

総合論文

質量分析装置を用いるタンパク質中 D 型アミノ酸残基の同定

高田 匠¹

加齢後の組織中タンパク質内部の様々な部位に存在すると考えられる異性化 Asp を同定するためには、キラル誘導体分離法、ジアステレオマー誘導体化法など煩雑な研究手法の組み合わせが一般的であった。これに対して、著者らの研究室では質量分析装置を『質量検知装置』として用い、液体クロマトグラフィーと組み合わせた手法を開発、改良して簡便・迅速にタンパク質中の異性化 Asp 部位を決定することに成功した。本手法では、2段階の酵素消化に応じて生成する合計4つの試料を同条件の nano-scale 液体クロマトグラフィー連結型の質量分析装置へと導入する。各ペプチド断片中で Asp 異性体に準じた酵素の作用による分子量変化が生じるため、質量で描くクロマトグラムから各々対応するペプチド断片のピークが消失する。これを利用することで各 Asp 異性化部位の同定及び Asp 異性体の区別を同時に行うことが可能となった。

1 緒言

生体組織のみならず食品や薬品などの構成成分であるタンパク質は、複数のアミノ酸がアミド結合した高分子である。タンパク質を構成するのは20種類ものアミノ酸であり、このうちグリシンを除く19種のアミノ酸はL-アミノ酸、D-アミノ酸の両方の形態を持つキラル分子である。それにもかかわらず、生体内リボソーム上でのタンパク質合成時にはL-アミノ酸のみが選ばれる。生合成時リボソーム上では、mRNAの塩基配列に基づいて対応したアミノ酸を含むアミノアシル tRNA が結合する。この材料となるアミノ酸とアミノアシル tRNA との反応は、アミノアシル tRNA 合成酵素により触媒されるが、この酵素がL-アミノ酸のみを基質とする。そのため、D-アミノ酸は tRNA と結合せず、結果として生体内でD-アミノ酸を含むタンパク質が生合成されることはない。したがって、生体内のタンパク質を構成するアミノ酸はすべてL-アミノ酸となる。このようにキラル分子において一方の光学異性体のみが偏って存在することをホモキラリティという。生体にとってタンパク質中のアミノ酸ホモキラリティの獲得はタンパク質の複雑性を制限する意味で生命の進化に不可欠だった可能性がある。しかし実際に生命の起源で生体がどのようにして、このタンパク質中アミノ酸ホモキラリティを獲得したのかについては解明されていない。

興味深いことに、これら生体内タンパク質が有するアミノ酸のホモキラリティが崩れつつある。最近の研究にお

いて眼の水晶体や網膜、結膜、角膜、脳、皮膚、歯、骨、動脈壁、靭帯、肺、腸など様々な組織のタンパク質中にD-アミノ酸残基が確認され、特に加齢性疾患との関連性が示唆されている^{1)~13)}。これらの同定されているタンパク質中のD-アミノ酸残基の多くは、アスパラギン酸残基 (Asp) である。筆者の研究室ではD-アスパラギン酸残基 (D-Asp) に着目し、その異性化機構、組織への影響、疾患との関連性、新規加齢バイオマーカーとしての利用などに関する研究を進めている。

タンパク質中で生じるアミノ酸のホモキラリティの破綻、その主たるL-AspからD-Aspへの変化は自発的及び非酵素的に生じる化学反応である。単純なL-アミノ酸からD-アミノ酸への化学変化としては、水溶液中でのL-アミノ酸内部 α -炭素に結合している水素の引き抜きと、再度水素が結合する際に側鎖と位置関係が逆転する経路が考えられる。しかし、このような反応は塩基性条件下や高温条件下に限られる。また、生体内のタンパク質中でD-アミノ酸として同定されているアミノ酸の多くがAspであることを説明することができない。実際にはAspには特有の異性化機構が存在しており、時間に応じて自発的にD-Aspへと変化していく。それに伴いタンパク質中のD-アミノ酸の多くがD-Asp及びその誘導体(β 結合型のiso-Asp。以下では β -Aspと記述する)となる。

Asp特有の異性化機構をFig. 1に示す。本反応の開始点は、L-Asp (L- α -Asp)のC末端側ペプチド結合に参加している窒素原子上の、孤立電子対によるAsp側鎖カルボニル炭素への求核攻撃である。この反応によりAspは五員環のケト型L-スクシニミドとなる。このスクシニミド上で生じるケト-エノール平衡によってエノール中間体

E-mail: takumi@rri.kyoto-u.ac.jp

¹ 京都大学複合原子力科学研究所: 590-0494 大阪府泉南郡熊取町朝代西2

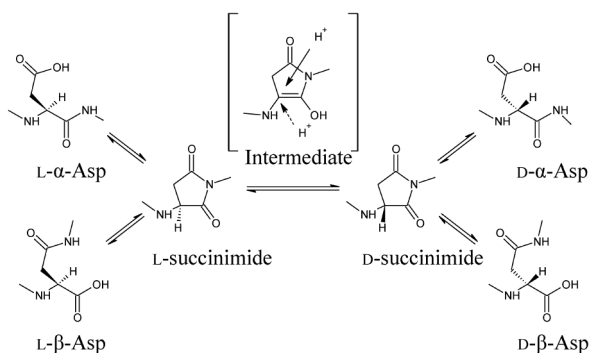


Fig. 1 Reaction scheme for spontaneous isomerization of Asp residues in protein

Inversion and isomerization of Asp residues in proteins are considered to proceed via a succinimide intermediate. The ratio of hydrolysis into α -Asp and β -Asp is almost set to approximately 1:3, but the ratio of inversion via an intermediate depends on each Asp. The local structure nearby an intermediate may alter the inversion to the D-isomers.

(Intermediate) が生成する。続いてエノール中間体に対するプロトンの付加方向によって、L-スクシニミドとD-スクシニミドの双方が形成される。その後、加水分解に由来する2通りの開環反応が起こることによって、L-スクシニミドからはL- α -AspまたはL- β -Aspが、D-スクシニミドからはD- α -AspまたはD- β -Aspが形成される。このスクシニミドの開裂には方向性がある。 α 体と β 体の生成比は α 体が15~30%、 β 体が70~85%であり、 β 体のほうが形成されやすい¹⁴⁾¹⁵⁾。

以上のようにして生じ、蓄積すると予想される異性化Asp残基だが、実際にはすべてのAspが同様に異性化するとは限らない。これらタンパク質内部で部位特異的に生じる異性化「反応の場」を明らかにするためには、多くのタンパク質中から、どのような部位のAspが異性化しやすいのかを網羅的に同定する必要がある。しかし、アミノ酸の光学異性体は、物理的・化学的性質が等しく異性体間の分離が困難であるがゆえ、これまで網羅的な分析は進められていなかった。従来からジアステレオマー法-逆相HPLC-蛍光検出などの複合的な手法で分析されていたものの、煩雑な操作とスループットの低さが指摘されていた。この問題をクリアするべく著者らの研究室では、質量分析装置を用いた迅速で簡易かつ網羅的な、異性化Asp同定手法の開発及び改良に取り組んできた。

2 D-Asp 分析手法の改良

2.1 従来のタンパク質中 D-Asp 分析手法

Fig. 2に、従来のジアステレオマー法を主軸として進める場合と、著者らが開発した nano-scale 液体クロマトグラフィー連結型の質量分析装置 (nanoLC-MS/MS) を用いた

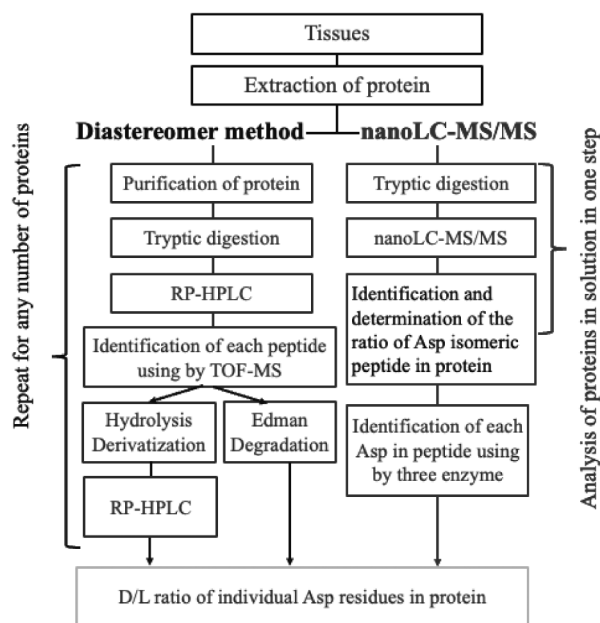


Fig. 2 Comparison of conventional D/L analysis and nanoLC-MS/MS methods for analyzing Asp isomers in protein

手法の手順を示す。従来法では、まず生体試料からのタンパク質の分画、酵素消化、逆相HPLCによるペプチド断片の分画、TOF-MSなどによるペプチド断片の同定を進めることになる。これらに続けてペプチドの酸加水分解・ジアステレオマー誘導体化後の逆相HPLC結果から、D/L比の算出を経て、D-アミノ酸残基の存在するタンパク質及び部位を特定する。他方、 α 体と β 体の区別は同サンプルを用いたエドマン分解にて行う。これらの手法は分析したタンパク質中において酵素消化した全部分のアミノ酸種の異性化部位と異性化率を同定できるという利点があるが、一つの標的アミノ酸残基部位に対して1週間程度の解析時間が必要である。さらに、本手法では、組織抽出物を用いる際には各タンパク質分画後、個別に酵素処理以降の操作を行う必要があるため、生体試料に含まれる全タンパク質を網羅的に分析するために莫大な時間が必要となる。このように、分析に必要とする時間と実験操作の煩雑性が、タンパク質中の網羅的な異性体分析の障壁になっていた。

2.2 nanoLC-MS/MS を用いたタンパク質中 D-Asp 分析手法

従来の分析手法にかかる問題をクリアするべく著者らが開発した手法では、nano-scaleの逆相HPLCからの溶出ピークに対して質量分析装置を「質量検知装置」として用いることが重要となる¹⁶⁾。通常、質量分析装置は、組織内タンパク質の酵素処理後のペプチド断片の質量を網羅的にデータベース検索することを主たる目的として用いられる。一方、ペプチド内部のアミノ酸残基に関しては、L型

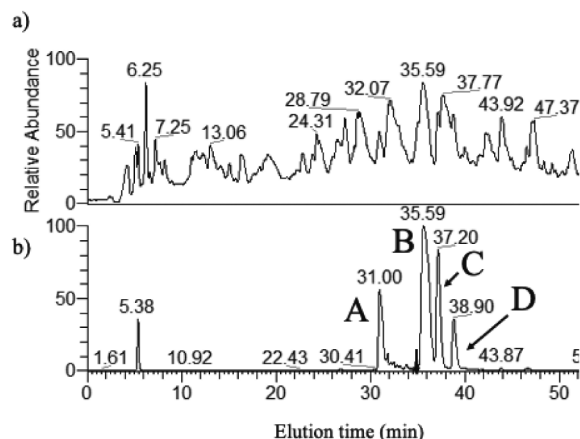


Fig. 3 Nano-RP-HPLC chromatograms of the tryptic peptides of WI fractions of lens proteins from 73-year-old human

a) Full LC-MS chromatogram of tryptic peptides obtained from the lens water-insoluble (WI) fraction of 73-year-old human. b) Extraction of peaks in the MS range 588–589.5 m/z corresponding to an Asp isomer-containing peptide.

あるいは D 型にかかわらずペプチド自体の分子量は変化しない。本手法ではその部分に着目し、最初にデータベース解析をする際に網羅的に分子量を検索するのではなく、同一分子量であるにもかかわらず逆相クロマトグラフィー溶出時間の異なるペプチドに着目する。当該ピークを確認後、全クロマトグラムのデータ中から本ペプチドの分子量を有するクロマトグラムのみを選択抽出する。分解能の高い質量分析装置を検知器として用いるため、わずかな試料中から少量の D-Asp を見逃さず検出することができる。著者らはイオン化効率上昇に伴う感度及び分離能向上を見込み、逆相分離部分に nano-scale のラインカラムを設置しているが、試料の量が十分にありその分離に適したカラムであれば、どのようなカラムでも使用可能である。

Fig. 3 に、加齢後のヒト水晶体不溶性画分から抽出した水晶体構成タンパク質の分析データを示す。ヒト眼内の水晶体組織は代謝機構が乏しく、その構成タンパク質（クリスタリンと呼ばれる）は生涯を通して化学的な修飾を受け続ける。そのためクリスタリン内部には、加齢に応じた D-Asp の蓄積が顕著に見られる。Fig. 3 の各クロマトグラム上では横軸が nano-RP-HPLC からの溶出時間、縦軸が MS で検出したイオンの強度である。a) に関しては 73 歳のヒト水晶体から抽出した不溶性画分を尿素で可溶化したのち trypsin で消化し、生成したペプチド断片を nanoLC-MS/MS で分析後、観察された全ペプチド断片を表示している。b) に関しては a) と同じデータ中から、既知の異性化 Asp を含む、あるクリスタリン内部ペプチドの質量のみを抽出して描いたクロマトグラムである。配列は等しくも異性化したアミノ酸を含むペプチドは、元配列ペプチドのジアス

テレオマーとなり化学的性質が変化する。よって、b) に示すように実際は逆相カラム中で分離しており、一つの質量で抽出した場合に複数のピークとして示される。ただし、タンパク質の酵素消化物のように多数のペプチドを同時に分析した場合、質量の等しい異なる配列が存在する可能性がある。そのため MS/MS から得られるフラグメントイオンを用いたペプチド配列の確定が必要となる。著者らは MS でクロマトグラムを抽出しつつ、同時に MS/MS を取得する実験系を組んでいる。Fig. 4 では Fig. 3b で見られたクロマトグラム中のペプチドピーク 4 種を溶出順に A～D とし、それぞれのピークに対応する MS/MS のマススペクトルを示している。A～D の抽出物に関して b イオン、y イオンの数値がすべて同一であることから、これらのピークはすべて同一配列由来のものであり、クロマトグラム上で見られたピークの分離が各 Asp 異性体由来のものであることがわかる。なお A～D 中の各 Asp 異性体の区別は次項に述べる手法で行った。

2.3 nanoLC-MS/MS と Asp 異性体認識酵素を用いたピーク帰属手法

以上の手法にて異性体の有無は判断できるが、各異性体への帰属は不可能である。過去、著者らは各ピークの帰属のため標品ペプチドを化学合成して同システムへと用い、溶出時間の重ね合いから判別する手法をとっていた。この手法では、どのような配列中の異性化 Asp に関しても同定は可能である一方、標品となるペプチド合成のための試薬や手間がかかる欠点があった。そこで現在では質量分析装置の特性を生かし、trypsin 消化後のペプチド断片混合物に対して 3 種類の異性化 Asp 認識酵素を追加して、2 段階消化する手法をとっている¹⁷⁾。本同定法では下記 3 種の酵素を用いる (Fig. 5)。まず Asp-N を用いて L- α -Asp 含有ペプチド由来のピークを同定する。Asp-N は L- α -Asp のみに作用して Asp の N 末端側ペプチド結合を切断する酵素であり、他 Asp 異性体には作用しない。そのため、Asp-N をサンプルに作用させた場合に質量で描いたピークが消えれば、そのピークは L- α -Asp 含有ペプチド由来のピークであり、消えなければそれ以外の三つの Asp 残基異性体のいずれかを含むことになる。次に PIMT (protein L-isoaspartyl methyltransferase) を用いて、L- β -Asp 含有ペプチド由来のピークを同定する。PIMT は L- β -Asp 残基を特異的に認識し、L- β -Asp 残基のカルボキシル基に補因子である SAM (S-(5'-adenosyl) L-methionine) のメチル基が転移するのを触媒する酵素である。メチルエステルとなった L- β -Asp 残基は、スクシンイミドを経て L- α 体:L- β 体=1:3 の割合で Asp 残基異性体へと戻る。一度の反応により L- β 体の量は 3/4 になるため、反応が十分な回数起これば L- β 体が著しく減少すると考えられる。つまり、PIMT と SAM をサンプルに作

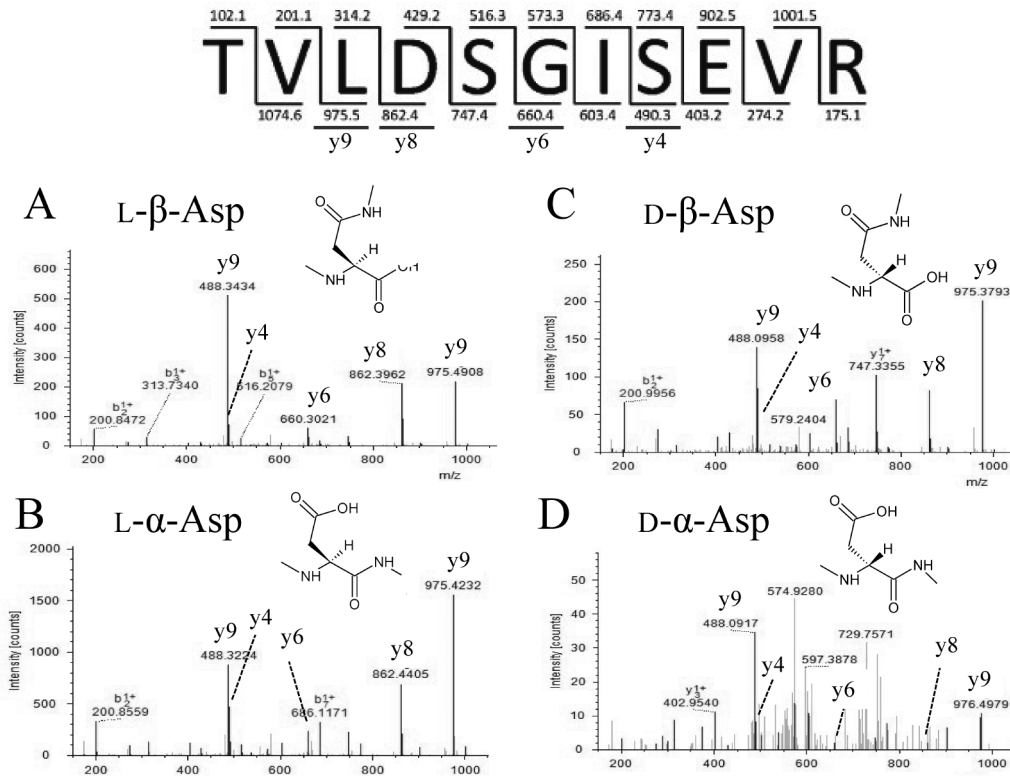


Fig. 4 MS/MS spectra of A–D of Fig. 3, corresponding to an Asp isomer-containing peptide. The target peptide sequence is on the top, the peak of which was actually extracted from lens WI fraction on Fig. 3. MS/MS spectra of peaks, corresponding to peaks A–D on Fig. 3b. Four peaks on different elution time showed the same MS/MS.

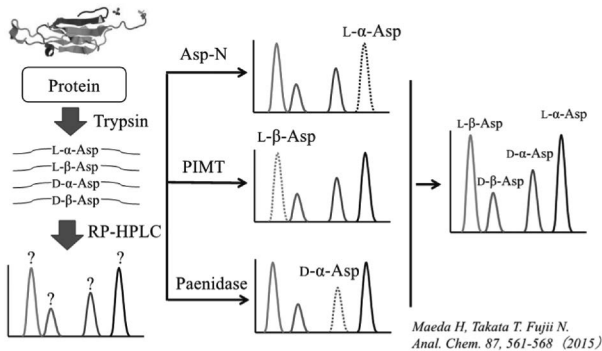


Fig. 5 Summary of the analysis of isomerization of Asp in protein using four different enzymatic digestion

用させた場合にピークの減少が見られれば、そのピークは L-β-Asp 含有ペプチド由来のピークであることになる。Paenidase を用いて、D-α-Asp 含有ペプチド由来のピークを同定する。Paenidase は D-α-Asp 残基の C 末端でペプチド結合を切断する酵素である。そのため、Paenidase をサンプルに作用させた場合に消失したピークを D-α-Asp 含有ペプチド由来のピークとみなす。最後に、どのステップにおいても変化がなかったピークを D-β-Asp 由来のピークと同定する。これらの分析はすべて市販の酵素を準備すること

で実行でき、分析に要する手間や時間もかからない。費用に関しても 1 回の同定に用いる量はそれぞれ数 μL の酵素であり、非常に安価なものとなる。加えて、組織からタンパク質の精製なども不用であり、ネックとなっていた得られる成果の網羅性も非常に高い。これを用いて、著者らの研究室では加齢後のヒト水晶体中で、加齢性白内障に關与すると考えられるクリスタリン中アミノ酸の「ホモキラリティの破綻」を数多く見いだしてきた^{16)–20)}。

3 結 言

従来のジアステレオマー法では分析に時間を要し、また特別に必要である装置も多く、網羅的な Asp 異性体含有タンパク質の分析は困難であった。一方、質量分析装置を質量検知装置として用いる本手法では複雑な装置の導入の必要がなく、容易な手順かつ網羅性も高い。本手法により網羅的な異性化 Asp 部位同定が可能になると同時に、各部位の Asp 異性化率の比較も可能となった。

一方で次のような課題も残る。例えば本稿で紹介した酵素を用いる場合、アミノ酸配列依存的に酵素の作用が不十分となる場合がある。また末端に Asp が存在する場合や連続して Asp が存在する場合に分析が困難となる。これらの課題の解決が今後の目的になる。

本手法はほかの様々な分離手法との相性もよく、様々な電気泳動後の in-gel digestion や Western blotting 後の On membrane digestion などにも応用可能である。これらの手法を組み合わせ構造因子・配列因子に加えて、種々の条件での異性化率の比較から異性化修飾の進行に関与する因子を明らかにしたいと考えている。

生体内でタンパク質が正しい機能を発揮するためには、それぞれのタンパク質が正常な高次構造を維持する必要がある。これに対して Asp の D 体化は側鎖方向が変化し、 β 化は主鎖が伸長するため、これらの変化がタンパク質高次構造に影響を与え、機能変化などを生じる可能性がある。これを実際に証明するためにはタンパク質中の Asp を Asp 異性体に置換し、その物性を無修飾のものと比較すればよい。しかしながら、タンパク質中の Asp を Asp 異性体に置換して議論する実験系は技術的に困難なため、いまだ報告されていない。

著者らの研究室では、過去にクリスタリン中の配列を模したペプチド中の Asp を 4 種類の Asp 異性体に置換した 4 つのペプチドを合成して、構造変化及び機能変化を調査した²¹⁾。本報告中では、Asp を他異性体に置換することで二次構造の変化や機能変化が示されている。そのほかにも、抹消 T 細胞表面の受容体として機能するタンパク質 CD4 中では、内部 β -Asp 増加が基質結合能の低下を生じ²²⁾、 β アミロイドタンパク質では D-Asp の形成がタンパク質の凝集を促進する報告がある²³⁾。これらのように、一見悪影響を及ぼすことが予想される本修飾であるが、フィブロネクチンに関しては内部 β -Asp の増加がインテグリンとの結合活性を増加させることが報告されており²⁴⁾、異性化は単に疾患原因となるのみならず、タンパク質機能の調節を行う可能性も示されている。

本稿では、生体内タンパク質中アミノ酸のホモキラリティの破綻部分の同定手法を紹介してきた。しかしながら、現段階ではまだ十分に網羅的なデータは揃っていない。より様々な検体から多くのデータを得て、それらの意義を示す必要がある。そのため、さらに迅速・簡便・網羅的に本現象を同定し評価することのできる手法の開発が必要であると考えている。技術的な部分を改良しながら、実用的な観点では各タンパク質分子固有の加齢指標としての確立し、様々な加齢性疾患の早期探知・予防開始などへと活用していきたいと考えている。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金「基盤研究 (C)」(20K11646) の支援によりなされたことを付記し、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) P. M. Helfman, J. L. Bada : *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **72**, 2891 (1975).
- 2) G. H. Fisher, N. M. Garcia, I. L. Payan, R. Cadilla-Perezrios, W. A. Sheremata, E. H. Man : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 683 (1986).
- 3) S. D. Shapiro, S. K. Endicott, M. A. Province, J. A. Pierce, E. J. Campbell : *J. Clin. Invest.*, **87**, 1828 (1991).
- 4) J. T. Powell, N. Vine, M. Crossman : *Atherosclerosis*, **97**, 201 (1992).
- 5) N. Fujii, Y. Ishibashi, K. Satoh, M. Fujino, K. Harada : *Biochim. Biophys. Acta*, **1204**, 157 (1994).
- 6) N. Fujii, K. Satoh, K. Harada, Y. Ishibashi : *J. Biochem.*, **116**, 663 (1994).
- 7) S. Ritz, A. Turzynski, H. W. Schutz, A. Hollmann, G. Rochholz : *Forensic. Sci. Int.*, **77**, 13 (1996).
- 8) N. Fujii, S. Tajima, N. Tanaka, N. Fujimoto, T. Takata, T. Shimo-Oka : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 1047 (2002).
- 9) S. Ritz-Timme, I. Laumeier, M. Collins : *Int. J. Legal. Med.*, **117**, 96 (2003).
- 10) Y. Kaji, T. Oshika, Y. Takazawa, M. Fukayama, T. Takata, N. Fujii : *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 3923 (2007).
- 11) Y. Kaji, T. Oshika, F. Okamoto, N. Fujii : *Br. J. Ophthalmol.*, **93**, 974 (2009).
- 12) Y. Kaji, T. Oshika, Y. Takazawa, M. Fukayama, N. Fujii : *Br. J. Ophthalmol.*, **93**, 977 (2009).
- 13) R. Motoie, N. Fujii, S. Tsunoda, K. Nagata, T. Shimo-oka, T. Kinouchi, N. Fujii, T. Saito, K. Ono : *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 1999 (2009).
- 14) T. Geiger, S. Clarke : *J. Biol. Chem.*, **262**, 785 (1987).
- 15) K. Aki, N. Fujii, N. Fujii : *PLoS One*, **8**, e58515 (2013).
- 16) N. Fujii, H. Sakaue, H. Sasaki, N. Fujii : *J. Biol. Chem.*, **287**, 39992 (2012).
- 17) H. Maeda, T. Takata, N. Fujii, H. Sakaue, S. Nirasawa, S. Takahashi, H. Sasaki, N. Fujii : *Anal. Chem.*, **87**, 561 (2015).
- 18) T. Takata, K. Murakami, A. Toyama, N. Fujii : *Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom.*, **1866**, 767 (2018).
- 19) T. Takata, T. Matsubara, T. Nakamura-Hirota, N. Fujii : *Exp. Eye Res.*, **182**, 10 (2019).
- 20) N. Fujii, T. Takata, I. Kim, K. Morishima, R. Inoue, K. Magami, T. Matsubara, M. Sugiyama, T. Koide : *Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom.*, **1868**, 140446 (2020).
- 21) N. Fujii, N. Fujii, M. Kida, T. Kinouchi : *Amino Acids*, **39**, 1393 (2010).
- 22) G. Teshima, J. Porter, K. Yim, V. Ling, A. Guzzetta : *Biochemistry*, **30**, 3916 (1991).
- 23) T. Tomiyama, S. Asano, Y. Furiya, T. Shirasawa, N. Endo, H. Mori : *J. Biol. Chem.*, **269**, 10205 (1994).
- 24) A. Corti, F. Curnis : *J. Cell Sci.*, **124**, 515 (2011).

Identification of D-amino Acid Residues in Proteins Using Mass Spectrometry

Takumi TAKATA¹

E-mail : takumi@rri.kyoto-u.ac.jp

¹Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University, Kumatori-cho, Sennan-gun, Osaka 590-0494

(Received April 22, 2022; Accepted May 3, 2022)

Homochirality of amino acid residues of protein is essential for life. For a long time, it was believed that D-amino acids were excluded from living systems, and that proteins consisted only of L-amino acids. However, recent developments in analytical techniques have led to the discovery of D-amino acids in living organisms, such as peptides and proteins. Many D-amino acids are aspartates, which are located in various sites within metabolically inactive tissues. In order to identify such aspartate residues in protein, a combination of complicated methods and instruments has been previously applied. In contrast, our laboratory has recently developed a rapid, easy and comprehensive method to identify D-Asp and β -Asp in tissues using LC-MS/MS, thus using mass spectrometry as a “mass detection device”. A total of four samples from the same tissue and proteins, generated in two steps of enzymatic digestion, are used for LC-MS/MS. The identification of each iso-Asp containing peptide peak is performed by the disappearance of the chromatogram due to the alteration of molecular weight by each enzymatic digestion. By using this methodology, it is possible to identify and distinguish each D-Asp and β -Asp in protein without a set of complicated methods and instruments.

Keywords: chirality; mass spectrometry; isomerization; racemization; aging.