

加齢臭成分のバイオマーカーとしての応用研究

名古屋大学大学院生命農学研究科

内 田 浩 二

Trans-2-nonenal is an unsaturated aldehyde with an unpleasant greasy and grassy odor endogenously generated during the peroxidation of polyunsaturated fatty acids. 2-Nonenal covalently modified human serum albumin through a reaction in which the aldehyde preferentially reacted with the lysine residues. Using high performance liquid chromatography with on-line electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI/MS/MS), we established a highly sensitive method for detection of a 2-nonenal-histidine adduct and confirmed that the adduct was indeed formed during the lipid peroxidation-mediated modification of protein *in vitro*.

1. 緒 言

脂質過酸化反応により、多岐にわたるアルデヒド類が生成することが、これまでによく研究されている。脂質過酸化の初期産物である脂質ヒドロペルオキシドは、遷移金属存在下においてアルコキシラジカルを経て炭素-炭素結合開裂を起こす。その結果、エステル化されていない主に炭素数3-9の脂質アルデヒドと、末端がエステル化されたアルデヒドが生成される。脂質アルデヒドには、ケトアルデヒド、*n*-アルカナール、2-アルケナール、4-ヒドロキシ-2-アルケナールのような脂質アルデヒドが含まれ、それらは生体内のタンパク質の修飾に関する重要な活性種であると認識されている。これらの脂質アルデヒドは、細胞機能を担う生体分子やDNAへの変異導入により細胞ダメージを蓄積させるものと考えられている。また、LDL中のapo Bへのアルデヒドの付加は、粥状動脈硬化症を引き起こすメカニズムであるマクロファージの泡沫細胞への変化を誘導する。

揮発性のアルデヒド化合物である2-ノネナール (Fig. 1) は特有の芳香性を持ち、中年期以降のヒトにおいてその生

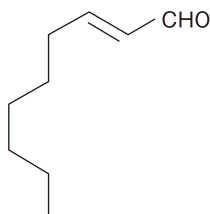


Fig. 1 2-ノネナールの化学構造



Study on senescent product as a biomarker
Koji Uchida
Graduate School of Bioagricultural Sciences,
Nagoya University

成が加速されることから“加齢臭”として知られている¹⁾。2-ノネナールは多価不飽和脂肪酸から脂質過酸化反応を介して生成されることが報告されており、ヒトの体臭としての2-ノネナールも脂質過酸化反応を介して脂肪酸(パルミトレイン酸)から生成されるものと推定されている。また、2-ノネナールは品質劣化したビールや長時間加熱したリノール酸を豊富に含む食用油からも検出されている。一方、2-ノネナールは α,β -不飽和アルデヒド構造を有することから、タンパク質などの生体成分と反応性を有する。これまでに、グリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素やチロシン脱リン酸化酵素類の酵素活性低下などのタンパク質との反応性に関する報告もなされているが、その化学作用の詳細は不明である。本研究課題では、加齢臭2-ノネナールがどのような脂肪酸を起源として生成されるのかを解明し、その生成抑制に至る技術方法の開発を目的に、2-ノネナールのタンパク質との反応性を詳細に検討するとともに、2-ノネナール修飾タンパク質を高感度に検出する測定系の開発を目的として開始された。初年度では、加齢臭成分の一つである2-ヘキセナールについて、その修飾タンパク質に対するモノクローナル抗体の開発を行い、抗体が認識する2-ヘキセナール-ヒスチジン付加体の化学構造を解明し、それらの付加体のバイオマーカーとしての有用性について検討した。最終年度では、より高感度に定量を行うことが可能な液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析装置(LC-MS/MS)を用い、2-ノネナール修飾タンパク質の加齢臭マーカーとしての意義を見いだすことを目的に、2-ノネナール-ヒスチジン付加体 (Fig. 2) の高感度検出法の開発を行った。

2. 方 法

2.1 2-ノネナールとヒスチジンの反応

- (1) 2-ノネナール (10mM) とヒスチジン (10mM) をリン酸バッファー中 (pH7.4) で37℃、24時間反応させた。
- (2) 反応後、1NのNaOH水溶液を反応液の10分の1量加

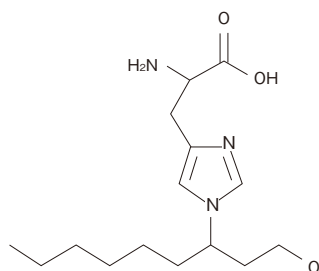


Fig. 2 2-ノネナル-ヒスチジン付加体の化学構造

え、塩基性とした後に2-ノネナルに対して大過剰のNaBH₄を加え、室温で3時間還元処理を行った。

- (3) 還元処理後、1 NのHClを加え、中和した後HPLC分析を行った。不溶性の塩が析出していた場合、フィルター濾過した後に分析を行った。

- (4) 逆相 HPLC分析条件

Column : Develosil C30-UG-5 (8 φ 100mm)

Flow rate : 2.0 ml/min

Detection : 200 – 650nm

Eluent : A, H₂O/0.1%TFA ; B, acetonitrile/0.1% TFA

Gradient :	Time (min)	0	40
	A (%)	100	34
	B (%)	0	66

2.2 酸加水分解

- (1) ミクロチューブにサンプルを加え、遠心エバポレーターにより乾固した。
- (2) 加水分解用チューブに6N HCl を少量注ぎ、サンプル入りミクロチューブを入れた後、真空ポンプにより減圧条件とした。
- (3) 110 °Cの乾熱器に入れ、24 時間加水分解した。
- (4) 加水分解終了後、ミクロチューブ内に残ったHClをデシケーターにより留去した。

2.3 LC-MS/MS解析

- (1) 加水分解後サンプルをMiliQに溶解し、LC-MS/MS用サンプルとした。
- (2) Retention time、fragmentationを確認した後、Cone potentialおよびCollision energyの最適化を行った。
- (3) LC-MS/MS分析条件
- Injection : 10μl
- Cone potential : 35 eV
- Collision energy : 25 eV
- Ion mode : ESP⁺
- Monitored ion : *m/z* 298 → 110
- Column : Develosil C30-UG-5 (2.0/100)

Flow rate : 0.3 ml/min

Solvent A : H₂O/0.1% HCOOH

Solvent B : acetonitrile/0.1% HCOOH

Gradient :

Time (min)	0	2	6
A (%)	98	98	5

2.4 タンパク質と2-ノネナルの反応

- (1) BSA (1.0mg/ml) をリン酸バッファー (pH 7.4) 中で37°Cで2-ノネナルと反応させた。時間依存的な測定では1 mM 2-ノネナルと0–24 時間反応させ、2-ノネナル濃度依存的な測定では0–10mMの2-ノネナルと24時間反応させた。
- (2) 反応後、0.2N NaOHを反応液の10分の1量加え、塩基性とした後に2-ノネナルに対して大過剰のNaBH₄を用いて未反応2-ノネナルおよび2-ノネナル-ヒスチジン付加体を3 時間還元し、反応を停止した。
- (3) 0.2N HClを用いて反応液の中和を行った。なお、熱が発生するのでこの操作は氷上で行った。

2.5 2-ノネナル修飾タンパク質中の2-ノネナル-ヒスチジン付加体の定量

- (1) 反応液と等量の20%TCA水溶液を加え（最終濃度10 %）、軽くボルテックスした後に氷上で1 時間静置し、タンパク質を不溶化した。
- (2) 7,000 ×g (10,000 rpm, 6cm)、4°Cで15分遠心してタンパク質を沈殿させ、沈殿を乱さぬように上清を除いた。
- (3) 200mlの氷冷アセトンを加えて軽く攪拌した後、同様に遠心して上清を除いた。
- (4) 内部標準物質として2-ノネナル-¹⁵N-ヒスチジンを一定量加えた後、前述の条件で酸加水分解を行い、LC-MS/MS (UPLC-ESI/MS, Acquity TQD tandem quadrupole mass spectrometer) による解析を行った。添加した内部標準物質の量と比較し、検量線と照らし合わせてサンプル中の2-ノネナル-ヒスチジン付加体の濃度を測定した。

3. 結果

2-ノネナルとタンパク質との反応において、タンパク質中のリジン残基およびヒスチジン残基の減少が顕著であった。当研究室において既に、リジン1分子に対して2-ノネナルが2分子付加した付加体である2-ノネナル-リジン付加体を同定しており²⁾、この付加体のLC-MS/MSを用いた定量法を確立している。しかしヒスチジンについては、2-ノネナルをはじめとする不飽和アルデヒド類と反応性を有することが知られているものの、2-ノネナル

とヒスチジンの付加体は未だ同定されていない。そこで今回はヒスチジンについて、2-ノネナール付加体のNMRによる構造解析およびLC-MS/MSを用いた検出系の確立を試みることにした。2-ノネナールとヒスチジンをリン酸バッファー中で37℃、24 h反応させ、HPLC分析を行ったところ、新たに生成するピークが確認された。このピークを分取し、NMRによる構造解析を行ったところ、ヒスチジンに対し、2-ノネナールが1分子マイケル付加した2-ノネナール-ヒスチジン付加体 (Fig. 2) であった。続いてこの付加体の酸加水分解に対する安定性を評価することとした。酸加水分解は、タンパク質中のペプチド結合を切断し、アミノ酸レベルまで完全分解する操作であり、この操作によりタンパク質中に生成したアミノ酸のアルデヒド付加体をLC-MS/MSにより検出・定量することが可能になる。得られた付加体の安定性を高めるために水素化ホウ素ナトリウムによりアルデヒド基をヒドロキシ基に還元した後に酸加水分解を行い、付加体の安定性をLC-MS/MSにより確認した。その結果、この付加体は酸加水分解に対して安定であることが認められ、さらに定量限界がおおよそ50fmolであったことから、タンパク質中から付加体を高感度に検出・定量することが可能であると示唆された。より正確な定量を行うために、安定同位体標識された2-ノネナール-ヒスチジン付加体を内部標準物質とした安定同位体希釈法

により、定量を行うこととした。ヒスチジン中の窒素原子が安定同位体に置換された安定同位体ヒスチジンを用いて、上述の方法で内部標準2-ノネナール-ヒスチジン付加体を作成した。安定同位体標識されたヒスチジンは、ヒスチジンと質量数が3異なり、LC-MS/MS解析では異なる物質として検出されるが、ヒスチジンと物性は同じであり、化学操作における挙動だけでなく、LC-MS/MS解析におけるイオン化効率、検出感度、フラグメンテーション全てにおいてヒスチジンと一致するため、内部標準物質として最適であると考えられた (Fig. 3)。得られた内部標準を一定量とそれに対し任意の割合の2-ノネナール-ヒスチジン付加体を混合した後LC-MS/MS解析を行い、得られたピーク面積比から、2-ノネナール-ヒスチジン付加体の濃度に対するピーク面積比の検量線を作成した。2-ノネナール-ヒスチジン付加体の濃度未知試料に対しては、内部標準物質を加えた後LC-MS/MS解析を行い、得られたピーク面積比を検量線と照らし合わせることで2-ノネナール-ヒスチジン付加体の正確な濃度を求めることが出来る。

この方法を用いて、実際に2-ノネナール修飾タンパク質中から2-ノネナール-ヒスチジン付加体を定量することとした。BSA (1.0mg/ml) に2-ノネナールを最大10mMの濃度で、37℃で24h反応させた後、還元処理および酸加水分解を行い、LC-MS/MSを用いて2-ノネナール-ヒスチ

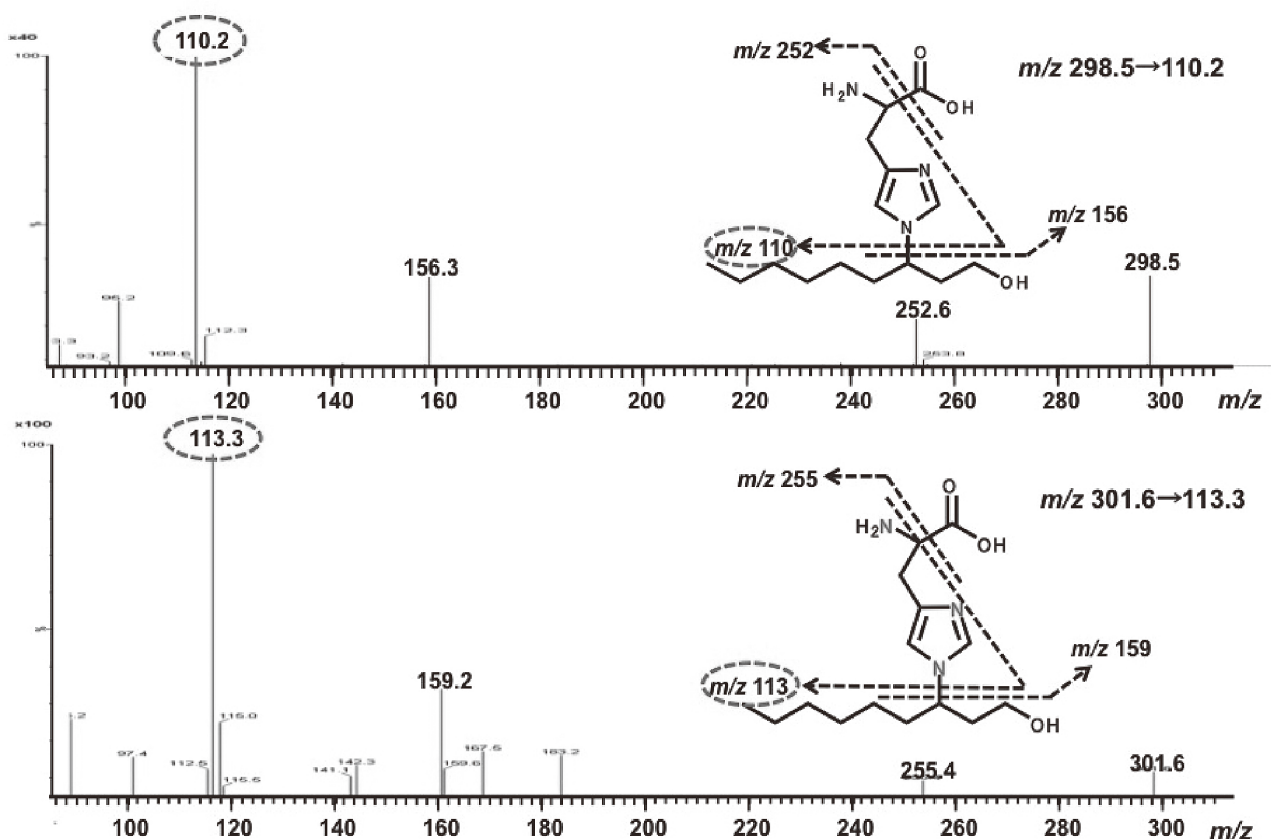


Fig. 3 2-ノネナール-ヒスチジン付加体のLC-MS/MS解析

ジン付加体を定量した。その結果、2-ノネナールの濃度依存的に2-ノネナール-ヒスチジン付加体の生成量の増加が確認され、10mMの2-ノネナールにおいて最大となった。その生成量はBSA 1molあたり、2.8molであった (Fig. 4)。BSA 1mol中にヒスチジン残基は17残基存在するため、この条件での2-ノネナールによるヒスチジンの修飾効率はおおよそ16.5%であった。続いて、2-ノネナールとタンパク質の反応による2-ノネナール-ヒスチジン付加体の生成量の経時的な変化を解析することとした。BSA (1.0mg/ml) を1mMの2-ノネナールと37℃で最大48h反応させた後、同様に還元処理および酸加水分解を行い、2-ノネナール-ヒスチジン付加体を定量した (Fig. 5)。その結果、反応時間依存的に2-ノネナール-ヒスチジン付加体の生成量が増加し、24hにおいて最大となった。その生成量はBSA

1molあたり、2.1molであった。この条件での2-ノネナールによるヒスチジンの修飾効率はおおよそ12.4%であった。

4. 考 察

2-ノネナールは不飽和脂肪酸から脂質過酸化反応を介して生成されることが報告されており、 α , β -不飽和アルデヒド構造を有するためタンパク質などの生体分子と高い反応性を有している。また、近年、2-ノネナールは加齢臭の主要な成分として同定され、中年期のヒトの表皮に存在することが明らかとなってきた。しかしながら、2-ノネナールによるタンパク質修飾反応に関する詳細な研究はこれまでほとんど行われていないのが現状であった。本年度の研究課題では、LC-MS/MSを用いたタンパク質中の2-ノネナール-ヒスチジン付加体の検出法の確立を行った。LC-

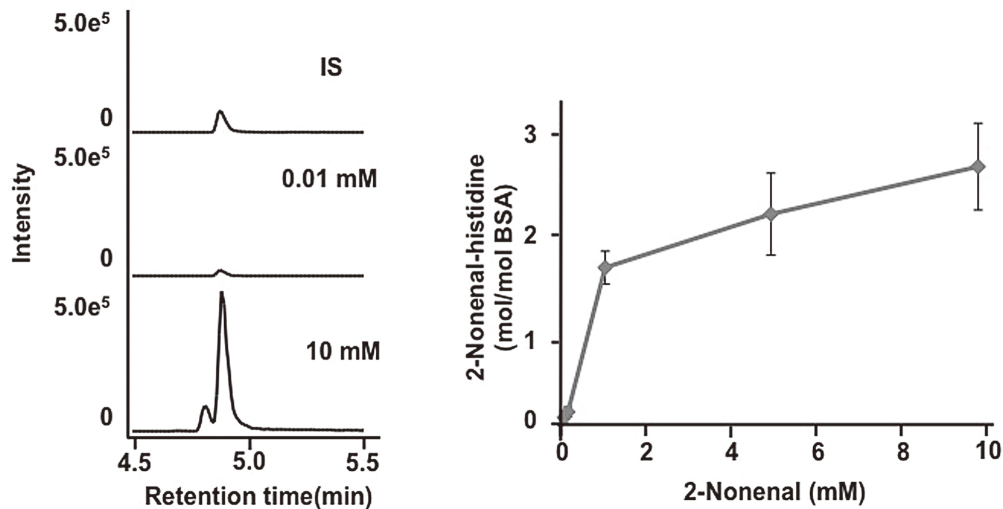


Fig. 4 2-ノネナール-ヒスチジン付加体のLC-MS/MS解析：2-ノネナール濃度に依存したヒスチジン付加体の生成

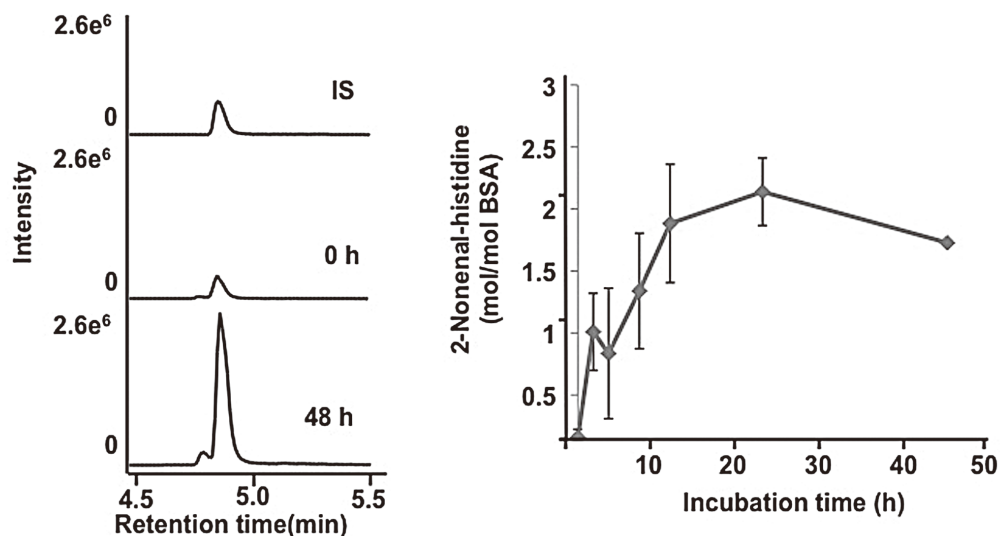


Fig. 5 2-ノネナール-ヒスチジン付加体のLC-MS/MS解析：反応時間に依存したヒスチジン付加体の生成

MS/MSは高速液体クロマトグラフ (HPLC) と質量分析計 (MS) を結合させた装置であり、試料中成分の固定相 (カラム) と移動相に対する保持力の差、プリカーサーイオン、プロダクトイオンの三点により、試料成分を分析できる。また、一度に複数の成分を分析でき、安定同位体を内部標準に用いることで、精製による回収率の差や測定間の誤差を補正できるため、高感度で選択的な定量を行うことが可能である。本研究では、安定同位体希釈法を用い、2-ノネナール修飾タンパク質中から2-ノネナール-ヒスチジン付加体を実際に検出可能であることを確かめた。0.01~10 mMの2-ノネナールをBSAと反応させたものから2-ノネナール-ヒスチジン付加体を検出したところ、どちらについても、2-ノネナール濃度依存的な生成量の増加がみられた。この他、脂肪酸過酸化によるタンパク質修飾、および酸化LDLなどにおける2-ノネナール-ヒスチジン付加体も確認されており、加齢臭2-ノネナールが脂質過酸化反応

を介して普遍的に生成されうることを確認した。このように、本研究課題においてLC-MS/MSを用いた2-ノネナール-ヒスチジン付加体の高感度定量が可能になったことから、今後生体試料などを用いた加齢臭研究への応用が見込まれる。

(引用文献)

- 1) Haze, S., Gozu, Y., Nakamura, S., Kohno, Y., Sawano, K., Ohta, H., and Yamazaki, K. (2001) 2-Nonenal newly found in human body odor tends to increase with aging. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 520-524.
- 2) Ishino, K., Wakita, C., Shibata, T., Toyokuni, S., Machida, S., Matsuda, S., Matsuda, T., and Uchida, K. (2010) Lipid peroxidation generates a body odor component trans-2-nonenal covalently bound to protein in vivo. *J. Biol. Chem.* **285**, 15302-15313.