

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25513001

研究課題名(和文)新規誘導体化分析法を利用する高精度ペプチドミクス

研究課題名(英文) Development of a reliable peptidomics technique using a novel chemical derivatization approach

研究代表者

宮川 恒 (Miyagawa, Hisashi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10219735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析計を用いたペプチドの配列決定は難しい場合があるが、N末端を化学修飾することによってその信頼性を高めることができる。しかし、N末端選択的な修飾反応や、ロイシンとイソロイシンの判別が課題であった。そこで本研究では、酸化性的アミド結合形成反応を用いることによってN末端選択的な修飾を達成し、高エネルギーCID条件下での側鎖開裂を促進する化学修飾構造についても明らかにした。さらにこれらの手法を用いて、サソリ毒液中に含まれる3種の抗菌性ペプチドの構造決定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Peptide sequencing by mass spectrometry is known to be facilitated by chemical modification of the peptide N-terminus. In this study, we first optimized the method for N-terminal selective modification and then investigated the modification structures suitable for Leu/Ile discrimination under high-energy CID conditions. In addition, we successfully identified three novel antimicrobial peptides from the scorpion *Isometrus maculatus* venom using the method developed in this study.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ペプチド 質量分析 アミノ酸配列決定 化学修飾 抗菌性

## 1. 研究開始当初の背景

ヘビやクモ、サソリなどの生物毒は、長い進化の過程で作られ、優れた生理活性を持つことから、基礎研究のツールとして有用であるだけでなく、医薬・農薬への応用へ向けたリード化合物として期待されている。近年、器官・組織・細胞中に存在するペプチド群を、一斉かつ網羅的に構造解析・定量するペプチドミクス (peptidomics) 手法が開発され、生理活性ペプチドの探索に用いられるようになってきた。ペプチドミクス手法では、まず対象試料に含まれるすべてのペプチドの構造を決定し、その後さまざまな情報をもとにして、それらの生理活性・生物学的意義を明らかにする。特に、上記の生物毒成分の網羅的解析はベノミクス (venomics) と呼ばれる。

生理活性ペプチドの探索には、活性を指標にして精製を繰り返す手法がこれまで用いられてきた。しかしこの手法では、微量にしか含まれない生理活性ペプチドは、見逃される可能性が高い。また、たとえ単離できたとしても、汎用されてきたエドマン分解による構造解析法では測定感度が低いために同定が難しい場合も多かった。これに対し、ペプチドミクス手法において用いられる質量分析計による解析では、ペプチドの高感度配列決定が可能であり、感度の面で大きな利点がある。またそれぞれの成分を合成によって十分量確保してから活性測定が行われるため、微量成分であっても見逃される危険性はほとんどない。このように、ペプチドミクス手法を活用することにより、これまで注目されてこなかったマイナーな有毒生物のもつ毒素成分の解析が劇的に進み、これらからの新たな生理活性物質の発見が期待されている。

しかしながら、現状では質量分析計を用いる配列決定は、エドマン分解法ほどの高い信頼性が得られず、そこがペプチドミクス研究のボトルネックとなっている。これは質量分析によるペプチド配列決定の根拠となる MS/MS のフラグメンテーションプロセスがペプチド配列に依存して変化し、必ずしも規則的でないためである。ただし、ペプチド配列に固有のスペクトル情報は得られるために、データベースに登録された既知ペプチドと比較することによって、その同定が可能である。しかしながら有毒生物の多くはマイナー生物であり、ゲノムなどの配列情報がデータベースにほとんど存在しない。これらの生物に含まれる未知ペプチドの解析には、現状では MS/MS 情報のみを用いた配列決定手法 (*de novo sequencing*) が必要である。

## 2. 研究の目的

ペプチドの配列解析は質量分析計を用いて広く行われているが、前述したように信頼性の面で問題があり、配列情報が未知のペプチドの解析に対してはエドマン分解法に完全に取って代わるまでには至っていない。 *de*

*novo sequencing* における具体的な問題点は、「フラグメント化が不完全である」とことと、「フラグメントの帰属が難しい」とことにある。近年の新たなフラグメンテーション手法を取り入れた質量分析計の開発によって、ある程度この問題は克服されているが、それでも完全とは言えない。このような質量分析装置の弱点を補う有効な手段として化学修飾法がある。

これまでに化学修飾のための試薬が開発されているが、その性能は満足のものではなかった。代表研究者らは最近、ペプチド N 末端アミノ基を、高いプロトン親和性をもつ構造 (例えば 4-アミジノ安息香酸) で修飾することにより、N 末端側のフラグメントを優先的に生成させ、より解釈しやすいスペクトルへと改善することに成功している。この手法により、ペプチドの配列決定精度を格段に向上させることができる。しかし本手法をペプチドミクスへ応用するためには解決すべき課題がいくつか残されていた。一つは、修飾部位の反応選択性である。ペプチドには、N 末端とリジン側鎖にアミノ基が存在するが、化学修飾は N 末端選択的に行う必要がある。この問題に対しては、二種類のアミノ基のわずかな  $pK_a$  の違いを利用して、N 末端アミノ基のみを優先的に修飾する方法があるが、その選択性は一般的にあまり高くない。また二つ目の問題として、同じ質量を持つロイシン (Leu)・イソロイシン (Ile) の判別がある。近年よく用いられるフラグメンテーションの手法は、低エネルギー衝突誘起解離であるが、この場合アミノ酸側鎖の開裂は通常起こらないため、判別は不可能である。一方、高エネルギー衝突誘起解離を用いればこの開裂が観測され、判別は可能となる。しかしながら、この開裂が常に起こるわけではなく、配列の末端領域に高い塩基性をもつアミノ酸残基の存在が必須である。

本研究では、まず化学修飾試薬の N 末端アミノ基への選択的導入法の確立を目的として、酸化的アミド化反応を用いた方法の開発を試みた。また、高エネルギー衝突誘起解離の条件下で Leu・Ile 判別を容易にする化学修飾構造について検討した。さらに、これらの手法を用いて、*de novo sequencing* 法によるサソリ毒液由来の抗菌性ペプチドの同定を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 酸化的アミド化反応を用いた N 末端選択的  
化学修飾法

芳香族アルキンを、マンガンが配位したポルフィリン触媒および  $H_2O_2$  と反応させると、ペプチドの N 末端アミノ基が選択的に修飾されることがすでに報告されている (図1)。本研究では、修飾によってより解釈しやすいスペクトルを与える効果のある 4-アミジノフェニル基の選択的導入条件について検討した。

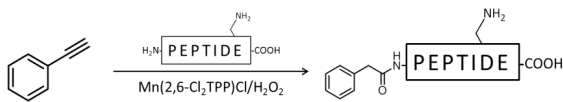


図1 酸化的アミド結合形成反応

### (2) 高エネルギー衝突誘起解離条件下で Leu・Ile 判別を容易にする化学修飾構造

塩基性の高い構造を含む種々の化合物(図2)を Leu・Ile 含有ペプチド(配列:AAGLQIA)のN末端に導入し、その高エネルギー衝突誘起解離条件下での Leu・Ile 側鎖開裂由来のイオンである d イオンの検出強度を比較することによってその効果を評価した。

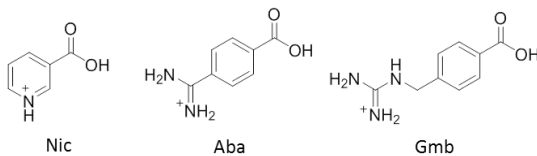


図2 N末端修飾に用いた化合物

### (3) マダラサソリ毒液由来の抗菌性ペプチドの探索・同定

サソリ毒液由来の抗菌性ペプチドは、疎水性が高く、ジスルフィド結合をもたないものが多い。そこで、まず逆相 HPLC を用いて毒液を 20 の画分に分け、最も保持時間の大きい画分を得た後、これを還元アルキル化反応に供し、反応の前後で質量の変化を調べた。質量変化のないペプチドはジスルフィド結合を持たないため、これらを抗菌性ペプチドの候補と考えた。これらのペプチドについて、低エネルギーおよび高エネルギー衝突誘起解離条件において分析を行い、得られたプロダクトイオンスペクトルから配列を決定した。さらに、ロイシンとイソロイシンの判別のために、高エネルギー衝突誘起解離条件下でアミノ酸側鎖の開裂促進効果のあることが判明した Gmb を導入して同様に分析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 酸化的アミド化反応を用いた N 末端選択的修飾法

まず 4-ethynylbenzamide(表1, A)を合成し、ペプチド修飾反応を行ったところ、N 末端選択的な導入は見られたものの、その導入効率は低く、副生成物が多く生成した。そこで、芳香族アルキンの置換基とペプチドへの導入効率の関係を調べたところ、置換基の  $\sigma$  値が小さいほどペプチドへの導入効率が高くなることが判明した。これは、 $\sigma$  値が大きくなると反応中間体であるケテン体の反応性が上がり、副反応が優先して起こることが原因だと考えられた。したがって、 $\sigma$  値を 0 付近に保ちつつ、4-アミジノフェニル基を含む芳香族アルキンを用いる必要があると考え、N-(4-ethynylphenyl)-4-amidinobenzamide (E) を合成したところ、N 末端選択的に反応が進行し、本手法によって、4-アミジノフェニル基の N 末端

選択的な導入が可能であることが明らかとなった。

表1 置換基とペプチドへの導入効率の関係

R-	$\sigma_p$ 値	ペプチドへの導入効率
(A)	0.65	-
(B) H-	0.00	++
(C) Br-	0.23	+
(D) NC-	0.67	-
(E)	0.01	++

### (2) 高エネルギー衝突誘起解離条件下で Leu・Ile 判別を容易にする化学修飾構造

低エネルギー衝突誘起解離条件下でフラグメンテーションの改善に有効であることが知られているニコチン酸 (Nic)、4-アミジノ安息香酸 (Aba)、およびアルギニン側鎖に含まれる構造 (グアニジノ基) をもつ 4-グアニジノメチル安息香酸 (Gmb) を、N 末端修飾化合物として用いた (図2)。高エネルギー衝突誘起解離条件下での MS/MS 測定の結果、未修飾および Nic 修飾体においては、Leu/Ile 判別に必要な d イオンの生成はわずしか見られなかった (図3)。これに対し、Aba 修飾体においては d イオンの生成が中程度に確認され、さらに Gmb 修飾体においては最も高い強度で d イオンが観測された。プロトン親和力は Nic、Aba、Gmb の順に高くなることから、d イオンの生成には Aba よりも高い塩基性が必要であることが分かった。

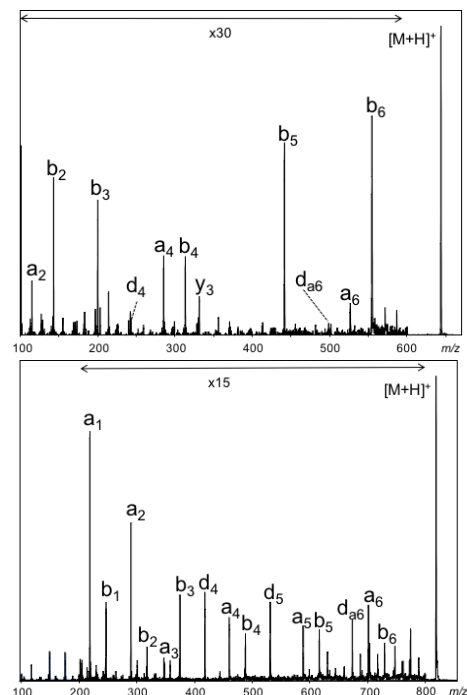


図3 プロダクトイオンスペクトルの比較 (上:未修飾、下 Gmb による修飾)

### (3) マダラサソリ毒液由来の抗菌性ペプチドの探索・同定

毒液から得られた疎水性の高い画分には還元・アルキル化反応前後で質量変化のないペプチドが多く含まれていた。その内、質量1698、2804 および 1707 Da の3つのペプチド（それぞれ Im-4、Im-5 および Im-6 と命名）について、未修飾の状態での低エネルギーおよび高エネルギー衝突誘起解離条件下でそれぞれ MS/MS 分析を行い、得られたプロダクトイオンスペクトルからアミノ酸配列を決定した。この段階では、一部の配列の同定および Leu/Ile 判別ができていなかったため、上記研究でアミノ酸側鎖の開裂促進効果のあることが示された Gmb を N 末端アミノ基に導入して再度高エネルギー衝突誘起解離条件下で分析を行った。その結果、すべての配列を完全に同定することができた（図4）。Im-4、Im-5 および Im-6 はそれぞれ 17、25 および 16 残基のペプチドであり、その一次構造について類似性検索を行った結果、Im-4 および Im-6 についてはそれぞれサソリ毒由来の抗菌性ペプチド TsAP-2 および mucroporin との類似性が高く、また、Im-5 についてはアリ毒由来のペプチド ponericin W1 との類似性が高く、これらが抗菌性ペプチドであることが強く示唆された。

Im-4: **FIGMIPGLIGGLISAIK-NH<sub>2</sub>**

Im-5: **FLGSLFSIGSKLLPGVIKLFQRKKQ**

Im-6: **FFFLPSLIGGLVSAIK-NH<sub>2</sub>**

図4 マダラサソリ毒液由来の抗菌性ペプチド

### 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1件）

Y. Nihashi, M. Miyashita, H. Awane, and H. Miyagawa, Differential <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N-Labeling of Peptides Using N-Terminal Charge Derivatization with a High-Proton Affinity for Straightforward *de novo* Peptide Sequencing, Mass Spectrometry, 査読有, 2, 2013, A0024  
DOI: 10.5702/massspectrometry.A0024

〔学会発表〕（計6件）

① 北中淳史、宮下正弘、中川好秋、宮川恒 「マダラサソリの毒液に含まれる抗菌性ペプチドの *de novo* シーケンス解析」第63回質量分析総合討論会、2015年6月17日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

② A. Kitanaka, M. Yakio, M. Miyashita, Y. Nakagawa and H. Miyagawa, Identification of novel antimicrobial peptides from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*, 第52回ペプチド討論会、2015年11月16日、平塚市中央公民館（神奈川県平塚市）

③ 北中淳史、宮下正弘、中川好秋、宮川恒 「マダラサソリの毒液に含まれる抗菌性ペプチド」第30回農薬デザイン研究会、2015年11月12日、メルパルク京都（京都府京都市）

④ A. Kitanaka, M. Miyashita, A. Kubo, T. Sato, M. Toyoda, H. Miyagawa, N-terminal Charge Derivatization for Discrimination between Leu and Ile in Peptides by High-Energy CID MS/MS Analysis, 20th International Mass Spectrometry Conference, 2014年8月26日、ジュネーブ（スイス）

⑤ 北中淳史、宮下正弘、久保歩、佐藤貴弥、豊田岐聡、宮川恒 「高エネルギーCID MS/MS 分析によるペプチド中の Leu/Ile の判別における N 末端修飾の効果」第62回質量分析総合討論会、2014年5月14日、ホテル阪急エキスポパーク（大阪府吹田市）

⑥ 北中淳史、宮下正弘、宮川恒 「MS/MS 分析によるペプチド中の Leu/Ile の判別における N 末端修飾の効果」日本農芸化学会 2014 年度大会、2014年3月30日、明治大学（神奈川県川崎市）

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

宮川 恒 (MIYAGAWA, Hisashi)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：10219735

#### (2)研究分担者

なし

#### (3)連携研究者

宮下 正弘 (MIYASHITA, Masahiro)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：80324664