

Topological Mass Spectrometry Analysis による翻訳後修飾された 脳下垂体ホルモンの分子多型の新発見

安田 明和, 茂里 康

(産業技術総合研究所健康工学研究部門)

1. はじめに

脳下垂体から新しいホルモンが見つかるかもしれない。今日、このような研究目標を掲げても、誰しもが「無理」という烙印を押すと思われる。しかしながら、ほんの数十分の時間を費やした実験を行うことで、新規らしい物質の候補について、その見当がつけられるとしたらどうなるであろうか。いろいろ調査してみるのも面白いかもしれない。

ホルモンや神経ペプチド類は産生細胞で合成された後にプロセッシングを受けるが、すぐに血中に放出される例は少なく、分泌顆粒といった形態をもって細胞内に蓄積されている。この点に着目し、新規ホルモンの探索法として、1960年代に超遠心分離機を用いて脳下垂体の細胞から分泌顆粒を精製する試みが行われていた¹⁾。ところが、分泌顆粒の単離精製に成功していたにもかかわらず、顆粒の中にある成分を分析する次の手段がなかったために、このホルモン探索法は次第に忘れ去られていったのである。一方、1990年代になりマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) が登場した。筆者らは、この分析機器の応用を試行錯誤しているうちに、組織切片を用いた分析を行うと、細胞内分泌顆粒の中に存在している成分を分子量プロファイルとして選択的に検出できることを見いだした²⁾。本稿では、脳下垂体の切片を用いた MALDI-TOF MS 分析を基に、今まで同定することが困難であったホルモンの翻訳後修飾について紹介する。

2. MALDI-TOF MS 分析における切片調製法の問題点

トリス緩衝液, リン酸緩衝液, 生理食塩水など生化学や

組織学の実験でよく使われる緩衝液の使用は、MALDI-TOF MS 分析において試料のイオン化を阻害する。これらに対し、質量分析法で推奨されるギ酸や酢酸溶液を組織切片に応用すると、浸透圧の関係で細胞形態が維持できない。そこで切片調製法の重要な点として、組織学的に鑑み、おかしな結果にならないように留意した。切片調製法を検討するために、甲殻類の神経系を用いて生理食塩水による凍結包埋を試みた。生理食塩水は1%程度の食塩を含む水溶液なので、 -30°C 以下に温度調整することでうまく凍結包埋できた。しかしこの温度では氷が硬くなりすぎ、切り出し時に針状に砕けてしまう場合が多かった。そこで、食塩の濃度を下げることにより、もう少し高めの温度設定にできるものと期待した。最終的には摘出した組織を0.4%食塩水で凍結包埋し、 -20°C で切り出しを行うことになった。

次に、過剰に存在している無機塩類を取り除くことを検討した。成功のヒントは、しゃぶしゃぶを食べている時にあった。スライスされた肉をさっとお湯にくぐらすと、表面だけが洗い流されていることに気づいた。このことをうまく応用すればよいのである。最終的に MALDI-TOF MS 時における切片の調製法は以下に示す。

クリオスタットにより30~40 μm の厚さで切り出す。クリオスタットを使用する際に、替刃はステンレス鋼よりカーボン製のものを用いた方がよい。ステンレス製の刃では氷が接触した瞬間に振動が起きやすく、切片は針状に崩れる場合が多い。スライスした切片はMALDI用サンプルプレートに置き、マトリックス溶液を添加した後、直ちに吸い取る。次にマトリックス溶液を再度添加し、真空下で素早く結晶化する。もし、真空状態にできない場合は、ドライヤーの送風を使って結晶化させることが望ましい。

0.4%食塩水を用いて凍結包埋した方法で切り出した切片は、組織化学的研究において有効であった。12 μm 程度の厚さにスライスした切片をMASSコーティングされたスライドガラスに置き乾燥させた後に、10%中性緩衝ホルムアルデヒド液を用いて固定化した。アメリカザリガニ

Topological mass spectrometry analysis for post-translational modifications in pituitary hormones

Akikazu Yasuda and Yasushi Shigeri (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Health Research Institute, 1-8-31 Midorigaoka, Ikeda, Osaka 563-8577, Japan)

の脳から調製した切片では、*in-situ* ハイブリダイゼーション法により神経ペプチドの産生細胞の同定ができた³⁾。また筆者らは、トルイジンブルー染色法を神経分泌細胞に対する簡便な観察法として活用している。

3. MALDI-TOF MS 分析におけるスペクトルの現れ方

40 μm の厚さで調製した切片を MALDI-TOF MS 分析すると、基本的にマトリックス由来の分子イオンだけが検出される。しかしながらレーザーがとある細胞を照射すると、ペプチドやタンパク質の分子イオンが突如現れるのである。甲殻類の神経系の他に、魚類やラットの脳下垂体、視床下部、膵臓などから得られたスペクトルを精査してみると、ホルモンとして知られている物質の分子イオンが目立って観察されていた。すなわち、「分泌顆粒の中に入っている物質を分子量プロファイルとして可視化している」という経験則が得られたのである。しかも、余計な分子イオンがほとんど観察されず、選択性をもってホルモン分子が検出できるのである。この不思議な現象については、「分泌顆粒は電子密度が高い状態なので、マトリックスからのプロトンを受け取りやすいのかもしれない」という自分勝手な理屈をつけて納得していた。さらに「分泌顆粒の中身」を観察しているという事実に基づき、得られた分子量情報を指標に精製を進めることで、新規ホルモンや神経ペプチドを探索する方法を提唱し、「Topological Mass Spectrometry Analysis」と名づけた⁴⁾。この戦略法は、各精製段階において生物活性試験が行われなため、試料の消費が極力抑えられ、研究に必要な動物の数を大幅に削減することを可能にしてきた。現在までに、魚類、甲殻類、昆虫および植物におけるペプチド性情報伝達物質の研究に活用されている。

一方、このような組織切片を用いた MALDI-TOF MS 分析の可能性を受けて、2000 年代に入ると Imaging Mass という分野が登場した。そこでは組織切片は 10 μm より薄く調製するように示唆されている。これは、観察される分子イオンの様子が切片の厚さが 10 μm を境に劇的に変化するからである。しかしながら、そのスペクトルには、ターゲットになる細胞に特異な物質の分子イオンの他に、細胞質内に広く含まれている物質の分子イオンと一緒に観察されている。つまり、Imaging Mass では常に多くの分子イオンが検出され、その中から任意の分子イオンを拾っていることになる。Topological Mass Spectrometry Analysis と Imaging Mass はどちらも組織切片を用いた分析であるが、切片の調製法の違いによって、得られるスペクトルの性状は大きく異なっているのである。キーポイントは切片の厚さにあると思われる。Topological Mass Spectrometry Analy-

sis における切片の厚さが 40 μm になった理由の 1 つは、解析を行った当初、水平滑走式のマクロトームしかなく、これより薄い切片の調製が難しかったからである。このことが、結果として幸運をもたらしてくれたのであった。一方、MALDI におけるイオン化のメカニズムはよくわからない点が多い。従って、なぜ分泌顆粒の中身が選択的に観察できるのかは、いまだ謎である。なお、Imaging Mass に関しては解説書が既に存在しているので、そちらを参照して欲しい^{5,6)}。

4. Topological Mass Spectrometry Analysis によるメダカ脳下垂体の解析

メダカ脳下垂体を用いた実施例を紹介する⁷⁾。切片を MALDI-TOF MS 分析すると、ある特徴的なスペクトルが得られた (図 1)。その 1 つは、 m/z 1622.402 の分子イオンから順に m/z 1664.363, 1706.304, 1748.329 へ 42 ダルトン (Da) ずつ大きくなったピークが観察されたことである。魚の黒色素胞刺激ホルモン (MSH) には α -と β -の 2 種類がある。 α -MSH は 13 残基のアミノ酸で構成され、アミノ末端のアセチル化とカルボキシ末端のアミド構造を持つ (Ac-SYSMEHFRWGKPV-amide)、分子量 1663.77 と算定されるペプチドである。すなわち、 m/z 1622.402 はアセチル基を持たない α -MSH の分子イオンであり、そこからアセチル基が 1~3 つ付加した α -MSH の存在が予想できた。過去の脳下垂体ホルモン研究から、 α -MSH 分子の他に N 末端のアセチル基が欠けた分子およびアミノ末端のセリンがジアセチル型になった 3 タイプの分子が知られていた。したがって、3 個のアセチル基を持った α -MSH の分子型は新たな発見になる。この分子がどのような構造をしているのかを精査するために、エレクトロスプレーイオン化法を用いた質量分析計による構造解析を行った。 m/z 1748.88 の分子量を持つペプチドの MS/MS スペクトルでは α -MSH の部分配列が示された。アミノ末端の Ser 残基は *N,O*-ジアセチル体であった。また、3 位の Ser 残基に相当する位置の質量が 129 Da となり、Ser 残基の質量 87 Da より 42 Da 大きくなっていった。しかしながら、Ser 残基のアセチル化と簡単に結論づけることはできない。129 Da という数値は、Ser 残基から Glu 残基へ変異している可能性も示唆している。そこでペプチド合成にあたり、側鎖の修飾された分子の化学合成は難しいので、アミノ末端が未修飾の α -MSH とこれの 3 位が Glu 残基に置換したものを合成した。これら合成品による HPLC の溶出パターンをシミュレーションした結果、両者を十分に分離することはできなかった。脳下垂体から単離した分子では、ジアセチル化 α -MSH より 1 分以上遅い溶出時間に

テクニカルノート

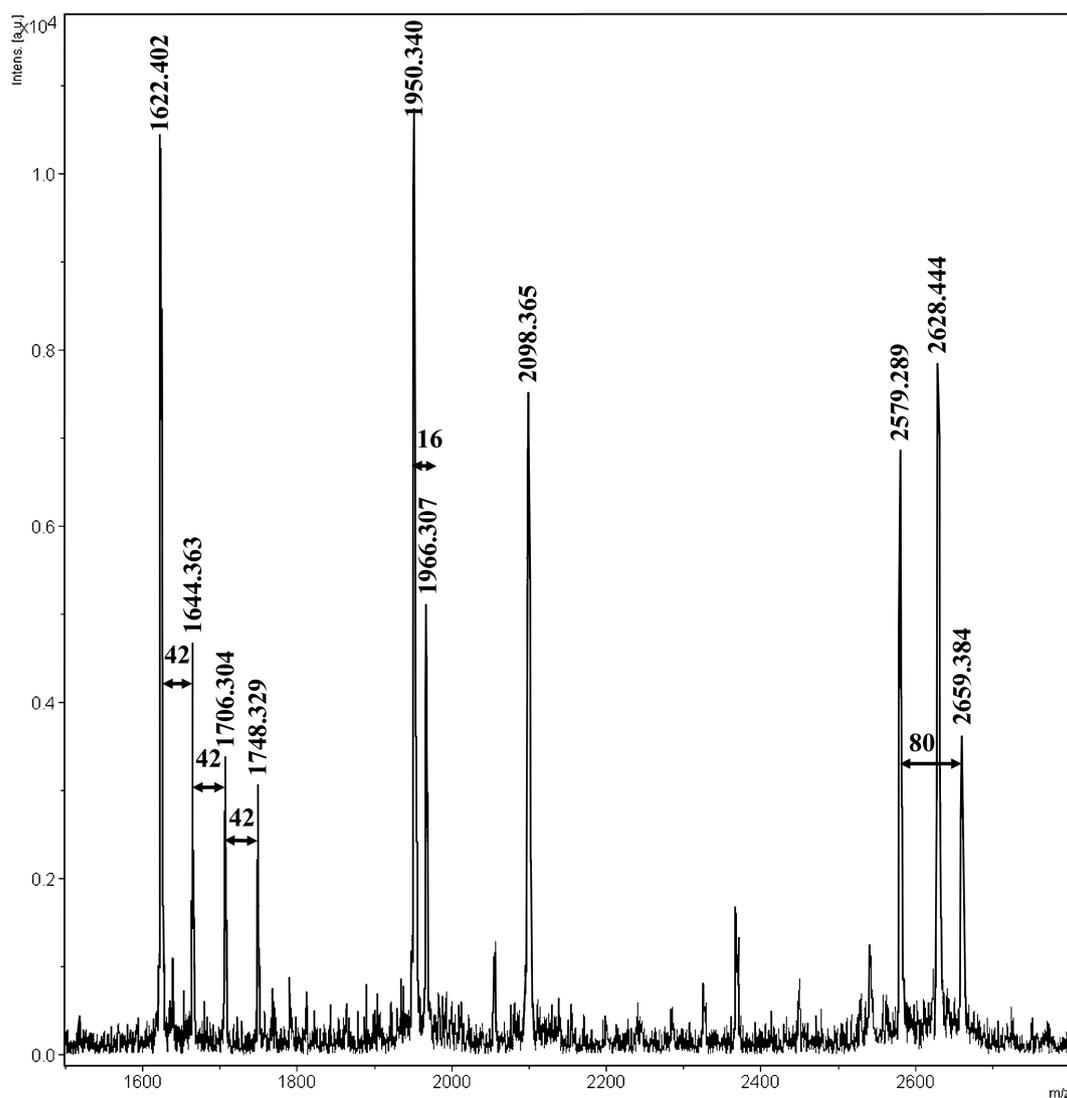


図1 メダカ脳下垂体から調製した切片を用いた MALDI-TOF MS スペクトル

なっていたので、3位における Ser から Glu 残基への変異ではなく、Ser 残基の側鎖がアセチル化されていた分子型と決定した。

メダカの β -MSH のアミノ酸配列は DGSYKMKHFRWS-GPPAS であり、 m/z 1950.340 が分子イオンとなる。 β -MSH の分子イオンから 16 Da 大きい分子イオンは構造未知のホルモンと期待できた。この分子の MS/MS スペクトルでは、 β -MSH のカルボキシ末端からの配列が読み取れ、15位の Pro 残基の部分 Pro 残基より 16 Da 大きくなった 113 Da になっていた。113 という数字は、Ile および Leu 残基と同じ質量なので、MS/MS スペクトルの結果からだけでは、どのアミノ酸残基なのかは判断できない。 $[\text{Ile}^{15}]\beta$ -MSH と $[\text{Leu}^{15}]\beta$ -MSH を合成し、HPLC による溶出位置を検討した結果、両者は β -MSH より遅れて溶出し

てきた。メダカの脳下垂体由来の分子は、 β -MSH より前に溶出していたことから、 β -MSH の 15 位は Ile や Leu 残基への変異ではなく、Pro 残基がヒドロキシ化修飾を受けていることが示唆された。脳下垂体ホルモンでヒドロキシプロリン (Hyp) 残基を含む分子の報告例はなく、メダカの β -MSH は脳下垂体におけるヒドロキシ化修飾の最初の例となった。

また、 m/z 2659.384 の分子イオンはコルチコトロピン様中葉ペプチド (CLIP) の分子イオンの m/z 2579.289 より 80 Da 大きい。両者の MS/MS 解析を比較した結果、RPVKVYTPNGVEEESSEVFPGEM 構造の 15 位の Ser 残基がリン酸化されていたことが判明した。リン酸化 CLIP の存在は、ラットやヤツメウナギでも報告されている。以上、要するに、メダカの脳下垂体において、プロオピオメ

ラノコルチン関連ホルモンに対して様々な翻訳後修飾が行われていることが解明できたのである。

5. プロオピオメラノコルチン関連ホルモンの翻訳後修飾

次にコイ、キンギョ、ニジマス、アフリカツメガエル、ラットなどの脳下垂体を MALDI-TOF MS 分析してみると、トリアセチル化 α -MSH はコイとキンギョからも見いだされた⁸⁾。一方、Hyp 残基をもつ β -MSH はメダカ以外の動物からは検出されなかった。コイやキンギョのトリアセチル化 α -MSH を精製し MS/MS 分析すると、驚くべきことに、メダカのトリアセチル化 α -MSH とは異なった修飾を示すスペクトル結果となった。すなわち、アミノ末端の Ser 残基がジアセチル化されていたのは共通であったが、メダカのホルモンでは3位の Ser 残基が修飾を受けていたのに対し、コイとキンギョでは2位の Tyr 残基がアセチル化されていたのであった (図2)。

コイの脳下垂体からのプロオピオメラノコルチン関連ホルモンの単離は、既に2報の論文として報告されていた。1つは抗 α -MSH 抗体を用いたラジオイムノアッセイ法によって、酢酸抽出物を高速液体クロマトグラフィーで分画したもから α -MSH を含むフラクションを同定したものである⁹⁾。ここでは、アセチル基を持たない α -MSH、*N*-アセチル化 α -MSH、ジアセチル化 α -MSH の3タイプが同定されていた。もう1つの論文では、塩酸アセトン抽出したものを LC-MS 解析し、MSH 類を同定している¹⁰⁾。ここでも、上記と同じ3タイプの α -MSH が同定されているが、トリアセチル化 α -MSH の存在は記述されていない。なぜ、過去の論文ではトリアセチル化 α -MSH が見つからなかったのか。この疑問を解く鍵は抽出法にあると思ひ、酢

酸抽出と塩酸アセトン抽出を再検討した。筆者らが上記の単離法で行った0.1%トリフルオロ酢酸を含む50%アセトニトリル抽出法と同様に、酢酸抽出物中からトリアセチル化 α -MSH を検出することができた。したがって、ラジオイムノアッセイによるホルモンの検出では、研究に用いた抗体がトリアセチル化 α -MSH を認識していなかったと思われる。一方、塩酸アセトン抽出では、トリアセチル化 α -MSH の抽出効率が極めて悪い結果となった。このことが夾雑物によるイオン化の抑制と相まって、LC-MS によるトリアセチル体の検出ができなかった原因と結論づけた。

ニジマスの脳下垂体には HSYSMEHFRWGKPIGH の構造を有したサブタイプの α -MSH が存在し、また、アフリカツメガエルの α -MSH は AYSMEHFRWGKPV-amide の構造をしている。これらアミノ末端が Ser 残基以外のアミノ酸残基になっている α -MSH において、アセチル化した分子が検出されることはなかった。このことは α -MSH 分子において、ペプチド側鎖に対するアセチル化はアミノ末端のアセチル化が必須であることを示唆している。

6. Topological Mass Spectrometry Analysis を用いた α -MSH 分子の組成分析

魚類において、MSH の主な生理作用はその名が示すように、メラニン色素の拡散による体色の暗化にある。実際に、魚を白い背景あるいは黒い背景に馴致させた後、MSH の脳下垂体含量や血中濃度を調べた研究例が多く報告されている。今のところ、トリアセチル化 α -MSH を検出できる手段は質量分析法に限られている。しかし MALDI-TOF MS 分析では、測定物質の定量性を問うのは難しい場合が多い。そこで、 α -MSH 分子の脳下垂体中の

(A) Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-amide

(B) Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-amide

(C) Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-amide

(D) Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-amide

(E) Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-amide

図2 α -MSH 分子におけるアセチル化

(A) : *N*-デスアセチル化 α -MSH, (B) : *N*-アセチル化 α -MSH, (C) : ジアセチル化 α -MSH, (D) : コイ/キンギョ型のトリアセチル化 α -MSH, (E) : メダカ型のトリアセチル化 α -MSH.

テクニカルノート

組成比について切片を用いた MALDI-TOF MS による解析を試みた⁸⁾。メダカとキンギョは、白あるいは黒背景にした水槽で5日間飼育したものを用いた。代表的なスペクトルを図3に示す。メダカではアセチル基を持たない分子型が α -MSHの主成分、キンギョではジアセチル型が主成分である。得られた各イオンのピーク強度を合算し、そこから各分子型の相対比を算出した結果、どちらの魚種も、主成分である分子型の比率が黒い背景に馴致した方が高く、

白い背景に馴致すると10%程度低くなる傾向が見られた(図4)。実験中の動物を観察していると、白い背景色で飼育しているメダカやキンギョは落ち着きがなく、常に何かに警戒しているような泳ぎをしていた。このことから、白い背景では常にストレスにさらされた状態であり、脳下垂体ホルモンが血中に放出された結果として主成分である分子型の比率に違いがでたものと予想している。同じような現象はヨーロッパ産のクロダイでも報告されている¹¹⁾。ト

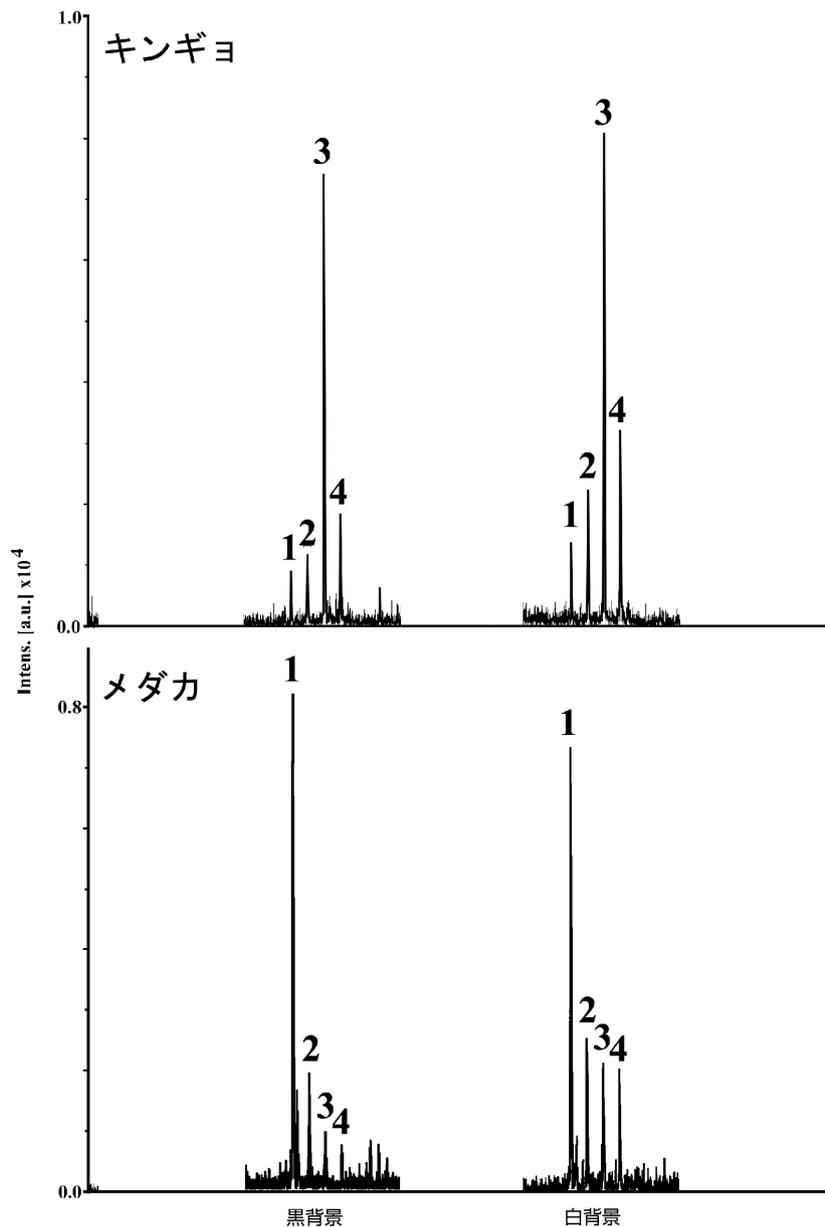


図3 黒背景と白背景に馴致したキンギョとメダカから調製した脳下垂体のMALDI-TOF MS スペクトル

1: *N*-デスアセチル化 α -MSH, 2: *N*-アセチル化 α -MSH, 3: ジアセチル化 α -MSH, 4: トリアセチル化 α -MSH.

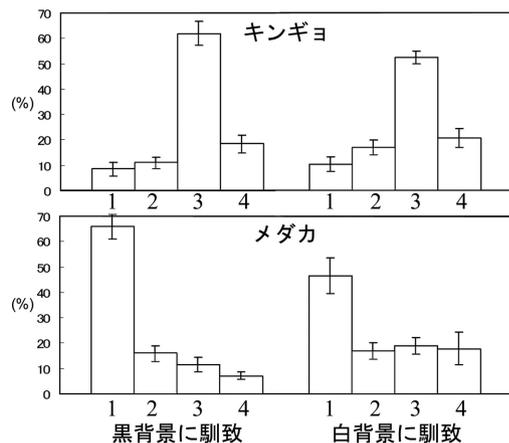


図4 黒背景と白背景に馴致したキングギョとメダカの脳下垂体における各 α -MSH分子の組成

1: N-デアセチル化 α -MSH, 2: N-アセチル化 α -MSH, 3: ジアセチル化 α -MSH, 4: トリアセチル化 α -MSH.

リアセチル体の比率は、他の成分と同様に主成分の増減に伴い変化していた。一方、メダカ、キングギョ、クロダイの結果とは逆に、ニジマスやマツカワといった魚種の研究結果では、黒い背景に馴致した方がMSHの脳下垂体含量が低下し、血中濃度も高くなっている^{12,13)}。またニジマスやマツカワは、黒背景時には体色が黒っぽく、白背景では白っぽくなるので、MSHの脳下垂体や血中レベルと黒色素胞の刺激による体色変化について、正の相関としてよく理解されている。しかしながら、これら魚種では Topological Mass Spectrometry Analysis による脳下垂体の解析において、トリアセチル型 α -MSHは存在していない。

7. おわりに

近年の分子生物学の発展により、多種類にわたり脳下垂体ホルモンのアミノ酸配列情報が蓄積されてきた。その一方でポストゲノム研究の重要性も言われている。ここに、組織切片を直接MALDI-TOF MSすることの1つの成功例を示した。また、Topological Mass Spectrometry AnalysisとImaging Massの異なった切片の調製法により、得られるスペクトルに対する意義の違いを解説した。Topological

Mass Spectrometry Analysisにおいて脳下垂体から新規ホルモンの発見には至らなかったが、新たに翻訳後修飾されているホルモン分子を幾つか見いだすことができた。切片を用いたMALDI-TOF MSでは組織の抽出からホルモン分子の同定まで、ほんの20~30分もあればできることである。様々な動物の内分泌組織の解析をやってみて損はあるまい。

本稿を推敲するにあたり、「電子顕微鏡像を見ながら、ついでに一粒の分泌顆粒からもマスが測れたら、世の中の研究方法は大きく変わる」といった夢物語について、両分析機器を製作している某メーカーの社長やエンジニアと語り合ったことを思い出した。ちょうど世紀が変わろうとしている時である。しかしながら、電子顕微鏡と質量分析計のコラボレーションははまだ実現していない。

- 1) Peridue, J.F. & McShan, W.H. (1962) *J. Cell Biol.*, **15**, 159–172.
- 2) Yasuda-Kamatani, Y. & Yasuda, A. (2000) *Gen. Comp. Endocrinol.*, **118**, 161–172.
- 3) Yasuda-Kamatani, Y. & Yasuda, A. (2006) *J. Comp. Neurol.*, **496**, 135–147.
- 4) Yasuda, A., Yasuda-Kamatani, Y., Nozaki, M., & Nakajima, T. (2004) *Gen. Comp. Endocrinol.*, **135**, 391–400.
- 5) 瀬藤光利 (2007) 生化学, **82**, 874–879.
- 6) Setou, M. (Ed.) (2010) *Imaging Mass Spectrometry*, Springer, Japan.
- 7) Yasuda, A., Tatsu, Y., Kawata, Y., Akizawa, T., & Shigeri, Y. (2011) *Peptides*, 2127–2130.
- 8) Yasuda, A., Tatsu, Y., & Shigeri, Y. (2012) *Gen. Comp. Endocrinol.*, **175**, 270–276.
- 9) Follenius, E., van Dorsselaer, A., & Meunier, A. (1985) *Gen. Comp. Endocrinol.*, **57**, 198–207.
- 10) Takahashi, A., Takasaka, T., Yasuda, A., Amemiya, Y., Sakai, M., & Kawauchi, H. (2000) *Fish Shellfish Immunol.*, **10**, 273–284.
- 11) Arends, R.J., Rotllant, J., Metz, J.R., Mancera, J.M., Bonga, S. E.W., & Flik, G. (2000) *J. Endocrinol.*, **166**, 427–435.
- 12) Baker, B.I., Wilson, J.F., & Bowley, T.J. (1984) *Gen. Comp. Endocrinol.*, **55**, 142–149.
- 13) Amiya, N., Amano, M., Takahashi, A., Yamanome, T., & Yamamori, K. (2007) *Gen. Comp. Endocrinol.*, **151**, 135–141.