

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号： 17401
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2022 ~ 2022
課題番号： 22H04275
研究課題名 質量分析リン酸化プロテオーム用いた微量機能タンパク質の評価検討

研究代表者

谷 直紀 (TANI, Naoki)

熊本大学・技術部・技術専門職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：質量分析計を用いた網羅的解析ではごく僅かなサンプル量にて測定解析が可能となっているが、翻訳後修飾の解析では大量のサンプルを投入する必要がある。カラムの試料負荷量が最大に近い投入が必要であったが、数時間単位の分離溶出グラジエントを用いることでリン酸化ペプチドの修飾解析が可能となった。一方、リン酸化ペプチド精製・クリーンアップキット用いた比較実験の方が、微量タンパク質のリン酸化修飾の網羅的評価には有効であった。リン酸化ペプチド精製の有無による実際の生体内の調節機構に関わる微量タンパク質への比較評価までできなかったため、今後引き続き、微量タンパク質の評価を目指し、実験を継続して行く予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

質量分析計の高感度・高性能・高速化により、質量分析計を用いたプロテオミクスによりタンパク質の翻訳後修飾による調節機構を解明する研究が盛んに行なわれている。装置の高感度・高性能・高速化により網羅的解析ではごく僅かなサンプル量にて測定解析が可能となっているが、翻訳後修飾の解析では大量のサンプルを投入する必要がある。リン酸化修飾の網羅的解析を僅かなサンプル量にて測定解析が可能とすることで、プロテーム解析のスピードアップ、さらに生体内の調節機構に関わる研究へ進展も期待される。

研究分野： 生命科学

キーワード： 質量分析 翻訳後修飾 プロテオミクス

1. 研究の目的

転写・翻訳後タンパク質による生体の調節機能や動的性質にスポットライトが当てられ、質量分析計を用いたタンパク質の翻訳後修飾による調節機構を解明する研究が盛んに行われている。特にリン酸化ではごく微量な変化が生体の調節機構に深く関わっていることが多く、本研究では試料中の微量なリン酸化ペプチドを効率的・選択的に測定し、リン酸化ペプチド検出から機能タンパク質の解析限界を評価する。

2. 研究成果

質量分析計の高感度・高性能・高速化により、網羅的解析ではごく僅かなサンプル量にて測定解析が可能となっているが、翻訳後修飾の解析では大量のサンプルを投入する必要がある。条件検討の結果、市販 HeLa 細胞由来トリプシン消化物に混在する修飾ペプチドを確実に評価するには、数時間単位の分離溶出グラジエントが必要であり、カラム試料負荷量が最大に近いサンプルを投入することにより、微量タンパク質の修飾解析を最低限にて評価することが可能となった。そこで、リン酸化ペプチド精製・クリーンアップキットを用いた評価も加えて比較測定解析を行った(図)。カラム試料負荷量が最大に近いタンパク質サンプルがリン酸化ペプチド精製(Fe-NTA)を用いることで、リン酸化修飾されたペプチドのみを測定解析することができ(図左) さらに、リン酸化修飾されたペプチドの検出数が増え、試料中の微量なリン酸化ペプチドを効率的・選択的に測定するには有効であることから、さらに、他のリン酸化ペプチド精製キットとの比較や精製工程における条件検討を行った。しかし、リン酸化ペプチド精製の有無による実際の生体内の調節機構に関わる微量タンパク質への比較評価までできなかったため、今後引き続き、微量タンパク質の評価を目指し、実験を継続して行く予定である。

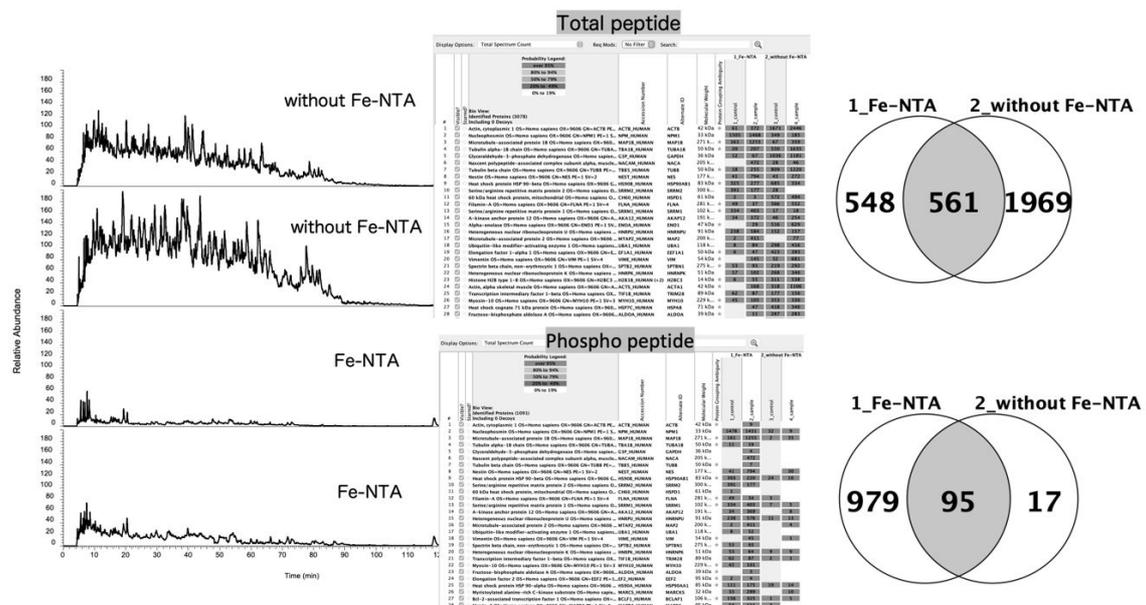


図 リン酸化ペプチドクリーンアップキット用いた評価。
 左)MSクロマトグラムの比較。
 中央) Total Spectrum Countと Phosphopeptide count の比較。
 右上) 検出タンパク質数の比較および右下) 検出リン酸化タンパク質数の比較。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------