

バイオインダストリーセミナー 1

日時 2017年 11月24日(金) 12:30~13:30

会場 広島大学 霞キャンパス 応仁会館 大会議室 (2階)

演題①

金属配位結合を利用したプロテオミクス

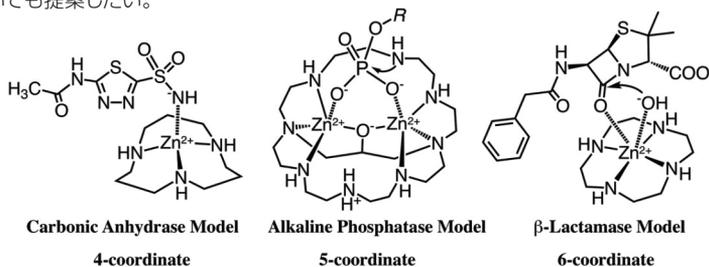
演者①

小池 透 先生 (広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 医薬分子機能科学：小池&木下研究室)

要旨①

機能性タンパク質(酵素や受容体)と相互作用する物質(基質分子や医薬品)は、イオン結合、水素結合、双極子相互作用、疎水性相互作用を組み合わせ、その選択性や結合力を保持している。しかし、水溶液中では、それら単独の結合力は、共有結合や金属配位結合に比べて桁違いに小さい(共有結合 \geq 金属配位結合 \gg イオン結合 $>$ 水素結合 \gg 双極子相互作用 \sim 疎水性相互作用)。したがって、分子認識を基盤としたプロテオミクスやドラッグデザインの分野では、それら弱い引力をできるだけ数多く標的タンパク質内で働かせることができる分子構造が求められる。一方、金属配位結合は、共有結合に匹敵する結合力を備えながら、適当な環境に置けば配位子を無傷な状態で脱離させることが可能である。したがって、金属イオンの特性をうまく利用すれば、配位結合を実用的な分子捕捉の手段として十分利用できる。例えば、金属イオン固定化親和性カラム法の鉄(III)錯体やガリウム(III)錯体、金属酸化物親和性クロマトグラフィーのチタン(IV)酸化物やアルミニウム(III)酸化物、His タグ技術で用いられるニッケル(II)錯体などがその例である。

本研究室を担当する以前、演者は、低分子亜鉛錯体を亜鉛酵素の活性中心モデル(下図)として利用した基礎化学的な研究を行っていた。本セミナーでは、それらの研究から得られた亜鉛イオンの特性を他の金属イオンと比較することにより、フォスタグ技術の開発経緯やその長所と短所について紹介したい。また、時間があれば、他の金属錯体のプロテオミクス分野への利用の可能性についても提案したい。



演題②

りん酸基特異的捕捉分子「フォスタグ」を利用した製品紹介

演者②

中川 祐二 (和光純薬工業株式会社 開発第一本部 ライフサイエンス試薬開発部)

要旨②

りん酸化タンパク質研究用試薬「フォスタグ」製品群の紹介をします。

和光純薬工業株式会社

本社：〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
 東京本店：〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号
 営業所：北海道・東北・筑波・藤沢・東海・中国・九州

問い合わせ先

フリーダイヤル：0120-052-099

URL：<http://www.wako-chem.co.jp>E-mail：labchem-tec@wako-chem.co.jp

Phos-tag® シリーズのご紹介はこちらから



エレクトロスプレーイオン化 – 電子移動解離タンデム質量分析法のメカニズムとPhos-tagを利用したリン酸化ペプチド分析への応用

日時：11月25日(土) 12:15~13:15

会場：広島大学 霞キャンパス 応仁会館 大会議室(2階)

講演者：浅川 大樹

産業技術総合研究所

はじめに：一般的に、タンパク質の同定は酵素消化により生成した消化ペプチドをESI-MSやMALDI-MSで分析し、得られたマスペクトルをMASCOTなどのデータベースと照合するというプロセスで行われる。一方で、未知の翻訳後修飾を含むタンパク質や、データベースが十分に整備されていない生物由来のタンパク質の分析には対応できないことが多く、マスペクトルから直接タンパク質のアミノ酸配列を同定する目的で新しいフラグメンテーション手法の開発も行われている。正確なタンパク質アミノ酸配列同定には、タンパク質を規則的に分解する手法が必要であり、これはタンパク質イオンのラジカル化反応により実現されている。タンパク質のラジカル化に伴うフラグメンテーションとして最も広く用いられている手法は電子移動解離法(ETD)である。ETDはタンパク質の多価イオンとラジカルアニオンの再結合反応により、目的のタンパク質をラジカル化させ、タンパク質主鎖のN-C α 結合の選択的フラグメンテーションを誘起する手法である。ETDはペプチド・タンパク質のアミノ酸配列に有用な手法であるが、分解効率が低いことが欠点である。

我々はこれまでに、ペプチドのイオン化の際に金属イオンを添加し、生成する金属-ペプチド複合体をETDの前駆体イオンとして用いることで分解効率の改善がみられることを明らかにしている。^{1,2} さらにこの分解メカニズムについて計算化学を用い、解析を行ったところ、ETDでは、タンパク質主鎖のカルボニルの π^* 軌道に電子が付加し、分解が誘起されることを明らかにした。^{3,4} 本研究では、金属イオン添加ETD法を応用し、リン酸基に特異的に結合する亜鉛錯体、Phos-tagを用い、Figure 1に示すようにリン酸化ペプチドの正確なアミノ酸配列解析を可能としたので紹介する。⁵

結果と考察：10 μ Mのトリプシン消化リン酸化ペプチドのモデルVNQIGpTLSESIKおよびVNQIGTLpSEpSIK、をESI-MSで分析を行ったところ、 $[M+H]^+$ および $[M+2H]^{2+}$ が生成したが、 $[M+3H]^{3+}$ は検出されなかった。これはリン酸化ペプチド中に存在するプロトン化サイトがN末端アミノ基とC末端Lys残基の二ヶ所であるため、 $[M+2H]^{2+}$ がESI-MSで生成する最大価数のイオンとなったと考えられる。次に、10 μ Mのリン酸化ペプチド試料溶液にPhos-tagを添加し、ESI-MSで分析を行ったところ、リン酸基にPhos-tagが選択的に配位し、1リン酸化ペプチドでは3価イオン、2リン酸化ペプチドは4価イオンが生成した。次に、このPhos-tagとリン酸化ペプチドの複合体を前駆体イオンとしてETD-MS²の測定を行った。1リン酸化ペプチドの3価イオンのETD-MS²スペクトルをFigure 1に示す。これまでのETD-MS²過程の基礎研究から予想されるように、Phos-tagを添加することによりESIで生成するリン酸化ペプチドイオンの価数を増加させ、最大価数のイオンをETD-MS²の前駆体として用いることで、リン酸化ペプチドのアミノ酸配列解析に有用な情報を得ることができるようになった。

参考文献

- 1) D. Asakawa, T. Takeuchi, A. Yamashita, Y. Wada, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 25, 1029-1039, 2014.
- 2) D. Asakawa, Y. Wada, *J. Phys. Chem. B*, 118, 12318-12325, 2014.
- 3) D. Asakawa, A. Yamashita, S. Kawai, T. Takeuchi, Y. Wada, *J. Phys. Chem. B*, 120, 891-901, 2016.
- 4) D. Asakawa, E. De Pauw, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27, 1165-1175, 2016.
- 5) D. Asakawa, I. Osaka, *Anal. Chem.*, 88, 12393-12402, 2016.

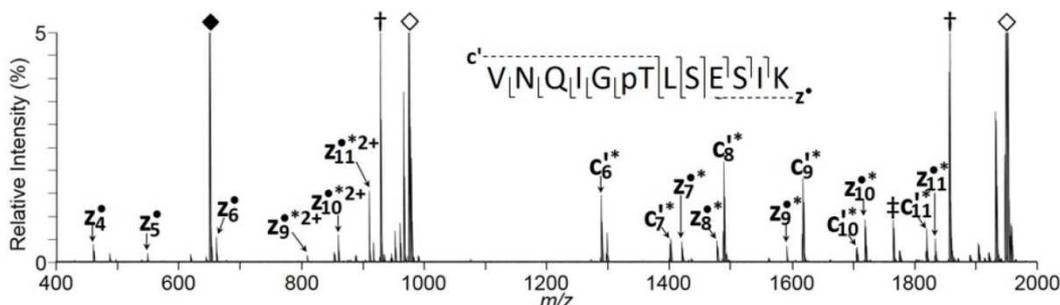


Figure 1. Phos-tag – リン酸化ペプチド複合体3価イオンのETD MS²スペクトル