

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26505016

研究課題名(和文) 質量分析法による金属結合タンパク質の構造解析

研究課題名(英文) Analysis of Metal-binding Proteins by Mass Spectrometry

研究代表者

浅川 大樹 (Asakawa, Daiki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・分析計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号：60584365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：金属結合タンパク質の構造解析手法開発の基礎研究として、金属-ペプチド複合体の質量分析におけるフラグメンテーション過程について研究を行った。まずペプチドの電子移動解離タンデム質量分析法において金属塩添加により生成する金属-ペプチド複合体をブレッカーサーイオンとして用いることでアミノ酸配列を反映する良好なスペクトルが得られることを明らかにした。このメカニズムについて検討するために計算化学を用いて、遊離プロトンを含まない金属-ペプチド複合体を計算化学により設計し、メカニズムを明らかにした。さらにこのメカニズムを応用し、リン酸基と特異的に結合する金属錯体を用いリン酸化ペプチドの配列解析法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Electron transfer dissociation (ETD) tandem mass spectrometry have been used as analytical method for characterization of protein. Since ECD/ETD involved the recombination between peptide ion and electron/anion, employing ions with a higher charge state as the precursor dramatically increases the yield of radical reactive species and thereby improving the sequence coverage obtained with ETD. However, the charge state of peptides is dependent on the peptide sequence, especially on the number of basic residues. For analysis of tryptic peptides, the N-terminal amino group and the C-terminal basic residue are protonated, often yielding doubly protonated species. However, double protonation is not enough for the ion/electron reaction of ETD to yield better sequence coverage. We found that the use of a suitable metal salt in analyte solution would increase the charge state of tryptic peptide ions containing acidic residues and provide information useful for sequencing by ETD.

研究分野：分析化学、質量分析

キーワード：Analytical Chemistry Mass Spectrometry

1. 研究開始当初の背景

生命科学領域の研究は質量分析技術の発達に伴い、急速に発展している。現在は、1 fmol 程度の生体分子を同定することが可能となっている。この検出感度は他の分析手法の追随を許さない。ヒトゲノムが完全に解読されたことにより、ヒトの生体内に存在するタンパク質がカタログ化され、多数のタンパク質を網羅的に質量分析で同定するプロテオーム研究を行うことが可能となった。

このプロテオーム研究は、生体内に存在するタンパク質を抽出し、質量分析により検出、ゲノム情報により構築されたデータベースにより同定を行うという一連の流れからなる。このプロトコルからもわかるように、このデータベースで決定できるタンパク質の情報はアミノ酸の一次配列のみである。その一方、ほとんどのタンパク質は生体内で生合成された後に、リン酸化、糖鎖付加などの翻訳後修飾を受け、本来の機能を獲得する。さらに酵素などのタンパク質は活性中心として金属を含むことが多い。しかしながらタンパク質の翻訳後修飾や金属結合サイトを正確に決定するのは未だに困難である。

2. 研究の目的

タンパク質の分析に広く用いられているエレクトロスプレータンデム質量分析法を用い、タンパク質の翻訳後修飾や金属結合サイトを正確に決定する方法の提案を行う。タンパク質の翻訳後修飾の異常や金属イオン結合サイトの異常などにより、タンパク質が本来の機能を失い、疾患の原因となることは古くから知られているため、本手法の提案により疾患メカニズム解明や医薬品開発等に寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

タンパク質の分析に広く用いられているエレクトロスプレータンデム質量分析法を用い実験を行う。特に翻訳後修飾を含むタンパク質や金属結合タンパク質の構造解析に有用とされている電子移動解離タンデム質量分析法を基盤とした新規アミノ酸配列解析手法に関する実験を行う。

さらに電子移動解離における分解過程の解析を行うために、密度汎関数理論による理論計算を行う。

4. 研究成果

まず金属結合タンパク質の構造解析手法開発の基礎研究として、金属 - ペプチド複合体のフラグメンテーションについて研究を行った。まず、金属 - ペプチド複合体の構造解析には従来質量分析で用いられる衝突誘起解離法 (Collision Induced Dissociation, CID) よりも電子移動解離 (Electron Transfer Dissociation, ETD) が有効であることを明らかにした。加えて、ペプチドの ETD タンデム質量分析による構造解析においては、通常エレクトロスプレーイオン化

質量分析で生成する多価プロトン化分子よりも価数の大きい金属 - ペプチド複合体をプリカーサーイオンとして用いることで、より良好な結果を得ることができるようになった。さらに ETD におけるフラグメントイオンの生成プロセスから、金属 - ペプチド複合体における金属の結合位置の推測が可能であることを明らかにした。これらの成果は査読付き学術雑誌に 2 件の原著論文として発表している。(Asakawa, D., Takeuchi, T., Yamashita, A., Wada, Y., J. Am. Soc. Mass Spectrom. 25, 1029-1039, 2014 および Asakawa, D., Wada, Y., J. Phys. Chem. B 118, 12318-12325, 2014)

これは、金属 - ペプチド複合体の ETD タンデム質量分析において、フラグメンテーションの本質解明に繋がる重要な実験結果であると考え、計算科学を用い反応解析を行った。反応経路解析を行うために、分子内に遊離プロトンを含まない金属 - ペプチド複合体を作成することが必要である。私は計算化学 (密度汎関数理論) を用いて設計し、電子移動解離および電子捕獲解離タンデム質量分析による実験を行った。このモデル金属 - ペプチド複合体の分解過程について詳細に検討を行い、結果を論文として報告した。(D. Asakawa, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 27, 2016, 1165-1175 および D. Asakawa, A. Yamashita, S. Kawai, T. Takeuchi, Y. Wada, J. Phys. Chem. B 120, 2016, 891-901.)

これまでに明らかにしたメカニズムを応用し、リン酸基と特異的に結合する金属錯体を用いリン酸化ペプチドの配列解析法の開発を行った。金属錯体を添加することでリン酸化ペプチドを選択的にイオン化し、電子移動解離タンデム質量分析法によりアミノ酸配列解析を行うことが可能となった。この成果は Anal Chem 誌に論文発表を行った。(D. Asakawa, I. Osaka, Anal. Chem., 88, 2016, 12393-12402.)

また、金属結合タンパク質の構造解析に有用であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化イソース分解についても分解効率の評価法を提案し、J. Mass Spectrom. に二報の論文を発表した。(D. Asakawa, I. Osaka, J. Mass Spectrom. 52, 2017, 127-131 および D. Asakawa, N. Smargiasso, E. De Pauw, J. Mass Spectrom., 51, 2016, 323-327.) さらに、本分析手法について、総説執筆依頼を受け、Mass Spectrom. Rev. に発表を行った。(D. Asakawa, Mass Spectrometry, Mass Spectrom. Rev., 35, 2016, 535-556.)

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 8 件)

D. Asakawa, I. Osaka, Direct MALDI-MS Analysis of the Disulfide Bonds in Peptide Using Thiosalicylic Acid as a Reactive Matrix, J. Mass Spectrom., 査読有, vol.52, 2017, pp.127-131.

DOI: 10.1002/jms.3906
D. Asakawa, I. Osaka, -
High-Confidence Sequencing of
Phosphopeptides by Electron Transfer
Dissociation Mass Spectrometry Using
Dinuclear Zinc(II) Complex,
Anal. Chem., 査読有、vol.88, 2016,
pp.12393-12402.
DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03645
D. Asakawa, Principles of Hydrogen
Radical Mediated Peptide/Protein
Fragmentation during Matrix-Assisted
Laser Desorption/Ionization Mass
Spectrometry, Mass Spectrom. Rev., 査
読有、vol.35, 2016, 535-556.
DOI: 10.1002/mas.21444
D. Asakawa, E. De Pauw, Difference of
Electron Capture and Transfer
Dissociation Mass Spectrometry on Ni²⁺-,
Cu²⁺- and Zn²⁺-Polyhistidine Complexes
in the Absence of Remote
Protons, J. Am. Soc. Mass Spectrom.,
査読有、vol.27, 2016, 1165-1175.
DOI: 10.1007/s13361-016-1395-z
D. Asakawa, N. Smargiasso, E. De
Pauw, Estimation of Peptide N-C Bond
Cleavage Efficiency during MALDI-MSD
Using a Cyclic Peptide, J. Mass
Spectrom., 査読有、vol.51, 2016,
323-327.
DOI: 10.1002/jms.3748
D. Asakawa*, A. Yamashita, S. Kawai, T.
Takeuchi, Y. Wada, N-C Bond Cleavage
of Zinc-Polyhistidine Complexes in
Electron Transfer
Dissociation Mediated by Zwitterion
Formation. Experimental Evidence and
Theoretical Analysis of the
Utah-Washington Model, J. Phys. Chem.
B, 査読有、vol.120, 2016, 891-901.
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11118
D. Asakawa*, Y. Wada, Electron
Transfer Dissociation Mass
Spectrometry of Peptides Containing
Free Cysteine Using Group XII Metals
as a Charge Carrier, J. Phys. Chem. B,
査読有、vol.118, 2014, 12318-12325.
DOI: 10.1021/jp502818u
D. Asakawa*, T. Takeuchi, A. Yamashita,
Y. Wada*, Influence of Metal-Peptide
Complexation on Fragmentation and
Inter-Fragment Hydrogen Migration in
Electron Transfer Dissociation, J. Am.
Soc. Mass Spectrom., 査読有、vol.25,
2014, 1029-1039.
DOI: 10.1007/s13361-014-0855-6

〔学会発表〕(計5件)

浅川大樹、竹内孝江、山下明日香、和田
芳直、金属-ペプチドコンプレックス形成

が電子移動解離に与える影響、2014年5
月15日、第62回質量分析総合討論会、
大阪府吹田市

浅川大樹、山下明日香、和田芳直、竹内
孝江、金属-ペプチド複合体を用いた電
子移動解離質量分析法の本質解明に向け
たアプローチ、2015年6月17日、第63
回質量分析総合討論会、茨城県つくば市
浅川大樹、山下明日香、河合志希保、竹
内孝江、和田芳直、亜鉛ヒスチジン複合
体を用いた電子移動解離質量分析法の
本質解明に向けたアプローチ、2015年
12月7日、第5回新アミノ酸分析研究会、
東京都文京区

浅川大樹、Edwin De Pauw、プロトンを含
まない亜鉛-ポリヒスチジン複合体の電
子捕獲・電子移動解離過程、2016年5月
18日、第64回質量分析総合討論会、大
阪府吹田市

D. Asakawa, E. De Pauw, Difference of
Electron Capture and Transfer
Dissociation Mass Spectrometry on
Zn²⁺-Polyhistidine Complexes in the
Absence of Remote Protons, 2016年6
月6日、64th ASMS Conference, サンア
ントニオ、テキサス、米国

浅川大樹、大坂一生、金属錯体添加を利
用した電子移動解離タンデム質量分析法
によるリン酸化ペプチドのアミノ酸配列
解析、2016年11月4日、第6回新アミ
ノ酸分析研究会、東京都文京区

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: リン酸化タンパク質またはペプチドの
アミノ酸配列解析法

発明者: 浅川大樹

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2016-174673

出願年月日: 2016年9月7日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浅川 大樹 (ASAKAWA, Daiki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・分
析計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号 : 26505016