

分子細胞治療

別刷

発行：株式会社 先端医学社
〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町2-17-8 浜町花長ビル

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析でもたらされた新知見

間野博行*

ヒトゲノムプロジェクトが終了しわれわれのもつ蛋白をコードする遺伝子の全体像が明らかになりつつある。DNA マイクロアレイを用いることで、これら数万種類の遺伝子の発現量を任意の細胞・組織間で簡便にくらべることが可能になった。現在、急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群などさまざまな造血器悪性腫瘍の患者サンプルをマイクロアレイで解析し、得られた遺伝子発現プロファイルのなかから患者の長期予後にリンクするものをスクリーニングする試みが精力的におこなわれている。同定された予後関連遺伝子群の発現量をもとに各患者の予後を予測することがこれらのプロジェクトの目標であり、今後は遺伝子発現プロファイルにもとづいた造血器悪性腫瘍の新しい分類法が提案されると期待される。

はじめに

約 30 億塩基対におよぶヒトゲノムの核酸配列を決定する大規模事業である「ヒトゲノムプロジェクト」がついに 2003 年 4 月に終了宣言をおこない、ヒト染色体の euchromatin 領域のほぼ完全な塩基配列が決定された (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/>)。ヒトのもつ蛋白をコードする総遺伝子数はおそらく 2 万～2 万 5 千種類前後になると予想されている¹⁾。かつて夢であったヒトの全遺伝子プールの全貌がいよいよ明らかになるう

としており、ポストゲノム時代が訪れたといえる。

この膨大な遺伝子情報を有効に使う技術であるゲノミクス・プロテオミクスが、造血器悪性腫瘍の解析においても重要な役割を担うことは間違いない。今後の医学研究においては、「膨大ではあるがあくまで有限なヒト遺伝子プール」のなかから特定の特徴を備えた遺伝子を効率よく同定することが重要になる。ゲノミクス技術のなかでも DNA チップはすでに複数の疾患で有用な解析ツールとなることが示されてきた²⁾³⁾。

DNA チップはスライドガラスなどの小さな担体上に、解析する遺伝子由来の cDNA あるいはオリゴヌクレオチドを高密度に配置したものであり、いわば超高密度ドットプロット法といえよう⁴⁾。一枚の DNA チップ上には数千～数万種類の DNA 断片が配置されており、一回の実験でこれら数多くの遺伝子の発現変化を包括的に解析できる。

Key Word

DNA マイクロアレイ
急性骨髄性白血病
骨髄異形成症候群
遺伝子発現プロファイル

* MANO Hiroyuki/自治医科大学ゲノム機能研究部

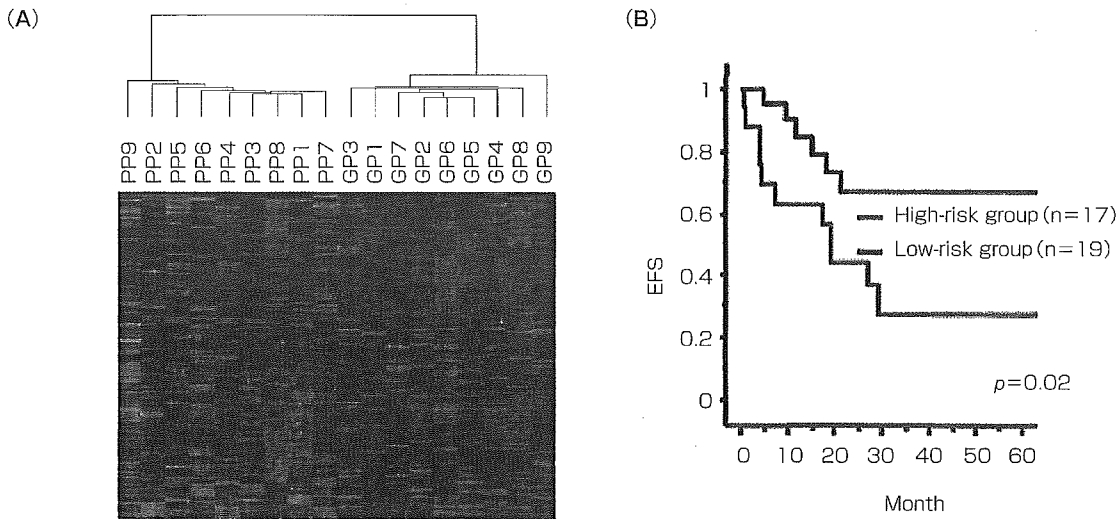


図1 骨髄単核球の発現プロファイルによる予後予測 (Yagi T *et al.*, 2003⁷⁾ より改変引用)
 (A) 長期生存症例(GP)と予後不良症例(PP)間で発現が異なる遺伝子を取り出したところ 133 種類同定された。これら遺伝子の発現量で二次元クラスタリングをおこなった。(B) 上記遺伝子の発現量でテストサンプルを二次元クラスタリングし、大きく分かれた二群間で予後を比較した。

このように DNA チップを用いることで、これまでとは比較にならないような膨大な遺伝子発現データを解析することができるようになった。こうして得られた特定の遺伝子群の発現様式、発現パターンを「遺伝子発現プロファイル (gene expression profile)」とよぶ。このプロファイルをくらべることで疾患の特性・病因に迫れるのではないかと考えられる。

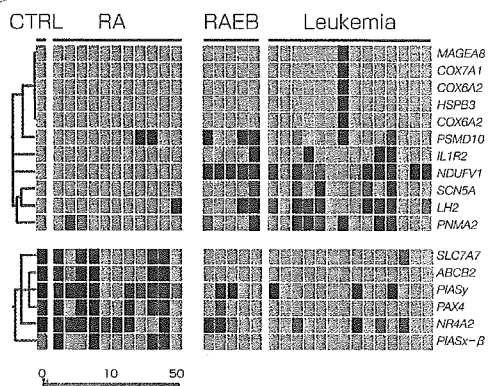
1. 急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia: AML)の予後予測

AMLは未熟な血液細胞ががん化して生じる疾患であり、これまでさまざまなパラメーターが治療予後にリンクすることが報告されてきた⁸⁾。現在臨床の場で白血病の診断および予後予測をおこなう場合、患者骨髄細胞に関して①ペルオキシダーゼ、エステラーゼなどの特殊染色、②FACSを用いた細胞表面マーカーの解析、③遺伝子異常の有無の解析(免疫グロブリン遺伝子やT細胞表面レセプター遺伝子の再構成、*BCR-ABL* 遺伝子、*PML-RAR α* 遺伝子などの有無)、④染色体型の解析、などの検査が利用される⁹⁾。これらを総合的に解析することで予後にある程度リンクした診断がおこなえるが、上記の解析をすべておこなうのは煩雑であり多くの専門

技術も必要となる。一方、例えば一枚の DNA チップを用いることで旧来の方法で得られる情報がすべて解析可能となれば、診断はより簡便になりかつ異なった施設間での診断の一致率も上昇するであろう。骨髄中の血球の多くは単核球とよばれる分画に相当し、これまで AML 患者骨髄単核球を用いた DNA チップ実験により患者予後を予測する試みがおこなわれてきた。

Yagi ら⁷⁾は小児 AML 患者 54 例について Affymetrix 社製 GeneChip[®] Human Genome U95A チップを用いた遺伝子発現解析をおこない、小児 AML 内での予後良好群と不良群とを予測する試みをおこなっている。彼らのサンプル内で3年以上完全寛解を維持している症例9例と初回緩解導入に失敗した症例9例の間で発現量が統計的に異なる遺伝子 133 種類を抽出し(図1 A)、これら予後関連遺伝子の発現量をもとにして、患者全体を二次元クラスタリング法あるいは supported vector machine (SVM) 法によって層別化した。その結果どちらの方法によっても AML 内で生命予後が異なるサブグループを検出することに成功している(図1 B)。すなわち遺伝子発現プロファイルをもとにした新しい疾患分類法の可能性が提示されたことになる。

同様に Bullinger ら⁸⁾は AML 患者 116 例の骨髄単核



図② MDS の病期進行に伴い発現量が変化する遺伝子 (Ueda M *et al.*, 2003¹⁰⁾より改変引用)

「健常人+RA」期と「RAEB+白血病」期とを比較した結果、後者で発現誘導する遺伝子 11 種類(上図)、および低下する遺伝子 6 種類(下図)が同定された。それぞれの発現パターンを遺伝子系統樹(gene tree)の形で表す。遺伝子名は右に示してあり、また発現量は下にあるカラーバーに沿って色で示される。

球より mRNA を調整し、約 3 万 9 千種類の cDNA を配置した DNA チップで解析をおこなっている。彼らは患者を training set と test set に分け、前者のデータを用いて患者予後に発現量がリンクする遺伝子をスクリーニングした。その結果 100 種類以上の予後予測遺伝子セットを同定することに成功している。さらにこれら遺伝子の発現量をもとに患者を 2 群に分け、その予後を比較したところ、2 群の生命予後は有意に異なっていた ($p < 0.001$)。またあらかじめ取っておいた test set において検証したところ、やはり 2 群の予後は大きく違っている ($p = 0.006$) ことが示された。これらの予後分類法が現行の核型にもとづく分類法とは独立したものであることを示すために、彼らは核型分類では中間群に分類される「正常核型」をもった患者のみを選択し、その予後予測も試みている。彼らの分類法を適応したところ、正常核型のなかでも予後良好群と不良群とを区別することに成功した ($p = 0.046$)。彼らの解析は旧来の核型分類法とは異なった新しい予後予測法の可能性を示唆しており興味深い。

また Valk ら⁹⁾も同様の目的から 285 例の AML 患者骨髄単核球を用いて約 13,000 種類の遺伝子に関する発現量を測定した。彼らもやはり予後にリンクした遺伝子発現プロファイルがあることを検出している。

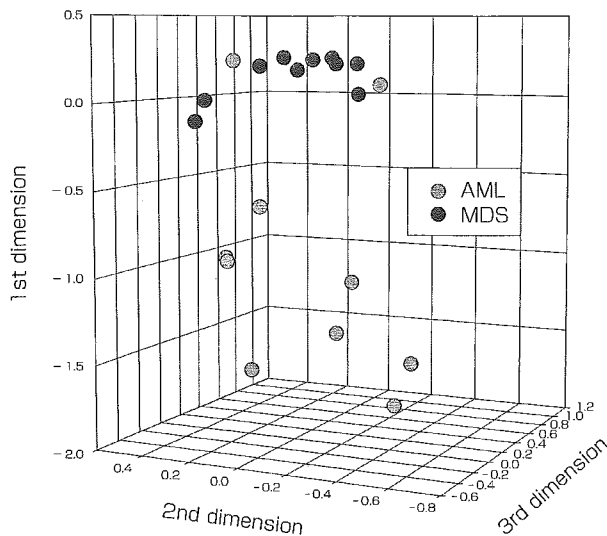
2. 骨髄異形成症候群(MDS)の病期進展機構

MDS については、その発症機構、再生不良性貧血との鑑別、病期進展機構、また MDS 由来白血病と特発性 AML との鑑別など、現在なお不明な点が多数残されている。マイクロアレイによる解析はこれらの疑問に答えるうえで有用だと思われるが、しかしながら MDS の

ように骨髄中の悪性芽球が患者ごとに大きく異なる疾患の場合は偽陽性データを減らすよう工夫する必要がある。たとえば MDS 初期の不応性貧血(RA)と MDS 由来白血病とを比較する場合と考えると、前者患者骨髄中の悪性芽球は 5%以下であり、後者では少なくとも悪性芽球が 20%以上を占める。単純に両骨髄をアレイによって比較すると、未分化な血球に特異的な遺伝子は白血病患者骨髄中では必ず発現が誘導されているように結論づけられてしまう。しかしこれは、骨髄中での幼弱な白血病芽球の増加を反映した結果であり、ほとんどの場合実際の芽球一細胞あたりの mRNA 量に変化は認められない。

われわれは造血幹細胞分画に特異的に発現する膜蛋白 CD133(AC133)¹⁰⁾に着目し、CD133 に対するアフィニティカラムを用いて広く血液悪性疾患患者より造血幹細胞相当分画を純化保存するバンク事業「Blast Bank」を開始した。2005 年 9 月現在ですでに Blast Bank のサンプル数は 600 例を越えており、純化ヒト疾患細胞のゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級のものである。

Ueda ら¹⁰⁾は本バンクに属する MDS の各病期サンプルをマイクロアレイで比較することで、病期進展機構の解明を目指した。健常人骨髄 1 例、RA 期 11 例、RAEB 期 5 例、および MDS 由来白血病 15 例のバンクサンプルより mRNA 分画を抽出し、ヒト転写因子、膜蛋白質、およびシグナル伝達分子などの 2304 種類の遺伝子を配置した DNA マイクロアレイによる解析をおこなっている。その結果、複数の病期特異的遺伝子を同定することに成功している。一方、病初期から、RAEB/AML への移行メカニズムをこのデータセットから解析



図③ MDS 由来白血病と *de novo* AML サンプルの仮想空間への投射(筆者作成)
両疾患間で発現量が有意に異なる遺伝子を抽出し、これらの遺伝子発現パターンの主成分を3種類抽出した。得られたパターンを仮想軸とする三次元空間にサンプルを投射したところ、両疾患群が遺伝子発現パターンの上から、異なる疾患単位であることが示唆された。

することも可能である。たとえば全体を予後良好群である「正常+RA」期と予後不良群である「RAEB+AML」期に大きく分け、両者間で発現量が大きく異なる遺伝子を同定することも試みた。その結果、図②に示すように11種類の遺伝子が病期の進展に伴い発現量が増加することが明らかになり、一方6種類の遺伝子の発現量が減少することも示された。前者は病期進展に関与するがん遺伝子の、また後者はがん抑制遺伝子のよい候補といえる。

たとえば後者の遺伝子群に属するPIASyは当初転写因子STAT1の機能を抑制する細胞内分子としてクローニングされ、現在はユビキチン類似分子であるSUMO (small ubiquitin-like modifier)の結合酵素そのものであると考えられている。細胞内蛋白分解系専用の「蛋白タグ」であるユビキチンとは異なり、SUMOの細胞内機能は多彩であり、PIASyの機能もSTAT1, p53, アンドロゲンレセプターの活性調節など多岐にわたる。また、Uedaら¹⁴⁾はPIASyの発現低下がMDSにおける病期進行メカニズムに直接関与している可能性を検証する目的で、G-CSF依存性に顆粒球へと分化するマウス骨髄系細胞株32Dへ同遺伝子を導入した。その結果PIASyの発現誘導に伴って細胞の著明なアポトーシスが認められることがわかった。これらの結果はPIASyの「がん抑制遺伝子」としての機能を強く示唆しており、PIASyの発現低下がMDS病期進行の新たなメカニズムである可能

性が注目される。

3. MDSとAMLの鑑別診断

一方、鑑別診断マーカーのスクリーニングにもマイクロアレイは有用である。MDS由来のAMLは*de novo* AMLにくらべ治療抵抗性であることが多く、その鑑別診断は重要であるが、両者を明確に区別することはしばしば困難である。Miyazatoら¹²⁾はMDS由来AMLおよび*de novo* AML両群のBlast Bankサンプルそれぞれ5例を選び、1152遺伝子の発現量を比較した。その結果膜蛋白DlkがMDS由来群特異的に高発現していることを確認し、またその疾患特異的発現は症例を追加した定量的real-time RT-PCR法によっても確認された。

Oshimaら¹³⁾は、はたしてMDS由来AMLと*de novo* AMLが遺伝子発現の面から鑑別可能か否かを正確に検証する目的で、Blast Bankに属する両疾患群のうち、FABサブタイプでM2に分類されるサンプルのみ各10例を選び、12,000種類以上の遺伝子発現量をマイクロアレイで比較した。この解析により分化傾向(FABサブタイプ)もそろったCD133陽性細胞間での詳細な比較が可能になる。まずt検定により両群間で発現量が統計的に有意に異なる遺伝子を抽出し、さらに各群における発現量の平均値が群間で大きく異なる遺伝子を選び出した。その結果計73種類の遺伝子が最終的に同定

された。実際には、これら遺伝子の発現量のパターンは、73 遺伝子がそれぞれ独立しているわけではなく、よく似たものも多い。そこで correspondence analysis 法によって発現量の変化パターン 73 種類から代表的なもの 3 種類を抽出した(すなわち代表的な仮想発現パターンそれぞれ作る仮想遺伝子 3 種類を作成したことになる)。これら仮想遺伝子 3 種類を軸とした仮想空間に各サンプルを投射したのが図 4 である。その結果 MDS 由来 AML と *de novo* AML のサンプルの多くが仮想空間上で異なった位置に存在することがわかった。すなわち両疾患は異なった単位と考えてよいことを示唆している。一方図 4 において、一部の症例が遺伝子発現パターンと臨床診断が合致していないことも明らかである。これらの結果は遺伝子発現プロファイルにもとづく新しい診断法が可能であることを示唆しているが、その正当性は長期的な患者生命予後とのリンクが証明されてはじめて明らかになるであろう。

おわりに

DNA マイクロアレイがその新規性のみで注目・検討された時期は終わりつつあり、比較的高額な実験費用に見合うだけの有用性が本当にあるのかが問われる時代になった。ヒトゲノムプロジェクトの成果は、医学にとってきわめて貴重(かつ膨大)な情報リソースであり、この有効活用なくして 21 世紀の医療は成り立たないであろう。必ずしも DNA マイクロアレイが理想のシステムとはいえないが、現段階でヒトゲノム情報の網羅的利用に関して DNA マイクロアレイを超える技術は存在しない。実際の実験にあたっては「網羅的発現比較によって何を明らかにしたいのか?」を明確に念頭に置き、そのための最も効率よいアプローチを検討することが重要であろう。DNA マイクロアレイシステムは慎重にデザインされた実験においてのみ、そのきわめて高いスクリーニング能力を発揮すると考えられる。

文献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium : Finishing the euchromatic sequence of the

human genome. *Nature* 431 : 931-945, 2004

- 2) Dhanasekaran SM *et al* : Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412 : 822-826, 2001
- 3) van't Veer LJ *et al* : Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415 : 530-536, 2002
- 4) Duggan DJ *et al* : Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21 : 10-14, 1999
- 5) Grimwade D *et al* : The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML : analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92 : 2322-2333, 1998
- 6) Bennett JM *et al* : Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103 : 620-625, 1985
- 7) Yagi T *et al* : Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood* 102 : 1849-1856, 2003
- 8) Bullinger L *et al* : Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350 : 1605-1616, 2004
- 9) Valk PJ *et al* : Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350 : 1617-1628, 2004
- 10) Hin AH *et al* : AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90 : 5002-5012, 1997
- 11) Ueda M *et al* : DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 123 : 288-296, 2003
- 12) Miyazato A *et al* : Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 98 : 422-427, 2001
- 13) Oshima Y *et al* : DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17 : 1990-1997, 2003

MANO Hiroyuki

まの・ひろゆき

1959 年、岡山県生まれ

1984 年、東京大学医学部医学科卒

1986 年、東京大学医学部第三内科入局

1989 年、米国テネシー州 St. Jude 小児研究病院生化学部門 留学

1991 年、東京大学医学部第三内科文部教官 助手

1993 年、自治医科大学分子生物学講座 講師

2001 年より自治医科大学ゲノム機能研究部 教授(現職)

専門は血液内科、ゲノム医学

研究テーマはゲノミクス技術を用いた造血器悪性腫瘍の病態解明

特集●個別化医療の実現を目指して

遺伝子発現プロファイリングによる 急性骨髄性白血病の予後予測

間野 博行

遺伝子発現プロファイリングによる急性骨髄性白血病の予後予測

間野博行

自治医科大学ゲノム機能研究部

DNA マイクロアレイを用いることで、数万種類の遺伝子の発現量を任意の細胞・組織間で簡便に比べることが可能になった。現在、急性骨髄性白血病患者サンプルをマイクロアレイで解析し、得られた遺伝子発現プロファイルのなかから患者の長期予後にリンクするものをスクリーニングする試みが精力的に行われている。また最近は、患者骨髄の単核球全体を解析するのではなく、きわめて幼弱な造血幹細胞分画のみをあらかじめ純化した後にマイクロアレイ解析を行うことも試みられている。同定された予後関連遺伝子群の発現量をもとに各患者の予後を予測することがこれらのプロジェクトの目標であり、今後は遺伝子発現プロファイルに基づいた急性白血病の新しい分類法が提案されると期待される。

Key words DNA microarray, genomics, AC133, karyotype

遺伝子発現プロファイル

約 30 億塩基対に及ぶヒトゲノムの核酸配列を決定する大規模事業である「ヒトゲノムプロジェクト」がついに 2003 年 4 月に終了宣言を行い、ヒト染色体のユークロマチン (euchromatin) 領域のほぼ完全な塩基配列が決定された (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/>)。ヒトのもつタンパク質をコードする総遺伝子数はおそらく 20,000~25,000 種類前後になると予想されている¹⁾。かつて夢であったヒトの全遺伝子プールの全貌がいよいよ明らかになるうとしており、ポストゲノム時代が訪れたといえる。

この膨大な遺伝子情報を有効に使う技術である

ゲノミクス、プロテオミクスが、白血病の解析においても重要な役割を担うことは間違いないであろう。今後の医学研究においては、「膨大ではあるがあくまで有限なヒト遺伝子プール」のなかから、特定の特徴を備えた遺伝子を効率よく同定することが重要になる。ゲノミクス技術のなかでも DNA マイクロアレイ、DNA チップ (以下 DNA マイクロアレイ) はすでに複数の疾患で有用な解析ツールとなることが示されてきた^{2,3)}。

DNA マイクロアレイはスライドガラスなどの小さな担体上に、解析する遺伝子由来の cDNA あるいはオリゴヌクレオチドを高密度に配置したものであり、いわば超高密度ドットプロット法といえよう⁴⁾。たとえば今、組織 A 由来の cDNA を蛍光色素 Cy3 で標識し、組織 B 由来の cDNA を蛍

Prediction of prognosis for AML based on gene expression profile

Hiroyuki Mano

まの・ひろゆき 1984 年東京大学医学部卒業。86 年同第三内科入局、医学博士、91 年同助手、93 年自治医科大学医学部分子生物学講座講師、2001 年同大学医学部ゲノム機能研究部教授 (現在に至る)。研究テーマ：ゲノミクス技術を用いた造血器悪性腫瘍の病態解明。

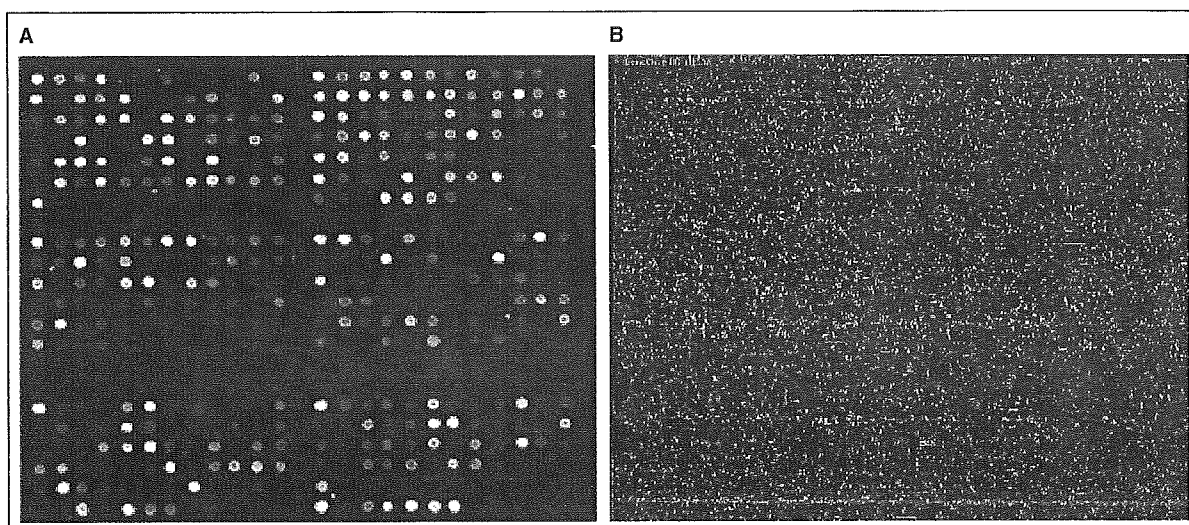


図1 DNA マイクロアレイのスキャン画像

cDNA タイプマイクロアレイ (A) および Affymetrix 社の GeneChip (B) をスキャンした画像をそれぞれ示す。

A: cDNA アレイの場合は2種類のサンプルから調製した cDNA をそれぞれ Cy3 と Cy5 の蛍光色素で標識し、混合してハイブリダイズした。Cy3 標識 cDNA が主に結合したスポットは緑色、Cy5 標識 cDNA が主に結合したスポットは赤色、両者がほぼ等量結合したスポットは黄色で表される。

B: 単一のサンプルより調製した標識 cRNA をハイブリダイズさせてあり、実際は単色のグレースケールで表されるが、発現強度をわかりやすくするために pseudo-color で表してある。

光色素 Cy5 で標識したとする。両者の混合物を cDNA を高密度に配置したマイクロアレイとハイブリダイズさせると、標識 cDNA は各スポット上の遺伝子の組織 A と B における発現量の比に応じた形でスポットに結合する (図 1A)。レーザーで励起すると Cy3 は緑色、Cy5 は赤色の蛍光を発するため、あるスポット上の遺伝子が組織 A のみに発現していれば緑色のスポットとなり、B のみに発現していれば赤色のスポットとなる。また両組織においてほぼ等量に発現している遺伝子の場合には黄色のスポットとして見える。このようにして両色素の蛍光強度を測定することで、それぞれのスポット上の遺伝子の測定サンプル間における発現比が定量できるのである。1枚の DNA マイクロアレイ上には数千~数万種類の DNA 断片が配置されており、1回の実験でこれら数多くの遺伝子の発現変化を包括的に解析できる。

なお、担体上にオリゴヌクレオチドを配置したオリゴヌクレオチドアレイの場合には、上述のような Cy3 と Cy5 の二重染色による2検体間発現比

較ではなく、1種類の検体を1種類の蛍光染色で解析することのほうが多い。したがって、1枚のアレイからは単一の組織の発現プロファイルが得られるのみであり、他の組織と比べる場合は、それぞれ異なったアレイで得られたデータをなんらかの方法でノーマライズさせた後にコンピュータ上で比較することになる (図 1B)。また、オリゴヌクレオチドアレイの場合にはスポットの蛍光強度を増強するために、mRNA からいったん二本鎖 cDNA を作製し、さらに T7 RNA ポリメラーゼなどを用いて RNA を増幅するとともに蛍光色素を取り込ませることが多い。

このようにマイクロアレイを用いることで、これまでとは比較にならないような膨大な遺伝子発現データを解析することができるようになった。こうして得られた遺伝子群の発現様式、発現パターンのことを「遺伝子発現プロファイル (gene expression profile)」と呼ぶ。このプロファイルを比べることで白血病の特性に迫れるのではないかと考えられる。

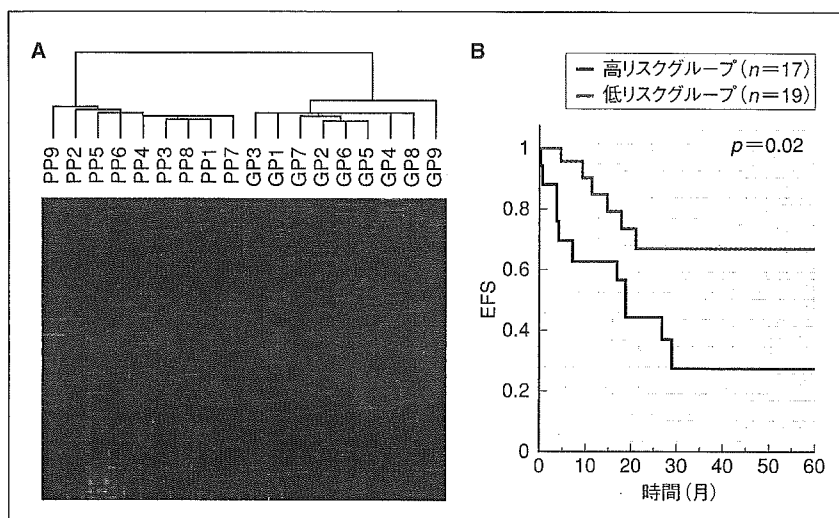


図2 骨髄単核球の発現プロファイルによる予後予測

A: 長期生存症例 (GP) と予後不良症例 (PP) 間で発現が異なる遺伝子を取り出したところ 133 種類同定された。これら遺伝子の発現量で 2 次元クラスタリングを行った。

B: 上記遺伝子の発現量でテストサンプルを 2 次元クラスタリングし、大きく分かれた 2 群間で予後を比較した。EFS: event-free survival

(Yagi T, et al. Blood 2003; 102: 1849-56⁷⁾より)

DNA マイクロアレイを用いた急性骨髄性白血病の新しい予後予測

急性骨髄性白血病 (AML) は未熟な血液細胞が癌化して生じる疾患であり、これまでさまざまなパラメータが治療予後にリンクすることが報告されてきた⁵⁾。現在、臨床の場で白血病の診断および予後予測を行う場合、患者骨髄細胞に関して①ペルオキシダーゼ、エステラーゼなどの特殊染色、②FACSを用いた細胞表面マーカーの解析、③遺伝子異常の有無の解析 (免疫グロブリン遺伝子や T 細胞表面レセプター遺伝子の再構成、*BCR-ABL* 遺伝子、*PML-RARα* 遺伝子などの有無)、④染色体型の解析、などの検査が利用される⁶⁾。これらを総合的に解析することで予後にある程度リンクした診断が行えるが、上記の解析をすべて行うのは煩雑であり多くの専門技術も必要となる。一方、たとえば 1 枚の DNA マイクロアレイを用いることで旧来の方法で得られる情報がすべて解析可能となれば、診断はより簡便になり、かつ異なった施設間での診断の一致率も上昇するであろう。骨髄中の血球の多くは単核球 (mononuclear cell) と呼ばれる分画に相当し、これまで AML 患者骨髄単核球を用いた DNA マイクロアレイ実験により患者予後を予測する試み

が行われてきた。

Yagi らは、小児 AML 患者 54 例について Affymetrix 社 GeneChip HGU95A チップを用いた遺伝子発現解析を行い、小児 AML 内での予後良好群と不良群とを予測する試みを行っている⁷⁾。彼らのサンプル内で 3 年以上完全寛解 (complete remission; CR) を維持している症例 9 例と初回寛解導入に失敗した症例 9 例の間で発現量が統計的に異なる遺伝子 133 種類を抽出し (図 2A)、これら予後関連遺伝子の発現量をもとにして、患者全体を 2 次元クラスタリング法、あるいは supported vector machine (SVM) 法によって層別化した。その結果、どちらの方法によっても AML 内で生命予後が異なるサブグループを検出することに成功している (図 2B)。すなわち、遺伝子発現プロファイルをもとにした新しい疾患分類法の可能性が提示されたことになる。

同様に Bullinger らは、AML 患者 116 例の骨髄単核球より mRNA を調製し、約 39,000 種類の cDNA を配置したマイクロアレイで解析を行っている⁸⁾。彼らは患者を training set と test set に分け、前者のデータを用いて患者予後に発現量がリンクする遺伝子をスクリーニングした。その結果、100 種類以上の予後予測遺伝子セットを同定することに成功している。さらに、これら遺伝子の発

現量をもとに患者を2群に分け、その予後を比較したところ、2群の生命予後は有意に異なっていた ($p < 0.001$)。また、あらかじめ取っておいた test set において検証したところ、やはり2群の予後は大きく違っている ($p = 0.006$) ことが示された。これらの予後分類法が現行の核型に基づく分類法とは独立したものであることを示すために、彼らは核型分類では中間群に分類される「正常核型」をもった患者のみを選択し、その予後予測も試みている。彼らの分類法を適用したところ、正常核型のなかでも予後良好群と不良群とを区別することに成功した ($p = 0.046$)。彼らの解析は旧来の核型分類法とは異なった新しい予後予測法の可能性を示唆しており興味深い。

また Valk らも同様の目的から、285例のAML患者骨髄単核球を用いて約13,000種類の遺伝子に関する発現量を測定した。彼らもやはり予後にリンクした遺伝子発現プロファイルがあることを検出している⁹⁾。

純化細胞を用いた急性骨髄性白血病の予後予測

しかし、実際にDNAチップを用いた実験を行うと、本法が意外にも偽陽性データが多く効率の悪い手技であることにも気付く。その理由を、たとえば健康人と白血病患者の骨髄を比べる場合で考えてみよう(図3)。正常骨髄はさまざまな系統の細胞群から成る「ヘテロ」な集団である。もし今、この骨髄中の多能性幹細胞の1クローンが悪性転化して白血病になったと仮定すると、白血病患者の骨髄は幹細胞由来の白血病細胞が多くを占めるようになり、それ以外の細胞の骨髄における割合は相対的に低下する。したがって、両者の骨髄細胞(あるいは単核球)全体を単純に比較するようなDNAチップ解析を行うと、造血幹細胞分画以外の細胞(たとえば図3の青色細胞)特異的に発現する遺伝子などはすべて減少して見えてしまう。この変化は、それぞれの遺伝子の細胞内におけるmRNAのコピー数を反映しておらず、

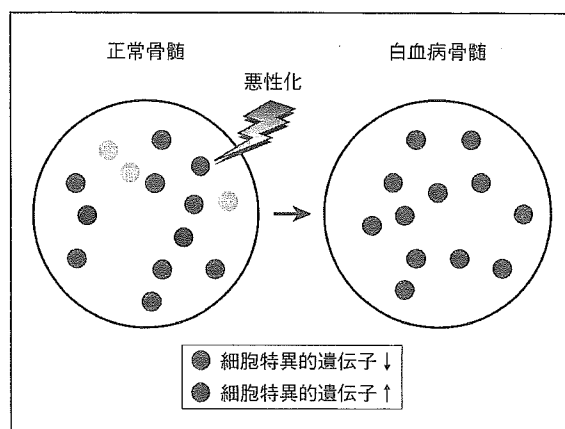


図3 「Population shift 効果」による偽陽性データ

正常骨髄はさまざまな細胞から成るヘテロな集団である。今そのなかから緑色の細胞が悪性化し白血病が生じたとする。患者骨髄内は結果的に緑色由来の細胞が大半を占めることになり、それ以外の細胞の割合は相対的に減少する。したがって、骨髄全体を正常と白血病患者で比べるような単純なマイクロアレイ解析を行えば、青色細胞特異的な遺伝子は必ず減少しているように見え、逆に緑色細胞特異的な遺伝子の発現は必ず増加しているように見えてしまう。このような変化は実際の細胞内での発現変化を反映しているわけではなく、単に骨髄内でのポピュレーションの変化を見ているに過ぎない。この「population shift 効果」による見せかけの発現変化が、大量の偽陽性データを生み出すもととなる。

誤って「発現減少」と判断されたわけである。一方、幹細胞特異的に発現していた遺伝子は、細胞あたりの発現量の変化の有無にかかわらず骨髄中における割合が増加するために、誤って「発現誘導」と判断されることになる¹⁰⁾。これらのさまざまな偽陽性や偽陰性データのノイズのなかから真に「癌化に伴って細胞あたりの発現量が変化する」遺伝子を選択するのはきわめて困難であろう。

では、どのようにすればこれら偽陽性データを回避する効率のよいゲノム解析が可能となるのであろうか。白血病を含む多くの血液悪性疾患が、造血幹細胞あるいはそのごく近傍の幼若細胞における悪性転化に起因することが知られる。そこで、患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化しこれを用いてDNAチップ解析を行えば、患者骨髄中の芽球の割合や芽球の分化傾向の違いに影響されない精度の高い解析が可能になると期待される。筆者らは、造血幹細胞分画に特異的に発現する膜

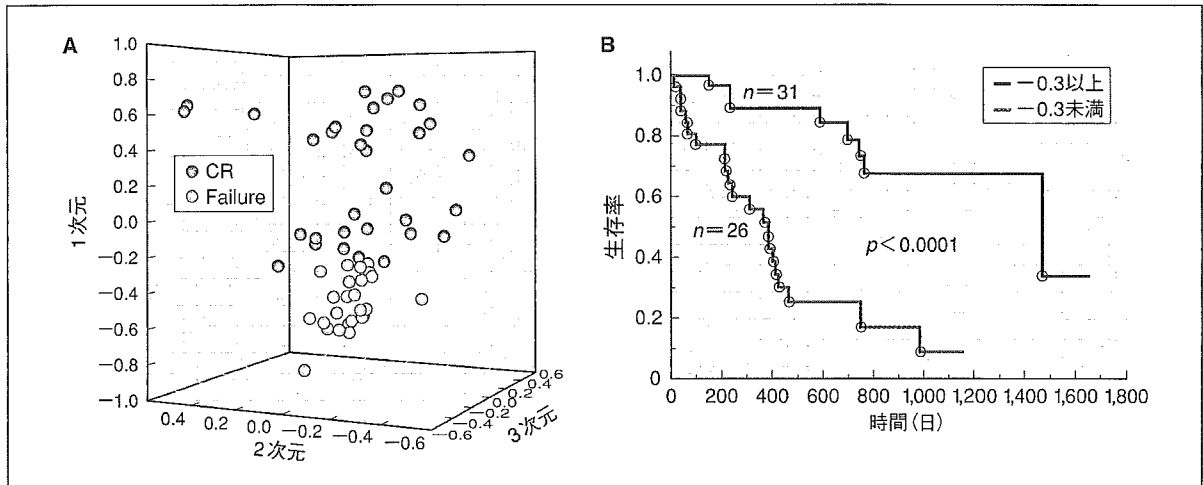


図4 AC133陽性細胞を用いた予後予測

A: 化学療法による初回寛解導入が成功した群 (CR) と失敗した群 (Failure) との間で有意に発現量が異なる遺伝子をスクリーニングし、その発現プロファイルから代表的なものを3種類抽出した。これらプロファイル上の仮想発現量に基づいてサンプルを空間に投射したところ、CR群とFailure群とは異なった位置に配置された。
 B: 仮想空間のZ軸の値が-0.3未満 (灰色) か以上 (赤色) かによって患者を二分し、その予後をKaplan-Meier法で比較した。

タンパク質 AC133¹¹⁾に着目し、AC133に対するアフィニティカラムを用いて広く血液悪性疾患患者より造血幹細胞相当分画を純化・保存するバンク事業「Blast Bank」を開始した。平成16年12月現在ですでにBlast Bankのサンプル数は600例を超えており、純化細胞のゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級といえる¹²⁻¹⁴⁾。

では具体的に、Blast Bankを用いて白血病の予後予測が可能か否か検討してみよう。筆者らは、ヒト全遺伝子が配置されたDNAマイクロアレイを用いて標準的化学療法を受けたAML患者66例の骨髄AC133陽性細胞について遺伝子発現プロファイルデータを得た。これら66例の患者中初回化学療法によってCRに到達した症例は51例あり、残り15例は寛解導入に失敗した。後者の15例は1年以内に全員死亡しており、きわめて予後不良なグループといえる。この初回化学療法に成功した患者と失敗した患者の間では遺伝子発現プロファイルは違うのであろうか。それを検討するために44,000種類のプローブセット (33,000種類の遺伝子に相当) の発現データ中、両グループ間で発現が有意に異なる遺伝子を選び

出し、さらに少なくともどちらかのグループでは高い発現量を示す遺伝子をスクリーニングしたところ、最終的に約30種類の遺伝子が得られた。得られた遺伝子の発現プロファイルはそれぞれが互いに独立なわけではなく、よく似たものも多い。そこでcorrespondence analysis法¹⁵⁾によって、これら30種類の発現量パターンから全体を最も代表する仮想発現プロファイルを3種類抽出した (すなわち、代表的な仮想発現パターンそれぞれを作る仮想遺伝子3種類を作製したことになる)。これら仮想遺伝子3種類を軸とした仮想空間に各サンプルを投射したのが図4Aである。その結果興味深いことに、治療奏効症例と失敗症例とは空間上不連続な位置に独立して存在することがわかった。言い換えると、両グループは遺伝子発現プロファイルの面では異なった集団に属することになる。

このような空間上の位置は患者予後にリンクしているのであろうか。図4Aをよく見てみると、患者サンプルはZ軸上で最も強く分離されていることがわかる。そこで、症例の仮想空間上でのZ軸上の値が-0.3未満か-0.3以上かによって大

きく2群に分け、その長期生命予後を Kaplan-Meier 法によって解析してみた。図 4B で明らかのように、両群は大きく予後が異なることがわかる。しかも、さまざまな方法で予後関連遺伝子を絞り込んだ結果、数種類の遺伝子の発現量を測定するだけで患者の長期予後を予測可能なことまで明らかになった (Yamashita ら, 未発表データ)。これらの予後関連遺伝子数は、以前の骨髓単核球による解析で同定された 100 種類以上の予後関連遺伝子数に比べて明らかに少ない。純化した細胞を標的として解析することで分化傾向などによるノイズが低減し、少数の遺伝子で予後予測可能になったのではないかと考えられる。

DNA マイクロアレイがその新規性のみで注目・検討された時期は終わりつつあり、比較的高額な

実験費用に見合うだけの有用性が本当にあるのかが問われる時代になった。ヒトゲノムプロジェクトの成果は、医学にとってきわめて貴重 (かつ膨大) な情報リソースであり、この有効活用なくして 21 世紀の医療は成り立たないであろう。必ずしも DNA マイクロアレイが理想のシステムとはいえないが、現段階でヒトゲノム情報の網羅的利用に関して DNA マイクロアレイを超える技術は存在しない。実際の実験にあたっては「網羅的発現比較によって何を明らかにしたいのか」を明確に念頭に置き、そのための最も効率よいアプローチを検討することが重要であろう。DNA マイクロアレイシステムは慎重にデザインされた実験においてのみ、そのきわめて高いスクリーニング能力を発揮すると考えられる。

文献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004 ; 431 : 931-45.
- 2) Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001 ; 412 : 822-6.
- 3) van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002 ; 415 : 530-6.
- 4) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, et al. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999 ; 21 : 10-4.
- 5) Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML : Analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998 ; 92 : 2322-33.
- 6) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985 ; 103 : 620-5.
- 7) Yagi T, Morimoto A, Eguchi M, et al. Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood* 2003 ; 102 : 1849-56.
- 8) Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 1605-16.
- 9) Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 1617-28.
- 10) Miyazato A, Ueno S, Ohmine K, et al. Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 2001 ; 98 : 422-7.
- 11) Hin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997 ; 90 : 5002-12.
- 12) Tsutsumi C, Ueda M, Miyazaki Y, et al. DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2004 ; 32 : 828-35.
- 13) Ota J, Yamashita Y, Okawa K, et al. Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders. *Oncogene* 2003 ; 22 : 5720-8.
- 14) Oshima Y, Ueda M, Yamashita Y, et al. DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003 ; 17 : 1990-7.
- 15) Fellenberg K, Hauser NC, Brors B, et al. Correspondence analysis applied to microarray data. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 10781-6.

Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin

Kumiko Saeki,^{1,*} Etsuko Yasugi,^{1,*} Emiko Okuma,¹ Samuel N. Breit,⁴
Megumi Nakamura,³ Tosifusa Toda,³ Yasushi Kaburagi,² and Akira Yuo¹

¹Departments of Hematology and ²Metabolic Disorder, Research Institute, International Medical Center of Japan;

³Proteomics Collaboration Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, Japan;

and ⁴Centre for Immunology, St. Vincent's Hospital, and University of New South Wales, Sydney, Australia

Submitted 27 October 2004; accepted in final form 11 April 2005

Saeki, Kumiko, Etsuko Yasugi, Emiko Okuma, Samuel N. Breit, Megumi Nakamura, Tosifusa Toda, Yasushi Kaburagi, and Akira Yuo. Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E419–E428, 2005. First published April 12, 2005; doi:10.1152/ajpendo.00512.2004.—Insulin/IGF-I-dependent signals play important roles for the regulation of proliferation, differentiation, metabolism, and autophagy in various cells, including hematopoietic cells. Although the early protein kinase activation cascade has been intensively studied, the whole picture of intracellular signaling events has not yet been clarified. To identify novel downstream effectors of insulin-dependent signals in relatively early phases, we performed high-resolution two-dimensional electrophoresis (2-DE)-based proteomic analysis using human hematopoietic cells 1 h after insulin stimulation. We identified SRp20, a splicing factor, and CLIC1, an intracellular chloride ion channel, as novel downstream effectors besides previously reported effectors of Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor 2 and glutathione *S*-transferase- π . Reduction in SRp20 was confirmed by one-dimensional Western blotting. Moreover, MG-132, a proteasome inhibitor, prevented this reduction. By contrast, upregulation of CLIC1 was not observed in one-dimensional Western blotting, unlike the 2-DE results. As hydrophilic proteins were predominantly recovered in 2-DE, the discrepancy between the 1-DE and 2-DE results may indicate a certain qualitative change of the protein. Indeed, the nuclear localization pattern of CLIC1 was remarkably changed by insulin stimulation. Thus insulin induces the proteasome-dependent degradation of SRp20 as well as the subnuclear relocalization of CLIC1.

HL-60 cells; PDQuest; matrix-assisted laser desorption ionization coupled to time-of-flight mass spectrometry; Mascot

INSULIN AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I (IGF-I) are known as important regulators of a variety of biological effects, including growth, development, and metabolism. Moreover, insulin-dependent signals contribute to the regulation of azurophil granule-selective macroautophagy in human hematopoietic cells (16). The molecular mechanisms for the actions of insulin and IGF-I have been intensively studied by various approaches, including gene-targeting animal experiments (1, 8, 14, 22) and molecular cloning techniques (20, 21). Now, the scenario for early intracellular signal transduction including a protein kinase activation cascade is well documented. It has been revealed that common intracellular signaling pathways are working downstream of insulin and IGF-I, including insulin

receptor substrates (IRSs) (12) and Shc (17). The IRSs phosphorylate phosphatidylinositol 3-kinase to activate Akt, which transmits signals for proliferation and survival as well as the hematopoietic macroautophagy regulation (16), and the mammalian target of rapamycin and S6 kinase, which transmit signals for growth and translation besides hepatic macroautophagy regulation (2). On the other hand, Shc transmits signals for differentiation in hematopoietic cells (25).

In contrast to the early signal transduction, the picture of the later signaling events remains rather obscure. A large number of still undetermined molecules may be working downstream of the insulin-dependent signals. To obtain the whole picture of the intracellular signaling events downstream of the insulin receptor, comprehensive studies such as transcriptome analysis and proteome analysis may be especially powerful. A transcriptome analysis can illuminate the intracellular signaling events if they require new transcriptions or altered message stabilities. However, changes in protein expression are not always associated with those of the message expression, and vice versa. Thus transcriptome analysis would occasionally bring about false positive and/or false negative results. In this sense, proteome analysis is thought to be a more practical tool. Moreover, proteome analysis has merit in demonstrating protein modification changes such as phosphorylation and acetylation besides the change in net expression amounts. Indeed, studies on proteome analysis have successfully identified the protein molecules associated with metabolic regulation in the liver (3, 7). However, proteome analysis on insulin signaling in hematopoietic cells has not been performed despite the significance of insulin-dependent signals in the hematopoietic system.

For the first time, we performed proteomic analysis using human hematopoietic cells with the high-resolution two-dimensional electrophoresis (2-DE) system. We show that SRp20, a splicing factor, and CLIC1, an intracellular chloride ion channel, are working as novel downstream effectors of insulin signaling. The biological relevance of these events is discussed.

MATERIALS AND METHODS

Cells, growth factors, and inhibitors. HL-60 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; JRH Bioscience, Lenexa, KS). For insulin-stimulating experiments, cells

* These authors contributed equally to this work. The order of the authors' names was arbitrarily arranged.

Address for reprint requests and other correspondence: A. Yuo, Dept. of Hematology, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan (e-mail: yuoakira@ri.imcj.go.jp).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

had been previously cultured in serum-free RPMI 1640 medium supplemented with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ human holo-transferrin (Sigma Chemical, St. Louis, MO) for 3 days, and then 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin (Sigma) were added. Transferrin was suspended in RPMI 1640 medium, and insulin was solubilized by 1 N hydrochloride. In some experiments, MG-132 (Calbiochem, La Jolla, CA) was added 30 min before insulin stimulation.

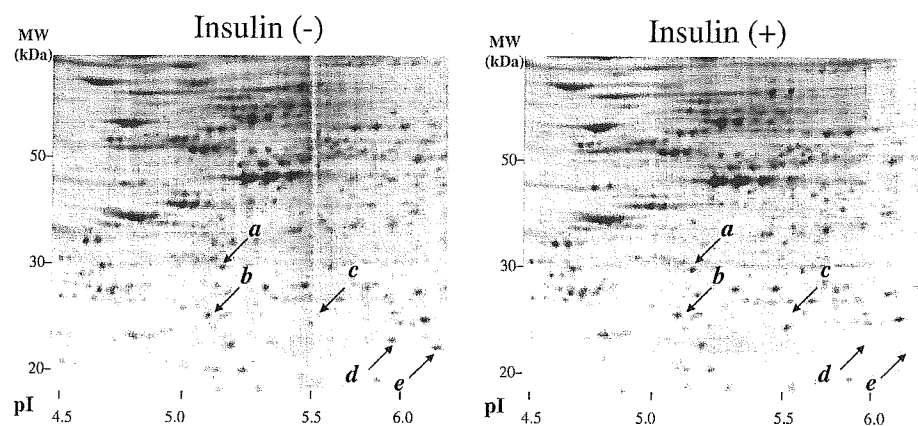
Two-dimensional gel electrophoresis with quantitative analyses. Insulin-depleted cells were stimulated by insulin. After a 1-h incubation, stimulated and nonstimulated cells were collected. After a washing with wash buffer (10 mM Tris·HCl buffer, pH 8.0, 5 mM magnesium acetate), 4×10^7 cells were suspended with 7 volumes of lysis buffer containing 2 M thiourea, 7 M urea, 4% (wt/vol) CHAPS, and 1 mM Pefabloc SC PLUS (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The cell suspensions were kept for 10 min on ice, sonicated intermittently, and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C, and the supernatant fractions were collected. The protein concentration was determined in the lysis solution with a dye reagent from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ), using BSA as a standard. The lysate was alkylated with Ready Prep Reduction-Alkylation Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The 120 μg of protein lysate per gel were subjected to two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). One-dimensional isoelectric focusing was carried out using Immobiline dry strip (18 cm long, pH 3–10 nonlinear or pH 4–7 linear, Amersham Biosciences) in a horizontal electrophoresis system (Ettan IPGphor, Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. After the one-dimensional electrofocusing, IPG gels were equilibrated with buffer containing 50 mM Tris·HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% (vol/vol) glycerol, 2% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.01% bromophenol blue, and 0.5% dithiothreitol, followed by alkylation with equilibration buffer containing 4.5% idoacetamide instead of 0.5% dithiothreitol at room temperature for 15 min. The gels were subjected to two-dimensional SDS-PAGE (10% gel). Proteins were visualized in the gels by staining with SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Bio-Rad Laboratories) for overnight. The fluorescence intensity of each protein spot was digitally recorded by Fluor-Imager 595 (Amersham Biosciences) using ImageQuant software and the differential protein expression quantitatively analyzed by PDQuest software (Bio-Rad Laboratories). The density of each spot was normalized by that of the smallest β -actin spot. Initially, all of the spots were roughly matched by an automatic program in PDQuest software, which was followed by a more detailed manual matching process to correct inappropriate matching pairs. Three to six independent experiments were performed, and the results were statistically analyzed by Student's *t*-test.

Mass spectrometric analysis. Mass spectrometric analysis was performed according to the method reported by Toda et al. (23), with slight modifications. Briefly, each protein spot in SYPRO Ruby-

stained gels was picked by FluoroPhoreStar 3000 (Anatech, Tokyo, Japan). The pieces of gels were dehydrated in 50% acetonitrile and 50% ammonium bicarbonate, next in 100% acetonitrile, and dried. The proteins were digested with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin (sequencing grade modified trypsin; Promega, Madison, WI) at 30°C. After overnight protein digestion, peptide fragments in the digest were subjected to matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) coupled to a time-of-flight (TOF) (MALDI-TOF) mass spectrometer (AXIMA-CFR; Shimadzu, Kyoto, Japan) for peptide mass fingerprinting (PMF). Protein identification was performed with the Mascot server (Matrix Science, Boston, MA) and Protein Prospector (UCSF Mass Spectrometry Facility, San Francisco, CA). We selected the *Homo sapiens* database of SWISS-PROT and parameters: peptide tolerance ± 0.4 Da and one missed cleavage. Carbamidomethyl modification of cysteine and acetylation of the NH_2 -terminal end or lysine and phosphorylation of serine, threonine, or tyrosine were considered. Protein identification was repeated at least once with spots from different gels. Phosphorylated peptides were confirmed by MALDI-TOF-MS in a postsource decay (PSD) mode of AXIMA-CFR and AXIMA-CFRplus (Shimadzu). NH_2 -terminal acetylation was determined by MALDI-QIT-TOF-MS in an MS/MS mode (AXIMA-QIT, Shimadzu).

One-dimensional Western blotting. Cells (5×10^5) were lysed with 100 μl of 1 \times Laemmli's sample buffer and boiled. Ten microliters of this lysate were subjected to SDS-PAGE with 15% gels. The electric transfer onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane was carried out with a semidry blotting apparatus (Bio-Rad Laboratories) at 50 mA/cm² for 45 min at room temperature using buffer containing 2.25% Tris, 10.8% glycine, and 20% methanol. The first antibody reaction was performed using anti-SRp20 antibody (7B4; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor (Rho-GDI) antibody (A-20; Santa Cruz Biotechnology), anti- β -tubulin antibody (H-235; Santa Cruz Biotechnology), a sheep anti-CLIC1 antiserum (25), anti-cyclin D3 antibody (C-16; Santa Cruz Biotechnology), anti-cyclin E antibody (M-20; Santa Cruz Biotechnology), and anti-cyclin A antibody (BF683; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). The second antibody reaction and the final detection procedure were performed using ECL Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences) or SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) according to the manufacturers' guidance. Information of the chemical luminescence was analogically developed onto Hyperfilm (Amersham Biosciences). After scanning of the developed film, the band intensities were calculated by ImageQuant software (Amersham Biosciences). Stripping of the first antibody was performed by incubating the PVDF membrane with Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce Biotechnology) at room temperature for 30 min.

Fig. 1. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) profile of human hematopoietic HL-60 cells with or without insulin treatment. HL-60 cells were cultured with transferrin-supplemented serum-free medium for 3 days. Then buffer solution (left) or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin (right) was added, and cells were cultured for another 1 h at 37°C. Cell lysates were prepared as described in Experimental Procedures, and 2-DE was carried out. PDQuest software-based analysis demonstrated that the 5 spots (indicated by arrows) showed significant differences in their expressions with or without insulin treatment. Spot a, CLIC1, an intracellular chloride ion channel; spot b, Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor 2 (Rho-GDI-1); spot c, and glutathione S-transferase-pi (GST-pi); spots d and e, SRp-20, a splicing factor; *isoform of β -actin.



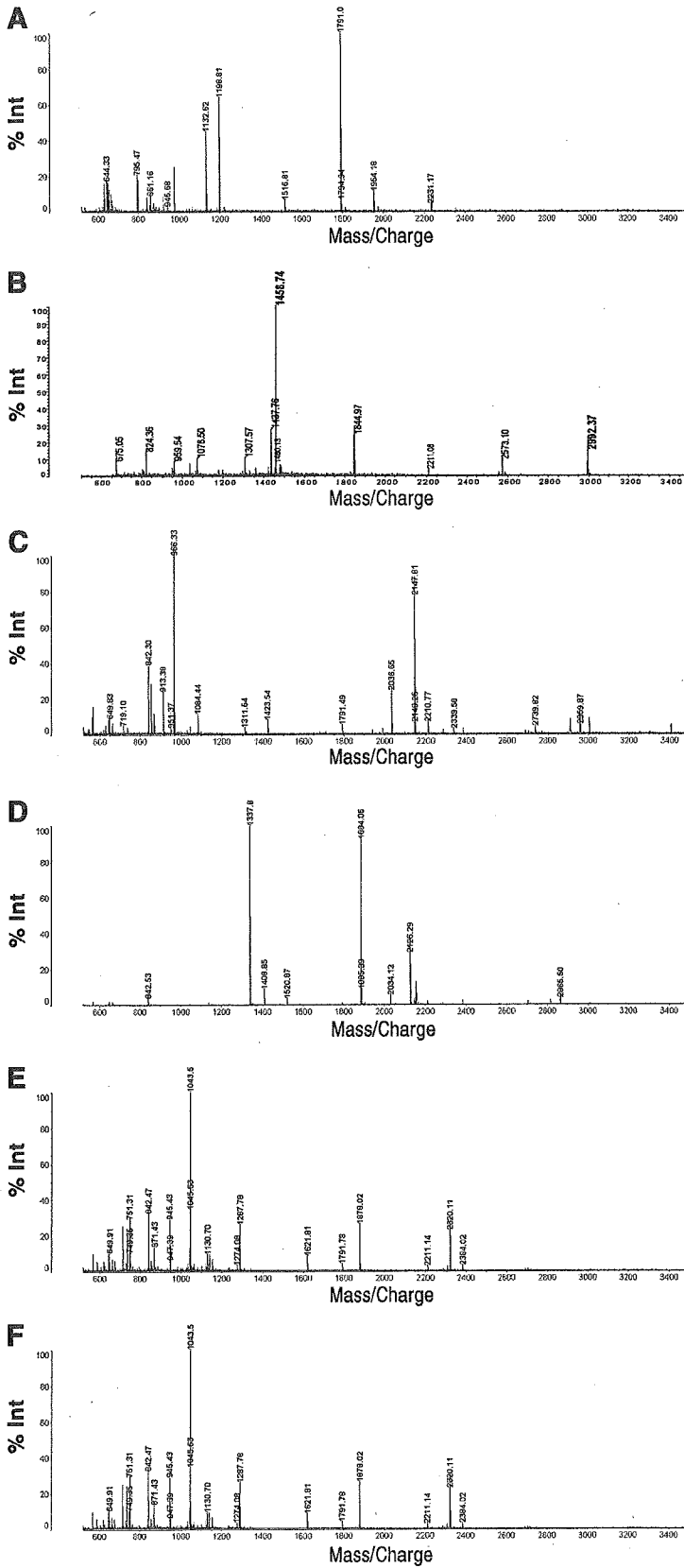


Fig. 2. Peptide mass fingerprinting (PMF) of spots a–e. Spots a (B), b (C), c (D), d (E), e (F) were picked, and, after trypsin digestion, matrix-assisted laser desorption ionization coupled to a time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF-MS) analysis was performed. As a positive control, a β -actin spot (* in Fig. 1) was picked and analyzed (A).

Two-dimensional Western blotting. SYPRO Ruby-stained proteins on gels were resolubilized and transferred according to our previously reported method (23). Briefly, the stained gel was incubated in resolubilization buffer (0.2% wt/vol SDS, 0.3% wt/vol Tris, 0.7% wt/vol glycine) for 10 min and mounted onto a PVDF membrane in a semidry blotting apparatus (Bio-Rad Laboratories). Electrotransfer was carried out at 4 V/cm² for 1 h at room temperature using buffer containing 0.3% (wt/vol) Tris, 1.5% (wt/vol) glycine, 0.1% (wt/vol) SDS. The fluorescence images of the blotted PVDF membranes were scanned and recorded by FluorImager 595 (Amersham Biosciences). The PVDF membranes were further subjected to immunoblotting as in cases of 1-DE Western blotting.

Cell cycle analysis. Cells (5×10^5) were collected, washed with PBS, and fixed with 70% ice-cold ethanol for 4 h. After treatment with RNase A (100 μ g/ml, Sigma) for 30 min at 37°C, DNA was stained with 50 μ g/ml propidium iodide (Sigma). Cell cycle analysis was performed by FACScalibur (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) using CELL Quest software according to the manufacturer's guidance.

Immunocytochemistry. Cells were fixed on slide glasses with a cytospin apparatus (Cytospin2; Shandon, Pittsburgh, PA) with further fixation with acetone-methanol solution (1:3). The immunostaining procedure was performed as described elsewhere (16) using anti-CLIC1 antibody (1:1,000 dilution) (24). The cells were observed by fluorescent microscopy with Normarsky differentiated interference contrast (Olympus Optical, Tokyo, Japan).

Statistical analysis. Student's *t*-test was used to determine statistical significance. A *P* value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

2-DE protein expression profiles of human hematopoietic cells with or without insulin treatment. To identify novel downstream effectors in early phases of insulin-dependent signals in human hematopoietic cells, we performed the 2-DE-based differential protein expression analysis using human myeloblastic HL-60 cells. The cells which had been cultured in the absence of insulin for 3 days were treated with 5 μ g/ml insulin or water. After 1 h, cell lysates were prepared according to the standard isoelectric focusing electrophoresis method described in MATERIALS AND METHODS. In this procedure, highly hydrophobic, urea-insoluble proteins were eliminated during the centrifugation step as precipitants, and only the supernatant fractions were used for 2-DE. In preliminary experiments, we used the immobilized pH gradient gel strip with a broad pH range (pH 3–10 nonlinear) for one-dimensional isoelectric focusing. Although more than 1,000 protein spots were visualized after SYPRO Ruby staining, PDQuest software-based analysis indicated that the spots having significant expression changes by insulin treatment were mainly located at pH 4–6 in the horizontal axis (data not shown). Thus we performed the

Table 2. Ratios of spot intensities (insulin +/insulin -)

Spot	Protein	Means \pm SD	<i>P</i> Value
<i>a</i>	CLIC1	1.83 \pm 0.37	<0.01
<i>b</i>	Rho-GDI-2	2.03 \pm 0.43	<0.02
<i>c</i>	GST-pi	1.93 \pm 0.52	<0.05
<i>d</i>	SRp20	0.24 \pm 0.33	<0.01
<i>e</i>	SRp20	0.18 \pm 0.27	<0.005

Summarized results from 3–6 independent experiments are shown. Statistical analysis was performed by Student's *t*-test.

following detailed analysis using the immobilized pH gradient gel strip with a narrower range (pH 4–7 linear) for finer resolution (Fig. 1). Over 600 protein spots were visualized by SYPRO Ruby staining. From these spots, we selected the candidates for the subsequent mass spectrometric analysis according to the following criteria. The basal expression level was higher than 5% of that of the largest β -actin spot, and the increase or decrease in the expression after insulin stimulation was greater than twofold or less than one-half, respectively. After statistical analysis of the multiple experiments ($n = 3-6$), five candidates were determined (Fig. 1). These spots were picked from the gel and, after trypsin digestions, MALDI-TOF-MS analysis was performed. Figure 2 shows the PMF of each spot, with a PMF of β -actin as a positive control. These data were further analyzed, being sent to the Mascot search server, and it was suggested that *spot a* was CLIC1, *spot b* was Rho-GDI-2, *spot c* was glutathione *S*-transferase-pi (GST-pi), and *spots d* and *e* were SRp20 (Fig. 2 and Table 1). The Mascot score of each search result was 175 (*spot a*), 80 (*spot b*), 98 (*spot c*), 100 (*spot d*), and 64 (*spot e*), indicating that the protein identifications by PMF were highly reliable (the data are summarized in Table 1). The results of the statistical analysis for the expression amounts of these spots are summarized in Table 2. Among these spots, Rho-GDI-2 (*spot b*) and GST-pi (*spot c*) have already been identified as downstream effectors of insulin. Rho-GDI-2 is reportedly released from the intracellular membrane fractions to the cytoplasm by insulin (19), and the expression of GST-pi markedly increases after insulin stimulation (6). Thus we focused our research on the evaluation of *spot a* and *spots d* and *e*.

To confirm the Mascot search results, we performed 2-DE western blotting by transferring SYPRO Ruby-stained 2-DE protein spots to PVDF membrane. As shown in Fig. 3A, most of the proteins were properly transferred to the membrane with a SYPRO Ruby pattern similar to that of the original gel. As shown in Fig. 3B, *spot a* was indeed recognized by anti-CLIC1

Table 1. Protein identification by mass spectrometry analysis

Spot	GenBank Acc. No.	Protein Name	Mr		pI		Mascot Score	Peptides		Sequence Coverage, %
			Theo, Da	Obs, kDa	Theo	Obs		Match	Total	
<i>a</i>	O00299	CLIC1	2,7248	29.0	5.09	5.16	175	10	11	47
<i>b</i>	P52566	Rho-GDI-2	2,3031	23.6	5.10	5.08	80	6	9	24
<i>c</i>	P09211	GST-pi	2,3438	22.9	5.44	5.67	98	6	8	48
<i>d</i>	P23152	SRp20	1,9546	21.2	11.64	6.13	100	9	11	43
<i>e</i>	P23152	SRp20	1,9546	20.5	11.64	6.38	100	9	11	43

Values of theoretical isoelectric points (pI) and molecular weights/masses (Mr) were obtained from Mascot search results. Theo, theoretical; Obs, observed; CLIC1, intracellular chloride ion channel; Rho-GDI-2, Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor 2; GST-pi, glutathione-S-transferase-pi; SRp20, a splicing factor. Calculations of experimental isoelectric point (pI) and molecular weight (Mr) were based on migration of the protein spot on 2-D gels using PDQuest.

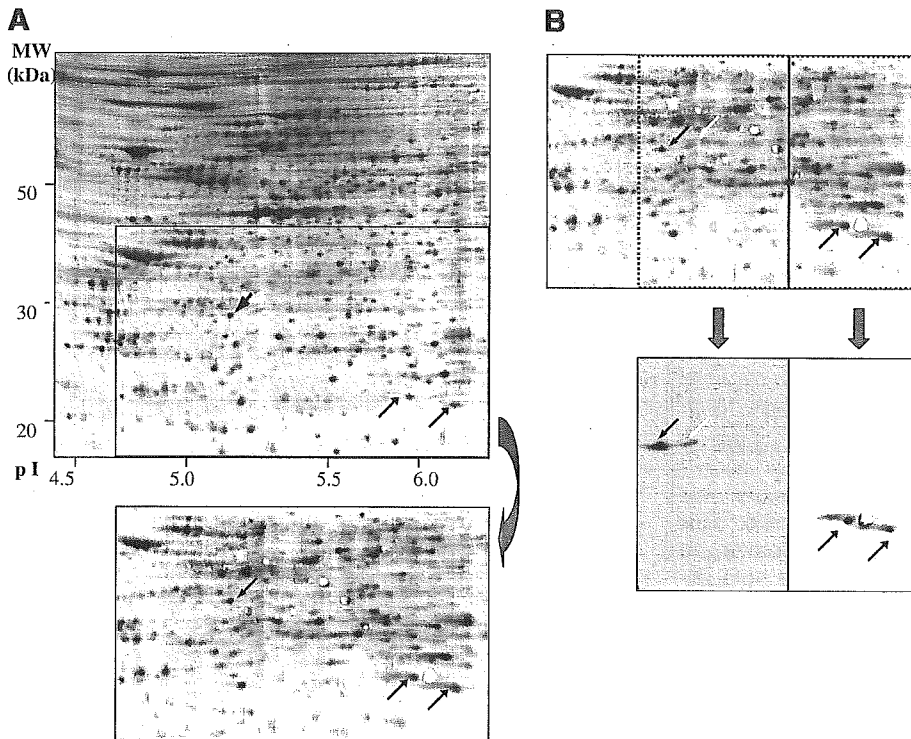
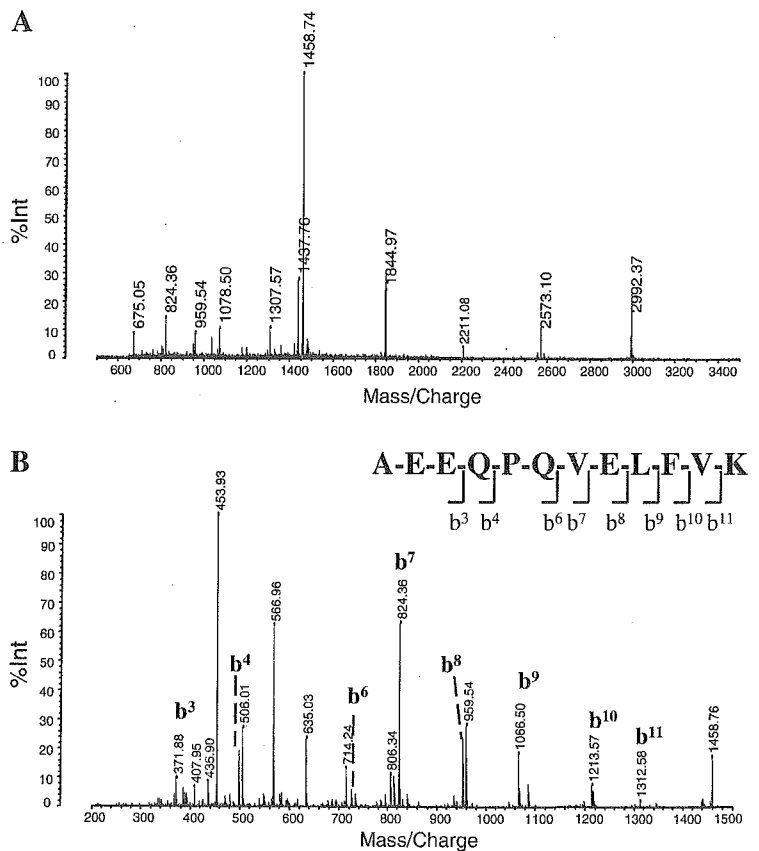


Fig. 3. 2-DE Western blotting. A: SYPRO Ruby-stained 2-DE gel, in which the lysate of buffer solution-treated cells were applied as in Fig. 1, left, was trimmed (top) and transferred onto a PVDF membrane (bottom). Transferred proteins were visualized by fluorescence image scanner. B: PVDF membrane was cut as indicated and blotted by anti-CLIC1 antiserum (bottom left) or anti-SRp20 antiserum (bottom right). Spots for CLIC1 and SRp20 are indicated with black arrows. Note that there is an extra spot on the anti-CLIC1-blotted membrane (indicated with white arrow).

Fig. 4. Amino acid sequencing of NH₂-terminal peptide fragment of CLIC1. Parent ion at *m/z* 1,458.74 in Fig. 2B in insulin-treated cells was subjected to subsequent analysis using MS/MS mode of MALDI-TOF-MS (AXIMA-QIT). The mass data of b-series of the product ions were analyzed by the PepSeq program in ProteinLynx software. NH₂-terminal acetylated peptides of *N*-acetyl-AEE (*m/z* 372.14, b³ ion), *N*-acetyl-AEEQ (*m/z* 500.20, b⁴ ion), *N*-acetyl-AEEQPQ (*m/z* 725.30, b⁶ ion), *N*-acetyl-AEEQPQV (*m/z* 824.38, b⁷ ion), *N*-acetyl-AEEQPQVE (*m/z* 953.42, b⁸ ion), *N*-acetyl-AEEQPQVEL (*m/z* 1,066.50, b⁹ ion), *N*-acetyl-AEEQPQVELF (*m/z* 1,213.57, b¹⁰ ion), and *N*-acetyl-AEEQPQVELFV (*m/z* 1,312.64, b¹¹ ion) were detected. Peptide mass fingerprinting (PMF; A) and MS/MS data of b-series (B) are shown. Similar analysis concerning control cells also demonstrated NH₂-terminal acetylation of CLIC1 (data not shown).



antibody and spots *d* and *e* were recognized by anti-SRp20 antibody. We also studied the possible modifications on these two proteins. As shown in Fig. 1A, the observed isoelectric point (pI) of CLIC1 was 5.16, which is similar to the Mascot information (the calculated pI was 5.09). Interestingly, there was an extra small spot with a higher pI value (Fig. 3B, white arrow). Indeed, we detected a doublet band in one-dimensional Western blotting, where the lysate prepared for 2-DE was mixed with an isovolume of 2× Laemmli's sample buffer and subjected to SDS-PAGE (data not shown and see Fig. 6B). Thus CLIC1 is expressed in at least two forms with different pI values in human hematopoietic cells, although the molecular basis for this difference was not elucidated. The MS digest analysis of spot *a* in the 2-DE profiles of both the insulin-treated and control cells demonstrated that the peptide fragment at mass-to-charge ratio (*m/z*) 1,458.74 in PMF of spot *a* represented the NH₂ terminus acetylated fragment acetyl-AEEQPQVELFVK, indicating that the first methionine was eliminated and the second alanine was N-acetylated. This finding was indeed confirmed by the amino acid sequencing at the *m/z* 1,458.74 fragment by the MS/MS mode of MALDI-TOF-MS, as shown in Fig. 4.

As for SRp20, the observed pI values of spots *d* and *e* were 6.13 and 6.38, respectively (Fig. 1 and Table 1), in contrast to the Mascot software information (the calculated pI was 11.64).

This discrepancy may come from the modifications of SRp20. The MS digest analysis indicated that the SRp20 was phosphorylated at two sites, including Ser¹¹⁵ and Ser¹⁰⁸, from the existence of the peptide fragment ions of *m/z* 751.31 and *m/z* 945.43 (Fig. 5A). Mass value of *m/z* 751.31 is speculated amino acid sequences as RRSPr₍₁₁₃₋₁₁₇₎, RSPRR₍₁₁₄₋₁₁₈₎, or SPRRR₍₁₁₅₋₁₁₉₎ (Fig. 5E). As concerns *m/z* 945.43, MS digest suggests the amino acid sequence as RRSPPPR₍₁₀₆₋₁₁₂₎, RSPPPRR₍₁₀₇₋₁₁₃₎, or SPPPPRR₍₁₀₈₋₁₁₄₎. Phosphorylated peptide was confirmed by MALDI-TOF-MS in a seamless PSD mode (AXIMA-CFR) that detected the neutral loss of phosphate group. As shown in Fig. 5, B and C, phosphorylation-dependent neutral loss (-80 Da) and dehydration (-18 Da) were detected in the fragments at *m/z* 751.31 and *m/z* 945.43. Conversely, the MALDI-TOF-MS PSD spectrum of the control peptide ion gated at *m/z* 1,043.57 showed no significant neutral loss (Fig. 5D). Next, the amino acid sequences of *m/z* 751.31, *m/z* 945.43, and *m/z* 1,043.57 were examined by the same method as described above by using AXIMA-CFRplus. The amino acid sequences of *m/z* 751.31 could not be determined because the fragment ion was low intensity (data not shown). However, it is presumable that the Ser¹¹⁵ is phosphorylated. From the mass spectra of gated ion at *m/z* 945.43, the amino acid sequence was determined as RRSPPPR₍₁₀₆₋₁₁₂₎, and the position of phosphorylation was Ser¹⁰⁸ (Fig. 6A). As a

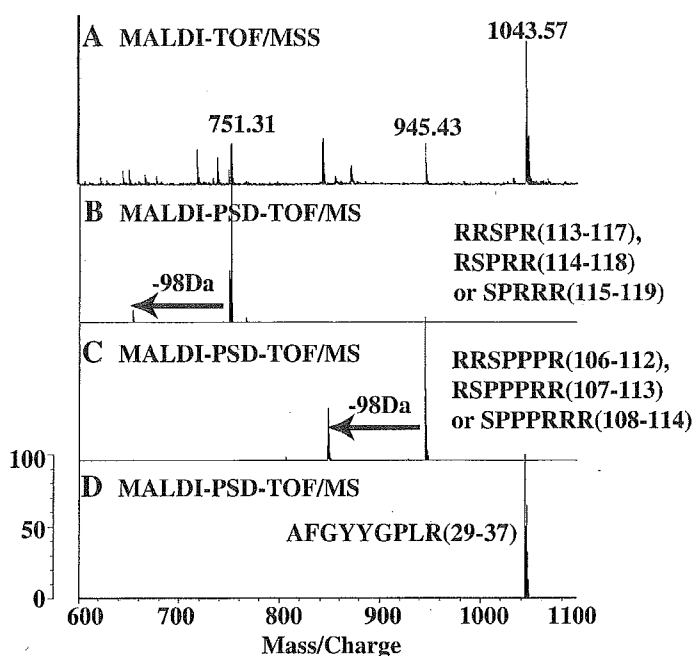
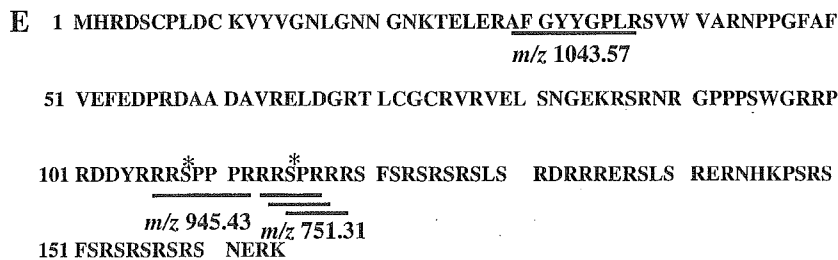


Fig. 5. Confirmation of SRp20 phosphorylation at specific serine residues. A: gated ions at *m/z* 751.31, 945.43, and 1,043.57 in Fig. 2E were subjected to analysis of neutral loss by MALDI-TOF-MS (AXIMA-CFR) in post-source decay (PSD) mode. The 98-Da loss of mass values was detected in gated ion at *m/z* 751.31 (B) and *m/z* 945.43 (C), but not in gated ion at *m/z* 1,043.57 (D) as a negative control. E: primary sequence of SRp20. *Phosphorylated amino acid.



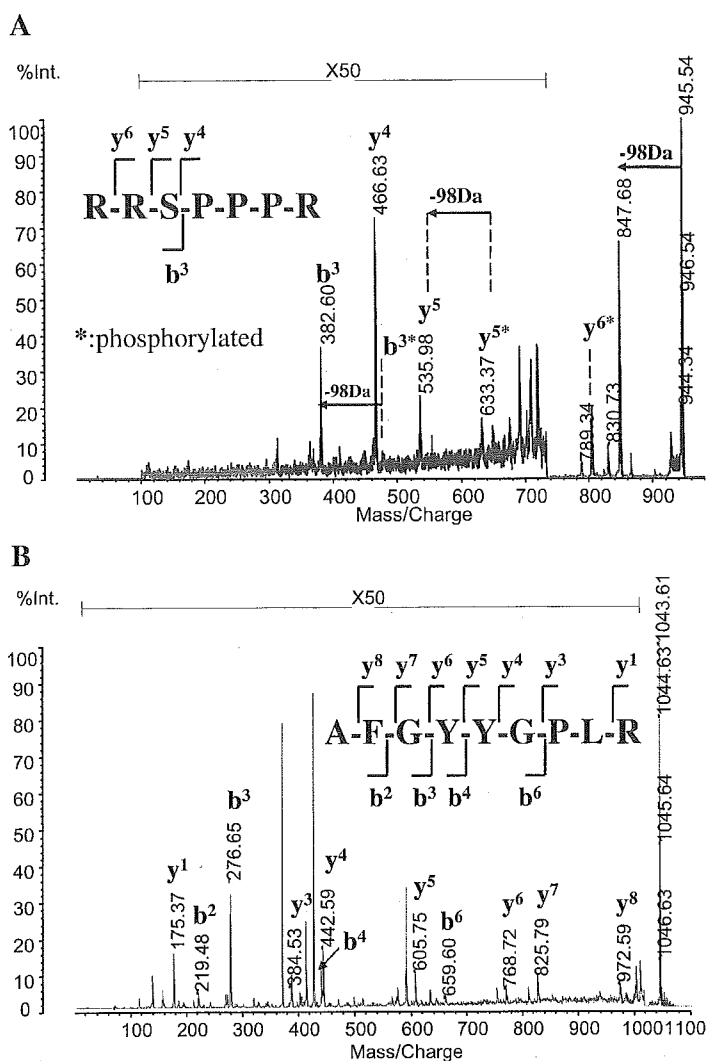


Fig. 6. Sequence analysis of gated ions at m/z 945.43 and 1,043.57 by MALDI-TOF-MS in PSD mode. A: gated ion at m/z 945.29 in Fig. 5C was subjected to subsequent analysis using PSD mode of MALDI-TOF-MS (AXIMA-CFRplus) B: three neutral loss ions (-98 Da) of m/z 480, 633, and 945 were detected. Gated ion at m/z 1,043.57 in Fig. 5D was subjected to the same analysis. Neutral loss ion (-98 Da) was not detected.

negative control, m/z 1,043.57 was subjected to analysis using PSD mode of AXIMA-CFRplus (Fig. 6B). The amino acid sequence was decided as AFGYYGPLR₍₂₉₋₃₇₎, which was not phosphorylated. These results indicated that Ser¹¹⁵ and Ser¹⁰⁸ were phosphorylated in human hematopoietic cells (Fig. 5E). Thus the two phosphorylations of SRp20 may be responsible for the acidic shift of SRp20 in 2-DE.

Thus the 2-DE-based differential protein expression analysis identified CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin in human myeloblastic HL-60 cells.

1-DE study of CLIC1 and SRp20 expressions after insulin stimulations. It is known that there are occasionally discrepancies between the results of 2-DE and 1-DE. The difference in the protein solubilization capacities between the two systems is thought to be one of the reasons. During cell lysate preparation in 2-DE, highly hydrophobic proteins are prone to make precipitations and thus be eliminated from the lysates after centrifugation. Thus the protein expression changes in 2-DE-based proteome analysis not only means that the net protein expression changes but also the changes in protein solubilization. So we studied the expressions of CLIC1 and SRp20 after insulin stimulation by 1-DE Western blotting.

In contrast to the results of 2-DE, there was no significant difference in CLIC1 expression between insulin-treated and nontreated samples in 1-DE (Fig. 7A). Moreover, CLIC1 was not detected as a single band, unlike the 2-DE results, where CLIC1 was detected as two spots. Interestingly, CLIC1 was detected as a doublet band, and the expression amounts of CLIC1 were indeed upregulated by insulin stimulation when the 2-DE lysates were treated by an isovolume of 2× Laemmli's buffer and subjected to 1-DE (Fig. 7B, lane 2). These findings strongly suggest that insulin treatment induced certain qualitative changes of CLIC1. Compared with 1-DE, the protein recovery rate in 2-DE was generally low: one-fourth the recovery as for CLIC1 (Fig. 7B, compare lanes 1 and 3) and one-eighth the recovery as for β -tubulin (Fig. 7B, compare lanes 1 and 3). However, the expression amounts of β -tubulin (Fig. 7B, compare lanes 1 and 2) and α -tubulin (data not shown) were not significantly changed by insulin treatment even in 2-DE lysates. By contrast, around a twofold increment in CLIC1 was reproducibly observed after insulin stimulation (Fig. 7, B and C, and data not shown). We then examined the possibility that the insulin-mediated increments in CLIC1 in 2-DE lysate were associated with the changes in its subcellular