

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 30 年 5 月 1 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 奈良県立医科大学・医学部
職 名 講師
研究代表者名 秦野 修

下記のとおり平成29年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号: 281028)

1. 共同利用研究 課題名	質量分析法を用いたステロイドホルモン産生機構の研究			
2. 共同利用研究 目的	申請者は、ステロイドホルモンの質量分析イメージング法による、組織細胞上の直接可視化法の開発を行っている。本年度は、神戸大学の分担者・岩崎がもつタンパク質解析技術等を用い、ステロイドに加えてステロイド産生に関与するタンパク質群の質量分析イメージング法の開発に着手すると共に、より高感度、かつ、高空間分解能のステロイドホルモン群のイメージング法の開発を行うことを目的とする。			
3. 共同利用研究 期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 秦野 修	奈良県立医科大学・医学部	講師	研究統括と質量分析法、タンパク質合成	
(分担研究者) 岩崎哲史	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター	助教	受入れとタンパク質合成、質量分析解析補助	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル統合経路研究 部門・細胞増殖分化制 御研究分野	氏 名	岩崎哲史

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同利用研究計画

1. ステロイドホルモンの質量分析イメージング法の感度向上条件等の検討

ラット / ヒト副腎など、ステロイド産生臓器の組織切片上で、イオン化効率を高める on-tissue 誘導体化法(ステロイドホルモンのケトン基を GirT 試薬により誘導体化)を用いて、組織切片上のステロイドホルモンを、より高感度で、直接可視化するための、条件検討を行った。又、2 段階の質量分析(MS/MS)反応を行い、1段階目で得られた m/z ピークが目的のステロイドホルモンであることの確認を行った。これらの際に、MALDI 検出に一般的な TOF 型質量分析機に加えて、質量分解能の極めて高い FT-ICR 型質量分析機(R:100 万)を用いて、質量分析イメージング検出の条件検討を行った。(主に秦野担当)

2. ステロイド産生に関与するタンパク質群の質量分析イメージング法の開発

1. の組織切片上におけるステロイドホルモンの質量分析イメージング法の開発に加えて、ステロイドホルモン合成酵素群(タンパク質)の質量分析イメージング法を開発するために、ラット / ヒトのステロイド産生関連タンパク質群 8 種を、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系 / 大腸菌の系を用いて cDNA より合成した。His タグ等による精製の後に、トリプシンによる切断を行い、質量分析 MALDI 法で、各タンパク質における検出感度の高いペプチド断片を前データとして同定、蓄積している。(秦野、岩崎、研究協力者: 竹田担当)

7. 共同利用研究の成果

副腎凍結切片上のステロイドホルモンは、GirT 試薬による on-tissue 誘導体化により、強いイオン化シグナルが得られ、MALDI 型質量分析機 FT-ICR MS (超高質量分解能, R:100 万)を用いることによって、 m/z 値 ± 0.001 以内の正確さで、GirT 誘導体化された Corticosterone, 11-DHC など、5 種の代表的なステロイドホルモンの質量分析イメージング像が、副腎皮質の束状層、網状層などの各層に得られた。ステロイドホルモンは、非誘導体化 MALDI イメージング法では、目的領域を含む低 m/z 領域にマトリックス由来の多数のバックグラウンドピークが検出されたが、本研究では、ステロイドホルモン(中のケトン基)を誘導体化してイオン化効率を高めることにより、強い誘導体化ステロイドの m/z ピークが得られ、組織切片上の 2 次元質量分析イメージング検出が可能となった。又、0.001 ダルトン程度の精密さで信頼すべき m/z 値が得られたことによって、未知の m/z ピークを含めた各検出成分の化学組成式が推定された。未知の m/z ピークは、副腎の球状層、束状層、網状層、髄質などに、各々、特有の空間分布を示し、推定された化学組成式から、新たな未知ステロイド等の検出にもつながると考えられる。今後、より高感度、高空間解像度でのステロイド類を検出する条件を開発し、ステロイド合成酵素群の発現との関連等について解析していきたい。又、ステロイドホルモン合成酵素群(8 種)を cDNA よりコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて合成し、抗 His タグ抗体による発現確認と精製後に、トリプシン分解によりペプチド断片化を行った後に、MALDI 質量分析法により高感度に検出されるペプチド断片の同定を行ない、タンパク質の質量分析イメージング法の開発の準備を行っている。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

学会発表

「SALDI と誘導体化によるステロイドホルモンのイオン化法の改良と質量分析イメージングへの応用」

秦野 修、磯崎勝弘、竹森 洋、大西 健、岩崎哲史、片桐昌直、川崎英也、一柳優子、荒川隆一

第 68 回イオン反応研究会/第 157 回質量分析関西談話会/第 6 回イオン移動度研究会・合同研究会 (2017) 奈良市

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究 平成 26~28 年度

「ステロイドホルモンの質量分析イメージングによる組織細胞上の直接可視化法の開発」

研究代表者: 秦野 修 研究協力者: 岩崎哲史

科学研究費補助金 基盤研究(C) 一般 平成 29~31 年度

「質量分析イメージングと標的プロテオミクスによるステロイドホルモン産生異常の解析」

研究代表者: 秦野 修 連携研究者: 岩崎哲史