

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山西弘一

平成19(2007)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	92
	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	96
	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	99
	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	103
	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に 関する研究	107
	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	112
	田上昭人	
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	114
	太田壽城	
8.	疾患関連たんぱく質解析に関する研究	119
	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	120
	高尾敏文	
10.	大腸癌のN型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析	124
	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	127
	金子 勲	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	159
IV.	研究成果の刊行物・別冊	167

## 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 理事長

### 研究要旨

本研究は、我が国における主要疾患である糖尿病、がん、高血圧、認知症などの患者と健常人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を用い、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、バイオインフォマティクス手法を駆使した情報処理技術により疾患関連たんぱく質の同定および比較定量を行った。更にそれらの結果に基づきデータベースの構築を進めている。また、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 血清糖たんぱく質の糖鎖はある種の疾患で変動することが知られている。今回、血清糖たんぱく質の部位特異的な糖鎖の変動を一斉に分析することを目的として、LC/MS/MSを用いた血清主要糖たんぱく質の糖鎖結合部位ごとの糖鎖を解析する糖鎖プロファイリング法を開発し、血清トリプシン消化物の標準的糖鎖プロファイルを作成した。また、疾患関連たんぱく質の機能解析技術・有効活用技術として、抗体の効率的創製法、および細胞内への効率的薬物送達を可能とするペプチドキャリアの創製を試みた。前年度までに構築してきた抗体ライブラリーを用い、極微量のたんぱく質を抗原として、迅速に抗体を取得しうる方法論の確立を行うとともに、細胞外から細胞内へ、既存のペプチドキャリアよりも効率よく物質導入可能な新規ペプチドを同定した。（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見出し新たな医薬品開発のシーズとするため、創薬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10課題を選択、作成し、倫理委員会で承認を受けた。各研究課題は二段階の試料収集形態とし、収集時間の要する検体以外の第一段階の血清試料をプロテオームファクトリー施設へ送付した。血漿試料の採取も開始し、組織試料についても採取・処理手順を作成、実施した。（友池）
- ③ 脂肪細胞の機能解析に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cAMP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 $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone( $\alpha$ -MSH)を単離・同定した。さらに、ラット脂肪組織抽出物を各分化段階の3T3-L1細胞に添加し、細胞内cAMP上昇活性を示す複数の分画の存在を確認した。脂肪細胞機能を制御する新しい生理活性ペプチドが存在する可能性が示唆された。（寒川）
- ④ 組織中のたんぱく質を酵素消化して得られるペプチドと組織を抽出して得られる内在性ペプチド

を、昨年度までに確立した2次元高速液体クロマトによる分離と質量分析計による検出法で解析し、得られる情報の有効性について検討を行った。血液中の低分子量たんぱく質、ペプチドについても同様の視点から解析し、より意義のある情報を収集すべく対象や手法について検討を進めた。(南野)

- ⑤ 国立精神・神経センター武蔵病院から提供したパーキンソン病患者血液試料の第一次解析結果を踏まえ、髄液試料を用いた絞り込みの有用性を確認し髄液使用についての IRB の承認を得た。また、細胞傷害時に神経細胞死が亢進するモデル動物を作製し、神経変性疾患発症機序の解析を進めた。さらに家族性筋萎縮性側索硬化症の変異遺伝子産物に関して未知の分解経路を発見し治療薬開発の新たな標的分子を開拓した。(高坂)
- ⑥ 糖尿病患者血清サンプルを基礎検討用及び本解析用に 128 例収集し、創薬プロテオームファクトリー施設に発送した。一部の検体を用いて cICAT 法で定量解析を行い、臨床情報との関連性を相関関係位解析等の統計学的手法にて予備的に解析した。さらに糖尿病以外に COPD 患者血清 10 例分を創薬プロテオームファクトリー施設に発送した。また、糖尿病患者尿サンプルを 2D DIGE 法にて解析し、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者にて健常者と比較して有意に変動する 80 個以上のスポットを認めた。一部については、既に報告されている Transferrin, Ceruloplasmin, Uromodulin が同定された。また、T0901317 処理にて HepG2 より分泌される apolipoprotein E を同定し、サイトカインにて分化させたマクロファージの発現たんぱくプロファイルを検索した。(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。(田上)
- ⑧ 認知症および骨粗鬆症患者の血清検体を創薬プロテオームファクトリー施設への提供・プロテオミクス解析を継続し、提供検体は合計 32 例となった。また、前年度の尿中のたんぱく質の解析に引き続き、これまでに確立した微量たんぱく質の解析システムを用い、アルツハイマー病 (AD) を中心として、認知症で最も変化が期待される脳脊髄液中の主なたんぱく質の同定を行った。また、前年度のラット脳組織の解析に続いて、家族性脳血管性認知症である Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL)患者脳のプロテオーム解析を行い、CADASIL 脳の微小血管には Notch3 の細胞外領域が蓄積していることを明らかとした。一方、骨形成担当細胞におけるたんぱく質リン酸化による機能制御について検討し、骨芽細胞において主要な骨形成促進物質の一つである線維芽細胞増殖因子-2(FGF-2)による血管内皮細胞増殖因子(VEGF)産生には、p44/p42 mitogen-activated protein (MAP)キナーゼに加えて stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK)のリン酸化による活性化が関与すること、FGF-2 が p70 S6 キナーゼをリン酸化し活性化すること、p70 S6 キナーゼの活性化が SAPK/JNK のリン酸化を抑制し、FGF-2 による VEGF 産生を抑制的に制御することを明らかとした。これらは臨床検体における疾患関連たんぱく質解析を進める上で、きわめて重要な新知見と考えられる。(太田)
- ⑨ 乳癌組織、閉塞性肺疾患の血清、運動ニューロン病の血清は随時プロテオーム解析を施行中であり、今後マーカー等について検討を行う。消化器癌は現在組織を集積中であり、近日プロテオーム解析を開始できる見込みである。リンパ腫は、正常組織使用の倫理的問題点を解決後、早急に解析に入る予定である。(佐古田)

- ⑩ 分子量 10 k Da 以上の高分子量たんぱく質画分についてたんぱく質プロファイルを効率よく得る方法をオンライン LC/ESI-MS/MS を用いて確立し、健常人由来尿たんぱく質のデータベースを構築した。また、尿由来糖ペプチド、糖たんぱく質の分離法、並びに、糖鎖構造解析法について検討した結果、LC/ESI-MS/MS による網羅的糖鎖構造解析が可能となった。(高尾)
- ⑪ 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、N 型糖鎖と糖脂質の酸性糖鎖を抽出し、2-アミノピリジンで蛍光標識した後、HPLC による 2 次元糖鎖マッピング法と質量分析法を組み合わせ、糖鎖構造を解析する技術を用いて、レーザーマイクロダイセクションの癌の糖鎖構造解析における有効性を評価するとともに、大腸癌に特徴的な糖鎖構造を明らかにした。(今岡)
- ⑫ 各研究協力機関から提供された、糖尿病、がん、認知症、腎疾患及び免疫・アレルギー疾患等の各種疾患試料(血清、組織等) 465 検体を受け入れ、そのうち血清試料 307 検体については、血清高発現たんぱく質(約 140 種類)の cICAT 法による解析研究(同定・比較定量)を完了し、その結果をデータベースに入力した。解析結果を関係研究協力機関に開示し、各たんぱく質の変化と臨床情報との関係を検討し、また追加研究への対応について協議した。その結果、小児ネフローゼ症候群(微小変化型)において、治療により変動したたんぱく質と他のたんぱく質の相関解析を網羅的に行うことにより、発症に関与する可能性のある複数の疾患関連たんぱく質(MBLP-1 等)を見出した(特許 2 件出願)。Laser-Micro-Dissection により、部位特異的に分取したヒト組織のたんぱく質解析 cICAT ワークフロー法(700-1000 種類の同定・定量可能)を構築し、研究協力機関より提供された組織試料(胃がん・正常組織)の解析を開始した。各種ヒト胃がん細胞株を、cICAT 法で比較検討し、スキルス株(Kato-III)に、FGF-receptor 2 が選択的に発現されていることを見出した。低発現たんぱく質の解析に関しては、限外ろ過膜・抗体カラムを利用することにより、高発現血清たんぱく質に加え、新たな低発現たんぱく質の解析が可能になった。また、正確な質量が測定可能な SELDI-QStar 等を用いてスループット性の高い血清バイオマーカーの探索系を構築中。各種疾患試料のたんぱく質の同定・比較定量解析結果を継続的にデータベースに蓄積するとともに、その解析結果と数値化した臨床情報同士の相関解析を行い、疾患関連たんぱく質候補探索を可能にする解析付加情報の作成を開始した。(金子)。

主任研究者

山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所  
理事長

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

研究分担者

友池仁暢 国立循環器病センター  
病院長

研究所代謝疾患研究部病態代謝研究室長

寒川賢治 国立循環器病センター研究所  
副所長

田上昭人 国立成育医療センター研究所  
薬剤治療研究部 部長

南野直人 国立循環器病センター研究所  
薬理部 部長

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・病理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 など)」、「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、認知症、

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を用い、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、バイオインフォマティクス手法を駆使した情報処理技術により疾患関連たんぱく質の同定および比較定量を行った。更にそれらの結果に基づきデータベースの構築を進めている。また、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: 疾患関連たんぱく質の糖鎖修飾解析と医薬品化に向けた基盤技術の開発

#### 1) 血清グライコミクス技術の開発

## (1) 試料

ヒト血清はシグマ社より、ヒトハプトグロビンはカルビオケム社より、修飾トリプシンはプロメガ社より購入した。

## (2) アルブミン除去

アルブミンは、モンタージュアルブミン除去キット（ミリポア社）を用いて除去した。効率よくアルブミンを除去するため、5  $\mu$ l の血清を処理した。

## (3) 還元カルボキシメチル化および酵素消化

アルブミン除去ヒト血清（血清 5  $\mu$ l 相当量）およびヒトハプトグロビン（100  $\mu$ g）を 50  $\mu$ l の緩衝液（0.5 M Tris-HCl、7 M グアニジン塩酸、5 mM EDTA、pH8.5）に溶解した。2  $\mu$ l の 1 M dithiothreitol を加え、40 分間 56  $^{\circ}$ C でインキュベートした。4.7  $\mu$ l の 1 M モノヨード酢酸を加え、暗所で室温 40 分放置した。PD-10 カラム（アマシャム GE ヘルスケア）により脱塩・脱試薬をし、溶出液を凍結乾燥した。50 ml の 0.1 M Tris-HCl（pH 8.0）に溶解し、1  $\mu$ g/ $\mu$ l の修飾トリプシンを 1  $\mu$ l 加え、12 時間 37  $^{\circ}$ C でインキュベートした。100  $^{\circ}$ C で 10 分間加熱して反応を停止させ、測定まで -20  $^{\circ}$ C で保存した。

## (4) HPLC

装置はパラダイム MS4（MicromBioResorces社）を用いた。カラムは MonoCap High Resolution 750 column（0.2 x 750 mm, GL Sciences Inc., Japan）を用いた。溶離液には、0.1 % ギ酸を含む 2 % アセトニトリル（V/V）（ポンプ A）と 0.1 % ギ酸を含む 90 % アセトニトリル（V/V）（ポンプ B）を用い、流速 0.2  $\mu$ l/min で流した。試料は、ナノトラップカラム（AMR社）に吸着させたのち、分析カラムへラインを切り替えた。サンプルは 5 % B で 5 分間流した後、80 min かけて 25 % B に、60 min かけて 45 % B に、40 min かけて 65 % B に、20 min かけて 90 % B に上昇させて溶出した。

## (5) ESI Qq-TOF MS/MS

質量分析装置は、Qstar pulser i（MDS Sciex）

を用いた。ナノエレクトロスプレーイオンソースを用い、スプレー電圧は 1700 V、ポジティブイオンモードで測定した。測定範囲は、MS は  $m/z$  1000-2000、MS/MS は  $m/z$  100-2000、スペクトルの積算時間は MS、MS/MS それぞれ 1 秒、5 秒とした。全てのイオンはモノアイソトピック質量で計算した。

## 2) 疾患関連タンパク質に対する抗体作製

### (1) メンブレンを用いたパンニング法の条件検討 ファージの作製

我々がこれまでに作製してきた、血管内皮細胞増殖因子 VEGF に対する受容体 KDR に対する抗体を発現したファージを positive control として、別の scFv クローンでルシフェラーゼに対する抗体ファージを negative control として、ファージを作製した。ファージの作製は、抗 KDR-scFv 遺伝子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  $\mu$ g/ml Ampicillin、2% Glucose 含有 LB プレートに播種し、37  $^{\circ}$ C で一晚培養した。50  $\mu$ g/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  $^{\circ}$ C で OD<sub>600</sub>=0.3~0.6 まで培養した。M13KO7 ヘルパーファージ（Invitrogen）を添加し、110 rpm、37  $^{\circ}$ C で 30 分間、250 rpm、37  $^{\circ}$ C で 30 分間培養後、2,000 rpm で 10 分間遠心し、得られたペレットに対して 100  $\mu$ g/ml Ampicillin、50  $\mu$ g/ml Kanamycin 含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養した。4  $^{\circ}$ C、2,000 rpm で 10 分間、さらに 10,000rpm で 15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-6,000、2.5 M NaCl を 1/5 volume 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  $\mu$ m の Millex®-HV（MILLIPORE）を用いてフィルターろ過し、ファージを回収した。

### メンブレンとブロッキング条件の検討

ブロット用メンブレン（①PVDF（Amersham）、

②ニトロセルロース膜 (Bio-Rad) を TBS に浸し、Bio-Dot Microfiltration Apparatus (Bio-Rad) に固定した。濃度調製した KDR Fc chimera を各ウェルに 500  $\mu$ l 添加し、KDR をメンブランに固相化した。blocking buffer (①4% skim milk、②10% skim milk、③10% skim milk & 25% glycerol) を 200  $\mu$ l/well 添加して、室温で 2 時間静置することでブロッキングした。TBS で 1 回洗浄し、blocking buffer で 10 倍希釈した精製ファージを 200  $\mu$ l/well 添加して、室温で 2 時間静置した。TBST (TBS、0.1% Tween 20) と TBS で 5 回洗浄後、blocking buffer で 7,000 倍希釈した HRP/anti-M13 monoclonal antibody (Amersham) を 200  $\mu$ l/well 添加した。TBST と TBS で 3 回洗浄後、ECL plus Western Blotting Detection System で処理し発光像を LAS-3000 (Fuji film, Inc.) により撮影した。

#### パンニングの溶出条件の検討

ニトロセルロース膜を TBS に浸し、Bio-Dot Microfiltration Apparatus に固定した。濃度調製した KDR を各ウェルに 500  $\mu$ l 添加しメンブランに固相化した。blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol) を 200  $\mu$ l/well 添加し、室温で 2 時間静置してブロッキングした。TBS で 1 回洗浄し、blocking buffer で 10 倍希釈した精製ファージを 200  $\mu$ l/well 添加して、室温で 2 時間静置した。TBST (TBS、0.1% Tween 20) と TBS で 5 回洗浄後、溶出 buffer (①Gly-HCl (pH 2.0)、②100 mM triethylamine、③Gly-NaOH (pH 11.0)、④0.5% SDS) を 100  $\mu$ l/well 添加し、室温で 30 分間静置した。TBS で 3 回洗浄後、blocking buffer で 7,000 倍希釈した HRP/ anti-M13 monoclonal antibody を 200  $\mu$ l/well 添加した。TBST と TBS で 3 回洗浄後、ECL plus Western Blotting Detection System で処理し、発光像を LAS-3000 にて撮影した。

(2) メンブランパンニングによる微量抗原を用いた抗体の単離

#### BIAcore を用いたパンニング

BIAcore3000 (BIACORE) を用いて、センサーチップ CM3 (BIACORE) に抗原たんぱく質 (KDR) を 5  $\mu$ g、50 ng、500 pg インジェクトすることにより固相化した。KDR 抗体ファージと negative control ファージを 1:100 で混合したものを input として、パンニングを行った。センサーチップ CM3 上に 10  $\mu$ g/ml に調製したたんぱく質 100  $\mu$ l をインジェクトし、CM3 固相化プロトコルに基づいて固相化した。たんぱく質として human KDR Fc chimera (R&D systems) を用いた。作製したファージライブラリを input としてインジェクトし、HBS-EPT buffer (HBS-EP (BIACORE)、0.05% Tween20) で 10 回 Rinse コマンドを実行した。抗原に結合したファージを Gly-HCl (pH 2.0) と Gly-NaOH (pH 11.0) により溶出回収し、output とした。1M Tris-HCl (pH 8.0) を 4  $\mu$ l と 2% Glucose 含有 2YT 培地を 250  $\mu$ l 加え、その一部を用いてタイターを測定した。残りのファージを大腸菌 TG1 株に感染させ、増殖させた後、上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、再度パンニング操作を行った。

#### ニトロセルロース膜を用いたパンニング

Bio-Dot Microfiltration Apparatus に、TBS に浸したニトロセルロース膜を固定した。濃度調製したたんぱく質を各ウェルに 500  $\mu$ l 添加し、メンブラン上に固相化した。固相化には KDR-Fc chimera を 5  $\mu$ g、50 ng、500 pg をそれぞれ使用した。blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol) を 200  $\mu$ l/well 添加して、室温で 2 時間静置してブロッキングした。TBS で 1 回洗浄し、blocking buffer で 10 倍希釈した KDR 抗体ファージと negative control を 1:100 で混合したものを input とし、200  $\mu$ l/well 添加して、室温で 2 時間静置した。TBST と TBS で 10 回洗浄後、100 mM triethylamine (pH 8.0) を 100  $\mu$ l 添加して、室温で 30 分間静置した。output ファージ溶液を回収し、それらに 50  $\mu$ l の Tris-HCl を加えて中和した。output ファージの一部を用いてタイターを測定した。



### Direct PCR によるインサートチェック

パンニング後に回収したファージを TG1 に感染させ、生じたコロニーをテンプレートとし、プライマー#156 (CAA CGT GAA AAA ATT ATT ATT CGC) 及び#158 (GTA AAT GAA TTT TCT CTG TAT GAG G) を用いて PCR を行った。アニーリング温度を 50°C で 1 分、伸長反応を 68°C で 1 分に設定し、AmpliTaq Gold (Applied biosystems) を用いて 35 サイクルで行った。PCR 産物を 1.5% TAE アガロースゲルを用いて電気泳動した。

### ファージ ELISA

ニトロセルロース膜を用いたパンニングにより回収されたファージを TG1 に感染させ、生じたコロニーをサンプルとして、ELISA を行った。パンニング後に回収したファージを TG1 に感染させ、生じたコロニーを 96 穴プレートに pick up した。各ウェルが OD<sub>600</sub> = 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 20 µl/well で添加した。37°C で 1 時間静置培養した後、2,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去した。100 µg/ml Ampicillin、50 µg/ml Kanamycin 含有 2YT 培地を 200 µl 加えて 37°C で一晚培養し、2,000 rpm で 10 分間遠心し、回収された上清を以下のスクリーニング実験に用いた。

anti-human IgG を 10 µg/ml となるように B buffer (0.05M carbonate-bicarbonate buffer, pH9.6) で希釈し、イムノプレートに 100 µl/well 添加して 8 時間静置した。PBS で 1 回 wash し、0.4% Block Ace(大日本製薬株式会社)で希釈した human KDR Fc chimera (0.5µg/ml) を 100 µl/well 添加し、一晚 4°C で静置して固相化した。固相化後に well 内の液を捨て、4% Block Ace を 200 µl/well 添加してブロッキングした。PBS で 1 回洗浄後、ファージサンプル 80 µl 及び 4% Block Ace 20 µl を各 well に添加し、緩やかに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 を 100 µl/well 添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、TMB 溶液 (ナカライテスク) を加えて発色を行い、2N 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)をマイクロプレートリーダーで測定した。

### (3) 乳癌関連たんぱく質に対する抗体の単離

#### 2D-DIGE 法

乳腺細胞株 184A1 と乳癌細胞株 SKBR3 を培養後、細胞溶解液 (7 M Urea、2 M Thiourea、4% CHAPS、10 mM Tris-HCl、pH 8.5) で溶解し、2D Quant Kit (Amersham) を用いてたんぱく質の濃度を測定した。内部標準用サンプル、乳腺細胞、および乳癌細胞たんぱく質各 50µg をそれぞれ 400pmol のラベル化試薬 cy2、cy3、cy5 (Amersham) と氷上で 30 分間反応させ、その後 10mM Lysine を加え、氷上で 10 分間静置して反応停止させた。標識されたサンプルをすべて混合し、sample buffer (2% DTT、2% Pharmalyte (Amersham Biosciences)、7M Urea、2M Thiourea、4% CHAPS) で 450µl にメスアップした。一方、たんぱく質を回収するためのピックゲル用に、標識しないサンプルも同様に混合調製した。等電点泳動用の専用ホルダーにサンプルを注入して、IPG-gel (pH 3-11) ストリップ (Amersham Biosciences) を入れ、ミネラルオイルを重層した。プレ膨潤を 10 時間行い、Ettan IPGPhor (Amersham Biosciences) を用いて、等電点電気泳動を行った。泳動終了後、IPG-gel を平衡化 buffer A ((Tris-HCl (pH 6.8)、6 M Urea、30% Glycerol、2% SDS、0.002% BPB、10 mg/ml DTT)) と平衡化 buffer B ((Tris-HCl (pH 6.8)、6 M Urea、30% Glycerol、2% SDS、0.002% BPB、25mg/ml Iodoacetamide) に浸し、各 15 分間平衡化を行った。二次元目の SDS-PAGE を行うため、均一ゲルに IPG-gel ストリップをセットし、アガロースで封入後、Ettan Daltsix Electrophoresis

System (Amersham Biosciences)にて2次元電気泳動を行った。ピック用ゲルは SYPRO Ruby (Molecular Probes)にて一晩染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner (Amersham Biosciences)を使用し、スポットピックには Ettan Spot Picker (Amersham Biosciences)を使用した。回収したスポットから Centrifuge (Millipore)を用いて、たんぱく質を抽出した。

#### ライブラリを用いたニトロセルロース膜パンニング

2D-DIGE 法によって回収した発現変動たんぱく質を固相化して、パンニングを行った。scFV ファージ抗体ライブラリを用いて、ニトロセルロース膜を使用したパンニングを上述したように行った。output ファージは大腸菌 TG1 株に感染させ、増殖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、再度同様のパンニング操作を行ったものを 2nd、3rd、4th パンニングまで行った。

### 3) 細胞内薬物導入に向けたペプチド性キャリアの開発

#### (1) Tat ペプチドをベースにしたペプチドライブラリの作製

##### Tat ペプチドをベースにしたペプチドライブラリの構築

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「Tat ペプチドライブラリ」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を調整した。ライブラリ作製にはプライマー、Y-oligo22 3' ex (5' -TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA TGA TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC-3') および Tat11(47-57)R (5' -TCA TCC TTG TAG TC TGC GGC CGC ACG ACG ACG SNN ACG ACG SNN SNN ACG SNN

SNN GGC CAT GGC CGG CTG GGC CGC ATG AAA G-3') を用い、pY03' mTNF FLAG 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 (東洋紡株式会社) を用いて PCR を 35 サイクル行った。この PCR 産物を PCR purification kit (QIAGEN) で精製した。得られた PCR 産物を Hind III および Not I (東洋紡株式会社) で処理し、あらかじめ Hind III および Not I で処理したファージミドベクター pY03' FLAG と T4 ligase (Roche Diagnostics) 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 EcoRI および Alkaline phosphatase (東洋紡株式会社) で処理し、PCR purification kit で精製した。あらかじめ 2YT 培地 (Invitrogen™ life technologies) 30ml で OD<sub>600</sub>=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 μl に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 (Stratagene®) に対して、精製後の溶液 10μl を添加し、Gene pulser®II (Bio-Rad Laboratories, Co., Ltd.) を用い、2.5 kV、0.25 μF、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 μg/ml アンピシリン (Sigma-Aldrich, Inc.)、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 (Clontech Laboratories, Inc.) 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、ライブラリサイズを算出した。

##### シーケンス解析

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 (QIAGEN) を用いて回収し、DNA sequencing Kit (Applied Biosystems) および 5× Sequencing Buffer (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った。その後、PERFORMA Gel Filtration Cartridge (Edge Bio Systems) を用いて精製し、減圧加熱により乾燥

させた。シーケンス解析は ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) により行った。

(2) PSIF (タンパク質合成阻害因子) を用いた新規 PTD のスクリーニング

#### ファージの作製

作製したライブラリ遺伝子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 アンピシリン、2%グルコース含有 LB プレートに播種し、37°Cで一晩培養した。50µg/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を加えてコロニーをすべて回収し、250 rpm 37°Cで OD<sub>600</sub> = 0.3 まで培養した。M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen™ life technologies) を添加し、110 rpm 37°Cで 30 分間、250 rpm 37°Cで 30 分間培養した後、2,000 rpm 10 分間遠心し、得られたペレットに対して 50 µg/ml アンピシリン、100 µg/ml カナマイシン含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養することで、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。

#### ファージの精製

ファージ粒子を含む TG1 培養液を 4°C 2,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。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% PEG-8,000 (和光純薬株式会社)、2.5 M NaCl(和光純薬株式会社)を 1/5 volume 加え、激しく混和して氷上で 2~3 時間静置した。次いで 15,000 rpm で 10 分間遠心して得られたファージペレットを NTE Buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1mM EDTA) に懸濁し、0.45µm の Millex®-HV (MILLIPORE) を用いてフィルターろ過して精製ファージ溶液とした。

#### Cell panning

HaCaT 細胞を用いてパンニングを行った。6 穴プレートに HaCaT 細胞を 5.0×10<sup>5</sup> 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%ウシ血清アルブミン (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、1M Tris-HCl pH8.0 500 µl を添加し、その 50 µl 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、再度同様のパンニング操作を行ったものを 2nd、3rd パンニングとした。

#### タイターの測定

2%グルコース含有 2YT 培地で OD<sub>600</sub> = 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 µg/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。

#### PSIF 発現ベクターへの組換え

作製したライブラリ (input) および 2nd、3rd パンニング後のライブラリから回収したプラスミドを NcoI (東洋紡株式会社) 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) にライゲーションキット Ver.2 (宝酒造株式会社) 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。PSIF (たんぱく質合成阻害因子) としては緑膿菌由来菌体外毒素 (GenBank:K01397) のたんぱく質合成阻害活性領域を利用した。

#### 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、OD<sub>600</sub> = 0.4~0.5 まで培養した。3,000 rpm 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 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。

#### ペプチドの細胞内移行能の評価 (PSIF による細胞傷害性試験 : MTT assay)

96 穴プレートに Opti-MEM で 1.5×10<sup>4</sup> 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(和光純薬株式会社)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、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 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。ペプチドを加え、37°C で培養 3 時間後に 5 mg/ml の MTT (和光純薬株式会社) 溶液を 10 µl/well 加え、さらに 37°C で 4 時間培養した。20% SDS (和光純薬株式会社)/0.01 N HCl を 100 µl/well 加えて暗所で 4 時間静置することで生成したホルマザンを溶解し、マイクロプレートリーダー (Model 3550、Bio-Rad Laboratories, Inc) で吸光度を測定した (Test wave length ; 595 nm/Reference wave length ; 655nm)。ペプチドを加えなかった群の吸光度をコントロール (100%) とし、各ペプチドのミトコンドリア活性の低下を指標とした細胞傷害性を評価した。また、viability は終濃度 1 mg/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。

#### (3) 候補クローンの細胞内移行能の評価

##### FITC 修飾ペプチドによる候補クローンの細胞内

#### 移行能の評価

24 穴プレートに HaCaT 細胞を 1.0×10<sup>5</sup> 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。培養上清を完全に除いた後、血清含有培地で 10 µM に希釈した各候補クローンの FITC 修飾体を 37°C で 3 時間作用させた。細胞表面に吸着しているペプチドを除去するため、0.25%トリプシン (GIBCO BRL) を 37°C、10 分間作用させた後、各細胞における FITC 修飾 Tat ペプチド由来の蛍光強度をフローサイトメーター (FACS Calibar, Becton Dickinson) により測定した (FACS 解析)。

#### (倫理面への配慮)

市販のヒト血清を用いているので、特に配慮していない。

#### **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**

創薬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 年度に倫理委員会の承認を得た。承認内容に従い研究計画の申請を行い、17 年度末までに 8 課題が倫理委員会で承認された。最終的に 10 課題につき申請、承認を受け実施する。

各課題の内容は二段階の実施形式とし、第一段階として各疾患においてたんぱく質変動が最も観測されやすいと予測される時期に同一患者より複数回の採血を行う。各課題の総検体数の 1/2~1/3 を第一段階の研究に当てる。次に、創薬プロテオームファクトリー施設からたんぱく質解析結果が提供された段階で臨床パラメータも含めた比較・解析を行い、各課題内での対象患者の絞り込み、試料採取時期の再検討などの修正を行う。絞り込んだ対象群、時期で第二段階の試料収集を行い試料の送付、解析を実施する。これらの解析結果、臨床情報を総合し、創薬プロテオームファクトリー施設と共同して、各課題の循環器疾患に関連す

るたんぱく質の発見を目指す。

17年度後半より血清試料以外に血漿試料の収集を開始したので、この違いを血中たんぱく質、ペプチドの変動などに結びつけるべく、国立循環器病センター内部での研究を開始する。また、昨年度承認を受けた心臓組織のプロテオーム解析研究の試料収集、抽出用組織の前処理・保存、保管が均一な条件で実施できるようマニュアルを作成する。また、個人情報保護法、臨床研究指針を厳守した情報管理、研究実施に向けたマニュアルを更に改善し、事故等がなく研究計画を実施できる体制を構築する。

### 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、ブタ脳及びラット脂肪組織から抽出したペプチドサンプルを添加し、細胞内 cAMP 濃度変化を指標としてアルファスクリーン法を用いて測定した。

#### (2)抽出および精製

ブタ脳及びラット脂肪組織を既報のとおり、100℃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。

(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)心臓組織試料の検討

ラット心房組織抽出物を主たる対象に、抽出物の脱塩、濃縮後、ゲル濾過にて分子量 1 万以上、6K-3K、3K 以下の 3 画分に分離し、それぞれについて還元アルキル (アセトアミド) 化後、分子量 1 万以上の画分 (たんぱく質画分) についてはトリプシン消化を行う。量の多いたんぱく質画分については、トリプシン消化を 2D-HPLC にて分離し (1 次元目 SP 陽イオン交換 HPLC, 1.0 x 50 mm, pH3.8 のギ酸アンモニウム・10%アセトニトリル含有系、2 次元目逆相 nano HPLC, 75-300 μm x 150mm, アセトニトリル-0.01%トリフルオロ酢酸系)、2 次元目 HPLC 溶出物については Maldi 質量分析用 target plate 上に spot し、Proteomics 4700 質量分析計で解析する。量の少ない 6K-3K、3K 以下については、先ず逆相 1 次元の nano HPLC にて分離し、たんぱく質画分のトリプシン消化物と同様に分析を行い、その解析結果、観測ペプチドの種類などに従い分離、解析手法の検討を行う。

心房組織のたんぱく質画分、ペプチド画分について安定した結果が得られた場合は、心室組織についても同様の解析を行い、解析の可否の判断を行う。

#### (2)血液試料の検討

血液のペプチド解析については、血漿と血清に分けて検討を行う。血漿についてはペプチド量が

非常に少ないこと、昨年度の終わりから試料にプロテアーゼインヒターカクテルを添加していること、などの相違があり、試料の採取、保存方法、処理方法の別にたんぱく質画分、分子量 6K 以下のペプチド画分に分けて検討を行う。基本的には逆相系固相抽出法によりたんぱく質、ペプチドを抽出し、抽出物の解析、ゲル濾過分離物の解析、逆相 nano HPLC 分離物の解析を行う。また、低分子量たんぱく質画分、ペプチド画分を対象を絞り込む場合は、相互作用を減弱させた条件下での限外濾過膜による分離、逆相系固相抽出による回収後、上記の方法に従い分析を行う。逆相 nano HPLC などにおける分離物については Maldi 質量分析計で、抽出物など分子量分布範囲の広い試料については Seldi 質量分析計で解析を行う。

#### (倫理面への配慮)

動物組織については、国立循環器病センターの動物実験指針に従った動物実験計画書を提出し、動物実験委員会の承認を受け、動物愛護に配慮して採取する。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、研究協力者に十分な説明を行い、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、主要な研究者が国立精神・神経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、倫理委員会の承認を得た。さらに、連結可能匿名化されているパーキンソン病およびパーキンソン症候群患者髄液が 40 例程度収集できており、その使用を倫理委員会での承認を受けた。

#### (2) モデル動物の解析、創薬標的分子開発に関する研究

UCH-L3 欠損マウスにおける細胞傷害時の神経細胞死亢進機序について網膜の光変性を題材に生化学的、病理学的に解析した。家族性筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子産物の変異体を用いその代謝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国立精神・神経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の同定、定量を行う。尿については 2D DIGE にてディファレンシャル解析を行い、LC-MS/MS にて同定する。結果について糖尿病の多様な病態とたんぱく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。

創薬プロテオームファクトリー施設での糖尿病関連血清たんぱくデータベースの構築とは別に、本施設での独自のプロジェクトとして早期糖尿病性腎症を研究対象に本施設内で 2DE-DIGE を用いて、微量アルブミン尿の有無による尿たんぱくプロファイルを健常者の尿たんぱく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探索する。

本施設にて収集可能な糖尿病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施設にて解析する。その一環として、呼吸器疾患（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。

また、感染防御に関与する組織マクロファージへの細胞内分化決定因子をプロテオーム解析にて同定することを目的として、ヒト末梢血液より分離した単球を *in vitro* で GM-CSF または M-CSF 存在下に培養することで成熟型マクロファージに分化させる。添加する分化因子を変えることで、

GM 型: human GM-CSF によって単球から分化誘導されたマクロファージ

M 型: human M-CSF によって単球から分化誘導されたマクロファージ

の 2 つの性質の異なるマクロファージ培養細胞に分化させた後に、

- ①培養開始から 48 時間経過後の GM 型、M 型
- ②培養開始から 7 日間（168 時間）経過後の GM 型、M 型
- ③7 日間（168 時間）培養後、結核菌（H37Rv）を感染させ、感染後 48 時間経過時点における GM 型、M 型

の 3 条件 6 種類の培養細胞からたんぱく抽出後に酵素消化し、nano HPLC-ESI MS/MS 質量分析計にてたんぱく同定を試みる。

#### 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マティクス技術を用いて解析する。さらに、同定された因子について疾患との関連性について生物学的・医学的関連性を解析するために動物や細胞を用いた検討を行う。

（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、追加申請：平成 18 年 12 月 27 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

昨年度までの本研究において策定・検証された創薬プロテオームファクトリー施設へのサンプル提供手順により、認知症および骨粗鬆症の診療を担当する診療科医師からの試料および診療情報の受領・一時保管・試料提供を行った。なお、今年度は特に認知症の試料提供を促進した。

脳脊髄液は前処理としてアルブミン、イムノグロブリン G、イムノグロブリン A、トランスフェリン、ハプトグロビン、アンチトリプシンといった高濃度に含まれる主要な 6 つのたんぱく質の抗体が固定されたアフィニティーカラムを用いて素通り画分と吸着した画分に分けた。これらの画分のたんぱく質はトリプシンで消化を行い、1 分間にナノリットルといった低流量で流せる HPLC を用いた nanoLC/MS/MS によってショットガン分析を行い、脳脊髄液中のたんぱく質を網羅的に解析した。

CADASIL 患者剖検脳および対照剖検脳はそれぞれプロテアーゼ阻害剤を含む PBS 中でホモジナイズし、ガラスビーズを用いたカラムで微小血管を分離した。血管は RIPA buffer, Urea/Thiourea, ギ酸等で可溶化し、各画分を

SDS 電気泳動後、Notch3 の抗体でウエスタンブロットを行った。さらに各画分は、nanoLC/MS/MS によるショットガン分析を行い、微小血管中のたんぱく質を網羅的に解析した。

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  $\alpha$ -MEM 培地にて培養し、5 日後培地を 0.3%FCS を含む  $\alpha$ -MEM として 48 時間後以下の実験に供した。細胞を各種阻害剤にて前処置した後、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) にて刺激し、培地中の VEGF (血管内皮細胞増殖因子) 濃度を ELISA にて、mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。細胞質分画中の p70 S6 キナーゼ、p44/p42 MAP キナーゼ、p38 MAP キナーゼ、stress-activated protein kinase/ c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) のリン酸化について Western blot 法を用いて解析した。p70 S6 キナーゼのノックダウンは siRNA のトランスフェクトにより行った。

(倫理面への配慮)

国立長寿医療センターにおける臨床試料の解析あるいは創薬プロテオームファクトリー施設への臨床試料の提供については、既に国立長寿医療センター倫理委員会および創薬プロテオームファクトリー施設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

乳癌、消化器癌、リンパ腫の組織、閉塞性肺疾患、運動ニューロン病の血清について、倫理委員会の定める手続きに従い、同意書を取得し、検体を集積し、感染症チェックを行う。組織については、切片を作成し、腫瘍組織と正常部分を区別して、プロテオーム解析を施行していく。

#### 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

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、網羅的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、さらに、同定確度の向上を目的に H17 年度試作したソフトウェアにより検証した後に、データベース構築に用いた。

尿ペプチドの分離は、内径 1 mm の強陽イオン交換担体カラム、内径 75  $\mu$  m の逆相担体カラムを用いて行った。また、尿たんぱく質は、予め限外ろ過膜により単離しておいたたんぱく質画分 (10 kDa $\sim$ ) を酵素消化し、上記と同様のイオン交換クロマトグラフィー (82 分画) により分離後、各々の画分に対して nanoLC/ESI-MS/MS によりたんぱく質同定を行った。

ペプチドの定量は、安定同位体  $^{18}\text{O}$  標識化ペプチド (酵素あるいは酸触媒を用いて調製) を尿試料に一定量スパイクして MS 測定し、観測されるイオンピークの強度比をもとに行なった。ピーク強度比の算出は、H16 年度に開発したソフトウェア “Isotopica” を用いて  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  の同位体比を求めることにより行った。

#### B-11:大腸癌の N 型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析

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)、C18 逆相カラム及び Amide 順相カラムの 2 種類の HPLC を用いて糖鎖構造を推定する 2 次元糖鎖マッピング法と質量分析法を組み合わせ、糖鎖構造を同定す



る。PA 化糖鎖の質量分析にはイオントラップ型質量分析計 LCQ Deca XP を用いた。PA 化糖鎖 10 fmol 以上で質量分析が可能であり、比較的構造の簡単な糖脂質であれば、MS<sup>3</sup> 解析で糖鎖のシークエンス情報が得られる。

レーザーマイクロダイセクションにはライカ社製、AS LMD を用いた。手術で採取された大腸癌サンプルをクリオスタットで 10 $\mu$ m の切片を作成し、ホイルつきのスライドガラスに貼り付けた。切片をエタノール固定あるいはアセトン固定し、ヘマトキシリン染色後、レーザーマイクロダイセクション法で癌細胞を抽出した。

#### (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)の調製は、10 ml 真空採血管(ベノジェクト 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 $^{\circ}$ C で 30 分静置(もしくは室温で 1 時間静置)したものを 4 $^{\circ}$ 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)を得た。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 $^{\circ}$ C)。必要に応じて融解し、実験に使用した。なお、本研究に使用するヒト標準血清(CTS02S)は、健常外国人(米国)の年齢 18~50 歳代の男性 5 名、女性 5 名より、採取した血清をプールしたものである(Uniglobe Research Coporation(CA, USA)より購入)。

#### 2) ヒト血清試料の cICAT 法による解析法の一部

#### (1) cICAT 試薬の定量

市販の cICAT 試薬ロットの一部に含量バラツキがある場合があるので、試薬(H, L 鎖)の一部を分取し、C18 逆相カラムで定量し、H 鎖試薬、L 鎖試薬のバラツキが 10%以内のロットを反応に使用した。

#### (2) DTT クエンチング法

昨年度に用いた方法(2)の中で、cICAT 反応後のクエンチング剤に用いた TCEP 1mM の代わりに、DTT 10mM を使用した。それに伴い、分画用の SCX カラムのサイズダウンを行い、また溶出バッファーを KCl 系からギ酸/ギ酸アンモニウム系に変更した。

以下に、改良法を記す。アジレント社製抗体カラム(Multiple Affinity Removal Column, 10 x 100mm)で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(3), 50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5)で可溶化し、TCEP(final 1mM, 95 $^{\circ}$ C, 10 min)で変性還元後、2.2mM の cICAT 試薬(AB)、(<sup>12</sup>C(L 鎖)あるいは <sup>13</sup>C(H 鎖)標識)を 37 $^{\circ}$ 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 10mM DTT 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 $^{\circ}$ C、16 時間消化した。得られた消化物を、分取用 HPLC(Vision Workstation System (AB))を用いて、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column(4.6 x 100mm)にかけ、10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH2.8, 25%CH<sub>3</sub>CN (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、素通り部分を洗浄後、吸着した cICAT 試薬反応ペプチドを 30% CH<sub>3</sub>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 $^{\circ}$ 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、0.05%ギ酸/25% CH<sub>3</sub>CN に溶解し、SCX column(4.6 x 100mm)にて、0.05%ギ酸/25% CH<sub>3</sub>CN - 0.5 M ギ酸アンモニウム/5.88%ギ酸/25% CH<sub>3</sub>CN 系(ギ酸アンモニウム 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 ペプチドは nano-LC/Q-Star XL (Applied Biosystems (AB), 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(1)。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(2.1 x 35mm)で 25 分画した各画分を nano-LC/Q-Star XL にて、分析時間 90min 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。

### 3) 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

昨年に作成した組織解析ワークフロー(図 21)に従い、協力医療機関より提供された 10 $\mu$ m の切片(100~400 枚)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(4)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。

### 4) 組織可溶化・たんぱく質抽出法

LMD で得られた部位選択的組織の乾燥重量を測定し、予想されるたんぱく質含量に合わせて、たんぱく質濃度(約 1mg/ml)になるように可溶

化溶液(8M 尿素(Wako), 4% CHAPS, 1mM TCEP or 65mM DTT, 40mM Tris/HCl(pH8.3), 1/100 protease inhibitors(Sigma, P2714: 100x stock soln))に懸濁し、Vortex を行い、超音波処理し、可溶化処理を行った。たんぱく質の定量は Lowry 法で行った。なお、一部の実験では可溶化液として、8M 尿素、2% SDS, 50mM Tris/HCl(pH8.3)溶液を用いた。得られた組織粗可溶画分(Total lysate)を 20 $^{\circ}$ C で、12,000rpm, 20 分間の遠心処理を行い、上清を組織全可溶画分とした。常法に従って、上述の組織全可溶画分溶液に冷アセトン(100%, 4 $^{\circ}$ C)を加えて、攪拌し、白濁した懸濁液を-80 $^{\circ}$ C で一晩放置し、アセトン沈殿を完結させた。その後 4 $^{\circ}$ 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 99.5% エタノールを加え、4 $^{\circ}$ C で 12,000rpm, 20 分の遠心処理し、残存する不純物(上清)を除き、たんぱく質沈殿画分を得た(約 100 $\mu$ g/tube, -30 $^{\circ}$ 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。Kato-III, MKN-45, MKN-74 などのヒト胃がん培養細胞株の可溶化は組織可溶化法に準じた。

### 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 $\mu$ g/tube 2 本をそれぞれ 1 unit の H 鎖 cICAT 試薬および L 鎖 cICAT 試薬反应用到に用意した。常法(2, 4)に従い、50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5)で可溶化し、TCEP(final 1mM, 95 $^{\circ}$ C, 10 min)で変性還元後、2.2mM の cICAT 試薬(AB)、<sup>13</sup>C (H 鎖)あるいは <sup>12</sup>C (L 鎖)標識を 37 $^{\circ}$ C、2 時間反応させた(反応液各 100  $\mu$ l)。未反応の試薬を 10mM DTT 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 $^{\circ}$ 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、10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH2.8, 25%CH<sub>3</sub>CN (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 (2~4 個連結) につけ、素通り部分を洗浄し、吸着した cICAT 試薬反応ペプチドを 30% CH<sub>3</sub>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℃、1~2 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。本ペプチドを減圧乾固した後、0.05%ギ酸/ 25% CH<sub>3</sub>CN に溶解し、SCX column(2.1 x 35mm)にて、0.05%ギ酸/25% CH<sub>3</sub>CN- 0.5 M ギ酸アンモニウム/5.88%ギ酸/25% CH<sub>3</sub>CN 系(ギ酸アンモニウム 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。なお、必要に応じて、得られた画分を、さらにアミド 80 カラムにより常法に従い分画した。

得られた cICAT ペプチドは Q-Star 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) Q-Star XL (ESI-Q/TOF) での測定

SCX による分画・脱塩したペプチド (cICAT 標識) を 0.1%TFA-2% CH<sub>3</sub>CN にて再溶解し、nano-LC (LC-Packing)/Q-StarXL (AB,ESI-Q/TOF) および nano-LC /Probot (LC-Packings) にて分析した。カラムは PepMap™ C18 100, 3μm, 100 Å, 75μm x 150mm(LC-Packings)を使用し、Q-Star XL 用移動相は A: 5%CH<sub>3</sub>CN/0.1% HCOOH, B: 95% CH<sub>3</sub>CN/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。ABI-4700 用移動相は、A: 5% CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, B: 95% CH<sub>3</sub>CN/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、Q-Star XL で分析する場合は、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レ

ージ(約 55%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 Data 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。

#### 7) 相関性解析の方法

5 点以上のデータが得られているたんぱく質の cICAT 比(H/L 値)について、各たんぱく質間で網羅的に相関係数を算出し、R>0.8 (R<sup>2</sup>>0.64) を示すたんぱく質ペアを抽出した。近似線の相関係数の算出には Excel を用いた。

#### 8) 大規模網羅的解析を考慮したデータ品質管理

本プロジェクトでは、MS 測定担当の研究者とインフォマティクス担当研究者が協力し、大規模網羅的解析を考慮したデータ品質管理基準を検討・策定した。MS 測定は、機器に関して別途定められた基準に従って調整する他、試料を測定する直前に 2 回、直後に 1 回、品質管理のために BSA 断片を測定し、その内容を確認している。現在、全ての血清高発現試料の MS 測定は、上記の品質管理基準に従っている。この管理基準によって定められたチェック項目のうち、液体クロマトグラフィーの動作品質を保証するための確認項目として、以下のデータを、測定ごとに複数の BSA ペプチド断片について確認する：

- 1) 各ペプチド断片のピークの溶出時間のうち、最大値を取る時間を確認する。
- 2) 各ペプチド断片のピークが最大値を取る時間のピークの強度を確認する。

確認されたデータは、さらに所定のフォーマット

の表計算シートに読み込み、相対的な溶出時間などを確認し、液体クロマトグラフィーが安定動作しているかを確認する。

これら作業は、各測定後に3つのBSA測定だけでなく、機器調整の段階でも行う必要があり、従来の機器付属のソフトウェアで手作業で行う場合は、時間がかかる、ミスが起こるなどの問題点をかかえていた。そこで、今年度の取り組みとして、上記1)、2)の作業を自動化し、作業の効率化と時間短縮と、測定品質の向上を図った。

今回の自動化機能は、Webベースのシステムであり、各質量分析計からシステムに接続し、BSA断片測定ファイルを指定するだけの簡便な操作で所定の結果が得られる。システム側では、必要なXIC(Extracted Ion Chromatogram)の計算を、自動的に並列処理して結果を返すようにしている。

## 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 疾患関連たんぱく質の糖鎖修飾解析と医薬品化に向けた基盤技術の開発

#### 1) 血清グライコミクス技術の開発

今回ターゲットとした血清中の主要糖たんぱく質は、IgG、トランスフェリン、IgA、IgM、ハプトグロビン、 $\alpha 2$ マクログロブリン、 $\alpha 1$ -antitrypsin、 $\alpha 1$ -acidglycoprotein、complement C3、及びセルロプラスミン等である。これらの糖たんぱく質は血清中の含量が高いため、血清トリプシン消化物のLC/MS/MSとデータベース検索を行うと、これらに由来する多くのペプチドが上位に同定される。しかし、糖ペプチドは、イオン化効率がペプチドのイオン化効率よりも劣ること、糖鎖の不均一性により複数の分子イオンが生じること、さらに、MS/MSにおいて糖鎖に由来する複雑なプロダクトイオンが生じることから、検索エンジンを用いた自動的なデータベース

検索では同定不可能である。

そこで、本研究では、図1の方法を検討することとした。すなわち、常法に従って血清からアルブミンを除去し、還元カルボキシメチル化した後、トリプシン消化し、LC/MS及びLC/MS/MSを用いてトリプシン消化物マップを作成する。LC/MS/MSで生じた糖鎖診断イオンを指標としてトリプシン消化物マップから糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを選び出し、データに加工を施した後、データベース検索によってペプチド部分を同定する。診断イオンを使っても選出されない糖ペプチドのマスマスペクトルは、市販の糖タンパク質を使って得られたペプチドマップ上の糖ペプチドの溶出位置等を参考にして選出する。最後に、同定された糖ペプチド周辺から、糖鎖が異なるペプチドを選び出し、糖鎖構造を解析する。また、別途MS/MSを伴わないLC/MSを行い、イオンピーク強度比から同一ペプチドに結合している糖鎖の割合を算出する。

以下に帰属結果を具体的に示す。

#### (1) データ依存的MS/MSスペクトルとデータベースを用いた糖ペプチドのペプチド部分の同定

図2(A)は、血清トリプシン消化物のLC/MSによって得られたTotal ion chromatogram (TIC)である。図2(B)は、LC/MSの各スキャンで得られた最も強度の高いイオンを前駆イオンとして行ったデータ依存的MS/MSで生じた糖鎖診断イオン $m/z$  204 (HexNAc<sup>+</sup>)の強度を示したものである。 $m/z$  204の強度が大きいプロダクトイオンスペクトルには、他の糖鎖関連イオンも観測されたことから、ほとんどが糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルであることが示唆された。

糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルの一例として、図3に147分に取り込まれた $m/z$  1320.9 (+3)のスペクトルを示す。 $m/z$  204 (HexNAc)、186 (HexNAx · H<sub>2</sub>O)、292 (NeuAc)、274 (NeuAc · H<sub>2</sub>O) および 366 (HexHexNAc)等の糖鎖由来のフラグメントイオンが強く観察さ