

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

分担研究報告書

GeLCMS 法によるリポソーム結合タンパク質の発現比較と同定

分担研究者：小海康夫 札幌医科大学医学部教育研究機器センター分子解析部門 教授

研究要旨

GeLCMS 法によるタンパク質の同定法を応用し、発現定量も行える non-label Quantitative differentiation システムを構築した。SELDI-TOF MS 解析では検出したマーカー候補分子がいかなるタンパク質であるかを同定するために精製濃縮などの多大な労力を要したのに比べ、本システムは、発現比較をラベルフリーで行うことができ、タンパク質同定をほぼ同時に行える利点がある。Nano-LCMS 解析で得られる膨大なピークデータを効率よく定量的に解析することができ、検出感度も非常に高く、バイオマーカー候補検出からタンパク質同定までを効率的に行える優れたシステムと考えられる。

A. 研究目的

われわれが血漿の前処理にもちいている人工脂質二重膜（リポソーム）をバイオリガンドとして結合タンパク質を回収する方法は新しい原理によるものである。リポソームに  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合するタンパク質群（LBP: liposome Binding Protein）には未知のタンパク質も多く含まれると考えられ、LBP のプロフィールの作成に取り組んできた。さらにプロフィールの作成と同時に発現量定量および比較が可能であれば、応用範囲の広い、有用なバイオマーカー探索システムになりうると考えられ、本システムの構築および実践に取り組んだ。

B. 方法

Step 1: GeLC-MS (Gel-enhanced liquid column chromatography-Mass Spectrometry)

法によるタンパク質の発現比較 (図 1 参

照)

a. 血漿の前処理：リポソームをもちいて血漿から liposome binding protein (LBP) を回収した (リポソーム作製の詳細は分担研究者相馬の研究報告に記載)。

b. Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

前処理後のサンプルに対し、Bradford 法にてタンパク質量測定を行った。次に 100 $\mu\text{g}$  分 Ph column 装填 HPLC にて 8 分画にわけ乾燥後、20 $\mu\text{l}$  の sample buffer (0.2M Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 8M Urea, 0.1M dithiothreitol (DTT), 0.01% Bromophenol blue (BPB)) にて溶解した。溶解したサンプルは 80mm  $\times$  100mm  $\times$  1.0mm precast polyacrylamide gel (5-15%, Tris-HCl, BioRad, USA) を用い、1 次元 SDS-PAGE により分離した。電気泳動条件は、50V 定電圧で、Tris-glycine electrophoresis buffer

(25mM Tris , 0.192M glycine , 0.1% SDS) を用いた。泳動後、polyacrylamide gel を銀染色(EZ stain Silver キット (ATTO , Tokyo)) し、各 lane ごと、長軸方向に 5mm 間隔でスライス(14 スライス)した。各スライスを 1mm 四方に刻み、Eppendorf tube 内で in gel digestion を行った。

#### c. In gel digestion

1mm 四方に刻んだ gel を 100% acetonitrile にて脱水し、centrifugal concentrator(タイテック株式会社)にて乾燥させた。10mM DTT および 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を添加し 56°C にて 1 時間インキュベート (還元) の後、55mM iodoacetamide および 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を加え 45 分間暗所静置した(アルキル化)。その後、100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  500  $\mu\text{l}$  にてゲル片を 10 分間インキュベートし、100% acetonitrile 500 $\mu\text{l}$  で脱水、centrifugal concentrator にて乾燥した。再度 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  500 $\mu\text{l}$  にて 30 分インキュベートの後、100% acetonitrile 500 $\mu\text{l}$  で脱水し、centrifugal concentrator にて乾燥させた。

次に digestion buffer (12.5ng/ $\mu\text{l}$  Trypsin(Wako, Tokyo), 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  , 5mM  $\text{CaCl}_2$ ) を 20 分ごと 3  $\mu\text{L}$  ずつ加え、4°C で静置し、gel 片が膨潤するまで繰り返した。digestion buffer (trypsin (-)) (50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  , 5mM  $\text{CaCl}_2$ ) を 20  $\mu\text{l}$  加え、37°C にてインキュベート(overnight)した。

インキュベート後、20mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を 50  $\mu\text{l}$  添加し 20 分 sonication によって

trypsin によって消化されたペプチドを抽出した。5% formic acid, 50% acetonitrile 溶液を 50  $\mu\text{l}$  添加し 20 分 sonication し、ペプチド抽出を 3 回繰り返した。抽出したペプチド溶液は、超遠心器 (40,000g, 30min) 処理し、上清を回収し質量分析にもちいた。

#### d. Non-label Quantitative differentiation

In gel digestion により、各スライスから抽出したペプチドを、nanoLC(DiNa , KYA Technology , Tokyo) と QSTAR<sup>®</sup> ( quadrupole-Time of Flight-MS/MS(Q-TOF-MS/MS ) Applied Biosystems Japan )にて MS 解析し、測定されたペプチドの質量、retention time および発現強度の情報をもとに DeCyder MS ソフトウェアシステム (GEヘルスケア バイオサイエンス) にてラベルフリーの発現差異解析同定をペプチドレベルでおこなった。

#### Step 2: GeLCMS 法によるタンパク質の同定 (図 1 参照)

Step1 で使用したのと同じサンプルを Step 1 で取得したペプチドの質量、retention time を利用し MSMS 解析することでプリカーサーイオンおよびフラグメントイオンの質量 data を集め、ProteinPilot software (Applied Biosystems) により蛋白質データベース検索し蛋白質の同定を行った。

#### Step 3: MRM:Multiple Reaction Monitoring による validation (図 1 参照)

Step 2 で得られた、MS および MS/MS の data を利用し、4000 Q TRAP LC/MS/MS システム (AppliedBiosystems) により

MRM (Multiple Reaction Monitoring) 解析し、タンパク質発現量の比較の validation を行う。

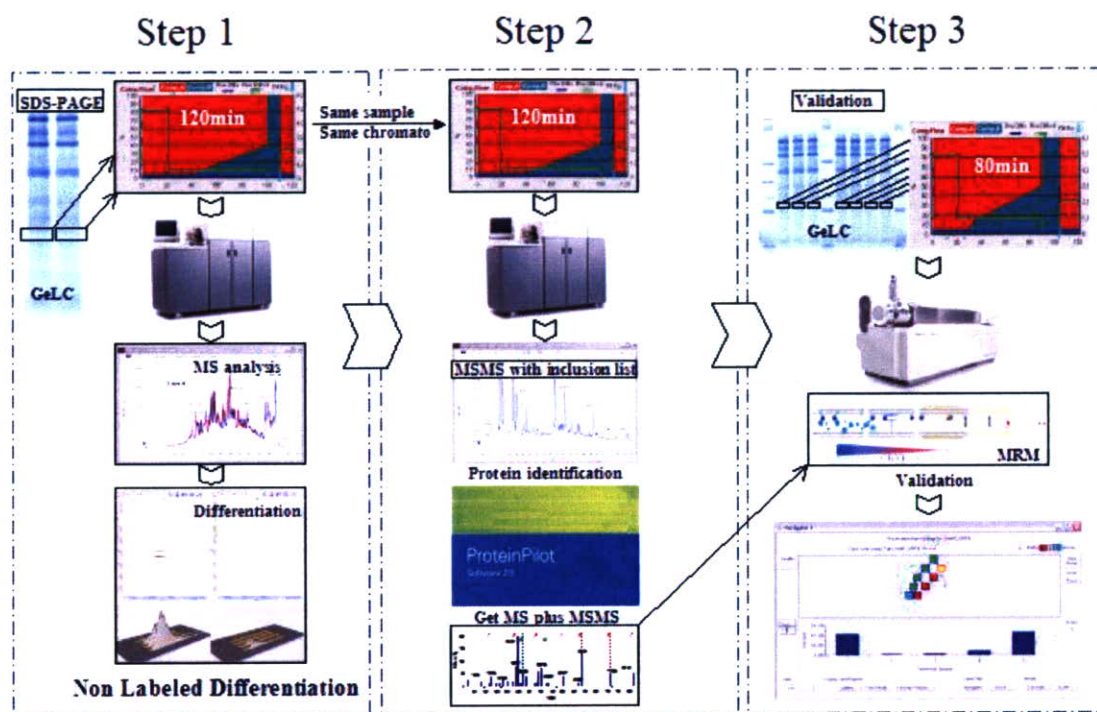


図1. 質量分析解析によるNon Label Quantitative differentiation の流れ

### C. 結果

Nano-LCMS 解析で得られる膨大なピークデータを効率よく定量的に解析するシステムを構築した。複数のスペクトラムからなる LCMS データを、質量電荷比 ( $m/z$ ) および保持時間 (RT) を二軸とする平面に描出し、その強度を濃淡で示す手法であり、保持時間のずれを機器の調整およびサンプルの調整を厳格におこなうことによって複数サンプル間での無標識定量比較 non-label

quantitative differentiation が可能となった。

### D. 考察

本研究で解析機器の主軸においた SELDI-TOF MS の測定感度は非常に良く、一度に protein chip に捕捉された複数のタンパク質を同時に測定することが可能である。多数のタンパク質の発現量および分子量がピークとして検出され、必要な検体はごく少量 (p mol レベル

～)であり臨床検体を直接利用でき、解析に要する時間も短く臨床への応用がしやすい利点がある。しかし得られる情報は質量電荷比と発現強度のみでありタンパク同定にはさらに精製濃縮の労力を必要とする。本分担研究で示した Non-label quantitative differentiation は、Nano-LCMS 解析で得られる膨大なピークデータを効率よく定量的に解析するシステムであり、検出感度も非常に高く、優れたシステムと考えられる。さらに RA におけるバイオマーカー検出のみならず、他疾患におけるバイオマーカーの検索にも利用でき、応用範囲は広く、今後、SELDI とあわせて、より効率的にバイオマーカー探索同定が行えると考ええる。

E. 結論：新規バイオリガンドであるリポソーム結合タンパク質プロファイリングの作成とともに発現比較ができるシステムを構築した。これにより GeLCMS 法単独にてバイオマーカーの発見が可能となった。

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表

a) 論文発表

1. リポソームをリガンドとして用いた血漿蛋白質のプロテオミクス解析  
木村成寿・相馬仁・苗代康可・小海康夫  
生物物理化学 2006;50:231-6

2. Plasma analysis of rheumatoid

arthritis by SELDI

Naishiro Y, Suzuki C, Kimura M, Yamamoto M, Takahashi H, Sohma H, Hori T, Shinomura Y, Kokai Y, Imai K. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2007 Jun;30(3):145-50.

b) 学会発表

1. 日本ヒトプロテオーム機構第4回大会  
リポソームをバイオリガンドとした新しい血漿タンパク質解析システムの検討  
小海康夫 2006/7/18(東京)
2. 日本ヒトプロテオーム機構第4回大会  
SELDI-TOF MS による関節リウマチのバイオマーカーの同定  
苗代康可 2006/7/18(東京)
3. 日本臨床免疫学会第34回総会  
SELDI TOF-MS による関節リウマチのバイオマーカーの同定  
苗代康可 2006/10/2(東京)
4. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会  
SELDI-TOF MS による関節リウマチのバイオマーカーの同定  
苗代康可 2007/7/30(東京)
5. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会  
血漿プロテオミクスにおける正常コントロールの病理学的考察  
小海康夫 2007/7/30(東京)
6. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会  
認知症の血中分子マーカー (アネキシン A5) の検討  
相馬 仁 2007/7/30(東京)
7. 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders

Elevation of plasma level of annexin  
A5 in Alzheimer' s disease  
Hitoshi Sohma, Yasuo Kokai  
2006/7/16-20 (Spain)

8. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of  
Biochemistry and Molecular Biology  
The novel molecular marker for  
Alzheimer diseas  
Hitoshi Sohma, Yasuo Kokai  
2006/6/18-23 (京都)

H. 知的所有権の出願・取得状況

特許出願中

1. リポソームをリガンドとして用いた体  
液タンパク質の解析方法及び体液タン  
パク質の調製方法 特願 2006-193711

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
木村成寿・相馬仁・苗代康可・小海康夫	リポソームをリガンドとして用いた血漿蛋白質のプロテオミクス解析	生物物理化学	50	231-6	2006
Naishiro Y, Suzuki C, Kimura M, Yamamoto M, Takahashi H, Sohma H, Hori T, Shinomura Y, Kokai Y, Imai K.	Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI	Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi	Jun;30(3)	145-50	2007
Hitoshi Sohma, Mami Yamaguchi, Kyoichi Matsumoto, Hirohito Honda, Yoshiyuki Amano, Yuka Mizue, Kokichi Kikuchi, Tetsu Maeda, Shozo Toyomasu, Masako Momma, Shinji Murakami, Yasuo Kokai	Elevation of plasma level of annexin A5 in Alzheimer's disease	10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders	July 16-20	145-51	2006

## 〔技術〕

## リポソームをリガンドとして用いた血漿蛋白質のプロテオミクス解析

木村成寿・相馬 仁・苗代康可・小海康夫

## SUMMARY

Human plasma contains a numerous number of proteins that provide variable information reflecting to physiological and pathological conditions of human body. Some of such proteins have been expected for pathobiological markers for diagnosis and drug development for human diseases. To capture plasma proteins in a manner of high-through put, several ligands have been employed, though these systems are still required many improvements. In this report, we present a novel system using liposome as a ligand to capture a wide variety of plasma proteins. One hundred micro litter of plasma was incubated with liposome of multi-lamellar vesicle in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Proteins bound to liposome were then eluted in the presence of EGTA. A two-dimensional gel analysis revealed more than 150 proteins in one electrophoresis run in a range of pH 4–7 with a molecular weight between 100 kda to 30 kda. The pattern of silver-stained proteins showed reproducible with the same donor. Apparent differences were detected between the pattern under different pathologic conditions including healthy volunteer and that with patients with chronic inflammation. Taken together, the method using liposome might provide a useful biological ligand for plasma protein analysis and a novel system for proteomic approach combined with other chromatographic module.

Key words: liposome, biological ligand, plasma, proteomics.

## はじめに

血漿は、血液成分の一部として全身諸臓器を環流し、大循環を経て心臓にもどり、肺を通過してふたたび臓器に送られる。すなわち、種々の疾患において血漿は、臓器および病巣からの血液環流により直接に病巣からの蛋白質を大循環に運搬している。このように、血漿中の蛋白質は、障害臓器からの情報を蛋白質を介して直接もたらすことにより、病態マーカーを含んでいることが生理、病理学的な論拠として挙げられる。血漿は、体液のなかで蛋白質の種類と濃度およびそれを含む非蛋白質成分の構成に大きな特徴を有する。蛋白質成分については、血清アルブミンなどのきわめて濃度の高い蛋白質から、ホルモンなどの低濃度蛋白質より構成されている。蛋白質の種類としても、疎水性の強い蛋白質から親水性の蛋白質まで多様である。近年、

プロテオミクスの技術によって血漿には3000種類を超える蛋白質が存在することが示された<sup>1)</sup>。さらに、病気の種類によってこれらの蛋白質の種類と濃度が変化することは、ヒト血液生化学臨床検査によるデータが示しているところである。新たなバイオリジカルリガンドの出現は、それ以前のさまざまな応用系では検出しにくかった分野の視野を与えるという点で重要な分野である。プロテオーム解析技術は、短時間に pmol 以下の微量蛋白質の同定が可能であり、より広範な分子マーカー解析に向いている。この特性を利用して本研究で我々は初めて、脂質をリガンドとして用いることを試みた。

生体膜は、種々のリン脂質およびそれらの異なる組成と割合によって、機能特異的に発達した器官である。人工的に形成したリポソーム<sup>2)</sup>は、生体膜上で起こる種々の現象をモデル的に引き起こすことができることから、酵素学、

Plasma proteomic analysis using liposome as a biological ligand.

Michitoshi Kimura, Hitoshi Sohma, Yasuyoshi Naishiro, Yasuo Kokai; 札幌医科大学医学部分子機能解析部門

Correspondence address: Yasuo Kokai; Department of Biomedical Engineering, Sapporo Medical University School of Medicine, S1W17, Chuo-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8556, Japan.

Abbreviations: PBS, phosphate buffered saline; MLV, multilamellar vesicle; SDS, sodium dodecyl sulfate; IEF, isoelectric focusing; HPLC, high performance liquid chromatography; LBP, liposome binding protein.

(受付 2006 年 8 月 3 日, 受理 2006 年 9 月 20 日, 刊行 2006 年 12 月 15 日)

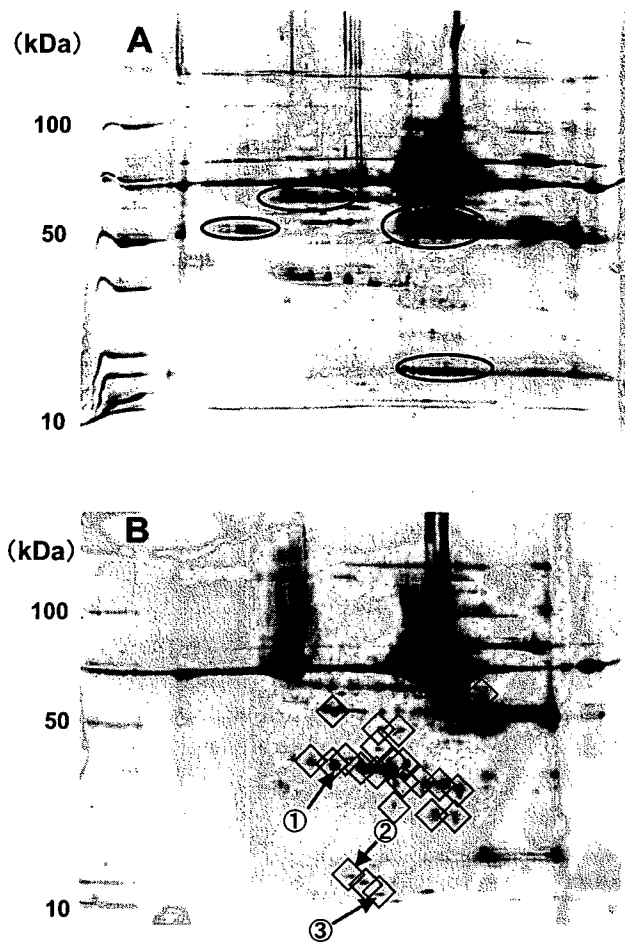


Fig. 1. Comparison of electrophoretic patterns with whole plasma proteins and liposome binding proteins by two dimensional gel electrophoresis.

Fifty microgram of whole blood plasma proteins (A) or liposome binding proteins (LBP) (B) are electrophoresed by two dimensional gel electrophoresis. Spots are visualized by silver staining. Diamonds indicate protein spots that showed an increased staining intensity in LBP compared to that with whole plasma proteins, whereas circles indicate protein spots that showed a decreased staining intensity in LBP compared to that with whole plasma proteins.

物性化学などの広い分野で検討されている。本研究では、リポソームが提供する膜構造の蛋白質への親和性をを用いた網羅的な蛋白質の解析の可能性を検討し、血漿蛋白質解析を通じて病態マーカー探索<sup>3)</sup>への応用の可能性を検討した。Ca<sup>2+</sup>は神経伝達物質の分泌に大きく関わり細胞の分化、増殖などの重要な因子である。しかし種々の病態で認められる持続的なCa<sup>2+</sup>濃度の上昇は酵素等の異常活性化により細胞障害を引き起こし、細胞が何らかの蛋白質分泌を起こす可能性がある。その蛋白質の中に血液中にまで運ばれるものが存在すれば、病態マーカーとなりうる<sup>4)</sup>。血液中には約2mMの高いCa<sup>2+</sup>が存在しているため、リポ蛋白質や細胞膜と結合している可能性がある。本研究では、Ca<sup>2+</sup>依存的にリン脂質と相互作用する血漿蛋白質に注目した。正常人および炎症性疾患患者の血漿を用いた解析により、

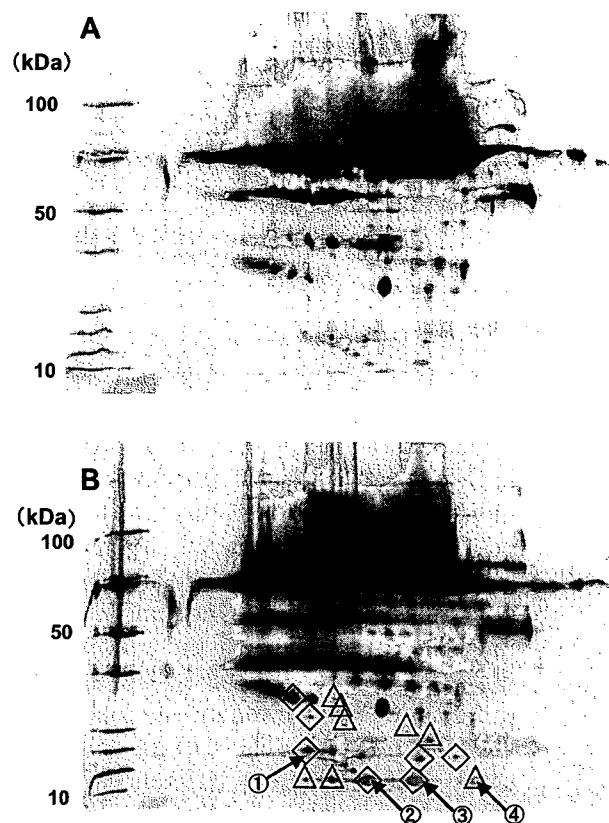


Fig. 3. Comparison of electrophoretic patterns of liposome binding proteins with plasma obtained from healthy volunteer (A) or malignant rheumatoid arthritis (MRA) (B) by two dimensional gel electrophoresis.

One hundred microgram of liposome binding proteins obtained from healthy volunteer (A) or malignant rheumatoid arthritis (MRA) (B) are electrophoresed by two dimensional gel electrophoresis.

Diamonds indicate protein spots that showed an increased staining intensity in MRA compared to that with healthy volunteer. Triangles indicate protein spots that showed unique spots in MRA compared to that with healthy volunteer.

現在までに報告されている病態マーカーが複数検出され、リポソームを用いた解析方法が血漿蛋白質のプロテオミクス解析に有用な可能性が示されたので報告する。

### 材料および方法

1. 材料：試薬は特記されたもの以外はSIGMA社特級を用いた。
2. 血漿：血漿は、札幌医科大学倫理規定ののっとりインフォームドコンセント後、附属病院第1内科患者より得た。得られた血液は、血漿分離し、血漿は-80°Cに凍結保存した。
3. リポソーム (Multilamellar Lipid Vesicle, MLV)：リン脂質 (egg PC; Phosphatidyl Choline, PS; Phosphatidyl Serine) はクロロホルム/メタノール (2:1) に溶解し (10 mg/ml)、必要量のPCとPSを9:1に混ぜ、N<sub>2</sub> (gas) で乾固させた。細胞膜に存在する酸性リン脂質 (PS) の含量が約10%である。今回はより単純な系を考え、リポソームの組成は10%PS



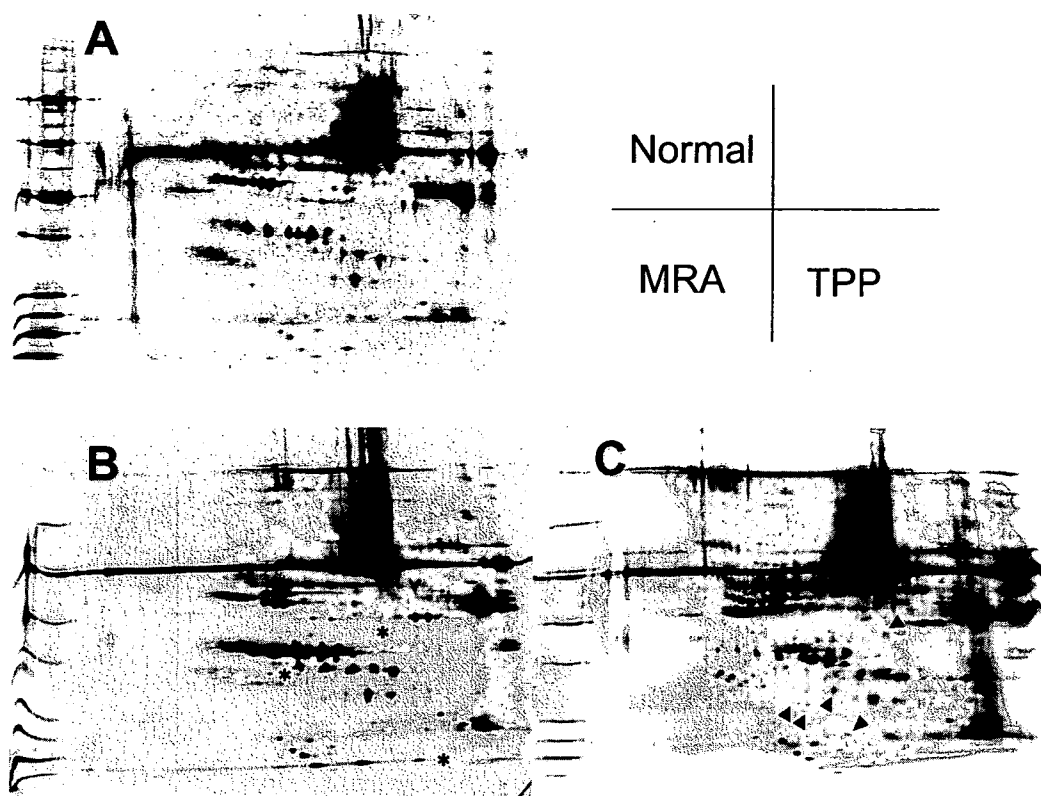


Fig. 2. Comparison of electrophoretic patterns of liposome binding proteins with plasma obtained from healthy volunteer (A), malignant rheumatoid arthritis (MRA) (B) and thrombocytopenic purpura (TPP) (C) by two dimensional gel electrophoresis.

Fifty microgram of liposome binding proteins obtained from healthy volunteer (A), malignant rheumatoid arthritis (MRA) (B) or thrombocytopenic purpura (TPP) (C) are electrophoresed by two dimensional gel electrophoresis. Distinct patterns among samples are evident in A, B and C. Asterisk indicates protein spot that is unique in MRA compared to that with healthy volunteer. Arrow head indicates protein spot that is unique in TPP compared to that with healthy volunteer.

と残りは主要な中性脂質である PC とした。その後, Buffer (50 mM Hepes (pH 7.5), 150 mM NaCl) を加えて, 48°C で 30 分間インキュベートし, 2 分間 vortex ミキサーで激しく攪拌し調製した。この条件<sup>5)</sup> で作製した MLV は蛋白質と結合した後, 下記の条件で完全に沈殿し, 回収することができる。リン脂質の終濃度は 5 mg/ml とした。

4. 血漿蛋白質リソソーム結合: 100  $\mu$ l の血漿に終濃度 4 mM となるように EGTA を添加し 20,000 $\times$ g にて遠心後, 上清を回収した。その上清にリソソーム 500  $\mu$ g, CaCl<sub>2</sub> 15 mM 加え, PBS にて全量を 1 ml とし, 4°C ローターにて 12 時間混和した。リソソームの添加量の増加によりリソソーム結合蛋白質 (LBP) 量は増加して行くことを確認している。今回は 500  $\mu$ g 添加した際, 回収操作が容易で十分な蛋白質量を得ることができたので以後の実験は, この条件に従った。20,000 $\times$ g にて遠心後, 20 mM Hepes (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> の Buffer にて洗浄し, 10 mM EGTA にて LBP を溶出した。EGTA と CaCl<sub>2</sub> の添加量については, MLV への結合の Ca<sup>2+</sup> 親和性の違いによる分離等を目的とする場合重要であると思われる。しかし, 今回, 最初の試みとして Ca<sup>2+</sup> 依存的に MLV に結合しうる全ての蛋白質を

調べることを考えたので, この量を用いた。

5. 電気泳動: IEF は Amersham 社のドライストリップ (pH 4-7) を用いて行った。泳動後, SDS にて平衡化し, 2 次元目の SDS-PAGE (8-12%)<sup>6)</sup> を行った後, 銀染色 (EZ stain Silver キット (ATTO, Tokyo)) し, Image Master 2D Platinum (Amersham#Biosciences, Tokyo)<sup>7)</sup> にて解析した。得られたスポットを回収し, trypsin による in gel digestion<sup>8)</sup> を行った。

6. 質量分析: in gel digestion にて得られたペプチドを nanoLC (DiNa, KYA Technology, Tokyo) と LCQ (Thermo Electron Co., Waltham, Massachusetts, USA) による LC/MS にて解析した。得られたデータは MASCOT (Matrix Science, Tokyo)<sup>9)</sup> を用いて SWISS prot, NCBI nr 蛋白質データベース検索<sup>10)</sup> をした。

## 結果

### 1. 血漿総蛋白質と LBP との比較

正常人全血漿蛋白質 (Fig. 1-A) および LBP (Fig. 1-B) を二次元電気泳動した結果, リソソームに特異的に結合することにより分離像度が上がった蛋白質のスポットを◇で

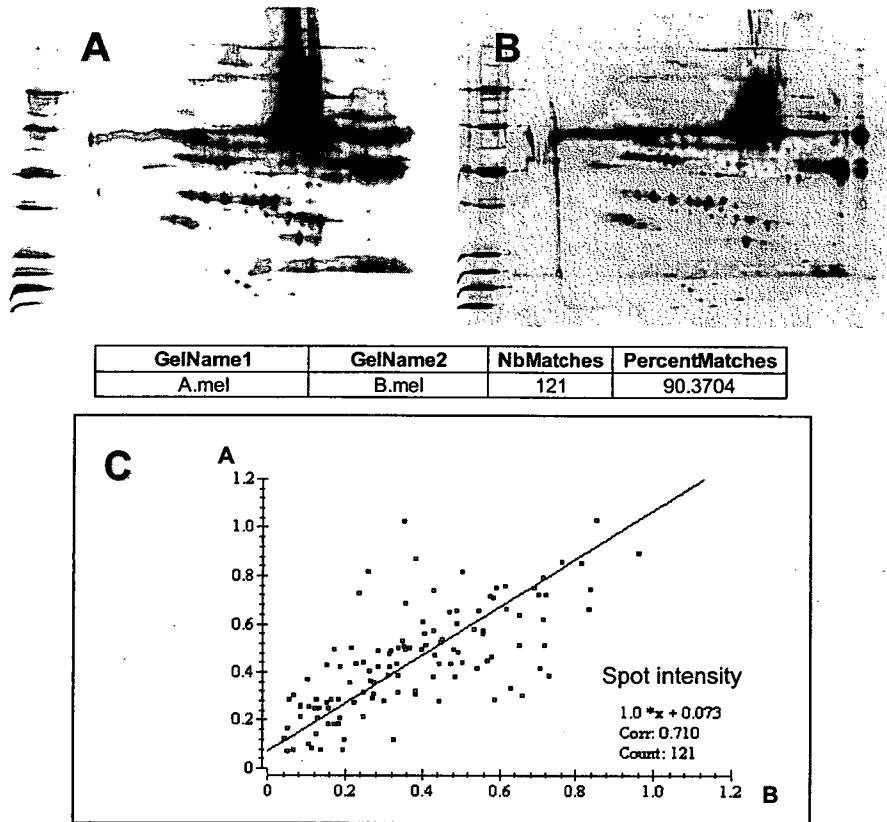


Fig. 4. Comparison of electrophoretic patterns of liposome binding protein obtained from the same plasma by independent maneuver.

Fifty microgram of liposome binding proteins obtained from healthy volunteer (A) or (B) are electrophoresed by two dimensional gel electrophoresis. The spot patterns are highly reproducible as indicated in C.

示した。全血漿中に見られ、LBPに見られないことからリポソームと結合していないと考えられる蛋白質のスポットを○で囲い示した。得られた蛋白質のスポットを質量分析にて解析した結果、①は Haptoglobin β 鎖、②は Apolipoprotein A1、③は Haptoglobin α 鎖であった。

## 2. 正常人血漿と炎症性疾患患者血漿における LBP の比較

正常人及び、炎症性疾患患者より得られた LBP を用い二次元電気泳動を行った (Fig. 2)。正常人、悪性関節リウマチ (MRA)、血小板減少性紫斑病 (TPP) において疾患により異なった電気泳動像が得られた。また正常人、MRA 患者血漿から LBP を得て二次元電気泳動を行った (Fig. 3)。正常人血漿よりも炎症性疾患 (MRA) 患者血漿において蛋白質量が増大、また炎症性血漿に特有に見られるスポットが確認できた。炎症性血漿において蛋白質のスポットが増強したものは◇で、特有に見られたものは△で示した。質量分析にて解析した結果、①は Apolipoprotein A1、②、③、④は Haptoglobin α 鎖であった。

## 3. 同一血漿由来の LBP での再現性の検討

同一血漿から独立手技にて LBP を 2 サンプル得て、二次

元電気泳動を行い、再現性の確認を行った (Fig. 4)。検出されたスポットを Image Master 2D Platinum にて解析したところ、Match 率 90.37%、スポット強度の相関係数は 0.71 であり高い相関 ( $0.7 \leq | \text{相関係数} | \leq 0.9$ ) を示し、良好な再現性を得ることができた<sup>11)</sup>。

## 4. カルシウム非依存性 LBP の比較

カルシウム依存性 LBP を得た後、リポソームに残る蛋白質を検出するため、1%SDS にて蛋白質 (カルシウム非依存性 LBP) を溶出し、電気泳動を行った (Fig. 5)。全てのサンプルにおいて高分子量から低分子量の多くの蛋白質のバンドが見られ、カルシウム非依存的にリポソームに結合する多数の蛋白質が存在することを確認した。

## 考 察

本研究の結果から、

1. リポソームは血漿蛋白質の一定の種類に対して特異性を有する結合スペクトラムを有すること
2. LBP は正常と疾患によって異なる可能性があること
3. 現在までにモチーフまたはドメインとして報告されているカルシウム結合性蛋白質以外の結合が見られたこと

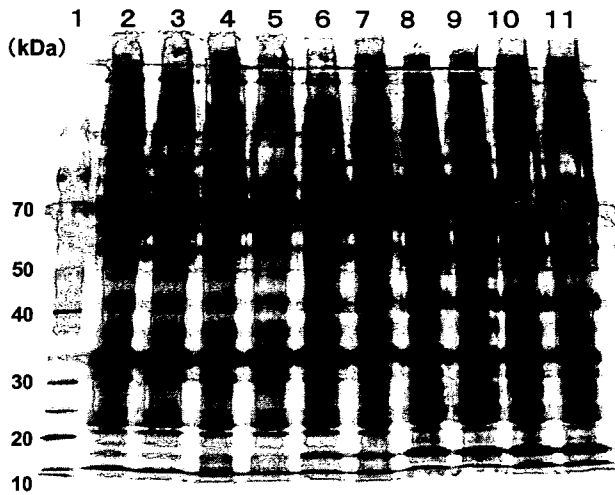


Fig. 5. Electropherogram of liposome binding protein that was not eluted in the presence of EGTA.

Fifty microgram of liposome binding proteins that were not eluted in the presence of EGTA obtained from healthy volunteer, thrombocytopenic purpura (TPP) or malignant rheumatoid arthritis (MRA) are electrophoresed by one dimensional gel electrophoresis.

- 1; marker
- 2, 3; healthy volunteer 1
- 4, 5; healthy volunteer 2
- 6, 7; healthy volunteer 3
- 8, 9; thrombocytopenic purpura (TPP)
- 10, 11; malignant rheumatoid arthritis (MRA)

が明らかとなった。これらの結果は、血漿には一定の条件のもとにリポソームに結合する蛋白質群が存在することを示す。リン脂質二重膜に結合する結合モチーフとして EF hand や Endonexin fold, C2 ドメインが知られている。Endonexin fold は, Type II  $Ca^{2+}$  binding-site と呼ばれ Annexin などに代表される結合モチーフで,  $Ca^{2+}$  存在下に PS と結合する。今回の実験では示さなかったが, 我々はリポソームが Annexin family の一部に結合することを同定している。近年, 種々の親和性抗体を用いた血漿中の高濃度蛋白質の除去<sup>12)</sup> が, 血漿プロテオミクス解析の前段階に導入されている。しかし, 血清アルブミンの除去が血漿プロテオミクス解析に影響を与えるという報告もある<sup>13)</sup>。血漿中の血清アルブミンは約 6 割を占め微量成分を分析する妨げになる。今回の実験で LBP の調製に使用した血漿量は血漿のみを二次元電気泳動に使用したときの約 100 倍量だが, 二次元電気泳動で認められた血清アルブミン量は, ほぼ同一であった (Fig. 1)。そのことから LBP 法は血清アルブミンを不完全だが除く効果があり, 更に低分子の蛋白質は LBP 法を用いることで, 二次元電気泳動法で分析可能な量にまで増強した。すなわち LBP 法は血清アルブミンによる解析妨害を減らし, 微量蛋白質を抽出するために有用な方法である。また今回, データを示してはいないが複数例の正常 LBP において, 同じ傾向の電気泳動パターンを得ることができ, MRA 患者 LBP とは異なったパターンだった。患者 LBP に

は炎症性疾患に関与する蛋白質の Haptoglobin (190 ~ 1700  $\mu\text{g/ml}$ ), Apolipoprotein A1 (男: 1190 ~ 1550  $\mu\text{g/ml}$ , 女: 1260 ~ 1650  $\mu\text{g/ml}$ ) (Haptoglobin, Apolipoprotein A1 は血漿蛋白質に占める割合<sup>14)</sup> としては 1% 程の蛋白質) が多く見られた。また正常 LBP をトリプシン消化後 LC-MS にて解析した結果, 血漿中に占める蛋白質の濃度が 1% に満たない Vitamin D binding protein (200 ~ 550  $\mu\text{g/ml}$ ), Ceruloplasmin (210 ~ 370  $\mu\text{g/ml}$ ), Transthyretin (220 ~ 400  $\mu\text{g/ml}$ ), Apolipoprotein C II (男: 18 ~ 46  $\mu\text{g/ml}$ , 女: 15 ~ 38  $\mu\text{g/ml}$ ), Apolipoprotein C III (男: 58 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$ , 女: 54 ~ 90  $\mu\text{g/ml}$ ), Heparin cofactor 2 (100  $\mu\text{g/ml}$ ), Antithrombin III (150 ~ 310  $\mu\text{g/ml}$ ) や, さらに Interleukin などと同レベルの濃度である Kininogen-1 (10 ~ 20  $\text{pg/ml}$ ) などの微量蛋白質が LBP 中に検出されている。このことより血漿蛋白質解析に本システムが有用であることが示唆された。100  $\mu\text{l}$  から短時間で簡便に特定の蛋白質を結合精製できる点は, 血漿プロテオミクスにおいてきわめて重要な特徴を有すると考えられる。今後, リポソームに結合する分子の網羅的な同定とともに, データベースの構築が重要と考えられる。一方血清アルブミンは, 含量は少ないが今回検討したサンプルのすべてに検出された。しかし血清アルブミンは, 両親媒性の性質を持つため特異的結合とは考えにくい。リポソーム結合分画に一定量の血清アルブミンや Ca 結合ドメインを保有していない Haptoglobin, Apolipoprotein A1 が回収されることの意義は, 今後の検討課題であり, LBP を網羅的に同定するなどして, その結合スペクトラムを決定する必要があると考えられる。

## 文 献

- 1) Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R, Haab BB, Simpson RJ, Eddes JS, Kapp EA, Moritz RL, Chan DW, Rai AJ, Admon A, Aebersold R, Eng J, Hancock WS, Hefta SA, Meyer H, Paik YK, Yoo JS, Ping P, Pounds J, Adkins J, Qian X, Wang R, Wasinger V, Wu CY, Zhao X, Zeng R, Archakov A, Tsugita A, Beer I, Pandey A, Pisano M, Andrews P, Tammen H, Speicher DW, Hanash SM. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 2005;5(13): 3226-3245.
- 2) Torchilin VP, Weissig V eds. Oxford University Press Preparation of liposomes in Liposomes, second edition, A Practical Approach, 2003:3-29.
- 3) Shen Y, Kim J, Strittmatter EF, Jacobs JM, Camp DG 2nd, Fang R, Tolia N, Moore RJ, Smith RD. Characterization of the human blood plasma proteome. *Proteomics* 2005; 5(15):4034-4045.
- 4) Trump BF, Berezsky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995;9(2):219-228.

- 5) Sohma H, Creutz CE, Gasa S, Ohkawa H, Akino T, Kuroki Y. Differential lipid specificities of the repeated domains of annexin IV. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1546(1):205-215.
- 6) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250(10):4007-4021.
- 7) Appel R, Hochstrasser D, Roch C, Funk M, Muller AF, Pellegrini C. Automatic classification of two-dimensional gel electrophoresis pictures by heuristic clustering analysis: a step toward machine learning. *Electrophoresis* 1988;9(3):136-142.
- 8) Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68(5):850-858.
- 9) Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999;20(18):3551-3567.
- 10) Mann M, Wilm M. Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal Chem* 1994;66(24):4390-4399.
- 11) Mitchell A, Power JF. An empirical investigation into the dimensions of run-time coupling in java programs. *ACM International Conference Proceeding Series; Vol. 91, Proceedings of the 3rd International Symposium on Principles and Practice of Programming in Java 2004, Las Vegas, Nevada 2004 June 16-18.*
- 12) Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K, Speicher DW. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 2005;5(13):3292-3303.
- 13) Granger J, Siddiqui J, Copeland S, Remick D. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics* 2005;5(18):4713-4718.
- 14) Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002;1(11):845-867. Review. Erratum in: *Mol Cell Proteomics* 2003;2(1):50.

## 第34回総会ポスター賞受賞記念論文

総説 (推薦論文)

推薦者: 日本臨床免疫学会理事, 第34回総会長 尾崎承一

## 血漿のプロテオミクス解析

苗代康可<sup>\*1,\*2</sup>, 鈴木知佐子<sup>\*2</sup>, 木村成寿<sup>\*1</sup>, 山本元久<sup>\*2</sup>, 高橋裕樹<sup>\*2</sup>  
相馬 仁<sup>\*1</sup>, 堀 司<sup>\*1,\*3</sup>, 篠村恭久<sup>\*2</sup>, 小海康夫<sup>\*1</sup>, 今井浩三<sup>\*4</sup>

## —Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI—

Yasuyoshi NAISHIRO<sup>\*1,\*2</sup>, Chisako SUZUKI<sup>\*2</sup>, Michitoshi KIMURA<sup>\*1</sup>, Motohisa YAMAMOTO<sup>\*2</sup>, Hiroki TAKAHASHI<sup>\*2</sup>, Hitoshi SOHMA<sup>\*1</sup>, Tsukasa HORI<sup>\*1,\*3</sup>, Yasuhisa SHINOMURA<sup>\*2</sup>, Yasuo KOKAI<sup>\*1</sup> and Kohzoh IMAI<sup>\*4</sup><sup>\*1</sup>Department of Biomedical Engineering, Sapporo Medical University School of Medicine<sup>\*2</sup>First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine<sup>\*3</sup>Department of Pediatrics, Sapporo Medical University School of Medicine<sup>\*4</sup>President, Sapporo Medical University School of Medicine

(Received March 23, 2007)

## summary

To identify protein biomarkers linking to disease activity and treatment responses of patients with rheumatoid arthritis (RA), proteomic study using mass spectrometric analysis of plasma proteins was performed. Proteomic profiling technologies can simultaneously resolve and analyze multiple proteins in plasma. Evaluation of multiple proteins of the plasma will be essential to discover protein biomarkers. In this study, we used protein chip surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry approach (SELDI-TOF MS). Through differential profiling of plasma proteins, we selected two prospective candidate biomarkers. One mass spectrometric peak distinguished patients with RA from healthy controls was transthyretin (TTR) and the other distinguished inactive patients with RA from patients with active RA was Serum Amyloid A (SAA). This study demonstrates that proteomic profiling using mass spectrometry of plasma greatly facilitates global discovery and verify clinically relevant sets of disease biomarker directly links to disease activity and treatment responses.

**Key words**—Rheumatoid Arthritis; Proteomics; SELDI-TOF MS; Plasma; Liposome

## 抄 録

プロテオミクスの技術が、近年、非常に発展してきている。プロテオミクス解析は複雑な、多種類のタンパク質混合物のプロファイルを一挙に解析することができる。さらに発現量のみではなく、タンパク質の修飾状態までも検出可能である。とくに、血漿のような、多くのタンパク質を含む、複雑なサンプルの解析に有効であると考えられ、関節リウマチにおける診断、疾患活動性および治療効果判定に有用と思われるバイオマーカーの検索が行われている。本稿では血漿のプロテオミクス解析に関する有用性、問題点を、関節リウマチを中心に、われわれの研究報告を含め解説する。

## 1. はじめに

関節リウマチ (以下 RA) は世界人口の約1%と罹患率の高い疾患であり、患者本人のQOLの低下やそれに伴う社会的損失と社会経済にも大きな影響

を及ぼす。しかしながら、生物学的製剤が使用可能となり、従来の治療薬では考えられないほどの画期的な効果が得られており、わが国においてもその有効性が証明されつつある。ただし、年間の薬剤費が高価であり、結核をはじめとした感染症の副作用もあるといった問題点がある。そこで生物学的製剤をより効率よく利用するためのバイオマーカーの開発が希求されている。今回、我々がRAを対象に実際に行ったマーカーの検索を例に、血漿のプロテオミクス解析について解説する。

\*1札幌医科大学教育研究機器センター分子機能解析部門

\*2札幌医科大学内科学第一講座

\*3札幌医科大学小児科学講座

\*4札幌医科大学

## 2. Proteomic analysis

ヒトゲノムプロジェクトの終結により、すべてのヒト遺伝子が明らかになり、次の目標はすべての体内のタンパク質を明らかにすることに移った。mRNA 発現量の変化がそのままタンパク質の発現量の変化と相関しない場合も多く、その機能の多くは、リン酸化、糖付加、アセチル化などの翻訳後修飾によって司られており、実際に生体内で機能しているのはこれらのタンパク質であるため、タンパク質発現解析についてはプロテオミクス解析の重要性が改めて認識されてきており、近年、目覚しく発展を遂げている<sup>1,2)</sup>。ゲノミクスの成功により作成された莫大な遺伝子のデータベースと近年の MS spectrometric technology の進歩により、格段に早くタンパク質を同定できるようになりプロテオミクス研究の発展に拍車をかけている。しかしゲノミクスの成功を導いた核酸を増幅する技術、すなわち PCR に相当する技術がプロテオミクスに存在しない。その結果、プロテオミクスの発展が試料のタンパク質濃度と測定器の感度に限定されているといっても過言ではない。プロテオミクスによる解析技術はまだまだ発展の途中であるが、試料中に存在する異常なタンパク質や、修飾されたタンパク質を直接解析する方法として非常に優れている。また、核酸の解析とは異なり、発現レベルの変化の解析以外にも翻訳後修飾の変化を解析することが可能であり、さまざまな視点からタンパク質を解析することができるため、細胞溶解液、血液、涙液、唾液、尿、髄液、関節液、乳汁といったさまざまな試料中タンパク質から種々のバイオマーカーの検索が行われている。

## 3. plasma analysis

プロテオミクスの技術により、血漿には 3000 種類を超えるタンパク質の存在が明らかになっている<sup>3)</sup>。血漿は、血液還流により全身諸臓器および病巣からのタンパク質を運搬している。血漿中には、各組織からのタンパク質の放出があり、そのタンパク質のプロファイリングから健康人と疾患群間での差異を捕らえることができる。サンプルとしての血漿は、比較的少ない侵襲で、治療の経過に応じて繰り返し入手できる長所もあり、バイオマーカーを探索するためにきわめてリーズナブルであると考えられる。しかし核酸と異なり、タンパク質は親水性や疎水性などの化学的な性質が多様であり、含まれて

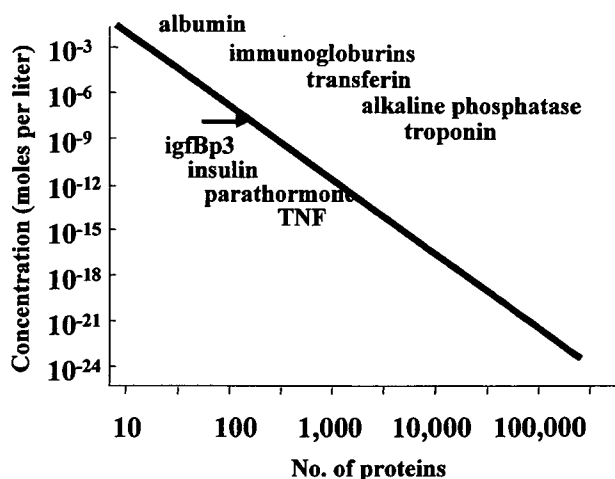


Fig. 1 血漿中に存在するタンパク質の濃度と種類  
→は SELDI-TOF MS による解析の検出限界を示す。

いるタンパク質のサイズも数千ダルトンから数百万ダルトンのものまで多種多様である。さらに  $10^{-10}$  M 未満の濃度が低いタンパク質から  $10^{-6}$  M 以上の濃度で血漿の大部分を占めるものまで含まれており解析を困難なものにしている (40 mg/ml の濃度で存在しているアルブミンからわずか 1 ng/ml で存在しているサイトカインまでさまざまである) (Fig. 1)。さらにこの低濃度領域には多くの種類のタンパク質が存在し、 $10^{-3} \sim 10^{-4}$  M には数十種類のタンパク質が存在するが、さらに低濃度になればなるほど存在するタンパク質の種類は増える (Fig. 1)。以下に説明する SELDI-TOF MS の測定感度は非常に良いとされながらも検出限界は  $10^{-8}$  M 程度であり、そのままでは血漿中の 10-20% 程度のタンパク質しか解析できず、アルブミンのような多量に存在するタンパク質の除去、等電点に応じた分画などの前処理が血漿のタンパク質解析には必要になる。

## 4. Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI

われわれは surface-enhanced laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry (以下 SELDI-TOF MS) を利用し RA 患者のインフリキシマブ投与前後の血漿を解析した。SELDI-TOF MS は表面化学を利用し、チップ上のタンパク質をイオン化し、質量分析器により分子量を測定する。測定した結果を Fig. 2 に示す。二つのピークが治療前後および健康人との比較により変化していた。

ProteinChip はタンパク質解析に適した様々な化学的性質 (陰イオン交換基, 陽イオン交換基, 逆相

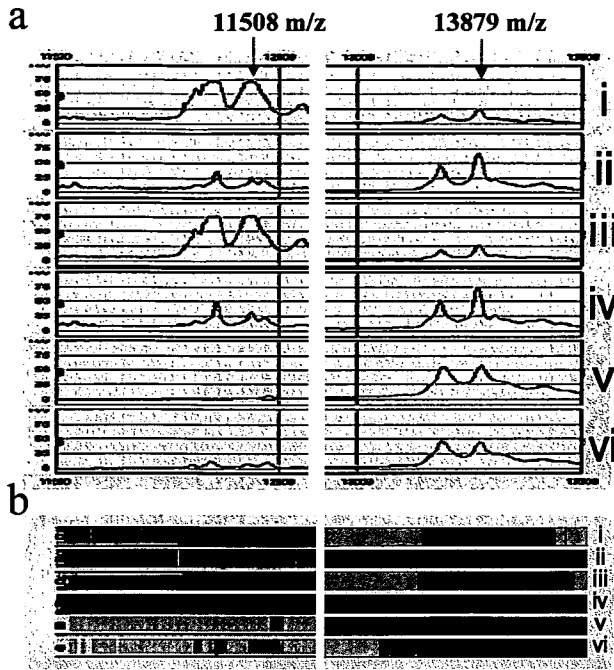


Fig. 2 SELDI-TOF MS による関節リウマチ患者および健康人血漿の解析結果  
 a: trace image b: gel image  
 →で示す 11508 m/z および 13879 m/z に変化が見られた。  
 i: リウマチ患者 A 血漿治療前, ii: リウマチ患者 A 血漿治療後, iii: リウマチ患者 B 血漿治療前, iv: リウマチ患者 B 血漿治療後, v: 健康人 A, vi: 健康人 B

基, 順相基, 金属イオン固定基, 抗体, 受容体タンパク, DNA) を chip 表面上に持たせてあり, その化学的性質に親和性を持つタンパク質を特異的に補足, 濃縮することができる (Fig. 3a). chip 表面上に補足されたタンパク質は UV パルスレーザーを受け, イオン化し, 真空中を検知器に向かい飛行する. 分子量の大きいものほど飛行時間は長くなり, 飛行時間から分子量が算出される (飛行時間型質量分析) (Fig. 3b). 一度の解析で protein chip に捕捉された複数のタンパク質の質量電荷比を同時に測定することが可能であり, 多数のタンパク質の発現量および質量電荷比が, ピークとして検出され, さらにゲルのイメージに変換することもできる (Fig. 2b). 必要な検体はごく少量であり (p mol レベル), 血液, 尿, 髄液, 関節液, 涙液, 唾液, 乳汁といった臨床検体を直接利用でき, 解析に要する時間も短く臨床への応用がしやすい利点がある.

RA 患者血漿を対象とした我々の解析の結果, それらのピークは serum amyloid A (SAA) と Trans-thyretin (TTR) であることが, アミノ酸シーケンサーによる解析にて明らかになった. SAA の SELDI における測定値は, 生化学的検査における

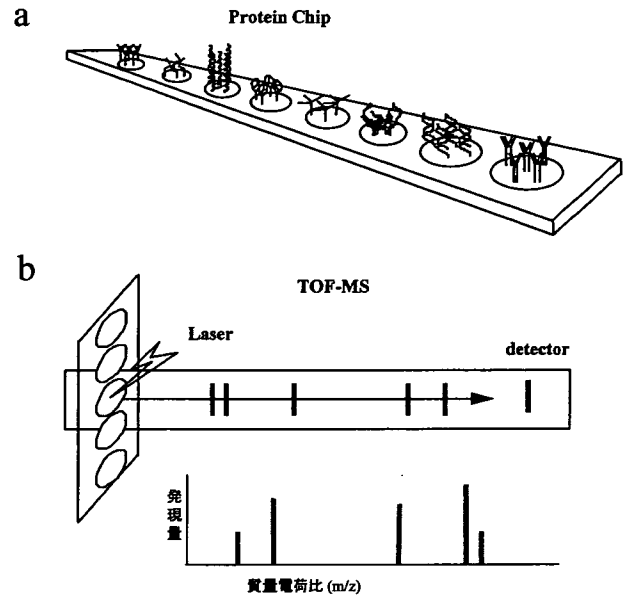


Fig. 3 protein chip および TOF MS の原理  
 a: イオン交換基, 逆, 順相基, 金属イオン固定基, 抗体, DNA 受容体タンパク, などが直径 2 mm のスポットに固定され, 親和性を持つタンパク質が濃縮, 捕捉される.  
 b: chip 表面上に補足されたタンパク質は UV パルスレーザーを受け, イオン化し, 真空中を検知器に向かい飛行する. 小さい分子ほど detector に早く到達する.

測定値と相関し (data not shown), CRP の生化学的検査における測定値とも相関した (Fig. 4). TTR においては, SELDI による測定のみが CRP に相関し (Fig. 3), TTR の生化学的検査における測定値は, 治療前後で一定の傾向を示さなかった (data not shown). 今回, われわれが行った proteomics による RA の血漿解析において見つかったバイオマーカー候補は, 既知のタンパク質ではあるが RA の状態を適切に反映しているものと考えられ, これらのマーカーもあわせて臨床診断することでより迅速かつ適切な疾患活動性の評価が行えるものとする.

SELDI-TOF MS によるバイオマーカー検索は非常に有効と考えられ, がんなど, 他の疾患領域においても, さかんに行われている. SELDI-TOF MS によって RA 患者血清を解析した報告としては, de Seny D らによる報告がある. 彼らは, RA の biomarker 候補として 5 つの peak を見出し, そのひとつが MRP-8 であったと報告している<sup>4)</sup>.

### 5. 二次元電気泳動 (TWO-DIMENSIONAL POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS: 2D-PAGE)

血漿のプロテオミクス解析に有効な手段として以

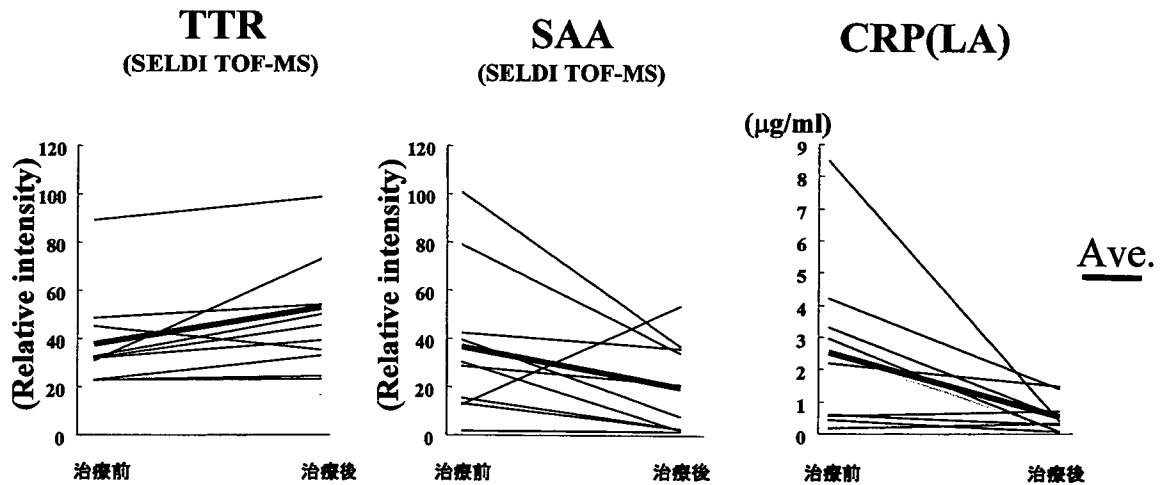


Fig. 4 関節リウマチ患者 10 名の治療前後の TTR および SAA の SELDI-TOF MS による測定値および Latex Agglutination 法による CRP 測定値の変化  
太線は平均値を示す。

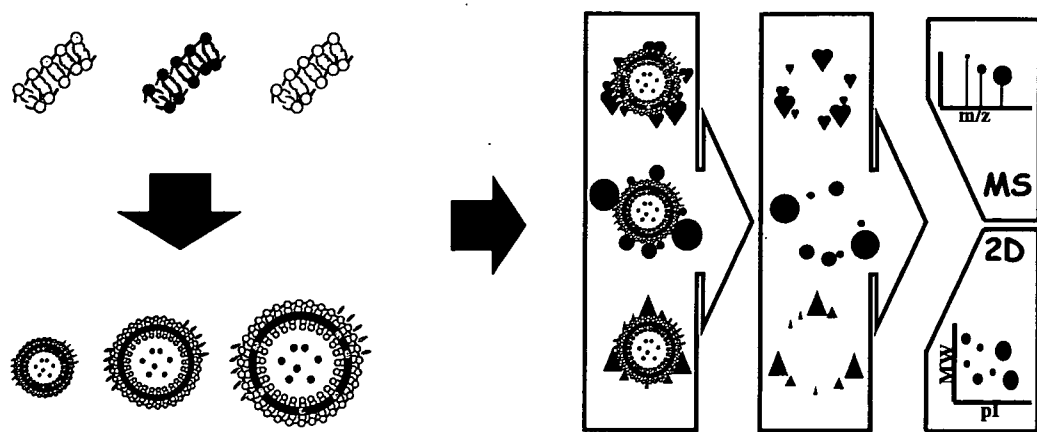
前よりある技術である。原理は、タンパク質の等電点と分子量の違いにより二次元に分離する方法である。この二つのパラメーターは、相関しないため翻訳後修飾を受けたタンパク質を含め複雑な多くの種類のタンパク質混合物も効率的に分離できる。分離されたタンパク質は、銀染色やクマシーブルー染色などによって描出され、サンプル間で比較される。複数のゲル間における比較の際、データのばらつきや再現性に乏しいという問題を抱え、定量的なタンパク質発現解析手段としては実用的ではないとされていたが、現在では同一ゲル中に多重蛍光標識した複数のタンパク質サンプルを流すことが可能となり、これらの問題は解決されている。二次元電気泳動では、一度に数百ものタンパク質を描出することができ、切り出したスポットをゲル内消化し得られたペプチド混合物を質量分析することでタンパク質の同定が可能である。二次元電気泳動法により、RA のバイオマーカーを検索した報告としては、Takeuchi らによる報告がある。彼らは、二次元電気泳動法により、リウマチ患者血清中から、infliximab 投与前後で発現が変化する 50 もの spot を見出し、同定の結果、それらの中に、CRP, C3, Apo J, Apo A-I, RBP, transthyretin が含まれていたことを報告している<sup>5)</sup>。RA においては自己抗原の検索も盛んに行われており、Matsuo らは滑膜組織を抗原にし二次元電気泳動法をもちいて、患者血清中から自己抗体の対応抗原の検索を行っている。その結果、シトルリン化 F-actin capping protein alpha-1 subunit (CapZ $\alpha$ -1 などの自己抗原の同定に成功し

ている<sup>6)</sup>。

## 6. Liposome

われわれは、今後血漿中のタンパク質群からバイオマーカーを検索するにあたり、いかに機能的に重要な分子を濃縮収集してることが重要と考え、リポソームをバイオプローブとして使用する方法を考案した。リポソームは生体膜上で起こる種々の現象をモデル的に引き起こすために作成された人工生体膜である<sup>7)</sup>。われわれは、リポソームが提供する膜構造のタンパク質への親和性をもちいた網羅的なタンパク質の解析の可能性を検討し、血漿タンパク質の解析を通じてバイオマーカー探索への応用の可能性を検討した<sup>8)</sup> (Fig. 5)。本法では  $Ca^{2+}$  依存的にリポソームに結合するタンパク質群を濃縮収集する方法である。 $Ca^{2+}$  は神経伝達物質の分泌に大きく関わり細胞の分化、増殖などの重要な因子である。しかし種々の病態で認められる持続的な  $Ca^{2+}$  濃度の上昇は酵素等の異常活性化により細胞障害を引き起こしうる。関節リウマチで特異的に出現する抗 CCP 抗体の対応抗原にシトルリン化タンパク質があるが、このシトルリン化を引き起こすペプチジルアルギニン・デイミナーゼ (PAD) は  $Ca^{2+}$  による活性化機構が明らかになっている<sup>9)</sup>。障害された細胞が何らかのタンパク質分泌を起こす可能性があり、そのタンパク質の中に血液中にまで運ばれるものが存在すれば、病態マーカーとなりうる<sup>10)</sup>。血液中には約 2 mM の高い  $Ca^{2+}$  が存在しているため、リポタンパク質や細胞膜と結合している可能性があ





リポソームの作製

リポソーム結合タンパク質の定量分析

Fig. 5 リポソームによるバイオマーカー検索の strategy 模式図

リポソームの作製：リン脂質 (egg PC ; Phosphatidyl Choline, PS ; Phosphatidyl Serine) はクロロホルム/メタノール (2:1) に溶解し (10 mg/ml), 必要量の PC と PS を 9:1 に混ぜ、N<sub>2</sub> (gas) で乾固。細胞膜に存在する酸性リン脂質 (PS) の含量が約 10% であり、リポソームの組成は 10% PS と残りは主要な中性脂質である PC とした。

リポソーム結合タンパク質の定量分析：定量分析の手段として SELDI-TOF MS のほか二次元電気泳動等の解析方法が利用できる

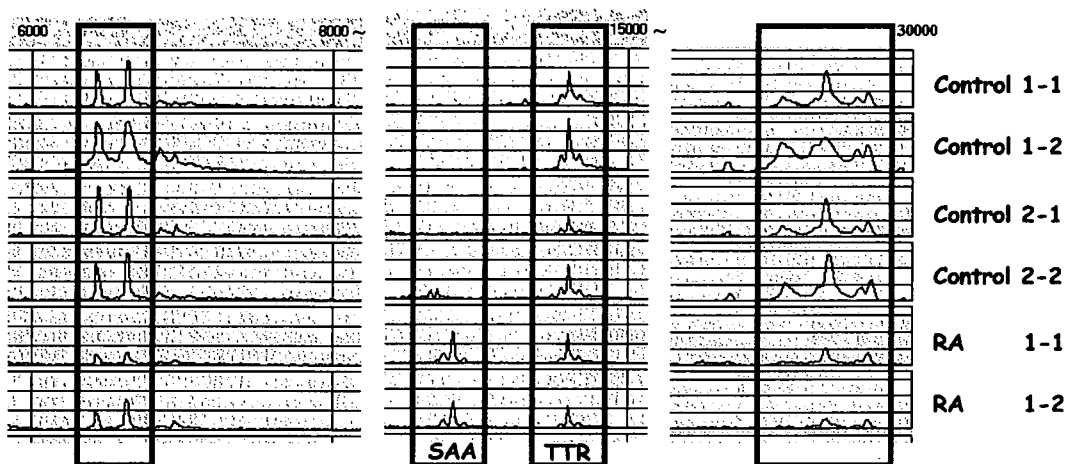


Fig. 6 リポソーム結合タンパク質の SELDI-TOF MS による解析

健常人二名とリウマチ患者治療前一名の血漿からリポソーム結合タンパク質を分離し、SELDI-TOF MS により解析した。(duplicate)

る。われわれは、Ca<sup>2+</sup> 依存的にリン脂質と相互作用する血漿タンパク質に注目し、実際に RA 患者血漿中の Ca<sup>2+</sup> 依存的 Liposome 結合タンパク質を SELDI-TOF MS により解析した結果 (Fig. 6), 上記の SAA, TTR のほかにも、健常人と比して発現が増加している peak の存在が明らかになり、現在同定中である。

7. おわりに

血漿のプロテオミクス解析についてわれわれの研究結果も交え述べた。血漿中にはいまだ解析されていない未知の低濃度領域が存在し、質量分析技術の

発展は道の領域の解析を可能にしようとしている。今後プロテオミクスがさらに発展し新たな診断マーカーや治療標的分子の同定がなされることが期待される。

文 献

- 1) Griffin, T. J., et al. : Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*, 1 : 323-333, 2002.
- 2) Chen, G., et al. : Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas.

- Mol Cell Proteomics*, 1 : 304–313, 2002.
- 3) Omenn GS, et al. : Overview of the HUPO Plasma Proteome Project : results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics*. 5(13) : 3226–3245, 2005.
  - 4) de Seny D, et al. : Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum*. 52(12) : 3801–3812, 2005.
  - 5) Takeuchi T, et al. : Serum protein profile of rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy (infliximab). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Feb 24, 2007.
  - 6) Matsuo K, et al. : Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach. *Arthritis Res Ther*. 8(6) : R175, 2006.
  - 7) Torchilin, V.P, et al. : , Oxford University Press, Preparation of liposomes in Liposomes, second edition, A practical approach, pp3–29, 2003.
  - 8) 木村成寿, ほか : リポソームをリガンドとして用いた血漿蛋白質のプロテオミクス解析. *生物物理化学* 50 : 231–236, 2006.
  - 9) Arita K, et al. : Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. *Nat Struct Mol Biol*. 11(8) : 777–783, 2004.
  - 10) Trump BF, Berezsky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J*. 9(2) : 219–228, 1995.

# Elevation of Plasma Level of Annexin A5 in Alzheimer's Disease

H. Sohma<sup>1</sup>, K. Matsumoto<sup>2</sup>, H. Honda<sup>3</sup>, Y. Mizue<sup>4</sup>, M. Momma<sup>5</sup>,  
M. Yamaguchi<sup>1</sup>, Y. Amano<sup>3</sup>, K. Kikuchi<sup>4</sup>, S. Murakami<sup>6</sup>, T. Maeda<sup>7</sup>,  
S. Toyomasu<sup>7</sup>, T. Saito<sup>8</sup> and Y. Kokai<sup>1</sup>

*Departments of <sup>1</sup>Biomedical Engineering and <sup>8</sup>Neuropsychiatry, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan; <sup>2</sup>Japan Clinical Laboratories, Inc., Kyoto, Japan, <sup>3</sup>Sanyo Chemical Industries, Ltd., Kyoto JAPAN, <sup>4</sup>Sapporo Immuno Diagnostic Laboratory, Inc., Sapporo JAPAN, <sup>5</sup>Kushiro Kita Hospital, Kushiro JAPAN; Departments of <sup>6</sup>Nursing and <sup>7</sup>Occupational Therapy, Sapporo Medical University, School of Health Sciences Sapporo, Japan*

## Abstract

In this study we aimed to investigate plasma molecular markers for Alzheimer's disease (AD). Secreted proteins from culture cells (rat glioma C6 cells) induced by Ca<sup>2+</sup>-damage with A23187 was fractionated as the lipid liposome (PC:PS=9:1) binding fraction. After 2D-gel, tryptic digestion and LC-MS/MS analysis, it was found that the fraction involved annexin A2, fetuin, annexin A5, and SLUG. As annexin A2 is highly expressed in blood cells, we focused on annexin A5 in human plasma. The level of plasma annexin A5 was 3.92 ± 2.08ng/ml (N=47) and 2.92±1.29ng/ml (N=19) in AD and vascular dementia patients, respectively, which is significantly higher than that in control was 0.87±0.21ng/ml (N=35). As the blood-brain barrier strictly limits transport into the brain through both physical (tight junctions) and metabolic (enzymes) barriers and relatively hydrophobic materials tends to go through the barrier to vasculature, annexin A5 may be a novel plasma molecular marker for dementia and especially AD. *Keywords:* Ca<sup>2+</sup>-stress, cytotoxicity, annexin A5, dementia, Alzheimer's disease, sandwich ELISA

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive decrease in cognitive functions. The morphological change of the brain in AD is due to neuronal cell apoptosis caused by functional disorder of mitochondria and

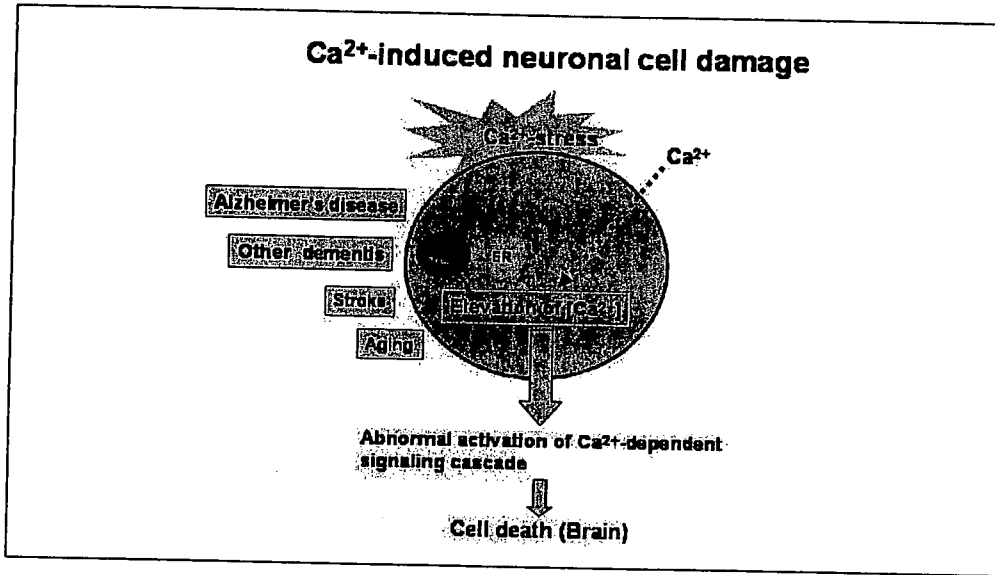


Fig. 1. Schematic illustration of Ca<sup>2+</sup>-induced cell damage in AD.

microsomes. Stress-induced cell damage is a crucial problem in the brain in AD (Mattson, 2004). Amyloid- $\beta$ -protein (A $\beta$ ), which is an unexpected proteolytic product of amyloid precursor protein (APP), accumulates in the brains of AD patients. This is thought to be the toxic principle of the neural cell death (Mattson, 2004). It has been demonstrated that the amyloid-dependent neurotoxicity involves perturbation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in neuronal cells (LaFerla, 2002) (Fig. 1). A $\beta$  may impair membrane Ca<sup>2+</sup> pumps and enhance Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-dependent channels and ionotropic glutamate receptors. In addition, Tau, which is thought to have a role in filament stabilization, has been shown to aggregate to form filaments in neurons. These cells were shown to have high Ca<sup>2+</sup> content, leading to the hyperactivation of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases and protein kinases in the postmortem brains from AD patients (Dickson, 2004; Saito et al., 1993). Thus, A $\beta$  and Tau in CSF have been focused on as molecular markers for AD. In this study, we examined specific molecular markers in patients' blood plasma which might represent neuronal cell damage. For that purpose, we first performed *in vitro* study using culture cells: we analyzed proteins secreted as a result of Ca<sup>2+</sup>-stress, and then explored plasma marker for AD.

## Materials and Methods

**Materials** Reagents were purchased from the following sources: ampholyte, molecular weight standards and Protein A-Sepharose 4B, Amersham Bioscience co. (Buckinghamshire, UK); cell proliferation kit II (LDH assay) from Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN, USA); EzStain Silver (silver staining