

N-7

水晶体中の異性化アスパラギン酸を含むペプチドの質量分析イメージング

Mass Spectrometry Imaging of Peptides Containing Isomerized Aspartic Acid in the Lens

○大谷彩¹, 松下祥子², 高田匠³, 鈴木佑典²*Aya Ohtani¹, Shoko Matsushita², Takumi Takata³, Yusuke Suzuki²

Crystallin proteins within the lens are susceptible to aspartic acid isomerization, which is considered a contributing factor to cataract formation. However, the localization of these isomerized proteins within opaque areas remains unclear. Therefore, we employed matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) to detect isomerized aspartic acid in the lens tissue. The m/z 848.8 peak, which is characteristic of the L β and D β form, was not detected in tissue samples that lost structure. Future work will require maintaining tissue structure and improving detection sensitivity.

水晶体は、眼球に局在し屈折率を調節する器官であり、光を透過させて網膜に結像させる役割を持つ。そのため、水晶体は透明性を保っており、この透明性の維持にはクリスタリンというタンパク質の安定な会合体形成が寄与している。しかし、この透明性は加齢に伴って失われ、タンパク質の会合構造が乱れて凝集が進むと白濁し、80歳以上ではほぼ100%白内障を発症することが知られている。このようなタンパク質の構造変化の要因の1つとして、クリスタリンタンパク質中のアスパラギン酸 (Asp) 残基が、通常のL α 体から異性化することが報告されている^[1]。しかし、Aspの異性体を含むクリスタリンタンパク質の詳細な局在は不明である。そこで、分子の分布局在を評価する手法の1つであるマトリックス支援レーザー脱離イオン化-質量分析イメージング (MALDI-MSI) を用いて、水晶体組織上の異性化Asp残基を含むペプチドの分布解析法の開発を試みることにした。

ヒトおよびブタの α A-クリスタリンのうち、Asp-58残基を含んだ55-65残基のペプチドを合成した。その際、立体異性体や結合様式の異なる4つの異性体であるL α 、L β 、D α 、D β 体を用いた。これらを蒸留水に溶解させ、MALDI法におけるイオン化補助剤として、2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) を70%メタノール水溶液 (v/v) に溶解させ、試料と混合して滴下した。その試料をJMS-S3000にて、質量範囲 m/z 150-2500の陽イオンを測定した。さらに、検出されたピークに対しインソース分解 (ISD) を行った。MALDI-MSIでは、ブタ水晶体薄切試料

に対し、トリプシン処理し、DHB溶液を全体へ均一に塗布し、同様に測定した。

ヒトおよびブタのペプチド試料からそれぞれのプロトン付加分子に相当する m/z 1175.7 \pm 0.1と m/z 1161.7 \pm 0.1のピークが検出された。また、ISDを行ったところ、ヒトおよびブタのL β 体およびD β 体の試料から、 m/z 862.8 \pm 0.2と m/z 848.8 \pm 0.1のそれぞれの構造に特有の断片化ピークが検出された (Figure 1)。そして、分布解析を試みたところ、トリプシン処理時に組織構造が失われたことが分かった。その組織上から m/z 1161.5 \pm 0.5のピークが検出された一方、検出強度が不足し、ISDによる特有の断片化ピークの検出には至らなかった。

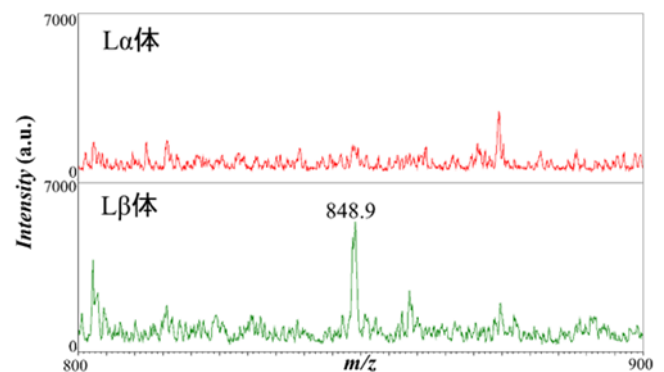


Figure 1. ISD mass spectra of pig peptide samples

β 体に特有の断片化ピークは、 α 体よりもAsp残基のペプチド鎖が長いことから、イオン化の際に切断されやすくなり、特有の断片化イオンが検出されたと考えられた^[2]。ブタの組織切片試料から検出された m/z 1161.5 \pm 0.5のピークは、Asp-58を含んだペプチドである可能性が考えられたが、特異的な断片化ピークが見られなかった。今後、組織構造を維持した試料作製と共に検出感度の向上が重要課題であると考えられた。

参考文献

- [1] 藤井紀子, 他, : “白内障原因蛋白質の変化をとらえる化学的アプローチ: 白内障におけるホモキラリティーの喪失”, *日本白内障学会誌*, Vol. 29, No. 13-20, 2017.
- [2] Yuzo Yamazaki, et al., : “Differentiation and Semi-quantitative Analysis of an Isoaspartic Acid in Human alpha-Crystallin by Postsource Decay in a Curved Field Reflectron”, *Analytical Chemistry*, Vol. 82, No. 15, 2010.

1: 日大理工・院(前)・応化, 2: 日大理工・教員・応化, 3: 京大複合研・教員