〔教育講演〕

電気泳動と質量分析の併用—変異蛋白質同定法のレベルアップ

清水 章

SUMMARY

Direct examination of hemolysate by electrospray ionization mass spectrometry may lead to the rapid ascertainment of variant hemoglobins (Hb) and to the quantification of glycosylated Hb. Plasma and cell proteins other than Hb can be prepared by immunoprecipitation prior to MS. The detected variants were sequenced by MS using enzyme cleaved peptides. We detected various variants of Hb, transthyretin, and CuZn-superoxide dismutase. New variants included; 1) Hb Sagami [β 139(H 17) Asn $\rightarrow$ Thr], and 2) Hb Hokusetsu [β 52(D 3) Asp $\rightarrow$ Gly]. These were studied to clarify the cause of unusual profiles of HPLC for HbA_{1c} measurement. Hb Sagami was an electrophoretically silent and isopropanol test-negative variant, detected solely by ESIMS. Other new variants included; 3) a variant transthyretin, amyloidogenic, [38 Asp $\rightarrow$ Ala], and 4) another variant transthyretin, non-amyloidogenic, [101 Gly $\rightarrow$ Ser]. Variant transthyretins are usually difficult to detect by electrophoresis. Samples containing variant Hb or high carbamylated Hb gave erroneous results of glycosylated Hb by routine HPLC and immunoassay, but did not by MS.

Key words: abnormal hemoglobin, electrospray ionization, variant transthyretin, amyloidosis, carbamylated Hb, glycosylated Hb.

はじめに

蛋白質のアミノ酸配列変異や翻訳後修飾構造を同定し定量することは、病気を診断し病態を明らかにするうえで重要である。この目的に従来から電気泳動やカラムクロマトグラフィーが用いられているが、これに質量分析 (Mass Spectrometry, MS) を併用することにより、測定が速くなり、正確になり、感度が高まる。エレクトロスプレーイオン化 MS 法 (ESI/MS) によると蛋白質分子を全分子のまま、ソフトに (分子を破壊しないで) イオン化し、分子中の数個所が荷電されて、複数の多価イオンが生じる。質量数/電荷として測定され、低質量域で精度の高い分析がなされ

る。例えばヘモグロビン (Hb) では 13 価から 17 価の多価イオンとして 900 から 1,300 の質量数が測定される。これをコンピュータで計算し分子量が得られる。分子量差 10 Da あれば、分裂したピークとして測定される。また酵素消化して得たペプチド混合物を、逆相 HPLC にかけて、その溶出液を on-line でタンデム MS (MS/MS) に接続し、フラグメントイオンを分析することにより、短時間でアミノ酸置換を明らかにすることができる。われわれはこの方法により多数の変異蛋白質を検出し、構造を決定した。通常、約 10 ピコモルで明瞭なスペクトルが得られる。さらに、われわれはキャピラリーカラム先端にポリマー系あるいはシリカ系逆相樹脂を充填し、カラムを分析系

Novel detection method of aberrant blood proteins by electrophoresis and mass spectrometry.

Akira Shimizu; 大阪医科大学病態検査学教室

Correspondence address: Akira Shimizu, Department of Clinical Pathology, Osaka Medical College, 2-7, Daigakucho, Takatsuki 569-8686, Japan.

第 48 回日本電気泳動学会・教育講演

に直結させ感度を上げ、 10^{-15} から 10^{-18} モル量での分析を可能とした。分析には、フィニガンマツト社製 TSQ-7000 質量分析計を主に用いている。MS 分析、材料の調製ほか、方法の詳細は既報の論文¹⁻⁷⁾に譲る。本稿では、異常 Hb、糖化 Hb および血清中の変異蛋白質の分析について、われわれのデータを中心に概略を述べる。

異常ヘモグロビン

これまでに発見された異常 Hb は 700 種類を超えている。検出法として、電気泳動がもっとも普通に行われてきた。等電点電気泳動のような分離能の優れた手段でも、正常 Hb と重なる異常 Hb もあり、それらは不安定 Hb として、加熱あるいは有機溶媒による変性試験を行うことによって検出される。Fig. 1 に Hb の等電点電気泳動像を示した。最上段は正常 Hb、2 段目以下は異常 Hb を含む検体である。case 1 は陰極側に、case 3, 4 は陽極側に異常成分が認められるが、case 2 は異常成分が分離していない。これらの 4 種の異常 Hb は糖化 Hb (HbA1c) の測定の際に、HPLC のクロマトグラムに不明のピークがみられたために分析を依頼された。異常 Hb には臨床症状 (赤血球の鎌型化、溶血性貧血、メトヘモグロビン血症、多血症、など) をきっかけに見いだされるものと、スクリーニングによって見いだされるものがある。近年、糖尿病の指標として HbA1c 測定の普及につれて、これを

Fig. 1. Isoelectric focusing (IEF) on a polyacrylamide gel containing Pharmalyte (pH range 6-9) of the hemolysate from a normal individual and probands.

The arrows indicate the abnormal Hb band. A₀: Hb A₀, A₂: HbA₂.

きっかけに発見される例が多い。

Fig. 2 に通常の HbA1c 測定用の HPLC のクロマトグラム、イソプロパノール試験結果、ESI/MS スペクトル、および MS 分析結果を示した。4 例の HPLC は注意深くみると異常なピークを示している。ESI/MS スペクトルは、Hb を溶血液として、あるいは溶血液に塩酸とアセトンを加えヘムを除いてグロビンとして測定した。血液量 5~50 μ l を用い希釈し、その一部を分析する。得られた複数の多価イオンを質量数に換算し (Deconvoluted spectrum)、図中にそれぞれの多価イオンから計算される質量数の平均値を示している。最上段の正常コントロールの分析例に示したように、 α , β 鎖の実測質量数がそれぞれの理論値にほぼ一致している (理論値 α 鎖: 15126.4, β 鎖: 15867.2)。case 1, 2, 3 では β 鎖が 2 本に分裂しており、両ピークの質量数差を右列に示した。case 4 は α 鎖にも β 鎖にも分裂したピークは認められない。質量数差と泳動度からアミノ酸置換の種類を絞ることができる。さらにグロビン混合物をトリプシン等の蛋白分解酵素で分解し、HPLC/ESI/MS によって分析する。グロビンの MS 分析によって得られた質量数差を手掛かりに異常ペプチドを検出し、MS/MS によってアミノ酸配列を明らかにした。結果を Fig. 2 右列括弧内に示した。図からわかるように、case 1 は質量分析でも等電点電気泳動でも変性試験でも検出される。case 3 は質量分析と等電点電気泳動で見いだされる。case 4 は質量数差がほとんどない変異であり、等電点電気泳動でのみ見いだされる。逆に、case 2 は質量分析によってのみ見いだされる。理論的にはこれらのいずれの方法でも検出できないものも考えられる。グロビン混合物のままの測定では、現在われわれが用いている質量分析計では、質量数差 10 以上が必要である。荷電が同じで、質量数の近いアミノ酸の組み合わせは Leu-Ile(0), Asn-Leu(1), Asn-Ile(1), Cys-Thr(2), Thr-Val(2), Val-Pro(2), Met-Gln(3), Cys-Val(4), Thr-Pro(4), Cys-Pro(6)、(括弧内質量数差)であり、このうち、2 段階の塩基変異を必要とする組み合わせを除くと、Leu-Ile, Asn-Ile, Thr-Pro が残る。このような中性アミノ酸間の変異でも高次構造上荷電に変化が生じて、泳動で差を示す場合もあり、また変異によって変性しやすい性質を獲得すると安定試験で見いだされる。on-line の逆相 HPLC によりグロビン鎖を分離し、両ピークの質量を連続して測定することにより、上記の Thr-Pro(4) の変異による異常鎖は検出し得ると考えている。これ

Fig. 2. Comparison of the results among a normal individual and 4 cases of abnormal Hb.

1) chromatogram of routine HPLC using ionic exchange weak cation exchange column chromatography, HA-8121, Kyoto Daiichi, Kyoto, 2) isopropanol test, 3) deconvoluted ESI spectra of intact globin, 4) mass differences between normal and abnormal β -chains measured by ESI/MS, substitution determined by us in parenthesis and the name of Hb. Whole blood samples were diluted 500 times with a 0.2% formic acid-50% acetonitrile solution and 5 μ l of the diluted solution was injected into ESI/MS (TSQ 7000) via a sample loop. The results of the normal individual and probands (cases 1-4.) correspond to cases shown in Fig. 1. β^* : abnormal β -globin.

までの分析で、HbSとCとの2重ヘテロ型 [β 6 (A3) Glu→Val, Lys], HbEのホモ型 [β 26 (B8) Glu→Lys] においては、正常の β 鎖が混ざっていないので、GluとLysの質量数差の1を明確に捕らえ得た。

case 2は正常 β 鎖より13 Da小さい異常鎖として見いだされ、グロビン混合物をトリプシンおよび

lysyl endopeptidaseで消化したペプチドをLC/ESI/MS (逆相HPLC-silica-based Vydac C_{18} -溶出液をon-lineでESI-MSにつなぐ) によって分析し、 β T-14より13 Da小さい異常の β T-14を見いだした。さらにこのフラグメントイオンをMS/MSにより分析し、[β 139 Asn(H 1)→Thr]であることを決定し、これまでに報告されていない新しい異常Hbであった

ので, Hb Sagami と名づけた⁷⁾. また, やはり HbA1c 分析をきっかけに [β 52 Asp(D3) $\rightarrow$ Gly] を見だし Hb Hokusetsu と名づけた.

MS によると翻訳後修飾の異常を明らかにすることができる. 翻訳後修飾構造は DNA 分析ではわからない. Hb Bristol は DNA 分析で β 67, GTG(Val) $\rightarrow$ ATG(Met) と報告され, 蛋白質化学的方法で Val $\rightarrow$ Asp とされていたが, われわれは MS を用い Met, Asp の両方を含む配列が存在することを示した⁸⁾. 翻訳後, ヘム鉄近傍の Met が一部酸化され Asp に変化すると考えられる. また, Hb Niigata [β 1 Val(NA1) $\rightarrow$ Leu] では, イニシエーターの Met が切断されており, さらに N 末 Met が 20% アセチル化されていることを示した. Hb Santa Ana [β 88 Leu $\rightarrow$ Pro], Hb Peterborough [β 88 Leu $\rightarrow$ Pro] 等, 本邦未報告例を決定した.

MS による糖化 Hb の測定

Fig. 2 の最上段正常 control の Hb の ESI/MS スペクトルをみると, α 鎖 β 鎖の両ピークとも, 高質量側に小ピークを伴い, 小ピークの質量数はそれぞれのグロビン分子に 162 付加されており, グルコースが 1 分子結合していると考えられる. 糖化ヘモグロビンの代表成分は, β 鎖 N 末端にグルコースのアルデヒド基が Schiff 塩基を生成した後, Amadori 転位して生じた HbA1c である. HbA1c は糖尿病コントロールのマーカーとして近年重要度が増している. しかし測定法には HPLC, アフィニティカラムクロマトグラフィー, 糖化部分に対する特異抗体を用いる免疫法など多種類あり, 方法間で測定値にかなり大きい差が認められている. 方法間の誤差を少なくするために安定した標準物質があれば良いのだが, Hb は変化しやす

Table 1. Comparison of the glycosylated hemoglobin values were measured by 4 methods.

	HPLC ^a	Latex agglutination ^b	Poly CAT A ^c	ESI/MS ^d
HbM Boston (α 58 His $\rightarrow$ Tyr)	4.5	5.5	2.5	3.7
Hb Riyadh (β 120 Lys $\rightarrow$ Asn)	2.7	5.0	2.9	3.0
	2.6	5.1	2.7	4.0
	4.3	6.6	2.2	5.2
Hb Peterborough (β 111 Val $\rightarrow$ Phe)	2.6	3.8	1.1	2.9
Hb Takamatsu (β 120 Lys $\rightarrow$ Glu)	2.5	4.5	3.2	3.4
Hb Niigata (β 1 Val $\rightarrow$ acMet-Leu Met-Leu)	13.8	3.5	4.6	5.8
	13.2	3.3	4.7	6.9
Hb Sagami* (β 139 Asn $\rightarrow$ Thr)	1.1	1.1	1.0	1.8
Hb Hokusetsu (β 52 Asp $\rightarrow$ Gly)	4.6	11.0	5.2	11.8
HbE** (β 26 Glu $\rightarrow$ Lys)	0	4.9	0	5.2
Uremia (n=11)	7.1 $\pm$ 1.4	6.0 $\pm$ 1.0	5.7 $\pm$ 1.7	5.7 $\pm$ 1.0
Reference values	4.4 $\pm$ 0.9	5.0 $\pm$ 0.4		

HPLC; routine HPLC using ionic exchange weak cation exchange column chromatography, HA-8121, Kyoto Daiichi, Kyoto, Latex agglutination; Immunoassay by latex agglutination, DCA-2000 Bayer-Sankyo, Poly CAT A; high resolution cation-exchange HPLC⁹⁾, ESI/MS, whole blood samples were diluted 500 times with a 0.2% formic acid-50% acetonitrile solution and 5 μ l of the diluted solution was injected into ESI/MS (TSQ 7000) via a sample loop⁹⁾.

a: HbA1c/total Hb, b: HbA1c/total Hb, c: HbA1c/total Hb, d: glycosylated normal β subunit/glycosylated normal β subunit + non-glycosylated normal β subunit. The amount of glycosylated abnormal Hb (counterpart of HbA1c) is not included in the calculation in c and a. * Possibly associated with β thalassemia, ** Homozygote of HbE.

いので、標準物質の信頼性は低い。溶液状態でも凍結乾燥状態でもメト化、システインへのSH化合物の結合、さらに変性などが避けられない。標準物質は時間とともに変化しており、われわれの高分解イオン交換HPLCによっても、質量分析によっても、標準物質および採血後数日冷蔵保存された血液検体がこれらの変化したHbを相当量含んでいることが明らかである。このような変化がHPLCのクロマトグラフを変えてしまう。また異常ヘモグロビンが存在すると、これまでのいずれの方法を用いてもHbA1c値は大きく狂ってしまう。同じHPLCであっても京都第一科学の機械と、東洋曹達の機械で異なるクロマトグラフと測定値を示す異常Hb例もみられる (Table 1, Hb Hokusetsu)。腎機能が低下して血中尿素値が上昇する場合、カルバミルHbが増加し、HPLCによるHbA1c値に正の誤差を与える。これも知っていないと誤診、誤療につながる。われわれはESI/MSによって溶血液を分析し、糖化Hbを精度よく測定できることを示した⁶⁾。β鎖の非糖化成分と糖化成分の比を求めた。再現性は3%以下であり、従来法との相関は0.990、分析時間は1検体あたり3分であった。MSでは異常Hbを含む検体においても、高BUN値検体においても、正確に糖化成分の比率が出ると考えられるので、このような検体を用いて、従来法とMSとでどのような差があるかを検討した。

Table 1は4種の方法による糖化Hbの測定値を比較した。糖尿病を含むHbA1c測定依頼検体および異常Hb例と、腎機能低下例を用いた。HPLCは日常検査による測定値であり、京都第一科学社製の全自動GHb測定機による。免疫法としてパイエル三共DCA-2000によった。異常Hbおよび高尿素値検体について、詳しく調べるため、高分解能イオン交換樹脂を用い、溶出液のpHイオン強度グラジエントで60分の測定系によって分析した。ESI/MSによってβ鎖の糖化非糖化の比を求めた。多数例について通常のイオン交換HPLCによるHbA1c値とESI/MSによる糖化非糖化β鎖の比率の相関をみると、通常のサンプルはほぼ直線上に並んでおり、上記のように相関は良い。異常Hbを含む検体は大きく回帰直線よりずれており、異常Hbの種類によって通常のHPLCによるHbA1c値のほうが低い場合が多い (Table 1)。血中尿素高値例 (BUN>50 mg/dl, creatinine>2.5 mg/dl) ではHPLCによるHbA1c値が高い傾向にある。尿素より生じたシアン酸が反応し、カルバミルHbに変化し、HPLCのHbA1cピークに一部重なるため

ある。一方抗体法ではβ鎖N末に異常のあるHb Niigataで低値を示している。このように従来の測定法をモニターする目的にも質量分析は必須の手段なのである。

血清中蛋白質

全分子のままでESIMSにより質量数を目安としてHb以外の変異蛋白質を検出することも可能である。Hbは血中に高濃度に含まれるので、溶血液を作成するだけで分析できるが、その他の血中、組織中蛋白質は、手間のかかる精製を要する。われわれは試料に抗血清を加え、生じた沈殿物を洗浄後、LCを連結したMSにより分析し、目的蛋白質の明瞭なシグナルを得られることを示した。この方法によりトランスサイレチン (TTR) を分析し、30例を超える異常TTRを同定した。異常TTRは家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の原因となり、その検出、同定は臨床上も重要である。これまでに同定したTTR変異のうちで、[30 Val→Met]、[109 Ala→Ser]などは、既報の構造変化であり、アミロイドーシスを起こす変異であった。加えて、これまでに報告されていない異常TTRを見いだし、MSにより構造を明らかにした。1つはアミロイドーシスを起こす症例であり、[38 Asp→Ala]と決定された。もう一方は、75歳までアミロイドーシスに原因する症状を示していない症例で、[101 Gly→Ser]の変異であった。101 Glyは分子表面にあり、4量体において、他サブユニットとの接触面に位置していない。またサイロキシン、レチノール結合蛋白質の結合位置からも離れている。[60 Thr→Ala]はアミロイドーシスの症例であり、これまでの報告はアイルランド系のアメリカ人家系であり、わが国では初めての例である。FAPでは肝移植が良好な治療効果をあげている。免疫沈降物のMSにより、肝移植後、異常成分 [30 Val→Met] が完全に消失することを示した。

さらに銅亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) と抗SOD1の免疫沈降物の分析により、赤血球中、脊髄組織よりの抽出液中に変異SOD1を検出し、正常と異常成分の量比を測定できることを示した。変異SOD1は家族性筋萎縮性側索硬化症例 (FALS) の一部の原因になっており、異常成分の半減期と重症度とが関連する可能性が指摘されており、MSによる変異SOD1の量比決定は臨床上重要であろう。

Fig. 3にFALS患者の赤血球中のSOD1分析結果

Fig. 3. The transformed ES mass spectrum of reduced SOD 1 in erythrocytes prepared by immunoprecipitation from a normal individual (a) and from patients with familial amyotrophic lateral sclerosis.

b: [G 37 R]; c: [A 4 S]; d: [H 46 R]. A: normal monomer SOD 1; A*: mutant monomer SOD 1; The values in the figures are the average molecular mass and standard deviation of a mass spectral plot for each multiply charged ion, calculated using the BIOMASS deconvolution program installed in the Finnigan TSQ 7000 instrument.

を示した。図中にそれぞれの多価イオンから計算される質量数の平均値と標準偏差を示している。また脊髄組織抽出液から同様に免疫沈降し、異常 SOD 1 を検出することができる。われわれは Cu イオンとの結合

や、異常 SOD 1 の安定性の測定その他のさまざまな血清中組織中の成分の分析に MS を応用しようとしている。

共同研究者 大阪医科大学病態検査学教室 中西豊文, 岸川匡彦, 宮崎彩子, 小山郁夫, 河野好恵

貴重な検体を分析させていただいた下記各施設の先生方に深く感謝いたします。

青木芳和 (神奈川県予防医学協会・臨床検査部), 菊池美也子 (神奈川県予防医学協会・総合精密健診部), 大庭雄三 他 (山口大・臨床検査医学), 安東由喜雄 他 (熊本大・第一内科), 中里雅光 他 (宮崎医科大第三内科), 田本重美, 大澤伸昭 (大阪医大・第一内科), 上野玲 他 (川崎病院・内科), 佐古田三郎, 小川康子 (阪大・神経内科), 吉岡尚文 (秋田大・法医学), 岸田修 他 (吹田市民病院・内科)

文 献

- 1) Nakanishi T, Okamoto N, Tanaka K, Shimizu A. Laser desorption time-of-flight mass spectrometric analysis of transferrin precipitated with antiserum: A unique simple method to identify molecular weight variants. *Biol Mass Spectrom* 1994; 23: 230-3.
- 2) Nakanishi T, Shimizu A, Okamoto N, Ingendoh A, Kanai M. Analysis of serum protein precipitated with antiserum by matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight and electrospray ionization mass spectrometry as a clinical laboratory test. *J Am Soc Mass Spectrom* 1995; 6: 854-9.
- 3) Kishikawa M, Nakanishi T, Miyazaki A, Shimizu A, Nakazato M, Kangawa K, Matsuo H. Simple detection of abnormal serum transthyretin from patients with familial amyloidotic polyneuropathy by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry using material precipitated with specific antiserum. *J Mass Spectrom* 1996; 31: 112-4.
- 4) Nakanishi T, Miyazaki A, Kishikawa M, Shimizu A, Yonezawa T. Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of peptides derived by enzymatic digestion of oxidized globin subunits: An improved method to determine amino acid substitution in the hemoglobin "core". *J Am Soc Mass Spectrom* 1996; 7: 1040-9.
- 5) Miyazaki A, Nakanishi T, Kishikawa M, Shimizu A, Ohba Y, Tanaka A, Sasaki H. Post-

translational modification from methionine to aspartic acid residue on a variant hemoglobin, Hb Bristol, a proof by ESI-MS-MS. J Mass Spectrom 1996; 31: 1311-3.

- 6) Nakanishi T, Miyazaki A, Kishikawa M, Yasuda M, Tokuchi N, Kanada Y, Shimizu A. Quantification of glycated hemoglobin by electrospray ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom 1997; 32: 773-8.
- 7) Nakanishi T, Miyazaki A, Kishikawa M, Shimizu A, Aoki Y, Kikuchi M. Hb Sagami [β 139(H 17)Asn $\rightarrow$ Thr]: A new hemoglobin variant not detected by isoelectrofocusing and isopropanol test, was detected by electrospray ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom 1998; in press.
- 8) Bisse E, Wierand H. High-performance liquid chromatographic separation of human haemoglobins. J Chromatogr 1988; 434: 95-110.