


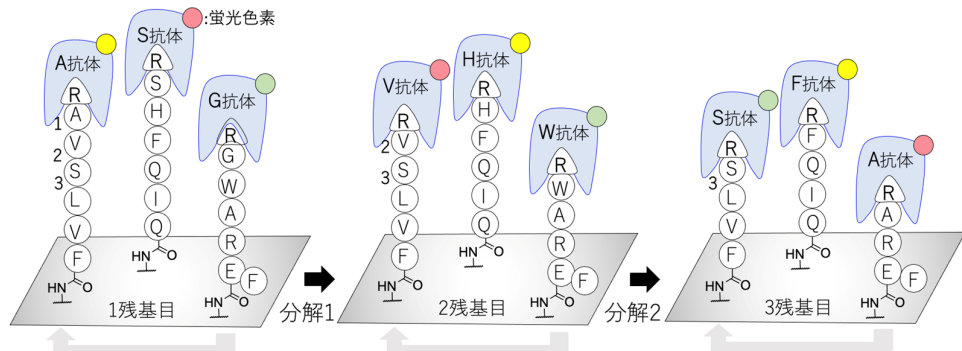
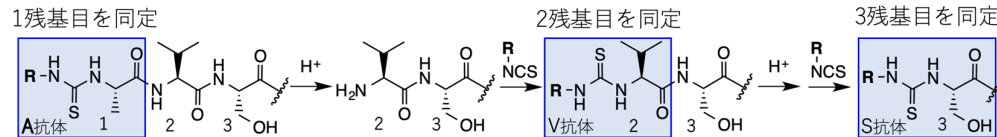
超並列ペプチド1分子アミノ酸配列決定法の開発

	研究代表者	名古屋大学・工学研究科・教授 村上 裕 (むらかみ ひろし)	研究者番号:10361669
	研究課題情報	課題番号: 23H05456 キーワード: ペプチド、タンパク質、一分子、配列決定、人工抗体	研究期間: 2023年度~2027年度

なぜこの研究を行おうと思ったのか (研究の背景・目的)

● 研究の全体像

「超並列ペプチド1分子アミノ酸配列決定法」を開発することで、超高感度・網羅的なタンパク解析法の開発を目指す。従来のタンパク質のアミノ酸配列決定では、タンパク質を酵素で限定加水分解して得られたペプチドを、エドマン分解、もしくはタンデム質量分析計で分析している。しかし、これらの手法を用いて、ペプチドの1分子アミノ酸配列決定は実現できていない。そこで村上グループでは、N末端アミノ酸として20種類の天然アミノ酸と12種類の翻訳後修飾アミノ酸をもつ各ペプチドに特異的に結合する人工抗体群、全反射照明蛍光顕微鏡、ガラス基板上でのエドマン分解を組み合わせ、ペプチドの1分子アミノ酸配列決定法の開発を行う (図1)。本方法では、生体試料から得たタンパク質を、プロテアーゼで限定加水分解し、主鎖と側鎖のアミノ基にエドマン分解試薬を反応させたあとに、ガラス基板上に共有結合を介して固定化する。次に、ペプチドのN末端アミノ酸を、それぞれのアミノ酸に特異的に結合する人工抗体により同定する。さらに、エドマン分解により1残基目を除いて、2残基目の主鎖のアミノ基にエドマン分解試薬を反応させる。このように逐次分解と抗体によるN末端アミノ酸の検出を繰り返すことで、ペプチドの翻訳後修飾を含むアミノ酸配列を逐次的に1分子で決定する。最後に、本申請で開発した、翻訳後修飾にも対応した超並列ペプチド1分子アミノ酸配列決定法を用いて、細胞から得たタンパク質の翻訳後修飾パターンを解析する。本技術が完成すれば、多様なペプチドの翻訳後修飾を含むアミノ酸配列を1分子レベルで並列的に決定できる。そのため、DNA次世代シーケンサーのような革新をタンパク質レベルでおこす、ペプチド次世代シーケンサーが開発できると考えられる。



複数のビデオ画像を撮る

画像から複数種類のペプチドの配列を1分子で決定!

図1 人工抗体を用いた超並列ペプチド1分子アミノ酸配列決定法

この研究によって何をどこまで明らかにしようとしているのか

本研究の鍵となるのは、エドマン分解試薬で修飾したペプチドN末端をアミノ酸特異的に認識して、ペプチドに結合する人工抗体である。人工抗体とは、抗体様タンパク質であり、抗体に比べて安価に生産できる、構造が単純で修飾が施しやすい、高速人工抗体創製法を用いることで動物への免疫を行うことなく迅速に結合分子の創製が可能、などの優れた特徴を持つ。村上グループでは進化分子工学的手法を駆使した高速人工抗体創製法を開発し、これまでにSARS-CoV-2中和抗体など様々な標的タンパク質に対して結合する人工抗体の創製に成功している。そこで本研究ではまず、ペプチドのN末端にエドマン分解試薬を反応させた標的分子を合成し、これを磁気ビーズに固定する。さらに、本磁気ビーズと、100兆種類からなる人工抗体ライブラリを混合して、磁気ビーズを磁石で集めることで、ペプチドのN末端に特異的に結合する人工抗体を得る (図2)。生物が産生するタンパク質は、基本的に20種類の決まったアミノ酸からなっている。そこで同様の操作を、これら20種類の天然アミノ酸をN末端に持つペプチドを標的として用いて行い、20種類の末端アミノ酸をそれぞれ認識することができる人工抗体を取得する (図3)。

一方、生物により合成される多くのタンパク質は、様々な修飾 (翻訳後修飾) によりその機能が制御されており、これら翻訳後修飾の研究が、生命を理解する上で不可欠なものとなっている。そこで、本研究課題では、20種類の天然アミノ酸の他に、翻訳後修飾を受けて合成されるいくつかの代表的な翻訳後修飾アミノ酸についても、人工抗体を創製する (図4)。

こうして人工抗体を創製した後に、これらを蛍光標識し、一分子を観察することができる全反射照明蛍光顕微鏡を用いて、図1に示した「超並列ペプチド1分子アミノ酸配列決定法」の開発を行う。

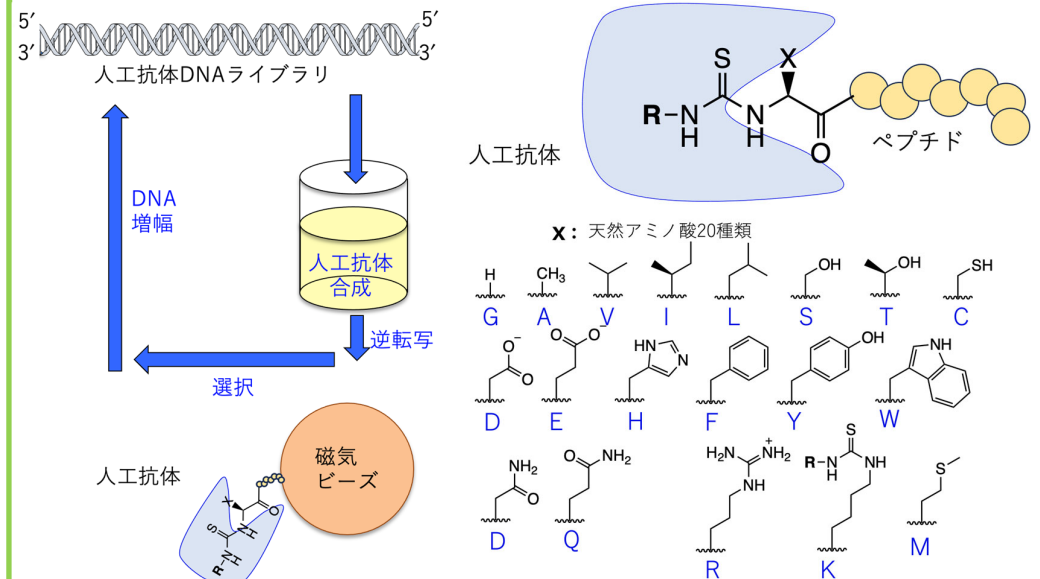


図3 一分子ペプチド配列決定法に対応する20種類の天然アミノ酸

図2 高速人工抗体創製法

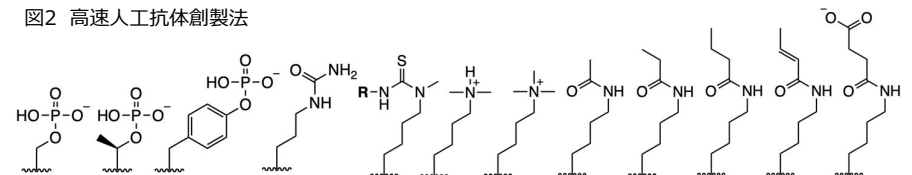


図4 一分子ペプチド配列決定法に対応する翻訳後修飾アミノ酸