

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006-2008
課題番号：18310146
研究課題名（和文） 新規 C 末端特異的誘導体化によるプロテオミクス解析法の開発
研究課題名（英文） Development of the method for proteome analysis based on a novel chemical derivatization specific to C-termini of proteins
研究代表者
中沢 隆（NAKAZAWA TAKASHI）
奈良女子大学・理学部・教授
研究者番号：30175492

研究成果の概要：

タンパク質のC末端アミノ酸配列解析法の開発のために、本研究ではペプチドの選択的C末端誘導体化の反応条件を最適化した結果、簡単なアミド化において収率を平均60%以上にすることに成功した。この誘導体化と新規N末端標識に基づくC末端ペプチド単離法を組み合わせることで、C末端が翻訳後修飾されたペプチドのマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-MS）によるアミノ酸配列解析を可能にした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

今日のプロテオミクスは、ゲノム塩基配列から得られる膨大な情報と質量分析計の技術的革新によって発展してきた。具体的には、特定の条件下で培養した細胞・組織からタンパク質を抽出後、ポリアクリルアミドゲルによる二次元電気泳動法（2D-PAGE法）で各タンパク質を分離し、タンパク質自体あるいはその酵素消化により生成する多数のペプチド断片の質量数を質量分析計により測定することでタンパク質を同定し、最終的に全発現タンパク質のプロファイルを完成する

という手法が用いられている。しかし、現行のプロテオミクスの解析技術において早急に解決しなければならない最も重要な課題の一つに、質量分析計によるタンパク質同定法の信頼性を高めることがある。質量分析法（MS）ではペプチドおよびペプチドのタンデムMS（MS/MS）により生成するフラグメントイオンの質量数の情報しか得られないため、データ解析用の多くのアルゴリズムの開発がなされてはいるが、必然的に同定の信頼性には限界がある。特に、生体内生理活性ペプチドや低分子量タンパク質あるいは翻

訳後修飾を多く受けているタンパク質の場合、誤って帰属されることにしばしば遭遇する。特に、生体内で機能している成熟タンパク質の半数以上が、アミノ末端（N末端）にアセチル基をはじめ予測不能な置換基が化学的に結合しているため、ゲノム情報と質量分析法のみでは成熟体のアミノ酸配列に関する情報を得るのは極めて困難である。このようなタンパク質の分析、同定法にかかわる欠陥は、プロテオミクスの発展に対する重大な障害となっており、この問題を解決する有力な方法の一つとして、ペプチド鎖のN末端やC末端を特異的に化学修飾することによる、プロテオーム解析法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、新規のC末端カルボキシル基の特異的修飾法に基づいて、既存の生化学的な技術では全く対応できないタンパク質のカルボキシル末端（C末端）のアミノ酸配列解析を、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化（MALDI）法を用いた質量分析法によるタンパク質のアミノ酸配列解析を高感度かつ迅速に行う方法の開発を目指す。すなわち、プロテオミクスによる生命機能の解明に大きく寄与するための方法の開発と実用化が目的である。

3. 研究の方法

この研究で用いるのは、細胞・組織から適当な方法で分離して得たタンパク質のC末端を標識し、このタンパク質をプロテアーゼ消化した後、生じたペプチドの混合物を分離することなく、標識されたピークの特性をもとにMALDI質量分析装置を用いてC末端付近のアミノ酸配列を解析する方法である。

従来のEdman法のような標準的なN末端アミノ酸配列決定法を補完する、あるいはこれに代わりうるタンパク質のC末端アミノ酸配列決定法は、その高い必要性によりかなり古くから国内外で広く研究されてきた。しかし、C末端のカルボキシル基と側鎖のカルボキシル基を化学的に区別することが非常に困難であるため、現在に至るまで実用に耐える方法は確立されていない。

国内においては、次田らが開発した、オキサゾロンを経由するタンパク質のC末端アミノ酸逐次的分解法と質量分析法の組み合わせ（Tsugita, A. et al. *Eur. J. Biochem.* **206**, 691-696 (1992)）、これを酸による限定的加水分解を利用したやや一般化した方法（Zhong, H. et al. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1291-1296, 2004）などが報告されている。しかしこれらの方法は、限定分解速度がアミノ酸残基の種類により大きく異なり、また質量分析におけるペプチド断片のイオン化効率が一律でないため、試料の純度が解析結果の信頼性に直接影響

するなどの理由から、未だ一般的な方法とはなっていない。比較的最近では、Beemuenらのグループが化学試薬（臭化シアン）を用いるペプチド限定分解法とカルボキシペプチダーゼを組み合わせ、その分解生成物をやはり質量分析法で分析する方法を発表している（Samyn, B. et al. *Nat. Methods* **2**, 193-200, 2005）。この方法は、本研究課題で目指す迅速性、高信頼性の基準を満たす極めて優れたものであるが、臭化シアンの作用を受けるメチオン残基を含むタンパク質にしか適用できないという問題点を含む。

本研究では、タンパク質のC末端のカルボキシル基が、酸無水物と反応して特異的にオキサゾロンに変換されることで、側鎖のカルボキシル基と区別されることに注目した。この反応は、松尾らによってタンパク質のC末端アミノ酸のトリチウム化に基づく同定法（Matsuo, H. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**, 69-74, 1966）として知られていたが、ここではさらにオキサゾロンがカルボキシル基の活性化体であるため、MALDI-MSにおいて感度向上効果が期待される正電荷を持つ求核剤と反応させて標識する方法（図1）に採用することにした。

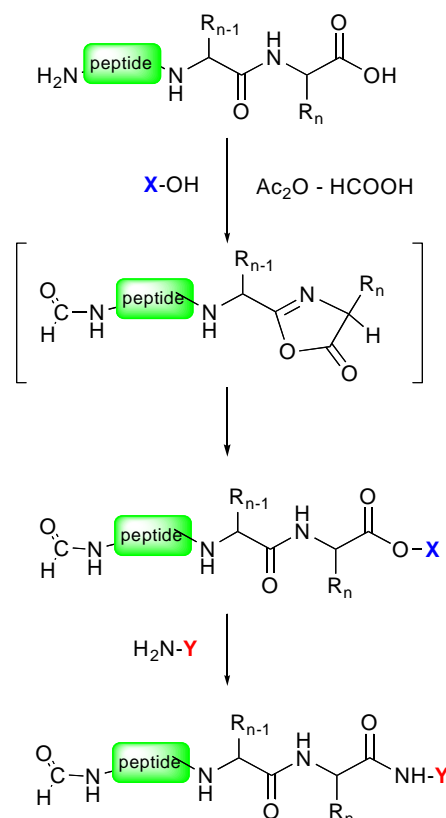


図1 オキサゾロンを経由するタンパク質のC末端アミノ酸標識法で用いる反応。求核剤Y-NH₂のYには正電荷を持つ基が含まれている。

本研究課題の初年度（平成 18 年）には図 1 で X-OH と示した C 末端活性化剤に、ペンタフルオロフェノール (Pfp-OH) が適していることを見いだした。このフェノールとのカルボン酸の活性エステルは、オキサゾロンが加水分解される水溶液系でも比較的安定であった。このようにして活性化したペプチド・タンパク質の C 末端を標識する試薬として、初期のアミノ基をもつアルギニン誘導体に始まって、ヒドラジン誘導体、システインのようなアミノチオール類などを検討した。その中で比較的成功したものが 2-ヒドラジノ-2-イミダゾリン (Imz-NHNH₂) であった (図 2)。この試薬を用いた C 末端標識実験の成果については次項で述べる。

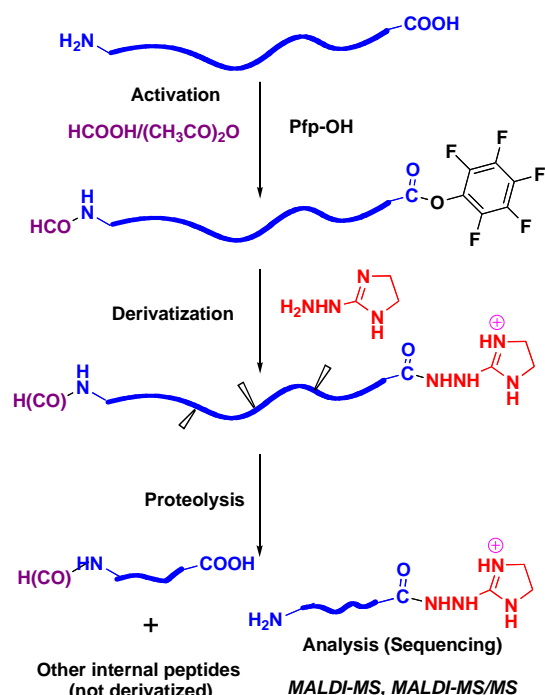


図 2 ヒドラジノイミダゾリンによる C 末端標識化および MALDI-MS による C 末端アミノ酸配列解析法。タンパク質の消化にはキモトリプシンを用いる。これはトリプシンによる消化で、C 末端に正電荷を持つアルギニンが生じる可能性が高く、混合物中に存在するそのペプチドのピークと C 末端ヒドラジドのピークの区別が困難になるからである。

図 2 に示すように、Imz-NHNH₂ で C 末端を標識したタンパク質はキモトリプシンで消化し、生じたペプチド断片は分離することなく、MALDI マス・スペクトルを測定する。混合物中の C 末端由来以外のペプチド断片は、一般的に正電荷が末端にないので、C 末端ペプチドのピークが優先的に検出されると期待される。この方法を実際に構造既知のモデルタンパク質に試みたところ、C 末端ペプチドのピークが検出されたが、未知試料の C 末

端解析に適用するためには反応効率の向上と、C 末端ペプチドのピークに何らかの特徴を持たせる標識試薬の改良が必要であることが明らかになった。さらに、C 末端ペプチドの Imz-ヒドラジドのピークを PDS または CID による MS/MS 分析において、複雑な解離を起こし、アミノ酸配列解析に必要な特定の系列のフラグメントピーク群がほとんど観測できないという問題点が生じた。

そこで、この結果をふまえて、MS/MS において一定のフラグメント化パターンを示す、よりアミノ酸配列解析に適するように標識試薬の改良または標識法の新規開発に着手した。試薬の改良の点では、Imz-NHNH₂ をより単純なヒドラジンでおきかえた C 末端ヒドラジドに反応させる、アルデヒド基をもつ標識試薬を調製した (図 3)。

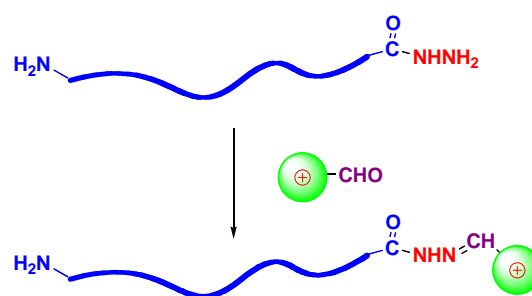


図 3 ヒドラジンによる C 末端ヒドラジド化およびヒドラジドとアルデヒドの反応によるヒドラジン型標識化。図 2 の誘導体化をこれらの 2 段階の反応でおきかえた。C 末端活性化の際にアミノ基がホルミル化されるが、ヒドラジンとの反応により脱ホルミル化され、元のアミノ基が再生される。アミノ基もアルデヒド基と反応して Schiff 塩基を生じる可能性があるが、おそらくヒドラゾンよりも不安定で、解析結果に影響しない。

標識試薬のアルデヒド基を Fmoc 固相ペプチド合成用樹脂に固定化して、C 末端由来のペプチドのみの単離も試みた。この樹脂にはあらかじめアルギニンが結合していて、そのアミノ基にはスペーサーを介してアルデヒド基が付いている。C 末端がヒドラジド化したペプチドはこのアルデヒド基と反応して樹脂に固定化され、他のペプチドと分離した後、トリフルオロ酢酸によって樹脂から切り離されると同時にアルギニンの保護基が脱離する (図 4)。こうして、単離された C 末端ペプチドにはスペーサーを介してアルギニンが結合しているので、MALDI-MS による高感度の検出とアミノ酸配列解析が容易になると期待された。

結果的にはこの方法で得られるペプチドのヒドラジド[1]も、PSD および CID 分析で、期待した程の明快な MS/MS スペクトルが得

られなかった。ところが、冷蔵庫中で1週間程度放置してあった Leu-enkephalin から調製した微量 (約 10 pmol) の分析用試料を分析したところ、予想されたピークに加えて、それよりも 16 Da 分子量の大きい化合物のピークが検出された。このピークの PSD スペクトルでは b-イオンの系列に属するフラグメントピークが優先的に観測され、これによって容易に試料のアミノ酸配列を読み取ることができた。また、この PSD 解析から、分子量の 16 Da の増加が、ヒドラゾン部分の酸化によるヒドラジド[2]の生成を原因とすることが明らかになった。

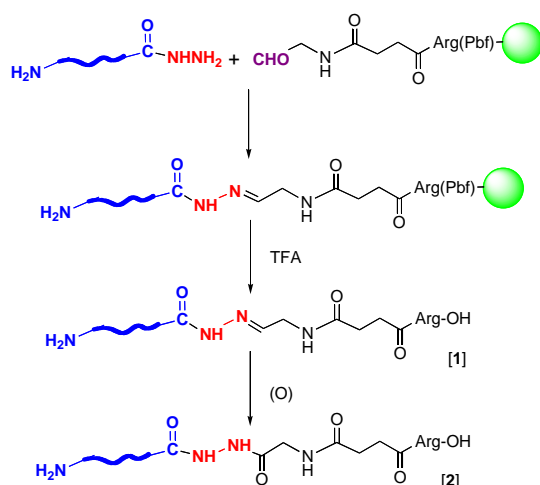


図4 C末端ヒドラジドとアルデヒド基との反応によるC末端ペプチドの固定化および標識法。TFAによって樹脂から切り離されたC末端標識ペプチドは直接MALDI-MSで解析できる。予想された標識生成物[1]は自動的に[2]に酸化されるが解析には[2]が適している。

現在、この結果をもとに、C末端ヒドラジドから直接[2]に対応する誘導体を得る方法を検討している。

4. 研究成果

研究の当初の目的は、図4の方法を改良・発展させることによって達成できる見込みであるが、研究方法の項で述べた、ここに至る研究成果はほとんどすべて次項(5)にあげた論文・学会発表等で公表済みである。査読付き論文のうち雑誌のタイトルに「プロテオミクス」、「質量分析」、および「分析」を含むものが3報ずつ、その他1報である。

本研究を行う過程で予期しなかった多くの展開があり、そのうちいくつかは本研究が当初設定した目標以上の成果をあげ、あるいはより発展的な研究課題を生み出した。その一つはオキサゾロンを経由せず、すべてのカルボキシル基をアミド化する反応に基づくC末端ペプチド単離法・アミノ酸配列解析法で

ある。この方法は本研究課題とはカルボキシル基の区別の点で全く異なる反応を用いるので、今後は2つの方法を組み合わせたより効果的なプロテオミクス解析技術に発展させる予定である。

本研究課題のおそらく最も効果的な応用は、C末端が翻訳後修飾されたタンパク質の検出と構造解析にあると思われる。連携研究者の九山らは、試料のタンパク質をLysCプロテアーゼで消化し、 α -アミノ基を特異的に修飾した後、末端にLysの ϵ -アミノ基を持たないC末端ペプチド以外を固定化によって除く新しい方法を開発した(Kuyama H. et al. *Proteomics* **8**, 1539-1550, 2008)。このC末端ペプチド単離法に本研究課題のC末端誘導体化法を組み合わせることによって、単にタンパク質のC末端アミノ酸配列を解析するだけでなく、既に修飾されているために誘導体化を受けないC末端が翻訳後修飾されたタンパク質の検出とその構造解析が可能となる(論文①)。従来解明の遅れていたタンパク質のC末端構造とその翻訳後修飾についての研究は、ここに始まるといってよいだろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

① Hiroki Kuyama, Chihiro Nakajima, Takashi Nakazawa, Osamu Nishimura, and Susumu Tsunasawa. "A new approach for detecting C-terminal amidation of proteins and peptides by mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization" *Proteomics* **9**, in press, 査読有。

② Minoru Yamaguchi, Daisuke Nakayama, Keisuke Shima, Hiroki Kuyama, Eiji Ando, Taka-aki Okamura, Norikazu Ueyama, Takashi Nakazawa, Shigemi Norioka, Osamu Nishimura, and Susumu Tsunasawa. "Selective isolation of N-terminal peptides from proteins and their de novo sequencing by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry without regard to unblocking or blocking of N-terminal amino acids" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 3313-3319, 2008, 査読有。

③ Masaru Miyagi and Takashi Nakazawa. "Determination of pK_a values of individual histidine residues in proteins using mass spectrometry" (**Accelerated article**) *Anal. Chem.* **80**, 6481-6487, 2008, 査読有。

④ Takashi Nakazawa, Minoru Yamaguchi, Taka-aki Okamura, Eiji Ando, Osamu Nishimura, and Susumu Tsunasawa. "Terminal proteomics: N- and C-terminal analyses for high-fidelity identification of proteins using mass spectrometry" *Proteomics* **8**, 673-685, 2008, 査読有。

⑤ Minoru Yamaguchi, Takashi Obama, Hiroki Kuyama, Daisuke Nakayama, Eiji Ando, Taka-aki Okamura, Norikazu Ueyama, Takashi Nakazawa, Shigemi Norioka, Osamu Nishimura, and Susumu Tsunasawa. "Specific isolation of N-terminal fragments from proteins and their high-fidelity *de novo* sequencing" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 3329-3336, 2007, 査読有.

⑥ Akihiro Ito, Taka-aki Okamura, Hitoshi Yamamoto, Norikazu Ueyama, Minoru Yamaguchi, Hiroki Kuyama, Eiji Ando, Susumu Tsunasawa, Kojiro Ake, Ryoji Masui, Seiki Kuramitsu, Takashi Nakazawa, and Shigemi Norioka. "Simultaneous detection of N-terminal fragment ions in a protein mixture using a ruthenium(II) complex" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 2647-2653, 2007, 査読有.

⑦ Akihiro Ito, Taka-aki Okamura, Ken Masui, Maki Kaneko, Ryoji Masui, Kojiro Ake, Seiki Kuramitsu, Minoru Yamaguchi, Hiroki Kuyama, Eiji Ando, Shigemi Norioka, Takashi Nakazawa, Susumu Tsunasawa, Hitoshi Yamamoto, and Norikazu Ueyama, "High sequence-coverage detection of proteolytic peptides using a bis(terpyridine)ruthenium(II) complex" *Analyst* **132**, 358-364, 2007, 査読有.

⑧ Hideto Shimahara, Takuya Yoshida, Yasutaka Shibata, Masato Shimizu, Yoshimasa Kyogoku, Fumio Sakiyama, Takashi Nakazawa, Shin-ichi Tate, Shin-ya Ohki, Takeshi Kato, Hozumi Moriyama, Ken-ichi Kishida, Yasuo Tano, Tadayasu Ohkubo, and Yuji Kobayashi. "Tautomerism of histidine 64 associated with proton-transfer in catalysis of carbonic anhydrase" *J. Biol. Chem.* **282**, 9646-9656, 2007, 査読有.

⑨ Minoru Yamaguchi, Mutsumi Oka, Kimiko Nishida, Mayu Ishida, Ayako Hamazaki, Hiroki Kuyama, Eiji Ando, Taka-aki Okamura, Norikazu Ueyama, Shigemi Norioka, Osamu Nishimura, Susumu Tsunasawa, and Takashi Nakazawa. "Enhancement of MALDI-MS spectra of C-terminal peptides by the modification of proteins via an active ester generated *in situ* from an oxazolone" *Anal. Chem.* **78**, 7861-7869, 2006, 査読有.

⑩ Takashi Nakazawa. "Chemistry in proteomics: an interplay between classical methods in chemical modification of proteins and mass spectrometry at the cutting edge" *Current Proteomics* **3**, 33-54, 2006, 査読有.

[学会発表] (計9件)

① Mariko Nakagawa, Minoru Yamaguchi, Hiroki Kuyama, Chihiro Nakajima, Susumu Tsunasawa, Osamu Nishimura, Eiji Ando, and Takashi

Nakazawa. "Isolation and mass spectrometric sequencing of C-terminal peptides based on exhaustive amidation of proteins" BMB2007 (第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会), 2008年12月12日, 神戸ポートアイランド.

② Mariko Nakagawa, Minoru Yamaguchi, Hiroki Kuyama, Chihiro Nakajima, Eiji Ando, Susumu Tsunasawa, Osamu Nishimura, and Takashi Nakazawa. "Isolation of C-terminal peptides of proteins by exhaustive amidation followed by proteolytic digestion for sequencing with mass spectrometry" *17th Meeting of Methods in Proteins Structure Analysis*, 27 August, 2008, 北海道大学.

③ Mariko Nakagawa, Minoru Yamaguchi, Hiroki Kuyama, Eiji Ando, Susumu Tsunasawa, Osamu Nishimura, and Takashi Nakazawa. "Isolation of C-terminal peptides of proteins by exhaustive amidation followed by proteolytic digestion for mass spectrometric sequencing" *56th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 2 June, 2008, Denver, Colorado, USA.

④ 中島ちひろ, 中川真理子, 水谷文, 辻智恵美, 岡むつみ, 山口実, 綱澤進, 西村紀, 中沢隆. "MALDI-MSを用いたタンパク質のC末端ヒドラジド化によるアミノ酸配列解析法" BMB2007 (第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会), 2007年12月12日, パシフィコ横浜.

⑤ Takashi Nakazawa, Minoru Yamaguchi, Mariko Nakagawa, Mutsumi Oka, Chihiro Nakajima, Hiroki Kuyama, Eiji Ando, Daisuke Nakayama, Taka-aki Okamura, Osamu Nishimura, and Susumu Tsunasawa. "C-Terminal Derivatization of proteins via hydrazides for sequencing with MALDI-MS" *55th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 5 June, 2007, Indianapolis, Indiana, USA.

⑥ 中川真理子, 中島ちひろ, 山口実, 岡むつみ, 辻智恵美, 九山浩樹, 安藤英治, 岡村高明, 綱澤進, 西村紀, 中沢隆. "MALDI質量分析のためのC末端ヒドラジド化に基づくペプチドの標識法" 第7回日本蛋白質科学会年会, 2007年5月24日, 東北大学.

⑦ Mutsumi Oka, Mariko Yamamoto, Chihiro Nakajima, Chiemi Tsuji, Mariko Nakagawa, Minoru Yamaguchi, Kimiko Nishida, Susumu Tsunasawa and Takashi Nakazawa. "C-Terminal activation of peptides with an active ester via an oxazolone" *Int. Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/4th Peptide Engineering Meeting*, 5 November, 2006, パシフィコ横浜.

⑧ Takashi Nakazawa, Minoru Yamaguchi, Kimiko Nishida, Mutsumi Oka, Ayako Hamazaki, Hiroki Kuyama, Eiji Ando, Taka-aki Okamura, Norikazu Ueyama, Shigemi Norioka, and

Susumu Tsunasawa. "MALDI mass spectrometric analysis of proteins by charge tagging at the C-terminus" 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 22 June, 2006, 京都国際会議場.

⑨ Takashi Nakazawa, Minoru Yamaguchi, Kimiko Nishida, Mutsumi Oka, Ayako Hamazaki, Hiroki Kuyama, Eiji Ando, Taka-aki Okamura, Norikazu Ueyama, Shigemi Norioka, and Susumu Tsunasawa. "C-Terminal charge-tagging of proteins for the sequencing with MALDI-MS" 55th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 30 May, 2006, Seattle, Washington, USA.

[図書] (計1件)

中沢 隆、矢野重信「金属錯体と金属タンパク質の質量分析」, *生命元素事典* (桜井弘編), 第4章, 2項 [7], pp. 407-411, オーム社 (2006).

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: タンパク質又はペプチドのC末端修飾法、C末端固定化法、及び解析法

発明者: 中沢 隆、岡 むつみ、西田希実子、山口 実、九山浩樹、安藤英治、上山憲一、岡村高明、綱澤 進

権利者: 株式会社 島津製作所、国立大学法人奈良女子大学、国立大学法人大阪大学 (JST 特許出願支援: #S2006-0043PTC)

種類: 特許

番号: 特願 2005-307831

出願日: 平成 18 年 10 月 20 日

国内外の別: 国際出願

○取得状況 (計4件)

①名称: ペプチドのアミノ酸配列決定法

発明者: 山口 実、安藤英治、乗岡茂巳、上山憲一、岡村高明、中沢 隆

権利者: 株式会社 島津製作所

種類: 特許

番号: 第 **4232660** 号

取得年月日: 平成 20 年 12 月 19 日

国内外の別: 国内

②名称: イソチオシアネート基を有する金属錯体、及びそれを用いるタンパク質のアミノ酸配列決定方法

発明者: 上山憲一、岡村高明、乗岡茂巳、中沢 隆、山口 実、安藤英治

権利者: 株式会社 島津製作所

種類: 特許

番号: 第 **4211305** 号

取得年月日: 平成 20 年 11 月 7 日

国内外の別: 国内

③名称: タンパク質のN末端フラグメントを選択的に回収する方法

発明者: 乗岡茂巳、上山憲一、岡村高明、中沢 隆、山口 実、安藤英治、綱澤 進

権利者: 株式会社 島津製作所

種類: 特許

番号: 第 **4120580** 号

取得年月日: 平成 20 年 5 月 9 日

国内外の別: 国内

④名称: Method for modifying protein or peptide C-terminal

発明者: Takashi Nakazawa, Minoru Yamaguchi, Hiroki Kuyama, Eiji Ando, Norikazu Ueyama, Taka-aki Okamura, and Shigemi Norioka

権利者: Shimadzu Corporation

種類: 特許

番号: **US 7,294,707 B2**

取得年月日: Nov. 13, 2007

国内外の別: 国外 (アメリカ合衆国)

[その他]

ホームページ

<http://www.chem.nara-wu.ac.jp/~nakazawa/>

セミナーでの講演

Takashi Nakazawa. "Protein Chemistry and Enzymology as Fundamentals for Proteomics", in *Proteomics and Functional Genomics Group Special Seminar*, 23rd September 2008, Department of Veterinary Science, University of Liverpool, Liverpool, UK.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中沢 隆 (NAKAZAWA TAKASHI)

奈良女子大学・理学部・教授

研究者番号: 30175492

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

九山浩樹 (KUYAMA HIROKI)

大阪大学・蛋白質研究所寄附研究部門・准教授

研究者番号: 60437332

西村 紀 (NISHIMURA OSAMU)

大阪大学・蛋白質研究所寄附研究部門・教授

研究者番号: 10374125

(4) 研究協力者

SIMON J. GASKELL

University of Manchester・Director of the Michael Barber Centre for Mass Spectrometry・Professor [Vice President (Research) of the University]