

審査の結果の要旨

氏名 羅 紋真

本研究は、タンパク質の機能調節に重要な役割を果たしている翻訳後修飾の一つであるリン酸化修飾の網羅的な変動解析方法を確立するために、マクロファージに分化させた THP-1 細胞で LPS 刺激後、cytosolic と membrane 画分を代謝標識を用いた質量分析(Mass Spectrometry, MS)による様々なタンパク質の同定やリン酸化修飾の解析を行い、下記の結果を得た。

1. リン酸化ペプチドの濃縮するためには、二酸化チタンを用いた。特に酸性アミノ酸基とリン酸基との区別をするために、TFA(trifluoroacetic acid)などの強酸を用い、疎水的作用を減らすために、有機溶媒濃度を 80%に高めることによって S/N 比を高くすることができ、市販品より簡単な方法で精製効率を高めた。
2. この手法の有効性を確かめるため、リン酸化ペプチドを濃縮したあと、CIP(calf intestine phosphatase)で反応させたものを MALDI-TOF MS で確認した結果、ほとんどのピークが脱リン酸化されることを確認した。このことからこの方法はリン酸化ペプチドの精製法として有効であると思われる。
3. MS/MS を行った後、さらに Neutral loss scan(H_3PO_4 , 98Da)に相当するペプチドを選択的に MS/MS/MS を行うという手法を用いることによって、信頼性の高いリン酸化ペプチド部位の同定ができた。
4. MS を用いてリン酸化ペプチド解析を行ったところ、マクロファージに分化させた THP-1 細胞で 5 分での LPS 刺激で cytosolic 画分から 61 個、membrane 画分から 49 個のリン酸化ペプチドを同定することができた。30 分より 5 分での刺激で約 2 倍のリン酸化ペプチドが同定され、その中変動が見られたリン酸化ペプチドは約 30%であった。

5. さらに、リン酸化修飾の報告がなかった **Amphiphysin** から **249-serine** 残基、**Leukocyte common antigen precursor** から **972-serine** 残基、**Adenylyl cyclase associated protein1(CAP1)**から **185-Tyrosine** 残基がリン酸化修飾されたペプチドを新たに同定した。
6. 特に、**Adenylyl cyclase associated protein1(CAP1)**の場合、同じ残基からの3つの異なるリン酸化されたサイトのリン酸化の減少と今まで報告がなかった1つのリン酸化サイトのリン酸化の増加がこの研究において観察されたことから、**LPS** 刺激での生体内の各リン酸化部位での応答や役割が異なっているという重要な事実が明らかになった。
7. **MS** を用いてタンパク質解析を行ったところ、マクロファージに分化させた **THP-1** 細胞で **24** 時間での **LPS** 刺激で **cytosolic** 画分から **74** 個、**membrane** 画分から **95** 個のタンパク質を同定した。その中変動が見られたタンパク質はそれぞれ **27** 個、**39** 個であった。今回の解析で、新たに多くの変動が見られたタンパク質を同定することができた。

以上、本論文はリン酸化修飾において、**LC-MS/MS** を用いた解析方法から、複数のタンパク質の同定と同時にリン酸化修飾基やリン酸化修飾部位の同定が可能になった。さらに、既知のリン酸化修飾タンパク質だけでなく、リン酸化修飾されると報告がなかったタンパク質のリン酸化修飾も解析する包括的な方法を確立することができた。本研究は、リン酸化修飾の生理的な役割やタンパク質の機能解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。