

マトリックス支援レーザー脱離イオン化  
飛行時間型質量分析計を用いる  
ポリアミン生合成酵素の構造解析

古屋 牧子

## 目次

### 総論の部

緒言	1
第一章 ラットスペルミジン合成酵素の一次構造の決定	8
第一節 エドマン法によるラットスペルミジン合成酵素の アミノ酸配列分析	8
第二節 選択的切断により得られるペプチドの質量分析	10
第三節 ラットスペルミジン合成酵素の N 末端アセチル化の 証明	19
第四節 小括	21
第二章 ラット <i>S</i> -アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の一次構造の 決定	23
第一節 選択的切断によって得られるペプチドの質量分析	23
第二節 不可逆阻害剤を用いた $\alpha$ サブユニットの N 末端 ピルビン酸基の確認	26
第三節 ラット <i>S</i> -アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の $\beta$ サブユニットの N 末端アセチル化の証明	28
第四節 ジスルフィド結合の有無の確認	31
第五節 小括	32

第三章	プトレシンによるラット <i>S</i> -アデノシルメチオニン 脱炭酸酵素の構造安定化に関する研究	33
第一節	トリプシンによるラット <i>S</i> -アデノシルメチオニン 脱炭酸酵素の消化に対するプトレシンの影響	33
第二節	ヨード酢酸によるラット <i>S</i> -アデノシルメチオニン 脱炭酸酵素の阻害に対するプトレシンの影響	35
第三節	プトレシンによるラット <i>S</i> -アデノシルメチオニン 脱炭酸酵素の活性化と IAA 標識との関係	39
第四節	小括及び考察	41
総括		43
略号		45
謝辞		47
実験の部		48
引用文献		56

## 総論の部

### 緒言

近年、ヒトゲノム計画などの大規模なゲノム解読プロジェクトが実施され、ヒトの遺伝情報のすべてが明らかにされた[1-4]。ゲノムには生命をコントロールする基本情報が刻まれており、ゲノム解析により人類は広大な情報を手に入れることができた。一方、ゲノム配列はわかったが、生命現象のメカニズムはまだ未知である。ゲノム DNA をもとに RNA が作られ、RNA をもとにタンパク質が作られるという生命現象における流れの中で、ゲノム配列は一番下の階層であり、生命現象を理解するには、より高次の階層に向かって網羅的な解析を進める必要がある。そのため、タンパク質の構造と機能を解析するプロテオーム研究が進められている。

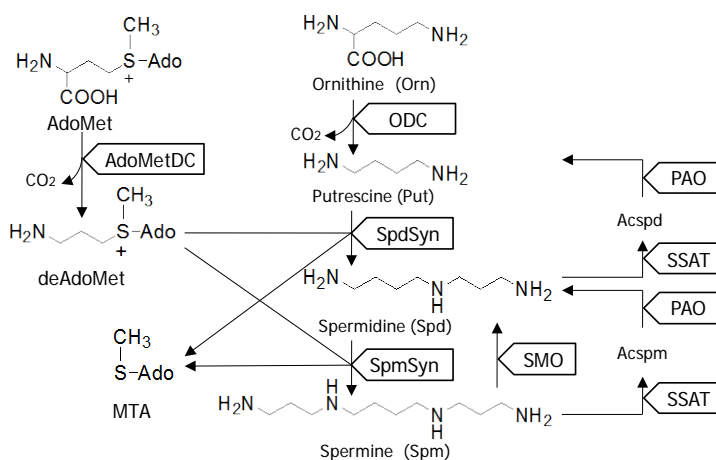
タンパク質は遺伝情報に基づいて生合成されるが、アミノ酸が単純に連なったポリペプチド鎖の形で細胞内に存在していることはむしろ少なく、その合成過程あるいは合成後に、リン酸化、糖鎖修飾、プロテアーゼによるプロセッシング、アセチル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受けている[5]。翻訳後修飾によってタンパク質は、その機能、安定性、及び細胞内局在などを変化させていることが明らかになっており、タンパク質の修飾反応は種々の細胞現象を語る上で不可欠なものとなっている。遺伝子工学やゲノム解析の発達により、微量精製タンパク質を得ればタンパク質を分子同定することは比較的容易になったが、タンパク質の翻訳後修飾については、cDNA のシーケンスからわかるタンパク質の一次構造から類推することはできても、実際にその修飾が細胞内で起きているかということは、個々のタンパク質にお

いて調べる必要があるのは今も昔も大きく変わらない。

タンパク質の機能はその立体構造と密接な関係をもっている [6, 7]。タンパク質はアミノ酸配列の違いによって異なった立体構造をもっており、その機能発現のためにはそれぞれ正しい折りたたみ構造をもっていなければならない。逆に、同じアミノ酸配列であっても正しい折りたたみをしていないタンパク質は機能をもたない。たとえば狂牛病やアルツハイマーのようにタンパク質の折りたたみに異常が生じることで発症する病気も多い。現在の技術では、アミノ酸配列の情報だけからタンパク質の立体構造を予測するのは不可能なケースがほとんどである。従って、タンパク質の立体構造解析を行うことによって、どのように折りたたまれているかを実験的に明らかにする必要がある。

哺乳動物の細胞にはジアミンであるプトレシン、ポリアミンであるスペルミジン、スペルミンの 3 種が存在し、細胞増殖や分化に伴い、それらの量が複雑に変動し、増殖・分化において重要な役割を演じている [8]。哺乳動物におけるポリアミンの生合成経路をしめす (Fig. 1)。オルニチンからオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) によって生じたプトレシンは、2 つの異なったアミノプロピル基転移酵素であるスペルミジン合成酵素 (SpdSyn) とスペルミン合成酵素 (SpmSyn) によって、スペルミジン、そしてスペルミンへと変換される。この時のアミノプロピル基供与体としては、脱炭酸化 *S*-アデノシルメチオニン (deAdoMet) が用いられるが、これは *S*-アデノシルメチオニン (AdoMet) から *S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (AdoMetDC) によって作られる。ポリアミンは、この 4 つの不可逆反応を触媒する酵素によって生成するが、一度アセチル化を受けた後に酸化的に分解されることで、プトレシンにまで戻る逆経路も存在する。その際、ポリアミンであるスペルミジ

ン及びスペルミンのアセチル化はスペルミジン／スペルミン  $N^1$ -アセチル基転移酵素 (SSAT) によって、またアセチルポリアミンのプロレシンあるいはスペルミジンへの変換はポリアミン酸化酵素 (PAO) によって行われる。また、アセチル化を介さずスペルミン酸化酵素 (SMO) により直接スペルミンからスペルミジンに代謝する経路が存在している。



AdoMet, S-adenosylmethionine; deAdoMet, decarboxylated S-adenosylmethionine; MTA, 5'-methyladenosine; AdoMetDC, S-adenosylmethionine decarboxylase; ODC, ornithine decarboxylase; SpdSyn, spermidine synthase; SpmSyn, spermine synthase; SSAT, spermidine/spermine  $N^1$ -acetyltransferase; PAO, acetyl polyamine oxidase; SMO, spermine oxidase

Fig. 1 Biosynthetic and metabolic pathway of polyamines

SpdSyn により生合成されるスペルミジンは、生物界に広く存在する各種ポリアミンの中でも中心的な存在であり、その一部は、タンパク質合成開始因子 eIF-5A の構成成分であるハイプシン生合成において、唯一のアミノブチル供与体として働くことが明らかになっている [9]。このような事実は、細胞増殖における SpdSyn の重要性を意味するものであり、本酵素について得られる情報は、ポリアミンの調節ひいては細胞増殖の調節に関して有用な指針を与える可能性がある。

哺乳動物由来 SpdSyn のアミノ酸配列については、ヒト[10]、マウス[11]及びラット[12]の cDNA 配列の解析結果が報告されていたが、ヒトとマウスの極めて高い類似性に比べて、ラットの N 末端約 30 残基及び C 末端 20 残基の類似性が乏しかったため、再検討の必要があった[12]。その頃、質量分析装置の飛躍的進歩が始まり、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) やエレクトロスプレーイオン化質量分析計 (ESI-MS) などが開発された。MALDI イオン化法は、従来のイオン化法では壊れやすかった大型の生体分子 (タンパク質、ペプチド、多糖など) のイオン化に向いているため、分子量の大きな高分子化合物の質量分析が可能である[13-17]。MALDI-TOF MS 分析は、必要とするサンプル量が微量で良く、サンプルの純度に対する要求性も比較的低いという利点がある。そこで本研究では、ラット前立腺からの微量な精製酵素の翻訳後修飾を含めた一次構造について、MALDI-TOF MS を用いて検討することにした。

ポリアミン生合成の律速酵素である AdoMetDC は、補欠分子族として共有結合したピルビン酸基を含んでいる数少ない酵素の 1 つである[18, 19]。これらピルビン酸依存性の脱炭酸酵素類はヒスタミン、deAdoMet、ホスファチジルエタノールアミン (細胞膜成分の一つ)、 $\beta$ アラニン (アセチル CoA の前駆体) など細胞機能にとって重要な成分の生成に関与することで知られ、薬物開発の重要な標的となっている。これまでに知られているすべての AdoMetDC は、プロエンザイムの形で生合成された後、内部のセリン残基が解裂し活性な酵素になることが明らかになっている[20-22]。このプロセスにおいて、セリン残基がピルビン酸基に変化する。ヒト AdoMetDC の解裂部位は、Leu-Ser-Glu-Ser-Ser-Met-の配列中の Glu<sub>67</sub> と Ser<sub>68</sub> (下線で示した) の間で起こる。この解裂によりプロエンザイムから成熟な酵素にとって必要不可欠な

$\alpha$ 及び $\beta$ と呼ばれる二つの異なったサブユニットを生じる[22-24]。哺乳動物 AdoMetDC のプロエンザイムのプロセッシングがプトレシンにより促進されること、また成熟な本酵素の活性がプトレシンにより活性化することが知られている[25-27]。これらのことから、本酵素にはプトレシンの作用部位の存在が予想されてきた。実際、Tobert らは、ポリヒスチジンタグ (His-tag) 付加ヒト組換え体 AdoMetDC の X 線構造解析を行い、プトレシンが $\beta$ シート構造に挟まれて存在することを報告している (Fig. 2) [28, 29]。

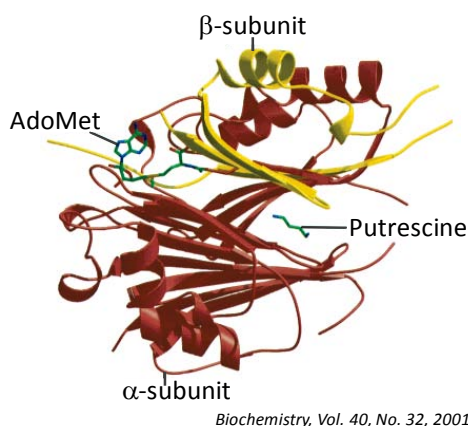


Fig. 2 AdoMetDC monomer diagram showing the bound AdoMet and putrescine

また近年、プトレシンを含んでいない His-tag 付加ヒト組換え体 AdoMetDC の X 線構造解析についても報告されており、プトレシンが結合している場合の立体構造と異なっていることが報告されている [30]。現在までに組換え体を用いた AdoMetDC の構造解析についてはいくつか報告されているが、哺乳動物から精製した AdoMetDC の立体構造については報告されていない。

タンパク質の立体構造解析は、遺伝子改変技術が確立されて以来、



大腸菌で発現した組換えタンパク質を用いる研究が中心となっている。多くの場合、大腸菌に由来するタンパク質との分離を容易にするため、ポリヒスチジン等のアフィニティータグをつけた組換えタンパク質として大腸菌内で生成させ、夾雑成分から単離精製して構造解析を行うのが一般的である。アフィニティータグの1つである His-tag は、組換えタンパク質の精製において最も利用されているタグであり、6 分子またはそれ以上の連続したヒスチジンを目的とする組換えタンパク質の N 末端または C 末端に連結させ、金属アフィニティークロマトグラフィーによって目的タンパクを精製することができる。His-tag 自身は立体構造を持たず小さい構造をしているため、目的タンパク質に与える影響は少ないと考えられている。しかしながら、目的とするタンパク質や研究の種類によっては思いもよらない影響を与える可能性がある[31-33]。また先述のように、生体内で機能しているタンパク質の多くは翻訳後修飾を受けているものが多く、それら翻訳後修飾による一次構造の変化が立体構造に影響を与える可能性もあり得る。従って生体内のありのままの状態を知るためには、生体組織から目的タンパク質あるいは複合体を分離、精製して解析する必要がある。

タンパク質のほとんどの立体構造は、X 線結晶構造解析法及び NMR のいずれかによって決定されている。これらの手法によって、タンパク質とリガントとの結合部位や複合体形成によって引き起こされるタンパク質の構造変化に関する原子レベルの構造情報を得ることができる。しかしながら、これらによるタンパク質の立体構造解析には高純度タンパク質が大量に必要となるため、哺乳動物から精製した微量の酵素タンパク質を分析するのは困難である。近年、「微量・迅速・正確」という質量分析法の特長を最大限利用し、タンパク質の機能に関わる高次構造や分子間相互作用に関する情報を質量分析法で得るための方

法を確立し、さまざまな生体高分子複合体の構造機能解析に応用した研究が展開され始めている[34]。また、側鎖選択的な化学修飾を含むさまざまな方法は、酵素活性部位における選択的なアミノ酸の役割や[35, 36]、タンパク質同士の相互作用[37]及びタンパク質の立体構造[38]を明らかにするために用いられている。この質量分析法と側鎖選択的な化学修飾を組み合わせることで、他の方法では検出できないタンパク質の機能の分子的特徴を明らかにすることが可能になると考えた。

このような背景から、本研究では、微量タンパク質の分析が可能なMALDI-TOF MSを用いた、タンパク質の構造解析法を念頭において、構造情報の少ないポリアミン生合成酵素タンパク質の構造解析を、一次構造及び三次構造に関して展開した。第一章では三種類の選択的切断法とMALDI-TOF MSを組み合わせた方法によるラット SpdSyn の一次構造について記した。第二章では、第一章で有用性を示した方法を応用し、ラット AdoMetDC の一次構造及びジスルフィド結合の有無について分析した結果を記した。第三章では、プトレシンによるラット AdoMetDC の構造安定化について記した。

## 第一章 ラットスペルミジン合成酵素の一次構造の決定

哺乳動物由来 SpdSyn のアミノ酸配列は、ヒト[10]、マウス[11]及びラット[12]由来酵素の cDNA 配列の解析結果に基づき報告されているが、ヒトとマウスの極めて高い類似性に比べて、ラットの N 末端約 30 残基及び C 末端約 20 残基の類似性が乏しく、タンパク質による直接分析が必要であった。そこで本研究では、ラット前立腺から精製した微量な酵素を用い、SpdSyn の一次構造を決定することを目的とした。

### 第一節 エドマン法によるラットスペルミジン合成酵素のアミノ酸配列分析

現在、質量分析計などのプロテオーム研究に関する装置が飛躍的な進歩を遂げ、アミノ酸配列の確認に MALDI-TOF MS や ESI-MS などの質量分析計を用いることが多くなった。しかし、未知タンパク質やゲノム情報が明らかでない試料を対象とした研究においては、現在もエドマン法をベースとしたアミノ酸解析法が重要な解析技術として用いられている。本研究を開始したのは、生体高分子の分析が可能な質量分析装置が普及する前の、気相シーケンサーでアミノ酸配列を分析するのが常套法とされていた頃である。気相シーケンサーで検出できるフェニルチオヒダントイン-アミノ酸は 1 pmol 程度であるが、実際のタンパク質を用いてアミノ酸配列分析を行うには、限定加水分解、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるペプチド分離精製などの収率を考慮しなければならず、少なくとも数十 $\mu$ g のタンパク質が必要である。気相シーケンサーでは、ペプチド 20~30 残基のアミノ酸配列を決めるのが限度であり、より長鎖ペプチドの場合には最後までア

ミノ酸配列を決めるのは難しい。そのためラット前立腺から少量の酵素を繰り返し精製しながら研究を進めた。精製した酵素をリジルエンドペプチダーゼで限定加水分解して得られるペプチドを逆相系のHPLCで分離精製し、気相シーケンサーによりアミノ酸配列分析を行った。その結果を、DNA配列に基づくマウス及びヒト SpdSyn のアミノ酸配列とともに Fig. 3 に示した。ラット由来酵素をリジルエンドペプチダーゼ消化することによって得られた6個のペプチド(K6, 7, 9, 11, 12, 15)の完全なアミノ酸配列及び7個のペプチド(K2, 3, 4, 5, 8, 13, 14)の部分的なアミノ酸配列をヒト及びマウス由来酵素の配列と比較した。

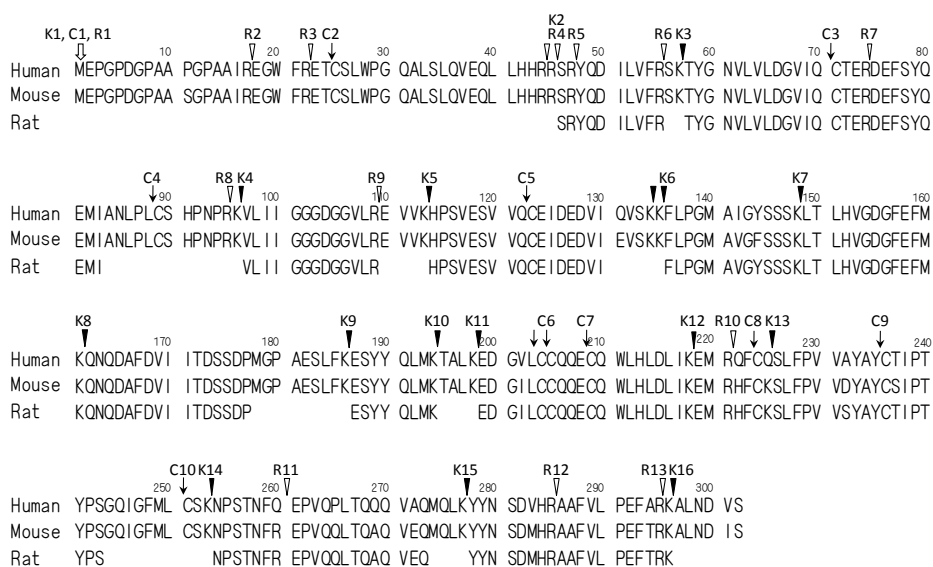


Fig. 3 cDNA-derived amino acid sequences of human and mouse spermidine synthase with a partial sequence of rat enzyme determined by the Edman method after lysylendopeptidase digestion

Specific cleavage sites based on the mouse sequence are shown with lysylendopeptidase (K1-K16), NTCB (C1-C10), and arginylendopeptidase (R1-R13). The marks also represent the resulting peptides.

この結果から、ラット由来酵素のアミノ酸配列は他の2種類、特にマウス由来酵素とかなり類似していることが示唆された。ヒトとマウス由来酵素のアミノ酸配列が異なる配列については、Val<sub>142</sub>, Ile<sub>202</sub>, His<sub>222</sub>, Lys<sub>225</sub>, Arg<sub>260</sub>, Gln<sub>265</sub>, Ala<sub>269</sub>, Glu<sub>272</sub>, Met<sub>283</sub>, Thr<sub>294</sub>の10個のアミノ酸はマウスと一致しており、Tyr<sub>144</sub>とThr<sub>237</sub>についてはヒトと一致していた。Ser<sub>232</sub>だけはラット特有であった。しかしながら、得られる精製酵素の量が限られていることや、リジルエンドペプチダーゼ処理においてC末端及びN末端アミノ酸を含むペプチドフラグメントが得られていないことから、エドマン法だけで全体のアミノ酸配列を確かめるのは、非常に困難であった。

## 第二節 選択的切断により得られるペプチドの質量分析

1. リジン残基での切断により得られるペプチドのMALDI-TOF MS分析  
エドマン法によるアミノ酸配列では、精製酵素量の制約のため、全配列を決定するまでには至らなかった。そこで、MALDI-TOF MSを用いて、ラット SpdSyn の選択的切断により生成するペプチド断片の質量を測定することで、未決定部分の配列をヒト、マウスの配列と比較しながら検討することにした。

MALDI-TOF MSは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法と飛行時間型の質量分析部からなる質量分析装置である (Fig. 4)。マトリックスに含まれたペプチド試料に、337 nmの窒素レーザーを照射し、ペプチドをイオン化後、加速電圧をかけることでペプチドを一定の方向に飛行させ、一定距離を飛行するのに要する時間を測定して質量を算出する。質量の軽いものほど速く飛ぶため、検出器に到達する時間が分子量の軽いものほど早くなる。

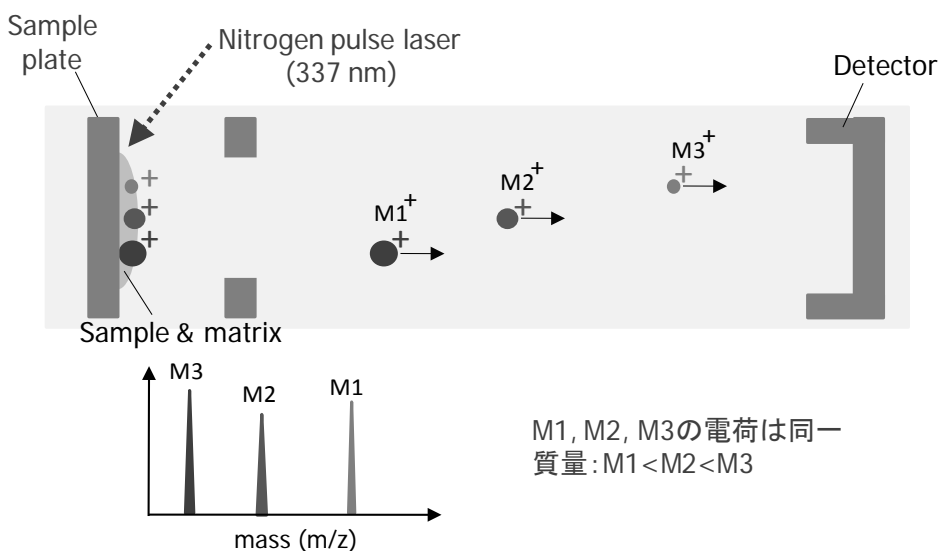


Fig. 4 Principle of MALDI-TOF MS

エドマン法によるアミノ酸配列分析を行った際のリジルエンドペプチダーゼ処理した精製ペプチド試料溶液の残分を用いて MALDI-TOF MS による測定を行った。Fig. 5 にはエドマン法ではアミノ酸配列が最後まで決められなかったペプチド K14 の測定結果を示した。得られた質量がヒト、マウスのアミノ酸配列から計算される質量と一致し、未決定の配列もヒト、マウスの配列と同じであることが強く示唆された。他の精製ペプチドについても同様に測定し、その結果を Table 1 にまとめた。ヒト及びマウスのアミノ酸配列に基づき、リジルエンドペプチダーゼ処理により得られることが予想されるペプチドを、N 末端側から K1~K16 と番号を付けた。エドマン法によりアミノ酸配列が明らかになっている K6, K7, K9, K11, K12, K15 の計算値と実測値の差が十分小さく、使用条件での MALDI-TOF MS の分析精度が満足し得るものであることが分かった。

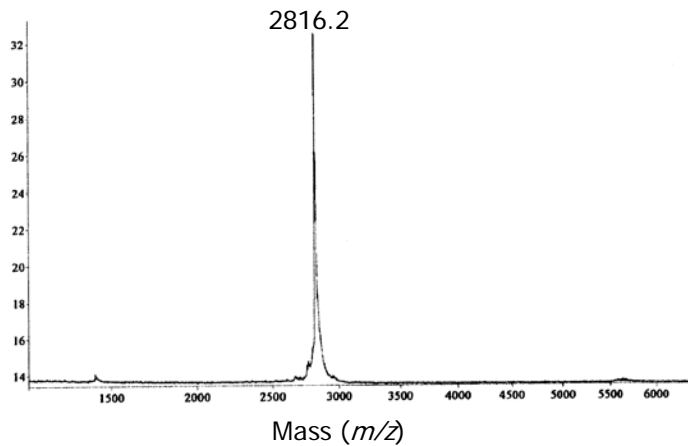


Fig. 5 MALDI-TOF MS spectrum of the K14 peptide purified by HPLC after lysylendopeptidase digestion of rat spermidine synthase

See the partial amino acid sequence determined by the Edman method in Fig. 3, and the calculated mass based on the mouse sequence in Table 1.

また、K14の他にエドマン法では明らかにならなかったK2, K3, K4, K5, K8, K13についても、ヒト、マウスのアミノ酸配列を参考にして未決定アミノ酸を補い、計算値と実測値を比較したところ、よく一致しており、ラット SpdSyn のアミノ酸配列がヒト、マウスのそれと高い類似性を有することが分かった。しかし、N 末端部分を含む K1、C 末端部分を含む K16 及び MALDI-TOF MS で分析するには不十分なテトラペプチドの K10 については検出することができず、他の選択的切断法を利用して MALDI-TOF MS による分析を行うことにした。

Table 1 MALDI-TOF MS data for reversed phase HPLC-fractionated peptides obtained by lysylendopeptidase-digestion of rat spermidine synthase

Fragments	Residues	<i>m/z</i>		
		$[M+H]^+$ calc <sup>a)</sup>	$[M+H]^+$ obs	$\Delta$
K1	1-45	5054.8	nd <sup>b)</sup>	
K2	46-57	1512.7	1513.0	-0.3
K3	58-96	4569.2	4567.9	1.3
K4	97-113	1682.0	1682.5	-0.5
K5	115-134	2400.6	2399.6	1.0
K6	135-148	1344.6	1345.3	-0.7
K7	149-161	1494.8	1494.6	0.2
K8	162-186	2727.0	2725.5	1.5
K9	187-194	1062.2	1063.5	-1.3
K10	195-198	432.5	nd	
K11	199-218	2491.9	2491.1	0.8
K12	219-225	1009.2	1010.6	-1.4
K13	226-253	3190.8	3189.1	1.7
K14	254-277	2816.2	2816.2	0
K15	278-296	2346.7	2346.8	-0.1
K16	297-302	632.7	nd	

a) The calculated values are based on the mouse sequence, except for K6 or K13 in which Tyr<sub>144</sub> or Ser<sub>232</sub> and Thr<sub>237</sub> are adopted, respectively.

b) No peptide detected by HPLC.

## 2. システイン残基での切断により得られるペプチドの MALDI-TOF MS 分析

ヒト、マウスのアミノ酸配列に基づき、25番目のシステインのN末端側で切断できれば、MALDI-TOF MSで分析するのに適した長さのN末端部分を含むペプチドが得られると考えられた。そこで、2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid (NTCB) 及び還元剤である tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)を用いてシステイン残基のN



端側を選択的に切断する Wu らの方法[39]を採用して行うことにした (Fig. 6)。この方法は、TCEP で精製酵素のジスルフィド結合を還元し、ついで NTCB によりシステインの SH 基をシアン化した後、tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)で pH 7.8 から 9.0 に上げると、付加したシアノ基がシステイン残基の N 端側と 2-iminothiazoline 環を形成しながら切断する反応を利用したものである。

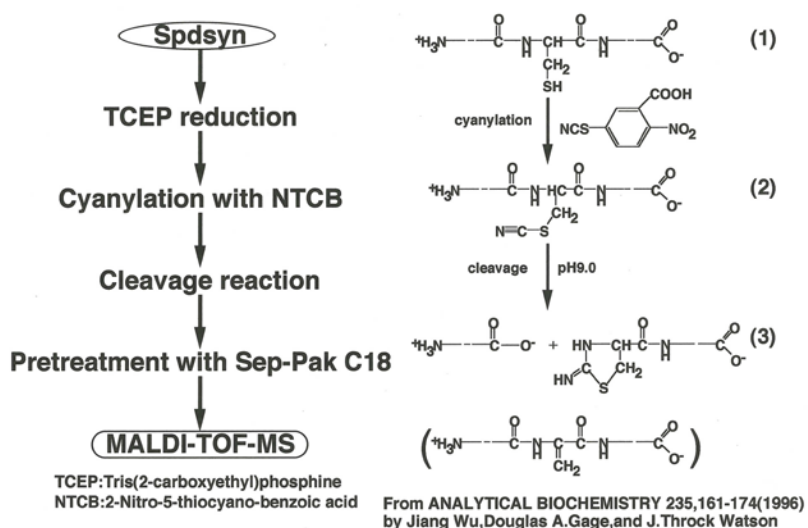


Fig. 6 Specific cleavage at cysteine residue by NTCB reaction

この方法により生じたペプチドは、N 末端が閉環しているためエドマン法によるアミノ酸配列分析には適用できないが、質量分析計である MALDI-TOF MS には有用である。この方法により得られることが予想されるペプチドに、N 末端側から番号 (C1-C10) をつけ解析した (Fig. 3)。この方法によって得られたペプチドを MALDI-TOF MS で測定したところ、いくつかのペプチドについて分子量が 103 Da 増加したピークを伴うことがわかった (Fig. 7)。この 103 Da 増加したピーク (図中\*印)

は、pHを上昇させる際に用いた高濃度の Tris が、2-iminothiazoline 環形成によるペプチドの切断の際に、一方のペプチドの C 末端側に結合したものであると考えられ、同じペプチドが 2 つのピークになることはスペクトルを複雑にするため、好ましくなかった。そこで Tris-HCl 緩衝液の代わりにリン酸緩衝液 (pH 7.8) を用い、水酸化ナトリウムを用いて pH 9.0 にすることにより切断した。

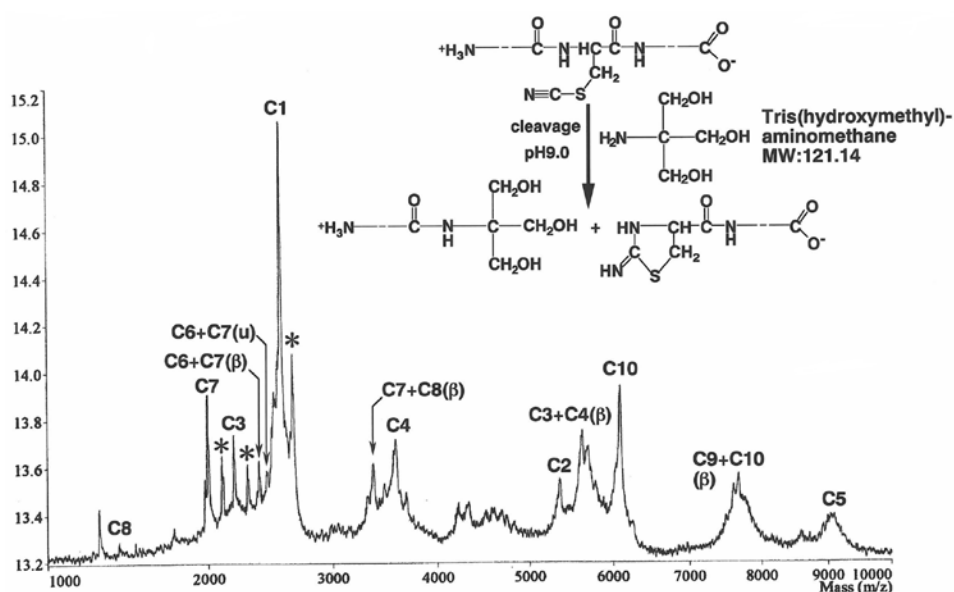


Fig. 7 MALDI-TOF MS spectrum of NTCB-cleaved peptides of spermidine synthase (pH 9.0 adjusted with Tris)

その結果、103 Da 増加したピークは消滅したので、この改良法によりラット SpdSyn を断片化し、質量分析することにした。なお、図中の記号(C1~C10)は、後述するように、計算値と比較して対応する実測値に合わせて記してある。設定した条件で反応後、Sep-Pak (C18) にペプチドを吸着し 0.1% TFA を含む 80% アセトニトリルで溶出したものにつ

き、質量分析した結果を Fig. 8, Table 2 にまとめた。既知の副反応により生じるペプチドを含めると、すべての切断されたペプチドが検出されたと考えられ、これまで明らかでなかった N 末端を含むペプチド及び C 末端を含むペプチドもヒト、マウスと高い類似性を有することがわかった。ペプチド C1 の分子量は、N 末端がアセチル化され、11 番目のアミノ酸がヒトと同じプロリンで、その他の配列はマウスと一致することが示唆された。また、C 末端ペプチドである C10 の分子量は、マウスのアミノ酸配列と一致することが分かった。他の部分については、144 番目、237 番目のアミノ酸がそれぞれヒトのアミノ酸配列のチロシン、スレオニンであり、232 番目のアミノ酸がラットに特異的なセリンであるのを除けば、マウスのアミノ酸配列と一致することがわかった。

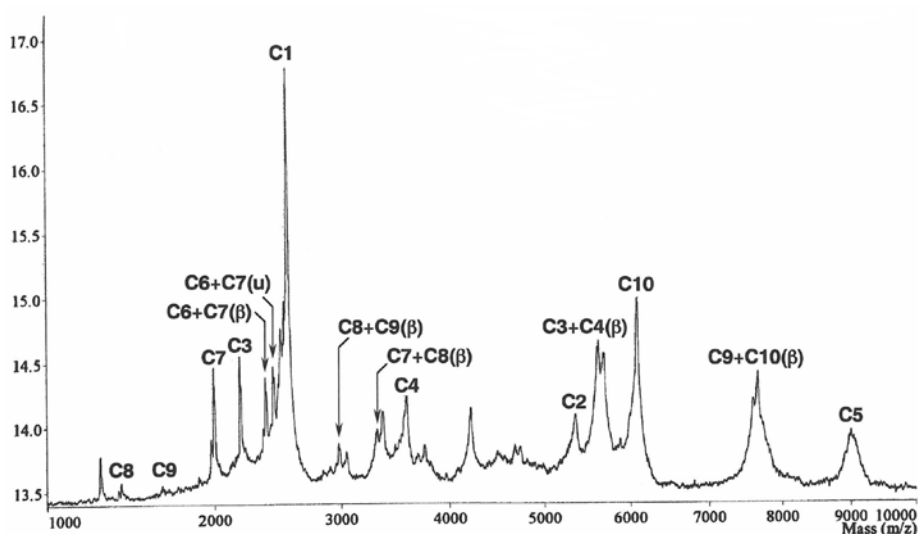


Fig. 8 MALDI-TOF MS spectrum and peak assignment of NTCEB-cleaved peptides of spermidine synthase (pH 9.0 adjusted with NaOH)

Table 2 MALDI-TOF MS data for Sep-Pak C18 retained peptides obtained by NTCB-treatment of rat spermidine synthase

Fragments	Residues	<i>m/z</i>		
		$[M+H]^+$ calc <sup>a)</sup>	$[M+H]^+$ obs	$\Delta$
C1	1-24	2552.9 <sup>b)</sup>	2552.4	0.5
C2	25-70	5364.3	5365.0	-0.7
C3	71-88	2185.5	2185.2	0.3
C4	89-122	3590.2	3588.8	1.4
C3+C4 ( $\beta$ ) <sup>c)</sup>	71-122	5697.6	5698.4	-0.8
C5	123-203	9026.3	9030.9	-4.6
C6	205-208	461.5	nd <sup>e)</sup>	
C7	209-223	1995.4	1995.5	-0.1
C6+C7 ( $\beta$ ) <sup>c)</sup>	205-223	2378.8	2378.4	0.4
C6+C7 (u) <sup>d)</sup>	205-223	2437.9	2437.2	0.7
C8	224-235	1402.7	1402.5	0.2
C7+C8 ( $\beta$ )	209-235	3320.0	3320.9	-0.9
C9	236-250	1654.0	1654.4	-0.4
C8+C9 ( $\beta$ )	224-250	2978.6	2980.4	-1.8
C10	251-302	6101.0	6101.2	-0.2
C9+C10 ( $\beta$ )	236-302	7676.8	7671.8	-5.0

a) The calculated values are based on the modified mouse sequence (Tyr<sub>144</sub>, Ser<sub>232</sub> and Thr<sub>237</sub>) except for C1. b) Calculated as the N-terminal acetylated human sequence (Pro<sub>11</sub>). c)  $\beta$ -Elimination peptide. d) Cyanylated and uncleaved peptide. e) Not detected.

### 3. アルギニン残基での切断により得られるペプチドの MALDI-TOF MS 分析

気相シーケンサーによるアミノ酸配列分析、リジルエンドペプチダーゼ処理、NTCB 処理後の MALDI-TOF MS 分析によりラット SpdSyn のアミノ酸配列はほぼ明らかになった。しかし、エドマン法でアミノ酸

配列が明らかになっていない部分に関して、リジルエンドペプチダーゼあるいはNTCB処理後のいずれか1つの方法でしか質量データが得られていない部分も存在した。そこで、これまでの結果をより確実なものとするため、アルギニルエンドペプチダーゼ処理による断片化を行い、MALDI-TOF MSによる測定を行った (Fig. 9)。図中 R1~R13 は、NTCB 処理の時と同様に予想されるペプチドに N 端側から番号をつけ、計算値と比較して対応する実測値ピークに合わせて記したものであり、結果を Table 3 にまとめた。R1~R3、R5、R8、R11~R13 について対応する質量ピークを検出することができ (Fig. 9)、いずれもこれまでに得られた結果を強く支持するものであった。

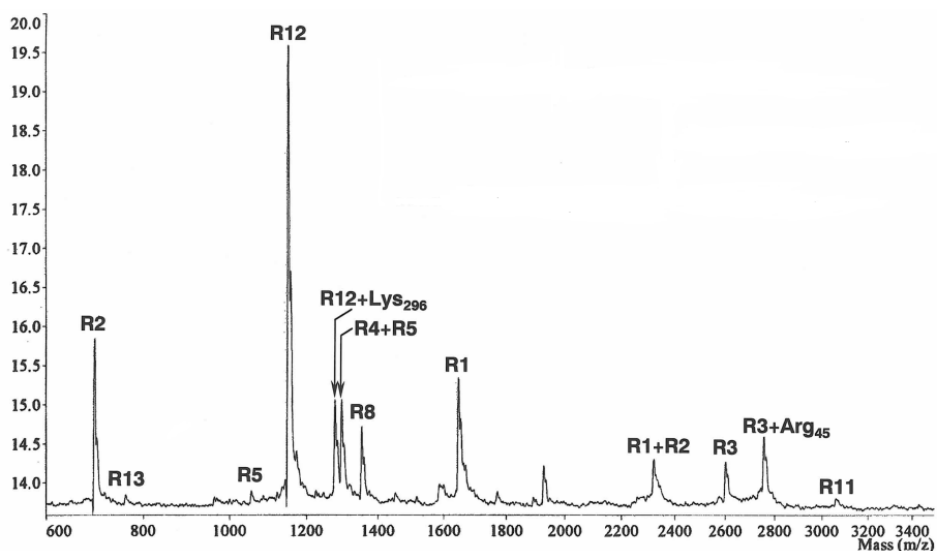


Fig. 9 MALDI-TOF MS spectrum of peptides obtained after the digestion of rat spermidine synthase with arginylendopeptidase

The digest was applied directly to the MS. Peptide marks on peaks were assigned after verification of the observed  $m/z$  values from the calculated values listed in Table 3.

Table 3 MALDI-TOF MS data for peptides obtained by arginylendopeptidase-digestion of rat spermidine synthase

Fragments	Residues	<i>m/z</i>		
		$[M+H]^+$ calc <sup>a)</sup>	$[M+H]^+$ obs	$\Delta$
R1	1-17	1646.9 <sup>b)</sup>	1646.2	0.7
R2	18-22	694.8	695.3	-0.5
R1+R2	1-22	2322.6 <sup>b)</sup>	2321.9	0.7
R3	23-44	2605.0	2604.9	0.1
R3+Arg <sup>45</sup>	23-45	2761.1	2759.9	1.2
R4	46-47	262.3	nd	
R5	48-55	1054.2	1055.0	-0.8
R4+R5	46-55	1297.5	1297.7	-0.2
R6	56-74	2154.5	nd	
R7	75-95	2520.8	nd	
R8	96-109	1354.6	1354.4	0.2
R9	110-221	12839.6	nd	
R10	222-260	4581.3	nd	
R11	261-285	3066.4	3063.1	3.3
R12	286-295	1151.4	1151.5	-0.1
R12+Lys <sup>296</sup>	286-296	1279.5	1279.5	0
R13	296-302	760.9	760.9	0

a) The calculated values are based on the modified mouse sequence (Pro<sup>11</sup>, Tyr<sup>144</sup>, Ser<sup>232</sup> and Thr<sup>237</sup>). b) Calculated as the N-terminal acetylated peptides  
c) Not detected.

### 第三節 ラットスペルミジン合成酵素のN末端アセチル化の証明

N末端がアセチル化されていることをより直接的に調べるために、N末端を含むペプチド(C1, R1)をHPLCにより精製する必要があった。しかし、酵素試料が微量である上に、断片化のためのNTCB処理、アルギニルエンドペプチダーゼ処理により試料が希釈されたり、試料溶液の

塩濃度が上昇したりするため、第一節で用いた HPLC 条件で精製するのは困難であった。

そこで、反応液の全量を直接カラムに導入し、濃縮精製が可能なカラムスイッチング法を採用した (Fig. 10)。微量ペプチドの分離のため内径 1 mm のセミマイクロカラムを採用し、50  $\mu\text{l}/\text{min}$  のグラジエント溶出を行い、数 pmol のペプチドの分離、検出を可能とする HPLC 系を設定して C1 及び R1 の精製を行った。ピークの検索は、溶出液 100  $\mu\text{L}$  ずつを分画して集め、各分画の 1  $\mu\text{L}$  を MALDI-TOF MS で質量測定することにより行った。

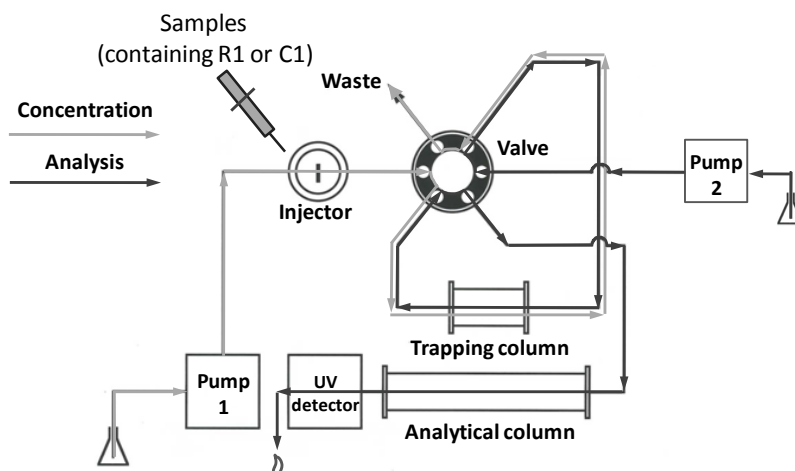


Fig. 10 Schematic diagrams of HPLC for separation and detection of picomole order of peptides

アシルアミノ酸遊離酵素 (AARE) は、N 末端がアシル化されたペプチドからアシルアミノ酸を遊離する酵素である。本酵素の N 末メチオニンがアセチル化されているとすれば、C1, R1 とともに AARE 処理によりアセチルメチオニンの脱離したペプチドが検出されるはずである。

そこで、これまでに得られた配列を基にして、C1, R1 からアセチルメチオニンが脱離したペプチドの計算値を算出し、実測値と比較した。その結果、AARE 処理により C1 からは  $m/z$  2378.7、R1 からは  $m/z$  1473.8 にそれぞれアセチルメチオニンが脱離したペプチドが新たに検出され、ラット SpdSyn の N 末端のメチオニンがアセチル化を受けていることが明らかとなった (Fig. 11)。

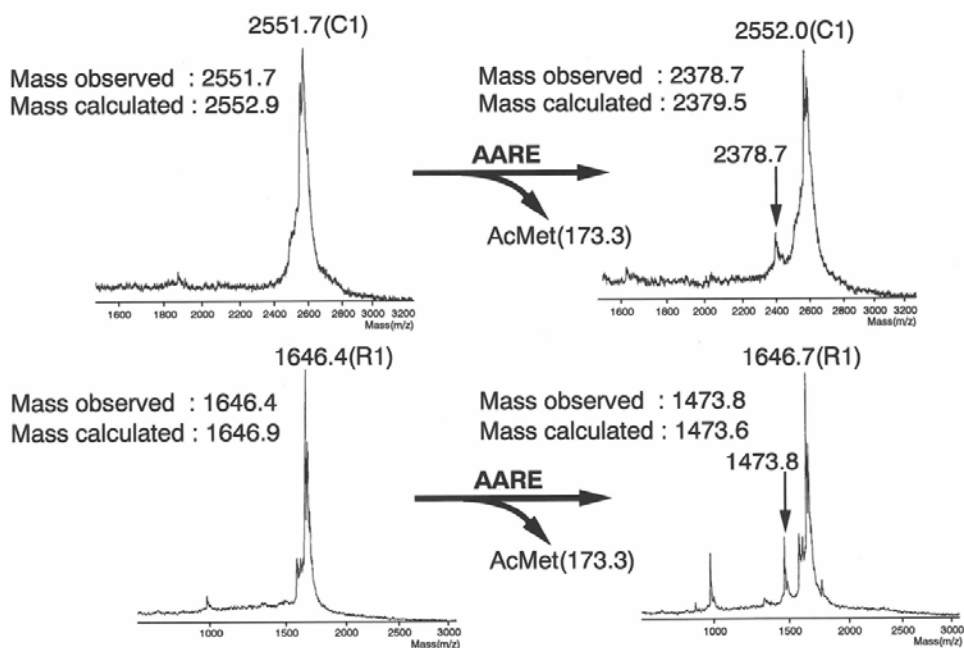


Fig. 11 Liberation of acetylmethionine from the peptides, C1 and R1, with AARE

#### 第四節 小括

本章では、ラット前立腺から精製した SpdSyn の一次構造を、三種類の選択的切断法と MALDI-TOF MS 分析を組み合わせる方法によって決定



した (Fig. 12)。また、微量の N 末端ペプチドをカラムスイッチング-セミマイクロカラム HPLC により分離精製し、得られたペプチドに AARE を作用させた後、MALDI-TOF MS 分析を行うことにより、N 末端のアセチル化を明らかにした。以上の結果から、ラット SpdSyn のアミノ酸配列は、ヒト及びマウスのアミノ酸配列とそれぞれ 95.7%、98.7% と高い類似性を有することが明らかとなった。本章の結果は、遺伝子配列から予想されていたアミノ酸配列の誤りを指摘すると同時に、質量分析を用いるアミノ酸配列分析について、NTCB によるシステイン残基の選択的切断法の有用性を示した。

```

AcMEPGPDGPAA  PGPAAI REGW  FRETCSLWPG  QALSLOVEQL   40
LHRRRSRYQD  ILVFRSKTYG  NVLVLDGVIQ  CTERDEFSYQ   80
EMIANLPLCS  HPNPRKVLII  GGDGGVLRE  VVKHPSVESV  120
VQCEIDEDVI  EVSKKFLPGM  AVGYSSSKLT  LHVGDGFEFM  180
KQNQDAFDVI  ITDSSDPMGP  AESLFKESYY  QLMKTALKED  200
GILCCQEQEQ  WLHLDLIKEM  RHFCKSLFPV  VSYAYCTIPT  240
YPSGQIGFML  CSKNPSTNFR  EPVQQLTQAO  VEQMQLKYYN  280
SDMHRAAFVL  PEFTRKALND  IS

```

Fig. 12 Primary structure of rat spermidine synthase

## 第二章 ラット *S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の一次構造の決定

ラット[23, 40]、ハムスター[41]及びウシ由来 AdoMetDC の cDNA 配列は、ヒト AdoMetDC の cDNA 配列と 90%以上の相同性を有しており、推定されるアミノ酸配列も 3~7 残基程度の相違であることが知られているが、アミノ酸配列分析に基づく AdoMetDC のアミノ酸配列は、ウシ由来の酵素においてリジルエンドペプチダーゼ消化で得られたいくつかのペプチドについて確認されている以外は、報告がない[42]。ラット肝臓から精製された AdoMetDC とラット背筋から精製された AdoMetDC では、等電点、プトレシンによる活性化、基質である AdoMet の  $K_m$  値、及び AdoMetDC の競合阻害剤である methylglyoxal bis(guanyl)hydrazone (MGBG) の親和性が異なることから、生体内で翻訳後修飾を受ける可能性が示唆されている[43]。また、ウシ及びラット由来 AdoMetDC についてエドマン分析を行った際に N 末端アミノ酸が検出されなかったことから、 $\alpha$ サブユニットの N 末端がピルビン酸により保護されているだけでなく、 $\beta$ サブユニットの N 末端も何らかの修飾を受けている可能性が示唆されている[44]。翻訳後修飾の有無は、本酵素量の細胞内調節様式を理解する上で重要である。そこで本章では、第一章で有用性を示した MALDI-TOF MS と選択的切断法を組み合わせる方法[45]をラット前立腺由来 AdoMetDC に応用し、翻訳後修飾を含めた一次構造及びジスルフィド結合の有無について検討した。

### 第一節 選択的切断によって得られるペプチドの質量分析

ラット前立腺から精製した AdoMetDC について MALDI-TOF MS 分析を

行ったところ、明瞭な2つの $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットに相当するピークが検出された (Fig. 13)。高分子量側のピーク ( $m/z$  30498.8) は、cDNA配列から推察される $\alpha$ サブユニットの計算値 ( $m/z$  30,503.9) と近い値を示した。しかし、低分子量側のピーク ( $m/z$  7,678.9) は $\beta$ サブユニットの計算値よりも42.4 Da大きい値を示し、 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列が推定される配列と異なるかあるいは翻訳後修飾を受けている可能性が示唆された。

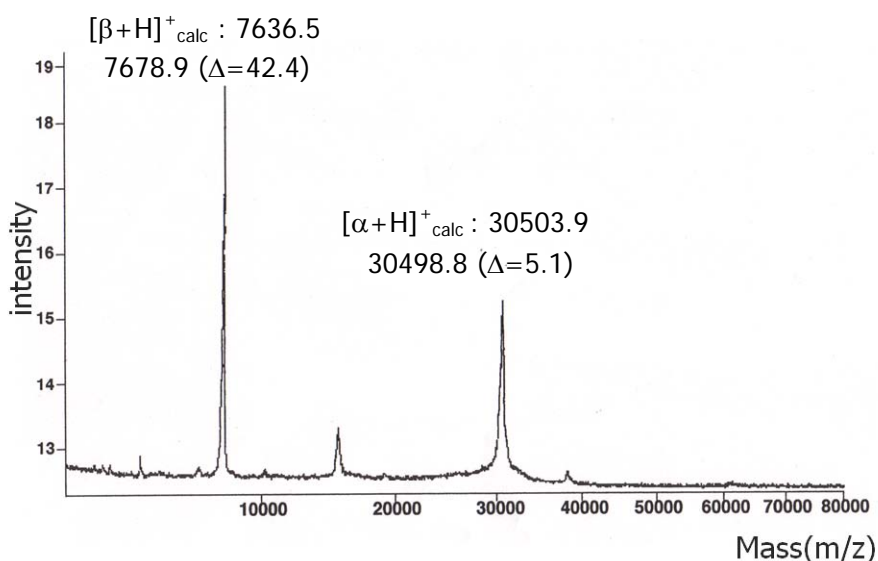


Fig. 13 MALDI-TOF MS spectrum of purified AdoMetDC from rat prostate

$[\alpha+H]^+_{\text{calc}}$  indicates the calculated mass of the  $\alpha$ -subunit based on rat AdoMetDC with Ser-68 converted into a pyruvate residue.  $[\beta+H]^+_{\text{calc}}$  indicates the calculated mass of the  $\beta$ -subunit based on the rat AdoMetDC sequence.

そこで AdoMetDC の一次構造を確認するために、ラット前立腺から精製した AdoMetDC をリジルエンドペプチダーゼ消化、アルギニルエンドペプチダーゼ消化、トリプシン消化、V8 プロテアーゼ消化及び NTCB を用いた化学的方法により選択的に切断した後、MALDI-TOF MS を行った。得られたピークについては、EXPASy-PeptideMass を用いて計算した理論値と比較した (Fig. 14)。

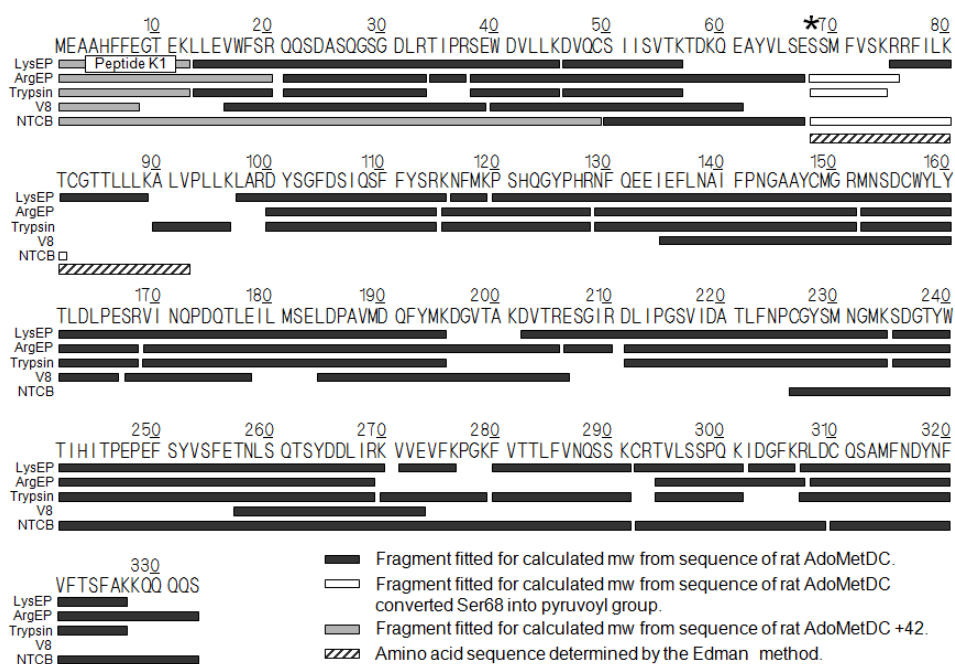


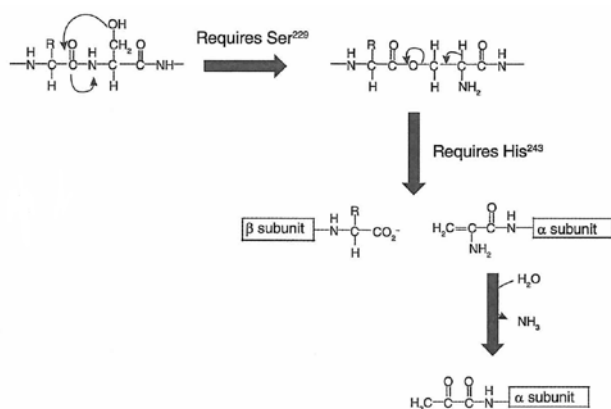
Fig. 14 Amino acid sequence of AdoMetDC based on the rat cDNA sequence and MALDI-TOF MS data from purified rat prostate AdoMetDC

Asterisk indicates the site of pyruvate residue formation in the self-cleavage reaction. LysEP, lysylendopeptidase digestion; ArgEP, arginylendopeptidase digestion; V8, V8 protease digestion; NTCB, chemical method using NTCB.

$\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットのN末端を含むアミノ酸配列以外の部分については、2種類以上の切断法により確認することができた。また、すべての切断法において $\beta$ サブユニットのN末端ペプチドの計算値よりも分子量が42 Da多いペプチドが検出され、 $\beta$ サブユニットのN末端部分がアセチル化されている可能性が強く示唆された。

## 第二節 不可逆阻害剤を用いた $\alpha$ サブユニットのN末端ピルビン酸基の確認

本節では、前節において確認できなかった $\alpha$ サブユニットのN末端を含むアミノ酸配列についての分析を試みた。報告されているすべてのAdoMetDCは、プロエンザイムの形で生合成された後、内部のセリン残基が解裂し活性な酵素になることが明らかになっている[46]。このプロセスにおいて、内部に存在するセリン残基がピルビン酸基に変化し、 $\alpha$ サブユニットのN末端がピルビン酸で保護されているため、エドマン分解により分析することができない(Fig. 15)。



*Essay in Biochemistry, Vol. 46, 25-45, 2009*

Fig. 15 Formation of pyruvate

The mechanism by which cleavage occurs via non-hydrolytic serinolysis.

一方、組換え体ヒト AdoMetDC が、基質である AdoMet や *cis*-amino-2-butenyl 基を有する不可逆阻害剤によって不活性化される際、ピルビン酸がトランスアミナーゼによってアラニンに変換されることが報告されている (Fig. 16) [47, 48]。そこで類似の構造を有する阻害剤 5'-{[(*Z*)-4-amino-2-butenyl]amino}-5'-deoxyadenosine (MDL74038) によって不活化したラット由来 AdoMetDC をについて、気相シーケンサーにより分析を行った。その結果、ピルビン酸基がアラニンに変換された場合のラット AdoMetDC のアミノ酸配列と一致する配列 ASMFVSKRRFILKTXGTLLLLKALV が検出された。

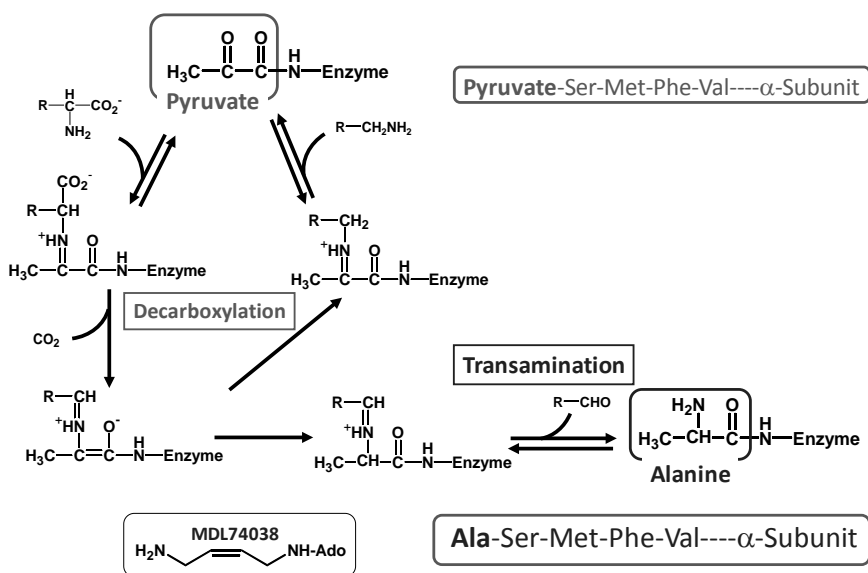


Fig. 16 Reaction mechanism of AdoMetDC

### 第三節 ラット *S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の $\beta$ サブユニットのN末端アセチル化の証明

次に、 $\beta$ サブユニットのN末端のアミノ酸配列について確認した。リジルエンドペプチダーゼ処理で得られたペプチドK1 (Met<sub>1</sub>-Lys<sub>12</sub>のMet<sub>1</sub>がアセチル化されている  $m/z$  1438.6 と一致する  $m/z$  1438.6 のペプチド) を逆相 HPLC により分離し、AARE により処理した。その結果、ペプチドK1 からアセチルメチオニンの遊離が確認された (Fig. 17)

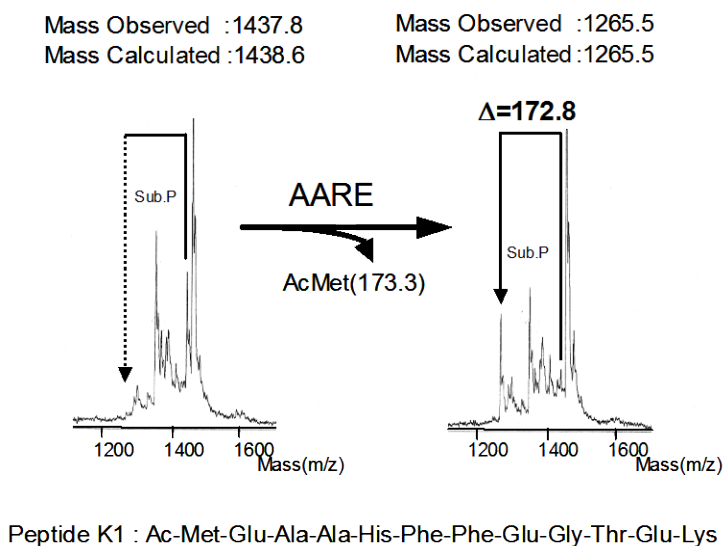


Fig. 17 Liberation of acetylmethionine from the peptide K1 by reaction with AARE

The lysylendopeptidase digestion product of purified rat prostate AdoMetDC, peptide K1, was incubated with AARE as described in Materials and Methods. The incubation mixture was analyzed by MALDI-TOF MS.

さらに、 $\beta$ サブユニットの N 末端アセチル化について MALDI-post-source decay (PSD) 分析を用いて直接配列分析を行った。MALDI-PSD 分析は、MALDI 分析で得られる生成イオンの中からプリカーサーイオンを選択し、通常の測定時よりレーザーパワーを上げて測定すると、ペプチドの自己崩壊が起こり、フラグメントイオンがイオン化後加速電圧により飛行しているところに進行とは逆の電場をかけてイオン群を折り返し、分離検出する方法であり、この方法を用いることによりアミノ酸配列を決定することができる (Fig. 18)。

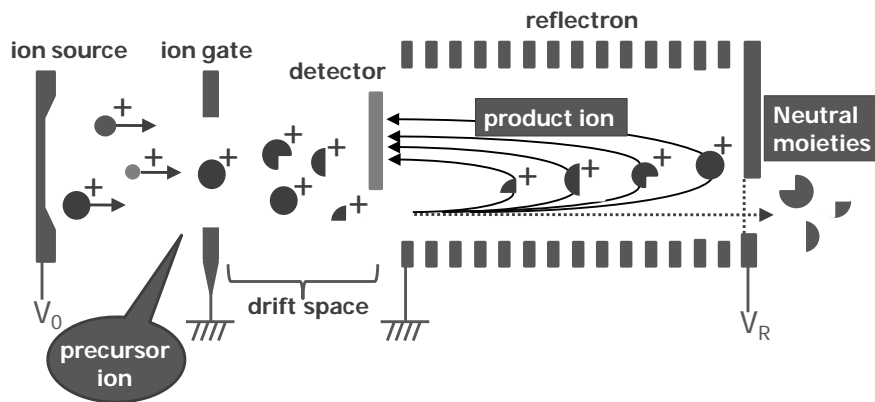


Fig. 18 Principle of PSD analysis

PSD 分析では、ペプチドの多様な切断が起こりえるが、通常アミド結合の切断が優先される傾向にある。しかしその際、Fig. 19 に示すように[49]、一か所の切断より、N 末端側のイオン (b 系列イオン) と C 末端側のイオン (y 系列イオン) の 2 種のイオンの生成が起こる。この分析法は初期に導入された MALDI-TOF MS では分析が不可能であったため、その後に導入された AXIMA-CFR (Shimadzu/Kratos) によって分析を行った。Fig. 20 に示したように  $m/z$  1438.64 のプリカーサーイオンから、



アセチル基が脱離した  $m/z$  1306.40 (y12) のピークが検出され、その後のアミノ酸配列も cDNA 配列から予想されるアミノ酸配列と一致したことから、N 末端がアセチルメチオニンであることが明らかとなった。

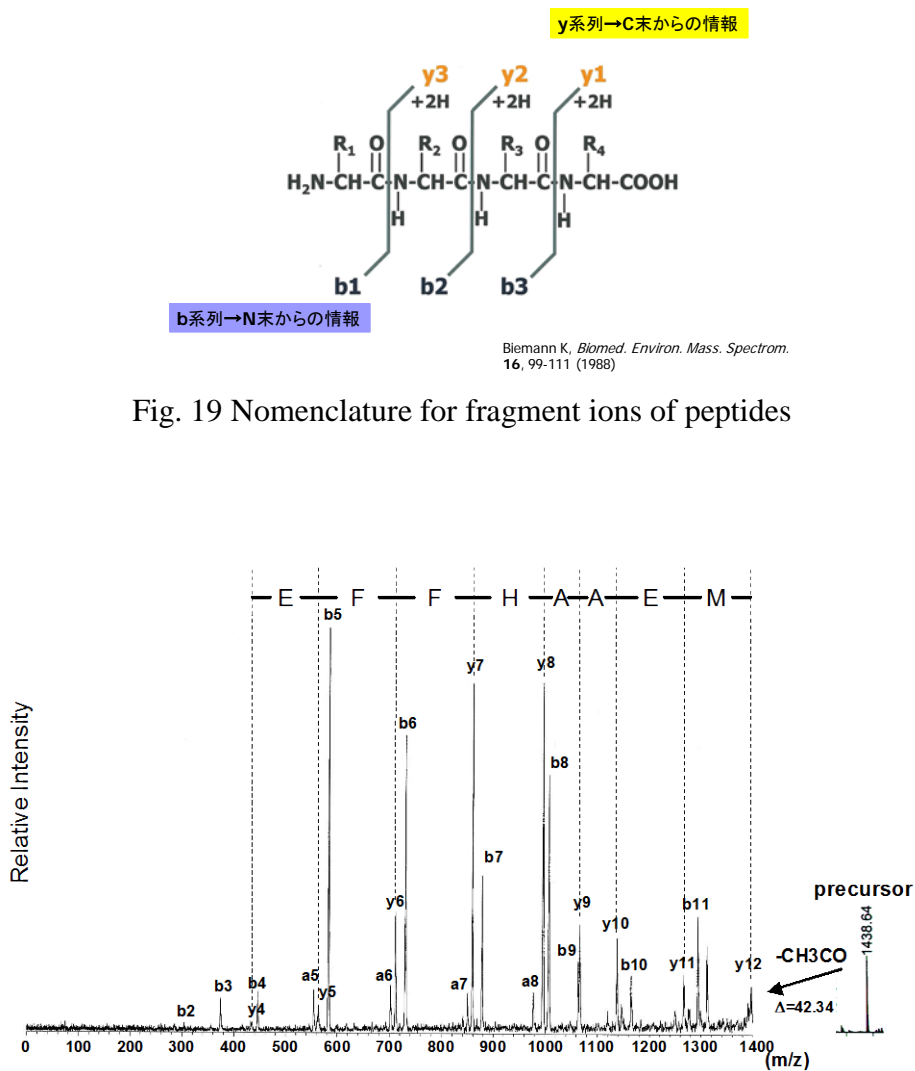


Fig. 20 MALDI-PSD spectrum of the peptide containing the  $\beta$ -subunit N-terminus of AdoMetDC, derived from tryptic digestion

#### 第四節 ジスルフィド結合の有無の確認

ラット AdoMetDC は $\alpha$ サブユニット内に 6 個のシステイン残基(Cys<sub>82</sub>, Cys<sub>148</sub>, Cys<sub>156</sub>, Cys<sub>226</sub>, Cys<sub>292</sub>, Cys<sub>310</sub>)、 $\beta$ サブユニット内に 1 個のシステイン残基 (Cys<sub>49</sub>) を有している。これら 7 個のシステインがスルフヒドリル基として存在しているのか、またはジスルフィドの状態で存在しているのかを確認するために、ジチオスレイトール (DTT) の存在下あるいは非存在下においてヨード酢酸 (IAA) によりカルボキシメチル化し、リジルエンドペプチダーゼ及びトリプシン消化を行った。

リジルエンドペプチダーゼ消化によって得られたペプチドのうち、Asp<sub>46</sub>-Lys<sub>56</sub> (Cys<sub>49</sub> がカルボキシメチル化された分子量,  $m/z$  1250.6)、Thr<sub>81</sub>-Lys<sub>89</sub> (Cys<sub>82</sub> がカルボキシメチル化された分子量,  $m/z$  1007.5)、Asp<sub>202</sub>-Lys<sub>234</sub> (Cys<sub>226</sub> がカルボキシメチル化された分子量,  $m/z$  3617.1)、Cys<sub>292</sub>-Lys<sub>301</sub> (Cys<sub>292</sub> がカルボキシメチル化された分子量,  $m/z$  1176.6) 及び Arg<sub>307</sub>-Lys<sub>327</sub> (Cys<sub>310</sub> がカルボキシメチル化された分子量,  $m/z$  2563.9) が DTT の有無にかかわらず検出された。また、トリプシン消化によって得られたペプチドのうち、Asp<sub>46</sub>-Lys<sub>56</sub> (Cys<sub>49</sub> がカルボキシメチル化された分子量,  $m/z$  1250.6)、Asn<sub>129</sub>-Arg<sub>151</sub> (Cys<sub>148</sub> がカルボキシメチル化された分子量,  $m/z$  2694.0)、Met<sub>152</sub>-Arg<sub>168</sub> (Cys<sub>156</sub> がカルボキシメチル化された分子量,  $m/z$  2163.9)、Asp<sub>211</sub>-Lys<sub>234</sub> (Cys<sub>226</sub> がカルボキシメチル化された分子量,  $m/z$  2603.0) 及び Leu<sub>308</sub>-Lys<sub>327</sub> (Cys<sub>310</sub> がカルボキシメチル化された分子量,  $m/z$  2406.0) の 5 つのペプチドが DTT の有無にかかわらず検出された。これらの結果から、ラット前立腺由来 AdoMetDC に存在する 7 つのシステイン全てがスルフヒドリル基として存在していることが示唆された。

その後、4 カ月以上氷上で保存したラット前立腺由来 AdoMetDC の

Cys<sub>148</sub> と Cys<sub>156</sub> の間にジスルフィド結合が形成されていることを確認した。His-tag 付加ヒト組換え体 AdoMetDC の立体構造解析において、Cys<sub>148</sub> と Cys<sub>156</sub> は近傍に存在していることが示されている [28, 50]。この結果は、この 2 つのシステインが溶液中においても近い位置に存在していることを示唆した。この現象は試験内で起こったことではあるが、酸化還元条件によっては細胞内でも起こりうる可能性があると考えられる。

## 第五節 小括

本章では、MALDI-TOF MS と気相シーケンサーを用いることにより、ラット前立腺 AdoMetDC の一次構造を決定した。本章の結果は、cDNA 配列から予想されるラット AdoMetDC タンパク質のアミノ酸配列が正しいことを示すとともに、 $\alpha$ サブユニットの N 末端がヒト酵素と同様にピルビン酸基に変換されていること、また AARE を用いる方法及び MALDI-PSD 分析により、 $\beta$ -サブユニットの N 末端がアセチル化されていることを示した (Fig. 21)。

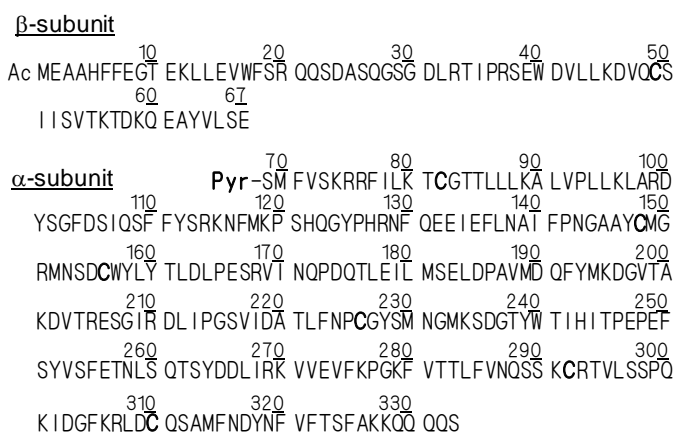


Fig. 21 Primary structure of rat prostate AdoMetDC

### 第三章 プトレシンによるラット S-アデノシルメチオニン 脱炭酸酵素の構造安定化に関する研究

諸言で述べたように、哺乳動物 AdoMetDC のプロエンザイムのプロセッシングがポリアミンの前駆体であるプトレシンによって促進されること、また生成された成熟酵素の活性がプトレシンにより著しく上昇することから[25-27]、本酵素にはプトレシンの作用部位の存在が予想されてきた。His-tag 付加ヒト組換え体 AdoMetDC の X 線構造解析の結果から、プトレシンが $\beta$ シート構造に挟まれて存在していることが報告されているが[28, 29]、組織中における本酵素の立体構造に対する作用の詳細は明らかになっていない。そこで本章では、第二章で明らかにしたラット AdoMetDC に関する一次構造情報をもとに、MALDI-TOF MS によって化学修飾試薬の反応性を評価する当該酵素の立体構造法を展開し、プトレシンによる当該酵素の活性化の効果を、タンパク質の安定性という観点から明らかにすることを目的とした。

#### 第一節 トリプシンによるラット S-アデノシルメチオニン 脱炭酸酵素の消化に対するプトレシンの影響

タンパク質分解の感受性は、タンパク質の微妙な立体構造変化を検出する方法となることが知られている[51]。そこでトリプシンによる AdoMetDC の消化に及ぼすプトレシンの影響を調べることを目的とし、プトレシン存在下及び非存在下、AdoMetDC をトリプシン消化した試料について MALDI-TOF MS 分析を行った(Fig. 22)。トリプシン消化前では、AdoMetDC の $\alpha$ サブユニット及び $\beta$ サブユニットと思われるピークがプトレシンの存在下及び非存在下において検出された。消化 5 分以内

に Thr<sub>294</sub>-Ser<sub>333</sub> ( $m/z$  4635.2) 及び Ser<sub>68</sub>-Arg<sub>293</sub> ( $m/z$  25888.7) と思われるペプチドがプトレシン存在下及び非存在下で検出された。消化時間が長くなるにつれ低分子量ペプチドフラグメントの生成が観察された。検出されるピークの種類と検出強度に差はほとんど見られなかったが、プトレシンの存在によって検出時間は3倍程度遅くなった。同様に AdoMetDC をトリプシン処理した試料について SDS-PAGE により分析した結果においても、プトレシンによる $\alpha$ サブユニットの消失の遅延が観察された。この結果からプトレシンが AdoMetDC の立体構造を安定化している可能性が示唆された。そこで次に、化学的手法を用いてプトレシンによる立体構造の安定化に関して詳細に検討した。

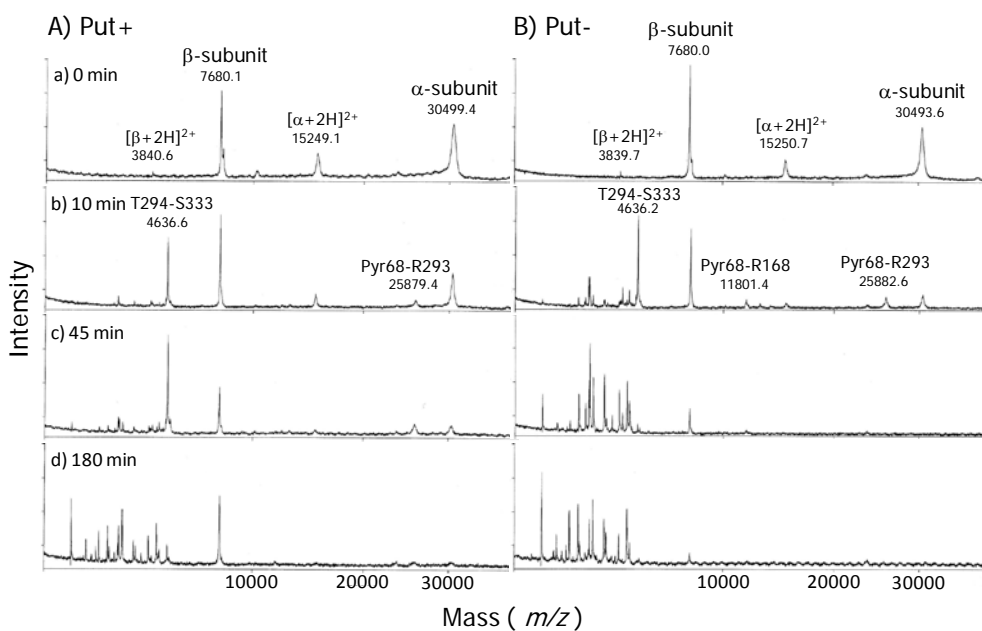


Fig. 22 MALDI-TOF MS spectra of AdoMetDC digested with trypsin for (a) 0 min, (b) 10 min, (c) 45 min, and (d) 180 min in the presence of putrescine (A) and in the absence of putrescine (B)

## 第二節 ヨード酢酸によるラット S-アデノシルメチオニン 脱炭酸酵素の阻害に対するプトレシンの影響

AdoMetDC の触媒反応における最初のステップは、補欠分子族であるピルビン酸と基質である AdoMet とのシッフ塩基の形成であり (Fig. 16)、Cys<sub>82</sub>はこの脱炭酸化反応におけるプロトンの供与体であると考えられている [47, 52]。Cys<sub>82</sub>をセリンまたはアラニンなどのアミノ酸残基に変異することによって酵素活性が著しく低下することから、Cys<sub>82</sub>はヒト AdoMetDC の活性に必須なアミノ酸であることが明らかとなっている [47, 53]。また、プトレシン及び還元剤である DTT は、哺乳動物 AdoMetDC の活性の維持に必須である。そこで本節では、プトレシンの効果を SH 基カルボキシメチル化試薬であるヨード酢酸 (IAA) によって精製 AdoMetDC を阻害した際にプトレシンが及ぼす影響について検討した (Fig. 23)。

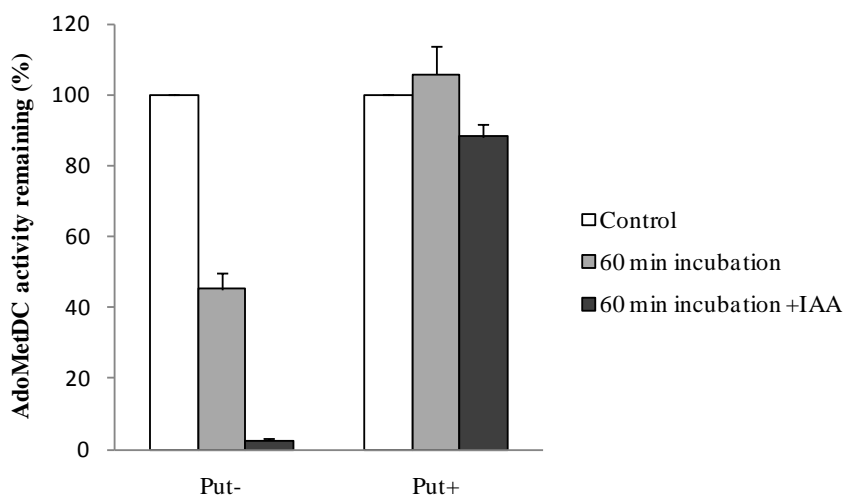


Fig. 23 Effect of putrescine on the inactivation of rat AdoMetDC by IAA  
The results are expressed as the means  $\pm$  SD (n=3).

プトレシン非存在下では 37°C、60 分のインキュベーションで AdoMetDC の活性は 55%に減少した。これに対し、プトレシン存在下では活性の減少は認められなかった。更に IAA を加えて 37°C、60 分インキュベーションした結果、プトレシン非存在下では活性が著しく低下したのに対し、プトレシン存在下では活性が 80%程度残存していた。この結果から、プトレシンが空気酸化による失活及び IAA による阻害から AdoMetDC を保護している可能性が示唆された。

次に、プトレシン存在下及び非存在下において IAA 処理を行った酵素試料について MALDI-TOF MS 分析を行った (Fig. 24)。

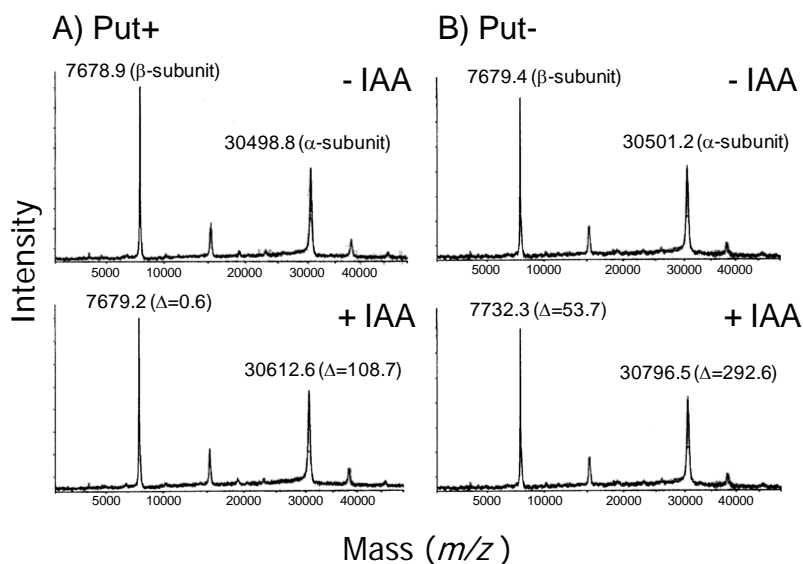


Fig. 24 MALDI-TOF MS spectra of AdoMetDC treated with IAA in the presence of putrescine (A) and in the absence of putrescine (B)

IAA 未処理の酵素では、 $\alpha$ サブユニットの分子量と近いピーク及び $\beta$ サブユニットの分子量に近いピークが観察された。プトレシン存在下における IAA 処理では、 $\alpha$ サブユニットは計算値よりも分子量が 108.7 Da

増加していたが、 $\beta$ サブユニットでは変化はなかった。これに対し、プトレシンの非存在下では $\alpha$ サブユニットの分子量が 292.6 Da 増加しており、 $\beta$ サブユニットの分子量も 53.7 Da 増加していた。システインがカルボキシメチル化されると分子量が 58 Da 増加することから、プトレシン存在下では $\alpha$ サブユニット 1 モル当たり 1.9 モルの IAA が反応し、 $\beta$ サブユニットでは反応しないが、プトレシン非存在下では $\alpha$ サブユニット 1 モル当たり 5.0 モル、 $\beta$ サブユニット 1 モル当たり 0.9 モルの IAA が反応していることがわかった。

ラット AdoMetDC には $\alpha$ サブユニットに 6 個 (Cys<sub>82</sub>, Cys<sub>148</sub>, Cys<sub>156</sub>, Cys<sub>226</sub>, Cys<sub>292</sub>, Cys<sub>310</sub>)、 $\beta$ サブユニットに 1 個 (Cys<sub>49</sub>) のシステインが存在しており、前章で示したようにこれらはすべてスルフヒドリル基として存在していることが示唆されている [54]。そこで、プトレシン存在下及び非存在下でどのシステインが IAA によって標識されているかを確かめるため、リジルエンドペプチダーゼ消化した試料について MALDI-TOF MS 分析を行った (Table 4)。

プトレシン非存在下では、Cys<sub>49</sub> を含むペプチド Asp<sub>46</sub>-Lys<sub>56</sub>、Cys<sub>226</sub> を含むペプチド Asp<sub>202</sub>-Lys<sub>234</sub>、Cys<sub>292</sub> を含むペプチド Cys<sub>292</sub>-Lys<sub>301</sub> 及び Cys<sub>310</sub> を含むペプチド Arg<sub>307</sub>-Lys<sub>327</sub> が IAA 標識ペプチドとして検出された。Cys<sub>148</sub> 及び Cys<sub>156</sub> を含むペプチド Pro<sub>120</sub>-Lys<sub>195</sub> については、2 つのシステインが IAA 標識されているピークが検出された。プトレシン存在下においては、Cys<sub>292</sub> を含むペプチド Cys<sub>292</sub>-Lys<sub>301</sub> 及び Cys<sub>310</sub> を含むペプチド Arg<sub>307</sub>-Lys<sub>327</sub> が IAA 標識ペプチドとして検出されたが、Cys<sub>49</sub> を含むペプチド Asp<sub>46</sub>-Lys<sub>56</sub> 及び Cys<sub>148</sub> 及び Cys<sub>156</sub> を含む Pro<sub>120</sub>-Lys<sub>195</sub> は未標識ペプチドとして存在していた。Cys<sub>82</sub> を含むペプチド Thr<sub>81</sub>-Lys<sub>89</sub> はプトレシン存在下及び非存在下のいずれにおいても検出されず、Cys<sub>49</sub> を含む Asp<sub>46</sub>-Lys<sub>56</sub> はプトレシン存在下において検出され



Table 4 MALDI-TOF MS data for peptides obtained by lysylendopeptidase-digestion of IAA-treated rat AdoMetDC in the presence or absence of putrescine

Cysteinylnresidue	Fragment containing Cys	Put-			Put+		
		[M+H] <sup>+</sup> <sub>calc</sub>	[M+H] <sup>+</sup> <sub>obs</sub>	[M+H] <sup>+</sup> <sub>obs</sub>	[M+H] <sup>+</sup> <sub>obs</sub>	[M+H] <sup>+</sup> <sub>obs</sub>	[M+H] <sup>+</sup> <sub>obs</sub>
Cys <sub>49</sub>	D46-K56	1234.6 <sup>a)</sup>	-	-	1234.9 <sup>b)</sup>	-	-
	D46-K56+CM	1250.6	1250.3	-	-	-	-
	D46-K56+CM	1292.5 <sup>a)</sup>	1292.2 <sup>b)</sup>	-	-	-	-
Cys <sub>82</sub>	T81-K89	991.5 <sup>a)</sup>	-	-	991.5 <sup>b)</sup>	-	-
	T81-K89+CM	1049.8 <sup>a)</sup>	1049.2 <sup>b)</sup>	-	-	-	-
Cys <sub>148</sub>	P120-K195	8936.1	-	-	8937.1	-	-
	P120-K195+2CM	9052.1	9052.9	-	-	-	-
Cys <sub>156</sub>	P120-K195	8936.1	-	-	8937.1	-	-
	P120-K195+2CM	9052.1	9052.9	-	-	-	-
Cys <sub>226</sub>	D202-K234	3559.1	-	-	3561.0	-	-
	D202-K234+CM	3617.1	3617.1	-	-	-	-
Cys <sub>292</sub>	C292-K301	1118.6	-	-	-	-	-
	C292-K301+CM	1176.6	1176.8	-	1176.3	-	-
Cys <sub>310</sub>	R307-K327	2505.8	-	-	-	-	-
	R307-K327+CM	2563.9	2564.2	-	2564.3	-	-

a) The calculated as the C-terminal homoargnyrated rat sequence.

b) After treatment with *O*-methylisourea.

なかった。

*O*-メチルイソウレアによってリジン残基をホモアルギニンに変換すると、リジンを含むペプチドの MALDI-TOF MS 分析の感度が著しく上昇することが報告されている [55]。そこで、プトレシン存在下及び非存在下で IAA 処理した酵素をリジルエンドペプチダーゼで酵素消化した試料に対し、*O*-メチルイソウレアを反応させた後、MALDI-TOF MS 分析を行った。リジンからホモアルギニンに変換することによってペプチドの分子量は 42 Da 増加する。*O*-メチルイソウレア処理を行った結果、プトレシン非存在下でいままで検出されていなかったペプチド Thr<sub>81</sub>-Lys<sub>89</sub> 及び Asp<sub>46</sub>-Lys<sub>56</sub> を IAA 標識ペプチドとして検出することができた。一方、プトレシン存在下において、これらのピークは未標識

ペプチドとして検出された。

### 第三節 プトレシンによるラット *S*-アデノシルメチオニン 脱炭酸酵素の活性化と IAA 標識との関係

第一節及び第二節の結果からプトレシンによって AdoMetDC の立体構造が安定化されていることが示唆された。そこで本節では、プトレシンの添加濃度を変化させた時の AdoMetDC 活性と IAA 標識数との関係について検討した (Fig. 25)。

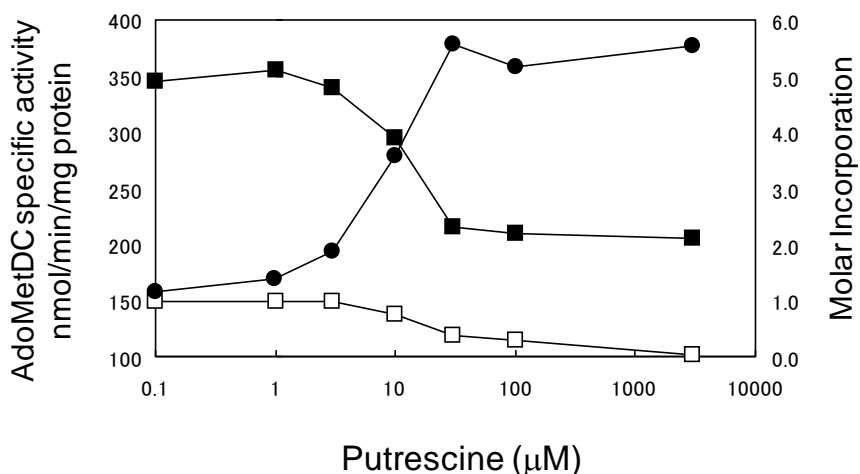


Fig. 25 Effect of putrescine concentration on AdoMetDC activity and total incorporation of IAA

The symbols indicate AdoMetDC activity (●), incorporation of IAA into the  $\alpha$ -subunit (■), and incorporation of IAA into the  $\beta$ -subunit (□). Data are expressed as the mean of duplicate assays.

IAA の標識量は、プトレシン濃度が 0-3  $\mu\text{M}$  の時には $\alpha$ サブユニット 1 モル当たり 5.0 モル、 $\beta$ サブユニット 1 モル当たり 1.0 モルの IAA が反応した。プトレシンの濃度が 10  $\mu\text{M}$  を超えると徐々に減少し始めた。AdoMetDC 活性については、プトレシン濃度が 0-3  $\mu\text{M}$  の時には影響はなかったが、プトレシン濃度が 10  $\mu\text{M}$  を超えると徐々に活性が上昇した。この結果は、数 $\mu\text{M}$  のプトレシンを添加すると AdoMetDC の活性が上昇し始めるという以前の報告と矛盾がなかった[27, 56]。これらの結果から、AdoMetDC 活性の上昇は、プトレシンによる酵素の立体構造の安定化と相関があることが示唆された。

以上の結果をまとめて、プトレシンによる酵素タンパク質の構造に対する影響を推察した (Fig. 26)。プトレシンが存在しない場合に IAA による標識がすべてのシステイン残基に起こることは、プトレシンの除去による特定部位の立体構造変化というよりは、プトレシンの結合により維持されていた安定な立体構造がとり得なくなるために起こる現象であると推察された。

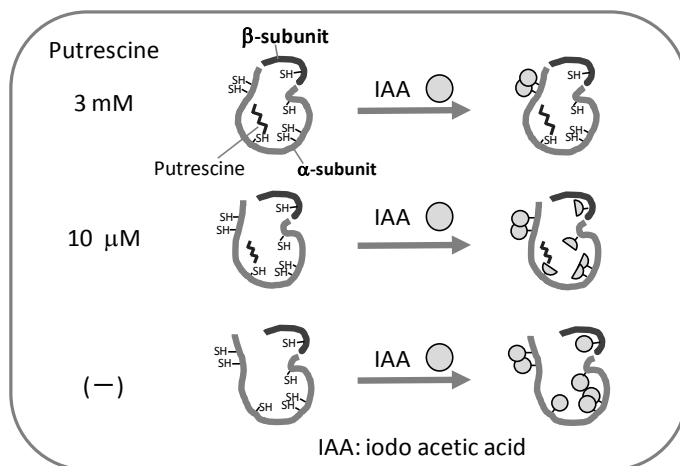


Fig. 26 Schematic diagram showing effect of putrescine on AdoMetDC structure

#### 第四節 小括及び考察

本章の結果から、ラット前立線由来 AdoMetDC の立体構造がプトレシンによって安定化されていることが明らかとなった。

プトレシンは IAA による不可逆阻害から AdoMetDC を保護した (Fig. 23)。また、プトレシン存在下における IAA 標識 ( $\alpha\beta$  二量体 1 モルあたりの IAA 標識数: 1.9 モル) がプトレシン非存在下 ( $\alpha\beta$  二量体 1 モルあたりの IAA 標識数: 5.9 モル) よりも明らかに低下した。これらのことから、プトレシンはシステイン残基と IAA とのアクセスを妨げるような立体構造変化を引き起こしていることが示唆された (Fig. 24)。以前の研究において、His-tag 付加ヒト組換え体 AdoMetDC ではプトレシンを除去しない場合でも IAA によって阻害されることが報告されている [47]。この場合の  $\alpha\beta$  二量体 1 モルあたりの IAA 標識数は 2.7 モルであった。本研究における IAA との反応性の違いは、ラットとヒトのアミノ酸配列の違いであるか、N 末端に結合している His-tag の影響、またはその両方である可能性が示唆された。

本研究において、プトレシン非存在下では全てのシステイン残基が IAA によってカルボキシメチル化されたが、プトレシン非存在下では Cys<sub>292</sub> 及び Cys<sub>310</sub> のみであった (Table 4)。この結果は、His-tag 付加ヒト組換え体 AdoMetDC において Cys<sub>292</sub> 及び Cys<sub>310</sub> が酵素の表面に露出しているという X 線構造解析の結果と一致している [28-29]。また本研究結果は、プトレシンが Cys<sub>49</sub>、Cys<sub>82</sub>、Cys<sub>148</sub>、Cys<sub>156</sub>、Cys<sub>226</sub> 周辺部位と外部溶媒とのアクセスのしやすさを変化させていることも示している。プトレシン存在下、非存在下の His-tag 付加ヒト組換え体 AdoMetDC の結晶構造解析の結果において、プトレシン結合部位の近傍にある芳香族アミノ酸 (Phe<sub>285</sub>、Phe<sub>315</sub>、Tyr<sub>318</sub> 及び Phe<sub>320</sub>) 及び Ser<sub>312</sub>-Phe<sub>320</sub> のループ

の立体構造が変化していることから、プトレシンの結合によって Ser<sub>312</sub>-Phe<sub>320</sub> のループが外部溶媒からプトレシン結合部位を隠すように閉鎖すると報告されている[28-30]。このループの閉鎖によって IAA とシステイン残基周辺部位とのアクセスのしやすさが変化することはあり得るが、プトレシンによる立体構造のより詳細な情報を得るためには、組織由来の酵素や培養細胞を用いたさらなる検討が必要であると考えられる。

AdoMetDC のトリプシン消化の初期段階において、セルフプロセッシングにより 68 番目のセリンがピルビン酸に変化している Ser<sub>68</sub>-Arg<sub>293</sub> ( $m/z$  25888.7) 及び Thr<sub>294</sub>-Ser<sub>333</sub> ( $m/z$  4635.3) だと思われるピークが観察された (Fig. 22)。この結果は、トリプシンによって最初に分解される部位が Arg<sub>293</sub> であることを示している。His-tag 付加ヒト組換え体 AdoMetDC の結晶構造解析において、Arg<sub>293</sub> を含むループ Arg<sub>293</sub>-Ser<sub>298</sub> は不規則なループであることが示されていることから[50]、このループは不安定であり自由に動いていると推察される。また、本研究結果から Arg<sub>293</sub> に隣接する Cys<sub>292</sub> がプトレシンの存在の有無にかかわらず IAA によって標識されていたことから (Table 4)、Arg<sub>293</sub> の近傍部位はプトレシンの存在の有無にかかわらず外部溶媒やトリプシンと接触しやすい位置に存在していることが示唆される。

AdoMetDC はポリアミン生合成経路における必須の酵素であることから、抗がん剤及び抗寄生虫薬開発の重要なターゲットとなっている [57-61]。以上の結果は、プトレシンのような低分子化合物が AdoMetDC の立体構造や活性を調節していることを示しており、プトレシンの結合部位に作用して立体構造を不安定化する化合物を見出すことができれば、今までにはない新しいタイプの阻害剤の開発につながると考えられる。

## 総括

本研究では、微量タンパク質の分析が可能な MALDI-TOF MS を用いた、タンパク質の構造解析法の開発を念頭において、構造情報の少ないポリアミン生合成酵素タンパク質の構造解析を、一次構造及び三次構造に関して展開した。

第一章及び第二章では、MALDI-TOF MS とタンパク質の選択的切断法を組み合わせることによって、ラット組織から精製した SpdSyn 及び AdoMetDC の一次構造を初めて明らかにした。これらの研究から、cDNA 塩基配列情報のみからでは得られない両酵素の N 末端修飾の有無、及び翻訳後修飾の有無を明らかにした。第三章では、第二章で明らかにしたラット AdoMetDC に関する一次構造情報をもとに、MALDI-TOF MS によって化学修飾試薬の反応性を評価する当該酵素の立体構造解析法を展開し、プトレシンによる当該酵素の活性化の効果を、タンパク質の安定性という観点から明らかにした。すなわち、プトレシンの存在下でシステイン残基をヨード酢酸標識で標識した AdoMetDC について、酵素消化したペプチド断片を分析することによって、ヨード酢酸の反応性が大きく変化することを明らかにした。このことは、プトレシンにより AdoMetDC の立体構造が安定化されることを明瞭に示すとともに、タンパク質の化学修飾の状況を質量分析により迅速に解析することが立体構造解析に有用であることを示した。

以上のように本研究結果は、ポリアミン生合成酵素の生理機能の解明研究に新たな視点を与えるとともに、生体由来の微量タンパク質の一次構造を効率的に決定するための方法論及び立体構造を研究するための新たな手法を提示した。本論文で示した方法論は、生体由来の微

量タンパク質の構造変化を質量分析計により解析する画期的な方法論の開発にもつながるものと考えられる。

本論文で使用した略号を示す。

AARE; アセチルアミノ酸遊離酵素,

*N*-acetylamino acid releasing enzyme

AdoMet; *S*-アデノシルメチオニン, *S*-adenosylmethionine

AdoMetDC; *S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素,

*S*-adenosylmethionine decarboxylase

CHCA;  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid

deAdoMet; 脱炭酸化 *S*-アデノシルメチオニン,

decarboxylated *S*-adenosylmethionine

DHB; 2,5-dihydroxybenzoic acid

DTT; ジチオスレイトール, dithiothreitol

HPLC; 高速液体クロマトグラフィー,

high performance liquid chromatography

IAA; ヨード酢酸, monoiodoacetic acid

MALDI-TOF MS; マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型

質量分析, matrix-assisted laser desorption/

ionization time of flight mass spectrometry

MDL74038; 5' -{[(*Z*)-4-amino-2-butenyl]amino} -5' -deoxyadenosine

MGBG; methylglyoxal bis(guanyl)hydrazone

NTCB; 2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid

ODC; オルニチン脱炭酸酵素, ornithine decarboxylase

PAO; ポリアミン酸化酵素, polyamine oxidase

PSD; post-source decay

SDS; sodium dodecyl sulfate

SMO; スペルミン酸化酵素, spermine oxidase



SpdSyn; スペルミジン合成酵素, spermidine synthase  
SpmSyn; スペルミン合成酵素, spermine synthase  
SSAT; スペルミジン/スペルミン  $N^1$ -アセチル基転移酵素,  
spermidine/spermine  $N^1$ -acetyltransferase  
TCEP; tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride  
TFA; trifluoroacetic acid  
Tris; tris(hydroxymethyl)aminomethane

## 謝辞

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部 白幡 晶 教授に深く感謝いたします。

本研究に際し、数々の有益なご助言とご指導を賜りました武蔵野大学薬学研究所 鮫島 啓二郎 教授に深く感謝いたします。

数々のご助言、ご指導を賜りました城西大学薬学部 新津 勝 教授、城西大学薬学部 池口 文彦 准教授、城西大学薬学部 杉田 義昭 准教授、城西大学薬学部 高尾 浩一 助教、城西大学薬学部 井口 毅裕 講師、城西大学薬学部 山寄 健一 助手、細田 晴美 元助手、佐々木ひとみ 元助手、任 良赫 元助手に感謝いたします。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました城西大学薬学部 日比野 康英 教授ならびに近藤 誠一 教授に深く感謝いたします。

最後に、生化学講座、細胞生理化学講座、食品衛生学研究室、旧薬品分析化学教室及び城西大学機器センターの皆様に感謝いたします。

## 実験の部

### 試薬

酵素精製及び活性測定に用いた MGBG 及び AdoMet は Sigma-Aldrich 社より、[carboxy- $^{14}\text{C}$ ]AdoMet (57 mCi/mmol) は GE Healthcare 社より、プトレシン二塩酸塩は東京化成工業より購入した。[*S, R*-methyl- $^{14}\text{C}$ ]deAdoMet は、当研究室で合成したものをを用いた。

還元カルボキシメチル化に用いた DTT 及び IAA は Sigma-Aldrich 社から購入した。IAA は再結晶してから実験に用いた。酵素消化に用いたリジルエンドペプチダーゼ (*Achromobactor* protease I) は和光純薬より、アルギニルエンドペプチダーゼ (mouse submandibular protease) は TaKaRa 社より、V8 プロテアーゼ (*Staphylococcus aureus* protease) は ICN 社より、sequencing grade porcine trypsin は Promega 社より購入した。システインでの化学的切断に用いた TCEP 及び NTCB は Sigma-Aldrich 社から購入した。AARE は TaKaRa 社より、*O*-methylisourea hemisulfate は和光純薬より購入した。MDL74038 は既存の方法に従い当研究室で合成したものをを用いた。

MALDI-TOF MS 分析に用いた substance P、angiotensin I、bovine pancreatic insulin (insulin B)、apomyoglobin、cytochrome C、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) 及び $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) は Sigma-Aldrich 社より、2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid (MSA) は Aldrich 社より購入した。HPLC 及び MALDI-TOF MS 分析には Milli-Q により精製した水を用いた。その他の試薬及び溶媒は市販の分析グレードのものをを用いた。

### SpdSyn の精製 [62]

7週令の雄性SDラット50匹から摘出した前立腺(約20g)を、0.3mM EDTA、10mM 2-メルカプトエタノールを含む25mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2)でホモジナイズして遠心分離(10,000×g)を行った後、さらに超遠心分離(105,000×g)を行い粗抽出液を得た。その30%-60% 硫安分画を緩衝液A(0.3mM EDTA及び0.5mM DTTを含む25mM リン酸緩衝液 pH 7.2)に対して透析した後、DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー(0-0.4M NaCl in 緩衝液Aで溶出)で分画し、70% 硫安で濃縮した。さらに緩衝液B(0.3M NaClを含む緩衝液A)で透析後、ATPA-Sepharose アフィニティークロマトグラフィー(25mM deAdoMetを含む緩衝液Bで溶出)に供し、ほぼ完全な精製酵素を得た(SDS-PAGEにより確認)。

### AdoMetDC の精製 [43, 63]

ラット組織中の本酵素活性は低いので、MGBG処理を行って活性を約20倍上昇させた臓器を酵素源とした。MGBGは本酵素の強力な阻害剤であり、酵素に結合して分解速度を低下させ組織中に酵素たんぱく質を蓄積させた。12週令の雄性SDラット50匹から摘出した前立腺(約30g)を緩衝液A(25mM DTT、25mM プトレシン及び0.1mM EDTAを含む25mM リン酸塩緩衝液 pH 7.5)でホモジナイズし、超遠心分離(105,000×g)を行い粗抽出液を得た。その35-65% 硫安分画を緩衝液Aに対して透析した後、DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー(0-0.3M NaClを含む 緩衝液Aで溶出)で分画し、70% 硫安で濃縮した。さらに、緩衝液B(2.5mM プトレシン、2.5mM DTT及び0.1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5)で透析後、MGBG-Sepharose アフィニティー

カラムクロマトグラフィー (1 mM MGBG 及び 0.5 M NaCl を含む緩衝液 B で溶出) に供し、ほぼ完全な精製標品を得た (SDS-PAGE により確認)。

### SpdSyn の活性測定

当研究室で合成した [*S, R*-methyl-<sup>14</sup>C]deAdoMet を基質とし、Hibasami 及び Pegg らの方法に従って測定した [64]。反応液は、10 μM deAdoMet、1 mM プトレシン、5 mM DTT、0.75 mg/ml bovine serum albumin (BSA) を含む 0.1 M リン酸カリウム (pH 7.4) からなる溶液を用いた。

### AdoMetDC の活性測定

[carboxy-<sup>14</sup>C]AdoMet を基質として測定した [63]。反応液は 1.25 mM DTT、3 mM プトレシン、200 μM [carboxy-<sup>14</sup>C]AdoMet (57 mCi/mmol) を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) からなる溶液を用いた。Fig. 25 の実験においては、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) の代わりに 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) を用いた。

### タンパク定量

BSA を標準タンパク質とし、Bio-Rad Protein Assay Kit®を用いる Bradford 法により測定した。

### 還元カルボキシメチル化

精製した酵素に 6 M 塩酸グアニジン、21 mM DTT、10 mM EDTA を含む 500 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) を加え、サンプルチューブ内の空気を窒素ガスで置換し、室温で 2 時間変性・還元した。その後、IAA 溶液を最終濃度が 45 mM となるように反応液に加えた。カルボキシメ

チル化反応を 30 分行い、2-メルカプトエタノールを加えて反応を停止した。

#### リジルエンドペプチダーゼ処理

還元カルボキシメチル化した酵素溶液を、1 mM EDTA 及び 5% アセトニトリルを含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で透析し、モル比が 100:1 になるようにリジルエンドペプチダーゼを加え、37°C で 18 時間インキュベートした。

#### アルギニルエンドペプチダーゼ処理

還元カルボキシメチル化した酵素溶液を、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で透析し、モル比が 10:1 になるようにアルギニルエンドペプチダーゼを加え、37°C で 18 時間インキュベートした。

#### トリプシン処理

還元カルボキシメチル化した酵素溶液を、50 mM 炭酸アンモニウム溶液で透析し、重量比が 40:1 になるようにトリプシンを加え、37°C で 18 時間インキュベートした。第三章でのプロテシン存在下、非存在下におけるトリプシン消化においては、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で、酵素溶液とのモル比が 50:1 になるようにトリプシンを加えて 37°C でインキュベートした。反応は 10% トリフルオロ酢酸 (TFA) の添加により停止した。

### V8 プロテアーゼ処理

還元カルボキシメチル化した酵素溶液を、100 mM 炭酸アンモニウム溶液で透析し、モル比が 30:1 になるように V8 プロテアーゼを加え、37°C で 18 時間インキュベートした。

### NTCB によるシステインでの化学的切断法[38]

100  $\mu$ l の酵素溶液に、8 M 塩酸グアニジン及び 1.33 mM TCEP を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 300  $\mu$ l を加え、よく攪拌した。その後、0.01 M NTCB を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) と 8 M 塩酸グアニジンを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) の 1:3 の混液を 44.3  $\mu$ l 加え、37°C、30 分間インキュベートし、3 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 9.0 に調整後、さらに 37°C で 16 時間インキュベートした。

### AARE 処理

HPLC により精製したペプチド溶液を窒素ガスで乾固し、10 mM DTT を含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 100  $\mu$ l に再溶解した。溶液を二分し、一方に AARE を加え、他方をコントロールとして 37°C で 16 時間インキュベートした。

### ピルビン酸基のトランスアミネーション

AdoMetDC の  $\alpha$  サブユニットを気相シーケンサーで分析するため、AdoMetDC を不可逆阻害剤 MDL74038 で阻害し、 $\alpha$  サブユニットの N 末端に結合しているピルビン酸基をトランスアミネーションした。これにより  $\alpha$  サブユニットがアラニンに変換した [47, 48] 。

### ジスルフィド結合の有無の確認

精製した AdoMetDC を 21 mM DTT の存在下または非存在下で、6 M 塩酸グアニジン、10 mM EDTA を含む 500 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) を加えてサンプルチューブ内の空気を窒素ガスで置換し、室温で 2 時間インキュベートした。その後、IAA 溶液を最終濃度が 45 mM となるように反応液に加え、カルボキシメチル化反応を 1 時間行った。

### O-メチルイソウレアによる消化ペプチドの修飾

AdoMetDC をリジルエンドペプチダーゼ消化した後、2 M O-メチルイソウレアを 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液に溶解させた液を試料に等量加え、pH を 10 に調整した後、37°C でインキュベートした。

### HPLC

カラムは TOSOH TSKgel ODS120T カラム (4.6 mm i. d. × 250 mm)、溶離液は 0.1% TFA を含む 5% アセトニトリル溶液 (溶液 A) と 0.1% TFA を含む 80% アセトニトリル溶液 (溶液 B) を用いた。流速は 1.0 ml/min で、検出は 220 nm で行い、90 分で溶離液 B の割合が 0% から 75% になるような A と B のリニアグラジエントで溶出した。気相シーケンサーで分析したペプチドについては、さらに TOSOH TSK gel Octyl 80Ts カラム (4.6 mm i. d. × 150 mm) により逆相 HPLC を用い、45 分で B の割合が 0% から 75% となるような A と B のリニアグラジエントで溶出し、各ペプチドを精製した。

SpdSyn を NTCB 処理、アルギニルエンドペプチダーゼ処理することにより得られたペプチド (C1, R1) を HPLC で精製するために、カラムスイッチング法を用いた。分離カラムは Vydac218TP51 (1 mm i. d. × 250 mm)、吸着カラムは Inertsil ODS-3 (4 mm i. d. × 10 mm) を用い



た。検出はマイクロフローセル (0.6  $\mu$ l) を用いて 220 nm で行い、0.1% TFA を含む 5% アセトニトリルを吸着カラムに 1.0 ml/min の流速で流し、試料を注入後にバルブを切り替え、0.1% TFA を含む 50% アセトニトリルを 50  $\mu$ l/min の流速で流して試料を吸着から溶出し、分離カラムで分離して、C1、R1 を精製した。

#### ZipTip<sub>C4</sub> または ZipTip<sub>C18</sub> による試料の前処理

第二章及び第三章の実験で MALDI-TOF MS を行った際、タンパク質及びペプチドは ZipTip<sub>C4</sub> または ZipTip<sub>C18</sub> により前処理を行った。0.1% TFA を含む MilliQ 水で脱塩し、0.1% TFA を含む 80% アセトニトリル溶液で溶出した。

#### 質量分析

装置はサーモクエスト社の VISION2000 を用い、リフレクターモードによる測定を行った。マトリックスとしては DHB 10 mg/ml 水溶液または DHB:MSA=9:1 の混合物である DHBs を用い、マトリックス 1  $\mu$ l と試料 1  $\mu$ l をステンレス製のプローブ上で混合後、空気乾燥により結晶化し、N<sub>2</sub> レーザー (337 nm) を照射してイオン化し、そのイオン飛行時間により質量分析を行った。得られたピークは標準タンパク質として用いた insulin B、angiotensin I、cytochrome C 及び apomyoglobin を用いてキャリブレーションした。MALDI-PSD 分析は AXIMA-CFR (Shimadzu/Kratos, Manchester, U. K) を用いた。マトリックスは CHCA を用いた。

## アミノ酸配列分析

第一章において逆相 HPLC により精製したペプチドを分析した際には、島津製作所の気相シーケンサー (Shimadzu PSQ-1) を用いた。第二章においては、Microcon YM-10 カラムを用いた遠心濃縮法により反応液から余分な阻害剤を除去して濃縮した後、気相シーケンサー Shimadzu PPSQ-21A を用いて分析を行った。

## 引用文献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature*, **431**, 931-945 (2004).
- 2) International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature*, **409**, 860-921 (2001).
- 3) Venter J. C. *et al.*, *Science*, **291**, 1304-1351 (2001).
- 4) She X. *et al.*, *Nature*, **431**, 927-930 (2004).
- 5) 竹縄忠臣 編 タンパク質科学イラストレイテッド 羊土社
- 6) Gregory A. Petsko/Dagmar Ringe 編 タンパク質の構造と機能  
メディカル・サイエンス・インターナショナル
- 7) 河野 敬一/田之倉 優 編 構造生物学 共立出版
- 8) Pegg A. E., *IUBMB Life*, **61**, 880-894 (2009).
- 9) Park M H., *J. Biochem.*, **139**, 161-169 (2006).
- 10) Wahlfors J., Alhonen L., Kauppinen L., Hyvonen T., Janne J., Eloranta T. O., *DNA and Cell Biology*, **9**, 103-110 (1990).
- 11) DDBJ accession number L19311.
- 12) Tekwani B. L., Nuttall M. E., Stanley B. A., Pegg A. E., unpublished observations. Sequence of N-terminal 30 amino acids: MKREFRRTTGPLPGPAIREGWFRETCSLSC; sequence of C-terminal 17 amino acids: R-PSCCSS-PGKP.
- 13) Karas M., Hillenkamp F., *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301 (1988).
- 14) Chait B. T., Wang R., Beavis R. C., Kent S. B. H., *Science*, **262**, 89-92 (1993).
- 15) Patterson D. H., Tarr G. E., Regnier F. E., Martin S. A., *Anal. Chem.*, **67**, 3971-3978 (1995).

- 16) Reiber D. C., Grover T. A., Brown R. S., *Anal. Chem.*, **70**, 673-683 (1998).
- 17) Yates J. R., *J. Mass Spectrom.*, **33**, 1-9 (1998).
- 18) Van Poelje P. D., Snell E. E., *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 29-59 (1990).
- 19) Hackert M. L., Pegg A. E., in *Comprehensive Biological Catalysis* (Sinnott M.L., Ed.) pp 201-216, Academic Press, London (1997).
- 20) Pegg A. E., McCann P. P., *Pharmacol. Ther.*, **56**, 359-377 (1992).
- 21) Stanley B. A., in *Polyamines: Regulation and Molecular Interaction* (Casero, R. A., Jr., ed) pp 27-75, R. G. Landes Co., Austin, TX (1995).
- 22) Shirahata A., Pegg A. E., *J. Biol. Chem.*, **261**, 13833-13837 (1986).
- 23) Pajunen A., Crozat A., Jänne O. A., Ihalainen R., Laitinen P. H., Stanley B. A., Madhubala R., Pegg A. E., *J. Biol. Chem.*, **263**, 17040-17049 (1988).
- 24) Stanley B. A., Pegg A. E., Holm I., *J. Biol. Chem.*, **264**, 21073-21079 (1989).
- 25) Pegg A. E., *Cell. Biochem. Funct.*, **2**, 11-15 (1984).
- 26) Pegg A. E., Williams-Ashman H. G., *J. Biol. Chem.*, **244**, 682-693 (1969).
- 27) Kameji T., Pegg A. E., *Biochem. J.*, **243**, 285-288 (1987).
- 28) Tolbert W. D., Ekstrom J. L., Mathews I. I., Secrist III J. A., Kapoor P., Pegg A. E., Ealick S. E., *Biochemistry*, **40**, 9484-9494 (2001).
- 29) Ekstrom J. L., Tolbert W. D., Xiong H., Pegg A. E., Ealick S. E., *Biochemistry*, **40**, 9495-9504 (2001).
- 30) Bale S., Lopez M. M., Makhatadze G. I., Fang Q., Pegg A. E., Ealick S. E., *Biochemistry*, **47**, 13404-13417 (2008).
- 31) Goel A., Colcher D., Koo J-S., Booth B. J. M., Pavlinkova G., Batra S. K.,

- Biochim. Biophys. Acta.*, **1523**, 13-20 (2000).
- 32) Chant A., Kraemer-Pecore C. M., Watkin R., Kneale G. G., *Protein Expr. Purif.*, **39**, 152-159 (2005).
- 33) Groer G. J., Haslbeck M., Gessner A., *J. Chromatogr. B.*, **877**, 1643-1650 (2009).
- 34) Akashi S., *YAKUGAKUZASSHI*, **126**, 915-929 (2006).
- 35) Anthony-Cahill S. J., Magliery T. J., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **3**, 299-315 (2002).
- 36) Tyagi R., Gupta M. N., *Biokhimiya (Moscow)*, **63**, 334-344 (1998).
- 37) Hagar-Braun C., Tomer K. B., *Biochemistry*, **41**, 1759-1766 (2002).
- 38) Safarian S., Moosavi-Movahedi A. A., Hosseinkhani S., Xia Z., Habibi-Rezaei M., Hosseini G., Sorenson C., Sheibani N., *J. Protein Chem.*, **22**, 643-654 (2003).
- 39) Wu J., Gage D. A., Watson J. T., *Anal. Biochem.*, **235**, 161-174 (1996).
- 40) Pulkka A., Keranen M. R., Salmela A., Salmikangas P., Ihalainen R., Pajunen A., *Gene*, **86**, 193-199 (1990).
- 41) Tekwani B. L., Stanley B. A., Pegg A. E., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1130**, 221-223 (1992).
- 42) Mach M., White M. W., Neubauer M., Degen J. L., Morris D. R., *J. Biol. Chem.*, **261**, 11697-11703 (1986).
- 43) Pösö H., Pegg A. E., *Biochemistry*, **21**, 3116-3122 (1982).
- 44) Pegg A. E., Stanley B. A., Pajunen A., Crozat A., Janne O. A., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **250**, 101-109 (1988).
- 45) Wada M., Amano D., Hosoda H., Shirahata A., Samejima K., Pegg A. E., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 889-895 (1999).
- 46) Pegg A. E., *Essays Biochem.*, **46**, 25-45 (2009).

- 47) Xiong H., Stanley B. A., Pegg A. E., *Biochemistry*, **38**, 2462-2470 (1999).
- 48) Shantz L. M., Stanley B. A., Secrist III J. A., Pegg A. E., *Biochemistry*, **31**, 6848-6855 (1992).
- 49) Biemann K., *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.*, **16**, 99-111 (1988).
- 50) Ekstrom J. L., Mathews I. I., Stanley B. A., Pegg A. E., Ealick S. E., *Structure*, **7**, 585-595 (1999).
- 51) Yang H. H., Li X. C., Amft M., Grotemeyer J., *Anal. Biochem.*, **258**, 118-126 (1998).
- 52) Pegg A. E., Xiong H., Feith D. J., Shantz L. M., *Biochem. Soc. Trans.*, **26**, 580-586 (1998).
- 53) Stanley B. A., Pegg A. E., *J. Biol. Chem.*, **266**, 18502-18506 (1991).
- 54) Wada M., Shirahata A., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 891-894 (2010).
- 55) Hale J. E., Butler J. P., Knierman M. D., Becker G. W., *Anal. Biochem.*, **287**, 110-117 (2000).
- 56) Sakai T., Hori C., Kano K., Oka T., *Biochemistry*, **18**, 5541-5548 (1979).
- 57) Pegg A. E., *Cancer Res.*, **48**, 759-774 (1988)
- 58) Marton L. J., Pegg A. E., *Annu. Rev. Pharmacol.*, **35**, 55-91 (1995).
- 59) Seiler N., *Curr. Drug. Targets*, **4**, 537-564 (2003).
- 60) Pless M., Belhadj K., Menssen H. D., Kern W., Coiffier B., Wolf J., Herrmann R., Thiel E., Bootle D., Sklenar I., Müller C., Choi L., Porter C. W., Capdeville R., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 1299-1305 (2004).
- 61) Bale S., Brooks W., Hanes J. W., Mahesan A. M., Guida W. C., Ealick S. E., *Biochemistry*, **48**, 6423-6430 (2009).
- 62) Samejima K., Yamanoha B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **216**, 213-222 (1982).
- 63) Shirahata A., Christman K. L., Pegg A. E., *Biochemistry*, **24**, 4417-4423

(1985).

64) Pegg A. E., Hibasami H., *Biochem. J.*, **169**, 709-712 (1978).