

トレス発生の痕跡が強く認められる。申請者らは遷移金属の触媒する脂質過酸化反応と活性酸素種 (ROS) 生成反応をモデルとし、AD で高濃度に蓄積するアミロイドベータペプチド (A β) が銅と相互作用し、A β が銅の毒性を軽減する可能性を示した (2007年)。しかし生体試料から銅の結合した A β を検出したデータは得ていない。本研究では、エレクトロスプレーイオン化による質量分析 (ESI-MS) 法を用いて、旧来の質量分析装置では困難であった銅 - ペプチド錯体の検出を試みた。生体試料からの銅 - ペプチド錯体の検出と定量まで可能となれば、遷移金属動態が病態と関連するであろう AD やウィルソン病といった疾患のスクリーニング法開発につながる可能性がある。

[方法]

ESI-MS によって、標準アミノ酸や GSH などのオリゴペプチドを含む各種銅錯体の価数ならびに配位数を決定した。並行して生体試料 (健常ヒト唾液) 中の銅錯体の分析を試みた。

- ①安定な既知キレート試薬: Cu (I) キレートであるバソクプロインスルホン酸 (BCS)、Cu (II) をはじめとする多価陽イオンのキレート試薬であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、Cu (I/II) キレートであるオルトフェナンスロリン (OPT) につき、ESI-MS 測定を妨害しない酢酸アンモニウム溶液 (pH 7) で 1 mM とし、0.5-1 当量の銅 (Cu²⁺) 添加前後の ESI-MS スペクトルを測定した。
- ②アミノ酸・オリゴペプチド等: 既知キレート同様に酢酸アンモニウム溶液 (pH 7) で 1 mM とし、0.5-1 当量の銅 (Cu²⁺) 添加前後の ESI-MS スペクトルを測定した。
- ③生体試料: ヒト唾液は塩濃度等が尿よりも血漿に近く、タンパク質濃度が Lowry 法で 1-2 mg/ml と安定して高値が得られる。タンパク質の多くは高分子量のムチンと考えられるが、他にもアミラーゼ等数種のバンドが SDS-PAGE-CBB 染色で観察されると報告されている。遊離銅イオン、セルロプラスミン活性は検出されなかったが、既知の低分子量タンパク質 (ヒスタチン・シスタチン) に金属キレート能が観察されると期待して、メンブレンフィルターを用いた遠心ろ過により分子量 5000 以下のペプチド画分を調製し、LC-ESI-MS による銅錯体の検出を試

17) 高感度 ESI-MS を用いた疾病マーカーとしての金属 - ペプチド錯体の検出

研究代表者 津村 直美

[背景と目的]

遷移金属は酵素やキャリアータンパク質の活性中心として必須であるが、その価数と量、すなわち体内を循環する際の化学種によって redox active となり酸化ストレスの原因となる可能性がある。アルツハイマー病 (AD) などの神経変性疾患やウィルソン病では、遷移金属の高い濃度の蓄積と神経原線維変化、酸化ス

表 1 MS 検出可能な配位子

Tested agent	+ H ⁺ (<i>m/z</i>)	+ Cu ⁺ (<i>m/z</i>)
BCS	521.05	641.99 (2Cu ^{+/2+} ?)
OPT	181.07	242.99
EDTA	293.10	not detected
Cys, Cys-Cys		
GSH (γ -Glu-Cys-Gly)	308.09	371.01
GSSG (GSH dimer)	613.17	674.08 (Cu ²⁺ ?)
(sulfanyl)		
D-penicillamine (for Wilson's disease)	150.07	not detected
D-penicillamine dimer	297.11	359.03
His*		
GHK (hepatic cell growth factor)	156.08	218.00
Carnosine (β -Ala-L-His)	341.19	402.11 (Cu ²⁺ ?)
	227.12	289.04
Homocarnosine (γ -aminobutyryl-L-His)	241.13	303.06
Anserine (β -Ala-N (π) -methyl-L-His)	241.13	303.06
Met*	150.06	211.98
Gly	76.04	137.96
GG (Gly-Gly)	133.06	194.99
GGG (Gly-Gly-Gly)	613.17	674.08 (Cu ²⁺ ?)

* N 末端をアセチル化した場合は銅錯体が検出されなかった。

みた。

[結果]

ESI-MS によって検出される銅錯体は限定的であることが判った。銅をキレートするものは硫黄、アミン、カルボン酸、ポルフィリン等の環、に大別できるが、これらのうちカルボン酸に分類されるキレート (EDTA, Glu) については ESI-MS による高感度検出はできなかった。一般的に ESI-MS はイオン化時に酸を付加する陽イオンモードで測定するがカルボン酸には陰イオンモードが望ましいことによる。陰イオンモードは感度が劣るため実用的ではない。以上を表 1 にまとめた。また、生体試料を ESI-MS にアプライする際には、高濃度の NaCl が妨害物質となるため、LC 導入前に脱塩処理が必須であった：スピンカラム C18 に吸着後 (0.1% ギ酸 +80% アセトニトリル) で溶出させ脱塩試料とした。脱塩試料について顕著なピーク (銅添加前 *m/z* 4371、銅添加後 *m/z* 4433；いずれも多価イオンのデコンボリューション後の値) が得られたが、MS-MS 等の詳細な解析は行っていない。

[考察]

これまで我々は主として ESR を用いて銅錯体の定性、定量を試みてきたが、ESR には固有の欠点がある：カルボン酸類の錯体については感度が低く、アミノ酸やジペプチドのようなアミン-カルボン酸二座配位子を対象とする場合以外は、トリス緩衝液のような Cu(II) 検出用アミンを高濃度で溶媒に用いた銅添加回収測定が必要であった。ESI-MS によって検出できる銅錯体は ESR と同様に限定的であったが、幾つか相違点もある。ESR では ESI-MS に較べはるかに感度が低く定性面に劣るが、NaCl などは妨害物質ではなく、粘度・濁度の高い試料も測定可能であった。ESR ではアミノ酸の種類に拠らず銅錯体が同等のシグナル強度で検出され定量性がみられたが、ESI-MS ではアミノ酸の種類に拠って結合定数またはイオン化効率が異なることを反映する結果となった。ESI-MS では多くのキレートで 1 価の銅が結合した状態と解釈される結果を得たが、これは ESR や銅選択性電極を用いた場合とは異なるため理由を検討中である。ESI-MS を用いた定量を検討するため、AD で銅と同様高濃度の蓄積がみられるが価数変化のない亜鉛の測定を考えている。

[謝 辞]

質量分析は旭川医科大学教育研究推進センター・阿久津弘明氏に測定および解析上の助言を頂きました。唾液中のタンパク質濃度は平成 23 年度入学の医学科 1 年生諸氏の基礎生化学実習における測定値を参考にしました。深く感謝申し上げます。

[文 献]

- 1) M. Nakamura, N. Shishido, A. Nunomura et al., Specific reaction of Met 35 in amyloid beta peptide with hypochlorous acid, *Free Radical Research*, 44 (7): 734-741 (2010)
- 2) N. Shishido, K. Nakayama and M. Nakamura, Determining the status of copper in the urine of Long-Evans Cinnamon rats and patients with Wilson's disease, *旭川医科大学研究フォーラム*, 9: 11-23 (2009)
- 3) M. Nakamura, N. Shishido, A. Nunomura et al., Three histidine residues of amyloid beta peptide control the redox activity of copper and iron, *Biochemistry*, 46 (44): 12737-12743 (2007)
- 4) T. Hayashi, N. Shishido, K. Nakayama et al., Lipid peroxidation and 4-hydroxy-2-nonenal formation by copper ion bound to amyloid-beta peptide, *Free Radical Biology & Medicine*, 43 (11): 1552-1559 (2007)