

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	CHANG CHIH-HSIANG
論文題目	Proteomic studies on protein N-terminus and peptide ion mobility by nano-scale liquid chromatography/tandem mass spectrometry		
<p>Protein N-terminus reflects the information of protein stability, subcellular localization, translational initiation sites, and endogenous protease cleavage sites. Mass spectrometry-based proteomics plays an essential role in large-scale protein identification and quantification. Under a global proteome background, identification of protein N-terminus, which is low abundant and diverse in post-translational modification, is the major challenge of N-terminal proteomics called N-terminomics. The existing methods to enrich protein N-terminal peptides require complex chemical derivatization with undesired side reactions, huge sample loss, and long analysis time, limiting the applications to high-throughput analysis and precious biological samples. Therefore, developing highly efficient and parallelizable approaches to enrich N-terminome is required for studying limited biological samples. A method for in-depth N-terminome profiling was established by the utilization of a unique protease and ion exchange chromatography prior to nanoLC/MS/MS. In addition, a proof-of-concept study to evaluate the identifiability and quantifiability of the developed method for N-terminomics was conducted on the time-course biological process of cell differentiation (Chapter 1).</p> <p>To achieve a deeper proteomic profiling, an additional dimension of separation prior to mass spectrometry analysis is one of the common solutions. Trapped ion mobility spectrometry (TIMS) has been considered as an effective pre-separation in MS-based proteomics. Peptides are separated in drift tube based on the collision cross-section (CCS) in the gas phase. Building a comprehensive CCS prediction model for peptides will allow not only the direct application to improve confidence of MS/MS-based identification but will help better the current understanding of underlying mechanisms for ion mobility-based separations, resulting in improving MS/MS-based quantitation by reducing the complexity of peptide ions prior to tandem mass spectrometry. A semi-empirical approach based on position-dependent coefficients of the amino acid sequence was applied to establish a Sequence-Specific Ion mobility Calculator (SSICalc) (Chapter 2).</p> <p>In Chapter 1, the development of a facile and rapid approach for protein N-terminal peptide enrichment is described. The approach for protein N-terminal peptide enrichment is separated from the internal peptides by strong cation exchange chromatography according to a retention model based on the charge/orientation of peptides. This method consists of two steps: the first step is to generate a property that enables to discriminate the protein N-terminal peptides from the internal peptides in a complexed peptide digest. The second one is to enrich protein N-terminal peptides based on the generated physicochemical properties. The first step is achieved by employing a new protease, Tryp-N, which cleaves at the N-terminal side of Arg or Lys. The protein N-terminal peptides, without Arg or Lys; and the internal peptides, with two basic charges at N-terminus, are generated after Tryp-N digestion and subsequently separated by strong cation exchange chromatography (SCX). On average, 1,550 acetylated and 200 unmodified protein N-terminal peptides from 20 µg of Tryp-N-digested HEK293T cell lysate were identified in a single LC/MS/MS analysis with less than 3% contamination of internal peptides. The application of this N-terminomics workflow to the analysis of proteoform dynamics during adipogenesis in mice was investigated as a proof-of-concept experiment. Protein N-terminal peptides were enriched by SCX chromatography from three biological replicates at five time points from preadipocytes (Day</p>			

0) to mature adipocytes (Day 8) at a 2-day interval. The enriched N-terminal peptides were identified and quantitated by LC/MS/MS. The identification number of protein N-terminal peptides decreased after the differentiation to beige adipocytes. In addition, protein N-terminome profiles were changed during the cell differentiation.

In Chapter 2, seven proteases such as trypsin, LysargiNase, Lys-C, Lys-N, Glu-C, Asp-N and chymotrypsin were used to digest HeLa cell lysates and the peptides were analyzed by SCX/RP-LC/TIMS/Q/TOF. There were 14,482, 86,268, 27,463 and 5,733 peptides belonging to the 1+, 2+, 3+ and 4+ populations, respectively. Following the previously reported modeling approaches using intrinsic size parameters (ISP), we extended this methodology to encode the position of individual residues within a peptide sequence. A generalized prediction model was built by dividing the dataset into 8 groups (four charges for both tryptic/non-tryptic peptides). Position dependent ISPs were independently optimized for the eight subsets of peptides, resulting in prediction accuracy of ~0.981 for the entire population of peptides. We find that ion mobility is strongly affected by the peptide's ability to solvate the positively charged sites. Internal positioning of polar residues and proline leads to decreased CCS values as they improve charge solvation; conversely, this ability decreases with increasing peptide charge due to electrostatic repulsion. Furthermore, higher helical propensity and peptide hydrophobicity result in preferential formation of extended structures with higher than predicted CCS values. Finally, acidic/basic residues exhibit position dependent ISP behaviour consistent with electrostatic interaction with the peptide macro-dipole, which affects the peptide helicity.

In this thesis, a novel N-terminomics technology as well as a prediction model for peptide CCS values were developed. These would be useful to expand the potential of nano-scale LC/MS/MS-based proteomics.

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ナノ LC/MS/MS を用いるショットガンプロテオミクス研究において、タンパク質 N 末端と消化ペプチドのイオンモビリティ予測に関して行った研究をまとめたものである。論文は2章から構成され、第1章では、タンパク質 N 末端の大規模解析について、第2章では、タンパク質消化ペプチドのイオンモビリティ値の大規模計測とそれに基づく予測法の開発について記述されている。

タンパク質の N 末端は、タンパク質の安定性、細胞内局在性、翻訳開始部位、内因性プロテアーゼ切断部位などの情報を反映している。ショットガンプロテオミクスは、大規模なタンパク質の同定・定量を行う上で不可欠な手法となっているが、タンパク質 N 末端の大規模解析を行う場合には、技術的課題があった。それは、タンパク質 N 末端由来の消化ペプチドは、それ以外の消化ペプチドに比べると圧倒的に数が少なく、事前に濃縮しておくことが必須である。既存の方法では、タンパク質の N 末端ペプチドを濃縮するためには、副反応を伴う化学的誘導体化ステップを避けることができず、サンプルロスによる感度低下、長時間の処理時間によるスループットの低下により、その応用範囲が制限されている。そこで、申請者は、限られた生物学的サンプルを研究するためには、N末端ペプチドを濃縮するための高効率かつ並列化可能な手法開発を行った。すなわち、ナノ LC/MS/MS の前に、消化酵素 TrypN と強カチオン交換クロマトグラフィーを利用することで、N-terminome の詳細なプロファイリングを行う方法を確認した。さらに、開発した N-terminomics 法の同定・定量性を評価するための概念実証研究を、脂肪細胞分化の時間経過プロセスを対象に実施した。

高深度プロテオミクスプロファイリングを実現するためには、質量分析の前に別の次元の分離を行うことが一般的な解決策の一つとなっている。トラップイオンモビリティ分光(TIMS)は、質量分析を用いるプロテオミクスにおいて効果的な事前分離技術として考えられてきた。気相中の衝突断面積 (CCS) の違いに基づいて、ペプチドイオンをイオンソースとマスアナライザーの間のドリフトチューブ内で分離するものであり、ペプチドイオンの包括的な CCS 予測モデルを構築することは、タンデム質量分析を用いる同定の信頼性を向上させるという直接的な応用だけでなく、イオンモビリティに基づく分離メカニズムの理解を深める。またタンデム質量分析の前にペプチドイオンの複雑さを軽減することで定量性を向上させることにも役立つと考えられる。申請者は、トリプシン、LysargiNase、Lys-C、Lys-N、Glu-C、Asp-N、キモトリプシンの7つのプロテアーゼを用いて HeLa 細胞溶解液を消化し、SCX/RP-LC/TIMS/Q/TOF でペプチドを分析した。1+, 2+, 3+, 4+に属するペプチドはそれぞれ 14,482, 86,268, 27,463, 5,733 個であった。固有サイズパラメータ (ISP) を用いたモデリング手法を拡張し、ペプチド配列内の個々の残基の位置を符号化し、予測モデルを一般化した。データセットは8つのグループ (トリプティック/非トリプティックペプチドおよび 1+, 2+, 3+, 4+のイオン) に分割されたのち、位置依存性の ISP は、ペプチドの8つのサブセットに対して独立して最適化され、その結果、ペプチドの全集団に対して $R^2=0.981$ の予測精度が得られた。イオンモビリティは、正電荷残基に強く影響されることがわかった。また極性残基とプロリンの内部配置は、CCS 値の減少につながった。さらに、より高いらせん性とペプチドの疎水性は、予測された CCS 値よりも大きな構造の優先的形形成につながることをわかった。アミノ酸配列の位置依存性係数に基づく半経験的なアプローチを適用して、Sequence-Specific Ion mobility Calculator モデルを確認した。

本論文では、N末端プロテオミクスに加え、ペプチドのイオンモビリティ予測モデルを開発した。これらの技術は、ショットガンプロテオミクスの可能性を広げるために有用である。よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年2月19日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては（令和6年3月21日までの間）当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降

〔注〕

1. （記述例1）を参考に、論文審査の結果の要旨の結句には学位論文の審査についての認定を明記するとともに、試問の結果の要旨を付け加えること。
2. 論文の公表方法について、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断され、かつその旨を「論文審査の結果の要旨」に記載する場合は、（記述例2）を参考に記述すること。
3. 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、欄外の「要旨公表可能日」欄に、公表可能とする日付を記入すること。（ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内となる。）