

質量分析技術による「ゲノム・フリー」な Apolipoprotein E タイピング (迅速 ApoE セロタイプング)

千葉大学医学部附属病院検査部・遺伝子診療部 西村 基



#### 【研究目的】

Apolipoprotein E (以下 ApoE) 遺伝子には  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$  の 3 つの対立遺伝子があり、それぞれに対応する E2, E3, E4 の 3 つのアイソフォーム・タンパク質が存在する。これらのアイソフォーム間には 112 位と 158 位のアミノ酸に違いがある。野生型とされる ApoE3 に対して、158 位に Arg (アルギニン)  $\rightarrow$  Cys (システイン) の変異のある ApoE2、ならびに他の位置にアミノ酸変異のある ApoE2 variant は浸透率は低いが III 型家族性脂質異常症の原因変異と目されている。一方、112 位に Cys  $\rightarrow$  Arg の変異のある ApoE4 はアルツハイマー型認知症の強力なリスクファクターと認識されている。

申請者らは、これまで汎 ApoE 抗体による免疫沈降と質量分析(LC-MS/MS)を組み合わせることで血清 ApoE のほぼ全長がリシーケンス可能であり、セロタイプングに応用できるとの先行研究結果(**PLoS One. 2014 Jan 14;9(1):e85356**)を発表している。この先行研究を発展させ、血清タンパク質を対象とした迅速な質量分析による定量法、質量分析による精密な血清タンパク質の性状分析、そしてこれらを組み合わせ、ゲノム DNA 解析が不要な (いわば「ゲノム・フリー」な)、診察前検査も可能となりうる迅速な質量分析による ApoE セロタイプング法の確立を研究目的とする。

#### 【研究方法と研究結果】

申請者らの先行研究では汎 ApoE 抗体による免疫沈降を用いているが、これは 3ul の血清から 15 分程度の時間で、比濁法で測定できる沈降物が得られる効率の良い抗体である。先行研究の過程で、この免疫沈降は ApoE を純度高く捕捉する事が判明している。本研究においても、この免疫沈降を用いて短時間で ApoE を分離し高純度トリプシンによる消化まで行うことを計画した。ApoE2, E4 変異はいずれもトリプシンの認識するペプチド切断サイト (リジン、アルギニンの C 末側) と関係するため、ApoE タイプによ

り消化物の分子量は異なることとなるが、このような差異は質量分析での検出に適している。

そして質量分析計には MALDI-MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計)を用い、数分の単位での質量分析を行うことを計画した。

しかしながら ApoE は血中濃度は 4mg/dl 程度であり、その消化物の質量はさらに小さいものであり MALDI-TOF で得られるシグナルは微弱で LC-MS/MS 法のような精度が得られなかった。申請者らは並行して、そもそも MALDI-MS を含めた質量分析を用いて血清タンパク質の迅速分析や、その精密な性状分析が可能なのか、既に申請者らの研究室で見出されていた肝疾患マーカーFibrinogen alpha C chain 5.9 kDa fragment (FIC5.9) に対して検討を行ったところ、それは可能であり論文発表を行った (**Clin Proteomics. 2016 Oct 7;13:27.**)。

#### 【考察】

夾雑物に強く、菌コロニーからさえ直接の質量分析を臨床検査レベルで可能とする MALDI-MS であったが、免疫沈降物の精製をいかに工夫しても、精度の良く再現性のあるシグナルを得ることができなかった。つまり、そのような高性能な MALDI-MS であっても、資料の精製度の低さの許容と、資料の微量さの二兎を追うことができなかった。免疫沈降物は、抗原と抗体という単純な組成であるが、分子量で見ると抗体の占める割合が圧倒的であり、質量比で言えば抗原の純度はごく低い。この点、LC カラムを build-in として持ち、精製の機能が内包されている LC-MS/MS が、免疫沈降物の再現良い質量分析には欠くことができないと考えられた。一方、FIC5.9 のように血清に豊富なタンパク質やその断片の場合には、MALDI-MS による簡便な質量分析が可能であり、つまり二兎を追わずどちらかの条件を妥協すれば、MALDI-MS による迅速な血清タンパク質の質量分析や、その臨床検査化は十分に可能であると考えられた。

#### 【学術推進プロジェクトについて】

このたびは学術推進プロジェクトに御採用を賜り、誠にありがとうございました。ここまでに述べました通り思い切って、試行錯誤をさせていただきました。

免疫沈降物の精製とその MALDI-MS による解析については予備実験を繰り返すことが多く、述べたように結局、それに終始してしまい「高性能な MALDI-MS であっても、資料の精製度の低さの許容と、資料の微量さの二兎を追うことができなかった」のが正直なところです。一方、ベンチマークの意味合いもあり並行して行った FIC5.9 の解析においては質量分析を用いて血清タンパク質の迅速分析や、その精密な性状分析じたいは可能であり、論文発表を行うことができました (**Clin Proteomics. 2016 Oct 7;13:27.**)。

このように、その迅速性と高性能から臨床検査において最も普及している質量分析計である MALDI-MS においても、二兎を追えなかったことは、それ自体は negative data では

ありますが、ますます質量分析計の臨床検査応用が進められている中で貴重な経験であったと考えます。支援していただいた学術推進プロジェクトの今後の発展のためにも、臨床検査医学に少しでも貢献できるような形で今後の新たな研究成果の報告につなげるようにいたします。

重ねてになりますが、このたびは御採用を賜り誠に有難うございました。今後ともよろしくお願いいたします。