

第 70 回質量分析総合討論会 Late-Breaking Abstracts (質量分析夏の学校枠)

Presenter	Affiliation	Title	ID
前田 朝登 A. Maeda	京都大学大学院 Kyoto University	高感度タンパク質構造変化プロファイリングに向けたリン酸化プローブ標識法の検討 (Phosphoprobe Labeling for Highly Sensitive Profiling of Protein Conformational Changes)	2P-48(LB)
森川 和哉 K Morikawa	京都大学大学院 Kyoto University	N 末端アセチル化修飾の大規模解析法の開発 (Large-scale analysis of co-translational acetylation at protein N termini)	2P-49(LB)

高感度タンパク質構造変化プロファイリングに向けたリン酸化プローブ標識法の検討

(京都大学大学院薬学研究科¹・医薬基盤・健康・栄養研究所²)

まえだ あさと おがた こうすけ すぎやま なおゆき いしはま やすし
○前田 朝登¹・小形 公亮¹・杉山 直幸¹・石濱 泰^{1,2}

Phosphoprobe Labeling for Highly Sensitive Profiling of Protein Conformational Changes

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University¹, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition²)

○A. Maeda¹, K. Ogata¹, N. Sugiyama¹, Y. Ishihama^{1,2}

Short Abstract: Intracellular protein function is regulated by their higher-order conformational changes such as the formation of protein complexes. Recently, several proteome-wide methods for the analysis of higher-order conformational changes have been reported, in which protein surfaces are labeled with probes and are identified by mass spectrometry. However, the high complexity of proteome samples makes it difficult to detect probe-labeled peptides and structural changes. In this study, we aimed to develop a high-sensitive and comprehensive method to analyze conformational changes, using phosphate groups as probes that can be easily enriched and purified. We evaluated the possibility of detecting protein conformational changes based on differences in phosphoprobe labeling efficiency through *in vitro* kinase reactions. We found that *in vitro* phosphorylation efficiency of denatured BSA was increased more than 50-fold than that of native BSA. We will also report the results of profiling *in vitro* phosphorylation efficiency of purified proteins treated with thermal denaturation.

Keywords: Protein conformation, Protein kinase, Phosphorylation, LC/MS/MS, Structural proteomics,

はじめに

細胞内タンパク質の機能はタンパク質複合体の形成などによる高次構造の変化によって制御される。タンパク質の包括的な機能解析のためには高次構造変化をプロテオーム規模で明らかにすることが重要である。近年、タンパク質表面を選択的にプローブ標識し質量分析にて標識部位を同定する、プロテオーム規模高次構造変化解析法が注目を集めている。しかし、プロテオーム試料は複雑性が高く、プローブ標識ペプチドの検出率が低いいため、包括的な構造変化の検出が困難である。そこで我々は、高感度かつ包括的なプロテオーム高次構造変化解析法の開発を目指した。

我々は基質タンパク質をリン酸化修飾する酵素であるプロテインキナーゼに着目した。キナーゼによる *in vitro* リン酸化反応効率が基質タンパク質の構造状態を反映することが確認できれば、リン酸基を基質タンパク質の構造を認識するためのタグとして用いた構造解析法の実現が期待される。さらに、リン酸化ペプチドは既に確立されたリン酸化ペプチド濃縮法¹⁾により簡便に濃縮・精製が可能であり、リン酸化プローブ標識ペプチドを高い検出効率で解析できることが期待される。本研究では、*in vitro* キナーゼ反応によるリン酸化プローブ標識を用い、プローブ標識率によるタンパク質構造解析の実現可能性を精査した。

方法および結果

精製タンパク質を基質とし、組換えキナーゼによる *in vitro* リン酸化反応効率が基質の構造状態を反映するかを評価した。基質として予め還元アルキル化による変性処理を行った BSA(Bovine Serum Albumin)と、無処理の BSA を用い、組換えキナーゼにはチロシンキナーゼ SRC (Carna Biosciences) を用いた。*In vitro* キナーゼ反応を行った後、それぞれを trypsin 消化し、得られたリン酸化ペプチドを液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) により定量比較した。その結果、変性処理を行った BSA では、無処理の BSA と比較しチロシンリン酸化効率が 50 倍以上増加した。このことから、SRC キナーゼは基質タンパク質の構造情報を認識してリン酸化修飾を行っている可能性が示唆された。本発表では、*in vitro* キナーゼ反応時間が構造変化の検出感度と検出選択性に及ぼす影響、および様々な温度で熱変性処理した精製タンパク質の *in vitro* リン酸化反応効率のプロファイリング結果についても報告する。

参考文献

1) Sugiyama N *et al.*, *Mol. Cell Proteomics.*, 2007

共翻訳 N 末端アセチル化修飾の大規模解析法の開発

(京都大学大学院薬学研究科¹・理化学研究所生命医科学研究センター²・医薬基盤・健康・栄養研究所³)

もりかわかずや にしだひろし うちやまじゅんき いまみこうし いしはまやすし
○森川和哉¹・西田紘士¹・内山純貴¹・今見考志^{1,2}・石濱泰^{1,3}

Large-scale analysis of co-translational acetylation at protein N-termini

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University¹, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences², National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition³)

○K.Morikawa¹, H.Nishida¹, J.Uchiyama¹, K.Imami^{1,2}, Y.Ishihama^{1,3}

Short Abstract: Acetylation of α -amino groups at the protein N-terminus affects a wide range of protein functions. Many proteins are known to be co-translationally acetylated by ribosome-associated N-acetyltransferases. The functional significance of co-translationally acetylated proteins is not well understood on a proteome-wide scale. In this study, we developed a method for a large-scale analysis of protein N-terminal acetylation on nascent polypeptide chains by combining affinity enrichment of puromylylated nascent polypeptides and the isolation of protein N-terminal peptides by TrypN digestion and SCX chromatography. We successfully identified 420 protein N-terminal acetylation sites on nascent polypeptides, showing 1.4-fold and 3.5-fold improvements in the identification numbers of protein N-terminal peptides and the enrichment selectivity, respectively, in comparison to a conventional approach.

Keywords: Proteomics, Nascent Polypeptide Chains, Protein N-terminal Acetylation, Strong Cation Exchange Chromatography

背景・目的

細胞内のリボソームにおいて翻訳されている新生ポリペプチド鎖の N 末端は共翻訳修飾を受け、タンパク質のフォールディングや安定性を制御していることが知られている。中でもタンパク質 N 末端の α -アミノ基に対するアセチル化修飾は翻訳と共に、または翻訳後に起こるとされているが、共翻訳修飾される N 末端アセチル化タンパク質とその機能的意義についてはプロテオームレベルでの理解は進んでいない。最近、我々は新生ポリペプチド鎖の大規模解析を可能とする pSNAP 法¹⁾ および、TrypN 消化と強カチオン交換クロマトグラフィー (SCX) を組み合わせたタンパク質 N 末端ペプチド濃縮法 N-CHAMP²⁾ を開発した。そこで本研究では、これらの手法を組み合わせることで、LC/MS/MS を用いたショットガンプロテオミクスによる共翻訳 N 末端アセチル化修飾の大規模解析法の検討を行った。

方法・結果

まず pSNAP 法で得られた新生ポリペプチド鎖のトリプシン消化物に対し SCX を組み合わせることで新生ポリペプチド鎖における N 末端アセチル化の大規模解析を試みた。その結果、ヒト培養細胞から 298 種の新生ポリペプチド鎖 N 末端ペプチドが同定され、その濃縮率は 23%であった。さらなる同定数と濃縮率の向上を目的とし、TrypN 消化とピペットチップ型 SCX カラムによる N-CHAMP 法を適用した。TrypN で消化されたタンパク質 N 末端ペプチドはトリプシン消化とは異なりリジン・アルギニン残基を含まず正電荷を有しないため、SCX を用いて選択的に分離・濃縮することができる。TrypN 消化物に対してピペットチップ型 SCX カラムによる N-CHAMP 法を最適化し適用したところ、1158 種のタンパク質 N 末端アセチル化ペプチドを含む計 1288 種のタンパク質 N 末端ペプチドを高い濃縮率 (99%) で同定することができた。この N-CHAMP 法を pSNAP 法で得られた新生ポリペプチド鎖に対して適用した。その結果、新生ポリペプチド鎖において 420 種のタンパク質 N 末端アセチル化ペプチドが濃縮率 80%で同定され、従来法と比較して 1.4 倍の同定数と 3.5 倍の濃縮率の向上を達成できた。今後、さらなる高感度化と選択性の向上に向けた検討をおこない、プロテオームレベルでの共翻訳 N 末端アセチル化修飾の大規模解析を達成する。

参考文献

- 1) J.Uchiyama *et al.*, *iScience*, in press (2022).
- 2) C.H.Chang *et al.*, *Mol cell Proteomics*, **20**, 10003 (2021).