

## 蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる

### 生体内タンパク質の高感度分離分析

日大生産工 ○朝本 紘充 南澤 宏明 中釜 達朗 齊藤 和憲  
武蔵野大・薬研 今井 一洋

#### 【はじめに】

分析化学の分野において幅広く用いられている分析機器の一つに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) がある。HPLCは、充填剤 (固定相) を詰込んだカラムに水や有機溶媒などの液体を流しながら、移動相に目的成分を含む試料を混ぜて固定相を通過させることで試料の成分分離を行う装置である。一般にHPLCでの検出には、目的成分の性質を考慮したうえで、吸光度、示差屈折率、電気化学、質量分析、蛍光および化学発光などの各検出器から最適な検出手段を選択する。なかでも、蛍光検出法は、蛍光性化合物のみを標的とすることから他の検出法に比べて選択性が高く、高感度である。しかし、目的成分が蛍光体でない場合、HPLC-蛍光検出だけでその分析を行うことは不可能である。この場合、それらを蛍光試薬で標識化し、HPLCで分離、検出することで高感度かつ再現性良く定量することが可能である。ここでは、我々がこれまでに行ってきたDAABD-Clと呼ばれる発蛍光誘導体化試薬を利用した老化ラット脳内のプロテオーム解析、並びに蛍光試薬であるThioflavin Tを用いたアミロイド線維と呼ばれる病原性のタンパク質凝集体の分析について紹介する。

#### 【老化ラット脳内のプロテオーム解析】

2003年にヒトゲノムの解読完了が宣言されて以降、病因遺伝子を特定するための研究が進んでいる。しかし、生体内で疾患の発症に直接的に関与するのは遺伝情報の最終産物であるタンパク質であることから、それら疾患の発症機構を解明するためにはゲノムのみならず、プロテオームの解析が重要である。近年では、正常組織と疾患発症部位内で存在量が変化しているタンパク質またはある組織内で加齢に伴い発現量が変動するタンパク質

の検出・同定などを目的とした「プロテオミクス研究」が急速な発展を遂げている。

Toriumiらは、チオール基選択性発蛍光誘導体化試薬であるSBD-Fにより生体試料中のタンパク質を蛍光誘導体化(Fluorogenic derivatization: FD)し、蛍光検出器と組み合わせたHPLCにより分離、検出した後、目的タンパク質のみを抽出し、これを酵素水解してHPLC-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)に付し同定するという新規プロテオーム解析法(FD-LC-MS/MS法)を開発した<sup>1)</sup>。さらにMasudaらは、LC-MS/MSでの高感度検出をも可能にした発蛍光誘導体化試薬であるDAABD-Clを開発した<sup>2)</sup>。DAABD-Clを用いたFD-LC-MS/MS法は、その高い感度と再現性により、比較的タンパク質抽出量の少ないマウス脳内の微小部位(海馬、大脳皮質及び脳幹)における高感度なプロテオーム解析を可能とした<sup>3)</sup>。本講演では、同手法を用いて行ったラット海馬内で老化に伴い発現量が変動するタンパク質の検出及び同定の実験に関する成果<sup>4)</sup>について報告する。

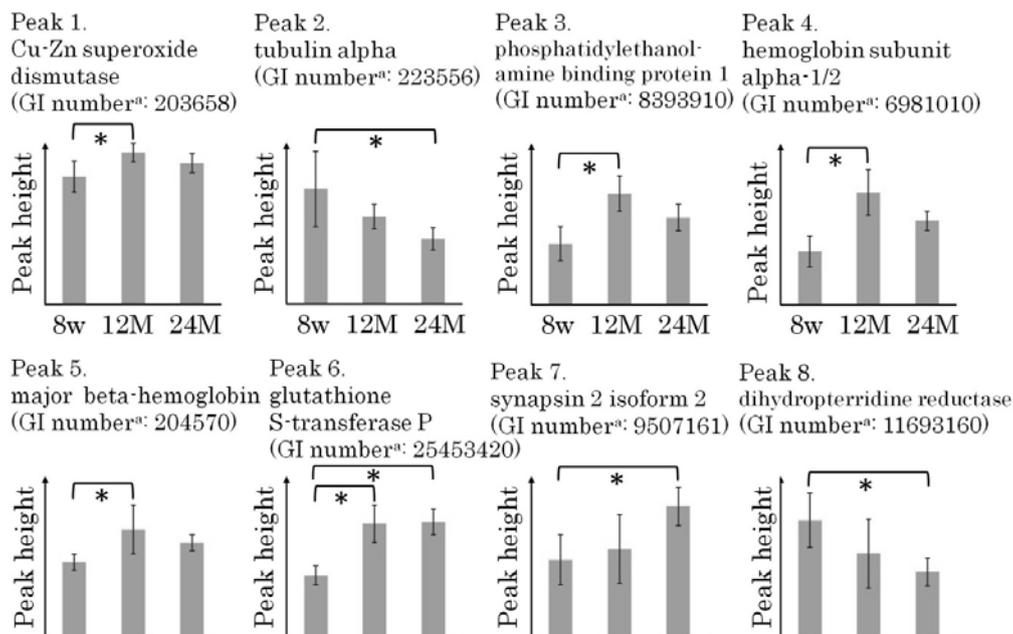
#### 【アミロイド線維の高感度検出法】

アルツハイマー病に代表されるアミロイドーシスは、生体内において特定のタンパク質により形成されたアミロイド線維と呼ばれる規則的な繊維状構造体が、神経細胞などに沈着することで発症する疾患群である。現在、アルツハイマー病の診断は画像診断の他、髄液中に流出したアミロイド線維の検出および定量により行われている。近年では、血液中に含まれる微量のアミロイド線維を抗原抗体反応により検出法も開発されている。我々は今回、蛍光検出HPLC及びThioflavin Tを用いた、より簡便で高感度なアミロイド線維の検出法の開発を行った。

---

Development of High-sensitivity Separation Analysis of Biological Proteins  
by High-performance Liquid Chromatography (HPLC) with Fluorescence Detection

Hiromichi ASAMOTO, Hiroaki MINAMISAWA, Tatsuro NAKAGAMA  
Kazunori SAITOH and Kazuhiro IMAI



**Fig. 1** Comparison of peak heights of each of the age-related altered proteins in rat hippocampus among three aging stages (8 weeks, 12 and 24 months). Mean values  $\pm$  SD are plotted ( $n = 5$  at each time point). Asterisks indicate significant differences (Tukey's test of all data points,  $p < 0.05$ ).

<sup>a</sup> GI number is simply a series of digits that are assigned consecutively to each sequence record processed by NCBI.

### 【実験】

#### 老化ラット脳内のプロテオーム解析

蛍光誘導体化反応は、3段階の老化過程(8週齢、12および24月齢)におけるラットの海馬から抽出した各々の可溶性タンパク質画分にpH8.7の塩酸グアニジン緩衝液で調製したTCEP、EDTA並びにCHAPS溶液を加え、最後にDAABD-Cl/アセトニトリル溶液を添加後、40°Cで10分間加熱することで行なった。HPLCにおけるカラムにはタンパク質分離用カラムを用いた。加齢に伴い有意な変動がみられたピークを分取後、トリプシン消化によりペプチドへと分解した。得られたペプチドのアミノ酸配列をLC-MS/MSより決定し、これをMASCOTデータベースと照合することで変動したタンパク質の同定を行なった。

#### 【結果と考察】

HPLC-蛍光検出において老化に伴う発現量変化が確認されたタンパク質のピーク画分を分取し、HPLC-MS/MSに供した。その結果、Cu/Zn-Superoxide dismutaseをはじめとした計8種類のタンパク質が同定された。Fig. 1にはこれら8種類のタンパク質の名称並びにそれらの老化に伴う発現量変化の様子を棒グラフで示した。これからわかるように、抗酸化作用の増強に関与するCu-Zn superoxide dismutase (Peak 1)並びにglutathione S-transferase P (Peak 6)は12月齢にかけて増加し、その後はほとんど変動しなかった。また、海馬内の神経細胞骨格の構成成分であるtubulin alpha (Peak 2)、及び還元酵素のdihydropteridine reductase (Peak 8)は老化に伴い減少した。

一方、神経伝達物質の放出機構に関与しているsynapsin 2 isoform 2 (Peak 7)は老化に伴い増加することがわかった。さらに、細胞の生体膜融合に関与するphosphatidylethanolamine binding protein (PEBP) 1 (Peak 3)及び血液中での酸素運搬を担うhemoglobinの構成成分であるhemoglobin subunit alpha-1/2 (Peak 4)並びにmajor beta-hemoglobin (Peak 5)は12月齢にかけて増加した後、24月齢にかけて減少傾向にあることが明らかとなった。

本講演では、蛍光検出器と組み合わせたHPLC、及び蛍光試薬であるThioflavin Tを用いたアミロイド線維の分析法の開発研究に関する成果についても併せて報告する。

#### 【参考文献】

- 1) C. Toriumi et al., *Anal. Chem.* (2003) **75**, p.3725.
- 2) M. Masuda et al., *Anal. Chem.*, (2004) **76**, p.728.
- 3) H. Asamoto et al., *J. Chromatogr. A*, (2008) **1208**, p.147.
- 4) 朝本 紘充 他, *分析化学*, (2012) **6**, p.547.