

学 位 論 文 題 名

Novel metods for functional proteomics and glycomics based
on matrix-assisted laser desorption/ionization time
of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry

(MALDI - TOF 質量分析法を基礎とする

新しいプロテオミクス・グライコミクス解析法に関する研究)

学位論文内容の要旨

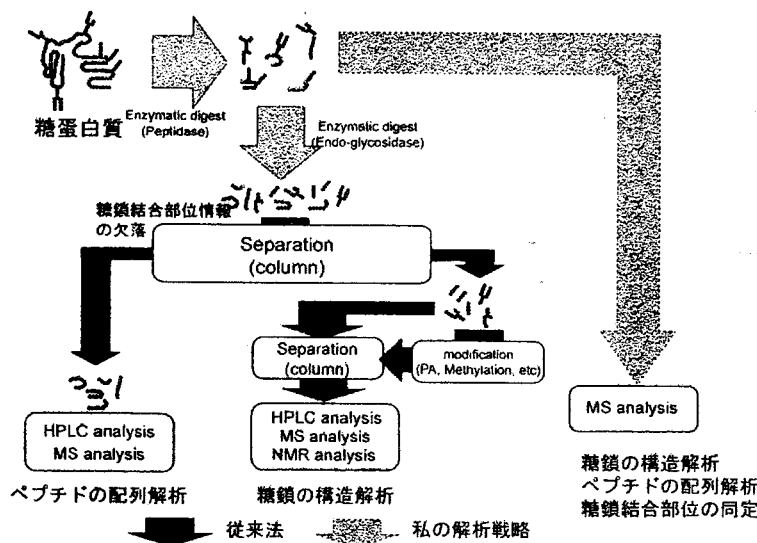


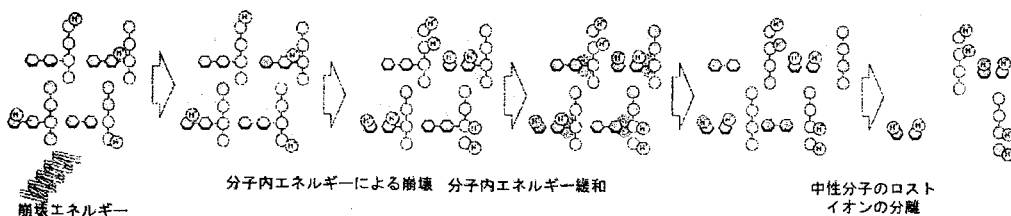
Fig. 1

生体内における多くの蛋白質は糖鎖付加を受けた糖蛋白質として存在しており、発生・分化・癌・感染・老化・生殖などの多くの生命現象において、糖鎖が極めて重要な役割を担っていることが知られてきた。このような背景の下、複合糖質における糖鎖の重要性がこれまでになく広く認識され、機能糖鎖解析すなわちグライコミクスに関する研究が世界規模で急速に展開されている。しかしながら、糖蛋白質は性質の異なる糖鎖とペプチドで構成されているため、

効率よく糖ペプチドを解析する技術はいまだ確立しておらず、従来法では、主として糖蛋白質から酵素消化により糖鎖とペプチド鎖を分けて分析する手法が取られてきた(Fig. 1)。しかし、この場合は糖鎖結合部位情報の欠落が起こるため、蛋白質のどの部位にどの糖鎖

MS/MS解析

(a) 遅いフラグメント化 (従来法)



(b) 早いフラグメント化

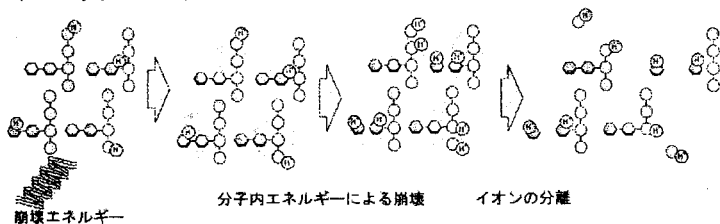


Fig. 2

構造が結合しているか同定する事ができない。本論文では、糖蛋白質の結合部位情報を保持したままの糖ペプチドを直接解析する事を研究目標とした。その解析の手法として、高感度かつ簡便な MS (質量分析) を用いて糖ペプチドからペプチド配列・糖鎖結合部位・糖鎖構造情報を得るプロテオミクス・グライコミクス解析法の開発を行なった。

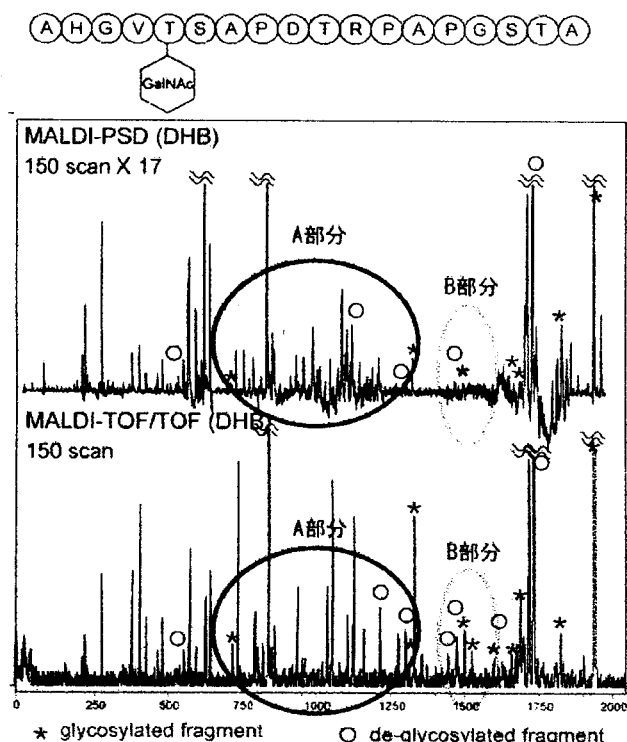


Fig. 3

従来の MS/MS 分析は、崩壊エネルギーの制御を行って分析する方法が主流であり、崩壊する際の分子内エネルギーの緩和による分子崩壊を考慮していなかった (Fig. 2a)。申請者は分子内エネルギーが緩和する時間 (イオンが崩壊して分離される時間) に着目し、分子エネルギー緩和が起こらない時間軸のフラグメントイオンを検出するために MALDI-LIFT TOF/TOF 測定法を用いてこの現象の確認を試みた (Fig. 2b)。最初に、ほぼ同じ崩壊エネルギーを用いた時の O 結合型糖ペプチドの MALDI-PSD と MALDI-LIFT TOF/TOF のスペクトルを比較した (Fig 3)。

分子内緩和に関わる時間は、通常 PSD では μsec 、TOF/TOF では nsec オーダーである。フラグメントパターンは、MALDI-PSD モードでは様々なもの (A, B, Y, A-17, B-17) が検出されるが TOF/TOF モードは一定のもの (B, Y) が検出された (Fig 3 の A 部分)。前者では、分子エネルギー緩和による過度のフラグメント化 (B, Y $\rightarrow$ A, A-17, B-17) が起きている事を示す。後者では、過剰のフラグメントピークが検出されないので、スペクトルの解析がしやすい事がわかる。そして、糖鎖含有フラグメントに着目すると TOF/TOF スペクトルの方がより顕著に糖含有フラグメントが多く検出されている事が分かった (Fig 3 の B 部分)。これは、分子エネルギー緩和による糖鎖結合の切断を抑制している事を示す。つまり、分子エネルギー緩和に着目したフラグメントイオンの素早い分離と検出を MS/MS 解析に用いる概念は簡便なフラグメント解析と糖鎖結合ペプチドといった複雑な分子の解析に有効であり、さらに糖鎖結合部位の同定を行なう上では PSD よりも TOF/TOF の方が優れていることを明らかにした。現在、MS/MS 解析の概念 (フラグメントイオンの検出) でこのようなアプローチを行なっている例はなく、世界初の試みである。この手法を応用する事により従来法では解析できなかったヘテロな糖鎖が混在した複雑かつ不安定な O 結合型糖ペプチドのペプチド配列のみならず、糖鎖結合部位の同定も成功した。

また、申請者はこの概念を基盤として糖ペプチドの情報を選別して抽出・解析できる Matrix-Dependent-Selective-Fragmentation (MDSF)を開発する事によって、ペプチド配列情報・糖鎖結合部位同定に加え、糖鎖配列情報・糖鎖立体的情報・の抽出・同定を行なえる方法を確立した。

以上、この MDSF による MS 分析法は、迅速かつ高感度に行う事ができる新規なグライコ・プロテオミクス解析法であり、生命現象における糖鎖の働きと蛋白質の働きを解明する上で大きな貢献を果たすと期待される。

以上

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 教 授 河 野 敬 一
副 査 助 教 授 門 出 健 次
副 査 特任助教授 出 口 喜三郎

学 位 論 文 題 名

Novel metods for functional proteomics and glycomics based
on natrix-assisted laser desorption/ionization time
of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry

(MALDI - TOF 質量分析法を基礎とする

新しいプロテオミクス・グライコミクス解析法に関する研究)

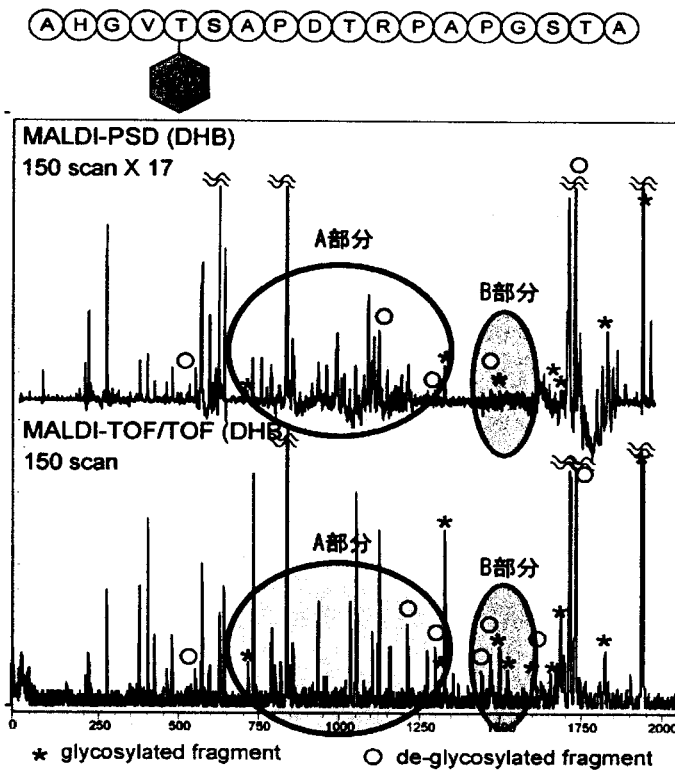


図 1

生体内における多くの蛋白質は糖鎖付加を受けた糖蛋白質として存在しており、発生・分化・癌・感染・老化・生殖などの多くの生命現象において、糖鎖が極めて重要な役割を担っていることが知られてきた。このような背景の下、複合糖質における糖鎖の重要性がこれまでになく広く認識され、機能糖鎖解析すなわちグライコミクスに関する研究が世界規模で急速に展開されている。しかしながら、糖蛋白質は性質の異なる糖鎖とペプチドで構成されているため、効率よく糖ペプチドを解析する技術はいまだ確立しておらず、従来法では、主として糖蛋白質から酵素消化により糖鎖とペプチド鎖を分

けて分析する手法が取られてきた。しかし、この場合は糖鎖結合部位情報の欠落が起こるため、

蛋白質のどの部位にどの糖鎖構造が結合しているか同定する事ができない。本論文では、糖蛋白質の結合部位情報を保持したままの糖ペプチドを直接解析する事を研究目標とした。その解析の手法として、高感度かつ簡便な MS (質量分析) を用いて糖ペプチドからペプチド配列・糖鎖結合部位・糖鎖構造情報を得るプロテオミクス・グライコミクス解析法の開発を行なった。

従来の MS/MS 分析は、崩壊エネルギーの制御を行って分析する方法が主流であり、崩壊する際の分子内エネルギーの緩和による分子崩壊を考慮していなかった。申請者は分子内エネルギーが緩和する時間 (イオンが崩壊して分離される時間) に着目し、分子エネルギー緩和が起こらない時間軸のフラグメントイオンを検出するために MALDI-LIFT TOF/TOF 測定法を用いてこの現象の確認を試みた。最初に、ほぼ同じ崩壊エネルギーを用いた時の O 結合型糖ペプチドの MALDI-PSD と MALDI-LIFT TOF/TOF のスペクトルを比較した (図 1)。分子内緩和に関わる時間は、通常 PSD では μsec 、TOF/TOF では nsec オーダーである。フラグメントパターンは、MALDI-PSD モードでは様々なもの (A, B, Y, A-17, B-17) が検出されるが TOF/TOF モードは一定のもの (B, Y) が検出された (図 1 の A 部分)。前者では、分子エネルギー緩和による過度のフラグメント化 (B, Y $\rightarrow$ A, A-17, B-17) が起きている事を示す。後者では、過剰のフラグメントピークが検出されないので、スペクトルの解析がしやすい事がわかる。そして、糖鎖含有フラグメントに着目すると TOF/TOF スペクトルの方がより顕著に糖含有フラグメントが多く検出されている事が分かった (図 1 の B 部分)。これは、分子エネルギー緩和による糖鎖結合の切断を抑制している事を示す。つまり、分子エネルギー緩和に着目したフラグメントイオンの素早い分離と検出を MS/MS 解析に用いる概念は簡便なフラグメント解析と糖鎖結合ペプチドといった複雑な分子の解析に有効であり、さらに糖鎖結合部位の同定を行なう上では PSD よりも TOF/TOF の方が優れていることを明らかにした。現在、MS/MS 解析の概念 (フラグメントイオンの検出) でこのようなアプローチを行なっている例はなく、世界初の試みである。この手法を応用する事により従来法では解析できなかったヘテロな糖鎖が混在した複雑かつ不安定な O 結合型糖ペプチドのペプチド配列のみならず、糖鎖結合部位の同定も成功した。

また、申請者はこの概念を基盤として糖ペプチドの情報を選別して抽出・解析できる Matrix-Dependent-Selective-Fragmentation (MDSF) を開発する事に成功した。この解析法により糖ペプチドの MS 測定から、糖ペプチド中のペプチド配列情報に加え、従来では解析が困難であった糖鎖結合部位・糖鎖配列情報・糖鎖立体的情報の抽出・同定を行なえる方法を確立した。

さらに、申請者は Mechanism-based-fluorescent affinity labeling という糖加水分解酵素を選択的に阻害・標識する自殺基質を用いて生体内から任意の酵素を吊り上げ、同定する手法の開発も行なった。この手法は、糖蛋白質や糖脂質といった糖鎖を作り出す過程の中で重要な糖関連酵素群の一つである糖加水分解酵素のプロテオーム解析である。

ここまで示したとおり、申請者は生態内での糖鎖の機能を解明する上で重要な糖鎖自身のMS解析のみならず糖鎖合成に関与する蛋白質である糖加水分解酵素のMS解析という糖鎖を中心とした幅広いプロテオーム解析を確立した。本研究において得られた知見は、生命現象を制御する重要な糖蛋白質の機能解明・同定をする上で必要不可欠な解析法であり、ライフサイエンスの解明・発展に大きく貢献するものである。よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。