

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

分担研究課題：In vivo 遺伝毒性試験の低用量リスク評価法に関する研究

研究分担者： 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部
研究協力者： スレッシュ ティルパッティ 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部

研究要旨

遺伝毒性の定量的リスク評価に向けて、特に低用量でのヒトに対するリスク評価モデルの構築は重要な課題となっている。我々はこれまでに、実際のヒトにおけるリスク評価のための暴露マーカーとして、より検出感度が高く低用量までのモニタリングが可能であると考えられるタンパク質の付加体（アダクト）に注目し、LC-MS を用いたプロテオミクス的手法による網羅的高感度検出法としてのプロテインアダクトミクス法の確立を行った

標的となるヒトタンパク質としては、これまでにヘモグロビンをを用いた解析法が報告されているが、我々は血清中に最も豊富に存在し、より反応性が高いと期待されるヒトアルブミン（HAS）に着目した。HSA の 34 番目のシステイン（Cys34）は高い反応性を持つことが報告されているため、我々はまず Cys34 の付加体に注目し解析を行い、昨年度は、モデル実験として、HSA を *in vitro* にてグリシドール等のアルキル化剤を反応させ、目的であるシステイン付加体と合わせて、リジン、ヒスチジン残基のアミノ基への付加体を検出した。今年度は、本検討をより一般化するため、ヒト血清サンプル中の HSA システイン残基における未知の付加体を、MS/MS スペクトルの類似性から網羅的に解析した結果、複数の付加体候補が得られた。非修飾ペプチドとの精密な質量差より付加体の構造を予測した結果、システインの酸化体、ジメチルヒ素付加体に一致する付加体構造が推定された。

A . 研究目的

In vivo 遺伝毒性試験の結果をヒトへのリスク評価へと外挿する場合、ヒトにおける暴露評価が重要となる。食品などでは摂取量からある程度の予測も可能であるが、個体差や未知の危険物質への暴露の可能性などを考えた場合、より確実な暴露マーカーとして、DNA 等の生体高分子への反応物である付加体の検出が、より直接的な評価として有用である。

こうした目的で、従来遺伝毒性の研究では DNA 付加体の検討が行われてきており、化学物質と癌の発生の直接的因果関係の証明に役立つとともに、最近では LC-MS を用いたアダクトミクスと呼ばれる手法により、未知の付加体

を網羅的に検出する試みも進んでいる。DNA 付加体は突然変異の誘発に直結する傷としてその生物学的意義は大きいですが、化学物質の DNA への到達性や、DNA 修復機構により効率的に除去されるなどの問題から、低用量暴露の評価に応用するのはまだ感度的にも難しいと考えられる。通常、変異原物質は核内の DNA と反応する前に、細胞の内外において多くのタンパク質と遭遇し、大部分はこちらと反応してしまうと考えられる（図 1）。そこで、DNA に比べてより反応性が高いと考えられるタンパク質へのアダクトの利用に着目した。

変異原物質は基本的に求電子物質であり、DNA への反応性とともにタンパク質への反応

性を持つ。以前より、各種変異原に対する鋭敏な暴露マーカーとして、血中タンパクに対する各種アダクトの解析が行われ、最近ではアクリルアミドやグリシドールによるヘモグロビンアダクトの報告がされている。我々はさらにこのアプローチを一般化する目的で、近年進歩の著しいLC-MSによるプロテオーム解析技術を利用した網羅的解析によるアダクトームによるアプローチを開始した。ヒトアルブミン (HAS) の34番目のシステイン (Cys34) は高い反応性を持つことが報告されているため、我々はまず Cys34 の付加体に注目し解析を行った。HSA の構造及び暴露マーカーとしての特徴を図2に示す。Cys-34 は立体構造上比較的外側の部分に位置し、求電子化合物による反応を受けやすいと考えられる。トリプシン消化による断片としては、21 アミノ酸と3番目に大きいペプチドとなる。

B. 研究方法

1. ヒト血清サンプルの LC-MS/MS によるプロテオーム解析

ヒト血清サンプルとして、Promedix 社より入手した白人男性の前立腺癌患者由来の血清検体を用いた。

プロテオーム解析に関しては、以下の方法に従った。

1) タンパク質の溶解および消化条件

(タンパク質の溶解)

ヒト血清 2 μ l に2倍量のアセトンを添加してタンパク質を沈殿させた。遠心分離により上澄を除き、沈殿を洗浄後、15 μ l のタンパク溶解液 Rapigest (Waters) 0.1% に溶解させた。

(還元アルキル化)

タンパクの溶解後、トリプシンによる消化を促進するために、以下の条件にてタンパク質 S-S 結合の還元とアルキル化の処理を行なった。タンパク溶液 30 μ l に、30 μ l の 10 mM DDT を加え、60 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 μ l の 30 mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。

(トリプシン消化)

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液 (Trypsin Gold、Promega) を 4.6 μ l (0.25 μ g/ μ l) 加え、37 °C で一晩消化した。消化液を、ZipTip C18 - P10

(Millipore) にて精製後、LC-MS 解析に用いた。

2) LC-MS 測定条件

ナノ LC として、ADVANCE S Nano LC System (Michrome) を使用した。オートサンプラーにて試料を導入し、配管には内径 50 μ m のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (AMR、ZAPOLOUS) およびトラップカラム (CERI、L-column micro) を使用した。移動相は A (2% アセトニトリル、0.1% ギ酸)、B (80% アセトニトリル、0.1% ギ酸) の2種類の組成の溶媒を用い、A100% から B100% へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。サンプルの必要量、最適なグラジエント組成、流速等の測定条件について検討を行なった。

質量分析装置としては、当研究所にて共同利用機器として使用可能な四重極/FT 型のタンデム質量分析装置 Q-Exactive (Thermo Scientific) を用い、前述のナノ LC とオンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。通常の測定は、ポジティブモードを使用した。逆相 C18 カラム (AMR 製 Zaplous Column α 0.1 mm x 50 mm) にてペプチドを分離後、ナノスプレーインターフェース (Captive Spray、AMR) にて質量分析装置へと導入した。

質量分析装置の設定に関しては、基本的に以下の項目に関して最適な MS 測定条件を検討した。

- MS 質量範囲 350-2000 m/z
- Total Analysis Time 150 min
- Resolution 30,000
- Accumulation time Normal (0.1-0.3 sec.)
- Spray Voltage 1600-2000 V
- MS/MS 測定条件 上位 3 ペプチド (2 価以上) を自動選択。
- LC 流速 150-300 nl/min
- LC グラジエント A 溶媒 (2% アセトニトリル、0.1% ギ酸) と B 溶媒 (80% アセト

ニトリル、0.1%ギ酸)によりグラジエント。

3) データ解析ソフトウェアによるノンラベル定量解析

Q-Exactive による質量分析データ(RAW 形式)は、基本的に付属のソフトウェアである Xcalibur を用いて解析し、LTQ-Orbitrap の場合には、FT-MS 測定と MS/MS 測定が同時に行うため、基本的にデータ依存的 MS/MS 測定を同時に行った。また、定量比較のための解析ソフトウェアとして“Progenesis LC-MS” (Nonlinear Dynamics) を採用し、比較プロテオーム解析に利用した。

本ソフトウェアは、二次元電気泳動のゲルスポットの定量比較のために開発されたソフトウェアを基本とし、LC-MS 用に開発されたものである。LTQ-Orbitrap からの生データである Raw 形式のファイルを直接読み込むことができ、TPP と同様に 3D グラフ化が可能である。この画像化されたデータを元に、異なるサンプル間のリテンションタイムの補正を行うことにより、ペプチドスポットのマッチングを行い、複数のサンプル間の定量比較および、統計解析を行うことが可能である。また、MS/MS データを含む複数の Raw データを統合して MASCOT 検索を行う機能もあり、同定結果を取り込んで、タンパクレベルでの解析を行うこともできる。

4) データベース検索によるタンパク質の同定

MS/MS 測定から得られたフラグメントイオンパターンより、ペプチドマスフィンガープリンティング法によるタンパク質の同定を行うための解析ソフトである MASCOT(Matrix Science)を用いて、SwissProt プロteinデータベースを検索した。MASCOT の検索パラメータとしては LTQ 用のデフォルト値を用い、固定修飾としてシステインのカルバミドメチル化を、可変修飾として、メチオニンの酸化、およびセリン、スレオニン、チロシンのリン酸化を設定した。同定の信頼性には、MASCOT のデフォルト値である、 $p < 0.05$ を用い、切断ミス許容数 1 にて検索を行った。

5) システイン 34 含有ペプチドフラグメント

付加体の網羅的解析

同定されたペプチドのうち、システイン 34 を含むペプチド (ALVLIAFAQYLQQ CPFEDHVK) に着目し、このペプチドが溶出されたリテンションタイム付近前後 10 分間に検出された未同定ペプチドの中から、このペプチドフラグメントと類似した MS/MS スペクトルを示すペプチドピークを目視により検索した。

C . 研究結果

1. ヒト血清プロテオームマップ

前立腺がん患者由来血清より得られたタンパク質をトリプシン消化後に、LC-MS によりショットガンプロテオミクス解析し、ProgenesisLC-MS にて解析を行った結果、図 3 に示すようなペプチドマップが得られた。

同時に得られた MS/MS スペクトルデータを利用して MASCOT によるデータベース検索によるタンパク同定を行った結果、ヒト血清アルブミン (HSA) の各種フラグメントが検出されたが、このうち C34 を含むフラグメントは、ALVLIAFAQYLQQ CPFEDHVK からなる 21 アミノ酸残基の比較的長いペプチドとして同定された。このうちのシステインは還元アルキル化によりカルバミドメチル化を受けた形で、質量電荷比 (m/z) = 830.772 の 3 価イオンとして観察された。比較的長いペプチドであるため、逆相カラムによる分離においては、リテンションタイム約 100 分付近の最後の部分に観察された (図 3)。このペプチドピークから得られた MS/MS スペクトラムとその帰属を図 4 に示す。

通常 MS/MS スペクトルにて観察される b および y イオンシリーズのうち、どちらかが観察されることによりほぼすべてのフラグメントがカバーされており、同定の信頼性は高い。システイン残基はカルバミドメチル化された形で検出されている。

このシステインに何らかの付加体が形成されている場合には、還元アルキル化による修飾を受けず、その付加体分の質量数とカルバミドメチル化の差分の質量数変化が生じることと

なる。

MS/MS スペクトルに関して、C34 を含まないフラグメントについては、b、y シリーズイオンともに元の非修飾ペプチドと同一の質量電荷比を持つため、部分的にスペクトルは一致する事になる。このスペクトルの類似性を手がかりに、C34 含有ペプチドと溶出時間が近いペプチドの中で、MS/MS スペクトルの類似したペプチドを、未修飾体の主要なピークを手掛かりとして検索し、アダクトの候補として同定した。その一例を図 4 に示す。

上段の非修飾ペプチドと比較して、システイン残基までを含む y シリーズイオンである y 8 の質量数がカルバミドメチル修飾分(57.02)を加味して $183.97+57.02=240.99$ 増加するとともに、システインを含む y9 以降のフラグメントがすべて同じ質量数だけシフトしていることが確認できる。これは、システイン残基に異なる修飾が起きていることを反映するスペクトルであり、システインを含まないフラグメントである、b2—b4、y4-y7 のフラグメントは、非修飾体と完全に一致している。以上の結果より、このペプチドがシステインに対する付加体を含むペプチドであると結論でき、その質量数は、240.99 となる。同様に、MS/MS スペクトラムの類似性を検討した結果、複数の付加体候補が得られた。これらのうち、精密質量差がタンパク修飾データベース(UniMod)にて既に報告されているシステインの就職と一致したものを表 1 に示した。

これらは、付加体分の質量差として、47.983、103.99、209.025 であり、それぞれ 0.40、11.83、2.65 ppm の誤差で既知の修飾である、cysteic acid(cysteine oxidation)、dimethylarsino、carbamidomethyl DDT と一致した。

また、既知の修飾とは一致しなかった付加体候補の質量数とそれから類推される元素組成を表 2 に示す。元素組成の推定からありえない構造の場合もあるが、いくつかの組成については実際に可能な構造であるとともに、比較的質量誤差も少なかったことから、実際の付加体の構造である可能性も高いと考えられる。得られた組成式から考えられる付加体の構造を図 5 に示した。また、得られた付加体候補物質のサ

ンプル間での発現量のばらつきを図 6 に示す。

今後得られた付加体の構造を、試験管内で合成した標準品との比較などから同定していきたい。

D . 考察

ヒトの変異源物質に対する暴露マーカーとして、血中アルブミンのシステイン 34 残基への付加体に注目し、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクスの手法により、これらを網羅的に検出することを試みたが、MS/MS スペクトルの類似性を手掛かりとして、いくつかの付加体候補ピークが検出された。

未修飾体ペプチドとの質量差が既に報告されている修飾と一致したものが 3 種類あったが、このうち Carbamidomethyl DDT 修飾に関しては、トリプシン消化の際に人為的に入る就職であると考えられるため、サンプル中に存在した付加体ではないと考えられる。

システインの酸化体については、処理の過程で起こる人為的な修飾である可能性は否定できないが、34 番目のシステイン残基は生体内で S-S 結合を生成せず比較的フリーな SH 基として存在することが知られていることから、生体内での酸化作用により生成している可能性も十分考えられる。

最も注目されるのは、有機ヒ素化合物である dimethylarsinous (AsIII) acid 由来の付加体であり、ヒトは低濃度のヒ素に暴露されている事実から、その付加体が検出できたとすれば、その意義は大きい。現在は質量数からの推定に過ぎないため、今後試験管内にて HSA をジメチルアルシン酸と反応させることにより付加体を合成し、LC-MS における確認を行う予定である。

質量差の報告のないペプチドに関しては、その精密質量から取りうる元素組成を推定したが、C₃S や HN₄₀ など現実的にはありえない構造を持つものもあり、これらが付加体である可能性は低い。逆に化合物は特定できないが、取りうる構造のものもあり、今後その付加体の構造を明らかにしていきたい。

今回の検討により、いくつかの付加体の候補が得られたが、ジメチルヒ素を除き、既知の何

らかの変異原物質による付加体は検出されなかった。これまでの報告では、ヒトヘモグロビンを用いて、アクリルアミドやグリシドールといった食品中の変異原物質による付加体が検出されているため、HSA のシステインに対するこれらの付加体が検出されることも期待されたが、残念ながら今回は検出できなかった。検出感度がそれほど高くないためであるとも考えられるが、これまでの検討から、これら化合物はシステイン以外にも、リジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸のアミノ基に対しても反応性を示すことがわかってきており、今後はシステイン残基に限定せず、他のアミノ酸へのアダクトも含めてより網羅的に解析を行う予定である。この際、MS/MS ピークの同一性の検索を容易にするため、独自のアルゴリズムに基づく解析ソフトウェアの開発に着手した。

今後さらに検討を進め、タンパクアダクトーム解析としての手法を確立し、変異原研究に新しい潮流を作ることにより、ヒトの暴露モニタリングとリスク評価へと貢献していきたい。

E . 結論

MS/MS スペクトルより、ヒトアルブミンのシステイン残基 (Cys34) への付加体と推定される複数のピークを血清中にて検出した。いくつかの付加体に関しては既知の修飾であり、未知の修飾については、その質量差より、可能な付加体の構造を推測した。

LC-MS/MS を用いた網羅的アダクト解析は、ヒトの変異原への曝露マーカーの検出に有効である。

F . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Nishikawa K, Iwaya K, Kinoshita M, Fujiwara Y, Akao M, Sonoda M, Thiruppathi S, Suzuki T, Hiroi S, Seki S, Sakamoto T. Resveratrol increases CD68⁺ Kupffer cells co-localized with adipose differentiation-related protein (ADFP) and ameliorates high-fat-diet-induced fatty liver in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2015

- 2) 鈴木孝昌 コンパニオン診断薬の現状と課題 「最先端バイオマーカーを用いた診断薬 / 診断装置開発と薬事対応」 p271-275 (技術情報協会) 2015

2 . 学会発表

- 1) Suresh T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y., Suzuki T. Individual variations in the human urinary proteome in relation to rat. The 3rd International Conference on Personalized Medicine (2014.6)(Prague)
- 2) スレッシュ ティルパッティ、斎藤嘉朗、本間正充、佐藤陽治、鈴木孝昌 変異原暴露モニタリング手法としてのタンパクアダクトミクス日本環境変異原学会第43回大会 (2014.12)(東京)
- 3) Suzuki T., Suresh T. Protein adductome analysis for the human exposure monitoring to mutagens. The 4th Asian Conference on Environmental Mutagens (2014.12)(Kolkata)
- 4) 鈴木孝昌 医薬品開発においてヒト内在性物質を測定する際の定量分析法に関する留意点(案)の概要:規制の重要性と今後の課題 第6回 JBF シンポジウム (2015.2)(東京)

図1 変異原物質による DNA とタンパク質に対する付加体形成の概念図

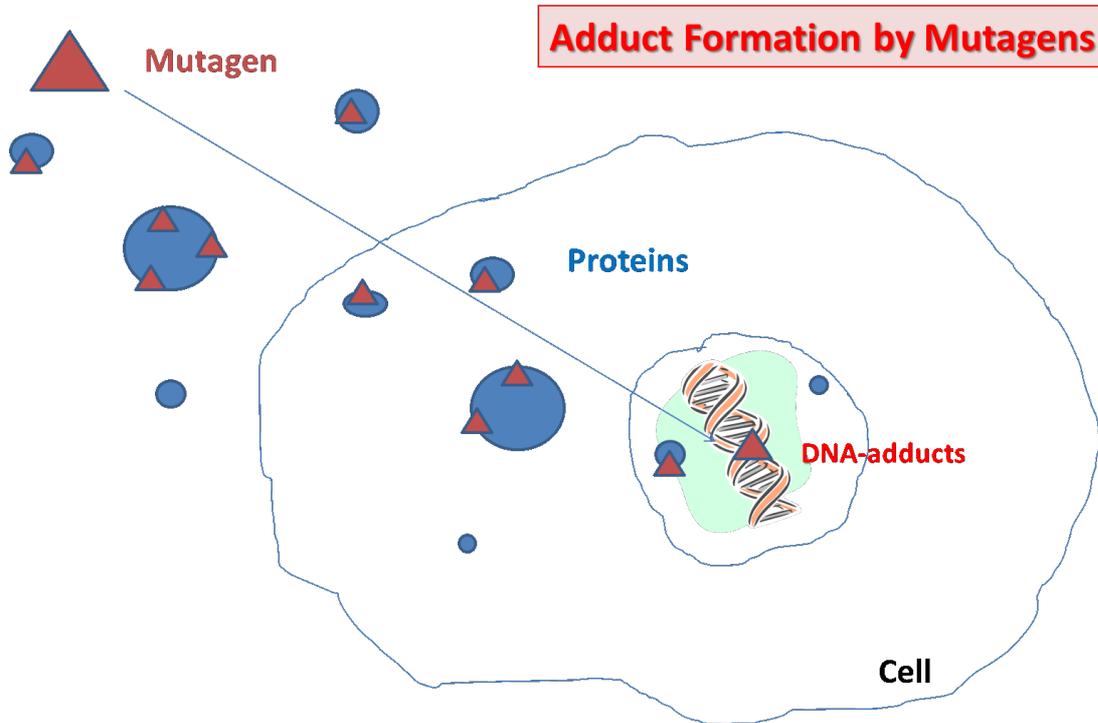
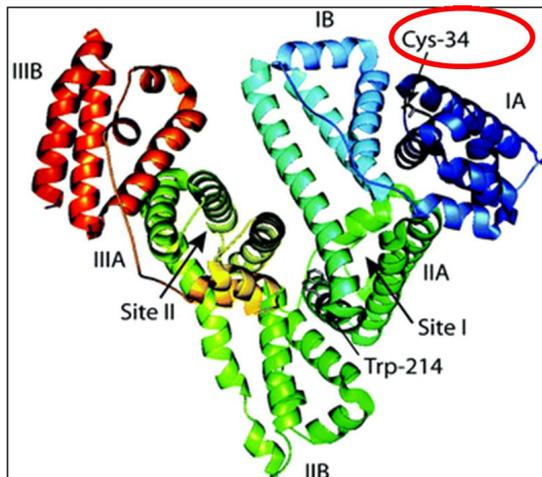


図2 暴露マーカーとしてのヒト血清アルブミン (HSA) の特徴



- Cys³⁴ of HSA is the preferred reaction site for electrophiles in human serum
- It is 3rd biggest trypsinized peptide in HSA with 21 amino acid

Crystal Structure of HSA showing reactive sites

“ALVLIAFAQYLQQ**C**PFEDHVK”

図3 ヒト血清プロテオームマップと HSAC34 フラグメントペプチドピークの溶出位置

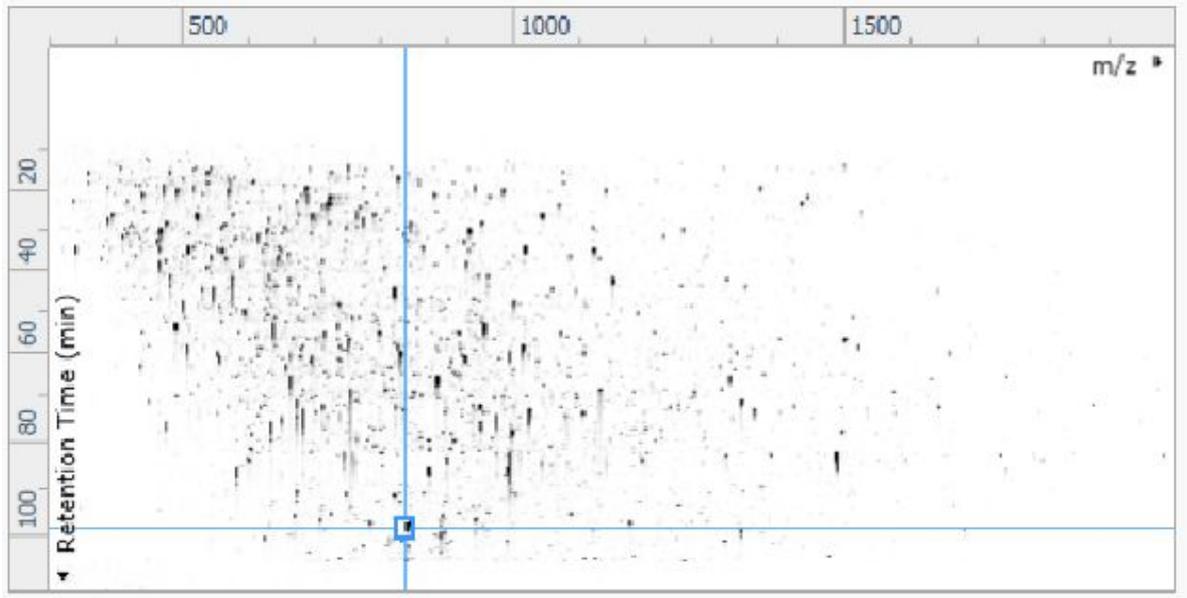


図4 HSA システイン 34 含有ペプチドの MS/MS スペクトルと付加体候補ペプチドの MS/MS スペクトルの比較

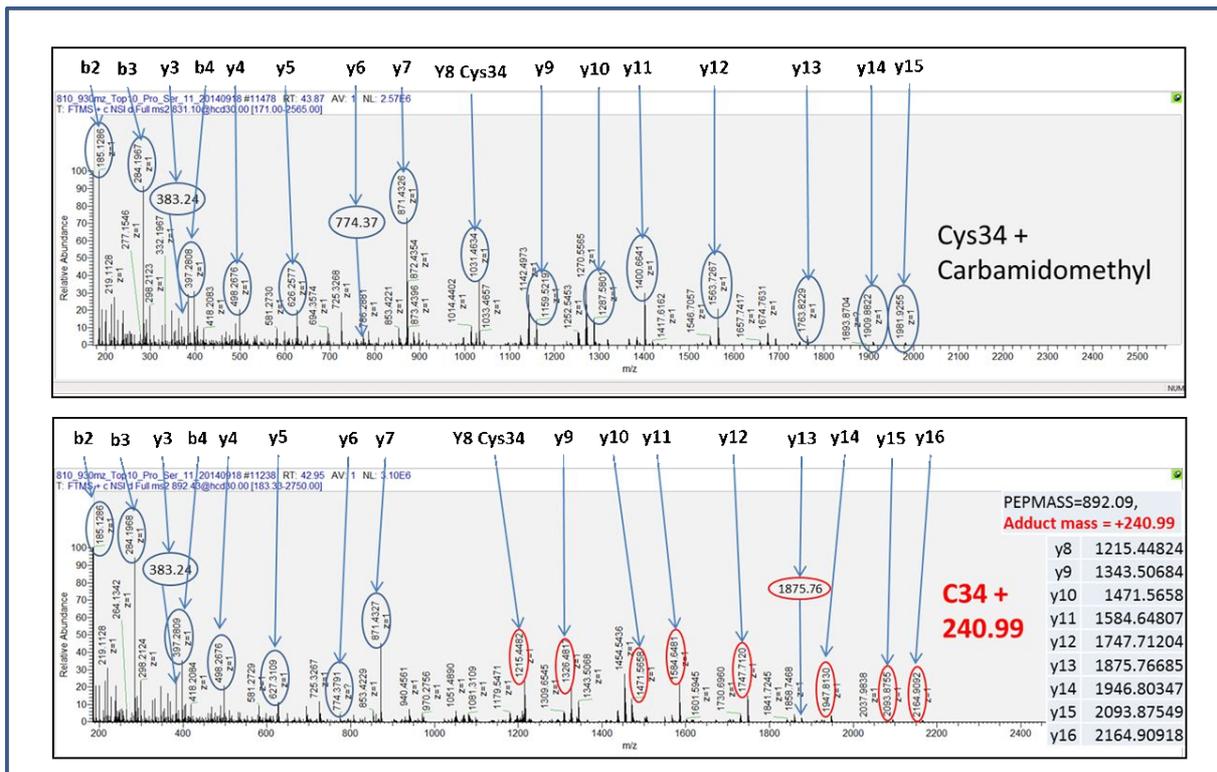
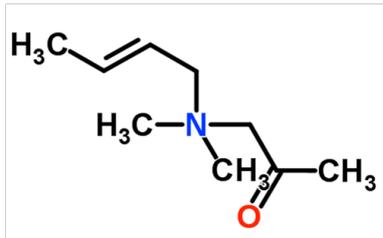


図5 元素組成より推定される化合物の構造

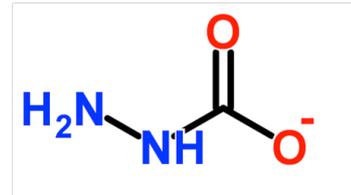
1-[[*(E)*-but-2-enyl]-dimethyl- λ 5-azanyl]propan-2-one

Molecular Formula: C₉H₁₈NO
Average mass: Da
Monoisotopic mass: Da



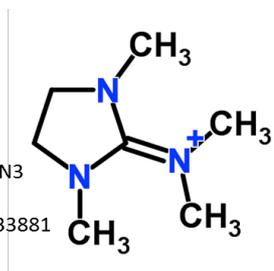
Carbazate

Molecular Formula: CH₃N₂O₂
Average mass: 75.047 Da
Monoisotopic mass: 75.020004 Da



N,N,1,3-Tetramethyl-2-imidazolidiniminium

Molecular Formula: C₇H₁₆N₃
Average mass: 142.221 Da
Monoisotopic mass: 142.133881 Da



(6*S*,7*S*)-6-[(2-Carboxyethyl)sulfanyl]-7-hydroxy-octadecanoic acid

Molecular Formula: C₂₁H₄₀O₅S
Average mass: 404.604 Da
Monoisotopic mass: 404.259644 Da

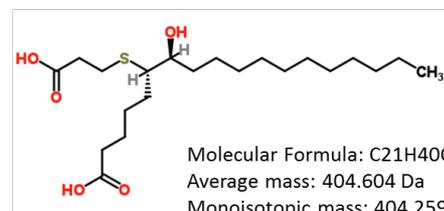


図6 付加体候補ペプチドの発現量のサンプル間でのばらつき

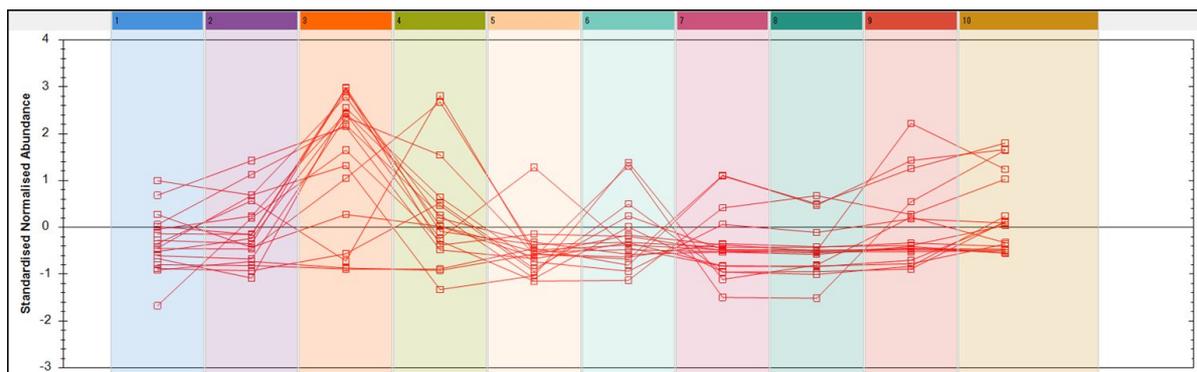


表 1 システイン 34 部位の既知の付加体候補

Modification details - UNIMOD						
Peptide mass	2480.2449	Delta	47.983	PPM error	0.4032	
Accession #	345	PSI-MS Name	Trioxidation	Interim Name	Cysteic_acid	
Description	cysteine oxidation to cysteic acid					
Composition	O(3)	Monoisotopic	47.9847	Average	47.9982	
Specificity						
Site	C	Position	Anywhere	Classification	Chemical derivative	
Peptide mass	2536.2519	Delta	103.99	PPM error	11.8285	
Accession #	902	PSI-MS Name		Interim Name	DimethylArsino	
Description	dimethylarsinous (AsIII) acid					
Composition	H(5) C(2) As	Monoisotopic	103.9607	Average	103.9827	
Specificity						
Site	C	Position	Anywhere	Classification	Post-translational	
Peptide mass	2641.2869	Delta	209.025	PPM error	2.6502	
Accession #	893	PSI-MS Name		Interim Name	CarbamidomethylDTT	
Description	Carbamidomethylated DTT					
Composition	H(11) C(6) N O(3) S(2)	Monoisotopic	209.0180	Average	209.2864	
Specificity						
Site	C	Position	Anywhere	Classification	Artefact	

表 2 システイン 34 部位の未知の付加体候補の質量数と推定元素組成

Peptide Mass	Adduct mass	Elemental	PPM	Peptide Mass	Adduct mass	Elemental	PPM
2464.288	32.002	HO2	343.8	2521.169	88.884	CNS2	747.3
2485.236	53.983	C2HNO	287.5	2572.405	140.119	C7H15N3	4.2
2492.197	59.912	CHOS	915.3	2586.418	154.133	C9H17NO	12.8
2496.244	63.959	HS2	108.3	2588.375	156.090	C11H11N	5.41
2499.222	66.937	C3S	413.0	2629.212	196.927	C7H2OS3	1.12
2505.288	73.003	CH2N2O2	567.0	2675.700	240.990	C10H2N4O2S	0.63
2505.300	73.015	C6H2	8.8	2908.526	476.241	C23H35N5O4S	0.05
2511.260	78.974	O5	7.2	2835.537	403.252	C21H40O5S	18.9

