

MALDI-TOF MSによる修飾ペプチドの 構造解析と定量解析

絹見 朋也

産業技術総合研究所 計測標準研究部門

本講演では、MALDI-TOFを使った修飾を受けたペプチドの構造解析と定量解析について3つの話題に関して紹介する。始めに、代表的な翻訳後修飾であるリン酸化について、ISDによるリン酸化ペプチドの配列解析、およびペプチド基質のリン酸化の定量解析によるキナーゼアッセイ法の開発を紹介する。一方で、ペプチドのリン酸化により等電点が低くなり陽イオンモードでのイオン化効率が低下することが知られていた。我々が酸化ストレスマーカー探索の中で見いだしたシステイン残基の酸化によっても同様のイオン化効率の低下が見られることが分かった。最後にシステイン酸化とイオン化効率低下のメカニズムを詳細に検討した結果について議論する。

1. はじめにータンパク質のリン酸化

生体は外界からの様々な刺激や情報に対して多様な応答を示し、環境への適応や恒常性の維持などを行っている。これらの刺激（例えばアドレナリンやインシュリンなどのホルモンや成長因子、光受容や嗅覚などの感覚刺激）から最終的な応答（細胞の増殖、分化、代謝調節、感覚、記憶など）へは様々な分子が関与し、情報の伝達、増幅や処理を行っている。細胞外からの刺激は受容体タンパクにより細胞内へ伝えられ、受容体タンパクは情報伝達分子である二次メッセンジャーの放出やアダプタータンパクの活性調節によりその情報を下流へと伝えてゆく。タンパクのリン酸化は、この情報の伝達過程に大きな役割を果たしている。タンパクのリン酸化反応とは、タンパクを構成するアミノ酸側鎖のアルコール性水酸基（セリン、スレオニン）やフェノール性水酸基（チロシン）に対し、主にATPのγリン酸基が転移する反応をいう。この反応は、プロテインキナーゼと

呼ばれるタンパクリン酸化酵素により触媒され、脱リン酸化酵素（プロテインフォスファターゼ）によって脱リン酸化が触媒される。リン酸化と脱リン酸化によるタンパクの可逆的なリン酸化反応は、基質タンパクの活性を変化させる「分子スイッチ」として働き、多段階のリン酸化カスケードと呼ばれるリン酸化による活性調節機構により情報の増幅や制御を行っている。

こうしたリン酸化というタンパクの一次構造変化は、どのようにしてタンパク本体の活性へ影響を与えるのであろうか。構造機能相関の立場では、リン酸化が高次構造変化を引き起こし、リン酸化部位から離れた部位において基質との親和性が増加すること（ロングレンジのアロステリック効果）として理解されている¹⁾。また、リン酸化による高次構造変化を伴わない活性制御の例も知られており、イソクエン酸脱水素酵素などでは、基質の結合部位近傍のリン酸化が基質との結合を阻害し、基質ータンパク間の結合活性を調節していることがわかっている²⁾。タンパクのリン酸化に対する興味は、リン酸化カスケードによる多彩な生理作用を分子レベルで解明することにある。すなわち、リン酸化による一次構造変化とその高次構造への影響と構造機能相関、そして細胞内のリン酸化カスケードのリンケージ解析とそれらのクロストークの解明が現在の目的と言えるだろう。このため、たいへん広範な分野にわたって統一的に理解する必要が生じている。そのためにはタンパク間の相互作用やリン酸化による構造変換とともに、リン酸化のストイキオメトリーや一次構造の情報、すなわちリン酸化部位に関する情報が不可欠となる。ところがリン酸化はタンパクが合成され、成熟タンパクとなった後に受ける化学修飾の一つであり（翻訳後修飾）、遺伝情報に基づいた構造ではない。また、キナーゼの基質

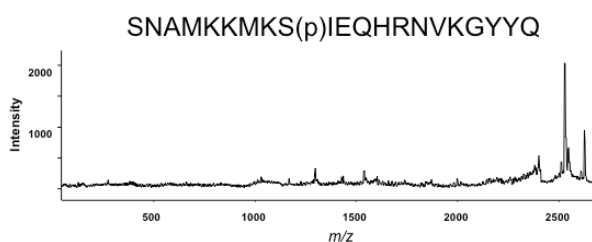


Fig. 1 PSD spectrum of phosphopeptide, SNAMKKMKS(p)IEQHRNVKGYQ.

特異性は低く、基質タンパクのコンセンサス配列によるリン酸化部位に関する情報は推定の域を出ない³⁾。したがってリン酸化部位を知るためには、最終産物であるリン酸化タンパクの分析による実験的証明が必要となる。

ESIやMALDI法の実用化により、タンパク化学的手法に基づく様々な構造解析法に質量分析が応用されるようになった。そのなかでもリン酸化タンパクの構造解析法として質量分析がもっとも有力な方法となり、現在、当該分野では質量分析の独壇場といって差し支えない。その理由は感度、正確さ、分析の迅速性が従来法（³²Pによるラベリ化やエドマン分解など）とは比較にならないほど優れているからである。ここで、1) ISD(In-source Decay)による長鎖リン酸化ペプチドの構造解析、2) MALDIのキナーゼアッセイへの応用、の2つの話題について、MALDIを駆使したリン酸化ペプチド、タンパクの解析例を紹介したい。

2. In-Source Decayによるリン酸化ペプチドの構造解析

リン酸化ペプチドをCID-MS/MSやPSDにより構造解析する際、ペプチド鎖の主鎖の解裂に比べリン酸基の脱離 (-80, HPO₃; -98, H₃PO₄) が顕著に起こる。特に10アミノ酸を超えるリン酸化ペプチドでは、主鎖の解裂はほとんど観測されず、配列解析は非常に困難であった⁴⁾。ペプチドの構造解析にはCID-MS/MSやPSDが有力な方法であるにもかかわらず、こうしたリン酸基の脱離によって適応限界が規定されるため、リン酸化部位決定に応用することは困難なことが多い。

PSDに代わるMALDI-TOF/MSを用いたフラグメントイオンの解析法として、イオン源内で生じたフラグメントイオンを測定するIn-Source Decay (ISD)が報告されている^{5, 6)}。この方法は電場による加速前にイオン源内でレーザー照射後生じたフ

ラグメントイオンを測定する方法で、ポリペプチド鎖の場合、分子量数万にも及ぶタンパクの連続したシーケンスイオンを観測することができる。我々はISDによって長鎖リン酸化ペプチドの構造解析が可能ではないかと考え、PRIのリン酸化部位を含む21残基、および31残基のリン酸化ペプチドを用いてISDの測定条件およびISDスペクトルの検討を行なった。

測定はVoyager Elite MALDI-TOF/MS (Applied Biosystems社、内蔵N₂レーザー)のdelayed extraction, linear modeで行なった。リン酸化ペプチドはFmoc法によって合成されたものを逆相HPLCにより精製し、マトリックスはDHB (2, 5-dihydroxybenzoic acid) を用い定法に従い試料を調製した (PSDスペクトルの測定にはマトリックスとして α -cyano-4-hydroxycinnamic acidを使用)。ここでは31アミノ酸残基のリン酸化ペプチド、phospho-PRI349-379

(APGTIEKKRSNAMKKMKS(p)IEQHRNVKGYQD)の例を紹介する。このペプチドのPSDスペクトルをFig. 1に示す。リン酸基の脱離を示す[MH-98]⁺が強く観測され、ペプチド鎖から生じるフラグメントイオン (シーケンスイオン) は極めて低い強度しか与えない。それに対しISDスペクトルはFig. 2に示すように、[M+H]⁺以外からのニュートラルロスイオンが見られず、連続したシーケンスイオン (a_n, c_n, y_n, z_n+2系列) が観測される。注目すべきことはリン酸基を保持したまま主鎖の解裂が起こるため、修飾部位決定には極めて有用な情報を与えることである。たとえばc₁₇ (m/z=1918) とc₁₈ (2085) の差167は87 (セリンの残基量) +80 (リン酸基) に対応している。y₁₃ (1651) とy₁₄ (1818)、z₁₃+2 (1636) とz₁₄+2 (1803) についても同様である。しかも、c系列のイオンの強度が最も高くスペクトルの帰属がきわめて容易に行える⁷⁾。

a_n, c_n, y_n, z_n+2の系列の隣り合ったシーケンスイオンが観測されること、およびc系列のイオンの強度が最も高いという現象は、他のリン酸化ペプチドとそれらの非リン酸化型ペプチドにおいてもみられた。このとき、全シーケンスの約90%をカバーする連続したシーケンスイオンを観測することができた。ただし、delayed extraction modeを利用し、マトリックスとしてDHBを用いなければ、シーケンスイオンを観測することはできなかった。delay timeや加速電圧等の測定条件は、通常のlinear, delayed extraction modeと

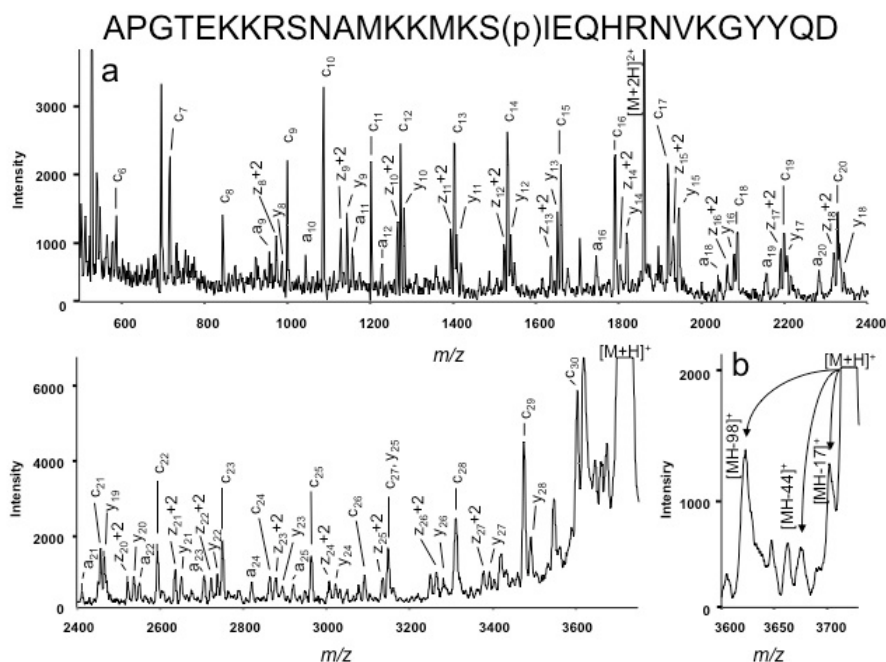


Fig. 2 a) ISD spectrum of phosphopeptide, APGTEKKRSNAMKKMK(S)pIEQHRNVKGGYYQD. b) The $[M+H]^+$ region.

同等でも十分な質のスペクトルを得ることができる。この方法は、試料が高度に精製されている必要があり、分子イオンピークやその2価イオンピーク付近、およびマトリックスのバックグラウンドと重なる低分子量領域では、判読可能なシーケンスイオンを得ることはできない。しかし、市販のdelayed extractionの機能をもつMALDI-TOF/MSをそのまま使用でき、ピコモル前後の試料量でISDスペクトルを得ることができることから、リン酸化にとどまらず、多くの修飾タンパク、ペプチドの構造解析への応用が期待される。

3. MALDI-TOF/MSによるキナーゼアッセイ

プロテインキナーゼ（タンパク質リン酸化酵素）のアッセイは、最も基本的な生化学的解析の1つである。一般に ^{32}P によって放射性標識したATPを用いて、リン酸化反応による ^{32}P の取り込みを定量することで酵素活性を測定する。このため構造情報が得られないことや放射性化合物の取り扱いなどの問題点がある。我々はMALDI-TOF/MSにより、放射性物質を使わず、簡便、かつ短時間でキナーゼ（CaMKII）のアッセイを行える系を開発した。MALDI-TOF/MSスペクトル上の非リン酸化型とリン酸化型基質のピーク面積比から、リン酸化の割合を定量することが可能である⁸⁾。しかし酵素源として組織の粗抽出液を用いた場合、緩

衝液などに由来する塩や狭雑物などの影響により、定量可能な質のスペクトルを得ることが出来ない。実際にキナーゼのアッセイを行う上でこうした欠点を解決するため、簡便な基質精製が必要である。この方法は基質にビオチン標識したペプチドを用い、アビジンコートビーズにより基質を反応混合液から一段階の操作で回収、精製することによって、MALDI-TOF/MSによるリン酸化の定量を可能にするものである。

基質はN末端をビオチン化したPRIの部分ペプチドで、CaMKIIのよい基質として働く。その構造はBiotin-LQPAPGTIEKKRSNAMKKMK(S)IEQHRであり、Sがリン酸化されるセリンである。このペプチドには塩基性アミノ酸が多く含まれるため、負電荷をもつリン酸基の修飾によってもMALDIでのイオン化効率には変化はない^{1,2)}。酵素源としてウシガエル脳の粗抽出液を用い、基質濃度は $50\mu\text{M}$ とした。リン酸化反応はトリフルオロ酢酸を添加することで停止させ、Tris-HCl (pH 6.8)を加えて中和した後にストレプトアビジンコート磁気ビーズ（Dynabeads M-280, Dynal）を加え基質を回収、洗浄した。 α -cyano-4-hydroxycinnamic acidをマトリックスとして、ビーズ-ペプチド複合体をそのままMALDI-TOF/MSにより測定した。測定はVoyager Elite MALDI-TOF/MS (Applied Biosystems社)のlinear modeで行った。

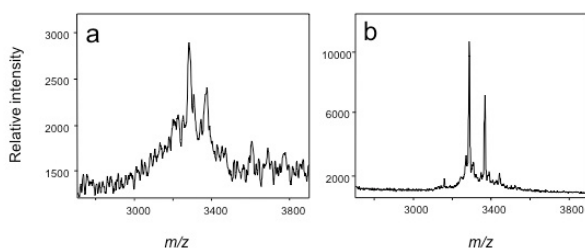


Fig. 3 Phosphorylated peptide a) before purification, b) after purification.

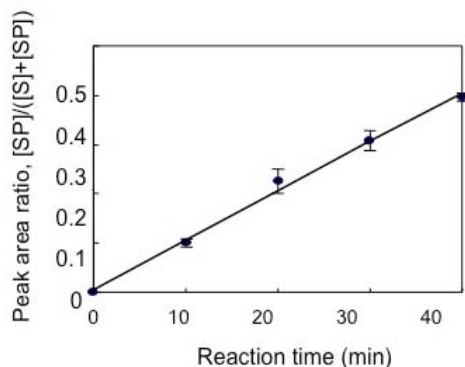


Fig. 4 Time course of phosphorylation monitored by MALDI-TOF MS.

反応溶液をそのまま測定したとき、およびビーズで基質を回収したときのMALDI-TOF/MSスペクトルをFig. 3に示す。このように一段階の簡便な精製によりS/Nが格段に向上し、ピーク面積を正確に求められるようになった。そこで、50 μ lのリン酸化反応溶液から経時的に2 μ lのフラクションをとりビーズによりペプチドを回収し、MALDI-TOF/MSスペクトルを測定した。非リン酸化型の基質をS、リン酸化型をSPとして、それぞれのMALDI-TOF/MSスペクトルにおけるピーク面積を[S]、[SP]とすると、リン酸の取り込みは $[SP]/([S]+[SP])$ で表される。Fig. 4に示すように、反応時間と $[SP]/([S]+[SP])$ の値は良好な直線関係を示した。このことからリン酸化反応の経時的な追跡が可能であり、キナーゼのアッセイに使用できることがわかった。また、SとSPの実際の存在量による $[SP]/([S]+[SP])$ の値に対し、MALDI-TOF/MSスペクトル上でのピーク面積による $[SP]/([S]+[SP])$ の値は傾きが1の直線関係にあることから、質量スペクトル上の面積比は実際のリン酸化ペプチドの存在比と一致することが示された¹³⁾。この方法は、組織の粗抽出液など狭雑物を多く含んだ場合であってもアッセイが可能で、しかも質量の変化があればリン酸化に限らず他の修飾やプロテアー

ゼなどに関わる反応のアッセイにも応用が可能である。精製操作が簡便なため、アビジンコートされた96穴プレートなどを用いたHigh Throughputアッセイの系を組みやすい特徴もっている。⁹⁾

4. システイン残基の酸化とMALDIでの検出効率への影響

蛋白質の翻訳後修飾は生理的に極めて重要な意味を持つものの、極めて微量であり、翻訳後修飾基が大きな電荷を持つ場合が多いためイオン化しにくく、質量分析を行う上で大きな問題となっている。システインはチオール基を持ち酸化を受けやすいアミノ酸として知られるが、我々は、プロテオーム解析により細胞や生体組織中から酸化ストレスによってシステインが酸化を受けたシステインスルホン酸 ($-SO_3H$) の構造を同定した。このとき、システインの酸化はランダムに起こるのではなく、活性部位システインのスルホン酸への選択的な酸化であることを明らかにした。しかし、システインスルホン酸が強い酸性残基であるために検出効率（イオン化効率）が極めて低く、システインスルホン酸を含む蛋白質の同定例は少ない。システインの酸化された酸性蛋白質、ペプチドを効率的に探索できる方法論を開発する目的で、システインスルホン酸含有ペプチドの効率的なイオン化法を検討した。マトリックス-試料溶液に混合することでリン酸化ペプチド、核酸などのMALDIイオン化を促進する添加剤として知られているクエン酸二アンモニウム (DAHC) に注目し、MALDIでの効果、ならびにマトリックスを用いないレーザーイオン化法であるDIOS (desorption/ionization on porous silicon) 法によりそのイオン化機構を考察した。

試料はペルオキシレドキシン6 (Prx6) のシステインを含む部分配列DFTPVCTTELGR (K1)およびDINAYNCEEPTEK (K2)についてシステインがフリー、カルバミドメチル化、システインスルホン酸に修飾されたもの（それぞれK1-re, K1-cam, K1-ox, およびK2-re, K2-cam, K2-ox）を合成し、それぞれの等モル混合物 (K1-mix, K2-mix) として使用した。DIOSチップはシリコンウエハを電解エッチング法により作成した。測定はVoyager DE Pro (ABI), AXIMA CFR (島津)を用い、リフレクターモードで行った。

各々のペプチド単独では正イオンモードで全てイオン化されたが、K1-mixを α -cyano-4-

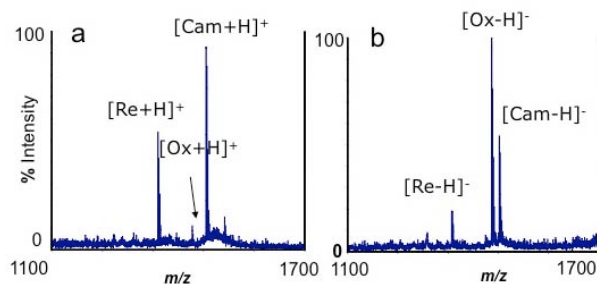


Fig. 5 MALDI-TOF MS spectra of peptide mixture by a) CHCA positive ion mode, b) negative ion mode.

hydroxycinnamic acid (CHCA)を用いて測定したときはK1-oxのピークは観測されなかった。一方、負イオンモードではK1-oxがベースピークとして観測された (Fig. 5)。このマトリックス-試料混合物にDAHCを添加することで、正イオンモードにおいてもK1-oxを観測することができた。様々なマトリックスを検討したところ、正イオンモードでは核酸のイオン化に用いられる2,4,6-trihydroxyacetophenoneとDAHCの混合マトリックスが最も高いK1-oxの強度が得られることがわかった。これらの結果はK2-mixにおいても同様であった。DIOSによるイオン化ではCHCAを用いたときと同様の結果が得られ、DIOSにおいてもDAHCがK1-oxのイオン化を促進することがわかった。K2-mixではK2-re, K2-oxがNa付加イオンとして観測されたが、DAHCの添加によりそれぞれプロトン付加体としてイオン化され、K2-oxもプロトン付加イオンとして観測されるようになった (Fig. 6)。これらのことから、DAHCはプロトンの供給源として働き、システインスルホン酸を含む酸性ペプチドのイオン化を促進することがわかった。¹⁰⁾

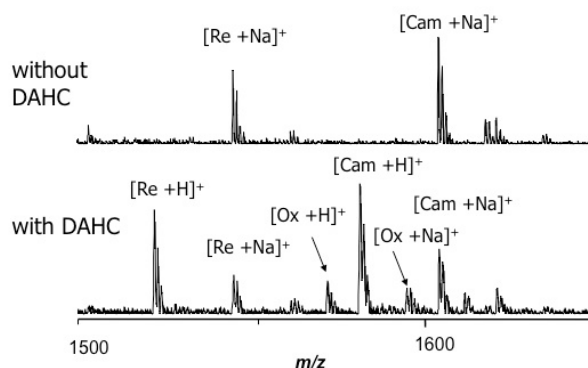


Fig. 6 Positive DIOS spectra of K2-mix, which equimolar mixture of -SH form (Re), -SO₃H form (Ox), -S-CH₂CONH₂ (Cam) of DINAYNCEPTEK.

文献

- 1) L. N. Johnson and M. O Reilly, Curr.Opin. Struct. Biol., 6, 762 (1996).
- 2) A. M. Dean, M. H. I. Lee and D. E. Koshland, Jr, J. Biol. Chem., 264, 20482 (1989).
- 3) J. E. Casnellie "Methods in Enzymology," Vol. 200 ed. by T. Hunter and B. M. Sefton, Academic Press, San Diego (1991), p.115.
- 4) R. S. Annan and S. A. Carr, Anal. Chem., 68, 3413 (1996).
- 5) R. S. Brown and J. J. Lennon, Anal. Chem., 67, 3990 (1995).
- 6) J. J. Lennon and K. A. Walsh, Protein Sci., 6, 2446 (1997).
- 7) T. Kinumi, H. Niwa and H. Matsumoto, Anal. Biochem., 277, 177 (2000).
- 8) H. Matsumoto, E. S. Kahn and N. Komori, Anal. Biochem., 260, 188 (1998).
- 9) T. Kinumi, E. Niki and H. Matsumoto, J. Biochem. 138, 791 (2005).
- 10) T. Kinumi, Y. Shimomae, R. Arakawa, Y. Tatsu, Y. Shigeri, N. Yumoto and E. Niki E. J. Mass Spectrom. 41, 103 (2006).