

論文の内容の要旨

論文題目 SBD-Fを用いたペプチド・タンパク質の微量定量法の開発と応用に関する研究

氏名 鳥海 千冬

【序論】遺伝子から作られる生理活性ペプチド及びタンパク質は、プロセッシングやリン酸化のような翻訳後修飾を受けるため、遺伝子の構造から予測できないペプチド・タンパク質の分子種が生体内に存在する。また、これら修飾により、生体内に存在するペプチド・タンパク質の数は 10~30 万種にも上ると考えられ、ゲノム情報から細胞内で発現しているペプチド・タンパク質の種類及びその量を予測し、生命の分子基盤を理解することは困難である。それゆえ、生命維持に関するホメオスタシスを理解するためには、ゲノム情報の最終的な表現型であるペプチド・タンパク質そのものを分析化学の手法により分離・定量することが必須であると考えられる。現在、生体内のペプチド・タンパク質の定量は、主に免疫学的方法を用いて行われている。しかし、この方法は特異的抗体の作製が必要であること、並びに定量性及び再現性が十分得られないことなどの問題点がある。

私は、定量性及び再現性が良い HPLC 法をペプチド・タンパク質の分析法に応用することを考えた。従来の HPLC-UV 検出法では感度が低く、生体内に pM 以下のレベルで存在するペプチド・タンパク質を定量することは困難であるため、HPLC-蛍光検出法を取り上げることにした。従来の経験によれば、ペプチド・タンパク質の立体障害のために完全な蛍光標識が困難であることや、標識の結果、疎水性が増大することによるタンパク質の吸着や析出のために、これら試薬の高分子量ペプチド・タンパク質の分離・定量法への適用は現実的ではなかった。そこで私は、高感度で水溶性のチオール基選択的な蛍光誘導体化試薬(SBD-F、図 1)を、チオール基を含有するペプチド・タンパク質の誘導体化に適用し、それらを高感度に分離・定量する方法の開発を考えた。

本研究では、ペプチドとしてインスリンを取り上げ、その分離・定量法を開発し、これを用いて糖尿病ラットのランゲルハンス島(ラ島)中インスリンアイソマー(Ins 1 及び Ins 2)を分離・定量し、それらの mRNA 発現量との関係を調べた。一方、本誘導体化方法を細胞内に存在する不特定多数のタンパク

質の分離、定量及び同定法、すなわちプロテオーム解析法に応用し、特定の環境、時間及び空間において細胞内に発現しているタンパク質を見出す方法の開発を目指した。

【本論】

1. HPLC-蛍光検出法を用いたインスリンアイソマーの高感度分離・定量法の開発

本研究ではインスリン分子内の-S-S-結合を還元剤 (tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)) により Chain A 及び B に還元し、両 Chain のチオール基の全てに SBD-F を反応させ、生成した Chain A 及び B 誘導体をそれぞれ HPLC-蛍光検出法により高感度に定量することを試みた。

今回、水溶性の高い SBD-F による蛍光誘導体化反応を水系で行うため、水溶性の高い TCEP を還元剤に選択した。条件検討の結果、pH 9、40°C 及び 5 倍モル以上の TCEP 存在下においてインスリンは速やか(30 min 以内)に Chain A 及び B に還元された。

インスリンは、低分子化合物の蛍光誘導体化条件 (pH 9.5、60°C、1 h) において全く SBD-F と反応しなかった。そこで、反応系に各種界面活性剤を添加することにした。その結果、CMC 以上の n-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DM) 添加により Chain A 及び B 誘導体の生成が著しく促進されることが明らかとなった (図 2)。さらに、蛍光誘導体化条件を最適化した結果、0.7 mM TCEP、1.7 mM SBD-F、2 mM EDTA、1 mM DM 存在下、pH 9、40°C、3 h 反応において分子内のチオール基全てを SBD 化することができた。

HPLC カラムにシラノール基が残存する ODS を用いることによりラットの Ins 1 及び Ins 2 を分離し、定量法を確立することができた。本方法はラ島 1 個中のインスリンアイソマーの分離・定量を可能とした。本方法を用いて正常及び遺伝的糖尿病ラット (GK ラット) のラ島中インスリンアイソマーを分離・定量し、比較した結果、本糖尿病ラットにおいてヒトインスリンに対応すると考えられる Ins 2 含量の低下を見出した。

2. デキサメタゾン誘発糖尿病ラットと非投与ラットにおけるインスリンアイソマー及び mRNA 発現量の比較

デキサメタゾン (Dex) は 2 型糖尿病を誘発することが知られているため、新たに Dex 誘発による糖尿病ラットを作製し、ラ島中インスリンアイソマーを分離・定量した。さらに、これらの mRNA を測定してアイソマー含量との関係を調べた。

Dex 10 mg/kg を 1 日 1 回、4 日間連続皮下投与し、糖尿病を誘発させた。GK ラットと同様に、本糖尿病ラットにおいてラ島中 Ins 2 含量の低下が認められた (図 3)。この低下の原因として Ins 2 mRNA の発現量の低下が確認された。そこで、この Ins 2 低下の原因が Dex 自身または糖尿病から生じる高血糖状態によるものかを検討するために、培養ラ島を用いて調べた。その結果、Dex 存在下では両インスリンアイソマーとその mRNA がいずれも減少するが、Ins 1 と比べて Ins 2 及びその mRNA の方がより大きく低下することを見出した。一方、高グルコース状態では Ins 2 及びその mRNA のみが低下した。以上のことから、デキサメタゾン自身及び高血糖状態により Ins 2 mRNA 発現量がより大きく低下することにより、本病態ラットのラ島中 Ins 2 含量が減少するものと推察された。

3. SBD-F を用いた新規プロテオーム解析法の確立とその応用

SBD-F はペプチドに限らずチオール基を含有するタンパク質の分離・定量法にも応用可能と考えら

れた。そこで、SBD-Fによる蛍光誘導体化法を用いた新規プロテオーム解析法の開発を試みた。BSA (Mw:66385)を標品として新たにタンパク質の誘導体化条件を検討した。タンパク質を変性させるために6 M塩酸グアニジンを追加し、さらにペプチドの誘導体化に必須であった界面活性剤の添加を検討した。その結果、CHAPS添加によりBSA誘導体の生成量が最も増大した。さらに、BSAを用いて蛍光誘導体化反応条件の最適化を行い、タンパク質の誘導体化の最適条件(1 mM TCEP、3.5 mM SBD-F、2 mM EDTA、10 mM CHAPS、6 M塩酸グアニジン存在下、pH 9及び40°Cにて3 h反応)を設定することができた。

本誘導体化方法の各種タンパク質への適用性、並びに感度及び定量性について調べた。各種タンパク質誘導体は、HPLCクロマトグラム上でそれぞれsingle peakを示し、検量線は10~1000 fmolの間で良好な直線性($r>0.9994$)を示したことから、本法の定量性と各種タンパク質への適用性が示された。一方、本法の検出限界は0.2~6.0 fmol(S/N=3)であり、高感度な検出が可能であった。

SBD化タンパク質をタンデム質量分析装置(MS/MS)により同定するため、BSA誘導体のトリプシン消化ペプチド混合物のMS/MS分析を行った。その結果、改良したデータベース検索ソフト(SBDの分子量の増加分を加味)を用いてSBD化タンパク質の同定法を確立することができた。

本手法を用いてDex投与及び非投与ラットのラ島中タンパク質のプロテオーム解析を行った。ラ島中タンパク質を蛍光誘導体化後、2次元HPLCにより合計129本の蛍光ピークに分離した。これらを定量し、Dex投与により変化した蛍光ピークのみを分取し、ついでトリプシン消化し、生成したペプチド混合物のHPLC-MS/MS分析とデータベース検索を行った。その結果、Dex投与ラットのラ島中における5種のタンパク質の増加及び3種のタンパク質の減少を見出した(表1)。

【総括】インスリン分子内の酸化型チオール基を還元すると同時に、水溶性でチオール基選択的な発蛍光試薬であるSBD-Fを反応させることにより、インスリンアイソマー(Ins 1及びIns 2)のHPLC-蛍光検出による高感度分離・定量法を開発した。本方法は、ラ島1個でインスリンアイソマーの定量が可能であった。

開発した分離・定量法を用いて、Dex誘発糖尿病ラットのラ島中インスリンアイソマーを分離・定量し、ヒトインスリンに対応するIns 2選択的な減少を見出した。その際、Ins 2 mRNAの発現量も低下していたことから、本糖尿病ラットではDex自身及び糖尿病から生じる高血糖状態により選択的にIns 2 mRNA発現量が低下し、Ins 2含量が大きく低下したものと考えられた。

タンパク質をSBD-Fにより蛍光誘導体化し、新規プロテオーム解析法を開発した。本方法は、刺激等により変動したタンパク質のみを高感度に定量及び同定することが可能であった。本手法を用いてDex投与ラットのラ島中の数種のタンパク質の変動を見出すことができた。

以上のように、ゲノム情報の最終的な表現型であるペプチド・タンパク質の分析法を確立し、薬物投与及び病態におけるそれらの変動を捉えることができた。今後、本方法により病態に関わるペプチド・タンパク質を発見することができれば生命維持に関するホメオスタシス、ひいては生命の分子基盤を理解することが可能になるものと期待される。

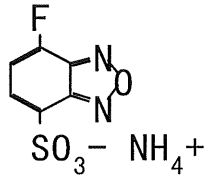


図1. Ammonium 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate (SBD-F)

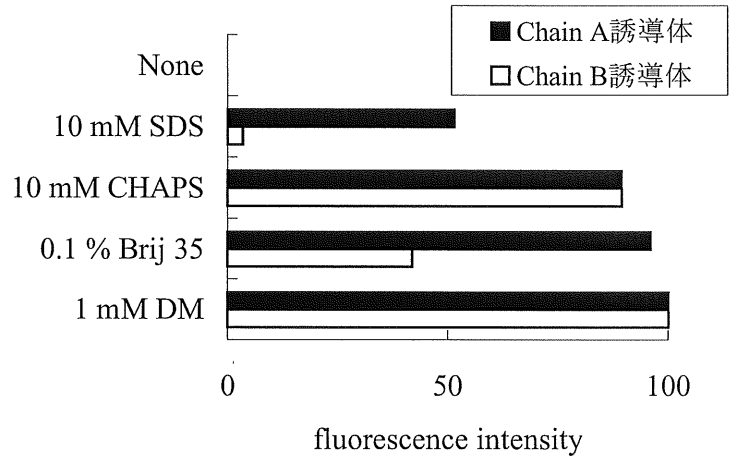


図2. インスリンの蛍光誘導体化に及ぼす各種界面活性剤の影響

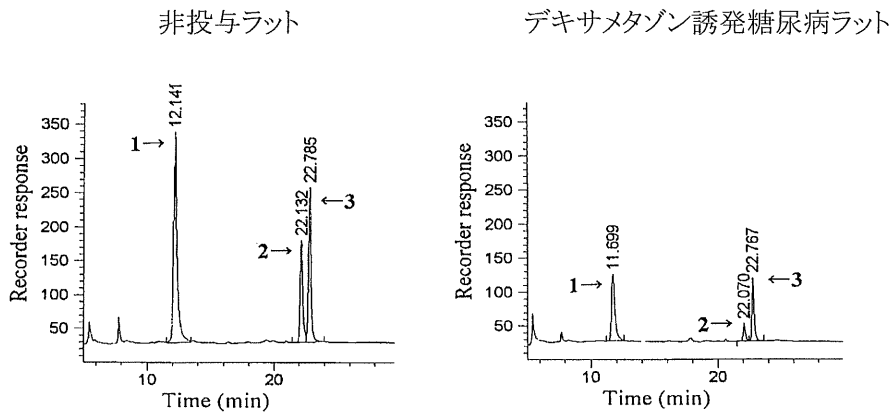


図3. デキサメタゾン誘発糖尿病及び非投与ラットのランゲルハンス島中SBD化インスリンアイソマーのクロマトグラム

1. Chain A誘導体、2. Chain B2誘導体、3. Chain B1誘導体

表1. デキサメタゾン投与により変動したランゲルハンス島中タンパク質

Peak no.	Average ratio (Dex/Control)	Protein	Mw	Database accession no.
12	0.5	protein P31	13284	CSRT31
15	0.4	dnaK-type molecular chaperone hsp72-psl	70884	S31716
24	2.1	pancreatic polypeptide	10968	NP_036758
29	0.5	insulin 2	5797	NP_062003
30	6.0	proinsulin 2	12331	NP_062003
36	1.9	78 KD glucose-regulated protein	72302	P06761
61	1.8	phosphatidylethanolamine binding protein	20788	NP_058932
121	1.8	thioredoxin	12854	NP_446252