

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号： 1 7 4 0 1
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2020 ~ 2020
課題番号： 2 0 H 0 0 9 9 1
研究課題名 質量分析を用いた微量タンパク質の翻訳後修飾部位の特定評価方法の検討

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：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った。条件検討の結果、市販の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ることが判明した。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の評価が可能となった。一方、リン酸化ペプチド精製・クリーンアップキットを用いた評価では、微量タンパク質のリン酸化修飾を網羅的に評価ができる結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、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。質量分析計を用いたタンパク質同定では、装置の高感度・高性能・高速化により網羅的解析を行う場合でもごく僅かなサンプル量にて測定解析が可能であるが、修飾解析となるとショットガン法を用いても相当量のサンプルを必要とする問題がある。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

ヒトゲノム解析が終わり、転写・翻訳後の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プロテームに関する研究が盛んに進められている。特に、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。本研究では高性能質量分析計を用いた微量機能タンパク質の修飾部位特定の解析限界を検討し、微量タンパク質の修飾解析の見本となる測定・評価方法を確立することを目的し、MS と MS2 データから修飾部位特定を目指すものである。

2. 研究成果

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った。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、数時間単位の高感度溶出グラジエントが必要であることが判明した(図1、左パネル)。さら

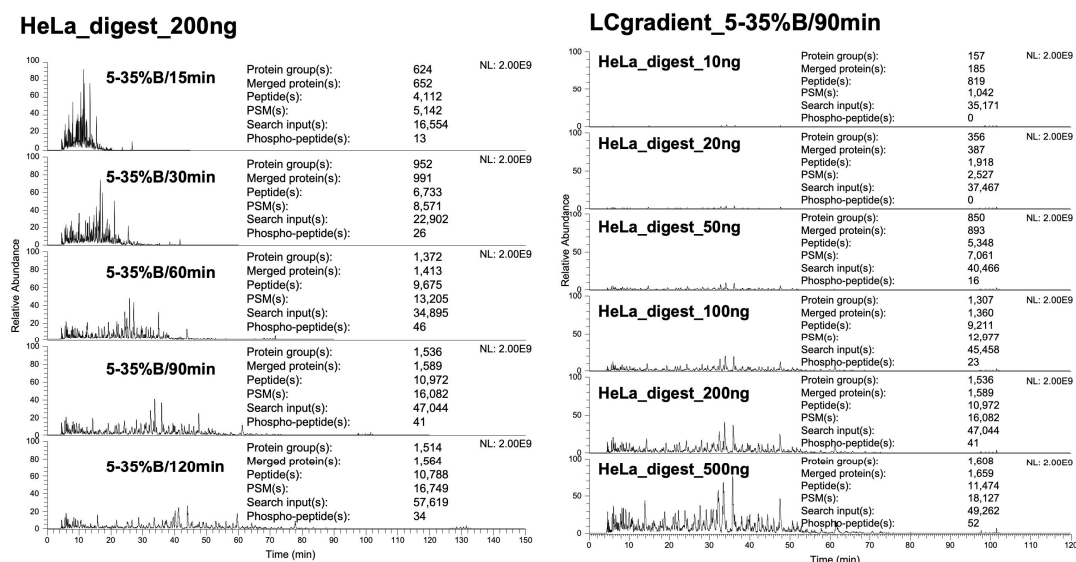


図1 HeLa 消化物を用いた測定方法の検討(グラジエント時間の最適化)。解析ソフト Proteome Discoverer により、Peptide Confidence (Minimum confidence: High)、Peptide Rank (Maximum rank: 1)、Peptides Per Protein (Minimal number of peptides: 2, Count only rank 1 peptides: True とフィルター処理を行った。

に、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の評価が可能となったが、修飾部位特定の解析限界と考えられた(図1、右パネル)。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た。微量タンパク質のリン酸化修飾を網羅的に評価ができることが判明した(図2)。しかし、精製工程における減少を考慮し、多くのサンプル量から精製を開始したため、今後、精製を開始する投入量の限界を調べる必要がある。さらに、今回の結果を踏まえ、生体内の調節機構に関わる微量タンパク質において評価を目指し研究を進めて行く予定である。評価方法を確立することにより、生命科学分野におけるショットガンプロテオミクスに貢献できると考えている。

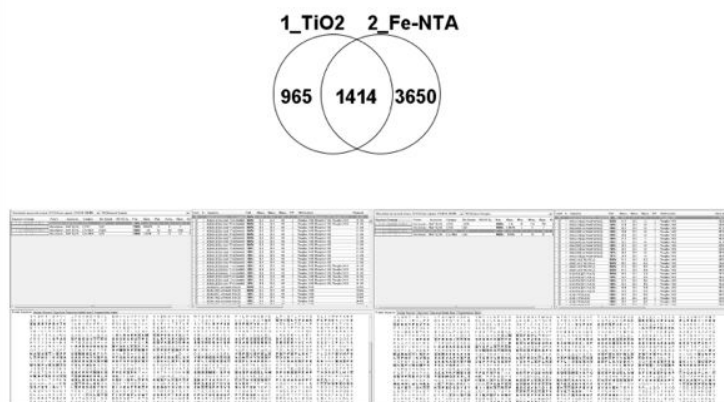


図2 リン酸化ペプチドクリーンアップキットを用いた評価。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 谷 直紀
2．発表標題 質量分析を用いたショットガン解析からPTM解析
3．学会等名 熊本大学令和2年度技術部技術報告会
4．発表年 2021年

〔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
----	--------