

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	岩崎 未央
論文題目	メートル長キャピラリーカラムを用いる高深度プロテオーム解析システムに関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>タンパク質は多様な細胞機能を直接制御しており、その制御メカニズムの解明は、様々な疾病原因の解明や創薬標的探索にもつながるため、きわめて重要である。細胞機能解析においては、ある一群のタンパク質に注目するだけでなく、タンパク質全体、すなわちプロテオームを網羅的に解析する必要がある。ナノ液体クロマトグラフィー質量分析 (nanoLC-MS) を用いたショットガンプロテオミクスは、タンパク質の網羅的解析に有効な手法であり、近年の質量分析装置およびコンピューターの処理能力の進歩によりその網羅性は格段に向上した。一方、ヒト細胞内プロテオームには10^6倍以上のタンパク質発現量の差があることが知られており、低発現タンパク質の同定は未だ困難である。本研究ではタンパク質の発現量に関わらず、高深度かつ網羅的に細胞内プロテオームを解析できるシステムの開発を目的とした。</p> <p>これまで強カチオン交換クロマトグラフィーや等電点電気泳動といった多次元分離法を組み合わせることで、nanoLC-MS測定試料の複雑性を軽減させて低発現タンパク質の同定効率を向上させる試みがなされてきた。しかし、分画しても発現量の多いタンパク質が優先的に同定される傾向は変わらないため、低発現タンパク質に対する同定効率の改善効果は小さかった。また、前分画を行うために出発試料量が増大し、微量試料の測定が困難であった。そもそも、発現量の多いタンパク質が優先的に同定される理由は、MS測定において試料のイオン化が共存成分により妨げられるためである。したがって、低発現タンパク質の同定効率を向上させるには、イオン化反応時の共存イオンを減らす必要がある。本研究では、試料を分画するのではなく、nanoLCにおける分離能を向上させることで、共存イオンによるイオン化抑制の軽減を実現し、低発現タンパク質の同定効率を著しく改善するシステムの開発を目指した。</p> <p>最初に分離能を改善する分析カラムの検討を行った。分離能を改善するには、カラムを伸長する、あるいは粒子径を小さくするといった方法があるが、いずれの方法も送液に必要な圧力が増大するという問題がある。モノリス型カラムは従来までの粒子充填剤型カラムと異なり、三次元ネットワーク状の骨格とその流路とが一体となった構造を持つため、送液に必要な圧力が小さく、分離能の高い長いカラムを使用できる。分離能を改善することで低発現タンパク質の同定効率が向上するかを検討するため、大腸菌をモデル生物として、3.5メートル長 (内径100 μm, 500 nL/min, 20 MPa) のモノリス型カラムを用いたnanoLC-MS測定を行った。その結果、モノリス型カラムを用いることで、従来法よりもペプチドの分離が向上し、MSでのイオン化抑制が抑えら</p>			

れ、約5倍の感度上昇が得られることがわかった。また、グラジエント時間を伸ばしてもピーク幅の広がりが増えられたため、40時間のグラジエント分析を行ったところ、これまで1分析では同定できなかったような膜タンパク質などの発現量の低いタンパク質群が同定され、大腸菌発現プロテオームの一斉解析に成功した。本研究により、モノリス型カラムによる分離能向上がMSにおけるイオン化抑制効果の軽減につながり、前分画なしのnanoLC-MS測定システム（ワンショットプロテオミクスシステム）がプロテオームの一斉解析に有効であることを世界に先駆けて示した。

次に、ヒト子宮頸ガン由来培養細胞（HeLa細胞）に対し、2メートルから6メートル長のモノリス型カラムを用いたワンショットプロテオミクスシステムによるヒトプロテオーム解析を行った。その結果、従来法の約3倍のタンパク質同定効率の向上が観測され、前分画を行わないワンショットプロテオミクスシステムとしては世界最大のヒトタンパク質同定数を達成した。しかし、60時間のグラジエント分析でも約7,000タンパク質同定に留まり、大腸菌の場合には観測された測定ダイナミックレンジの拡大はヒトプロテオーム解析ではみとめられなかった。最終的に、数十マイクログラムの試料から約6日間のnanoLC-MS繰り返し分析で、約一万タンパク質の同定に成功した。さらに、がんをはじめとする様々な疾病で重要なリン酸化プロテオームを解析するため、ヒトリン酸化ペプチド濃縮試料に対して、モノリス型カラムを用いたnanoLC-MS測定を行ったところ、一日の分析で一万リン酸化ペプチドの同定に成功した。数百マイクログラムのヒトタンパク質試料から、一万タンパク質および一万リン酸化ペプチドを約一週間で同定できるシステムはこれまでに報告されておらず、モノリス型カラムを用いるワンショットプロテオミクスシステムの有用性を示唆するものであった。

(論文審査の結果の要旨)

著者は、ナノ液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(nanoLC-MS/MS)システム用のメートル長キャピラリーカラムを自家製造し、ショットガンプロテオミクスへの適用をはかるとともに、その有用性を検討した。

最初に第1章では、粒子充填キャピラリーカラムを用いた従来法とモノリス型キャピラリーカラムを用いた手法(ワンショットプロテオミクス)を比較し、分離向上により得られる効果を検証した。まず、大腸菌タンパク質消化試料を用いてnanoLC-MS/MS測定を行ったところ、粒子充填キャピラリーカラムを用いた分析系と比較して、モノリス型キャピラリーカラムでは緩勾配グラジエント条件下でもピーク幅の増大が抑えられ、ピークキャパシティーが6倍以上向上した。さらに、クロマトグラフィーの分離が向上することでMSシグナル強度が平均5倍増強された。この現象はグラジエント溶出時間を通して観測されており、ショットガンプロテオミクス試料でイオン化抑制が恒常的に起きていることを初めて示した。また、ワンショットプロテオミクスによるイオン化向上によってプロテオーム解析の深度(ダイナミックレンジ)を従来法よりも約72倍拡大させることに成功した。この手法は、多次元分離法を用いた前分画手法よりも単位時間および単位試料量の点において効率的であることがわかった。その結果、これまで同定が困難であった膜タンパク質などの低発現タンパク質群を含む約2,600タンパク質が同定された。これは同一試料を用いたDNAマイクロレイ解析結果で得られた発現遺伝子数とほぼ同等であり、発現しているほぼ全てのタンパク質、すなわち大腸菌発現プロテオームの一斉解析に成功した。

続いて第2章では、大腸菌よりも複雑性の高いヒト試料に対してモノリス型キャピラリーカラムを用いた解析(ワンショットプロテオミクス)を行い、分離向上により得られる効果を検証した。まず、HeLa細胞トリプシン消化試料を用いて6メートル長のモノリス型キャピラリーカラムによるnanoLC-MS/MS測定(グラジエント時間:42時間)を行ったところ、単一測定での同定ヒトタンパク質数を最大6,000にまで向上させることに成功した。大腸菌プロテオーム解析の場合と同様に、従来の粒子充填キャピラリーカラムと共通に同定されたペプチドピーク面積を比較したところ、ヒトプロテオーム解析においてもクロマトグラフィーの分離向上によりMSシグナル強度が約5倍増強されていた。しかし、同定されたペプチドの濃度差範囲の拡大は大腸菌プロテオーム解析結果と比較して小さく、ヒトプロテオームの一斉解析には至らなかった。この理由として、クロマトグラフィーの分離向上がヒトプロテオーム試料の複雑性に対して不十分であり、MSシグナル増強効果が十分には得られなかったためと考えられる。ワンショットプロテオミクス法を用いた4回の繰り返し測定によって、約1週間でヒト発現プロテオームの8割にあた

る約1万種のヒトタンパク質が同定された。ワンショットプロテオミクス法は単位時間・試料量あたりの同定効率に関して、既存法を大幅に上回る性能を示した。次に、ワンショットプロテオミクスをリン酸化プロテオーム解析に応用し、3段階のグラジエント勾配を用いた12時間測定を行うことで、1日で約17,000リン酸化ペプチドが同定された。既存の大規模解析と比較した結果、リン酸化プロテオーム解析においても単位時間・試料量あたりの同定効率が改善することが明らかとなった。ワンショットプロテオミクスによる翻訳後修飾を含むヒトプロテオーム解析結果から、発現量の低いプロテインキナーゼの98%が同定されており、ヒトプロテオーム解析深度を深めることに成功した。

以上、著者はショットガンプロテオミクス測定にメートル長モノリスカラムを用いたワンショット法が有効であることを大腸菌プロテオーム、ヒトHeLa細胞プロテオームおよびヒトHeLaリン酸化プロテオーム解析を通じて示してきた。大腸菌については発現プロテオーム一斉解析を達成し、LC分離の向上がタンパク質の同定に及ぼす影響を明確に示した。ヒトプロテオーム一斉解析までには至らなかったが、将来必要となってくるMSの能力等も示し、更には同定効率が非常に高いヒトリン酸化プロテオーム解析システムを実現した。

ヒトプロテオーム一斉解析を実現するには、nanoLC-MS/MS測定前に数十～数百の前分画を行うことが一般的と考えられている中、nanoLC部の分離効率を最大化し、前分画なしで一斉解析を行おうとする試みは大胆でユニークなものであったが、モデル生物である大腸菌でそのコンセプトの有用性を示し、ヒトプロテオームおよびヒトリン酸化プロテオーム解析でも従来法よりも大きな改善が認められた。本法はショットガンプロテオミクスの新たなアプローチとして幅広く使われていくことが期待される。

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25年2月22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