

Title	Mass Spectrometric Methods for Protein Profiling
Author(s)	里見, 佳典
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45963">https://hdl.handle.net/11094/45963</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">〈a href="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">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	董 見 佳 典
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)
学位記番号	第 19632 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Mass Spectrometric Methods for Protein Profiling (質量分析によるタンパク質のプロファイリング法に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 高尾 敏文  (副査) 教授 長谷 純宏 教授 村田 道雄 教授 関口 清俊

### 論文内容の要旨

ポストゲノム時代において、質量分析の発展と遺伝子配列データベースの充実に伴い、タンパク質を網羅的にプロファイリングすることが重要になっている。タンパク質をプロファイリングするには、1) データベースに対して質量分析データをもとに発現タンパク質を確度よく同定する、2) 様々な生理的变化に伴うタンパク質の量変動解析を行う、3) 遺伝子情報にはない翻訳後修飾の構造を詳細に解析するための有効な方法論を開発、確立する必要がある。本研究では、この3つのテーマについて新規手法を開発し、それを様々なタンパク質の構造解析に応用することで、特に、種々の新規タンパク質翻訳後修飾の構造を明らかにすることができた。

#### 1. ペプチドの Edman 分解と質量分析によるタンパク質の同定法

酵素消化ペプチドに対して Edman 分解を部分的に行い、質量分析を行うと、質量情報以外にも N 末端アミノ酸情報が同時に得られる。この情報を検索することで、より確実にタンパク質が同定できると考えた。Edman 分解は、メチルイソチオシアネート (MITC) によるカップリング反応と、トリフルオロ酢酸 (TFA) による切断反応を、それぞれを減圧下 45°C10 分で反応を行うことで、部分的に Edman 分解反応を行うことができることが分かった。次に、N 末端アミノ酸と質量情報を元にタンパク質を検索するタンパク質検索ソフトウェアを開発した。また、タンパク質が一意的に同定できる確率を計算したところ、トリプシンを用いた場合、ヒトのタンパク質データベース (117,404 配列) に対して検索を行うと、2~3つのペプチド情報 (N 末端アミノ酸と質量) のみでも、誤差が 500 ppm から 100 ppm の範囲で 84.6~99.8%という高い確率でタンパク質を一つに絞り込むことができることが分かった。

#### 2. 安定同位体標識によるタンパク質の量変動解析法

ある2状態のタンパク質混合物があった場合、一方を安定同位体標識した後、両者を混合し、質量分析によりペプチドを測定すると、安定同位体の質量差で2状態由来の同じペプチドが検出される。このシグナル強度比は2状態のタンパク質の量比を反映するため、タンパク質の量変動解析を行うことができる。現在さまざまなラベル法が報告されているが、同位体効果の影響や、汎用性が低いなどの問題点がある。そこで、 $^{13}\text{C}$  を1つ含む、 $^{13}\text{C}$ -アセチル化による量変動解析法を試みた。この方法は、同位体効果の影響がなく、アミノ基を持つ全てのペプチドに高収率で反応できる方法である。まず、標準ペプチドとして Bradykinin (RPPGFSPFR) を用いて、量比解析が可能であるかどうかを検証した。その結果、標識体の質量差がわずかに 1 mass unit であっても、量比を精度よく算出できることが分かった。この方法を、尿ペプチドに適用した結果、尿ペプチド混合物からインシュリン C ペプチドを検出し、その量

比を解析することができた。尿ペプチドは疾患マーカー探索のターゲットの一つであり、この方法を応用することができると思われる結果であった。

### 3. 質量分析によるタンパク質の翻訳後修飾解析

#### 3-1 新規精密質量測定システムの開発

±3 ppm という精度で測定ができる、ナノエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法による新規精密質量測定システムを開発した。これを *Transducin*  $\gamma$  subunit のファルネシル化修飾の構造解析に応用したところ、ファルネシル基由来の特徴的なフラグメントイオンの同定に有効であった。

#### 3-2 翻訳後修飾の解析

質量分析を用いて、種々の翻訳後修飾 (糖鎖、リン酸化、ファルネシル化、ホスファチジルエタノールアミン修飾) 解析に成功した。糖鎖については、ヒト血清トランスフェリンの糖ペプチドによる部位特異的糖鎖構造の解析。リン酸化については、藍藻のタンパク質 *KaiC* の自己リン酸化部位の解析。また、インタクトの *Transducin*  $\gamma$ -subunit を MS/MS で解析することで、ファルネシル基の解析を行った。また、酵母タンパク質 *App8* から、ホスファチジルエタノールアミンによる新規修飾様式を発見した。

## 論文審査の結果の要旨

様々な生物種のゲノム情報が明らかにされている今日、その情報をもとに蛋白質を網羅的にプロファイリングするための簡便で精度の高い方法を確立することが重要になっている。申請者は、この問題に取り組むために、1) アミノ酸配列データベースに対して質量分析データをもとに蛋白質を精度よく同定する方法として、気相エドマン分解と質量分析による蛋白質同定法を考案した。2) 蛋白質の量変動解析を行う方法として、安定同位体  $^{13}\text{C}$  標識による蛋白質の量変動解析法を考案した。それにより、例えば、2つの比較したい異なる生理的条件下で得られる蛋白質混合物試料に対して各構成蛋白質の量変動解析が可能となった。3) ナノエレクトロスプレーイオン化法における新規精密質量測定法を開発し、液体クロマトグラフィー/質量分析において精密質量測定が可能となり、また、未知修飾基の分子式を簡便に推定することも可能となった。さらに、様々な生理的に重要な機能を有する蛋白質において、糖鎖、脂質、リン酸化等による新規な蛋白質翻訳後修飾の構造解析に成功した。

以上により、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。