

論文の内容の要旨

論文題目 微量タンパク質の質量分析技術開発とその食品・医薬品への応用

氏名 山田 尚之

ゲノム配列解析技術の著しい発展により、近年、多くの生物種で全遺伝子配列解析が進展し、その膨大な配列情報はデータベースとして継続的に蓄積されている。蓄積された遺伝子データベースは、遺伝子あるいはその発現に関する大規模解析から生命現象を解明するゲノミクスという新しいアプローチの発展に大きく寄与している。ゲノムを対象としたゲノミクスに対して、プロテオーム（タンパク質の総和）を包括的に解析する手法はプロテオミクスと呼ばれる。これは、上記遺伝子データベースの他に、質量分析を中心とした微量タンパク質解析技術を基盤としている。生命現象の直接の担い手であるタンパク質を包括的に解析するプロテオミクスは、基礎生命科学のみならず、基礎・臨床医学、創薬、農学即ち発酵等の生物生産、食品科学、酵素学などの幅広い分野で重要な役割を果たし始めている。昨今では、特に医薬品開発や医療分野において、創薬ターゲットタンパク質や疾患関連マーカーの新しい探索方法として期待されている。

基盤となるタンパク質の質量分析は、1960年の **Biemann** らのペプチド配列解析研究から始まり、その後日本と米国を中心に発展してきた。申請者が所属する研究室もその一つであり、一次構造解析だけでなく高次構造および相互作用解析の新しい方法論を確立してきた。

このような微量タンパク質解析技術は、医学・薬学のみならず、健康食品の開発や食品の安全・安心の実現など、幅広く人類のために応用できると考えられる。中でも食

物アレルギーを引き起こす抗原タンパク質を高感度に検出する技術は本研究以前には未だなく、微量タンパク質解析技術はこのような食品の安全・安心に貢献できる筈である。

一方、包括的かつ大規模解析には、高感度であることに加えて耐久性と堅牢性が重要な課題となってきた。また、プロテオミクス等で見出された創薬ターゲットの機能解析や低分子薬剤の設計を行う上で、立体構造及び相互作用解析の重要性が増している。X線結晶構造解析やNMRを用いたタンパク質の構造解析技術は、これを解決する強力な手法であるが、解析に必要な試料量と時間に課題があり、より簡便で高感度の手法開発の必要性が高まっている。

このような背景のもと、本研究では、①食品の安全・安心を支えるための微量タンパク質分析法の開発、②微量タンパク質同定のための耐久性と堅牢性の高い質量分析基盤技術およびタンパク断片化技術の開発、③タンパク質 2 次構造および相互作用部位解析技術の開発、の都合項目の研究開発を実施し、食品・医薬品に対して具体的に実用的化することが目的である。食品、医薬品への具体的応用としては、各々、食品用アミノ酸・核酸製品の食品アレルギー対策用分析技術開発、リウマチ治療薬開発基盤としての意義があるサイトカイン、即ち、抗ヒト・インターロイキン-6（ヒト IL-6）中和抗体のエピトープ解析法開発を実施した。特に、タンパク断片化技術は、立体構造情報や相互作用情報をも含む点で極めて重要である。以下、実施した研究の概略を述べる。

1) 食品用アミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質分析法の開発

食品アレルギーの主たる原因物質はタンパク質であり、アレルギー症状を誘発する抗原量に関しては、個人差はあるものの、総タンパク質として数 $\mu\text{g/g}$ レベルでは殆ど誘発しないであろうと考えられている。食物アレルギーを持つ消費者保護の観点から、日本国内においては平成 14 年度より、アレルギー物質を含む食品にはその表示が義務化された。抗原タンパク質の種類については、発症数、重篤度から勘案して特定原材料 5 品目(卵、乳、小麦、そば、落花生)についてはその表示が義務化されており、その測定手段として、抗原-抗体反応を用いた ELISA 法が確立されている。しかし、これ以外のアレルゲンについては良い方法がない。一方、日本においても遺伝子組み換え技術を用いた食品が一部で流通するようになっているが、未だに消費者の不安が大きく残っている。抗原性を有する可能性がある遺伝子組み換え体由来のタンパク質の残存が危惧されている。

一方、調味料や食品素材は多くの加工食品の中に添加されており、天然のうま味成分であるグルタミン酸、イノシン酸、グアニル酸は世界中で使われている。アミノ酸もサプリメントや医療用途として用いられている。これら食品・医薬用のアミノ酸・核酸は、非常に高度に精製されているため、タンパク質はほとんど含まれていないと推察される。

しかしながら、上述した社会的背景の下、アミノ酸・核酸中の残存総タンパク質量を数 $\mu\text{g/g}$ レベルで検出できる測定法を開発することは、食品の安心と安全を支える上で重要である。本研究では、プロテオミクスの技術であるドットプロット法と蛍光染色法を組み

合わせることで、さらにアミノ酸の溶解度が高い酸性条件にすることにより、アミノ酸・核酸中の残存タンパク質（検出限界 $1 \mu\text{g/g}$ ）分析法を確立し、製品の安全性を保証する技術として実用に供することができた。

2) 微量タンパク質同定のための質量分析基盤技術開発

大規模解析においては、感度と解析スピードと自動化は大変重要である。質量分析によるタンパク質同定は、液体クロマトグラフィー（LC）とタンデム質量分析計（MS/MS）を組み合わせた LC-MS/MS が用いられる。一般的には、研究対象試料となるタンパク質混合物をトリプシンなどのプロテアーゼで消化し、ペプチドとして測定する。高感度化のため内径 $75 - 300 \mu\text{m}$ の微細なカラムとそれに対応した流速（ $50 - 300 \text{nL/min}$ ）の HPLC が使われる。イオン化にはナノエレクトロスプレーイオン化法（ナノ ESI 法）が必須である。ナノ ESI 法では、内径が数十 μm のフューズドシリカ製細管（エミッター）が広く使用されている。伝導性を付与するために金属薄膜あるいは伝導性高分子薄膜を被覆するが、物理的な強度が弱いことに加え、イオン化による高電圧印加で皮膜が剥離し、安定したイオン化能を維持することが困難であった。本研究では、伝導性と耐久性を兼ね備えたステンレスで内径 $30 \mu\text{m}$ 細管のナノ ESI 用エミッターを作成した。その結果、従来品と同等以上の感度を持ち、数週間以上の連続測定に耐えうる微量タンパク質同定システムを開発することができた。

3) 微量タンパク質同定のためのタンパク断片化技術開発

タンパク質を酵素消化等の前処理なしに質量分析計（MS）の中で断片化し、迅速かつ高感度に同定しようとする新しい方法論は、“トップダウン・プロテオミクス”と呼ばれ、次世代のタンパク質同定法として期待されているが、断片化できるタンパク質の分子量に制限があることが最大の課題である。ヒト・アポトランスフェリン（ 79kDa ）がこれまで断片化に成功した最大のタンパク質であり、これ以外は 30kDa 以下の限られたタンパク質の報告しかない。本研究では、独自に開発した金属製ナノ ESI 用エミッターの耐久性を活用し、イオン源付近の温度を 250°C 以上に加熱し、分子イオンに熱エネルギーを与えることにより、断片化効率を向上させる方法を開発した。その結果、これまで困難であったリゾチームや BSA の断片化の効率が著しく向上するとともに、部分的ではあるが IgG2b（ 150kDa ）の高分子量タンパク質の断片化にも成功した。

4) 断片化技術のタンパク質 2 次構造情報抽出への応用

立体構造未知のタンパク質アミノ酸配列からその立体構造を予測することは、機能の類推やタンパク質工学に活用されている。しかし、計算化学により構築されたモデル構造や 2 次構造予測は実験による検証がなされていない。そこで、分解能は低いながらも、簡便に 2 次構造情報得られる技術には大きな期待があり得る。本研究では、MS でタンパク質

を断片化した際に、 α ヘリックスや β シートなど、しっかりとした構造を持つ部分が切断されにくい傾向があることを複数のタンパク質で見出した。断片化スペクトルを詳細に解析することにより、これらの部分的立体構造情報を抽出できる可能性が示唆され、予測構造の評価に利用できるものと期待している。

5) タンパク質断片化技術の相互作用部位解析への応用

タンパク質は単独で静的に存在するだけで機能することはなく、低分子あるいはタンパク質などの生体高分子と動的に相互作用することで機能を発現する。創薬ターゲットタンパク質の機能や低分子薬剤の設計を行うためには、相互作用部位を明らかにする必要がある。最も有効な手段は、X線結晶構造解析やNMRによる複合体の構造解析である。一方、H/D交換反応とMSを用いた手法は、情報は少ないものの簡便かつ迅速な手法である。一般的な方法は、複合体を形成させた後、H/D交換を行い、経時的にpepsin消化、あるいはMS内での断片化により、断片ペプチドの質量変化を追跡する方法である。しかし、高分子量のタンパク質複合体の場合、得られるデータが膨大となり、解析が非常に困難になることが課題であった。本研究ではこれを解決するために、一方のタンパク質をゲルに固定化し、複合体形成とH/D交換反応をアフィニティーカラム内で行い、その後、酸性溶媒を用いて、H/D交換速度を低下させるとともに、複合体を解離させる手法を開発した。これにより、データ解析を軽減することが可能となった。この手法をリュウマチ治療薬創製に関わるヒトIL-6とその中和抗体の相互作用部位解析で検証・応用した。その結果、抗IL-6中和抗体は、ヒトIL-6のC末端付近を認識することで、受容体gp80との結合を阻害し、中和活性を持つことが示唆され、実用性があることを示すことが出来た。