

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82627

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410190

研究課題名(和文)2次元クロマトグラフィーと超高感度アミノ酸分析による翻訳後修飾の絶対定量法の研究

研究課題名(英文)Quantification of post-translational modified amino acids by 2D-HPLC and ultra-sensitive amino acid analysis

研究代表者

益田 晶子 (Masuda, Akiko)

国立研究開発法人海上・港湾・航空技術研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：10322679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質はDNA遺伝情報を元に生成されたあと、タンパク質の様々な機能発現に関与した化学修飾を受ける。これを翻訳後修飾(PTM)という。このPTMとタンパク質の機能との関係を解明することは重要であるが、どのような修飾を受けるかは遺伝情報に書かれていないため、タンパク質内で修飾されたアミノ酸を分析する必要がある。この修飾アミノ酸は微量であることが多く、これまで定量的な分析は困難だった。本研究では、タンパク質からアミノ酸への定量的な加水分解方法、分離能を高めるための2次元クロマトグラフィーの開発を行い、超高感度アミノ酸分析法と組み合わせることで、翻訳後修飾を受けたアミノ酸の絶対定量法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Proteins are chemically modified after translation based on genetic information of DNA, the modifications which are related to the expression of various functions of proteins. The modifications are referred to as post-translational modifications (PTMs). It is important to elucidate the relationship between PTMs and protein functions. In order to analysis of PTMs, modified amino acids themselves must be quantified since there is no description in DNA of what kind of modifications are executed. Until now, however, it has been difficult to quantify the modified amino acids because only small amounts of them are contained. In this study, quantitative hydrolysis method of proteins to amino acids and 2-dimensional HPLC to improve the resolution of analysis were developed. Combining these techniques with ultra-sensitive amino acid analysis, the analysis method was established for absolute quantification of modified amino acids.

研究分野：分析化学

キーワード：アミノ酸分析 翻訳後修飾 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳後修飾 (PTM) は様々な生体制御機構に関与しており、PTM とタンパク質機能との相関、エピジェネティックな遺伝子制御への寄与など、いまだに新しい発見が続いている。こういった制御機構は PTM の可逆的な性質によって成立しているため、時間的な変動や、拮抗するほかの修飾からフィードバック制御を受けることで、PTM はタンパク質内でヘテロな状態で存在することが多い。このような修飾パターンの変化、差異がタンパク質機能を制御するだけでなく、ヒストン修飾を介して、エピジェネティックな遺伝子制御へも関与していると示唆されており、PTM の精密な定量分析法が望まれている。

一般的に、プロテオーム研究における網羅的なタンパク質の同定と相対量変動解析、PTM 解析には質量分析法が用いられている。分析データをゲノムデータベースと照合して解析し、迅速にタンパク質同定ができるほか、ある特定の PTM を仮定して照合を行うことで、ターゲットとした PTM を非常に特異的に高感度で検出することが可能である。その一方で、修飾の有無によるイオン化効率の違いなどから、PTM の絶対量を定量することは容易ではなく、特にヘテロな状態で存在する PTM に関しては同定することも難しい。これに対し、アミノ酸分析法は、タンパク質を加水分解し、生じた構成アミノ酸をクロマトグラフィーで分離し同定し絶対量を正確に定量する手法であるため、ヘテロな PTM (たとえば、アルギニン残基の一部がモノメチル化、一部がジメチル化しているような場合) であっても定量することが可能である。ただし、PTM を受けたアミノ酸は微量であることが多く、大量に存在する未修飾アミノ酸とどのように分離して分析するかが課題であった。

2. 研究の目的

本研究では絶対定量が行えるアミノ酸分析とクロマトグラフィーの 2 次元化によって、選択的に PTM アミノ酸を定量する手法を確立する。また、正確にアミノ酸を定量するためには、定量的なタンパク質の加水分解方法が必要である。そのために簡便で定量的にタンパク質を加水分解できるよう、新たに固体酸触媒を用いた加水分解法を開発し、従来の塩酸では不可能であったタンパク質加水分解の自動化を行う。これらの技術開発によって PTM の精密定量を可能にする。

3. 研究の方法

(1) 定量的な加水分解方法の開発

タンパク質の PTM アミノ酸を正確に定量するためには、まず定量的にタンパク質の加水分解が行われることが必要であり、特に極微量の PTM を定量するためには外部からのコンタミネーションを防ぐためにも自動化

ができること。しかし液体の酸 (塩酸) では機械化は困難なため、固体酸触媒を用いた加水分解方法を確立する。

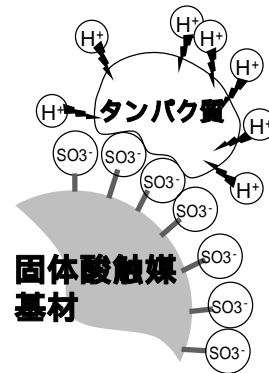


図 1. 固体酸触媒を用いた加水分解の概念

(2) 2 次元クロマトグラフィーによる分離能向上

目的の PTM アミノ酸を選択的に検出するため、異なるモードのクロマトグラフィーを組み合わせた 2 次元クロマトグラフィー法を確立することで高分離を実現する。

4. 研究成果

(1) 液体サンプル用の固体酸触媒による加水分解

スチレン・ジビニルベンゼン共重合体を基材とする強陽イオン交換樹脂を用い、バッチ法でタンパク質の加水分解テストを行った。加水分解時間を変えて回収率、アミノ酸組成を評価したところ、従来の塩酸法と同等のアミノ酸回収率を得るためには、加熱温度は 150、加熱時間は 1 時間が最も良いことがわかった。また、樹脂の加水分解能力を調べるため、一定量の樹脂 (樹脂 50% 懸濁液を 10 マイクロリットル) を用いてタンパク量を変えて加水分解実験を行ったところ、牛血清アルブミン (BSA) は 100 マイクログラム程度まで定量的に加水分解ができることが明らかになった。また樹脂からの回収率は抽出溶液にも依存するため、抽出液の最適化を行ったところ、1N の水酸化ナトリウム水溶液で効率よく抽出できることがわかった。さらに、一定量の BSA に対し樹脂量を増やしていくと回収率が減少することから、タンパク量/樹脂比が重要であることもわかった。これらの結果から、固体酸触媒を用い、適切な条件で加水分解とアミノ酸抽出を行えば、定量的なタンパク質加水分解およびアミノ酸組成分析が可能であることを示せた。

この樹脂をカラムに充填しカラム内加水分解を行った。回収率はバッチ法よりも低く 70% ~ 50% 程度だった。これはインジェクション時に素通りしてしまう成分があるからであることがわかったため、樹脂とタンパク質溶液の接触面積を増やすため樹脂粒径を小さくするなどの対策が必要である。

(2) 膜状固体酸触媒による加水分解

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) で分離したサンプルをポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜に電気的にプロットングして膜上に転写したものを分析するための膜状固体酸触媒の作成と評価を行った。膜状の固体酸触媒とするため、PVDF 膜を基材とし官能基を導入した。官能基は同じフッ素系のポリマーであるスルホン化ポリマーを PVDF 膜に積層することで導入した。膜に対するスルホン化ポリマーの量や積層方法について加水分解効率が最大になるよう最適化を行った。また加水分解後のアミノ酸溶出方法についても、pH を振って検討を行った結果、pH8-9 程度の塩基性緩衝溶液で効率よくアミノ酸が回収できることを見出した。

作成した膜状固体酸触媒に、まずタンパク溶液をドットプロットすることでサンプルを添加し加水分解を行った。その結果、10pmol 程度のタンパク量で十分に定量的に加水分解が行えることがわかった。そこで、SDS-PAGE ゲルから電気的にプロットングしたタンパク質バンドを切り出し、スルホン化ポリマーを積層し加水分解を行った。その結果、1 バンドあたり 1.5pmol から 20pmol 程度のタンパク質で、従来法の塩酸法と同等のアミノ酸組成を得ることができた。また得られたアミノ酸組成からタンパク質データベースを検索することでタンパク質の同定も可能だったことから、定量的なアミノ酸組成が得られたことを示すことができた。

また、前述の溶液用の固体酸触媒では耐熱性が低いために、反応温度を上げることができなかったが、膜状固体酸触媒では 150 まで温度をあげることができるため、加水分解時間を従来の塩酸法の 20 時間から 2 時間に短縮できた。

(3) 2次元クロマトグラフィー

翻訳後修飾を受けたアミノ酸は多くの場合、未修飾の通常アミノ酸に比べ非常に量が少ない。そこで修飾アミノ酸を精度よく選択的に検出するため、大量に存在する未修飾アミノ酸や夾雑物ピークをあらかじめ分離できるように、クロマトグラフィーの2次元化を行った。1次元目にはカーボンカラムによる吸着クロマトグラフィーを用い、アミノ酸を分離・分取し、次に、回収した各フラクションのアミノ酸を蛍光誘導体化した後、2次元目の逆相クロマトグラフィーで分離し検出することとした。アミノ酸標準溶液を用い、1次元目の吸着カラムでのアミノ酸ごとの損失を調べた結果、ヒスチジン、メチオニン、プロリンで回収率が低いことが明らかになった。しかし、注入量 10nmol 以上では回収率がほぼ 100%となった。また、標準タンパク質である BSA を用い、加水分解後のサンプルを2次元クロマトグラフィーにかけた場合と、2次元目のみで分析した場合で比較し

たところ、ヒスチジン以外の回収量はほぼ一致した。一方、2次元目のみでは夾雑物の妨害を受けチロシンの定量が難しかったが、2次元化することで、定量可能になった。

実サンプルとして、HL-60 細胞から酸抽出したヒストンを用い実験を行った。ヒストンをポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) で分離し、ポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜に電気的にプロットングして膜上に転写した。このうちヒストン H3.3 および H4 のバンドを切り出して加水分解後、1次元目のクロマトグラフィーにかけてフラクションを分取した。分取したサンプルの一部を蛍光誘導体化試薬である 6-アミノキノリル-N-ヒドロキスクシニミジルカルバメート (AQC) を用いて蛍光ラベル化し、2次元目の逆相クロマトグラフィーで分離・定量を行った。比較のために、1次元目なしで加水分解後、直接 AQC でラベル化し、逆相クロマトグラフィーで分離・定量を行った。その結果、2次元化することで、ヒストン H3.3 からは、1次元目なしでは検出されなかったモノメチルリジンが、ヒストン H4 からは、モノメチルリジンに加え、非対称ジメチルアルギニン、対称ジメチルアルギニンが検出された。このように、クロマトグラフィーを2次元化することで、1次元では夾雑物などによって検出できなかった翻訳後修飾アミノ酸を検出することに成功した。

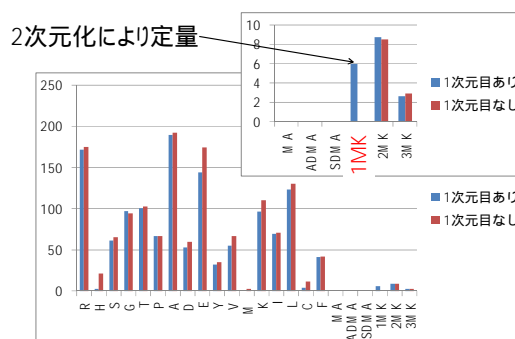


図 2. HL-60 細胞より抽出したヒストン H3 のアミノ酸残基数。クロマトグラフィーを2次元化することで、モノメチルリジンを定量することが可能になった。

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 2 件)

(1) Yanagisawa T, Takahashi H, Suzuki T, Masuda A, Dohmae N, Yokoyama S, Neisseria meningitidis translation elongation factor P and its active-site arginine residue are essential for cell viability, PLoS ONE, 査読あり, 11(2),2016, e0147907.

DOI:10.1371/journal.pone.0147907

(2) 堂前直、アミノ酸分析の膜タンパク質構造解析への応用、アミノ酸研究、査読なし、10 巻、2016,67-69.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 堂前直、益田晶子、固体酸触媒を利用したタンパク質加水分解、第 4 回日本アミノ酸学会・産官学連携シンポジウム、2014 年 6 月 16 日、東京都・文京区

(2) 益田晶子、堂前直、自動・迅速アミノ酸分析を可能にする固体酸触媒をもちいた加水分解方法の検討、日本分析化学会第 63 年会、2014 年 9 月 19 日、広島県・東広島市

(3) 鶴木元香、益田晶子、堂前直、中村祐輔、佐々木裕之、ヒストンリジン残基の水酸化修飾の発見と DNA メチル化に関する新しい因子の発見、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年 6 月 9 日、福岡県・福岡市

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：付着物の定量分析による防汚性能評価方法及び防汚性能評価システム

発明者：益田晶子、堂前直

権利者：国立研究開発法人海上・港湾・航空技術研究所

種類：特許権

番号：特願 2017-065200

出願年月日：平成 29 年 3 月 29 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

益田 晶子 (MASUDA AKIKO)

国立研究開発法人海上・港湾・航空技術研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：10322679

(2)研究分担者

堂前 直 (DOHMAE NAOSHI)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：00321787