REGULAR PAPER

タンパク質の精密質量決定の生物学的意義

Biological Significance of the Precise Mass Measurement of Proteins

和田 芳直*
Yoshinao WADA

(Received November 20, 1997; Accepted January 14, 1998)

Achievement of the unit mass accuracy in the molecular mass determination of proteins has been stressed. Single mass change of proteins is caused by single amino acid substitutions including Glu/Lys, Asn/Leu, Asn/Ile, Asp/Asn, and Glu/Gln, of which four mutations except for Asn/Leu are produced by single nucleotide changes. In the case of Hemoglobin Hoshida, a substitution of Asn for Asp was found in a peptide of 2056.9 Da with a decrease of single mass unit. In a structural study of the transferrin isoform which is characteristic of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome and missing asparagine-linked oligosaccharides, assignment of Asn but not Asp for the residue that should be glycosylated was necessary for delineating the molecular pathogenesis of this disorder. However, as demonstrated in β_2 -microglobulin, proteins are often partially deamidated during sample preparation or *in vivo*. This may compromise the biological significance of the precise mass measurement of proteins.

緒 言

タンパク質質量の1原子質量単位 (いわゆる "1マス") の違いは一次構造の違いを意味する。アミノ酸の置き換わりで1マスの違いを生起するのは Glu と Lys, Asn と Leu/Ile, Asp と Asn, Glu と Gln の組み合わせであり、それらは基本的には遺伝子の核酸配列の違いに基づいている。これらのうち Asn と Leu の組み合わせ以外はアミノ酸をコードする核酸トリプレットコドンのうちの1個の変異で起こるので、そのようなアミノ酸置換による構造変異タンパクにはしばしば遭遇する¹⁾。実際、そのようなアミノ酸変異は、例えば β グロビン 99Asp→Asn や 66Lys→Glu のように、タンパク質の機能や安定性に影響を及ぼす場合があり、変異を検出し構造決定することは生物学的に重要である。

アミノ酸置換を初めとしたアミノ酸一次構造変化を決定する方法としての質量分析はその微量試料への対応能力、迅速性において優れている。歴史的にみると、かつては分子量 2000 以上のペプチドあるいはタンパクにおける1マスの変化を確実に検出することが容易でなかったために、Asp や Glu のカルボキシル基に修飾を行って、それぞれ Asn, Gln からの質量変化を拡大する方法を我々は考案したが²⁾、主として分解能の向上による正確な質量測定が現

実化したことにより、そのような測定前操作はほとんど不要になった。

ところで、上に挙げた1マスの質量変化をタンパク質に与えるアミノ酸変異のうち、Asn→Asp, Gln→Glu については翻訳後修飾の一種である脱アミド反応でも起こる³⁾。本論文では遺伝子変異、糖鎖結合 Asn 残基、脱アミドの例を挙げて、タンパク質の質量を1あるいはそれ以下の桁まで精密に決定することの生物学的意義と問題について論じる。

実 験

1. 試料調製

抗凝固剤存在下で採血した血液より遠心により赤血球を得、蒸留水による低張処理で溶血液を作製した。溶血液を酸性アセトンと混和することでグロビンを得た後、6 M 尿素存在下でのイオン交換クロマトグラフィーにより変異タンパクを単離した。還元カルボキシメチル化の後、トリプシンにより加水分解した。トランスフェリンは血清より抗トランスフェリン抗体を固相化したアフィニティーカラムによって精製した。還元ピリジルエチル化の後、トリプシンにより加水分解した。 β_2 ミクログロブリンは尿よりイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、リシルエンドペプチダーゼにより加水分解した。

ESI-MS による測定は還元アルキル化前の試料を逆相クロマトグラフィーを用いてさらに精製・脱塩した試料について行った。

2. 質量分析

FAB-MS, ESI-MS ともに JEOL-SX102 質量分析計によ

* 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 (〒594-1101 大阪府和泉市室堂町 840)
Department of Molecular Medicine, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health (840 Murodo-cho, Izumi, Osaka 594-1101, Japan)

り測定した。FAB-MS はグリセリンにトリクロロ酢酸を混ぜたものをマトリックスとした。ESI-MS はタンパク試料を水 / アセトニトリル / 酢酸 (49/49/2 容) 溶液に対し 20 pmol/ μ L に溶解し 0.7 μ L/min で直接注入した。いずれも測定分解能は 3000 とした。

結果と考察

1. Asp→Asn 変異ヘモグロビン

Fig. 1a はヒト β グロビンのトリプシン消化ペプチド混合物の典型的な FAB マススペクトル、いわゆるペプチドマップ、である^{4),5)}。各シグナルはペプチド断片のプロトン化分子であり、それらの m/z 値からグロビタンパクを構成するペプチドの分子量がわかり、それによって時には一次構造変化の部位や種類まで特定できる¹⁾。試料は電気泳動により発見された変異種である。一見正常に見えるこのマススペクトルもペプチド T5 のシグナルを詳しく見ると計算質量 2057.94 u (monoisotopic mass) に対するプロトン化分子として予想される (正常対照を Fig. 1c に示した) よりも 1 マス小さく検出されていることで、このペプチド内に変異のあることがわかった。変異の部位と種類はこのペプチドをプリカーサーイオンとした MS/MS によって決定された⁶⁾。

多くの疾患がタンパク質の点変異によって起こる。それら変異タンパクは遺伝子の 1 塩基置換によって起こっている場合がほとんどである。20 種類のアミノ酸置換の組み合わせ全 190 種類のうち 1 塩基の変異によるものは 75 種類、そのなかで 1 マスの違いを起こすのは Glu と Lys, Asn と Ile, Asp と Asn, Glu と Gln の組み合わせ 4 種類であるから、ここに挙げたような 1 マスの変化の同定が必要なケースは単純に見積って約 5.3% と多い。ここではタンパクをペプチドに加水分解して質量変化を検出したが、未切断タンパクの質量測定によって 1 マスの変化を確実にかつ感度良く検出できれば、遺伝子解析を越えた構造変化の一次スクリーニング法としての質量分析の応用が広がるであろう。

Fig. 1. FAB mass spectra of a tryptic digest of human β -globin. (a and b) Mutant with a substitution of Asn for Asp in peptide T5. (c) Normal peptide.

2. 糖鎖結合 Asn 残基

遺伝子変異でなくともタンパク質の質量の 1 マスの決定が疾患解析にとって重要な場合がある。

Carbohydrate-deficient glycoprotein 症候群 (CDG 症候群) では糖タンパク質における糖鎖の欠損が見られる。それは ESI-MS によるトランスフェリンの分子量測定において正常型 (分子量約 8 万) に比べて 2200 Da (バイアンテナ糖鎖の質量に相当する) 小さい分子型の同定によってわかったのであるが^{7),8)}、この欠損は糖タンパク質合成の際の糖鎖の一括転移反応の障害によるものと考えられた。しかし、いったん付加した糖鎖が *N*-グリコナーゼ様活性をもつ酵素によってポリペプチド鎖から脱離した可能性も否定できなかった。山下らはこの糖鎖付加部位を含むペプチドを分子量測定することで後者の可能性を否定した⁹⁾。Fig. 2 に示すとおりである。糖鎖はポリペプチド鎖の Asn-X-Ser/Thr 配列の中の Asn 残基に付加する。付加反応が起こらなければ Asn のままであるが、付加した糖鎖が加水分解を受けた後は Asp となる。患者のトランスフェリンから得られたペプチドの FAB-MS マススペクトルはこの分子には付加反応が起こらなかったことを確認した (Fig. 2a)。なお、健康人から得られた糖鎖付加をもつペプチドから人工的に *N*-グリコナーゼで糖鎖を脱離したペプチドのマススペクトルを対照として Fig. 2b に示した。その場合には確かに Asn が Asp に変化することがわかる。

タンパク質の一次構造解析においては遺伝子解析が主流となっている現在、翻訳後修飾の解析への質量分析の寄与への期待は高い。実際、これはトランスフェリン遺伝子に

Fig. 2. FAB mass spectra of a peptide containing the *N*-glycosylation site of transferrin. (a) Unglycosylated peptide from a patient with CDG syndrome. (b) Deglycosylated peptide by *N*-glycanase. Sequence of the peptide is presented at the top. The underlined residue at position 413 is an *N*-glycosylation site of transferrin. "CHO" means oligosaccharide chain.

変異はなく、遺伝子解析によっては解決されない問題を1マスの変化の検出によって解決した例である。

3. 脱アミド

腎不全により長期に人工透析を受けている患者のなかにはアミロイドと呼ばれる線維が骨関節のほか皮膚や粘膜に沈着し、さまざまな症状が引き起こされることが明らかになり、透析アミロイドーシスと呼称されるようになった。アミロイド線維を構成する主要タンパクは β_2 ミクログロブリン(β_2 M、分子量11729.2)であり、クラスI MHCタンパク複合体のサブユニットとして、ほとんどの有核細胞表面に存在している。これらの細胞から血中に放出された β_2 Mはそのほとんどが腎尿細管で代謝、再吸収されるが、腎機能の低下により血中濃度は上昇する。しかし、透析アミロイドーシスの発症者と非発症者の間に、血中 β_2 M濃度の差はなく、血中濃度の上昇に加え、 β_2 Mに何らかの修飾が加わり発症するものと考えられている。このような背景の中で電気泳動において正常よりも酸性側にシフトする β_2 Mが透析アミロイドーシス発症機構解明の鍵を握っているのではないかと考えられたことがあった¹⁰⁾。

Fig. 3. Transformed spectra of β_2 -microglobulin. (a) Theoretical peak shape of the molecule measured at a resolution of 3000. (b and c) Measured spectra. The sample giving the spectrum c contains acidic isoforms.

Fig. 4. FAB mass spectra of the lysylendopeptidase peptides from β_2 -microglobulin. (a and c) Peptides with partial deamidation of Asn. (b and d) Unaffected peptides. The sequences of these peptides are presented at the top and the deamidation sites are underlined.

患者血清より精製した β_2 MをESI-MSにより測定し、トランスフォームしたのがFig. 3である。試料によっては計算から導かれた同位体分布に比して、高質量側に広がって検出されている (Fig. 3c)。酵素消化により得たペプチドをFAB-MSにより測定し、プロトン化分子の分布を調べたところ、二つのペプチドにそれぞれ計算値より1マス大きい成分が混在していた (Figs. 4a, 4c)。対照として酸性成分をもたない β_2 Mを同様に測定したものと比べるとその違いは明らかである (Fig. 4b, 4d)。酸性 β_2 Mは配列中のAsn残基が脱アミドを起こしてAsp (および isoaspartate) となったものであった。このような脱アミド β_2 Mはアルカリ溶液下で加熱することによって人工的に作製できるが、それは透析アミロイドーシスに関係すると考えられる生物活性をもたなかったことから、脱アミド β_2 Mは発症とは直接関係のないことがわかった¹¹⁾。

β_2 Mにおける脱アミド反応は、それが起こりやすいとされているAsn-Gly配列に観測されたが、実際に測定するタンパク試料では、Asnの(時にGlnにも)脱アミドは程度の差はあるものの起こっている。それは主として試料の精製過程で生じると考えられるが、生体内で起こっている可能性も否定できない。脱アミド成分を含むタンパク試料を質量分析により測定すると、Fig. 3cのように計算によって求められる同位体分布に比して高質量域に広がる。その際、試料が脱アミド化タンパク混合物であることを認識できなければ、そのシグナルから算出した平均(化学)質量は非脱アミドタンパクのそれよりも大きくなる。かつて、著者らはESI-MSにより測定されるシグナルが計算値よりやや高質量域にずれることを報告したが¹²⁾、あるいはそれには脱アミドも関与しているかもしれない。そのような混合物の存在、あるいはタンパク試料そのものの構造的heterogeneityはFTICRなどによる高分解能測定によって、より明確になるものと思われる。

結 論

タンパク質における1原子質量単位の変化を明確にとらえることは、遺伝子の変異、翻訳後修飾を解析する上で重要である。

謝 辞 トランスフェリンおよび β_2 ミクログロブリンの分析はそれぞれ山本美和子さんと久田(宮地)美貴さんに協力していただきました。

文 献

- 1) Y. Wada, T. Matsuo, and T. Sakurai, *Mass Spectrom. Rev.*, 8, 379 (1989).
- 2) Y. Wada, A. Hayashi, I. Katakuse, T. Matsuo, and H. Matsuda, *Biomed. Mass Spectrom.*, 12, 122 (1985).
- 3) H. T. Wright, *Protein Engng.*, 4, 283 (1991).
- 4) Y. Wada, A. Hayashi, T. Fujita, T. Matsuo, I. Katakuse, and H. Matsuda, *Biochim. Biophys. Acta*, 667, 233 (1981).
- 5) Y. Wada, A. Hayashi, M. Fujimura, I. Katakuse, T. Ichihara, H. Nakabushi, T. Matsuo, T. Sakurai, and H. Matsuda, *Biochim. Biophys. Acta*, 749, 244 (1983).

- 6) Y. Wada, T. Matsuo, I. A. Papayannopoulos, C. Costello, and K. Biemann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **122**, 219 (1992).
- 7) Y. Wada, A. Nishikawa, N. Okamoto, K. Inui, H. Tsukamoto, S. Okada, and N. Taniguchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**, 832 (1992).
- 8) Y. Wada, J. Gu, N. Okamoto, and K. Inui, *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 108 (1994).
- 9) K. Yamashita, T. Ohkura, H. Ideo, K. Ohno, and M. Kanai, *J. Biochem. (Tokyo)*, **114**, 766 (1993).
- 10) H. Ogawa, A. Saito, O. Oda, M. Nakajima, and T.G. Chung, *Clin. Nephrol.*, **30**, 158 (1988).
- 11) T. Miyata, Y. Iida, Y. Ueda, T. Shinzato, H. Seo, V. M. Monnier, K. Maeda, and Y. Wada, *Kidney Int.*, **49**, 538 (1996).
- 12) Y. Wada, J. Tamura, B. D. Musselman, D. B. Kassel, T. Sakurai, and T. Matsuo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 9 (1992).

Keywords: Mutation, Unit mass, Electrospray ionization, Deamidation, Protein