

## 奨励賞

絹見 朋也 氏 [独立行政法人産業技術総合研究所, 博士(理学)]



〔業績〕 質量分析によるタンパク質の翻訳後修飾の解析と応用

絹見朋也氏は1991年電気通信大学材料科学科卒業、1993年同大学電子物性工学専攻博士前期課程修了、博士後期課程在学中の1993～1995年米国オクラホマ大学に留学、1996年同大学同専攻博士後期課程修了、博士(理学)を取得した。日本パーセプティブ株式会社、電気通信大学電子物性工学助手、国立感染症研究所細胞化学部を経て2001年産業技術総合研究所ヒューマンストレスシグナル研究センター、2006年から現在の産業技術総合研究所計測標準研究部門に勤務している。

絹見氏の質量分析に関する研究は、三つに大別される。

### 1. タンパク質リン酸化と視覚機能制御に関する質量分析による構造研究

視覚における光情報の流れをとらえると、光受容したロドプシンの情報は、Gタンパク質の活性化、セカンドメッセンジャーの環状GMPの分解を行うホスホリパーゼCの活性化による光情報の増幅機構とチャネルの開閉へと伝播される。視覚の研究の中心は、この情報伝達機構解明へと移りつつあった。当時、過剰に増幅された光情報を制御するタンパク質であるアレスチンは、リン酸化により機能制御を受ける活性調節タンパク質として知られていた。当該分野で活発な研究を進めていた米国オクラホマ大学Matsumoto研究室で、絹見氏は質量分析を用いて、アレスチンの一種、フォスレスチン(PRI)の*in vivo*リン酸化部位を世界で初めて明らかにした。その内容は、ショウジョウバエ視細胞からPRIを二次元電気泳動で分離、プロテアーゼ消化後キャピラリーLC-MSによる分析を行うもので、PRIのSer<sub>366</sub>がリン酸化されることを証明した。

一連の研究は、「プロテオーム」という用語が生まれる前に、その手法を確立したものであった。さらに、評価の高いこの手法は、世界の視覚にかかわる研究者に質量分析の手段としての重要性のみならず、カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼIIの研究やcAMPの関与するレセプター研究など細胞内情報伝達機構解明にも広く展開できることを示し、質量分析の生化学分野への普及にもつながる貢献を果たした。

### 2. タンパク質の酸化に関する質量分析による構造研究

タンパク質によるレドックス制御は、一般に、システイン残基のスルフェン酸とチオールとの可逆性に基づくとされている。しかし、過剰の酸化剤が存在すると、タンパク質の不可逆的な酸化が起こる。絹見氏はこの過剰な酸化に注目し、酸化タンパク質に対して、質量分析によるタンパク質中のシステイン残基の酸化で生じるスルホン酸検出を試みた。すなわち、パーキンソン病原因遺伝子産物であるDJ-1タンパク質のシステインスルホン酸への酸化は、Cys<sub>106</sub>が最も起こりやすいことを、二次元電気泳動とLC-MSによって示し、酸化ストレスとパーキンソン病の関連性を明らかにした。さらに、アルツハイマーやパーキンソン病の赤血球中のペルオキシレドキシニンに、システインスルホン酸を見だし、それらの疾病の進行によりシステインスルホン酸が有意に増加することを明らかにした。また、ペルオキシレドキシニン6の二つのシステイン、Cys<sub>46</sub>とCys<sub>90</sub>において、酸化ストレス下、スルホン酸へ容易に酸化されることをMALDI-TOF/MSを用いて観測した。このときに、システインの酸化によるイオン化効率の著しい減少は、クエン酸水素二アンモニウムを添加することで改善、高感度に検出できることを見いだした。また、DIOS (desorption/ionization on silicon)におけるクエン酸水素二アンモニウムの効果を精査することで、プロトン源を増やせばシステイン酸化ペプチドの検出感度を向上できることを示した。本手法はシステインが酸化されたタンパク質、ペプチドに広く適用でき評価が高い。

また、タンパク質の酸化はアミノ酸側鎖の構造変化をもたらす場合がある。特に、フェントン試薬との反

応で生成する酸化タンパク質では、塩基性アミノ酸残基が酸化されやすいことはよく知られている。しかし、酸化タンパク質の酸化部位の決定は、酸化反応により複雑な混合物を与えるため、困難であった。そこで、酸化によって得られるカルボニルタンパク質を選択的に検出できれば、カルボニル化反応と他の酸化反応を区別が可能になり、複雑な酸化タンパク質の構造解析も可能になると期待できる。絹見氏は2,4-ジヒドロフェニルヒドラジン(2,4-DNPH)の6個の炭素を $^{13}\text{C}$ でラベルした2,4-DNPHを化学合成し、 $^{12}\text{C}$ -DNPHと1:3,3:1の比の試薬を反応させ、マスペクトル上、カルボニル化されたタンパク質を判別して、MS/MSによるフラグメンテーション解析する方法を案出した。この方法は、ICATでよく使われる重水素を使わないので、水素移動の反応を考慮する必要がなく、六つの $^{13}\text{C}$ を用いることによって、スペクトルでのピーク判別が容易である特色を有する。本手法により、次亜塩素酸ナトリウム酸化によって、窒素原子を含む分子の脱離が起こることを見だし、従来知られていなかった反応が起こりうることを示した。

これらの酸化の研究によって、質量分析に新しい方法や手法を導入し、酸化タンパク質の詳細な構造解析、その応用として難治性疾患のマーカー候補を提示できたことが顕著な業績として挙げられる。

### 3. 無機粒子をマトリクスとする低分子量化合物のレーザーイオン化法開発

先のクエン酸水素二アンモニウム-DIOSの研究と前後して、絹見氏らはMALDIに無機粒子をマトリクスとして用いる独創的な研究をした。その研究は、田中耕一氏らの研究にある、粒径数十nmの金属超微粒子ではなく、数~数十 $\mu\text{m}$ の粒径をもつ入手容易な金属粒子や金属酸化物の粒子でもイオン化できることを明らかにした。調べられた金属粒子、酸化金属粒子はいずれも試料のイオン化を支援するマトリクスとして働き、なかでも特に酸化チタンが高いイオン化効率を与えた。酸化チタンが優れている理由はマトリクスがイオン化しない点と、効率的に急速加熱が起こるためと仮定した。DIOSをはじめとする、現在盛んに研究されているマトリクスフリーのイオン化の先駆的研究であり、当該論文は100件近く引用されており、高い評価を受けている。

以上、絹見氏は、リン酸化と酸化に関して、翻訳後修飾タンパク質のプロテオミクス解析、質量分析による詳細な構造解析と機能解析を具体的に示した。そこで得られた結果は、活性調節タンパク質としてのアレスチンの役割やペルオキシレドキシシンにおけるシステインスルホン化の構造解析だけにとどまらず、神経伝達・酸化ストレスに関係するタンパク質の機能解析、疾患マーカー探索への可能性も示唆している。

また、絹見氏が質量分析の実験で得た技術、すなわち、DIOS利用の拡張、安定同位体の利用拡大や無機粒子を使ったMALDIは、質量分析における「誰でも簡単に使える」技術として、質量分析研究の影の部分での貢献を果たし、これらのことは高く評価できる。

日本質量分析学会主催の質量分析講習会講師、日本質量分析学会誌編集委員を務めたほか、第56回質量分析総合討論会において実行委員として事務局を担当し、討論会運営に大きな役割を果たした。質量分析に関する研究ならびに学会活動へのいっそうの活躍が期待され、日本質量分析学会奨励賞にふさわしいと認められた。

### 授賞対象業績リスト

- 1) H. Matsumoto, B. Kurien, Y. Takagi, E. S. Kahn, **T. Kinumi**, N. Komori, T. Yamada, F. Hayashi, K. Isono, W. L. Pak, K. W. Jackson, and S. L. Tobin, Phosrestin I undergoes the earliest light-induced phosphorylation by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase in *Drosophila* photoreceptors, *Neuron*, **12**, 997-1010 (1994).
- 2) **T. Kinumi**, S. L. Tobin, H. Matsumoto, K. W. Jackson, and M. Ohashi, The phosphorylation site and desmethionyl N-terminus of *Drosophila* phosrestin I *in vivo* determined by mass spectrometric analysis of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis, *Eur. Mass Spectrom.*, **3**, 367-378 (1997).
- 3) E. S. Kahn, **T. Kinumi**, S. L. Tobin, and H. Matsumoto, Phosrestide-1, a peptide derived from the *Drosophila* photoreceptor protein phosrestin I, is a potent substrate for  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-

- dependent protein kinase II from rat brain, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **119**, 739–746 (1998).
- 4) T. Kinumi, H. Niwa, and H. Matsumoto, Phosphopeptide sequencing by in-source decay spectrum in delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **277**, 177–186 (2000).
  - 5) T. Kinumi, T. Saisu, M. Takayama, and H. Niwa, Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis, *J. Mass Spectrom.*, **35**, 417–422 (2000).
  - 6) T. Kinumi, E. Niki, and H. Matsumoto, Affinity-tagged phosphorylation assay by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (ATPA-MALDI): Application to calcium/calmodulin-dependent protein kinase, *J. Biochem.*, **138**, 791–796 (2005).
  - 7) T. Kinumi, J. Kimata, T. Taira, H. Ariga, and E. Niki, Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide mediated oxidation *in vivo* in human umbilical vein endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 722–728 (2004).
  - 8) T. Kinumi, Y. Ogawa, J. Kimata, Y. Saito, Y. Yoshida, and E. Niki, Proteomic characterization of oxidative dysfunction in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by exposure to oxidized LDL, *Free Radic. Res.*, **39**, 1335–1344 (2005).
  - 9) T. Kinumi, Y. Shimomae, R. Arakawa, Y. Tatsu, Y. Shigeri, N. Yumoto, and E. Niki, Effective detection of peptides containing cysteine sulfonic acid using matrix-assisted laser desorption/ionization and laser desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **41**, 103–112 (2006).
  - 10) Y. Yoshida, A. Yoshikawa, T. Kinumi, Y. Ogawa, Y. Saito, K. Ohara, H. Yamamoto, Y. Imai, and E. Niki, Hydroxyoctadecadienoic acid and oxidatively modified peroxiredoxins in the blood of Alzheimer's disease patients and their potential as biomarkers, *Neurobiol. Aging*, **30**, 174–185 (2009).
  - 11) T. Kinumi, I. Osaka, A. Hayashi, T. Kawai, H. Matsumoto, and K. Tsujimoto, Protein carbonylation detected with light and heavy isotope-labeled 2,4-dinitrophenylhydrazine by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **57**, 371–377 (2009).