

氏名	河上 麻美代
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬科学
学位記授与番号	博甲 第 5954 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科 薬科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)
学位論文の題目	質量分析による小胞型グルタミン酸トランスポーター 2 検出法の改良
論文審査委員	教授 上原 孝 (主査) 准教授 高杉 展正 准教授 安井 典久

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

質量分析法はタンパク質の構造や機能解析の有用な手法である。特に、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix-assisted laser desorption/ionizaion; MALDI) は、高分子のタンパク質やペプチドを検出することに適しており、特定のアミノ酸側鎖の官能基を特異的に架橋する化学修飾剤を用いることで、可溶性タンパク質の機能や相互作用が構造的に解析されてきた。この方法は膜貫通タンパク質である輸送体 (トランスポーター) への応用が期待されるが、輸送活性を保持したまま真核生物の膜タンパク質を大量発現させる方法がなかったこと、膜タンパク質は疎水性が高いこと、精製に必要な界面活性剤がイオン化を阻害すること等の問題点があったため、質量分析はトランスポーター研究において広く使われていなかった。

2010 年に大腸菌による真核生物のトランスポーターの大量発現・精製系が開発された。この方法は、大腸菌由来の可溶性 $\alpha$ ヘリックスタンパク質を cDNA の N 末端または C 末端に付加することにより、封入体を形成することなく膜タンパク質を発現できる。この膜画分を非変性の界面活性剤で可溶化させ、Ni-NTA アフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製することにより、輸送活性を保持した膜タンパク質を大量に得ることができる。

本研究では、この大腸菌による大量発現・精製系を用いることにより、上述した課題を解決することができるのではないかと考え、輸送活性を保持したトランスポーターの質量分析法を新たに構築することを目的とした。小胞型神経伝達物質トランスポーターは神経伝達物質をシナプス小胞に濃縮しており、伝達物質の種類と開始点を決定する重要な膜分子

である。この小胞型神経伝達物質トランスポーターに焦点をあて、大腸菌による大量発現・精製系に基づく質量分析法を構築し、小胞型グルタミン酸トランスポーター（**Vesicular glutamate transporter; VGLUT**）を質量分析し、高いカバー率でペプチド断片を検出した。この方法で**VGLUT**と化学修飾剤との結合を評価できることを実証した。さらに小胞型興奮性アミノ酸トランスポーター（**Vesicular excitatory amino acid transporter; VEAT**）と小胞型アセチルコチントランスポーター（**Vesicular acetylcholine transporter; VAcHT**）を質量分析し、他のトランスポーターにも適用できることを明らかにした。以上の結果から、大腸菌によるトランスポーターの大量発現・精製系を用いて、輸送活性を保持したトランスポーターの質量分析法を構築できたと結論した。この方法でトランスポーターへの化学修飾剤の結合を評価することは、基質結合部位や阻害薬結合部位の探索などに有効であり、トランスポーターの構造解析に応用できると期待される。

## 論文審査結果の要旨

先に提出された初稿の学位論文では、実験手法に加えデータの解釈に多くの誤りが指摘されており、この点の再検討が必須であることを伝達した。さらには、実験結果に基づく考察の展開、結果がもたらす意義について不明瞭な部分があることを審査委員会で指摘された。また、一部の実験において適切なコントロールが取られていない点や解析方法に問題があり、明瞭な結論を得るには不十分な箇所も見受けられた。2回に渡る審査委員会と最終試験での議論を介して、これらの問題点に対して、申請者は適当な訂正・修正を行ったことを認めた。審査委員会ではこの点を踏まえ、本学位論文は学術的な意義を有していることで意見が一致した。したがって、博士の学位に値すると判断し、最終的に合格とした。