INTEGRATED PAPER

質量分析による変異蛋白質の迅速検出と臨床検査への応用

Rapid Detection by Soft Ionization Mass Spectrometry
of Variant Proteins and Its Application
for Clinical Laboratory Tests中西豊文^{*a)}・岸川匡彦^{a)}・宮崎彩子^{a)}・清水 章^{a)}Toyofumi NAKANISHI, Masahiko KISHIKAWA,
Ayako MIYAZAKI, and Akira SHIMIZU

(Received September 29, 1995)

The soft ionization mass spectrometry such as MALDI-TOF and ESI are powerful tools for the detection of proteins, peptides and other biological molecules in body fluids. Since biologically active compounds occur at very low concentrations in mixtures containing salts, there has arisen the need for some special sample handling techniques. In this study, we described some simple preparations for the detection of abnormal proteins in blood and urine prior to the analysis by MALDI-TOF and ESI mass spectrometry.

First, by only dilution with distilled water to 10–150 times, albumin and the incomplete immunoglobulin heavy chain in sera and albumin, Bence Jones protein, β_2 -microglobulin, hemoglobin and lysozyme in urine from patients with nephritis, monoclonal gammopathy and monocytic leukemia were clearly detected. Second, adsorption of albumin with Blue gel or IgG with Protein G Sepharose 4FF could be improved the sensitivities and signal-to-noise ratios for the detections of these proteins. Finally, by immunoprecipitations with specific antisera, proteins at lower concentrations, such as carbohydrate deficient transferrin, could be easily detected using MALDI-TOFMS as well as on-line HPLC/ESIMS analysis.

As to the analysis of variant hemoglobinopathy, the peptides prepared by digestion of intact globin were analyzed and nearly 90 significant peaks were detected by a single spectrum from ESI analysis. Ion peaks which were assigned with some degree of certainty covered whole sequence from α - and β -subunits. Especially, at the analysis of a variant hemoglobin "core", the free cysteine residue would be converted into cysteic acid by performic acid oxidation before enzymatic cleavage, which would increase the recoveries of the peptides in the "core" regions. The tandem mass spectrometry with oxidized globin mixture digested with trypsin and lysyl endopeptidase will offer a standard method to detect substitution in the "core" region of hemoglobin.

緒 言

最近、エレクトロスプレーイオン化 (ESI: Electrospray ionization)、マトリックス補助レーザー脱離イオン化 (MALDI: Matrix-assisted laser desorption ionization) などのソフトイオン化質量分析法の分析精度、感度が共に向上し、アトモル (10^{-18}) レベル以下の異常蛋白質の検出およびその構造解析が可能となり、今後、病態診断に重要な血清蛋白質など、生体高分子物質の分析手段として、臨床検査

^{*a)} 大阪医科大学病態検査学 (〒569 高槻市大学町 2-7)

Department of Clinical Pathology, Osaka Medical College (2-7 Daigaku-cho, Takatsuki-shi, Osaka 569, Japan)

Fig 1. MALDI-TOF mass spectra of transferrin in serum.

a) purified normal transferrin by affinity chromatography; b) prepared normal serum with Blue gel; c) prepared serum from a patient with CDG; d) immunoprecipitate of normal serum with anti-transferrin serum; e) immunoprecipitate of serum from a patient with CDG. Tf: transferrin; Ig: immunoglobulin G; Alb: albumin. The arrows show CDT.

に应用されることが期待される。しかし、分析試料の調製には、従来よりアフィニティークロマト法など比較的手間のかかる精製法が用いられてきた。今回、従来法に代わる簡便かつ迅速な前処理手段として、1) 脱イオン水による希釈、2) 市販アフィニティゲルを用い、血清や尿中に多量に存在する共存物質の除去、3) 特異抗体による抗原抗体反応を利用した目的蛋白質の分離などにより分析試料を得、マイクロキャピラリー HPLC/ESIMS あるいは MALDI/TOFMS (Time-of-flight mass spectrometry) により、体液中の種々の異常蛋白質の分析に応用し、その有用性を確立した。

また、異常ヘモグロビン分析では、各サブユニットに分離せず、過ギ酸酸化後、酵素消化し、その消化ペプチドを MS/MS, CID/MS/MS (CID: Collision-induced dissociation) 分析により、“Core” 部分に変異部位のある異常ヘモグロビンの同定に応用し、本法が臨床検査法として実用可能であることを証明した。

実 験

1) 試料

糖鎖欠損トランスフェリン (CDT: Carbohydrate-deficient transferrin): 糖鎖欠損糖蛋白症候群

Fig. 2. Analysis of transferrin in serum prepared by immunoprecipitation via ESI-MS connected to a microcapillary HPLC.

a) normal control; b) CDG patient.

(CDG: Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome) 患者, アルコール多飲者, 肝機能障害患者, 妊婦, および健常者を対象とした. 分析試料は, 既報^{1), 2)}に従い作成した.

血清および尿中蛋白質: Heavy 鎖病, 単クローン性高グロブリン血症, 慢性単球形白血球病, 腎機能障害患者および健常者を対象とした. 被検者血清および尿を脱イオン水にて 10~150 倍に単純希釈したもの, 一定量のブルーゲルあるいはアフィゲルプロテイン G と脱イオン水にて 10 倍希釈した血清あるいは尿を混合, 5~30 分間攪拌後, 遠心分離しその上清を再度~5 倍希釈したものを分析試料とした.

異常ヘモグロビン (Hb): イソプロパノール変性試験陽性患者および健常者を対象とした. 被検者の EDTA 加あるいはヘパリン加赤血球浮遊液より, Drabkin ら³⁾の方法に準じてグロビン混合物を得た. さらに得られたグロビン混合物を直接, TPCK-トリプシン (Worthington Biochemical 社, Lot No. 33K996), さらにリシルエンドペプチダーゼ (和光純薬, Lot No. 035A) を加えて, 24 時間, 37°C にてインキュベーションした後, 凍結乾燥し分析に供した. 一方, グロビン混合物を Hirs ら⁴⁾の方法に従い, 過ギ酸酸化後, 凍結乾燥し, さらに得られた酸化グロビン混合物を 0.1 M-NH₄HCO₃ (pH = 8.4) に溶解し, 酵素消化後, 再度凍結乾燥し分析試料とした. グロビン混合物の酵素処理には, 上記以外に V8 プロテアーゼ (ICN Biochemical 社 Lot No. 33K996) を用いた.

2) 質量分析計

MALDI/TOFMS: 日本電子(株)製 LDI-1700 (Linear 型) およびフィニガンマット社製 Vision-

Fig. 3. MALDI-TOF mass spectra of proteins in serum.

a) diluted normal serum with distilled water to 10–150 times; b) diluted serum from a patient with Heavy chain (α) disease; c) prepared serum from a patient with Heavy chain (α) disease by Blue gel; d) prepared serum from a patient with Heavy chain (α) disease.

Alb albumin; AT: α_1 -antitrypsin; Ig: immunoglobulin G; Tf: transferrin; α H: α chain; γ H: γ chain and *: unknown.

2000 (Linear 型, Reflectron 型) を用いた。マトリックスには、100 mM のシナピン酸あるいは、2,5-ジヒドロキシ安息香酸を用いた。

ESI/MS: ESI イオン源を装着したフィニガンマット社製トリプルステージ四重極型質量分析計 TSQ-

Fig. 4. MALDI-TOF mass spectra of proteins in urine.

a) diluted normal urine with distilled water to 10–150 times; b) nephritis; c) monoclonal gammopathy; d) monocytic leukemia.

Alb: albumin; β MG: β_2 -microglobulin; Hba: hemoglobin α subunit; Hb β : hemoglobin β subunit; γ : Bence Jones (γ) protein; Ly: Lysozyme.

7000を用いた。CID/MS/MSは、オクタポール電圧のオフセットを20 eVに設定し実施した。

マイクロキャピラリー HPLC: 免疫沈降物の分析には、ポリマー系逆相カラム (PLRP-S, 1 mm×50 mm, 1000Å, 8μm, Michrom Bioresources 社製) を装着した Fast Protein Analyzer (Michrom Bio-

Fig. 5. Deconvoluted spectrum of intact globin from a patient with Hb Santa-Ana.

resources 社製) を用いた。溶出条件は、既報²⁾に準じた。一方、グロビン混合物の酵素消化物の分析には、逆相カラム (Vydac C18, 0.5 mm×150 mm, 300Å, 5 μm, Michrom Bioresources 社製) を用い、0.1%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル/水 (2:98, v/v) と 0.08%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル/水 (98:2, v/v) による 45 分間グラジエントにて、酵素消化ペプチドを順次溶出させた。

結 果

Fig. 1 に、MALDI/TOFMS によるアフィニティークロマトによる精製正常 Tf (a), 市販ブルーゲルによるアルブミン除去血清 (b, c), および免疫沈降物中 (d, e) の Tf 分析結果を示す。CDG 患者例 (c, e) では、正常 Tf (79.8 kDa) 以外に約 2.2 kDa 小さい CDT が肩ピークとして検出できた。また、アルコール多飲者例からも CDG 患者に比較して異常の程度は低い、CDT が検出された。

Fig. 2 に、マイクロキャピラリー HPLC/ESIMS による免疫沈降物中の Tf 分析結果を示す。保持時間約 11 分に Tf 分画が出現し、そのフルスキャン ES スペクトルは、+20 から +37 価の多価イオンが明瞭に検出された。一方、CDG 患者例 (b) では、*印で示したように +21 から +30 価の CDT 由来の多価イオンが同時に検出された。また、他の肝機能障害患者、妊婦例では、正常 Tf (79548.8±5.5) 以外にシアル酸脱離 (79265.9±9.7)、フコース付加体 (79704.8±5.2)、Triantenary 型 Tf (80204.7±5.7) の増加が認められた。

Fig. 3 に、健常者血清および Heavy 鎖病患者血清の水希釈 (a および b, d), 市販ブルーゲル処理血清 (c) の MALDI/TOFMS の分析結果を示す。脱イオン水にて希釈処理した健常血清からは、アルブミン (Alb), IgG, Tf, α₁ アンチトリプシン (α₁AT) などのシグナルが検出された。α 鎖病患者血清では、それ以外に Alb の肩ピークとして 69.8 kDa, 35.0 kDa に各々 α 鎖由来のイオンが、γ 鎖病患者血清からは、94.9 kDa に γ 鎖由来の 1 価イオンが検出された。一方、Alb 除去した α 鎖病患者血清からは、α 鎖の 1 価, 2 価, 3 価, および 2 量体イオンが明瞭に検出できた。

Fig. 4 に、脱イオン水による希釈尿の MALDI/TOFMS による分析例を示す。腎機能障害患者では、Alb 以外に 11.7 kDa に β₂ ミクログロブリン (βMG) が、15.1 と 15.9 kDa にヘモグロビン (Hbα, Hbβ) が検出された。また、単クローン高 γ グロブリン血症例では、ベンス・ジョーズ蛋白 (BJP-κ あるいは

BJP- λ) の 1 価イオンが検出できた。単球性白血病患者では 14.9 kDa にリゾチーム (Lyz) および 11.9 kDa に β MG の 1 価イオンが検出された。

Fig. 5 に、イソプロパノール変性試験陽性患者血液より得たグロビン混合物のマイクロキャピラリー HPLC/ESIMS による分析結果を示す。本患者では、 $\beta^{\text{Santa Ana}}$ が 15854.0 に検出され、正常 β 鎖との実測質量数の差は、14.3 であった。

Fig. 6 および 7 に、患者血液より得た過ギ酸酸化グロビン混合物をトリプシンとリシルエンドペプチダーゼを組み合わせて酵素消化し、得られた消化物の ESI/MS/MS による分析結果を示す。本患者では、正常 β T10 が、 $m/z=1470.3$ に、異常 β T10 が、 $m/z=1453.9$ に検出され、その CID スペクトルは Yⁿ シリーズが優位なフラグメントパターンを示し、さらにペプチド内にプロリンの存在を示唆す

Bu Series	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Normal	58.0	159.1	<u>306.1</u>	<u>377.2</u>	<u>478.2</u>	591.3	678.3	807.4	920.5	<u>1057.5</u>	<u>1208.5</u>	<u>1323.6</u>	<u>1451.7</u>
Santa Ana	58.0	159.1	<u>306.1</u>	<u>377.2</u>	<u>478.2</u>	575.1	662.3	791.4	904.4	<u>1041.5</u>	1192.5	<u>1307.5</u>	1435.6
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> $\text{H}-\text{Gly}-\text{Thr}-\text{Phe}-\text{Ala}-\text{Thr}-\text{Leu}-\text{Pro}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Leu}-\text{His}-\text{Cys}^*-\text{Asp}-\text{Lys}-\text{OH}$ </div> </div>													
Normal	1469.7	1412.7	<u>1311.6</u>	<u>1164.5</u>	<u>1093.5</u>	<u>992.5</u>	<u>879.4</u>	<u>792.3</u>	<u>663.3</u>	<u>550.2</u>	<u>413.1</u>	<u>262.1</u>	<u>147.1</u>
Santa Ana	<u>1453.6</u>	1396.6	<u>1295.6</u>	<u>1148.5</u>	<u>1077.5</u>	<u>976.4</u>	<u>879.4</u>	<u>792.3</u>	<u>663.3</u>	<u>550.2</u>	<u>413.1</u>	<u>262.1</u>	<u>147.1</u>
Yn Series	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

a

(Continue)

Fig. 6. CID mass spectra of trypsin-lysylendopeptidase digest after performic acid oxidation by microcapillary HPLC-ESI/MS/MS.

a) normal β T-10 (precursor ion: $m/z=735.6$); b) abnormal β T-10 (precursor ion: $m/z=727.3$) from a patient with Hb-Sanat Ana.

るフラグメントイオンがベースピークとして検出された。次に、オクタポール電圧を 20 eV に設定し、あらかじめこのフラグメントイオンを生成させ、生成したプロリンフラグメントイオンを Q1 マスに導き、さらに MS/MS 分析を実施し、その MS/MS/MS スペクトルから、 β 鎖 88 番目のロイシンがプロリンに置換した変異ペプチドであることを同定することができた。

考 察

抗原抗体反応を利用した前処理は、従来のアフィニティークロマト法、HPLC 法などに比して目的蛋白質の精製、脱塩操作、凍結乾燥などが不要であり、短時間にしかも未変性の分析試料が得られた。MALDI/TOFMS による免疫沈降物の分析では、共存する多量の抗体由来のシグナルは、目的蛋白質のシグナルに影響を与えず、構造異常蛋白質を迅速に検出することができた。一方、オンラインで接続したマイクロキャピラリー HPLC/ESIMS による分析では、前処理操作の過程で混入した無機塩や共存物質の除去および濃縮効果により、アダクトイオンの少ない S/N (S/N: Signal/Noise) 比の良好な ES スペクトルを得ることができた。また、溶出溶媒の極性や pH、スキマー/キャピラリー間電圧を変更することにより、目的蛋白質の多価イオン生成を自由に制御することが可能であった。免疫沈降物中の目的蛋白質の検出限界（混合比 1:1 あるいは 1:10）は、MALDI/TOFMS 分析では、使用血清量は 1 μ l、絶対量としては 200 fmol 相当量であり、オンラインで接続したマイクロキャピラリー HPLC/ESIMS では、5 pmol 相当量と考えられた。検出感度の低下を招くアダクトイオンの生成は、

Rapid Detection by Soft Ionization MS of Variant Proteins

Fig. 7. Octapole CID/MS/MS spectrum of a fragment (precursor ion: $m/z=976.3$) of abnormal β T-10 from a patient with Hb-Sanāt Ana.

血清と特異抗体との反応時間に相関し、時間の経過とともにリン酸、Na イオンなどが付加したアダクトイオンの強度が上昇する傾向にあるため、反応時間は5分間以内が望ましい。

CDG 患者およびアルコール多飲者の免疫沈降物から、正常 Tf と同時に、N-アスパラギン結合型糖鎖1分子が欠如した CDT が検出され、アフィニティークロマト法により精製した Tf を用いた分析結果と一致した^{5), 6)}。また、健常者血清からでも CDT やシアル酸脱離、フコース付加、Triantenary 型などの異常糖鎖構造を持つ Tf が、分析精度 0.01% 前後で正確にかつ迅速に検出できた。

尿中蛋白質の MALDI/TOFMS 分析では、1 μ l の尿を脱イオン水で希釈するだけで無機塩などの夾雑物質の影響を回避でき、病態診断に重要な Alb, BJP, β MG, Lyz, ミオグロビン、ヘモグロビンなどの蛋白質を迅速に検出することができ、しかも内部標準物質を添加することにより定量分析も可能と思われた。一方、血清蛋白の分析でも、単純脱イオン水希釈だけで、Alb, IgG など高濃度に存在する蛋白質は明瞭に検出することができた。しかし、CDT などの異常蛋白の分析には、過剰に存在する Alb, IgG などが、ターゲット上でのマトリックス-試料混合物の結晶化、イオン化を妨害するため、あらかじめ市販のアフィニティーゲルにて Alb および IgG を除去することによって、S/N 比、検出感度共に

良好なスペクトルを得ることができた。

異常 Hb の分析では、各サブユニットに分離せずに、インタクトグロビン混合物を ESI/MS あるいは MALDI/TOFMS にて分析し、異常鎖を迅速に検出することができた。また、酵素消化物の分析では、グロビン混合物を直接トリプシン消化し、その消化物を ESI/MS にて分析したところ、すべての α, β 鎖のトリプシン消化ペプチド 29 個のシグナルを検出することができることを確認した⁷⁾。一方、この簡便処理法で同定できなかった“Core”部分に変異部位が存在する異常ヘモグロビン症の検出には、あらかじめ過ギ酸酸化したグロビン混合物をトリプシンおよびリジレンドペプチダーゼ消化して得られたペプチド混合物を MS/MS あるいは Octapole CID/MS/MS にて分析すれば、“Core”部分のペプチドの回収率も良く、しかも Y⁺ シリーズ優位な構造解析が容易な CID スペクトルが得られた。すなわち、Gaskell らは⁸⁾、C 末側のリジン残基の + 電荷とシステイン酸の - 電荷とが分子内のイオン間相互作用により、反対電荷を打ち消し合った場合、等しく一様にペプチド結合が解裂したフラグメントパターンを示すと考察している。今回、この過ギ酸酸化法にて前処理し、ESIMS 分析することにより、 β T-10 に変異部位の存在する Hb-Santa Ana の、アミノ酸変異部位を迅速に同定できた。

また、この Hb-Santa Ana の同定には、過ギ酸酸化しなくても、従来のトリプシン消化に加えて V8 プロテアーゼを作用させることにより、システインを含まないオクタペプチドが得られ、その得られた消化ペプチドをインフュージョン注入法を用いた ESI/MS/MS あるいは Octapole CID/MS/MS にて、 β 88 番目のロイシンがプロリンに置換した変異ペプチドを同定することも可能であった。

結 論

1) オンラインにて接続したマイクロキャピラリー HPLC/ESI-MS による免疫沈降物中の蛋白質分析では、脱塩、夾雑物質の除去、および濃縮効果により S/N 比、分解能共に良好な ESI スペクトルが得られた。この方法は、検出感度も良好であり、糖鎖構造異常 Tf 以外の他の体液中の変異蛋白質の検出に応用可能である。

2) MALDI/TOFMS による体液中の蛋白質分析は、現在、微量サンプルで、迅速に病態診断に重要な指標蛋白質を検出できる唯一の方法と考えられる。しかも質量分析計の改良に伴って、今後、さらに定量性が向上すれば、臨床検査法として実用化される可能性を有している。

3) 異常 Hb 分析は、従来法では、検出不可能なアミノ酸変異も、ソフトイオン化質量分析法を用いれば、迅速検出が可能であり、しかも過ギ酸酸化グロビン混合物の酵素消化ペプチドの MS/MS 分析により、“Core”部分の変異部位を確実に同定することが可能であり、今後、“Core”部分の変異部位を同定するための標準法となるであろう。

文 献

- 1) T. Nakanishi, N. Okamoto, K. Tanaka, and A. Shimizu, *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 230(1994).
- 2) T. Nakanishi, A. Shimizu, N. Okamoto, A. Ingendoh, and M. Kanai, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **6**, 854 (1995).
- 3) D. L. Drabkin, *J. Biol. Chem.*, **164**, 703 (1946).
- 4) C. H. W. Hirs, *J. Biol. Chem.*, **219**, 611 (1955).
- 5) K. Yamashita, H. Ideo, T. Ohkura, K. Fukushima, I. Yuasa, K. Ohno, and K. Takeshita, *J. Biol. Chem.*, **268**, 5783 (1993).
- 6) Y. Wada, J. Gu, N. Okamoto, and K. Inui, *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 108 (1994).
- 7) T. Nakanishi, M. Kishikawa, A. Shimizu, A. Hayashi, and F. Inoue, *J. Mass Spectrom.*, **30**, 663 (1995).
- 8) O. Burllet, C. Y. Yang, J. R. Guyton, and S. J. Gaskell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **6**, 242 (1995).

Keywords

Immunoprecipitation
Soft ionization
mass spectrometry
Variant proteins
Oxidized globin
cysteic acid
Octapole CID/MS/MS