

審査の結果の要旨

氏名 鳥海千冬

生体内のペプチド・タンパク質は、現在、主として免疫学的方法で定量されているが定量性及び再現性の点で難点がある。HPLC 法は定量性及び再現性に優れているため、それに代わるべきペプチド・タンパク質の分離・定量法として期待されている。しかし、従来の HPLC-UV 法は感度が低く、また、蛍光誘導体化-HPLC 法による高感度化も試みられてきたが、蛍光試薬の疎水性が高いため標識されたペプチド・タンパク質が前処理過程で吸着あるいは析出するため実用的とはいえなかった。

申請者は水溶性でチオール基選択的な発蛍光試薬である Ammonium 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate (SBD-F) を用いてペプチド・タンパク質を蛍光誘導体化することで吸着や析出を回避し、HPLC-蛍光検出法により高感度にペプチド・タンパク質を分離・定量することを目指した。さらに本蛍光誘導体化法をプロテオーム解析法に応用し、細胞内に発現するタンパク質を見出す方法の開発を行った。

1. はじめに、ヒト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、両鎖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 HPLC-蛍光検出法により高感度に分離・定量する方法を検討した。システイン等の低分子化合物の蛍光誘導体化条件下では、SBD-F はインスリンと全く反応せず、各種界面活性剤の内、n-dodecyl- β -D-maltopyranoside の添加により反応が大きく促進されることを見出した。本条件をラットインスリンアイソマー(Ins 1 及び Ins 2)の蛍光誘導体化に適用し、HPLC による分離・定量を検討した。Ins 1 由来の Chain B1 誘導体の塩基性が Chain B2 誘導体のそれより高いことを利用して、シラノール基が残存する逆相カラム(TSK-gel ODS 120T)を用いるとこれらを分離・定量することが可能となった。本分離・定量法の検出限界は約 3~4 fmol と高感度であり、検量線も良好な直線性を示した。これにより従来免疫学的方法では困難であったランゲルハンス島 1 個中のインスリンアイソマーの分離・定量が実現した。本法を用いて正常及び遺伝的糖尿病ラット(GK ラット)のランゲルハンス島中インスリンアイソマーを分離・定量したところ、Ins 2 含量が低下していることを見出した。

2. 1 で開発した分離・定量法を用いて、デキサメタゾン誘発糖尿病ラットのランゲルハンス島中インスリンアイソマーを分離・定量し、それらの mRNA 発現量と比較した。デキサメタゾン 10 mg/kg を 1 日 1 回、4 日間皮下投与することにより惹起される糖尿病ラットのランゲルハンス島中において、GK ラットと同様の Ins 2 選択的な減少を見出すことができた。さらに、それぞれのアイソマーの mRNA を測定したところ、本糖尿病ラットでは Ins 2 の mRNA が大きく低下していること

が明らかとなった。このように、糖尿病ラットでは Ins 2 の mRNA 発現量が低下するために Ins 2 の含量が減少すること、Ins 1 は糖尿病で減少しにくいことが本研究により初めて明らかとなった。

3. さらに申請者は、新規プロテオーム解析法の開発を目指した。先に確立したインスリンの反応条件下ではタンパク質の蛍光誘導体化は不十分であり、界面活性剤の CHAPS 及びタンパク質変性剤である塩酸グアニジンを追加することにより蛍光誘導体化が初めて達成されることが明らかとなった。本条件下各種タンパク質を蛍光誘導体化し、分離・定量した結果、HPLC のクロマトグラム上でそれぞれ単一のピークを与え、検量線はいずれも良好な直線性を示したことから、本誘導体化方法の各種タンパク質への適用性及び定量性を確認することができた。本法の検出限界は 0.2~6.0 fmol (S/N=3) であり、2 次元電気泳動法より約 10 倍程度高感度化することができた。次に、生成した SBD 化タンパク質を 2 次元 HPLC-蛍光検出法により高感度に分離・定量し、MS/MS 分析及び補正したデータベース検索ソフト (MASCOT: システインの分子量を 103.1 から SBD 化システインの分子量 301.0 へ変更) により同定する方法の確立を試みた。まず、SBD のスルホン酸基のマイナス電荷を利用して陰イオン交換 HPLC を行い、タンパク質を 5 つの画分に分画し、これらを濃縮後、疎水性相互作用に基づく 2 次元目の逆相 HPLC を行うことで SBD 化タンパク質の分離・定量が可能となった。本 2 次元 HPLC 法を用いてラットランゲルハンス島中のタンパク質を分離した結果、合計 129 の蛍光ピークを得ることができた。これらの全てのピーク面積を求め、デキサメタゾン投与及び非投与ラットとで比較することにより、デキサメタゾン投与による 5 種類のタンパク質の増加と 3 種類のタンパク質の減少を見出した。これらをトリプシン消化後、生成したペプチド混合物を LC-MS/MS 分析と改良したデータベース検索ソフトを用いてそれぞれのタンパク質を同定することに成功した。

以上、本研究はペプチド・タンパク質の高感度分離・定量法の開発と更なる応用への試みを行ったものであり、薬学の発展に寄与するところ大であると考えられ、博士(薬学)に相応しいと認められた。