

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏 名	森 坂 裕 信
論文題目	Construction of a novel proteome analysis system using monolithic columns (モノリスカラムを用いた新規プロテオーム解析システムの構築と性能評価)		
(論文内容の要旨)			
様々な生物のゲノム解読により多くの分子情報が得られたが、より直接的に生命現象を解析するには、タンパク質の総体を対象としたプロテオーム解析が必須である。現在のプロテオーム解析手法では、電気泳動と質量分析計の組み合わせによる検出が用いられているが、質量分析計での測定時においてイオン化抑制による感度と精度の低下が問題となっている。そこで、本研究では、電気泳動に代わるタンパク質分離手法としての液体クロマトグラフィーの高性能化を目指して、分離媒体の開発を基盤とした新規プロテオーム解析システムの構築と評価を行った。			
1. 高性能分離のためのモノリスカラムの開発 一般的な分離媒体である粒子充填カラムでは、カラム負荷圧の問題から、実際的な超高性能分離には限界がある。そこで、新しい分離媒体として、ネットワーク構造を有し、カラム圧の低いモノリスカラムを調製し、超高性能化を検討した。まず、シリカ担体モノリスの調製法を確立し、様々なモノリス構造を持つカラムを作成し、液体クロマトグラフィーによる性能評価を行った。構造を最適化した結果、汎用されている粒子充填カラムの限界を超える高速・高性能分離が可能となった。また、粒子充填カラムでは不可能な理論段数100万段の保持のある実用的な条件での分離を達成した。			
2. プロテオーム解析のためのモノリスカラムを用いた二次元ペプチド分離システムの構築 現在のプロテオーム解析では、タンパク質を酵素消化したペプチドの質量分析を行い、その質量情報から検索エンジンによりタンパク質同定などのデータ解析を行っている。また、プロテオミクスでは、非常に複雑な混合液を測定対象とするので、非常に大きな分離能(ピークキャパシティー)を持つシステムが必要となる。独立した複数の分離系をバルブによりオンライン接続した多次元システムでのピークキャパシティーは、各次元の積で表せるので、多次元化は、分離キャパシティーの増加に有効である。したがって、開発したモノリスカラムをペプチド分離システムに適用して、モノリスカラムの高速分離を利用した二次元液体クロマトグラフィーシステムへの展開を検討した。二次元システムの第二次元では、第一次元で分離されたサンプルを連続的に分離する必要があるため、高速分離に適応できる系が要求される。モノリスカラムを用いた場合、再平衡化を含め1分析を2分間で完了できる系が可能となり、これを第二次元に適用した二次元液体クロマトグラフィーシステムを用いてペプチド混合物を分析した結果、分析時間40分で、ピークキャパシティー700を達成した。			

また、チタニアカラムを併用することにより、細胞の情報伝達系において重要な役割をするリン酸化タンパク質を断片化したリン酸化ペプチドを効率的に濃縮し、オフライン接続の質量分析計での検出も可能とした。さらに、ハイスループット測定に必須である質量分析計とのオンライン接続を達成するために、質量分析計のナノスプレーイオン化モジュールと直接接続できるように、液体クロマトグラフィーシステムの小型化を検討した。その結果、構築したキャピラリーモノリスカラムを用いたオンラインシステムにおいては、分離の向上により、質量分析計での検出感度とタンパク質同定能力の向上を達成した。

3. モノリスカラムによるタンパク質分離の検討

従来、細胞より抽出されたタンパク質混合物はペプチドに断片化された後に質量分析されるので、試料の複雑性は数十から数百倍に増加する。したがって、回収率やスループットとの競合になるが、プロテオーム解析において最も有効な手段は、タンパク質そのものの分離である。二次元ゲル電気泳動法は、一般的なタンパク質分離手法であるが、分離様式が等電点と分子量に制限されるので、測定対象のタンパク質の範囲が限定され、スループットも低く、定量性に問題があるので今後の拡張性が乏しい。そこで、モノリスカラムを用いたタンパク質の高速・高性能分離を検討した。

タンパク質分離に有利な細孔径の大きなワイドポアモノリスカラムを調製し、タンパク質分離を行った結果、良好な分離が確認でき、特徴である高速分離も可能になった。また、この特性を利用したタンパク質の二次元分離を検討した結果、従来の一次元システムでは分離不十分な混合物を二次元化により完全分離でき、タンパク質分離においても多次元化の優位性が明らかになった。

4. プロテオーム解析への応用

構築したシステムの実用化を目指して、セルロース資化性嫌気微生物 *Clostridium cellulovorans* のセルロース分解酵素複合体「セルロソーム」にフォーカスしたプロテオーム解析を検討した。近年、バイオマスの効率的な分解性を示すこの酵素超複合体「セルロソーム」が注目されているが、そのセルロース分解反応機構は不明な点が多い。そこで、多種類のバイオマスを非常に効率的に分解できるセルロソームを生産するこの微生物に着目し、フォーカスドプロテオーム解析により、効率的な分解機構の分子解析を行った。その結果、基質条件に関わらず恒常的に生産されている基本的なセルロソームタンパク質があることが明らかになった。このことから、*Clostridium cellulovorans* は無作為にセルロソームを生産しているのではなく、資化できる資源環境をセンシングし、セルロソーム構成を最適化していることが明らかになった。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

ポストゲノムサイエンスにおいて、タンパク質の総体を対象としたプロテオーム解析は、生命現象を解明するうえで重要である。本研究は、新規分離媒体モノリスカラムの開発に加え、これを用いた新規プロテオーム解析システムの構築と性能評価を行ったものである。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 種々のドメイン構造を持つモノリスカラムを調製し、液体クロマトグラフィーによる性能評価を行った結果、モノリス構造を最適化することにより、汎用されている粒子充填カラムの限界を超える高速・高性能分離を可能とした。
2. モノリスカラムを用いたオンライン二次元システムを構築し、ペプチド混合物ならびにタンパク質混合物の分離を試みた結果、通常(一次元)システムと比較して、高速で効率的な分離を達成した。また、チタニアカラムの併用により、リン酸化ペプチドの効率的な濃縮と検出を可能とした。
3. 構築した新規プロテオーム解析システムにより、バイオマスの有効利用に重要なセルロース分解酵素複合体「セルロソーム」に焦点をあてたプロテオーム解析を、セルロース資化性嫌気微生物*Clostridium cellulovorans* を対象に行った。その結果、本菌が基質に応じてセルロソーム構成を最適化していることを明らかにした。

以上のように本論文では、新規分離媒体であるモノリスカラムの調製法を確立するとともに、ペプチドやタンパク質の高速・高性能分離を実現した。また、実際のプロテオーム解析において、イオン化抑制効果を軽減し、精度の高い解析を実現した。これらの成果は、新規なプロテオーム解析システムの構築に資するものであり、生体高分子化学、生体機能分析化学、応用微生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成23年11月10日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降