
タンパク質のコンホメーション変化を指標にするプロテオーム解析

課題番号 16590033

平成16年度～平成18年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成19年 5月

研究代表者 白幡 晶

城西大学薬学部 教授

タンパク質のコンホメーション変化を指標にするプロテオーム解析

課題番号 16590033

平成16年度～平成18年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成19年 5月

研究代表者 白幡 晶

城西大学薬学部 教授

スペルミジン、スペルミンに代表されるポリアミンは、その生合成および代謝が遺伝子発現と密接に関わり、細胞増殖因子として作用する。したがって、その生合成阻害剤や類似対は抗がん剤や抗寄生虫薬開発の観点から研究が進められており、そのいくつかはすでに臨床応用に供されている。しかし、細胞内および細胞膜上におけるポリアミンの分子ターゲットとして詳細が明らかなものは、核酸、およびポリアミンがその翻訳後修飾に関するeIF5Aタンパク、NMDA受容体やチャネル分子など限られた分子であり、機能の詳細は不明であるといつてよい。

一方、疾患特異的なタンパク質、あるいは病態の進行に伴ってコンホメーション変化したタンパク質の検出は、医薬品開発における創薬ターゲット分子の探索に重要である。現在タンパク質の立体構造解析は、X線回折法、核磁気共鳴法、円二色性法などを用いて行われている。これらの方法では、精製したタンパク質を用いる必要があるが、数多くあるタンパク質の中から、立体構造変化を起こす特定のタンパク質を検出するための方法としては適さない。網羅的な検出を可能にするためには、コンホメーション変化を化学修飾などによって検出できるような標識法が有用であろうと思われる。一方、プロテオーム解析は、タンパク質の分離、消化酵素を用いるタンパク質の切断後、質量分析を行い、タンパク質を網羅的に解析する方法であり、網羅的なタンパク質の量的変化追跡を可能とする。

そこで、タンパク質のコンホメーションの違いにより標識試薬の反応性が異なることを利用して、網羅的にポリアミンの結合によってコンホメーション変化したタンパク質の検出が可能であると考えた。本研究では、蛍光SH反応試薬の標識量の違いを利用し、コンホメーション変化したタンパク質の解析を網羅的に行う方法の開発を目的とした。そして、その方法論を、ポリアミン合成の調節とその機能との関連が注目されるプロテオーム機能解析に応用することを目指した。

本研究ではまず、モデルタンパク質を用いて、化学試薬の標識量の変化を指標にすれば、MALDI-TOF MSにおいて低分子結合に基づくタンパク質のコンホメーション変化の検出が可能であることが分かった。次に、蛍光SH基標識を合成し、蛍光強度の変化による評価によりタンパク質のコンホメーション変化解析を可能とした。続いて、その蛍光標識タンパク質を酵素消化後、蛍光検出逆相HPLCピーク画分をMALDI-TOF MS及びMALDI-PSD TOF MSにて分析したところ、蛍光標識システインを含めたペプチドのアミノ酸配列解析ができることがわかった。そして、タンパク質のコンホメーション変化の網羅的解析の基礎検討実験として、コンホメーションの異なる同一のタンパク質を分子量の異なる2種類のSH基蛍光標識試薬によりそれぞれ蛍光標識し、酵素消化後、蛍光検出逆相HPLCに供し、そのピーク画分をMALDI-TOF MSにより解析した。その結果、標識の分子量が異なった分だけの隔てたシグナルの検出を可能とし、シグナル強度の相対比較を指標に用いることにより、コンホメーション変化の評価系を開発した。

一方、タンパク質のシステイン残基のN残基で切断する試薬により、タンパク質の構造解析に極めて有用になる切断に伴うC末端の標識法を開発した。本標識法では、種々の電荷の異なるアルキルアミンによる標識に応用できることを見出し、MALDI-TOF MSによる PSD 分析に供したところ、明瞭な配列分析が可能であることからタンパク質の構造解析に有用であることを示したのみならず、比較定量法への応用にも拡げることができた。

また、先述のポリアミン修飾ペプチドを化学的に作製する一方で、プロテアーゼ消化によって断片化されたペプチドがポリアミンにより修飾されることを見出した。これは、食事中に含まれるタンパク質は、消化され吸収される際、食品中に大量に存在するポリアミンが消化や吸収過程に何らかの影響を与える可能性を示唆することを示した。

そこで本報告書では、研究成果を以下の3点に整理して報告する。

1) 蛍光試薬の標識量の違いを利用したコンホメーション変化したタンパク質の解析

- コンホメーション変化を指標とするプロテオーム解析法開発のための基礎検討

2) タンパク質の化学的断片化に伴うペプチドのアルキルアミン修飾を利用した MALDI-TOF MS を用いるタンパクの比較定量法の開発

- MALDI-TOF MS 分析によるシステイン含有タンパク質の定量法の開発

3) タンパク質のプロテアーゼ消化によるペプチドのポリアミン修飾

- プロテアーゼ消化におけるポリアミンによるペプチド修飾
- Formation of polyamine-modified peptides during protein digestion

4) その他

- Structural and functional relationship among diamines in terms of inhibition of cell growth
- Mammalian spermidine synthase—identification of cysteine residues and investigation of the putrescine binding site—
- Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse
- Characterization of transgenic mice with widespread overexpression of spermine synthase
- Bis(ethyl)norspermine potentiates the apoptotic activity of the pure antiestrogen ICI 182780 in breast cancer cells
- Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation
- Antisense recognition of the HER-2 mRNA: effects of phosphorothioate substitution a polyamines on DNA.RNA, RNA.RNA, and DNA.DNA duplex stability

- Control of spermidine and spermine levels in rat tissues by trans-4-methylcyclohexylamine, a spermidine-synthase inhibitor
- Ionic, structural, and temperature effects on DNA nanoparticles formed by natural and synthetic polyamines
- Bending of the estrogen response element by polyamines and estrogen receptors alpha and beta: a fluorescence resonance energy transfer study
- Aminopropyltransferases: function, structure and genetics
- Inhibition of putrescine aminopropyltransferase influences rat liver regeneration
- Induction of apoptotic cell death by putrescine
- Synergistic apoptosis of MCF-7 breast cancer cells by 2-methoxyestradiol and bis(ethyl)non-spermine

研究組織

研究代表者 : 白幡 晶 (城西大学・薬学部・教授)
研究分担者 : 杉田義昭 (城西大学・薬学部・講師)
研究分担者 : 池口文彦 (城西大学・薬学部・助教授)
研究分担者 : 高尾浩一 (城西大学・薬学部・助手)

研究経費

交付決定額 (3、600)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2,600	0	2,600
平成17年度	500	0	500
平成18年度	500	0	500

研究発表

(1) 学会誌等

Higashi, K., Yoshida, K., Nishimura, K., Momiyama, E., Kashiwagi, K., Matsufuji, S., Shirahata, A., Igarashi, K.

Structural and functional relationship among diamines in terms of inhibition of cell growth

J. Biochem. 136, 533-9 (2004)

Goda, H., Watanabe, T., Takeda, N., Kobayashi, M., Wada, M., Hosoda, H., Shirahata, A., Samejima, K.

Mammalian spermidine synthase--identification of cysteine residues and investigation of the putrescine binding site--

Biol. Pharm. Bull., 27, 1327-32 (2004)

Wang, X., Ikeguchi, Y., McCloskey, D.E., Nelson, P., Pegg, A.E.

Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse

J Biol Chem., 279, 51370-5 (2004)

Ikeguchi, Y., Wang, X., McCloskey, D.E., Coleman, C.S., Nelson, P., Hu, G., Shantz, L.M., Pegg, A.E.

Characterization of transgenic mice with widespread overexpression of spermine synthase

Biochem J. 381, 701-7 (2004)

Balabhadrapathruni, S., Santhakumaran, L.M., Thomas, T.J., Shirahata, A., Gallo, M.A., Thomas, T.

Bis(ethyl)norspermine potentiates the apoptotic activity of the pure antiestrogen ICI 182780 in breast cancer cells

Oncol. Rep., 13, 101-8 (2005)

Nishimura, K., Murozumi, K., Shirahata, A., Park, M.H., Kashiwagi, K., Igarashi, K.

Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation

Biochem. J., 385, 779-85 (2005)

Venkiteswaran, S., Vijayanathan, V., Shirahata, A., Thomas, T., Thomas, T.J.
Antisense recognition of the HER-2 mRNA: effects of phosphorothioate substitution
and polyamines on DNA.RNA, RNA.RNA, and DNA.DNA duplex stability
Biochemistry, 44, 303-12 (2005)

Kobayashi, M., Watanabe, T., Xu, Y. J., Tatemori, M., Goda, H., Niitsu, M., Shirahata,
A., Samejima, K
Control of spermidine and spermine levels in rat tissues by trans-4-
methylcyclohexylamine, a spermidine-synthase inhibitor
Biol. Pharm. Bull., 28, 569-573 (2005)

Vijayanathan, V., Lyall, J., Thomas, T., Shirahata, A., Thomas, T. J.
Ionic, structural, and temperature effects on DNA nanoparticles formed by natural
and synthetic polyamines
Biomacromolecules., 6, 1097-1103 (2005)

Vijayanathan, V., Thomas, T.J., Nair, S.K., Shirahata, A., Gallo, M.A., Thomas, T.
Bending of the estrogen response element by polyamines and estrogen receptors alpha
and beta: a fluorescence resonance energy transfer study
Int. J. Biochem. Cell Biol., 38, 1191-1206 (2006)

Ikeguchi, Y., Bewley, M. C., Pegg, A. E.
Aminopropyltransferases: function, structure and genetics
J. Biochem., 139, 1-9 (2006)

Kobayashi, M., Takao, K., Shiota, Y., Sugita, Y., Takahashi, M., Nakae, D., Samejima,
K.
Inhibition of putrescine aminopropyltransferase influences rat liver regeneration
Biol Pharm Bull., 29, 863-7 (2006)

Takao, K., Rickhag, M., Hegardt, C., Oredsson, S., Persson, L.
Induction of apoptotic cell death by putrescine
Int. J. Biochem. Cell Biol., 38, 621-8 (2006)

Ito, T., Sugita, Y., Ikeguchi, Y., Shirahata, A.

Formation of polyamine-modified peptides during protein digestion

Biochem. Biophys. Res. Comm., 356, 159-62 (2007)

Nair, S.K., Verma, A., Thomas, T.J., Chou, T.C., Gallo, M.A., Shirahata, A., Thomas, T.

Synergistic apoptosis of MCF-7 breast cancer cells by 2-methoxyestradiol and bis(ethyl)norspermine

Cancer Lett., 250, 311-22 (2007)

(2) 口頭発表

池口文彦, Edwards, A., Schwartz, C.E., Pegg, A.E., 白幡 晶

ポリアミンの生化学的及び生理学的役割解明のための解析

第17回バイオメディカル分析科学シンポジウム (兵庫) 2004年 6月

高田佐智子、寺澤友基子、杉田義昭、白幡 晶

新規Acrolein定量試薬の開発と腎不全モデルラット血清中Acrolein様物質の追跡

「ポリアミンと核酸の共進化」第3回合同シンポジウム (東京) 2004年 8月

Ikeguchi, Y., Nakatani, S., Arikawa-Hirasawa, E., Ishijima, M., Pegg, A.E., Wada, M., Mano, H. and Shirahata, A.

Effect of polyamines on differentiation of murine chondrogenic cell line ATDC5

2004 INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYAMINES (千葉) 2004年12月

Ikeguchi, Y., Edwards, A., Pegg, A.E.

Critical residues at aminopropyl-transferring reaction in spermidine synthase and spermine synthase

第19回 日本ポリアミン研究会 (北海道)、2005年 2月

井上 学、矢敷実希子、和田牧子、白幡 晶

ペプチドのC末端標識のMALDI-PSD TOF MS

日本薬学会 第125年会 (東京) 2005年 3月

高田佐智子、寺澤友基子、杉田義昭、白幡 晶

腎不全モデルラットにおける血清中アクロレイン及びアクロレイン様成分の変動

日本薬学会 第125年会 (東京) 2005年 3月

Ikeguchi, Y., Nakatani, S., Arikawa-Hirasawa, E., Ishijima, M., Pegg, A. E., Wada, M., Mano, H. and Shirahata, A.

Effect of polyamines on differentiation of murine chondrogenic cell line ATDC5.
The 2005 Gordon Research Conference on Polyamines (米国) 2005年 7月

山寄 健一、Pegg, A. E.、池口文彦、白幡 晶

Gy雄マウスとヒトスペルミン合成酵素遺伝子導入Gy雄マウスの精巣特異的DNAマイクロアレイによる解析

ポリアミンと核酸の共進化 第4回合同シンポジウム (東京) 2005年 9月

渡辺亮介、伊藤俊行、鷹觜勇貴、池口文彦、白幡 晶

デオキシハイプシン合成酵素における蛍光標識ジアミンの基質性

ポリアミンと核酸の共進化 第4回合同シンポジウム (東京)、2005年 9月

渡辺亮介、伊藤俊行、齋田麻実、鷹觜勇貴、五十嵐一衛、池口文彦、白幡 晶

ピリジル標識ジアミンを用いるHPLCによるデオキシハイプシン合成酵素活性測定法の開発
第20回 日本ポリアミン研究会 (仙台) 2006年 1月

日下部真彦、中山伸朗、名越澄子、五十嵐一衛、池口文彦、白幡 晶

DHS阻害剤による細胞増殖抑制機序の解明

日本薬学会第126年会 (仙台) 2006年 3月

丹波卓也、池口文彦、白幡 晶

5'-メチルチオアデノシンのエテノ誘導体化法を用いるスペルミン合成酵素活性測定のための蛍光検出HPLC法の開発

日本薬学会第126年会 (仙台) 2006年 3月

上田登茂子、伊藤俊行、和田牧子、池口文彦、白幡 晶

タンパク質のコンホメーション変化を指標とするプロテオーム解析法の開発の基礎検討

日本薬学会第126年会 (仙台) 2006年 3月

山寄健一、中山伸朗、名越澄子、池口文彦、白幡 晶

アミノアルキルシクロヘキシルアミンの細胞増殖に対する影響

日本薬学会第126年会 (仙台) 2006年 3月

池口文彦、松沢 厚、梅澤一成、五十嵐一衛、一條秀憲、白幡 晶

ASK1によるポリアミン類縁体に対する細胞感受性の変化

日本薬学会 第126年会（仙台）2006年 3月

梅澤一成、伊藤俊行、井上 学、矢敷美希子、和田牧子、手塚淑人、池口文彦、白幡 晶

タンパク質の断片化に伴うアルキルアミン標識

ポリアミンと核酸の共進化 第5回合同シンポジウム（東京）2006年11月

石井育美、池口文彦、手塚淑人、五十嵐一衛、和田政裕、真野 博、白幡 晶

細胞内ポリアミン量の制御と脂肪前駆細胞における分化

日本ポリアミン研究会 第21回（東京）2007年 1月

齋田麻実、池口文彦、中谷祥恵、平澤恵理、石島旨章、Pegg, A. E.、和田政裕、真野 博、

白幡 晶、骨病変を有するスペルミン合成酵素遺伝子改変マウスの解析

日本薬学会 第127年会（富山）2007年 3月

梅澤一成、伊藤俊行、井上 学、矢敷実希子、日比野康英、松沢 厚、一條秀憲、手塚淑人、

和田牧子、池口文彦、白幡 晶

MALDI-TOF MS分析による細胞内システイン含有タンパク質の定量法の開発

日本薬学会 第127年会（富山）2007年 3月

山崎雅恵、鮫島啓二郎、手塚淑人、池口文彦、白幡 晶

ESI-MSによるポリアミンのトレーサー実験における前処理法の検討及び細胞への応用

日本薬学会 第127年会（富山）2007年 3月

石井育美、池口文彦、手塚淑人、和田政裕、真野 博、白幡 晶

脂肪前駆細胞分化に対するポリアミンの影響

日本薬学会 第127年会（富山）2007年 3月

（3）出版物

なし

研究成果

目次

	頁
コンホメーション変化を指標とするプロテオーム解析法開発のための基礎検討	1
MALDI-TOF MS 分析によるシステイン含有タンパク質の定量法の開発	65
プロテアーゼ消化におけるポリアミンによるペプチド修飾	126
Ito, T., <u>Sugita, Y.</u> , <u>Ikeguchi, Y.</u> , <u>Shirahata, A.</u> Formation of polyamine-modified peptides during protein digestion Biochem. Biophys. Res. Comm., 356, 159-62 (2007)	196
Higashi, K., Yoshida, K., Nishimura, K., Momiyama, E., Kashiwagi, K., Matsufuji, S., <u>Shirahata, A.</u> , Igarashi, K. Structural and functional relationship among diamines in terms of inhibition of cell growth J. Biochem. 136, 533-9 (2004)	200
Goda, H., Watanabe, T., Takeda, N., Kobayashi, M., Wada, M., Hosoda, H., <u>Shirahata,</u> <u>A.</u> , Samejima, K. Mammalian spermidine synthase--identification of cysteine residues and investigation of the putrescine binding site-- Biol. Pharm. Bull., 27, 1327-32 (2004)	207
Wang, X., <u>Ikeguchi, Y.</u> , McCloskey, D.E., Nelson, P., Pegg, A.E. Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse J Biol Chem., 279, 51370-5 (2004)	213
<u>Ikeguchi, Y.</u> , Wang, X., McCloskey, D.E., Coleman, C.S., Nelson, P., Hu, G., Shantz, L.M., Pegg, A.E. Characterization of transgenic mice with widespread overexpression of spermine synthase Biochem J. 381, 701-7 (2004)	219

- Balabhadrapathruni, S., Santhakumaran, L.M., Thomas, T.J., Shirahata, A., Gallo, M.A., Thomas, T.
Bis(ethyl)norspermine potentiates the apoptotic activity of the pure antiestrogen ICI 182780 in breast cancer cells
Oncol. Rep., 13, 101-8 (2005) 226
- Nishimura, K., Murozumi, K., Shirahata, A., Park, M.H., Kashiwagi, K., Igarashi, K.
Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation
Biochem. J., 385, 779-85 (2005) 234
- Venkiteswaran, S., Vijayanathan, V., Shirahata, A., Thomas, T., Thomas, T.J.
Antisense recognition of the HER-2 mRNA: effects of phosphorothioate substitution and polyamines on DNA.RNA, RNA.RNA, and DNA.DNA duplex stability
Biochemistry, 44, 303-12 (2005) 241
- Kobayashi, M., Watanabe, T., Xu, Y. J., Tatemori, M., Goda, H., Niitsu, M., Shirahata, A., Samejima, K
Control of spermidine and spermine levels in rat tissues by trans-4-methylcyclohexylamine, a spermidine-synthase inhibitor
Biol. Pharm. Bull., 28, 569-573 (2005) 251
- Vijayanathan, V., Lyall, J., Thomas, T., Shirahata, A., Thomas, T. J.
Ionic, structural, and temperature effects on DNA nanoparticles formed by natural and synthetic polyamines
Biomacromolecules., 6, 1097-1103 (2005) 256
- Vijayanathan, V., Thomas, T.J., Nair, S.K., Shirahata, A., Gallo, M.A., Thomas, T.
Bending of the estrogen response element by polyamines and estrogen receptors alpha and beta: a fluorescence resonance energy transfer study
Int. J. Biochem. Cell Biol., 38, 1191-1206 (2006) 263
- Ikeguchi, Y., Bewley, M. C., Pegg, A. E.
Aminopropyltransferases: function, structure and genetics
J. Biochem., 139, 1-9 (2006) 279

- Kobayashi, M., Takao, K., Shiota, Y., Sugita, Y., Takahashi, M., Nakae, D., Samejima, K.
Inhibition of putrescine aminopropyltransferase influences rat liver regeneration
Biol Pharm Bull., 29, 863-7 (2006) 288
- Takao, K., Rickhag, M., Hegardt, C., Oredsson, S., Persson, L.
Induction of apoptotic cell death by putrescine
Int. J. Biochem. Cell Biol., 38, 621-8 (2006) 293
- Nair, S.K., Verma, A., Thomas, T.J., Chou, T.C., Gallo, M.A., Shirahata, A., Thomas, T.
Synergistic apoptosis of MCF-7 breast cancer cells by 2-methoxyestradiol and bis(ethyl)norspermine
Cancer Lett., 250, 311-22 (2007) 301

コンホメーション変化を指標とする
プロテオーム解析法開発のための基礎検討

略号表

2PyPut : *N*-(2-Pyridyl)-1,4-diaminobutane

P2M : *N* - [2-(2-Pyridylamino)ethyl] maleimide

P3M : *N* -[3-(2-Pyridylamino)propyl] maleimide

P4M : *N* -[4-(2-Pyridylamino)butyl] maleimide

OVA : ovalbumin

INS : insulin , bovine

2-ME : 2-mercaptoethanol

TFA : trifluoroacetic acid

AdoMetDC : *S*-adenosylmethionine decarboxylase

TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride

Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

AdoMetDC : *S*-adenosylmethionine decarboxylase

DTNB : 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)

MALDI-TOF MS : matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight

mass spectrometry

MS : mass spectrometry

PSD : post-source decay

CHCA : α -cyano-4-hydroxycinnamic acid

Ang I : angiotensin I

INS β : insulin β chain , bovine

FAB-MS : fast atom bombardment mass spectrometry

ICAT : Isotope coded affinity tags

緒言

疾患特異的なタンパク質、あるいは、病態の進行に伴って活性の変化するタンパク質の検出は、「コンホメーション病」¹⁾を含めた数多くの疾患に対する創薬ターゲット分子の探索という意味で、医薬品開発における重要な課題である。コンホメーション病は、タンパク質の立体構造の変化に伴う機能変化に起因する疾患の総称であり、タウタンパク質や β -アミロイドタンパク質が関係するアルツハイマー病、DJ-1 タンパク質が関係するパーキンソン病、プリオンタンパク質が関係するプリオン病などを含んでいる²⁾。これらの病態に関与するタンパク質の立体構造の変化と疾患との関連に関するさまざまな研究は急速に進展しており^{3) 4) 5)}、特定疾患における臓器内タンパク質のコンホメーション変化が検出できれば、病因の解明、治療薬の開発における非常に有用な情報となるものと思われる。また、薬物との結合によりコンホメーションが変化するタンパク質の検出は、作用や副作用機序の理解にも重要であると考えられ、その方法論の開発は広い分野にわたり意義深い。

しかし、タンパク質のコンホメーション変化の検出技術は、核磁気共鳴法やX線回折法、円二色性法等の進歩により高感度化が進んでいるが、いずれも精製したタンパク質を必要とする。従って、生体試料中多くのタ

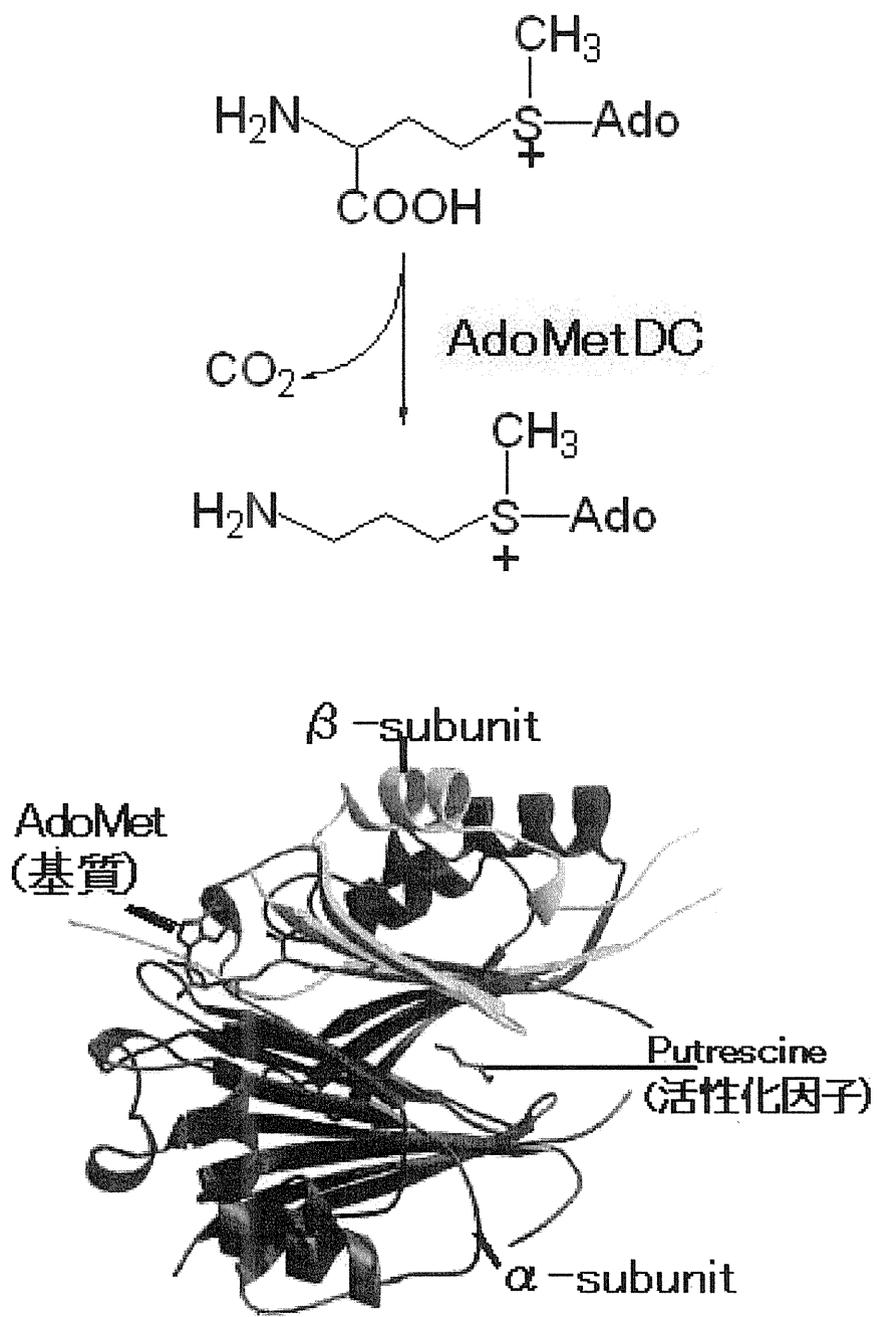
ンパク質の中から、立体構造の変化した特定のタンパク質を検出することは現状では困難と言える。

一方、ヒトゲノム全 DNA 配列の解読が終了し、プロテオーム解析も、生命の仕組みを研究する手段として多様化されてきた。「プロテオーム (proteome)」とは、生物個体がかもつ protein (タンパク質) 全体を意味する造語であり、それらを網羅的に解析することをプロテオーム解析という。これまでのプロテオーム解析は、存在するタンパク質の同定及び、その量的変化を追跡するために用いられており、タンパク質を電気泳動やクロマトグラフィーを組み合わせて分離した後、消化酵素により切断し、断片化されたタンパク質の質量分析を行うものであった。この解析方法は疾患に伴うタンパク質量の変化を調べ、医薬品ターゲット分子の検出に汎用されてきた。もし、何らかの化学修飾により、タンパク質のコンホメーション変化の有無を検出することが可能となれば、従来のプロテオーム解析法を応用することで、立体構造の変化するタンパク質の特定が可能となるものと思われる。そこで、本研究では、タンパク質の化学修飾とプロテオーム解析手段を利用して、コンホメーション変化したタンパク質の検出を網羅的検出法開発のための基礎検討を行うことを目標とした。

当研究室の和田は、ポリアミン生合成酵素の一つである S -

adenosylmethionine decarboxylase (AdoMetDC) の立体構造の安定化にポリアミンの前駆体である低分子のプトレシンが関与していることを明らかにした(Fig. 1)。すなわち和田は、SH 標識試薬であるモノヨード酢酸に対するAdoMetDC の反応性をMALDI-TOF MS を用いて調べ、試料中にプトレシンが存在する場合と比較して、プトレシン非存在下の方がAdoMetDC により多くモノヨード酢酸が標識されることを見出した⁶⁾。このことは、プトレシンが存在している場合、AdoMetDC の立体構造が安定化し、モノヨード酢酸標識を受けにくく、プトレシンを除くと、立体構造が維持できなくなるためより多くのモノヨード酢酸が反応するものと考察された(Fig. 2)。すなわち、SH 基の反応性の違いが、タンパク質のコンホメーション変化の指標になることが示唆された。

また、当研究室の町田は、和田の発見をさらに発展させて、蛍光 SH 標識試薬であるCy3maleimide (Cy3m) に対するAdoMetDC の反応性を二次元電気泳動により調べ⁷⁾、その結果、泳動のスポット位置の変化から、プトレシンの有無によってAdoMetDC におけるCy3m 標識量に違いが見られることを明らかにした。これらのことは、低分子によりコンホメーション変化するタンパク質の検索が蛍光 SH 標識試薬を用いることによって、可能であることを示していると考えている。



Biochemistry, Vol. 40, No. 32, 2001

Fig. 1 Structure and reaction of AdoMetDC

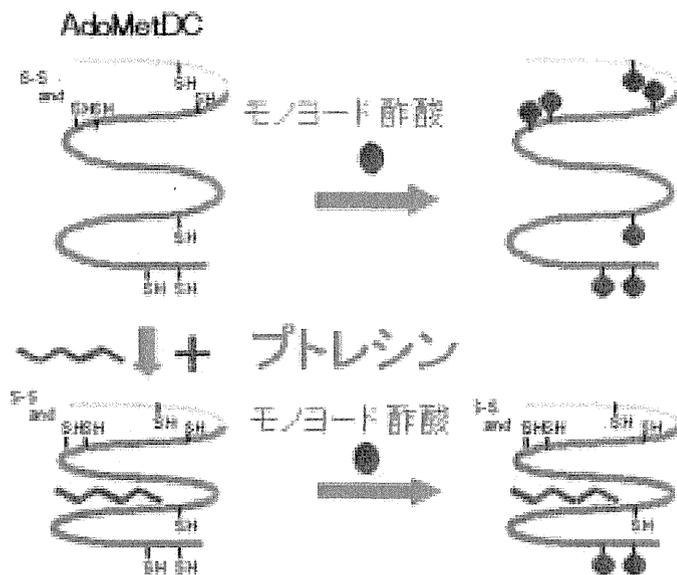
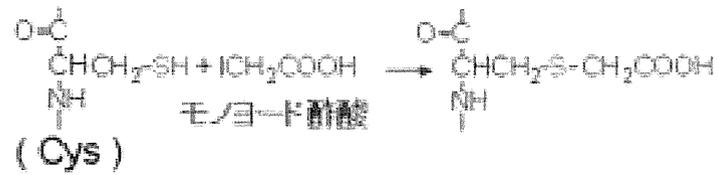


Fig. 2 Reaction of AdoMetDC with monoiodoacetic acid in the presence of putrescine

遊離の SH をもつシステイン残基は、すべてのタンパク質に存在するわけではないが、特定の活性酵素や機能タンパク質に存在することは知られている。また、すべてのタンパク質に含有されていないが故に、遊離の SH 基を標的とする検出は、標識タンパク質の分離・同定を容易にする可能性が高い。そこで、本研究では、コンホメーション変化を、蛍光 SH 反応試薬によって、簡便に検出する方法論を開発することを第一の目的とした。

近年、質量分析装置 (MS) を検出器として、安定同位体をもつ標識試薬を用いてタンパク質の相対的な量の測定が一般化しつつある。Aebersold らはシステイン残基のアルキル化剤としてビオチン構造を有する試薬を用いることにより、標識物質を効率よく精製できるようにした Isotope Coded Affinity Tags (ICAT) 法を開発した⁸⁾。彼らの方法は安定同位体の利用により 2 種の質量をもつ標識試薬をそれぞれ異なる試料に適用したのち、試料を消化分解後アビジンカラムにより分離し、標識ペプチドを質量分析により検出するものである。すなわち、質量差のピーク強度を指標にして、標識ペプチドを含有するタンパク質の量的変化の検出を可能としている。

一方、当研究室の井上は MALDI-TOF MS を用いて、メチレン鎖の

長さが異なる 2 種のペプチド C 末端標識化合物を用いることによってもタンパク質の相対的な量を知ることが可能であることを示した⁹⁾。

本研究では、井上が示した結果をもとに、分子量の異なる 2 種の蛍光 SH 標識試薬を用いて、立体構造変化を起こすタンパク質の簡便で網羅的な検出法の可能性を検討することも目的の一つとした。

本論は、第 1 章では、プロテオーム解析に有用な蛍光 SH 標識試薬の選択、第 2 章では SH 標識量の違いを利用したコンホメーション変化したタンパク質の検出、第 3 章では、開発した分子量の異なる 2 種の標識試薬を用いて、コンホメーション変化したタンパク質を簡便で網羅的に検出するための基礎検討についてそれぞれ述べた。

本論

第一章 蛍光 SH 標識試薬の選択

蛍光 SH 標識試薬の選択のためには、検出のための蛍光団と反応のための反応基を選択する必要がある。プロテオーム解析に応用することを前提として、試薬の選択を行った。

1-1 蛍光団の選択

蛍光 SH 標識試薬の蛍光団の選択にあたり、以下の条件を考慮した。すなわち第一に、HPLC で高感度に検出するため、強い蛍光強度を有すること、第二に、タンパク質の内側に存在するシステインと反応しやすくさせるため、小さい蛍光団であること、第三に、MALDI-TOF MS 分析で検出できるように、N₂ レーザーである 337nm に極大吸収を示さないこと、第四に、質量分析における検出感度を考慮して、プラス電荷をもつことである。蛍光団としては、ダンシル基をはじめとして、汎用される多種のものが考慮対象であるが、溶解性、大きさ等上記条件を考慮し、*N*-(2-Pyridyl)-1,4-diaminobutane (2PyPut) に関する当研究室の伊藤らの報告¹⁰⁾をもとに、337nm に極大吸収を示さない 2-ピリジルアミノ基が最も適当な蛍光団である (Fig. 3) と考えた。

1-2 標識試薬の選択

SH 基に対する反応基としては、入手の容易さから、ヨード酢酸誘導体あるいはマレイミド誘導体が一般的である。

当研究室では、プロレシンによる AdoMetDC の立体構造安定化に関し

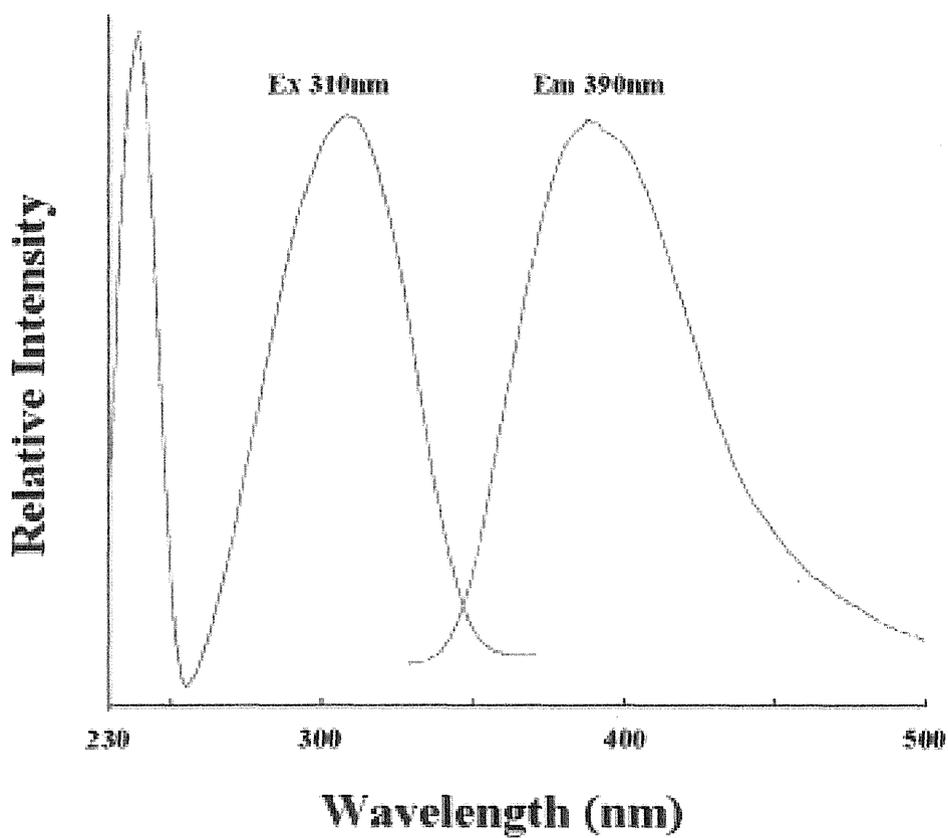
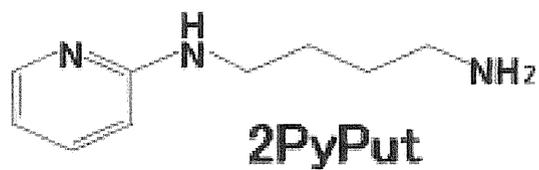


Fig . 3 Excitation and emission spectra of 2PyPut
solvent TFA / Acetonitrile / H₂O = 0.1: / 5 / 95

て、SH 標識試薬モノヨード酢酸によるタンパク質中の遊離システイン残基の化学修飾を指標として、研究を行ってきた。また、タンパク質内部の SH 基への反応性を考慮して、比較的分子量の小さいヨード酢酸誘導体が、適当であろうと判断し研究開始当初は、ヨード酢酸誘導体の入手を検討した。SH 基標識可能なモノヨード酢酸に蛍光団として 2-ピリジルアミノ基を導入した、*N'*-Iodoacetyl-*N'*-pyridylputrescine を候補化合物として考え、その合成を試みたが、目的成分を得ることができず、その合成を断念した。

そこで次に、マレイミド基を導入した *N*-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl] maleimide を候補化合物として選択した。対象化合物は市販品のものはそのまま入手し、アルキル鎖の異なる化合物は報告¹¹⁾をもとに調製した。

マレイミド基は遊離 SH 基に対する高選択的な反応基である。その反応は付加反応であり、その結果チオエーテルとなる (Fig. 4)。pH 8 以上ではマレイミド自身の加水分解が促進されるため、一般的に反応は中性付近で行う。そこで、マレイミドの安定性を確認するために、市販されている *N*-[2-(2-Pyridylamino)ethyl]maleimide (P2M) を用い、25°C と 37°C リン酸緩衝液 (pH7.0) 条件下で時間ごとに

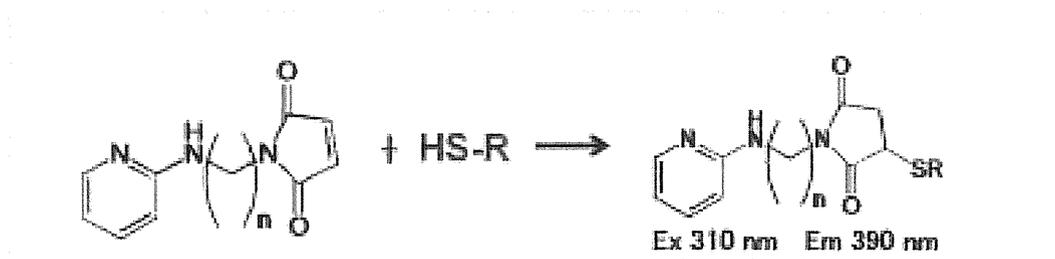


Fig. 4 Reaction of *N*-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimide with SH group

HPLC (HPLC システム 1) により分析を行った (Fig. 5)。その結果、P2M 量は経時的に減少し、未知ピークは経時的に増加することが分かった(Fig. 6)。分解過程の詳細は不明であるが、このことにより、P2M 標識条件としてはリン酸緩衝液(pH 7.0)中、25°Cでは1時間、37°Cでは30分間を超えない必要があることが分かった。

マレイミド基は蛍光団の近傍に存在する物質の消光団として、作用する可能性がある。そこで P2M を用いて、その可能性を探るために、SH 基と反応後、蛍光強度が変化するかどうかを調べた。SH 基として 2-mercaptoethanol (2-ME)中、P2M を含む溶液の蛍光強度を測定すると、2-ME 存在下で強い蛍光が検出され、P2M は 2-ME と反応することにより、その蛍光強度が増加することが分かった (Fig. 7)。これは、マレイミド基が消光団であり¹²⁾、2-ピリジルアミノ基の蛍光に影響を与えること、すなわち標識試薬としては、有用な特性をもつことが分かった。

HPLC Condition

Column: Inertsil ODS-2

150 × 4.6mm ID

Mobile phase: 10% Acetonitril in 0.1%TFA

Flow rate: 0.5ml/min

Detection: UV 310 nm

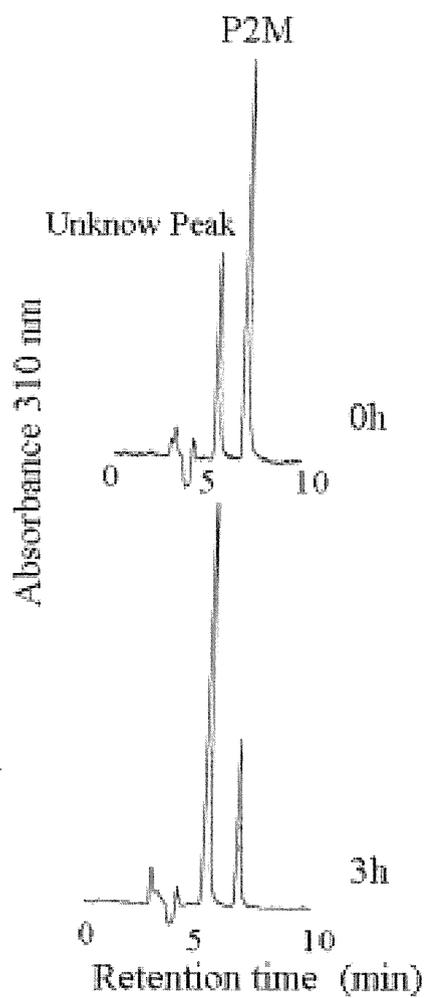


Fig. 5 HPLC analysis of P2M solution with or without incubation at 37 °C

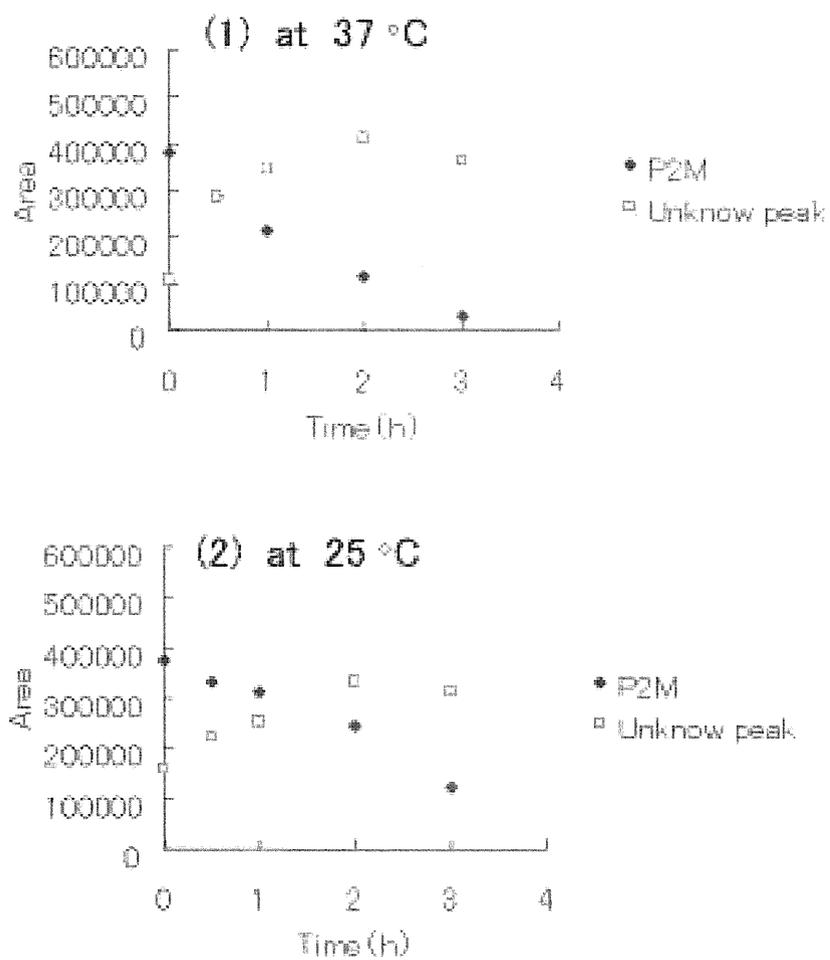


Fig. 6 Stability of P2M in phosphate buffer, pH7.0

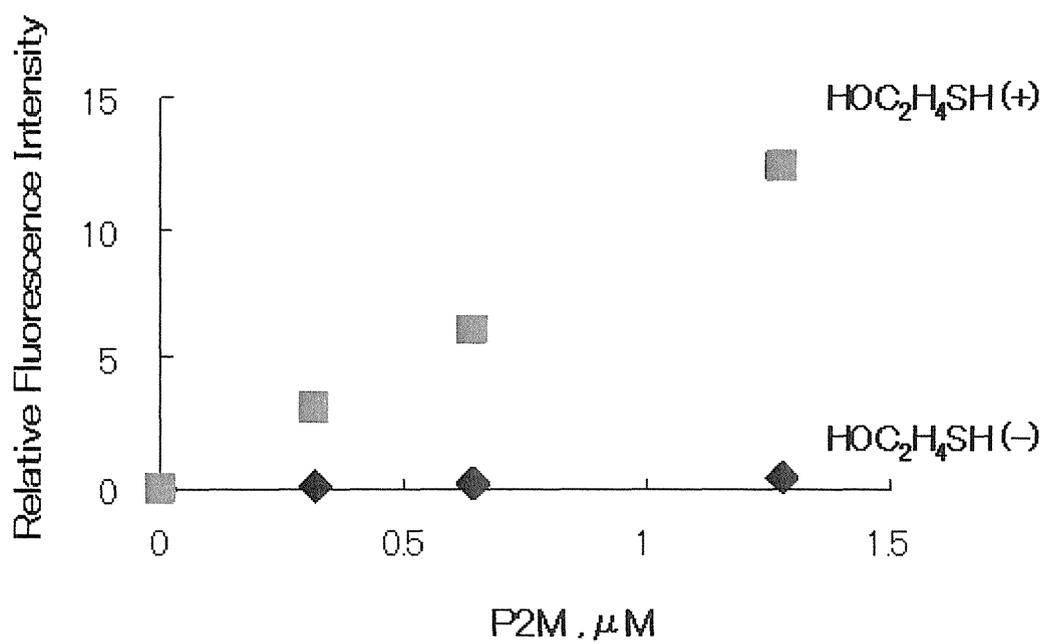


Fig. 7 Fluorescence intensity of P2M after reaction with 2-ME

1-3 ペプチド中遊離システイン残基の標識と標識ペプチドの MALDI-TOF MS 分析

前節に蛍光SH試薬として、*N*-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimideは、蛍光特性、SH基との反応特性から有用であることを示したが、実際のペプチド中システインとの反応性や選択性及び質量分析における検出に関する情報はない。本節では、それらの確認をモデルペプチドとして、ウシ膵臓由来 Insulin (INS)を用い、標識試薬として、*N*-[4-(2-Pyridylamino)butyl] maleimide (P4M)を用いて行った。

INSは総残基数51(A鎖21、B鎖30)、分子量約5700Daのペプチドであり、Fig. 8にはINSの一次配列を示した。A鎖、B鎖と呼ばれる2本のペプチドが結合した構造をもっており、3ヶ所のS-S結合(A鎖Cys 6 – B鎖Cys 7、A鎖Cys 20 – B鎖Cys 19、A鎖Cys 7 – A鎖Cys 11)を有している。

Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP)でINSを還元し、すべてのS-S結合を遊離SH基としたのち、P4Mと25°Cで1時間反応させた。反応後、V8プロテアーゼにより切断した標識ペプチド断片を蛍光検出のHPLCで分離した。Fig. 9のクロマトグラムに示されるように、P4Mと反応しない試料では、検出ピークは存在せ

A鎖

GIVEQCCASVCSLYQLENYCN

B鎖

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA

Fig. 8 Amino acid sequence of insulin

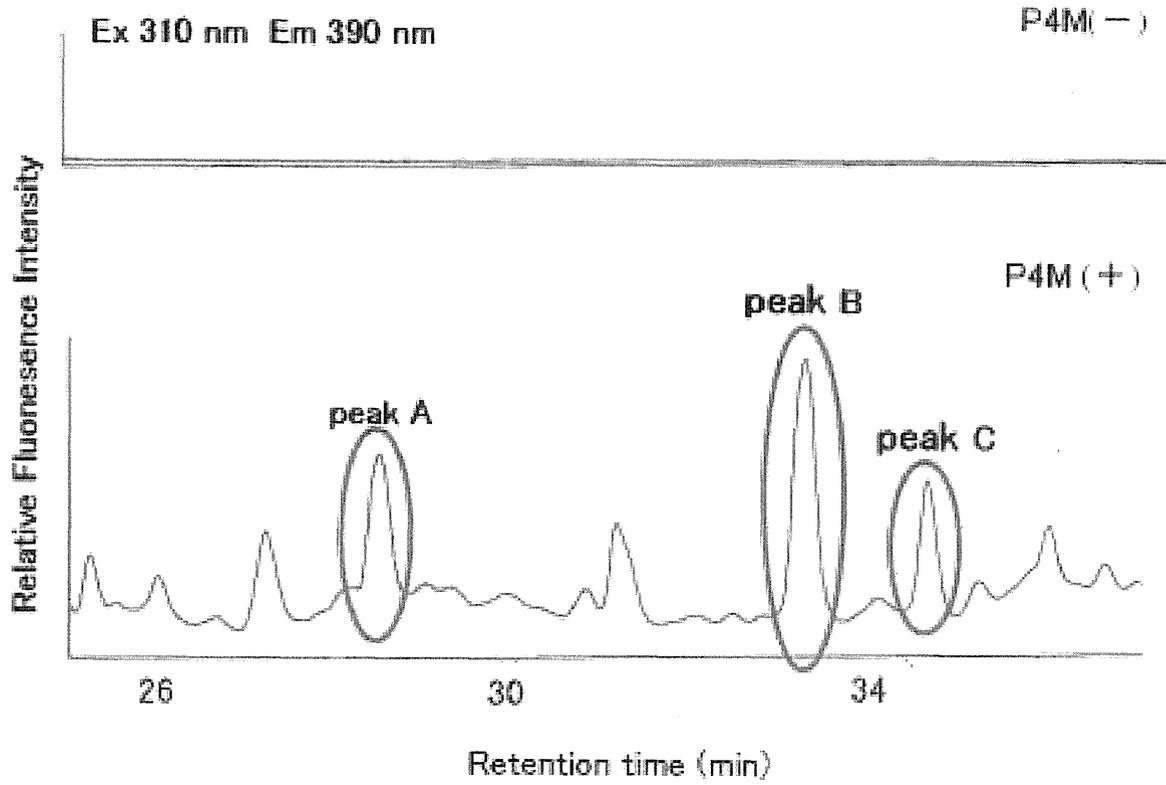


Fig.9 HPLC chromatogram for labeled insulin digested with V8 protease

ず、P4M と反応した試料では、ピークが数多く見られ、P4M がペプチドを修飾していることが示唆された。

質量分析、アミノ酸配列の検出には操作が容易な MALDI-TOF MS 分析及び post-source decay (PSD)分析を用いることとした。

MALDI-TOF MS とは、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化というイオン化法と飛行時間型の質量分離部からなる質量分析装置である(Fig. 10)。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、これに加速電圧をかけることで、ペプチドイオンを一定の方向に飛行させる。その後、進行方向とは逆向きに電場をかけイオン群を折り返させる。このときに、質量の軽いものほど速く飛び、早い段階で折り返すため、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。これを利用して、ペプチド質量を測定する分析法が MALDI-TOF MS 分析方法である¹³⁾。また、PSD 分析とはペプチドのアミノ酸配列や修飾部位を解析するための方法であり、Fig. 11 に PSD の原理を示した。MALDI で得られる生成イオンから、イオンゲートなどを用い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イオン化させることで、ペプチドが自己崩壊を起こし、フラグメントイオ

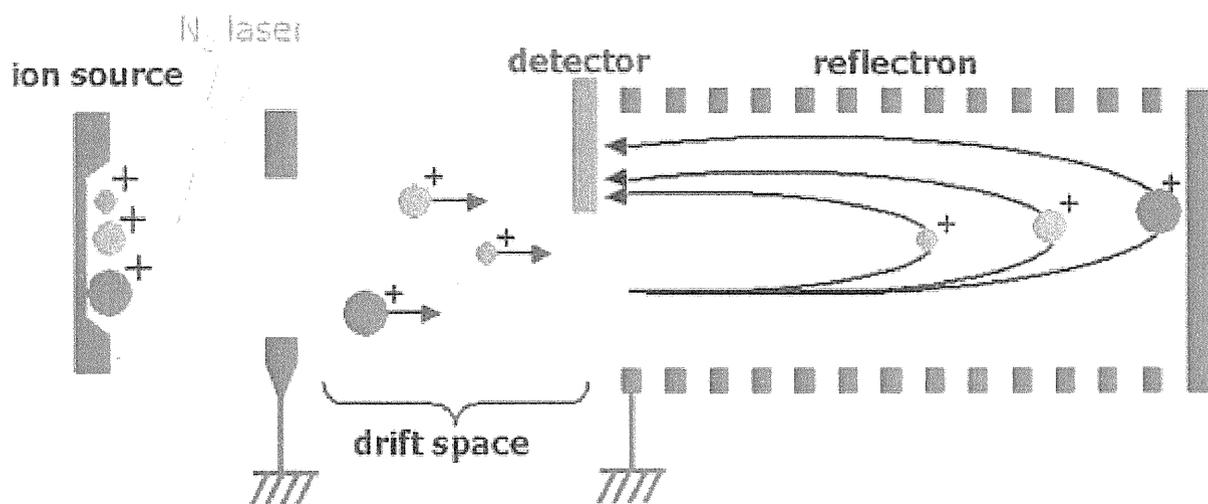


Fig. 10 Principle of MALDI-TOF MS analysis

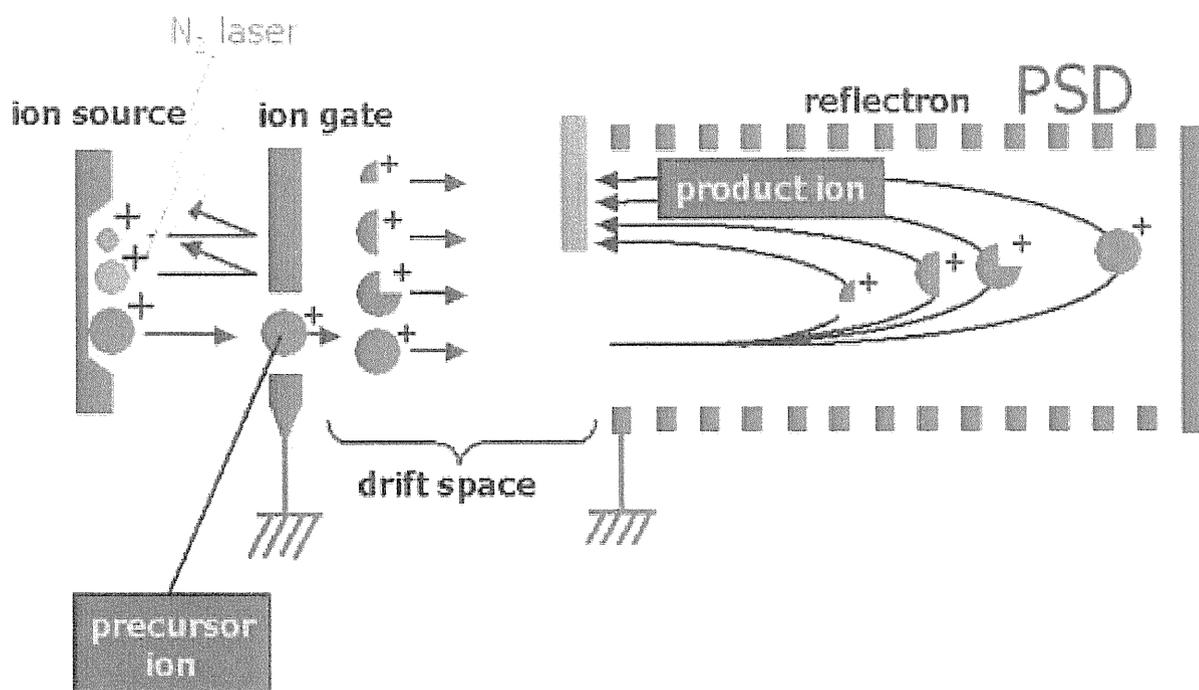


Fig. 11 Principle of PSD analysis

ンが生成する。この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方向とは逆の電場をかけてイオン群を折り返させ、分離する。これが PSD 分析で、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¹⁴⁾。

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がある。その際、Fig. 12 に示すように一ヶ所の切断により、N 末端側を含む b イオンと C 末端側を含む y イオンの 2 種類のイオンの生成が起こる¹⁵⁾。

Fig. 11 にはペプチドの PSD 分析スペクトルの模式図を示した。縦軸がイオン強度、横軸が分子量/価数 (m/z) となる。例えば、y2 と y3 のフラグメントイオンの分子量の差はアミノ酸 2 (AA_2) の分子量に相当し、同定することができる。このことを組み合わせることでアミノ酸の配列及び修飾位置の特定が可能となる。

Fig. 12 中に示した、ピーク A、B 及び C を分取し、それぞれについて MALDI-TOF MS 分析を行った (Fig. 13)。その結果、それぞれ明瞭なイオンピークを示し、予想される断片化ペプチドの分子量と一致した分子イオンピークを検出した。ピーク A は、INS の B 鎖 1 か

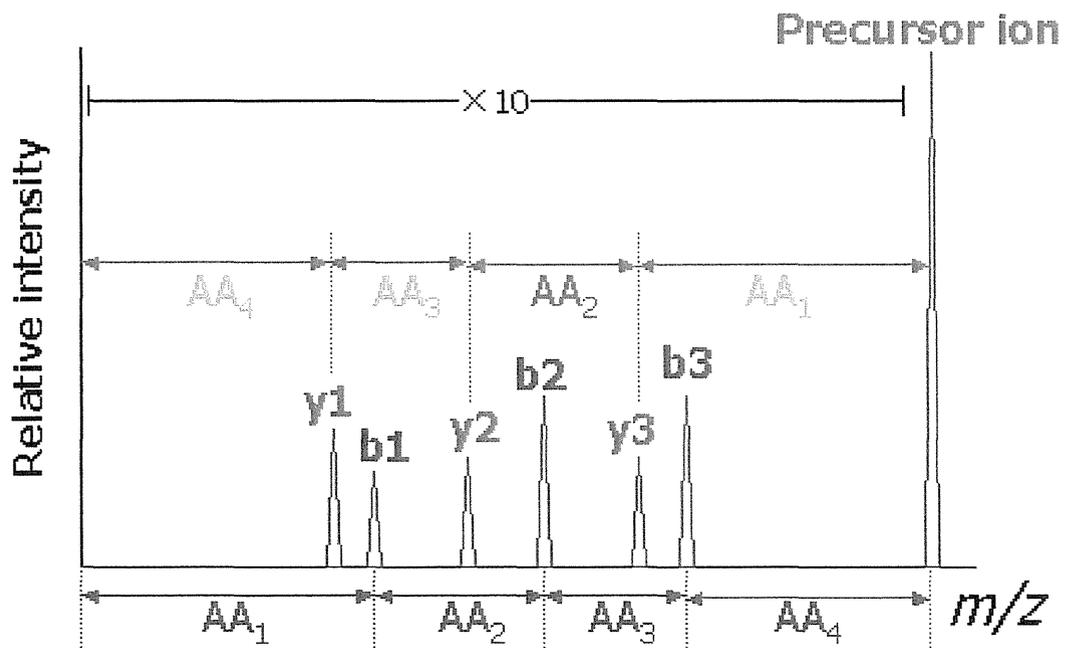
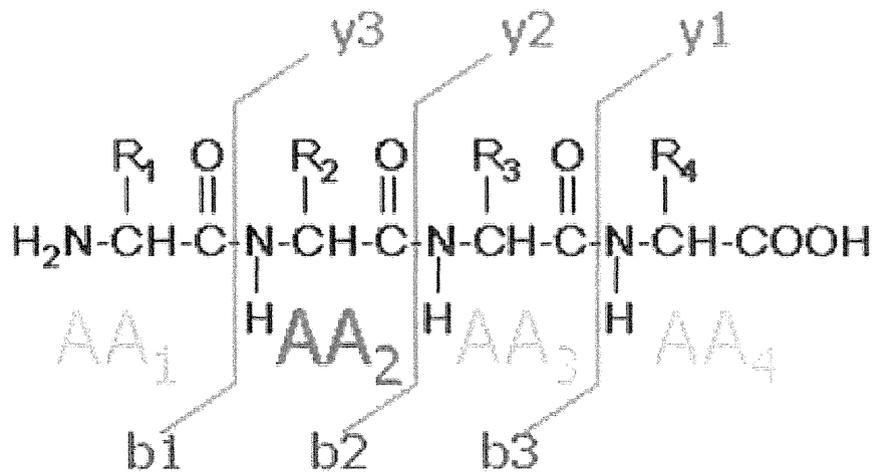


Fig. 12 PSD spectrum and nomenclature for fragment ions of peptide

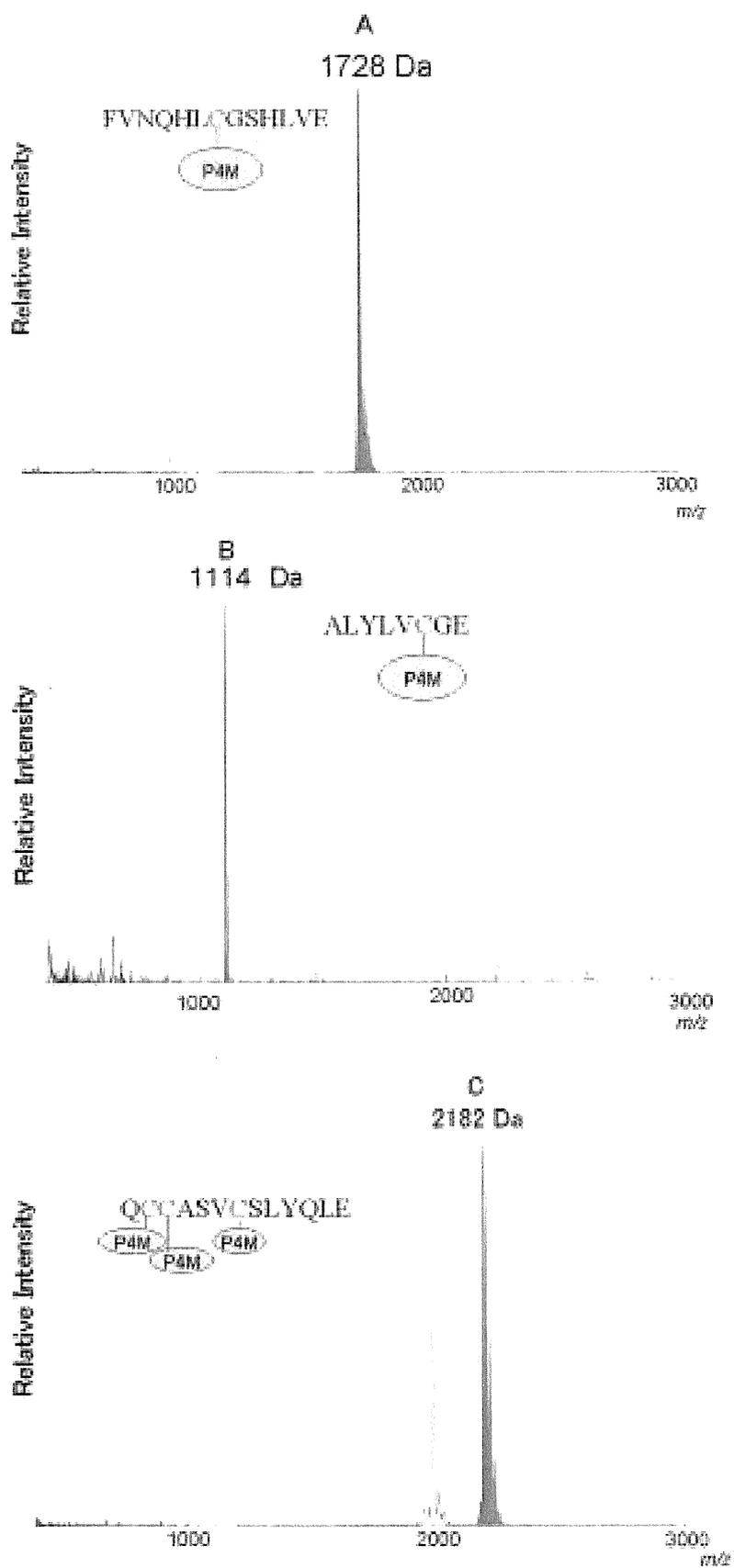


Fig.13 MALDI-TOF MS spectra of P4M labeled peptides

ら 13 番目に相当するペプチドに P4M が修飾されたもの(分子量 1728)、ピーク B は B 鎖 14 から 21 番目に相当するペプチドに P4M が修飾されたもの(分子量 1113)、ピーク C は A 鎖 5 から 17 番目相当するペプチドに P4M が修飾したもの(分子量 2182)と、それぞれ同定した。また、HPLC クロマトグラム上検出された他のピークは、消化が不完全なペプチドであり、主要な検出ピークはシステイン残基と P4M が反応して生成したものであり、選択性高く試薬がシステイン残基と反応することが示唆された。

さらに、ピーク A、B 及び C のペプチドそれぞれについて、PSD 分析を行った(Fig. 14)。ペプチドの PSD 分析において全てのフラグメントイオンが検出されてはいないものの、y 系列及び、b 系列においても P4M がシステインを修飾していることを確認した。これらのことから、*N*-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimide 修飾ペプチドは、MALDI-TOF MS 及び MALDI-PSD TOF MS 分析において検出可能であることが分かった。

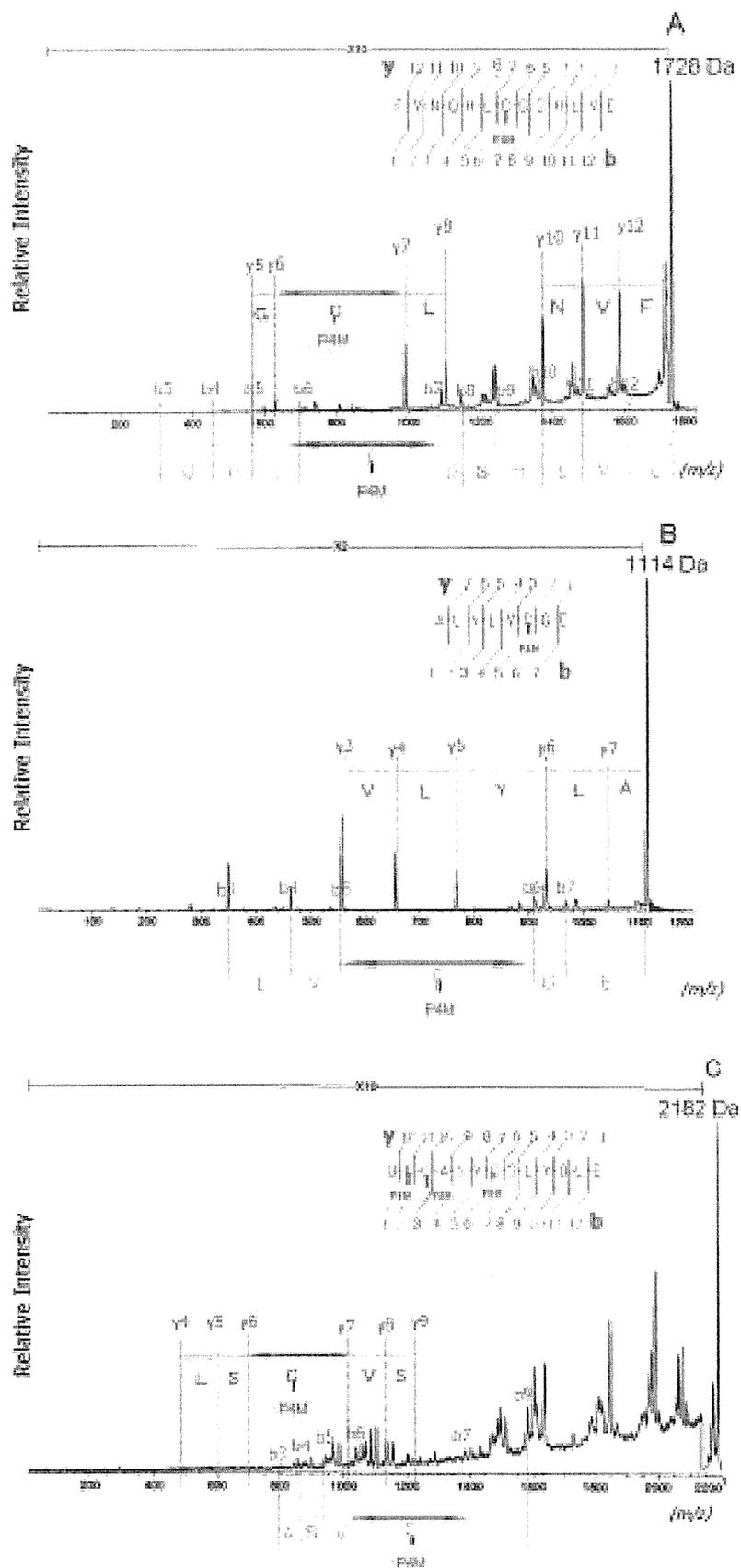


Fig.14 MALDI-PSD TOF MS spectra of P4M labeled peptide

1-4 まとめ

N-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimide は、SH 標識試薬に有用な水溶性マレイミド誘導体であると考えられた。P2M は、SH 基と反応することにより蛍光が増加することが分った。リン酸緩衝液 (pH7.0) 中、長時間反応させると分解することが示唆された。

N-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimide は、モデルタンパクとして用いた還元 INS の SH 基と反応したことが分かった。そして、その酵素消化後、HPLC 分取した *N*-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimide 修飾ペプチドは、MALDI-TOF MS において検出でき、MALDI-PSD TOF MS において配列分析も可能であることがわかった。

第二章 SH 標識量の違いを指標としたコンホメーション変化したタンパク質の検出

第一章では、MALDI-TOF MS 分析が可能な標識ペプチドを与える標識試薬として、*N*-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimide が有用であることを示した。本章では、本試薬が実際にタンパク質のコンホメーション変化の検出に有用であるかどうかを調べることを目的とした実験について扱った。

本研究室はこれまでに、ポリアミン合成酵素の一つである AdoMetDC タンパク質の立体構造の安定化に低分子が関与することを MALDI-TOF MS を用いて明らかにしてきた。したがって、当初は AdoMetDC をモデルタンパクとして利用することを考慮したが、モデルタンパク質として精製標品を得るためには、動物臓器からの精製が繁雑であること及び、簡便に精製できる組み換え体発現系がないことなどから、他のモデルタンパクから検索することとした。

モデルタンパク質の要件として、コンホメーション変化が観察できること、遊離の SH 基をもち、その反応性がコンホメーションにより変化すること、安価であることなどを考慮して、検討した結果、オボアルブミン(OVA)を第一の候補とすることとした。

OVA は、ニワトリの卵白中のタンパク質に約 45%含有する、総残基数 385、分子量約 45 kDa の糖タンパク質である。Fig. 15 には OVA の一次配列を示した。N 末端はアセチル化されており、分子内にリン酸化されたセリン残基 (Ser 68、Ser 344) を有し、また Asn 292 にアスパラギン結合糖鎖のコンセンサス配列を有している。分子内には 4 個の遊離 SH 基 (Cys 11, Cys 30, Cys 367, Cys 382) と 1 ヶ所の S-S 結合 (Cys 73 - Cys 120) が存在しており、この 1 ヶ所の S-S 結合は切断しても分子構造には影響は無いとされている^{16) 17)}。また、OVA は X 線結晶構造解析により立体構造が明らかになっており¹⁸⁾ (Fig. 16)、 α - β マルチドメインタイプに属している。また、OVA は共存するグアニジンの濃度により Ellman 試薬、5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) の標識量が増加するという報告¹⁹⁾があり、4 つある遊離の SH 基に対する反応性が変性剤によるコンホメーション変化によって変化することが報告されている。

10	20	30	40	50	60	
GSIGAASMEF	C ⁷³ DVFKELKV	HHANENIF	C ³⁰ PIAINSALAM	VYLGAKDSTR	TDINKVVRFD	
70	80	90	100	110	120	
KLPGFGDSIE	A ⁷⁰ CGTSYVNH	SSLRDILNQI	TKPNDVYSFS	LASRLYAEER	YPIILPEYL	C ¹²⁰
130	140	150	160	170	180	
VKELYRGGLE	PINFDTAADD	ARELINSWVE	SQTNGIIRNV	LQPSSVDSQT	AMVLVNAIVF	
190	200	210	220	230	240	
KGLWEKAFKD	EDTDAMPFRV	TEQESKPVQM	MYQIGLFRVA	SMASEKMKIL	ELPFASGTMS	
250	260	270	280	290	300	
MLVLLPDEVS	GLEQLESIIN	FEKLTWTSS	NVMEERKIKV	YLP RM KMEEK	YMLTSLV LM AM	
310	320	330	340	350	360	
GITDVFSSSA	NLSGISSAES	LKISQAVHAA	HAEINEAGRE	VVGS AE AGVD	AASVSEEFRA	
370	380					
DHPFL	C ⁷³ KH	IATNAVLF	FG	C ³⁰ SP		

Fig.15 Amino acid sequence of ovalbumin

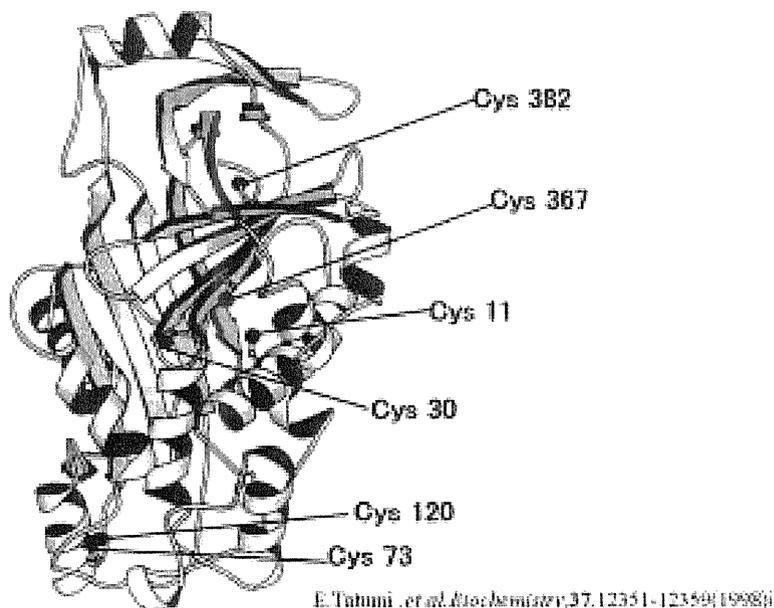


Fig.16 Structure model of ovalbumin from chicken

2-1 OVA を用いた本試薬の標識量の検討

まず初めに、標識試薬と異なったコンホメーションをもつタンパク質を反応後、タンパク質に結合する標識試薬量を、直接蛍光強度を測定することで評価した。すなわち、グアニジン濃度の異なる OVA 溶液を調製し、P2M、*N*-[3-(2-Pyridylamino)propyl] maleimide (P3M)、もしくは P4M (OVA 中システイン残基数の 20 倍量) を添加し、25°C で 1 時間反応を行った後、2-ME (SH 標識試薬の 20 倍量) により、反応を停止させた。反応液を、2 M 尿素含有-50 mM Tris 塩酸 (pH7.8) 緩衝溶液により透析した後の溶液の蛍光強度 (Ex 310 nm, Em 390 nm) を測定した (Fig. 17)。その結果、グアニジン 0 M 濃度においても、一部蛍光が観察されたが、グアニジン濃度の増加に伴って、その蛍光強度が増大することが分かった。このことは、グアニジン 0 M 濃度においても、反応可能な遊離 SH 基が OVA に存在しており、グアニジン濃度の増加によってコンホメーションが変化し、反応可能な遊離 SH 基が増加することを示していると考えた。すなわち、タンパク質のコンホメーション変化が、蛍光 SH 標識試薬の標識量の違いにより評価可能であることが示唆された。また、炭素鎖数が異なる P2M、P3M、P4M 間では、各グアニジン濃度における蛍光強度にはほ

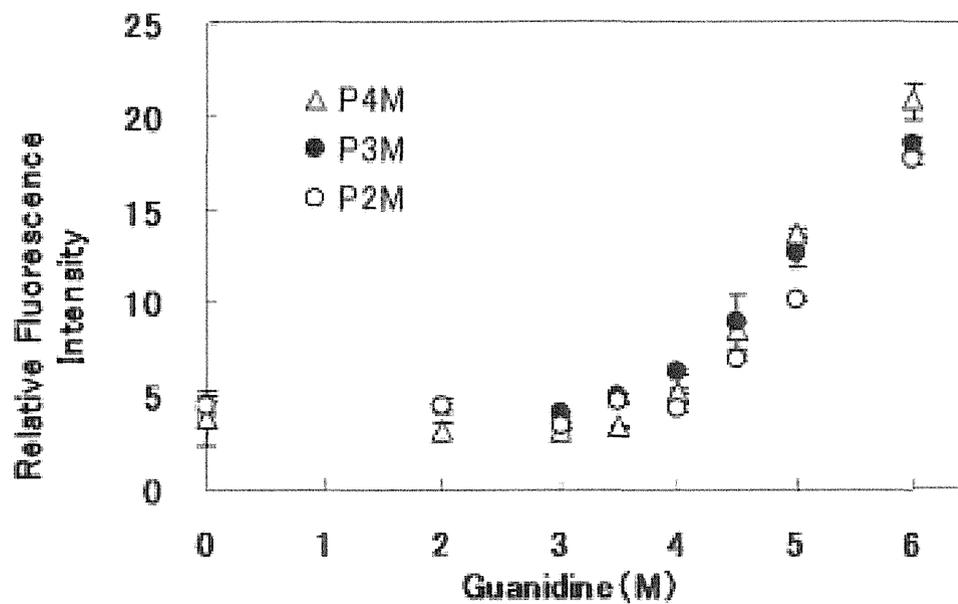


Fig. 17 Effect of guanidine concentration on fluorescence of OVA labeled with P2M,P3M and P4M

とんど差は見られなかった。すなわち、アルキル鎖長の異なる 3 種の標識化合物は、タンパク質中の遊離 SH 基への反応性に関して大きな違いがないことが分かった。

次に、実際に標識されたペプチドを同定するために、標識タンパク質を消化後 HPLC 分離することで、標識ペプチド数を評価した。

Fig. 18 には、OVA に P3M を 6 M グアニジン有無で標識後、キモトリプシン消化した標識ペプチド断片を HPLC (HPLC システム 3) で分離した結果を示した。6 M グアニジンを共存させて標識すると、グアニジンを共存させない場合と比較して、より数多くのピークが強い強度で検出され、P3M が多数のペプチドを修飾していることが示唆された。また、それぞれのピークを分取し、MALDI-TOF MS 分析を行うと、予想される遊離の SH 標識ペプチドの分子量と一致した分子量イオンピークを検出した。しかし、6 M グアニジン共存下の場合、ジスルフィド結合が還元されて生成する SH 基と反応した標識ペプチドも確認された。これは、長時間の変性条件下²⁰⁾でジスルフィド結合の交換反応が促進するためでないかと考えられた²¹⁾。

続いて、MALDI-TOF MS 分析 (Fig. 19) 及び、PSD 分析を行い (Fig. 20)、HPLC 保持時間の 37 分のピークが OVA 379~385 の Cys 382 に、

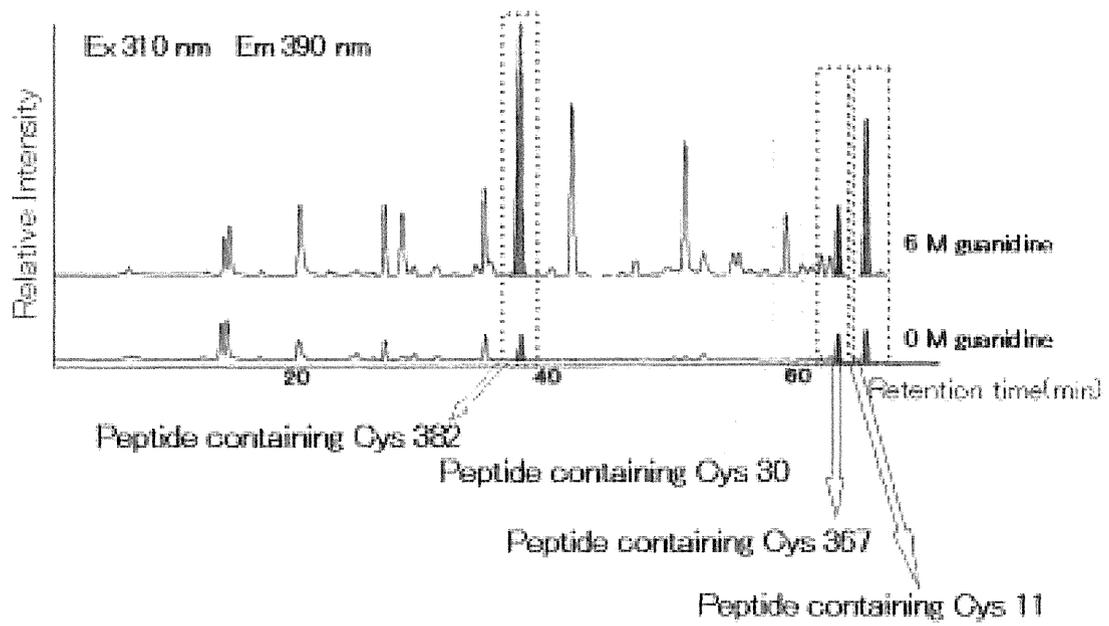


Fig. 18 HPLC chromatogram of P3M labeled OVA digested with chymotrypsin

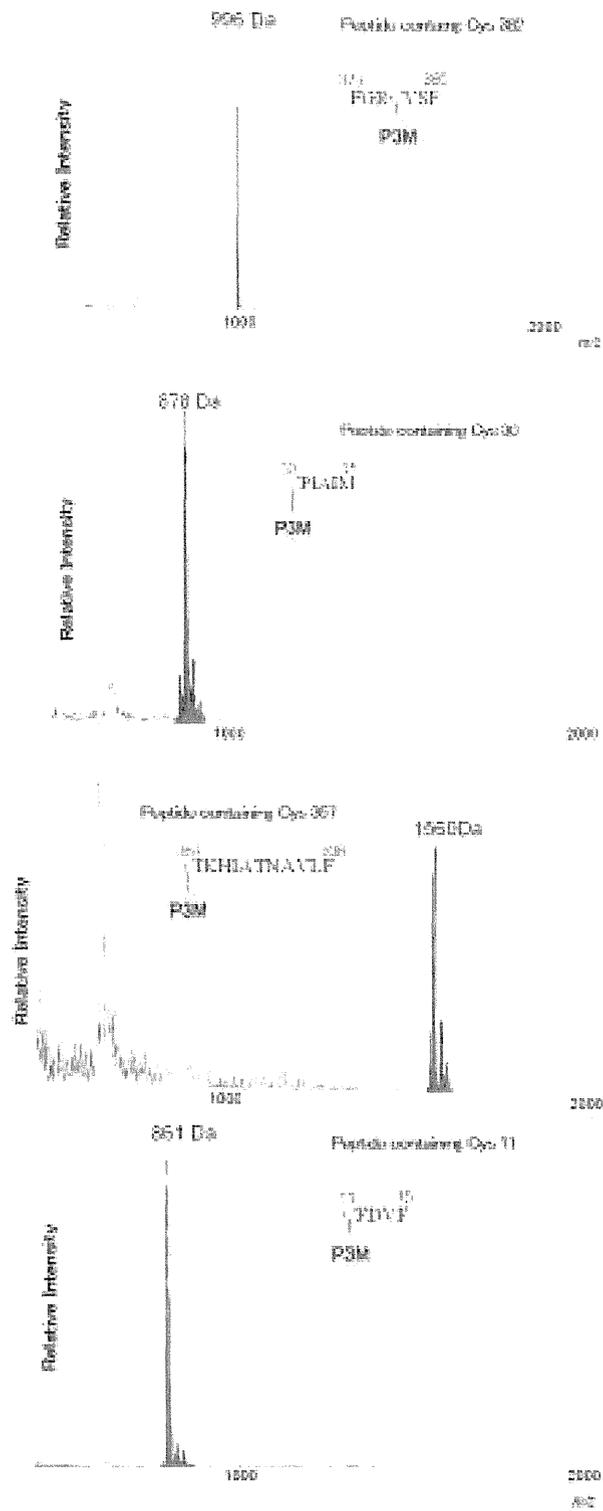


Fig. 19 MALDI-TOF MS spectra of P3M- labeled peptide

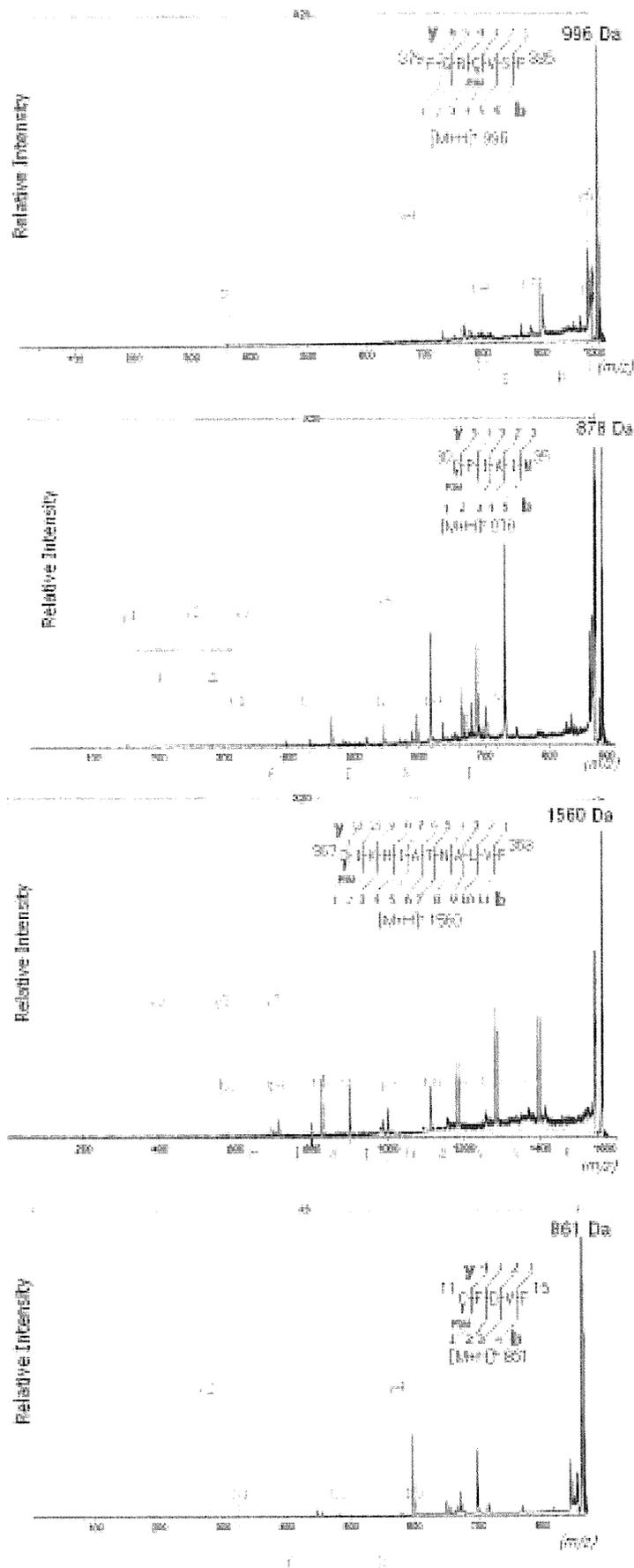


Fig. 20 MALDI-PSD TOF MS spectra of P3M- labeled peptide

58 分のピークが OVA 30~35 の Cys30 に、62 分のピークが OVA 367~378 の Cys 367 に、64 分のピークが OVA 11~15 の Cys 11 に、それぞれ P3M が標識されたペプチドを含むピークであると同定した。この実験を通じて、遊離のシステイン残基を含むペプチドフラグメントが容易に確認できること、さらに、6 M グアニジンの有無によるタンパク質のコンホメーションの違いによって、蛍光 SH 標識試薬の標識量が異なることが分かった。各ピークにおいて、各ペプチドにおけるクロマトグラム上の 6 M グアニジンで変性させた際の蛍光強度を 100% とし、グアニジンのピーク高さに及ぼす影響を Fig. 21 に示した。すべてのピークにおいて、グアニジンの濃度の増加に伴い、蛍光強度つまり標識量が増加することが示された。

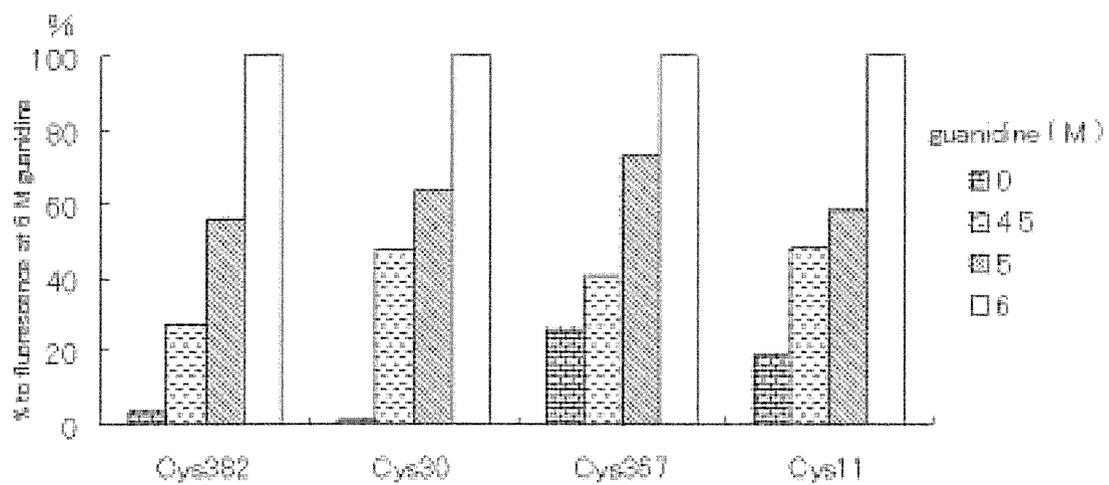


Fig. 21 Effect of guanidine concentration on fluorescence of peptides labeled with P3M

2-2 まとめ

今回モデルとして用いたグアニジンによる、OVA の蛍光 SH 標識試薬の標識量の違いを、HPLC 蛍光検出、MALDI-TOF MS 及び、MALDI-PSD TOF MS で検出した。その結果、グアニジンによる OVA のコンホメーション変化の違いを蛍光 SH 標識試薬の標識量の違いによって解析でき、これはタンパク質のコンホメーション変化を本蛍光 SH 標識試薬による標識量の変化によって評価できることを示唆している。

第三章 コンホメーション変化したタンパク質の簡便で網羅的な 検出のための基礎検討

化学修飾とプロテオーム解析を組み合わせることで、機能分子を特定する試みはすでにくつか報告されている。Oda らは、臨床開発中の抗がん剤 E7070 標的タンパク質の特定を目的として、E7070 固定化カラムを通した分画と通さない分画の 2 つのタンパク質の画分のプロテオーム解析を、ICAT 法 (Isotope Coded Affinity Tags) を用いて行い、E7070 に特異的に結合したタンパク質の解析に成功している²²⁾。この例は、薬物の量的な変化が起こるタンパク質を分子量の異なる 2 種の SH 標識試薬と LC/ESI-MS/MS により、同定することが、薬物の作用解析に有用であることを示している。Oda らの例は安定同位体の使用により反応性に違いがない分子量の異なる 2 種の標識試薬を利用したものであるが、すでに第二章で、本研究で用いたメチレン鎖の長さが異なる 3 種の標識試薬は、タンパク質のシステイン残基との反応性にほとんど差がないことを示唆する結果を得ている。したがって、本研究で開発した分子量の異なる標識試薬を 2 種の試料に適用比較することによって、Oda らと同様の結果が期待できると考えた。

一方、タンパク質の網羅的な解析には、二次元電気泳動による分離と MALDI-TOF MS が汎用されている。本章では、分離の再現性に優れる HPLC 蛍光検出を使う操作(Fig. 22)の有用性を検討した。即ち、①コンホメーションの異なる 2 種の試料にメチレン鎖の長さが異なる 2 種の蛍光試薬 *N*-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimide (本章では、*n*=2 及び *n*=3)により SH 基標識を行う、②両者を混合後酵素消化を行ない、③HPLC で分離し (HPLC システム 3)、④その分画を MALDI-TOF MS により分析する、等の操作を実施し、分子量が 14 異なるピーク強度から、コンホメーション変化したタンパク質の存在の予測が可能かどうかを調べることにした。前章に続いて OVA をモデルタンパク質として用いて実験を行った。

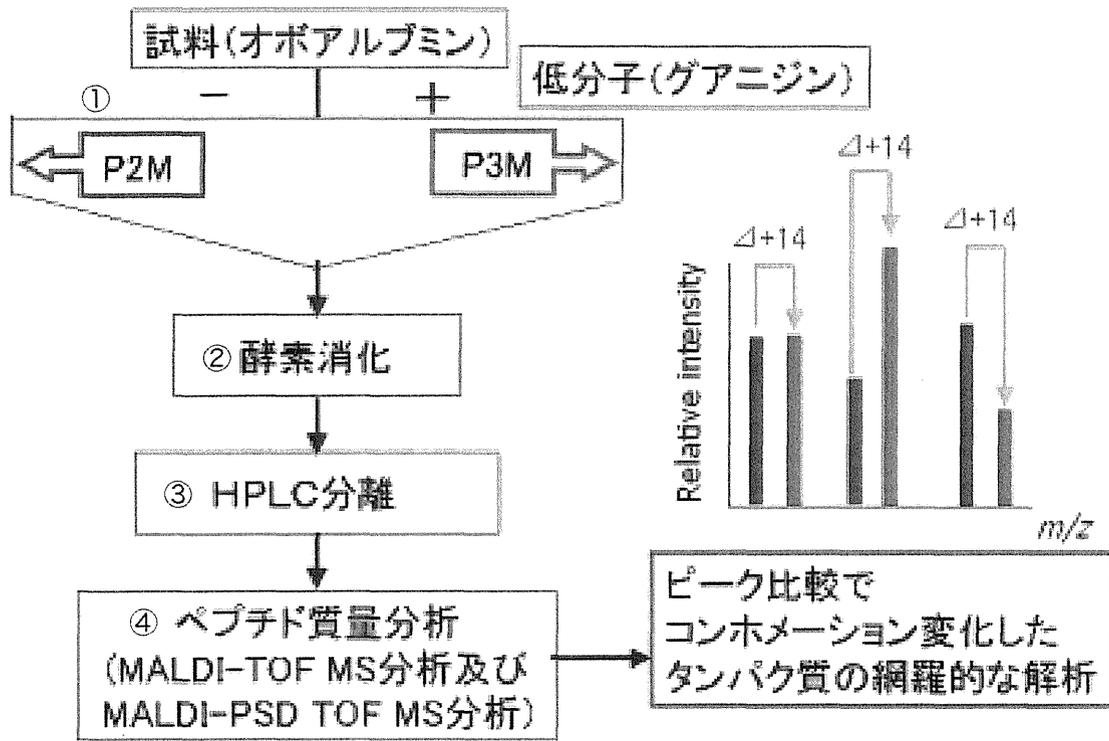


Fig. 22 Proteomic analysis based on detection of conformational change of protein

3-1 コンホメーション変化の質量分析による解析

モデルタンパクである OVA を用いて、コンホメーションが異なる 2 種の試料を調製し、5 M グアニジンによる変性 OVA に P3M 及び グアニジン非存在下未変性 OVA に P2M を添加し、SH 基を標識した。それぞれの試料を透析し、等量ずつ混合後、キモトリプシン消化を行った。その試料を蛍光検出 HPLC により分離分取した (HPLC システム 3)。その際、メチレン鎖の長さが異なる標識試薬により、標識されたペプチドは、HPLC クロマトグラム上、ほとんど異なる保持時間を与えない条件によって分離した。そのような条件で分画した分画について MALDI-TOF MS 分析を行ったところ、遊離システイン Cys 382, Cys 367, Cys 11 を含む 3 種のペプチドピークを検出し、コンホメーションが変化すると予想される試料間で、分子量が 14 異なるピークの強度に大きな相違があることがわかった (Fig. 23)。即ち、標識量の差を、分子量の異なる標識試薬を用いることで、容易に検出できることが示唆された (Fig. 24)。また、グアニジンのない状態で標識されなかった Cys 30 は構造上内側に存在し、グアニジンによる OVA 変性時のみ標識試薬と反応することも考えられた。この結果は、Fig. 18 の X 線結晶構造解析の結果とも矛盾していなかった。ま

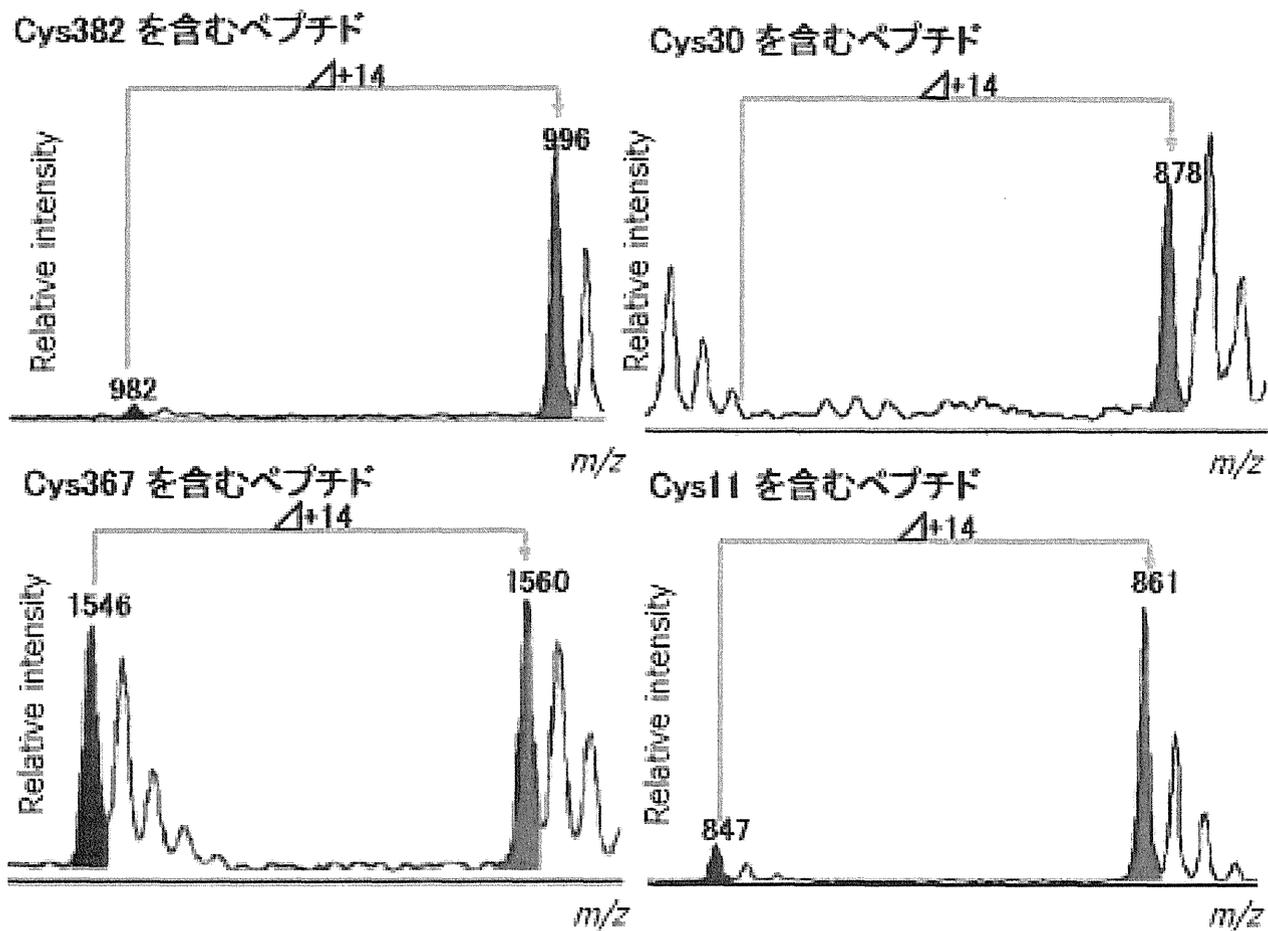


Fig. 23 MALDI- TOF MS spectra of P2M- and P3M- labeled peptide

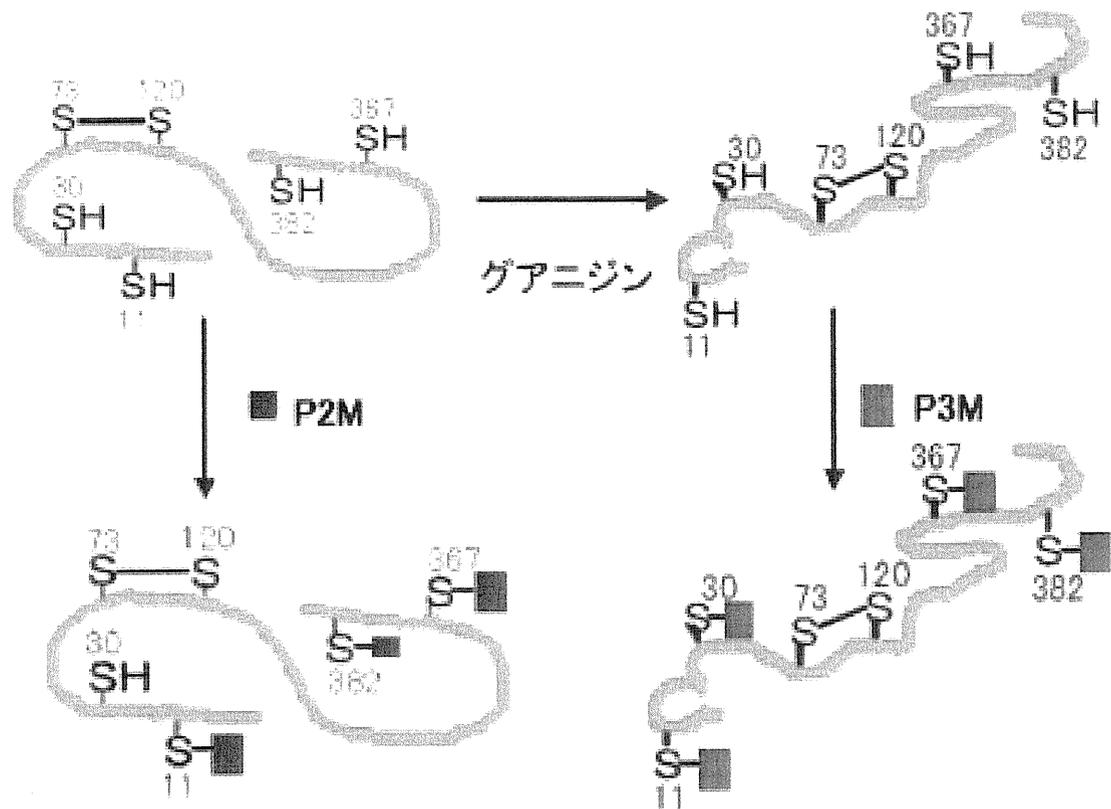


Fig. 24 Reaction of OVA with P2M or P3M

た、検出ピークの MALDI-PSD TOF MS 分析においても、分子量が 14 異なる断片化シグナルを確認できる (Fig. 25) ことから、このように検出された標識ペプチドの配列確認も容易に行うことができることがわかった。これらのことから、分析スペクトル上で、容易にコンホメーション変化の検出が可能であることが分かった。

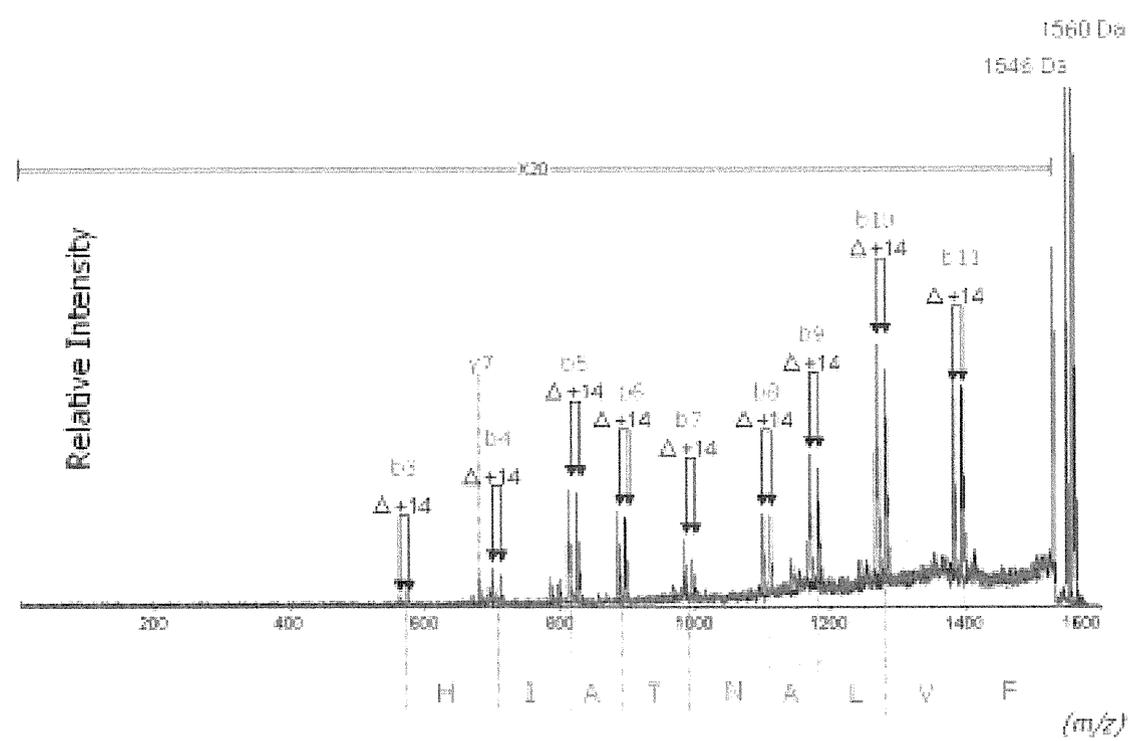
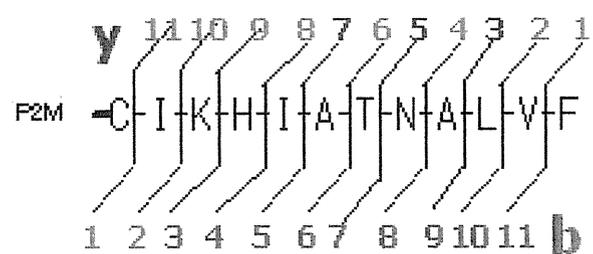
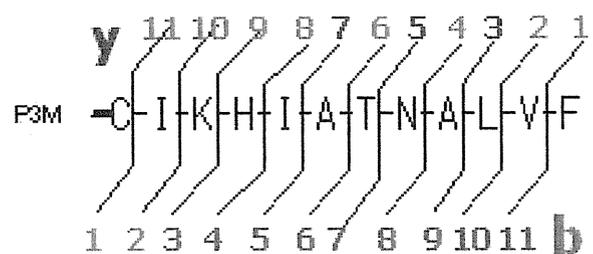


Fig. 25 Overlaid MALDI-PSD TOF MS spectrum of P2M and P3M labeled peptide

3-2 まとめ

本章では、モデルタンパク質として OVA を用い、メチレン鎖の異なる 2 種の *N*-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimide、ここでは P2M 及び P3M を用いて、コンホメーションが異なるタンパク質のシステイン残基を標識し分離後、質量分析により検出することで、タンパク質のコンホメーション変化の検出が可能であることを示した。これらのことは、メチレン鎖の長さが異なる 2 種の *N*-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl] maleimide を利用することで、機能プロテオミクス解析法の開発が可能であることを示唆している。

総まとめ

第一章では、*N*-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimide は、蛍光 SH 標識試薬として有用な水溶性マレイミド誘導体であると考えられた。P2M は、SH 基と反応することにより蛍光が増加することが分った。

N-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimide 修飾ペプチドは、MALDI-TOF MS において検出でき、MALDI-PSD TOF MS において配列分析も可能であることがわかった。

第二章では、グアニジンによる OVA のコンホメーション変化の違いを蛍光 SH 標識試薬の標識量の違いによって検出が可能であることがわかった。このことによりタンパク質のコンホメーション変化を本蛍光 SH 標識試薬による標識量の変化によって評価できることを示唆される。

第三章では、メチレン鎖の長さが異なる 2 種の *N*-[*n*-(2-Pyridylamino)alkyl]maleimide を利用することで、非常に容易にタンパク質のコンホメーション変化を検出することができることが明らかになり、簡便な機能プロテオミクス解析法の開発が可能であることが示唆された。今後、薬物のターゲット分子の検索や生体機能の解析へ応用が期待される。

実験の部

材料

SH 標識試薬の調製に用いたマレイミドは Ardrich 社から、*N*-メチルモルホリンは東京化成から、その他の特級化学試薬は関東化学あるいは和光純薬工業から購入した。蛍光 SH 標識試薬 P2M は和光純薬工業より購入した。

システイン残基に標識することの確認に用いた INS、コンホメーション変化させるモデルタンパクとして用いた OVA、INS 還元の際に用いた tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP)、タンパク質変性の際に用いたグアニジン塩酸塩は SIGMA 社より購入したものをそのまま用いた。酵素消化の際に用いた V8 プロテアーゼは PIERCE 社、キモトリプシンは Roche 社より購入したものをそのまま用いた。

MALDI-TOF MS 分析及び PSD 分析の際に用いた INS、Ins β 、Ang I、CHCA は SIGMA 社より購入したものをを用いた。今回の実験に用いた水はすべて Milli Q により調製したものをを用いた。購入した試薬は全てそのまま用いた。

N- [n-(2-Pyridylamino) alkyl] maleimide の調製

まず、マレイミド基の導入に用いる *N*-Ethoxycarbonylmaleimide は、以下のように行った²³⁾。

N-Ethoxycarbonylmaleimide : マレイミド 29 g (0.3 mol) と *N*-メチルモルホリン 33 ml (0.3 mol) とを酢酸エチル 1300 ml 氷冷中で攪拌し、酢酸エチル 200 ml 中にクロロギ酸エチル 29 ml (0.3 mol) 溶解させた溶液を滴下した後、更に氷冷下で 30 分攪拌した。反応終了後、沈殿物を酢酸エチルで洗浄し、濾液を減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル-ジエチルエーテル溶液 (1/10 v/v) から再結晶し、ジエチルエーテルで洗浄後、紫色の結晶を得た。その後、FAB-MS により分子量($M+H^+$ 170)を確認した。

当研究室で合成した 2-(3 -Aminopropyl) aminopyridine または、2-(4 -Aminobutyl) aminopyridine 約 1g (0.006 mol) を飽和炭酸水素ナトリウム 27 ml に氷冷下溶解し、*N*-Ethoxycarbonylmaleimide 1 g (0.006mol) を添加し、氷冷下 1 時間攪拌した。反応終了後、析出した結晶を濾取し、蒸留水による洗浄後、乾燥した。その後、FAB-MS により分子量($M+H^+$, P3M 232, P4M, 245)を確認した。

機器

MALDI-TOF MS 分析

島津/KRATOS 飛行時間型質量分析装置 KOMPACT MALDI IV を用い、リニアモードにより測定した。マトリックス含有溶液には 0.1% TFA の 40% アセトニトリル溶液に α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)を飽和させたものを用いた。ステンレス製サンプルプレートウェルに、試料 $0.5\mu\text{l}$ をのせ、空気乾燥させた。さらにマトリックス溶液 $0.5\mu\text{l}$ をのせて、空気乾燥させて結晶化させた後、分析した。機器較正には、標準品として Angiotensin I (Ang I) [10^{-5} M、(M+H)⁺ Average 1297.50 Da] と Insulin β chain bovine (Ins β) [10^{-5} M、(M+H)⁺ Average 3496.9 Da] と INS [10^{-5} M、(M+H)⁺ Average 5734.6 Da] を用いた。

PSD 分析

島津/KRATOS 飛行時間型質量分析装置 AXIMA-CFR *plus* を用い、リフレクターモードにより測定した。マトリックスは 0.1% TFA の 40% アセトニトリル溶液に CHCA を飽和させたものを用いた。ステンレス製サンプルプレートウェルに、試料を $1\mu\text{l}$ をのせて空気乾燥させた後、さらにマトリックスを $1\mu\text{l}$ を乗せて空気乾燥させて結

晶化させた後、分析した。

HPLC 条件

以下に示す 4 種の HPLC 条件を用いた。

HPLC システム 1

Column : GL サイエンス Inertsil ODS-2 4.6 φ X150

Mobile phase : 0.1% TFA in 10% acetonitrile

Flow rate : 0.5mL/min

UV : 310 nm SPD-6A(島津製作所)

Pump: LC-10AT(島津製作所)

HPLC システム 2

Column : Tosoh ODS 120T 4.6 φ X250

Mobile phase : A; 0.1% TFA in 5% acetonitrile

B; 0.1% TFA in 80% acetonitrile

0% A in 10 min , then 0—100% B in 90 min

Flow rate : 1 mL/min

Excitation : 310 nm Emission : 390 nm EP-15205 (日本分光株式会社)

Columns temperature : 30 °C CO-965(日本分光株式会社)

Pump: PU-986 (日本分光株式会社)

HPLC システム 3

Column : Tosoh ODS 120T 4.6 ϕ X250

Mobile phase : A; 0.1% TFA in 5% acetonitrile

B; 0.1% TFA in 80% acetonitrile

45—55% B in 100 min

Flow rate : 1mL/min

Excitation : 310 nm Emission : 390 nm EP-15205 (日本分光株式会社)

Columns temperature : 30 °C CO-965(日本分光株式会社)

Pump: PU-986 (日本分光株式会社)

HPLC システム 4

Column : Tosoh ODS 120T 4.6 ϕ X250

Mobile phase : 0.1% TFA in 11% acetonitrile

Flow rate : 1mL/min

Excitation : 310 nm Emission : 390 nm EP-15205 (日本分光株式会社)

Columns temperature : 30 °C CO-965(日本分光株式会社)

Pump: PU-986 (日本分光株式会社)

SH 標識試薬と 2-Mercaptoethanol (2-ME)との反応実験

0.32 M、0.64 M、0.96 M、及び 1.28 M の P2M を含む 50 mM リン酸溶液を調製した。その中に、2-ME を P2M の 20 倍量添加し、25°C

1 時間反応させた。その後、蛍光検出器(JASCO FP-750 型 分光蛍光計)(Ex 310 nm 、 Em 390 nm)により測定した。

蛍光 SH 標識試薬の安定性実験

500 μ M の P2M を含む 50 mM リン酸溶液を 37 °C 及び室温 (25 °C)にて加温したのち、試料 10 μ l を HPLC (HPLC システム 1) に供して、残存する P2M 量を測定した。

標識実験

10⁻⁴ M ウシ膵臓由来 INS 110 μ l に 0.1 mM TCEP 30 μ l を添加し、37 °C で 30 分 6M グアニジン含有 0.1M Tris 塩酸 (pH8.0) 緩衝液中反応させた。そして、INS の SH 基の 10 倍量の P4M を添加し、室温 1 時間反応させた。脱塩操作として、50 μ l BOND-ELUT C18 に供し、0.1%TFA で 2ml により洗浄後、0.1%TFA-50%アセトニトリル溶液 2ml により溶出した。その溶出液を凍結乾燥により乾燥した。それに、50mM リン酸ナトリウム溶液に 50 μ l を添加した後、さらに、V8 プロテアーゼ(インスリンの 1/50 倍量)を添加し、37°C で 24 時間反応させた。10 μ l を HPLC (HPLC システム 2)に供し、P4M の蛍光強度を指標として 1 分ごとに分取し凍結乾燥により濃縮を行い、MALDI-TOF MS 分析のサンプルとした。理論上の P4M 結合ペプチ

ドの分子量の計算値と一致するものを、PSD 分析した。

グアニジン存在下の標識実験

50 mM リン酸(pH7.0)、6M グアニジン含有 50m M リン酸(pH7.0) 緩衝液をそれぞれ調製し、両者を用いて、0, 2, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6 M グアニジン含有 50 mM リン酸(pH7.0)緩衝液を 8 種類調製した。それぞれに OVA を添加した OVA 溶液(4.2mg/ml 10^{-4} M)を、4°C 24 時間 インキュベートした。

その試料 140 μ l に OVA 中 SH 基の 20 倍量の P2M、P3M、及び P4M を添加し、室温 1 時間反応後、反応停止として SH 標識試薬の 20 倍量 2-ME を添加した。最終濃度が 3 M グアニジン溶液となるように、それぞれに 140 μ l ずつ様々なグアニジン濃度含有 50 mM リン酸 (pH7.0)緩衝液を添加した。そして、2M 尿素含有 50 mM Tris 塩酸 (pH 7.8) の溶液により P2M、P3M、及び P4M の蛍光強度を指標に完全透析を行なった。

その溶液を Milli Q 水により 60 倍に希釈し、蛍光検出器(JASCO FP-750 型 分光蛍光計)(Ex 310 nm 、 Em 390 nm)により測定した。

モデルタンパク質における標識ペプチドの分析

OVA に P2M あるいは、P3M を標識後、透析した試料にキモトリプシンをタンパク量に対して 1/50 倍量を添加し、25°C 8 時間酵素処理を行なった。その後、蛍光を指標に HPLC (HPLC システム 3 あるいは 4) により分析し、30 秒ごとに分取し凍結乾燥し試料とした。それぞれの試料を MALDI-TOF MS 分析により含まれるペプチドの分子量を測定し、理論上の P3M 結合ペプチドの分子量の計算値と一致するものに関して、PSD 分析に供した。

参考文献

- 1) Carrell, R.W. *et al.*, Conformational disease, *Lancet*, **350**,134-138(1997).
- 2) 岩坪 威、神経変性 異常タンパク質の形成・毒性・分解 *細胞工学*, **20**, 1474-1477(2001).
- 3) R.H.Pain 編 タンパク質のフォールディング シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社
- 4) V. Bonifati *et al.*, Mutation in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism, *Science* , **299**, 256-258 (2003).
- 5) Q. Zhang *et al.*, Cys-10 Mixed Disulfide Modifications Exacerbate Transthyretin Familial Variant Amyloidogenicity: A Likely Explanation for Variable Clinical Expression of Amyloidosis and the Lack of Pathology in C10S/V30M Transgenic Mice ? ,*Biochemistry*, **44**, 9079-9085 (2005).
- 6) 和田牧子、岩崎聖子、白幡晶、ラット S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の化学的構造解析,日本ポリアミン研究会第 17 回研究発表会要旨集,**20**,(2002).
- 7) 町田真弓, SH 基の反応性を標識にしたタンパク質のコンホメーション変化の検出法, 城西大学大学院平成 15 年度修士論文

- 8) Gygi S.P. *et al.*, Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, *Nat Biotechnol*, **17**, 944-999(1999).
- 9) 井上学, タンパク質の化学的断片化の伴うペプチド C 末端修飾の MALDI-PSD TOF MS 分析への利用, 城西大学大学院平成 16 年度修士論文
- 10) 伊藤俊行, プロテアーゼ消化におけるポリアミンによるペプチド修飾, 城西大学大学院平成 15 年度修士論文
- 11) 加藤英雄 *et al.*, 公開特許広報(A)日本特許庁, 特開平 6-122679
- 12) 正田 卓司 *et al.*, 光誘起電子移動を利用したタンパク質蛍光ラベル化試薬の開発, 第 125 年会日本薬学会要旨集, **2**、46、9-0167
- 13) Karas, M. *et al.*, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301 (1988).
- 14) Kaufmann, R. *et al.*, Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization, *Rapid Commun. Mass spectrum*, **7**, 902-910 (1993).
- 15) Bieman, K. *et al.*, Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure, *Biomed Environ. Mass Spectrom.*, **16**, 99-111(1988).

- 16) Stein P.E. *et al.*, Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution, *J. mol. Biol.* , **22**, 3, 941-959(1991).
- 17) Nisbet A.D. *et al.*, The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin, *Eur. J. Biochem.*, **115**, 2, 335-345(1981).
- 18) E. Tatsumi *et al.*, Conformational State of Ovalbumin at Acidic pH as Evaluated by a Novel Approach Utilizing Intrachain Sulfhydryl-Mixed Disulfide Exchange Reactions, *Biochemistry*, **37** , 12351-12359 (1998).
- 19) K. Takeda *et al.*, Dependence of Reaction Rate of 5,5'-Ditiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) to Free Sulfhydryl Groups of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin on the Protein Conformations, *J. Protein Chem.*, **11**, 187-192 (1992).
- 20) Batra PP. *et al.*, Circular dichroic study of conformational changes in ovalbumin induced by modification of sulfhydryl groups and disulfide reduction, *J. Protein Chem.* , **8**, 2, 221-229 (1981).
- 21) M. Onda. *et al.*, Refolding Mechanism of Ovalbumin? *J. Biol. Chem.* **278**(26) 23600-23609 (2003).
- 22) Y. Oda. *et al.*, Quantitative Chemical Proteomics for Identifying Candidate Drug Target, *Anal. Chem.* , **75**, 2159-2165 (2003).

23) O.Keller *et al.*, Preparation and Some Properties Maleimide Acids and Maleoyl Derivatives of Peptides, *Helv.Chim.Acta.*, **58**, 531-541 (1975).

MALDI-TOF MS 分析によるシステイン含有タンパク質の
定量法の開発

略号表

AA : amino acid

Ang I : angiotensin I

AESA : 2-aminoethanesulfonic acid

APSA : 3-amino-1-propanesulfonic acid

BIAM : biotinylated iodoacetamide

CHCA : α -cyano-4-hydroxycinnamic acid

ESI : Electro Spray Ionization

HEPES : *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid)

HSA : human serum albumin

IAM : iodoacetamide

ICAT : Isotope Coded Affinity Tags

INS : bovine insulin

LC-MS : liquid chromatography mass spectrometry

MALDI-TOF MS : matrix-assisted laser desorption/ionization

time-of-flight mass spectrometry

NTCB : 2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid

Ova : ovalbumin

PSD : post-source decay

TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine

TFA : trifluoroacetic acid

Trx : thioredoxin

はじめに

現在、人のゲノム配列解析は完了し、遺伝子の数も予測されつつある。しかしながら、遺伝子の機能を解明するためには塩基配列情報だけでは不十分である。生体内で実際に機能を現しているのはタンパク質であり、生体内のタンパク質がいつ、どこで、どのように機能しているのかを明らかにすることは重要である。このような背景から現在、ポストゲノム研究としてタンパク質の構造機能を網羅的に研究するプロテオーム解析はバイオサイエンス分野の主要課題といえる。プロテオーム解析では、単離したタンパク質を酵素消化または化学的断片化によりペプチドとしたのち、MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) にてペプチドの部分アミノ酸配列の決定、タンパク質の同定が行なわれる¹⁾。ここで MALDI-TOF MS 分析及びアミノ酸配列を分析できる手法である MALDI-PSD TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay time-of-flight mass spectrometry) 分析について説明したい。MALDI-TOF MS は、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化装置と飛行時間型の質量分離部からなる質量分析装置である (Fig. 1)。マトリックスに含まれたペプチド試料に、波長 337 nm の窒素レーザーを照射しペプチドをイオン化後、これに

加速電圧をかけることで、ペプチドイオンを一定の方向に飛行させる。その後、進行方向とは逆向きに電場をかけ、イオン群を折り返させる。このときに、質量の軽いものほど速く飛び、早い段階で折り返すため、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。このことを利用して、ペプチドの質量を測定する分析法が MALDI-TOF MS である²⁾。

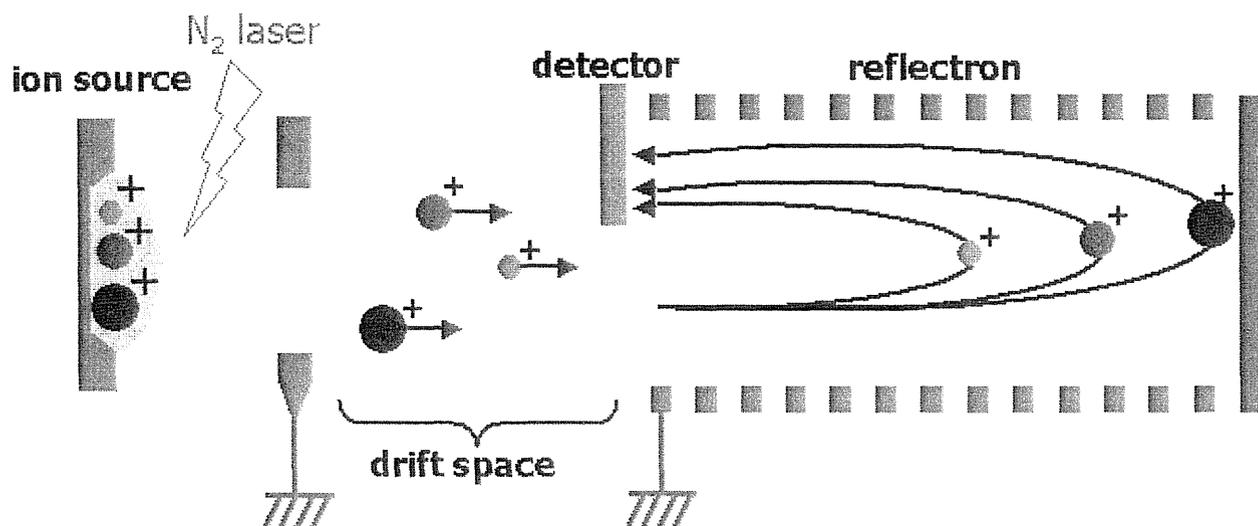


Fig. 1 Scheme for MALDI-TOF MS system

● ● ● : ペプチド

N_2 レーザーによってペプチドはイオン化される。イオン源 (ion source) から導入されたイオンは無電化領域 (drift space) を一定速度で飛行し、質量電荷比 (m/z) の小さなイオンから順に検出器 (detector) へ到達する。TOF MS のモードには、イオン源から検出器までイオンを直線的に飛行させる「リニアモード」と検出器に到達する前にイオンを静電界ミラー (reflectron) にて反転させる「リフレクターモード」がある。リフレクターモードでは、reflectron を用いてイオンを反転させることによって、分解能の低下の原因となる初期運動エネルギーのばらつきを収束させることで高い分解能を得ることができる。

続いて、MALDI-TOF MS 分析を応用したアミノ酸配列分析手法である MALDI-PSD TOF MS 分析について説明する。Fig. 2 に示すように、MALDI で得られる生成イオンから、イオンゲートにて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イオン化させることで、ペプチドが自己崩壊を起こし、フラグメントイオンが生成する。この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方向とは逆の電場をかけてイオン群を折り返させ、分離する。これが MALDI-PSD TOF MS 分析で、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³⁾。フラグメントイオンの生成の際、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がある。その際、Fig. 3、4 に示すように一ヶ所の切断により、N 末端側を含む b イオンと C 末端側を含む y イオンの 2 種類のイオンの生成が起こる⁴⁾。

Fig. 5 には Fig. 3 に示したペプチドの MALDI-PSD TOF MS 分析の模式図を示した。縦軸がイオン強度、横軸が分子量/価数 (m/z) となる。例えば、 y_2 と y_3 のフラグメントイオンの分子量の差はアミノ酸 2 の分子量に相当することから、このことを組み合わせることでアミノ酸の配列や修飾位置がわかる。

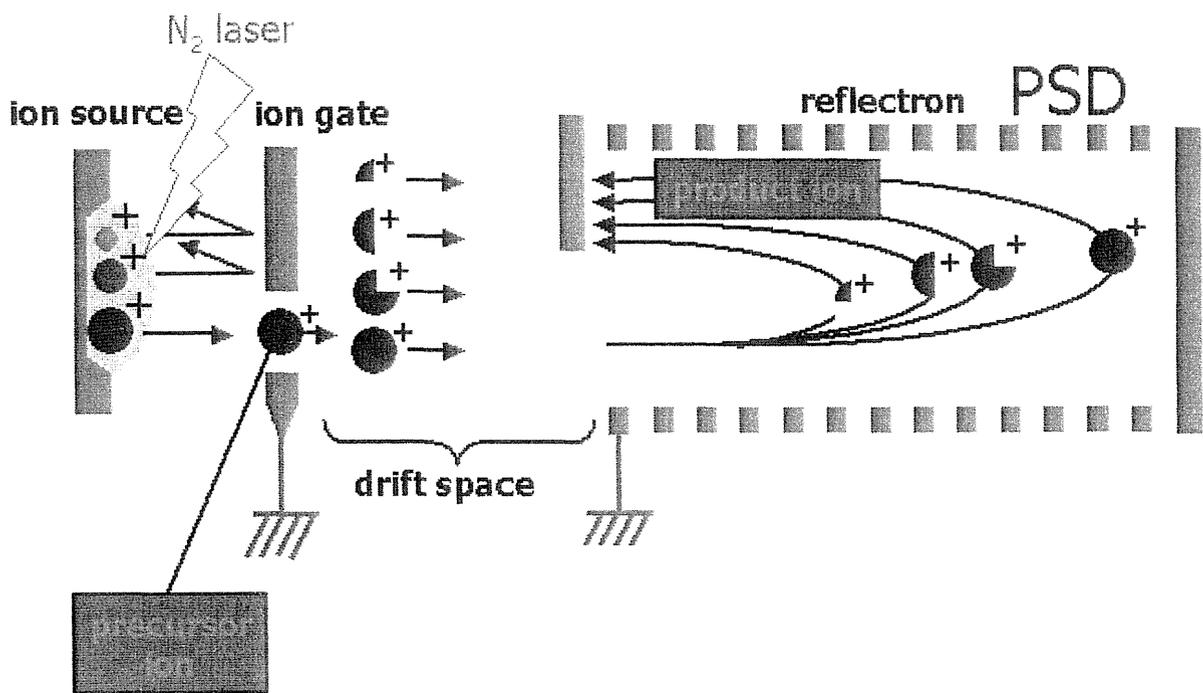


Fig. 2 Scheme for MALDI-PSD TOF MS analysis

: 自己崩壊したペプチド

イオン源から生じたイオンはイオン種自身の過剰内部エネルギーまたは残留ガスとの衝突によってある程度分解する。この現象をポストソース分解 (post-source decay : PSD) という。PSD によって生じた product ion は前駆イオン (precursor ion) と同じ速度で飛行する。次に測定対象にしたいイオン群 (precursor ion 及び product ion) を ion gate を用いて分離する。ion gate を通過し、reflectron に導入された測定対象のイオン群は、reflectron の反射率を調整することによって分離される。

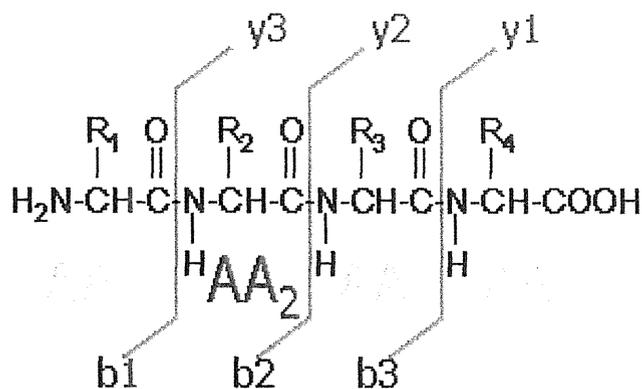


Fig. 3 Nomenclature for fragment ions of peptide

AA : amino acid

ペプチドの自己崩壊は主にペプチド結合部分でおこり、N 末端側を含む b イオンと C 末端側を含む y イオンの 2 種類のイオンの生成が起こる。

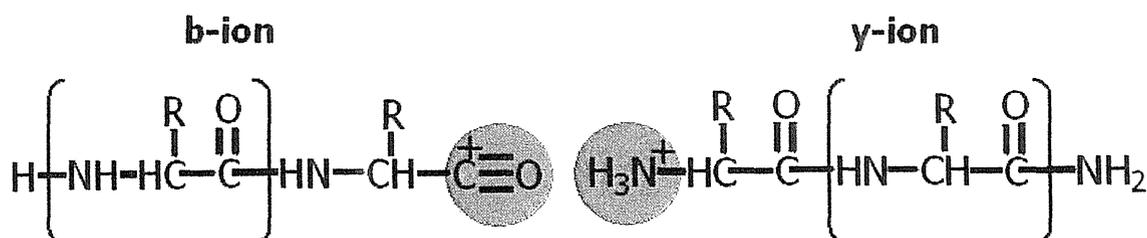


Fig. 4 Proposed structures of b-ion and y-ion

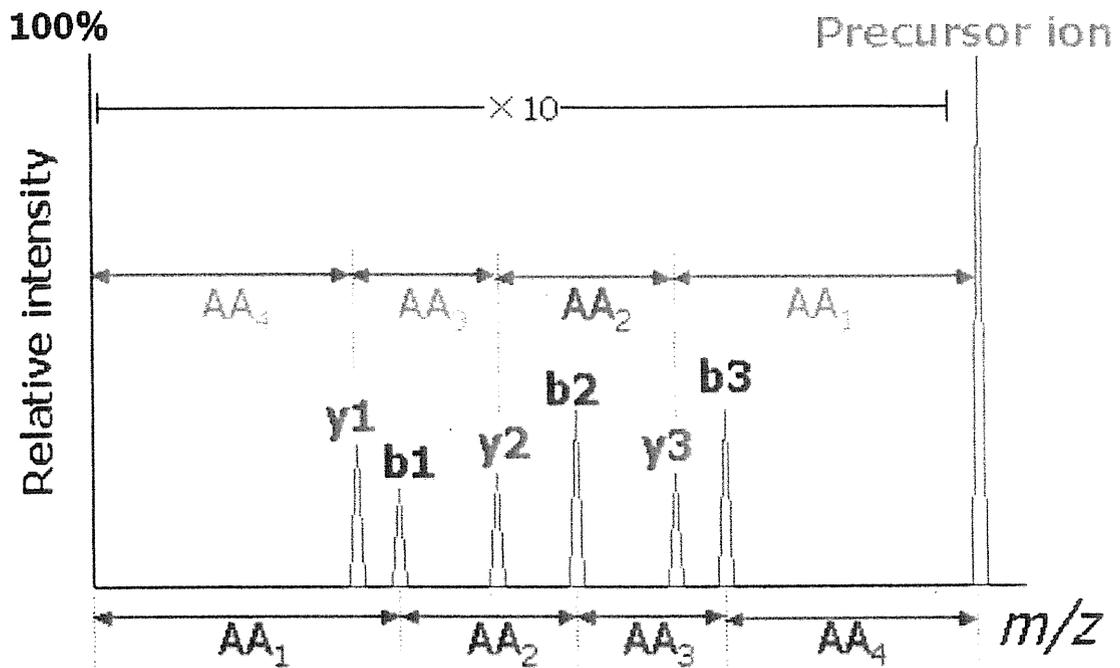


Fig. 5 Schematic PSD spectra

PSD スペクトルでは、前駆イオン (precursor ion) よりも低分子領域に product ion 由来のシグナルが確認される。例えば、y2 と y3 のフラグメントイオンの分子量の差はアミノ酸 2 (AA₂) の分子量に相当することから、このことを組み合わせることでアミノ酸の配列等がわかる。

当研究室では、タンパク質の化学的断片化法として NTCB (2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid) を用いたシステイン特異的な切断法を検討してきた。NTCB は、タンパク質中のシステイン残基をシアノ化後、塩基性条件下、切断部位の N 末端側にイミノチアゾリン環を生成させ、タンパク質を切断する試薬として知られている⁵⁾。当研究室の矢敷はこの切断反応時においてアルキルアミンが共存すると C 末端側にアルキルアミンが導入されることを見出した⁶⁾(Fig. 6)。そして当研究室の井上は本法を利用し、Ova (ovalbmin) に由来するペプチドについて、アルキルアミン標識の MALDI-TOF MS 分析への影響及び、アルキル鎖の炭素数が一つ異なるアルキルアミン標識試薬を用いることによるタンパク質の比較定量法の検討を行った⁷⁾。

本研究では、本標識法の質量分析における有用性を明らかにすることを目的とし、NTCB によって多くのペプチド断片が得られる HSA (Human Serum Albumin) をモデルタンパク質として用い、陰電荷を持つアルキルアミンによる標識のペプチドの検出への影響を調べた。また、井上が検討した方法を利用することで、生体内の代表的なシステイン含有タンパク質である Trx (Thioredoxin) の酸化型、還元型の分別定量の可能性を検討した。

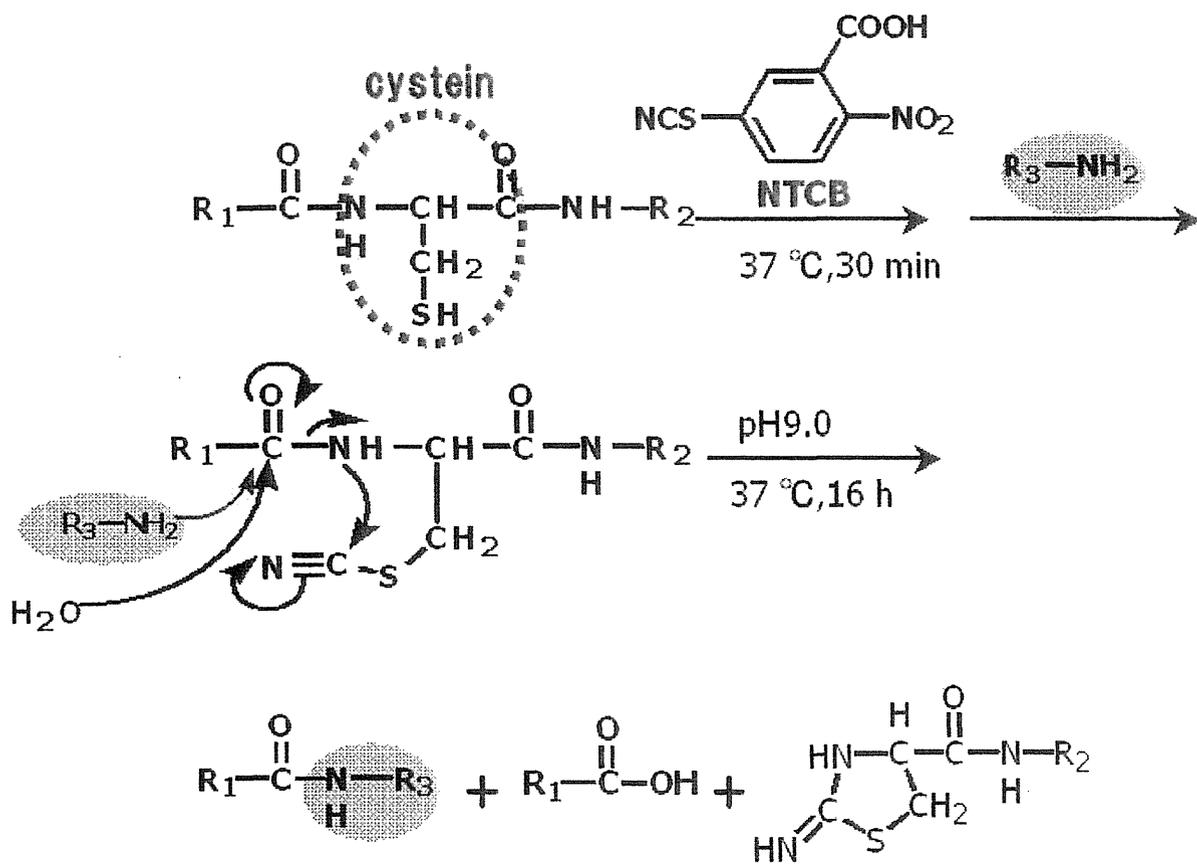


Fig. 6 Peptide bond cleavage with NTCB and alkylamine

第一章 MALDI-TOF MS 分析における陰電荷を有するアルキルアミン標識の有用性

1-1 はじめに

タンパク質の一次構造は、精製タンパクを断片化したのちアミノ酸配列分析法に従い決定される。断片化法としては、リシン及びアルギニン残基の C 末端側で切断するトリプシン、リシン残基の C 末端側で切断するリシルエンドペプチダーゼなどを用いる酵素法が最も一般的であるが、NTCB を用いて、システイン残基をシアノ化後、塩基性条件下で化学的に断片化を行なう方法もある。この方法は生成する断片化ペプチドの N 末端がイミノチアゾリン構造となるため、N 末端側からアミノ酸を切断するエドマン分解法を利用するアミノ酸配列分析には適用できない。そのため、ペプチド分析では限られた目的でのみ利用されていた。しかし、ESI (Electro Spray Ionization) 法と MALDI 法の緩和なイオン化を用いた、質量分析によるペプチドの配列分析が一般化されるにつれ、幅広く応用されるに至っている。

先にも述べたように当研究室では、システイン残基の N 末端側化学的断片化剤である NTCB によって断片化ペプチドの C 末端が共存するアルキルアミンの C 末端標識法を見出している。MALDI-PSD

TOF MS 分析において、矢数ら Ova (ovalbumin) の切断で生じたアルキルアミン標識ペプチドのアミノ酸配列分析に及ぼす標識試薬の有する電荷の影響に関する検討を行なった。その結果、陰電荷を有する AESA (2-aminoethanesulfonic acid) による標識では、ペプチドにおける MALDI-PSD TOF MS 分析のシグナルが増強される傾向を示した。この結果は、陰電荷を有するアルキルアミン標識が MALDI-PSD TOF MS 分析に好影響を与える可能性を示唆していた。さらに当研究室の井上が様々なアルキルアミンを用いて、MALDI-PSD TOF MS 分析における影響を検討した結果、やはり AESA においてそのシグナルが増強される傾向があることがわかった。

そこで、本章ではまず本標識法を適用した Ova 以外のタンパク質に由来するペプチドの MALDI-TOF MS 及び MALDI-PSD TOF MS 分析における電荷の影響を調べることを目的として、NTCB による断片化によって多くのペプチドが得られる HSA (Fig. 7) をモデルタンパク質として用いて、検討を行うこととした。

1 DAHKSEVAHR FKDLGEEENFK ALVLIAFAQY LQQCPFEDHV KLVNEVTEFA
 51 KTCVADESAE NCDKSLHTLF GDKLCTVATL RETYGEMADC CAKQEPERNE
 101 CFLQHKDDNP NLPRLVRPEV DVMCTAFHDM EETFLKKYLY EIARRHPYFY
 151 APELLFFAKR YKAAFTECCQ AADKAACLLP KLDEL RDEGK ASSAKQRLKC
 201 ASLQKFGERA FKAWAVARLS QRFPKAEFAE VSKLVTDLTK VHTECCHGDL
 251 LECADDRADL AKYICENQDS ISSKLKECCE KPLLEKSHCI AEVENDEMPA
 301 DLPSLAADFV ESKDVCKNYA EAKDVFLGMF LYEYARRHPD YSVVLLLRLA
 351 KTYETTLEKC CAAADPHECY AKVFDEFKPL VEEPQNLIKQ NCELFEQLGE
 401 YKFQNALLVR YTKKVPQVST PTLVEVSRNL GKVGSKCCKH PEAKRMPCAE
 451 DYLSVVLNQL CVLHEKTPVS DRVTKCCTES LVNRRPCFSA LEVDETYVPK
 501 EFNAETFTFH ADICTLSEKE RQIKKQTALV ELVKHKPKAT KEQLKAVMDD
 551 FAAFVEKCKK ADDKETCFAE EGKKLVAAASQ AALGL

Fig. 7 Amino acid sequence of Human Serum Albumin (HSA)

HSA は 35 のシステイン残基を含んでいる。

1-2 電荷を持つアルキルアミン標識ペプチドの MALDI-TOF MS に おけるペプチド検出への影響

本節で用いるモデルタンパクとして HSA を選択した。HSA は、血流のバランスを維持し、アミノ酸・脂肪酸・ホルモンなどの輸送に関与している蛋白質である。総残基数 585、分子量約 66 kDa のタンパク質である。HSA は 35 個のシステイン残基を含有し、NTCB により、28 個の断片化ペプチドが得られ、これらの断片化ペプチドには本法で検出しやすいとされる分子量 1000~2000 の断片化ペプチドが 10 個得られるはずである。NTCB 断片化反応の方法論確立には、Ova を用いた方法が報告されており⁸⁾、多くの情報が蓄積されている。当研究室でも、これまで Ova を用いて検討を行っていたが、より多様なアミノ酸配列においてもアルキルアミン標識の影響を検討するためにシステイン残基を多く含む HSA を用いて、以下の実験を行うこととした。

HSA を TCEP にて還元後、NTCB を添加し、コントロールとして milliQ 水 (アルキルアミン非存在下条件) を添加したもの、アルキルアミン標識試薬としては負電荷を持つ AESA、正電荷を持つ agmatine を用いて、電荷をもつアルキルアミン標識の影響を検討することと

した。これら反応条件は、当研究室の伊藤らが検討した、蛍光標識物質と同様の反応条件⁹⁾を用いた。反応液は疎水性樹脂を備えた ZipTipC₁₈ により脱塩後、MALDI-TOF MS 分析を行なった。

その結果、milliQ 水を用いた断片化試料では、10 個ある分子量 1000 ~2000 の HSA 由来ペプチドのうち 7 個確認できた。また AESA では 7、agmatine では 9 個確認できた。アルキルアミンを用いて断片化した場合には、ペプチド結合部位がカルボン酸として切断された未標識ペプチドよりも各標識物質分だけ大きい分子量を示すシグナルを検出した (Fig. 8、Fig. 9)。

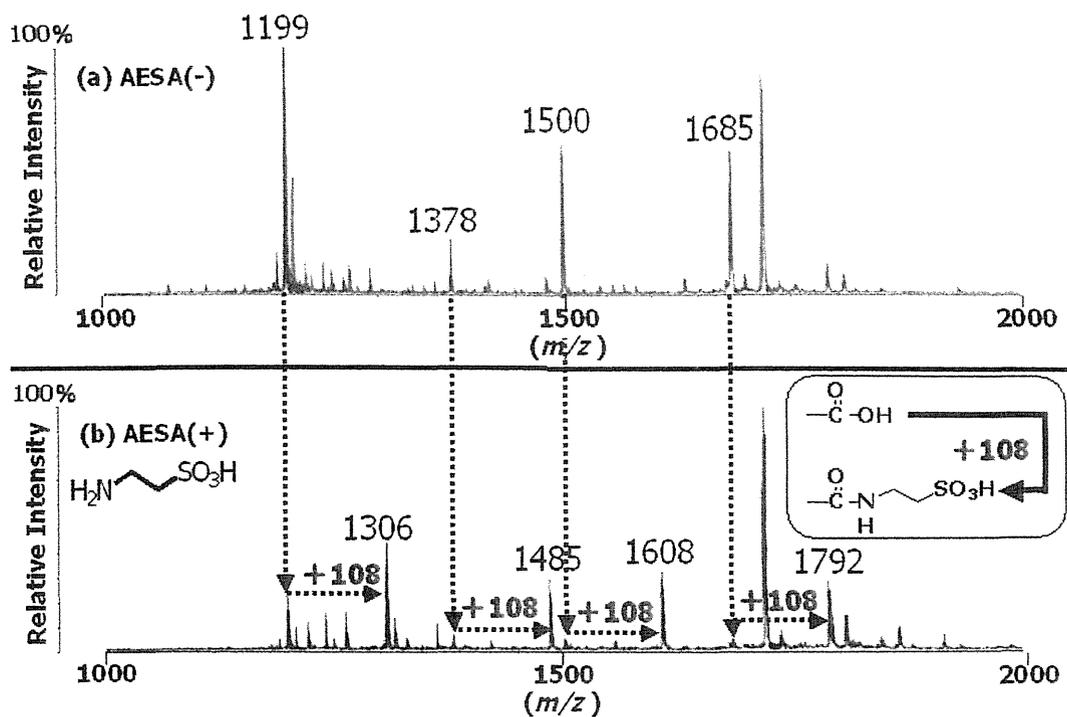


Fig. 8 MALDI-TOF MS spectra for peptides derived from HSA
 (a) unlabeled (AESA (-)) peptides
 (b) AESA-labeled (AESA (+)) peptides

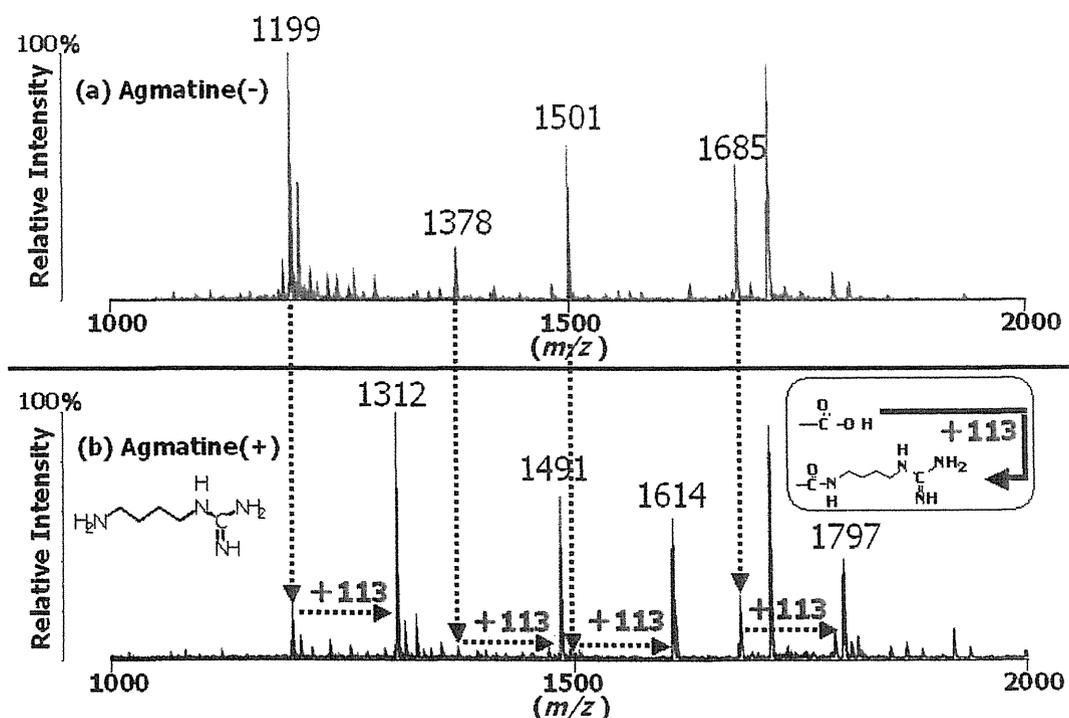


Fig. 9 MALDI-TOF MS spectra for peptides derived from HSA
 (a) unlabeled (Agmatine (-)) peptides
 (b) AESA-labeled (Agmatine (+)) peptides

次に AESA がスルホン酸基を有していることに注目し、MALDI-TOF MS 分析において、陰電化を検出する negative mode による AESA 標識ペプチドの検出を試みた。ペプチドを分析する際には positive mode で測定されることが一般的であり、negative mode は核酸等の構造的に陰電荷を帯びやすい物質において使用されることが多い。

その結果 AESA 標識ペプチドを negative mode で測定した場合、positive mode で測定したものよりも選択的に検出できることがわかった (Fig. 10)。

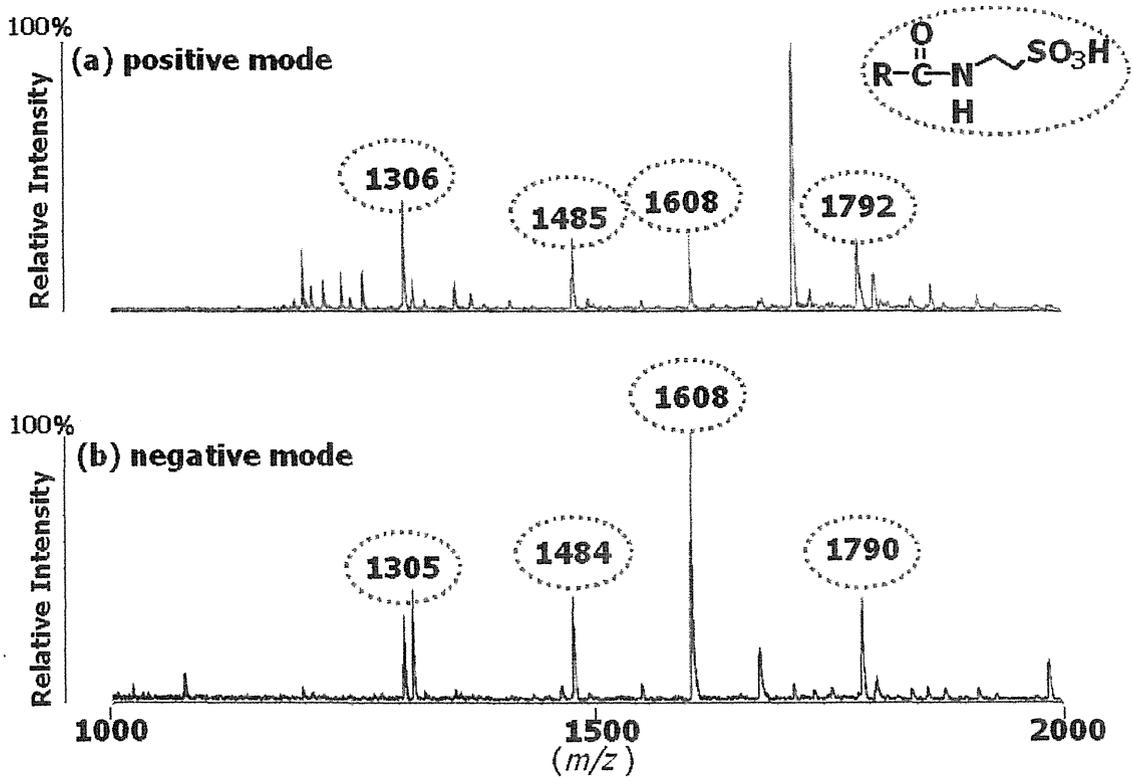


Fig. 10 MALDI-TOF MS spectra of AESA-labeled peptides
(a) positive mode (b) negative mode



1-3 電荷を持つアルキルアミン標識ペプチドの MALDI-PSD TOF

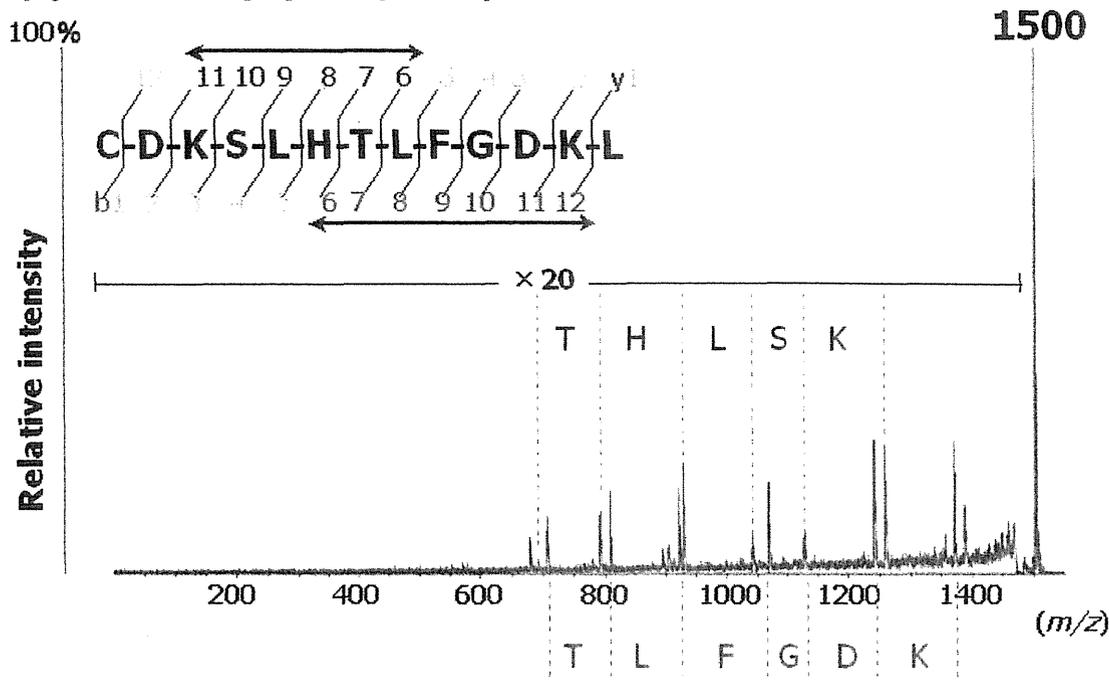
MS 分析への影響

当研究室の矢敷は Ova を用いた本標識法の検討において、AESA を標識したペプチドの MALDI-PSD TOF MS 分析におけるシグナルが著しく増強したことを報告している。

HSA 由来の未標識ペプチド及び、AESA を標識したペプチドの MALDI-PSD TOF MS 分析を行った結果、3つの断片化ペプチド(62-74、75-89、250-261)において、AESA 標識ペプチドでは未標識ペプチドに比べ、y-ion よりも b-ion イオンのシグナル強度がより選択的に高くなり、明瞭なスペクトルが得られる傾向にあることが判明した。

(Fig. 11、Fig. 12、Fig. 13)。この要因として、AESA の有するスルホン酸基の強い陰電荷により y-ion の+電荷の中和により、検出されにくくなり、b-ion の選択的検出が可能になるためだと思われる (Fig. 14)。

(a) unlabeled peptide (62-74)



(b) AESA-labeled peptide (62-74)

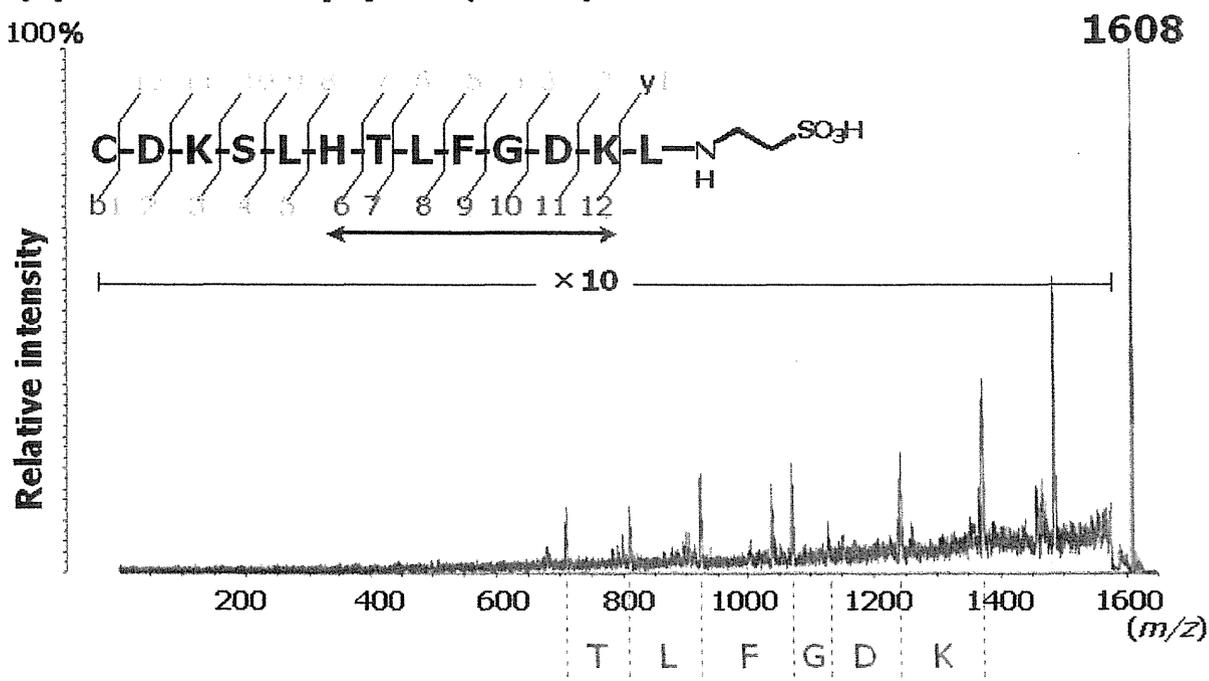
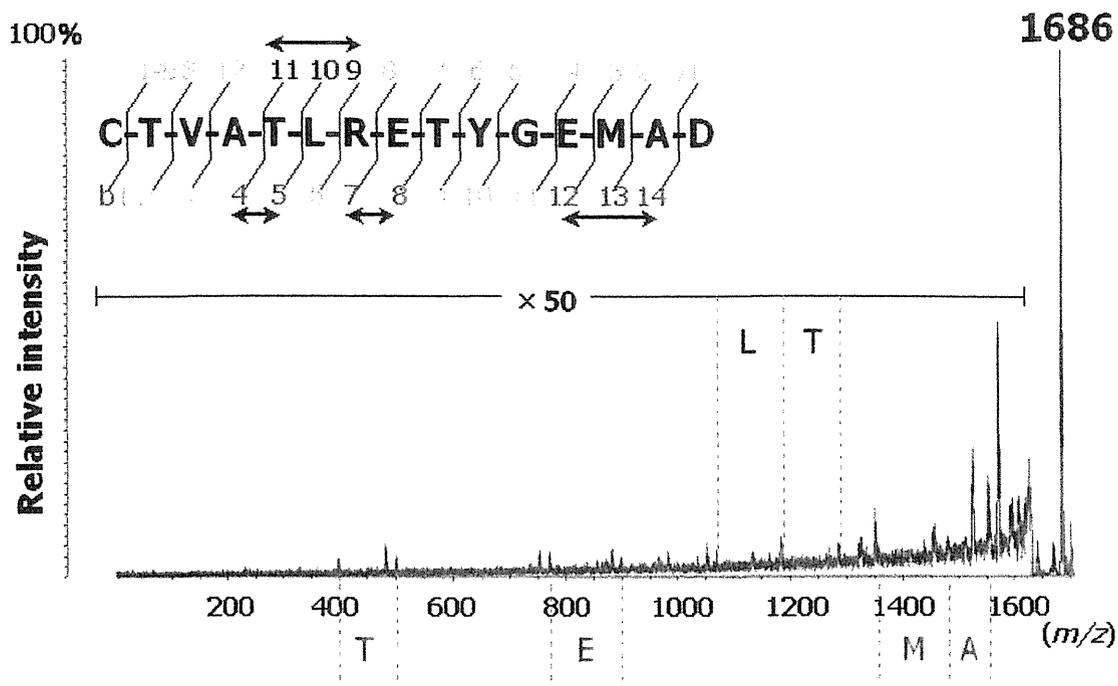


Fig. 11 MALDI-PSD TOF MS spectra of peptides derived from HSA
 (a) unlabeled peptide (62-74) (b) AESA-labeled peptide (62-74)

↔ : The lines cover amino acid sequences to be analysed

(a) unlabeled peptide (75-89)



(b) AESA-labeled peptide (75-89)

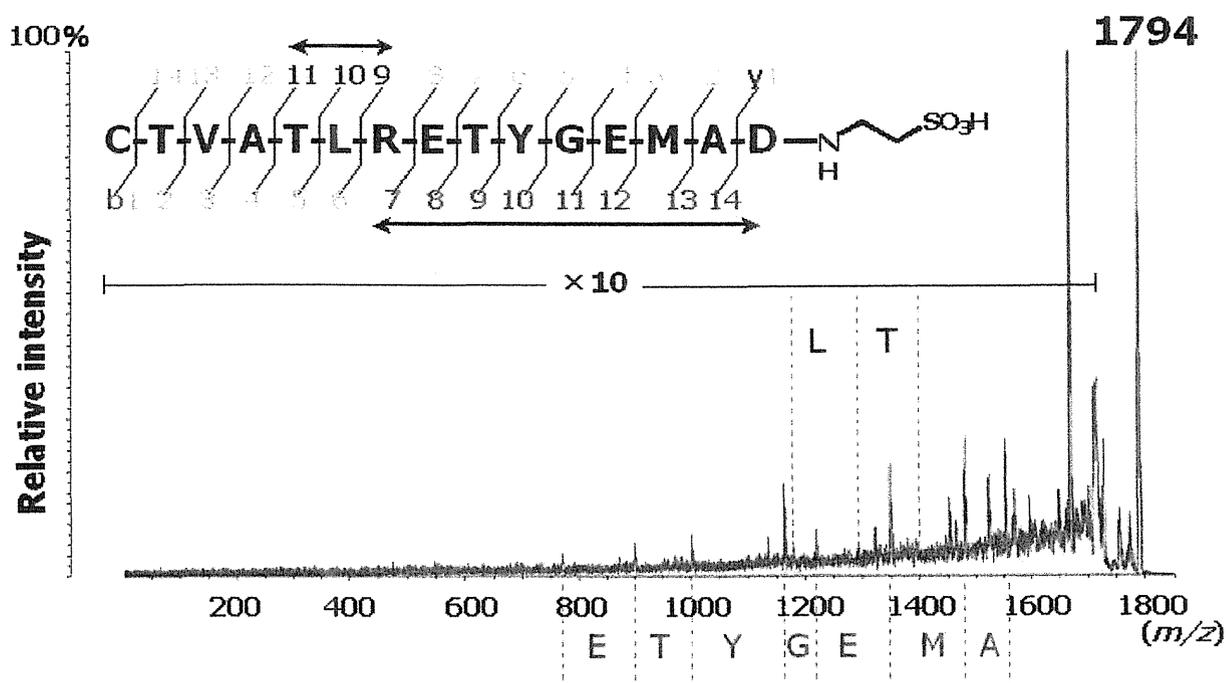
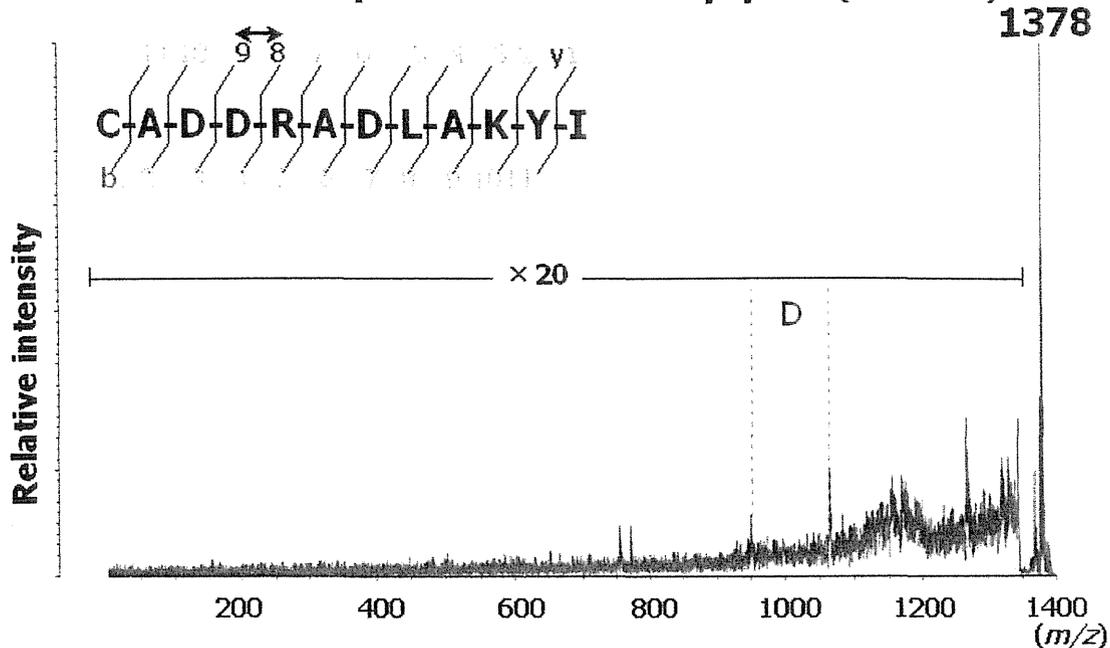


Fig. 12 MALDI-PSD TOF MS spectra of peptides derived from HSA
 (a) unlabeled peptide (75-89) (b) AESA-labeled peptide (75-89)

↔ : The lines cover amino acid sequences to be analysed

MALDI-PSD TOF MS spectrum of unlabeled peptide (250-261)



MALDI-PSD TOF MS spectrum of AESA-labeled peptide (250-261)

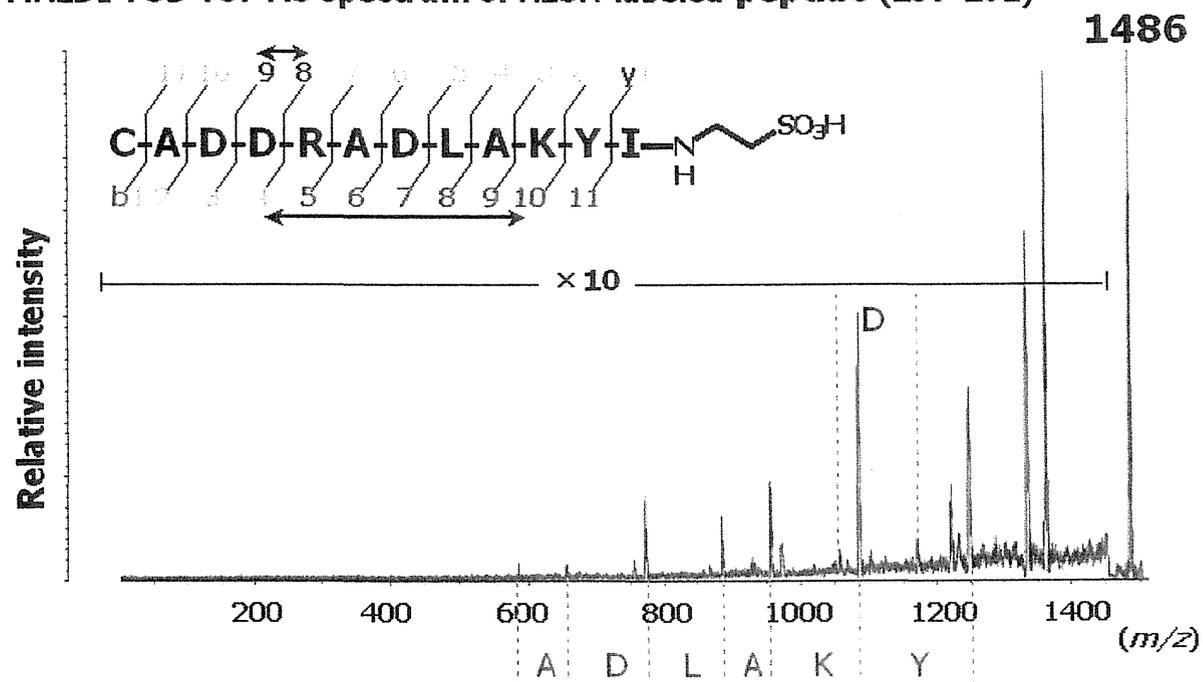


Fig. 13 MALDI-PSD TOF MS spectra of peptides derived from HSA
 (a) unlabeled peptide (250-261) (b) AESA-labeled peptide (250-261)

↔ : The lines cover amino acid sequences to be analysed

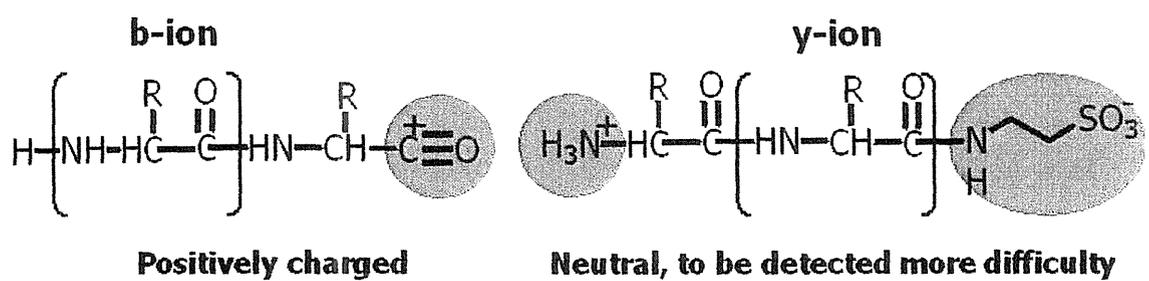


Fig. 14 Proposed structures of b-ion and AESA labeled y-ion

1-4 まとめと考察

agmatine、AESA とともに、HSA 由来の標識ペプチドの検出が確認でき、本標識法が様々なアミノ酸配列のペプチドにも適応可能であることがわかった。また AESA 標識ペプチドの MALDI-TOF MS 解析では、negative mode を用いることにより、より標識ペプチドを選択的に検出することが可能であることがわかった。さらに、矢敷、井上らは AESA 標識ペプチドの PSD パターンは b、y-ion とともにイオン強度が高くなる傾向にあることを示しているが、本実験の結果では AESA 標識ペプチドの PSD パターンは、未標識ペプチドに比べて b-ion がより選択的に検出できるようになる傾向があることがわかった。アミノ酸配列と検出感度との詳しい関連性については現在も検討中であるが、AESA によるペプチドの C 末端標識は negative mode による測定にて標識ペプチドの選択的検出が可能となること、また PSD 分析が有利になる点で、有用であることが考えられる。

第二章 negative mode 測定における MALDI-TOF MS によるペプチ

ド検出における定量性の検討

2-1 はじめに

現在のプロテオーム技術、つまり質量分析装置とデータベース、これらを結ぶ検索システムによってタンパク質の同定は飛躍的に容易になってきた。しかし、タンパク質を同定するだけでは、機能解析としては不十分である。すなわち、プロテオームによる機能解析研究では、例えば、内外の環境的因子の影響などによって生じた個々のタンパク質の比較定量データが必要となる。

質量分析装置を検出器として用いたタンパク質の定量分析の試みでは、あらかじめタンパク質を標識試薬で標識断片化したのち、内部標準物質をサンプルに添加して検出する内部標準法が一般的である。現在、質量分析装置での内部標準物質としては、主に安定同位体標識の試薬が用いられている¹⁰⁾⁻¹³⁾。Aebersold らはシステイン残基のアルキル化剤としてビオチン化試薬を使うことにより、システイン残基のみアビジンカラムによって効率よく精製できるようにした ICAT (Isotope Coded Affinity Tags) 法を開発した¹⁴⁾。そして、安定同位体の重水素で標識したビオチン試薬を使うことにより、2つのサ

ンプルの相対的定量を可能にした。このことを参考にして当研究室の井上は AESA 及び AESA よりもアルキル鎖の炭素数が一つ長い APSA (3-amino-1-propanesulfonic acid) の C 末端標識ペプチドにおいて、標識ペプチドのうち片方を内部標準物質として用いる比較定量法の検討を、Ova をモデルタンパク質として行っていた。その結果、Ova 由来の APSA 標識ペプチドを内標準物質として、AESA 標識ペプチドとのシグナル強度比をもとに検量線を作成したところ、良好な検量線を引くことができた。

本章では、井上が検討した比較定量実験において、前章で negative mode 測定にて AESA 標識ペプチドを選択的に検出できたことを参考にし、negative mode における本比較定量法の定量性について明らかにすることを目的とした。モデルタンパク質としては HSA 及び Trx を検討した。

2-2 negative mode 測定における HSA を用いた比較定量法の検討

AESA あるいは APSA を NTCB 存在下 HSA と反応させ、その反応物を等量混合し MALDI-TOF MS を用いて分析した。その結果メチレン基一個分、分子量で 14 Da 異なる位置に対となったシグナルをいくつか検出できた。Fig. 15 にはその一部 (34-52) を示す。APSA 標識ペプチド ($m/z=2354$) の濃度を一定、内標準物質とし、HSA の濃度を様々に変化させて標識反応を行って得た AESA 標識ペプチド ($m/z=2340$) を等量混合した後、AESA 標識ペプチドと APSA 標識ペプチド由来のシグナルのシグナル強度比をもとに検量線を作成したところ、Fig. 16 に示すような良好な検量線を作成することができた。以上のことより negative mode 測定においても本比較定量法が有用であることが明らかになったため、次節では本比較定量法の Trx (thioredoxin) への応用を試みた。

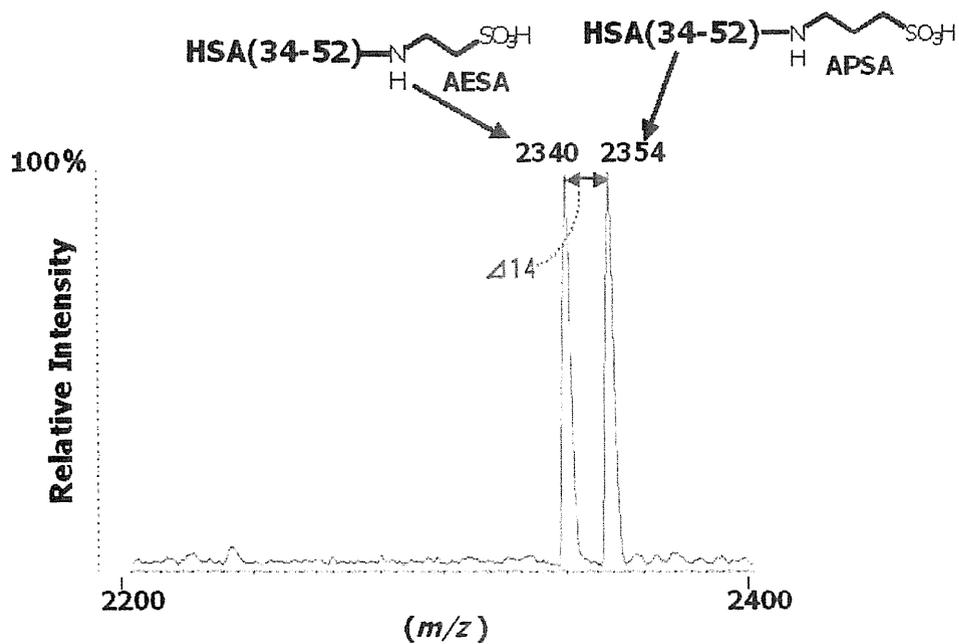


Fig. 15 MALDI-TOF MS spectra of AESA- and APSA-labeled peptides (34-52) derived from HSA

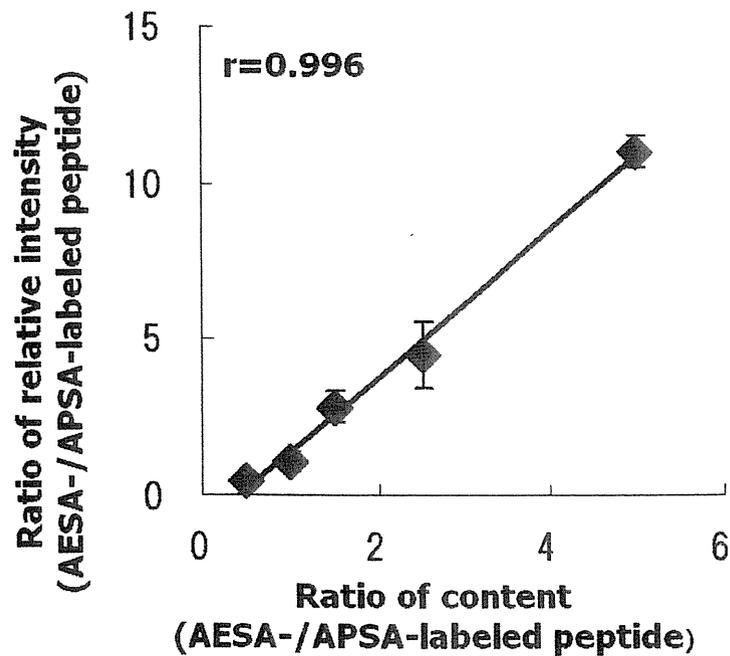


Fig. 16 Calibration curve of AESA-labeled peptide derived from HSA n=3

2-3 negative mode 測定における Trx を用いた比較定量法の検討

Trx は GSH (Glutathione) とともに、細胞内の抗酸化機構を担う代表的なシステイン含有タンパク質である (Fig. 17)。特に Trx は、近年ヒトにおいて HIV 感染^{15), 16)}、虚血性心疾患¹⁷⁾、気管支喘息¹⁸⁾、C 型肝炎¹⁹⁾、非アルコール性脂肪肝炎²⁰⁾、関節リウマチ²¹⁾ などの種々の疾患において、その血清・血漿中濃度が上昇することが報告されており、また Trx 高発現マウスが長寿傾向を示すこと²²⁾、Trx ノックアウトマウスは胚性致死となってしまうことが明らかになっている²³⁾。さらに、NF- κ B、Ref-1、AP-1 および p53 などの転写因子の DNA 結合活性を調節するほか、アポトーシスのシグナル伝達に関与する MAPKKK (Mitogen Activating Protein Kinase Kinase Kinase) である ASK-1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase) に結合し、その活性を制御することが知られている²⁴⁾ (Fig. 18)。

以上のようなことから現在、生体内の Trx の量的変化や Trx の機能を解明するための研究が盛んに行われている。

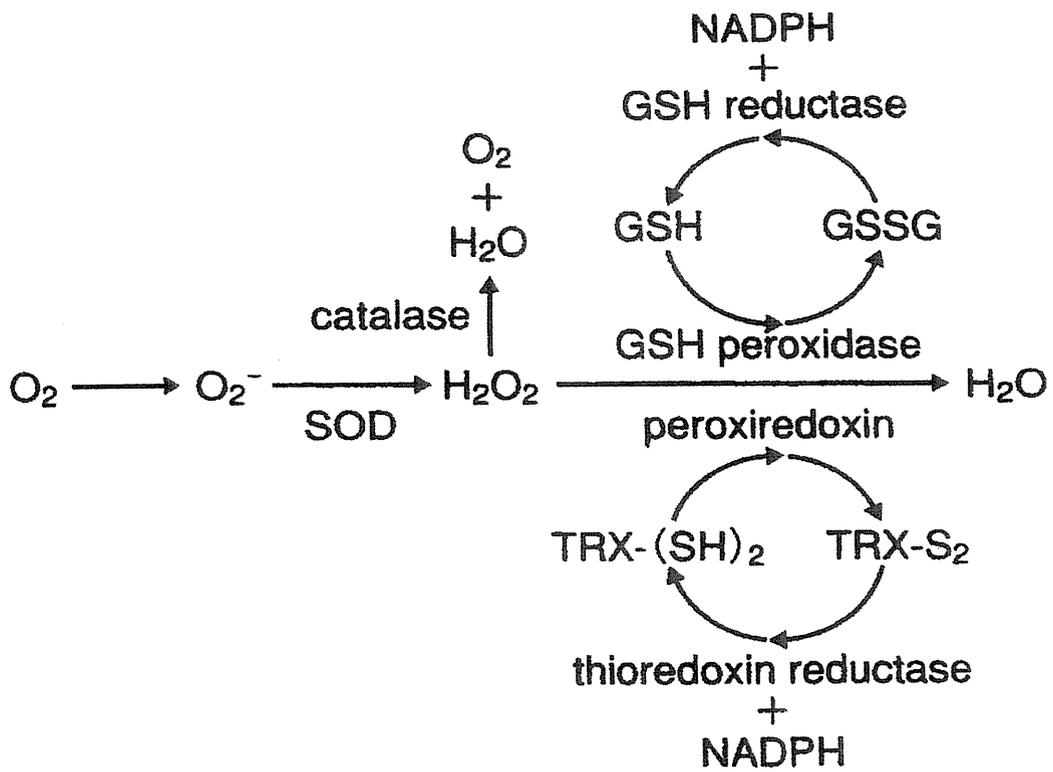


Fig. 17 Antioxidative mechanism

Trx は、Trx 依存性のペルオキシダーゼである peroxiredoxin との協調作用により、細胞内の活性酸素種を消去する抗酸化物質として働く。

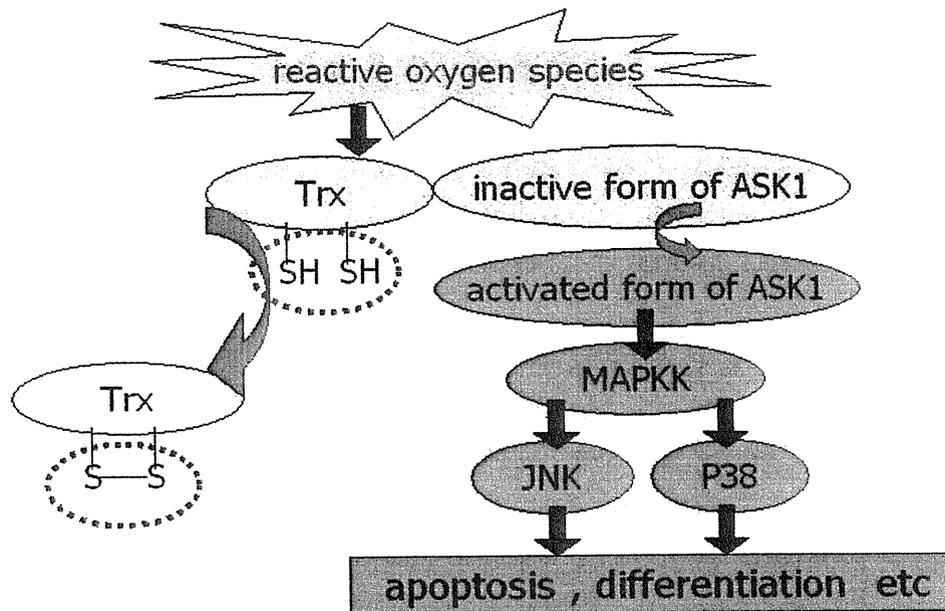


Fig. 18 Example for thioredoxin's functions

細胞内で還元型 Trx の一部は ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) と複合体を形成して存在する。過酸化水素等の活性酸素などが作用すると還元型 Trx のシステイン残基のチオール基は酸化され酸化型 Trx となる。すると Trx-ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) 複合体から Trx は遊離し ASK1 は活性型となる。活性型 ASK 1 は MAPKK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase) を活性化させ、MAPKK は JNK (c-Jun N-terminal kinase) 及び p38 を活性化しアポトーシスや分化などを誘導することが明らかとなっている。

本実験では、Fig. 19 に示すように大腸菌由来の Trx がそのアミノ酸配列上にシステイン残基を2つしか含有していないことに着目し、NTCB による断片化アルキルアミン標識の結果を検討する際に解析が容易であろうと予測した。大腸菌において Trx は DNA 合成に必須なリボヌクレオチド還元酵素に水素イオンを供与する補酵素であることも明らかになっており、必要不可欠なタンパク質である。

以上のようなことから、大腸菌由来の Trx の標品を用いて実験を行うこととした。

AESA あるいは APSA を NTCB 存在下 Trx と反応させ、その反応物を等量混合し MALDI-TOF MS を用いて分析した。すると HSA のときと同様に、Fig. 20 に示したような分子量で 14 Da 異なる位置に AESA、APSA それぞれのアルキルアミンで標識された Trx 由来のシグナルを確認することができた。また、APSA 標識ペプチド ($m/z=3660$) の濃度を一定、内標準物質とし、Trx の濃度を様々に変化させて標識反応を行って得た AESA 標識ペプチド ($m/z=3646$) を等量混合した後、AESA 標識ペプチドと APSA 標識ペプチド由来のシグナルのシグナル強度比をもとに検量線を作成したところ、Fig. 21 に示すような良好な検量線を作成することができた。

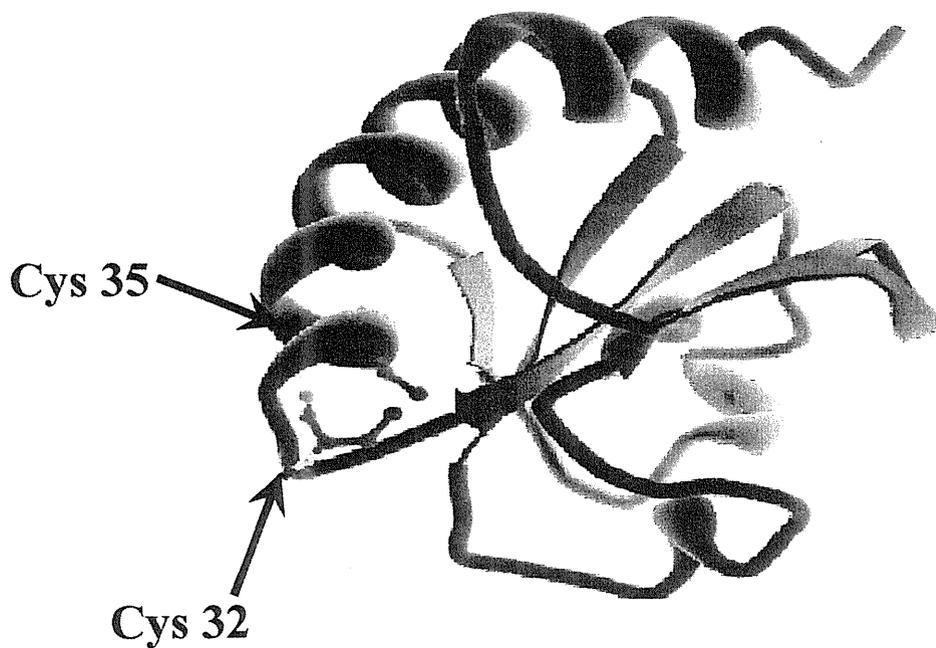


Fig. 19 Structure of E.coli Trx

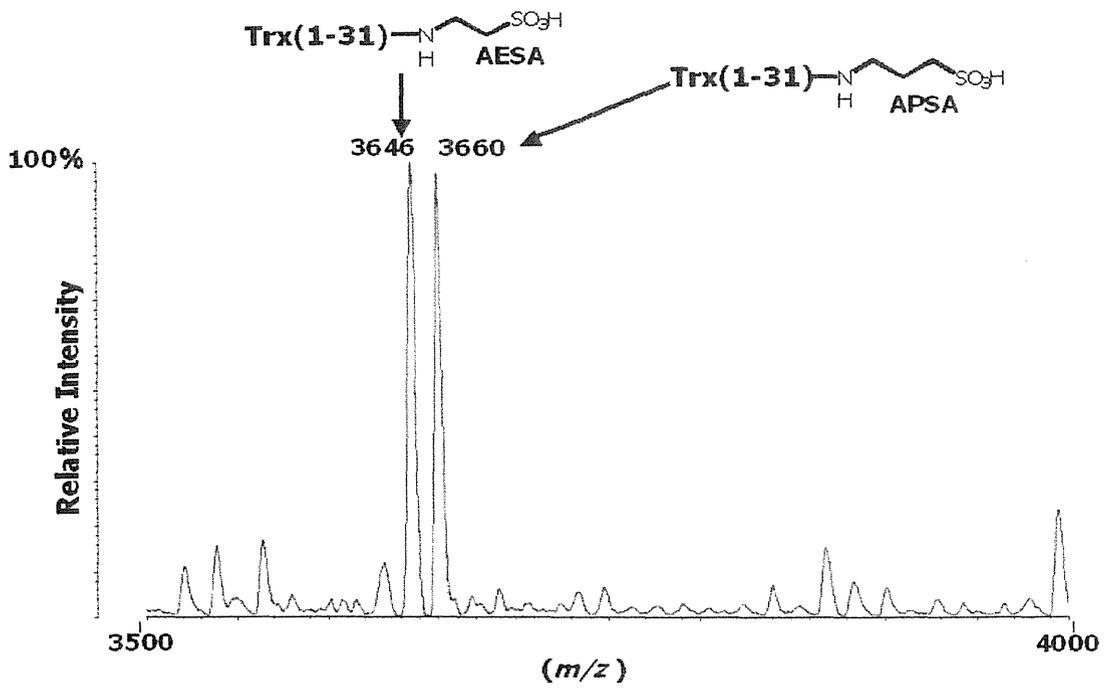


Fig. 20 MALDI-TOF MS spectra of AESA- and APSA-labeled peptides derived from Trx

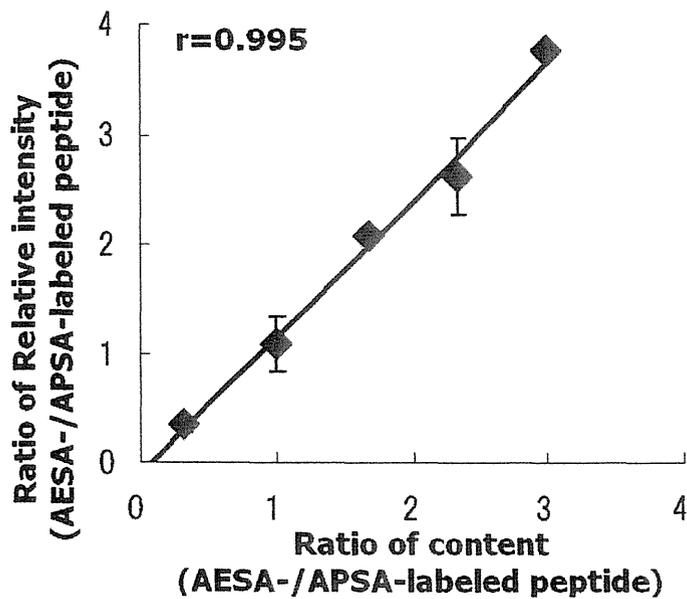


Fig. 21 Calibration curve of AESA-labeled peptide derived from Trx
n=3

2-4 まとめと考察

AESA、APSA を用いた本定量法が negative mode における測定においても良好な検量線が得られることが明らかになり、またその汎用性についても証明できた。このことは本法を用いることで、目的とするシステイン含有タンパク質の量的変化について調べることが可能となることを示唆している。一般的に細胞内外のタンパク質の変動は ELISA 法、ウェスタンブロット法などの免疫抗体法によって検出される。しかし、これらの方法を用いるためには、良好な抗体の調製が不可欠であり、また十分な測定精度は期待できない場合が多い。本研究結果は、非常に簡便な前処理反応によりタンパク質の断片化及び断片化ペプチドの標識が行えること、また機器分析装置を用いることによる定量が可能であることを示唆しており、今後目的のタンパク質を再現性よく分離できる条件等が整えば、従来の定量法と比較してより簡便で迅速な測定法となることが期待される。

第三章 本標識法及び iodoacetamide による標識を併用した酸化型、還元型 thioredoxin の分別定量

3-1 はじめに

二章の結果より本定量法を用いることで Trx の定量が可能であることが示唆された。現在、Trx を定量する方法としては ELISA など免疫化学的に測定する方法が汎用されている。しかしながら、これらの方法では Trx の酸化型と還元型の区別をすることができない。還元型 Trx が細胞の分化、増殖に関する ASK-1 を制御していることから、Trx の酸化型、還元型の割合の解析が可能となれば、より詳細な細胞応答機構が明らかになることが予想される。また、Trx に限らず、タンパク質のシステイン残基の修飾がシグナルのセンサーとなり、シグナル調節 (レドックス制御) に重要であるという分子機構が多く報告されており、システイン残基の酸化還元状態をモニターすることは極めて重要である。Walter らは、Trx の酸化型、還元型の割合を解析する方法として、グアニジン存在下、IAM (iodoacetamide) を Trx に反応させ、AM 標識 Trx 及び AM 未標識 Trx を電気泳動にて分離、クマシーブルー染色にて検出している²⁵⁾。これは還元型 Trx は IAM による標識を受け、酸化型 Trx は IAM による標識を受けないこ

とを利用したもので、スポットの濃さを基にそれぞれの割合を算出している²⁵⁾。しかし、この方法では酸化型、還元型を区別するために電気泳動を行う必要があるため、一検体あたりの測定時間が長時間になってしまう。もし酸化型、還元型の区別が質量分析装置等の機器分析装置にて簡便に検討できるのであれば、測定時間の大幅な短縮が期待される。

そこで本章では二章の結果をふまえ、本標識法及びIAMによる遊離システイン残基の標識を併用することにより、Trxの反応性に富むシステイン残基の同定、及び酸化型、還元型の分別定量がMALDI-TOF MSにて可能であるかどうかを検討した。

3-2 IAMによる標識を併用することによる、反応性に富む

システイン残基の同定

Trxを過量のTCEPで処理しジスルフィド結合を遊離システイン残基に還元後、IAMと反応させ、MALDI-TOF MS分析を行った。Fig. 22 (A)に示したTrxの分子量は11675であり、Fig. 22 (B)に示した分子量11733は大腸菌由来のTrxが含有する2つのシステイン残基のうち、一方のみのシステイン残基がAM標識された時の分子量と一致した。NTCBによるタンパク質の断片化は、システイン残基のシアノ化を起因として起こるため、AM標識を受けたシステイン残基は切断反応の対象とはならない。そのことを利用してAM標識したTrxをNTCB及びAESAあるいはAPSAにより断片化、アルキルアミン標識を行いMALDI-TOF MSを用いて2つのシステイン残基のうち、どちらがAM標識されたのかを調べた。その結果Fig. 23に示したように、AM及びAESA ($m/z=3960$) あるいはAPSA ($m/z=3974$) によって標識されたと思われるシグナルが検出できた。これらの分子量はFig. 24に示したように、Cys 32がAM標識を受け、Cys 35が断片化、アルキルアミン標識された分子量と一致した。これはCys 32がCys 35よりも反応性に富むことを示唆するものであり、カドミウムと大

腸菌由来の Trx のシステイン残基の相互作用を評価している報告と一致するものであった²⁶⁾。

以上のことから、本標識法及び IAM による標識を併用することによる、反応性の高いシステイン残基の同定が可能であることが示唆された。

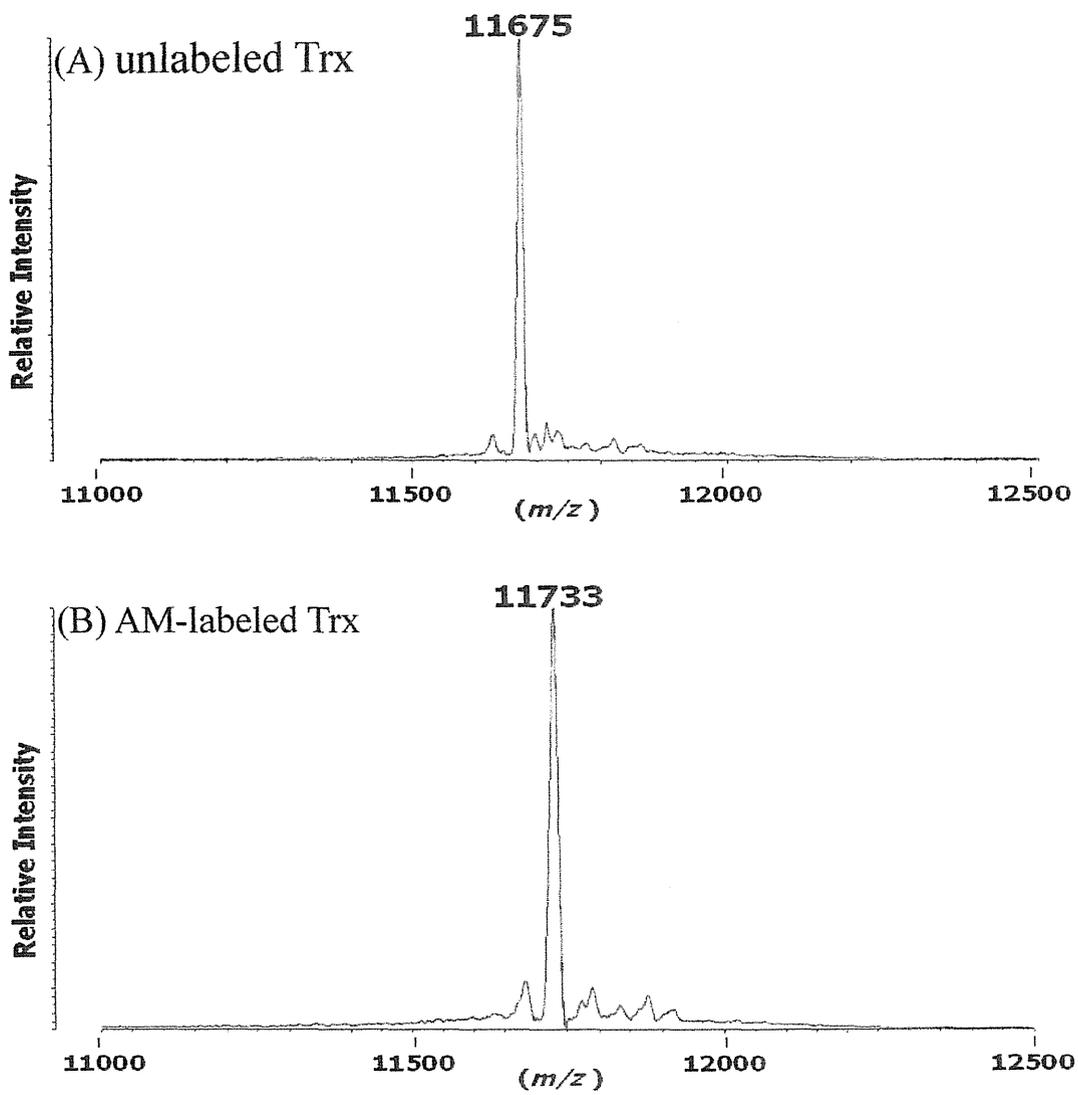


Fig. 22 MALDI-TOF MS spectra of unlabeled and AM-labeled thioredoxin
(A) unlabeled Trx (B) AM-labeled Trx

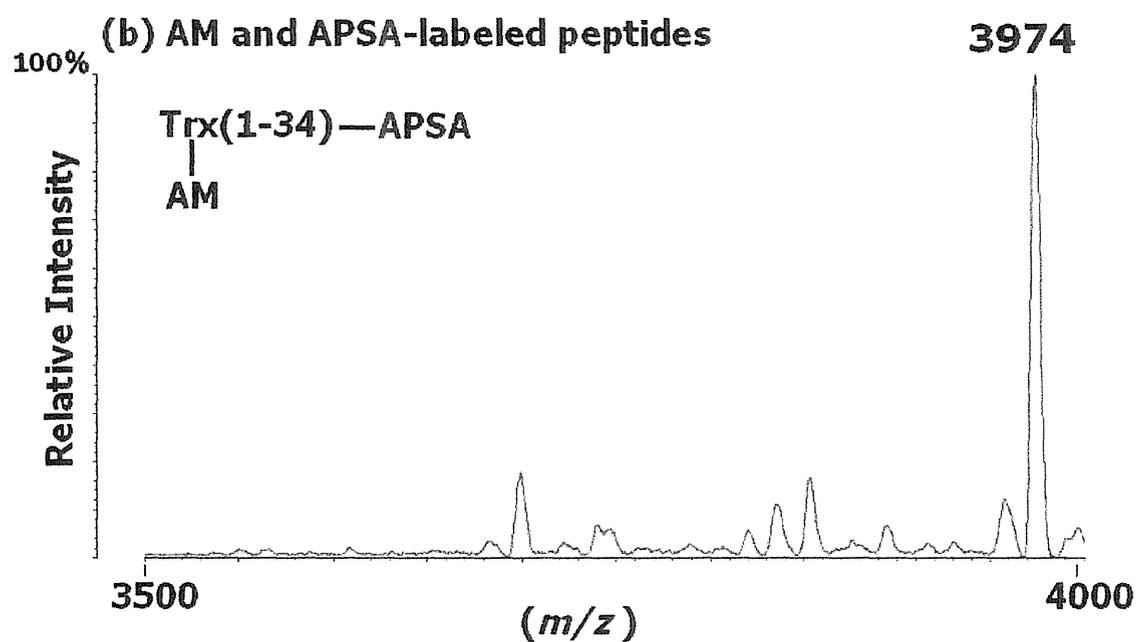
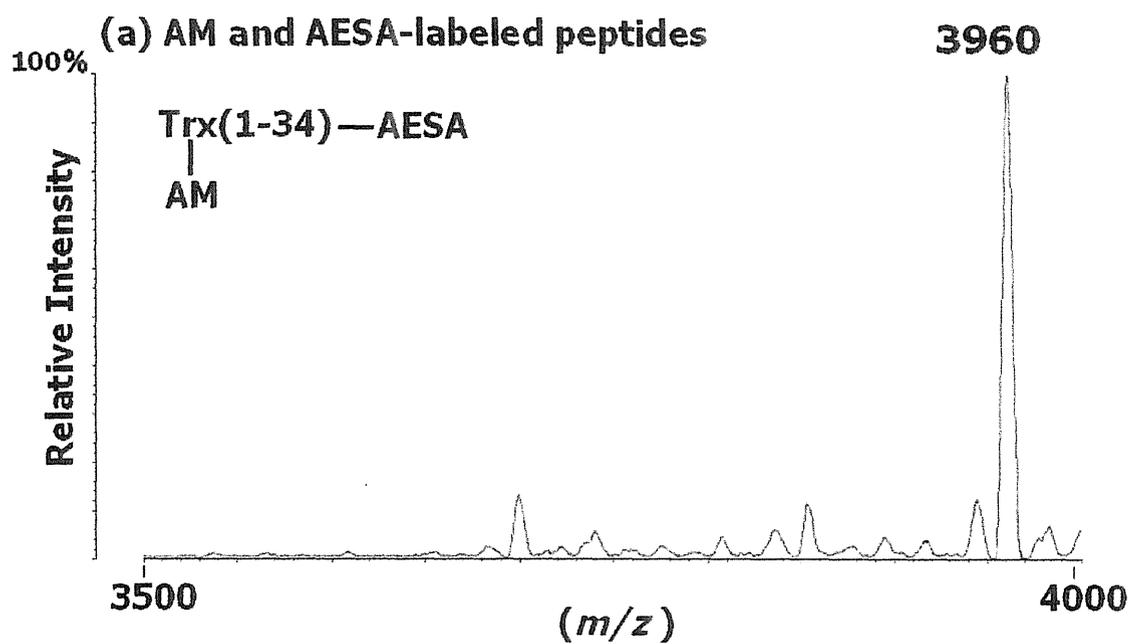


Fig. 23 MALDI-TOF MS spectra of peptides derived from Trx
(a) AM and AESA-labeled peptides
(b) AM and APSA-labeled peptides

3-3 本法の Trx の酸化還元状態解析への応用

前節で還元型 Trx 中のシステイン残基の一方は常に IAM による標識反応を受けることが明らかになった。このことは酸化型の Trx では IAM による標識が起こらないため酸化型、還元型タンパク質の分別定量が可能となることを示唆している。そこで本節では、本法の応用として、Trx の酸化還元状態を調べる方法論を検討した。Trx の酸化還元状態モデルの作成には、過酸化水素の添加量により Trx の酸化型、還元型の割合を変化させて、調製した試料を用いた。様々な濃度の過酸化水素で処理した Trx それぞれを IAM 処理後、還元し、NTCB 及び AESA を添加し、断片化に伴う AESA 標識を行った。同様にして大過剰の過酸化水素で処理して得た APSA 標識ペプチド ($m/z=3660$) を内標準物質として様々な濃度の過酸化水素で処理して得た AESA 標識ペプチド ($m/z=3646$) と混合し、MALDI-TOF MS 分析を行った。Fig. 25 には実際の実験結果とそれぞれの分子量に由来するペプチドについて示した。この結果から過酸化水素濃度が増すにつれ、AESA 標識ペプチドの割合が増加していることがわかる。AESA 標識ペプチドの APSA 標識ペプチドに対するシグナル強度比をみることで、過酸化水素のシステイン残基に対する影響を評価す

ることができる。Fig. 26 には過酸化水素量と内標として用いた APSA 標識ペプチドと AESA 標識ペプチドのシグナル強度比の関係を示した。Trx に添加した過酸化水素濃度が増すにつれ、内標準物質である APSA 標識ペプチドのシグナル強度に対する、AESA 標識ペプチドのシグナル強度の割合が大きくなっていることがわかる。すなわち、過酸化水素濃度の増加に伴い、Trx の酸化型の割合が増加していることを示している。

以上のことより、本標識法及び IAM 標識を併用することによって、反応性の高いシステイン残基における酸化型と還元型の分別定量が可能であることが示唆された。

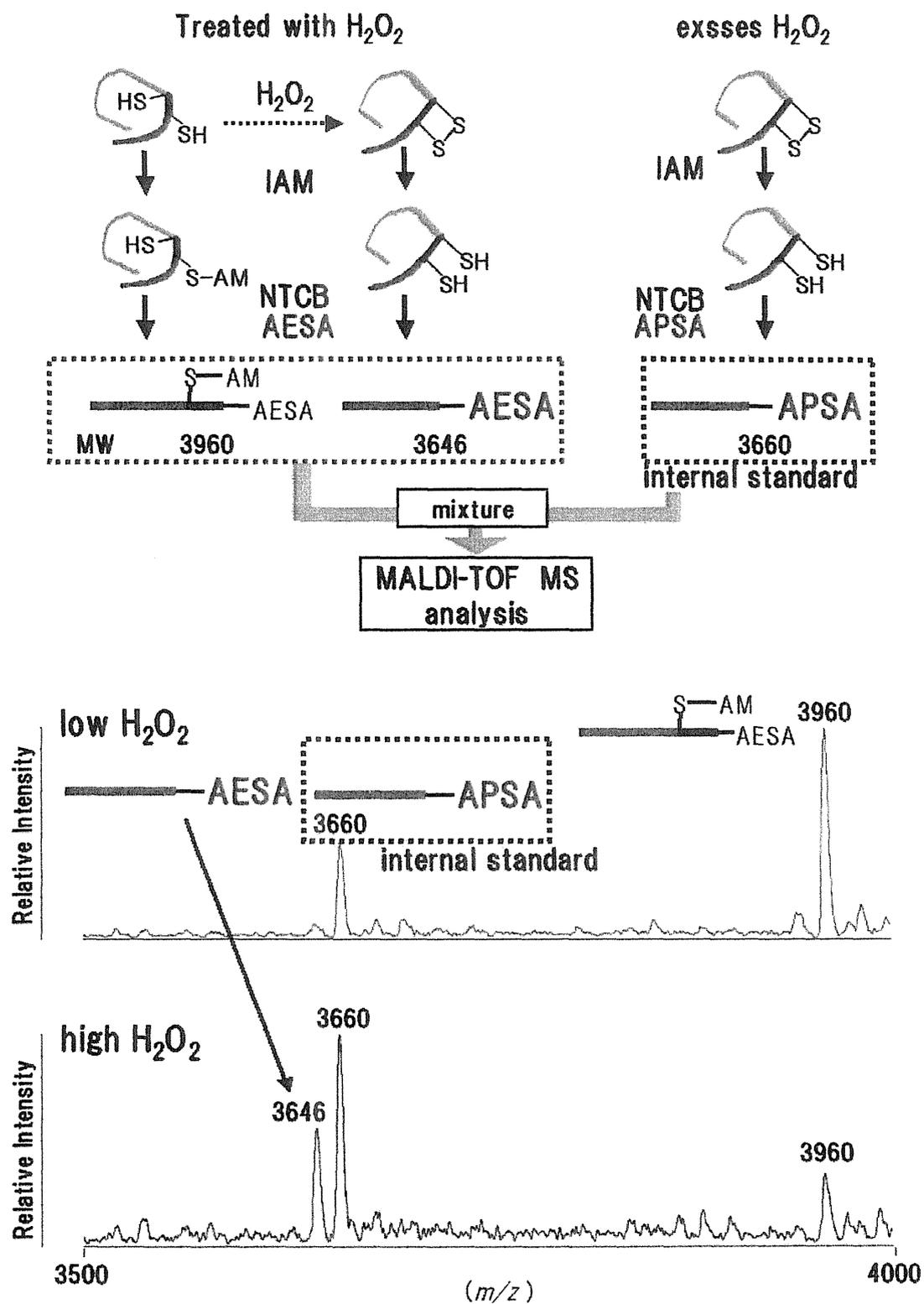


Fig. 25 AM and AESA- or APSA-labeled approach to redox proteomics

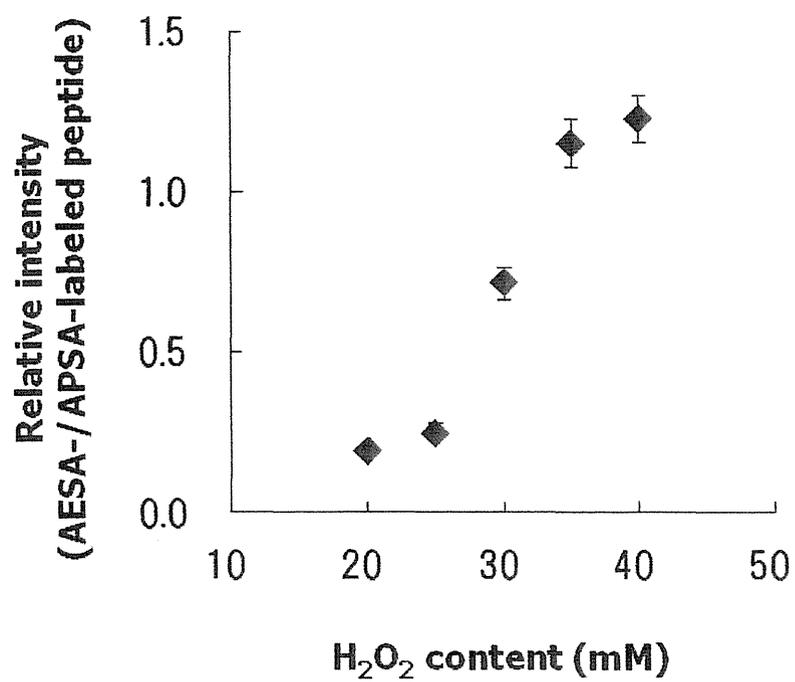


Fig. 26 Effect of hydrogen peroxide on redox state of thioredoxin

3-4 まとめと考察

本標識法及び IAM 標識を併用することによる、Trx の反応性に富むシステイン残基の同定とその酸化型、還元型の分別定量が可能であることが示唆された。システイン残基上のチオール基は反応性に富むために様々な酵素の活性中心として機能している。この酸化修飾は必然的にその活性に大きな変化をもたらすことから、細胞内におけるチオール基の酸化還元状態をモニターすることは極めて重要である。タンパク質のリン酸化は ^{32}P を用いた標識法やリン酸化アミノ酸特異的な抗体の使用により比較的容易に解析できる。これに対してシステイン残基の酸化修飾は、チオール基特異的蛍光試薬や非還元的 SDS-PAGE や等電点電気泳動上でのタンパク質の泳動度の変化をもとに解析する方法などがあるものの、最終的には質量分析装置を用いた同定が必要とされる²⁷⁾。本法を用いることでタンパク質の酸化型、還元型の区別、及びその同定が同時にできることから、従来の分析法よりも簡便に酸化型、還元型タンパク質の分別定量が可能であると予想される。レドックス制御に関するタンパク質としては Trx 以外にも PTP (protein tyrosine phosphatase)²⁸⁾ や ERK (extracellular signal-regulated kinase)²⁹⁾ などが知られており、本法を用

いることにより、Trx 及び他のレドックス制御に関するタンパク質の機能をより簡便かつ詳細に検討できることが期待される。

第四章 総括

第一章より、陰性電荷を有するアルキルアミンにより標識されたペプチドは、MALDI-TOF MS 分析における negative mode による測定でより選択的に検出できることがわかった。また、MALDI-PSD TOF MS 分析においてもより明瞭なスペクトルが得られる傾向にあることが判明した。以上のことから陰電荷を有するアミノアルキルスルホン酸によるペプチドの C 末端標識の有用性が示された。

また第二章より、negative mode による測定においても、アルキル鎖の炭素数が一つ異なる 2 種のアミノアルキルスルホン酸による C 末端標識を利用することで相対的な量の比較が可能であることが明らかになり、その汎用性も確認できた。

さらに第三章では、本標識法及び IAM による標識を併用することによる、反応性に富むシステイン残基の同定とその酸化型、還元型の分別定量が可能であることが示唆された。Trx において質量分析装置を用いた酸化型、還元型の分別定量実験は初めての試みであり、本法を応用することで、Trx 及び他のレドックス制御に関するタンパク質の機能をより詳細に検討できることが期待される。

今後アルキルアミン標識ペプチドの特異的精製が可能となれば本

法を細胞試料中の特定のシステイン含有タンパク質にも応用できると考えている。

実験材料と方法

試薬

HSA、NTCB、HEPES、グアニジン塩酸塩は SIGMA 社より、TCEP は PIERCE 社より、Trx は和光純薬工業より購入した。

AESA、IAM は和光純薬工業より、APSA、Agmatine は ALDRICH 社より購入したものをを用いた。

アセトニトリルは関東化学株式会社より、TFA（アミノ酸分析用）は和光純薬株式会社より購入した。

MALDI-TOF MS 分析及び PSD 分析の際に用いた cyt C、Ins、Ins β 、Ang II、CHCA は SIGMA 社より購入した。

今回の実験に用いた水はすべて Milli Q により調製した。

アルキルアミン標識ペプチドの MALDI-TOF MS 分析におけるペプチド検出に及ぼす電荷の影響

25 μ M HSA 1 mL に 25 mM TCEP 150 μ L を添加し、37°C で 30 分反応させ、次に 25 mM NTCB 300 μ L を添加し、37°C で 30 分反応させた。ここまでの反応は 0.1 M HEPES-HCl、6 M guanidine (pH 8.0) 緩衝液中で行った。その後、反応液を 5 μ L 分取し、0.5 M アルキルア

ミン 5 μL を添加し、pH を 9.0 付近に調整後、37°C で 16 時間反応させた。反応停止には 10% TFA 2 μL を添加した。この試料を、疎水性樹脂を備えた ZipTipC₁₈ により脱塩後、MALDI-TOF MS 分析を行った。

negative mode 測定における HSA を用いた比較定量法の検討

MALDI-TOF MS を用いた相対的定量法の汎用性を検討するために、20 μM HSA 1 mL に 25 mM TCEP 136 μL を添加し、37°C で 30 分反応させ、次に 25 mM NTCB 280 μL をそれぞれに添加した。ここまでの反応は 0.1 M HEPES-HCl、6 M guanidine (pH 8.0) 緩衝液中で行った。これらを 37°C で 30 分反応させた後、反応液に緩衝液を加えて濃度を 1/10、2/10、3/10、5/10 に希釈したものを作成した。1/10、2/10、3/10、5/10、1 倍希釈反応液をそれぞれ 5 μL 分注し、これらすべてに 0.5 M AESA を 5 μL を添加した。また 2/10 希釈反応液を 5 μL 分注したものを 5 つ用意しそれぞれに 0.5 M APSA を 5 μL 添加した。これらを pH を 9.0 付近に調整後、37°C で 16 時間反応させた。反応停止には 10% TFA 2 μL を用いた。2/10 希釈反応液に APSA を反応させた試料及びそれぞれの濃度の HSA に AESA を反応させた試料を等量混合し、これらの試料を、疎水性樹脂を備えた ZipTipC₁₈ により脱塩後、

MALDI-TOF MS 分析を行なった。

negative mode 測定における Trx を用いた比較定量法の検討

200 μ M Trx 300 μ L に 25 mM TCEP 12 μ L を添加し、37°C で 30 分反応させ、次に 25 mM NTCB 24 μ L をそれぞれに添加した。ここまでの反応は 0.05 M HEPES-HCl、3 M guanidine (pH 8.0) 緩衝液中で行った。これらを 37°C で 30 分反応させた後、反応液に緩衝液を加えて濃度を 1/20、3/20、5/20、7/20、9/20 に希釈したものを作成した。1/20、3/20、5/20、7/20、9/20 希釈反応液をそれぞれ 30 μ L 分取し、これらすべてに 0.5 M AESA を 30 μ L を添加した。また 3/20 希釈反応液を 30 μ L 分注したものに 0.5 M APSA を 30 μ L 添加した。これらの pH を 9.0 付近に調整後、37°C で 16 時間反応させた。反応停止には 10% TFA 10 μ L を用いた。30 μ M Trx に APSA を反応させた試料及びそれぞれの濃度の Trx に AESA を反応させた試料を等量混合し、これらの試料を、疎水性樹脂を備えた ZipTipC18 により脱塩後、MALDI-TOF MS 分析を行なった。

IAM による標識を併用することによる、Trx の反応性に富むシステム残基の同定

1 mg/mL Trx 100 μ L を用意し、Trx 溶液に 20 mM TCEP を 2 μ L 加え室温にて 30 分間反応させた。さらに、その反応液に 40 mM IAM を 2 μ L 添加し、室温にて 30 分反応させた。反応停止には 1 M β -mercaptoethanol 2 μ L を用いた。その後、その反応液を 10 μ L とり、0.5 M AESA 20 μ L を加えたものと 0.5 M APSA 20 μ L を加えたものを調製した。次にそれぞれに 20 mM NTCB 20 μ L を加え、pH を 9.0 付近に調整後 37°C で 16 時間反応させた。反応停止には 10% TFA 20 μ L を用いた。AESA を反応させた試料及び APSA を反応させた試料を等量混合し、これらの試料を、疎水性樹脂を備えた ZipTipC18 により脱塩後、MALDI-TOF MS 分析を行なった。

本法の Trx の酸化還元状態解析への応用

1 mg/mL Trx 100 μ L 溶液それぞれに最終濃度が 20 μ M、25 μ M、30 μ M、35 μ M、40 μ M となるように過酸化水素を加え室温にて 30 分間反応させた。さらに、それぞれの反応液に 40 mM IAM を 2 μ L 添加し、室温にて 30 分反応させた。反応停止には 1 M β -mercaptoethanol 2 μ L を用いた。その後、それぞれの反応液を 10 μ L とり、これらに 0.5 M AESA 20 μ L を加えた。また、40 μ M の過酸化水素で処理したものについては 0.5 M APSA 20 μ L を加えたものも調製した。次にそれぞ

れに 20 mM NTCB 20 μ L を加え、pH を 9.0 付近に調整後 37°C で 16 時間反応させた。反応停止には 10% TFA 20 μ L を用いた。40 μ M の過酸化水素で処理し APSA を反応させた試料及びそれぞれの濃度の過酸化水素で処理し AESA を反応させた試料を等量混合し、これらの試料を、疎水性樹脂を備えた ZipTipC18 により脱塩後、MALDI-TOF MS 分析を行なった。

MALDI-TOF MS 分析

島津製作所製 AXIMA-CFR を用い、HSA についてはリフレクターモードで、Trx についてはリニアモードにより測定した。マトリックスは CHCA を用い、10 mg/mL となるよう 0.1% TFA:アセトニトリル=3:2 溶液に溶かしたものを使用した。マトリックス 1 μ L と試料 1 μ L をステンレス製のプローブ上で混和し、空気乾燥により結晶化した後、分析した。機器更正には、Ang II [10^{-5} M、(M+H)⁺ Average 1047.2 Da] と bovine insulin [10^{-5} M、(M+H)⁺ Average 5734.6 Da] の 2 点を用いて行った。

PSD 分析

島津製作所製 AXIMA-CFR を用いた。マトリックスは CHCA を用

い、10 mg/mL となるよう 0.1% TFA:アセトニトリル=3:2 溶液に溶かしたものを使用した。ステンレス製サンプルプレートに、試料を 1 μ L 乗せて空気乾燥させた後、さらにマトリックスを 1 μ L 乗せて空気乾燥させて結晶化させた後、分析した。機器更正には、Ang II [10^{-5} M、(M+H)⁺ Average 1047.2 Da]と bovine insulin [10^{-5} M、(M+H)⁺ Average 5734.6 Da]の 2 点を用いて行った。

参考文献

- 1) 綱澤進 / 平野久 編 プロテオミクスの基礎 講談社サイエンティフィック
イフイック
- 2) Karas M. *et al.* : *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301 (1988).
- 3) Kaufmann R. *et al.* : *Rapid Commun. Mass spectrum.*, **7**, 902-910
(1993).
- 4) Biemann K. *et al.* : *Biomed. Environ. Mass Spectrum.*, **16**, 99-111
(1988).
- 5) Wu J. *et al.* : *Anal. Biochem.*, **235**, 161-174 (1996).
- 6) 矢敷実希子 / タンパク質の化学的断片化に伴うペプチド C 末端
標識法の開発とペプチド分析への応用 城西大学大学院平成 14
年度修士論文
- 7) 井上学 / タンパク質の化学的断片化に伴うペプチド C 末端標識
の MALDI-PSD TOF MS 分析への利用 城西大学大学院平成 16 年
度修士論文
- 8) Wu J. *et al.* : *Anal. Biochem.*, **235**, 161-174 (1996).
- 9) 伊藤俊行 / プロテアーゼ消化におけるポリアミンによるペプチ
ド修飾 城西大学大学院平成 15 年度修士論文

- 10) Oda Y. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6591-6596 (1999).
- 11) Kuyama H, *et al.* : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 1642-1650 (2003).
- 12) Hsu J.-L. *et al.* : *Anal. Chem.*, **75**, 6843-6852 (2003).
- 13) Ibarrola N. *et al.* : *Anal. Chem.*, **75**, 6043-6049 (2003).
- 14) Gygi S. P. *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, **17**, 994-999 (1999).
- 15) Nakamura H. *et al.* : *Int. Immunol.*, **8** : 603-611 (1996).
- 16) Nakamura H. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** : 2688-2693 (2001).
- 17) Miyamoto S. *et al.* : *Am. Heart J.*, **146** : 465-471 (2003).
- 18) Yamada Y. *et al.* : *Immunol. Lett.*, **86** : 199-205 (2003).
- 19) Sumida Y. *et al.* : *J. Hepatol.*, **33** : 616-622 (2000).
- 20) Sumida Y. *et al.* : *J. Hepatol.*, **38** : 32-38 (2003).
- 21) Jikimoto T. *et al.* : *Mol Immunol.*, **38** : 765-72 (2002).
- 22) Mitsui A. *et al.* : *Antioxid. Redox Signal*, **4** : 693-696 (2002).
- 23) Matsui M. *et al.* : *Dev. Biol.*, **178** : 179-185 (1996).
- 24) Takeda K. *et al.* : *Cell Struct. Funct.*, **28** : 23-29 (2003).
- 25) Walter H. W. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **278**, 33408-33415 (2003).

26) Rollin-Genetet F. *et al.* : *Eur J Biochem.*, **271**, 1299-309 (2004)

27) 淀井淳司、松尾禎之 編 レドックス – ストレス防御の医学
医歯薬出版

28) Kamata H. *Arch. Biochem. Biophys.*, **434** : 16-25 (2005)

29) Nishida M. *et al.* : *Nature*, **408** : 492-495 (2000)

プロテアーゼ消化におけるポリアミンによるペプチド修飾

■略号表

2PyPut : *N*-(2-pyridyl)-1,4-diaminobutane

3PyPut : *N*-(3-pyridyl)-1,4-diaminobutane

AA : amino acid

Ang I : angiotensin I

AcSpd : *N*¹-acetylspermidine

AcSpm : *N*¹-acetylspermine

BSA : bovine serum albumin

CHCA : α -cyano-4-hydroxycinnamic acid

CYT C : cytochrome C horse

DeAdoMet : decarboxylated-*S*-adenosylmethionine

DHB : 2,5-dihydroxybenzoic acid

Dns33 : *N*-[3-(dansylamino)propyl]-1,3-diaminopropane

HB : hemoglobin bovine

HEPES : *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid)

INS : insulin bovine

INS β : insulin β chain bovine

NTCB : 2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid

MALDI-TOF MS : matrix-assisted laser desorption/ionization

time-of-flight mass spectrometry

MSA : 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid

MTA : 5'-methylthioadenosine

ODC : ornithine decarboxylase

PA : polyamine

PAO : polyamine oxidase

PSD : post-source decay

Put : putrescine

Spd : spermidine

SpdSyn : spermidine synthase

Spm : spermine

SpmSyn : spermine synthase

SSAT : spermidine / spermine *N*¹-acetyltransferase

TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride

TFA : trifluoroacetic acid

Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

■緒言

多くの脊椎動物では、腸の成熟は出生後、初期の週で起こることが知られている¹⁾。この成熟は、生物にとって新しい環境、特に新しい食物成分、アレルゲンまたは微生物への適応のために必須である。母乳中にはポリアミンが多く存在し、乳児ラットに対するポリアミンの経口投与は、腸粘膜における構造的、生化学的変化（種々の消化酵素活性の変化など）を引き起こすことが示され、ポリアミンが消化管の正常な発育において重要であることが示唆されている²⁾。

生物は、細胞増殖必須因子として知られているポリアミンを内在性の合成経路によりオルニチンから合成するか、食物中に含まれるポリアミンを腸管から吸収することで細胞に供給している³⁾ (Fig. 1)。成人は一日にポリアミンを350~550 μmol 摂取しているとされている⁴⁾。欧米人の平均的な食事から一日に摂取するポリアミン量をそれぞれ算出すると概ね Put が 220,000 nmol、Spd が 99,000 nmol、Spm が 69,000 nmol となる。摂取した量のポリアミンとして生体内に入る割合はそれぞれ異なり、Put は 29~39%、Spd は 87~96%、Spm は 85~93% であると報告されている⁵⁾。

ポリアミンは多くの生物材料食品に多量に存在しているため、食

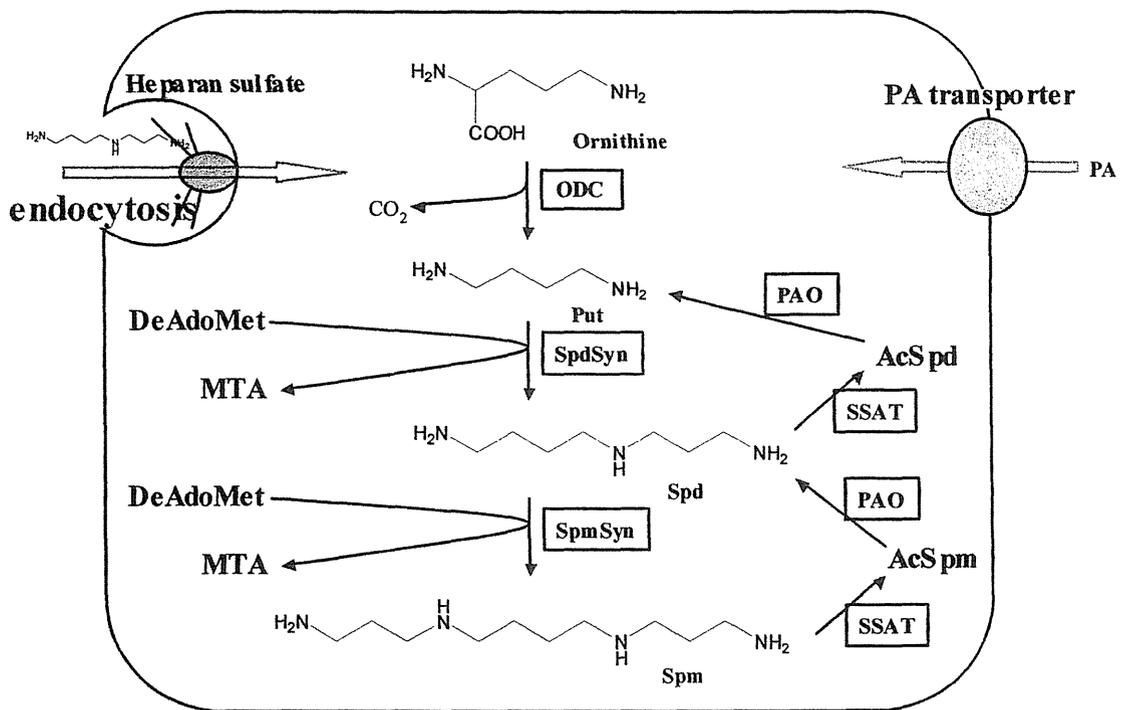


Fig. 1 Polyamine biosynthetic pathway and uptake

物由来のポリアミンが消化管での消化・吸収を修飾している可能性が予想される。しかし、消化管での消化・吸収におけるポリアミンの影響の報告は少なく、特に消化における影響はほとんど検討されていない。

食事中のタンパク質またはポリペプチドはそのままでは吸収されず、胃液に含まれるペプシン、膵液に含まれるトリプシン・キモトリプシン・エラスターゼ・カルボキシペプチダーゼ A・B によりオリゴペプチドやアミノ酸などに酵素消化される。オリゴペプチドは、さらに刷子縁膜ペプチダーゼによりトリペプチド・ジペプチド・アミノ酸に分解される。タンパク質はこのようにして、トリペプチド・ジペプチド・アミノ酸になってはじめて小腸吸収細胞から H^+ /ジ(トリ)ペプチド共輸送系や Na^+ /アミノ酸共輸送系を介して吸収される⁶⁾ (Fig. 2)。

しかしながら、*in situ* 腸管ループを用いインスリンをタンパク分解酵素阻害剤と併用し投与すると血糖降下作用が観察されることから、腸管から高分子が吸収される可能性が示唆されている⁷⁾。

近年、カチオン性の多糖類であるキトサンが、細胞障害をほとんど示さずに高分子物質の膜透過性を著しく促進すると報告されている⁷⁾。さらに、カチオン性ポリマーのポリ-L-アルギニンが細胞膜で

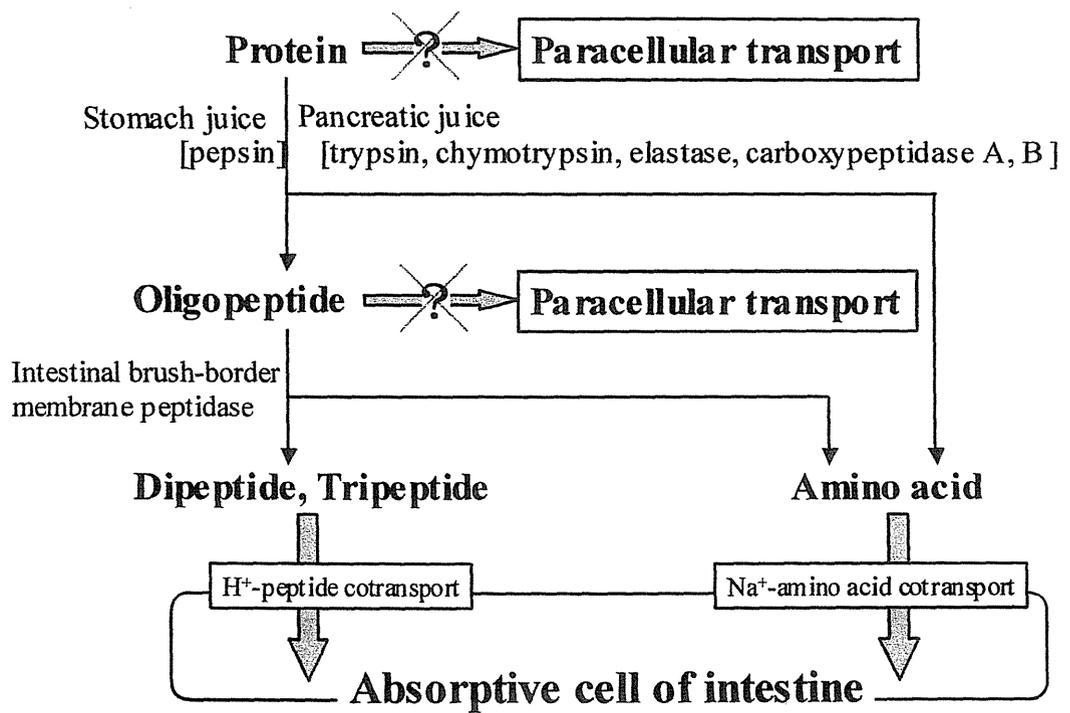


Fig. 2 Digestion and absorption of Protein in intestine

の物質透過を増加させるという報告もある⁸⁾。また、カチオン性物質をタンパク質に結合させることにより細胞膜の透過が亢進したという報告がされている⁹⁾。よって、食事由来のカチオン性物質であるポリアミンが、腸管内でタンパク質の消化・吸収を修飾している可能性は高い。

本研究は消化管に存在するポリアミンがタンパク質の消化・吸収に影響を与える可能性を探ることを目的とした。

腸管での、タンパク質消化の大半を占めているのはセリンプロテアーゼである。セリンプロテアーゼによる消化の反応機構を考察すると、消化の際に、ポリアミンが共存するとタンパク質の断片化したペプチドの C 末端にポリアミンが結合する可能性が示唆された。第一章は消化管に存在するポリアミンがタンパク質の消化に影響を与える可能性を探る研究の一環として、*in vitro* において C 末端ポリアミン修飾ペプチドがセリンプロテアーゼの消化に伴い生成するかどうか検討した。

プロテアーゼによって生じた C 末端ポリアミン修飾ペプチドの生体内への作用を検討する上で、C 末端ポリアミン修飾ペプチドの作製は必要不可欠である。そこで、第二章として、システイン残基の N 端側化学的断片化剤である NTCB を用いた C 末端ポリアミン修飾ペ

プチドの簡便で迅速かつ大量に作製する方法を検討した。

■第一章 タンパク質のプロテアーゼ消化におけるポリアミンによるペプチドC末端修飾

1-1 はじめに

食品中に含まれるポリアミンは体内へのポリアミン供給に使われるほか、近年、腸上皮細胞に対する種々の作用が報告されており、腸の成熟など消化管の正常な発育において重要であることが示唆される。しかしながら、消化におけるポリアミンの影響はほとんど検討されていないのが現状である。

本研究に先立ち、プロテアーゼ処理に伴う¹⁴C標識Putの基質タンパク質への取り込みに関する鈴木らの興味ある報告¹⁰⁾を紹介する。

彼らは、トランスグルタミナーゼ活性測定法を用いて、ジメチルカゼインを¹⁴C標識Put及び、キモトリプシン、ズブチリシン、あるいはパパインを37℃でインキュベートし、反応液をペーパーデスクでろ取したのち、残渣に存在する放射能を検出した結果、Table 1に示すように各プロテアーゼで処理することで残渣に¹⁴C標識Putが残ることを確認している。これはPutが基質タンパク質に結合したことを示している。そして、各プロテアーゼ阻害剤によりPutの基質タンパク質への取り込みが低下することを確認している。そこで彼らは、

6.3 mg/mL Dimethylcasein
0.16 M Tris-HCl
1.0 mM Dithiothreitol
0.4 mM [1.4 ¹⁴ C]Putrescine and Enzyme

Addition	Concentration (ng/mL)	putrescine incorporation (pmol/30 min)
Chymotrypsin	80	2.1±0.1
Subtilisin	240	1.6±0.1
Papain	640	1.4±0.1
BSA	640	0.0±0.0

Table 1 Putrescine-incorporating activities of homogeneously purified proteases

これらのプロテアーゼにトランスグルタミナーゼ様活性があると考察している。

しかしながら、プロテアーゼの反応機構を考察すると別の可能性が考えられた。

セリンプロテアーゼによる反応機構は、まず酵素内セリン残基のポリペプチドアシル炭素への求核置換反応が進行し、アシル-酵素中間体の形成とペプチド（C端側）の遊離がおこり（第1段階）、次いでアシル-酵素中間体への水分子による求核置換反応（加水分解）が進行し、2つ目のペプチド（N端側）が遊離する（第2段階）とされている^{11, 12, 13}。この第2段階の際、水分子による求核置換反応が進行する前に、消化管に存在するポリアミンによるアシル-酵素中間体のアミノリシスがおこれば、第2段階で遊離するペプチドのC末端がポリアミンにより修飾されることになる（Fig. 3）。

Fig. 3には、X線結晶構造解析から明らかになった、キモトリプシンの全容と活性部位を示した。195番目のセリンの近傍が基質認識のポケットとなり、ペプチド鎖は酵素表面の長い溝に横たわるように位置する。したがって、ポリアミンが水分子と競合してアシル-酵素中間体を攻撃することは可能であることが示唆された。

豚由来の3つのセリンプロテアーゼの基質特異性は異なり、トリ

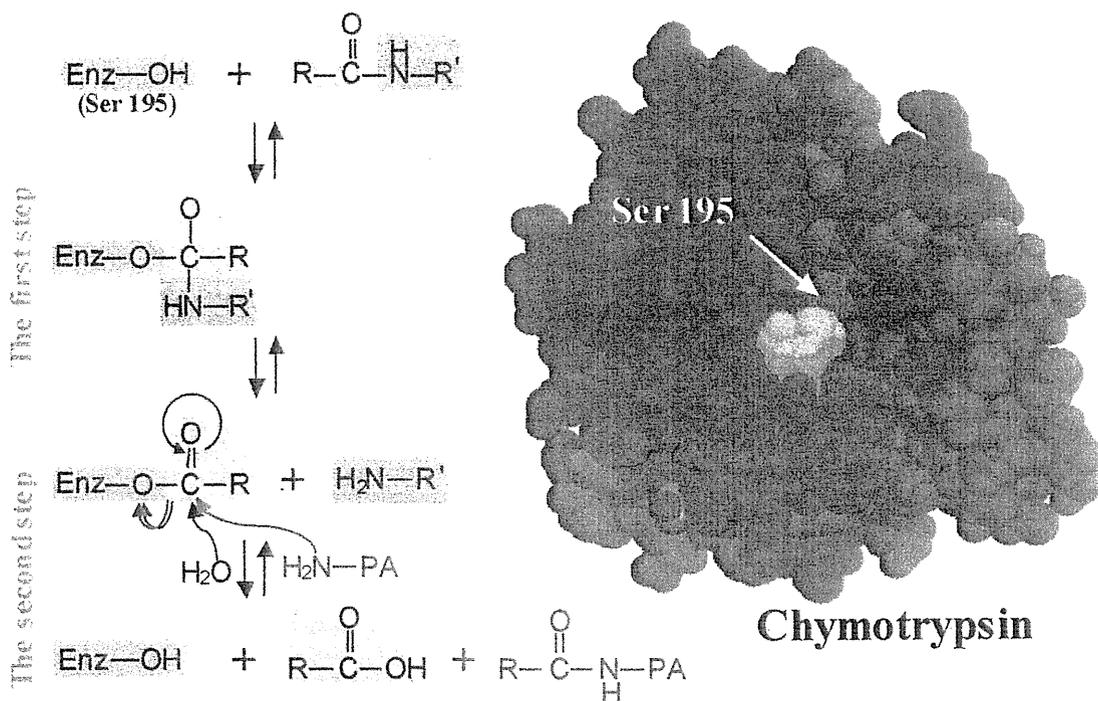


Fig. 3 The mechanism of serine protease-catalyzed amide hydrolysis and aminolysis

プシンはR・Kの塩基性アミノ酸、キモトリプシンはF・Y・W・M・Lの比較的かさ高い疎水性アミノ酸、エラスターゼはL・I・V・A・G・Mの比較的小さい疎水性アミノ酸を認識する (Fig. 4)。しかし、これら3つの酵素の反応機構は同じである⁶⁾。

例えば、Fig. 5に示すようにある基質タンパク質がキモトリプシンにより切断された場合、加水分解とアミノリシスが9:1の割合で起きるとしたら、断片化されたペプチドのC末端の1割がポリアミンにより修飾されることとなる。

小腸でのタンパク質の消化の大半を占めているのがセリンプロテアーゼであり、もし、食事により消化管内ポリアミン濃度が上昇した場合、腸管内においてポリアミン結合ペプチドが生成している可能性は十分考えられる。

本実験は消化管に存在するポリアミンがタンパク質の消化に影響を与える可能性を探る研究の一環として、*in vitro*においてC末端ポリアミン修飾ペプチドがセリンプロテアーゼの消化に伴い生成するかどうか確認することを目的とした。

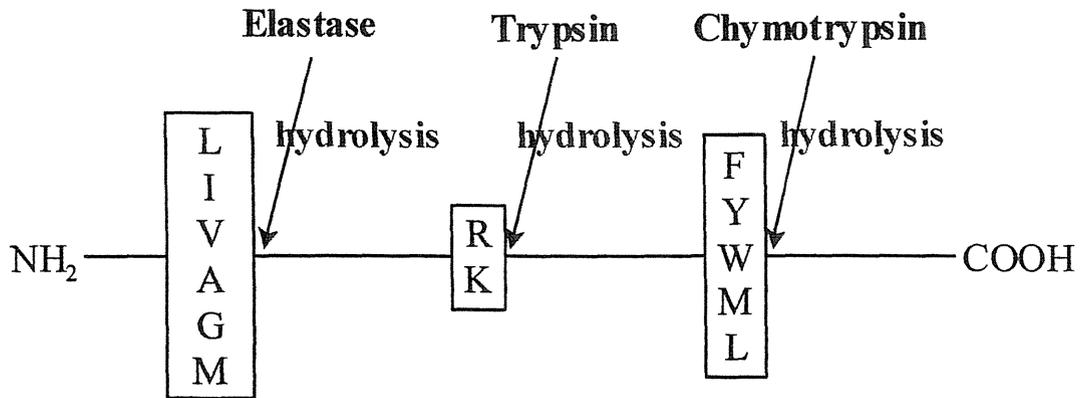


Fig. 4 Substrate specificity of serine proteases

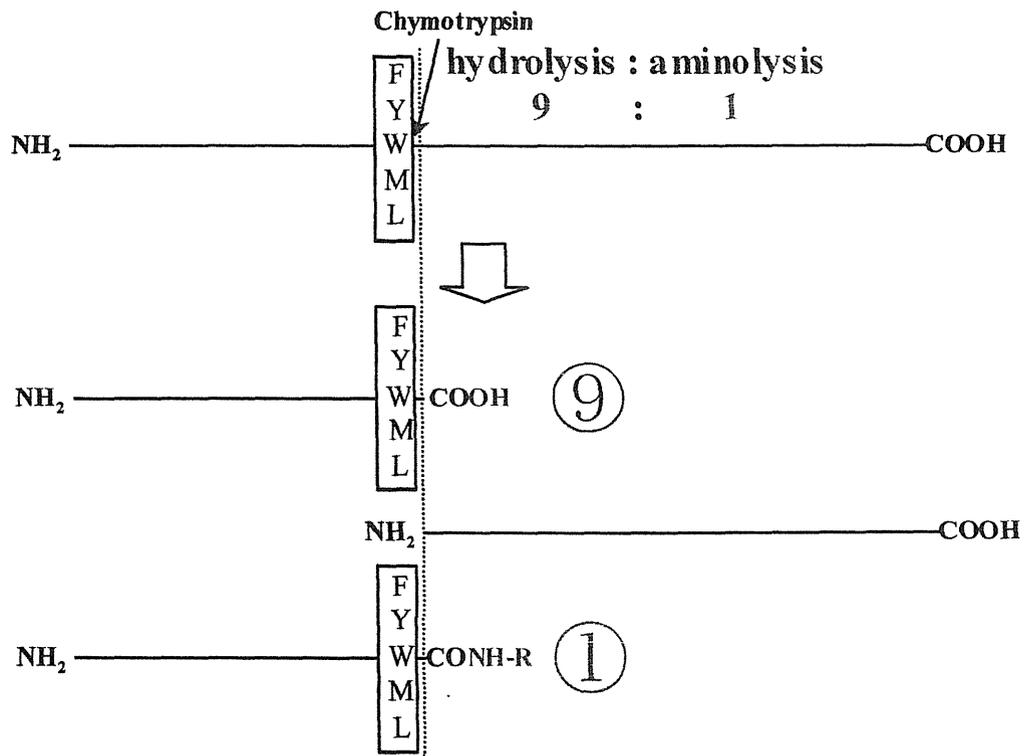


Fig. 5 Serine protease-catalyzed amide hydrolysis and aminolysis

1-2 MALDI-TOF MS 分析及び PSD 分析

プロテアーゼ消化の際に生じると予想される C 末端ポリアミン修飾ペプチドの検出・同定に際し、MALDI-TOF MS 分析及び PSD 分析を用いることとした。そこでまず、今回用いた分析機器の説明をする。

MALDI-TOF MS とは、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化というイオン化法と飛行時間型の質量分離部からなる質量分析装置である (Fig. 6)。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、これに加速電圧をかけることで、ペプチドイオンを一定の方向に飛行させる。その後、進行方向とは逆向きに電場をかけイオン群を折り返させる。このときに、質量の軽いものほど速く飛び、早い段階で折り返すため、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。このことを利用して、ペプチドの質量を測定する分析法である¹⁴⁾。

次に MALDI-TOF MS 分析を応用した PSD 分析を説明する。PSD 分析とはペプチドのアミノ酸配列や修飾部位を解析するための方法で、Fig. 7 に PSD の原理を示した。MALDI で得られる生成イオンから、イオンゲートなどを用い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イオン化させることで、ペプチ

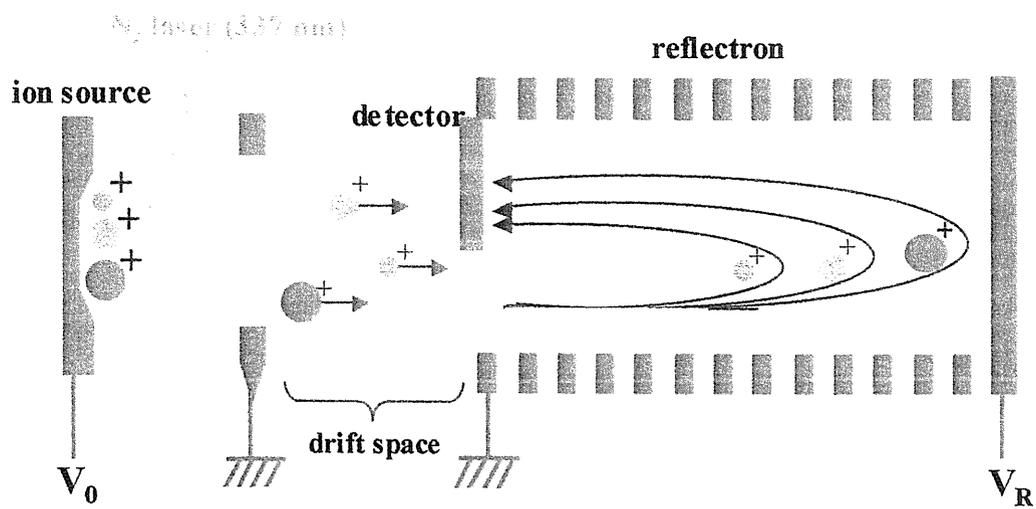


Fig. 6 MALDI-TOF MS analysis

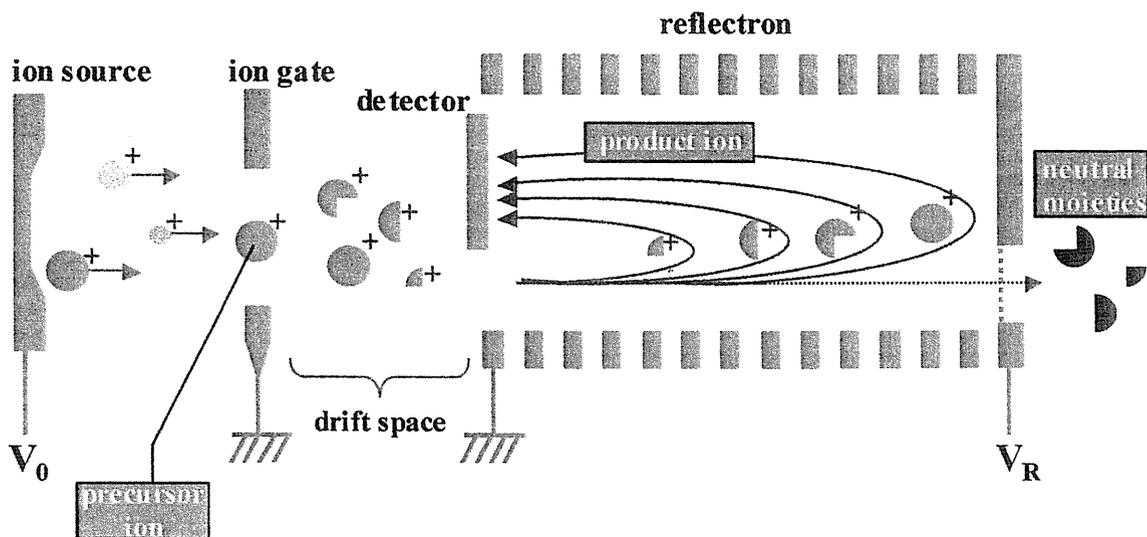


Fig. 7 Principle of PSD (post-source decay) analysis

ドが自己崩壊を起こし、フラグメントイオンが生成される。この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方向とは逆の電場をかけてイオン群を折り返させ、分離する。これが PSD 分析で、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¹⁵⁾。

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がある。その際、Fig. 8 に示すように一ヶ所の切断により、N 末端側を含む b イオンと C 末端側を含む y イオンの 2 種類のイオンの生成が起こる¹⁶⁾。

Fig. 9 に Fig. 8 に示したペプチドの PSD 分析の模式図を示した。縦軸がイオン強度、横軸が分子量/価数 (m/z) となる。例えば、y1 と y2 のフラグメントイオンの分子量の差はアミノ酸 3 の分子量に相当することから、このことを組み合わせることでアミノ酸の配列や修飾位置がわかる。

しかし、337 nm のレーザーを用いて、イオン化しているため、337 nm に過度の吸収を示す物質が共存した場合、イオン化が妨げられ、検出しにくくなるという欠点がある。また、プラスチャージでペプチドを飛行させているため、塩基性アミノ酸を持たないようなペプチドなどは検出しにくいという欠点もある。

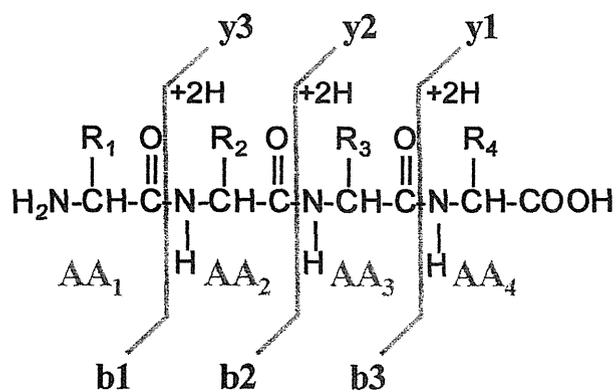


Fig. 8 Nomenclature for fragment ions of peptides

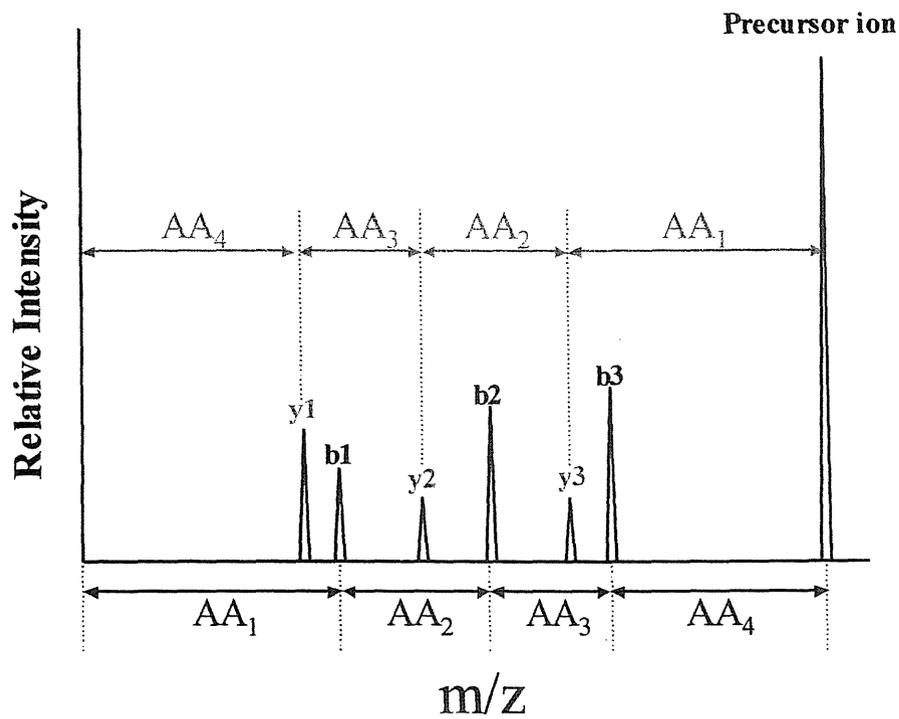


Fig. 9 PSD spectrum

1-3 合成蛍光アルキルアミンの蛍光特性

ポリアミン修飾ペプチドがセリンプロテアーゼによるタンパク質消化に伴い生成するという先ほどの仮説を確認する実験を容易にするため、モデルポリアミンとして蛍光ポリアミン誘導体を用いることとした。

蛍光ポリアミン誘導体の選出にあたり、以下の 3 つの条件を挙げた。

第一に、微量しか修飾ペプチドが生成しないことが予想されたので、HPLC にて高感度に検出するために強い蛍光強度を有すること。第二に、酵素反応の基質として用いるため、小さい蛍光団であること。第三に、MALDI-TOF MS 分析で検出できるように、337nm に吸収を殆ど示さず、かつ、検出しやすくなるように修飾後にプラス電荷をもつこと。

Table 2 は、候補ポリアミンとして合成した 2PyPut、3PyPut 及び DNS33 の種々の液性下での蛍光強度を比較した結果である。この結果より、上記の 3 条件を満足する 2PyPut をモデルポリアミンとして用い以下の実験を行うこととした。

2PyPut の励起スペクトルと蛍光スペクトルを Fig. 10 に示した。337 nm に大きな吸収を示さないことが確認できた。

Compound 1.5 μ M	0.1 M HCl	H ₂ O	0.1 M NaOH
2PyPut	24.6 Ex308 Em393	18.9 Ex300 Em370	8.5 Ex299 Em372
3PyPut	7.6 Ex259 Em422	8.6 Ex242 Em381	12.8 Ex248 Em386
Dns33	0.5 Ex321 Em549	1.3 Ex332 Em545	3.8 Ex315 Em544

1.50 μ M (-)-quinine = 100 (0.1 M H₂SO₄)
Ex 350 nm Em 454 nm

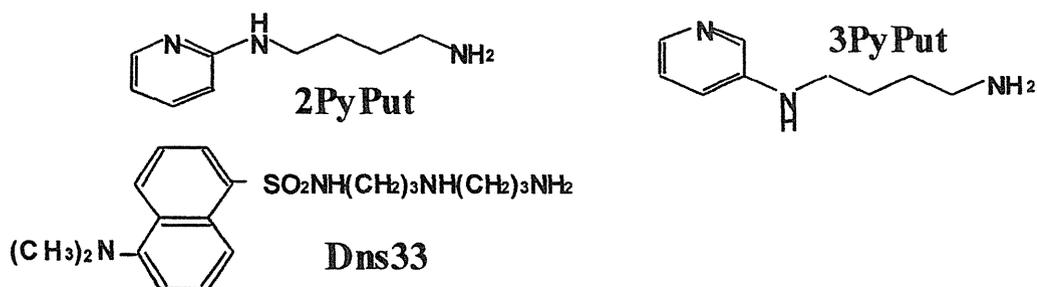


Table 2 Relative fluorescence intensities of alkylamine

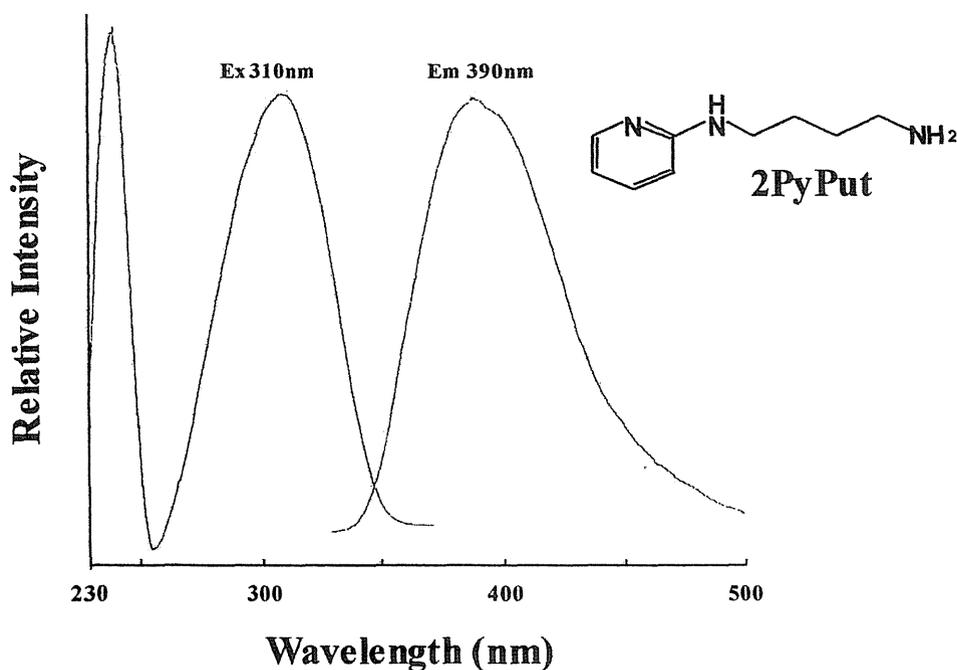


Fig. 10 Excitation and Emission Spectra of 2PyPut in
0.1% TFA / 5% acetonitrile

1-4 プロテアーゼ消化による C 末端 2PyPut 修飾ペプチドの生成の確認

蛍光ポリアミン誘導体として前節において有用であると確認した 2PyPut を用い、*in vitro* において C 末端修飾ペプチドの生成を以下のように確認を行った。

酵素としてはタンパク質消化において中心的な役割を示すトリプシン、キモトリプシン、エラスターゼを用い、消化されるタンパク質としては Cyt C、HB を用いた。Cyt C と HB は変性剤を用いることなく各酵素により容易に断片化されるため、これらを用いた。1 mg/mL の Cyt C または HB に 0.8 M 2PyPut 存在下、トリプシン、キモトリプシン及びエラスターゼにより、pH 9.4 で、それぞれ 37 °C、16 時間処理した (Fig. 11)。

まず、トリプシンについての結果を示す。

Fig. 12 には HB について 2PyPut 有無でトリプシン処理した場合の HPLC 分析の結果を示した。

上がコントロール (2PyPut 非存在下)、下が 2PyPut 存在下トリプシン消化したもので、2PyPut の励起波長 310 nm、発光波長 390 nm で検出している (HPLC conditions 1st)。この波長ではトリプトファンも検出してしまうため、コントロール試料にもピークが見られた。

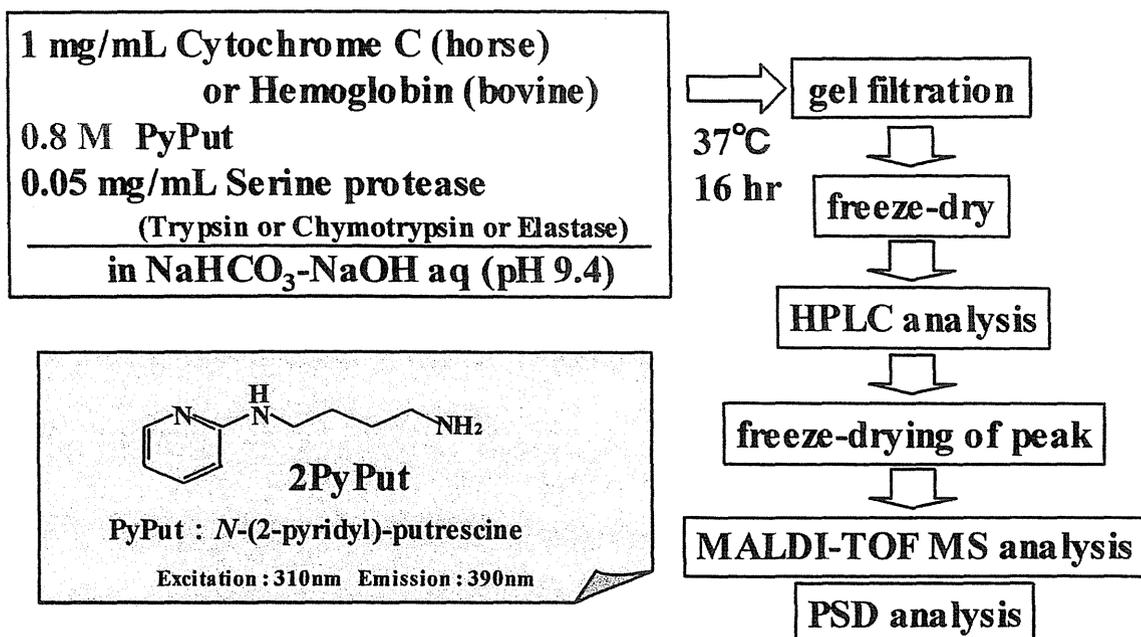


Fig. 11 Method of C-terminus labeling by protease-catalyzed digestion

Detection : Ex 310 nm Em 390 nm

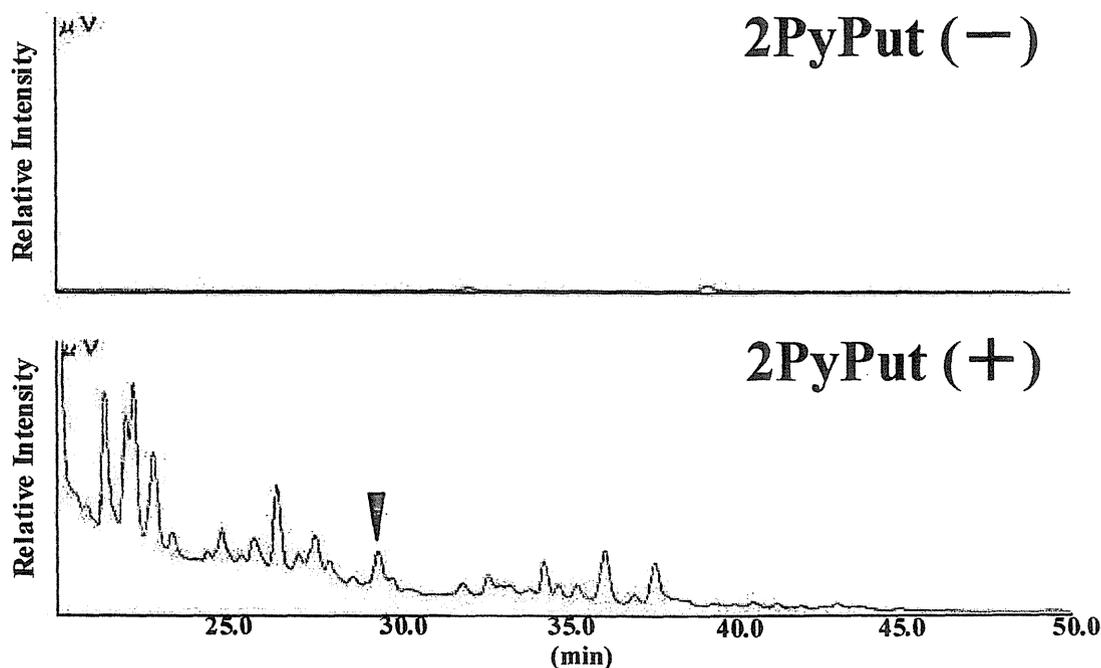


Fig. 12 HPLC chromatograms of hemoglobin after tryptic digestion with and without 2PyPut

2PyPut 存在下ではピークが数多く検出され、2PyPut が多数のペプチドを修飾していることが示唆された。これらのピークを分取し、MALDI-TOF MS 分析を行い理論値と一致したものについて PSD 分析を行った。以下に、Fig. 12 中に矢印で示したピークに含まれていたペプチド分析の結果を例にして説明する。

Fig. 13 には、その分取サンプルについての MALDI-TOF MS 分析の結果を示した。HB の α サブユニットの 17 から 31 番目に相当する断片化したペプチドに 2PyPut が修飾されたペプチドの分子量 1676.5 Da のピークが確認された。

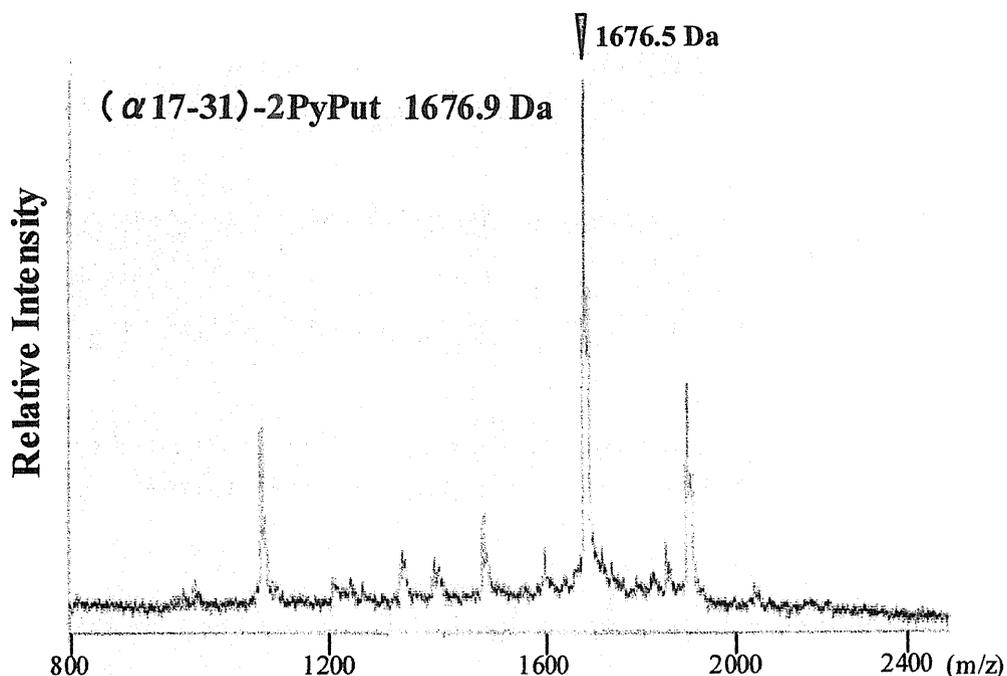


Fig. 13 MALDI-TOF MS spectrum of 2PyPut labeled peptide

Fig. 14にはHBの α 、 β サブユニットとCyt Cのアミノ酸配列中に、このように検出して確認できた修飾されたペプチドを四角で示した。なお、シーケンスに縦に入れた線は酵素による切断部位を示している。修飾は複数のペプチド断片に起こっていることが示唆された。

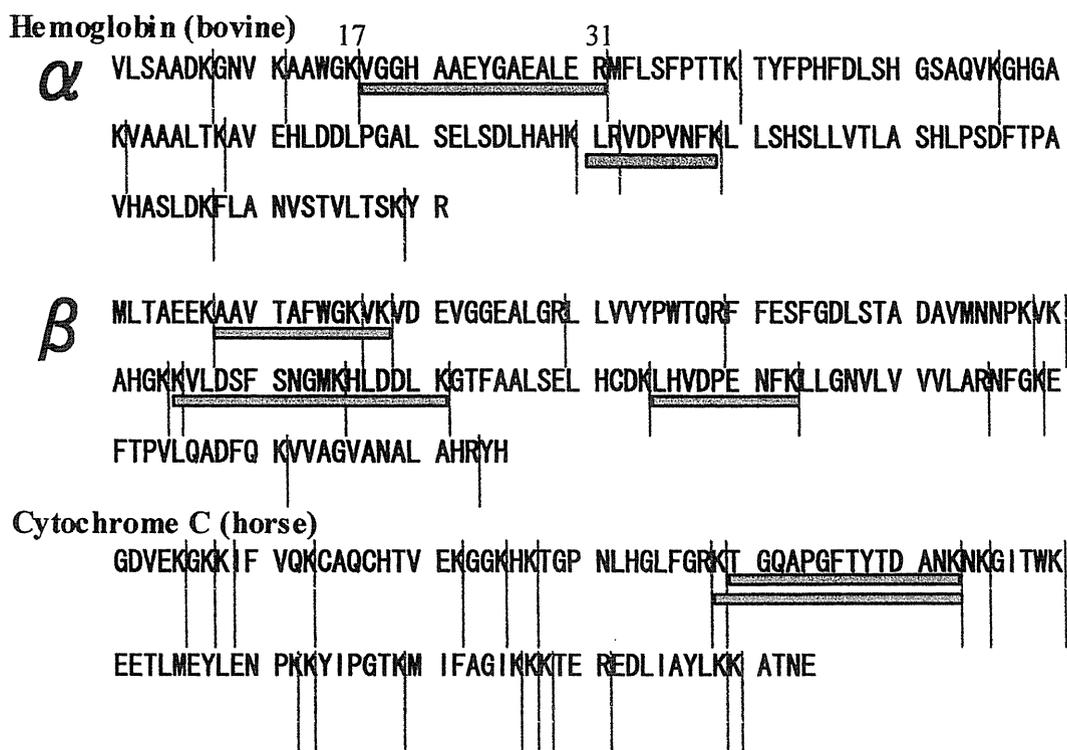


Fig. 14 Sequence of 2PyPut labeled peptides detected with MALDI-TOF MS spectrometry after digestion by trypsin

Fig. 15 は、先ほどの 1676.9Da のペプチドについて PSD 分析を行った結果で、y 系列 1~9 までのピークが観察され、C末端に 2PyPut が修飾されていることが確認された。

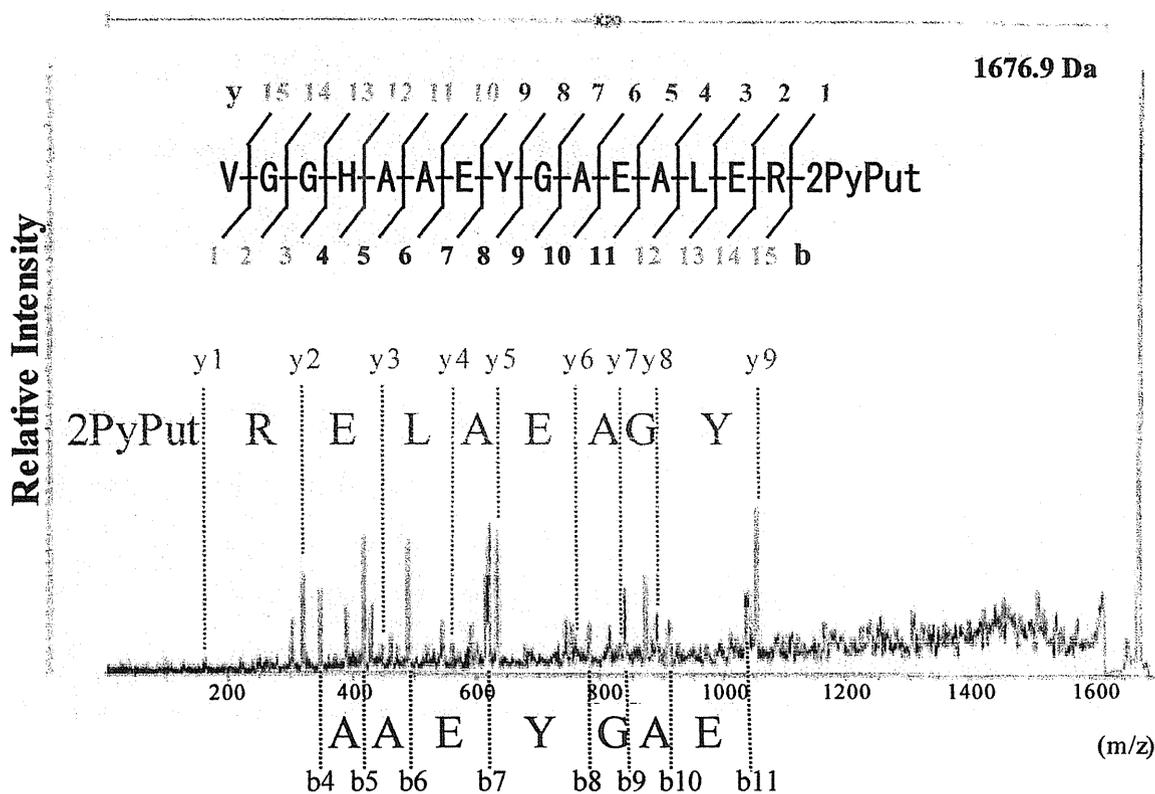


Fig. 15 Confirmation of C-terminus labeling by PSD analysis

次に、キモトリプシン処理の結果を示す。先ほどと同様に HB を 2PyPut 存在下キモトリプシン処理した後、HPLC にて分析した (Fig. 16-a)。Fig. 16-a の矢印で示したピークを HPLC にて分取し、MALDI-TOF MS 分析を行ったところ HB の α サブユニットの 1 から 24 番目に相当する修飾ペプチド (MW 2546 Da) であることが確認された (Fig. 16-b)。Fig. 17 には、HB の α 、 β サブユニットと Cyt C 中に、このように検出して確認できた修飾されたペプチド配列を示した。修飾されていると思われる断片化ペプチドは多数検出された。先ほどの 2546 Da のピークを PSD 分析したところ C 末端に 2PyPut が修飾されていることが確認された (Fig. 18)。

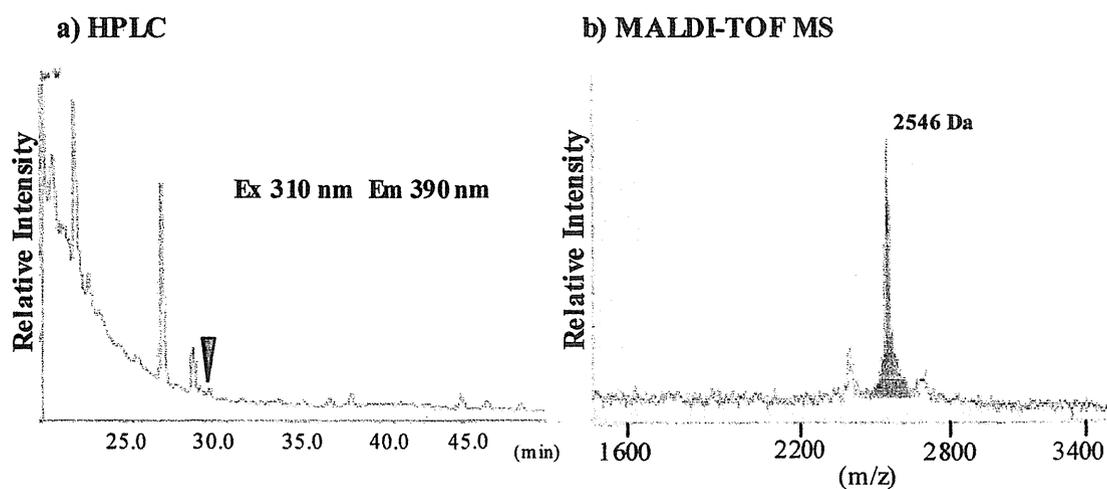
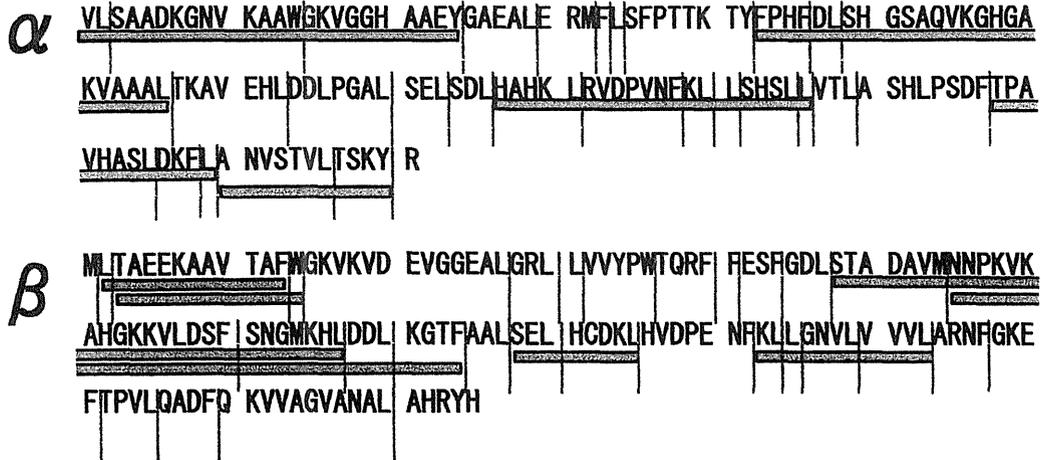


Fig. 16

- a) HPLC chromatogram of hemoglobin after chymotryptic digestion
- b) MALDI-TOF MS spectrum of 2PyPut labeled peptide

Hemoglobin (bovine)



Cytochrome C (horse)



Fig. 17 Sequence of 2PyPut labeled peptides detected with MALDI-TOF MS spectrometry after digestion by chymotrypsin

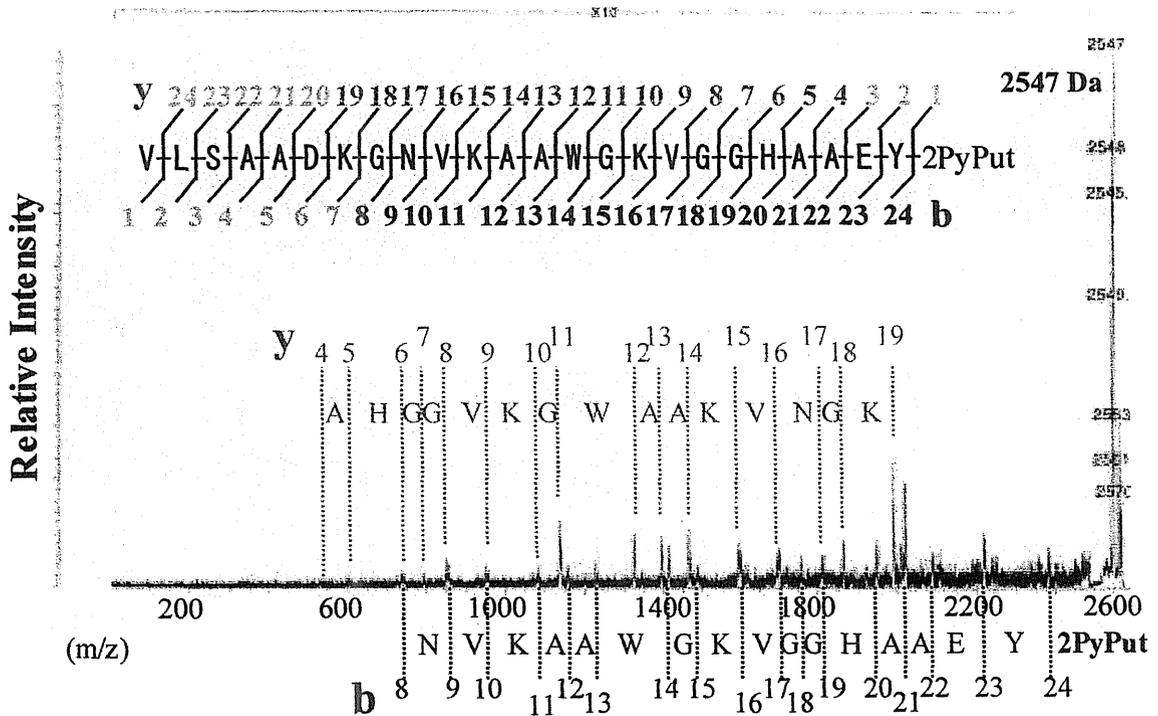


Fig. 18 Confirmation of C-terminus labeling by PSD analysis

最後に、エラスターゼ処理の結果を示す。先ほどと同様に CYT C を 2PyPut 存在下エラスターゼ処理した後、HPLC にて分析した (Fig. 19-a)。Fig. 19-a の矢印で示したピークを HPLC にて分取し、MALDI-TOF MS 分析を行ったところ CYT C の 35 から 41 番目に相当する修飾ペプチド (MW 924 Da) であることが確認された (Fig. 19-b)。Fig. 20 には、HB の α 、 β サブユニットと Cyt C 中に、このように検出して確認できた、修飾されたペプチド配列を示した。修飾されていると思われる断片化ペプチドは多数検出された。先ほどの 924 Da のピークを PSD 分析したところ C 末端に 2PyPut が修飾されていることが確認された (Fig. 21)。

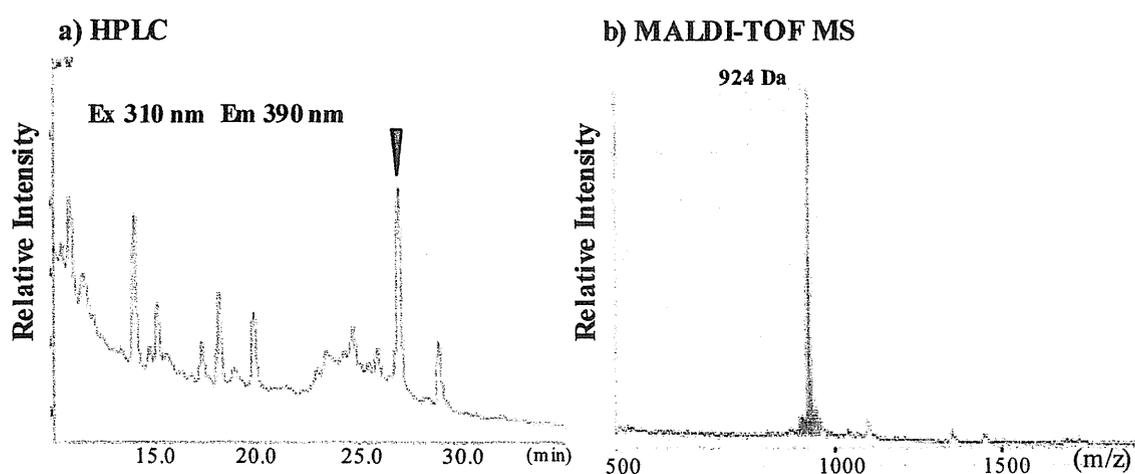
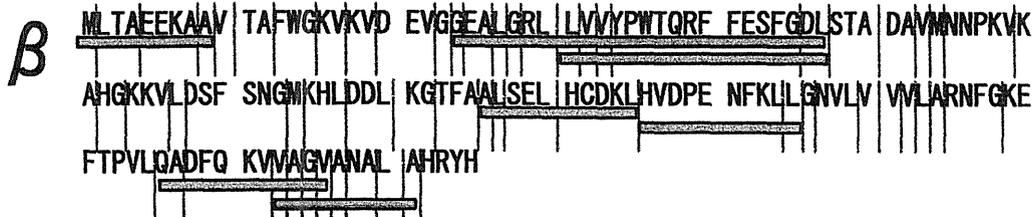
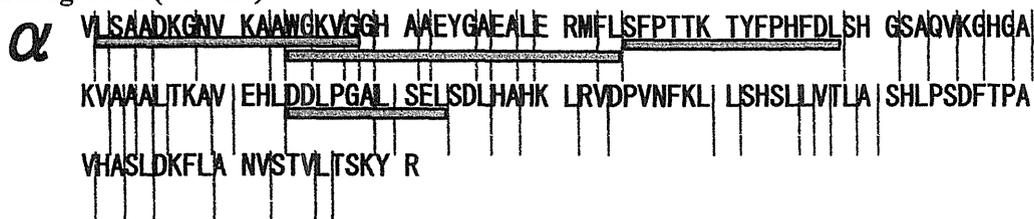


Fig. 19

a) HPLC chromatogram of Cytochrome C after digestion by elastase
b) MALDI-TOF MS spectrum of 2PyPut labeled peptide

Hemoglobin (bovine)



Cytochrome C (horse)

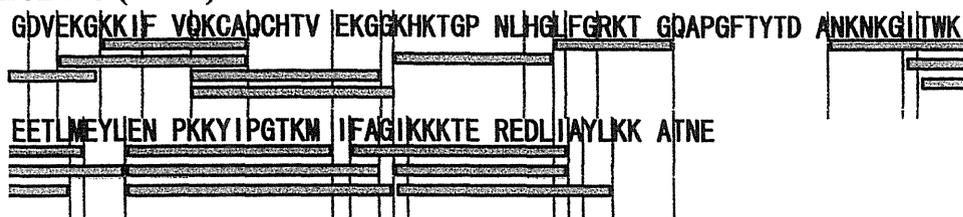


Fig. 20 Sequence of 2PyPut labeled peptides detected with MALDI-TOF MS spectrometry after digestion by elastase

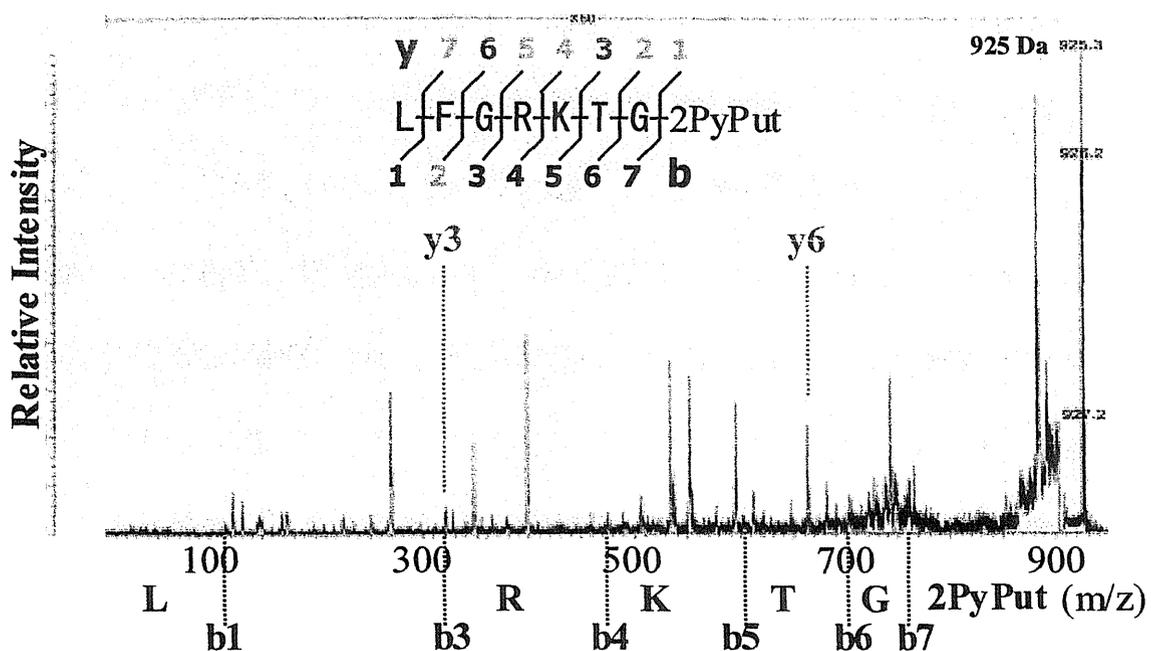


Fig. 21 Confirmation of C-terminus labeling by PSD analysis

以上の結果から、セリンプロテアーゼによるタンパク質消化の際、ポリアミンなどのアルキルアミンが共存すれば、ペプチドの C 末端に修飾が起こることは間違いないものと思われた。

1-5 プロテアーゼ消化に伴う C 末端修飾の修飾率

消化管内でどの程度の割合で修飾が起きているか推察するため、先ほどの HB を 2PyPut 存在下キモトリプシン処理した試料を用いて、ペプチド C 末端への修飾率を求めた。トリプトファンを持つペプチド (HB α 鎖 1~24) について、未修飾ペプチド (Ⅲ) と、2PyPut 修飾ペプチド (Ⅳ) のピークを比較することで求めた (Fig. 22)。

Fig. 22 の上が 220 nm で測定したクロマトグラム、下が トリプトファンの蛍光すなわち励起波長 280 nm 発光波長 320 nm で測定したクロマトグラムを示している。I で示されているトリプトファンを含まない 2PyPut 修飾ペプチドが下段において、検出されないことから、検出励起波長 280 nm 発光波長 320 nm では 2PyPut は検出されないことが確認できた。このため、トリプトファンを含むペプチドについて修飾ペプチド及び未修飾ペプチドの存在量をトリプトファンの蛍光強度から比べることができると考えられる。

その結果、Fig. 22 に示すように キモトリプシンにより生じる 1 つ

の修飾ペプチドはHPLCクロマトグラム上、未修飾ペプチドの約1%のピーク面積であることがわかり、修飾が%オーダーで起こることが示唆された。

修飾率の違いは、修飾部位の前後の配列や立体的な位置に影響されると考えている。修飾率については、これからさらに検討する予定である。

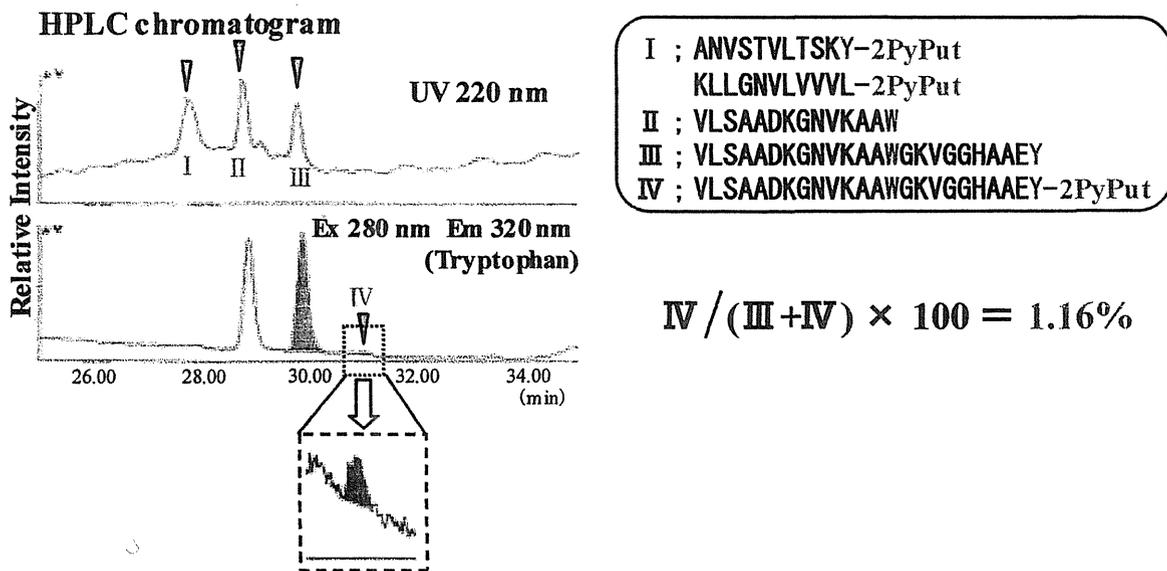


Fig. 22 Rate of C-terminus labeling

1-6 修飾の条件検討

アルカリ条件下かつ高濃度の 2PyPut 存在下において C 末端修飾反応が起きることが確認されたので、次に、このセリンプロテアーゼ消化に伴う断片化反応が生理的条件下で進行するか確認するために、HB のトリプシン消化をモデル実験として種々条件検討した。HPLC conditions 2nd にて β 鎖 95-103 の 2PyPut 修飾ペプチド (LHVDPENFK-2PyPut) を示す保持時間 37.8 分のピークを A とし、 α 鎖 17-31 の 2PyPut 修飾ペプチド (VGGHAAEYGAEALER-2PyPut) を示す保持時間 39.5 分のピークを B として、A と B を指標に評価した (Fig. 23)。なお、各種条件において検出された A、B のピークは、

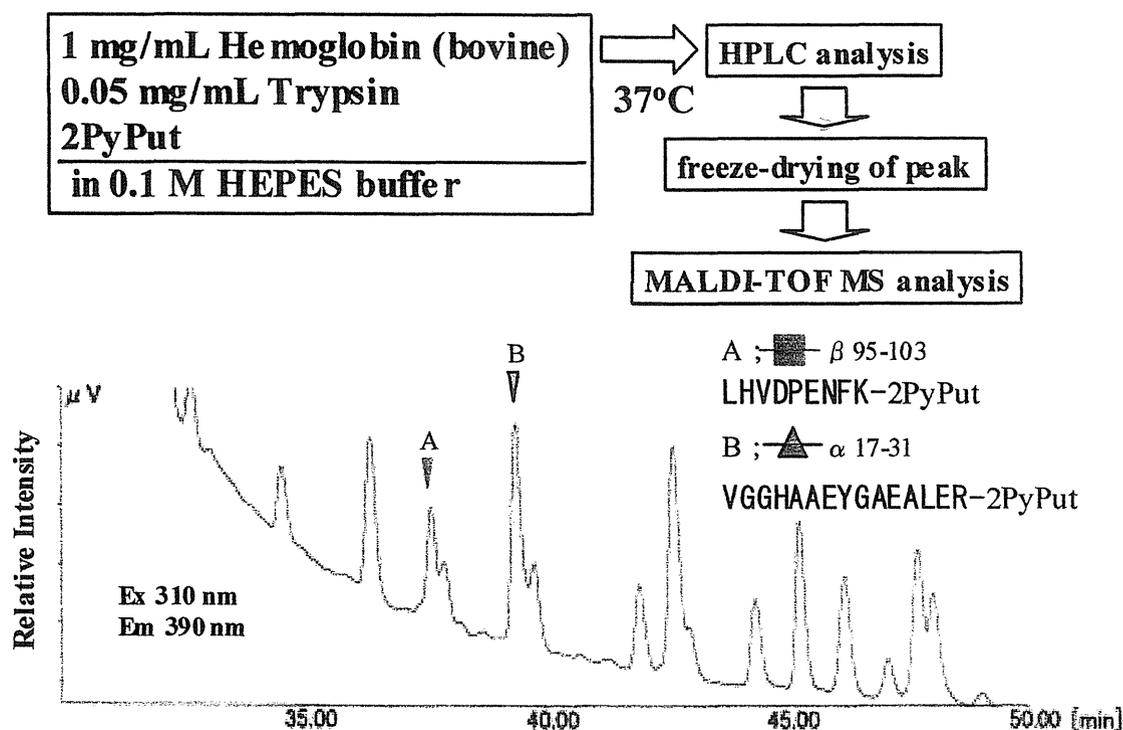


Fig. 23 HPLC chromatogram of hemoglobin after tryptic digestion with 2PyPut

MALDI-TOF MS 分析により 2PyPut 修飾ペプチドであることを確認した。

まず、1 mg/mL HB に 50 mM 2PyPut 存在下、pH 7.6 でトリプシンにより処理した際の修飾ペプチド生成のタイムコースを観察したところ、2 種の修飾ペプチドの生成速度が異なる結果が得られた (Fig. 24)。これは、 β 鎖 95-103 は HB の立体構造の内側に存在し、立体障害のため修飾されず、ある程度タンパク質の断片化が進んでから修飾が起こるためではないかと考えている。また、この結果から、1 時間程度の時間で、ペプチドの修飾が起こることが判明した。

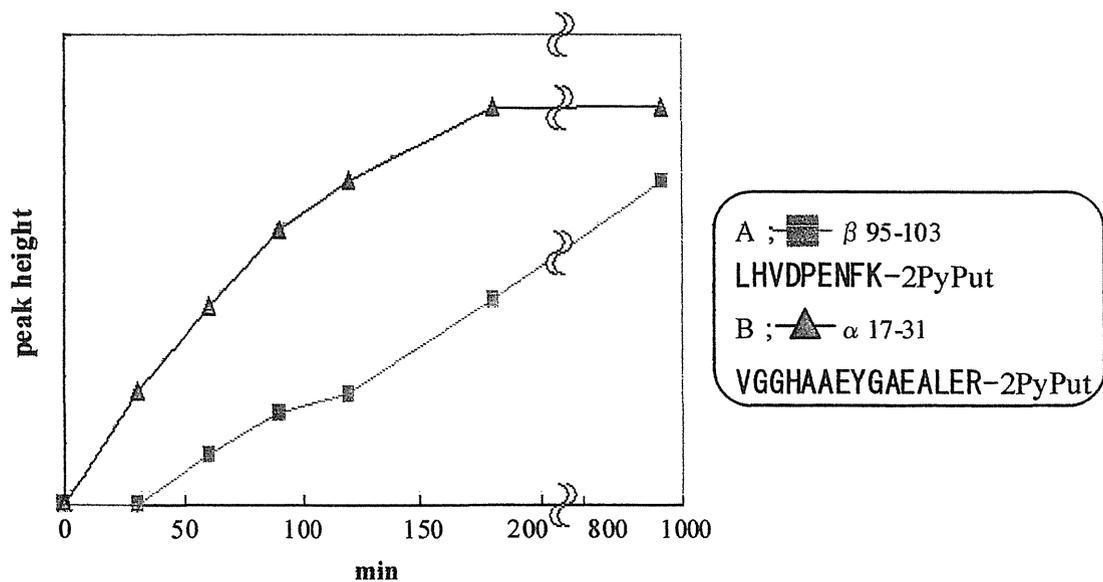


Fig. 24 Time dependency of C-terminus labeling reaction

次に、pHの影響を検討した。その結果、pH 6.9 から 8.0 まで修飾ペプチドの生成量にはそれほど変化がないことが判った (Fig. 25)。

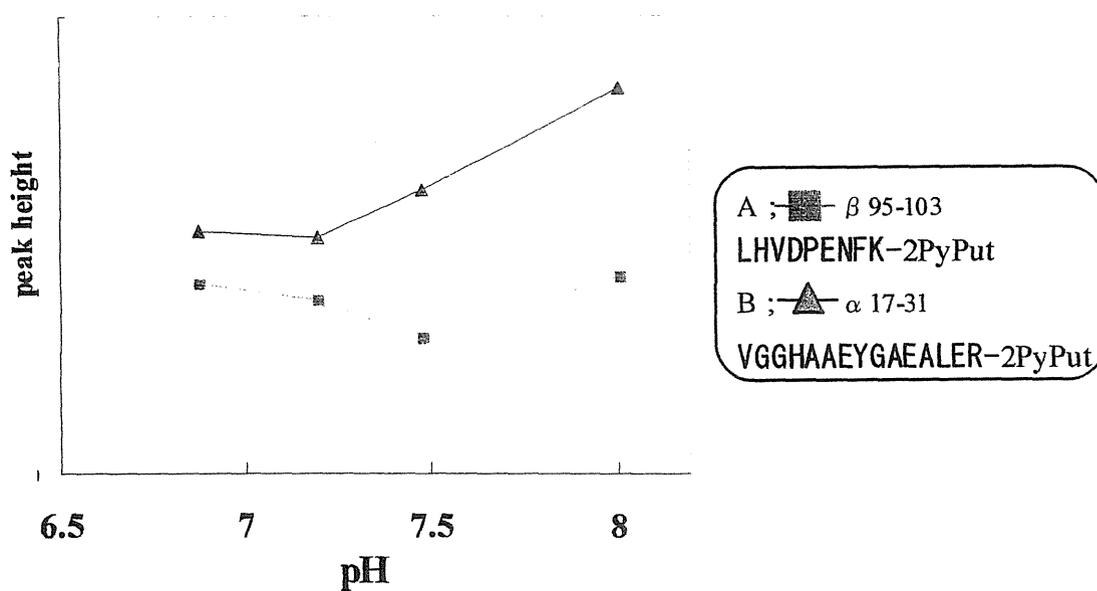


Fig. 25 pH dependency of C-terminus labeling reaction

最後に、2PyPut 濃度の影響を検討した。HB に 0.5 から 50 mM の 2PyPut 存在下、トリプシンで 16 時間処理した結果、A、B ともに 0.5 ~50 mM 2PyPut 存在下において、修飾ペプチドの生成を確認することができ、2PyPut が 0.5 mM と低濃度でもペプチドへの標識が起こることが判明した (Fig. 26)。

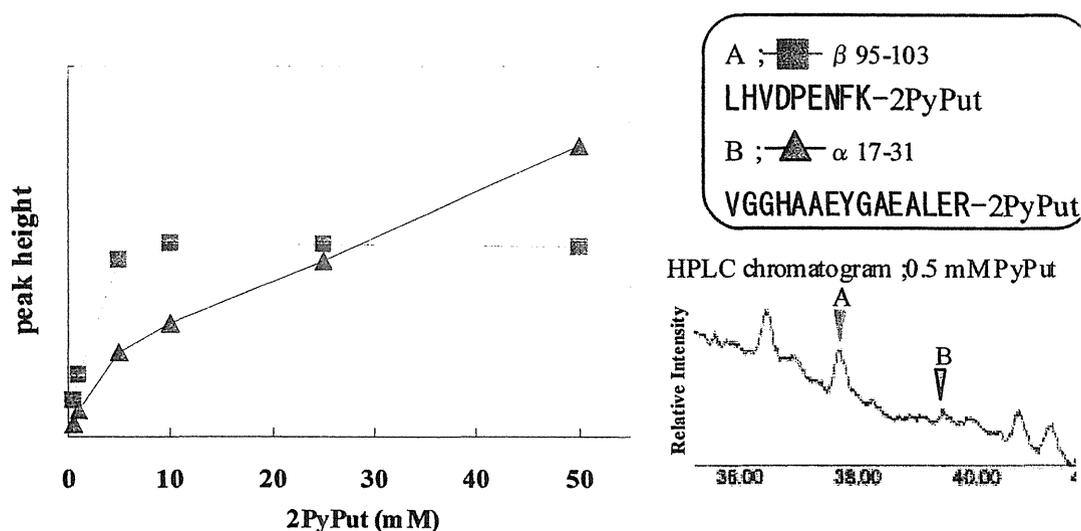


Fig. 26 2PyPut concentration dependency of C-terminus labeling reaction

これらの条件検討の結果からプロテアーゼによる C 末端修飾反応は生理的な条件で十分に起こるものと思われた。

1-7 プロテアーゼ消化による C 末端ポリアミン修飾ペプチドの確認

モデルポリアミンである 2PyPut でペプチドへの修飾がおこることが確認できたので、生理的条件に近い条件で断片化ペプチドの C 末端がポリアミンにより修飾されるかどうか確認を行った。1 mg/mL HB に 1 mM の Spd あるいは Spm 存在下、pH 7.5 で、それぞれトリプシンにより 37 °C、16 時間処理した。HPLC によりピークを分取し、MALDI-TOF MS 分析、PSD 分析を行った。

ポリアミンは蛍光を有しないため、HPLC にて標識ペプチドを蛍光を指標にして分取することができないので、ペプチド溶出部分のすべてから検出、同定を試みた。

Fig. 27 には Spd 存在下で得られたペプチドの MALDI-TOF MS 分析と PSD 分析の結果を示した。Spd 存在下では、ヘモグロビンの α サブユニットの 17~31 番目の断片化ペプチドに Spd が修飾されたペプチドの分子量である 1656.9 Da に相当するピークを MALDI-TOF MS 分析で確認できた。このピークは、未修飾ペプチド、すなわち C 末端がカルボン酸として切断された時に比べて 127.0 Da 大きく理論値と一致した。これを PSD 分析したところ b 系列 3 から 15 までのピークが観察され、C 末端に Spd が修飾されていることが確認された。

Fig. 28 には Spm 存在下で得られたペプチドの MALDI-TOF MS 分析と PSD 分析の結果を示した。Spm 存在下でも、同様に、C 末端に Spm が修飾されていることを確認できた。

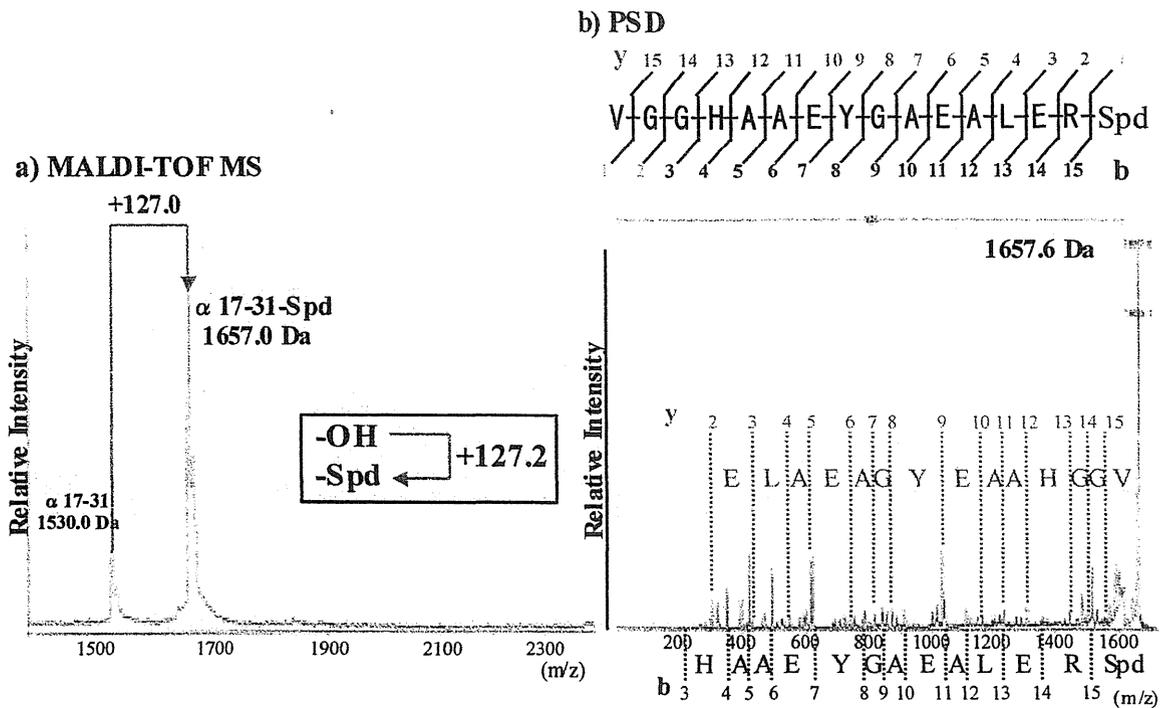


Fig. 27 a) MALDI-TOF MS spectrum of spermidine labeled peptide
b) Confirmation of C-terminus labeling by PSD analysis

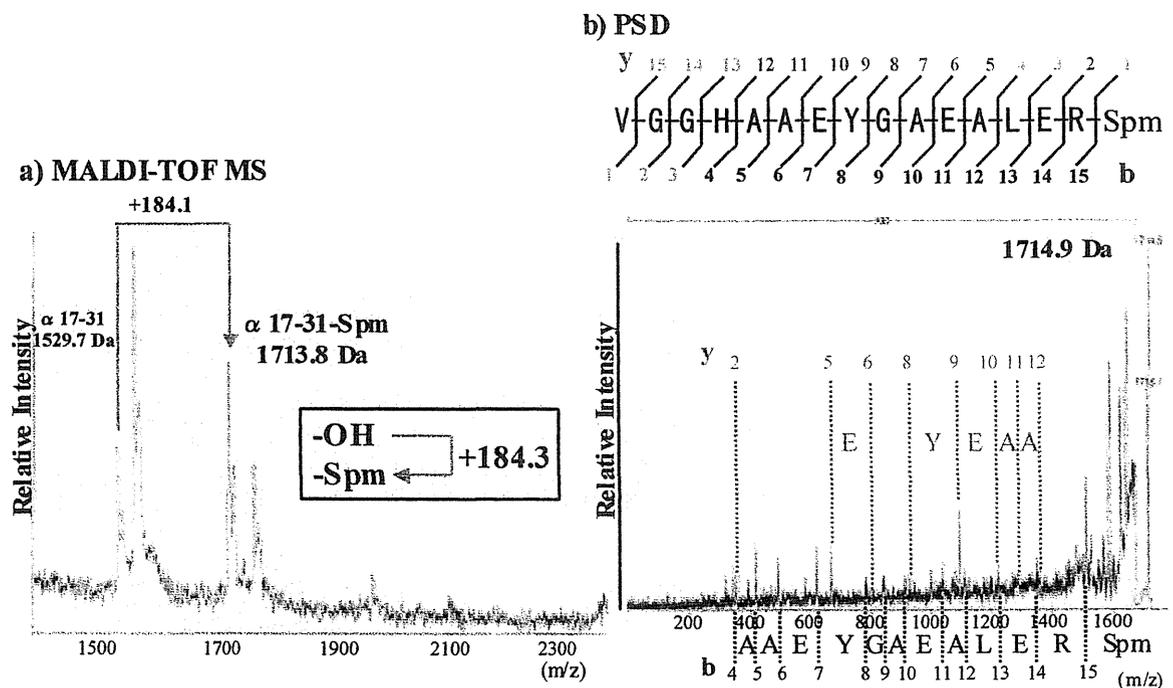


Fig. 28 a) MALDI-TOF MS spectrum of spermine labeled peptide
b) Confirmation of C-terminus labeling by PSD analysis

1-8 まとめ

タンパク質のセリンプロテアーゼ消化の際に、断片化したペプチドの C 末端が共存するポリアミンなどのアルキルアミンによって修飾されることを見出した。

また、今回モデル化合物として用いた 2PyPut が HPLC 分析及び MALDI-TOF MS 分析の検出において有用な試薬であることが確認できた。

食事直後の腸管内ポリアミン濃度は mM レベルに達することが知られている。したがって、以上の結果は消化管内で、ポリアミン修飾ペプチドが生成することを示唆しているものと考えられる。

1-9 C末端ポリアミン修飾ペプチドの作用の可能性

最後にC末端ポリアミン修飾ペプチド及びC末端ポリアミン修飾アミノ酸の生体での作用の可能性について言及する (Fig. 29)。

腸管内において、ポリアミン修飾ペプチドが生成した場合、第一に腸管からの吸収に影響を与える可能性が考えられる。哺乳類においては、摂取されたタンパク質は、加水分解されてトリペプチド、ジペプチド、アミノ酸になり小腸から吸収され、オリゴペプチドさらにポリペプチドの腸管からの吸収はされにくいとされている。しかし、ペプチドがポリアミンにより修飾されることにより、腸管のポリアミンの透過経路を通過できるようになり吸収されやすくなることは十分考えられる。

分子量の大きいペプチドは、ヘパランサルフェートを介したエンドサイトーシスにより取り込まれ¹⁷⁾、分子量の小さいものは、ポリアミントランスポーター¹⁸⁾により取り込まれる可能性があるのではないかと考えている。また、分子量に関わらず、細胞間隙からの透過が促進される可能性も考えられる。

また、カチオン性物質をタンパク質に結合させることにより細胞膜の透過が亢進したという報告がされていることから、ポリアミンで修飾されたペプチドは細胞膜の透過能が亢進する可能性がある。

第二に、吸収された後、腸管細胞に対し作用する可能性がある。

そして、第三に、吸収されたポリアミン修飾ペプチドが全身循環器系に入ったならば、アレルギー反応に関わる可能性や、組織に対して作用を及ぼす可能性がある。

また、ポリアミンが結合したタンパク質が、ラット血液脳関門を通過しやすくなるという報告¹⁹⁾があることから、脳に何らかの作用を及ぼす可能性も考えられる。

さらに、今回は食物由来のポリアミンを用いて行ったが、1級アミノ基を持つ薬物などが腸溶製剤などで投与された場合、消化管で高濃度になりプロテアーゼにより断片化されたペプチドに修飾される可能性がある。そして、薬物修飾ペプチドが生体内に何らかの影響を与えている可能性がある。

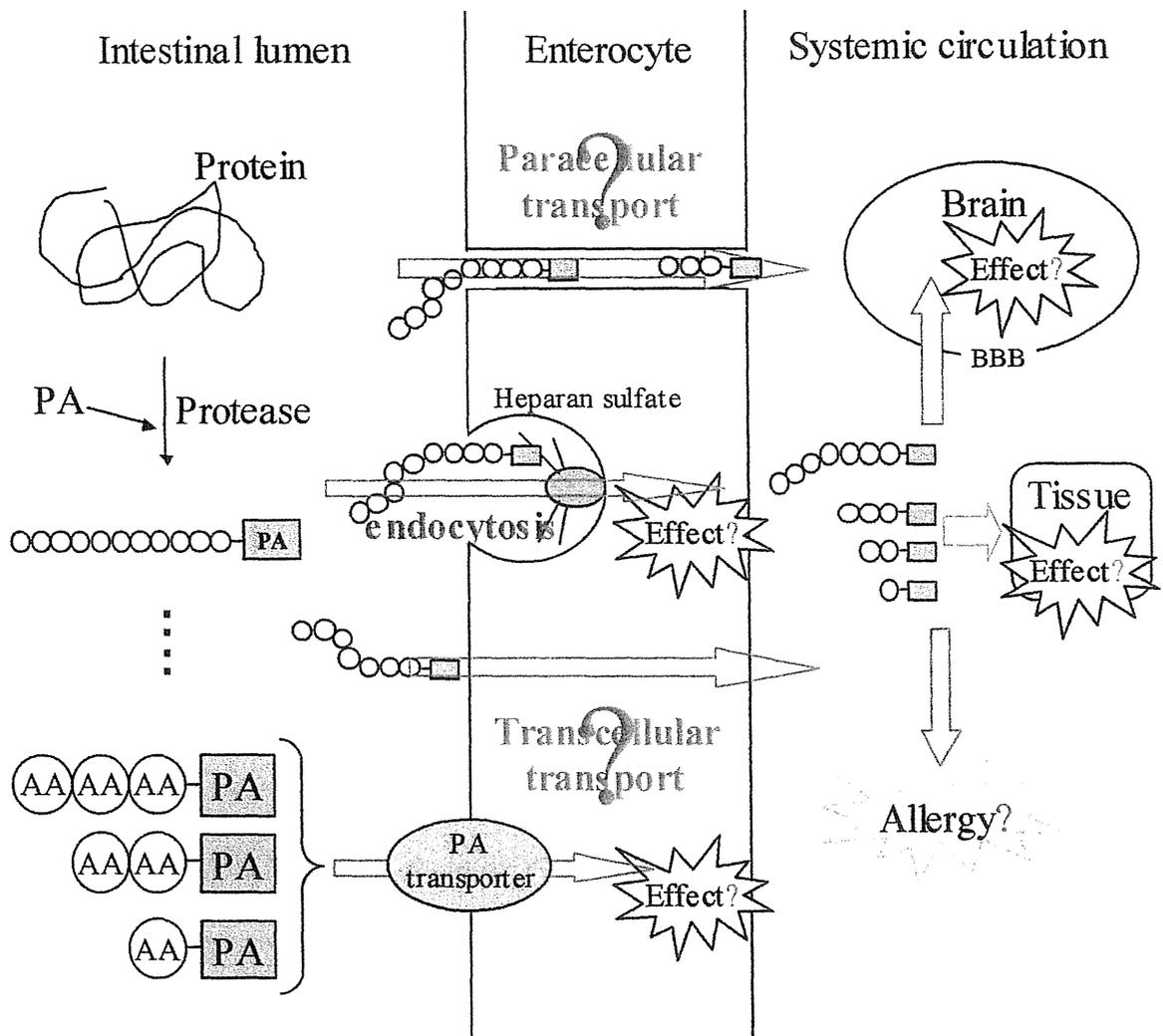


Fig. 29 Possible effect of polyamine-labeled peptide

■第二章 C末端ポリアミン修飾ペプチドの作製法の検討

2-1 はじめに

前述のように、生体内で C 末端ポリアミン修飾ペプチドが生成した場合、腸管の透過の亢進や組織・細胞に対する作用が生じる可能性がある。これらのことを確認する際に C 末端ポリアミン修飾ペプチドの作製が必要不可欠となる。

近年、当研究室の矢敷らは、システイン残基の N 端側化学的断片化剤である NTCB を用いた断片化ペプチドへのアルキルアミンの C 末端標識法を見出している^{20, 21)}。NTCB は、タンパク質中のシステイン残基をシアノ化したのちアルカリ条件下でペプチドを切断するシステインの N 端側切断試薬として知られている。この切断反応時にアルキルアミンを添加すると、切断部位の N 端にイミノチアゾリン環が生成し、C 端にアルキルアミンが導入される (Fig. 30)。この方法を用いて、C 末端ポリアミン修飾ペプチドを作製するため、簡便で迅速かつ大量に作製できる条件を検討した。

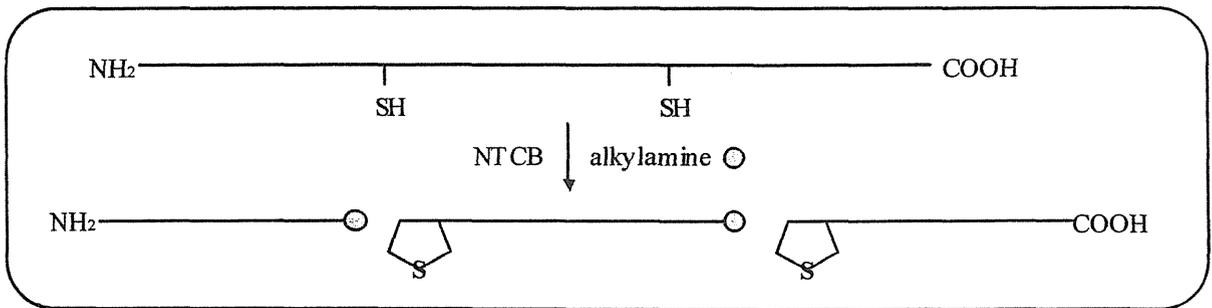
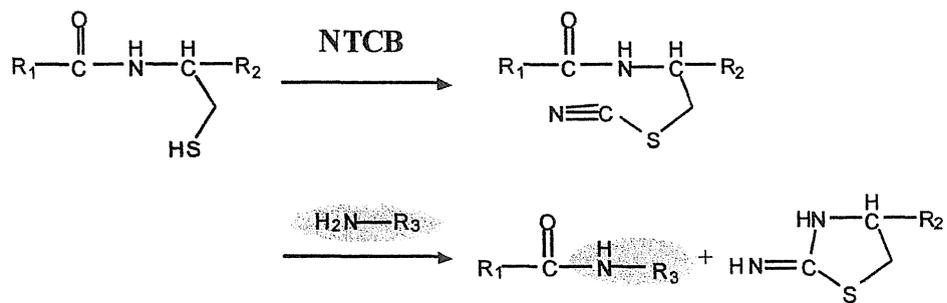


Fig. 30 Peptide bond cleavage with NTCB and alkylamine

2-2 化学的断片化に伴う 2PyPut によるペプチド C 末端修飾

C 末端ポリアミン修飾ペプチドの生理作用を知る上で、C 末端ポリアミン修飾ペプチドの作製は必要不可欠である。そこで、簡便に作製できるかどうか、アルキルアミンであるポリアミン共存下での NTCB 断片化反応を検討した。モデルタンパク質としてはオボアルブミンを選択した。

オボアルブミンは、ニワトリの卵白中のタンパク質に約 45% 含有されている、総残基数 385、分子量約 45 kDa の糖タンパク質である。Fig. 31 にはオボアルブミンの一次配列を示した。N 末端はアセチル基でブロックされており、分子内にリン酸化されたセリン残基 (Ser 68、Ser 344) を有し、また Asn 292 にアスパラギン結合糖鎖のコンセンサス配列を有している。分子内には 4 個の SH 基と 1 ヶ所の S-S 結合 (Cys 74 – Cys 121) が存在しており、この 1 ヶ所の S-S 結合は切断しても分子構造には影響は無いとされている。また、オボアルブミンは X 線結晶構造解析により立体構造が明らかになっており、 α - β マルチドメインタイプに属している。

NTCB 断片化反応の方法論確立には、このオボアルブミンを用いた方法が報告されており²⁰⁾、多くの情報が蓄積されているため、以下の実験に用いることとした。

	10	20	30	40	50	60
GS	IGAASMEF	CFDVF	KELKV	HHANENIF	YCP	PIA
	70	80	90	100	110	120
KL	PGFGDSIE	AQCGT	SVNVH	SSLRD	ILNQI	TKPND
	130	140	150	160	170	180
VK	ELYRGGLE	PINFQ	TAADQ	AREL	INSWVE	SQTNGI
	190	200	210	220	230	240
KGL	WEKAFKD	EDTQAMP	FRV	TEQESK	VPQM	MYQIGL
	250	260	270	280	290	300
ML	VLLPDEVS	GLEQLES	IIN	FEKLT	EWTS	NVMEER
	310	320	330	340	350	360
GIT	DVFSSA	NLSG	ISSAES	LKISQ	AVHAA	HAEINE
	370	380				
DHP	FLFCIKH	IATNA	VLFFG	RCVSP		

Fig. 31 Amino acid sequence of ovalbumin

モデルポリアミンとして 2PyPut を用い、まず 2PyPut が NTCB を用いた化学的断片化によって C 末端修飾されるかどうか確かめた。

Fig. 32 は、NTCB を用いてオボアルブミンをシアノ化後、1 M の 2PyPut で断片化し、反応液を MALDI-TOF MS 分析した結果である。ペプチド結合部位がカルボン酸として切断された場合と比べて、分子量が 147.2 Da 大きいピークが同時に確認された。この差は断片化したペプチドの C 末端に 2PyPut がアミド結合したことによると考えられる。

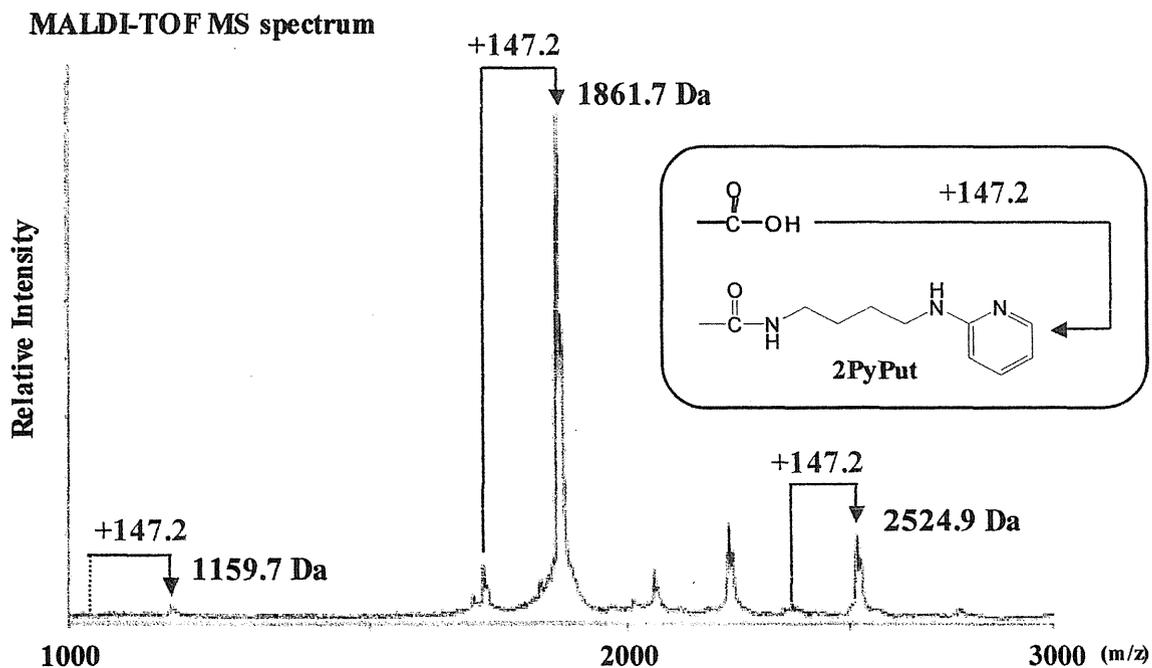


Fig. 32 MALDI-TOF MS spectrum of ovalbumin after cyanylation with NTCB and subsequent cleavage with 2PyPut

実際に C 末端に修飾されているかどうか、オボアルブミンの 1~10 までの配列に 2PyPut が結合したと思われる 1159.7 Da のピークについて PSD 分析を行った。その結果、Fig. 33 に示されているように、すべてのフラグメントイオンが検出されてはいないが、y 系列 1~8 までのピークが観察され、2PyPut が C 末端修飾されていることが確認できた。

このことから、NTCB を用いて 2PyPut を断片化したペプチドの C 末端に修飾できることが確認された。

PSD spectrum

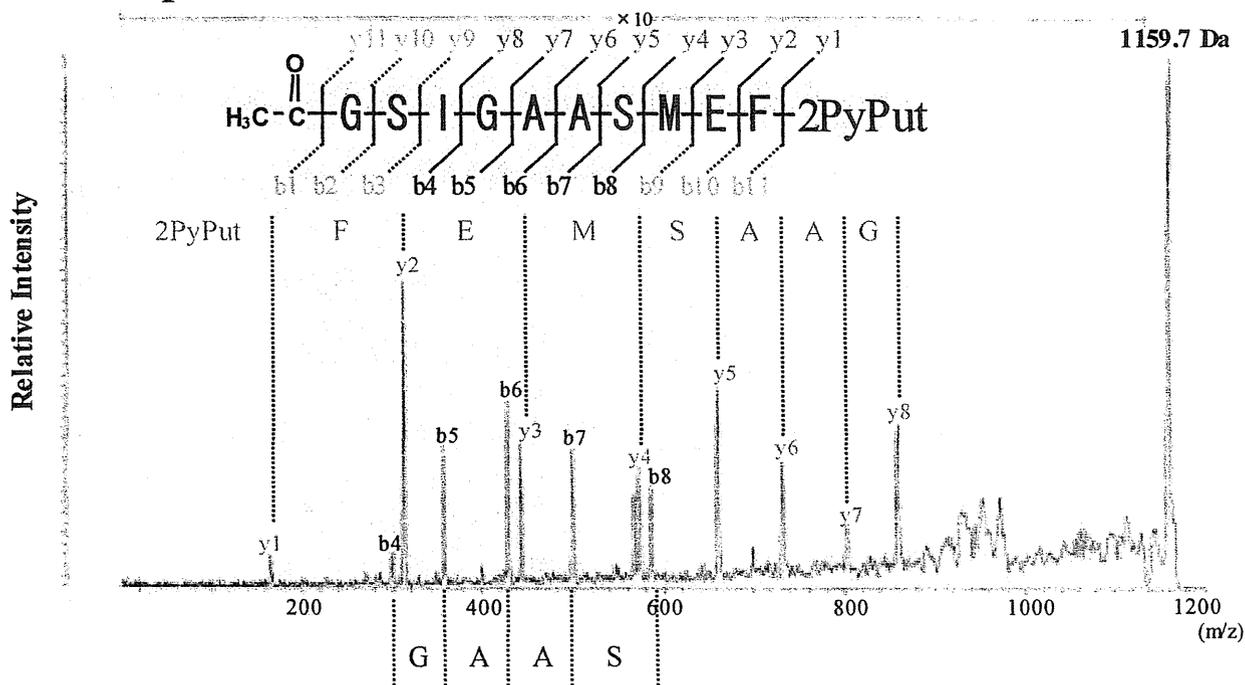


Fig. 33 Confirmation of C-terminus labeling by PSD analysis

2-3 C末端修飾の条件検討

2PyPut 共存下での NTCB を用いた化学的断片化による C 末端修飾化反応の最適な条件を検討した。

オボアルブミンをモデルタンパク質として用い、データ算出には HPLC conditions 3rd を用いた。

HPLC 分析において、UV 検出器及び蛍光検出器を用い、UV 220 nm でペプチドを検出し、蛍光計は励起波長 310nm、発光波長 390nm で 2PyPut を検出した。Fig. 34 に示したクロマトグラムの中で各 UV ピークと各蛍光ピークの保持時間が同じものが、蛍光修飾ペプチドと考えられる。それらのピークの中で保持時間 4~11 分の間にある蛍光修飾ペプチドの蛍光ピークの総面積が蛍光修飾ペプチドの生成量に依存すると考えて条件検討した。

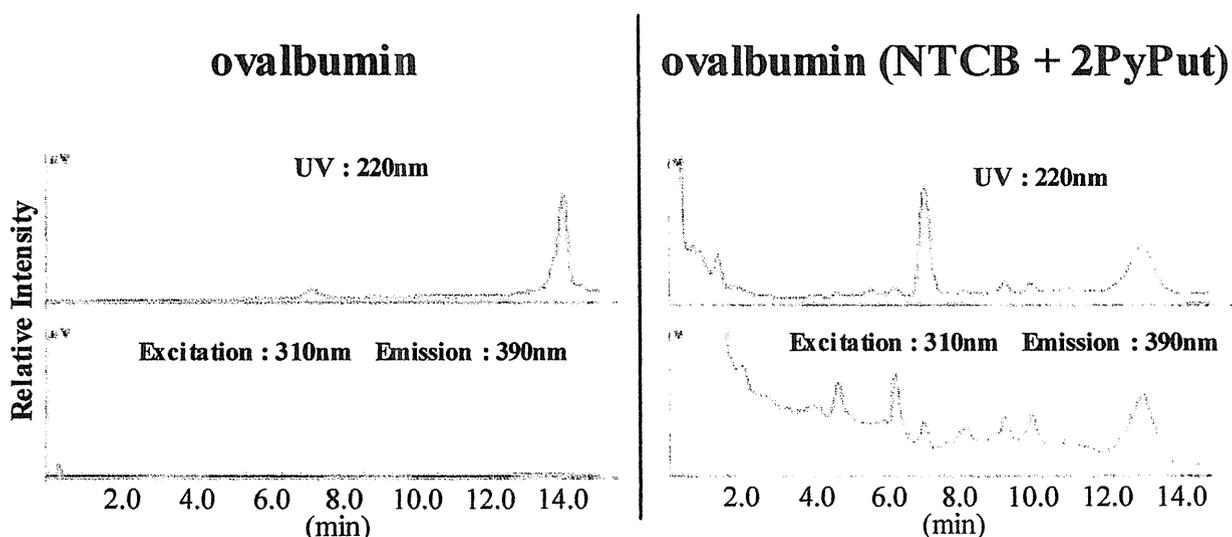


Fig. 34 HPLC chromatogram of ovalbumin after cyanylation with NTCB and subsequent cleavage with 2PyPut

条件検討するに当たり、NTCB による断片化反応で一般的に用いられる反応条件を基本条件とし、その条件を順次変えて条件検討を行った (Fig. 35)。

Fig. 35- I は、S-S 結合を切断する還元剤である TCEP の有無で生成量に影響があるかを検討したものである。TCEP により S-S 結合を切断したとき、より多く C 末端修飾ペプチドが得られることが確認された。

Fig. 35 -II は、反応 B の反応時間を検討したものである。反応時間によって生成量に変化が無いことが確認されたが、完全に反応が進行するように反応時間を 30 分とした。

Fig. 35-III は、NTCB の量を検討したもので、横軸は NTCB とオボアルブミンのモル比である。オボアルブミンはシステイン残基が 6 個あるので、NTCB とオボアルブミンのモル比が 6 のとき、NTCB とシステイン残基のモル比が 1 となる。NTCB がシステイン残基の 4 倍以上で蛍光強度がほぼ一定となったが、多くのタンパク質で修飾が進行するようにシステイン残基の 10 当量用いることとした。

Fig. 35-IV は、反応 C の pH を検討したもので、pH 8.8 以上で蛍光強度が一定となった。しかし、pH が高いと断片化の際に、 β イルミネーションの副反応が起こりやすくなるため²²⁾、pH 9.0 とした。

Fig. 35-Vは、反応 C の反応時間を検討したもので、反応時間が 8 時間以上で反応が完了することがわかった。

Fig. 35-VIは、反応 C の 2PyPut の濃度を検討したもので、0.8 M が最適濃度であった。

以上の結果から、TCEP は S-S 結合数の 10 当量用い、37 °C で 30 分反応させることとした。NTCB はシステイン残基の 10 当量用い、37 °C で 30 分反応させることとした。2PyPut · 2HCl を用い、反応液中 0.8 M になるように加えることとした。pH は 5 M NaOH 溶液を用い pH 9.0±0.2 に調製し、37 °C で 16 時間反応させることとした。

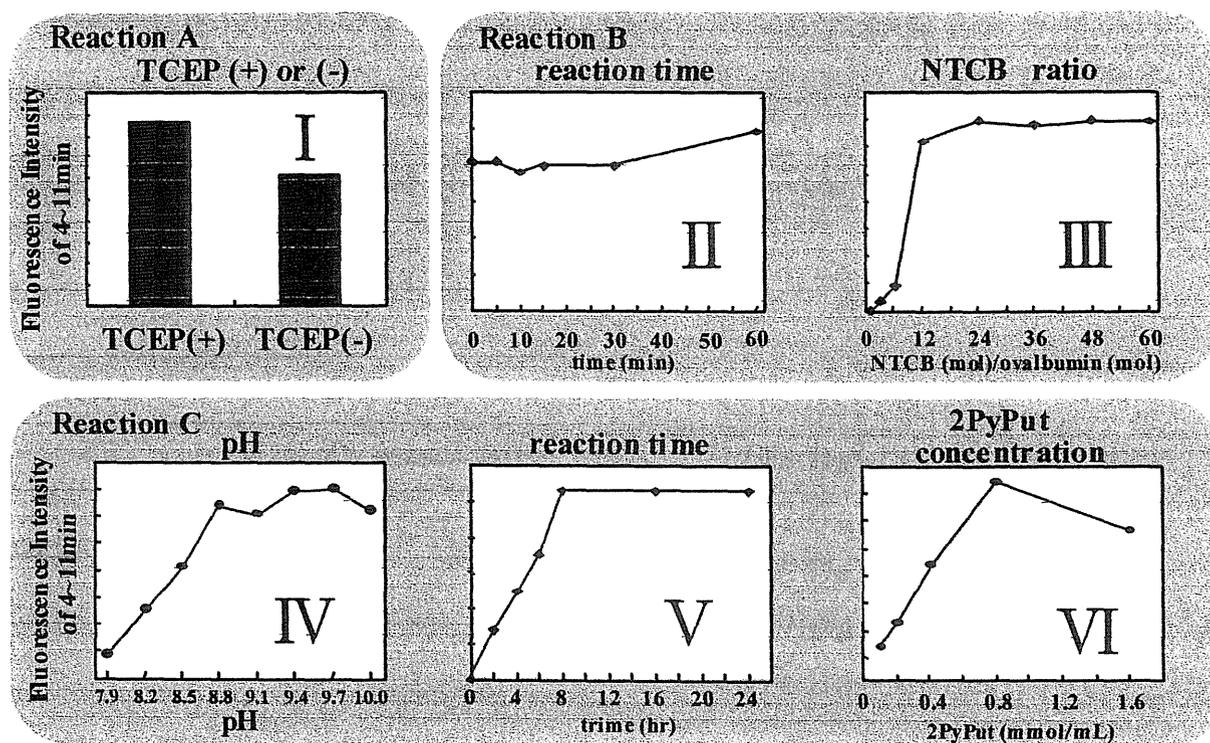
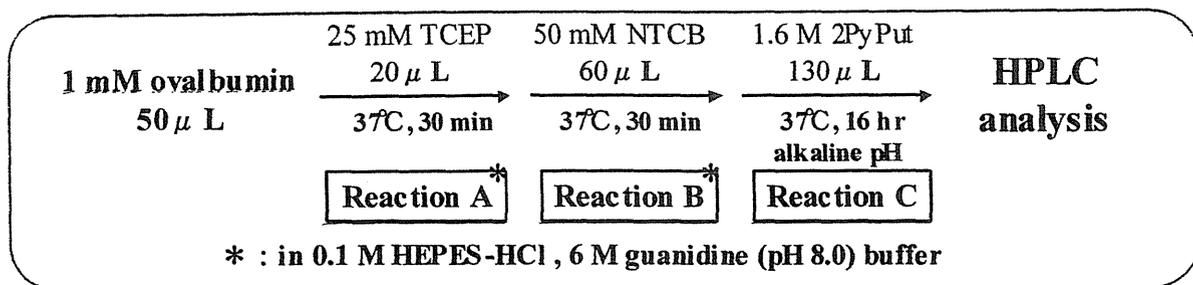


Fig. 35 Effect of several conditions in reaction

2-4 他のタンパク質への応用

2PyPut 共存下での NTCB を用いた化学的断片化による C 末端修飾化反応の最適な条件を定めたので、この反応条件により、他のタンパク質から C 末端 2PyPut 修飾ペプチドが得られるか確かめた。

定めた反応条件でヘモグロビン及びカタラーゼを修飾したところ、予想した通りの分子量の C 末端修飾タンパク質を得ることができた。

Table 3 には、オボアルブミン、ヘモグロビン及びカタラーゼから得られた修飾ペプチドの分子量とアミノ酸数を示した。タンパク質の種類を変えることでシステインにはさまれた種々の長さのポリアミン修飾ペプチドを得ることが可能であることが示唆された。

	MW(Da) - Length
Ovalbumin (chicken)	1158 Da – 10 AA*
	1862 Da – 15 AA
	2525 Da – 19 AA
	3517 Da – 29 AA
	5571 Da – 47 AA
Hemoglobin (bovine)	10110 Da – 91 AA
Catalase (bovine)	2069 Da – 16 AA
	7927 Da – 67 AA
	16769 Da – 145 AA

*AA : Amino acid

Table 3 2PyPut labeled peptides

2-5 C末端 2PyPut 修飾ペプチドの大量合成

ヘモグロビンはシステイン残基を α サブユニットに1つしか持たず、NTCBによるC末端標識反応の際に単一の修飾ペプチドを生成するため、修飾ペプチドの精製がより簡便となる。そこで、ヘモグロビンのNTCBによるC末端標識反応をモデル実験として、ヘモグロビン由来の分子量約1万Daの2PyPut修飾ペプチドを大量に合成し迅速に精製できるかかどうか検討した。

先ほど条件検討した条件の濃度をそのままに、反応液の量を μL オーダーからmLオーダーにし、HBをNTCB処理した。

HBをNTCBを用いた化学的断片化に伴う標識法により反応後、HPLC conditions 3rdにより分取し、凍結乾燥により乾燥させることで、0.6 mgの1万DaのC末端2PyPut修飾ペプチドを得ることができた。

得られたC末端2PyPut修飾ペプチドは、HPLC conditions 3rdにて単一のピークを示し、アガロース電気泳動を行い銀染色した結果、単一のバンドを示し、また、MALDI-TOF MS分析により測定し理論上の修飾ペプチドの分子量であることが確認された (Fig. 36)。

この方法で簡便で迅速かつ大量にC末端ポリアミン修飾ペプチドを得ることは可能であろうと思われた。

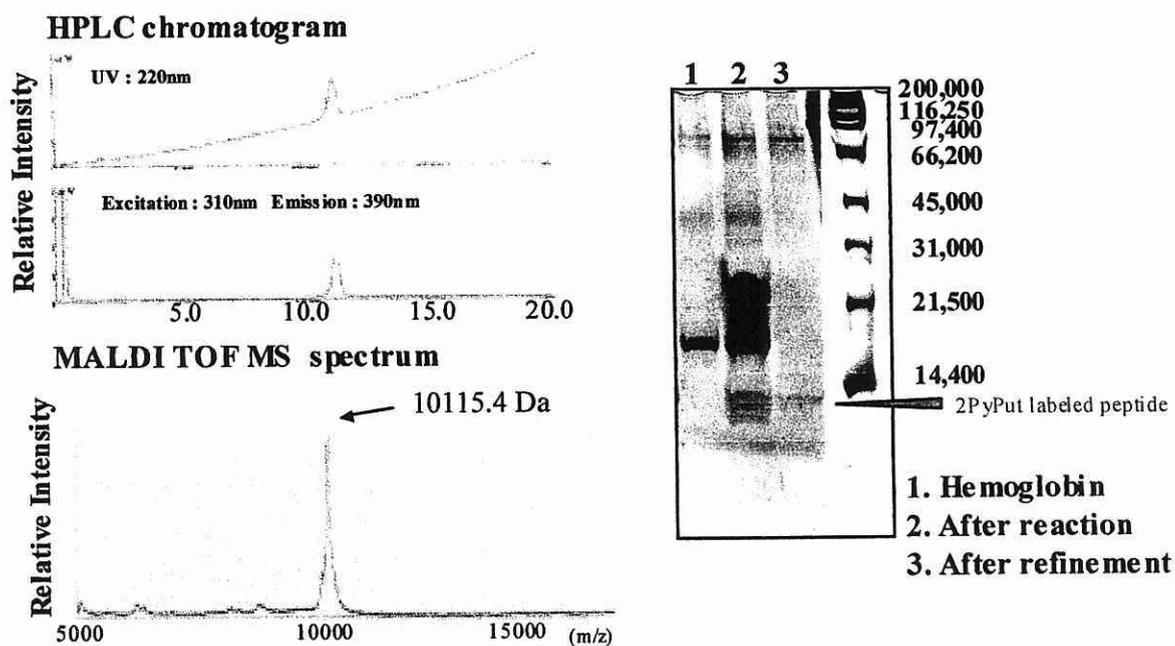


Fig. 36 Refinement of C-terminus 2PyPut labeled peptide by HPLC

2-6 まとめ

NTCB を用いた本標識法により、簡便で迅速かつ大量に C 末端修飾ペプチドが得られることがわかった。これらの方法は C 末端修飾ペプチドの作製に有用である。

タンパク質の種類を変えることでシステインにはさまれた種々の長さのポリアミン修飾ペプチドを得ることが可能であることが示唆された。

しかしながら、NTCB を用いた本標識法では、得られたペプチドの N 端側がイミノチアゾリン環を形成してしまうため、本来のペプチドとは異なる挙動を示す可能性があり、更なる改良が必要となる可能性が考えられる。

■実験の部

試薬

合成に用いたプトレシン、2-ブロモピリジンは東京化成工業株式会社より、3-ブロモピリジンは和光純薬株式会社より購入したものをを用いた。

プロテアーゼ消化の際に用いたシトクロムC、エラスターゼ、Spd、SpmはSIGMA社より、トリプシンはPromega社より、キモトリプシンはRoche社より購入したものをを用いた。

化学断片化の際に用いたオボアルブミン、NTCB、HEPES、グアニジン塩酸塩はSIGMA社より、TCEPはPIERCE社より、カタラーゼ、ヘモグロビンは和光純薬株式会社より購入したものをを用いた。

HPLC分析の際に用いたアセトニトリルは関東化学株式会社より、TFA（アミノ酸分析用）は和光純薬株式会社より購入したものをを用いた。

MALDI-TOF MS分析及びPSD分析の際に用いたIns、Ins β 、Ang I、CHCAはSIGMA社より、DHB、MSAはALDRICH社より購入したものをを用いた。

今回の実験に用いた水はすべてMill Qにより調製したものをを用い

た。

トリプシンによる C 末端修飾の確認

1 mg/mL の HB あるいは CYT C を 0.8 M 2PyPut 存在下、pH 9.4 で、タンパク質の各 1/50 量のトリプシン、キモトリプシン又はエラスターゼにより 37 °C で 16 時間処理した。反応後、過剰量の 2PyPut をセファデックス G25 を用いゲルろ過により除いたのち、ろ液を凍結乾燥により濃縮した。これを 2PyPut の蛍光を指標に HPLC によりピークを分取し (HPLC conditions 1st)、凍結乾燥により濃縮しサンプルとした。このサンプルに含まれるペプチドの分子量を MALDI-TOF MS 分析により測定し、理論上の 2PyPut 結合ペプチドの分子量の計算値と一致するものに関して、PSD 分析を行った。

トリプシンに C 末端修飾反応の条件検討—経時変化

1 mg/mL HB を 50 mM 2PyPut 存在下、pH 7.6 でタンパク質の 1/50 量のトリプシンで処理し、0、30、60、90、120、180、960 分後に 30 °C にして反応を停止させた。反応液を HPLC (HPLC conditions 2nd) で分析し、保持時間 37.8 分及び 39.5 分のピークについて評価した。また、2つのピークに含まれているペプチドをそれぞれ分取し、凍結

乾燥により濃縮しサンプルとした。このサンプルに含まれるペプチドの分子量を MALDI-TOF MS 分析により測定し、理論上の 2PyPut 結合ペプチドの分子量の計算値と一致するか確かめた。

トリプシンに C 末端修飾反応の条件検討－pH 変化

1 mg/mL HB を 50 mM 2PyPut 存在下、pH 6.9、7.2、7.5、8.0 でそれぞれタンパク質の各 1/50 量のトリプシンで処理し、16 時間後に -30 °C にして反応を停止させた。反応液を HPLC (HPLC conditions 2nd) で分析し、保持時間 37.8 分及び 39.5 分のピークについて評価した。また、2 つのピークに含まれているペプチドをそれぞれ分取し、凍結乾燥により濃縮しサンプルとした。このサンプルに含まれるペプチドの分子量を MALDI-TOF MS 分析により測定し、理論上の 2PyPut 結合ペプチドの分子量の計算値と一致するか確かめた。

トリプシンに C 末端修飾反応の条件検討－2PyPut 濃度変化

1 mg/mL HB を 0.50、1.0、5.0、10、25、50 mM 2PyPut 存在下、pH 7.6 でそれぞれタンパク質の各 1/50 量のトリプシンで処理し、16 時間後に -30 °C にして反応を停止させた。反応液を HPLC (HPLC conditions 2nd) で分析し、保持時間 37.8 分及び 39.5 分のピークにつ

いて評価した。また、2つのピークに含まれているペプチドをそれぞれ分取し、凍結乾燥により濃縮しサンプルとした。このサンプルに含まれるペプチドの分子量を MALDI-TOF MS 分析により測定し、理論上の 2PyPut 結合ペプチドの分子量の計算値と一致するか確かめた。

トリプシン消化によるポリアミン C 末端修飾の確認

1 mg/mL の HB を 1.0 または 50 mM ポリアミン (Spd あるいは Spm) 存在下、pH 7.5 で、タンパク質の各 1/50 量のトリプシンにより 37 °C で 16 時間処理した。反応後、HPLC によりピークを分取し (HPLC conditions 2nd)、凍結乾燥により濃縮しサンプルとした。このサンプルに含まれるペプチドの分子量を MALDI-TOF MS 分析により測定し、理論上のポリアミン (Spd あるいは Spm) 結合ペプチドの分子量の計算値と一致するものに関して、PSD 分析を行った。

NTCB を用いた化学的断片化に伴うペプチド C 末端標識

1 mM オボアルブミン 10 μ L に 25 mM TCEP 4 μ L を加えて、37 °C で 30 分反応させ、次に 50 mM NTCB 12 μ L を加えて、37 °C で 30 分反応させた。ここまでの反応は 0.1 M HEPES-HCl, 6 M guanidine (pH 8.0) 緩衝液中で行った。その後、1.6 M 2PyPut 26 μ L を加えて、pH

を調製後、37 °Cで16時間反応させた。

タンパク質としてヘモグロビン、カタラーゼについても同条件下、反応を行った。

C 末端 2PyPut 修飾ペプチドの大量合成

1 mM ヘモグロビン 1 mL に 25 mM TCEP 835 μ L を加えて、37 °C で 30 分反応させ、次に 50 mM NTCB 241 μ L を加えて、37 °C で 30 分反応させた。ここまでの反応は 0.1 M HEPES-HCl, 6 M guanidine (pH 8.0) 緩衝液中で行った。その後、1.6 M 2PyPut 2 mL を加えて、pH を調製後、37 °C で 16 時間反応させた。

HB 由来 1 万 Da の蛍光修飾ペプチドの精製

HB を NTCB を用いた化学的断片化に伴う標識法により反応後、HPLC conditions 3rd により分取し、凍結乾燥により乾燥させた。

2PyPut の合成

プトレシン (MW 88.15, *d* 0.877, 106.5 mL, 1.06 mol) に 2-ブロモピリジン (MW 158, *d* 1.657, 20.2 mL, 0.212 mol) を加え、N₂ 置換し、120 °C で 10 時間反応させた。反応終了を TLC にて、2-ブロモピリジ

ンの消失で確かめた。反応過剰のプトレシンを 85 °C で減圧留去した。除ききれっていないプトレシンと反応中に発生した HBr を除くため、4 M NH₃ 水溶液 (200 mL) を加え、クロロホルム (600 mL) で 4 回抽出し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、クロロホルム : メタノール (10 : 1) 溶出部より 2PyPut を得た (24.5 g, 69.9%)。

2PyPut (22.8 g, 0.138 mol) をエタノール (約 30 mL) に溶かし、濃塩酸 (26.7 mL) を加えた。溶媒を減圧留去した後、残渣をエタノールで再結晶し、析出した結晶をろ取したのち乾燥させ 2PyPut・二塩酸塩を得た (29.5 g, 58.9%)。MS (FAB, Glycerol) 166 (M⁺+H). *Anal.* Calcd for C₉H₁₇N₃Cl₂: C, 45.39; H, 7.19; N, 17.64. Found: C, 45.23; H, 7.28; N, 17.54.

3PyPut の合成

プトレシン (MW 88.15, *d* 0.877, 6.1 mL, 60.7 mmol) に 3-ブロモピリジン (MW 158, *d* 1.64, 1.17 mL, 12.2 mmol) を加え、N₂ 置換し、160 °C で 108 時間反応させた。反応過剰のプトレシンを 85 °C で減圧留去した。除ききれっていないプトレシンと反応中に発生した HBr を除くため、4 M NH₃ 水溶液 (10 mL) を加え、クロロホルム (40 mL)

で 5 回抽出し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール(10:1)溶出部より 3PyPut を得た (347 mg, 17.4%)。

3PyPut (140 mg, 0.84 mmol) にピクリン酸 (577 mg, 2.52 mmol) のエタノール溶液を加え、析出した結晶をろ取したのち乾燥させ 3PyPut・ピクリン酸塩を得た (147 mg, 3.54%)。MS (FAB, Glycerol) 166 (M^+H)。

MALDI-TOF MS 分析

サーモクエスト社 VISION 2000 を用い、リフレクターモードにより測定した。マトリックスは、分子量 5,000 Da 以下は DHB をミリ Q 水に 10 mg/mL となるように溶かしたものをを用いた。5,000 Da 以上のときは DHBs (DHB 水溶液と MSA 溶液の 9:1 の混液) を用いた。MSA 溶液とは、MSA が 10 mg/mL となるように 10%エタノール水溶液とアセトニトリルが 2:1 となる溶液に溶解させたものである。マトリックス 1 μ L と試料 1 μ L をステンレス製のプローブ上で混和し、空気乾燥により結晶化した後、分析した。機器更正には、DHB 由来イオン [137.02 Da]と Ang I [10^{-5} M、($M+H$)⁺ Average 1297.50 Da]と Ins [10^{-5} M、($M+H$)⁺ Average 5734.6 Da]の三点を用いて行った。

PSD 分析

島津/KRATOS 飛行時間型質量分析装置 AXIMA-CFR Version 2 を用いた。マトリックスは 0.1% TFA の 40% アセトニトリル溶液に CHCA を飽和させたものを用いた。ステンレス製サンプルプレート のウェルに、試料を 1 μ L 乗せて空気乾燥させた後、さらにマトリックスを 1 μ L 乗せて空気乾燥させて結晶化させた後、分析した。機器 更正には、Ang I [10^{-5} M、(M+H)⁺ Average 1297.50 Da]と Ins β [10^{-5} M、(M+H)⁺ Average 3496.9 Da]の二点を用いて行った。

HPLC conditions 1st

Column : TOSOH ODS 120T 250X4,6 ϕ

Mobile phase : A; 0.1% TFA in 5% acetonitrile

B; 0.1% TFA in 80% acetonitrile

0–100% B in 90 min

Flow rate : 1 mL/min

UV : 220 nm

Excitation : 310 nm Emission : 390 nm

Columns temperature : 30 °C

HPLC conditions 2nd

Column : TOSOH ODS 120T 250X4,6 ϕ

Mobile phase : A; 0.1% TFA in 5% acetonitrile

B; 0.1% TFA in 80% acetonitrile

0% A in 10 min , then 0—100% B in 90 min

Flow rate : 1 mL/min

UV : 220 nm

Excitation : 310 nm Emission : 390 nm

Columns temperature : 30 °C

HPLC conditions 3rd

Column : Poros R1/M 100X4.6 ϕ

Mobile phase : A; 0.1% TFA in water B; 0.1% TFA in acetonitrile

5—65% B in 20 min

Flow rate : 5 mL/min

UV : 220 nm

Excitation : 310 nm Emission : 390 nm

Columns temperature : 30 °C

■参考文献

- 1) Etienne-Poncin. *et al.*, 'Evolution of some biochemical Characteristics of the intestinal mucosa during the first postnatal weeks in C57 mice. Effects of thyroxine and putrescine', *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **9**, 375-382 (1989).
- 2) Patricia D. *et al.*, 'Dietary polyamines and non-neoplastic growth and disease', *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **13**, 1027-1032 (2001).
- 3) 白幡 晶. 'ポリアミンの生理的役割の探索 生合成阻害剤の利用', *化学と生物*, **28**, 162-171 (1990).
- 4) Bardocz S. *et al.*, 'Polyamine in food – implications for growth and health', *J. Nutr. Biochem.*, **4**, 66-71 (1993).
- 5) Susan B. *et al.*, 'The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth', *Br. J. Nutr.*, **73**, 819-828 (1995).
- 6) 細谷憲政 / 消化・吸収－基礎と臨床－ 296-324 第一出版
- 7) 山本 昌. '生理活性ペプチドの経粘膜吸収改善に関する生物薬剤学的研究', *薬学雑誌*, **121**, 929-948 (2001).
- 8) Ohtake K. *et al.*, 'Poly-L-Arginine enhances paracellular permeability via Serine/threonine phosphorylation of ZO-1 and tyrosine

- dephosphorylation of occluding in rabbit nasal epithelium', *Pharm. Res.*, **20**, 1838-1845 (2003).
- 9) Yamada H. *et al.*, 'Reversible cationization, a new method for delivery of a denatured protein into living cells. Application on to p53', 第76回日本生化学会大会ポスター発表.
- 10) Suzuki S. *et al.*, 'Protease catalyzed reaction of polyamine incorporation into protein', *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1609-1612 (1997).
- 11) H, R, Horton. / ホートン生化学 121-129 東京化学同人
- 12) Frey PA. *et al.*, 'A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases', *Science*, **264**, 1927-1930 (1994).
- 13) Tobin JB. *et al.*, 'Low-barrier hydrogen bonding in molecular complexes analogous to histidine and aspartate in the catalytic triad of serine proteases', *Biochemistry*, **34**, 6919-6924 (1995).
- 14) Karas M. *et al.*, 'Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons', *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301 (1988).
- 15) R Kaufmann. *et al.*, 'Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization', *Rapid Commun.*

Mass spectrum., 7, 902-910 (1993).

- 16) Biemann K. *et al.*, 'Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure', *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 16, 99-111 (1988).
- 17) Mattias B. *et al.*, 'Tumor attenuation by combined heparan sulfate and polyamine depletion', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 371-376 (2002).
- 18) Vladan M., 'Polyamine in the gut lumen: bioavailability and biodistribution', *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 13, 1021-1025 (2001).
- 19) Poduslo JF. *et al.*, 'Polyamine modification increases the permeability of proteins at the blood-nerve and blood-brain barriers', *J. Neurochem.*, 66, 1599-1609 (1996).
- 20) Jiang W. *et al.*, 'A Strategy to locate cysteine residue in protein by specific chemical cleavage followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry', *Anal. Biochem.*, 235, 161-174 (1996).
- 21) 矢敷実希子 / タンパク質の化学的断片化に伴うペプチド C 末端標識法の開発とペプチド分析への応用 城西大学大学院平成 14 年度修士論文

22) 石黒正恒 / 生物化学実験法 8 SH 基の化学修飾 113-115,
138-141 学会出版センター

