

博士論文

1 分子酵素活性プロファイリングによる

疾患関連酵素の超高感度検出

坂本 眞伍

## 目次

第一章 序論.....	3
第一節 酵素活性検出による疾患診断.....	4
第二節 1分子計測法.....	6
第三節 血液中の酵素活性検出を利用した診断の課題.....	8
第四節 1分子酵素活性プロファイリング.....	10
第二章 血液中の ALP アイソザイムの 1 分子レベルでの分離検出.....	12
第一節 蛍光プローブ群の開発.....	13
第二節 ALP アイソザイムの分離・検出.....	25
第三節 血液中 ALP アイソザイムの判別・定量.....	28
第四節 ALP アイソザイム活性の二峰性について.....	32
第五節 小括.....	35
第三章 血液中の多様な phosphatase の 1 分子酵素活性プロファイリング.....	36
第一節 血液中の多様な phosphatase の検出.....	37
第二節 活性パターンの重ね合わせによる検出酵素の推測と疾患との関連.....	40
第三節 阻害剤を用いたアッセイによる検出酵素の推測.....	44
第四節 小括.....	46
第四章 血液中の ENPPs の 1 分子酵素活性プロファイリング.....	47
第一節 背景及び ENPPs 活性検出蛍光プローブ群の開発.....	48
第二節 血漿サンプル中の ENPPs 活性検出とすい臓がんとの関連.....	51
第三節 1 分子酵素活性プロファイリングの検出感度.....	58
第四節 小括.....	60
第五章 総括と今後の展望.....	61
第一節 総括.....	62
第二節 今後の展望.....	63
実験の部.....	66
参考文献.....	78

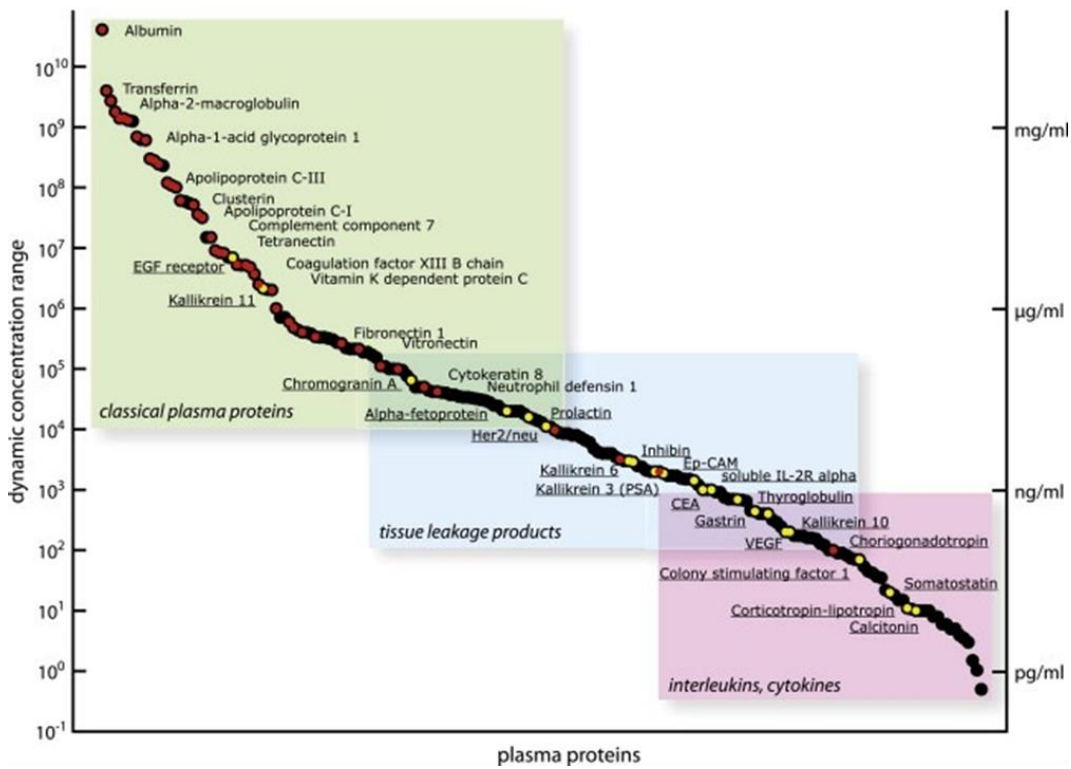
# 第一章

## 序論

## 第一節 酵素活性検出による疾患診断

生体内では数千種類を超える酵素反応が進行しており、それによって起こる複雑な代謝活性によって生命活動が維持されている。生体内の酵素活性の異常は種々の疾患と関連しており、病態を反映して血液中などに特異的に表れる酵素も存在することから、血液中の様々な酵素活性を測定することによる疾患診断が可能であることが知られている。例えば amylase<sup>1</sup>, alkaline phosphatase<sup>2</sup>, gamma glutamyl transferase<sup>3</sup>などの酵素活性を測定する生化学検査は、古くから臨床における疾患診断の一環として利用されてきた。

このような酵素を含めたタンパク質を検出する手法として近年、ELISA や質量分析法によるプロテオミクスにおける技術開発が進んでいる。しかしながら、近年の血中のタンパク質の発現量解析の結果より、多数の夾雑物が存在する血液などの生体サンプルを取り扱う際、プロテオミクスによって主に解析可能である血液中のタンパク質群の濃度レンジと、特定の疾患と関連するバイオマーカーとなり得るタンパク質群の濃度レンジには少なからず乖離がみられている<sup>4</sup> (Fig. 1-1-1)。そのため、その発現量の少なさから発見に至ることができていないタンパク質や、診断手法の確立に至っていないタンパク質も多数存在するとの考えがなされており、生体サンプル中に存在する、より低濃度域のタンパク質、及び酵素を高感度に検出する手法の開発が求められている。



*Mol. Oncol.* **2009**, *3*, 33-44.

Fig. 1-1-1. Depicted are the plasma protein concentration. Red dots indicate proteins that were identified by the HUPO plasma proteome initiative and yellow dots represent currently utilized biomarkers.

## 第二節 1 分子計測法

酵素活性検出の高感度化を実現し得る技術としては、多数の微小なリアクターに酵素を 1 分子ずつ分画し、蛍光プローブのようなレポーター分子を用いてその活性を検出する 1 分子計測法を用いた手法が開発されてきた。その代表的なものとして東京大学工学系研究科、野地研究室で開発されているマルチウェルチャンバー型のマイクロデバイスを利用した研究例がある。こちらの研究例では beta-galactosidase<sup>5</sup> などの、単一の精製酵素に着目した、触媒回転数などのタンパク質機能の精査に用いられてきた(Fig. 1-2-1, A)。本手法では、フッ素樹脂をコーティングしたスライドガラスに対して微細加工技術を施し、多数の微小なウェルを形成したマイクロデバイスを使用しており(Fig. 1-2-1, B)、デバイスに反応溶液をロードしたのちに疎水性溶媒でそれぞれのウェルを密封することで密封された微小環境中での酵素反応を進行させる(Fig. 1-2-1, C)。それぞれのウェルの容積は fL オーダーと非常に小さいため、酵素 1 分子が産生するレポーター分子であっても短時間で検出可能な濃度に到達し、酵素活性を 1 分子単位という高感度で測定することが可能である。過去の報告では、この手法を用いて溶液中の alkaline phosphatase の活性を 0.4 pg/mL という ELISA の数百倍以上の感度での検出を達成している<sup>6</sup>。

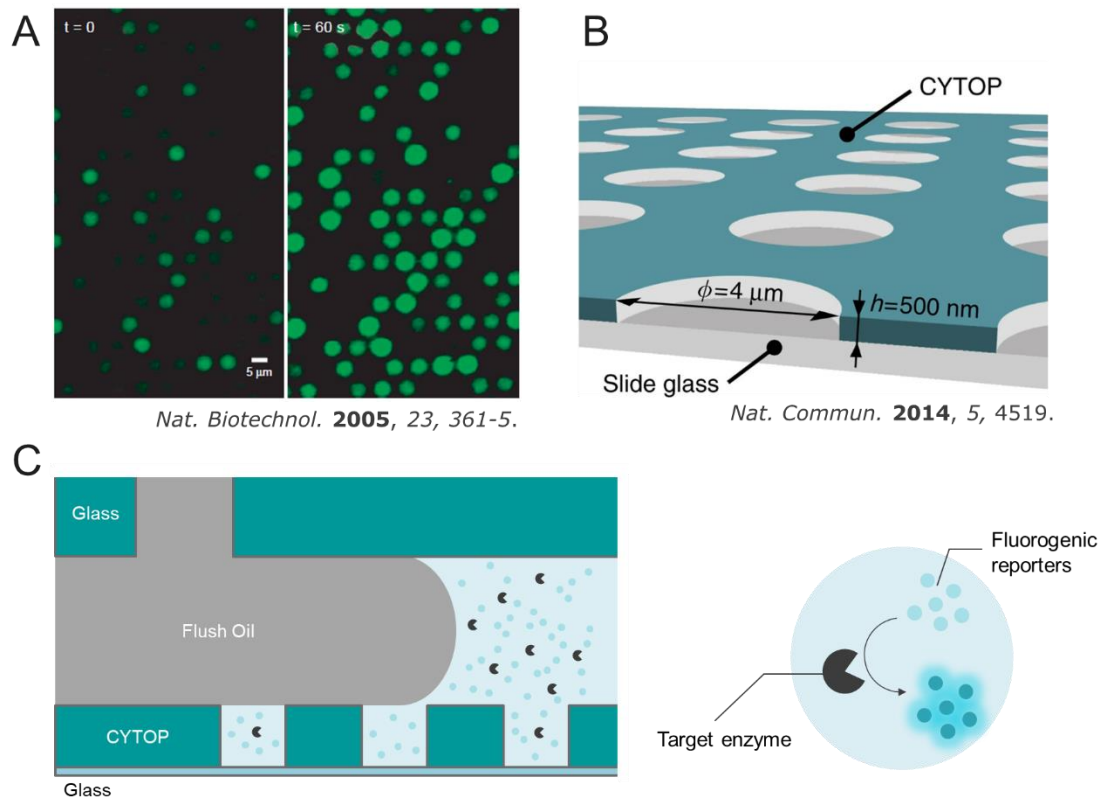


Fig. 1-2-1. (A) Fluorescent images of the enzymatic activity in the chambers. (B) Illustration of microfabricated chamber. (C) Schematic illustration of the single enzyme activity detection assay.

### 第三節 血液中の酵素活性検出を利用した診断の課題

酵素活性検出を利用した疾患診断法における1つの課題が、類似の活性を有する酵素群（アイソザイム・サブタイプ）の存在である。

例えば、alkaline phosphatases (ALPs)の場合、異なる臓器由来のALP活性の異常が、それぞれ異なる疾患と関連していることが知られており、病態診断に利用されている (Table 1-3-1)。具体的には、まずALPの吸光基質である *p*-nitrophenyl phosphate をALPが加水分解することで生じる *p*-nitrophenol の405 nmの吸光度を基に血清中のALP全体の活性を測定 (JSCC 標準化対応法) し、そこで異常値が出た場合には、非変性電気泳動法によってどのアイソザイムが異常値を示しているのかについて同定するという流れがとられている (Fig. 1-3-1)。この方法は古くから現在までおこなわれているものであるが、いくつかの課題も存在する。まず活性を利用した吸光法では、酵素活性を血中の酵素全体の和でしか評価ができないため、この測定だけから寄与する複数のアイソザイムの内訳を知ることができない。また、非変性電気泳動法については、操作が煩雑で一度の測定に数十分程度かかるなどスループットが低く、ある程度の発現量がないと酵素活性の検出ができないため、血中に微量存在する酵素を検出しようと考えた際には、この方法は適していない。

マイクロデバイスを用いた酵素活性検出においても、生体サンプル中に存在する複数の酵素がマイクロウェル内にランダムに封入されてしまうため、特に類似の活性を持つ酵素群が存在する酵素種を検出する場合には、これらの酵素を区別して検出することが困難である。このような問題点から1分子計測法においては、血液・尿などの生体サンプルを用いた酵素活性測定は行われてこなかった。



Isozymes	Derived Organ	Related diseases
ALP1	Liver	Obstructive jaundice Metastatic hepatoma Biliary tract disease
ALP2	Liver	Hepatitis Hepatic cirrhosis Hepatoma
ALP3	Bone	Bone diseases Bone metastasis Hyperthyroidism
ALP4	Placenta	Late pregnancy Malignancy
ALP5	Intestine	Hepatic cirrhosis Diabetes
ALP6	Ig binding	Ulcerative colitis

Table 1-3-1. Subtypes of ALPs in serum and their relations to diseases.

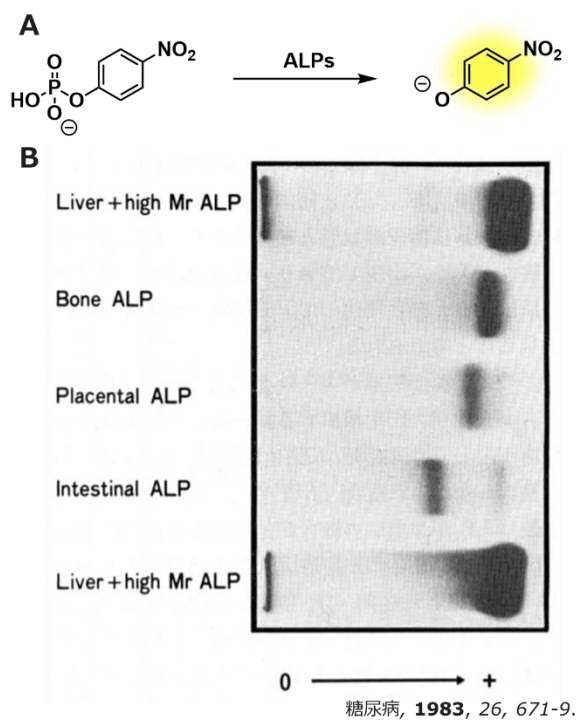


Fig. 1-3-1. (A) Reaction used in JSCC reference method. (B) Electrophoresis-base detection of ALPs in serum of patients showing abnormal values in JSCC reference method.

#### 第四節 1分子酵素活性プロファイリング

このような問題を受けて、溶液中に存在する酵素の活性を、1分子ずつ複数のパラメータで評価することでアイソザイム・サブタイプレベルでの分離検出をおこなうことを目指した。これによって、1分子計測技術における高感度という利点を生かしつつ、類似の活性を有する酵素群の多数存在する生体サンプルの測定にも適用可能となることが期待される。

具体的な戦略としては、まず酵素毎に異なる反応性を示す複数色の蛍光プローブを開発し、測定する生体サンプルに加えてマイクロデバイスへの封入を行う。ウェル中の各酵素がそれぞれ異なる反応性を以って複数色のプローブと同時に反応すると、各色の蛍光上昇速度の組み合わせ（活性パターン）が各酵素種に固有のものとなるため、その活性パターンに基づいて各酵素種を区別可能であると期待される。このような方法により、通常活性検出に基づく手法では分離検出が困難なアイソザイムも個別に検出することが可能であることに加え、各酵素種に相当するウェルの個数を数えることで定量を行うことも可能である。そして、疾患患者と健常者との間での差異を見出すことで疾患の診断に利用することを目指す(Fig. 1-4-1.)。このような戦略でサンプル中の複数の酵素活性を1分子レベルで分離検出する方法論を1分子酵素活性プロファイリングと命名し、その確立に取り組んだ。

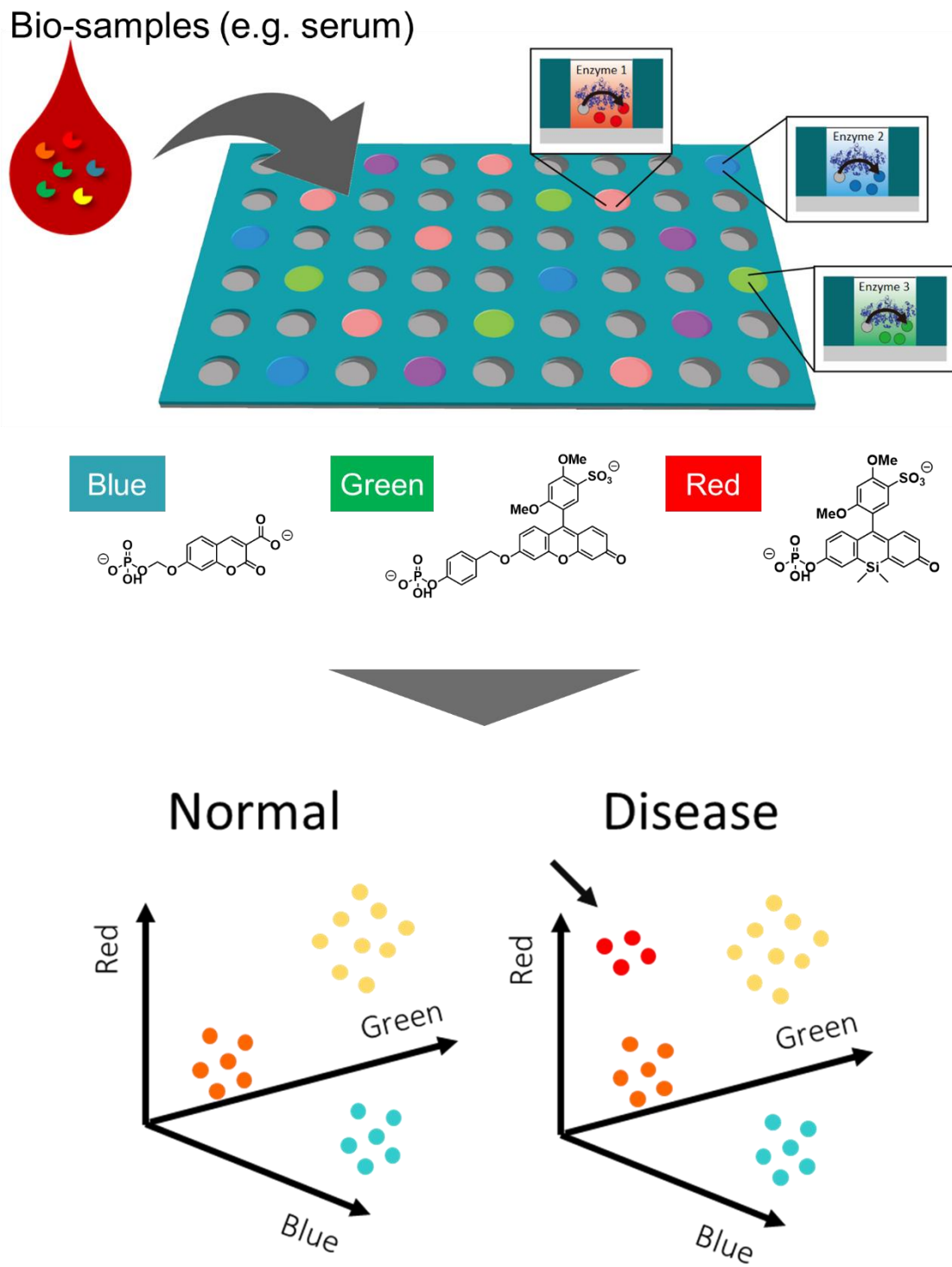


Fig. 1-4-1. Schematic view of single enzyme activity-based protein profiling.

## 第二章

### 血液中の ALP アイソザイムの 1 分子レベルでの分離検出

## 第一節 蛍光プローブ群の開発

まず本研究の概念実証として、複数色のプローブの組み合わせによって ALP の異なる臓器由来のアイソザイムを分離検出することを試みた。

本学修士課程および博士課程において、本研究の目的に適う phosphatase 活性検出蛍光プローブ群の開発を行った。

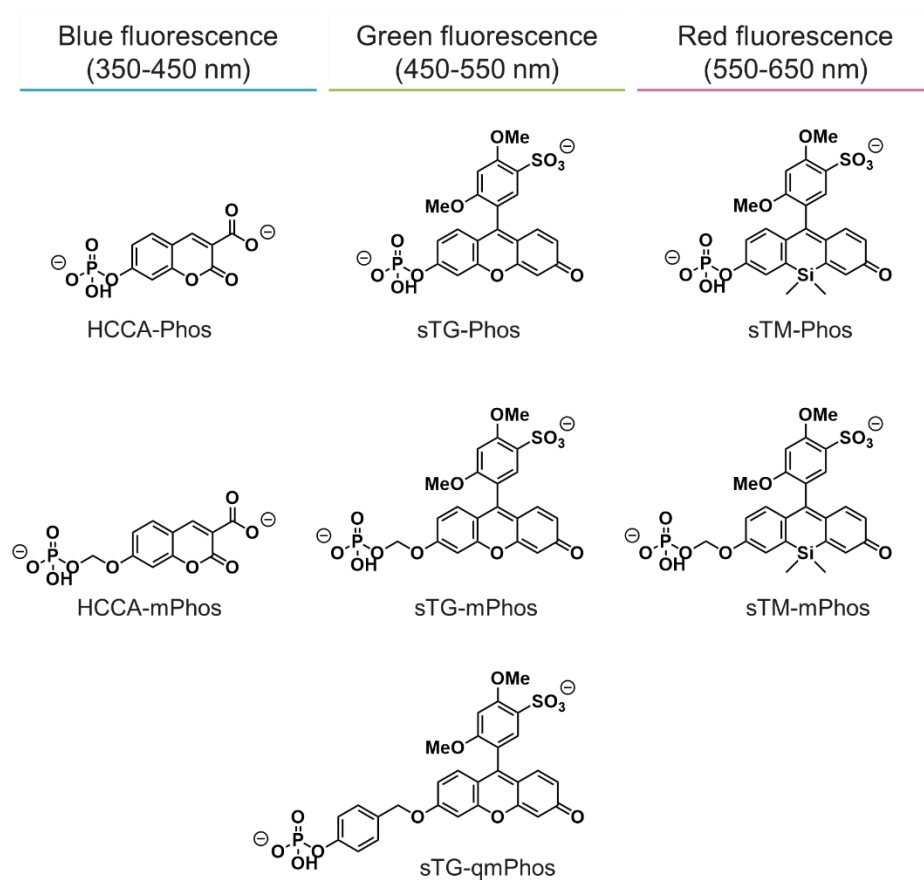


Fig. 2-1-1. Developed novel probes to detect phosphatases activity in microdevice.

### 蛍光プローブ群の開発におけるクライテリア 1 – 水溶性官能基を有する

本研究で使用するマイクロデバイスでは、酵素反応の容器となるそれぞれのウェルが疎水性溶媒によって密閉されているため、蛍光母核の脂溶性が高いプローブ（例：4-methylumbelliferyl phosphate, 以下 4MU-Phos）を使用した場合、酵素反応により産生される蛍光性生成物が疎水性溶媒中へ漏出してしまい、定量性の高い測定が困難であるという問題があった。そこで、青色の蛍光波長を有するプローブの母核としては 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid (HCCA) を選択し、緑色・赤色の蛍光波長を有するプローブの母核としては本学修士課程において開発した水溶性の高い蛍光色素（sTG, sTM）を使用した。

それぞれの色素のフェノール体（pH 3.0）、フェノキシド体（pH 13.0）、ALP の至適 pH（pH 9.3）における光学特性を精査した。その結果を以下に示す（Table 2-1-1, Fig. 2-1-2）。

		Absorbance max wavelength (nm)	Emission max wavelength (nm)	Molar extinction coefficient ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	Fluorescence quantum yield
HCCA	Sodium phosphate buffer (pH 3.0)	350	445	$2.3 \times 10^4$	0.955
	Diethanolamine buffer (pH 9.3)	388	446	$3.2 \times 10^4$	0.826
	0.1 N sodium hydroxide solution (pH 13.0)	387	445	$3.2 \times 10^4$	0.986
sTG	Sodium phosphate buffer (pH 3.0)	444	521	$4.5 \times 10^4$	0.045
	Diethanolamine buffer (pH 9.3)	499	517	$9.9 \times 10^4$	0.679
	0.1 N sodium hydroxide solution (pH 13.0)	497	520	$1.0 \times 10^5$	0.885
sTM	Sodium phosphate buffer (pH 3.0)	472	545	$1.6 \times 10^4$	0.004
	Diethanolamine buffer (pH 9.3)	589	608	$9.5 \times 10^4$	0.518
	0.1 N sodium hydroxide solution (pH 13.0)	587	605	$9.4 \times 10^4$	0.547

Table 2-1-1. Photophysical properties of developed dyes. Measurement were done in indicated buffers.

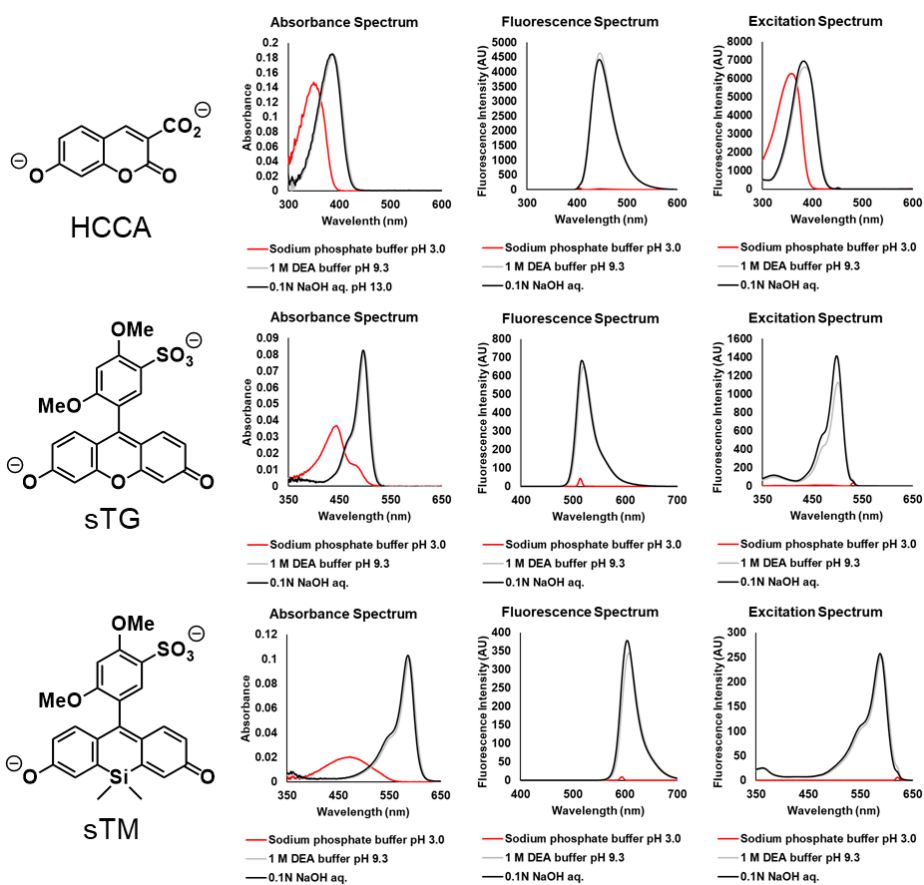


Fig. 2-1-2. Absorbance, fluorescence and excitation spectra of HCCA (upper, 10  $\mu\text{M}$ ), sTG (middle, 1  $\mu\text{M}$ ) and sTM (lower, 1  $\mu\text{M}$ ) in sodium phosphate buffer (100 mM, pH 3.0), diethanolamine-HCl buffer (1 M, containing 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 9.3) or sodium hydroxide solution (0.1 M, pH 13.0). Fluorescence spectra were measured under excitation at 405 nm (for HCCA), 514 nm (for sTG) and 594 nm (for sTM). Excitation spectra were measured under emission at 450 nm (for HCCA), 530 nm (for sTG) and 620 nm (for sTM)

これらの水溶性官能基を有する蛍光プローブを用いて活性測定を行うことで、蛍光性生成物のウェルからの漏出が防止され、定量性の高い測定が可能となった (Fig. 2-1-3)。

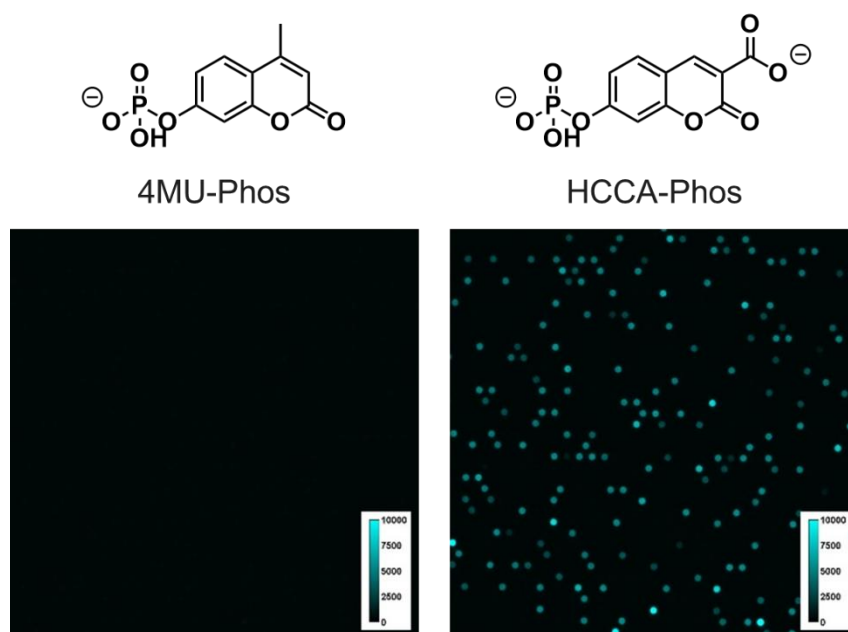


Fig. 2-1-3. Representative fluorescence images of a microdevice containing ALP (from *P. pastoris*,  $\lambda = 0.1$ , where  $\lambda$  is the existence probability of a protein molecule per well) with fluorescence probes (4MU-Phos and HCCA-Phos, 100  $\mu\text{M}$ ) in tris-HCl buffer [100 mM (pH 7.4), containing 1 mM  $\text{MgCl}_2$  and 0.1% (w/w) CHAPS] after 50 min incubation.

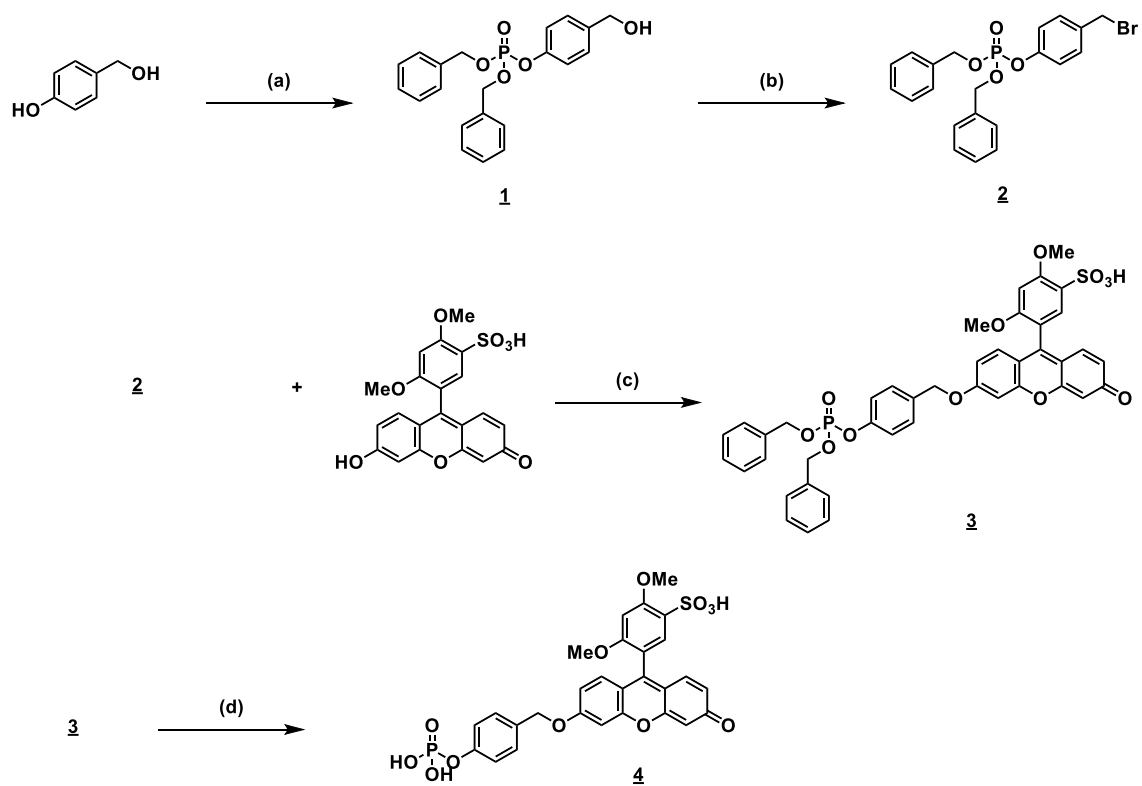


## 蛍光プローブ群開発におけるクライテリア 2 – 酵素間で反応性に差異のある基質認識部位の構造を有する

ALP のアイソザイム間で反応性に差異を持たせるために、ALP の基質認識部位であるリン酸エステル部位の構造が異なるプローブを複数開発した。具体的には、蛍光色素に直接リン酸エステルが結合したもの (HCCA-Phos, sTG-Phos, sTM-Phos) に加え、リン酸エステルの化学的性質を変化させることで複数の phosphatase 間での基質選択性に差異を与えることができるという報告<sup>7</sup>に基づき、蛍光色素とリン酸エステル間にメチレン基を有するプローブ (HCCA-mPhos, sTG-mPhos, sTM-mPhos) を本学修士課程において開発した。これらのプローブは、リン酸エステルの加水分解後に生成する hemiacetal 構造が速やかに formaldehyde を生成しつつ脱離することで、蛍光増大が起こることが期待される。

また、リン酸エステルの化学的性質の異なる基質認識部位の構造を取り入れることで、ここまで開発した 2 種類とも反応性の異なるプローブを開発することができることを期待し、蛍光色素とリン酸エステル間に 4-hydroxybenzyl alcohol 構造を有する緑色の蛍光プローブ、sTG-qmPhos を本学博士課程において開発した。このプローブは、リン酸エステルの加水分解後に 4-hydroxybenzyl alcohol 部位が速やかに *p*-quinone methide を生成しつつ脱離することで、蛍光増大が起こることが期待される。

sTG-qmPhos は以下のスキームに従って合成した。



Scheme 2-1-1. Synthesis of a novel phosphatase activity detection fluorescent probe (sTG-qmPhos).

(a) dibenzyl phosphite, DMAP, DIEA,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , Yield: 52 % (b)  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{CBr}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., Yield: 46 % (c)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{DMSO}/\text{CH}_3\text{CN}$ , r.t., Yield: 70 % (d) TMSI, pyridine,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , Yield: 65 %.

以上のように開発した phosphatase 活性検出蛍光プローブ群は、ALP と反応し、速やかに蛍光上昇を示した。プローブ群及び、その ALP との反応前後における光学特性を精査した結果を以下に示す (Table 2-1-2, Fig. 2-1-4)。

	Absorbance max wavelength (nm)	Emission max wavelength (nm)	Fluorescence quantum yield
HCCA-Phos	350	445	0.955
HCCA-mPhos	388	446	0.826
sTG-Phos	387	445	0.986
sTG-mPhos	444	521	0.045
sTG-qmPhos	499	517	0.679
sTM-Phos	497	520	0.885
sTM-mPhos	472	545	0.004

Table 2-1-2. Photophysical properties of developed dyes. Measurement were done in diethanolamine buffer (pH 9.3).

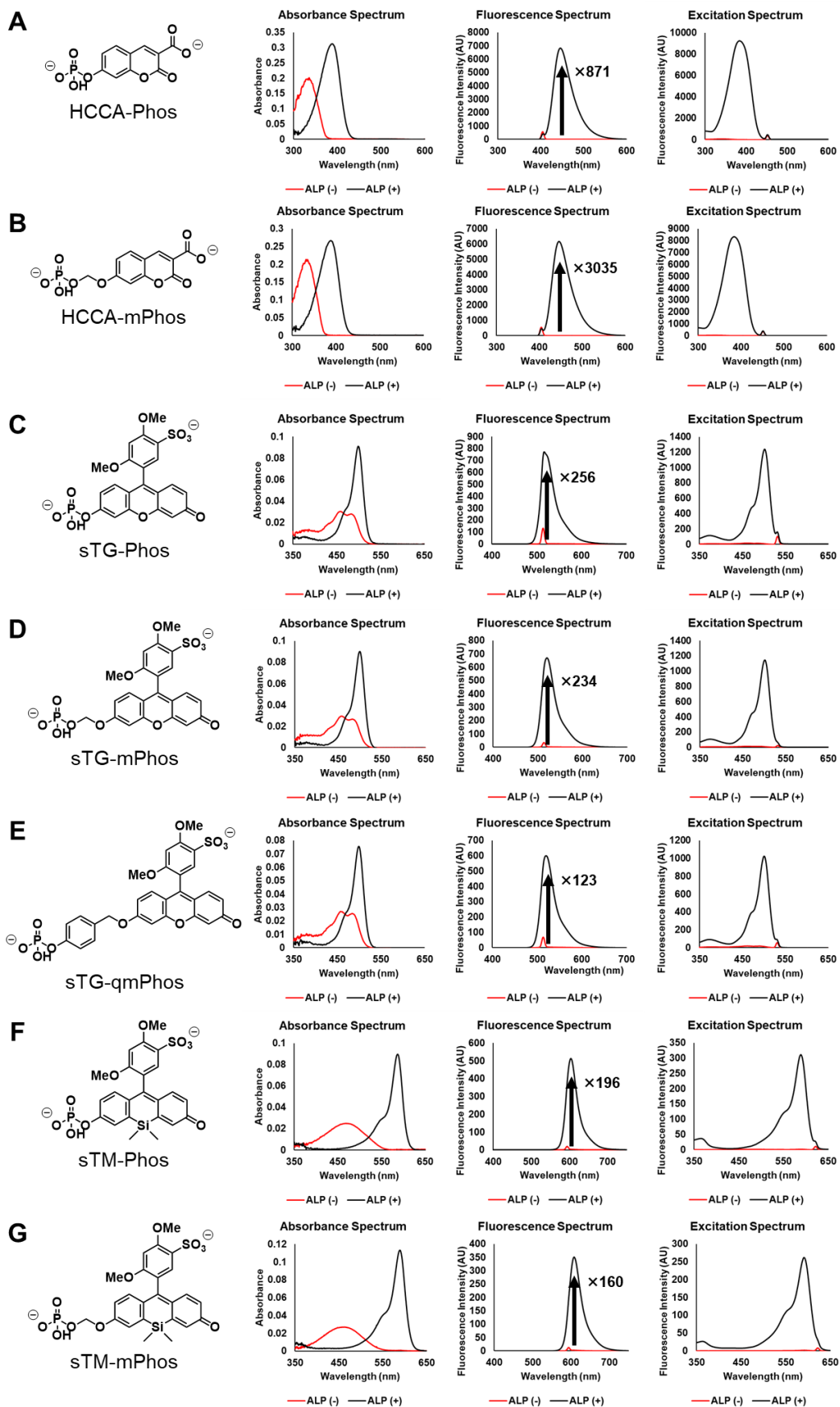


Fig. 2-1-4. Absorbance, fluorescence and excitation spectra of (A) HCCA-Phos, (B) HCCA-mPhos, (C) sTG-Phos, (D) sTG-mPhos, (E) sTG-qmPhos, (F) sTM-Phos and (G) sTM-mPhos (10  $\mu$ M for HCCA-based probes and 1  $\mu$ M for sTG and sTM-based probes) after incubation with/without ALP (from *Pichia pastoris*) in diethanolamine buffer (1 M, containing 1 mM  $MgCl_2$ , pH 9.3). Fluorescence spectra were measured under excitation at 405 nm (for HCCA-based probes), 514 nm (for sTG-based probes) and 594 nm (for sTM-based probes). The excitation spectra were measured under emission at 450 nm (for HCCA-based probes), 530 nm (for sTG-based probes) and 620 nm (for sTM-based probes).

また、これらのプローブ群について、各 ALP アイソザイムに対する反応性を検討したところ、各プローブに対する反応性の高低が各アイソザイムによって異なることが見出された (Fig. 2-1-5, Table 2-1-3)。

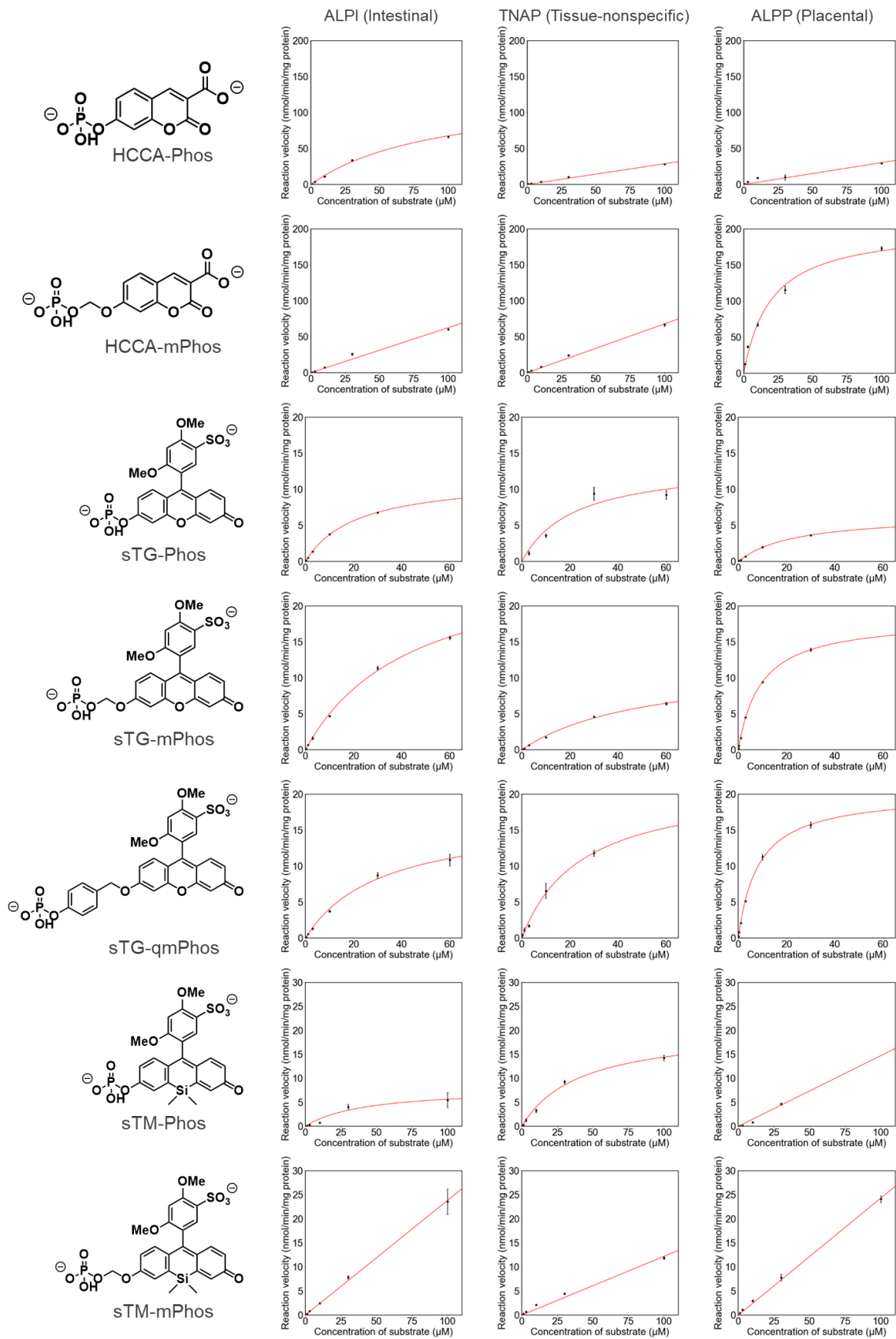


Fig. 2-1-5. Michaelis-Menten analyses of the reactivities of developed fluorescent probes toward different ALP isozymes. Assays were performed in DEA-HCl buffer (pH 9.3) containing 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% w/w CHAPS, 1 mM DTT and ALPs (recombinant, ALPI: 0.84 μg/mL, TNAP: 0.87 μg/mL, ALPP: 0.8 μg/mL). Incubation was performed at 25 °C for 30 min. Error bars represent S.E. (n = 4).

	ALPI			TNAP			ALPP		
	$k_{cat}$ (/sec)	$K_m$ (μM)	$k_{cat}/K_m$ (/sec/μM)	$k_{cat}$ (/sec)	$K_m$ (μM)	$k_{cat}/K_m$ (/sec/μM)	$k_{cat}$ (/sec)	$K_m$ (μM)	$k_{cat}/K_m$ (/sec/μM)
HCCA-Phos	0.14	94.18	$1.53 \times 10^{-3}$	-	-	$3.19 \times 10^{-4}$	-	-	$3.10 \times 10^{-4}$
HCCA-mPhos	-	-	$6.93 \times 10^{-4}$	-	-	$7.48 \times 10^{-4}$	0.21	19.84	$1.06 \times 10^{-2}$
sTG-Phos	$1.28 \times 10^{-2}$	21.14	$6.04 \times 10^{-4}$	$1.50 \times 10^{-2}$	21.62	$6.93 \times 10^{-4}$	$6.70 \times 10^{-3}$	23.07	$2.90 \times 10^{-4}$
sTG-mPhos	$3.02 \times 10^{-2}$	44.73	$6.74 \times 10^{-4}$	$1.34 \times 10^{-2}$	52.50	$2.55 \times 10^{-4}$	$1.89 \times 10^{-2}$	9.36	$2.02 \times 10^{-3}$
sTG-qmPhos	$1.86 \times 10^{-2}$	31.57	$5.89 \times 10^{-4}$	$2.38 \times 10^{-2}$	24.67	$9.64 \times 10^{-4}$	$2.09 \times 10^{-2}$	8.34	$2.50 \times 10^{-3}$
sTM-Phos	$8.82 \times 10^{-3}$	41.95	$2.10 \times 10^{-4}$	$2.24 \times 10^{-2}$	41.05	$5.45 \times 10^{-4}$	-	-	$1.55 \times 10^{-4}$
sTM-mPhos	-	-	$2.64 \times 10^{-4}$	-	-	$1.32 \times 10^{-4}$	-	-	$2.48 \times 10^{-4}$

Table 2-1-3.  $k_{cat}$  and  $K_m$  values of developed probes with different ALP isozymes. MW = 66 kDa (ALPI), 66 kDa (TNAP), and 62 kDa (ALPP) were used for calculation. For substrate-enzyme pairs whose  $K_m$  values were higher than the measurable ranges, linear fitting was performed to calculate the  $k_{cat}/K_m$  values.

これらのプローブのうち、HCCA-mPhos, sTG-Phos の組み合わせを用いて、ヒト小腸型 ALP (ALPI) と組織非特異型 ALP (TNAP) の精製酵素の活性をマイクロデバイス中で測定したところ、両アイソザイムに対して、1分子レベルでの活性の強度に差異を見出すことができた (Fig. 2-1-6)。

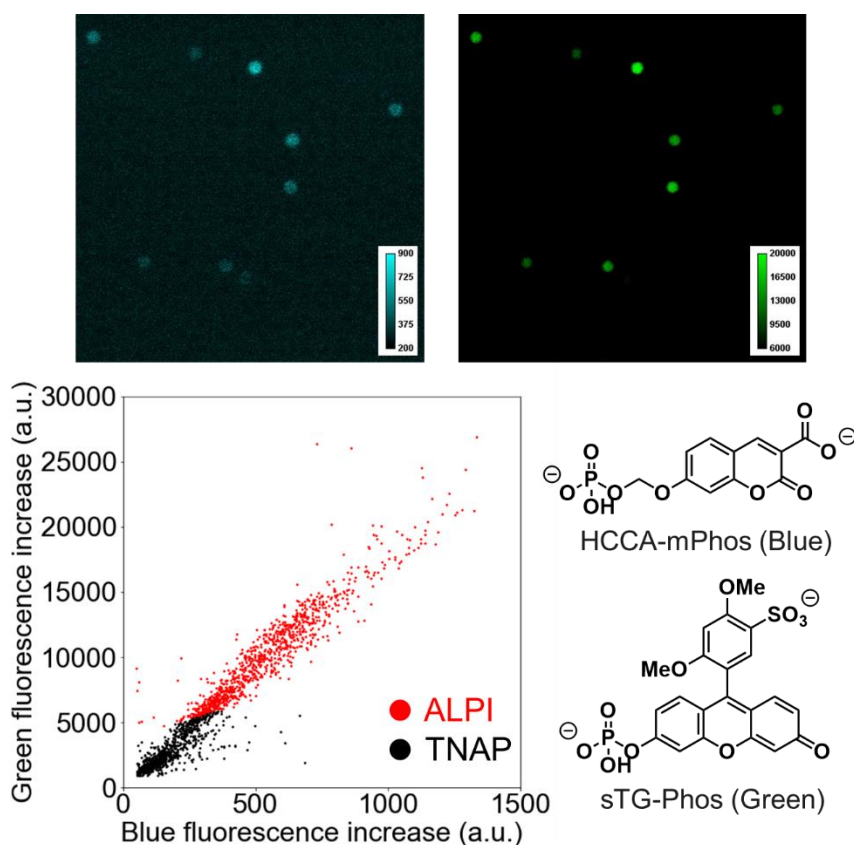


Fig. 2-1-6. (upper) Representative fluorescence images (432-475 nm and 500-580 nm) of microdevice containing mixture of ALPI and TNAP (recombinant,  $\lambda = 0.1$ ,  $\lambda$ : existence probability per a well) with fluorescence probes (HCCA-mPhos and sTG-Phos, 20  $\mu\text{M}$ ) in Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.4, containing 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 0.1% w/v CHAPS), 50 min after incubation at 25  $^\circ\text{C}$ . (lower left) Scattered plot of the fluorescence increase of the well containing enzyme molecule. A result was analyzed by discriminant analysis based on Mahalanobis' Distance (see Methods). (lower right) Chemical structures of using probes in this assay.



## 第二節 ALP アイソザイムの分離・検出

これまで、ALP アイソザイムをその活性パターンにより分離検出することを目指していたが、ALPI・TNAP について、1 分子ごとの活性に強弱を見出すに留まっており、各プローブに対する反応性の組み合わせの違いに基づいた分離検出は達成できていなかった。

そこで、両アイソザイムで各プローブに対する反応性の組み合わせに明確な差異が見出せるような（散布図上では明確に異なるクラスターとして現れるような）測定条件の検討を行った。ALP の活性が最も高くなる条件下で測定を行うことで基質に対する反応性の差異も強く現れるのではないかと考え、そのような溶液条件の下（1 M DEA buffer with 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.3）<sup>6</sup>、sTG-mPhos, sTM-Phos のプローブの組み合わせを用いて活性測定を行うことで、ALPI・TNAP 両アイソザイムの活性パターンに明確な差異を見出すことに成功した（Fig. 2-2-1）。また、両アイソザイムの混合溶液を測定した場合においても、検出された各分子について、精製酵素単体での測定データを教師データとする判別分析（実験の部、Discrimination analysis 参照）を行うことによっていずれのアイソザイムかを判定し、分離検出することが可能であった（Fig. 2-2-2）。

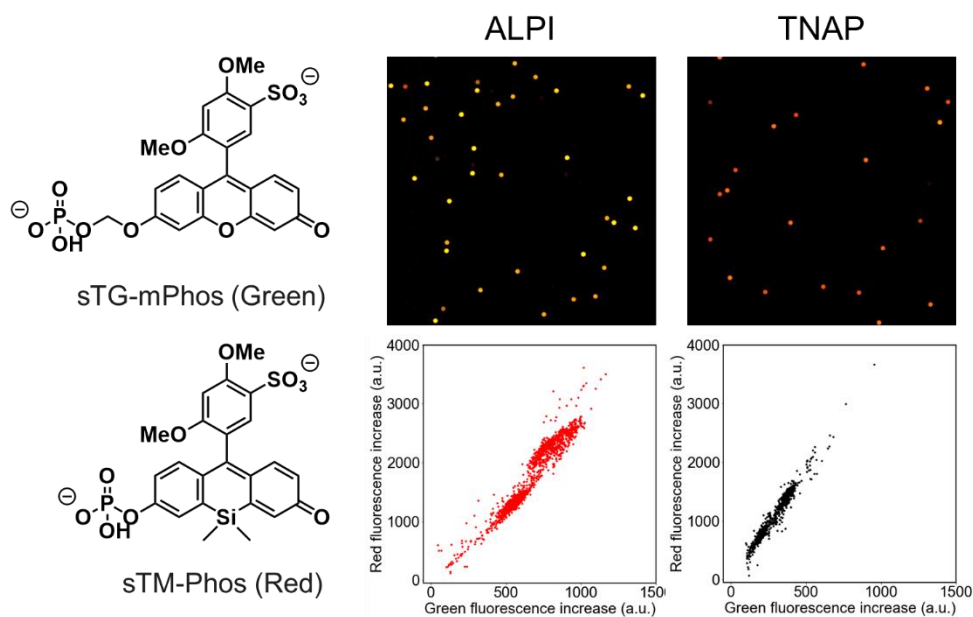


Fig. 2-2-1. (A) Chemical structures of using probes in this assay. (B, upper) Representative fluorescence images (530-580 nm and 610-700 nm) of microdevice containing ALPI and TNAP (recombinant.  $\lambda = 0.1$ ,  $\lambda$ : existence probability per a well) with fluorescence probes (sTG-mPhos and sTM-Phos, 30  $\mu\text{M}$ ) in DEA-HCl buffer (1 M, pH 9.3, containing 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% w/v CHAPS), 50 min after incubation at 25  $^\circ\text{C}$ . (B, lower) Scattered plot of the fluorescence increase of the well containing enzyme molecule.

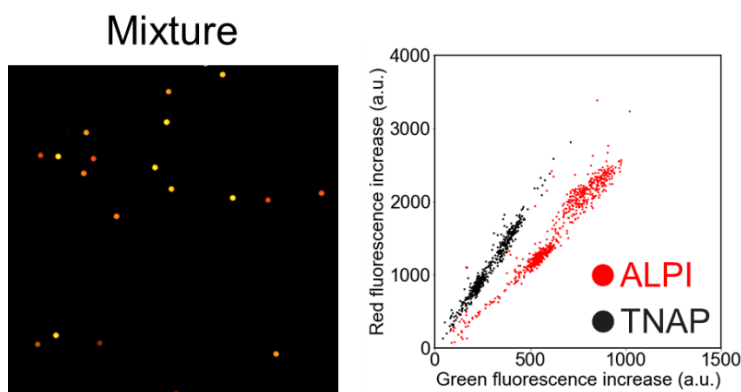


Fig. 2-2-2. (left) Representative fluorescence images (530-580 nm and 610-700 nm) of microdevice containing mixture of ALPI and TNAP (recombinant.  $\lambda = 0.1$ ,  $\lambda$ : existence probability per a well) with fluorescence probes (sTG-mPhos and sTM-Phos, 30  $\mu\text{M}$ ) in DEA-HCl buffer (1 M, pH 9.3, containing 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% w/v CHAPS), 50 min after incubation at 25  $^\circ\text{C}$ . (right) Scattered plot of the fluorescence increase of the well containing enzyme molecule. A result was analyzed by discriminant analysis based on Mahalanobis' Distance (see Methods).

また、ALPI と TNAP の精製酵素をそれぞれ濃度比 1 : 5, 1 : 1, 5 : 1 で混合した溶液を調製し、マイクロデバイスで活性を測定した結果、検出された酵素のうち ALPI として分離検出された分子数の割合は、実際に混合した割合に従って推移した (Fig. 2-2-3)。すなわち、本手法は高い定量性を以って溶液中の ALP アイソザイムを分離検出することが可能であることが示唆された。

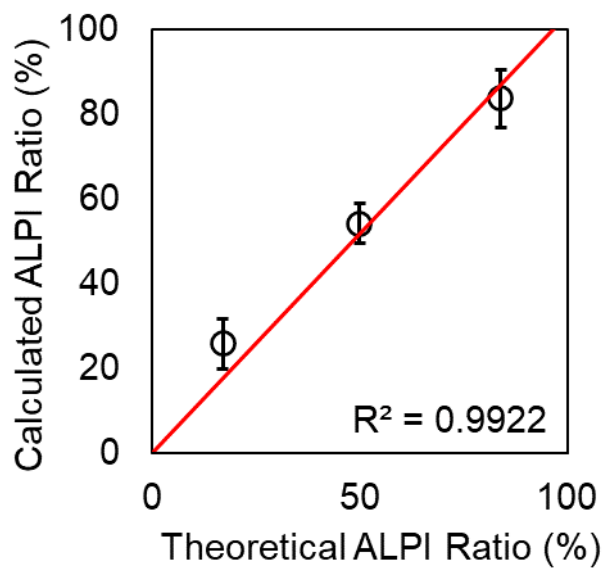


Fig. 2-2-3. Experiments were performed with mixtures of different ratios of ALPI and TNAP (horizontal axis), and the percentages of spots that appeared in the area of ALPI were counted (vertical axis). Experiments were performed three times. Error bar, SD ( $n = 3$ ).

### 第三節 血液中 ALP アイソザイムの判別・定量

前節で、精製酵素を用いた測定において、ALPI と TNAP を高い定量性を以って分離検出することが可能であることが示されたが、生体サンプルを用いて測定した場合においても同様の測定が可能か検討を行った。10名の検体に由来する血清サンプルを測定した結果、2種類の活性パターンを持つ酵素が検出され (Fig. 2-3-1)、10名の血清サンプルの測定データ全てについて、精製酵素の測定データを教師データとした判別分析に基づき、ALPI・TNAP を分離検出することが可能であった (Fig. 2-3-2)。

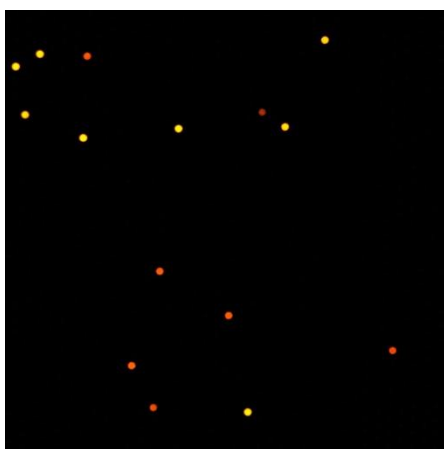


Fig. 2-3-1. Representative fluorescence images (530-580 nm and 610-700 nm) of microdevice containing 1/3,000-diluted human serum with fluorescent probes (sTG-mPhos and sTM-Phos, 30  $\mu$ M) in DEA Buffer (1 M, pH 9.3, containing 1 mM  $MgCl_2$ , 0.1% w/v CHAPS), 50 min after incubation at 25  $^{\circ}C$ .

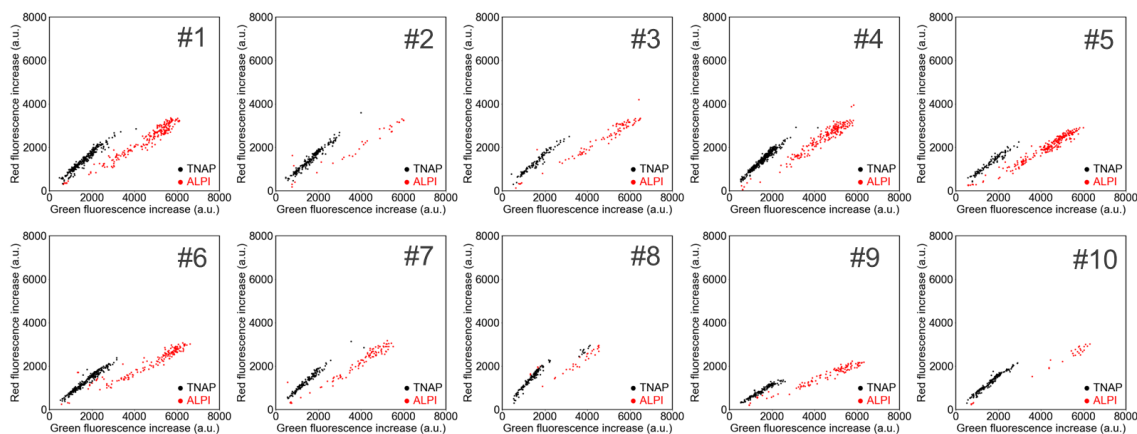


Fig. 2-3-2. Scatter plots of activity acquired for 10 samples from human serums. Each point was assigned to the ALPI or TNAP cluster by discrimination analysis (see Methods).

また、それぞれの血清サンプルにおいて ALP アイソザイムを定量的に分離検出できているのかを検討するため、一般に生化学検査で用いられる比色分析によって測定される各検体サンプル中の ALPI の活性と、マイクロデバイスにおいて ALPI であると判別された分子の活性値の合計を比較した。

比色分析による測定においては、血液中で活性を持っている ALP アイソザイムは主に ALPI と TNAP で構成されているという仮定の下、TNAP 選択的な阻害剤である levamisole<sup>8</sup> を用いて血清中 ALPI 活性の定量を試みた。血清中の ALPI に由来する活性値は、血清全体における活性値の阻害された割合と、ALPI, TNAP それぞれの精製酵素の活性の阻害された割合に基づいて算出した (Fig. 2-3-3, 2-3-4)。

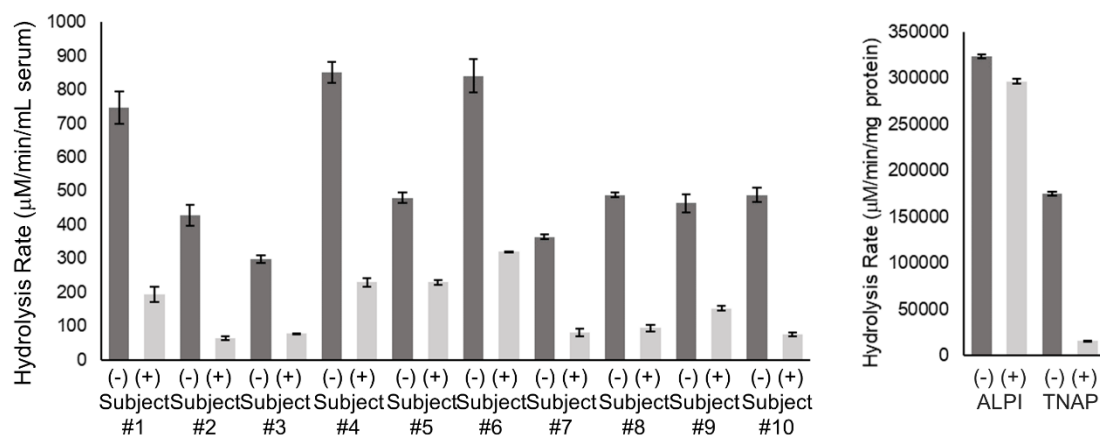


Fig. 2-3-3. Hydrolysis rate at 10-40 min of 5 mM solution of p-nitrophenylphosphate in NEAE buffer (100 mM, pH 10.0, with or without 100 µM levamisole) containing 5.2-fold diluted serum, 0.41 µg/mL ALPI and 0.28 µg/mL TNAP. Incubated at 25 °C. Error bars represent S.E. (n = 4)

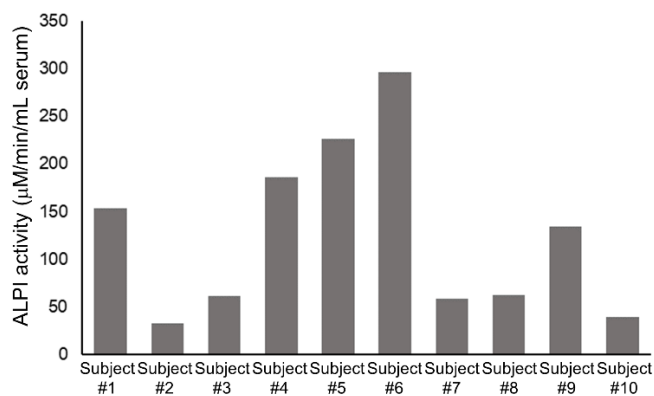


Fig. 2-3-4. ALPI activity value in serum calculated by under formula derived from former experiment at Fig. 2-2-1.  $ALPI\ activity = (a - 0.088 * b) / 0.828$ , a = serum activity values with levamisole, b = serum activity values without levamisole.

比色分析で得られた ALPI の活性値と、マイクロデバイスにおいて ALPI であると判別された分子の活性値の合計は各検体において強い相関を示した (Fig. 2-3-5)。すなわち、本検出法は血液サンプルを用いた場合においても、定量性高く溶液中の ALP アイソザイムを分離検出することが可能であることが示唆された。

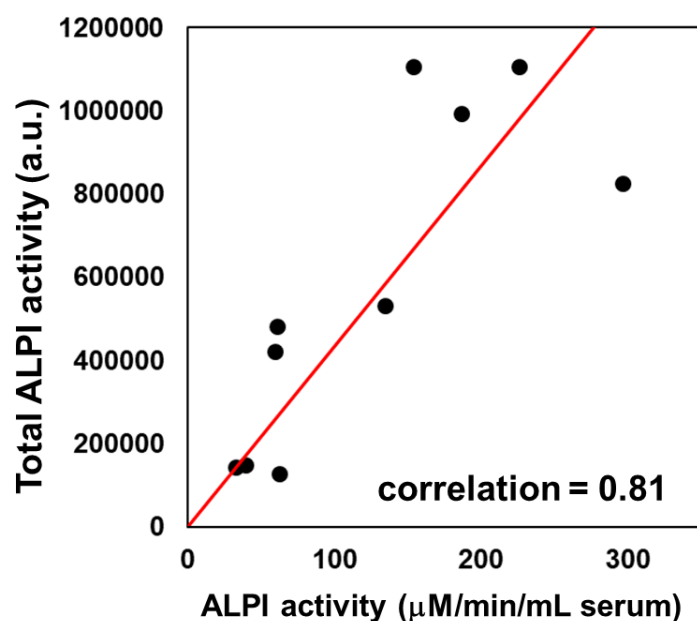


Fig. 2-3-5. The comparison of the integral of the activities calculated from the spots assigned as ALPI and the ALPI activity monitored by conventional biochemical assay (see Fig. 2-3-4.). The analysis with serum from 10 individuals is shown.

#### 第四節 ALP アイソザイム活性の二峰性について

ALP はその活性に二峰性を持つことが知られており、それは1分子単位での活性計測を行うことで初めて検出することが可能である<sup>9</sup>。また、その二峰性がホモダイマータンパク質であるALPの各サブユニットに見出される活性種と不活性種のホモ/ヘテロダイマーの組み合わせに由来すること、活性種と不活性種の生成は翻訳・フォールディングの段階でその活性中心に亜鉛が配位することができるか否か・周辺環境の酸化還元状態等に依存していること、などが示唆されている<sup>10</sup>。

本研究においても、Fig. 2-4-1 に示される測定データから、ALP のヒト臓器由来のアイソザイムもその活性に二峰性を有することを見出しているが、高活性種と低活性種の存在比は精製酵素と血清サンプル中で検出されたものと異なっていた。TNAP については、精製酵素では活性の弱いポピュレーションの数が多く、血清サンプル中では両者のポピュレーションは同程度存在した。一方、ALPI については、精製酵素では活性の弱いポピュレーションの数が多く、血清サンプル中では活性の強いポピュレーションの数が多かった

(Fig. 2-4-1)。前節で活性を測定した10名分の血清サンプルに対して同様の解析を行った結果、いずれの検体においても二峰性の分布は同様の傾向を示した (Fig. 2-4-2)。

このALPの例に関して、生体内の亜鉛濃度については、その欠乏自体が疾病となり様々な症状を引き起こす<sup>11</sup>ほか、膵β細胞内での亜鉛イオン濃度がインスリン分泌に影響を与える<sup>12</sup>ことが報告されている。ただ実際に亜鉛欠乏が糖尿病と直結することを示す報告は少なく、本研究でもALPの二峰性に関して糖尿病患者特異的な活性パターンは見出されなかった。しかしながら、同一の分子種であってもその活性パターンの分布に差異があることを見出すことのできる本手法では、その他の分析法では得ることのできない、タンパク質の合成過程等に反映される、各臓器や細胞中の金属イオン濃度・酸化還元状態の異常等に関する情報を得ることができると期待される。



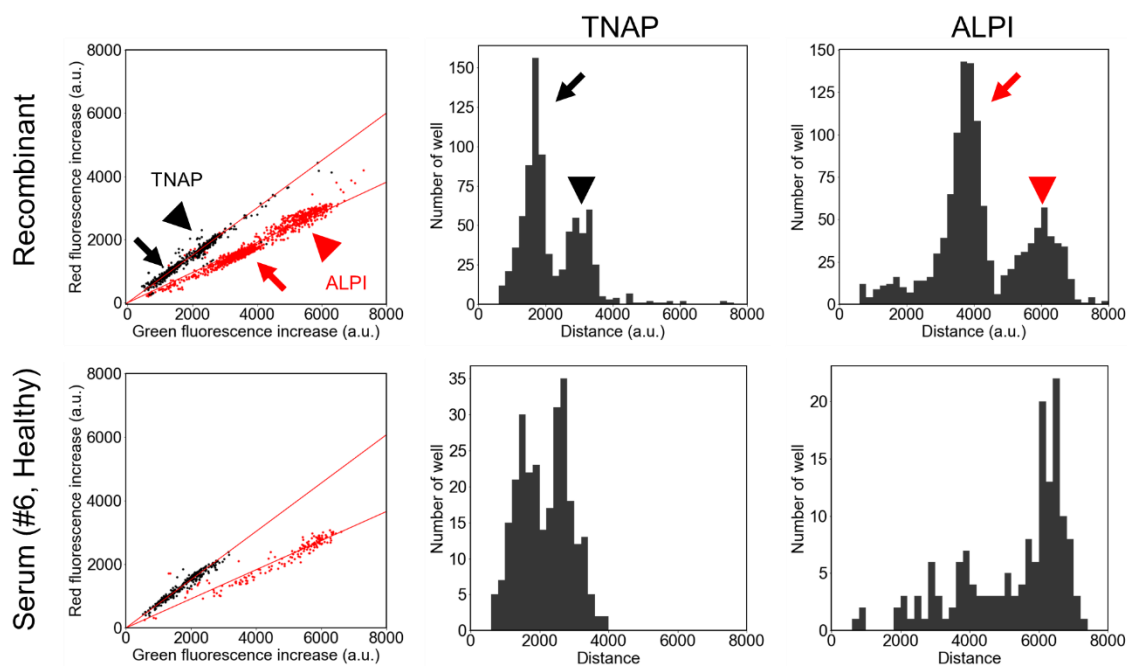


Fig. 2-4-1. Each cluster was fitted to a straight line. In the diagrams, “Distance” represents the distance to the origin from the foot of the perpendicular beneath each point. (Top) The result with recombinant TNAP and ALPI mixed at a 1:1 ratio. (Bottom) The result obtained with 1/3000 diluted human serum.

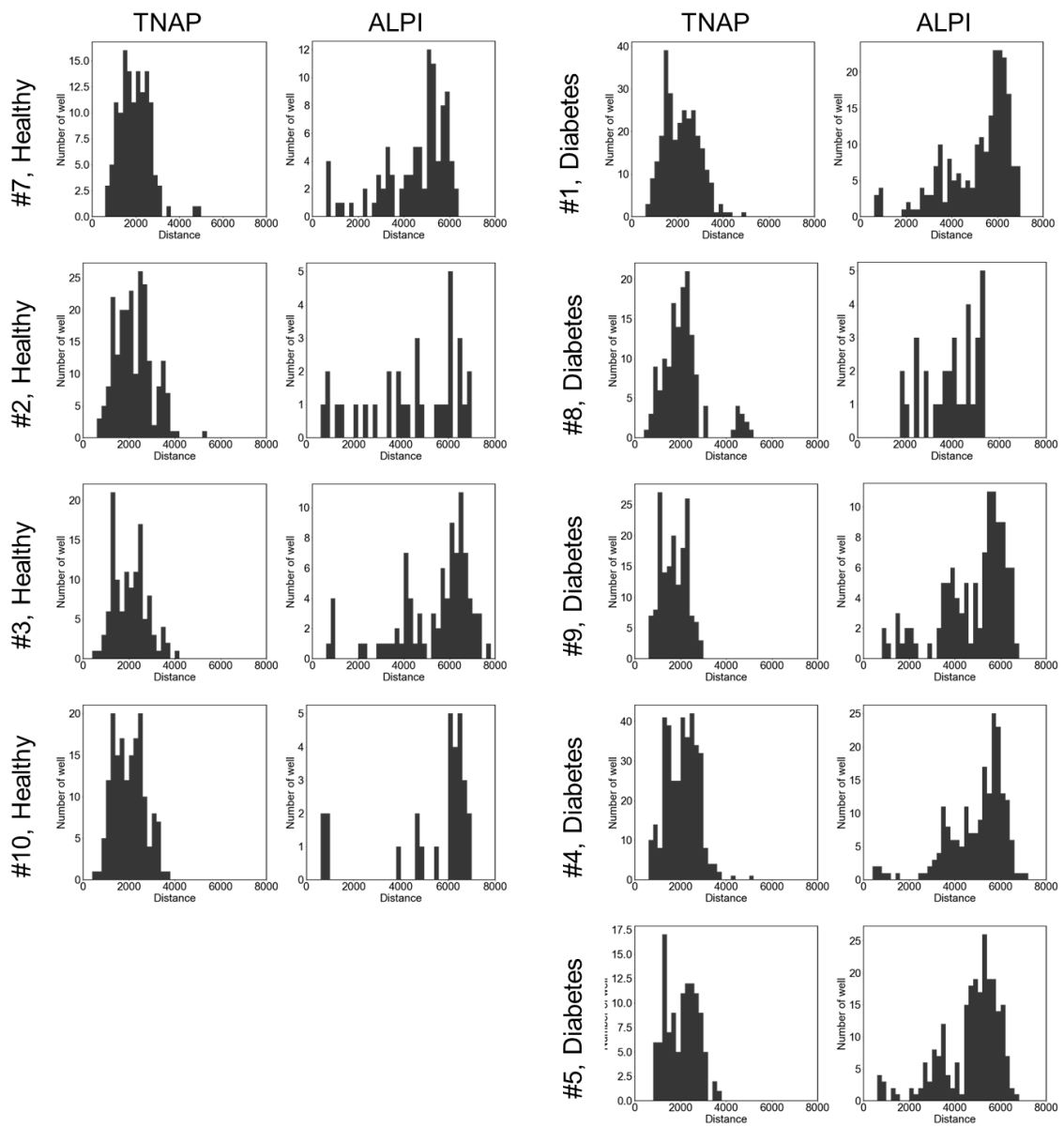


Fig. 2-4-2. In the diagrams, "Distance" represents the distance to the origin from the foot of the perpendicular beneath each point. The result diagrams acquired for 9 samples from human serums with 1/3000 diluted.

## 第五節 小括

- マイクロデバイスを用いた測定により、生体サンプル中の ALP アイソザイムを 1 分子レベルでの活性パターンの差異に基づいて分離検出するという目的で、①複数波長に蛍光波長を有する、②水溶性官能基を有する、③異なる反応点の構造を有する、というクライテリアを満たす phosphatase 活性検出蛍光プローブ群を開発した。
- ALP の活性が最も高くなる条件下において、反応点の構造の異なる 2 色のプローブ、sTG-mPhos と sTM-Phos を用いて 2 種類の ALP アイソザイム、ALPI と TNAP をその活性パターンに基づいて分離検出することに成功した。
- 血清サンプルを用いた測定においても、同様の測定条件でサンプル中の ALPI と TNAP を定量性高く分離検出することに成功した。
- 1 分子レベルでの活性パターンを測定することで、ALP のヒト臓器由来のアイソザイムも活性に二峰性を有することを見出した。また、高活性種と低活性種の存在比は精製酵素と血清サンプル中で検出されたものと異なっていた。

### 第三章

## 血液中の多様な phosphatase の 1 分子酵素活性プロファイリング

## 第一節 血液中の多様な phosphatase の検出

血液中には ALP 以外にも acid phosphatase, protein phosphatase 等多様な phosphatase が存在していることが知られている。そこでこれらも含め、より多数の異なる活性パターンを有する酵素を検出可能な条件下での測定を行うこととした。

具体的には、なるべく多数の基質認識部位の構造を有するプローブの組み合わせ (HCCA-mPhos, sTG-qmPhos, sTM-Phos) を用い、多くの酵素の至適 pH である中性の条件下で測定を行うこととした。また、一部の protein phosphatase については活性部位のチオールが酸化状態の場合失活するため<sup>13</sup>、反応溶液に DTT を添加して、還元的条件にてアッセイを行った。

上記の条件下において前章で用いた 10 名の検体由来血清サンプルの測定を行った。その結果、前章での ALP 検出に適した測定条件下での場合と比較して、より多種類の異なる活性パターンを持つ酵素を検出することができた (Fig. 3-1-1, Fig. 3-1-2)。

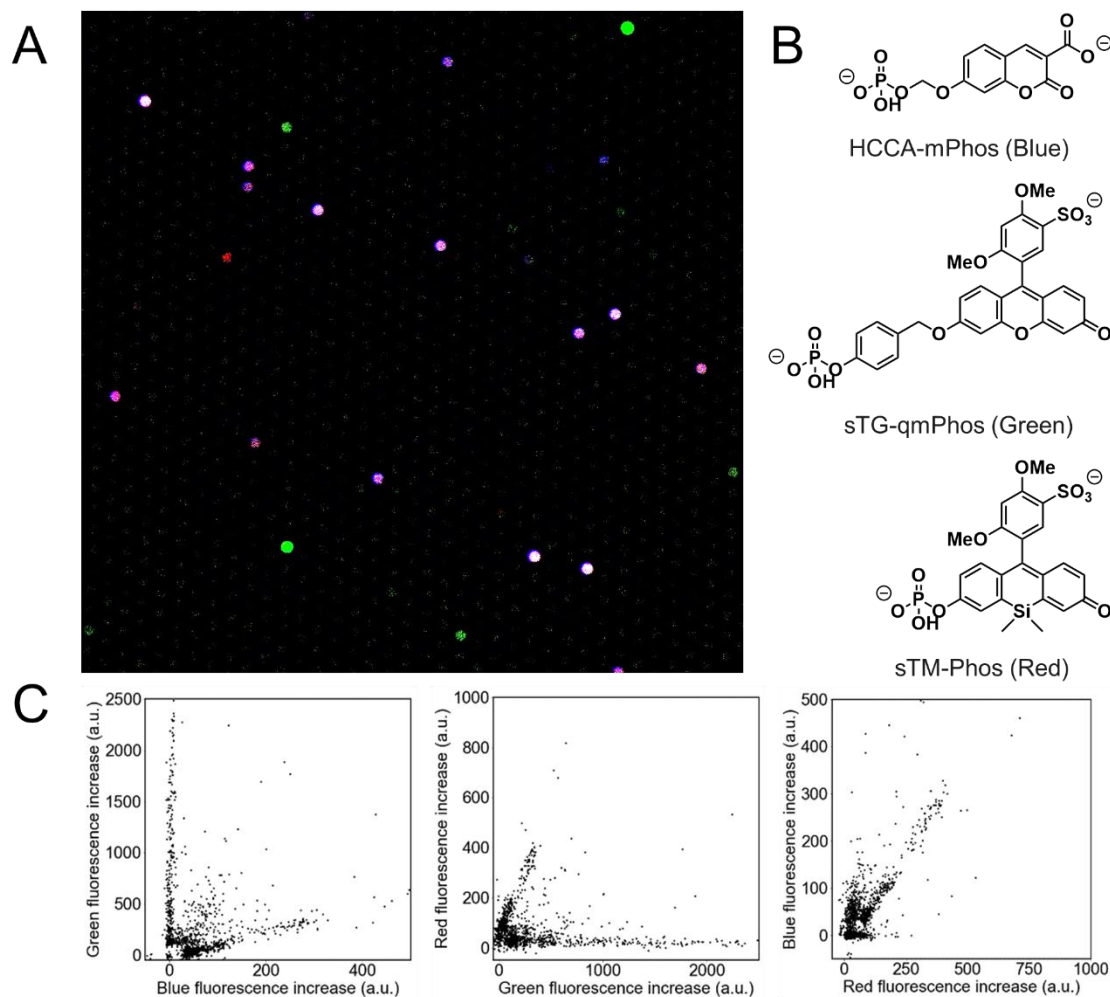


Fig. 3-1-1. (A) Representative fluorescence overlay image (432-500nm, 530-580 nm, and 610-700 nm) of a microdevice containing 1:3000 diluted serum with fluorogenic probes [30  $\mu$ M; HCCA-mPhos (blue), sTG-qmPhos (green), and sTM-Phos (red)] in tris-HCl buffer [100 mM (pH 7.4), containing 1 mM  $MgCl_2$ , 100 mM dithiothreitol, and 0.1% (w/v) CHAPS] after 2-hour incubation. (B) Chemical structures of using probes in this assay. (C) Representative scattered plot of the activities of the phosphatases in experiment of (A) from subject #1.

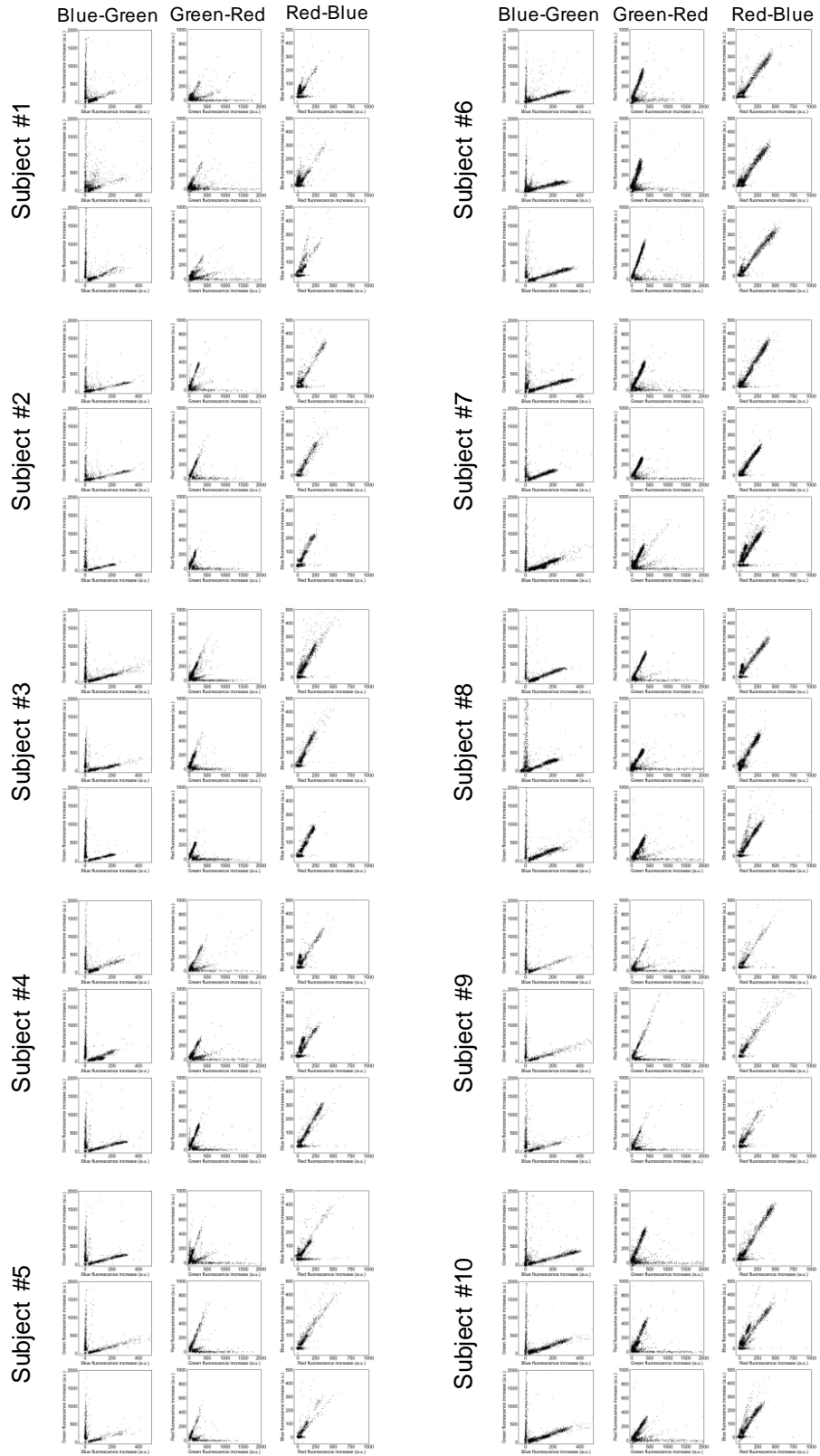


Fig. 3-1-2. All serum measurement data of 10 subjects.

## 第二節 活性パターンの重ね合わせによる検出酵素の推測と疾患との関連

このように多種類の異なる活性パターンを持つ酵素の検出可能な条件において、いずれかの phosphatase と疾患との関連の有無を見出すことを目指し、測定データに対して多変量解析を行った。このデータにおいては、実際に何の酵素が何種類検出されているのか不明であるため、教師なしのクラスター分析を採用した。

具体的には、検体 10 名分のサンプルを各 3 回測定した、合計 30 回分の測定データを 1 つにまとめ、VBGMM（変分ベイズ推定を用いた多変量混合 3 次元正規分布へのフィッティング、実験の部 cluster analysis 参照）でクラスター分析を行った。

VBGMM を用いたクラスター分析は、教師なし、かつクラスター数が不明の場合の解析法として最も推奨されている方法であり、多数のピークが存在するデータに対して、点推定ではなく確率分布で近似することで全てのピークの情報を見失うことなく反映させることができる。また、クラスター数に関しても、最も確率の高いクラスター数を推定することが可能である。

今回の解析においては、1 種類の酵素は 1 つの活性パターンを有し、それらは正規分布する、との仮定の下で行っており、クラスター分析を行って見出された各クラスターはそれぞれ別の酵素種を検出しているとみなしている。

上記の分析を行った結果、測定データは全部で 9 つのクラスターに分類された (Fig. 3-2-1, 結果を Green-Red の 2 次元に投影)。

また、各健常者と糖尿病患者での測定データにおいて、各クラスターとして分離検出された酵素の分子数を比較したところ、Cluster7 と Cluster9 として検出された酵素の分子数が、糖尿病患者において有意に増加していた (Fig. 3-2-2)。



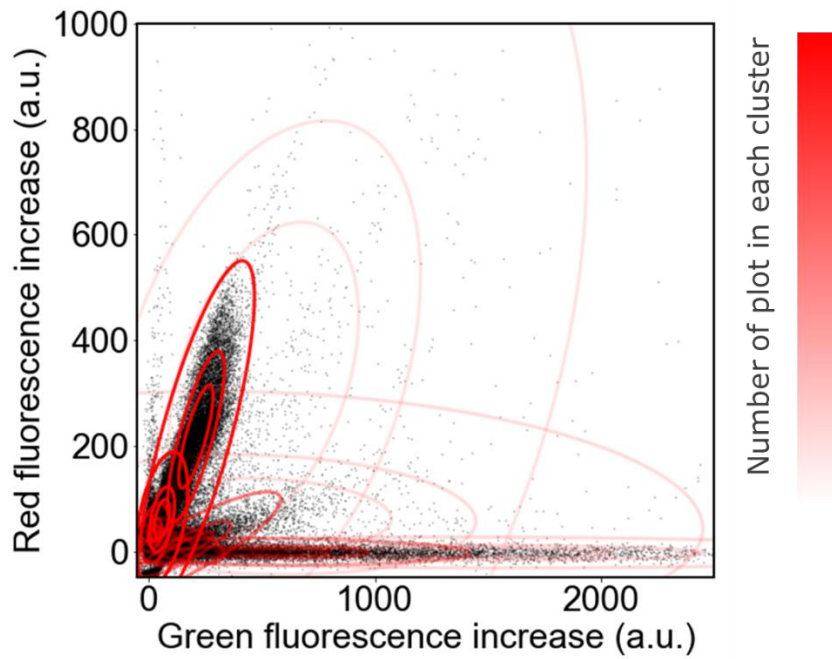


Fig. 3-2-1. Whole plots were distributed into 9 clusters by VBGMM (see Methods). Contour lines show the Mahalanobis' distances of 0.89, 1.47, and 3.03 from each cluster (corresponding to 33%, 66%, and 99% of the population being inside the contour lines) and their intensity represents the number of points included by the cluster.

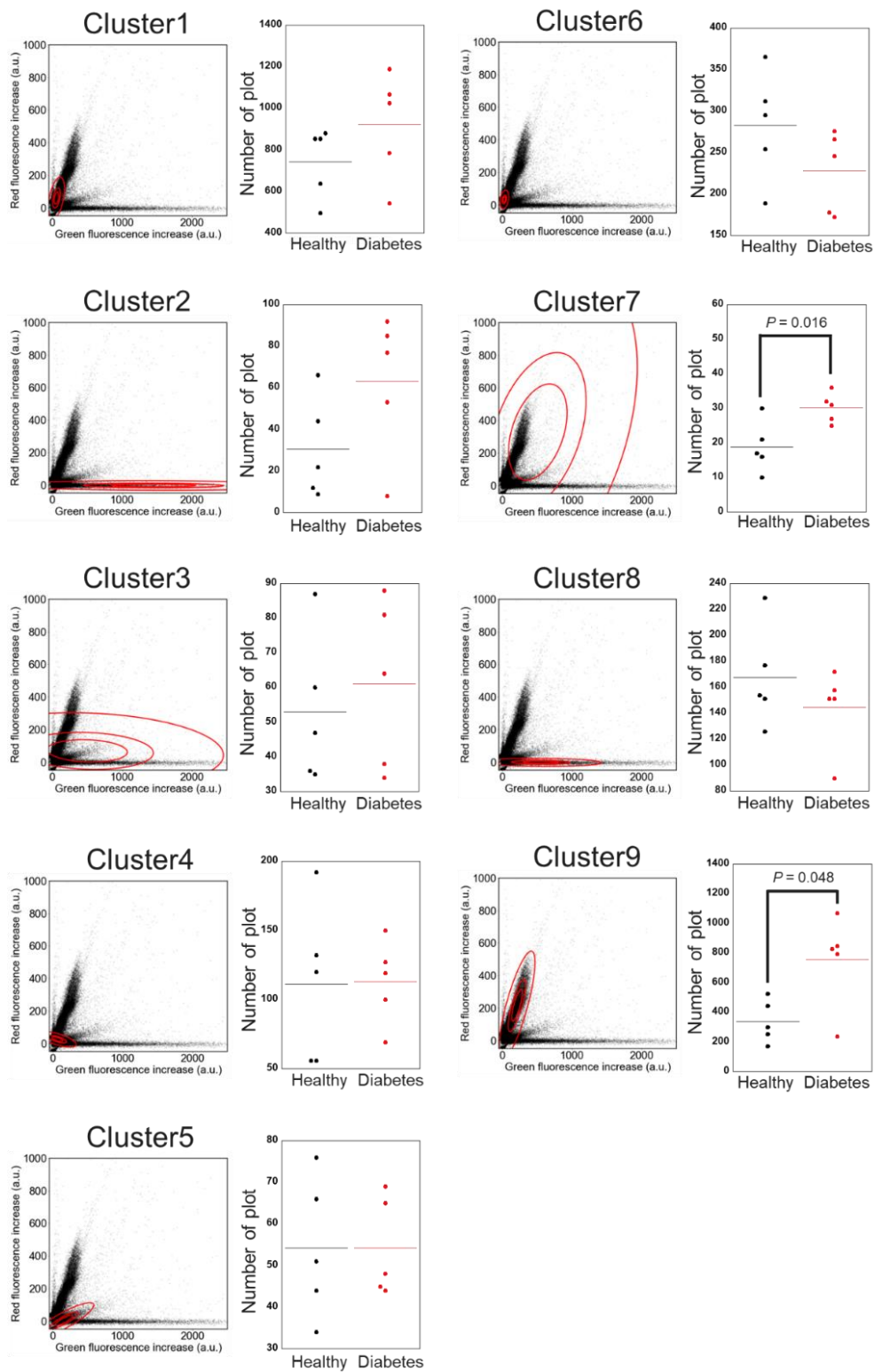


Fig. 3-2-2. The contour lines show the distribution of each cluster. The dot plots show the number of plots assigned to each cluster.  $P$  value was analyzed using Mann-Whitney U test<sup>14</sup>.

このうち Cluster9 については、同条件で ALPI の精製酵素を測定した場合の活性パターンと類似していることが見出された (Fig. 3-2-3)。

これは糖尿病患者の血中において小腸型 ALP が増加しているという過去の報告<sup>15</sup>と矛盾しない結果となっている。

すなわち本測定方法を用いることで、血液中に存在する多数の phosphatase に由来する活性プロファイルを得ることが可能であり、その中で特定のクラスターを構成する酵素を精製酵素の活性パターンに基づいて推定し、疾患との関連を示唆する結果を得ることが可能であることが示された。

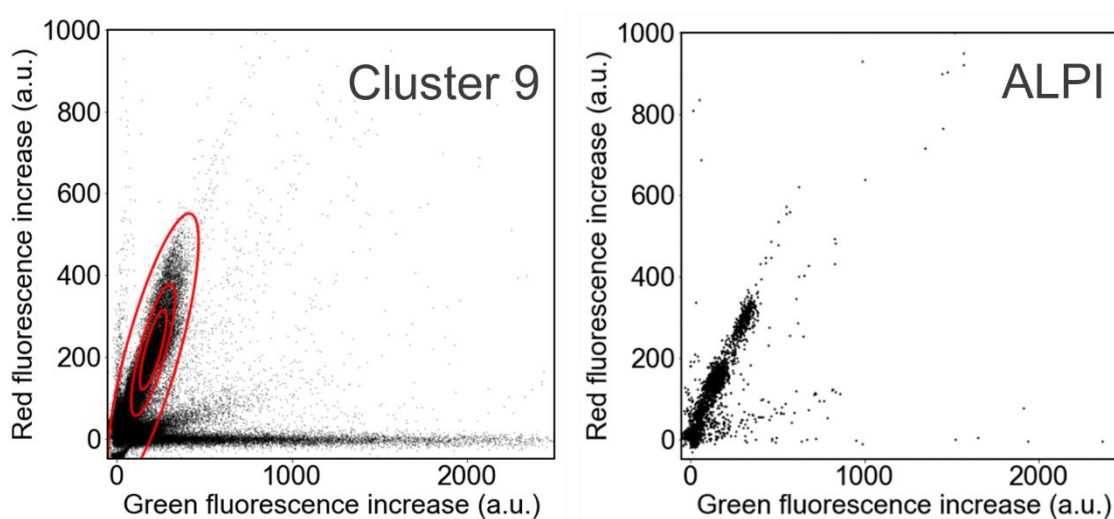


Fig. 3-2-3. (left) The contour lines show the distribution of cluster 9. (right) Scattered plot of the fluorescence increase of the well in measurement of purified recombinant ALPI.

### 第三節 阻害剤を用いたアッセイによる検出酵素の推測

前節までで得られた測定データにおいて、sTG-qmPhos (Green)のみと反応している酵素で構成されたクラスターが複数見出されている (Fig. 3-2-2, cluster2, 3, 8)。sTG-qmPhos の構造から、これらのクラスターは何らかの protein tyrosine phosphatase に由来しているのではないかと仮説を立て、阻害剤を用いた検討を行うことでクラスターを構成する酵素の推測を試みた。

まず protein tyrosine phosphatase に対して選択的な阻害剤である bpV(phen)によって、protein tyrosine phosphatase の1つである PTP1B の活性が阻害されるかどうかをプレートリーダーでのアッセイにおいて検討した。その結果、今回特異的に反応している基質である sTG-qmPhos に対する  $IC_{50}$  は  $15.1 \mu\text{M}$  であった (Fig. 3-3-1)。

そこでマイクロデバイスにおける測定で反応溶液に bpV(phen)を添加し、血清中の phosphatase 活性の測定を行ったところ、sTG-qmPhos (Green)のみと反応している酵素活性に由来するクラスターが消失したため (Fig. 3-3-2)、このクラスターは何らかの protein tyrosine phosphatase に由来すると推測される。

すなわち生体サンプルから本測定手法によって得られた活性プロファイルのうち、特定のクラスターを構成する酵素の推測が、阻害剤を用いたアッセイによっても可能であることが示された。

また、protein tyrosine phosphatase は主に細胞膜・細胞質に局在している酵素であり<sup>16</sup>、その活性が血清中で測定されたという報告はほとんどない。すなわちこの結果は、サンプル中の多種類の酵素を1分子レベルの活性パターンに基づいてプロファイリングすることで、これまでに検出されたという報告のなかった酵素を分離検出することのできる可能性を示唆するものである。

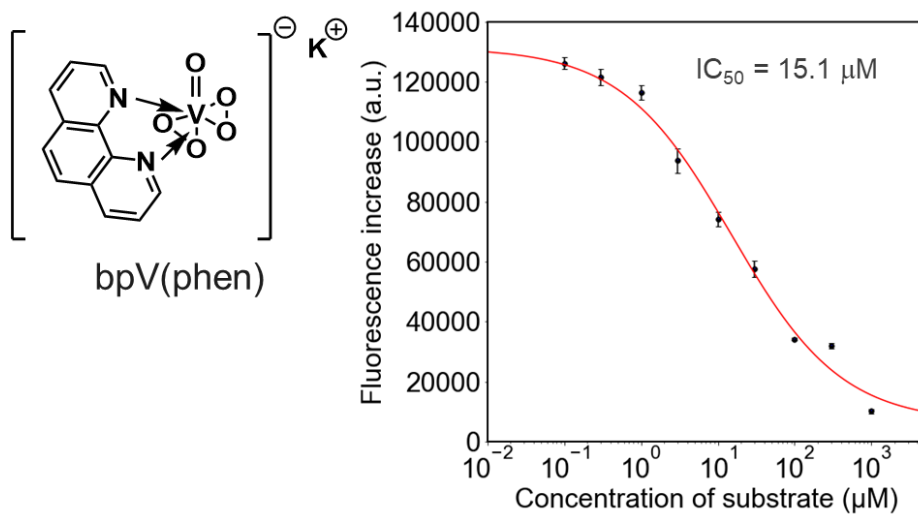


Fig. 3-3-1. (left) Chemical structure of bpV(phen). (right) Inhibitory curve of recombinant PTP1B (a representative PTP) with bpV(phen). Assay was performed in Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% w/w CHAPS, 100 mM DTT, 30 μM sTG-qmPhos and PTP1B (recombinant, 0.01 μg/mL). Incubation was performed in 25 °C for 30 min. Error bars represent S.E. (n = 4).

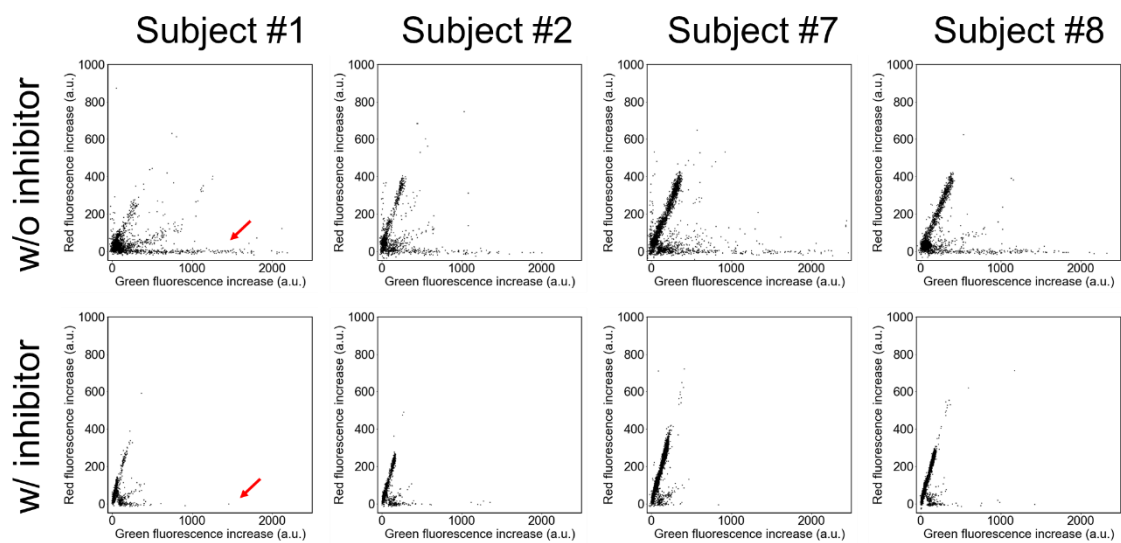


Fig. 3-3-2. Detection of fractions of phosphatases with unique reactivity against sTG-qmPhos. Scatter diagrams of activity profiles in four serum samples with or without 100 μM bpV(phen). The unique reactivity fraction is indicated by red arrow.

#### 第四節 小括

- HCCA-mPhos, sTG-qmPhos, sTM-Phos の組み合わせのプローブを用い、中性条件、還元的条件下で測定を行うことで、多数の異なる活性パターンを有する酵素を検出することができた。
- 血清サンプルの測定データに対して VBGMM によるクラスター分析を行ったところ、9つのクラスターに分類された。このうちのクラスターの1つについて、分子数が糖尿病患者で有意に増加しており、その活性パターンは ALPI と類似していた。すなわち血液サンプルから得られた活性プロファイルのうち、特定のクラスターを構成する酵素を精製酵素の活性パターンに基づいて推定し、疾患との関連を示唆する結果を得ることが可能であることが示された。
- 血清サンプルの測定データで見出されたクラスターのうち、sTG-qmPhos のみと反応している酵素で構成されたクラスターは protein tyrosine phosphatase の阻害剤を添加してアッセイを行うと消失した。すなわち特定のクラスターを構成する酵素の推測は阻害剤を用いたアッセイによっても可能であることが示された。また、protein tyrosine phosphatase の活性が血清中で測定されたという報告はほとんどなく、1分子酵素活性プロファイリングでは、過去に検出されたという報告のなかった酵素を分離検出することのできる可能性が示唆された。

## 第四章

### 血液中の ENPPs の 1 分子酵素活性プロファイリング

## 第一節 背景及び ENPPs 活性検出蛍光プローブ群の開発

前章までで、生体サンプル中に存在する類似の活性をもつ酵素群を、その1分子毎の活性パターンに基づいて分離検出しプロファイリングすることが可能であることが示された。そこで、複数のサブタイプを持つ別の酵素群に対してもこの方法論を応用することを考えた。ターゲットは ectonucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (ENPPs) を選択した。ENPPs は生体内に遍在する膜結合型、及び分泌型の酵素で、細胞外のヌクレオチドやリン脂質の加水分解によってシグナル伝達の制御を行っている<sup>17</sup>。ENPPs は7種類のサブタイプを持ち、それらには機能や基質が不明なものも多いが、autotaxin としても知られる ENPP2 に関してはすい臓がん患者の血清中での活性が上昇しているという報告<sup>18</sup>もある。そこで、生体サンプル中の ENPPs をその1分子毎の活性パターンに基づいて分離検出し、プロファイリングする系を構築することで、すい臓がん患者に特異的な活性プロファイルを見出すことを目指した。

Subtypes	functions	substrates
ENPP1	multifunction	nucleotides
ENPP2 (autotaxin)	multifunction	lysophospholipids
ENPP3	Basophil marker	unknown
ENPP4	unknown	unknown
ENPP5	unknown	unknown
ENPP6	unknown	lysophospholipids
ENPP7	unknown	lysophospholipids

Table 4-1-1 Functions and substrates of subtypes of ENPPs.



まず、マイクロデバイス適合性の蛍光色素である sTG, sTM を母核とし、基質認識部位として複数種類の nucleotide monophosphate を持つ ENPPs の活性検出プローブ群の開発を行った (Fig. 4-1-1.)。プローブの合成スキームは本研究成果に基づいた特許出願明細書を参照 (PCT/JP2020/22546)。

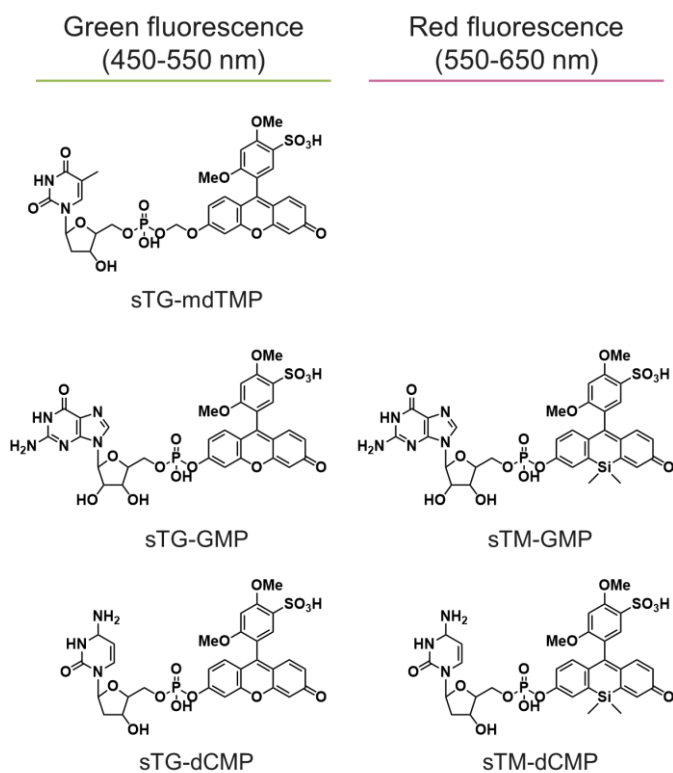


Fig. 4-1-1. Developed novel probes to detect ENPPs activity in microdevice.

合成したプローブは ENPP1-3 の精製酵素に代謝され、蛍光上昇を示した (Fig. 4-1-2.)。

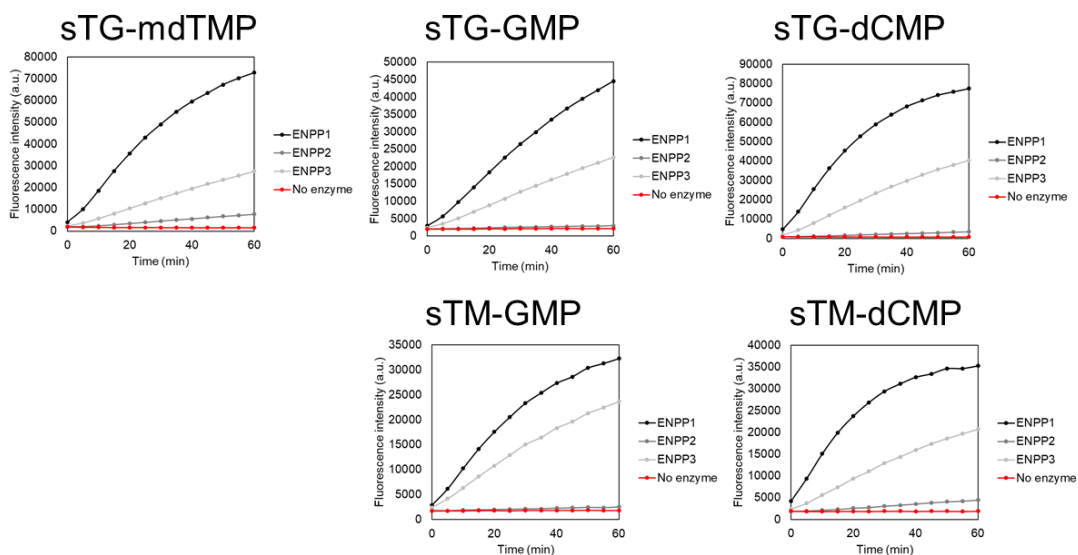


Fig. 4-1-2. Reactivity of ENPPs toward probes based on sTG and sTM with diverse nucleotide reactive sites. Assay was performed in Tris-HCl buffer (pH 9.0) containing 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 μM probes, and 1 μg/mL enzymes. Experiments were performed three times.

## 第二節 血漿サンプル中の ENPPs 活性検出とすい臓がんとの関連

開発した ENPPs 活性検出蛍光プローブ群のうち、生体サンプル中の ENPPs 活性検出においてどの組み合わせを使用するか検討を行った。開発したプローブ群の2色の組み合わせ6通りを用いて検体由来の血漿サンプル中の ENPPs 活性を測定したところ、sTG-mdTMP と sTM-dCMP の組み合わせで測定した場合が活性パターンの異なる酵素を最も多く検出することができたため、この組み合わせを採用して血漿サンプル中の ENPPs 活性を測定することとした (Fig. 4-2-1, 4-2-2.)。

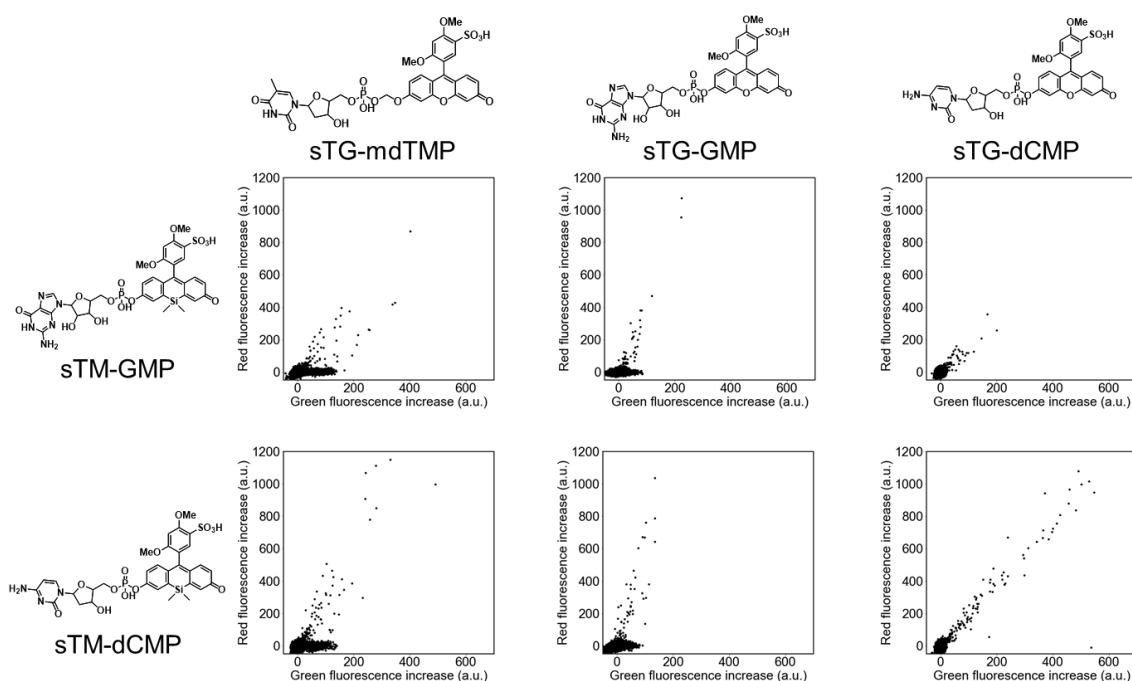


Fig. 4-2-1. Choice of sets of fluorescent probes to monitor ENPPs activities in plasma. Indicated probe pairs (100  $\mu$ M each) were used in the assays of 1/500-diluted plasma in the microdevice.

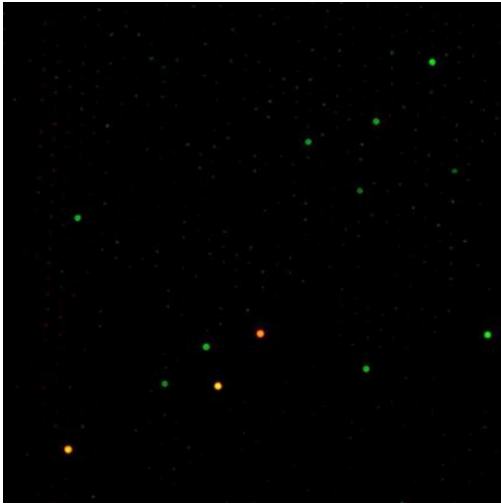


Fig. 4-2-2. Representative overlay fluorescence image (530-580 nm and 610-700 nm) of a microdevice containing 1:500 diluted serum with fluorogenic probes [sTG-mdTMP (green) and sTM-dCMP (red), 100  $\mu$ M] in tris-HCl buffer [100 mM (pH 9.3), containing 1 mM  $\text{MgCl}_2$  and 0.5% (w/v) CHAPS] after 40 min incubation.

sTG-mdTMP, sTM-dCMP の組み合わせのプローブを用いて、健常者 14 名、すい臓がん患者 31 名の検体由来血漿サンプルを測定し、健常者とすい臓がん患者との間で ENPPs 活性プロファイルに差異が見出せるか検討を行った。

測定したデータについては、こちらも第三章第二節と同様に教師なしかつクラスター数が不明であるため、45 名分の測定データを統合し、VBGM によるクラスター分析を行った。その結果、測定データは全部で 3 つのクラスターに分類された (Fig. 4-2-3 top)。このクラスター分析の結果においては、1 つの広範囲に広がるクラスターの範囲内にその他の比較的範囲の狭い 2 つのクラスターが完全に含まれてしまっている。そこで、可能な限りこれらが重複していない部分を抽出するために、赤色の蛍光強度上昇値について、比較的範囲の狭い 2 つのクラスターにおいて確率的に 99% の分子が含まれる上限の境界線に Threshold を引き、その範囲に含まれる分子を改めて Cluster1, 2, 3 として設定した (Fig. 4-2-3 bottom)。

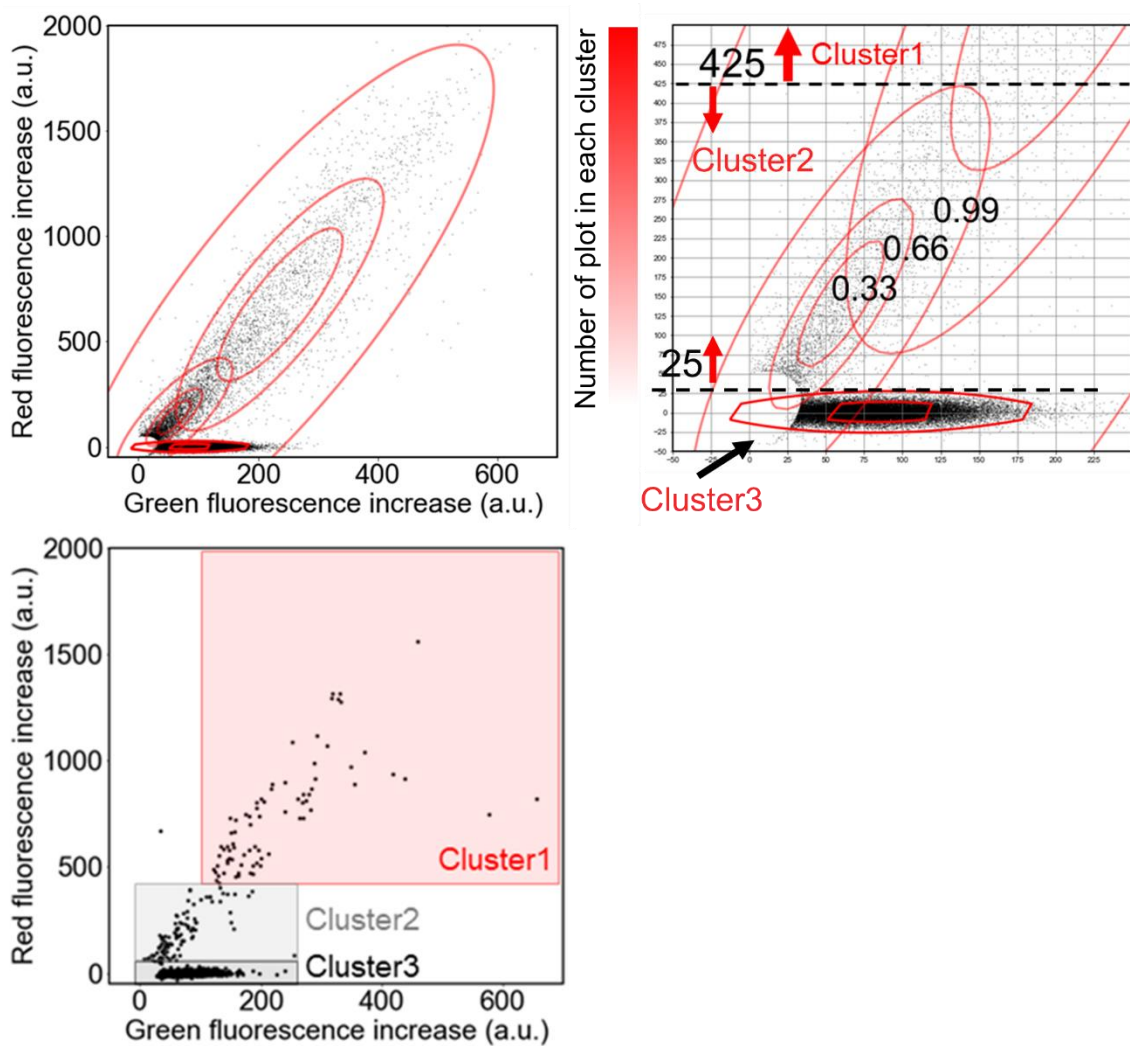


Fig. 4-2-3. Whole plots are distributed into 3 clusters by VBGMM (see Methods). (top) Contour lines show the Mahalanobis' distances of 0.89, 1.47, and 3.03 for each cluster (indicating that 33%, 66%, and 99% of the population is included inside the contour, respectively) and their intensity represents the number of points included by the cluster. (bottom) threshold analysis determined by cluster analysis

ここで、測定した各検体のデータにおいて、設定した各クラスターに分類される酵素の分子数を数えたところ、Cluster 1 として分類される酵素の分子数が、すい臓がん患者において有意に増加していた (Fig. 4-2-4)。

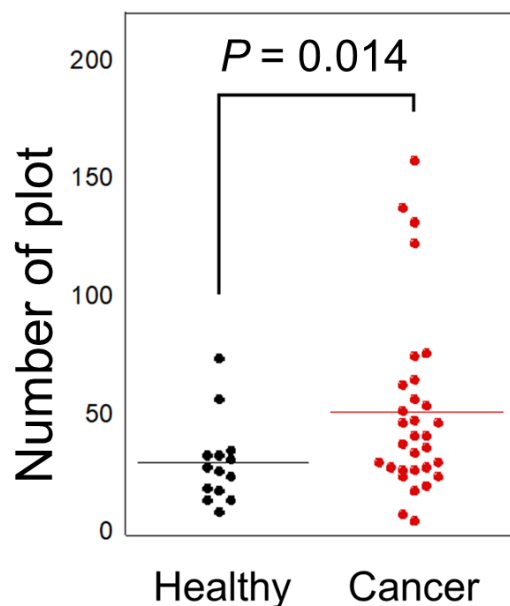


Fig. 4-2-4. The dot plot shows the number of plots assigned to cluster 1 in Fig. 4-2-3. *P* value was analyzed using Mann-Whitney U test<sup>14</sup>.

続いて、それぞれのクラスターがどの酵素に由来するのかを推定するため、ENPP1-3の精製酵素を用いてマイクロデバイスでの活性測定を行った。その結果、ENPP1は比較的活性の弱いポピュレーションのみで構成されているのに対し、ENPP3は活性の強いものから弱いものへと、広い分布を示した (Fig. 4-2-5.)。ENPP2に関しては、マイクロデバイスを用いて活性を検出することはできなかった。それぞれの酵素が、ここまでで設定した3つのクラスターのうちどこに当てはまるのか重ね合わせたところ、ENPP1のうち大部分はCluster2に分類され、一部はCluster3の低活性の部分に分類された。ENPP3のうち活性の強いものはCluster1に、活性の弱いものはCluster2に分類された。よって、Cluster1はENPPのサブタイプのうち主にENPP3に由来することが推測された (Fig. 4-2-5)。

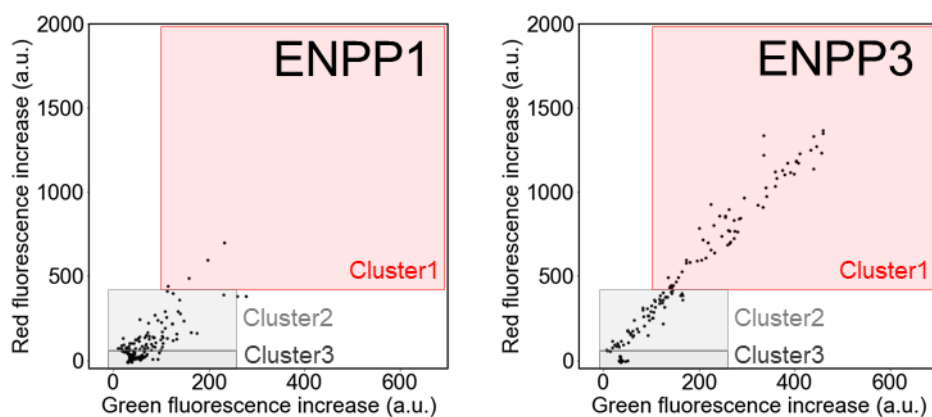


Fig. 4-2-5. Measurements of purified recombinant ENPP1 and ENPP3. All points in each measurement were assigned to one of 3 clusters.



ENPP3 は CD203c 抗原としても知られる好塩基球の活性化マーカーであり<sup>19</sup>、Cluster1 が ENPP3 に由来していた場合、がんの進行に伴った炎症が原因で血中への逸脱量が増加していたという仮説が考えられる<sup>20</sup>。実際にすい臓がん患者を診断する目的での ROC 曲線を Cluster1 の分子数に基づいて作成したところ、その性能を示す値である AUC は対象のすい臓がん患者のステージが進行するに伴って上昇していた (Fig. 4-2-6.)。

また、ENPP3 とすい臓がんとの関連は過去に報告されておらず、この結果は 1 分子酵素活性プロファイリングによって酵素活性と疾患との新たな関連を見出すことのできる可能性を示唆するものとなっている。

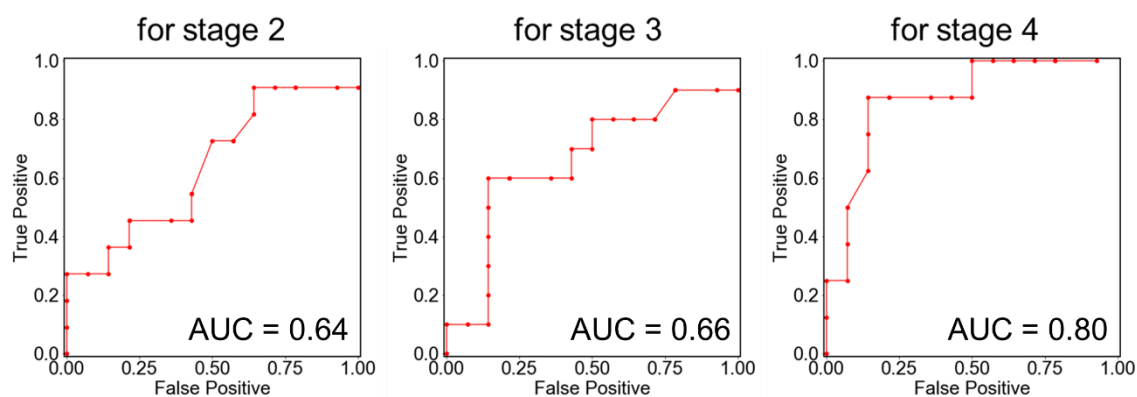


Fig. 4-2-6. The ROC curves were calculated from the number of points assigned to cluster 1 for pancreatic cancer subjects at each stage versus healthy subjects.

### 第三節 1 分子酵素活性プロファイリングの検出感度

ここまで、1 分子酵素活性プロファイリングの手法により、生体サンプル中に存在する複数の酵素を類似の活性を有するものまで含めて分離検出することを達成してきたが、本技術は 1 分子計測技術に基づいているため、その高い検出感度という点も、生体サンプル中の酵素活性検出という観点において 1 つの大きな利点となり得る。

ENPP3 の精製酵素を用いてマイクロデバイスにおける測定の検出限界値を検討したところ、その検出限界値は 1.8 fM (180 fg/mL, Fig. 4-3-1.) で、また前節で検出された、Cluster1 に相当する酵素の分子数から計算される反応溶液中の濃度の中央値は 2 pg/mL であり、いずれも通常 100 pg/mL とされている ELISA の検出限界値<sup>21</sup> を大きく下回っている。

前節のアッセイでは血漿を 500 倍希釈して測定しているため、実際の血中濃度は 1 ng/mL 程度であると考えられるが、ウエスタンブロッティングによる測定では ENPP3 の精製酵素の検出限界は 2 ng/mL 程度と推定され、また Cluster1 の構成酵素が ENPP3 であるとすると、血漿サンプル中の ENPP3 を検出することはできていない (Fig. 4-3-2)。この結果からも 1 分子酵素活性プロファイリングは既存のタンパク質検出技術と比較してより感度の高い検出技術であると言える。

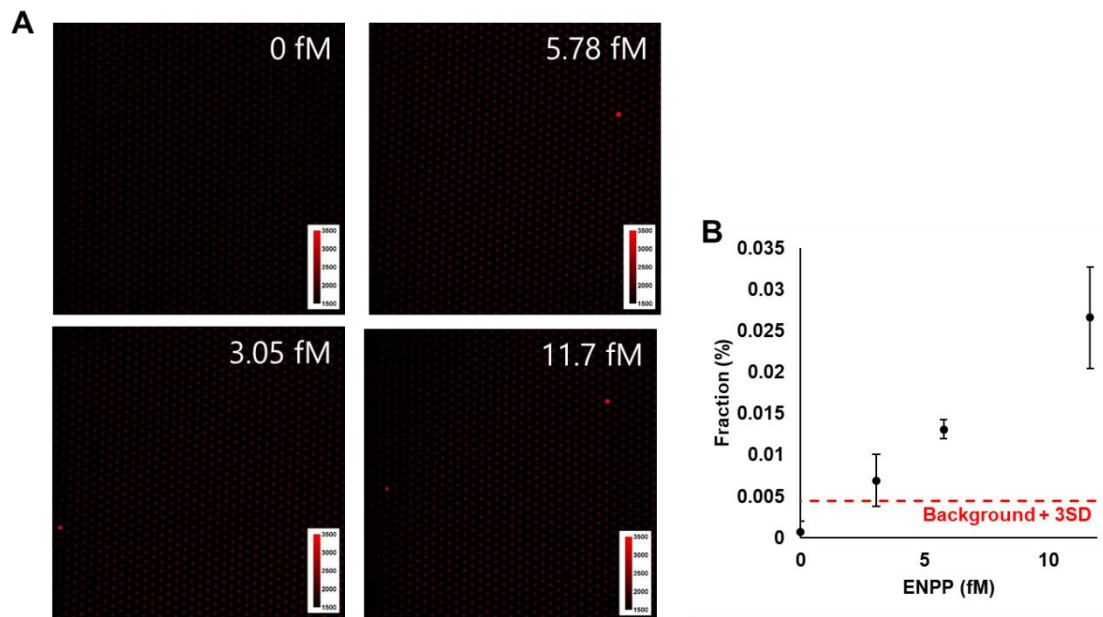


Fig. 4-3-1. (A) Fluorescence images of microdevices containing recombinant ENPP3 (0, 3.05, 5.78, 10.4 fM) with fluorescent probes (sTM-dCMP, 100  $\mu$ M) in Tris-HCl buffer (100 mM, pH 9.3, containing 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % CHAPS), after incubation for 40 min. (B) The fractions of ENPP3-containing chambers versus ENPP3 concentration. The error bars represent S.D (n = 3). The red line represents the fraction of the background count (measured under ENPP3-free conditions) plus 3 times the S.D.

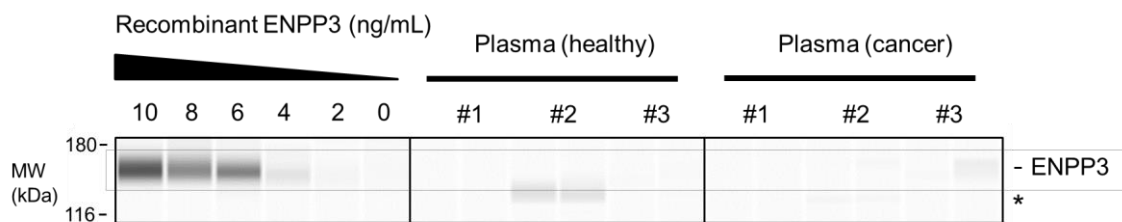


Fig. 4-3-2. The result of Western blotting analysis of ENPP3 detection in serum. The analysis was performed using an automated capillary electrophoresis system (Simple Western system and Compass software; ProteinSimple). Recombinant ENPP3 with indicated concentrations were analyzed as a positive control. The plasma samples meant for electrophoresis were prepared by removing serum albumin by Pierce Albumin Depletion Kit (Thermo Fisher Scientific); the final loading sample was diluted to 1/10 of the original blood, and the analysis was performed using duplicates of samples prepared from three healthy subjects and three patients with stage 4 pancreatic cancer.

#### 第四節 小括

- マイクロデバイス適合性の蛍光母核に種々の nucleotide-monophosphate 構造を付与することで、ENPPs 活性検出蛍光プローブ群を開発した。
- sTG-mdTMP, sTM-dCMP のプローブの組み合わせを用いて検体由来血漿サンプルの測定を行うことで、3つのクラスターに分類される異なる活性パターンを有する酵素を検出することができた。このうちのクラスターの1つについては ENPP3 であると推測され、その分子数がすい臓がん患者で有意に増加していた。ENPP3 とすい臓がんとの関連は過去に報告されておらず、この結果は1分子酵素活性プロファイリングによって酵素活性と疾患との新たな関連を見出すことのできる可能性を示唆するものであると言える。
- マイクロデバイスにおける測定の検出感度を考えた際、ENPP3 の精製酵素を用いた検出限界値の検討、血漿サンプルを用いた活性検出のいずれにおいても ELISA の検出限界値を大きく下回っており、ウエスタンブロットティングの結果からも、既存のタンパク質検出技術と比較してより感度の高い検出技術であると言える。

## 第五章

### 総括と今後の展望

## 第一節 総括

本研究では、生体サンプル中に存在する多数の酵素を1分子ずつ分離し、酵素認識部位の構造の異なる複数色のプローブを組み合わせて同時に反応させることで、その反応性の組み合わせに基づいて、類似の活性を有する酵素群まで分離検出することの可能な技術、1分子酵素活性プロファイリングの確立を行った。

本技術の概念実証として、マイクロデバイス適合性の phosphatase 活性検出蛍光プローブ群を開発し、適切な溶液条件でアッセイを行うことで、検体由来血清サンプル中の ALP アイソザイム、ALPI と TNAP の分離検出を達成した。これは基質認識の非常に類似している両アイソザイムをその活性に基づいて分離検出した初めての例である。さらに本研究では、それぞれのアイソザイム及びその由来に応じて、活性の二峰性に異なる分布を見出し、タンパク質合成に関わる生体内の環境変化を反映した情報を得ることができると可能性を示唆している。これは1分子レベルでの活性パターンを解析することによって、酵素の量的な情報のみならず質的な情報も得ることが可能であるという本技術の重要な特長を示す結果である。

さらに、適切なプローブの組み合わせ・多種類の酵素に適した溶液条件でアッセイを行うことで、phosphatases, ENPPs に関して異なる活性パターンを有する複数の酵素群からなる検体サンプル毎のプロファイルを得ることが可能であった。得られた酵素活性プロファイルのデータに対してクラスター分析を行うことで、各酵素活性パターンごとのクラスターに分類することが可能であり、精製酵素の測定データとの重ね合わせ及び阻害剤を用いたアッセイにより、特定のクラスターの構成酵素を推定することが可能であった。また、このような測定及び解析を行うことにより、ENPP3 とすい臓がんといった、酵素活性と疾患との新たな関連を見出すことができる可能性を示唆する結果が得られている。

このように、生体サンプル中の多数の酵素を活性パターンに基づいて分離検出することの可能な本技術であるが、その検出感度についても従来のタンパク質検出技術と比較して非常に高いという実験結果が得られており、生体サンプル中に存在するより低濃度域の酵素を高感度に検出することで、新たな診断手法の確立に繋げることのできる可能性を有する技術であるということが言える。

## 第二節 今後の展望

### 1 分子酵素活性プロファイリングの展開

本研究における1分子酵素活性プロファイリングの適用は phosphatases, ENPPs に限られていたが、蛍光プローブを用いて活性を検出可能な酵素であれば、マイクロデバイス適合性のプローブを新たに開発することによって原理上すべて測定対象とすることが可能であると考えられる。さらに生体サンプル中での活性検出に報告のなかった酵素であっても、検出感度の高さ・特異的な活性パターンによって類似の活性を有する酵素群からの分離検出が可能、という点から、新たに活性を見出すことが可能であることが本研究でも示唆されている。

また、本技術はサンプル要求量が極めて少なく、酵素活性による検出であるため比較的短時間で測定可能であることから、今後、本技術によって性能の高い診断バイオマーカーの確立が為された際には、近年注目を集めているリキッドバイオプシーへの応用も期待される。リキッドバイオプシーとは、元来血液中を循環するがん細胞（circulating tumor cells; CTC）の検出による診断法として開発され<sup>22</sup>、現在は主に核酸分子の検出によるがんの診断を目指して開発されている技術である<sup>23</sup>。これに対して本技術は、タンパク質の機能としての酵素活性を検出しているという点でより生体の表現型に直結する理解を与えることのできる診断法として期待され、実際にタンパク質の機能に着目した診断を進める研究は、近年注目を集めている分野でもある<sup>24</sup>。

### クラスターの構成酵素の同定

本技術の課題として、検出された酵素に対して得られる情報はその活性パターンに限られ、さらに検出量も合計高々数千分子という極めて微量であることから、特定の活性パターンを有するクラスターとして検出された酵素を一義的に同定することが困難であるという点がある。

本研究においては、精製酵素の測定データから得られる活性パターンとの重ね合わせ、もしくは阻害剤を用いたアッセイによる当該クラスターの消失、という間接的に推定する手法を示した。より直接的に推定する手法としては、抗体を用いた免疫沈降や活性阻害などが考えられるが、本技術に適用可能か否かは未検討で、また性能の高い抗体の存在する酵素にしか適用できないという制約がある。

しかしながら、上記で示した間接的な推定に加えて、本研究における ENPP3 と炎症反応との関連といった、推定される酵素の生体内での機能と表現型との関連性を議論することで、ある程度確度の高い推定は可能であると考えられる。

また、1分子レベルという極めて微量のタンパク質を同定する方法としては、基板上へ1分子のタンパク質を固定し、エドマン分解によってアミノ酸配列を決定する方法<sup>25</sup>やナノポアを通過する際の電位変化を利用してアミノ酸配列を決定する方法<sup>26</sup>が開発されている。これらはタンパク質のアミノ酸配列を決定することで一義的な同定が可能と考えられるが、得られる情報はあくまでも一次配列のみであるため、これらと生体内での機能である活性に関する情報を得ることのできる本技術を組み合わせることなどにより、微量なタンパク質も含め、生体内のタンパク質をより網羅的・包括的に分析することが可能となることも期待される。



## 検出感度の向上

本研究においては、血漿中に約 1 ng/mL の濃度で存在している、すい臓がん患者において有意に増加している活性プロファイルの酵素を検出することを達成した。ただ序論でも述べたように、現在まで発見に至ることができていないタンパク質や、診断手法の確立に至っていないタンパク質を新たにバイオマーカーとして利用するために、サンプル中の濃度が pg/mL 以下のレンジのタンパク質まで検出可能となることが望ましい。

生体サンプル中に存在する、より低濃度の酵素を検出するためには、2つの方法が考えられる。

1つは、測定に用いる生体サンプルの希釈率を下げることである。本研究においては、血清・血漿サンプルの希釈率は 500-3000 倍で測定しているが、この希釈率を下げることでサンプル中に実際に存在している濃度と、測定段階における実行濃度を近づけることができ、サンプル中濃度が本技術の検出限界値により近いタンパク質まで検出可能となると考えられる。しかしながら反応溶液中のタンパク質濃度が高濃度である場合、疎水性溶媒を用いたウェルの密封が機能しない傾向にあるため、血液サンプル中のアルブミン等を除く処理を行う必要があるが、ごく低濃度にしか存在していないターゲット酵素がこのような処理の影響を受けないことを担保する必要がある。

2つ目は、測定対象とするウェルの数を増やすことである。1分子計測技術においてはその特性上、検出限界が測定範囲に含まれる目的の分子の数の確率によって規定されるため、測定範囲の拡張が直接的に感度の向上に繋がることが期待される。

この観点において1分子計測技術の高感度化を考えた際、本技術に類似の技術としてデジタル ELISA<sup>27</sup>が存在するが、この技術は原理上、検出限界値がターゲット分子と抗体との親和性に規定されてしまうことに対し、本技術では酵素それ自体の有する機能を検出しているため、この測定範囲の拡張がそのまま感度向上に寄与するという点で、今後の技術開発による高感度化への潜在性はより高いと考えられる。

## 実験の部

## **Materials and Methods**

### **General materials**

ALP from *Pichia pastoris* was purchased from Roche. Recombinant PTP1B was purchased from Enzo. Other recombinant proteins were purchased from OriGene. ENPPs were prepared according to the literature<sup>28</sup>. General chemicals were of the best grade available, supplied by AdipoGen, Tokyo Chemical Industry, Wako Pure Chemical Industries, and Sigma-Aldrich, and were used without further purification.

### **Serum samples from diabetes patients**

Serum samples from diabetes patients and healthy subjects were purchased from in.vent Diagnostica GmbH (Germany). The experiments are covered under the company's ethical guidance and the approval of patients.

### **Plasma samples from healthy controls and patients with pancreatic cancer**

Plasma samples (n = 45) were obtained from untreated pancreatic ductal adenocarcinoma patients (n = 31) and healthy controls (n = 14) at the National Cancer Center Hospital and Osaka Medical College between 2006 and 2008. Written informed consent was obtained from all of the participants. Blood samples were collected in EDTA glass tubes. The supernatant was separated by centrifugation and cryopreserved at -80°C until analysis. All samples were processed in the same manner. The study was reviewed and approved by the ethics committees of the National Cancer Center (Tokyo, Japan; authorization no. 2014-246) and Tokyo University (Tokyo, Japan; authorization no. 30-9). Patients were classified as having clinical disease stage I, II, III, or IV according to the International Union against Cancer<sup>29, 30</sup>.

## **Instruments**

NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-LA400 at 400 MHz for  $^1\text{H}$  NMR and at 100 MHz for  $^{13}\text{C}$  NMR. Mass spectra (MS) were measured on a JEOL JMS-T100LP AccuTOF LC-plus 4G (ESI). Preparative HPLC was performed on an Inertsil ODS-3 (10.0×250 mm) column (GL Sciences Inc.) using an HPLC system composed of a pump (PU-2080, JASCO) and a detector (MD-2015). Preparative MPLC was performed on an Isolera One purification system (Biotage) equipped with a Biotage SNAP Ultra C18 column (for reverse phase separation) or on an MPLC system composed of a pump and a detector (EPCLC AI-580S, Yamazen) and equipped with a silica gel column (silica gel 40  $\mu\text{m}$  or Amino 40  $\mu\text{m}$ , Yamazen) (for normal phase separation). LC-MS analysis was performed on an Acquity UPLC H-Class system (Waters) equipped with an Acquity UPLC BEH C18 1.7  $\mu\text{m}$  (2.1×50 mm) column (Waters) and an MS detector (QDa, Waters).

## **UV-Vis absorption and fluorescence spectroscopy**

UV-Visible spectra were obtained on a Shimadzu UV-1850. Fluorescence spectroscopic studies were performed on a Hitachi F-7100. The slit width was 5.0 nm for both excitation and emission. The photomultiplier voltage was 400 V.

## **Enzyme activity measurement with a plate reader**

For Fig. 2-1-4 and 3-3-1, the fluorescence in 384-well black plates (Greiner) was measured with a microplate reader (2103 EnVision; PerkinElmer, Inc.). To determine the enzymatic activities, the time course of the fluorescence intensity (excitation and emission: 335-375 nm/448-473 nm for umbelliferone derivatives, 478-492 nm/523-548 nm for TokyoGreen derivatives) was measured at 1 min intervals at 25°C, and the initial velocity of fluorescence increase was converted to enzymatic activity using the corresponding fluorescent products (1  $\mu\text{M}$ ) as standards. For Fig. 4-4-1, the fluorescence was measured in 96-well half area plates (Corning) with a microplate reader (ARVO X5; PerkinElmer, Inc.). To determine the enzymatic activities, the time course of the fluorescence intensity

(excitation and emission: 478-492 nm/523-548 nm for TokyoGreen derivatives, 519-544 nm/565-625 nm for TokyoMagenta derivatives) was measured at 5 min intervals at 25°C. For the measurement of ALPI activities in serum by conventional biochemical assay, the absorbance was measured in 384-well clear plates (Nunc™) with a microplate reader (SH-8000 Lab; Corona Electric Co., Ltd.). To determine enzymatic activities, the time course of the absorbance (at 405 nm) was measured at 1 min intervals at 25°C, and the initial velocity of absorbance increase was converted to enzymatic activity based on measurements of 10, 30, and 100  $\mu$ M standards.

### **Preparation of microdevices for assay**

Chamber array devices were prepared based on a previous report<sup>31</sup>. A glass coverslip (24×32 mm) was sonicated in acetone and isopropanol, and deionized in water for 10 min. Then, the coverslip was immersed in 10 M KOH for several hours and rinsed with deionized water. It was spin-coated with an amorphous fluorocarbon polymer (CYTOP 816AP; Asahi Glass, Japan) at 3400 rpm for 30 s and baked for 1 h on a hotplate at 180°C. The thickness of the CYTOP layer was 3  $\mu$ m. The CYTOP-coated coverslip was spin-coated with a positive photoresist (AZ-4903; AZ Electronic Materials, USA) at 7,500 rpm for 60 s and baked at 55°C for 3 min and then at 110°C for 5 min. Subsequently, photolithography was carried out using a photomask with 3  $\mu$ m holes, separated by 3  $\mu$ m. The resist-patterned coverslip was dry-etched with O<sub>2</sub> plasma in a reactive ion etching system (RIE-10NR; Samco, Japan) to remove the exposed CYTOP. The substrate was cleaned and rinsed with acetone and isopropanol to remove the remaining photoresist. The resulting CYTOP-on-coverslip substrate had an array of exposed SiO<sub>2</sub> patterns with a diameter of 4.3  $\mu$ m, each held a water droplet in the digital enzyme assay.

## Digital enzyme assay in the microdevice

The enzyme stock solution was diluted with the assay buffer containing fluorescence probes. Next, 15  $\mu\text{L}$  reaction mixture was introduced into the microdevice by manual pipetting. Then, 40  $\mu\text{L}$  AE-3000 (AGC Chemicals) and 40  $\mu\text{L}$  Fomblin<sup>®</sup> PFPE (SOLVAY) were introduced into the microdevice to flush out excess reaction mixture and to form W/O droplets. The fluorescence imaging was done using a Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS-AF) instrument with a TCS SP8 and 20 $\times$  dry objective lens (HCPLAPO CS2 20 $\times$  0.75 DRY). The light sources were diode, argon and HeNe lasers. The excitation wavelength and the emission wavelength were 405 nm/432-500 nm for umbelliferone derivatives, 514 nm/530-580 nm for TokyoGreen derivatives, and 594 nm/610-700 nm for TokyoMagenta derivatives. All measurements were performed at 25°C. Optimized conditions for enzymatic assays were as follows. For ALPs, biological samples were mixed with HCCA-mPhos (30  $\mu\text{M}$ ), sTG-mPhos (30  $\mu\text{M}$ ), and sTM-Phos (30  $\mu\text{M}$ ) in diethanolamine-HCl buffer (1 M, pH 9.3) at 25°C, and the fluorescence increase was monitored for 40 min (for Fig. 2-2-1, 2-2-2, 2-2-3, 2-3-1, 2-3-2, 2-4-1, and 2-4-2). For general phosphatases, biological samples were mixed with HCCA-mPhos (30  $\mu\text{M}$ ), sTG-qmPhos (30  $\mu\text{M}$ ), and sTM-Phos (30  $\mu\text{M}$ ) in tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.4) at 25°C, and the fluorescence increase was monitored for 2 h (for Fig. 3-1-1, 3-1-2, 3-2-1, 3-2-3, and 3-3-2). For ENPPs, biological samples were mixed with sTG-mdTMP (100  $\mu\text{M}$ ) and sTM-dCMP (100  $\mu\text{M}$ ) in tris-HCl buffer (100 mM, pH 9.3) at 25°C and the fluorescence increase was monitored for 40 min (for Fig. 4-2-1, 4-2-2, 4-2-3, 4-2-5, and 4-3-1).

## **Image processing**

The fluorescence increase was calculated by linear fitting of 4 time points of fluorescence intensity inside ROIs corresponding to each well. ROIs were set by the following procedure. First, a suitable threshold for almost all wells in the microdevice was set and the areas meeting appropriate conditions (diameter: 10-50 pixels, circularity: 0.7-1.0) were selected as ROIs. Second, each ROI was reset to a circular ROI whose center was the same as that of the original ROI and whose diameter was 8 pixels. All processing was performed with ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

## **Discrimination analysis**

In Fig. 2-2-2, 2-3-2, and 2-4-1, each well was assigned to the ALPI cluster or the TNAP cluster using discrimination analysis. The training data for ALPI and TNAP were decided by measuring the purified recombinant protein (Fig. 2-2-1). The Mahalanobis' distance from the training data of each well was measured and the well was assigned to the cluster that has the smallest Mahalanobis' distance.

## Cluster analysis

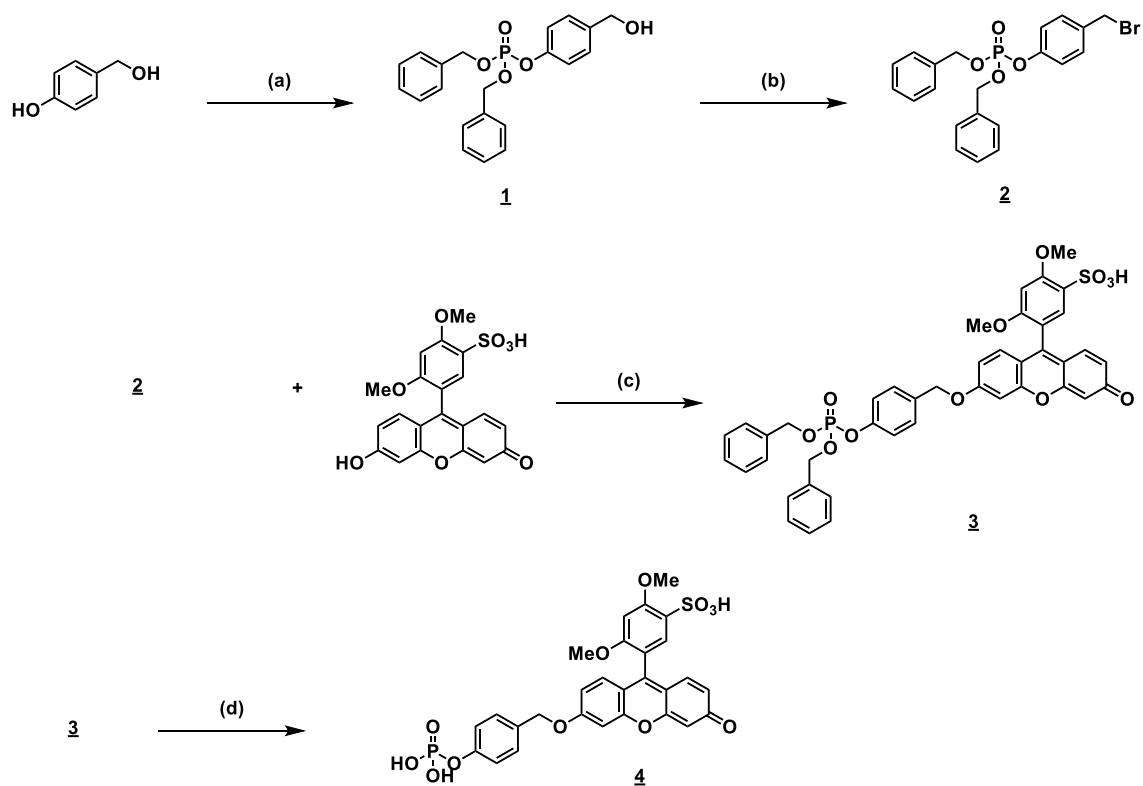
The assay was performed under conditions where  $\lambda$  (probability of existence of a protein molecule in a well) was around 0.01. We treated each spot as a representative of a single enzyme molecule. Cluster analysis was performed using a variational Bayesian-Gaussian mixture model (VBGMM, implemented in Python with scikit-learn; <https://scikit-learn.org/>); the model assigns all data points to a mixture of unidentified numbers of Gaussian distributions by means of the variational Bayesian method. The initial cluster number was set to 9 (in phosphatase assay, Fig. 3-2-1, 3-2-2, and 3-2-3) or 3 (in ENPP assay, Fig. 4-2-3 and 4-2-5). We omitted the data from the empty wells, defined as wells whose Mahalanobis' distance was less than or equal to the threshold calculated from the assay with blank buffer. The wells with apparent increase in fluorescence below zero for all wavelengths (in phosphatase assay) or for the green wavelength (in ENPPs assay) were also omitted from the analysis.

## Western blotting

Western blotting was performed with serum samples treated with Pierce Albumin Depletion Kit (Thermo Fisher Scientific) for the removal of serum albumin. All the electrophoresis samples were diluted to 1/10 of the intact serum for the loading. The proteins were separated and detected using an automated capillary electrophoresis system (Simple Western system and Compass software; ProteinSimple) using Wes Separation Capillary Cartridges for 12-230 kDa. Antibodies against ENPP3 (Abcam, ab233777) were used at a dilution of 1:50. The signals were detected using an HRP-conjugated secondary anti-mouse antibody and were visualized using ProteinSimple software.



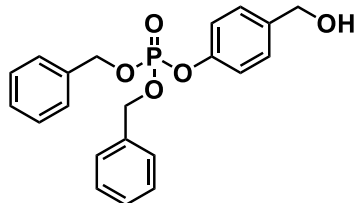
## Synthesis of a novel phosphatase activity detection probe.



Synthesis of a novel phosphatase activity detection fluorescent probe (sTG-qmPhos).

(a) dibenzyl phosphite, DMAP, DIEA,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , Yield: 52 % (b)  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{CBr}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., Yield: 46 % (c)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{DMSO}/\text{CH}_3\text{CN}$ , r.t., Yield: 70 % (d) TMSI, pyridine,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , Yield: 65 %.

### Preparation of compound 1



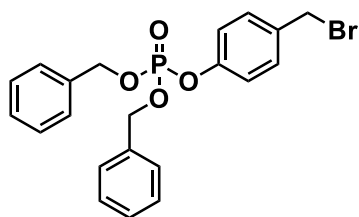
A solution of dibenzyl phosphite (3195  $\mu\text{L}$ , 14.5 mmol) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  was added dropwise to a solution of 4-hydroxybenzyl alcohol (1241 mg, 10.0 mmol), DMAP (122 mg, 1.0 mmol), DIEA (3666  $\mu\text{L}$ , 21.0 mmol) and  $\text{CCl}_4$  (4836  $\mu\text{L}$ , 50.0 mmol) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  at  $-10^\circ\text{C}$ . The reaction mixture was stirred under Ar at  $-10^\circ\text{C}$  for 6 hours, and then evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (eluent: AcOEt/hexane = 29/71 > 50/50) to afford 1 2012 mg (5.23 mmol) as a colorless solid, yield 52%.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.27-7.32 (m, 12H), 7.07 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz), 5.09 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.53 (s, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  149.6, 138.9, 135.5, 128.5, 128.4, 128.1, 128.0, 119.7, 70.2, 63.1

HRMS (ESI $^+$ ): Calcd. for  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 407.1024, Found, 407.1021 (-0.3 mmu).

## Preparation of compound 2



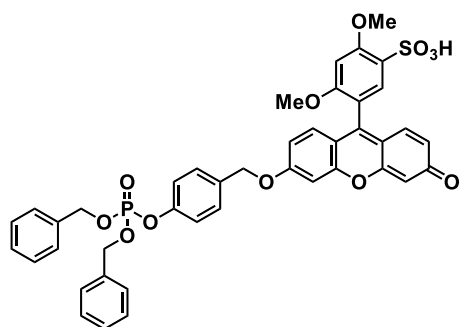
A solution of  $\text{PPh}_3$  (491 mg, 1.87 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added dropwise to a solution of 1 (600 mg, 1.56 mmol) and  $\text{CBr}_4$  (1035 mg, 3.12 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  under Ar at r.t. The reaction mixture was stirred under Ar at r.t. for 6 hours, and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$ , and the organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (eluent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) to afford 2 (318 mg, 0.71 mmol) as a colorless solid, yield 46%.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.27-7.35 (m, 12H), 7.05 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz), 5.10 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.50 (s, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  150.2, 135.8, 135.4, 130.5, 128.6, 128.4, 128.0, 120.1, 70.3, 31.7.

HRMS (ESI $^+$ ): Calcd. for  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 469.0180, Found, 469.0170 (-1.0 mmu).

### Preparation of compound 3



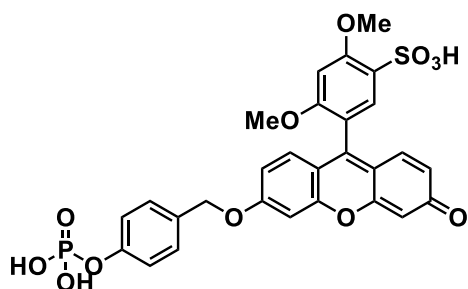
sTG was prepared according to the master's thesis. A solution of 2 (270 mg, 0.60 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (anhydrous) was added dropwise to a mixture of sTG (86 mg, 0.20 mmol) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (261 mg, 0.80 mmol) in DMSO and CH<sub>3</sub>CN (anhydrous) under Ar at r.t. The reaction mixture was stirred under Ar at r.t. for 6 hours. Then, sodium phosphate buffer (pH 7.4) was added, and the organic solvent was removed *in vacuo*. The aqueous solution was purified by HPLC (eluent: A/B = 99/1 > 0/100, A: 100% H<sub>2</sub>O containing 0.1 M TEAA, B: 80% CH<sub>3</sub>CN and 20% H<sub>2</sub>O containing 0.1 M TEAA). The eluate was desalted on a Sep-Pak C18 Cartridge (Waters), and evaporated under reduced pressure. The product was freeze-dried to obtain 3 112 mg (0.14 mmol) as an orange solid, yield 70%.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.71 (s, 1H), 7.42 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.11-7.29 (m, 15H), 6.95 (dd, 1H, *J* = 8.9, 2.5 Hz), 6.91 (s, 1H), 6.54 (dd, 1H, *J* = 9.6, 2.3 Hz), 6.38 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 5.18 (s, 2H), 5.09 (d, 4H, *J* = 8.7 Hz), 4.05 (s, 3H), 3.77 (s, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 185.9, 164.3, 160.1, 160.1, 155.1, 151.0, 135.5, 135.4, 133.4, 131.9, 130.8, 130.2, 129.2, 128.6, 128.4, 128.1, 128.0, 125.3, 120.1, 120.1, 118.0, 114.8, 114.7, 111.2, 104.1, 101.1, 96.3, 70.3, 69.78, 55.38.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): Calcd. for [M+H]<sup>+</sup>, 795.1665, Found, 795.1662 (-0.3 mmu).

### Preparation of 4 (sTG-qmPhos)



A mixture of 3 (50 mg, 0.063 mmol), TMSI (130  $\mu$ L, 0.945 mmol) and pyridine (77  $\mu$ L, 0.756 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was stirred at 0 °C for 1.5 hours. Sodium phosphate buffer (pH 7.4) was added, and the aqueous phase was separated and evaporated. The residue was purified by HPLC (eluent: A/B = 99/1 > 0/100, A: 100%  $\text{H}_2\text{O}$  containing 0.1 M TEAA, B: 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$  containing 0.1 M TEAA). The eluate was desalted on a Sep-Pac C18 Cartridge (Waters) and evaporated under reduced pressure. The product was freeze-dried to afford 4 (25 mg, 0.041 mmol) as an orange solid, yield 65%.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.68 (s, 1H), 7.21-7.39 (m, 7H), 6.98 (dd, 1H,  $J$  = 8.9, 2.5 Hz), 6.92 (s, 1H), 6.57 (dd, 1H,  $J$  = 9.6, 2.3 Hz), 6.42 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz), 5.20 (s, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.80 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  185.9, 164.7, 160.1, 155.1, 154.0, 151.1, 131.9, 130.7, 130.2, 130.0, 128.8, 127.9, 125.3, 120.3, 120.2, 118.0, 114.8, 114.7, 111.2, 104.0, 101.1, 96.3, 70.4, 55.4.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): Calcd. for  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 637.0546, Found, 637.0552 (+0.6 mmu).

## 参考文献

1. Schenker, S. Amylase--its clinical significance: a review of the literature. *Medicine* **55**, 269-289 (1976).
2. Sharma, U., Pal, D. & Prasad, R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **29**, 269-278 (2014).
3. Whitfield, J. Gamma glutamyl transferase. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* **38**, 263-355 (2001).
4. Schiess, R., Wollscheid, B. & Aebersold, R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Molecular oncology* **3**, 33-44 (2009).
5. Rondelez, Y. et al. Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology. *Nature biotechnology* **23**, 361-365 (2005).
6. Obayashi, Y., Iino, R. & Noji, H. A single-molecule digital enzyme assay using alkaline phosphatase with a coumarin-based fluorogenic substrate. *Analyst* **140**, 5065-5073 (2015).
7. Kawaguchi, M., Hanaoka, K., Komatsu, T., Terai, T. & Nagano, T. Development of a highly selective fluorescence probe for alkaline phosphatase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**, 5088-5091 (2011).
8. Van Belle, H. Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. *Clinical Chemistry* **22**, 972-976 (1976).
9. Craig, D.B., Arriaga, E.A., Wong, J.C., Lu, H. & Dovichi, N.J. Studies on Single Alkaline Phosphatase Molecules: Reaction Rate and Activation Energy of a Reaction Catalyzed by a Single Molecule and the Effect of Thermal Denaturation The Death of an Enzyme. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 5245-5253 (1996).
10. Ueno, H., Kato, M., Minagawa, Y., Hirose, Y. & Noji, H. Elucidation and control of low and high active populations of alkaline phosphatase molecules for quantitative digital bioassay. *bioRxiv* (2020).
11. Hambidge, M. Human Zinc Deficiency. *The Journal of Nutrition* **130**, 1344S-1349S (2000).
12. Huber, A.M. & Gershoff, S.N. Effect of zinc deficiency in rats on insulin release from the pancreas. *J Nutr* **103**, 1739-1744 (1973).

13. Denu, J.M. & Tanner, K.G. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**, 5633-5642 (1998).
14. Marx, A., Backes, C., Meese, E., Lenhof, H.-P. & Keller, A. EDISON-WMW: Exact Dynamic Programming Solution of the Wilcoxon-Mann-Whitney Test. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **14**, 55-61 (2016).
15. Tibi, L., Collier, A., Patrick, A., Clarke, B. & Smith, A. Plasma alkaline phosphatase isoenzymes in diabetes mellitus. *Clinica chimica acta* **177**, 147-155 (1988).
16. Tonks, N.K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**, 833-846 (2006).
17. Massé, K., Bhamra, S., Allsop, G., Dale, N. & Jones, E.A. Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase (Enpp) nucleotidases: cloning, conservation and developmental restriction. *International Journal of Developmental Biology* **54**, 181-193 (2009).
18. Nakai, Y. et al. Specific increase in serum autotaxin activity in patients with pancreatic cancer. *Clinical biochemistry* **44**, 576-581 (2011).
19. Quail, D.F. & Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine* **19**, 1423 (2013).
20. De Monte, L. et al. Basophil Recruitment into Tumor-Draining Lymph Nodes Correlates with Th2 Inflammation and Reduced Survival in Pancreatic Cancer Patients. *Cancer Res* **76**, 1792-1803 (2016).
21. Zhang, S., Garcia-D'Angeli, A., Brennan, J.P. & Huo, Q. Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general. *Analyst* **139**, 439-445 (2014).
22. Pantel, K. & Alix-Panabières, C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends in Molecular Medicine* **16**, 398-406 (2010).
23. Liu, M. et al. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Annals of Oncology* (2020).



24. Soleimany, A.P. & Bhatia, S.N. Activity-Based Diagnostics: An Emerging Paradigm for Disease Detection and Monitoring. *Trends in Molecular Medicine* **26**, 450-468 (2020).
25. Swaminathan, J. et al. Highly parallel single-molecule identification of proteins in zeptomole-scale mixtures. *Nature biotechnology* **36**, 1076 (2018).
26. Varongchayakul, N., Song, J., Meller, A. & Grinstaff, M.W. Single-molecule protein sensing in a nanopore: a tutorial. *Chemical Society Reviews* **47**, 8512-8524 (2018).
27. Rissin, D.M. et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nature Biotechnology* **28**, 595-599 (2010).
28. Kawaguchi, M. et al. Screening and X-ray crystal structure-based optimization of autotaxin (ENPP2) inhibitors, using a newly developed fluorescence probe. *ACS chemical biology* **8**, 1713-1721 (2013).
29. Honda, K. et al. Altered plasma apolipoprotein modifications in patients with pancreatic cancer: protein characterization and multi-institutional validation. *PloS one* **7**, e46908 (2012).
30. Honda, K. et al. Plasma biomarker for detection of early stage pancreatic cancer and risk factors for pancreatic malignancy using antibodies for apolipoprotein-AII isoforms. *Scientific Reports* **5**, 15921 (2015).
31. Zhang, Y. et al. Accurate high-throughput screening based on digital protein synthesis in a massively parallel femtoliter droplet array. *Science Advances* **5**, eaav8185 (2019).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導を受け賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室、浦野泰照教授に心より感謝申し上げます。非常に多忙な中、研究の進捗や方針についての的確なご指摘、ご提案をして頂き、本成果に繋げることができました。

極めて貴重なご助言を頂きました、花岡健二郎准教授、上野匡助教、小松徹助教に深く感謝申し上げます。特に小松徹助教は、研究の方針についてのディスカッション、行き詰った際の的確なアドバイスや指導など、貴重な時間を多く割いて頂きました。重ねて深く感謝申し上げます。

1 分子計測技術に関して実験の指導・研究方針に関する議論を中心として共同研究を行って頂いた野地博行教授、渡邊力也主任研究員、張翼博士に深く感謝申し上げます。

ENPPs 活性検出に関してプローブの開発を中心として共同研究を行って頂いた中川秀彦教授、川口充康講師に深く感謝申し上げます。

すい臓がん患者検体サンプルの提供・検体を用いた実験に対するご指導を中心として共同研究を行って頂いた本田一文大学院教授、奥坂拓志肝胆膵内科長、植野高章教授に深く感謝申し上げます。

酵素活性プロファイリングデータの多変量解析に関してアドバイス・ディスカッションをして頂いた井上大輝博士に深く感謝申し上げます。

常に励まし合い、共に研究を行い、忙しい中で相談相手になってくださった薬品代謝化学教室の全ての皆様に感謝致します。特に、研究室生活の支えとなってくれた、同期の池野喬之博士、大野久史君、粕谷有沙博士、溝口舞博士、Nusaiba Hameed さんに深く感謝致します。

最後に、長い学生生活を支え、応援してくれた家族に心からの感謝を致します。

2021 年 3 月

東京大学大学院薬学系研究科薬科学博士課程薬品代謝化学教室

坂本 眞伍