

Fig. 36 解析ワークフロー：全体像

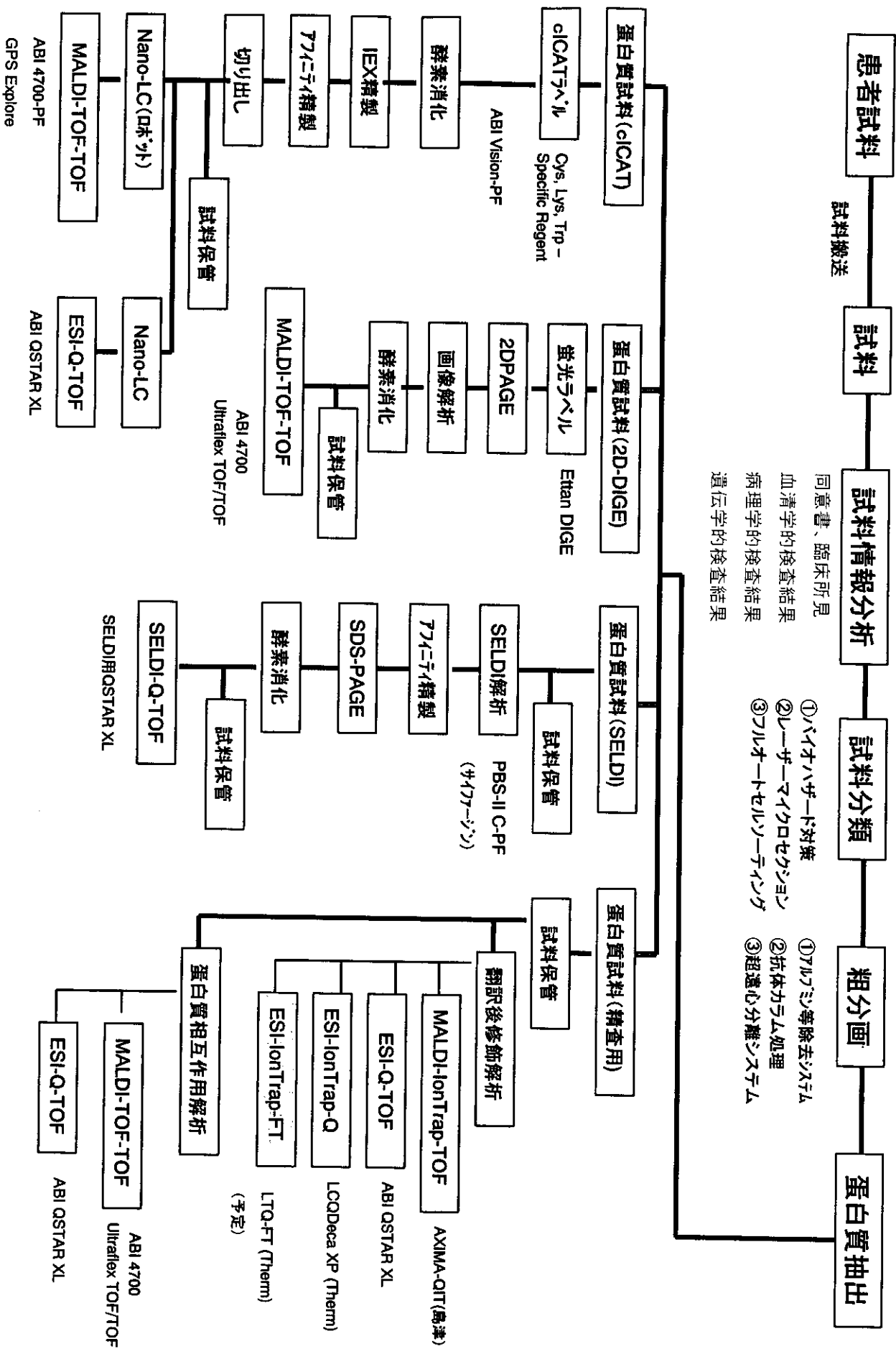
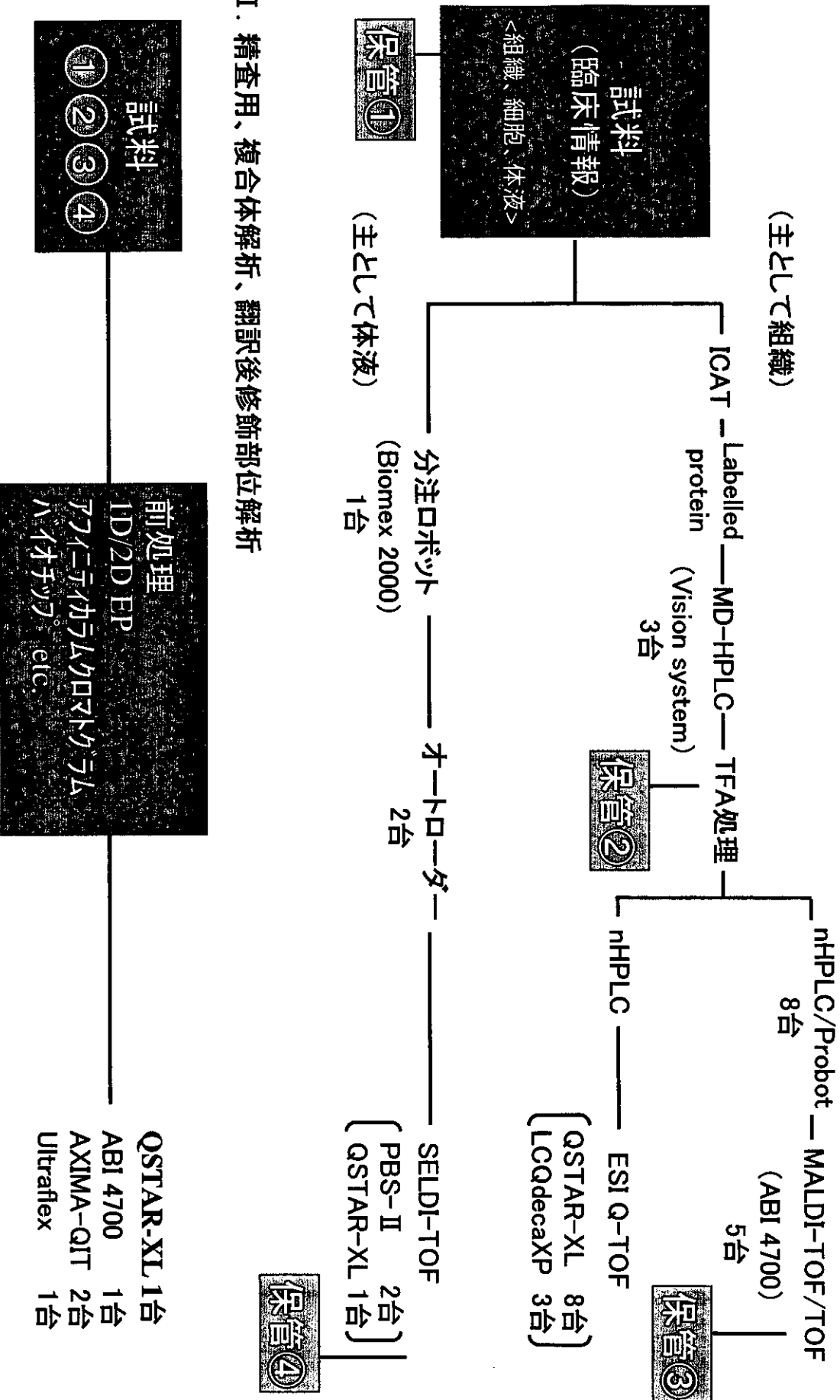


Fig. 37 創薬プロテオームファクトリーワークフロー

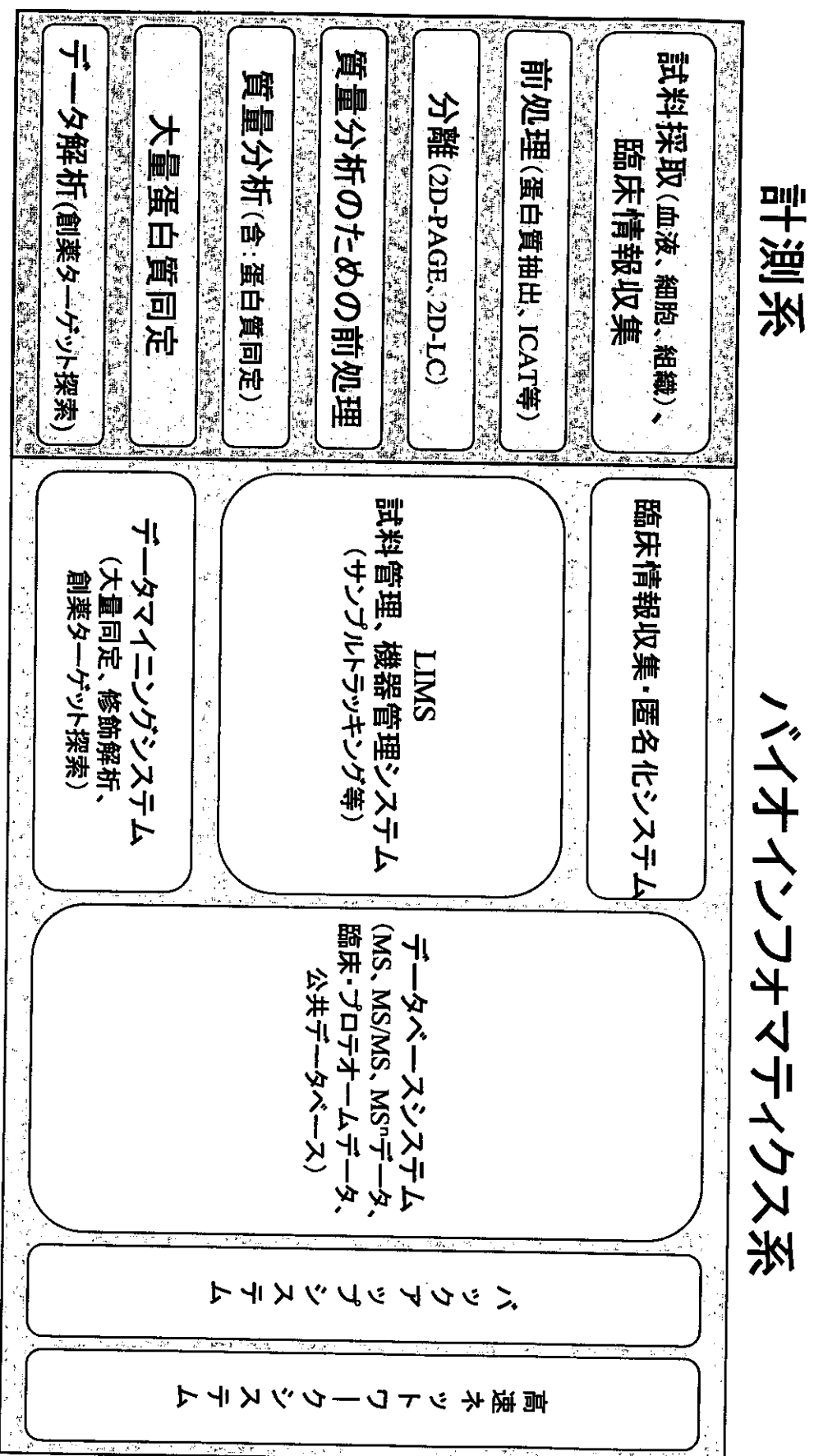
I. データベース構築



II. 精査用、複合体解析、翻訳後修飾部位解析

Fig. 38

プロテオームファクトリーにおける バイオインフォマティクス構成図



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

分担研究者：早川堯夫（国立医薬品食品衛生研究所副所長）

研究要旨 疾患関連タンパク質解析技術として、1) 2次元液体クロマトグラフィーによるタンパク質の精細分離、及び ICAT 法を利用したタンパク質発現解析システムの構築、2) 蛍光標識2次元ディファレンシャル電気泳動装置とマイクロアレイを組み合わせたタンパク質発現情報、及び遺伝子発現情報比較システムの構築、3) LC/MS, LC/MS/MS, 及び2次元電気泳動法を利用したグライコプロテーム解析技術の開発、並びに、4) 疾患関連タンパク質の機能解析に向けた遺伝子発現制御系の開発を行った。

協力研究者：

鈴木孝昌（国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部）

配島由二（国立医薬品食品衛生研究所療品部）

高橋芳樹（国立医薬品食品衛生研究所療品部）

川崎ナナ（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

原園 景（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

橋井則貴（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

伊藤さつき（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

水口裕之（国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部）

を細胞系や生体内で発現させて、実際に疾病等に関連していることを示す実証的解析が必要である。

しかし、タンパク質の発現解析については、DNA マイクロアレイに匹敵するようなハイスループットな解析法が確立されていないのが現状であり、現在、最も一般的に用いられている2次元電気泳動(2D-GE)による解析法においても、解析できるタンパク質量に制限があること、発現量の少ないタンパク質、塩基性タンパク質、及び脂溶性の高いタンパク質等の解析が困難であること、並びにゲルからのタンパク質及び消化したペプチドの回収効率が低いこと等、解決しなければならない多くの問題が存在している。

また、リン酸化、アセチル化、及び糖鎖付加等に代表される翻訳後修飾は、タンパク質の機能調節等に不可欠であることが知られており、中でも細胞認識や細胞接着等に関与している糖鎖は、癌や自己免疫疾患等、様々な疾患と密接な関連があ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、すなわち、タンパク質発現解析とタンパク質同定に焦点を当てた方法では、糖タンパク質や糖鎖部分が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。

我々は、疾患等によって変動するタンパク質の探

A. 研究目的

創薬の標的となる可能性がある生体分子の候補を探索するためには、1) 疾患毎に、患者と健常人との間でタンパク質発現の差異が明確にされ、かつタンパク質の発現に関する情報が蓄積されること、2) DNA マイクロアレイ解析により得られる遺伝子の発現情報とタンパク質の発現情報とを比較することで、両者の発現情報の相関性あるいは相違性を明らかにすること、3) 遺伝子の発現情報やゲノム情報からでは得られないタンパク質の翻訳後修飾について詳細に解析し、翻訳後修飾に関する情報を蓄積することが重要である。そしてさらには、4) 検索分子

索と同定, 同定されたタンパク質の情報と遺伝子情報との対比, 及び翻訳後修飾, 特に糖鎖に関する解析を含む疾患関連プロテオーム解析技術を確立するために, 以下の研究を行った.

- I. タンパク質発現解析システムの構築
- II. タンパク質発現情報と遺伝子発現情報比較システムの構築
- III. グライコプロテーム解析技術の開発
- IV. 疾患関連タンパク質の機能解析に向けた遺伝子発現制御系の開発

B. 研究方法

(I) タンパク質発現解析のためのシステム構築

(1) 2D-LC を利用したタンパク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(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.

細胞溶解液上清のタンパク含量を測定し, 5mg タンパク質に相当する量に 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 2D HPCF クロマトフォーカシング

カラム (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. MiliQ 水

フラクション分取: 96 ヶ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.

(2) LC-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, タンパク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) タンパク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 (BIROBOT 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タンパク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

α -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 μ l 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) 糖タンパク質の還元カルボキシ化

糖タンパク質サンプル (AFP および CP) 200 μ g またはアルブミン低減ヒト血清 (HS-Alb) 20 μ l 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 μ l に溶解した。2-メルカプトエタノール 4 μ l 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 μ l 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タンパク質のトリプシン消化

還元カルボキシメチル化した糖タンパク質 (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 (200 μ l) に溶かした。試料溶液 100 μ l をとり、1 μ g/ μ l の修飾トリプシン溶液を 1 μ l 加え、37°C で、糖タンパク質サンプルは 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。

5) CHO および CHOIII 細胞膜タンパク質画分の抽出

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% CO₂), 両細胞から (5~6×10⁷ 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 µg, CHOIII 細胞膜画分;230 µg). 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タンパク質の脱塩, 精製を行った.

6) CHO 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 グアニジウム塩酸塩, 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 µl 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 µl 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タンパク質を除去した後, 上清を濃縮, 凍結乾燥した. 得られた糖鎖は 0.5 M 水素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) 可溶性膜タンパク質画分の調製

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), 可溶性膜タンパク質画分を得た. 可溶性膜タンパク質画分は, 2D-GE を用いて分離した.

9) CHO 細胞膜画分の 2D-GE

・ 1 次元目等電点電気泳動 (IEF: isoelectric focusing)
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. 200µg のサンプルをゲル膨潤用バッファー (250µl, 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).

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

(50µA/strip)

・ 2 次元目電気泳動

1 次元目電気泳動終了後, タンパク質チオール残基を 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 がタンパク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, Nacal 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-E₄, 2µg/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) 可溶性膜タンパク質の 2D-GE

ラット脳の可溶性膜タンパク質（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 μ l 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, 可溶性膜タンパク質を取り込ませた (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 \times 160 \times 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. 分離されたタンパク質は, Simply Blue SafeStain を用いて検出した.

13) 糖タンパク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 μ l 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 μ l 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) 糖タンパク質のゲル内消化

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 μ g/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 μ l 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 μ l 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 μ 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 μ 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.

16) HepG2 由来タンパク質の Cy 標識

HepG2 及び *N*-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) をトランスフェクトした HepG2 (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% CO₂), 両細胞 (5×10⁶個/dish) から膜面分抽出キット (Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit, PIERCE Biotechnology) を用いて膜面分を抽出した. 得られた膜面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. またタンパク定量は 2-D Quant kit (Amersham biosciences) でプロトコールに従い行った.

両膜面分は 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従いラベル化した. 各標識試薬は無水ジメチルホルムアミド (DMF) で 400 pmol/μl に希釈し, 50 μg のタンパク質に対して 400 pmol を使用した. サンプル溶液 (50 μl) に標識試薬 1μl を加えて混和後, 氷上暗所で 30 分間インキュベートした. 反応は 10 mM リジン 1 μl 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に示した (Table 1).

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

17) 2D-DIGE

・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 μl/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 2).

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

(50μA/strip)

・2次元目電気泳動

1次元目電気泳動終了後, タンパク質チオール残基を carboxyamidomethyl 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.

・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 100 μl (500 μg) 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。

18) LC/MS/MS によるペプチド/糖ペプチドマッピング

糖タンパク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% 酢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 µg (タンパク量換算)
CP	0.2 µg (m/z 400-2000)
	1.0 µg (m/z 1000-2000) (タンパク量換算)
HS-Alb	0.01 µl (試料血清換算)

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)

カラム : MAGIC C18

(Michrom BioResource 社製, 0.2×50 mm, 3µ)

溶離液 A : 0.1% 酢酸を含む 2% アセトニトリル水溶液

溶離液 B : 0.1% 酢酸を含む 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 µl/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。

19) LC/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 µl/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

20) LC/MS/MS によるタンパク質の同定

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% 酢酸を含む 2% アセトニトリル水溶液

溶離液 B：0.1% 酢酸を含む 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 μl/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)

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) 疾患関連タンパク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, SwaI, P1-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 (Fig. 27)。

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 rITTA 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 MgCl₂, 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 1×10^4 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 1×10^9 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。

C. 研究結果

D. 考察

(I) タンパク質発現解析システムの構築

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, 解析できるタンパク質はある程度制限される。また, 一度にアプライできるタンパク量が制限されるため, どうしても発現量の少ないタンパク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タンパク質にある場合が多いとされる。さらに, 塩基性タンパクや脂溶性の高いタンパクに関しては, 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, ゲルからのタンパク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。このよう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, 実際に重要なタンパク質がこうした解析により検出された報告も多い。

そこで, 我々は分離能, 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, タンパク質としての分離を 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タンパクを 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。

1) 2D-LC を利用したタンパク質の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、pH4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0.4pH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1M 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穴ディーブウエルプレート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タンパク質を合計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個のタンパク質を同定できれば、全体で1万個以上のタンパク質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。実在するタンパク質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、タンパクの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フォーマンスしか持たない。しかし、存在するタンパク質量は多いことや、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)のシステムに使用されているように、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型質量分析装置でタンパク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)。

2) LC-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)。細胞や組織破碎液など複雑な生体成分中に存在する大量のタンパク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ともに、疎水性などの性状の近いタンパクを扱うことにより、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ニングする (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) タンパク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タンパク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タンパク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、タンパク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。したがって、疾患関連タンパク質の発現に加え、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、数千のタンパク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)。疾患関連タンパク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タンパク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タンパク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、マイクロタイター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タンパク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、タンパク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 マイクロアレイ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、疾患と関連するタンパク質や mRNA の発現量の変化、あるいはタンパク質

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

細胞発現タンパク質の約50%は糖タンパク質であり、糖鎖部分は細胞認識や接着等細胞間の相互作用や、様々なタンパク質の機能調節に携わっていることが知られている。また、糖タンパク質の発現、及び結合糖鎖の構造や不均一性は、癌や自己免疫疾患等様々な疾病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、糖タンパク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タンパク質発現解析、及びMSとデータベース検索によるタンパク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タンパク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、糖タンパク質の解析は取り残されているのが現状である。糖タンパク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。

糖タンパク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。糖タンパク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。

我々は、これまで、LC/MSを用いた糖タンパク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、様々な糖タンパク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、疾患組織と健常組織における糖タンパク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タンパク質を見つけ出し、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出来るものと期待される。

本項では、糖タンパク質(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タンパク質糖鎖差異解析
- 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タンパク質の糖鎖解析

(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、タンパク質の消化物を直接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タンパク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、糖タンパク質の同定及び糖鎖解析には利用することができず、糖タンパク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。我々は、将来的に

2D-LC/MS/MS を用いたプロテーム解析において、糖タンパク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。そこで今回我々は、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タンパク質 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タンパク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タンパク質の解析を行った。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) 血清中の糖タンパク質解析への応用

LC/MS/MS によって、糖タンパク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、これを血清糖タンパク質の解析に応用した。血清 20 μ l 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、これを血清タンパク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、発現タンパク質の消化物を 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タンパク質の発現解析、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タンパク質糖鎖差異解析

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。我々は、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、細胞発現タンパク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タンパク質の糖鎖の差異解析と 2D-GE を用いた目的糖鎖を有するタンパク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、細胞接着や癌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 PNGase 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. 17(A)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 細胞の膜タンパク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. 17(B)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、可溶性タンパク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タンパク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 を用いた糖タンパク質の同定

つぎに、プロテオミクスの手法を用いて bisecting GlcNAc が付加したタンパク質の同定を行った。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 で全タンパク質を染色した結果(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、糖タンパク質に特徴的な train 状のスポットが複数組検出され、一部のタンパク質の糖鎖に bisecting GlcNAc が付加されていることが確認された。

3) Bisected 糖鎖発現糖タンパク質の同定

① Bisected 糖鎖発現糖タンパク質の粗分画

Fig. 20(A)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 によるタンパク質同定において、信頼性の高い結果を得るためには約 1~2 µg 程度のタンパク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タンパク質の場合、タンパク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 で粗分画を行ったから、再度 2D-GE を行うことを検討した。Fig. 21(A)-(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、複数のタンパク質に 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、ゲルからタンパク質を抽出後、濃縮して再度 2D-GE を行った。

② 糖タンパク質の同定

バンド A を 2D-GE で展開し、SYPRO Orange で染色した図を Fig. 21(B)に示した。約 100 kDa 付近に糖タンパク質特有の 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. 21(C))。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. 21(D)), 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. 21 (E))。

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 型膜糖タンパク質で、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、また肝癌細胞における GnT-III の活性上昇は癌性変化の一つとして考えられていることから、細胞の癌化とインテグリン $\alpha 3$ 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 糖鎖含有タンパク質については、タンパク質含有量が不十分であること、また、夾雑タンパク質が多いことから同定困難であった。

プロテオミクスの手法により 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