

厚生労働科学研究費補助金

疾患関連たんぱく質解析研究事業

疾患関連たんぱく質解析研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山西弘一

平成18(2006)年4月

目次

I.	総括研究報告	
	疾患関連たんぱく質解析研究	1
	山西弘一	
II.	分担研究報告	
1.	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	68
	友池仁暢	
2.	疾患関連たんぱく質解析研究の一環としてのエネルギー代謝調節に 関与する生理活性ペプチドの探索	72
	寒川賢治	
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	75
	南野直人	
4.	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	80
	高坂新一	
5.	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	84
	鎌木康志	
6.	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	89
	秦 順一	
7.	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	91
	太田壽城	
8.	疾患関連たんぱく質解析に関する研究	95
	佐古田三郎	
9.	疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立	96
	高尾敏文	
10.	癌組織のN型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析技術の確立	101
	今岡真義	
11.	同位体標識法(cICAT)による各種疾患患者試料(血清・組織) のたんぱく質発現解析研究	104
	金子 勲	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	145
IV.	研究成果の刊行物・別冊	

疾患関連たんぱく質解析研究

主任研究者 山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所 所長

研究要旨

本研究は、我が国における五大疾患などについて、健常人と患者との間の発現たんぱく質の変動を評価することにより、疾患の発症や悪化、治癒に関わるたんぱく質（疾患関連たんぱく質）を医薬品シーズ・創薬ターゲット・疾患マーカーとして有効活用するための基盤技術を開発しようとするものである。本年度は、国立医療機関などから提供された各種ヒト疾患サンプルのプロテオームを、質量分析法などの手法を駆使し、大規模かつ高速解析するための基礎的検討を推進するとともに、見出された疾患関連たんぱく質の有効活用技術の開発に関する検討を行い、以下の知見・情報を得た。

- ① 自己免疫性疾患と糖たんぱく質糖鎖の関係解明における、独自に開発した糖鎖ディファレンシャル解析法の応用可能性を評価することを目的として、SLEモデルマウス *lpr/lpr* 及び正常マウス *+/+* 腎臓由来 N 結合型糖鎖の差異解析を行った。その結果、 α -glucosidase II の発現量が減少していることが確認され、 α -glucosidase II の発現低下と、糖鎖ディファレンシャル解析によって明らかになった M9+Glc と分解糖鎖の増加、及び膜糖鎖の減少は、*lpr/lpr* マウスの腎臓病変において、小胞体ストレスの原因となる糖鎖生合成異常が生じている可能性が示唆された。また、疾患関連たんぱく質に対する抗体やドラッグキャリアを作製するために、独自のファージ表面提示法を用いて、迅速かつ高速に抗体やペプチド性キャリアを発現したファージライブラリを作製した。その結果、極微量の抗原を認識する一本鎖抗体を短時間でスクリーニング出来ることが明らかとなったとともに、既存のキャリアペプチドよりも効率よく細胞内へ薬物を導入しうるキャリアの作製に成功した。（山西）
- ② 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解析し新たな医薬品開発シーズとするため、国立循環器病センターで試料、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を広く立案するとともに、各研究課題について第一段階の試料収集を行い、順次プロテオームファクトリー施設へ送付した。また血清以外の試料についてもプロテオーム解析を行うべく、対象、試料の採取、分別、保管法などについて検討を行った。（友池）
- ③ 脂肪細胞の有用な培養細胞系であるマウス胎仔由来線維芽細胞（3T3-L1 細胞）を用いて細胞内 Ca イオン濃度変化を指標としたスクリーニングを行い、ブタ脳組織よりニューロペプチド Y (NPY) を、またラット小腸組織よりペプチド YY (PYY) を単離・同定するとともに、3T3-L1 細胞が NPY や PYY の受容体である Y 受容体を発現していることを明らかにし、これらのペプチドが脂肪細胞の増殖・分化や代謝などの制御に重要な役割を担っている可能性を示した。（寒川）
- ④ 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を中心に検討を

行い、2次元高速液体クロマトを用いた分離と質量分析計による検出で有効な情報が得られることを確認するとともに、脳内ペプチド、たんぱく質のトリプシン消化物などに適用し方法の改善を行うことで、血液中のペプチドについても、解析できる方法論の開発を行った。(南野)

- ⑤ 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行い、パーキンソン病における第一次解析結果を得るとともに、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。(高坂)
- ⑥ 国立国際医療センターの内分泌代謝科の協力により、糖尿病患者血清サンプルを基礎検討用及び本解析用に50例以上収集し、創薬プロテオームファクトリー施設に発送するとともに、初期糖尿病性腎症のある糖尿病患者尿サンプル及び腎症のない糖尿病患者尿サンプルを各10例以上収集し、2DE, LC-MS にて解析する系を確立した。また、本施設にてヒト肝細胞由来細胞株 HepG2 分泌たんぱく質解析を通して確立した系を用いて、ヒト脂肪細胞および単球から分化させたマクロファージ由来の分泌蛋白の予備的解析を行った。(鍋木)
- ⑦ 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創薬プロテオームファクトリーに試料を提供するとともに、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。(秦)
- ⑧ 加齢関連疾患のうち痴呆(認知症)、骨粗鬆症患者の血清検体および褥瘡皮膚をプロテオームファクトリーへ提供し、プロテオミクス解析を開始するとともに、尿中たんぱく質・ペプチドの網羅的プロテオーム解析するための、尿中たんぱく質の濃縮・精製法を確立した。さらに骨粗鬆症治療薬として用いられるミノドロネートの骨形成担当細胞におけるたんぱく質リン酸化に対する作用について検討し、骨吸収因子である p44/p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK)のリン酸化の役割とプロテインキナーゼCと Raf-1 の関係性を明らかにした。(太田)
- ⑨ プロテオーム解析に先立つ倫理的問題を含めた課題をほぼ解決し、乳癌、消化器癌の残余組織、リンパ腫の生検組織、閉塞性肺疾患や運動ニューロン病の血清をプロテオーム解析する準備を整えた。(佐古田)
- ⑩ タンデム質量分析とデータベース検索によるペプチド・たんぱく質の同定の確度を向上させるための方法を考案し、それを用いて健常人、及び、種々の疾患患者から提供された尿のペプチドプロファイルを取得し、個人毎のデータベースを構築した後に、データ間の比較解析法を検討した。(高尾)
- ⑪ 糖鎖のなかでも、癌との関わりが示唆される N 型糖鎖と酸性糖脂質の構造解析を行うための技術の確立を目指し、レーザーマイクロダイセクション法や、HPLCによる2次元糖鎖マッピング法、質量分析法を組み合わせ、糖鎖構造を解析する方法を開発した。(今岡)
- ⑫ 健常日本成人血清と外国人購入血清の血清たんぱく質を、cleavable ICAT(cICAT)法により比較・検討した結果ほぼ同等であったので、外国人購入血清をヒト標準血清として用いることとした。
本標準血清を用いて、平成 16 年度に策定した疾患関連血清たんぱく質解析フロー(cICAT 法)に基づき、各研究協力機関から提供されたヒト血清試料(糖尿病、がん、認知症、腎疾患及び免疫・アレルギー疾患等)の同定・比較解析研究を実施した。そのうち、腎疾患ネフローゼ患者とパーキンソン病患者血清の解析結果を関係研究協力機関に開示し、病態・治療に伴う変化の解析および追加研究等の対応について検討した。また、cICAT 法によるヒト組織(細胞)たんぱく質解析ワークフロー法を構築するため、その基礎実験

として、ヒト胃がん細胞株等を用いて細胞可溶化法、cICAT 標識ペプチド分画条件等を検討し、細胞株間同士の発現たんぱく質の同定・比較定量解析を行った。さらに、低発現血清たんぱく質に関しては、SELDI 法、たんぱく質分画法を取り入れる前処理法を検討した。

上記の得られたデータは、独自スコアリング機能を導入した統合データ解析システム(HiSpec)により解析し、たんぱく質同定の効率化とたんぱく質同定・比較定量結果の高信頼化を図った。また、今後の同定・定量結果の網羅性向上のため、ペプチドマップ技術に関する基礎的検討を行い、解析法を特許出願した。(金子)。

主任研究者

山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所
所長

研究分担者

友池仁暢 国立循環器病センター研究所
病院長

寒川賢治 国立循環器病センター研究所
副所長

南野直人 国立循環器病センター研究所
薬理部長

高坂新一 国立精神・神経センター神経研究所
所長

鎗木康志 国立国際医療センター
研究所代謝疾患研究部病態代謝研究
室長

秦 順一 国立成育医療センター
総長

太田壽城 国立長寿医療センター
病院長

佐古田三郎 大阪大学大学院医学系研究科
教授

高尾敏文 大阪大学蛋白質研究所
教授

今岡真義 大阪府立成人病センター
総長

金子 勲 ヒューマンサイエンス振興財団
創薬プロテオームファクトリー
生体試料分析部門長

A. 研究目的

国際的な新薬開発競争に際して、シーズとなる疾患関連たんぱく質の発見、知的財産権の確保は、今後の我が国の医薬品産業の発展に不可欠である。そのためには、現在、実施されている実験動物を用いた「mRNA発現解析アプローチ」やたんぱく質全般の基本構造や機能を解析する「たんぱく質からのアプローチ」の取組みに加え、患者と健常者の間のたんぱく質の種類・質・発現量の違いを解明し、医薬

品開発のシーズとなる疾患関連たんぱく質の発見を可能にする「疾患からのアプローチ」が極めて重要である。その背景としては、1) 現在、有効な治療法が確立していない疾患の発症メカニズムを詳細に解析するためには、臨床・病情報と連結した患者試料を組織的・系統的に解析することが不可欠であると強く認識されてきたこと、2) 3万の遺伝子の表現形である数10万種以上の膨大なたんぱく質の解析が、高性能質量分析機器の開発および「同位体標識法(ICAT)」、「プロテインチップ法」、「ショットガン法」等の網羅性の高い新規解析法の開発等により現実的に可能になりつつあることが挙げられる。

実際、スイス、ドイツ、米国等欧米諸国では、「疾患からのアプローチ」を国家的規模のプロジェクトとして、大量の予算を投入し始めた状況である。このように研究が国際的に激化している状況に鑑み、我が国としても、国民に有効で安全な新規医薬品を速やかに提供し、医療に貢献するという観点から、高血圧、糖尿病、がん、痴呆、自己免疫アレルギー性疾患等を対象として、新薬開発に必要な疾患関連たんぱく質の同定とその機能解析、データベース化を行う基盤研究を、産学官連携により推し進め、国際競争力のある画期的な新薬の開発を支援し、日本における製薬企業等の振興・発展を図ることが必要である。

本研究では、我が国の主要な疾患に関してその発症・治療に関わるたんぱく質を解析することにより、重要な新規創薬ターゲットを発見し、画期的な医薬品の研究開発に繋がるシーズを多数提供することを目的とする。それにより、遺伝子解析では欧米に出遅れたものの、たんぱく質解析研究の観点から我が国の創薬研究に係る基盤的な技術レベルが向上し、日本の医薬品産業の国際的競争力が強化され、日本国内はもとより世界の患者に質の高い医薬品を提供することが可能となる。さらに、それに派生する効果として、ナノHPLC、高性能質量分析機器類を用いる大量かつ高効率(ハイスループット)のたんぱく質解析技術およびそれに対応する情報処理解析技

術(バイオインフォマティクス)等の最先端分野の科学技術・産業分野における我が国の水準の向上に資することが期待される。

本観点から今年度は、国立医療機関などから提供される各種ヒト疾患サンプルのプロテオームを、質量分析法によって大規模かつ高速解析するとともに、疾患関連たんぱく質・ペプチド・糖の機能解析に関する検討を行った。

B. 研究方法

B-1-1: 糖鎖ディファレンシャル解析による疾患関連糖鎖・糖たんぱく質の解析

1) マウス腎臓膜画分及び可溶性画分の調製

全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウス及びコントロールマウスとして、MRL/MpJ- lpr/lpr (lpr/lpr) 及び MRL/Mp-+/+ (+/+)を用いた。腎臓は日本エスエルシー株式会社より購入した。lpr/lpr 及び +/+の腎臓(n=3)から難溶性結合組織を Cell strainer (70mm, BD Biosciences) によって除去した後、組織細胞中に混在する赤血球を NH₄Cl-Tris 溶液処理により除去した。膜及び可溶性画分は 2D Fractionation kit (Amersham Biosciences, USA) を用いて調製した。

2) 糖鎖の切り出し、及びピリジルアミノ(PA)化

200 µg のたんぱく質を還元カルボキシメチル化した後、PNGaseF (10 unit/50mM リン酸緩衝液 500 µl, pH 7.2) 処理により、N 結合型糖鎖を切り出した。70% エタノール沈殿によりたんぱく質を除去した後、得られた上清を濃縮、乾燥させて糖鎖を回収した。PALSTATION (タカラバイオテック) を用いて、lpr/lpr 及び +/+由来糖鎖を重水素未置換アミノピリジン(d0-AP)及び 6 重水素置換アミノピリジン(d6-AP)でそれぞれ標識した後、Envi-Carb (Supelco, USA)を用いて過剰の試薬を除去した。

3) 糖鎖ディファレンシャル解析

以下のシステム及び分析条件を用いた。

LC: 装置, MAGIC 2002 システム (Michrom BioResource); カラム, Hypercarb (ThermoElectron, 0.2 × 150 mm, 5 µ); 溶離液 A, 2%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6); 溶離液 B, 80%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6); グラジエントプログラム, 5-45% B液(0-60分); 流速, 約 2 µl/分。

ESI-MS: 装置, LTQ linear ion trap mass spectrometer/Fourier transform ion cyclotron resonance (Thermo Electron); イオンモード, ポジティブ; キャピラリー温度, 200 °C; ESI 電圧, 2.0 kV; スキャン範囲, m/z 700-2,000; MSⁿ 測定 (n=2~4), Isolation width, 3.0 u; Collision Gas, N₂; Collision

energy, 30%; MSⁿ, データ依存的。

4) 倫理面への配慮

本研究では、市販の動物組織を使用した。

B-1-2: 疾患関連たんぱく質の機能解析基盤と有効活用技術の確立

I) 疾患関連たんぱく質に対する抗体の作製に向けた抗体ライブラリー作製法の開発

I-1) 骨髄および脾細胞 cDNA の調製

抗体遺伝子のソースとして、3 種類のマウス (C57BL/6, Balb/c, C3H, 雄, 6 週齢) から骨髄細胞と脾細胞を回収し、cDNA を調製した。50~100 mg の組織に対して 1 ml の TRIzol reagent (Invitrogen) を加え、ホモジナイズした。室温で 5 分間インキュベーション後、TRIzol reagent 1 ml に対して 200 µl の chloroform を加え、15 秒間振盪撹拌した。室温で 3 分間インキュベーション後、12,000 × g, 4°C で 15 分間遠心した。上清を新しい tube に移し、上清と等量の isopropyl alcohol と 1/10 量の 3 M sodium acetate を加えた。室温で 10 分間インキュベーションし、12,000 × g, 4°C で 15 分間遠心した。上清を除き、適当量の 70% ethanol で wash し、7,500 × g, 4 °C で 5 分間遠心した。上清を除き、pellet を DEPEC 処理水で溶解し、total RNA とした。この total RNA 5 µg あたり、50 µM oligo(dT)₂₀ (Invitrogen) 1 µl、10mM dNTP mix 1 µl を混合し、DEPEC 処理水を加えて 10 µl とし、65 °C で 5 分間インキュベーションした。10 × RT buffer 2 µl、25 mM MgCl₂ 4 µl、0.1 M DTT 2 µl、RNaseOUT™ (Invitrogen) 1 µl、SuperScript™ III RT (Invitrogen) 1 µl を加えて、50°C で 50 分間、85°C で 5 分間反応させた。RNase H (Invitrogen) 1 µl を加え、37 °C で 20 分間反応させ、cDNA を得た。

I-2) scFv (single chain Fv fragment) 遺伝子の作製

以下のように immunoglobulin V_H および V_L 遺伝子ライブラリーを調製した。上記方法で得られた cDNA を テンプレートとし、アニーリング温度を 50 °C で 1 分間、伸長反応を 68 °C で 1 分間に設定し、抗体遺伝子増幅用の primer sets (2 pmol) と KOD-plus-DNA Polymerase (TOYOBO) を用いて PCR を 35 サイクル行った。この PCR 産物を PCR purification kit (QIAGEN) で精製し、VL 断片と VH 断片とした。VL 断片と VH 断片を テンプレートとして、アニーリング温度 63°C で 1 分間、伸長反応を 68°C で 1 分間に設定し、KOD-plus-DNA Polymerase を用いて assembly PCR を 19 サイクル行った。この assembly PCR 産物とプライマー; (5' -GCC AAG CTT TGG AGC CTT TTT TTT GGA GAT TTT CAA CGT GAA AAA ATT ATT ATT CGC AAT TCC TTT AGT TGT TCC TTT CTA TGC GGC CCA GCC GGC CAT GG CC-3'), 及びプライマー; (5' -TTA GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GGT TTT GCT

AAA CAA CTT TCA ACA GTC TAT GCG GCA CGC
GGT TCC ACG GAT CCG GAT ACG GCA CCG GCG
CAC CTG CGG CCG C-3')を用い、アニーリング
65 °C×1min、伸長68 °C × 1minに設定し、
KOD-plus-DNA Polymeraseを用いて35サイクルの
PCRを行った。このPCR産物をPCR purification kitで
精製し、scFv遺伝子ライブラリーを得た。

I-3) 非免疫 scFv 抗体ライブラリーのファージミドへの組み込み

scFv 遺伝子を制限酵素 NcoI 及び NotI で処理し、一方、ファージミドベクター pCANTAB5E (Amersham)をあらかじめ Nco I 及び Not I で処理し、T4 ligase (Roche Diagnostics)により、16 °C、16時間ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物はPCR purification kitで精製した。あらかじめ大腸菌 TG1 (Stratagene)を 2YT 培地で OD=0.4~0.6 まで培養し、MilliQ で3回洗浄操作を行い、10% Glycerol で懸濁後、-80 °Cにて保存した(competent cell)。解凍後、氷冷した TG1 competent cell 50 µl に対して、scFv DNA 溶液 1 µl を添加し、エレクトロポレーション装置 (GenePulser Xcell, Bio-Rad)を用い、1.8 kV、0.25 µF、200 Ωの条件にて遺伝子導入した。その後、2% Glucose 含有 2YT 培地を添加し、37 °C、1時間培養した後、その一部をとって 50 µg/ml Ampicillin、2% Glucose 含有 2YT 培地で希釈し、PetriFilm (3M Microbiology)に播種し、一晩37 °Cにて培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリーサイズを算出した。

I-4) scFv 遺伝子の DNA シークエンス解析

上記の scFv 遺伝子により形質転換されたコロニーから任意に選択したクローンのプラスミドを QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて回収し、プライマー; (5' -CAA CGT GAA AAA ATT ATT ATT CGC-3')とプライマー; (5' -GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG-3') 及び BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems)を用いてサイクルシークエンス反応を行った。シークエンス解析は ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により行った。

I-5) scFv 提示ファージの作製

作製した scFv 遺伝子ライブラリーを組み込んだファージミドベクターを大腸菌 TG1 株にエレクトロポレーションし、その適量を 50 µg/ml Ampicillin、2% Glucose 含有 LB プレートに播種し、37°Cで一晩培養した。50 µg/ml Ampicillin、2% Glucose 含有 2YT 培地を加えてコロニーを全て回収し、250 rpm、37 °Cで OD600 = 0.3~0.6 まで培養した。ヘルパーファージ(M13KO7、Invitrogen)を添加し、110 rpm、37 °Cで30分間、250 rpm、37 °Cで30分間培養した。2,000 rpmで10分間遠心後、ペレットに対して 100 µg/ml Ampicillin、50 µg/ml Kanamycin 含有 2YT 培地を添加して6時間培

養することで scFv 提示ファージを産生させた。4 °C、2,000 rpmで10分間、さらに10,000 rpmで15分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% ポリエチレングリコール(PEG)-6000、2.5 M NaClを1/5容加え、激しく混和して氷上で1時間静置した。15,000 rpmで10分間遠心して得られたペレットを NTE buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA)に懸濁し、0.45 µmの Millex-HV フィルター(MILLIPORE)を用いてろ過滅菌し、scFv 提示ファージを回収した。

I-6) BIAcore を用いたパンニング

scFv 提示ファージのアフィニティパンニングは、Biacore3000 (BIACORE)を用いて行った。NHS 活性化センサーチップ CM3 (BIACORE)上に 10 µg/ml の抗原たんぱく質溶液を 100 µl アプライし、固相化プロトコールに従って固相化した。抗原として human KDR Fc chimera (R&D systems)を用いた。scFvファージ抗体ライブラリーを input ファージとして KDR 固相化センサーチップ上に Inject し、HBS-EPT buffer (HBS-EP (BIACORE)、0.05% Tween20)で10回の Rinse を行った。Glycine-HCl (pH 2.0)、続いて Glycine-NaOH (pH 11.0)を流すことによって抗原に結合したファージを溶出回収し、1 M Tris-HCl (pH 8.0)を 4 µl 加えて中和し、output ファージとした。Output ファージに 2% Glucose 含有 2YT 培地を 250 µl 加え、そのうち一部を用いてファージタイターを測定した。残りは大腸菌 TG1 株に感染させ、上記ファージ作製法に従ってファージを産生させた。これと同様の操作(パンニング)を繰り返したものをそれぞれ 2nd、3rd、4th、5th パンニングとした。また、疾患関連たんぱく質のモデルとしてさらに、Bid (Alexis Biochemicals)、Luciferase (Promega)を固相化してパンニングを行った。

I-7) ファージ ELISA

パンニング後の outputファージを TG1 に感染させ、生じたコロニーを、100 µg/ml Ampicillin、2% Glucose 含有 2YT 培地を満した 96 穴プレートに pick up した。各ウェルが OD600 = 0.3~0.6 に達するまで培養した後、100 µg/ml Ampicillin、2% Glucose 含有 2YT 培地で10倍希釈した M13KO7ヘルパーファージ溶液を 20µl/well で添加した。1時間 37 °Cで静置培養した後、2,000 rpmで10分間遠心し、上清を除去した。続いて 100 µg/ml Ampicillin、50 µg/ml Kanamycin 含有 2YT 培地を 200 µl 加えて 37 °Cで一晩培養することでファージを産生させ、2,000 rpmで10分間遠心し、上清をファージサンプルとした回収した。次に、anti-human IgG-Fc を 10 µg/ml となるように 50mM 炭酸バッファー pH 9.6 (B-buffer)で希釈し、96 穴イムノプレートに 100 µl/well 添加して 8 時間静置し固相化を行った。固相化プレートを PBS で1回 wash し、0.4% Block Ace(大日本製薬株式会社)で 0.5 µg/ml となるよう希釈した human KDR Fc chimera を 100 µl/well

添加し、4 °Cで一晩静置した。その後、抗体溶液を除去し、4% Block Ace を 200 μ l/well 添加してブロッキングを行った。続いて PBS で 1 回洗浄後、ファージサンプル 80 μ l 及び 4% Block Ace 20 μ l を各 well に添加し、振とうさせながら室温で 2 時間反応させた。PBST (PBS, 0.05% Tween20) で 3 回洗浄後、0.4% Block Ace で 3,000 倍希釈した HRP/anti-M13 monoclonal antibody (Amersham) を 100 μ l/well 添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。さらに PBST で 3 回洗浄後、基質溶液 (TMBE Peroxidase Substrate, Moss Inc) を加えて発色させ、2 N 硫酸を添加することで反応を停止させた。吸光度(測定波長 450 nm、対照波長 655 nm)はマイクロプレートリーダー (BioRad) で測定した。

II) 細胞外から細胞内へたんぱく質を導入するためのペプチド性キャリア開発

II-1) Tat ペプチドをベースにしたペプチドライブラリーの構築

Tat ペプチド (11mer; Tat47-57) のアルギニン以外のアミノ酸がランダムなアミノ酸に置換された「mutant Tat ペプチドライブラリー」を作製するため、PCR 法を用い、アルギニン以外のアミノ酸をコードする塩基コドン、全 20 種類のアミノ酸をコードするランダムな塩基配列 (NNS 配列; N=A/T/G/C、S=G/C) に置換した遺伝子ライブラリーを調整した。ライブラリー作製にはプライマー (5' -TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA TGA TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC-3') および (5' -TCA TCC TTG TAG TCT GCG GCC GCA CGA CGA CGS NNA CGA CGS NNS NNA CGS NNS NNG GCC ATG GCC GGC TGG GCC GCA TAG AAA G-3') を用い、pCANTABE ベースのプラスミドをテンプレートとしてアニーリング温度を 65 °C で 1 分、伸長反応を 68 °C で 1 分に設定し、KOD-plus-DNA Polymerase を用いて PCR を 35 サイクル行った。この PCR 産物を PCR purification kit で精製した。得られた PCR 産物を HindIII および NotI で処理し、あらかじめ HindIII および NotI で処理したファージミドベクター pY03' FLAG と T4 ligase を用いて 16°C、16 時間ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を Eco8II および Alkaline phosphatase で処理し、PCR purification kit で精製した。あらかじめ 2YT 培地 30 mL で OD600=0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10%グリセロール溶液で 200 μ l に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に対して、精製後の溶液 10 μ l を添加し、Gene purser II を用い、2.5 kV、0.25 μ F、200 Ω でエレクトロポレーションを行った。その後、2% グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 μ g/mL アンピシリン、2% グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローン

ディスクに播種し、一晩培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリーサイズを算出した。

II-2) シークエンス解析

得られたコロニーから任意に選択した各クローンのプラスミドを QIAprep[®] Miniprep kit を用いて回収し、ABI PRISM 310 により DNA シーケンスを解析した。

II-3) ファージの作製

I-5) で示した方法に基づいて、Tat ペプチドのアミノ酸置換体を表面提示したファージを調製した。

II-4) Cell panning

固相化抗原のかわりにモデル疾患皮膚細胞 (HaCaT 細胞) に対してパニングを行った。6 穴カルチャープレートに HaCaT 細胞を 5.0×10^5 cells/well で播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。PBS で 3 回洗浄した後、Opti-MEM (Invitrogen[™] life technologies) で希釈した 2% BSA を用いて 37°C で 2 時間ブロッキングした。精製したファージについても等量の 2% BSA を用いて 4°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキングが終了したファージを HaCaT 細胞に加え、15 分ごとに振とうしながら 37°C で 2 時間培養した。この細胞を PBS で 20 回洗浄した後、50 mM HCl 1 mL を加えて 4 °C で 10 分間培養した。このファージ溶出液を回収し、1 M Tris-HCl pH 8.0 500 μ l を添加し、その 50 μ l を用いて下記の方法に従いタイターを測定した。残りのファージ溶液は 2% グルコース含有 2YT 培地を 4.5 mL 加えて再度 TG1 に感染させ、増幅させて上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、再度同様のパニング操作を行ったものを 2nd、3rd パニングとした。

II-5) タイターの測定

2% グルコース含有 2YT 培地で OD600 = 0.3 まで培養した TG1 に対して、10 倍希釈で段階希釈したファージ溶液を添加し、37°C で 1 時間培養した。培養液の一部に 50 μ g/mL アンピシリン、2% グルコース含有 2YT 培地を添加し、クローンディスクに播種し一晩培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測することで、ファージタイターを算出した。

II-6) PSIF 発現ベクターへの組換え

作製したライブラリー (input) および 2nd、3rd パニング後のライブラリーから回収したプラスミドを NcoI および NotI で処理した。あらかじめ NcoI および NotI で処理した PSIF 発現ベクター pY7 (pCANTAB5E に PSIF 発現コドンを組み込んだもの、PSIF; 緑膿菌毒素 Pseudomonas aeruginosa enterotoxin 由来たんぱく質合成阻害因子) にライゲーションキット Ver.2 (宝バイオ) を用いて組み込むことで、ペプチドと PSIF との融合体を発現するプラスミドを構築した。

II-7) ペプチドと PSIF との融合体を含む培養上清の作製

ペプチドと PSIF との融合体を発現するプラスミドを

TG1 にエレクトロポレーションにより導入し、得られたコロニーを 96 穴プレートヘランダムにピックアップして一晩培養した。50 µg/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地 100 µL を新たに添加したプレートに、一晩培養した培養液 10 µL を添加し、OD600 = 0.4~0.5 まで培養した。3,000 rpm で 20 分間遠心した後、上清を除き 1 mM IPTG、50 µg/mL アンピシリン含有 2YT 培地 200 µL を添加し、37 °C で 12 時間培養した。再び 3,000 rpm で 20 分間遠心し、上清を回収して以降のスクリーニングに供した。

II-8) ペプチドの細胞内移行能の評価

96 穴カルチャープレートに Opti-MEM で 1.5×10^4 cells/well に希釈した HaCaT 細胞を播種し、終濃度 50 µg/mL となるようにシクロヘキシミドを添加した。次いで、上記の方法に従って作製した培養上清をそれぞれ 50 µL ずつ加え、37 °C で 24 時間培養した。その後、ペプチドによって細胞内に導入された PSIF による細胞傷害性を MTT assay により測定し、ペプチドの細胞内移行能を評価した。また、viability は終濃度 1mg/mL のシクロヘキシミドを加えた群を 100%、PSIF を発現しない TG1 の培養上清を加えた群を 0% として算出した。

IV) 倫理面への配慮

ヒト細胞は市販の細胞株を使用した。

B-2: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と協力して実施する循環器疾患関連たんぱく質解析研究の全体計画については、16 年度倫理委員会の承認を得た。この承認結果に従い、3 課題を昨年度提出したが、今年度は最終的に全 10 課題の申請を行う。各循環器疾患についてたんぱく質の変動が最も観測されやすい状況で採血などを行う研究計画を作成し、倫理委員会で審議・承認を得る。また、血清試料以外に血漿、あるいは心臓などの組織を収集する研究を提案し、倫理委員会の承認を得る。承認された研究課題については、均一な条件での試料採取、分離、保管ができるように検討を行い、個別にプロトコルを作成する。特に組織については同意から試料の取得や保存に至るまで多くの問題が存在するので、個々について適切な対応法を探る。また、個人情報保護法、臨床研究指針を再確認し、研究実施や情報管理に向け実際に即したマニュアルを作成し、研究計画の実施を問題なく進める体制を当センター内に構築する。

B-3:疾患関連たんぱく質解析研究の一環としてのエネルギー代謝調節に関与する生理活性ペプチドの探索

1) マウス胎仔由来線維芽細胞 (3T3-L1 細胞) の培養、分化誘導とアッセイ: 3T3-L1 細胞を 96 穴プレー

トで培養し、confluent の 2 日後を 0 日 (day0) とした。また、3T3-L1 細胞の分化誘導は、day0 にデキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、インスリンを含む培地で培養を行い、day2 にインスリンのみを含む培地に交換し、day4 以降は 2 日おきに 10% 牛胎仔血清を含む培地で培地交換を行った。各分化段階の 3T3-L1 細胞 (day0, day4, day8) に、ブタ脳及びラット小腸から抽出したペプチドサンプルを添加し、細胞内 Ca イオン濃度の変化を指標として FLIPR システムを用いて測定した。

2) 抽出および精製: ブタ脳及びラット小腸を既報のとおり、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、陽イオン交換 (SP-Sephadex) にて得られた強塩基性画分のゲル濾過を行った。さらに活性画分は、CM-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) Y 受容体の発現解析: 各分化段階の 3T3-L1 細胞及びラット脂肪組織より抽出した RNA を用いて RT-PCR 法により Y 受容体 (Y1, Y2, Y4, Y5 受容体) の発現を解析した。

(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-4: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

1) 分離対象ペプチド: ショットガン解析法においては、たんぱく質のトリプシン消化により生成するペプチドを通常分離、検出する。このため、分離・検出系の検討では、相当する分子量 3,000 以下の脳や心臓のペプチドをモデルとし、さらに実際に脳のたんぱく画分についても検討を行う。

2) ペプチド分離システム: ペプチドーム解析で作成した 2D-HPLC の改良をさらに進めた。1 次元目に強酸性陽イオン交換 HPLC、2 次元目に C18 逆相系 HPLC を用いるが、今年度はステップ 2D-HPLC においては 2 次元目を nano LC とし、感度などの検討を行う。自動リニア 2D-HPLC (2 次元目 micro LC) については、昨年度までに動作確認を行い分析に使用したので、今年度は再現性や測定感度などの問題について検討を進める。イオン交換 LC の溶媒系 (pH3.8 のギ酸アンモニウム・10% アセトニトリル含有)、逆相 LC の溶媒系 (アセトニトリル・0.01% トリフルオロ酢酸)、カラム類については昨年度までの物を使用するが、nanoLC についてはカラム類の検討も行う。

3)ペプチドの検出と解析: microLC溶出液はスプリットし、エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析計(ESI-TOF)と MALDI-TOF-TOF 質量分析計(Proteomics 4700)にて検出、構造解析を行う。NanoLC溶出液はターゲットプレート上にスポットし、Maldi 質量分析でのみ解析する。

4)血液試料の検討: 血液のペプチド解析については幾つかの方法提案されているが、今年度は最も簡便な固相抽出法にて調製を行う。抽出物をゲル濾過HPLC で分離しペプチド画分を調製後、micro LCにて分離、濃縮し、Maldi 質量分析機で測定する。Seldi 質量分析計でも定法、あるいは上記方法で測定を行い、比較検討する。

5)組織抽出物の検討: 昨年度に続き、抽出後の試料調製について検討を行う。変性剤・ディタージェントからなる溶媒系で抽出後、還元アルキル化とトリプシン消化、濃縮、脱塩などの手順を各段階で検討し、心臓などの組織試料に適した方法論を作成する。また、副反応の軽減に向けた方策についても検討を行う。

(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する。血液試料は「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」として当センターの倫理委員会で承認を受け、研究協力者に十分に説明を行い、同意を得て採取した試料を対象に行う。

B-5: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

(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、パーキンソン病及びパーキンソン症候群(多系統萎縮症など)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資料、説明文書、同意文書を作成し、国立精神・神経センター倫理委員会にて承認された。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。I93MUCH-L1 変異体を発現するトランスジェニックマウスなどを用いパーキンソン病発症機序におけるユビキチン系とリソソーム系の役割を解析した。

(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-6: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、糖尿病患者の血清及び尿を採取する。血清については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 を用いて糖尿病に関連したたんぱく質の同定、定量を行う。解析された結果について、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早期糖尿病性腎症を研究対象に、本施設内で施行する 2DE を用いて、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健常者の尿タンパク質プロファイルと比較検討し、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。

本施設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創薬プロテオームファクトリーにて解析する一環として、呼吸器疾患(気管支喘息及び慢性閉塞性肺疾患)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。

本施設での独自のプロジェクトとして、手術時に採取された腹壁及び内臓脂肪細胞の分泌蛋白のディファレンシャル解析、感染防御に関与する組織マクロファージの機能解析を目的とサイトカインで分化させた単球での分化後に発現量の変化するたんぱく質の網羅的検索も当研究所の 2-D LC-MS/MS, 2DE を用いて解析する。

B-7: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

B-8: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

昨年度の本研究において策定したPFへのサンプル提供手順の確認作業を実施し、対象疾患診療各科担当者からの試料受領・一時保管・提出行程の検証を行った。

ヒト尿を採取後すぐに氷冷し、プロテアーゼインヒビターを添加後、遠心分離し上清を回収し、0.45・mのフィルター処理を行い解析試料とした。前年度はサンプル中の全てのたんぱく質・ペプチドを解析する目的で、脱塩・濃縮のみを行い、直接MALDI-TOF-MSによる分析を試みたが、高分子領域(分子量一万以上)のシグナルを得ることは出来なかった。そこで、サンプルを低分子のペプチド画分と高分子のたんぱく質画分に分けることにし、硫酸沈殿法を用いた。氷温あるいは4°Cを維持した状態で、試料を攪拌しながら硫酸を添加、80%飽和の状態で一晩かけて沈殿を生成させた。沈殿と上清は遠心分離により回収し、それぞれをたんぱく質画分、ペプチド画分とした。硫酸沈殿物として得られたたんぱく質画分の分析のためには、再可溶化が必要となる。そこで、界面活性剤、変性剤等を用いて可溶化の条件を検討した。また、SDS-PAGEにて解析を行い、サンプルの日差変動について検討した。

APPやA β などのAD発症に関わるたんぱく質複合体を脳組織より精製するために、まず、シナプス画分を含む脳抽出液よりシナプスタンパク質の代表としてNeuroiginやPSD-95などのシナプスタンパク質複合体を精製し、NanoLC-MS/MSで同定した。また、加齢に伴いこれら複合体の構成蛋白質が変化するか否かを検討した。アシル化修飾をうけた蛋白質に関してもビオチンスイッチと呼ばれる方法でアシル化たんぱく質の精製法を検討した。

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時間後以下の実験に供した。細胞をミノドロネートにて前処置した後、プロスタグランジンF2 α あるいはTPAにて刺激し、培地中のVEGF(血管内皮細胞増殖因子)濃度をELISAを用いて測定した。細胞質画分中のRaf-1、MEK1/2およびp44/p42 MAPKのリン酸化についてはWestern blot法を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

PFへの臨床試料提供については、既に当院倫理委員会およびPF倫理委員会の承認を得ている。

B-9:疾患関連たんぱく質解析に関する研究

組織については、数百枚の切片を作成後、腫瘍組織と正常部分を区分する必要がある。再現性のある結果を出すには、熟練した技術を要する。切片作成後、染色することで、組織の保存状態に関しても検討した。

臨床データの保存については、最終目標が達成されるべくその内容に関して検討した。

(倫理面について)

検体数を十分量にするため、今回のプロジェクト以前に採取した検体に関しても、倫理的問題を解決すべく、外来にて再度説明し、患者さんに承諾を得るよう努めた。

B-10: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。MASCOTの検索結果は、同定確度の向上を目的に試作した“Peptide-List Extractor”により検証した。

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。

量変動解析は、安定同位体 ^{18}O による標識を酵素消化により行った後に、非標識のものと等量混合してナノLC/ESI-MS、または、MALDI-MSを用いて行った。量比の算出は、2004年度に開発した“Isotopica”を用いて観測される各々の分子イオンピークに対して $^{18}O/^{16}O$ の同位体比を計算することにより行った。

B-11:癌組織のN型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析技術の確立

癌組織はヘテロな組織であり、癌細胞以外に様々な細胞が含まれており、癌組織の中で癌細胞が占める割合が10%以下である癌もめずらしくない。そこで、解析の精度を上げるため、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、癌組織から癌細胞のみを高率に抽出し、それらの糖鎖構造を解析することとした。N型糖鎖はヒドラジン分解でN型糖たんぱく質より切り出す。また、脂質成分をクロロフォルム:メタノール溶液で抽出し、DEAEを用いたイオン交換にて、酸性脂質を分離した。酸性脂質はEndoglycoceramidase II(TAKARA)で処理することにより糖鎖部分を切り出した。N型糖鎖と酸性糖脂質の解析方法としては、

糖鎖を高感度で検出するため糖鎖部分を2-アミノピリジンで蛍光標識し(ピリジルアミノ化、PA 化)、HPLC を用いた 2 次元糖鎖マッピング法と質量分析法を組み合わせて、糖鎖構造を同定する。

(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-12: 同位体標識法(cICAT)による各種疾患患者試料(血清・組織)のたんぱく質発現解析研究

1) 血清の調製法:

患者血清(研究協力機関で実施)および日本人健康人血清(本施設で実施)の調製は、10 ml 真空採血管(ベノJECT II 血清分離剤・凝固促進剤フィルム入り)を用いて採血した血液(通常は 10-20 ml 程度)を37°Cで30分静置(もしくは室温で1時間静置)したものを4°Cで、1,500 × g (3,000rpm)で10分遠心分離を行うことにより、上清(血清)をえた。得られた血清は 0.2ml ずつ 1.5 ml チューブ(エッペンドルフ製)に分注し、冷凍保存した(-80°C)。必要に応じて融解し、実験に使用した。

なお、健康外国人血清(約 100ml/人、合計 10 名、)は Uniglobe Research Corporation(CA, USA)より購入した。本外国人血清は年齢 18~50 歳代の男性 5 名、女性 5 名より、採取したものであり、この 10 人の血清をプールしたものを標準血清(CT02S)とした。ヒト血漿は Rockland Immunochemicals 社(PA, USA)より購入した。

2) 凍結組織切片の調製および LMD による正常・病変部位特異的組織分取:

凍結ヒト組織(ヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSSRB)より購入)を OCT compound (包埋剤, SAKURA 社製)で包埋した組織ブロックをライカ社製のクリオスタット(LEICA 社製 CM1850)を用いて、-20°C で厚さ 10µm の切片(100~200 枚)を作成した。調製した切片を切除用のスライドガラスに貼り付け、風乾後、95%エタノール液で組織を固定化し、ヘマトキシリンの 3 倍希釈液で軽く染色した。Laser Micro Dissection (LMD) (LEICA 社製 AS LMD)を用いて常法(参考文献 2)により、病変部位あるいは正常部位を指定してレーザーを照射することにより部位特異的に切除し、試験管に集め、必要に応じて可溶化処理を行った。市販組織を用いて技術を習得中である。

3) 組織(細胞)可溶化・たんぱく質抽出法:

(1) 研究協力機関より提供される患者組織の解析を開始する前に、ヒト細胞株を用いて細胞の可溶

化、アセトン沈殿によるたんぱく質の単離等の検討を行った。用いた細胞株はヒトがん細胞株(KATO-III, MKN-45, MKN-74, HeLa)であり、HSSRB より購入した。それぞれの培養培地(KATO-III; DMEM/RPMI-1640/10%FBS, MKN-45 and MKN-74; RPMI-1640, 10%FBS, HeLa; DMEM/10% FBS)で大型フラスコを用いて炭酸ガス培養インキュベータで培養し、それぞれ約 10^7 の細胞を得た。得られた細胞は PBS で洗浄後、-80°C で保存し、必要に応じて実験に用いた。エタノール固定化処理のため、細胞($5\sim 8 \times 10^6$ cells)に 0.5 ml の冷 99.5% エタノールを加え、軽く振とうさせ細胞を均一に懸濁した後に、遠心(3,000 rpm, 10 min)し、上清を捨て、沈殿部分(細胞)を得た。細胞の可溶化法には関しては、細胞中の出来る限り多くのたんぱく質を可溶化する目的で以下の方法で行った。

固定化した細胞(KATO-III の場合は 5.75×10^6 cells)を、氷上で 0.5 ml の可溶化溶液(9.8M 尿素(Wako), 4% CHAPS, 1mM EDTA, 1mM TCEP, 100 倍希釈した protease inhibitors(Sigma, P2714: 100x stock soln))に懸濁し、Vortex を行い、超音波処理(0.5 - 1 分、数回に分けて、低温を保つ)し、可溶化処理を行った。得られた細胞粗可溶画分(Total lysate)を 20°C で、12,000rpm, 20 分間の遠心処理を行い、上清を CHAPS/尿素可溶画分とし、沈殿を CHAPS/尿素不溶画分としてそれぞれ分取した。CHAPS/尿素不溶画分を 0.1 ml の 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl, 1mM TCEP(pH8.5)溶液に加え、Vortex と超音波処理を行い、95°C, 10 分間加熱した後に、12,000 rpm, 20 分間の遠心処理を行い、上清(CHAPS/尿素不溶/SDS 可溶画分)と沈殿残渣画分(フィルム状固形物)を分取した。各画分のたんぱく質の定量は Lowry 法で行った。特に言及しない限り、CHAPS/尿素可溶画分と CHAPS/尿素不溶/SDS 可溶画分とを合わせて細胞全可溶画分とした。

(2) たんぱく質アセトン沈殿処理:

上述の細胞全可溶画分溶液(5mg/ml に調製) 25µl(125µg protein 相当)に 100µl の MilliQ 水を添加し、攪拌後、960µl の冷アセトン(100%, 4°C)を少しずつゆっくり加えて、攪拌した。白濁した懸濁液を -30°C で一晩放置し、アセトン沈殿を完結させ、その後 4°C で 12,000 rpm, 20 分の遠心処理を行い上清を除き沈殿画分(crude proteins)を得た。この沈殿画分に 200µl の 99.5% エタノールを加え、4°C で 12,000rpm, 20 分の遠心処理し、残存する尿素などの不純物(上清)を除き、たんぱく質沈殿画分を得た(約 100µg/tube, -30°C で保存)。この操作によるたんぱく質の回収率は約 80%であった。

4) ヒト血清試料の cICAT 法による解析

アジレント社製抗体カラム (Multiple Affinity Removal Column, 10 x 100mm) を使用し、Albumin, IgG, α 1-Antitrypsin, IgA, Transferrin, Haptoglobin を血清より除去した。すなわち、200 μ l のヒト血清を 15,000 rpm で遠心後、Agilent binding buffer A (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ンし、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 Lowry 法で測定した。

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、常法に従い (参考文献 3), 50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5) で可溶化し、TCEP (final 1mM, 95°C, 10 min) で変性還元後、2.2mM の cICAT 試薬 (Applied Biosystems), 12 C (L 鎖) あるいは 13 C (H 鎖) 標識を 37°C、2 時間反応させた (通常は標準血清を L 鎖試薬、疾患患者血清を H 鎖試薬で標識する)。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、分取用 HPLC (Vision Workstation System (Applied Biosystems)) を用いて、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column (4.6 x 100mm)) にかけて、10mM KH_2PO_4 , pH2.8, 25% CH_3CN (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) にかけて、素通り部分を洗浄後、吸着した cICAT 標識ペプチドを 30% $\text{CH}_3\text{CN}/0.4\%$ 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 時間反応させてビオチン部分を切断し、cICAT 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 (4.6 x 100mm) にかけて、十分に洗浄後、SCX-binding buffer + KCl (0 ~ 0.5M gradient) でペプチド画分を分画 (25 ~ 50 分画) し、それぞれ C18 column で脱塩し、減圧乾固した。得られた cICAT 標識ペプチドは nano-LC/QSTAR XL (Applied Biosystems, ESI-Q/TOF) で質量分析測定を行い、生データをチェック後、統合データベースシステム (HiSpec) を用いてペプチドおよびたんぱく質の同定・比較定量解析をした (参考文献 1)。

なお、研究協力機関より送付される患者血清試料をルーチン測定する場合は、上述のプロトコール

に従い操作し、標準血清 (CT02S) を L 鎖試薬、患者血清を H 鎖試薬でそれぞれ標識し、TFA 切断後、最終的に SCX column (4.6 x 100mm) で 25 分画した各画分を nano-LC/QSTAR XL にて、分析時間 75min の分析条件で測定し、HiSpec のバイオフィアオマティクス手法により、標準血清 (L 鎖標識) と患者血清 (H 鎖標識) の各たんぱく質の比較定量比 (H/L) を計算した。

5) 細胞・組織たんぱく質の cICAT 法による解析

細胞由来たんぱく質各 100 μ g/tube 2本をそれぞれ 1 unit の H 鎖 cICAT 試薬および L 鎖 cICAT 試薬反応用に用意した。常法 (3) に従い、50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5) で可溶化し、TCEP (final 1mM, 95°C, 10 min) で変性還元後、2.2mM の cICAT 試薬 (Applied Biosystems), 13 C (H 鎖) あるいは 12 C (L 鎖) 標識を 37°C、2 時間反応させた (反応液各 100 μ l)。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、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column (4.6 x 35mm)) にかけて、10mM KH_2PO_4 , pH2.8, 25% CH_3CN (SCX-binding buffer) で吸着・洗浄後、SCX-binding buffer + 0.5M KCl (SCX-elution buffer) で溶出させた。溶出画分をアビジンカートリッジカラム (4 個連結) にかけて、素通り部分を洗浄し、吸着した cICAT 標識ペプチドを 30% $\text{CH}_3\text{CN}/0.4\%$ 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、1 時間反応させてビオチン部分を切断し、cICAT 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 (4.6 x 35mm) にかけて、十分に洗浄後、SCX-binding buffer + KCl (0 ~ 0.5M gradient) でペプチド画分を分画 (10 分画) し、それぞれ C18 column で脱塩し、減圧乾固した。なお、1 分画の時は SCX-binding buffer + KCl 0.5M で溶出したのち脱塩処理を行った。得られた cICAT 標識ペプチドは QSTAR で質量分析測定を行い、血清の場合と同様に統合データベースシステム (HiSpec) を用いて、ペプチドおよびたんぱく質の同定・比較定量解析を行った。

6) 細胞・組織たんぱく質のトリプシン断片法 (ショットガン法) による解析

cICAT プロトコールに準じて、細胞由来たんぱく質をヨードアセトアミドで還元カルバミドメチル化後、トリプシン処理を行い、得られたペプチドを分画後、同様に QSTAR で解析した。すなわち、100 μ g の細胞由来たんぱく質を、常法 (4) に従い、50 mM

Tris/HCl, 0.1% SDS (pH8.5)で再可溶化し、TCEP (final 1mM, 95°C, 10 min)で変性還元後、2.2mM のヨードアセトアミドで 37°C、2時間反応させた(反応液 100 μ l)。未反応の試薬を 1.0mM TCEP でクエンチングし、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、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column(4.6 x 35mm) にか、10mM KH₂PO₄, pH2.8, 25%CH₃CN (SCX-binding buffer)で吸着・洗浄後、SCX-binding buffer + KCl (0 ~ 0.5M gradient)でペプチド画分を分画(10分画)し、それぞれ C18 column で脱塩し、減圧乾固した。なお、1分画の時は SCX-binding buffer + KCl 0.5M で溶出したのち脱塩処理を行った。得られたショットガンペプチドは QSTAR で質量分析測定を行い、統合データベースシステム(HiSpec)でペプチドおよびたんぱく質の同定解析をおこなった。

7) Nano-LC による peptide の分離精製:

SCX による分画・脱塩したペプチド(cICAT 標識および非標識)を 0.1%TFA-2% CH₃CN にて再溶解し、nano-LC(LC Packing)/QSTAR XL (Applied Biosystems, ESI-Q/TOF) および nano-LC /Probot (LC Packings))にて分析した。カラムは C18PepMap™100, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m x 150mm(LC Packings)を使用し、QSTAR XL用移動相は A: 5%CH₃CN/0.1% HCOOH, B: 95% CH₃CN/0.1% HCOOH によるリニアグラジエント(流速:200 nl/min, 分析時間 75分)である。4700 Proteomics Analyzer 用移動相は、A: 5% CH₃CN/0.1% TFA, B: 95% CH₃CN/0.1% TFA によるリニアグラジエント(流速 300 nl/min, 分析時間 55分)である。なお、QSTAR XLで分析する場合は、一部高発現たんぱく質のペプチドが定量測定範囲を超えないように(飽和しないように)各画分の injection 量を調整した。

8) QSTAR XL (ESI-Q/TOF)での測定:

BSA トリプシン消化ペプチド断片(100fmol)を用いて nano-LC の調整を行い、規定のシーケンスカバーレージ(約 40%以上)が得られるのを確認した後、サンプルの測定を行った。なお、血清試料の一部高発現たんぱく質のペプチドが定量測定範囲を超えないように(飽和しないように)各画分の injection 量を調整した。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(Information Dependent Acquisition) Mode)であり、Peak detection threshold は 25 count, MS range は m/z 370-1430 である。測定データの信頼性を確保するために、実サンプルを 5~10 回測定する度に 1 回、QC 用の BSA 消化物

(100fmol)を測定した。

9) 4700 Proteomics Analyzer (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 でキャリブレーション(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た。

10) たんぱく質同定・比較定量処理および統合データベースの改良:

ヒト血清 cICAT 試料および細胞・組織 cICAT 試料のそれぞれについて、それら各試料由来の画分データがある程度そろった時点で、順次 HiSpec データ解析システム(Search Manager)に登録して、たんぱく質同定・比較定量処理を行った。HiSpec システム内では、Mascot 投入用のピークリスト作成、比較定量解析用の cICAT ペアイオンの探索および面積強度計算、Mascot サーバへのピークリストの投入、ペプチド・たんぱく質同定結果のデータベースアップロード等の処理を自動で行った。

ユーザ(研究者)サイドでは、コンピュータによる解析結果が全てデータベースに登録された時点で、HiSpec 同定・比較定量結果編集・閲覧ビューワ (Results Viewer)を用いて、その同定結果・比較定量結果についての精査を行った。作業の具体的な内容としては、同一サンプル由来の複数の画分データのコンバイン処理、Mascot スコアやランクによる第 1 次フィルタリング、類縁たんぱく質のロールアップ処理を行った。また、個別の Mascot 同定ペプチドについて、さらに、個別別の精査・検証済みデータを疾患ごとにソーティングし、疾患の有無により発現量の変動が見られるたんぱく質の抽出を試み、疾患関連たんぱく質のデータベース化および視覚化を検討した。

今年度のソフトウェア開発項目のうち主なものとして、cICAT 定量比の精度向上を目的とした Search Manager および Results Viewer の改良、ユーザによるデータ精査の効率化を目的とした、「生データ参

照、検証データ確定登録機能」および「PF 独自スコアリング、自動フィルタリング機能」の構築を行った。現在これらは全て実運用ベースで稼働している(詳細は後述)。

また、将来のペプチド・たんぱく質同定数の向上や疾患関連たんぱく質の抽出効率の向上を目的とした、ペプチドマッピング技術について検討を行い、解析法を特許出願するとともに、実データを基にその有用性の検証を進めている。

C. 実験結果

以下の D. 考察の項に結果及び考察として記載

D. 結果・考察

D-1-1 糖鎖ディファレンシャル解析による疾患関連糖鎖・糖たんぱく質の解析

昨年度我々は、疾患関連グライコプロテオーム解析技術の一つとして、安定同位体標識法、及びリニアイオンラップ/フーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析装置を用いた糖鎖ディファレンシャル解析法を開発した。本分析法は、図1に示すように、正常組織由来糖鎖を標準糖鎖として安定同位体標識し、同位体未標識の病態組織由来糖鎖に等量混合して LC/MSⁿ を行うことによって、疾患に伴う糖鎖分布の変化と、変化した糖鎖の構造を明らかにするものである。昨年度はさらに、本分析法を用いて、自己免疫性疾患全身性エリテマトーデスモデルマウス (lpr/lpr) と正常マウス (+/+) 腎臓に発現する糖たんぱく質の糖鎖ディファレンシャル解析を行い、自己免疫性疾患モデルマウス腎臓の N 結合糖鎖は、正常マウス腎臓の糖鎖とは異なる分布を示すことを見出した。そこで本年度は、糖たんぱく質の発現変動や糖鎖構造の変化が起因する(あるいは結果となっている)疾患の探索やその機構解明のための糖鎖ディファレンシャル解析法の応用可能性を試験する目的で、自己免疫疾患モデルマウスにおける糖鎖分布の変化をさらに詳細に解析した。

昨年度同様に、lpr/lpr 及び +/+ マウス腎臓の膜画分から切り出した糖鎖を d0-AP 及び d6-AP でそれぞれ標識し、d0-PA 及び d4-PA 糖鎖を調製した。タンパク質量に換算して等量になるように両者を混合し、LC/MSⁿ を用いた糖鎖ディファレンシャル解析を行った。図2 に MS¹ (m/z 700-2000) のトータルイオンクロマトグラム、及び MS²・MS⁴ から推定された糖鎖構造を示す。膜画分の主要糖鎖は、高マンノース型糖鎖 (M5-9) 及びトリマンノシルコア構造の β 1-4 マンノースに1分子の N アセチルグルコサミン (GlcNAc) が付加したバイセクテッド複合型 2 本

鎖糖鎖と推定された。また多くの複合型糖鎖のコア部分及び側鎖にフコース (Fuc) が付加されており、ルイス x ($\text{Gal } \beta$ 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) またはルイス y ($\text{(Fuc } \alpha$ 1-2)Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) 部分構造を有していることが示唆された。

同様に、可溶性画分からも標識糖鎖を調製し、LC/MS による糖鎖ディファレンシャル解析を行った。その結果、可溶性画分の主要な糖鎖は高マンノース型糖鎖 (M5-9)、及び膜画分で検出されたフコシル糖鎖であることが示唆された(図3)。それ以外に特徴的な糖鎖として、M9 に1分子のヘキソースが付加した糖鎖が検出され、グルコース (Glc) が1分子結合した (M9+Glc) と推定された。また、フコシルトリマンノシルコア、さらに、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。このように可溶性画分には、糖鎖生合成初期段階の糖鎖や、分解途中の糖鎖が存在することが確認された。

図4 は、d0-PA 及び d4-PA 糖鎖のイオン強度比の平均値 ($n=3$) を表したもので、疾患モデルマウス及び正常マウス腎臓組織全体の各 N 結合糖鎖の結合量の違いを示している。図4では、糖鎖が生合成される順番に従い、図の左側に生合成初期段階の糖鎖、中央に合成後期、右側に分解過程にある糖鎖を配置している。表1は、d0-PA 糖鎖のイオン強度を d4-PA 糖鎖のイオン強度で除した値を示しており、1.0 より大きい場合は lpr/lpr においてその糖鎖の結合量が増加していること、逆に小さい場合は減少していることを表している。表の上に位置する糖鎖は合成初期段階の糖鎖である。糖鎖ディファレンシャル解析結果から、M9+Glc の結合量は、lpr/lpr では正常よりも 40% 増加していることが明らかになった。また、糖鎖のコア部分の分解が進んだ糖鎖が約 2 倍に増加していることが判った。さらに、高マンノース型糖鎖には大きな違いは見られなかったが、多くの複合型糖鎖の結合量は lpr/lpr で正常の 24-82% に減少しており、その傾向は、ガラクトースが1分子しか結合していない複合型 2 本鎖糖鎖に顕著であった。また、膜画分の糖鎖の比較定量を行ったところ、lpr/lpr ではほとんどの糖鎖の結合量が減少していることが明らかとなった(図5 及び 表2)。

以上のように、自己免疫疾患様の糸球体腎炎を発症している SLE モデルマウス腎臓において生じている糖たんぱく質糖鎖の生合成異常を、糖鎖ディファレンシャル解析によって短時間で詳細に解析できることが確認された。

自己免疫疾患において糖鎖異常が生じていることはよく知られている。例えば、リウマチ性疾患患者や、SLE モデルマウスでは、血清中の免疫グロブリンに結合しているアガラクト糖鎖の割合が顕著に増加していることや、ある糖鎖遺伝子をノックアウトしたマウ

スでは、自己免疫疾患様症状を示すことが報告されている。我々は、自己免疫性疾患と糖たんぱく質糖鎖の関係解明における、独自に開発した糖鎖ディファレンシャル解析法の応用可能性を評価することを目的として、SLE モデルマウス lpr/lpr 及び正常マウス +/-腎臓由来 N 結合型糖鎖の差異解析を行った。

糖鎖比較定量解析、及び変化した糖鎖の構造解析の結果、SLE モデルマウスの腎臓では、糖鎖合成初期段階の糖鎖(M9+Glc)や、分解が進んだ糖鎖の結合量が増加していること、及び、ガラクトースが結合した複合型糖鎖が減少していることが明らかになった。また、膜画分では、糖鎖の結合量が全体的に減少していることが確認された。

今回 SLE モデルマウスで蓄積が確認された M9+Glc 糖鎖は、N 結合糖鎖合成初期段階で作用する α -glucosidase II の基質糖鎖である。 α -glucosidase II は、小胞体内での糖たんぱく質の品質管理過程における鍵酵素の一つとして知られている。ポリペプチド鎖は小胞体内で M9 糖鎖に 3 分子の Glc が結合した M9+Glc₃ 糖鎖の付加を受ける。その直後に小胞体内の α -glucosidase I および II により、Glc が除去される。小胞体のレクチン様分子シャペロンである膜結合型カルネキシンとその可溶性ホモログ、カルレティキュリンはカルシウム依存性のレクチン活性をもち、M9+Glc に高い親和性を持つ。カルネキシン/カルレティキュリンは M9+Glc を認識して未完成な糖たんぱく質に結合し、糖たんぱく質のフォールディングを補助する。フォールディングが完了し、 α -glucosidase II により糖鎖上のグルコースが除去されると、タンパク質はカルネキシン/カルレティキュリンとの親和性を失って遊離され、ゴルジ装置に輸送される。このとき、グルコースが切断されないと、糖タンパク質は輸送されずに小胞体内に蓄積される。このような異常糖たんぱく質は品質管理機構により排除されるが、過剰な蓄積により小胞体ストレスが持続すると、アポトーシスが引き起こされると考えられている。この小胞体ストレスによるアポトーシス誘導は糸球体腎炎を引き起こす原因の 1 つとされている。

昨年度我々は、2D-DIGE を用いてタンパク質発現差異解析を行い、SLE モデルマウスでは、 α -glucosidase II の発現が低下していることを見出した。本年度も追試実験を行い、 α -glucosidase II の発現量が減少していることを確認している。 α -glucosidase II の発現低下と、糖鎖ディファレンシャル解析によって明らかになった M9+Glc と分解糖鎖の増加、及び膜糖鎖の減少は、lpr/lpr マウスの腎臓病変において、小胞体ストレスの原因となる糖鎖合成異常が生じている可能性を示唆するものである。SLE の糸球体腎炎の発症と糖鎖合成異常の関

係について、さらなる解析が望まれる。

以上のように、糖鎖ディファレンシャル解析は、糖鎖生合成や糖たんぱく質発現変化の発見とその機構の解明に応用可能であることが確認された。今後、様々な疾患の原因(あるいは結果)となっている糖鎖構造や、糖鎖関連たんぱく質の探索、及びその機構を解明する方法として有用であると期待される。

D-1-2 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

D) 疾患関連たんぱく質に対する抗体の迅速作製に向けた高効率抗体ライブラリー作製法の開発

様々な疾患関連たんぱく質に対して簡便かつリアルタイムにモノクローナル抗体を単離する技術の確立を目的に、昨年度までに確立した抗体ライブラリー作製法をさらに改良し、多様性、品質により優れた非免疫マウス scFv ファージ抗体ライブラリーの作製法について検討を行った。

そこで、PCR により増幅しうる抗体遺伝子の多様性をより拡大し、増幅効率の向上を達成するため、抗体遺伝子増幅用プライマーの DNA 配列の最適化、および、あらかじめプライマーにリンカー配列を組み込むことを試みた。この改良型 PCR プライマーセットを用いてマウス骨髄および脾細胞より調製した cDNA をテンプレートとして V_L 遺伝子と V_H 遺伝子を増幅し、それらを連結することにより scFv 遺伝子ライブラリーを調製した。さらに得られた scFv 遺伝子をファージミドベクター pCANTAB5E に組み込んだ(図6)。このベクターをエレクトロポレーションにて大腸菌 TG1 株に導入し、続いてヘルパーファージを感染させることで、scFv 抗体を M13 ファージのマイナー外郭蛋白質である g3p に融合体として発現するファージライブラリーを構築した。得られたファージライブラリーのタイターは 2.4×10^9 であった。また、ライブラリーから任意にピックアップした 12 クローンについてインサート DNA のシーケンスを解析した結果、フレームシフトや変異は認められず、独立クローンで構成されていることが確認された(表3)。抗原結合部位に最も重要であると言われている V_H 遺伝子の CDR3 領域の多様性は 2×10^7 と考えられているが、本研究における scFv ファージライブラリーのサイズは 2.4×10^9 CFU であり、生体が有する抗体の多様性を模倣しうる優れた抗体ライブラリーを構築できたことが示唆された。

そこで次に構築した非免疫 scFv 抗体ライブラリーの有用性を評価するため、腫瘍組織血管内皮細胞に高発現していることが知られる分子 KDR に対する抗体の単離を目的にアフィニティパンニングを行った。一般に抗体ライブラリーのパンニングにはイムノチューブに固相化した抗原を用いられ、これまで著者ら

も同様のパンニングの方法を用いてきた。しかし、パンニング条件を最適化し、より微量の抗原から目的抗体を単離し、かつ作業の自動化を達成するため、マイクロ流路系で抗原の固相化、サンプルのアプリ、洗浄等を自動で行うことが可能な BIAcore3000 システムを使用した(図7)。BIAcore を用いることにより、パンニングにおける wash 条件および溶出条件等を緻密に制御できるため、目的抗原に対してより高い結合性を有する抗体を単離することが可能になると考えられる。そこでまず、既存の抗原特異的 scFv 提示ファージを用い、BIAcore3000 により、センサーチップ上に固相化した抗原に対して scFv ファージを結合させた後、複数の溶出液を用いて解離条件を検討した。その結果、Gly-HCl (pH 2.0) と Gly-NaOH (pH 11.0) を溶出液として用いることで、結合している scFv ファージを完全に解離できた。したがって以後は溶出液には Gly-HCl (pH 2.0) と Gly-NaOH (pH 11.0) を用いることとした。wash 条件については HBS-EPT を用い、BIAcore の rince コマンドを 2 回行う場合と 10 回行う場合でパンニングを行い、どちらの条件で抗原に対する抗体の濃縮効率が良いのかを比較した。目的抗原に結合する抗体クローンの濃縮は、パンニングに用いた input ファージの titer に対するパンニング後に回収された output ファージの titer の比で評価した。output ファージの titer 比は、パンニングを繰り返すにつれて増加したことから、KDR に結合する抗 KDR 抗体を提示したファージが選択・濃縮されていることが示唆された。2 回 rince の条件では 1st パンニング後の ratio に比べて 5th パンニング後の ratio が約 100 倍に増加しているのに対して、10 回 rince の条件では約 1,000 倍にまで増加していた(図8)。

次に、パンニングの結果をより詳細に評価するため、各ラウンドで回収されたファージを大腸菌 TG1 に再感染させ、生じたコロニーを 96 穴プレートに回収することでモノクローン化し、大腸菌培養上清中に産生されたファージを用いて、KDR に対するファージ ELISA を行った。その結果、input ファージではほとんどのクローンで KDR に対する結合が見られなかったのに対し、5th パンニング後の output ファージでは KDR に結合を示すクローンが顕著に増加していた。また、ファージ ELISA の結果から、2 回 rince の条件では KDR に対して高親和性のクローンが 1 つしかないのに対して、10 回 rince の条件では KDR に対して結合性を示すクローンが増加し、そして高親和性のクローンが 8 個確認された(図9)。このことから、2 回洗浄の条件と比較して、10 回洗浄の条件の方が、効率よく抗体を選択できるだけでなく、目的抗原に対して強い結合力を示すクローンも選択できることが示唆された。得られた高親和性の抗 KDR scFv 8 クローンについて DNA シーケンスを解析した結果、これら

のクローンは 3 種類のクローン (anti-KDR scFv-1, 2 および 3) からなることが確認された(表4)。

更にこれらクローンの特性を評価したところ、anti-KDR scFv-1,2,3 は human KDR に対して特異的に結合し、human TNF receptor 2, luciferase, Bovine serum albumin, human importin- α , human importin- β には結合性を示さなかった。また、これらの抗体はヒト KDR だけではなく、マウス KDR に対しても結合性を示した。一般にハイブリドーマによる抗体作成法では、免疫する動物のたんぱく質とホモロジーの高いたんぱく質を抗原とした場合には、抗体を得ることが困難である。マウス KDR はヒト KDR と 80% という高いホモロジーを有するものの、本研究により構築したマウス非免疫ファージ抗体ライブラリーからマウスおよびヒト KDR に結合性を示す抗体が単離できたことは、本ライブラリーの有用性を示唆するものと考えられる。

構築した非免疫 scFv ファージ抗体ライブラリーの有用性をさらに詳細に評価するため、疾患関連たんぱく質のモデルとして、細胞内アポトーシス関連たんぱく質であるヒト Bid を抗原としてパンニングを行った。その結果、パンニングを重ねるにつれて output ファージのタイターの割合が増加し、各抗原に親和性を有する抗体を提示したファージクローンが濃縮されていることが示唆された(図10)。さらに ELISA によるスクリーニングおよび DNA シーケンス解析の結果、各抗原に対して複数の scFv 抗体クローンが得られたことが確認できた。

以上のように、本研究において、プライマーセットを改良することにより、昨年度に構築した抗体ライブラリーよりも多様性・質に優れたライブラリーを構築することができたものと考えられる。さらに、アフィニティパンニングに BIAcore システムを用いるという、目的抗体を効率よく濃縮する手法を確立することができた。

今後、本ライブラリーを用いて、疾患関連たんぱく質に対する抗体を、迅速かつ網羅的に単離しうるシステムを確立し、たんぱく質機能解析や臨床診断や抗体医薬等への展開を目指す予定である。

II) 細胞外から細胞内へたんぱく質を導入しうるペプチド性キャリアの開発

細胞内で機能する疾患関連たんぱく質を創薬シークとして有効利用しようとした場合、標的細胞に対して、細胞外から細胞内へたんぱく質を導入することが必要不可欠である。本観点において、近年、protein transduction domain: PTD あるいは cell penetrating peptide、と呼ばれるペプチドが、細胞外から細胞内へ侵入しうること、さらに、PTD をキャリアとすることで、カーゴたんぱく質を細胞内へ導入しうるが見出され、新たなドラッグデリバリーシステ

ムとして注目されている。既存の PTD の中で HIV-TAT たんぱく質の部分配列である Tat ペプチドは、有効性・安全性ともに最も優れていると考えられている。しかし細胞内薬物導入キャリアとしてより多くの疾患に適用するためには現状の導入効率では不十分であり、導入効率の向上が熱望されている。

そこで我々は、ファージディスプレイライブラリー技術を PTD の改変へと応用することで、細胞内移行活性に優れた PTD 様ペプチド性キャリアの創製を試みた。さらに、細胞内移行能にもとづいてペプチドを効率的にスクリーニングするために、緑膿菌菌体外毒素由来のタンパク質合成阻害因子 (PSIF) を利用することで、新規 PTD の創製にも展開可能なテクノロジーの確立を試みた。なお、PSIF は、単独では細胞内へ侵入できないためタンパク質合成阻害活性を全く示さない。しかし、Tat ペプチドのような PTD と融合させることで PSIF に細胞内への移行能を付与すると、たんぱく質合成阻害活性を初めて発揮するようになる。つまり、PTD-PSIF 融合たんぱく質を用いた新規 PTD のスクリーニングでは PTD の細胞内侵入活性を PSIF の細胞傷害性として容易に評価することが可能であり、この評価系をファージ表面提示法と組み合わせることで、一度に何百、何千といった PTD 変異体のスクリーニングが可能となる。

まず新たな細胞内移行ペプチドを創製するために、Tat ペプチド (11mer; 47-57) のアルギニン以外のアミノ酸を他のアミノ酸に網羅的に置換したペプチドライブラリーを作製した (図 11)。Tat ペプチドの細胞内への移行には、その配列に含まれるアルギニンの電荷が寄与していると言われている。今回は細胞内移行に重要だと考えられるアルギニンを残し、それ以外のアミノ酸を網羅的に置換することで、PTD としての特性を残しつつさらなる導入効率の向上を図れるものと考え、ライブラリーの作製を試みた。

全 20 種類のアミノ酸をコードし得る NNS 配列を導入したプライマーを用いて PCR を行い、その PCR 断片をファージミッドベクターに組み込んだ。このベクターを大腸菌 TG1 株に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、多様な種類のペプチドをファージマイナー外殻タンパク質である g3p の先端に発現するファージライブラリーを作製した。このライブラリーの理論的なサイズは $20^5=3.2 \times 10^6$ CFU であるのに対し、実際に作製したライブラリーサイズは 1.6×10^7 CFU であり、理論値を十分に網羅したライブラリーの構築に成功した。また、ライブラリーから任意にピックアップしたクローンの DNA シークエンスを解析した結果、Tat ペプチドのアルギニン以外のアミノ酸残基がランダムに置換されており、独立したクローンで構成されていることを確認した (表 5)。

続いて、細胞内移行能を有するペプチドをスクリーニングするため、作製した Tat ペプチドのアミノ酸置

換体発現ファージライブラリーを用いて、ヒト角化細胞株 HaCaT に対してセルパニングを行った (図 12)。本研究ではセルパニングを 3 回行い、選択・濃縮されたクローンについて以降のスクリーニング操作を行った。

パニング後のライブラリー遺伝子を PSIF 発現ベクターに一挙に組み換え、大腸菌培養上清中に産生させたペプチドと PSIF との融合体を用い、PSIF による細胞傷害性を指標にペプチドの細胞内移行活性を評価した。PSIF 自体は単独では細胞内移行能を持たないため、ペプチドが細胞内移行活性を持たない限り細胞傷害性を示さない。ペプチドと PSIF との融合体を産生した大腸菌培養上清を用いてスクリーニングを行った結果、パニングを繰り返すことで細胞内へ侵入する能力をもつクローンが選択・濃縮されていることを確認した (図 13)。大腸菌の培養上清中に産生されるタンパク質濃度は各クローンで異なるため厳密な比較はできないが、現在最も導入効率が優れていると言われる Tat ペプチドよりも細胞内導入効率に優れたクローンが多数得ることができた。今後、これらペプチドのアミノ酸シーケンスの解析や、細胞内移行特性等について検討を行う予定である。

D-2: 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

16 年度には、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、内部審査機関である高度先駆的医療・研究審査委員会と倫理委員会で十分な審議の後、承認を受け実施可能となった。また、倫理委員会より指摘を受け、創薬プロテオームファクトリー施設との間で MTA を交わした。上記の全体計画の承認はあるものの、個々の実施課題については個別に申請、承認を得ることが必要と倫理委員会で判断された。これに従い平成 16 年度に応募のあった多数の研究課題から 4 件を選定、申請し、「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」、「研究計画 2-1. 腎血管性高血圧関連たんぱく質の探索研究」、「研究計画 3-1. 糖尿病治療前後の動脈硬化関連たんぱく質の探索研究」が倫理委員会で承認された。

平成 17 年度は、申請済みの「研究計画 3-2. 冠動脈疾患を有する家族性高コレステロール血症の LDL-アフェレーシス治療施行前後のたんぱく質の探索研究」に加え、「研究計画 3-3. 高コレステロール血症患者における疾患関連たんぱく質の探索研究」、「研究計画 4-1. 急性期心不全関連たんぱく質の探索研究」、「研究計画 4-2. 急性心筋梗塞症および類似疾患における疾患関連たんぱく質の探索研究」、「研究計画 5-1. 心組織における心筋症関連たんぱく質の探索研究」について倫理委員会の承認を受け

た。これらに加え、肺高血圧症と周産期疾患に関連する2件の研究課題を申請中であり、全体として10研究課題を当センターでは実施予定にしている。昨年度未記載の研究課題の趣旨は以下の通りである。

腎血管性高血圧関連たんぱく質の探索研究: レニン・アンジオテンシン(RA)系は、高血圧発症のみならず血管・臓器障害や脳血管疾患、心疾患の発症、進展に深く関わり、その活性化や障害には酸化ストレスが関与する。腎血管性高血圧症でRA系が非常に賦活化されている片側性腎動脈狭窄による腎血管性高血圧患者を対象に、経皮経管腎動脈形成術を施行し、腎動脈狭窄解除による血漿レニン活性の低下、RA系賦活化の是正前後での血液中に含まれるたんぱく質を比較、解析することにより、RA系や酸化ストレスに関連する新しい治療標的となるたんぱく質群の発見し、診断、治療、予防への応用を目指す。

糖尿病治療前後の動脈硬化関連たんぱく質の探索研究: 糖尿病に合併する大血管や細小血管の障害が治療で抑制されるが、血糖コントロールだけでなく生活習慣改善が重要である。当センターの研究では運動療法群において非運動療法群に比べ内皮機能改善などの結果を得ているので、運動療法を含めた糖尿病治療前後での患者血中たんぱく質を網羅的に解析、比較することにより、糖尿病治療に伴い変化するたんぱく質群を発見し、糖尿病合併症の診断や治療法の開発へ展開する。

高コレステロール血症患者における疾患関連たんぱく質の探索研究: スタチン内服前後での高コレステロール血症患者の血液中のたんぱく質を網羅的に解析、同定することにより、発症や重症化に関連するたんぱく質の発見を目指す。一方、スタチンは冠状動脈硬化、頸動脈硬化、腹部動脈瘤などの発症、進展を防止する多面的効果が認められるが、その機序は不明である。これらのたんぱく質群の発現解析、機能解析により、動脈硬化関連疾患に対する診断法、発症予防法、高選択性医薬品の開発等を目指す。

急性期心不全関連たんぱく質の探索研究: 心血管疾患の最終終末像の大半が心不全を呈するが、現在の心不全治療において内科的治療には限界があり、補助循環装置や心臓移植に頼るほかがなく、新しい心不全治療開発の必要性が痛感される。心不全は原因疾患が多岐にわたり病態が不均一であるという理由からその治療を含めた研究には困難を伴う。これまでの遺伝子解析に加え、発現たんぱく質の解析が必要不可欠であるとされており、心不全に関連した新たな血中たんぱく質の同定、解析により、心不全の予防や治療に対する新たな方法の開発へと展開する。

急性心筋梗塞症および類似疾患における疾患関連たんぱく質の探索研究: 急性心筋梗塞症(AMI)は冠動脈粥腫破綻により生じると考えられているが、成因には未だ不明な点が多い。AMIに類似するが冠動脈は正常像を示す疾患群(たこつぼ心筋障害)も散見されるが、その成因も不明である。これらの疾患の重症期、緩解期、疾患間の比較解析により、AMI およびその類似疾患に関連したたんぱく質を同定し、予防や治療に対する新たなアプローチ、診断・治療法の開発に発展させる。

心組織における心筋症関連たんぱく質の探索研究: 心不全やその原因となる心筋疾患の病態を分子レベルで明らかにするために、遺伝子解析技術を用いた各種解析が行われてきたが、実際に機能を発現するたんぱく質解析の必要性が強く指摘されている。本研究では心不全および心筋症を対象に、剖検例より得られた心室、心房組織のたんぱく質の同定、比較・解析を行い、その機能や量的変動の意義を明らかにする。更に標的たんぱく質の機能や量の調節より、診断、発症予防、治療に対する新たな方法論の開発に展開させる。

17年度当初から血液試料採取を開始したが、研究協力者への説明、同意取得、試料採取・処理、匿名化、試料送付、管理・保管等を行う専任の看護師を採用し、各ステップに対応したマニュアル並びに説明資料を作成した。同意取得に関しては、創薬プロテオームファクトリープロジェクトの説明と共に、各疾患試料収集の必要性を説明するよう倫理委員会より指示を受けたため、通常の研究協力者説明資料に加えて平易に図解した説明資料を作成し、十分に時間を掛けた説明を行うこととした。また、急性期で研究協力者からの同意取得が困難な時のみ代諾者を認め、その際も緩解期には必ず協力者自身からの同意取得を行う手順とした。剖検例における組織採取については、当日の遺族への同意取得だけでは時間的、心理的余裕がなく、十分な理解と判断が行われない場合も想定されるため、2ヶ月後に資料や同意確認の書類を遺族代表に送付し、いつでも同意を撤回できる状況を作り、同意撤回時は研究データなども破棄する手順を作成した。

17年度からは個人情報保護法も施行されたため、臨床情報などの個人情報についても、基準を満足する手順、保管体制を作成した。本研究では遺伝子を取り扱わないが、これに準じた匿名化の手順を行い、匿名化は研究に関与しない研究機器管理室長が行い、対応表を保管すると共に、厳密に認証管理された条件下で担当者だけが管理時にのみアクセスできる環境を設定し、実際に運用している。

上記以外にも各段階で個人情報の管理に努めると共に、試料などの保管時に問題発生がないよう、保

管方法、機器や体制についても異常時の確認、対応、伝達方法なども含め、より安全性の高い体制を作成した。

採取した試料は5人分(通常10検体)を基準として、試料や情報がまとまり次第、創薬プロテオームファクトリーの指示に従い資料を暗号化し、試料と共に送付した。現在までこれら方法で問題は一切発生していない。

研究計画 3-2 は血漿試料のみを、研究計画 2-1、3-3、4-1、4-2 では解析目的のために血清に加えて血漿試料を採取した。血漿試料の採取・分離、保管条件等についてもマニュアルを作成し、凝固線溶系の活性化を防ぎ均一な試料調製が可能となるように努めた。研究計画 4-1 ではより高品質の血漿試料を入手するため、プロテアーゼ阻害剤添加などの検討も行いつつ試料採取を進めている。

全ての研究計画は二段階になっており、第一段階の解析結果に基づき、第二段階では臨床症例などを絞り込んで試料を採取、解析する予定である。現在まで創薬プロテオームファクトリー施設から解析結果が報告されていないため、第二段階に進んだ課題はない。

疾患関連たんぱく質解析研究は、医薬品開発のシーズ探索を目指した国家プロジェクトで、厚生労働省の高度医療センターが中心となり疾患別に試料や情報を提供し、研究結果をデータベース化しコンソーシアム参加企業が活用して研究開発を行う新しい形態である。当センターでは全体計画の承認に時間を要したが、詳細な審議により、倫理、研究の両面において整った計画を作成できたと考えている。個別研究課題においても、今年度末までに10課題が承認される見込みであり、承認済み研究課題毎に必要な書類、試料や情報の収集体制を構築している。個々の手順についても、臨床研究の指針、個人情報保護法、倫理委員会や高度先駆的医療・研究審査委員会での意見に従い着実且つ正確な手順を作成できたと考えている。

循環器病関連疾患のプロテオーム解析では、これまで疾患と蛋白質の関連に対する明確な成果は報告されていないため、創薬プロテオームファクトリー施設から第一段試料に対する解析結果が得られた段階で対象や状況を絞り込み、変動する蛋白質が正確に検出される状況を作出したい。そのために、採血、試料処理や保管、剖検試料の採取・保管条件などについて、さらに検討を進めたい。

D-3:疾患関連たんぱく質解析研究の一環としてのエネルギー代謝調節に關与する生理活性ペプチドの探索

各分化段階の 3T3-L1 細胞に対して、ブタ脳から抽出したペプチド画分をゲル濾過で分離した各分画に

ついてアッセイを行った結果、分子量約 4,000 の分画に Ca イオン濃度上昇活性を見出し、その活性は特に day0 の細胞で強く見られた。この活性画分をイオン交換 HPLC 及び逆相 HPLC により分離、精製したところ、逆相 HPLC にてほぼ同じ溶出位置に2つの活性ピークを見出した。この活性ピークから最終精製したペプチドを、プロテインシークエンサーによるアミノ酸配列解析及びマススペクトロメーターによる質量分析を行ったところ、36 残基のアミノ酸からなる NPY と NPY のN末端アミノ酸2残基が切断された NPY(3-36)が同定された。

各分化段階の 3T3-L1 細胞に対して、ラット小腸から抽出したペプチド画分をゲル濾過したサンプルを用いてアッセイを行った結果、分子量約 4,000 の分画に Ca イオン濃度上昇活性を見出し、その活性は day0、day4 でほぼ同等の強さであった。この活性画分をイオン交換 HPLC 及び逆相 HPLC により分離、精製し、プロテインシークエンサーによるアミノ酸配列解析及びマススペクトロメーターによる質量分析を行ったところ、36 残基のアミノ酸からなる PYY が同定された。本研究により、ブタ脳及びラット小腸より脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドとして、NPY 及び PYY をそれぞれ同定した。NPY や PYY は中枢性の摂食調節ペプチドとして作用し、生体のエネルギー代謝調節に關与することが知られている。さらに NPY は脂肪細胞に作用して、アディポサイトカインの一種であるレプチンの分泌を制御し、カテコラミンによる脂肪分解を抑制することが報告されている。一方、PYY については NPY(3-36)が末梢投与により摂食抑制に働くことが知られているが、脂肪細胞に対する作用は不明である。

各分化段階の 3T3-L1 細胞における NPY 及び PYY の受容体である Y 受容体の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した結果、NPY と PYY にほぼ同等の親和性を持つ Y1 受容体と、PYY により強い親和性を持つ Y4 受容体の発現が確認された。また、Y1 受容体は分化誘導前の day0 に、Y4 受容体は分化誘導後の day4 に最も強い発現が認められた。さらにラット脂肪組織における Y 受容体の発現を検討したところ、Y1 及び Y4 受容体の発現が認められた。

本研究では、分化段階の異なる 3T3-L1 細胞を用いてアッセイを行った。これにより、NPY や PYY が脂肪細胞の分化過程において異なる強さの活性を示すことが明らかとなり、その活性の強さは NPY や PYY に対して異なる親和性を持つ Y 受容体の発現パターンと一致していた。特に、Y1 受容体は脂肪細胞に分化する前の前駆脂肪細胞の時期に強い発現が認められ、今回同定した NPY や PYY が脂肪細胞の増殖・分化を制御する可能性が示唆された。今後さらに生理学的な検討や疾患との関連等を進めることにより、脂肪細胞の分化・増殖を制御する新たな治療薬の