

論文審査の結果の要旨

氏名 植田 幸嗣

本論文は、2章からなり、第1章は MALDI-QIT-TOF 質量分析計を用いた高感度スクリーニング法の開発、第2章は、Lectin-coupled ProteinChip システムと SELDI-TOF 質量分析法を用いた血清糖タンパク質のハイスループットプロファイリングについて述べられている。

本研究は、近年本邦において全悪性新生物による死亡数のうち、男性で1位、女性で2位を占めており、死亡数の増加率が全がんで1位である肺癌（平成17年厚生労働省人口動態統計）における早期診断が可能な新規バイオマーカーの開発を目的に行った。その手法として、2種の異なるグライコプロテオーム解析を用いて、肺癌の早期診断や予後予測のバイオマーカーとなり得る、血清タンパク質上の癌特異的糖鎖構造を網羅的に同定する解析法を構築した。

1) $^{12}\text{C}_6^-$, $^{13}\text{C}_6^-$ -NBS 安定同位体ラベル法と MALDI-QIT-TOF 質量分析計を用いた高感度スクリーニング法

血清を構成するタンパク質の濃度幅は、最も多量な成分（アルブミンなど）から微量タンパク質（インターロイキンファミリーなど）まで、実に 10^{14} 以上にも及ぶ。しかしながら現行の質量分析計のダイナミックレンジは $10^3 \sim 10^5$ に過ぎない。したがって、腫瘍マーカーとして主に用いられているタンパク質 ($10^{-1} \sim 10^2$ ng/ml) を検出するには、従来法通り多段階の分画精製を行うだけではなく、検出すべき対象を特異的に単離、分析する Focused Proteomics の技法が重要な意義を持つ。

本研究では、①抗体カラムを用いた血中多量タンパク質の除去、②レクチンカラムによる糖鎖構造特異的な糖タンパク質精製、③ $^{12}\text{C}_6^-$, $^{13}\text{C}_6^-$ -nitrobenzenesulfonyl (NBS) 安定同位体タグによるトリプトファン特異的ラベル、④2D- μ HPLC によるペプチドの分画、⑤Matrix assisted laser desorption/ionization-Quadrupole ion trap-Time of flight mass spectrometry (MALDI-QIT-TOF MS) による定量解析及びタンパク質同定の5段階から構成される糖鎖標的腫瘍マーカー候補の網羅的スクリーニング法を構築した。解析サンプルには、文部科学省リーディングプロジェクト「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」のバイオバンクジャパンにおいて収集されたIV期肺腺癌患者血清5症例を使用した。

①では、血清中から MARS Hu-6 column (Agilent technologies) を用いて、血清タンパク質総質量の88%を占める6種類の多量タンパク質を除去した。続いて②でN型糖鎖基幹部分に存在する Fucose($\alpha 1, 6$)N-acetylglucosamine 構造を特異的に認識する *Lens culinaris* (LCA) レクチンをアガロースビーズにカップリングしたレクチンビーズを HPLC カラムに充填し、 μ HPLC によって Fucose($\alpha 1, 6$)N-acetylglucosamine 構造を持つ血清タンパク質を特異的に濃縮、精製した。LCA レクチンカラムを用いたこの精製でのタンパク質収率は約8%であった。

ここまで精製を行ったサンプルでも、その構成成分の濃度分布は非常に広く、血中微量タンパク質の質量分析による検出が困難であった。そこで定量的質量分析用のアイソトープタグとして $^{12}\text{C}_6$ -, $^{13}\text{C}_6$ -NBS ラベルの使用を選択した (③)。このタグはタンパク質中のトリプトファン残基のみに共有結合する。さらに、ラベル化タンパク質をトリプシン消化した後、フェニルカラムクロマトグラフィーによって容易に非ラベルペプチドを除去することが可能である。トリプトファンは *in silico* プロテオーム解析によって全タンパク質の 96%に少なくとも 1 つ以上含まれることがわかっているが、最も低頻度に出現するアミノ酸残基であるため、非ラベル化ペプチドをあらかじめ除去することにより、網羅性を維持しつつ解析母集団を大幅に削減することができる。このステップにより、検出タンパク質数の増加だけでなく微量タンパク質の検出感度を大きく向上することができた。

$^{12}\text{C}_6$ -NBS でラベルした健常者ユニバーサルコントロールと、 $^{13}\text{C}_6$ -NBS でラベルした各肺癌症例サンプルを混合後、 $1.0 \times 50 \text{ mm PolySULFOETHYL A column (PolyLC)}$ 、 $0.3 \times 150 \text{ mm CAPCELL PAK C18 MGII column (資生堂)}$ から構成される $2\text{D-}\mu\text{HPLC}$ を用いて 1 サンプルセットを 1192 フラクションに分画し、MALDI ターゲットプレートにマトリクスと共に自動分注した (④)。ここで、NBS タグ中のニトロ基は質量分析器内でラジカル反応により崩壊し、 -14 、 -16 、 -30 Da の質量を持つ二次生成イオンを与えるため、 $2,5\text{-dihydroxybenzoic acid (DHB)}$ と $4\text{-hydroxy-3-nitrobenzoic acid (HNBA)}$ を混合した独自のマトリクスを開発し、タグの PSD (Post source decay) を最小限に抑制できることを見いだした。

これら $1192 \text{ fraction} \times 5 \text{ samples}$ に対して MALDI-QIT-TOF MS 解析を行い、そのスペクトルから得られたピークの質量数、強度をデータベース化した。 $^{12}\text{C}_6$ -NBS と $^{13}\text{C}_6$ -NBS の間には 6 Da の質量差が存在するため、健常者血清サンプル中に存在した糖タンパク質と、肺癌患者血清サンプル中に存在した同タンパク質の量比はこの 6 Da 差のピーク強度を比較することで求められる。また、従来通りレクチンカラム精製後サンプルを用いた定量比較のみでは、 $^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$ のピーク強度に有意差があったとしても、それが糖鎖構造変化に由来するものなのかコアタンパク質の存在量比に由来するものなのか判断できない。この問題点を克服するために、本研究では LCA レクチンカラム精製前のサンプルも同様に定量解析を行い、LCA レクチンカラム精製後のサンプルから得られた定量解析結果からコアタンパク質自体の量比を差し引くことによって、糖鎖構造変化にのみフォーカスした定量解析を可能とした。

肺癌患者血清 5 例に対して上記解析を行った結果、レクチンカラム精製後サンプルから計 2549 の $^{13}\text{C}_6/^{12}\text{C}_6$ ペアピークが検出され、そのうち 170 ペアで肺癌患者血清中での Fucose ($\alpha 1, 6$) N-acetylglucosamine 構造付加率の亢進が、150 ペアでは減少が予測された。この合計 320 ペアピークに対して MALDI-QIT-TOF MS/MS によるタンパク質同定を試み、175 ペアの MS/MS スペクトルから NBS ラベル化ペプチドを確認した。これ以外は MS/MS スペクトルが十分な強度で得られなかったもの、もしくは偶発的に 6 Da の質量差を持った別のペプチドが同じフラクションから検出されたものであった。この 175 ペアから、最終的に 65 ペプチドの配列の同定に成功し、これらは 34 個のタンパク質に帰属された。

この 34 タンパク質の糖鎖標的腫瘍マーカー候補から、肺癌患者血清において顕著なフ

コシル化亢進、もしくは減少が予測された Haptoglobin と Pigment epithelial differentiating factor (PEDF) について、レクチンブロット、及び MALDI-QIT-TOF MSⁿ を用いた糖鎖構造解析による確認実験を行った。スクリーニングに使用した血清サンプルを含む健常人 10 例、肺癌患者血清 10 例を用いた検証実験の結果、Haptoglobin、PEDF 上の N 型糖鎖には $\alpha 1, 6$ フコシル化の高頻度な増加、減少がそれぞれ検出できた。また、フコシル化頻度増減の割合も NBS ラベル法での定量結果とよく一致していた。

これらのことから、本研究で樹立した糖鎖標的腫瘍マーカーの網羅的同定法は、血清タンパク質上の特定の糖鎖構造変化を、高感度かつ定量的に検出することが可能であることが示された。本手法はレクチンの種類を増やすことで、あらゆる疾患の血清中での多様な糖鎖標的バイオマーカー探索に応用が可能であると考えられた。

2) Lectin-coupled ProteinChip システムと SELDI-TOF 質量分析法を用いた

血清糖タンパク質のハイスループットプロファイリング

前述のスクリーニング法開発に加え、さらなるスループットの向上、レクチン精製ステップの簡便化を目的として、レクチン結合 ProteinChip と Surface enhanced laser desorption/ionization- Time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) を用いた糖タンパク質プロファイリング法を構築した。

本手法では MARS Hu-14 column (Agilent technologies) を用いて、血清タンパク質総質量の 94% を占める 14 種類のタンパク質を除去した血清サンプル 20 例をレクチン結合 ProteinChip との反応に使用した。このサンプルをそれぞれ N-acetylgalactosamine-Ser/Thr^{*} 構造を持つ O 型糖鎖全般を認識する Jacalin レクチン、もしくは N-acetylneuraminic acid ($\alpha 2, 6$) Gal/N-acetylgalactosamine^{*} 構造を特異的に認識する SNA レクチンを結合させた ProteinChip にアプライし、目的の糖鎖構造を持つタンパク質をトラップしたそれら ProteinChip を直接 SELDI-TOF MS にて解析した。

これまで、通常使用されるマトリクス (CHCA, DHB, SPA など) を用いると N 型、O 型糖鎖上に存在するシアル酸残基の顕著な脱離が起き、糖タンパク質定量解析において大きな障害となっていた。しかし 2, 4, 6-Trihydroxyacetophenone (THAP) をマトリクスとして使用することによってこの崩壊を最小限に抑えられることを見だし、酸性糖タンパク質の正確な定量解析を可能とした。

この解析から、肺癌患者血清において N-acetylneuraminic acid ($\alpha 2, 6$) Gal/N-acetylgalactosamine 構造に高頻度の欠失が予測される質量数 9851 のピークが検出された。このピークに相当するタンパク質を、陰イオン交換スピンカラム、Tris-tricine SDS-PAGE によって濃縮、精製し、最終的に MALDI-QIT-TOF MS/MS 解析から apolipoprotein C-III (APOC3) タンパク質であることを明らかにした。さらに、同 MS³ 解析により APOC3 タンパク質上の O 型糖鎖結合部位の同定にも成功した。

次に、各種 sialidase、Endo- α -N-acetylgalactosaminidase 処理、および MALDI-TOF MS リニアモードでの解析によって APOC3 の一箇所の糖鎖結合部位には I: N-acetylneuraminic acid ($\alpha 2, 3$) Gal ($\beta 1, 3$) [N-acetylneuraminic acid ($\alpha 2, 6$)] N-acetylgalactosamine、II: N-acetylneuraminic acid ($\alpha 2, 3$) Gal ($\beta 1, 3$) N-acetylgalactosamine の 2 種類の糖鎖構造があることを明らかにした。さらにスクリー

ニングに用いた 20 症例と同じサンプルを用いたウェスタンブロッティング解析により、健常者血清では糖鎖構造 I の方がメジャーであるが、肺癌患者血清では高頻度に構造 II の存在量の方が多くなっていることが確認され、この結果は ProteinChip を用いた定量的プロファイリングの結果とよく一致していた。

本スクリーニング法は、マーカートンパク質の同定を別途行わねばならない短所があるが、多検体から極めて迅速に糖鎖構造プロファイルを得ることができる処理能力を有しており、統計学的処理によって確実性の高い糖鎖標的腫瘍マーカースクリーニングが可能になることが示された。

なお、本論文は、片桐豊雅、嶋田崇史、入江新司、佐藤孝明、中村祐輔、醍醐弥太郎との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証をおこなったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。