

Title	リン酸化プロテオミクスの検出感度に関する基礎研究
Author(s)	大坂, 一生
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書: 1-5
Issue Date	2015-06-02
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/12833">http://hdl.handle.net/10119/12833</a>
Rights	
Description	研究種目: 基盤研究(C), 研究期間: 2012 ~ 2014, 課題番号: 24619006, 研究者番号: 90550244, 研究分野: 質量分析学

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24619006

研究課題名(和文)リン酸化プロテオミクスの検出感度に関する基礎研究

研究課題名(英文)Study on ion yield of phosphorylated peptides in ESI for proteomic analysis

研究代表者

大坂 一生 (Osaka, Issey)

北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター・講師

研究者番号：90550244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳後修飾タンパク質の検出や構造解析は、医学・薬学の分野において重要である。タンパク質の同定は、そのタンパク質の消化物の質量分析によって行われる。しかし、消化生成物のペプチドはイオン化効率が一律でないため、検出感度が低いペプチドがある。これまでペプチドの検出感度の低下に関する詳細な議論は行われていない。本研究ではペプチドの物性とイオン収量の関係を系統的かつ定量的に評価した。多くの疎水性アミノ酸残基を含むペプチドは正負イオンともにより高い収量を示した。ESIにおいて試料分子のイオンの気化流束はイオン化効率よりもイオン収量に与える影響が大きいことが定量的に示された。

研究成果の概要(英文)：Methods for the proteomic analysis have been established using ESI-MS interfaced with liquid chromatography. If all the peptide ion peaks from a protein digest can be detected in a mass spectrum, accurate identification of the protein can be achieved. However, it is difficult to detect the all tryptic digests because of the different ion yields for each peptide fragment. The ion yields of peptides are strongly dependent upon their physicochemical properties. I have studied the effects of the hydrophobic amino acid Phe residue and the influence of its position in peptides on the positive- and negative-ion yields in ESI. Hydrophobic peptides containing Phe residue(s) were potentially advantageous to the vaporization process from the charged droplet to the gas-phase in ESI, resulting in increased total ion yields in both positive- and negative-ion ESI. The enhancement effect of hydrophobicity on the ion yields was higher than that of basicity and acidity of the peptides in ESI.

研究分野：質量分析学

キーワード：ESI プロテオミクス イオン収量 ペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

翻訳後修飾タンパク質の検出や構造解析は、医学・薬学の分野において大変重要である。翻訳後修飾タンパク質の中でもリン酸化タンパク質は、アルツハイマーや癌などのマーカーとなるものが多いことが知られている。タンパク質は X 線回折によって構造を解されるが、リン酸化タンパク質の情報は極めて少ない。NMR 法は溶液中のタンパク質の立体構造を決定できるが多くの試料量を必要とする分析手法である。微量のタンパク質の同定は、二次元電気泳動や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離・精製後に酵素消化を行い、消化生成物の質量分析の結果とデータベースの照合によって行われる。この手法はペプチドマスフィンガープリント(PMF)法と言われている。しかし、消化生成物のペプチドはイオン化効率が一律でないため、中には検出感度が低いために検出できないペプチドがあり、その場合はタンパク質の配列のカバー率が低下する。また、翻訳後修飾を受けたペプチド、特にリン酸化ペプチドはイオン収量が少ないために、量の少ないリン酸化タンパク質の構造決定が困難である。リン酸化タンパク質の配列カバー率上昇のための解決策は、リン酸化されたペプチド断片の濃縮と、使用する消化酵素の変更のみである。アミノ酸配列やペプチドのリン酸化による検出感度の低下の原因に関する詳細な議論は行われていない。

### 2. 研究の目的

質量分析法の正イオン検出モードにおいては、アルギニン(R)残基を含有するペプチドの感度が高いことが経験的にわかっている。その理由は、R は塩基性の高いグアニジノ基を含んでおり、アミノ酸の中で最もプロトン親和性が高いためであると説明される。しかし、これらを系統的に評価して、イオン収量と物性の関係性を検証した例は少ない。

プロテオームにおいて最もよく使用され

ており応用例も多い LC-MS で用いられるイオン化法の ESI においては、ペプチドのイオン化の系統的な評価の研究が進んでいない。LC-MS においてタンパク質の配列カバー率の低下を引き起こすペプチドの物性や、リン酸基導入によるイオン収量への影響を解明することは、プロテオーム解析とその定量的分野において大きな知見となる。

本研究課題ではリン酸化プロテオームのために、アミノ酸やペプチドの物性とイオン収量の関係を系統的かつ定量的に評価することを目的として、研究を遂行した。主に、アミノ酸残基やペプチドの物性とイオン収量の関係の定量的な評価や、リン酸化ペプチドのリン酸化によるイオン収量の定量的な評価、リン酸化タンパク質消化生成物のイオン収量の評価を行った。

### 3. 研究の方法

質量分析におけるイオン化の反応は、以下の式を用いて検討した。

$$J_i = I \times J_v$$

( $J_i$ :イオン収量,  $I$ :イオン化効率,  $J_v$ :気化流束)

イオン化効率( $I$ )は、プロトン親和力や酸・塩基性度などの物性と関連する 気化流束( $J_v$ )は凝縮相からの気化・脱離の傾向を示し、溶液では表面への移動のしやすさを表す表面活性や疎水性などと関連する。本研究課題で用いる ESI における気化流束( $J_v$ )は、電荷分離後に同電荷のイオンを高濃度に含む溶液が大気中で噴霧気化されて気体状イオンを生成する傾向を示す。本研究課題では、様々な構造のペプチドのイオン収量と検出限界を求めることで、ペプチドの物性とイオン収量の関係性を評価した。

実験は LC-MS を用いてフローインジェクション法で行った。試料の正負イオンのイオン収量をそれぞれ求めた。

(1) ペプチドを構成するアミノ酸の物性の影

## 響の評価

スレオニン(T)ベースペプチド(T7)等を用いて行った。(表1) T7 ペプチドの末端を塩基性のアルギニン(R)に変更したペプチド(RT6, T6R)や,疎水性のフェニルアラニン(F)に変更したペプチド(RT5F, FT5R)等を用いて,アミノ酸残基の物性とイオン化収量の関連性を定量的かつ系統的に評価した。

Peptide	Sequence
T7	TTTTTTT
RT6	RTTTTTT
T6R	TTTTTTR
RT5F	RTTTTTF
FT5R	FTTTTTR
KT6	KTTTTTT
ACTH18-35 (A1)	RPVKVYPNGAEDESAEAF
[pTry <sup>23</sup> ]-ACTH18-35 (A1p1)	RPVKV <sub>p</sub> YPNGAEDESAEAF
[pTry <sup>23</sup> , pS <sup>31</sup> ]-ACTH18-35 (A1p2)	RPVKV <sub>p</sub> YPNGAEDE <sub>p</sub> SAEAF
[Arg <sup>30</sup> ]-ACTH18-36 (A2)	RPVKVYPNGAEDESAEAFR
[Arg <sup>36</sup> ]-ACTH19-36 (A3)	PVKVYPNGAEDESAEAFR
ACTH19-36 (A4)	PVKVYPNGAEDESAEAFP
ACTH22-39 (A5)	VYPNGAEDESAEAFPLEF
[Arg <sup>22</sup> ]-ACTH22-39 (A6)	RYPNGAEDESAEAFPLEF

表 1. スレオニンベースや ACTH ベースのペプチド

### (2) ACTH ベースペプチドのイオン収量

質量分析において標準試薬として頻繁に使用されている ACTH ペプチドフラグメントを用いてイオン収量を検証した。ACTH のC末端や両末端を塩基性アミノ酸のRに変更したペプチドや,疎水性アミノ酸のプロリン(P)が末端にあるペプチド,C末端がFでありN末端がRで構成されるペプチドを用いた。(表1) これらを相対的に定量評価して,多価イオン生成や感度低下の要因を検証した。

### (3) リン酸化ペプチドのイオン収量

ペプチドはリン酸化によりイオン収量が減少する。しかしイオン化法のESIにおいて,リン酸基の数やその結合アミノ酸によるイオン収量への影響は知られていない。本研究課題ではペプチドのリン酸化によるイオン収量低下を定量的に評価した。試料はACTHの18-35フラグメントの配列を基準として,そのチロシン(Y)やセリン(S)の側鎖をリン酸化したリン酸化ペプチドを用いた。(表1)

### (4) ペプチドの多価イオンの生成

ESIによるペプチドやタンパク質の多価イオン生成に対する添加物の影響を評価した。添加剤には酢酸や酢酸アンモニウム,アンモニア水,炭酸水素アンモニウム等を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) スレオニンベースペプチドのイオン収量

ペプチドを構成するアミノ酸の物性の影響の評価については,スレオニン(T)をベースとしたペプチドを用いて行った。塩基性のArg残基や疎水性アミノ酸のPhe残基のイオン収量に与える影響を評価した。Fig. 1にスレオニンベースペプチドの正・負イオンのイオン収量を示す。

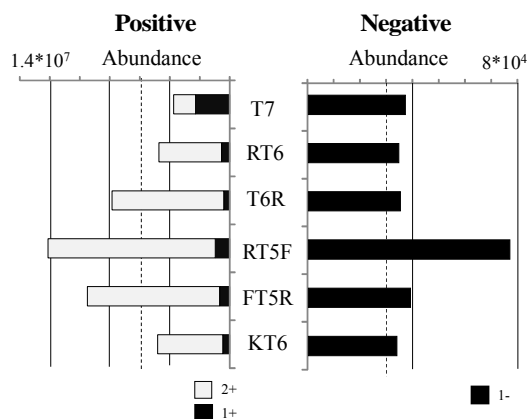


Fig. 1. スレオニンベースペプチドのイオン収量

Arg残基を含むペプチドは正イオンのイオン収量が高かったが,負イオンのイオン収量においてはあまり変化が見られなかった。Arg残基の側鎖の官能基はプロトン親和力が高いため,正イオンモードにおいてペプチドのプロトン付加イオンの量が多くなったと考えられる。一方,Phe残基を含むペプチドは正負両方のイオンモードにおいてイオン収量が向上した。正負両方のイオンモードにおいて,疎水性度が高いほどイオン収量が高くなることがわかった。この結果は,ESIの液滴中からのペプチドの気化流束( $J_v$ )が増加したことを示す。またペプチドのArgやPhe残基の位置によるイオン収量の違いも明らかとなった。

(2) ACTH ベースペプチドのイオン収量

ACTH フラグメントを用いて、アミノ酸の物性がイオン収量に与える影響を評価した。ACTH ベースペプチドのイオン収量を Fig. 2 に示す。ACTH フラグメントの RPVKVYPNGAEDESAAEF(A1) と RPVKVYPNGAEDESAAEFR(A2)の比較において、A2 は塩基性アミノ酸の Arg を二つ含むにも関わらず、A1 よりもイオン収量が小さかった。Arg は高い親水性の性質を持つため、Arg を多く含むペプチドの脱離量が少なくなったことが原因であると考えられる。A6 は疎水性アミノ酸残基が多く、また塩基性アミノ酸を含有しており、特に高いイオン収量を示した。本研究によって、ESI において気化流束( $J_v$ )はイオン化効率( $I$ )よりもイオン収量に与える影響が大きいことが定量的に示された。

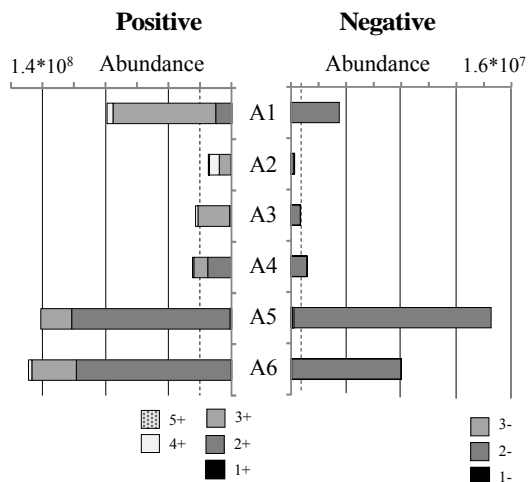
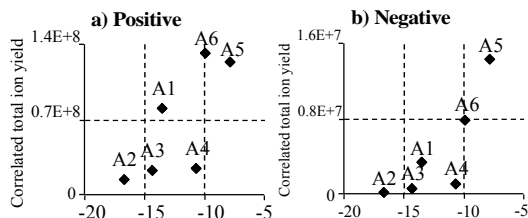


Fig. 2. ACTH ベースペプチドのイオン収量

ペプチドの疎水性度を分配係数から計算すると、疎水性の高いペプチドはイオン収量が高いことが示された。(Fig. 3) ペプチドの分配係数はイオン収量を理解するために重要なファクターであることが示唆された。

本研究の ESI におけるペプチドの疎水性度とイオン収量の関係を解析において、Arg や Phe の位置の違いによるイオン収量の違いが示され、ESI において気化流束( $J_v$ )はイオン化効率( $I$ )よりもイオン収量に与える影響が大

きいことを定量的に示すことができた。



Partition coefficient calculated for ACTH-based peptides  
Fig. 3. ACTH ベースペプチドの分配係数(PA)とイオン収量の関係

(3) リン酸化ペプチドのイオン収量

ESI によるリン酸化ペプチドのイオン収量を評価するために設計されたリン酸化 ACTH の定量的な評価を行った。リン酸化ペプチドのイオン収量を Fig. 4 に示す。リン酸基は負イオンを生成しやすいが、正負イオンモードの両方において、リン酸基の数が多いほどイオン収量が減少した。リン酸基は親水性が高いため、リン酸化ペプチドの脱離効率が低かったと考えられる。このことは、上述の ESI において気化流束( $J_v$ )はイオン化効率( $I$ )よりもイオン収量に与える影響が大きいという結果に一致した。

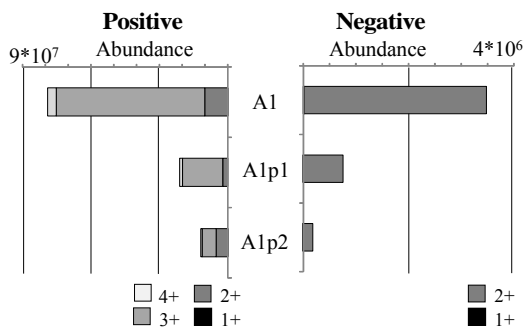


Fig. 4. リン酸化 ACTH のイオン収量

(4) ペプチドやタンパク質の多価イオン生成

ペプチドやタンパク質の多価イオン生成に対する添加物の影響を評価した。試料溶液への酢酸の添加量を増加させると、pH 変化に伴いタンパク質は変成するために、タンパク質表面の電荷状態が変化する。その結果、得られる多価イオン分布も変化する、酢酸の添加(pH3)では高い価数の正イオン、酢酸アンモニウム(AM)の添加(pH6.7)は低い価数の正イオンが生成された。タンパク質とペプチドの両

方において、同様の結果が得られた。酢酸-酢酸アンモニウムバッファ(pH3)を用いると、酸性条件化であるにも関わらず低い価数の正イオンが得られた。この結果は、ESI で得られるタンパク質の多価イオンは、タンパク質の変成だけでなく、ESI で生成された帯電液滴中におけるペプチドと添加物分子の反応も関係していることを示唆した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計3件)

1. Influence of hydrophobicity on positive- and negative-ion yields of peptides in ESI-MS, I. Osaka, M. Takayama, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2014, 28, 2222-2226, DOI: 10.1002/rcm.7010 (査読有り)

2. Two-dimensional mapping using different chromatographic separations coupled with mass spectrometry for the analysis of ginsenosides in Panax Ginseng root and callus, I. Osaka, H. Hisatomi, Y. Ueno, S. Taira, Y. Sahashi, H. Kawasaki, R. Arakawa, Anal. Sci., 2013; 29: 429-434, <http://doi.org/10.2116/analsci.29.429> (査読有り)

3. 5-Amino-1-naphthol, a navel 1,5-naphthalene derivative matrix suitable for matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay of phosphorylated peptides, I. Osaka, M. Sakai, M. Takayama, Rapid Commun. Mass Spectrom., 2013; 27: 103-108, DOI: 10.1002/rcm.6430 (査読有り)

##### [学会発表](計7件)

1. エレクトロスプレーイオン化法における化合物の物性とイオン収量の関係の評価, 大坂一生, 日本分析化学会 高分子分析研究懇談会 第375回例会, ゆうぽうと, 東京都品川区, 2014年12月10日

2. Two dimensional mapping integrating two chromatograms obtained with LC-MS for proteomics analysis, I. Osaka, Y. Ueno, H. Kawasaki, R. Arakawa, 30th International Symposium on Chromatography (ISC2014), Salzburg, Austria, 2014/9/12-18

3. 高感度プロテオーム解析のためのLC/MSにおけるペプチドのイオン収量の評価, 物質構造解析, 大坂一生, 理研シンポジウム 物質構造解析 2014 MS と NMR の基礎と実践,

理化学研究所鈴木梅太郎記念ホール, 埼玉県和光市, 2014年6月20日

4. Influence of arginine, lysine, phenylalanine residues and phosphorylation on the positive- and negative-ion yields of peptides in ESI-MS, I. Osaka, M. Takayama, HUPO 12th Annual world congress, Pacifico Yokohama, Yokohama City, Kanagawa, Japan, 2013/9/14-2013/9/18

5. ESIにおけるペプチドの電荷状態分布に対する溶媒組成の影響, 大坂一生, 高山光男, 第61回質量分析総合討論会, つくば国際会議場 つくばエポカル, 茨城県つくば市, 2013年9月10日-2013年9月12日

6. Influence of basicity and hydrophobicity of amino acid residues on the positive- and negative-ion yields of peptides in ESI-MS, I. Osaka, 日本質量分析学会 第三回若手春季シンポジウム 2013, Senri Life Science Center, Toyonaka City, Osaka, Japan; 2013/6/20

7. Optimization of ESI method for the LC-MS analysis of phosphorylated peptide, I. Osaka, M. Takayama, 19th International Mass Spectrometry Conference 2012; PWe-044, Kyoto International Conference Center, Kyoto City, Kyoto, Japan, 2013/9/15-21

##### [図書](計0件)

##### [産業財産権]

○出願状況(計0件)

国内外の別:

○取得状況(計0件)

##### [その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

大坂 一生 (OSAKA ISSEY)  
北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター・講師  
研究者番号: 90550244

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: