REVIEW

MS の臨床診断学への応用

中 西 豊 文*

Applications of Current MS Techniques to Disease Diagnostics
Toyofumi NAKANISHI

(Received November 2, 2000; Accepted December 12, 2000)

We have been applied current MS techniques to detect and characterize aberrant proteins and to determine modified proteins from 1994. Two simple methods were devised to prepare proteins in these projects. One was immunoprecipitation with antisera against target protein, followed by LC-ESIMS and the other was 2-dimensional LC connected to ESIMS. Using these procedures, we detected more than 40 cases (10 different types) of transthyretins (TTRs), 5 cases (5 different types) of Cu/Zn superoxide dismutases and 60 cases (29 different types) of hemoglobins (Hbs) for 8 years. TTR has several isoforms in serum, most of which are caused by disulfide linkage with cysteine residue at position 10. We found an ion peak 80 Da larger than unmodified TTR by MS, assigned it to S-sulfonated TTR and the modified TTR can be used as a diagnostic marker for molybdenum cofactor deficiency. We also measured glycosylated β -globin N-terminus hexapeptide (HbA1c) by immobilized endoproteinase Glu-C digestion and measured these digests by LC-ESIMS technique, proposed by Kobold *et al.* and calculated the values of HbA1c by weighted sum of singly and doubly charged ions of these hexapeptides. Finally we describe identifications of Burkitt lymphoma BL60 cell line proteins catalogues by radical-free/high reduction two-dimensional gel electrophoretically separation and a high sensitive nanoflow-electrospray ion trap mass spectrometry.

1. 緒 言

構造異常タンパク質が起因する疾患の種類は年々増加している。その異常タンパク質を迅速に検出することは病気を早期発見し、その病態を解明するうえで重要である。現在、主流となっている遺伝子解析は、迅速で容易であるが、得られる構造情報は翻訳直後の前駆体の推定一次構造であり、翻訳後修飾など Post-Genome 解析には不向きである。一方、1980 年代後半に登場したソフトイオン化質量分析法¹⁾は、インタクト分子のままで 10 kDa 以上のタンパク質の分子量を決定することができ、しかもタンデム型質量分析 (2 台の質量分析計を連結: MS/MS) 法を用いれば、アミノ酸配列を短時間に同定できる。さらに 90 年代に入りソフトイオン化法の技術革新に伴って、HPLC、キャピラリー電気泳動法などの分離手段とオンラインで連結可能となり、数ピコモル量のタンパク質があれば、分子量、アミノ酸配列が決定できることより翻訳後修飾、タンパク質-タンパク質間相互作用などプロテオーム解析にも応用され、今やタンパク質構造解析に必須の手法となった。

本稿では、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) 法を用いた疾患関連変異タンパク質・ペプチド、翻訳後修飾タンパク質の解析例、およびヒト培養細胞から

溶出物のプロテオーム解析例について紹介する。

2. 変異タンパク質の構造解析

1) 異常ヘモグロビン (Hb): 近年、著明な臨床症状を示さず HPLC 法による糖化 Hb 溶出パターン異常を契機に発見される異常 Hb 症が増加しており、これまでに 25 種類 (48 症例) の異常 Hb を同定した^{2)~5)}。

分析対象: HPLC 法 (HA-8150; 京都第一科学) による HbA1c 溶出パターン異常が認められた症例の血液試料を用いた。

症例 1: 27 歳、男性。貧血症状は認められず、HbA1c (日常法) は 2.9% であった。高分解能 HPLC 法にて、HbA₀ より遅れて溶出する異常成分 (31%) を検出した。インタクトヘモグロビン分子を ESI-MS にて分析した結果、正常 α 鎖より 27.0 Da 大きい異常 α 鎖 (15184.5 Da) が認められ、酵素消化後、断片ペプチドの LC-ESI-MS/MS 解析より、 α 鎖 15 番目 Gly が Asp に置換した Hb Interlarken を検出・同定した。

症例 2: 51 歳、男性。貧血症状は認められず、HbA1c (日常法) は測定不可であった。高分解能 HPLC 法では、HbA₀ より速く溶出する異常成分 (25.5%) が存在した。インタクトヘモグロビン分子を ESIMS にて分析した結果、正常 β 鎖より 22.0 Da 大きい異常 β 鎖 (15893.0 Da) が認められ、酵素消化ペプチドの ESI-MS/MS 解析により、 β 鎖 79 番目 Asp が His に置換した Hb Tigraye を検出・同定した。

* 大阪医科大学病態検査学 (☎569-8686 高槻市大学町 2-7)
Department of Clinical Pathology, Osaka Medical College
(2-7 Daigaku-cho, Takatsuki-shi, Osaka 569-8686, Japan)

Table 1. Characterization of Abnormal Hbs by MS

Variants Hbs	Substitution and mass differences	Case No.
I-Interlaken	$\alpha 15\text{Gly} \rightarrow \text{Asp}$ (-58 Da)	1
E	$\beta 26\text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$ (-1 Da)	1
J-Lome	$\beta 59\text{Lys} \rightarrow \text{Asn}$ (-14 Da)	1
Bristol	$\beta 67\text{Val} \rightarrow \text{Met}$ (+32 Da) $\rightarrow \text{Asp}$ (+16 Da)	1
Hamadan	$\beta 56\text{Gly} \rightarrow \text{Arg}$ (+99 Da)	1
Tigraye	$\beta 79\text{Asp} \rightarrow \text{His}$ (+22 Da)	1
Camden	$\beta 130\text{Gln} \rightarrow \text{Glu}$ (+1 Da)	1

Fig. 1. Transformed ES mass spectra of TTR from a normal infant (A) and from a patient with molybdenum cofactor deficiency (B, C). A and B, not reduced; C, reduced. a, Free TTR; b, TTR conjugated with cysteine; c, TTR conjugated with cysteinylglycine; d, TTR conjugated with glutathione; $\square$, TTR S-sulfonated; $\star$, Δ , $\diamond$ modified TTR.

Table 1 に最近 1 年間に我々の教室にて同定した変異 Hb のリストを示す。

3. 翻訳後修飾タンパク質の構造解析

3.1 モリブデン補因子欠損症候群⁶⁾

モリブデン補因子欠損症候群 (molybdenum cofactor deficiency syndrome) では、亜硫酸酸化酵素などの必須要素であるモリブデン補因子が欠損するため、生後すぐよりの治療抵抗性痙攣・重篤な精神発達遅滞などさまざまな臨床症状を呈する。この疾患は、常染色体劣性の遺伝疾患

で、欧州では 72 例の報告があるが、認識不足による見落としが懸念されている。上記症状に加え、低尿酸血症で気づかれることが多い。亜硫酸酸化酵素の活性の低下により、亜硫酸が硫酸に代謝されず、血清中に蓄積する。このため、血清中のシステインは S-スルホシステインに修飾される。遊離システインをもつタンパク質も同様に亜硫酸化されていることが予測された。

Fig. 1A が、健常児のトランスサイレチン (TTR) スペクトルであり、Fig. 1B が本疾患患児のスペクトルであり、Fig. 1C はジチオスレイトール (DTT) による還元処理後の患児のスペクトルである。本疾患患児においては、S-sulfonated TTR (Fig. 1B の 13838.9 Da の分子) が 85% 以上を占め、この手法により診断が可能であると考えられる。

4. 糖化ヘモグロビン (HbA1c) の真値測定^{7)~9)}

4.1 Glu-C 消化/LC-ESI-MS 法

グロビン混合物 1 mg を 100 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4) に溶解し、エッペンドルフチューブ内で固定化 Glu-C (Poroszyme™ Glu-C: PE Biosystems 社製) にて消化 (42°C, 4 時間) し、遠心分離後、得られた上清をシリカ系逆相カラム (Vydac18; CyPress 社) を装着した Fast Protein Analyzer (UMA 社製) に注入した。糖化および非糖化ヘキサペプチド (Hex) を 2 液系溶媒にて溶出させ、TSQ7000 にて検出した。糖化 Hex は、 m/z 429.2, m/z 857.6 を非糖化 Hex は m/z 348.2, m/z 695.4 を指標イオンに設定し、Selected Ion Monitoring (SIM) モードで分析し、ピーク面積比よりその糖化率を算出した。

構造の異なる 2 ペプチド間のイオンピーク強度比は、モル比に比例しているが、イオン化効率によってピーク比を補正する必要がある。

そこで、我々は、イオン強度比よりモル比を算出するため、各々 Hex の 1 価および 2 価イオンのピーク面積の和から求める式：

$$(0.5 \times \text{糖化 Hex } 2 \text{ 価イオン強度} + \text{糖化 Hex } 1 \text{ 価イオン強度}) / (0.5 \times \text{非糖化 Hex } 2 \text{ 価イオン強度} + \text{非糖化 Hex } 1 \text{ 価イオン強度})$$
により検量線を作成した。混合モル比 (糖化 Hex/非糖化 Hex) が 1/5 (HbA1c=16.7%) の場合、その計算値は 0.208 であり、1/9 (10.0%) では 0.118、1/19 (5.0%) では 0.056、1/39 (2.5%) では 0.029 と検量線は直線性 ($n=5$, $r=0.999$, $S_{xy}=0.005$) を示し、再現性も良好であった ($CV < 2.5\%$)。このように上記計算式を用いた

Fig. 2. HbA1c values obtained by HA-8150, and LC-ESI-MS methods. ●, results for homozygous HbA; ○, samples heterozygous for Hb variant and Hb A.

総イオンピーク面積比は、混合モル比にほぼ完全に一致した（傾き 1.0）ことより、本法は HbA1c 真値を算出できることを示唆している。

次に、糖尿病患者 ($n=45$)、異常 Hb 症 ($n=36$) を対象に、Glu-C 消化/LC-ESI-MS 法にて分析し、上記計算式より Hex の糖化率を算出し、HPLC 法との相関性を検討した。相関性 ($r=0.9925$)、回帰式 ($y=-0.7440+0.9142x$) 共に良好であった (Fig. 2)。しかし、HPLC (HA-8150) 法による HbA1c 値は、本法より 1~2 割程度高値に算出された。正誤差の原因について現在解析中であるが、患者溶血検体を高分解能 HPLC にて分画し、各々の分画を LC-ESI-MS にて分析した結果、新規修飾 Hb が HbA1c 分画より検出され、これら成分が加算されるためと考えられた。

5. ヒト培養細胞酸可溶画分のプロテオーム解析

今回、2 週間培養した Ramos 細胞 (B 細胞系) をトリス-酢酸アンモニウム緩衝液中で超音波破碎し、15,000 rpm/10 分間遠心、上清画分をラジカルフリー/高還元性 (RFHR) 2 次元電気泳動後、アミドブラック染色し、陽性スポットを切り取り還元アルキル化後トリプシン消化（ゲル内）し、得られた断片化ペプチド混合物を自家製ナノスプレーティップを用いた NanosprayIT-MS & MS/MS にて構造解析し、データベース検索 (SwissProt) によりタンパク質を同定した。

結果：以下のタンパク質を同定した。括弧内は同定根拠としたペプチドのアミノ酸配列と MH^+ および完全分子の pI 、分子量を示す。*印は高濃度存在したタンパク質。

1) 糖代謝系酵素： Triosephosphate isomerase (pI 6.5, 27 kDa, VVIAYEPVWAIGTGK: 1603.6, TATPQ-QEVHEKLR: 1736.6), *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (8.6, 36, LISWYDNEFGYSNR: 1764.6; VVDLMAHMASKE: 1331.4), *Fructose bis-phosphate aldolase A (8.4, 39, IVAPGKGILAADESTGSIK:

1898.8; LQSIGTENTEENRR: 1647.0), *Pyruvate kinase (7.6, 58 kDa, APIIAVTRNPQTAR: 1508.8), * α -enolase (7.0, 47, SGKYDLDFKSPDDPSR: 1827.9; AGYTDKV-VIGMDVAASEFFR: 2177.5; IGAEVYHNLK: 1144.3)

2) 抗酸化タンパク質： Biliverdin-IX reductase (pI 7.1, 22 kDa, HDLGHFMLR: 1125.8; LPSEGPQPAHV-VVGDDR: 1757.8), Thioredoxin peroxidase (5.9, 22, TIAQDYGVVKADEGISFR: 1983.8; GLFIHDDKGILR: 1360.4)

3) 免疫系に関与： Cyclophilin A (pI 7.7, 18 kDa, VSFELFADKVPK: 1380.6; VNPTVFFDIAVDGEP-LGR: 1947.2), Cofilin (8.2, 18, LGGSAVISLEGKPL: 1341.6; VSFELFADKVPK: 1380.0; VFNDMKVR: 1008.5),

Macrophage migration inhibition factor (7.7, 12, SYSK-LLCGLLAER: 1511.4; LLCGLLAERLR: 1046.2)

4) ストレスタンパク質： Heat shock protein (pI 8.9, 11 kDa, GGEIQPVSVK: 1014.0; KFLPLFDR: 1036.2; VVLDDKYFLFR: 1530.4)

5) 細胞内情報伝達： Protein kinase C inhibitor-1 (pI 6.4, 14, AQVARPGGDTIFGK: 1417.4)

6) 腫瘍転移抑制： Nucleoside diphosphate kinase B (pI 8.5, 17 kDa, TFIAIKPDGVQR: 1344.6)

また、データベースに記載されていない未知タンパク質の一部アミノ酸配列 (PMFXIeVXIeVXIeFXX: 1286.7) を見いだした。

謝 辞 本研究は、大阪医科大学の清水 章教授のご指導と中川俊正助教授、岸川匡彦、宮崎彩子両助手、ならびに同物理学教室の和田明助教授、吉田秀司助手、牧 泰史先生との共同で進められた。

文 献

- 1) Y. Wada, A. Hayashi, T. Fujita, T. Matsuo, I. Katakuse, and H. Matsuda, Structural analysis of human hemoglobin variants with field desorption mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, 667, 233-241 (1981).
- 2) T. Nakanishi, A. Miyazaki, M. Kishikawa, A. Shimizu, O. Kishida, and K. Imai, A new hemoglobin variant found during HbA1c measurement: Hb Hokusetsu [β 52(D3) Asp→Gly]. *Hemoglobin*, 22, 355-371 (1998).
- 3) T. Nakanishi, A. Miyazaki, M. Kishikawa, A. Shimizu, Y. Aoki, and M. Kikuchi, Hb Sagami [β 139(H17) Asn→Thr], a new variant hemoglobin, not detected by isoelectrofocusing and isopropanol test, but detected by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 33, 565-569 (1998).
- 4) T. Nakanishi, A. Miyazaki, M. Kishikawa, A. Shimizu, and Y. Aoki, Hb Peterborough [β 111(GH13) Val→Phe], in a Japanese female, rapid identification by ESI/MS/MS using proteolytic digests of oxidized globin. *Hemoglobin*, 22, 23-35 (1998).
- 5) Y. Ohba, Y. Hattori, S. Sakata, N. Okayama, T. Hirano, T. Nakanishi, A. Miyazaki, and A. Shimizu, Hb Niigata [β 1(NA1) Val→Leu]; the fifth variant with retention of the initiator methionine and partial acetylation. *Hemoglobin*, 21, 179-186 (1997).

- 6) M. Kishikawa, T. Nakanishi, A. Shimizu, and M. Yoshino, Detection by mass spectrometry of highly increased amount of S-sulfonated transthyretin in serum from a patient with molybdenum cofactor deficiency. *Pediatr. Res.*, **47**, 492–494 (2000).
- 7) T. Nakanishi and A. Shimizu, Ratio of the ion peak intensity of glycated and non-glycated hexapeptides from the N-terminal of hemoglobin β -chain by LC-ESI mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **47**, 389–391 (2000).
- 8) T. Nakanishi and A. Shimizu, Determination of ionization efficiency of glycated and non-glycated peptides from the N-terminal of hemoglobin β -chain by ESIMS. *J. Chromatogr. (B)*, **746**, 83–89 (2000).
- 9) T. Nakanishi, A. Miyazaki, K. Iguchi, and A. Shimizu, Effect of hemoglobin variants on routine glycohemoglobin measurements assessed by a mass spectrometric method. *Clin. Chem.*, **46**, 1689–1692 (2000).

Keywords: Current MS technique, Immunoprecipitation-MS, 2-Dimensional LC, Aberrant proteins, Disease diagnostics