



Title	α -アミノ基選択的反応による蛋白質N末端ペプチド単離法の開発
Author(s)	三上, 寿幸
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48742
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 >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 ^み三 ^{かみ}上 ^{とし}寿 ^{ゆき}幸

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 2 1 5 4 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 9 月 26 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

理学研究科化学専攻

学 位 論 文 名 α -アミノ基選択的反応による蛋白質 N 末端ペプチド単離法の開発

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 高尾 敏文

(副査)

教 授 相本 三郎 教 授 深瀬 浩一 教 授 村田 道雄

論 文 内 容 の 要 旨

生体内において、多くのタンパク質は成熟過程においてプロテアーゼによる切断や様々な翻訳後修飾を受け、遺伝子からだけでは推定できない構造をとっている。その中で、タンパク質の N 末端は様々な修飾や多様な切断を受ける部位であり、その構造は生体内での機能と密接に結びついている。また、ペプチド総体を対象にしたペプチドーム解析においては、生理活性を有するペプチドではしばしば N 末端が修飾されており、N 末端ブロックペプチドにフォーカスをあてた解析法は、新規な生理活性ペプチドを探索する有効な方法になるものと考えられる。

本研究では、生体内の機能と密接に関連している N 末端が修飾されたタンパク質やペプチドにフォーカスをあて、それらを効率的に同定することを目的として α -アミノ基選択的反応の開発を行い、さらに、N 末端ペプチドを複雑な混合物から選択的かつ簡便に単離することを目的として上記 α -アミノ基選択的反応が固相上で行える固相担体の開発を行った。

N 末端 α -アミノ基選択的ラベル化法について種々検討した結果、1) 試薬として無水酢酸を使用し、ペプチドを 0.1% 酢酸水溶液 (pH 3.3) に溶解し、0℃ (水中) での反応、あるいは、2) 試薬としてフェニルイソシアネート (PIC) を使用し、ペプチドを 0.1 M ピリジン-酢酸 (pH 6.0) に溶解し、室温での反応を行うことにより、 α -アミノ基選択性 90% 以上での反応をそれぞれ達成することができた。さらに、本ラベル化法の応用として、蛋白質 N 末端ペプチドの同定、及び、配列解析について、安定同位体を利用する質量分析法により簡便に行えることを示した。

蛋白質 N 末端ペプチドを選択的かつ効率よく単離する方法を確立する目的で、ペプチド N 末端 α -アミノ基と選択的に反応するイソシアネート基を有する新規なアミノ基反応性樹脂 (Resin-NCO) を作製した。本樹脂を用いることにより、ペプチド Lys 側鎖 ϵ -アミノ基とは反応することなく、N 末端 α -アミノ基選択的に樹脂と結合させることが可能となった。これにより、N 末端アミノ基が遊離のペプチドは高効率で樹脂にトラップされるため、複雑なペプチド混合物中から N 末端ブロックペプチドを容易に単離することが可能となった。

新規な樹脂 Resin-NCO を用いて、種々の生体試料中の N 末端修飾ペプチドの単離を試みた。尿中に排泄される内在性の N 末端修飾ペプチドや蛋白質 N 末端ペプチドの同定を行ったところ、従来報告されていない N 末端情報も含めて、26 種類の N 末端修飾ペプチドを同定することができ、本方法の有用性を示すことができた。また、脳抽出ペプチド粗分画についても同様な解析を行った。その結果、既知 N 末端修飾ペプチドに加えて、今まで報告されていない N 末端修飾ペプチド 1 種を単離することができ、現在これらの生理的意義を検証している。

論文審査の結果の要旨

生体内において、多くのタンパク質は成熟過程においてプロテアーゼによる切断や様々な翻訳後修飾を受け、遺伝子からだけでは推定できない構造をとっている。その中で、蛋白質の N 末端は様々な修飾や多様な切断を受ける部位であり、その構造は生体内での機能と密接に結びついている。申請者は、N 末端が修飾された蛋白質やペプチドにフォーカスをあて、それらを効率的に同定することを目的として、 α -アミノ基選択的反応の開発を行い、 α -アミノ基選択性 90%以上での反応を確立することに成功した。さらに、本法の応用として N 末端ペプチドを複雑な混合物から選択的かつ簡便に単離できる固相担体の開発を行った。本開発担体は、ペプチド Lys 側鎖 ϵ -アミノ基とは反応せず、N 末端 α -アミノ基と選択的に結合するので、複雑なペプチド混合物中から N 末端ブロックペプチドのみを容易に単離することが可能となった。実際の応用例として、尿や脳等の生体試料中の複雑な蛋白質混合物から N 末端修飾ペプチドの単離を行い、従来報告されていない N 末端情報を含む多くの N 末端修飾ペプチドの同定に成功した。

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。