

パフォーマンスしか持たない。しかし、存在するたんぱく量は多いことや、ゲルからの回収の際のロスがないことから、さらに他の方法と組み合わせることによりそのパフォーマンスを上げられる可能性がある。一つは、蛍光誘導体化による検出である。この際、現在ディファレンシャル2次元電気泳動(2D DIGE)のシステムに使われているように、2色の異なる蛍光ラベル化したサンプルを同時に流すことによりその発現差を同一クロマトグラム上にて比較できる系を作るため、多波長蛍光検出器(Waters 2475)の利用も検討している(Fig.3)。また、各フラクションをさらに SDS-PAGE ゲルに流して分子量に基づいた分離をし、発現差の見られたバンドを切り出して、ゲル内消化の後、MALDI-TOF/TOF 型質量分析装置でたんぱくを同定するというアプローチも有効であると考えられ、基礎的検討を行っている(Fig.4)。

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

ICATラベル化したペプチドをLC-MS/MSおよびMALDI-TOF/TOFMSを組み合わせ、より網羅的に検出するためのシステムを構築している(Fig.5)。細胞や組織破砕液など複雑な生体成分中に存在する大量のたんぱく質の網羅的解析をするためにはサンプルの前処理が重要になると考えられる。Fig.5に示したように、ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction Kitなどの利用により細胞を分画することにより複雑性を落とすと同時に、疎水性などの性状の近いたんぱくを扱うことにより、その後の操作効率が上がると考えられる。そして、ICATラベル、トリプシン消化後に、Vision Workstationを用いてペプチドを陽イオン交換クロマトグラフィーにより20-30程度のフラクションに分離を行う。その後、同じ装置を用いてアビジンアフィニティークロマトグラフィーにてICATラベル化ペプチドの分離を行った後、各フラクションについてTFA処理を行い、アフィニティタグを切断する。この後、

LC-MS/MSによる解析としては、Splitless Nano HPLC System DiNaにてC18逆相カラムによるペプチドの分離を行った後に、オンラインでQSTAR-XL LC-MS/MSへ導入し質量分析を行い、質量差9のペプチドのピークを比較定量する。また、一部は、LC Packings社プロテオーム解析用ナノLCシステムを用いて、同じくC18逆相カラムによるペプチドの分離を行った後に、Probotマイクロフラクションコレクタを用いてMALDIターゲットプレート上へマトリックス試薬とともにスポットティングする(Fig.6)。これを、AB4700 MALDI-TOF/TOF型質量分析装置で解析することにより、同様に対応する同位体ピークの比較定量を行う。ESIとMALDIというイオン化手法の違いにより、二つの質量分析装置によって検出可能なペプチドの範囲は少し異なると予想されるため、両者を組み合わせて解析することで、より広い範囲のペプチドに関してデータが得られることが期待される。

現在装置のセットアップが終了し、標準サンプルを用いてICATラベル化による解析の定量性などについて基礎的な検討を行っている。

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

創薬の標的となる生体分子の候補を探索するためには、疾患と関連する細胞内シグナル伝達経路などに関わるたんぱく質の発現をプロファイリングすることが重要な鍵となる。しかし、細胞内のシグナルの流れは複雑であり、シグナルが分岐したり、フィードバック機構が働いたり、あるいは、他のシグナルとクロストークしている。したがって、細胞内シグナル伝達経路のたんぱく質の発現をプロファイリングするためには、個々のシグナル伝達経路を調べるだけでなく、クロストークも含めたシグナル全体を把握することが必要不可欠である。また、細胞内のシグナル伝達経路の生体分子の多くは翻訳後修飾を受ける。例えば、たんぱく質がリン酸化などの修

飾を受けて活性型に変換されたり、あるいは脱リン酸化され不活性型に変換される。従って、疾患関連たんぱく質の発現に加え、翻訳後修飾についても解析できるプロファイリングシステムが必要となる。

まず、2D-DIGE のシステムの導入により、数千のたんぱく質について複数の試料間で発現量の変化を一度に解析できるようになった (Fig.7)。疾患関連たんぱく質のリン酸化も含めた翻訳後修飾についても高感度で解析可能となった。これは、異なる蛍光色素で複数のたんぱく質サンプルを標識して同一ゲル上で一括して電気泳動を行えるようになり、泳動後のゲルの画像化が可能となったためである。質量分析計を用いてたんぱく質を同定するためには、スポットピッキングや酵素処理などの前処理が必要であるが、付随するシステムでは、サンプルを自動で前処理することが可能である。すなわち、発現に差異が認められたスポットをピッキングし、マイクロタイプレート内にて酵素消化処理後、新規プレートにペプチド断片を自動的に分注することが可能となった。したがって、本システムの導入により、疾患関連シグナル伝達経路のたんぱく質の発現や翻訳後修飾の解析が可能となった。

細胞内の疾患関連シグナル伝達分子の発現に関して、たんぱく質レベルだけでなく、mRNA レベルでも解析できれば、両者のデータの相関性や相違性を明確にできると考えられる。そこで、患者や健康人由来の血液や組織、細胞から mRNA を一定の収量で、かつ簡便な操作で精製できる BIOROBOT M48 も導入された。本装置の導入により、血液や組織、細胞から mRNA を直接精製することが可能となった。本装置では mRNA を自動で効率よく精製できるため、GeneChip を用いた DNA マイクロアレー解析に迅速に移行できるようになった。GeneCHIP のシステムで得られたデータは、リアルタイム RT-PCR から得られたデータと相関性が高い。したがって、疾患と関連するシグナル伝達分子の発現に関して、信頼性が高い十分な情報が得られると考えられる。

上述の 2D-DIGE から GeneChip までの一連の装

置を組み合わせることで、疾患と関連するたんぱく質や mRNA の発現量の変化、あるいはたんぱく質の翻訳後修飾について網羅的かつ効率的にプロファイリングするための自動化システムが構築できた。

III : 疾患関連グライコプロテーム解析技術の開発

細胞発現たんぱく質の約 50% は糖たんぱく質であり、糖鎖部分は細胞認識や接着等細胞間の相互作用や、様々なたんぱく質の機能調節に携わっていることが知られている。また、糖たんぱく質の発現、及び結合糖鎖の構造や不均一性は、がんや自己免疫疾患等様々な疾患に関連して変化することが報告されている。しかし、従来のプロテオミクス的アプローチでは、糖たんぱく質や糖鎖部分に関与する様々な生命現象や病態との関係を解明することはできない。すなわち、2D-GE、2D-LC、及び ICAT 法等をはじめとするたんぱく質発現解析、及び MS とデータベース検索によるたんぱく質同定を基本とする手法は、糖鎖を含む翻訳後修飾されたたんぱく質の同定や翻訳後修飾の解析には威力を発揮することができず、糖たんぱく質の解析は取り残されているのが現状である。糖たんぱく質や糖鎖と疾患の関係を明らかにするためには、糖鎖の定性的・定量的解析に基づくグライコプロテオーム・グライコーム解析技術の開発が不可欠であると思われる。

糖たんぱく質は糖鎖構造が異なる様々な分子種 (グライコフォーム) の集合体である。糖鎖の構造は複雑な上、多くの異性体が存在することから、その解析には多大な時間と労力が要求され、一部の習熟した研究者にしかできないものと見なされてきた。糖たんぱく質の構造を解析する方法として、グライコフォームを分離し解析する方法、糖ペプチドとして解析する方法、糖鎖部分を切り出して解析する方法があり、それぞれに適した分析法が利用されてきた (Fig.8)。この中で、MS と LC をオンラインで結んだ LC/MS は、多くの異性体が存在する糖鎖の詳細な構造を識別し、不均一性に関する情報も提供し

てくれることから、現在、糖鎖生物学分野において最も有力なツールとして期待されている方法である。これまで、LC/MS を用いた糖たんぱく質特性解析法として、糖ペプチドマッピングによる糖鎖結合部位と部位特異的糖鎖不均一性解析法、並びに遊離糖鎖のプロファイリングによる糖鎖構造・不均一性解析法を開発し、様々な糖たんぱく質の構造解析に利用してきた。これらの方法とプロテオミクス的アプローチを組み合わせることができれば、疾患組織と健康組織における糖たんぱく質発現量の比較や結合している糖鎖の差異解析を通して、疾患関連糖鎖遺伝子や糖たんぱく質を見つけ出し、新たな診断法の開発や糖鎖と疾患の関係の解明につなげることができるものと期待される。

本項では、糖たんぱく質(グライコプロテオーム)の発現解析及び結合糖鎖(グライコーム)解析に焦点を当てた疾患関連プロテオーム解析技術の開発を目的としている。本年度は、以下の3つの方法について検討を行った。

- 1) 糖ペプチド解析-ペプチド/糖ペプチドの LC/MS/MS 測定による糖鎖構造推定とペプチド同定
- 2) 糖鎖解析-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによる発現糖たんぱく質糖鎖差異解析
- 3) グライコフォーム解析-2D-GE によるグライコフォーム解析とゲル内糖たんぱく質の糖鎖解析

①糖ペプチド解析:

ペプチド/糖ペプチドの LC/MS/MS 測定による糖鎖構造推定とペプチド同定

プロテオーム解析の手法として、最近、2D-GE を使用せず、たんぱく質の消化物を直接 2D-LC/MS/MS で解析する方法が注目されている。2D-GE を用いた場合に比べゲルからの回収操作がないため、簡便且つ少ないサンプル量でたんぱく質同定ができるという利点がある。しかし、糖ペプチ

ド等の CID-MS/MS に関するデータが十分に揃っていないことや適当な検索ソフトが作製されていないことから、糖たんぱく質の同定及び糖鎖解析には利用することができず、糖たんぱく質は残念ながら手がつけられないまま放置されているのが現状である。将来的に 2D-LC/MS/MS を用いたプロテーム解析において、糖たんぱく質も同様に解析できるようにすることを理想として、LC/MS/MS による糖ペプチドの解析、すなわち、糖鎖構造推定とペプチド同定の可能性を探った。

(1)糖ペプチドイオンの特定

LC/MS/MS を用いたペプチド/糖ペプチドマッピングにおいて最初に直面する問題は、無数のペプチドイオンの中からいかに糖ペプチドイオンを特定するか、ということである。現在、インソースフラグメンテーションやプリカーサーイオンスキャンにより糖鎖に特徴的なフラグメントイオン (m/z 204, 366 など)を確認することで糖ペプチド由来のイオンを判別する方法が用いられている。しかし、インソースフラグメンテーションを利用した方法は、高感度に LC における糖ペプチドの溶出位置を特定することが出来るが、糖ペプチドであるプリカーサーイオンを検出することが出来ず、別途通常の LC/MS 測定を行い、インソースフラグメンテーションで得られたデータと照らし合わせながら糖ペプチドイオンを特定しなければならない。一方、プリカーサーイオンスキャンは糖ペプチドイオンの分子量を測定することは出来るが、感度が悪い、糖ペプチド以外のイオンも検出してしまうなどの問題がある。また、これらの方法によって溶出位置が特定できた糖ペプチドの同定を行うためには、さらにペプチドシーケンサーや糖ペプチドをペプチドにして MS/MS 測定を行う等の分析が必要となる。そこで今回、データ依存的 MS/MS スペクトルを解析することで糖ペプチド由来イオンをより正確に選択し、さらにはペプチド配列を決定出来るかどうかについて検討を行な

った。

今回分析に用いた糖たんぱく質 α フェトプロテインには、推定 N 結合糖鎖結合部位が一箇所しか存在しないので、トリプシン等で酵素消化した場合、得られる糖ペプチドは 1 種類だけとなるはずである (Fig.9)。 α フェトプロテインを還元カルボキシメチル化した後、トリプシンで消化し、ペプチド・糖ペプチド断片とした。この糖ペプチドを含む全ペプチド混合物を LC/MS で分析した結果、Fig.10A に示すトータルイオンクロマトグラム(TIC)が得られた。このペプチドマップに現れているピークを構成する分子イオンは自動的にデータ依存的な MS/MS 測定に付されている (Fig.10B)。Fig.10C は MS/MS の TIC の中から、糖鎖の指標となる m/z 204 のフラグメントイオンだけを選択的に取り出したものであり、2 つのピーク群が確認された。尚、 m/z 204 は、糖鎖の構成単糖である GlcNAc または GalNAc の B イオンに相当する。この操作によって、ペプチドマップ中の糖ペプチドイオンを特定することが可能となった。

(2)糖鎖構造推定

Fig.11 は糖ペプチドと特定された 2 つのピークのうち、ピーク 1 (m/z 1061.8³⁺) の MS/MS スペクトルの一つを示したものである。低分子量側に糖鎖に由来するイオン、[HexNAc]⁺ (m/z 204)、[HexNAcHex]⁺ (m/z 366)に加えて、[HexNAc-H₂O]⁺ (m/z 186)、[HexNAc-2H₂O]⁺ (m/z 168)等のイオンが生成されているのが確認された。また、[NeuAc]⁺ (m/z 292)、[NeuAc-H₂O]⁺ (m/z 274)が認められることからシアル酸が結合していることが推定された。

さらに、高分子量側には糖鎖が完全に切れたペプチドに相当するイオン(m/z 978.5)、及びそのペプチドに[HexNAc]が 1 分子または 2 分子結合したイオン、さらに[Hex]が 1 ~ 3 分子分増えたイオンが認められ、N 結合糖鎖のコア部分の配列に関する情報が MS/MS スペクトル上に現れていることがわかった。

糖鎖構造は TOFMS で得られた糖ペプチドの分子

量(3182.3Da)からペプチドの理論分子量(977.5Da)を差し引いて得られた分子量(2222.8Da)を基に、シアル酸が結合した 2 本鎖糖鎖であることが推定された。さらに、このイオンの近傍イオンの TOFMS データ及び MS/MS スペクトルを解析した結果、 α フェトプロテインに付加している糖鎖を Table 4 のように推定することができた。

(3)ペプチド部分の同定

ペプチドに相当するイオンの m/z 値 (978.5)から、この糖ペプチドは α フェトプロテインのトリプシン消化によって得られることが予想される VNFTEIQK と推定された。さらに詳細にスペクトルを観察したところ、中分子量領域にペプチドに由来する b 及び y イオンが検出されていることがわかった。Fig.11 中の表はペプチド VNFTEIQK から得られることが予想されるフラグメントイオンを示したものである。網掛けした部分は Fig.11 のプロダクトイオンスペクトル内に存在を確認することができたフラグメントイオンであり、VNFTEIQK 配列を有するペプチドであることが確認された。

尚、ピーク 2 は解析の結果、一部切れ残った FTKVNFTEIQK ペプチドに糖鎖が付加したものであることが確認された。

(4)複数の糖鎖結合部位を有するたんぱく質の糖鎖結合部位の同定と部位特異的糖鎖構造解析

つぎに、複数の糖鎖結合部位を有する糖たんぱく質の解析を行った。セルロプラスミンは 7 箇所の推定 N 結合糖鎖結合部位を有しているが (Fig.12)、各部位に結合している糖鎖の種類は明らかにされていない。 α フェトプロテインと同様にトリプシン消化し、7 箇所の推定 N 結合糖鎖結合部位を有するペプチドを含む全ペプチドを LC/MS で分析した。その結果、TOFMS TIC (Fig.13A)、MS/MS TIC (Fig.13B)、及び m/z 204 のマスクロマトグラム (Fig.13C)が得

られ、Fig.13C 上に4つのピークが検出された。

Fig.14 はピーク 1 を構成する一つのイオンの MS/MS スペクトルである。 α フェトプロテイン同様に糖鎖に由来するフラグメントが検出され、 m/z 292 のイオンが認められることから、シアル酸結合糖鎖であることが確認された。また、ペプチドのフラグメントイオンから、ペプチド 129-146 と同定され、分子量 4096.6Da からペプチド分子量 1891.8Da を引いた値から糖鎖はジシアロ複合型 2 本鎖糖鎖と推定された。同様に他の3つのピークについても解析を行った結果、ピーク 2 は Asn1202、ピーク 3 は Asn397、ピーク 4 は Asn358 を含む糖ペプチドと同定され、N 結合糖鎖はセルロプラスミンの7つの推定 N 結合糖鎖結合部位のうち、138、358、397、及び 1202 位の Asn に結合していることが明らかになった。また、TOFMS で得られた分子量から各部位に結合している糖鎖の構造は Table 5 のように推定された。別途行った LC/MS/MS 測定により、残りの3箇所の N 結合糖鎖結合部位を含むペプチドが検出されたことから、227、588、929 位の Asn には糖鎖が結合していないことが明らかになった。

(5)血清中の糖たんぱく質解析への応用

LC/MS/MS によって、糖たんぱく質の一次構造及び糖鎖構造に関する情報が一度に得られることが明らかになったので、これを血清糖たんぱく質の解析に応用した。血清 20 ml から市販のカートリッジを用いてヒト血清アルブミンを 50%程度除去し、トリプシンで消化してペプチド・糖ペプチド断片とした。これを直接 LC/MS/MS で測定することによって、TOFMS TIC (Fig.15A)、MS/MS TIC (Fig.15B) が得られることを確認し、これを血清たんぱく質のプロファイルとした。つぎに、確実に糖ペプチドの位置を特定するため m/z 204 のマスクロマトグラム (Fig.15C) に加えて m/z 366 のマスクロマトグラム (Fig.15D)を描き、共通ピークが認められた時間を糖ペプチドの溶出時間と特定した。一番大きなピーク

を構成するイオン(m/z 1221.7³⁺)の MS/MS スペクトルを Fig.16 に示した。ペプチドに由来するイオンからハプトグロビンに由来する糖ペプチドであることが同定され、糖鎖構造についてもジシアロ複合型 2 本鎖糖鎖と推定された。

以上のように、発現たんぱく質の消化物を LC/MS/MS で解析することによって、LC/TOFMS 部分でプロファイル評価を行うと同時に MS/MS 部分で特性解析ができることが明らかとなった。今後、正常と非正常サンプル間における糖たんぱく質の発現解析、及び糖鎖の変化に関する解析を行っていきたいと考えている。

②糖鎖解析

LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによる細胞発現糖たんぱく質糖鎖差異解析

糖ペプチドの LC/MS/MS によって、結合糖鎖の構造を推定することが可能となったが、糖鎖には、単糖、分岐構造、結合様式が異なるたくさんの異性体が存在し、これらを糖ペプチドの LC/MS/MS で識別して定量解析することは依然不可能である。糖鎖の微細構造の識別や定量解析には、糖鎖部分を切り出して解析する方法が適当である。極性物質の吸着能が高く、ESI に適した溶媒で糖鎖を分離・溶出できるグラファイトカーボンカラム(GCC)を用いることによって、高マンノース型、複合型、混成型糖鎖や、酸性糖鎖、中性糖鎖など様々な糖鎖を一度に分離・検出できる糖鎖プロファイリング法を開発している。そこで、GCC-LC/MS を用いて、簡単な操作と実行可能なサンプル量で、細胞発現たんぱく質の糖鎖の差異解析が可能かどうかを検証した。モデルとして、糖鎖遺伝子導入によって糖鎖の構造と分布が変化していることが予想される細胞を用い、糖鎖プロファイリング法を用いた細胞発現糖たんぱく質の糖鎖の差異解析と 2D-GE を用いた目的糖鎖を有するたんぱく質の同定と特性解析を検討した。

(1)糖鎖の差異解析

N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III)は、複合型 2 本鎖糖鎖に bisecting GlcNAc を付加する糖転移酵素で、細胞接着やがん転移と関係があることが報告されている。ここでは、GnT-III 遺伝子を導入した CHO 細胞を病態モデルとして、糖鎖プロファイリング法によって糖鎖の変動を捉えることができるかどうかを検証した。5 x 10⁶ 個程度の CHO 細胞と GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞を界面活性剤処理し、膜画分及び可溶性画分に分画した。それぞれの画分から PNGaase F によって糖鎖を切り出し、NaBH₄ で還元後、LC/MS によるプロファイリングを行った。

Fig.17A は CHO 細胞の膜画分の糖鎖プロファイルである。各ピークのマススペクトルから、CHO 細胞の膜たんぱく質に付加している糖鎖は高マンノース型糖鎖とシアル酸が結合した複合型 2 本鎖糖鎖が中心で、さらに混成型、トリマンノシルコア部分のみの糖鎖や、1 本鎖糖鎖などの比較的小さな糖鎖も結合していることが確認された。

Fig.17B は、GnT-III 遺伝子導入細胞の膜画分の糖鎖プロファイルで、矢印で示す位置に CHO 細胞からは検出されない新たなイオンが検出された。GCC で糖鎖を分離した場合、bisecting GlcNAc が付加した糖鎖は付加されていない糖鎖より早く溶出される傾向がある。GnT-III 遺伝子導入によって新たに出現した糖鎖の分子量は、その後溶出された 2 本鎖糖鎖の分子量より HexNAc 1 分子分増加していることから、bisecting GlcNAc を有する 2 本鎖糖鎖であることが示唆された。Fig.18 は新たに検出されたピークのマススペクトルとそれより推定された糖鎖構造である。

同様に可溶性画分についても糖鎖プロファイリングを行ったところ、膜画分とは異なるパターンが得られ、マススペクトルから、可溶性たんぱく質に結合している糖鎖は主に高マンノース型であることがわかった。また、膜ほどではないが、GnT-III 遺伝子

導入細胞の可溶性画分からも bisecting GlcNAc が付加していると思われる糖鎖が検出された (Data not shown)。

Fig.19 は CHO 細胞、及び GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞から切り出された主な糖鎖のピーク面積をアシアロ複合型 2 本鎖糖鎖のピーク面積を 1.0 として相対的に表したもので、糖鎖分布の変化を示している。このグラフから、GnT-III の発現によって bisecting GlcNAc が付加したと思われる糖鎖は出現するが、糖鎖全体の分布に大きな変化は生じないことがわかる。これは、GnT-III 発現によって糖鎖構造に変化が生じたたんぱく質が全体の一部であることを示唆していると考えられる。

このように、GCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは糖鎖の構造や分布の違いを簡単に識別できることから、健常及び病態サンプル間の糖鎖の差異解析法として有用であると思われる。

(2)2D-GE、レクチンプロット、及び LC/MS/MS を用いた糖たんぱく質の同定

つぎに、プロテオミクスの手法を用いて bisecting GlcNAc が付加したたんぱく質の同定を行った。Fig.20 は、GnT-III 遺伝子導入細胞の膜画分を 2 枚のゲルで展開し、Sypro Orange で全たんぱく質を染色した結果(A)、及び bisecting GlcNAc を認識する PHA-E₄ レクチンを用いてレクチンプロットを行った結果(B)を示している。レクチンプロットによって、酸性側の 70-80 kDa 周辺に、糖たんぱく質に特徴的な train 状のスポットが複数組検出され、一部のたんぱく質の糖鎖に bisecting GlcNAc が付加されていることが確認された。

(3)Bisected 糖鎖発現糖たんぱく質の同定

1) Bisected 糖鎖発現糖たんぱく質の粗分画

Fig.20A に示した 2D-GE の泳動図には無数のスポットが認められ、レクチンプロットによって検出されたスポットの位置を特定することが困難であった。また、一般的に MS によるたんぱく質同定において、信頼性の高い結果を得るためには約 1~2 mg 程度のたんぱく質量が要求されるが、レクチンプロットやウエスタンプロットで検出されるたんぱく質の場合、たんぱく質同定のための十分な量が得られない場合が多い。そこで、SDS-PAGE で粗分画を行った後、再度 2D-GE を行うことを検討した。Fig.21A-(1)は膜画分の SDS-PAGE の結果を示したもので、高分子領域から低分子領域まで多数のバンドが確認された。レクチンプロットを行った結果 (Fig.21-(2))、約 50~150 kDa 付近に数個のバンドが検出された。今回用いたサンプルは細胞膜画分のみであるが、複数のたんぱく質に Bisecting GlcNAc が付加されていることが予想された。レクチンプロットにより確認されたバンド A 及びバンド B に相当するゲルを切り出し、ゲルからたんぱく質を抽出後、濃縮して再度 2D-GE を行った。

2)糖たんぱく質の同定

バンド A を 2D-GE で展開し、SYPRO Orange で染色した図を Fig.21B に示した。約 100 kDa 付近に糖たんぱく質特有の train 状のスポットが多数確認された。バンド A のレクチンプロットでは約 120 kDa に顕著な train スポット (スポット a) が検出された (Fig.21C)。バンド B の 2D-GE ゲル上にも同様に多数の train スポットが確認され (Fig.21D)、レクチンプロットの結果、70 kDa (スポット b) 及び 50 kDa (スポット c) 付近にスポットが検出された (Fig.21E)。

スポット a, b, 及び c の同定は、2D-レクチンプロットにより検出されたスポットに相当するゲルを切り出し、トリプシンによるゲル内消化後、LC/MS/MS によって行った。その結果、スポット a はインテグリン $\alpha 3$ と同定された (Fig.22)。イン

テグリン $\alpha 3$ は 1 型膜糖たんぱく質で、フィブロネクチンやラミニンなど接着に関わる因子のレセプターであることが報告されている。GnT-III が細胞接着や増殖などに関与していること、また肝がん細胞における GnT-III の活性上昇はがん性変化の一つとして考えられていることから、細胞のがん化とインテグリン $\alpha 3$ 糖鎖の変化の関係について興味を持たれるところである。尚 レクチンプロットで検出された 70 及び 50 kDa の bisected 糖鎖含有たんぱく質については、たんぱく質含有量が不十分であること、また、夾雑たんぱく質が多いことから同定困難であった。

プロテオミクス的手法により 2D-GE/レクチンプロットを行う場合、2D-GE で検出されるスポットは数千個にも及ぶために matching は困難を極める。そこで、免疫沈降法やレクチンアフィニティーカラムなどで目的たんぱく質を精製した後に 2D-GE を行うのが一般的であるが、今回用いたサンプルのように難溶性たんぱく質を含む場合は同様の方法を利用することができない。今回示した SDS-PAGE による粗精製、及びゲル染色とレクチンプロットを同一ゲルで行うことはゲル-PVDF 膜間の matching 精度を高めるために非常に有用であると考えられる。

以上のように、CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法によって、従来のプロテオミクス的手法では困難であった細胞発現糖たんぱく質糖鎖の差異解析が可能となった。さらに 2D-GE 及びレクチンプロットを組み合わせることによって、目的糖たんぱく質の同定が可能であることが実証された。

③グライコフォーム解析

2D-GE によるグライコフォーム解析とゲル内糖たんぱく質の糖鎖解析

2D-GE はたんぱく質発現解析の手法として最もよく用いられている方法、最近では、複数の蛍光色素を利用した 2D-DIGE などが注目を集めている。しかし、前述したように、糖たんぱく質の場合、

2D-GE においてグリコフォームが分離された train 状スポットとして現れるため、発現解析が複雑となる。従来のプロテオミクス的手法では、どのスポットを分析・検索しても同じたんぱく質が同定されるだけで、スポットの変化、すなわちグリコフォーム分布の変化と疾患の関係に関する情報を得ることはできない。2D-GE によってグリコフォームのプロファイリングを行い、ゲル内糖たんぱく質の糖鎖構造を明らかにすることができれば、疾患関連糖たんぱく質の同定だけでなく、疾患と糖鎖の関係の解明にもつながると考えられる。

一般に2D-GEとクマシーブルー (CBB) 染色によって検出可能な糖たんぱく質量は 1mg 程度といわれているが、ゲルからの回収率や操作中の損失等を考慮に入れると、サブマイクログラムのたんぱく質に由来する糖鎖を解析できる分析システムが必要となる。前述した GCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法のゲル内糖たんぱく質糖鎖解析における可能性を調べ、細胞由来糖たんぱく質のグリコフォームプロファイリングと糖鎖構造解析に利用した。

(1)ゲル内糖たんぱく質糖鎖の解析

エリスロポエチンには3本のN結合型糖鎖が結合し、糖鎖は分子全体の40%を占めている。糖鎖の大部分はシアル酸が複数結合した比較的分子量が大きい酸性糖鎖である。2 mg のエリスロポエチンを SDS-PAGE で展開し、ゲル内 PNGase F 消化により糖鎖を切り離し、超音波処理により糖鎖を抽出した。NaBH₄還元糖鎖を CapGCC-LC/MS で分析したところ Fig.23A-(2)のような糖鎖プロファイルが得られ、ゲルから抽出された EPO の糖鎖の分離パターンは、泳動前の分離パターン(Fig.23A-(2))とほぼ同様であることが確認された。また、ピーク面積比から、ゲル内糖たんぱく質の約 60%の糖鎖が回収されていることが明らかになった。

つぎに、エリスロポエチンよりも分子量が大きく、中性糖鎖である高マンノース型を含む3本のN結合

糖鎖が付加しているヒト黒色腫細胞産生ヒト組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) を用いて同様の実験を行った。その結果、たんぱく質や結合糖鎖の種類が異なっても、ゲル内糖たんぱく質糖鎖を回収し、解析できることが確認された (Fig.23B)。

(2)2D-GE によるグリコフォーム解析とゲル内糖たんぱく質の糖鎖解析

ラット脳を用いて 2D-GE によるグリコフォームプロファイリングとゲル内糖たんぱく質の糖鎖解析を行った。細胞・組織中にはハウスキーピングたんぱく質が多く存在し、抽出物をそのまま 2D-GE に添加した場合、それらの妨害により、目的糖たんぱく質及びその関連たんぱく質のプロファイルを作成できないケースが想定される。また、2D-GE にアプライできるサンプル量も限られていることから、対象たんぱく質の特性に応じて粗分画を行っておく必要がある。前述した CHO 細胞の場合は SDS-PAGE により粗分画を行ったが、ここでは脳に存在する GPI アンカー型糖たんぱく質を分析対象とし、脱脂、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 による膜画分の可溶化、Triton X-114 の温度依存性相分離による膜画分の回収、及び PIPLC 消化を行い、GPI アンカー型糖たんぱく質を含む膜たんぱく質可溶性部分を分画した (Fig.24)。

可溶性膜たんぱく質画分を 2D-GE で展開し CBB 染色したところ、Fig.25A に示す泳動図が得られ、多数のスポットが確認された。ゲル片を切り出し、ゲル内トリプシン消化を行い、LC/MS/MS を用いた配列解析とデータベース検索を行った結果、Fig.25A の通り同定された。50 kDa 付近に検出され、LAMP、NTM、OBCAM、及び Kilon と同定されたたんぱく質は、Ig ドメインを3個持つ GPI アンカー型たんぱく質 IgLON スーパーファミリーと呼ばれるたんぱく質で、主に神経組織に発現し、神経網形成等に重要な役割を担っていると考えられている。一次構造の相同性が高いことから、個々に単離するのは難し

く、これまで糖鎖構造を含め詳細構造は明らかにされていなかった。今回、2D-GE を行うことによって、神経網形成に関連する一連のたんぱく質のプロファイリングを行い、たんぱく質同定を行うことができた。IgLON が多くのスポットとして検出されたのはグライコフォームが分離したためと考えられたので、LC/MS によって、グライコフォームの糖鎖構造を調べた。

代表例として、Fig.25B に、あるスポットの糖鎖プロファイルを示す。各ピークの m/z 値をもとに糖鎖構造を解析した結果、主要なピークは、主に脳特異的に発現していることが報告されている BA-2 糖鎖であることが示唆された。その他、高マンノース型糖鎖 (M5、M6、M7、及び M9)、ハイブリッド型、及び複合型糖鎖も検出された。検出された糖鎖の中には、フコースを 2 分子以上含むと推定されるものもあり、非還元末端側にフコース残基を持つことが示唆された。脳には Le^x 構造を有する糖鎖が多く存在することが報告されており、今回の結果はそれらの報告によく一致している。また、硫酸基が結合していると推定される糖鎖も検出された。今回の手法を用いることによって、細胞、組織由来の糖たんぱく質のグライコフォームのプロファイリングと各スポットの同定、及び糖鎖構造解析が可能であることが示された。

(3)2D-DIGE を用いた糖たんぱく質の発現解析とゲル内糖たんぱく質特性解析への応用

2D-GE を用いた定量的プロテオーム発現解析法として、前述したように 2D-DIGE が注目されている。この方法が糖たんぱく質のグライコフォーム分布の変化、あるいは糖鎖の変化を捉えることができるかどうかを、再び GnT-III 遺伝子導入細胞を用いて評価した。ここでは、GnT-III 遺伝子導入 HepG2 細胞を用いた。

Fig.26 は Cy3 標識した HepG2 膜画分、及び Cy5 標識 HepG2III 膜画分を 1 枚のゲルで同時に展開し

たものを、同時表示ゲル画像として示したものである。黄色のスポットは発現量がほぼ同一のたんぱく質であり、赤または緑色のスポットは発現量が増加または減少しているたんぱく質を示している。DIGE による発現たんぱく質の差異解析では、ラベル化効率、蛍光検出感度の調節などの実験上のばらつきを考慮する必要がある。今回の実験のばらつきの検定を行った結果、HepG2 の 2S.D.は約 1.32 であり、HepG2III の 2 S.D.は約 1.27 であった。そこで、2 種類のサンプル間で発現量差が 1.4 倍以上のスポットを GnT-III 遺伝子導入の影響により変化したスポットとして、それらのたんぱく質の同定を行った。その結果、HepG2 に対して HepG2III の発現量が減少しているスポットは 133 スポット (5.3%)、増加しているスポットは 57 スポット (2.3%) であった。これらのスポットの中で特に変化の大きいスポットは No.539 (+2.26)、819 (-1.74)、1543 (-2.30)、1741 (-2.78) 及び 2151 (-2.21) であった (Fig.26)。

次にこれらのスポットについて、LC/MS/MS によるたんぱく質同定を試みた結果、トランスフェリン (No.539)、5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase (No.819)、アクチン (No.1543)、cytosolic malate dehydrogenase (No.1741)、及び glutathione-s-transferase like (No.2151) と同定された。

ここで特に注目されるのは No.539 のスポットで、これはグライコフォームが分離したと思われる train スポットを構成するスポットの 1 つであると考えられた。トランスフェリンは肝臓で合成され、2 箇所の鉄結合部位を有する分子量約 80 kDa の鉄輸送たんぱく質で、健常人のトランスフェリンには主要な糖鎖として Asn-413 及び Asn-611 の 2 個所にジシアロ複合型 2 本鎖糖鎖が結合している。一方、肝がん患者由来のトランスフェリンには bisected 複合型 2 本鎖糖鎖が結合していることから、GnT-III 活性と肝がん化の関連性が指摘されている。本研究ではコントロールとして HepG2 細胞を使用しているため、コントロールにも bisected 糖鎖を持つトラ

ンスフェリンが存在すると予測されるが、HepG2IIIではtrain 状スポットの中のNo.539のみ発現量が増加し、残りのtrain 状スポットについては逆に減少傾向がみられた。これはHepG2細胞にGnT-III遺伝子を導入することによって、糖鎖の不均一性に変化が生じていることを示唆しているものと考えられる。糖たんぱく質の糖鎖には不均一性が存在し、正常細胞ではその不均一性は一定に保たれているが、ある種の疾患では不均一性に変化が生じることが知られている。DIGEシステムは単にたんぱく質の差異解析だけではなく、糖たんぱく質のグリコフォームの定量解析にも有用であると考えられる。

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

遺伝子・たんぱく質の機能解明は、DNAチップ、in silico解析等によるトランスクリプトーム、プロテオーム解析などにより絞り込み、推定が行われているが、決め手となるのは、標的細胞やin vivoに候補遺伝子を導入して発現させ、その機能を直接評価する実証的解析である。しかし、in silico、トランスクリプトーム、プロテオーム解析法の急速な進展に比し、実証的解析系の開発は極めて遅れている。これは適切な遺伝子導入・発現技術の開発が遅れているためであり、高効率の遺伝子導入活性を有し、目的遺伝子の発現を可逆的に、かつ定量的に調節し、細胞機能の変化を直接解析できる基盤技術の開発は極めて重要である。そこで、既存のベクターでは最も遺伝子導入効率が優れているとされているアデノウイルスベクターをベースにして、薬剤反応性の転写活性化因子の遺伝子とその応答配列を含んだプロモーターをもつ目的遺伝子を単一のベクターに搭載し、外的に加えた薬剤により目的遺伝子の発現制御が可能なベクターシステムの開発を行った。

本年度は、分担研究者らがこれまでに開発済みのアデノウイルスゲノムの2領域あるいは3領域に同時に外来遺伝子を挿入できる発現制御型アデノウ

ルスベクターの更なる有効性、汎用性の拡大を目的に、発現誘導能に優れたtet-on系の開発、第2世代のrtTA遺伝子(2nd generation rtTA；rtTA遺伝子に数bpのmutationが挿入)、および変異ファイバーを用いたベクターシステムの開発、およびその有用性の実証を行った。

発現誘導能に優れたtet-onシステムを搭載したアデノウイルスベクターの開発については以下の点に改良を加えた。1) rtTAの発現レベルを上昇させ、2) テトラサイクリン制御性のサイレンサーであるtTSを用いることでbasal活性を抑え、3) かつ単一のアデノウイルスベクターで3者(目的遺伝子、rtTA遺伝子、tTS遺伝子)の遺伝子を発現させることである。

1) については、E3欠損領域に挿入したrtTA発現単位(CMVプロモーターにより制御されている)にイントロンAの配列を付与した。2, 3) については、3者(目的遺伝子、rtTA遺伝子、tTS遺伝子)の遺伝子を単一のベクターで発現させる様々なベクターを作製した。このため、まず3者の遺伝子をアデノウイルスゲノムの異なった領域に独立に搭載できるトリプル遺伝子発現系からなるアデノウイルスベクターを開発した(Fig.27)。E1/E3欠損領域に加え、本研究で注目した領域はE4領域と3' ITRの間の領域であり、この部位に制限酵素ユニーク部位のXbaI部位を挿入した。作製したベクタープラスミドpAdHM48はE1欠損領域にI-CeuI、SwaI、P1-SceI部位を、E3欠損領域にCsp45I部位を、E4領域と3' ITRの間の領域にXbaI部位を有しており、それぞれの領域に簡便な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外来遺伝子を挿入できる。

このシステムを利用して目的遺伝子(ルシフェラーゼあるいはSEAP；テトラサイクリン誘導性プロモーターにより制御)をE1欠損領域に、イントロンAを付与したrtTA遺伝子(CMVプロモーターにより制御)をE3欠損領域に、tTS遺伝子(EF1 α プロモーターにより制御)をE4領域と3' ITRの

間の領域に同時に搭載させたアデノウイルスベクターを開発した。本改良型 tet-on システムを搭載したアデノウイルスベクター (Ad-rTA-tTS-L、Ad-rTA-tTS-SEAP) は、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼあるいは SEAP 遺伝子のどちらを用いても、種々の細胞株で 60-2500 倍以上の高い遺伝子発現制御能を示した (Fig.28-31)。この遺伝子発現誘導能は、tTS 発現単位を有せず、E3 欠損領域に rTA 発現単位だけを有したベクター (AdOn-L4、AdOn-SEAP4) に比べ遙かに (1~2 オーダー) 優れていた。一方、アデノウイルスゲノムの同一領域 (E1 あるいは E3 欠損領域) に IRES (internal ribosome entry site) 配列や両方向性プロモーターを用いて複数の外来遺伝子を搭載させたベクターでは高い発現制御能を示さず (Fig.28 29)、個々の遺伝子を独立に、異なった領域で発現させることが重要なことが判明した。

さらなる発現誘導能の上昇を目的に変異 rTA の機能を検討した。各ベクターの遺伝子発現・誘導特性を SK HEP-1 で検討したところ、tTS 遺伝子を有していない Ad-M2-SEAP4、Ad-S2-SEAP4 では、AdOn-SEAP4 と比較し顕著な変化は認められなかった。一方、tTS 遺伝子を有した Ad-rTA-tTS-SEAP、Ad-M2-tTS-SEAP、Ad-S2-tTS-SEAP では、オリジナルの rTA を用いた Ad-rTA-tTS-S に比べ、inducer であるドキシサイクリンに対して高い感受性を示し、1-2 オーダー低いドキシサイクリン濃度で、SEAP の発現制御が認められた。発現誘導能 (最大活性とバックグラウンド活性の比) に関しては、Ad-rTA-tTS-SEAP、Ad-M2-tTS-SEAP、Ad-S2-tTS-SEAP では 1000 倍以上の誘導能を示した (ベクター間で顕著な変化は認められなかった)。一方、tTS 遺伝子を有していないベクターは発現誘導能は低く、数十倍程度であった (Fig.32)。

次に in vivo での検討を行った。各アデノウイルスベクターをマウスに尾静脈内投与し、経日的に血中 SEAP レベルを測定した。アデノウイルスベクターはマウスに尾静脈内投与すると、95%以上の活性

が肝臓で認められることが判明しているため、本実験では主に肝臓で産生され血液中に分泌された SEAP を測定していることになる。ドキシサイクリンをマウスに drinking water として投与したところ、変異 rTA と tTS 遺伝子を有した Ad-M2-tTS-SEAP、Ad-S2-tTS-SEAP においては、ドキシサイクリンに依存して、血中 SEAP レベルの上昇が認められた。ドキシサイクリンを除去すると (通常の drinking water を与えると)、血中 SEAP レベルは低下した。AdOn-SEAP4、Ad-rTA-tTS-SEAP、Ad-M2-SEAP4、Ad-S2-SEAP4 ではドキシサイクリンによって血中 SEAP レベルの上昇は認められなかった (Fig.33)。これは、in vitro での実験結果で明らかとなったように、Ad-M2-tTS-SEA と Ad-S2-tTS-SEAP では、他のベクターに比べ、ドキシサイクリンに対して高い感受性を示すことを反映しており、Ad-M2-tTS-SEAP と Ad-S2-tTS-SEAP 以外のベクターでは、in vivo において遺伝子発現の制御が認められるのに必要な最低限度のドキシサイクリン濃度に達していないことが考えられた。以上の結果より、変異 rTA と tTS 遺伝子を同時に有したアデノウイルスベクターは in vitro、in vivo の両条件下において、極めて効率良く遺伝子発現レベルを制御できることが明らかとなった。

一方、アデノウイルスベクターによる効率の良い遺伝子導入には、標的細胞がアデノウイルス受容体 (CAR ; coxsackievirus-adenovirus receptor) を発現していることが必要である。そのため、アデノウイルス受容体 (CAR ; coxsackievirus-adenovirus receptor) 発現が乏しい細胞 (造血幹細胞をはじめとする血液細胞、樹状細胞、気道上皮細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、骨格筋細胞、一部のがん細胞、多くのマウス由来株化細胞など) には効率良く感染できないことが問題点となっている。そこで、アデノウイルスベクターのファイバーノブの HI ループに αv インテグリン ($\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$) との親和性を有した RGD 配列を組み込んだベクターや、ファイバー部分だけを CAR とは異なった受容体である

CD46 を認識して感染する 35 型アデノウイルスのファイバーに置換したベクターを作製し、これらのベクターを発現制御型ベクターと組み合わせたベクターの開発を行った。これにより、より広範な細胞に高効率遺伝子導入・発現が可能なアデノウイルスベクターの開発が期待できる。

まずは、E3 欠損領域に tTA 遺伝子を挿入した tet-off 系の発現制御型アデノウイルスベクターとの組み合わせを行った。作製したベクターの機能を HeLa 細胞 (CAR 陽性、インテグリン陽性、CD46 陽性)、LNZ308 細胞 (CAR 陰性、インテグリン陽性、CD46 陽性)、NIH3T3 細胞 (CAR 陰性、インテグリン陽性、CD46 陰性) で検討したところ、従来のファイバーをもった AdOff-S6 では、CAR 陽性の HeLa 細胞でのみ高い発現誘導能を示した。RGD ペプチドを付与したファイバーをもった AdRGD-Off-S6 では、いずれの細胞においても高い発現誘導能を示し、35 型アデノウイルスのファイバーをもった AdF35-Off-S6 では、CD46 陽性の HeLa 細胞と LNZ308 細胞で高い発現誘導能を示した。従って、期待通り感染域を制御することが可能となった (Fig.34, 35)。

ファイバー遺伝子はウイルス後期遺伝子の L5 領域に位置し、その構造はテール、シャフト、ノブの領域に分けられる。CAR と結合するのは C 末端のノブ領域である。本研究で用いたファイバー改変アデノウイルスベクターは、ファイバー領域の外来ペプチドの挿入部位として適したノブの HI ループに RGD ペプチドを遺伝子工学的に付与させることで、多くの細胞で発現している αv インテグリンを認識して感染できる。また、35 型アデノウイルス由来のファイバーを付与したベクターは CD46 を認識して感染できる (従来型アデノウイルスベクターは 5 型アデノウイルスを基盤としている)。これらの技術を組み合わせることにより、標的細胞特異性の制御が可能となり、CAR 陰性細胞を含む多くの細胞で効率の良い目的遺伝子の発現制御が可能となった。

D-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)

それぞれのウサギから肝臓組織を採取し、二次元電気泳動を行ったところ、それぞれ約 220 個のスポットを認めた。このスポットを Imagemaster Lab Scan を用いて解析し、濃さに大きな違いのあるスポットをピックアップした。TGL ではスポットとして認識されないが、TGH では濃いスポットが認められたスポットを含む数個のスポットの部分のゲルを切り出した。その後、脱色し、トリプシンによるゲル内消化を行い、脱塩の操作の後、質量分析計用サンプルプレートにスポットした。MALDI-TOF-MS を用いてトリプシンによる切断されたペプチドフラグメントの解析を行った。データベース検索をしたところ、このペプチドフラグメントのパターンは、既知の蛋白質のものではないことがわかった。ウサギの蛋白質のデータベースが、ヒトやマウスのもものと異なり、充実していないためであると考えられた。また、MALDI-TOF-MS 法で得られるデータは、トリプシン消化により切断されたペプチドフラグメントの長さであるので、切断されるアルギニンおよびリシンの位置が種差によって、異なるため、ヒトのデータに合致しない可能性も考えられた。次に、MS-MS を用いて同じサンプルを解析した。MS-MS は、シークエンスの情報も得られることから、MALDI-TOF-MS より多くの情報が得られると考えられた。MS-MS により、GITSFLVDR、ASSTCPLTFENVK の 2 つのペプチドが、ヒトの Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain precursor とマッチし、ProbabilityBased Mowse Score が 52 (38 以上で同定と判断出来る) であった。また TGL に多量に発現し、TGH にほとんど発現を認めない蛋白質は、MS-MS により、7 つのペプチドがウサギ Carboxylesterase と一致し、Probability Based Mowse Score は 102 であり、発現量に差異のある蛋白質 2 つが同定された。

現在、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスなど、遺伝子を操作して疾患モデル動物を作製できる。しかしながら、マウスは cholesterol ester transfer protein (CETP)を欠損しているため、ヒトの動脈硬化進展モデルにはなりにくい。ウサギは CETP を有し、そのリポ蛋白代謝がヒトに似通っているため、動脈硬化のモデルとして適当と考えられる。WHHL ウサギから、高中性脂肪血症を呈するライン(TGH)を得た。TGH は、著明な高コレステロール血症に加え、高中性脂肪血症も呈している。最近、TGH が TGL および日本白色ウサギに比し、アセチルコリンに対する内皮依存性弛緩反応が低下していることを報告した (Life Sciences, 74, 1487-1501, 2004)。これは、高コレステロール血症をベースにした高中性脂肪血症の、血管内皮機能への作用が明らかになったもので、このモデル動物の有用性を示すものであると考えられる。

本研究で、TGL に多量に発現し、TGH に発現を認めない蛋白質が Carboxylesterase であると同定された。Carboxylesterase は、種々の組織に存在するセリン依存性エステラーゼであり、Acyl coenzyme A cholesterol acyl transferase(ACAT)活性を持つことが知られている。ACAT は、細胞内で oleoyl CoA とコレステロールを基質として、コレステリルエステルを生じ、細胞内にコレステロールを貯蔵する働きを持つ。細胞内コレステロールが増加すると、LDL 受容体発現が抑制され、コレステロール合成が低下し、ACAT 活性が誘導され、フリーのコレステロールはエステル化され、細胞内に貯蔵される。細胞内コレステロールが減少すると、LDL 受容体発現が誘導され、コレステロール合成が低下する。TGL と TGH はいずれも LDL 受容体を欠損しているから、LDL 受容体を介して細胞内へのリポ蛋白の取り込みは行われぬ。従って、肝細胞内ではコレステロール合成は常に上昇している。de novo 合成されたコレステロールはエステル化されにくい。受容体を介して取り込まれたコレステロールは、エステル化されやすいことは、すでに報告されてい

る。著明な高中性脂肪血症を呈する TGH では、TGL に比しはるかに多量のリポ蛋白が LDL 受容体以外の受容体 (アポ E 受容体、レムナント受容体など) を介して取り込まれていると考えられ、ACAT は TGH の方が当然発現を誘導されていると考えられる。ところが、実際は TGH では ACAT の蛋白質としての発現量は非常に少ない。TGH では、一次的あるいは二次的な原因で肝細胞の ACAT 自体の発現が低い可能性が考えられる。二次的な原因としては、LDL 受容体以外のリポ蛋白の受容体発現が抑制されている可能性も考えられる。

一方、TGH に多量に発現し、TGL にほとんど発現を認めない蛋白質として Acyl coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain precursor (SCAD)が同定された。SCAD は脂肪酸オキシダーゼの 1 種でアシル CoA をアセチル CoA まで酸化する反応を触媒する。SCAD は、C の数が 6 および 4 という分子量の小さな脂肪酸のみに働く。SCAD の欠損症は、出生直後から低血糖、嘔吐をくり返し数日で死に至るものから、40~50 才代になって初めて筋力低下などの症状が現われるものまで非常にバリエーションが大きい。TGL に比し、SCAD が TGH に多量に発現しているのは、脂肪酸酸化の量を反映している可能性がある。

本研究で高中性脂肪血症の病因を知り、動脈硬化発症、進展のメカニズムを探るため、組織抽出液のプロテオーム解析の系を整え、肝臓で発現している蛋白質のプロテオーム解析を行った。TGL と TGH で発現に著明な差のある蛋白質の同定に成功した。肝臓での発現蛋白質を解析することにより、さらに病態の把握に重要な蛋白質を知ることができる。また、動脈硬化巣での蛋白質の発現を解析することにより、動脈硬化の発症のメカニズムにまでせまることができるのではないかと考えられる。

D-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

グレリンはラットおよびヒト胃組織から単離・構造決定された 28 残基のアミノ酸からなるペプチドであるが、3 番目の Ser 残基が脂肪酸 (n-オクタノ酸) でアシル化修飾された特徴的な構造を有し、この脂肪酸修飾は活性発現に必須である。しかし、ヒトの胃や血漿中におけるグレリン分子型の存在様式は明らかでなかった。今回、グレリン特異的な 2 種類の RIA および GHS-R 発現細胞を用いた Ca アッセイにより、ヒト胃組織よりグレリンおよび関連分子をゲル濾過、イオン交換 HPLC、逆相 HPLC により精製し、プロテインシーケンサーおよびマスマスペクトロメーター (ESI-MS) を用いて構造決定を行った。

その結果、胃組織中には多種類のグレリン分子が存在することが明らかになった。主要分子型である 28 残基のオクタノイル化されたグレリン (octanoyl ghrelin, C8:0) 以外に、グレリンと同等の活性を有する関連分子として脂肪酸修飾の異なるデカノイルグレリン (decanoyl ghrelin, C10:0)、デセノイルグレリン (decenoyl ghrelin, C10:1)、C-末端の Arg の欠落した 27 残基の octanoyl ghrelin[1-27]、decanoyl ghrelin[1-27] が存在することが明らかになった。また、非活性型である des-acyl ghrelin は多量に存在し、des-acyl ghrelin[1-27] も存在した。さらに血漿中のグレリン関連分子も抽出し、逆相 HPLC と RIA を用いた解析により、これらの分子型が血漿中にも存在することが明らかになった。一方、胃切除手術に於ける血漿グレリン濃度の検討により、手術直後は手術前の約 1/2 程度に低下していること、その後数週間から数ヶ月かけて徐々に上昇することが明らかになった。

以上の結果より、以下の考察を得た。ヒト胃および血漿中には主要分子型である 28 残基のオクタノイル化されたグレリン以外に、グレリンと同等の活性を有する関連分子として C 末端部の Arg の欠落した 27 残基のグレリンやデカノイルグレリン (decanoyl ghrelin, C10:0)、デセノイルグレリン

(decenoyl ghrelin, C10:1) などの脂肪酸修飾の異なる分子型が多種類存在すること、また、脂肪酸修飾されていない非活性型である des-acyl ghrelin および des-acyl ghrelin[1-27] も多量に存在することが明らかになった。これらの分子型は、グレリンの翻訳後修飾により生成したものであり、グレリンの複雑な生合成機序を反映している。このような多種類のグレリン分子の存在は、グレリンのこれまで知られていない新たな生理機能や調節機序に関与する可能性が考えられる。

グレリン生合成機序に関しては、脂肪酸によるアシル化修飾に関与する酵素の同定、修飾に使用される脂肪酸の由来などを含めた詳細な機序については、まだほとんど解明されていない。今後、種々の生理状態や病態と内因性グレリンの分子型との関連およびその制御機序に興味を持たれる。さらに、グレリンのアシル化修飾酵素に関しては、創薬の重要なターゲットになるものと考えられる。

D-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)

今年度の研究で構築したステップ 2 次元 HPLC システムは、1 次元目を 1.0 x 30 mm のカラムで流速 20 ml/min、2 次元目を 0.3 x 150 mm のカラムで流速 4 ml/min の条件で行った。リジン残基とロイシン残基の割合を変更した 11 残基の電荷、疎水性の異なる 5 種類の標準ペプチドにて保持能力、分離能力を検討した結果、対象となるたんぱく質消化ペプチド全体を保持、分離する十分な能力を持つことが確認された。次に 1 次元目の溶媒について段階的に変化させて溶出条件を検討した結果、ほぼ全てのペプチドが 250mM ギ酸アンモニウムで溶出されること、2 次元目の溶媒についてアセトニトリル濃度を直線的に変化させて溶出条件を検討した結果、ほぼ全てのペプチドが 35%アセトニトリル濃度で溶出されることが明らかとなり、この分離系でペプチド

全体を十分に分離できることが確認できた。また、HPLC の流量低下による再現性の低下も懸念されたが、数回の繰り返し実験においては、比較的小さい保持時間の変動で止まっており、現状では満足すべき結果と考えられた。

リニア 2 次元 HPLC については、システムが導入できたのが最近であるが、上記 5 種類の標準ペプチドによる検討結果では十分な分離が得られることが確認された。更に脳内ペプチドやたんぱく質の還元アルキル化後の酵素消化物についても現在予備的な検討を実施し、ほぼ予想通りの分離機能を有し、ステップ 2 次元 HPLC システムに比してより詳細な分離が可能であることが示された。

ステップ 2 次元 HPLC システムにおいて、分子量 3,000 以下のブタ脳ペプチド約 200mg (組織重量として 1.5g 相当) を 6 種の塩濃度で段階的に溶出し、各溶出物を一旦トラップカラムに濃縮、脱塩後、2 次元目の逆相 HPLC で 50 分間のアセトニトリル直線濃度勾配溶出を行ったところ、約 800 ペプチドを高い S/N 比で検出し、その内イオンカウント数の大きい 160 ペプチドについて構造を推定することができた。また、このシステムの分離時間は約 7.5 時間であり、後で行った MALDI-TOF-TOF 質量分析計による構造解析時間も含め、全行程をほぼ 3 日間で終了することができた。

以上を考察すると、生体内ペプチドを対象とするペプチドーム解析とデータベース構築においては、現在 1 次元目で 70 画分に分離を行い、各画分を 2 次元目の逆相 HPLC で詳細に分離し、溶出液を 2 種のイオン化法による質量分析計で検出、構造解析を行っている。今回これとほぼ同様のシステムでたんぱく質消化物を念頭において低分子量ペプチドの自動 2 次元解析システムを構築し解析し、6 段階の溶出でも 800 ペプチドを検出できた。ペプチドーム解析では同様の試料を用いて約 5000 ペプチドの検出ができていますので、1 次元目のステップ数の増加、あるいはリニア 2 次元 HPLC の使用による 1 次元目の画分数の増加により、最終的にはほぼ同数のペ

プチド検出が可能と考えられる。

構造解析については、現在は 2 次元 HPLC の溶出液の約 1/4 量しか最終的な構造解析に使用できていないこと、対象としたペプチドがゲノムや EST データベースが貧弱なブタ由来であること、酵素消化物のように C 末端アミノ酸が一定なペプチドでないことを考慮すると、本実験をヒト試料、マウス試料について実施すればより高い同定率が可能で有ると考えられた。ヒト培養細胞などをモデルに、対象動物による同定率の比較検討を行う予定であるが、恐らく 50~100% 程度の上昇が期待できるであろう。

最近、ナノ、マイクロ 2 次元 HPLC を実施できる各種の機器が販売されはじめていますが、そのままでは本研究目的を十分満足できる機器は存在しない。また、1 次元目 HPLC より溶出されたペプチドのトラップシステムの改良も必要で、吸着力の弱い短いペプチドについては回収できないことがある。今回構築したリニア 2 次元 HPLC については若干の改良を加えたが、ショットガン法でカバー率の高い結果を得るには、機器と共に使用するカラム担体や溶媒系の改良も必要である。

D-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: 研究試料の確保に関する研究

ミレニアム研究で行っている研究試料の取り扱いに準拠し、本研究における新規試料、既提供試料はともに連結可能匿名化を行い、武蔵病院副院長を個人情報管理者とする情報、試料の管理体制を構築した。具体的な試料確保の動き出しは、来年度早々の倫理委員会承認後になる見込みである。

II: パーキンソン病モデルを用いた研究

I93M UCH-L1 が野生型 UCH-L1 に比べ凝集性が高いことを見出した。I93M UCH-L1 発現トランスジ

ェニックマウスを作製したところ、神経病理学的に黒質 TH 陽性ニューロンの脱落と線状体ドーパミン含量の低下を見出した。さらにこのモデルマウスを用いてパーキンソン病発症と密接に関連している遺伝子群を約 20 種同定したがグリア細胞に発現している遺伝子も病理学的変化が生じる以前から変動していることを見出した。また UCH-L1 が欠損する gracile axonal dystrophy マウスのプロテオーム解析を行い、病態特異的に変動している酸化蛋白質 4 種を同定した。

以上の I および II から、パーキンソン病、アルツハイマー病など神経変性疾患については近年の分子遺伝学的解析から家族性疾患を中心にいくつかの病因遺伝子が同定された。数多くの孤発性については病因の特定はいまだだなされていないが家族性の成果を発展させることで、対症療法の高高度化だけでなく根本的治療法開発も展望できるとの期待が高まっている。成因に関しては国内外における研究から、蛋白質の構造変化、凝集、蓄積と神経細胞死・神経変性との関連が示されており conformation 病の概念確立とともに、アポトーシスに加えて神経細胞機能不全も神経変性の主因として位置づけられるようになってきた。さらに、近年では免疫学的機序の関与に注目が集まっており、喫煙者にパーキンソン病発症者が少ないという疫学的調査が明らかにされるなど生活習慣との関連でも注目を集めている。

これらの近年の知見を参考に、血液、尿などの末梢サンプルにおいても新たな知見が生み出される可能性が高いと考え、神経変性疾患患者における血液、尿中蛋白質の網羅的解析を行うことにした。今年度は国立精神・神経センター武蔵病院との連携の基盤を形成し、武蔵病院側からの臨床検体の供給体制を整えた。来年度早々にも国立精神・神経センター武蔵地区倫理委員会に必要書類を提出し、審査を受け、今後の検体利用を具体化する。また、検体処理に精通するためモデル動物を用いたサンプル処理と蛋白質の網羅的解析技術を構築した。

独自に作成した I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスが既存のパーキンソン病モデル動物に比べ優れた点を多々有している新規モデルであることを見出した意義は大きく、当該モデルマウスを用いてパーキンソン病発症と密接に関連している遺伝子群を約 20 種同定出来た。今後これらの遺伝子産物の機能解析を通して新たな創薬の標的分子を見出す予定である。パーキンソン病では酸化ストレスが発症誘因と考えられているが UCH-L1 機能に関連した酸化蛋白質群が見出された意義は大きい。病態初期からのグリア・ニューロン相互作用が変調を来す可能性も見出しており、パーキンソン病発症の分子カスケードの全容解明を一層めざして研究を展開している

D-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

I：臨床サンプルの収集

当センター病院の内分泌代謝科を中心として、臨床サンプル提供体制を確立するよう、院内関係者と調整した。

II：LC-MS を用いたプロテオーム解析

当センター研究所 代謝疾患研究部にて、臨床サンプルを用いた前処理、二次元電気泳動及び液体クロマトグラフィーによるたんぱく質の分離、LC-MS を用いたたんぱく質の同定の予備検討を行った。また、翻訳後修飾を受けたたんぱく質を精製するために、抗リン酸化たんぱく質抗体をコンジュゲートしたビーズ等を用いたアフィニティー・クロマトグラフィーによる基礎検討を行った。

III：Protein Chip

糖尿病患者由来サンプル中の低分子量たんぱく質及びペプチドを解析するために、当センター研究所 代謝疾患研究部の Protein Chip を用いて健常人

の血清・尿のプロファイリングのレファランス作りを行い、採取及び保存条件の違いを検討した。

以上のⅠからⅢより、プロテオーム・ファクトリーのプロジェクトの第1年度として、プロテオーム・ファクトリー研究施設での糖尿病関連たんぱく質のデータベース構築のための臨床サンプル収集の準備、当センターでの合併症及び動脈硬化性疾患のバイオマーカー同定のための予備検討を行った。次年度はプロテオーム・ファクトリー研究施設での血清、尿の採取法及び輸送法が確立し次第、倫理委員会での審査・承認を受けた上で、糖尿病患者、健常者のサンプルの収集及び発送を開始する。また、合併症及び動脈硬化性疾患のバイオマーカー同定のプロジェクトについては、まず健常者ボランティアにて翻訳後修飾を受けたたんぱく質の同定を試み、その目的に最適な前処理法の検討を行う。また、同定されたたんぱく質について修飾部位の同定、糖鎖の構造解析を含めた詳細な解析を行うために、プロテオーム・ファクトリー研究施設の hybrid MS 等を用いた予備検討を行う。

今後の課題としては、in vivo でのインスリンの主要な標的臓器である肝臓、骨格筋、脂肪組織の採取及び解析が挙げられるが、これらの臓器は治療行為により採取することが困難であり、さらに採取時の被検者の状態によってたんぱく質のプロファイルが大きく変化する可能性がある。このため、これらの臓器からのサンプルの解析は、前処理法が確立した上で採取法を含めて慎重に検討していく。

D-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

プロテオームを解析するプロテオミックスの方法は、細胞機能を演出するたんぱく質の大規模な動態研究に適しており、その適応範囲は生命科学を基盤とする能率や環境科学などを含めて多岐にわたる。しかしながら、現在最も注目されているのは、高度

医療技術、とりわけ臨床医学や創薬への応用である。創薬は、多彩な学問領域から提供される複合的な知識と技術が求められる知識集約的な産業であるが、ゲノム科学とりわけプロテオミックスは、疾患メカニズムの解明、創薬ターゲットの同定、臨床所見に依存しない医薬品の薬効や副作用評価など、基礎から臨床まで幅広い適応範囲を有する。多くの薬物の直接的な標的となるたんぱく質を解析の対象とするプロテオミックスは、先駆医療とりわけ「メカニズムに基づく合理的な創薬」を加速するテクノロジーとして期待される。現在知られているヒトの一生で疾患の原因となる遺伝子の第一位はほとんどが酵素遺伝子であるが、現在用いられている薬物の標的は受容体が約半数を占めている。このことは、酵素が代謝の恒常性維持に重要であるという事実とともに解析可能な疾患や開発可能な医薬品の種類や増加が医薬品の標的となる分子の探索や評価のためのテクノロジーの発展に依存していることを示しているものと考えられる。従って疾患の原因を調査し、薬物をスクリーニングするための新しいテクノロジーが開発されれば、従来とは異なる遺伝子やたんぱく質を標的とする新しい医薬品が生み出される可能性がある。複数の遺伝的因子と環境因子の複雑な相互作用によって生じる生活習慣病などの疾患原因の解明にはゲノミックスからの情報とともに病理組織などでの現場検証、すなわちプロテオミックスからの情報が必要不可欠である。プロテオミックスはがんをはじめとする様々な疾患のマーカーの探索や病院の解明、創薬に向けた研究に応用されているが、本研究課題では、小児の免疫アレルギー疾患の解明に、患者由来の組織・血清・尿を用いて発現プロテオミックスの研究に取り組む。

本年度は、免疫アレルギー疾患の代表例である喘息・慢性腎炎・ネフローゼ症候群について原因遺伝子だけではなくその遺伝子により作られるたんぱく質の動態や他の生体分子との相互作用、さらにはこれに関連する細胞全体の機能情報ネットワークの解析情報について文献的考察を行い、患者の調査を

行った。成育医療センターにおいて対象となる患者の数は、一年間あたり喘息50～100例、腎疾患100～200例が見込まれ、これらの疾患においてはプロテオーム解析により病態関連因子および薬物標的因子の解明が可能となることが考えられた。

免疫アレルギー疾患に関する研究のみならず、様々な疾患・生体システムにおける遺伝子発現や形態変化から生物機能を解明しようとする研究には、プロテオーム解析の技術はcDNAマイクロアレイなどのトランスクリプトーム解析の技術とともに非常に有効となる。しかしながら、たんぱく質の解析には当然ながらDNAに対するPCRのような増幅手段は使えず、さらに、疾患関連分子は、一般に細胞内発現が少なく修飾や変動が激しいものが多い。従って、現状においても病態に関連する非常に微量なたんぱく質の検出や同定などに関しては技術的に諦めざるおえない場面にしばしば遭遇する。しかし、質量分析機器(MALDI-TOF MS, LC-ESI MS/MS)とその周辺機器(蛋白分離・検出・抽出処理装置やHPLCやデータ解析ソフトなど)を中心にたんぱく質の分析感度・分離能は格段に進歩し、さらにより高い感度と分離能と解析速度をもつたんぱく質構造解析技術開発も世界中で盛んに行われている。また、これらの解析結果をもとに、出来るだけ多くのその分子に関連する情報が短時間で得られるようなバイオインフォマティクスも世界中で開発されてきている。このことは、プロテオミクス解析の将来的な可能性に対する世界中の研究者の期待の現れであると考えられる。ゲノム解析におけるPCRやcDNAマイクロアレイなどに匹敵するような生体蛋白質の翻訳後修飾を含むたんぱく質構造と機能の解析システムが今後どこまで高度に構築できるか更にはゲノム科学・たんぱく質科学・医学・情報科学・細胞生物学・医薬化学等の相互作用による効果的な共同体が如何に形成されるかが今後の治療と予防を目指した疾患研究におけるプロテオーム解析の課題となると考えられる。

D-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

サンプル提供予定数が確定した。当院より、痴呆患者髄液70～100人分、血液200～300人分、骨粗鬆症患者の尿および血清200～300人分を毎年提供することが可能と思われる。さらに痴呆疾患については全国の共同研究者から500ペア(患者と対照)の血清を1～2年で集める予定。また、長期縦断疫学研究で採取した主に健常者の血清2,000検体を提供する用意がある。痴呆疾患および骨粗鬆症等の加齢性疾患に係わるプロテオミクス研究を実施したいと考える。アルツハイマー病についての、髄液たんぱく質を解析し、疾患特異的マーカーを探索中。骨粗鬆症については尿中物質を探索中である。

加齢関連疾患のたんぱく質解析には病院と研究所の連携が不可欠である。

D-9： がん関連たんぱく質解析に関する研究

得られた組織を病理医が迅速にマクロ診断を行い、ミクロ診断に供す組織と研究に供す組織を切り出し、写真撮影後、研究用の資料を急速凍結する部屋および設備を作成した。手術場に隣接した部屋の改装、写真撮影装置の設置、切り出し台の設置を行った。次年度の半ばで全て完成予定である。

がん組織の網羅的蛋白解析を行う場合、染色体転座などについても検討しておかなければ、同一のがんであっても当然出来てくる蛋白に差異が生じる可能性がある。従って、手術後サンプルを培養に供し、転座などを確認するシステムの必要性も考慮しなければならない。また、保存チューブや保存の方法などは、今後目的に応じて検討しなければならない。また、がんの場合は、手術時の臨床情報を電子媒体に入力できるシステムが必要で、今後の問題として残される。

D-10： 疾患関連蛋白質解析のための質量分析法の確

立

- I : 質量分析の直前に逆相樹脂担体を充填したカラム ($\Phi 0.3 \times 1\text{mm}$) に試料を保持させ、0.2% 酢酸、5% アセトニトリルを含む水溶液で脱塩、洗浄の後、0.2% 酢酸、80% アセトニトリル水溶液 (流速 200~300nL/min) で樹脂に吸着したペプチドを溶出し、直接 ESI イオン源へ導入した。1mM の Tris-HCl 緩衝液を含む蛋白質のトリプシン消化物 (100fmol/ μL) をそのまま ESI-MS により測定すると Tris-HCl のクラスターイオンのみが観測され、ペプチド由来のシグナルは得られなかった。同じ試料溶液を用いて上記方法により脱塩、濃縮を行った後のスペクトル(3分間積算し、約 1 μl の試料溶液を消費) では、Tris-HCl は除かれ、トリプシンペプチド由来の多価イオンシグナルのみが観測された。さらに、シグナル/ノイズ比が大幅に向上することで、サブピコモルレベルのペプチドに対して MS/MS 測定が可能となった。
- II : 血漿、尿から効率的にペプチドを抽出する方法について検討した。血漿では逆相担体による濃縮、ゲルろ過を、尿ではイオン交換あるいは透析後、逆相担体による濃縮、ゲルろ過による分画 (ペプチド、たんぱく質画分) を順次行い、最終的に逆相ナノ LC により分離、分画する方法を確立した。分離したペプチドを直接 MS 用試料プレートに直接プロットし、引き続き MALDI-MS/MS による自動測定とペプチドの同定をハイスループットで行える一連の方法を確立し、尿由来のペプチドに応用した。その際、尿ペプチドの日内、日間変動等を調べた。
- III : ナノ ESI 法においてサブピコモル量の微量ペプチドのミリマス測定 (MS/MS) を可能にする新規方法を考案した。これにより、MS/MS において帰属できない断片イオンや翻訳後

修飾の帰属が容易に行えるものと思われる。

- IV : ペプチドの MS 及び MS/MS スペクトルとデータベース検索等で得られた候補配列や理論値を照合するソフトウェアの試作を行った。
- V : 微量蛋白質をハイスループットで同定する目的で、多検体試料気相化学反応装置によるエドマン分解と MS による方法について検討した。気相化学反応装置では、気相で試薬と反応を行うので試料の汚染やロスがなく、また、MALDI-MS 用の試料プレート上に塗布した多数 (~900 検体) の異なる試料に対して複数の化学反応を連続して行うことができる。この装置を用いて、複数の蛋白質消化物に対して、エドマン分解を 1~3 サイクル行った。反応産物の MALDI-MS では、分子量情報の他に、N 末端 1~3 残基のアミノ酸配列が得られた。これらの情報を合わせてデータベース検索に供することにより、蛋白質の同定確度は飛躍的に向上した。また、エドマン分解反応条件を最適化することで、サブピコモルレベルの蛋白質に対して MALDI-MS により同定することが可能となった。

以上、微量試料前処理、及び、分離法の開発については、尿や血漿など様々な共雑物を含む生体試料から直接簡単にペプチドや蛋白質を分画できるようになったが、安定性や微量成分の検出についてはまだ評価できていない。また、MS/MS による同定ではサブピコモルレベルの蛋白質・ペプチドに対して行うことが可能であったが、実際の同定に必要な最低量 (尿や血漿) も調べる必要がある。量的変動解析を行う方法について種々検討したが、微量試料の場合は、2つの比較したい試料間で、吸着や酵素などによる処理に微妙な差が生じるために再現性はまだ得られていない。

ペプチド混合物のエドマン分解反応後の MS スペクトルは一般に複雑になるので、エドマン分解

/MALDI-MS をもとに個々のペプチドから効率よくアミノ末端配列情報を抽出し、配列データベースに対し検索できるソフトウェアの開発が必要と考えられ、現在その試作を行っている。

質量スペクトルのデータベースへの収納については、個々の質量分析計付属のデータ解析ソフトウェアに依存するところが大きく、今後の課題と考えられる。一方、解析結果の収納については、ペプチドと蛋白質の場合では収納法が大きく異なり、発見的データベース構築にはそれぞれに対し最適の方法を確立しておく必要がある。

D-11: がんに対するテ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

手術以外に適切な治療法がなく、従って予後が悪い肺がん患者について免疫療法を施行している。免疫活性化には BCG の成分など人体に無害で、かつヒト樹状細胞などに対する自然免疫活性化物質を用いている。これらは機能的にはヒト Toll-like receptors (TLRs) のリガンドである。この免疫療法で現在 600 人の肺がん患者 (約 60%) が生存中である。TLR 刺激後の樹状細胞には TLR 分子複合体が形成され、強力な活性化が起きる。この複合体を抽出してプロテオーム解析すればがんにも有効な免疫活性化の基盤が明らかになるはずである。TLR 刺激のアウトプットは genechip などで推定がついており、分子間反応の構築を類推できる。また、免疫沈降法につかえる抗体などは当研究室で独自に開発したものをを用いており、すでに 60 余の TLR 結合蛋白質が 2 次元電気泳動などで確認できている。これらを LC-MS で同定していく。

マウス組織およびヒトがん細胞ともに発現しているたんぱく質を 500-1000 程度同定することができた。またアセチル化などの翻訳後修飾されているペプチドに関しても同定可能であった。

本結果は宿主側の抗がん環境を分子レベルで規定する一助となり、がん細胞側の要因と相まって、

より適切なオーダーメイド治療をがん患者の適応に応じて用意するために重要な基礎データとなる。

D-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: 解析ワークフロー (全体像) の設定

創薬ターゲットの探索を目的として、疾患関連蛋白質の患者と健常人との優位な差を見出すためには、臨床情報と連結可能な多数の検体を、一括管理し、共通のプロトコールで集中的に解析することが重要である。そこで、疾患毎に、100 名以上の健常人・患者検体 (組織+体液) を解析可能にする解析ワークフロー (Fig. 36) を設定した。基本的には、手術時に得られた組織は、同位体標識 (ICAT) 法を用いてターゲット探索用に (nanoHPLC、ABI-4700 および Q-STAR-XL で解析)、手術前後で採取された体液 (血清、尿等) は SELDI-TOF 法を用いてマーカー探索用に使用する (Fig. 37)。なお、この場合、必要に応じて、アジレントイムノカラム処理などの適切な前処理を行う。2DPAGE 法 (Ettan DIGE system) は、主として予試験用あるいは確認用に用いる。また、mRNA 発現解析では解析不可能な翻訳後修飾部位解析、蛋白質複合体解析等の精査解析には、専用の高性能質量分析機を用意した。さらに、試料採取、臨床情報、匿名化、試料・機器管理 (LIMS)、前処理法、分離法、質量分析、大量蛋白同定、創薬ターゲット探索用データ解析までを連結可能にする統合型バイオインフォマティクス系も構築した (Fig. 38)。

II: Cleavable ICAT 法の確立

組織に多量に存在する house keeping gene protein を除き、疾患に関連がある low abundant protein を効果的に解析するため、¹³C、¹²C cleavable ICAT 試薬 (ビオチンタグがあり Cysteine 残基に反応) で正常・患者組織を分別標識し、その後、トリプシン