

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 久保田 一石

質量分析は 1980 年代の革新的な二つのイオン化法の発見、それに続く 1990 年代の質量分析装置の革新、蛋白質アミノ酸配列データベースの拡充、ソフトウェアの開発により近年飛躍的に進歩し、フェムトモルレベルでの蛋白質の同定、翻訳後修飾の解析が可能となってきた。この質量分析技術を用いた蛋白質解析は、蛋白質の網羅的解析であるプロテオーム解析の最重要基盤技術であり、プロテオーム解析以外にも様々な応用が試みられている。

一般に医薬品は蛋白質に作用することで効果を発揮する。そのため現代の創薬プロセスでは、初めに創薬の標的となる標的蛋白質の探索が行われる。画期的な新薬の研究開発には、画期的な新規標的蛋白質が必須であり、効率的な創薬標的蛋白質の探索研究は創薬における最初の重要なステップである。

本論文では近年急速に発展した質量分析による蛋白質解析技術を用いて、骨代謝疾患治療薬の標的探索、抗ウイルス・抗腫瘍薬の標的探索及び妥当性評価、関節リウマチ治療薬の妥当性評価法の開発など創薬標的蛋白質研究の成果について述べている。

第 1 章は序論であり、論文の構成、研究の背景、研究の目的について述べている。

第 2 章では破骨細胞分化過程に分泌される蛋白質を対象として、骨代謝疾患治療薬の標的探索を行った結果について述べている。すなわち、破骨細胞分化過程で増減する分泌蛋白質の網羅的プロテオーム解析を行い、既に報告のある蛋白質のみならず、新規蛋白質の同定に成功している。プロテオーム解析の手法としては蛋白質の網羅性を高めるため、2 次元電気泳動法とショットガン解析法の一つである Isotope-coded affinity tags (ICAT)法を用いている。これらの同定された蛋白質は骨リモデリング過程の調節蛋白質候補であり、かつ薬剤の標的蛋白質候補であると述べている。さらに、破骨細胞分化過程で分泌される骨芽細胞分化抑制活性を見出し、その本体が血小板由来増殖因子であることを、複数種類のクロマトグラフィーの組み合わせによる精製、質量分析による同定、中和抗体を用いた妥当性評価により確認している。このような骨芽細胞分化抑制因子の同定は、質量分析を前提とした超微量蛋白質精製系を構築することにより初めて可能となった。破骨細胞より分泌される骨芽細胞分化調節因子は初の知見であり、血小板由来増殖因子は骨粗鬆症治療薬の有力な候補蛋白質であると述べている。

第 3 章では抗ウイルス・抗腫瘍作用を持つインターフェロン(IFN)の作用機序に關与

する RNA 分解を介した細胞またはウイルスの制御系を対象として、その調節分子 5'-triphosphorylated, 2', 5'-phosphodiester-linked oligoadenylates (2-5A) を分解する酵素 2'-phosphodiesterase (2'-PDE) を創薬標的蛋白質として選定し、その精製・同定、その機能解析を通して薬剤標的としての妥当性評価について述べている。この 2'-PDE と呼ばれる酵素は、その活性は古くから知られていながら、その実体は明らかにされていなかった。本研究において質量分析を前提とした超微量精製スキームを構築することにより、初めてそのクローニングに成功している。この 2'-PDE の過剰発現株では IFN・二本鎖 RNA による細胞増殖阻害が有意に軽減された。反対に、RNA 干渉による 2'-PDE の発現抑制、低分子化合物による 2'-PDE の酵素阻害によって、有意にウイルス増殖が阻害された。これらの結果から、2'-PDE は RNA 分解を介した細胞またはウイルスの制御系の負のレギュレーターとして作用し、本酵素が創薬標的蛋白質として有望であることが示されたと結論づけている。

第 4 章では翻訳後修飾の一つであり、関節リウマチ発症との関連が報告されている Peptidylarginine deiminase (PADI) によるフィブリノーゲンのシトルリン化部位を質量分析により解析し、関節リウマチ治療薬の妥当性評価を行う技術の開発について述べている。すなわち、有望な創薬標的蛋白質である PADI4 と、滑膜細胞で発現しているアイソフォーム PADI2 によるフィブリノーゲンのシトルリン化される Arg 残基部位を、脱イミノ化反応によるシトルリン化に伴う +1 Da の質量変化を利用して同定する方法を開発した。さらに、Asn、Gln 残基の脱アミド化に伴う +1 Da の質量変化と Arg 残基のシトルリン化に伴う +1 Da の質量変化を簡便に区別することが可能な新規シトルリン化部位同定法の開発も行った。すなわち、 $H_2^{18}O$  を反応液中に 50% 含ませることによって、シトルリン基に取り込まれる  $H_2O$  由来の酸素が  $^{16}O:^{18}O=1:1$  となるため、質量スペクトル上で Arg 残基のシトルリン化に伴う +1 Da の質量変化 : +3 Da の質量変化 = 1 : 1 となる人工的な同位体ピークを生成させることが可能となり、効率的な同定を実現した。

第 5 章では本研究の総括及び今後の展望について述べている。

本論文は創薬標的蛋白質の探索及び妥当性評価を目的として、質量分析技術を最大限活用する実験系を考案・構築し、プロテオーム解析、超微量蛋白質精製、翻訳後修飾解析へと応用したものであり、化学生命工学、特に蛋白質工学、プロテオミクス、さらにゲノム創薬分野への発展に寄与するところ大である。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。