

厚生労働科学研究費補助金  
疾患関連たんぱく質解析研究事業

## 疾患関連たんぱく質解析研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長尾 拓

平成16（2004）年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

疾患関連たんぱく質解析研究	1
長尾 拓	

### II. 分担研究報告書

1. 疾患関連たんぱく質解析技術の確立に関する基盤的研究	102
早川 堯夫	
2. 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立 (高中性脂肪ウサギのプロテオーム解析)	175
友池 仁暢	
3. 疾患関連たんぱく質解析研究の一環としての 内因性グレリンの翻訳後修飾による多様な分子型の解析に関する研究	179
寒川 賢治	
4. 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立 (たんぱく質消化物としてのペプチドの分離・解析技術の確立)	182
南野 直人	
5. 痴呆等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立	186
高坂 新一	
6. 糖尿病等代謝性疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立に関する研究	190
笹月 健彦	
7. 小児の免疫関連疾患に関わる微量たんぱく質解析技術の確立	192
秦 順一	
8. 加齢関連疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立	195
太田 壽城	
9. 疾患関連たんぱく質解析に関する研究	197
佐古田三郎	
10. 疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立	198
高尾 敏文	
11. 各種がんに関連する組織試料作成技術及び微量たんぱく質解析技術の確立	202
小山 博記	
12. 生体サンプル由来たんぱく質の前処理法の確立及び生体中微量たんぱく質の各種分離技術の確立	205
金子 勲	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	217
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

## 疾患関連たんぱく質解析研究

主任研究者 長尾 拓 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨：本研究は五大疾患などについて、患者と健常人との間の発現たんぱく質群（プロテオーム）の種類、質、量の相違を比較（疾患プロテオミクス）することにより、疾患関連たんぱく質群の網羅的探索を通じた「疾患関連たんぱく質群のプロテオーム動態に関するバイオインフォマティクス（創薬基盤データベース）」を構築し、疾患関連たんぱく質群の中から医薬シーズ・創薬ターゲット・疾患マーカーなどを同定すると共に、21世紀型創薬（プロテオーム創薬）の基盤技術の確立や疾病治療に有効な新規医薬、診断薬、治療法の開発につなげるなど、我が国独自の知的財産を創出しようとするものである。以上の観点から本年度は、国立医療機関などにより提供されるヒト組織サンプルに対して、多数の最新鋭高性能質量分析機器などを用い、大規模かつ高速解析するための基礎的検討を推進し、以下の知見・情報を得た。

- ① 疾患関連たんぱく質解析技術として、(1)2D-LC によるたんぱく質の精細分離及び ICAT 法を利用した、たんぱく質発現解析システムの構築、(2)蛍光標識 2D-DIGE とマイクロアレーを組み合わせた、たんぱく質・遺伝子発現情報比較システムの構築、(3)LC/MS、LC/MS/MS 及び 2D-GE を利用したグライコプロテーム解析技術の開発、(4)疾患関連たんぱく質の機能解析に向けた遺伝子発現制御系の開発に成功した。
- ② 動脈硬化性疾患のリスクファクターとなる高中性脂肪血症の病因と病態生理を解明するため、高度の高中性脂肪血症を病態モデル兔 (TGH)と軽度の TGL を用い、肝臓におけるプロテオーム動態を比較したところ、TGL に特徴的な Carboxylesterase や TGH に特徴的な Acyl CoA dehydrogenase を見出した。
- ③ ヒト胃組織および血漿中に存在する内因性グレリン分子型の検討を行った結果、オクタノイル化されたグレリンを初めとする多種類のグレリン関連分子が存在することが明らかになった。
- ④ 従来の 2DE 法よりも優れた分離・検出システムの確立を目的に、ショットガン解析法の構築を図ったところ、高感度に多数の酵素消化ペプチドの検出やその構造解析が可能であることを明らかにした。
- ⑤ 神経変性疾患（パーキンソン病、若年性痴呆症など）に対するプロテオミクス研究を推進するため、ヒト臨床検体の供給体制を整備すると共に、プロテオームの網羅的解析技術やモデル動物を確立した。
- ⑥ 糖尿病に関するプロテオミクス研究を推進するため、LC-MS/MS、Protein Chip などを駆使した研究体制を整え、外来及び入院患者からの臨床サンプル収集の体制を確保した。
- ⑦ 難治性の小児炎症性・アレルギー性免疫疾患の中で喘息・腎炎・ネフローゼ症候群に関する疾患特異的な体液性因子のプロテオミクスについて、患者の血清・尿を用いた解析方法の確立などを行った。
- ⑧ 痴呆症や骨粗しょう症等の加齢関連疾患たんぱく質解析を目指し、ヒトサンプル提供体制を確立した。
- ⑨ 手術後の残余検体を研究に供する目的で、共通のインフォームド Consent 用紙を作製し、医学倫理委員会で認められると共に、残余検体の定義を明らかにして、その設備を充実させた。
- ⑩ 質量分析法による生体内蛋白質・ペプチドの構造解析をフェムトモルレベルで再現性よく評価するため、ハードウェアや解析ソフトウェアを試作し、その優れた有用性を認めた。
- ⑪ がん患者に対するテーラーメイド医療の実現にむけて、抗がん免疫能の増強に関与する遺伝子産物の解析とがん組織に発現するたんぱく質群の網羅的解析を開始し、基礎的データを蓄積した。
- ⑫ 疾患毎に、臨床・病情報と連結した患者 100 名以上の生体試料（組織＋体液）の疾患関連たんぱく質が解析可能な高性能質量分析装置等の機器類及びそれに対応する統合型バイオインフォマティクスシステムを構築した。

研究分担者	
早川堯夫	国立医薬品食品衛生研究所 副所長
友池仁暢	国立循環器病センター 病院長
寒川賢治	国立循環器病センター 生化学部長
南野直人	国立循環器病センター 薬理部長
高坂新一	国立精神・神経センター神経研究所 所長
笹月健彦	国際医療センター研究所 所長
秦 順一	国立成育医療センター 所長
太田壽城	国立療養所中部病院長寿医療研究センター 病院長
佐古田三郎	大阪大学大学院医学系研究科 教授
高尾敏文	大阪大学蛋白質研究所 教授
小山博記	大阪府立成人病センター 総長兼研究所長
金子 勲	ヒューマンサイエンス振興財団

## A. 研究目的

医薬品開発に際して、創薬ターゲットや医薬シーズ、疾患マーカーとなる疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保は、今後の医薬品産業の発展に必要な不可欠である。従って、近年ますます激化しつつある新薬開発や新規治療技術の創出において、欧米諸国等との国際競争に打ち勝つためには、疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保に向けた作業を加速させることが重要となってきた。そのためには、現在実施されているタンパク 3000

プロジェクトなどのように、たんぱく質全般の基本構造と機能との関連を解析する「たんぱく質からのアプローチ」に加え、患者と健常者との間のたんぱく質の種類、質、量の違いを比較する「疾患からのアプローチ」により、創薬ターゲットや医薬シーズ、疾患マーカーを同定することが急務となっている。

このような疾患プロテオミクス研究に基づいた創薬（プロテオーム創薬）への期待と注目が国際的・学際的に集約されてきた背景として、ゲノムシーケンス研究から判明した約 3 万種の遺伝子に比して、膨大とも言える 10 万種以上にものぼるたんぱく質、特に解析困難であった巨大分子量のたんぱく質に対しても、高性能質量分析機器の開発および「ICAT 法」、「ショットガン法」などの網羅性の高い新規開発などにより大規模かつ包括的なハイスループット解析が可能となり、「疾患からのアプローチ」が昨今の技術革新により現実的になったことが挙げられる。事実、スイスやドイツ、米国などの欧米諸国は、この「疾患からのアプローチ（疾患プロテオミクス）」に国家プロジェクトとして、大量の予算を投入し、今まさに着手し始めている。

以上の重大な局面に鑑み、我が国としても、高血圧、糖尿病、がん、痴呆症、炎症性・アレルギー性免疫疾患などを対象として、新規治療薬・診断薬の開発や新規医療技術・治療法の確立などに必須となる疾患関連たんぱく質の網羅的探索と同定、これらのデータベース化を行い、プロテオーム創薬を達成できる基盤研究を産官学連携により推し進め、国際競争力に満ち溢れた画期的な医薬開発を支援し、日本における製薬企業などの振興・発展を図ることがきわめて最重要である。

上記観点から本研究は、我が国の主要疾患などに関して、患者と健常人との間の発現たんぱく質群（プロテオーム）の種類、質、量の相違を時空間的に比較解析することにより、疾患関連たんぱく質群の探索・同定と、得られた情報をもとに創薬基盤データベースを構築するものである。また、この疾患関連たんぱく質群の中から医薬シーズ・創薬ターゲッ

ト・疾患マーカーなどを同定すると共に、プロテオーム創薬の基盤技術の確立を図り、我が国独自の知的財産を創出するものである。本研究の成果は、我が国の創薬研究に係る基盤的な技術レベルを飛躍的に向上させ、遺伝子解析では欧米に出遅れたものの、日本の医薬品産業の国際競争力を強化し、我が国はもとより、世界の患者に質の高い医療を提供することに寄与するものと考えられる。また派生效果として、ナノ HPLC や高性能質量分析機器類を用いた大量かつ高効率のたんぱく質解析技術およびそれに対応する情報処理解析技術といった最先端分野の科学技術などに関して我が国の水準を向上させ研究者の育成などにも多大に寄与することが期待される。

## B. 研究方法

### B-1: 疾患関連たんぱく質解析技術の確立に関する基盤的研究

#### 1: たんぱく質発現解析のためのシステム構築

##### ①2D-LCを利用したたんぱく質の精細分離による解析

###### (1)試料調製

約  $10^7$  個の HL-60 細胞(前骨髄球系白血病細胞株)及び HL-60RG 細胞 (HL-60 の増殖速度が亢進した亜株)を細胞溶解用バッファー(7.5M urea 2.5M thiourea, 12.5% glycerol, 50mM Tris, 2.5% n-octylglucoside, 6.25M Tris-(carboxyethyl) phosphine hydrochloride, 1.25mM protease inhibitor)に懸濁溶解させ、20,000g にて 60 分間遠心分離した上清をサンプルとして用いた。細胞溶解液上清のたんぱく含量を測定し、5mg たんぱく質に相当する量に 1 次元分離に用いる Start Buffer を加え、2.5 ml とした。PD-10 カラム (amersham) をあらかじめ

25 ml の Start Buffer にて平衡化した後、上記細胞溶液をアプライした。溶離液を捨て、カラムを 3.5 ml の Start Buffer にて溶出し、3.5 ml 分の溶出液を分取した。

###### (2)2D-LC (Fig.1)

装置: ProteoSep LC (Gilson)

###### 1 次元分離:

カラム: PF 2DHPCF クロマトフォーカシング  
(Beckman Coulter)

流速: 0.2 ml/min

検出波長: UV280nm

カラム温度: 室温

溶離液: 1. Start Buffer pH8.5  
2. Elution Buffer pH4.0  
3. 1 M NaCl  
4. MilliQ 水

フラクション分取: 96 穴ディーブウエルプレートに 16-20 フラクションを時間および pH により分取した。pH 変化の内領域に関しては 8 分間隔で、pH 変化の見られた領域に関しては、0.4 pH ユニットごとにフラクションを分取した。

###### 2 次元分離:

カラム: PF 2D HPRF 逆相カラム  
(Beckman Coulter)

流速: 0.75 ml/min

検出波長: UV 214 nm

カラム温度: 50 度

溶離液: A 0.1% TFA in Water

B 0.08% TFA in Acetonitrile

グラジエントプログラム: 0-100% B for 30 min

フラクション分取: 1 分(0.75ml)ごとに合計 48

フラクションを分取した。

##### ②LC-MS/MSを用いた安定同位体ラベル化によるショットガンペプチド解析

###### (1)安定同位体ラベル化

Cleavable ICAT Reagents kit (Applied

Biosystems)を用いることにより、たんぱく質のシステイン残基を異なる質量をもつ同位体にてラベル化する。本キットは、1.システイン結合部位 (Iodoacetamide) 2.アフィニティタグ (ビオチン) 部位 3. 同位体ラベルリンカー ( $C_{10}H_{17}N_3O_3$ ) 4. 酸による切断部位 (acid cleavage site) よりなり、リンカーチェーンの9つの炭素を  $^{13}C$  に置換することにより、 $^{12}C$  を用いた場合と9の質量差を持ったタグにてラベルされる。そして、ビオチンタグを用いてアビジンアフィニティカラムにて精製を行うことでラベル化ペプチドのみを回収し、TFAにてタグを切断した後、LC-MS/MS等での解析に用いる。

## (2)液体クロマトグラフィー

VISION™ Workstation(Applied Biosystems)  
プロテオーム解析用ナノ LC システム (LC Packings)

Famos™ オートサンプラー

Ultimate™ マイクロポンプ/検出器

Switchos™ マイクロカラムスイッチング装置

Probot™ マイクロフラクションコレクタ

Splitless Nano HPLC System DiNa (KYA テクノロジーズ)

## (3)質量分析装置

ESI-Q/TOF 型 LC-MS/MS QSTAR-XL-PF  
(Applied Biosystems)

MALDI-TOF/TOF AB4700 (Applied Biosystems)

## II : たんぱく質発現情報及び遺伝子発現情報の比較のためのシステム構築

本研究では、蛍光標識2次元ディファレンシャル電気泳動装置 (2D-DIGE) (アマシャムバイオサイエンス社)、全自動核酸精製装置 (BIOROBOT M48) (QIAGEN 社)、DNA マイクロアレー解析装置

(GeneChip) (Affymetrix 社)などの装置を組み合わせ、疾患と関連する細胞内シグナル伝達経路などに関わる生体分子について、網羅的かつ効率的にたんぱく質や遺伝子の発現量の変化を解析できるプロファイリングシステムを構築した。

## III : 疾患関連グライコプロテーム解析技術の開発

### ①試薬

$\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) は Advanced ImmunoChemical 社より、セルロプラスミン (CP) は Calbiochem 社より、ヒト血清は Sigma Aldrich 社より購入した。ヒト黒色腫細胞性 t-PA は和光純薬より購入した。遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチンはキリンビール株式会社より供与された。GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞及び HepG2 細胞は国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部主任研究官日向昌司氏より供与された。トリプシンは、Promega 社製の修飾トリプシンを使用した。ギ酸は、和光純薬社製を用いた。PD-10 カラムは、Amersham Pharmacia 社製を使用した。

### ②血清のアルブミン除去

20 ml のヒト血清から Millipore 社のアルブミン除去キットを用いて含有アルブミン量を低減させ、凍結乾燥した。

### ③糖たんぱく質の還元カルボキシル化

糖たんぱく質サンプル (AFP および CP) 200 mg またはアルブミン低減ヒト血清 (HS-A1b) 20 ml 分 (血清換算) を 8 M グアニジン塩酸塩、5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6、540 ml に溶解した。2-メルカプトエタノール 4 ml を加え、40°C で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 11.3 mg を試料溶解溶液 90 ml に溶かし、試料溶液に加え、遮光下 40°C にて 2 時間放置した。PD-10 カラムを用いて脱試薬し、得られた試料溶液を凍結乾燥した。

#### ④還元カルボキシメチル化糖たんぱく質のトリプシン消化

還元カルボキシメチル化した糖たんぱく質 (RCM-AFP および RCM-CP) およびアルブミン低減ヒト血清 (RCM-HS-Alb) を 50 mM 重炭酸アンモニウム (200ml) に溶かした。試料溶液 100 ml をとり、1 mg/ml の修飾トリプシン溶液を 1 ml 加え、37°C で、糖たんぱく質サンプルは 12 時間、アルブミン低減ヒト血清は 24 時間消化した。消化後、測定まで -20°C に保存し酵素反応を停止させた。

#### ⑤CHO および CHOIII 細胞膜たんぱく質画分の抽出

CHO 及び *N*-結合型糖鎖に bisecting GlcNAc を付加する *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 III の遺伝子を導入した CHO 細胞 (CHOIII) を 0.1 units/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin, 及び 10% FCS を含む F-12 Nutrient Mixture HAM (Invitrogen Co. USA) 培地で培養した後 (37°C, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>)、両細胞から (5~6×10<sup>7</sup> 個)、界面活性剤 (TritonX114) を用いる熱層分離法を利用した膜画分抽出キット (Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit, PIERCE Biotechnology, USA) によって、それぞれの細胞の膜画分を分画した (CHO 細胞膜画分; 200 mg, CHOIII 細胞膜画分; 230 mg)。分画後、界面活性剤除去カラム (Detergent-OUT, Geno Technology, USA) を用いて界面活性剤を除去した後、アセトン沈殿 (-70°C, 3 時間) による反復洗浄によりたんぱく質の脱塩、精製を行った。

#### ⑥CHO 細胞からの糖鎖の切り出し

脱塩、乾燥させたサンプルに、8M グアニジン塩酸塩、5 mM EDTA を含む 0.5M Tris-HCl (pH 8.6) を 1.0 ml を加えて溶解した。さらに、2-メルカプトエタノール 7.2 ml を加えて室温で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 21 mg を試料溶解溶液 167 ml に溶かし、試料溶液に加え、遮光下、室温で 2 時間放置した。反応終了後、PD-10 カラ

ムを用いて脱塩し、得られた試料溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥したサンプルに、PNGase F (15 unit) を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.2), 500 µl を加え、37°C で 96 時間反応させた。反応液はエタノール沈殿によってたんぱく質を除去した後、上清を濃縮、凍結乾燥した。得られた糖鎖は 0.5 M 水酸化ホウ素ナトリウム水溶液 500 µl を加え、室温で 16 時間還元した。反応後、10% (v/v) 酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Supelco, Bellefonte, USA) を用いて脱塩した。

#### ⑦ラット脳膜画分の調製

ラット脳 (生後 3 週齢, 1.25 匹分, 湿重量約 1.8 g) に冷アセトン、40 ml を加え、ポリトロンを用いて 1000 rpm で、氷冷しながら、1 分間均質化した。遠心分離後 (3000rpm, 室温, 10 分)、上清を除去し、再度、冷アセトン、30 ml を加え、同じ操作を繰り返した。遠心後、クロロホルム/メタノール混液 (2/1, v/v)、40 ml を加え、ポリトロンを用いて 1000 rpm で、1 分間均質化後、室温で 1 時間放置した。遠心分離後 (3000rpm, 室温, 10 分)、上清を除去し、再度、クロロホルム/メタノール混液、40 ml を加え、10 秒間均質化後、室温で 30 分放置した。遠心分離後、沈殿をメタノールで 2 回洗浄した。洗浄した沈殿に 0.15 M 塩化ナトリウム、1 mM EDTA 及び 1 mM PMSF を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.4 (均質化用緩衝液)、30 ml を加え、ポリトロンを用いて 1000 rpm で 10 秒間均質化を行った。ラット脳、5 匹分をまとめて遠心分離し (10,000×g, 4°C, 20 分)、再度沈殿に均質化用緩衝液を加え (ラット脳、5 匹分に対し 40 ml)、ポリトロンを用いて 1000 rpm で 20 秒間均質化後、10% Triton X-114 を含む均質化用緩衝液 8 ml を加え、4°C で一晩攪拌し、膜画分の可溶化を行った。可溶化溶液を遠心分離後 (10,000×g, 4°C, 20 分)、上清を 37°C で 10 分間放置後、遠心分離し (3000 rpm, 30°C, 5 分)、Triton X-114 相と水相に分離した。得られた Triton X-114 相に均質化用緩衝液を等量加え洗浄し、再び 37°C で 10 分

間放置後、遠心分離した (3000 rpm, 30°C, 5 分)。得られた Triton X-114 相に冷アセトンを 4 倍量加え、-15°C で一晩放置後、遠心分離し (3,000 rpm, 4°C, 30 分)、膜画分を得た。

#### ⑧可溶性膜たんぱく質画分の調製

得られた膜画分を 1% Triton X-100 を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) に溶かし、ラット脳、5 匹分に対し、PIPLC, 2 unit を加え、37°C で 18 時間消化した。反応溶液の 1/4 倍容の 10% Triton X-114 を加え (最終 Triton X-114 濃度, 2%)、0°C に冷却後、よく攪拌した。反応溶液を 37°C に保温後、遠心分離し (3000 rpm, 30°C, 5 分)、Triton X-114/水相分離を行った。Triton X-114 相を除いた後、水相に 10% Triton X-114-トリス塩酸緩衝液 pH 7.4 を 1/4 倍容加えて洗浄した。水相に冷アセトンを 4 倍容加え、-15°C で一晩放置後、遠心分離し (3000 rpm, 4°C, 60 分)、可溶性膜たんぱく質画分を得た。可溶性膜たんぱく質画分は、2D-GE を用いて分離した。

#### ⑨CHO 細胞膜画分の 2D-GE

(1)1 次元目等電点電気泳動 (IEF: isoelectric focusing)

Table1 IEF condition

Step	Voltage (V)	Duration (h:min)	Volt-hour (kVh)
Rehydration		12:00	
1	500	1:00	0.5
2	1000	1:00	1.0
3	8000	2:00	16.0
Total		10:20	17.5

(50mA/strip)

IEF 用ゲルとして、Immobiline DryStrip ゲル (IPG strip, 13 cm, pH4-7 non-linear, Amersham biosciences, USA) を使用した。200mg のサンプルをゲル膨潤用バッファー

(250ml, 7M Urea, 2M Thiourea, Destreak Reagent, 0.5% IPG buffer pH 4-7, 2% CHAPS, BPB) に溶解させて膨潤添加法により添加した。泳動は IPGphorII (Amersham biosciences) を用いて下記の条件で行った (Table 1)。

#### (2)2 次元目電気泳動

1 次元目電気泳動終了後、たんぱく質チオール残基を carboxyamidemethyl 化するために IPG strip を 2 種類のバッファー (50 mM Tris-Cl (pH 8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 65 mM DTT), 及び (50 mM Tris-Cl (pH 8.8), 6 M Urea, 30% glycerol, 2% SDS, 135 mM iodoacetamide) で SDS 平衡化した。2 次元目電気泳動用ゲルは 7.5% アクリルアミドゲル (14×14 cm, 1.0 mm) を使用し、20 mA/gel で泳動した。泳動終了後、ゲルは Sypro Orange (Molecular Probes, USA) を用いてプロトコールに従い染色した。画像の取り込みは Typhoon 9400 (Amersham biosciences) を用いて、レーザー及び蛍光フィルターは 532/580 nm BP 30nm を使用した。

#### ⑩レクチンプロット

レクチンプロット用の 2D-GE ゲルは転写バッファー (25 mM Tris 20 mM Glycine, 20% methanol) 中で Sypro Orange を用いて 30 分間染色して、画像を取り込んだ後にウエスタンプロットに用いた。装置はセミドライプロット装置 (トランスプロット SD セル, Bio-Rad, USA) を使用し、0.1% SDS を含む転写バッファーを用いて PVDF 膜に転写した (25V, 4°C, 90 分間)。Sypro Orange がたんぱく質と共に転写されることを利用して転写効率、転写位置を確認後、0.5% casein-PBS (pH7.2) で 4°C, 16 時間ブロッキングした。ブロッキング終了後、PBS で PVDF 膜を 3 回洗浄した後、シアリダーゼ (0.1 unit/ml, Nacalai tesque) で 37°C, 16 時間処理した。反応終了後、再度 15 分間ブロッキング、次いで PBS で 3 回洗浄後、biotinylated PHA-E4



(Pytohaemagglutinin-E<sub>4</sub>, 2mg/ml)で4°C, 2時間インキュベートした。次いでPBSで3回洗浄した後、1000倍希釈したavidin-alkaline phosphatase (AP) complexes 溶液で4°C, 1時間インキュベートした。検出にはAP conjugate substrate kit (Bio-Rad)を用いた。

#### ⑪エリスロポエチン及びt-PAのSDS-PAGE

12.5% (80×80×1 mm)を用いて、25 mM トリス塩酸塩、0.19 M グリシン、0.1% SDSを含む泳動用緩衝液中、20 mA で泳動させた。分離されたt-PAは、Simply Blue SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて検出した。

#### ⑫可溶性膜たんぱく質の2D-GE

ラット脳の可溶性膜たんぱく質(湿重量約0.6 g相当分)を、0.5% IPG バッファー(pH 3-10)、8M 尿素、2% CHAPS 及び 0.7 mg DTT を含む IPG ストリップ膨潤溶液 250 ml に溶かした(サンプル溶液)。IPG ドライストリップ(pH3-10, 13 cm)に、サンプル溶液を添加し、ストリップを膨潤させると共に、可溶性膜たんぱく質を取り込ませた(20°C, 12時間)。膨潤後、等電点電気泳動(IEF)を行った(グラジエントモード、500V; 500Vhr, 1000V; 1000Vhr, 8000V; 16000Vhr)。IEF後、ストリップに、DTT 100 mg を含む平衡化バッファー(50 mM Tris-HCl, pH8.8, 6M 尿素, 30% グルリロール及び2% SDS)を10 ml 加え、室温で、30分間振とうした。さらに、平衡化バッファーを除いた後、ヨードアセトアミド 250 mg を含む平衡化バッファーを10 ml 加え、遮光して、室温で、20分間振とうした。ストリップをSDS-PAGE(10-20%, 160×160×1 mm)の上端に乗せ、0.5% アガロースで封入し、25 mM トリス塩酸塩、0.19 M グリシン、0.1% SDS を含む泳動用緩衝液中 25 mA で泳動させた。分離されたたんぱく質は、Simply Blue SafeStain を用いて検出した。

#### ⑬糖たんぱく質のゲル内アルキル化

SDS-PAGE 後、t-PA を含むゲル片を切り出し、30%アセトニトリルを含む25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いて脱色後、アセトニトリルを加え脱水した。アセトニトリルを除去後、減圧濃縮遠心エバポレーター(Speed Vac)を用いて、ゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片に10 mM DTT を含む25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 150 µl を加え、56°C で1時間反応させた後、室温に戻した。還元化溶液を除いた後、25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いてゲル片を洗浄した。洗浄用溶液を除いた後、55 mM モノヨード酢酸ナトリウムを含む25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 150 µl を加え、室温で遮光下45分間反応させた。反応後、アルキル化溶液を除いた後、洗浄用溶液を用いてゲル片を洗浄し、50%アセトニトリルを含む25 mM 重炭酸アンモニウム溶液(脱水用溶液)を用いてゲル片を脱水し、Speed Vac を用いてゲル片を乾燥させた。

#### ⑭糖たんぱく質のゲル内消化

ゲル内アルキル化を行った乾燥ゲル片にトリプシン溶液(10 µg/ml, 50 mM 重炭酸アンモニウム)を加え、氷上で30分間放置し、ゲル片にトリプシン溶液を染み込ませた。余分なトリプシン溶液を取り除き、37°C で一晩反応させた。50%アセトニトリル及び5%トリフルオロ酢酸水溶液(抽出溶液) 300 µl を加え、室温で30分間振とうし、ペプチドを含む抽出液を回収した。再度抽出操作を行った後、抽出液をすべて回収し、Speed Vac を用いて濃縮した。また、2D-GE ゲルより切り出したゲル片については、脱色後同様にゲル内消化を行った。

#### ⑮エリスロポエチン及びt-PAの糖鎖の調製(ゲル内消化)

ゲル内アルキル化を行った乾燥ゲル片にPNGase F(3 unit)を含む50 mM リン酸緩衝液(pH7.2)、120 µl を加え、37°C で16時間反応させた。反応後、ゲル片を含む反応液を超音波照射(30分間)し、遊離糖鎖を抽出・回収した。さらに、水

200  $\mu$ l を加え、超音波照射による抽出・回収を 3 回繰り返した。抽出液をすべて合わせ、Speed Vac を用いて乾固させた後、0.25 M 水素化ホウ素ナトリウム水溶液 200  $\mu$ l を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb を用いて脱塩した。

#### ⑩ HepG2 由来たんぱく質の Cy 標識

HepG2 及び *N*-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) をトランスフェクションした HepG2 細胞株 (HepG2III) を 0.1 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 及び 10% FCS を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO) 培地で培養した後 (37°C, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>)、両細胞 (5 × 10<sup>6</sup> 個/dish) から膜画分抽出キット (Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit, PIERCE Biotechnology) を用いて膜画分を抽出した。得られた膜画分は界面活性剤の除去 (Detergent-OUT, Geno Technology), アセトン沈殿 (-70°C, 3 時間, ×3 回) による洗浄をした後、可溶化溶液 (7M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS) に溶解させてサンプル溶液 (5 mg/ml, pH 8.5) とした。またたんぱく定量は 2-D Quant kit (Amersham biosciences) でプロトコールに従い行った。両膜画分は 2D-DIGE 用蛍光 cyanine dyes (CyDye DIGE Fluor minimal dyes; Cy2, 3, 5, Amersham biosciences) を用いてプロトコールにしたがって、ラベル化した。各標識試薬は無水ジメチルホルムアミド (DMF) で 400 pmol/ml に希釈し、50 mg のたんぱく質に対して 400 pmol を使用した。サンプル溶液 (50 ml) に標識試薬 1ml を加えて混和後、氷上暗所で 30 分間インキュベーションした。反応は 10 mM リジン 1 ml を加えて停止させて、CyDye 標識サンプルとした。またサンプルと CyDye の組み合わせを以下の Table 2 に示した。

Table 2 2D-DIGE experimental design for differential in-gel analysis

Gel Number	Cy2	Cy3	Cy5
1	HepG2	HepG2III	HepG2
2	HepG2III	HepG2	HepG2III

#### ⑪ 2D-DIGE

(1) 1 次元目等電点電気泳動 (IEF: isoelectric focusing)

3 種類の標識サンプル溶液 (各 50 ml/ゲル) を混和した後、等量の 2 × サンプルバッファー (7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 2% Pharmalyte (pH3-10), 130mM DTT) を加えて IEF 用サンプル溶液とした。IEF 用ゲルとして、Immobiline DryStrip ゲル (IPG strip, 24 cm, pH3-10 non-linear, Amersham biosciences) を使用し、サンプルを膨潤添加法により添加した後、下記の条件で IPGphorII (Amersham biosciences) を用いて遮光下泳動を行った (Table 3)。

Table 3 IEF condition

Step	Voltage (V)	Duration (h:min)	Volt-hour (kVh)
Rehydration		10:00	
1	500	1:00	0.5
2	1000	1:00	1.0
3	8000	8:20	62.5
	Total	10:20	64.0

(50mA/strip)

(2) 2 次元目電気泳動

1 次元目電気泳動終了後、たんぱく質チオール残基を carboxyamidemethyl 化するために IPG strip を 2 種類のバッファー (50 mM Tris-Cl (pH8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 65

mM DTT)、及び (50mM Tris-Cl (pH 8.8)、6M Urea, 30% glycerol, 2% SDS, 135 mM iodoacetamide) で SDS 平衡化した。2次元目電気泳動用ゲルは 12%アクリルアミドゲル (25.5×20 cm, 1.0 mm) を使用し、泳動装置は EttanDALTwelve gel format (Amersham biosciences) を用いた。また陽極側に×1, 陰極側に×2の泳動バッファー (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) を使用して 1W (max. 600 V, 400 mA), 20 時間泳動した。DIGE 画像の取り込みは Typhoon 9400 (Amersham biosciences) を用いて、レーザー及び蛍光フィルターは Cy2 画像 488/520 nm bandpass (BP) 40 nm, Cy3 は 532/580 nm BP 30 nm, 及び Cy5 は 633/670 nm BP 30 nm を使用した。画像解析は Cy2 画像を standard として DeCyder Differential Analysis Software (Version 5.0, Amersham biosciences) を用いて行った。

### (3)2D-DIGE 質量分析用 2次元電気泳動

質量分析用サンプルとして、各 100ml (500 mg) の未 Cy5 標識 HepG2 及び HepG2III サンプル溶液を使用した。両サンプル溶液を混和後、前述と同様にサンプル溶液の調製、1次元、及び 2次元目電気泳動を行った。ゲルは Sypro Ruby (Molecular Probes) で染色、ゲル画像の取り込みは Typhoon 9400 (457 nm/610 BP 30 nm) で行った。

### ⑩LC/MS/MS によるペプチド/糖ペプチドマッピング

糖たんぱく質のトリプシン消化産物を用いて以下の条件で LC/MS/MS を行った。試料は、0.1%ギ酸水溶液で適度に希釈した。インジェクトしたサンプル量はそれぞれ以下の通りである。

AFP 0.2 mg (たんぱく量換算)  
CP 0.2 mg (m/z 400-2000)

1.0 mg (m/z 1000-2000)  
(たんぱく量換算)

HS-Alb 0.01 ml (試料血清換算)

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource)  
カラム : MAGIC C18 (Michrom BioResource 社製、0.2×50 mm、3μ)

溶離液 A : 0.1%ギ酸を含む 2%アセトニトリル水溶液

溶離液 B : 0.1%ギ酸を含む 90%アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム :

B 液 : 5% (0~10分)  
5~65% (10~40分)

流速 : 2 ml/min

MS

装置 : ハイブリッド型 LC/MS/MS システム  
Qstar Pulsar i (Applied Biosystem 社)

イオン化 : ESI

測定モード : ポジティブイオンモード  
スプレー電圧 : 2,500 V

スキャン範囲 (m/z) :

検出 : Q/TOF-MS  
ペプチドマップ : 400-2,000  
糖ペプチドマップ : 700-200  
または 1000-2,000

MS/MS : 100-2,000

データ依存的に MS/MS 測定を行った。イオンの価数および大きさにより 50-80 eV のコリジョンエネルギーを与えた。

### ⑪LC/MS による糖鎖プロファイリング

HPLC :

装置 : MAGIC 2002 システム (Michrom BioResource 社製)

カラム : Hypercarb (Michrom BioResource 社製、

0.2×150 mm)

溶離液 A: 2%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

溶離液 B: 80%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

グラジエントプログラム:

B 液 5~20% (0~15 分)

20~70% (15~35 分)

流速: ポンプ 100 ml/分、

スプリッター 2500/1000

ESI-MS:

装置: エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極 MS/MS システム TSQ 7000 (Finnigan 社製)

測定モード: ネガティブイオンモード

キャピラリー温度: 175 °C

マルチプライヤー: 1,000 V

ESI 電圧: 1,500 V

スキャン範囲: 700-2,000

スキャン回数: 3 秒

ESI-MS/MS

測定モード: ポジティブイオンモード

キャピラリー温度: 175 °C

マルチプライヤー: 1,200 V

ESI 電圧: 2,000 V

スキャン範囲: 100-2,100

スキャン回数: 4 秒

Collision Gas: Ar, 2.0 mTorr

Collision energy: -25 eV

## ② LC/MS/MS によるたんぱく質の同定

HPLC:

装置: Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)

カラム: MAGIC C18 (Michrom BioResource 社製, 0.2×50 mm, 3 μ)

溶離液 A: 0.1%ギ酸を含む 2%アセトニトリル

水溶液

溶離液 B: 0.1%ギ酸を含む 90%アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム:

B 液: 5-65%B (0-20 分)

70%B (21-25 分)

流速: 3 ml/分

ESI-Q/TOFMS:

装置: API QSTAR Pulsar i (Applied Biosystems 社製)

検索ソフト: Mascot (Matrix Science)

データベース: Swiss Prot

## (倫理面への配慮)

上記 B-1 の研究における動物実験については、各施設の動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施するものであり、倫理審査の承諾を得て行った。動物組織及びヒト血清に関しては市販品を使用しているため特に配慮を必要としない。

## IV: 疾患関連たんぱく質の機能解析に向けた遺伝子発現制御系の開発

### ①ベクタープラスミドの作製

アデノウイルスゲノムの E4 領域と 3' ITR の間の領域に XbaI 部位を、E3 欠損領域に Csp45I 部位を有したベクタープラスミド pAdHM48 を作製した。また、pAdHM48 のファイバー (ファイバーシャフトおよびファイバーノブ) コード領域を 35 型アデノウイルス由来のファイバーに置き換えたベクタープラスミド pAdHM49 を作製した。これらのベクタープラスミドは E1/E3 領域を除く全てのアデノウイルスゲノムを有しており、E1 欠損領域にはユニークな制限酵素部位である I-CeuI、Swal、PI-SceI 部位を有している。従って、E1/E3 両欠損領域および E4 領域と 3' ITR の間の領域の 3 領域に、in vitro ライゲ

ーションに基づいたプラスミド構築を利用して簡便に外来遺伝子を挿入することが可能になった。

## ②発現制御型アデノウイルスベクターの作製

Tet-off システムあるいは tet-on システムのための転写活性化因子 tTA (tetracycline-responsive transcriptional activator) あるいは rtTA (reverse tetracycline-responsive transcriptional activator) の発現単位を E3 欠損領域に挿入し、テトラサイクリン応答性のプロモーター (TRE/CMV) とルシフェラーゼあるいはヒト分泌性アルカリフォスファターゼ (SEAP) 遺伝子からなるカセットを E1 欠損領域に挿入したアデノウイルスベクターを作製した。また、rtTA の発現単位にイントロン A の配列を付与したアデノウイルスベクターを作製した。E3 欠損領域に rtTA 発現単位を、E4 領域と 3' ITR の間の領域に tTS (tetracycline-controlled transcriptional silencer) 発現単位を、E1 欠損領域にテトラサイクリン誘導性のプロモーター下に SEAP 発現単位を挿入したアデノウイルスベクターを作製した。rtTA 遺伝子に数 bp の mutation を施すことで作製された M2 あるいは S2 mutant rtTA (kind gifts from Dr. W. Hillen, University of Erlangen) を rtTA 遺伝子の代わりに挿入したアデノウイルスベクターなどを作製した。作製した個々のベクターについては Table 6 に示した。E3 欠損領域に tTA 発現単位を有しファイバーノブの HI ループをコードした領域に RGD (CDCRGDCFC) 配列を付与した SEAP 発現アデノウイルスベクター、AdRGD-Off-S6、ファイバー領域を 35 型アデノウイルス由来のものに置換したアデノウイルスベクター、AdF35-Off-S6 を作製した。

各アデノウイルスベクターは 293 細胞に 3 次感染までさせることにより大量調製した。アデノウイルスベクターを塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10 % glycerol からなる溶液で透析した。アデノウイルスベクターの生物学的 (PFU: Plaque Forming Unit) タイターは End-point dilution 法で測定した。

## ③培養細胞への遺伝子導入

SK HEP-1、HeLa、LNZ308、NIH3T3 細胞などを 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well 播種し、翌日各アデノウイルスベクターを種々の濃度で 1.5 時間作用させた。種々の濃度のドキシサイクリン存在下で 48 時間培養後、培養液中に分泌された SEAP 活性を測定した。

## ④マウスへの遺伝子導入

各アデノウイルスベクターを  $1 \times 10^9$  PFU、マウス (Balb/c, nude) の尾静脈内に投与し、経日的に血中 SEAP レベルを測定した。ドキシサイクリンは drinking water としてマウスに与えた。

## B-2: 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立 (高中性脂肪ウサギのプロテオーム解析)

### I: TGL および TGH の特性解析

TGL、TGH、日本白色ウサギ (JW) の体重、血清総コレステロール値、中性脂肪値、空腹時血糖値を表 1 に示す。日本白色ウサギに比し、TGL および TGH ともに低体重であった。TGL、TGH は、ともに WHHL ホモ接合体をバックグラウンドにしているため、コレステロール値は高値であった。TGL および TGH の皮膚には黄色腫の多発を認めたが、JW では認めなかった。

### II: 二次元電気泳動

TGL および TGH を麻酔し、肝臓組織を切り出し、細切後、液体窒素中で凍結、-70°C に保存した。サンプル調製時には、ポリトロンを用いてホモゲナイズした。二次元電気泳動は、Immobiline® (Amersham) pH 3-10 を用い、12 時間の膨潤の後、

50 V 1 時間、100 V 1 時間、800 V 8 時間、等電点電気泳動を行った。ストリップを DTT 10 mg/ml 含有平衡化バッファー中に浸して平衡化し、ヨードアセトアミド 25 mg/ml 含有平衡化バッファーに浸して平衡化した。平衡化したストリップを DALT 12.5 ゲルにセットし、6W で 18 時間、二次元目の電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを 10% 酢酸、40% エタノール中で固定、クマシーブリリアントブルー染色を行い、スキャナーを用いて画像ファイルとした。

### III：質量分析計による分析

ゲルから目的のスポットを切り出し、脱色し、アセトニトリルで脱水後、プロテアーゼ溶液を加え、37°C で 18 時間反応させた。Zip Tip を用いて脱塩後、質量分析計用サンプルプレートにスポットした。マトリックス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型質量分析計 (MALDI- TOF MS) による分析および MS-MS による分析を行った。

**B-3：疾患関連たんぱく質解析研究の一環としての内因性グレリンの翻訳後修飾による多様な分子型の解析に関する研究**

#### I：グレリンの測定および活性測定

グレリンに特異的な 2 種類のラジオイムノアッセイ (RIA) 法 (C-RIA および N-RIA) により測定した。C-RIA は、グレリンの C 末端部配列 (Gin13-Arg28) に対して作製した抗体を用い、活性型グレリン (acyl ghrelin)、および不活性型グレリン (des-acyl ghrelin) を共に認識する。一方、N-RIA はグレリンの N 末端部配列 (Gly1-Lys11; Ser3 はオクタノイル化修飾) に対して作製した抗体を用い、活性型グレリンのみを認識する。ラットのグレリン受容体 (GHS-R) を安定発現した細胞 (CHO-GHSR62) を用いた Ca<sup>2+</sup> アッセイ、および麻酔下ラットにおける GH 分泌促進活性を測定した。

### II：検体および抽出・精製

胃組織は、胃がん手術時の摘出組織の一部を本人の同意のもとに、-80°C で保存後使用した。血漿検体は、終夜絶食後の健常ボランティアより AM 7:00-8:00 の間に EDTA・アプロチニン入り採血管に採取した血液を直ちに遠心分離後、-80°C で保存した。胃組織の粘膜部を既報のとおり、100°C で 5 分間熱処理後、1 N 酢酸抽出、アセトン沈殿、Sep-Pak C18 カートリッジ、ゲル濾過、イオン交換 HPLC、逆相 HPLC により分離、精製した。血漿は Sep-Pak により既報の方法で抽出した。

### III：構造解析

精製したペプチドの構造は、プロテインシークエンサーおよびマスマスペクトロメーター (ESI-MS) を用いて解析した。

#### (倫理面への配慮)

上記 B-3 の研究においてヒトを対象とした研究を行うに際しては、ヘルシンキ宣言を遵守し各研究施設で定められた臨床研究の規定に従って実施した。

**B-4：高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立(たんぱく質消化物としてのペプチドの分離・解析技術の確立)**

#### I：分離対象ペプチド

たんぱく質の消化により生成するペプチドは、対象となるたんぱく質、使用する消化酵素の種類にもよるが、短い断片を得たい場合はトリプシン、比較的長い断片を得たい場合はリジルエンドペプチダーゼが一般に用いられる。これらは消化能力が高い上に、切断部位の特異性も高く、また自己消化しにくい性質を保持していたり付与されたりしており、利

便性が高い。前者は大凡分子量 2,000 以下、後者においては分子量 3,000 以下のペプチドが消化、生成するペプチドの大部分であるため、今回の検討では分子量 3,000 以下の生体内ペプチド、特に脳内ペプチドをモデルとして研究を行った。

## II：ペプチド分離システム

これまでに行ってきた生体内ペプチドの網羅的解析（ペプチドーム解析とペプチドーム・データベース構築）において開発、使用してきた方法論を改良しつつ検討を行った。ペプチドは、通常陽イオン交換樹脂と逆相系樹脂に強く吸着し、かつ高度の分離が得られるため、この2つを組み合わせた分離システムが使用されている。この内、イオン交換樹脂は保持容量が大きく溶出には塩類を使用するため1次元目の分離に、逆相系樹脂は保持容量が小さいが溶出には揮発性の有機溶媒と塩類を使用でき、より高度な分離が得られるため2次元目の分離に使用されることが多い。そこで、1次元目は陽イオン交換 HPLC を行い、樹脂としては S P (sulfopropyl) 基を持つシリカ系担体、塩類としてはペプチドの吸着力を増し除去の容易な pH3.8 のギ酸アンモニウムを使用した。2次元目には吸着力の強い C-18 基を有するシリカ系担体、溶媒にはアセトニトリル・トリフルオロ酢酸(TFA)を使用し、続く検出システムでのイオン化効率を上昇させるため、TFA 濃度を 0.01% とした。また、これらの1次元目と2次元目の HPLC を連動して行うため、1次元目を段階的塩濃度溶出、2次元目を直線濃度勾配溶出とするシステム(ステップ2次元 HPLC、LC Packings 社製)について詳細に検討を行い、更に当研究室で仕様を決定し試作した1次元目、2次元目共に直線濃度勾配溶出が可能なシステム(リニア2次元 HPLC、島津社製)について部分的な検討を行った。

## III：構造解析

ペプチドの検出と解析：2次元 HPLC より溶出した液体試料は2つの流路に分離し、一方はエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析計(ESI-TOF、JEOL 社製)でペプチドの検出と大まかな量的評価を行った。もう一方はマトリックス支援レーザー脱離イオン化二重連結型飛行時間質量分析計(MALDI-TOF-TOF、ABI 社製)にて構造解析を行うため、MALDI 質量分析計用のターゲットプレート上にスポットし、マトリックス塗布後、構造解析を行った。

### (倫理面への配慮)

上記 B-4 の研究における全ての動物実験は、当センターの実験動物委員会(実験動物福祉小委員会)が定めた動物実験指針に従い、動物愛護に配慮して実施した。

## B-5：痴呆等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

### I：神経変性疾患(パーキンソン病等)の研究試料の確保

新規試料については、パーキンソン病患者及び若年性痴呆症の患者のリンパ芽球、血漿、尿、髄液等を研究に利用するための説明試料、説明文書、同意文書を作成し、来年度早々に行われる国立精神・神経センター倫理委員会に提出する予定である。また、東京大学医学部神経内科に保存されていたパーキンソン病患者の株化リンパ球 200 症例については、主要な研究者が当センターに異動したことにより、既提供試料として研究利用ができるように、これも倫理委員会に申請する予定である。

### II：モデル動物の開発に関する研究

脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 について家族性パーキンソン病で報告されている I93M 変異体を発現

するトランスジェニックマウスを通常の方法で作成し、その表現型を生化学的、病理学的に解析した。遺伝子の網羅的解析は Affimetrix 社の Gene Chip システムを利用した。

#### (倫理面への配慮)

上記 B-5 の研究において、動物を使用する研究計画はすべて国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会や分担研究者の所属する施設の倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針並びに米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。本年度はヒト標本を用いた研究は行わなかった。

#### B-6： 糖尿病等代謝性疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立に関する研究

糖尿病関連たんぱく質のデータベース構築のためのサンプルとして、糖尿病患者及び健常者の血清及び尿を血清：200-300 サンプル／年程度、尿：100-150 サンプル／年程度を目標として採取する。臨床情報を添えてプロテオーム・ファクトリー研究施設に発送し、同施設の LC-MS/MS を用いてたんぱく質の同定、定量を行う。糖尿病の病態とたんぱく質のプロファイルとの関係性をバイオインフォマティクスの技術を用いて解析し、データベース化する。また独自のプロジェクトとしては、糖尿病に固有な細小血管症或は糖尿病に瀕発する動脈硬化性疾患を合併した患者の臨床サンプル（血清、赤血球膜）について、たんぱく質のプロファイルに加えて翻訳後修飾（糖鎖添加、リン酸化）に着目して、ion trap MS/MS, Protein Chip にて解析する。

#### B-7： 小児の免疫関連疾患に関わる微量たんぱく質解析技術の確立

原疾患を有する患者から発症時（急性期）、寛解

期および正常人の血清および尿中の蛋白質の種類、質、量の相違について質量分析装置およびバイオインフォマティクス技術を用いて解析する。

#### (倫理面への配慮)

上記 B-7 の研究は、すべて「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省 厚生労働省 経済産業省)」に準拠し、研究計画書、各書式を作成し、関係研究施設の倫理委員会の承認を得た後、おこなう。その際、連結可能匿名化による個人情報保護を原則とし、研究協力者によるインフォームドコンセントの自署、遺伝カウンセリング部門の対応の周知など研究指針に従いすすめる。また、ヒトを対象とした臨床研究の実施に当たっては、「臨床試験に関する倫理指針（平成 15 年厚生労働省告示第 255 号）」を遵守して行う。

#### B-8： 加齢関連疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

現在通院中の物忘れ外来（毎日）と骨粗しょう症外来等（3 回/週）から、インフォームドコンセントの取れた患者の髄液、血液、尿等を採取、保存し、匿名化した後に研究に应用するシステムを構築した。すなわち、臨床検査部長の下、機器の整備を行い、痴呆疾患及び骨粗鬆症の責任者の協力によるサンプル提供体制を確立した。

#### (倫理面への配慮)

上記 B-8 の研究については、倫理委員会に諮り、承認を得た後に研究を進める。倫理小委員会は毎月 1 回開催されている。

#### B-9： がん関連たんぱく質解析に関する研究

研究に供与できるのは、手術後の残余検体である。残余検体とは、病理医が診断に使用した残りを意味する。もし、それら組織を研究に供するとなれば



ば、残余と病理医が判断した材料を急速に小分けして凍結する必要がある。今回は、小分けの場所、設備、組織を入れるチューブの選定などについて検討した。

#### (倫理面への配慮)

上記 B-9 の研究について、残余検体を研究に供する、大阪大学医学系研究科に共通のインフォームドコンセントを作製し医学倫理委員会で検討して、承認された。今後この書面を用いて同意の得られた患者さんの組織を保存予定である。

#### **B-10: 疾患関連蛋白質解析のための質量分析法の確立**

既設のタンデム質量分析計 (ESI-MS/MS, MALDI-MS/MS)を用いて、尿、血漿から抽出、単離した蛋白質・ペプチドの測定を行なった。質量分析における検出効率を改善する目的で、種々の樹脂担体による試料の前処理法について検討し、MALDI法では、サンプルプレートに試料を塗布する直前に逆相担体による脱塩処理を行う方法を、ESI法では、試料をインジェクトするための試料ループ内に逆相担体を充填することで脱塩と濃縮を行う方法を用いた。ナノ LC を用いてピコモル以下の尿、血漿から抽出、単離したペプチド、及び、蛋白質の酵素消化物の分離、分画を行った。単離されたサブピコモルレベルのペプチドに対して、MALDI-MS/MS や ESI-MS/MS を行い、同定および配列決定を行った。スペクトルの解析には、本研究で改良した一次構造解析支援ソフトウェア“SEQMS”を、データベース検索による蛋白質同定には、市販の検索エンジンの”MASCOT”を用いた。気相化学反応装置を用いて、試料プレート上に塗布した複数のペプチドあるいは蛋白質消化物(サブピコモル)に対して、エドマン分解を1~3サイクル行った。反応産物をMALDI-MSにより測定し、観測されたシグナル間の質量をもとにN末端アミノ酸(配列)を決定し、デ

ータベース検索に供した。

#### **B-11: がんに対するテーラーメイド医療を目指した疾患関連たんぱく質解析研究**

健常者およびがん患者の末梢血からリンパ球や樹状細胞を単離し、BCG やインターフェロンなどで刺激後、変動する遺伝子群を Genechip 法で解析した。また当教室で作製した各種 Toll like receptor(TLR)の抗体を用い、免疫沈降法で TLR 複合体を精製した。マウスの肺組織およびヒト肺がん細胞株からたんぱく質を抽出し、8MUrea で変性後、DTT、ヨードアセトアミドで処理し、トリプシンで消化した。生じたペプチド断片を強力カチオンマイクロカラム(SCX)と逆相 C18 マイクロカラムを組み合わせた二次元 HPLC で分離し、nanoESIMS/MS に導入した。Dynamic exclusion scan を用い、測定データセットは Mascot および TurboSequest で解析した。

#### **B-12: 生体由来たんぱく質の前処理法の確立及び生体中微量たんぱく質の各種分離技術の確立**

#### I: nanoHPLC/ABI4700 および Q-Star-XL による標準蛋白質断片の同定

BSA トリプシン消化断片を 0.1%ギ酸/アセトニトリル溶媒系(5 - 60% AcCN, 200nl/min)で nanoHPLC(C18 LC Packing, 75um, 150mm, pore 100 Å)にて分画し、溶出したピークをプロボットシステムで ABI4700 用金属プレートに分注した。一方、同様に nanoHPLC より溶出されたピークを直接、ナノスプレタイプの Q-STAR XL/MS/MS system で解析した。同定は後述するマスコット検索エンジンを基本とした統合型データ解析ソフトで行った。ともに、10fmole 以下の標準ペプチドの同定が可能であった。

#### II: 血清前処理法

生体試料（血清）の前処理法は以下の方法で行った。まず、マウス血清を PBS に溶解し、アジレント社のイムノカラム (Mult Aff Rem Column, 4.6 x 50mm) にて分画し、素通り画分を分取後、アセトン処理を行い、蛋白質画分を得た。これにより、主要なアルブミン、イムノグロブリン (IgG, IgA)、トランスフェリン、ハプトグロビン、 $\alpha$ -1-アンチキモトリプシン (合計 5 種) が除かれ、蛋白量はもとの約 1/10 になることを確認した。なお、この画分を血清低濃度蛋白質画分とする。

### III: Cleavable ICAT 法

前述の血清低濃度蛋白質画分 (final 1mg/ml) を SDS/Urea で可溶化し、TCEP で還元後、1.75mM の Cleavable ICAT 試薬 (ABI 社製、 $^{13}\text{C}$  あるいは  $^{12}\text{C}$  標識) を 37℃、2 時間反応させた。未反応の試薬を 3.5mM の TCEP でクエンチングし、Cleavable ICAT 試薬反応蛋白質を 50mM Tris (pH8), 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1%G に溶解し、トリプシン (TPCK 処理) で 37℃、16 時間消化した。得られた消化物を陰イオン交換カラム (Poly LC Sulfoethyl A, 10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH3, 25%AcCN, 0 - 500mM KCl) で 15 画分に分画した。各画分をアピジンカラムにかけ、素通り部分を洗浄後、吸着した ICAT 試薬反応ペプチドを 30% AcCN/0.4% TFA で溶出した (Vision Workstation System)。溶出画分を乾燥後、100%TFA で 37℃、2 時間反応させ、ビオチン部分を切断させた ICAT 試薬反応ペプチドを得た。本ペプチドを上述の nanoHPLC/ABI4700MALDI/TOF/TOF system で解析した。同定は前述の統合型データ解析ソフトで行った。

### IV: 統合型 IT システムの機能・使用法

#### ①匿名化・臨床情報収集システム

本システムでは、プロテオームファクトリー (PF) においてヒト検体を受け入れる際、個人識別情報、

検体情報、臨床情報等を取り込み、再度匿名化を行って個人情報の識別を不可能とした上で、解析に必要な情報を解析部門に提供する。

以下、具体的な使用法の一例について述べる。

- ・ 検体提供機関において、検体に匿名化検体番号ラベルを貼った後 PF に送付する。
- ・ PF 個人情報管理室において、検体を再度匿名化し、検体のラベルを貼り替える。検体は保管場所へ移動する。
- ・ 検体提供機関において、当該検体に対応する臨床情報を Text または Excel ファイルで出力し、PF に送付する。
- ・ PF 個人情報管理室において、臨床情報を臨床情報収集システムで収集・匿名化し、匿名化済み臨床情報としてデータベース化する。

#### ②試料管理・機器管理システム (LIMS)

本システムは、各試料に対して、いつ、誰が、どのような作業を行ったかを管理する他、機器についての情報、使用状況、機器のメンテナンスといった運用を支援する。本システムを用いて、試料や機器についての具体的な管理項目を以下列挙する。

- ・ 試料や試薬の保管場所等の物理位置管理
- ・ 試料や試薬に関する付帯情報の管理 (処理時期、実験条件等)
- ・ 試料や試薬の状態管理 (残量等)
- ・ 試料や試薬の変更履歴管理
- ・ 実験機器管理 (状況把握等)
- ・ 実験出力データ (LC、MS 等) 管理

#### ③データマイニングシステム

本システムでは、HITACHI 製の PC クラスタ (50 ノード) をプラットフォームとして、膨大な質量スペクトルデータの収集からたんぱく質同定結果のデータベース化に至る以下の自動解析機能を実装している。

- 1) 自動データ収集機能: データベース構築用の

質量分析計：ABI4700 及び Q-STAR について、その測定終了後自動的に測定データをデータベースシステムに格納。

- 2) 自動 1 次データ格納機能：格納された測定生データを呼び出し、たんばく質同定エンジン (Mascot) へ投入するための 1 次データ (ピークリストファイル) を自動生成。また、ICAT サンプルに由来するデータの場合は、MS ピークリストより親イオンのクラスタ面積 (ピーク強度) 情報及びラベル情報 (Light, Heavy) を自動収集。
- 3) 自動たんばく質同定機能：生成・格納されたピークリストファイルを自動的に Mascot システムへ送り、たんばく質同定処理を自動実行して結果を保存。
- 4) 自動たんばく質同定結果格納機能：Mascot 処理結果を統合型データベースへ自動アップロードし、同定結果やたんばく質変動結果を閲覧。
- 5) なお、たんばく質同定には Matrix Science 社製の Mascot を主要同定エンジンとして利用するが、同定できなかったイオンピークや、同定スコアが低いイオンピークについては、補助同定システムとして、PST 法を用いた de novo シークエンシング機能を実装する。

#### ④データベースシステム

データベースシステムは、システム全体の監視、管理、制御、データ保全等に関する一切の機能を担う。プラットフォームとして、Solaris 9 を搭載したサン・マイクロシステムズ社製の Sun Fire 6800 を設置する。また、本システムのリレーショナルデータベースは Oracle 9i で構築する。データベースには、以下の項目が自動的にあるいはユーザにより格納される。

- 1) LIMS 関連情報 (サンプル情報、臨床情報、機器情報、測定データ等)
- 2) 同定システム投入前の初期データ

- 3) たんばく質同定結果、発現変動結果
- 4) たんばく質同定最終結果
- 5) アノテーション情報 (ターゲットマイニング情報、公共 DB 情報等)
- 6) 計算ジョブ管理、ユーザ管理、機器クオリティ管理

#### ⑤バックアップシステム

本システムは、バックアップ対象のサーバ (LIMS サーバ、ファイルサーバ、データマイニング用アプリケーションサーバ、データマイニングシステムの一部のノード) 上のファイルやデータベースの領域を、指定された設定情報に従い自動的にバックアップする機能を有する。また、機器制御用パソコン等の指定された領域についても、LIMS サーバを介した自動バックアップを実行する。なお、匿名化・臨床情報サーバについては、オフラインでの運用を行うため、バックアップは DVD-RAM 等のメディアを用いて行うことにする。

#### ⑥高速ネットワークシステム

統合型 IT システムを構成する各サーバ間的高速ネットワーク接続を実現するための高速スイッチを設置している。これにより、主要なサーバ間は 1Gbps の速度で接続されている。

## C 研究結果

以下の D. 考察に結果及び考察として記載。

### D. 考 察

D-1: 疾患関連たんばく質解析技術の確立に関する基盤的研究

#### 1: たんばく質発現解析のためのシステム構築

現在、最も一般的に用いられている方法が 2D-GE による解析法である。既製 pH 勾配ストリップゲルなどの利用により、再現性や解像度が改善し、細かい pH レンジの組み合わせなどにより数千のスポットを検出できるようになってきている。また、異なる蛍光色素ラベルによる同一ゲルでの比較法の登場により定量性も改良されて来ているが、ゲルを用いることによる限界により、解析できるたんぱく質はある程度制限される。また、一度にアプライできるたんぱく量が制限されるため、どうしても発現量の少ないたんぱく質をスポットとして検出できない。しかし、通常重要な変化は発現量の少ないたんぱくにある場合が多いとされる。さらに、塩基性たんぱくや脂溶性の高いたんぱくに関しては、一次元目の pH 勾配ゲルへの溶解性により解析は難しい。さらに、ゲルからのたんぱく質および消化したペプチドの回収効率の低さにより、質量分析計での同定において、銀染色レベルでシグナルの弱いスポットは解析が難しいという事実がある。この様な制限はあるものの、現状においては比較的簡便に利用できる手法として広く用いられており、実際に重要なたんぱく質がこうした解析により検出された報告も多い。そこで、分離能、感度および定量性の向上をめざして、分離手法としてはゲル電気泳動よりは優れていると考えられる液体クロマトグラフィーによる分離手法を応用し、2D-GE に代わる分離手法の確立を試みた。その際のアプローチとして、主に二つの方向性を模索している。一つは、たんぱく質としての分離を 2D-LC を用いて行う試みである、他方は、消化したペプチドに対して安定同位体ラベルを施し、LC/MS/MS を使って、一定質量差のピークの比較により網羅的にラベル化ペプチドの検索を行い発現差の見られたたんぱくを MS/MS 解析により同定する手法である。なお、この際 LC/MS/MS を用いる代わりに、LC からの溶出ペプチドを直接 MALDI ターゲット上に Matrix 試薬と混合してスポットティングできる装置を用いて、MALDI-TOF/TOFMS 装置による、よりハイスループットな解析も検討する予定である。

#### ①2D-LC を利用した精細分離による解析

一次元目の等電点による分離においては、pH8.5 の Starting Buffer にてコンディショニングの後、pH 4 の Elution Buffer に交換して溶出することにより、Fig.2 に示すように、広い濃度範囲においてほぼ直線的な pH グラジエントが得られた。溶離液の pH を測定しながら、pH 変化が始まった後は 0.4 pH ユニットごとにフラクションを分取した。これにより、等電点 PI に基づく再現性のあるフラクション分取が可能となった。なお、pH 変化は異なるランの間でも、かなり同一の時間経過を示して変化した。pH 変化が始まる以前のフラクションを 8 分間隔で 3 フラクション、pH 変化中のフラクションを 11 フラクション、および 1 M NaCl 溶出フラクションを 2 フラクションに分け、合計 16 フラクションに分離した。

2次元目の逆相カラムによる分離においては、1次元目で得られた各フラクションをそれぞれ、48 フラクションに分離した。フラクションコレクターには、96 穴ディープウェルプレート 8 枚を装着でき、オーバーナイトで流すことにより、最初の細胞溶解液中の相たんぱく質を合計 768 のフラクションに分離することができた。単純に計算すれば、1 フラクションあたり 13 個のたんぱく質を同定できれば、全体で 1 万個以上のたんぱくを同定できることになり、現状で最もパフォーマンスの高い解析手法になり得る。実在するたんぱく量は各フラクションそれ以上の数はあるはずであるので、さらに LC-MS/MS による分析および SDS-PAGE を使った分離を組み合わせることにより、この目標を達成したい。

また、現在では検出器として UV を用いているが、たんぱくの UV 吸収効率が低いため、感度的には比較的存在量の多いピークしか検出できない。そのため、この系にて UV 吸収を用いて比較可能なピーク数は、おおざっぱに見積もって各フラクションあたり 10-20 ピーク × 16 ピークで、せいぜい数百ピークであり、2次元電気泳動と同等かそれ以下のパ