

## 審査の結果の要旨

氏名 合田 竜弥

ポリペプチド(タンパク質及びペプチドの総称として使用)は、発現遺伝子群の最終産物であり、細胞の形態や機能を直接制御している。そのため、癌化等により細胞の形態や機能が変化する過程で、個々のポリペプチドの発現量、翻訳後修飾なども変化する。この変化したポリペプチドを、例えば疾患関連バイオマーカーとして捉えることで、疾患の早期診断や原因解明を目指したプロテオミクス研究が、逆相液体クロマトグラフィー(LC)-質量分析計(MS)を用いて盛んに行われている。しかし、LC-MS を用いた生体試料中のポリペプチドの高感度定量の報告例は極めて少ない。この主たる要因として、ポリペプチドの容器等に対する吸着が挙げられる。これまで、この吸着を回避するために、アルブミンのようなポリペプチドや界面活性剤の添加が有効であることが示されてきた。しかし、これら添加物の効果を測定対象毎に確認しなければならない一方で、これらの LC への導入は、カラムの詰まりや劣化を促進すると共に感度低下を引き起こすために、これらを含む試料の LC への導入量は大きく制限される。そのため、従来報告されている LC-MS 法の定量下限は nM レベルであり、一般的に定量下限が数 pM である免疫学的手法と比較して千倍程度低い。学位申請者は、ポリペプチドの容器等に対する吸着を詳細かつ網羅的に評価し、LC へ導入可能な溶液を用いてポリペプチドの容器等に対する吸着を回避できる方策を見出し、試料溶液を大量に LC へ導入することで、百 pM レベルのポリペプチドを定量可能な LC-MS 法を開発した。

第1章では、カラム充填剤に対するポリペプチドの吸着能がある特定の有機溶媒含量(臨界含量)を境に急激に変化するという現象の発見の経緯が記載されている。複数の有機溶媒を含む溶液中の urocortin を用いた検討から、複数の有機溶媒を含む溶液中のポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能は、単独の有機溶媒が示す臨界値( $X_i$ )に対する溶液中のその含量( $x_i$ )の比( $x_i/X_i$ )の総和( $f_n = \sum x_i / X_i$ )で示され、 $f_n$  値が 1 となる点を臨界値として急激に変化することが示された。

第2章では、臨界値を境としたポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の変化に基づくポリペプチドの溶出機構が記載されている。カラムに保持されたポリペプチドのカラムからの溶出機構を評価するために、まず、カラムに保持されたポリペプチドが、カラムから溶出する時の溶離液中の総有機溶媒含量  $V_T(\%)$  を、測定時のグラジエント勾配値及びその時得られた保持時間を用いて算出する方法を検討した。その結果、各ポリペプチドは、グラジエント勾配と無関係に特定の有機溶媒含量の溶離液にて溶出されることが示された。この時得られた  $V_T(\%)$  は、ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能を変化させる試料溶液中有機溶媒の臨界含量とほぼ同等の値を示し、また、各ポリペプチドは、 $f_n = 1$  を示す溶離液にて溶出されることが明らかになった。さらに、保持時間とグラジエント勾配との間にはべき乗則が認められた。従って、溶離液中のポリペプチドは、グラジエント溶出法によって形成される有機溶媒勾配を有する溶離液中に存在する臨界値( $f_n = 1$ )を挟んでカラム充填剤に対する吸着能を急激に変化させており、カラム充填剤に対する吸脱離を繰り返すこと

で、最終的に臨界値 ( $f_n = 1$ ) を示す溶離液中に濃縮されてカラムから溶出していることが示された。また、ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の変化の要因を検証するために、アセトニトリル含量の異なる urocortin 溶液の円偏光二色性スペクトル解析を行った。その結果、ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の変化は、溶液中のアセトニトリルによって惹起される可逆的なポリペプチドの高次構造変化に起因するものであることが示唆された。

第3章では、ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の変化を利用した新規 LC システムのが記載されている。学位申請者は、臨界値を境にしたポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の可逆性を利用し、容器等に対する吸着を回避できる有機溶媒含量の溶液中のポリペプチド全てを、カラムに保持した 1 本のピークとして溶出できる新規グラジエントシステムを考案した (Fig. 1)。

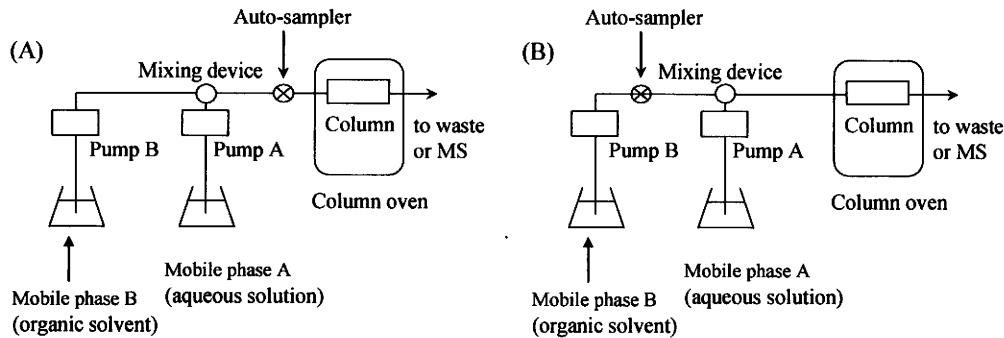


Fig. 1. Flow diagrams of (A) a standard gradient system and (B) a new gradient system

この新規グラジエントシステムでは、導入されたポリペプチド溶液に対して、カラム入口より前で水系移動相を混合させることで、カラムに流入する溶離液中の有機溶媒含量をポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の臨界値 ( $f_n = 1$ ) より小さくすることができる。そのため、有機溶媒含量が  $f_n > 1$  を示す溶液中でカラム充填剤に対する吸着能を失っていたポリペプチドでも、カラム入口前の混合により生じる  $f_n < 1$  の溶離液中で、カラム充填剤に対する吸着能を瞬時に回復するために、全てカラムへ保持することができた。この新規 LC システムのポリペプチドの高感度定量における性能を、従来のグラジエントシステムの性能と比較検討した。その結果、新規 LC システムは、標準 LC システムと比較して、測定精度、試料導入量、定量感度、多成分同時測定の点で極めて優れていることが明らかとなった。

第4章では、新規グラジエントシステムを用いたマウス血漿中 amyloid  $\beta$ -protein1-38、1-40、1-42 及び 1-43 fragment (A $\beta$ ) の同時定量法の開発について記載されている。まず、血漿中夾雑ポリペプチドから微量の各 A $\beta$  を分離可能とする前処理法として、アセトニトリル及びメタノールを用いた血漿除タンパク法を検討した。この時得られた低い回収率から、除タンパク操作時の A $\beta$  の自己凝集又は A $\beta$  と他の血漿ポリペプチドとの凝集が示唆された。そこで、有機溶媒添加によって凝集した血漿ポリペプチドを溶解させる方策を検討したところ、酢酸をある一定量以上加えることで血漿ポリペプチドを完全溶解できた。この知見に基づき、分画分子量 10,000 の限外ろ過膜を用いて、血漿ポリペプチドから各 A $\beta$  を分離回収する前処理法を考案し、その性能を評価した。その結果、最適化された条件下では、全ての A $\beta$  について 90% 程度の回収率を得ることができた。この時、酢酸は、限外ろ過膜上に保持される夾雑ポリペプチドと各 A $\beta$  との結合を阻害する効果を有していることも示唆された。最後に、限外ろ過膜を用いた前処理法及び新規 LC システムを用いたマウス血漿中 A $\beta$  同時定量法の再現性を確認した。その結果、0.5~20 nM の濃度範囲で、低分子化合物と同様の基

準で再現性よく同時定量可能であることが明らかになった。

以上のように、学位申請者は、有機溶媒によって惹起されるポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の可逆性を利用した新規 LC システムを開発すると共に、血漿ポリペプチドの溶解及びポリペプチド間の結合に与える酢酸の効果を利用した血漿前処理法を開発した。この新規 LC システムは、標準 LC システムと比較して、測定精度、試料導入量、定量感度、多成分同時測定の点で優れていることから、今後、免疫学的手法に匹敵もしくは凌駕する感度を有する生体試料中ポリペプチドの特異性に優れた LC-MS 高感度定量法の開発が可能である。また、本新規 LC システムは、未知ポリペプチドを含めたポリペプチドの網羅的解析においても強力なツールに成り得ると考えられた。これらの技術は、分析化学、医学・薬学研究に大きく貢献すると期待される。よって、本研究を行った合田竜弥は博士(薬学)の学位を受けるにふさわしいと判断した。