

学位論文

「生理活性ペプチド結合蛋白同定のための新手法の開発」

DM 15028 星山 綾子

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程  
臨床医科学群 内分泌代謝内科学  
指導教授 七里 眞義

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 論文要旨

ヒト生理活性ペプチドの生体内作用に関しては多くの研究が行われてきたが、それらのヒト血中の結合タンパクについては解明されていないものがほとんどであり、分子存在様式やプロセッシングはもちろん、正確な代謝も不明な生理活性ペプチドも数多い。質量分析法は、タンパク研究においては有用な手法であり、著者が所属する研究室では、生理活性をもつペプチドホルモンの探索研究とその測定系の確立や機能探索研究に、プロテオーム技術を取り入れてきた。膵内分泌ペプチドホルモンである **Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP)** は半減期が短いとされるが、生体内での作用発現や輸送・代謝のメカニズムに血漿タンパクとの結合が関与している可能性があることを考慮し、今回、質量分析法を用いた血漿結合タンパクの網羅的な探索手法を考案してその同定を試みた。蛍光標識 GIP を血漿と反応させてネイティブゲル電気泳動ののち、蛍光を指標として切り出したタンパクバンドをゲル内消化して抽出し、液体クロマトグラフィー質量分析を行って、蛍光標識 GIP と共在したタンパクを同定したところ 3 つのヒト血漿高存在量タンパクが検出された。同定された血漿タンパクが GIP と結合するかどうかを確認するために、それぞれの精製タンパクを試験管内で蛍光標識 GIP と反応させてネイティブゲル電気泳動ののち、ウェスタン解析を行ったところ、3 つの大分子量タンパクに相当する泳動位置付近に GIP 様免疫活性が検出され、さらに同部位に蛍光の発光も観察されたため GIP と同定された血漿タンパクが結合したと考えられた。

以上から本法は蛍光標識ペプチドを用いて血漿中の結合タンパクを同定しうる簡便で有用な新手法となりうるものと考えられた。

## 目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. FITC 標識	2
2-2. IgG の精製	2
2-3. Native PAGE/Blue Native PAGE	3
2-4. LC-MS/MS 分析のための泳動後のゲル処理	3
2-5. FITC-GIP の結合時間の検討	4
2-6. ゲル内消化を用いた競合実験	4
2-7. Western Blotting	5
2-8. 血液サンプルの取り扱い	5
3. 結果	
3-1. FITC 標識ペプチドと血漿の反応	5
3-2. GIP と複合体を形成する血漿タンパクの LC-MS/MS による同定	6
3-3. GIP と複合体を形成する血漿タンパクの反応時間の検討	6
3-4. 競合実験を用いたタンパク複合体形成の確認	7
3-5. Western Blotting を用いたタンパク複合体形成の確認	8
4. 考察	9
5. 総括	11
6. 今後の課題	11
7. 謝辞	11
8. 引用文献	12



## 1. 序論

血中には、アルブミンのような高濃度タンパク質が約 20 種類存在し総タンパクの 99%を占めているが、それに比べてごく微量なタンパク、ペプチドも数多く存在している[1]。これらの中には、バイオマーカー候補として発表、研究されているものもあるが、存在様式が不明であったり定量性が困難で研究が進展しないものも多い。内分泌代謝領域でもさまざまな生理活性ペプチドが生体制御にかかわることが知られているが、体循環の機構やタンパク間の相互作用については依然として不明な点が多い。著者の所属する研究室の共同研究者である北里大学 理学部 物理学科 物性物理学講座 小寺らは、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS)を用いて、翻訳後修飾やプロセッシングを受けて精製された血漿中の小分子量ネイティブペプチドを、高感度に分離・精製して低濃度まで測定する技術を開発することに成功している[2]。LC-MS/MS 分析は血液サンプルから個々のタンパク質量だけでなくリン酸化、メチル化などの翻訳後修飾全般も同時に検出できるため、タンパク研究において非常に強力な分析手法であり、これまでバイオマーカー開発や新規治療標的分子の探索研究に用いられてきた。著者の所属研究室では、プロテオーム技術を用いて生理活性ペプチドホルモンの探索研究とその測定系の確立[3]、機能探索を行ってきた[4]。本研究では糖尿病領域で注目されてきた膵内分泌ペプチドホルモンの一つである gastric inhibitory polypeptide (GIP)に着目して血漿中の結合タンパクを明らかにすることを試みた。GIP は上部小腸に存在する K 細胞から分泌される 42 個のアミノ酸からなるポリペプチドで、消化管内における糖や脂質などの栄養素により刺激分泌され、膵β細胞に作用することでインスリン分泌を促進するインクレチンのひとつである[5]。K 細胞から分泌される GIP はいわゆる活性型 GIP であるが、活性型 GIP の血中半減期は健常人で約 7 分、2 型糖尿病患者で約 5 分と報告されている[6]。GIP は膵臓でインスリン分泌促進、グルカゴン分泌促進の作用を持つほか、脂肪細胞の増加作用、骨芽細胞のアポトーシス抑制など全身性で多岐にわたるといふ報告がある[7]。このことから、半減期の短いペプチドの安定化にタンパク複合体の関与があると推察し、前述の質量分析法を用いた網羅的な探索研究を考案した。これまでのタンパク複合体やタンパク相互作用の研究は、プルダウン法、共免疫沈降法、ファウエスタン法、ネイティブゲル電気泳動法(Native-PAGE)、ブルーネイティブゲル電気泳動法(Blue-Native PAGE)法などが広く用いられているが、複合体タンパクの解析のためには構成要素がある程度明らかになっている必要がある。つまりは網羅的には探索できない手法である。その中でも Native-PAGE はタンパク変性を行わないためタンパク複合体の高次構造が維持された状態で分離することができる電気泳動であり、ゲ

ル中でもタンパクが活性を持つため泳動後の様々な応用例が報告されている[8]。GIP と複合体を形成するタンパクは未知であるが、Native-PAGE を用いて GIP 様免疫活性と同じ泳動位置にあるタンパクバンドに対して LC-MS/MS 解析を行うことにより、標的となるタンパクに対して網羅的に分析することが可能となるのではないかと考えた。そのため今回の目的ペプチドである GIP を蛍光標識して複合体を可視化して処理を行うことを発案し、質量分析を用いた網羅的なタンパク複合体探索の手法を確立し、GIP と結合するタンパクを明らかとする目的で本研究をおこなった。

## 2. 方法

### 2-1 FITC 標識

標準 GIP、GLP-1、Glucagon ペプチド（ペプチド研究所、日本）は ddH<sub>2</sub>O で 10<sup>-4</sup>M に溶解し、fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma Aldrich 社, Missouri, 米国)は DMSO(同仁化学研究所、日本)に溶解し 10nmol/μl とした。FITC/DMSO 50ul と上記ペプチド 50ul で FITC:ペプチド=100:1(mol 比)で混合した後に、炭酸ナトリウム緩衝液(0.1M,PH9.1)を 150ul 加え、PH を調整し、室温、遮光下で 3 時間反応させて、ラベリングした。蛍光標識 GIP、GLP-1、Glucagon (以下、FITC-GIP、FITC-GLP-1、FITC-Glucagon)は Sephadex 25 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより、未反応の FITC と分離して経時的に分注し、その 10μl と測定バッファー (100mM bicine,100mM NaCl,PH 8.5) 90μl を 96well 黒プレートに入れ、マイクロプレートリーダーで 485nm の励起波長および 528nm の発光波長で蛍光を確認して最も強度の高いサンプルを使用した[9]。HMW Native Marker Kit (GE Healthcare 社、英国)についても同様の方法で蛍光標識をおこなった。

### 2-2. IgG の精製

active GIP N 端、inactive GIP N 端、GIP C 端に相当する 6~7 アミノ酸からなる合成ペプチド[Cys<sup>0</sup>]-PEG-HKHNITQ、YAEGTFPEG-[Cys<sup>0</sup>]および EGTFIS-PEG-[Cys<sup>0</sup>]を既報の方法で処理し[3]、日本白ウサギに免疫感作して採取した家兎抗 GIP 血清、および正常ヒト血清を Melon<sup>TM</sup> Gel IgG Spin Purification Kit(Thermo Fisher Scientific 社, Massachusetts,米国)を用いて処理し、それぞれの抗 GIP IgG およびヒト IgG を精製した。精製した抗 GIP IgG は ELISA にて抗体価を測定した。

### 2-3 Native PAGE/Blue Native PAGE

血液サンプルは健常人の保存凍結血漿を使用した。FITC-GIP 4 $\mu$ l とヒト血漿 6 $\mu$ l を混合し、37℃で 18 時間静置したのち、Native PAGE™ sample buffer ( Thermo Fisher Scientific 社)と ddH<sub>2</sub>O で希釈し 20 $\mu$ l としたものを泳動サンプルとした。Gradient 15-25 % gel (Perfect NT Gel; DRC 社、日本)を用い、陰極と陽極の緩衝液はともに、20×Native PAGE™ Running buffer (Thermo Fisher Scientific 社) を添付文書に従って希釈して使用し、遮光下、室温、120V で 120 分泳動した。分子量マーカーは、蛍光標識した MW Native Marker Kit を用いた。ゲル内の蛍光は Fas-Digi Gel Documentation system を用いて撮影し、画像解析ソフト image J を用いて解析した。

また、同様にサンプルを調整し、gradient 15-25 % gel (Perfect NT Gel; DRC 社)を用いて Blue Native PAGE をおこなった。泳動緩衝液は陽極には 20×Native PAGETM Running buffer (Thermo Fisher Scientific 社) を製造元の添付文書に従い希釈し、陰極には 20×Native PAGETM Running buffer と 20×NativePAGETM Cathode Buffer Additive (Thermo Fisher Scientific 社)を製造元の添付文書に従い希釈して Light blue cathode buffer (0.002% G-250 を含む)を作成し使い、遮光下、室温、120V で 120 分泳動した。

### 2-4 LC-MS/MS のための泳動後のゲル処理

ゲル内消化による抽出と LC-MS/MS 分析は既存の方法をもとに行い、サンプルはシリコナイズチューブを使用して処理した[10]。

#### ・ゲルの切り出し

前述の NativePAGE 後のゲルを LED イルミネーターで目視し、確認できた蛍光バンドを 2mm×8mm 程度に切り出し、おおよそ 2mm 幅になるように断片化した。それらすべてを 1 本のチューブに入れ、少量の ddH<sub>2</sub>O を加えた。

#### ・還元アルキル化

チューブ内に 100%アセトニトリルを加えて静置し、5 分おきに攪拌、廃液し、遠心エバポレーターにてゲル片が乾燥するまで約 60 分吸引乾燥した。ゲル片に 10mM DTT/25mM 重炭酸アンモニウム 100 $\mu$ L を加えて 56℃で 1 時間反応し、その後余剰な反応液を廃液、25mM 重炭酸アンモニウム 100 $\mu$ L を入れて 10 分間振盪し洗浄した。その後廃液し、55mM ヨードアセトアミド 100 $\mu$ L を加えて 45 分、遮光下で振盪し、その後廃液して 25mM 重炭酸アンモニウム 100 $\mu$ L を加えて 10 分振とうにて洗浄し、その後廃液し、ddH<sub>2</sub>O で軽くすすぎ廃液した。



- ・ゲル内消化

100%アセトニトリルを加えて静置し、5分おきに攪拌、その後液を除去し、ゲル片が乾燥するまで30~60分吸引乾燥した。Trypsin 100ng/ $\mu$ l 20 $\mu$ l、Lys-C 100ng/ $\mu$ l 20 $\mu$ l/50mMTris(PH9.0)を入れ、45分間氷上でゲルに吸収させ、余剰分を除去して50mMTris(PH 9.0)をゲルが浸るくらいまで加え、37°Cで24時間作用させた。

- ・後処理

上清は新しいチューブに移し、5%ギ酸/50%アセトニトリルをゲルが浸る程度に加えて20分振盪し、2回目の抽出液として上清と混合した。

- ・脱塩処理：

得られた抽出液はEmpore<sup>TM</sup>C18 sealant (3 M 社、MN、米国)で満たされた stop and go extraction tips (stage tips) を用いて脱塩処理を行い、質量分析を行った[11]。

- ・質量分析

LC-MS/MS 分析は、LC(Easy-nLC1000,Thermo Fisher Scientific 社)およびQ-Exactive(Thermo Fisher Scientific 社)による超高感度 LCMS システムを使用した。データベース検索は、Proteome Discoverer 1.4.0.288 ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific 社) に組み込まれている SEQUEST アルゴリズムを使用して行い[12]、Peptide Spectrum Matches(PSMs)、Sequence Coverage を得た。

## 2-5 FITC-GIP の結合時間の検討

血漿 4 $\mu$ l と FITC-GIP 6 $\mu$ l を 37°C で 5 分から 6 時間で反応させた後に前述の NativePAGE を行い、LED イルミネーターでゲルの蛍光画像を獲得し、画像処理ソフトウェア imageJ を用いて解析を行った[13]。血漿はそれのみで自家蛍光を有したため、それぞれの結果から自家蛍光の蛍光強度を基礎値として除いて解析した。

## 2-6 ゲル内消化を用いた競合実験

標準 GIP を  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  に調整し、その 1 $\mu$ l とヒト血漿 6 $\mu$ l を 37°C で 1 時間反応させた後、続いて FITC-GIP と遮光下で 37°C で 3 時間反応させ、120V、2 時間で Native-PAGE を行った。得られた血漿の自家蛍光部位と、同じ位置の蛍光バンドを LED イルミネーターで目視下で切り出し、1-2mm $\times$ 2mm 大に切断し、シリコナイズマイクロチューブに入れて ddH<sub>2</sub>O で洗浄した。ゲル片に 100%アセトニトリルを 100 $\mu$ L 加えて静置し、5分おきに攪拌しながら 15 分作用させ、その後ゲル片が乾燥するまで遠心エバポレーターで 120 分吸引乾燥した。ゲ

ル用緩衝液[30mM TES,140mM NaCl,4mM KCL,10mM CaCl<sub>2</sub>(PH 7.5)]に pronase E を 0.2mg/ml となるように加えた消化液 490μL を乾燥したゲル片に加えて、暗所 37℃で 72 時間反応させた。サンプル内の消化液をマイクロチューブに回収したのち、ゲル片に 50%アセトニトリル 25μl を加えて 10 分振盪し、同じ回収用チューブに加えた。黒底 96well プレートに測定バッファー (100mM bicine,100mM NaCl,PH 8.5) を 50μL をいれ、抽出した消化溶液を全量入れ、485nm の励起波長および 528nm の発光波長で測定した[9]。

## 2-7 Western Blotting

Native PAGE 後のゲルを転写前緩衝液(20mM Tris,150mM glycine,2%SDS)に入れて 30 分振盪し、Trans-Blot® Turbo™ Transfer System で PVDF メンブレン(Immune-Blot® PVDF Membrane; Bio-Rad Laboratories 社、カナダ)に 25V、45 分間の条件で転写した。転写後は ddH<sub>2</sub>O で洗浄後、0.05% (w/v) tween® 20 (Sigma Aldrich 社)を含む TBS (TBS-T) で 2%に調整した BSA で 2 時間ブロッキングを行った。TBS-T で 5 分間、3 回洗浄後、精製した抗 GIP 抗体 C 端を HIKARI A(ナカライテスク社、日本)で 1 : 200 に希釈した一次抗体溶液に入れ、室温で 60 分間静置した。TBS-T で 5 分間、3 回洗浄後、Goat anti Rabbit IgG(Bio-Rad Laboratories 社) を HIKARI B(ナカライテスク社)で 3000 倍に希釈した二次抗体溶液に入れ、室温で 60 分間静置した。免疫検出は Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare 社) を用いて ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare 社)による撮影ならびに解析を行った。

## 2-8 血液サンプルの取り扱い

本研究は、北里大学医学部・病院倫理委員会 治療・臨床研究審査委員会の承認のもと（承認番号：C19-245）、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に準拠して行った。

# 3. 結果

## 3-1 Native PAGE

FITC-GIP、FITC-GLP-1、FITC-Glucagon とヒト血漿を反応させ、NativePAGE を行った。いずれの反応物も、蛍光標識ペプチドを添加していない血漿のみを泳動した際に光する自家蛍光と思われるバンドがアルブミンの分子量と一致して (66kDa) 認められたが、FITC-GIP と血漿の反応では、より泳動距離の長い位置に特異的な蛍光バンドが見られた(図 1、矢印 b)。GLP-1、Glucagon についてはこの位置にバンドは認められず、アルブミンの位置のバン

ドについても自家蛍光に近い微小な蛍光を認めるのみであった（図 1）。FITC-GIP と血漿タンパクが複合体を形成したまま泳動した可能性が示唆された。また、Glucagon については GIP と異なる位置に特異的なバンドの形成を認めた。BN-PAGE を試みたが、蛍光色素が CBB により消光し明確なバンドの形成を認めず、本研究では Native-PAGE を用いることとした。

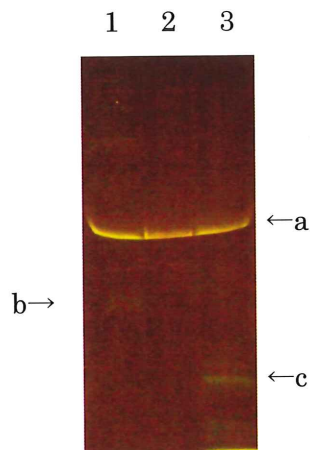


図 1 電気泳動後のゲルの蛍光検出

1.GIP,2.GLP-1,3.Glucagon の蛍光標識ペプチドとヒト血漿を混合し 120V で 2 時間泳動した。(a) 分子量 66kDa (b) (c) は GIP-FITC、Glucagon-FITC と血漿の反応物泳動後の蛍光バンドの位置を示す。

### 3-2 GIP と複合体を形成する血漿タンパクの LC-MS/MS による同定

Native PAGE で得られた特異的なバンドをゲル内消化し、抽出物の LC-MS/MS 解析を行い、MS/MS 分析における、それぞれのタンパク由来のスペクトルに合致したペプチド数である Peptide Spectrum Matches (PSMs)、アミノ酸配列のカバー率である Coverage を評価の指標とした。ヒト免疫グロブリン  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\mu$ 、トランスフェリン、アルブミン由来のトリプシン消化ペプチドがそれぞれ 17、13、16、13、11 の PSMs、全長配列の 51%、36%、30%、23%、17%の Coverage で同定され、これらが GIP と複合体を形成していた血漿結合タンパクである可能性が示された。

### 3-3 GIP と複合体を形成する血漿タンパクの反応時間の検討

GIP と血漿タンパクが結合した複合体量の経時的な増加を検討するため、FITC-GIP と血漿との反応後の NativePAGE による蛍光バンド強度の経時的な変化を確認した。

NativePAGE ではアルブミンの自家蛍光(図 2 A:3-a)と同様の位置に蛍光バンドを認めた(図 2A:1-a)。血漿の自家蛍光も同様の位置であり、このバンドを形成するタンパクは血漿中のアルブミンと推察された。

血漿と FITC-GIP により形成された 2 つの蛍光バンド（図 2 A:1-a,b）は、反応時間 5-15 分といったごく短時間から自家蛍光より強い蛍光が検出された。蛍光バンドの強度の経時的变化を図 2B に示す。この結果より、6 時間まで複合体形成は漸増していると考えられた。

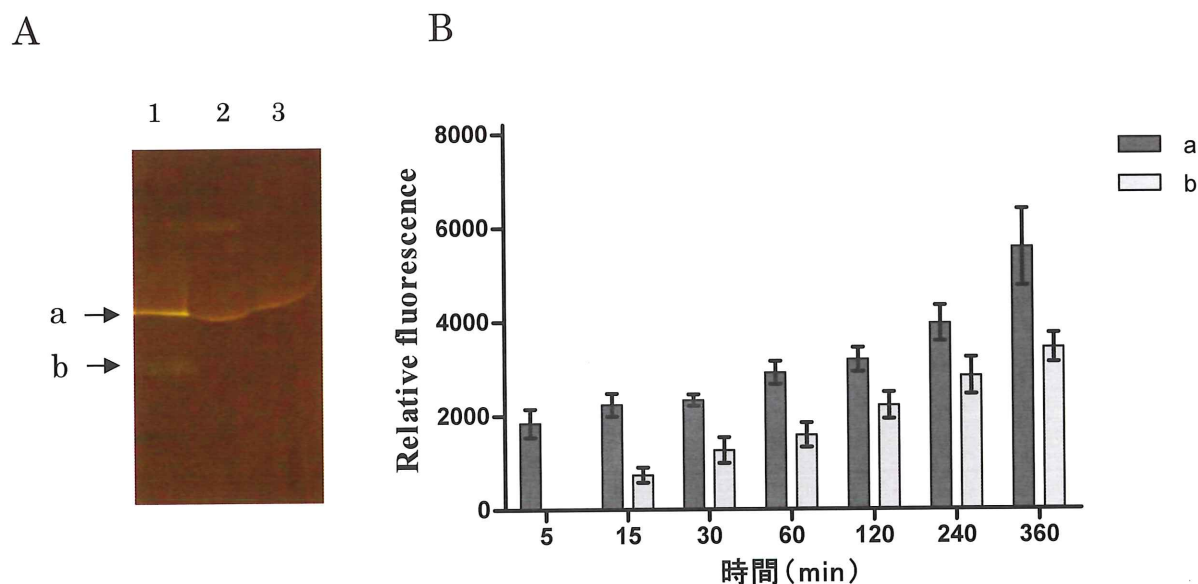


図 2 複合体形成の時間的变化

A.1.血漿+FITC-GIP、2.血漿、3 ヒトアルブミンを 120V で 2 時間泳動したゲルの蛍光検出の写真。B.A-a、A-b のバンドの蛍光強度の経時的变化の検討。A と同様に 6 回の電気泳動を行い、得られた蛍光画像を imageJ を用いて面積として定量化・解析した平均値±標準誤差を示す。b の 5 分については目視下にて蛍光バンドを確認できないため除外した。

### 3-4 競合実験を用いた複合体形成の確認

本研究では FITC-GIP と血漿タンパクの複合体形成を確認している。FITC-GIP と GIP が血漿中の同一タンパクとタンパク複合体を形成していることを確認するため、および、結合量のおおよその推察のため、FITC-GIP と GIP の結合競合実験を行った。あらかじめ GIP( $10^{-4}$ M、 $10^{-5}$ M)と血漿を試験管内で反応させて血漿タンパクと GIP を結合させ、そこに FITC-GIP を加えてさらに反応させてから NativePAGE を行うことで FITC-GIP の結合の低下を確認した。

FITC はタンパク質と結合すると蛍光が減弱する性質があり[9]、NativePAGE 後にゲル内消化によりタンパクと解離させて蛍光抽出を行い、定量的に比較した。血漿のみのサンプルも自家蛍光を示したが、FITC-GIP と血漿の反応物では明らかに蛍光強度が高く、GIP を



事前に混合して競合させたサンプルではGIPの濃度依存的にFITC-GIP結合が低下した(図3)。これにより、GIP及びFITC-GIPは同一のタンパクとタンパク複合体を形成していると考えられた。

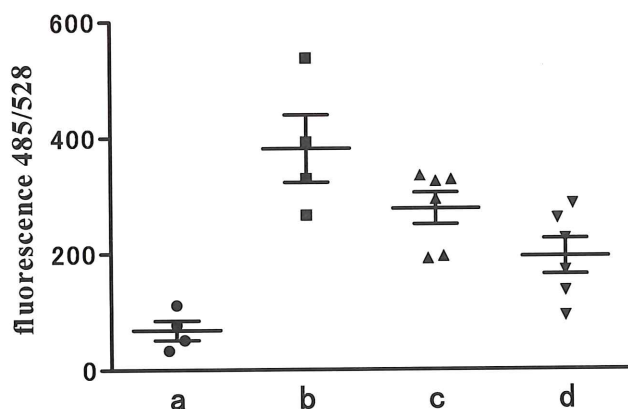


図3 GIPとFITC-GIPの競合実験

FITC-GIPと血漿の反応物と、予め高濃度GIPを作用させた血漿とFITC-GIPの反応物のNativePAGEで形成するバンドの蛍光強度の比較。泳動後、a.血漿、b. FITC-GIP+血漿、c. GIP $10^{-5}$ + FITC-GIP+血漿、d. GIP $10^{-4}$ + FITC-GIP+血漿の66kDaに認める蛍光バンドをゲル内消化して蛍光抽出を行い、その強度を測定した。同様の実験を6回行い、蛍光強度の平均値±標準誤差を示す。

### 3-5 Western Blottingを用いたタンパク複合体形成の確認

上記で得られた3つの候補タンパクそれぞれとFITC-GIPを混合し、特異的な蛍光バンドの形成を確認した。また、ウエスタン解析により、確かに蛍光バンドにGIPが存在することを免疫学的に確認した。FITC-GIPと血漿、ヒトアルブミンを反応させたサンプルでは、泳動後のゲルのLEDによる励起で明らかなバンドを検出した(図4-A)。また、Western Blottingではヒトアルブミン、ヒトIgG、トランスフェリンそれぞれとFITC-GIPをあらかじめ試験管内で混合したサンプルは、非混合サンプルに比して明らかなバンドを形成しており、これらのタンパクがGIPとタンパク複合体を形成し、特異的なバンドを形成することが示された(図4-B)。尚、Native PAGEでは泳動するタンパクにより泳動緩衝液のPH調整が必要であるが、本研究では複数のタンパクを用いるため調整していない。そのため、分子量とPHによりバンドの形成位置は規定されるため、本研究では分子量マーカーによるおよそのタンパクの推察はできない。ただし66kDaの分子量マーカーについてはアルブミンであり、バンド形成の位置と比較して考察することが可能である。



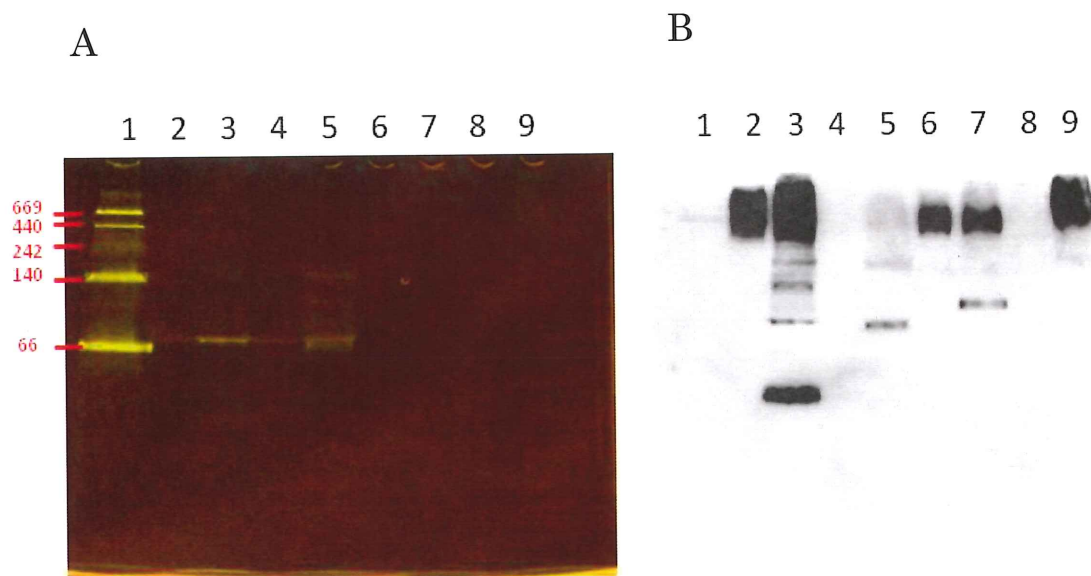


図4 NativePAGE とそれに続くウエスタンブロット

A.LC-MS/MS 分析により同定された、GIP と複合体を形成している可能性のあるタンパクと FITC-GIP の反応物の NativePAGE 後のゲルの蛍光検出、B.A と同一のゲルを用いたウエスタン解析で、抗 GIP 抗体 C 端による GIP の免疫検出の結果。1.分子量マーカー、2.血漿、3.血漿+ FITC-GIP、4.ヒトアルブミン、5.ヒトアルブミン+ FITC-GIP、6.IgG、7.IgG+ FITC-GIP、8. Transferrin、9. Transferrin + FITC-GIP である。

#### 4. 考察

本研究では、蛍光標識ペプチドと血漿との反応物を Native PAGE することにより、ペプチドと血漿タンパクの複合体を可視化させ、蛍光バンドを切り出した後、ゲル内トリプシン消化したうえで LC-MS/MS 解析を行うことにより蛍光標識ペプチドに結合する血漿タンパクを同定することに成功した。Native PAGE を用いることにより蛍光標識ペプチドが血漿タンパクに結合したまま泳動されるため、蛍光バンドを LC-MS/MS により網羅的に解析することにより結合する大分子量タンパクの候補を同定することが可能となった。従来の報告では、ゲル内消化を用いた LC-MS/MS 分析でゲル全体を網羅的に分析する方法や[14]、2次元電気泳動後に分析する方法[15]などがあるが、今回の方法では Native-PAGE にて蛍光標識ペプチドと同じ位置に泳動する試料のみを解析することが可能となる。また、今回の蛍光を指標に切り出したタンパク領域は、ゲル全体を CBB 染色してもタンパクバンドを認めな

かった。CBB により染色されたバンドを色素を指標に切り出して LC-MS/MS の試料とする手法では試料として選別されない、あるいはゲル全体を等間隔に切り出して試料とする網羅的なサンプルの調整であってもそのタンパクが形成するバンド全体を一つの試料として切り出すことができなかった可能性がある。以上より、本手法は小分子量ペプチドの血中結合タンパクを同定する新たな手法として有用である可能性が考えられた。

現在、電気泳動によるタンパク複合体を探索する試みとして、Blue-Native PAGE が用いられることが多い。Blue-Native PAGE は分子量に応じた分離を行うことができるため、タンパク複合体の構成要素をある程度推測することが可能であるうえに、より簡便であるからでもある。本研究では、Blue-Native PAGE を用いて同様の手法を試みたが、泳動後のゲルの蛍光検出では明確な蛍光バンドが確認できなかった。この原因を探るために蛍光サンプルに Blue-Native PAGE の泳動緩衝液を混合したところ、蛍光が消失してしまったため、CBB G-250 が蛍光標識タンパクに結合することで消光をもたらしている可能性が考えられた。今回の手法では電気泳動後のゲルの蛍光バンドの泳動部位に、確かに蛍光標識した小分子量の GIP が存在することを確認するために、泳動ゲルをニトロセルロース膜に転写して抗 GIP 抗体を用いたウエスタン解析を行った。これにより GIP 様免疫活性を簡便に確認することができるため、LC-MS/MS により構成タンパク質を同定する本手法では、血漿蛋白と FITC-GIP の共在を蛍光で検出することが可能である Native-PAGE を用いるべきであると考えられた。

今回、FITC-GIP がヒトアルブミンだけでなく、ヒト IgG、トランスフェリンのそれぞれにも結合し、血漿タンパク質の複合体を形成する可能性を明らかにした。この3種のタンパクは非常に豊富な血漿成分であるが、内因性 GIP、および投与された GIP ペプチドが、これらの血漿タンパク質に結合して、循環血中で複合体を形成し得ることは容易に推察される。糖尿病治療薬として用いられるようになった GLP-1 と異なって、GIP は生物学的作用は強力であるにもかかわらず、注射薬としての効果は GLP-1 よりも劣るため臨床応用されるに至っていないが、GLP-1 に比較して大分子量蛋白への結合能がはるかに高いことがその大きな要因であったことが推察される。

今回のウエスタン解析で使用した抗体は GIP の C 端に対する抗体であるため、39 アミノ酸の活性型 GIP とその N 端の 2 アミノ酸が DPP-4 により切断された非活性型 GIP の両者とともに認識するものである。活性型 GIP と非活性型 GIP の N 端を認識する 2 つの抗体も作成して、同様にウエスタン解析したが C 端抗体を用いたときのような免疫検出ができなかった。この理由として、GIP に結合するアルブミン、IgG、トランスフェリンなどの血漿大

分子量タンパクが GIP の N 端側に結合したため、抗原認識部位を変化させた可能性が考えられる。GIP の N 端領域にこれらの血漿タンパクの結合が示唆される結果となった。

## 5. 総括

蛍光標識ペプチドと Native-PAGE、LC-MS/MS の組み合わせにより、生理活性ペプチドの血中結合蛋白を同定する新たな手法を開発した。本手法は、蛍光標識ペプチドを用いることにより視覚的に結合蛋白との複合体を目標として確認することができるため、従来の手法よりもはるかに簡便である。生体内での循環機構が明らかとなっていない他の生理活性ペプチドへの応用が可能であり、汎用性が高い手法であると考えられる。

## 6. 今後の課題

本研究では、蛍光標識後のペプチドサンプルはカラムにより未反応の FITC と分離することはできているが、GIP 中のアミノ基と FITC が結合している正確な割合は不明であり、使用した FITC -GIP 溶液中の GIP の濃度は不明である。本研究は定性的な評価のみであり、定量的な評価、複合体と遊離体の存在率の検討などが今後の課題の一つである。

また、インクレチンは、DPP-4 により分解されていない「active」なペプチドが血糖調整など生理活性の主軸を担っている。複合体形成の詳細を検討するにあたり、active GIP の複合体形成率を知ることが、生体内での活性維持や遠隔臓器への作用を解明する上で重要であると考えられ、今後の課題とする。

## 7. 謝辞

本論文は筆者が北里大学医療系研究科 内分泌代謝内科学博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。北里大学 理学部 物理学科 物性物理学講座 教授 小寺 義男先生には、研究遂行にあたり日頃よりご指導戴きました。ここに深謝の意を表します。また、内分泌代謝内科学教室技術員 加藤 由起子様には研究中有益なご助言を戴き、感謝の意を表します。医療系研究科 内分泌代謝内科学研究室および理学部 物理学科 物性物理学教室の各位には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言を戴き感謝の意を表します。

本研究の一部は、北里大学医学部けやき会研究助成によりおこなった。



## 8. 引用文献

1. Finoult, I., et al., *Sample preparation techniques for the untargeted LC-MS-based discovery of peptides in complex biological matrices*. J Biomed Biotechnol, 2011. 2011: p. 245291.
2. Kawashima, Y., et al., *High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples*. J Proteome Res, 2010. 9(4): p. 1694-705.
3. Fujimoto, K., et al., *Identification and quantification of plasma free salusin-beta, an endogenous parasympathomimetic peptide*. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 8275.
4. Ogawa, A., et al., *Physiological fluctuations of human plasma total salusin-beta, an endogenous parasympathomimetic/proatherosclerotic peptide*. Peptides, 2014. 59: p. 83-8.
5. Deacon1, C.F. and a.B. Ahrén2, *Physiology of Incretins in Health and Disease*. The Review of DIABETIC STUDIES, 2011.
6. Seino, Y., M. Fukushima, and D. Yabe, *GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences*. J Diabetes Investig, 2010. 1(1-2): p. 8-23.
7. 李, 相., et al., *糖尿病治療を変える新たな糖尿病薬インクレチン*. 昭和医学会雑誌, 2010. 70(1): p. 34-44.
8. Noor Remmeriea, b., Thomas De Vijldera,b, Dirk Valkenborga,c,d, Kris Laukense,f, Koen Smetsg, Jilles Vreekeng, Inge Mertensa,c, Sebastien C. Carpentierh, Bart Panish, Geert De Jaegeri,j, Ronny Blustk, Els Prinsenb, Erwin Wittersa,c,k,\*, *Unraveling tobacco BY-2 protein complexes with BN PAGE/LC-MS/MS and clustering methods*. JOURNAL OF PROTEOMICS, 2011.
9. Breen, C.J., M. Raverdeau, and H.P. Voorheis, *Development of a quantitative fluorescence-based ligand-binding assay*. Scientific Reports, 2016. 6: p. 25769.
10. Satoh, M., et al., *Effect of thyroxine on abnormal pancreatic proteomes of the hypothyroid rdw rat*. PROTEOMICS, 2005. 5(4): p. 1113-1124.
11. Rappsilber, J., Y. Ishihama, and M. Mann, *Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics*. Analytical Chemistry, 2003. 75(3): p. 663-670.
12. Suzuki, S., et al., *Methionine sulfoxides in serum proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress*. Scientific Reports, 2016. 6: p. 38299.
13. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature Methods, 2012. 9: p. 671.
14. Helbig, A.O., et al., *A three-way proteomics strategy allows differential analysis of*

- yeast mitochondrial membrane protein complexes under anaerobic and aerobic conditions*. PROTEOMICS, 2009. 9(20): p. 4787-4798.
15. Farhoud, M.H., et al., *Protein complexes in the archaeon Methanothermobacter thermautotrophicus analyzed by blue native/SDS-PAGE and mass spectrometry*. Mol Cell Proteomics, 2005. 4(11): p. 1653-63.