

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860023

研究課題名(和文) 質量分析法を用いたS-ニトロシル化タンパク質の高感度分析法の開発

研究課題名(英文) Development of specific and sensitive method for analysis of protein S-nitrosylation using mass spectrometry

研究代表者

津元 裕樹 (TSUMOTO, HIROKI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：00409385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、質量分析法を用いた高感度なS-ニトロシル化タンパク質の分析手法の開発を目的とした。S-ニトロシル基の選択的かつ効率的な還元剤の開発を行い、トリフェニルホスフィンエステル誘導体の一つがアスコルビン酸と比較して有用である可能性を示唆できた。また、水溶性トリフェニルホスフィン誘導体TXPTSは、質量分析によるS-ニトロシル化ペプチドの検出と修飾部位の解析に有用である可能性を示唆できた。

研究成果の概要(英文)：Protein S-nitrosylation is an important post-translational modification in a wide range of biological processes. However, direct detection of S-nitrosylated peptide using mass spectrometry is difficult because of instability and low abundance. The aim of this study is to develop a specific and sensitive method for analysis of protein S-nitrosylation using mass spectrometry. It was demonstrated that triphenylphosphine ester derivative is useful for the selective and efficient reduction of S-NO bonds compared with ascorbate and the water-soluble phosphine TXPTS is useful for the detection of S-nitrosylated peptide using mass spectrometry.

研究分野：プロテオーム解析、質量分析

キーワード：S-ニトロシル化 質量分析 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO: nitric oxide) は L-アルギニンを基質として NO 合成酵素により産生されるガス状分子である。近年、タンパク質中システイン (Cys) 残基のチオール基 (-SH) に対する NO による S-ニトロシル (SNO) 化が可逆的なタンパク質翻訳後修飾として酵素活性や細胞内局在などの機能調節に関わっていることが多く報告され、重要な翻訳後修飾として注目されている。

SNO 化の役割を明らかにするためには、SNO 化されるタンパク質を網羅的に同定すること、あるいはターゲットとするタンパク質のどの部位が SNO 化されているかを明らかにする必要があり、SNO 化タンパク質の高感度な分析手法の開発が強く望まれていた。

(1) 網羅的解析における問題点

SNO 化タンパク質の分析手法としてピオチンスイッチ法が汎用されている。この方法は、SH 基の保護 (Step 1)、SNO 基の還元 (Step 2)、新たに生じた SH 基 (SNO 化されていた Cys 残基) のピオチン化 (Step 3) の 3 ステップにより行われ、SNO 化されていた Cys 残基をピオチン化し、アビジンで濃縮する方法である。SNO 基の還元剤としてアスコルビン酸が最も用いられているが、還元効率と選択性が低いという問題があった (図 1)。

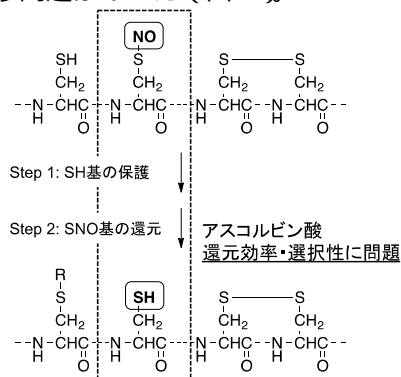


図 1. ピオチンスイッチ法の問題点

(2) ターゲット解析における問題点

質量分析法はタンパク質の同定やその翻訳後修飾解析において重要な分析手法の一つである。しかしながら、SNO 基の不安定さのため、特にマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization, MALDI) 法を用いる質量分析装置において、SNO 化ペプチドの直接検出および修飾部位の解析が困難であるという問題があった。

2. 研究の目的

新規 S-ニトロシル基還元剤の開発および S-ニトロシル化部位特異的誘導体化法の開発により、高感度な S-ニトロシル化タンパク質分析手法の開発を目的とした。

(1) 新規 S-ニトロシル基還元剤の開発

汎用されているアスコルビン酸と比較し、還元効率および特異性が高い S-ニトロシル基還元剤の探索を目的とした。

(2) S-ニトロシル化部位特異的誘導体化法の開発

水溶性トリアリールフォスフィン誘導体 TXPTS (ACS Chem. Biol. 2010, 5, 405) を SNO 化ペプチドの質量分析に応用し、簡便かつ効率的な SNO 化ペプチド分析法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規 S-ニトロシル基還元剤の開発

選択性についての検討

分子内ジスルフィド結合を有するペプチドと様々な還元剤との反応後、質量分析により反応生成物を確認し、選択性を評価した。

還元効率についての検討

SNO 化ペプチド/タンパク質を還元後、チオール親和性樹脂による精製を行い、還元効率を評価した。

(2) S-ニトロシル化部位特異的誘導体化法の開発

精製法および分析条件の検討

TXPTS 試薬を用いて SNO 化ペプチドの誘導体化反応を行い、C18 スピнкаラム、グラファイトスピнкаラム、強アニオン交換スピнкаラムと C18 スピнкаラムによる精製後、質量分析により評価した。

反応条件の検討

SNO 化ペプチドに対する TXPTS 試薬の等量、反応時間、バッファー組成について検討した。

質量分析は MALDI-TOF/TOF 型質量分析装置を用い、ポジティブモードとネガティブモードで測定した。マトリックスには -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) を用いた。

4. 研究成果

(1) 新規 S-ニトロシル基還元剤の開発

選択性についての検討

様々な還元剤と分子内ジスルフィド結合を有するペプチドの反応生成物を質量分析により解析し、ジスルフィド結合を還元しない化合物の探索を行った。ジチオトレイトール (DTT) を用いた場合、完全に還元されて分子量が 2 Da 増えたチオール体となり m/z 2656.4 にシグナルが検出された (図 2 a)。また、水溶性の高いトリフェニルホスフィンエステル PE-SO3 (Nitric Oxide 2012, 26, 20) では部分的に還元されることも明らかになった (図 2 b)。一方、トリフェニルホスフィンエステル PE-PEG (Nitric Oxide 2012, 26, 20) ではジスルフィド結合は還元されず、m/z 2654.4 にモノアイソトピックピークが検出され (図 2 c) 同位体分布もコントロールとして用いた水 (図 2 d) およびジメチルスルホキシド (DMSO) と同じであった (図 2 e)。

以上の結果より、ペプチドでの反応において、PE-PEG はジスルフィド結合を還元しないことが質量分析より明らかとなった。

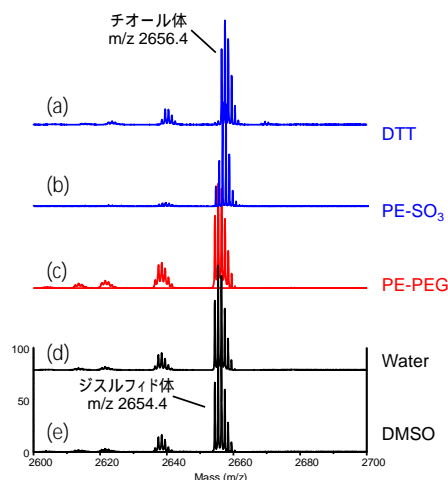


図 2. 分子内ジスルフィド結合を有するペプチドの MALDI-TOF マススペクトル(ポジティブモード)。

還元効率についての検討

ジスルフィド結合を還元しないことが明らかとなった PE-PEG の還元(濃縮)効率を検討するため、SNO 化ペプチドを含むサンプルを PE-PEG を用いて還元後、チオール反応性樹脂による濃縮を行い、濃縮および素通画分の質量分析をおこなった。その結果、SNO 化ペプチドのチオール体に相当する m/z 1267.6 のシグナルがほぼ濃縮画分で検出された(図 3b)。よって、SNO 化ペプチドのほとんどは還元されたものと考えられる。

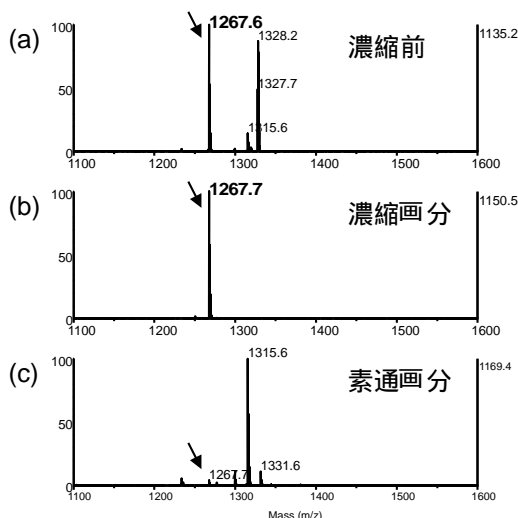


図 3. チオール親和性樹脂による濃縮前後の MALDI-TOF マススペクトル(ポジティブモード)。

次に、培養細胞から SNO 化タンパク質を濃縮し、ウエスタンブロッティングにより目的のタンパク質の検出を行った(奈良県立医科大学 小澤健太郎 准教授との共同研究)。その結果、化合物 A (PE-PEG) および化合物 B (PE-SO₃) は、汎用されているアスコルビン酸と比較して高い還元(濃縮)効率を示すこ

とがわかった(図 4)。

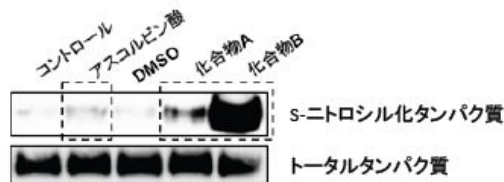


図 4. 還元剤による還元(濃縮)効率の違い

以上の結果より、PE-PEG はジスルフィド結合を還元せず(図 2)、アスコルビン酸と比較して還元(濃縮)効率が良いことがわかった(図 4)。よって、網羅的な S-ニトロシル化プロテオーム解析において、アスコルビン酸に代わる還元効率と選択性の良い還元剤となる可能が示唆された。

(2) S-ニトロシル化部位特異的誘導体化法の開発

精製法および分析条件の検討

TXPTS 試薬は 3 つのベンゼン環および酸性の硫酸基を有するため、グラファイトあるいは強アニオン交換で効率的に精製されることを期待した。しかしながら、これらの官能基を有するスピнкаラムではペプチドを精製できないことが質量分析によりわかった。

MALDI-TOF MS において SNO 化ペプチドの NO は脱離し、脱 NO 化ペプチドとして検出される。TXPTS 試薬による誘導体化前、ポジティブモードでは NO が脱離した $[M+H-NO]^+$ として m/z 1267.6 に検出された(図 5a)。一方、誘導体化後、C18 スピнкаラムを用いて精製してポジティブモードで測定を行った結果、 m/z 1267.6 のシグナル強度が減少し、 m/z 1233.7 および 1299.6 が新たに検出されることがわかった(図 5b)。さらにネガティブモードにより測定した結果、SNO 化ペプチドが TXPTS 試薬により誘導体化されたペプチドに相当する m/z 1849.8 ($[M-H]^-$) を検出することができた(図 5c)。

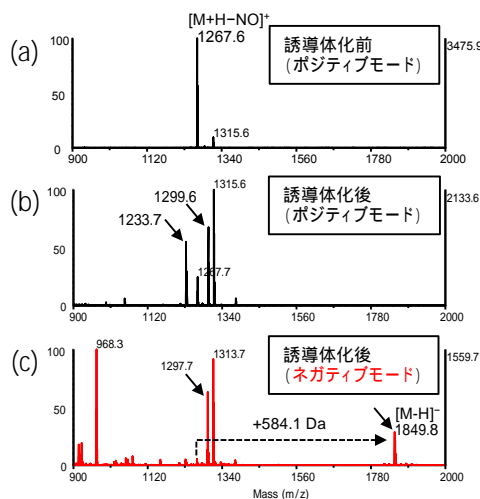


図 5. TXPTS 誘導体化前後の MALDI-TOF マススペクトル(ポジティブおよびネガティブモード)。

SNO 化 Cys 残基が誘導体化されたことを確認するため、TXPTS 誘導体化ペプチド (m/z 1849.6、 $[M-H]^-$) および非誘導体化ペプチド (m/z 1265.5、 $[M-H]^-$) の MALDI-TOF/TOF (ネガティブモード) を行った (図 6)。誘導体化前、SNO 化 Cys 残基 (C*) を含む y 系列のフラグメントイオン y5 (m/z 562.1) と y8 (m/z 904.2) が検出された (図 6 a)。一方、誘導体化後では、それらが TXPTS 誘導体化により 584 Da シフトした y5 (m/z 1145.9) と y8 (m/z 1488.0) が検出された (図 6 b)。これらの結果より、TXPTS 誘導体化部位が SNO 化 Cys 残基であることがわかった。

また、C-S および S-P 結合のフラグメントイオンと考えられる m/z 616.7 および 584.8 が強く検出された (図 6 b、図 7)。これらのフラグメントイオンは TXPTS 誘導体化、つまりは SNO 化ペプチドの診断イオンとして有用であると考えられる。

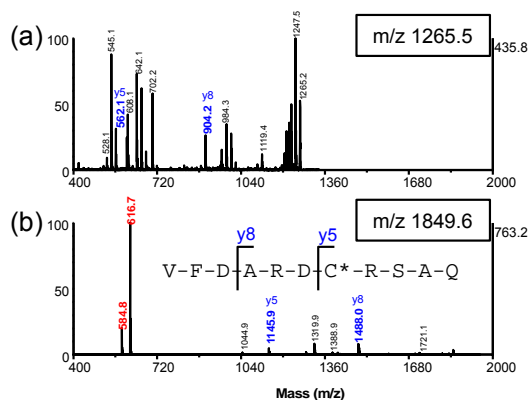


図 6. TXPTS 誘導体化前後の MALDI-TOF/TOF スペクトルの比較 (ネガティブモード)。

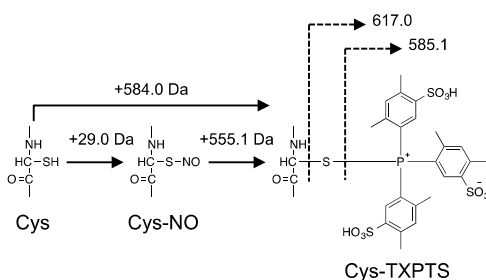


図 7. SNO 化 Cys 残基の TXPTS 誘導体化による分子量変化と予想される化学構造。

反応条件の検討

反応条件を検討した結果、SNO 化ペプチドに対して 20 等量の TXPTS 試薬 (10 μ M) を用い、反応バッファー (50 mM HEPES, 1 mM DTPA, pH 7.1) 中、室温で 1 時間反応させることで誘導体化反応が十分進行することがわかった (図 8 a)。また、TXPTS 試薬を加えない場合 (図 8 b)、SNO 化されていない同じ配列のペプチドの場合 (図 8 c)、TXPTS 誘導体化ペプチド (m/z 1850) は検出されなかったこと、ペプチドのシグナル (m/z 1266) が主に検出されたことから、SNO 基と TXPTS 試薬の特異的な反応によるものと考えられる。

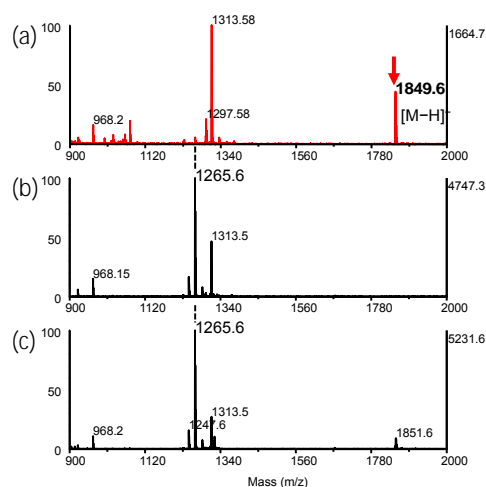


図 8. TXPTS 誘導体化反応生成物の MALDI-TOF マススペクトル (ネガティブモード)。

以上の結果より、SNO 化部位は TXPTS 試薬により容易に誘導体化され、MALDI-TOF/TOF のネガティブモードで検出および解析が可能であること、TXPTS 試薬に特徴的なフラグメントイオンが検出されることがわかった。よって、TXPTS 誘導体化法は、簡便な SNO 化ペプチド分析法となる可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津元 裕樹 (TSUMOTO HIROKI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号: 00409385

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし