

抗体固体化磁気ビーズを用いたImmuno-MSによる血清マーカー定量法の開発

Development of the immuno-MS work flows for serum biomarker quantification using the antibodies immobilized on the magnetic beads

○高畑 良雄¹, 西野耕平¹, 羽生尚宏², 川上 隆雄¹

株式会社メディカル・プロテオスコープ¹・多摩川精機株式会社²

要旨

【材料と手順】

・Immuno-MS（抗体を用いたアフィニティ精製とペプチド断片の質量測定を組み合わせた手法）の材料と試料調製からデータ解析までの手順
→ 2種類の手順を提示
①溶出後加水分解：ビーズ表面に固定化した抗体とAFPの複合体からAFPを溶出後にプロテアーゼ加水分解
②ビーズ上加水分解：ビーズ表面に固定化した抗体とAFPの複合体にプロテアーゼを加えて加水分解

【定量対象ペプチドの選定】

→ ペプチド同一一覧から定量対象ペプチドを選定

【アフィニティ精製条件の最適化】

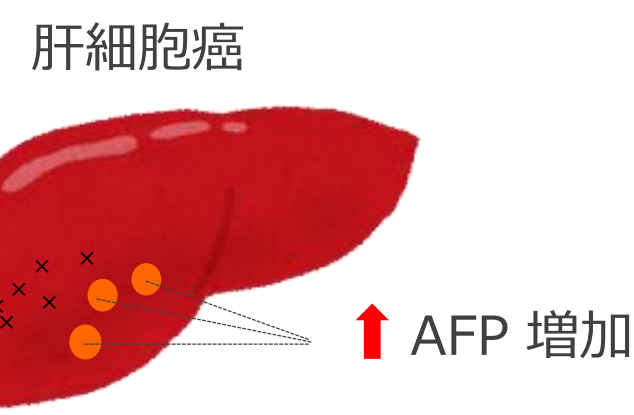
・溶出後加水分解におけるAFPの溶出溶出条件を検討
→ 有機溶媒を含む溶出液でAFP溶出量が増加

【定量性の評価】

・AFP添加濃度とAFPペプチドの検出強度の相関を検証
・血清内在性AFPの濃度を算出

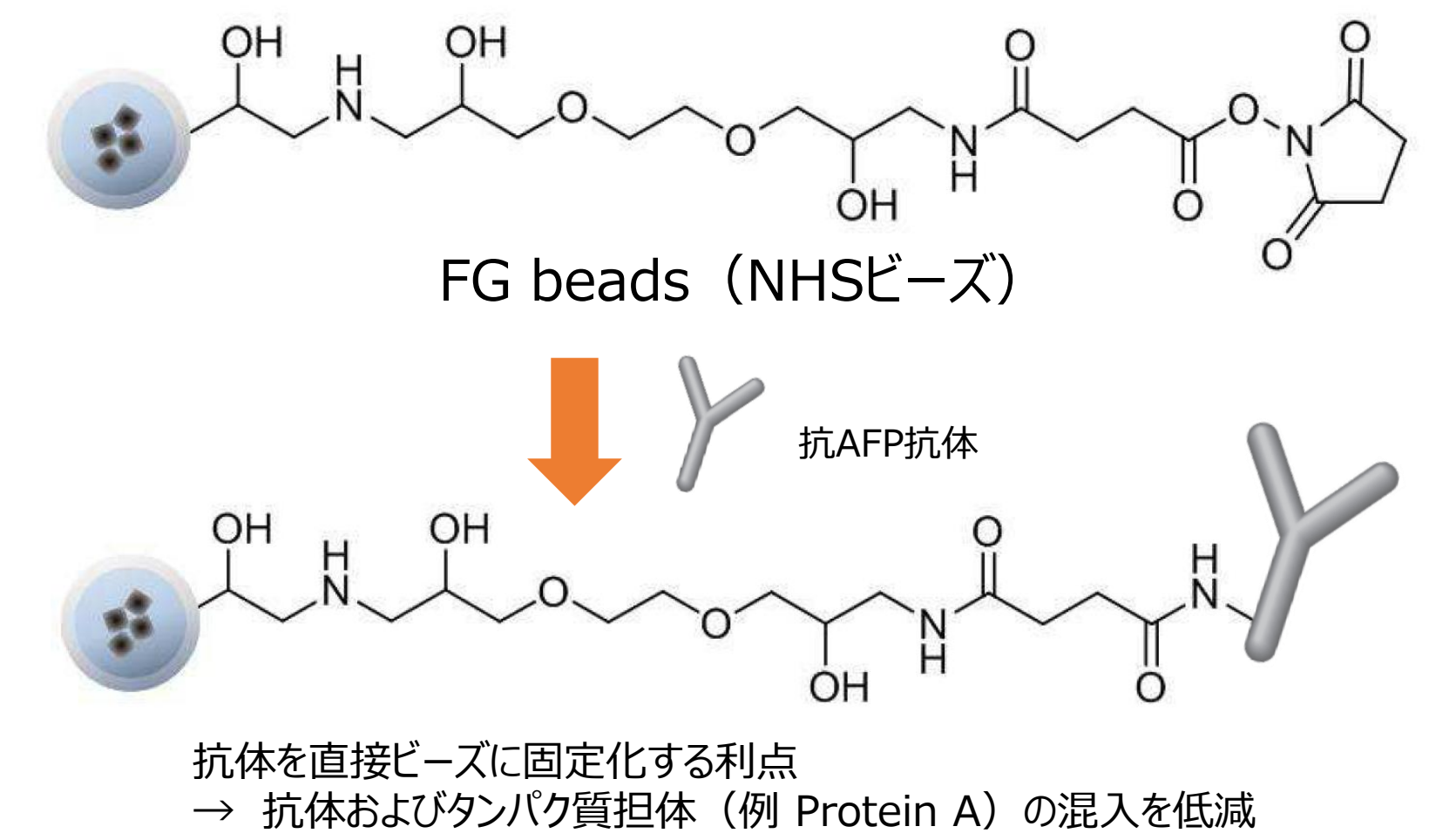
材料と手順

α-fetoprotein (AFP)



- ・肝細胞癌や精巣腫瘍の腫瘍マーカー¹⁾
- ・胎児の肝細胞や卵黄嚢で産生
- ・分子量約7万
- ・iPS細胞などの分化の状態を示すマーカーとしても広く利用
- ・健康者の血清AFP濃度は10 ng/ml²⁾未満

抗AFP抗体の磁気ビーズへの固定化



定量対象ペプチドの選定

同定ペプチド一覧と定量対象ペプチドの選定

候補ペプチドの選定条件

- (1) Swiss-Protのヒトのアミノ酸配列データベースに対してユニーク配列
- (2) C末端にのみシリン残基またはアルギニン残基を含む
- (3) N末端にグルタミン残基を含まない
- (4) システイン残基およびメチオニン残基を含まない
- (5) 健康者の血清から同定
- (6) 検出強度の高い上位3点

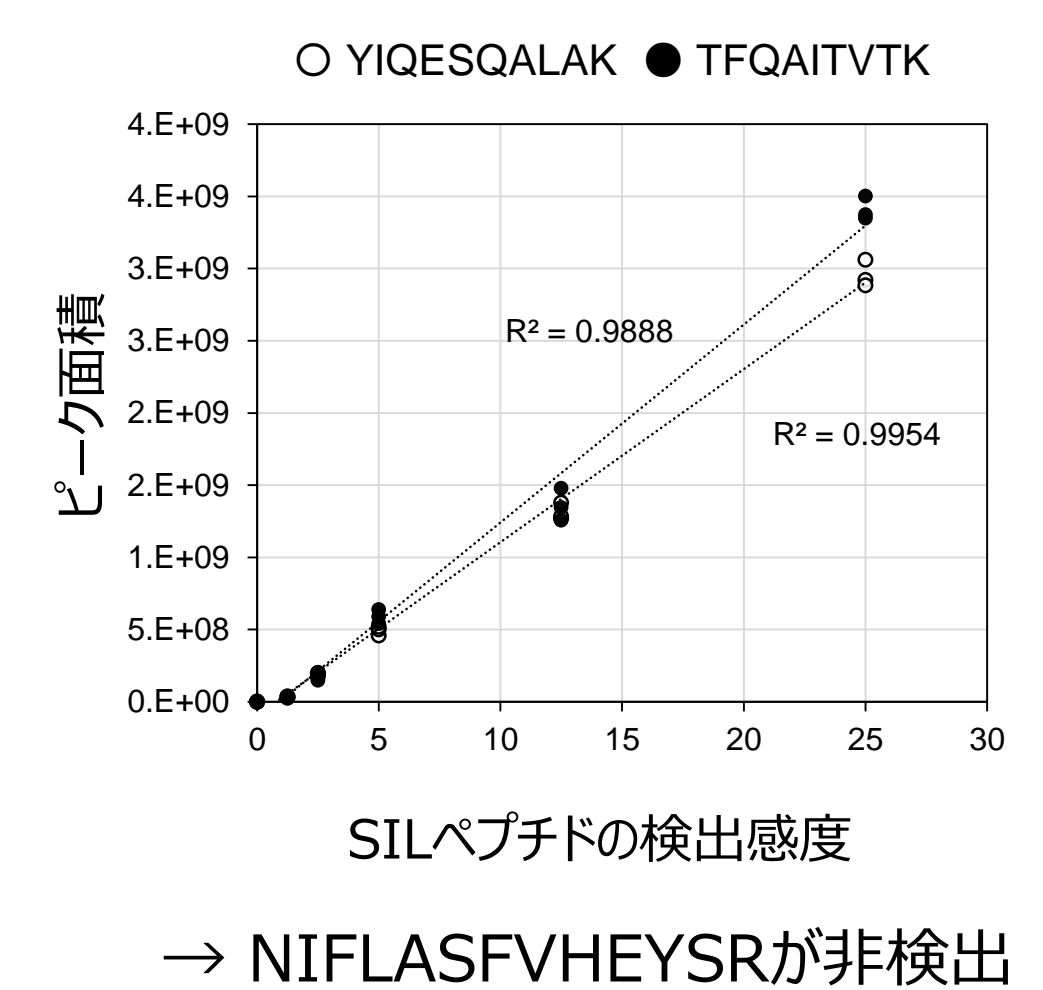
試料：健康者血清からのアフィニティ精製物

1	MKVVESIFLFLFLNFTSR	151	YEDRETFMNF	201	CFQTKAAVTVKEL	251	NFTIEIQKLVLDVA	301	ECCKLTTLERGGCI	351	LASFVHEYSRRHP	401	LQKYIQESQALAK	451	TRKMAATAATCCOL	501	CTSSYANRRPFC	551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV		
51	FAQFVQEAATYKEV	101	EKEILEKYGHSDCC	151	YEDRETFMNF	201	CFQTKAAVTVKEL	251	NFTIEIQKLVLDVA	301	ECCKLTTLERGGCI	351	LASFVHEYSRRHP	401	LQKYIQESQALAK	451	TRKMAATAATCCOL	501	CTSSYANRRPFC	551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV
101	EKEILEKYGHSDCC	151	YEDRETFMNF	201	CFQTKAAVTVKEL	251	NFTIEIQKLVLDVA	301	ECCKLTTLERGGCI	351	LASFVHEYSRRHP	401	LQKYIQESQALAK	451	TRKMAATAATCCOL	501	CTSSYANRRPFC	551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV		
151	YEDRETFMNF	201	CFQTKAAVTVKEL	251	NFTIEIQKLVLDVA	301	ECCKLTTLERGGCI	351	LASFVHEYSRRHP	401	LQKYIQESQALAK	451	TRKMAATAATCCOL	501	CTSSYANRRPFC	551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV				
201	CFQTKAAVTVKEL	251	NFTIEIQKLVLDVA	301	ECCKLTTLERGGCI	351	LASFVHEYSRRHP	401	LQKYIQESQALAK	451	TRKMAATAATCCOL	501	CTSSYANRRPFC	551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV						
251	NFTIEIQKLVLDVA	301	ECCKLTTLERGGCI	351	LASFVHEYSRRHP	401	LQKYIQESQALAK	451	TRKMAATAATCCOL	501	CTSSYANRRPFC	551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV								
301	ECCKLTTLERGGCI	351	LASFVHEYSRRHP	401	LQKYIQESQALAK	451	TRKMAATAATCCOL	501	CTSSYANRRPFC	551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV										
351	LASFVHEYSRRHP	401	LQKYIQESQALAK	451	TRKMAATAATCCOL	501	CTSSYANRRPFC	551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV												
401	LQKYIQESQALAK	451	TRKMAATAATCCOL	501	CTSSYANRRPFC	551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV														
451	TRKMAATAATCCOL	501	CTSSYANRRPFC	551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV																
501	CTSSYANRRPFC	551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV																		
551	EFLINLVKQKPOI	601	SKTRAAALGV																				
601	SKTRAAALGV																						

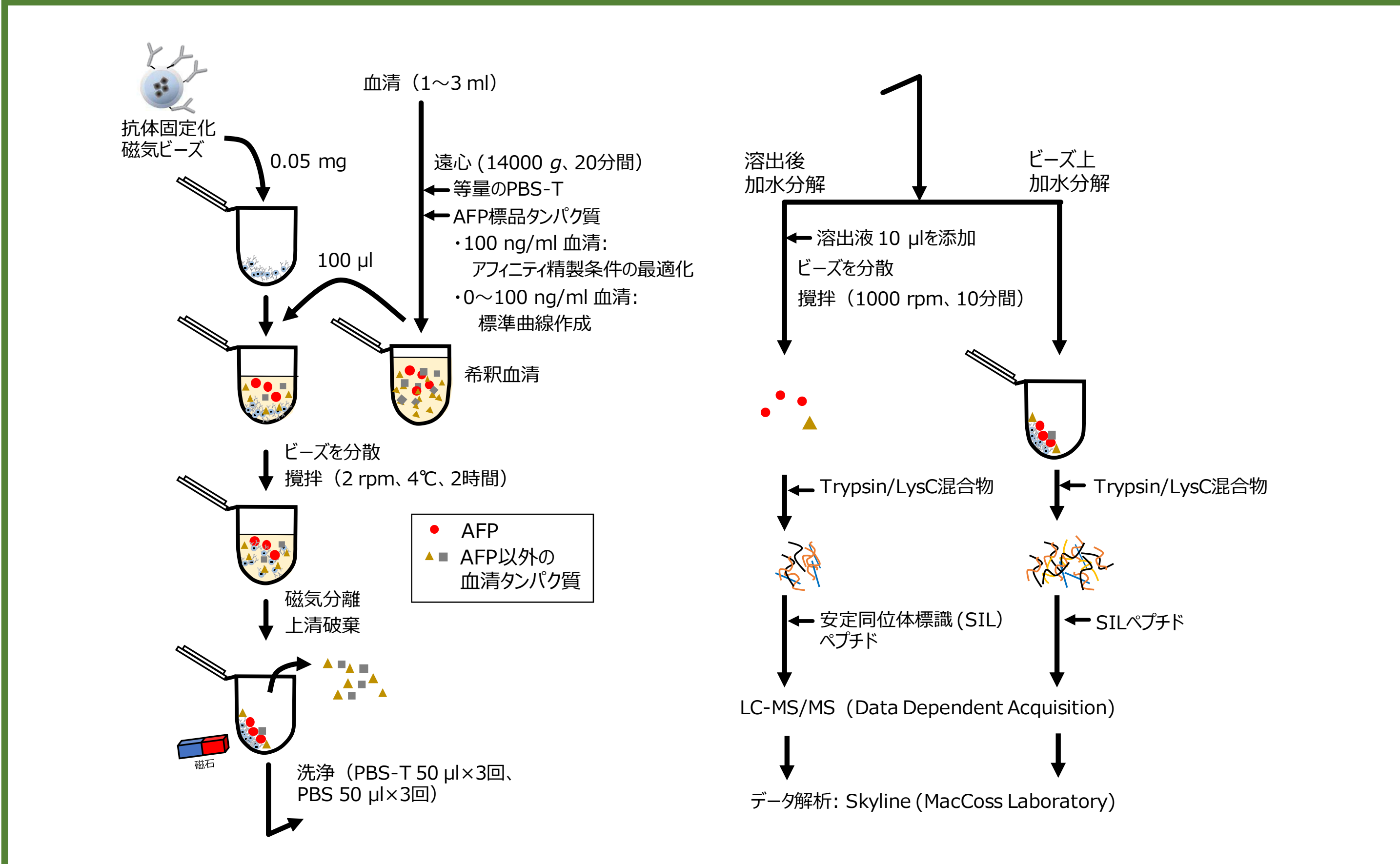
ショットガン分析によりAFP由来ペプチドを同定した。

→ 「YIQESQALAK」および「TFQAITVTK」を定量対象ペプチドに選定

SILペプチドのアミノ酸配列
YIQESQALAK*
TFQAITVTK*
NIFLASFVHEYSR*
K*: K(13C6,15N2)
R*: R(13C6,15N4)

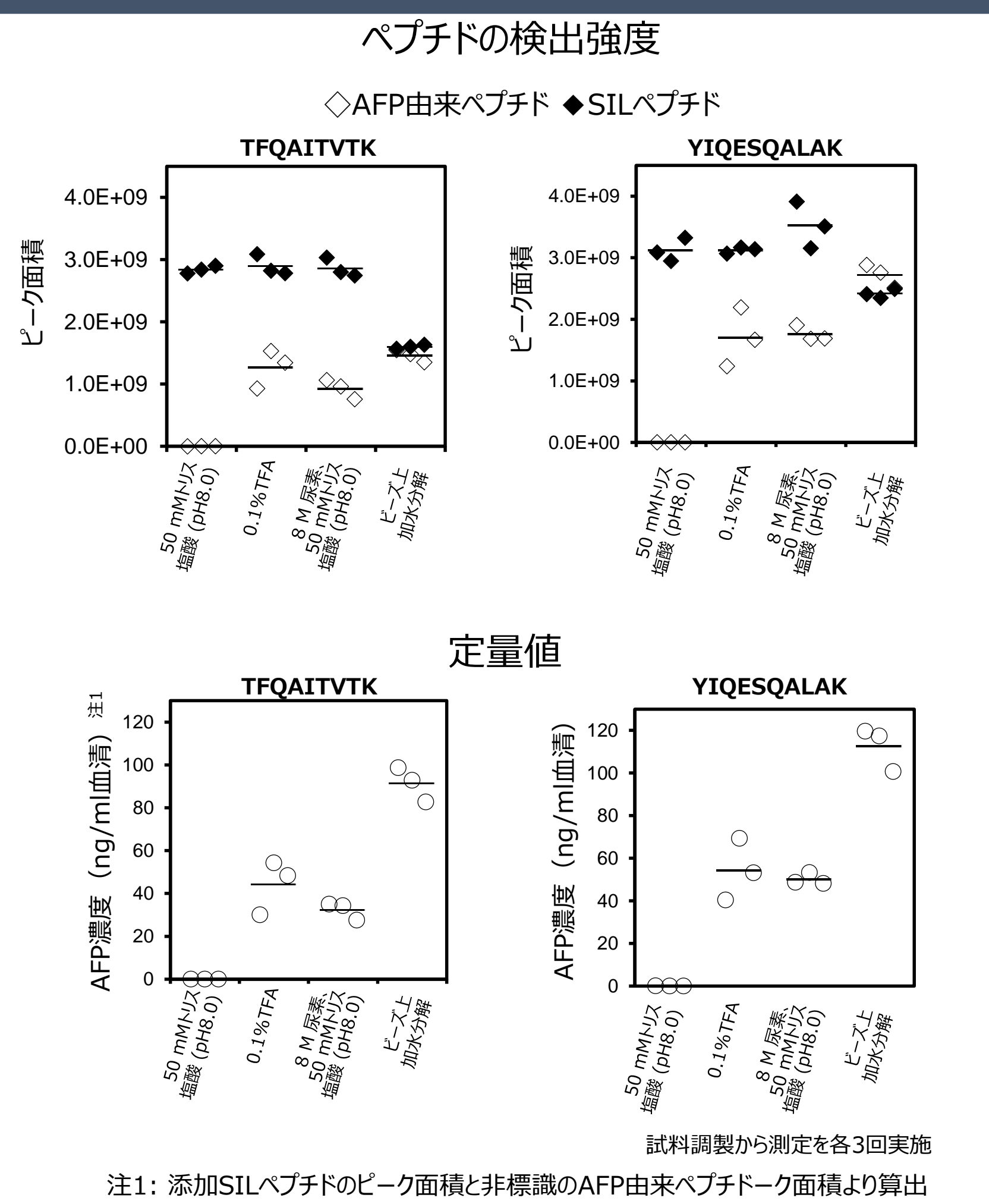


試料調製からデータ解析まで



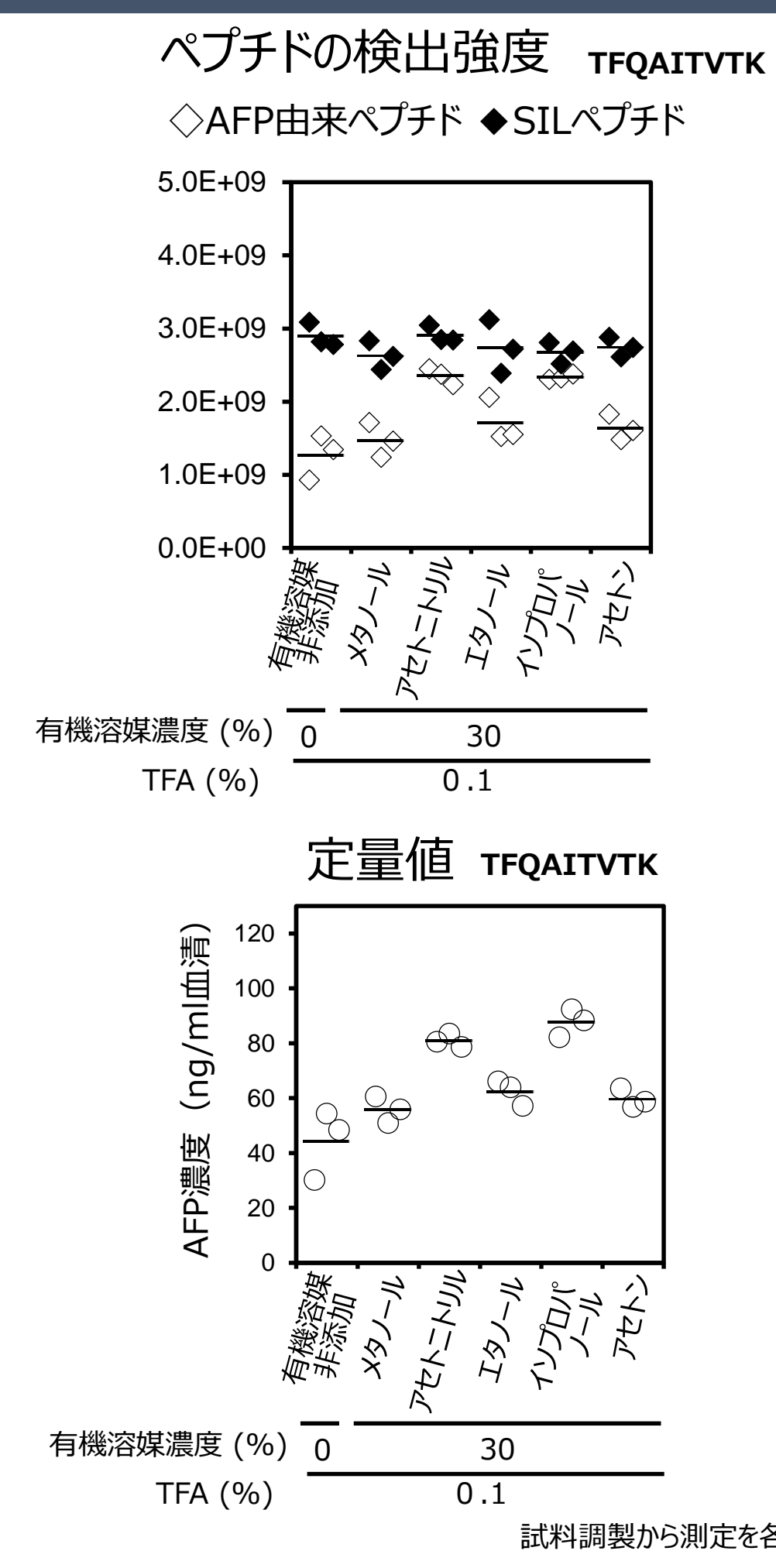
アフィニティ精製条件の最適化

最適化前の溶出後加水分解とビーズ上の加水分解の比較

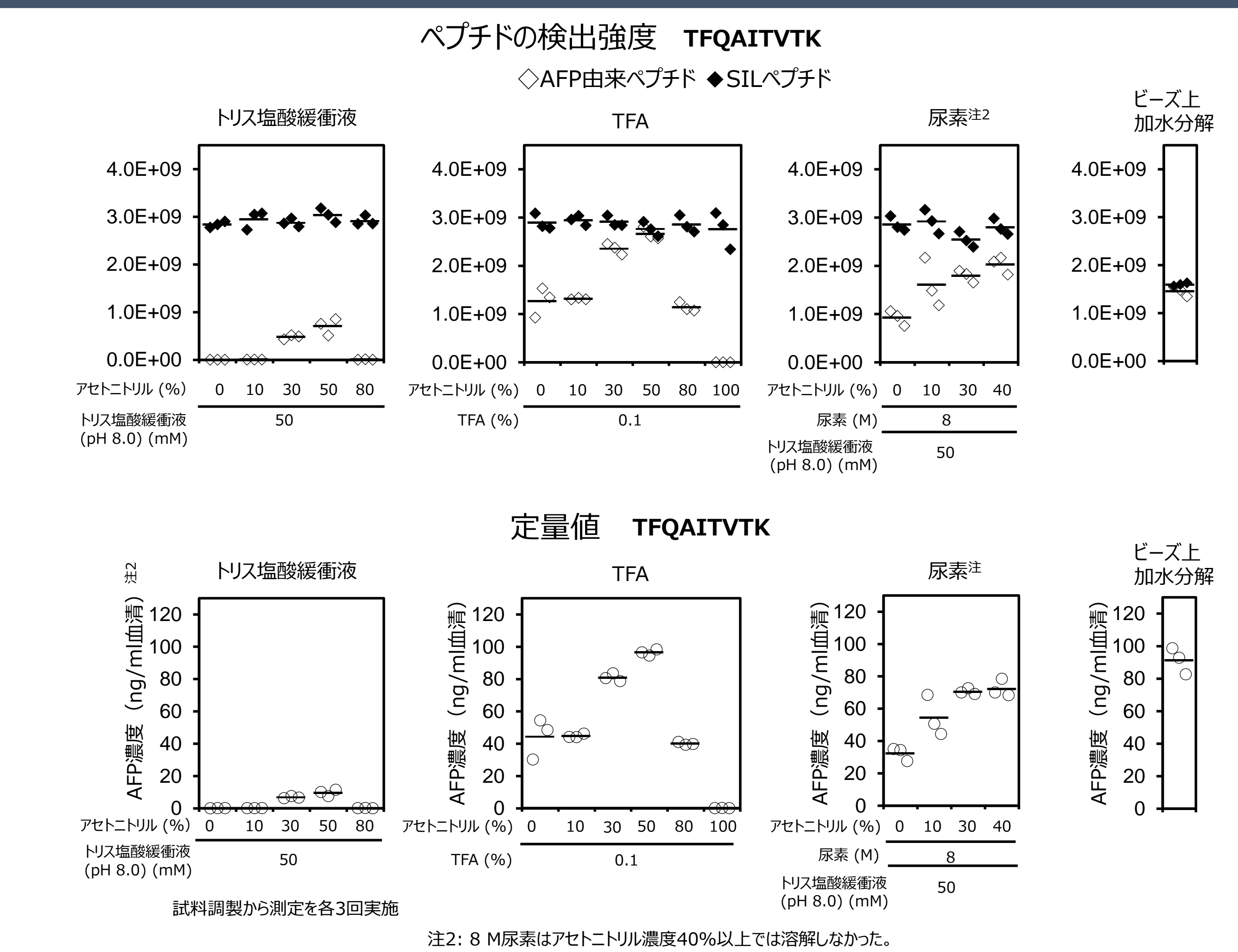


→ 定量値はビーズ上の加水分解がもっとも高かった。
→ ただし、ビーズ上の加水分解ではSILペプチドのピーク面積が低下した。

有機溶媒含有溶出液によるAFPの溶出

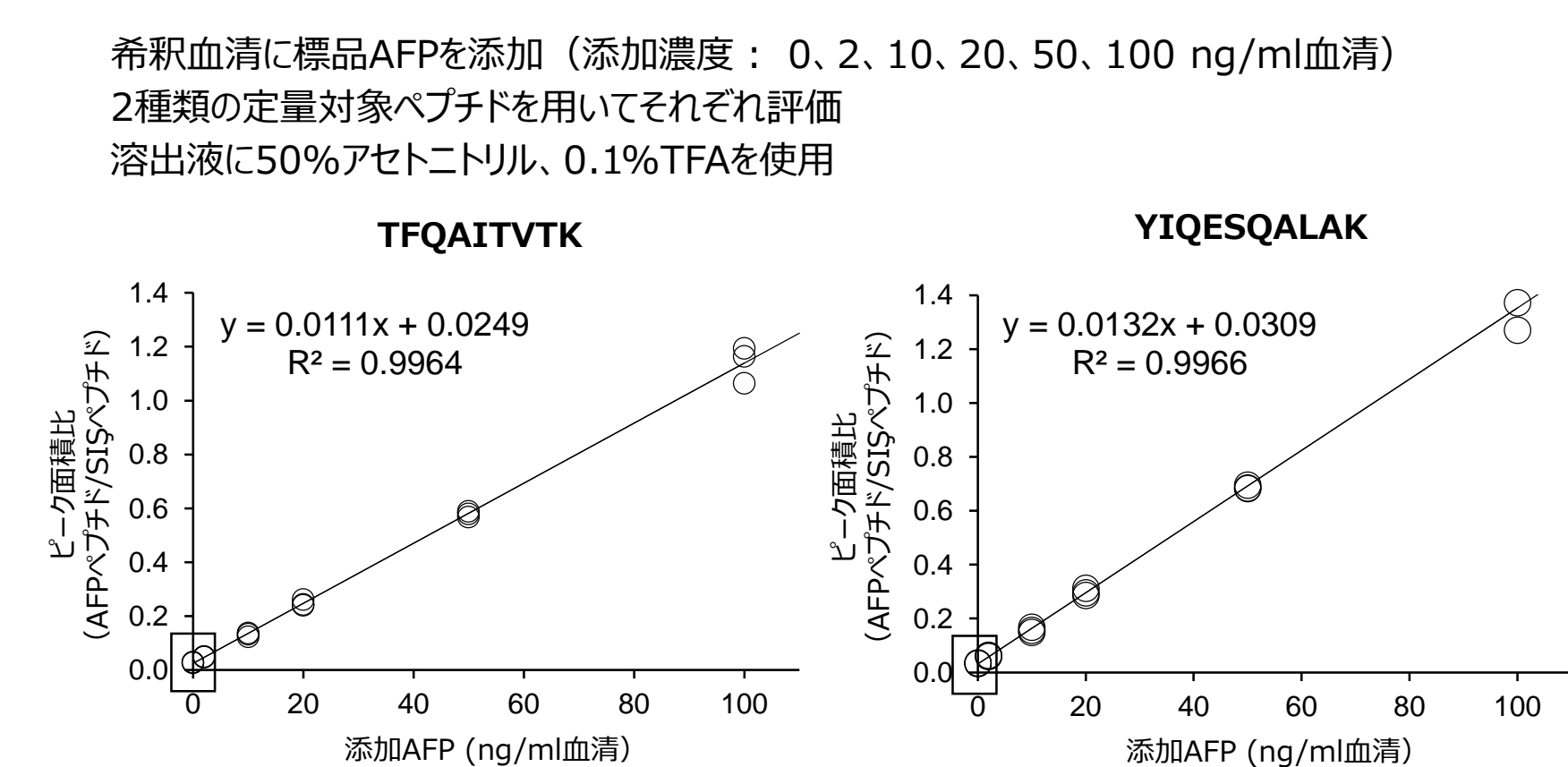


溶出液のアセトニトリル含有率とAFPの溶出量との関係

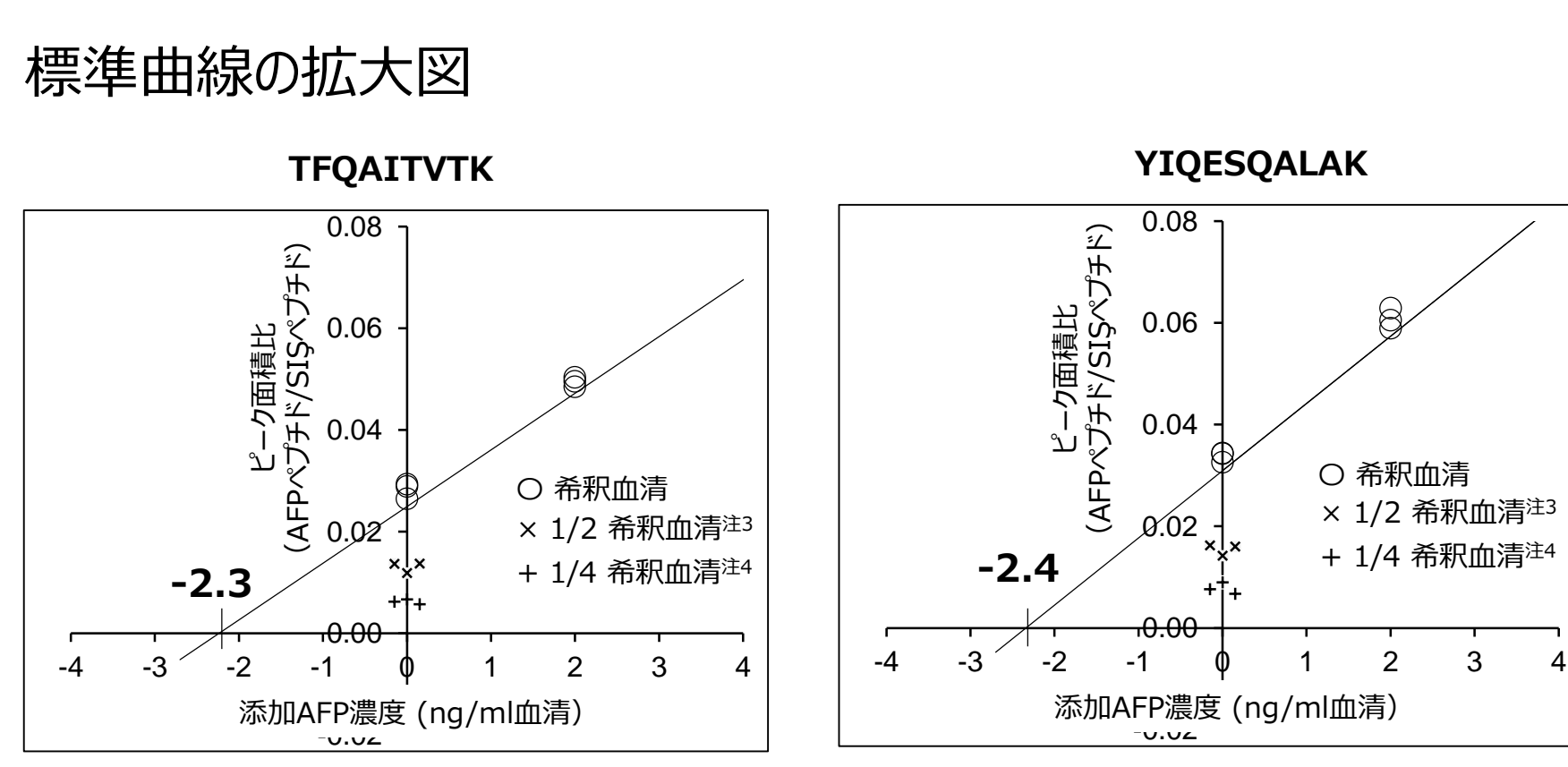


定量性の評価

標準曲線の描画



血清内在性AFP濃度の算出



結論と今後の方針

・溶出後加水分解では、有機溶媒を含む溶出液を用いるとAFPの溶出量が増加した。
・溶出液の組成が0.1% TFA、50%アセトニトリルでAFPの溶出量および検出強度は最大となった。
・ビーズ上加水分解と比べ、最適化した溶出後加水分解では、AFPの溶出量は同程度であったが、検出強度が有意に高かった。より定量に適した分析法であると考えられた。
・本報で確立した分析条件において、添加したAFP濃度と補正したAFPペプチドのピーク面積に高い相関 ($R^2 > 0.99$) が観測された。
・検量線の回帰式から血清内在性AFPの濃度を2.3 ng/mlと算出した。この値は報告されている健康者血清のAFP濃度 (< 10 ng/ml)²⁾ の範囲に収まっている。
・今後は他の血清マーカーにも本分析手順を適用し、定量性を検証する予定である。

謝辞：本研究は横浜市立大学プロテオーム解析センターのご協力のもとで実施しました。

参考文献

- 1) H. Lund et al., Anal. Chem., **84**, 7926-7932 (2012).
- 2) Y. Jeon et al., Gut liver, **11**(1), 136-141(2017)
- 3) M. Omata et al., Hepatol Int., **4**(2), 439-474 (2010).