

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460684

研究課題名(和文) アミン反応性同位体タグによる血清タンパク質ストレス損傷の定量

研究課題名(英文) Quantification of stress-induced modification of serum protein using amine-reactive isotope tags

研究代表者

石田 哲夫 (Ishida, Tetsuo)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：10176191

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)：合成されたばかりのタンパク質には20種類以外のアミノ酸はほとんど含まれない。しかし、生体内では生理的や病理的な化学修飾(リン酸化や活性酸素種との反応など)が常に起こるので、化学的な傷がタンパク質に蓄積していく。このタンパク質の傷は生体内のストレスを反映するので、異常を知らせるバイオマーカーになる。そこで、本研究では、タンパク質を消化してアミノ酸にまで分解し、傷のついたアミノ酸の化学構造を同定し定量することを旨とした。その結果、重さだけが異なるタグ(ダブシル基)をアミノ酸につけることで基準試料と未知試料を正確に比較分析・定量する基礎技術が確立できた。

研究成果の概要(英文)：Newly synthesized proteins consist mainly of 20 proteinogenic amino acids. However, in the biological environments, proteins are chemically modified both by physiological mechanisms such as phosphorylation/dephosphorylation and by reaction with highly reactive compounds such as reactive oxygen species and glucose. Irreversible modifications are more heavily accumulated on the relevant proteins when higher biological stress exists. Therefore, it is clinically important to measure accurately protein modification.

In the present study, I aimed to quantify non-proteinogenic amino acids released from proteins by acid hydrolysis. Dabsyl groups with mass difference of 6 were used to discriminate amino acids derived from distinct samples. On the basis of capillary chromatography on a reverse-phase column combined with a conventional electrospray ion-trap mass spectrometer, the basics of simultaneous measurement of three samples has been established.

研究分野：生化学

キーワード：翻訳後修飾 ダブシルクロリド アミノ酸 質量分析 安定同位体ラベル キャピラリークロマトグラフィー 微量分析 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質は、新規に合成される時点では 20 種類のアミノ酸だけからなるが、合成が完了した直後から様々な化学修飾を受ける。例えば、活性酸素のように反応性の高い化合物にさらされると、タンパク質のシステインが酸化される。また、タンパク質の機能を生理的に調節するための化学修飾(リン酸化・メチル化・アセチル化・水酸化など)を受ける。タンパク質の化学的な傷の種類と程度は、生物の生理的・病理的状态の鋭敏に反映している。特に、不可逆的な化学修飾の蓄積はタンパク質の機能障害を引き起こし、病気の誘因となっていく。したがって、タンパク質の特異的・非特異的の化学修飾を網羅的かつ定量的に測定することがますます重要になってきていた。

(2) タンパク質の合成材料になるアミノ酸は 20 種類だけだが、アンモニアを安全に排出できる尿素に変える代謝経路(尿素サイクル)のシトルリンやオルニチン、記憶や学習の脳機能に必要な D-セリンなど、非常に多くのアミノ酸が体内で機能している。食材や身近な動物や植物が産生し利用するアミノ酸も含めるとその種類は 100 を超える。含有量もサブマイクロモル/リットルから数十ミリモル/リットルと 10 万倍以上の幅がある。したがって、これらを網羅するアミノ酸分析は非常にチャレンジングなテーマで、世界中で分析方法の改良や新規分析方法の開発が活発に行われていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、既知のアミノ酸だけでなく未知のアミノ酸も一括して同定し分別定量する方法を開発し、その有効性を検証することを目指した。具体的には、自家合成した 3 つ組の安定同位体ラベル剤 ($^{13}\text{C}_0$ -、 $^{13}\text{C}_6$ -、 $^{13}\text{C}_{12}$ -ダブシルクロリド)を用いて 3 つのサンプル(このうちの 1 つは濃度既知の標準アミノ酸混合液)を重さの異なるダブシルクロリドで別々にラベルした後ひとつにまとめ、それを液体クロマトグラフィーで分離し、質量分析装置で重さの違いで分離してトリプレットまたはダブレットピークとして検出する。この測定原理の実用化を目指した。

(2) 本研究遂行中に医学部から理学部に移籍したことをきっかけに、ヒト由来のサンプルだけでなく、身近な植物や動物中のアミノ酸(ミモシンや α -メチルアミノ-L-アラニンなど)も分析対象とした 1 ミリグラムのサンプル中の遊離アミノ酸が測定できることを目標に追加した。

3. 研究の方法

(1) タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸と内部標準としての α -アミノ酪酸と $^{13}\text{C}_2$ -グリシンの 22 アミノ酸を基本アミノ酸ゲル

ープとして用い、ラベル反応の最適な諸条件を探索した。実証実験では、アフリカマイマイ(巨大陸生カタツムリ)の血リンパ(ヒトの血液に当たる)や粘液・プラナリアからメタノールでアミノ酸を抽出して用いた。

(2) 分析カラムには、オクタデシル基を結合させた粒径 3 マイクロメートルのシリカゲルを充填した内径 0.3 ミリメートルで長さ 150 ミリメートルのキャピラリーカラムを用いた。分離溶媒には、0.1%トリフルオロ酢酸を含む純水(溶媒 A)と 0.1%トリフルオロ酢酸を含む 90%アセトニトリル/10%純水混合液(溶媒 B)とを用いた。流速は 3 マイクロリットル/分で、溶媒 B の割合を時間とともに上げることでダブシルラベルされたアミノ酸を分離した。検出には、ナノエレクトロスプレー装置を装着した汎用のイオントラップ型質量分析装置を用いた。

(3) 大量に生成するラベル反応副生成物のメチルオレンジを完全に除去するため、オクタデシル基を結合させたシリカモノリスによる固相抽出を行った。

4. 研究成果

(1) ダブシルクロリド溶液は 0.01%トリフルオロ酢酸を含むアセトン溶液として調製する。

ダブシルクロリドはほとんどの溶媒に対する溶解度が低く、1 ミリリットルのアセトンに 4 ミリグラムを完全に溶解するのは困難であった。そこで、アセトンに少量のトリエチルアミンを加えたところ、短時間の攪拌で溶解した。しかし、この溶液ではトリエチルアミンが塩基触媒として働き、湿気による加水分解でダブシルクロリドがメチルオレンジにすぐに分解されてしまうことが分かった。次に、1 ミリリットルのアセトンに対してトリフルオロ酢酸を終濃度が 0.01%になるように加えたところ、湿気による加水分解が抑制され何日も安定な試薬ストックが得られることが分かった。

(2) ダブシルラベル反応は、0.1 モル/リットルの重炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.0、で再溶解したサンプルにダブシルクロリド溶液を 2 回に分けて加え、60 10 分間行う。

アミノ酸のプロトンが結合していない状態のアミノ基のみがダブシルクロリドと反応するので、この点からは pH が高いほどよく反応する。しかし、pH が高くなるほど水酸化物イオンの濃度が高くなり、ダブシルクロリドの加水分解速度が速くなる。そこで、pH 9.0 を選択し、加水分解で減少したダブシルクロリドを途中で補充するために 2 回に分けて試薬を加える方法にした。試薬との反応速度はアミノ酸によって大きく異なり、プロリンが非常に速く反応し、グリシンが次に速いことが分かった。

(3) オクタデシル基を結合したシリカモノリスキャピラリーカラムを用いてラベル反応後サンプルの脱塩とメチルオレンジの完全除去を行い、全量を分析に供する。

報告されているアミノ酸分析のすべては、内径が1ミリメートル以上のセミマイクロカラムを使用しており、ラベル後のサンプルをそのまま、または適当な溶媒で希釈して、高々5マイクロリットルを分析に供している。それ以上カラムに注入できないのは以下の理由による。大量の未反応試薬または試薬の加水分解産物が副産物として生じるのは、どのラベル試薬でも原理的に避けられない。したがって、これらが大量に分析カラムに入ると正常なクロマトグラムが得られなくなるからである。この状況は、キャピラリーカラムではもっと深刻になることが判明した。そこで、ダブルシリカアミノ酸を失うことなく完全にメチルオレンジを除去する方法を探索した。

その結果、0.1%トリフルオロ酢酸の強酸性下で、キャピラリー-C₁₈シリカモノリスカラムによる固相抽出に成功した。溶媒Bが16.7%の条件でメチルオレンジのみを完全に除去することができた。これにより、ラベルサンプルの全量をキャピラリーカラムに注入できるようになり、分析感度が飛躍的に高くなった。

(4) 定量性の確認

ラベル反応は、試薬の加水分解が競合し、各アミノ酸で試薬との反応速度も異なるので非常に複雑である。それぞれのアミノ酸の量を精確に測定できるかどうかは自明ではない。そこで、既知濃度のアミノ酸混合液をテスト試料として定量性を検証した(図1)。

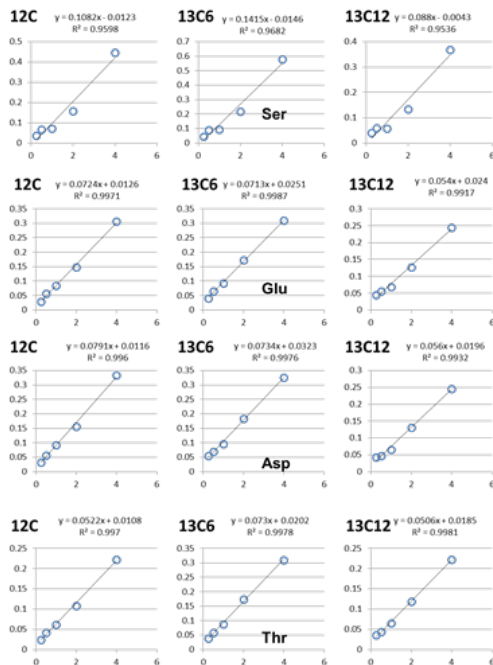


図1 アミノ酸の検量線

0.5-5 ナノモルの濃度領域でどの重さのラベル試薬に対しても良好な検量線が得られ

ている。50-500ピコモルの濃度領域でも多くのアミノ酸に対して直線の検量線が得られ、定量性が実証された。ただし、リシンやアルギニンなど一部のアミノ酸についてはさらに検討が必要である。

(5) 生体試料による検証

プラナリアの無性固体は生殖臓器を持たず、体重は5ミリグラム程度で、自切して欠損部分を再生して増殖する。その有性個体は生殖臓器を持ち有性生殖で増殖する。この比較的小さな生物で個体別にアミノ酸の含有量を定量することで、本研究で開発した方法を検証した(図2)。

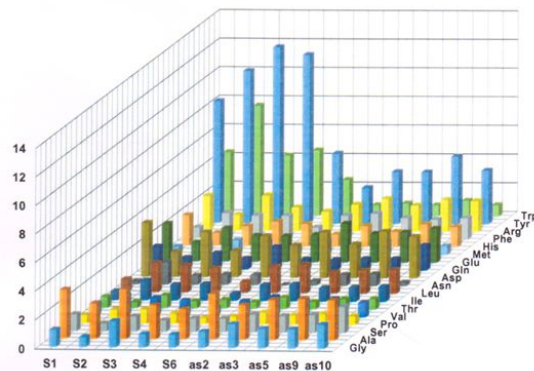


図2 プラナリアのアミノ酸含有量(ナノモル/5ミリグラム体重)

個体別にアミノ酸含有量を測定することができた。有性個体がトリプトファンとチロシンを無性固体の数倍以上有することが分かった。

(6) 今後の展望

本研究で構想したアミノ酸定量の基本コンセプトを証明し、実際に微量サンプルに対して応用できることを示すことができた。しかし、塩基性アミノ酸を含む一部のアミノ酸については、定量可能な濃度範囲が狭く、その原因を明らかにしてさらに改善する必要がある。

タンパク質の損傷の種類と程度を定量するという当初の目標によりやくとりかかるところまでアミノ酸分析方法を確立することができた。今後は、タンパク質やペプチドをアミノ酸に加水分解する最適な方法をアルブミンなどモデルタンパク質で探索する。

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 3件)

石田 哲夫, フラビン酵素の低酸素下で増強する基質活性化と阻害、生化学、査読有、87、2015、315-320

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870315

Maezawa, T., Tanaka, H., Nakagawa, H., Ono, M., Aoki, M., Matsumoto, M., Ishida, T., Agata, Y., Horiike, K., Kobayashi, K. Planarian D-amino acid oxidase is involved in ovarian development during sexual induction. Mechanism of Development, 査読有、132、2014、69-78
DOI: 10.1016/j.mod.2013.12.003

Nishimura, Y., Tanaka, H., Ishida, T., Imai, S., Matsusue, Y., Agata, Y., Horiike, K. Immunohistochemical localization of D-serine dehydratase in chicken tissues, Acta Histochemica、査読有、116、2014、244-249
DOI: 10.1016/j.acthis.2013.12.011

〔学会発表〕(計12件)

石田 哲夫、天願 竣治、安田 翔、トリプル安定同位体ダブルシルラベルによる微量スケールアミノ酸分析法の開発、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会合同大会、2015.12.02、神戸ポートアイランド(兵庫県)

天願 竣治、安田 翔、石田 哲夫、ダブルシルヒドラジンをを用いた2-オキソ酸の定量法の開発とその応用、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会合同大会、2015.12.02、神戸ポートアイランド(兵庫県)

安田 翔、天願 竣治、石田 哲夫、アフリカマイマイ *Achatina fulica* 粘液中のL-アミノ酸酸化酵素の精製とその酵素学的性質の解析、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会合同大会、2015.12.02、神戸ポートアイランド(兵庫県)

下地 康介、石田 哲夫、巨大陸生カタツムリ *Achatina fulica* のD-セリン分解酵素の探索、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会合同大会、2015.12.02、神戸ポートアイランド(兵庫県)

安田 翔、天願 竣治、石田 哲夫、アフリカマイマイ *Achatina fulica* 粘液中のL-アミノ酸酸化酵素の精製、第15回日本蛋白質科学会年回、2015.6.25、あわぎんホール(徳島県)

石田 哲夫、安田 翔、天願 竣治、フラビンオキシダーゼの酸素依存性基質阻害・活性化の理論的解析、第15回日本蛋白質科学会年回、2015.6.25、あわぎんホール(徳島県)

吉岡 博史、石田 哲夫、谷 泰史、三原 久明、大腸菌ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼの嫌気下での精製と機能解析、日

本農芸化学会2014年会、2014.3.28、明治大学生田キャンパス(東京)

石田 哲夫、質量差6のトリプルタグによるアミノ基含有化合物の精確な定量、BIOtech 2013 アカデミックフォーラム、2013.0509、東京ビッグサイト(東京都)

石田 哲夫、田中 裕之、西村 嘉洋、坂本 健補、堀池 喜八郎、ヒト血清アルブミンへのダンシルアミノ酸の結合機構、第13回日本蛋白質科学会年回、2013.6.13、とりぎん文化会館(鳥取県)

石田 哲夫、田中 裕之、西村 嘉洋、坂本 健補、堀池 喜八郎、安定同位体標識ダブルシルクロリドを利用したアミン類代謝動態解析、2013年酵素・補酵素研究会、2013.6.21、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県)

千田 美紀、西澤 明人、木村 成伸、石田 哲夫、福田 雅夫、千田 俊哉、補酵素FADの構造変化がフェレドキシン還元酵素BphA4の全体構造変化に与える影響、第86回日本生化学会大会、2013.9.12、パシフィコ横浜(神奈川県)

田中 裕之、石田 哲夫、西村 嘉洋、坂本 健補、堀池 喜八郎、脊椎動物の進化とD-セリン代謝、第86回日本生化学会大会、2013.9.12、パシフィコ横浜(神奈川県)

〔図書〕(計1件)

Ishida, T., Frontal gel filtration, Advanced methods in structural biology, Chapter 14, Springer Japan (印刷中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 哲夫 (ISHIDA, Tetsuo)

琉球大学・理学部海洋自然科学科化学系・教授

研究者番号: 10176191