

表 8. ヒト高発現血清たんぱく質 222 種類の分類別一覧表

血清同定タンパク質(222種類)

補体系(30)	Blood transport and binding protein(20)	Protease inhibitor(15)	その他(82)
complement component C1q, A chain	afamin	alpha 2 macroglobulin	aggrecan 1 isoform 1 precursor
complement component C1q, B chain	beta-2-glycoprotein 1	alpha-1 antiproteinase, antitrypsin	amyloid beta A4 protein precursor isoform
complement component C1q, C chain	cholesteryl ester transfer protein, plasma	alpha-1-antichymotrypsin	attractin isoform 2
complement component 1, r subcomponent	fc fragment of IgG binding protein	alpha-2 antipainin	beta actin
complement component 1, s subcomponent-like protein	hyaluronan binding protein 2	antithrombin III	beta globin
complement component 1, s subcomponent	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	bikunin	cadherin 1 type 1 preproprotein
complement component 2	insulin-like growth factor 2	complement component 1 inhibitor	carnosinase glutamate carboxypeptidase like protein
complement component 3	insulin-like growth factor binding protein 2	cystatin C	cartilage acidic protein 1
complement component 4A	insulin-like growth factor binding protein 3	heparin cofactor II	cartilage oligomeric matrix protein
complement component 5	insulin-like growth factor binding protein 4	inter-alpha (globulin) inhibitor H1	cathelicidin antimicrobial peptide
complement component 6	insulin-like growth factor binding protein 5	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	CD14 antigen
complement component 7	insulin-like growth factor binding protein 6	inter-alpha (globulin) inhibitor H3	CD163 antigen isoform a
complement component 8, alpha polypeptide	insulin-like growth factor binding protein 7	inter-alpha (globulin) inhibitor H4	CD44 antigen isoform 1 precursor
complement component 8, beta polypeptide	insulin-like growth factor binding protein, alpha	kallistatin precursor	CD5 antigen-like
complement component 8, gamma polypeptide	lactotransferrin	tissue factor pathway inhibitor	CD58
complement component 9	retinol-binding protein 4, plasma		cell adhesion molecule with homology to L1
complement factor H	selenoprotein P precursor	apolipoprotein(8)	chitobiase, di-N-acetyl-
factor H-related protein 1	tetranectin	apolipoprotein A-II	chromosome 20 open reading frame 3
factor H-related protein 2	transthyretin, prealbumin	apolipoprotein B	collectin sub-family member 10
factor H-related protein 3	vitamin D-binding protein	apolipoprotein C-IV	cysteine-rich secretory protein 3
factor H-related protein 4		apolipoprotein D	defensin, alpha 1 preproprotein
factor H-related protein 5	Enzyme(24)	apolipoprotein E	delta globin
complement factor B	a disintegrin-like and metalloprotease (repro	apolipoprotein F	dermcidin precursor
complement factor I	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	apolipoprotein Lp(a)	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix prote
properdin P factor, complement	biotinidase	apolipoprotein M	extracellular link domain containing 1
complement factor D	butyrylcholinesterase		extracellular matrix protein 1
complement component 4 binding protein, alpha	carboxypeptidase N 83 kDa chain	Common circulating blood protein(14)	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor for CD
complement component 4 binding protein, beta	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD	alpha 1B-glycoprotein	fetuin B; fetuin-like protein
complement receptor type 2	carboxypeptidase U(carboxypeptidase B2)	alpha-1-microglobulin	fibroblast activation protein, alpha subunit
complement component c1q receptor	dipeptidylpeptidase IV	alpha-2-glycoprotein, zinc	fibronectin
	dopamine beta-hydroxylase	alpha-2-HS-glycoprotein	ficolin 2 isoform a
血液凝固・線溶・キニン系(20)	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodi	beta-2-microglobulin	ficolin 3 isoform 1
coagulation factor II	fucoosidase	ceruloplasmin	follicle stimulating hormone receptor
coagulation factor V	lecithin-cholesterol acyltransferase	clusterin isoform 1	galectin 3 binding protein; L3 antigen
coagulation factor V II precursor isoform	lysosome precursor	clusterin isoform 2	haptoglobin related protein
coagulation factor IX	mannan-binding lectin serine protease 1	clusterin isoform 3	heparan sulfate proteoglycan 2
coagulation factor X	mannan-binding lectin serine protease 2	hemopexin	HGF activator preproprotein
coagulation factor XI	matrix metalloproteinase 2 preproprotein	orosomucoid 1	hypothetical protein MGC45378
coagulation factor XII	matrix metalloproteinase 3 preproprotein	orosomucoid 2	immunoglobulin J chain
coagulation factor XIII A chain	matrix metalloproteinase 9 preproprotein	peptidoglycan recognition protein L	immunoglobulin superfamily, member 4
coagulation factor XIII B subunit	metalloproteinase inhibitor 1 precursor	vitronectin	interleukin 1 receptor accessory protein is
protein C	pancreatic ribonuclease		intracellular adhesion molecule 2 precursor
protein S	paraoxonase 1	血小板由来(9)	keratin 1
protein Z	plasma glutathione peroxidase 3	glycoprotein V (platelet)	keratin 6A
histidine-rich glycoprotein	prenylcysteine oxidase 1; prenylcysteine ly	glycoprotein VI (platelet)	L1 cell adhesion molecule isoform 1 precu
plasminogen	tryptophan/serine protease	latent transforming growth factor beta bind	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1
plasma kallikrein B		multimerin 1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, sub
kininogen(H+L)		platelet factor 4	lipopolysaccharide-binding-protein precursor
von Willebrand factor		pro-platelet basic protein	L-plastin 1
fibrinogen, alpha chain isoform alpha-E pre		secreted protein, acidic, cysteine-rich (oste	
fibrinogen, beta chain		thrombospondin 1	
fibrinogen, gamma chain		triggering receptor expressed on myeloid ce	
分類参照: Molecular & Cellular Proteomics 1:947-955 2002			
1. グレーのタンパク質は、現在の測定系で再現性よく同定・比較定量できるタンパク質			

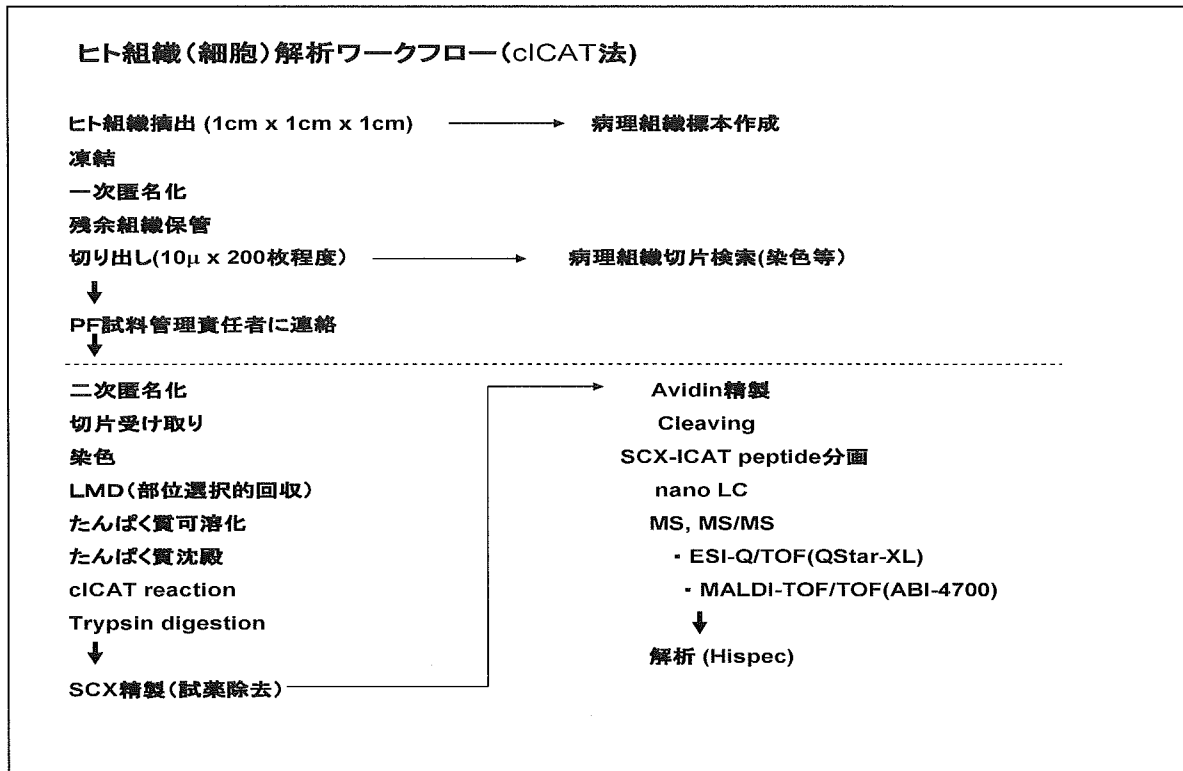


図 2 6 ヒト組織(細胞)解析ワークフロー(cICAT 法)

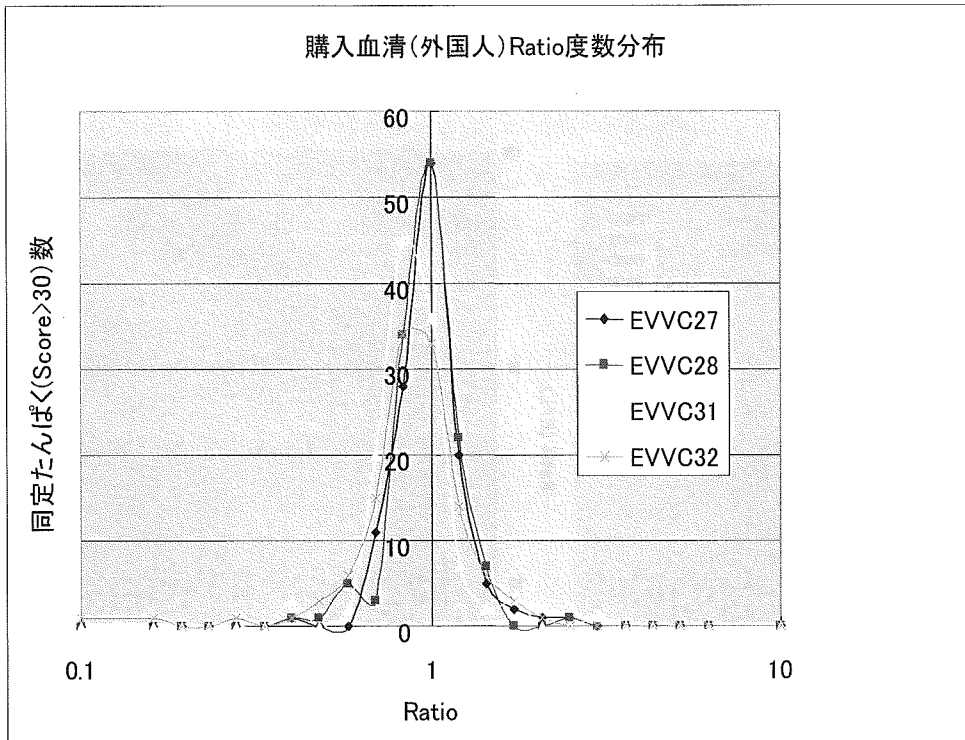


図 20. 外国人個別別血清中の同定たんぱく質数と Raio(H/L)の度数分布

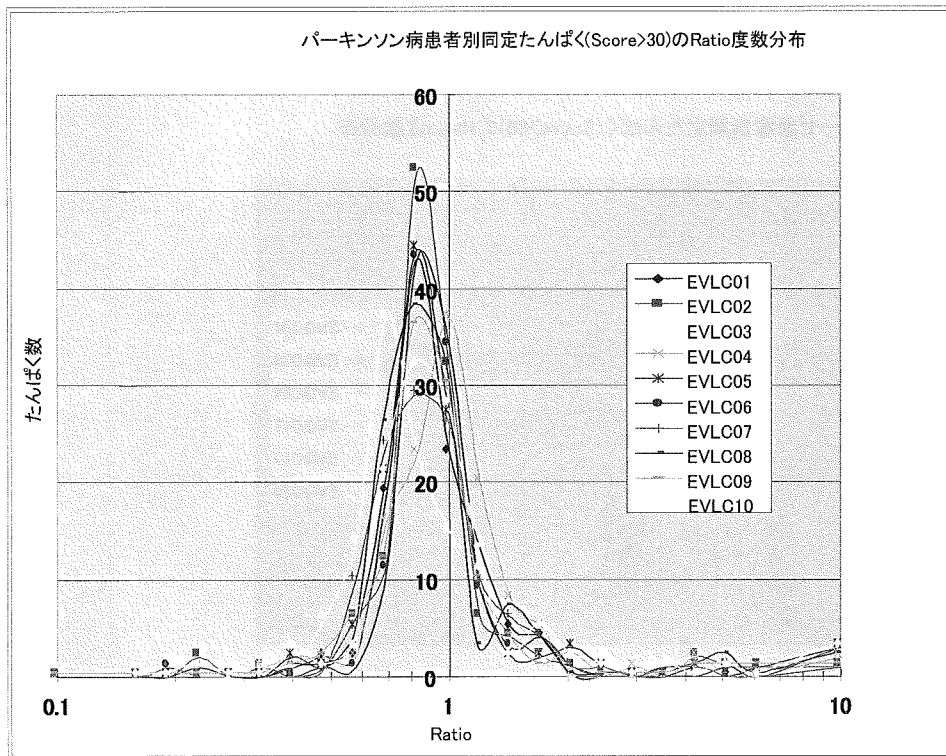


図 21. パーキンソン病患者別同定たんぱく質の Ratio (H/L)度数分布

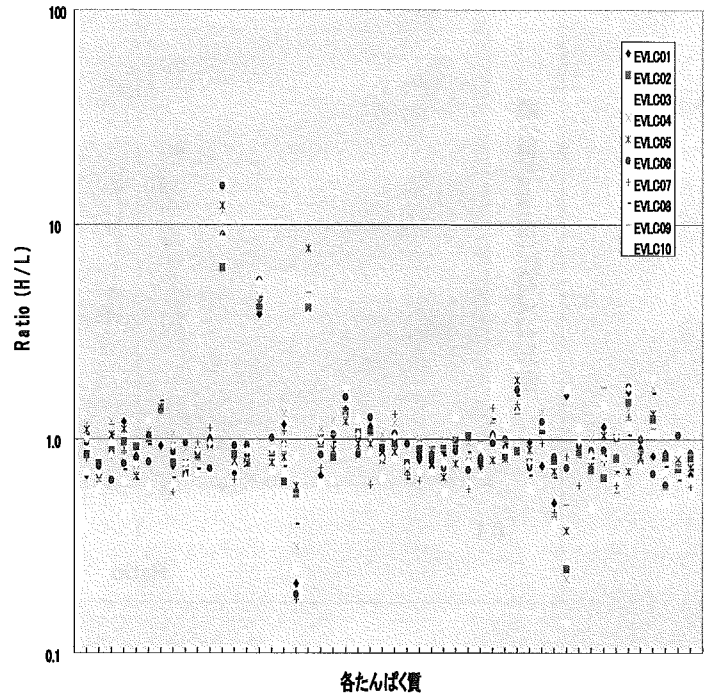
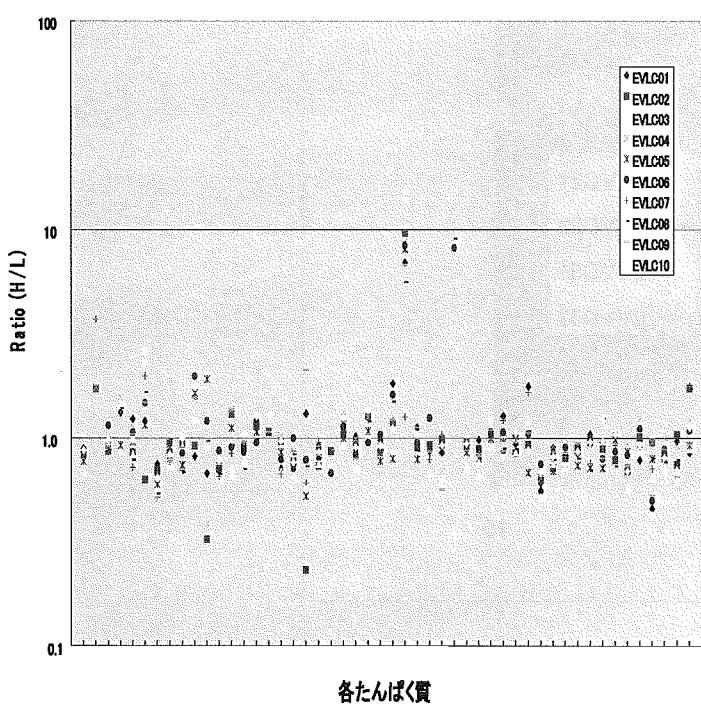


図 2 2. パーキンソン病患者各血清たんぱく質別 Ratio (H/L)分布

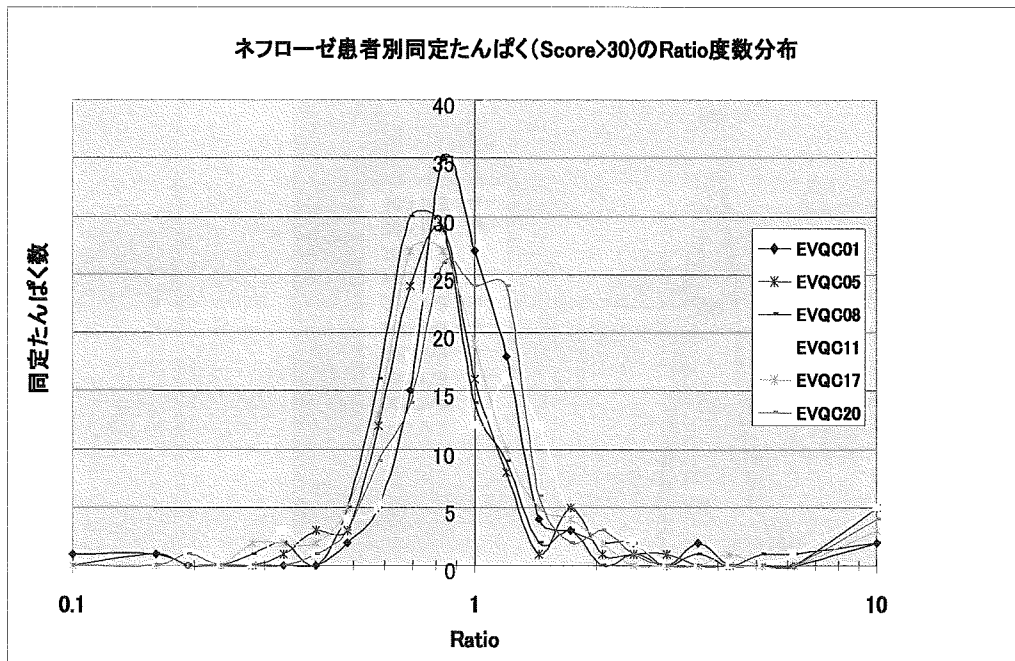


図 2 3. ネフローゼ患者別同定たんぱく質の Ratio(H/L)度数分布

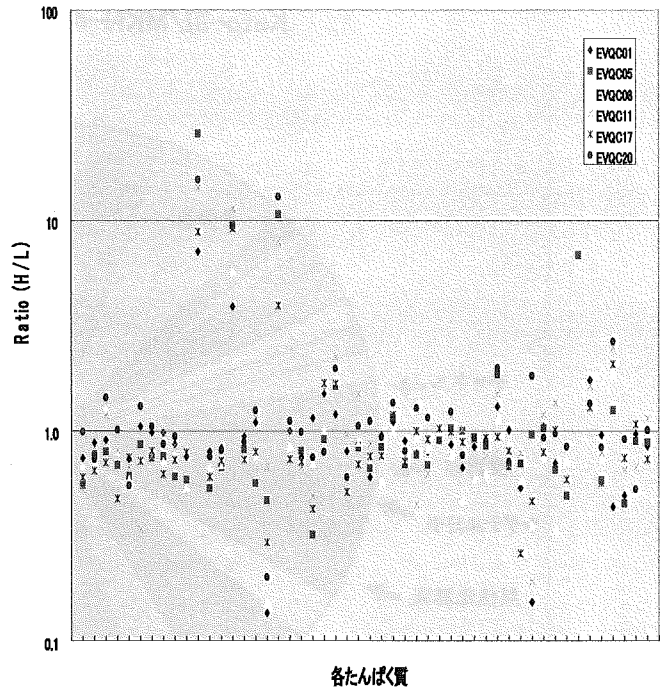
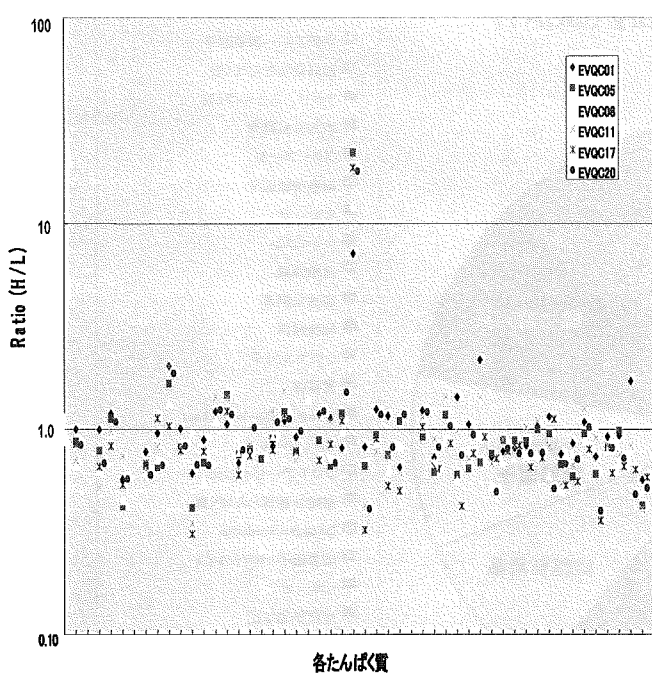


図 2 4. ネフローゼ患者（治療前（発症期））の血清たんぱく質別 Ratio (H/L) 分布

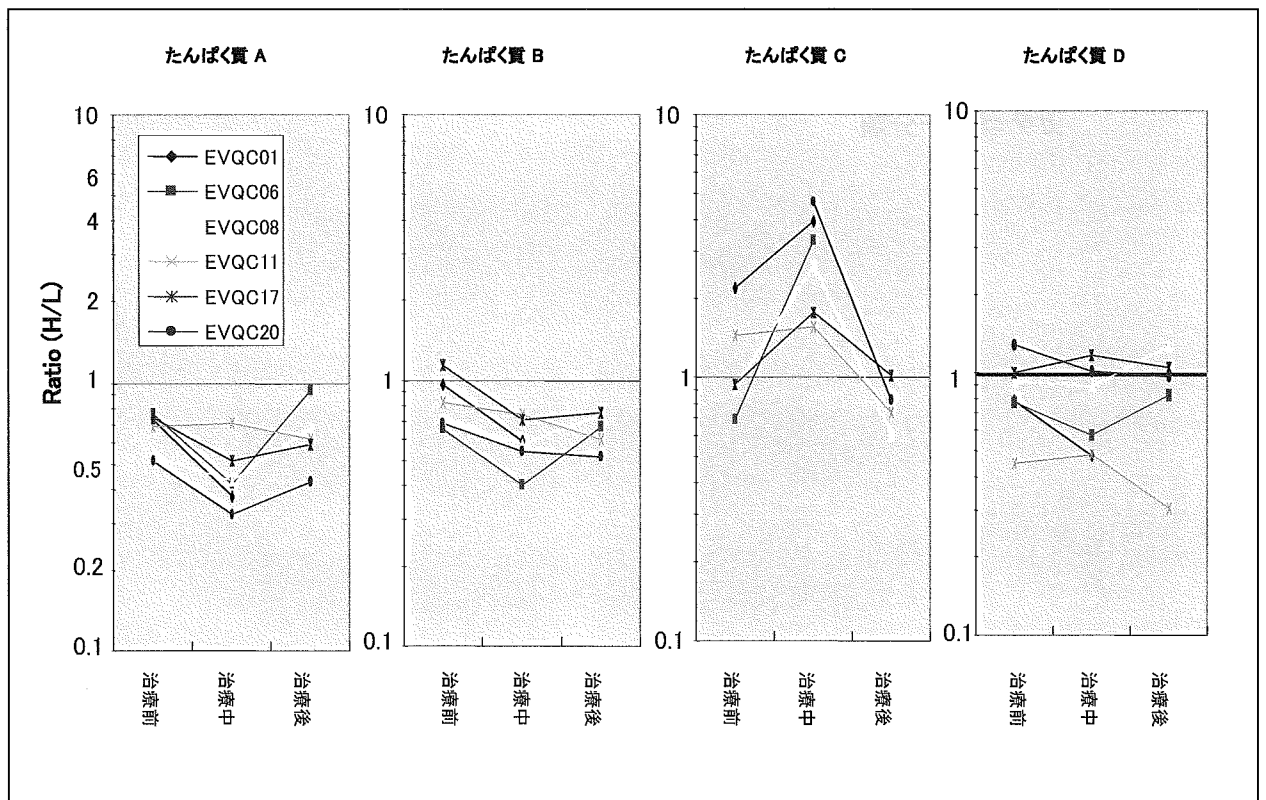


図 2 5 ネフローゼ患者血清たんぱく質の治療前・中・後の経時変化

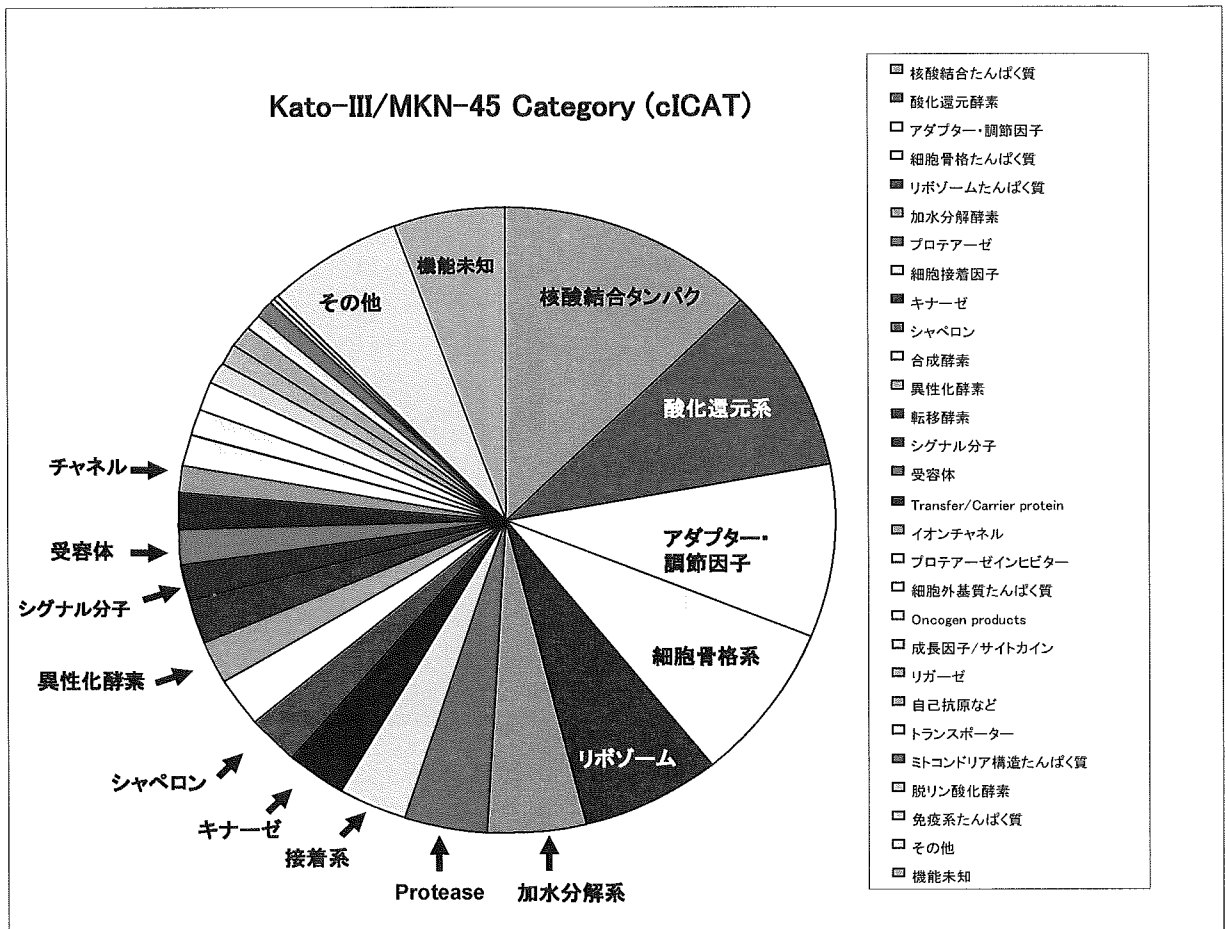
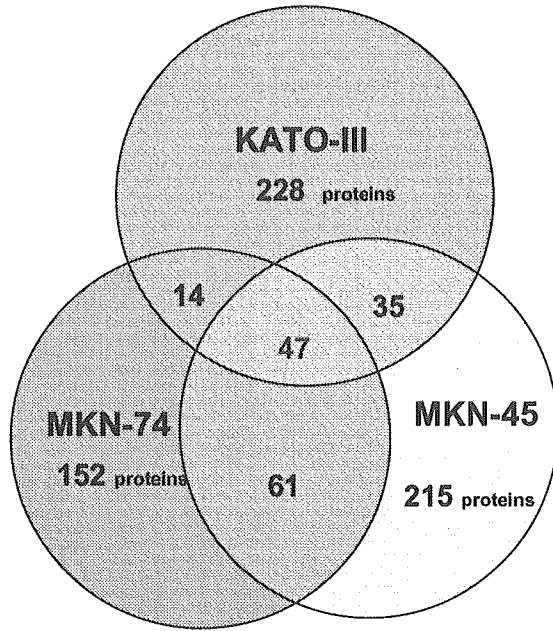


図 2 9. KATO-III と MKN-45 の cICAT 解析で同定したタンパク質(292 種類)の
カテゴリー分類

がん細胞株により発現たんぱく質が大きく異なる。

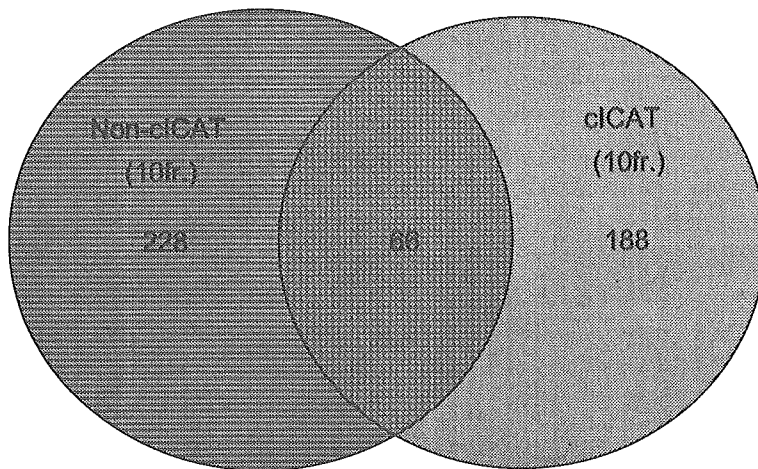


すべてに共通の47種:

heat shock proteins, actin, myosin, keratin 1, villin, nucleolin, nucleophosmin, elongation factors, Zink finger, pyruvate kinases, annexin A2, PKC, solute carrier family 2, prolyl 4-hydroxylase, aspartate aminotransferase, etc

図27. トリプシン断片法(ショットガン法)によるヒト胃癌細胞株(KATO-III, MKN-45, MKN-74)の同定たんぱく質数の比較(ベン図)

SCX10分画での比較



* cIcAT法とショットガン法では同定されるたんぱく質が異なる(本条件下)。

図28 KATO-IIIのcIcAT法とショットガン法により同定されたたんぱく質の種類と数の比較(ベン図)

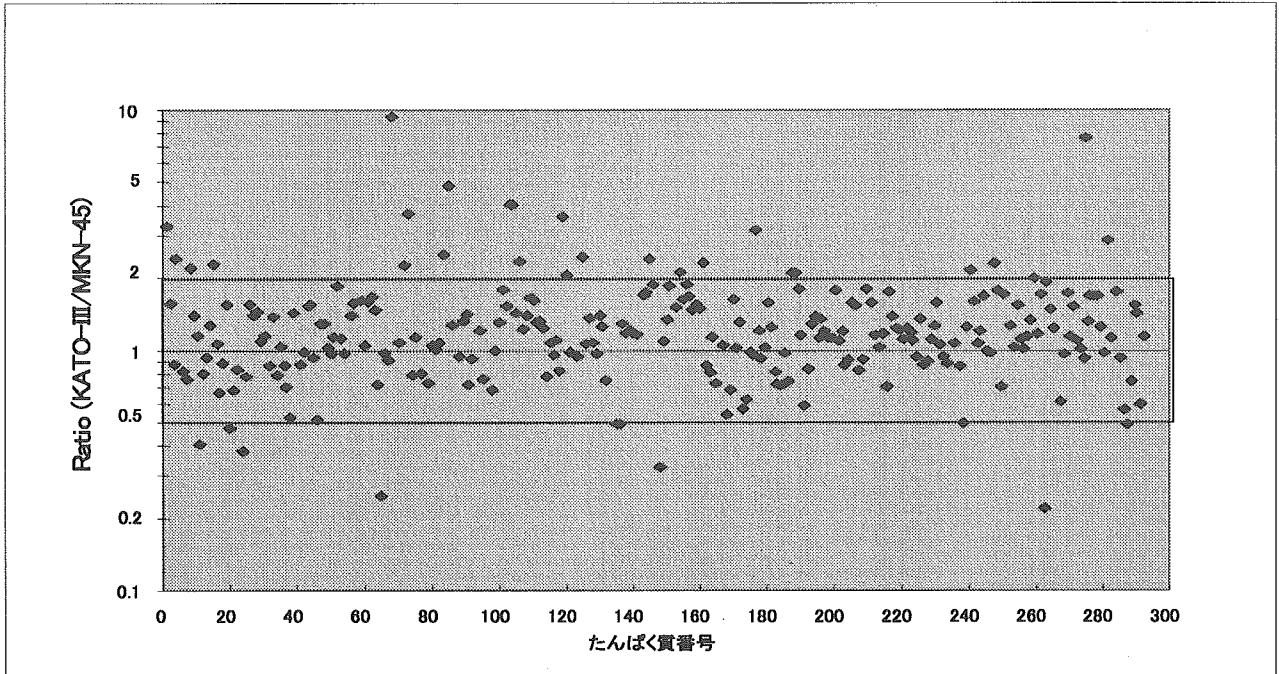


図 3 0 . KATO-III と MKN-45 の同定各たんぱく質の発現比較定量比(KATO-III/MKN-45)

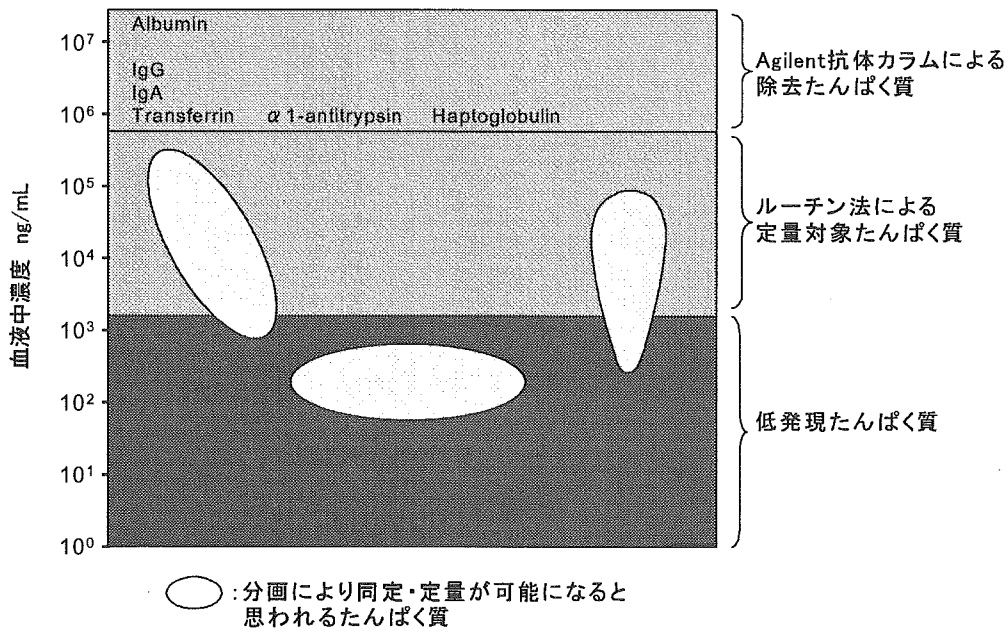


図 3 1 低発現たんぱく質解析の概念図

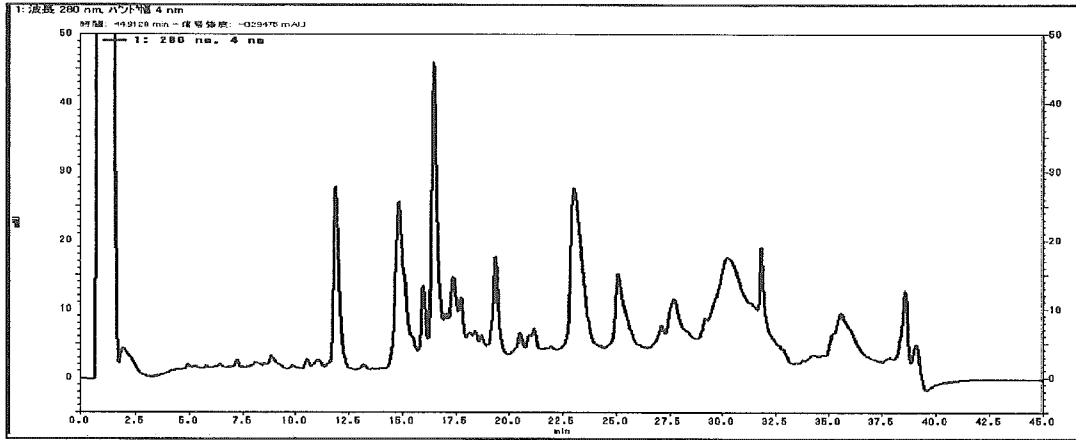
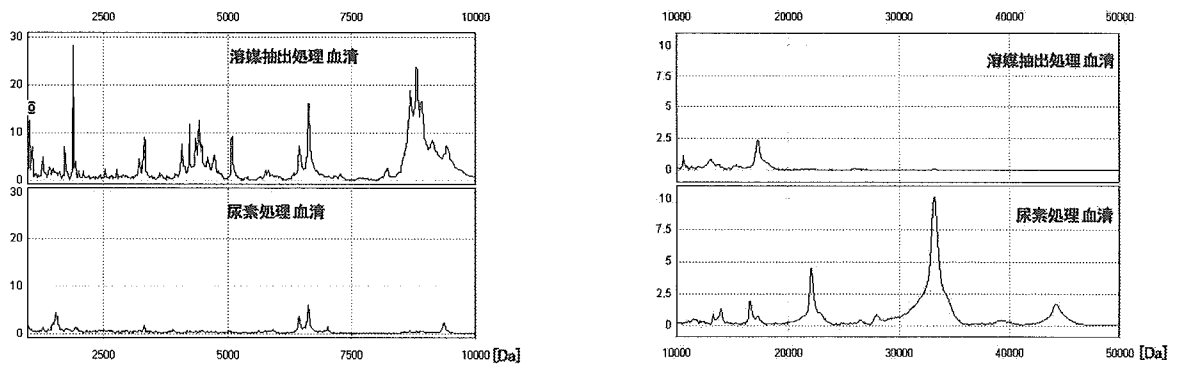


図 3 2. アジレント抗体カラム処理血清の C18 逆相分画クロマトによる分離



低分子領域 (1~10kDa)

高分子領域 (10~50kDa)

図 3 3. 溶媒抽出法および尿素処理法による血清の SELDI-TOF 法による解析

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

高血圧、心循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

分担研究者 友池仁暢 国立循環器病センター病院長

研究要旨

高血圧症、心臓病や脳血管疾患などの循環器系疾患に関連するたんぱく質を解析し新たな医薬品開発シーズとするため、当センターで試料、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した。その中より 10 課題を選択して研究計画を提案し、8 課題については倫理委員会で承認を受けた。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。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。

A. 研究目的

心臓病や脳卒中による年間死亡数は 30 万人に達し、死亡数 1 位のがんに匹敵する。循環器疾患全体での年間患者数は 1000 万人を越え、がん患者の約 8 倍であり、平均入院患者数も 30 万人に達する。また、要介護などの認定者は 400 万人に上るが、その第一原因は脳血管疾患の後遺症で 3 割を占める。これらの事実は、超高齢化社会を迎える我が国において、循環器疾患の制圧が極めて重要な課題であることを如実に示している。

本研究の目的は、血液や組織を対象として循環器疾患に関連するたんぱく質を網羅的に解析、データベース化し、疾患関連たんぱく質を見出すことにより、新たな診断、治療法開発のシーズを発見し、それに基づく医薬品開発を可能とすることである。平成 17 年度は、当センターの実施課題を 10 課題までに増加させ、試料や臨床情報の収集を拡大し、創薬プロテオームファクトリー施設に送付すると共に、返却されたデータに基づき研究を更に発展させることを目標とする。また、個人情報保護法、臨床研究指針に従って研究の実施や情報の管理ができるマニュアルを作成し、実施する。更に血清以外の試料、特に組織試料に収集に関する課題を申請し、実施に向けた手続きを作成すると共に、試料の採取、保管などのプロトコールについても検討を行う。

B. 研究方法

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、個別にプロトコールを作成する。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地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。

C. 研究結果

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。本研究では遺伝子は取り扱わないが、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も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。

D. 考察

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。

E. 結論

17年度末までに、循環器疾患領域で妥当と考えられる10種の疾患や病態について、疾患関連たんぱく質探索研究を開始する。研究実施に必要な倫理的、科学的な基盤は確立でき、試料や情報の採取、処理、

保管、保護などについては、法令、指針や倫理委員会の結論や指示に従った手順を作成し、実際に運用、実施に移した。より正確かつ高度な情報が得られるよう、更に改訂を加える予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

疾患関連たんぱく質解析研究の一環としての
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

分担研究者 寒川賢治 国立循環器病センター研究所 副所長

研究要旨

近年、心筋梗塞などの循環器疾患の発症リスクとしてのメタボリックシンドロームが注目されており、その発症基盤としての肥満及び脂肪細胞の機能解明が重要な課題となっている。従来、脂肪細胞は単なるエネルギー貯蔵臓器と見なされてきたが、最近では、様々な生理活性物質（アディポサイトカイン）を分泌する内分泌臓器として生体のエネルギー代謝調節に関与していることが明らかにされつつある。一方、脂肪細胞の機能制御に関わる生理活性ペプチドが存在すると考えられるが、これまで同定されていなかった。本研究では、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・同定した。さらに、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。

A. 研究目的

近年、糖尿病、高血圧、高脂血症などのリスクファクターが単一個体に重複して発症すると、動脈硬化性疾患の発症頻度がきわめて高率になることが明らかとされ、これらの病態を一元的に捉える疾患概念としてメタボリックシンドロームが注目されている。メタボリックシンドロームの発症基盤として肥満及び脂肪細胞機能が重要であり、脂肪細胞が様々な生理活性物質（アディポサイトカイン）を分泌する内分泌臓器として生体のエネルギー代謝調節に関与していることが明らかにされつつある。一方、脂肪細胞に作用して種々の機能制御に関わる生理活性ペプチドが存在すると考えられるが、これまで同定されていなかった。

我々はこれまでに、生体のエネルギー代謝調節に関与する新規生理活性ペプチドの探索を行い、オーファン GPCR であった成長ホルモン分泌促進因子受容体の内因性リガンドとしてグレリンの同定に成功し、循環器系やエネルギー代謝調節での役割を解明することにより創薬や臨床応用へむけての基盤研究を行ってきた。また、オーファン GPCR である FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1 の内因性リ

ガンドとしてニューロメジジン U（NMU）をラット小腸抽出物より単離・同定した。NMU の生理機能は発見以来 20 年間不明であったが、受容体の同定によって摂食・エネルギー代謝調節において重要な役割を担うことが明らかとなり、メタボリックシンドロームの発症基盤である肥満の成因に密接に関係していることを示した。さらに、FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1 の第 2 の内因性リガンドとして、ニューロメジジン S（NMS）をラット脳抽出物より発見し、NMS が概日リズムの発振機構や摂食調節において重要な機能を担っていることを明らかにしてきた。

本研究では、疾患関連たんぱく質解析研究の一環として、脂肪細胞の増殖・分化や代謝などの制御に関わる生理活性ペプチドの探索を行い、ブタ脳及びラット小腸組織よりニューロペプチド Y（NPY）及びペプチド YY（PYY）を単離・同定し、生理的機能及び疾患との関わりを考察した。

B. 研究方法

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、プロテインシークエンサーおよびマスマスペクトロメーター (Voyager-DE PRO) を用いた MALDI TOF/MS により解析した。

4) 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。

C. 研究結果

1) NPY の単離・同定

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マ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。

2) PYY の単離・同定

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マ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。

3) Y 受容体の発現解析

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。

D. 考察

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関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。

今回の結果から、本研究で用いた手法が、エネルギー代謝系の調節に関わる生理活性ペプチドの探索において有用であることが確認された。今後、この手法により脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドの探索を進めることにより、メタボリックシンドロームの発症基盤としての肥満および脂肪細胞機能に関与する新たな生理活性因子の同定が期待できる。

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開発が期待できる。

E. 結論

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を培養脂肪細胞系を用いて行い、ブタ脳及びラット小腸抽出物より NPY 及び PYY を単離・同定した。脂肪細胞にはこれらペプチドの受容体も発現しており、NPY や PYY 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が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Ida T, Mori K, Miyazato M, Egi Y, Abe S, Nakahara K, Nishiara M, Kangawa K, Murakami N. Neuromedin S is a novel anorexigenic hormone. *Endocrinology*, 146: 4217-4223, 2005.
- ② Shousha S, Nakahara K, Sato M, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Effect of neuromedin S on feeding regulation in the Japanese quail. *Neurosci Lett*, 391: 87-90, 2006.
- ③ Mondal MS, Date Y, Yamaguchi H, Toshinai K, Tsuruta T, Kangawa K, Nakazato M. Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. *Regul Pept*, 126: 55-59, 2005.
- ④ Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, Nakao K. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology*, 146: 355-364, 2005.

- ⑤ Iwakura H, Hosoda K, Son C, Fujikura J, Tomita T, Noguchi M, Ariyasu H, Takaya K, Masuzaki H, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Itoh H, Toyokuni S, Kangawa K, Nakao K. Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagon promoter-ghrelin transgenic mice. *J Biol Chem*, 280: 15247-15256, 2005.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究協力者

宮澤 崇 (国立循環器病センター研究所)

宮里幹也 (国立循環器病センター研究所)

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

分担研究者 南野直人 国立循環器病センター研究所 部長

研究要旨

高血圧症や心循環器系疾患において発現するたんぱく質を網羅的に解析し、疾患マーカーや創薬標的たんぱく質を発見するためには、高感度、高精度の分離、検出システムを構築し、より多くのタンパク質を再現的に検出することが必要である。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した。実際に脳内ペプチド、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った。血液中のペプチドについても、これらの方法を用いて解析する方法論の開発を進めた。

A. 研究目的

ヒトや各種モデル動物のみならず、イヌをはじめとする多くの動物ゲノム遺伝子配列が決定されるに伴い、生体に実在、機能するたんぱく質のファクトデータベース構築の必要性がより強く認識されるようになった。細胞、組織、体液などのたんぱく質の発現・存在量、立体構造、相互作用、機能などの情報を包括的に収集、利用可能とすることは、生命現象の理解のみならず疾患発症や病態形成に関わるたんぱく質、医薬品や食品をはじめ産業に利用できる有用たんぱく質の発見の上で極めて重要と考えられる。しかし、たんぱく質分子は様々な生命現象の場で多彩な機能を発揮するため極めて多様な性質を示し、対象に存在するたんぱく質総体である「プロテオーム」を解析し存在量を比較する発現プロテオミクスにおいても、未だ普遍的且つ容易な方法論が提出されていない。機能調節に関わる修飾などの詳細構造解析についてはさらに困難な問題が山積している。本研究では循環器疾患を対象として、ヒト組織、血液、細胞などに含まれるたんぱく質を網羅的に解析し、高血圧、心疾患、動脈硬化などに関連するたんぱく質を見出すために必要な解析法

（プロファイリング法）の確立、高感度・高精度化、高効率のたんぱく質同定法や量的評価法、再現性の高く迅速な解析システムの開発研究などを行う。

本年度の研究では、「ショットガン解析法」の分離法としての2次元高速液体クロマトグラフィー(2-dimensional high performance liquid chromatography, 2D-HPLC)を更に至適化して感度上昇を図ると共に、自動化2次元HPLCを使用し再現性や質量測定結果等の検討を行う。血液試料についてペプチド画分の調製、解析を行い、実用への可能性を探ると共に、導入予定である Seldi 質量分析法でも測定し、方法論の開発、分析感度比較などの検討を行う。組織試料などを対象に、抽出から分離、検出に至る各過程の操作を確立し、全体として十分な感度、同定数が得られるか検討を行う。これらを総合し、心臓などの対象試料に適用するプロトコールと分析システムを作成する。

B. 研究方法

1) 分離対象ペプチド: ショットガン解析法においては、たんぱく質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、nano LC 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: micro LC 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。Nano LC 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。

C. 研究結果

2 次元目の逆相 HPLC として nano LC の検討を行った。この方法では検出に一種の質量分析計しか使用できないが、高感度化が図れる。保持時間などの再現性に問題があるとされていたので検討を加えた結果、初回サイクルを除き、グラジエント終了時からのインジェクションまでの時間を一定に保ち、気泡混入を避けることにより、各ペプチドの保持時間もかなり安定することが確認された。保持時間精度が 5 回平均で 1 分以内には収まることが確認できたので、ステップ 2D-HPLC システムの 2 次元目 (カラム: 75 micron x 150 mm, 流速: 300 nl/min, 60 分直線濃度勾配溶出) に使用した。溶出液はマトリックスと混合後、20 秒ごとにプレートにスポットした。分子量 3000 以下の脳ペプチドを対象とした結果では、数 μg のペプチドの使用により 1 回の逆相 HPLC で 30 程度のペプチド構造解析が可能であることが分かった。心臓のペプチド画分で同様の実験を行った結果、脳よりペプチド含量が少ないために同定率は高くないが、ANP の断片ペプチド等を同定できた (ANP は分子量が大きく、分析対象に入っていない)。

たんぱく質解析例として、ラット脳よりペプチド画分調製時に残されたたんぱく質画分を還元アルキル化後トリプシン消化し、脳ペプチドに相当する重量を直接逆相 nano LC で分離、解析した。Maldi 質量分析により同定されたペプチド数は平均して脳ペプチドをかなり上回った。これは、同定ペプチドが主要なたんぱく質に由来すること、C 末端が R ある

いはKに限定されるためソフトウェア検索での同定率が高いためと考えられる。非特異的に切断されている組織内ペプチドに比して、たんぱく質のトリプシンペプチドは高い効率で構造解析データできることが明らかとなった。一方、トリプシン消化により親水性小ペプチドも多数発生するが、従来のトラップカラム、分離用カラムに吸着されない可能性がある。異なるカラムを検討しているが、より多くのペプチドを検出系に導入するため、両カラムの選択を進める必要がある。

自動リニア 2D-HPLC については、使用前調整に時間が掛かるため、現状ではステップ 2D-HPLC と同様の 6-10 段階でしか 1 次元目の分離ができていない。この範囲内で脳ペプチドを用いて検討を行ったが、再現性にかんがりの変動があることが分かり、一つは 1 次元 LC の長い linear gradient の溶出においてポンプ送液精度が大きく影響すること、スポット部でプレート固定装置に微妙なブレがあることなど分かり、制作会社と改良に努めている。

血液試料からのペプチド抽出については数社の逆相系固相抽出カートリッジを使用した。有機物の回収率などにはかなりの違いがあるが、希釈し弱酸性化した血漿試料からのペプチド回収についてはかなり安定した結果が得られた。ゲル濾過後のペプチド画分量について血液 1 mL と組織 1 g を比較すると、分子量 3000 以下のペプチドの回収量は血漿試料の方が 1/10 以下と少なく、検出されるペプチドのほとんどが補体、特に C3f に由来するものが多いという結果となった。また、血漿分離までの時間、凍結-融解などによりペプチド量は明確に増加し、補体系以外に凝固線溶系たんぱく質に由来するペプチドも観測されるようになった。このため、血漿試料はペプチド分析を主体とする疾患マーカー探索に有望と考えられるが、採血や血漿の保存、ペプチド回収法の検討が必要であり、これら問題の解決の可否が大きなポイントと考えられた。本年度 Seldi 質量分析計を導入したが、導入

時期が遅れたため血液試料の処理方法について有効な解析、比較が行えていない。来年度は両者を並用して処理方法と血液ペプチドの変動を正確に把握し、方法を確立したい。

組織試料からのたんぱく質抽出については、既存の方法で満足すべき物であることを確認したが、ショットガン解析に導入するまでの処理方法で観測されるペプチド種にかなりの変化があることが分かった。そこで、ICAT法などで採用されているように抽出試料を直接還元アルキル化、トリプシン消化後にペプチド画分を回収、分離する手順を検討した。先ず還元剤を添加せずに抽出操作を行い、得られた上清を還元アルキル化後、希釈、pH確認、調整し、直接トリプシン消化を行った。ペプチド回収は逆相カートリッジとイオン交換ミニカラムで迅速に行い、濃縮凍結乾燥後、一部を逆相HPLCで分離検討した。その結果、還元剤とトリプシンの添加量は組織重量当たり一定量以上が必要であり、量的な減少は回収の低下に繋がることが明らかとなった。リジン残基などのアルキル化副反応は、添加還元剤量との比率をほぼ 1 : 1 に保つことで回避され、逆に増加すると急激に易反応部位への導入率が増加した。途中のたんぱく質の可溶化状態、消化状態などについては、Seldi質量分析計を利用して、さらに検討を進めたい。心臓組織については動物試料での検討結果であるが、今回の方法を分離プロファイリング法とし、部分的改良を加え実試料に適用する予定である。

D. 考察

ペプチドーム解析において開発してきた 2D-HPLC システムを活用することにより、ショットガンプロテオーム解析で効率的に多数のたんぱく質消化ペプチドを同定できることが示された。同じ重量の試料を用いた場合、脳ペプチドに比して脳たんぱく質トリプシン消化物ではより多数のペプチドが同定でき、さらに nano LC の導入により、1/5-1/10 の試料でほぼ同等の解析結果が入手可能と確認された。nano LC 化に伴い 1 次元目から 2 次元目への

移行部分などに改良が必要である。リニア自動2D-HPLCシステムについては、限定的ではあるが問題が見つかり、機器側に更なる改良を進め、省力化と効率化を可能としたい。

血液中のペプチド量は極めて少なく、疾患マーカー探索に非常に有望であることが示されたが、採血処理、保存、濃縮などの操作で二次的に分解ペプチドが生成する可能性があるため、先ず再現性の高いプロトコル作成が不可欠である。組織試料については、心臓組織を対象として抽出、還元アルキル化、酵素消化、ペプチド回収について一通りのプロトコルを完成できた。疾患モデル動物での比較解析を行うと共に、他組織試料への方法の改訂、適用を図りたい。当センターでは心臓組織を対象とする研究計画も倫理委員会で承認されたため、独自のプロテオーム解析課題として実施に移したい。

E. 結論

2D-HPLC がショットガン法プロテオーム解析のプロファイリングに適していることが確認され、2次元目を nano LC とすることにより、更なる高感度化が実施可能であることが分かった。省力化、迅速化した広範な分離に必要な自動化リニア 2D-HPLC は、単回分離には有効であるが再現性の問題が残り、機器の改良も含め検討を続けることにした。血液試料の解析から、血中ペプチド量は極めて少なく、再現的な調製法が確立できれば疾患マーカー探索に有望であることが明らかとなった。循環器系組織試料については、抽出、還元アルキル化、消化、分離、検出に至るプロトコルが作成でき、次年度から実際の解析に着手することとした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

① K. Hamano, T. Katafuchi, K. Kikumoto and N.

Minamino: Calcitonin receptor-stimulating peptide-1 regulates ion transport and growth of renal epithelial cell line LLC-PK₁, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330, 75-80 (2005)

② T. Katafuchi, K. Hamano, K. Kikumoto and N. Minamino: Isolation and characterization of a glycine-extended form of calcitonin receptor-stimulating peptide-1: another biologically active form of calcitonin receptor-stimulating peptide-1, *Peptides*, 26, 2616-2623 (2005)

③ N. Minamino, H. Kuwahara, Y. Kuwahara-Matsui, J. Isoyama- Tanaka, T. Kihara, M. Matsubae, T. Katafuchi, T. Takao, M. Isoyama: Peptidome database and identification of new endogenous/bioactive peptides, "Peptide Science 2004" Ed. Y. Shimohigashi (The Japan Peptide Society, Osaka, 2005) pp. 29-32.

④ 佐々木一樹、南野直人：循環器病学におけるペプチドミクス，分子心血管病，6，599-606 (2005)

2. 学会発表

①南野直人：ペプチドーム・データベースの構築と新規活性ペプチド・GPCRリガンドの探索，第2回GPCR研究会（平成17年5月、東京）

②南野直人：ペプチドーム解析の現状と新規生理活性ペプチドの探索，Clinical Proteomics in Chiba 2005（平成17年11月、千葉）

③佐々木一樹、南野直人：ペプチドーム解析による新規ペプチドの探索，国立遺伝学研究所セミナー（平成18年1月、三島）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者