

# バイオ解析チーム

## Biomolecular Characterization Team

チームリーダー 堂前 直  
DOHMAE, Naoshi

バイオ解析チームは、生命現象の解明に向け、生体成分構造解析法の開発や構造解析を用いた応用研究を行っている。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、さまざまな生物活性を持つ。そのタンパク質の構造を調べることで、活性と遺伝子との対応が見つかる。さらに詳細に構造解析することで、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を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である。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、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研究に取り組んでいる。さらに高次構造解析にも力を注いでいる。現在、種々の質量分析計、タンパク質シークエンサー、生体高分子用のX線回折装置や600MHz NMR、さらに分析用超遠心装置を管理し共用できるように整備し、さらに播磨研究所研究技術開発室と連携してSpring-8の遠隔測定支援システム和光地区の窓口業務を行っている。

### 1. タンパク質構造解析法の開発と応用

#### (1) 生体分子の翻訳後修飾を含めた詳細な構造解析 (堂前<sup>\*1</sup>, 鈴木<sup>\*1</sup>, 益田<sup>\*2</sup>, 浅沼<sup>\*3</sup>, 平野<sup>\*4</sup>)

タンパク質は遺伝情報を写し取った転写RNAを翻訳して生合成される。多くのタンパク質はこの遺伝情報どおりにアミノ酸が並んだポリペプチドとして合成された後に何らかの修飾を受ける。この遺伝情報に直接記載されていない、タンパク質独自の情報 = 翻訳後修飾を解明することがポストゲノムシークエンス時代のタンパク質の構造解析に求められる大きな役割である。また、バイオプ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も大きな要求がある。しかしこれらの修飾部位解析や薬剤結合部位解析を含めた詳細精密構造解析は大変困難な課題のひとつである。

翻訳後修飾は、修飾残基があらかじめ予想されていれば、抗体などを用いた解析も可能であるが、どのような修飾がなされているか不明な場合が多い。このような、翻訳後修飾を解析する一般的な方法として、1. エレクトロスプレーイオン化法質量分析計 (ESI-MS) による精度の高いタンパク質分子の質量測定、2. タンパク質を酵素消化して断片化して液体クロマトグラフィー質量分析を行い、修飾の入ったペプチド断片として同定する。3. タンパク質を塩酸加水分解して、アミノ酸レベルへ分解し、翻訳後修飾アミノ酸または修飾残基として高感度に同定する。の3つを併用することを確立した。

翻訳後修飾の解析は、GSCの横山GD, 香川研究員らと共同でヒトRad52のSUMO化の解析を行った。また、東海大学の辻教授とともに、シアル酸転移酵素ST6Gal-Iのジスルフィド結合の位置を決定した。加えて、生体超分子構造・機能研究協力グループの守屋研究員とシロアリ腹腔内細菌のタンパク質同定を行った。一昨年より吉田化学遺伝学研究室の吉田稔主任研究員らと共に開始した分裂酵母タンパク質の網羅的翻訳後修飾解析については、網羅的解析の基盤を確立し、また特定タンパク質の翻訳後修飾、ハイブシン化やアセチル化の部位などを解析した。

#### (2) 生体分子の定量的解析法の開発 (益田<sup>\*2</sup>, 鈴木<sup>\*1</sup>, 堂前)

タンパク質は含まれるアミノ酸の種類や配列によって多種多様な性質を示すため、通常ひとつの方法で定量的に解析することは難しい。また、昨年から行っているタンパク質から定量的にペプチドを産生して質量分析する相対的な定量法には絶対的指標も必要である。アミノ酸組成分析法は、タンパク質・ペプチドをアミノ酸レベルに分解して、アミノ酸配列に依存せずに、唯一、絶対定量できる方法である。そこで本年度はアミノ酸組成分析法による微量タンパク質の絶対定量解析について検討を行った。

我々は、高感度アミノ酸分析を実現するために、AQC (アミノキノリルカルバミル化) 誘導体を用いたプレレベル化法により微量タンパク質定量を行っているが、環境からの汚染を抑えてアミノ酸へ加水分解することがネックとなっていた。この問題を解消するために加水分解の自動化は大変重要である。我々は固相の酸を用いることによりタンパク質を自動で加水分解する方法を発明し、組成分析へ応用した。

また、アミノ酸を定量する際にはアミノ酸の標準液を用いる。国際的な指標として、NIST (アメリカ標準基準局) からSIトレーサブルなアミノ酸標準液が配賦されているが、3種類の市販の標準液を用いた組成分析、NMRによる直接定量などの方法を用いて調べた結果、NISTのアミノ酸標準液のメチオニン含量が公称値より少ないことが判明した。今後、新たにSIトレーサブルなアミノ酸標準液の作成を行う必要性が浮き彫りになった。

#### (3) 3次元構造に基づく構造生物学およびその関連技術の研究開発 (宮武, 堂前)

X線結晶構造解析による構造生物学研究において、放射光利用は必須の要件であるが、放射光施設から遠方の研究者が放射光を利用するのは必ずしも容易ではない。そこで、われわれは放射光科学総合研究センターの研究技術開発室と共同で、和光地区にSpring-8遠隔測定支援システムの窓口を開設した。このシステムにより、あらかじめSpring-8に送付しておいた結晶のX線回折測定を、インターネットを経由した遠隔操作によって行うことが可能になり、放射光測定がより身近になった。さらに希望者に対しては、放射光科学総合研究センター放射光システム生物学研究グループの協力の下、目的タンパク質試料を提供する環境も整備した。現在、Spring-8遠隔測定支援システムを利用した構造生物学的研究が、バイオ解析チームと他の研究室との間で進行中である。一方、現在の構造生物学研究においてはタンパク質の結晶化が最大の難関であり、タンパク質の革新的な結晶化技術の開発が望まれている。そこでわれわれは、ナノテクノロジーなどを駆使した新規なタンパク質結晶化方法の開発を行っている (フロンティアナノプロテインサイエンスサブチーム、フロンティア研究技術開発・支援チームとの共同研究)。

#### (4) RNAの質量分析(中山、秋山\*<sup>5</sup>、小池\*<sup>5</sup>)

タンパク質に翻訳されないいわゆるnon-coding RNA(ncRNA)が生体にとり重要な機能を果たしていることが次第に明らかとなってきた。これらのncRNAを解析するためには、従来RNAを逆転写して得たcDNAを配列解析することで、元のRNAを同定する方法がもちいられてきたが、ncRNA機能に重要な役割を持つ転写後修飾の情報が無視されてしまうこと、RNAごとの逆転写されやすさの違いにより結果にバイアスが掛かってしまうことなどが問題だった。一方、タンパク質解析に広くもちいられてきた質量分析法は分子質量および内部構造情報を得ることが出来るためRNA解析法候補としても有望である。しかし、未知試料に含まれているRNAを同定するために一般的なデータ解析方法が無いためもあり、転写後修飾を解析した少数を除けばほとんど報告が無い。私たちは質量分析をもちいたRNA同定を可能とするため、RNA質量データを配列データベースに対して問い合わせる検索エンジンの作成を開始した。今年度はまずRNAの質量分析内での断片化パターン傾向を調べ、その結果を反映させたデータベース検索エンジンのプロトタイプソフトウェアを作成した。このソフトウェアをもちいて生体から分離したsmall RNA画分から個々のRNAを同定することが可能だった。

## 2. 質量分析法の基盤技術開発

### (1) 気相断片化反応を用いた生体分子の構造解析法 (中村)

自動化されたタンデム質量分析計によって数多くのMS/MSスペクトルを迅速に測定することが可能となっているが、スペクトルの解釈という大きなボトルネックが存在するため、タンパク質消化ペプチドの同定・定量以外の分野においては、MS/MSスペクトルは十分有効に活用されていない。スペクトルの解釈が困難である一因は質量分析装置内(気相)における断片化反応(フラグメンテーション)の体系的理解が進んでいない点にあり、測定条件とスペクトルパターン変動の関係の理解が不十分であることと相まって、スペクトルデータベース構築の障害ともなっている。質量分析法を用いた低分子代謝産物等の解析を促進するため、断片化反応に関する理解を深める必要がある。複合型糖鎖含有糖ペプチドにおける奇数電子イオン経路断片化反応(ECD法)の特性について検討した結果、ECD法によるMS/MSスペクトルは、対象分子へのプロトン付加数、不対電子を局在化できる官能基の有無等複数の因子に支配されることが示された(物質構造解析チーム本郷らとの共同研究)。この結果は、ECD法による断片化反応が、可動プロトン数の影響を受ける偶数電子イオンの断片化反応(CID法、IRMPD法)と共通の基盤(統計理論)に基づいて理解できることを示唆しており、非ペプチド性分子に対してECD法の応用展開を図っていくための指針となるものである。ECD法に関する基礎検討に並行してCID法やIRMPD法等の従来型断片化反応を用いた解析法を応用展開し、生体内薬物のLC/MS/MS法による微量定量(BSI構造神経病理研究チーム Wong らとの共同研究)、環状ペプチド系天然物の構造決定(物質構造解析チーム、岩手大学木村らとの共同研究)等を実施した。また、共同利用質量分析装置を用いての種々低分子化合物の同定、定性、定量等を支援した(物質構造解析チームと共同研究)。

---

\*<sup>1</sup>特別任期制職員, \*<sup>2</sup>協力研究員, \*<sup>3</sup>協力技術員, \*<sup>4</sup>研修生, \*<sup>5</sup>派遣職員

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 spectrometry. We are interested in developing new characterization methods for biological molecules.

## 1. Biomolecular characterization

### (1) Development and application of analytical methods for structural details on biological molecules

Direct analysis of modifications of amino acid residues and their positions within a protein sequence is still required in post genome sequence era. Furthermore, binding site of a low molecular reagent to a protein is the most important information for an approach using chemical biology with bio-probe.

To characterize protein structure containing post-translational modifications, we recommend the combination of three procedures. 1) Observation of molecular weight of whole protein using electro-spray ionization mass spectrometry. 2) Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of enzymatic digest. 3) Amino acid analysis of acid hydrolyzates. We have applied post-translational modifications (PTMs) analysis combined with mass spectrometry (MS) and chemical methods to several cases. For example, we have characterized SUMOylation site or disulfide bond pair of proteins. Furthermore we have started modifomics project. Some acetylation sites or hypusine site of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* proteins were analyzed.

### (2) Development of quantitative analysis of biomolecules

An application of a single method is generally insufficient for quantitative analysis of protein since the properties of protein depend on the kinds and the sequence of amino acids. Amino acid analysis is absolutely quantitative method and is applicable to any kind of protein. The absolute value is useful for MS analysis that only provides relative amount of digested peptides.

We carried out a highly sensitive amino acid analysis using a fluorescent derivatizing reagent, 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). Contamination from environment during acid hydrolysis from protein to amino acids, however, often interferes the sensitive analysis. We developed an automated system for acid hydrolysis to avoid the contamination and applied the system to amino acid analysis, using solid acid instead of liquid acid in ordinary protocols.

Quantification of amino acids requires a standard solution of amino acid mixture. The international standard of amino acids is supplied by NIST (National Institute of Standards and Technology of the USA). The lower value of methionine than that of declared amount of the NIST standard, however, was indicated by our amino acid analysis and NMR quantification. We recommend preparing the new amino acid standard that is SI traceable.

### (3) Studies on structural biology and its related technologies

Researchers far from synchrotron facilities often feel it stressful to visit the facilities for measurement of X-ray diffraction. Thus we and the division of synchrotron radiation instrumentation together built a mail-in system in Wako campus area

for remote accumulation of the diffraction data at SPring-8. In addition, we provide purified protein samples to the researchers in Wako area in cooperation with SR system biology research group. On the other hand, crystallization of target proteins is indispensable to recent structural biology, so that effective techniques of crystallization are strongly desired. In this point of view, we have developed novel methods of protein crystallization based on nano-technologies.

#### (4) RNA mass spectrometry

Although the last decade has witnessed a remarkable growth in protein analysis by mass spectrometry, the growth has not happened to another class of functional biopolymer, i.e. non-coding RNA (ncRNA). A reason for the differences is the lack of a software tool for the identification of ncRNAs and their modifications. We have started to develop a search engine that retrieves DNA/RNA sequence databases using mass data of nuclease digest of RNA. We have examined the fragmentation pattern of oligoribonucleotides in mass spectrometer and implemented rules into a prototype program. Using the program has successfully identified major components in a mixture of small RNAs.

## 2. Fundamentals of mass spectrometry

### (1) Gas-phase chemistry for structural characterization of biomolecules

Systematic understanding of the experimental and fundamental aspects on gas-phase ion chemistry is a key to full exploitation of tandem mass spectrometry for structural characterization. The study on electron capture dissociation (ECD) of glycopeptides with complex-type sugar chains provided a new insight into the fragmentation via odd-electron systems. It was shown that the ECD fragmentation patterns were governed by multiple factors including the availability of the radical localizing site and the degree of protonation. This provides a foundation for the application of ECD to structural characterization of non-peptide molecules. In the meantime, conventional dissociation methods including CID and IRMPD were applied to tandem mass spectrometric analysis (qualitative and quantitative) of small molecules in various biological systems.

### *Staff*

#### *Head*

Dr. Naoshi DOHMAE

#### *Members*

Dr. Takemichi NAKAMURA

Dr. Hideyuki MIYATAKE

Dr. Hiroshi NAKAYAMA

Dr. Akiko MASUDA <sup>\*2</sup>

Dr. Takehiro SUZUKI <sup>\*1</sup>

Dr. Keiko NAKANISHI <sup>\*2</sup>

Ms. Miwako ASANUMA <sup>\*3</sup>

---

<sup>\*1</sup> Special Fixed Term Contract Employee <sup>\*2</sup> Contract Researcher <sup>\*3</sup> Contract Technical Scientist

#### *in collaboration with*

Dr. Minoru YOSHIDA (Chem. Genet. Lab.)

Dr. Akihiro ITO (Chem. Genet. Lab.)

Dr. Akihisa MATSUYAMA (Chem. Genet. Lab.)

Dr. Hiroyuki OSADA (Antibiot. Lab.)

Dr. Siro SIMIZU (Antibiot. Lab.)

Dr. Makoto MUROI (Antibiot. Lab.)

Dr. Makoto KAWATANI (Antibiot. Lab.)

Dr. Hideo OKUMURA (Antibiot. Lab.)

Dr. Shogo MATSUMOTO (Mol. Entomol. Lab.)

Dr. Masataka SUZUKI (Mol. Entomol. Lab.)

Dr. Shigeharu MORIYA (Environ. Mol. Biol. Lab.)

Dr. Yoko AIDA (Viral Infec. Diseases Unit)

Dr. Masamitsu WATANABE (Low Temp. Phys. Lab.)

Dr. Yoshinobu AOYAGI (Nanosci. Develop. Sup. Team.)

Dr. Yayoi HONGO (Mol. Character. Team)

#### *Visiting Members*

Dr. Tomohiko TSUGE (ICR, Kyoto Univ.)

Dr. Masayoshi NAKASAKO (Fac. Sci. Tech., Keio Univ.)

Dr. Fumika SHINOZAKI (Fac. Agricul., Univ. of Tokyo)

Ms. Misaki AKIYAMA (WDB Co. Ltd.)

Ms. Masami KOIKE (WDB Co. Ltd.)

#### *Trainees*

Mr. Yuichi HIRANO (Fac. Sci., Tokai Univ.)