

Title	SEQUENCE ANALYSIS OF PROTEIN COMPLEXES USING A RUTHENIUM COMPOUND
Author(s)	伊藤, 彰厚
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47707">https://hdl.handle.net/11094/47707</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	伊 藤 彰 厚
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 20889 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	SEQUENCE ANALYSIS OF PROTEIN COMPLEXES USING A RUTHENIUM COMPOUND (ルテニウム錯体を用いた複合タンパク質のアミノ酸配列解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 原 田 明  (副査) 教 授 深 瀬 浩 一 教 授 倉 光 成 紀 助 教 授 山 本 仁 講 師 岡 村 高 明

### 論 文 内 容 の 要 旨

生体内において、タンパク質は他のタンパク質と相互作用し複合体を形成する事で代謝系、呼吸器系、光合成系、電子伝達系などといった重要な生体機能を発現している。例えば酸素輸送タンパク質であるヒトヘモグロビンは一般に $\alpha_2\beta_2$ の4つのサブユニットからなるが、4量体となることで単量体のミオグロビンより効率的に酸素輸送を行える。即ち、一つのヘムに酸素が結合すると他のサブユニットの立体構造も変化する。この変化により、より酸素と結合しやすくなる。このような現象はアロステリック効果と呼ばれ、生体高分子特有のものである。生体内の高度な反応制御機能を明らかにするには、この超分子的な相互作用をもつ複合タンパク質そのものの解析が必要である。

しかし、現在のタンパク質の解析法では複合タンパク質を変性させ相互作用を断ち切った上で、各々のタンパク質を質量分析 (MS) により解析している。この場合、複合タンパク質を構成するタンパク質成分を特定するのは困難である。また、タンパク質の発現量は極少量であることが多い上、従来のタンパク質分析の場合、夾雑物などの影響で解析の精度が低いことが多い。複合タンパク質の機能を解析するには、相互作用を保ったまま複合タンパク質を分離し、タンパク質成分を高感度かつ高精度に解析する新たな手法を確立する必要がある。

本論文では、まずタンパク質を高感度かつ高精度に解析することを目的とし、質量分析にてイオン化しやすいビス(ターピリジン)ルテニウム錯体の誘導体をタンパク質 N 端標識試薬 (Ru-CO 標識試薬) として応用し、これを用いたタンパク質のアミノ酸配列の解析法を確立した。次に、2D-Native-PAGE を用い複合タンパク質の機能と相互作用を保ったまま分離し、得られた複合タンパク質成分を 2D-SDS-PAGE で再度分離することでその構成成分に分離する 2 段階の分離手法を用いることで複合体の構成成分の特定を行った。

まず、アミノ酸配列解析法を確立するため Ru-CO 標識試薬を用いて 20 種類の天然アミノ酸のメチルエステルを MS/MS 測定により系統的に解析した。この結果、各アミノ酸それぞれに特徴的なフラグメンテーションパターンを示し、これを解析することでロイシン、イソロイシンのような質量が等しい構造異性体の場合でも一義的に決定できることがわかった。また、長鎖ペプチドの場合でも同様のパターンが見られ、これによりアミノ酸配列を正確に解析できることがわかった。

この方法をリジン残基の側鎖アミノ基をグアニジル化により保護したタンパク質に行うことでタンパク質の N 末

端のみを検出でき、簡便に N 端アミノ酸配列解析ができることがわかった (N 端選択標識法)。また、タンパク質混合物に N 端選択標識法を用いることで系中に含まれる全ての N 端ペプチドの同時検出にも成功した。更に、タンパク質を酵素消化した消化断片をグアニジル化し (Ru)-CO 標識することで 90% 以上の高いシーケンスカバー率が得られ高精度なタンパク質の同定ができた。

また、複合タンパク質を 2D-Native-PAGE および 2D-SDS-PAGE で分離したものを、(Ru)-CO 標識法により解析することで複合体の構成タンパク質の決定に成功した。

以上により、複合タンパク質を構成するタンパク質成分を同定する手法が確立できた。このような手法を確立することは、複合タンパク質の機能・相互作用の解明に寄与するのみでなく、医療分野における病気の早期診断にも貢献するものであると考える。

## 論文審査の結果の要旨

光合成系、呼吸鎖、代謝系、電子伝達系などの生体内で重要な機能はタンパク質が超分子的に相互作用した複合タンパク質によって実現している。このようなタンパク質の解析は生命機能の解明やこれを用いた医療、機能性物質の開発に於いて必要不可欠である。ゲノム情報が明らかにされた現在、発現しているタンパク質の構造解析の主流では複合タンパク質を個々の構成タンパク質に分離し、ゲノム情報などデータベースを基に質最分析を用いてアミノ酸配列決定を行っている。この方法では分離したタンパク質のどの組合せが複合タンパク質を構成していたかを決定することは困難である。一方、質量分析を用いた解析では検出感度はペプチドのイオン化効率に大きく左右されるため、アミノ酸配列により感度が大きく異なる。例えばタンパク質が混合物では、観測されるピークの強度比が構成成分比を反映していないどころか、感度のよいフラグメントイオンのために他のペプチドのイオンそのものが検出されないこともあり問題となっている。

本学位申請者は複合タンパク質を、超分子相互作用を維持したまま分離し、アミノ酸配列を決定する新しい方法の開発を行った。実際に発現している極微量のタンパク質を解析するには高感度、高精度の解析手法の確立が必要であり、既存の方法では不十分であるため新しい概念に基づく試薬・方法論の開発から行っている。本博士論文は以下の点を明らかにしている。1) ビス (ターピリジン) ルテニウム錯体型標識試薬を用いた選択的タンパク質 N 末端標識と高感度・高精度検出法の開発、2) 従来では困難だった、質量の等しいロイシンとイソロイシンの質量分析による識別、3) タンパク質混合物の構成成分に依存しない、同時 N 末端アミノ酸配列決定、4) 従来のペプチドマスマフィンガープリンティング法の改良、5) 超分子相互作用を維持したまま複合タンパク質を分離する方法と構成成分の同定法の開発、6) 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の未知複合タンパク質の解析。

本研究で用いられているビス (ターピリジン) ルテニウム誘導体は酸、塩基、酵素処理などに対し極めて安定な遷移金属錯体で、光に対しても安定で、光励起されることで錯体そのものがイオン化しやすいため、MALDI-TOF-MS を用いた本目的に合致している。また、ルテニウムに由来する特徴的な同位体パターンより、未修飾のペプチドフラグメントイオンとの識別が極めて容易である。MALDI-TOF-MS はマトリックスとして低分子量化合物を用いるため、低分子量のイオンについての議論は従来では困難であったが、この試薬は分子量が約 700 と大きいために、これで標識することで低分子量の夾雑イオンと分離し、フラグメントイオンの開裂パターンを厳密に議論できるようになり、全く分子量の等しいアミノ酸の区別を可能にした。2D-Native-PAGE と 2D-SDS-PAGE 組み合わせた複合タンパク質の解析方法は様々な生物由来のタンパク質の分離に応用でき、医療面での応用など今後の発展が期待できる。

以上のように本申請者は独創的な発想のもとに基礎的な研究だけでなく実用的な研究成果もあげ超分子相互作用を解明するための足掛かりを築いた点から高分子科学への寄与は大きいと言える。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。