

# 希少疾患フリードライヒ運動失調症の 血液バイオマーカー、フラタキシン-M タンパク質の定量

Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムによる分析

## 著者

Nicolas Eskenazi,  
Teerapat Rojsajjakul,  
Clementina Mesaros, and  
Ian A. Blair  
Penn/CHOP Friedreich's  
Ataxia Center of Excellence  
and Department of  
Systems Pharmacology and  
Translational Therapeutics,  
Perelman School of Medicine,  
University of Pennsylvania  
  
Linfeng Wu  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

フリードライヒ運動失調症 (FRDA) は、ミトコンドリア成熟型フラタキシン (フラタキシン-M) タンパク質の発現不全を原因とする、進行性の神経系損傷と運動障害を伴う遺伝性疾患です。フラタキシン-M (81-210) は、ミトコンドリアプロセシングペプチダーゼ (MPP) による、完全長フラタキシン (1-210) の 2 段階のタンパク質分解切断によって生じます。フラタキシン-M は循環血中に分泌されないため、血漿や血清では分析できません。しかしフラタキシン-M は、血小板やヒト末梢血単核球 (PBMC) など、ミトコンドリアを有する血液細胞中に存在しています。

質量分析 (MS) と免疫沈降 (IP) および安定同位体希釈メソッドの組み合わせにより、高い精度と正確度でフラタキシン-M を定量することが可能です。この定量では、主に、高分解能 MS とナノフロー液体クロマトグラフィー (ナノフロー LC) システムの組み合わせが用いられてきていますが、この手法には時間がかかり、ナノフロー LC/MS システムを維持するために厳格な品質管理が必要とされます。ユニット分解能トリプル四重極 LC/MS (LC/TQ) システムと組み合わせた標準流速 LC システムは、通常は、フラタキシン-M のような低濃度タンパク質の定量には使用されません。このアプリケーションノートでは、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) 取り込みモードを用いる Agilent 6495 LC/TQ と標準流速 HPLC の組み合わせによる、より優れたフラタキシン-M の定量分析を紹介します。このシステムは、パラレルリアクションモニタリング (PRM) 取り込みモードを用いる高分解能オービタルトラッピング質量分析計と組み合わせたトラップ溶出ナノフロー LC/MS システムと比較して、より優れた感度、精度、正確度、装置のランタイムを実現します。したがって、血液サンプル中のフラタキシン-M の高スルーput 定量には、標準流速 HPLC を使用した 6495 LC/TQ プラットフォームが、トラップ溶出ナノフロー LC/MS システムよりも適していることがわかります。

## はじめに

FRDA は稀少疾患とされていますが、米国で最も一般的な遺伝性運動失調症です。進行性の性質の結果として、大部分の患者は、発症後 15.5 ± 7.4 年 (平均年齢 ± SD) で車いすでの生活になります<sup>1</sup>。しかし、主な死因は心臓疾患です<sup>2</sup>。現在、FRDA のための有効な治療はないものの、NRF-2 活性化因子オマベロキシロンは治療投与量において安全で、神経機能を改善することが明らかになっており、今後の治療戦略としての可能性が示されています<sup>3</sup>。多くの FRDA 症例の遺伝的基盤は、フラタキシン (FXN) 遺伝子の第一イントロンにおける両方のアレル (GAA1 および GAA2) の GAA トリプレットリピートの伸長であり、これはエピジェネティックな転写サイレンシングと完全長のフラタキシンタンパク質の発現低下の原因となります<sup>4</sup>。少数の FRDA 患者 (3 % 未満) は、一方のアレルに突然変異または小さな変異があり、もう一方のアレルに GAA リピート伸長がある、複合ヘテロ接合体です<sup>5</sup>。典型的な FRDA 症例において、GAA1 の長さ (最短の伸長) は疾患の重症度と関連している一方で、GAA 伸長が長くなるほど早期に発症し、より速く進行します<sup>6</sup>。

ヒト完全長フラタキシン (アイソフォーム 1、MW = 23,135 Da) は、N 末端にミトコンドリア標的配列を有する 210 アミノ酸の前駆体タンパク質として発現します (図 1)。ミトコンドリアプロセシングペプチダーゼ (MPP) による 2 段階のタンパク質分解切断により、ミトコンドリアフラタキシン-M (81-210; MW = 14,268 Da) が形成されます。鉄硫黄クラスター形成、鉄の貯蔵、ヘム合成、呼吸鎖、酸化ストレスに対する細胞応答などを含む一連のパスウェイにおいて、フラタキシン-M が機能的構成要素であることが、いくつかの証拠により強く示唆されています<sup>7-10</sup>。対照的に、赤血球に見られるミトコンドリア外のフラタキシンアイソフォーム E (フラタキシン-E) タンパク質 (76-210; MW = 14,953 Da) には、ミトコンドリア標的配列がありません。ミトコンドリア標的配列は、翻訳において、選択的スプライシングとそれに次ぐ N 末端アセチル化を

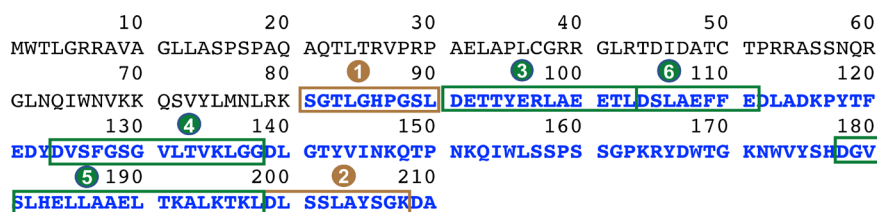


図 1. 完全長フラタキシンおよびフラタキシン-M のアミノ酸配列 (青で表示)。Asp-N 消化ペプチド 1 および 2 (茶色の枠) は定量のために、ペプチド 3 ~ 5 (緑色の枠) はタンパク質検出の確認のために使用しました。

通じて生じます<sup>11</sup>。その発現は、FRDA において、DNA の過剰メチル化によって下方制御されます<sup>12</sup>。フラタキシン-E に起因する機能はまだ明らかにされていません。

フラタキシンは循環血中に分泌されないため血漿や血清では分析できません。これまで、フラタキシンの量は、一般的に、FRDA 線維芽細胞、リンパ球、筋生検、PBMC から、ウェスタンブロット分析、酵素結合免疫測定法 (ELISA)、または電気化学発光測定法を用いて測定されてきました<sup>13</sup>。フラタキシン-E が赤血球のみに存在するという発見により、フラタキシンは、血小板や PBMC などの個々の細胞ではなく、全血サンプルでの分析が可能になりました<sup>14</sup>。この発見により、フラタキシン-M は、ミトコンドリアを有する、血小板や PBMC などの血液細胞のみに存在することが明らかとなりました。さらに、質量分析 (MS) と安定同位体希釈メソッドにより、高い精度と正確度でフラタキシン-M を定量することが可能です。このような分析では主に、ナノフロー液体クロマトグラフィー分離と高分解能 MS (ナノフロー LC/MS) が組み合わされて使用されていますが、これは時間がかかり、分析機器を維持するために厳密な品質管理と専門知識が必要とされます<sup>13</sup>。本研究で紹介したものなど、疾患とバイオマーカーの研究では、統計的に信頼できる所見を得るために大規模なサンプルコホートの分析が必要となることが多く、スループットが重要な考慮事項となります。標準流速 LC システム (LC/TQ) と組み合わせたユニット分解能トリプル四重極装置は、特に大規模なコホート研究において、より堅牢に、高スループットに対応するように設計されています。

標準流速 6495 LC/TQ 装置が、フラタキシン-M のルーチン定量において、現行のトラップ溶出ナノフロー LC/MS システムを改善できるかどうかを判断するために、両方のシステムでサンプルを分析しました。FRDA 被験者由来の全血サンプルにフラタキシン-M の安定同位体アナログを添加し、IP で濃縮してから、Asp-N プロテアーゼで消化しました。消化されたペプチドを 2 種類の LC/MS 機器で分析しました。線形検量線帰直線、検出下限 (LOD)、定量下限 (LLOQ) の相関係数は、6495 LC/TQ システムでより優れた結果を示しました。この結果は、トラップ溶出ベースのナノフロー LC/MS システムで必要とされる量よりも、少ないオンカラムのサンプル量で得ることができました。また、2 つの LC/MS プラットフォームにおいて、機器の分析時間に非常に大きな差が生じました。個々の合計の分析時間が、6495 LC/TQ システムでは 11 分、ナノフロー LC/MS システムでは 105 分となります。したがって、10 人の対照群と 30 人の FRDA 被験者からの血液サンプルの標準的な分析は、ナノフロー LC/MS システムでは 8 日間かかる場所、1 日以内で完了することが可能でした。これらのデータは、血液サンプル中のフラタキシン-M の高スループット定量においては、トラップ溶出ナノフロー LC/MS システムよりも、標準流速 6495 LC/TQ プラットフォームの方が適していることを示しています。

## 実験方法

### 化学物質および材料

別途記載のない限り、試薬と溶媒はすべて LC/MS グレードのものを使用しました。 $^{13}\text{C}_6$ -ロイシンは Cambridge Isotope Laboratories (マサチューセッツ州アンドーバー) から入手しました。抗フラタキシン抗体 (クローン 1D9) は LifeSpan Biosciences, Inc. (ワシントン州シアトル) から入手しました。ピメルイミドジメチル二塩酸塩 (DMP)、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、cOmplete Mini EDTA フリー Easypack プロテアーゼ阻害剤混合物錠剤、エンドプロテアーゼ Asp-N シーケンスグレード、DL-ジチオスレイトール (DTT)、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヒトリゾチム、イミダゾール、グリセロール、フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF)、トリエタノールアミン、エタノールアミン、M9 最小塩類 5倍濃縮粉末、最小微生物培地 (M9 培地) は MilliporeSigma (マサチューセッツ州ビレリカ) から購入しました。Ni-NTA アガロース樹脂は Qiagen (メリーランド州ジャーマンタウン) から購入しました。HPLC グレードの水とアセトニトリルは Burdick and Jackson (ミシガン州マスキーゴン) から入手しました。重炭酸アンモニウムと酢酸は Fisher Scientific (ペンシルベニア州ピッツバーグ) から購入しました。タンパク質 G 磁性 Dynabeads は Life Technologies Corporation (ニューヨーク州グランドアイランド) から入手しました。

### 全血サンプル

血液サンプルは 2 人の健康な対照被験者、および 38 人のホモ接合性 FRDA 被験者から取得しました。全員がフィラデルフィア小児病院で実施中の自然史研究に同時に登録しました。この研究に参加した各ドナーから、書面でのインフォームドコンセントを取得しました。18 歳未満の被験者の場合、親または法的保護者から書面でのインフォームドコンセントを取得しました。この研究は、フィラデルフィア小児病院の倫理審査委員会 (IRB)

により承認されました (IRB プロトコル # 01-002609)。静脈血は紫色のキャップの 8.5 mL Vacutainer EDTA チューブで採取し、静かに反転して混合しました。すべてのサンプルをすぐに Eppendorf チューブに分注し、分析までの間  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍凍しました。

### 非標識および安定同位体標識フラタキシン-M の発現と精製

非標識および細胞培地アミノ酸安定同位体標識 (SILAC) 標識成熟フラタキシンの発現は、大腸菌 BL21 DE3 で以前に記述のとおり行いました<sup>15</sup>。簡潔に説明すると、FXN cDNA プラスミド (pTL1) からのヒト成熟型フラタキシン (81-210) のコード配列の増幅を行って、pET21b プラスミドへクローニングし、6x ヒスチジン (His) 配列に結合しました。6x His タグと融合したフラタキシンは、1 mM  $\text{MgSO}_4$ 、10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ 、0.5 % グルコース、および 100 mg/L アンピシリンを含む M9 培地の 大腸菌 BL21 DE3 で発現しました。非標識フラタキシンの発現のために、M9 培地に 0.025 % のロイシンを添加しました。SILAC-標識フラタキシンの発現のために、M9 培地に 0.025 %  $^{13}\text{C}_6$ -ロイシンを添加しました。培養細胞切片を収集して、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ヒトリゾチムを含む溶解バッファ (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、500 mM NaCl、10 mM イミダゾール、10 % グリセロール、2 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、2x プロテアーゼ阻害剤混合物、1 mM PMSF) で溶解しました。溶解液は  $20,000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 30 分間遠心分離し、上清を Ni-NTA 樹脂で精製しました。非標識フラタキシン-M と SILAC-標識フラタキシン-M の純度は、SDS-PAGE とクマシーブルー染色によって 95 % より高いことが確認されました。

### IP に先だつ全血サンプルの前処理

すべての血液サンプルを室温で解凍し、500  $\mu\text{L}$  の各サンプルを、プロテアーゼ阻害剤混合物を含む 750  $\mu\text{L}$  の NP-40 溶解バッファ (150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH 7.5、0.5 % Triton X-100、0.5 % NP-40、1 mM DTT、1 mM EDTA) と混合しました。内部標準として、同量の SILAC-標識フラタキシン-M (20 ng) を各サンプル (キャリブレータ、QC、全血) に添加しました。サンプルに、超音波ディスプレイ (Fisher、ペンシルベニア州ピッツバーグ) を使用して 30 パルス、5 の強度で氷上でプローブ超音波処理を行ってから、17,000 g、 $4^{\circ}\text{C}$  で 15 分間遠心分離して、溶解しました。上清をペレットから移し、免疫沈降 (IP) のために、調製済み DMP-架橋結合抗フラタキシンタンパク質 G Dynabeads を用いてインキュベーションしました。

### 免疫沈降 (IP) および Asp-N 消化

DMP を用いてマウスモノクローナル抗フラタキシン抗体 (4  $\mu\text{g}$ ) をタンパク質 G ビーズ (0.5 mg) に前述のように架橋結合しました<sup>15</sup>。簡潔に説明すると、最初にマウスモノクローナル抗フラタキシン抗体を一晚にわたり  $4^{\circ}\text{C}$  でタンパク質 G 磁性 Dynabeads を用いてインキュベーションし、抗体結合ビーズを作成しました。mAb-結合ビーズを 13 mg/mL の DMP 溶液を用いて室温で 1 時間インキュベーションし、安定な架橋結合抗フラタキシンタンパク質 G 磁性 Dynabeads を作成しました。架橋結合タンパク質 G ビーズは、PBS 中で、 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 週間保存可能です。処理済みの全血サンプル (1.25 mL) を 0.5 mg の抗フラタキシンタンパク質 G 磁性 Dynabeads に添加し、回転攪拌下で、一晚にわたり  $4^{\circ}\text{C}$  で IP を行いました。0.02 % Tween-20 を含む PBS でビーズを 3 回洗浄し、フラタキシン-M を 100  $\mu\text{L}$  の溶出バッファ (10 % のアセトニトリルを含む 100 mM の酢酸水溶液) で溶出させました。溶出液を不活性化ガラスインサート (Waters、マサチューセッツ州ミルフォード) に移し、減圧濃縮器 (Jouan RC 10.22、Fisher、ペンシルベニア州ピッツバーグ) で乾燥させました。サンプルを 100 ng の Asp-N を含む 50  $\mu\text{L}$  の 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液で溶解し、LC/MS 分析の前に一晚にわたり  $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベーションしました。

## LC/MS 分析

6495 トリプル四重極 LC/MS システムと Agilent 1290 Infinity II LC システムを組み合わせ使用し、標準流速超高性能液体クロマトグラフィーとマルチプルリアクションモニタリング質量分析 (UHPLC-MRM/MS) を行いました。LC 条件の詳細は表 1 のとおりです。サードパーティ製トラップ溶出ナノフロー LC システムに高分解能オービタルトラッピング質量分析計を組み合わせ、(PRM) 取り込みモードにより、ナノフロー超高性能液体クロマトグラフィーとパラレルリアクションモニタリング質量分析 (UHPLC-PRM/MS) を行いました。UHPLC-PRM/MS の条件は表 2 のとおりです。

## データ解析

データ解析は Skyline (ワシントン大学 MacCoss Laboratory、ワシントン州シアトル) を使用して行いました。Skyline ソフトウェアを使用して、非標識/Light (L) ペプチドと標識/Heavy (H) ペプチドの各 MRM または PRM トランジションのピーク面積比を算出し、絶対定量に使用しました。ペプチドの比率は、 $S^{81}GTLGHPGSL^{90}$  Asp-N ペプチドの  $y_4^+$  イオンと  $D^{198}LSSLAYSGK^{208}$  Asp-N ペプチドの  $y_8^+$  イオンの PRM トランジションの L/H 比を使用して算出しました。フラタキシン-M の量は各ペプチドの検量線から算出しました。次に、2 つのペプチドに対して得られた平均濃度からフラタキシン-M 濃度を算出しました。フラタキシン-M が存在することをさらに確認するため、その他の 3 種類のペプチドをモニタリングしました。macOS バージョン 9.3.1 用 Prism 9 (GraphPad Software, LLC) で直線回帰モデルを使用して、GAA リピートとフラタキシン濃度との相関付けを実行しました。

表 1. UHPLC-MRM/MS の条件

Agilent 1290 Infinity II LC の条件	
分析カラム	Agilent ZORBAX RRHD Rapid Resolution HD、2.1 × 50 mm、1.8 μm (部品番号 959757-902)
カラム温度	35 °C
溶媒 A	水、0.1 % 酢酸
溶媒 B	アセトニトリル、0.1 % 酢酸
分析 LC 流速	0.4 mL/min
グラジエント	0 分で 5 % B 1.00 分で 10 % B 2.75 分で 24 % B 3.50 分で 36 % B 5.00 分で 95 % B 6.50 分で 95 % B 7.00 分で 5 % B 8.50 分で 5 % B
注入量	2 μL
インジェクタ温度	4 °C
ニードル洗浄	5 秒フラッシュ
ニードル洗浄溶媒	30 % メタノール
Agilent 6495 LC/TQ の条件	
ガス温度	230 °C
ガス流量	13 L/min
イオン極性	ポジティブモード
ネブライザ	40 psi
ソースガス温度	300 °C
ソースガス流量	10 L/min
キャピラリー電圧	4,500 V
ノズル電圧	500 V

## 結果と考察

### サンプル前処理

メソッド開発中に、全血サンプルに含まれる低濃度のタンパク質であるフラタキシン-Mの分析のために、抗フラタキシンマウス mAb と磁性 Dynabeads との共有結合を使用した免疫沈降が必要であることが明らかとなりました。Dynabeads との結合は、高濃度タンパク質によるバックグラウンドの干渉を最小限に抑制するために有用でした。さらに、サンプル濃縮時およびプロテアーゼ消化時の変動により、プロテアーゼ消化ステップの後に標識ペプチド内部標準を使用することは、正確で高精度のタンパク質の定量には不十分と考えられました。したがって、「light」(非標識) および「heavy」(安定同位体標識) フラタキシン-M タンパク質は、個々に調製し、精製しました。安定同位体標識フラタキシン-M タンパク質への安定同位体標識ロイシンの取り込みは 99.0 % 超でした。IP ステップの前に、内部コントロールとして、精製済みの安定同位体標識フラタキシン-M タンパク質を血液サンプルに添加しました。図 2 に全体的な実験ワークフローを示します。

表 2. ナノフロー UHPLC-PRM/MS の条件

ナノフロー UHPLC の条件	
トラッピングカラム	Acclaim PepMap C18 カートリッジ, 0.3 mm × 5 mm, 100 Å (Thermo Scientific)
分析カラム	C18 AQ キャピラリーカラム, 10 μm ブルドチップ付き, 75 μm × 25 cm, 3 μm 粒子サイズ (Columntip, コネチカット州ニューヘイブン)。
カラム温度	25 °C
ローディング溶媒	水/アセトニトリル (99.5:0.5, v/v), 0.1 % 酢酸を含む
溶媒 A	水/アセトニトリル (99.5:0.5, v/v), 0.1 % 酢酸を含む
溶媒 B	アセトニトリル/水 (98.0:2.0, v/v), 0.1 % 酢酸を含む
トラッピングカラムへのロード量	4 分間で 10 μL/min
分析 LC 流量	400 nL/min
グラジエント	0 分で 2 % B 10 分で 2 % B 30 分で 35 % B 35 分で 60 % B 53 分で 98 % B 73 分で 80 % B 74 分で 2 % B 100 分で 2 % B
注入量	8 μL
インジェクタ温度	4 °C
ニードル洗浄	5 秒
ニードル洗浄溶媒	10% メタノール
オービタルトラッピング質量分析計の条件	
スプレー電圧	2,500 V
イオン移送キャピラリー温度	275 °C
イオン極性	ポジティブモード
S-レンズ Rf レベル	55
インソース CID	2.0 eV
分解能	60,000
AGC ターゲット	2.00E+05
最大 IT	80 ms

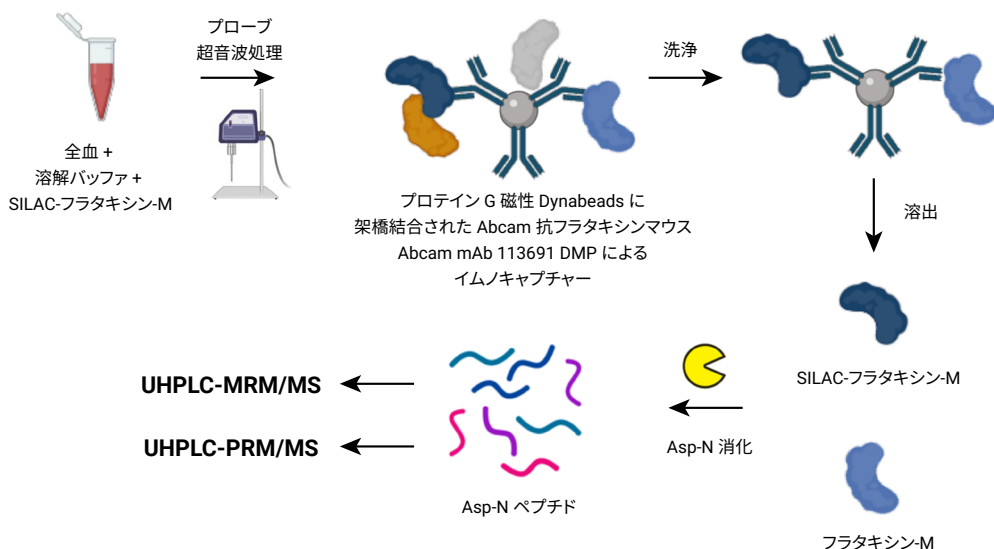


図 2. フラタキシン-M サンプル前処理および LC/MS 分析の実験ワークフローの概略図

### MRM および PRM トランジションの比較

モニタリング対象のフラタキシン-M タンパク質由来のペプチド配列、それらに対応する MRM および PRM トランジション、2種の LC/MS システムでのペプチド溶出時間を表 3 に示します。

UHPLC-MRM/MS では、プリカーサイオンおよびプロダクトイオンの両方にノミナル質量を使用しました。一方、UHPLC-PRM/MS では、プリカーサイオンにノミナル質量を使用しましたが、プロダクトイオンには精密質量を使用しました。高分解能 LC/MS システムと比較して、ユニット質量 LC/TQ システムには原則的に、ある程度のバックグラウンド干渉が生じる可能性があります。このような問題は、6495 LC/TQ による血液のフラタキシン-M の分析では観察されませんでした。したがって、最初のタンパク質の探索とメソッド開発の後に、ルーチン分析のための定量の精度と正確度に関して、より高速な UHPLC-MRM/MS 手法を評価しました。

### ペプチド分離

フラタキシン-M の定量 (SGTLGHPGSL) と総フラタキシンの定量 (DLSSLAYS GK) に使用した Asp-N 消化ペプチド、および検出確認のためのその他 3 種類のペプチド (DETTYERLAEETL、DGVSLHELLAAELTKALKTKL、DSLAEFFE) はそれぞれ明確に分離されました。分離には、標準流速 UHPLC-MRM/MS とナノフ

ロー UHPLC-PRM/MS の両方のメソッドを使用しました (図 3)。MRM/MS システムでは、PRM/MS システム (8 μL、表 2) と比較し

て、より少量のサンプルを注入しましたが (2 μL、表 1)、どちらのシステムでも検出と定量に対し十分な MS シグナルが得られました。

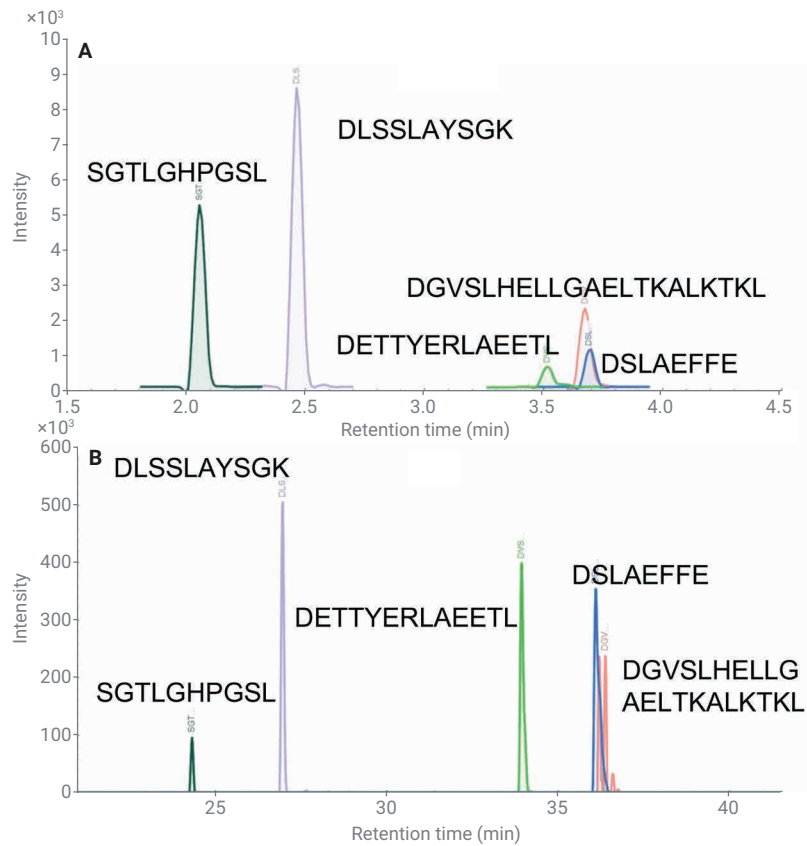


図 3. ターゲットペプチドの LC/MS クロマトグラム: S<sup>81</sup>GT LGHPGSL<sup>90</sup> (ペプチド-1)、D<sup>198</sup>LSSLAYS GK<sup>208</sup> (ペプチド-2)、D<sup>91</sup>ETTYERLAEETL<sup>103</sup> (ペプチド-3)、D<sup>178</sup>GVSLHELLAAELTKALKTKL<sup>198</sup> (ペプチド-4)、D<sup>104</sup>SLAEFFE<sup>111</sup> (ペプチド-5)。 (A) 標準流速 UHPLC-MRM/MS。 (B) ナノフロー UHPLC-PRM/MS。

表 3. フラタキシン-M 分析のための MRM/MS および PRM/MS トランジション。定量は網掛けの枠で示したペプチドで実行し、MRM/MS にはノミナル質量を使用しました。L = [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-ロイシン、L = light (非標識)、H = heavy (標識)。

No.	開始	終了	ペプチド	L または H	プリカーサイ オン	プリカーサイ オン (m/z)	プロダクト イオン 1	プロダクト イオン 1 (m/z)	プロダクト イオン 2	プロダクト イオン 2 (m/z)	プロダクト イオン 3	プロダクト イオン 3 (m/z)	UHPLC 溶出時間 (分)	ナノ UHPLC 溶出時間 (分)
1	81	90	SGTLGHPGSL	L	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	463.24	y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	680.373	y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	567.289	y <sub>4</sub> <sup>+</sup>	373.208	2.02	24.05
1	81	97	SGTLGHPGSL	H	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	469.26	y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	692.413	y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	573.309	y <sub>4</sub> <sup>+</sup>	379.229	2.02	24.05
2	198	208	DLSSLAYS GK	L	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	520.77	y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	812.415	y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	725.383	y <sub>3</sub> <sup>+</sup>	291.166	2.44	26.85
2	198	208	DLSSLAYS GK	H	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	527.79	y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	818.435	y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	731.403	y <sub>3</sub> <sup>+</sup>	291.166	2.44	26.85
3	91	103	DETTYERLAEETL	L	MH <sub>3</sub> <sup>3+</sup>	523.91	b <sub>12</sub> <sup>++</sup>	719.820	b <sub>11</sub> <sup>++</sup>	669.296	b <sub>10</sub> <sup>++</sup>	604.775	3.26	32.25
3	91	103	DETTYERLAEETL	H	MH <sub>3</sub> <sup>3+</sup>	527.93	b <sub>12</sub> <sup>++</sup>	722.830	b <sub>11</sub> <sup>++</sup>	672.307	b <sub>10</sub> <sup>++</sup>	607.785	3.26	32.25
4	178	198	DGVSLHELLAAELTK ALKTKL	L	MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup>	563.33	y <sub>12</sub> <sup>++</sup>	643.906	y <sub>11</sub> <sup>++</sup>	608.387	b <sub>2</sub> <sup>+</sup>	173.056	3.66	37.05
4	178	198	DGVSLHELLAAELTK ALKTKL	H	MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup>	563.33	y <sub>12</sub> <sup>++</sup>	652.936	y <sub>11</sub> <sup>++</sup>	617.417	b <sub>2</sub> <sup>+</sup>	173.056	3.66	37.05
5	104	111	DSLAEFFE	L	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	479.21	b <sub>4</sub> <sup>+</sup>	387.187	b <sub>3</sub> <sup>+</sup>	316.150	y <sub>2</sub> <sup>+</sup>	295.129	3.68	36.05
5	104	111	DSLAEFFE	H	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	482.22	b <sub>4</sub> <sup>+</sup>	393.208	b <sub>3</sub> <sup>+</sup>	316.150	y <sub>2</sub> <sup>+</sup>	295.129	3.68	36.05

検量線は SGTLGHPGSL ( $MH_2^{2+} \rightarrow y_4^+$ ) および DLSSLAYSGL ( $MH_2^{2+} \rightarrow y_8^+$ ) において 0.5 ~ 60 ng の範囲で直線性を示しました。標準流速 UHPLC-MRM/MS システムでの検量線の  $R^2$  値はそれぞれ 0.9985 と 0.9985 でした (図 4A)。ナノフロー UHPLC-PRM/MS システムでの検量線の  $R^2$  値はそれぞれ 0.9622 と 0.9951 でした (図 4B)。6495 LC/TQ システムで得られた検量線は、ナノフロー UHPLC-PRM/MS システムで得られた検量線と比較して、より優れた精度および正確度を示しています。この結果は標準流速 UHPLC-MRM/MS システムにおける両方のペプチドの LOD と LOQ が、より優れていることを示しました。

分析時間においても大きな差が生じました。標準流速 UHPLC システムでは 5 つすべてのペプチドが 4 分以内に溶出したのに対し、ナノフロー UHPLC では 38 分かかりました (図 3)。これらの個別の分析時間の合計は、標準流速 UHPLC システムでは 11 分、ナノフロー UHPLC システムでは 105 分ということになりました (図 5)。フラタキシン-M の標準のアッセイには、10 の標準サンプルと、30 の FRDA 被験者由来の血液サンプルが含まれます。これらのサンプルの三連での測定にかかった時間は、ナノフロー UHPLC-PRM/MS システムでは 8 日間と 18 時間だったのに対し、標準流速 UHPLC-MRM/MS では 23 時間でした (図 5)。標準流速 UHPLC-MRM/MS における大幅な機器分析時間の短縮と優れた定量の品質により、ラボでは、他にも、フラタキシンに関するいくつかのハイスルーブットな実験を実行することができました<sup>11,12</sup>。

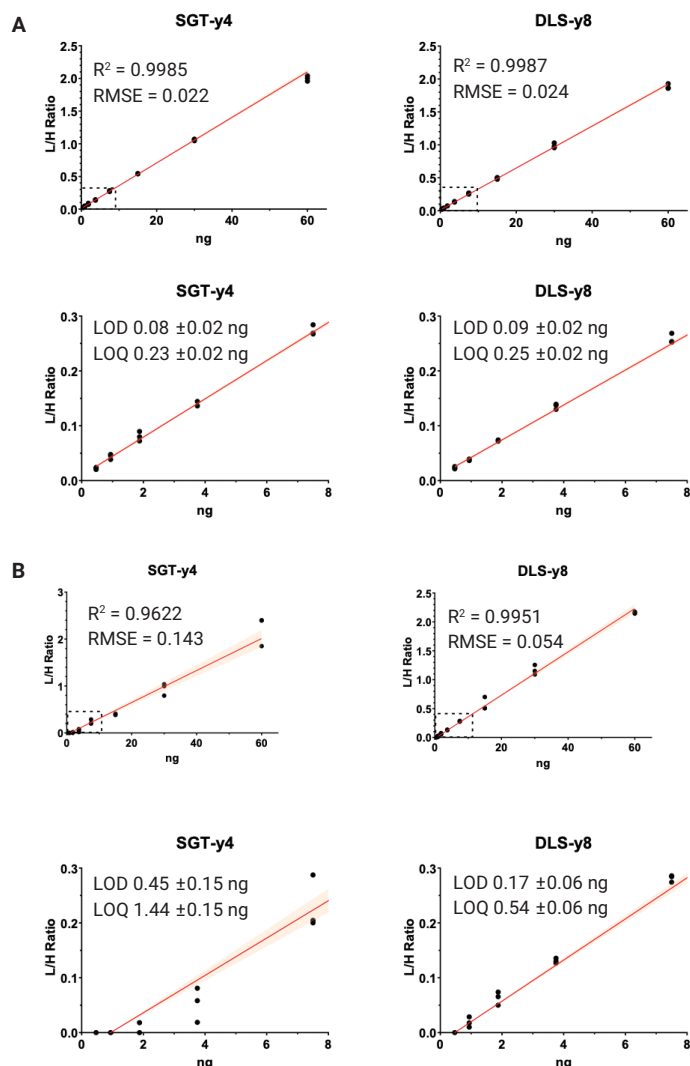


図 4. ペプチド SGTLGHPGSL.D ( $MH_2^{2+} \rightarrow y_4^+$ ) および L.DLSSLAYSGL.D ( $MH_2^{2+} \rightarrow y_8^+$ ) の検量線。(A) UHPLC-MRM/MS。(B) ナノフロー UHPLC-PRM/MS。上のプロットは 0 ~ 80 ng の濃度範囲における検量線の相関係数 ( $R^2$ ) と二乗平均平方根誤差 (RMSE)、下のプロットは 0 ~ 8 ng のより低い濃度範囲における検量線と対応する LOD および LOQ を示しています。

## 健康な対照被験者および FRDA 被験者の血液サンプル

2 人の健康な対照被験者のフラタキシン-M の血中濃度はそれぞれ 4.5 と 5.2 ng/mL (図 6) で、以前の研究で確認されたレベルと同様でした。反対に、FRDA 被験者の血中フラタキシン-M 濃度は 0.3 ~ 3.8 ng/mL の範囲でした。FRDA 被験者サンプルでの最高濃度は、GAA リピートが平均わずか 200 回の被験者で確認されました。これは FRDA の軽症型と一致します。最低濃度は、GAA リピートが平均 1,000 回の被験者で確認されました。これは FRDA の最重症型と一致します。興味深いことに、フラタキシン-M 濃度と平均 GAA リピートとの間に良好な相関関係 ( $R^2 = 0.8547$ ) が示されました (図 6)。この相関関係はナノフロー UHPLC-PRM/MS を用いた過去の測定結果と一致します<sup>13</sup>。Y 軸の切片は、健康な対照被験者の血液で確認された平均フラタキシン-M 濃度に相当します。

## 結論

全血サンプル中のフラタキシンのプロテオフォームを濃縮するために、共有結合抗フラタキシンマウス mAb を使用して、免疫沈降 (IP) メソッドを開発しました。IP ステップの前に、内部標準として、安定同位体標識フラタキシン-M タンパク質を血液サンプルに添加しました。次にすべての IP サンプルを Asp-N プロテアーゼで消化しました。ターゲットペプチドの定量には、最初はナノフロー UHPLC-PRM/MS システムを使用しました。次いで、Agilent 6495 LC/TQ システムを使用して、オンカラムでのサンプル濃縮が不要な、より迅速な標準流速 UHPLC-MRM/MS メソッドを開発しました。このアプリケーションノートでは、全血試料中のフラタキシン-M タンパク質の定量のための、これらの 2 つの LC/MS システムの分析性能を比較しています。6495 LC/TQ システムによる大幅に高速なメソッド、優れた直線性、精度および正確度により、従来のナノフロー UHPLC-PRM/MS メソッドを、より迅速な標準流速 UHPLC-MRM/MS メソッドに代替できることが確認されました。

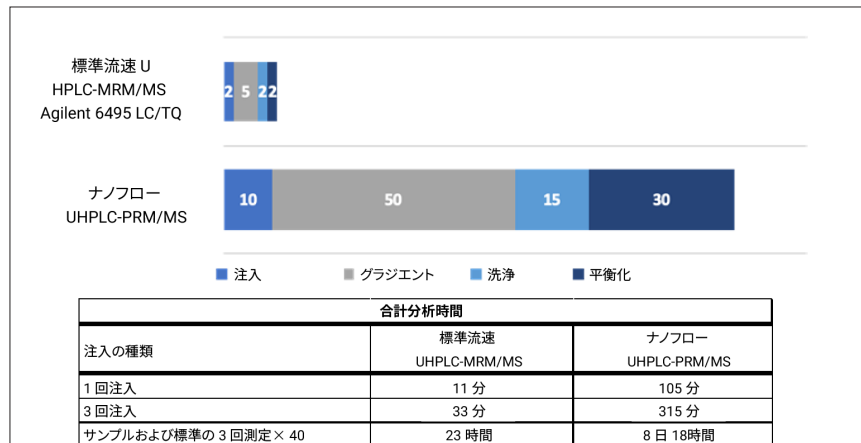


図 5. 標準流速 UHPLC-MRM/MS とナノフロー UHPLC-PRM/MS の LC/MS 分析時間の比較。どちらのメソッドにも 3 回の洗浄が含まれています (キャリブレーション後とサンプル注入後に開始)。

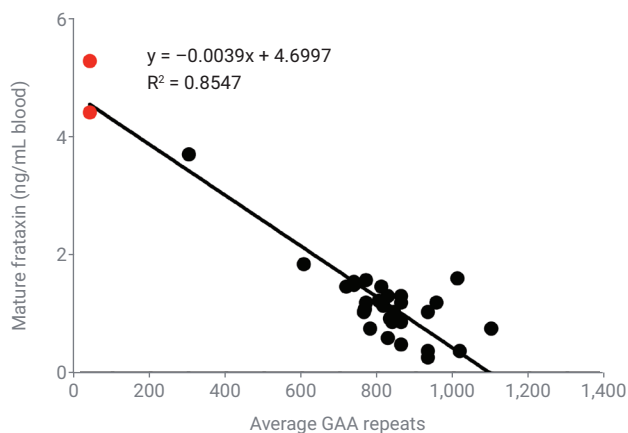


図 6. Agilent 6495 LC/TQ の分析結果に基づき、血液サンプル中のヒトフラタキシン-M 濃度は、疾患被験者の遺伝子の平均 GAA リピートと高い相関が示されました。赤は健康な対照被験者を示します。



## 参考文献

1. Evans-Galea, M. V. *et al.* Cell and Gene Therapy for Friedreich Ataxia: Progress to Date. *Hum. Gene Ther.* **2014**, *25*(8), 684–93. Epub 2014/04/23. doi: 10.1089/hum.2013.180. PubMed PMID: 24749505.
2. Pousset, F. *et al.* Durr A. A 22-Year Follow-up Study of Long-term Cardiac Outcome and Predictors of Survival in Friedreich Ataxia. *JAMA Neurol.* **2015**, *72*(11), 1334–41. Epub 2015/09/29. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.1855. PubMed PMID: 26414159.
3. Lynch, D. R. *et al.* Safety, Pharmacodynamics, and Potential Benefit of Omaveloxolone in Friedreich Ataxia. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2019**, *6*(1), 15–26. Epub 2019/01/19. doi: 10.1002/acn3.660. PubMed PMID: 30656180; PMCID: PMC6331199.
4. Santos, R. *et al.* Friedreich Ataxia: Molecular Mechanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox. Signal.* **2010**, *13*(5), 651–90. Epub 2010/02/17. doi: 10.1089/ars.2009.3015. PubMed PMID: 20156111; PMCID: PMC2924788.
5. Gellera, C. *et al.* Frataxin Gene Point Mutations in Italian Friedreich Ataxia Patients. *Neurogenetics* **2007**, *8*(4), 289–99. Epub 2007/08/19. doi: 10.1007/s10048-007-0101-5. PubMed PMID: 17703324.
6. Sacca, F. *et al.* A Combined Nucleic Acid and Protein Analysis in Friedreich Ataxia: Implications for Diagnosis, Pathogenesis and Clinical Trial Design. *PLoS One* **2011**, *6*(3), e17627. Epub 2011/03/18. doi: 10.1371/journal.pone.0017627. PubMed PMID: 21412413; PMCID: PMC3055871.
7. Rotig, A. *et al.* Aconitase and Mitochondrial Iron-Sulphur Protein Deficiency in Friedreich Ataxia. *Nat. Genet.* **1997**, *17*(2), 215–7. doi: 10.1038/ng1097-215. PubMed PMID: 9326946.
8. Delatycki, M. B.; Bidichandani, S. I. Friedreich Ataxia- Pathogenesis And Implications for Therapies. *Neurobiol Dis.* **2019**, *132*, 104606. Epub 20190905. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104606. PubMed PMID: 31494282.
9. Doni, D. *et al.* The Displacement of Frataxin from the Mitochondrial Cristae Correlates with Abnormal Respiratory Supercomplexes Formation and Bioenergetic Defects in Cells of Friedreich Ataxia Patients. *FASEB J.* **2021**, *35*(3), e21362. doi: 10.1096/fj.202000524RR. PubMed PMID: 33629768.
10. Monfort, B. *et al.* Recent Advances in the Elucidation of Frataxin Biochemical Function Open Novel Perspectives for the Treatment of Friedreich's Ataxia. *Front Neurosci.* **2022**, *16*, 838335. Epub 20220302. doi: 10.3389/fnins.2022.838335. PubMed PMID: 35310092; PMCID: PMC8924461.
11. Guo, L. *et al.* Characterization of a New N-Terminally Acetylated Extra-Mitochondrial Isoform of Frataxin in Human Erythrocytes. *Sci. Rep.* **2018**, *8*(1), 17043. Epub 2018/11/20. doi: 10.1038/s41598-018-35346-y. PubMed PMID: 30451920; PMCID: PMC6242848.
12. Rodden, L. N. *et al.* DNA Methylation in Friedreich Ataxia Silences Expression of Frataxin Isoform E. *Sci. Rep.* **2022**, *12*(1), 5031. Epub 20220323. doi: 10.1038/s41598-022-09002-5. PubMed PMID: 35322126; PMCID: PMC8943190.
13. Wang, Q. *et al.* Simultaneous Quantification of Mitochondrial Mature Frataxin and Extra-Mitochondrial Frataxin Isoform E in Friedreich's Ataxia Blood. *Front. Neurosci.* **2022**, *16*, 874768. Epub 20220428. doi: 10.3389/fnins.2022.874768. PubMed PMID: 35573317; PMCID: PMC9098139.
14. Blair, I. A. *et al.* The Current State of Biomarker Research for Friedreich's Ataxia: a Report from the 2018 FARA Biomarker Meeting. *Future Sci. OA.* **2019**, *5*(6), FSO398. Epub 2019/07/10. doi: 10.2144/fsoa-2019-0026. PubMed PMID: 31285843; PMCID: PMC6609901.
15. Guo, L. *et al.* Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Analysis of Platelet Frataxin as a Protein Biomarker for the Rare Disease Friedreich's Ataxia. *Anal. Chem.* **2018**, *90*(3), 2216–23. Epub 2017/12/23. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04590. PubMed PMID: 29272104; PMCID: PMC5817373.

ホームページ

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)**

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、  
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。  
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに  
変更されることがあります。

RA44930.5725

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, January 26, 2023

5994-5608JAJP

