

論文審査の結果の要旨

氏名 秦 裕子

本論文は5章から成り、第1章は序論、第2章は膠芽腫患者由来 GB2 細胞における包括的蛋白質ネットワーク解析、第3章は膠芽腫患者由来 GB2 細胞における包括的リン酸化ネットワーク解析、第4章は膠芽腫患者由来 GB2 細胞の情報伝達系を規定する新規シグナル制御因子の探索、第5章は考察及び結論について述べられている。

膠芽腫は最も悪性度の高いがんの一種で、診断確定後の平均生存期間は約1年である。当該腫瘍に関する精力的な研究にもかかわらず、過去10年以上にわたってその治療成績はほとんど改善されていない。近年、がん組織にも自己複製能と多分化能を有する幹細胞が存在するというがん幹細胞の概念が支持され、脳腫瘍においてもその存在が実験的に証明された。この概念は、がん組織にも幹細胞を頂点とする階層性が存在し、通常の腫瘍細胞を供給しながら組織の維持増殖を行っているという現象を想定させるものである。従ってがんの根治のためには腫瘍組織全体をターゲットとする従来の抗がん剤治療並びに放射線治療に基づく手法を見直し、がん幹細胞に焦点を当てた新たな治療戦略の展開が必要である。そこで本研究では、高感度、高精度測定を可能とする次世代型質量分析計 (LTQ-Orbitrap Velos ETD) にナノ流速液体クロマトグラフ装置 (Dina-2A) を on-line で接続した nanoLC-MS/MS システムを用いて、膠芽腫幹細胞の情報伝達系に関する包括的な蛋白質ネットワーク解析を行い、当該細胞の制御機構の特徴をシステムレベルで抽出した。

第2章では、膠芽腫患者由来 GB2 細胞における発現蛋白質の全体像を俯瞰するために、nanoLC-MS/MS システムを用いたショットガンプロテオーム解析を行い、ペプチドレベルでは 8,896 種類、蛋白質レベルでは 2,089 種類の分子群を同定した。同定されたプロテオーム情報の特徴をより詳細に明らかにするために、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) によるパスウェイ解析を行ったところ、glycolysis/gluconeogenesis、pyruvate metabolism、pentose phosphate pathway 等の Warburg 効果に関連する様々な代謝経路が modified Fisher's exact test を用いて $p < 0.0001$ の高い有意水準を持って抽出され、また興味深いことに ribosome、spliceosome 及び proteasome システムに関しては $p < 1 \times 10^{-15}$ の極めて高い有意水準を持つことを示している。

第3章では、nanoLC-MS/MS システム及び高精度相対定量法である Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell culture (SILAC) 法を併用して、GB2 細胞における EGF 刺激依存的なリン酸化活性の変動に関して異なる2種類のフラグメント開裂法を用いて包括的に定量解析を行った。その結果、2,282 種類のリン酸化蛋白質に由来する 6,073 種類のリン酸化ペプチドを同定し、その中でリン酸化部位が1か所同定されたペプチドは 5,497 種類、2か所以上同定されたペプチドは 576 種類であった。また SILAC 法に基づく高精度定量解析の結果、EGF 刺激に応じて 516 か所のリン酸化レベルが上昇し、275 か

所が低下していることを示した。大変興味深いことに、代表的な神経幹細胞マーカーの一つである nestin に関しては 36 か所のリン酸化部位が同定され、11 か所の新規リン酸化部位を含む多くのアミノ酸配列が種間でよく保存されていることを明らかにした。また、同定されたリン酸化プロテオーム情報から細胞機能に関する特徴を導出するために、DAVID を用いてパスウェイ解析を行ったところ、Notch, ErbB, mTOR 等のがんの増殖や幹細胞の制御にかかわる様々な経路が高いリン酸化レベルであることを示している。さらに EGF 依存的なリン酸化活性の変動をパスウェイレベルで俯瞰するために Ingenuity Pathways Analysis (IPA) によるネットワーク解析を行ったところ、代表的な Canonical Pathway に属する Molecular mechanisms of cancer を構成するシグナル因子 SHC1 (Src homology 2 domain containing) transforming protein1) において Y427 のリン酸化レベルが EGF 依存的に約 18 倍上昇しており、mTOR signaling に属する因子である RPS6 (ribosomal protein S6) の S235 及び S236 のリン酸化活性に関しては EGF 依存的に約 30 倍の制御を受けていることを明らかにしている。

第 4 章では、蛋白質レベルでの新規制御因子の探索を行うことを目的として、得られた大容量のスペクトル情報を用いてヒト蛋白質データベース及びヒト RNA データベースに対して検索を行い、ヒト RNA データベースのみにヒットした新規リン酸化ペプチドを抽出した。その結果、従来非コード領域と規定されていた RNA 配列領域に由来する 3 種類のペプチドのセリン残基がリン酸化を受け、さらにその中の 1 ペプチドのリン酸化活性が EGF により制御されているという大変興味深い事実を見出し、GB2 細胞の性質を規定する情報伝達制御機構が蛋白質ネットワークレベルで従来の想定を超える多様性を持つことを示している。

なお、本論文第 2 章、第 3 章、第 4 章は、西村教子、那須亮、近藤裕子、津本浩平、秋山徹、尾山大明との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析及び検証を行ったもので、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。