

Fig. 4. Two-dimensional map of the PA-*N*-glycans. The elution profiles of each PA-*N*-glycan on normal and reversed phase HPLC were expressed in glucose units (GU) based on the elution times of the PA-isomaltooligosaccharides and plotted on the map. (A) Map of peaks G1–G12. (B) Map of the sequential exoglycosidase digests of peaks G7, G8, and G11. Circles indicate the positions of the each peak. X indicates the position of the standard PA-*N*-glycan. Solid arrows indicate the direction of change in the elution positions after digestion with β 1,4-galactosidase. Dotted arrows indicate the direction of change in the elution position after digestion with α 1,3/4-fucosidase.

Table 2
Mass analysis of the PA-*N*-glycans G1–12

Peak	Mass		Estimated composition
	Observed	Calculated	
G1	1598.2	1598.6 [M+H] ⁺	Hex ₃ HexNAc ₅ -PA
G2	1744.3	1744.7 [M+H] ⁺	Hex ₃ HexNAc ₅ dHex ₁ -PA
G3	1744.2	1744.7 [M+H] ⁺	Hex ₃ HexNAc ₅ dHex ₁ -PA
G4	1906.2	1906.7 [M+H] ⁺	Hex ₄ HexNAc ₅ dHex ₁ -PA
G5	1906.2	1906.7 [M+H] ⁺	Hex ₄ HexNAc ₅ dHex ₁ -PA
G6	2069.1	2068.8 [M+H] ⁺	Hex ₅ HexNAc ₅ dHex ₁ -PA
G7	2215.1	2214.9 [M+H] ⁺	Hex ₅ HexNAc ₅ dHex ₂ -PA
G8	2213.9	2214.9 [M+H] ⁺	Hex ₅ HexNAc ₅ dHex ₂ -PA
G9	2229.8	2230.8 [M+H] ⁺	Hex ₆ HexNAc ₅ dHex ₁ -PA
G10	2068.5	2068.8 [M+H] ⁺	Hex ₅ HexNAc ₅ dHex ₁ -PA
G11	2359.7	2360.9 [M+H] ⁺	Hex ₅ HexNAc ₅ dHex ₃ -PA
G12	2230.2	2230.8 [M+H] ⁺	Hex ₆ HexNAc ₅ dHex ₁ -PA

β -galactosidase, respectively. Thus the structure of G11 was estimated to be 22bisF with two Lewis^x structures.

The estimated structures of PA-*N*-glycans G1–G12 are summarized in Table 3. One of the seven identified *N*-glycans is a triantennary complex-type *N*-glycan with core α (1,6) fucose residue, whereas the other six are derivatives of the

bisecting GlcNAc-bearing complex-type *N*-glycans with or without Lewis^x α (1,3) and/or the core fucose residues.

Discussion

Tissue heterogeneity and the consequent need for enrichment of specific cell types before sample analysis presents a major problem in the study of cancer. The presence of contaminating cells within a sample hampers its accurate molecular analysis, and the results obtained cannot easily be traced back to the biological properties of the tumor itself. Acquisition of specific cell populations in sufficient quantity and quality is a substantial challenge. LMD is one of the methods that is being increasingly used to overcome this problem, and has already been extensively employed for the analysis of DNA, RNA, and protein.

In this study, we have investigated the potential of LMD as a tool in cancer glycomics studies using colon cancer as a model. First, we confirmed the preservation of *N*-glycan profiles after histological procedures, including alcohol fixation, H&E staining, PBS washing, and dehydration with alcohol, followed by solubilization with HFIP/acetic acid mixture (Supplementary Fig. 1). PA-*N*-glycans prepared from the microdissected tissue samples were of sufficient quality for structural analysis in the form of two-dimensional sugar chain mapping and ESI-MS. These findings demonstrated the feasibility of using LMD in combination with *N*-glycan analysis for the clinical evaluation of cancerous tissue samples.

In this study, we compared the profiles of *N*-glycans derived from LMD samples (new method) with those from the non-LMD samples (conventional method). Our analysis of the LMD samples readily identified seven characteristic *N*-glycans whose marked expression differences between normal and cancerous colon cells could only be detected using the LMD procedure (Fig. 3). By contrast, analysis of the bulk samples (conventional method) did not reveal such alterations in these *N*-glycans. This result clearly indicates the existence of cells-type specific expression of *N*-glycans in the tissue specimen that can be detected with the aid of LMD. Thus, our study has demonstrated the general utility of LMD in glycan analysis by overcoming problems associated with tissue heterogeneity.

In summary, to the best of our knowledge, this is the first application and evaluation of LMD in cancer glycomics. The usefulness of this technique was demonstrated by showing the existence of unique changes to the expression of *N*-glycans in cancerous colon cells that can only be detected using microdissected cell samples. We believe that the combination of LMD and glycomics will define changes in glycan expression patterns that occur with cancer development and progression, and thereby facilitate the identification of new molecular markers and/or potential therapeutic targets. However, further refinements of the LMD technology to permit more rapid and reliable procurement of a substantial amount of sample will be required.

Table 3
Estimated structures of PA-*N*-glycans G1–G12

Peak	Structure	Abbreviation	CC/NC ratio ^a	
			LMD (-)	LMD (+)
G1		ag22bis	1.13	0.12
G2 (G3)		ag22bisF	1.20	0.10
G4 (G5)		G ₁ 22bisF	0.91	0.09
G6 (G10)		22bisF	0.66	0.13
G7 and G8		(Le ^x) ₁ 22bisF	0.74	0.09
G9 (G12)		224F	0.92	0.22
G11		(Le ^x) ₂ 22bisF	0.78	0.07

^a Ratios were calculated from the peak areas on reversed phase HPLC in Fig. 3.

Acknowledgments

This work was supported in part by Grant-in-Aid for Scientific Research (C) No. 17510191 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and by research grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.191.

References

- [1] A. Varki, Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology* 3 (1993) 97–130.
- [2] R.A. Dwek, Glycobiology: “towards understanding the function of sugars”, *Biochem. Soc. Trans.* 23 (1995) 1–25.
- [3] J.W. Dennis, M. Granovsky, C.E. Warren, Protein glycosylation in development and disease, *Bioessays* 21 (1999) 412–421.
- [4] A. Kobata, A journey to the world of glycobiology, *Glycoconj. J.* 17 (2000) 443–464.
- [5] D.H. Dube, C.R. Bertozzi, Glycans in cancer and inflammation—potential for therapeutics and diagnostics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 477–488.
- [6] S. Hakomori, Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism, *Cancer Res.* 56 (1996) 5309–5318.
- [7] S. Hakomori, Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 10231–10233.
- [8] M. Fukuda, Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens, *Cancer Res.* 56 (1996) 2237–2244.
- [9] J.W. Dennis, J. Pawling, P. Cheung, E. Partridge, M. Demetriou, UDP-*N*-acetylglucosamine:α-6-*D*-mannoside β1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice, *Biochim. Biophys. Acta* 1573 (2002) 414–422.

- [10] M. Fukuda, Roles of mucin-type *O*-glycans in cell adhesion, *Biochim. Biophys. Acta* 1573 (2002) 394–405.
- [11] R. Kannagi, M. Izawa, T. Koike, K. Miyazaki, N. Kimura, Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis, *Cancer Sci.* 95 (2004) 377–384.
- [12] Y. Zhang, I. Schmack, D.G. Dawson, H.E. Grossniklaus, A.H. Conrad, Y. Kariya, K. Suzuki, H.F. Edelhauser, G.W. Conrad, Keratan sulfate and chondroitin/dermatan sulfate in maximally recovered hypocellular stromal interface scars of postmortem human LASIK corneas, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (2006) 2390–2396.
- [13] N. Hirota, K. Mizuno, Y. Goto, Cooperative α -helix formation of β -lactoglobulin and melittin induced by hexafluoroisopropanol, *Protein Sci.* 6 (1997) 416–421.
- [14] S. Hess, F.J. Cassels, L.K. Pannell, Identification and characterization of hydrophobic *Escherichia coli* virulence proteins by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 302 (2002) 123–130.
- [15] S. Natsuka, S. Hase, Analysis of *N*- and *O*-glycans by pyridylamination, *Methods Mol. Biol.* 76 (1998) 101–113.
- [16] A. Kondo, J. Suzuki, N. Kuraya, S. Hase, I. Kato, T. Ikenaka, Improved method for fluorescence labeling of sugar chains with sialic acid residues, *Agric. Biol. Chem.* 54 (1990) 2169–2170.
- [17] K. Yanagida, S. Natsuka, S. Hase, A pyridylamination method aimed at automatic oligosaccharide analysis of *N*-linked sugar chains, *Anal. Biochem.* 274 (1999) 229–234.
- [18] S. Nakakita, D. Ama, S. Natsuka, S. Hase, Analysis of oligosaccharide structures of glycoproteins in polyacrylamide gel, *Anal. Biochem.* 303 (2002) 206–209.
- [19] I. Fujimoto, K.K. Menon, Y. Otake, F. Tanaka, H. Wada, H. Takahashi, S. Tsuji, S. Natsuka, S. Nakakita, S. Hase, K. Ikenaka, Systematic analysis of *N*-linked sugar chains from whole tissue employing partial automation, *Anal. Biochem.* 267 (1999) 336–343.
- [20] N. Tomiya, J. Awaya, M. Kurono, S. Endo, Y. Arata, N. Takahashi, Analyses of *N*-linked oligosaccharides using a two-dimensional mapping technique, *Anal. Biochem.* 171 (1988) 73–90.
- [21] Y. Makino, K. Omichi, S. Hase, Analysis of oligosaccharide structures from the reducing end terminal by combining partial acid hydrolysis and a two-dimensional sugar map, *Anal. Biochem.* 264 (1998) 172–179.
- [22] T. Takemoto, S. Natsuka, S. Nakakita, S. Hase, Expression of complex-type *N*-glycans in developmental periods of zebrafish embryo, *Glycoconj. J.* 22 (2005) 21–26.

質量分析の可能性—未知生体分子の探索ツールとして

高尾 敏文

生体は多種多様な分子の複雑な混合物であり、それぞれの分子は秩序正しく配置され、時間および空間軸で量変動や構造変化をしながら機能を発揮している。さらに、生体分子の複雑かつ巧妙な点は、一つの分子が微細な構造変化によって空間的配置を変えたり、相互作用する分子のレパートリーを変えたりすることにより、生理機能を発揮している点である。従って、それらを理解するには、複雑な生体分子の集合体を網羅的に調べ、そこに存在する全ての分子を同定、さらには、存在量や構造変化などを解析するということが重要である。多種多様な分子で構成される生体を一網打尽に解析できる方法は今のところない。また、生体という複雑系を考えると、そのようなことは到底かなう話ではない。しかし、現在の網羅的解析の方向を生んでいるのは、様々な生物種のゲノム塩基配列の決定を背景に、質量分析による蛋白質同定がハイスループットで簡便に行えるようになり、生命科学においてパラダイムシフトが起きたからにはかならない。現在では、蛋白質に留まらず、糖や脂質などの様々な生体分子の網羅的解析にも利用されるようになり、質量分析をフルに活用した“オーム”解析が盛んに行われるようになった。

どんな分析においても測定分解能と感度は分析技術の発展には欠かせない重要な要素である。前者は複雑な構造を解き明かす上で、後者は微量にしかない、例えば生体分子などを検出する上で重要である。質量分析も正にこの二つのポイントに

集約される技術開発が盛んに行われてきた。特に、測定感度という点においては、まず試料を気化し、イオン化する必要があるわけだが、30年程前までは、一般に揮発しにくい生体分子はまったく測定の対象外であった。1980年代に入り、いくつかの画期的なイオン化法が開発されたことにより、分析対象は一挙に生体高分子にまで拡がり、測定感度は飛躍的に向上し、今や、アト(10^{-18})モル量の極微量試料でも測定の範疇に入るほどの高感度測定が可能となった。

現在市販されている質量分析計は、分析部の方式としては大きく分けて5種類ほどだが、市販機の種類となると、プロテオミクスに絞っても約30機種以上挙げられる。このように多様な機種が開発される理由の一つは質量分析の特殊事情にある。質量分析法は分子や原子を電場や磁場の中で直接操作し検出するという点で、ほかの分光学的な分析法とはまったく異なる原理に基づいている。従って、質量分析を行うには、まず、試料分子を真空中に気化、イオン化するという極めて困難なハードルを乗り越えなければならない。そしてさらに厄介なことは、効率よく気化、イオン化するためには、それに適した試料を導入してやる必要がある。すなわち、試料の前処理や分離という質量分析の前段階が測定の結果を大きく左右し、特に、微量試料の場合は測定の成否を握る。そのような理由から、市販機では液体クロマトグラフィーなどの分離技術との組み合わせをはじめとする様々な工夫がなされており、装置の多様化

の一因となっている。

前述のように、難揮発性物質をイオンとして気化することは20世紀後半における質量分析の大きな命題であった。そのような中、1980年代半ばに相次いで報告された二つのイオン化法(エレクトロスプレーイオン化¹⁾とソフトレーザーイオン化法²⁾)は、特に生体高分子の測定を可能とし、2002年度のノーベル化学賞の対象にもなった。質量分析において、イオン化は生体試料のような微量試料に対しては測定の成否を握る極めて重要なポイントになるが、これら二つのイオン化法を駆使しても試料分子のほんの一部がイオン化しているにすぎず、近い将来、より高効率のイオン化法が出現するものと期待される。

生体には未だ検出されていない極微量の機能性分子や、疾患マーカーなどの生理機能はないが生理状態を反映する有用な分子があるものと考えられる。また、既知の分子においても、生体の中では発現量の変化やまだ知られていない微小な構造変化をしている可能性もある。それらを探索、解析する方法として、現状では、質量分析法は最も適した分析法といえるが、それには前述のように、質量分析に供するまでの試料の前処理や分離が極めて重要になってくる。最新の質量分析計を駆使すれば、“フェムトモルオーダーの試料量での測定がルーチンかつハイスループットで行える”とよくいわれる。しかし、実際の試料を質量分析にかける際には、大抵の場合、まず対象とする物質を濃縮あるいは分離したり、供雑物を除去したりする操作が必要となるため、どうしてもロスや分解は避けられず、フェムトモルオーダーの生体試料を出発材料として分析まで到達するのは極めて難しい。また、扱う試料の状態も、特に生体から得られるものは様々であり、一概に分析必要量を見積もるのは困難である。

以上のように、質量分析は多くの技術革新により、特に生物・医学の分野で大きく貢献、利用されるようになったが、今後その可能性を一層広げるには、質量分析法の特性を熟知した上で、目的の物質群に照準を当てた試料前処理法や分離技術をいかに工夫するかということが重要になってくる。試料調製、分離法は、検出したい対象試料分

子や出発材料に応じて最適な方法を確立する必要がある。言い換えれば、血液、尿、組織、細胞抽出物といった生体材料は、直接質量分析に供しても有意なデータを得るのは難しい。それらに対する前処理や分離法は、当然のことながら、ペプチド、蛋白質、あるいは糖鎖や脂質といった生体成分の何に照準を当てて分析するかによって異なり、また、目的に応じて最適化も必要となる。

実 例

生体材料を扱った質量分析による網羅的解析の一例として、われわれが現在取り組んでいる“尿中の蛋白質のプロファイリング”について紹介する。目的は、尿から早期診断や予後診断に有用な疾患マーカーを探索するためである³⁾。尿を対象とした理由は、実際にヒトの生体材料として最も調達しやすいこと、蛋白質の分解がほかの生体材料と比較して少ないという点が大きな理由である。勿論、尿をそのまま質量分析にかけてもペプチドや蛋白質はほとんど見えない。ましてや、疾患マーカーとなりうる微量ペプチド・蛋白質は検出できないので、当初はまず、尿からペプチド・蛋白質を効率よく単離するところから始める必要があった。ここでは簡単に質量分析までの試料調製の流れと解析結果について述べる⁴⁾。

図1に示したように、比較解析したい尿(ここでは妊娠中と出産後のヒトの尿)を別々に採取後、塩や色素などの低分子化合物を限外濾過により除き、得られた蛋白質溶液を乾固し、次に二つの試料間での量変動解析を行うために、それぞれの試料を通常の蒸留水で調製した緩衝液と¹⁸O標識水(H₂¹⁸O)で調製した緩衝液に別々に溶解し、同条件で酵素消化を行った。得られたペプチド混合物を同量混合の後、ナノHPLCで分離、溶離液を直接MALDI-MS用のステンレス製のプレートに30秒毎に位置を変えながらプロットした(図2a, 図3)。その後、MALDI用マトリックスとして、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸の溶液をそれぞれのスポットに添加し、乾燥後、図4に示すMALDIタンデム質量分析計を用いて測定した。それぞれの分画された試料スポットに対し、MS測定→分子質量と強度を取得→観測されたペプチ

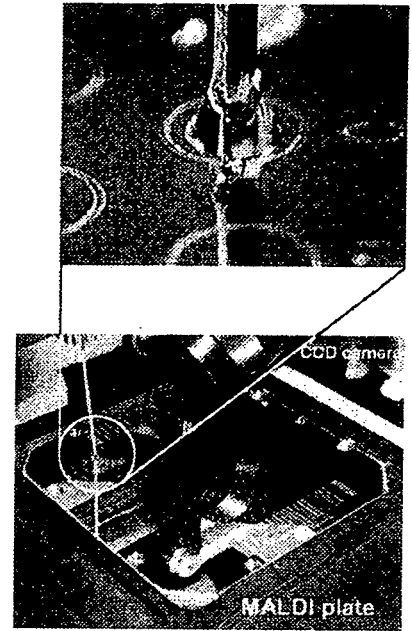
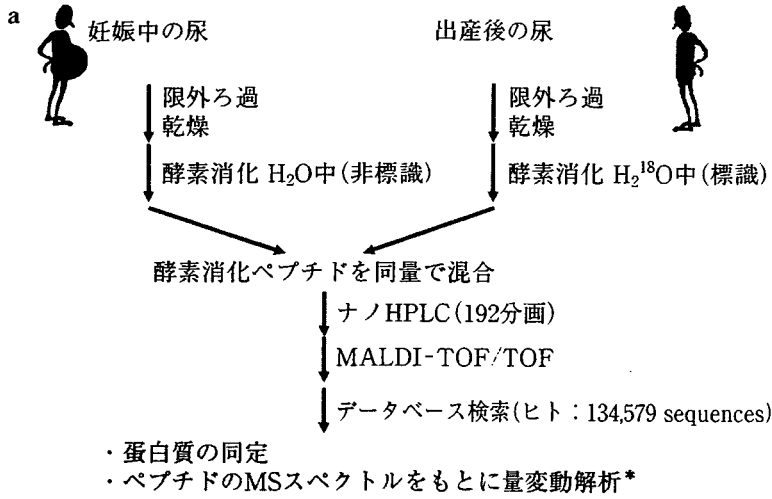


図 3 ナノ HPLC から溶出するペプチド溶液を MALDI-MS 用のプレートにプロットする様子

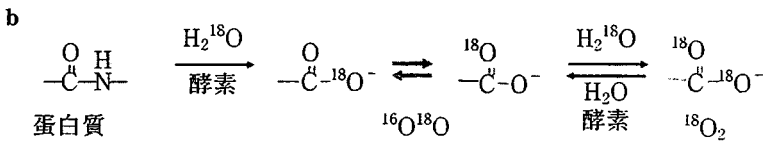


図 1 a: ヒト尿蛋白質のプロファイリングと比較解析の流れ, b: 酵素消化(加水分解)による¹⁸O 標識。* ウェブアプリケーション Isotopica (<http://coco.protein.osaka-u.ac.jp/Isotopica>) を用いて, 分子イオン領域に観測される¹⁶O₂, ¹⁶O¹⁸O, ¹⁸O₂の三つのイオン種のピーク強度比を算出(図 2 B, 2 C)

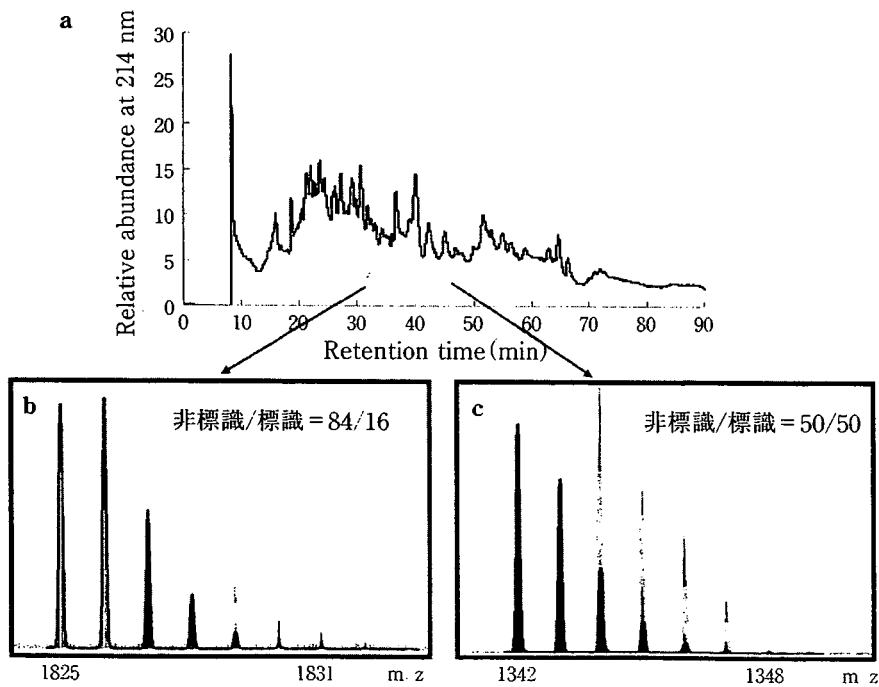


図 2 妊娠中と出産後のヒト尿由来蛋白質の比較解析

a: 別々に調製した妊娠中(非標識)および出産後(¹⁸O 標識)のヒト尿由来蛋白質のリシルエンドペプチダーゼ消化物の同量混合物のナノ HPLC。 **b, c:** 二つの典型的な MALDI-MS スペクトルの分子イオン領域。各々のペプチドは MS/MS により poly-Ig receptor (B), serum albumin (C) に帰属された。該当するアミノ酸配列と観測同位体分布をもとに非標識(青色のトレース)と標識(¹⁸O が 1 個 [桃色] と ¹⁸O が 2 個 [黄色] 導入された分子種の和)の比を Isotopica により算出。(巻頭カラー 8 頁)

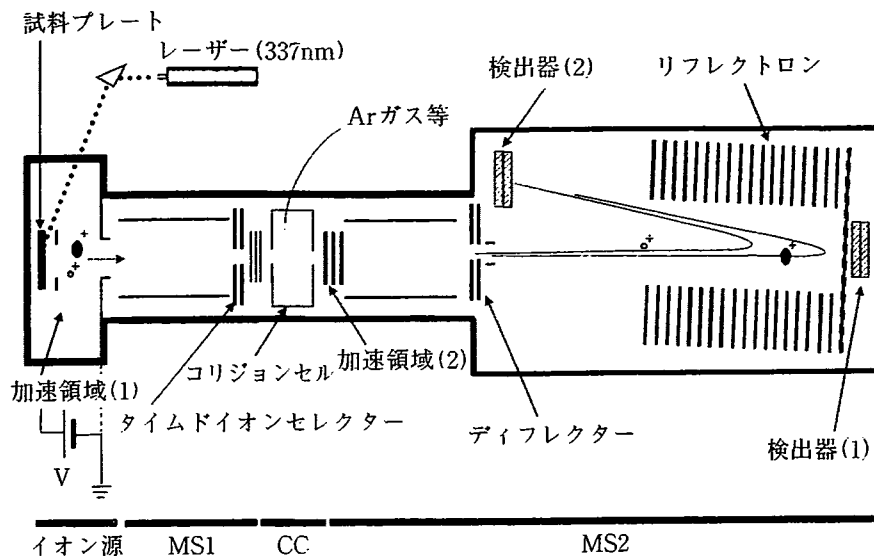


図 4 マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型タンデム質量分析計の概略図

飛行時間型質量分析計 2 台 (MS1 と MS2) をタンデムに連結した装置で、イオン化法としては紫外レーザー (337 nm) による MALDI が採用されており、ハイスループットでの蛋白質同定に適している。この装置による MS/MS では、MS1 で分離した特定のイオンをタイムダイオンセクターにより選択し、引き続き、選択したイオンをコリジョンセル内で分解、そして、生成したフラグメントイオンを一定のエネルギーになるように再加速後、MS2-リフレクトロン (反射電場) で質量分析することができる。そのため、分解能、精度の点で優れた結果を与えてくれる。

ドイオンを前駆イオンとして MS/MS 測定という一連の動作を自動で行った。測定時間はスポットの数とスポットあたりの前駆イオンの数などによって異なるが、一つの MS/MS 測定に要する時間は約 10 秒程度である。蛋白質の同定は、ヒトの配列データベース (134,579 配列, 2005 年 4 月) に対して、測定した全ての MS/MS スペクトル (この分析では約 500 枚) をもとに行い、同定結果は自動で出力される。

ここで示した方法では、1 回の採取の尿 10 ml を出発材料として、逆相系のナノ HPLC (90 分の通常のグラジエント分析) による 1 回の分離で約 50 種類程度の蛋白質が同定された。出発材料を増やす、あるいは、異なる試料調製法や高度な分離法 (例えばイオン交換と逆相系による二次元 LC) を用いれば、同定される蛋白質の種類や数は増えるが、ここではまず、尿中に存在する主要な蛋白質の存在様式 (種類と量) をみることにし、上述のような簡便な方法により分析を行っている。

さらに、二つの試料間での蛋白質の量変動解析に ^{18}O 標識法を利用した。すなわち、一方の試料は調製時に ^{18}O 標識を行い、もう一方は非標識下で調製し、両者を同量混合して分析を行った後に

後述の方法により非標識/標識の比を求めることで蛋白質の量変動を解析した (図 1 a)。 ^{18}O 標識法は蛋白質を酵素消化により断片化する際に簡単に行え (図 1 b)、生体試料の量変動解析にしばしば利用されるようになってきた。しかし、 ^{18}O 標識による質量シフトは +2 または +4u しかなく、天然同位体ピークと重なって観測されるために、最近まで標識、非標識のペプチドの量比を見積もるのは簡単ではなかった。われわれはこの問題を解決するために、新たにソフトウェア "Isotopica" を開発し^{5,6)}、WEB 上での公開、利用も開始している⁷⁾。このソフトウェアを利用すれば、実測されたペプチドの分子イオンをもとに、標識、非標識体の量比を正確に見積もることができる⁸⁾。図 2 C は血清アルブミン由来のペプチドだが、出産前後で変化はなく、ほぼ等量観測されている。それに対して図 2 b は poly-Ig レセプター由来ペプチドで、妊娠中では明らかに尿中に多く存在していることがわかる。

おわりに

質量分析計は感度、精度において性能は大幅に向上し、生命科学における優れた "探査機" となっ

たが、どのように“舵”を取るかは各研究者にかかっている。ここで紹介したような尿などの生体から得られる複雑な混合物試料に対して行う網羅的解析では、質量分析に供する試料をどのように調製するか、すなわち、抽出や精製法、出発材料の量や試料の安定性などによって結果は大きく左右される。従って、質量分析計を駆使した網羅的な解析から得られる膨大なデータから導かれるデータベース(蛋白質の種類と存在量)は一見普遍的なもののように思えるが、上述の理由から、われわれは意味のある、そして、再現性の取れる個々の比較解析から差のある分子の候補を的確に見つけることに集中して分析を進めている。特に、血液、尿、組織といった生体材料においては、個人差や年齢などによる個体内での生理的変化は少なからずあり、まして疾患マーカー探索においては病態による著しい変化が伴うことが予想され、ピンポイントでの的確な比較解析が重要と考える。現在、疾患マーカーなどの探索研究が盛んになっているが、一方では、分析対象としている材料、やり方では何も見つからないかもしれない、あるいは、使用している質量分析計の性能が十分でないかもしれないといった先の見えないリスクのある研究である。ここで紹介したような生体材料(尿)、そして用いた分析手法がマーカー探索におけるニッチと成りえるかどうかは、有効な(役に立つ)マーカー候補を一つでも世に送り出せるか

どうかにかかっている。このような厳しい現実も一方ではありながら、質量分析計の“探査機”としての大きな可能性を考えると、今まで見落としていた何か重要な、そして驚くような発見がそこにあるかもしれないといった探究心に駆られる。

●文 献

- 1) Yamashita M, Fenn JB: *J Phys Chem* 88: 4451, 1984
- 2) Tanaka K, Ido Y, Akita S et al: Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry, p 185, 1987
現在は、ほぼ同時にドイツのグループから発表されたマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)が普及している。(Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F: *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 78: 53, 1987)
- 3) 高尾敏文, 里見佳典, 佐々木一樹: 質量分析による尿タンパク質のプロファイリング, プロテオミクスによるがん研究の新戦略, 第63回日本癌学会学術総会記事, Vol. 95, pp 61-62, 2004
- 4) Taya A, Satomi Y, Suto K et al: Quantitative proteomics of human urine by ^{18}O -labeling Proceedings of the 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, 2005
- 5) Fernández-de-Cossio J, Gonzalez LJ, Satomi Y et al: *Rapid Commun Mass Spectrom* 18: 2465-2472, 2004
- 6) Fernandez-de-Cossio J, Gonzalez LJ, Satomi Y et al: *Nucleic Acids Res* 32: 674-678, 2004
- 7) <http://coco.protein.osaka-u.ac.jp/Isotopica/>
- 8) 里見佳典, Fernández-de-Cossio J, 高尾敏文: Webアプリケーション“Isotopica”による ^{18}O 標識定量プロテオミクス, 第53回質量分析総合討論会, pp 416-417, 2005

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¹⁾²⁾。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かたち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 α 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・空間的に巧妙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)

心房性ナトリウム利尿ペプチド	SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLCNSFRY
グルカゴン	HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT
グレリン	OCOC ₂₇ H ₁₅ GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
抗利尿ホルモン	CYFQNCPRG-NH ₂
ソマトスタチン	SANSNPAMAPRRERKAGCKNFFWKFTTSC
ニューロテンシン	<QLYENKPRRPYL

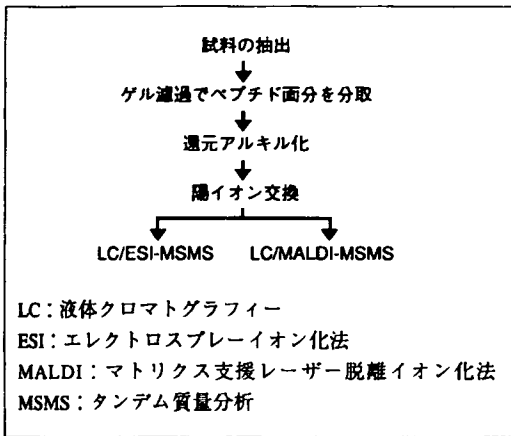
ペプチドミクスでは翻訳後修飾を含めた完全な分子型の構造決定が必要となる。
<: グルタミンの環状化

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● 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●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。

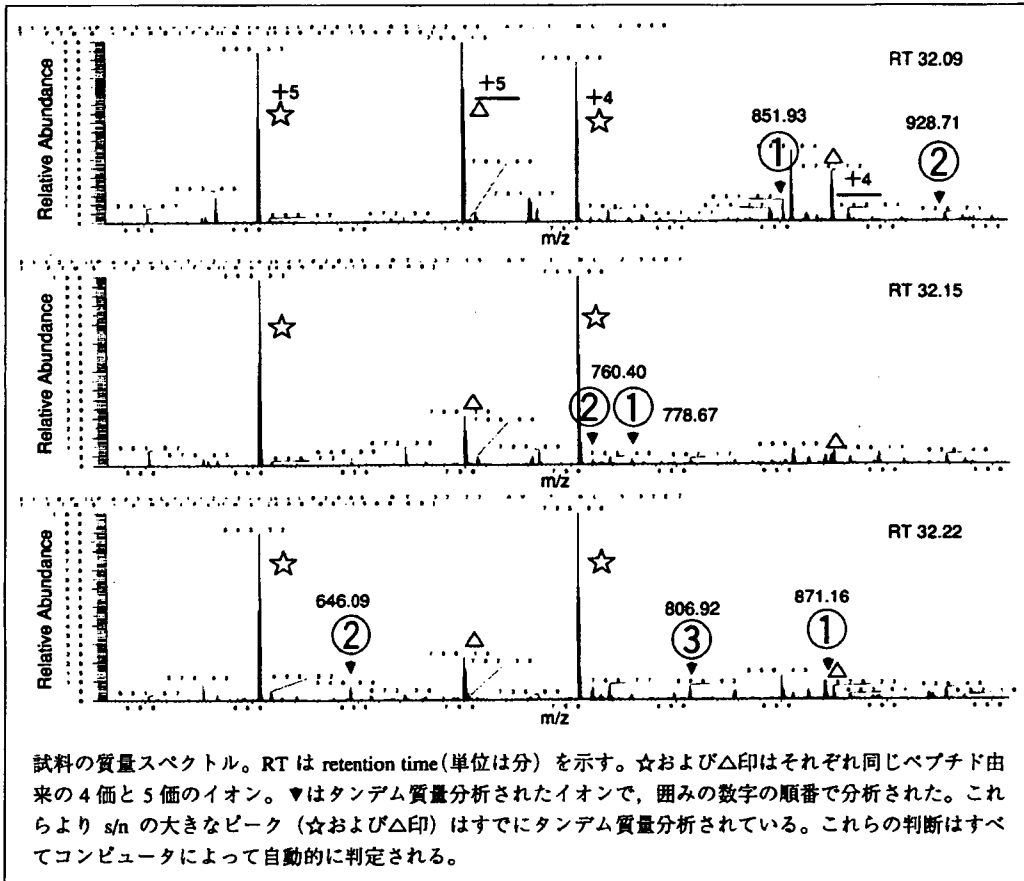
ペプチド同定の効率を高める立場からは、MALDIおよびESIの双方のイオン化法を併用した分析が望ましい。MALDIでは1個のみならず2個イオンも多く観測される。ESIは多価イオンが検出されるので、質量が9000程度までのペプチドに対応は可能である。質量が1万以下の領域では電気泳動ゲル染色に比べて質量分析の感度が高いことは明らかだが、3000を超えるペプチドの同定にはpmol程度が必要となる。

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ク

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。

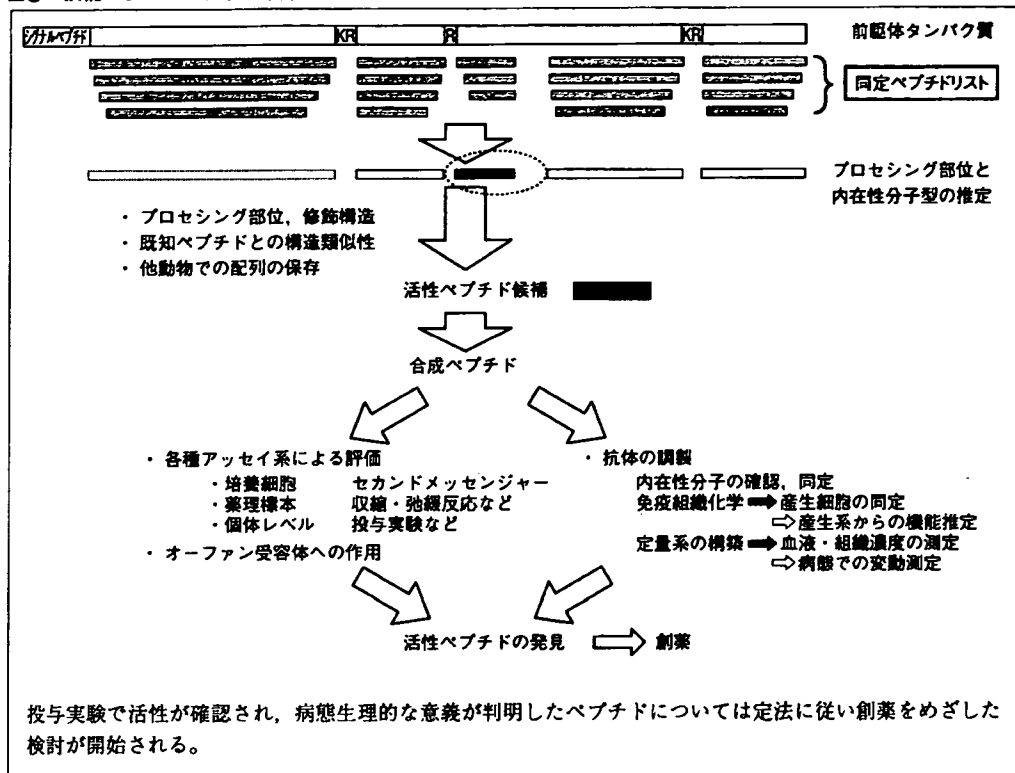
LC/MALDI-MSMS は、LC/ESI と同様に逆相系のナノカラムを用いて分離した試料を MALDI で測

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¹⁾。

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
アミノ酸配列改変型				
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 Gargin	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	Retepase	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 α	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
糖鎖改変型				
グルコセレブロンダーゼ	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
PEG結合型				
インターフェロン α	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 α	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
融合タンパク質				
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

(2) 改変型 tissue-plasminogen activator(t-PA)

・ Reteplase (Retavase®)

t-PA のドメインのうち、K2 ドメイン(Kringle2 ドメイン)とPドメイン(プロテアーゼドメイン)の2つのドメインのみからなる改変体。非改変型のt-PAでは血中半減期が約3分であるため、点滴静注(持続投与)によりようやく薬効が得られるが、Reteplaseの血中半減期は90分以上と延長されており、単回の静脈内投与が可能となっている。また、フィブリン親和性減少のため、血栓への浸透性が高く、血栓の速やかな溶解が可能であるとされている。

・ Tenecteplase (TNKase®)

t-PAのK1ドメインの103番目のThrをAsnに、117番目のAsnをGluに置換し、Pドメインの4つのAlaを置換した改変体。非改変型と比較して、フィブリン親和性および、t-PAの阻害因子であるplasminogen activator inhibitor-1への抵抗性が上昇し、血中半減期が延長されている。

・ Pamiteplase パミテプラーゼ(ソリナーゼ®)

t-PAのK1ドメインを欠損させ、天然型t-PAでN末端から275番目のArgをGluに置換した改変体。フィブリンに対する高い親和性を有し、プラスミノゲン活性化作用がフィブリンにより顕著に増強され、血中半減期も延長されている。

(3) 改変型インターフェロン

・ Interferon alfacon-1

インターフェロンアルファコン-1(アドバフェロン®)

ヒトインターフェロンアルファの12種類のサブタイプのアミノ酸配列において、各位置のアミノ酸を出現頻度の最も高いアミノ酸に置換した改変体。コンセンサスインターフェロンとも呼ばれる。現在臨床に供されている「PEG非修飾型」のインターフェロンアルファ(主としてインターフェロン α 2a/ α 2b)と比較して、高い抗ウイルス活性、抗肝炎活性を示す。

(4) 改変型顆粒球コロニー刺激因子

・ Nartograstim ナルトグラスチム(ノイアップ®)

Granulocyte colony stimulating factor(G-CSF)のN末端側から1, 3, 4, 5, 17番目のアミノ酸がAla, Thr, Tyr, Arg, Serに置換した改変体。天然型のG-CSFと比較して、約3倍の比活性を示す。

2.2 糖鎖改変型

(1) 糖鎖改変型グルコセレブロシダーゼ

・ Imiglucerase イミグルセラゼ(セレザイム®)

CHO細胞で生産された β -グルコセレブロシダーゼをシアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよびヘキソサミニダーゼの酵素処理により糖鎖末端をマンノースにした改変体。標的細胞であるマクロファージ表面に存在するマンノース受容体を介して細胞に取り込まれる。レセプターへの標的指向能、レセプター介在性のエンドサイトーシスを有するDDS製剤と位置づけられる。

(2) 糖鎖改変型エリスロポエチン

・ Darbepoetin alfa ダルベポエチン アルファ(ネスプ®)

5カ所のアミノ酸置換により、天然のerythropoietin(EPO)にN型糖鎖結合部位を新たに2カ所導入した改変体。天然のEPOには3本のN結合型糖鎖と1本のO結合型糖鎖が付加されているが、ダルベポエチンアルファでは、5本のN結合型糖鎖と1本のO結合型糖鎖が結合している。結合糖鎖が増えることにより血中半減期が延長され、投与量・投与回数の削減が期待される。

2.3 PEG 結合型

(1) PEG 結合型インターフェロン

・ Peginterferon alfa-2a

ペグインターフェロン アルファ-2a(ペガシス®)

インターフェロンアルファ-2aのリジン残基(主な部位：第31位、第121位、第131位、第

134位)の1カ所に、1分子の分枝ポリエチレングリコール(分子量:約40,000)が、アミド結合を介して共有結合している修飾タンパク質(分子量:約60,000)。血中半減期が従来の約10倍に延長されており、投与量・投与回数の削減、抗原性の低下が期待される。そのため、患者のコンプライアンスの向上に大きく貢献している。

・ Peginterferon alfa-2b

ペグインターフェロン アルファ-2b
(ペグイントロン®)

インターフェロンアルファ-2bのアミノ酸残基(Cys¹, His⁷, Lys³¹, His³⁴, Lys⁴⁹, Lys⁸³, Lys¹¹², Lys¹²¹, Tyr¹²⁹, Lys¹³¹, Lys¹³³, Lys¹³⁴, Ser¹⁶³およびLys¹⁶⁴)の1カ所に1分子のメトキシポリエチレングリコール(平均分子量:約12,000)がカルボニル基を介して共有結合している修飾タンパク質(分子量:約32,000)。血中半減期が延長されており、投与量・投与回数の削減、抗原性の低下が期待される。

(2) PEG 結合型顆粒球コロニー刺激因子

・ Pegfilgrastim (Neulasta®)

大腸菌で生産されたG-CSF(フィルグラスチム)のN末端アミノ酸に、メトキシポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド(平均分子量:約20,000)を1分子結合させた修飾タンパク質。血中半減期が延長されており、投与量・投与回数の削減が期待される。

(3) PEG 結合型成長ホルモン誘導体

・ Pegvisomant ペグビソマント(ソマバート®)

Human growth hormone(hGH)のアミノ酸配列を9カ所置換することにより、hGH受容体アンタゴニストとして作用するよう改変したタンパク質にPEG化を施した修飾タンパク質。タンパク質1分子あたり、4~6分子のPEG(分子量5,000)がLys残基に結合しており、体内安定性や血中滞留性の

向上が期待される。

2.4 融合タンパク質

・ Denileukin Diftitox (Ontak®)

Diphtheria toxinの一部(Met1~Thr387)-HisとInterleukin 2(IL-2)の一部(Aln1~Thr133)からなる融合タンパク質。リンパ腫細胞表面のIL-2受容体に結合し、受容体リガンド複合体として細胞内に取り込まれる。IL-2受容体の発現細胞へのターゲティング能を有し、これらの細胞特異的にジフテリアトキシンによるタンパク質合成阻害に基づいた細胞死を誘導する。

・ Etanercept エタネルセプト(エンブレル®)

ヒトTumor necrosis factor(TNF)受容体p75の細胞外のリガンド結合ドメインとヒトIgGのFc部分の融合タンパク質。細胞表面のTNF受容体へのTNFの結合を拮抗的に阻害する。Fc部分は血中半減期延長や可溶性受容体の二量化(リガンド【TNF】への親和性向上)の役割を持つ。

・ Alefacept (Amevive®)

ヒトleukocyte function antigen 3(LFA-3)の細胞外領域であるCD2結合ドメインとヒトIgG1のFcドメインの融合タンパク質。CD2抗原を表面に発現しているTリンパ球に選択的に結合し、リンパ球の活性化を阻害する。

・ Abatacept (Orencia®)

ヒトCTLA-4の細胞外ドメインとIgG1のFcドメインの融合タンパク質。抗原提示細胞(APC)上に存在するCD80/CD86分子に結合することにより、CD28分子を介したT細胞の活性化が阻害される。

3. 新たな機能性人工タンパク質の創出技術

従来から多くのバイオ研究機関が、特定レセプターへの親和性や選択性に優れた“生理活性タンパク質のアミノ酸置換体(機能性人工タンパク質)”を創製するため、Kunkel法などの点突然変異法を用いた構造変異体(アミノ酸置換体)の作製を精力的に試みている。しかし点突然変異法は、1つ1つのアミノ酸を置換した変異体を作製し、個々の変異体を別々に精製し機能評価しなければならぬため、莫大な時間と労力を要するうえ、評価できる変異体の数には実質的に限界があり、有効な変異体の効率的・効果的な作製とはいえなかった。それに対して近年、ファージ表面提示法を利用することにより 10^8 種類以上もの多様性を有した構造変異タンパク質(生理活性タンパク質のアミノ酸置換体)を一挙にCombinatorial Biosynthesisし、この構造変異体ライブラリーの中から、レセプター親和性や特異性などが向上した“機能性人工タンパク質”を迅速かつ効率よくスクリーニングできる基盤技術が開発されている。

ファージ表面提示法を用いたスクリーニングでは、ファージ表面にタンパク質を発現させ、固定化された標的分子と結合するファージを選別する操作を繰り返して、目的の結合特性を示すタンパク質を発現するファージを選択していく。また、選択されたファージを大腸菌に感染させれば、その培養上清中にタンパク質を発現させ、これを用いて、タンパク質の生物活性もハイスループットに評価することが可能である。さらに、培養上清というクルードなサンプルでは必ずしも評価できない発現タンパク質の物理化学的性質や生物学的性質を詳細に解析する必要がある場合には、発現させた変異体タンパク質を精製して評価を行うこともできる。

多数の変異体を評価できるという利点を活かし、

ファージ表面提示法を用いて、従来の方法では見出すことのできなかった構造変異体の探索に成功した例として、腫瘍壊死因子(TNF)のリジン欠損体が報告されている²⁾。従来点突然変異法を用いた構造-活性相関研究では、TNFのLys11やLys65・Lys90はその立体構造(三量体)形成やレセプター結合に必須と報告されていた。TNFに限らず、一般にリジン残基は多くの場合、生理活性タンパク質の高次構造形成やリガンド-レセプター結合などに必須の役割を担っているため、他のアミノ酸への置換は致命的な活性低下を招いてしまうことが、従来までの点突然変異解析によって常識となっていた。しかしファージ表面提示法を用いることで、Lys11やLys65・Lys90を含む全6個のリジン残基を一挙に他の様々なアミノ酸へ置換したタンパク質ライブラリーを構築することが可能となった結果、野生型TNFと同等さらには10倍以上もの生物活性を有するリジン欠損TNFを創製できることが判明した²⁾。この例では、TNFの6カ所のリジン残基を他の各種のアミノ酸に置換したTNF変異体ライブラリーをファージに導入し、固定化したTNF受容体への結合能を有するTNF変異体を発現しているファージをBiacore[®]を用いて選別、さらに、選別されたファージを感染させた大腸菌の上清を用いたバイオアッセイ(TNF感受性細胞に対する細胞傷害性試験)により、変異体の生物活性を評価している。リジン残基を置換しても活性を保持した変異体が得られた理由としては、リジンから置換されたアミノ酸が、TNFの活性保持に適したアミノ酸であったことが考えられる。従来点突然変異法を用いた検討では、リジンをアラニンなどのアミノ酸に置換してTNFの活性が失われることを評価しているが、6カ所あるリジン残基をリジン以外のアミノ酸19種類に置換した変異体(19⁶種類)の機能を個別に評価することは現実的でないこともあり、活性を保持したリジン欠損体を見出す試みはなされていなかった。ファージ表面提示法を駆