

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 坂本 眞伍

【背景】

本研究では、生体サンプル中に存在する多数の酵素を微小なウェル中に 1 分子ずつ分画し、その活性を指標としてそれらを識別・高感度に検出するという方法論の開発を行った。生体サンプル中の酵素活性検出における感度の向上は、特に疾患の早期発見や新規バイオマーカーの発見に大きく資すると期待される。酵素活性検出の超高感度化を実現し得る技術としては、多数のマイクロウェルに酵素を 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¹。しかしながら、血液、尿のような多数の酵素種が含まれる生体サンプル中の酵素活性検出に本手法を適用する場合、各酵素はマイクロウェル内にランダムに封入されてしまうため、どのウェルに何の酵素が入っているかを知ることができないという問題が生じた。特に疾患関連酵素として知られ、疾患のスクリーニングにも利用されている alkaline phosphatases (ALPs) のように、類似の活性を持つ酵素群 (アイソザイム) が存在する酵素種を検出する場合においては、これらの酵素を区別して検出することが出来ないことが、生体サンプルを利用した酵素の検出に制限を与えている。

これに対し本研究では、ウェル中に含まれる 1 分子の酵素を、異なる反応点と異なる蛍光波長を有する複数の蛍光プローブに対する反応性の組み合わせ (活性パターン) の違いによって識別するという手法によって上記の問題を解決し、マイクロデバイスを用いた 1 分子レベルの超高感度計測という長所を最大限に生かした新規診断プラットフォームを開発することを目指した (Fig. 1)。

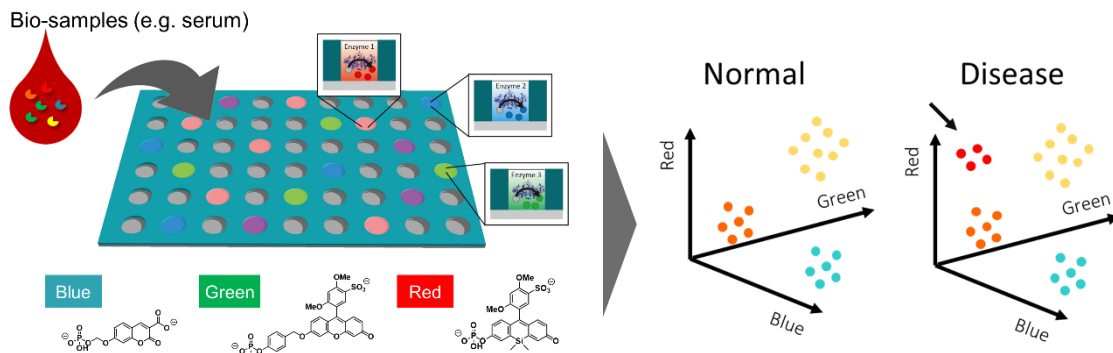


Fig. 1 Schematic view of single enzyme activity-based protein profiling (SEAP)

【結果】

1. 血液中の ALP アイソザイムの 1 分子レベルでの分離検出

本研究ではまず、サンプル中の ALP の活性をアイソザイム毎に分離し、検出することを目的として、ALP 活性検出用の多色の蛍光プローブ群を開発した。そのうち、ALP の基質となるリン酸エステル部位の構造の異なる 2 色のプローブ (Fig. 2a) を用いて、2 種類の ALP アイソザイム、小腸型 ALP (ALPI) と組織非特異型 ALP (TNAP) の活性測定を行ったところ、それぞれにおいて 2 色のプローブに対する反応性の組み合わせが異なることを見出し、溶液中の両アイソザイムを 1 分子レベルで分離検出することに成功した。さらに、ヒト血清サンプルを用いた測定においても、サンプル中に存在する両アイソザイムをその活性パターンに基づいて 1 分子レベルで分離検出することに成功した (Fig. 2b, c)。また、10 名の検体由来のサンプル中において、本手法で ALPI として検出された各分子の活性の総和は、通常の生化学検査で用いられる比色分析によって測定された ALPI の活性値と高い相関を示した (Fig. 2d)。すなわち本手法を用いて、血液サンプル中の ALP アイソザイムを分離検出し、定量することが可能であることが示された。

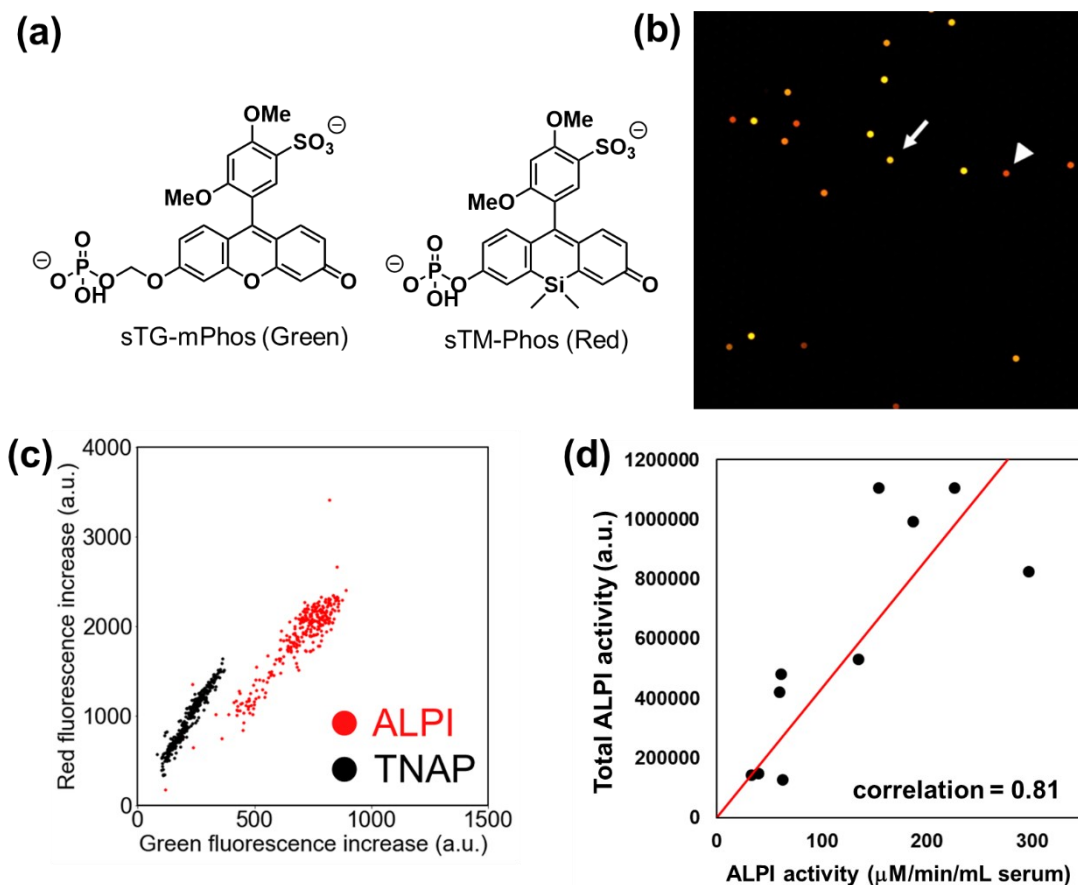


Fig. 2 (a) Chemical structure of novel fluorescent probes to detect ALPs activity. (b) Representative fluorescence images (530-580 nm and 610-700 nm) of microdevice containing 1/3,000-diluted human serum. (c) Scatter plot of the activities of the proteins in the experiment shown in (b). (d) The comparison of the integral of the activities calculated from the spots assigned as ALPI and the ALPI activity monitored by conventional biochemical assay.

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

さらに、ALP に限らず、血液中に存在する多様な phosphatase を検出するため、生理的 pH の条件の下、それぞれ異なる酵素認識部位の構造を有する 3 色の phosphatase 検出用蛍光プローブ (Fig. 3a) を用いて検体由来血清サンプルの測定を行った。その結果、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 (Fig. 3b)、これらはクラスター分析の結果、9つのクラスターに分類することができた (Fig. 3c)。この測定条件下でも ALPI に由来するクラスターを推定することが可能であり、糖尿病患者においてこのクラスターに相当する分子数が有意に増加していることを見出した (Fig. 3d)。この結果は、糖尿病患者において ALPI の活性が上昇しているという過去の報告に矛盾しないものとなっている²。

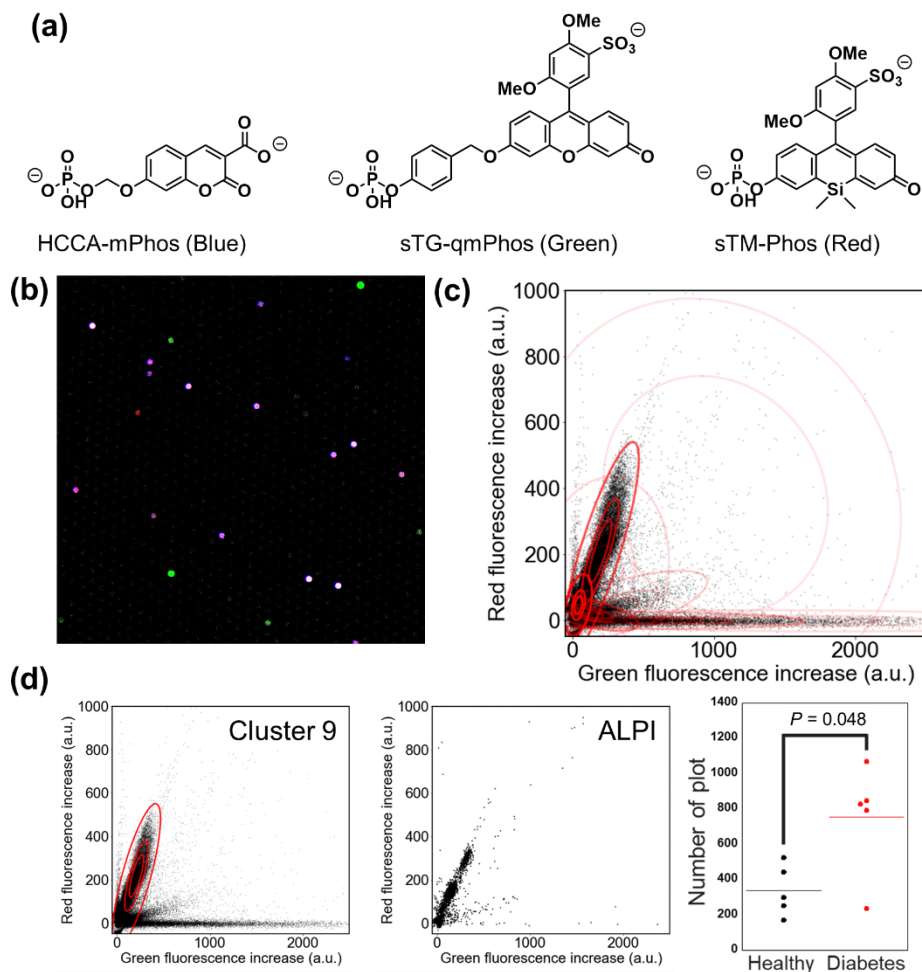


Fig. 3 (a) Chemical structure of novel fluorescent probes to detect phosphatases activity. (b) Representative fluorescence overlay image (432-500nm, 530-580 nm, and 610-700 nm) of a microdevice containing 1:3000 diluted serum. (c) Scatter plots of activity acquired from five healthy individuals and five patients with diabetes. Whole plots were distributed into 9 clusters by cluster analysis. (d) (left) The contour lines show the distribution of cluster 9. (middle) Scattered plot of the fluorescence increase of the well in measurement of purified recombinant ALPI. (right) The dot plots show the number of plots assigned to each cluster. P value was analyzed using Mann-Whitney U test.

3. 血液中の ENPPs の 1 分子酵素活性プロファイリング

1 分子レベルでの活性パターンに基づいた生体サンプル中の酵素のプロファイリング技術の確立を受けて、特に早期診断法の確立が求められているすい臓がんの診断バイオマーカーの探索を試みた。ターゲット酵素としては ectonucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (ENPPs) を選択した。ENPPs は細胞外の nucleotide triphosphate などの基質を加水分解するという活性を有し、7 種類のサブタイプを持つ酵素である。まず ENPP 活性検出用の多色の蛍光プローブ群を開発し (Fig. 4a)、これを用いることで血漿サンプル中に存在する ENPPs を 1 分子レベルで検出することに成功した。血漿サンプル中で検出された ENPPs に対しその活性パターンに基づいてクラスター分析を行ったところ、3 つのクラスターに分類された (Fig. 4b)。この手法を以って健常者・膵臓がん患者を含む血漿サンプルを測定したところ、クラスター 1 に相当する酵素について、膵臓がん患者における血漿中の分子数の有意な増加を見出した (Fig. 4c)。精製酵素を用いた検討結果より、この酵素は ENPP3 であると推測されている。ENPP3 は好塩基球の活性化マーカーとして知られている酵素で、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。

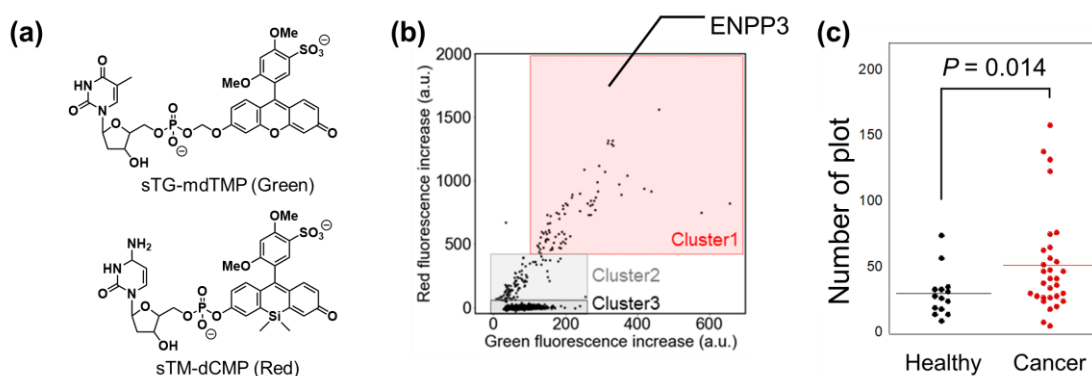


Fig. 4 (a) Chemical structure of novel fluorescent probes to detect ENPPs activity. (b) Scatter plots of ENPPs activity data for plasma samples. Points were assigned to three clusters by cluster analysis. (c) The dot plot shows the number of plots assigned to cluster 1 in (b) (ENPP3). P value was analyzed using Mann-Whitney U test.

【総括】

本研究では、生体サンプル中に存在する酵素を、1 分子毎の複数の蛍光プローブに対する反応性の組み合わせに基づいて分離検出する方法論を確立した。さらにこの手法を用いて、血液中の ALP、ENPP についてアイソザイム・サブタイプのレベルまでで分離検出することを達成し、疾患と酵素活性との新たな関係性を見出すことが可能であることを示した。今後は検出対象とする酵素活性や診断対象とする疾患をさらに拡張した研究を進めることで、より診断において性能の高いバイオマーカーの発見及び新規疾患診断法の確立が期待される。

【参考文献】

1. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 361-5.
2. *Clin. Chim. Acta.* **1988**, *177*, 147-55.