

別紙1-1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 小俣 洋介

論 文 題 目


Screening of novel Midkine binding protein by BioID2-based proximity labeling

(BioID2 を用いた近位依存性ビオチン標識法による
新規ミッドカイン結合タンパク質のスクリーニング)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

岡島 徹也 

名古屋大学教授

委員

豊岡 伸哉 


名古屋大学教授

委員

高橋 義行 

名古屋大学教授

指導教授

柳 正 健治 

論文審査の結果の要旨

別紙 1-2

今回、近位依存性ビオチン標識法および質量分析法を用いて神経芽腫の予後不良因子であるミッドカイン (Midkine, MK) の新たな結合因子を網羅的に探索した。まず、MK-BioID2 を発現するプラスミドを 293T 細胞へ導入し、その融合タンパク質を細胞外へ分泌させた。培養上清に含まれる当該タンパク質には、ビオチン化活性を有していることが確認された。次に、培養上清を用いて MK に応答する細胞をビオチン化させ、その細胞溶解液をストレプトアビジンビーズで分離抽出し質量分析を行った。その結果、新規の MK 結合因子の候補として最終的に 25 種類にまで絞った。MK に応答する細胞は Ribosomal Protein S6 のリン酸化の有無で評価したが、その上流に存在する Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) と insulin-like growth factor 2 (IGF2) のシグナル伝達を調製する Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) が候補に含まれていたため、この分子に着目した。質量分析に使用したサンプルをウエスタンブロッティング法で確認した結果、35 kDa 付近にバンドが検出された。故に、質量分析によって検出された IGFBP2 は MK-BioID2 と結合しビオチン化されることが確かめられた。本研究に対し、以下の点を議論した。

1. 本研究では 3 回の独立した質量分析で 25 種類まで絞りこみ、最終的には MASCOT score と RPS6 のリン酸化と関係がある分子に着目した。この他にも、使用する MK 感受性細胞を変えて同様な実験を行う方法や、MK シグナルペプチドのみを含む BioID2 プラスミドを用いて、同様な方法によって LC-MS/MS で検出された候補をコントロールとし、MK-BioID2 でビオチン化された候補から、コントロールを除いて絞り込む方法などが挙げられる。

2. MK は神経芽腫の予後不良に関わる因子で、多くの神経芽腫の細胞株で発現している。さらに、星状細胞腫、大腸癌、そして前立腺癌などにも発現している。正常条件下では発生が進むにつれ MK を発現する組織が少なくなり、妊娠後期では腎臓でしか発現していない。以上のことから、腫瘍のマーカーだけでなく、MK を標的とした治療法が確立されれば、神経芽腫を始め様々な癌に対して応用できる可能性がある。

3. MK 受容体が同定されれば、それに対する競合阻害剤を合成し、細胞内シグナル経路を遮断する方法が挙げられる。本研究では、BioID2 により IGFBP2 と MK との結合を示唆した。IGFBP2 が IGF2 に結合することで、IGF1R およびその下流の RPS6 リン酸化を調製しているとする、MK が IGFBP2 に結合することで遊離した IGF2 がそのシグナル経路を動かしている可能性が考えられる。この仮説を証明すれば、IGFBP2 を加えるなどの治療法も考案できる。

以上の理由により、本研究は博士 (医学) の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	小俣 洋介
試験担当者	主査	岡島 徹也	副査 ₁	豊岡 伸哉
	副査 ₂	高橋 義行	指導教授	門和 健治
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ストレプトアビジンによるブロッティングでビオチン化タンパク質のバンドがかなり多く、それに伴いLC-MS/MSの解析で検出された候補も多くなることが想定される。その絞り込み方法について。 2. 治療における MK の意義、重要性について。 3. MKの不活化抗体での治療 (mouse) について。 <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、分子生物学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				