

イトゴカイ及びイトゴカイの分泌粘液中に存在するアミノ酸及びペプチドの探索

武田 夏実^{1,†}, 山根 綾華^{2,†}, 荻野 哲也³, 佐藤 健司³

¹常翔啓光学園高等学校, ²徳島市立高等学校, ³京都大学大学院農学研究科

要旨

泥中に生息している海産イトゴカイ (*Capitella teleta*) の体内及び分泌粘液中の分子量320以下のアミノ化合物をアミノ基に対する誘導化と液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) を用いたプリカーサーシステムにより検出した。アミノ酸に関しては、イトゴカイの分泌粘液中でグルタミン酸、アラニン、プロリンの割合が体内での割合に比べ高かった。これらのアミノ酸が分泌粘液中に分泌され機能を発揮する可能性が示唆される。また、分泌粘液中に、グルタミン酸またはアスパラギン酸とバリン、ロイシン、イソロイシンから構成されるジペプチドの存在が推定された。加えて、プロダクトスキャン分析で同定できない低分子化合物の存在を見出した。これらのジペプチドおよび低分子アミノ化合物も生理活性を持つ可能性が示唆される。

重要語句: アミノ酸, ペプチド, イトゴカイ, ベントス, 粘液, 液体クロマトグラフィー質量分析計

序論

海洋生物は、非常に多種多様であり、その中でも海洋無脊椎動物は、後天的な免疫系を持たないにも関わらず、微生物の多い環境においても生存している。このような生物は、分子量数千程度の抗菌ペプチドを分泌して微生物の増殖を抑制している⁽¹⁾。一方、海洋無脊椎動物中の分子量数百程度の低分子ペプチドに関する知見は、グルタチオンやアンセリン等の一部のペプチドを除いてほとんどない。これらの低分子ペプチドは、抗菌活性等の生理機能を持つ可能性がある。抗菌性を持つ低分子ペプチドが存在すれば、ヒトの健康増進に寄与できる可能性がある。しかし、ペプチドは、ペプチダーゼ等により迅速に分解されることが知られている⁽²⁾。そのため、体外に分泌したペプチドが機能を持つためには、ペプチダーゼに対する抵抗性を持つ必要がある。今回の研究では、海洋無脊椎動物が低分子ペプチドを合成、分泌し、利用している可能性を検証するために、泥中で粘液を分泌し、

その中で生息するイトゴカイの体内及び分泌粘液中のアミノ酸および低分子ペプチド等のアミノ化合物の存在を検討した。

試料と方法

試料

イトゴカイ *Capitella teleta* は有明海で採取され京都大学農学研究科で培養・維持したものを利用した。イトゴカイは体外に粘液を分泌し、その中で生息している (図1)。粘液はピンセットで採取した。

試薬

6-aminoquinolyl-*N*-hydroxy-succinimidyl carbamate (AQC) は Synchem (Altenburg, Germany) から購入した。アセトニトリル (HPLC用)、及びギ酸はナカライテスク (京都市) から購入した。その他の試薬は分析用を用いた。

ペプチドの抽出

イトゴカイ本体 (0.1342 g) に 150 μ L のリン酸緩衝液 pH

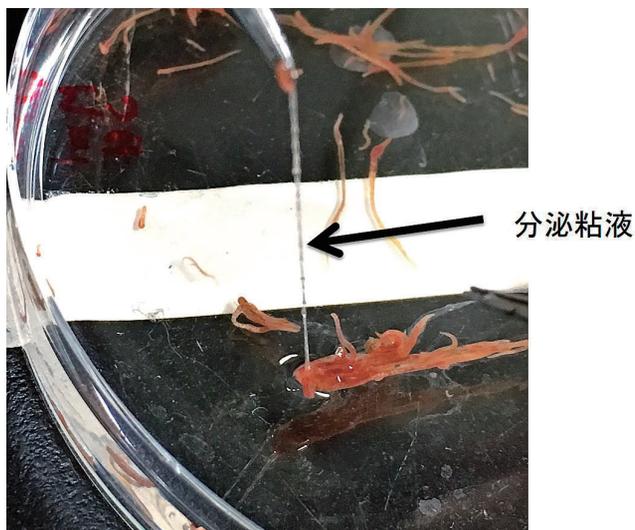


図1. イトゴカイとその粘液 (矢印)

[†] 武田夏実と山根綾華は貢献度の等しい筆頭者である。
内容に関する連絡先: kensato@kais.kyoto-u.ac.jp

7.4 (PBS) を加え、バイオマッシャーII (ニッピ, 東京) を用いて磨砕後, 300 μ L の60%酢酸を加えた。分泌粘液 (112 mg) には50 μ L のPBSおよび150 μ L の60%酢酸を加えた。その後, 10,000 \times g で10分間遠心分離, 上清を採取し, フィルター (Cosmonice 0.45 μ m, ナカライテスク, 京都) でろ過した。

サイズ排除クロマトグラフィー

30%酢酸抽出物中の成分は(イトゴカイ本体抽出物は50 μ L, 分泌粘液抽出物は200 μ L) をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) より分画した。SECによる分離には流速0.5 mL/minで0.1%ギ酸を含む10%アセトニトリルで平衡化したSuperdex Peptide (10 mm \times 300 mm, GE Healthcare) を用いた。1分ごとに溶出液を採取した。

液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS)

SEC画分を減圧遠心濃縮器で約100 μ Lに濃縮した。そのうち10 μ LをInertsil ODS-3, 2 mm \times 250 mm (GLサイエンス, 東京) を用いたLC-MS/MSにより分析した。溶出は流速0.2 mL/minで0.1%ギ酸 (A液) 及び80%アセトニトリルを含む0.1%ギ酸 (B液) を用いた2液グラジエントにより行った。カラムはA液で平衡化し, 10 μ Lのサンプルを注入後, 15分間でB液の割合を30%に直線的に上昇した。さらに, 5分間で50%に上昇させ, さらに5分間で100%に上昇させた。その後, 10分間, A液でカラムを平衡化した。カラムは, 40 $^{\circ}$ Cで保持した。溶出してきた成

分は, エレクトロスプレーイオン化 (ESI) プロブを備えたトリプル四重極質量分析器 (LCMS-8040) を用いて, トータルイオンを検出した。イオンのスキャン範囲は, $m/z=100-1000$ で行った。

アミノ化合物の特異的な検出のためAQC試薬によりアミノ基の誘導化を行った。AQC 1 mgを333 μ Lのアセトニトリル中で50 $^{\circ}$ Cで加熱し溶解した。SEC画分50 μ Lを乾固し, ホウ酸ナトリウム緩衝液 (AQC Tagに添付) を80 μ L加え, さらにAQC溶液20 μ Lを加えた。その後, 50 $^{\circ}$ Cで10分保ち, 遠心分離後, 上清をサンプルとした。逆相HPLCでの分離条件は前述の通り行った。アミノ基を持つ化合物はAQCと反応して, AQC誘導体となる。AQC誘導体はタンデム質量分析 (MS/MS) によりAQC由来のフラグメントイオン ($m/z=171$) が生じる。そのためLC-MS/MSにより $m/z=171$ を生じるプリカーサーイオンはアミノ化合物であると考えられる。この手法によりアミノ化合物の特異的な検出を行った (プリカーサーイオン)。コリージョンエネルギーは-35Vとした。プリカーサーイオンのスキャン範囲は $m/z=200-300, 300-400, 400-500$ を同時にスキャンした。また $m/z=400-500$ で検出されたプリカーサーイオンはコリージョンエネルギー-35Vで解裂したフラグメントイオンを検出した (プロダクトスキャン)。

結果

図2にイトゴカイ体内, および分泌粘液抽出物のSEC

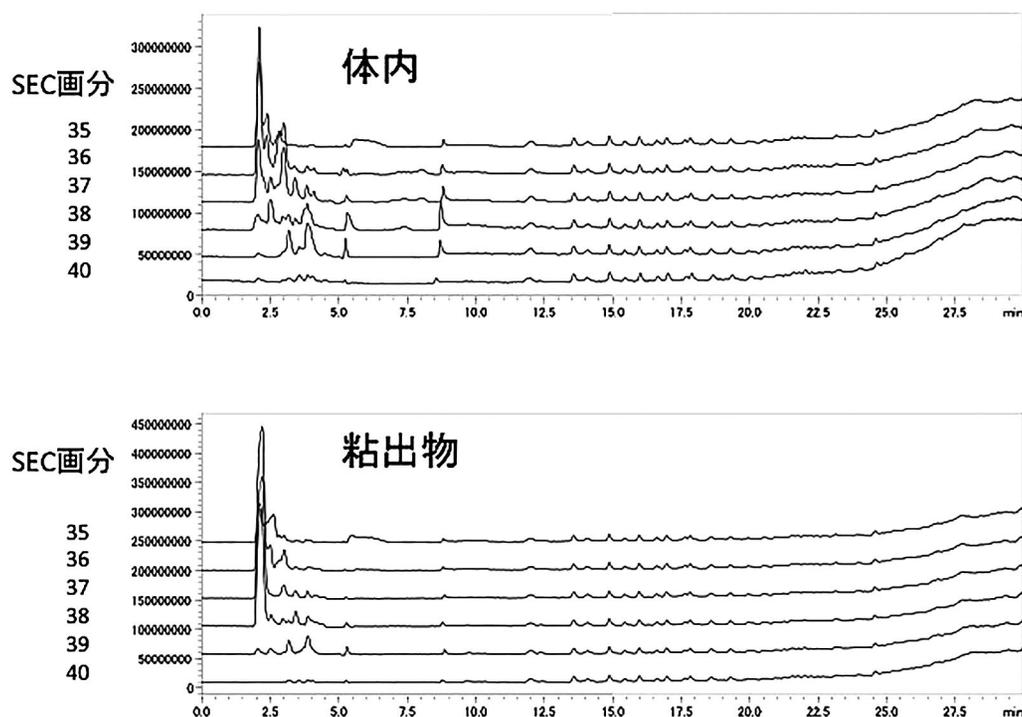


図2. イトゴカイ体内および分泌粘液抽出物のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 画分の逆相HPLC-質量分析 (LC-MS) によるトータルイオンクロマトグラム
SEC画分を逆相クロマトグラフィーで分画し, $m/z=100-1000$ の範囲をポジティブモードでスキャンした。

画分のLC-MSによるイオンクロマトグラムを示す。ほとんどのピークは5分以内に溶出し、親水性の化合物が中心であった。またSEC画分40の矢印で示すピークのスペクトルパターンを図3に示す。非常に多くの成分が含ま

れていた。そのためSEC-LC-MSの2次元クロマトグラフィによっても抽出物中の成分の分離は不十分であることが明らかとなった。

図4-6に示す様にAQC誘導化によりアミノ化合物の疎

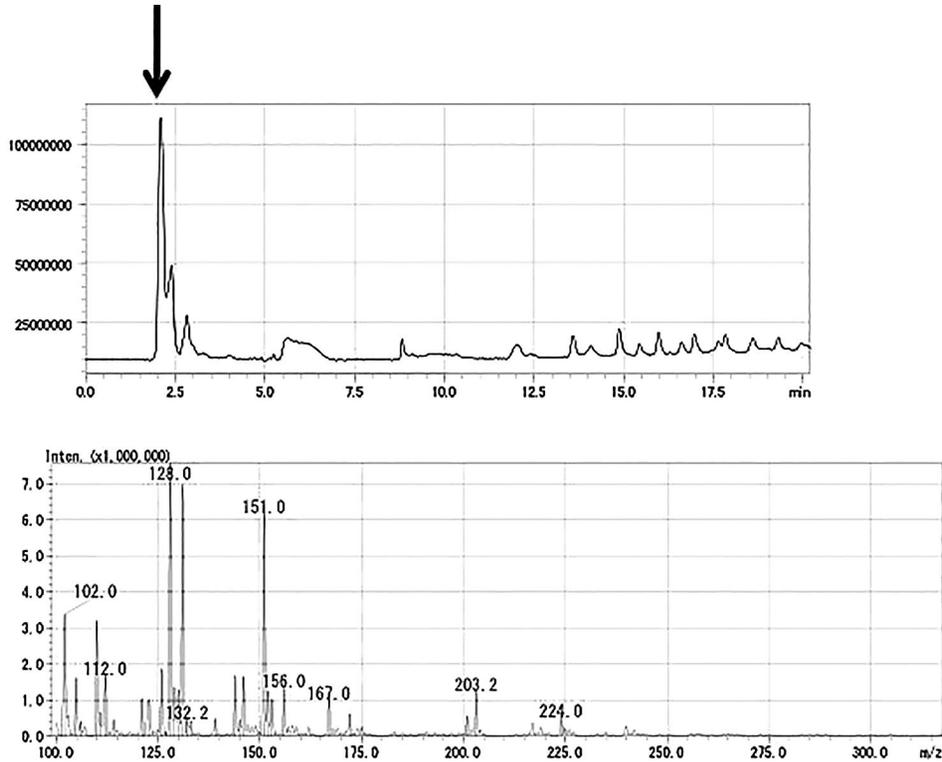


図3. 分泌粘液のSEC画分40のLC-MSピーク(矢印)のスペクトル分析

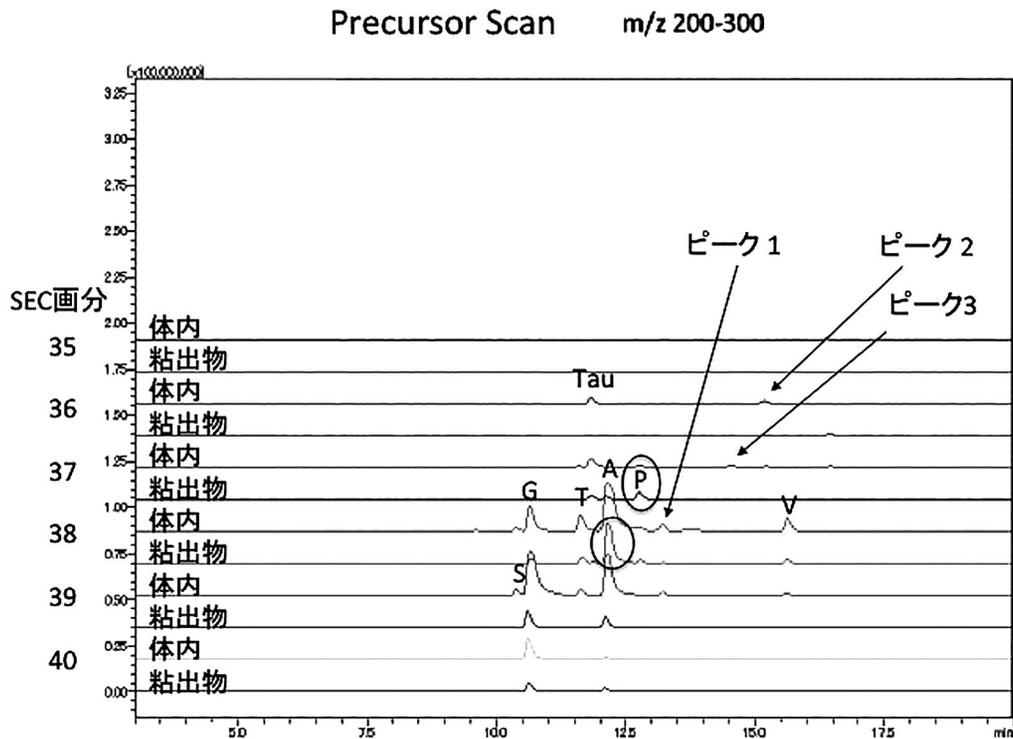


図4. イトゴカイ体内と分泌粘液のSEC画分のLC-MS/MSプリカーサーズキャン
 サンプルはAQCで誘導後、LC-MS/MSによりAQC由来のフラグメントイオンを生成するプリカーサーイオンを $m/z=200-300$ で検出した。この操作でアミノ基をもつ成分を選択的に検出した。分子量と溶出位置からアミノ酸を同定した。A：アラニン、G：グリシン、T：スレオニン、P：プロリン、V：バリン、S：セリン、Tau：タウリン。粘質物中にアラニン、プロリンが多く含まれる。

水性が増し、分離が改善された。またAQC由来のフラグメントイオン ($m/z=171$) を検出するプリカーサーキャン分析によりアミノ化合物が特異的に検出された。

$m/z=200-300$, $300-400$ のAQC誘導化物のプリカーサーイオンはアミノ酸のAQC誘導物の m/z に相当する。スペクトル分析の結果、得られた m/z 値から171を引くことで分子量が求められる。分子量から推定したアミノ酸を図4, 5に1字記号で示す。イオンのスキャン範囲が $m/z=200-300$ (分子量30-130の低分子アミノ化合物に相当) では、タウリン、グリシン、アラニン、プロリン、バリン、トレオニン、セリンが検出された。また、スキャン範囲が $m/z=300-400$ (分子量130-230の低分子アミノ化合物に相当) の場合、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、

メチオニンが検出され、イトゴカイの体内及び分泌粘液中に多種類のアミノ酸の存在を確認した。ほとんどのアミノ酸はイトゴカイ体内の抽出物で大きなピークが認められたが、プロリン、アラニン、グルタミン酸においては、分泌粘液に比較的多く検出された。本研究終了後、これらの結果はアミノ酸分析によっても確認した。また、表1に示すようにピーク1-6は分子量73, 124, 129, 130, 157を示し、これらはタンパク質構成アミノ酸の分子量と一致せず、他のアミノ化合物であると考えられる。

ジ・トリペプチドが含まれる $m/z=400-500$ のプリカーサーキャン分析(分子量230-330の低分子アミノ化合物を検出)では、図6に示す様に主要なピークを20選択した。プリカーサーイオンのスペクトル分析により得られた m/z から分子量を推定した。さらにプロダクトスキャン

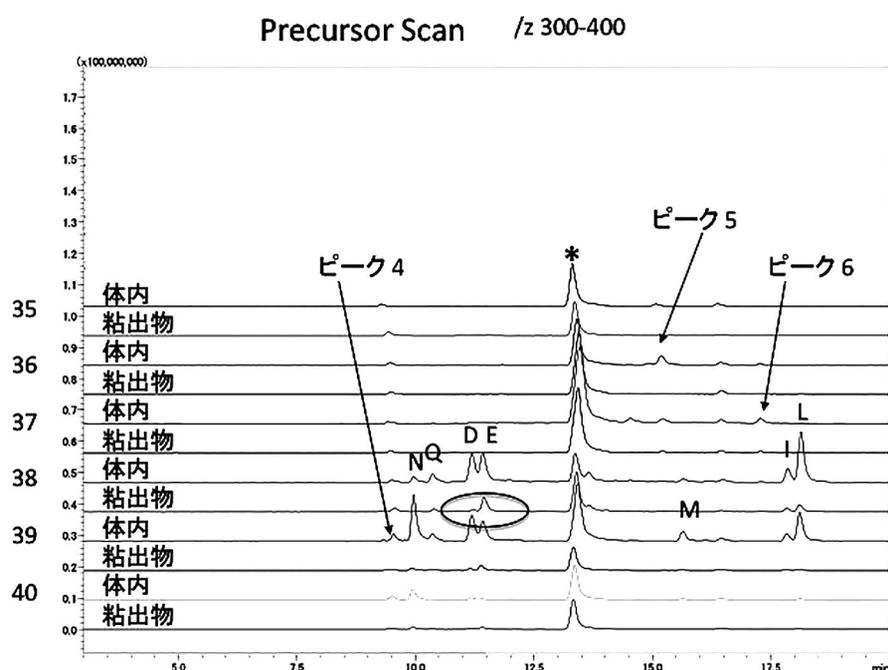


図5. イトゴカイ体内と分泌粘液のSEC画分のLC-MS/MSプリカーサーキャン ($m/z=200-300$)
D: アスパラギン酸, E: グルタミン酸, I: イソロイシン, L: ロイシン, N: アスパラギン, Q: グルタミン, M: メチオニン. 粘質物中にグルタミン酸が多く含まれる。

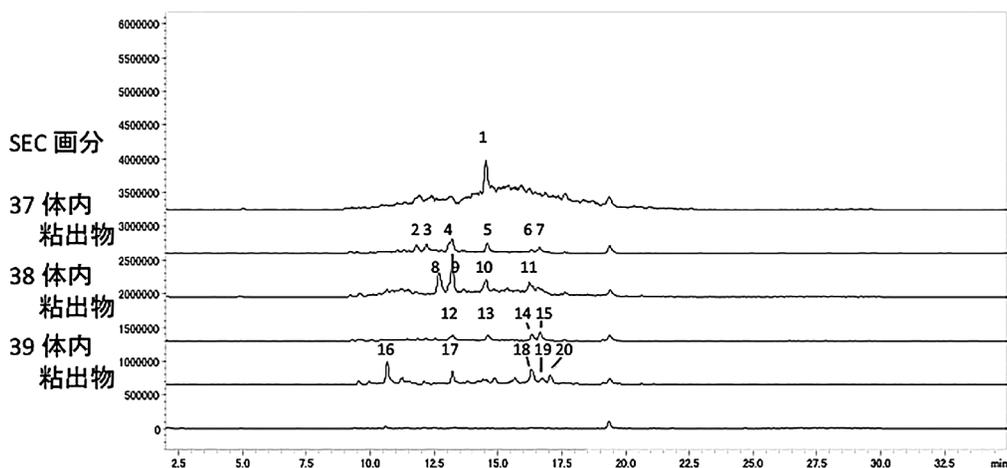


図6. イトゴカイ体内と分泌粘液のSEC画分のLC/MS/MSプリカーサーキャン ($m/z=300-500$)
ジペプチド, トリペプチドに相当する成分が検出されている。

ンによりフラグメントイオンを得、その構造を推定した(表2)。図7にピーク14と15(プリカーサー $m/z=431.1$)に対するプロダクトスキャンの結果を示す。いずれもイソロイシンまたはロイシンのインモニウムイオンとy1イオン、グルタミルイソロイシン/グルタミルロイシンのy2イオンとAQC由来のイオンが検出され両ピークはグルタミルイソロイシンまたはグルタミルロイシン(EI/EL)と推定できる。前述のペプチドの他、グルタミルバリン(EV; ピーク5)、アスパラチルバリン(DV; 11)、およびアスパラチルイソロイシンまたはアスパラチルロイシン(DI/DL; 18)が推定された。他のピークはタンパク質構成アミノ酸の組合せでは説明できない分子量とフラグメントイオンを持っていた。

考察

SEC画分を直接LC-MSでトータルイオンを検出した場合、親水性物質の分離が不十分で、スペクトル分析で多くの成分が分離できていなかった。AQCによる誘導化とプリカーサースキャンによりアミノ化合物の分離の改善と選択的な検出が可能となった。ほとんどのアミノ酸は体内の方が粘液中に比べ多く含まれていたが、粘液中のグルタミン酸、プロリン、アラニンのピークの割合が大きく、これらのアミノ酸から構成されている分泌粘液中の成分が分解されたのか、もしくはゴカイ自身がこれらのアミノ酸を他のアミノ酸に比べ優先的に体外に分泌した

可能性が考えられる。前者の可能性を確認するため、分泌粘液構成アミノ酸の組成を調べる必要がある。後者の場合、バクテリア等の微生物が多い環境に遊離のアミノ酸を分泌することはバクテリアに利用される可能性があり、イトゴカイにとっての機能が不明である。一方、海産無脊椎動物は通常のタンパク質を構成するL-アミノ酸のみではなくD-アミノ酸を含むことが知られている⁽³⁾。イトゴカイの分泌粘液のアミノ酸の光学異性体に関する知見は著者の知る限り存在しない。また、D-アミノ酸はD-アミノ酸化酵素の基質になり、ケト酸に代謝される。その過程でアンモニアと過酸化水素を発生する。この反応で生じた過酸化水素が抗菌性を示す可能性がある。もし、イトゴカイがD-グルタミン酸、D-アラニンを粘液中に分泌し、これらを代謝することで抗菌性を示せば、このシステムはイトゴカイの環境中での生体防御機能の一翼を担っている可能性がある。これらの可能性を今後検討してゆく必要がある。アミノ酸に相当する分子量で未同定の成分は、 $m/z=244$ (推定分子量73)がアミノプロパナール、 $m/z=301$ (推定分子量130)がアグマチンに相当する(表1)。これらの化合物の存在を今後確認すべきであり、さらにその機能を解明すべきであると考えられる。

また、イトゴカイの分泌粘液中に含まれる低分子ペプチドは、泥中に生息しているイトゴカイと共生する生物が分泌したか、あるいは、イトゴカイの体内から分泌されたと推測できる。LC-MS/MS解析からグルタミン酸またはアスパラギン酸と疎水性アミノ酸であるバリン、ロ

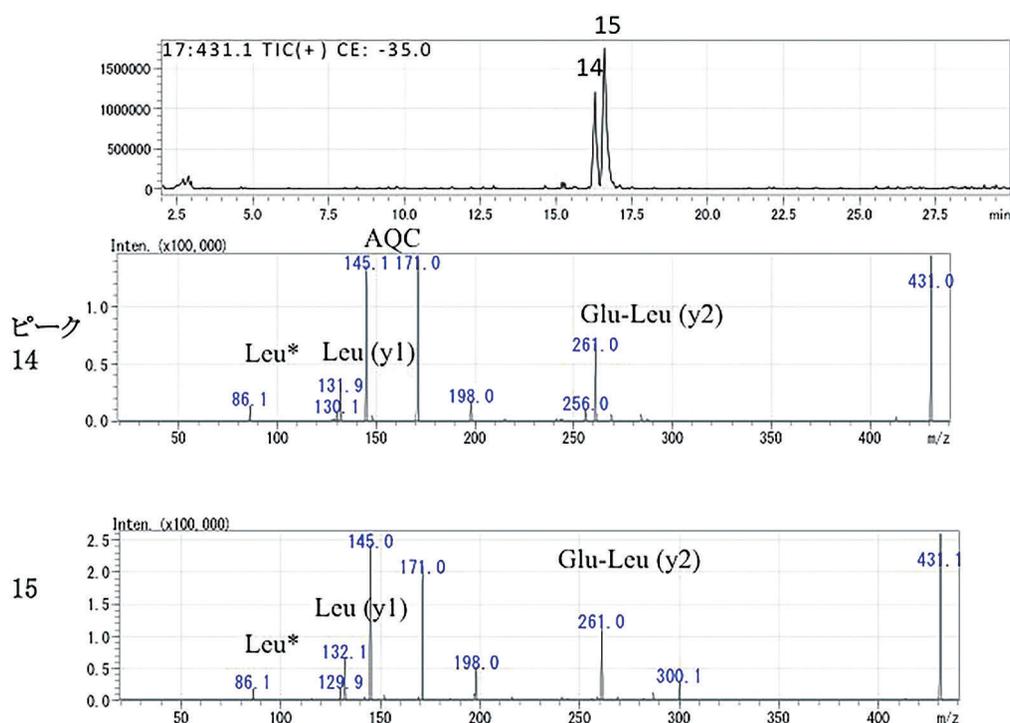


図7. LC-MS/MSによるペプチドの構造解析

図6のピーク14,15のフラグメントイオンパターンを示す。

*はインモニウムイオンを示す。ロイシン (Leu)とイソロイシン (Ile)は分子量が同じであるため区別できない。ここではいずれもLeuと記載している。

表1. 未同定の低分子化合物の分子量

ピーク番号	m/z	推定分子量	推定成分
1	244	73	アミノプロパナール
2	300	129	
3	295	124	
4	301	130	アグマチン
5	300	129	
6	328	157	

図4, 5に記したピークの番号のスペクトル解析により得た。データベース (Mass Bank) で分子量が一致した成分を推定成分とした。推定分子量はAQC誘導体のm/zより計算した。

イシン, イソロイシンから構成されるジペプチドの存在が示唆された(表2)。いずれもアミノ末端に側鎖にカルボキシル基をもつアスパラギン酸またはグルタミン酸を持っている。ジペプチドはペプチターゼにより分解されやすいため、ペプチダーゼに対して耐性を持つ γ 位または β 位のカルボキシル基とペプチド結合を持つ可能性がある。今後、イソペプチドを化学合成し、溶出パターンを比較することで同定してゆきたい。また、アミノ基を持つが、LC-MS/MSによりタンパク質構成アミノ酸由来のペプチドと同定できないピークが見られた(表2)。これらのペプチド様化合物を同定し、これらの抗菌性等の生理機能を今後確認してゆきたい。

結論

本研究では、イトゴカイの体内及び分泌粘液中に一般のアミノ酸の他に、低分子アミノ化合物と低分子ペプチドの存在が示された。現段階では、粘液中に検出されたアスパラギン酸・グルタミン酸とロイシン・イソロイシンから構成されるペプチドの構造と機能は特定できないが、これらのペプチドがイトゴカイまたヒトにとっても有益な活性を持つ可能性がある。LC-MSのピーク面積比から体内と分泌粘液ではアミノ酸組成が異なることが示された。両者に含まれるアミノ酸の生理機能について今後調べてゆきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、基盤コース後期、専修コースを通して、多大なご指導を頂いた京都大学大学院農学研究科海洋生物機能学分野の皆様へ深く感謝申し上げます。皆様には、研究を通して、研究内容に関する幅広い知識や研究者としての在り方、研究との向き合い方について多くのことを学ばせて頂き、本当にありがとうございました。

イトゴカイを提供して頂いた、熊本県立大学の堤裕昭先生と北九州大学の上田直子先生のご厚意に感謝いたします。

表2. ペプチド画分のアミノ化合物の分子量と推定構造

ピーク番号	m/z	推定分子量	推定成分
1	442.3	271	不明
2	424.1	253	不明
3	403.2	232	不明
4	417.1	246	不明
5	417.1	246	EV; V*, V (y1)
6	431.2	260	EL; L*, L (y1), EL (y2)
7	431.2	260	EL; L*, L (y1), EL (y2)
8	434.1	263	不明
9	487.2	316	不明
10	442.3	271	不明
11	403.2	232	DV; V*, AQC-D (b2)
12	487.2	316	不明
13	417.1	246	EV; V*, V (y1)
14	431.2	260	EL; L*, L (y1), EL (y2)
15	431.2	260	EL; L*, L (y1), EL (y2)
16	491.2	320	不明
17	487.2	316	不明
18	417.1	246	DL; L*, AQC-D (b2)
19	403.2	232	不明
20	431.2	260	EL; L*, L (y1), EL (y2)

図6に示すピーク番号のスペクトル解析による。MS/MS分析により観察されたイオンにより構造を推定*はインモニウムイオンを示す。アミノ酸は1文字表記で示す。

また、京都大学ELCASプログラムを通して献身的なサポートを頂きましたELCAS事務局の皆様をはじめ、このような貴重な学びの場を与えて下さり、支えた下さった全ての方々に心から感謝致します。

参考文献

1. Sperstad, S. V., Haug, T., Blencke, H.-M., et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotec. Adv.* 29, 519–530 (2011).
2. Sato, K., Tsukamasa, Y., Imai, C., et al. Improved method for identification and determination of ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by high-performance liquid chromatography separation. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 806-810 (1992).
3. Preston, R. L. Occurrence of d-amino acids in higher organisms: A survey of the distribution of d-amino acids in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, B. 87, 55-62 (1987).

Detection of amino acids and peptides in body and secreted mucus from marine polychaetes, *Capitella telera*

NATUMI TAKEDA^{1,†}, AYAKA YAMANE^{2,†} TETSUYA OGINO³ & KENJI SATO³

¹Josho Keiko Gakuen, ²Tokusima Municipal High School, ³Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Abstract

Amino compounds with molecular weights less than 329 dalton were detected in the body and secreted mucus from the marine Polychaeta, *Capitella telera*, which is distributed in the mud of shallow seas. The amino group of samples was derivatized with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). The AQC derivatives were resolved by reversed phase HPLC and specifically detected by tandem mass spectrometry (MS/MS) in precursor ion scan mode. The proportions of glutamic acid, alanine, and proline to total amino acids in the secreted mucus were higher than those in the body, which suggested that these amino acids might be preferentially excreted into the mucus and exert some specific effects. LC-MS/MS analysis revealed the presence of di-peptides that consisted of glutamic acid or aspartic acid and valine, leucine, and isoleucine in the secreted mucus. Furthermore, some unidentified amino compounds were detected. These di-peptides and low molecular weight amino compounds might also have some specific effects in the mucus.

Key words: Amino acids, peptide, polychaetes, benthos, mucus, LC-MS.

[†]Natumi Takeda and Ayaka Yamane equally contributed to this study.
Corresponding Researcher: kensato@kais.kyoto-u.ac.jp