

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01956

研究課題名(和文) 光照射による蛍光基NBD脱離を利用したNBD標識ペプチドの同定

研究課題名(英文) Identification of NBD-labeled peptides by using photo irradiation-induced NBD loss

研究代表者

浅沼 三和子 (Asanuma, Miwako)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・技師

研究者番号：70381598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：今までに、生物活性化合物の標的タンパク質選択的にNBD蛍光基を結合させる蛍光アフィニティー標識法を用いてNBD標識されたタンパク質を質量分析で同定することは可能であったが、NBD修飾部位を明らかにするべくNBD標識ペプチドの同定は容易でなかった。本研究では、NBD修飾部位同定を目的とし、光照射によりNBD標識ペプチドからNBD蛍光基が脱離する現象に着目したNBD標識ペプチド選択的な液体クロマトグラフィー質量分析法の確立と、分析に供する試料調製法の確立を目指した。結果、NBD標識ペプチドの回収法を確立し、NBD標識ペプチドの検出およびNBD修飾部位の同定に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、NBD標識されたタンパク質のNBD修飾部位を同定することが可能となった。今後、未だ作用機序の解明されていない様々な生物活性物質に本手法を活用することで、生物活性化合物の標的タンパク質や周辺タンパク質の探索が進み、医薬品開発や分子生物学的分野への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously made it possible to identify nitrobenzoxadiazole (NBD)-labeled proteins using a turn-ON fluorescent affinity labeling method and mass spectrometry. However, it was not easy to identify NBD-labeled peptides and determine the NBD-modified sites by mass spectrometry. In this study, in order to identify the NBD-modified sites of NBD-labeled proteins, we tried to establish a method for selective detection of NBD-labeled peptides using liquid chromatography-mass spectrometry, focusing on a phenomenon of the loss of NBD moiety from NBD-labeled peptide by photo-irradiation, and also the sample preparation method for the MS analysis. As a result, we established a method to recover NBD-labeled peptides and succeeded in identification of some of the NBD-labeled peptides and the NBD-modified sites.

研究分野：質量分析

キーワード：質量分析 標的タンパク質 蛍光 標識 ケミカルバイオロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

作用機序の不明な生物活性物質は数多く存在し、作用機序の解明やその先の医薬品開発への応用には、その標的タンパク質や結合部位を明らかにすることが重要である。しかし、細胞内には多数のタンパク質が存在し、その中から標的タンパク質を明らかにすることは容易ではない。その問題を解決する手法として、我々は生物活性化合物の標的タンパク質選択的にニトロベンゾオキサジアゾール (NBD) で蛍光標識することが可能な turn-ON 蛍光アフィニティー標識法を開発した [Chem. Sci. 2014, 5, 1021.]. 本標識法は、O-NBD 状態では無蛍光であるが N-NBD では蛍光性となる仕組みを利用しており、O-NBD ユニットを導入した生物活性物質がその標的タンパク質と相互作用すると、O-NBD 近傍に位置するリジン残基と反応して、標的タンパク質に蛍光性 N-NBD を導入することができる。これを目印にして、蛍光イメージングによる NBD 標識タンパク質の細胞内局在の調査や質量分析による NBD 標識タンパク質の同定が可能となる。

当時、薬剤標的として注目を集めているミトコンドリア外膜に存在する膜タンパク質トランスロケータータンパク質 (TSPO) の結合リガンドにこの標識法を適用したところ、TSPO と複合体を形成するタンパク質群の一つである電位依存性アニオンチャネル (VDAC) が NBD 標識されることがわかっていった。しかし、その酵素消化物を質量分析するも NBD 標識ペプチドの検出には至らなかった。NBD 標識ペプチドの検出、すなわち NBD 修飾部位を明らかにすることは、薬剤を含む生物活性物質の作用機序の知見を得るための重要な情報となるため、NBD 標識ペプチドの検出および同定法の開発を探索していた。

このような中、我々は光照射により NBD 標識ペプチドから NBD が脱離したペプチドが生じる現象を見出した。そこで、この現象を利用した液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) のメソッド考案や、質量分析に供する試料調製法の確立を行い、それら手法を用いることで、O-NBD を導入した生物活性物質によって NBD 標識されるタンパク質の NBD 修飾部位の同定を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、光照射により NBD 標識ペプチドから NBD 部分が脱離する現象に着目し、蛍光検出器を備えた液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-蛍光-MS) を用い、NBD 標識ペプチド選択的な LC-MS/MS 分析法の確立を目指す。また、質量分析に適した NBD 標識ペプチドの回収法の確立も進め、turn-ON 蛍光アフィニティー標識法により NBD 標識されたタンパク質の NBD 修飾部位の同定を目指す。図 1 に NBD 標識タンパク質の NBD 修飾部位を同定する手順の概要を示す。本研究では図中のゲル内消化から LC-蛍光-MS において検討を進める。

3. 研究の方法

NBD 標識ペプチド選択的な光照射 LC-MS/MS に必要な条件の探索

NBD 標識ペプチド選択的な光照射 LC-MS/MS に必要な条件の探索を行った。まずは、NBD 蛍光基を導入した合成ペプチドをモデルペプチドとして用い、光照射による NBD 脱離の評価は蛍光検出器を備えた液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-蛍光-MS) で行った。質量分析計は ThermoFisher 社 Orbitrap XL を用いた。また、通常分析条件に近い環境を模するため、非標識ペプチド混合物中にモデルペプチドを少量添加して同様の評価を行った。非標識ペプチド混合物は培養細胞の抽出物をトリプシンで処理して調製した。

NBD 標識ペプチド回収法の確立と NBD 標識ペプチドの同定

光照射 LC-MS/MS の構築と並行し、実サンプルへの適用を進めながら汎用性の高い NBD 標識ペプチドの回収法の確立を目指すこととした。O-NBD ユニットを導入したミトコンドリア外膜タンパク質トランスロケータータンパク質 (TSPO) のリガンドで培養細胞を処理し、培養細胞の可溶化後にポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。NBD 標識タンパク質は蛍光ゲルイメージャーで確認した。蛍光を示すゲルバンドを切り出し、ゲル内消化方法や NBD 標識ペプチドの回収手順の検討を行った。また、ペプチド試料は LC-蛍光-MS で分析を行い、質量分析データのデータベース検索は mascot server (マトリックスサイエンス社) を用いて行った。

4. 研究成果

光照射処理したモデルペプチドを LC-蛍光-MS で分析したところ、NBD 脱離したペプチドを確認することができたため、この特性を利用した光照射 LC-MS/MS のメソッド構築を本ペプチドで進めることとした。非標識ペプチド混合物中にモデルペプチドを少量添加して同様の評価を行ったところ、同じく NBD 脱離現象が見られた。このことから、細胞抽出物などのペプチド混合物中に存在する NBD 標識ペプチドの検出を行うといった、複雑な系への適用も可能であることが示唆された。また、実験を進めていくなかで、質量分析計導入前にペプチド混合物の複雑性を下げることが NBD 標識ペプチドの検出に有効である知見が得られており、一方で、使用予定の装置に故障トラブルが生じたため、質量分析に供する試料調製法の確立を優先的に進めることとした。

試料調製法の検討には実サンプルを用いた。O-NBD ユニットを導入した TSPO リガンドで処理した培養細胞を可溶化したのち SDS-PAGE でタンパク質を分離し、その蛍光ゲルイメージを取得したところ、蛍光を示す複数のゲルバンドが検出された。それらゲルバンド中には NBD 標識され

たタンパク質が含まれている。そこで、蛍光ゲルバンドのゲル内消化を行い、得られたペプチド混合物の質量分析により NBD 標識ペプチドの検出を試みた。

まずゲル内消化物を直接質量分析したところ、今まで同様、大量の非標識ペプチドから NBD 標識ペプチドを検出することはできなかった。そこで、ゲル内消化物を免疫沈降処理し、得られたペプチド試料の LC-蛍光-MS 分析を試みた。その結果、免疫沈降処理の前後で、質量分析の total ion current クロマトグラム上の全イオン量が大幅に減少し、さらに蛍光クロマトグラムにおいては蛍光ピーク強度が上昇していることがわかった。また、蛍光クロマトグラム上で複数の蛍光ピークが検出されたことから、数種類の NBD 標識ペプチドの存在が示唆された。得られた質量分析データを用いて mascot server によるデータベース検索を行ったところ、複数の NBD 標識ペプチド候補 m/z 情報を得ることができた。しかし、この中には擬陽性が含まれている可能性があったため、最終的な NBD 標識ペプチド同定の判断は、蛍光クロマトグラムの蛍光ピーク情報や MS/MS スペクトルの確認などにより行った。具体的には、NBD 標識ペプチド候補 m/z の検出時に蛍光クロマトグラム上で蛍光ピークが出現しているか、NBD 標識ペプチド候補 m/z の MS/MS スペクトルで十分なプロダクトイオン情報が得られているか、そして、 m/z の質量の誤差範囲は適切か、これらを主な基準として擬陽性の排除を行った。この結果、数種類の NBD 標識ペプチドを同定することができ、NBD 修飾リジン残基の決定に成功した。そして、同定された NBD 標識ペプチドの一つは、当初予想していた VDAC タンパク質であることが明らかとなった。

しかし未だ、LC-蛍光-MS と通常のデータベース検索による NBD 標識ペプチドの同定が困難な例がある。この課題に対して、NBD 脱離現象の活用は有効な手段であると考え、引き続き本研究に取り組むことで検出困難な事例に対応できるのではないかと考えている。

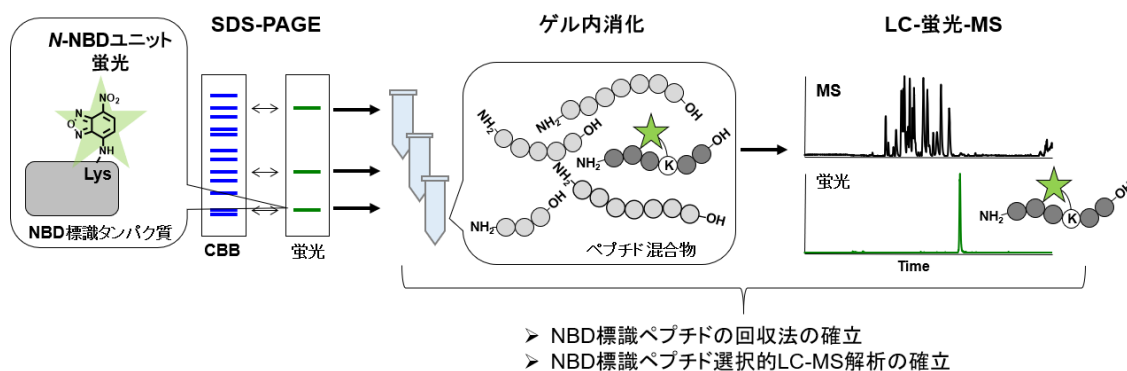


図 1. NBD 標識タンパク質の NBD 修飾部位同定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅沼三和子、山口卓男、どど孝介、大金賢司、袖岡幹子
2. 発表標題 Turn-ON蛍光アフィニティー標識法を用いた生物活性化合物標的タンパク質の解析
3. 学会等名 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会2018年合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅沼三和子、どど孝介、田中美帆、大金賢司、江越脩祐、袖岡幹子
2. 発表標題 Turn-ON蛍光アフィニティーラベル化法によりNBD標識される生物活性化合物標的タンパク質の網羅的解析への取り組み
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅沼三和子、どど孝介、大金賢司、袖岡幹子
2. 発表標題 Turn-ON蛍光アフィニティー標識法と質量分析法を用いた生物活性化合物の標的タンパク質解析
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第12回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅沼三和子、どど孝介、田中美帆、大金賢司、江越脩祐、袖岡幹子
2. 発表標題 Turn-ON 蛍光アフィニティー標識法を用いた生物活性化合物標的タンパク質の網羅的解析への取り組み
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	大金 賢司 (Ohgane Kenji) (30771092)	国立研究開発法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・ 基礎科学特別研究員 (82401)	