

30TC-am05

¹⁸O一置換標識法と nanoLC/ESI-MS/MS による血清プロテオーム解析法の有用性
検証

○森 大¹, 島田 美樹^{1,2}, 眞野 成康^{1,2} (¹東北大院薬, ²東北大病院薬)

【目的】近年、疾患バイオマーカー探索を目的とした血清プロテオーム解析が注目されている。血清中の発現量の大きく異なる多種多様なタンパク質の変動解析には、安定同位元素標識法を組み合わせたnanoLC/ESI-MS/MSが有効となる。しかしながら、従来法では標識操作が煩雑であるばかりか、LC分離が不十分な場合に変動解析が極めて困難となる。こうした課題を解決するため、演者らはトリプシン酵素反応を活用する¹⁸O一置換標識法を開発し、昨年度の本年会で報告している¹⁾。今回、疑似バイオマーカーを添加した血清プロテオームを用い、本法の有用性の検証を試みた。

【方法】ヒト血清 10 μL (タンパク量として 20 nmol相当) に対し、疑似バイオマーカーとしてニワトリ由来リゾチームを 10 あるいは 100 pmol 添加した後、抗血清アルブミン抗体および抗IgG抗体を用いて両タンパク質を除去した。続いて、各々を軽水あるいは¹⁸O標識水で調製した 50 mMモノエタノールアミン含有の 50 mMリン酸緩衝液 (pH 11) 中、37°Cで9時間インキュベートし、すべてのタンパク質をペプチドに断片化した。非標識および¹⁸O標識試料を等量で混合し、nanoLC/ESI-MS/MSにて分析した。データはMASCOT (Matrix Science)を用いて網羅的に解析し、添加したリゾチームの両試料間の量比を調べた。

【結果・考察】今回のモデル実験で、MASCOT解析により32種類のタンパク質が同定された。添加したニワトリ由来のリゾチームも同定され、しかもその量比は 10.1 と理論値とほぼ一致することが判明した。以上の結果から、本法が血清中のバイオマーカー探索に適用可能であることが明らかとなった。

1) 森大, 阿部幸平, 山口浩明, 後藤順一, 島田美樹, 眞野成康: タンパク質変動解析のための¹⁸O一置換反応に関する検討, 日本薬学会第129年会, 28N-am07