

質量分析器用のアミン反応性同位体標識試薬の開発

育成研究：JSTイノベーションサテライト滋賀 平成20年度採択課題
「プロテオーム解析用2種およびメタボローム分析用1種の新規マルチ同位体標識化合物の開発と製品化」



代表研究者：福井大学 総合実験研究支援センター・バイオ実験機器部門 准教授 松川 茂

■ 研究概要

室温、水溶液中で安定な新規アミン反応性同位体標識試薬の開発に成功した。質量差1のPy試薬8種、より高機能化を実現した質量差2のPyII試薬7種の2シリーズで、質量分析器によるプロテオーム、メタボローム解析に使用できる。プロテオーム解析はPy試薬またはPyII試薬のうち3種を用いて行う。メタボローム解析はPy試薬またはPyII試薬のうち最大7種を用いることにより、多試料中の多成分の同時一斉分析が高效率で行える。

■ 研究内容、研究成果

網羅的プロテオーム解析、臨床プロテオーム解析による疾患マーカー探査と診断に適した蛋白質の標識用の同位体ラベル化試薬、並びに脳代謝と生理活性アミンの脳内3D分布解析、脳機能を制御する薬物の効果分析を推進するための定量用同位体ラベル化試薬の開発およびその分析を可能にする質量分析解析システムを構築した。

プロテオーム解析には質量差4のPy試薬3種ないし質量差6のPyII試薬3種の同位体ラベル試薬を使用する。蛋白をこの試薬により標識後トリプシン消化し、イオン交換カラムで分画した後にMS/MS分析を行う(図1)。正常及び疾患患者由来のヒト血漿蛋白を用い市販試薬のcICATと性能比較したところ、同等の成績が得られた(図2)。

生理活性アミン、アミノ酸などのメタボローム分析には質量差2のPy試薬5種ないし質量差2のPyII試薬7種の同位体ラベル試薬を使用する(図3)。除蛋白したサンプルをこの試薬により標識した後に精製し、LC/MSにより多試料中の多成分を一斉自動分析する。ラット脳組織を分析したところ、組織30nl(1mm x 1mm x 30μm)中のドーパミン含量の測定に成功した(図4)。これは従来のドーパミン測定法の1000倍以上の感度を達成している。

当試薬はプロテオーム解析では従来の製品と同等の能力を確保している上に、室温、水溶液中でも構造が極めて安定であること、蛋白質を直接標識可能なこと、安価に製造が可能であるといった利点が上げられる。メタボローム解析では超高感度分析が可能であること、1分析で最大7試料中の多成分を一斉分析できること、自動分析にも対応していることといった優位性が挙げられる。

■ 今後の展開、将来の展望

質量分析機を用いた測定は、感度が非常によい反面ノイズも多くなる。そのためノイズを軽減する方法が見つかり、非常によい分析方法となる。それを旨として本試薬を用いたiTRAQ型ラベリング試薬の開発を行っている。これを用いMS/MS分析を行えばよりS/Nの良い測定が期待できる。さらに本試薬により標識された物質のみを精製する方法の開発も行っている。これによりサンプル中の夾雑物除去によるノイズの軽減および高感度分析が期待できる。

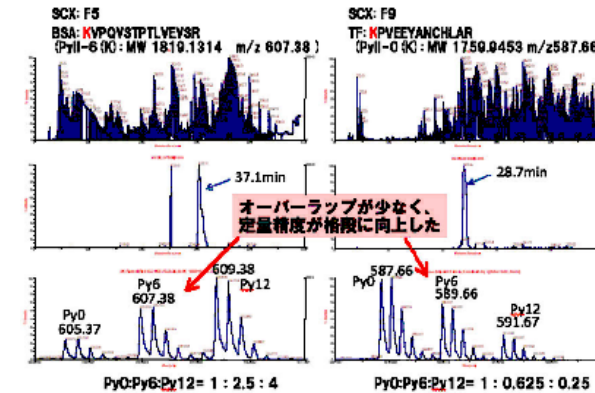


図1 PyII 標識ペプチドのMS/MS分析

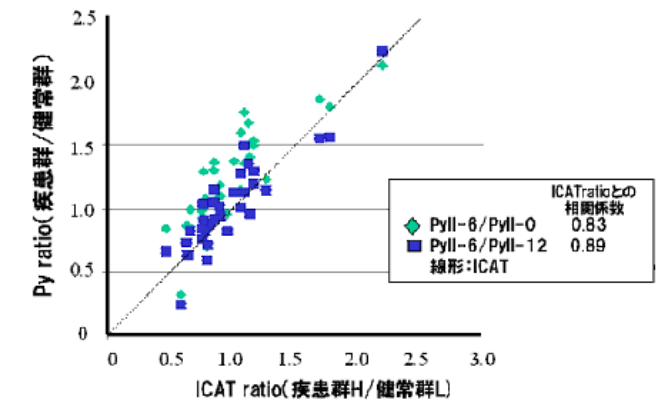


図2 PyII 試薬とcICATとの性能比較

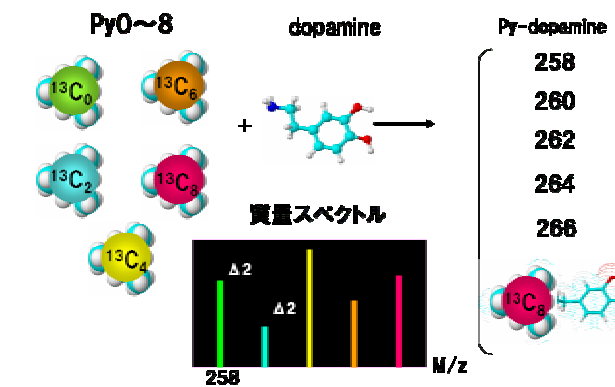


図3 Py 試薬によるドーパミンの標識

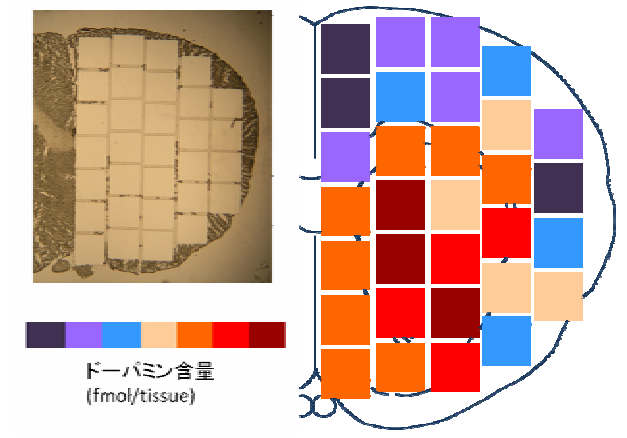


図4 ラット脳ドーパミン地図

■ 研究体制

◆ 代表研究者

福井大学 総合実験研究支援センター・バイオ実験機器部門 准教授 松川 茂

◆ 研究者

成田和巳(福井大学)、友杉直久(金沢医科大学)、出口喜三郎(金沢医科大学)、荒川靖(北陸大学)、荒川由紀美(北陸大学)、甲田公良((株)日立ハイテクノロジーズ)、山下博教((株)日立ハイテクノロジーズ)、吉江正樹((株)日立ハイテクノロジーズ)、前田彰彦(大陽日酸株式会社)、下平晴記(大陽日酸株式会社)、坂本健(日立製作所中央研究所)、金子明人(日立製作所中央研究所)

◆ 共同研究機関

福井大学、金沢医科大学、北陸大学、(株)日立ハイテクノロジーズ、大陽日酸株式会社、日立製作所中央研究所

■ 研究期間

平成21年4月 ~ 平成24年3月