

技術論文

東京湾表層堆積物中のジペプチド分析

—ジペプチドの GC/MS による解析—*

三田 肇**

(2011 年 1 月 17 日受付, 2011 年 5 月 19 日受理)

1. はじめに

タンパク質は、地球上の全ての生物に普遍的に含まれ、触媒機能や構造形成の役割を担う生命活動にとって非常に重要な有機化合物であり、生体中に豊富に存在している。タンパク質は、通常 20 種のアミノ酸が、遺伝子 (DNA) の情報に従って、リボソーム上で、特定の配列 (一次構造) をもって縮合した分子量が概ね 10,000 以上の高分子化合物である。生物体の死後にタンパク質は、タンパク質分解酵素による加水分解や化学的な加水分解を受けやすく、堆積物中で比較的速やかに分解される。また、糖などとアミノカルボニル反応により生成するメラノイジンなどへの変性も起きる。一方で、生体中でタンパク質の総量は多くとも、個々のタンパク質分子の物質量は少なく、堆積物などに含まれている個々のタンパク質分子を分離し分析することは困難である。そこで、タンパク質の種類や物質量などを求めるのではなく、酸加水分解によって得られるアミノ酸を結合態アミノ酸として分析することが一般的である。

タンパク質の加水分解過程には、タンパク質中の任意の位置で加水分解を受ける反応と、タンパク質が N-末端より 2 残基ずつ環状中間体 (ジケトピペラジン) を経てアミノ酸が 2 個縮合したジペプチドが遊離する反応が知られている (Steinberg and Bada, 1983; Sepetov et al., 1991)。このため、堆

積物試料中にジペプチドは比較的豊富に含まれていることが期待される。また、微生物の中には、栄養源として取り込むために特定のペプチドの細胞膜透過を行うためのシステムを備えたものが知られており、ジペプチドの選択的透過にはジペプチドパーミアーゼという酵素が関与している (Alves and Payne, 1980; Payne and Smith, 1994; Smith et al., 1999)。この中で、低温環境である深海堆積物中から単離された *Pseudoalteromonas* sp. は、菌体外にプロテアーゼを分泌し、それにより分解して得られたジペプチドをジペプチドパーミアーゼを用いて菌体内に取り込むことで、貧栄養環境に適応していることが報告されている (Zhang et al., 2010)。このような事例から、今後、ジペプチドがバイオマーカーとして展開できる可能性もある。

一方、炭素質隕石中にジペプチド (glycylglycine (Gly-Gly)) を検出した報告がある (Shimoyama and Ogasawara, 2003)。多くの炭素質隕石の水抽出物を加水分解をすることでアミノ酸が検出されることに関する報告例は多いが、ペプチドが前生物的に生成しうることは、生命の起原を考える上で興味深い。今後、多くの炭素質隕石について、分析が進むことが期待される。

また、20 種類のアミノ酸からなるジペプチドは 400 種類になり、堆積物試料中で検出されたアミノ酸がすべてジペプチド由来であったとしても、個々のジペプチドが含量はアミノ酸含量の 1/400

*Dipeptides in Tokyo Bay sediment –Analyses of dipeptides by GC/MS

**福岡工業大学工学部生命環境科学科, 〒 811-0295 福岡県福岡市東区和白東 3-30-1

Hajime Mita, Department of Life, Environment and Materials, Science Faculty of Engineering, Fukuoka Institute of Technology 3-30-1, Wajiro-Higashi, Higashi-Ku, Fukuoka, FUKUOKA 811-0295, Japan

となる。実際にはジペプチドとして存在するものより、タンパク質などとして存在するアミノ酸の方が多いため、個々のジペプチドの存在量はさらに少なく分析が難しいという課題がある。

本報では、タンパク質の初期統成過程におけるジペプチドの存在を明らかにするために、東京湾表層堆積物中に含まれるジペプチド分析の結果について報告する。ペプチド類の分析には HPLC を用いることの方が一般的であるが、前述したようにジペプチドの種類は非常に多いため、HPLC では十分な分離を期待できなかったため、HPLC に比べ分離能の高いガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) を用いた。GC を用いたジペプチド分析は、GC を用いたアミノ酸分析に準じた。但し、ジペプチドはアミノ酸に比べ、分子量が大きく揮発性が低下するので、アミノ基の誘導化はメチルエステルとし、カルボキシル基はトリフルオロアセチル化し、揮発性誘導体とした。また、誘導体化反応は酸存在下に加熱して行うため、誘導体化反応中に部分的な加水分解反応も生じる。そこで、加水分解反応が進行せずにかつ効率的に誘導体化させるために室温で 3 時間のエステル化を行った (Ogasawara et al., 2000)。

2. 実験

ジペプチド抽出

東京湾表層堆積物 S8602 における最表層 (0-2.5 cm) の試料を分析に用いた。採取後、凍結乾燥し凍結保存されていた堆積物試料を粉碎し、試料 2 g に 3 mL の水を加えて 60°C で 1 h 抽出する操作を 8 回繰り返した。集めた抽出液を 2 分し、片方は、酸加水分解を行いアミノ酸分析を行った。残りは、0.15 mL の 3 mol/L の HCl 水溶液を加え pH 1.8 とし、Dowex 50W-X8 (H⁺) イオン交換カラム (10 cm × 1 cmID) に加え、25 mL の純水で金属イオン、酸性、中性物質を除去した。ついで、25 mL の 1.2 mol/L ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 6.5) で、遊離のアミノ酸とペプチドを溶離した。この溶離液を 2 分し、片方については遊離のアミノ酸分析を行った。残りを凍結乾燥し、ここでのジペプチド分析に用いた。なお、遊離アミノ酸と酸加水分解アミノ酸の酸分析は、陽イオン交換法に基づ

く HPLC 分析 (自動アミノ酸分析計) により行った (Spackman et al., 1958)。

ジペプチド分析

3 mL の 1.5 mol/L HCl-メタノールを加え、室温で 3 h 処理し、メチルエステルとした。ついで、溶媒を留去し、1 mL のトリフルオロ酢酸無水物を加え、室温で 30 min 処理し、トリフルオロアセチル化を行った。減圧により反応溶液を除去し、水と酢酸エチルを加え、ジペプチド誘導体を酢酸エチル層より回収した。酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウムを加え脱水した後、窒素気流により 50 μ L まで濃縮した。濃縮液 1 μ L を GC-MS (Shimadzu, GC-MS QP-5000) にスプレットレス法で注入した。GC のカラムには、Chirasil-L-Val キャピラリーカラム (Chrompack International Inc., 25 m × 0.25 mmID) を用い、キャリアーガスにはヘリウムを 1 mL/min で流した。カラムオープンには、50°C から 90°C まで 10°C/min で昇温し、90°C から 145°C まで 5°C/min で昇温し、20 min 維持した後、145°C から 180°C まで 2°C/min で昇温し、180°C から 200°C まで 5°C/min で昇温した。検出には、イソブタンを反応ガスとした化学イオン化法を (イオン化電圧 200 eV) 用いた質量分析計を使用した。データの取り込みは、トータルイオンクロマトグラフの測定には 1 s ごとに m/z 100-400 を走査し、定量には 0.1 s ごとにサンプリングを行う選択イオンモードで測定した。また、標準物質としては市販のジペプチド 34 種を用いた。また、以上の分析法の概要を、Fig. 1 に示した。

3. 分析結果

GC/MS 分析の結果得られた選択イオンクロマトグラム (Selective ion chromatogram, SIC) を Fig. 2 に示す。この結果、34 種のジペプチドを検出した。それら同定したジペプチドを保持時間と同定に用いた分子イオンなどともに Table 1 に示す。また、代表的なマススペクトルを Fig. 3 に示す。

マススペクトルでは、いずれもプロトンが付加した分子イオンが強く現れ、フラグメントイオンとしては分子量より 31 小さい脱メトキシ体のイオンが小さく観測された (Fig. 3)。また、glycyl-L-

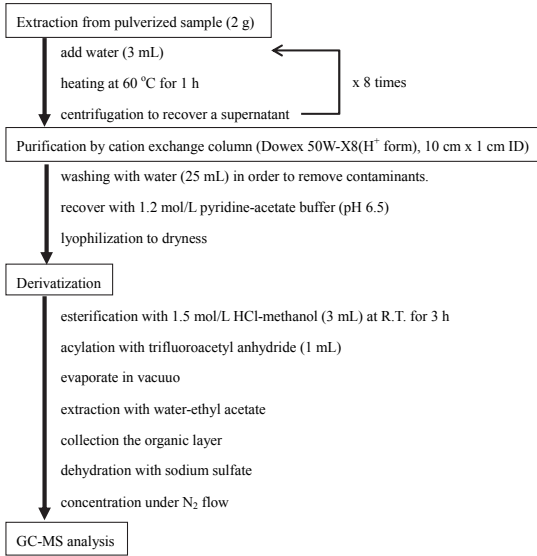


Fig. 1. Schematic diagram of dipeptide analysis in sedimentary rock.

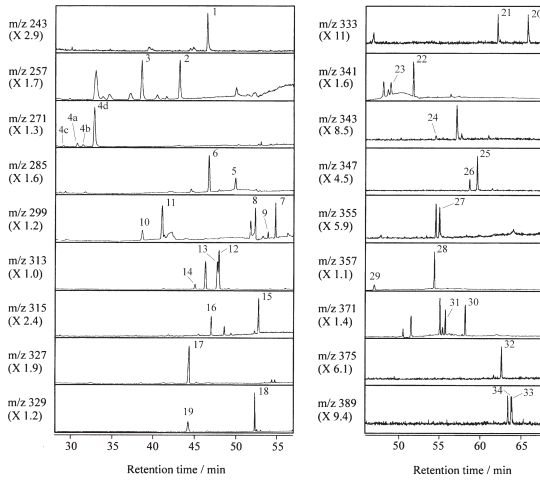


Fig. 2. Selective ion chromatograms of *N*-trifluoroacetyl methyl esters of dipeptides in water extract of the sample at 1.3 cm in depth of the sediment core S8602 of Tokyo Bay. The *m/z* ions correspond to $(M+1)^+$, where *M* stands for a molecular weight of each dipeptide derivative. Peak numbers (1-34) correspond to those of compounds in Table 1. (Ogasawara et al., 2001)

valine (Gly-L-Val) と L-valylglycine (L-Val-Gly) のように同じアミノ酸からなるジペプチドで配列順の異なるものも同じ形状のマスマスペクトルを示した (Fig. 3c, d)。

Table 1. Concentrations of dipeptides in water extracts of the sample at surface of the sediment core S8602 of Tokyo Bay

No.	Compound name	Configuration	<i>m/z</i> *	Retention time/min*	Concentration / nmol g ⁻¹
1	glycylglycine		243	0.00	1.6
2	glycylalanine	L	257	0.00	3.7
3	alanylglycine	L	257	0.00	2.7
4a	alanylalanine	DD	271	0.00	0.31
4b	alanylalanine	DL	271	0.00	0.19
4c	alanylalanine	LD	271	0.00	0.12
4d	alanylalanine	LL	271	0.00	4.7
5	glycylvaline	L	285	0.00	2.5
6	valylglycine	L	285	0.00	3.2
7	glycylleucine	L	299	0.00	3.6
8	leucylglycine	L	299	0.00	1.5
9	glycylisoleucine	L	299	0.00	0.53
10	alanylvaline	LL	299	0.00	2.1
11	valylalanine	LL	299	0.00	4.6
12	alanylleucine	LL	313	0.00	4.8
13	leucylalanine	LL	313	0.00	4.1
14	alanylisoleucine	LL	313	0.00	1.3
15	glycylaspartic acid	L	315	0.00	1.7
16	aspartylglycine	L	315	0.00	1.2
17	valylvaline	LL	327	0.00	3.0
18	alanylaspatic acid	LL	329	0.00	5.6
19	aspartylalanine	LL	329	0.00	3.9
20	glycylphenylalanine	L	333	0.00	0.31
21	phenylalanylglycine	L	333	0.00	0.25
22	valylleucine	LL	341	0.00	4.2
23	leucylvaline	LL	341	0.00	1.3
24	glutamylalanine	LL	343	0.00	0.34
25	alanylphenylalanine	LL	347	0.00	0.74
26	phenylalanylalanine	LL	347	0.00	0.31
27	leucylleucine	LL	355	0.00	1.4
28	valylaspartic acid	LL	357	0.00	4.3
29	aspartylvaline	LL	357	0.00	1.9
30	valylglutamic acid	LL	371	0.00	4.4
31	leucylaspartic acid	LL	371	0.00	2.0
32	valylphenylalanine	LL	375	0.00	0.69
33	leucylphenylalanine	LL	389	0.00	0.64
34	phenylalanylleucine	LL	389	0.00	0.52
Total					80

* Mass numbers used for identification of dipeptides on mass fragmentograms.

** All compounds were identified by coincidence in mass spectra and retention times with those of authentic compounds.

今回調べたグリシンを含むジペプチド5種については、いずれもグリシンが *N*-末端に存在するジペプチドが *C*-末端にあるものより保持時間が遅い傾向が見られた。一方, alanylvaline (Ala-Val) と

valylalanine (Val-Ala) では Ala-Val が先に溶出し、alanylleucine (Ala-Lue) と luecylalanine (Lue-Ala) では Lue-Ala が先に溶出した。このことから、*N*-末端側と *C*-末端側のアミノ酸分子の大小などによって溶出順を推定することは困難であることを示している。よって、標準物質との溶出時間の一致を確認しなければ配列を同定することはできない。このため、本研究では、標準試料となるジペプチドの用意ができた 34 種について、同定を行った。

ジペプチドの誘導体化過程において、タンパク質や大きなポリペプチドの加水分解によるジペ

チドの生成や、存在するジペプチドのアミノ酸への加水分解により、実際に存在するジペプチドを正しく測定できない可能性がある。既報の誘導体化条件 (Islam and Darbre, 1972; Knapp, 1979) を参考にポリグリシン (平均分子量 6800) やヘキサグリシンのエステル化を 80°C, 1h で行ったところ、実際にジペプチドが検出された。しかし、本分析条件では、これらのモデルペプチドからジペプチドの生成は認められていない (<0.02-0.04%) (Ogasawara et al., 2000)。一方、80°C, 1h のエステル化を行ったところグリシンや *L*-バリンの生成が確認された *L*-Val-Gly を、本分析条件でエステル化したところ、グリシンや *L*-バリンの生成も認められなかった (<0.2%)。よって、本分析条件は、穏やかな反応であり、より大きなタンパク質やポリペプチドからのジペプチドへの分解と、存在するジペプチドの分解が抑制されている。

また、光学活性なカラムを用いることで、通常のカラムでは (*L*-alanyl-*L*-alanine (*L*-Ala-*L*-Ala), *D*-Ala-*D*-Ala) と (*D*-Ala-*L*-Ala, *L*-Ala-*D*-Ala) の 2 つのジアステレオマーにしか分けることができないが、4 つのジアステレオマーの全てを区別して検出することができた (Fig. 4)。このことにより、ジペプチドの起源についての情報を得ることができる。Ala-Ala の 4 つのジアステレオマーでは、*L*-Ala-*L*-Ala が最も多く、ついで *D*-Ala-*D*-Ala, *D*-Ala-*L*-Ala, *L*-Ala-*D*-Ala の順で検出された。*L*-Ala-*L*-Ala からのエピ化では、まず *D*-Ala-*L*-Ala あるいは *L*-Ala-*D*-Ala が多く生成することになり、*D*-Ala-*D*-Ala が最も少なくなるはずである。しかし、*D*-Ala-*D*-Ala の方が、*D*-Ala-*L*-Ala や *L*-Ala-*D*-Ala より多く検出されたことは、*D*-Ala を含むジペプチドが、*L*-Ala-*L*-Ala からのエピ化から生じたものではないことを示している。おそらく、グラム陽性菌の細胞壁のペプチドグリカンに由来すると考えられる。Gly-Val では、Gly-*L*-Val のみが検出され、Gly-*D*-Val が検出されなかったことから、エピ化が進行していないことが裏付けられる (Ogasawara et al., 2000)。なお、この分析条件で glycyl-*L*-aspartic acid (Gly-*L*-Asp) と *L*-Ala-*L*-Ala を誘導体化したところ、エピ化した Gly-*D*-Asp や、*D*-Ala-*L*-Ala, *L*-Ala-*D*-Ala, *D*-Ala-*D*-Ala のピークは検出されていない (<0.1%)。このように、誘導体

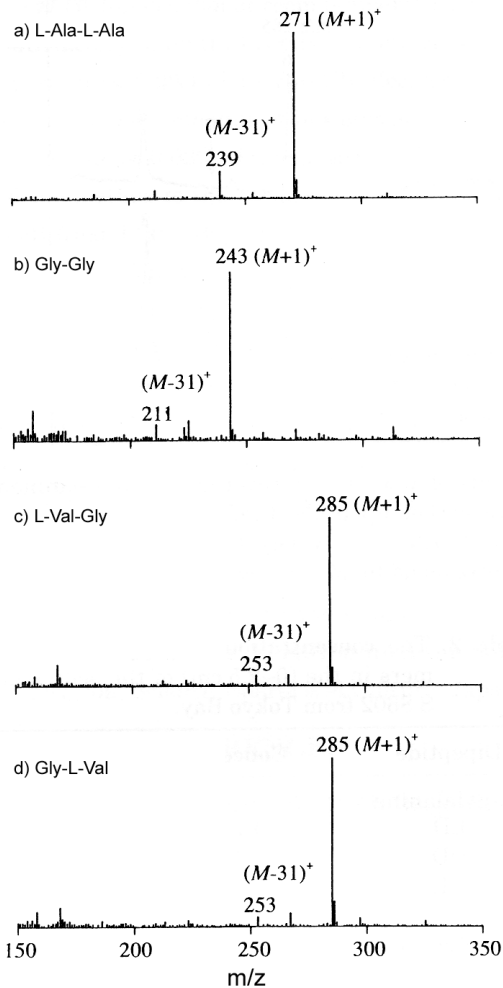


Fig. 3. Mass spectra of *N*-trifluoroacetyl methyl esters of a) *L*-Ala-*L*-Ala, b) Gly-Gly, c) *L*-Val-Gly, and d) Gly-*L*-Val standards obtained by the chemical ionization mode. (Ogasawara et al., 2000)

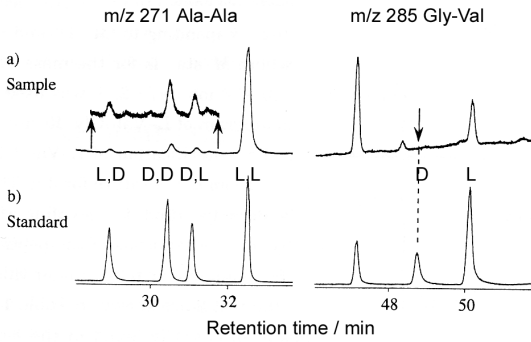


Fig. 4. Selective ion chromatograms of *N*-trifluoroacetyl methyl esters of ala-ala diastereomers (*m/z* 271) and gly-val diastereomers (*m/z* 285) in water extract of the sample at 1.3 cm in depth of the sediment core S8602 of Tokyo Bay. (Ogasawara et al., 2000)

化中のエピ化は無視することができるが確かめられている。

4. 今後の展開

検出されたジペプチドの量は、4-0.1 nmol/g であり、加水分解アミノ酸と遊離アミノ酸の量は 860-38 nmol/g と 13-1.3 nmol/g であった (Ogasawara et al., 2001)。例えば、Gly を含むジペプチドは、39 種類存在するがそのうち 12 種が同定され、その総量は 23 nmol/g であり、加水分解により検出された Gly の約 2.7% を占めており、遊離態の Gly よりも多い。一部のタンパク質やポリペプチドが分析中に加水分解した可能性もあるが、ここでの分析条件ではポリグリシンやヘキサグリシンからジペプチドの生成が生じないことが確かめられている (Ogasawara et al., 2000)。このことから、ジペプチドが比較的安定 (Hill, 1965) であり、堆積物中にかなり多く存在しているものと考えられる。

一方、これまでにタンパク質・ポリペプチドの堆積環境における化学分解過程におけるジペプチドの生成反応として、*N*-末端より 2 残基ずつ環状中間体 (ジケトピペラジン) を経る反応が提案されている (Steinberg and Bada, 1983; Sepetov et al., 1991)。この場合、生じるジペプチドはももとのタンパク質・ポリペプチドの配列情報を保持せず、ジケトピペラジンの開環反応の起こりやす

さによって決まることになる。しかし、ジケトピペラジンの開環反応から予測されるジペプチドの存在比 (Smith and Baum, 1987; Steinberg and Bada, 1983) と、検出されたジペプチドの存在比 (Ogasawara et al., 2001) が大きく異なることや、ペプチドグリカン構成するペプチドの *C*-末端に存在するジペプチドである *D*-ala-*D*-ala が検出されていること (Ogasawara et al., 2000) から、ここで検出されたジペプチドはジケトピペラジンを介して生成したものではない。

このようにジペプチドは比較的多く検出されながら、その生成経路については不明である。微生物の中には、菌体外にプロテアーゼを分泌し、分解して生じたジペプチドなどを栄養源として取り込むものが知られていること (Zhang et al., 2010) から、ジペプチドの生成には生分解の寄与が大きいことが考えられる。また、ジペプチドの分析がアミノ酸分析では困難であったバイオマーカーとして活用できる可能性がある。現状では、堆積物中のジペプチドの分析例は少ないが、今後、分析例が集まることで大きく発展することが期待される。

謝 辞

使用した東京湾堆積物試料は、東京都立大学石渡良志名誉教授のご好意により提供を受けました。本研究の遂行に当たり筑波大学化学系下山晃名誉教授のご指導を頂きました。また、筑波大学大学院化学研究科小笠原亮博士 (現アジレントテクノロジー) には分析データを提供いただきました。また、力石嘉人博士と 1 名の匿名の査読者の方には査読を通して貴重のご意見をいただきました。本研究の一部は、福岡工業大学総合研究機構環境科学研究所研究員研究費 (H20 年度) により実施しました。ここに記して感謝いたします。

引用文献

- Alves R.A. and Payne J.W. (1980) The number and nature of the peptide transport systems of *E. coli*: characterization of specific transport mutants. *Biochem. Soc. Trans.* **8**, 704-705.
- Hill R.L. (1965) Hydrolysis of proteins. *Adv. Protein*

- Chem.* **20**, 37-107.
- Islam A. and Darbre A. (1972) Gas-liquid chromatography of trifluoroacetylated amino acid methyl esters. Determination of their molar responses with flame ionization detector. *J. Chromatogr.* **71**, 223-23.
- Knapp D.R. (1979) Handbook of analytical derivatization reactions. John Wiley & Sons (NewYork).
- Ogasawara R., Ishiwatari R. and Shimoyama A. (2001) Detection of water extractable dipeptides and their characteristics in recent sediments of Tokyo Bay. *Geochem. J.* **35**, 439-450.
- Ogasawara R., Mita H., Ishiwatari R. and Shimoyama A. (2000) Analysis of water-extractable dipeptides from sediments by gas chromatography-mass spectrometry. *Res. Org. Geochem.* **15**, 57-61.
- Payne J.W. and Smith M.W. (1994) Peptide transport by microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **36**, 1-80.
- Sepetov M.F., Krymsky M.A., Ovchinnikov M.V., Bespaloba Z.D., Isakova O.L., Soueck M. and Lebi M. (1991) Rearrangement, racemization and decomposition of peptides in aqueous solution. *Peptide Res.* **4**, 308-313.
- Shimoyama A. and Ogasawara R. (2002) Dipetides and diketopiperazines in the Yamato-791198 and Murchison carbonaceous chondrites. *Origin Life Evol. Biosphere* **32**, 165-179.
- Smith G.G. and Baum R. (1987) First-order rate constants for the racemization of each component in a mixture of isomeric dipeptides and their diketopiperazines. *J. Org. Chem.* **52**, 2248-2255.
- Smith M.W., Tyreman D.R., Payne G.M., Marshall N.J. and Payne J.W. (1999) Substrate specificity of the periplasmic dipeptide-binding protein from *Escherichia coli*: experimental basis for the design of peptide prodrugs. *Microbiol.* **145**, 2891-2901.
- Spackman D.H., Stein W.H. and Moore S. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* **30**, 1190-1206.
- Steinberg S.M. and Bada J.L. (1983) Peptide decomposition in the neutral pH region via the formation of diketopiperazines. *J. Org. Geochem.* **48**, 2295-2298.
- Zhang W.-X., Xie B.-B., Chen X.-L., Dong S., Zhang X.-Y., Zhou B.-C. and Zhang Y.-Z. (2010) Domains III and I-2a, at the Entrance of the Binding Cleft, Play an Important Role in Cold Adaptation of the Periplasmic Dipeptide-Binding Protein (DppA) from the Deep-Sea Psychrophilic Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain SM9913. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4354-4361.