

京都大学	博士（薬科学）	氏名	西田 紘 士
論文題目	プロテインターミノミクスのためのタンパク質末端ペプチド濃縮法の開発とノンカノニカルタンパク質の大規模同定への応用に関する研究		
<p>タンパク質末端配列は、局在、相互作用、活性や安定性等の幅広いタンパク質機能に関与する生理学的に重要な部位である。さらに、内因性プロテオリシスや異なる翻訳開始点によってタンパク質機能に変化することも報告されている。したがって、タンパク質の発現量だけでなく、それらのタンパク質末端配列の状態を包括的に把握することで、より精確な生命現象の理解につながる。液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析(LC/MS/MS)を用いたショットガンプロテオミクスでは、前もって酵素でタンパク質をペプチドに消化する。この手法でタンパク質末端大規模解析（プロテインターミノミクス）を行う際には、タンパク質末端ペプチドの割合を高める必要があり、濃縮のための前処理法が用いられる。現在までに開発されたタンパク質N末端ペプチド濃縮法には、化学反応性の高いタンパク質のアミノ基を利用した手法が広く用いられている一方で、タンパク質C末端ペプチド濃縮法にはいまだに汎用性の高い確立した手法がない。その理由は、タンパク質N末端アミノ基と比べC末端カルボキシ基は反応性および特異性に乏しいため、多段階の化学修飾やHPLCによる分離を組み合わせた、より複雑な濃縮プロセスを必要とすることが挙げられる。</p> <p>第1章では、ピペットチップ型ミニカラムによる配位子交換クロマトグラフィーを用いた新規タンパク質C末端濃縮法の開発を行った。配位子交換担体として酸化セリウムを用い、種々の移動相条件を検討した結果、ヒト子宮頸がん由来培養細胞から抽出したタンパク質30 µgを用いて1,600種以上のタンパク質C末端配列の同定に成功した。既存手法と比較すると、濃縮にかかる時間は数時間から10分程度に短縮でき、約1/10程度の試料量で、より多くのタンパク質C末端が同定可能であった。本手法では、すべての同定ペプチドにおけるタンパク質C末端ペプチドの割合を90%以上に高めることが可能であり、20-30%程度の既存手法と比べ、高選択的かつハイスループットなタンパク質C末端ペプチド濃縮法であることが示された。</p> <p>第2章では、タンパク質末端解析技術を用いたノンカノニカルなタンパク質の大規模同定法の開発を行った。近年のトランスレトーム解析の発展により、非翻訳領域に存在するノンカノニカルな ORF が網羅的に同定されている。しかし、一般的にトランスクリプトームとプロテオームの発現プロファイルは完全には一致しておらず、高深度なグローバルプロテオーム解析であっても翻訳されたノンカノニカルなタンパク質の同定数は限定的である。そこで、上述のタンパク質 C 末端ペプチド濃縮法も含めた当研究室で開発してきたタンパク質末端解析技術を用いて、ノンカノニカルなタンパク質を大規模同定するためのプラットフォームの構築を検討した。データベース検索用の配列データを最適化した結果、トランスレトーム解析から予測されていない ORF から翻訳されたタンパク質も同定され、タンパク質レベルでの解析の重要性が示された。本法を、ヒト単球性白血病細胞株である THP-1 のマクロファージへの分化におけるタンパク質およびタンパク質末端解析に応用し、ノンカノニカルタンパク質のプロテオームプロファイリングに成功した。</p> <p>以上、高選択的かつハイスループットなタンパク質 C 末端ペプチド濃縮法の開発およびノンカノニカルタンパク質の大規模同定のためのプラットフォーム構築を行い、ヒト培養細胞株へ応用した。本研究により、タンパク質末端が関与するより詳細な生命現象の理解が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、タンパク質の末端配列解析を、ショットガンプロテオミクスを用いて大規模に行うための基盤技術の開発と、その技術を応用した非典型翻訳物(タンパク質)の大規模同定への応用について記述したものである。タンパク質末端のプロテオーム規模での解析(protein terminomics)をLC/MS/MSを用いたショットガンプロテオミクス法で行うためには、プロテアーゼ消化後にタンパク質内部から生じる内部ペプチドとタンパク質末端由来の末端ペプチドの混合物から選択的に末端ペプチドを検出する必要があり、LC/MS/MS測定前に末端ペプチドを濃縮しておくことが必須となる。従来のprotein terminomicsの弱点は、末端ペプチド濃縮法、特にC末端ペプチド濃縮法の性能が悪く、内部ペプチドの混入を防げなかった点であった。本研究では、このC末端ペプチド濃縮法を新たに開発し、protein terminomics解析プラットフォームを確立するとともに、その手法を非典型翻訳物(タンパク質)の大規模同定に適用することを目的とし、種々の検討が行われた。論文は2章から構成され、第1章では、酸化金属担体を用いる配位子交換クロマトグラフィーとV8プロテアーゼ消化を組み合わせることにより、新規のタンパク質C末端ペプチド濃縮法を開発したことについて述べられている。第2章では、確立した末端ペプチド濃縮法を用いて、どのようにノンカノニカルなタンパク質末端を同定するかを検討し、translatome解析結果を用いないデータベース検索法を開発し、マクロファージ分化細胞の解析に適用したことが述べられている。

従来のC末端ペプチド濃縮法は、C末端カルボキシ基に対する化学修飾を用いるものがほとんどであり、濃縮には多くのステップが必要で、そのため必要試料量も多く、時間もかかり、さらには濃縮後でも内部ペプチドが7, 8割含まれているという状況であった。今回開発された方法は、V8プロテアーゼ消化後の内部ペプチドがそのC末端に2つのカルボキシ基を含むことに注目し、ピペットチップ型のディスパーザブルカラムに充填された酸化セリウム粒子上で配位子交換により、内部ペプチドとC末端ペプチドを分離するものである。移動相への種々の修飾剤を最適化することにより、カラムに試料溶液を通液させるだけでC末端ペプチドを90%以上の純度で濃縮することに成功しており、従来法とは一線を画す異次元の性能を有していることが示された。N末端ペプチド濃縮について最近開発されたLysargiNase消化とそれに続くカチオン交換クロマトグラフィーによるワンステップ濃縮法と、今回のC末端ペプチド濃縮法を組み合わせることにより、高効率なタンパク質両末端ペプチド濃縮が実現し、ショットガンプロテオミクスによるprotein terminome解析の技術基盤の確立に成功した。

また、ノンカノニカルなタンパク質の大規模同定については、translatome解析による非翻訳領域に存在するノンカノニカルなORFが網羅的に同定されているが、必ずしもtranslatomeで同定された領域が翻訳されているとは限らないところに注目し、protein terminomicsを中心に置いたノンカノニカルタンパク質大規模同定のためのプラットフォームの構築を検討した。データベース検索用の配列データを最適化した結果、予想通りtranslatome解析から予測されていないORFから翻訳されたタンパク質も同定され、タンパク質レベルでの解析の重要性を示した。データベース検索用データベースのカスタマイズと検索におけるセミプロテアーゼ切断サイトの許容の組み合わせにより、高い信頼性を有するノンカノニカルタンパク質末端の同定法を確立した。本法を、ヒト単球性白血病細胞株であるTHP-1のマクロファージへの分化におけるタンパク質およびタンパク質末端解析に応用し、ノンカノニカルプロテオームのプロファイリングに成功した。

以上の成果は、本分野における新たな可能性を切り開くものであり、本手法を様々な試料に適用することにより、新たな生物学的発見も期待できる。

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5年2月17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。