

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山田尚之

本論文は、タンパク質の包括的解析法であるプロテオミクスの質量分析基盤技術開発とその食品・医薬品への応用研究を行ったものであり、8章からなる。

第一章では、タンパク質の質量分析の歴史とこれを発展させたプロテオミクスの現状について述べている。

第二章では、食品アレルギーに対する安心と安全を保证するためのアミノ酸・核酸製品中の微量タンパク質分析法の開発において、アレルゲンである抗原タンパク質の分析に関する課題とこれを解決する分析手法開発について詳細を議論している。プロテオミクスの技術を応用し、ドットプロット法と高感度タンパク質蛍光染色試薬 (SyproRuby) により、標準試料 (牛血清アルブミン、卵白リゾチーム、ユビキチン、牛インスリン、酸化型インスリン B 鎖) を 0.1 ppm で検出できる検出法を確立した。さらに、アミノ酸の溶解度が高い 1 N 塩酸を用いることにより、アミノ酸重量あたり 1 ppm の検出下限で残存タンパク質の検出を行うことを可能とした。実試料として食品用アミノ酸及び核酸 25 品目を測定した結果、全て検出下限以下であることを明らかにした。本法の検出下限は、アレルギー症状を誘発すると危惧される数 ppm よりも低く、アミノ酸・核酸製品に対する食品アレルギーの懸念を除くに十分な性能を持つ手法であると結論づけた。

第三章では、質量分析による微量タンパク質同定の基盤技術であるナノエレクトロスプレーイオン化 (ナノ ESI) において、現状の課題である脆弱性を克服するためのエミッターの設計・製作とその性能について詳細を議論している。強度と耐久性が低いフーズドシリカ製のエミッターに対し、導電性と耐久性を併せ持つステンレスを用いて内径 30 ミクロンのストレート細管を作成した。50 - 200 nl/min の低流量域で ESI の効率を高めるために、内径を可能な限り細くすること、先端をテーパ加工すること、また、目詰まりを回避するために直管の形状にするなどの鋭意工夫をしている。質量分析計に搭載し、タンパク質の酵素消化物測定で感度と耐久性を評価し、フーズドシリカ製と比較して感度を維持したまま、高い耐久性を獲得していることを実証した。膨大な試料を分析する必要のあるプロテオミクスにおいて、長期間連続測定に耐えうる技術であると結論づけた。

第四章では、タンパク質を酵素消化等の前処理なしに質量分析計の中で断片化し、迅速かつ高感度に同定する新しい方法論 “トップダウン・プロテオミクス” の要素技術である高分子量タンパク質の断片化法について、熱エネルギーを付与することにより、断片化効率を向上させる新たな手法を開発し、そのメカニズムと効果について詳細に議論している。フーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析計 (FT-MS) に耐久性の高いステンレス製ナノ ESI エミッターを搭載し、イオン化領域を 250 ~ 350 °C に加熱することによ

り、ユビキチンや牛血清アルブミンにおいて従来よりも断片化効率が向上し、タンパク質同定が可能であることを明らかにしている。さらに、ジスルフィド結合を有するリゾチームや高分子量タンパク質である IgG2b といったこれまで断片化が困難なタンパク質においても良好なスペクトルを得ることができ、測定限界分子量を大きく更新した。

第五章では、質量分析計でタンパク質の断片化した場合、 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を見出し、断片化スペクトルからの 2 次構造情報取得の可能性について、詳細に議論している。データ解析ソフトを作成し、FT-MS を用いたノズルスキマーCID 法および IRMPD 法で得られたタンパク質の断片化イオンを詳細に帰属したところ、 α ヘリックスや β シートは、断片化を受けにくい傾向があることを複数のタンパク質（インターロイキン-6 (IL-6)、ユビキチン、ウシミオグロビン、carbonic anhydrase）で見出した。タンパク質断片化スペクトルを解析することにより、2 次構造を形成している部位の情報を抽出できる可能性がある結論している。

第六章では、タンパク質断片化法に、水素/重水素 (H/D) 交換法およびアフィニティークロマトグラフィー法を組み合わせることによるタンパク質-タンパク質相互作用解析法の開発し、さらにこの手法を活用し、リウマチ治療薬開発基盤としての意義がある抗ヒト IL-6 中和抗体のエピトープを明らかにし、その中和活性の機構について詳細に議論している。相互作用部位のみを D 化させる H/D 逆交換反応の反応条件の検討とアフィニティークロマトグラフィーの至適条件設定を行っている。抗体を固定化することにより、質量分析の対象を IL-6 のみとすることでデータ解析を容易にしている。さらに、複合体を形成していない IL-6 分子を排除することでノイズデータを削除している。質量分析に適した溶媒を用いるなどの工夫を行い、H/D 逆交換反応後、溶出した IL-6 をノズルスキマーCID 法及び IRMPD 法で断片化、スペクトルを帰属し、D 化率を求めている。その結果、Val 11・Asp 26, Leu 126・Lys 131, Asp 160・Met 184 の 3 つの領域において D 化率が高く、IL-6 と中和抗体 MH166 の相互作用部位であることを明らかにした。IL-6 の立体構造と多くの変異体研究の知見から、MH166 は IL-6 の受容体 IL-6R (gp80) との結合を阻害することで中和活性を発揮していると結論づけている。

第七章では、全体を通したディスカッションを行い、質量分析技術を中心としたプロテオミクス技術開発研究の成果と意義、そして今後の展望について述べている。

第八章では研究の全体を総括している。

以上、本論文は、プロテオミクスの技術的発展と応用拡大を示したものであり、具体的には、①食品の安全・安心を支えるための微量タンパク質検出法の開発、②微量タンパク質同定のための耐久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を実施し、具体的応用として、アミノ酸・核酸製品の食品アレルギー対策用分析、リウマチ治療薬開発基盤としての意義がある IL-6 中和抗体のエピトープ解析を実施した。特に、タンパク質断片化技術は、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り、将来的なプロテオミクスの発展に向けて、基礎的な研究として貢献し得るものである。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値があるものと認めた。