



Title	Large-scale Identification of Endogenous Secretory Peptides Using Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry
Author(s)	佐々木, 一樹
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61527
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	佐々木 一樹
論文題名 Title	Large-scale Identification of Endogenous Secretory Peptides Using Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry (電子転移開裂質量分析を用いる内因性分泌ペプチドの包括的な解析)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
ペプチドホルモンや神経ペプチドのような生理活性ペプチドは重要な細胞間情報伝達物質である。新しい生理活性ペプチドの発見は基礎研究にとどまらず、創薬を視野においた応用研究への波及効果を有している。従来の探索法で見逃されてきた新しい生理活性ペプチドを同定するためのアプローチとして、質量分析を活用した分泌ペプチドのプロファイリングが有効であることを我々は示してきた。質量分析による配列決定にはペプチド鎖の開裂が必要であり、衝突誘起開裂法(CID)が標準的である。開裂法が異なると同定されるペプチドも異なってくることが予想されるが、実際にどのようなペプチドが同定されるかは明らかではない。本研究では、新しい開裂法である電子転移開裂法(ETD)を用い、培養細胞の分泌ペプチドをプロファイリングし、その中から生理活性ペプチド候補分子を選択し、候補ペプチドが生理活性ペプチドか否かの可能性について検証した。	
〔方 法(Methods)〕	
ペプチドホルモン産生能を有するヒト膵内分泌腫瘍由来QGP-1株を用いた。分泌ペプチドを分析するために、5分間の脱分極刺激を与えて無血清培養上清を回収した。固相抽出・ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、分子量1万未満のペプチド分画を単離した。得られた試料は液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)で分析し、配列同定に必要なMS/MSスペクトルを取得した。ペプチド鎖の開裂法にはCIDとETDを用いた。各MS/MSスペクトルは、ヒト蛋白質配列データベースに基づいて配列を同定するMascotソフトウェアを用いてマッチングを実施した。同定配列を前駆体配列上に帰属させて、プロセシングの状況を推測するマップを作製した。抗菌活性は酸化還元試薬を用いた比色分析とコロニーアッセイで評価した。	
〔成 績(Results)〕	
CIDでは795ペプチド、ETDでは569ペプチドが同定され、重複は397ペプチドであった。同定できたペプチドは分子量で1000から15000 Daにおよび、半数は3000 Daを超えていた。神経細胞・内分泌細胞に選択的に発現する分泌蛋白質VGFに由来するペプチドが同定数の最多を占めた。同定ペプチドを前駆体上にマップしたところ、新たに同定された4か所を含め、18か所のプロセシング部位が明らかになった。初めて明らかになったArg553-Thr554間での切断で、C末端アミド化ペプチドVGF[554-577]-NH₂がETDによってのみ同定された。同ペプチドは配列内部に連続するアルギニン残基を3つ有し、CIDではその周辺配列の開裂が不十分なために同定できなかったことが判明した。抗菌活性を評価すると、哺乳類の代表的な抗菌ペプチド、βディフェンシン-2、カテリシジンに匹敵する抗菌活性をMicrococcus luteus と酵母に対して示し、活性に関与するのはN末端領域であることが判明した。	
〔総 括(Conclusion)〕	
ヒト甲状腺髄様癌由来株TTで示したスキームと同様に、短時間の脱分極刺激を与えることでペプチドホルモンを含む分泌ペプチドが効率よく同定できることを明らかにした。実際に分泌されるペプチドをそのままの分子型で質量分析すると、プロセシングの実像に近づけることを示してきたが、ETDがそのような包括的解析に貢献できることを明らかにした。プロセシングを受けて生成するペプチドから、生理活性を検証する候補ペプチドを選択する目安として、本研究では塩基性の高さに着目した。塩基性の高いペプチドは生理活性ペプチドである可能性が高いため、簡便なスクリーニング法として抗菌活性を評価した。同定できたVGF[554-577]-NH₂は内部に連続するアルギニンを3残基含み、通常実施されるプロテオーム解析では同定が困難なペプチドである。得られた情報は新規生理活性ペプチドの発見に有用であり、分泌ペプチドプロファイリングの網羅性を高めることで新規活性分子の発見が加速されることが期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 佐々木 一樹		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 高 島 成二
	副 査	大阪大学教授 南 池 章
	副 査	大阪大学教授 月田 早智子

論文審査の結果の要旨

生理活性ペプチドは生体間の重要な情報伝達物質の一種であり、新しいペプチドの発見は様々な波及効果をもたらす。申請者は、内分泌細胞がエクソサイトーシスによって分泌するペプチドのプロファイリングを質量分析で実施し、得られた配列情報から生理活性ペプチド候補を選択した後に実際に活性を検証するという新しいアプローチを考案している。本論文では、ヒトのソマトスタチン産生腫瘍由来株を対象とし、プロファイリングの包括性を高めるために電子転移開裂タンデム質量分析を用いて、神経内分泌細胞に選択的に発現する分泌蛋白質VGFの554-577番目に相当するC末端アミド化ペプチドを見出した。当該ペプチドは従来の衝突誘起開裂法では同定されなかった。また、既知の抗菌ペプチドに匹敵する抗菌活性を有する生理活性ペプチドであることを明らかにした。本研究は、他に類例のないアプローチに基づく研究であり、博士（学位）の授与に値する。