


学位論文要旨

氏名 星山 綾子 

論文題目

「生理活性ペプチド結合蛋白同定のための新手法の開発」

指導教授承認印

七里 真美 

生理活性ペプチド結合蛋白同定のための新手法の開発

氏名 星山 綾子

(以下要旨本文)

【背景】

GIP(glucose-dependent insulinotropic polypeptide)は、十二指腸および小腸の K 細胞によって合成される 42 アミノ酸ポリペプチドであり、膵β細胞からのインスリンのグルコース依存性放出を引き起こすインクレチンの一つである。今日、インクレチンの作用にもとづく糖尿病治療薬に注目が集まり、糖尿病に対する処方も多くを担っている。一方でインクレチンの膵外作用も多く報告され、GIP については骨代謝や脂肪蓄積、動脈硬化への影響が報告されている。インクレチンは血中で、DPP-4 (dipeptidyl peptidase-IV) で速やかに不活化され、活性化ペプチドの血中半減期が非常に短いことが知られている。そのため、これらの膵外臓器での生理活性の保持のためには、結合蛋白との複合体形成など酵素消化されない条件が必要である。

NativePAGE(Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis)は変性剤を使用せず、複合体を形成した状態で蛋白を分離できる電気泳動の手法である。本手法により分離した蛋白をゲル内から抽出し、質量分析 LC/MS を組み合わせることで、蛋白複合体を形成するそれぞれの蛋白を同定することができる。GIP をヒト血漿と混合し、得られた複合体を解析することで GIP をはじめとする生理活性ペプチドが血中で結合する蛋白を同定できるものと考え、本研究を立案した。

【方法】

チオウレア結合により GIP に蛍光色素 FITC を標識し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより未反応の FITC と FITC 標識 GIP (GIP-FITC) を分離し、 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=485/528\text{nm}$ で最も蛍光強度の高いサンプルを使用した。

精製した GIP-FITC と血漿を 37°C で 18 時間反応させ、Native PAGE を行い、泳動後のゲルを Blue/Green LED イルミネーターで目視しながら蛍光バンドを切り出した。洗浄、還元/アルキル化の後、トリプシン、Lys-C によるゲル内消化を行い、ゲル内の蛋白を抽出した。抽出したサンプルは脱塩処理を行った後、LC-MS/MS 分析を行った。分析には LC (Easy-n LC1000) と Q-Exactive を組み合わせた超高感度 LC-MS システムを使用し、データベース検索は、Proteome Discoverer 1.4.0.288 ソフトウェアに組み込まれた SEQUEST アルゴリズムを使用して行った。

LC/MS で同定された蛋白と GIP-FITC を 37°C で 18 時間反応させ、前述の Native PAGE を行い、PVDF メンブレンに 25V 45 分間の条件で転写した。一次抗体として精製した抗 GIP 抗体 C 端を用い、HRP 標識ヤギ抗ウサギ抗体を二次抗体としてウエスタンブロットを行った。検出には ImageQuant LAS 4000 を使用した。

複合体形成の競合実験として、あらかじめ非蛍光標識 GIP を血漿と 37°C で 1 時間反応させた後、GIP-FITC を 37°C で 3 時間反応させ、前述の Native PAGE を行った。LED イルミネーターで目視しながら蛍光バンドを切り出し、プロナーゼ E によるゲル内消化を行った。抽出液の蛍光強度を $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=485/528\text{nm}$ で測定した。

GIP-FITC の複合体形成時間の検討では、GIP-FITC と血漿を 1、5、15、30、60、120、240、360 分反応させた後に Native PAGE を行い、LED イルミネーターで蛍光バンドを撮影した。得られた画像は解析ソフト imageJ を用いて蛍光面積に換算し、比較した。

【結果】

血漿と GIP-FITC を反応させた Native PAGE では、二つの特異的な蛍光バンドを確認した。この蛍光部位に一致してウエスタンブロットで GIP が検出され、GIP-FITC および複合体が同部位に存在していると考えられた。結合時間の検討では、15 分以内のごく短い反応時間で GIP-FITC は血漿中の蛋白と複合体を形成し 6 時間後まで結合量は増加していた。ゲル内消化を用いた結合競合実験では、より高濃度の非標識 GIP を競合させたものほどゲル内の蛍光強度が減弱し、競合により GIP-FITC の蛋白への結合が低下したと考えられた。

上記ウエスタンブロットでより強く GIP が検出された部分を切り出し、ゲル内消化により蛋白を抽出し、LC-MS/MS 分析を行った。複数の蛋白が同定されたが、Peptide Sequence Matches(PSMs) から上位の蛋白を本実験の候補蛋白とした。主なものとして免疫グロブリン IgG、アルブミン、トランスフェリンが同定され、IgG については重鎖をはじめとする各領域が、アルブミンやトランスフェリンについてもアミノ酸配列の全長から様々な領域が検出された。これらの蛋白について抗 GIP 抗体にてウエスタンブロットを行い、精製したヒト IgG およびアルブミンとそれぞれ GIP-FITC とを混合したサンプルでは、特異的なバンドが検出された。

【考察】

本研究は、生理活性ペプチドの血中での結合蛋白を明らかにするため、GIP を用いて複合体形成の有無を検討したものである。

ペプチドを蛍光標識することで可視化し、目的部位の切り出しを行った電気泳動後の質量分析では、複数の蛋白が検出されたが、今回は PSMs の高いものを候補蛋白として扱った。候補としたものはどれも、アミノ配列の全長から複数箇所の配列が同定されており、酵素消化などにより生じた特定の断片ペプチドではなく、蛋白質の全長が存在していると推察された。

この結果をもとに行ったウエスタンブロットでは、ヒトアルブミンとヒト免疫グロブリン IgG とそれぞれ複合体を形成している可能性が示唆された。どちらも生体内で高い濃度で存在し、分泌された GIP が即時に結合することができる蛋白である。アルブミンについては、生体内の多くの物質の輸送蛋白としての働きが知られており、化学的に結合ドメインを作成することで薬剤の生体内での分解を抑制する技術等が開発されている。GIP についても安定した結合により複合体を形成し、血中で輸送されている可能性が考えられた。また、複合体形成時間の検討では、短時

間での形成が明らかとなり、不活化酵素の作用を受ける前に安定化することで、全身臓器への運搬、作用が可能となっていると考えられた。

本研究の電気泳動の手法は Native PAGE であり、個々の蛋白やその複合体のもつ等電点と分子量の双方で泳動時のバンドの形成箇所が変化するため、既存の分子量マーカーによる蛋白の推定が困難であった。Native PAGE の変法で、泳動緩衝液に CBB (Coomassie Brilliant Blue) を加えた Blue-Native PAGE ではこの問題が解決されるため今日多く用いられているが、CBB の存在下では蛍光色素が消光し、確認できなかつたため、本研究では用いなかた。そのため、質量分析による蛋白の同定や、複数の単離蛋白でのウエスタンブロットで、複合体形成の確認を行った。これまでのゲル内消化にもとづく質量分析の手法では、1次元あるいは2次元の電気泳動後のゲルを染色し、切り出し、ゲル内消化を行うものであり、さらに煩雑であった。本研究の手法を用いることで、1次元の電気泳動から直接試料部位を選出し、網羅的ではなく限局された部位の分析が可能となり、より簡易的に複合体を探索できると考えられた。また、本研究中に行った電気泳動後のゲルの CBB 染色では、今回分析に用いた切り出し部は染色されていないため、染色後のゲルを用いた網羅的な解析では対象部位として選定されず、蛋白の同定に至らなかつた可能性が高い。本研究では、血漿との反応物で確認された蛍光バンドと同定した蛋白単体での反応で免疫検出されるバンドのゲル内での位置が異なり、複数の蛋白を含む複合体の形成による電荷の変化や IgG の軽鎖や重鎖といった分解産物との結合が考えられた。