



Title	A New Strategy for Biomarker Discovery Based on the NBS Method
Author(s)	Watanabe, Makoto
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49738">https://hdl.handle.net/11094/49738</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	わた 渡	なべ 辺	まこと 真
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)		
学 位 記 番 号	第 2 2 4 5 1 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 9 月 25 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科化学専攻		
学 位 論 文 名	A New Strategy for Biomarker Discovery Based on the NBS Method (新規プロテオーム解析法の開発とそのバイオマーカー探索への応用)		
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 相本 三郎 (副査) 教 授 高尾 敏文 教 授 村田 道雄		

論 文 内 容 の 要 旨

診断マーカーや薬物ターゲットなどの新規バイオマーカー探索を目的として、演者は新たなプロテオーム解析手法であるNBS(2-nitrobenzenesulfenyl)法を開発した。NBS 法は、酸性条件下でトリプトファン残基に選択的・定量的に反応する NBSCI(2-nitrobenzenesulfenyl chloride) 試薬を利用した定量的プロテオーム解析手法である。この手法では2つの異なる試料(例えば正常組織とガン組織)から蛋白質を抽出し、そこに含まれる個々の蛋白質発現の量的差異を質量分析装置で解析することができる。

一方で、開発当初のプロトコルでは試薬の特性が十分に生かしきれていない部分も見られた。そこで、演者はプロトコルの最適化を行うことで解析効率の向上を目指した。まず、一連の NBS プロトコル操作の間のサンプル回収率の向上を目的として、可溶化剤を従来の 0.1% SDS から 8M 尿素(もしくは、6M グアニジン塩酸塩)に変更した。また、NBS ラベル化ペプチドにおける NBS 試薬とトリプトファン残基部分の持つ高い芳香族性に注目し、官能基に同じく芳香族を含むフェニルレジンを用いて、ラベル化ペプチドの分離を試みた。結果として、最適化されたプロトコルではサンプルロスが抑えられ、且つ効率の良い解析が可能となった。

次に、解析での更なる高感度化を図る目的として NBS ラベル化ペプチドを選択的にイオン化するマトリックスの開発を行った。NBS ラベル化ペプチドと非ラベル化ペプチドの混合サンプルを MALDI-TOF 型の質量分析装置で測定する際に 3H4NBA(3-hydroxy4-nitrobenzoic acid)をマトリックスとして用いると、非ラベル化ペプチドの検出が抑えられ、ラベル化ペプチドが選択的に検出されることが分かった。結果として、3H4NBA を MALDI-TOF 型の質量分析装置での測定に適用することによって解析の高感度化を図ることができた。

以上で述べたように、プロトコルの最適化と、選択的イオン化マトリックスを用いた高感度検出とを組み合わせることで、NBS 法は非常に実用性の高い手法となった。 更には、演者はこの NBS 法と高速液体クロマトグラフィ、質量分析装置、解析ソフトウェアとを組み合わせることにより、新規プロテオーム解析システム(NBS バイオマーカー探索システム)を構築した。

最後に、演者はこの解析システムを大腸ガン臨床サンプル(組織)に応用し、ガン関連マーカー探索を行った。12 症例サンプルの解析の結果、多数の新規バイオマーカー候補蛋白質(98 種類)

を同定した。本研究で新規に同定された候補蛋白質のうち、6 種類(ZYX, RAN, RCN1, AHCY, LGALS1, VIM)についてはウェスタンブロットィング解析を行なうことでプロテオーム解析データのバリデーションができた。さらには免疫組織化学染色による詳細実験により、これらの蛋白質と大腸ガンとの関連性も示唆された。以上のことから、本解析システムは新規疾患関連因子同定ツールとして有効であることが実証された。本研究で同定されたバイオマーカー候補蛋白質は診断マーカー、治療ターゲット、分子イメージングなど医療分野への応用が今後大いに期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

診断マーカーや薬物ターゲットなどの新規バイオマーカー探索を目的として、渡辺真君は新たなプロテオーム解析手法であるNBS(2-nitrobenzenesulfenyl)法を開発した。NBS法は酸性条件下でトリプトファン残基に選択的・定量的に反応するNBSCI(2-nitrobenzenesulfenyl chloride)を利用した定量的プロテオーム解析手法であり、これによって効率的な蛋白質発現解析が可能となった。

次に、本法による生体試料解析の際の効率化・高感度化を図ることを目的として、解析プロトコルの最適化を行った。本研究では、サンプルの可溶化剤を最適化することにより、ラベル化効率、およびサンプル回収率の向上を図ることができることを明らかにした。また、NBSラベル化ペプチドの濃縮カラムを従来のLH-20セファデックスからフェニルセファロースカラムに変更することにより、濃縮効率を向上させることができた。

その一方で、本法による解析での更なる高感度化を図ることを目的としてNBSラベル化ペプチドを選択的にイオン化するマトリックスの開発を行った。本研究では、MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometer)測定に用いるマトリックスとして3H4NBA (3-hydroxy4-nitrobenzoic acid)を適用することによって、NBSでラベル化されたペプチドを選択的にイオン化できることを発見し、解析の高感度化を図ることができた。本研究で発見された「マトリックス化合物による、ある化学種の選択的イオン化」は今後のMALDI研究に繋がる非常に重要な知見である。

渡辺君は上記のようにして開発・最適化を行ったNBS法と液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析装置(MS)、解析ソフトウェアとを組み合わせることにより、新たなプロテオーム解析プラットフォーム(NBS バイオマーカー探索システム)を構築した。そして、この解析プラットフォームを大腸ガン臨床サンプル(組織)に応用することによって多数の新規バイオマーカー候補蛋白質(98種類)を同定した。本研究で新規に同定されたバイオマーカー蛋白質のうち6種類については免疫組織化学染色実験等による詳細解析を行うことにより大腸ガンとの関連性が実証された。以上のことから、本解析システムの新規疾患因子同定ツールとしての有効性が実証された。本研究で同定されたバイオマーカー候補蛋白質は診断マーカー、治療ターゲット、分子イメージングなど医療分野への応用が今後大いに期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。