

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 多 賀 祐 喜

論 文 題 目

質 量 分 析 を 用 い た 新 規 コ ラ ー ゲ ン 分 析 法  
の 開 発 と 応 用

### 論文審査担当者

主 査	名古屋大学准教授	灘 野	大 太
	名古屋大学教授	松 田	幹
	名古屋大学教授	牧	正 敏
	名古屋大学助教	大 島	健 司



## 論文審査の結果の要旨

コラーゲンは皮膚や骨、腱などの結合組織を構成する主要なタンパク質成分であり、組織の維持の他にも、細胞機能の調節など様々な役割を果たしている。組織でのコラーゲンの型組成や翻訳後修飾 [3-hydroxyproline (3-Hyp)、4-Hyp、hydroxylysine (Hyl)、galactosyl hydroxylysine (GHL) および glucosyl galactosyl hydroxylysine (GGHL)] が疾患などに関連して変化することは報告されているが、それらコラーゲンの質的变化の生体内での役割や意味はほとんど解明されていない。本学位論文では、コラーゲンの質をより詳細かつ正確に把握することで新たな知見の獲得へとつなげるため、質量分析を用いた新規コラーゲン分析法の開発を行った。その研究成果の概要を以下に記す。

(1) ヒドラジドケミストリーを用いたコラーゲン O 結合型糖鎖の部位特異的分析法の開発

コラーゲンに微量に存在する O 結合型糖鎖 GHL・GGHL について、高感度分析を可能にするためヒドラジドケミストリーを利用した新規精製法を開発した。本法ではまず、コラーゲンをトリプシン消化した後、ガラクトースオキシダーゼ酸化により GHL・GGHL に含まれるガラクトースの C6 位にアルデヒド基を生成させる。次に、これを樹脂に固定化させたヒドラジド基と反応させてヒドラゾン結合を形成させることにより、GHL・GGHL 含有ペプチドを精製する。最後に、酸性溶液中で加熱してヒドラゾン結合を切断することにより糖ペプチドのまま溶出させ、liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) でペプチド配列と糖鎖修飾部位を同定する。このヒドラジド法を用いてウシ I・II 型コラーゲンの分析を行った結果、過去に報告されていた糖鎖修飾部位のほとんどが同定された。さらに I・II 型コラーゲンそれぞれで新規修飾部位も同定され、これまでの分析法に比べはるかに網羅的かつ高感度な分析が可能であることが示された。

(2) ヒドラジドケミストリーと SILAC を用いた骨形成不全症によるコラーゲンの糖鎖修飾増加機構の解析

ヒドラジド法と代謝的安定同位体標識法 SILAC を組み合わせることにより、定量性を確保した GHL・GGHL 分析法を開発し、骨形成不全症 (osteogenesis imperfecta ; OI) で起こるコラーゲンの糖鎖修飾増加機構の解明を試みた。SILAC 標識によりサンプルを最初に混合することができるため、ヒドラジド法の低い回収率により懸念された定量性の低さや MS 分析でのイオン化効率の変動などを補正した高精度な比較定量が可能となった。本法を用いて、正常および OI 皮膚線維芽細胞が産生するコラーゲンで各部位での糖鎖修飾率の比較を行った結果、GHL 修飾は OI でほとんど変化しなかった一方、GGHL 修飾は OI で顕著に増加することが明らかとなった。また、OI のみで検出された糖鎖修飾部位は見つからなかった。以上のことから OI では、三重らせん形成遅延によりコラーゲン中特定の Lys のみで糖鎖修飾が進行し、一

連の反応の最終産物である GGHL が蓄積していくことが示された。

### (3) 安定同位体標識コラーゲンとこれを用いた各種コラーゲン分析法の開発

質量分析を用いたコラーゲン分析のための新たなツールとして、安定同位体標識コラーゲンの開発を行った。まず、ヒト胎児肺線維芽細胞を培養時、安定同位体標識された Lys、Arg および Pro を添加することにより、産生されるコラーゲンのそれらアミノ酸とその翻訳後修飾全てを安定同位体で標識した。その際、標識条件やコラーゲンの精製条件を最適化することにより、標識した全てのアミノ酸で約 95%以上という高い標識率を達成することができた。この高度に標識された安定同位体標識コラーゲンを内部標準として添加し、各種処理後に LC-MS で測定を行うことにより、トリプシン消化ペプチドを用いた型別コラーゲン定量、4-Hyp を用いた全コラーゲン定量、そして網羅的なコラーゲン翻訳後修飾定量を、操作間および測定間誤差を全て補正して行うことが可能となった。本法を用い、ラットの皮膚、骨および尾腱由来コラーゲンについて上記 3 種の分析を行った結果、過去の報告と非常によく一致する結果が得られ、さらにこれまで不可能であった微量成分の検出・定量も行うことができ、その高い測定精度と感度が示された。

### (4) 安定同位体標識コラーゲン分解物を用いた血中 Hyp 含有ペプチドの高精度定量分析

安定同位体標識コラーゲンをコラーゲン由来オリゴペプチドの測定に応用し、ゼラチン加水分解物経口摂取後に血中で検出される各種 Hyp 含有ペプチドの高精度分析法を開発した。Hyp 含有ペプチドの内部標準を作製するため、トリプシン、キモトリプシンおよび血漿プロテアーゼを用いて、体内でのタンパク質分解過程を模倣したペプチド生成を試みた。その結果、多様な Hyp 含有ペプチドを作製することができ、この安定同位体標識コラーゲン酵素分解物を用いることにより、ゼラチン加水分解物摂取後のヒト血漿サンプルで、計 13 種類の Hyp 含有ペプチドの同時分析が可能となった。また、それらの Hyp 含有ペプチドの定量値を合計した値が、ペプチド型 Hyp の定量値（安定同位体標識コラーゲン酸加水分解物を内部標準として用い酸加水分解前後の 4-Hyp 量から算出）と非常に近い値となり、安定同位体標識コラーゲン分解物を用いた両分析法の高い定量精度が示された。

以上のように、本学位論文では、質量分析を用いた新規分析法を開発することで、これまで困難であったコラーゲンの正確な分析を可能とし、そのアプローチに独創性、新規性が認められる。また、それらの分析法を用いて OI での糖鎖修飾増加機構の解析や新規血中 Hyp 含有ペプチドの測定などを行い、新しい知見を提出した。本学位論文で開発されたコラーゲンの新規分析法は、今後のコラーゲン研究の進展に大きく寄与することが期待される成果であると評価し、博士（農学）に値するものと判定した。

