

Title	Development of Methods for N-and C-Terminal Sequence Analyses of Proteins by MALDI-TOF Mass Spectrometry
Author(s)	山口, 実
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47634">https://hdl.handle.net/11094/47634</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	やまぐちみのもる 山 口 実
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 20886 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学 位 論 文 名	Development of Methods for N-and C-Terminal Sequence Analyses of Proteins by MALDI-TOF Mass Spectrometry (MALDI-TOF 質量分析装置によるタンパク質の N 末端、C 末端配列解析法の研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 原 田 明  (副査) 教 授 青 島 貞 人 助 教 授 山 本 仁 講 師 岡 村 高 明

### 論 文 内 容 の 要 旨

MALDI-TOF 質量分析装置を用いたタンパク質の配列解析においては、タンパク質をトリプシン等の酵素で消化し、その MS スペクトルや MS/MS (PSD) スペクトルから得られた結果をデータベースで検索を行ないタンパク質の同定を行うことが主に行われている。ゲノムデータベースには多くのタンパク質は、前駆体タンパク質として登録されているために、成熟タンパク質の N 末端、C 末端の配列を同定することが困難な場合が多い。

本研究における N 末端の配列解析法の研究では、対象タンパク質に対して、以下の反応を行い N 末端フラグメントの単離を行った。①還元、カルバミドメチル化を行ない、システイン残基のスルフヒドリル基をブロックした。②リジン残基にグアニジノ化を行ない、ホモアルギニン残基に転換した。その結果、タンパク質のアミノ基は N 末端にのみ存在する。③その後、ピオチニルシステイン酸を N 末端のアミノ基に反応させた。④誘導体化されたタンパク質をトリプシン消化した。⑤トリプシン消化物をアビジンレジンに反応させ、N 末端フラグメントを吸着させた後に、内部フラグメントを洗浄除去した。⑥N 末端フラグメントをアビジンレジンから遊離し、回収することにより単離した。その結果、本方法により単離されたタンパク質の N 末端フラグメントは、N 末端が負電荷を持つスルホン酸誘導体になる。また、C 末端は正電荷のグアニジノ基を持つホモアルギニン残基またはアルギニン残基になる。そのために、MALDI-PSD 分析で検出されるプロダクトイオンは、C 末端を含む y 系列イオンが優位に検出され、データベース検索を行わずに MALDI-PSD スペクトルから直接配列解析を行うことを実現できた。更に、N 末端誘導体化試薬の検討を行ないピオチニルシステイン酸の代わりに Sulfo-NHS-S-S-biotin を用い、N 末端フラグメントをアビジンレジンから遊離させるのではなく、Sulfo-NHS-S-S-biotin のジスルフィド結合を過ギ酸酸化により切断し、N 末端フラグメントをスルホン酸誘導体として回収することにより、タンパク質量としてサブピコモルの感度での分析を実現することができた。

C 末端の配列解析法の研究においては、①ペプチド、タンパク質の C 末端をギ酸、無水酢酸を用いオキサゾロン経由で選択的に活性化した。この際、アスパラギン酸、グルタミン酸のカルボキシル基は活性化しない。②次いで、MALDI-TOF 質量分析のポジティブモードでの分析において高感度で検出されるグアニジノ基を持つアルギニンメチルエステルまたは 2-ヒドラジノ-2-イミダゾリンを活性化された C 末端部に反応させ、C 末端を誘導体化した

タンパク質を得た。③対象タンパク質を適切なプロテアーゼで消化した。その結果、この方法により、数種類のタンパク質において、C末端を誘導体化したペプチドをMALDI-TOF質量分析のポジティブモードで優位に検出でき、C末端配列解析の基盤技術を構築した。

## 論文審査の結果の要旨

タンパク質の解析をすることは生命機能の理解のために必要不可欠である。ゲノム情報が明らかになった現在ではポストゲノムとしてタンパク質を網羅的に解析するプロテオミクスが盛んに行われている。現在の手法は発現しているタンパク質の部分構造を質量分析を用いて決定し、ゲノム情報の開始コドンから終止コドンまでの間をタンパク質（前駆体タンパク質）として同定している。実際に発現しているタンパク質（成熟タンパク質）はDNAからの転写以降、スプライシングなどのプロセッシングを経て翻訳後修飾されるため、発現している真のタンパク質の同定とは言い難い。成熟タンパク質を正確に同定するには、まずタンパク質のN末端、C末端の両方を決定する必要がある。しかし、N、C末端配列決定をする系統的な手法が確立されていないのが現状である。

本学位申請者はN、C末端アミノ酸配列を分離し、決定する方法の開発を行った。個々の技術の基本概念は既存のものも含まれるが、それらをうまく組み合わせ改良することで独自の手法を確立している。本博士論文では以下の点を明らかにしている。1) ビオチニルシステイン酸 N 末端標識試薬の開発とアビジンレジンを用いた N 末端フラグメントの回収、2) スルホ-S-S-ビオチン標識試薬による回収率、検出感度の向上、3) オキサゾロンを経由したペプチド C 末端への選択的修飾と選択的イオン化。回収した N 末端フラグメントからアミノ酸配列を決定するにはMALDI-TOF-MSにおけるMS/MSの情報が得られるPost source decay (PSD) という手法を用いている。この方法ではフラグメントイオンとしてN末端側とC末端側が生じるため解析が困難となるが、N末端にスルホン酸であるシステイン酸を導入することでC末端フラグメントイオンの相対強度を高め、アミノ酸配列決定を容易にしている。アビジン-ビオチンの相互作用は強く、これが回収率を低下させる大きな原因となっている。改良法ではジスルフィド結合を試薬に導入することで、ビオチンが強固にアビジンに結合したままでも、ジスルフィドを過ギ酸で酸化的に切断しスルホン酸とすることで回収率の向上を行っている。N末端のアミノ基とリジン側鎖のアミノ基は反応性が大きく異なるためN末端の選択的修飾は比較的容易であるがC末端は側鎖のカルボン酸と反応性が近く報告例も少ない。数少ない方法の1つとしてオキサゾロンを経由する方法が知られているが副反応も多く反応制御が難しい。本申請者は系中でペンタフルオロフェノールの活性エステを経る方法でC端のみを標識することに成功した。カチオン性の標識試薬を反応させることでC末端フラグメントを選択的にイオン化させC末端配列解析の基盤技術を構築した。

以上のように本申請者はタンパク質のN、C末端を正確に同定する手段の開発を行い、確立した。学術的な基礎研究として高分子科学への貢献が大きいばかりではなく、応用面にも目を向け本博士論文で開発した試薬は市販品として既に商品化されている。本研究は当該分野だけでなく、医療や製薬などの他分野への波及効果もあり、C末端配列解析については今後の発展が期待できる。よって、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。