

盲点が多数あることに留意する必要がある。データ解析の際には、質量と相対強度の数値のみに依存することになるため、アーチファクトを極力排除し、信頼性のあるデータを取得するうえで最も重要なのが採血直後からの検体の取り扱いである。実際に留意すべき点を列挙する。

1) 血清検体

最も容易に試料を集めやすいのは血清であり、米国から発表される SELDI の論文は大半が血清を対象としている。しかし、膵癌をはじめとする多くの症例では、血液凝固・線溶系に異常をきたしている場合が多い。凝固促進剤を加えた真空採血管で回収された場合でも、凝固しない場合もある。血清は、採血後に凝固まで放置されることが多く、保管状況が不明になっている検体が多い。筆者の検討では、血清中には凝固過程で生じる多量のフィブリノペプチドの断片が放出されている。診断における高感度と特異性をうたっている論文でも、検体の取り扱い法について明確に記載している事例は少なく、施設間で再現性が確保されない要因の一つであると考えられる。

2) 血漿検体

血漿としては、抗凝固剤としてヘパリンやエチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) が一般的だが、目的により使い分ける必要がある。プロテアーゼ阻害薬として採血管で用いられるトラジロールを用いると、これは分子量約 6.5 kDa のペプチドであり、解析にあたって障害となるため、使用は不適當である。血漿は凝固反応が抑制されているはずであるが、実際に健常者の血漿中のペプチドを網羅的に分析してみると、フィブリノペプチドの関連ピークがかなりの頻度で見出される場合もあり、採血ごとにばらつきが生じるのは事実である。よって、分画した試料を解析する場合も、これらのピークの影響を受けにくい状態で測定可能な条件を各実験者が設定する必要がある。膵癌の検体

では、血漿でもフィブリン塊などが生成しているものも少なからずみうけられる。

また血球成分との分離は遠心分離でおこなうが、その温度は一定にしておく必要がある。低温で遠心すると、血小板や白血球より脱顆粒した内容物が血漿中に多量に放出されることにも注意が必要である。

3) その他

血液は体内ではプロテアーゼとインヒビターのバランスが保たれているが、一度体外に取り出されると、凝固系・線溶系の活性化に付随してさまざまなプロテアーゼが活性化されるのは周知である。いったん凍結した後に解凍すると、さらに分解が進行することにも留意する必要がある。

SELDI での分析で低分子量蛋白質をターゲットにする場合、アルブミンなどの蛋白質との非共有結合を抑制するために、尿素などを添加することが多いが、尿素入りの試料を希釈すると、プロテアーゼによっては活性化するものがあり、調製試料を希釈する際にも温度変化などに注意が必要である。

4. スペクトル解釈上の留意点

二次元電気泳動法 (2-DE) で一つのスポットに複数種類の蛋白質が含まれていることはよく知られているが、質量分析においても、分解能が低い場合には、s/n が大きく、裾野をひくピークの下に、ピークが複数隠れてしまっている点にも注意する必要がある。四重極-飛行時間型質量分析計は高分解能のため、また異なる注意が必要となってくる。例えば、生体試料のような複雑な試料を測定する場合、分画したとしても、同一分画内に、1 Da 違いの別種のペプチドが同時に存在することがある。これは同位体分布に注意することで回避しうる。また、前述のように、マルチマーカー解析で重要なものと位置づけられたペプチド断片で、スペクトル上で相対強度が高いピークの場合、

同一分子由来の関連ピークが随伴してスペクトル上に出現する場合があります（例えば、メチオニン残基の酸化に伴う 16 Da シフト、ナトリウム付加に伴う 22 Da シフト）、違うペプチドと誤認しないよう注意が必要である。また、試料を液体状態で長期保存するとアスパラギン、グルタミンの脱アミドが生じることもある。

5. 膵癌の診断への応用

多くの癌で、特定の質量値の組み合わせからなるピークセットがマーカーとして有効であるとして多数の論文で報告されているが、膵癌の領域で実用化するまでには検討すべき多数の事項を抱えている。まず、そのマーカーに臓器特異性があるか否かが問題になる。仮に、切除可能の膵癌の 9 割で陽性になる特定のピークセットが存在するとしても、それが他臓器の癌でも高い頻度で陽性になる場合は、確定診断に要する時間とコストの削減にはなり難い。しかし、膵臓という臓器を強く特徴づけるピークセットならば、例えば、良性の膵管内乳頭腫瘍で陽性になったとしても、膵臓の精査に進めるので臨床的な意義は認められる。慢性膵炎と膵癌を明瞭に識別できるマーカーは遺伝子レベルを含め、これまでに見出されていないことを考えると、SELDI にもとづく解析においても慢性膵炎との鑑別診断には期待できない可能性もある。膵癌組織では炎症性病変が随伴していることを考慮すると、慢性膵炎に限らず、炎症性の膵疾患と、悪性腫瘍をマーカーのみで識別するのは相当な困難が予想される。いずれにせよ、Stage I で見つかる膵癌症例はきわめて少ないため、画像診断の進歩とあわせて治療可能な膵癌症例が増えるようになれば、非常に有意義である。

イオン交換などで分画した試料について、SELDI プロテインチップを四重-極飛行時間型質量分析計で解析する現在のアプローチは、相応の設備を必要とし、再現性を含めた多施設間での大規模研究が、実用化までに必須である。検体採取

に関して現場の理解と協力を得ることは重要であり、採血後の取り扱いについてどの程度の条件まで許容されるのかについて明らかにする作業も重要である。

また、仮に早期診断に有効であることが確立した際にも、血液検体の分画操作が必須である点は今後も不変であると予想される。分画を回避して、目的ペプチド断片のみを検体から検出するためには、よい抗体が必要であり、その抗体を SELDI プロテインチップ上に固定化し、抗体に捕捉されたペプチドを質量分析する手法が望ましい。それによって、従来の免疫学的測定法単独では不可能であった「特定の大きさの分子そのもの」を検出することが可能となる。「一本釣り」の手法で同定されているマーカーについてもその事情は同様であり、従来の腫瘍マーカーと同様に複数のマーカーの同時評価が実施されていくと予想される。今のところは米国 NCI を中心とした Early Detection Research Network¹¹⁾では膵癌に力点が置かれているとは言い難い。

おわりに

膵癌の臨床の現場で、究極的に望まれるのはハイリスク群を絞り込めるマーカーである。癌関連遺伝子に胚細胞性変異を起こしている(リー-フラウメニ癌症候群)家系やポイツ-ジェガーズ症候群の家系は膵癌発症のリスクが高いが、大多数の膵癌症例ではこのような遺伝的素因は不明であり、疫学的な研究による危険因子の同定もなされておらず、一般集団の中からハイリスク群を絞り込めるようになる見通しは現在のところはない。この 1~2 年で、腫瘍マーカー探索の分野は急速に進歩することが予想されるが、多くの問題を克服したうえで SELDI で見出されたピークが膵癌の診療に供されるようになることを期待したい。

謝辞：

本稿の執筆に際し中森正二先生(国立病院機構大阪医

療センター外科) から貴重なコメントを賜った.

文 献

- 1) Argani P, Rosty C, Reiter RE *et al* : Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression : prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **61** : 4320-4324, 2001
- 2) Hustinx SR, Cao D, Maitra A *et al* : Differentially expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas identified through serial analysis of gene expression. *Cancer Biol Ther* **3** (Epub ahead of print) : 2004
- 3) Koopmann J, Buckhaults P, Brown DA *et al* : Serum macrophage inhibitory cytokine 1 as a marker of pancreatic and other periampullary cancers. *Clin Cancer Res* **10** : 2386-2392, 2004
- 4) Missiaglia E, Blaveri E, Terris B *et al* : Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidatemarkers for pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Int J Cancer* **112** : 100-112, 2004
- 5) Hutchens TW, Yip TT : New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun Mass Spectrom* **7** : 576-580, 1993
- 6) Sorace JM, Zhan M : A data review and re-assessment of ovarian cancer serum proteomic profiling. *BMC Bioinformatics* **4** : 24, 2003
- 7) Rosty C, Christa L, Kuzdzal S *et al* : Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* **62** : 1868-1875, 2002
- 8) Sasaki K, Sato K, Akiyama Y *et al* : Peptidomics-based approach reveals the secretion of the 29-residue COOH-terminal fragment of the putative tumor suppressor protein DMBT 1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* **62** : 4894-4898, 2002
- 9) Koopmann J, Zhang Z, White N *et al* : Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* **10** : 860-868, 2004
- 10) Conrads T, Zhou M, Petricoin E *et al* : Cancer diagnosis using proteomic patterns. *Expert Rev Mol Diagn* **3** : 411-420, 2003
- 11) <http://www3.cancer.gov/prevention/cbrg/edrn/publications.html>

分子心血管病

別刷

発行：株式会社 先端医学社

〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 2-17-8 浜町花長ビル

循環器病学におけるペプチドミクス

佐々木一樹*, 南野直人*

SASAKI Kazuki, MINAMINO Naoto

*国立循環器病センター研究所薬理部

SUMMARY

生理活性ペプチドは循環器疾患の創薬、診断法のシーズとしての有用性が認識されている。ゲノム配列が明らかになった現在も未知の生理活性ペプチドの発見が期待されている。ペプチドミクスは生理活性ペプチドをはじめとした生体に内在するペプチドを包括的に理解するための新しい領域で、現状では発現解析法の確立に主眼が置かれている。新規生理活性ペプチドを発見するためには内在ペプチドの同定が必須であり、それはプロテオミクスでは現実的には不可能である。新規ペプチド発見の新しいアプローチとしてペプチドミクスが市民権を得る時代が到来しようとしている。

POINTS

- 循環器疾患の診断・治療法開発のうえでペプチドは今後も有望である。
- ペプチドミクスは、生理活性ペプチド等の生体内に存在するペプチドを対象にする。
- プロテオミクスの手法ではこのようなペプチドは分析できない。
- ペプチドミクスは新規生理活性ペプチド探索の新しいアプローチを提供する。

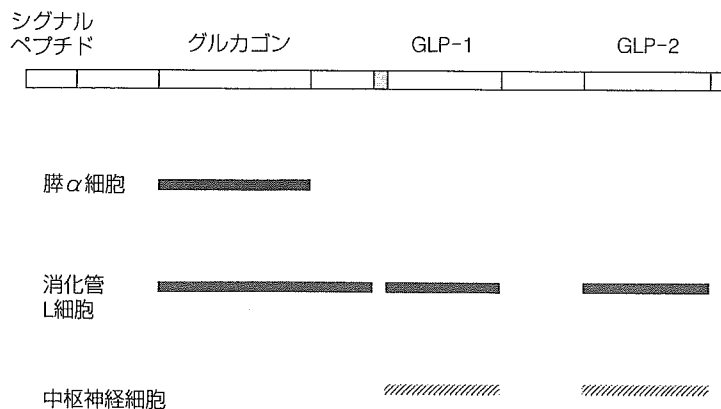
KEY WORDS

ペプチドミクス, 発現解析, 生理活性ペプチド, 疾患マーカー

はじめに

循環器系の調節因子として、アンジオテンシン、ナトリウム利尿ペプチド類、エンドセリン、アドレノメデュリン (AM) などを標的にした診断・治療法が開発されている。これらは分子量1万以下の小さな蛋白質、すなわちペプチドとよばれる。ペプチドミクスは、生理活性ペプチドをはじめとした生体に内在するペプチドの体系的な解析に関する技術の総称で、循環器病の領域では新規

生理活性ペプチドの探索に貢献しうる。内在ペプチドの解析はプロテオミクスでは盲点になっており、本稿ではプロテオミクスとの差異について言及しながら、発現解析のツールとしてのペプチドミクスについて解説するとともに、低分子量蛋白質・ペプチド性の疾患マーカー探索の試みについても紹介する。



図① 生理活性ペプチドのプロセシングの多様性
グルカゴンの事例. GLP: Glucagon-like peptide
(筆者作成)

本稿で用いる言葉の定義

ペプチドと蛋白質を区別する明解な定義はないが、一般にはゲル電気泳動で分離、検出されにくい分子量1万以下のアミノ酸のポリマーをペプチドと称する。ペプチドミクスは生体に内在するペプチドの体系的な解析に関する技術で、発現プロテオミクスが対象にしている蛋白質の酵素消化に由来するペプチドは除外される。また、ある系に存在する蛋白質全体をプロテオームと称し、それに対応してペプチド全体をペプチドームと称する。

生体内にどんなペプチドが存在するか

筆者ら³⁾は1999年よりブタ脳を対象にペプチドーム解析を開始した。その結果から推定すると、体内に存在するペプチドの大部分は蛋白質の代謝過程で生じる分解ペプチドであると予想される。そのなかに、「積極的な存在意義」をもったペプチドが微量ながら存在している。医学の立場からは後者、すなわち、特定のアミノ酸配列を認識するプロテアーゼによる切断（プロセシング）に伴って生成するペプチドに興味をもたれる。たとえば、酵素前駆体が活性型に変換される際に随伴して切り出されるプロペプチドや、ペプチドホルモンなどとして知られる生理活性ペプチド、あるいは免疫系細胞のプロテアソームで分解されて主要組織適合性抗原と複合体を形成し抗原提示される10残基程度からなるペプチドなどで

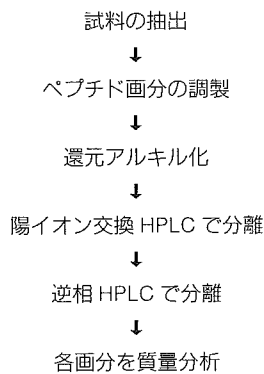
ある。

なかでも、ナトリウム利尿ペプチドやエンドセリンなどの生理活性ペプチドは循環器病の領域で注目される。生理活性ペプチドは、前駆体蛋白質から翻訳された後に、特定のアミノ酸配列を認識するプロテアーゼで切り出されて生じる。そして、特有の翻訳後修飾を伴うことが多く、ほとんどの事例で、その翻訳後修飾が生理活性の発現に必須である。たとえば、強力な摂食亢進作用以外に、重症心不全に対する心機能改善効果を有するグレリンはそのセリン残基がオクタン酸エステル化されており、血管拡張作用や心筋梗塞後の組織保護作用を示すAMは分子内環状構造とアミド化構造を有する。ゲノム情報のみではこのような翻訳後修飾や、組織ごとに異なるプロセシングパターン（図①）は予測できず、構造解析も含めた発現解析の重要性を示している。したがって、ヒトでゲノム構造がほぼ明らかになったとはいえ、未知の生理活性ペプチドが今後も多数発見されると予想される。

ペプチドミクスとは

ペプチドミクスについて説明する前に、プロテオミクスについて簡単に言及する。これは蛋白質の個別研究ではなく、特定の系に存在する全蛋白質を対象にした発現解析や、構造と機能の相関を体系的に解析するための諸技術を示す言葉である。

一方で、ペプチドミクスは言葉自体が新しく、プロテ



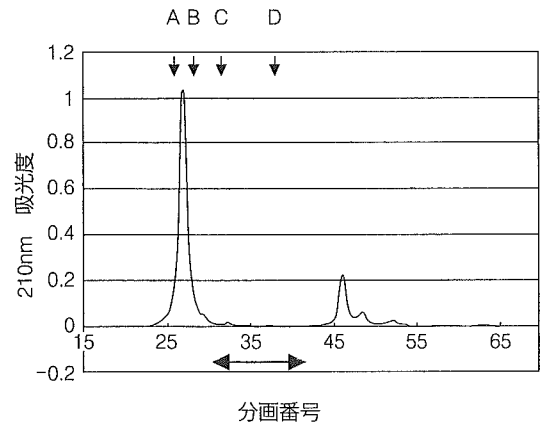
図② ペプチドミクスを用いる発現解析の流れ
(筆者作成)

オミクスと同一視されやすい。現在は内在ペプチドの発現解析がペプチドミクスの最も大きな課題であり、生理活性ペプチドの新しい探索法として今後が期待されている。発現解析の流れを図②に示す。試料ペプチドを高速液体クロマトグラフィ (high performance liquid chromatography: HPLC) で分離し、各分画の質量分析をおこない、含有されるペプチドの一次構造決定はタンデム質量分析とよばれる手法で進めていく。質量分析計および周辺技術の発展がペプチドミクスの中核をなしている。

ペプチドミクスとプロテオミクスの相違点

発現解析の領域に限定すると、プロテオミクスとペプチドミクスの端的な違いは、①分析試料から蛋白質成分を分離除去する、②分析試料は酵素消化を実施しない、の2点にある。

まず、①の背景について述べる。生物試料に含まれるペプチド総量は、蛋白質総量にくらべて非常に少ない。ブタ脳組織を対象とした筆者らの解析では、ペプチド画分の総重量は蛋白質画分の0.1%程度であった。ほかの生物試料でも状況は同様である。図③は、細胞の培養上清の事例で、ペプチドは蛋白質にくらべて少ないことが実感される。質量分析法で検出する場合、共存成分との相対的存在量比によって、当該分子の検出は大きく左右される。したがって発現解析に際してペプチド試料への蛋白質の混入はできうるかぎり排除する必要がある。蛋



図③ 培養細胞の上清を逆相系樹脂で処理した試料のゲル濾過
両矢印の領域がペプチド画分に相当する。左側のピークは蛋白質、右側は低分子物質。縦矢印は、分子量マーカーの位置：A、血清アルブミン (約66,000)；B、RNase A (約13,500)；C、神経ペプチド Y (4,271)；D、ニューロテンシン (1,673)
(筆者作成)

白質とペプチドの分離は、ゲル濾過、電気泳動ゲルからの electroelution、限外濾過などの方法がある。

つぎに②について説明する前に、プロテオミクスで酵素消化をおこなう理由を述べる。現在の質量分析計では、分子量の制約により、蛋白質自体をタンデム質量分析できないため、酵素消化が実施される。酵素消化にはトリプシンや LysC のように塩基性アミノ酸の C 末端側で切断する酵素が用いられるが、それによって構造解析(タンデム質量分析)時のデータ解釈が多少容易となる。ペプチドミクスはこのような酵素消化を加えることができない。生理活性ペプチドは塩基性アミノ酸を配列中に含むため、このような酵素で切断すると、ペプチド全体の構造を同定できなくなるからである(図④)。

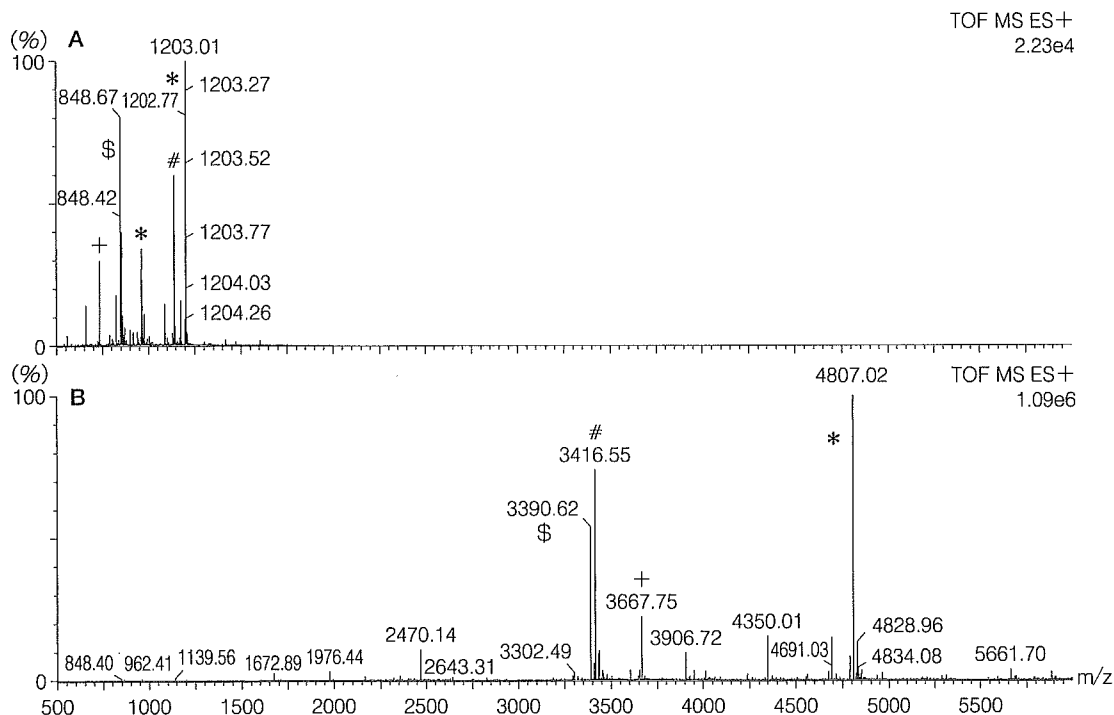
検出

前述のように、HPLC で分離された試料の質量分析がペプチドの発現解析の主要な作業を占めている。質量分析は高感度でペプチドを検出でき、ペプチドによっては10 fmol という微量で検出可能である。しかし、これは実際の試料では実現しにくい状況である。たとえば、目的ペプチドを単一状態で10 fmol 含む試料で良好な s/n で

[MKSIFYVAGLFLVMLVQGSWQ] QDTEEKSRSLRSFSASQADPLSDPDQMNE DKRHSQGTFTSDYSKYLD SRR AQDFVQWLMNTKRNRN NIAKRHDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRRRDFPEEVAIVEEL GRRHADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDRK

図④ 生理活性ペプチド前駆体のアミノ酸配列

グルカゴンの事例。太文字は生理活性ペプチドとして切り出される領域。括弧内はシグナルペプチド。プロテオミクスの手法では、酵素消化が必須のため、図中の R および K の C 末端側で切断されてしまう。
(筆者作成)



図⑤ ESI によるマスペクトルの実際

A : 測定で得られるスペクトル。B : A で観測されるピークを 1 価に換算したスペクトル。たとえば、B の * 印で示したペプチドは実際に検出されるわけではなく、実際には A でみられるように 4 価、5 価イオンのみが観測されている。同様に、B で # 印で示したペプチドは 3 価イオンのみが観測されている。
(筆者作成)

ピークが観測されたとしても、数十 pmol で別のペプチドが共存すると、目的ペプチドの検出強度が顕著に低下する。この現象はイオン抑制とよばれる。イオン抑制効果を最小限にするためには、HPLC を用いてさまざまなパラメータでペプチドを分離する必要がある。

イオン化法は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix assisted laser desorption/ionization : MALDI) と、エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization : ESI) の 2 種類を併用すると、検出ペプチド数を増加できる。質量分析ではマスペクトルのかたち

でデータが得られ、横軸は質量電荷比 (m/z)、縦軸は相対強度を示す。一般に MALDI では 1 価のイオンが強く観察されるために、スペクトル中にどんなペプチドが検出されているか理解しやすい。一方で、ESI では多価イオンを生じるため、スペクトルは複雑になるのが難点である (図⑤)。

同定

検出されたペプチドは逐次同定していく。質量分析計

を用いる一次構造決定法がいくつかあるなかで、タンデム質量分析法が最も実用的である。タンデム質量分析法とは、目的分子をさまざまな方法で断片化させ、生成するイオン（フラグメントイオン）を質量分析して、本来の分子の構造を明らかにする方法である。ヒトのようにゲノム構造がほぼ明らかになった生物種では、タンデム質量分析法による一次構造の決定は、Edman 分解およびそれに引きつづく cDNA クローニングに依存していた従来とは比較にならないほど簡便になった。たとえば、**図⑥**では、タンデムマスペクトル上に現れた5つのアミノ酸残基に由来するピークの質量の値、アミノ酸配列、目的ペプチドの質量の情報のみで一意的に同定されている。

タンデム質量分析による同定の実用面での最大の長所は、目的ピークが単一に精製されている必要がないことである。たとえば、**図⑦**の試料中には38種類のペプチドが含まれているが、生化学的な分離操作を加えずに30種類が同定された。Edman 分解で問題になる N 末端のブロックなどの影響も受けない。ただし、タンデム質量分析法は一種の「破壊分析」であり、目的分子が断片化しない場合や、断片化で生じるフラグメントイオンの情報が不十分な場合は同定不可能である。

ペプチドミクスによる発現解析の実際

発現解析に際しては、試料調製の成否が解析結果の質を左右する。生物試料にはプロテアーゼが多量に含まれ、抽出の過程でペプチドは分解されやすい。また、抽出の過程で蛋白質が分解すると、本来存在していた内在性ペプチドと区別が不可能になる。そこで、これらを抑制するために、組織の場合は迅速な加熱処理、凍結不可避の場合は粉末化後の煮沸、液体試料の場合は迅速な酸処理や蛋白質との分離などで、プロテアーゼを失活、除去させる。また、ジスルフィド結合で環状化した内側のアミノ酸配列情報をタンデム質量分析で得るためには、システイン残基の還元アルキル化が必須である。また、生体試料に含まれる塩類や、化学反応に用いる試薬はペプチドよりイオン化しやすく、ペプチドの検出を妨げるので質量分析前に除去する。

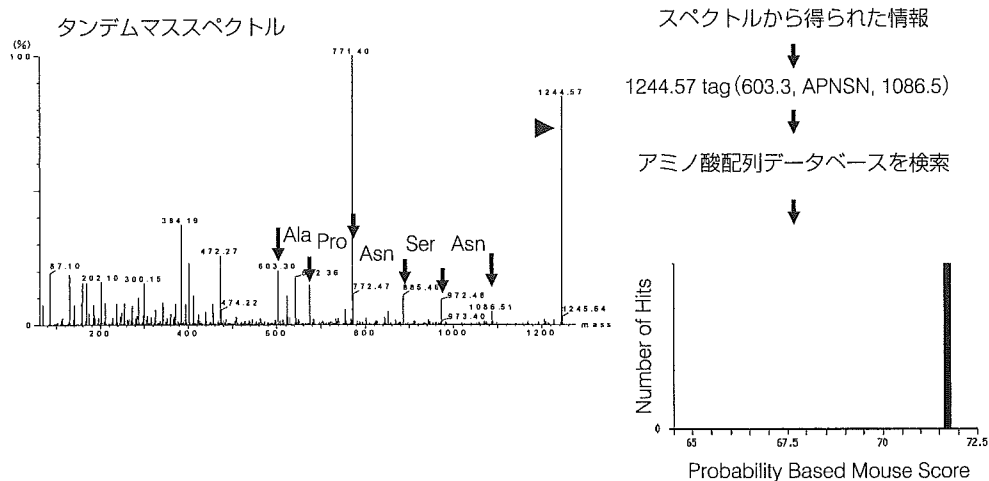
このように調製した試料中には、種類、含有量ともに

多種多様なペプチドが混合状態で存在している。これらを可能なかぎり数多く同定することが、発現解析の重要な課題となる。そのためには、原理の異なる液体クロマトグラフィを組み合わせて試料を分離する。1分画に、ある程度の高い s/n をもつペプチドが数種類のみ再現性よく分離できれば理想的であるが、ペプチドによって存在量はさまざまで、その開きは優に10の6乗を超えるため、存在量が多いペプチドは複数の分画に分散する。相対的に存在量が少ないペプチドを同定するためには、もう一段階の HPLC 操作を加える。現実的には、ゲル濾過で得られたペプチド画分をまとめて還元アルキル化処理をおこなった試料を引きつづきイオン交換 HPLC で分離する。イオン交換 HPLC の各分画を逆相 HPLC で約50~100分画に分離する。

このように、原理の異なる2つのクロマトグラフィで分離することを、二次元クロマトグラフィと称する。筆者らは、マウス脳のペプチドーム解析では、脳組織0.8gより出発して、一次元目に陽イオン交換 HPLC (70分画)、二次元目に逆相 HPLC (75分画)、すなわち全体を約5,000分画に分割している。このときに約8,000個のペプチドを検出し、構造決定に至ったのは約1,000個だった。このように HPLC 操作を1つ加えると、解析すべき試料数は飛躍的に増加するため、現実的には、スクリーニングの「網目」をどの程度の細かさ・粗さにするかを試料ごとに検討する必要がある。

候補ペプチドの選択

同定されたペプチドのなかから、生理活性ペプチドに特徴的な翻訳後修飾、同定ペプチドに隣接するアミノ酸配列(切断酵素の認識配列)、ジスルフィド結合、アミノ酸組成をもとに、候補ペプチドを選択する。翻訳後修飾を有する候補分子の場合は、修飾構造選択的な抗体を製作する。免疫染色で当該ペプチドの分布、産生細胞を把握し、さらにそのペプチドが組織中に実在することを、放射免疫測定法 (radioimmunoassay : RIA)、および組織抽出物からの免疫沈降物の質量分析で確認する。RIA は高感度で定量性にすぐれている。後者はそれらの点では劣っているが、「免疫活性」の実体を理解できる点です



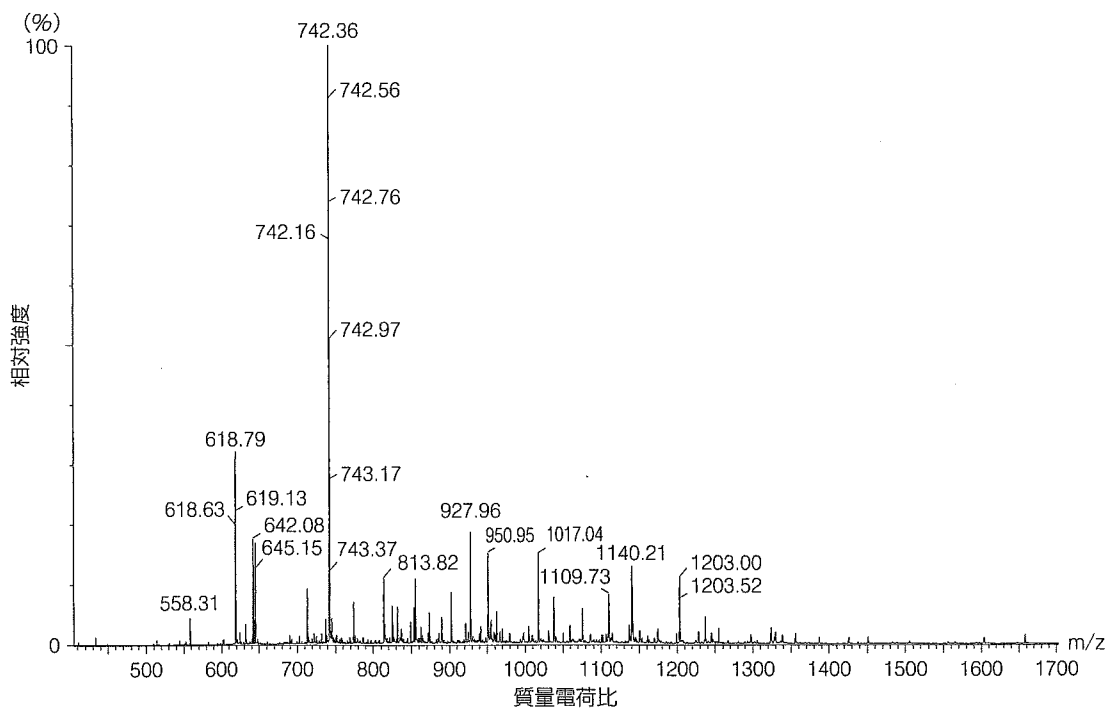
1. [gi|4507243](#) Mass : 12727 Total score : 72 Peptides matched : 1

somatostatin[Homo sapiens]

Observed Mr (expt) Mr (calc) Delta Score Peptide

1 1244.57 1243.56 1243.56 0.00 72 SANSNPAMAPRE

図⑥ m/z 1244.57 (矢頭) のタンデム質量分析による同定
 スペクトル上から連続した5つのアミノ酸配列を読み取り、質量の情報とともにデータベースを検索した。太文字の配列を含むペプチドとして一意的に同定された。
 (筆者作成)



図⑦ ペプチドミクスで実際に解析する試料の測定例
 質量が測定できた38種類のペプチドのうち30個はこの試料からタンデム質量分析で同定された。
 (筆者作成)

がれている⁴⁾。

実在を確認後に、どのような活性を有するかを検討する。特定の活性を指標に単離精製して発見されたペプチドとは異なり、この点は試行錯誤の要素が大きくなる。ただし、免疫染色で陽性となる細胞、組織の機能、あるいはその産物から、当該ペプチドの機能は推定も可能である。また、候補ペプチドについて、オーファン受容体のリガンドスクリーニングは受容体同定を考えるうえで望ましい。

上述の方法とは異なり、二次元に分離した各分画について、特定の生物活性で評価する方法も可能性があり、多量に存在する既知の生理活性ペプチドが複数の分画に分散すると、未知の生理活性ペプチドの活性はマスクされる可能性が強く、工夫を必要とする。候補ペプチドが循環器系に作用するか否かは、生理学的実験が必須であり、動物実験を経て、有用なペプチド候補を選択していく。

疾患マーカーの開発

最後に、低分子量蛋白質関連でとりわけ癌研究で活発に実施されている疾患マーカー探索開発について簡単に言及する。循環器疾患においても、とくに心疾患に関しては診断および治療方針の決定などに有用なマーカーの開発が望まれている。心不全の病態把握のマーカーとして血漿中BNP濃度の測定が保険適用になっており、生命予後の予知因子としても確立している。このようなマーカーがさらに発見され、複数のマーカーの測定によって個別的な診断が可能になれば臨床的意義は大きい。究極的にはプアリスク群を選択可能なマーカーが発見されれば望ましい。心筋細胞から分泌あるいは逸脱してくる蛋白質やペプチドは循環血中で希釈されるため、数百 μ lの血液検体からこのようなマーカーのプロテオミクス、ペプチドミクスによる探索は現実的には困難である。

これに対して、癌の領域で提唱されたアプローチであるが、血中に多量に存在する蛋白質の数種類の特異的断片のセットが、診断に利用可能であるという成績が多数報告されている⁵⁾⁶⁾。これは、癌では早期から凝固、線溶系に異常をきたす場合が多いので、血中に多量に存在す

る蛋白質にも二次的に影響を与えた結果、スペクトルに変化が現れるのではないかと推定されている。このようなセットを選択するためにはバイオインフォマティクスのソフトウェアの支援が必要になる。循環器疾患の病態に適用可能か否かは今後の課題になるが、その検討には、表面改良型レーザー脱離イオン化質量分析法⁶⁾(surface-enhanced laser desorption/ionization: SELDI) やアルブミンに非共有結合的に付着している低分子蛋白質を分析するアプローチが欧米では実施されている⁷⁾。血清は凝固の過程で多数のプロテアーゼが活性化されており、多数のペプチド性ピークが観測されたとしても、真の病態を反映しているか、採血以後の体外で生じたアーティファクトなのかについて、試料の採取を含めた厳格な管理が必須となる⁸⁾。

おわりに

本稿ではプロテオミクスと混同されやすいペプチドミクスについて、総論的な解説を中心にすえながら、運用面での注意点についても言及した。ペプチドミクスが循環器病領域で期待される役割として現在のところ中心になっているのは、新規生理活性ペプチドの探索と疾患マーカー開発である。本稿がその現状について理解するための一助になれば幸いである。



文献

- 1) 南野直人：ペプチドーム—生体内ペプチドのファクトデータベース—。蛋白質核酸酵素 46 (suppl 11) : S 1510-S 1517, 2001
- 2) Minamino N *et al* : Determination of endogenous peptides in the porcine brain : possible construction of peptidome, a fact database for endogenous peptides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 792 : 33-48, 2003
- 3) 佐々木一樹ほか：ペプチドーム解析の現状と展望。実験医学増刊 23 : 133-140, 2005
- 4) Sasaki K *et al* : Peptidomics-based approach reveals the

- secretion of the 29-residue COOH-terminal fragment of the putative tumor suppressor protein DMBT1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 62 : 4894-4898, 2002
- 5) Li J *et al* : Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 48 : 1296-1304, 2002
- 6) 佐々木一樹 : SELDI-TOF-MS による腫瘍マーカー探索とがん診断の試み. 化学フロンティア 10, 化学同人, 京都, 2003, pp.181-190
- 7) Stanley BA *et al* : Heart disease, clinical proteomics and mass spectrometry. *Dis Markers* 20 : 167-178, 2004
- 8) Tammen H *et al* : Peptidomic analysis of human blood specimens : comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display. *Proteomics* 5 : 3414-3422, 2005

SASAKI Kazuki

ささき・かずき

北海道生まれ, 東京大学医学部医学科卒, 国立がんセンター研究所を経て, 2004 年より国立循環器病センター研究所. 研究テーマ : 質量分析法による新規生理活性ペプチドの探索.

趣味 : 音楽・庭園鑑賞.

E-mail : ksasaki@ri.ncvc.go.jp
