

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		未知翻訳後修飾にも対応する翻訳後修飾の一斉定量分析法の開発			
研究テーマ (欧文) AZ		Quantitative proteomic analysis of known and unknown post-translational modifications by mass spectrometry			
研究氏 代表 者	カナ CC	姓)アダチ	名)ジュン	研究期間 B	2007 ~ 2009 年
	漢字 CB	足立	淳	報告年度 YR	2009 年
	ローマ字 CZ	Adachi	Jun	研究機関名	京都大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		京都大学地球環境学堂助教			
<p>概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)</p> <p>全ゲノム DNA の塩基配列の決定により、多くの生物では主に質量分析によって細胞内に存在するタンパク質の大規模同定、すなわちプロテオーム解析が研究の主流となってきている。プロテオーム解析も、タンパク質の同定から定量へと解析技術が発展しているが、翻訳後修飾されたタンパク質の解析に関しては一部の翻訳後修飾（リン酸化・ユビキチン化など）の大規模な同定が行われているが、データベースに登録されている約 300 種類にも及ぶ翻訳後修飾の大半はその修飾パターンや生物学的役割が未知である。</p> <p>本申請研究では、予測していない翻訳後修飾変化も捉えることが可能なプロテオーム解析システムを構築した。具体的には、蛋白質の定量には安定同位体アミノ酸標識(SILAC)法を用いた高精度な定量系を構築した。続いて、変化のあるペプチドのみを集中的に解析する Targeted MS/MS 法を実施するために、ナノ液体クロマトグラフィーの保持時間の変動係数を 0.5%以内におさえ、変化のあるペプチドのみを MS スペクトルから自動的に抽出、MS/MS 取得リストへ登録して、MS/MS スペクトルを得るシステムをつくった。さらに、未知翻訳後修飾を検出するために、MS/MS スペクトルの de novo 解析と Error Tolerant Search を並行して行うシステムを構築した。上記の技術を用いて、HepG2 細胞中で過酸化水素が引き起こす酸化修飾を探索したところ、12 個の蛋白質が変動していた。なかでもペルオキシレドキシシン 6 は 90%以上が酸化され、主にスルホン酸修飾されていることを同定した。SILAC 法を用いた場合、軽い親ピークと重い親ピークの MS/MS スペクトルを比較することで、γ イオンシリーズの帰属を明確に判断することができること、また特定の蛋白質を標的とした免疫沈降法と SILAC 法を組み合わせた SILAC-IP 法によって、より低存在量の修飾も検出できることを確認した。</p>					
キーワード FA	翻訳後修飾	プロテオーム解析	SILAC 法		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA									
研究機関番号 AC					シート番号									

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	アダクトミクス-DNA およびタンパク質付加体の網羅的解析							
	著者名 ^{GA}	松田知成、足立淳、 周佩欣	雑誌名 ^{GC}	実験医学					
	ページ ^{GF}	183~190	発行年 ^{GE}	2	0	0	9	巻号 ^{GD}	27
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

Large-scale identification of proteome by the mass spectrometry has become the main current of the research after the whole genome DNA sequence in a lot of living species. The proteomic analysis has been developed from the identification of proteins into the quantitative proteomic analysis. Some of post translational modifications (such as phosphorylation and ubiquitination) have been intensively identified in a large scale, however the majority of the PTMs registered in the database are still not known for their modification map and biological functions.

In this research, we constructed the proteome analysis platform to detect unexpected post-translational modification changes by combining various key technologies. More specifically, we employed Stable Isotopic Labeling using Amino Acids in Cell Culture (SILAC) for protein quantitation. Then we did targeted MS/MS approach to sequence only differentiated peptides. Reproducible retention time of our nano LC system (CV < 0.5%) and automatic extraction of differentiated peptides' peaks from MS spectra made targeted MS/MS approach effective to identify peptides which show altered ratio in abundance. In addition, to detect an unexpected post-translational modification, de novo sequence analysis and error tolerant search were employed in parallel. Using these techniques, we explored the oxidative modification caused by hydrogen peroxide in HepG2 cells. Twelve proteins showed altered ratio were identified. Among them, peroxiredoxin6 was oxidized more than 90 percent, and major oxidative modification form was sulfonic acid modification. Comparing MS/MS spectra from SILAC light and heavy parent ion peaks made possible to distinguish y-ion peak series from b-ion peak series clearly. Moreover, combination of immunoprecipitation for specific target proteins and SILAC (SILAC-IP method) was confirmed that the lower abundant modification can be detected.