

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590044

研究課題名(和文)MSサイレントな翻訳後修飾の解析基盤構築

研究課題名(英文)Development of a method to screen MS-silent post-translational modifications

研究代表者

後藤 貴章(Goto, Takaaki)

東北大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40344684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析法では識別できない翻訳後修飾としてタンパク質中のアミノ酸異性化の解析手法を検討した。従来のプロテオミクス手法に加え、新たに各種修飾体を含む対象タンパク質の包括的抽出法、正負両イオンの相補的解析による全配列相当ペプチド群の検出手法を確立し、液体クロマトグラフィー/高分解能質量分析法と組み合わせることにより、異性化を含めた非酵素的翻訳後修飾の網羅的解析に応用可能な手法を構築した。

研究成果の概要(英文)：A novel methodology to screen MS-silent post-translational modifications on protein has been examined. This method is based on MS-based proteomics combined with the group-specific immunoaffinity extraction, complementary data analyses in both positive and negative mode, and LC/high-resolution MS. This strategy can be used for screening of modifications including isomerization.

研究分野：物理系薬学

キーワード：分析科学 生体分子 タンパク質 質量分析 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の非酵素的な翻訳後修飾は、酸化ストレスシグナルのみならず癌や神経変性疾患、生活習慣病などの疾患との関連からも多大な注目を集めていた。一般に非酵素的な翻訳後修飾は、各種タンパク質に対し非特異的に起こり、その解析は容易ではなかった。このため、酸化還元状態に特化したレドックスプロテオミクス (McDonagha J. *Proteomics* 2009 など)も展開されていたが、いずれもカルボニル化など特定の修飾を検出しているに過ぎなかった。

こうした背景から、申請者らは、標的タンパク質を限定し、その分子上の『ケミカルモディフィコミクス』、すなわち非酵素的な翻訳後修飾情報の網羅的解析技術の概念を提唱し、従来のプロテオミクス技術を超えて解決すべき課題に取り組んでいた。まず、各種修飾体解析における試料調製の見地から、抗体の分子認識特性を活用した各種修飾体の群特異的抽出法を開発するとともに、質量分析法と組み合わせ、修飾体の選択的検出と修飾部位の決定に有用であることも報告した。一方、プロテオミクスの基盤技術として、正イオン検出および負イオン検出データの相補的解析の有用性を明示した (*Anal. Methods* 2010)。さらに、エドマン分解を応用した絶対定量的プロテオミクス手法を考案した (*Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010)。これらを用い、アルブミンを標的とした非酵素的な翻訳後修飾情報の包括的な解析法の開発に取り組んでいた。一方、修飾機構の観点から、単純な酸化や付加反応のみならず、転移や開裂を伴う機構の存在を明らかにし、多様な修飾体生成の可能性を示した (*Chem. Res. Toxicol.* 2008)。さらに、各種内因性アルデヒドとの反応によりモデルペプチド・タンパク質の N 末端アミノ酸が非酵素的に異性化することを明らかにした。

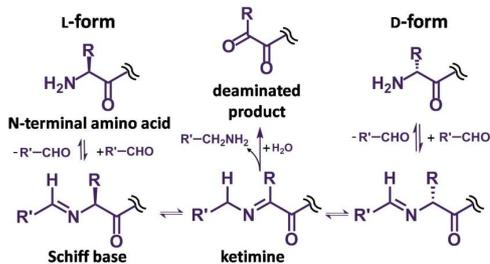


Fig.1. Mechanism for the racemization of N-terminal amino acid by aldehyde

しかし、異性化は質量変化を伴わないため、質量分析法による識別は困難である。特に立体異性化はフラグメントパターンにもほとんど相違が認められず、プロテオミクスの基盤技術となる質量分析法のみでは解析困難であり、高精度な分離手法との組み合わせた新たな解析法が必要となる。立体異性化はこれまで、タンパク質中のアミノ酸の異性化は、Ser や Asp など特定のアミノ酸残基のみが注目され、解析は酸加水分解後のアミノ酸分析により行われてきた。包括的な翻訳後修飾解

析において本法を直接適用することは困難であるが、さらにエドマン法を導入することにより非酵素的な翻訳後修飾としての異性化解析が可能になるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、質量分析法では識別できない翻訳後修飾、すなわちタンパク質中のアミノ酸異性化の解析手法を確立することにある。これを実現するため、従来のプロテオミクス技術に加え、新たに独自の各種修飾体を含む対象タンパク質の包括的抽出法、正負両イオンの相補的解析による全配列相当ペプチド群の検出手法、安定同位元素導入エドマン法による異性化解析法の構築を試みる。これによって、多様な非酵素的な翻訳後修飾情報の包括的解析を可能とし、標的プロテオミクスの新たな方向性を切り拓くものである。

バイオマーカー探索では、臨床試験による検証が必要となるが、倫理的な側面から、確固とした分析法の確立が前提となる。本研究の到達点は、従来のプロテオミクス技術で困難であったタンパク質中のアミノ酸の異性化解析基盤を構築し、非酵素的な翻訳後修飾情報の包括的解析を可能にすることである。すなわち、先述の独自手法を導入し、異性化アミノ酸含有ペプチドの LC における高精度分離とこれに続く高感度エドマン法によって以下の課題の解決を図る。

抗体の分子認識特性を活用した各種修飾体の群特異的抽出によって、夾雑成分を排除し解析効率の向上を図る。本法の有用性はモデルペプチド及びアルブミンを用いて明示されている。本研究ではさらに対象をヘモグロビンにまで拡大し、最適条件を精査する。

正イオン検出および負イオン検出データの相補的解析に加え、複数種のプロテアーゼ消化物の解析を併用により対象タンパク質の全配列をカバーするペプチド群の検出を図る。なお、既に MALDI-MS における本法の有用性は検証済みであるが、本研究では LC/ESI-MS/MS に特化した条件の検討および最適化を行う。また、LC により異性化ペプチドの高精度な分離を行い、多量の非修飾ペプチド中から選択的に検出可能な条件を確立する。

上記により検出した異性化ペプチドに対し、エドマン法による逐次的アミノ酸解析によって、異性化部位の決定を行う。微量試料での解析に対応させるため、同位体希釈 LC/MS を組み合わせたエドマン分解物の分析法を導入する。さらに、光学異性体分離、高感度化を指向したエドマン型試薬の検討も行う。これまでもタンパク質中のアミノ酸異性化を解析する手法はいくつか報告されているが、本研究では異性化を非酵素的な翻訳後修飾の一つと位置付け、『ケミカルモディフィコミクス』の観点から他の非酵素的な翻訳後修飾とともに包括的に解析可能な分析基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

対象タンパク質として、まず血清アルブミンをとりあげ、*in vitro*でのモデル修飾アルブミンの調製を行った。さらに各種質量分析法による修飾位置ならびに構造の決定を行った。これと併行し、アルブミン標品及びこれら修飾体を用い、LC/ESI-MS/MSによる異性化したアミノ酸残基を含む消化ペプチドの高精密分離条件並びに選択的検出条件を精査・最適化した。さらに分析条件の検討、定量性の評価を行った。さらに、対象タンパク質をヘモグロビンにも拡張、高感度化の検討など改善を試みた。さらに、市販の血漿試料および血液試料を用いて異性化タンパク質の検出を試み、本法の有用性を総合的に検証した。

アルブミン標品および次項で調製する修飾アルブミンの各種酵素消化物を用い、正・負イオンの検出モードを駆使してLC/ESI-MS/MSにより全配列をカバーする消化ペプチド群の検出並びに分離の条件を精査した。ついで、非修飾ペプチドの選択的検出条件を検討した。並行し、血漿中アルブミンの抽出条件を検討した。固定化抗体を用いた市販のアルブミン除去カラムを評価した。

市販のアルブミンを、過酸化水素、Cu(II)/アスコルビン酸、ペルオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>)、次亜ハロゲン酸(HOCl, HOBr)、過酸化脂質分解物、グルコースなどとインキュベートし、異性化アルブミンを得た。また、これに含まれる修飾アルブミンをMALDI-TOF/MSならびにLC/ESI-MS/MSに付し、修飾位置の決定を行なった。既知の修飾情報はUNIMOD websiteを利用した。

同位体希釈LC/MSによるエドマン分解物の高感度定量法を応用し、分離条件の検討によりアミノ酸異性化部位の決定法を検討した。併せて、重水中でエドマン分解反応を行い、反応過程におけるラセミ化による重水素化率を評価した。

標品および修飾ヘモグロビンの各種酵素消化物を用い、全配列をカバーする消化ペプチド群の検出並びに分離の条件を精査した。これと並行して抗体カラムを調製し、赤血球分画からのヘモグロビン及び修飾体の包括的抽出条件を最適化した。

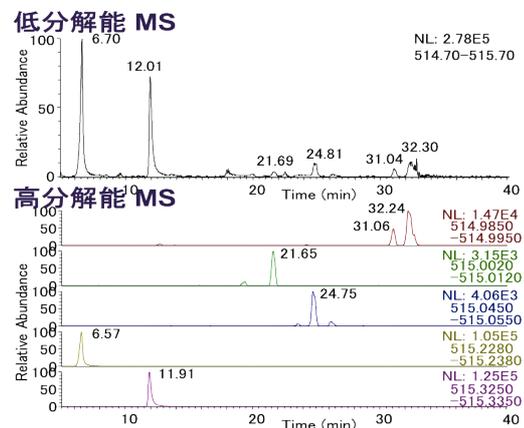
市販のヘモグロビンを、化学修飾反応に付し、異性化ヘモグロビンを得た。また、これに含まれる修飾ヘモグロビンをMALDI-TOF/MSならびにLC/ESI-MS/MSに付し、修飾位置の決定を行なった。さらに、一連の分析法の最適化とヒト正常血液を用いた評価を行い、実試料中の修飾アルブミン及び修飾ヘモグロビン解析可溶性タンパク質の化学修飾プロファイリング法として応用可能な一般性を検証した。

### 4. 研究成果

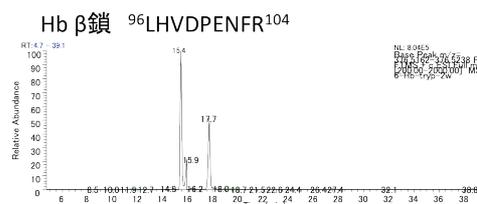
LC/ESI-MS/MSを用い、アルブミン消化ペプチドの分析条件を最適化し、全配列をカバーする消化ペプチド群の検出並びに分離の条件を精査した。アルブミン標品および各種修飾反応により調製した修飾アルブミンの各種酵素消化物を用い、これに含まれる修飾アルブミンをMALDI-TOF/MSならびにLC/ESI-MS/MSに付し、修飾の種類ならびに修飾位置を決定可能であった。このとき、UNIMOD websiteを利用することで解析効率を向上可能であった。また、電場型フーリエ変換質量分析計を用いた測定結果をディファレンシャル解析ソフトウェアXC-MSにより比較することによって、修飾ペプチドを容易に検出可能にした。これらと並行し、固定化抗体を用いた市販のアルブミン除去カラムを評価し、新たに溶出条件を設定することにより、修飾体を含めた血漿中アルブミンの抽出を可能にした。

また、同位体希釈LC/MSによるエドマン分解物の高感度定量法を確立し、一方、キラル分析を目的とした重水中でのエドマン分解反応における重水素化率測定の結果、エドマン分解物生成過程でのラセミ化によるアミノ酸異性化率の補正には、より高精度な反応制御が必要であることが判明し、今後課題を残した。

これらの検討結果を基にした一連の分析条件の最適化と実試料の評価を行った。生体内でのタンパク質中アミノ酸異性化の原因やメカニズムには未解明の部分が多く、酸化ストレス下などの修飾反応のみでは異性化モデルタンパク質の調製は困難であった。そこで血清アルブミンおよびヘモグロビン溶液への紫外線照射により修飾モデルタンパク質を調製した。これらを酵素消化し、LC/ESI-MSにより消化ペプチドを分析した結果、細かな断片化が多く認められたものの、同一 $m/z$ の抽出イオンクロマトグラム上に保持時間の異なる複数のピークが確認された。これら修飾モデルタンパク質を用いて分析法を検証した結果、低分解能測定では複数出現した擬陽性ピークも、高分解能測定により精密質量の相違に基づいた判別が可能であった。



また、MS/MS を組み合わせることによって、酸化などの通常の化学修飾位置も容易に同定可能であった。さらに健康人血液からイムノアフィニティー抽出した血清アルブミンに適用し、異性化部位を含むと考えられるペプチドを複数検出した。異性化部位を直接同定するためには、更なる検討が必要であるが、本法は可溶性タンパク質の化学修飾プロファイリング法として応用可能であると考えられた。



本研究の成果は、標的タンパク質を限定した非酵素的翻訳後修飾の包括的解析という新たな方向性を切り拓くものである。また、非酵素的な翻訳後修飾の解析法として、酸化ストレスや活性酸素シグナル、レドックス制御機構研究など、活性化化学種が関与する種々多様な生理機能やタンパク質中のアミノ酸異性化の関与が示唆されている眼科領域や中枢神経性の疾患などの病態の解明に資するものと考えられる。

#### 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 5 件)

1. Predicted multiple selected reaction monitoring to screen activated drug-mediated modifications on human serum albumin. Fumio Osaki, Takaaki Goto, Seon Hwa Lee and Tomoyuki Oe: *Anal. Biochem.*, **449**, 59-67 (2014). (査読有)  
DOI: 10.1016/j.ab.2013.12.016
2. Aldehyde stress-mediated novel modification of proteins: epimerization of the N-terminal amino acid. Ryo Kajita, Takaaki Goto, Seon Hwa Lee and Tomoyuki Oe: *Chem. Res. Toxicol.*, **26**, 1926-1936 (2013). (査読有)  
DOI: 10.1021/tx400354d
3. Complete amino acid sequencing and immunoaffinity clean-up can facilitate screening of various chemical modifications on human serum albumin. Takaaki Goto, Kazuyuki Murata, Seon Hwa Lee and Tomoyuki Oe: *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 7383-7395 (2013). (査読有)  
DOI: 10.1007/s00216-013-7146-0

[学会発表](計 14 件)

1. Simultaneous mass spectrometric analysis of various chemical modifications on human serum albumin: strategies for clean-up, sequence coverage, and identification. Takaaki Goto, Yuta Kudo, Kazuyuki Murata, Seon Hwa Lee, Tomoyuki Oe: 62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 15-19, 2014, Baltimore, USA
2. 血清アルブミン上の網羅的化學修飾解析を目的とした高分解能LC/MSによる修飾ペプチド検出法の検討: 後藤貴章, 工藤裕太, 李宣和, 大江知行: 第 74 回分析化学討論会, 2014 年 5 月 24 ~ 25 日, 郡山
3. アルデヒドによるタンパク質 N 末端アミノ酸異性化の研究: 梶田遼, 後藤貴章, 李宣和, 大江知行: 新アミノ酸分析研究会 第 3 回学術講演会, 2013 年 12 月 2 日, 東京
4. シッフ塩基形成を介した血清アルブミン N 末端アミノ酸の光学反転: 梶田遼, 後藤貴章, 李宣和, 大江知行: 平成 25 年度日本分析化学会東北支部若手交流会, 2013 年 7 月 19 ~ 20 日, 仙台
5. Mechanistic Study on Non-enzymatic Isomerization of N-terminal Amino Acids by Endogenous Aldehydes. Ryo Kajita, Takaaki Goto, Seon Hwa Lee and Tomoyuki Oe: 19th International Mass Spectrometry Conference, September 15-21 2012, Kyoto, Japan

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

後藤 貴章 (GOTO, Takaaki)  
東北大学・大学院薬学研究科・講師  
研究者番号: 40344684

##### (2)研究分担者

大江 知行 (OE, Tomoyuki)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号: 10203712

李 宣和 (LEE, Seon Hwa)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 60519776