

バイオ解析チーム

Biomolecular Characterization Team

チームリーダー 堂前 直

DOHMAE, Naoshi

当チームは、生命現象を解明するために、生体成分に関する解析法の開発やその応用を行っている。生体成分の中でも特にタンパク質は生命現象の源であり、その構造を調べることで単に遺伝子との対応が付けられるだけでなく、生物学的活性のメカニズムや活性の制御機構について重要な知見が得られる。これら生体分子の解析のための新しい手法や装置の開発および導入を行い、装置ならびに設備の設置や管理、解析方法に関する情報の整備することで研究支援を行う。質量分析法の発達やデータベースの充実、検索プログラムの発展に伴い微量成分の同定方法は容易になりつつある。これに反して、定性的なデータベース検索以外の解析は大変困難になりつつある。これを打開するため発展著しい質量分析による構造解析に加え、古典的な化学的手法をも併用し、新規な修飾や未知の配列に対応できる詳細な構造解析や微量定量解析の開発と応用に取り組んでいる。さらに、気相断片化反応を用いた生体分子の構造解析法にも力を注いでいる。現在、プロテインシーケンサー、種々の質量分析計、600 MHz NMR や分析用超遠心分析装置を管理し共用できるように整備している。

1. 生体分子の翻訳後修飾を含めた詳細な構造解析（堂前, 中山, 西村*）

ポストゲノムシーケンス時代のタンパク質構造解析への要求の1つが翻訳後修飾に関する知見の蓄積であろう。また、バイオブローブを用いたケミカルバイオロジー研究を始め、低分子薬剤のタンパク質結合位置の解析に大きな要求がある。これらの修飾部位解析を含めた詳細精密構造解析は今後の最も重要な課題の1つと考えられる。

ゲノムデータベースに対する一致度をスコアにすることで、タンパク質と遺伝子を対応することについては、現在相当のレベルで微量化自動化がなされているが、翻訳後修飾を始めとする修飾基および修飾部位の決定は困難を極めている。全く構造に予想の付かない新規物質の構造解析は大変難しいが、当チームでは質量分析のみの解析法から質量分析法を中心とした総合的な手法の組み合わせによる構造解析を行うことで、構造未知生体分子の解析を行う方法を検討している。本年は、植物科学研究センター福田グループディレクターと共同で植物の培地中に分泌される分化阻害物質の精製を行い、翻訳後修飾を含む精密な構造解析を行った。また、ERATOの酒井教授と共同でラット脳に存在する生理活性ペプチドを精製し、翻訳後修飾を含む構造を決定した。さらに中央研究所丑田ユニットリーダーと共にクラゲ由来の新規有用物質の精製と構造解析を行っている。

昨年度導入したMALDI-TOF/TOF装置は、MALDIイオン化法を用いることで、今までのESI法ではイオン化の難しいペプチド（特に翻訳後修飾されたペプチド）が構造解析できる可能性を持つ。このMALDI-TOF/TOF装置を液体クロマトグラフィーとオフラインでつなげて、自動でオフラインのLC-MS/MSが測定できるシステムを構築した。卵白アルブミンスタンダードを用いて調べた結果、糖鎖ペプチド、リン酸化ペプチド、Nアセチル化ペプチドなどの翻訳後修飾ペプチドを容易に検出でき、1回のクロマトグラフィーでMS/MSによるリン酸化部位まで求めるこ

とができた。また、このシステムを千葉大五十嵐教授のグループと共にポリアミン欠乏により増加、減少するタンパク質に応用し、いくつかのスポットを同定した。

当チームは独自に築いたタンパク質プロセッシング方法のノウハウを礎にしてウシ血清アルブミンのプロテオームスタンダードを作成し、民間企業に作成ノウハウを委嘱して商品として市販してきた。本年度はヒトプロテオーム研究のためのスタンダードとしてヒト血清アルブミンのスタンダードを、また、リン酸化や糖鎖ペプチドなどの翻訳後修飾を研究するためのスタンダードとして卵白アルブミンのスタンダードを作成し、民間企業へ委嘱し実用化を行った。

2. 生体分子の定量的解析法の開発（中山, 堂前, 廣谷*）

タンパク質の発現定量解析に質量分析法への期待が高まっている。同位体を用いた質量分析による定量法は歴史が古く、低分子化合物では確立されており、またペプチド類への応用が始められている。しかし、たとえ現在の技術でペプチドの定量ができたとしても、タンパク質からペプチドへの変換（つまりプロテアーゼによるタンパク質の消化）が再現的、定量的に行えないと意味を持たなくなる。当チームでは、現状の独自のノウハウを基にすることで、タンパク質から定量的に酵素消化できるシステムの開発を行っている。タンパク質から酵素消化を行う方法として、電気泳動で精製した試料と、精製する以前の混合物の状態に合わせて2つのシステムを開発している。本年は、電気泳動から調製した試料についてはラピッド・エンジニアリングチーム橋内氏と共同でタンパク質プロセッシングロボットの開発を行った。設計、組み立て、調整は本年度中に完了し、プロトコルの開発については来年度へ引き継いだ。また、混合物試料については、タンパク質をビーズ（固層）に吸着させ、消化を行う方式を取る装置の開発を行っている。こちらは装置の設計が完了しており、消化条件の検討を進め

ている。自動化装置（ロボット）は、多様なニーズもあり今後さらに多用途な装置の開発も視野に入れている。

タンパク質の絶対定量の最も信頼できる方法の1つにアミノ酸分析法がある。現在ニンヒドリン法が信頼性に最も優れているため一般に使用されているが、さらに100から1,000倍高感度なプレラベル法も存在している。プレラベル法について検討を行いアミノ酸の分離条件など基本的な条件検討の結果を得た。今後は環境からの汚染の影響や加水分解条件の微量化、定量性の検定などの条件検討を行い、微量タンパク質（特にPVDF膜に転写された試料）の絶対定量を行えるように開発を進めたい。

3. 気相断片化反応を用いた生体分子の構造解析法（中村）

質量分析法を用いた生体分子の構造解析では、解析対象となる分子に対し試験管内（液相または固相）で種々の誘導体化や断片化を行った後、得られた誘導体や断片の分子量を測定して解析対象分子の構造情報を得るという間接的方法がしばしば用いられる。イオン化した生体分子を質量分析装置内（気相）で断片化して構造情報を得る直接的方法是感度と迅速性の面で有利と考えられるが、タンパク質等大きな生体分子の構造解析には余り用いられてきていない。これは、気相断片化反応に利用可能な方法がごく限られている、断片化と生成物（フラグメントイオン）の観測は装置および実験面での様々な因子に依存し反応機構の一般化および定量的解析が行い難い反応の制御が困難であり大きな分子からは非選択的に多数の断片を生じるので、感度およびデータ解析の両面で不利、等の問題が存在するためである。これら種々問題の解決は、化合物のタイプと構造解析上の問題に応じた気相反応の選択、フラグメンテーションモデルの確立による自動データ解析やデータベース検索の精度向上と効率化、反応機構を踏まえた測定条件の合理的設定と未知物質解析の信頼性向上、反応の制御による解析の高感度化および高効率化等につながり、生体分子構造解析および生命科学分野への応用面で大きな波及効果が期待される。本年度は、生体分子解析の新しい気相断片化反応としての可能性を持つ多重極蓄積支援解離（MSAD）について、モデル化合物を用いて断片化反応の特性評価を行い、反応の制御と高効率化および選択性の向上を目指して、反応デバイスの改良とイオンの活性化状態に関する検討を行った。

まず、タンパク質分子の断片化のモデルとして、エレクトロスプレーイオン化により生成したユビキチンの多価イオンについて種々反応条件にてMSADを観測し、断片化の残基選択性について検討した。MSADは、FT-ICR質量分析装置の分析セルとイオン源の間の中真空領域に設置された六重極イオンリザーバー内でイオンの蓄積時間に依存して誘起される断片化反応である。ユビキチンイオンに対するMSADでは、特定の条件下でAsp残基のカルボキシ末端側での断片化に高い選択性が認められ、さらに、80%以上という非常に高い変換率で前駆イオンから選択的断片を生成しうることが見いだされた。MSADは気相断片化の際に最も一般的に用いられる衝突活性化解離（CID）に類似点を有するが、通常のCIDの時間スケール（マイクロ秒）に比較してはるかに長い時間（数秒）に多数回（数千回以上）の低エネルギー衝突が繰り返されることによって誘起

されるゆっくりとしたイオンの活性化が特徴である。このゆっくりとした活性化が、酸性残基側鎖が関与する環状遷移状態を経由しての低エネルギー障壁反応経路に対して有利なため、ユビキチンイオンの断片化においてAsp残基カルボキシ末端側での高い位置選択性が観測されたものと考えられる。しかしながら、既存の装置では、MSADによる断片化反応の間も六重極イオンリザーバー内にイオンが流入し続けるので、反応条件の制御や、選択性が達成される条件の詳細な検討が困難であった。そこで、以下のごとく反応デバイスの改良を行った。即ち、ナノスプレーエミッターの保持機構を自動メカニカルステージに置き換え、質量分析装置の測定パルス制御プログラムから生成する信号を自動メカニカルステージの制御信号へと変換するプログラムを作成し、六重極イオンリザーバー内へのイオンの流入を、質量スペクトルの測定パルス系列に同期させて制御することを可能とした。この改良型の反応デバイスを用い、まず、結合開裂のエネルギー閾値について良く調べられている温度計分子について断片化を試み、MSAD条件下でのイオンの活性化について解析した。

* 協力技術員

This team is engaged in structural characterization of biological molecules to support biological science. Our activities include mass spectrometry, protein chemical analyses, ultracentrifugal analysis and nuclear magnetic resonance. We are interested in developing new characterization methods for biological molecules.

1. Development and application of analysis methods for structural detail on biological molecules

Direct analysis of modifications and their position within the protein sequence is required because genomic search is not able to predict post-translational modifications for a majority of proteins for sure. Furthermore, the binding site of a low molecular reagent with a protein is the most important information for an approach using chemical biology with a bio-probe. We have been developing analytical methods for post-translational modifications or bio-probe binding site of proteins combined with MS and chemical methods. We have applied this method to several cases, for example an inhibitor of cell differentiation from plant medium and a physiological active peptide from rat brain extracts, a novel glycol-protein from jellyfish with post-translational modifications.

We have developed off-line liquid chromatography-matrix assisted laser desorption / ionization tandem mass spectrometry (off-line LC-MALDI-MS). Trypsin peptides from bovine serum albumin or from ovalbumin were identified at a 30 fmol-1 pmol levels include phosphate-peptide. Using this system, we have identified several polyamine sensitive spots from a 2D-gel.

2. Development of quantitative analysis of biomolecules

Several new approaches for quantitative MS are described and Isotope dilution is the most promising approach. But it is a bottleneck of the protein quantification using MS that protein is converted to peptide quantitative. To resolve this problem, we have developed protein processing

systems. Two typical robots were designed for the purified protein in the 1D or 2D-gel and for complex mixture in solution.

Amino acid composition analysis is the most reliable protein absolute quantification method. We tried a pre-labeled method that was 1000 times sensitive than the Ninhydrin method. In combination with the acid hydrolysis method, we have been developing an absolute quantification method of a minute quantity protein.

3. Gas-phase chemistry for structural characterization of biomolecules

The gas-phase chemistry in a time dependent dissociation process, multipole storage assisted dissociation (MSAD), was studied in the context of mass spectrometric structural characterization of biomolecules. The MSAD process is a low-energy slow activation-dissociation process that involves a unique form of collision-induced dissociation (CID) in the hexapole ion storage device at low vacuum region between the ion source and analyzer cell of an FT-ICR mass spectrometer. Ubiquitin ions generated by electrospray ionization were fragmented at the C-terminus to Asp residues at a high selectivity under specific MSAD conditions. The process was studied further as a better understanding of the process should facilitate application of this residue selective fragmentation. In order to gain a better control of MSAD and enable fine tuning of experimental conditions, the ion source was fabricated in-house with a nano-electrospray needle mounted on a computer-controlled moving stage, which can be synchronized with experimental events so that the flow of ions into the storage device may be switched off during the reaction delay period. By using this improved device, activation of ions in the MSAD process were characterized with benzylpyridinium thermometer ions, which have been previously well characterized in terms of dissociation threshold energies.

Research Subjects

1. Structural analysis of biological molecules involved in post-translational modification
2. Development of quantitative analysis of biomolecules
3. Gas-phase chemistry for structural characterization of biomolecules

Staff

Head

Dr. Naoshi DOHMAE

Members

Dr. Nobuhiro MORISHIMA
Dr. Takemichi NAKAMURA
Dr. Yasuhiro ISOGAI
Dr. Yutaka ITO
Dr. Hiroshi NAKAYAMA
Ms. Tomoe NISHIMURA*
Ms. Naoko HIROTANI*

* Contract Technical Scientist

in collaboration with

Dr. Hiroyuki OSADA (Antibiot. Lab.)
Dr. Takeo USUI (Antibiot. Lab.)
Dr. Hideki KAKEYA (Antibiot. Lab.)
Dr. Yoko NAGUMO (Antibiot. Lab.)
Dr. Fumio HANAOKA (Cell. Physiol. Lab.)
Dr. Kaoru SUGASAWA (Cell. Physiol. Lab.)
Dr. Masafumi TSUJIMOTO (Cell. Biochem. Lab.)
Dr. Hiroo FUKUDA (Morphog. Res. Group, PSC)
Mr. Tokuzi KITSUNAI (Rapid Eng. Team)
Dr. Kiminori USHIDA (Eco-Soft Mater. Res. Unit)
Dr. Akiko MASUDA (Eco-Soft Mater. Res. Unit)
Dr. Soichi KOJIMA (Mol. Cell. Pathol. Res. Unit)

Visiting Members

Dr. Tomohiko TSUGE (Kyoto Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

- Hoshino M., Dohmae N., Takio K., Kanazawa I., and Nukina N.: "Identification of a novel amino-terminal fragment of amyloid precursor protein in mouse neuroblastoma Neuro2a cell", *Neurosci. Lett.* **353**, 135–138 (2003). *
- Iwata H., Kaibara M., Dohmae N., Takio K., Himeno R., and Kawakami S.: "Purification, identification, and characterization of elastase on erythrocyte membrane as factor IX-activating enzyme", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 65–70 (2004). *
- Ishida M., Dohmae N., Shiro Y., Oku T., Iizuka T., and Isogai Y.: "Design and synthesis of *de novo* cytochromes *c*", *Biochemistry* **43**, 9823–9833 (2004). *
- Usui T., Watanabe H., Nakayama H., Tada Y., Kanoh N., Kondoh M., Asao T., Takio K., Watanabe H., Nishikawa K., Kitahara T., and Osada H.: "The anticancer natural product pironetin selectively targets Lys352 of α -tubulin", *Chem. Biol.* **11**, 799–806 (2004). *
- Usui T., Kazami S., Dohmae N., Mashimo Y., Kondo H., Tsuda M., Terasaki A., Ohashi K., Kobayashi J., and Osada H.: "Amphidinolide H, a potent cytotoxic macrolide, covalently binds on actin subdomain 4 and stabilizes actin filament", *Chem. Biol.* **11**, 1269–1277 (2004). *
- Hirose H., Arasaki K., Dohmae N., Takio K., Hatsuzawa K., Nagahama M., Tani K., Yamamoto A., Tohyama M., and Tagaya M.: "Implication of ZW10 in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi", *EMBO J.* **23**, 1267–1278 (2004). *
- Tohri A., Dohmae N., Suzuki T., Ohta H., Inoue Y., and Enami I.: "Identification of domains on the extrinsic 23 kDa protein possibly involved in electrostatic interaction

with the extrinsic 33 kDa protein in spinach photosystem II”, *Eur. J. Biochem.* **271**, 962–971 (2004). *

Aihara H., Nakagawa T., Yasui K., Ohta T., Hirose S., Dohmae N., Takio K., Kaneko M., Takeshima Y., Muramatsu M., and Ito T.: “Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo”, *Genes Dev.* **18**, 877–888 (2004). *

Shibata M., Ishii J., Koizumi H., Shibata N., Dohmae N., Takio K., Adachi H., Tsujimoto M., and Arai H.: “Type F scavenger receptor SREC-I interacts with advillin, a member of the gelsolin/villin family, and induces neurite-like outgrowth”, *J. Biol. Chem.* **279**, 40084–40090 (2004). *

Tomita T., Mizumachi Y., Chong K., Ogawa K., Konishi N., Sugawara-Tomita N., Dohmae N., Hashimoto Y., and Takio K.: “Protein sequence analysis, cloning, and expression of flammutoxin, a pore-forming cytolysin from *Flammulina velutipes*”, *J. Biol. Chem.* **279**, 54161–54172 (2004). *

Watanabe A., Hong W. K., Dohmae N., Takio K., Morishima-Kawashima M., and Ihara Y.: “Molecular aging of tau: Disulfide-independent aggregation and non-enzymatic degradation *in vitro* and *in vivo*”, *J. Neurochem.* **90**, 1302–1311 (2004). *

Taoka M., Yamauchi Y., Shinkawa T., Kaji H., Motohashi W., Nakayama H., Takahashi N., and Isoe T.: “Only a small subset of the horizontally transferred chromosomal genes in *Escherichia coli* are translated into proteins”, *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 780–787 (2004). *

Kanai Y., Dohmae N., and Hirokawa N.: “Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule”, *Neuron* **43**, 513–525 (2004). *

Nakamura T., Dohmae N., and Takio K.: “Characterization of a digested protein complex with quantitative aspects: An approach based on accurate mass chromatographic analysis with Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry”, *Proteomics* **4**, 2558–2566 (2004). *

(総説)

Kanki T., Nakayama H., Sasaki N., Takio K., Alam T. I., Hamasaki N., and Kang D.: “Mitochondrial nucleoid and transcription factor A”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1011**, 61–68 (2004).

堂前直: “プロテインシークエンサー”, *蛋白質 核酸 酵素* **49**, 1534–1540 (2004).

[単行本・Proc.]

(その他)

Nakamura T. and Dohmae N.: “Residue selective fragmentation of electrospray-generated ubiquitin ions in a time dependent process”, *Proce. 52nd ASMS Conf. on Mass Spectrometry and Allied Topics (CD-ROM)*, Nashville, USA, 2004–5, The American Society for Mass Spectrometry, Nashville, p. A041522 (2004).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Kaku H., Ito Y., Okada M., Nishizawa Y., Dohmae N., Takio K., Ishii-Minami N., Minami E., and Shibuya N.: “Oligochitin elicitor receptor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells: Characterization and molecular cloning”, *NIAS-COE/PROBRAIN/TOKUTEI Joint Int. Symp.: Plant Immunity: signalings to acquired resistance*, Tsukuba, Mar. (2004).

Nakamura T. and Dohmae N.: “Residue selective fragmentation of electrospray-generated ubiquitin ions in a time dependent process”, *52nd ASMS Conf. on Mass Spectrometry and Allied Topics*, (American Society for Mass Spectrometry), Nashville, USA, May (2004).

Menon S., Tsuge T., Dohmae N., and Wei N.: “Interaction between CSN1 (COP9 Signalosome subunit 1) and components of transcription/RNA processing complexes SAP130, Ddx15/hPrp43/mDEAH9, and CFIm68”, *2004 FASEB Summer Research Conf. on Mechanisms in Plant Development*, Saxtons River, USA, Aug. (2004).

Kojima S., Kondo W., Saio M., Imajoh-Ohmi S., Dohmae N., Kawada N., and Okuno M.: “The first evidence of latent TGF-beta activation in a human hepatic disease: implication for a new therapeutic strategy using protease inhibitors for hepatic disease”, *12th Int. Symp. on Cells of the Hepatic Sinusoid*, Bilbao, Spain, Sept. (2004).

(国内会議)

竹本(堀)千重, 中山洋, 赤坂領吾, 白水美香子, 倉光成紀, 廣田洋, 瀧尾擴士, 横山茂之: “Analysis of *Thermus thermophilus* HB8 ribosomal and related proteins”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第2回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 8月(2003).

Aihara H., Nakagawa T., Yasui K., Ohta T., Hirose S., 堂前直, 瀧尾擴士, Muramatsu M., Ito T.: “Nucleosomal Histone Kinase-1 (NHK-1) phosphorylates nucleosomal Histone H2A C terminal amino acid, crucial residue for specific gene regulation”, 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2003).

中村健道: “偶数電子イオンの断片化と生体分子構造解析: 時間窓を通じた観測”, 第52回質量分析総合討論会, 名古屋, 6月(2004).

中村健道, 堂前直: “エレクトロスプレーにより生成したユビキチンイオンの残基選択的フラグメンテーションと時間依存的過程”, 第52回質量分析総合討論会, 名古屋, 6月(2004).

叶直樹, 本田香織, 浅見綾, 熊代沙織, 清水史郎, 中村健道, 近藤恭光, 雨宮智之, 畠山哲, 田代英夫, 長田裕之: “光親和型低分子マイクロアレイ: そのコンセプトと展望”, 第19回コンビナトリアルケミストリー研究会, 川崎, 9月(2004).

堂前直, 西村友枝, 中山洋: “Optimization and evaluation of off-line coupling of liquid chromatography to MALDI-TOF/TOF MS using proteome standard”, 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月(2004).

Okudaira H., Nishimura K., Kashiwagi K., 堂前直, 西村友枝, 瀧尾擴士, Igarashi K.: “Polyamine modulon in mammalian cells; identification of proteins whose synthesis is stimulated by polyamines at the translational level”, 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2004).
井川智史, 高根沢康一, 柴田真美, 古泉博之, 石井淳子, 安達栄樹, 辻本雅文, 堂前直, 瀧尾擴士, 新井洋由: “Type F

scavenger receptor SREC-I interacts with advillin, a member of the gelsolin/villin family, and induces neuritelike outgrowth in mouse fibroblastic L cells”, 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2004).
福本泰典, 天野美美, 横井雅幸, 花岡文雄, 堂前直: “分裂酵母 Ddb1 複合体の単離と解析”, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2004).