

以上のことから、FGF-receptor 2 を選択的に強発現している Kato-III 株は、FGF-receptor 2 siRNA により著しい増殖阻害を受けるので、FGF-receptor 2 に極めて依存する細胞増殖を行う細胞株と考えられる。また、未分化充実型腺がん株 MKN-45 及び中分化腺がん株 MKN-74 株が FGF-receptor 2 siRNA によって増殖阻害を受けないことは、FGF-receptor 2 が殆ど発現していないことと矛盾せず、これらの細胞株は他の受容体を介して増殖するものと考えられる。また、Kato-III 株と MKN-45 株の FGF-receptor 2 の mRNA レベルを RT-PCR 法で定量すると、Kato-III 株は MKN-45 株の約 300 倍多く発現していることが明らかになった(データ省略)。従って、この両株に関しては、FGF-receptor 2 の mRNA 発現とたんぱく質発現および機能(増殖能)とは良く一致することになる。一方、他のスキルス胃がん株の OCUM-1 株と NUGC-4 株に関して言及すると、OCUM-1 株は Kato-III 株の約 5 % FGF-receptor 2 たんぱく質を発現しているが、siRNA による増殖阻害を受けなかった。また、NUGC-4 株は殆ど FGF-receptor 2 たんぱく質を発現していなかったが、Kato-III 株に比べると弱いながら増殖阻害を受けた。このうち、OCUM-1 株は Kato-III 株に比べ 3 -4 倍多く EGF-receptor を発現していることから、恐らく、EGF-receptor の増殖系が主流であるので FGF-receptor 2 siRNA の阻害を受けなかったものと推定される。一方、NUGC-4 株が siRNA による阻害を受ける理由は定かではない。一つの可能性として、cICAT 法では検出できない類縁の受容体に siRNA が作用して弱い阻害を受けたことが考えられる。

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行っている。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 断片測定だけでなく、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を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、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。

9) 同定・定量精度向上とユーザ利便性向上へ向けた各種改良:

血清高発現たんぱく質解析データがハイスループットで質量分析部門から送られてくるようになると、バイオインフォマティクス側で行う同定結果、定量結果の検証についても、ハイスループット化を実現する必要がある。最終的な検証である「人の目による精査」を効率化するために、①システム側で実行可能な自動検証処理を可能

とするための各種機能の追加と、②人的精査作業を個人差なくルーチン化するためのマニュアルの作成、の2点を行った。以下システム側で構築した機能について概要を述べる。

#### (1)自動コンバイン・コンペア・フィルター・セーブ機能

・ Search Manager の Combine Mascot Results 画面に、「Combine & Filter」機能を追加することにより、指定した結果ファイルのコンバイン、ICAT-L と H のコンペア、これまで手作業で行っていた各種フィルター処理（後述）、スコア 20 以下のタンパク質の除去、Specified Protein の復活、データベースへのセーブを自動実行するようにした。コンバインするファイルの指定はマニュアルチェックで行うが、ファイル名絞込みなどのフィルタリング、チェックオール機能により、簡便化した。

・ この機能により、作業者は上記機能でセーブされたコンバインデータを出発点に、精査作業を実施すればよいことになった。

#### (2)ペプチド及び断片イオンの Mass 実測値と理論値とのずれを評価することによる偽陽性フィルター機能

・ Mascot で同定されたスコア 10 以上の全てのペプチドについて、前駆体イオンの質量実測値と理論値からのずれを線形回帰法によりフィッティングして、基準値以上外れたイオンについては、同定リストから除外した。

・ 同様の工程を b 系列、y 系列のフラグメントイオンについても行い、各フラグメントシリーズの信頼性指標として定義した。この指標を Peptide Verification の自動化に利用した。

#### (3)Peptide Verification 自動化

・ コンペア時に、ペプチドのスコアと上記偽陽性フィルターの結果を踏まえた基準（詳細省略）を用いて、各ペプチドについて、基準を満たしたペプチドに Y(真)の Peptide Verification Flag を付与した。

#### (4)Intersection 関連機能

・ タンパク質 A とタンパク質 B がトリプシン断片

ペプチドを共有していて、かつ各々固有のトリプシン断片ペプチドも含まれる場合

(Intersection の関係)、サンプル中にはたんに質 A と B が共存すると考えられ、共有されているペプチド (Intersection ペプチド) については A、B の定量計算から外す必要がある。

ところが、例えば B が偽陽性であった場合、上記共有ペプチドは A 固有のペプチドということになり、定量計算の扱いが変化する。このように、Intersection の関係は慎重に検討する必要がある。A 固有のペプチド、B 固有のペプチドのうち、Mascot スコアが 20 未満のものは Intersection を考慮した定量化の計算処理の対象から外すことにした。例えば、A 固有のペプチドがスコア 20 以上で存在し、B 固有のペプチドが全てスコア 20 未満だった場合は、B は A とは独立のたんぱく質とは考えず、Roll-up することにした。

・ 各たんぱく質に、Intersection ペプチドを共有する別のタンパク質が存在する場合、AP カラムに\*をつけることにした。作業者による精査の後、Intersection タンパク質が偽陽性であることが判明し Roll-up した場合、この\*が消えるようにした。

#### (5)Peptide Ratio, Protein Ratio 計算時のロジック変更

・ Peptide Details 画面に Intersection カラムを新設し、複数のタンパク質で共有されているペプチド (Intersection ペプチド) に\*マークをつけ、それらは Ratio 計算には考慮しないことにした。

・ たんぱく質ごとに、上記 Intersection ペプチドや飽和したペプチド (Caution カラムに satu) を除いたペプチドについて、ICAT 定量比の対数平均や対数分散を求め、最終的に基準値以上外れているペプチドを外れ値 (Outlier) として除去しタンパク質の比の計算には用いないことにした。

・ Peptide Details 画面に OLR (OutLier Removal) カラムを追加し、ペプチドが上記の外れ値とな

った場合、\*\*\*を付与して注意喚起した。

- ・OLR カラムに\*\*\*の付いているペプチドについては、その OLR ボックスをクリックすることにより、NCBI の SNP DB に登録されている SNP 情報を参照することができるようにした。
- ・これにより、同一のたんぱく質由来であるにも関わらず他のペプチドと大きく異なる比を持つペプチドについて、その変動の原因がアミノ酸置換を伴う SNP であるかどうかの検証が非常に容易の行えるようになった。

以上述べたようなシステムの機能追加と整備されたマニュアルによる作業者の精査作業のルーチン化により、たんぱく質同定・定量結果を最終的にデータベース登録するまでに PF 作業者がチェックに要する時間は1検体あたり2時間に短縮され、個人的なばらつきの少ない高精度なたんぱく質発現データベースを構築・提供することが可能になった。

#### E. 考察：

各研究協力機関から提供された全ての患者血清たんぱく質(624 検体)の解析に関しては、cICAT 法による上位約 140 種類、累計約 350 種類の高発現血清たんぱく質の同定と比較定量解析を完了させた。また、日本人の健常者血清として、糖尿病非罹患患者 42 検体(国際医療センター提供)およびボランティア健常人血清 30 検体(日本赤十字社提供)の解析も同様に行った。上述のデータは全て標準血清(CTS02S)をベースとして連結計算してある。さて、昨年の報告書にも記述したが、標準血清と日本人患者血清の調製法が一部異なるため、厳密な意味で健常者血清と患者血清を比較するためには、日本人健常者との比較が重要である。今回、国際医療センターより提供された上述の健常者血清(非糖尿病罹患)42 検体と標準血清を比較したところ、血小板由来のたんぱく質を除くと大きな差異は認められなかった。しかし、より詳細に検討すると僅かではあるが、血清主要たんぱく質の一部に差異があることが分かった。同様な傾向は赤十字社の健常者血清でも観察され

た。この差異が人種によるものなのか血清調製法によるものかは定かではないが、各疾患患者血清との比較解析には日本人健常者血清の解析結果を用いる方が望ましい。前述のごとく、標準血清をベースとして連結処理してあるので、日本人健常者血清と各疾患同士を比較解析することが可能である。

実際、糖尿病患者血清 73 検体と上述の健常者血清(非糖尿病罹患)42 検体を、標準血清を介して統計解析すると、糖尿病の合併症の有無・種類により、有意差( $p < 0.01$ )のある十数種類のたんぱく質が見いだされてきた。これらのたんぱく質が糖尿病及び合併症の発症にどのように関係するかは今後の課題ではあるが、同様なアプローチは他の疾患でも適用可能であることを示すものと思われる。

さて、上述の cICAT 法による血清解析では上位約 140 種類の同定と比較定量が可能であるが、より低濃度の血清たんぱく質(低発現血清たんぱく質)を解析することは未知の創薬ターゲットや診断マーカーを探索する上で極めて重要な課題である。勿論、大量の血清を用い、膨大な処理時間をかけ分画数を大幅に増加させ、質量分析に長時間かけて解析すれば同定たんぱく質数を増加させることも可能であるが、患者より採取可能な血清量は限られており、また、多数の臨床検体を迅速に解析し結果を提供する場合には、現実的には殆ど不可能な方法である。新たな視点での低発現血清たんぱく質の解析法が望まれていた。さて、患者血清たんぱく質を解析する目的の一つは、病変組織より血清に漏出した疾患関連組織たんぱく質を検出し比較することである。今回、我々は、cICAT 法の特性を利用し病変組織たんぱく質を介在させることにより、直接患者血清と健常者血清と比較するよりも遥かに多くの病変組織由来の低発現血清たんぱく質を解析する方法を見出した(特許出願済み)。実際に、病変組織由来たんぱく質としてパーキンソン病患者脳脊髄液(PD-CSF)を介在させ、パーキンソン病患者と健常者の血清を本法により解析すると、パーキンソン

病に特徴的な血清低発現たんぱく質が見出された。本方法は、リンクさせる病変組織たんぱく質を変換することにより、他の疾患でも応用可能であると考えられる。

一方、中枢神経系疾患患者の脳脊髄液(CSF)を直接解析することは、より病変部位に近いという点で勿論大変に重要である。すでに、2次元電気泳動法や iTRAQ 法で神経変性疾患患者の CSF の解析が試みられている(13)。今回、基礎検討用検体として、国立精神・神経センターで保存されていたパーキンソン病患者脳脊髄液(連結不可能匿名化、プールしたもの)を用いて、cICAT 法による CSF たんぱく質解析を検討した。血清と同様に、アジレント抗体カラムで処理した画分を解析したところ、313 種類(100  $\mu$ g あたり)のたんぱく質の同定が可能であった。この同定たんぱく質を分類すると、最も多いのは受容体であり、次いで細胞外マトリックス、情報伝達物質、細胞接着分子の順であった。このことから脳脊髄液は脳組織の細胞・細胞膜及び細胞質から漏出したたんぱく質を多数含むものと考えられる。なお、脳脊髄液のたんぱく質に関しては、米国のグループが iTRAQ 法で解析を行っているが、cICAT 法で同定した 313 種類のうち、211 種類は cICAT 法でのみ同定可能なたんぱく質であった(図 23)。その中には、各種受容体、神経変性疾患等に関与するとされる多数の低発現たんぱく質が含まれていた。iTRAQ 法は簡便でスループ性も高いが、cICAT 法の低発現たんぱく質の解析に有効という長所が反映されたものと思われる。以上のことから、今後、cICAT 法で中枢神経系疾患患者毎の脳脊髄液を解析することは疾患関連たんぱく質を探索する上で重要であると思われる。

胃がん等の組織たんぱく質の cICAT 法解析では、100  $\mu$ g から通常のルーチンアッセイ(SCX25 分画)では約 800-1000 種類のたんぱく質の同定と比較解析ができる。また、分画数を多くすれば 2300 種類のたんぱく質の同定・比較定量も可能であり、この点、血清とは大きく異なる。しかし、最大の問題点は Laser Micro-Dissection(LMD)による部

位特異的分取に長時間を要することである(100  $\mu$ g を分取するのに数週間を要す)。より高性能の LMD が望まれる。特に、スキルス胃がんのように原発部位のみを選択する場合は大変な技術・労力・時間を必要とする。しかし、得られた結果は、多くの興味ある知見をもたらした。

スキルス胃がんは胃がん全体の約 10% を占める極めて悪性であり殆ど治療効果が認められない。その最大の理由は、通常の胃がん検診では発見しにくく、発見された時にはすでに組織全体にがん細胞が広がり、手遅れのことが多い。その意味で、一刻も早く、スキルス胃がん早期診断法の確立及び創薬ターゲットの探索が切望されている。今回、スキルス胃がん患者 3 例及び通常の各種分化型胃がん 6 例及び乳がん 3 例につき、そのがん病変部位と正常腺組織部位を cICAT 法で解析した結果、スキルス胃がんは、本来、血液系・骨髄系に発現しているたんぱく質が選択的に強発現していることが分かった。特に、細胞膜受容体の CD177 はスキルス胃がん 3 例中 2 例で強発現(H/L =  $\infty$ )しており、免疫組織染色法でもスキルスがん細胞に局在することが確認された。なお、CD177 は真性赤血球増加症のマーカーであるがその機能の詳細は不明である。また、Fibrinogen-like 2 も 3 例中 2 例で強発現(H/L= 6-10)していた。Fibrinogen-like 2 は T リンパ球の一部が産生しウイルス性肝炎の劇症化に関与するとされるので、スキルス胃がんの特長点である線維増生を説明できるかもしれない。これらのたんぱく質は抗体医薬の創薬ターゲット候補及びバイオマーカー候補になる可能性が考えられる。また、胎児のある時期までは、血球系細胞は原始消化器管で産生されることを考慮すると、その血球系幹細胞とスキルス胃がん細胞との関係にも興味を持たれる。

国立がんセンター研究所の協力により導入した高速度 SELDI-QqTOF-MS システム(prOTOF 2000)を用いて、健常人(糖尿病非罹患)血清(40 検体)及び糖尿病患者血清(124 検体、合併症有無、種類別で群分け)を解析した。本システムは、質量

精度、分解能ともに高性能であり、かつ、高速度計測が可能であるため、上記の多数の臨床検体を短時間で解析することが可能であった。その結果、糖尿病性網膜症患者群で選択的に検出される8個のピークを迅速に見出すことができた。そのうちの1つ、 $m/z$  1866.2を抽出精製し、ABI4700の精密質量数測定法(ミリマス)、CID-MS/MS法を用いて詳細に解析した結果、本物質は予想に反してペプチドではなく、界面活性剤のCHAPSであることが判明した。本物質が、なぜ一部に検出されるのかは定かではないが、CHAPSは標準キット中にあるものなので、他のSELDI血清解析の場合も同様な現象は起こる可能性がある。今後、この点を、留意する必要があると思われる。一方、他の7つのピークはペプチドであるとおもわれる。これらのピークを同様に精製し、ABI-4700およびQSTAR XL等の精査用MSで同定をすれば、糖尿病に関係する疾患関連たんぱく質を見出すことが可能であろう。

#### F. 結論：

各研究協力機関から提供された各種疾患(23疾患)及び日本人健常者を含む全ての血清(624検体)について、cICAT法による高発現血清たんぱく質(上位約140種類、累計約350種類)の同定と比較定量解析を完了させ、その解析結果及び臨床情報が連結可能なデータベースに格納した。これにより、日本人健常者と各疾患群血清との統計解析が可能になった。一例として、糖尿病患者と日本人健常者とを比較した結果、糖尿病の合併症の有無・種類により、有意差( $p < 0.01$ )のある十数種類のたんぱく質が見いだされた。このことは同様なアプローチが他の疾患でも適用可能であることを示す。低発現血清たんぱく質の解析法は、新規な疾患関連たんぱく質の探索に極めて重要である。今回、組織たんぱく質を介在させることにより、病変部位より漏出する血清低発現たんぱく質の解析法を構築した(特許出願)。一方、患者組織たんぱく質に関しては、主としてがん患者組織試料(がん・正常組織等、34検体)をcICAT法によ

り解析した結果、スキルス胃がん細胞は本来血球系に発現しているたんぱく質(CD177等)を強発現していることが判明した(特許出願2件)。高分解能計測能をもつ高速度SELDI-QqTOF-MS法を導入して、糖尿病患者(合併症有無)血清(124検体)及び健常人血清(40検体)を解析し、合併症で観察されるピークの一つを同定した。さらに検討を要するが、他疾患にも応用可能であろう。以上、主として、cICAT法を用いて解析をしてきたが、今後は、iTRAQ法等も取り入れて疾患関連たんぱく質を探索することが望まれる。また、見出した疾患関連たんぱく質の機能解析を明らかにすることが知的財産権確保に必要である。

#### G. 健康危険情報：

特になし。創薬プロテオームファクトリー施設

#### H. 研究発表：

なし。

#### I. 知的財産権の出願・登録状況：

##### ①特許取得

1. 名称：アミノ末端修飾ペプチドの分離方法

発明者：高尾敏文、三上寿幸

特許出願予定(2008年2月10日)

2. 名称：新規ペプチド

発明者：山崎基生、高橋憲行、南野直人、佐々木一樹、高尾敏文、里見佳典

PCT/JP2006/314969号

日本、米国、ヨーロッパに移行予定(2008年)

3. 名称：スキルス型がんの疾患関連たんぱく質およびその使用

出願日：平成19年4月25日

出願番号：特願2007-115593

4. 名称：スキルス型がんの疾患関連たんぱく質およびその使用(追加特許)

出願日：平成19年10月24日

出願番号：特願2007-244433

5. 他2件出願予定

## K. 参考文献:

- 1) Kirk, C. et al. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2. 299-314(2003)
- 2) 金子勲: 疾患関連たんぱく質解析研究  
平成 16 年度総括・分担研究報告書(長尾拓編)  
p254-286.
- 3) 金子勲: 疾患関連たんぱく質解析研究  
平成 17 年度総括・分担研究報告書(山西弘一編)  
p.104-144
- 4) 金子勲: 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(山西弘一編)  
p.127-158
- 5) Ross, P.L. et al *Mol Cell Proteomics* 3,  
1154-1169(2004)
- 6) Kondo, T., Seike M. et al. *Proteomics*. 3,  
1758-1766 (2003)
- 7) Falk R. J., et al: Primary glomerular disease.  
In; Brenner and Rector' s *The Kidney*(ed by  
Brenner B.M.) p1293-1380, Saunders,  
Philadelphia, 2004
- 8) スキルス胃がん 基礎と臨床(Scirrhou  
Carcinoma of the Stomach -A  
Multidisciplinary Approach  
曾根融生、井藤久雄著(医薬ジャーナル社)
- 9) 組織病理アトラス(Atlas of Histopathology)  
第 5 版 小池盛雄、恒吉正澄、深山正久、  
森永正二郎著(分光堂)
- 10) Temerinac, S. Et al: *Blood* 95,  
2569-2576(2000)
- 11) Matunobu, T., Ishiwata T. et al: *Int. J.*  
*Onco*, 2, 307-314 (2006)
- 12) DeSouza, L et al: *J. Proteome Research* 4,  
377-386(2005)
- 13) Abdi, F. Et al: *J. Alzheimer' s Disease* 9,

293-348(2006)

## J. 研究協力者

- |       |                                           |
|-------|-------------------------------------------|
| 川崎ナナ  | 国立医薬品食品衛生研究所<br>生物薬品部 室長                  |
| 原園 景  | 国立医薬品食品衛生研究所<br>生物薬品部 主任研究官               |
| 橋井則貴  | 国立医薬品食品衛生研究所<br>生物薬品部 研究官                 |
| 堤 康央  | 独立行政法人医薬基盤研究所<br>創薬プロテオミクスプロジェクトリーダー      |
| 角田慎一  | 独立行政法人医薬基盤研究所<br>創薬プロテオミクスプロジェクト<br>主任研究員 |
| 鎌田春彦  | 独立行政法人医薬基盤研究所<br>創薬プロテオミクスプロジェクト<br>主任研究員 |
| 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                             |
| 佐々木一樹 | 同上 研究所 薬理部                                |
| 尾崎 司  | 同上 研究所 薬理部                                |
| 須藤浩三  | ヒューマンサイエンス財団流動研究員                         |
| 田家亜由美 | 文部科学省科学研究費特任研究員                           |
| 門田守人  | 大阪大学大学院医学系研究科<br>消化器外科学                   |
| 山本浩文  | 同上                                        |
| 中森正二  | 国立病院機構 大阪医療センター                           |
| 奥山明彦  | 大阪大学大学院医学系研究科<br>泌尿器科学                    |
| 野々村祝夫 | 同上                                        |
| 中山雅志  | 同上                                        |
| 中里雅光  | 宮崎大学医学部附属病院第三内科                           |
| 芦谷淳一  | 同上                                        |
| 山口秀樹  | 同上                                        |

### Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
佐々木一樹、 南野直人	生理活性ペプチド 探索のためのペプ チドミクス研究	寒川賢治、南 野直人	ペプチド と創薬	Medical Do	大阪	2007	51-56

#### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
堤 康央, 石井明子, 早川堯夫	第6節 機能性人工たんぱく質., バイオ医薬品の品質・安全性評価,	(株) エル・ アイ・シー		369-378	2007
Kamada H., Shibata H., Tsutsumi Y.	Development of new anti-TNF therapy.	Inflammation and Regeneration	27	512-515	2007
Sato S, Hanada R, Kimura A, Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Fujita T, Kato S, <u>Kangawa K</u> , Kojima M, Shinomiya K, Takeda S.	Central control of bone remodeling by neuromedin U.	Nat Med	13	1234-1240	2007
Takahashi H, Kurose Y, Sakaida M, Suzuki Y, Kobayashi S, Sugino T, Kojima M, <u>Kangawa K</u> , Hasegawa Y, Terashima Y.	Ghrelin differentially modulates glucose-induced insulin secretion according to feeding status in sheep.	J Endocrinol	194	621-625	2007
Sakamoto T, Mori K, Nakahara K, Miyazato M, <u>Kangawa K</u> , Sameshima H, Murakami N.	Neuromedin S exerts an antidiuretic action in rats.	Biochem Biophys Res Commun	361	457-461	2007
Iwakura H, Akamizu T, Ariyasu H, Irako T, Hosoda K, Nakao K, <u>Kangawa K</u> .	Effects of ghrelin administration on decreased growth hormone status in obese animals.	Am J Physiol Endocrinol Metab	293	E819-825	2007

Toshinai K, Mondal MS, Shimbara T, Yamaguchi H, Date Y, <u>Kangawa K</u> , Nakazato M.	Ghrelin stimulates growth hormone secretion and food intake in aged rats.	Mech Ageing Dev	128	182-186	2007
T. Naka, E. Katsumata, K. Sasaki, N. Minamino M. Yoshioka, Y. Takei	Natriuretic peptides in Cetaceans: Identification, molecular characterization and changes in plasma concentration after landing	Zool. Sci	24	577-587	2007
H. Yamaguchi, K. Sasaki, Y. Satomi, T. Shimbara, H. Kageyama, M.S. Mondal, K. Toshinai, Y. Date, L.J. Gonzalez, S. Shioda, T. Takao, M, Nakazato, N. Minamino.	Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2	J. Biol. Chem.	282	26354-26360	2007
Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. and Kohsaka, S.	Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglia chemotaxis.	Glia	55	604-616	2007
Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, BV., Jacobson, KA., Kohsaka, S. and Inoue, K.	UDP acting at P2Y(6) receptors is a mediator of microglial phagocytosis.	Nature	446	1091-1095	2007
Setsubie, R., Wada, K.	The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases.	Neurochem. Int.	52	105-111	2007
Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T. and Wada, K..	Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening.	Bioorgan. Med. Chem	15	6810-6818 2007	



Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J., Miyoshi, K., Ogawa, N. and Murata, M.	Preventing effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinine formation.	Neurosci Res.	60	106-113	2007
Murata, M., Hasegawa, K., Kanazawa, I., The Japan Zonisamide on PD Study Group	Zonisamide improves motor function in Parkinson disease. A randomized, double-blind study.	Neurology	68	45-50	2007
Funayama, M., Li, Y., Tomiyama, H., Yosino, H., Imamichi, Y., Yamamoto, M., Murata, M., Toda, T., Mizuno, Y. and Hattori, N.	LRRK2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population.	Neuro Report	18(3)	273-275	2007
Tagawa, K., Marubuchi, S., Qi, M.L., Enokido, Y., Tamura, T., Inagaki, R., Murata, M., Kanazawa, I., Wanker, E.E. and Okazawa, H.	The induction levels of heat shock protein 70 differentiate the vulnerabilities to mutant huntingtin among neuronal subtypes.	J. Neurosci.	27(4)	868-880	2007
Satake, W., Mizuta, I., Suzuki, S., Nakabayashi, Y., Ito, C., Watanabe, M., Takeda, A., Hasegawa, K., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M. and Toda, T.	Fibroblast growth factor 20 gene and Parkinson's disease in the Japanese population.	Neuroreport	18	937-940	2007
Amino, T., Ishikawa, K., Toru, S., Ishiguro, T., Sato, N., Tsunemi, T., Murata, M., Kobayashi, K., Inazawa, J., Toda, T. and Mizusawa, H.	Redefining the disease locus of 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia.	J. Hum Genet	52	643-649	2007
青木吉嗣, 山本敏之, 尾方克久, 大矢 寧, 小川雅文, 村田美穂	嚥下造影検査が重症筋無力症増悪の評価に有効であった1例.	臨床神経学	47(10)	669-671	2007
村田美穂	パーキンソン病の治療、薬物療法.	Clini Neurosci.	25	82-85	2007

青木吉嗣, 岡本智子, 大矢 寧, 小川雅文, 村田美穂, 山村 隆, 大槻泰介	多発性硬化症が疑われた頸髄海綿状血管腫の49歳女性例.	脊椎脊髄ジャーナル	20(3)	273-278	2007
村田美穂, 長谷川一子	ディベート、パーキンソン病の初期治療はレボドパカ、ドパミンアゴニストか?	Clini Neurosci..	25	240-241	2007
村田美穂	パーキンソン病の診察のポイント.	MB Med Reha.	76	7-12	2007
村田美穂	Parkinson病患者における日中睡眠過多と突発的睡眠.	神経内科	60(1)	67-71	2007
村田美穂	パーキンソン病の治療戦略、早期患者への治療方針.	内科	99(5)	787-791	2007
服部信孝, 村田美穂, 佐藤健一, 鈴木正彦	内科医のためのパーキンソン病診療、座談会、パーキンソン病治療のこれから.	内科	99(5)	884-894	2007
村田美穂	薬物治療、我が国初の新規治療薬の開発に向けて - 新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの開発 - .	最新医学	62(7)	40-45	2007
Tokuda H, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Hanai Y, Hosoi T, Harada A, Ohta T, Kozawa O.	(-)-Epigallocatechin gallate enhances prostaglandin F2 $\alpha$ -induced VEGF synthesis via up-regulating SAPK/JNK activation in osteoblasts.	J.Cell.Biochem.	100	1146-1153	2007
Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Hosoi T, Harada A, Ohta T, Kozawa O.	(-)-Epigallocatechin gallate suppresses endothelin-1-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts: inhibition of p44/p42 MAP kinase activation.	FEBS Lett.	581	1311-1316	2007
Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Kozawa O.	Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt limits FGF-2-induced VEGF release in osteoblasts.	Mol Cell Endocrinol	267	:46-54	2007
Tokuda H, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Doi T, Harada A, Takai S, Kozawa O.	Rho-kinase regulates endothelin-1-stimulated IL-6 synthesis via p38 MAPK in osteoblasts.	Biochem Biophys Res Commun	362	799-804	2007

Yamauchi J, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Doi T, Kato H, Ogura S, Kato K, Tokuda H, Kozawa O.	(-)-Epigallocatechin gallate inhibits prostaglandin D2-stimulated HSP27 induction via suppression of the p44/p42 MAP kinase pathway in osteoblasts.	Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.	77	173-179	2007
Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Harada A, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Ohta T, Kozawa O.	Platelet-derived growth factor-BB amplifies PGF2 $\alpha$ -stimulated VEGF synthesis in osteoblasts: function of phosphatidylinositol 3-kinase.	Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.	77	187-193	2007
Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Harada A, Yasuda E, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Ogura S, Ohta T, Kozawa O.	Negative regulation by p70 S6 kinase of FGF-2-stimulated VEGF release through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts.	J. Bone Miner. Res.	22	337-346	2007
Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Yasuda E, Toyoda H, Kaneoka Y, Yamaguchi A, Kumada T, Kozawa O.	Protein kinase C $\delta$ regulates the phosphorylation of heat shock protein 27 in human hepatocellular carcinoma.	Life Sci.	81	585-591	2007
Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Kozawa O.	Limitation by p70 S6 kinase of PDGF-BB-induced IL-6 synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells.	Metabolism.	56	476-483	2007
H. Korekane, S. Tsuji, S. Noura, M. Ohue, Y. Sasaki, S. Imaoka, Y. Miyamoto	Novel fucogangliosides found in human colon adenocarcinoma tissues by means of glycomic analysis	Anal Biochem	364	37-50	2007

## 1. 新しいペプチドの探索法

### 4) 生理活性ペプチド探索のためのペプチドミクス研究

佐々木一樹・南野直人

質量分析法、ゲノム情報の拡充、生物情報学の進歩に支えられてタンパク質の発現解析が可能になった。しかし、生物試料に含まれる生理活性ペプチドなどの内在性ペプチドは、現在のプロテオミクスの手法をそのまま応用しても解析が困難で、ペプチドミクスの概念が新たに提唱されている。本稿では、生理活性ペプチドの探索とペプチドミクスの関わりについて記述する。特定の活性を指標に目的ペプチドを精製して同定する従来の手法とは異なり、同定した内在性ペプチド群から候補ペプチドを選択し、合成して実際に活性の有無を検証する新しいアプローチで、今後の発展が期待されている。

#### はじめに

ペプチドミクスは内在性ペプチドを包括的に解析する研究分野と定義される<sup>1)~5)</sup>。分子量が1万以下のアミノ酸のポリマーをペプチドとみなすと、生物試料中のペプチドの大半はタンパク質の代謝過程で生じる断片である。創薬の観点からは、ペプチドミクスには新規生理活性ペプチドの探索が期待されている。本稿では、ペプチドミクスの生理活性ペプチドとの関わりを中心に記述する。

#### I. ペプチドミクスに要請されること -タンパク質プロセッシング現象の理解

ペプチドミクスの手法で内在性ペプチド群から生理活性ペプチド候補分子を見出すためには、細胞内でタンパク質が規則性をもって切断され、さらに修飾を受けていくパターンを実像に近いカタチで明らかにする必要がある。まず、このことについて説明する。

生理活性ペプチドは前駆体タンパク質から様々なプロテアーゼの作用で切断されて生成される。その過程はプロセッシングと呼ばれ、合成過程でミスフォールディングされたタンパク質や役割を終えたタンパク質がプロテアーゼで代謝的分解を受ける現象あるいは非特異的な分解現象とは区別される。多くの生理活性ペプチドの場合、プロセッシングの第一段階はプロホルモン変換酵素が前駆体タンパク質中の塩基性アミノ酸対のC端側を認識して切断することから始まる。ただし、塩基性アミノ酸対が必ずしもすべて切断されるわけではなく、単一塩基性アミノ酸が認識されている事例も少なくない。引き続き、C端の塩基性アミノ酸はカルボキシペプチダーゼEで除去される。C端アミノ酸がグリシンの場合で、かつアミド化酵素の活性が高い条件下ではグリシンの $\alpha$ 炭素が酸化され、最終的にグリシンの直前の残基のカルボキシル基がアミドに変換される。内分泌系あるいは神経系細胞から分泌される生理活性ペプチドが注目

内在性ペプチド、ペプチドミクス、プロテオミクス、質量分析、タンデム質量分析、LC/ESI-MS、LC/MALDI-MS、生理活性ペプチド、翻訳後修飾

されてきたが、それら以外の細胞から産生される活性ペプチドでは塩基性アミノ酸以外の部位でプロセッシングを受けている事例が多く、プロホルモン変換酵素以外の多様なプロテアーゼが関与している。

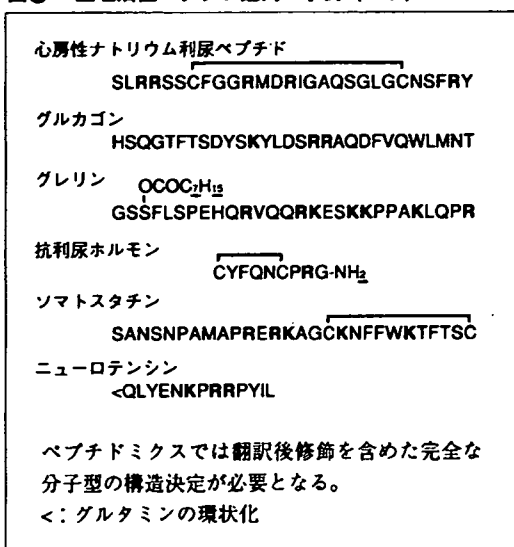
プロセッシングの様相は様々で、同じ前駆体タンパク質であっても細胞ごとに異なるばかりでなく、細胞の環境次第で変化する。これらに加えて、生理活性ペプチドは多様な翻訳後修飾を受け、機能発現に重要であることが多い。細胞内では多種類の酵素によって時間的・空間的に巧みな制御を受けながら、このような一連のプロセッシングが進行している。ゲノム情報のみではプロセッシングは予測されず、酵素類の協調作業の結果として生じた一連の内在性ペプチドの構造決定の蓄積のうえに初めて明らかになる。これがペプチドミクスの課題といえる。そして、上述のようなプロホルモン変換酵素に依存しない非典型的なプロセッシングの様相を体系的に把握できれば新規ペプチドの発見に有用な知見となる。内在性ペプチドの効率的な構造決定および未知の翻訳後修飾の解析などの要請に応えられる技術は質量分析のみである。現在は少数点以下2桁目まで正確なペプチドの質量測定が日常的に可能になっている。さらに定量性を加味した質量分析が可能になればプロセッシングの理解に有用である。本稿では割愛するが、定量的な解析についても、安定同位体を利用した方法が発表されており、今後は実試料での検討が期待される。

## II. プロテオミクスとペプチドミクスの違い

発現解析に際して、プロテオミクスもペプチドミクスも質量分析法を用いるので相違がわかりにくい。プロテオミクスの手法では内在性ペプチドは同定されない。ここではプロテオミクスとの違いについて説明する。

ほとんどの発現プロテオミクス研究では、タンパク質を酵素で消化して、質量分析で対処可能な断片ペプチドを取り扱う。C端が塩基性アミノ酸になるペプチドが質量分析上有利なため、トリプ

図① 生理活性ペプチド配列の事例 (ヒト)

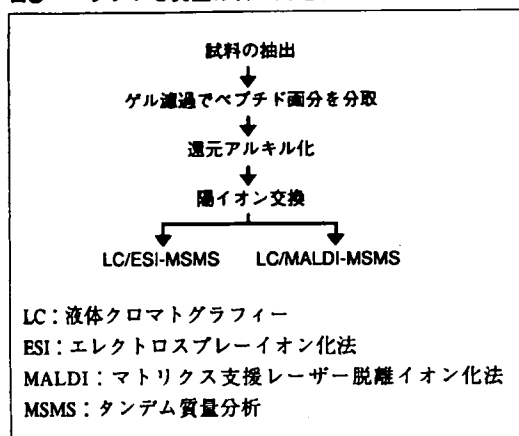


シンや LysC エンドペプチダーゼを汎用する。ある1つのタンパク質を酵素消化すると複数種類の消化ペプチドが生成するが、それらすべてが均一に検出され、後述のタンデム質量分析で同定されるわけではない。タンパク質の配列の中で消化ペプチド断片の少なくとも1種類の同定によって、タンパク質の同定と結論している。一方で、ペプチドミクスでは内在性ペプチドの同定が課題であり、生理活性ペプチドの分子型を決定するには人為的な酵素消化はできない (図①)。

また、生物試料中での生理活性ペプチドの存在量の少なさは発現解析で問題になる。質量分析では存在量の多い分子、イオン化されやすい分子が検出されやすい。したがって、試料の抽出過程で様々なプロテアーゼが活性化されて存在量の多いタンパク質が分解される状況を最小限に抑える必要がある。このような外的要因で生じる分解ペプチドは、生体内で厳密な制御下で生成する内在性ペプチドと比較して圧倒的に量が多いばかりでなく、両者は抽出過程で区別がつかなくなる。とりわけ生理活性ペプチドは微量かつ易分解性であり、抽出法の成否に大きく左右される。

共存するタンパク質の分解を抑制させる条件を各試料について吟味のうえで試料を抽出した後に、

図9 ● ペプチドを質量分析で同定するまでの流れ



内在性ペプチドの同定を可能にするために試料からタンパク質成分を除去する。質量分析するまでの試料調製の流れを図9●に示した。

### Ⅲ. ペプチドの同定

同定手段としてのタンデム質量分析法の進歩がペプチドミクスに大きく貢献し、従来のEdman分解法は有用性が低下した。タンデム質量分析法の利点は、単一に試料を精製する必要がなく、またN端ブロックが問題にならないことである。これはEdman法にはない特色である。すなわち、混在する多種類のペプチドより特定の質量をもつペプチドのイオンを電気的に選択し、そのイオンを断片化させて得られる多数のプロダクトイオンの質量を測定する。

測定値に相当する質量をもつ候補配列をデータベースより検索後に、各候補配列の断片化で生じるプロダクトイオンの理論値と、実測値を照合する。この作業は支援ソフトウェアで迅速に実施される。適合度が最上位にランクされた候補と第二候補が適合度において明瞭な差があるほど最上位の候補が当該ペプチドである確率が高くなる。これをもって「同定」とする。

質量精度が高い装置では誤差範囲を狭めて候補配列を選出できるので、偽陽性が少なくなる。プロテオミクスでは特異性の明瞭な酵素で切断するので、C端アミノ酸について限定した選出ができる。

しかし、内在性ペプチドはC端アミノ酸が任意なので、偽陽性のペプチドの数も多くなりやすく同定の確度が下がりやすい。したがって、ペプチドミクスではプロテオミクス以上に精密質量測定が肝要である。これは翻訳後修飾を検討するうえでも重要となる。

### Ⅳ. ペプチドの質量分析の実際

プロテオミクスが取り扱う酵素消化ペプチドはタンパク質中の塩基性アミノ酸の出現頻度からすると、多くの場合、質量が2500以下になる。プロテオミクスではこれ以上大きなペプチドは事実上考慮が不要である。一方で、生理活性ペプチドは質量が3000を超えるものが多数存在し、アドレノメデュリンのように6000に達するペプチドもある。生理活性ペプチド前駆体タンパク質に由来するプロペプチドの多くも質量は6000を超えている。

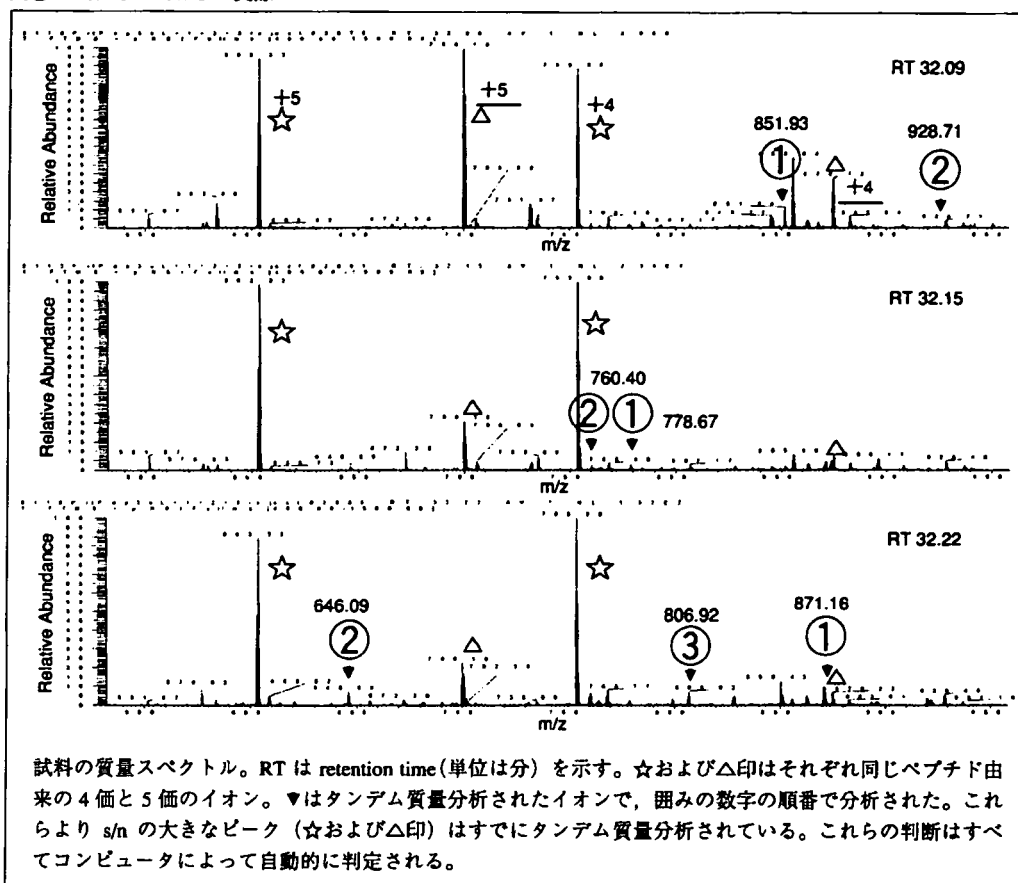
ペプチド同定の効率を高める立場からは、MALDIおよびESIの双方のイオン化法を併用した分析が望ましい。MALDIでは1価のみならず2価イオンも多く観測される。ESIは多価イオンが検出されるので、質量が9000程度までのペプチドに対応は可能である。質量が1万以下の領域では電気泳動ゲル染色に比べて質量分析の感度が高いことは明らかだが、3000を超えるペプチドの同定にはpmol程度が必要となる。

#### 1. ペプチドミクスで利用される高効率な分析法

ペプチドは精製の最終過程で逆相系カラムを用いる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が用いられる。逆相HPLCは移動相に塩を用いず質量分析法と相性がよい。現在はLC/ESI-MSMSおよびLC/MALDI-MSMSと呼ばれる方法で分析されている。

LC/ESI-MSMSは微流速(数百nL/min)送液が可能なHPLC、ナノカラム、タンデム質量分析計の3者をオンラインで接続したシステムを用いる。カラムから分離される試料をオンラインでESIチップの先端からスプレーさせて試料をイオン化させ、タンデム質量分析計に導入する。ある一定時間でイオン化される分子群の質量を測定し、設定閾値を超えたs/nをもつシグナルについて逐次タ

図● LC/ESI-MSMS の実際



ンデム質量分析を実施する(図●)。この方法ではカラムを通った試料はすべてスプレーされ、再測定はできない。また、溶媒や環境中に存在する夾雑イオンに妨害を受けやすい。しかし、複数回の測定にたる試料を準備できる場合は条件設定を変更して、同定ペプチド数を増大させられる。ペプチドミクスでは酵素消化ペプチドより大きな質量のペプチドを多く取り扱うので、ESIでの同定は分解能に優れた四重極飛行時間型の装置が使用されてきたが、近年イオントラップと電場型フーリエ変換法を併用するハイブリッド型質量分析計が登場し、極めて高い質量精度と分解能が同時に達成可能になった。

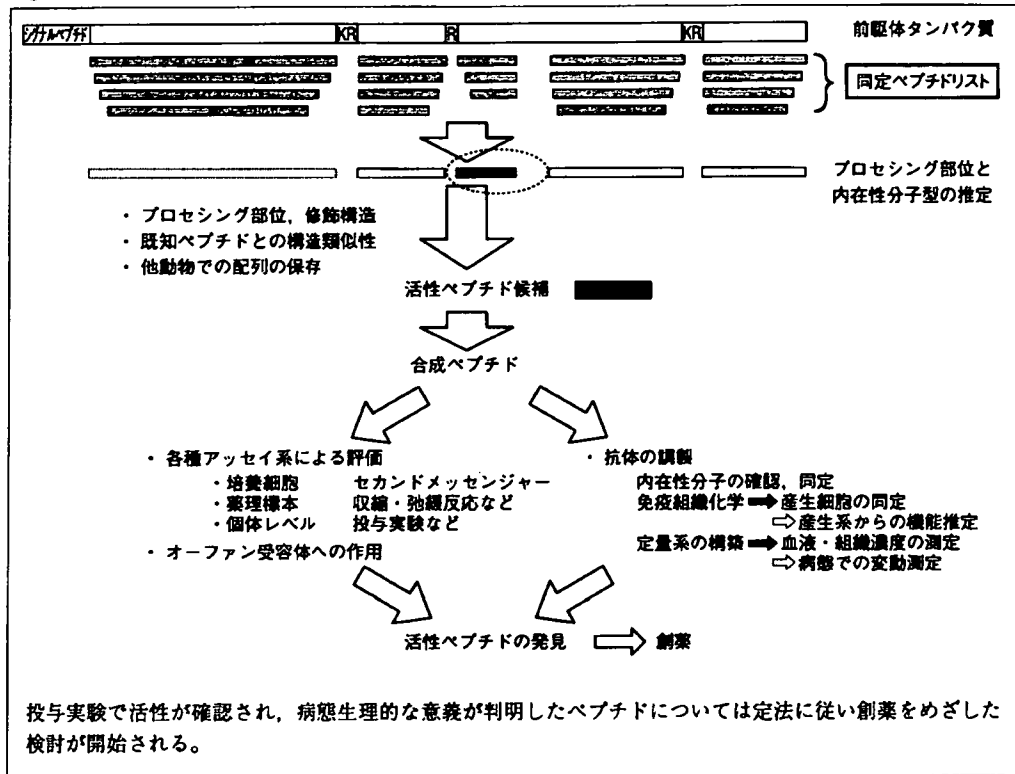
LC/MALDI-MSMSは、LC/ESIと同様に逆相系のナノカラムを用いて分離した試料をMALDIで測

定する方法である。カラムから分離した試料をMALDIのプレートにロボットを用いてスポットし、マトリクスを添加後に各スポット上のペプチド群の質量を測定する。引き続きタンデム質量分析は、一定の時間幅をもってカラムから溶出したペプチドについて、最も高いs/nが得られるスポットを選択しながら逐次実施される。プレート上に試料が保持されているため、条件を変えた再測定が可能であるのが大きな利点である。LC/MALDI-MSMSではタンデム飛行時間型の装置が有利である。

## 2. 同定されたペプチド群から新規活性ペプチドをどのように見出すか

同定ペプチドを個々の前駆体配列にマップする作業により、その前駆体のプロセシングの状況が浮かび上がってくる。既知生理活性ペプチド前駆

図● 候補ペプチドの選択と評価過程



体では、従来の生化学内分泌学的手法で明らかにされていたプロセッシングの様式が追認される。つまり、プロホルモン変換酵素で切断された後に、エクソペプチダーゼでC端あるいはN端から徐々に切断されていく様子が推定される。シグナルペプチド部分は全く同定されず、その部分は空白として際立つことも印象的である。これまでに活性ペプチドの前駆体とみなされなかった分泌タンパク質についても、このような作業で前駆体からのプロセッシングが推定でき、各領域について種間での相同性を検討し、さらに活性ペプチドに含まれる頻度の高いアミノ酸の有無、ジスルフィド結合

の有無、活性ペプチドに特徴的な翻訳後修飾の有無などを考慮して、合成ペプチド選択の判断材料にする。ペプチド配列のみで活性ペプチドか否かは判断できないので、免疫染色で発現部位の検討、生理学・薬理学的なアッセイ系で個々の作用を検証していくことになる(図●)。

### おわりに

ペプチドミクスを活用した生理活性ペプチド探索は様々な課題を抱えているが、関連分野の発展にともない今後新展開が期待される分野である。

### 参考文献

- 1) Clynen E, de Loof A, et al : Gen Comp Endocrinol 132, 1-9, 2003.
- 2) Schrader M, Schulz-Knappe P : Trends Biotechnol 19, S55-60, 2001.
- 3) Fricker LD, et al : Mass Spectrom Rev 25, 327-344, 2006.
- 4) 南野直人 : 蛋白質核酸酵素 46, 1510-1517, 2001.
- 5) Sasaki K, et al : Cancer Res 62, 4894-4898, 2002.



参考図書

\* これならわかるマスマスペクトロメトリー, 志田保夫  
他編, 化学同人, 2001.

参考ホームページ

- ・ 文部科学省科学技術振興調整費によるペプチドーム解析の公開データホームページ  
<http://www.peptidome.org>
- ・ タンデム質量分析で観測されるプロダクトイオンに基づいて, タンパク質配列データベースより合致する候補配列を検索させるソフトウェア  
<http://www.matrixscience.com>  
<http://prospector.ucsf.edu>

佐々木一樹

東京大学医学部医学科卒業  
国立がんセンター研究所細胞増殖因子研究部室長  
国立循環器病センター研究所薬理部室長

## 第6節 機能性人工タンパク質

### 1. はじめに

本章で前述されている抗体をはじめ、ホルモン、酵素、血液凝固因子、ワクチン、さらにはインターフェロン類、顆粒球コロニー刺激因子、エリスロポエチンなどのサイトカイン類やそのレセプターを含む機能性タンパク質は、遺伝性疾患、代謝異常、循環器病、がん、免疫疾患、感染症などの各種疾病に対する従来にはない特異的な薬効を発揮する医薬品として医療に大きなインパクトを与えてきた。最近、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス等の進展も相俟って、各種疾病の治癒に資すると思われるタンパク質(医薬品シーズ・タンパク質)を探索・同定し、これら医薬品シーズ・タンパク質を安全かつ効果的に疾病治療できる医薬品として開発しようとする試みが益々注目を集めるようになってきた。しかし、「医薬品シーズ・タンパク質」そのものを医薬品として使用しようとしても、これらは一般に体内安定性に極めて乏しいことや投与方法に限界があるために、臨床応用の際には全身に大量頻回投与を余儀なくされ、コンプライアンス面はもとより安全性・有効性面で必ずしも満足すべき結果が得られないことが往々にしてある。ちなみにサイトカインなどの生体内生理活性タンパク質は、様々な細胞上の複数のレセプターを介したり、活性タンパク質間のクロストークやフィードバック機構などを通じて、“必要な場所で、必要なタイミングと濃度で”多彩な *in vivo* 生理活性を示すものである。こうした生理活性タンパク質の薬理的効果を期待して生理的濃度を超えて非経口的

(全身)に投与すると、これらが非生理的な時空間で、非生理的な濃度でレセプターや他の生体機能分子と相互作用することになり、目的とする治療作用のみならず副作用の原因となる他の作用までも同時に発現してしまうことも少なからずある。これらの理由から、多くの機能性タンパク質のうちでそれ自体が医薬品化されたタンパク質は一部にすぎない。そこで、上記課題を克服し、医薬品シーズ・タンパク質の有効性と安全性を確保することを可能とする創薬技術の開発は、疾患関連タンパク質として探索・同定されたものをより多く医薬品化するためのキーポイントと言える。以上の観点から現在、機能性タンパク質の医薬品化を目指して生物学的あるいは化学的アプローチを用いて、有効性と安全性に優れた“機能性人工タンパク質”を創出しようとする試みがなされており、コンセンサスインターフェロンのようなタンパク質のアミノ酸配列改変体はもとより、ペグイントロンやペガシスのようなポリエチレングリコール(PEG)修飾タンパク質などが実際に臨床へ供され始めている。本節では、すでに医薬品として開発された機能性人工タンパク質について概説すると共に、新たな機能性タンパク質の創出技術並びに機能性人工タンパク質の品質、安全性確保策について述べることにする。なお近年、医薬品として多くの品目が承認されているヒト化モノクローナル抗体やその修飾体も機能性人工タンパク質の範疇ではあるが、すでに本章第4節および第5節で取り上げられているので本稿では言及しない。

## 2. 上市されている機能性人工タンパク質

これまでに日米 EU で承認されたタンパク質性医薬品の中で、“機能性人工タンパク質”と位置づけられる主なものを表 1 に示した。アミノ酸配列改変型、糖鎖改変型、PEG 結合同型、融合タンパク質に分類される。主として投与回数・投与量の削減を目指し、薬効の持続性を得るため体内(血中)での安定性の向上を図る、特定レセプターへの指向性付与(ターゲティング能の導入)を図る、また薬物自体の有効成分放出システムや作用機構を制御する設計を施して持続性や速効性を図るといった“タンパク質の体内動態制御”を目的とした改変が施されている場合が多い。言い換えれば、前項で述べたタンパク質の生体内における時空間的挙動を制御しようとするドラッグ・デリバリー・システム(Drug Delivery System : DDS)の 1 つとして、機能性人工タンパク質の創製が試みられているものが中心と言えよう。以下に、それぞれの機能性人工タンパク質の特性について簡単に述べる。医薬品の名称は、日本名が決められているものについてのみ日本語を併記した。

### 2.1 アミノ酸改変型

#### (1) 改変型インスリン

##### ・ Insulin lispro

インスリン リスプロ(ヒューマログ®)

インスリン B 鎖 28 番目の Pro を Lys に、B 鎖 29 番目の Lys を Pro に置換した改変体。インスリン分子間での会合を抑制する結果、多量体形成が阻害され、投与部位から血中への速やかな移行を実現した速効型インスリンである。

##### ・ Insulin Aspart インスリン アスパルト

(ノボラピッド®)

インスリン B 鎖 28 番目の Pro を Asp に置換し

た改変体。分子間の疎水的相互作用を抑制し、多量体形成が抑制される結果、投与部位から速やかに血中へ移行するため、速効型インスリンと位置づけられる。

##### ・ Insulin Glulisine (Apidra®)

インスリン B 鎖 3 番目の Asn を Lys に、B 鎖 29 番目の Lys を Glu に置換した改変体。多量体形成が抑制されるため、血中への速やかな移行が可能となった速効型インスリン。

##### ・ Insulin Glargin

インスリン グラルギン(ランタス®)

インスリン B 鎖 C 末端に Arg を 2 個付加し、A 鎖 C 末端の Asn を Gly に置換した改変体。等電点がインスリンの pH 5.4 より中性側にシフトしているため、pH 4.0 の製剤中では完全に溶解しているが、皮下投与されると pH が 7.0 まで上昇するために投与部位で微細な不溶体を形成する。個々のインスリン分子は、その不溶体からゆっくりと再溶解されて循環血中に入るため、血中にインスリンが徐放され、薬効の持続化が図られる。

##### ・ Insulin Detemir インスリン デテミル(Levemir®)

インスリン B 鎖 30 番目の Thr を欠損させ、B 鎖 29 番目(C末端)Lys の ε アミノ基に C14 脂肪酸を結合した改変体。アルブミンへの結合性を持つため、血中での滞留性が向上している。また投与部位での多量体形成とアルブミン結合性のため、血中に徐放されることから、薬効の持続化が期待される。比活性はインスリンと比較して低く、脂肪細胞における脂質合成を指標にした *in vitro* で代謝促進作用はインスリンの約 27% であり、インスリン受容体に対する親和性はインスリンの約 46% であること、また、インスリン様成長因子 IGF-1 受容体を介した細胞増殖促進作用はインスリンの約 11%、IGF-1 受容体に対する親和性はインスリンの約 16% であると報告されている<sup>1)</sup>。

表1 日米EUで医薬品として承認されている機能性人工タンパク質

分類	一般名	適応疾患	改変部位	付加された主な機能
<b>アミノ酸配列改変型</b>				
インスリン	Insulin Lispro	糖尿病	B28Pro→Lys, B29Lys→Pro	速効性(多量体形成抑制, 血中移行促進)
インスリン	Insulin Aspart	糖尿病	B28Pro→Asp	速効性(多量体形成抑制, 血中移行促進)
インスリン	insulin Glulisine	糖尿病	B3Asn→Lys, B29Lys→Glu	速効性(多量体形成抑制, 血中移行促進)
インスリン	Insulin Glargin	糖尿病	A鎖のC末端のAsn→Gly, B鎖のC末端にArg2個付加	持続性(中性pHでの溶解性低下による徐放化)
インスリン	insulin Detemir	糖尿病	B30Thr欠損, B29LysにC14脂肪酸結合	持続性(アルブミンとの結合による)
t-PA	Reteplase	急性心筋梗塞	Fドメイン, EGFドメイン, K1ドメイン欠損, 糖鎖なし	血中半減期延長
t-PA	Tenecteplase	急性心筋梗塞	K1ドメインの2アミノ酸置換, Pドメインの4アミノ酸置換	血中半減期延長
t-PA	Pamiteplase	急性心筋梗塞	K1ドメイン欠損, Arg275→Glu	血中半減期延長
インターフェロン $\alpha$	Interferon alfacon-1	C型肝炎	各サブタイプで出現頻度の高いアミノ酸に置換	比活性上昇
G-CSF	Nartograstim	好中球減少症	N末端付近5アミノ酸置換	比活性上昇
<b>糖鎖改変型</b>				
グルコセレブロシダーゼ	Imiglucerase	ゴーシェ病	シアル酸を酵素的に除去し, 糖鎖末端をマンノースに	標的細胞(マクロファージ)への取り込み促進
エリスロポエチン	Darbepoetin alfa	貧血	アミノ酸置換によりN型糖鎖付加部位を2カ所追加	血中半減期延長
<b>PEG結合型</b>				
インターフェロン $\alpha$	Peginterferon alfa-2a	C型肝炎	PEG修飾(40kDaの分岐型PEG, 1カ所, Lys)	血中半減期延長
インターフェロン $\alpha$	Peginterferon alfa-2b	C型肝炎	PEG修飾(12kDaのPEG, 1カ所, Lys他)	血中半減期延長
G-CSF	Pegfilgrastim	好中球減少症	PEG修飾(20kDaのPEG, 1カ所, N末端)	血中半減期延長
成長ホルモン誘導体	Pegvisomant	先端巨大症	9アミノ酸置換+PEG修飾(5kDaのPEG, 4-6カ所, Lys)	GHアンタゴニストとしての作用+血中半減期延長
<b>融合タンパク質</b>				
サイトカイン+毒素	Denileukin Diftitox	皮膚T細胞リンパ腫	Diphtheria toxin+IL2	IL2受容体に結合
膜タンパク質細胞外ドメイン+Fc	Etanercept	関節リウマチ	TNFR+Fc	TNFに結合+血中濃度持続
膜タンパク質細胞外ドメイン+Fc	Alefacept	尋常性乾癬	LFA3+Fc	CD2に結合+血中濃度持続
膜タンパク質細胞外ドメイン+Fc	Abatacept	関節リウマチ	CTLA4+Fc	CD80/CD86に結合+血中濃度持続