

佐々木一樹 (国立循環器病センター研究所
薬理部)

桑原 大幹 (国立循環器病センター研究所
薬理部)

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）

分担研究報告書

痴呆等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

分担研究者 高坂 新一 国立精神・神経センター神経研究所 所長

研究要旨

本研究では神経変性疾患（パーキンソン病、若年性痴呆症など）の治療成績向上を行いまたその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、血液、尿サンプル中のたんぱく質のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴あるたんぱく質群を同定し、その臨床的利用を行うことを目標とする。本年度は国立精神・神経センター武蔵病院からの臨床検体の供給体制を確立し、試料のプロテオームファクトリーへの提供を行い、パーキンソン病における第一次解析結果を得た。また、神経変性疾患研究の困難さを克服するためパーキンソン病モデル動物を開発しその解析を進めた。

A. 研究目的

本研究では、神経変性疾患（パーキンソン病、若年性痴呆症など）の治療成績向上を図り、またその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、当該疾患に特異的な、あるいは特徴あるたんぱく質群の同定とその臨床的活用をめざす。神経変性疾患ではたんぱく質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられているが、その成立には免疫機序の関与も認められ、また自律神経症状などを認めることも多い。さらに、生活習慣がその発症に影響を与えることは近年の疫学的調査から明らかになってきており、血液、尿などの解析から予防・診断に関して新たな知見が得られるとの期待が高まっている。また、種々の薬剤が神経変性疾患の治療に用いられているが、脳内への効果的な輸送には血中動態並びにその代謝の分子実体の解明が不可避である。したがって本研究のアプローチは薬物治療の向上にも多大に貢献する。本年度はパーキンソン病 10 例、パーキンソン症候群 2 例の臨床検体の確保と情報のまとめを行い、プロテオームファクトリーへ提供した。

また脳という組織の特殊性から、研究成果の獲得にはモデル動物の開発と利用が神経変性疾患研究には必須であることから、新規パーキンソン病モデルマウス（I93M UCH-L1 発現マウス）を自家開発しその解析を行うなど周辺分野の基盤整備も行った。

B. 研究方法

（1）神経変性疾患（パーキンソン病等）の研究試料の確保

新規試料については、パーキンソン病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。

C. 研究結果

(1) 研究試料の確保に関する研究

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

(2) パーキンソン病モデルを用いた研究

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

造を解析したところ、I93MUCH-L1 変異体、野生型 UCH-L1、さらに、パーキンソン病発症に防護的である S18Y 型 UCH-L1 が病態に相關した構造を呈することが明らかにした。

D. 考察

パーキンソン病など神経変性疾患については近年の分子遺伝学的解析から家族性疾患を中心にいくつもの病因遺伝子が同定された。数多くの孤発性については病因の特定はいまだなされていないが家族性の成果を発展させることで、対症療法の高度化だけでなく根本的治療法開発も展望できるとの期待が高まっている。成因に関しては国内外における研究から、たんぱく質の構造変化、凝集、蓄積と神経細胞死・神経変性との関連が示されており conformation 病の概念確立とともに、アポトーシスに加えて神経細胞機能不全も神経変性の主因として位置づけられるようになってきた。さらに、近年では免疫学的機序の関与に注目が集まっており、喫煙者にパーキンソン病発症者が少ないという疫学的調査が明らかにされるなど生活習慣との関連でも注目を集めている。

我々はこれらの近年の知見を参考に、血液、尿などの末梢サンプルにおいても新たな知見が生み出される可能性が高いと考え、神経変性疾患患者、特にパーキンソン病における血液、尿中たんぱく質の網羅的解析を行うことにした。今年度はパーキンソン病患者とパーキンソン症候群、及び、プロテオームファクトリーが保存する正常対照者とを比較検討するための試料を供給し、ファクトリーにおいて第一次解析結果を得る段階まで進展した。今後は、更なる検体での解析の続行による疾患特異的たんぱく質の同定を図るとともに、より中枢神経の病態を反映している髄液サンプル活用の戦略を考慮する。

すでに独自に作成した I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスが既存のパーキンソン病モデル動物に比べ優れた点を多く有している新規モデルであることを見出したが、特にその初期変

化としてユビキチン系とリソソーム系の運動による UCH-L1 の不溶性沈殿を見出している。今年度はさらにパーキンソン病発症に防護的である S18Y 型 UCH-L1 が病態の相関することを見いだした。本成果の意義は大きく、根本的治療に向けて新たな治療標的が見出される可能性が高まった。

E. 結論

当センターから供給した患者検体を用いたプロテオーム解析により、パーキンソン病において変動するたんぱく質の第一次候補が得られた。さらに供給数を増加させるとともに、髄液を用いた戦略を考慮する。また、パーキンソン病モデルマウス I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスの病態解析を行った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

<高坂新一>

Kamitori, K., Tanaka, M. Okuno-Hirasawa, T., and Kohsaka, S.: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. B.B.R.C. 330 (2005) 446-453

Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S. and Kohsaka, S.: Visualization of microglia in living tissues by using Iba1-EGFP transgenic mice. J. Neurosci. Res. 81 (2005) 357-362

Yogosawa, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K I., Miyoshi, H., Kohsaka, S. and Akazawa, C.: Ubiquitylation and Degradation of Serum-inducible Kinase by hVPS18, a RING-H2 Type Ubiquitin Ligase. J. Biol. Chem. 280 (2005) 41619-41627

<和田圭司>

Wang, Y.L., Liu, W., Wada, E., Murata, M., Wada, K. and Kanazawa, I.: Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA.

Neurosci. Res. 55 (2005) 241-249

Naito S, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Ikeda S, Adachi T, Shimizu HM, Suzuki J, Fujiwara S, Okada T, Nishikawa K, Aoki, S. and Wada, K.: Characterization of multimetric variants of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in water by small-angle neutron scattering. Biochem. Biophys. Res. Commun. 339 (2006) 717-725

Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Hara, Y., Ohashi, H., Nishimoto, M., Abe, T., Kudo, Y., Sekiguchi, M., Sato, Y, Aoki, S., Noda, M. and Wada, K.: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. J. Cell Sci. 119(Pt1) (2006) 162-171

2. 学会発表

(国際学会)

<後藤雄一>

Mimaki, M., Komaki, H., Kirino, Y., Suzuki, T., and Goto, Y.: The mitochondrial DNA point mutation at the discriminator base of tRNA-Glutamate is necessary to cause benign infantile cytochrome c oxidase deficiency. The 2006 Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Salt Lake City, USA, 10.26-28, 2005

<村田美穂>

Murata, M.: Zonisamide improves motor function in Parkinson's patients: A nation-wide, double-blind, placebo-controlled trial. 16th International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Berlin, Germany, 6.5-9, 2005

(国内学会)

<高坂新一>

平澤孝枝、松村直人、内野茂夫、高坂新一 : NMDA 受容体を介した神経幹細胞増殖制御の解析. 第 20 回神経組織の成長・再生・移植研究会 学術集会、大阪、5.28, 2005

内野茂夫、堤も絵、平澤孝枝、伊藤雅之、後藤雄一、高坂新一 : マウス中枢神経系における MeCP2 の発現解析. 第 28 回日本神経科学大会、横浜、7.26, 2005

大澤圭子、入野康宏、中村泰子、赤澤智宏、井上

和秀、高坂新一：Involvement of P2X4 receptor in ATP-induced chemotaxis of microglia. 第 48 回日本神経化学学会大会、福岡 9.29, 2005

平澤孝枝、内野茂夫、高坂新一：Iba1-EGFP トランスジェニックマウスを用いた生体内ミクログリアの可視化. 第 10 回グリア研究会、大阪、10.22, 2005

大澤圭子、入野康宏、中村泰子、赤澤智宏、井上和秀、高坂新一：細胞外 ATP 受容体 P2X4 によるミクログリアの遊走能の調節. 第 28 回日本分子生物学会大会、福岡 12.7, 2005

與五沢里美、芝陽子、中山和久、川崎政人、若槻壮市、高坂新一、赤澤智宏：hVPS18 ユビキチンリガーゼによる GGA3-GAT のモノユビキチン化. 第 28 回日本分子生物学会大会、福岡 12.9, 2005

<村田美穂>

村田美穂、平林直次、大槻泰介、久野貞子：パーキンソン病で認める幻覚の分類とその出現背景. 第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、5.25-27, 2005

小川雅文、村田美穂、大矢 寧、尾方克久、鈴木幹也、久野貞子、金澤一郎：オリーブ橋小脳

萎縮症の MRI 橋横走線維変性所見出現時期. 第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、5.25-27, 2005

田川一彦、星野将隆、丸淵茂樹、村田美穂、金澤一郎、Erich Wanker、岡澤 均：Hsp70 発現誘導による変異性ハンチントンの神経細胞死に対する小脳神経細胞の抵抗性. 第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、5.25-27, 2005.

西岡健弥、北見聡章、富山弘幸、村田美穂、今井壽正、服部信孝、水野美那：家族性パーキンソン病における SNCA 領域の遺伝子重複の検討. 第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、5.25-27, 2005

村田美穂：パネルディスカッションー神経内科から核医学への期待ー. 第 45 回核医学会総会、東京、11.11, 2005

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

糖尿病等代謝性疾患に関連する微量たんぱく質
解析技術の確立に関する研究

分担研究者 鏑木 康志 国立国際医療センター・研究所

研究要旨

【目的】わが国の主要な疾患の一つである糖尿病について、患者及び健常者由来の臨床サンプルのたんぱく質の差異を大規模にプロテオーム解析することにより、糖尿病関連たんぱく質のデータベースを構築し、新規創薬ターゲット、バイオマーカーの発見に資することを目的とする。

【方法】糖尿病患者から血清及び尿を採取して、血清は創薬プロテオームファクトリー施設のhybrid MS, MALDI-TOF/TOFにて、尿は本施設の2DE, LC-MSにて、たんぱく質のプロファイルを健常者と比較検討する。糖尿病以外にも閉塞性呼吸器疾患(COPD及び気管支喘息)の患者血清について、創薬プロテオームファクトリー施設にて同様な解析を行う。また、ヒト由来の脂肪細胞、単球から分化させたマクロファージを用いて、インスリン抵抗性や感染防御に関与するたんぱく質をmulti-dimensional LC-MS/MSや2DE, LC-MSにて検索する。

【結果】本施設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した。また、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。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、ヒト脂肪細胞分泌たんぱく質の予備的解析を行った。単球から分化させたマクロファージの発現たんぱく質を2DEにて予備的に解析した。

【考察】糖尿病患者の臨床サンプルを大規模に収集し、疾患及び合併症に関連したたんぱく質のデータベースを作成することは、同定されたたんぱく質の機能解析等による新たな創薬ターゲットの発見、糖尿病の合併症を早期診断するバイオマーカー開発のために有用である。また、呼吸器疾患等の糖尿病以外の疾患においても、同様のアプローチは有用であると考ええる。

A. 研究目的

糖尿病は、ライフスタイルの西洋化に伴ってわが国では戦後急増し、今や国民病ともいえるが、心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患の基礎疾患としても重要である。また、糖尿病性細小血管症を生じて網膜症による失明や腎症による人工透析、糖尿病性壊疽による下肢切断も増加しており、国民健康上大きな問題になっている。糖

尿病の複雑な病態を解明するためには、遺伝子及びたんぱく質の両面からのアプローチが必要であり、前者については候補遺伝子及び網羅的アプローチの両面からの網羅的解析が進んでいるが、後者については培養細胞、実験動物を用いた網羅的解析が端緒に付いたばかりである。

国立国際医療センター、東京女子医大、国立健康・栄養研究所の今年度ま

での共同プロジェクトとして、(1) インスリン作用特異性の原因のプロテオーム解析による網羅的検索、(2) 組織細胞工学的視点でのブタ膵内分泌細胞の分化・増殖・再生に關与する重要なたんぱく質の同定、(3) 糖尿病発症に影響する環境因子の分子機構についての転写因子に焦点を当てた解析、(4) SELDIプロテインチップシステムを用いた血清・尿たんぱく質プロファイリングによる新たな分子マーカーの開発を研究の4つの柱として行われた。しかし、同プロジェクトでは糖尿病患者由来サンプルを用いた大規模な解析は行われなかった。

今回我々は、プロテオームファクトリーを利用した糖尿病患者由来サンプルでの網羅的たんぱく質解析を駆使して、糖尿病の新規治療標的の発見、糖尿病及びその合併症の進行度、予後及び治療効果を判定する診断マーカーの開発等を目指す。また、本施設にて収集可能な糖尿病以外の疾患についても、臨床サンプルの収集及びプロテオーム解析を用いた網羅的な検索にて、疾患固有の治療標的及び診断マーカーの発見を目指す。

B. 研究方法

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たんぱく質プロファイルを健常者の尿たんぱく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、感染防御に關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2D-LC-MS/MS, 2DEを用いて解析する。

C. 研究結果

【臨床サンプルの収集】

・糖尿病

糖尿病患者由来血清の予備検討のために、過去に他の研究計画(ミレニアム・プロジェクト)の際に採取されていた糖尿病患者24人分の血清サンプルを創薬プロテオームファクトリー施設に平成17年3月発送

し、解析結果を待っている。それに加えて、糖尿病診断マーカーの本格的解析に使用する糖尿病患者血清サンプルを本年度28人から収集し、創薬プロテオームファクトリー施設に発送した。

早期糖尿病性腎症の尿たんぱく質プロファイルを本施設内にて解析するために、限外濾過による濃縮及び脱塩の後に、血清で最も多い6種類のたんぱく質を除去するマルチプルアフィニティ除去カラムにて処理し、2DEにて予備的解析を行った。患者検体については、微量アルブミン尿のある糖尿病患者及びない糖尿病患者から尿たんぱく質を各10例以上収集しており、健常者コントロールからの尿検体の収集後に2DEにて解析する準備が整った。

・ 糖尿病以外の疾患

気管支喘息及び慢性閉塞性肺疾患の診断マーカー開発を目的として、創薬プロテオームファクトリー施設への血清サンプル受け入れのために同施設の倫理委員会での手続きを行い、検体の収集、提供の体制を確立した。

【2DE, LC-MSを用いたプロテオーム解析】

・ 糖尿病

当センター研究所・代謝疾患研究部にて、臨床サンプルを用いた多次元液体クロマトグラフィーによるたんぱく質の分離、LC-MSを用いたたんぱく質の網羅的同定の予備検討として、ヒト肝細胞由来細胞株HepG2の培養上清に含まれる分泌たんぱく質の解析を行った。培養上清回収時に限外ろ過にて低分子量側（50kDa以下）のタンパク質を回収、前処理として還元・アルキ

ル化法あるいは熱変性といった方法を組み合わせて、得られたペプチドを2-D LC-MS/MSにより解析することによって、400以上のたんぱく質の同定が可能であった。このシステムを臨床サンプルに応用する一環として、消化器疾患での手術の際に採取した腹壁及び内臓（大網）の脂肪組織をコラゲナーゼ処理して単離した遊離脂肪細胞を用いて、腹壁及び内臓脂肪細胞由来の分泌たんぱく質の2DEでのディフュゼンシャル解析の予備検討を行った。

・ 糖尿病以外の疾患

肺組織内で感染防御に関与している組織マクロファージの機能に重要なたんぱく質を網羅的に解析するために、健常者末梢血液から採取した単球をM-CSFあるいはGM-CSFといったヒトサイトカインで分化させ、分化後に発現量の変化するたんぱく質を2DEにて網羅的に解析し、それぞれに特異的に発現したたんぱく質の同定を試みた。このなかの1つのたんぱく質を選び、現在その機能解析を免疫的手法にて進めている。また、ヒト気道上皮における自然免疫系遺伝子のアレル特異的発現比の定量法を開発した。さらに、プロテオーム解析に用いる検出器と測定システムを新たに考案した。現在HS財団TLOを通じた特許出願を目指して審査継続中である。

【SELDI-TOF】

糖尿病患者由来サンプル中の低分子量たんぱく質及びペプチドを解析するために、当センター研究所のSELDI-TOFを用いて、健常人の血清プロファイリングのレファレンス作りを行った上で、糖尿病

教育入院の前後で血糖コントロール改善効果を反映する血清マーカーを検索した。

D. 考察

プロテオームファクトリーのプロジェクトの3年度目として、創薬プロテオームファクトリー施設での糖尿病関連たんぱく質のデータベース構築のための予備検討用の血清サンプルの解析、本格的解析用の血清の収集及び発送が開始された。次年度からは、創薬プロテオームファクトリー施設での予備検討の解析結果によって、特徴的なたんぱく質・プロファイルを示す糖尿病及び合併症の病態を絞り込み、それらの病態を有する患者血清を優先的に収集して創薬プロテオームファクトリー施設にて解析する。尿たんぱく質については創薬プロテオームファクトリー施設での解析が行えないため、本施設内にて今年度確立した方法で前処理した尿たんぱく質を用いて、糖尿病患者及び健常者の尿検体を2DEにて解析し、アルブミン以外の糖尿病性腎症に特異的な早期診断マーカーを検索する。血清及び尿の低分子量たんぱく質及びペプチドについては、本施設のSELDI-TOFを用いた解析を試みる。

糖尿病以外の疾患については、呼吸器疾患（気管支喘息及び慢性閉塞性肺疾患）患者由来血清の収集を創薬プロテオームファクトリー施設での手続きがようやく完了したため、来年度初めから最初に少数の予備検討用血清サンプルを創薬プロテオームファクトリー施設に発送して解析する。また、今年度から開始した

組織マクロファージのプロテオーム解析については、M-CSFあるいはGM-CSFでの分化後に発現量の変化するたんぱく質・プロファイルを用いて、これらに結核菌やHIVに感染した際の発現パターンの変化から、感染防御に関与するたんぱく質を網羅的に解析していく。また、今年度考案したプロテオーム解析検出器・測定システムを改良する。

*in vivo*でのインスリンの主要な標的臓器の中で比較的採取が容易な脂肪組織について、今年度までに本施設にて確立された2D LC-MS/MSによる網羅的タンパク質同定の系を用いて、インスリン抵抗性に関与する内臓脂肪由来の分泌たんぱく質を検索する。

E. 結論

ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を疾患の診断及び治療にいかにかかすかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者：740万人、潜在的には推計1620万人と患者数が多い上にさらに増加傾向にあること、患者の90%以上を占める2型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。このため、本プロジェクトにて糖尿病患者由来サンプルを大規模に収集し、たんぱく質の網羅的同定を行い、たんぱく質プロファイルと様々な臨床情報との関連性についてバイオインフォマティクス技術を用いて多変量解析することによって、遺伝子素因、環境因子、合併症等の影響が加味された上での病態に合わせた新しい治療法の開発、病態や病期を診断

可能な新規のバイオマーカー開発によって、糖尿病の診療に貢献することが期待される。また、呼吸器疾患等の糖尿病以外の疾患においても、同様のアプローチは有用であると考えられる。

F. 健康危険情報
該当事項なし

G. 研究発表

論文：

Yamashita R, Fujiwara Y, Yuan X, Yasuda K, Kaburagi Y. 2D-LC-MS/MS Analysis of secreted proteins from HepG2 cells. *J Electrophoresis* (2005) 1: 1-4.

Yamashita R, Yazuda K, Kaburagi Y. Proteomic analysis of proteins secreted from hepatocytes. *J Mass Spectrom Soc Jpn* (2005) 3: 164-168.

Yamashita R, Saito Y, Satoh S, Aoki K, Kaburagi Y, Sekihara H. Effects of dehydroepiandrosterone on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma cell line, HepG2. *Endocrine J.* (2005) 52: 727-733.

学会発表：

山下亮、泉和生、野田光彦、安田和基、
鏑木康志：遊離脂肪酸を長時間刺激したINS-1細胞のプロテオーム解析、第48回日本糖尿病学会学術総会、2005年5月、神戸

山下亮、安田和基、鏑木康志：Secretome of human hepatocyte and mouse muscle cell. 第三回日本ヒトプロテオーム学会、2005年8月、横浜

山下亮、泉和生、野田光彦、安田和基、鏑木康志：遊離脂肪酸を長時間刺激したINS-1細胞のプロテオーム解析、第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡

鏑木康志、浜田圭子、荒井恵実、山下亮：IRS高発現CHO細胞の核抽出液でのプロテオーム解析、第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡

Matsushita I, Hijikata M, Terakawa T, Ito H, Morita T, Keicho N. Haplotype-specific over-expression of the beta defensin-1 gene in human bronchial epithelium. *American Thoracic Society International conference 2005*

松下育美、土方美奈子、寺川貴裕、伊藤秀幸、森田敬知、慶長直人：ヒト気道上皮における感染防御に関わる自然免疫系遺伝子の発現機構の検討、第25回気道分泌研究会

松下育美、土方美奈子、寺川貴裕、伊藤秀幸、森田敬知、慶長直人：ヒト気道上皮における自然免疫系遺伝子のアルレル特異的発現比の定量、第25回RMCB研究会

総説：

寺川貴裕、慶長直人：サルコイドーシス—プロテオミクス・アプローチ—、*THE LUNG perspectives* Vol.13 No.4 2005年10月号

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

小児免疫・アレルギー疾患関連因子の探索ならびに微量タンパク質解析技術の確立
分担研究者 秦 順一 国立成育医療センター 総長

研究要旨 小児の免疫・アレルギー疾患の中で腎炎・ネフローゼ症候群について疾患特異的な指標となる体液性因子の解析について血清を用いた解析方法および患者について検討を行った。

A. 研究目的

小児の免疫・アレルギー疾患は近年患者の増加がみられ、その病因・病態の解明および治療法の開発は成育医療において重要な課題の一つである。このような疾患の病態の解明・治療法の開発において、網羅的に疾患関連因子・薬物標的因子の探索が可能なプロテオーム解析は、トランスクリプトーム解析とともに有用である。つまり、これらの疾患においては、原因遺伝子だけではなくその遺伝子により作られるたんぱく質の動態や他の生体分子との相互作用、さらにはこれに関連する細胞全体の機能情報ネットワークを詳細に解析し、個体の遺伝的特徴（ゲノム情報）を付加して系統的に整理していくことにより、疾患の解明治療法の開発が可能となるものと考えられる。喘息やネフローゼ等の疾患は、ステロイド剤や免疫抑制剤が有効であることより、原因となる疾患関連分子が血清中あるいは尿中に存在することが示唆されてきている。本研究では、疾患関連新規病態分子を同定し病態の解明とともに、免疫・アレルギー疾患の新たな治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

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

（倫理面への配慮）

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

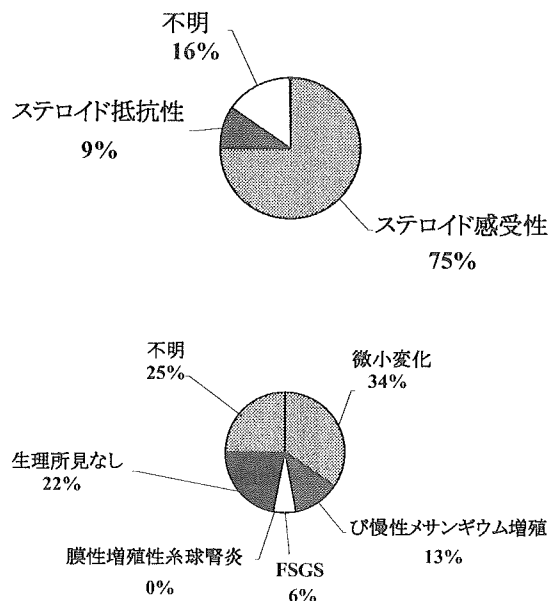
C. 研究成果

本年度は、小児腎疾患の患者より血清を採取し血清中のプロテオーム解析を行った。平成17年度成育医療センターにて採取した検体の16年10月から平成17年11月まで採取した検体は以下の通りである。

1. 検体数 42 検体
2. 検体内訳
 - 2-1. 検体内訳

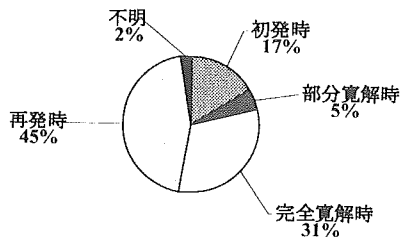
ネフローゼ症候群	32
FSGS（巣状分節性糸球体硬化症）腎移植後	7
IgA 腎症	2
その他	1
計	42

2-2. ネフローゼ症候群における組織型等内訳



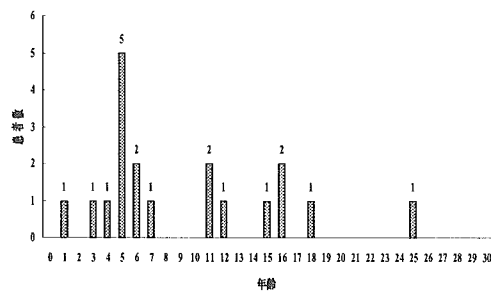
2-3 検体提供時病期

初発時	7
部分寛解時	2
完全寛解時	13
再発時	19
不明	1
計	42(検体)

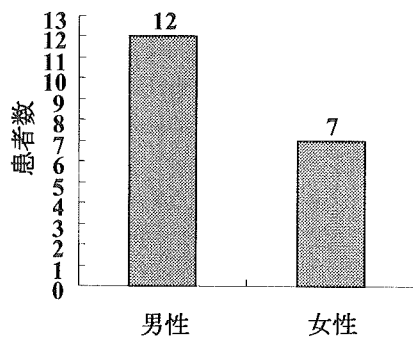


3-1. 検体提供患者数 21名 (内2名臨床情報未受理)

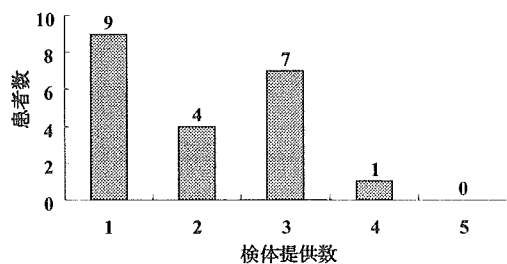
3-2. 初回検体提供時年齢



3-3. 性別



3-4. 検体提供数



血清中のプロテオームについては、現在解析中である。

D. 考察

小児腎疾患の中でも特にネフローゼ症候群に関連する因子の探索同定を行うためにネフローゼ症候群の様々な病態下における血清を採取した。現在、コントロール血清との比較、病態間における比較を行い疾患特異的、病態特異的因子のプロテオーム解析を行い、さらに疾患や病態との関連性について解析を行う必要があると考えられる。

E. 結論

小児の腎疾患の病態解明・薬物標的因子の探索において患者由来の血清のプロテオーム解析は非常に有望と考えられる。しかしながら、解析結果のデータベースを作製し、疾患関連因子の探索を行うには、それぞれの症例や病態において少なくとも10例の解析を必要とする。現在、ネフローゼ症候群においては、データベース作製・関連因子の探索が可能となる症例数が集まってきているが、今後さらに症例数を増やす必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得 なし

2) 実用新案登録 なし

3) その他 なし

厚生科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 太田壽城 国立長寿医療センター 病院長
田平 武 国立長寿医療センター 研究所長
研究協力者 徳田治彦 国立長寿医療センター 臨床検査部長
深田正紀 国立長寿医療センター 遺伝子蛋白質解析室長

研究要旨

本年度は、加齢関連疾患のうち痴呆（認知症）および骨粗鬆症患者の血清検体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した。また、アルツハイマー病（AD）のバイオマーカー探索に資するため、尿中たんぱく質・ペプチドの網羅的プロテオーム解析を進め、電気泳動上、尿中たんぱく質を再現性よく濃縮・精製する方法として、硫酸沈殿法を検討した。沈殿画分を 1% Triton X-100, 8M urea で再可溶化することにより SDS-PAGE 上損失無くたんぱく質を回収できることが確認された。ラット脳組織のシナプス画分からシナプスタンパク質 PSD-95、neuroligin 等を免疫沈降し、共沈降するたんぱく質を同定する系を確立した。さらに骨粗鬆症治療薬として用いられるビスフォスフォネート製剤のうち、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た。骨芽細胞においてミノドロネートは骨吸収因子である p44/p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) のリン酸化の抑制を介してプロスタグランジン F_{2α} による血管内皮細胞増殖因子(VEGF)産生を抑制すること、その作用点がプロテインキナーゼCと Raf-1 の間であることを明らかとした。治療効果の解析に資するたんぱく質解析を進める上で、治療薬による細胞レベルでの機能たんぱく質の翻訳後修飾を明らかとすることは、有用なアプローチ法であると考えられた。

A.研究目的

高齢化社会の進行に伴い、加齢関連疾患の急増が知られている。これまでに私共は、痴呆および骨粗鬆症患者の臨床検体について、病院から研究所へのサンプル提供体制を確立し、さらに痴呆・骨粗鬆症・褥瘡の3疾患について、病院から創薬プロテオームファクトリー（PF）へのサンプル提供体制を整備してきた。また、疾患関連たんぱく質およびペプチドの分析態勢を整備し、ADに関連するたんぱく質・ペプチドの網羅的解析技術について検討してきた。

本年度は、認知症・骨粗鬆症患者の血清サンプルのPFへの提供により、PFにおけるプロテオーム解析を開始することとした。また、アルツハイマー病（AD）のバイオマーカーの探索に資すべく、健常者の尿検体を用いて電気泳動上、たんぱく質を再現性よく濃縮・精製する方法を検討することとした。これら網羅的解析に加えて、AD発症に重要な役割を果たしている APP や Aβ などのたんぱく質複合体を脳組織より精製、同定し、そ

れら構成たんぱく質の尿および髄液における変動を検討することとした。一方で、AD発症の最初の標的と考えられているシナプスにおけるたんぱく質の輸送や機能を制御するアシル化修飾（翻訳後脂質修飾の一つ）をうけたたんぱく質に着目し、アシル化たんぱく質の精製、および同定法の条件設定を検討し、アシル化たんぱく質の変動が有用なバイオマーカーの候補となりうるかを検討することとした。さらに骨粗鬆症の発症制御に関する機能たんぱく質解析として、骨芽細胞培養系を用いて、新しいビスフォスフォネート製剤であるミノドロネートのたんぱく質リン酸化に対する作用を明らかとすることとした。

B.研究方法

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 μm 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とに分けることにし、硫安沈殿法を用いた。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安を添加、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。硫安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たんぱく質が変化するか否かを検討した。アシル化修飾をうけたたんぱく質につい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F_{2 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。細胞質分画中の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。

C. 研究結果

認知症および骨粗鬆症患者の血清につき検体採取・保存およびPFへの提供を開始した。今年度は認知症3例、骨粗鬆症14例の提供を行った。

50 mlのヒト尿サンプルから硫安沈殿法により約0.3 gの沈殿物を得た。沈殿画分を1% Triton

X-100, 8 M Urea で再可溶化することによりSDS-PAGE上損失なくたんぱく質を回収できた。この方法を用いて尿の採取日による変動が見られるか否かを検討した結果、SDS-PAGE上、日差変動は見られなかった。さらに、これらたんぱく質の同定を行うため、MALDI-TOF-MSによる解析、および二次元電気泳動による解析を継続中である。硫安沈殿における上清は、疎水性クロマトグラフィーを用いて脱塩およびたんぱく質、ペプチドの濃縮を行った。

ラット脳組織のシナプス画分から代表的なシナプスタンパク質PSD-95、Neuroiginなどをラット脳組織より免疫沈降し、共沈降するたんぱく質を正確に同定する実験系が確立できた。さらに、加齢に伴うたんぱく質複合体の動態変化をみる系を確立した。今後、AD発症に重要な役割を果たしていると考えられているAPPなどのたんぱく質複合体を精製、同定し、加齢に伴う変化を検討していくこととした。

マウス骨芽細胞様MC3T3-E1細胞において、ミノドロネートは用量依存性（3~100 μM ）にプロスタグランジンF_{2 α} により惹起されるVEGF産生を抑制した。プロスタグランジンF_{2 α} によるRaf-1、MEK1/2およびp44/p42 MAPKのリン酸化は、ミノドロネートにより抑制された。一方、ミノドロネートはプロテインキナーゼCの活性化物質であるTPAによるVEGF産生およびRaf-1、MEK1/2、p44/p42 MAPKのリン酸化を抑制した。

D. 考察

認知症および骨粗鬆症について、PFへの臨床試料提供が開始された。これらの疾患はいずれも高齢者医療においてその対策が急務となっているものであり、疾患関連たんぱく質の解析が待たれる。今後、特に認知症の検体採取を重点的に行うこととした。

尿は非侵襲的に採取可能な試料として非常に優れているが、通常、尿中のたんぱく質、ペプチドは少なく、解析にあたっては、濃縮が必要となる。過去に報告されている尿のプロテオーム解析においては、その濃縮法として透析後に凍結乾燥するものや、限外濾過法を用いたものがあるが、これらの方法では、低分子量の物は失われてしまい、解析ができない。硫安沈殿法は古典的方法ながら、サンプル中のたんぱく質やペプチドの損失が無い。硫安沈殿物の再可溶化については、実験結果から、SDS-PAGEで分析可能なたんぱく質はほぼ全て可溶化されていると考えられる。本法により調製した

同一人由来の尿サンプルで日差変動が SDS-PAGE で認められなかったことから、個人間、さらには健康者と患者間での比較、検討は可能と思われる。

たんぱく質複合体は一見、安定であるように思われがちであるが、今回、加齢に伴いたんぱく質複合体の構成たんぱく質がダイナミックに変動することが明らかになった。今後、AD 発症に関与する APP 等のたんぱく質複合体を同定し加齢変化を検討していくことによりバイオマーカーの候補となりうるたんぱく質を同定できることが期待される。

ビスフォスフォネート製剤は骨粗鬆症の治療薬として用いられている。骨芽細胞において、私共はプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ が三量体型 GTP 結合たんぱく質を介してプロテインキナーゼ C の活性化にいたる経路であるホスホリパーゼ C およびホスホリパーゼ D を活性化すること、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ はプロテインキナーゼ C 依存性に p44/p42 MAPK を活性化し VEGF 産生を促進することを報告している。ミノドロネートがプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ による Raf-1、MEK1/2 および p44/p42 MAPK のリン酸化を抑制したことより、その作用点は Raf-1 の上流と考えられた。さらにミノドロネートは TPA による Raf-1、MEK1/2 および p44/p42 MAPK のリン酸化を抑制したことから、その作用点はプロテインキナーゼ C と Raf-1 の間であると考えられた。ビスフォスフォネート製剤のプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ による VEGF 産生に対する作用については、インカドロネートが増強し、チルドロネートが抑制し、アレンドロネートおよびエチドロネートが影響しないことを報告している。またその作用点はプロテインキナーゼ C と Raf-1 の間であることを報告している。以上から、ビスフォスフォネート製剤の骨芽細胞機能に対する作用に構造の違いによる相違があることが示唆された。細胞レベルでの機能たんぱく質の解析結果は、疾患関連たんぱく質の動態を詳細に解析する際、極めて重要な示唆を与えるものと考えられる。

E. 結論

加齢関連疾患（痴呆・骨粗鬆症）の臨床検体のプロテオームファクトリーへの提供を開始した。ヒト尿サンプルのプロテオーム解析に向けたサンプル調整法として硫安沈殿法を行い、各画分の分析を行った。脳組織よりたんぱく質複合体を正確に同定する方法が確立し、加齢に伴う変化を検討することが可能となった。培養骨芽細胞における骨粗鬆症の発症制御に関する機能たんぱく質解析

では、ミノドロネートは PKC と Raf-1 の間に作用してプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ による VEGF の産生を抑制することが強く示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukata, Y., Brecht, D.S., and Fukata, M. (2006) Protein palmitoylation by DHHC protein family. *The CRC Press: The Dynamic Synapse: Molecular Methods in Ionotropic Receptor Biology*. In press
2. Olsen, O., Moore, K.A., Fukata, M., Kazuta, T., Trinidad, J.C., Kauer, F.W., Streuli, N., Misawa, H., Burlingame, A.L., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. Neurotransmitter release regulated by a MALS / liprin- α presynaptic complex. *J. Cell Biol.* 170:1127-1134 2005.
3. Fukata, Y., Tzingounis, A.V., Trinidad, J.C., Fukata, M., Burlingame, A.L., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. Molecular constituents of neuronal AMPA receptor. *J. Cell Biol.* 169:399-404 2005.
4. Hanai Y, Tokuda H, Takai S, Harada A, Ohta T, Kozawa O. Minodronate suppresses prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induced vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts. *Horm. Metab. Res.* in press.
5. Yoshida M, Kanno Y, Ishisaki A, Tokuda H, Hirade K, Nakajima K, Katagiri Y, Shimizu K and Kozawa O. Methotrexate suppresses inflammatory agonists-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *J. Rheumatol.* 32:787-795, 2005
6. Noda T, Tokuda H, Yoshida M, Yasuda E, Hanai Y, Takai S, Kozawa O. Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in insulin-like growth factor-I-induced alkaline phosphatase activity in osteoblasts. *Horm. Metab. Res.* 37:270-274, 2005.
7. Yoshida M, Tokuda H, Ishisaki A, Kanno Y, Harada A, Shimizu K, Kozawa O. Tiludronate inhibits prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induced vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 236:59-66, 2005.

2. 学会発表

1. 深田正紀、深田優子、Roger A Nicoll, David S

Bredt. Identification of PSD-95
palmitoylating enzymes 日本神経科学学会大
会 (2005年7月、横浜)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H.知的財産権の出願・登録状況

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

疾患関連たんぱく質解析に関する研究

分担研究者 佐古田 三郎 大阪大学大学院 医学系研究科 教授

研究要旨 プロテオーム解析に先立つ倫理的問題を含めた課題はほぼ解決され、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が整った。今後、順次解析していく予定である。

A. 研究目的

難治性疾患として、腫瘍性疾患、肺疾患、運動ニューロン疾患の組織や血清たんぱく質を網羅的に解析し、治療方法の開発、診断マーカー、治療評価マーカーなどを見出すことを最終目的とする。今回は、解析に先立ち、円滑に解析が進むよう組織切片作成について整備し、検体提供に伴う倫理的問題で残されていた課題について解決することおよび臨床データ入力に関する検討を行った。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

組織切片の作成については、担当者を置き、常時再現性のある切片を作成できる体制を確立した。臨床データに関しては、入力を漸次進める体

制が出来上がりつつある。また、検体数についても、解析に十分数を確保するため、プロジェクト以前に採取した検体に関しても、承諾を得るよう努力した。

D. 考察

個人情報保護法を尊重しながら、検体数を確保し、研究を進めていく必要があり、これらの諸問題は、ほぼ解決した。臨床データの入力に関しては、採取後の経過も重要であり、最新のデータを入力し、さらに適宜更新していくことが、重要である。

E. 結論

解析に先立つ倫理的問題、技術的課題は、ほぼ解決した。今後臨床データを入力し、難治性疾患として、腫瘍性疾患（乳癌、消化器癌、リンパ腫）の組織、閉塞性肺疾患、運動ニューロン疾患の血清たんぱく質を網羅的に解析していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立

分担研究者 高尾敏文 大阪大学蛋白質研究所 教授

質量分析法を用いた生体内たんぱく質・ペプチドの構造解析をフェムトモルレベルという微量で精度よく行うための方法論の確立を目指し、質量分析に関連する分析的手法やハードウェアの開発、並びに、データを効率よく、確度よく解析するためのソフトウェアの試作を行った。本年度は、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。

A. 研究目的

たんぱく質の一次構造および翻訳後修飾を微量かつ高感度で解析するには、化学・分析的手法、ならびに、質量分析に関するハード・ソフトウェアの開発研究は必要不可欠である。本研究では、疾患関連たんぱく質の同定を個人から得られる生体試料をもとに行うことを想定して、特に、尿から得られる限られた微量たんぱく質及びペプチドを効率よく分離・抽出するための方法とそれらの構造解析を高感度かつ確度よく行うための質量分析法を確立する目的で行った。

本年度は、上記目的を達成するために、以下の3つの研究内容を実施した。

- ①ペプチドの同定確度の向上を図るために、MS/MS データをもとにデータベース検索を行って得られる結果に対して、MS/MS でのフラグメンテーションの傾向からバリデーションが行なえる方法を考案した。
- ②同定されたペプチド（修飾基も考慮）群を元のたんぱく質群に対して一度にマッピングすることのできるソフトウェア“ProcessMap”を開発し、インターネット上で利用を可能とした。
- ③健常人（10人）、及び、種々の疾患患者（30人）から提供された尿ペプチドのプロファイルを取得、蓄積し、個人毎のデータベースを構築した。また、候補ペプチドに対し、ハイスループットで解析が行なえる免疫沈降/MS 法と

¹⁸O 標識による定量解析法を確立した。

B. 研究方法

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 1 mm の強陽イオン交換担体カラム、内径 75 μm の逆相担体カラムを用いた。

量変動解析は、安定同位体¹⁸Oによる標識を酵素消化により行った後に、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¹⁸O/¹⁶Oの同位体比を計算することにより行った。

C. 研究結果

1) MS/MS スペクトルをもとに行うデータベース検索結果の検証

MALDI-MS/MS スペクトルにおいて観測されるペプチドのフラグメンテーションを蓄積し、配列依

存的に切断を受けやすい、あるいは、切断を受けにくいアミノ酸を調べ、それをもとにMASCOTによる検索から出力される結果（候補アミノ酸配列）の検証を行った。現在、ペプチド結合での切断が3ヶ所以上観測されたスペクトルについて（それ以下のものは有意性がないとした）、以下の3条件は必要条件とした。

①候補アミノ酸配列中にAsp-Pro、あるいは、Glu-Proがあるが、それらのペプチド結合の切断が観測されていない場合はScoreを減ずる。②配列中にAspまたはGluがあり、それらのC端側のペプチド結合の切断が観測されていればScoreにボーナスを加える。③配列中にProがあり、そのN端側で切断が観測されていればScoreにボーナスを加える。これらの条件検証をバッチで行なえるソフトウェア（Peptide-List Extractor）を試作した。

2) 内在性ペプチドの生体内での切断（プロセッシング）部位や修飾を可視化するソフトウェアを開発。

尿や血清中に存在する比較的分子量のペプチドは疾患マーカーとして有用であると同時に生理活性ペプチドを含んでいる可能性もある。それらの網羅的解析で同定される膨大な数のペプチドリストを一度に元のたんぱく質群に対してマッピング、可視化できるソフトウェア

“ProcessMap”を試作り、WEB上で利用できるものとした。

(<http://coco.protein.osaka-u.ac.jp/procmap/>) 入力データとしては、Mascotから出力される結果をペプチドリストとして再編集したテーブルを利用することができる。これを用いることにより、様々なプロセッシングや代謝分解を受けて生成してくる特徴的なペプチドの同定が容易に行えるようになると考えられる。

3) 尿ペプチドプロファイリングとマーカー探索
前年度に引き続き、健常者及び疾患患者の尿ペプチドプロファイルの取得、蓄積し、個人毎のデータベースを構築した。尿はH15年度に確立した方法により処理し、回収されるペプチド画分を2D-LC(イオン交換とnano-LC)により分画し(1344画分)、MALDI-MS/MS→データベース検索

→Peptide-List Extractor（本年度試作、上記参照）により解析し、最終的に得られるペプチドプロファイルを個人毎のデータベースとして蓄積した。また、前年度試作のペプチドプロファイルの可視化と2者間比較が行なえるソフトウェア（“Discover”）を改良し、グルーピングやグループ内及びグループ間比較を可能とした。

さらに、疾患マーカー候補となりうるペプチドに対しては免疫沈降法により操作を大幅に簡略化して症例数を増やして検証していくストラテジーを立てた。その一連の操作、方法を以下のように確立した。

①ポリクローナル抗体（IgG）を作成し、ビーズに固定化（糖鎖を利用した共有結合による）する方法を確立した。

②検出されるペプチドの絶対量を求める方法として、¹⁸O標識されたペプチドを用いて行なう方法を確立した。具体的には尿に別途調製した¹⁸O標識ペプチドをスパイクし、数段階の単離、精製の後、MALDI-MSを測定する。得られたスペクトルは前年度開発のソフトウェア“Isotopica”（特に、質量差の小さい安定同位体を用いた量変動解析に有用）

(<http://coco.protein.osaka-u.ac.jp/isotopica/>)により非標識/標識のピーク強度比を求め、ペプチドの絶対量を算出した。検出されたペプチド量の規格化は、現在のところ、バッチ法で単離されるペプチドの総量を紫外吸収により見積もり、その値に対する相対量として行なった。また、スパイクに用いた内部標準用¹⁸O標識ペプチドの簡便な調製法を考案した。

D. 考察

MS/MS データをもとに行うデータベース検索はルーチン化されているが、スペクトルの再現性、検索結果の信憑性には未だ問題がある。前者は試料の調製法や状態に大きく影響される。後者は、タンデム質量分析計のハードウェアに関する性能とペプチドの性質（フラグメンテーションの起こりやすさ）に左右されるが、フラグメントイオンの質量からデータベースを検索、同定する市販の検索エンジンにも少なからず問題がある。すなわち、フラグメンテーションは質量分析計の機種

ごとに特徴があり、市販の検索エンジンはそれら個々の情報を考慮してスコアリングを行なっていないので、不十分といえる。上記の設定条件は、我々の使用しているMSでは100%適用できることが経験的にわかっていたので、検索結果の検証に有効に利用できた。さらに、これまで蓄積したスペクトルをもとに統計的にフラグメンテーションの傾向を割り出し、上記条件以外で検索結果の検証に有効な条件を見つけ、それらを検索結果の信憑性の向上に利用していく予定である。

尿中に存在する比較的量の多いペプチドについては異なる試料間で再現性よく同じ配列のものが排泄されている。また、それらはたんぱく質の特定の部位に由来している。これらのペプチドの代謝分解（或いは、プロセッシング）と種々の病態や健康状態との関連について調べていきたい。

尿ペプチドプロファイルを健常者と種々の疾患患者について取得し、傾向を調べた。個人間および個人内での変動や疾患による変動等を知るためにはさらに多くの試料についてデータを蓄積する必要がある。1344画分のMSで観測される10,000以上の膨大なMSデータの比較を多検体に対して簡便に行なう目的で、昨年度開発の“Discover”に新たな機能を追加したが、ペプチドプロファイルに特化したデータマイニング用ソフトウェアとしたい。

180 標識法による量変動解析については、標準たんぱく質を用いて方法の適用性を検討した。 160 (非標識)/ 180 (標識)比が1よりも小さい場合は1:30、1よりも大きい場合は10:1程度の量比判定が可能であることがわかった。また、 $^{160}/^{180}$ の量比を精度よく求めるには、観測分子イオン領域において同位体が分離する測定条件を調整することと、分子イオンピークを良好なS/N比で観測することが重要である。この方法を生理的に異なる状態から得られた2つの尿から単離したたんぱく質画分に応用し、有用性を確認した。その際、昨年度開発の“Isotopica”を用いることで正確に量比解析を行なうことができた。

マーカー候補ペプチドに対しては抗体を作成し、免疫沈降/MS法によりスループットを上げ症

例数を増やしていく予定だが、検出限界としては、抗体にもよるが、尿（～40 mL）を用いたスパイク実験から30 fmol程度まで検出可能であったが、さらに高感度化を図るために試料調製において工夫していく予定である。

E. 結論

装置依存的ではあるが、ペプチドのMS/MSにおけるフラグメンテーションの経験的な特徴をデータベース検索結果に反映させ、同定確度を向上させることができた。

尿中に排泄されるペプチドの多くはある一定の断片化を受け、また、もとのたんぱく質のある一定の部位から生成していることが示唆された。

健常者および疾患患者由来の尿ペプチドプロファイルを取得、蓄積し、比較解析を行った。マーカー候補ペプチドに対しては抗体を作成し、免疫沈降/MS法により解析を行っていくが、実際の尿を用いて検出限界を調べた結果、30 fmol程度まで検出できることがわかり、疾患マーカー候補の検証に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Kita K, Okumura N, Takao T, Watanabe M, Matsubara T, Nishimura O, Nagai K.: Evidence for phosphorylation of rat liver glucose-regulated protein 58, GRP58/ERp57/ER-60, induced by fasting and leptin. FEBS Lett. 580, 199-205 (2006).
- ②Okumura N, Hashida-Okumura A., Kita K., Matsubae M., Matsubara T., Takao T., Nagai K.: Proteomic analysis of slow-and fast-twitch skeletal muscles. Proteomics 5, 2896-906 (2005).
- ③ Uchiyama S, Kobayashi S, Takata H, Ishihara T, Hori N, Higashi T, Hayashihara K, Sone T, Higo D, Nirasawa T, Takao T, Matsunaga S, Fukui K.: Proteome analysis of human metaphase chromosomes. J Biol. Chem. 280: 16994-7004 (2005).
- ④Kaida A, Ariumi Y, Baba K, Matsubae M,