

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22370040

研究課題名（和文） 金属タンパク質、高分子タンパク質複合体の質量分析法の開発

研究課題名（英文） Mass Spectrometry of Metalloproteins and High-Molecular-Weight Protein Complexes

研究代表者

高尾 敏文 (TAKAO TOSHIFUMI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：10197048

研究成果の概要（和文）： エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析計（既設）のイオン源において、高 m/z 領域（4000 以上）でのイオン透過率を向上させるための改良を行い、高分子量蛋白質複合体をネイティブ状態（蛋白質水溶液を中性 pH、pmol 程度の低濃度の生理的状态に近い条件で調製）で質量分析できる方法を開発した。本装置により、種々の蛋白質複合体の化学量論や金属蛋白質における金属イオンの配位特性（種類と化学量論）を調べることが可能となった。

研究成果の概要（英文）： A method for high-efficient ion transmission of high- m/z molecular ions has been developed and embedded in a conventional electrospray ionization mass spectrometer. The method allows for measurement of large molecular complexes such as a protein complex, metalloprotein, etc. in native states, which is useful for revealing stoichiometry of molecules that form a complex or metal ions that are coordinated in a metalloprotein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：蛋白質複合体、金属蛋白質、エレクトロスプレーイオン化質量分析、ネイティブ状態、金属イオン、化学量論

1. 研究開始当初の背景

蛋白質複合体や金属蛋白質の構造特性を調べる上で、まず構成する蛋白質や金属イオンの種類と化学量論を知ることが重要である。それらを調べる方法として質量分析法は有効であるが、通常の測定法においてはネイティブ構造を維持したままで分子イオンを観測することは以下の2つの点で困難であっ

た。1) ネイティブ蛋白質のエレクトロスプレーイオン化においては荷電数が少なくなるため、高 m/z 領域で分子イオンは観測される（市販の装置では m/z 4,000 程度までの測定が一般的な使用となっている）。2) 蛋白質をネイティブ状態で測定するには、中性の pH、低濃度（～数十 μM ）、室温程度の溶液を用いて測定する必要がある。本研究では、

主に、これら2つの点を克服するための開発及び測定法の確立を試みた。

2. 研究の目的

蛋白質複合体や金属蛋白質は生体内で重要な働きをしている。酵素の約半数は活性発現に金属イオンを利用していることから明らかのように、多くの蛋白質において、機能獲得・発現に金属イオンやその他の分子との複合体形成は必要不可欠である。本研究は、生理的条件下におけるネイティブ蛋白質の複合体形成（金属イオンの配位や蛋白質間相互作用）を質量分析により正確に調べる方法を確立する目的で行った。

3. 研究の方法

既設の質量分析計（図1）に以下の3つの改良を行なった。

(1) エレクトロスプレーイオン化において生成したイオン（イオン源）を、細孔を通して真空へ導入する際には、細孔の真空側（水色の領域）に超音速ジェットが生じる。超音速ジェット中では、バックグラウンドガス（窒素）と試料イオンなどは、ほぼ等速に加速されるため、質量の大きな高分子複合体のイオンは、結果として高い運動エネルギーを獲得するのでバックグラウンドガスとの衝突により分解、解裂が起きてしまう。これを防ぐために、本研究では、細孔（スキマー2）の径を0.4 mm→0.5 mmに広げることで細孔の分析系側の真空度を下げ、図1の水色の領域でイオンを十分に減速することとした。

(2) イオン導入部（図1）において、高m/zでのイオン透過率を上げるために低周波交流電源を試作し、並びに、イオン取り込み効率を上げるためにスキマー1（写真、図2）の口径を拡大した。

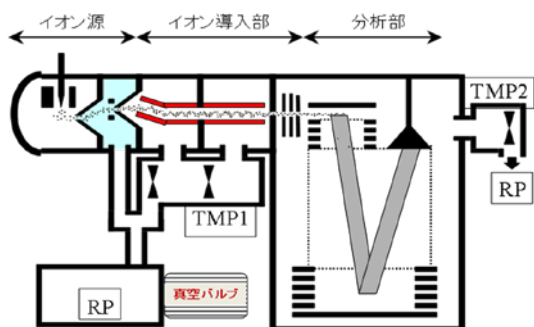
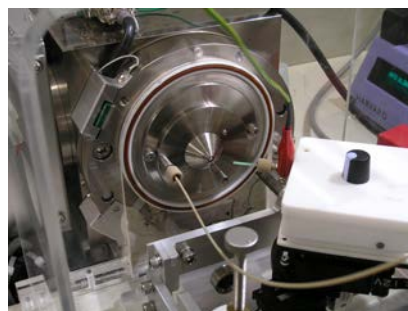


図1. ESI-TOFMS（日本電子社製の AccuTOF を改造）

(3) 蛋白質をネイティブ状態で測定するには溶媒として水系を用いる必要がある。安定なエレクトロスプレーを発生するために、溶液の温度コントロール（0-40℃）と導入角度の微調整が可能なキャピラリー保持用

ステージを試作した（写真の白いテフロン製の箱にガラス製キャピラリーを固定）。測定は、キャピラリーの先端内径15~30 μm、流速0.2~0.3 μL/分、キャピラリー電圧1500~1800 Vの設定で5-10分の積算で行った。



（写真）ESI イオン源。本研究で試作したステンレス製スキマー（図2）と試料溶液導入用キャピラリー保持ステージ（テフロン製、架台にはペリチェ素子を内蔵）

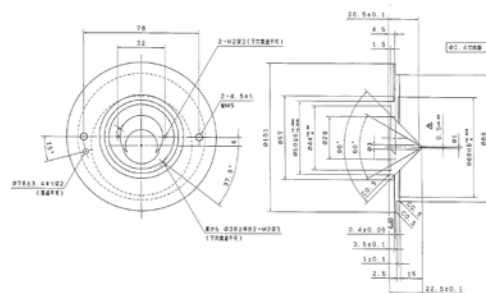


図2. スキマー（写真）。イオン取り込みの口径を0.8 mm→1 mmに変更。

4. 研究成果

種々の蛋白質複合体や金属結合性抗生物質の測定を行うことで、ESIイオン化における複合体形成条件を確立し、主に、以下の蛋白質の測定を行ない、金属配位特性等の新たな知見を得た。

- (1) 抗生物質（クロモマイシン、及び、ミトラマイシン）の金属配位特異性を明らかにした。（論文2）
- (2) β2-ミクログロブリン、及び、その構造異性体の金属配位特性を見出した。（論文1）

長期透析患者の合併症である透析アミロイドーシスの原因蛋白質であるβ2-ミクログロブリン（β2m）の2価金属イオンに対する配位特性を調べた。β2mのアミロイド繊維形成機構の詳細は未だ不明であるが、凝集の初期段階のオリゴマー形成時に開始因子としてCu²⁺イオンが介在している可能性が報告されている。一方、β2mは生理的条件下（温度、pH、濃度）で脱アミド化/異性化が進行し、Asn17とAsn42の2箇所において、それぞれ33、347

日の半減期で脱アミド化が起こることを明らかにした(図3)。さらに、脱アミド化により生じたAsp17の45%、Asp42の97%がisoAspに異性化することも見出した(図4)。脱アミド化によりAsnがAspに変換され、分子全体として負イオンが増加するが、それと同時に、isoAspへの異性化を伴うため、蛋白質の高次構造にも影響を与えるものと考えられる。

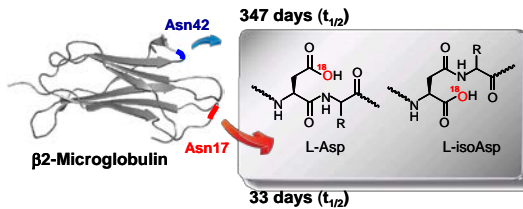


図3. β 2-ミクログロブリンに見出した脱アミド化/異性化反応

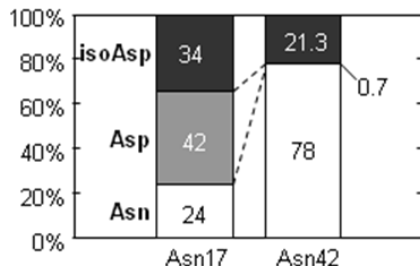


図4. 50°C、8日間インキュベーション後の β 2m中のAsn17及びAsn42におけるAsn/Asp/isoAspの相対比。

本研究では、Asn17とAsn42の箇所において脱アミド/異性化した β 2mとCu²⁺イオンとの相互作用をnanoESI-MSにより調べた。その結果、脱アミド化/異性化した β 2mは、ネイティブ β 2mよりもCu²⁺イオンとの親和性が増加するという新たな知見を得た。(図5)

このことから、脱アミド化/異性化による構造変化がCu²⁺イオンとの結合能を増大したものと考えられた。透析アミロイドシスの発症が数年を要することを考えると、脱アミド化/異性化のような半減期の長い反応とそれによって増すCu²⁺イオンとの親和性が、 β 2mの凝集の初期段階における原因の一つになっているものと考えられ、また、長期透析患者のアミロイドシス発症の時間軸との関連も強く示唆する結果と考えられる。

(3) カルノシナーゼ2 (ホモダイマー、106 kDa) の検出に成功した。(学会発表5)

カルノシン等のジペプチドを加水分解する酵素カルノシナーゼ2はホモダイマーとして活性を発現することが知られている。本研究で改造したESI-TOF/MSを用いることにより、モノマーに開裂することなく、ダイマーを効率よく測定することに成功した。(図6)

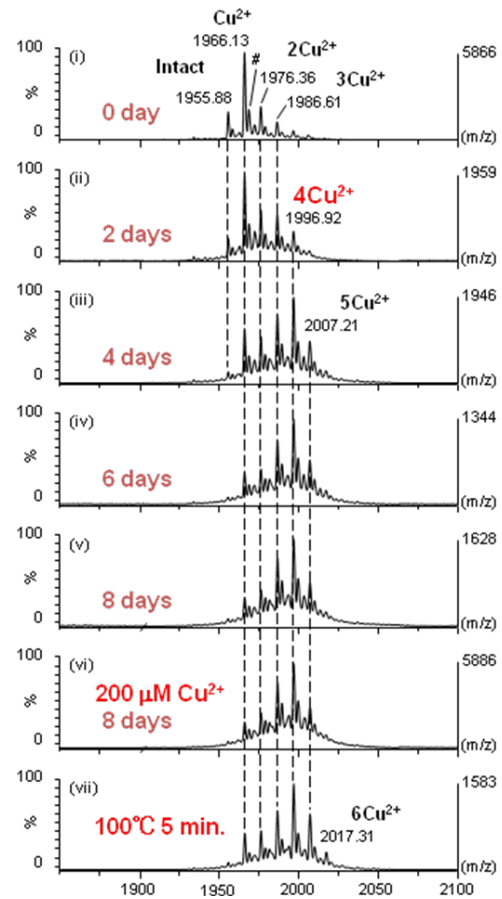


図5. β 2mの脱アミド化/異性化に伴って増加するCu²⁺イオンとの親和性。 β 2m: 20 μ M、Cu²⁺: 100 μ M、pH 7.4

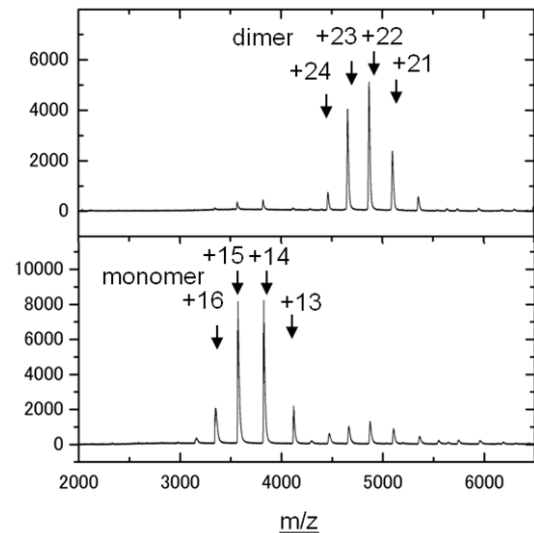


図6. 金属酵素カルノシナーゼ2 (106 kDa) のESI-TOF/MS。上段: 水溶液中で測定(→高m/z領域にダイマーの分子イオンが観測された); 下段: 20%アセトニトリル添加して測定(→ダイマーが減少し、モノマーが主に観測された)。

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 12 件)

1. Fukuda M, Takao T (2012) Quantitative Analysis of Deamidation and Isomerization in β 2-Microglobulin by ^{18}O Labeling. *Anal. Chem.* 84, 10388-10394. (査読有)
2. Lahiri S, Takao T, Devi PG, Ghosh S, Ghosh A, Dasgupta A, Dasgupta D. (2012) Association of aureolic acid antibiotic, chromomycin A3 with $\text{Cu}(2+)$ and its negative effect upon DNA binding property of the antibiotic. *Biometals*, 25, 435-450. (査読有)
3. Kim C, Aono S, Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Okumura N, Takao T, Doki Y, Mori M, Nagano H. (2012) Significance of Alanine Aminopeptidase N (APN) in Bile in the Diagnosis of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation. *J Surg Res.* 175, 138-148. (査読有)
4. Betancourt LH, Sánchez A, Pérez Y, Fernandez de Cossio J, Gil J, Toledo P, Iguchi S, Aimoto S, González LJ, Padrón G, Takao T, Besada V. (2011) Charge state-selective separation of peptides by reversible modification of amino groups and strong cation-exchange chromatography: evaluation in proteomic studies using peptide-centric database searches. *J. Proteomics.* 74: 2210-2213. (査読有)
5. Hanke GT, Satomi Y, Shinmura K, Takao T, Hase T. (2011) A screen for potential ferredoxin electron transfer partners uncovers new, redox dependent interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1814: 366-374. (査読有)
6. Konishi K, Yamamoto H, Mimori K, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Sekimoto, M, Matsuura N, Takao T, Doki Y, Mori M. (2010) Expression of C4.4A at the invasive front is a novel prognostic marker for disease recurrence of colorectal cancer. *Cancer Sci.* 101(10):2269-2277. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. Fukuda M, Takao T: “Quantitative analysis of deamidation and isomerization in β 2-microglobulin by ^{18}O labeling” The 8th Annual Meeting

of Nine Life Science Institutes Affiliated with the National University in Japan, 27-28/Jun, 2013, Kyoto University, Kyoto.

2. Takao T: “Mass Spectrometric Strategies for the Analysis of Posttranslational Modifications” IPR International Symposium 2012, 22/Nov, 2012, Senri-Hankyu Hotel, Suita
3. Takao T: “Mass Spectrometry for Analysis of Posttranslational Modifications”, Recent Advances in Chemical & Physical Biology Organized by Saha Institute of Nuclear Physics & Mechanobiology Institute, National University of Singapore, 5-7/Mar, 2012, Kolkata, India.
4. 高尾敏文: プロテオミクスによるバイオマーカー探索、平成 23 年度文部科学省私立大学戦略的基盤研究形成事業、「生物分子システムに基づく創薬科学フロンティア研究」、2012 年 2 月、京都薬科大学、京都
5. Okumura N, Tamura J, Takao T: “Analysis of Dimer Formation of Carnosine Dipeptidase 2 (CNDP2) by ESI-TOF/MS” The 59th Annual Conference on Mass Spectrometry, 13-15/Sep, 2011, Hotel Hankyu Expo Park, Suita.
6. Takao T: “Mass spectrometry for analysis of posttranslational modifications” The 1st International Symposium on Recent Advance in Medical Proteomics Organized by Yokohama City University, 16/Sep, 2010, Yokohama.

[図書] (計 2 件)

1. 高尾敏文、“新規タンパク質の発見法” 日本医事新報、No. 4522, pp. 87 (2010)
2. 高尾敏文、“疾患・バイオマーカー探索” 生化学、82(6):533-40 (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高尾 敏文 (TAKAO TOSHIFUMI)
大阪大学・たんぱく質研究所・教授
研究者番号: 10197048

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

奥村 宣明 (OKUMURA NOBUAKI)
大阪大学・たんぱく質研究所・准教授
研究者番号: 20224173