



Title	Decomposition of protein nitrosothiols in matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry
Author(s)	金子, 理奈
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43904">https://hdl.handle.net/11094/43904</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	かねこりな
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17637 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Decomposition of protein nitrosothiols in matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry (化学量論的解析のための S-ニトロソ化タンパク質の質量分析)
論文審査委員	(主査) 教授 平野 俊夫 (副査) 教授 和田 芳直 教授 谷口 直之

### 論文内容の要旨

#### 〔 目的 〕

一酸化窒素 (NO) は血管平滑筋の弛緩因子として同定された。その後、血小板凝集抑制、アポトーシスの制御、シグナル伝達物質としてなど、様々な生理機能が報告されてきた。一方、NO はチオール基と共有結合し、比較的安定な S-ニトロソチオールを生成することがわかっている。その中でタンパク質チオール基への S-ニトロソ化反応は細胞内および細胞外において、NO の運搬およびタンパク質活性制御に関わる重要な翻訳後修飾と考えられている。S-ニトロソ化タンパク質の検出には化学発光法やジアゾカップリング反応が用いられているが、これらはタンパク質結合 NO を直接検出できない。今回、翻訳後修飾の解析に重要な役割を果たしている質量分析法を適用することで、S-ニトロソ化タンパク質の構造生物学的な技術基盤の確立を試みた。

#### 〔 方法ならびに成績 〕

システイン残基を含むペプチド (配列: LQQCPFEDH) を合成した。トランスサイレチン (TTR) はヒト血漿からアルブミンを除去した後、陰イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。

ペプチドに対しては 75%メタノール/1%酢酸、TTR は PBS 環境中で 10 mM の NO 供与剤 NONOate (NOC12) と 1 時間インキュベートし、S-ニトロソ化反応を行った。S-ニトロソ化 TTR 及びペプチドは逆相クロマトグラフィーにて分画した。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 測定には Voyager DE-RP (Applied Biosystems)、エレクトロスプレー (ESI) 測定には Mariner (Applied Biosystems) を用いた。

MALDI 法では、S-ニトロソ化ペプチドのプロトン付加分子イオン ( $m/z$  1145.4) は検出されず、NO が脱離した後で水素付加が起こった (=還元された) と考えられる 29 Da 小さいイオン ( $m/z$  1116.4) が検出された。TTR においても同様の結果が得られた。

一方、ESI 法では S-ニトロソ化ペプチド、S-ニトロソ化 TTR 共にプロトン付加分子イオンが検出できた。

ESI 法において、ノズル電圧は必須であるが、印加電圧の上昇により分子間結合の開裂を起こすことがわかってい

る。S-ニトロソ化ペプチドにおいて、ノズル電圧を段階的に上昇させるとまず2価イオンで、引き続いて1価イオンにNOの脱離による30 Da小さいイオンが増加した。TTRにおいてもノズル電圧の上昇に伴い、価数依存的なNO脱離が観測された。

未修飾TTRとS-ニトロソ化TTRのプロトン付加分子イオンのシグナル面積比は、同じ試料の逆相クロマトグラフィーによる分析結果と一致した。

#### [ 総括 ]

タンパク質およびペプチドのS-ニトロソ化は、質量分析における以下の3つの特徴により同定できる。

1. ノズル電圧の低い条件下でESI法を適用することにより、開裂のないプロトン付加分子イオンを検出できた。
2. ノズル電圧の上昇に伴い、中性NO分子の脱離による30 Da小さいイオンが検出される。この現象は、高い価数のイオンほどイオンのエネルギー状態が高いため顕著である。
3. MALDI法では、光解離もしくはイオン化の過程で起こる電子移動が原因で、NOが脱離還元されるため、29 Da小さいイオンが検出される。

質量分析法は、特定タンパク質におけるS-ニトロソ化の程度を正確に決定でき、NOの生理作用の詳細解析に役立つことが期待できる。

### 論文審査の結果の要旨

一酸化窒素(NO)は血管平滑筋の弛緩因子として同定された。その後、血小板凝集抑制、アポトーシスの制御、シグナル伝達物質としてなど、様々な生理機能が報告されてきた。一方、NOはチオール基と共有結合し、比較的安定なS-ニトロソチオールを生成することがわかっている。その中でタンパク質チオール基へのS-ニトロソ化反応は細胞内および細胞外において、NOの運搬およびタンパク質活性制御に関わる重要な翻訳後修飾と考えられている。S-ニトロソ化タンパク質の検出には化学発光法やジアゾカップリング反応が用いられているが、これらはタンパク質結合NOを直接検出できない。

本論文では、生体内で重要な作用を担うと考えられているS-ニトロソ化タンパク質を、翻訳後修飾の解析に有効な質量分析法を用いて検出及び定量を、マトリックス支援レーザーイオン化法(MALDI)とエレクトロスプレー法(ESI)の2つのイオン化法について検討した。

MALDI法においてはS-ニトロソ化のプロトン付加分子イオンは検出されず、NOの脱離・還元を示す29 Da小さいイオンが検出された。この現象は本論文で初めて報告した。

一方、ESI法において、S-ニトロソ化を示す29 Da大きいイオンが検出でき、通常より低いノズル電圧で測定することでS-ニトロソ化の定量ができた。

更に、ノズル電圧を上昇させることにより、NO分子の脱離を示す30 Da小さいイオンが検出され、しかもこの脱離の割合は多価イオンの価数に依存した。この結果は、質量分析法を用いてS-ニトロソ化の存在を証明するための有効な情報が得られるという点で大変進歩的である。

質量分析法が第一に優れている点は、S-ニトロソ化タンパク質を一酸化窒素分子の脱離を伴わない状態で直接測定できること、また第二には、各々のタンパク質について分子レベルの修飾状態を解析できることにある。これらのことは、従来から用いられている化学発光法などの検出法では不可能であった。

質量分析法を用いることで、翻訳後修飾によるタンパク質の機能制御の解析及び生体内での一酸化窒素運搬機構に関わる分子の探索が大きく進歩するものと期待される。

更に、一酸化窒素との関係が示唆されている動脈硬化や糖尿病といったさまざまな病態の分子レベルにおける原因究明にも大いに役立つと考えられる。

以上のことから、本論文は学位に値するものと認められる。