

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510225

研究課題名（和文）新規C末端ペプチド単離法に基づくプロテオーム解析法の実用化

研究課題名（英文）Enhancing the practicability of the method for proteome analysis based on a new isolation scheme of C-terminal peptides.

研究代表者

中沢 隆 (Nakazawa Takashi)

奈良女子大学・理学部・教授

研究者番号：30175492

研究成果の概要（和文）：全カルボキシル基を化学的にアミド化したタンパク質を酵素消化すると、目的とするC末端ペプチド以外のすべてのペプチドに遊離のカルボキシル基が生じる。これらのアニオン性解離基をもつすべてのペプチドは、強塩基性陰イオン交換体（SAX）カラムを用いる高速液体クロマトグラフィーで大部分除去できる。SAXカラムに吸着しないC末端ペプチドを高度に濃縮し、質量分析によるアミノ酸配列解析を容易にする方法が確立できた。

研究成果の概要（英文）： We have established a method to identify proteins by MALDI mass spectrometry of the C-terminal peptide obtained from a protein in which all the carboxyl groups were protected by exhaustive amidation. The optimized protocol to concentrate or isolate the C-terminal peptide from the proteolytic digest of the fully amidated protein includes the use of a strong anion-exchange HPLC column to remove anionic peptides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：有機化学・プロテオミクス・質量分析学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：タンパク質，C末端ペプチド，プロテオミクス，アミノ酸配列解析，質量分析

1. 研究開始当初の背景

細胞あるいは特定の生体組織・器官のタンパク質を網羅的に解析するプロテオミクスは、質量分析装置の技術的革新によって発展してきた比較的新しい研究分野である。方法として、タンパク質の分離に主にポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動法（2D-PAGE法）を、同定にはタンパク質自体あるいはその酵素消化により生成する多数のペプチド断片の質量分析法が主に用いられている。このうちタンパク質の同定においては、質量分析データをゲノム塩基配列データベースか

ら得られる膨大な情報をもとに解析し、最終的に全発現タンパク質のプロファイルを完成するという手法が用いられている。しかし、現行のプロテオミクスの解析技術において早急に解決しなければならない最も重要な課題の一つに、質量分析計によるタンパク質同定法の信頼性を高めることがある。質量分析法（MS）ではペプチドおよびペプチドのタンデムMS（MS/MS）により生成するフラグメントイオンの質量数の情報しか得られないため、データ解析用の多くのアルゴリズムの開発がなされてはいるが、必然的に同定

の信頼性には限界がある。特に、生体内生理活性ペプチドや低分子量タンパク質あるいは翻訳後修飾を多く受けているタンパク質の場合、誤って帰属されることにしばしば遭遇する。特に、生体内で機能している成熟タンパク質の半数以上が、アミノ末端 (N末端) にアセチル基をはじめ多種多様な置換基で修飾されているため、ゲノム情報と質量分析法のみでアミノ酸配列を解析し、確実な同定を行うことは極めて困難である。このようなタンパク質の分析、同定法にかかわる欠陥は、プロテオミクスの発展に対する重大な障害となっており、この問題を解決する有力な方法の一つとして、ペプチド鎖の N 末端や C 末端を特異的に化学修飾することによる、プロテオーム解析法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、新規の C 末端カルボキシル基の特異的修飾法に基づいて、既存の生化学的な技術では全く対応できないタンパク質のカルボキシル末端 (C 末端) のアミノ酸配列解析を、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化 (MALDI) 法を用いた質量分析法によるタンパク質のアミノ酸配列解析を高感度かつ迅速に行う方法の開発を目指す。すなわち、本研究は生命機能の解明に大きく寄与するためのプロテオミクスに基づく方法の開発と実用化を目的としている。

3. 研究の方法

研究の開始当初は、タンパク質の全カルボキシル基をアミド化し、これを適当なタンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) で消化することで、C 末端以外のすべてのペプチドを生じる遊離のカルボキシル基の負電荷により強塩基性イオン交換体に吸着除去し、C 末端ペプチドを選択的に濃縮・単離することを計画した (図 1)。このために、①カルボキシル基の修飾試薬と反応条件、②適切な長さの C 末端ペプチドを生成するプロテアーゼ、③遊離のカルボキシル基を持つペプチドに対して選択性をもつ塩基性吸着体と分離条件をそれぞれ検討した。

C 末端ペプチドの濃縮または単離用に検討

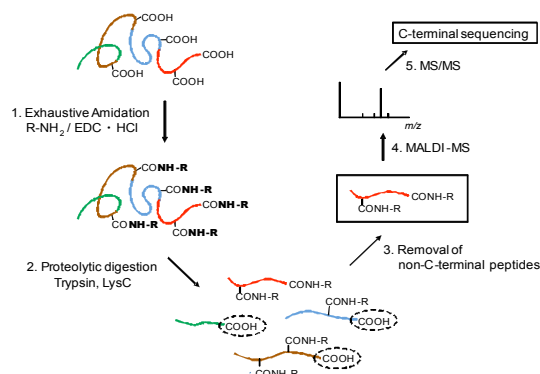


図 1 タンパク質の C 末端ペプチドの濃縮・分離およびアミノ酸配列解析法

した試料は、初期はアミノ酸配列既知で C 末端のカルボキシル基が遊離のものとアミド化された数種のオリゴペプチドを用いた。吸着体と分離条件がほぼ確定した段階で、 β -ラクトグロブリン、ニワトリ卵白リゾチーム、チトクローム c、ウシ血清アルブミンなどについて、カルボキシル基の修飾法と、プロテアーゼ消化物の分離条件を検討した。濃縮・分離の効率は、吸着体による処理の後に得られた濃縮物のマトリックス支援レーザー脱離/イオン化タンデム飛行時間型 (MALDI-TOF/TOF) 質量分析法を用い、主にポストソースディケイ (PSD) 法によるアミノ酸配列解析とともにアミド化修飾の位置の確認を行った。

アミン試薬		m/z		
Asp Glu	NH ₄ Cl	Asp(CONH ₂)	114.04	= Asn Gln
		Glu(CONH ₂)	128.06	
Asp Glu	CH ₃ NH ₂ Cl	Asp(CONHCH ₃)	128.06	= Gln —
		Glu(CONHCH ₃)	142.07	
m/z 115.03 129.04	NH ₂ CH ₂ CH ₂ OH·HCl	Asp(CONHCH ₂ CH ₂ OH)	158.07	
		Glu(CONHCH ₂ CH ₂ OH)	172.08	

図 2 アミド化に用いるアミンによるアスパラギン酸 (Asp: D) およびグルタミン酸 (Glu: E) の残基質量の変化。右端のカラムは修飾生成物と質量が同じになるアミノ酸を示す。

4. 研究成果

(1) 当初の研究計画に関わる成果

カルボキシル基はアミド化によって負電荷を帯びる可能性がなくなると同時に、反応に用いるアミンの分子量に応じて質量が増加する (図 2)。研究の当初用いたメチルアミンの場合、修飾されたアスパラギン酸 (D) の残基質量は 128.06 となり、グルタミン (Q) と区別できなくなる。3 年間の研究の結果、①のアミド化に関しては縮合剤の水溶性カルボジイミド (EDC) 存在下に 2-アミノエタノールまたはエチレンジアミンをタンパク質に対して 100 当量以上で反応させる方法を確立した。

②のプロテアーゼは、通常最も頻繁に用いられるトリプシン以外に、リジン (K) の C 末端側でペプチド結合を特異的に加水分解する LysC もこの方法に有効であることが明らかになった。側鎖のカルボキシル基をアミド化により修飾したため、GluC や AspN は利用できないが、本研究の過程で、タンパク質のカルボキシル基を修飾することなく GluC で消化する別法を開発した。③の遊離のカルボキシル基を持つペプチドの選択的吸着体として、炭酸カルシウムの微粒子、ハイドロキシアパタイト、種々の陰イオン交換樹脂などを比較・検討した結果、強塩基性イオン交換体 (SAX) を充填した高速液体クロマトグラフィー用カラムにより、pH 7.5 付近で最も分離が良好であった (データは省略する)。

モデルタンパク質として選んだ β -ラクトグ

ロブリンの場合、まずシスチン残基を還元カルボキサミドメチル (RCam) 化後 (カルボキシメチル化の場合、修飾したシステインの側鎖にカルボキシル基が生じるため適当でない)、カルボキシル基のエチレンジアミンまたは 2-アミノエタノールによるアミド化、次いでトリプシン消化を行った。低分子量のオリゴペプチドと同様の条件 (SAX カラムによる HPLC 分離法) で消化物を分離したところ、C 末端ペプチドの MALDI-TOF ピークが優先的に観測できた (図 3)。また、そのピークの MALDI-PSD スペクトルにより、3 つのカルボキシル基が全てアミド化された C 末端ペプチドに由来する LSFNPTQLE**E**QC(cam)HI** のアミノ酸配列を確認した (図 4)。

以上の結果は、モデルタンパク質として用いた分子量 18,400 でアミノ酸残基数 162 のウシ・β-ラクトグロブリンについて得られた。

B. HPLC のフロースルー画分 (0-1 分)

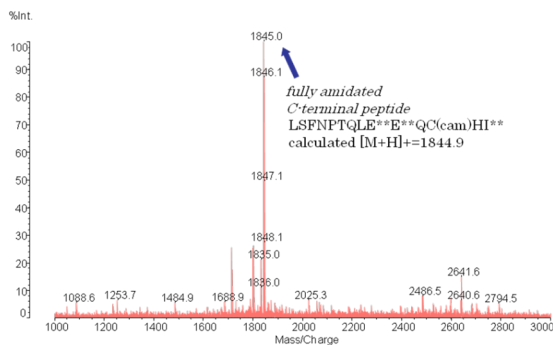


図 3 SAX カラムを用いた HPLC におけるフロースルー画分の MALDI-TOF スペクトル。C 末端ペプチドのアミノ酸配列から予想される質量 (1714 Da) よりも質量が 132 Da (44 × 3) 増加した m/z 1846 に最大強度のピークが観測されている。E** と I* はそれぞれ側鎖が 2-ヒドロキシエチル化されたグルタミン酸と C 末端がアミド化されたイソロイシンを示す。

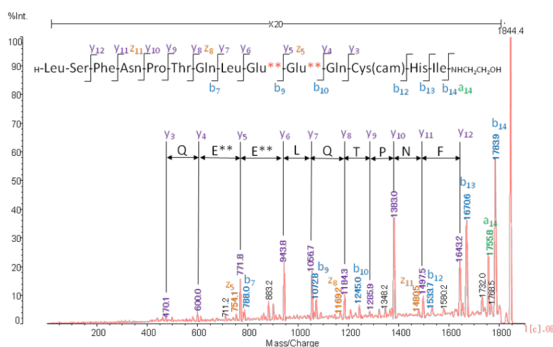


図 4 図 3 で最大強度で観測された m/z 1846 のピークの MALDI-PSD スペクトル。アミノ酸配列 LSFNPTQLE**E**QC(cam)HI** に相当するすべての y-系列のフラグメントイオンが観測されている。

この段階で確立した方法を図 5 にまとめた。

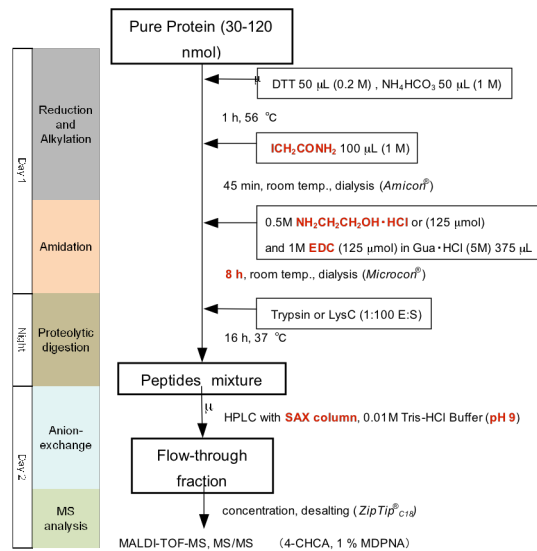


図 5 タンパク質中の全カルボキシル基アミド化に基づく C 末端ペプチド濃縮・分離および質量分析による C 末端アミノ酸配列解析法のまとめ。精製度の高いタンパク質試料 (約 100 nmol) の C 末端アミノ酸解析に要する時間は約 2 日である。

ところが、同じ方法をニワトリ卵白リゾチーム、ウシチトクローム c、などに適用したところ、C 末端ペプチドのピークの確認およびアミノ酸配列解析には成功したが、いずれも期待した C 末端ペプチドのピーク強度は濃縮混合物中で最大とはならなかった。特に、分子量が約 66,000 のウシ血清アルブミンでは、C 末端ペプチドのピークは他のペプチドピークの中に完全に埋没していて、分離の効果は極めて不十分であることが明らかになった。すなわち、未知試料の分析には、さらに方法の改良が必要となった。それと同時に、図 5 の方法で対処できない C 末端が既にアミド化されているタンパク質に適用する方法の開発の必要性が生じた。

(2) C 末端がアミド化されたタンパク質の同定法

天然のタンパク質にはあまり例がないが、内分泌ペプチドホルモンの多くは C 末端がアミド化されている。こうしたペプチドホルモンに図 5 の方法を適用すると、誤った結論が得られるおそれがある。しかし、この点を利用すると逆に、C 末端がアミド化されたタンパク質やペプチドの発見や同定が容易になると考えた。この実験を行うにあたって最も簡単な方法は、全カルボキシル基を図 5 のようにアミド化し、プロテアーゼ消化物を直接 MALDI-TOF 分析すればよい。しかし、この

方法ではC末端が単純にアミド (CONH₂) 化されているのか、別の置換基でアミド (CONHR; R ≠ H) 化されているのか、全く区別できない。そこで、本研究に先行するC末端のみをアミド化するオキサゾロン法を利用することとした。方法の原理と結果を図6に示す(雑誌論文⑥に記載した図を使用)。

この方法の最大の特徴は、イオン交換の代わりに、化学的にアミノ基を捕捉する固相担体を用いて分離の効率を高めている点にあ

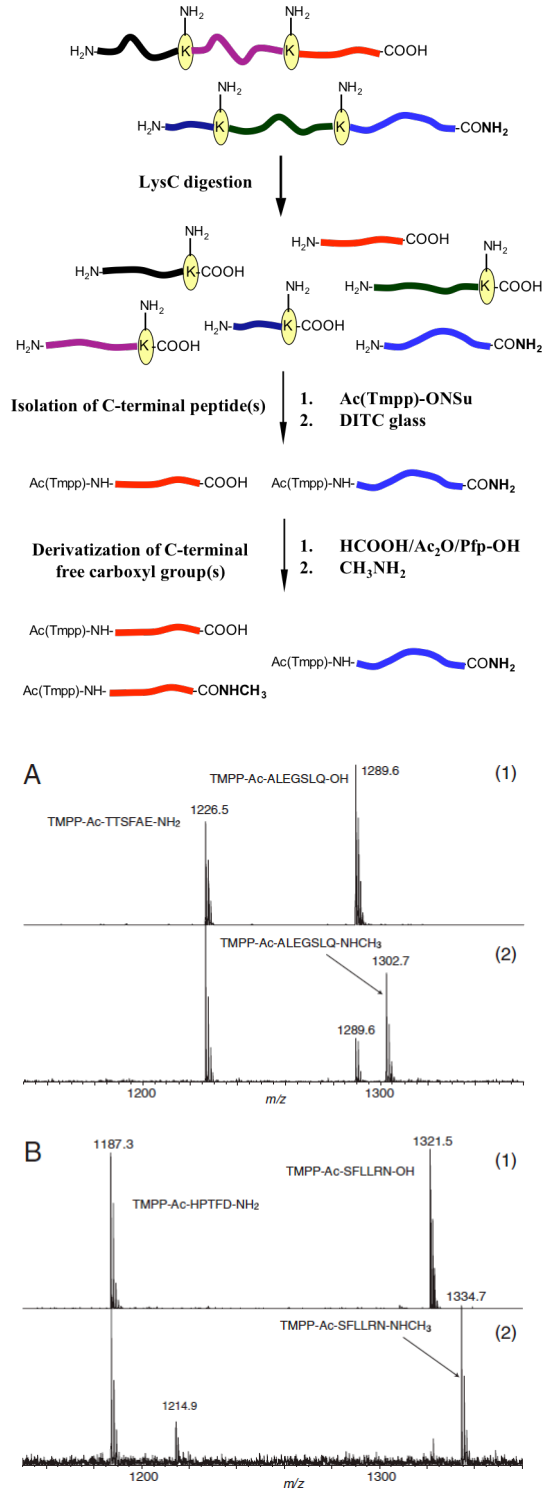


図6 (左側のカラム) C末端がアミド化されたタンパク質の検出法およびC末端アミノ酸配列解析法の原理(上)と、濃縮・分離したC末端ペプチドのMALDI-TOFスペクトル(AとB)。C末端以外のペプチドは、図5の方法の電荷ではなく、LysC消化によって生じる遊離のα-アミノ基を、TMPP (Tris-(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium) 基で置換したアセチル基で保護した後、C末端以外のペプチドを、Lysの側鎖のアミノ基とイソチオシアネート基をもつ固相担体(DITCガラス)と反応させて除く。担体に捕捉されなかったC末端ペプチドはTMPP基によるピーク強度の増加効果によって検出を容易にしている。(A): 2種のペプチド(TTSFAE-NH₂とALEGLSQ-OH)の反応前(1)と後(2)の比較。C末端のカルボキシル基がアミド化されているTTSFAE-NH₂由来のピークに変化がないことに注目。(B): HPTFD-NH₂とSFLLRN-OHの比較。AとBは、C末端のグルタミン酸とグルタミン、アスパラギン酸とアスパラギンが明確に区別できることを示す。

る。実際に、この方法をウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト・アドレノメデュリン(hAM)、およびヒト・カルシトニン(hCN)の混合物に適用したところ、C末端がアミド化されていないBSAとアミド化されているhAMおよびhCNが明確に区別できたばかりでなく、各タンパク質のC末端アミノ酸配列解析が行えた(図7)。

ここで注目すべき点は、(1)の方法では確認できなかったBSAのC末端ペプチドのピークが図7で明瞭に確認できることである。(2)

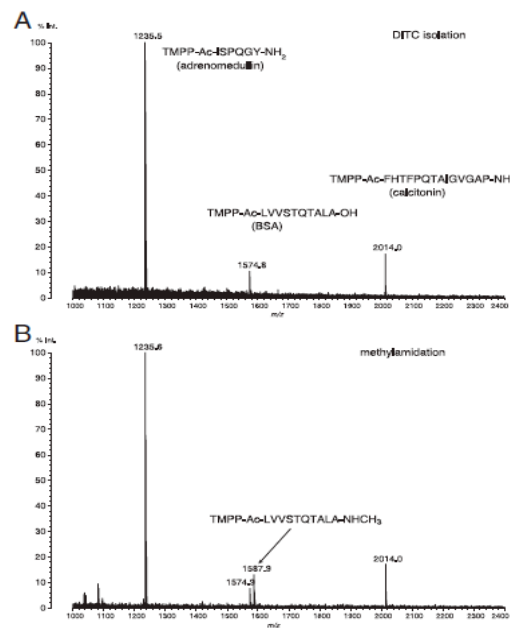


図7 タンパク質のC末端ペプチド混合物のMALDI-TOFスペクトル。C末端ペプチドピーク、BSA (m/z 1574.8)、hAM (m/z 1235.5)、hCN (m/z 2014.0)のうち、C末端がアミド化されていない、BSAのみ14 Daの質量増加が見られた。

の方法は、タンパク質を数段階にわたって化学修飾する必要性により、実験に経験と技術を要するため、汎用化には課題を残すとはいえ、確実性という点では(1)よりも優れている。そこで、(1)の方法をより簡略化しつつ分離の効率を向上させるために、カルボキシル基の化学修飾を行わない以下の方法を開発した。

(3) GluC 消化と SAX カラムを用いる図 5 の方法の改良法

最初の方法(1)の問題点は、塩基性アミノ酸残基が多いペプチド中に 1 個だけカルボキシル基がある場合、そのペプチドが SAX カラムに十分に吸着されないことである。例えば C 末端にアルギニン残基があった場合、C 末端のカルボキシル基はアルギニンのグアニジノ基と salt bridge を形成すると、SAX のカチオン性基に吸着しなくなる。そこで、C 末端のカルボキシル基が近くのカチオン性側鎖と相互作用せず、同時にカルボキシル基の酸性度を増加させる案を検討することにした。具体的には、図 8 に示すようにタンパク質に、側鎖にカルボキシル基をもつグルタミン酸 (E) とアスパラギン酸 (D) の C 末端側で加水分解する GluC プロテアーゼを作用させると、タンパク質の C 末端以外のペプチドはすべてジカルボン酸をそれぞれの末端に生じる。ジカルボン酸の片方のカルボキシル基は他方の影響で酸性度が高くなる。その反面、もう一方のカルボキシル基は広い pH 範囲にわたって解離状態にあることになるので、SAX カラムに対する吸着能は高くなると期待される。

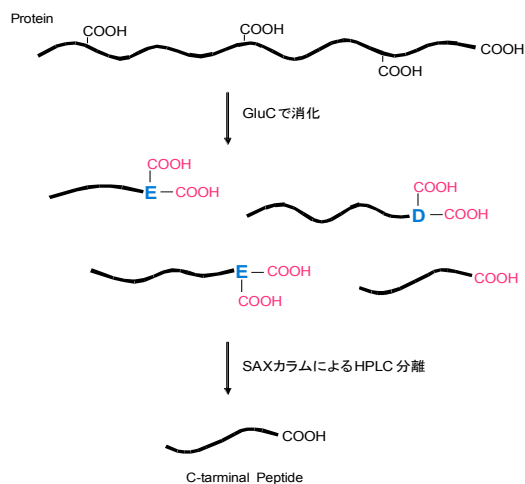


図 8 GluC 消化と SAX カラムを用いるタンパク質の C 末端ペプチド混合物の濃縮・分離法の原理。

この方法を、(1)の方法では C 末端ペプチドがほとんど検出できなかった BSA に適用した結果を図 9 に示す。図から明らかのように、

BSA の GluC 消化物を pH 7 で SAX カラムに通すと、 m/z 1962.5 付近に C 末端ペプチド由来のピークが明瞭に観測された。SAX カラムの pH はこれより高くても低くても C 末端ペプチドの濃縮効果は低下した。この結果は、当然高 pH では C 末端ペプチドが SAX カラムに吸着され、低 pH では C 末端ペプチド以外にも SAX カラムに吸着されなくなることから予想されたことである。

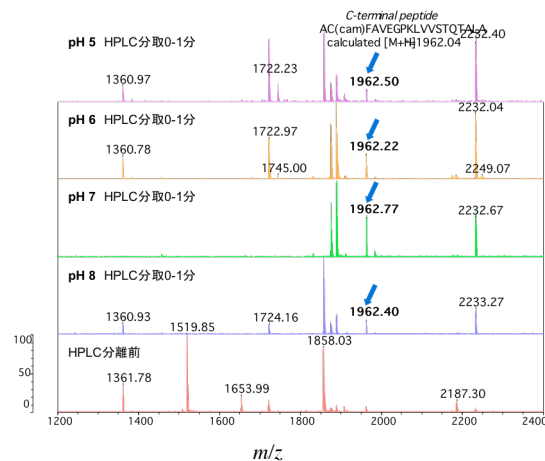


図 9 BSA の GluC 消化物の SAX カラムによる分離パターン。 m/z 1962.5 にピークを生じた BSA の C 末端ペプチド (AC(cam)-FAVEGPKLVVSTQTALA) は、pH 7 で濃縮・分離の効率が最も高かった。

最後に図 9 で濃縮された BSA の C 末端ペプチドについて観測された m/z 1962 のピークに対する MALDI-PSD-TOF スペクトルを図 10 に示す。このスペクトルから C 末端アミノ酸配列が明瞭に読み取れる。このことから、研究の目的が達成されたと判断できる。

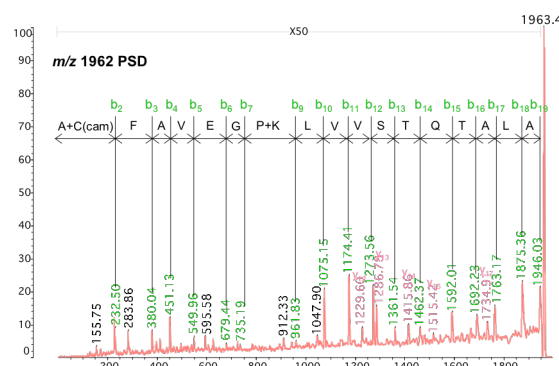


図 10 m/z 1962 のピークに対する MALDI-PSD-TOF スペクトル。ほぼ全体のアミノ酸配列 (ALATQTSVVLKPGVEAFC-(cam)A) にあたる b-系列イオンが観測できている。

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 6 件)

① Chihiro Nakajima, Hiroki Kuyama, Takashi Nakazawa, Osamu Nishimura. "C-Terminal sequencing of proteins by MALDI mass spectrometry through the specific derivatization of the α -carboxyl group with 3-aminopropyl-tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide" *Anal. Bioanal. Chem.* in press. 査読有.

② Hiroki Kuyama, Chihiro Nakajima, Takashi Nakazawa, Osamu Nishimura. "Enzymatic conversion of arginine to citrulline for improving the fragmentation of N^α-tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium acetylated peptides by tandem mass spectrometry" *Anal. Methods* **3**, 2829-2835 (2011). 査読有. DOI: 10.1039/C1AY05177F.

③ Masato Amano, Jun Hasegawa, Naoki Kobayashi, Naoyuki Kishi, Takashi Nakazawa, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui. "Specific racemization of heavy-chain cysteine-220 in the hinge region of immunoglobulin gamma 1 as a possible cause of degradation during storage" *Anal. Chem.* **83**, 3857-3864 (2011). 査読有. DOI: 10.1021/ac200321v.

④ Chihiro Nakajima, Hiroki Kuyama, Takashi Nakazawa, Osamu Nishimura, and Susumu Tsunasawa. "A method for N-terminal *de novo* sequencing of N^α-blocked proteins by mass spectrometry" *Analyst* **136**, 113-119 (2011). 査読有. DOI: 10.1039/C0AN00384K.

⑤ Hiroki Kuyama, Chihiro Nakajima, Takashi Nakazawa, Osamu Nishimura. "Conversion of arginine to ornithine for improving the fragmentation pattern of peptides labeled with the N-terminal tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium group in tandem mass spectrometry" *Anal. Methods* **2**, 1792-1797 (2010). 査読有. DOI: 10.1039/c0ay00439a.

⑥ Hiroki Kuyama, Chihiro Nakajima, Takashi Nakazawa, Osamu Nishimura, Susumu Tsunasawa. "A new approach for detecting C-terminal amidation of proteins and peptides by mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization" *Proteomics* **9**, 4063-4070 (2009). 査読有. DOI: 10.1002/pmic.200900267

〔学会発表〕(計 3 件)

①宮路淳子, 河原一樹, 六車美保, 松尾良樹, 岡田文男, 中沢 隆「質量分析による牽牛子塚古墳出土夾紵棺断片中の絹の確認」第 28 回日本文化財科学会, 2011 年 6 月 11 日. 筑波大学.

②Takashi Nakazawa, Yuzo Yamazaki, Atsuko Miyaji, Yoshiki Matsuo. "Identification of animal species by the MALDI-MS of collagen in animal glues used in archaeological materials" 58th

ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, May 27, 2010, Salt Lake City, Utah, USA.

③Mariko Nakagawa, Hiroki Kuyama, Minoru Yamaguchi, Eiji Ando, Osamu Nishimura, Susumu Tsunasawa, Takashi Nakazawa. "Isolation of C-Terminal Peptides by Strong Anion-Exchanger from Proteolytic Digests of Fully Amidated Proteins for Mass Spectrometric Sequencing" 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2 June 2009, Philadelphia, PA, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 2 件)

名称: タンパク質又はペプチドの C 末端を修飾する方法

発明者: 中澤 隆, 山口 実, 九山浩樹, 安藤英治, 上山憲一, 岡村高明, 乗岡茂巳

権利者: (株) 島津製作所

種類: 特許

番号: 第 4556473 号

取得年月日: 平成 22 年 7 月 30 日

国内外の別: 国内

名称: 生体試料の構造解析法

発明者: 中澤 隆, 安藤英治, 山口 実

権利者: (株) 島津製作所

種類: 特許

番号: 第 4407349 号

取得年月日: 平成 21 年 11 月 20 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nara-wu.ac.jp/proteome/aprp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中沢 隆 (NAKAZAWA TAKASHI)

奈良女子大学・理学部・教授

研究者番号: 30175492

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

九山 浩樹 (KUYAMA HIROKI)

大阪大学・蛋白質研究所寄附研究部門・特任准教授

研究者番号: 60437332