

200400180A

厚生労働科学研究費補助金
疾患関連たんぱく質解析研究事業

疾患関連たんぱく質解析研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長尾 拓

平成17 (2005) 年 4月

厚生労働科学研究費補助金
疾患関連たんぱく質解析研究事業

疾患関連たんぱく質解析研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長尾 拓

平成17（2005）年4月

目 次

I. 総括研究報告書

疾患関連たんぱく質解析研究	1
長尾 拓	

II. 分担研究報告書

1. 疾患関連たんぱく質解析技術の確立	136
–疾患関連グライコプロテオーム解析–	
早川 堯夫	
2. 疾患関連たんぱく質の機能解析基盤と有効活用技術の確立	165
堤 康央	
3. 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	218
友池 仁暢	
4. 疾患関連たんぱく質解析研究の一環としての新規生理活性ペプチド、ニューロメジンの発見	222
寒川 賢治	
5. 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	226
(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)	
南野 直人	
6. 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に関する研究	230
高坂 新一	
7. 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	234
鏑木 康志	
8. 小児免疫・アレルギー疾患関連因子の探索ならびに微量タンパク質解析技術の確立	237
秦 順一	
9. 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	240
太田 壽城	
10. 疾患関連たんぱく質解析に関する研究	244
佐古田三郎	
11. 疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立	245
高尾 敏文	
12. 癌組織を用いたプロテオーム解析技術の確立	250
今岡 真義	
13. 生体サンプル由来たんぱく質の前処理法の確立及び生体中微量たんぱく質の各種分離技術の確立	254
金子 勲	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	287
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

疾患関連たんぱく質解析研究

主任研究者 長尾 拓 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨:本研究は五大疾患などについて、患者と健常人との間の発現たんぱく質の変動を、質的、量的、時空間的に評価することにより、疾患の発症や悪化、治癒に関わるたんぱく質(疾患関連たんぱく質)を探査し、この中から医薬品シーズ・創薬ターゲット・疾患マーカーとなるたんぱく質を絞り込み、これらを有効活用することで新規医薬、診断薬、治療法の創出に寄与しようとするものである。本年度は、国立医療機関などにより提供される各種ヒト疾患サンプルのプロテオームおよびグライコプロテオームを、質量分析法によって大規模かつ高速解析するための基礎的検討を推進するとともに、見出された医薬品シーズとなるたんぱく質の有効活用技術の開発に関する検討を行い、以下の知見・情報を得た。

- ① 疾患に関連する糖たんぱく質及び糖鎖の網羅的解析(グライコプロテオーム)を目的に、糖鎖安定同位体標識法、及びリニアイオンラップ/フーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析装置を用いた定量的定性的糖たんぱく質糖鎖プロファイリング法を開発した。本方法を用いて SLE(全身性エリテマトーデス)モデルマウスの腎臓のグライコプロテオーム解析を行った結果、可溶性および不溶性たんぱく質画分の糖鎖結合量が正常マウスと異なっていること、および糖鎖生合成の初期段階に関与する α -glucosidase II の発現量が低下していることを見出した。(早川)
- ② 数多くの疾患関連たんぱく質の中から医薬品シーズや創薬ターゲットとなり得るたんぱく質を迅速に絞り込む技術の確立を目的に、組織・細胞レベル及び細胞小器官レベルでのたんぱく質の分離・抽出を行うための条件検討、2DLC 及び 2DGE によるたんぱく質の分離・精製システムの立ち上げた。また、絞り込まれた疾患関連たんぱく質の機能解析とその有効活用を図ることを目的に、種々たんぱく質に対する抗体を簡便に作製できる基盤技術の確立、たんぱく質の構造-活性相関を高速解析するための基盤技術の開発、医薬品シーズとして利用可能なたんぱく質の安全性と有効性を向上させるための動態制御技術の創出、疾患関連たんぱく質の細胞内局在性を感度良く解析する技術の基礎検討を行った。(堤)
- ③ 高血圧症、心臓病や脳血管疾患などの循環器系疾患に関連するたんぱく質を網羅的に解析することを目的に、研究倫理委員会の承認を得て、試料・臨床情報の収集を開始した。(友池)
- ④ オーフアン GPCR である FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1 の内因性リガンドとして 36 アミノ酸からなる新規生理活性ペプチド、ニューロメジン S(NMS)をラット脳より単離・同定した。(寒川)
- ⑤ 従来の2次元電気泳動法に替わる方法として、たんぱく質を酵素消化して得られるペプチドを網羅的に分離、解析しうるショットガン解析法について検討を行い、手動、自動化した2次元高速液体クロマトを用いることでペプチドを再現的に分離できることが確認できた。(南野)
- ⑥ 神経変性疾患(パーキンソン病、若年性痴呆症など)に特徴的なたんぱく質群を同定するため、臨床検体の供給体制を確立し、プロテオームファクトリーへの試料提供を開始した。また、パーキンソン病モデルマウス

ス(I93M UCH-L1トランスジェニックマウス)を開発し、その初期変化について解析を行った。(高坂)

- ⑦ 糖尿病患者のプロテオーム解析を目的に、臨床サンプルの収集体制を整えた。また、multi-dimensional LC-MS/MS、SELDI-MS 解析、翻訳後修飾されたたんぱく質の解析のための基礎検討を行った。(鍋木)
- ⑧ 小児の免疫・アレルギー疾患の中で腎炎・ネフローゼ症候群のプロテオーム解析を目的に、ネフローゼ症候群、IgA 腎症、巣状硬化症 7 例、膜性増殖性糸球体腎炎 1 例の血清を採取し、解析方法に関する検討を行った。(秦)
- ⑨ 加齢関連疾患(痴呆・骨粗鬆症・褥創)臨床検体のプロテオームファクトリーへの提供体制を整備した。また、疾患関連たんぱく質の網羅的解析に使用する各種分析装置の設置・調整を行い、アルツハイマー病(AD)に関連する尿中たんぱく質・ペプチドの解析条件を検討した。さらに、続発性骨粗鬆症の疾患モデルとして甲状腺機能亢進状態に着目し、細胞レベルでの機能たんぱく質について検討した。(太田)
- ⑩ 腫瘍性疾患、肺疾患、運動ニューロン疾患の組織や血清の蛋白を網羅的に解析し、治療方法の開発、診断・治療評価マーカーの同定を目的に、これら疾患試料の倫理問題について手続きを開始するとともに、試料採取および保存方法について検討を行った。(佐古田)
- ⑪ 質量分析法を用いた生体内たんぱく質・ペプチドの構造解析を微量で精度よく行うための方法論確立を目指し、ナノESIによる精密質量測定法をLC/ESI-MSに適用することにより、LC/ESI-MSでの精密質量分析が可能となった。また、MS や MS/MS スペクトルで観測される同位体分布を理論同位体分布と自動で照合できる新しいソフトウェア“Isotopica”を開発した。(高尾)
- ⑫ 癌のプロテオーム解析の精度を向上させることを目的に、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いて、顕微鏡下で癌細胞のみを切り出し、癌細胞で発現しているたんぱく質を効率よく抽出する前処理プロトコルを確立した。また、二次元電気泳動や二次元液体クロマトグラフィーシステムを用いた解析プロトコルを確立した。(今岡)
- ⑬ プロテオームファクトリー施設における倫理審査委員会、個人情報保護のための匿名化システム、試料機器管理システム(LIMS)を確立した。ヒト標準血清を用いて同位体標識法(cICAT法)に関する検討を行い、血清前処理法、cICAT peptide の分離法、nano-LC system/高性能質量分析(Q-Star XL、ABI-4700等)解析法、および大量たんぱく質同定・定量解析法(HiSpec System)までの一連の疾患関連血清たんぱく質解析フローをほぼ完成させた。(金子)

研究分担者	
早川堯夫	国立医薬品食品衛生研究所 副所長
堤 康央	国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 副プロジェクト長
友池仁暢	国立循環器病センター 病院長
寒川賢治	国立循環器病センター 生化学部長
南野直人	国立循環器病センター 薬理部長
高坂新一	国立精神・神経センター神経研究所 所長
鎌木康志	国立国際医療センター 研究所代謝疾患研究部病態代謝研 究室長
秦 順一	国立成育医療センター 所長
太田壽城	国立療養所中部病院長寿医療研究 センター 病院長
佐古田三郎	大阪大学大学院医学系研究科 教授
高尾敏文	大阪大学たんぱく質研究所 教授
今岡真義	大阪府立成人病センター 総長
金子 勲	ヒューマンサイエンス振興財団 創薬プロテオームファクトリー 生体試料分析部門長

A. 研究目的

医薬品開発に際して、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーとなる疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保は、今後の医薬品産業

の発展に必要不可欠であり、ライフラインと位置づけられる。従って、近年ますます激化しつつある新薬開発や新規治療技術の創出において、欧米諸国等との国際競争に打ち勝つためには、疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保に向けた作業を加速させることが重要となってきている。そのためには、現在実施されているタンパク3000プロジェクトなどのように、たんぱく質全般の基本構造と機能との関連を解析する「たんぱく質からのアプローチ」に加え、患者と健常者との間のたんぱく質の質、量の違いを時空間的に評価する「疾患からのアプローチ」により、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーを同定することが急務となっている。

このような疾患プロテオミクス研究に基づいた創薬(プロテオーム創薬)への期待と注目が国際的・学際的に集約されてきた背景として、ゲノムシーケンス研究から判明した約2万2千種の遺伝子に比して、膨大とも言える10万種以上にもものぼるたんぱく質、特に解析困難であった巨大分子量のたんぱく質に対しても、高性能質量分析機器の開発および「ICAT法」、「ショットガン法」などの網羅性の高い新規開発などにより大規模かつ包括的なハイスループット解析が可能となり、「疾患からのアプローチ」が昨今の技術革新により現実的になったことが挙げられる。事実、スイスやドイツ、米国などの欧米諸国は、この「疾患からのアプローチ(疾患プロテオミクス)」に国家プロジェクトとして、大量の予算を投入し、今まさに着手し始めている。

以上の我が国にとって重要かつ深刻な状況を鑑み、我が国としても、高血圧、糖尿病、がん、痴呆症、炎症性・アレルギー性免疫疾患などを対象として、新規治療薬・診断薬の開発や新規医療技術・治療法の確立などに必須となる疾患関連たんぱく質の網羅的探索と同定、これらのデータベース化を行うと共に、これらたんぱく質を有効活用できる基盤技術の開発研究を産官学連携により推し進め、国際競争力に満ち溢れた画期的な医薬開発を支援し、日本における製薬企業などの振興・発展を図ることが最重要とな

る。

以上の背景のもと、本研究は、我が国の主要疾患などに関して、患者と健常人との間の発現たんぱく質の変動を、質的、量的、時空間的に評価することにより、疾患関連たんぱく質の探索と、得られた情報をもとに創薬基盤データベースを構築するものである。また、探索されてきた数多くの疾患関連たんぱく質群の中から医薬品シーズ・創薬ターゲット・疾患マーカーとなり得るたんぱく質を絞り込み、これらを新規医薬品の創出等に有効活用していくための基盤技術を確認し、我が国独自の知的財産を創出しようとするものである。本研究の成果は、我が国の創薬研究に係る基盤的な技術レベルを飛躍的に向上させるため、遺伝子解析では欧米に出遅れたものの、日本の医薬品産業の国際競争力を強化し、我が国はもとより、世界の患者に質の高い医療を提供するものと考えられる。また派生効果として、ナノ HPLC や高性能質量分析機器類を用いた大量かつ高効率のたんぱく質解析技術およびそれに対応する情報処理解析技術といった最先端分野の科学技術などの我が国の水準を向上や研究者の育成などにも多大に寄与するものである。

本観点から今年度は、国立医療機関などから提供される各種ヒト疾患サンプルのプロテオームあるいはグライコプロテオームを、質量分析法によって大規模かつ高速解析するための基礎的検討を行うとともに、見出されたたんぱく質の有効活用技術の開発に関する検討を行った。また、ヒト疾患患者試料の取扱いに関して倫理的手続きを行い、各種試料の採取および保存体制を整えた。

B. 研究方法

B-1: 疾患関連たんぱく質解析技術の確立

ー疾患関連グライコプロテオーム解析ー

1) SLE モデルマウス腎臓由来可溶性たんぱく質及

び不溶性たんぱく質の分画

lpr/lpr マウス、及び+/+マウスの腎臓は日本エスエルシー株式会社より購入した。lpr/lpr 及び+/+マウスの腎臓(n=3)から難溶性結合組織を Cell strainer (70 mm、BD Biosciences) によって除去した後、組織細胞を遠心分離(1000 rpm、5 min)によって回収した。得られたペレット中に混在する赤血球を10倍量のNH₄Cl-Tris 溶液(pH 7.2、4°C、2 min)処理により除去した後、プロテインインヒビターを含むPBS溶液で細胞を3回洗浄した。

可溶性及び不溶性たんぱく質は市販のたんぱく質分画キット(2D Fractionation kit、Amersham Biosciences、USA)を用いて、プロトコールに従い分画した。得られたたんぱく質はアセトン沈殿(-20°C、2 h)及び遠心分離(12000xg、4°C、10 min)により脱塩及び脱脂した後、7 M urea、2 M thiourea、18 mM DTT、2 % CHAPS を含むバッファーに溶解してサンプル溶液とした。たんぱく質濃度は 2D Quant kit(Amersham Biosciences)で定量した。

2) 可溶性及び不溶性たんぱく質画分からの N 合型糖鎖の切り出し

200 µg のたんぱく質を含むサンプル溶液をアセトン沈殿、及び遠心分離により脱塩、乾燥した。サンプルに8 M グアニジン塩酸塩、及び5 mM EDTA を含む0.5 M Tris-HCl(pH 8.6)溶液(500 µl)を加えて溶解し、さらに2-メルカプトエタノール 3.6 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 10 mg を試料溶解液 84 µl に溶かし、試料溶液に加えて遮光下、室温で2時間放置した。反応終了後、PD-10 カラム(Amersham Biosciences)を用いて脱塩し、得られた溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥したサンプルに PNGaseF(10 unit)を含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)500 µl を加えて、37°C で48時間反応させた。反応液はエタノール沈殿によりたんぱく質を除去した後、上清を濃縮、凍結乾燥した。

3) 糖鎖のピリジルアミノ化

カップリング試薬、及び還元試薬はそれぞれ 12.8 M AP-酢酸溶液、及び 3.3 M ボランジメチルアミン複合体-酢酸溶液を用いた。20 μ l のカップリング試薬を 200 μ g の lpr/lpr マウス由来たんぱく質から切り出した糖鎖に加えて 90 °C で 60 分間反応させた。反応液に 20 μ l の還元試薬を加えて 80 °C で 60 分加熱して還元した。さらに、反応液にトリエチルアミン-メタノール(40 μ l)及びトルエン(50 μ l)を加えた後、窒素気流下減圧乾固した(60 °C、15 分間)。過剰の未反応試薬は残渣にメタノール(20 μ l)及びトルエン(40 μ l)を加えた後、窒素気流下減圧除去した(60 °C、10 分間)。さらに 50 μ l のトルエンを残渣に加えた後、窒素気流下減圧乾固した(50 °C、10 分間)。+/+マウス由来糖鎖は d_6 AP で標識した。PA-糖鎖は Envi-Carb (Supelco、 Bellefonte、 USA)を用いて脱塩した。

4) 2D DIGE

4-1) たんぱく質の Cy 標識

表 1 2D DIGE experimental design for differential in-gel analysis

Gel Number	Cy2	Cy3	Cy5
1	Standard	+/+1	lpr/lpr-1
2	Standard	lpr/lpr-2	+/+2
3	Standard	+/+3	lpr/lpr-3

可溶性画分のたんぱく質は 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/ μ l に希釈し、50 μ g のたんぱく質に対して 400 pmol を使用した。サンプル溶液に標識試薬を加えて混和後、氷上暗所で 30 分間インキュベートした。10 mM リジンを加えて反応を停止させ、CyDye 標識サンプルとした。スタンダードとして、全てのサンプル(+/+1、+/+2、+/+3、lpr/lpr-1、lpr/lpr-2、lpr/lpr-3)の等量混合

液を使用した。サンプルと CyDye の組み合わせは以下の通りである(表 1)。

4-2) 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 μ l/ゲル)を混和した後、等量のサンプルバッファー(7 M Urea、2 M Thiourea、4 % CHAPS、2 % Pharmalyte (pH 3-10)、130 mM 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、pH 3-10 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)を用いて泳動を行った(表 2)。

表 2 IEF condition

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

(50 μ A/strip)

4-3) 2次元目電気泳動

1次元目電気泳動終了後、たんぱく質チオール基を carboxyamidomethyl 化するために IPG strip を2種類のバッファー(50 mM Tris-Cl(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 \times 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 \times 1、陰極側に \times 2 の泳動バッファー(25

mM Tris、192 mM glycine、0.1 % SDS)を使用し、1W(max. 600 V、400 mA)、28時間泳動した。DIGE 画像の取り込みは Typhoon 9400 (Amersham biosciences)を用いた。レーザ及び蛍光フィルターとして、Cy2 は 488/520 nm bandpass (BP)40nm、Cy3 は 532/580 nm BP 30 nm、及び Cy5 は 633/670 nm BP 30 nm を使用した。画像解析及び統計処理は Cy2 画像をスタンダードとして DeCyder Differential Analysis Software (Version 5.0、Amersham biosciences)を用いて行った。

4-4) 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 μ l(500 μ g) の Cy 未標識スタンダード溶液を使用した。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)で染色し、ゲル画像の取り込みは Typhoon 9400(457 nm/610 BP 30 nm)で行った。

5) スポットピッキング及びゲル内消化

質量分析用ゲルと解析用ゲルは DeCyder を用いてマッチングさせた。スポットのピッキングは DeCyder で作成したピッキングリストを使用して ProHunter AS-2000 (アズワン株式会社)で行った。

ゲル内消化はすべて 96 穴プレート(V 底ウェルタイプ、Nunc)内で行った。まず、100 μ l の 50 %メタノールを含む 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液で 30 分間振とうし、ゲル片を脱色した。さらに 100 μ l の 100 % アセトニトリルで 30 分間インキュベートした後、Speed Vac で完全に乾燥させた。乾燥させたゲル片に 5 μ l のトリプシン溶液(20 μ g/ml、0.1 %オクチルグルコシドを含む 20 mM 重炭酸アンモニウム)を加え、37 °C で一晩反応させた。50 μ l の 1 %トリフルオロ酢酸水溶液/50 %アセトニトリルを加え、4 °C で 5 分間超音波処理し、ペプチド抽出液を回収した。次いで 70 μ l の 0.2 %トリフルオロ酢酸水溶液/50 %アセトニトリルを加え、再度抽出

処理を行った。さらに 100 %アセトニトリルを加えて、室温で 15 分間インキュベート下の後に抽出液をすべて回収し、Speed Vac を用いて濃縮した。

6) LC/MS

6-1) LC/MS による PA 糖鎖のプロファイリング
分析条件は以下の通りである。

LC:

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

カラム: Hypercarb (Michrom BioResource 社製、0.2 \times 150 mm、5 μ)

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 5~45 % (60 分)

流速: 2 μ l/分

ESI-MS:

装置: LTQ-FT (Thermo Electron、USA)

測定モード: ポジティブイオンモード

キャピラリー温度: 200 °C

ESI 電圧: 2.0 kV

スキャン範囲: 700-2,000

MSⁿ 測定 (n=24)

測定モード: ポジティブイオンモード

キャピラリー温度: 200 °C

ESI 電圧: 2.0 kV

スキャン範囲: 100-2,100

Isolation width : 3.0 unit

Activation time : 30 ms

Collision Gas: N₂

Collision energy: 30 %

データ依存的に MSⁿ 測定を行った。

6-2) LC/MS/MSによるたんぱく質の同定

条件は以下の通りである。

LC:

装置: Paradigm MS4 (Michrom BioResource、USA)

オートサンプラー LC-PAL (CTC)

カラム: MAGIC C18 (Michrom BioResource、0.2x50 mm、3 μ)

溶離液 A: 0.1 %ギ酸を含む 2 %アセトニトリル水溶液

溶離液 B: 0.1 %ギ酸を含む 90 %アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム:

B 液: 5 % (0~10 分)、5~65 % (10~40 分)

流速: 2 μ l/min

LC/MS/MS:

装置: LTK

分析条件は 6-1) に準ずる。

データベース検索エンジン: Mascot (Matrix Science) 及び TurboSEQUENT (Thermo Electron)

<倫理面への配慮>

本研究では、市販の動物組織を使用しているの
特に配慮は行っていない。

B-2: 疾患関連たんぱく質の機能解析基盤と有効活用技術の確立

I) 効果的かつ効率的な疾患プロテオーム解析基盤の確立

I)-① 臨床検体の受入体制の確立

解析対象疾患として、成人T細胞白血病リンパ腫 (adult T-Cell leukemia-lymphoma; ATL) を選択した。ATL は、予後不良ながんのひとつとして知られ、ヒトT細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type I; HTLV-I) の感染により発症す

ることが明らかとなっているものの、ATL 発症に至るまでの分子メカニズムはほとんど明らかにされておらず、また有効な治療方法も確立されていない。ATL は世界の中でも我が国において頻度が高い疾患であり、特に九州・沖縄など南西日本で患者が多いことが特徴である。そこで ATL の分子病態をたんぱく質レベルで解明し、疾患マーカーや医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質を絞り込んでいくことを目的に、患者由来試料のプロテオーム解析を行うことにした。本年度は、患者から試料の提供を受けるための倫理申請手続きを行い、試料の確保と受入体制の整備を行った。

試料は鹿児島大学医学部附属病院より提供を受けることとした。解析対象としてATL患者、HTLV-1キャリア、および対照としての健常人ボランティアを選定し、尿および血液の提供を受ける。ATL患者には急性型、リンパ腫型、慢性型、くすぶり型、急性転化型の細分類があり、それぞれの違いを分子レベルで明らかにするため、各病型の患者試料を確保する。試料採取後、尿は速やかに凍結し、また血液は血漿および単核球を分離後に凍結した後、当研究施設に輸送する。試料とともに診療情報(性別、年齢、主疾患名、合併症、薬物治療の情報、各種血液生化学検査値)の提供を受け、プロテオーム解析結果と統合して分析を行う。なお、本研究はヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針が適用されるものではないが、本指針に準じて実施するものとする。試料および診療情報の匿名化は、鹿児島大学医学部に置く個人情報管理者により行う。ATL患者およびHTLV-1キャリア由来試料は、病期の経過を追跡可能とするために連結可能匿名化とし、健常人ボランティアの試料については連結不可能匿名化とする。以上の研究計画を国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会および鹿児島大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会に申請し、承認(国立衛研については条件付き承認)を得た。

I)-② 組織・細胞などからのたんぱく質の分離・抽

出を行うための条件検討

培養細胞の細胞質由来たんぱく質を分離・抽出・精製し、プロテオーム解析を行っていくにあたり、次年度以降、ATLを解析対象とすることから、モデル細胞としてヒトT細胞白血病由来のT cell lineであるJurkat細胞を用いた。Jurkat細胞は、10% FBS RPMI-1640培地にて経代培養したJurkat細胞を、1mM EDTA/PBSにて洗浄し、1,000 rpmにて5分間遠心し、細胞塊を得た。細胞をPBS(-)にて再度懸濁し、細胞数を測定した(8×10^6 cells)。この細胞を、細胞溶解液(20 mM HEPES-NaOH、0.25 M Sucrose、1.0% Triton-X、Protease Inhibitor cocktail (Roche社))にて細胞を溶解し、室温で20分間、反応させた。反応後、ピペットにて強くピペッティングし、不溶物を懸濁した。この反応液を、14,000rpm、4°Cで遠心し、残存する沈殿物を除去した。この上清を細胞質由来のたんぱく質液として、たんぱく定量(BCA™ Protein Assay Kit: PIERCE社)した。得られたたんぱく質溶液の濃度は、約1.2 mgであった。

I)-③2DLC及び2DGEによるたんぱく質の分離・精製システムの立ち上げ

上記I)-②にて得られたたんぱく質溶液に、4倍容のアセトンを添加し、-80°Cで1時間放置し、たんぱく質を沈殿させた。この沈殿を4°C、14,000 rpm、30分間遠心し、たんぱく質を回収した。この沈殿をInvitrogen社製の泳動バッファー(7M Urea、2M Thiourea、4% CHAPS、20 mM DTT、1% ZOOM Carrier Ampholytes 3-10)にて再溶解し、Invitrogen社製のZOOM IEF Fractionatorにて異なるpI分画に精製した。この精製したたんぱく質溶液を、Amersham Biosciences社製のEttan IPGphor IIにて、1次元目の電気泳動を行った。電気泳動後のストリップをポリアクリルアミドゲルにて再度電気泳動し、2次元に展開した。反応後のポリアクリルアミドゲルをクマシーブルーにて染色し、スポットを確認した。

I)-④疾患関連たんぱく質ライブラリの構築

疾患関連細胞で発現しているたんぱく質を網羅的にライブラリ化することで、疾患関連たんぱく質間での相互作用解析や疾患関連たんぱく質に対する抗体作製、医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の迅速単離とその機能解明を効率よく進めていくため、現在2種類のファージディスプレイcDNAライブラリの構築を進めている。「M13ファージディスプレイcDNAライブラリ」に関してはまず、炎症系細胞や白血病細胞、HTLV-1感染細胞といった疾患関連細胞からmRNAを調製し、これらをテンプレートにランダムプライマーを用いてcDNAの合成を行った。今後、制限酵素NotI、NcoIによりcDNAおよびファージミドベクターpY02を切断後、これらのライゲーションを行い、ファージコートたんぱく質g3p遺伝子上流側にcDNAが挿入されたファージミドライブラリとしていく。このライブラリを用いて大腸菌TG1をエレクトロポレーションにより形質転換し、ヘルパーファージM13KO7を感染させることにより、cDNAにコードされたたんぱく質をg3p融合たんぱく質としてファージ表面へ網羅的に提示させることができ、かつ、ヘルパーファージを感染させない場合にはたんぱく質を可溶型として得られるものと考えている。一方で、「T7ファージディスプレイライブラリ」に関しては、M13ファージと同様に、疾患関連細胞からmRNAを調製し、それをテンプレートにオリゴdTプライマーまたはランダムプライマーを用いてcDNAの合成を行っている。このシステムでは、末端にEcoRIサイト、およびHindIIIサイトを有するアダプターを付加した後、T7-Selectベクターに挿入することで、10Bキャプシドタンパク遺伝子下流側にcDNAが挿入されたファージミドライブラリを現在、調整段階である。本ファージミドベクターをin vitro packagingを行い、大腸菌BLT5403あるいはBLT5645に感染させることにより、cDNAを10Bとの融合たんぱく質として表面に発現したファージを得ることができるものと考えている。

II) たんぱく質の機能解析とその有効活用法の開発 II)-①種々たんぱく質に対する抗体を迅速かつ簡

便に作製できる基盤技術の確立

<マウス cDNA の作製>

BALB/c マウス、B16BL6 マウス、C3H マウス (雌 6~8 週齢) の脾臓及び大腿骨由来の骨髓を回収後、PBS にて洗浄した。TRIzol Reagent を 1g の脾臓に対し 20mL 加え、また骨髓細胞 1×10^7 cells/mL に対し 2mL を添加した。ホモジナイズ後、室温にて 5 分間放置し、TRIzol Reagent 1mL に対し、クロロホルムを 0.2mL 加え、15 秒間激しく混和した。3 分間放置後、4°C、12,000rpm で 15 分間遠心し、回収した水層に対して等量のイソプロパノールを添加した。室温で 10 分間放置した後、4°C、12,000rpm で 15 分間遠心し、上清を除いた。得られた沈殿に 0.7mL の 99.9% エタノール、0.3mL の分子生物学グレードの蒸留水 (D.W.) と 0.01mL の 3M Sodium Acetate を加えた。十分に懸濁処理した後 4°C、12,000rpm で 15 分間遠心し、上清を除いて沈殿を乾燥させ、1mL の D.W. に沈殿を溶解することで total RNA とした。この total RNA から Amersham Biosciences 社製の mRNA Purification Kit を用いて mRNA を分離・精製し、Invitrogen 社製の SUPER SCRIPT First Strand Synthesis System を用いて cDNA を random hexamers プライマーで作製した。

<マウス scFv 遺伝子の作製>

上記で作製した cDNA を鋳型 (テンプレート) として、表 3 で示したオリゴプライマーセットと、校正活性に優れた Taq polymerase を用い、以下の条件で PCR を行い、マウス由来のナイーブ VL 遺伝子及びナイーブ VH 遺伝子を増幅した (図 1)。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
 - 2) 96°C 1 分間 (Denature)
 - 3) 55°C 1 分間 (Annealing)
 - 4) 68°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 35 サイクル繰り返し】

- 5) 68°C 4 分間
- 6) 4°C Hold

得られた PCR 産物は QIAGEN 社製の PCR purification kit により精製した。また図 2 に示したように、増幅した VL 遺伝子と VH 遺伝子は以下の条件で assemble PCR を行い、VL 遺伝子と VH 遺伝子を連結し、マウス由来のナイーブ scFv 遺伝子を得た。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
 - 2) 96°C 1 分間 (Denature)
 - 3) 60°C 1 分間 (Annealing)
 - 4) 68°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 20 サイクル繰り返し】
- 5) 68°C 4 分間
 - 6) 4°C Hold

得られた PCR 産物は、5'-gcc aag ctt tgg agc ctt ttt ttt gga gat ttt caa cgt gaa aaa att att att cgc aat tcc ttt agt tgt tcc ttt cta tgc ggc cca gcc ggc cat ggc c-3'及び 5'-cgc cgg cgt cca cgc ggc cac ggc ata ggc cta ggc gac ctt ggc gca cgg cgt atc tga caa ctt tca aca aat cgt ttt gga gta tgt ctt tta agt aaa tg-3'の両プライマーを用い、下記の条件で PCR を行い、scFv 遺伝子を増幅した。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
 - 2) 96°C 1 分間 (Denature)
 - 3) 63°C 1 分間 (Annealing)
 - 4) 68°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 20 サイクル繰り返し】
- 5) 68°C 4 分間
 - 6) 4°C Hold

最終的に増幅した scFv 遺伝子は、PCR purification kit による精製およびアガロースゲル精製を行った。

<ナイーブ scFv・ファージライブラリの作製>

図3に示したように、増幅したマウス scFv のライブラリ遺伝子を制限酵素 Sfi I と Not I で処理し、インサートとした。また pY02 ベクターも同様に、Sfi I と Not I で処理した。なお、この pY02 は、ファージ外殻たんぱく質 g3p と挿入遺伝子の産物(本研究では、マウス scFv のライブラリ)との融合たんぱく質を大腸菌に発現させるためのベクターである。ベクターと scFv インサートを T4 DNA ligase を用いて 16°C で 16 時間ライゲーションした。得られたライゲーション産物は PCR purification kit にて精製した。一方、電極ポレーションに用いる大腸菌(TG1)は、予め 30mL の 2YT 培地で OD600=0.4 まで培養し、ミリ Q で 3 回洗浄操作を行い、10%グリセロール水溶液で 200 μ L に懸濁した後、氷冷し保存した。この TG1 に対して、精製したライゲーション産物溶液を 10 μ L 添加し、2.5kV、0.25 μ F、200 Ω で電極ポレーションを行った。その後、2%グルコース含有 2YT 培地を 790 μ L 添加し、1 時間プレ培養した後、一部(50 μ L)を下記のライブラリサイズの測定用に回収し、残りについては 50 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 LB-Agar プレートに播種し、37°C で 12 時間培養した。

<ライブラリサイズの測定>

電極ポレーション後の TG1 プレ培養溶液から 50 μ L を回収し、100 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を用いて 10 倍で段階希釈し、各 TG1 希釈溶液 450 μ L に対して 800 μ L の 100 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、全量を Clontech 社製のクローンディスクに播種し、37°C で一晩培養した。ライブラリサイズは 10 の n 乗希釈したところで計数されたコロニー数 (m) から、ライブラリサイズ = $m \times 10^9 / 9 \times 2 \times 10^n$ CFU/mL として算出した。

<フィンガープリント解析>

クローンディスク上に形成されたモノクローナルな TG1 コロニーをピックアップし、Taq DNA Polymerase を用いて、scFv 遺伝子部分をダイレクト

PCR した。尚、ダイレクト PCR で用いたプライマーは、5'- caa cgt gaa aaa att att att cgc -3' 及び 5'- gta aat gaa ttt tct gta tga gg-3' であり、以下の条件で PCR を行った。

1) 96°C 4 分間 (Predenature)

2) 96°C 1 分間 (Denature)

3) 57°C 1 分間 (Annealing)

4) 68°C 1 分間 (Extension)

【2)→3)→4)→2)を 35 サイクル繰り返す】

5) 68°C 4 分間

6) 4°C Hold

得られた PCR 産物 10 μ L を、制限酵素 BstN I で処理し、アガロース電気泳動によりその消化パターンを観察した。

<ナイーブ scFv を表面提示したファージライブラリの作製>

50 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 LB プレートに播種し、37°C で一晩培養したプレートから、コロニーをバルク回収し、100 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を加えて、250rpm、37°C で OD600=0.3 まで振盪培養した。50 μ L の M13KO7 ヘルパーファージを添加し、37°C、110rpm、30 分間、続いて 37°C、250rpm、30 分間培養した後、1,700 \times g、15 分間遠心し、得られた大腸菌ペレットに対して 100 μ g/mL アンピシリン、50 μ g/mL カナマイシン含有 2YT 培地を添加して 12 時間培養することで、ナイーブ scFv を表面提示したファージライブラリを培養上清中に誘導した。

<ファージの精製>

ファージライブラリを誘導させた TG1 培養液を氷冷し、1,700 \times g、10 分間遠心し、上清を回収した。さらに 20,000 \times g で 15 分遠心し、回収した上清に氷冷した 20%PEG8,000、2.5M NaCl を加え、激しく混和して氷上で 2~3 時間静置した。次いで 20,000 \times g で 15 分間遠心して得られたペレットを NTE Buffer(100mM NaCl、10mM Tris、1mM EDTA)に

懸濁し、精製ファージ溶液とした。

<ルシフェラーゼに対するパンニング>

Carbonate-Bicarbonate 緩衝液でルシフェラーゼを 10 μ g/mL に希釈し、Nalge Nunc 社製のイムノチューブに 1mL 添加し、一晩 4 $^{\circ}$ C で静置することで抗原を固相化した。イムノチューブを Phosphate buffered saline (PBS) で 3 回洗浄後、大日本製薬株式会社製の 2% Block Ace を 5mL 加え、37 $^{\circ}$ C、2 時間静置することでブロッキングした。PBS でさらに 3 回洗浄後、精製したナイーブ scFv ファージライブラリをインプット(input)ファージ溶液として 1mL を添加し、4 $^{\circ}$ C、1 時間静置した後、0.05% Tween 含有 PBS(PBST)にて 5~20 回洗浄した。次に 100mM HCl を 1mL 添加し、4 $^{\circ}$ C、10 分間静置後、回収し、500 μ L の Tris-HCl Buffer pH8.0 と混和し、アウトプット(output)ファージ溶液とした。この抗原への結合、洗浄、ファージ溶出、TG1 に感染させることでのファージ増幅といった一連の操作(パンニング)を複数回繰り返すことで、特定の抗原に高親和性な scFv を表面提示したファージクローンを選択・濃縮した。

<ファージタイトーの計測>

インプット(input)ファージ溶液及びアウトプットファージ溶液中のファージ粒子数を計測するため(パンニング効率および特定抗原に結合するファージクローンの濃縮程度を観察するため)、各々の溶液を段階希釈した。この希釈溶液 100 μ L に、予め 2% グルコース含有 2YT 培地で OD600=0.3 に達するまで培養しておいた TG1 溶液を 300 μ L 添加し(合計 400 μ L)、37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養した。培養液に 100 μ g/mL アンピシリン、2% グルコース含有 2YT 培地 800 μ L を添加し、クロンディスクに播種し、一晩培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測し、計数された希釈段階 10 の n 乗のコロニー数(m)から、ライブラリサイズ = $m \times 10 \times 10^n$ CFU/mL として算出した。インプットファージ数とアウトプットファージ数から、 $ratio = (\text{アウトプットファージ数}) / (\text{インプットファージ数})$ を算出した。

<ファージ ELISA>

クロンディスクからモノクローナルな大腸菌コロニーをピックアップし、100 μ g/mL アンピシリン、2% グルコース含有 2YT 培地入りの 96 穴プレートに各々播種し、各ウェルの OD600=0.3~0.6 に達するまで培養した。続いて、M13KO7 ヘルパーファージ原液を予め 100 μ g/mL アンピシリン、2% グルコース含有 2YT 培地で 10 倍希釈しておいた溶液を、20 μ L/well で添加した。1 時間 37 $^{\circ}$ C で静置培養し、1,700 \times g、10 分間遠心後、上清を除き 2% グルコース、100 μ g/mL アンピシリン、50 μ g/mL カナマイシン含有 2YT 培地 150 μ L を添加し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。その後、1,700 \times g、10 分間遠心し、96 穴プレートの上清をモノクローナルな scFv 提示ファージ溶液とした。ルシフェラーゼ、もしくは Ovalbumin を 10 μ g/mL に Carbonate-Bicarbonate 緩衝液で希釈し、100 μ L/well で添加し、4 $^{\circ}$ C で一晩放置することで、固相化した。PBS で 3 回洗浄後、2% Block Ace を 200 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間静置することによりブロッキングした。PBS で 3 回洗浄後、96 穴プレートの上清サンプル(モノクローナルな scFv 提示ファージ溶液)を 100 μ L/well で添加した後、室温で 2 時間静置した。その後、PBST で 3 回、PBS で 3 回洗浄した。0.4% Block Ace で 3000 倍希釈した HRP した抗ファージ抗体(ファージ外殻たんぱく質の一種である g8p を認識する抗体; Anti-M13 Monoclonal Conjugate;) を 100 μ L/well で添加し、室温 2 時間静置した。その後、PBST で 3 回、PBS で 3 回、再度洗浄操作を行い、基質溶液(TMBZ)を加え、発色させた後、2N 硫酸にて反応停止を行った。吸光度(測定波長 450nm、対照波長 655nm)をマイクロプレートリーダーで測定した。

<シーケンス解析>

ファージ ELISA で抗原に対する特異性が認められたクローンなどについては、96 穴プレートから大腸菌モノクローンを回収し、100 μ g/mL アンピシリン、2% グルコース含有 2YT 培地で一晩培養した後 QIAGEN 社製の QIAprep Miniprep Kit で用いてファージミドベクター(モノクローナルな scFv 遺伝子を

含むプラスミド)を回収し、5'-caa cgt gaa aaa att att att cgc-3'及び5'-gta aat gaa ttt tct gta tga gg-3'をプライマーとして使用し、DNA シークエンス解析を行い、scFv 遺伝子の配列と scFv のアミノ酸配列を決定した。

<種々抗原に対するパンニング>

血管内皮増殖因子受容体 2 型、血管内皮増殖因子、腫瘍壊死因子(TNF- α)及び緑膿菌由来のたんぱく質合成阻害因子を Carbonate- Bicarbonate 緩衝液で 10 μ g/mL に希釈し、イムノチューブに固相化した。その後、前述したパンニングやファージ ELISA、シーケンス解析を行い、ナイーブ scFv ファージライブラリの有用性評価を行った。

II)-②たんぱく質の構造-活性相関を高速解析するための基盤技術の開発

<wild-type TNF- α とファージ外殻たんぱく質 g3p との融合体を発現させるファージミドベクターの作製>

疾患関連たんぱく質の機能解析の一つとして、たんぱく質の構造-活性相関を高速解析するための基盤技術を開発していくため、炎症性サイトカインの一種である腫瘍壊死因子(TNF- α)をモデルたんぱく質に検討を行った。ここではまず、コントロールベクター等の作製を行った。Sfi I サイト及び Not I サイトを付加した 2 種類のプライマー(5'-CGC AAT TCC TTT AGT TGT TCC TTT CTA TGC GGC CCA GCC GGC CAT GGC CAT GGT CAG ATC ATC TTC TCG AAC CCC GAG-3'及び 5'-ATC CGG ATA CGG CAC CGG CGC ACC TGC GGC CGC GGA TCC ACC ACC ACC CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC CTG-3')を用い、ヒト TNF- α の cDNA をテンプレート(テンプレート)として以下の条件で PCR した。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
- 2) 96°C 1 分間 (Denature)
- 3) 60°C 1 分間 (Annealing)

- 4) 72°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 35 サイクル繰り返し】
- 5) 72°C 4 分間
- 6) 4°C Hold

得られた PCR 断片を Sfi I 及び Not I で処理し、予め Sfi I 及び Not I 処理したファージミドベクター (pY02:ファージ外殻たんぱく質 g3p と挿入遺伝子の産物との融合たんぱく質を大腸菌に発現させるためのベクター)とをライゲーションすることにより、TNF- α をコードするファージミドベクター (pY02-TNF)を作製した。得られた pY02-TNF を大腸菌 TG1 にエレクトロポレーションで導入後、100 μ g/ml アンピシリン及び 2%グルコースを含む 2YT 培地に懸濁し、37°Cにて 1 時間振盪培養を行った後、100 μ g/ml アンピシリン及び 2%グルコースを含む LB プレートに播種し、一晚培養した。プレートよりコロニーをモノクローナルにピックアップした後、100 μ g/ml アンピシリン及び 2%グルコースを含む 2YT 培地に懸濁し、37°Cにて振盪培養を行った。その後 OD600=0.5 となったときに M13KO7 ヘルパーファージを加え 1 時間、37°Cにて緩やかに振盪培養を行った。遠心後、100 μ g/ml アンピシリン及び 50 μ g/ml カナマイシンを含む 2YT 培地にて 6~8 時間、37°Cにて振盪培養を行うことで wild-type TNF- α (wtTNF- α)発現ファージを産生させた。

<wtTNF- α 発現ファージの精製>

wtTNF- α 発現ファージを含んだ TG1 培養液を氷冷し、1,000 \times g、10 分間遠心し、上清を回収した。さらに、20,000 \times g、15 分間の遠心した後、回収した上清に氷冷した 20%PEG8,000、2.5 M NaCl を 1/5 量加え、氷上で 2~3 時間冷却した。20,000 \times g で 20 分間遠心して得られたペレットを NTE buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA)に懸濁し、精製 wtTNF- α 発現ファージ溶液とした。

<ファージ粒子数(ファージタイター)の測定>

2%グルコースを含む 2YT 培地で、OD600=0.3 まで培養した TG1 に対して、段階希釈したファージ

溶液を添加し、37°C、1 時間培養した。その後、100 µg/ml アンピシリン及び 2%グルコースを含む LB プレートに播種し、一晩培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測することで、ファージ粒子数を算出した。

< Surface Plasmon Resonance (SPR 法: BIAcore)による wtTNF-α 発現ファージの TNFR1 への結合特性評価とそのパンニング条件の最適化 >

ピアコア株式会社製の BIAcore biosensor を用いて以下のようにパンニングを行った。ヒト TNF レセプター1(TNFR1)の Fc キメラのセンサーチップ F1 への固定化は、以下のようにアミンカップリングキットを用いて行った。32.5 mg/ml の EDC、5.75 mg/ml の NHS (N-hydroxysuccinimide) 溶液を 120µl(12分間)インジェクションし、センサーチップ上の CM-デキストランのカルボキシル基を活性化した。その後、10 mM の酢酸緩衝液 pH 4.0 で 50 µg/ml に調整した TNFR1 を 110 µl (11 分間)インジェクションした。続いて、1M の Ethanolamine hydrochloride(pH 8.5)溶液にて残存している活性化 NHS 基をブロックした。さらに再生溶液(10 mM Glycine-HCl 緩衝液 pH 2.0)により、非特異的に結合している TNFR1 などを洗浄した。その後、種々濃度(タイター、ファージ粒子数)に調製した wtTNF-α 発現ファージ溶液を 3 µl/min で 30 分間添加し、TNFR1 への結合特性などを評価した。パンニング効率を検討するために、CD22 に対する一本鎖抗体(scFv)を発現するファージに対して、粒子数として終濃度 10%となるように wtTNF-α 発現ファージを混合し、インプットファージ混合溶液とした。このインプットファージ混合溶液を、HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005% Surfactant P20)をランニングバッファーとして、流速 3 µl/min で 50 µl インジェクションした。リンコマンドを用い、非特異的に結合したファージを除去した後、再生溶液を 20 µl/min で 1 分インジェクションし、その溶出液を回収した。パンニングで溶出さ

れたアウトプットファージ混合溶液を TG1 に感染させ、得られたコロニーに対して wtTNF-α 遺伝子を同定するためのダイレクト PCR(667bp の PCR 断片として検出できる)を行い、BIAcore パンニングによる wtTNF-α 発現ファージの濃縮(選択)効率を判定した。ダイレクト PCR は、プライマーとして 5'-CAA CGT GAA AAA ATT ATT ATT CGC-3'及び 5'-GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG-3'を使用して、KOD Taq polymerase を用い、以下の条件で行った。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
 - 2) 96°C 1 分間 (Denature)
 - 3) 60°C 1 分間 (Annealing)
 - 4) 68°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 35 サイクル繰り返し】
- 5) 68°C 4 分間
 - 6) 4°C Hold

アウトプットファージ混合溶液中の TNF-α 発現ファージの割合を算出し、インプットファージ混合溶液中の TNF-α 発現ファージの割合(10%)を比較することで、パンニング効率を測定した。

< TNF-α の構造-活性相関の高速解析を目的とした網羅的な構造変異 TNF-α を表面提示したファージライブラリの作製 >

本検討では TNF-α をモデルたんぱく質として、その構造-活性相関を高速解析できる研究基盤を確立していくことを目指し、TNF-α 中のリジン残基(一般にたんぱく質中のリジン残基は、たんぱく質の立体構造の形成や安定化、レセプターや基質との結合などに重要な役割を担っていると考えられており、他のアミノ酸への置換は活性の減弱などを招いてしまうと考えられている。)を最初のターゲットに絞り込み、TNF-α 中の全 6 個のリジン残基が他のアミノ酸に置換された構造変異体ライブラリの作製を行った。図 4 に示したように、3 回の PCR によって、TNF-α のリジン残基をコードするコドン(配列)をすべてのアミノ

酸をコードするランダムコドン、NNS 配列 (N は A/T/G/C のいずれかを、S は G/C のいずれかをコードする) に変換した。まず、5'-TC TAC TCC CAG GTC CTC TTC NNS GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG-3' 及び 5'-GGC CTC AGC CCC CTC TGG GGT CTC CCT CTG GCA GGG GCT SNN GAT GGC AGA GAG GAG GTT GAC SNN GGT CTG GTA GGA GAC GGC GAT GCG-3' を用い、KOD Taq polymerase を用い、以下の条件で PCR を行った。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
- 2) 96°C 1 分間 (Denature)
- 3) 60°C 1 分間 (Annealing)
- 4) 68°C 30 秒間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 35 サイクル繰り返し】
- 5) 68°C 4 分間
- 6) 4°C Hold

PCR purification kit 及び Sigma 社製の GeneElute Agarose Spin Columns で精製した 162bp の PCR 産物及び 5'-TA GTC GGG CCG ATT GAT CTC AGC GCT GAG TCG GTC ACC SNN CTC CAG CTG GAA GAC CCC TCC CAG ATA GAT GGG CTC ATA CCA GGG SNN GGC CTC AGC CCC CTC TGG GGT-3' を用い、以下の条件で PCR を行った。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
- 2) 96°C 1 分間 (Denature)
- 3) 60°C 1 分間 (Annealing)
- 4) 72°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 35 サイクル繰り返し】
- 5) 72°C 4 分間
- 6) 4°C Hold

PCR purification kit 及び GeneElute Agarose

Spin Columns で精製した 251bp の PCR 産物及び 5'-TA GTT GTT CCT TTC TAT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC NNS CCT GTA GCC CAT GTT GTA GCA-3' をプライマーとし、pY02-TNF をテンプレートとして用い、前記の条件で KOD Taq polymerase を用いて PCR を行った。以上の 3 回の PCR によって、TNF- α 中に含まれる 6 個のリジンアミノ基をコードするコドン を NNS 配列に置換した。得られた 463bp の PCR 産物 (TNF- α の構造変異体ライブラリ遺伝子; TNF- α 中に含まれる 6 個のリジンアミノ基を他の 20 種類のアミノ酸に置換した TNF- α の構造変異体をコードした遺伝子ライブラリ) を PCR purification kit 及び GeneElute Agarose Spin Columns で精製した後、前記 PCR 条件でプライマーとして 5'-GCC CAG ACT CGG CAA AGT CGA GAT AGT CGG GCC GAT TGA TCT CAG CGC T-3' 及び 5'-GTT GTT CCT TTC TAT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC-3' を用い、KOD Taq polymerase で増幅した。その後、Sfi I 及び Eco 47III で処理し、予め Sfi I、Eco47III 処理した pY02-TNF と T4 ligase を用いて 16°C にて 16 時間のライゲーションを行った。得られたライゲーション産物は PCR purification kit で精製した。予め 2YT 培地 30 ml で OD600=0.4 まで前培養し、ミリ Q で 3 回洗浄操作を行い、10% グリセロール溶液で 200 μ l に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に対して、精製したライゲーション溶液 10 μ l を添加し、2.5 kV、0.25 μ F、200 Ω の条件でエレクトロポレーションした。その後、2% グルコースを含む 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、一部を取って、100 μ g/ml アンピシリン及び 2% グルコースを含む LB プレートに播き一晩培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。また、残りのサンプルに関しては、ファージ産出及び精製を行うことで、TNF- α の構造変異体を網羅的に表面提示したファージライブラリを得た。

<構造変異 TNF- α 発現ファージライブラリを用いた

構造-活性相関研究の基礎検討

構造変異 TNF- α をファージ g3p 先端に提示したライブラリを用いて、前述した BIAcore 解析 (SPR 法) の手法を用い、TNFR1 や TNF レセプター2 (TNFR2)、TNF- α 中和抗体に対するパンニングを行い、その結合特性を評価した。また複数回のパンニング後に得られたアウトプットファージライブラリから、各構造変異 TNF- α モノクローンを 96 穴プレートなどへピックアップし、培養上清中に可溶性構造変異 TNF- α や構造変異 TNF- α 発現ファージを誘導し、ELISA や種々バイオアッセイにより、種々機能を評価するとともに、DNA シーケンス解析することで構造変異 TNF- α の 1 次構造を決定した。

II)-③ たんぱく質の安全性と有効性を向上させるための基盤技術の創出

<リジン欠損 TNF- α 発現ベクターの構築>

リジン欠損 TNF- α をコードする遺伝子は、Nde I サイト及び、EcoR I サイトを付加したプライマー (5'-GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT G-3'及び 5'-CTT CCT TTC GGG CTT TGT TAG CAG CCG AAT TCT TAC AGG GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TG-3')を用い、PCR にて増幅した。PCR purification kit で精製後、Nde I 及び EcoR I によって処理した。予め、Nde I、EcoR I で処理した pYas-1 (T7プロモーター支配下に組み込んだ遺伝子産物を大腸菌にて発現させるベクター) にライゲーションし、リジン欠損 TNF- α 発現プラスミドを構築した。

<リコンビナントたんぱく質の産出>

構築したリジン欠損 TNF- α 発現プラスミドをヒートショック法で大腸菌 BL21DE3 (IPTG 添加により T7RNA ポリメラーゼを細胞内産生する大腸菌株) に形質転換し、2YT 培地で 1 時間培養後、100 μ g/ml アンピシリン含有 LB プレートに播種し、37°C で一晚培養した。プレートからコロニーをバルクで回収し、0.4% Glucose、1.68 mM MgSO₄、100 μ g/ml アンピ

シリン含有 Terrific Broth 培地に加え、37°C で振盪培養した。OD600=3.0 になった時点で最終濃度 1 mM の IPTG を加え、さらに 4 時間培養することで、リコンビナントたんぱく質をインクルージョンボディとして産出した。

<インクルージョンボディの回収>

IPTG にてリコンビナントたんぱく質を誘導した大腸菌の培養液を 3,000 rpm、10 分間遠心し、大腸菌ペレットを回収した。TES buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、40 mM EDTA、250 mM NaCl) にて沈殿を懸濁し、終濃度 0.23 mg/ml となるように Lysozyme (Roche) を加え、室温で 1 時間振盪した。その後、終濃度 0.5 M 及び 2.5% となるように NaCl 及び、Triton X-100 をそれぞれ添加し、室温でさらに 1 時間振盪した。続いて 4°C、10,000 rpm、40 分遠心した。得られた沈殿を、再度 TES buffer に懸濁し、同様の操作を 3 回行った後、TES buffer で 3 回洗浄操作を行い、4°C、10,000 rpm、40 分遠心し、得られた沈殿をインクルージョンボディとして回収した。

<インクルージョンボディの可溶化>

得られたインクルージョンボディを秤量し、湿重量 1.8 g あたり 10 ml の GTE buffer (6 M Guanidine HCl、100 mM Tris-HCl pH 8.0、2 mM EDTA) に懸濁し、2 時間室温にて静置した。その後、4°C、12,000 rpm、40 分遠心し、不溶物を除去した。上清を回収し、Pierce 社製の Coomassie-Blue Plus Protein Assay Reagent Kit を用い、BSA をスタンダードとしてたんぱく質濃度を Bradford 法で定量し、終濃度 10 mg/ml に GTE buffer で調製した。Dithioerythritol を終濃度 10 mg/ml となるように添加し、4 時間室温で静置した。

<Refolding 及び精製>

pH 9.5 に調整した refolding buffer (100 mM Tris、2 mM EDTA、1 M Arginine) を氷冷し、酸化 Glutathione を 551 mg/ refolding buffer で添加後、激しく攪拌しながら可溶化したインクルージョンボディ/GTE 溶液に加え、4°C で 30 時間静置した。SPECTRA/POR Membrane MWCO 6-8,000 を用

い、透析 buffer(20 mM Tris-HCl pH 7.4、100 mM Urea)に対して計 6 回、4°Cで透析した。得られた透析液を、0.2 μ m の Membrane Filters を用いて不要物を除去した後、buffer A(20 mM Tris-HCl pH 7.4、1 mM EDTA) で平衡化した Q sepharose (Pharmacia biotech 社製)に添加し、0.3 M NaCl 含有 buffer A で溶出させることによりリフォールディング後のリコンビナントたんぱく質を濃縮した。得られた濃縮液を、PBS で平衡化した Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia biotech 社製)にて、三量体形成しているヒト天然型 TNF- α と同じ分画である約 40 kDa(GFC 用 Protein 標準品によるスタンダードからの算出分子サイズ)のピークを分取し、精製リコンビナント TNF- α を得た。

<SDS-PAGE>

各試料と 2XSDS protein gel loading solution を等量混合し、終濃度 5% となるように 2-Mercaptoethanol を添加後、95°Cで 10 分間処理した。各試料を、第一化学社製の PAG ミニ「第一」15/25 にアプライし、SDS-PAGE 用緩衝液(25 mM Tris、192 mM Glycine、10% SDS)を用い、ゲル 1 枚当たり 40 mA の定電流で 1 時間電気泳動を行った。泳動後、Coomassie Brilliant Blue を用いて染色した。また Amersham Biosciences 社製の LMW Calibration Kit を分子量マーカーとして用いた。

<マウス LM 細胞を用いた TNF- α の比活性 (TNFR1 を介した生物活性)の測定>

マウス L929 細胞の無血清培養亜株(LM 細胞)は 1%ウシ胎仔血清(FBS)を含む Eagle's minimum essential medium (MEM)で継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。予め 96 穴培養プレートで段階希釈したサンプル 100 μ l に、2 μ g/ml のアクチノマイシン D(終濃度 1 μ g/ml)含有 1% FBS-MEM で希釈した LM 細胞を 1×10^4 cells/100 μ l/well で添加した。細胞播種後 37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下 24 時間培養した。その後、25%グルタルアルデヒド 20 μ l で生細胞を固定し、洗浄により死細胞を除去した。0.05%メチレンブルー

溶液で細胞を染色した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度(吸収波長 655 nm、対照波長 415 nm)を測定し、比活性を評価した。

<ヒト Hep2 細胞を用いた TNF- α の TNFR1 を介した生物活性の測定>

Hep2 細胞は 10%FBS 及び抗生物質を含む RPMI-1640 で継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96 穴培養プレートにて 10% FBS 含有 RPMI で 4×10^4 cells/100 μ l/well に希釈した Hep2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 3 時間培養を行った後、予め 100 μ g/ml シクロヘキシミド(終濃度 50 μ g/ml)含有の 10%FBS-RPMI にて段階希釈したサンプル 100 μ l を加えた。37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 18 時間培養を行った後、25%グルタルアルデヒドで生細胞を固定した。洗浄後 0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色し、プレートを洗浄・風乾した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度(吸収波長 655 nm、対照波長 415 nm)を測定し、生物活性を評価した。

<ヒト TNFR2 を介した in vitro 活性測定>

PC60 細胞及びヒト TNFR2 (hTNFR2)を強制発現させた PC60 細胞【PC60(+)細胞】は 10%FBS、1 mM sodium pyruvate、 5×10^{-5} M の 2-ME と、適量の抗生物質を含む RPMI-1640 で継代培養し(PC60(+)細胞には 3 μ g/mL puromycin も添加)、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。 1×10^6 cell/ml に調整した細胞を 96 穴培養プレートに 50 μ l/well で播種し、予め 4 μ g/ml のヒトリコンビナント interleukin-1 β を含む培養液で段階希釈したサンプルを 50 μ l/well 加えた。37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養後、培養上清中に分泌されたラット GM-CSF を ELISA にて定量した。

<一級アミン量の定量>

作製したリコンビナント TNF- α の一級アミン量は、フルオレスカミン法を用いて測定した。0.1% PEG(平均分子量 20,000 を含むホウ酸緩衝液(pH 8.5)490 μ l にサンプル 10 μ l を加え混合した後、

fluorescamine/dioxan 溶液(0.3 mg/ml)を 500 μ l 添加混合した。10 分後、蛍光強度(励起波長 390 nm、蛍光波長 475 nm)を測定した。

<SPR 法(BIAcore)を用いた TNFR1 及び TNFR2 に対するアフィニティの測定>

前述したようにセンサーチップ CM5 に対して、TNFR1 の Fc キメラ及び TNFR2 の Fc キメラを固定化した。各 TNF- α サンプルは、たんぱく濃度として 2 μ g/ml から 62.5 ng/ml にランニングバッファーで希釈し、インジェクションした。各パラメータの算出は、BIA evaluation 3.0 program により行った。<Meth-A 固形がんの作製>

Meth-A fibrosarcoma(マウス繊維芽肉腫)は、実験に供するまで BALB/c マウス(雌 4 週齢)を用い、腹腔内継代で維持した。腹水より採取した Meth-A 細胞懸濁液を溶血・洗浄後、生細胞数を trypan blue 法により計測した。細胞を PBS で懸濁し、 1×10^6 cells/ml に調整した。BALB/c マウスの腹部を除毛した後、Meth-A 懸濁液 200 μ l を腹部皮内移植し、固形がん直径が約 7 mm に達したマウスを実験に供した。

<たんぱく質の in vivo 有用性(in vivo 抗腫瘍効果)の評価>

in vivo 抗腫瘍効果は PBS で種々の濃度に希釈したサンプルを Meth-A 担がんマウスに単回尾静脈内投与することで行った。コントロール群は PBS を投与した。抗腫瘍効果の指標として投与 24 時間後の腫瘍出血壊死を測定した。腫瘍出血壊死作用は全腫瘍面積に対する出血壊死部の面積により評価した。

<たんぱく質の in vivo 安全性(LD50 値)の評価>

LD50 値の算出は、PBS で種々の濃度に希釈したサンプルを Balb/c マウス(雌 4 週齢)に単回尾静脈内投与し、投与後 24 時間のデータを基に LD50 値を算出した。

<体内動態の検討>

TNF- α などのたんぱく質サンプルを PBS で 5 μ g/ml に希釈し、Balb/c マウスに 200 μ l/mouse で尾

静脈内投与を行い、経時的に採血した。血清を回収し、以下のように抗 TNF- α 中和抗体を用いたサンドイッチ ELISA を行った。PBS で 4 μ g/ml に希釈した抗 TNF- α 中和抗体で 96 穴 ELISA プレートを目相化した。4% Block Ace 含有 PBS で 2 時間ブロッキングを行い、適宜希釈したサンプルを添加した。室温で 2 時間静置し、洗浄操作を 3 回行った後、200 ng/ml に希釈したビオチン化抗 TNF- α 抗体を添加した。室温で 2 時間静置し、洗浄操作を 3 回行った後、1/2、000 希釈したアビジン HRP を添加し、室温で 1 時間静置した。洗浄操作を 3 回行った後、基質溶液 TMBZ を加えて発色させ、2 N 硫酸を添加することで反応停止を行った。吸光度(測定波長 450 nm、対照波長 655 nm)をマイクロプレートリーダーで測定した。サンプル毎にスタンダードを作製し、血中濃度を算出した。

<たんぱく質の体内挙動制御方法の開発 I : チオール基を標的とした部位特異的 PEGylation : N-cys-TNF- α 発現ベクターの構築>

N 末端にシステイン残基を新たに導入した TNF- α 変異体(N-cys-TNF- α)をコードする遺伝子は、Nde I サイト及び EcoR I サイトを付加したプライマー(5'-GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG TGC GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC-3'及び 5'-CTT CCT TTC GGG CTT TGT TAG CAG CCG AAT TCC AGG GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TG-3')を用い、前記の条件で PCR を行うことで増幅した。PCR purification kit で精製後、Nde I 及び EcoR I によって処理した。予め、Nde I と EcoR I で処理した pYas-1 に組み込むことで発現プラスミドを構築した。

<たんぱく質の体内挙動制御方法の開発 II : N 末端アミノ基を標的とした部位特異的 PEGylation : リジン欠損 TNF- α の PEG 化>

TNF- α の PEG 化は、分子量 5,000 の直鎖状の mPEG-SPA (methoxypolyethylene glycol succinimidyl propionate)を用い、TNF- α の 1 級アミンに対して 5 倍モル量又は 50 倍モル量の