

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

分担研究者 友池仁暢（国立循環器病センター病院長）

研究要旨

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し、その成果を新たな医薬品開発シーズとするため、当センターが循環器疾患を対象として試料、臨床情報を収集し、プロテオームファクトリー施設と協力してたんぱく質を解析、データベース化する研究計画全体について、倫理委員会で承認を受けた。病院、研究所より研究課題の提案を受け、その中より本研究の主旨に則しプロテオーム解析により有効な情報が得られると推定される研究課題を選択、検討した。研究計画を順次倫理委員会へ提出し、承認を得た後、試料・臨床情報の収集を開始した。

A. 研究目的

心臓病や脳卒中による年間死亡数は30万人に達し、死亡数1位のがんにほぼ匹敵する。循環器疾患全体での年間患者数は1034万人とがんの128万人の約8倍であり、平均入院患者数も30万人に上り、さらに要介護などの認定者400万人の第一位はその3割を占める脳血管疾患の後遺症である。このため、急速な高齢化が進行する我が国において、循環器疾患の制圧は、極めて重要な課題となっている。

本研究の目的は、このような循環器疾患に関連するたんぱく質を網羅的に解析、データベース化し、疾患関連たんぱく質を探索することにより、新たな診断、治療法開発のシーズを発見し、それに基づく医薬品開発を可能とすることである。平成16年度は、当センターにおいて研究実施に必要な手続き（技術的な検討、プロトコルの検討、倫理委員会での審議）を完了すると共に、研究実施体制を整え研究課題を設

定し研究を開始した。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

当センターでは、内部審査機関である高度先駆的医療・研究審査委員会で、研究実施計画の医学的、科学的妥当性について検討を行い、承認の後に倫理委員会に提出することが出来る。

委員の半数は施設外の有識者で構成されており、倫理と法律的観点からの審議を経て妥当と判断されれば総長から研究実施の承認を得ることが出来る。疾患関連たんぱく質解析研究は、新たな国家的プロジェクトであるとともに、試料や臨床情報をプロテオームファクトリー施設に提供し、その解析結果はデータベース化されプロテオームファクトリーのコンソーシアム参加企業22社で医薬品開発に活用される新たな研究形態である。

当センター内で多数の研究実施計画が提出されると推定されたため、先ず疾患関連たんぱく質解析研究の計画全体の理念と当センター実施に関する基本方針について倫理委員会の承認を受けた。個別の研究計画についても通常通りの審議過程（高度先駆的医療・研究審査委員会、倫理委員会、総長裁可）をとって実施の可否が検討された。

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所、ヒューマンサイエンス振興財団、各医療機関、プロテオームファクトリー施設、コンソーシアム参加企業などが相互に契約を結ぶ複雑な形態を取るため、高度先駆的医療・研究審査委員会では研究の意思決定システム、知的所有権などの問題で多くの確認が必要であった。また、プロテオームファクトリー施設と当センターとの間で「プロテオーム解析による循環器疾患関連たんぱく質の探索研究における検体および臨床情報の提供に関する合意文書」(MTA)策定の必要性も指摘され、合意文書を交わした。研究計画全体の申請時には、提供する臨床情報の内容、匿名化の方法、試料送付の添付書類が未整備であったことも重なり、承認に時間を要した。高度先駆的医療・研究審査委員会からは、多数の研究計画の倫理委員会審査・承認が必要となるため、研究計画全体の倫理的取り扱いについて承認が得られた際は、高度先駆的医療・研究審査

委員会での医学的、科学的妥当性の認定と研究計画全体の倫理委員会の承認の総合により、個別研究計画を承認するという提案が付記された。

上記の高度先駆的医療・研究審査委員会の結論に基づき作成した計画書を倫理委員会に提出したところ、当初の提案は不承認となったが、その理由は、①個別の研究計画が多数でも、各々厳密な審査を行うことは不可欠である、②網羅的たんぱく質解析により、従来は不明であった個人情報や遺伝子情報とは質的に異なる重大な個人情報が明らかになる可能性がないか、などの指摘があり、たんぱく質解析においても遺伝子解析に近い個人情報管理が必要との認識が示された。更に、③たんぱく質の網羅的解析という手法が社会に受け入れられる状況とするため、啓蒙活動や情報公開なども必要であり、同意取得時には十分な説明、平易な説明資料の作成などが要請された。健常者からの試料収集については、④当センターで多数の実績、蓄積があるようなので、各種研究で共有化、効率化を図り、健常者からの試料収集数を増加させない努力をすべきとの指摘も受けた。これらの改訂や資料追加を行い、研究プロジェクトの総論部分が最終承認を得た。

当センター内で循環器疾患関連たんぱく質解析研究の課題を募集したところ、50件に及ぶ研究提案を受けた。その中より本研究の主旨に則し、かつ有効な情報が得られると推定される課題、患者発生頻度や試料収集期間、研究実施体制への移行時間などを考慮し、研究実施計画の作成、高度先駆的医療・研究審査委員会、倫理委員会への申請を開始した。16年度中に6研究計画以上を申請し、3課題程度が承認される見込みである。「研究計画1-1.脳動脈閉塞による急性期脳卒中関連たんぱく質の探索研究」については倫理委員会の承認が既に得られ、病院および研究所側での実施体制を構築して、

試料採取、情報収集を開始している。

「脳動脈閉塞による急性期脳卒中関連たんぱく質の探索研究」では、脳動脈における血管内皮や中膜筋層の細胞増殖や間質のたんぱく質産生レベルでの構造や機能、量的異常が脳卒中の誘因・進展に繋がると仮定し、分泌されたたんぱく質の量的および質的变化を追跡する。このため、同一患者の脳卒中急性期と慢性期の血清たんぱく質の変化を網羅的に解析し、脳卒中発症関連たんぱく質ライブラリーを作成し、その中より脳卒中の病態生理に関わるたんぱく質の発見を目指している。

この他、「心不全に関連するたんぱく質の探索研究」では、心不全増悪期から緩解期への変化が劇的であり、前後で血液中たんぱく質の質的、量的な変化が想定されている。これまでレニン-アルドステロン系やBNP等の因子の変動が報告されているが、特にBNPは血管拡張剤であり、心不全の重症度指標として臨床で汎用されている。未発見、未同定のたんぱく質の中にも数多くの有用候補が存在すると考えられ、たんぱく質の網羅的解析より新たなマーカーや治療標的の発見へ展開させる。「冠動脈疾患を有する家族性高コレステロール血症患者のLDL-アフェレーシス治療施行前後の血中たんぱく質の探索研究」では、LDL-アフェレーシスによりLDL粒子だけでなく多様なたんぱく質も同時に除去され、冠動脈疾患の再発予防に成果をあげている。このため、アフェレーシス施行前後のたんぱく質解析により動脈硬化の発症、進展に関わるたんぱく質を同定でき、治療法などの開発へ発展できると考えられる。「難治性心疾患に関連するたんぱく質の探索研究」では、現在心臓移植しか治療法のない難治性心疾患について検討を行う。遺伝的背景、ウイルス感染、心筋炎などの多彩な発症原因が考えられているが、病態としては心筋細胞のアポトーシス、残存心

筋の代償作用の欠落、心筋線維の脱落などが共通の現象として認められ、正常組織とのたんぱく質の網羅的比較により、病因究明や治療・創薬標的の同定に進むことが可能と考えられる。これら以外にも、たんぱく質網羅的解析・比較と量的変動の解析より、明確な解析結果が期待される疾患、症例、対象を選び、研究実施計画の選定、立案を進めた。

#### D. 考察

疾患関連たんぱく質解析研究は、将来の医薬品開発のシーズを目指した国家プロジェクトであり、厚生労働省の医療機関が疾患別に分担して参加する新たな研究形態をとり、研究結果を集積しデータベース構築を行うものである。当センターでは初期の研究計画全体の作成や承認に時間を要したが、高度先駆的医療・研究審査委員会、倫理委員会での詳細な審議、検討により、倫理、研究の両面において整った全体研究計画を作成でき、今後この全体研究計画に従い多くの個別研究実施計画が承認を受け、臨床試料・情報の収集が加速的に進むものと考えられる。研究実施体制もまだ修正、効率化が必要であるが、上記の倫理委員会の指摘事項を遵守しつつ、有用な情報、成果を発信できる基盤を整備する予定である。

#### E. 結論

16年度の研究により、国立循環器病センターでは広範な循環器疾患における疾患関連たんぱく質探索研究を実施するため、必要となる倫理的、研究的基盤を確立できた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

## 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

分担研究者 寒川賢治 国立循環器病センター研究所 部長

ゲノム構造解析の飛躍的な進展によって、リガンドが不明なオーファン G たんぱく質共役型受容体 (GPCR) が数多く存在することが明らかにされてきた。我々はこれまでにオーファン GPCR である FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1 の内因性リガンドとして摂食・エネルギー代謝調節において重要な役割を果たす生理活性ペプチドであるニューロメジン U (NMU) を同定した。本研究では、FM-4/TGR-1 発現細胞を用いた細胞内 Ca イオン濃度測定によって、これら 2 種類の GPCR の新たな内因性リガンドに由来する活性をラット脳抽出物中に見出した。この活性を精製・構造解析した結果、本ペプチドは 36 アミノ酸残基からなる新規ペプチドであることが判明し、またラット脳では視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus) で特異的に発現していたことからニューロメジン S (NMS) と命名した。NMS の N 末端部のアミノ酸配列は既知のたんぱく質・ペプチドと相同性を示さなかったが、アミド化された C 末 7 アミノ酸残基構造は NMU と完全に一致していた。

### A. 研究目的

多くの生理活性ペプチドは、細胞膜上に存在し 7 回膜貫通領域を共通構造とする G たんぱく質共役型受容体 (GPCR) を介して情報を伝達することにより、様々な生命現象において調節因子として機能している。近年、ヒトゲノム構造解析の飛躍的な進展により 250-300 種類の GPCR の存在が明らかにされ、その中にはリガンドが不明なオーファン GPCR が数多く存在することが示された。この事実は新たな生体調節機構、すなわちそれに関与する新規生理活性ペプチドが多数存在することを強く示唆している。また、現在使用されている医薬品の約 45% は GPCR を標的としていることから、オーファン GPCR の内因性リガンドの探索により新規生理活性ペプチドの発見にとどまらず、それを利用した各種疾患の治療・診断法の研究開発が可能である。

我々は、これまでに逆薬理学的手法を駆使してオーファン GPCR であった成長ホルモン分泌促進因子受容体の内因性リガンドとしてグレリンの同定に成功し、循環器系やエネルギー代謝調節での

役割を解明することにより創薬や臨床応用へむけての基盤研究を行ってきた。また、オーファン GPCR である FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1 の内因性リガンドとしてニューロメジン U (Neuromedin U: NMU) をラット小腸抽出物より単離・同定した。NMU の生理機能は発見以来 20 年間不明であったが、受容体の同定によって摂食・エネルギー代謝調節において重要な役割を担うことが明らかとなり、循環器疾患などに代表される生活習慣病の危険因子である肥満の成因に密接に関係していることを示した。一方、FM-4/TGR-1 の内因性リガンド探索の過程で、NMU とは異なる新たな生理活性ペプチドに由来する活性をラット脳抽出物中に見出した。

本研究では、疾患関連たんぱく質解析研究の一環として、新規生理活性ペプチドであるニューロメジン S (Neuromedin S: NMS) を同定し、構造決定した。また、その特徴的な発現分布から NMS の生理機能及び疾患との関わりを考察した。

### B. 研究方法

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℃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、プロテインシーケンサーおよびマス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。

## C. 研究結果

### 1) 新規オーファン GPCR リガンドの精製

我々はこれまでにオーファン GPCR である FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1 の内因性リガンドとして NMU (分子量 2642.9) をラット小腸より単離・同定した。この探索過程において、ラット脳から抽出したペプチド画分をゲルろ過展開したサンプルを用いて FM-4/TGR-1 発現細胞に対するアッセイを行った結果、2 峰性の活性ピークを見出した。1 つの活性ピークは NMU の分子量と一致したが、他方の活性はより分子量の大きな分画 (4000) に溶出されていた。また、この活

性は逆相 HPLC にてラット NMU と比較して明らかに親水性側に溶出され、これらの結果は NMU とは異なる FM-4/TGR-1 の新たな内因性リガンドがラット脳内に存在していることを示唆した。この新たな内因性リガンドを単一に精製した結果、510 g のラット脳から約 2.5 pmol のペプチドが得られた。

### 2) 新規ペプチドの構造解析

プロテインシーケンサーによる、精製した新規内因性リガンドのアミノ酸配列の解析により、N 末端からの部分配列を LPRLHSDSRMATIDFPKK と決定した。精製したペプチドの全構造を決定するために、このペプチドの前駆体をコードする cDNA をクローニングしたところ、ラットでは 152 アミノ酸残基からなる前駆体の構造が明らかになった。この前駆体にはたんぱく質の分泌に関わる N 末端シグナルペプチド配列と、プロセシングプロテアーゼによって限定切断を受ける 4 箇所の切断部位の存在が認められた。決定した N 末端配列は 3 番目の切断部位の直後から続いていたことから、精製したペプチドは 3、4 番目の切断部位で限定切断を受け産生されることが明らかになった。また、4 番目の切断部位の直前にはペプチドの C 末アミド化の供与体となるグリシン残基が存在したことから、新たな内因性リガンドの全構造を、C 末端がアミド化された 36 アミノ酸残基からなるペプチド (LPRLHSDSRMATIDFPKKDPTTSLGRPFLLFRPRN-NH<sub>2</sub>) と推定した。このペプチド構造から計算される理論  $m/z$  値 (4240.3) は、精製したペプチドでの実測値 (4240.2) とほぼ一致したことから、推定したペプチド構造は精製したペプチドの構造と一致していることが示された。このペプチドの N 末端部分 (29 アミノ酸残基) は既知のペプチド・たんぱく質と相同性を示さないため、このリガンドは新規生理活性ペプチドであることが明らかになった。また興味深いことに、本ペプチドのアミド化された C 末 7 残基の配列は、NMU と完全に一致していた。

### 3) 新規ペプチドの組織分布

この新規生理活性ペプチドについての組織分布をリアルタイム PCR で解析した結果、中枢神経系、脾臓、精巣で強い mRNA の発現が認められた。中枢

神経系のなかでも視床下部での発現が顕著に高かったことから、脳内分布を *in situ* ハイブリダイゼーション法にて解析した。その結果、視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus) で特異的な発現が認められたため、今回同定した新規生理活性ペプチドをニューロメジン S (Neuromedin S: NMS) と命名した。

#### D. 考察

本研究により、新規生理活性ペプチドである NMS を同定した。NMS の C 末端構造 (7 アミノ酸残基) は NMU と全く同一であった。この構造は NMU の活性発現・受容体への結合に必須であることから、NMS と NMU は受容体を共有していると推測される。実際、NMS と NMU は FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1 の両方に対して同程度のアゴニスト活性、親和性を示した。

非常に興味深いことに NMS は、脳内では哺乳類の概日リズムの調節・発振をつかさどる視交叉上核に特異的に発現していた。このことは NMS が概日リズムの発振機構において何らかの重要な機能を担っている可能性を強く示唆している。今後、リズム異常に関連する疾患 (睡眠覚醒障害、時差ぼけ、躁鬱病など) と NMS との関わりを解明することにより、新たな治療・診断法の開発が期待できる。

また、ヒト NMS 遺伝子は 2 番染色体 q11.2 に位置し、この遺伝子座は肥満に関連する量的形質遺伝子座の 1 つと一致する。NMS は NMU と同一の活性部位配列を有すること、NMU は中枢性に摂食活動を抑制しエネルギー代謝調節に関与していることから、NMS も摂食調節に関与している可能性が示唆された。

GPCR は創薬の重要なターゲットとなっていることから、NMS の発見により新たな医薬品開発が期待される。

#### E. 結論

オーファン GPCR である FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1 の内因性リガンドとして NMU の他に 36 アミノ酸残基からなる新規生理活性ペプチド、NMS を単離・同定した。NMS は概日リズムの発振機構や摂食調節において重要な機能を担っている可能性が示唆

された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ①Mori K, Miyazato M, Ida T, Murakami N, Serino R, Ueta Y, Kojima M, Kangawa K. Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *EMBO J*, 24: 325-335, 2005.
- ②Hosoda H, Doi K, Nagaya N, Okumura H, Nakagawa E, Enomoto M, Ono F, Kangawa K. Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples. *Clin Chem*, 50: 1077-1080, 2004
- ③Hanada T, Toshinai K, Date Y, Kajimura N, Tsukada T, Hayashi Y, Kangawa K, Nakazato M. Upregulation of ghrelin expression in cachectic nude mice bearing human melanoma cells. *Metabolism*, 53: 84-88, 2004
- ④Suzuki H, Masaoka T, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nomura S, Kangawa K, Ishii H. Helicobacter pylori infection modifies gastric and plasma ghrelin dynamics in Mongolian gerbils. *Gut*, 53: 187-194, 2004
- ⑤Shibata K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Makino Y, Makino I, Kawarabayashi T, Futagami K, Gomita Y. Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus. *Peptides*, 25: 279-287, 2004
- ⑥Nakai Y, Hosoda H, Nin K, Ooya C, Hayashi H, Akamizu T, Kangawa K. Short-term secretory regulation of active form of ghrelin and total ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 150: 913-914, 2004.
- ⑦Itoh T, Nagaya N, Yoshikawa M, Fukuoka A, Takenaka H, Shimizu Y, Haruta Y, Oya H, Yamagishi M, Hosoda H, Kangawa K, Kimura H.

Elevated plasma ghrelin level in underweight patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med, 170: 879-882, 2004.

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

森 健二 (国立循環器病センター研究所)  
宮里幹也 (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おいて発現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、高感度、高精度の分離、検出システムを構築し、より多くのタンパク質を検出することが必要である。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、解析す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てほぼ再現的に分離できることを確認した。脳組織内に存在するペプチドを2次元高速液体クロマトで分離、解析したところ、多数のペプチドの検出、構造解析が可能であった。

#### A. 研究目的

ヒトをはじめとする各種動物、モデル動物のゲノム遺伝子配列の決定とデータベース化の完了に伴い、生体に実在、機能するたんぱく質のファクトデータベース構築の必要性が広く認識されるようになった。細胞、組織、体液などに存在する各種たんぱく質の詳細な構造、存在量や立体構造、相互作用などの情報を収集することにより、その変動や異常による病因の究明、疾患・病態マーカーの発見や高感度・特異的診断法の開発、創薬や治療の標的たんぱく質の発見、機能を活用した有用たんぱく質の創出などが可能となると考えられる。プロテオームは対象とする系に存在するたんぱく質の総体を意味するが、解析法やデータベースの定義、収録情報や範囲、構築法などについては未だ確定的な概念、方法論が提出されていない。しかし、まず対象系に存在する多数のたんぱく質の同定、変動測定、詳細構造の解析、機能解析を行わなければならない。本研究では循環器疾患を対象として、ヒト組織、血液、細胞などに含まれるたんぱく質を網羅的に解析し、高血圧、心疾患、動脈硬化などに関連するたんぱく質を見出すために必要とされる解析法（プロファイリング法）の確立、解析法の高感度・高精度化、高効率のたんぱく質同定法や量的評価法、高再現性が

つ高速な解析システムの研究、開発を行う。更にその方法論に基づいて開発した装置、システムなどを用いてヒト試料を解析し、高血圧、心循環器系疾患などの診断法の開発、創薬に利用可能なたんぱく質の発見を目指す。

本年度の研究では、これまで実施してきたペプチドーム解析の分離、検出、解析の方法論を、たんぱく質の効率的同定法として注目を集めている「ショットガン解析法」に適用可能とすると共に、その自動化を進めた。また、実際に対象組織の取り扱い、可溶化・抽出、初期段階でのたんぱく質の脱塩・濃縮、消化などの方法論について検討を行った。たんぱく質消化物の分離については、2次元高速液体クロマトグラフィー（2-dimensional high performance liquid chromatography, 2D-HPLC）と質量分析計による検出、解析を組織内ペプチドを対象として行い、情報収集の可否や効率などについても検討を行った。

#### B. 研究方法

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(sulfoethyl, 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 Guanidinium 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。

## C. 研究結果

ショットガン法でのペプチド解析モデルとして行ったマウス脳の分子量 3,000 以下のペプチド混合物は、たんぱく質のトリプシン消化物にほぼ相当する分子量であり、量や種類の点において非常に高い多様性を有し、参照するには適切な対象であった。

自動化したリニア2次元HPLCシステムの構成は、ステップ2次元HPLCシステムと基本的に同様である。リニア2次元HPLCシステムは、1次元目を1.0 x 150 mmのカラム、流速5 $\mu$ l/minで360分間、2次元目を0.3 x 150 mmのカラム、流速5 $\mu$ l/minで50分の直線濃度勾配で行った。トラップカラムは0.5 x 10 mmの高炭素含量C18カラムを使用した。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、およびブタ脳抽出物で条件検討を行ったが、ステップ2次元HPLCシステムと同様にマイクロカラム、キャピラリーカラムの使用により、通常分析用カラム(4.6 x 250 mmなど)に比して相対的な保持力が低下し、イオン交換HPLC、逆相系HPLCにおいて、それぞれ250mMギ酸アンモニウム、35%アセトニトリルでほとんどのペプチドの溶出が終了した。同様に、トラップカラムにおける保持が相対流量の多い場合には不十分となる傾向にあり、カラムサイズ、充填剤などの更なる検討が必要である。初期溶媒の濃度、グラジエントの領域、トラップカラムの吸着力などの問題は一応解決できたが、分析対象ペプチド量の変動によらず安定した回収率と分離を得るには、カラム充填剤などの更なる検討が必要である。特にトリプシン消化物は、pH3.8の酸性条件でも正電荷数が少なくイオン交換HPLCの初期に溶出され、疎水性も比較的弱いため、吸着力の強いカラム、充填剤とグラジエント初期溶出条件の至適化が必要である。

ペプチドーム解析では、約0.8gのマウス組織由来のペプチドを使用して分子量3,000以下のペプチド、4,000強を検出できたが、6段階に分割したこのシステムでは20%程度しか検出できておらず、上記の溶出条件などの至適化により、この数を増加できると考えられる。MALDI-TOF-TOF質量分析計による構造解析も含め、全行程を2-3日間で終了することができる。ステップ2次元HPLCシステ

ムの1次元目では、予め設定した塩濃度でしか溶出できなかったが、リニア2次元HPLCシステムでは対象に適した濃度勾配溶出が可能で、システムの維持、使用には時間を要するが、総合的にはより有用な結果が得られると考えられる。

組織からのたんぱく質の抽出効率においては、変性剤とCHAPS、Tritonなどのディタージェントを含む抽出溶媒系が優れており、特に分析機器メーカー等から推奨されている抽出溶媒でホモジナイズすると、軟組織はほぼ完全に可溶化された。この段階で、一部はDTTで還元後、モノヨードアセトアミドでアルキル化を行った。脱塩・濃縮には、有機溶媒やトリクロロ酢酸などによるたんぱく質の沈殿法、小型の遠心型限外濾過を用いた。後者は簡便であるが、脱塩過程でたんぱく質の沈殿が程度の差はあれ生成し、それらの回収の有無によりたんぱく質量が変動した。たんぱく質沈殿法もたんぱく質濃度により沈殿形成速度や回収率が異なり、沈殿回収、洗浄後の再溶解が大きな問題であった。低濃度の尿素やディタージェント入りバッファーを一般に使用するが、不溶物が残ることが多く、超音波ホモジナイズした。この状態で一部についてはDTTで還元後、アルキル化を行った。還元アルキル化を行った試料については、再度限外濾過法か沈殿法でたんぱく質を回収し、同様に再溶解を行った。これらを約1/100量の自己消化抑制トリプシンにて37℃、20時間程度消化を行い、消化中も溶液を攪拌した。消化物は酸性化後、逆相C18カートリッジにて脱塩、濃縮し、逆相HPLCで分離、解析した。

未だ解析途上であるが、処理段階が増えるにつれて回収率が下がり、不均一が発生する傾向にあり、抽出、濃縮、消化法については17年度に最終的な結論を出したい。この実験過程で2つの問題点があった。第一は、初期段階での還元アルキル化が処理過程としては有利であるが、過剰な試薬によるアミノ基のアルキル化などを含めた副反応が発生し、これらが質量分析計による検出、構造解析時に問題となることである。今一つは可溶化に使用するディタージェント類が、逆相HPLCやその後の質量分析などに悪い影響を及ぼすため、可溶化とその除去の兼ね合いが問題である。

#### D. 考察

生体内ペプチドを対象とするペプチドーム解析において開発してきたリニア2次元 HPLC システムは、たんぱく質の消化物を分析するショットガンプロテオーム解析においても有効であることが、マウス脳ペプチドの解析より確認された。ナノ、マイクロ流量で使用できる市販2次元 HPLC 機はまだ十分な評価が得られていないが、上記システムはカラム、樹脂、溶媒などに改良が必要であるものの、実用装置として使用可能と考えられた。ペプチド構造解析効率の評価なども含め来年度に解析を実施したい。

たんぱく質の抽出から還元アルキル化、酵素消化、2次元 HPLC までの方法論は大部分が確立されていると考えられていたが、実際の組織への適用によっても多くの問題があり、現代の高感度な質量分析によるペプチド解析に耐えうる一般的な方法論の構築が必要である。今後少量試料から出発した場合は、これらの問題点が更に増幅、観測されるため、現段階で血管、心臓などの循環器系組織や細胞に対して至適な方法論を開発しておくことが、今後のプロテオーム解析には不可欠である。

#### E. 結論

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に、ペプチドーム解析で開発してきた自動化リニア2次元 HPLC が有効であることが確認できた。分離充填剤や溶媒などの選択と至適化により、貴重なヒト試料の解析に適した分離システムの構築が可能である。一方、組織たんぱく質の抽出から消化物調製までの段階でたんぱく質特有の均一処理を困難とする問題点が多数見出され、少量循環器系組織から出発したたんぱく質を包含、解析できる処理方法の設定を17年度に行う。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① S. Takeda, T. Okada, M. Okamura, T. Haga, J. Isoyama-Tanaka, H. Kuwahara and N. Minamino:

The receptor-Gαfusion protein as a tool for ligand screening: a model study using a nociceptin receptor-Gαi2 fusion protein. *J. Biochem. (Tokyo)*, 135, 597-604 (2004)

- ② S.M. Guan, H. Nagata, K. Maeda, M. Kuboniwa, N. Minamino and S. Shizukuishi: Purification and characterization of a hemoglobin-binding outer membrane protein of *Prevotella intermedia*. *FEMS Microbiol Lett.*, 235, 333-339 (2004).
- ③ Y. Takei, S. Hyodo, T. Katafuchi and N. Minamino: Fish-derived novel adrenomedullin in mammals: its structure and function. *Peptides*, 25, 1643-1656 (2004)
- ④ T. Katafuchi and N. Minamino: Structure and biological properties of three calcitonin receptor-stimulating peptides, novel members of the calcitonin gene-related peptide family. *Peptides*, 25, 2039-2045 (2004)
- ⑤ 佐々木一樹、磯山正治、南野直人：ペプチドーム解析の現状と展望, *実験医学*, 23, 585-592 (2005)

## 2. 学会発表

- ① N. Minamino, H. Kuwahara, Y. Matsui, J. Isoyama-Tanaka, T. Kihara, M. Matsubae, T. Takao, M. Isoyama: Peptidome database construction for the pig and mouse brain peptides, 第2回 J-HUPO (平成16年5月、東京)
- ② 南野直人、桑原大幹、磯山-田中純子、木原孝洋、松八重雅美、高尾敏文、磯山正治：ペプチドーム (Peptidome)：生体内ペプチドのファクトデータベース化と応用, 第77回日本内分泌学会学術総会 (平成16年6月、京都)
- ③ 南野直人、桑原大幹、松井泰子、木原孝洋、磯山-田中純子、磯山正治、高尾敏文：ブタ、マウス脳のペプチドームデータベースと情報解析, 第77回日本生化学会大会 (平成16年10月)
- ④ N. Minamino, H. Kuwahara, Y. Kuwahara -Matsui, J. Isoyama-Tanaka, T. Kihara, M. Matsubae, T. Katafuchi, T. Takao, and M. Isoyama: Peptidome Database and Identification of New Endogenous /Bioactive Peptides, 第1回アジア太平洋ペプチドシンポジウム-第41回日本ペプチド学会 (平

成16年11月、福岡)

## 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  
佐々木一樹 (国立循環器病センター研究所 薬理部)  
片瀬 剛 (国立循環器病センター研究所 薬理部)

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

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

分担研究者 高坂 新一 国立精神・神経センター神経研究所 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、尿酸プ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を確立し、試料のプロテオームファクトリーへの提供を開始した。また、神経変性疾患研究の困難さを克服するためパーキンソン病モデル動物を開発しその解析を進めた。

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の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。本年度はまず年度当初に臨床検体の使用に関して倫理委員会への申請を行い、審査・承認を受けた。これにより血液・尿など臨床検体の円滑的な利用が可能となり研究

を実質的に推進するための基盤が整備された。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(193M UCH-L1 発現マウス)を自家開発しその解析を行う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。

## C. 研究結果

### (1) 研究試料の確保に関する研究

新規試料については、すでに本センターの倫理委員会での承認を得ている、「血液、尿、髄液を用いた脳神経疾患の病因・治療法の開発に関する研究」によって収集・保存が可能な疾患の内、パーキンソン病及びパーキンソン症候群患者の血漿、尿を本研究に利用するための倫理申請を行い、承認を得た。そして、2005年2月までに、10名のパーキンソン病患者血漿をプロテオームファクトリーに供給した。

### (2) パーキンソン病モデルを用いた研究

I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスを作製し発症前における初期変化を解析したところ UCH-L1 の凝集性が早期から高まっていることを見出した。この凝集性の亢進はユビキチン系とリソソーム系の運動により生じていることが明らかになった。また UCH-L1 が欠損する

gracile axonal dystrophy マウスの機能形態学解析を行い、UCH-L1 は生体においてはアポトーシスに促進的な作用を有する可能性を見出した。

## D. 考察

(この段は昨年度と同一文章)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も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法開発も展望できるとの期待が高まっている。成因に関しては国内外における研究から、蛋白質の構造変化、凝集、蓄積と神経細胞死・神経変性との関連が示されており conformation 病の概念確立とともに、アポトーシスに加えて神経細胞機能不全も神経変性の主因として位置づけられるようになってきた。さらに、近年では免疫学的機序の関与に注目が集まっており、喫煙者にパーキンソン病発症者が少ないという疫学的調査が明らかにされるなど生活習慣との関連でも注目を集めている。

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、特にパーキンソン病における血液、尿中蛋白質の網羅的解析を行うことにした。今年度はパーキンソン病患者とパーキンソン症候群、及び、プロテオームファクトリーが保存する正常対照者とを比較検討するための試料がファクトリーに供給できる体制が確立できた。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。

昨年度は独自に作成した 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が、今年度さらにその初期変化としてユビキチン系とリソソーム系の運動による UCH-L1 の不溶性亢進を見出した。本成果の意義は大きく、根本的治療に向けて新たな治療標的が見出される可能性が高まった。今後これらの初期変化を規定する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。

#### E . 結論

倫理委員会での承認を受け 2005 年 2 月までに、10 名のパーキンソン病患者血漿をプロテオームファクトリーに供給した。

#### F . 健康危険情報 特になし

#### G . 研究発表

##### 1. 論文発表

Akazawa, C., Nakamura, Y., Sango, K., Horie, H. and Kohsaka, S.: Distribution of the galectin-1 mRNA in the rat nervous system; its transient upregulation in rat facial motor neurons after facial nerve axotomy. *Neurosci.* 125, 171-178, 2004

Akazawa, C., Tsuzuki, H., Nakamura, Y., Sasaki Y., Ohsaki, K., Nakamura, S. Arakawa, Y. and Kohsaka, S.: The upregulated expression of sonic hedgehog in motor neurons after rat facial nerve axotomy. *J. Neurosci.* 24, 7923-7930, 2004

Nakajima, K., Tohyama, Y., Kurihara, T. and Kohsaka, S.: Axotomy-dependent urokinase induction in the rat facial nucleus: possible stimulation of microglia by neurons. *Neurochem Int.* 46, 107-116, 2005

Kamitori, K., Tanaka, M. and Kohsaka, S.: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. *BBRC.*, 2005, in Press

Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., uchino, S. and Kohsaka, S.: Visualization of microglia in living tissues by using Iba-1EGFP transgenic mice. *J. Neurosci. Res.*, 2005 in press

Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J., Lynn, B., Wang, Y.L., Osaka, H., Wada, K. and Butterfield, D.A.: Proteomic analysis of 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.*, 88, 1540-1546, 2004

Bonin, M., Poths, S., Osaka, H., Wang, Y.L., Wada, K. and Riess, O.: Microarray expression analysis of *gad* mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathways. *Mol Brain Res*, 126, 88-97, 2004.

Wang, Y.L., Takeda, A., Osaka, H., Hara, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Sun, Y.J., Kwon, J., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Yoshikawa, Y. and Wada, K.: Accumulation of  $\beta$ - and  $\gamma$ -synucleins in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 deficient *gad* mouse. *Brain Res*, 1019, 1-9, 2004

Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y. and Wada, K.: Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testes. *Am. J. Pathol.*, 165, 1367-1374, 2004.

Kubota, T., Furuumi, H., Kamoda, T., Iwasaki, N.,

Tobita, N., Fujiwara, N., Goto, Y., Matsui, A., Sasaki, H. and Kajii, T.: ICF syndrome in a girl with DNA hypomethylation but without detectable DNMT3B mutation. American J. of Medical Genetics 129A, 290-293, 2004

2. 学会発表  
(国際学会)

Mimaki, M., Nishino, I., Nonaka, I., Goto, Y.: Novel mtDNA G3242A and G3244A mutations adjacent to a common A3243G mutation. The 52th Meeting of American Society of Human Genetics, Toronto, Canada, 10.27, 2004

Kohsaka, S.:

Requirements for Hazard Assessment of Chemical Substances and the Nervous System. The 3th International Symposium on Children's Environmental Health, Ministry of the Environment, Tokyo, Japan, 2.24, 2005

(国内学会)

星雅人、佐々木洋、赤澤智宏、高坂新一:

ラット顔面神経軸索損傷後における SH3 binding domain glutamic acid rich protein like 3 (SH3BGRL3)の発現上昇. 第19回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会、岐阜 6.19, 2004

平澤孝枝、大澤圭子、今井嘉紀、内野茂夫、高坂新一: Iba1-EGFP トランスジェニックマウスの作製; ミクログリアの可視化技術の開発. 第27回日本神経科学・第47回日本神経化学合同大会、大阪、9.21, 2004

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

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

主任研究者 鏑木 康志 [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、創薬プロテオームファクトリー施設のhybrid MS, MALDI-TOF/TOF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2DE, LC-MS/MSでの解析にて検討する。

【結果】本年度は、当センターにて培養細胞を用いたmulti-dimensional LC-MS/MSの予備検討を行った。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糖尿病患者からの臨床サンプル(データベース用及び合併症診断マーカー検索用)の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動脈硬化性疾患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。糖尿病の複雑な病態を解明するためには、遺伝子及び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、後者については培養細胞、実験動物を用いた網羅的解析が端緒に付いたばかりである。

国立国際医療センター、東京女子医大、国立健康・栄養研究所の今年度まで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β細胞内分泌細胞の分化・増殖・再生に関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つの柱として行われたが、同プロジェクトでは、糖尿病患者由来臨床サンプルを用いた大規模な解析は行われなかった。

今回我々は、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網羅的タンパク質解析にて、糖尿病の新規治療標的の発見、糖尿病固有の合併症及び動脈硬化性疾患の進行度、予後及び治療効果を判定する診断マーカーの開発等を目指す。

#### 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を用いてタンパク質の同定、定量を行う。糖尿病の多様な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。

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、進行度と血清タンパク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タンパク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。

## C. 研究結果

### 【臨床サンプルの収集】

#### ・ 糖尿病

糖尿病患者由来血清の予備検討のため、過去に他の研究計画(ミレニアム・プロジェクト)の際に採取されていた血清サンプルを、再同意を取得した上で創薬プロテオームファクトリー施設に発送する準備を整えた(H17年3月発送予定)。また、データベース構築用、動脈硬化診断マーカー検用の糖尿病血清収集については、本センター及び創薬プロテオームファクトリー施設の倫理委員会での承認を受け、検体の収集、提供の体制が確立した。早期糖尿病性腎症の尿タンパク質解析については、本センター内にて尿タンパク質の濃縮、脱塩、2DEでの予備的解析を行ったが、患者検体収集及び創薬プロテオームファクトリー施設での本格的解析については、同施設での尿タンパク質、ペプチドの解析法の確立を待っている段階である。

#### ・ 糖尿病以外の疾患

気管支喘息及び慢性閉塞性肺疾患について、早期診断、治療効果の判定に寄与する診断マーカー開発を目的として、当センターの研究所・呼吸器疾患研究部及び病院・呼吸器科を中心に、臨床サンプル(血清)の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多次元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網羅的同定の予備検討として、ヒト肝細胞由来細胞株HepG2の培養上清に含まれる分泌タンパ

ク質の解析を行った。培養上清回収時に限外ろ過にて低分子量側(50kDa以下)のタンパク質を回収、前処理として還元・アルキル化法あるいは熱変性といった方法を組み合わせて、得られたペプチドを2-D LC-MS/MSにより解析することによって、400以上のタンパク質の同定が可能であった。

また、翻訳後修飾を受けたタンパク質の解析のために、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、レクチン等を用いたアフィニティ・クロマトグラフィーによる精製、2DEゲルでの翻訳後修飾を受けたタンパク質を染色する色素(ProQ Diamond, ProQ Emerald)を用いた基礎検討を行った。

### 【SELDI-TOF】

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SELDI-TOF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上で糖尿病の病態や治療効果を反映する血清・尿マーカーを検索した。

## D. 考察

プロテオームファクトリーのプロジェクトの2年度目として、創薬プロテオームファクトリー施設での糖尿病関連タンパク質のデータベース構築、糖尿病患者での動脈硬化性疾患及び糖尿病性腎症早期診断マーカー検索のための臨床サンプル収集の準備、当センターでの臨床検体でのタンパク質の翻訳後修飾の網羅的解析のための予備検討を行った。次年度からは、創薬プロテオームファクトリー施設での血清、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、糖尿病関連タンパク質のデータベース構築、動脈硬化に特有なマーカー検索のための糖尿病患者由来血清の収集及び発送を開始する。創薬プロテオームファクトリー施設にて尿タンパク質、ペプチドの解析法が確立し次第、糖尿病患者での尿検体も収集する。低分子量タンパク質及びペプチドについては、当センター及び創薬プロテオームファクトリー施設のSELDI-TOFを用いた解析を開始する。糖尿病以外の疾患については、呼吸器疾患(気管支喘息及び慢性閉塞性肺疾患)患者由来血清の収集を当センター及び創薬プロテオームファクトリー施設の手続きが完了し次第開始する。また、気管支洗浄液や関節液等の血清以外の臨床検体の解析法について、創薬プロテオームファクトリー施設と協力して検討していく。

タンパク質の翻訳後修飾の網羅的解析については、2DEと共にon-lineあるいはoff-lineでの液体クロマトグラフィーを用いた解析法の検討を行う。詳細な解析を行うために、創薬プロテオームファクトリー施設のhybrid

MS等を用いた予備検討を行う。

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、脂肪組織からの検体採取は困難であり、さらに採取時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、比較的採取が容易な組織（脂肪組織等）のみにて、in vitroでの解析を検討していく。

#### 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すが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者：740万人、潜在的には推計1620万人と患者数が多い上にさらに増加傾向にあること、患者の90%以上を占める2型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。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、タンパク質プロファイルと様々な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多変量解析することによって、遺伝子素因、環境因子、合併症等の影響が加味された上での病態に合わせた新しい治療法の開発、病態や病期を診断可能な新規のバイオマーカー開発によって、糖尿病の診療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

論文：

Yamashita R, Fujiwara Y, Yuan X, Yazuda K, Kaburagi Y. 2D-LC-MS/MS Analysis of secreted proteins from HepG2 cells. J Electrophoresis in press

Yamashita R, Yazuda K, Kaburagi Y. Proteomic analysis of proteins secreted from hepatocytes. J Mass Spectrom Soc Jpn in press

学会発表：

Yamashita R, Fujiwara Y, Yasuda K, Kaburagi Y. Proteomic analysis of proteins secreted by HepG2 cells. 第二回日本ヒトプロテオーム学会、2004年5月、東京

山下亮、安田和基、鏑木康志：肝細胞分泌タンパク質のプロテオーム解析、第47回日本糖尿病学会学術総会、2004年5月、東京

山下亮、藤原優子、安田和基、鏑木康志：ヒト肝癌由来 HepG2 細胞でのインスリン依存性リン酸化タンパク質の網羅的解析、第52回質量分析総合討論会、2004年6月、名古屋

山下亮、藤原優子、安田和基、鏑木康志：分子代謝疾患研究におけるプロテオーム解析の有用性、第31回BMSコンファレンス、2004年7月、福井

山下亮、藤原優子、安田和基、鏑木康志：C2C12筋芽細胞分化における蛋白発現プロファイルのプロテオーム解析、第77回日本生化学会大会、2004年10月、横浜

#### 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

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** 小児の免疫・アレルギー疾患の中で腎炎・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

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薬や環境科学などを含めて多岐にわたる。しかしながら、現在最も注目されているのは、高度医療技術、とりわけ臨床医学や創薬への応用である。創薬は、多彩な学問領域から提供される複合的な知識と技術が求められる知識集約的な産業であるが、ゲノム科学とりわけプロテオミックスは、疾患メカニズムの解明、創薬ターゲットの同定、臨床所見に依存しない医薬品の薬