

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05530

研究課題名(和文)水素ラジカルによるジスルフィド結合含有タンパク質の新規分析法

研究課題名(英文) Novel method for indentifying disulfide-linked proteins using hydrogen radical

研究代表者

高山 光男 (Takayama, Mitsuo)

横浜市立大学・理学部・教授

研究者番号：10328635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：複数のジスルフィドS-S結合を有する同族タンパク質、卵白リゾチームHELと牛ラクトアルブミンaLAの分解特性を、水素ラジカルを攻撃試薬としたアミノ酸配列解析および構造特異性の観点から比較検討した。水素ラジカルとDTTの組合せは主鎖N-C結合とS-S結合の同時分解を可能にし80残基まで迅速な配列決定を達成した。さらにTFAの添加はaLAを残基特異的(Asp, Ser/Thr, Gln, Gly)に加水分解したのに対し、HELは分解せず強い酸耐性を示した。HELとLAの酸に対する耐性の違いは、HELが塩基性であるのに対し、LAは酸性であることに帰することができその反応機構を提出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は生体を形作る最も重要な物質であり、その性質や反応特性を知ることは健康維持の科学的知識として必須である。本研究課題である、複数のジスルフィド結合を持つタンパク質の分析手法の開発では、先端の質量分析技術を用い、当該タンパク質のアミノ酸配列と分解特性を迅速に行うことに成功した。すなわち、数分のうちに当該タンパク質の80残基以上のアミノ酸配列を決定できた。また4本のジスルフィド結合を有する牛乳由来のアルファラクトアルブミンは酢酸など酸性試薬に対し分解耐性が低く容易に分解したが、卵白由来のリゾチームは強い耐性を示し種々環境下でもその抗菌活性を維持し得る性質を持ちうる事が判明した。

研究成果の概要(英文)：Disulfide-bridged (S-S) containing proteins bovine alpha-lactoalbumin (aLA) and beta-lactoglobulin (bLG) have been examined by hydrogen radicals produced by ultraviolet laser photons, and showed residue specific flexible cleavage at the Asp/Asn/Cys/Ser/Gly residues. Furthermore, evolutionarily homologous proteins aLA and hen egg-white lysozyme (HEL) having very similar secondary and tertiary structures. The treatment of aLA and HEL with DTT/AcOH/NH<sub>3</sub> resulted in similar degradation behaviors of the backbone N-C and S-S bonds. However, the treatment of aLA with acetic acid and trifluoroacetic acid resulted in unexpected residue-specific degradation at the peptide bond of the Asp, Ser/Thr, Gln and Gly residues, while HEL did not occur such degradation. The study demonstrates the sensitive and resistant of evolutionary homologous proteins aLA and HEL to the acid hydrolysis coming from acidic and basic nature of the proteins.

研究分野：質量分析学

キーワード：水素ラジカル ジスルフィド結合 タンパク質化学

1. 研究開始当初の背景

(1)ジスルフィド(S-S)結合は、二つのシステイン残基のチオール基(-SH)の酸化反応によって形成した共有結合でありタンパク質の翻訳後修飾の一つである。その主な機能は、ペプチドやタンパク質の立体配座の維持安定化にあり、ターゲット分子との結合選択性や酵素活性などの機能向上に重要な役割を演じる。特にS-S結合を複数もつ糖鎖分解酵素リゾチームやRNA分解酵素リボヌクレアーゼ(RNase)など進化的に重要な意味を持つタンパク質は、プロテアーゼに対して強靱な分解耐性を持ち安定した酵素機能を維持する。このためS-S結合の構造安定化の性質はタンパク質製剤の開発にも利用され、S-S結合含有タンパク質の分析は実用上重要な意味を持ち、現在でも多くの方法が改良開発されている。近年のS-S結合含有ペプチドやタンパク質の解析は、アトモル以下での迅速分析を可能とする質量分析(MS)技術を基盤としている。しかし、安定なS-S結合の切断と分離技術には従来の一連の試料調製(溶液中でのチオール試薬による還元アルキル化、化学分解/酵素消化、LCによる分離)が必須である。また最終段階でのタンデム質量分析(MS/MS)から生成される膨大なデータから、アミノ酸配列とS-S結合位置を解析するアルゴリズムも高度化している。しかし、最新のMS/MSと解析アルゴリズムを駆使しても、新規分析法の開発には古典的なS-S結合含有モデルタンパク質RNase-AやモデルペプチドInsulinなどを用いるのが現状であり、複数のS-S結合を有する新規ペプチドやタンパク質の分析がいかに困難であるか理解できる。

本申請に先立ち、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI MS)に使う脱離イオン化用のマトリックス材のうち、開発済みの水素ラジカル発生試薬 5-amino-1-naphthol (5, 1-ANL)を用い4本のS-S結合を含む牛乳由来タンパク質  $\alpha$  ラクトアルブミンにMALDI分析を適用したところ、Cys6-Cys120のS-S結合と主鎖N-C $\alpha$ 結合の同時分解に由来するピーク群 c12 から c27 まで高く観測された。それらピーク群の各質量差からアミノ酸配列を決定できただけでなく、Cys28-Cys111のS-S結合の水素ラジカルによる還元分解に由来する c28 以降のピーク群も観測され、C44 以上まで配列を読むことができた(図1)。このとき、c27 と c28 のピーク強度の不連続的な低下から Cys28-Cys111 のS-S結合の位置を特定できることが期待された。申請に先立つ本発見から、複数のS-S結合を含むタンパク質のアミノ酸配列とS-S結合位置の両方の迅速分析が可能であることを期待した。

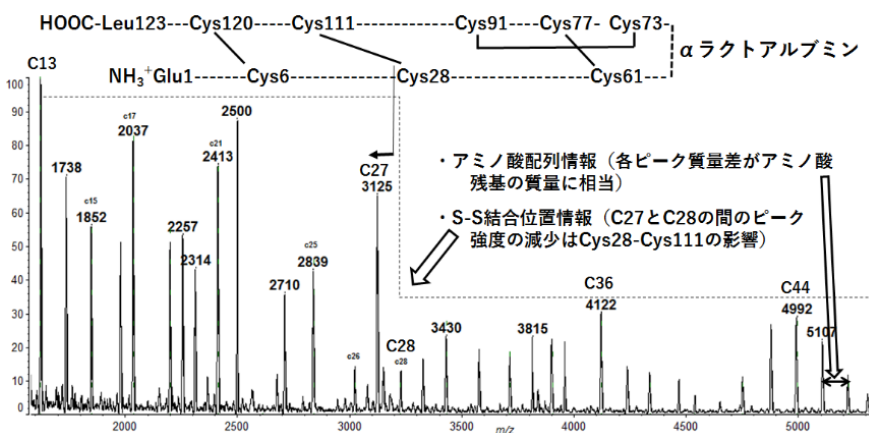


図1 水素発生試薬を用いた  $\alpha$  ラクトアルブミンのMALDI MS。各ピーク間質量(アミノ酸残基の質量)から配列情報が得られ、c27とc28の強度の不連続的な低下からCys28-Cys111のS-S結合の位置を特定できる。

## 2. 研究の目的

(1)本研究は、複数のS-S結合を有するタンパク質のアミノ酸配列およびS-S結合部位の決定を目的とした。S-S結合はタンパク質の機能と直接関連する高次構造を安定化させ酵素消化にも耐性を与えている。またS-S結合の還元チオール化とアルキル化および化学分解や酵素消化などは溶液中での試料調製が必須であったが、本研究では主要な反応を真空中での水素ラジカルによる選択的なS-S結合の還元チオール化と主鎖N-C $\alpha$ 結合の切断の両反応を行うことにより、MSを基盤としたS-S結合含有タンパク質の迅速な分析だけでなく、副反応の抑制することも期待した。その際、従来の手法や調製過程と併用することも考慮し、以下の課題解決を目標とした。

1. 水素ラジカルによるS-S結合の還元チオール化反応 (-S-S-  $\rightarrow$  -SH HS-) と主鎖N-C $\alpha$ 結合の切断反応の速度 (収率) を決定し収率向上の理論的戦略を確立する。
2. 上記反応速度に対する分子サイズの影響を調べるために、S-S結合を含有するペプチドとタンパク質の分解速度の違い、およびその機構を明らかにする。
3. S-S結合の還元チオール化によって生成するシステイン残基の側鎖 (-SH) の反応性 (酸化還元、側鎖脱離、主鎖切断など) を、他のアミノ酸残基の側鎖と比較しその違いを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)MALDI MSを使うタンパク質主鎖N-C $\alpha$ 結合の分解反応機構 (in-source decay, ISD) は申請者によって2001年に解明されたが、その後も副反応を伴わない反応特異性の高い水素ラジカル発生試薬の化学構造特性を見出し国際質量分析会議等で報告してきた。すなわち、タンパク質主鎖のカルボニル炭素上に選択的に水素ラジカルを付加させ、カルボニル炭素上に不対電子を局在化させることにより、主鎖 N-C $\alpha$  結合のみを特異的に切断し他の副反応を抑えることに成功した (図2)。その際、水素発生官能基 (-OH, -NH<sub>2</sub>) の水素原子がタンパク質主鎖のカルボニル酸素のn電子と予め水素結合する機構モデル (図1 a) が実験方法の基盤となっている。このモデルによりラジカル誘起の分解反応 (図2 b) は極めて選択性が高く、N-末端側 (図2 c) およびC-末端側に由来する特異性の高い分解生成物 c fragment などを与える。これら分解物を質量分析することによってアミノ酸配列解析情報を得ることができる。以上に述べた反応モデルに基づくMALDI-ISD MSを主要方法とし、従来の還元試薬等を組み合わせた溶液反応も併用し、複数のS-S結合およびフリーのチオール基 (システイン残基) を含むタンパク質を試料とした。

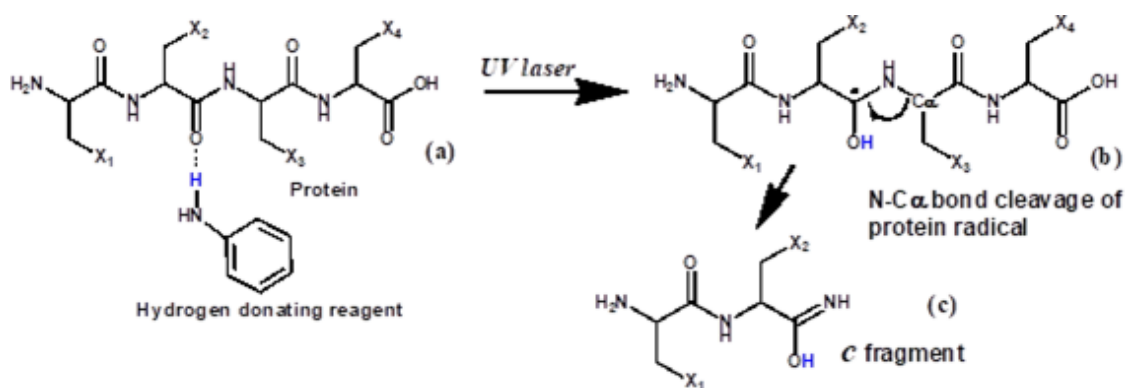


図2 ペプチド主鎖カルボニル酸素への水素原子の水素結合(a)とタンパク質ラジカルの生成と主鎖N-C $\alpha$ 結合の分解反応(b)、およびN-末端側特異的な分解生成物(c)。

#### 4. 研究成果

(1)本研究では、主要基本技術 MALDI-TOF MS 法に基づいた成果の他に、タンパク質の分解耐性に関する予期せぬ新規成果を得た。

##### ① 複数の S-S 結合およびシステイン残基を含むタンパク質の分析

4本のジスルフィド S-S 結合を有する牛  $\alpha$  ラクトアルブミン ( $\alpha$ LA) 及び2本の S-S 結合と一つのシステイン残基を有する牛  $\beta$  ラクトグロブリン A ( $\beta$ LG) を用いた結果、予測通り主鎖 N-C $\alpha$ 結合と S-S 結合が同時に分解して生成した分解物が観測できた。特に Cys66-Cys160 位置の S-S 結合に由来する分解物 c65 の位置においてピーク強度の不連続的な低下が見られ、S-S 結合位置を強く反映したスペクトルデータを得た (図3)。図3中、c10 から c65 までは S-S 結合なしの配列であり、本ピーク群は実験条件から 100ns 以内に起こる分解反応に由来する。Cys66-Cys160 位置の S-S 結合以降の分解物も c97 まで観測され、S-S 結合の同時分解も起こっていることが確認された。主鎖 N-C $\alpha$ 結合の分解には水素原子1つの結合が必要であるが、S-S 結合の還元チオール化分解には2つの水素原子を必要とするためトータルの反応速度は遅くなり、その結果としてピーク強度の不連続的減少が観測されたと考えられる。さらにチオール基-SHの反応は特性として、Cys121に由来する特徴的な分解物ピーク w42 が観測され (図3)、側鎖である SH の脱離を伴うことが判明した。本反応はフリーのシステイン残基の位置特定を可能とする指標ピークを与える。本成果は米国化学会雑誌 ACS OMEGA2019 に掲載された。

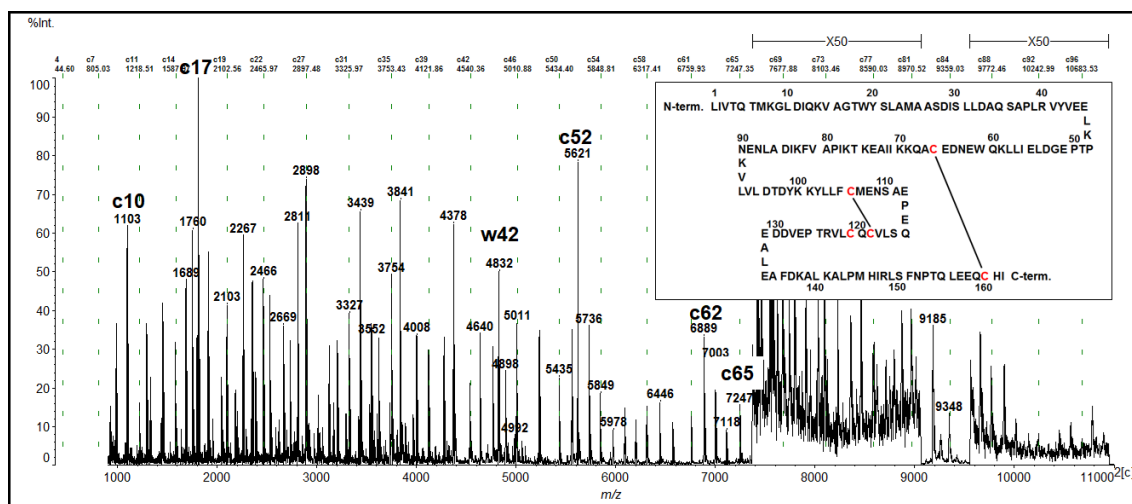


図3 牛 $\beta$ ラクトグロブリンAの主鎖分解スペクトル。ACS OMEGA 2019, 4, 20308-20314.

##### ② 複数の S-S 結合を含む進化学上の同族タンパク質の分析

4本のジスルフィド S-S 結合を有する同族タンパク質、卵白リゾチーム (HEL) と牛  $\alpha$  ラクトアルブミン ( $\alpha$ LA) の分解特性を比較検討した。HEL と  $\alpha$ LA は進化学上強い関連性があり、二次構造と三次構造の類似性が極めて高く (図4)、どちらも安定なタンパク質である。本研究では、S-S 結合の還元を促進するジチオトレイトール (DTT) 処理により、HEL も  $\alpha$ LA も副次反応なしでアミノ末端から80残基まで迅速な配列決定と S-S 位置の推定を可能にした。本成果は申請課題を達成できたことを示すが、研究途上、HEL と  $\alpha$ LA には酸試薬に対する耐性に決定的な差異があることを発見した。すなわち、トリフルオロ酢酸 (TFA) の添加は  $\alpha$ LA をアミノ酸残基特異的 (Asp-Xxx, Xxx-Ser/Thr, Gln-Xxx, Xxx-Gly, Gly-Xxx) に加水分解するのに対し、HEL は全く反応せず酸に対する強い耐性を示した。HEL と

$\alpha$  LA の酸に対する耐性の違いは、HEL が塩基性タンパク質であるのに対し  $\alpha$  LA は酸性タンパク質であることに帰することができ、その反応機構を提出し専門誌に掲載された (Biochemistry and Biophysics Reports 101212, 10.1016/j.bbrep.2022.101212) .

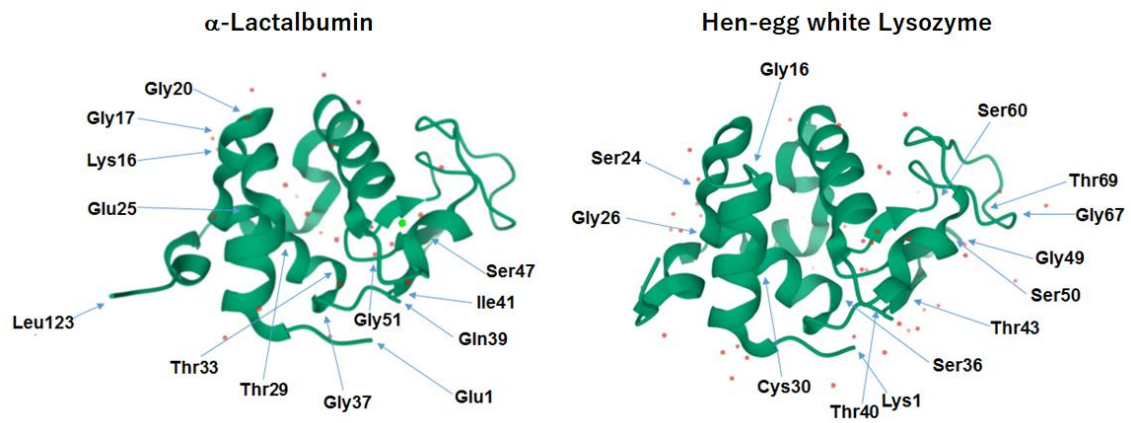


図4 牛  $\alpha$  ラクトアルブミン ( $\alpha$  LA) と卵白リゾチーム (HEL) の二次および三次構造



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>K. Miyazawa, M. Takayama  | 4. 巻<br>31              |
| 2. 論文標題<br>Multiple Hydrogen Loss from [M + H] <sup>+</sup> and [a] <sup>+</sup> ions of Peptides in MALDI In-Source Decay Using a Dinitro-Substituted Matrix | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>J. Am. Soc. Mass Spectrom.  | 6. 最初と最後の頁<br>547-552   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/jasms.9b00013   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>A. Kageshima, A. Motoyama, M. Takayama  | 4. 巻<br>34              |
| 2. 論文標題<br>Influence of hydrophilic additives on the signal intensity in electrospray ionization of flavonoid glycosides                                      | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Rapid Commun. Mass Spectrom.  | 6. 最初と最後の頁<br>1-10      |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/rcm.8914  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>A. Kagoshima, K. Sekimoto, M. Takayama  | 4. 巻<br>30              |
| 2. 論文標題<br>Intramolecular Hydrogen Transfer from the Alpha-Carbon and Backbone Amide Nitrogen (Nb) to form c- and y-Ions in Negative-Ion CID of Peptides      | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>J. Am. Soc. Mass Spectrom.  | 6. 最初と最後の頁<br>1592 1600 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s13361-019-02245-z  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>S. Sekiya, M. Yamakoshi, S. Iwamoto, K. Tanaka, M. Takayama   | 4. 巻<br>445             |
| 2. 論文標題<br>Residue specific formation of [a] <sup>+</sup> ions initiated by the loss of hydrogen from [M+H] <sup>+</sup> in high energy CID of peptides       | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Int. J. Mass Spectrom.  | 6. 最初と最後の頁<br>116195    |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ijms.2019.116195  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>M. Takayama   | 4. 巻<br>4                 |
| 2. 論文標題<br>Estimation of flexible and rigid residues of disulfide-bridged and phosphorylated proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>ACS Omega   | 6. 最初と最後の頁<br>20308 20314 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acsomega.9b02814  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-                 |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>K. Nagoshi and M. Takayama   | 4. 巻<br>436         |
| 2. 論文標題<br>Residue-specific radical-driven dissociation of peptides using matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay wit hydrogen-donating and abstracting matrices | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>Int. J. Mass Spectrom.   | 6. 最初と最後の頁<br>25 32 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ijms.2018.11.002   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-           |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>M. Takayama   | 4. 巻<br>29           |
| 2. 論文標題<br>Sensitive and resistant of the homologous disulfide-bridged proteins alpha-lactoalbumin and lysozyme to attack of hydrogen-atoms, dithiothreitol and trifluoroacetic acid, examined by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Biochemistry and Biophysics Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>101212 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrep2022.101212  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-            |

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>吉川大、高山光男                           |
| 2. 発表標題<br>チオール含有マトリックスを用いた抗腫瘍抗生物質のMALDI-MS分析 |
| 3. 学会等名<br>第68回質量分析総合討論会                      |
| 4. 発表年<br>2020年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>宮澤慶、高山光男                             |
| 2. 発表標題<br>MALDI-MSDにおけるペプチドからの複数水素の脱離とラジカル誘導分解 |
| 3. 学会等名<br>第68回質量分析総合討論会                        |
| 4. 発表年<br>2020年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>総谷勇貴、名越慶士郎、高山光男                    |
| 2. 発表標題<br>複数のジスルフィド結合を持つタンパク質のMALDI-MSDによる解析 |
| 3. 学会等名<br>第67回質量分析総合討論会                      |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |