氏　名　（本籍）	小　坂　俊　幸
学位の種類	博　士（薬　学）
学位記番号	薬　第　484　号
学位授与年月日	平成 17 年 1 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当

学位論文題目　フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析法の蛋白質解析への応用に関する研究

論文審査委員　（主　査）教　授　後　藤　順　一

教　授　竹　内　英　夫

助教授　眞　野　成　康

論文内容要旨

ヒトゲノムの解読が終了し、ポストゲノムとして蛋白質を解析対象としたプロテオーム研究が大きな注目を集めている。プロテオーム研究では、組織や細胞で発現している蛋白質のプロファイルや翻訳後修飾を含む高次構造、蛋白質複合体などが解析される。

上述の解析において、鍵となっているのが、配列データベースと質量分析法を使用した蛋白質同定手法である。その方法として、ペプチドマスフィンガープリンティング法(PMF)とペプチドシークエンスタグ法の二つがあり、蛋白質同定の信頼性は、両方法とも使用するペプチド質量データの精度に依存する。

フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析法(FT-ICR MS)は、原理的に最も高い質量分解能と質量精度が得られる。これらの優れた性能を利用することにより、蛋白質同定の精度と効率を飛躍的に高めることができると考えられるが、生体高分子の測定に利用されているエレクトロスプレーイオン化(ESI)と相性が悪いことなどの理由により実用化が遅れ、蛋白質解析にはほとんど利用されてはいなかった。しかしながら、1990年代後半になり、ようやく実用的なFT-ICR MSが開発され、蛋白質解析への応用研究に道が開かれた。そこで、プロテオーム研究への応用を目的として、FT-ICR MSの高分解能と高質量精度を利用した、蛋白質解析手法の検討を行なった。

・PMF法による蛋白質同定

PMF法による蛋白質同定は迅速、高感度なことが特徴であり、主にマトリックス支援レーザー脱離イオン化－飛行時間型(MALDI-TOF)MSによりペプチド質量データの取得が行なわれている。MALDI-TOF MSデータを使用した蛋白質同定の際には、質量精度が100 ppm程度であるがゆえに、ペプチド質量のランダムマッチの確率が高く、誤同定をさけるために、十分な数のペプチド質量データを得ることなどの厳格な基準を設けることが必要である。

そこで、蛋白質酵素消化物をナノエレクトロスプレーイオン化(nanoESI)/FT-ICR MSで直接測定することにより、ペプチド質量データを迅速に取得して、PMF法による蛋白質同定を行なうことを試みた。PMF法による蛋白質同定でESIが使用されてこなかったのは、各ペプチドにつき数種の多価イオンが生成するためスペクトルが複雑となり、蛋白質酵素消化物を直接測定した場合にはピークの重なりが助長されることが原因であった。しかしながら、FT-ICR MSの高質量分解能により、蛋白質酵素消化物を直接測定した場合においても、ピークの重複を問題とすることなく、観測された全てのペプチドイオンの価数、質量電荷値を問題なく決定することができた。また、得られたペプチド質量は外部標準法を用いても数ppmレベルの高精度であり、ピコモルレベルの測定感度でルーチン的に取得できることがわかった。その結果、nanoESI/FT-ICR MSデータによるPMF法では、ペプチド質量のランダムマッチが減少し、データベース検索のノイズがMALDI-TOF MSデータによるPMF法に比較して格段に減少するため、蛋白質同定の信頼性が向上することが明らかとなった。これにより、PMF法のみでも、解析対象の蛋白質そのものがデータベースに存在しなくても近縁種の相同蛋白質を有意に同定できる、いわゆる異種間蛋白質同定が可能である

ことが示唆された。そこで、nanoESI/FT-ICR MSの精密データを使用したPMF法により、データベースに未登録であったラットアルデヒドオキシダーゼ(AO)蛋白質の同定を行なったところ、データベースに登録されていたヒトおよびウシAOの相同蛋白質を有意に同定することができ、異種間蛋白質同定の可能性を証明することができた。

さらに、FT-ICR MSの質量分解能と質量精度を利用することにより、ペプチド混合物のcapillary-skimmer衝突誘起解離(CID)測定から、各ペプチドの配列タグ情報が迅速に取得できることが判明し、本測定がnanoESI/FT-ICR MSによる蛋白質同定の信頼性の向上に利用できることを明らかとした。

・二次元電気泳動(2D-PAGE)で分離した蛋白質のC末端の同定

蛋白質プロファイル解析の際、2D-PAGEで分離した蛋白質スポットを同定していくと、しばしば異なる位置のスポットから、同一の蛋白質が同定されることがある。この原因としては、蛋白質が異なった翻訳後修飾を受けていたことが考えられる。したがって、蛋白質プロファイル解析においては、蛋白質の種類や発現量のみならず、多様な翻訳後修飾を解析することが重要であり、そのための解析手法の確立が望まれている。このような観点から、蛋白質C末端プロセッシングの可能性を探るため、2D-PAGEで分離した蛋白質のC末端を同定する手法として、^{18}O安定同位体ラベル法とFT-ICR MSを組み合わせた解析手法の検討を行なった。

まず、2D-PAGEで検出された蛋白質スポットを50% $H_2{}^{18}O$を含む緩衝液でゲル内酵素消化を行なう。生成する消化ペプチドのC末端カルボキシル基へは^{18}Oが導入されるが、その際、蛋白質のC末端由来の消化ペプチドには理論的に^{18}Oは導入されない。酵素消化物のnanoESI/FT-ICR MS測定を行ない、FT-ICR MSの優れた質量分解能と質量精度を利用して、各ペプチドイオンの同位体ピークパターンを精査することにより、C末端ペプチドを同定することができると考えられる。蛋白標品を用いた検討により、^{18}O標識したペプチド混合物のnanoESI/FT-ICRマススペクトルのみで、蛋白質C末端由来の^{18}O標識されていないペプチドを明確に判別することが可能であった。そこで、本手法を、ラット肝臓ライセートの2D-PAGEに観測された10スポットの解析に応用した結果、すべてのスポットの蛋白質同定と10スポット中8スポットの蛋白質C末端の同定を行なうことができ、本手法のプロテオーム解析における有用性を示すことができた。

・交互スキャンnanoLC/FT-ICR MSによる蛋白質同定

蛋白質混合物試料を扱う機会が多いプロテオーム解析においては、その複雑性の解消のために、LC/MS/MS測定による解析が強く望まれる場面があるが、FT-ICR MSを用いたLC/MS/MS測定に関しては、海外の一部の大学で研究的に試みられているのが現状である。その理由としては、FT-ICR MSのMS/MS測定に一般的に用いられているCIDでは、測定時間が長くなり、オンラインLC/MS/MS測定を行なう場合には不向きなためであり、また、他機種で行なわれているdata-dependent LC/MS/MS測定によるデータ取得にも、現状のFT-ICR MS装置では対応が難しいからである。

そこで、オンラインのnanoLC/FT-ICR MS測定において、ペプチドのフラグメンテーション誘起法として多重極滞留支援解離capillary-skimmer CIDあるいは赤外多光子解離を利用したMS/MS測定と、通常のFT-ICR MS測定とを交互に行なう測定システムを構築した。これらの交互スキャン測定により、1回のnanoLC/FT-ICR MS測定で、一気にペプチドの分子量および配列タグ情報を取得し、高感度かつ信頼性の高い蛋白質同定を行なうことを試みた。

上述の測定システムにおいては、親イオンの選択なしにMS/MS測定が行なわれるが、FT-ICR MSの質量分解能と質量精度を利用することにより、ペプチドイオンとフラグメントイオンを明確に帰属することができた。そこで、ヒトおよびラットジアセチル還元酵素の蛋白質同定に応用した結果、サブピコモルレベルの試料量で精度の高い蛋白質同定が達成できることを確認できた。

審査結果の要旨

今日、生命科学研究のみならず創薬科学研究において、生命機能維持に極めて重要な蛋白質の構造と機能を網羅的に解析するプロテオーム解析に大きな注目と期待がよせられている。本研究の推進では、蛋白質の構造を微量でしかも迅速に解析する手法が極めて重要であり、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法やエレクトロスプレー（ESI）イオン化法を装着した飛行時間型質量分析計、あるいは四重曲型質量分析計が広く用いられている。しかし、これらは質量分析計の評価において最も重要な因子であるイオンの分解能と質量の精度において十分とは言えない。これに比しフーリエ変換イオンサイクロトロン（FT-ICR MS）は、最も高い分解能と質量精度がえられる。そこで本論文ではこの特性に着目し、蛋白質、C末端部アミノ酸の同定に検討を加えると伴に、同定の高速化と高精密化に吟味を加えた。

蛋白質の同定には、ペプチド断片の質量情報とゲノム情報を利用するPMF法が広く利用される。しかし、従来法では質量精度が100 ppm程度であり、誤同定が避けられない。先ず、(nanoESI) /FT-ICR MSを構築し、種々検討を加えた結果、極めて高い分解能で質量精度数ppmレベルという高精度の得られることを明らかにした。この時のペプチド測定の感度はピコモルレベルと高感度であり、しかもルーチン的に利用できることも判った。この結果、創薬研究で極めて重要となるゲノム情報のないの動物種の蛋白質構造を他の動物のデーターから類推することが可能となった。

蛋白質のC末端を解析することは容易ではない。そこで次に本質量分析法の特長をいかし、重酸素標識法と組み合わせた同定法を構築した。この方法では、酵素水解後のペプチドフラグメントのうち、C末端カルボキシル基のみが重酸素で標識されず容易に識別することができる。

プロテオーム解析では酵素水解後の複雑なペプチド混合物を測定対象とする。このためLC/MS/MS分析が推賞される。しかしFT-ICR MSでは一般に用いられるCIDに難があり、MS/MS分析には不向きである。そこで、多重局滞留支援解離capillary-skimmer CIDあるいは赤外多光子解離を利用したMS/MS分析と、通常のFT-ICR MS分析とを組み合わせて交互スキャンを行う新たな手法を構築した。これによりペプチドの分子量と配列タグ情報を一気に得ることが出来るようになり、迅速性に優れた高感度かつ信頼度の高い蛋白質同定が可能となった。

以上、本論文は、FT-ICR MSという質量分析計の特長を十分に活かした新たな蛋白質解析手法を開発し、その有用性を実証したものであり、博士（薬学）の学位論文として合格と認める。