

論文審査結果の要旨

申請者の博士後期課程論文「ムチン型糖鎖の高速高感度分析法の開発及びその実用化研究」は、糖タンパク質糖鎖の一種であるムチン型糖鎖の分析法の開発とその応用例をまとめた内容である。ムチン型糖鎖に代表される O-型糖鎖はウイルスや細菌による感染症や癌あるいは免疫疾患などの様々な疾病に関与し、疾病に伴いその構造が大きく変化することが明らかにされつつある。このような背景から O-結合型糖鎖は病態マーカーや新規医薬品のターゲット分子として期待され、疾患にともなう O-結合型糖鎖プロファイルの変化の解明が求められている。通常糖タンパク質糖鎖の解析はコアタンパク質から糖鎖を遊離した後、蛍光標識し、分離分析と質量分析を組み合わせる方法が用いられる。糖タンパク質糖鎖の一種である N-結合型糖鎖では上記した手法による解析が進んでいる。一方 O-結合型糖鎖では有効なコアタンパク質からの糖鎖遊離法がなく、解析は困難を極めていた。

本論文では O-結合型糖鎖の高速高感度分析を可能にする高速糖鎖自動切断装置 (AutoGlycoCutter:AGC)を開発し、従来日単位を要した O-結合型糖鎖の遊離反応を僅か1分に短縮し500倍以上のハイスループット化を達成している。また従来法では不可能であった O-結合型糖鎖の蛍光標識化を達成し、O-結合型糖鎖の高感度分析法を確立している。また開発した AGC と質量分析装置を連結した AGC-MS システムを開発し、MALDI-TOF MS を用いた O-結合型糖鎖の高速高感度分析法を確立した。

さらに本論文ではバイオマーカーの探索を目指した実践的なモデル実験として、AGC を用いて培養癌細胞中の O-結合型糖鎖の網羅的解析を実施している。培養癌細胞として 10⁶ cell から O-結合型糖鎖の解析が可能なプロトコルを確立し、10 種類の培養癌細胞中から 80 種類の O-結合型糖鎖構造の同定に成功している。観察された 80 種類の糖鎖の発現量を元に 10 種類の培養癌細胞の個性解析を実施した結果、細胞の分化度の違いによって O-結合型糖鎖プロファイルが大きく変化することを明らかにした。また未分化な胃腺癌細胞である MKN45 細胞中に新規性が高い、分子内にシアル酸を 3 分子持つ高度に伸張された O-結合型糖鎖が高発現することを明らかにしている。さらに O-結合型糖鎖の中でも解析が困難な構造として認識されている Tn 抗原の同定法の開発に取り組み、転移能が高い結腸腺癌細胞(LS174T)で Tn 抗原が高発現することを明らかにしている。培養癌細胞の O-結合型糖鎖解析を実施した結果得られたこれらの知見は、O-結合型糖鎖を細胞の分化マーカーや癌の悪性度の指標として利用できる可能性を強く示唆するものであり、基礎研究領域だけでなく臨床研究的観点からも非常に価値が高い内容であると判断できる。また本研究で開発した技術は培養癌細胞だけでなく血清や組織等の臨床試料に容易に適用することができるため、今後さらなる臨床応用が期待される。

これらの研究内容は 2007 年の Analytical biochemistry、2009 年の Journal of proteome research、2010 年の Analytical biochemistry の 3 つの学術誌で公表されており、学位論文として高く評価される。

氏名	きかい 堀	とし 俊	ひろ 博
学位の種類	博 士 (薬学)		
学位記番号	薬 第 8 8 号		
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	液体クロマトグラフィー／エレクトロスプレーイオン化質量分析法による胆汁酸の新規抱合体と疾患関連タンパク質の同定		
論文審査委員 (主査)	教授	池	川 繁 男
(副主査)	教授	掛	桶 一 晃
(副主査)	教授	仲	西 功

論文内容の要旨

今日、バイオメディカル領域において質量分析法(MS)が果たす役割は極めて大きなものがあり、卓越した分離能を持つガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィー(LC)とMSを組み合わせたハイファナーテッドMSが広く利用されている。とりわけ、LC/MSはエレクトロスプレーイオン化(ESI)、大気圧化学イオン化など、各種ソフトイオン化法の開発によってその適用範囲が飛躍的に拡大し、タンパク質、核酸などの高分子化合物のみならず低分子の胆汁酸、ステロイドホルモン、薬物などの難揮発性、水溶性、極性化合物の測定に威力を発揮している。本論文は、分子内にアミノ基、硫酸基、カルボキシル基などの解離性官能基を持つ化合物の直接測定に好適な手段となっているリニアイオントラップ型LC/ESI-MSⁿを用いて、胆汁酸のアミノ酸抱合にける代謝活性中間体を前駆体とするグルタチオン(GSH)並びにN-アセチルシステイン(NAC)抱合体への変換と、これら抱合体の胆汁並びに尿中への排泄を明らかにするとともに、アフィニティークロマトグラフィーによる蛋白質の選択的な捕捉とプロテオーム解析法を駆使してモノヒドロキシ胆汁酸であるリトコール(LCA)に親和性を有する疾患関連蛋白質を同定したものである。

すなわち、第1章では胆汁酸のアミノ酸抱合における代謝活性中間体として知られるアシルアデニレートやCoAチオエステルが電子親和性に富む活性なエステルであり、これらがグルタチオン(GSH)のチオール基と反応してGSH抱合体に変換されることが想定されることから、初めに標品としてヒト主要胆汁酸5種のGSH抱合体をBOC-GSH誘導体と胆汁酸の活性エステルとの縮合反応によって合成した。引き続き、これら標品の正並びに負イオン検出ESI-MSにおいて生成する特徴的イオンを精査するとともに、LC/ESI-MSによる高感度直接分析法を構築した。さらに、本法によってコール酸(CA)のアシルアデニレートとCoAチオエステルいずれもが非酵素的のみならずグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)の作用を受けてGSH抱合体に変換されることを明らかにするとともに、肝毒性が知られるLCAと肝機能改善薬として用いられるウルソデオキシコール酸(UDCA)をラットに投与すると、これらがGSH抱合体として胆汁中に排泄されることを世界に先駆けて実証した。

薬物、ステロイドホルモン、胆汁酸などの低分子生理活性物質は、生体内で極性を増す方向に代謝され、最終的に抱合体として排泄される。多くの場合、不活性型へと代謝されるが、ときとして反応性に富む活性代謝物へと変換され、ペプチドやタンパク質のアミノ基と反応して付加体を形成して毒性を発現する。今回明らかにしたGSH抱合体は、胆汁酸の代謝活性中間体とGSHとの反応によって生成する不活性型と考えられ、先に示されている胆汁酸の代謝活性中間体によるタンパク質付加体の生成を抑制する生体防御反応と捉えることができよう。

一方今日、N-アセチルシステイン(NAC)がアセトアミノフェンを初めとする薬物性肝障害の治療薬として用いられるばかりか、米国ではサプリメントとしても服用されている。このため、NACが保有するチオール基の反応性を考えると、生体に投与されたNACが上述した胆汁酸の代謝活性中間体をNAC抱合型胆汁酸に誘導して、尿中、胆汁中に排泄することが推測される。そればかりか、第1章で明らかにしたGSH抱合体がさらに代謝を受けてNAC抱合体へと変換されて尿中、胆汁中に排泄される代謝経路の存在も推測される。そこで第2章では、初めにヒト主要胆汁酸5種のNAC抱合体を標品として合成し、正並びに負イオン検出ESI-MSにおいて生成する特徴的イオンを精査するとともに、LC/ESI-MSによる高感度直接測定法を構築した。引き続き、本法によってCAのアシルアデニレートとCoAチオエステルとNACとの反応性に吟味を加え、いずれもが非酵素的のみならずGSTの作用を受けてNAC抱合体に変換されることを明らかにした。さらに、胆汁うっ滞モデルラットにLCAを経口的に、一方、NACを腹腔内に投与するとLCAがNAC抱合体として排泄されることも明らかにし、NAC投与時における胆汁酸の新規代謝排泄経路の存在を実証した。

一方、今日におけるプロテオーム研究では、生体分子間の特異的相互作用を利用したアフィニティークロマトグラフィー(AFC)が広く用いられ、組織、細胞内の膨大な蛋白質群からリガンド特異的な蛋白質を選択的に分離・精製するツールとして威力を発揮している。そこで第3章では、AFCの有用性に着目し、肝毒性や大腸癌発症のプロモーターとして古くより知

られる LCA を不溶性担体に固定化して用いる AFC によって LCA に親和性を持つ疾患関連蛋白質を捕捉し、その構造解析を試みた。すなわち、蛋白質に対する担体の立体障害と LCA の分子構造を考慮し、LCA の 3 位水酸基と 24 位カルボキシル基にブリッジを導入した 2 種の LCA 誘導体を合成し、これらを活性エステル法によって 10 原子のスペーサーを持つスクシンイミジル修飾アガロースに固定した。引き続き、ラット肝細胞内ミトコンドリア画分の蛋白質群をアフィニティー担体に通導して、捕捉された蛋白質を一次元電気泳動法によって展開分離し、特定したスポット上の蛋白質をゲル内酵素消化して得たペプチド混合物を LC/ESI-MS/MS 分析に付してアミノ酸配列を決定するとともに、得られたペプチドの質量数を基に蛋白質をデータベース検索した。その結果、捕捉した蛋白質が CPS-I、glutamate dehydrogenase、acyl-CoA dehydrogenase、enoyl-CoA hydratase、acetyl-CoA acyltransferase、aldehyde dehydrogenase などのミトコンドリアに局在する酵素タンパク質であるほか、ミトコンドリアに混入した血清タンパク質の albumin や細胞質内の GST を LCA と親和性を持つタンパク質であることを明らかにすることができた。今後更に、これらタンパク質の翻訳後修飾や LCA との分子間相互作用のみならず、LCA-タンパク質複合体の三次元構造の解析が望まれるが、今回得られた蛋白質に関する知見は、LCA による肝疾患の病因、病態の解明、さらには新規医薬品を開発してゆく上で大きく役立つものと期待される。

堺俊博君より提出された博士論文「液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析法による胆汁酸の新規抱合体と疾患関連タンパク質の同定」は、胆汁酸の新規代謝物として推測されるグルタチオン並びに *N*-アセチルシステイン抱合体を標品として合成したうえ、これらの液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化—質量分析法による直接分析法を構築し、これら代謝物が胆汁あるいは尿中に排泄されることを明らかにするとともに、アフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質の捕捉とプロテオーム解析法を駆使してモノヒドロキシ胆汁酸であるリトコール酸に親和性を有する疾患関連タンパク質を同定した研究成果をまとめたものである。

すなわち、胆汁酸のアミノ酸抱合における代謝活性中間体として知られるアシルアデニレートや CoA チオエステルが電子親和性に富む活性なエステルであり、これらがグルタチオン(GSH)のチオール基と反応して GSH 抱合体に変換されることが想定されることから、初めに標品としてヒト主要胆汁酸 5 種の GSH 抱合体を BOC-GSH 誘導体と胆汁酸の活性エステルとの縮合反応によって合成した。引き続き、これら標品の正並びに負イオン検出 ESI-MS において生成する特徴的イオンを精査するとともに、LC/ESI-MS による高感度直接分析法を構築した。さらに、本法によってコール酸(CA)のアシルアデニレートと CoA チオエステルいずれもが非酵素的のみならずグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ(GST)の作用を受けて GSH 抱合体に変換されることを明らかにするとともに、肝毒性が知られる LCA と肝機能改善薬として用いられるウルソデオキシコール酸(UDCA)をラットに投与すると、これらが GSH 抱合体として胆汁中に排泄されることを実証し、胆汁酸の新規代謝排泄経路として世界に先駆けて発表した。

引き続き、胆汁酸の GSH 抱合体がさらに代謝を受けて NAC 抱合体へと変換されて尿中、胆汁中に排泄される代謝経路が推測されることから、初めにヒト主要胆汁酸 5 種の NAC 抱合体を標品として合成し、正並びに負イオン検出 ESI-MS において生成する特徴的イオンを精査するとともに、LC/ESI-MS による高感度直接測定法を構築した。さらに、本法によってコ

ール酸のアシルアデニレートと CoA チオエステルと NAC との反応性に吟味を加え、いずれもが非酵素的のみならず GST の作用を受けて NAC 抱合体に変換されることを明らかにした。さらに、胆汁うっ滞モデルラットに NAC を腹腔内に投与すると、経口投与した毒性の高い胆汁酸として知られる LCA が NAC 抱合体として解毒排泄されることも明らかにし、NAC 投与時における胆汁酸の新規代謝排泄経路とした。

一方、今日におけるプロテオーム研究では、生体分子間の特異的相互作用を利用したアフィニティークロマトグラフィー(AFC)が広く用いられ、組織、細胞内の膨大な蛋白質群からリガンド特異的な蛋白質を選択的に分離・精製するツールとして威力を発揮している。そこで、AFC の有用性に着目し、肝毒性や大腸癌発症のプロモーターとして古くより知られる LCA を不溶性担体に固定化して用いる AFC によって LCA に親和性を持つ疾患関連蛋白質を捕捉し、質量分析法を基盤とするプロテオーム解析法によって数種のタンパク質を同定した。得られた蛋白質に関する知見は、LCA による肝疾患の病因、病態の解明、さらには新規医薬品を開発してゆく上で大きく役立つものと期待される。

堀俊博君は、本研究を通して質量分析法に関する知識と技術を修得し、纏められた論文は、内容に独創性と多くの新しい知見を含み、博士論文として十分評価に値するものであり、2名の副主査から高い評価を得ている。

本論文が、近畿大学大学院薬学研究科の博士論文として十分評価しうるものと判定する。

氏 名	福 田 浩 三
学位の種類	博 士 (薬学)
学位記番号	薬 第 8 9 号
学位授与の日付	平 成 2 2 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	大和当帰の栽培調製法の薬史的考証および日本と中国で生産した大和当帰の評価

論文審査委員 (主 査)	教 授	松 田 秀 秋
(副主査)	教 授	松 尾 圭 造
(副主査)	教 授	村 岡 修