

血清アルブミンの化学修飾オミクスに基づく  
バイオマーカー探索法の研究

臨床分析化学分野

B1YM1063 村田 和之

## 略号表

ACTH: adrenocorticotropic hormone (副腎皮質刺激ホルモン)

Ala: alanine (アラニン)

Ang: angiotensin (アンジオテンシン)

Arg: arginine (アルギニン)

Asn: asparagine (アスパラギン)

Asp: aspartic acid (アスパラギン酸)

CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O: copper(II) sulphate pentahydrate (硫酸銅五水和物)

Cys: cysteine (システイン)

DHB: 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-ジヒドロキシ安息香酸)

DTT: dithiothreitol (ジチオスレイトール)

Gln: glutamine (グルタミン)

Glu: glutamic acid (グルタミン酸)

HCl: hydrogen chloride (塩酸)

His: histidine (ヒスチジン)

HNE: 4-hydroxy-2(*E*)-nonenal (4-ヒドロキシ-2(*E*)-ノネナール)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide (ハイドロゲンペルオキシド)

HSA: human serum albumin (ヒト血清アルブミン)

IAA: iodoacetamide (ヨードアセトアミド)

IAE: immunoaffinity extraction (イムノアフィニティー抽出)

Ins B: insulin chain B oxidized, bovine (ウシ、酸化型インスリン B 鎖)

IS: internal standard (内標準物質)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: potassium dihydrogenphosphate (リン酸二水素カリウム)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: dipotassium hydrogenphosphate (リン酸水素二カリウム)

Lys: lysine (リジン)

MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionization

(マトリクス支援レーザー脱離イオン化)

Met: methionine (メチオニン)

MS: mass spectrometry (質量分析法)

*m/z*: mass-to-charge ratio (質量電荷比)

NaOH: sodium hydroxide (水酸化ナトリウム)

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>: ammonium bicarbonate (重炭酸アンモニウム)

ONOO<sup>•</sup>: peroxyxynitrite (ペルオキシナイトライト)

PMF: peptide mass fingerprinting

(ペプチドマスフィンガープリンティング)

Pro: proline (プロリン)

S/N: signal-to-noise ratio (シグナル - ノイズ比)

TFA: trifluoroacetic acid (トリフルオロ酢酸)

TOF/MS: time-of-flight mass spectrometry (飛行時間型質量分析法)

Trp: tryptophan (トリプトファン)

Tyr: tyrosine (チロシン)

V8: endoproteinase Glu-C, staphylococcus aureus V8

(エンドプロテイナーゼ Glu-C, V8 プロテアーゼ)

Val: valine (バリン)

## 目次

第一節 序	…… 1
第二節 化学修飾 HSA 検出法及び抽出法の検討	…… 6
第三節 HSA に対する活性化学種の反応性の検討と 解析ターゲットペプチドの同定	……20
第四節 血漿中化学修飾 HSA の解析	……32
第五節 結語	……38
謝辞	……40
実験の部	……41
引用文献	……55

## 第一節 序

化学的ストレスは、体の内因性あるいは外因性の化学物質等により、生体に負荷のかかった状態である。化学的ストレス下では活性酸素、過酸化脂質等の活性化学種により、タンパク質<sup>[1,2]</sup>や核酸<sup>[3]</sup>等の生体分子の修飾、さらには細胞の傷害<sup>[4]</sup>も発生する場合がある。通常、これらに対してスーパーオキシドジスムターゼやグルタチオンといったスカベンジャーによる保護機構により生体の均衡が保たれている<sup>[5]</sup>。しかし、疾患や老化、生活習慣の変化等による化学的ストレスの増大がその均衡を崩し、生体機能に重大な影響を及ぼすことがある<sup>[6]</sup> (図 1)。そのため、生体の化学的ストレスを把握することは極めて重要な意義を有している。今日では、臨床における病態や治療効果の客観的かつ正確な判定を目的として、ゲノミクス<sup>[7]</sup>やプロテオミクス<sup>[8]</sup>に代表される最新の研究手法を駆使して化学的ストレスを反映する病態バイオマーカーの探索も進められている。

バイオマーカー探索に用いられる試料として、体液や組織が一般的である。中でも血液は、試料採取の際の被験者への負担が組織に比べて小さいことから、様々な臨床検査にも用いられている。また、タンパク質は選択的スプライシングや翻訳後修飾を受けることから、遺伝子よりも動的に身体の状態を反映していると考えられる。このため近年、血中のタンパク質を対象として、プロテオミクスを応用したバイオマーカー探索が盛んに行われている。主なターゲットとされているのは、ディーププロテオームと呼ばれる極微量のタンパク質群であり、これらの総量は血清タンパク質の総量の 1%にも満たない (図 2)。残りの 99%以上を占めているのは、わずか 22 種類の良く知られた血清主要タンパク質である。一方、ディーププロテオームには同定されるだけでも 4500 種類以上のタンパク質が存在し<sup>[9]</sup>、さらに多くの未同定タンパク質が存在する可能性がある。しかし、極めて多様なタンパク質が極微量にしか存在しないため、最新の

技術と装置を持ってしても解析は困難を極めている。

化学的ストレスによりタンパク質のアミノ酸側鎖が様々な非酵素的翻訳後修飾、すなわち化学修飾を受ける。例えば、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) のラジカル開裂や、 $\text{Cu}^{\text{II}}$  の触媒作用による開裂によりスーパーオキシド、ヒドロキシラジカル等の活性酸素種が発生する<sup>[10]</sup>。これら活性酸素種は主にメチオニン (Met)、トリプトファン (Trp)、ヒスチジン (His) 側鎖を酸化する<sup>[10-12]</sup>。また、グルコースはリジン (Lys) 側鎖のアミノ基やアルギニン (Arg) 側鎖のグアニジノ基と糖付加体を形成し<sup>[13-15]</sup>、脂質過酸化物である 4-ヒドロキシ-2(*E*)-ノネナール (HNE) は、Lys、His、システイン (Cys) 求核性アミノ酸側鎖へマイケル付加やシッフ塩基の形成により結合する<sup>[16]</sup>。活性窒素種に分類されるペルオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) は主にチロシン (Tyr) 側鎖の 3 位をニトロ化する<sup>[17]</sup>。これらの化学修飾は、Tyr リン酸化の様な酵素的翻訳後修飾とは異なり、活性化学種の曝露量に依存して起こると考えられる。このため、化学修飾を網羅的に解析することが、化学的ストレスやそれらに関連する疾患・健康状態を反映したバイオマーカー発見に繋がる。こうした背景から、当研究室では、この様な化学修飾の網羅的な解析手法『化学修飾オミクス』の概念を提唱し、研究を進めてきた<sup>[18-20]</sup>。

従来の翻訳後修飾解析では、特定の修飾に特異的な濃縮法や検出法を用い、検出した修飾タンパク質を同定する方法がとられる<sup>[21]</sup>。これに対して、化学修飾オミクスは全タンパク質から特定のタンパク質をターゲットとし、その全ての化学修飾を網羅的に解析する手法である点で大きく異なる。この化学修飾オミクスに基づくバイオマーカー探索では、種々の化学種と反応する確率の高い高濃度なタンパク質がターゲットに適しており、血中で高濃度に存在する主要タンパク質はその代表格である。通常こうした主要タンパク質は測定妨害物質として扱われ、プロテオーム解析の対象とはならない。それゆえ、化学修飾に

関する解析も未だ不十分であり、バイオマーカー探索の余地が多大に残されている。

血清タンパク質の約 6 割を占めるヒト血清アルブミン (HSA) は、分子量 66 kDa のタンパク質である<sup>[22]</sup>。血液の浸透圧調節、薬物・脂肪酸・金属等との結合や輸送等、多彩な生理機能を有し、生物学的半減期は約 20 日である。585 アミノ酸残基からなり、化学修飾の標的となり易い塩基性アミノ酸残基を多数含む。Lys 残基を 59、Arg 残基を 24、His 残基を 16 有する。また、35 の Cys 残基の内、唯一ジスルフィド結合を形成していない Cys<sup>34</sup> が存在する。中長期の血糖マーカーとして臨床で利用されている<sup>[23,24]</sup>糖付加アルブミンは、主に Lys<sup>525</sup>へグルコースが付加した化学修飾体である。また、Cys<sup>34</sup>の遊離スルフィドリル基にシステインやグルタチオン等の結合した『酸化型』アルブミンも血中に存在する<sup>[25,26]</sup>。バイオマーカーとして有用なこれらの化学修飾 HSA が知られている一方で、その他の化学修飾に関する情報は乏しい。

そこで本研究では、化学修飾オミクスに基づく新たなバイオマーカー探索の方向性を開くべく、質量分析法 (MS) を基盤に HSA をターゲットとした網羅的な化学修飾解析の手法を構築し、評価した。まず第二節では、網羅的な化学修飾解析には不可欠となる HSA の全アミノ酸配列を網羅可能な消化ペプチドの検出を目的とし、切断特性の異なるタンパク質消化酵素と正/負イオン検出モードを使用する HSA の全アミノ酸配列検出法を検討した。また、血漿から化学修飾体も含めた全 HSA の選択的抽出を目的にポリクローナル抗体を活用した群特異的抽出について検討した。次いで第三節では、HSA に対する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、グルコース、HNE、ONOO<sup>•</sup>の反応性を検討し、モデル修飾体として酸化、糖化、HNE、ニトロ化修飾 HSA を調製した。それを基に、修飾を受け易い部位を同定し、重点的解析ターゲットペプチドを決定した。第四節では血中化学修飾 HSA の検出を検討し、構築した手法を用い実試料の化学修飾解析を行った。

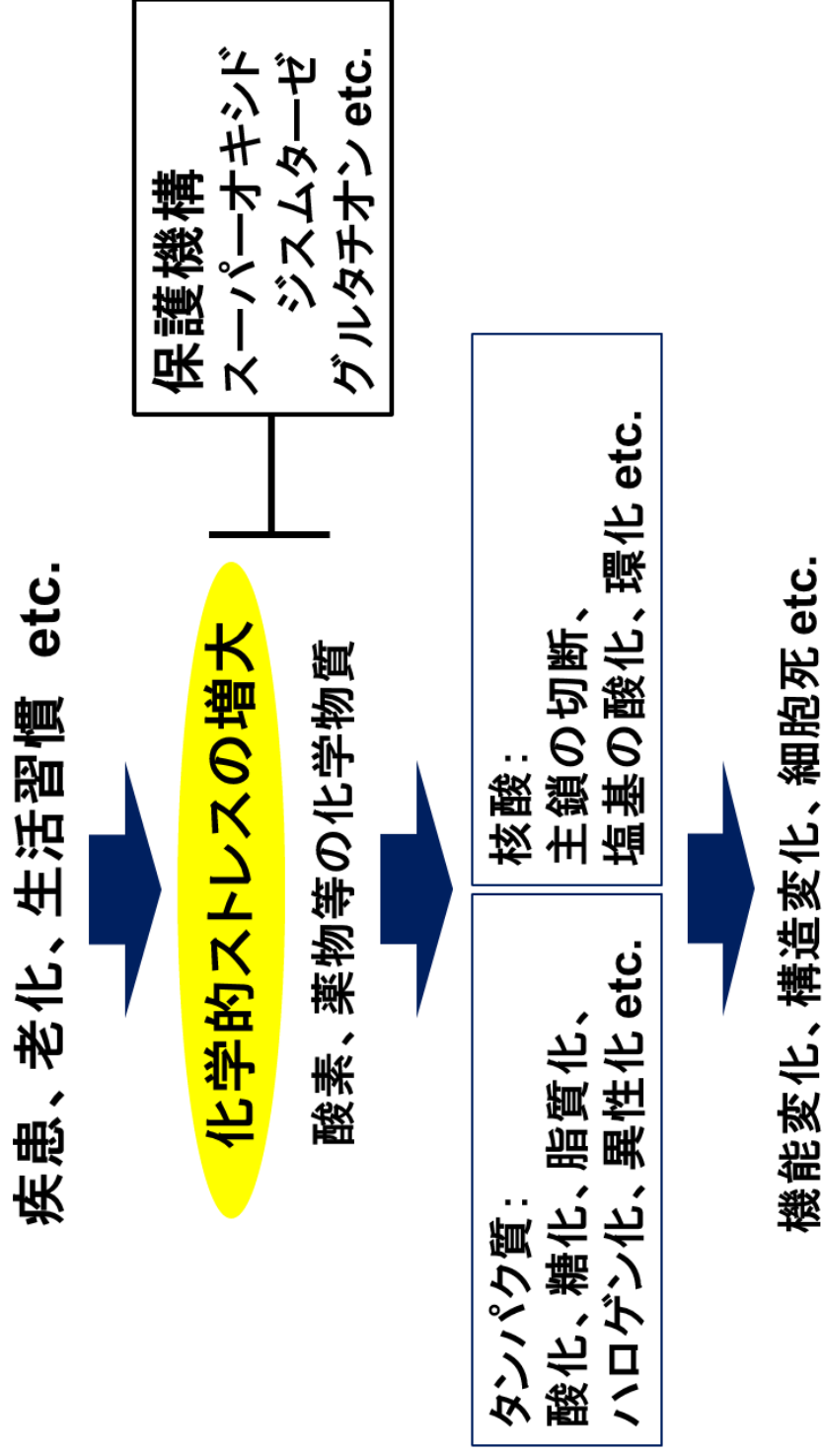


図1 化学的ストレスの生体への影響



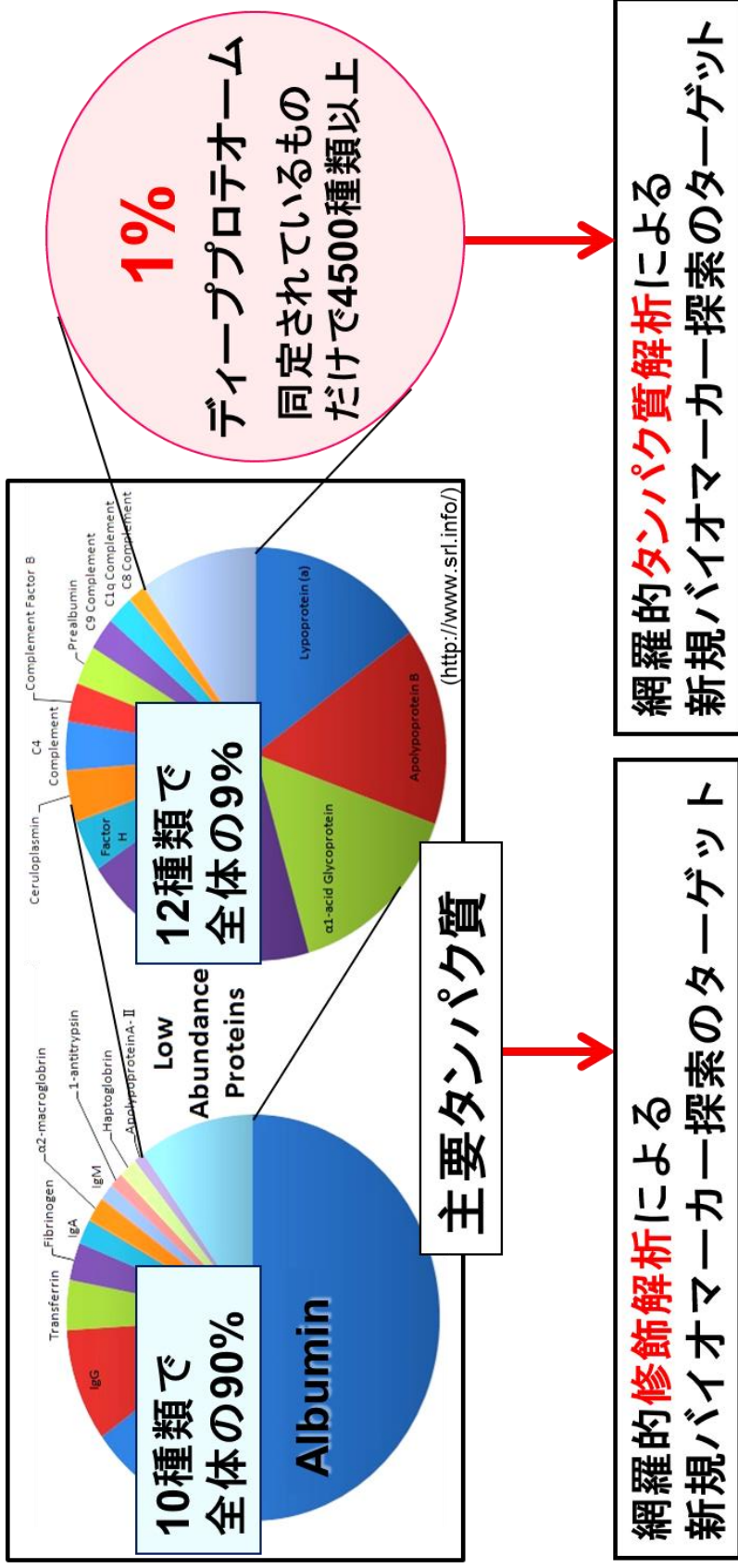


図2 血清タンパク質の内訳と新規バイオマーカー探索のターゲット

## 第二節 化学修飾 HSA 検出法及び抽出法の検討

従来の翻訳後修飾解析においては、酸化芳香族アミノ酸の蛍光検出や、酸化チタンによるリン酸化ペプチドの選択的抽出の様に、特定の修飾に特異的な手法が用いられてきた<sup>[21]</sup>。しかし、網羅的な修飾解析のためには、修飾の種類に依存しない検出法や抽出法を用いた解析法を構築する必要がある。近年、タンパク質研究に繁用されている MS では、MALDI 法や ESI 法等、極めてソフトなイオン化法が用いられる。これらの方法は、修飾部位を分解させずに検出する上でも有利である。ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法<sup>[27]</sup>は、MS を用いたタンパク質同定法であり、専らマトリクス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)-飛行時間型質量分析法 (TOF/MS) で用いられる。ここでは本手法の化学修飾 HSA の網羅的解析法への応用を検討した (図 3)。PMF 法では、タンパク質を酵素消化したペプチド断片を MS で測定する。その結果をタンパク質データベースの理論的データと比較すると、ペプチド質量パターンを基としたタンパク質同定が可能となる。この手法を基にして、以下の化学修飾解析法を考察した。まず、血中から選択的に抽出した HSA を酵素消化に付し、得られたペプチド断片を MS で測定する。修飾ペプチドはデータベース検索によって、未修飾ペプチドとの質量差から判別可能となる。なお、ジスルフィド結合 17 カ所を含む HSA に対し高い配列カバー率を得るために、酵素消化時の還元アルキル化が必要と考えられる。これにより、Cys 残基の酸化修飾情報が失われるが、スルフェン酸化等可逆的で不安定な修飾は汎用的なバイオマーカーとして利用困難であり、定量的評価も難しい。このため、バイオマーカー探索の観点からは、Cys 残基の酸化修飾情報よりも解析時の配列カバー率の向上が重要である。そこで本節では、MALDI-TOF/MS における正/負イオン検出モードの併用及

び複数の消化酵素の併用による HSA 全アミノ酸配列の検出を検討した。さらに、修飾の有無に関わらず HSA のみを精製可能な選択的抽出を検討した。

HSA 上の化学修飾を漏れなく検出するためには、全アミノ酸残基をカバーするペプチド断片の検出、すなわち全配列検出が不可欠となる。HSA をトリプシンや Glu-C (V8) で消化すると、およそ 50 種類以上のペプチド断片となる。検出されない断片があると、それに相当する部位の化学修飾情報が得られない。一般に全配列検出が困難<sup>[28]</sup>とされる理由は、正イオンを生成しにくいペプチドを含むことと、4 アミノ酸残基程度までの短いペプチドを MS で検出困難であることである。

正イオン化しにくいペプチドは、塩基性アミノ酸残基が少ない等、むしろ負イオン化に適した特性を持つ可能性がある。先に、当研究室では負イオン検出モードを活用したタンパク質同定率の向上を検討し、負イオン検出モードの併用が配列カバー率の向上に有用であり、さらに HSA でも効果のあることを示した<sup>[29]</sup>。リン酸添加 2,5-ジヒドロキシ安息香酸がマトリクスとして正/負イオン検出の両モードに共通して使用可能で、いずれにおいても良好なイオン生成能を示すことも見出した。

一方、MALDI 法では、マトリクスやそのクラスターイオン等が低質量域に多量に生成するため、 $m/z$  600 以下の短いペプチド断片の検出が困難になる。また、試料調製時の脱塩操作等で、比較的疎水性の小さい短鎖のペプチドは無機塩等と共に除かれることもある。このような短鎖ペプチドの問題を回避するためには、特異性の異なるプロテアーゼの相補的利用が有用だと考えられる (図 4)。例えば、酵素消化に繁用されるトリプシンは、弱塩基性条件下で Lys, Arg 残基の C 末側で切断する。ただし、修飾を受けた Lys, Arg 残基 の C 末側とプロリン (Pro) 残基 の N 末側は切断せず、HSA の理論的切断箇所は 78 ヲ所となる。V8 は、リン酸非存在条件下でグルタミン酸 (Glu) 残基の C 末側で切断し、Pro 残基の

N 末側は切断しない。V8 による HSA の理論的切断箇所は 60 ヲ所である。この様な特異性の異なる酵素の併用により、一方の酵素では短い断片となる配列部分を、他方では長いペプチド断片中に含めることもできる。そこでまず、市販の HSA を用いて、そのトリプシン消化ペプチドを上記マトリクスを用いて分析した。HSA を定法に従いトリプシン消化して得られたペプチドの配列カバー率は、正イオンモードで全アミノ酸の 92%であった (図 5, 赤)。なお、検出されなかった配列は、Gln<sup>196</sup>-Lys<sup>199</sup>、Ala<sup>210</sup>-Lys<sup>212</sup>、Asp<sup>314</sup>-Lys<sup>317</sup>、Tyr<sup>411</sup>-Lys<sup>413</sup>、Asn<sup>429</sup>-Lys<sup>444</sup>、Val<sup>473</sup>-Lys<sup>475</sup>、Gln<sup>522</sup>-Lys<sup>524</sup>、His<sup>535</sup>-Lys<sup>545</sup>であった。負イオンモードの配列カバー率は 88% (図 5, 青) であり、合計の配列カバー率は 94%に達した。因みに、N 末端に相当するテトラペプチドの DAHK は、短く高極性のため検出されないと予想された。消化時間を調節して反応が完了しきらない条件で行ったところ、Lys<sup>4</sup>の C 末側で切断されていない Asp<sup>1</sup>-Lys<sup>20</sup>として N 末端ペプチドの検出に成功した。この様なペプチドの検出のため、データベース検索において切断ミス数を最大 2 ヲ所に設定した。また、トリプシンは自己消化によりキモトリプシン様の基質特異性を示す<sup>[30]</sup>。一部に同様の切断が見られたが、キモトリプシン様切断はわずかであり、解析に影響は無いと考えられた。次に、V8 を使用し、トリプシン消化と同様に不完全な消化条件を用いて分析した。データベース検索において切断ミス数を最大 2 ヲ所とした。HSA を V8 消化して得られたペプチドの配列カバー率は、正イオン、負イオンモードでそれぞれ 98%、86%であり、トリプシン消化物で検出されなかった 196-199 番目、314-417 番目、429-444 番目、473-475 番目、522-524 番目、539-545 番目の配列を含むペプチドも検出された (図 5, 黄, 緑)。以上の結果、トリプシンまたは V8 消化物を正イオンあるいは負イオンモードで測定すると、単独の測定では検出されたペプチドの配列カバー率は 86-98%であった。しかし、全ての測定結果を組み合わせた配列カバー率は 100%となり、全アミノ酸配列に相当するデータ

を取得可能になった。なお、両酵素のどちらでも短いペプチドとなると予想される配列部分があり、Lys 残基の C 末側を切断する Lys-C を用いることで適度な長さの断片にできると考えられた。しかし、今回は 2 酵素の不完全な消化条件を利用することにより全配列を検出することができたため、本酵素の使用は不要であると考えられた。

次いで、HSA の選択的抽出法を検討した。PMF と同様に、本法では試料精製が極めて重要である。HSA 以外のタンパク質・ペプチドが混入した場合、単にマスペクトルが複雑になるだけでなく、修飾ペプチドの同定が困難となるおそれもある。また、HSA 抽出法が化学修飾 HSA に対する選択性が低い場合、そもそも化学修飾解析は不可能である。そのため、HSA を特異性高く認識し、HSA の化学修飾に寛容な抽出法が必要である。Cohn の低温エタノール抽出法<sup>[31]</sup>は、低コストであるが工業的用途で、微量精製には適していない。他に、チバクロンブルー等の色素へのアフィニティーを利用した色素抽出法<sup>[32]</sup>、抗 HSA 抗体を用いたイムノアフィニティー抽出法 (IAE)<sup>[33]</sup>がある。色素抽出法はチバクロンブルーをカラムに充てんしたキットも市販される等簡便な方法であるが、特異性が低く<sup>[34]</sup>、夾雑タンパク質の混入を避けられない。IAE では多くの場合、固定化抗 HSA 抗体が利用される。抗体は約 5 アミノ酸残基以上のエピトープと呼ばれる部位を認識する<sup>[35]</sup>ことから、特定のエピトープを持つ抗原タンパク質を特異性高く認識し結合する。IAE では、より高い特異性を得るため認識部位の単一なモノクローナル抗体を使用することが多い。しかし、化学修飾解析法では、本来エピトープとなる部分に修飾がある場合に、抗体の認識を阻害する可能性もある。そこで、認識部位の多様なポリクローナル抗体を用いて HSA 認識に対しては厳密に、しかし修飾認識に対しては寛容という、一見相反する要件を同時に満たすことが可能である。すなわち、修飾によりあるエピトープの構造が変化しても、他のエピトープを認識する抗体によって HSA を捕捉し、

様々な修飾 HSA 群を一度に抽出可能になる。先に当研究室でアンジオテンシン II 類縁体をモデルとしてこの群特異的抽出法を検討し、その有用性を明らかにしている [20]。

本研究では、ディーププロテオーム解析用に HSA 除去カラムとして市販されている Vivapure Anti-HSA Kit を用いた (図 6)。本来は HSA の選択的除去を目的とした製品であるが、抽出カラムとしての利用を検討した。抽出操作は、キットに付属する緩衝液中 HSA を抗体に捕捉、洗浄した後、グリシン/塩酸緩衝液を用いて HSA を溶出した。最適化した条件で、血漿中濃度に調製した HSA 溶液 20  $\mu$ L を抽出し、そのタンパク質濃度を、Bradford 法を用いて測定した。全抽出液中には 0.48 mg protein のタンパク質、すなわち HSA が含まれていた (表 1)。添加した HSA の 60% を回収できており、後の解析に十分な量の HSA が回収できていることを確認した。さらに、本カラムを用いたヒト血漿抽出物をトリプシン消化後 MALDI-TOF/MS で測定したところ、HSA 標品と同様のマススペクトルが得られた (図 7)。また、この測定結果から PMF 法により HSA の同定も可能であった。これらのことから、本法により血漿中から HSA を抽出可能であることが確認された。抗体やカラムへの非特異的結合や、HSA との相互作用により、HSA 以外のタンパク質と一緒に抽出されている可能性も考えられたが、マススペクトル上で夾雑タンパク質由来と考えられるピークは認められなかった。さらに、トリプシンあるいは V8 でそれぞれ酵素消化を行った抽出液を MALDI-TOF/MS に付し、データベース検索の結果から可能性の高い 20 種類のヒトタンパク質を調べた。その結果、HSA のみがいずれの酵素を用いた場合も共通して同定され、タンパク質の一致可能性を示すスコアは HSA で他のタンパク質の 10 倍以上となった (表 2、3)。夾雑タンパク質の混入を仮定した場合、PMF により混入したタンパク質が比較的高スコアで同定されるはずである。しかし、両酵素の消化物から HSA 以外に共通して同定されたタンパク質は

無く、IAEによるHSAの選択的な抽出が確認された。

以上、検出法と抽出法の検討により、課題であった全配列検出と選択的抽出が可能となった。これにより、従来法では見過ごされてきた修飾部位の検出や、複数種の修飾の同時解析も可能になる。上記の成果を踏まえ、次節では各種の活性化学種を用いて、HSAに対する反応性と、バイオマーカー探索におけるターゲットペプチド候補を検討した。

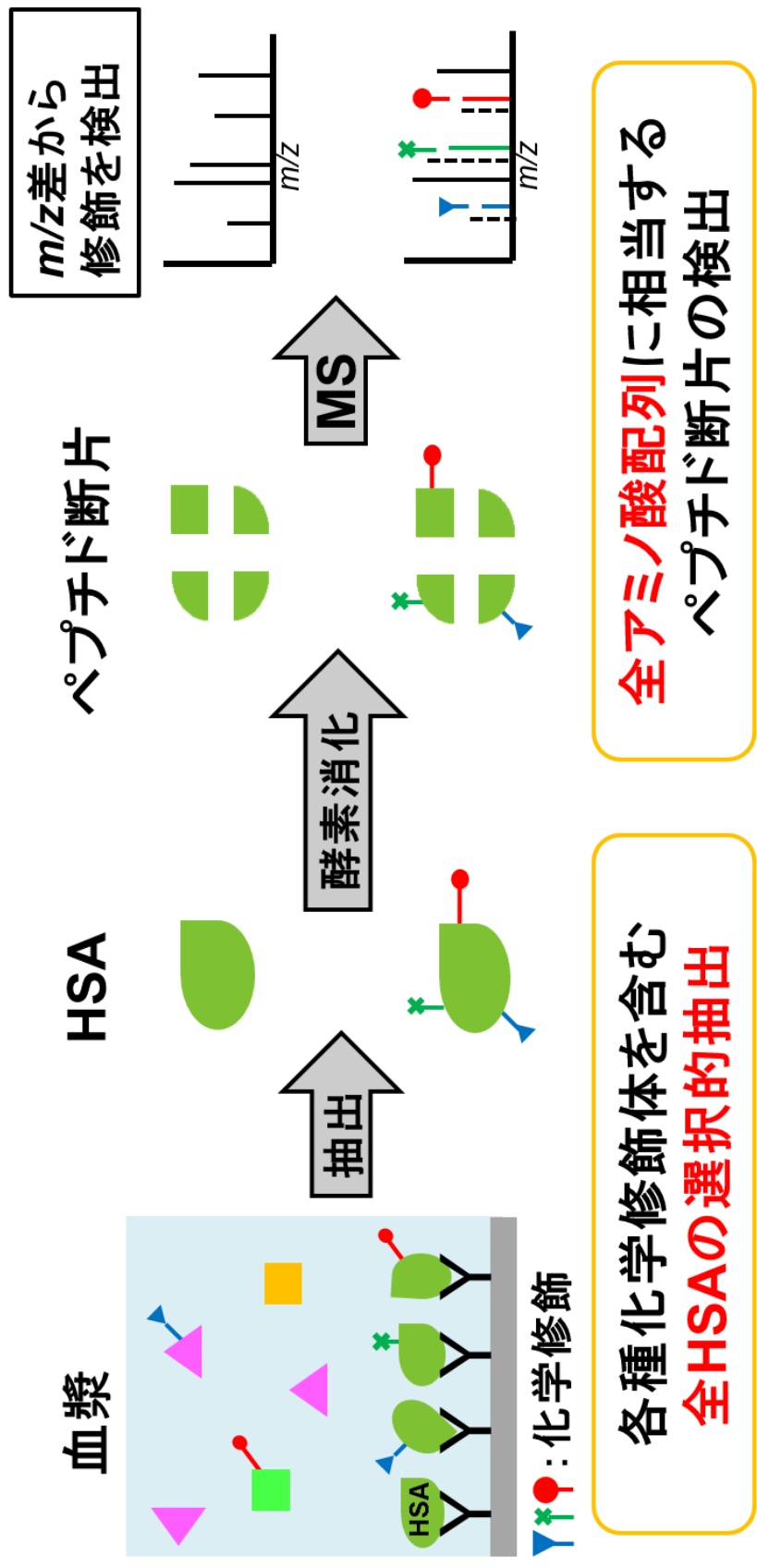


図3 HSA化学修飾解析法の概略



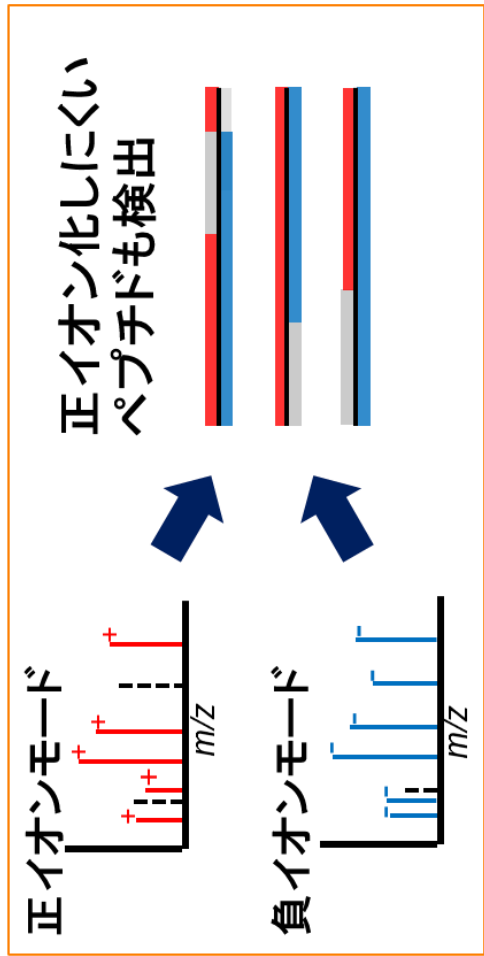
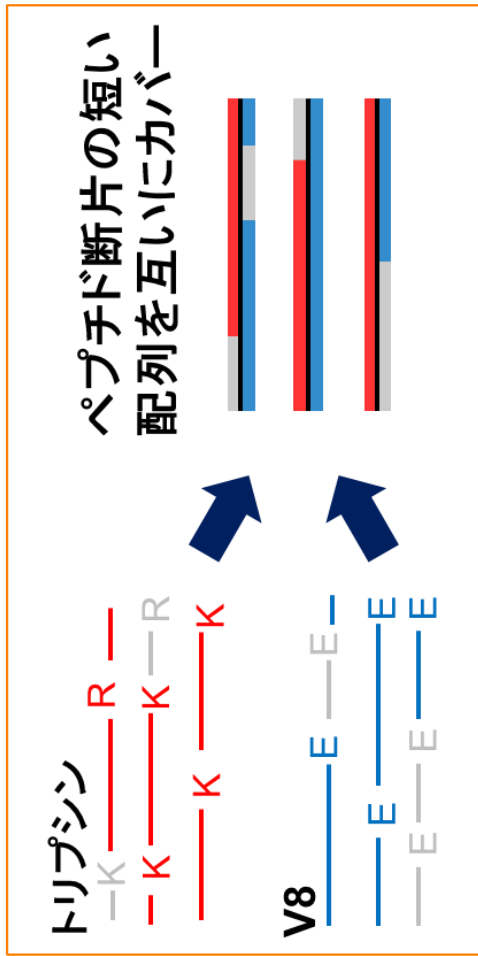
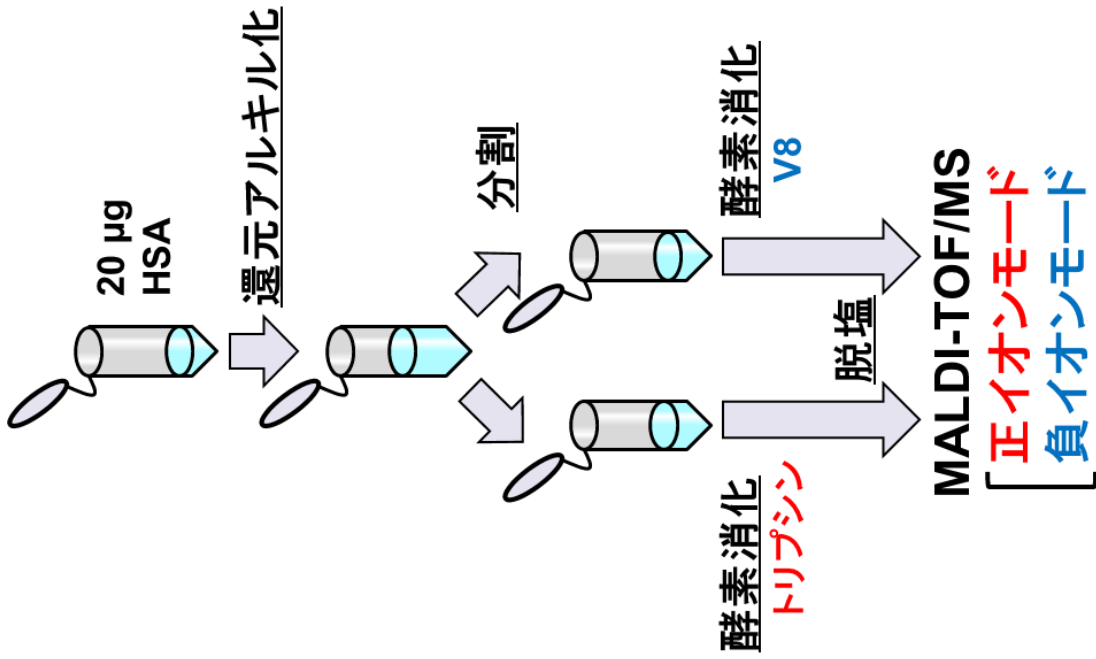


図4 配列カバール率向上のための検出法の概略

1 DAHKSEVAHREFKDLGEEENFKALVLI AFAQYLQQCFEDHVKLVNEVTEFA  
51 KTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE  
101 CFLQHKDDNPNI PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYETARRHPYFY  
151 APELLFFAKRYKAAFT E C C Q A A D K A A C L L P K L D E L R D E F G K A S S A K Q R L K C  
201 ASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTKVHTECCHGDL  
251 LECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA  
301 DLPSLAADFVE SKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLLA  
351 KTYETLLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE  
401 YKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAE  
451 DYLSVVLNGLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRRPCFSALEVDETYVPK  
501 EFNAEFTTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELL V K H K P K A T K E Q L K A V M D D  
551 FAAFVEKCKADDKETCFAEFGKKLVAAASQAALGL

## 図5 MALDI-TOF/MSで検出されたHSAの消化ペプチド

赤: トリプシン消化、正イオンモード、88%、黄: V8消化、正イオンモード、94%、  
青: トリプシン消化、負イオンモード、75%、緑: V8消化、負イオンモード、86%

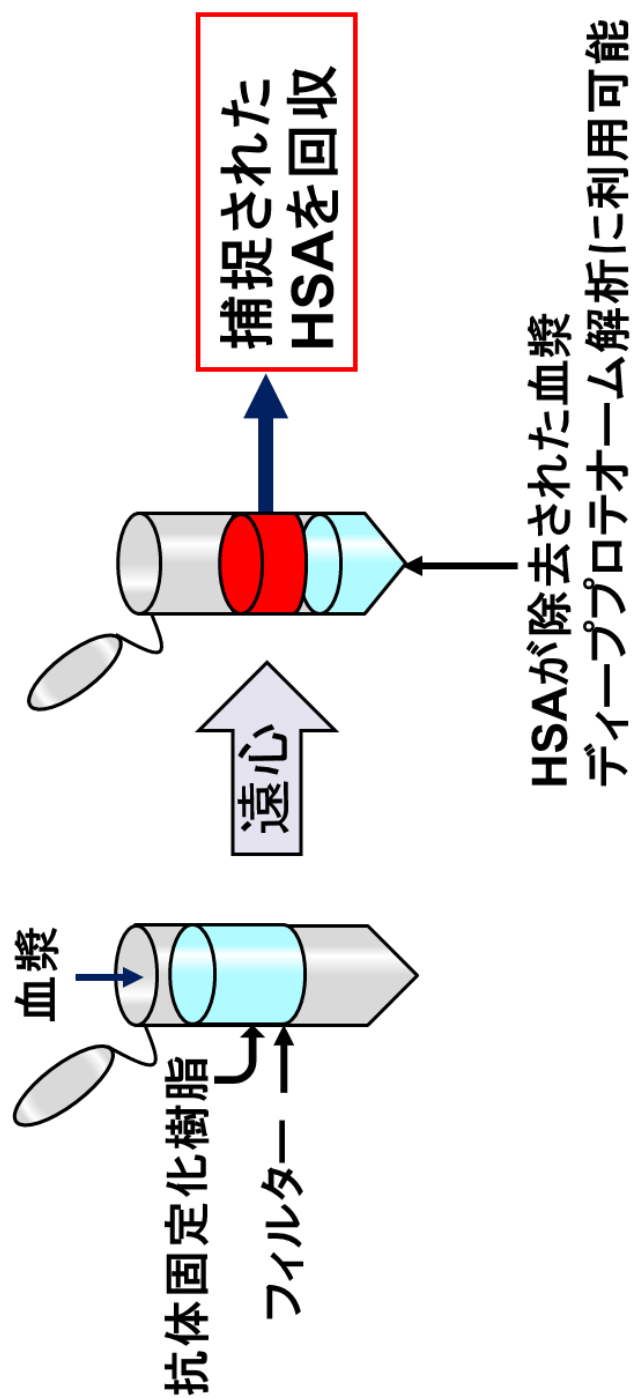


図6 HSA選択的イムノアフィニティー抽出法の概略

表1 抽出液中のタンパク質量と回収率

試料	タンパク質量 (mg protein)	回収率 (%)
血漿中濃度HSA溶液	0.80	100
抽出液	0.48	60

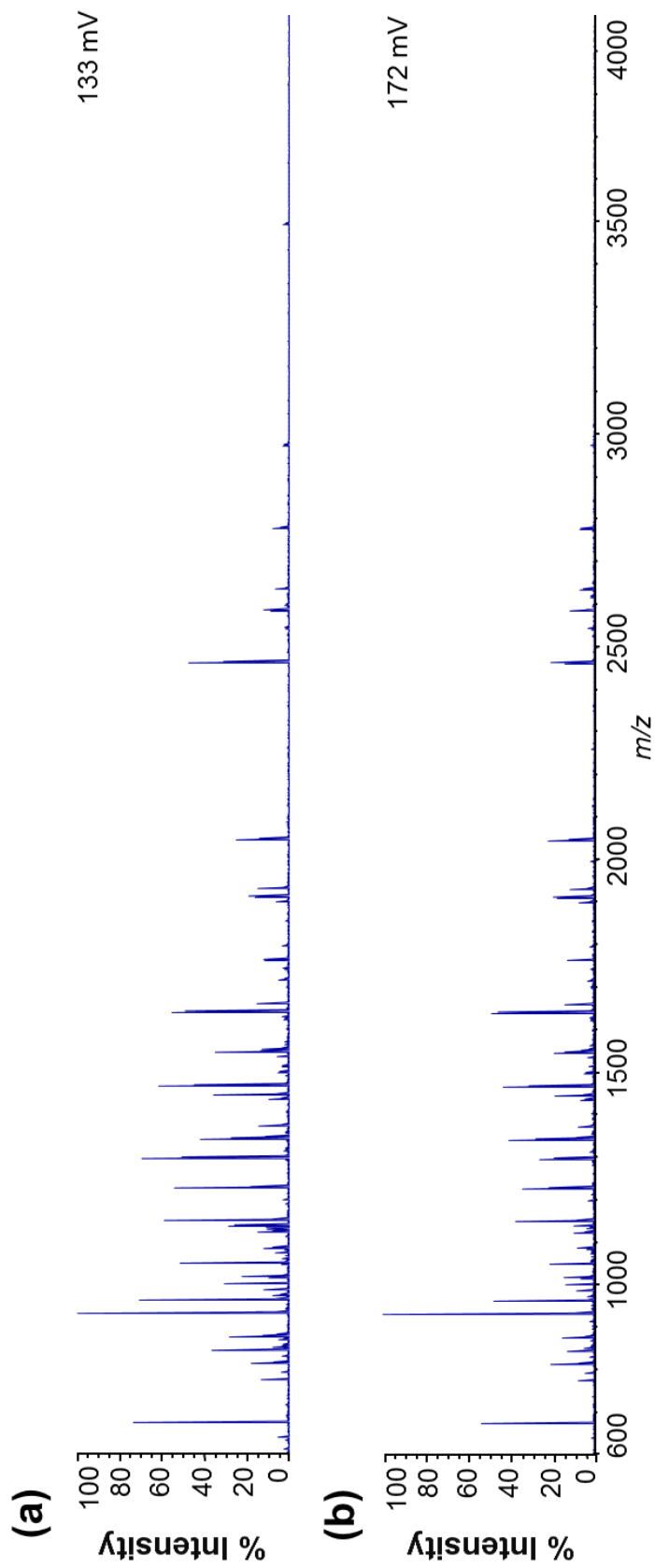


図7 HSA標品 (a) 及び血漿抽出物 (b) トリプシン消化物のマススペクトル

表2 血漿抽出液トリプシン消化物中のタンパク質同定スコア

#	タンパク質	スコア
1	Serum albumin	631
2	Arginyl-tRNA-protein transferase 1	58
3	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	56
4	Probable ATP-dependent RNA helicase DOX46	53
5	Spectrin beta chain	51
6	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	50
7	Protein monoglycosylase TTLL8	48
8	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	48
9	MD repeat-containing protein 37	44
10	SRC kinase signaling inhibitor 1	43

表3 血漿抽出液V8消化物中のタンパク質同定スコア

#	タンパク質	スコア
1	Serum albumin	557
2	Gamma-synuclein	48
3	Melanoma-associated antigen 12	43
4	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1	42
5	Protein FAM65C	37
6	Protein ZNF738	36
7	Protein inscuteable homolog	36
8	Serine/threonine-protein kinase	35
9	Zinc finger protein 131	35
10	Sarcalumenin	35

### 第三節 HSA に対する活性化学種の反応性の検討と 解析ターゲットペプチドの同定

糖尿病や癌等の疾患、喫煙等の生活習慣により  $\text{H}_2\text{O}_2$  [36]、グルコース [23]、HNE [37]、 $\text{ONOO}^-$  [38] といった活性化学種が増加することがある。これに伴いタンパク質の化学修飾の発現頻度も上昇すると考えられ、[図 8](#) に示す様な修飾体が生成すると推測される。酸化体では未修飾ペプチドに対して酸素原子一つ分の +16 Da [39-41] ([図 8, a, b, c](#))、糖化体では D-グルコースの脱水を伴縮合に伴う +162 Da [42] ([図 8, d, e](#))、HNE 付加体ではマイケル付加生成物の +156 Da [43] ([図 8, f, g](#))、ニトロ化体ではベンゼン環上のニトロ基置換に伴う +45 Da [44] ([図 8, h](#)) の質量差をそれぞれ生じると予想される。これらの活性化学種の HSA に対する反応性と被修飾部位を精査することで、バイオマーカー探索において重点的に解析すべき部位を定め修飾体検出を容易にすることができる。そこで、各種活性化学種を用い HSA との反応性に検討を加えた。

HSA 標品を  $\text{H}_2\text{O}_2$  (分子量 34.0) 及び硫酸銅五水和物 (分子量 249.7) / アスコルビン酸 (分子量 176.0)、D-グルコース (分子量 180.2)、HNE (分子量 156.2)、 $\text{ONOO}^-$  (分子量 62.0) との反応に付し、得られた酸化、糖化、HNE、ニトロ化修飾 HSA を前節で確立した方法で解析した。各モデル修飾体調製は、血液の pH を考慮しリン酸緩衝液 (pH7.4) 中で行い、HSA 濃度は健常人の平均的な血中濃度である  $600 \mu\text{M}$  とした。各化学修飾 HSA の分析をした結果、酸化部位を含むペプチドには活性化学種の種類によらず +16 Da の質量差が確認された ([図 9, 10, a](#))。糖化部位を含むペプチドは +162 Da の質量差を有していた ([図 10, b](#))。また、糖化を受けたと考えられるいずれのペプチド配列中にもトリプシン消化の阻害が見られた。これは修飾を受けた Lys と Arg の C 末側で酵素消化の阻害が起きたためであり [14]、後の修飾部位の特定に用いた。HNE 修飾部位を



含むペプチドでは+156 Da (図 10, c) の他、シッフ塩基を形成したと考えられる質量差+138 Da のペプチドも検出された。ニトロ化部位を含むペプチドには+45 Da の質量差が見られた (図 10, d)。さらに、MALDI によるイオン化の過程でニトロ基が光分解し<sup>[45]</sup>、酸素原子一つが脱離した+29 Da の質量差を有したペプチドも検出された。これらのペプチドの質量と、化学修飾の反応機構から既報を参考に修飾部位を決定した結果、過酸化水素による酸化修飾では、全ての Met 残基<sup>[12]</sup>及び Trp<sup>214</sup><sup>[10]</sup>の計 7 ヲ所、銅による酸化修飾では 16 ヲ所中 6 ヲ所の His 残基<sup>[10]</sup>の修飾が検出された (図 11)。同様に糖化修飾は 27 ヲ所で検出され、Arg<sup>218</sup><sup>[13-15]</sup>及び約半数の Lys 残基<sup>[13-15]</sup>への付加が認められた。HNE 修飾は His<sup>9</sup><sup>[16]</sup>、His<sup>67</sup>、His<sup>146</sup>、His<sup>247</sup>、His<sup>288</sup>、His<sup>440</sup>、His<sup>510</sup> の他ジスルフィド結合を形成する Cys 残基<sup>[16]</sup>の一部の計 10 ヲ所で検出された。一方、ニトロ化修飾は Tyr 残基<sup>[17]</sup>のみの 5 ヲ所で検出された。

これらの部位を三次元構造モデル (Protein Data Bank Japan, 1BJ5) (図 12) 上にプロットすると、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酸化及び糖化を受けた部位の多くは分子表面に露出しているのに対して、Cu<sup>II</sup> による酸化部位、HNE 修飾部位、ニトロ化部位は分子内部に多い傾向にあった。このような相違には、活性化学種との極性が大きく影響していると考えられる。まず活性化学種の極性を考えると、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、D-グルコース、Cu<sup>II</sup>、ONOO<sup>-</sup>は極性が高く、HNE は極性が低いと考えられる。一方、タンパク質の安定構造は疎水性相互作用に影響を受けるため、一般に外側は高極性、内側は低極性のアミノ酸残基に富む。つまり、Arg、Lys は外側に比較的多く存在し、His は分子内外に同程度存在する<sup>[46]</sup>。このため、比較的高極性の D-グルコースは親水的な環境にある外側のアミノ酸残基を修飾したと考えられる。同様に、低極性の HNE では分子内部の His 残基への修飾が見られる。それに対し、Cu<sup>II</sup>は極性であるが、HSA の金属結合部位に含まれる His 側鎖に結合する<sup>[47]</sup>。これにより他の極性化学種に比べ分子内部の His 残基の酸化修飾が

起き易いと考えられる。一方、Cys、Met、Tyr は内側に多い傾向がある。しかし、HSA ではジスルフィド結合等の要因により全ての Met が外側に露出している。このため、比較的高極性の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が Met に接近しやすくなったと考えられる。また、ONOO<sup>•</sup> も高極性であるが、同時に強い求核剤でもある。Tyr 側鎖のベンゼン環は求核置換反応のターゲットとなり易い。そのため、分子内部の Tyr 残基もニトロ化を受けたと考えられる。これらの修飾は、各修飾 HSA について個別に研究された報告もあるが<sup>[10-17]</sup>、今回明らかにされた修飾部位は、これまで *in vitro* でも *in vivo* でも報告されていない部位も含まれていた (図 11, 星印)。この結果は、全配列を検出可能な解析法を確立したことにより、これまで見過ごされてきた配列部分の修飾解析が可能となった結果であり、本法の有用性を示す結果と考えられる。

次に、活性化学種の HSA に対する反応性を調べるため、各種活性化学種の濃度を変化させたところ、修飾を受けるアミノ酸残基が限定された。それぞれ最も低い濃度の活性化学種による化学修飾反応の生成物では Met<sup>329</sup> (*m/z* 1448.71、V8)、His<sup>338</sup> (*m/z* 1483.84、トリプシン) の酸化、Lys<sup>525</sup> (*m/z* 1290.76、トリプシン) の糖化、His<sup>247</sup> (*m/z* 2242.95、トリプシン) の HNE 修飾、及び Tyr<sup>138</sup> (*m/z* 972.48、トリプシン) のニトロ化のみが確認された (図 13)。これらの残基は HSA 中で最も容易に修飾を受ける部位だと考えられる。すなわち、これらの残基を含むペプチドは、血漿試料解析において重点的な解析対象となるターゲットペプチドになる。

最後に、イムノアフィニティー抽出における化学修飾 HSA の抽出を確認するため、上記の各種修飾 HSA を用いて抽出を行った。その結果、抽出前後の試料からはいずれも同様に各種修飾ペプチドが検出され、未修飾 HSA と同時に各種修飾 HSA も抽出可能であることが確認された。さらに、血漿成分の影響を調べるため等量の血漿に添加して抽出操作を行った結果、血漿中の化学修飾 HSA も

同様に抽出可能であることが確認された (図 14、15)。

そこで、次節では上記のターゲットペプチドを重点解析対象としてヒトの血漿中 HSA の化学修飾解析を行うこととした。

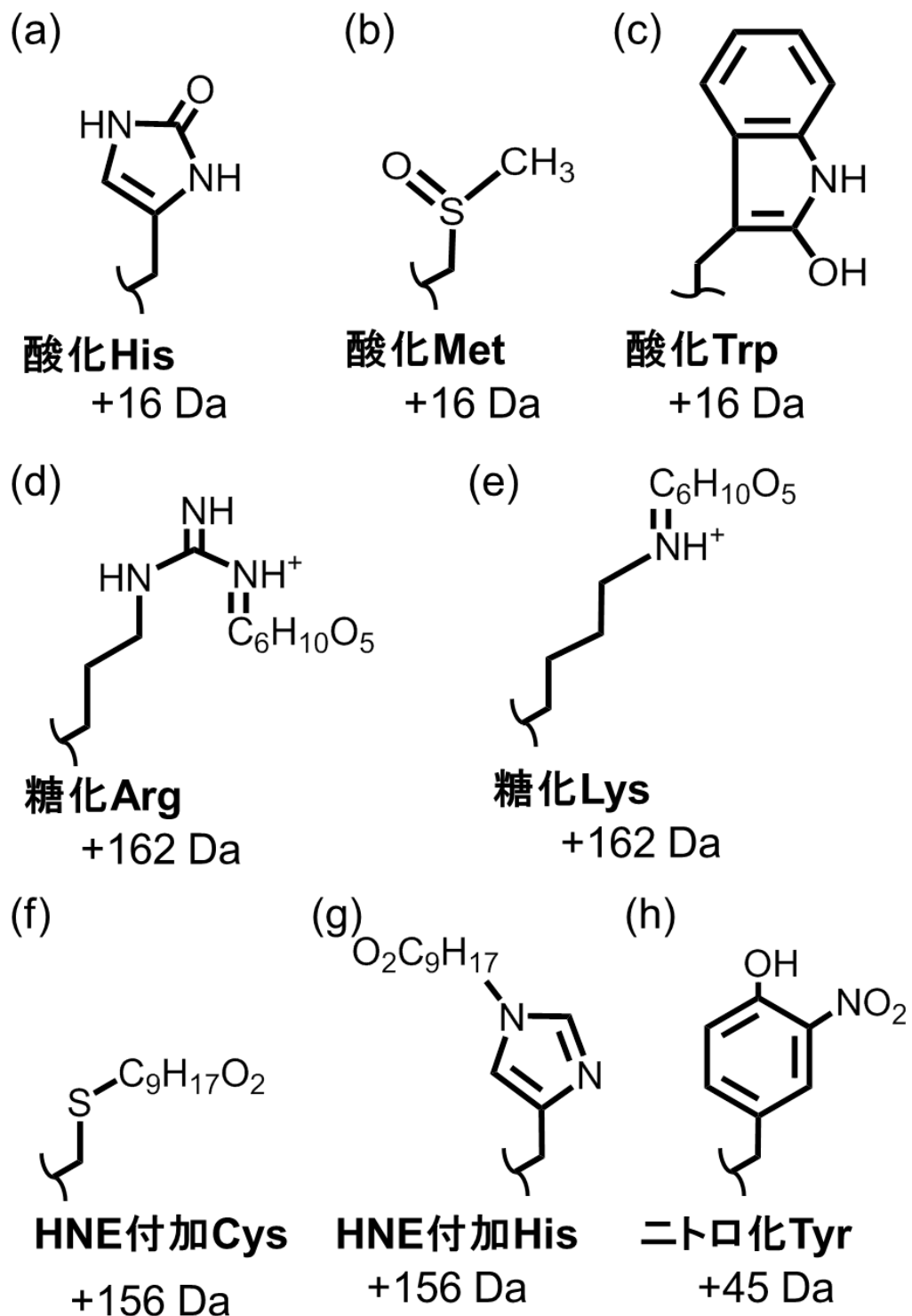
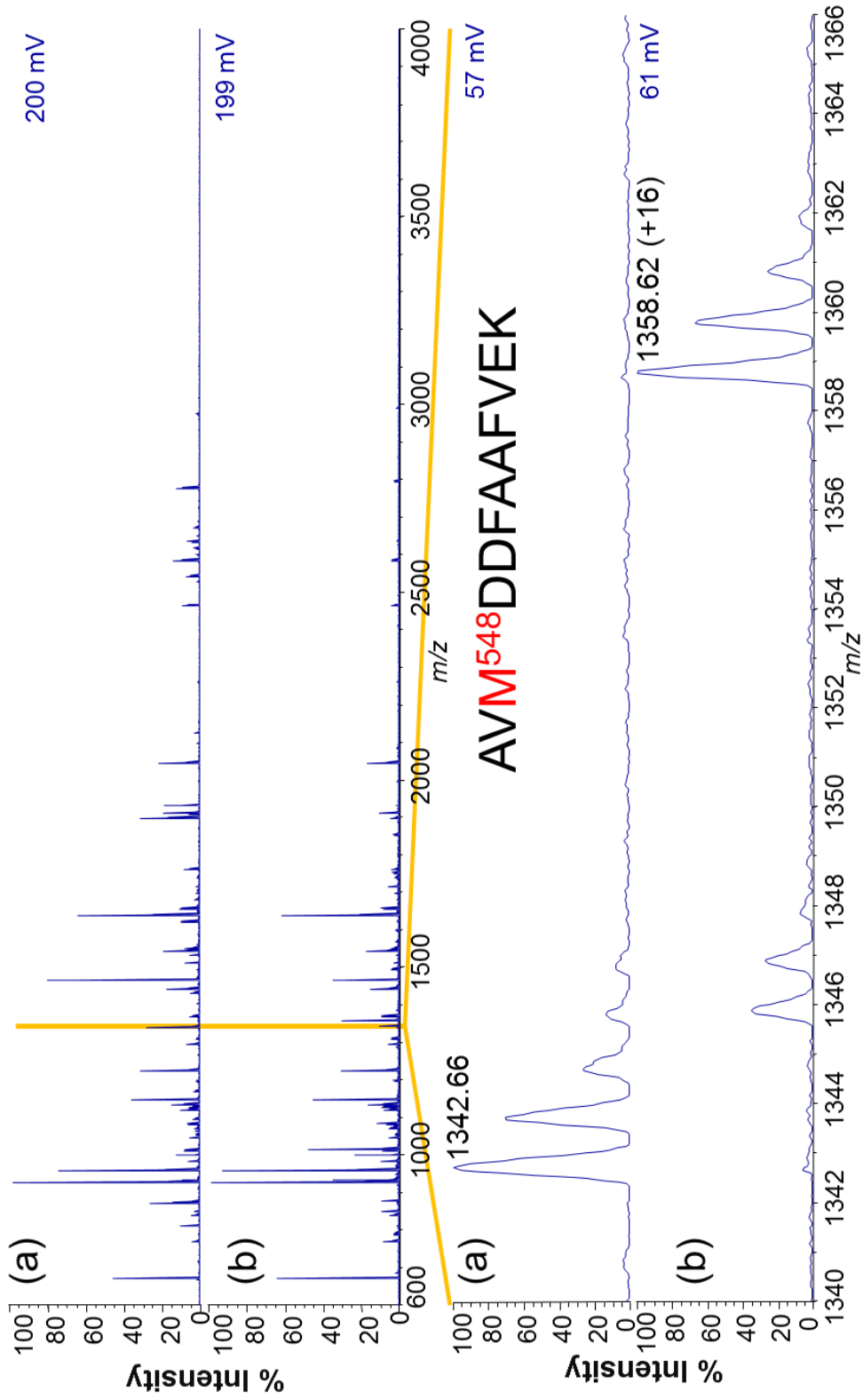


図8 推測される化学修飾アミノ酸側鎖の構造



**図9 過酸化水素による酸化修飾HSAのマススペクトル**

下段は典型的な差の見られた部分の拡大図

(a) HSA標品、トリプシン消化、(b) 過酸化水素による酸化HSA、トリプシン消化

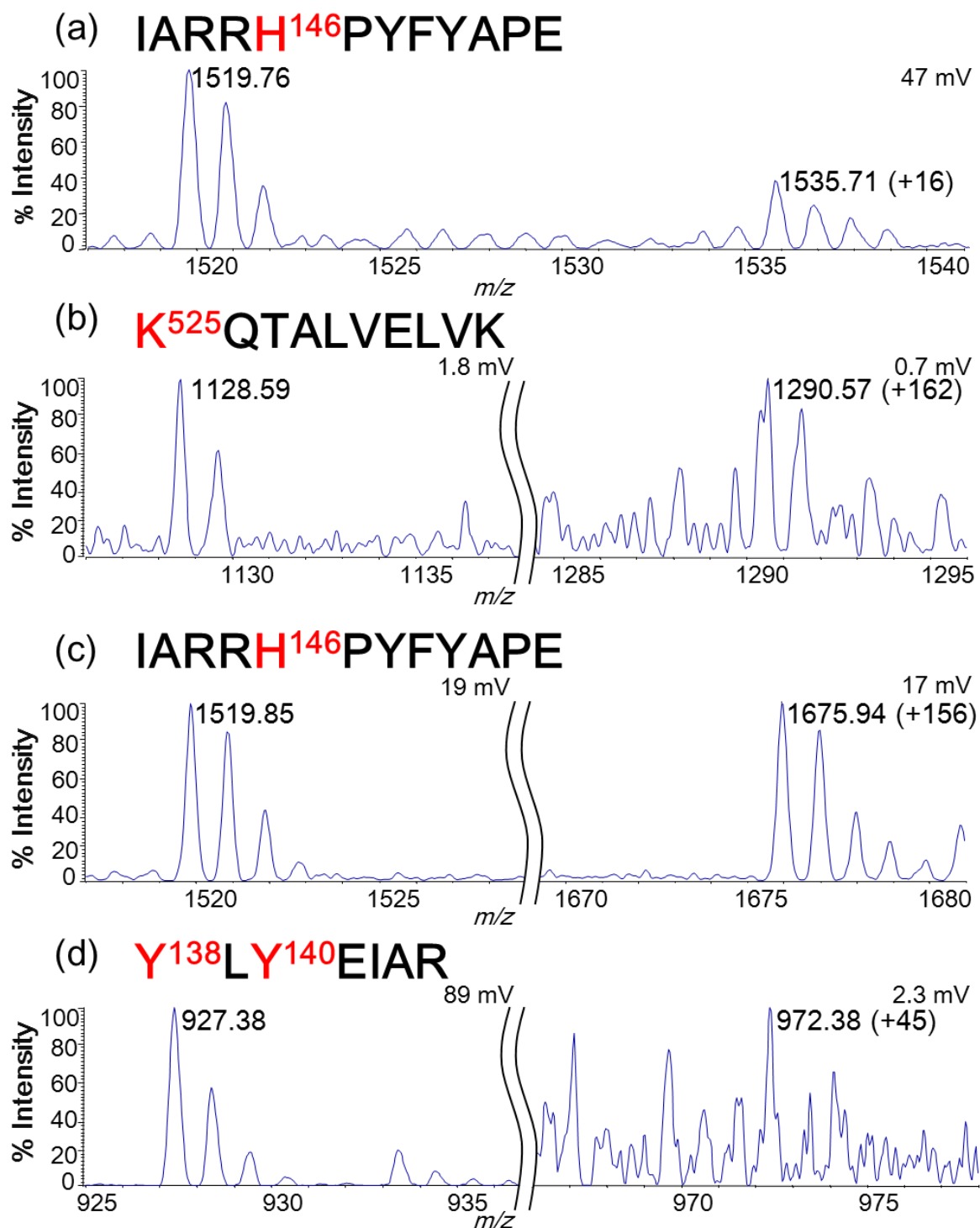


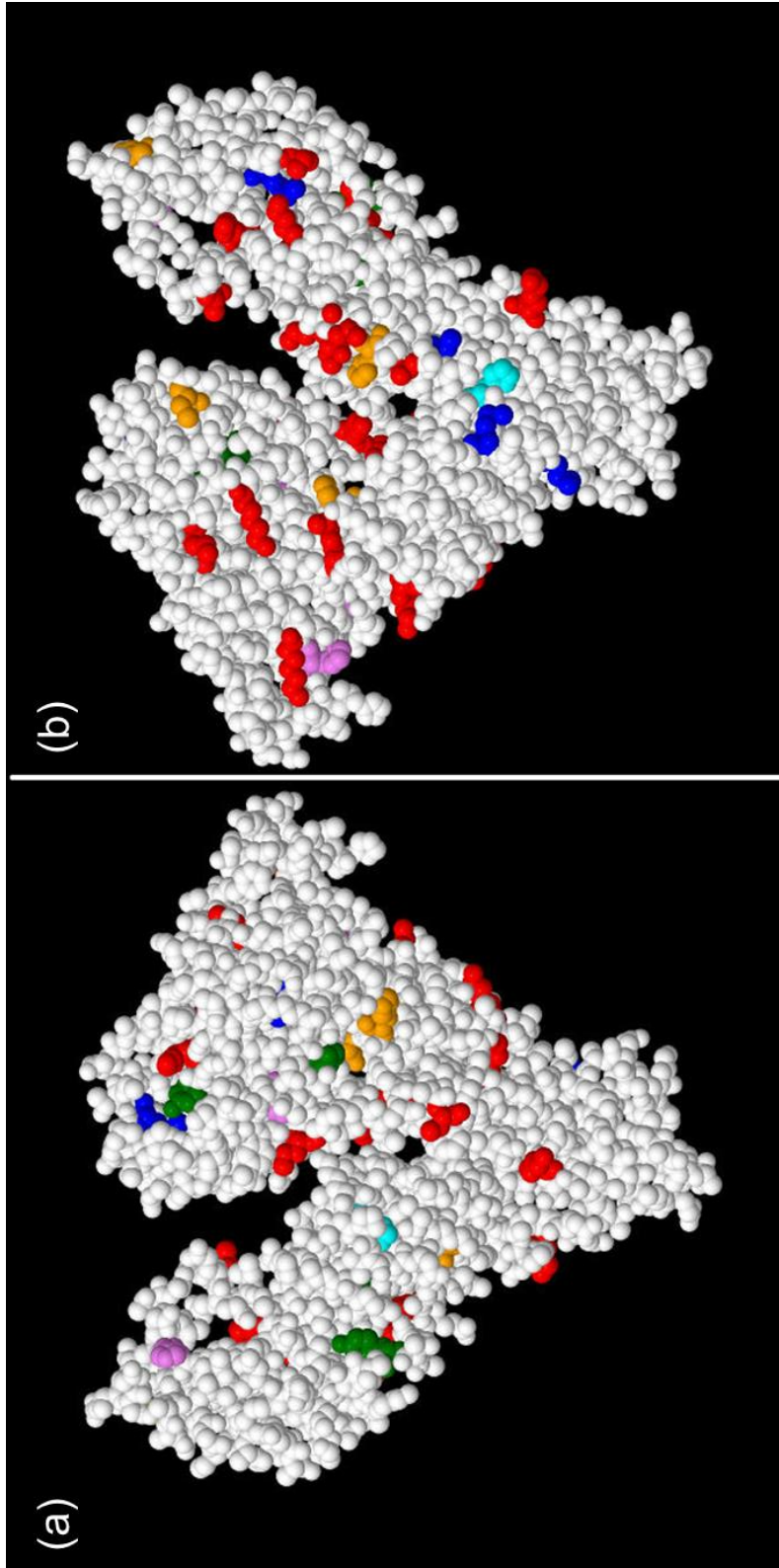
図10 モデル修飾HSA酵素消化物のマスペクトル

- (a) Cu<sup>II</sup>による酸化HSA、V8消化
- (b) 糖化HSA、トリプシン消化
- (c) HNE修飾HSA、V8消化
- (d) ニトロ化HSA、トリプシン消化

1 DAHKSEVA<sup>\*</sup>IR F<sup>\*</sup>KDLGEE<sup>\*</sup>NFK ALVLI<sup>\*</sup>AFAQY LQQCP<sup>\*</sup>FEDHV KLVNE<sup>\*</sup>VTEFA  
 51 KTCVADESAE NCDKSL<sup>\*</sup>ITLF GD<sup>\*</sup>KLCTVATL RETYGE<sup>\*</sup>MADC CAKQEPERNE  
 101 CFLQHKDDNP NLPRLVRPEV DVMCTA<sup>\*</sup>FHDN EETF<sup>\*</sup>LK<sup>\*</sup>YLY EIARR<sup>\*</sup>HPYFY  
 151 APELLFFAKR<sup>\*</sup>YKAAFT<sup>\*</sup>ECCQ AADKAA<sup>\*</sup>CLLP KLDEL<sup>\*</sup>RDEG<sup>\*</sup>K ASSA<sup>\*</sup>KORL<sup>\*</sup>KC  
 201 ASLQK<sup>\*</sup>FGERA F<sup>\*</sup>KAWA<sup>\*</sup>VARLS ORFPKAEFAE VSKLV<sup>\*</sup>TDLTK VHTECC<sup>\*</sup>HGDL  
 251 LECADDRADL AKYICENQDS ISSKL<sup>\*</sup>KECCE K<sup>\*</sup>PLLEK<sup>\*</sup>SHCI AEVENDE<sup>\*</sup>MPA  
 301 DLP<sup>\*</sup>SLAADFV ESKDVCKNYA EAKDV<sup>\*</sup>FLGMF LYEYARR<sup>\*</sup>HPD YSVVLL<sup>\*</sup>LRLA  
 351 K<sup>\*</sup>TYETTLEKC CAAAD<sup>\*</sup>PH<sup>\*</sup>ECY AKVFDE<sup>\*</sup>F<sup>\*</sup>KPL VEEPQ<sup>\*</sup>NLIKQ NCELFE<sup>\*</sup>QLGE  
 401 Y<sup>\*</sup>K<sup>\*</sup>FQNAL<sup>\*</sup>LVR Y<sup>\*</sup>TK<sup>\*</sup>KVPQ<sup>\*</sup>VST PTLVE<sup>\*</sup>SRNL GK<sup>\*</sup>VGS<sup>\*</sup>K<sup>\*</sup>CK<sup>\*</sup>H PEAK<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>MP<sup>\*</sup>CAE  
 451 DYLSV<sup>\*</sup>VNLGL CVL<sup>\*</sup>HE<sup>\*</sup>KTPVS DRVT<sup>\*</sup>KCCTES LVNRR<sup>\*</sup>PC<sup>\*</sup>FSA LEVDE<sup>\*</sup>TY<sup>\*</sup>VPK  
 501 EFNAET<sup>\*</sup>TF<sup>\*</sup>FI ADICTL<sup>\*</sup>SE<sup>\*</sup>KE RQIK<sup>\*</sup>KQTALV ELVKH<sup>\*</sup>KPKAT KEQL<sup>\*</sup>KAV<sup>\*</sup>MDD  
 551 FAAFVEK<sup>\*</sup>CCK ADDKET<sup>\*</sup>CF<sup>\*</sup>AE EGK<sup>\*</sup>LLVAASQ AALGL

## 図11 HSAのアミノ酸配列と化学修飾部位

赤: 糖化部位、青: 過酸化水素による酸化部位、水色: Cu<sup>II</sup>による酸化部位、  
 黄: 4-HNE修飾部位、緑: ニトロ化部位、星印: 未報告の修飾部位



**図12 HSAの三次元構造と被修飾部位**

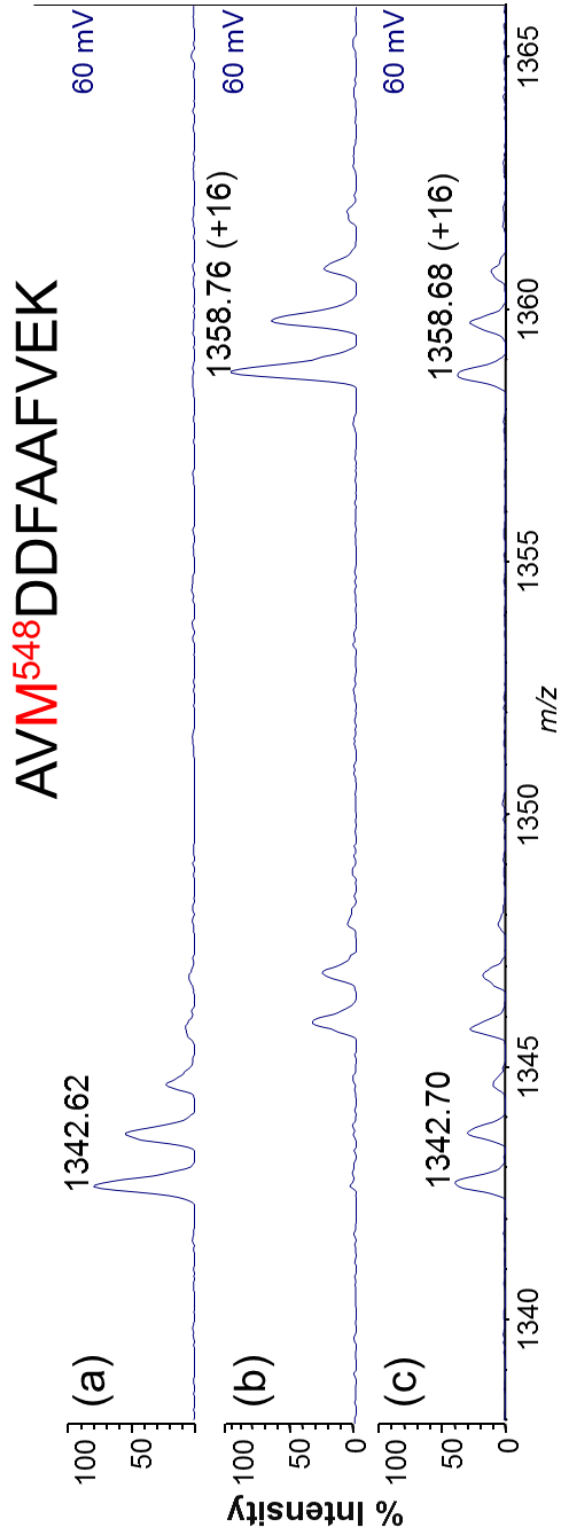
(b) (a)を反対側から見た図  
 赤: 糖化部位、青: 過酸化水素による酸化部位、水色: Cu<sup>II</sup>による酸化部位、  
 黄: 4-HNE修飾部位、緑: ニトロ化部位、紫: 酸化及び4-HNE修飾部位





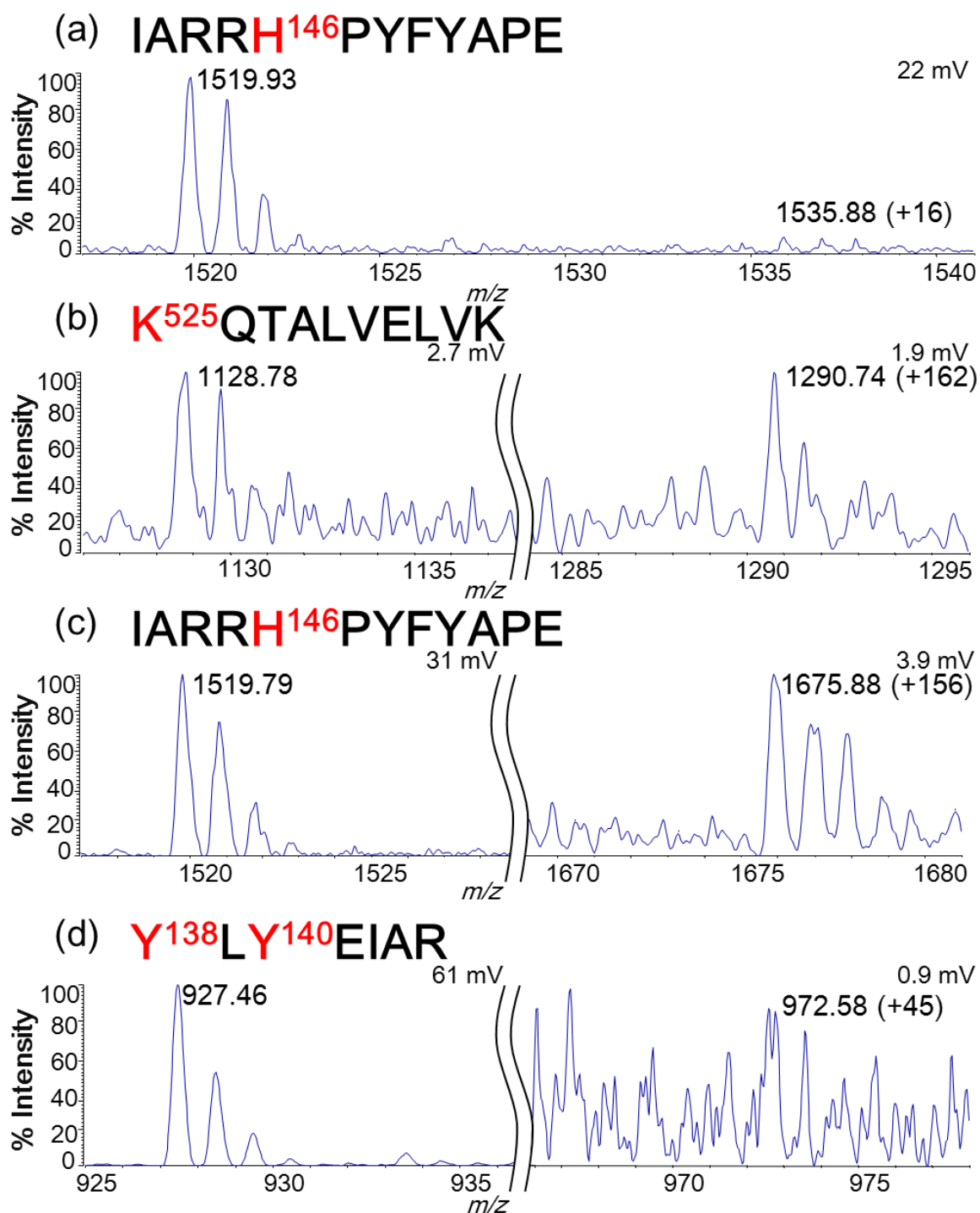
**図13 HSA上の化学修飾を受けやすい部位**

赤:糖化修飾、青:酸化修飾、黄:4-HNE修飾、緑:ニトロ化修飾



**図14 酸化修飾HSA添加血漿抽出HSA酵素消化物のマスペクトル**

- (a) 血漿抽出HSA、トリプシン消化
- (b) 過酸化水素による酸化HSA、トリプシン消化
- (c) 酸化HSAを添加した血漿の抽出HSA、トリプシン消化



**図15 化学修飾体添加血漿抽出HSA酵素消化物のマスペクトル**

- (a) Cu<sup>II</sup>による酸化HSA、V8消化
- (b) 糖化HSA、トリプシン消化
- (c) HNE修飾HSA、V8消化
- (d) ニトロ化HSA、トリプシン消化

## 第四節 血漿中化学修飾 HSA の解析

前節での検討により、修飾を受け易い部位を明らかにし、バイオマーカー候補となるターゲットペプチドを決定した。これらの化学修飾 HSA は、健康な人の血中 HSA にも存在する可能性がある。例えば、HSA 内の Lys の糖化は多くの報告がある [13,14,23,24]。健康な成人でも 10% の HSA に糖化が見られ、特に Lys<sup>525</sup> は全糖化部位の 3 割を占めている [48]。糖尿病患者の血中では糖化 HSA が増加するため、既に中期の血糖指標として臨床でも用いられている。また、HSA 配列中唯一の Trp 残基はヒドロキシラジカルにより酸化を受けることが知られている [49,50]。そこで、モデル実験で得られたターゲットペプチドを中心に血漿中の HSA 上の網羅的修飾解析を行った。

まず、前節で調製した化学修飾 HSA を用いて予想される血中濃度の化学修飾体を検出可能かを評価した。前節のモデル修飾体調製時に用いた各活性化学種は、D-グルコースを除き血中濃度よりも高濃度である。そのため、実際の血中の化学修飾体はモデル修飾体に比べて低比率で存在すると考えられる。そこで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により全ての Met を酸化した酸化 HSA を用い、MALDI-TOF/MS で検出可能な修飾率を検討した。ここでの修飾率とは、試料中の修飾体量を全 HSA 量で除した値である。HSA 標品に酸化 HSA を 0.1-50% の割合で混合し、本法を適用した。その結果、Met<sup>548</sup> を含む未修飾のトリプシン消化ペプチドである *m/z* 1342.64 のペプチドと、その酸化体である *m/z* 1358.63 のペプチドは、修飾率 50% で同程度のピーク強度を示した (図 16, c)。この結果から、これらの酸化体は未修飾体と同程度のイオン化効率を有すると考えられる。さらに、酸化体は修飾率 0.2% 相当の濃度においても検出可能であったが (図 16, i)、修飾率 0.1% 相当まで低下させると修飾体の検出は困難であった (図 16, j)。このことから、同程度のイオン化効率であれば修飾率 0.2% 以上で存在する修飾体を検出可能で

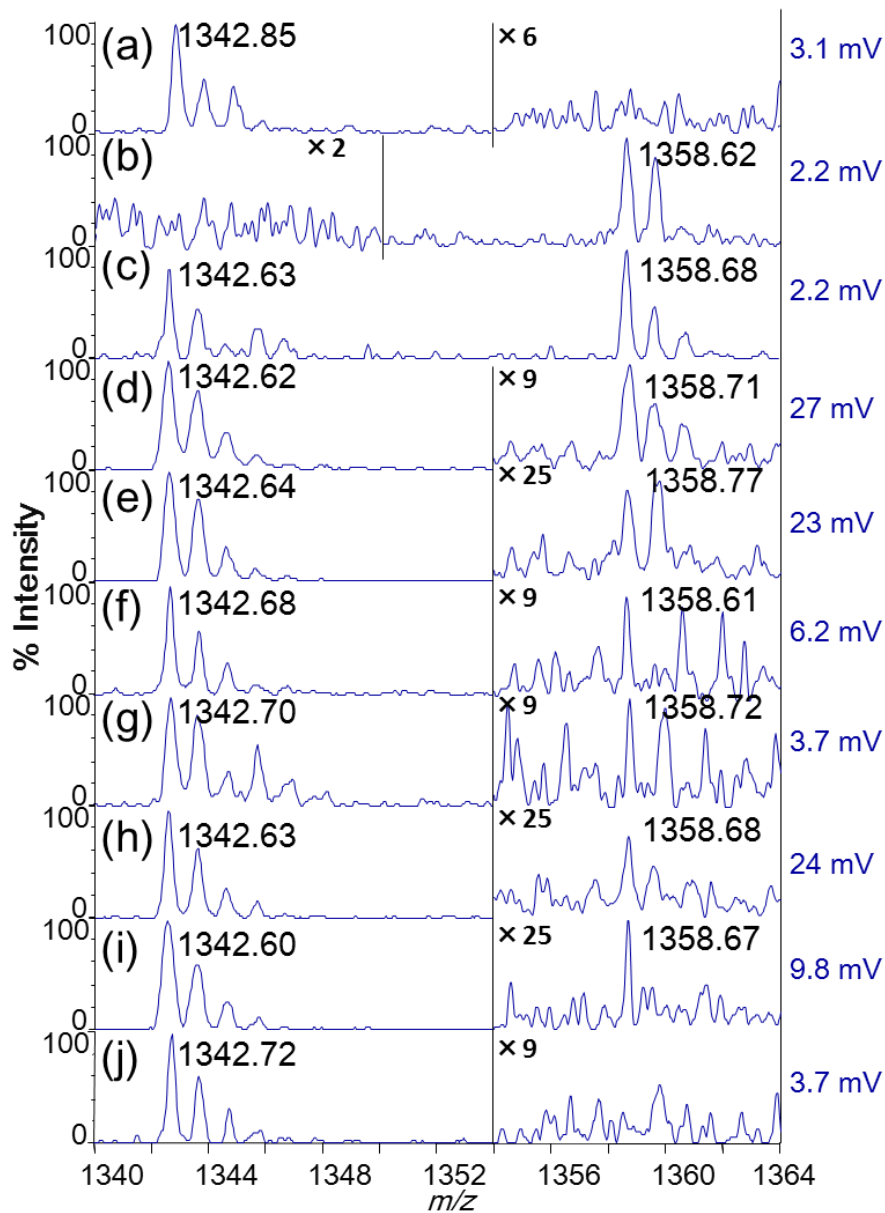
あることが示唆された。因みに、健康な成人では血中の Lys<sup>525</sup> の糖化は全 HSA の 3%程度であると言われている<sup>[48]</sup>。このことから、MALDI-TOF/MS の感度は血中化学修飾体を十分に検出可能な感度であると考えられた。

そこで、実際にヒトの血漿中 HSA の解析を行った。なお、血漿試料は健康な成人 10 名分の血漿を混合した市販のプール血漿を使用した。この混合血漿に対して本法を適用し、酸化、糖化、HNE、ニトロ化修飾を対象として血漿抽出 HSA の解析結果をデータベース検索に付した。その結果、Lys<sup>525</sup> に糖化を受けたペプチド ( $m/z$  1290.67、トリプシン) (図 17) と、Trp<sup>214</sup> に酸化を受けたペプチド ( $m/z$  689.37、トリプシン) (図 18) が検出された。一方、前節で決定した他のターゲットペプチドは検出されなかった。

Lys<sup>525</sup> 糖化ペプチドは低濃度のグルコースにより生成したモデル修飾体解析にも見られる糖化修飾探索のターゲットペプチドでもある。このことから、モデル修飾体から得られたターゲットペプチドが血漿試料解析においても利用可能であることが示唆された。一方、Trp<sup>214</sup> 酸化修飾ペプチドは、ヒドロキシラジカルを生じる化学的ストレスのマーカーとして利用可能であると考えられる。今回酸化体が検出された Trp<sup>214</sup> はこれまで酸化を受けることは Trp の蛍光消失により確認されていた<sup>[49]</sup>。本研究においては、蛍光検出の様な修飾の種類や修飾部位に特異的な検出法ではなく MS を用いた網羅的修飾解析を行ったことにより、他の修飾体と共に Trp 酸化を検出できた。このことから、本法を用いることで、より効率的なバイオマーカー探索が可能であることが示唆された。

以上の結果より、本解析法を用いて血中 HSA の網羅的化学修飾解析が可能であり、血中の化学修飾 HSA を検出可能であることを示した。今回の修飾体解析では重点解析対象としたその他の修飾ペプチドは検出されなかった。しかし、血中には他にも化学的ストレスの増大に伴って生成する修飾体が存在すると推測されることから、今後の各種化学ストレス下にある対象者の血漿解析により

新たな修飾 HSA が検出される可能性もある。こうした検証により新たなバイオマーカーの発見に繋がれば、本手法の有用性が明示されるものと考えられる。



**図16 未修飾／酸化混合HSA酵素消化物のマスペクトル**

(a) HSA標品、(b) 酸化HSA、(c) 修飾率50%相当、  
 (d) 修飾率10%相当、(e) 修飾率2%相当、(f) 修飾率1%相当、  
 (g) 修飾率0.5%相当、(h) 修飾率0.3%相当、(i) 修飾率0.2%相当、  
 (j) 修飾率0.1%相当

# K<sup>525</sup>QTALVELVK

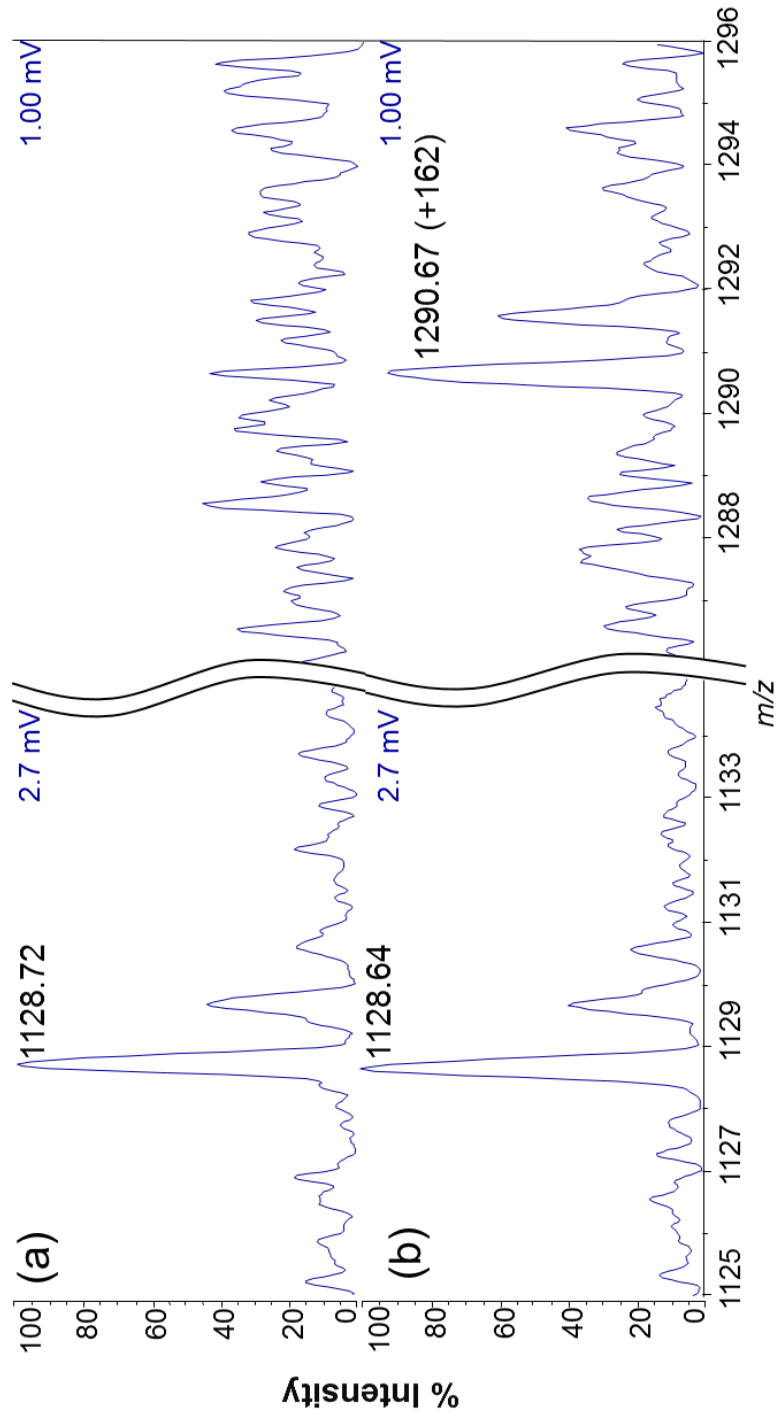
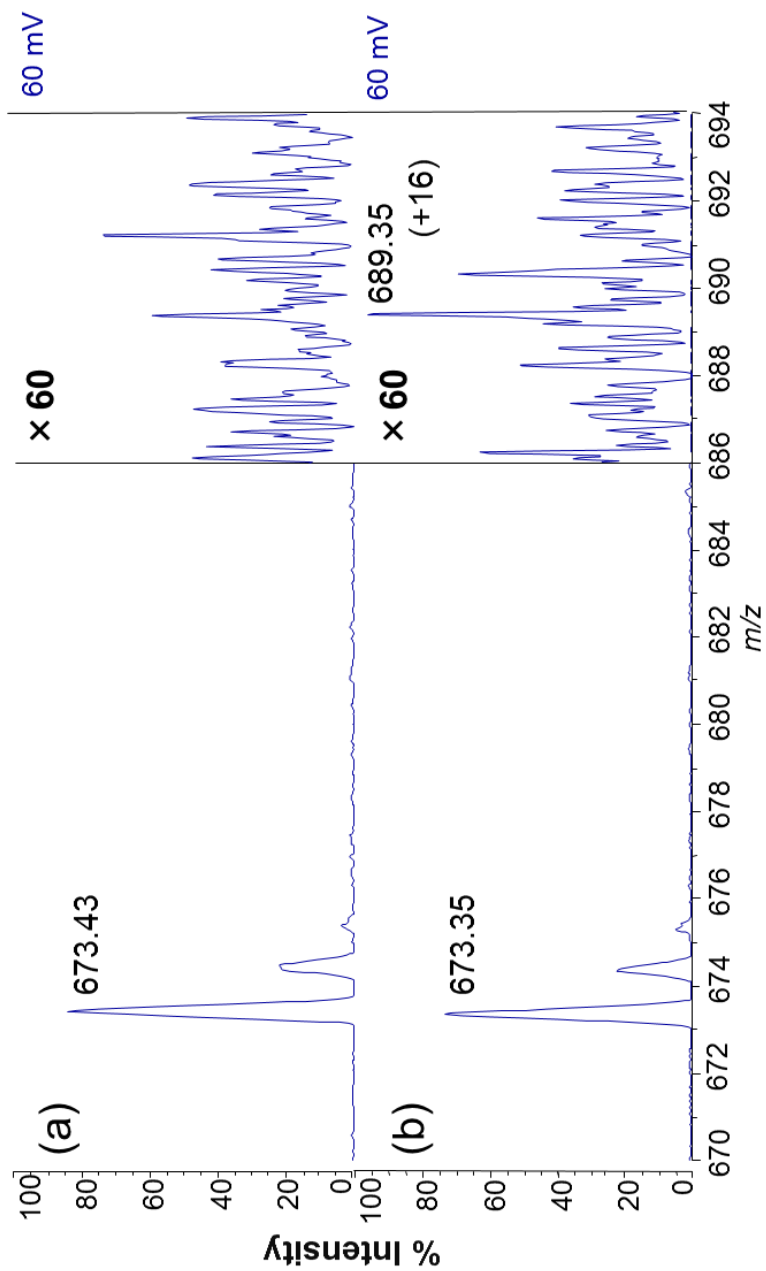


図17 Lys<sup>525</sup>糖化ペプチドのマスマスペクトル

(a) HSA標品、トリプシン消化、(b) 血漿抽出HSA、トリプシン消化



**AW<sup>214</sup> AVER**



**図18 Trp<sup>214</sup>酸化ペプチドのマススペクトル**

(a) HSA標品、トリプシン消化、(b) 血漿抽出HSA、トリプシン消化

## 第五節 結語

バイオマーカー探索の新たな方法論の確立を目的として、HSA を対象とした網羅的な化学修飾解析に関する検討を行い以下の成果を得た。

まず、全ての化学修飾部位を解析可能にするため、MALDI-TOF/MS により HSA の全配列をカバー可能な消化ペプチド群の検出方法を検討した。切断特性の異なる酵素でそれぞれ消化した HSA を正イオン及び負イオン検出モードで測定し、取得データを相互に補完することで、100%の配列カバー率を達成した。また、解析対象とする HSA 及びその修飾体を群特異的に血清試料から抽出するため、ポリクローナル抗体を用いた IAE 法を検討した。各種条件の最適化により、簡便な操作で夾雑タンパク質を排除し、HSA 及びモデル化学修飾体を同時に回収可能な条件を確立した。

次いで、各種の活性化学種を用いて、酸化、糖化、HNE、ニトロ化の各化学修飾について HSA の被修飾部位を解析した。それぞれの修飾に特徴的な質量シフトを示したペプチドを検出し、未報告の部位を含む複数の被修飾部位を特定した。また、それぞれの修飾における被修飾部位が異なる傾向を示した。さらに活性化学種の濃度を変化させることによって、修飾を受け易い部位を特定した。

最後に、本法を血漿試料に適用し、HSA 上の網羅的修飾解析法としての有用性を検証した。まず、血漿にモデル修飾 HSA を添加し、これらを検出可能であることを示した。次いで、本法を健常人の血液試料に適用し、糖化並びに酸化を検出し、これらの被修飾部位を特定した。これらから、本法を血中 HSA の網羅的な化学修飾の解析に応用可能であることを示した。

本研究において、血中 HSA 上の網羅的な化学修飾解析の手法を確立した。本手法に基づいたバイオマーカー探索の有用性を検証するためには、さらに多く

の病態や症例を含めた実試料の解析が必要になると考えられる。しかし、従来の血中プロテオミクスあるいは翻訳後修飾解析とは方向性を異にする本方法論は、より効率的なバイオマーカー探索を可能にするものと期待される。

## 謝辞

本研究を推進するにあたり、終始御懇篤な御指導御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科臨床分析化学分野教授 大江知行先生に謹んで感謝申し上げます。

本論文に対し、有益な御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科生物構造化学分野准教授 三浦隆史先生に深くお礼申し上げます。

また、本研究に際し御指導御協力を賜りました東北大学大学院薬学研究科臨床分析化学分野講師 後藤貴章先生、同助教 李宣和先生に深く感謝申し上げます。

質量分析装置の使用に際し、御協力を賜りました東北大学医学系研究科医学研究支援センター共通機器管理室の皆様には厚くお礼申し上げます。

最後に、終始支えていただきました東北大学大学院薬学研究科 臨床分析化学分野の同窓の皆様に、心からの感謝とお礼を申し上げます。

## 実験の部

### 装置

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) には、Shimadzu Co. (Kyoto, Japan) 製の AXIMA Performance を用いた。データ処理には Kratos Analytical Ltd. (New York, NY, USA) 製の Shimadzu Biotech Launchpad Ver.2.9.3.20110624 を用いた。pH メーターは、DKK-Toa Co. (Tokyo, Japan) 製の HM-25G を用いた。恒温水槽は、Tokyo Rikakikai Co., Ltd. (Tokyo, Japan) 製の振盪槽 SB-9 並びに同社のヒーターユニット NTT-1110 を用いた。恒温器は Isuzu Seisakusho Co. (Sanjo, Japan) 製の Incubator Himawari を用いた。

### 試薬

Human serum albumin (HSA)、ascorbic acid、endoproteinase Glu-C (V8)、insulin chain B oxidized, bovine (Ins B) は、Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) から購入した。Vivapure Anti-HSA Kit は、Sartorius Stedim Biotech GmbH (Goettingen, Germany) から購入した。正常ヒト血漿は、Kohjin Bio Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。Urea、glycine、hydrogen chloride (HCl)、ammonium bicarbonate ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )、hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、potassium dihydrogenphosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、dipotassium hydrogenphosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )、D-glucose、toluene、dithiothreitol (DTT)、iodoacetamide (IAA)、acetonitrile、tetrafluoroacetic acid (TFA)、sodium hydroxide (NaOH) は、Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) から購入した。Sequencing grade modified trypsin は、Promega Co. (Madison, WI, USA) から購入した。Adrenalcorticotropic hormone (ACTH) は、American Peptide Company, Inc.

(Sunnyvale, CA, USA) から購入した。Angiotensin (Ang) I、Ang II は、Peptide Institute, Inc. (Minoh, Japan) から購入した。4-Hydroxy-2(*E*)-nonenal (HNE) は、Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。Sodium peroxydinitrite (ONOONa) は、Dojindo Laboratories Co., Ltd. (Kamimashiki, Japan) から購入した。Copper(II) sulphate pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。Bio-Rad Protein Assay は、Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA) から購入した。ZipTip pipette tips with 0.6  $\mu\text{L}$   $\text{C}_{18}$  resin、AmiconUltra-0.5 centrifugal filter devices は、EMD Millipore Co. (Billerica, CA, USA) から購入した。2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB)は、Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。Ethanol は、Yamaichi Chemical Industries Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。超純水は EMD Millipore Co.製の MilliQ Integral 10 で精製したものを使用した。

## 第二節付属実験

### 各種溶液及び緩衝液の調製

12.5 mM, 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液、6.5 M urea 溶液は、それぞれ超純水に溶解して調製した。

それぞれ超純水に溶解して調製した 100 mM glycine 水溶液及び 100 mM HCl を混合して pH2.0 に調整し、100 mM glycine/HCl buffer (pH2.0) とした。

HSA を 20 mg 量り取り、6.5 M urea 溶液 500  $\mu\text{L}$  に溶解し 40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  HSA 溶液とした。

HSA を 0.5 mg 量り取り、6.5 M urea 溶液 500  $\mu\text{L}$  に溶解し HSA 試料溶液とした。

### HSA のイムノアフィニティー抽出

HSA の捕捉は、Vivapure Anti-HSA Kit の使用法に沿って行った。抗 HSA 抗体固定化樹脂 400  $\mu\text{L}$  に対してスピнкаラム型フィルターを用いて 400 $\times$ g で 2 分間遠心し、保存液を除いた。血漿または 40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  HSA 溶液 20  $\mu\text{L}$  を付属の binding buffer 180  $\mu\text{L}$  で希釈し、抗体固定化ゲルと混合し、懸濁状態を保つよう転倒混和を行いながら室温で 15 分間インキュベートした後、400 $\times$ g で 2 分間遠心した。洗浄のため、binding buffer 200  $\mu\text{L}$  を加えて室温で 2 分間転倒混和した後 400 $\times$ g で 2 分間遠心する操作を 2 回繰り返した。フィルターを予め 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 200  $\mu\text{L}$  を入れた新しいチューブに移し替え、溶出のため 100 mM glycine/HCl buffer (pH2.0) 200  $\mu\text{L}$  を加えて室温で 5 分間転倒混和した。400 $\times$ g で 2 分間遠心して得られたろ液を HSA 抽出液とした。

### HSA 標品の酵素消化

Sequence grade modified trypsin を付属の trypsin buffer に 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  とな

るよう溶解したものを、50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液で 5 倍希釈し、0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  trypsin 溶液とした。

V8 を超純水に 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  となるよう溶解したものを、50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液で 5 倍希釈し、0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  V8 溶液とした。

HSA 試料溶液または HSA 抽出液の 20  $\mu\text{L}$  を取り、110 mM DTT/12.5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 2  $\mu\text{L}$  を HSA 溶液に加えた後、37°C で 1 時間インキュベートし、タンパク質中ジスルフィド結合の還元を行った。600 mM IAA/12.5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 2  $\mu\text{L}$  を試料溶液に加えた後、37°C の暗所で 45 分間インキュベートし、還元されたシステイン残基を保護するためのアルキル化を行った。110 mM DTT/12.5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 20  $\mu\text{L}$  を試料溶液に加えて未反応の IAA を失活させた。その後、50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 56  $\mu\text{L}$  を加えて試料溶液を希釈した。還元アルキル化後の HSA 溶液各 40  $\mu\text{L}$  に 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  trypsin または 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  V8 溶液各 4  $\mu\text{L}$  を加えた後、37°C で 17 時間インキュベートしてタンパク質消化を行い、酵素消化済 HSA 試料溶液とした。

#### ZipTipC<sub>18</sub> による HSA 標品酵素消化物の脱塩

酵素消化済 HSA 試料溶液に対して ZipTipC<sub>18</sub> (0.6  $\mu\text{L}$ ) を用いて脱塩を行った。ZipTipC<sub>18</sub> を acetonitrile 100  $\mu\text{L}$  で浸潤化を行い、0.1% (v/v) TFA 水溶液 100  $\mu\text{L}$  で平衡化を行った。その後、酵素消化済 HSA 試料溶液を ZipTipC<sub>18</sub> に通導し、0.1% (v/v) TFA 水溶液 50  $\mu\text{L}$  で洗浄後、超純水/acetonitrile (25/75, v/v) 混液 20  $\mu\text{L}$  で溶出し、脱塩済試料溶液とした。

#### HSA 標品酵素消化物の MALDI-TOF/MS

リン酸 (98%) を超純水に 2% (w/v) となるよう希釈し、リン酸水溶液とした。DHB は超純水/acetonitrile (50/50, v/v) 混液に 600 mM となるよう溶解し、



DHB 溶液とした。

質量較正用の内標準物質 (IS) として Ang II ( $m/z$  1046.5423), Ang I ( $m/z$  1296.6853)、ACTH (18-39) ( $m/z$  2465.1989)、Ins B ( $m/z$  3494.6435)を、Ang II と Ang I は 1  $\mu$ M、ACTH (18-39) は 2  $\mu$ M、Ins B は 4  $\mu$ M となるよう超純水に溶解し、IS 溶液とした。

MALDI マトリクスはリン酸水溶液、DHB 溶液、IS 溶液を 2: 1: 1 (v/v/v) で混合し、マトリクス溶液とした。

脱塩済試料溶液 5  $\mu$ L とマトリクス溶液 5  $\mu$ L を混合し、その混合液 1  $\mu$ L をプレート上に添加して風乾後、MALDI-TOF/MS 装置に導入した。

MALDI-TOF/MS の測定は正イオンモードと負イオンモードでそれぞれ行い、測定条件は、正/負イオン検出モードとも、reflectron mode; Mass range, 600-4000 Da; Laser, N<sub>2</sub> laser (337 nm); Pulse width, 3 ns; Max laser repeat rate, 50 Hz; Profiles, 100 per sample; Shots, 2 accumulated per profile; Ion gate, blank, 600 Da; Pulsed extraction optimized at, 2800 Da に設定した。

#### HSA 標品のデータベース検索

MALDI-TOF/MS での測定により得られたピークの内、シグナル・ノイズ比 (S/N) が 3 以上のモノアイソトピックピークを選択し、データベース解析に利用した。解析は Matrix Science Inc. (Boston, MA, USA)の検索エンジンソフトウェアである Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) の Peptide Mass Fingerprint を用いた。検索条件は、Database, SwissProt; Enzyme, trypsin または V8-E; Missed cleavage, allow up to 2; Taxonomy, Homo sapiens (human); Protein mass, 66 kDa; Mass values, MH<sup>+</sup>または M-H<sup>-</sup>, Monoisotopic; Fixed modifications, Carbamidomethyl (C); Variable modification, Oxidation (M), Glu-> PyroGlu (N-term E), Gln-> PyroGlu (N-term Q); Peptide tolerance,

±0.2 Da; Report Top: 5 または 20 hits に設定した。また、配列カバー率はアミノ酸の数をもとに計算した。

#### タンパク質定量

それぞれ超純水で希釈した、5 倍希釈 Bio-Rad Protein Assay 染色液 200  $\mu\text{L}$  と、10 倍希釈 HSA 抽出液 10  $\mu\text{L}$  を 96 well マイクロプレート内で混合し、5 分間室温でインキュベートした後波長 595 nm の吸光度を測定した。検量線は超純水に溶解して調製した 1、0.5、0.1、0.05、0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の HSA 溶液を用いて作成した。

### 第三節付属実験

#### 20 mM potassium phosphate buffer (pH7.4) の調製

それぞれ超純水に溶解して調製した 20 mM  $K_2HPO_4$  水溶液及び 20 mM  $KH_2PO_4$  水溶液を混合して pH7.4 に調整し、20 mM potassium phosphate buffer (pH7.4) とした。

#### 過酸化水素による酸化修飾 HSA 調製

HSA 20 mg を 20 mM potassium phosphate buffer (pH7.4) 450  $\mu$ L に溶解し、20 mM potassium phosphate buffer (pH7.4) に溶解して調製した 1 M または 10 mM  $H_2O_2$  を 50  $\mu$ L 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。反応液をカットオフ値 30 kDa の限外ろ過フィルターに移し、14,000 $\times$ g で 12 分間遠心して過剰の反応試薬をろ過した後、新しいチューブにフィルターを逆さに置き、1,000 $\times$ g で 2 分間遠心してフィルター上に残った約 50  $\mu$ L の HSA 濃縮液を回収した。回収した HSA は 40  $\mu$ g/ $\mu$ L となるように 6.5 M urea 溶液で希釈し、過酸化水素による酸化修飾 HSA とした。

#### 銅／アスコルビン酸による酸化修飾 HSA 調製

HSA 20 mg を 20 mM potassium phosphate buffer (pH7.4) 450  $\mu$ L に溶解し、20 mM potassium phosphate buffer (pH7.4) に溶解して調製した 500 mM  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ /200 mM ascorbic acid または 10 mM  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ /20 mM ascorbic acid を 50  $\mu$ L 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。「第三節付属実験 過酸化水素による酸化修飾 HSA 調製」と同様に限外ろ過して HSA を回収し、40  $\mu$ g/ $\mu$ L となるように 6.5 M urea 溶液で希釈し、銅／アスコルビン酸による酸化修飾 HSA とした。

### 糖化修飾 HSA 調製

HSA 20 mg を 5 mM toluene/20 mM potassium phosphate buffer (pH7.4) 450  $\mu$ L に溶解し、5 mM toluene/20 mM potassium phosphate buffer (pH7.4) に溶解して調製した 2 M または 5 mM D-glucose を 50  $\mu$ L 加え、37°C で 28 日間インキュベートした。「第三節付属実験 過酸化水素による酸化修飾 HSA 調製」と同様に限外ろ過して HSA を回収し、40  $\mu$ g/ $\mu$ L となるように 6.5 M urea 溶液で希釈し、糖化修飾 HSA とした。

### HNE 修飾 HSA 調製

HSA 20 mg を 20 mM potassium phosphate buffer (pH7.4) 450  $\mu$ L に溶解し、ethanol に溶解して調製した 30 mM または 5 mM HNE を 50  $\mu$ L 加え、37°C で 2 時間インキュベートした。「第三節付属実験 過酸化水素による酸化修飾 HSA 調製」と同様に限外ろ過して HSA を回収し、40  $\mu$ g/ $\mu$ L となるように 6.5 M urea 溶液で希釈し、HNE 修飾 HSA とした。

### ニトロ化修飾 HSA 調製

HSA 20 mg を 20 mM potassium phosphate buffer (pH7.4) 450  $\mu$ L に溶解し、0.1 M NaOH に溶解して調製した 657 mM ONOONa を 50  $\mu$ L 加え、直ちに攪拌しながら室温で 1 分間インキュベートした。「第三節付属実験 過酸化水素による酸化修飾 HSA 調製」と同様に限外ろ過して HSA を回収し、40  $\mu$ g/ $\mu$ L となるように 6.5 M urea 水溶液で希釈し、ニトロ化修飾 HSA とした。

### モデル修飾体添加血漿試料中 HSA のイムノアフィニティー抽出

「第二節付属実験 HSA のイムノアフィニティー抽出」と同様に、HSA の捕捉は、Vivapure Anti-HSA Kit の使用法に沿って行った。抗 HSA 抗体固定化樹

脂 400  $\mu\text{L}$  に対してスピнкаラム型フィルターを用いて 400 $\times\text{g}$  で 2 分間遠心し、保存液を除いた。40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  修飾 HSA 溶液 20  $\mu\text{L}$ 、または血漿と 40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  修飾 HSA 溶液各 10  $\mu\text{L}$  を付属の binding buffer 180  $\mu\text{L}$  で希釈し、抗体固定化ゲルと混合し、懸濁状態を保つよう転倒混和を行いながら室温で 15 分間インキュベートした後、400 $\times\text{g}$  で 2 分間遠心した。洗浄のため、binding buffer 200  $\mu\text{L}$  を加えて室温で 2 分間転倒混和した後 400 $\times\text{g}$  で 2 分間遠心する操作を 2 回繰り返した。フィルターを予め 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 200  $\mu\text{L}$  を入れた新しいチューブに移し替え、溶出のため 100 mM glycine/HCl buffer (pH2.0) 200  $\mu\text{L}$  を加えて室温で 5 分間転倒混和した。400 $\times\text{g}$  で 2 分間遠心して得られたろ液を HSA 抽出液とした。

#### モデル修飾体の酵素消化

40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  修飾 HSA 溶液を 6.5 M urea 溶液で 40 倍希釈し、修飾 HSA 試料溶液とした。

「第二節付属実験 HSA 標品の酵素消化」と同様に、修飾 HSA 試料溶液または HSA 抽出液の 20  $\mu\text{L}$  を取り、110 mM DTT/12.5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 2  $\mu\text{L}$  を HSA 溶液に加えた後、37 $^\circ\text{C}$  で 1 時間インキュベートし、タンパク質中ジスルフィド結合の還元を行った。600 mM IAA/12.5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 2  $\mu\text{L}$  を試料溶液に加えた後、37 $^\circ\text{C}$  の暗所で 45 分間インキュベートし、還元されたシステイン残基を保護するためのアルキル化を行った。110 mM DTT/12.5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 20  $\mu\text{L}$  を試料溶液に加えて未反応の IAA を失活させた。その後、50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 56  $\mu\text{L}$  を加えて試料溶液を希釈した。還元アルキル化後の HSA 溶液各 40  $\mu\text{L}$  に 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  trypsin または 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  V8 溶液各 4  $\mu\text{L}$  を加えた後、37 $^\circ\text{C}$  で 17 時間インキュベートしてタンパク質消化を行い、酵素消化済 HSA 試料溶液とした。

### モデル修飾体酵素消化物の脱塩

「第二節付属実験 HSA 酵素消化物の脱塩」と同様に、酵素消化済 HSA 試料溶液に対して ZipTipC<sub>18</sub> (0.6 μL) を用いて脱塩を行った。ZipTipC<sub>18</sub> を acetonitrile 100 μL で浸潤化を行い、0.1% (v/v) TFA 水溶液 100 μL で平衡化を行った。その後、酵素消化済 HSA 試料溶液を ZipTipC<sub>18</sub>に通導し、0.1% (v/v) TFA 水溶液 50 μL で洗浄後、超純水/acetonitrile (25/75, v/v) 混液 20 μL で溶出し、脱塩済試料溶液とした。

### モデル修飾体酵素消化物の MALDI-TOF/MS

MALDI マトリクスは「第二節付属実験 HSA 酵素消化物の MALDI-TOF/MS」と同様に、リン酸水溶液、DHB 溶液、IS 溶液を 2: 1: 1 (v/v/v) で混合し、マトリクス溶液とした。

脱塩済試料溶液 5 μL とマトリクス溶液 5 μL を混合し、その混合液 1 μL をプレート上に添加して風乾後、MALDI-TOF/MS 装置に導入した。

MALDI-TOF/MS の測定は正イオンモードと負イオンモードでそれぞれ行い、測定条件は、正/負イオン検出モードとも、reflectron mode; Mass range, 600-4000 Da; Laser, N<sub>2</sub> laser (337 nm); Pulse width, 3 ns; Max laser repeat rate, 50 Hz; Profiles, 100 per sample; Shots, 2 accumulated per profile; Ion gate, blank, 600 Da; Pulsed extraction optimized at, 2800 Da に設定した。

### モデル修飾体酵素消化物のデータベース検索

MALDI-TOF/MS での測定により得られたピークの内、S/N が 3 以上のモノアイソトピックピークを選択し、データベース解析に利用した。解析は Matrix Science 社の検索エンジンである Mascot の Peptide Mass Fingerprint を用いた。検索条件は、Database, SwissProt; Enzyme, trypsin または V8-E; Missed

cleavage, allow up to 2; Taxonomy, Homo sapiens (human); Protein mass, 66 kDa; Mass values, MH<sup>+</sup>または M-H<sup>-</sup>, Monoisotopic; Fixed modifications, Carbamidomethyl (C); Variable modification, Oxidation (M), Glu-> PyroGlu (N-term E), Gln-> PyroGlu (N-term Q)及び、Oxidation (H, W), Hex (K, R), HNE (K, C, H), HNE-Delta, H<sub>2</sub>O (K, C, H), Nitro (Y)の内モデル修飾体に適したものを選択; Peptide tolerance, ±0.2 Da; Report top, 5 hits に設定した。

#### 第四節付属実験

##### 血漿試料中 HSA のイムノアフィニティー抽出

「第二節付属実験 HSA のイムノアフィニティー抽出」と同様に、HSA の捕捉は、Vivapure Anti-HSA Kit の使用法に沿って行った。抗 HSA 抗体固定化樹脂 400  $\mu\text{L}$  に対してスピナラム型フィルターを用いて 400 $\times$ g で 2 分間遠心し、保存液を除いた。正常ヒト血漿 20  $\mu\text{L}$  を付属の binding buffer 180  $\mu\text{L}$  で希釈し、抗体固定化ゲルと混合し、懸濁状態を保つよう転倒混和を行いながら室温で 15 分間インキュベートした後、400 $\times$ g で 2 分間遠心した。洗浄のため、binding buffer 200  $\mu\text{L}$  を加えて室温で 2 分間転倒混和した後 400 $\times$ g で 2 分間遠心する操作を 2 回繰り返した。フィルターを予め 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 200  $\mu\text{L}$  を入れた新しいチューブに移し替え、溶出のため 100 mM glycine/HCl buffer (pH2.0) 200  $\mu\text{L}$  を加えて室温で 5 分間転倒混和した。400 $\times$ g で 2 分間遠心して得られたる液を HSA 抽出液とした。

##### 血漿抽出 HSA の酵素消化

検出可能な修飾率の検討においては、「第三節付属実験 過酸化水素による酸化修飾 HSA 調製」に従って 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  を用いて調製し、6.5 M urea 溶液で希釈した 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  酸化修飾 HSA の試料溶液を、「第二節付属実験 HSA 標品の酵素消化」と同様に調製した 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  HSA 溶液それぞれ 1、9、49、99、199、299、499、999 当量と混合し、修飾 HSA 試料溶液とした。

「第二節付属実験 HSA 標品の酵素消化」と同様に、血中 HSA 抽出液の 20  $\mu\text{L}$  を取り、110 mM DTT/12.5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 2  $\mu\text{L}$  を HSA 溶液に加えた後、37 $^\circ\text{C}$  で 1 時間インキュベートし、タンパク質中ジスルフィド結合の還元を行った。600 mM IAA/12.5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 2  $\mu\text{L}$  を試料溶液に加えた後、37 $^\circ\text{C}$  の暗所で 45 分間インキュベートし、還元されたシステイン残基を保護する



ためのアルキル化を行った。110 mM DTT/12.5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 20  $\mu\text{L}$  を試料溶液に加えて未反応の IAA を失活させた。その後、50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 56  $\mu\text{L}$  を加えて試料溶液を希釈した。還元アルキル化後の HSA 溶液各 40  $\mu\text{L}$  に 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  trypsin または 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  V8 溶液各 4  $\mu\text{L}$  を加えた後、37°C で 17 時間インキュベートしてタンパク質消化を行い、酵素消化済 HSA 試料溶液とした。

#### 血漿抽出 HSA 酵素消化物の脱塩

「第二節付属実験 HSA 酵素消化物の脱塩」と同様に、酵素消化済 HSA 試料溶液に対して ZipTipC<sub>18</sub> (0.6  $\mu\text{L}$ ) を用いて脱塩を行った。ZipTipC<sub>18</sub> を acetonitrile 100  $\mu\text{L}$  で浸潤化を行い、0.1% (v/v) TFA 水溶液 100  $\mu\text{L}$  で平衡化を行った。その後、酵素消化済 HSA 試料溶液を ZipTipC<sub>18</sub> に通導し、0.1% (v/v) TFA 水溶液 50  $\mu\text{L}$  で洗浄後、超純水/acetonitrile (25/75, v/v) 混液 20  $\mu\text{L}$  で溶出し、脱塩済試料溶液とした。

#### 血漿抽出 HSA 酵素消化物の MALDI-TOF/MS

MALDI マトリクスは「第二節付属実験 HSA 酵素消化物の MALDI-TOF/MS」と同様に、リン酸水溶液、DHB 溶液、IS 溶液を 2: 1: 1 (v/v/v) で混合し、マトリクス溶液とした。

脱塩済試料溶液 5  $\mu\text{L}$  とマトリクス溶液 5  $\mu\text{L}$  を混合し、その混合液 1  $\mu\text{L}$  をプレート上に添加して風乾後、MALDI-TOF/MS 装置に導入した。

MALDI-TOF/MS の測定は正イオンモードと負イオンモードでそれぞれ行い、測定条件は、正/負イオン検出モードとも、reflectron mode; Mass range, 600-4000 Da; Laser,  $\text{N}_2$  laser (337 nm); Pulse width, 3 ns; Max laser repeat rate, 50 Hz; Profiles, 100 per sample; Shots, 2 accumulated per profile; Ion gate, blank, 600 Da; Pulsed extraction optimized at, 2800 Da に設定した。

### 血漿抽出 HSA 酵素消化物のデータベース検索

MALDI-TOF/MS での測定により得られたピークの内、S/N が 3 以上のモノアイソトピックピークを選択し、データベース解析に利用した。解析は Matrix Science 社の検索エンジンである Mascot の Peptide Mass Fingerprint を用いた。検索条件は、Database, SwissProt; Enzyme, trypsin, または V8-E; Missed cleavage, allow up to 2; Taxonomy, Homo sapiens (human); Protein mass, 66 kDa; Mass values, MH<sup>+</sup> または M-H<sup>-</sup>; Monoisotopic; Fixed modifications, Carbamidomethyl (C); Variable modification, Oxidation (M, H, W), Glu-> PyroGlu (N-term E), Gln-> PyroGlu (N-term Q), Hex (K, R), HNE (K, C, H), HNE-Delta, H<sub>2</sub>O (K, C, H), Nitro (Y); Peptide tolerance, ±0.2 Da; Report top, 5 hits に設定した。

## 引用文献

1. Masaki Otagiri and Victor Tuan Giam Chuang: Pharmaceutically important pre- and post-translational modifications on human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 527-534 (2009).
2. Nurith Shaklai, Robert L. Garlick, and H. Franklin Bunn: Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J. Biol. Chem.*, **259**, 3812-3817 (1984).
3. Barry Halliwell and Okezie I. Aruoma: DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Lett.*, **281**, 9-19 (1991).
4. Christian Behl, Martina Widmann, Thorsten Trapp, and Ffloian Holsboer: 17- $\beta$  Estoradiol protects neurons from oxidative stress-induces cell death *in vitro*. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **216**, 473-482 (1995).
5. Roberta Masella, Roberta Di Benedetto, Rosaria Vari, Carmela Filesi, and Claudio Giovannini: Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, **16**, 577-586 (2005).
6. Kevin St. P. McNaught and Peter Jenner: Extracellular accumulation of nitric oxide, hydrogen peroxide, and glutamate in astrocytic cultures

following glutathione depletion, complex I inhibition, and/or lipopolysaccharide-induced activation. *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 979-988 (2000).

7. Ivan Rusyn, Shoji Asakura, Brian Pachkowski, Blair U. Bradford, Mikhail F. Denissenko, Jeffrey M. Peters, Steven M. Holland, Janardan K. Reddy, Micheal L. Cunningham, and James A. Swenberg: Expression of base excision DNA repair genes is a sensitive biomarker for *in vivo* detection of chemical-induced chronic oxidative stress: identification of the molecular source of radicals responsible for DNA damage by peroxisome proliferators. *Am. Soc. Cancer Res.*, **22**, 1050-1057 (2013).
8. Zhen Zhang, Robert C. Bast Jr., Yinhua Yu, Jinong Li, Lori J. Sokoll, Alex J. Rai, Jason M. Rosenzweig, Bonnie Cameron, Young Y. Wang, Xiao-Ying Meng, Andrew Berchuck, Carolien van Haaften,-Day, Neville F. Hacker, Henk W. A. de Bruijn, Ate G. J. van der Zee, Ian J. Jacob, Eric T. Fung, and Daniel W. Chan: Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res.*, **64**, 5882-5890 (2004).
9. Yufeng Shen, Jeongkwon Kim, Eric F. Strittmatter, Jon M. Jacobs, David G. Camp II, Ruihua Fang, Nikola Tolié, Ronald J. Moore, and Richard D. Smith: Characterization of the human blood plasma proteome. *Proteomics*, **5**, 4034-4045 (2005).

10. Koji Uchida and Shunro Kawasaki: Selective oxidation of tryptophan and histidine residues on protein through the copper-catalyzed autooxidation of L-ascorbic acid. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, **53**, 1529-1535 (1988).
11. Gerard Marx and Mordechai Chevion: Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper (II) and ascorbate. *Biochem. J.*, **236**, 397-400 (1985).
12. Anna Maria Salzano, Giovanni Renzone, Andrea Scaloni, Armida Torreggiani, Carla Ferreri, and Chryssostomos Chatgililoglu: Human serum albumin modifications associated with reductive radical stress. *Mol. Biosyst.* **7**, 889-898 (2011).
13. Niggi Iberg and Rudolf Flückiger: Nonenzymatic glycation of albumin *in vivo*. Identification of multiple glycosylated sites. *J. Biol. Chem.*, **261**, 13542-13545 (1986).
14. Naghmeh Sattarahmady, Ali A. Moosavi-Movahedi, and Mehran Habibi-Rezaei: A biophysical comparison of human serum albumin to be glycated *in vivo* and *in vitro*. *J. Med. Biochem.*, **30**, 5-11 (2011).
15. Himanshu S. Gadgil, Pavel V. Boldarenko, Michael J. Treuheit and Da Ren: Screening and sequencing of glycated proteins by neutral loss scan LC/MS/MS method. *Anal. Chem.*, **79**, 5991-5999 (2007).

16. Giancarlo Aldini, Luca Gamberoni, Marica Orioli, Giangiacomo Beretta, Luca Regazzoni, Roberto Maffei, and Marina Carini: Mass spectrometric characterization of covalent modification of human serum albumin by 4-hydroxy-*trans*-2-nonenal. *J. Mass Spectrom.*, **41**, 1149-1161 (2006).
17. Kaisheng Jiao, Sarasawathi Mandapati, Paul L. Skipper, Steven R. Tannenbaum, and John S. Wishnok: Site-selective nitration of tyrosine in human serum albumin by peroxyxynitrite. *Anal. Biochem.*, **293**, 43-52 (2001).
18. 大江知行: 生体高分子の微小変化を通してみる生命現象 —バイオマーカー探索のブレークスルーとなりうるか?— *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **57**, 167-172 (2009).
19. 大江知行: 質量分析による蛋白質・ペプチドの化学修飾解析 —効率的な早期診断マーカー・治療ターゲットの探索を目指して— *臨床化学*, **38**, 177-184 (2009).
20. Takaaki Goto, Shota Kojima, Shohei Shitamichi, Seon Hwa Lee, and Tomoyuki Oe: Chemical modificomics: a novel strategy for efficient biomarker discovery through chemical modifications on a target peptide. *Anal. Methods*, **4**, 1945-1952 (2012).

21. Mark O. Collins, Lu Yu, and Jyoti S. Choudhary: Analysis of protein phosphorylation on a proteome-scale. *Proteomics*, **7**, 2751-2768 (2007).
22. Theodore Peters Jr.: All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. Chapter 2-5, Academic Press, San Diego (1995).
23. Roswitha Dolhofer and Otto H. Wieland: Increased glycosylation of serum albumin in diabetes mellitus. *Diabetes*, **29**, 417-422 (1980).
24. Takuji Kazuma, Yumiko Uematsu, Tomomi Usami, and Shigeyuki Imamura: Study of glycated amino acid elimination reaction for an improved nonenzymatic glycated albumin measurement method. *Clin. Chim. Acta*, **346**, 135-143 (2004).
25. Hiroyuki Terawaki, Kazunobu Yoshimura, Toshio Hasegawa, Yukie Matsuyama, Tsuneo Negawa, Kenichi Yamada, Masato Matsushima, Masaaki Nakayama, Tatsuo Hosoya, and Seiichi Era: Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int.*, **66**, 1988-1993 (2004).
26. Jennifer L. Beck, Shanika Ambahera, Sarah R. Yong, Margaret M. Sheil, John de Jersey, and Stephen F. Ralph: Direct observation of covalent adducts with Cys34 of human serum albumin using mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **325**, 326-336 (2004).

27. Darryl J. C. Pappin, Peter Hojrup, and Alan J. Bleasby: Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.*, **3**, 327-332 (1993).
28. Chunling Wa, Ron Cerny, and David S. Hage: Obtaining high sequence coverage in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry for studies of protein modification: analysis of human serum albumin as a model. *Anal. Biochem.*, **349**, 229-241 (2006).
29. Takao Sanaki, Mao Suzuki, Takaaki Goto, Seon Hwa Lee, and Tomoyuki Oe: Simple and efficient approach to protein identification by the peptide mass fingerprinting method: concomitant use of negative ionization. *Anal. Methods*, **2**, 1144-1151 (2010).
30. Vela Keil-Dlouhá, Nicole Zylber, Nguyen T. Tong, and Borivoj Keil: Cleavage of glucagon by  $\alpha$ - and  $\beta$ -trypsin. *FEBS Lett.*, **16**, 287-290 (1971).
31. Edwin J. Cohn, Laurence E. Strong, William L. Hughes, Jr., Dwight J. Mulford, John N. Ashworth, Marshall Melin, and Harold L. Taylor: Preparation and properties of serum and proteins. IV. A system for the separation into fractions of protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 459-475 (1946).



32. James Travis, Jean Bowen, Duane Tewksbury, David Johnson, and Ralph Pannell: Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. *Biochem. J.*, **157**, 301-306 (1976).
33. Laura F. Steel, Michael G. Trotter, Pamela B. Nakajima, Taj S. Mattu, Gregory Gonye, and Timothy Block: Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 262-270 (2003).
34. Elisabetta Gianazza and Philippe Arnaud: A general method for fractionation of plasma proteins: dye-ligand affinity chromatography on immobilized Cibacron blue F3-GA. *Biochem. J.*, **201**, 129-136 (1982).
35. Noelle Doyan, Claude Lapresle, Pierre Lafaye, and Jean-Claude Mazie: Study of the antigenic structure of human serum albumin with monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.*, **22**, 1-10 (1985).
36. Karl Oettl, Gilbert Reibnegger, and Otto Scumut: The redox state of human serum albumin in eye disease with and without complications. *Acta Ophthalmol.*, **89**, 174-179 (2011).
37. Shinya Toyokuni, Satoshi Yamada, Minoru Kashima, Yu Ihara, Yuichiro Yamada, Tomoyuki Tanaka, Hiroshi Hiai, Yutaka Seino, and Koji Uchida: Serum 4-hydroxy-2-nonenal-modified albumin is elevated in

- patient with type2 diabetes mellitus. *Antioxid. Redox Sign.*, **2**, 681-685 (2000).
38. Pal Pacher, Joseph S. Beckman, and Lucas Liasudet: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, **87**, 315-424 (2007).
39. Christian Schöneich: Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1703**, 111-119 (2005).
40. Christian Schöneich: Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxo-histidine in peptides and proteins. *Pharm. Biomed. Anal.*, **21**, 1093-1097 (2000).
41. Simin D. Maleknia, Jason W. H. Wong, and Kevin M. Downard: Photochemical and electrophysical production of radicals on millisecond timescale to probe the structure, dynamics and interactions of proteins. *Photochem. Photobiol. S.*, **3**, 741-748 (2004).
42. Diane A. Servetnick, Debra Bryant, Kevin J. Wells-Knecht, and Paddy L. Wiesenfeld: L-Arginine inhibits *in vitro* nonenzymatic glycation and advanced glycosylated end products formation of human serum albumin. *Amino Acids*, **11**, 69-81 (1996).

43. Durgesh V. Nadkarni and Lawrence M. Sayre: Structure definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynoneneal. *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 284-291 (1995).
44. Hakan Gunaydin and Kendall N. Houk: Mechanisms of peroxyxynitrite-mediated nitritation of tyrosine. *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 894-898 (2009).
45. Aaron Sarver, N. Karoline Sceffler, Martin D. Shetlar, and Bradford W. Gibson: Analysis of peptides and proteins containing nitrotyrosine by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 439-448 (2001).
46. Takatsugu Hirokawa, Seah Boon-Chieng, and Shigeki Mitaku: SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, **14**, 378-379 (1998).
47. David Bar-Or, Gerald Curtis, Nagaraja Rao, Nick Bampos, and Edward Lau: Characterization of the Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> binding amino-acid residues of the N-terminous of human serum albumin. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 42-47 (2001).
48. Andrej Frolov and Ralf Hoffman: Identification and relative quantification of specific glycation sites in human serum albumin. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 2349-2356 (2010).

49. Kelvin J. Davies: Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895-9901 (1987).
  
50. Elisabetta Meucci, Alvaro Mordente, and Giuseppe E. Martorana: Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: conformational and functional changes. Implications in protein aging. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4692-4699 (1991).