

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650038

研究課題名（和文）標的蛋白化学的切除試薬（ケミカルシザーズ）の開発と応用

研究課題名（英文）Novel development and applications of the reagents for chemical scission of targeted proteins as chemical scissors

研究代表者

野崎 修 (Nozaki, Osamu)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50164687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、標的蛋白化学的切除試薬の開発と臨床応用であった。理由は、化学的に温和な反応条件で迅速に蛋白破壊可能な試薬が、疾患治療および病因究明に必要なためである。方法と原理：開発試薬の蛋白過酸化イソインドールは、蛋白をo-phthalaldehydeとチオール化合物でイソインドールへ変換し、続いて過酸化水素で過酸化して作成した。結果：蛋白過酸化イソインドール形成は、蛍光画像撮影で証明した。蛋白過酸化イソインドールの酸化で発光が生じた。発光後、その蛍光画像は消失した（蛋白破壊の証明）。血清蛋白分画のバンド蛋白も、切除できた。結論：本試薬により、蛋白破壊が同時発光モニターしながら可能となった。

研究成果の概要（英文）：Development of the novel reagent for chemical scission of targeted proteins and its clinical application were studied. The reagents those demolish proteins under mild chemical conditions have been requested for treatment of patients and research of diseases. The reagents were protein peroxyisindoles of proteins, and were prepared by the reaction with hydrogen peroxide following to the reaction with o-phthalaldehyde and thiol compounds. The production of protein peroxyisindole were confirmed by fluorescence imaging. The peroxyisindole was oxidized to emit light, accompanying of disappearance of the fluorescence image. This meant demolition of proteins. The reagent of peroxyisindole was also applied to serum protein fractionated by electrophoresis resulting in successful cleavage. In conclusion, the novel reagents of proteins allowed simultaneous protein scission and monitoring of the accompanying chemiluminescence.

研究分野：臨床検査医学、内科学、分析化学

キーワード：蛋白切除 蛋白過酸化イソインドール 化学発光 蛍光画像測定 質量解析 試薬開発 血清蛋白分画  
o-phthalaldehyde

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 種々の病因蛋白の解析および治療法の開発では、標的蛋白を自由に切断してその影響を解析することが必要である。現行蛋白切断法うち、(1)プロテアーゼ等酵素を用いた方法の問題は、標的蛋白のみの切除ができないことである。更に、(2) 強酸、強アルカリあるいは放射線による破壊法の問題は、過激な反応条件のために、生体細胞へ応用できないことであった(文献 1)。そのため、生理環境に近い穏和な条件下で、希望する蛋白の切除可能な方法が必要とされている。これらの問題を解決するために、我々は、過酸化窒素含有環状物質を切除剤とする化学的蛋白切断試薬の新規開発と、そして生体蛋白切除への応用を企画した。

(2) 本研究者らは、これまでに化学発光(イミダゾール化学発光)を呈する種々の窒素含有環状物質のスクリーニングと、その過酸化物の構造解析を行ってきた(文献 2)。その過程で、本研究の過酸化窒素含有環状物質を用いる蛋白特異的切断法のヒントを得た。本法の蛋白化学的切断原理は、以下のようである。① 蛋白を窒素含有環状化合物に誘導する。② 窒素含有環状誘導蛋白を酸化する。③ 酸化反応で発光を生じ、同時に窒素含有環状構造は、破壊される。(想定)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、標的蛋白化学的切除試薬の開発と応用であった。本研究で開発する切除試薬は、過酸化蛋白誘導体であった。具体的には、① 蛋白の過酸化方法を開発した。蛋白の直接過酸化方法および蛋白の2重修飾法を開発した。すなわち、窒素含有環状物質へ誘導後に更に過酸化した。② 蛋白の過酸化窒素含有環状物質(発蛍光性)の生成を検証・測定するために、蛍光画像測定システムを考案・自作した。本研究に適した蛍光画像測定システムが、市販されていないためであ

った。③ 蛋白の過酸化状態を評価するために、過酸化蛋白測定方法を考案した。化学発光法を適応した。④ 本研究で開発する蛋白過酸化試薬による蛋白化学的切除結果を検証した。⑤ 本法応用検討の対象は、(a) アミノ酸・ペプチドの化学発光測定・蛍光測定・化学切除、および (b) 臨床検査血清蛋白分画中蛋白バンドの蛍光画像測定・化学発光測定・化学切除であった。

## 3. 研究の方法

### (1) 蛋白の過酸化誘導体作成：

蛋白を過酸化する方法(2つ)を開発した。

① 蛋白の過酸化水素単独過酸化方法：エチルアルコール液中で蛋白と過酸化水素(98 mmol/L)を加えて5分間・室温で反応した。次に67%エチルアルコール(Tricine液, pH 12.5)を加えて5分間・室温で反応した。

② 蛋白2重修飾過酸化方法(過酸化イソインドール法)：エチルアルコール液中に秘鍵蛋白試料を入れた。0-Phthalaldehyde (OPA), N-acetylcysteine および過酸化水素(98 mmol/L)を順次加え、それぞれ室温で5分間反応して蛋白過酸化イソインドール誘導体を作成した。

### (2) 過酸化蛋白の化学発光反応：

エチルアルコール液中に過酸化蛋白を加えた。次いでフェリシアン化カリ液を添加して、化学発光反応(室温)を行った。その際発生した化学発光強度は、光電子増倍管を装備した化学発光装置(Luminescencer-PSN, ATTO)で測定した。

### (3) デジタルカメラ蛍光画像測定：

デジタル蛍光画像測定装置(自作)を、本研究用に開発した。Black light (370 nm) 照射器(2台)とデジタルカメラ(ニコン Coolpix 7100, UV カットフィルター装着)を暗箱に組み込んで作成した。デジタルカメラ蛍光画像測定用試料は、濾紙(Advantec #2)に塗布した蛋白過酸化誘導体を風乾して作成した。蛍光画像撮影は、過酸化蛋白塗布濾紙の背面からblack light (UV) 照射し、濾紙中過酸化蛋白から発生した蛍光をデジタルカメラでカラー画像撮影(ISO 6400)した。

#### (4) 過酸化インスリン誘導体の質量分析：

化学発光反応前後で、インスリンの過酸化水素単独過酸化誘導体試料の質量分析(TOF-MS法)を行った。使用質量分析計は、AXIMA Confidence (島津)であった。

#### (5) 血清蛋白分画バンドの化学的切除：

臨床検査における血清蛋白分画試料中蛋白バンドの蛍光画像測定・化学発光測定および化学的切除を行った。検体セルロースアセテート膜上試料は、検査室ですでにボンソ 3R 染色されていたので、Tricine 液(pH 9.0)で脱色した後、過酸化イソインドール誘導体化反応を行った。化学発光反応前後で、セルロースアセテート膜上蛋白バンドのカラー蛍光画像計測をデジタルカメラで行った。

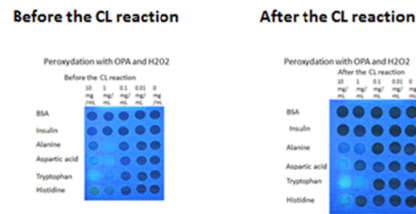
### 4. 研究成果

#### (1) 蛋白過酸化誘導体の化学発光測定：

単独過酸化 Albumin を過酸化水素単独で過酸化して化学発光反応を行わせると、牛アルブミン(BSA)は発光した。②二重修飾過酸化 Albumin は、フェリシアン化カリ酸化で発光した。単独過酸化と2重過酸化とのCL強度比較では、2重過酸化の方が強い発光を生じた。③繰り返し化学発光測定：同一過酸化検体についてフェリシアン化カリで繰り返しCL反応を御子起こして、CL強度および蛍光強度変化を検討した。その結果、過酸化アルブミンは、CL反応毎に破壊されたことが判明した。

#### (2) 蛋白過酸化イソインドール誘導体のデジタルカメラ蛍光画像測定：

過酸化二重修飾 Albumin は紫外線照射(370 nm)で青白色蛍光を生じた。化学発光反応後は、蛍光強度は消失あるいは減弱を示した。蛍光強度は、albumin 濃度に相関した。その画像を提示する。



#### (3) 本法の適応：

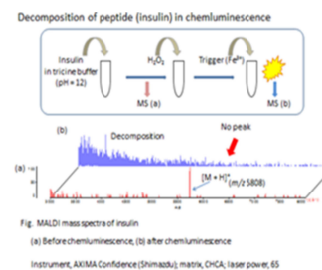
##### ① 血清蛋白分画バンドの化学的切除：

本法を血清蛋白分画(臨床検査項目)試料の蛋白バンド切除に適応した。まずボンソ 3R 染色蛋白バンドからボンソ 3R を Tricine 溶液(pH 9.0)で脱色した。その後蛋白バンドを本法により OPA と過酸化水素で二重修飾した。化学発光反応前後での蛍光画像計測結果では、発光後に各蛋白バンドの蛍光強度は減弱あるいは消失した。

##### ② インスリンの化学的切除：

過酸化水素単独で過酸化したインスリンの化学発光前後試料を TOF-MS 解析した。その結果、化学発光反応前の過酸化インスリンピーク(M/Z 5808)は、化学発光反応後では消失し、しかも M/X 5808 より小さい質量ピークが多数出現した。

### 単独過酸化インスリンのTOF-MS



##### ③ アミノ酸化学発光と化学的切除：

アミノ酸の化学発光測定・切除方法を開発した。アミノ酸は、過酸化水素で単独過酸化し

ても、発光しなかった。しかし、アミノ酸を o-phthalaldehyde (OPA) 修飾後更に過酸化修飾すると強く発光した。OPA+過酸化二重修飾アミノ酸の蛍光強度と発光強度はアミノ酸種類により異なった。一級アミノ基保護アミノ酸は、単独過酸化反応および OPA と過酸化水素二重修飾反応のいずれでも、発光しなかった。蛍光も発生しなかった。この結果は、本法におけるアミノ酸過酸化法は、アミノ酸の 1 級アミノ基を認識していることを示した。過酸化アミノ酸は、化学発光反応後にその発光性は消失していて、化学切除されたことが判明した。

⑤ 結論：本研究で、蛋白の化学的切除試薬（蛋白過酸化誘導化合物）を開発した。蛋白過酸化体を担鉄酸化剤で酸化すると、強い発光の発生と同時に蛋白の構造が破壊された。

#### <引用文献>

① Morgan P. E., Pattison D. I., Hawkins C. L., et al. Separation, detection, and quantification of hydroperoxides formed at side-chain and backbone sites on amino acids, peptides, and proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 45: 1279 - 89.

② Nozaki O and Kawamoto H. Reactivation of horseradish peroxidase with imidazole for continuous determination of hydrogen peroxide using a micro-flow injection - chemiluminescence detection system. *Luminescence*, 18; 203-206, 2003.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Osamu Nozaki, Motohiro Shizuma. Chemical scission of albumins, peptides and amino acids and accompanying chemiluminescence after peroxidation with hydrogen peroxide. *Luminescence* 2014; 29:

37-38. 査読あり。ISSN 1522-7235.

② 野崎 修、静間基博。 アミノ酸の o-phthalaldehyde・過酸化二重修飾による化学発光測定。日本分析化学会第 63 年会講演要旨集 2014; 39. 査読あり。  
[http://conference.wdc-jp.com/jsac/nenka\\_i/63/index.html](http://conference.wdc-jp.com/jsac/nenka_i/63/index.html)

[学会発表] (計 2 件)

① Osamu Nozaki, Motohiro Shizuma. Chemical scission of albumins, peptides and amino acids and accompanying chemiluminescence after peroxidation with hydrogen peroxide. The 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 23-28 June 2014, Uppsala, Sweden.

② 野崎修・静間基博。 アミノ酸の o-phthalaldehyde・過酸化二重修飾による化学発光測定。日本分析化学会第 63 年会。2014 年 9 月 17-19 日。東広島市。

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野崎 修 (NOZAKI, Osamu)

近畿大学・医学部附属病院・ 講師

研究者番号: 50164687

### (2) 研究分担者

静間基博 (SHIZUMA, Motohiro)

地方独立行政法人・ 大阪市立工業研究所・

生物・生活材料研究部・ 研究員

研究者番号 40416318

### (3) 研究協力者

河本 裕子 (KAWAMOTO, Hiroko)