

生体中におけるタンパク質機能状態の高精度比較解析

生物科学専攻 生物物理学

DS-18902 紺野 亮

タンパク質の酵素消化ペプチドを網羅的に分析する、いわゆるショットガンプロテオミクス技術の急速な発展に伴い、生命ならびに疾患に関連したタンパク質の高感度な検出が可能となってきた。しかし、この方法は最初の段階でタンパク質を酵素消化するため、疾患や生理機能にとって重要なタンパク質の切断状態を解析することは不可能である。一方、試料中のタンパク質を電気泳動で分離し、ゲルを短冊状に切り出してゲル内消化後に質量分析する one-dimensional SDS-PAGE followed by LC-MS/MS (GeLC-MS/MS) 法はタンパク質の切断情報を解析することができる。しかし、2 試料間での比較を行う場合、レーン間でのゲルの切り出し精度の低さや高感度質量分析計の分析における不安定性により、タンパク質切断状態の高精度な比較解析は困難である。そこで、本研究では安定同位体ジメチル標識と GeLC-MS/MS 法を組み合わせた Stable isotope labeled GeLC-MS/MS (SI-GeLC-MS/MS) 法を開発した。SI-GeLC-MS/MS 法では、従来法に比べて約 2 倍にあたる全体の約 80% のペプチドについて高い精度（比率 0.8~1.25 以内）での比較分析が実現できた。これらのことから本方法によって比較対象試料中のペプチドの高精度な比較分析を実現できることが示された。さらに、確立した方法を限定分解したヒト血清アルブミン（HSA）と β カゼインに応用し、タンパク質の切断ならびに翻訳後修飾の解析を行った。その結果、HSA では消化酵素量の増加に伴って、切断断片が増加したことを確認した。また、 β カゼインではリン酸化による電気泳動の移動度の変化およびリン酸化部位の特定に成功した。

以上の結果より、本研究で開発した SI-GeLC-MS/MS 法は 2 試料間のタンパク質切断状態ならびに翻訳後修飾の違いを高い精度で比較分析可能であり、今後、疾患や生理機能に直結するタンパク質の切断情報の検出に役立つものと考えている。