

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05575

研究課題名（和文）硫酸化プロテオミクス基盤技術の開発

研究課題名（英文）Development of Sulfoprotein Analytical Methods

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・計量標準総合センター・上級主任研究員

研究者番号：60584365

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、強酸性であり特に解析が困難な硫酸化タンパク質の分析を目的とし、硫酸化プロテオミクスを行うための基盤技術、つまり負イオンを対象としたラジカル分解質量分析法に関する研究を行った。特に、電子や水素ラジカルを使用したラジカル分解法によるペプチドの解離メカニズムを明らかにし、当該手法がペプチド負イオンの分析に有用である理論的根拠を示した。これらの基礎研究で硫酸化タンパク質をはじめとした酸性タンパク質の分析結果を容易に同定することが可能となり、硫酸化プロテオミクスの基盤となる質量分析技術を構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体中に存在するタンパク質のチロシン残基のおおよそ1%が硫酸化を受けていると報告されている重要なタンパク質翻訳後修飾である。質量分析法の発展により、生体中に含まれるタンパク質の網羅的な計測、プロテオミクス研究が可能となったが、ほとんどの研究報告がタンパク質の正イオンのみを対象としている。硫酸化を受けたタンパク質は強酸性であるため、正イオンを計測対象とした質量分析法では検出が困難である。硫酸化タンパク質をはじめとした酸性タンパク質の網羅的な計測のために開発が急務であった負イオンを対象としたラジカル分解質量分析法を開発した。

研究成果の概要（英文）：The sulfoproteins are difficult to analyze by mass spectrometry with positive-ion operation due to their strong acidic nature. In this study, I examined a mass spectrometry method with radical-induced dissociation for negative ions, with the aim of analyzing sulfated proteins.

In particular, I clarified the dissociation mechanism of peptides by radical degradation using electron radicals and hydrogen radicals, and provided theoretical basis for the usefulness of this method for negative ion analysis of peptides. These basic studies made to establish mass spectrometry techniques as a basis for sulfated proteomics.

研究分野：分析化学

キーワード：質量分析 気相イオン ラジカル タンパク質

## 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。この検出感度と検出の網羅性は他の分析法の追従を許さず、質量分析法は生体分子の検出に最適な手法であると期待されている。さらに近年、様々な生物のゲノムが解読されており、生体内に存在するタンパク質がカタログ化されている。このゲノム情報に由来する「データベース」と質量分析法によって得られた「タンパク質の質量」と突き合わせることで、生体分子の網羅的な同定が可能となってきている。一方で、タンパク質が生合成されたのちに受けるリン酸化、硫酸化、糖鎖付加などの翻訳後修飾も、生命現象に大きな影響を与えることが明らかとなってきたが、この翻訳後修飾はゲノム情報に由来する「データベース」には記載されていないため、タンパク質の翻訳後修飾の分析は質量分析のみに頼らざるを得ないのが現状である。質量分析法の高度化が必要とされている。

## 2. 研究の目的

タンパク質の翻訳後修飾の解析には、タンパク質のラジカル分解法と質量分析法を組み合わせた手法が有効である。しかしながら、タンパク質のラジカル分解法に関するほとんどの研究報告はタンパク質の正イオンのみを対象としており、正イオンになりにくい酸性タンパク質の解析への適用は困難である。以前の報告によると、生体中に存在するタンパク質のチロシン残基のおおよそ1%が硫酸化を受けており、タンパク質の硫酸化は重要な翻訳後修飾であると推察される。このチロシン硫酸化は3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸を基質としてタンパク質チロシン硫酸転移酵素によって触媒される。硫酸化タンパク質の機能としては、抗体の異物認識、白血球の炎症部位への移動、補体因子の活性化などの生態防御反応への関与が明らかになっている。その一方で、最近、硫酸化がセリンやスレオニン残基にも起こることが明らかとなっており、硫酸化は「タンパク質のチロシン残基にのみ起こる」という通説が覆されている。そしてこのセリン、スレオニン残基の硫酸化に関与する酵素も基質も明らかとなっておらず、生体内には未知の硫酸化タンパク質が多数存在していると推測される。未知タンパク質の検出、および同定には質量分析法が有効であるが、硫酸化タンパク質は強酸性であるため、リン酸化や糖鎖付加など他の翻訳後修飾に比べて研究が進んでおらず、おらず、生体内におけるタンパク質硫酸化の全体像は明らかになっていない。生体中における硫酸化の動態と役割を明らかにするためには、生体中に存在する硫酸化タンパク質できるだけ多く、網羅的に検出する「硫酸化プロテオーム」技術の開発が必要である。この硫酸化プロテオームの実現のためには、タンパク質の負イオンに適用可能な新しいラジカル分解タンデム質量分析法の開発が必要である。

## 3. 研究の方法

硫酸化タンパク質の分析について、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-質量分析計(MALDI-MS)を用いた。MALDIの際に起こるラジカル分解を利用するMALDI-ISD法は飛行時間型質量分析計を、MALDIで生成した負イオンに水素ラジカルを照射する水素付着解離法(HAD法)についてはイオントラップ・飛行時間型質量分析計を用いた。得られた実験結果から硫酸化タンパク質の分解過程を推定するために、量子化学計算ソフトGaussian16を用いて理論的解析を行った。量子化学計算はM06-2Xを汎関数、6-31+G(d,p)を基底関数とした密度汎関数理論を用いた。

## 4. 研究成果

本研究では、強酸性であり特に解析が困難な硫酸化タンパク質の分析を目的とし、硫酸化プロテオミクスを行うための基盤技術、つまり負イオンを対象としたラジカル分解質量分析法について、特に、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)の際に起こるラジカル分解を利用するMALDI-ISD法と、MALDIで生成した負イオンをイオントラップに蓄積し、水素ラジカルを照射する水素付着解離法(HAD法)について研究を行った。MALDI-ISD法は2001年より、タンパク質への水素ラジカルの転移反応で起こると考えられていたが、本研究によって水素ラジカルではなく電子の移動であることを明らかにした。つまりMALDI-ISDの初期過程はタンパク質の負イオン化であるため、強酸性の硫酸化ペプチドを効率的に分析できる手法であることが理論的に解明された。MALDI-ISD法では、硫酸化タンパク質から生じる硫酸化サイトを含むフラグメントイオンの選択的な検出が可能であり、硫酸化タンパク質の直接分析に有効であることが明らかとなった。

一方、HAD法はこれまで、タンパク質への水素付着と水素脱離が同時に起こり、それぞれタンパク質主鎖のN-C結合とC-C結合のラジカル分解を誘起されると考えられていた。しかしながら、本研究によって分解に寄与しているのは水素付着のみであり、N-C結合とC-C結合の解離はともに水素付着に起因することが明らかとなった。一方で、HAD法により硫酸化タンパク質からの水素引き抜き反応も観測されているが、これはタンパク質主鎖のラジカル分解には寄与しない。HAD法によるタンパク質・ペプチドのラジカル分解過程の全貌が明らかになったことで、実験結果の解釈が容易となり、未知硫酸化タンパク質の正確な同定が可能となると考えられる。HAD法は硫酸化タンパク質を消化して得られるペプチドの分析に有効である。本

手法も MALDI-MSD 法と同様に硫酸化ペプチドから生じる硫酸化サイトを含むフラグメントイオンの選択的な検出が可能であるという特徴を持ち、硫酸化ペプチドの硫酸化サイトの同定に有用である。

これらの基礎研究で硫酸化タンパク質をはじめとした酸性タンパク質の分析結果を容易に同定することが可能となり、硫酸化プロテオミクスの基盤となる質量分析技術を構築できた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asakawa Daiki, Sugiyama Eiji, Mizuno Hajime, Todoroki Kenichiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Study of Substituted Phenethylamine Fragmentation Induced by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Its Application for Highly Sensitive Analysis of Neurotransmitters in Biological Samples	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Society for Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 2144 ~ 2152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jasms.1c00173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asakawa Daiki, Saikusa Kazumi	4. 巻 57
2. 論文標題 Fragmentation efficiency of phenethylamines in electrospray ionization source estimated by theoretical chemistry calculation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 e4802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jms.4802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asakawa Daiki, Takahashi Hidenori, Iwamoto Shinichi, Tanaka Koichi	4. 巻 144
2. 論文標題 Hot Hydrogen Atom Irradiation of Protonated/Deprotonated Peptide in an Ion Trap Facilitates Fragmentation through Heated Radical Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 3020 ~ 3028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c11081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asakawa Daiki	4. 巻 31
2. 論文標題 Ultraviolet-Laser-Induced Electron Transfer from Peptides to an Oxidizing Matrix: Study of the First Step of MALDI In-Source Decay Mass Spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Society for Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 1918 ~ 1926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jasms.0c00186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asakawa Daiki	4. 巻 56
2. 論文標題 Cooperative dissociation of peptide backbones and side chains during matrix assisted laser desorption/ionization in source decay mediated by hydrogen abstraction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 e4530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jms.4530	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asakawa Daiki, Mizuno Hajime, Sugiyama Eiji, Todoroki Kenichiro	4. 巻 92
2. 論文標題 In-Source Fragmentation of Phenethylamines by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Toward Highly Sensitive Quantitative Analysis of Monoamine Neurotransmitters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 12033 ~ 12039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c02667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asakawa Daiki, Takahashi Hidenori, Iwamoto Shinichi, Tanaka Koichi	4. 巻 92
2. 論文標題 Gas-Phase Peptide Fragmentation Induced by Hydrogen Attachment, from Principle to Sequencing of Amide Nitrogen-Methylated Peptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 15773 ~ 15780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c02766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asakawa Daiki, Mizuno Hajime, Sugiyama Eiji, Todoroki Kenichiro	4. 巻 146
2. 論文標題 Fragmentation study of tryptophan-derived metabolites induced by electrospray ionization mass spectrometry for highly sensitive analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 2292 ~ 2300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0an02069a	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------