

学 位 論 文 要 旨

氏 名 福西 智子



論 文 題 目

酸化ストレスマーカーとしての血清中蛋白のメチオニン酸化レベル定量法

指 導 教 授 承 認 印

七里真義



酸化ストレスマーカーとしての血清中蛋白のメチオニン酸化レベル定量法

氏名 福西 智子

【はじめに】酸化ストレスは老化現象のみならず癌・糖尿病・心血管病・神経変性疾患など、様々な疾患の発症・進展に関連する。特に罹患率の増加している糖尿病などの生活習慣病においては、酸化ストレスの亢進が重要な臓器障害の進展因子として注目されており、各種疾患の発症に寄与している可能性が考えられている。そのため、生体内の酸化ストレスレベルを正確に評価できるバイオマーカーの開発は重要な臨床的課題である。酸化ストレスは活性酸素による蛋白質、核酸、脂質など生体成分への酸化修飾であり、その結果として種々の臓器機能障害が惹起されるが、蛋白質のメチオニン残基の酸化は可逆的な酸化反応であり、微弱な酸化ストレスを鋭敏に反映し得る。そのため、特に血液中の酸化ストレスレベルを正確に捉えるのは困難とされている。今回、質量分析の技術を用いてヒト血中蛋白質の詳細な解析を行うことで、メチオニン残基の酸化を正確に捉えることにはじめて成功した。質量分析計を用いた手法は様々な疾患の発症、進展を予測しうるバイオマーカーを発見することを可能とし、初期の酸化ストレスの指標を見出すことで病態の解明につながると期待される。

【研究目的】本研究では初期の酸化ストレスを、ごく少量の臨床血清サンプルから質量解析によって定量分析するための新たな方法を開発し、ヒト血清蛋白質のメチオニン残基の酸化レベルが、安定的に高い再現性を示す臨床的指標になりうるかどうか検討することを目的とした。

【実験方法】試料は血清 2 μ L を使用した。はじめにシステイン残基の S-S 結合を還元、アルキル化した後にトリプシン消化して得られた酵素消化ペプチドを質量分析計で分析した。ペプチドの同定解析は、溶媒流速 300 nL/min の超微流速の液体クロマトグラフィー (LC) と質量分析計 Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) を組み合わせた高感度 LC-MS にて網羅的に行った。その後、酸化状態の高精度比較解析には溶媒流速 200 μ L/min の汎用 LC と質量分析計 LTQ-Orbitrap Discoverer (Thermo Fisher Scientific) を組み合わせた、再現性が高い高精度 LC-MS を使用した。得られたデータはペプチド定量解析用ソフトウェア Xcalibur (Thermo Scientific) を用いて解析し、メチオニン残基を含むトリプシン消化ペプチドの酸化型と非酸化型ペプチドの信号強度 (MS イオンクロマトグラムの強度) の比を酸化比として解析した。

【結果】

1. メチオニン酸化状態の基礎的検討と対象ペプチドの選択

まず初めに、実験過程においてメチオニン残基の酸化状態が変化しないことを確認するために、トリプシン消化処理した大腸菌由来の β ガラクトシダーゼを未処理の血清に添加し、通常の試料調製後に LC-MS 分析を行った。その結果、試料調製前後においてメチオニン残基の酸化比に顕著な差は認められなかった。

次に高感度 LC-MS を用いて網羅的な同定解析を行った結果、酸化メチオニンを含む 53 のペプチドが同定された。その中から比較解析用の LC-MS 分析で信号強度が十分に大きく、明確に分離でき、かつ、再現性良く分析できる 5 種類のペプチドを選択した。その結果、血清アルブミン (Met-111、Met-147)、Complement C3 (Met-1181)、Ig γ -1chain C region (Met-135)、 α 1-antitrypsin (Met-409) が条件を満たすペプチドであった。しかしこの中で、Complement C3 (Met-1181) はすべての検体において 99.9% 以上のメチオニン残基が酸化されており、本研究の検討から除外し、以降の研究では、血清アルブミン (Met-111、Met-147)、Ig γ -1chain C region (Met-135)、 α 1-antitrypsin (Met-409) の 4 種類のペプチドを対象とした。

2. 酸化比の安定性の検討

健常者を対象として、上述のペプチドに対して実験条件にともなう酸化比の変動の有無について検討した。酵素消化時間を 4、18、21、24 時間と変えて調製し、比較した結果、18 時間以上では酸化比は安定していた。次に採血から遠心分離までの時間による酸化比の影響を確認したが、30 分から 6 時間では顕著な変動は観測されなかった。また保存していた血清を融解後、凍結・融解を 4 回繰り返した場合でも、酸化比に顕著な変動は観測されなかった。

3. 酸化比の生理的変動

血中メチオニンの酸化比の日内変動を調べるために、3・6・7・8・9・16・18・20・23 時に採血して分析した。その結果、それぞれのペプチドにおいて顕著な日内変動は認められなかった。次に、酸化比の急性反応を確認するため健常喫煙者で喫煙前および喫煙後 15・30・60 分でメチオニンの酸化比を日内変動と同様の方法で分析したが、顕著な変動は認められなかった。また、抗酸化作用を有する Vitamin C 1000mg を服用前と 4 日間の継続内服期間において酸化比の顕著な変動は認められなかった。

4. 糖尿病患者における酸化比の変動

健常非喫煙者 18 名と 2 型糖尿病患者 23 名、腎不全合併 2 型糖尿病患者 12 名、健常喫煙者 9 名の血清を対象に酸化比を比較検討した。血清アルブミンの 2 種類のメチオニン残基 (Met-111、Met-147) の酸化比は健常非喫煙者群より 2 型糖尿病の両群 (腎不全なし、腎不全合

併)で有意に高値を示し($p<0.001$)、健常喫煙者群の酸化比も健常非喫煙群と比較して高値を示した(Met-111: $p<0.014$ 、Met-147: $p<0.0036$)。また、Ig γ -1chain C region(Met-135)も糖尿病患者群の酸化比は健常者群に比べて有意に高値を示した($p<0.001$)。

5. 要因の解析

酸化比に影響を与えている要因を把握するためステップワイズ法による重回帰分析を行った。その結果は血清アルブミン(Met-111)の酸化比では糖尿病($\beta=0.368$, $F=13.893$, $P<0.001$)と腎不全($\beta=0.269$, $F=7.180$, $P<0.0095$)がそれぞれ独立した因子であった。また血清アルブミン(Met-147)においても糖尿病($\beta=0.589$, $F=24.942$, $P<0.001$)と腎不全($\beta=0.375$, $F=13.551$, $P<0.001$)が独立した因子であった。またIg γ 1 chain C region(Met-135)の酸化比に関しては糖尿病($\beta=0.601$, $F=25.376$, $P<0.001$)が独立した因子であり、血清アルブミン(Met-147)は喫煙($\beta=0.281$, $F=6.715$, $P<0.012$)が糖尿病、腎不全に次ぐ独立した因子であった。一方、年齢と性別は酸化比に対する独立した因子ではなかった。

【考察】

本研究では、質量分析計を用いてメチオニン残基の酸化反応を捉え、メチオニン酸化比が新たな病態解明につながる酸化ストレスマーカーとなりうる可能性を示した。

これまでメチオニン残基の酸化状態はきわめて不安定であると信じられており、実験の過程で容易に酸化が亢進し、還元反応も併行して進行するのではないかと考えられてきた。そのため、本研究ではまずトリプシン消化した大腸菌由来の β ガラクトシダーゼペプチドを用いて、血清の試料調製からLC-MS分析の全ての実験過程において酸化状態の変化を詳細に観察した。驚いたことに検討したいずれの血清蛋白のメチオニン残基の酸化状態もその酸化比の定量レベルはきわめて安定で、通常の血清の処理操作や酵素消化や還元アルキル化を含む質量解析前処理から解析にいたるさまざまな処理によっても、今回の検討で試料調製法を整備することによってほとんど変動を示さず高い安定性と再現性を示すことが明らかになった。さらに安定性の高いLC-MSを用いることで高い精度で分析が可能であり、かつ疾患に伴って興味深い変動を示す酵素消化ペプチドの検出につながった。

2型糖尿病群は血清アルブミンの2種類(Met-111、Met-147)とIg γ -1chain C region(Met-135)のメチオニン残基の酸化が健常非喫煙者と比べて明らかに高値を示しており、内因性の酸化ストレスが検出できている可能性が示された。また本研究対象の非喫煙健常者群が患者群と比較し若年であったことから、2型糖尿病において酸化ストレスが生じていることを裏付けるために重回帰分析を用いて検討したが、年齢や性別は関連性がなく、糖尿病と腎不全の病態そのものが血清アルブミン(Met-111、Met-147)の酸化比に影響を与えるということが判明した。

本研究より健常者の血清アルブミン (Met-111 と Met-147) と Ig γ 1chain C region (Met-135) の酸化レベルが判明し、また 2 型糖尿病群で高い酸化レベルを示したことは、これらの酸化比が 2 型糖尿病の酸化ストレス状態を反映している可能性があり、臨床における新規バイオマーカーになり得ると考えられる。喫煙に関しては高濃度のフリーラジカルを含み、酸化ストレス亢進に関わっていることが知られており、特異的なペプチドの酸化が肺疾患の指標になり得る。

以上のように、安定した前処理技術と質量分析の技術によってヒト血中酸化ストレスレベルをわずかな血清から定量化することに成功した。本研究で示した酸化レベルの亢進が各種疾患の病態に直接関与する新たな血清蛋白のメチオニン残基を同定し、酸化ストレスに起因する疾患・病態の進行や予後を予測することのできるバイオマーカーの発見に繋がる可能性があり、今後さらなる詳細な分析結果の蓄積に期待が持たれる。