

称号及び氏名	博士(獣医学) 田中 勝啓
学位授与の日付	平成20年3月31日
論文名	「質量分析法を用いたタンパク質アミノ酸置換の同定とミトコンドリア糖タンパク質の探索」
論文審査委員	主査 小森 雅之 副査 久保 喜平 副査 中村 洋一 副査 竹中 重雄 副査 和田 芳直

論文要旨

緒論

ゲノム解読後、生体の構成分子である遺伝子やタンパク質、代謝物などを対象に生命現象を包括的に研究し、生体分子のネットワークの全体像を体系的に理解しようとするシステムズバイオロジーが注目を集めている。なかでも生命活動の主体となるタンパク質群であるプロテオームを研究対象とするプロテオミクスは、大規模な網羅的解析から、特定タンパク質との相互作用分子の同定まで、生命科学研究全般へ広く展開されている。

タンパク質の多くはリン酸化、糖鎖修飾、脂質修飾などを受け、その機能と密接に関連している。その化学的性質の変化はプロテオミクスの中核技術である質量分析においても分子量、イオン化効率などへ影響するため、その検出と同定をより一層困難にしている。

そこで、本研究では、質量変化からのアミノ酸変異の同定を試みるとともに、糖鎖特異的染色法やレクチンによる糖タンパク質の特異的検出法を用い、糖鎖修飾機構が明らかにされていないミトコンドリア糖タンパク質の検出と同定を試みた。

第一章 質量分析によるアミノ酸変異の同定

ヒトゲノム30億塩基対のうち、一塩基多型 (SNP) は約 300 万個、つまり 1000 塩基対に 1 ヶ所の割合で存在し、特定のタンパク質の量的または質的な変化をおこし、疾患あるいは体質とよばれる遺伝的素因をもたらしている。SNP によるアミノ酸置換によって変異タンパク質の質量は正常なタンパク質から置換されたアミノ酸の質量に応じて変動する (0.0364~129.0578Da)。この質量変化を測定することで、タンパク質やペプチドに生じたアミノ酸置換を決定できる。しかし、Lys-Arg (28.0061 Da 差)、Ala-Val (28.0313 Da 差)、Gln-Arg (28.0425 Da 差)等ではその質量差が非常に近似しており、多くの質量分析装置で

は区別できていないのが現状である。そこで、精密質量測定によるアミノ酸置換の一義的同定を試みた。測定には高い質量測定精度を有するフーリエ変換質量分析装置 (FT-ICR MS) を用いた。また、試料には、多くのアミノ酸置換の報告があり、遺伝病のモデルとしてよく用いられているグロビンを用いた。

グロビンは、いずれも遺伝子型がヘテロで一塩基置換によるアミノ酸変異を持つ患者由来の3種 (Hb Moriguchi、Hb J Cape Town、Hb G Couthatta) を用い、精製後、プロテアーゼ消化し、MALDI FT-ICR MS による測定を行った。それぞれのプロテアーゼ消化物は、遺伝的にヘテロであることから、マススペクトル上では正常ペプチドとともに変異ペプチドが同時に観測され、互いの質量差から、アミノ酸の置換を検証した。その結果、Hb Moriguchi、Hb J Cape Town、Hb G Couthatta のアミノ酸置換のそれぞれを 26.0044 ± 0.0005 , 28.0424 ± 0.0009 , 58.0054 ± 0.0011 Da 差として検出した。すなわち、Tyr→His、Arg→Gln、Glu→Ala として同定することが出来た。また、質量分析によるペプチドの測定が 2ppm 未満の測定精度を保持すれば、統計学的に 99%信頼限界で一義的にアミノ酸置換を決定できることが示された。さらに、アミノ酸置換による質量差が最小である Lys-Gln の質量差 0.0364Da を持つ9残基の合成ペプチドを用いたモデル実験を行ったところ、FT-ICR MS による精密質量測定によって、両ペプチドの質量差を明確に確認できた。

以上の結果から、精密質量測定により、アイソマーであるロイシンとイソロイシンを除く、全てのアミノ酸変異をその質量差から決定できることを明らかにした。

第二章 質量分析によるミトコンドリアの糖鎖修飾タンパク質の探索

糖タンパク質は生体のタンパク質の半分を占めるといわれている。糖鎖修飾にはN-結合型糖鎖修飾とO-結合型糖鎖修飾がある。N-結合型糖鎖修飾は小胞体 (ER) -ゴルジシステムを介して、O-結合型糖鎖修飾はゴルジにおいて糖鎖の付加とプロセッシングが行われる。一方、細胞内小器官であるミトコンドリアは約 1,000 種類のタンパク質から構成されるが、ミトコンドリアゲノムにコードされるタンパク質は約 1%に過ぎず、残り 99%は核内のゲノムにコードされる。核ゲノムにコードされたミトコンドリアタンパク質はサイトゾルにおいて翻訳され、そのN末端に存在するターゲット配列や内在性のシグナル配列を元に、ER-ゴルジを通過せず、ミトコンドリアへ輸送される。しかし、ミトコンドリアにおいてもレクチンを用いた免疫染色やミトコンドリア画分から精製した糖鎖の分析などから、糖タンパク質の存在が示唆されてきた。このミトコンドリアタンパク質の糖鎖修飾は現在提唱されている ER-ゴルジ経由の糖鎖修飾機構からは説明できない。そこで、ミトコンドリアの糖タンパク質を網羅的に探索し、ミトコンドリア糖タンパク質を同定することを試みた。

マウス肝臓ホモジネートから、分画遠心法と密度勾配遠心法によりミトコンドリアを精製した。オルガネラマーカータンパク質の抗体を用いたウェスタンブロット解析により、調製されたミトコンドリア画分には ER やリソソームなど他のオルガネラの混入が殆ど無いことを確認した。そのミトコンドリア画分を超音波破碎し、二次元電気泳動によって展開後、糖鎖特異的染色法である Pro-Q Emerald にて染色し、約 30 個のタンパク質スポットを検出した。それらをゲルから切り出し、プロテアーゼ消化後、ペプチド断片を抽出し、MALDI-TOF 質量分析装置を用いたペプチドマスフィンガープリント法によるタンパク質同定を行った。その結果、carbamoyl-phosphate synthase、pyruvate carboxylase、sarcosine dehydrogenase、succinate dehydrogenase、aldehyde dehydrogenase 2、aldehyde dehydrogenase6A1、glutamate dehydrogenase、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase、long chain specific acyl-CoA dehydrogenase、ornitine transcarbamylase、ubiquinol-cytochrome α 、aspartate aminotransferase、dimethylglycine dehydrogenase の 13 種の糖鎖修飾候補タンパク質を同定した。これら同定されたタンパク質はいずれも既

知のミトコンドリアタンパク質であった。

さらに、同定した 13 種のタンパク質のうち、succinate dehydrogenase (SDHA) を抗体を用いて免疫沈降し Pro-Q Emerald 染色したところ、約 70 kDa のバンドが特異的に染色された。また、その約 70 kDa のバンドを切り出し、ペプチドマスフィンガープリント解析した結果、SDHA であることを確認した。

また、N結合型糖鎖を認識する Con A レクチンを用いたアフィニティ精製によって、ミトコンドリアの N結合型糖鎖修飾タンパク質の分離を試みた。マウス肝臓ホモジネートから調製したミトコンドリアタンパク質を Con A レクチンアガロースに結合させ、ハプテン糖により溶出した画分を SDS-PAGE 展開した結果、5本の主要なバンドを確認した。ゲルから各バンドを切り出し、ペプチドマスフィンガープリント法により解析した結果、ATP synthase α 、ATP synthase β 、aldehyde dehydrogenase2、3-ketoacyl CoA thiolase、aspartate aminotransferase を同定した。aldehyde dehydrogenase 2、aspartate aminotransferase は Pro-Q Emerald 染色による解析からも検出・同定されたタンパク質であり、N結合型糖鎖修飾がされている可能性が高いと考えられる。

総括

1. アミノ酸置換による質量差を精密質量分析によって解析した結果、変異体に固有の質量差を持つ全てのアミノ酸変異を同定できることを明らかにした。この成果はタンパク質の質量分析からアミノ酸変異同定が可能であることを実証するものであり、プロテオミクス研究への適用が期待される。
2. 糖鎖特異的染色法とレクチンを用いてミトコンドリア糖タンパク質の探索を行った結果、糖鎖特異的染色から 13 種類、N結合型糖鎖アフィニティ精製から 5 種類を同定した。そのうち、2 種は両方から検出された。

審査結果の要旨

一塩基多型 (SNP) のようにゲノムに生じた塩基置換は特定のタンパク質の量的または質的な変化を起こし、疾患あるいは体質と呼ばれる遺伝的素因をもたらしている。また、タンパク質の多くはリン酸化、糖鎖修飾、脂質修飾などの翻訳後修飾を受け、その機能と密接に関連している。このようなタンパク質の化学的性質の変化はプロテオミクスの中核技術である質量分析においても分子量、イオン化効率などへ影響するため、その検出と同定をより一層困難にしている。そこで、本研究では、質量変化からのアミノ酸変異の同定を試みるとともに、糖鎖特異的染色法やレクチンによる糖タンパク質の特異的検出法を用い、ミトコンドリア糖タンパク質候補の検出と同定を試み、以下の成果を得た。

第 1 章では、精密質量測定によるアミノ酸置換の一義的同定を試みた。多くのアミノ酸置換の報告があり、遺伝病のモデルとして用いられるグロビンを試料とし、高い質量測定精度を有するフーリエ変換質量分析装置 (FT-ICR MS) を用いて測定した。遺伝子型がヘテロであり、点変異によるミスセンス変異を持つ患者由来の 3 種のグロビン (Hb

Moriguchi、Hb J Cape Town、Hb G Coughatta) を用い、精製後、プロテアーゼ消化し、MALDI FT-ICR MS による測定を行った。マススペクトル上では正常ペプチドとともに変異ペプチドが同時に観測され、それらの質量差から、アミノ酸の置換を検証した。その結果、Hb Moriguchi、Hb J Cape Town、Hb G Coughatta のアミノ酸置換のそれぞれを 26.0044 ± 0.0005 , 28.0424 ± 0.0009 , 58.0054 ± 0.0011 Da 差として検出した。すなわち、それぞれ、Tyr から His、Arg から Gln、Glu から Ala への置換として同定することができた。また、質量分析によるペプチドの測定が 2ppm 未満の測定精度を保持すれば、統計学的に 99%信頼限界で一義的にアミノ酸置換を決定できることが示された。さらに、アミノ酸置換による質量差が最小である Lys-Gln の質量差 0.0364Da を持つ 9 残基の合成ペプチドを用いたモデル実験を行ったところ、FT-ICR MS による精密質量測定によって、両ペプチドの質量差を明確に検出できた。以上の結果から、精密質量測定により、アイソマーであるロイシンとイソロイシンを除く、ヒトグロビンにおける全てのアミノ酸変異をその質量差から決定できる可能性が示唆された。

第2章では、ミトコンドリアの糖タンパク質を網羅的に探索・同定することを試みた。マウス肝臓ホモジネートの細胞分画によりミトコンドリア画分を調製した後、密度勾配遠心法によりさらにミトコンドリアを精製した。オルガネラマーカータンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロット解析により、得られたミトコンドリア画分には ER やリソソームなど他のオルガネラの混入が殆ど無いことを確認した。このミトコンドリア画分を用いて以下の二通りの方法によりミトコンドリア糖タンパク質候補の同定を行った。

まず、ミトコンドリア画分を超音波破碎し、二次元電気泳動により分離後、糖鎖特異的染色試薬である Pro-Q Emerald で染色し、約 30 個のタンパク質スポットを検出した。それらをゲルから切り出し、プロテアーゼ消化後、ペプチド断片を抽出し、MALDI-TOF 質量分析装置を用いたペプチドマスフィンガープリント法によってタンパク質同定を行った。その結果、carbamoyl-phosphate synthase、pyruvate carboxylase、sarcosine dehydrogenase、succinate dehydrogenase、aldehyde dehydrogenase 2、aldehyde dehydrogenase 6A1、glutamate dehydrogenase、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase、long chain specific acyl-CoA dehydrogenase、ornitine transcarbamylase、ubiquinol-cytochrome *c*、aspartate aminotransferase、dimethylglycine dehydrogenase の 13 種の糖鎖修飾候補タンパク質を同定した。これら同定されたタンパク質はいずれも既知のミトコンドリアタンパク質であった。

次に、*N*-結合型糖鎖を認識する Con A レクチンを用いたアフィニティ精製によって、ミトコンドリアの *N*-結合型糖鎖修飾タンパク質の分離を試みた。マウス肝臓ホモジネートから調製したミトコンドリアタンパク質を Con A レクチンアガロースに結合させ、ハプテン糖により溶出した画分を SDS-PAGE 展開した結果、5 本の主要なバンドが得られた。各バンドを切り出し、ペプチドマスフィンガープリント法により解析した結果、ATP synthase α 、ATP synthase β 、aldehyde dehydrogenase 2、3-ketoacyl CoA thiolase、aspartate aminotransferase を同定した。aldehyde dehydrogenase 2 と aspartate aminotransferase は Pro-Q Emerald 染色による解析からも検出・同定されたタンパク質であり、*N*-結合型の糖鎖修飾を受けている可能性が高いと考えられる。

以上のように本研究は、患者由来グロビンを用いた精密質量分析により全ての *N*-アミノ酸置換の同定が可能であることを示した。また、ミトコンドリア糖タンパク質候補の探索を行い、糖鎖特異的染色法から 13 種、レクチンアフィニティ精製法から 5 種を同定した。これらの成果は、医学・獣医学の発展に貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終

試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。