

( 続紙 1 )

|  |  |    |       |
|--|--|----|-------|
| 京都大学   | 博士 (薬学)                                      | 氏名 | 園村 和弘 |
| 論文題目   | $\alpha$ -アミノ基選択的反応を用いた新規タンパク質末端アミノ酸配列解析法の開発 |    |       |
| (論文内容の要旨)  |  |    |       |
| <p>多くのタンパク質は生体内で様々な翻訳後修飾を受けることでその機能を獲得する。リン酸化や糖鎖修飾はよく知られた例であるが、N末端およびC末端部分の修飾やプロセッシング等がタンパク質の機能発現に重要な役割を果たす場合も多い。近年のハードおよびソフト両面での急速な発展により、質量分析(MS)はタンパク質解析の重要な手段となっており、タンパク質の末端配列解析に対しても有力な解析手法となり得る。この目的を達成するための方法論として、タンパク質の酵素消化物から末端部分のペプチド断片を選択的に単離するアプローチが有用である。これまでに、タンパク質中に存在する2種類のアミノ基であるN末端<math>\alpha</math>-アミノ基とリシン側鎖の<math>\epsilon</math>-アミノ基のいずれかを選択的に修飾する反応を利用した種々の単離法が開発されてきたが、反応効率・感度などの面で満足できるものではなかった。そこで本研究では、「TMPP試薬 (N-succinimidylloxycarbonylmethyl tris(2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium bromide) を用いた化学修飾」と「アミノ基転移反応を用いたN末端アミノ酸の<math>\alpha</math>-ケト酸への変換」という2つの<math>\alpha</math>-アミノ基選択的反応を利用した末端ペプチドの単離およびアミノ酸配列解析法を新たに開発した。</p> |  |    |       |
| 第一章 TMPP試薬を用いた末端アミノ酸配列解析法の開発   |  |    |       |
| <p>Huangらによってペプチドの配列解析に用いられるようになったTMPP試薬は、1) 反応溶液のpHを適切に調整することによりタンパク質およびペプチドの<math>\alpha</math>-アミノ基選択的に反応する、2) TMPP基がN末端に導入されたペプチドはタンデムMS解析において単純化したスペクトルを与えるので、そのアミノ酸配列をデータベースに依らずに直接解析すること (de novo 配列解析) が容易になる、という2つの優れた特徴を有している。申請者は、リシンのN末端側でペプチド鎖を切断するメタロエンドプロテアーゼ (LysN) でタンパク質を加水分解すると、N末端以外のペプチド断片にはリシン残基が含まれることに着目し、各ペプチド断片の<math>\alpha</math>-アミノ基をTMPP試薬で選択的に修飾後、イソチオシアナート基を有するガラスビーズ (DITCガラス) でN末端以外のペプチド断片を除去することにより、N末端ペプチドを効率的に単離、de novo配列解析する方法を開発した。</p>  |  |    |       |
| 第二章 アミノ基転移反応を用いたタンパク質末端ペプチド単離法の開発  |  |    |       |
| <p>MSにおけるペプチドの検出感度は、測定するペプチドのサイズ、アミノ酸組成、修飾基などの要素に大きく影響を受ける。もし、単離した末端ペプチドに、様々な官能基を位置選択的に導入できる方法があれば、TMPP試薬を用いる方法との相補的な利用が期待でき、より正確な構造解析が可能となる。Dixonらは銅、ピリジン、</p>  |  |    |       |

グリオキシル酸の存在下でのN末端アミノ酸の $\alpha$ -ケト酸への変換反応（アミノ基転移反応）を報告している。 $\alpha$ -ケト酸は様々な求核試薬と特異的に反応しうることから、申請者はこの反応を末端ペプチドの配列解析に利用することを考えた。この発想に基づき、酵素消化前のタンパク質のN末端アミノ酸を $\alpha$ -ケト酸に変換し、これを*O*-(4-nitrobenzyl)hydroxylamineと処理し、オキシム体を形成後、これをLysNで処理し、DITCグラスによってN末端以外のペプチド断片を除去することにより、N末端ペプチドが容易に単離・配列解析できることを示した。

一方、細胞内でのプロセッシング様式等を知る上から、タンパク質のC末端構造の同定も非常に重要な課題であるが、現在でも確立された方法がない。申請者は、リシンのC末端側でペプチド鎖を切断するリシルエンドペプチダーゼ（LysC）でタンパク質を処理した後、アミノ基転移反応により各ペプチド断片のN末端を $\alpha$ -ケト酸に変換し、遊離のリシン側鎖を有するC末端以外のペプチド断片をDITCグラスによって除去し、C末端ペプチドを選択的に得る新たな方法を開発した。さらに、単離したC末端ペプチドを2,4-dinitrophenylhydrazineで処理することにより、感度良くMS測定できることを確認した。

### 第三章 アミノ基転移反応を用いたN末端修飾タンパク質からのN末端ペプチド単離法の開発

N末端修飾タンパク質のN末端構造解析にも、上記のDITCグラスのように、アミノ基反応性の固相担体を利用してN末端以外のペプチド断片を除去するアプローチが有用である。これまでに種々のアミノ基反応性の固相担体が利用されているが、反応性の低さなどが問題となっている。このことから、アミノ基転移反応によって生じる $\alpha$ -ケト酸に対するヒドラジンの高い反応性を利用し、N末端以外のペプチド断片を効果的に除去する新しいアプローチを考案した。すなわち、N末端修飾タンパク質を酵素消化後、アミノ基転移反応によってN末端以外のペプチド断片のN末端を $\alpha$ -ケト酸とし、それらのペプチド断片をトシルヒドラジン基を導入したグラスビーズで取り除くことにより、容易にN末端ペプチドを単離することに成功した。また、酵素消化前のタンパク質の $\alpha$ -アミノ基をTMPP試薬で修飾することにより、同様の単離法がN末端に修飾を受けていないタンパク質にも応用可能であることを示した。さらに、この方法を2次元電気泳動で分離した大腸菌タンパク質のN末端配列解析に応用し、その有用性を確認した。

以上の研究は、N末端修飾やプロセッシングを受けたタンパク質の末端配列解析に新しい方法論を提供するものである。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

タンパク質の末端部分には、様々な翻訳後修飾やプロセッシングが生じることが知られており、その解析法の開発は生命科学において重要な課題であると考えられる。リン酸化などの翻訳後修飾については、その解析法が確立されつつあるといえるが、末端構造についてはまだまだ新しい解析法の開発や既存法の改善が求められている。

本研究では、 $\alpha$ -アミノ基選択的反応とアミノ酸残基特異的なプロテアーゼを効果的に組み合わせることにより、新しいタンパク質末端アミノ酸配列解析法を開発した。第一章では、Huangらにより開発されたTMPP試薬を利用し、LysN消化とDITCグラスビーズによる処理を組み合わせることにより、新規N末端アミノ酸配列解析法を開発した。この方法は、これまでの方法のほとんどが末端ペプチドの単離のみを行うものであったのに対し、TMPP基によるMS/MSスペクトルの単純化によって、単離したN末端ペプチドの*de novo*配列解析を可能にした。第二章では、Dixonらにより報告されたアミノ基転移反応を用いて、N末端およびC末端ペプチドの新規単離法を開発した。これらの方法は、末端ペプチドに様々な官能基を導入できる可能性を有しており、TMPP試薬を用いる方法と相補的に利用することが期待できる。第三章では、アミノ基転移反応によって生じる $\alpha$ -ケト酸とヒドラジンなどの求核性官能基との高い反応性に着目し、その反応をN末端修飾タンパク質からのN末端ペプチドの単離へと応用した。その結果、アミノ基反応性の固相担体を用いる既存法に比べて、より短時間でN末端ペプチドの単離を実現した。最後にこの単離法とTMPP試薬を組み合わせることにより、N末端に修飾を受けていないタンパク質のN末端*de novo*配列解析法を開発した。

これらの方法については、複数のモデルタンパク質を用いてその有用性を検討した。また、第三章の方法を用いて、二次元電気泳動で分離した大腸菌タンパク質のN末端配列解析を行い、実際のサンプルへの応用の可能性を示した。

以上、本研究は、N末端修飾やプロセッシングを受けたタンパク質の末端アミノ酸配列解析に新たな方法論を提供するものであり、生体内で機能するタンパク質の詳細構造を解明する上で有効な手段となる事が期待される。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成23年 6月10日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降