

mPEG-SPAを添加し、37°C、30分反応させることにより行った。ε-アミノカプロン酸をそれぞれmPEG-SPAの10倍モル量添加することにより、反応を停止させた。得られたPEG-TNF-αはQセファロースによるアニオン交換クロマト及びゲル濾過HPLCにより、分取・精製した。

<PEG化TNF-αのin vivo有用性(in vivo抗腫瘍効果)の評価>

Meth-A 担がんマウスに対し、PBSで種々濃度に希釈したサンプルを単回尾静脈内投与することによって抗腫瘍効果を評価した。経日的に腫瘍径を測定し、以下に示す方法によって腫瘍体積を算出した。

$$(\text{腫瘍体積}) = 1/2(axb^2) - 1/2(an \times bn^2)$$

a; 腫瘍の長径、b; 腫瘍の短径

an; 壊死部長径、bn; 壊死部短径

腫瘍増殖阻害効果は、腫瘍移植後7日後(投与開始日)の腫瘍体積に対する相対比較により評価した。延命効果は各群の平均生存日数により算出した。なお、腫瘍移植後30日以上生存し、かつ腫瘍の痕跡が認められないマウスについては完全治癒とみなした。

II)-④たんぱく質の細胞内局在性を解析するための基盤技術の検討

<半導体量子ドット(QD)による標識法の確立と蛍光標識特性の評価>

Hela細胞(JCRB)およびHep3B細胞(ATCC)を2-wellチャンバースライド(Nunc)に 5×10^5 cell/wellで播種し、24時間培養した後3.7%ホルムアルデヒド/PBS溶液で20分固定した。0.5% Triton-X/PBSで10分浸透化処理(permeabilization)後、5xBlocking Buffer(シグマ)でブロッキングを行った。次に2% BSA/0.05% Triton-X/PBS(PBST)で100倍希釈したbiotin-mouse anti-αtubulin(Molecular Probes)を60分作用させ、PBSにより洗浄後

PBSTで希釈したQdot605-streptavidin(Quatumdot)を30分作用させた。PBSにより洗浄後、DAPIあるいはCytoGreen(MolecularProbes)/50% glycerolによりカバーガラス下に封入して蛍光顕微鏡観察に供した。

QD染色標本の観察・イメージングには落射蛍光顕微鏡(IX71、オリンパス)を使用し、冷却CCDカメラにてイメージを取得した。蛍光フィルターキューブは、Qdot605の観察にはEx 450nm short pass/DC 470/Em 605±10nm band pass(Chroma)を使用した。取得したイメージは画像解析ソフトウェア(Isis、MetaSystems)により処理を行い画像化した。

QDの光安定性を比較評価するため、Hela細胞のtubulinをQdot605により、actinをAlexa488により染色した。作製した標本に蛍光顕微鏡下でUV励起光を照射し、一定時間ごとに各蛍光イメージを取得した。得られたイメージを画像解析ソフトウェア(Adobe Photoshop)で解析することにより蛍光強度の変化を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヘルシンキ条約に基づき動物愛護の精神を遵守しつつ遂行されたものである。また本研究の遂行には、組換えDNA実験を避け得ないが、「組換えDNA実験指針(平成14年文部科学省告示第5号)」などに基づき、機関承認実験として承認を受けている(No.330、No.331、No.332、No.333、No.334、No.366、No.367)。また、次年度より実施するヒト由来試料を用いる実験に関して、鹿児島大学医学部および国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査委員会の承認を得た(国立衛研に関しては条件付き承認【112:成人T細胞白血病(ATL)の疾患プロテオミクスに関する研究】)。

B-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

プロテオームファクトリー施設に協力して実施する循環器疾患に関連するたんぱく質解析研究の全体計画について、倫理委員会の承認を得る。得られた承認結果に従い、各循環器疾患について研究計画を作成し、個別の課題として倫理委員会で審議・承認を得た後に研究を実施する。個別の研究課題については、病院、研究所の各科、研究グループより募集し、その中より検討、選択し、研究実施計画を作成する。同時に、研究の実施支援体制を当センター内に構築する。

B-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 S の発見

1) オーファン GPCR 発現細胞の作製とアッセイ: ヒト FM-4/TGR-1 cDNA (AF242874; residues 1-1240) を発現ベクター pcDNA3.1 へ挿入し、CHO 細胞で恒常的に発現させた。この細胞にラット脳から抽出したペプチドサンプルを添加し、引き起こされる細胞内 Ca イオン濃度の変化を FLIPR システムを用いて測定した。

2) 抽出および精製: ラット脳 420 匹分 (510 g) を既報のとおり、100°C で 5 分間熱処理後、1 N 酢酸にてペプチドを抽出した。アセトン沈殿、Sep-Pak C18 カートリッジによる処理の後、活性画分はゲル濾過、イオン交換 HPLC、逆相 HPLC により分離、精製した。

3) 構造解析: 精製したペプチドの構造は、プロテオシーケンサーおよびマスマスペクトロメーター (Voyager-DE PRO) を用いた MALDI TOF/MS により解析した。

4) ペプチド前駆体 cDNA のクローニング: ペプチド構造解析から得られたアミノ酸配列を用いた tblastn サーチを行い、目的 cDNA 配列の部分情報を得た。完全長 cDNA は RNA ligase-mediated RACE 法によりクローニングした。

5) 発現分布解析: ペプチドの組織分布は

LightCycler システムを用いたリアルタイム PCR により解析した。また、ラット脳内での詳細な分布は *in situ* ハイブリダイゼーション法にて観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては当施設のカイドラインに従い、その愛護に留意し投与実験や屠殺の際に苦痛を最小限にとどめるように十分に配慮した。

B-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 (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)

1) 分離対象ペプチド: ショットガン解析法においては、たんぱく質消化により生成するペプチドを質量分析計で検出するので、イオン化、構造解析効率を上昇させるため、通常は短い断片が得られるトリプシン消化が有利である。このため、分離系の検討では、相当する分子量 3,000 以下の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: ペプチドーム解析において、生体内ペプチドの網羅的分離、解析に使用してきた方法論を改良した。ペプチドは、通常酸性条件下で陽イオン交換樹脂と逆相系樹脂に吸着し、かつ濃度勾配溶出により高度の分離が得られるため、1次元目に強酸性 (sulfopropyl, sulfoethyl) 陽イオン交換 HPLC、2次元目に C18 逆相系 HPLC を用いた2次元分離システムを使用した。担体には吸着性や非特異的相互作用の少ないシリカ系や高度親水性ポリマーを選択し、イオン交換用に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・10%アセトニトリル含有溶媒系、逆相系 HPLC 用にはアセトニトリル・0.01%トリフルオロ酢酸 (TFA) 系を使用した。1次元目と2次元目の HPLC を連動するため、昨年度は1次元目に段階的塩濃度溶出システム (ステップ2次元 HPLC, LC Packings 社製) を用い

たが、今年度は当研究室で立案した2次元とも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)で検討を行った。

3)ペプチドの検出と解析:溶出液は2つにスプリットし、一方はエレクトロスプレーイオン化飛行時間型(ESI-TOF、ESI-Q-TOF など)で検出、解析し、他方はMALDI-TOF-TOF (Proteomics 4700、ABI社製)にて構造解析を行うため、ターゲットプレート上にスポットした。

4)組織抽出物の検討:組織抽出には、汎用されている尿素あるいはグアニジン塩酸、CHAPS、Triton などの変性剤・ディタージェントからなる抽出溶媒、あるいはディタージェント不含有で変性剤中心の抽出溶媒を使用し、還元剤を添加した。抽出後の各種の脱塩、濃縮操作、再溶解などの操作を行った後、還元アルキル化とトリプシン消化を行い、1次元HPLCによる分離後、質量分析により評価した。

(倫理面への配慮)

動物組織の収集においては、当センターの実験動物委員会(実験動物福祉小委員会)が定めた動物実験指針に従い、動物愛護に配慮して実施した。

B-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

(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の表現型を生化学的、病理学的に解析した。またI93M変異体発現細胞を調整し、I93M変異体の不溶化の分子機構を細胞生物学的に解析した。

(倫理面への配慮)

今回の研究に用いるヒト由来試料はすべて当センター倫理委員会において承認を得た方法でインフォームドコンセントを取得したものを使用する。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。

B-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

糖尿病関連たんぱく質のデータベース構築のためのサンプルとして、糖尿病患者及び健常者の血清及び尿を血清:200-300サンプル/年程度、尿:100-150サンプル/年程度を目標として採取する。臨床情報を添えて創薬プロテオームファクトリー施設に発送し、同施設のLC-MS/MSを用いてたんぱく質の同定、定量を行う。糖尿病の多様な病態とたんぱく質のプロファイルとの関係性をバイオインフォマティクスの技術を用いて解析し、データベース化する。

糖尿病データベース構築とは別の研究計画として、一部の糖尿病患者について頸動脈エコー及びPWVにて動脈硬化を客観的に評価し、進行度と血清たんぱく質のプロファイルを比較検討して動脈硬化性疾患の早期診断マーカー、糖尿病に合併した

動脈硬化性疾患予防及び治療の分子標的を検索する。また、早期糖尿病性腎症を研究対象とし、微量アルブミン尿の有無による尿たんぱく質プロファイルを網羅的に検討し、新規の糖尿病・早期腎症に固有な診断マーカー、糖尿病性腎症治療の分子標的を検索する。

当センターにて収集可能な糖尿病の以外の疾患由来サンプルについても、収集及び創薬プロテオームファクトリーでの解析を検討しており、その端緒として呼吸器疾患の患者血清を用いて治療の分子標的、診断マーカーを検索する。

当センターでの独自のプロジェクトとしては、糖尿病に固有な合併症及び動脈硬化性疾患に関連した翻訳後修飾(糖鎖添加、リン酸化)を、患者の臨床サンプル(血清、赤血球膜等)について当研究所の2-D LC-MS/MS、2DE、SELDI-TOFを用いて解析する。

B-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たんぱく質解析技術の確立

原疾患を有する患者から発症時(急性期)、寛解期および正常人の血清および尿中のたんぱく質の種類、質、量の相違について質量分析装置およびバイオフィンフォーマティクス技術を用いて解析する。

(倫理面への配慮)

本研究においては、国立成育医療センター倫理委員会に倫理申請を行い、承認を得た(平成16年8月17日、倫理申請受付番号94)。本倫理規定に従い、検体の採取・解析等遵守している

B-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

PFから示された検体搬送手順を、当院臨床検査

部の現状を踏まえて調整し、患者選択、同意の確認、患者情報のワークシートへの入力、検体採取、匿名化、検体の一時保存および搬送の各段階について整備した。ワークシートは、痴呆・骨粗鬆症・褥創の各疾患について、患者選択を行う当院研究者の意向を入れてPFにおいて作成されたものを使用することとした。

研究所において、二次元電気泳動装置、高速クロマトグラフィー装置、MALDI-TOF-MS、アミノ酸配列分析装置、およびNanoLC-MC/MSシステムの設置・調整を行い、尿中たんぱく質の解析条件を検討した。ヒト尿を採取後直ちに氷冷し、プロテアーゼインヒビター添加後、遠心分離上清を回収、0.45 μ mのフィルター処理を行い、解析試料とした。試料の脱塩・濃縮にはZipTipを用いた。また、低分子ペプチド画分の分離およびたんぱく質画分の濃縮には、硫酸沈殿法を行った。これらの処理済試料をSDS-PAGE、MALDI-TOF-MSあるいは二次元電気泳動法にて解析した。

さらに、新生仔マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様MC3T3-E1細胞を10%FCSを含む α -MEM培地にて培養し、5日後培地を0.3%FCSを含む α -MEMとして48時間後実験に供した。細胞にT3を作用させ、骨芽細胞の分化の指標であるオステオカルシンの産生をELISA法にて、p44/p42 MAP kinaseあるいはp38 MAP kinaseのリン酸化をWestern blot法にて解析した。オステオカルシnmRNAの発現についてはNorthern blot法にて解析した。

(倫理面への配慮)

PFへの臨床試料提供については、当院倫理委員会およびPF倫理委員会の承認を得た上で、搬送を開始することとした。

B-10: 乳癌、消化器癌組織のプロテオーム解析に関する研究

腫瘍性疾患、閉塞性肺疾患、運動ニューロン病の組織や血清に見出される蛋白を網羅的に解析し、正常者と比較し、増加しているあるいは減少している蛋白を見出す。見出された蛋白について、どのような意義があるか臨床データと併せて検討する。微量の生検材料については、網羅的蛋白解析技術について検討する。組織の保存方法、正常組織と癌組織の切り出し方法などについても検討する。

(倫理面について)

患者さんの組織や血清は大阪大学医学倫理委員会で研究として許可申請をし、同意が得られた検体についてのみまず保存する。臨床データについては匿名化して、個人情報情報を省いた形で検体とペアで保存する。

B-11: 疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立

既設の2つのタンデム質量分析計(ESI-MS/MS、MALDI-MS/MS)を用いて、尿から抽出、単離したたんぱく質・ペプチドの測定を行ない、同定及び修飾構造解析を行った。質量スペクトルの解析には、一次構造解析支援ソフトウェア“SEQMS”(1998年に開発)を、データベース検索によるたんぱく質同定には、市販の検索エンジン“MASCOT”を用いた。

尿ペプチドの分離には、内径 1mm の強陽イオン交換担体カラム、内径 75 μ m の逆相担体カラムを用いた。

リン酸化たんぱく質、及び、糖たんぱく質の酵素消化物の分離、分析は、内径 75 μ m の逆相担体カラムを装着したナノ LC/ESI-MS/MS により行った。

微量脂質修飾たんぱく質における修飾構造解析は、ESI-MS/MS により低エネルギー衝突活性化分解(Ar ガス)により行った。

ナノ ESI 精密質量測定は、今年度開発したデュ

アルスプレーヤー/高電圧スイッチング法により行った。

量変動解析は、安定同位体¹⁸Oによる標識を酵素消化により行い、非標識のものと混合してナノ LC/ESI-MS 及び MALDI-MS を用いて行った。量比の算出は、今年度開発した“Isotopica”を用いて質量スペクトル中に観測される各々のシグナルに対して同位体比を計算することにより行った。

B-12: 癌組織を用いたプロテオーム解析技術の確立

癌組織の切片を作成し、顕微鏡下で癌細胞のみを切り出すレーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いて、癌細胞由来のたんぱく質を効率よく回収する方法の検討を行った。レーザーマイクロダイセクションにはライカ社製、AS LMD を用いた。

手術で採取された大腸癌あるいは肺癌サンプルは手術場で OCT コンパウンドに包埋し、液体窒素で急速凍結し、使用するまで-80°Cに保存した。クリオスタットで 10 μ m の切片を作成し、ホイルつきのスライドガラスに貼り付ける。以下、組織の固定法、脱脂処理、染色法、レーザーマイクロダイセクションで切り出すまでの時間、ホイルからのたんぱく質の抽出法などのパラメーターを変え、たんぱく質の抽出効率、電気泳動での分離パターンなどを比較した。さらに、抽出したたんぱく質は、2次元電気泳動での分離、および2次元液体クロマトグラフィー/MS/MS システム(ショットガン法)での網羅的たんぱく質同定を行った。2次元電気泳動は Amersham の IPG strip(13cm、pH3-10)を用い、たんぱく質 50 μ g をアプライした。泳動後のゲルは SYPRO Ruby で蛍光染色し、イメージを取得した後、いくつかのスポットに関しては in gel digest を行い、LC/MS/MS システムにてたんぱく質の同定を行った。2次元液体クロマトグラフィー/MS/MS システムでの解析には、抽出たんぱく質 20 μ g を DTT、ヨードアセトアミドで還元アルキ

ル化後、トリプシンで切断した。切断されたペプチド群は on line で結ばれた強カチオンマイクロカラム (25mM~500mM ギ酸アンモニウム、pH 3.0 で溶出)と逆相 C18 マイクロカラム(0.2 X 50mm、0.1% ギ酸、アセトニトリルの溶媒を使用)で分離し、直接 ESI イオン源に挿入し、イオントラップ型質量分析計 (LCQ Deca XP)にて解析を行った。測定データのセットは検索エンジン、Mascot あるいは Turbo Sequest を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究内容は、大阪府立成人病センターに設けられた倫理審査委員会において既に承認されている。今回使用した癌組織は、手術前に患者さんに対して文書を用いて説明し、同意の得られた患者さんのサンプルである。

B-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

1) アジレント抗体カラムによる血清主要たんぱく質の除去:

アジレント社製抗体カラム (Albumin、IgG、 α 1-Antitrypsin、IgA、Transferrin、Haptoglobin 除去用、10 x 100mm)を使用した。200 μ l のヒト血清 (Rockland 社)を 15000 rpm で遠心後、Agilent Binding Buffer A で 5 倍希釈後、0.22 μ m のフィルターでろ過し、上述の抗体カラムにアプライし、素通り画分を分取した。吸着部分は Agilent Buffer B で溶出させ、その後、カラムは Buffer A で洗浄した。素通り画分を Centriprep 遠心式フィルターユニット (YM-3、Millipore)で濃縮し、50mM Tris/HCl、0.1% SDS (pH8.5)にバッファー交換後、たんぱく質濃度をローリー法で測定した。

2) ヒト標準血清の cICAT 反応:

前述の高濃度たんぱく質を除いた血清たんぱく質画分 (final 1mg/ml)を 50 mM Tris/HCl、0.1% SDS (pH8.5)で可溶化し、TCEP (final 1mM、95°C、10 min)で還元後、2.2mM の Cleavable ICAT 試薬 (Applied Biosystem (ABI)、¹³C (H 鎖)あるいは ¹²C (L 鎖) 標識)を 37°C、2 時間反応させた。未反応の試薬を 1.0mM TCEP でクエンチングし、H 鎖試料と L 鎖試料を等量混合し、トリプシン (Promega、TPCK 処理)で 37°C、16 時間消化した。得られた消化物を、Vision Workstation system (ABI)を用いて、SCX column ((Poly LC Sulfoethyl A Column (4.6 x 100mm)) にか、10mM KH₂PO₄、pH2.8、25%CH₃CN (SCX-binding buffer)で吸着・洗浄後、SCX-binding buffer + 0.5M KCl(SCX-elution buffer)で溶出させた。溶出画分を大型アビジンカラム (6.2 x 66.5mm)にか、素通り部分を洗浄後、吸着した ICAT 試薬反応ペプチドを 30% CH₃CN/0.4% TFA で溶出した (Vision Workstation System)。溶出画分を乾燥後、95%TFA(5%Scavenger 含有)で 37°C、2 時間反応させてピオチン部分を切断し、ICAT 標識ペプチド(H 鎖、L 鎖)を得た。本ペプチドは減圧乾固した後 SCX-binding buffer に溶解し、再び SCX column にか、十分に洗浄後、SCX-binding buffer + KCl (0 ~ 0.5M gradient)でペプチド画分を分画 (50 分画)し、それぞれ C18 trap column で脱塩し、減圧乾固した。

3) nano-LC による cICAT peptide の分離精製:

SCX による分画・脱塩した ICAT 標識ペプチドを 0.1%TFA-2% CH₃CN にて再溶解し、nano-LC(LC-Packing)/Q-Star XL (ABI、ESI-Q/TOF、以下、Q-Star とする)および nano-LC/Probot (LC-Packings)/ABI-4700 Proteomics Analyzer (ABI、MALDI-TOF/TOF、以下、ABI-4700 とする)にて分析した (カラム; PepMapTM C18 100、3 μ m、100Å、75 μ m i.d. x 150mm(LC-Packings)、Q-Star 用移動相; A: 5%

CH₃CN/0.1% HCOOH、B: 95% CH₃CN/0.1% HCOOH によるリニアグラジエント、ABI-4700 用移動相: A: 5% CH₃CN/0.1% TFA、B: 95% CH₃CN/0.1% TFA によるリニアグラジエント)。各分析は、以下の条件で行い、分析精度の向上を図っている。

4) Q-Star XL (ESI-Q/TOF)での測定:

BSA 消化物(50fmol)を用いて nano-LC の調整を行い、規定のシーケンスカバレッジ(約 40%程度)が得られるのを確認した後、試料の測定を行った。測定は MS 1 秒、第一 MS/MS 3 秒、第二 MS/MS 3 秒の合計 7 秒が 1 サイクルの自動測定(IDA Mode)であり、試料を 5~10 回測定する度に 1 回、QC 用の BSA 消化物(50fmol)を測定することで、測定データの信頼性を確保している。

5) ABI-4700 (MALDI-TOF/TOF)での測定:

nano-LC/Probot system で試料を分離し、マトリックス(CHCA、875ng/well)と共にスポットした。サンプルプレートを装置内に導入後、MS Reflector Mode でキャリブラント (Des-[Arg¹]-Bradykinin [(M+H)⁺ = 904.468]、Angiotensin I [(M+H)⁺ = 1296.685]、ACTH(1-17) [(M+H)⁺ = 2093.087]、ACTH(18-39) [(M+H)⁺ = 2465.199]、ACTH(7-38) [(M+H)⁺ = 3657.929])測定用のレーザー強度を決定する。続いて試料がアプライされている任意のスポットを数点選び、MS 測定および MS/MS 測定用のレーザー強度の検討を行った後、自動測定用のメソッドを作成、MS-MS/MS 連続測定(MS 積算:1250、MS/MS 積算:2000)を行った。なお自動測定を開始する直前にプレートキャリブレーションを実施し、プレート自体の補正を行うことで質量精度の向上に努めている。

6) ヒト血清の 2 次元電気泳動法:

アジレント抗体カラム素通り画分のヒト血清たんぱく質 500μg 分を 2 次元電気泳動した(1)。2 次元

電気泳動後、ゲルを SYPRO Ruby 染色し、Typhoon Image Analyzer (Amersham) により、ゲルのスキャンを行った。解析したゲルイメージから、DeCyder Software を用いてたんぱく質発現スポットを確認し、ピッキングリストを作成した。そのリストをもとに、Ettan Spot Handling Workstation を用いて、たんぱく質発現スポットを切り出し、切り出したゲルを 96 ウェルプレートに回収した。切り出したゲルは、インゲル消化法(2)にてトリプシン消化を行った。即ち、切り出したゲルを 100% CH₃CN で、5 分間洗浄した。洗浄後、10mM DTT で 37°C、10 分間、還元反応後、100% CH₃CN で 10 分間、ゲルを洗浄し、50mM ヨードアセトアミドで CAM 化反応を行った。CAM 化反応後、100% CH₃CN で 10 分間、ゲル洗浄後、4μg/ml トリプシン溶液を 50μl 加えて、37°C、1 時間、トリプシン消化を行った。トリプシン消化後の溶液、および残ったゲルに、20% CH₃CN 50μl 加えて、室温、30 分間、静置して得たペプチド溶液を、別の 96 ウェルプレートに回収した。同様に、0.1% TFA/50% CH₃CN 50μl、0.1% TFA/70% CH₃CN 50μl で回収した溶液も前述の 96 ウェルプレートに回収した。回収ペプチド溶液は、SpeedVac で乾固後、0.1% TFA/2% CH₃CN 100μl に溶解し、Q-Star にてペプチド/たんぱく質の同定を行った。

7) 統合データベースシステム関連:

創薬プロテオームファクトリー施設(PF)において稼動している統合データベースシステムの構成を機能別にまとめると、以下の通りとなる。

- (1) データ前処理モジュール
- (2) ペプチド・たんぱく質同定モジュール
- (3) 統合データベース
- (4) データ後処理モジュール

この中で、(2)については市販のたんぱく質同定エンジン:Mascot を使用した。(1)、(3)、(4)は PF 用に構築したデータマイニング・データベースシステムであり、HiSpec と総称した。また、(1)と(4)はデータ解析ソフトウェアモジュールであり、それぞれ

「Search Manager」「Results Viewer」とした。以下、これら2つのモジュールの役割と機能を示す。

(1) Search Manager

Search Manager は、質量分析計から出力された測定データをサーバに取り込み、各種解析処理を行い、ピークリストを生成し、Mascot に自動投入する処理までを、実行・管理するソフトウェアモジュールである。以下の5つの機能から構成される。

- データ登録(Data Registration): 質量分析計 ABI-4700、Q-Star、LCQ(Thermo ELECTON)の測定データを自動的にシステムに取り込む機能と研究者がデータを個別に登録するためのユーザインターフェイス機能からなる。
- ピークリスト生成(Peaklist Generation): Mascot 同定処理のために、MS/MS スペクトルからピークリストを生成する機能。機器付属ピークリスト作成標準ソフトウェアの互換機能を利用し、ピークリスト生成に関連する各種パラメータの設定も可能である。
- ピークリストフィルタリング (Peaklist Filtering): ICAT 法による比較定量解析のために、MS スペクトルから親イオンのピークリストを生成し、ICAT ペアイオンの探索やピークごとのクラスタ面積の計算処理を実行し、Mascot 投入用のピークリストファイルに情報付加する機能。比較定量精度向上用のソフトウェア改良済。
- Mascot 自動投入 (Mascot Search Submission): 生成されたピークリストを Mascot に自動で投入する機能と研究者がサーチパラメータを変更できるユーザインターフェイス機能を装備。
- データベース登録(Database Upload): Mascot 出力結果を統合データベースに自動アップロードする機能。統合データベースに登録された Mascot 同定結果と ICAT

比較定量結果は、後述の Results Viewer によって閲覧・編集等が可能となる。

(3) Results Viewer について

Results Viewer は、Search Manager を用いてデータベース化されたペプチド・たんぱく質の同定結果、ICAT 比較定量結果を表示・編集するモジュールである。複数の Mascot 検索結果(すなわち複数の実験結果)を統合化した表示が可能で、各種フィルタリングを利用することによって、たんぱく質同定結果・比較定量結果の評価・検証をリアルタイムに実現できる。

Results Viewer は、以下に示す4つの基本画面で構成される。

- Configuration: Mascot 出力データから、統合データベースに登録する内容、Viewer に表示する内容を選別するためのパラメータ設定を行う画面(ペプチドの Mascot スコア下限値、たんぱく質の Mascot スコア下限値、ペプチドのアミノ酸数下限値、等々)。
- Combine Mascot Results: 統合化して一覧表示したい Mascot 出力結果の設定を行う画面。同一サンプルに由来する複数フラクションの測定結果・Mascot 同定結果をまとめて一つの Combine Group に集約できる。ICAT サンプルの場合は、light 標識サンプルの Mascot 結果を集約すると、自動的に対応する heavy 標識ラベルサンプルの Mascot 結果も集約することが可能である。
- Compare Protein Scores: 比較して一覧表示したい Combine Group の指定を行う画面。ICAT サンプルの測定結果については、Combine Mascot Results 画面で生成した ICAT light 標識サンプル由来の Combine Group と ICAT heavy 標識サンプル由来の Combine Group を本画面で指

定することにより、これらのサンプルにおけるペプチドレベル及びたんぱく質レベルでの ICAT 定量比を表示することが可能。

- Manually Filter & Annotate : Results Viewer のメイン画面であり、たんぱく質同定・比較定量結果を閲覧・編集することができる。Protein Identified サブ画面、Peptide Details サブ画面、Spectrum Details サブ画面から構成される。Protein Identified サブ画面には、Configuration 画面で指定された Mascot スコア以上で同定されたたんぱく質リストが表示される。その中の一つを指定すると、そのたんぱく質を構成する同定ペプチドのリストが Peptide Details サブ画面に現われる。さらに、ペプチドの一つを指定すると、そのペプチドが同定される。MS/MS スペクトルのマッチング情報が Spectrum Details サブ画面に表示される。本画面には様々なフィルタリング機能が内蔵されており、冗長な関連たんぱく質群の除去や Mascot 偽陽性結果の排除などの煩雑な編集作業を容易にすることが可能。

C. 研究結果

以下のD.考察に結果及び考察として記載。

D. 考察

D-1: 疾患関連たんぱく質解析技術の確立

—疾患関連グライコプロテオーム解析—

1) SLE モデルマウス及び正常マウス腎臓由来糖たんぱく質糖鎖の差異解析

lpr/lpr 及び+/+マウスを病態及びコントロールマウスとし、それぞれの可溶性及び不溶性画分を用い

て糖鎖差異解析を行った。

1-1) 可溶性画分由来 N 結合型糖鎖の差異解析

lpr/lpr 及び+/+マウス腎臓の可溶性画分から PNGaseF で N 結合型糖鎖を切り出し、それぞれ d₀AP 及び d₄AP で標識した。たんぱく質量から換算して等量に相当する d₀PA 及び d₄PA 糖鎖の混合物を GCC-LC/linearITMS/ FT-ICRMS で分析した。図 5 A はベースピーククロマトグラム(上段)、及びその 2 次元表示図 (time vs *m/z* value、下段) である。病態モデルにおける糖鎖結合量は、正常モデルにおける糖鎖結合量を 1.0 として、d₀PA と d₄PA のイオン強度比から算出した。また、各イオンの糖鎖構造は、FT-ICRMS で測定した精密分子量から計算された糖組成、及び linearITMS による MSⁿ の結果得られた糖鎖配列情報を基に推定した。以下に代表的な糖鎖の解析例を示す。

図 6A はイオン強度が最も高く、32 分 (K2) に溶出された糖鎖のマスペクトルである。*m/z* 989.88 及び *m/z* 991.89 のイオンは lpr/lpr マウスに由来する糖鎖、及び+/+マウスに由来する糖鎖のイオンである。両イオンの強度から、この糖鎖の結合量は、病態モデルでは正常マウスの 1.23 倍に増加していることが明らかとなった。また、*m/z* 989.88 及び 991.89 のイオンは、[Hex]₉[HexNAc]₂ (理論分子量、1960.77、1964.77 Da) 糖鎖のアンモニア付加体であることが分かった。図 6B は、*m/z* 989.9 をプリカーサーイオンとする MSⁿ スペクトルである。MS²⁻⁴ スペクトルにおいて、ヘキソースの 2 価及び 1 価イオンに相当する *m/z* 81 及び 162 間隔の Y 系列イオンが多数検出されたことから、本糖鎖は図中に示すような M9 糖鎖であることが明らかとなった。

図 7A に M9 のイオンに次いで強く検出された 33.5 分 (E2) の糖鎖のマスペクトルを示す。イオン対 *m/z* 1189.47 及び 1191.48 のイオン強度比から、この糖鎖の結合量は、病態モデルマウスでは正常マウスに比較して 1.34 倍に増加していることが明らかとなった。*m/z* 値から算出した計算分子量 (lpr/lpr;

2376.96 Da 及び +/+; 2380.98 Da) は、糖組成式 [Fuc]₃[Hex]₅[HexNAc]₅ の 1 アンモニア付加体 (理論分子量、lpr/lpr; 2377.22、 +/+; 2381.22) に一致することから、これらのイオンは、Fuc が 3 分子結合した 2 本鎖または 3 本鎖糖鎖のイオンであると推定された。図 7B は *m/z* 1191.5 をプリカーサーイオンとする MSⁿ スペクトル、及び推定構造である。MS² スペクトルに、[Fuc]₁[Hex]₁[HexNAc]₁ 及び [Fuc]₂[Hex]₁[HexNAc]₁ の B イオン (B_{2α}/Y5_α⁺ または B_{2α}/Y6_α⁺ 及び B_{2α}⁺) に相当する *m/z* 512 及び *m/z* 658 が確認された。また [Hex]₁[HexNAc]₁ の B イオン (B_{2β}⁺) に相当する *m/z* 366 も強く検出された。B_{2α}/Y5_α⁺ または B_{2α}/Y6_α⁺ フラグメントイオンは B_{2α}/Y6_α⁺ フラグメントイオンの部分構造に相当すると考えられることから、本糖鎖は側鎖の Gal-GlcNAc に 2 分子の Fuc が付加した構造を有することが示唆された。さらに MS³ スペクトルに Y_{4α/4β}⁺ が検出されたことから、残りの Fuc は側鎖ではなくコア部分に付加していることが明らかになった。この Fuc は、一般的によく見られる糖鎖のように、還元末端 GlcNAc に結合していると推定される。本糖鎖のもう 1 つの特徴は、5 分子の HexNAc を持つことである。N 結合型糖鎖の場合、2 分子の GlcNAc はコア部分を構成していることから、3 分子の GlcNAc が側鎖に結合していると考えられる。従って、本糖鎖は 3 本鎖糖鎖または bisecting GlcNAc が付加された 2 本鎖糖鎖と推定された。MS³ スペクトルを精査したところ、プロダクトイオン *m/z* 872 (Y_{1/3α/3β}⁺) 及び 1018 (Y_{3α/3β}⁺) が検出されたことから、この糖鎖には bisecting GlcNAc が存在することが明らかとなった。これらの結果から、本糖鎖は Gal-GlcNAc 構造に 2 分子の Fuc が付加した側鎖構造を有する asialo-fucosylated bisected 2 本鎖糖鎖であることが示唆された。

他のイオンについても同様に帰属した結果を表 4 に示す。また各糖鎖の推定糖鎖構造を表 5 に示す。解析の結果、マウス腎臓の可溶性画分に多く存在する N 結合糖鎖は高マンノース型糖鎖 M5-9 (C1、A1、P1、N2 及び K2) 及び M9 に 1 分子のヘキソ-

スが付加した糖鎖 M9+Hex (I1) であることが明らかとなった。また、これらの糖鎖結合量は、病態モデルマウスでは正常マウスと比較して、1.22-1.72 倍に増加していることが分かった。高マンノース型糖鎖以外に腎臓に特徴的な糖鎖として、フコシル化トリマンノシルコア、及びコア糖鎖の非還元末端 Man が欠損した比較的分子量の小さい糖鎖が検出された。これらの糖鎖の結合量は、病態では 1.49-1.99 倍に増加していることが明らかとなった (F1、L1 及び O1)。さらに、Gal-GlcNAc 構造に 1 分子の Fuc が付加した側鎖構造を有する asialo fucosylated bisected 2 本鎖糖鎖 (G1)、G1 糖鎖の末端 Gal を欠く糖鎖 (J1) 及び asialo agalacto-fucosylated 2 本鎖糖鎖 (M1) などマイナー糖鎖として検出され、これらの糖鎖も病態モデルマウスでは正常マウスと比較して 1.23-2.27 倍に増加していた。

以上の結果、可溶性画分では lpr/lpr マウス由来糖鎖の結合量は、+/+ マウス由来糖鎖よりも全体的に増加していることが明らかとなった。この結果から、糖たんぱく質の発現量が変化している可能性、あるいは、たんぱく質の発現量に変化はないが、糖鎖の結合量に変化が生じている可能性が考えられた。そこで、後述する 2D DIGE によるたんぱく質発現差異解析を行ったところ、lpr/lpr マウスと+/+ マウス間で、発現量が変化した糖たんぱく質は極一部であり、両マウス腎臓由来糖たんぱく質の全体の発現量には、ほとんど差がないことが明らかとなった。この結果は、lpr/lpr マウスと+/+ マウス間の糖鎖結合量の差は、糖たんぱく質の発現量の差異に基づくものではないことを示している。さらに、2-D DIGE による発現差異解析の結果、α-glucosidase II α-subunit の発現量が可溶性及び不溶性画分共に減少していることが明らかになった。

1-2) 不溶性画分由来 N 結合糖鎖の差異解析

可溶性画分と同様に、lpr/lpr マウス及び+/+ マウスの不溶性画分から切り出した糖鎖を d₆AP 及び d₆AP でそれぞれ標識し、

GCC-LC/linearITMS/FT-ICRMS で分析した (図 5B)。不溶性画分由来糖鎖の中で最も多く存在する糖鎖は、34.5 分 (E2) に溶出された側鎖の Gal-GlcNAc に 2 分子の Fuc が付加した asialo-fucosylated bisected 2 本鎖糖鎖であり、その結合量は、病態モデルでは正常マウスに比べて 66% に減少していることが明らかとなった。次いで結合量が多かった糖鎖は高マンノース型糖鎖 M9 (K2) 及び M5 (C1) で、これらの糖鎖は正常と比較して、0.65-0.72 倍に減少していた。さらに Gal-GlcNAc 構造に 1 分子の Fuc が付加した asialo fucosylated bisected 2 本鎖糖鎖 (G1)、G1 糖鎖の末端 Gal を欠く糖鎖 (J1)、及び asialo agalacto-fucosylated 2 本鎖糖鎖 (M1) などが主な糖鎖として検出され、これらの糖鎖も正常と比較して、0.55-0.56 倍に減少していることが明らかとなった。

以上の結果、病態モデルマウスでは正常マウスと比較して、可溶性画分の糖鎖結合量は全体的に増加し、不溶性画分では逆に減少していることが明らかになった。

2) SLE モデルマウス及び正常マウス腎臓組織発現たんぱく質の差異解析

lpr/lpr マウスの腎臓由来可溶性及び不溶性たんぱく質糖鎖の結合量は、+/+マウスとは異なっていることが明らかになった。このように糖鎖結合量に差異が認められた原因として、糖たんぱく質の発現量が変化した可能性、及びたんぱく質の発現量に変化はないが、糖鎖生合成過程に何らかの変化が生じた可能性が考えられた。そこで lpr/lpr マウス、及び +/+マウス腎臓における糖たんぱく質の発現量を比較する目的で、2D DIGE による発現たんぱく質の差異解析を行った。

2-1) 可溶性画分のたんぱく質発現解析

図 8 は可溶性画分の 2 次元電気泳動画像である。可溶性画分の 2D DIGE では検出された約 3000 個のスポットの中 133 スポットに有意差が認められた。

その中で増加したスポットは 82 個、減少したスポットは 51 個であった。有意差が認められたスポットのたんぱく質同定結果を表 6 に示す。減少したたんぱく質は α -glucosidase II α -subunit (No. 404、438) metastasis-associated protein (No. 665)、 β -glucuronidase precursor (No. 796) 及び unnamed protein product (No. 868) などであった。また発現量が増加したたんぱく質は oxoglutarate dehydrogenase (No. 459、460)、interferon-inducible protein 10 receptor (No. 556)、aconitase II (No. 604)、thimet oligopeptidase I (No. 690)、ezrin (No. 693、697)、transglutaminase type 1 (No. 788) 及び PDZ domain containing I (No. 876) などであった。これらの発現量に変化が認められたたんぱく質の中で、糖鎖結合量の変化に関係して特に注目すべきたんぱく質は α -glucosidase II α -subunit である。このたんぱく質は糖たんぱく質糖鎖生合成過程の初期段階に関与する酵素として知られている。 α -glucosidase II の発現量の低下は、糖たんぱく質糖鎖の生合成過程に何らかの変化が生じていることを示唆しているものと思われる。

2-2) 不溶性画分のたんぱく質発現差異解析

図 9 に不溶性画分の 2 次元電気泳動画像を示す。検出されたスポット数は可溶性画分と同様に約 3000 スポットで、43 スポットに有意差が認められた (表 7)。有意差が認められたたんぱく質を同定した結果、増加したたんぱく質は、nidogen 1 (No.132、134 及び 137)、NADH dehydragenase (No. 302)、vacuolarH⁺-ATPase (No. 492)、D-lactate dehydrogenase (No. 702)、tropomoduline 3 (No. 775)、metaxin 2 (No. 1039)、NADPH dehydrogenase (No. 1051) 及び glutation peroxydase 3 (No. 1058 及び 1068) であった。減少したたんぱく質は、 α -glucosidase II α -subunit (No. 155 及び 162)、meprin (No.240) 及び ATPS (No. 604、609) であった。 α -glucosidase II α -subunit

は不溶性画分でも減少していることが明らかとなった。 α -glucosidase II は不溶性の α 及び可溶性の β -subunit から成るヘテロ 2 量体で、 α -subunit は β -subunit と結合したときに可溶化することが知られている。可溶性の α -subunit が不溶性画分から検出された理由として、細胞を可溶化した時に一部の α -glucosidase II が解離され、不溶性になった α -subunit が不溶性画分に移行したと考えられる。図 10 は、小胞体における N 結合糖鎖の生合成過程をまとめたものである。はじめに、M9 糖鎖に 3 分子の Glc が付加した糖鎖 (M9+Glc₃) がドリコールリン酸からたんぱく質に移行される。非還元末端の 2 分子の Glc は α -glucosidase I によって切断され、ついで、残りの 1 分子の Glc は α -glucosidase II によってトリミングされる。Glc が切断されて非還元末端となった Man は α -mannosidase I によって順次切り離され、M5 までトリミングされる。M5 となった糖鎖を有するたんぱく質は、ゴルジ装置に輸送される。ゴルジ装置で *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I) によって GlcNAc が付加された後、糖鎖生合成経路は 2 つに別れる。複合型糖鎖合成経路と、混成型糖鎖合成経路である。今回、可溶性画分で検出された M9 にヘキソースが付加した糖鎖は、N 結合糖鎖生合成過程から、M9+Glc と推定される。本研究では、この M9+Glc 糖鎖を基質とし、糖鎖の生合成の初期段階に関与する酵素 α -glucosidase II の発現が、病態モデルマウスでは低下していることが明らかとなった。糖鎖結合量が、lpr/lpr マウス腎臓と正常マウスの腎臓とは異なっていたという結果と合わせて、病態モデルマウスでは、糖たんぱく質糖鎖の生合成過程に何らかの変化が生じていることが示唆された。

2D DIGE では、 α -glucosidase II α -subunit 以外に、SLE または炎症反応に関与することが報告されている多くのたんぱく質が同定された。可溶性画分で検出された oxoglutarate dehydrogenase は dihydrolipoyl transacylase E2 と複合体を形成して抗ミトコンドリア抗体の抗原となるたんぱく質である。

この自己抗体が SLE 患者において検出されることから、SLE との関連性が指摘されている。抗 transglutaminase 抗体も同様に SLE 患者から検出されることが知られている。Interferon-inducible protein 10 receptor は lpr/lpr マウスの免疫応答及び炎症反応惹起に関与するたんぱく質として報告されている。Ezrin は細胞膜とアクチンフィラメントの架橋たんぱく質であり、アポトーシスの初期段階に遊離されることが知られている。lpr/lpr マウスは Ras の変異によりアポトーシスに抵抗性を示すことから、このようなアポトーシスに関連した分子の発現量が変化していることは非常に興味深い。

不溶性画分で検出された Nidogen 1 は、IV 型 collagen、laminin、perlecan と共に基底膜を構成している分子であり、これらの分子と複合体を形成し、インテグリンなどとの分子間相互作用に関与している可能性が示唆されている。ループス腎炎では腎基底膜が肥厚すること、SLE 患者では抗 nidogen 抗体価が上昇することから、SLE との関連性が指摘されている。Meprin は、ごく最近になって、炎症性疾患時に増加することが知られているマンナン結合たんぱく質 (MBP) の生体内リガンドであることが明らかにされた糖たんぱく質である。Lamin は核膜の裏打ち構造を構成する核膜たんぱく質である。SLE 患者において抗 lamin B1 抗体価が上昇することが報告されていることから、lamin C の発現量が増加していたという結果は非常に興味深い。抗酸化酵素である Glutathione peroxidase 3 の発現量の増加は、ループス腎炎により組織細胞に障害が生じていることを反映していると考えられる。

このように、今回の研究では、これまでに SLE 関連たんぱく質として個別に報告されていた複数のたんぱく質の発現量の変化を一度の分析で確認することができただけでなく、新たに、糖鎖生合成過程に関与する α -glucosidase II の発現量が低下していることを見出した。

本研究では定量的・定性的糖鎖プロファイリング

法を開発し、疾患モデルマウス腎臓の糖鎖の結合量が正常マウスの腎臓とは異なっていることを明らかにした。また、2D DIGEによるたんぱく質発現解析を行い、糖鎖生合成に係わる α -glucosidase II の発現が低下していることを見出した。我々が開発した定量的定性的糖鎖プロファイリングは、一回の分析に 500 マイクログラムものたんぱく質を必要とする 2D DIGE と比べ、20 マイクログラム程度のたんぱく質量で分析できること、また、操作が簡単で、分析及び解析に要する時間が短いことから、糖鎖の構造や分布の変化を直接検出する糖鎖差異解析法としてはもとより、糖鎖の生合成及び分解に関与するたんぱく質発現の解析法としても利用できることが示唆された。さらに本研究では、糖鎖生合成に関与する α -glucosidase II が低下することによって、膜を主成分とする不溶性画分と可溶性画分における糖鎖結合量が変化することを見出した。今後、糖鎖の生合成及び分解系に関わる他の酵素の発現解析、及び主な糖たんぱく質の糖鎖構造解析を進め、糖鎖生合成・分解系酵素と糖鎖分布の変化の関係、さらに自己免疫疾患や炎症性疾患と糖鎖生合成及び分解系酵素との関係を明らかにしていきたいと考えている。

D-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

ゲノム研究は収穫期を迎え、創薬を指向したライフサイエンス研究は、疾患の発症や悪化・治癒、さらには発生・分化といった様々な生命現象で生じるたんぱく質の時空間、質的・量的な変動を包括的に解明しようとするプロテオミクス、たんぱく質の立体構造やたんぱく間相互作用と生命現象との連関を理解しようとする構造ゲノミクスなどへと集約されつつある。これは、ゲノムが単なる情報(遺伝型)に過ぎず、そのままでは何ら機能を発揮し得ないこと、転写した RNA が機能する一部の例外を除き、このゲノム情報に基づき、多様なたんぱく質群(プロテオーム;

表現型)が翻訳され、その機能を発揮することで初めて多様な生命現象が認められることに因る。以上のポストゲノム研究の中でも創薬を指向した領域においては、

- (A) 疾患の発症や悪化、治癒で、時空間的、質的、量的に変動する“疾患関連たんぱく質”の探索と、これら疾患関連たんぱく質の中から「そのまま医薬品シーズとなるたんぱく質」や「創薬ターゲットとなるたんぱく質」を絞り込む(同定すること
- (B) 絞り込んだたんぱく質自体を医薬品シーズとして有効活用していくか、あるいは逆に絞り込んだたんぱく質を制御する薬剤を選択、最適化していくことによって新規医薬品を開発していくこと、及びそのための創薬基盤技術を開発すること

が、重要課題となっている。この研究の流れは、がんや種々感染症、自己免疫疾患などに対する抗体療法やサイトカイン療法といったたんぱく療法や siRNA などを用いた遺伝子治療などが台頭してきたことも相俟って、「それ自体が医薬品シーズとなるたんぱく質」や「創薬ターゲットとなるたんぱく質」を有効活用しようとするプロテオーム情報を利用した創薬(プロテオーム創薬)への期待を高めている。しかし、疾患関連たんぱく質を探索するための効率的かつ効果的な研究基盤や、疾患関連たんぱく質の中から「それ自体が医薬品シーズとなるたんぱく質」や「創薬ターゲットとなるたんぱく質」を絞り込み、これを医薬品開発などへ有効活用していくための基盤技術が未だ十分に整備されていないのが現状である。例えば、「それ自体が医薬品シーズとなるたんぱく質」を医薬品として適用しようとした場合、過去の多くの事例が示しているように、たんぱく質は一般に、体内安定性に極めて乏しいため、臨床応用の際には大量頻回投与を余儀なくされ、往々にして重篤な副作用を招いてしまう。なかでもサイトカインなどは、多

彩な細胞上の複数のレセプターを介して、多様な in vivo 生理活性を示すため、目的とする治療作用のみならず副作用の原因となる他の作用までも同時に発揮してしまう。そのため周知のように、医薬品化されたたんぱく質は極一部にすぎないのが現状である。

以上の観点から本研究では、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を推進するため、以下の研究を行った。

I)-①臨床検体の受入体制の確立

ATL は予後不良ながんのひとつであり、HTLV-1 ウイルスの感染が発症の原因となっていることが明らかにされている。しかし、その発症のメカニズムや、HTLV-1 に感染してから ATL を発症する人と発症しない人の違いなど未だ多くが不明であり、有効な治療法も確立されていない。したがって ATL の適切な診断法、有効な治療法の確立が望まれている。そこで我々は ATL 患者のプロテオーム解析を行うことにより、ATL の分子病態の解明と、疾患マーカー・医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の同定を行い、診断・治療に有用な情報を得るための基礎検討を開始した。本研究は、近未来的に HIV や肝炎ウイルスなどのウイルス性疾患の対するプロテオミクス、白血病をはじめとするがんに対するプロテオミクスへと直結するものと位置づけている。

解析対象として ATL を選択する意義として以下の点も重要となる。まず、白血病発症の起点が HTLV-1 の感染であり、他の多くのがんと比較して、明確であることである。すなわち他の多くのがんにおいては、発がんのイニシエーションが不明であるのに対し、ATL ではそれが明確であることは、がん化のメカニズムを解明するうえで有利な点が多い。すなわち、がん化に至るまでの生活環境や SNPs などの影響を比較的受けにくいと、解析する上で個体差や日内変動などの影響を受けにくいものと考えられる。次に、ATL の患者分布は全世界的にみても日本を含む一部の地域に限られており、先進国では日本以外ではほとんどみられないことがあげられる。

すなわち ATL 患者由来のサンプルを入手し、解析できる研究者が限られているために、難治性の疾患であるにもかかわらず、本疾患に関する研究はほとんど進展していない。一方で、ATL が稀な疾患であったとしても、ウイルス感染から白血病に至る過程は他のがんにも広く共通するものと考えられ、ATL の研究から他のがん研究にも有用な多くの知見を得られるものと期待される。さらに、多様な比較試料の採取が可能であることがあげられる。たとえば同一患者の薬物治療前、治療後の血液(病態組織)試料、薬物治療で寛解に至った患者あるいは無効であった患者、の試料などが入手可能であり、比較検討が可能となり、疾患プロテオミクス研究の可能性・有用性を最大限に引き出せるものと考えられる。

本年度は ATL 患者、HTLV-1 キャリアからインフォームドコンセントに基づいて血液・尿の提供を受け、試料を確保するための態勢を整えた(図 11)。ATL は九州・沖縄地方において患者が多いことから、鹿児島大学医学部と提携し、同附属病院で受診している患者から試料提供者を募ることとした。ATL には病型として急性型・リンパ腫型・慢性型・くすぶり型・急性転化型がある。また、HTLV-1 に感染していても、ATL を発症していないキャリアがいる。それら病態の違いとプロテオームとの関係を調べるため、病型ごとに 10 症例の試料の確保を目指すこととした。また、薬物治療の奏功性、病型の転化などとプロテオームとの関係を見出すため、同一患者をフォローアップして試料を採取することも試みる予定である。なお、これらの患者試料を用いた研究を進めるにあたり、インフォームドコンセント、個人情報の管理・匿名化について十分に配慮する必要があることから、国立医薬品食品衛生研究所および鹿児島大学医学部附属病院において研究倫理審査委員会に申請を行い、承認を得ることができた(国立衛研に関しては条件付き承認)。次年度より、実際に患者からの試料の採取を行い、プロテオーム解析を行う予定である。

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

プロテオミクスは言うまでもなく、細胞・組織等で発現している全たんぱく質について、その発現様式を網羅的に解析し、病態を含めた生命イベントを包括的に理解しようとするものである。しかし現状では、生体試料由来の全たんぱく質の時空間的、質的、量的な発現様式や、その通常時(正常・健常状態を含む)と刺激時(疾患状態を含む)における変動について、一挙かつ有効に解析・評価できる方法はない。そのため現時点では、このプロテオミクスを効果的かつ効率的に進めていくために、例えば生体試料由来のたんぱく質を十分なプロテアーゼインヒビターなどで前処理しておく、その時間的変化・質的变化を予め制御しておくことや、細胞膜・核小体・ミトコンドリアなどのような特定の細胞内小器官に予め分画し、空間的制御のもとにプロテオーム解析すること、翻訳後修飾やたんぱく質間相互作用などを指標に予め選択的濃縮したたんぱく質を調整しておくことなど、前処理方法の確立・最適化が必須となっている。即ちプロテオーム解析を行ううえでの大きな課題は依然として、日進月歩で改良され続けている質量分析機器を用いたたんぱく質の同定方法にあるのではなく、むしろ効率的に純粋な材料を調整する方法の開発をはじめとする前処理技術の確立と言える。そこで本研究ではまず、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を開始することにした(図 12)。

組織・細胞などからたんぱく質を分離・抽出する代表的な方法として、現在、細胞を破碎することで得られたホモジネートを、顆粒の大きさの違い(沈降速度の差)を利用して超遠心器にて細分化する分画遠心法と、顆粒の密度の違いを利用した密度勾配遠心法がある。分画遠心法は、比較的簡便に大量の細胞内小器官(オルガネラ)成分を分取することが出来るのに対して、密度勾配遠心法は、手技がやや煩雑ではあるが、純度の高いオルガネラ成分の精製が可能である。上記の方法は、それぞれ利点・欠点を有しており、目的によりこれらの方法を使い分ける必要

がある。現在、簡便にオルガネラ成分を分画出来る超遠心法と、分離能が高いとされる密度勾配遠心法との比較検討を行っており、高度に分離された生体試料の調整を行っている。また、密度勾配遠心法を用いる場合には、その煩雑性や再現性の面からも、各社から販売されているキット(PIERCE 社製、MERCK 社製など)を用いて、これらの比較検討を行っており、効果的かつ効率的にプロテオーム解析に次年度以降展開していく予定である。

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

最終的に質量分析機器によりたんぱく質を効果的に同定するためには、前述の I)-②などで得られたたんぱく質サンプルを 2 次元液体クロマトグラフィー(2DLC)や 2 次元ゲル電気泳動(2DGE)によりたんぱく質を分離・精製するステップが必要不可欠となる。このうち 2DGE は、たんぱく質を等電点と分子量の差に基づいて 1 枚のゲル上に 2,000~10,000 個のスポットに分離し、これらを可視化、ならびにたんぱく質の直接的な定量が可能である。従来、たんぱく質を可視化するための染色法としては、クマシーブルーや銀染色法が用いられた。しかし最近、2 つの異なった生体試料をたんぱく質の等電点や分子量に相対的な変化を与えない 2 種類の蛍光試薬で別々に標識し、それらを混合して同一ゲル上で分離した後、異なる励起光で励起して可視化した蛍光スポットを多重検出する方法(DIGE; differential gel electrophoresis)が開発された。この方法では同一たんぱく質はゲル上で同じ位置に泳動されるため、試料間のたんぱく質の量的変動を容易に測定できる。電気泳動法は、たんぱく質分子を全体として識別できるという意味ではトップダウン方式といえる決定的な利点を有した分析法で、目的のたんぱく質がゲル上でスポットとして検出できる場合には、そのたんぱく質の翻訳後修飾の状態などの変動解析にも有効である(図 13)。また我々は、2DGE 後の数千スポットを一挙にメンブランチランスファーし、後述する

cDNA フェージライブラリを用いてたんぱく質間相互作用解析を行うこと、さらに後述するナイーブ抗体ライブラリを用いて疾患関連細胞で発現しているたんぱく質に対する抗体を一挙作製することを計画しており、現在白血病細胞を用いて 2DGE を行うと共に、上記ライブラリの利用準備を進めている。

また、たんぱく質やペプチドの分離技術として 2DLC のセットアップも急いでいるところである。2DGE は、分析に時間がかかり、マニュアル操作が多くて自動化が困難なこと、ゲル上で検出できるたんぱく質の分子量や等電点の範囲が限られていること、分析のダイナミックレンジが小さく発現量が少ないたんぱく質の検出が困難なことなどが問題点として指摘されている。一方 2DLC は、たんぱく質混合物を予めプロテアーゼ処理し、消化ペプチドを質量分析するボトムアップ方式に汎用されており、「ショットガン (shotgun) 法」とも呼ばれる。この 2DLC は、2DGE に比べて検出できるたんぱく質の量的なダイナミックレンジが広く、また、適用できるたんぱく質の分子量や等電点、水に対する溶解度などに制約が少ないため、生体試料に含まれるたんぱく質の同定数を大幅に向上できる。今後、先述した 2DLC の利点を最大限に利用していくため、膨大な数のペプチドを精細分離することを目的に、カラムの選択(材質、カラム径など)やバッファー組成・流速の最適化などに着手している。さらに、2DGE のディファレンシャル解析と同様に、2DLC でも発現の差異解析を行おうとした場合、同位体コード・アフィニティー・タグ法 (ICAT 法) などによるラベル化が必須となるものの、現在のラベル化試薬には修飾部位、修飾効率などの点で懸念や問題を抱えている。本観点から現在、たんぱく質の発現解析をハイスループットで行うための新規ラベル化試薬の設計などを種々領域の研究者と協議中である。

I)-④ 疾患関連たんぱく質ライブラリの構築

プロテオーム解析により探索されてくる数多くの疾患関連たんぱく質について、たんぱく質間相互作

用や立体構造、生物機能等を迅速かつ網羅的に明らかとしていくことは、医薬品シーズや創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の絞り込み・同定とその創薬への有効活用の観点で最も重要な検討課題と位置づけられる。この点、疾患関連細胞で発現しているたんぱく質を網羅的に手にすること、即ちライブラリ化しておくことは、上記研究分野での圧倒的な競争力を発揮できることになる。本観点から我々は、cDNA フェージディスプレイライブラリを用いることによる、疾患関連たんぱく質のライブラリ構築を進めている。このフェージディスプレイライブラリを用いれば、目的たんぱく質に相互作用する分子をパンニング法によって迅速かつ網羅的に探索することが可能となる(図 14)。なおフェージディスプレイライブラリとして、繊維状フェージ M13 とラムダフェージ T7 を用いている。M13 フェージベクターでは、コートたんぱく質 g3p の N 末側に外来たんぱく質が融合して提示され、T7 フェージベクターではキャプシドたんぱく質 10B の C 末側に外来たんぱく質が融合して提示される。また、M13 フェージは分子量 6 万以上の高分子たんぱく質の提示効率は、たんぱく質の分子量の増大と共に低下してしまうものの、大きなレパートリーを有するライブラリを構築可能である。一方、T7 フェージでは大きなレパートリーを有するライブラリの構築は困難であるものの、比較的高分子量のたんぱく質をも効率よく提示することが可能である。また、ライブラリ作製に用いる cDNA として、細胞で発現している mRNA から単に合成した場合、発現レベルの低い遺伝子が得られない(発現量の多いたんぱく質の cDNA が大部分を占めてしまう)可能性がある。そこで、発現レベルの違いの影響を小さくすることが可能な均質化ライブラリ、あるいは対照となる細胞と疾患関連細胞において発現量が異なる遺伝子の cDNA を調製し得る subtraction ライブラリ等の技術を新たに適用しているところである。これらの技術を用いた疾患関連細胞 cDNA フェージディスプレイライブラリは次年度以降、たんぱく質の相互作用解析や疾患との関わり of 解明などに極めて有用なツールになるものと考えら

れる。

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

プロテオーム解析により探索されてくる数多くの疾患関連たんぱく質について、その体内・細胞内の局在化解析や生物機能解析を行ううえで、抗体は必須のツールとなる。この疾患関連たんぱく質に対する抗体は、時空間的、質的、量的なたんぱく質の発現変動解析のみならず、抗体医薬や診断薬としても利用可能となる。しかしながら現在、ハイブリドーマ法を利用して疾患関連たんぱく質に対する抗体を作製しようとした場合、少なくとも3ヶ月以上の期間を要してしまうため、数多くの疾患関連たんぱく質に対する抗体を一挙かつ短時間に作製できる基盤技術の開発が必須となっている。この点、昨今の抗体工学の発展に伴い、抗体中の抗原認識部位である重鎖可変領域(VH)と軽鎖可変領域(VL)をグリシン残基4つとセリン残基1つで構成されるペプチドリンカー(G4S リンカー)によって連結した1本鎖抗体(scFv)が考案されてきた。従来までのハイブリドーマ法を用いた抗体の生産と比較して、このscFvは、1)簡便かつ短時間で、リコンビナントscFvを安価かつ大量に大腸菌で生産できること、2)遺伝子工学的手法により、抗原への結合親和性の改良や他のたんぱく質との融合体作製などを容易に行えることなどのメリットを有している。scFvは、そのN末端よりVL、G4S リンカー、VHの順からなるVLVH型とVLとVHを入れ換えたVHVL型の2種類の形状を取り得る。その抗原への結合親和性(アフィニティ)に関しては、個々の抗体に大きく依存しており、VLVH型とVHVL型で優劣は付け得ないものの、大腸菌における生産効率や後述するファージ表面への提示効率は一般にVLVH型が勝っているものと考えられている。本観点から我々は、多様性に富んだナイーブ抗体ファージライブラリを作製するため、VLVH型のscFvを選択した。

現在までに報告されている抗体ファージライ

ブラリは大きく二つに分類される。ナイーブ抗体ファージライブラリは、抗原感作されていないBリンパ球から、抗体遺伝子を取り出して作製される。一方免疫ファージライブラリは、予め標的抗原で免疫した個体のBリンパ球から抗体遺伝子を回収し、作製される。この免疫ファージライブラリによる抗体作製は、抗体の遺伝子を単離し、大腸菌などにてリコンビナント抗体(scFv)を得るという点を除いては、抗原感作したB細胞とミエローマとの細胞融合によってハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体を得るという従来までの方法と殆ど同様である。そのため、抗原が既に判明している場合には簡便かつ短期間に、目的とする標的抗原に対する多種多様な抗体(scFv)が得られるというメリットを有しているものの、我々が本研究で目的としている「疾患関連たんぱく質に対する抗体を網羅的かつ迅速作製し、疾患関連たんぱく質の時空間的、質的、量的、機能的解明に応用することで医薬品シーズ・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」ためには適さない。一方でナイーブ抗体ファージライブラリは、理論上あらゆる抗原に対するモノクローナル抗体(scFv)を単離可能なことから、その汎用性、有用性が大いに期待されつつも、未だ世界的に見ても数グループでしか開発されていない。このナイーブ抗体ファージライブラリの質は、独立クローンからなるライブラリサイズ(モノクローナル抗体の多様性)により決定されるため、如何にライブラリサイズを高めていくかが最も重要な課題となる。しかし上述した既存のナイーブ抗体ライブラリの作製方法は、B細胞などからVL遺伝子やVH遺伝子を回収してくるためのプライマーの多様性が乏しいことやこれら抗体遺伝子を増幅するためのPCR条件の設定が非常に難しいこと、またPCRによってVH遺伝子とVL遺伝子を、G4Sリンカーをコードした遺伝子(一般にG4Sが3回繰り返されたペプチドでVHとVLを連結する)で連結する際、フレームシフトやミスマッチが頻繁に生じてしまうことなどの点で課題を残しており、ナイーブ抗体ファージライブラリの質的向上およびその手法の確立が必須課題となっている。

そこで本研究では、多様性を十分に持たせ、かつ、リンカー部位において正確なプライミングをする工夫を施したプライマーを設計することによって、上述の課題を充たす膨大な多様性を有する新たなナীব抗体ファージライブラリの構築を試みた。

マウス cDNA より、VL 遺伝子断片、VH 遺伝子断片を表 3 に記載したプライマーを用い PCR により増幅した。増幅した PCR 産物は、約 400bp 付近と約 350bp 付近に位置し、目的の VL 遺伝子断片と VH 遺伝子断片が得られたことを確認した(図 15)。この両遺伝子をアッセンブル PCR にて連結し、次いでこの PCR 産物をテンプレートとして scFv 遺伝子を増幅した。なお、増幅された scFv 遺伝子は、約 900bp であり、一般的な scFv 遺伝子サイズ(700~800bp)よりも長くなっている。これは、scFv 遺伝子(インサート)をファージミドベクター(pY02)へ方向性でライゲーションするため、scFv 遺伝子の 5'末端側に制限酵素 Sfi I サイトを、3'末端側に制限酵素 Not I サイトを付加したこと、またこれら両制限酵素による消化効率を高めるため(結果的にインサートのベクターへのライゲーション効率が高まる)、十分な付加配列を Sfi I サイトの上流、Not I サイトの下流に導入したためである。

得られた scFv の遺伝子ライブラリを pY02 にライゲーションした後、ライゲーション産物(遺伝子ライブラリが挿入されたファージミドベクター)を大腸菌 TG1 へエレクトロポレーションすることで形質転換した。ライブラリサイズを算出したところ、 5×10^8 種類という大きな多様性を有する大腸菌ライブラリを作製し得た【ひとつの大腸菌には、1 種類の scFv をコードしたファージミドベクターしか存在できない。従って、各大腸菌モノクローン中のファージミドベクターを回収し、各大腸菌由来の scFv 遺伝子の塩基配列が独立的であれば、大腸菌の数(多様性)=ファージの多様性=抗体の多様性となる。下記の知見を考慮し、本結果を考えた場合、 5×10^8 種類もの多様性を有した scFv を表面提示したファージライブラリが作製可能なことを示している。】(図 16)。この大腸菌ライブラリ

(ファージライブラリ)の質的評価を目的に、ランダムに 21 クローンをピックアップし、Direct PCR によって個々の大腸菌に含まれるファージミドベクター中に scFv 遺伝子が存在していることを確認したところ、全ての大腸菌クローンが scFv 遺伝子を保持していることを認めた。さらに得られた scFv 遺伝子を BstN I し、フィンガープリント解析した結果、21 クローンが異なった scFv 遺伝子をコードしていることが判明した(図 17)。またデータには示していないものの、これら 21 クローン由来の scFv 遺伝子をシーケンス解析したところ、scFv の抗原認識部位(相補性決定領域; complementarity determining region; CDR)のみならずフレームワーク領域も異なる配列を有していた。以上の事実は、本研究で設計したプライマーセットを用いることで、多様性に富んだナীব抗体ファージライブラリが創出できることを強く示しているものと考えられた。

ナীব抗体ファージライブラリの決定的な利点、即ち疾患プロテオーム研究にナীব抗体ファージライブラリを利用・活用する意義は、理論上、いかなる抗原に対しても、特異的なモノクローナル抗体(scFv)を迅速かつ簡便に単離可能なことにある。そこで次に、本研究で作製したナীব抗体ファージライブラリの有用性評価を目的に、種々抗原に対する scFv の単離を試みた。特定抗原に対する scFv の単離は、パンニングにより行った。パンニングは図 18 に示したように、

- 1) 標的抗原に結合しない scFv 提示ファージなどを取り除き、標的抗原と強い結合力を有する scFv を提示したファージクローンのみを回収すること
- 2) 回収した scFv 提示ファージクローンを再び大腸菌に感染させることで、ファージを増幅し、再度上記 1)を行うこと

で、標的抗原に選択的な scFv 提示ファージを濃縮・選択しようとするものである。そこでこのパンニングを利用し、モデル抗原としてのルシフェラーゼに対する scFv の単離を試みることで、パンニング条件の最

適化を図った。

はじめに、ナイーブ抗体ファージライブラリを抗原に添加した後の洗浄条件(抗原に結合しないファージクローンなどの除去条件)を検討した。プロトコル 1 は、PBS で 10 回洗浄、プロトコル 2 は、PBST で 3 回、PBS で 7 回洗浄、プロトコル 3 では、PBST で 10 回、PBS で 10 回洗浄を行った。インプットファージタイター(抗原に添加したファージ粒子数)とアウトプットファージタイター(洗浄後、溶出されてきたファージ粒子数)との比をパンニングラウンドごとに算出したところ、プロトコル 1 では 1 回目、2 回目のパンニングで大きな変化は認められなかったばかりか、3 回目のパンニング後でインプット/アウトプット比が逆に低下してしまった。一方プロトコル 2 及びプロトコル 3 では、パンニングを重ねるに連れて顕著にインプット/アウトプット比が上昇した。以上の結果は、プロトコル 2 及びプロトコル 3 を用いたパンニングにより、ルシフェラーゼに結合する scFv 提示ファージが濃縮されたことを示している(図 19)。特に最も過酷な洗浄条件を適用したプロトコル 3 において、3 回目のパンニング後に得られたファージクローンは、ルシフェラーゼに対して優れた選択性と結合性をあわせもった scFv を表面提示しているものと考えられた。そこでプロトコル 3 の各パンニング後に得られたファージをバルクで TG1 に感染させた後、生じたコロニーをランダムにピックアップし、モノクローナルなファージを産出させた(大腸菌・ファージのモノクローン化)。続いて、モノクローン化したファージの表面に提示された scFv のルシフェラーゼに対する結合性をファージ ELISA にて検討した(図 20)。その結果、3 回目のパンニング後に得られたクローンにおいて、90 クローン中、31 クローンがルシフェラーゼに対して強い結合力を有していた。その結合特異性を評価するため、OVA に対する結合性も同様に検討したところ、これら 31 クローンは OVA に結合しないことが判明した。これらの 31 クローンの scFv についてより詳細に評価するため、BstNI を用いたフィンガープリント解析を行ったところ、少なくとも 18 種の scFv が存在して

いることが示唆された(図 21)。さらに、4 クローンについては DNA シークエンス解析を試みた結果、異なった scFv であることが確認された(表 8)。以上の結果から、本研究で構築したナイーブ scFv ファージライブラリを用い、抗原パンニングすることで、2 週間以内にルシフェラーゼに対する種々モノクローナル scFv が単離、同定できることが明らかとなった。

次にナイーブ scFv ファージライブラリの有用性をさらに評価するため、血管内皮増殖因子受容体 2 型、血管内皮増殖因子、TNF- α 及び緑膿菌の菌体外毒素フラグメント(単独では毒性を全く発揮しない断片化体)に対してパンニングを行った。その結果、パンニングラウンドが進むに連れて、いずれの抗原に対してもインプット/アウトプット比が上昇していたことから、各抗原に対して特異的に結合する scFv が単離出来得るものと考えられた(図 22)。

scFv ファージライブラリは、モノクローナル抗体を迅速かつ網羅的に単離、同定が可能なシステムとして広く認識されつつある。特に、ナイーブ scFv ファージライブラリは、理論上、あらゆる抗原を認識するモノクローナル抗体を作製可能とさえ言われており、大きな期待が寄せられてはいるものの、有効なナイーブ抗体ライブラリを構築できた例は極めて少ない。その原因として、抗体遺伝子を増幅するためのプライマーセットの問題で VL 遺伝子や VH 遺伝子が有する多様性を再現できないこと、G4S リンカーをコードした塩基配列を利用し、VL 遺伝子と VH 遺伝子を連結するために行うアッセンブル PCR によって、フレームシフトなどが生じてしまうことなどが挙げられる。本研究では、これらの問題点を改善できるプライマーセットを設計することで、ナイーブ scFv ファージライブラリを構築し、その有用性を認めた。次年度以降は、本年度作製したナイーブ scFv ファージライブラリの改良と疾患プロテオーム研究への展開を図り、例えば疾患関連たんぱく質に対するモノクローナル scFv の網羅的創出を通じ、疾患関連たんぱく質の機能解析、時空間的、質的、量的な観点での発現様式の検索、たんぱく質相互作用の解析に順次展開し

ていく予定である。

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

疾患プロテオミクスにより絞り込まれてきた「医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質」を有効活用していく一つのアプローチとして、ファージ表面提示法を利用し、「たんぱく質の構造-活性相関」を高速解析することで、たんぱく質の活性中心や機能ドメインを検索していくことが挙げられる。このなかで最も重要となるポイントは、①たんぱく質中の複数のアミノ酸残基を、一挙に全 20 種類のアミノ酸へと置換した構造変異体(アミノ酸置換体)ライブラリの網羅性(質とサイズ)を如何に高めるか、②膨大な構造変異体ライブラリの諸機能を如何に高速評価していくのか、③この中から例えば、レセプターへの親和性や選択性に優れた変異体や特徴的な生物活性を有する変異体を見つけ出し、その構造-機能(レセプターへの結合様式や生物活性)との連関を追求していくかということである。このうち①に関しては、PCR 条件の設定やファージミドベクターの改良、大腸菌への遺伝子ライブラリの導入法を初めとするファージ産生プロトコルの改善を図った。一方で②と③に関しては、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の中から種々機能特性(レセプター親和性、選択性、生物活性など)を有する構造変異たんぱく質を提示したファージ集団を効率よく選別するため、個々構造変異体の特定ターゲットへの結合親和性の相違などを利用し、BIAcore を活用したソーティングを試みてきた(パンニング)。BIAcore は表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)を利用したバイオセンサーであり、相互作用する分子のうち一方をセンサーチップ表面上に固定化し、他方を含む試料をマイクロ流路系を介して添加し、センサー表面上で起こる分子の結合、解離によって生じる微量な質量変化を、SPR シグナルの変化としてリアルタイムにモニターする。この BIAcore を用いたパンニングの最大の利点は、例えばレセプターや

抗体といったターゲットを極微量調製するだけで、特定ターゲットに対する結合親和性や選択性にに基づいた選別が可能となること、またこれら情報をモニタリングできることにある。しかし現状では、これら BIAcore を用いたパンニングの決定的利点は全く生かされておらず、用いるセンサーチップの種類、流速など、種々条件の最適化に関する情報に乏しかった。そこで、BIAcore を用いたパンニングの最適化を図るため、用いるセンサーチップの種類や流速など種々条件を検討した。

BIAcore によるパンニングの最適化を図るため、センサーチップに固相化したレセプターに、ファージのような巨大粒子が結合可能であるか、TNFR1 (TNF レセプター1)を固相化したバイオセンサーに wild-type TNF- α (wtTNF- α) 発現ファージを添加することにより評価した。一般にたんぱく質分子の結合反応を解析する際、センサーチップとして CM5 が用いられている。しかし、ファージ粒子を適用した場合、ファージ粒子(直径約 10nm、長さ約 1 μ m)の大きさゆえに CM5 では良好な結果が得られなかった。そこで、CM5 より短いデキストラン鎖をもつ F1 センサーチップを用いて検討した。その結果、ネガティブコントロールとして用いた CD22 に対する一本鎖抗体(scFv)を表面提示したファージは全くレスポンスが確認されないにも関わらず、wtTNF- α 発現ファージはファージ粒子数の増加と共に、依存的に TNFR1 への結合量も増大することが示された(図 23)。また、一般にたんぱく質分子の結合反応を解析する際、試料は 10 ~20 μ l/min の流速で添加するが、ファージ粒子の場合このような早い流速では良好な結果が得られなかった。そのため、種々条件検討したところ、3 μ l/min の流速でファージを添加することにより最良の結果を得た。次に、BIAcore を用いたパンニング効率を検討するため、CD22 に対する scFv 発現ファージに対し 10%の割合で wtTNF- α 発現ファージを加えたものをインプットライブラリとして、TNFR1 を用いたパンニングを行い、回収されたファージ中の wtTNF- α 発現ファージの割合を PCR