

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

分担研究者 寒川賢治 国立循環器病センター研究所 部長

グレリンは3番目のSer残基が脂肪酸でアシル化修飾されることにより、初めて生理活性を有するが、その生合成機序や組織および血液中において存在する分子型の詳細については明らかになっていなかった。今回、グレリンに特異的な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。その結果、胃組織中には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。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decanoyl ghrelin(C10:0)、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、また、非活性型であるdes-acyl ghrelinおよびdes-acyl ghrelin[1-27]が存在し、さらにこれらの分子が血漿中にも存在することが明らかになった。

A. 研究目的

成長ホルモン(GH)は下垂体から分泌され、成長や代謝調節、また老化の進展などに深く関与するホルモンである。GH分泌低下はヒトにおいて、筋肉、骨量の低下、内臓脂肪蓄積型肥満、脂肪肝などをもたらす、高齢者のQOLを悪化させる。我々は1999年に、オーファン受容体であった成長ホルモン(GH)分泌促進因子受容体(Growth Hormone Secretagogue Receptor: GHS-R、グレリン受容体)の内因性リガンドとして、グレリンと名付けた新規ペプチドをラットおよびヒトの胃から発見した。グレリンは、脂肪酸で修飾された28残基のアミノ酸からなる生理活性ペプチドであるが、この脂肪酸修飾が活性発現に必須であるというこれまでにないユニーク構造である。グレリンは、強力なGH分泌促進作用を有するが、GH分泌以外にも摂食、エネルギー代謝、循環器系などにおいて多様な生体機能の調節に重要であることが明らかになっている。グレリンは主に胃から分泌されるが、その産生細胞は胃における主要な内分泌細胞であるにもかかわらず、それまで役割が不明であったX/A

様細胞と呼ばれていた細胞であることが明らかになっている。また、グレリンは小腸や膵臓でも胃に比べると低レベルながら産生され、さらに脳内では視床下部の弓状核において少数の神経細胞で産生される。

グレリンは3番目のSer(Ser 3)残基の側鎖が脂肪酸でアシル化修飾されることにより、初めて生理活性を有するが、その生合成機序や組織および血液中において存在する分子型の詳細については明らかになっていない。グレリンの発現、生合成、分泌調節機序を明らかにし、また、生体内で機能するグレリンの分子型の同定は、循環器系やエネルギー代謝系におけるグレリンの新しい機能および病態生理的意義の解明につながり、さらには創薬や臨床応用への基盤となる。

本研究では、疾患関連たんぱく質解析研究において、グレリンの構造と機能および疾患との関連解明の一環として、胃組織および血漿中に存在するグレリンの多様な分子型の同定を行った。

B. 研究方法

1) グレリンの測定：我々が開発した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 (Gln13-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。

2) グレリンの活性測定：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 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。

3) 検体：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。

4) 抽出および精製：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。

5) 構造解析：精製したペプチドの構造は、プロテインシーケンサーおよびマス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)

本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。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

ヒト胃および血漿中には、活性型のオクタノイル化されたグレリンおよび非活性型である des-acyl ghrelin 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 末端部や脂肪酸修飾の異なる分子型が多種類存在することが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem*, 278: 64- 70, 2003.
- ②Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Moriyama S, Takahashi A, Kawauchi H, Kangawa K. Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology*, 144: 5215- 5226, 2003.
- ③Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley LG, Hirano T, Grau EG, Kangawa K. Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 135: 421- 429, 2003.
- ④Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley LG, Hirano T, Grau EG, Kangawa K. Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J Endocrinol*, 176: 415- 423, 2003.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究協力者

細田洋司 (京都大学医学部)
清水重臣 (大阪大学医学部)
海谷啓之 (国立循環器病センター研究所)

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）
分担研究報告書

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）

分担研究者 南野直人 国立循環器病センター研究所 部長

高血圧症や心循環器系疾患に関連するたんぱく質を網羅的に解析し、疾患マーカーや創薬標的たんぱく質を発見するためには、より高感度、高精度で再現性の優れた分離、検出システムの構築が不可欠である。従来の2次元電気泳動法に代わるより優れた分離、検出システムとして、酵素消化後のペプチドについて網羅的解析を行ういわゆるショットガン解析法について検討を行い、実際に使用、解析可能なシステムを構築することができた。組織内に存在するペプチドについてこの方法を適用したところ、高感度に多数のペプチドの検出、構造解析が可能であることを明らかにした。更に、分離システムを自由に変更できる装置についてもほぼ作成することができた。これらの装置やシステムは、今後の疾患関連たんぱく質の網羅的解析に極めて有用であると考えられる。

A. 研究目的

ゲノム DNA 配列の完全決定とデータベース化の完了に伴い、生体内で実際に機能を発揮するたんぱく質のファクトデータベース構築の必要性、重要性が強調されている。これは、各種たんぱく質の生体内での存在様式、存在量や機能などに関する情報を収集・蓄積することにより、その異常による疾患の発症や病態の解析、疾患マーカーの発見や高感度・高精度化、創薬の標的となるたんぱく質の発見、各種産業に有用なたんぱく質の発見などが可能となると期待されるからである。プロテオームと呼ばれるたんぱく質全体の解析法やファクトデータベースの定義、収録情報や範囲、構築方法などについては未だ国際的にも議論がまとまっていないが、その第一歩として存在するたんぱく質の同定、量的測定、修飾構造を含めた詳細な構造解析と機能解析が必要であることは論を待たない。本研究ではヒト組織、血液、細胞など試料を用いて高血圧、心循環器系疾患を中心とした各種疾患に関連するたんぱく質を網羅的に解析し上記目的に必要な情報を収集するために、必要とされる解析方法（プロファイリング法）の確立、解析法の高感度・高精度化法、効率的な

たんぱく質の同定法や量的評価法、再現性の高く多検体処理可能なシステムなどについて研究、開発を行う。更にその方法論、装置、データ収集システムなどを用いて、高血圧、心循環器系疾患などに関連する有用なたんぱく質の発見を目指す。

本年度の研究では、基本となるたんぱく質の効率的同定法の確立を目指して、最近注目されつつある「ショットガン法」による解析について検討を行った。この方法は、従来の抽出方法では可溶化が困難なたんぱく質、2次元電気泳動法では分離が困難なたんぱく質、微量なたんぱく質などをも解析可能とするため、たんぱく質を還元アルキル化後に徹底的に消化して比較的均一な性質を取るペプチドとした後に、2次元高速液体クロマトグラフィー(2-dimensional high performance liquid chromatography, 2D-HPLC)で分離し、質量分析計にて網羅的に解析を行い、たんぱく質情報の収集を行う方法である。

B. 研究方法

1) 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。

2) 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。

3) 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(BSI-TOF、JEOL 社製)でペプチドの検出と大

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)

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。

C. 研究結果

モデル系として使用したブタ脳由来のペプチドの調製法やその性質、内容の詳細については発表論文1に記載しており、本報告において詳細は省略する。消化物にほぼ相当する分子量 3,000 以下のペプチドについて検討を行った結果、非常の多種類で量的にも極めて大きな違いのあるペプチド混合物であることを確認している。

今年度の研究で構築したステップ2次元HPLCシステムの全体像と収集される情報の概念を図1にまとめた。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 μ l/min、2次元目を0.3 x 150 mmのカラムで流速4 μ l/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

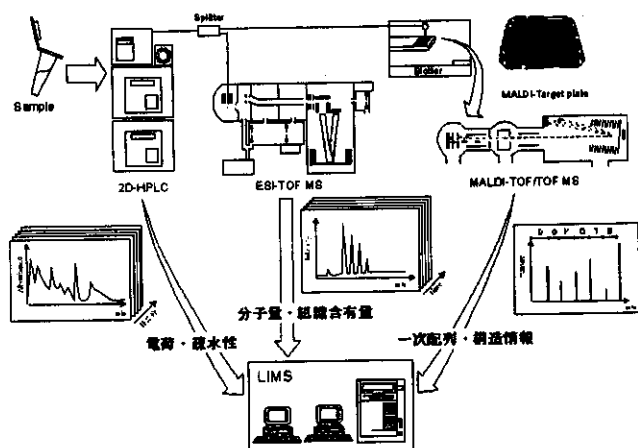


図1. 2D-HPLCシステムの概要と収集情報

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200[μ g(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-TOP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。

D. 考察

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あると考えられた。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るが、そのまま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。

E. 結論

高分離の2次元HPLCと高感度の質量分析計を組み合わせることにより、ショットガン法によるプロテオーム解析におけるプロファイリング法を作成することができた。使用する質量分析計も考慮した2次元HPLC分離条件の至適化、及び質量分析計で解析する試料濃度の上昇などにより、貴重なヒト試料の解析に適したシステムの構築が可能であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Minamino N, Tanaka J, Kuwahara H, Kihara T, Satomi Y, Matsubae M, Takao T. Determination of endogenous peptides in the porcine brain:

Possible construction of Peptidome, a fact database for endogenous peptides. *J Chromatogr B*, 792: 33-48, 2003.

- ② Kuwahara H, Tanaka-Isoyama J, Kihara T, Matsubae M, Matsui Y, Takao T, Isoyama M, Minamino N. Efficient data acquisition system for Peptidome database. *Peptide Science 2003*, Ed. by Ueki M, The Japan Peptide Society, p.465-466, 2004
- ③ 磯山(田中)純子、桑原大幹、木原孝洋、南野直人：生体内ペプチドのファクトデータベース「ペプチドーム」と蛋白質代謝のメタボローム：炎症と免疫, 11: 657-664, 2003.
- ④ 南野直人：ペプチドーム解析, *ファルマシア*, 39: 1157-1162, 2003.

2. 学会発表

桑原大幹、田中純子、木原孝洋、松八重雅美、高尾敏文、磯山正治、南野直人：ペプチドームデータベースの効率的な構築法について
第40回日本ペプチド討論会(平成15年10月、千葉)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

桑原大幹、松井泰子、磯山-田中純子、木原孝洋、片渕 剛 (国立循環器病センター研究所)

「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」

分担研究者 高坂 新一 国立精神・神経センター神経研究所長

本研究では神経変性疾患(パーキンソン病、若年性痴呆症など)の治療成績向上を行い、またその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、血液、尿酸ブル中の蛋白質のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群を同定し、その臨床的利用を行うことを目標とする。本年度は国立精神・神経センター武蔵病院からの臨床検体の供給体制の整備など連携の基盤を形成した。また、検体処理に精通するためモデル動物を用い、サンプル処理と蛋白質の網羅的解析技術を構築した。さらに、神経変性疾患研究の困難さを克服するためモデル動物の開発を進めた。

A. 研究目的

本研究では、神経変性疾患(パーキンソン病、若年性痴呆症など)の治療成績向上を図り、またその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群の同定とその臨床的活用をめざす。神経変性疾患では蛋白質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられているが、その成立には免疫機序の関与も認められ、また自律神経症状などを認めることも多い。さらに、生活習慣がその発症に影響を与えることは近年の疫学的調査から明らかになってきており、血液、尿などの解析から予防・診断に関して新たな知見が得られるとの期待が高まっている。また、種々の薬剤が神経変性疾患の治療に用いられているが、脳内への効果的な輸送には血中動態並びにその代謝の分子実体の解明が不可避である。したがって本研究のアプローチは薬物治療の向上にも多大に貢献する。本年度は研究が開始された年度でもあり、成果は多大には上がっていないが、血液・尿など臨床検体の円滑的な利用を図るために、倫理的問題の検討を始めた。研究の推進を図るため来年度初頭には倫理委員会での審査・承認を受けるべく準備を整えている。また脳という組織の特殊性から、研

究成果の獲得にはモデル動物の開発と利用が神経変性疾患研究には必須であることから、新規パーキンソン病モデルマウス(I93M UCH-L1 発現マウス)を自家開発するなど周辺分野の基盤整備も行った。

B. 研究方法

(1) 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。

(2) 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)

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。

C. 研究結果

(1) 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、既提供試料と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。

(2) 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。

D. 考察

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、対症療法的高度化だけでなく根本的治療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。

我々は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

E. 結論

本研究事業の円滑な推進を図るための基盤整備を平成15年度においておこなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Michael W. Salter and Inoue, K.: P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 14; 778-83, 2003
- Sasaki, Y., Hoshi, M., Akazawa, C., Nakamura, Y., Tsuzuki, H., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y12 in microglia in rat brain. *Glia* 44: 242-250, 2003
- Hirasawa, T., Wada, H., Kohsaka, S. and Uchino, S.: Inhibition of NMDA receptors induces delayed neuronal maturation and sustained proliferation of progenitor cells during neocortical development. *J. Neurosci. Res.* 74: 676-687, 2003
- Ohsawa, K., Sasaki, Y., Kohsaka, S. and Imai, Y.: Macrophage/Microglia-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J. Neurochem.* 88: 844-856, 2004
- Nishikawa, K., Li, H., Kawamura, R., Osaka, H., Wang, Y.L., Hara, Y., Hirokawa, T., Manago, Y., Amano, T., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.: Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 304, 176-183, 2003
- Osaka, H., Wang, Y.L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y.J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.: Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neurons. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 1945-1958, 2003
- Harada, C., Harada, T., Quah, H.M.A., Maekawa, F., Yoshida, K., Ohno S., Wada, K., Parada, L.F., Tanaka, K.: Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience*, 122, 229-235, 2003.
- Harada, T., Harada, C., Wang, Y.L., Osaka, H., Amanai, K., Tanaka, K., Takizawa, K., Setsuie, R., Sakurai, M., Sato, Y., Noda, M. and Wada, K.: Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury *in vivo*. *Am. J. Pathol.*, 164, 59-64, 2004
- Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J., Lynn, B., Wang, Y.L., Osaka, H., Wada, K. and Butterfield, D.A.: Proteomic Analysis of the Brain Proteins in the Gracile Axonal Dystrophy (gad) Mouse, a Syndrome That Emanates from Dysfunctional Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L-1, Reveals Oxidation of Key Proteins. *J. Neurochem.* (in press)
- Komaki, H., Akanuma, J., Iwata, H., Takahashi, T., Mashima, Y., Nonaka, I. and Goto, Y.: A novel mtDNA C11777A mutation in Leigh syndrome. *Mitochondrion* 2: 293-304, 2003.

2. 学会発表

(国際学会)

Kohsaka, S., Ohsawa, K., Sasaki, Y., Honda, S., Imai, Y. and Inoue, K.: Activation of Microglia by Extracellular ATP through Gi/o-coupled P2Y12 receptor. The 6th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Hong Kong, 2.4-7, 2004.

Wada, K.: Pathophysiological role of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in neurodegeneration. Symposium on the Ubiquitin-proteasome System and Neurological Diseases, 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Niigata, 9.26, 2003

Kaplan, M.P., Wood, M.A., Kurihara, L.J., Wada, K., Sekiguchi, M., Takada, K., Abel, T., A role for ubiquitin C-terminal hydrolase 3 (UCH-L3) in learning and memory, 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, LA, 11.10, 2003.

Goto, Y., H, Mimaki, M., Sudo, A., Akanuma, J., Komaki, H., Nishino, I., Nonaka, I.: Overview of 200 patients. 5th Japanese-French Workshop on Muscular Dystrophies, Tokyo, 6.13, 2003

(国内学会)

大澤圭子、高坂新一: ATP のミクログリアへの多彩な作用 第46回日本神経化学学会大会シンポジウム「神経系における細胞外 ATP 機能の多様性」、新潟、9.24, 2003

高坂新一: ニューロン機能を制御するミクログリア 第76回日本生化学会大会 大会教育セミナー、横浜、10.16, 2003

和田圭司: 精神神経難病の克服と脳の健やかさをめざして、九州大学生体防御医学研究所セミナー、7.11, 2003

和田圭司: 精神神経疾患と生命工学的創薬、国立精神・神経センター神経研究所・早稲田大学大学院理工学研究科合同シンポジウム「システ

ムとしての脳のはたらきを探る」, 10.1, 2003

和田圭司: パーキンソン病と脱ユビキチン化酵素 UCH-L1、慶應ニューロサイエンス研究会、11.22, 2003

後藤雄一: ミトコンドリアびよの治療、第46回日本小児神経学会総会イブニングトーク、5.23, 2003

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
2件 (出願中)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

分担研究者 笹月 健彦 [国立国際医療センター 研究所]

研究要旨

【目的】わが国の主要な疾患の一つである糖尿病について、患者及び健常者由来の臨床サンプルのタンパク質の種類、量、翻訳後修飾の差異を大規模にプロテオーム解析することにより、糖尿病関連タンパク質のデータベースを構築し、新規創薬ターゲット、バイオマーカーの発見に資することとする。

【方法】糖尿病患者及び健常者から臨床サンプルとして血清及び尿を採取して、プロテオーム・ファクトリー研究施設のhybrid MSによって得られたタンパク質のプロファイルについて両群で比較検討する。また、糖尿病に固有な細小血管症、本疾患に頻発する動脈硬化性疾患を合併する患者の臨床サンプルを用いて、これらの合併症とタンパク質の翻訳後修飾の差異の違いについてもLC-MS/MSでの解析にて検討する。

【結果】本年度は当センターでのLC-MS/MS, Protein Chipによるプロテオーム解析による研究体制を整えた。また、当センター病院にて内分泌代謝科の協力により外来及び入院患者からの臨床サンプル収集の体制を整えた。

【考察】糖尿病患者の臨床サンプルを用いて、疾患及びその合併症に関連したタンパク質及び翻訳後修飾のデータベースを作成することは、同定されたタンパク質の機能解析等による新たな創薬ターゲットの発見、糖尿病に固有な合併症及び動脈硬化性疾患の早期診断のバイオマーカーの開発のために有用である。

A. 研究目的

糖尿病は、ライフスタイルの西洋化に伴ってわが国では戦後急増し、今や国民病ともいえるが、心筋梗塞や脳卒中などの大血管障害の基礎疾患としても重要である。また糖尿病性細小血管症を生じて網膜症による失明や腎症による人工透析、糖尿病性壊疽による下肢切断も増加しており、国民健康上大きな問題になっている。代謝性疾患の病態は従来考えられていたよりもはるかに複雑である。これには遺伝子、タンパク質の両面からのアプローチが必要であり、前者については候補遺伝子及び網羅的アプローチの両面からの網羅的解析が進んでいるが、タンパク質の研究の多くは個別の蛋白を扱った物で、培養細胞、実験動物、ヒトでの網羅的解析はその端緒に付いたばかりである。

現在この解明のために、国立国際医療センター、東京女子医大、国立健康・栄養研究所の共同プロジェクトとして、(1)インスリン作用特異性の原因のプロテオーム解析による網羅的検索、(2)組織細胞工学的視点でのブタ膵内分泌細胞の分化・増殖・再生に参与する重要なタンパク質の同

定、(3)糖尿病発症に影響する環境因子の分子機構についての転写因子に焦点を当てた解析、(4)SELDIプロテインチップシステムを用いた血清・尿タンパク質プロファイリングによる新たな分子マーカーの開発を研究の4つの柱として進行中であるが、同プロジェクトでは、ヒト糖尿病患者からの臨床サンプルを用いた大規模かつ網羅的な解析は行われていない。

そこで今回われわれはプロテオーム・ファクトリーを利用した糖尿病患者由来サンプルでのプロテオーム研究において、糖尿病の画期的治療の分子ターゲットの発見、糖尿病固有の合併症及び動脈硬化性疾患の進行度及び予後、治療効果などを確定できるタンパク質マーカーの開発等をめざす。

B. 研究方法

糖尿病関連タンパク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を用いてタンパク質の同定、定量を行う。糖尿病の病態

とタンパク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。

当センター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頻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、タンパク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、当研究所のion trap MS/MS, Protein Chipにて解析する。

C. 研究結果

【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。

【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タンパク質の分離、LC-MSを用いたタンパク質の同定の予備検討を行った。また、翻訳後修飾を受けたタンパク質を精製するために、抗リン酸化タンパク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。

【Protein Chip】

糖尿病患者由来サンプル中の低分子量タンパク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を用いて健康人の血清・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。

D. 考察

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タンパク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、健康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、まず健康者ボランティアにて翻訳後修飾を受けたタンパク質の同定を試み、その目的に最適な前処理法の検討を行う。また、同定されたタンパク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タンパク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。

E. 結論

ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を疾患の診断及び治療にいかにかかすかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、1. 患者数が多い(国内の糖尿病患者: 740万人、潜在的には推計1620万人)上にさらに増加傾向にあり、特に患者の90%以上を占める2型糖尿病はインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併することで発症する多因子性疾患である。このため、本プロジェクトにて糖尿病患者由来サンプルを大規模に収集し、タンパク質の網羅的同定を行い、それらの情報と臨床情報との関連性についてバイオインフォマティクス技術を用いて解析することは、遺伝子素因に環境因子の影響、細小血管症や動脈硬化性疾患の有無が加味された上での、個々の患者の病態に合わせた新しい治療法の開発及び最適な治療法の選択に貢献することが期待される。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

該当事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当事項なし

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）

分担研究報告書

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

分担研究者 秦 順一 国立成育医療センター研究所 所長

研究要旨 小児の難治性免疫・アレルギー疾患の中で喘息・腎炎・ネフローゼ症候群について疾患特異的な指標となる体液性因子の解析について血清・尿を用いた解析方法および患者について検討を行った。

A. 研究目的

小児の免疫・アレルギー疾患は近年患者の増加がみられ、その病因・病態の解明および治療法の開発は成育医療において重要な課題の一つである。このような疾患の病態の解明・治療法の開発において、網羅的に疾患関連因子・薬物標的因子の探索が可能なプロテオーム解析は、トランスクリプトーム解析とともに有用である。つまり、これらの疾患においては、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を詳細に解析し、個体の遺伝的特徴（ゲノム情報）を付加して系統的に整理していくことにより、疾患の解明治療法の開発が可能となるものと考えられる。

喘息やネフローゼ等の疾患は、ステロイド剤や免疫抑制剤が有効であることより、原因となる疾患関連分子が血清中あるいは尿中に存在することが示唆されてきている。本研究では、疾患関連新規病態分子を同定し病態の解明とともに、免疫・アレルギー疾患の新たな治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

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）

本研究はすべて「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日文科省 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の保護を原則とし、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。

C. 研究成果

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楽や環境科学など

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まれ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クスからの情報が必要不可欠である。プロテオミクスは癌をはじめとす

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、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。

D. 考察

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はしばしば遭遇する。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。

なし

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1) 特許取得 | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他 | なし |

E. 結論

小児の免疫アレルギー疾患の病態解明・薬物標的因子の探索において患者由来の血清及び尿のプロテオーム解析は非常に有望と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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)

分担研究報告書

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

分担研究者 太田壽城 国立長寿医療センター 病院長

田平 武 国立長寿医療センター 研究所長

研究要旨

痴呆疾患や骨粗しょう症等の加齢関連疾患のたんぱく質解析を行うために、本年度は病院から研究所へのサンプル提供体制を確立した。

また、両疾患に特異的なマーカーを探索中である。

A. 研究目的

高齢化社会の急速な進行に伴い、加齢に伴って急増する痴呆疾患や骨粗しょう症・骨折が極めて重要な疾患となっている。

本研究ではこれら加齢関連疾患に関するたんぱく質解析を行い、疾患関連タンパクの探索と新しい治療法の開発を試みることである。本年度は特に、病院からのサンプル提供体制の確立を行った。

B. 研究方法

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応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)

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。

C. 研究結果

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、髄液タンパク質を解析し、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。

D. 考察

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。

E. 結論

痴呆疾患や骨粗しょう症等の加齢関連疾患のたんぱく解析を行い疾患関連タンパクの探索と新しい治療法の開発を試みる。

本年度は病院から研究所へのサンプル提供体制を確立した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

疾患関連たんぱく質解析に関する研究

分担研究者 佐古田 三郎 大阪大学大学院 医学系研究科 教授

研究要旨 手術後の残余検体を研究に供する目的で、大阪大学医学系研究科で共通のインフォームドコンセント用紙を作製し、医学倫理委員会で認められた。残余検体の定義を明らかにして、その設備を充実させた。癌登録の入力画面の作製を検討中である。

A. 研究目的

様々な組織についてプロテインチップを行うプロジェクトを打ち立て推進していく。今回は、消化器癌、乳癌などの組織を中心に、たんぱく質の網羅的解析を行い、がん治療に貢献する。しかし、倫理的問題、組織提供の問題などが多く今回はその問題解決を行った。

B. 研究方法

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、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。

C. 研究結果

まず、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。

D. 考察

癌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、同一の癌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、癌の場合は、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。

E. 結論

手術後に迅速に、マクロ診断できるシステムを構築した。その結果、研究に供することができる残余検体を凍結できるようになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立

分担研究者 高尾敏文 大阪大学蛋白質研究所 教授

質量分析法を用いた生体内蛋白質・ペプチドの構造解析をフェムトモルレベルという微量で再現性よく行うための方法論の確立を目指し、質量分析に関連するハードウェアの開発に着手し、また、データを効率よく、確実に解析するための解析ソフトウェアの試作を行った。実際には、尿や血漿由来の蛋白質やペプチドの同定、構造決定に応用し、多数の蛋白質・ペプチドの高感度検出、構造解析が可能であることを示した。質量分析を中心とするこれらの方法は今後の疾患関連蛋白質の同定に極めて有用であると考えられる。

A. 研究目的

蛋白質の一次構造および翻訳後修飾を微量かつ高感度で解析するには、化学・分析的手法、ならびに、質量分析に関するハード・ソフトウェアの開発研究は必要不可欠である。本研究では、疾患関連蛋白質の同定を個人から得られる試料をもとに行うことを想定して、特に、尿や血液から得られる限られた微量蛋白質及びペプチドを効率よく分離・抽出するための方法とそれらの構造解析を確実かつ迅速に行うための質量分析法を確立する目的で行った。

本年度は、上記目的を達成するために、以下の6つの研究項目を具体的な目標として研究を行った。

- ① 高感度質量分析の基盤となる2種のイオン化法（エレクトロスプレーイオン化及びマトリックス支援レーザー脱離イオン化）に最適な試料調製法の確立。
- ② 尿由来ペプチドの高効率回収法の確立。
- ③ 尿由来蛋白質の量的変動解析が行える方法の開発。
- ④ 様々な翻訳後修飾を行う上で有用な精密質量測定法の開発。
- ⑤ 実スペクトルを確実に解析するためのソフトウェアの開発。
- ⑥ 発見的データベース構築のためのデータ収納法の確立。

B. 研究方法

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。