

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510296

研究課題名(和文)被翻訳後修飾タンパク質のNおよびC末端構造同時解析法の開発

研究課題名(英文)Development of N- and C-terminal sequencing method for proteins with posttranslational modification

研究代表者

中沢 隆 (NAKAZAWA, TAKASHI)

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：30175492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳後修飾を受けてN末端またはC末端のどちらかがブロックされた成熟タンパク質を同定するための、修飾を受けていない側のアミノ基またはカルボキシル基のどちらかをMALDI質量分析で同程度の感度が得られるTMPP(トリメトキシフェニルホスホニウム)基をもつ修飾試薬で特異的に標識する方法を確立した。この研究の過程でペプチドのN末端アスパラギン酸の脱炭酸反応とそれに伴う脱アミノ化を発見し、これを利用した効率的なN末端およびC末端アミノ酸配列解析法の開発につながった。またこの方法を考古学資料の分析に適用し、4,400年前のエジプトの古墳の壁画片からウシ皮からのコラーゲンを検出した。

研究成果の概要(英文)：In order to identify mature proteins in which either N- or C-terminus is blocked, a new method for the modification of terminal free amino and carboxyl groups was developed. This method employs reagents containing the tris(trimethoxyphenyl)phosphonium (TMPP) group. In matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS), the TMPP reagents make it possible to detect the derivatized peptides at a greatly enhanced sensitivity, so that the N- and C-terminal sequencing with MALDI-MS can be performed with almost the same sensitivity. In the present study, a new reaction that converts the N-terminal aspartic acid residue to alanine or pyruvate through decarboxylation and subsequent deamination, respectively, was discovered. The possibility of developing a new method that uses this reaction was also pursued. This method was successfully applied to Egyptian archaeological specimens, which dated to 2,400 BG, thereby collagen derived from cow hide could be identified.

研究分野：生命有機化学、プロテオミクス、質量分析学

キーワード：タンパク質の翻訳後修飾 プロテオミクス 末端基の修飾 ケミカルバイオロジー 化学修飾 同位体交換 同位体標識

1. 研究開始当初の背景

本研究は、「新規 C 末端特異的誘導体化によるプロテオミクス解析法の開発」(基盤研究(B), 課題番号 18310146, 研究期間 2006-2008)と、それに続く「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」(基盤研究(C), 課題番号 21510225, 研究期間 2009-2011)を引き継いで、これまで独自に開発したタンパク質の C 末端アミノ酸配列法をより一般化したプロテオーム解析法として発展させることを目的としている。

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。個々のタンパク質の同定は、主にポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動法 (2D-PAGE 法) によって分離した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 (MS) によって行われる。ここで最も困難な課題となっているのは、最終的に全発現タンパク質のプロファイルを完成するために、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なければならない点である。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。

本研究課題に先行する前述の研究では、翻訳後修飾 (PTM) の可能性が比較的少ないペプチド鎖の C 末端分析によるタンパク質の同定法を開発した。これによる最大の成果は、プロテオミクスの発展に対する重大な障害の一つを克服した点である。しかし、C 末端のカルボキシル基がアミド化された生理活性ペプチドや、劣化過程で生じると考えられる正常なペプチド結合がアスパラギン酸の β -カルボキシル基に転位したタンパク質など、本研究を含めた従来の方法では対応できない分析試料は依然として多い。現実のプロテオームは、このように多様な翻訳後修飾を受けたタンパク質の複雑な混合物であり、特に考古学資料に含まれる極度に経年劣化の進んだタンパク質の同定は困難を極めてい。こういった問題を解決するため、できるだけ単純かつ特定の修飾に偏らない柔軟な分析手法に基づく解析法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

前述のように、現代のプロテオミクスが直面している問題点の一つに、タンパク質の PTM の同定の困難さがある。特に解析困難な課題は、タンパク質の成熟と分解に関わる重要な現象であるペプチド主鎖の修飾や切断を伴う PTM である。本研究では我々が提唱したタンパク質のアミノ末端 (N 末端) とカルボキシル末端 (C 末端) アミノ酸配列解析法に基づく「末端プロテオミクス (terminus proteomics)」⁽¹⁾ の手法をさらに発展させるとともに、それを駆使してこれらの問題の解決を目指す。また、研究の過程で遭遇することが予想される新規の PTM の同定法も開発し、そのタンパク質の成熟または分解過程の解明を試みる。

こうした研究の過程で得られる成果がプロテオミクスの進歩に貢献することは当然期待される。直接的にはタンパク質の機能と細胞内外における安定性との関連を明らかにする方法が開発できると思われる。さらに、近年目覚ましく発展した質量分析法の応用に関連して、古代の遺物中に残存するタンパク質の種類と生物種の同定から、その時代の文明、例えば古代技術史を探る一つの学問分野、すなわち我々が提唱しているタンパク質考古学の創成を目指す。

3. 研究の方法

(1) これまで、個別に展開してきた N 末端と C 末端のアミノ酸配列解析に基づくタンパク質同定法を、一連の実験操作で両末端の分析ができるように改良した。具体的には N 末端と C 末端アミノ酸残基に特異的な修飾試薬に共通して含まれる tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)-phosphonium (TMPP) 基 (修飾試薬の化学構造を次ページの図に示す)^(2,3) のより有効な活用法を検討した。

(2) C 末端アミノ酸残基の特異的標識法の研究中に、偶然 N 末端アスパラギン酸に特異的な脱炭酸および脱アミノ化反応を見出した。この反応を、タンパク質中でアスパラギン酸の N 末端側のペプチド結合を特異的に切断するプロテアーゼである AspN による消化と組み合わせることによって、タンパク質の N 末端ペプチドを AspN 消化によって生じる他のペプチドから容易に単離または質量スペクトル上で区別できると考えた。この方法は N 末端がアスパラギン酸のタンパク質には適用できないが、(1)の方法を適宜適用することで、本来の目的である N 末端と C 末端のアミノ酸同時配列解析の実現に取り組む。

(3) 本研究が対象とする PTM を含むタンパク質の標準試料として、コラーゲンを第一に選んだ。コラーゲンは、生合成の際にプロリン (Pro) とリシン (Lys) の一部が酸化されてそれぞれヒドロキシプロリン (Hyp) とヒドロキシリシン (Hyl) となる PTM を受け、Hyp はコラーゲンの三重鎖構造の安定化に、また Hyl は三重鎖間の架橋に重要な役割を果

たすことが知られている。さらにコラーゲンが細胞外に分泌される前段階のプロコラーゲンは、三重鎖構造以外の N 末端と C 末端のペプチドがコラーゲナーゼの作用により除かれる。しかも、I 型コラーゲンの三重鎖は、アミノ酸配列の異なる 2 本の α -1 鎖と 1 本の α -2 鎖でできており、各鎖は約 1,000 個のアミノ酸残基から成る。このように、高分子量のヘテロポリペプチドで、N 末端と C 末端が三重鎖のそれぞれで異なる可能性がある点で、両末端アミノ酸の確実な同定を目的とする本研究課題の試料としては理想に近い構造的特徴を有している。

コラーゲンの PTM は、このようにタンパク質の成熟過程を追跡する指標となるばかりでなく、古代の遺跡からの出土品や文化財に含まれる膠の主成分であることから、考古学的応用が見込まれる。結果的には、本研究課題が最も役立ったのは以下の研究成果で述べる古代の膠の研究であった。

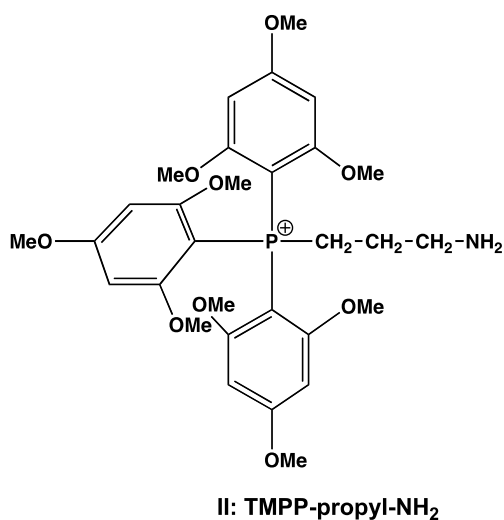
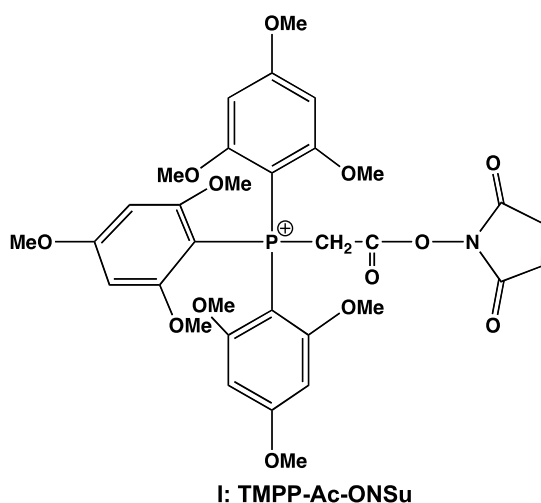


図 1 N 末端の修飾試薬、TMPP-Ac-ONSu (I) と C 末端の標識試薬の TMPP-propyl-NH₂ (II) の化学構造。TMPP 基はリン原子上に正電荷をもつため、MALDI-MS において誘導体化したペプチドのイオン化効率を著しく高めることで、ピークの感度向上効果がある。

4. 研究成果

(1) 図 1 の TMPP を含む修飾および標識試薬をそれぞれ単独に、または連続してコラーゲンに対して反応させ、末端アミノ酸の検出効率を比較した。モデルタンパク質のウシ・ラクトグロブリンに対して最初に I を、続いて II をオキサゾリンとして活性化⁽⁴⁾した C 末端に反応させ、トリプシン分解させた場合は、期待通り両末端アミノ酸が検出でき、それぞれの反応を別々に行った場合よりも多少は効率の向上が見られた。しかし、この方法をコラーゲンに適用した場合には C 末端アミノ酸が検出できなかった。

(2) ここでタンパク質の C 末端をより効率よく活性化して標識試薬 II と反応させるために、ギ酸中で種々の塩基触媒と酸無水物を組み合わせて反応条件を検討していたところ、モデルペプチド Angiotensin II (H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH) の分子量が 44 Da 減少することを発見した。この結果は、最初に C 末端のカルボキシル基が脱炭酸したものと解釈したが、生成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) MS の結果、脱炭酸はペプチドの N 末端のアスパラギン酸残基 (Asp) で起きていることが明らかになった。すなわち、N 末端の Asp がアラニン (Ala) に変化していたのである (この結果は [学会発表-7] で公表済み)。

さらにこの結果をより詳細に検討した結果、質量の減少が 45 Da になる生成物も確認され、その場合 N 末端の Asp は Ala を経てさらに酸化脱アミノ化したピルビン酸に変換されることも明らかになった ([学会発表-7] の内容を加えて論文投稿準備中)。反応式を下図 2 に示す。

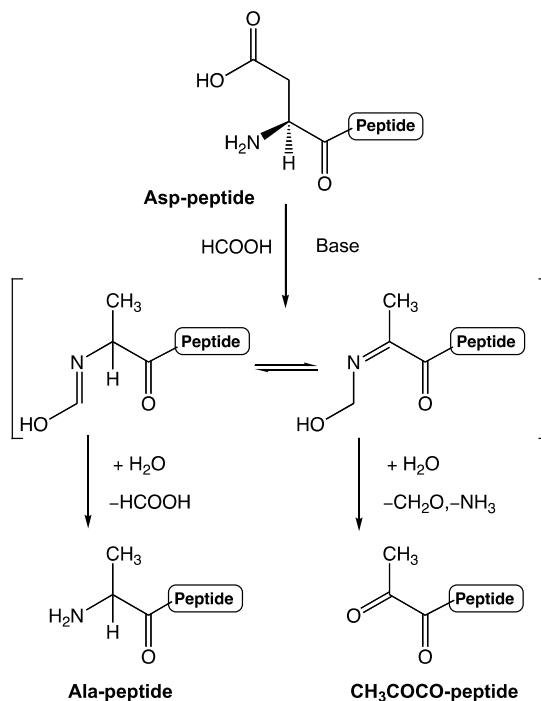


図 2 N 末端 Asp の脱炭酸 / 脱アミノ化反応

偶然得られたこの結果は、当初の(1)で計画した方法よりもタンパク質のN末端とC末端の同時分析には以下の理由により有望と考えられる(現在執筆中の論文が投稿規定:「未発表の内容を含む」に抵触するおそれがあるので概略のみ記す)。まず、この反応はN末端の Asp についてのみ起こるので、タンパク質を AspN で消化して得られるペプチドの混合部にこの反応を適用すれば、タンパク質のN末端に由来するペプチド以外はすべて Ala またはピルビン酸を N 末端に持つことになる。末端アミノ基をピルビン酸に変換してタンパク質の N 末端アミノ酸配列を解析する方法は既に報告されている^(5,6)。同時に解析すべき C 末端は、既存の方法⁽⁴⁾や Asp に特異的なプロテアーゼの使用、さらに〔雑誌論文-4〕で用いた水素/重水素 (H/D) 交換法との組み合わせなどによる方法を検討している。

(3) タンパク質は生体内において比較的短い期間で変性や分解を受けて新たなタンパク質に更新される。自然環境内でも重要な窒素源の一つとして、動物によって食べられたり、バクテリアによる分解を受けたりしてリサイクルされる。そのため一つの有機分子としての寿命は一部の例外を除いて極めて短いものと考えられる。考古遺物中にタンパク質を検出しようとするのは、そのような希少な例外を探る困難な試みに他ならない。八千万年前の恐竜の骨から抽出され、そのアミノ酸配列から恐竜の進化上の位置が特定された程の驚くべき持続性を示すコラーゲンは、こうしたタンパク質の寿命に関する常識を覆した例といえる⁽⁷⁾。

本研究では、平城京跡から出土した奈良時代(8世紀)の墨、ローマ・エジプト時代の宗教画の画材(3世紀, AD)、およびエジプトの地下墓の壁画片(2,400年, BC)に含まれている可能性のあるコラーゲンまたはその他のタンパク質の分析を行った。その結果、すべての試料でコラーゲン由来のアミノ酸配列が確認され、顔料の固着剤としてウシ皮から製造した膠が用いられていることが明らかになった。以上の研究成果は学術論文と学会発表(〔雑誌論文-5〕、〔学会発表-1, 5, 6〕)で公表した。

恐竜の骨と異なり、物理的な保護なしに放置されていたコラーゲンが部分的にはあっても特定のアミノ酸配列を残して遺跡に保存されていたことになる。検出されたペプチドのアミノ酸配列は、コラーゲン分子の三重鎖構造の特定の部分に集中していたため、この三重鎖構造こそがコラーゲンの安定性と深く関わっていて、完全な分解を免れさせた原因となったと考えられる。主な発表論文のうち、〔雑誌論文-1, 2〕は、主に構造と物性の面でのコラーゲンの安定性に関する研究成果である。特に〔雑誌論文-2〕は、コラーゲンのポリペプチド鎖が集合して三重鎖構造を形成する過程を実験的に解析した結果の報告であり、その成果は〔雑誌論文-5〕を

はじめとする、コラーゲンの考古学的安定性に関する考察に反映している。また、古代の膠が時代も地域も大きく異なるにもかかわらず、同じ原料からおそらくほとんど同じ製法で造られたことにも驚かされたが、こうした結果に対する考古学的解釈は今後の課題として残った。

タンパク質のNおよびC末端アミノ酸配列同時解析法の開発は、当初の計画とは異なるが、(2)のN末端における脱炭酸反応の発見によって原理的により確実な方向に発展するめどがついた。さらに(3)の考古学的に経年劣化が進行したタンパク質の分析を通じて、これまでに別々に発展させてきたN末端とC末端のアミノ酸配列解析法が十分に役立つことが確認できた。(3)ではコラーゲンのほかに、絹糸を構成するタンパク質であるフィブロインとセリシンが、アミノ酸配列解析によって、養蚕に用いたカイコガの種類を特定する決め手となることを明らかにした。実際、卑弥呼が活躍した時代とされる4世紀頃の奈良県桜井市の纏向遺跡から出土した巾着状布製品の質量分析によって、布は絹製であり、その絹はヤマモコ科で日本原産のテンサン(天蚕)由来であることを明らかにした(〔雑誌論文-6,7〕)。この時、フィブロイン分子の経年劣化の原因となるペプチド結合の切断が、特定のアミノ酸残基間で起こる傾向があることを発見したのは、絹試料の末端アミノ酸配列分析の賜物である。すなわち、タンパク質のNおよびC末端アミノ酸配列解析は、通常のプロテオミクスの研究ばかりでなく、考古学の有力な研究手段となりうるのである。これを実証できたことが本研究の最大の成果といえるかもしれない。

<引用文献>

- (1) T. Nakazawa, M. Yamaguchi, T-a. Okamura, E. Ando, O. Nishimura, and S. Tsunasawa. "Terminal proteomics: N- and C-terminal analyses for high-fidelity identification of proteins using mass spectrometry" *Proteomics* **8**, 673-685 (2008).
- (2) H. Kuyama, C. Nakajima, T. Nakazawa, and O. 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).
- (3) C. Nakajima, H. Kuyama, T. Nakazawa, and O. 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.* **404**, 125-132 (2012). [5. 主な発表論文等, 〔雑誌論文〕3と同じ]
- (4) M. Yamaguchi, M. Oka, K. Nishida, M.

Ishida, A. Hamazaki, H. Kuyama, E. Ando, T-a. Okamura, N. Ueyama, S. Norioka, O. Nishimura, S. Tsunasawa, and T. Nakazawa. "Enhancement of MALDI-MS spectra of C-terminal peptides by the modification of proteins *via* an active ester generated *in situ* from an oxazolone" *Anal. Chem.* **78**, 7861-7869 (2006).

(5) K. Sonomura, H. Kuyama, E-i. Matsuo, S. Tsunasawa, and O. Nishimura. "A method for terminus proteomics: selective isolation and labeling of N-terminal peptide through transamination reaction" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 6544-6547 (2009).

(6) K. Sonomura, H. Kuyama, E-i. Matsuo, S. Tsunasawa, and O. Nishimura. "Selective isolation of N-blocked peptide by combining AspN digestion, transamination, and tosylhydrazine glass treatment" *Anal. Biochem.* **410**, 214-223 (2011).

(7) M. H. Schweitzer, W. Zheng, C. L. Organ, R. Avci, Z. Suo, L. M. Freimark, V. S. Lebleu, M. B. Duncan, M. G. V. Heiden, J. M. Neveu, W. S. Lane, J. S. Cottrell, J. R. Cantley, L. C. Kalluri, R. Asara, J. M. Horner, "Biomolecular characterization and protein sequences of the Campanian hadrosaur *B. canadensis*. *Science* **324**, 626-631 (2009).

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 7 件)

1. Daisuke Motooka, Kazuki Kawahara, Shota Nakamura, Masamitsu Doi, Yoshinori Nishi, Yuji Nishiuchi, Young Kee Kang, Takashi Nakazawa, Susumu Uchiyama, Takuya Yoshida, Tadayasu Ohkubo, and Yuji Kobayashi. "The triple helical structure and stability of collagen model peptide with 4(S)-hydroxyprolyl-Pro-Gly units" *Biopolymers (Peptide Science)* **98**, 111-121 (2012). [DOI: 10.1002/bip.21730]

2. Kazuki Kawahara, Nobuaki Nemoto, Daisuke Motooka, Yoshinori Nishi, Masamitsu Doi, Susumu Uchiyama, Takashi Nakazawa, Yuji Nishiuchi, Takuya Yoshida, Tadayasu Ohkubo, and Yuji Kobayashi. "Polymorphism of collagen triple helix revealed by ¹⁹F NMR of model peptide [Pro-4(R)-hydroxyprolyl-Gly]₃-[Pro-4(R)-fluoroprolyl-Gly]-[Pro-4(R)-hydroxyprolyl-Gly]₃" *J. Phys. Chem. B* **116**, 6908-6915

(2012). [DOI: 10.1021/jp212631q]

3. Chihiro Nakajima, Hiroki Kuyama, Takashi Nakazawa, and 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.* **404**, 125-132 (2012). [DOI: 10.1007/s00216-012-6093-5]

4. Naoka Hayashi, Hiroki Kuyama, Chihiro Nakajima, Kazuki Kawahara, Masaru Miyagi, Osamu Nishimura, Hisayuki Matsuo, and Takashi Nakazawa. "Imidazole C-2 hydrogen/deuterium exchange reaction at histidine for probing protein structure and function with matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry" *Biochemistry* **53**, 1818-1826 (2014). [DOI: 10.1021/bi401260f]

5. Joy Mazurek, Marie Svoboda, Jeffrey Maish, Kazuki Kawahara, Shunsuke Fukakusa, Takashi Nakazawa, and Yoko Taniguchi. "Characterization of binding media in Egyptian Romano portraits using enzyme-linked immunosorbent assay and mass spectrometry" *e-Preservation Sci.* **11**, 76-83 (2014). [ISBN: 1581-9280 (web); ISBN: 1854-3928 (print)]

以上5編は査読あり。

6. 中沢 隆 「纏向遺跡の絹が語る古代日本の養蚕」(特集・化学で迫る邪馬台国の謎) *化学 (化学同人)* **68**, 12-16 (2013). [ISSN: 0451-1964] (査読無: 依頼原稿)

7. 河原一樹, 六車美保, 宮路淳子, 中沢 隆. 「纏向遺跡出土巾着状布製品の質量分析」*纏向学研究* **1**, 80-84 (2013). (桜井市纏向学研究センター, 調査報告, 査読無)

[学会発表](計 7 件)

1. 中沢 隆, 河原一樹, 小池伸彦, 舘野和己. 「平城京左京二坊二条大路出土の墨に含まれていた膠の質量分析」第29回文化財科学会(京都大学), 2012年6月(口頭発表)

2. 島田昌依, 橋本裕希, 中沢 隆. 「GluC 消

化と強塩基性陰イオン交換体によるタンパク質のC末端ペプチドの濃縮・分離」第85回日本生化学会大会(博多), 2012年9月(ポスター発表)

3. 河原一樹, 六車美保, 橋本輝彦, 寺澤薫, 宮路淳子, 中沢 隆. 「纏向遺跡出土の巾着形布製品の質量分析」第30回文化財科学会(弘前大学), 2013年7月(口頭発表)
4. Mai Shimada, Yuki Hashimoto, Asako Shitamichi, Natsuki Nakada, Takashi Nakazawa. "Concentration and isolation of C-terminal peptides of proteins by GluC digestion and LC separation" 第86回日本生化学会大会(パシフィコ横浜), 2013年9月(口頭発表)
5. Takashi Nakazawa, Yoko Taniguchi, Kazuki Kawahara, Shunsuke Fukakusa, Joy Mazurek, Marie Svoboda, and Jeffrey Maish. "The use of enzyme-linked immunosorbant assay and mass spectrometry for the characterization of binding media in Egyptian-Ronamo portraits" 40th International Symposium on Archaeometry, ISA2014, The Getty Museum/University of California, Los Angeles, 2014年5月21日(ポスター発表)
6. Shunsuke Fukakusa, Kazuki Kawahara, Ahmed S. Shoeib, Abel Akarish, Hideya Kawasaki, Hiroshi Suita, Ryuichi Arakawa, Takashi Nakazawa. "Characterization by nano-LC/ESI-MS/MS of highly degraded collagen detected in 4,400-year-old Egyptian wall paintings of the Idout tomb" 62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Baltimore, MD, 2014年6月19日(ポスター発表)
7. 築山香織, 中田菜月, 片岡麻衣, 中野沙紀, 中沢 隆. 「ペプチドのN末端アスパラギン酸のアラニンへの変換」第87回日本生化学会大会(京都国際会議場), 2014年10月(ポスター発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

www.nara-wu.ac.jp/proteome/aprp/index.html
(奈良女子大学学際的共同研究体制に基づくタンパク質考古学創成事業本部: プロジェクトリーダーとして)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中沢 隆 (NAKAZAWA TAKASHI)
奈良女子大学・自然科学系・教授
研究者番号: 30175492

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし