬とアミノ酸との反応が定量的に進まない場合があること、誘導体化アミノ酸の安定性が低い場合があること、アミノ酸分離前に誘導体化するため夾雑物に弱い（誘導体化試薬と反応するアミノ酸以外の成分による妨害ピークや、共存する塩や界面活性剤によって誘導体化反応が阻害される）こと、大過剰の誘導体化試薬を除去する

必要があること、といった点が挙げられる。本研究では、これらの欠点が克服された蛍光誘導体化試薬、6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート(AQC)を用いて分析を行った¹⁴⁾。この試薬については後述する。

また、誘導体化を行わないでアミノ酸を分析する方法として、キャピラリー電気泳動やHPLCと質量分析法による検出を組み合わせた方法も提案されている¹²⁻¹⁴⁾。

2. タンパク質の加水分解

タンパク質をアミノ酸分析するためには、まずタンパク質を構成するアミノ酸残基のペプチド結合を加水分解法により切断し遊離アミノ酸にする必要がある。この加水分解の方法として、大別すると、加水分解酵素を用いる方法、強アルカリを用いる方法、強酸を用いる方法がある。加水分解酵素を用いる方法は酵素に基質特異性があるため、多種の酵素を組み合わせてもタンパク質を完全にすべてアミノ酸に分解することは困難である。加水分解中のアミノ酸のラセミ化を防ぎ、光学異性体を保持したまま分析したい場合や、グルタミン、アスパラギンを定量したい場合など、特定の用途に用いられることが多い¹⁵⁾。強アルカリを用いる方法は、おもにトリプトファンの分析をする際に使われる^{15,16)}。強酸を用いる方法は、1820年にBraconnotが硫酸を用いて加水分解を行ったのが最初である¹⁷⁾。その後1849年にBoppは塩酸を使って加水分解を行った¹⁸⁾。現在では定沸点塩酸を用いた加水分解法が最も一般的な方法である¹⁵⁾。塩酸を試料に直接添加後、試料管を減圧封管して加水分解する液相法と、試料試験管を入れた容器に塩酸を加え、減圧封管した容器内で塩酸を蒸留し加水分解する気相法の2つがある。塩酸からの汚染物質の混入を防ぎ、微量試料を扱うためには気相法がよい。

微量分析では、外部の環境からのコンタミネーションが起こらないように細心の注意を要する。アミノ酸分析の場合、特に加水分解前に試料以外のタンパク質が混入してしまうと、アミノ酸レベルまで分解されたときに区別がつかないため、分析に大きな支障を生じる。そこで、精度よく加水分解を行うことが必要であるが、加水分解操作は試料の乾固、塩酸（および必要な場合はフェノール結晶）の添加、減圧封管と煩雑で熟練を要する。そこで、なるべく人の手を介さず加水分解を自動化することがのぞましい。しかし、塩酸を用いた加水分解をそのまま自動化するのは、塩酸によって流路が腐食されるなどして難しいため、最近我々は、新たに固体酸触媒を用いたタンパク質の加水分解法を開発することで加水分解の自動化に成功した¹⁰⁾。詳細は文献にゆずり、本節では標準的な加水分解法として塩酸気相加水分解法について説明する。

塩酸加水分解の場合、通常、110℃ 20時間加熱を行う。これにより、ほとんどのペプチド結合が切断されアミノ酸が回収されるが、トリプトファン、システイン、シスチンは、多くが破壊される。アスパラギン、グルタミンはそれぞれ、アスパラギン酸、グルタミン酸として回収される。さらにセリン、トレオニン、バリン・イソロイシンの回収率が低くなる傾向がある。これは水酸基を持つセリン・トレオニンは分解されて減少する一方、 β 位に分岐を持つバリン(V)、イソロイシン(I)を含むペプチド(V-V, V-I, I-V, I-I)は加水分解速度が他のペプチド結合に比べ著しく遅いためである¹⁹⁾。そこで、加水分解時間を24時間、48時間、72時間と変化させ、セリン、トレオニンは0時間外挿値を用い、バリン、イソロイシンはアミノ酸回収率が一定になった値（通常72時間加水分解した値）を採用する。また、システイン・シスチンに関してはタンパク質を加水分解前に還元・アルキル化するなどして保護して加水分解を行うと定量的に回収できる。トリプトファンは塩酸加水分解では分解されてしまうが、チオールを多量に添加することで分解を抑えられる。また、正確にトリプトファンを定量したい場合には、2g/Lのトリプタミンを含む4Mメタンスルホン酸を使うと定量的に回収できる。微量試料の場合、塩酸加水分解時にチロシン、メチオニンが減少することもあるが、フェノールを添加して塩酸によるチロシンのハロ化を抑え、脱気を十分に行うことでメチオニンの酸化を防ぐと定量的に回収できる。

2.1 必要な試薬, 器具

定沸点塩酸, フェノール結晶, 10pmol/uL のアミノ酸標準溶液 (市販の加水分解サンプル分析用の 17 種のアミノ酸 (それぞれ 2.5mmol/L) を含む標準アミノ酸混合溶液を希釈したもの), 10pmol/uL の内標 (ノルバリンなど) 水溶液, ミニナートバルブ, 遠心エバポレーター, 真空ポンプ, ブロックヒーター, 加水分解用小試験管 (たとえば 6 × 32mm), 加水分解用ガラスバイアル (たとえば 27.75mm × 70mm)。これらのガラス器具 (小試験管とガラスバイアル) はコンタミネーションを防ぐため, あらかじめ 550°C 3 時間乾熱するので, ホウケイ酸ガラス (borosilicate glass) 製を利用する。

2.2 プロトコル

- (1) ガラス器具を 550°C 3 時間乾熱する。
- (2) タンパク質溶液を内標とともに加水分解用小試験管に入れ, 遠心エバポレーターで乾固する。加水分解用標準アミノ酸溶液 (典型的には各 50pmol のアミノ酸を含む) も同様に内標を加えたのちに乾固する。
- (3) 加水分解用ガラスバイアルに, フェノール結晶を 1 ~ 2 かけら (約 1 ~ 2mg) 添加し, 定沸点塩酸 200μL を加える。
- (4) (3) のバイアルに (2) の小試験管を入れ, ミニナートバルブをバイアルにとりつけ, バイアルを減圧・脱気し, 封管する。
- (5) アルミブロックヒーターにバイアルを入れ, 加水分解する (110°C 20 時間)。
- (6) 加水分解後, 小試験管を取出し, 遠心エバポレーターで乾燥させ分析に用いる。

2.3 留意点

操作者由来のタンパク質の混入を防ぐため, 作業はすべてグローブをつけて行うとともに, 外部の環境からの汚染を防ぐためグローブボックス内で行う。さらに, サンプルの脱気, 封管, 加水分解は, サンプルの酸化を防ぐため, 窒素を充てんしたグローブボックスなど無酸素状態で行うことを推奨する。

3. アミノ酸の誘導体化

加水分解後のアミノ酸分析は遊離アミノ酸の場合と同様であり, クロマトグラフィーによる分離に基づいている。アミノ酸は一般に, 誘導体化して分析を行うため, 分離方法 (クロマトグラフィー) に応じて様々な誘導体化試薬が開発されている。大別して, イオン交換クロマトグラフィーでアミノ酸を分離した後に誘導体化して検出するポストカラムラベル化法, アミノ酸をあらかじめ誘導体化した後に逆相クロマトグラフィーで分離するプレカラムラベル化法の 2 種類の方法がある。ポストカラムラベル化法ではニンヒドリンによる誘導体化が最も一般的な方法で, 自動アミノ酸分析計も市販されている。この方法は定量性があり, 夾雑物にも強い反面, ポストカラム反応をするために特別な装置が必要なこと, ニンヒドリンの吸収から定量するため検出感度が低いという欠点もある。サンプル量として 1 アミノ酸あたり 2 ナノモル, タンパク量にして数マイクログラム必要である。そこで, 検出感度を向上させるために, プレカラム法のための, 様々な蛍光誘導体化試薬が開発され, ピコモル~サブピコモルレベルの検出が実現した^{1,7-9,11)}。蛍光誘導体化試薬を用いたプレカラムラベル化法では, 検出感度が高いだけでなく, 誘導体化アミノ酸を逆相クロマトグラフィーで分離することができるため, 分離能やクロマトグラフィーの再現性が高い, 市販の HPLC 装置を用いることができる, といった利点がある。一方, 蛍光ラベル化剤は大過剰に加えなくてはならないため, 未反応試薬が検出を妨害する可能性があること, 誘導体化後分離するため誘導体化アミノ酸の安定性に留意する必要がある。本研究で用いている蛍光誘導体化試薬, 6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート (AQC) は, 一級, 二級アミンともただちに反応し, 非常に安定な誘導体化物を形成する (室温, 一週間は安定)。また, 未反応試薬は加水分解され, 6-アミノキノリンを生じるが, 蛍光波長が異なるため, 分析の妨害にはならない。我々はこの試薬を文献にしたがって合成しているが^{1,10,11)}, Waters から分析キットの一部として市販されているほか, 海外メーカー数社が試薬のみの販売もしており, 入手可能である。

3.1 必要な試薬

20mM 塩酸, 0.2M ホウ酸緩衝液 (pH 8.8), AQC 溶液 (AQC 粉末を 3mg/mL, 約 10mM の濃度で, アセトニトリルに溶解させたもの), 10pmol/uL のアミノ酸標準溶液

3.2 プロトコル

アミノ酸キャリアレーション標準溶液: 内標・10pmol/uL スタンダード各 50pmol 分, 0.2M ホウ酸緩衝液 (pH 8.8), AQC 溶液を 1:3:1 の割合で混合し, 直ちに攪拌後, 55°C 10 分間加熱する。

加水分解物: 加水分解後乾燥させた小試験管に 20mM 塩酸, 0.2M ホウ酸緩衝液 (pH 8.8), AQC 溶液を 1:3:1 の割合で混合し, 直ちに攪拌後, 55°C 10 分間加熱する。

典型的には, いずれも全体積で 50uL になるように調製し, その 1/10 をカラムにインジェクションして分析する。

3.3 留意点

(1) AQC は水分があるとただちに加水分解されるため, 溶解に用いるアセトニトリルは HPLC 用など水分含量が痕跡量のものを使用する。望ましくは超脱水アセトニトリルを使用する。AQC 溶液は, 超音波洗浄機に 10 秒ほどかけたのちに, 55°C で加温し, AQC を完全に溶かす。

(2) AQC 溶液はサンプル溶液に添加した後, ただちに攪拌する。

(3) 塩や界面活性剤がある程度共存していても, 誘導体化反応は定量的に進むが, トリス-塩酸緩衝溶液のようにアミノ基を持つものは, AQC と反応し AQC を消費してしまうため, 使用しない。

(4) サンプル中のアミノ酸量と比較して AQC が十分でない場合, 反応が完全に進まないうえに, アミノ酸によってその程度が変わるため, 正確な定量ができなくなる。アミノ酸量を変化させた時の定量値について, どこまで直線性が保たれるか確認しておくとうい。図 1 に種々の量のアミノ酸標準溶液を一定量の AQC 試薬を用いて誘導体化した時の, アミノ酸定量値をプロットした。この場合, 全アミノ酸量 14nmol 程度まで反応の直線性が保たれているが, 17nmol では AQC の量が十分ではなく, 定量値が低くなっている。タンパク質加水分解物を分析する場合には, 常に全アミノ酸量がどれくらいになるかを念頭に, 必要ならば加水分解後にサンプルを希釈することが必要である。

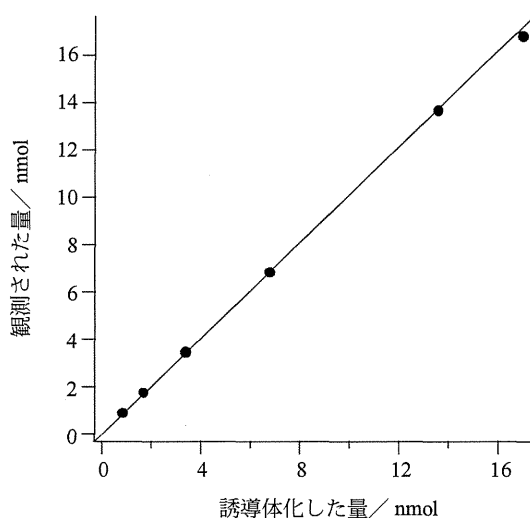


図 1 アミノ酸標準溶液を一定量の AQC 試薬を用いて誘導体化した時の AQC 試薬の反応直線性。

観測された全アミノ酸量を, 誘導体化した全アミノ酸量に対してプロットした。

4. クロマトグラフィー

誘導体化したアミノ酸の分離は、逆相カラムで水-アセトニトリル系の溶離液を用い、アセトニトリル濃度を変化させるグラジエント溶出で行われる。一般に、蛍光分子の発光強度は水溶液中では消光され弱く、有機溶媒中で強くなる。そのため逆相クロマトグラフィーで蛍光誘導体化したアミノ酸を検出する場合、溶離後半で溶離液の有機溶媒濃度が増加すると、ピーク強度が大きくなる。したがって、クロマトグラフィー後半に溶出される疎水性の高いアミノ酸と前半に溶出される親水性のアミノ酸とでは、ピーク応答が大きく異なり、量が少ないアミノ酸を分析する場合には定量性が下がる場合がある。そこで、我々は、イオンペア試薬としてテトラブチルアンモニウムブロミドを用い、アミノ酸間のピーク応答の差がなるべく小さくなるようにしている^{1,10,20,21)} (図2)。

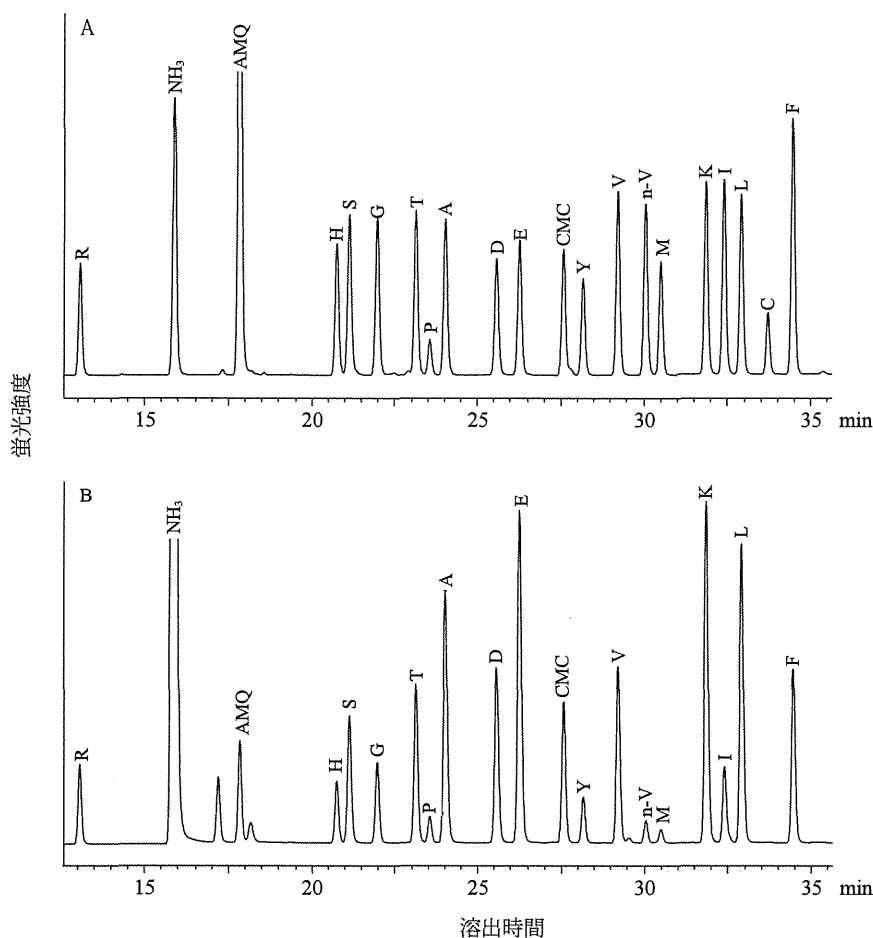


図2 アミノ酸標準溶液と還元カルボキシメチル化したBSA加水分解物のクロマトグラム

AQC誘導体化したアミノ酸標準溶液 5pmolのクロマトグラム (A) とトリプシン消化し、還元カルボキシメチル化したBSA加水分解物 (tBSA) のクロマトグラム (B)。アミノ酸は一文字表記で示している。一文字表記については表1を参照。AMQ: 6-アミノキノリン (過剰AQCの加水分解で生じる)、CMC: カルボキシメチルシステイン、n-V: ノルバリン

アミノ酸の定量は、標準アミノ酸混合液を分析し、そのピーク高さまたは面積を基準に行う。標準アミノ酸混合液はトリプトファン、アスパラギン、グルタミンを除いた17種のアミノ酸からなる。これは、標準的な方法である塩酸加水分解によって、前述のとおりトリプトファンはほとんど破壊されること、アスパラギン、グルタミンはそれぞれ、アスパラギン酸、グルタミン酸になるためである。したがってアスパラギン酸、グルタミン酸の分析値は、それぞれアスパラギン+アスパラギン酸、グルタミン+グルタミン酸の値となる。

定量されたアミノ酸量から、タンパク量を求める方法には2通りある。ひとつは、得られたアミノ酸のモル数に、そ

それぞれのアミノ酸残基質量をかけて合計する方法である。タンパク質のアミノ酸配列の情報がなくともタンパク量がわかるといふ利点があるが、加水分解中に破壊されてしまうアミノ酸は考慮することができない。もう一つの方法は、タンパク質のアミノ酸配列が既知の場合、得られたアミノ酸のモル数を各アミノ酸の理論的な残基数で割ることでタンパク量を求める方法である。理想的には、どのアミノ酸を使って計算しても同一の値（＝タンパク量）が得られるはずであるが、前述したように、加水分解中に破壊されたり、十分に加水分解されないアミノ酸もあるため、この方法を用いるときは回収率の高い安定なアミノ酸を選択するとよい。我々は通常、アラニン、フェニルアラニン、ロイシンの量から得られたタンパク量を平均して算出している。

このような定量を行う場合、検出器の応答の直線性も重要である。蛍光検出器の場合、微弱な蛍光を検出するために、光電子増倍管という信号を増幅する装置を用いる。この光電子増倍管は、印加する電圧を高くするほど、感度が高くなるがノイズも大きくなるため、電圧を変えられる装置であれば、サンプル量などに対応して適当な電圧を選択するとよい。また蛍光検出器は、入力信号に対して、通常2桁から4桁の直線性を示すように設計されているが、その範囲は印加電圧によっても変化するので、前もってチェックしておくとうい。アルギニンの量を変えてAQC誘導体化し、得られたクロマトグラムのピーク面積をプロットしたものが図3である。この場合、100フェムトモルから500ピコモルの範囲で直線的な応答が得られた。

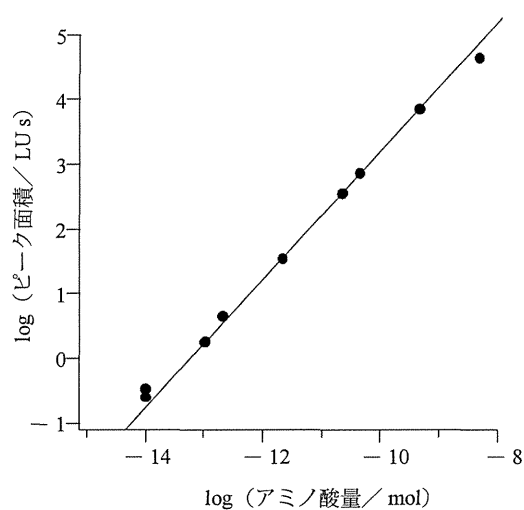


図3 蛍光検出器の応答直線性

AQC誘導体化アルギニンの量に対してクロマトグラムのピーク面積をプロットした。100フェムトモルから500ピコモルの範囲で直線的な応答が得られた。

4.1 必要な試薬・装置

溶離液A: 95% 30mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) + 5mM テトラブチルアンモニウムブロミド, 5% アセトニトリル (HPLC グレード)

溶離液B: 50% 30mM リン酸緩衝液 (pH 7.3), 50% アセトニトリル (HPLC グレード)

HPLC: 2液混合グラジェント溶離ができるもの, 高耐圧クロマトグラフィー, Agilent 1200 SL など

カラム: 高耐圧逆相カラム, InertSustain C18HP (3 × 250mm, 3μm, 耐圧 50MPa) など

4.2 プロトコル

下記のグラジェントでAQC誘導体化アミノ酸を溶出した後、1.8分間カラム洗浄 (99%B), 12.4分間カラム平衡化し次のサンプルの分析を行った。

グラジェント: %B 2-7.3-72.3-99 / 0-2.7-35.4-36.3 min

注入体積：5 μ L

カラム温度：42 $^{\circ}$ C

流速：0.4mL / min

蛍光検出：励起波長 250nm, 蛍光波長 395nm

5. 実験例

株式会社ケーワイエーテクノロジーより販売されているプロテオームスタンダード（還元アルキル化後にトリプシン消化した牛血清アルブミン（tBSA）10 ピコモル（0.66 マイクログラム））を塩酸気相法で加水分解し、AQC 誘導体化し分析した。分析時のクロマトグラムの一例を図 2 に示した。得られた 9 サンプルのアミノ酸組成の平均値および標準偏差を表 1 にのせた。標準偏差は $((\text{実験値} - \text{平均値})^2 / 2)^{1/2}$ で計算した。理論的な BSA の組成は、BSA のアミノ酸配列（Swiss-Prot データベース, P02769[25-607]）から、アスパラギン、グルタミンがアスパラギン酸、グルタミン酸になることを考慮し、トリプトファンが完全破壊されると仮定して計算した。表 1 に示したように、得られたアミノ酸組成は理論的な組成と一致した。システインは還元アルキル化されているため、カルボキシメチルシステインとして定量した。我々のシステムでは、加水分解操作はすべて窒素を充てんした無酸素グローブボックスで行っているため、メチオニンの酸化を防ぐことができる。表 1 に示したように、メチオニンも定量的に回収できている。

表 1 塩酸気相加水分解（110 $^{\circ}$ C 20 時間）した tBSA のアミノ酸組成

アミノ酸 ^a	理論的組成	tBSA ^b	
	%	%	
Arg (R)	4.0	4.2	± 0.1
His (H)	2.8	2.7	± 0.0
Ser (S)	4.8	4.8	± 0.2
Gly (G)	2.8	2.9	± 0.1
Thr (T)	5.7	5.7	± 0.1
Pro (P)	4.8	4.6	± 0.1
Ala (A)	8.1	9.1	± 0.3
Asp (D)	9.5	9.1	± 0.2
Glu (E)	14.0	14.7	± 0.1
CMC	6.0	6.6	± 0.1
Tyr (Y)	3.4	2.7	± 0.0
Val (V)	6.2	5.4	± 0.3
Met (M)	0.7	0.8	± 0.0
Lys (K)	10.0	10.8	± 0.1
Ile (I)	2.4	2.2	± 0.1
Leu (L)	10.0	9.7	± 0.1
Phe (F)	4.6	4.0	± 0.0

a. アミノ酸名の 3 文字表記。括弧内は 1 文字表記を示している。

b. 9 つのサンプルの平均値と標準偏差

おわりに

蛍光誘導体化試薬 AQC を用いることで微量タンパク質の高感度アミノ酸分析が可能になった。しかし微量タンパク質の正確な定量を行うためには、環境からの汚染を防ぐため微量サンプルを取り扱う正確なハンドリングが重要である。特に、加水分解前の汚染は致命的なため、細心の注意が必要である。本節では高感度アミノ酸分析のプロトコルについて、微量タンパク質の加水分解から解説した。このプロトコルによって、10 ピコモル程度の微量タンパク質でも定量

的に分析できることを示した。我々はさらに微量サンプルのアミノ酸分析を行うために高感度化を進め、現在はフェムトモルレベルのアミノ酸定量も可能となっている。興味のある方は文献を参照されたい²¹⁾。これらの技術が基礎研究のみならず、産業利用や医療にも役立つことを期待している。

文 献

- 1) Masuda, A., Dohmae, N., *Biosci Trends*,5, 231-238 (2011)
- 2) Moore, S., Stein, W.H., *J Biol Chem*,176, 367-388 (1948)
- 3) Hirs, C.H., Stein, W.H., Moore, S., *J Biol Chem*,211, 941-950 (1954)
- 4) Moore, S., Spackman, D.H., Stein, W.H., *Anal Chem*,30, 1185-1190 (1958)
- 5) Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S., *Anal Chem*,30, 1190-1206 (1958)
- 6) Benson, J.R., Hare, P.E., *Proc Natl Acad Sci U S A*,72, 619-622 (1975)
- 7) Watanabe, Y., Imai, K., *Anal Biochem*,116, 471-472 (1981)
- 8) Einarsson, S., Josefsson, B., Lagerkvist, S., *J Chromatogr A*,282, 609-618 (1983)
- 9) Lindroth, P., Mopper, K., *Anal Chem*,51, 1667-1674 (1979)
- 10) Masuda, A., Dohmae, N., *Anal Chem*,82, 8939-8945 (2010)
- 11) Cohen, S.A., Michaud, D.P., *Anal Biochem*,211, 279-287 (1993)
- 12) Soga, T., Heiger, D.N., *Anal Chem*,72, 1236-1241 (2000)
- 13) Yoshida, H., Mizukoshi, T., Hirayama, K., Miyano, H., *J Agric Food Chem*,55, 551-560 (2007)
- 14) Chaimbault, P., Petritis, K., Elfakir, C., Dreux, M., *J Chromatogr A*,870, 245-254 (2000)
- 15) Fountoulakis, M., Lahm, H.W., *J Chromatogr A*,826, 109-134 (1998)
- 16) Rutherford, S.M., Gilani, G.S., *Curr Protoc Protein Sci*,58, 11.9.1-11.9.37 (2009)
- 17) Braconnot, Henri, *Ann Chim Phys*,13, 113-139 (1820)
- 18) Bopp, F., *Ann*,69, 16-37 (1849)
- 19) Ozols, J., *Methods in enzymology Vol.182*, Academic Press, San Diego, 587-601 (1990)
- 20) Shindo, N., Nojima, S., Fujimura, T., Taka, H., Mineki, R., Murayama, K., *Anal Biochem*,249, 79-82 (1997)
- 21) Masuda, A., Dohmae, N., *Anal Bioanal Chem*, 405, 8073-8081 (2013)

TGF- β LAP degradation products, a novel biomarker and promising therapeutic target for liver fibrogenesis

Mitsuko Hara¹, m-hara@riken.jp

Tomokazu Matsuura², matsuurat@jikei.ac.jp

and Soichi Kojima^{1,}, skojima@riken.jp*

¹ Micro-Signaling Regulation Technology Unit, RIKEN Center for Life Science Technologies, Wako, Saitama 351-0918, Japan;

²Department of Laboratory Medicine, The Jikei University School of Medicine, Minato-ku, Tokyo 105-0003, Japan;

Corresponding Author:

Soichi Kojima, PhD. skojima@riken.jp

Address: 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0918, Japan.

Phone: +81-48-467-7938; fax: +81-48-462-4675

List of Abbreviations:

ECM, extracellular matrix; HSCs, hepatic stellate cells; α SMA, α smooth muscle actin; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; LAP, latency associated protein; SLC, small latent complex; LTBP, latent TGF- β binding protein; LLC, large latent complex; PLN, plasmin; PLK, plasma kallikrein; LAP-DP, LAP degradation products; LAP β 1, TGF- β 1 LAP; BDL, bile duct ligation; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

Abstract

While there are many blood and/or tissue biomarkers as well as algorithms clinically used to assess hepatic fibrosis, a good biomarker and therapeutic target of hepatic fibrogenesis, which reflects profibrotic changes, has not been established. The most fibrogenic cytokine, transforming growth factor (TGF)- β , is produced as a latent complex, in which TGF- β is trapped by its propeptide. On the surface of activated hepatic stellate cells, plasma kallikrein activates TGF- β by cleaving LAP between R⁵⁸ and L⁵⁹ residues, releasing active TGF- β from the complex. We made specific antibodies that recognize neo C-terminal (R⁵⁸) and N-terminal (L⁵⁹) ends of LAP degradation products (LAP-DP) and found that LAP-DP may serve as a novel surrogate marker of TGF- β activation, namely generation of active TGF- β , thereby a therapeutic marker for TGF- β -mediated liver fibrogenesis in patients and is also used to monitor effects of anti-fibrogenic factors or compounds for discovery of a novel anti-fibrosis drug.

Keywords

Biomarkers; hepatic fibrogenesis; TGF- β ; LAP; latent TGF- β activation; hepatic stellate cells; plasma kallikrein; LAP-DP; drug discovery; anti-fibrosis drug.

Introduction of liver fibrogenesis

Hepatic fibrosis is the excessive accumulation of extracellular matrices (ECM; mainly collagen) in the perisinusoidal space (or space of Disse) in the liver, and an important pathological step developing from chronic hepatitis to liver cirrhosis irrespective of etiologies [1], whereas hepatic fibrogenesis means fibrosis progression or an ongoing reaction producing excessive ECM, sometimes nonsymptomatic, in the liver [2]. While there are many blood and/or tissue biomarkers as well as algorithms clinically used to assess hepatic fibrosis [3-7], a golden standard is still scoring stained collagen fibers in the biopsy sample [3]. However, biopsy is invasive and risky. Imaging techniques including ultrasound elastography have been developed [3]. In contrast, a good biomarker and therapeutic target of hepatic fibrogenesis, which reflects prefibrotic changes, has not been established [2, 3]. Therefore, development of a noninvasive biomarker for hepatic fibrogenesis, which will lead to not only establishment of a novel diagnosis useful to prevent liver fibrosis/cirrhosis, but also acceleration of drug discovery and development against liver fibrosis, is in high demand [3].

Activation of hepatic stellate cells (HSCs)

Hepatic stellate cells (HSCs) play a central role in the pathogenesis of hepatic fibrosis by virtue of their ability to undergo a process termed activation [1, 2]. During this process, HSCs transform into myofibroblast-like cells accompanying several key phenotypic changes, which collectively increase extracellular matrix accumulation [1-3]. These include (1) cellular proliferation caused by upregulation of mitogenic cytokines

and their receptors; (2) morphologic changes with loss of stored vitamin A droplets; (3) contractility caused by increased α smooth muscle actin (α SMA), which may constrict sinusoidal blood flow; and (4) fibrogenesis mainly caused by increased synthesis and release of collagen.

TGF- β and its activation reaction

Among many cytokines and growth factors related to fibrogenesis, the most potent therefore “the most fibrogenic” cytokine is the 25 kD homodimeric cytokine, transforming growth factor (TGF)- β [8]. The TGF- β family is composed of 3 subtypes (TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3), with biological properties that are nearly identical [8]. TGF- β is produced as an inactive latent complex, in which active TGF- β is trapped by its propeptide, latency associated protein (LAP), and for exerting its biological activities, must be released from the complex [9]. This reaction is called activation of TGF- β (Fig. 1). TGF- β 1 is produced as a 390 amino acid precursor protein consisting of a signal peptide of 29 amino acids, an N-terminal LAP, and a C-terminal region that becomes the active TGF- β 1 molecule, and each region dimerized through S-S bonds. After processing by cleavage at R²⁷⁸-A²⁷⁹ by a furin-like protease, the LAP still non-covalently captures the active TGF- β 1, forming small latent complex (SLC) and preventing active TGF- β 1 from binding its cognate receptors [9]. The active TGF- β 1 and the LAP homodimers are 25 kD and 75 kD, respectively. SLC is S-S bonded to another gene product, the latent TGF- β binding protein (LTBP), via C³³ residues, forming the large latent complex (LLC). This complex can be sequestered in the ECM

(Fig. 1) [10] because LTBP is a member of an ECM protein family, fibrillin [11].

Activation of latent TGF- β is performed through different mechanisms depending on the tissue and cell types and experimental conditions and several molecules are known to activate TGF- β 1 in animal models [12-21]. These include integrins [12-15], thrombospondin [16], and proteases, such as matrix metalloproteinases and serine proteases [17-21]. The integrin α v β 6 binds to and activates latent TGF- β and plays a role in regulating pulmonary inflammation and fibrosis as well as biliary fibrosis [12-15]. Thrombospondin 1 is another major activator of latent TGF- β , especially in the lung and pancreas, by binding to a defined site within LAP and inducing a conformational change in the latent complex [16]. In the normal liver, TGF- β is produced and secreted from sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells (KCs, resident macrophages in the liver) at low levels. Elevated production of TGF- β was seen first in all cell types and then mainly in hepatocytes and HSCs after partial hepatectomy, whereas elevated production of TGF- β was seen solely in HSCs after inflammation and fibrosis [22]. TGF- β secreted from HPCs is entirely in the latent form, whereas TGF- β secreted from HSCs is 50%–90% in the active form [22]. Thus, HSCs are recognized as the major source of active TGF- β , namely the site of TGF- β activation, particularly in the damaged liver [22, 23].

We have addressed a potential proteolytic mechanism for latent TGF- β activation in HSCs by surface plasmin (PLN) and plasma kallikrein (PLK) during the formation of hepatic fibrosis [20, 21]. PLN releases latent TGF- β from the extracellular matrix and activates it by cleaving LAP from latent TGF- β molecules on the HSC surface [9, 20].

Lyons R.M. *et al.* first reported that PLN digests LAP and activates TGF- β 1 *in vitro* [24]. Using a protease inhibitor, Camostat Mesilate, we demonstrated that PLN and PLK are involved in the TGF- β 1 activation associated with liver fibrosis and impaired liver regeneration in animal models [20, 21]. However, it remained to be elucidated whether PLN- and/or PLK-dependent TGF- β 1 activation also occurs during the pathogenesis of liver fibrosis in patients as there was no good biomarker reflecting protease-dependent TGF- β 1 activation reaction. To answer this question, we determined cleavage site within LAP and made specific antibodies that recognize LAP degradation products (LAP-DP) bearing neo amino or carboxyl terminus [25].

TGF- β LAP-DP serves as a surrogate marker for its activation reaction

To identify the cleavage sites in LAP during latent TGF- β 1 activation by PLN and PLK, recombinant human LAP β 1 was digested with these proteases, the resultant fragments were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and the N-terminal sequence of each LAP-DPs were determined using a pulsed liquid protein sequencer Precise 494cLC, which revealed that PLN and PLK primarily cleave LAP β 1 between K⁵⁶ and L⁵⁷ residues, and R⁵⁸ and L⁵⁹ residues, respectively, during proteolytic activation of latent TGF- β 1 (Fig. 2) [25].

To detect PLK-produced LAP-DPs, we made two monoclonal antibodies. One is the R58 antibody detecting N-terminal side LAP-DPs terminating on R⁵⁸ residue (R⁵⁸ LAP-DPs), and another is L59 antibody detecting C-terminal side LAP-DPs starting from L⁵⁹ residue (L⁵⁹ LAP-DPs). We established techniques to detect each LAP-DP

using these antibodies [25]. The R⁵⁸ LAP-DPs remaining in tissues or cell surfaces through S-S bonded LTBP can be detected mostly in α SMA- positive activated stellate cells in liver tissues from both fibrotic animals and patients by immunostaining with the R58 antibody, whereas the L⁵⁹ LAP-DPs was not detectable by immunostaining with the L59 antibody [25]. Figure 3 is the results obtained from bile duct ligation (BDL) mice. Those mice often exhibited granulomatous lesions (*panel a*), in which fibroblastic cells infiltrated and started ECM production (*panel b*). Importantly, the R⁵⁸ LAP-DPs were detected in granulomatous lesions prior to Sirius red positivity, namely before collagen accumulation (arrowheads in *panel c*). In contrast, L59 antibody failed to stain the L⁵⁹ LAP-DPs with although various antigen unmasking procedures were treated (*panel d*). We found that the L⁵⁹ LAP-DPs were released into blood and could be measured by the ELISA using the L59 antibody (Hara et al., unpublished data). In panels *e-h*, nonparenchymal regions were recognized by antibody R58 (arrowheads in *panel e*), and mostly overlapped with α SMA-positive HSCs (arrowheads in *panel f*), but not with CD31-positive liver sinusoidal endothelial cells (*panel g*) nor with CD68-positive Kupffer cells (hepatic macrophages) (*panel h*). We further found that the R58 antibody detected TGF- β 1/3 LAP-DPs but not TGF- β 2 LAP-DPs due to the similarity and difference of the R58 side sequence, respectively (Fig. 2). Finally, we succeeded to detect R⁵⁸ LAP-DPs in patients with chronic hepatitis B and C virus (HBV and HCV, respectively) infection categorized as A1F2 and A2F2 as well as in patients with non-viral hepatitis, such as autoimmune hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [25]. A specific cell shape called crown-like structure or CLS is referred to a

biomarker for NASH both in an animal model and patients [26]. Recently, we found that R⁵⁸ LAP-DP positivity well matched emergence of CLS (Konuma et al., unpublished data).

These data suggest the occurrence of a PLK-dependent TGF- β activation reaction in patients and indicate that the LAP-DP may be useful as a surrogate marker reflecting PLK-dependent TGF- β 1/3 activation and subsequent fibrogenesis in fibrotic liver both in animal models and in patients.

Conclusion and future subjects

The most fibrogenic cytokine, TGF- β , is produced as a latent complex, in which TGF- β is trapped by its propeptide, LAP. On the surface of activated HSCs, PLK activates TGF- β by cleaving LAP between R⁵⁸ and L⁵⁹ residues, releasing active TGF- β from the complex. We made specific antibodies that recognize neo C-terminal (R⁵⁸) and N-terminal (L⁵⁹) ends of LAP-DP and found that LAP-DP may serve as a novel surrogate marker of TGF- β activation, namely generation of active TGF- β , thereby a therapeutic marker for TGF- β -mediated liver fibrogenesis in patients [25].

Utilizing the LAP-DP antibodies, we are developing techniques to visualize fibrogenic area by positron emission tomography (PET), planning to eliminate activated HSCs with *Pertussis* toxin, and challenging to solve the co-crystal structure of LAP and a LAP-DP targeting inhibitor, which binds to the LAP cleavage site, thereby inhibiting the TGF- β activation and liver fibrosis in the HBV-infected chimeric mice (Hara et al., unpublished data). The effectiveness of an inhibitor against TGF- β activation reaction

has been reported in the integrin-mediated activation of TGF- β (3, 15, 27). LAP-DP is also used to monitor effects of anti-fibrogenic factors or compounds for discovery of a novel anti-fibrosis drug. For example, we recently found that HCV NS3 protease mimics TGF- β 2 and enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor, and that an anti-NS3 antibody raised against the predicted binding sites attenuates liver fibrosis in HCV-infected chimeric mice [28]. In this study, R58 LAP-DP staining nicely showed the anti-fibrogenic potentials of the anti-NS3 antibody [28].

The technique developed accelerates the drug discovery targeting TGF- β -dependent fibrogenesis in patients suffering from chronic hepatitis.

Acknowledgment

This work was supported partly by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Science of National Institute of Biomedical Innovation (NIBL) and a grant from the Uehara Memorial Foundation, Japan (to S.K.), the Research on the Innovative Development and the Practical Application of New Drugs for Hepatitis B (Principal investigator: Soichi Kojima; H24-B Drug Discovery-Hepatitis-General-003) provided by the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

1. Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115:209–218
2. Friedman SL (2008) Mechanism of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134:1655-1669
3. Schuppan D, Kim YO (2013) Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest* 123:1887-1901
4. Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H (2013) A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep* 3:1065
5. Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H (2013) Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. *Hepatology* 57:1596-1604
6. Fallatah HI (2014) Noninvasive biomarkers of liver fibrosis: An overview. *Adv Hepatol* Article ID 357287
7. Kazankov K, Barrera F, Møller HJ, Bibby BM, Vilstrup H, George J, Grønbaek H (2014) Soluble CD163, a macrophage activation marker, is independently associated with fibrosis in patients with chronic viral hepatitis B and C. *Hepatology* 60:521-30
8. Dooley S, ten Dijke P (2012) TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res* 347:245-256