

質量分析を用いた 新規コラーゲン分析法の開発と応用

多賀 祐喜

2015 年 3 月

目次

略語表	6
第1章 序論	8
1-1 序論	9
1-2 図表	13
第2章 ヒドラジドケミストリーを用いたコラーゲン O 結合型糖鎖の部位特異的分 析法の開発	15
2-1 緒言	16
2-2 材料と方法	18
2-3 結果と考察	20
2-3-1 ヒドラジドケミストリーによる GHL・GGHL 精製方法の検討	20
2-3-2 ウシI・II型コラーゲンの糖鎖修飾部位の同定	22
2-4 図表	25

第3章 ヒドラジドケミストリーと SILAC を用いた骨形成不全症によるコラーゲンの糖鎖修飾増加機構の解析	34
3-1 緒言	35
3-2 材料と方法	36
3-3 結果と考察	39
3-3-1 OI 皮膚線維芽細胞由来コラーゲンの生化学的解析	39
3-3-2 ヒト線維芽細胞由来コラーゲンの糖鎖修飾部位の同定	40
3-3-3 OI によるコラーゲン糖鎖修飾増加の部位特異的比較定量分析	40
3-4 図表	44
第4章 安定同位体標識コラーゲンとこれを用いた各種コラーゲン分析法の開発	52
4-1 緒言	53
4-2 材料と方法	55

4-3	結果と考察	59
4-3-1	安定同位体標識コラーゲンの作製方法の検討	59
4-3-2	安定同位体標識コラーゲンをを用いたコラーゲン分析方法	61
4-3-3	ラット皮膚、骨および尾腱コラーゲンの分析	63
4-3-4	その他の応用例	64
4-4	図表	66
第5章	安定同位体標識コラーゲン分解物をを用いた血中 Hyp 含有ペプチドの高精度 定量分析	81
5-1	緒言	82
5-2	材料と方法	84
5-3	結果と考察	87
5-3-1	安定同位体標識コラーゲン酸加水分解物をを用いた分析	87
5-3-2	二段階酵素消化による安定同位体標識 Hyp 含有ペプチドの作製	88

5-3-3 安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を用いた分析·····	90
5-4 図表·····	93
第6章 総括·····	104
参考文献·····	109
図表の転載について·····	124
謝辞·····	126

略語表

Ala	alanine
Arg	arginine
AUC	area under the plasma concentration-time curve
BSA	bovine serum albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue R-250
CE	collision energy
CNBr	cyanogen bromide
Cys	cysteine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DP	declustering potential
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
GGHL	glucosyl galactosyl hydroxylysine
GHL	galactosyl hydroxylysine
Gln	glutamine
Glu	glutamate
Gly	glycine
HEL	human embryonic lung fibroblast
HILIC	hydrophilic interaction chromatography
HRP	horseradish peroxidase
Hyl	hydroxylysine

Hyp	hydroxyproline
Ile	isoleucine
LC	liquid chromatography
Leu	leucine
Lys	lysine
MRM	multiple reaction monitoring
MS	mass spectrometry
OI	osteogenesis imperfecta
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
Phe	phenylalanine
Pro	proline
SD	Sprague-Dawley
SDS	sodium dodecyl sulfate
Ser	serine
SILAC	stable isotope labeling by amino acids in cell culture

第 1 章

序論

1-1. 序論

コラーゲンは皮膚や骨、腱などの結合組織を構成する主要なタンパク質成分であり、細胞外マトリックスとして組織の維持の他にも、細胞機能の調節など様々な役割を果たしている (Gay and Miller 1983)。コラーゲンには、X-Y-Gly 繰り返しアミノ酸配列を持ち、3つのサブユニットから三重らせんを形成するという共通した特徴があり、I型コラーゲンであれば1014アミノ酸残基 ($338 \times \text{X-Y-Gly}$) からなる2つの $\alpha 1$ 鎖と1つの $\alpha 2$ 鎖で三重らせんを形成し、線維芽細胞などから分泌される。現在28種類のコラーゲン型が報告されており、生体内では様々な組織にそれぞれ特有のコラーゲン型組成で分布している。例えば、腱や骨を構成するコラーゲンはほとんどI型コラーゲンのみであるのに対し、皮膚ではI型コラーゲンの他に、III型コラーゲンも主要な成分として存在している (von der Mark 1981)。また、軟骨ではII型コラーゲンとIX、XI型コラーゲン (Mendler *et al.* 1989)、滑膜ではIII型およびI型コラーゲンがその大きな構成成分となっている (Eyre and Muir 1975)。年齢や生理的条件、疾患などによってそれら組織におけるコラーゲン型組成が変化することがあり、コラーゲン線維形成能やその線維の太さなどへ影響して、最終的に組織の性質の変化へとつながる場合がある。

このようにコラーゲンの質に関連する要素としては、他に翻訳後修飾が挙げられる (図1-1)。3-hydroxyproline (3-Hyp)、4-hydroxyproline (4-Hyp)、hydroxylysine (Hyl) とその糖鎖付加体である galactosyl hydroxylysine (GHL) および glucosyl galactosyl hydroxylysine (GGHL) は、コラーゲン配列に特有の翻訳後修飾であり、一部の例外を除き他のタンパク質にはまったく含まれない。中でも4-Hypは最も主要なコラーゲン翻訳後修飾であり、X-Y-Gly 配列のYに位置するProが水酸化されて生じる。I型コラーゲンでは1000アミノ酸残基当たり約100残基存在しており、コラーゲン三重らせんの安定化に大きく寄与していることが知られている (Berg and Prockop 1973)。それに対し、3-Hyp

は X-Y-Gly 配列の X に位置する Pro がまれに水酸化されて生じるが、その存在量は I 型コラーゲンで 1000 アミノ酸残基当たり約 1 残基と非常に少なく、その機能もほとんどわかっていない (Hudson and Eyre 2013)。Lys の翻訳後修飾は、X-Y-Gly 配列の Y の位置でのみ起こり、まず水酸化されて Hyl へ、そこにガラクトースが付加されて GHL へ、さらにグルコースが付加されて GGHL へと修飾される。それぞれの存在量は、例えば骨の I 型コラーゲンでは 1000 アミノ酸残基当たり約 10 残基、1 残基および 3 残基となっている (Stoltz *et al.* 1973)。これらの翻訳後修飾量はコラーゲン型の違いで大きく異なり、たとえば V 型コラーゲンでは I 型コラーゲンに対し 3-Hyp が約 3 倍、GHL・GGHL が約 10 倍含まれている。また、同じコラーゲン型でも由来組織や生理的条件の違い、疾患などによってその量が大きく変わる。

コラーゲンの異常による疾患は多数報告されており、それらの疾患では骨や皮膚などを主として、その他様々な組織で重篤な障害が引き起こされる。線維症は、組織での異常なコラーゲン量の増加が原因となることはよく知られているが、肺や肝臓の線維症で III 型コラーゲン/I 型コラーゲン比率が減少すること、コラーゲン当たりの Hyl 量が減少することなども報告されており、その疾患への関与が示唆されている (Seyer *et al.* 1976, Seyer *et al.* 1977)。また、I 型コラーゲンの遺伝子変異により引き起こされる骨形成不全症での糖鎖修飾の増加 (Tenni *et al.* 1993)、ビタミン C (アスコルビン酸) 欠乏症として知られる壊血病における 4-Hyp の減少なども知られている (Barnes *et al.* 1970)。その他にも様々な疾患でのコラーゲンの質的異常が報告されており、組織中のコラーゲンの量だけでなく、そのコラーゲンの型組成や翻訳後修飾などの質をモニターすることが重要であると考えられる。

コラーゲンおよびその翻訳後修飾の検出・定量には、放射性同位体標識やタンパク質化学的手法を用いた様々な方法が開発されてきたが、コラーゲン型特異的な分析や微量なコラーゲン翻訳後修飾の分析などでは、精度や感度の問題で正確な分析が困難な場合がある。

例えば抗体を用いたコラーゲンの検出では、全てのコラーゲンが X-Y-Gly 配列という共通した基本構造を持つため、コラーゲン型間でのクロスリアクションが常に懸念される（特に I 型コラーゲンと III 型コラーゲン間）(von der Mark 1981)。また通常、翻訳後修飾を含むコラーゲンのアミノ酸組成は、酸またはアルカリ加水分解後にアミノ酸分析装置で測定を行うが、微量な 3-Hyp を構造の類似した 4-Hyp と区別して解析することは非常に難易度が高く、近年まで 3-Hyp の分析自体行われている研究は少なかった。他にも GHL や GGHL もコラーゲン当たりの存在量が少なく、その分析には多大な労力と時間が必要となる。このように、体内での存在量は非常に多いコラーゲンではあるが、その質を正確に測定するには分析法の観点から解決すべき課題があり、疾患などに関連したコラーゲンの質的变化とその役割をほとんど把握できていないのが現状である。

近年、質量分析装置の性能が急速に発達し様々な研究分野で使われるようになってきており、これまで不可能であった高感度分析やハイスループットな大規模分析が可能となっている。質量分析装置はイオン化や検出の方法でいくつかの種類に分かれるが、その中で我々の用いる三連四重極型の質量分析装置は、液体クロマトグラフィーと連結させることにより LC-MS として大きくその性能を発揮する。MRM モードによる検出では、LC で分離された後 MS でイオン化された目的成分を Q1 で選択、Q2 で断片化、そして Q3 でその断片イオンを検出することにより、高感度かつ高い選択性を持つ定量分析が可能となる (図 1-2A)。また、タンパク質成分の分析では、あらかじめ酵素消化して生成させたペプチドを Q1 で選択し、Q2 でランダムに断片化することにより、Q3 で検出された各断片からそのペプチド配列を解読することができ、網羅的なタンパク質解析（プロテオーム解析）が可能である (図 1-2B)。こういった LC-MS を用いた分析手法は、コラーゲン研究分野でもよく採用されるようになってきている (Pataridis *et al.* 2008, Weis *et al.* 2010, Sricholpech *et al.* 2012, Terajima *et al.* 2014)。しかし、そのほとんどはコラーゲン型の同定や配列中の翻訳後修飾部位の同定に限られており、LC-MS を用いてもなお、微量なコ

ラーゲン型や翻訳後修飾について定量性を確保した詳細な分析を行うには課題が残る。

以上のことから本論文では、未だ解明されていない部分の多いコラーゲンの質について、新たな知見の獲得へとつなげるため、コラーゲンの微細な変化までも高感度かつ正確に検出できるよう、質量分析を用いたコラーゲンの新規分析法の開発を行った。第 2・3 章では、微量な GHL・GGHL の高感度分析のために開発したヒドラジド法と、それを用いた骨形成不全症患者由来コラーゲンの分析について報告し、第 4・5 章では、様々なコラーゲン分析における新たなツールとして、質量分析での内部標準として用いる安定同位体標識コラーゲンを開発し、さらにこれを応用した血中 Hyp 含有ペプチドの定量分析について報告する。

1-2. 図表

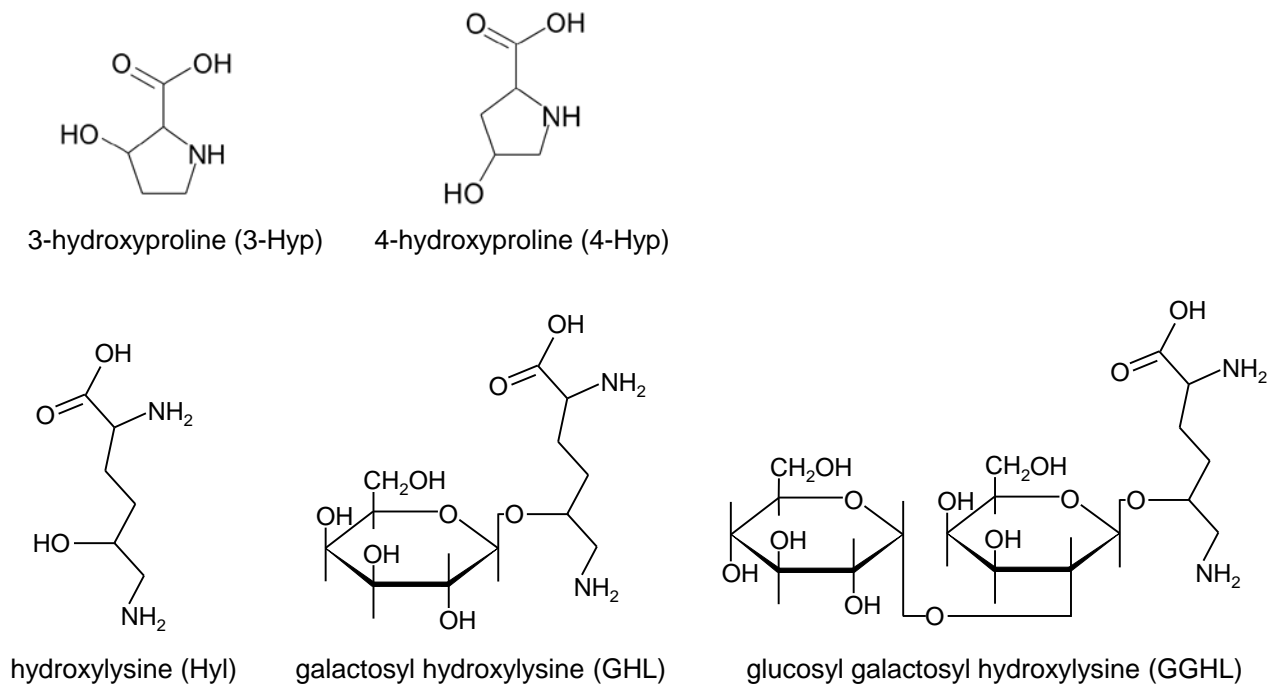


図 1-1. コラーゲン翻訳後修飾

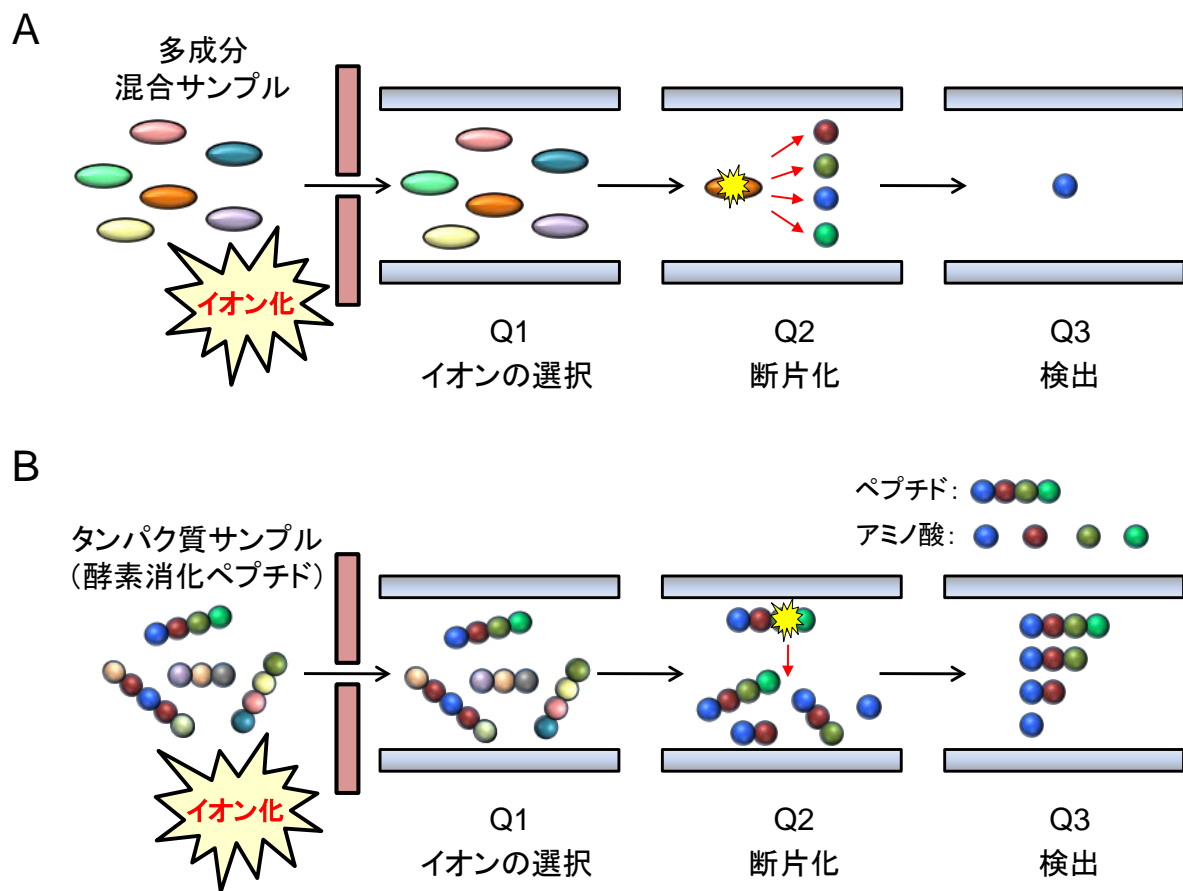


図 1-2. 三連四重極型質量分析装置を用いた分析

(A) MRM モードによる目的成分の選択的検出。

(B) MS/MS によるペプチド配列解析。

第 2 章

ヒドラジドケミストリーを用いた コラーゲン O 結合型糖鎖の部位特異的 分析法の開発

2-1. 緒言

コラーゲンに特異的な O 結合型糖鎖は、コラーゲンが翻訳されてから三重らせんを形成されるまでの間に、Lys が水酸化 (Hyl) された後、順番にガラクトシル化 (GHL) およびグルコシル化 (GGHL) されて生成する。これは X-Y-Gly 配列の Y に位置する Lys にのみ起こる反応であるが、I 型コラーゲンでは Lys 40 残基当たり 2 残基程度、II 型コラーゲンでは Lys 40 残基当たり 10 残基程度しか GHL・GGHL が存在せず (Kivirikko and Myllyla 1979)、その修飾部位を決めるモチーフ配列もわかっていない。近年、コラーゲン O 結合型糖鎖によるコラーゲンの細胞内への取り込み (Jurgensen *et al.* 2011)、コラーゲンへの細胞接着 (Stawikowski *et al.* 2014)、コラーゲン架橋 (Terajima *et al.* 2014) などへの関与が示唆されてきているが、生体内での実際の機能はほとんど解明されていない。このような GHL・GGHL の修飾部位の同定は、その機能解明の鍵となる可能性がある。

1970 年代、エドマン分解法を用いたペプチドシークエンサーによるコラーゲンの配列解析が数多く行われ、様々なコラーゲン型の一次配列が決定された (Fietzek and Kuhn 1975, Butler *et al.* 1976, Seyer and Kang 1977)。しかし、GHL・GGHL はペプチドシークエンサーで検出されないため、不検出という結果とアミノ酸組成分析や糖鎖分析などの結果とを合わせて、その修飾部位を推定しているに過ぎない。また、同じ修飾部位でも未修飾型、GHL および GGHL 修飾型が混在しているため、その分析はより困難となる。最近になって、質量分析を用いて酵素消化ペプチドの配列解析を行うことにより翻訳後修飾部位の同定が可能となり、コラーゲンについても LC-MS による新規 3-Hyp 修飾部位の同定などの報告がなされている (Weis *et al.* 2010)。しかし糖ペプチドの場合、一般にイオン化効率が低く、GHL・GGHL はその存在量も少ないことから直接 LC-MS で分析しても検出することは難しい。そのため精製が必要となるが、レクチンや抗体等による GHL・GGHL の精製法はこれまで報告されていない。

近年、質量分析を用いた N 結合型糖鎖修飾部位同定のために、ヒドラジドケミストリーと呼ばれる手法を用いた糖ペプチド精製法が開発された (Zhang *et al.* 2003)。この方法では、まず糖鎖を過ヨウ素酸で酸化することによりアルデヒド基を生成させ、樹脂に固定化されたヒドラジド基とヒドラゾン結合を形成させて糖ペプチドを捕捉する。樹脂を洗浄後、捕捉された糖ペプチドを N 結合型糖鎖切断酵素 PNGase F と反応させることによりペプチド部分を遊離させ、質量分析により糖鎖修飾されていたペプチドを同定する。このヒドラジドケミストリーを用いた分析法は、様々な N 結合型糖鎖の研究で利用されており (Pan *et al.* 2006, Ramachandran *et al.* 2006, Cao *et al.* 2009, Zeng *et al.* 2011)、さらに O 結合型糖鎖での利用例もいくつか報告されている (Nilsson *et al.* 2009, Klement *et al.* 2010, Kurogochi *et al.* 2010)。

本研究で我々は、このヒドラジドケミストリーを用いて GHL・GGHL 含有ペプチドを精製し、その修飾部位の同定を行うことにした。しかし、特徴のあるコラーゲン O 結合型糖鎖には既存の方法をそのまま適用することができなかったため、いくつかの改変を行い新たな精製方法を構築した。まず、GHL・GGHL は過ヨウ素酸により分解されてしまうため (Spiro 1967, Michaelsson *et al.* 1994)、代わりにガラクトースオキシダーゼで酸化し、GHL・GGHL に含まれるガラクトースの C6 位にアルデヒド基を生成させることにした。また、ガラクトースオキシダーゼ活性はカタラーゼと HRP により増強されることが報告されているため (Parikka and Tenkanen 2009, Parikka *et al.* 2010)、酸化反応にはこの 3 酵素を用いた。最後に、糖ペプチドの捕捉・洗浄後にペプチドを溶出させるため、酸性溶液中で加熱しヒドラゾン結合を切断することにした。これは、O 結合型糖鎖には PNGase F のような良い糖鎖切断酵素がないためもあるが、ヒドラゾン結合を切断することによりペプチドに糖鎖が結合したまま LC-MS で分析することができるため、糖鎖修飾部位と同時に糖鎖構造の同定も可能となるためである。

本章では、ヒドラジドケミストリーを用いたコラーゲン O 結合型糖鎖の精製方法（以降

ヒドラジド法とする) を確立するため、まず GHL・GGHL 標品を用いて方法の最適化を行い、次にウシ I・II 型コラーゲンで実際に GHL・GGHL 含有ペプチドを精製して、LC-MS による糖鎖修飾部位の同定を行った。

2-2. 材料と方法

・材料

ペプシン可溶化 I 型コラーゲンおよび II 型コラーゲンは、それぞれウシ皮膚およびウシ軟骨から抽出して使用した。また GHL・GGHL 標品は海綿から精製した (Butler 1982)。ガラクトースオキシダーゼ (SIGMA) は CNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare) と 4℃で一晩反応させて固定化し使用した。

・ヒドラジド法による GHL・GGHL 標品の精製

100 nmol の GHL および GGHL 標品を反応バッファー (150 mM NaCl 含有 100 mM リン酸緩衝液、pH 7.2) に溶解し、30 U の固定化ガラクトースオキシダーゼ、115 U のカタラーゼ (SIGMA) および 1.5 U の HRP (SIGMA) を添加して 37℃で 24 時間回転撹拌しながら反応させた。溶液を回収し、塩酸で pH を 4~5 に調整してから、あらかじめカップリングバッファー (150 mM NaCl 含有 100 mM 酢酸緩衝液、pH 4.8) で洗浄しておいた 200 μ l のヒドラジド樹脂 (Affigel Hz; Bio-Rad) と 37℃で 6 時間反応させた。反応後、樹脂をカップリングバッファー、1.5 M NaCl、100%メタノールおよび蒸留水で洗浄した後、0.1%ギ酸を添加し 80℃で 30 分間加熱して結合ペプチドを回収した。酸化前、酸化後、ヒドラジド樹脂からの素通り画分および溶出画分それぞれをトリエチルアミンでアルカリ条件に調整し、1 mM 重水素化ホウ素ナトリウム (Cambridge Isotope Laboratories) と室温で 1 時間反応させて還元と同時に重水素標識を行った。この重水素化は、ガラクトースオ

キシダーゼによって酸化された GHL・GGHL を標識するためである。最後にギ酸で酸性にして反応を停止させてから、 $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2\text{-Lys}$ (Cambridge Isotope Laboratories) を MS の注入量補正のための内部標準として添加し、各サンプルを LC-MS による MRM 分析に供した。酸化前の未反応 GHL・GGHL に対する酸化後および溶出画分の重水素標識 GHL・GGHL の MRM ピーク面積比から、ヒドラジド法による GHL・GGHL 標品の酸化効率および回収率を算出した。

・ GHL・GGHL 標品とその反応物の MRM 分析

MRM 分析は、Agilent 1200 Series HPLC システム (Agilent Technologies) と三連四重極型質量分析装置 3200 QTRAP (AB Sciex) を連結させた LC-MS で行った。ZIC-HILIC カラム (粒子径 5 μm 、長さ 150 mm、直径 2.1 mm; Merck SeQuant) を使い、流速 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、以下のグラジエント条件でサンプル分離を行った。0-5 分 : 90%移動相 B (100% アセトニトリル)、5-10 分 : 10-60%移動相 A (0.1%ギ酸)、10-25 分 : 60-90%移動相 A、25-30 分 : 90%移動相 B。MRM 分析の各種設定は Analyst 1.5.1 ソフトウェア (AB Sciex) で最適化したものを使用した。検出した MRM チャンネルを表 2-1 に示す。

・ ヒドラジド法による I・II 型コラーゲンからの GHL・GGHL 含有ペプチドの精製

1 mg のウシ I 型または II 型コラーゲンを反応バッファーに溶解し、60℃で 30 分間加熱して変性させた後、50 μg のトリプシン (SIGMA) を添加して 37℃で 16 時間消化反応を行った。反応後、100℃で 5 分間加熱しさらに 100 μg のトリプシン-キモトリプシンインヒビター (SIGMA) を添加して酵素を失活させた。以降、上記 GHL・GGHL 標品と同様にヒドラジド法による精製を行った。ヒドラジド樹脂から溶出した糖ペプチドをアルカリ条件下で 1 mM 水素化ホウ素ナトリウム (SIGMA) によって室温で 1 時間還元した後、ギ酸で酸性にしてから LC-MS/MS 分析に供した。

・ LC-MS/MS による糖鎖修飾部位の同定

LC-MS/MS 分析は、Agilent 1200 Series HPLC システムと三連四重極型質量分析装置 3200 QTRAP で行った。Ascentis Express C18 HPLC カラム (粒子径 2.7 μm 、長さ 150 mm、直径 2.1 mm; Supelco) を使い、流速 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、以下のグラジエント条件でサンプル分離を行った。0–5 分：98%移動相 A (0.1%ギ酸)、5–20 分：2–50%移動相 B (100%アセトニトリル)、20–25 分：90%移動相 B、25–30 分：98%移動相 A。分離されたペプチドは MS スキャン (m/z 400–1300) され、さらに各タイムポイントの中で最も強いピークシグナルのペプチド 2 つが MS/MS スキャン (m/z 100–1700) された。得られた MS/MS スペクトルから、ProteinPilot ソフトウェア 4.0 (AB Sciex) を使ってデータベースサーチによるペプチド同定を行った (データベース：UniProtKB/Swiss-Prot リリース 2011_08、動物種：ウシ)。その際、Lys のガラクトシル水酸化 (+178 Da) およびグルコシルガラクトシル水酸化 (+340 Da) を翻訳後修飾として登録して用いた。また、コラーゲン同定のため、Pro および Lys の水酸化の確率を既定よりも高く設定した。

2-3. 結果と考察

2-3-1. ヒドラジドケミストリーによる GHL・GGHL 精製方法の検討

ヒドラジド法を用いたコラーゲン O 結合型糖鎖精製の流れを図 2-1 に、またその際の詳細な反応を GGHL 含有ペプチドを例として図 2-2 に示す。GHL・GGHL 標品とコラーゲンからトリプシンで切り出された GHL・GGHL 含有ペプチドでは、ヒドラジド法による酸化、カップリングおよび溶出という精製工程が共通であるため、まずは標品を用いて本法の最適化を行った。

ガラクトースオキシダーゼはアガロースビーズに固定化することにより再利用、安定化

および酵素活性増強が可能となるという報告があったため (Light 1986)、実際に GHL・GGHL 標品でその固定化による効果を検証した (図 2-3)。その結果、ガラクトースオキシダーゼの固定化により、GHL および GGHL 標品に対して、それぞれ約 3 倍および約 8 倍の酸化活性の増強が示された。また、固定化により 3~4 回は活性を失わずに再利用できることも確認された (データは省略する)。従って以降の実験は全て、固定化ガラクトースオキシダーゼを用いて酸化反応を行った。また、GHL・GGHL 標品が 0.1%ギ酸 (pH 2.8) 中で 30 分間、80℃で加熱しても安定であることが確認されたため (加熱前後での比較で GHL は $99.8 \pm 6.8\%$ 、GGHL は $98.7 \pm 6.5\%$)、これをヒドラジド樹脂からの溶出条件とした。

図 2-4 はヒドラジド法による GHL および GGHL 標品の酸化効率と回収率を示す。それぞれ、カタラーゼと HRP 添加による効果も検証した。まずガラクトースオキシダーゼのみを用いたとき、GHL および GGHL 標品の酸化効率はそれぞれ 11.2% および 7.0% となり、回収率はそれぞれ 4.3% および 1.4% となった。それに対し、カタラーゼと HRP を反応系に添加すると、GHL および GGHL 標品の酸化効率はそれぞれ 11.4% および 14.0% となり、回収率はそれぞれ 4.7% および 3.6% となった。比較すると、ガラクトースオキシダーゼ単独では、GGHL 標品で特に酸化効率および回収率が低いという結果であった。これはおそらく非還元末端のグルコースが立体障害となり、ガラクトースオキシダーゼによる酸化および酸化されたガラクトースのヒドラジド樹脂への結合を阻害しているためと思われる。しかしながら、カタラーゼと HRP を添加することにより GGHL での酸化効率は約 2 倍に増強されており、回収率も同様に改善されていることが確認できた。酸化 GHL・GGHL は素通り画分にも回収量と同程度検出されてしまっていたが、これはヒドラジド樹脂の量やカップリング時間を増やしても改善することはできなかった (データは省略する)。最終的に GHL・GGHL 標品の回収率は、カタラーゼと HRP を添加しても 5% 弱というやや低い結果となったが、次に示すように LC-MS を用いた分析には十分であったため、この条

件でヒドラジド法によるコラーゲンサンプルからの糖ペプチド精製を行うことにした。

2-3-2. ウシ I・II 型コラーゲンの糖鎖修飾部位の同定

ウシ I・II 型コラーゲンを変性処理した後トリプシン消化し、GHL・GGHL 標品を用いて最適化した条件でヒドラジド法による精製を行った。得られた溶出画分の LC-MS によるペプチド配列解析の結果を、II 型コラーゲンを例として図 2-5 に示す。ガラクトースオキシダーゼによる酸化なしで精製を行ったコントロールではほとんどピークが検出されなかったのに対し、ヒドラジド法で精製することにより強いイオンクロマトグラムが観察された (図 2-5A)。LC での保持時間 14.8 分時点での MS スペクトルでは、高い強度のピークとして m/z 641.0、 m/z 695.0、 m/z 961.0 および m/z 1042.0 が検出された (図 2-5B)。 m/z 641.0 のピークを MS/MS 配列解析した結果、このペプチドは GHL を含有する GFOGQDGLAGPK*GAOGER (O は 4-Hyp を、K*は GHL を示す。電荷 = +3) と同定された (図 2-5C)。同様に、 m/z 695.0 のピークは GGHL を含有する GFOGQDGLAGPK#GAOGER (K#は GGHL を示す。電荷 = +3) と同定された (図 2-5D)。衝突誘起解離による断片化では、ペプチド結合よりもグリコシド結合が優先して壊されるため、GHL 含有ペプチドと GGHL 含有ペプチドでは似た MS/MS スペクトルとなっている。また、基本的に糖鎖の有無や大きさによって逆相クロマトグラフィーでの挙動は変わらないため、同じペプチドの GHL 修飾型と GGHL 修飾型はほぼ同じ保持時間で溶出される (図 2-5E および F)。 m/z 961.0 および m/z 1042.0 もそれぞれ、上で同定された GHL および GGHL 含有ペプチドの電荷+2 のピークであることが確認され (データは省略する)、微量 GHL・GGHL 含有ペプチドがヒドラジド法により非常に効率的に精製・濃縮されていることが示された。

ヒドラジド法により同定されたウシ I 型および II 型コラーゲンの GHL・GGHL 含有ペプチドの一覧を表 2-2 に示す。GHL・GGHL 修飾部位は X-Y-Gly 配列の Y の位置のみで

あり、またこの糖鎖修飾があると、立体障害のためその部位ではトリプシンで切断されない (Morgan *et al.* 1970, Wu *et al.* 1981)。ここでは以上の条件に適合し、かつデータベースサーチの結果で信頼性 90%以上のペプチドのみを同定とした。GHL・GGHL 部位でトリプシン切断されないことから、一般的なトリプシン消化ペプチドよりも分子量が大きくなったが、その分電荷も大きくなったため (+2~+4)、LC-MS でのスキャン範囲 m/z 1300 以内で多くのペプチドを検出することができた。結果として、I 型コラーゲン α 1 鎖で 5 個、I 型コラーゲン α 2 鎖で 8 個、そして II 型コラーゲン α 1 鎖で 24 個の GHL・GGHL 含有ペプチドが同定された。これまで様々な研究で糖鎖修飾部位が報告されていたが (Butler *et al.* 1976, Fietzek and Kuhn 1976, Butler *et al.* 1977, Francis *et al.* 1978, Seyer *et al.* 1989)、今回の結果はそのほとんどを網羅しており、さらに I 型コラーゲンで 3 箇所、II 型コラーゲンで 2 箇所の GHL・GGHL 修飾部位を新たに同定することができた。I・II 型コラーゲンをトリプシン消化後に直接 LC-MS で配列解析を行うと、ヒドラジド法に比べて 1/50 程度の量で、配列の半分をカバーするほどのペプチドを同定することができたが、そのうち同定された GHL・GGHL 含有ペプチドは、I 型コラーゲンで 1 個、II 型コラーゲンで 3 個のみであった (表 2-3)。このことから、ヒドラジド法により飛躍的にこれら糖ペプチドの同定効率が向上されたことが明らかである。

本章では、LC-MS でも検出が困難であった微量な GHL・GGHL を含有するペプチドとその修飾部位を同定するため、ヒドラジドケミストリーを用いた新規分析法を開発した。このヒドラジド法では、固定化ガラクトースオキシダーゼ、カタラーゼおよび HRP の 3 酵素による糖鎖の酸化 (アルデヒド基の生成)、および酸性溶液中での加熱による糖ペプチドの溶出 (ヒドラゾン結合の切断)、という 2 つの特徴によりコラーゲン O 結合型糖鎖の精製を初めて可能とした。精製画分を LC-MS によって分析することにより、これまでのペプチドシーケンサーを用いた分析法に比べ、圧倒的に網羅的かつ高感度な分析を簡便に行うことができるようになった。ただしいくつか課題も残るため、それらについて以下に

記述する。

同定された糖ペプチドの一部で、ペプチド生成に用いたトリプシンの切断部位である Lys または Arg 以外で切断されているものが検出されており、これは市販のガラクトースオキシダーゼに夾雑している他のプロテアーゼ活性によるものと考えられる (Hatton and Regoeczi 1976, Light 1986)。ガラクトースオキシダーゼの固定化およびトリプシン・キモトリプシンインヒビターの添加によってこれを抑えられることが期待されたが、それでもわずかにこのプロテアーゼ活性は残存していたことになる。より正確な分析のために、ガラクトースオキシダーゼの再精製もしくはリコンビナント酵素の使用などの必要がある場合も今後出てくる可能性はある。また、ヒドラジド法では、ガラクトースオキシダーゼによる酸化効率および最終的な回収率が低いため、この精製過程で定量性が損なわれる恐れがある。従って、今回のような修飾部位の同定では問題とはならないが、サンプル間で部位ごとの修飾率の比較などを行う場合、ヒドラジド法をそのまま適用することができない。そこで次章では、ヒドラジド法と代謝的安定同位体標識法 SILAC を組み合わせることにより、定量性を確保した GHL・GGHL の部位特異的分析法を開発し、それを用いて骨形成不全症患者由来コラーゲンの解析を行うことにした。

2-4. 図表

	Q1	Q3	CE
GHL	325.1	163.2	19
重水素標識GHL	327.1	163.2	19
酸化GHL	323.1	163.2	19
GGHL	487.2	163.3	27
重水素標識GGHL	489.2	163.3	27
酸化GGHL	485.2	163.3	27
$^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2\text{-Lys}$	155.1	90.1	21

表 2-1. GHL・GGHL とその反応物の MRM チャンネル

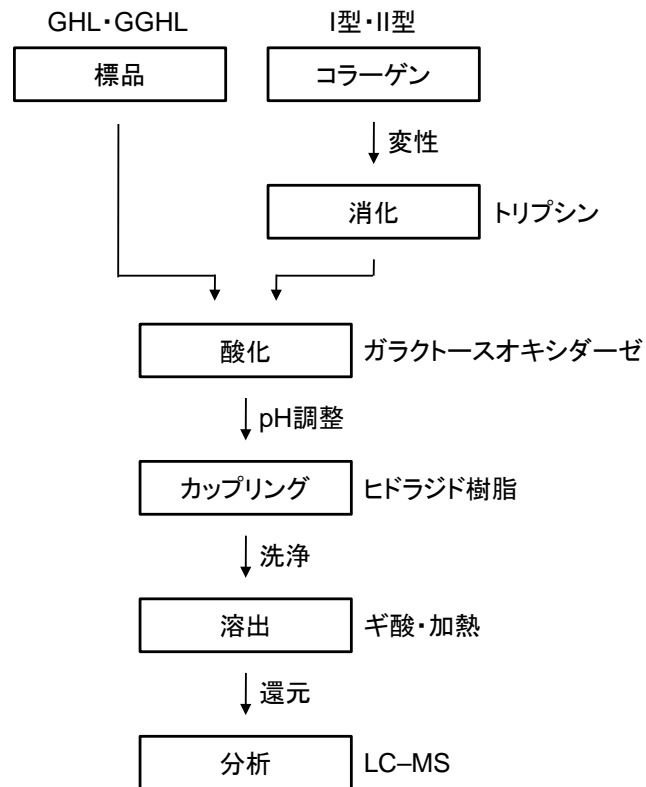


図 2-1. ヒドラジド法を用いた GHL・GGHL 標品および GHL・GGHL 含有ペプチド精製の流れ

コラーゲンを変性後トリプシン消化して生成した GHL・GGHL 含有ペプチドおよび GHL・GGHL 標品を、ガラクトースオキシダーゼによる酸化、弱酸性条件下でのヒドラジド樹脂へのカップリング、そして洗浄後にギ酸溶液中での加熱による溶出を行うことで精製し、アルデヒド基を還元して水酸基に戻してから LC-MS 分析を行う。

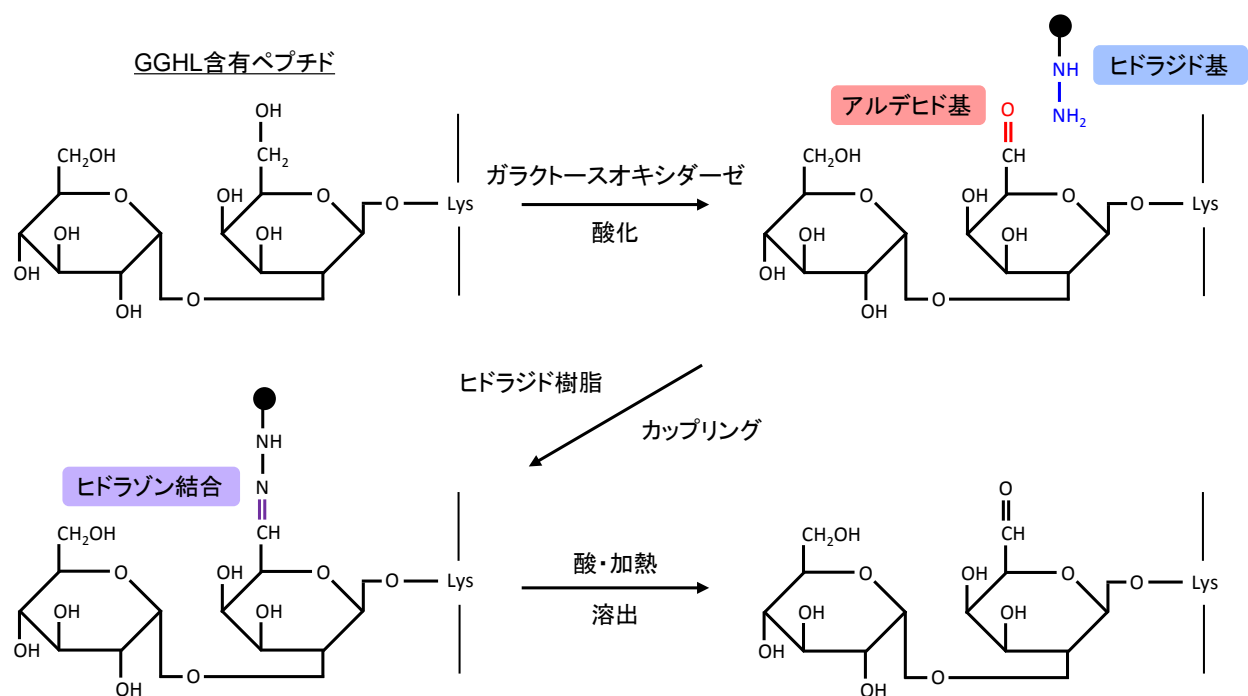


図 2-2. ヒドラジドケミストリーによる GGHL 含有ペプチド精製時の反応

ガラクトースオキシダーゼを用い、GGHL 含有ペプチドのガラクトース C6 位の水酸基をアルデヒド基に酸化する (37℃、24 時間)。次に、生じたアルデヒド基と樹脂に固定化されたヒドラジド基とでヒドラゾン結合を形成させる (37℃、6 時間)。樹脂を洗浄した後、0.1%ギ酸中で加熱することによりヒドラゾン結合を切断して、GGHL 含有ペプチドを溶出させる (80℃、30 分間)。

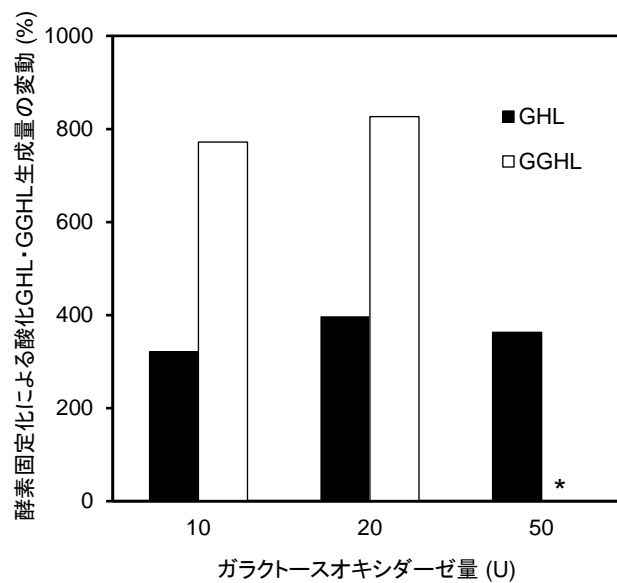


図 2-3. 酵素固定化によるガラクトースオキシダーゼ活性の増強

100 nmol の GHL・GGHL 標品に対し、10、20 および 50 U の溶液ガラクトースオキシダーゼまたは固定化ガラクトースオキシダーゼで酸化反応を行った（カタラーゼおよび HRP 共存下、37℃、24 時間）。生成した酸化 GHL および酸化 GGHL は MRM 分析で検出し、それぞれのユニット量での酵素固定化によるその生成量の変動を%表示で示した（N = 3）。

*溶液ガラクトースオキシダーゼ 50 U では酸化 GGHL はほとんど検出されなかった。

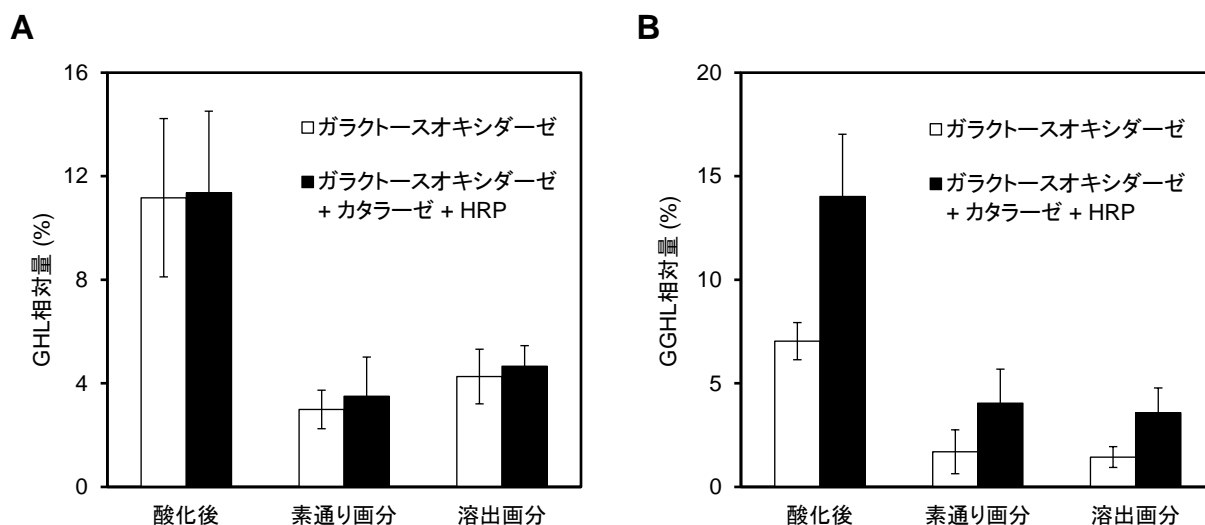
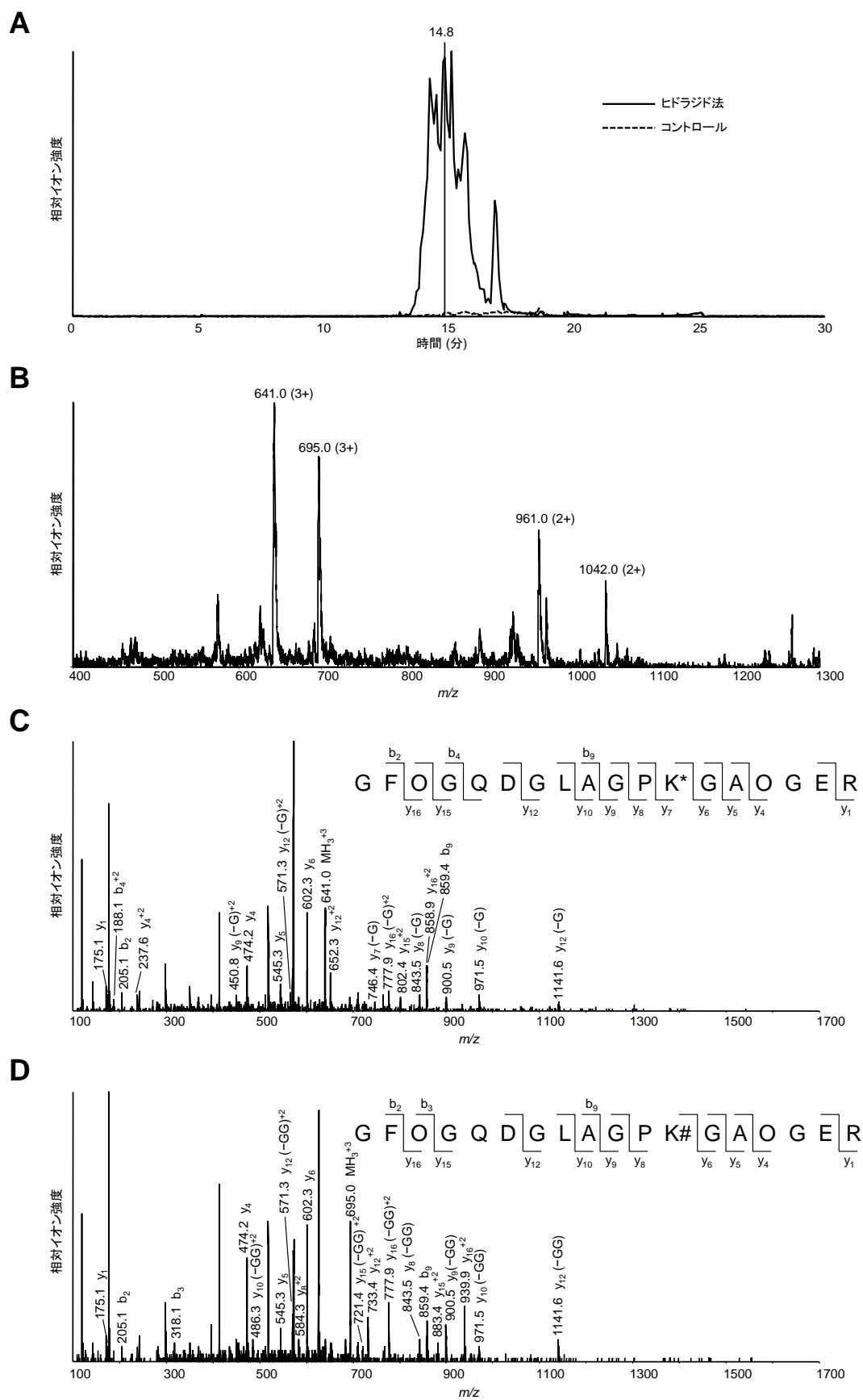


図 2-4. ヒドラジド法を用いた GHL・GGHL 標品の酸化効率および回収率

固定化ガラクトースオキシダーゼ単独、または固定化ガラクトースオキシダーゼ、カタラーゼおよび HRP の 3 酵素を用い、ヒドラジド法によって GHL・GGHL 標品を精製した。酸化前、酸化後、ヒドラジド樹脂からの素通り画分および溶出画分について、重水素化ホウ素ナトリウムで重水素標識した後、GHL・GGHL および重水素化 GHL・GGHL を MRM 分析で測定した (N = 5)。酸化前の GHL・GGHL に対する各画分の重水素化 GHL・GGHL のピーク面積比を、それぞれ (A) GHL 相対量 (%) および (B) GGHL 相対量 (%) で示す。



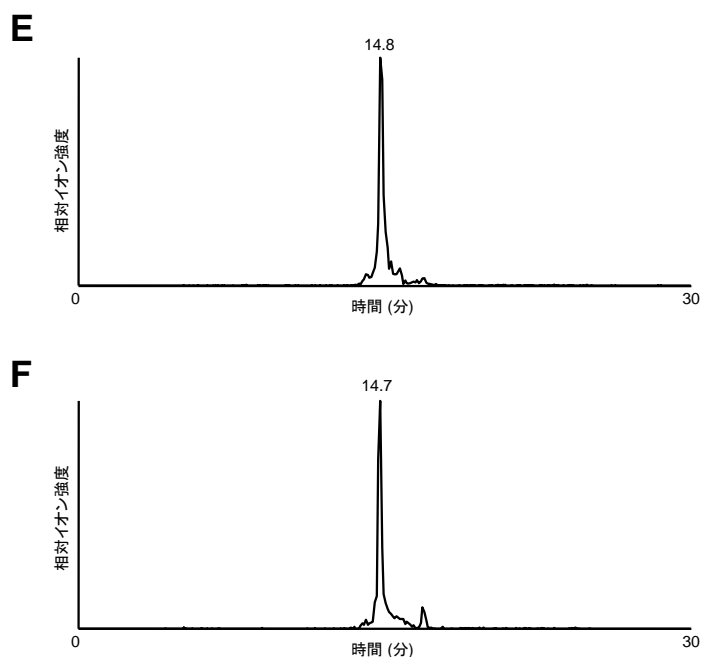


図 2-5. ウシ II 型コラーゲンでのヒドラジド法精製画分の LC-MS 配列解析

(A) トータルイオンクロマトグラム。コントロールはガラクトースオキシダーゼ酸化なしで処理したものを示す。

(B) A で示された保持時間 14.8 分時点の MS スペクトル。

(C) B で検出されたピーク m/z 641.0 の MS/MS スペクトル。-G は脱糖鎖されて検出されたフラグメントを示す。

(D) B で検出されたピーク m/z 695.0 の MS/MS スペクトル。-GG は脱糖鎖されて検出されたフラグメントを示す。

(E) B で検出されたピーク m/z 641.0 のモノアイソトピック抽出イオンクロマトグラム (m/z 640.96–641.29)。

(F) B で検出されたピーク m/z 695.0 のモノアイソトピック抽出イオンクロマトグラム (m/z 694.98–695.31)。

コラーゲン 型	鎖	部位 ^a	糖鎖修飾 部位	同定ペプチド配列 ^b	m/z	z	保持 時間 (分)	信頼性 (%)	報告文献
I	$\alpha 1$	76-90	87	R.GLOGTAGLOGMK*GHR.G	553.60	3	14.8	99	(Fietzek and Kuhn 1976)
		76-90	87	R.GLOGTAGLOGMK#GHR.G	607.62	3	14.8	99	(Fietzek and Kuhn 1976)
		91-108	99	R.GFSGLDGAK*GDAGPAGPK.G	593.94	3	14.9	99	新規
		658-687	684	K.GDAGPOGPAGPAGPPGPIGNVGAOGPK*GAR.G	689.09	4	15.2	99	(Fietzek and Kuhn 1976)
		658-687	684	K.GDAGPOGPAGPAGPPGPIGNVGAOGPK#GAR.G	729.60	4	15.2	99	(Fietzek and Kuhn 1976)
	$\alpha 2$	76-90	87	R.GFOGTPGLOGFK*GIR.G	570.95	3	16.5	93	(Fietzek and Kuhn 1976)
		76-90	87	R.GFOGTPGLOGFK#GIR.G	624.97	3	16.5	93	(Fietzek and Kuhn 1976)
		145-192	174	R.GSDGSVGPVGPAGPIGSAGPPGFOGAOGPK*GELGPVGNOPAGPAGPR.G	1087.78	4	16.9	99	(Fietzek and Kuhn 1976)
		145-192	174	R.GSDGSVGPVGPAGPIGSAGPPGFOGAOGPK#GELGPVGNOPAGPAGPR.G	1128.29	4	16.9	99	(Fietzek and Kuhn 1976)
		193-237	219	R.GEVGLOGLSGPVGPOGNOGANGLOGAK*GAAGLOGVAGAOGLOGPR.G	1038.77	4	17.1	99	(Fietzek and Kuhn 1976)
		193-237	219	R.GEVGLOGLSGPVGPOGNOGANGLOGAK#GAAGLOGVAGAOGLOGPR.G	1079.28	4	17.1	99	(Fietzek and Kuhn 1976)
		625-651	648	R.GEVGPAGPNGFAGPAGAAGQOGAK*GER.G	857.73	3	15.2	99	新規
		655-687	657	K.GPK*GENGPVGPTGPVGAAGSPGPNPOGPAGSR.G	761.11	4	15.0	99	新規
	$\alpha 1$	78-90	87	F.OGTOGLOGVK*GHR.G	500.27	3	14.3	99	(Butler <i>et al.</i> 1976)
		78-90	87	F.OGTOGLOGVK#GHR.G	554.29	3	14.3	99	(Butler <i>et al.</i> 1976)
		91-108	99	R.GYOGLDGAK*GEAGAOGVK.G	623.95	3	14.7	99	(Butler <i>et al.</i> 1976)
		100-126	108	K.GEAGAOGVK*GESGSOGENSGOPMGP.R	888.05	3	15.0	93	(Butler <i>et al.</i> 1976)
		145-183	174	R.GNDGQOGPAGPOGPVGPAGGPGFOGAOGAK*GEAGPTGAR.G	1191.88	3	15.3	99	(Seyer <i>et al.</i> 1989)
		193-237	219	R.GEOGTGSOGPAGAAGNOGTDGIOGAK*GSAGAOGIAGAOGFOGPR.G	1028.47	4	15.8	99	(Seyer <i>et al.</i> 1989)
		193-237	219	R.GEOGTGSOGPAGAAGNOGTDGIOGAK#GSAGAOGIAGAOGFOGPR.G	1068.98	4	15.8	99	(Seyer <i>et al.</i> 1989)
		238-263	252	R.GPOGPQGATGPLGPK*GQTGEOGIAGF.K	852.41	3	17.0	99	(Seyer <i>et al.</i> 1989)
		238-263	252	R.GPOGPQGATGPLGPK#GQTGEOGIAGF.K	906.42	3	17.0	99	(Seyer <i>et al.</i> 1989)
		316-333	327	R.GFOGQDGLAGPK*GAOGER.G	640.96	3	14.8	99	(Seyer <i>et al.</i> 1989)
		316-333	327	R.GFOGQDGLAGPK#GAOGER.G	694.98	3	14.8	99	(Seyer <i>et al.</i> 1989)
		334-360	342	R.GPSGLAGPK*GANGDOGROGEOGLOGAR.G	671.07	4	14.0	99	(Seyer <i>et al.</i> 1989)
		334-360	342	R.GPSGLAGPK#GANGDOGROGEOGLOGAR.G	711.58	4	14.0	99	(Seyer <i>et al.</i> 1989)
		397-416	408	R.GQOGVMGFOGPK*GANGEOGK.A	703.32	3	15.1	99	(Butler <i>et al.</i> 1977)
		417-429	420	K.AGEK*GLPGAOLR.G	472.91	3	14.5	99	(Butler <i>et al.</i> 1977)
		417-429	420	K.AGEK#GLPGAOLR.G	526.93	3	14.5	99	(Butler <i>et al.</i> 1977)
		520-555	531	R.GLOGTOGTDGPK*GAAGPAGPOGAQGPGLQGMGER.G	1154.87	3	15.7	99	(Butler <i>et al.</i> 1977)
		520-555	531	R.GLOGTOGTDGPK#GAAGPAGPOGAQGPGLQGMGER.G	1208.90	3	15.7	96	(Butler <i>et al.</i> 1977)
		556-567	564	R.GAAGIAGPK*GDR.G	624.31	2	13.0	93	(Francis <i>et al.</i> 1978)
		556-567	564	R.GAAGIAGPK#GDR.G	705.29	2	13.0	99	(Francis <i>et al.</i> 1978)
		586-618	603	K.GLTGPIGPOGPAGANGEK*GEVGPOGPAGTAGAR.G	1025.50	3	15.5	99	(Francis <i>et al.</i> 1978)
		586-618	603	K.GLTGPIGPOGPAGANGEK#GEVGPOGPAGTAGAR.G	1079.52	3	15.5	99	(Francis <i>et al.</i> 1978)
		658-687	684	K.GDAGAOGPQGPSSGAOGPQGTGTGPK*GAR.G	936.11	3	14.2	99	新規
		741-780	756	R.AGDOGLQGPAGPOGEK*GEOGDDGSPGPDGPQGLAGQR.G	972.18	4	15.3	99	新規

^a三重らせん開始位置を1とする。

^bOは4-Hypを、K*はGHL、K#はGGHL、KはHylを示す。

表 2-2. ヒドラジド法により同定されたウシ I・II 型コラーゲンの糖鎖修飾ペプチド

		配列カバー率 (信頼性90%以上)	同定GHL・GGHL 含有ペプチド数
I型コラーゲン	α 1鎖	53.2%	1
	α 2鎖	38.3%	0
II型コラーゲン	α 1鎖	55.6%	3

0.1 mg/mLのウシI型またはII型コラーゲンを変性処理後37°Cで16時間トリプシン消化し、得られたペプチド溶液10 μ lを3回LC-MSで分析してペプチド同定を行った。

表 2-3. 直接分析での GHL・GGHL 含有ペプチドの同定率

第 3 章

ヒドラジドケミストリーと SILAC を
用いた骨形成不全症によるコラーゲンの
糖鎖修飾増加機構の解析

3-1. 緒言

骨形成不全症 (OI) は、主に I 型コラーゲンの遺伝子変異により引き起こされる骨脆弱性を示す先天性の疾患である。OI では I 型コラーゲン中一箇所の Gly が他のアミノ酸に置換するだけで、小胞体での三重らせん形成の遅延、変性温度の低下、さらに組織への沈着量の減少が引き起こされる。2006 年には、コラーゲンシャペロンとしての機能も持つ prolyl 3-hydroxylase 関連遺伝子の変異によっても OI が引き起こされることが報告され、近年特に注目されている (Morello *et al.* 2006, Cabral *et al.* 2007, Alanay *et al.* 2010, Barnes *et al.* 2010, Christiansen *et al.* 2010)。OI では、組織中のコラーゲン量の減少がその症状の大きな要因であることは間違いないが、他方、合成されるコラーゲンの質的变化として O 結合型糖鎖の増加が知られている (Kirsch *et al.* 1981, Cetta *et al.* 1983, Bateman *et al.* 1984, Steinmann *et al.* 1984, Tenni *et al.* 1993, Morello *et al.* 2006)。OI での三重らせん形成の遅延により、Lys 水酸化酵素および糖鎖付加酵素の作用時間が伸びて GHL・GGHL が増加すると考えられているが、このコラーゲンの糖鎖修飾の増加が疾患の要因として関連しているのか、それともただの副次的な作用なのかは不明である。また、実際に OI によりコラーゲン上のどの部位でどのように糖鎖が増えていくのかもわかっていないが、その糖鎖修飾増加の様式としては 2 つの可能性が考えられる。ひとつは、OI コラーゲンで非特異的に糖鎖修飾部位が増加するというモデル、そしてもうひとつは、特定の部位のみで Hyl から GHL、そして GGHL へと糖鎖修飾が進行するというモデルである。これまで OI コラーゲンでの糖鎖修飾の増加は、SDS-PAGE での移動度変化やアミノ酸加水分解による分析などでしか確認されておらず、その配列上の位置情報を持った分析は全く行われていなかった。

そこで本研究では、第 2 章で開発したヒドラジド法を用いて OI コラーゲンの分析を行い、OI でのコラーゲン O 結合型糖鎖増加の機構を明らかにすることを目的とした。ただ

し、ヒドラジド法は最終的な GHL・GGHL 含有ペプチドの回収率が低いため、操作間で誤差が生じる可能性がある。そこで我々は、ヒドラジド法に代謝的安定同位体標識法である SILAC を組み合わせることにより定量性を確保することにした。SILAC は 2002 年に Mann らのグループによって開発された方法で、これを用いることにより質量分析での高精度な比較定量分析が可能となる (Ong *et al.* 2002)。この手法では、細胞培養時に異なった安定同位体質量で標識されたアミノ酸を添加して培養することにより (例えば $^{12}\text{C}_6\text{-Lys}$ と $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$)、サンプル間で細胞タンパク質に質量差を生じさせる。その後、サンプルを酵素消化して生じたペプチドを質量分析で測定すると、その安定同位体標識による質量差で由来サンプルを識別して検出することができる。サンプル間で比較されるペプチドは質量以外の化学的性質は全く同一であるため、サンプル処理での誤差や MS でのイオン化効率の変動などを吸収した高精度な定量が可能となる。現在では SILAC は数多くのプロテオーム研究で使用されており、さらに翻訳後修飾の部位特異的定量に用いられた例も報告されている (Ong *et al.* 2004, Olsen *et al.* 2006, Bonenfant *et al.* 2007)。

本章では、まず正常および OI 皮膚線維芽細胞が産生するコラーゲンについて、生化学的分析によりその性質の違いを確認し、次にヒドラジド法と SILAC を用い OI による糖鎖修飾の変動について詳細な分析を行った。

3-2. 材料と方法

・細胞培養

ヒト正常新生児由来皮膚線維芽細胞 (normal)、ヒト OI 新生児由来皮膚線維芽細胞 (OI-1 ; I 型コラーゲン α 1 鎖 946 番目の Gly が Cys に置換) (Kurosaka *et al.* 1994)、およびヒト OI 子供 (4 歳児) 由来皮膚線維芽細胞 (OI-2 ; I 型コラーゲン変異部位は不明) を 10% FBS (Intergen) 含有 DMEM (SIGMA) で継代培養した (37°C、5% CO_2)。

・コラーゲンの生化学的分析

正常および OI 皮膚線維芽細胞を 2% FBS、200 μ M アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物 (Wako) 含有 DMEM で 3 日間培養し、その培養上清を回収した。得られた培養上清に 0.1 N となるように塩酸を加えて酸性にした後、ペプシン (SIGMA) を 0.1 mg/mL となるように加え 4°C で 16 時間消化反応を行った。ここに NaCl を 1 M となるように添加し氷上で 3 時間置いた後、16,000 $\times g$ 、4°C で 10 分間遠心分離してコラーゲンを沈殿として回収し、これを 5 mM 酢酸に溶解した。

得られたコラーゲンについて SDS-PAGE 分析を行い (還元および非還元条件、5%ゲル)、CBB 染色後そのバンド強度からサンプル間でのコラーゲン相対量を決定した。また、円二色性分散計 Jasco-600 (日本分光) により、20°C から 50°C まで 0.25°C/分ずつサンプルの温度を上昇させながら、221 nm での円二色性楕円率を算出しその中間点をコラーゲンの変性温度とした。

・アミノ酸分析

等量の正常および OI コラーゲンサンプルを酸・アルカリ加水分解に供した。アルカリ加水分解は、2 N となるように NaOH を添加してからサンプルを PicoTag サンプルチューブ (Waters) に移し、さらにこれをリアクションバイアル (Waters) に入れて中の気体を窒素に置換してから、110°C、20 時間の条件で行った。加水分解後、サンプルを 30% 酢酸で中和してから、陽イオン交換カラム Oasis MCX (Waters) により脱塩し、カラム溶出液を遠心濃縮機 CVE-3100 (EYELA) により乾固させた。酸加水分解は、サンプルを PicoTag サンプルチューブ内で遠心濃縮機により乾固させ、これをリアクションバイアルに入れ 200 μ L の 6N HCl/1% フェノールをバイアル内に加えて、中の気体を窒素に置換してから 110°C、20 時間 (気相) の条件で行った。これらのアルカリおよび酸加水分解サンプルを

0.1%酢酸／5 mM 酢酸アンモニウムに溶解し、MRM 分析に供した。MRM 分析は Hyl (m/z 163.0→128.2、CE = 15 V) を追加し、サンプル分離のグラジエント条件を以下のように変更した以外は第 2 章と同様の方法で行った。0–5 分：90%移動相 B (100%アセトニトリル)、5–20 分：10–95%移動相 A (0.1%酢酸／5 mM 酢酸アンモニウム)、20–25 分：95%移動相 A、25–30 分：90%移動相 B。

・ヒドラジド法を用いた GHL・GGHL 含有ペプチドの精製と同定

第 2 章と同様の方法により、正常および OI コラーゲンサンプルからヒドラジド法を用いて GHL・GGHL 含有ペプチドを精製し、LC-MS/MS 分析およびデータベースサーチによりペプチド同定を行った（データベース：UniProtKB/Swiss-Prot リリース 2011_08、動物種：ヒト）。

・SILAC とヒドラジド法を用いた GHL・GGHL 含有ペプチドの比較定量

正常および OI 皮膚線維芽細胞を 2%透析 FBS (Thermo Scientific)、200 μ M アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物含有 SILAC DMEM (Thermo Scientific) で 3 日間培養し、その培養上清を回収した。この細胞培養時にタンパク質標識のため、正常細胞には $^{12}\text{C}_6\text{-Lys}$ (Thermo Scientific)、OI 細胞には $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$ (Thermo Scientific) をそれぞれ 100 mg/L 添加した。

得られた培養上清からコラーゲンを精製し、SDS-PAGE のバンド強度から I 型コラーゲン量を合わせた後、正常コラーゲンと OI コラーゲンを混合した。このサンプルについて、ヒドラジド法による GHL・GGHL 含有ペプチドの精製と LC-MS 分析を行った。得られた各ペプチドの $^{12}\text{C}_6\text{-Lys}$ 標識と $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$ 標識のモノアイソトピック抽出イオンクロマトグラム（MIO）のピーク高さから、各修飾部位の GHL・GGHL 修飾率の比較定量を行った。このとき、抽出イオンクロマトグラムのシグナルが十分でないものは分析対象から除外した。

3-3. 結果と考察

3-3-1. OI 皮膚線維芽細胞由来コラーゲンの生化学的解析

ヒト正常皮膚線維芽細胞（新生児）およびヒト OI 皮膚線維芽細胞（OI-1: 新生児、OI-2: 4 歳児）の産生するコラーゲンについて、はじめに生化学的解析によりその性質を比較した。まず、これらのコラーゲンサンプルを SDS-PAGE により分析した結果（図 3-1）、どのサンプルでも I 型コラーゲンが主要な成分として検出され、III 型コラーゲンも 5–10%程度含まれていることが確認された（III 型コラーゲンはジスルフィド結合を有するため、非還元条件において高分子領域でバンドが検出される）。OI 細胞由来の I 型コラーゲンで、 $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖どちらもバンドが 2 本になっており、上のバンドが正常細胞由来のものとは比べると移動度が遅くなっていることから、このコラーゲンで翻訳後修飾の増加が起きていると考えられる。次に、コラーゲンの熱安定性を円二色性分散計で測定した（図 3-2）。OI コラーゲンの変性温度はそれぞれ OI-1 で $39.5 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ 、OI-2 で $39.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ と算出され、正常コラーゲンの $41.3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ と比べて約 2°C 低くなるという、これまでの報告と一致する結果となった（Steinmann *et al.* 1984, Kurosaka *et al.* 1994）。

さらに、正常コラーゲンと OI コラーゲンの Lys 修飾の比較をアミノ酸分析により行った（表 3-1）。GHL・GGHL の糖鎖は酸加水分解で壊れてしまうため（Spiro 1967）、Hyl および GHL・GGHL はアルカリ加水分解、全 Hyl（Hyl + GHL + GGHL）は酸加水分解した後、MRM 分析により測定した。その結果、OI コラーゲンでは正常コラーゲンに比べて Hyl はほとんど変化しなかった一方、GHL はやや増加傾向が観察された（OI-1: 155.8%、OI-2: 105.1%）。GGHL ではさらにその増加が顕著であり（OI-1: 279.0%、OI-2: 176.2%）、主にこれが全 Hyl の増加へとつながっていると考えられる（OI-1: 145.4%、OI-2: 126.6%）。以上のように、今回得られた OI コラーゲンで糖鎖修飾が増加していることが確認され、

これまでいくつかの文献で報告されていたように GGHL の特に顕著な増加も観察された (Bateman *et al.* 1984, Steinmann *et al.* 1984)。

3-3-2. ヒト線維芽細胞由来コラーゲンの糖鎖修飾部位の同定

ここまでで示された OI コラーゲンでの糖鎖修飾の増加について、さらに位置情報を持った詳細な分析を行うため、ヒドラジド法を用いて正常および OI 細胞培養上清由来コラーゲンから GHL・GGHL 含有ペプチドを精製し LC-MS 分析を行った。その結果、正常および OI 細胞由来のヒト I 型コラーゲンで合計 14 箇所の糖鎖修飾部位が同定され、さらにヒト III 型コラーゲンでも 2 箇所の糖鎖修飾部位が同定された (表 3-2)。最近の研究で、高感度ナノ LC-MS を用いることにより、マウス骨芽細胞から得た I 型コラーゲンをトリプシン消化後に直接分析して、計 5 箇所の GHL・GGHL 修飾部位が同定されている (Sricholpech *et al.* 2012)。由来動物や組織は異なるが、それと比較すると、やはりヒドラジド法を用いることによりマイナーな修飾部位も高感度に同定することが可能であると言える。また、第 2 章のウシ I 型コラーゲンで同定された糖鎖修飾部位は全て網羅され ($\alpha 1$ 鎖 : Lys⁸⁷、Lys⁹⁹および Lys⁶⁸⁴、 $\alpha 2$ 鎖 : Lys⁸⁷、Lys¹⁷⁴、Lys²¹⁹、Lys⁶⁴⁸および Lys⁶⁵⁷)、さらに新規修飾部位として $\alpha 1$ 鎖で Lys¹⁷⁴、Lys²¹⁹、Lys²⁷⁰、Lys⁵³¹および Lys⁶⁰³が、 $\alpha 2$ 鎖で Lys⁵³¹が同定された。全体として、正常コラーゲンと OI コラーゲンでは検出される GHL・GGHL 含有ペプチドのピーク強度に差がありそうだったが、ヒドラジド法は定量性に問題があるため単純に比較することはできない。そこで次に、より正確な定量分析のためヒドラジド法に SILAC を組み合わせ、ここで同定された各糖ペプチドの比較定量を行うことにした。

3-3-3. OI によるコラーゲン糖鎖修飾増加の部位特異的比較定量分析

SILAC とヒドラジド法を用いた分析の流れを図 3-3 に示す。SILAC による細胞培養で

のコラーゲンの安定同位体標識は、正常細胞に $^{12}\text{C}_6\text{-Lys}$ を、OI 細胞に $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$ を添加して 3 日間行った。通常、SILAC では細胞のタンパク質を完全に標識するためには 5 日間以上培養する必要がある、比較的長い時間を要する (Ong *et al.* 2002)。しかし、コラーゲンは分泌タンパク質であり速やかに代謝されることから、完全標識にそれほど長い時間は必要としなかった。実際、この 3 日間の SILAC 標識で得られた OI コラーゲンでは、未標識のトリプシン消化ペプチドは LC-MS で検出されなかった (データは省略する)。標識コラーゲンを培養上清から抽出した後、正常コラーゲンと OI コラーゲンの量を合わせて混合することにより、続くトリプシン消化やヒドラジド法での誤差を全て吸収することが可能となる。検出は LC-MS で行い、 $^{12}\text{C}_6\text{-Lys}$ 標識ペプチドと $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$ 標識ペプチドのピーク高さを比較してその相対比を算出する。

検出された GHL・GGHL 含有ペプチドのモノアイソトピック抽出イオンクロマトグラムの一例として、I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の Lys¹⁷⁴修飾ペプチドを図 3-4 に示す。正常と OI-1 で比較すると、GHL 含有ペプチドではほとんど変化ないのに対し、GGHL 含有ペプチドでは OI-1 で顕著に増加していることが示された。同様に表 3-2 で同定されていた各糖ペプチドについて、正常細胞由来コラーゲンと OI-1 または OI-2 由来コラーゲンとで比較した結果を表 3-3 に示す。I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の Lys²⁷⁰と Lys⁵³¹および I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の Lys⁵³¹を含有する糖ペプチドは、ピーク強度が定量には不十分であったため除外した。まず OI-1 では、I 型コラーゲンで GHL はいくつかの部位で正常に比べて減少した他は、すべての修飾部位で正常とほぼ変わらないという結果となった。それに対し、GGHL は全ての部位で正常に比べ 123.2~378.4%と顕著に増加していた。この I 型コラーゲンで GHL よりも GGHL が顕著に増加するという結果は、OI-2 でも同様に得られた。III 型コラーゲンでは検出することのできた修飾部位は 2 箇所しかなかったが、その中では I 型コラーゲンと同様に GGHL の増加が観察された。OI による III 型コラーゲンでの糖鎖修飾の増加も過去に報告されており (Kirsch *et al.* 1981, Kirsch *et al.* 1987)、これを裏付ける結果と

なっている。ここで得られた各部位での糖鎖修飾の変動と、表 3-1 で示されたアミノ酸分析による全体的な糖鎖修飾の変動とを比べると、GHL はアミノ酸分析では OI で少し増加傾向があるという結果であったのに対し、部位ごとでの分析ではほとんど変わらないという、やや異なる結果となった。この 2 つの分析法による結果の不一致の原因は不明であるが、OI コラーゲンでは GHL よりも GGHL が顕著に増加するという傾向はどちらの結果でも明らかであった。また、今回検出された GHL・GGHL 含有ペプチドの中で、ピーク強度の違いはあったが OI コラーゲンでのみ検出されたものは存在しなかった。

以上の結果から、OI でのコラーゲンの糖鎖修飾増加は特定の部位でのみ起こること、そしてその部位では GGHL が顕著に増加していることが示された。ここから導き出される OI コラーゲンの糖鎖修飾進行モデルを図 3-5 に示す。OI での三重らせん形成の遅延により、新生コラーゲンが翻訳後修飾酵素にさらされる時間が長くなるため、特定の Lys が Hyl、GHL そして GGHL へと修飾されていく。従って OI コラーゲンでは、一連の修飾反応の中間体である Hyl と GHL はその量がそれほど変化しないのに対し、最終産物である GGHL は蓄積していくと考えることができる。近年注目されている prolyl 3-hydroxylase 関連遺伝子の変異による OI でも、アミノ酸分析やトリプシン消化後またはヒドラジド法精製後の LC-MS 分析により、皮膚、骨および尾腱で GGHL が顕著に増加していることが報告されている (Vranka *et al.* 2010, Pokidysheva *et al.* 2013)。三重らせん形成遅延によりこれらの糖鎖修飾の増加が起きていると考えられているため、今回示された OI での糖鎖修飾進行モデルはこの新たな OI にも当てはまる可能性が高い。

Lys の水酸化、ガラクトシル化およびグルコシル化を行う lysyl hydroxylase ファミリーが特定の配列に結合することは報告されているが、未だにモチーフ配列を決定するには至っていない (Risteli *et al.* 2004)。しかし、今回明らかになった OI における特定部位のみでの糖鎖修飾の進行からも、そのモチーフ配列が存在することが示唆される。また、Lys⁸⁷、Lys¹⁷⁴、Lys²¹⁹および Lys⁵³¹では I 型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖両方で糖鎖修飾が同定され

ており、何らかの配列特異性が存在していると思われる。結合組織の物理的強度に関与するコラーゲン架橋の形成に、I型コラーゲンの Lys⁸⁷などで糖鎖修飾が大きく影響することが分かってきており (Terajima *et al.* 2014)、特定部位での糖鎖修飾に生理的意味があること、また OI での糖鎖修飾増加にも病理的意味があることが示唆される。今後、ヒドラジド法を用いて OI やその他の検体を分析することにより、この未だ全容が明らかになっていないコラーゲン O 結合型糖鎖の生体内での役割を解明する手がかりへとつながることが期待される。

3-4. 図表

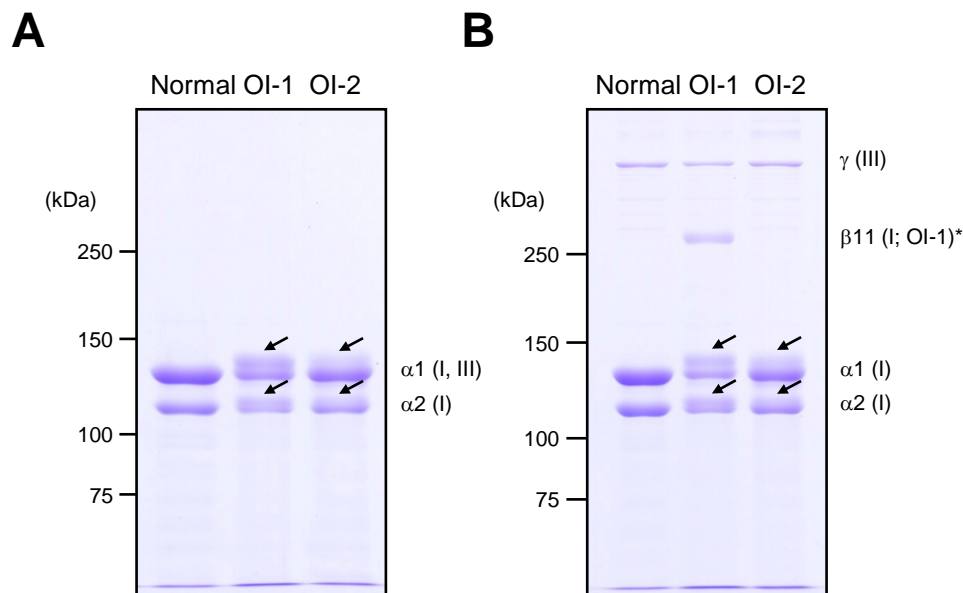


図 3-1. OI での I 型コラーゲンの SDS-PAGE における移動度の変化

正常および OI 皮膚線維芽細胞の培養上清から精製したコラーゲンを SDS-PAGE により分析した。矢印は翻訳後修飾が増加した I 型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖および $\alpha 2$ 鎖を示す。

(A) 5%ゲル、還元条件。

(B) 5%ゲル、非還元条件。

*OI-1 で検出された $\beta 11$ 鎖は、I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 946 番目の Gly から Cys へのアミノ酸置換により、ふたつの $\alpha 1$ 鎖がジスルフィド結合したものである (Kurosaka *et al.* 1994)。

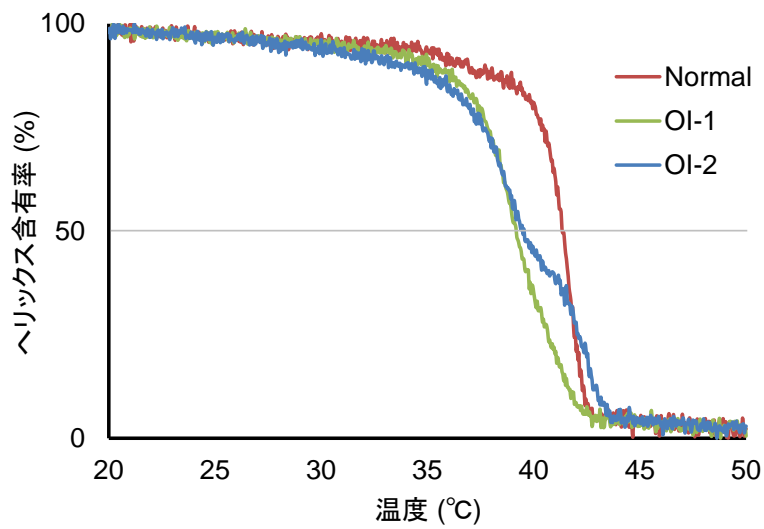


図 3-2. OI でのコラーゲン変性温度の変化

正常および OI 皮膚線維芽細胞の培養上清から精製したコラーゲンの変性温度を円二色性分散計により測定した。正常、OI-1 および OI-2 の変性温度はそれぞれ、 $41.3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、 $39.5 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ および $39.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ となった (N = 3)。

	% Hyl	% GHL	% GGHL	% 全Hyl ^a
OI-1	104.4 ± 16.3%	155.8 ± 23.3%	279.0 ± 37.5%	145.4 ± 16.0%
OI-2	93.1 ± 22.1%	105.1 ± 25.5%	176.2 ± 29.7%	126.6 ± 23.0%

^a全Hyl = Hyl + GHL + GGHL
N = 3

表 3-1. OI によるコラーゲン全体の Lys 修飾率の変動

コラーゲン 型	鎖	部位 ^a	糖鎖修飾 部位	同定ペプチド配列 ^b	m/z	z	保持 時間 (分)
I	$\alpha 1$	76-90	87	R.GLOGTAGLOGMK#GHR.G	607.62	3	14.5
		91-108	99	R.GFSGLDGAK*GDAGPAGPK.G	593.94	3	14.8
		145-183	174	R.GNDGATGAAGPOGPTGPAGPOGFOGAVGAK*GEAGPQGPR.G	894.66	4	15.4
		145-183	174	R.GNDGATGAAGPOGPTGPAGPOGFOGAVGAK#GEAGPQGPR.G	935.18	4	15.4
		193-237	219	R.GEOGPOGPAGAAGPAGNOGADGQOGAK*GANGAOGIAGAOGFOGAR.G	1015.96	4	15.4
		193-237	219	R.GEOGPOGPAGAAGPAGNOGADGQOGAK#GANGAOGIAGAOGFOGAR.G	1056.47	4	15.4
		265-290	270	K.GDTGAK*GEOGPVGVQGPAGPAGEEGK.R	852.39	3	14.3
		520-555	531	R.GANGAOGNDGAK*GDAGAOGAOGSQGAOGLQGMoger.G	851.36	4	14.7
		520-555	531	R.GANGAOGNDGAK#GDAGAOGAOGSQGAOGLQGMoger.G	891.87	4	14.7
		586-618	603	R.GLTGPIGPOGPAGAOGDK*GESGPSGPAGPTGAR.G	762.61	4	15.4
		586-618	603	R.GLTGPIGPOGPAGAOGDK#GESGPSGPAGPTGAR.G	803.13	4	15.4
		658-687	684	K.GDAGPOGPAGPAGPOGPIGNVGAOGAK*GAR.G	915.11	3	15.0
		658-687	684	K.GDAGPOGPAGPAGPOGPIGNVGAOGAK#GAR.G	969.12	3	15.0
	$\alpha 2$	76-90	87	R.GFOGTOGLOGFK#GIR.G	630.30	3	16.4
		145-192	174	R.GSDGSVGPVGPAGPIGSAGPOGFOGAOGPK*GEIGAVGNAGPAGPAGPR.G	1074.77	4	16.9
		145-192	174	R.GSDGSVGPVGPAGPIGSAGPOGFOGAOGPK#GEIGAVGNAGPAGPAGPR.G	1115.28	4	16.9
		193-237	219	R.GEVGLOGLSGVPVGPNOGANGLTGAK*GAAGLOGVAGAOGLOGPR.G	1035.77	4	17.5
		193-237	219	R.GEVGLOGLSGVPVGPNOGANGLTGAK#GAAGLOGVAGAOGLOGPR.G	1076.28	4	17.5
		520-555	531	R.GPSGPOGPDGNK*GEOGVVGA VGTAGPSGPSGLOGER.G	848.65	4	15.6
		625-651	648	R.GEVGPAGPNGFAGPAGAAGQOGAK*GER.G	857.73	3	15.1
		625-651	648	R.GEVGPAGPNGFAGPAGAAGQOGAK#GER.G	911.75	3	15.1
		655-687	657	K.GPK*GENGVVGPTGPVGAAGPAGPNGPOGPAGSR.G	757.62	4	15.3
		655-687	657	K.GPK#GENGVVGPTGPVGAAGPAGPNGPOGPAGSR.G	798.13	4	15.3
III	$\alpha 1$	85-99	96	K.GPAGIOGFOGMK#GHR.G	463.46	4	15.2
		325-342	336	R.GPAGPNGIOGEK*GPAGER.G	618.94	3	15.1

^a三重らせん開始位置を1とする。

^bOは4-Hypを、K*はGHL、K#はGGHLを示す。

表 3-2. ヒドラジド法により同定されたヒト I・III 型コラーゲンの糖鎖修飾ペプチド

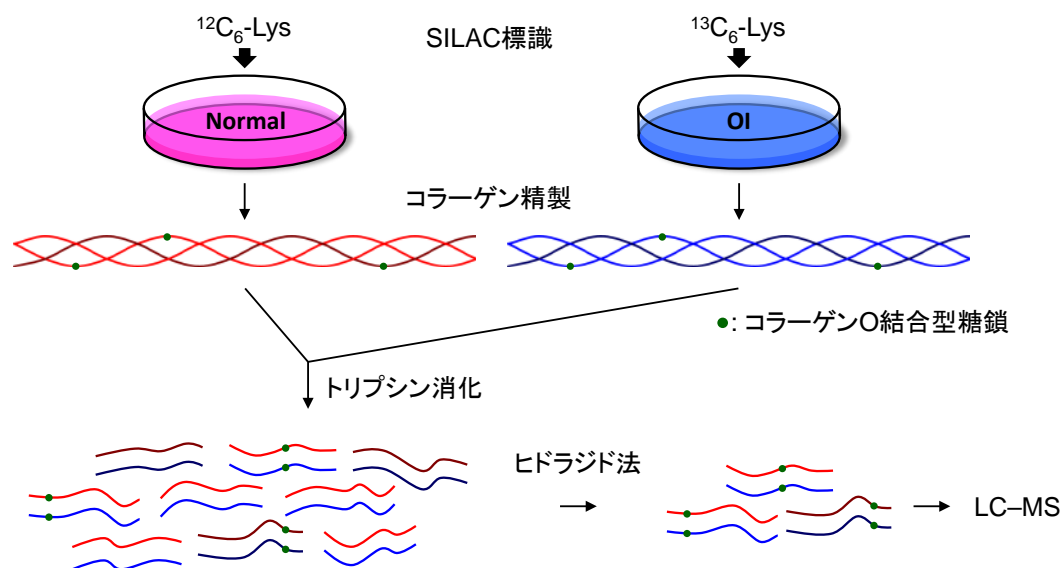


図 3-3. SILAC とヒドラジド法を用いたコラーゲン O 結合型糖鎖の部位特異的定量分析の流れ

細胞培養時に正常細胞には $^{12}\text{C}_6\text{-Lys}$ 、OI 細胞には $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$ を添加して SILAC 標識し、得られた培養上清からペプシン消化および塩析によりコラーゲンを精製する。この正常および OI コラーゲンサンプルを等量混合してトリプシン消化した後、ヒドラジド法により GHL・GGHL 含有ペプチドを精製して LC-MS 分析を行う。検出される各ペプチドの $^{12}\text{C}_6\text{-Lys}$ 標識ピークと $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$ 標識ピークのピーク高さの比から糖鎖修飾率を比較定量する。

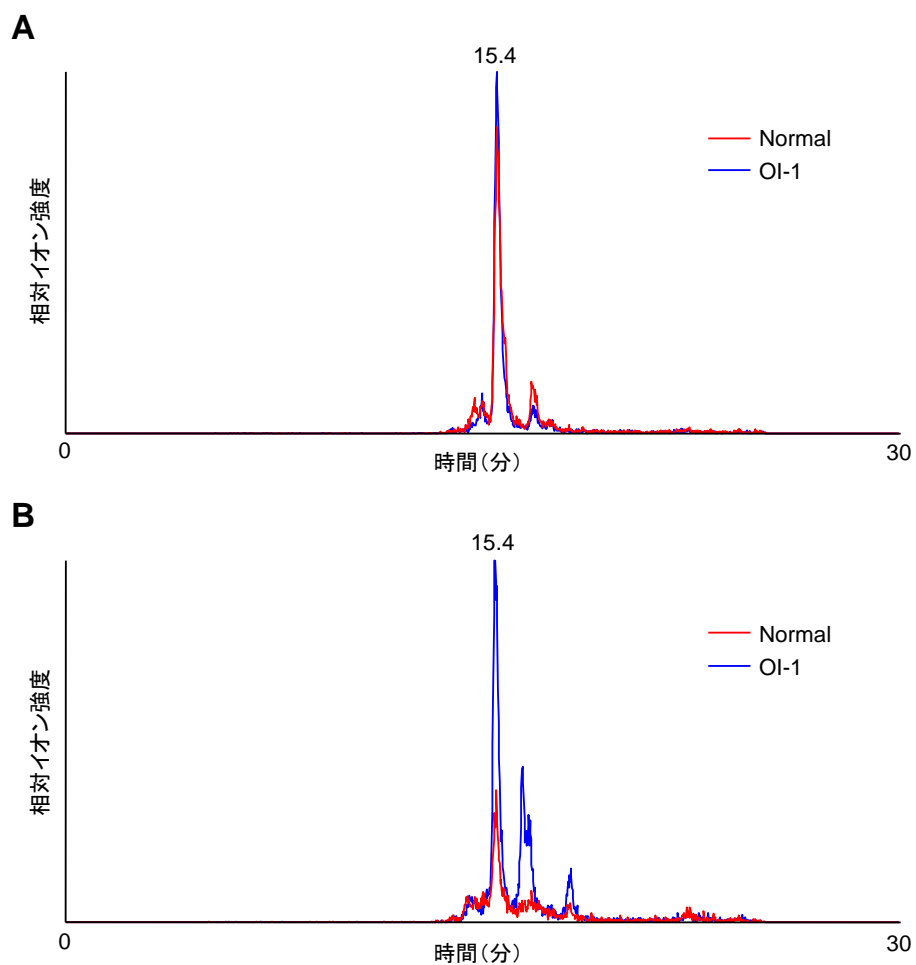


図 3-4. SILAC 標識されたコラーゲン糖鎖修飾ペプチドの抽出イオンクロマトグラム

SILAC 標識した正常および OI-1 のコラーゲンを混合してからトリプシン消化した後、ヒドラジド法により精製を行い、得られたペプチドを LC-MS で分析した。図は GNDGATGAAGPOGPTGPAGPOGFOGAVGAKGEAGPQGPR (I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖、修飾部位 : Lys¹⁷⁴) の (A) GHL 含有ペプチドおよび (B) GGHL 含有ペプチドのモノアイソトピック抽出イオンクロマトグラムである。

コラーゲン型	鎖	ペプチド配列 ^{a, b}	GHL (OI-1)	GGHL (OI-1)	GHL (OI-2)	GGHL (OI-2)	
I	$\alpha 1$	GLOGTAGLOGMK ⁸⁷ GHR	—	124.8 ± 3.2%	—	138.2 ± 3.7%	
		GFSGLDGAK ⁹⁹ GDAGPAGPK	104.1 ± 28.6%	—	110.5 ± 13.2%	—	
		GNDGATGAAGPOGPTGPAGPOGFOGAVGAK ¹⁷⁴ GEAGPQGPR	97.9 ± 34.7%	284.1 ± 39.2%	116.6 ± 32.5%	310.1 ± 16.4%	
		GEOGPOGPAGAAGPAGNOGADGQOGAK ²¹⁹ GANGAOGIAGAOGFOGAR	116.0 ± 30.6%	378.4 ± 20.6%	117.6 ± 8.7%	305.8 ± 22.0%	
		GLTGPIGPOGPAGAOGDK ⁶⁰³ GESGPSGPAGPTGAR	92.6 ± 12.8%	157.3 ± 45.5%	86.1 ± 8.8%	163.6 ± 15.3%	
		GDAGPOGPAGPAGPOGPIGNVGAOGAK ⁶⁸⁴ GAR	56.1 ± 3.7%	190.2 ± 9.6%	69.3 ± 6.3%	225.5 ± 13.3%	
	$\alpha 2$	GFOGTOGLOGFK ⁸⁷ GIR	—	123.2 ± 12.2%	—	143.0 ± 18.2%	—50
		GSDGSVGPVGPAGPIGSAGPOGFOGAOGPK ¹⁷⁴ GEIGAVGNAGPAGPAGPR	65.9 ± 21.7%	134.7 ± 27.6%	80.4 ± 18.6%	179.7 ± 29.9%	50–65
		GEVGLOGLSGPVGPOGNOGANGLTGAK ²¹⁹ GAAGLOGVAGAOGLOGPR	102.9 ± 33.8%	192.8 ± 53.4%	111.3 ± 31.2%	225.0 ± 58.1%	65–80
		GEVGPA PNGFAGPAGAAGQOGAK ⁶⁴⁸ GER	81.2 ± 25.9%	228.8 ± 30.2%	94.4 ± 9.7%	198.5 ± 32.6%	80–120
		GPK ⁶⁵⁷ GENGVVGPTGPVGAAGPAGPNGPOGPAGSR	110.1 ± 40.9%	159.1 ± 31.4%	123.5 ± 27.2%	159.4 ± 11.0%	120–150
III	$\alpha 1$	GPAGIOGFOGMK ³⁶ GHR	—	128.7 ± 8.7%	—	189.4 ± 19.4%	150–200
		GPAGPNGIOGEK ³³⁶ GPAGER	79.0 ± 10.2%	—	111.3 ± 8.5%	—	200–

^aOIは4-Hypを、太字のKは糖鎖修飾部位を示す。

^b検出感度の低いペプチドは定量対象から除外した。

N = 3

表 3-3. OI によるコラーゲンの部位ごとでの糖鎖修飾率の変動

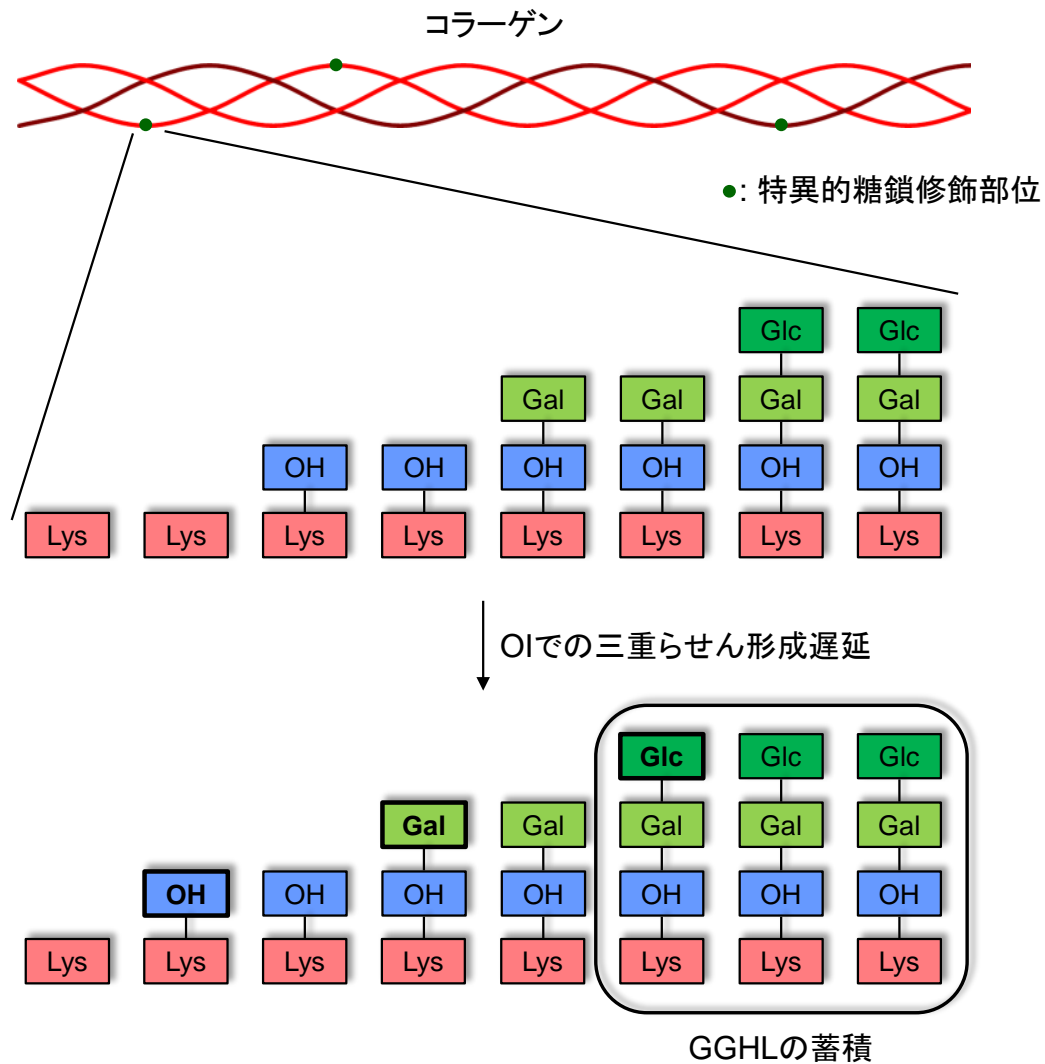


図 3-5. OI でのコラーゲン糖鎖修飾進行モデル

コラーゲンでは特定部位の Lys のみが小胞体での三重らせん形成までの間に翻訳後修飾される。その Lys 修飾は、各種酵素の作用により Lys が水酸化され Hyl へ、さらにガラクトシル化され GHL へ、そしてさらにグルコシル化されて GGHL へと進んでいき、通常、各修飾部位では Lys、Hyl、GHL および GGHL が混在している。OI では、アミノ酸変異によりコラーゲン三重らせんの形成遅延が起き、翻訳後修飾酵素に作用される時間が伸びるため特定部位での Lys 修飾が進行する。結果的に、Hyl と GHL はその量があまり変動しないのに対し、最終産物である GGHL が蓄積していくと考えられる。

第 4 章

安定同位体標識コラーゲンと これを用いた各種コラーゲン分析法の開発

4-1. 緒言

第2・3章でヒドラジド法によるコラーゲン O 結合型糖鎖 GHL・GGHL の高感度分析法を開発してきたが、コラーゲンには他に Hyl、3-Hyp および 4-Hyp という特徴的な翻訳後修飾が存在する (図 1-1)。またこれらの翻訳後修飾の他に、28 種類存在するコラーゲン型の組織内での組成もコラーゲンの質的变化に関連する要素として挙げられる。第1章で述べたように、年齢や生理的条件、疾患などに関連したこれらのコラーゲンの質的变化により、その組織の性質の変化へとつながる場合がある。OI や壊血病の他、線維症 (Seyer *et al.* 1976, Seyer *et al.* 1977, McKleroy *et al.* 2013)、がん (Shapiro and Eyre 1982, Lehmann *et al.* 1995)、糖尿病 (Kern *et al.* 1986, Abrass *et al.* 1988) などでもコラーゲンの質的異常が報告されており、それらが症状の要因の一つになっている可能性も考えられる。従って、コラーゲンの質的变化を微細なものまで正確に捉えることができれば、これまで見えていなかった新たな知見が得られるかもしれない。また、これらのパラメーターが、コラーゲン関連疾患のバイオマーカーや薬効評価系のマーカーとして利用できる可能性もある。ただし、現在用いられている分析法では、多くのコラーゲン分析で多大な作業や時間を要し、また感度や精度の面で正確な定量分析が困難な場合もある。そこで本章では、コラーゲン翻訳後修飾やコラーゲン型組成を簡便で高感度かつ高精度に定量分析するため、LC-MS を使った新たな分析法を開発することにした。

近年、LC-MS を用いることにより、I~V 型コラーゲンをトリプシン消化した後、それぞれのコラーゲン型に特有のペプチドを検出して型別定量を行った例や (Pataridis *et al.* 2008)、親水性相互作用を利用した HILIC カラムで、非常に構造の類似した 3-Hyp と 4-Hyp を分離して定量を行った例が報告されている (Langrock *et al.* 2006)。LC-MS ではこういった選択的な高感度分析が可能となるが、その一方、MS での夾雑物によるマトリックス効果や、HILIC カラムで特に顕著である LC での保持時間の変動などにより、サンプル間

でのイオン化効率の変動とそれに由来する測定誤差が引き起こされる懸念がある。この問題に対する解決策としては様々な方法が開発されているが、基本的に全て安定同位体標識法が利用されている。iTRAQ (Ross *et al.* 2004) やジメチル標識 (Hsu *et al.* 2003) などの化学修飾法を用いれば、ペプチドやタンパク質をサンプル間で異なった質量数の安定同位体で標識することができるため、その後混合して MS 分析を行うことにより、操作間および分析間誤差を補正した高精度な分析が可能となる。また、第3章で我々も利用した SILAC では、細胞培養時にタンパク質を代謝的に安定同位体標識するため、はじめの段階でサンプルを混合することができ、さらに誤差の少ない分析を行うことができる (Ong *et al.* 2002)。最近では、SILAC で標識した細胞をあらかじめ作製しておき、各サンプルにそれを内部標準として添加することにより、サンプルには標識の必要がなく組織サンプルにも利用可能な分析法も開発されている (Ishihama *et al.* 2005, Geiger *et al.* 2010)、他にも、標的が決まっている場合には、組み換えタンパク質合成系や大腸菌で目的タンパク質を安定同位体標識しながら発現させ、それを内部標準として用いる方法も開発されている (Hanke *et al.* 2008)。ただし、こういった組み換えタンパク質では翻訳後修飾されないため、翻訳後修飾分析にそのまま適用することはできない。

本研究では、翻訳後修飾を含め様々なコラーゲン分析で高精度な定量を可能とするため、内部標準として安定同位体標識コラーゲンを開発することにした。具体的には、高いコラーゲン合成能を有するヒト胎児肺線維芽 (HEL) 細胞培養時に、 $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$ 、 $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4\text{-Arg}$ および $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1\text{-Pro}$ を添加することにより、それらアミノ酸とその翻訳後修飾全てが安定同位体標識されたコラーゲンを作製する。試料コラーゲンを分析する際、はじめにこの安定同位体標識コラーゲンを内部標準として混合し、各種処理後に LC-MS で検出することにより、(1) 型別コラーゲン定量、(2) 全コラーゲン定量および (3) コラーゲン翻訳後修飾定量で高感度かつ高精度な分析を行うことができる。内部標準として高い定量精度を保証するためには、高度に安定同位体で標識されている必要があるため、本章ではまず安定

同位体標識コラーゲンの作製条件の検討を行った。次に、得られた安定同位体標識コラーゲンを用い、実際にラットの皮膚、骨および尾腱という異なった組織由来のコラーゲンを分析し、また最後に、細胞内コラーゲン取り込み能の測定など、安定同位体標識コラーゲンを用いた他の応用例も報告する。

4-2. 材料と方法

・材料

ヒト I・III 型コラーゲンおよび GHL・GGHL の標品は、それぞれヒト胎盤および海綿から精製して使用した。

・安定同位体標識コラーゲンの作製

HEL 細胞を 0.5% 透析 FBS、200 μ M アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物含有 SILAC DMEM で培養し、3 日ごとに培地の回収・交換を行った。この細胞培養時に標識のため、100 mg/L $^{13}\text{C}_6$ -Lys、100 mg/L $^{13}\text{C}_6^{15}\text{C}_4$ -Arg (Thermo Scientific) および 200 mg/L $^{13}\text{C}_5^{15}\text{C}_1$ -Pro (Cambridge Isotope Laboratories) をそれぞれ添加した。回収した培養上清に 0.1 N となるように HCl を加えてから、アガロース固定化ペプシン (SIGMA) を 0.1 mg/mL となるように添加し 4°C で 16 時間消化反応を行った。反応後、固定化ペプシンを遠心分離で除いてから、1 M となるように NaCl を加え氷上で 3 時間塩析した。16,000 $\times g$ 、4°C で 10 分間遠心分離した後、沈殿を 1 M NaCl および 95% エタノールで洗浄してから、5 mM 酢酸に溶解して安定同位体標識コラーゲン溶液を得た。

・ラット組織からのコラーゲン精製

5 週齢のオス SD ラット (日本 SLC) から皮膚、大腿骨および尾腱組織を抽出した。大腿

骨は 0.5 M EDTA (pH 7.8) 溶液中で 4℃、3 日間処理して脱灰した後、両端を切り落として除いてから液体窒素を使って粉碎した。0.5 M 酢酸溶液中で各組織サンプルを 5 mg/mL ペプシン (SIGMA) で 1 日 (皮膚および尾腱) または 3 日 (骨) 処理し、得られた抽出液から安定同位体標識コラーゲンと同様の方法で塩析によるコラーゲン精製を行った。さらに、塩析された沈殿を一度蒸留水に溶解してから Tris-HCl で pH を 8.0 に調整し、4℃で 16 時間静置してコラーゲンを等電点沈殿させた。16,000 *xg*、4℃で 10 分間遠心分離して得られた沈殿を 5 mM 酢酸に溶解した。

・コラーゲンの各種絶対値の算出

コラーゲンサンプルの酸・アルカリ加水分解は第 2 章と同様の方法で行った。安定同位体標識コラーゲン、ラット組織コラーゲンおよびヒト I・III 型コラーゲンを酸加水分解後、アミノ酸分析機 L-8900 (日立) で分析し、得られたアミノ酸量の合計からそれぞれコラーゲン量を算出した。安定同位体標識コラーゲンについてはアルカリ加水分解も加えて行い、各標識アミノ酸はアミノ酸分析機で分析し、標識 3-Hyp および標識 GHL・GGHL は *trans*-3-hydroxy-L-proline (SIGMA) および GHL・GGHL 標品をそれぞれ内部標準として後に記す条件で MRM 分析し、そのアミノ酸組成 (残基/1000 アミノ酸残基) を算出した。

安定同位体標識コラーゲンに含まれる I・III 型コラーゲン量は、ヒト I・III 型コラーゲンを内部標準として添加してから、後に記す条件でトリプシン消化と MRM 分析を行うことにより、マーカーペプチドの標識/未標識ピーク面積比から算出した。

・安定同位体標識コラーゲンをを用いた全コラーゲン定量

ラットコラーゲンサンプルに安定同位体標識コラーゲンをコラーゲン量としておおよそ 5:1 となるように添加し、酸加水分解を行った。得られた加水分解サンプルを 0.1%酢酸、

5 mM 酢酸アンモニウム／50%アセトニトリルに溶解して MRM 分析による測定を行い、未標識および標識 4-Hyp の定量を行った (MRM チャンネルは表 4-1 に示す)。このとき、ZIC-HILIC カラム (粒子径 3.5 μm 、長さ 150 mm、直径 2.1 mm; Merck SeQuant) を使って流速 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、以下のグラジエント条件でサンプル分離を行った。0–5 分 : 90%移動相 B (100%アセトニトリル)、5–20 分 : 10–95%移動相 A (0.1%酢酸／5 mM 酢酸アンモニウム)、20–25 分 : 95%移動相 A、25–30 分 : 90%移動相 B。MRM 分析の各種設定は Analyst 1.5.2 ソフトウェア (AB Sciex) で最適化したものを使用した。サンプルの全コラーゲン量は、4-Hyp と $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -4-Hyp のピーク面積比と安定同位体標識コラーゲンのコラーゲン量から算出した。

・安定同位体標識コラーゲンをを用いた型別コラーゲン定量

ラットコラーゲンサンプルに安定同位体標識コラーゲンをコラーゲン量としておおよそ 5 : 1 となるように添加した。サンプルを 1 mM CaCl_2 含有 100 mM Tris-HCl (pH 7.6) 溶液中で 60°C、30 分間処理して変性させた後、トリプシン (Promega) をサンプルの 1/100 量添加して 37°C で 16 時間分解反応を行った。分解溶液をギ酸で酸性にしてから MRM 分析に供し、スケジュール MRM アルゴリズム (AB Sciex) で I・III 型コラーゲン由来の未標識および標識トリプシン消化ペプチドの定量を行った。このとき Ascentis Express C18 HPLC カラム (粒子径 5 μm 、長さ 150 mm、直径 2.1 mm; Supelco) を使い、流速 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、以下のグラジエント条件でサンプル分離を行った。0–2 分 : 98%移動相 A (0.1%ギ酸)、2–6 分 : 2–60%移動相 B (100%アセトニトリル)、6–8 分 : 90%移動相 B、8–10 分 : 98%移動相 A。サンプルの I・III 型コラーゲン量は、I 型および III 型コラーゲンそれぞれのマーカールペプチド (表 4-2 に示す) の未標識／標識ピーク面積比と安定同位体標識コラーゲンの I・III 型コラーゲン量から算出した。

・安定同位体標識コラーゲンをを用いた翻訳後修飾定量

ラットコラーゲンサンプルに安定同位体標識コラーゲンをコラーゲン量としておおよそ 5 : 1 となるように添加した。酸・アルカリ加水分解を行った後、サンプルを 0.1%酢酸、5 mM 酢酸アンモニウム／50%アセトニトリルに溶解し、上記 4-Hyp と同様の方法で MRM 分析によりアミノ酸および翻訳後修飾の定量を行った (MRM チャンネルは表 4-1 に示す)。Pro、Lys およびその翻訳後修飾量の相対値は次の式で算出した：(未標識ピーク面積／標識ピーク面積)／(未標識 Arg ピーク面積／標識 Arg ピーク面積)。また、その相対値と安定同位体標識コラーゲンに含まれる各アミノ酸・翻訳後修飾のアミノ酸組成量から、それぞれの絶対量を算出した。

・安定同位体標識コラーゲンをを用いたその他の分析

コラーゲンの細胞内取り込み能の測定は、過去の方法を一部改変して行った (Jurgensen *et al.* 2011)。HEL 細胞を 48 ウェルプレートに 2×10^4 個／ウェルとなるように播種し、10%FBS 含有 DMEM で 37°C、24 時間培養した。細胞を 20mM HEPES、15 mg/mL BSA (SIGMA) 含有 DMEM で一度洗浄した後、同培地を再度加えて 37°C で 30 分間培養した。このとき、一部の群には 10 μ M のリソソームシステインプロテアーゼ阻害剤 E-64d (Merck Millipore) を加えた。続けて、安定同位体標識コラーゲンまたは 60°C、30 分間加熱しておいた変性安定同位体標識コラーゲンを 5 μ g/mL となるように添加し、さらに 37°C で 5 時間培養した。PBS で洗浄した後トリプシン／EDTA 処理で細胞を回収して、これを酸加水分解に供した。MRM 分析により検出された $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -4-Hyp ピーク面積から、安定同位体標識コラーゲンの細胞内取り込み率を算出した。

安定同位体標識コラーゲンの分解物を内部標準として用いる分析例として、PBS 中での 4-Hyp の分析を行った。等量の 4-Hyp (*trans*-4-hydroxy-L-proline ; SIGMA) を、10×PBS (SIGMA) から希釈して調製した 0.1×PBS、0.2×PBS、0.5×PBS、1×PBS および蒸留

水に溶解し、ここにあらかじめ酸加水分解しておいた安定同位体標識コラーゲンを添加した。これを Discovery HS F5 HPLC カラム（粒子径 5 μm 、長さ 250 mm、直径 4.6 mm; Supelco）を用いた MRM 分析に供し、4-Hyp および $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -4-Hyp の定量を行った。

4-3. 結果と考察

4-3-1. 安定同位体標識コラーゲンの作製方法の検討

まず、高度に安定同位体標識されたコラーゲンを作製するため、細胞培養でのコラーゲンの安定同位体標識方法および培養上清からの精製方法の検討を行った。安定同位体標識コラーゲンの作製手順を図 4-1A に示す。アスコルビン酸存在下でコラーゲンを盛んに合成する HEL 細胞の培養時に、 $^{13}\text{C}_6$ -Lys、 $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -Arg および $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -Pro を添加することにより、コラーゲンが代謝的に安定同位体標識されながら培養上清に分泌される。コラーゲンはその三重らせん構造によりペプシン耐性を持つため、ペプシン消化とその後の塩析により簡単に精製することができる。このとき、他のタンパク質の僅かな混入も避けるため、培地の血清濃度を 0.5% まで下げ、さらにアガロースビーズに固定化されたペプシンを培養上清の消化に使うことにした。以上のような手順により、I 型コラーゲンを主要成分とし、III 型コラーゲンが約 10% 含まれた高純度な安定同位体標識コラーゲンを得ることができた（図 4-1B）。

哺乳動物細胞では、Pro は Arg または Glu から代謝的に変換される（図 4-2）(Adams and Frank 1980)。従って、安定同位体標識 Pro を細胞培養時に添加しても、コラーゲン中 Pro および Hyp の高い安定同位体標識が達成されない恐れがある。過去の報告で、Arg から Pro への変換が 200 mg/L の Pro を添加することにより抑えられた例や (Bendall *et al.* 2008, Lossner *et al.* 2011)、Pro の添加により Glu から Pro への変換が抑えられた例がある (Eagle *et al.* 1965)。そこで我々は、安定同位体標識 Pro の添加量によるコラーゲン中

Pro・Hyp の標識率への影響を調べることにし、さらに培地中の Gln による Glu から Pro への変換への影響も同時に評価した (図 4-3)。Pro および Hyp の安定同位体標識率は、培養 1-4 日目ではやや低かったが 4-7 日目以降は安定していたため、ここでは 4-7 日目の値で評価した。結果としては、Pro および Hyp どちらにおいても、添加 $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -Pro 量を 50、200 または 350 mg/L としたとき、その添加濃度に依存して標識率は向上した。さらに、Gln を添加しないと、添加 $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -Pro 量にかかわらず標識率が向上することも観察された。以上より、Pro の添加と Gln の非添加により Arg および Glu から Pro への変換が抑えられ、それによって安定同位体標識 Pro のコラーゲンへの導入効率が向上することが明らかとなった。またこのとき、Pro および Gln の添加量がコラーゲン合成量に影響しないことも確認された (図 4-4)。Pro・Hyp の標識率が最も高いのは 350 mg/L の $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -Pro を添加したときだったが、Gln 非添加の場合で比べると、200 mg/L に対して大きくは向上していなかったため、コストとの兼ね合いで以降は 200 mg/L の $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -Pro 添加かつ Gln 非添加の条件を使用することにした。

次に、実際に安定同位体標識コラーゲンを作製するため、HEL 細胞に 100 mg/L $^{13}\text{C}_6$ -Lys、100 mg/L $^{13}\text{C}_6^{15}\text{C}_4$ -Arg および 200 mg/L $^{13}\text{C}_5^{15}\text{C}_1$ -Pro を添加して培養し、4-7 日目の培養上清からコラーゲンを精製した。この安定同位体標識コラーゲンに含まれる各アミノ酸の標識率および含有組成を表 4-3 に示す。Pro、Lys、Arg およびコラーゲン翻訳後修飾全てで安定同位体標識率が約 95%以上と、非常に高度に標識された安定同位体標識コラーゲンを作製することができた。このことは、これらの安定同位体標識コラーゲン由来アミノ酸の MRM クロマトグラムからも明らかである (図 4-5)。また、安定同位体標識コラーゲンのアミノ酸組成はヒト I 型コラーゲンとほぼ同一であることが確認された (Seyer *et al.* 1976, Miller and Gay 1982)。100 mm ディッシュ 1 枚で HEL 細胞を 3 日間培養したときに産生される安定同位体標識コラーゲンの全コラーゲン量は、全アミノ酸の合計から $23.6 \pm 2.7 \mu\text{g}$ となった。また、コラーゲン標品を内部標準として用いたトリプシン消化ペプチ

ドの MRM 分析の結果から、I 型コラーゲンおよび III 型コラーゲン量はそれぞれ $18.3 \pm 1.6 \mu\text{g}$ および $1.7 \pm 0.4 \mu\text{g}$ と算出された。このように安定同位体標識コラーゲンの各種絶対値を決定することにより、次の型別コラーゲン定量、全コラーゲン定量およびコラーゲン翻訳後修飾定量における絶対定量が可能となる。この 3 日間の培養によって作製される安定同位体標識コラーゲンで、全コラーゲン定量では 1000 サンプル以上、型別コラーゲン定量およびコラーゲン翻訳後修飾定量では 25 サンプル以上の分析を行うことができる。また、安定同位体標識コラーゲンは HEL 細胞の培養上清の回収・交換により連続して作製することができるため、大量調製も比較的簡単に行うことが可能である。

4-3-2. 安定同位体標識コラーゲンをを用いたコラーゲン分析方法

安定同位体標識コラーゲンをを用いた分析の流れを図 4-6 に示す。まず、組織または培養細胞から精製してきたコラーゲンサンプルに、安定同位体標識コラーゲンを内部標準として混合する。続いて、(1) 型別コラーゲン定量のためにはトリプシン消化、(2) 全コラーゲン定量のためには酸加水分解、そして (3) コラーゲン翻訳後修飾定量のためには酸・アルカリ加水分解を行い、得られたペプチドまたはアミノ酸をそれぞれ C18 カラムまたは HILIC カラムを用いて分離し MRM 分析で検出する。サンプル由来の未標識ピーク面積と対応する安定同位体標識コラーゲン由来の標識ピーク面積の比から、それぞれの定量値を算出する。このとき、全コラーゲン定量およびコラーゲン翻訳後修飾定量で用いられる 4-Hyp の測定において、安定同位体標識コラーゲンとコラーゲンサンプルの量比が 1 : 300 から 30 : 1 の間で、バックグラウンドの有無に関わらず高い精度と直線性があることが確認された (図 4-7)。以降の実験では検出感度とコストとの兼ね合いから、この量比を 1 : 5 となるように安定同位体標識コラーゲンを添加して使用することにした。

コラーゲン翻訳後修飾定量では、Hyl、GHL および GGHL はアルカリ加水分解、3-Hyp、4-Hyp、全 Hyl (Hyl + GHL + GGHL) および他のアミノ酸は酸加水分解を用いて分析を行

う。コラーゲン中の Arg は翻訳後修飾されないため、これをコラーゲン量の補正に用いることにし、以下の式で翻訳後修飾量の相対値を算出する：(未標識ピーク面積／標識ピーク面積)／(未標識 Arg ピーク面積／標識 Arg ピーク面積)。絶対量を算出する場合は、これに安定同位体標識コラーゲンの各アミノ酸組成を乗ずる。翻訳後修飾分析ではアミノ酸加水分解するため、夾雑タンパク質が存在していると各アミノ酸の由来をコラーゲンサンプルと区別できず、正確な定量を行うことができない。特に Arg はコラーゲン量補正に用いるため、他のタンパク質由来の Arg が入っていると全てのアミノ酸の算出値に影響してしまう。従って翻訳後修飾分析のためには、安定同位体標識コラーゲンとコラーゲンサンプルどちらも高い純度で調製することが必要となる。

型別コラーゲン定量で用いる I 型および III 型コラーゲンのマーカーペプチドの選択は、定量精度を保証するのに重要である。X-Y-Gly 配列の Y に位置する Lys は Hyl や GHL・GGHL へと修飾される可能性があり、由来が異なるサンプルでも安定して定量するためにはこの部位で切断されたペプチドは除外するのが望ましい。さらに、動物種間で同一の配列となるペプチド部位を選ぶことにより、ヒト由来の安定同位体標識コラーゲンで様々な動物種のコラーゲンを定量することが可能となる。また、安定同位体標識部位を 2 つ以上含有するペプチドを選べば、安定同位体標識率が飛躍的に高くなるため、分析誤差をさらに低減することができる。以上の基準により、ここでは I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖、I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖および III 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖でそれぞれ 2 つずつマーカーペプチドを選択し、各ペプチドで 2 チャンネルずつ MRM チャンネルを設定した (表 4-2)。これらを用いれば、ヒト、マウスおよびラット (I 型コラーゲンはさらにウシ) 由来の I・III コラーゲンが定量可能であり、他の動物種を分析する場合は適宜ペプチドを選ぶことにより対応できる。また、I・III 型コラーゲン以外のコラーゲン型も、それに応じたコラーゲン産生細胞を用いて安定同位体標識コラーゲンを作製することにより分析可能であると考えられる。

4-3-3. ラット皮膚、骨および尾腱コラーゲンの分析

安定同位体標識コラーゲンを用いた分析の精度を評価するため、実際に SD ラットの皮膚、骨および尾腱から抽出したコラーゲンサンプルの分析を行った。まず、20 μg のコラーゲンサンプルに安定同位体標識コラーゲンを添加してから、一部を酸加水分解、残りをトリプシン消化して全コラーゲン定量および型別コラーゲン定量を行った。その結果、図 4-8 に示されるように、全てのコラーゲンサンプルで全コラーゲン量および型別コラーゲン量 (I 型コラーゲン量と III 型コラーゲン量の合計) が 20 μg に非常に近似する測定値となり、その高い定量精度が確認された。さらに、骨では全体の 0.5%、尾腱では全体の 1.3% しか存在しない III 型コラーゲンを検出・定量することができた。骨や腱の III 型コラーゲンの分析は、その存在量の少なさから検出すること自体が非常に難しく (von der Mark 1981)、過去の LC-MS を用いた文献でも達成されていなかったが (Pataridis *et al.* 2008)、安定同位体標識コラーゲンと最適化された MRM 分析によりそれが可能となった。

次に、安定同位体標識コラーゲンを用いて各組織コラーゲンの翻訳後修飾分析を行った。組織間での相対定量の結果を図 4-9 に、絶対定量の結果を表 4-4 に示す。この分析により、各翻訳後修飾の由来組織の違いによる顕著な差が観察された。例えば、Pro や 4-Hyp は皮膚と尾腱でほとんど変わらなかったが、3-Hyp では皮膚に比べて尾腱で 462.3% という高い値となった。また、尾腱の GHL および GGHL はそれぞれ皮膚の 30.3% および 17.4% となり、それに対応して Hyl は皮膚の 159.7% という結果となった。他の翻訳後修飾も含め、本分析法で得られた結果は過去の文献で報告されたものと非常に一致していることが確認された (表 4-4) (Spiro 1969, Stoltz *et al.* 1973)。これまでに SILAC などの安定同位体標識法と質量分析を用いてタンパク質翻訳後修飾を分析した報告は多数あったが、それらは全てその修飾部位を含む酵素消化ペプチドでの定量であり、アミノ酸加水分解によりタンパク質全体の翻訳後修飾として分析した例は本法が初めてである。ペプチドとしての分析では翻訳後修飾の部位情報を得ることができる一方、情報量も多くなりそのデータ処理に

時間がかかる。多検体のスクリーニングなどでは、こういった単純かつ堅牢な分析システムが非常に効果を発揮すると考えられる。

本章では、安定同位体標識コラーゲンを用いた新規分析法により、I型コラーゲンを主要成分とする皮膚、骨および尾腱サンプルで比較を行い、3種のコラーゲン分析において高い定量精度と有用性が示された。ただし、今回作製した安定同位体標識コラーゲンによる型別コラーゲン定量では、I・III型コラーゲンのみしか定量することはできない。また、コラーゲン型間で翻訳後修飾量が大きく異なる場合があるため、コラーゲン型組成に大きな差がある組織間でのコラーゲン翻訳後修飾定量には注意が必要である。他の課題としては、組織サンプルの分析にはコラーゲンを可溶化する必要がある点が挙げられる。組織中に存在するコラーゲン全てを抽出・可溶化することは困難であり、その抽出効率がサンプル間で異なる可能性があるため、特にコラーゲン定量では抽出工程が結果に大きく影響する懸念がある。従って、現状ではあくまで組織から抽出されたコラーゲンでの分析という前提となる。今後、組織全体としてのコラーゲン定量が求められる場面も想定されるため、この課題を解決できるようにメソッド開発を進めていく。細胞の培養上清サンプルの場合はすでにコラーゲンが溶解しているため、そのまま安定同位体標識コラーゲンを添加すれば、ペプシン消化以降の処理を内部標準存在下で行うことができる。

4-3-4. その他の応用例

ここまでで、安定同位体標識コラーゲンを用い3種のコラーゲン定量分析法を開発してきたが、この新規ツールは様々なコラーゲン分析に応用可能である。例えば、細胞のコラーゲン取り込み能の測定は放射性同位体標識コラーゲンや蛍光標識コラーゲンを用いて行われてきたが (Madsen *et al.* 2007)、その分析に安定同位体標識コラーゲンを代用することができる。検出に専用の施設も必要なく、また標識部位が他の標識法に比べて圧倒的に多いため、より正確な測定値を得られることが期待される。実際に安定同位体標識コラー

ゲンを用いて測定を行い、コラーゲン変性およびリソソームシステインプロテアーゼ阻害剤の添加による細胞内取り込み率の増大が観察され、これまでの報告と一致する結果を確認することができた (図 4-10)。

安定同位体標識コラーゲンをそのままコラーゲンサンプルに添加すれば、MS 分析での測定誤差の他、トリプシン消化やアミノ酸加水分解など全ての操作誤差も補正することができるが、ある種の測定対象サンプルは既にアミノ酸やペプチドの形となっていることがある。そういった場合には、安定同位体標識コラーゲンをあらかじめ分解しておき、それを混合することにより、その後の操作および MS での内部標準として用いることができる。実際、4-Hyp を MRM 分析する際、サンプルが PBS 中に溶解されているとイオン化抑制により検出ピーク強度が低くなるが、安定同位体標識コラーゲンを酸加水分解してから添加することにより、 $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -4-Hyp による補正で正確な定量が可能であることが確認された (図 4-11)。そこで次章では、正確な定量に課題のあった血中 Hyp 含有ペプチド測定のため、安定同位体標識コラーゲンの酸または酵素分解物を用いた分析法を開発し、コラーゲンペプチド経口摂取後の各種 Hyp 含有ペプチドの血中濃度測定を行うことにした。

4-4. 図表

	Q1	Q3	CE
Pro	116.1	70.0	21
$^{13}\text{C}_5\text{ }^{15}\text{N}_1\text{-Pro}$	122.1	75.0	21
Hyp	132.1	86.1	19
$^{13}\text{C}_5\text{ }^{15}\text{N}_1\text{-Hyp}$	138.1	91.1	19
Lys	147.1	84.2	23
$^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$	153.1	89.2	23
Hyl	163.0	128.2	15
$^{13}\text{C}_6\text{-Hyl}$	169.0	134.2	15
GHL	325.1	128.1	33
$^{13}\text{C}_6\text{-GHL}$	331.1	134.1	33
GGHL	487.2	128.1	45
$^{13}\text{C}_6\text{-GGHL}$	493.2	134.1	45
Arg	175.1	70.2	33
$^{13}\text{C}_6\text{ }^{15}\text{N}_4\text{-Arg}$	185.1	75.2	33

表 4-1. アミノ酸およびコラーゲン翻訳後修飾の MRM チャンネル

コラーゲン型	鎖	部位 ^a	ペプチド配列 ^b	チャンネル	Q1	Q3	動物種
I	α 1	508–519	GVQG P OG P AG P R	未標識-1	553.28	764.41	ヒト、ウシ、マウス、ラット
				標識-1	570.28	798.41	
				未標識-2	553.28	821.43	
				標識-2	570.28	855.43	
		781–789	GVVG L OG R	未標識-1	449.75	473.25	ヒト、ウシ、マウス、ラット
				標識-1	457.75	489.25	
				未標識-2	449.75	643.35	
				標識-2	457.75	659.35	
	α 2	375–386	EG P V G LO G ID G R	未標識-1	591.80	630.32	ヒト、ウシ、マウス、ラット
				標識-1	602.80	646.32	
				未標識-2	591.80	800.43	
				標識-2	602.80	816.43	
		907–915	G PS G P Q G IR	未標識-1	434.73	570.34	ヒト、ウシ、マウス、ラット
				標識-1	445.73	586.34	
				未標識-2	434.73	714.39	
				標識-2	445.73	730.39	
III	α 1	142–153	G RO G LO G AAG R	未標識-1	556.29	615.32	ヒト、ウシ、マウス、ラット
				標識-1	572.29	631.32	
				未標識-2	556.29	898.47	
				標識-2	572.29	920.47	
		790–801	GLAG P OG M OG P R	未標識-1	569.78	442.24	ヒト、マウス、ラット
				標識-1	586.78	464.24	
				未標識-2	569.78	743.35	
				標識-2	586.78	771.35	

^a三重らせん開始位置を1とする。

^b**P**、**O**および**R**は安定同位体標識部位を示す。

表 4-2. I・III 型コラーゲンのマーカーペプチド

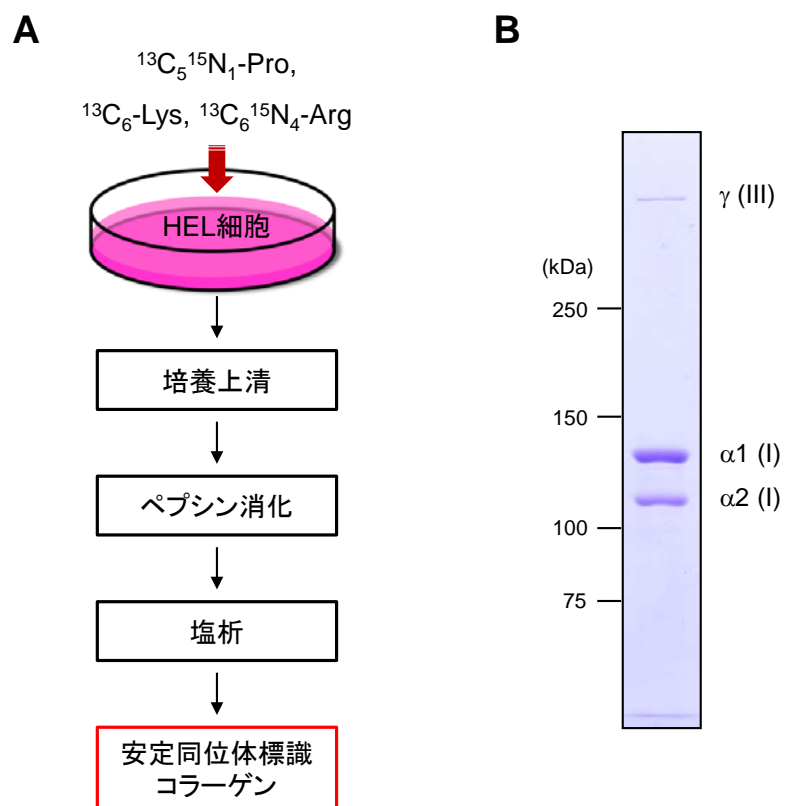


図 4-1. 安定同位体標識コラーゲンの作製

(A) HEL 細胞を用いた安定同位体標識コラーゲンの作製手順。

(B) 安定同位体標識コラーゲンの SDS-PAGE 図（5%ゲル、非還元条件）。

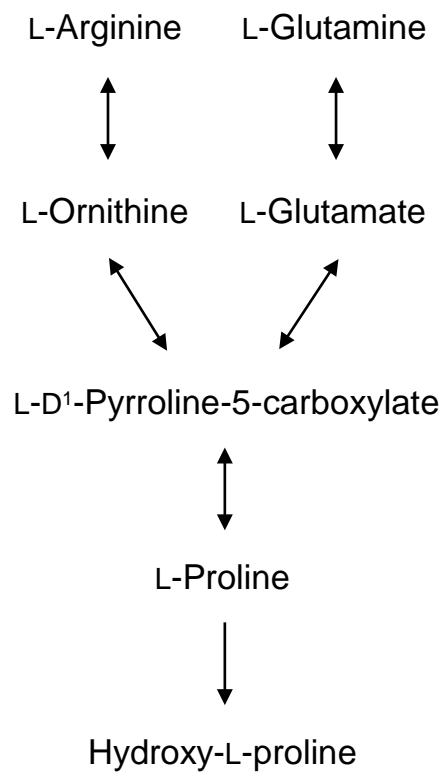


図 4-2. プロリン代謝経路

細胞内での Arg および Glu（または Gln）から Pro への変換経路を示す。Hyp は、リボソームでコラーゲンの翻訳が開始されてから小胞体で三重らせんを形成するまでの間に、ペプチド配列中の Pro が水酸化されて生成する。

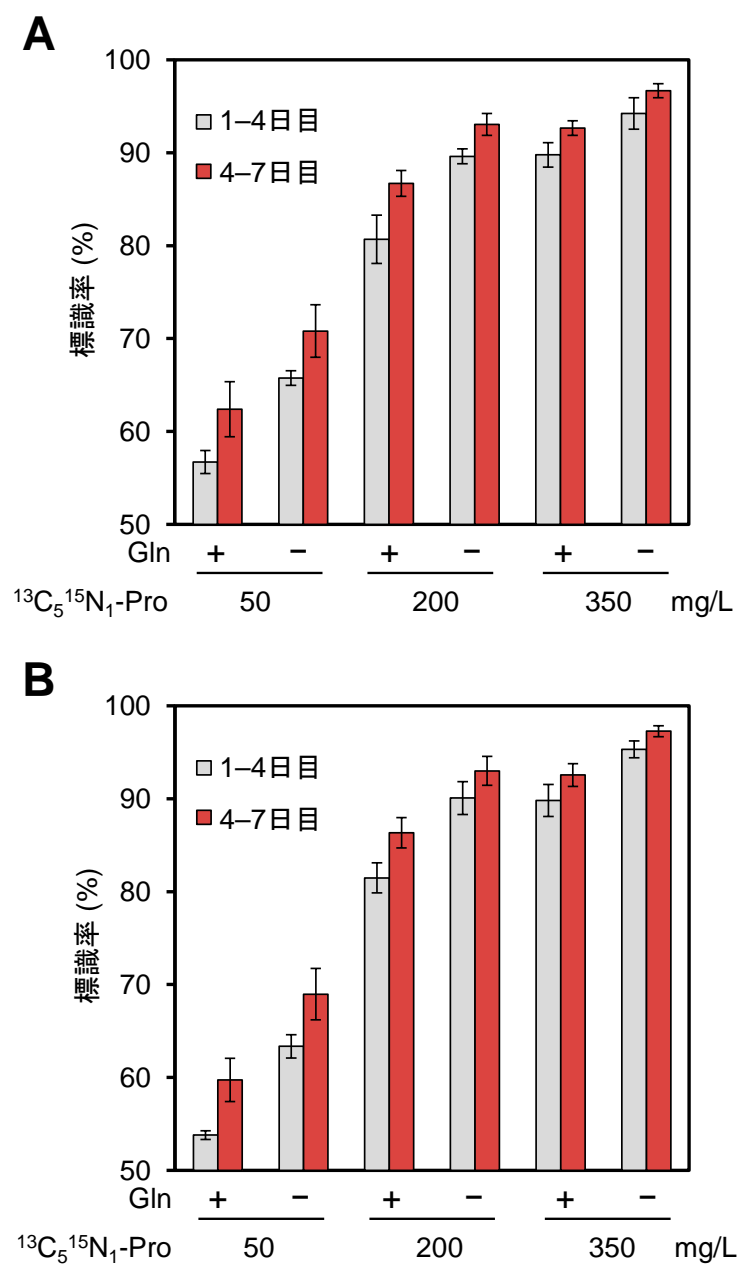


図 4-3. 安定同位体標識コラーゲンの標識条件検討

HEL 細胞を 300 mg/L の Gln 添加または非添加、かつ 50、200 または 350 mg/L の $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1\text{-Pro}$ 添加条件で培養し、得られた精製コラーゲンを酸加水分解後 MRM 分析に供して、標識ピーク/(未標識ピーク + 標識ピーク) の面積比から (A) Pro および (B) 4-Hyp の安定同位体標識率を算出した (N = 3)。

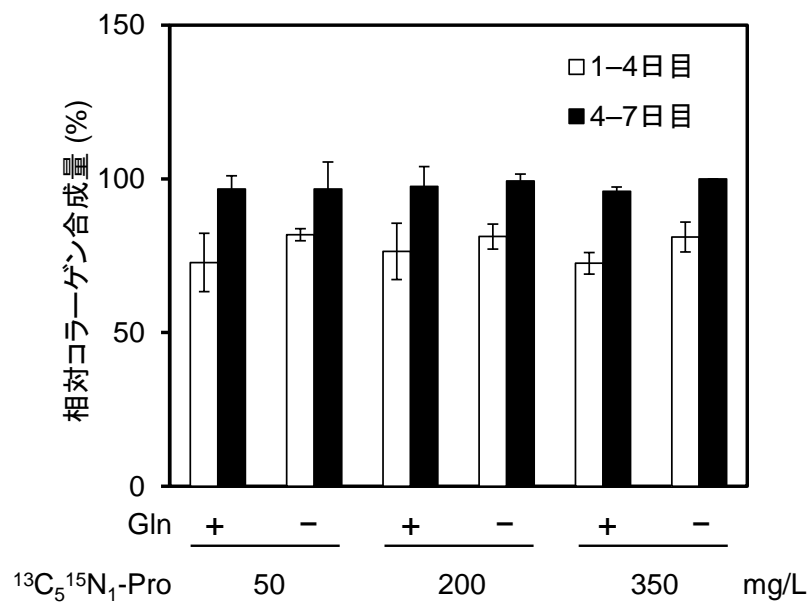


図 4-4. 添加 Pro・Gln 量とコラーゲン合成量

図 4-3 で MRM 分析により検出された標識および未標識 4-Hyp のピーク面積を合計し、これを合成コラーゲン量の指標として比較した (N = 3)。結果は 4-7 日目の 350 mg/L $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1\text{-Pro}$ 添加かつ Gln 非添加のサンプルを 100%としたときの相対比で表す。

	標識率 (%)			残基／1000残基
Pro	97.6	±	0.2	104.8
3-Hyp	97.3	±	0.1	1.8
4-Hyp	97.6	±	0.2	100.8
Lys	94.8	±	0.4	23.8
Hyl	96.6	±	0.3	9.7
GHL	96.7	±	0.7	0.6
GGHL	96.5	±	0.3	1.4
Arg	98.1	±	0.3	47.9

N = 3

表 4-3. 安定同位体標識コラーゲンの標識率とアミノ酸組成

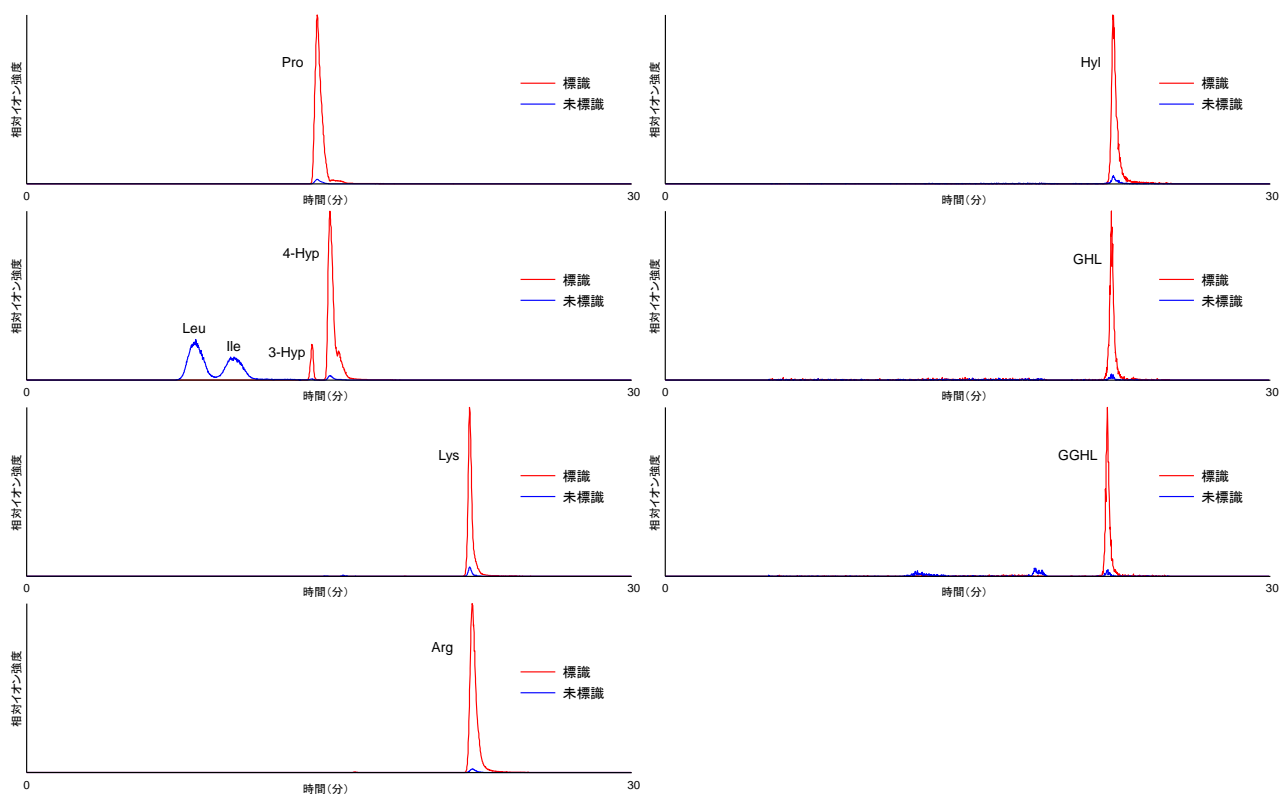
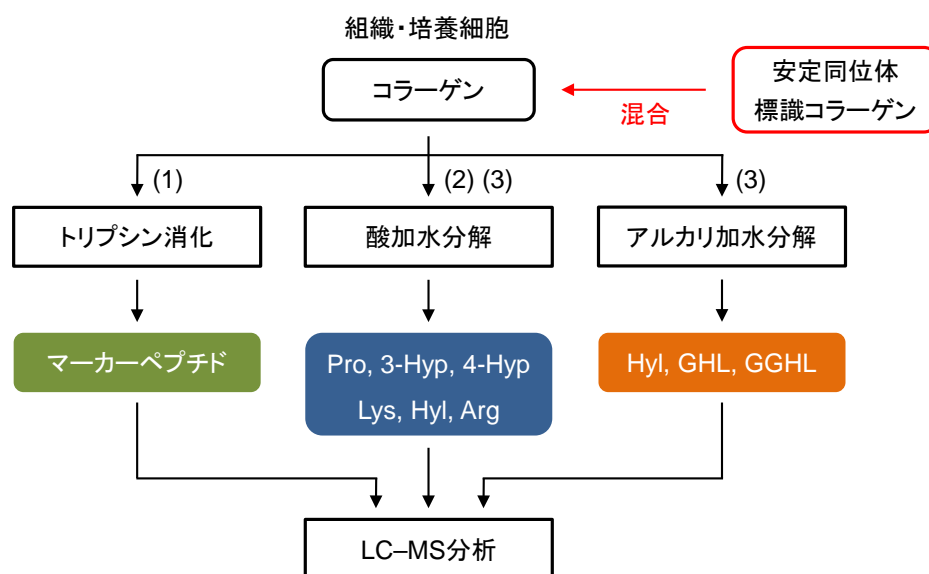


図 4-5. 安定同位体標識コラーゲン由来アミノ酸の MRM クロマトグラム

安定同位体標識コラーゲンを酸またはアルカリ加水分解して生じた Pro、Lys、Arg およびコラーゲン翻訳後修飾の MRM クロマトグラムを示す。



- (1) 型別コラーゲン定量: マーカーペプチド (2) 全コラーゲン定量: 4-Hyp
 (3) コラーゲン翻訳後修飾定量: Pro, 3-Hyp, 4-Hyp, Lys, 全Hyl, Arg, Hyl, GHL, GGHl

図 4-6. 安定同位体標識コラーゲンを用いたコラーゲン分析の流れ

安定同位体標識コラーゲンをコラーゲンサンプルに添加し、これをトリプシン消化または酸・アルカリ加水分解した後 LC-MS を用いた (1) 型別コラーゲン定量、(2) 全コラーゲン定量または (3) コラーゲン翻訳後修飾定量を行う。その際、安定同位体標識コラーゲン由来のペプチドまたはアミノ酸を内部標準として用いる。

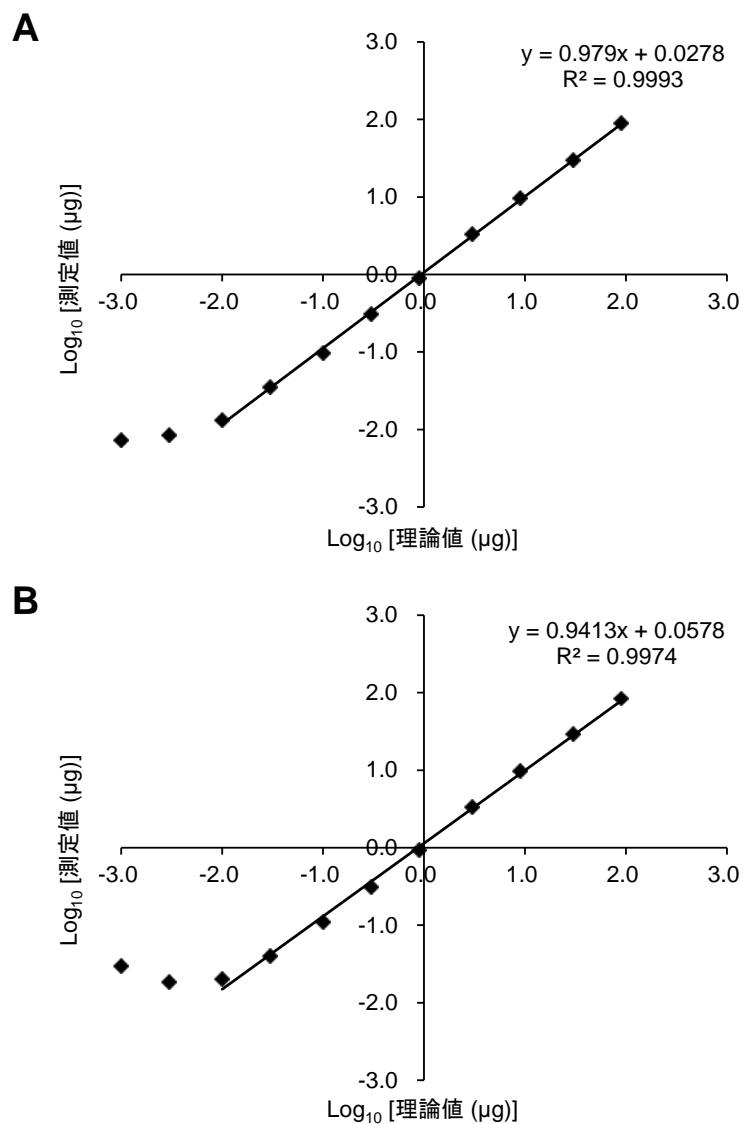


図 4-7. 安定同位体標識コラーゲンを用いた定量分析の精度と直線性

安定同位体標識コラーゲン 0.3 μg に対し、ラット尾腱コラーゲンを 300 : 1 から 1 : 300 の比となるように混合した。4-Hyp を含まないオボアルブミン (GE Healthcare) 1 μg の (A) 非添加条件または (B) 添加条件で酸加水分解を行い、遊離した 4-Hyp を MRM 分析により定量した。得られた 4-Hyp/ $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -4-Hyp ピーク面積比からコラーゲン量を算出し、測定値の理論値に対する相関性をプロットした。

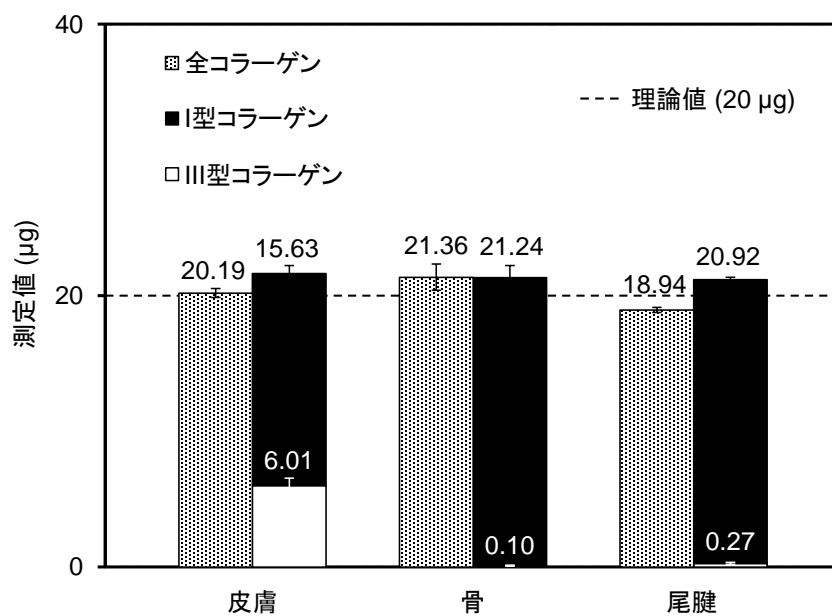


図 4-8. ラット組織別コラーゲンの全コラーゲンおよび型別コラーゲン定量

SD ラットの皮膚、骨および尾腱由来コラーゲン 20 µg に安定同位体標識コラーゲンを添加し、そのうち 1/10 量を酸加水分解して全コラーゲン定量 (4-Hyp) に、残りをトリプシン消化して I・III 型コラーゲンの型別定量 (マーカーペプチド) に供した (N = 3)。

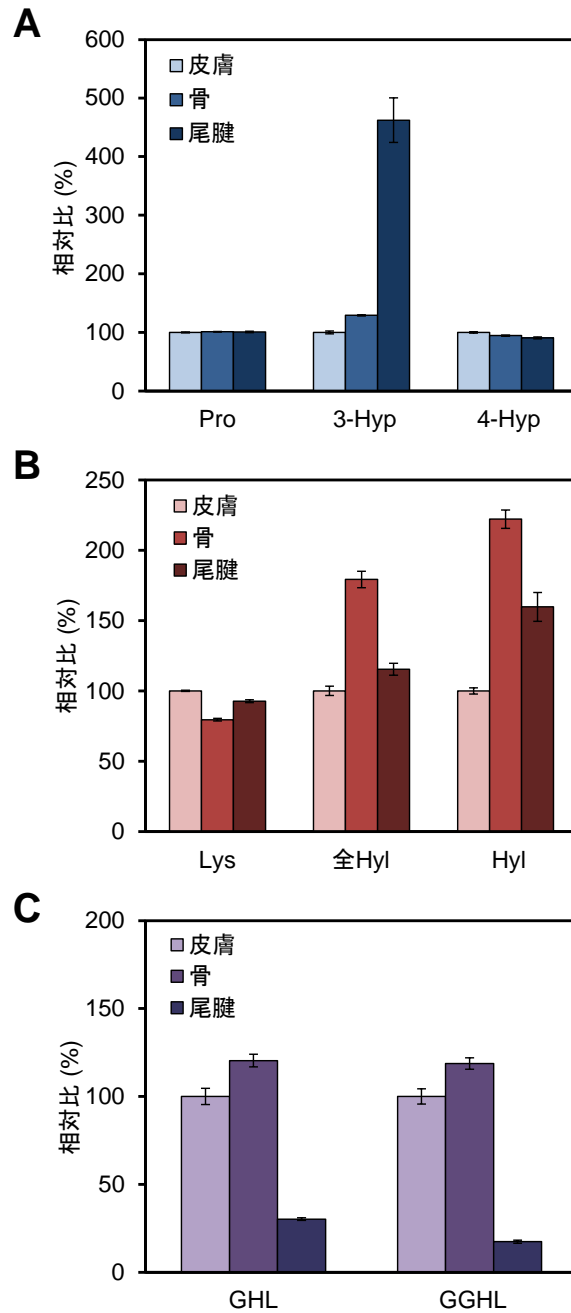


図 4-9. ラット組織別コラーゲンの翻訳後修飾定量（相対定量）

SD ラットの皮膚、骨および尾腱由来コラーゲンに安定同位体標識コラーゲンを添加し、酸・アルカリ加水分解してコラーゲン翻訳後修飾定量（A：Pro 水酸化、B：Lys 水酸化、C：Lys 糖鎖修飾）に供した（N = 3）。結果は皮膚を 100%としたときの相対比で表す。

残基／ 1000残基	皮膚	参考データ		骨	参考データ		尾腱	参考データ	
		(Spiro 1969)	(Stoltz <i>et al.</i> 1973)		(Spiro 1969)	(Stoltz <i>et al.</i> 1973)		(Spiro 1969)	(Stoltz <i>et al.</i> 1973)
Pro	90.1	—	119.5	91.1	—	114.7	90.7	—	116.6
3-Hyp	0.5	—	0.5	0.7	—	0.6	2.4	—	1.9
4-Hyp	107.1	—	90.3	101.3	—	91.6	97.2	—	88.2
Lys	30.0	—	29.8	23.8	—	21.8	27.8	—	28.4
全Hyl	7.9	7.6	5.7	14.2	—	13.9	9.1	7.5	7.2
Hyl	4.5	5.6	1.9	10.0	—	10.3	7.2	6.6	—
GHL	0.8	0.6	0.7	1.0	—	1.2	0.3	0.2	—
GGHL	1.6	0.7	2.0	1.9	—	2.6	0.3	0.2	—

表 4-4. ラット組織別コラーゲンの翻訳後修飾定量（絶対定量）

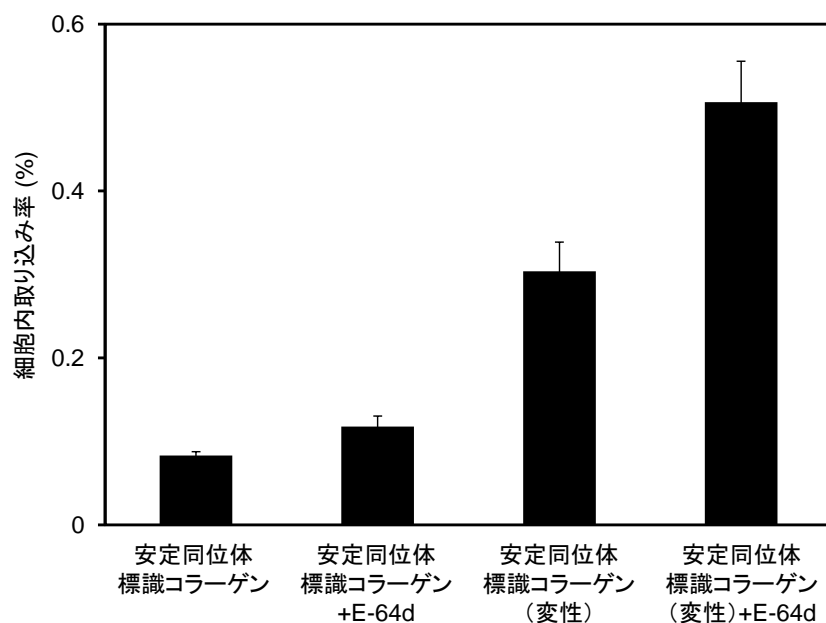


図 4-10. 安定同位体標識コラーゲンをを用いた細胞内コラーゲン取り込み量測定

HEL 細胞に安定同位体標識コラーゲン（未変性または変性）を添加し 37℃で 5 時間培養した。このとき、一部の群ではリソソームシステインプロテアーゼ阻害剤である E-64d であらかじめ 30 分間処理を行った。細胞を回収し酸加水分解してから MRM 分析により $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1\text{-4-Hyp}$ を測定し、細胞内取り込み率を算出した (N = 3)。

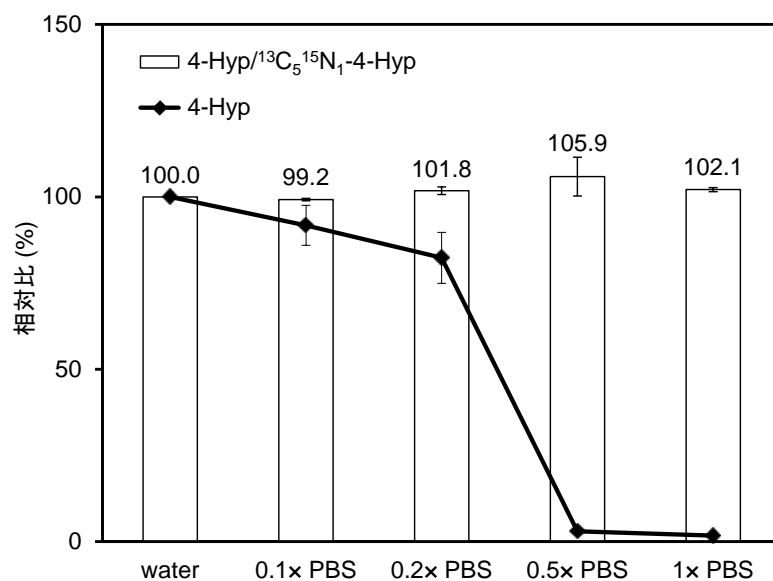


図 4-11. 安定同位体標識コラーゲン酸加水分解物の 4-Hyp 内部標準としての利用

4-Hyp を、蒸留水、0.1×PBS、0.2×PBS、0.5×PBS および 1×PBS に溶解し、安定同位体標識コラーゲン酸加水分解物を添加した後、MRM 分析により 4-Hyp ピーク面積および未標識 4-Hyp／標識 4-Hyp ピーク面積比の定量を行った (N = 3)。結果は蒸留水サンプルを 100%としたときの相対比で表す。

第 5 章

安定同位体標識コラーゲン分解物を用いた
血中 Hyp 含有ペプチドの高精度定量分析

5-1. 緒言

コラーゲンは三重らせん構造を有するため体内の消化酵素では分解されないが、コラーゲンを熱変性させたゼラチンや、ゼラチンをさらに酵素などで加水分解したゼラチン加水分解物（コラーゲンペプチド）は体内で容易に分解され吸収される。今から 50 年以上前に Prockop らによって、ゼラチン加水分解物を経口摂取すると血中に高い濃度で Hyp を含むペプチドが現れることが初めて報告された (Prockop *et al.* 1962)。長い間その構造は不明であったが、2005 年に佐藤らのグループによってそのコラーゲン由来 Hyp 含有ペプチドの主要成分が Pro-Hyp であることが同定され (Iwai *et al.* 2005)、さらにその後も様々な Hyp 含有ペプチドが血中で見つかった (Ala-Hyp、Ile-Hyp、Leu-Hyp、Phe-Hyp、Hyp-Gly、Ala-Hyp-Gly、Pro-Hyp-Gly および Ser-Hyp-Gly) (Iwai *et al.* 2005, Ohara *et al.* 2007, Shigemura *et al.* 2011)。彼らの報告では、コラーゲン由来 Pro-Hyp が血中で最大約 60 nmol/mL の濃度で検出されており (Ichikawa *et al.* 2010)、これまで報告されている他の食事由来ペプチド Val-Tyr (イワシ筋肉由来 ; 0.0019 nmol/mL) (Matsui *et al.* 2003) や Ile-Pro-Pro (牛乳由来 ; 0.0009 nmol/mL) (Foltz *et al.* 2008) などに比べ、圧倒的に高い血中濃度である。これは、Hyp 含有ペプチドが血中プロテアーゼに対して非常に安定であることに起因すると考えられている (Iwai *et al.* 2005, Shigemura *et al.* 2011)。このように非常に他種類かつ多量に血中に存在するコラーゲン由来オリゴペプチドには、何らかの機能を持っていることが想像され、実際に生体内で生理作用を有することも近年示唆されてきている。例えば、Pro-Hyp が皮膚線維芽細胞の増殖を促進すること (Shigemura *et al.* 2009, Ohara *et al.* 2010)、関節軟骨の分化維持や骨芽細胞の分化促進に関与することなどが報告されている (Nakatani *et al.* 2009, Kimira *et al.* 2014)。

このような様々な生理機能が期待される Hyp 含有ペプチドの血中濃度は、昔から酸加水分解前後の Hyp を測定してその差分を算出することにより、ペプチド型の Hyp として測

定されてきた (Prockop *et al.* 1962, Iwai *et al.* 2005)。また、それぞれの Hyp 含有ペプチドについては、ゲルろ過クロマトグラフィーで分画し、さらにフェニルイソシアネートにより誘導体化した後 C18 カラムで分離して、各ピークの Hyp 含量から半定量的に測定されてきた (Iwai *et al.* 2005, Aito-Inoue *et al.* 2006, Ohara *et al.* 2007)。しかし、このペプチド別の測定系では非常に煩雑な操作が必要であり、マイナーなペプチド成分の検出・定量も困難であるため、より高い感度と選択性を持つ簡便な検出法が望まれていた。これまで述べてきたように、MRM 分析では誘導体化の必要なく高感度・高選択性を有する測定が可能であり、一度目的成分について MRM チャンネルを組んでおけば簡便に定量分析を行うことができる。2010 年には、ゼラチン加水分解物摂取後のヒト血漿サンプルで除タンパク処理のみを行ってから、MRM 分析により 9 種の Hyp 含有ペプチドを同時測定した報告がなされている (Ichikawa *et al.* 2010)。そこでは、ヒトの空腹時血漿に各 Hyp 含有ペプチドの標品を添加して測定を行い、分析の良好な直線性と高い回収率 (94–107%) が確認されていた。しかし、やはり懸念されるのは MS 分析でのイオン化効率の変動による測定誤差であり、血漿のような様々な夾雑成分が存在する生体サンプルでは特にそのマトリックス効果は大きいと考えられる (Matuszewski *et al.* 1998, Dams *et al.* 2003)。また、ゼラチン加水分解物摂取後の血液では Hyp 含有ペプチドの含有量も劇的に変動するため、上記空腹時血漿とは異なった影響があると思われ、実サンプルでは正確な分析が行われていない可能性がある。

生理活性ペプチドの血中濃度を LC–MS で測定する際、定量性を確保するため、多くの研究で安定同位体標識された内部標準ペプチドを用いて分析が行われており、それらの安定同位体標識ペプチドは、市販品もしくは安定同位体標識アミノ酸からカスタム合成したものが使用されている (Stokvis *et al.* 2004, van Platerink *et al.* 2006, Fonteh *et al.* 2007, Mesmin *et al.* 2010, Inoue *et al.* 2012)。しかしコラーゲン由来ペプチドをターゲットとした場合、安定同位体標識された Hyp 含有ペプチドの市販品はなく、そもそも安定同位体標

識された Hyp も市販されていないため、Hyp 含有ペプチドひとつひとつにつき、それぞれ他の構成アミノ酸で標識した内部標準ペプチドを作製する必要があった。

そこで本章では、前章で開発した安定同位体標識コラーゲンから各種 Hyp 含有ペプチドの内部標準を調製し、これを用いた新規分析法を構築することにした。コラーゲン／ゼラチンからは、4 アミノ酸以上のペプチドであれば一種類のプロテアーゼでも比較的簡単に生成させることができ (Mendis *et al.* 2005, Li-Chan *et al.* 2012)、またコラゲナーゼを用いれば Gly-X-Y 単位で大量のトリペプチドを作製することができる (Fujita *et al.* 2003)。しかしながら、血中で検出される様々な種類の Hyp 含有ジペプチドおよびトリペプチド全てを同時に生成させることはできていなかった。そこで本研究では、トリプシン／キモトリプシン消化に続けて血漿プロテアーゼ消化を行い、体内でのタンパク質分解過程を模倣することにより、安定同位体標識コラーゲンからの各種標識 Hyp 含有ペプチドの生成を試みた。さらに、得られた安定同位体標識ペプチドを内部標準とし、ゼラチン加水分解物摂取後の血中 Hyp 含有ペプチドの定量を行って、その定量精度の評価を行った。またはじめに、ペプチド型 Hyp の定量 (酸加水分解前後の Hyp 量の差分) で、安定同位体標識コラーゲンを酸加水分解して生成させた $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -4-Hyp を内部標準として測定を行い、最後にこの安定同位体標識コラーゲンをを用いた 2 種の分析法で得られた結果を比較した。

5-2. 材料と方法

・材料

Pro-Hyp、Hyp-Gly および Gly-Pro-Hyp の標品は Bachem から購入し、その他の Hyp 含有ペプチドの標品は Anygen に委託して合成した。ペプシン可溶化 I 型コラーゲンは、ウシ皮膚から抽出して使用した。

・ゼラチン加水分解物経口摂取後のヒト血漿の調製

ヒト試験は、ヘルシンキ宣言に基づきニッピ・バイオマトリックス研究所倫理委員会の承認を得て医師の指導のもと行われた。健康な被験者 1 名に 12 時間の絶食後、25 g の魚鱗由来ゼラチン加水分解物 FCP (ニッピ; 平均分子量 3000–5000 Da) を経口摂取させた。摂取前 (0 時間)、摂取後 0.5、1、2、4 および 6 時間に腕から採血し、得られた血液を 10,000 \times g、4°C で 10 分間遠心分離して血漿を調製し、分析まで -80°C で保存した。

・安定同位体標識コラーゲン酸加水分解物を用いた遊離 Hyp およびペプチド型 Hyp の定量

第 4 章と同様の方法で安定同位体標識コラーゲンを作製し、これを酸加水分解した後に蒸留水に溶解して安定同位体標識コラーゲン酸加水分解物とした。これをヒト血漿サンプルおよび検量線用 4-Hyp 標品にそれぞれ添加し、血漿サンプルには 3 倍量のエタノールを加えて、10,000 \times g、4°C で 10 分間遠心分離して除タンパク処理を行った。この上清のうち一部は遊離 Hyp 定量のため 0.1%ギ酸/50%アセトニトリルで希釈してから、下に記す MRM 分析に供した。残りは全 Hyp (遊離 Hyp + ペプチド型 Hyp) 定量のため酸加水分解を行い、0.1%ギ酸/50%アセトニトリルに溶解させてから同様に MRM 分析に供した。MRM 分析による 4-Hyp および $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -4-Hyp の検出は、Analyst 1.6.2 ソフトウェア (AB Sciex) で最適化した設定を使い、サンプルを ZIC-HILIC カラム (粒子径 5 μm 、長さ 150 mm、直径 2.1 mm) で流速 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、以下のグラジエント条件で分離してから行った。0–5 分 : 90%移動相 B (100%アセトニトリル)、5–15 分 : 10–95%移動相 A (0.1%ギ酸)、15–20 分 : 95%移動相 A、20–25 分 : 90%移動相 B。遊離 Hyp 量および全 Hyp 量は、それぞれ得られた 4-Hyp のピーク面積から 4-Hyp 標品で作成した検量線を用いて算出し、このとき内部標準として添加した $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -4-Hyp による補正をした算出も行った。ペプチド型 Hyp 量は、全 Hyp 量から遊離 Hyp 量を差し引くことにより算出した。

・安定同位体標識コラーゲン酵素分解物の調製

操作の1日以上前に餌をコラーゲン非含有の AIN-93 M (オリエンタル酵母) に交換しておいたオスの ICR マウス (日本 SLC) の心臓から、ヘパリン (SIGMA) を用いて採血した。これを 10,000 *xg*、4℃で 10 分間遠心分離して上清の血漿画分を取り、さらに Hyp および Hyp 含有ペプチドを完全に除去するため、4℃で一晩 DPBS (SIGMA) に対して透析を行った。この血漿プロテアーゼを含む透析マウス血漿を、次の安定同位体標識コラーゲン酵素分解物の調製に用いた。

安定同位体標識コラーゲンを 1 mM CaCl₂ 含有 100 mM 炭酸水素アンモニウム溶液中で 60℃、30 分間加熱して変性させた後、トリプシン (Promega) およびキモトリプシン (Promega) を重量比で 1/50 量添加し、37℃で 16 時間消化反応を行った。反応溶液を 100℃で 5 分間加熱して酵素を失活させた後に遠心濃縮機で乾固させ、ここに透析マウス血漿を添加して 37℃で 24 時間消化反応を行った。反応後、エタノール沈殿により除タンパク処理を行い、この上清を遠心濃縮機により乾固させてから蒸留水で再溶解したものを安定同位体標識コラーゲン酵素分解物とした。この一部を 4-Hyp、Hyp 含有ペプチド標品混合液と混合し、次に記す MRM 分析によって、標識／未標識ピーク面積比から安定同位体標識コラーゲン酵素分解物中のそれぞれの含有量を算出した。

・安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を用いた Hyp 含有ペプチドの定量

ヒト血漿サンプルおよび検量線用 4-Hyp、Hyp 含有ペプチド標品混合液に安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を添加した。血漿サンプルはエタノール沈殿を行い、その上清を遠心濃縮機により乾固させた後、10 mM 酢酸アンモニウムに溶解してから MRM 分析に供した。Ascentis Express F5 HPLC カラム (粒子径 5 μ m、長さ 250 mm、直径 4.6 mm; Supelco) を使い、流速 400 μ l/min、以下のグラジエント条件でサンプル分離を行った。

0–7.5 分：100%移動相 A (10 mM 酢酸アンモニウム)、7.5–20 分：0–99%移動相 B (100% アセトニトリル)、20–25 分：99%移動相 B、25–30 分：100%移動相 A。検出した MRM チャンネルを表 5-1 に示す。Hyp および Hyp 含有ペプチドの血中濃度は、それぞれの未標識／標識ピーク面積比から、標品の未標識／標識ピーク面積比により作成した検量線を用いて算出した。また血漿中濃度－時間曲線下面積 (AUC_{0-6h}) は台形公式により算出した。

5-3. 結果と考察

5-3-1. 安定同位体標識コラーゲン酸加水分解物を用いた分析

まず、血漿サンプル中でのマトリックス効果による LC-MS 分析におけるイオン化効率への影響を評価した (図 5-1)。4-Hyp の分析と酸加水分解を用いた Gly-Pro-Hyp の分析どちらにおいても、血漿中で検出される 4-Hyp のピーク面積が 50～60%程度に減少しており、除タンパク処理を行っても血漿中では顕著なイオン化抑制が引き起こされることが示された。そこで、安定同位体標識コラーゲンを酸加水分解し、生成した $^{13}C_5^{15}N_1$ -4-Hyp を内部標準として用いることで、算出される結果がどのように変わるか検証することにした。

はじめにゼラチン加水分解物経口摂取後の血漿サンプルに安定同位体標識コラーゲン酸加水分解物を添加し、遊離 Hyp は除タンパク処理後にそのまま MRM 分析で測定した。またペプチド型 Hyp は、サンプルを酸加水分解後に MRM 分析して、そこから得られた全コラーゲン量から遊離 Hyp 量を差し引くことで定量を行った。その結果、ゼラチン加水分解物摂取後すぐに、遊離 Hyp およびペプチド型 Hyp の血漿中濃度が増加することが示された (図 5-2)。その濃度は摂取 1–2 時間後に最大となった後は減少して 6 時間後にはほとんど元に戻っており、この傾向は過去の報告とも一致していた (Ohara *et al.* 2007)。内部標準による補正の有無でもこのグラフパターンはほとんど同じであったが、その縦軸 (血漿中濃度) の値が大きく異なっていた。摂取 1 時間後において、遊離 Hyp および全 Hyp の

血漿中濃度をそのまま算出すると、それぞれ 150 ± 10 nmol/mL および 131 ± 9 nmol/mL であるのに対し、添加した $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1\text{-4-Hyp}$ で補正すると、それぞれ 315 ± 15 nmol/mL および 219 ± 4 nmol/mL と約 2 倍の算出値となった。これは、図 5-1 で示された血漿によるイオン化抑制による影響とよく一致している。さらに、何点かの摂取後時間では、補正をしないとペプチド型 Hyp の定量値がマイナスになってしまうものもあった。ペプチド型 Hyp 量の算出には、まず全 Hyp 測定のために酸加水分解を行うが、その後にサンプルを溶解する際、高温で焦げ付いたサンプルを全て回収するのは困難であった。従って、直接 MS 分析した遊離 Hyp との回収率の差が、このペプチド型 Hyp での低い定量結果の要因であると思われる。これについても、内部標準を酸加水分解前に添加することにより、MS でのイオン化効率の他にこの回収率も補正することができている。以上のことから、LC-MS で高精度な定量分析を行うためには内部標準は必須であると考えられる。そこで次に、Hyp 含有ペプチドの LC-MS 分析のため、安定同位体標識コラーゲンからそれらの内部標準ペプチドを作製することにした。

5-3-2. 二段階酵素消化による安定同位体標識 Hyp 含有ペプチドの作製

経口摂取されたゼラチン加水分解物は、はじめに胃や腸でトリプシン、キモトリプシン、その他の酵素で分解される。生成したジペプチドおよびトリペプチドは小腸から吸収され (Aito-Inoue *et al.* 2007, Watanabe-Kamiyama *et al.* 2010)、さらに血液中に存在する様々なプロテアーゼで分解される (Granelli-Piperno and Reich 1978)。ここでは、この体内でのタンパク質分解過程を模倣し、安定同位体標識コラーゲンをトリプシンおよびキモトリプシンで分解した後、血漿プロテアーゼでさらに分解することにより様々な種類の Hyp 含有ペプチドを生成させて、LC-MS 分析での内部標準として使用することにした (図 5-3)。ICR マウスから調製した血漿には、餌をコラーゲン非含有のものに変えても Hyp および Hyp 含有ペプチドが検出されたため (データは省略する)、透析してからこれを分解反応に

使用した。まず Hyp 含有ペプチドの生成条件を決定するため、ウシ I 型コラーゲンを基質として、使用酵素の組み合わせと透析血漿による分解時間（1、2、4、8、16 および 24 時間）の検討を行った（図 5-4）。Hyp 含有ペプチドは熱変性させただけのコラーゲンでは検出されず、またその後トリプシンおよびキモトリプシンで分解しても生成されなかった（データは省略する）。透析血漿のみによる 24 時間の分解では微量の Hyp 含有ペプチドしか生成されなかったが、あらかじめトリプシンまたはキモトリプシン、もしくは両酵素で分解を行っておくと、Hyp 含有ペプチドの生成が効果的に促進された（図 5-4B および C）。これはもともと生成量の少なかった Hyp-Gly で特に顕著であり、透析血漿のみによる 24 時間の分解ではその生成量が 0.181 pmol/μg であったのが、キモトリプシンによる前分解で 0.699 pmol/μg、トリプシンによる前分解で 2.84 pmol/μg、そしてキモトリプシンおよびトリプシンによる前分解で 3.95 pmol/μg へと増加した。どの分解条件においても、Hyp 含有ジペプチドおよびトリペプチドの生成とともに、最終的な分解産物として遊離 Hyp の生成も確認された（図 5-4A）。ほとんどの Hyp 含有ペプチドは透析血漿による分解時間が長くなるほどその生成量は増加したが、いくつかのペプチドでは違った傾向が認められた。例えば、Ala-Hyp の生成量は透析血漿による分解が 8 時間に達するまでは増加していたが、その後 16 時間や 24 時間では逆に減少した。おそらく、分解時間が長くなることにより、より大きなペプチドからの分解によって Ala-Hyp の生成量が増える一方、さらに Ala と Hyp へと分解されるためであると考えられる。一般に X-Pro (Hyp) 結合はプロテアーゼで切断されにくく (Rodriguez *et al.* 2008, Yang *et al.* 2012)、また Pro-Hyp や Hyp-Gly は血清中で安定であるという報告もされているが (Iwai *et al.* 2005, Shigemura *et al.* 2011)、少なくともいくつかの Hyp 含有ペプチドでは過度に血漿プロテアーゼにさらされると更に分解されることが明らかとなった。

以上の検討結果から、安定同位体標識コラーゲンから Hyp 含有ペプチドの内部標準を生成させるために、トリプシンおよびキモトリプシンで前分解を行った後、さらに透析血漿

で 24 時間分解反応を行うことにした。作製した安定同位体標識コラーゲン酵素分解物に含まれる Hyp 含有ペプチドを表 5-2 に示す。これまで報告されている血中 Hyp 含有ペプチドは全て、Pro および Hyp が安定同位体標識されたペプチドとして MRM 分析で検出された (図 5-5)。また、安定同位体標識率がその全てで 97%以上、さらに Pro-Hyp など 2 箇所の安定同位体標識部位を持つペプチドでは 99%以上となり、内部標準として高精度な分析に使用可能であることが確認された。生成された Hyp および Hyp 含有ペプチドを合計すると、重量比で元の安定同位体標識コラーゲンの 10.8%となり、I 型コラーゲンの Hyp 含量 (約 100 残基/1000 アミノ酸残基) から考えても、この分解条件は非常に効率的に Hyp 含有ペプチドを生成することができていると言える。Hyp-Gly などのいくつかのペプチドの含量は比較的少なくなっているが、それでも LC-MS 分析での内部標準として用いるには十分であった。第 5 章で、安定同位体標識コラーゲンをを用いた分析では、内部標準対サンプル比が 1 : 300 から 30 : 1 の間で高い精度と直線性があることが示されているため、以降の実験では、それぞれの Hyp 含有ペプチドでこの最適範囲になるように安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を使用するようにした。また、その使用量から計算すると、HEL 細胞を 100 mm ディッシュ 1 枚で 3 日間培養したときに得られる安定同位体標識コラーゲンで、100 サンプル以上の Hyp 含有ペプチドの分析を行うことができる。

5-3-3. 安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を用いた分析

安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を用いた分析法の定量性を評価するため、図 5-2 で測定したヒト血漿サンプルについて再度分析を行った。はじめに血漿サンプルに安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を添加し、その後エタノール沈殿と上清の濃縮のみ行ってから、MRM 分析により Hyp および Hyp 含有ペプチドの定量を行った。その結果、図 5-6 に示されるように、ゼラチン加水分解物摂取後のヒト血漿中で計 13 種類の Hyp 含有ペプチドが検出された。AUC_{0-6 h} の値は、Pro-Hyp-Gly の 0.663 ± 0.022 nmol/mL・h から

Pro-Hyp の $163 \pm 1 \text{ nmol/mL} \cdot \text{h}$ まで広く分布し、過去に報告されてきたように (Iwai *et al.* 2005, Ohara *et al.* 2007, Ichikawa *et al.* 2010)、Pro-Hyp の $\text{AUC}_{0-6 \text{ h}}$ は他の Hyp 含有ペプチドに比べ著しく高い値となった (表 5-3)。今回の分析では、微量な Hyp 含有ペプチドの検出・定量も可能にするため、エタノール沈殿後にその上清の濃縮を行った。この濃縮処理により検出感度が向上する一方、LC-MS でのマトリックス効果が強くなり定量精度が損なわれる恐れがある。しかしこの問題については、安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を内部標準として用いることにより克服することができ、定量精度を確保しながら高感度な分析を行うことができる。実際に、過去に血漿中で検出されたことのなかった Glu-Hyp、Ser-Hyp および Glu-Hyp-Gly という 3 つの Hyp 含有ペプチドの定量が可能となり、さらに、ピーク強度が検出限界に近かった Glu-Hyp-Gly を除き、全ての Hyp 含有ペプチドの定量において 3 回の分析で変動係数が 7%以内と、非常に再現性のある安定した結果を得ることができた。

最後に、安定同位体標識コラーゲンの分解物を内部標準とした 2 種の分析法で算出された Hyp 含有ペプチドの定量値の比較を行った (図 5-7)。各摂取後時間全てにおいて、図 5-6 で算出されたそれぞれの Hyp 含有ペプチドの血漿中濃度を合計した値は、図 5-2 で算出されたペプチド型 Hyp の定量値と非常によく一致していた。この結果は、安定同位体標識コラーゲン酵素分解物または酸加水分解物を用いた分析法は、どちらも高い定量精度を有することを示す。ただし、3 回の繰り返し測定において、安定同位体標識コラーゲン酸加水分解物を用いたペプチド型 Hyp の定量では、比較的誤差の範囲が大きい結果となった。おそらく、ペプチド型 Hyp は酸加水分解前後の Hyp 量を差し引いて算出しているため、そこが誤差の生じる要因となっていると考えられる。それに対し、安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を用いた Hyp 含有ペプチドの定量では、単純な測定プロセスであるため非常に誤差の少ない定量値を得ることができた。今回定量された 13 種類の Hyp 含有ペプチドの定量値の合計がペプチド型 Hyp 全体の値とほとんど変わらなかったため、これらのジベ

プチドおよびトリペプチドが、ゼラチン加水分解物摂取後に血中に現れた Hyp 含有ペプチドのほとんどを占めていると解釈することができる。このことから、少なくとも今回分析したヒト血漿中では、他に含有量の多い未同定の Hyp 含有ペプチドは存在しないことが示唆される。ただし、摂取するゼラチン加水分解物の由来動物の違いによって血中で検出される Hyp 含有ペプチドの量や構造が変わることが報告されており (Ohara *et al.* 2007)、また我々の実験で、ゼラチン加水分解物を調製するために使用する酵素の基質特異性の違いによっても、血中 Hyp 含有ペプチドの量や構造が変化することが示されている (データは省略する)。従って、今まで見つかっていない、高い生理作用を持つ Hyp 含有ペプチドが他にも血中に存在する可能性は十分にあると考えられる。

本章では、安定同位体標識コラーゲンを酸または酵素で分解することにより、Hyp または Hyp 含有ペプチドの内部標準を作製し、それらを用いた血中 Hyp 含有ペプチドの高精度定量分析法を開発した。特に、安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を用いることで、これまでに報告のない 13 種類の Hyp 含有ペプチドの同時分析が可能となり、その高い有用性が示された。さらに現在、マウスの血漿サンプルでは Leu-Hyp-Gly および Phe-Hyp-Gly も新たに検出されている (データは省略する)。今回の実験では Hyp を含むペプチドを対象として測定を行ったが、安定同位体標識コラーゲン酵素分解物は他のコラーゲン由来オリゴペプチド、例えば降圧作用を有する Gly-Pro (Ichimura *et al.* 2009) などの分析にも適用することができる。この 10 年で、様々な研究によってコラーゲン／ゼラチン加水分解物の経口摂取による機能性が探索されるようになってきた (Gómez-Guillén *et al.* 2011)。我々の開発した新規分析法は、経口摂取されたゼラチン加水分解物の体内での吸収や代謝をモニターするのに非常に有用であり、今後、コラーゲン由来オリゴペプチドの生理作用の研究や高い機能性を持つゼラチン加水分解物の開発にも役立つと考えている。

5-4. 図表

	Q1	Q3	CE
Hyp	132.1	86.1	19
<u>Hyp</u>	138.1	91.1	19
Ala-Hyp	203.1	132.2	17
Ala- <u>Hyp</u>	209.1	138.2	17
Glu-Hyp	261.2	243.2	15
Glu- <u>Hyp</u>	267.2	249.2	15
Ile-Hyp	245.1	132.2	17
Ile- <u>Hyp</u>	251.1	138.2	17
Leu-Hyp	245.1	132.2	17
Leu- <u>Hyp</u>	251.1	138.2	17
Phe-Hyp	279.1	132.2	33
Phe- <u>Hyp</u>	285.1	138.2	33
Pro-Hyp	229.2	70.1	37
<u>Pro-Hyp</u>	241.2	75.1	37
Ser-Hyp	219.1	132.2	19
Ser- <u>Hyp</u>	225.1	138.2	19
Hyp-Gly	189.1	86.1	21
<u>Hyp-Gly</u>	195.1	91.1	21
Gly-Pro-Hyp	286.0	127.2	21
Gly- <u>Pro-Hyp</u>	298.0	132.2	21
Ala-Hyp-Gly	260.1	189.1	19
Ala- <u>Hyp-Gly</u>	266.1	195.1	19
Glu-Hyp-Gly	318.2	189.1	17
Glu- <u>Hyp-Gly</u>	324.2	195.1	17
Ile-Hyp-Gly	302.2	189.1	19
Ile- <u>Hyp-Gly</u>	308.2	195.1	19
Leu-Hyp-Gly	302.2	189.1	19
Leu- <u>Hyp-Gly</u>	308.2	195.1	19
Phe-Hyp-Gly	336.1	189.1	21
Phe- <u>Hyp-Gly</u>	342.1	195.1	21
Pro-Hyp-Gly	286.2	189.1	21
<u>Pro-Hyp-Gly</u>	298.2	195.1	21
Ser-Hyp-Gly	276.2	189.1	19
Ser- <u>Hyp-Gly</u>	282.2	195.1	19

下線は安定同位体標識部位を示す。

表 5-1. Hyp および Hyp 含有ペプチドの MRM チャンネル

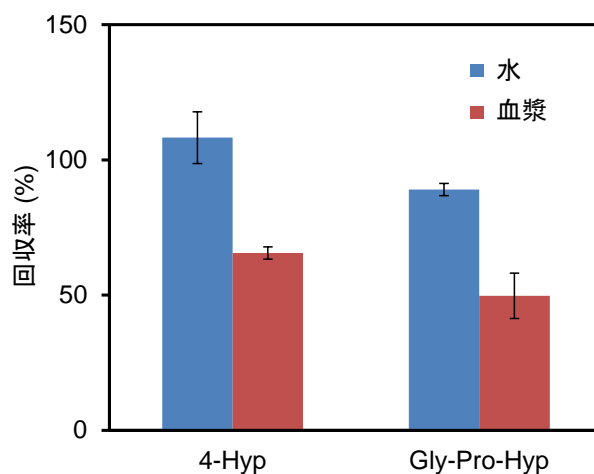


図 5-1. 血漿中でのイオン化抑制

4-Hyp 標品を蒸留水またはヒト空腹時血漿に添加しエタノール沈殿を行った後、上清を 0.1%ギ酸／50%アセトニトリルで希釈して MRM 分析に供した。同様に、Gly-Pro-Hyp 標品を蒸留水またはヒト空腹時血漿に添加しエタノール沈殿を行った後、上清を酸加水分解してから 0.1%ギ酸／50%アセトニトリルに溶解して MRM 分析に供した。回収率は、等モル量の 4-Hyp 標品を直接分析して得られたピーク面積とそれぞれの 4-Hyp ピーク面積との比から算出した (N = 3)。

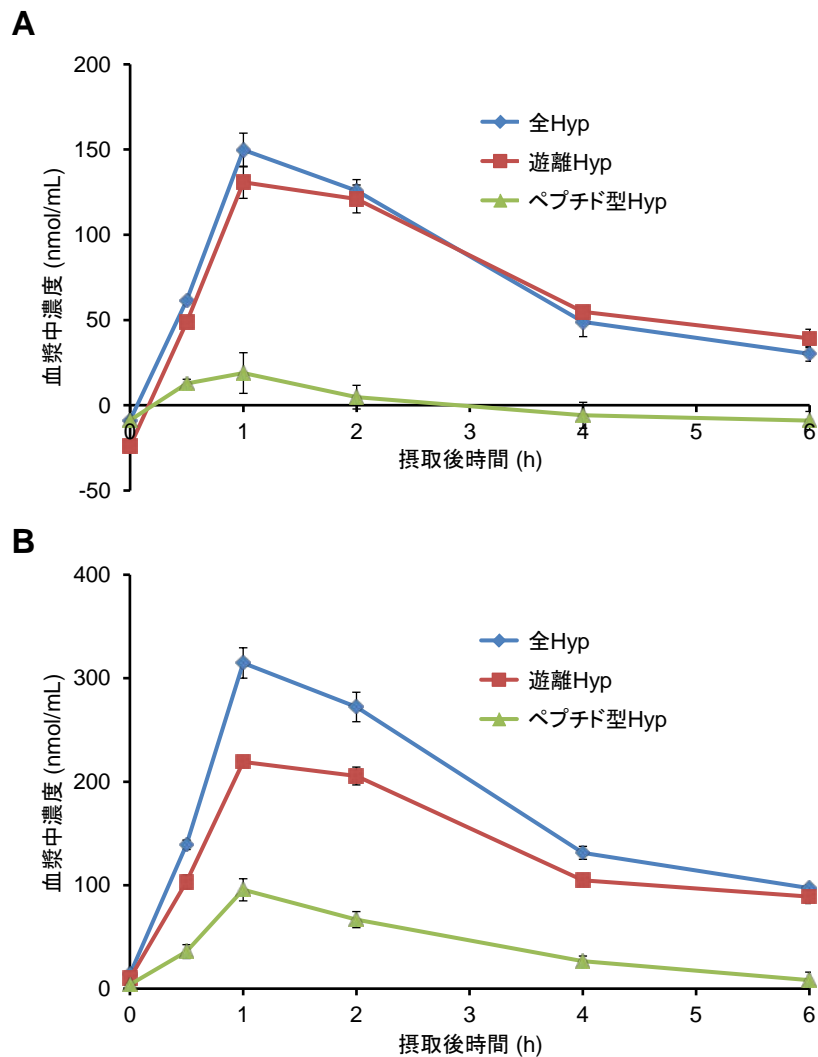


図 5-2. ゼラチン加水分解物経口摂取後のヒト血中遊離 Hyp およびペプチド型 Hyp の定量

安定同位体標識コラーゲン酸加水分解物をヒト血漿サンプルおよび検量線用 4-Hyp 標品に添加し、血漿サンプルはエタノール沈殿後、上清の一部を遊離 Hyp 定量のため直接 MRM 分析に、残りは全 Hyp 定量のため酸加水分解を行った後 MRM 分析に供した。全 Hyp および遊離 Hyp の血漿中濃度は、検量線を用いて $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_1$ -4-Hyp による (A) 補正無しおよび (B) 補正有りで算出した。また、ペプチド型 Hyp は全 Hyp から遊離 Hyp を差し引くことで算出した。各血漿サンプルは魚鱗由来ゼラチン加水分解物摂取後のヒト (N = 1) から調製し、それぞれ測定は 3 回行った。

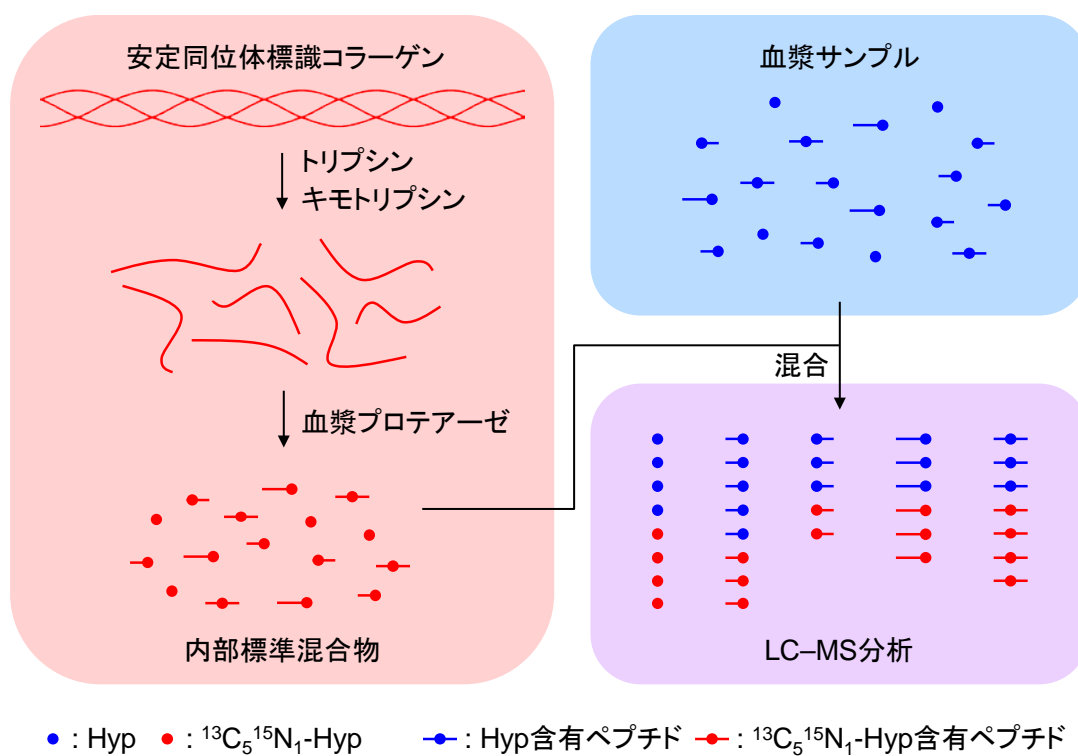


図 5-3. 安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を用いた血中 Hyp 含有ペプチド分析の流れ

安定同位体標識コラーゲンをトリプシンおよびキモトリプシンで分解した後、さらに血漿プロテアーゼで分解して安定同位体標識された Hyp および Hyp 含有ペプチドを作製する。これを血漿サンプルに内部標準として混合し、除タンパク処理および濃縮後 LC-MS 分析に供する。

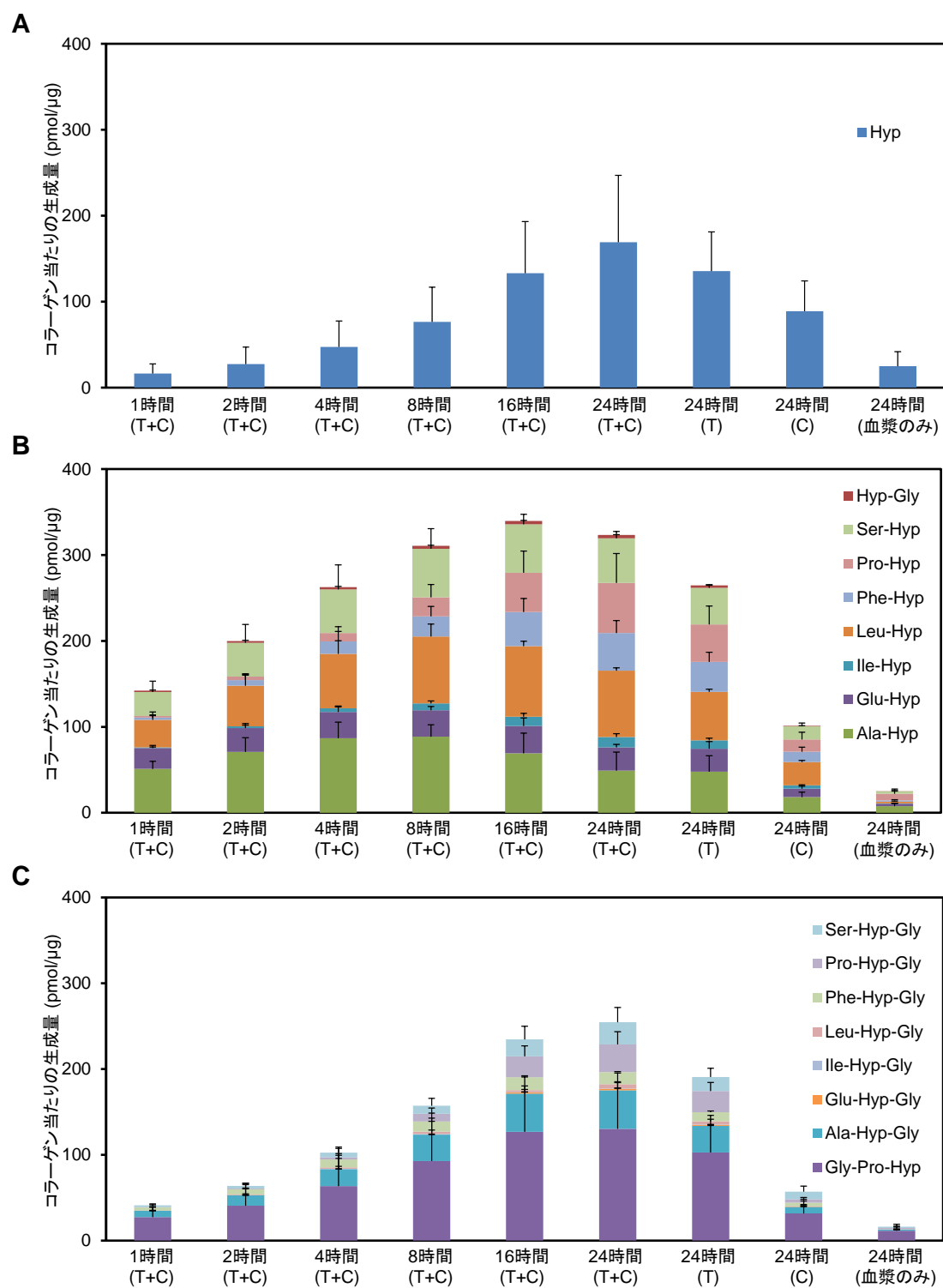


図 5-4. 二段階酵素消化による Hyp 含有ペプチド生成条件の検討

ウシ I 型コラーゲンを変性処理後、トリプシンまたはキモトリプシン、もしくは両酵素

を用いて 37℃で 16 時間分解し、さらに透析マウス血漿を添加して 37℃で 1–24 時間分解反応を行った。生成した (A) Hyp、(B) Hyp 含有ジペプチドおよび (C) Hyp 含有トリペプチドは MRM 分析により定量された (N = 3)。T はトリプシン、C はキモトリプシンを示す。

	分子量	安定同位体標識 コラーゲン当たりの含量 (pmol/μg)	安定同位体標識 コラーゲン当たりの含量 (ng/μg)	標識率 (%)
<u>Hyp</u>	137	190	26.0	98.1
Ala- <u>Hyp</u>	208	9.20	1.91	97.6
Glu- <u>Hyp</u>	266	14.9	3.95	98.2
Ile- <u>Hyp</u>	250	7.96	1.99	97.7
Leu- <u>Hyp</u>	250	29.3	7.33	98.3
Phe- <u>Hyp</u>	284	27.7	7.88	98.1
<u>Pro</u> -Hyp	240	47.7	11.5	99.4
Ser- <u>Hyp</u>	224	10.6	2.37	98.1
<u>Hyp</u> -Gly	194	1.82	0.353	98.9
Gly- <u>Pro</u> -Hyp	297	73.4	21.8	99.5
Ala- <u>Hyp</u> -Gly	265	31.5	8.34	98.4
Glu- <u>Hyp</u> -Gly	323	3.36	1.08	98.2
Ile- <u>Hyp</u> -Gly	307	0.129	0.0396	98.5
Leu- <u>Hyp</u> -Gly	307	2.56	0.786	97.8
Phe- <u>Hyp</u> -Gly	341	6.13	2.09	98.1
<u>Pro</u> -Hyp-Gly	297	17.9	5.30	99.6
Ser- <u>Hyp</u> -Gly	281	19.5	5.49	98.3
合計			108	

下線は安定同位体標識部位を示す。

表 5-2. 安定同位体標識コラーゲン酵素分解物中の Hyp 含有ペプチドの組成

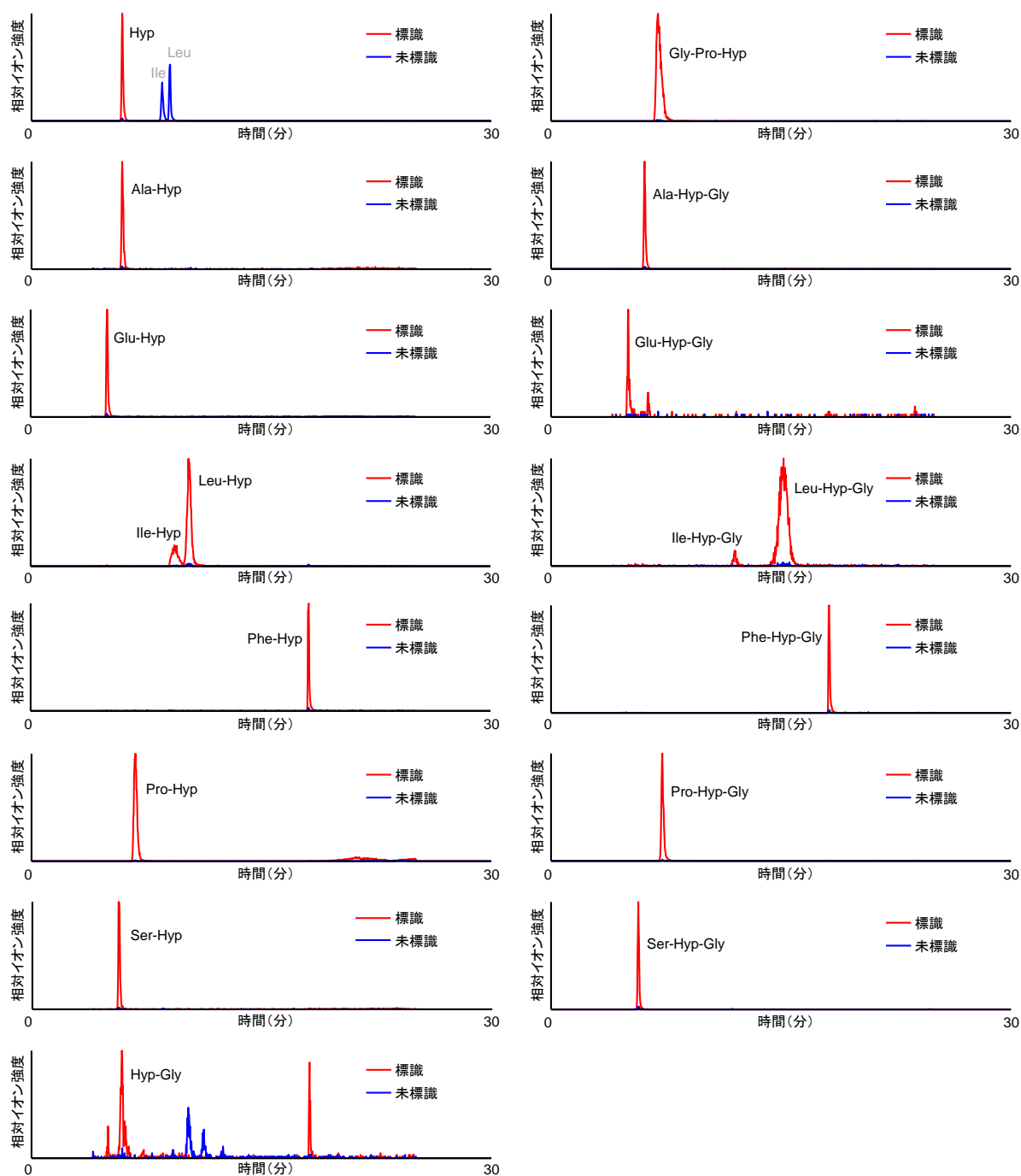


図 5-5. 安定同位体標識コラーゲン酵素分解物に含まれる Hyp および Hyp 含有ペプチドの MRM クロマトグラム

安定同位体標識コラーゲンをトリプシン、キモトリプシンおよび透析血漿で分解して生じた Hyp および Hyp 含有ペプチドの MRM クロマトグラムを示す。

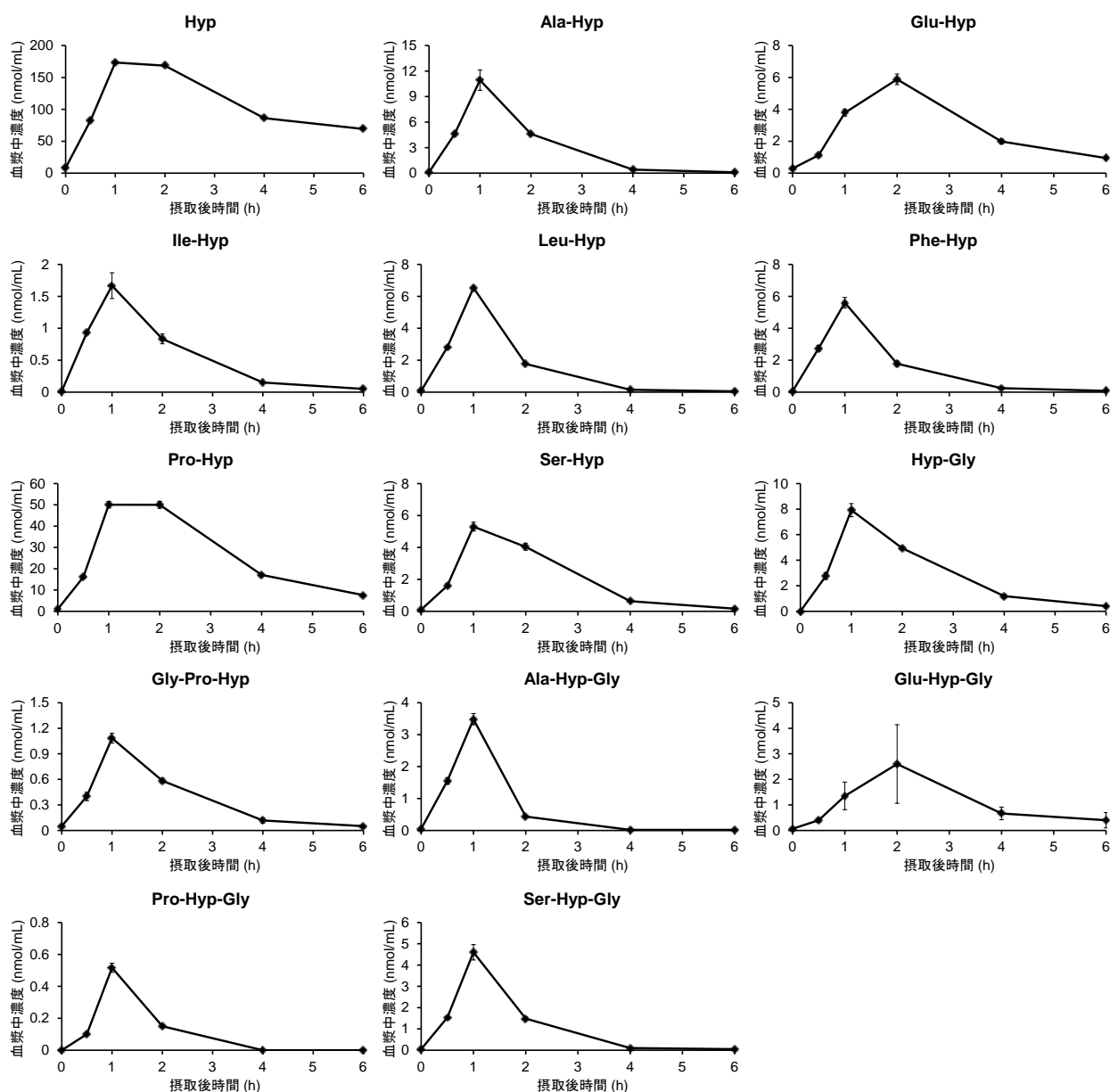


図 5-6. ゼラチン加水分解物経口摂取後のヒト血中 Hyp 含有ペプチドの定量

安定同位体標識コラーゲン酵素分解物をヒト血漿サンプルおよび検量線用標品混合液に添加し、血漿サンプルはエタノール沈殿後、上清を濃縮してから MRM 分析に供した。Hyp および Hyp 含有ペプチドの血漿中濃度は、検量線を用いて未標識／標識ピーク面積比から算出した。各血漿サンプルは魚鱗由来ゼラチン加水分解物摂取後のヒト (N = 1) から調製し、それぞれ測定は 3 回行った。

	AUC _{0-6 h} (nmol/mL•h)		
Hyp	667.92	±	30.02
Ala-Hyp	18.34	±	0.94
Glu-Hyp	17.22	±	0.83
Ile-Hyp	3.32	±	0.23
Leu-Hyp	9.33	±	0.09
Phe-Hyp	8.85	±	0.56
Pro-Hyp	162.59	±	1.29
Ser-Hyp	12.28	±	0.43
Hyp-Gly	17.49	±	0.45
Gly-Pro-Hyp	2.18	±	0.08
Ala-Hyp-Gly	4.10	±	0.22
Glu-Hyp-Gly	6.86	±	2.51
Pro-Hyp-Gly	0.66	±	0.02
Ser-Hyp-Gly	6.70	±	0.37

表 5-3. ゼラチン加水分解物摂取 6 時間後までの Hyp および Hyp 含有ペプチドの血漿中濃度－時間曲線下面積

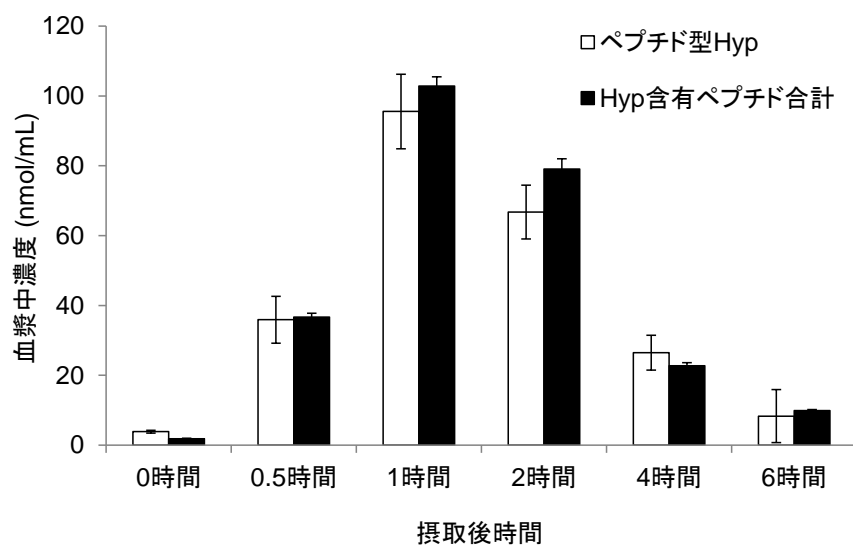


図 5-7. 安定同位体標識コラーゲンを用いた 2 種の測定法による Hyp 含有ペプチド定量値の比較

比較した「ペプチド型 Hyp」の値は図 5-2 から、「Hyp 含有ペプチド合計」の値は図 5-6 の各 Hyp 含有ペプチドの定量値を合計して用いた。

第 6 章

総括

本研究では、組織の維持や細胞機能の調節など様々な機能を持ち、生体内の主要なタンパク質であるコラーゲンについて新規分析法を開発することを目的とした。コラーゲン型組成や翻訳後修飾などのコラーゲンの質が年齢や生理的条件、疾患などによって変化することは知られていたが、既存の分析手法には感度や精度、網羅性などに課題があることもあり、その生体内での役割や意味はほとんど解明されていない。近年その性能が急速に発達している質量分析装置を用いることで高感度分析が可能となるが、それでも微量成分の検出や分析の定量性などは常に大きな課題となる。そこで、分析手法としての課題を解決することで新たな知見の獲得へとつなげるため、質量分析を用いたコラーゲン分析のために様々なツールを開発し、実際にそれらを用いて各種コラーゲンサンプルの分析を行った。

第2章では、コラーゲンに微量に存在するO結合型糖鎖GHL・GGHLについて、高感度分析を可能にするためヒドラジドケミストリーを利用した新規精製法を開発した。本法ではまず、コラーゲンをトリプシン消化した後、固定化ガラクトースオキシダーゼ、カタラーゼおよびHRPの3酵素によりGHL・GGHLに含まれるガラクトースのC6位にアルデヒド基を生成させる。次に、これを樹脂に固定化させたヒドラジド基と反応させてヒドラゾン結合を形成させることにより、GHL・GGHL含有ペプチドを精製する。最後に、酸性溶液中で加熱してヒドラゾン結合を切断することにより糖ペプチドのまま溶出させ、LC-MSでペプチド配列と糖鎖修飾部位を同定する。このヒドラジド法を用いてウシI・II型コラーゲンの分析を行った結果、これまで報告されていた糖鎖修飾部位のほとんどが網羅され、さらにI型コラーゲンで3箇所、II型コラーゲンで2箇所の新規修飾部位を同定することができた。昔からGHL・GGHLの修飾部位同定にはペプチドシーケンサーが用いられてきたが、それに比べはるかに網羅的かつ高感度な分析が可能であることが示された。GHL・GGHLは、コラーゲンへの細胞接着、コラーゲン架橋などとの関連が示唆されているが、その分析の難しさもあって生体内での実際の役割はほとんどわかっていない。本法を用いてより詳細な分析を行うことにより、このコラーゲンO結合型糖鎖の機能解明

へとつながることが期待される。

第 3 章では、前章で開発したヒドラジド法と代謝的安定同位体標識法 SILAC を組み合わせることにより、高感度かつ定量性を確保した GHL・GGHL 分析法を開発し、これを用いて骨形成不全症 (OI) 患者由来コラーゲンで起こる糖鎖修飾増加機構の解明を試みた。SILAC では、細胞培養時にサンプル間で異なった質量数の安定同位体標識アミノ酸でタンパク質を標識することにより、LC-MS を用いてその由来を識別することができる。それによってサンプルを最初に混合することができるため、ヒドラジド法の低い回収率により懸念された定量性の低さや MS 分析でのイオン化効率の変動などを補正した高精度な比較定量が可能となった。本法を用いて、正常および OI 皮膚線維芽細胞が産生するコラーゲンで各部位での糖鎖修飾率の比較を行った結果、GHL 修飾は OI でほとんど変化しなかった一方、GGHL 修飾は OI で顕著に増加することが明らかとなった。また、OI のみで検出された糖鎖修飾部位は見つからなかった。以上のことから OI では、三重らせん形成遅延によりコラーゲン中特定の Lys のみで糖鎖修飾が進行し、一連の反応の最終産物である GGHL が蓄積していくことが示された。ヒドラジド法と SILAC を組み合わせることにより高い感度と精度を持った定量分析を行うことができるため、GHL・GGHL の機能解明の他、この糖鎖修飾のモチーフ配列の同定など、今後様々な研究への応用を期待することができる。

第 4 章では、質量分析を用いたコラーゲン分析のための新たなツールとして、安定同位体標識コラーゲンの開発を行った。第 3 章で用いた SILAC では、測定サンプルを安定同位体標識することにより精度の高い分析を行うことができるが、一方、毎回サンプルを標識する必要があること、基本的には細胞由来サンプルにしか使用できないことなどが欠点として挙げられる。そこで、測定対象をコラーゲンに絞り、内部標準として添加するだけで様々な種類のコラーゲン分析で高精度な測定を可能とする安定同位体標識コラーゲンを作製することにした。まず、ヒト胎児肺線維芽細胞を培養時、安定同位体標識された Lys、

Arg および Pro を添加することにより、産生されるコラーゲンのそれらアミノ酸とその翻訳後修飾全てを安定同位体で標識した。その際、標識条件やコラーゲンの精製条件を最適化することにより、標識した全てのアミノ酸で約 95%以上という高い標識率を達成することができた。特に、Pro および Hyp は Glu や Arg から細胞内で代謝的に変換されるため、標識率が低下する懸念があったが、標識 Pro の添加量を増やし Gln を添加しないことにより、それらの変換を抑えられることが確認された。この高度に標識された安定同位体標識コラーゲンを内部標準としてサンプルに添加し、各種処理後に LC-MS で測定を行うことにより、トリプシン消化ペプチドを用いた型別コラーゲン定量、4-Hyp を用いた全コラーゲン定量、そして網羅的なコラーゲン翻訳後修飾定量を、操作間および測定間誤差を全て補正して行うことが可能となる。実際に本法を用い、ラットの皮膚、骨および尾腱由来コラーゲンについて上記 3 種の分析を行った結果、過去の報告と非常によく一致する結果が得られ、さらにこれまで不可能であった微量成分の検出・定量も行うことができ、その高い測定精度と感度が示された。安定同位体標識コラーゲンは他にも、コラーゲンの細胞内取り込み能の測定などにも応用可能であり、今後様々なコラーゲン研究で強力な分析ツールになると考えられる。

第 5 章では、安定同位体標識コラーゲンをコラーゲン由来オリゴペプチドの測定に応用し、ゼラチン加水分解物経口摂取後に血中で検出される各種 Hyp 含有ペプチドの高精度分析法を開発した。血漿などの生体サンプルでは、マトリックス効果により MS 分析でのイオン化効率の変動とそれによる測定誤差が引き起こされる場合が多い。これを補正するため、通常 MS による血中ペプチドの定量分析には安定同位体標識された内部標準ペプチドが用いられるが、4-Hyp や Hyp 含有ペプチドが安定同位体標識されたものは市販されていない。そこで本法では、安定同位体標識コラーゲンをあらかじめ酸加水分解して安定同位体標識 4-Hyp を、または酵素分解して安定同位体標識 Hyp 含有ペプチドを生成させることにより、内部標準として用いることにした。ただし、血中には様々な形の Hyp 含有ジペ

プチドおよびトリペプチドが検出されており、それらを同時に全て生成させることは困難であった。そこでトリプシン、キモトリプシンおよび血漿プロテアーゼを用いて、体内でのタンパク質分解過程を模倣したペプチド生成を試みた結果、これまで報告されていた全ての Hyp 含有ペプチドを作製することができた。この安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を用いることにより、ゼラチン加水分解物摂取後のヒト血漿サンプルで、Glu-Hyp、Ser-Hyp および Glu-Hyp-Gly が初めて定量され、計 13 種類の Hyp 含有ペプチドの同時分析が可能となった。また、それらの Hyp 含有ペプチドの定量値を合計した値が、ペプチド型 Hyp の定量値（安定同位体標識コラーゲン酸加水分解物を内部標準として用い酸加水分解前後の 4-Hyp 量から算出）と非常に近い値となり、安定同位体標識コラーゲン分解物を用いた両分析法の高い定量精度が示された。以上の結果より、本法はコラーゲン由来 Hyp 含有ペプチドの高精度定量分析を可能とし、その吸収・代謝試験や生理作用の探索などに非常に有用であると考えられる。

以上、本研究ではコラーゲンの翻訳後修飾や型組成、体内での代謝など、その性質をより詳細かつ正確に把握するため様々な分析法を新たに開発し、さらにそれらを用いることでOIでの糖鎖修飾増加機構の解明や新規血中 Hyp 含有ペプチドの測定などを可能にした。ヒドラジド法や安定同位体標識コラーゲンをを用い質量分析で測定することにより、これまで不可能であった高感度かつ高精度な定量分析を行うことができ、過去に分析された検体からも新たな知見が見つかる可能性もある。今後、我々の分析法が様々なコラーゲン研究で利用され、疾患に関連したコラーゲンの質的異常など未だに理解が進んでいない部分の解明へとつながることが期待される。

参考文献

Abrass, C. K., Peterson, C. V. and Raugi, G. J. (1988). "Phenotypic expression of collagen types in mesangial matrix of diabetic and nondiabetic rats." Diabetes **37**(12): 1695-1702.

Adams, E. and Frank, L. (1980). "Metabolism of proline and the hydroxyprolines." Annu Rev Biochem **49**: 1005-1061.

Aito-Inoue, M., Lackeyram, D., Fan, M. Z., Sato, K. and Mine, Y. (2007). "Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane." J Pept Sci **13**(7): 468-474.

Aito-Inoue, M., Ohtsuki, K., Nakamura, Y., Park, E. Y., Iwai, K., Morimatsu, F. and Sato, K. (2006). "Improvement in isolation and identification of food-derived peptides in human plasma based on precolumn derivatization of peptides with phenyl isothiocyanate." J Agric Food Chem **54**(15): 5261-5266.

Alanay, Y., Avaygan, H., Camacho, N., Utine, G. E., Boduroglu, K., Aktas, D., Alikasifoglu, M., Tuncbilek, E., Orhan, D., Bakar, F. T., Zabel, B., Superti-Furga, A., Bruckner-Tuderman, L., Curry, C. J., Pyott, S., Byers, P. H., Eyre, D. R., Baldridge, D., Lee, B., Merrill, A. E., Davis, E. C., Cohn, D. H., Akarsu, N. and Krakow, D. (2010). "Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta." Am J Hum Genet **86**(4): 551-559.

Barnes, A. M., Carter, E. M., Cabral, W. A., Weis, M., Chang, W., Makareeva, E., Leikin, S., Rotimi, C. N., Eyre, D. R., Raggio, C. L. and Marini, J. C. (2010). "Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding." N Engl J Med **362**(6): 521-528.

Barnes, M. J., Constable, B. J., Morton, L. F. and Kodicek, E. (1970). "Studies in vivo on the biosynthesis of collagen and elastin in ascorbic acid-deficient guinea pigs. Evidence for the formation and degradation of a partially hydroxylated collagen." Biochem J **119**(3): 575-585.

Bateman, J. F., Mascara, T., Chan, D. and Cole, W. G. (1984). "Abnormal type I collagen metabolism by cultured fibroblasts in lethal perinatal osteogenesis imperfecta." Biochem J **217**(1): 103-115.

Bendall, S. C., Hughes, C., Stewart, M. H., Doble, B., Bhatia, M. and Lajoie, G. A. (2008). "Prevention of amino acid conversion in SILAC experiments with embryonic stem cells." Mol Cell Proteomics **7**(9): 1587-1597.

Berg, R. A. and Prockop, D. J. (1973). "The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen." Biochem Biophys Res Commun **52**(1): 115-120.

Bonenfant, D., Towbin, H., Coulot, M., Schindler, P., Mueller, D. R. and van Oostrum, J. (2007). "Analysis of dynamic changes in post-translational modifications of human histones during cell cycle by mass spectrometry." Mol Cell Proteomics **6**(11): 1917-1932.

Butler, W. T. (1982). "Hydroxylysine glycosides." Methods Enzymol **82 Pt A**: 339-346.

Butler, W. T., Finch, J. E., Jr. and Miller, E. J. (1977). "Covalent structure of cartilage collagen. Amino acid sequence of residues 363-551 of bovine alpha1(II) chains." Biochemistry **16**(23): 4981-4990.

Butler, W. T., Miller, E. J. and Finch, J. E., Jr. (1976). "The covalent structure of cartilage collagen. Amino acid sequence of the NH₂-terminal helical portion of the

alpha 1 (II) chain." Biochemistry **15**(14): 3000-3006.

Cabral, W. A., Chang, W., Barnes, A. M., Weis, M., Scott, M. A., Leikin, S., Makareeva, E., Kuznetsova, N. V., Rosenbaum, K. N., Tifft, C. J., Bulas, D. I., Kozma, C., Smith, P. A., Eyre, D. R. and Marini, J. C. (2007). "Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta." Nat Genet **39**(3): 359-365.

Cao, J., Shen, C., Wang, H., Shen, H., Chen, Y., Nie, A., Yan, G., Lu, H., Liu, Y. and Yang, P. (2009). "Identification of N-glycosylation sites on secreted proteins of human hepatocellular carcinoma cells with a complementary proteomics approach." J Proteome Res **8**(2): 662-672.

Cetta, G., De Luca, G., Tenni, R., Zanaboni, G., Lenzi, L. and Castellani, A. A. (1983). "Biochemical investigations of different forms of osteogenesis imperfecta. Evaluation of 44 cases." Connect Tissue Res **11**(2-3): 103-111.

Christiansen, H. E., Schwarze, U., Pyott, S. M., AlSwaid, A., Al Balwi, M., Alrasheed, S., Pepin, M. G., Weis, M. A., Eyre, D. R. and Byers, P. H. (2010). "Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta." Am J Hum Genet **86**(3): 389-398.

Dams, R., Huestis, M. A., Lambert, W. E. and Murphy, C. M. (2003). "Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid." J Am Soc Mass Spectrom **14**(11): 1290-1294.

Eagle, H., Washington, C. L. and Levy, M. (1965). "End product control of amino acid synthesis by cultured human cells." J Biol Chem **240**(10): 3944-3950.

Eyre, D. R. and Muir, H. (1975). "Type III collagen: A major constituent of

rheumatoid and normal human synovial membrane." Connect Tissue Res **4**(1): 11-16.

Fietzek, P. P. and Kuhn, K. (1975). "The covalent structure of collagen: amino-acid sequence of the cyanogen-bromide peptides alpha1-CB2, alpha1-CB4 and alpha1-CB5 from calf-skin collagen." Eur J Biochem **52**(1): 77-82.

Fietzek, P. P. and Kuhn, K. (1976). "The primary structure of collagen." Int Rev Connect Tissue Res **7**: 1-60.

Foltz, M., Cerstiaens, A., van Meensel, A., Mols, R., van der Pijl, P. C., Duchateau, G. S. and Augustijns, P. (2008). "The angiotensin converting enzyme inhibitory tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro show increasing permeabilities with increasing physiological relevance of absorption models." Peptides **29**(8): 1312-1320.

Fonteh, A. N., Harrington, R. J. and Harrington, M. G. (2007). "Quantification of free amino acids and dipeptides using isotope dilution liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry." Amino Acids **32**(2): 203-212.

Francis, G., Butler, W. T. and Finch, J. E., Jr. (1978). "The covalent structure of cartilage collagen. Amino acid sequence of residues 552-661 of bovine alpha1(II) chains." Biochem J **175**(3): 921-930.

Fujita, A., Kawakita, H., Saito, K., Sugita, K., Tamada, M. and Sugo, T. (2003). "Production of tripeptide from gelatin using collagenase-immobilized porous hollow-fiber membrane." Biotechnol Prog **19**(4): 1365-1367.

Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E. and Montero, M. P. (2011). "Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review." Food Hydrocolloids **25**(8): 1813-1827.

Gay, S. and Miller, E. J. (1983). "What is collagen, what is not." Ultrastruct Pathol **4**(4): 365-377.

Geiger, T., Cox, J., Ostasiewicz, P., Wisniewski, J. R. and Mann, M. (2010). "Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue." Nat Methods **7**(5): 383-385.

Granelli-Piperno, A. and Reich, E. (1978). "A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids." J Exp Med **148**(1): 223-234.

Hanke, S., Besir, H., Oesterhelt, D. and Mann, M. (2008). "Absolute SILAC for accurate quantitation of proteins in complex mixtures down to the attomole level." J Proteome Res **7**(3): 1118-1130.

Hatton, M. W. and Regoeczi, E. (1976). "The proteolytic nature of commercial samples of galactose oxidase. Purification of the enzyme by a simple affinity method." Biochim Biophys Acta **438**(2): 339-346.

Hsu, J. L., Huang, S. Y., Chow, N. H. and Chen, S. H. (2003). "Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics." Anal Chem **75**(24): 6843-6852.

Hudson, D. M. and Eyre, D. R. (2013). "Collagen prolyl 3-hydroxylation: a major role for a minor post-translational modification?" Connect Tissue Res **54**(4-5): 245-251.

Ichikawa, S., Morifuji, M., Ohara, H., Matsumoto, H., Takeuchi, Y. and Sato, K. (2010). "Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate." Int J Food Sci Nutr **61**(1): 52-60.

Ichimura, T., Yamanaka, A., Otsuka, T., Yamashita, E. and Maruyama, S. (2009). "Antihypertensive effect of enzymatic hydrolysate of collagen and Gly-Pro in spontaneously hypertensive rats." Biosci Biotechnol Biochem **73**(10): 2317-2319.

Inoue, K., Ikemura, A., Tsuruta, Y., Tsutsumiuchi, K., Hino, T. and Oka, H. (2012). "On-line solid-phase extraction LC-MS/MS for the determination of Ac-SDKP peptide

in human plasma from hemodialysis patients." Biomed Chromatogr **26**(2): 137-141.

Ishihama, Y., Sato, T., Tabata, T., Miyamoto, N., Sagane, K., Nagasu, T. and Oda, Y. (2005). "Quantitative mouse brain proteomics using culture-derived isotope tags as internal standards." Nat Biotechnol **23**(5): 617-621.

Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y. and Ohtsuki, K. (2005). "Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates." J Agric Food Chem **53**(16): 6531-6536.

Jurgensen, H. J., Madsen, D. H., Ingvarsen, S., Melander, M. C., Gardsvoll, H., Patthy, L., Engelholm, L. H. and Behrendt, N. (2011). "A novel functional role of collagen glycosylation: interaction with the endocytic collagen receptor uparap/ENDO180." J Biol Chem **286**(37): 32736-32748.

Kern, P., Sebert, B. and Robert, L. (1986). "Increased type-III/type-I collagen ratios in diabetic human conjunctival biopsies." Clin Physiol Biochem **4**(2): 113-119.

Kimira, Y., Ogura, K., Taniuchi, Y., Kataoka, A., Inoue, N., Sugihara, F., Nakatani, S., Shimizu, J., Wada, M. and Mano, H. (2014). "Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells." Biochem Biophys Res Commun.

Kirsch, E., Krieg, T., Nerlich, A., Remberger, K., Meinecke, P., Kunze, D. and Muller, P. K. (1987). "Compositional analysis of collagen from patients with diverse forms of osteogenesis imperfecta." Calcif Tissue Int **41**(1): 11-17.

Kirsch, E., Krieg, T., Remberger, K., Fendel, H., Bruckner, P. and Muller, P. K. (1981). "Disorder of collagen metabolism in a patient with osteogenesis imperfecta (lethal type): increased degree of hydroxylation of lysine in collagen types I and

III." Eur J Clin Invest **11**(1): 39-47.

Kivirikko, K. I. and Myllyla, R. (1979). "Collagen glycosyltransferases." Int Rev Connect Tissue Res **8**: 23-72.

Klement, E., Lipinski, Z., Kupihar, Z., Udvardy, A. and Medzihradszky, K. F. (2010). "Enrichment of O-GlcNAc modified proteins by the periodate oxidation-hydrazide resin capture approach." J Proteome Res **9**(5): 2200-2206.

Kurogochi, M., Matsushita, T., Amano, M., Furukawa, J., Shinohara, Y., Aoshima, M. and Nishimura, S. (2010). "Sialic acid-focused quantitative mouse serum glycoproteomics by multiple reaction monitoring assay." Mol Cell Proteomics **9**(11): 2354-2368.

Kurosaka, D., Hattori, S., Hori, H., Yamaguchi, N., Hasegawa, T., Akimoto, H. and Nagai, Y. (1994). "Substitution of cysteine for glycine-946 in the alpha 1(I) chain of type I procollagen causes lethal osteogenesis imperfecta." J Biochem **115**(5): 853-857.

Langrock, T., Czihal, P. and Hoffmann, R. (2006). "Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry." Amino Acids **30**(3): 291-297.

Lehmann, H. W., Wolf, E., Roser, K., Bodo, M., Delling, G. and Muller, P. K. (1995). "Composition and posttranslational modification of individual collagen chains from osteosarcomas and osteofibrous dysplasias." J Cancer Res Clin Oncol **121**(7): 413-418.

Li-Chan, E. C., Hunag, S. L., Jao, C. L., Ho, K. P. and Hsu, K. C. (2012). "Peptides derived from atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors." J Agric Food Chem **60**(4): 973-978.

Light, N. D. (1986). "Use of galactose oxidase in labelling hydroxylysine glycosides of collagen." Connect Tissue Res **15**(4): 221-233.

Lossner, C., Warnken, U., Pscherer, A. and Schnolzer, M. (2011). "Preventing arginine-to-proline conversion in a cell-line-independent manner during cell cultivation under stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) conditions." Anal Biochem **412**(1): 123-125.

Madsen, D. H., Engelholm, L. H., Ingvarsen, S., Hillig, T., Wagenaar-Miller, R. A., Kjoller, L., Gardsvoll, H., Hoyer-Hansen, G., Holmbeck, K., Bugge, T. H. and Behrendt, N. (2007). "Extracellular collagenases and the endocytic receptor, urokinase plasminogen activator receptor-associated protein/Endo180, cooperate in fibroblast-mediated collagen degradation." J Biol Chem **282**(37): 27037-27045.

Matsui, T., Hayashi, A., Tamaya, K., Matsumoto, K., Kawasaki, T., Murakami, K. and Kimoto, K. (2003). "Depressor effect induced by dipeptide, Val-Tyr, in hypertensive transgenic mice is due, in part, to the suppression of human circulating renin-angiotensin system." Clin Exp Pharmacol Physiol **30**(4): 262-265.

Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. and Chavez-Eng, C. M. (1998). "Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations." Anal Chem **70**(5): 882-889.

McKleroy, W., Lee, T. H. and Atabai, K. (2013). "Always cleave up your mess: targeting collagen degradation to treat tissue fibrosis." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **304**(11): L709-721.

Mendis, E., Rajapakse, N. and Kim, S. K. (2005). "Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate." J Agric Food Chem **53**(3): 581-587.

Mendler, M., Eich-Bender, S. G., Vaughan, L., Winterhalter, K. H. and Bruckner, P.

(1989). "Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI." J Cell Biol **108**(1): 191-197.

Mesmin, C., Dubois, M., Becher, F., Fenaille, F. and Ezan, E. (2010). "Liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the absolute quantification of the expected circulating apelin peptides in human plasma." Rapid Commun Mass Spectrom **24**(19): 2875-2884.

Michaelsson, E., Malmstrom, V., Reis, S., Engstrom, A., Burkhardt, H. and Holmdahl, R. (1994). "T cell recognition of carbohydrates on type II collagen." J Exp Med **180**(2): 745-749.

Miller, E. J. and Gay, S. (1982). "Collagen: an overview." Methods Enzymol **82 Pt A**: 3-32.

Morello, R., Bertin, T. K., Chen, Y., Hicks, J., Tonachini, L., Monticone, M., Castagnola, P., Rauch, F., Glorieux, F. H., Vranka, J., Bachinger, H. P., Pace, J. M., Schwarze, U., Byers, P. H., Weis, M., Fernandes, R. J., Eyre, D. R., Yao, Z., Boyce, B. F. and Lee, B. (2006). "CRTAP is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta." Cell **127**(2): 291-304.

Morgan, P. H., Jacobs, H. G., Segrest, J. P. and Cunningham, L. W. (1970). "A comparative study of glycopeptides derived from selected vertebrate collagens. A possible role of the carbohydrate in fibril formation." J Biol Chem **245**(19): 5042-5048.

Nakatani, S., Mano, H., Sampei, C., Shimizu, J. and Wada, M. (2009). "Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo." Osteoarthritis Cartilage **17**(12): 1620-1627.

Nilsson, J., Ruetschi, U., Halim, A., Hesse, C., Carlsohn, E., Brinkmalm, G. and Larson, G. (2009). "Enrichment of glycopeptides for glycan structure and attachment

site identification." Nat Methods **6**(11): 809-811.

Ohara, H., Ichikawa, S., Matsumoto, H., Akiyama, M., Fujimoto, N., Kobayashi, T. and Tajima, S. (2010). "Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts." J Dermatol **37**(4): 330-338.

Ohara, H., Matsumoto, H., Ito, K., Iwai, K. and Sato, K. (2007). "Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources." J Agric Food Chem **55**(4): 1532-1535.

Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. and Mann, M. (2006). "Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks." Cell **127**(3): 635-648.

Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. and Mann, M. (2002). "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." Mol Cell Proteomics **1**(5): 376-386.

Ong, S. E., Mittler, G. and Mann, M. (2004). "Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC." Nat Methods **1**(2): 119-126.

Pan, S., Wang, Y., Quinn, J. F., Peskind, E. R., Waichunas, D., Wimberger, J. T., Jin, J., Li, J. G., Zhu, D., Pan, C. and Zhang, J. (2006). "Identification of glycoproteins in human cerebrospinal fluid with a complementary proteomic approach." J Proteome Res **5**(10): 2769-2779.

Parikka, K., Leppanen, A. S., Pitkanen, L., Reunanen, M., Willfor, S. and Tenkanen, M. (2010). "Oxidation of polysaccharides by galactose oxidase." J Agric Food

Chem **58**(1): 262-271.

Parikka, K. and Tenkanen, M. (2009). "Oxidation of methyl alpha-D-galactopyranoside by galactose oxidase: products formed and optimization of reaction conditions for production of aldehyde." Carbohydr Res **344**(1): 14-20.

Pataridis, S., Eckhardt, A., Mikulikova, K., Sedlakova, P. and Miksik, I. (2008). "Identification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS." J Sep Sci **31**(20): 3483-3488.

Pokidysheva, E., Zientek, K. D., Ishikawa, Y., Mizuno, K., Vranka, J. A., Montgomery, N. T., Keene, D. R., Kawaguchi, T., Okuyama, K. and Bachinger, H. P. (2013). "Posttranslational modifications in type I collagen from different tissues extracted from wild type and prolyl 3-hydroxylase 1 null mice." J Biol Chem **288**(34): 24742-24752.

Prockop, D. J., Keiser, H. R. and Sjoerdsma, A. (1962). "Gastrointestinal absorption and renal excretion of hydroxyproline peptides." Lancet **2**(7255): 527-528.

Ramachandran, P., Boonthueung, P., Xie, Y., Sondej, M., Wong, D. T. and Loo, J. A. (2006). "Identification of N-linked glycoproteins in human saliva by glycoprotein capture and mass spectrometry." J Proteome Res **5**(6): 1493-1503.

Risteli, M., Niemitalo, O., Lankinen, H., Juffer, A. H. and Myllyla, R. (2004). "Characterization of collagenous peptides bound to lysyl hydroxylase isoforms." J Biol Chem **279**(36): 37535-37543.

Rodriguez, J., Gupta, N., Smith, R. D. and Pevzner, P. A. (2008). "Does trypsin cut before proline?" J Proteome Res **7**(1): 300-305.

Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S.,

Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A. and Pappin, D. J. (2004). "Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents." Mol Cell Proteomics **3**(12): 1154-1169.

Seyer, J. M., Hasty, K. A. and Kang, A. H. (1989). "Covalent structure of collagen. Amino acid sequence of an arthritogenic cyanogen bromide peptide from type II collagen of bovine cartilage." Eur J Biochem **181**(1): 159-173.

Seyer, J. M., Hutcheson, E. T. and Kang, A. H. (1976). "Collagen polymorphism in idiopathic chronic pulmonary fibrosis." J Clin Invest **57**(6): 1498-1507.

Seyer, J. M., Hutcheson, E. T. and Kang, A. H. (1977). "Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver." J Clin Invest **59**(2): 241-248.

Seyer, J. M. and Kang, A. H. (1977). "Covalent structure of collagen: amino acid sequence of cyanogen bromide peptides from the amino-terminal segment of type III collagen of human liver." Biochemistry **16**(6): 1158-1164.

Shapiro, F. D. and Eyre, D. R. (1982). "Collagen polymorphism in extracellular matrix of human osteosarcoma." J Natl Cancer Inst **69**(5): 1009-1016.

Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park, E. Y., Nakamura, Y. and Sato, K. (2011). "Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate." Food Chem **129**(3): 1019-1024.

Shigemura, Y., Iwai, K., Morimatsu, F., Iwamoto, T., Mori, T., Oda, C., Taira, T., Park, E. Y., Nakamura, Y. and Sato, K. (2009). "Effect of Prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin." J Agric Food Chem **57**(2): 444-449.

Spiro, R. G. (1967). "The structure of the disaccharide unit of the renal glomerular

basement membrane." J Biol Chem **242**(20): 4813-4823.

Spiro, R. G. (1967). "Studies on the renal glomerular basement membrane. Nature of the carbohydrate units and their attachment to the peptide portion." J Biol Chem **242**(8): 1923-1932.

Spiro, R. G. (1969). "Characterization and quantitative determination of the hydroxylysine-linked carbohydrate units of several collagens." J Biol Chem **244**(4): 602-612.

Sricholpech, M., Perdivara, I., Yokoyama, M., Nagaoka, H., Terajima, M., Tomer, K. B. and Yamauchi, M. (2012). "Lysyl hydroxylase 3-mediated glucosylation in type I collagen: molecular loci and biological significance." J Biol Chem **287**(27): 22998-23009.

Stawikowski, M. J., Aukazi, B., Stawikowska, R., Cudic, M. and Fields, G. B. (2014). "Glycosylation modulates melanoma cell alpha2beta1 and alpha3beta1 integrin interactions with type IV collagen." J Biol Chem **289**(31): 21591-21604.

Steinmann, B., Rao, V. H., Vogel, A., Bruckner, P., Gitzelmann, R. and Byers, P. H. (1984). "Cysteine in the triple-helical domain of one allelic product of the alpha 1(I) gene of type I collagen produces a lethal form of osteogenesis imperfecta." J Biol Chem **259**(17): 11129-11138.

Stokvis, E., Rosing, H., Lopez-Lazaro, L., Schellens, J. H. and Beijnen, J. H. (2004). "Switching from an analogous to a stable isotopically labeled internal standard for the LC-MS/MS quantitation of the novel anticancer drug Kahalalide F significantly improves assay performance." Biomed Chromatogr **18**(6): 400-402.

Stoltz, M., Furthmayr, H. and Timpl, R. (1973). "Increased lysine hydroxylation in rat bone and tendon collagen and localization of the additional residues." Biochim Biophys Acta **310**(2): 461-468.

Tenni, R., Valli, M., Rossi, A. and Cetta, G. (1993). "Possible role of overglycosylation in the type I collagen triple helical domain in the molecular pathogenesis of osteogenesis imperfecta." Am J Med Genet **45**(2): 252-256.

Terajima, M., Perdivara, I., Sricholpech, M., Deguchi, Y., Pleshko, N., Tomer, K. B. and Yamauchi, M. (2014). "Glycosylation and cross-linking in bone type I collagen." J Biol Chem **289**(33): 22636-22647.

van Platerink, C. J., Janssen, H. G., Horsten, R. and Haverkamp, J. (2006). "Quantification of ACE inhibiting peptides in human plasma using high performance liquid chromatography-mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **830**(1): 151-157.

von der Mark, K. (1981). "Localization of collagen types in tissues." Int Rev Connect Tissue Res **9**: 265-324.

Vranka, J. A., Pokidysheva, E., Hayashi, L., Zientek, K., Mizuno, K., Ishikawa, Y., Maddox, K., Tufa, S., Keene, D. R., Klein, R. and Bachinger, H. P. (2010). "Prolyl 3-hydroxylase 1 null mice display abnormalities in fibrillar collagen-rich tissues such as tendons, skin, and bones." J Biol Chem **285**(22): 17253-17262.

Watanabe-Kamiyama, M., Shimizu, M., Kamiyama, S., Taguchi, Y., Sone, H., Morimatsu, F., Shirakawa, H., Furukawa, Y. and Komai, M. (2010). "Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats." J Agric Food Chem **58**(2): 835-841.

Weis, M. A., Hudson, D. M., Kim, L., Scott, M., Wu, J. J. and Eyre, D. R. (2010). "Location of 3-hydroxyproline residues in collagen types I, II, III, and V/XI implies a role in fibril supramolecular assembly." J Biol Chem **285**(4): 2580-2590.

Wu, G. Y., Pereyra, B. and Seifter, S. (1981). "Specificity of trypsin and

carboxypeptidase B for hydroxylysine residues in denatured collagens." Biochemistry **20**(15): 4321-4324.

Yang, C., Park, A. C., Davis, N. A., Russell, J. D., Kim, B., Brand, D. D., Lawrence, M. J., Ge, Y., Westphall, M. S., Coon, J. J. and Greenspan, D. S. (2012). "Comprehensive mass spectrometric mapping of the hydroxylated amino acid residues of the alpha1(V) collagen chain." J Biol Chem **287**(48): 40598-40610.

Zeng, X., Hood, B. L., Zhao, T., Conrads, T. P., Sun, M., Gopalakrishnan, V., Grover, H., Day, R. S., Weissfeld, J. L., Wilson, D. O., Siegfried, J. M. and Bigbee, W. L. (2011). "Lung cancer serum biomarker discovery using label-free liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Thorac Oncol **6**(4): 725-734.

Zhang, H., Li, X. J., Martin, D. B. and Aebersold, R. (2003). "Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry." Nat Biotechnol **21**(6): 660-666.

図表の転載について

第2章の図2-1、図2-2、図2-3、図2-4、図2-5、表2-1、表2-2および表2-3は、American Society for Biochemistry and Molecular Biology の許諾を得て下記文献より一部変更して転載した。

This research was originally published in *Molecular & Cellular Proteomics*. Taga, Y., M. Kusubata, K. Ogawa-Goto and S. Hattori. "Development of a novel method for analyzing collagen O-glycosylations by hydrazide chemistry." *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11(6): M111.010397. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology

第3章の図3-1、図3-2、図3-3、図3-4、図3-5、表3-1、表3-2および表3-3は、American Chemical Society の許諾を得て下記文献より一部変更して転載した。

Reprinted with permission from (Taga, Y., M. Kusubata, K. Ogawa-Goto and S. Hattori (2013). "Site-specific quantitative analysis of overglycosylation of collagen in osteogenesis imperfecta using hydrazide chemistry and SILAC." *J Proteome Res* 12(5): 2225-2232). Copyright (2013) American Chemical Society.

第4章の図4-1、図4-2、図4-3、図4-4、図4-5、図4-6、図4-7、図4-8、図4-9、図4-10、図4-11、表4-1、表4-2、表4-3および表4-4はAmerican Chemical Society の許諾を得て、下記文献より一部変更して転載した。

Reprinted with permission from (Taga, Y., M. Kusubata, K. Ogawa-Goto and S. Hattori (2014). "Stable isotope-labeled collagen: a novel and versatile tool for quantitative collagen analyses using mass spectrometry." *J Proteome Res* 13(8):

3671-3678). Copyright (2014) American Chemical Society.

第5章の図5-1、図5-2、図5-3、図5-4、図5-5、図5-6、図5-7、表5-1、表5-2および表5-3はAmerican Chemical Societyの許諾を得て、下記文献より一部変更して転載した。

Reprinted with permission from (Taga, Y., M. Kusubata, K. Ogawa-Goto and S. Hattori (2014). " Highly accurate quantification of hydroxyproline-containing peptides in blood using a protease digest of stable isotope-labeled collagen." J Agric Food Chem **62**(50): 12096-12102). Copyright (2014) American Chemical Society.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、ご指導いただきました灘野大太准教授に深く感謝致します。
また、研究を進める上で常に有益なご指導、ご助言を頂いた株式会社ニッピ・バイオマト
リックス研究所の服部所長、後藤次長、楠畑次長に感謝致します。その他、様々な面でご
協力いただきました株式会社ニッピの皆様にご心より御礼申し上げます。

最後に、いつも励まし支えてくれた家族に心から感謝致します。

2015 年 3 月