

氏 名	宮 地 淳
国 籍 ・ 本 籍	愛知県
学 位 の 種 別	博士（学術）
学 位 の 番 号	乙第204号
学位授与の日付	平成27年 6 月26日
学位授与の要件	名城大学学位規程第 3 条第 5 項該当
学 位 論 文 題 目	LC/MS を用いた生理活性ペプチドの定量 法に関する研究
論文審査委員	主 査 原 田 健 一
	副 査 森 裕 二
	副 査 田 中 義 人
	副 査 東 達 也

論 文 内 容 の 要 旨

液体クロマトグラフィーと質量分析装置を組み合わせた LC/MS は、すでに定性分析のみならず定量分析にも広く用いられており、特異性の高い定量ができることから、ペプチドやたんぱく質の定量にも応用することが提案されている。一方、製薬メーカーにおける創薬のターゲットは、従来の低分子薬物に加えて、たんぱく医薬、抗体医薬、ペプチド医薬および核酸医薬といわれるバイオ医薬品に主流がシフトしつつあり、これらバイオ医薬品の開発過程において、その薬物本体や作用を及ぼすたんぱく質やペプチド等を正確に定量することが求められている。このような背景下、著者は従来用いられてきたイムノアッセイ法を主体とするたんぱく質やペプチド類の定量に関する問題点を指摘するとともに、イムノアッセイに代わるものとして近年多くの報告がある LC/MS を用いたペプチド定量法においては、実用的な感度を達成した報告がないことを明らかにした。例えば、インクレチンの一種である GIP の血漿中濃度を正確に把握するための実用的な定量法は皆無であり、DPP4 阻害薬に代表される GLP-1 関連作用薬の正確な薬理的評価ができない状況が続いている。本研究では、抗体を用いることなく LC/MS で各種生理活性ペプチドを定量することを最終目的とし、そのための方法論の確立を目指した。

実際には、ペプチドの標準品を用いて高感度化のための検討因子の最適化を行い、定量法構築の方向性を明確にするとともに、それを GIP 定量法開発に適用し、高感度、かつ、実用的な定量法を完成させ、その有用性を証明した。特に、本実験から、未切断ペプチドではなく、プロテアーゼ処理して適当なサイズにしたフラグメントペプチド（サロゲートペプチドと呼ばれる）を用いる手法がきわめて有効であ

ることが確認された。しかしながら、望みのサロゲートペプチドを入手するための市販のプロテアーゼ数が限られており、多種多様なペプチドの分析には対応できないことが判明した。そこで、著者が所属する研究室で研究されている microcystin 分解性細菌 B-9 株の持つプロテアーゼが、サロゲートペプチド調製に用いることができると考察し、その機能解明を試みた。最終的に、B-9 プロテアーゼのうち、MlrB が哺乳類のペプチドに対して endoprotease 様に作用し、サロゲートペプチド獲得のための有用なプロテアーゼに成り得ることを確認するとともに、インクレチンの一種である GLP-1 の定量に適用し、その有用性を明らかにした。

1) LC/MS を用いた高感度ペプチド定量のための因子分析と GIP 定量法開発

高感度化のための因子として、MS に導入する試料のイオン化法、LC カラムの内径や流速について文献情報ならびに自身の検証により考察した。その結果、イオン化はエレクトロスプレーイオン化とし、カラムは出来る限り内径の小さなもの、それに伴い流速を低下させることが高感度化に必須であると結論付けた。ペプチドを定量する場合、測定対象となるペプチドを未切断のまま、あるいはプロテアーゼを用いて切断後、測定対象ペプチドの独自性を保持するサロゲートペプチドを定量する 2 種があるが、標準ペプチドを用いて比較した結果、サロゲートペプチド法が高感度化に適していることが明らかとなった。さらに、サロゲートペプチドには化学修飾を受けやすいアミノ酸を含有しないこと、そのためには適切なプロテアーゼの選択がきわめて重要であることを確認した。

GIP は DPP4 で切断されて活性を失うため、活性体を定量することは勿論のこと、分泌量を確認するためには非活性体をも定量する必要がある。両者の同時定量法を構築するにあたり、上記検討結果に加え、LC 移動相や前処理法を最適化するとともに、MS の性能を最大化するために、イオントラップ機能を兼ね備えた三連四重極 MS を用いた SRM³ 法を通常用いられる SRM 法と比較検討した。また、内標準物質に GIP の 6 位アミノ酸を安定同位体 (¹³C₉, ¹⁵N) ラベルしたペプチドを用いることにより、前処理過程の全ての操作とイオン化における定量による差異を完全に補正できることを示した。最終的に、ヒト血漿 200 μL、プロテアーゼには Asp-N を用い、活性型 GIP は GIP₁₋₈ を、非活性型 GIP は GIP₃₋₈ をサロゲートペプチドにより、活性型 GIP は SRM³ 法で定量限界 1 pM を、非活性型 GIP は SRM 法で定量限界 10 pM を達成した。この定量法は、免疫アッセイ法を凌駕する感度であり、特異性の高い定量法であるため臨床試験における血漿中 GIP の推移を的確に評価することが可能となった。

2) Microcystin 分解性細菌 B-9 株による各種生理活性ペプチドの加水分解

LC/MS を用いるペプチドの定量には、サロゲートペプチドを用いる手法がきわめて有効であること、しかし、それを取得するための入手可能な市販プロテアーゼ数が限られていることを上述した。ここでは、新規プロテアーゼの探索を目指して、ラン藻由来の環状ペプチドや抗生物質として使用される細菌由来の環状ペプチドを分解する microcystin 分解性細菌 B-9 株の持つプロテアーゼに注目し、哺乳類が有する各種生理活性ペプチドの分解挙動を観察した。その結果、本菌は S-S 結合を有する環状ペプチドおよび S-S 結合を有さない直鎖状ペプチドをともに分解することからサロゲートペプチド獲得のためのプロテアーゼと成り得ること、さらに環状ペプチドは B-9 プロテアーゼに対して抵抗性があることを明らかにした。また、その基質特異性については neprilysin に似た endopeptidase 様の切断が比較的強く観察

されたが、*exopeptidase* 様の切断も認められた。これは性質が異なる複数のプロテアーゼ (MlrA、MlrB、MlrC) が存在しているため、その基質特性を不明確にしていると考察した。

3) Microcystin 分解性細菌 B-9 株による glucagon/VIP ファミリーペプチドの加水分解

B-9 プロテアーゼの基質特異性を明確にするために、分子量やアミノ酸配列が類似した直鎖状ペプチドである glucagon/VIP ファミリーペプチドを基質とし、*serine protease* 阻害剤である PMSF および *metalloprotease* 阻害剤である EDTA を用いてプロテアーゼの働きを制御しながら分解挙動を観察した。これらのペプチドは、阻害剤を用いない場合、概して分解速度が速く、阻害剤により分解速度は遅くなった。一方、基質特異性については、EDTA で阻害した場合に *endoprotease* 様の切断が強調され、本挙動は *serine protease* である MlrB の特性と考察された。*Endoprotease* 様の切断は、サロゲートペプチド獲得に有用であると考察し、GLP-1 を B-9+EDTA で分解した際に確認された GLP-1₇₋₂₃ の生成および消失を注意深く観察し、これをサロゲートペプチドとしてヒト血漿中 GLP-1 定量法開発に適用した。GLP-1₇₋₂₃ は、再現性よく生成され、これに基づく GLP-1 の検量線、血漿に添加して得られた濃度の真度ならびに精度は良好であり、B-9 プロテアーゼが LC/MS を用いた生理活性ペプチドの定量に利用可能であることを明らかにした。

本研究では、LC/MS を用いる実用的なペプチド定量法確立に向けての課題を明らかにし、LC、イオン化や MS における検出等様々な項目の最適条件を導き出した。特に、その過程で、サロゲートペプチドを用いる定量法の有用性を示すとともに、サロゲートペプチド取得のための市販プロテアーゼが乏しいという新たな課題に対して、*microcystin* 分解性細菌 B-9 株の持つプロテアーゼの特質を、阻害剤を用いた分解挙動から明らかにし、望みのサロゲートペプチド入手法の道を拓いた。最終的に、従来のイムノアッセイ法の感度を凌駕する高感度定量法を、抗体を用いることなく確立し、新たなプロテアーゼの利用により、LC/MS で生理活性ペプチドを定量するための方法論を確立した。

論文審査の結果の要旨

本研究では、抗体を用いることなく液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC/MS）で各種生理活性ペプチドを定量することを最終目的とし、そのための方法論の確立を目指した。ペプチドの標準品を用いて高感度化のための検討因子の最適化を行い、定量法構築の方向性を明確にするとともに、それをインクレチンである GIP 定量法開発に適用し、高感度、かつ、実用的な定量法を完成させ、その有用性を証明した。この定量法は、イムノアッセイ法を凌駕する感度であり、特異性の高い定量法であるため臨床試験における血漿中 GIP の推移を的確に評価することが可能となった。

一方、本実験から未切断ペプチドではなく、プロテアーゼ処理して適当なサイズにしたフラグメントペプチド（サロゲートペプチドと呼ばれる）を用いる手法がきわめて有効であることが確認された。しかしながら、望みのサロゲートペプチドを入手するための市販のプロテアーゼ数が限られており、多種多様なペプチドの分析には対応できないことが判明した。そこで、申請者が所属する研究室で研究されている microcystin 分解性細菌 B-9 株の持つプロテアーゼが、サロゲートペプチド調製に用いることができると考察し、その機能解明を試みた。最終的に、B-9 プロテアーゼのうち、MlrB が哺乳類のペプチドに対して endoprotease 様に作用し、サロゲートペプチド獲得のための有用なプロテアーゼに成り得ることを確認するとともに、インクレチンの一種である GLP-1 の定量に適用し、その有用性を明らかにした。最終的に、従来のイムノアッセイ法の感度を凌駕する高感度定量法を、抗体を用いることなく確立し、新たなプロテアーゼの利用により、LC/MS で生理活性ペプチドを定量するための方法論を確立した。以上の結果は査読付き論文誌 3 編に公表されており、論文博士号取得のための基準を満たしている。

以上のことから、学位論文としての条件を備えていると評価できる。従って、学位を授与することを妥当なものと判断する。