

- experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 183: 7539-46, 2009.
11. Saita S., Shirane M., Natume T., Iemura S., Nakayama K.I.: Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with vesicle-associated membrane protein-associated protein. *J Biol Chem* 284: 13766-77, 2009.
 12. Tsukuba T., Yanagawa M., Okamoto K., Okamoto Y., Yasuda Y., Nakayama K.I., Kadowaki T., Yamamoto K. Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in several cell-surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages. *J Biochem* 145: 565-73, 2009.
 13. Kimura T., Sakai M., Tabu K., Wang L., Tsunematsu R., Tsuda M., Sawa H., Nagashima K., Nishihara H., Hatakeyama S., Nakayama K., Ladanyi M., Tanaka S., Nakayama K.I. Human synovial sarcoma proto-oncogene *Syt* is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. *Lab Invest* 89: 645-56, 2009.
 14. Matsuda M., Tsutsumi K., Kanematsu T., Fukami K., Terada Y., Takenawa T., Nakayama K.I., Hirata M. Involvement of phospholipase C-related inactive protein in the mouse reproductive system through the regulation of gonadotropin levels. *Biol Reprod* 81: 681-9, 2009.
 15. Tanaka S., Wakeyama H., Akiyama T., Takahashi K., Amano H., Nakayama K.I., Nakamura K.: Regulation of osteoclast apoptosis by *bcl-2* family protein *bim* and *caspase-3*. *Adv Exp Med Biol* 658: 111-6, 2010.
 16. Wang H., Bauzon F., Ji P., Xu X., Sun D., Locker J., Sellers R.S., Nakayama K., Nakayama K.I., Cobrinik D., Zhu L. *Skp2* is required for survival of aberrantly proliferating *Rb1*-deficient cells and for tumorigenesis in *Rb1(+/-)* mice. *Nature Genet* 42: 83-8, 2010.
 17. Bohgaki M., Matsumoto M., Atsumi T., Kondo T., Yasuda S., Horita T., Nakayama K.I., Okumura F., Hatakeyama S., Koike T. Plasma gelsolin facilitates interaction between β_2 glycoprotein I and $\alpha_5\beta_1$ integrin. *J Cell Mol Med*, in press, 2010.
 18. Iwatsuki M., Mimori K., Ishii H., Yokobori T., Takatsuno Y., Sato T., Toh H., Onoyama I., Nakayama K.I., Baba H., Mori M. Loss of *FBXW7*, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: Clinical significance. *Int J Cancer* 126: 1828-37, 2010.
 19. Fujii M., Kanematsu T., Ishibashi H., Fukami K., Takenawa T., Nakayama K.I., Moss S.J., Nabekura J., Hirata M. Phospholipase C-related but catalytically inactive protein is required for insulin-induced cell surface expression of γ -aminobutyric acid type A receptors. *J Biol. Chem.*, 285: 4837-4846 (2010).
 20. Tada H., Okano H.J., Takagi H., Shibata S., Yao I., Matsumoto M., Saiga T., Nakayama K.I., Kashima H., Takahashi T., Setou M., Okano H. *Fbxo45*, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity. *J Biol Chem* 285: 3840-9, 2010.
 21. Masuda K., Ishikawa Y., Onoyama I., Unno M., de Alboran I.M., Nakayama K.I., Nakayama K. Complex regulation of cell-cycle inhibitors by *Fbxw7* in mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene* 29: 1798-809, 2010.
 22. Tsukada Y., Ishitani T., Nakayama K.I. *KDM7* is a dual demethylase for histone H3 lysines 9 and 27 and functions in brain development. *Genes Dev* 24: 432-7, 2010.
 23. Susaki E., Kaneko-Oshikawa C., Miyata K., Tabata M., Yamada T., Oike Y., Katagiri H., Nakayama K.I. Increased *E4* activity in mice leads to ubiquitin-containing aggregates and degeneration of

hypothalamic neurons resulting in obesity. J Biol Chem, in press, 2010.

24. Old J.B., Kratzat S., Hoellein A., Graf S., Nilsson J.A., Nilsson L., Nakayama K.I., Peschel C., Cleveland J.L., Keller U.B. Skp2 Directs Myc-Mediated Suppression of p27^{Kip1} yet Has Modest Effects on Myc-Driven Lymphomagenesis. Mol Cancer Res 8: 353-62, 2010.
25. Okumura F., Matsunaga Y., Katayama Y., Nakayama K.I., Hatakeyama S. TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. J Cell Sci, in press, 2010.
26. Chan C.H., Lee S.W., Li C.F., Wang J., Yang W.L., Wu C.Y., Wu J., Nakayama K.I., Kang H.Y., Huang H.Y., Hung M.C., Pandolfi P.P., Lin H.K. Deciphering the transcription complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. Nature Cell Biol, in press, 2010.
27. Lin H.K., Chen Z., Wang G., Nardella C., Lee S.W., Chan C.H., Yang W.L., Wang J., Egia A., Nakayama K.I., Cordon-Cardo C., Teruya-Feldstein J., Pandolfi P.P. Skp2 targeting suppresses tumorigenesis through p19Arf/p53-independent cellular senescence. Nature 464: 374-9, 2010.

G-2. 学会発表

1. 中山敬一：細胞周期への出入りを制御するユビキチンリガーゼ群。日本分子生物学会第9回春季シンポジウム，分子生物学の新たな胎動～宮崎からの黎明の曙光～，宮崎，2009年5月。
2. 中山敬一：プロテオミクスが拓くユビキチン研究の新地平：酵素-基質関係の網羅的解明に向けて。千里ライフサイエンスセミナー「ユビキチン研究の新展開：病態生理学的観点から」，大阪，2009年9月。
3. 中山敬一：プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平：もうウェスタンブロットイン
- グは要らない?! 第29回日本糖質学会年会，高山，2009年9月。
4. 中山敬一：プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平：リン酸化とユビキチン化に関する網羅的解析。第82回日本生化学会大会，神戸，2009年10月。
5. 中山敬一：最新プロテオミクス技術による酵素-基質関係の網羅的解明。プロテオミクス-構造生物学講演会，東京，2009年11月。
6. Nakayama K.I., Yumimoto K., Matsumoto M.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by differential proteomics. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. 恩納，2009年11月。
7. 白根道子，中山敬一：Protrudin 依存的な小胞輸送によるシナプス制御と神経障害。第32回日本分子生物学会年会，横浜，2009年。
8. 青山 慧，石川善則，小野山一郎，中山敬一，中山啓子：ユビキチンリガーゼ SCFFbxw7 は Notch タンパク質分解により B 細胞の分化を制御する。第32回日本分子生物学会年会。(H21年12月，横浜)
9. 西山正章，中山敬一：初期発生において p53 機能を抑制するクロマチンリモデリング因子 CHD8。第32回日本分子生物学会年会，横浜，2009年12月。
10. 三輪正直，山田真生，津田雅貴，虫明正敏，中山啓子，中山敬一，藤澤順一，田中正和：DNA 損傷で誘導される中心体増幅の新しいシグナル経路。第68回日本癌学会学術総会，横浜，2009年12月。
11. 松本有樹修，洲崎悦生，小野山一郎，中山敬一：細胞周期抑制因子 p57 は小脳発生に必須の役割を担う。第32回日本分子生物学会年会，横浜，2009年12月。
12. 弓本佳苗，松本雅記，中山敬一：定量的プロテオミクスを用いたユビキチンリガーゼ基質の網羅的な同定。第32回日本分子生物学会年会，横浜，2009年12月。
13. 洲崎悦生，金子-押川千恵，宮田敬士，田畑光久，尾池雄一，山田哲也，片桐秀樹，中山敬

- 二：E4 経路の過剰な活性化は視床下部摂食中枢の神経障害と肥満を誘発する。第 32 回日本分子生物学会年会，横浜，2009 年 12 月。
14. 東田裕一，石谷 太，中山敬一：新規二重特異性ヒストン脱メチル化酵素 KDM7 は脳の発生に関与する。第 32 回日本分子生物学会年会，横浜，2009 年 12 月。
15. 松崎美美子，白根道子，松本雅記，中山敬一：Protrudin は KIF5 との相互作用を介して神経機能を制御する。第 32 回日本分子生物学会年会，横浜，2009 年 12 月。
16. 中山敬一：プロテオミクスが拓く生命科学探究：もうウェスタンブロットィングは要らない！？。第 3 回 FANTASY，東京，2010 年 2 月。
17. 中山敬一：細胞増殖をコントロールする分子機構：その破綻としての発癌。第 6 回日本消化管学会総会学術総会，福岡，2010 年 2 月。
18. Nakayama K.I., Yumimoto K., Matsumoto M.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by proteomics: Say good-bye to western blotting. 5th Global-COE International Symposium: Cell cycle and differentiation., シンガポール，2010 年 2 月。
19. Saita S., Shirane M., Nakayama K.I.: Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with VAMP-associated protein (VAP). 5th Global-COE International Symposium: Cell cycle and differentiation., シンガポール，2010 年 2 月。
20. Nakayama K.I.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship in ubiquitylation by differential proteomics: Say good-bye to western blotting. Biology of the ubiquitin and the ubiquitin-like systems. エルサレム，2010 年 3 月。

出願番号：特願 2009-169045

出願日：2009 年 7 月 17 日

出願人：国立大学法人九州大学

発明者：中山敬一，松本雅記（平成 21 年）

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

1. 発明の名称：タンパク質の定量方法

創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用

研究分担者 平野 久 横浜市立大学先端医科学研究センター副センター長・
大学院生命ナノシステム科学研究科生体超分子システム科学専攻教授

研究要旨

まずリン酸化タンパク質やそのリン酸化部位をハイスループットで網羅的に解析する方法を検討した。金属アフィニティー精製によってリン酸化ペプチドを濃縮し、LTQ・Orbitrap MS で解析すれば、1,500 以上のリン酸化タンパク質の同定、3,000 以上のリン酸化ペプチドの検出が可能であることが明らかになった。また、iTRAQ 法を併せて用いることによって、疾患に伴って発現が変動するリン酸化タンパク質を検出・同定することができた。しかし、iTRAQ でペプチドを標識すると同定できるリン酸化タンパク質の数は 1/3~1/4 に減少することがわかった。一方、質量分析ではリン酸化状態の異なる同一種のタンパク質を同定することは容易でない。そこで、リン酸化状態の異なる同一種のタンパク質を同定する方法に関して検討し、リン酸化アフィニティー電気泳動がリン酸化状態を解析する方法として優れていることを確認した。他方、卵巣明細胞腺がんの組織や培養細胞で検出される疾患関連タンパク質が血中で検出できないことが、診断マーカー開発の大きな壁になっている。そこで、がん細胞から分泌されるタンパク質は生体でがん組織から血液に分泌される可能性が高いと考え、卵巣明細胞腺がん培養細胞から培地に分泌されるタンパク質を検出し、バイオマーカー候補タンパク質を同定した。

A. 研究目的

タンパク質の翻訳後修飾の異常は、タンパク質の機能に様々な影響を及ぼす。そして、それがしばしば病気の原因となる。翻訳後修飾の中でも、リン酸化は、細胞内情報伝達、細胞機能の制御に係わる極めて重要な翻訳後修飾である。リン酸化の異常と疾患の関係が明らかになれば、異常にリン酸化されたタンパク質を疾患の診断マーカーとして利用できる可能性がある。また、リン酸化異常タンパク質は創薬ターゲットにもなる可能性がある。

そこで、本年度は、質量分析装置(MS)を用いてリン酸化タンパク質をハイスループットで網羅的に解析できる方法を検討すると共に、MS では明らかにすることが難しいリン酸化状態の異なる同一種のタンパク質をアフィニティー電気泳動で解析する方法の開発を行った。

一方、昨年度、卵巣明細胞腺がんの組織や培養細胞で 40 種類のタンパク質の発現変動を明らかにした。これらのタンパク質のうち、少なくとも 8 種類のタンパク質は明細胞腺がんでかなり特

異的に発現が変動することが確認された。昨年度は、これらのタンパク質が初期の明細胞腺がん患者の血漿中でもとらえることができるかどうか調べた。これまでに血漿中の約 3,000 のタンパク質を 4D-LC-ESI-Q/TOF MS によって微量の血液を用いて分析できるようにしたが、この方法を使っても上記明細胞腺がん関連タンパク質を血漿中に検出することはできなかった。組織検体や培養細胞でバイオマーカー候補タンパク質が見いだされても、血液中でそれを検出することは容易でないことがわかった。そこで、今年度は、がん細胞から分泌されるタンパク質は生体でがん組織から血液に分泌される可能性が高いと考え、卵巣明細胞腺がん培養細胞から培地に分泌されるタンパク質を検出・同定し、バイオマーカーとして利用できる可能性があるかどうか調べた。

B. 研究方法

B-1. 分析技術の検討

1) リン酸化タンパク質の網羅的解析

MSの感度の向上とリン酸化ペプチドを選択的に濃縮する方法の発達によって、リン酸化タンパク質をハイスループットで大規模に解析できるようになった。本研究では、タンパク質をプロテアーゼにより分解した後、リン酸基と金属とのアフィニティーを利用してリン酸化ペプチドを選択的に濃縮し、LC-MS/MSによってリン酸化ペプチドを検出・同定した。

まず、卵巣明細胞腺がん培養細胞からタンパク質を抽出し、トリプシンで消化した。消化物にTFAを加えて酸性にした後、Sep-Pakで精製した。得られた溶液中のリン酸化ペプチドをPHOS-TiO₂キット(GLサイエンス)によって濃縮した。そして、STAGE Tipで精製し、LC-MS/MS(ESI-Q/TOF MS、マイクロマス及びLTQ-Orbitrap MS(サーモ)を解析に用いた。

また、昨年度検討したiTRAQ法(昨年度の報告書を参照されたい)を併せて用いることによってデファレンシャルディスプレイ分析を行い、卵巣明細胞腺がん細胞と漿液性がん細胞との間でリン酸化状態に差があるタンパク質の検出・同定を試みた。

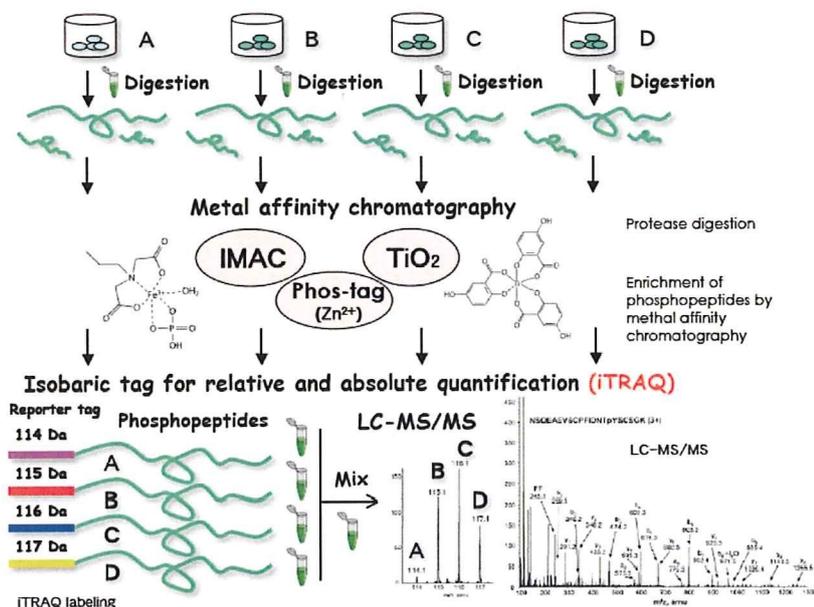
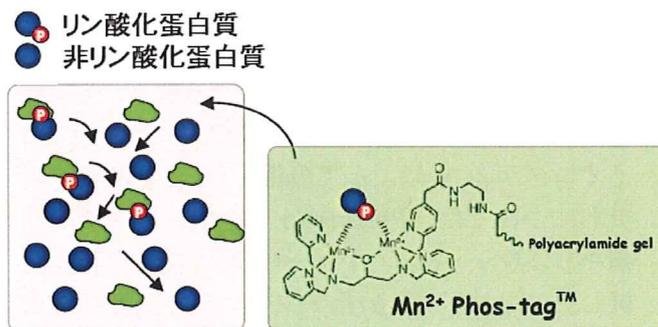


図1. リン酸化タンパク質のデファレンシャルディスプレイ分析。

A~D細胞からのタンパク質をiTRAQ試薬で標識。混合後、ペプチドに断片化して金属アフィニティー精製法でリン酸化ペプチドを濃縮。LC-MS/MSで同定した。



Phos-tagリガンド(緑)は、リン酸モノエステルイオン(R-OPO₃²⁻)を選択的に捕捉

図2. Phos-tagアフィニティー電気泳動によるリン酸化タンパク質の解析。

Phos-tagアクリルアミドを共重合させたゲルで電気泳動を行うと、Phos-tagとリン酸基が相互作用してリン酸化タンパク質の移動度が遅くなる。これを利用してタンパク質のリン酸化状態を解析する。

2) リン酸化アフィニティー電気泳動

MSは、ハイスループットで高感度な分析を可能にしたが、タンパク質のアイソフォーム、リン酸化状態が異なる同一種類のタンパク質の分析には向いていない。最近、開発されたPhos-tagアクリルアミドを共重合させたゲルを用いたアフィニティー電気泳動は、リン酸化状態が異なるタンパク質を分離する方法として利用できる可能性がある。そこで、リン酸化アフィニティー電気泳動を用いてヘテロ核リボヌクレオタンパク質K(nhRNP K)のリン酸化状態を解析し、その可能性を探った。

まず、マウスマクロファージ様細胞株であるJ774.1細胞及びHeLa細胞の細胞質と核からタンパク質を抽出した。一次元目に、固定化pH勾配等電点電気泳動ゲル(pH4.7-5.9)を用い、二次元目に、通常のSDS-PAGEゲル、またはリン酸化アフィニティーSDS-PAGEゲルを用いた。リン酸化アフィニティーSDS-PAGEゲルには、Phos-tagアクリルアミドを添加した。電気泳動後、SYPRO Ruby染色、または、ウエスタンブロット分析により

hnRNP K を検出した。

SYPRO Ruby 染色したゲルから切り出したタンパク質スポットをプロテアーゼ分解し、分解物を MALDI-TOF/TOF MS (4800, アプライドバイオシステムズ)によって分析した。リン酸化ペプチドについては、Phos-trap リン酸化ペプチド濃縮キット(パーキンエルマー)を用いて濃縮後、分析した。なお、リン酸化アフィニティー電気泳動に関する研究は、理化学研究所の小原収博士が中心となって行ったものである。

B-2. 疾患関連タンパク質(卵巣明細胞腺がん培養細胞分泌タンパク質)の検出・同定・検証

卵巣明細胞腺がん細胞株 4 種(OVTOKO, OVISE, OVMANA 及び OVSAYO)、粘液性腺がん細胞株 2 種(MCAS 及び RMUG-S)、漿液性腺がん細胞株 2 種(OVSAHO 及び OVKATE) の培養上清から得られたタンパク質を各組織別に等量ずつ混合して用いた。

まずタンパク質を還元カルボキシメチル化した後、トリプシンを加えて消化した。各消化液を逆相カラム (HiQ Still C18-3 W-3 0.15 mm I.D×50 mm KYA) を用いた 1D ナノ LC システム (Dina-2 A: KYA)によりペプチドを分離しながら、オンラインで ESI-Q/TOF MS と ESI-LIT/TOF MS (NanoFrontier LD, 日立) によって MS/MS 測定を行った。逆相カラムへの吸着は緩衝液 A (2% ACN, 0.1% FA/D.W)で行い、2%~40%の緩衝液 B (98% ACN, 0.1% FA/D.W) のリニアグラジェントにてペプチドを分離・溶出させた。得られたデータはマスコットサーチエンジンによって解析し、タンパク質の同定を行った。SwissProt データベースを用い、生物種はヒトに限定して検索した。

同定された分泌タンパク質が明細胞腺がん細胞株で発現していることを確認するために、培養した細胞とその培養上清からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット解析を行った。さらに 11 種の卵巣癌細胞株 (OVCAR3, OVSAHO, OVKATE, RMUG-S, MCAS, OVTOKO, OVISE, RMG-I, RMG-II, OVMANA 及び OVSAYO) から RNA を抽出し、分泌タンパク質の mRNA 発

現量をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。明細胞腺がんとの関連性が示されたタンパク質については、卵巣癌組織検体を用いてさらに発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

提供者の同意を得て採取され、匿名化された検体を用いて研究を行った。

C. 研究結果

C-1. 分析技術の検討

1) リン酸化タンパク質の網羅的解析

卵巣明細胞腺がん培養細胞からタンパク質を抽出し、トリプシンで消化した。生じたペプチドのうち、リン酸化ペプチドを PHOS-TiO キットによって濃縮し、ESI-Q/TOF MS 及び LTQ-Orbitrap MS によって分析した。LTQ-Orbitrap MS では、1 回の分析で 1,571 のリン酸化タンパク質、3,466 のリン酸化ペプチドを検出・同定することができたが、まったく同じ試料、同じ量を用いても ESI-Q/TOF MS では、79 のリン酸化タンパク質、117 のリン酸化ペプチドを検出・同定できるに過ぎなかった。機種によって検出・同定できるタンパク質の数には大きな違いがあることがわかった。現在は、1 回に 2,000~3,000 のリン酸化タンパク質を検出・同定して解析を進めている。

一方、iTRAQ 法を用いたデファレンシャルディスプレイ分析によって、卵巣明細胞腺がん細胞と漿液性がん細胞との間でリン酸化状態に差があるタンパク質の分析を試みたところ、32 種類のタンパク質を検出・同定することができた。しかし、iTRAQ 試薬でペプチドを標識すると非標識の場合に比べ、同定できるタンパク質数が 1/3~1/4 に減少した。

2) リン酸化アフィニティー電気泳動

J774.1 細胞の hnRNP K は、リン酸化アフィニティー二次元電気泳動により、少なくとも、核において 20 スポット、細胞質において 4 スポットに分離され、各スポットの量は LPS 刺激依存的に変動した。hnRNP K は 1 つの遺伝子から選択的スプライシングにより複数のアイソフォームを生成することが知られている。MS を用いたア

イソフォーム分析により、リン酸化アフィニティー二次元電気泳動で分離された各 hnRNP K スポットは、4 種類のイソフォーム（選択的スプライシング変異体）に由来することがわかった。また、核では、4 種類のイソフォームすべてが発現していたが、細胞質では、主に 1 種類のイソフォームのみが発現していた。このような局在性の違いから、hnRNP K は、イソフォーム毎に異なる機能を有すると考えられた。

次に、hnRNPK 各イソフォームのリン酸化修飾の違いを調べた。その結果、hnRNP K は、核では主に Ser116 又は Ser284 でリン酸化された 3 種類のリン酸化タイプ及び非リン酸化タイプとして存在し、LPS 刺激後、Ser116/Ser284 及び Ser116 リン酸化タイプが増加し、Ser284 及び非リン酸化タイプが減少することがわかった。一方、細胞質では、主に非リン酸化タイプとして存在し、LPS 刺激後に非リン酸化タイプは減少し、Ser116 リン酸化タイプのみが増加することがわかった。局在毎にリン酸化タイプの比率が刺激依存的に変化することから、これらのサイトでのリン酸化による hnRNP K の機能調節の可能性が示唆された。

以前 Habelhah らは、HeLa 細胞内に強制発現させたアミノ酸置換変異体の挙動を観察し、hnRNP K が血清刺激時に Erk 依存的に Ser284/S353 でリン酸化を受け、細胞質に蓄積することを報告した。しかし、今回行ったリン酸化アフィニティー二次元電気泳動の結果から、HeLa 細胞の細胞質における Ser284/S353 リン酸化 hnRNP K は刺激後も検出限界以下であり、主に内在性 Ser116 リン酸化タイプが増加する事がわかった。以上の結果を考え併せると、種々の刺激後、細胞質においては、Ser116 リン酸化が hnRNP K の機能発現に一定の役割を果たしていると考えられた。

C-2. 疾患関連タンパク質(卵巣明細胞腺がん培養細胞分泌タンパク質)の検出・同定・検証

MS を用いて解析を行った結果、3 種類の卵巣がん組織型のグループから合計 280 種類のタンパク質が同定され、半分以上が細胞外分泌型もしくは細胞質膜局在型として分類されるタンパク

質であることがわかった。明細胞腺がん群のみで検出された 58 種類の中で、種々の組織にて広範囲な発現はみられない分泌型のタンパク質が 19 種類見いだされた。この 19 種類のタンパク質に関して、様々な卵巣がん細胞株及び患者組織における遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法によって調べた結果、9 種類の分泌タンパク質の遺伝子が明細胞腺がん患者組織において有意に発現上昇していることがわかった。これらのタンパク質のうち、ANX4、オステロポンチン及び IGFBP1 については、ELISA 法により患者血清中の濃度を測定したが、明細胞腺がん患者に特異的に高い値は示されなかった。

今回、同定した明細胞腺がん特異的な分泌タンパク質群には、がん細胞の抗がん剤耐性や転移浸潤能との関連性が知られているタンパク質がいくつか含まれていた。これらが明細胞腺がん細胞の抗がん剤耐性にも関与しているかどうか明らかにするために、明細胞腺がん細胞株に 4 種類のタンパク質に対する siRNA を導入した。その結果、TFPI2 やセルロプラスミンの発現量を抑制した時に抗がん剤の一種シスプラチンに対する感受性が大きく上昇した。またマトリゲルチャンパープレートを用いた転移浸潤能試験を行った結果、TFPI2 やセルロプラスミンの siRNA を導入した細胞では、コントロール細胞と比べて、浸潤能が減弱することが明らかになった。したがって、これらのタンパク質は明細胞腺がん細胞の浸潤能を調節している可能性があると考えられた。

D,E. 考察及び結論

1) リン酸化タンパク質の網羅的解析

リン酸化タンパク質をハイスループットで網羅的に解析できるようになった。また、iTRAQ 法を組み合わせることで疾患でリン酸化状態が変動するタンパク質を検出・同定できるようになった。しかし、iTRAQ 標識してデファレンシャルディスプレイ分析を行うと、同定できるタンパク質の数が激減することがわかった。iTRAQ 標識を使わず、非標識で解析を行えば、同定数を増やせる可能性がある。今後、非標識の試料について解析し、ソフトウェアを使って定量的に解析してみたいと考えている。

2) リン酸化アフィニティー電気泳動

Phos-tag アクリルアミドは、リン酸化状態の異なるタンパク質の解析に有用であることがわかった。タンパク質のアイソフォーム、選択的スプライシング変異体、翻訳後修飾の異なる同一種タンパク質の解析は、MS では解析が難しいので、今後、質量分析を補完する技術として役立つと考えられる。

3) 疾患関連タンパク質(卵巣明細胞腺がん培養細胞分泌タンパク質)の検出・同定・検証

疾患関連タンパク質が組織検体や培養細胞を用いて検出されても、それか血液のような体液で検出できない場合は、バイオマーカーとしては利用しにくい。昨年度、組織検体や培養細胞を用いて検出された卵巣明細胞腺がん関連タンパク質を血漿中で検出しようとしたが、うまく検出できなかった。ここで解析している明細胞腺がん関連タンパク質は罹病初期に発現しているもので、量的にも少ない。それが、血液に放出されたとしても大量の血液で希釈されて検出が極めて難しいものになっている可能性は否定できない。もし、現在の MS の検出限界を超えているのであれば、検出するためのいくつかの方法が考えられる。一つは、MS の感度をさらに高めることであろう。最近、多反応モニタリングと呼ばれる質量分析法が発達し、特定のペプチドを高感度で選択的に検出できるようになった。この方法を使ってごく微量のバイオマーカーを検出できる可能性がある。また、リン酸化ペプチドのようにペプチドを濃縮することができれば、現在の MS でもごく微量のタンパク質を検出できる可能性はある。さらに、疾患関連タンパク質に対する自己抗体が産生されていれば、バイオマーカーとすることも可能であろう。しかし、もし、疾患関連タンパク質ががん組織から血液中に放出されていない場合は、これらの方法を使っても検出することは難しい。本研究で、がんに特異的に培養細胞から培地に放出されるタンパク質を解析した理由はここにある。すなわち、がん細胞から培地に分泌されるようなタンパク質は *in vivo* でもがん組織から血液中に放出され易いタンパク質では

ないかと考えられた。卵巣明細胞腺がん培養細胞から培地に分泌されるタンパク質を検出・同定したところ、多数のタンパク質が明細胞腺がんでは特異的に培地に分泌されていることがわかった。そのうち、いくつかのタンパク質は、明細胞腺がんによって mRNA レベルでもタンパク質レベルでも発現が増大していた。また、siRNA でその発現を抑えると、がんの増殖や抗がん剤耐性が抑制され、がんの浸潤性に変化が見られるものがあった。こうしたタンパク質は創薬のターゲットとして重要であると考えられる。これらのタンパク質の変動を血漿中で捉えられる可能性が大きいと推察されるが、この点に関しては現在検討を進めているところである。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Izumi N., Yamashita A., Iwamatsu A., Kurata R., Nakamura H., Saari B., Hirano H., Anderson P., Ohno S. AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK family and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Science Signaling*, in press.
2. Cong W., Hirose T., Yamashita A, Mizuno K., Harita Y., Hirano H., Ohno S. Apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) is involved in the PAR complex to regulate epithelial cell polarity. *Current Biol*, in press.
3. Kobiyama K., Takeshita F., Jounai N., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Ishii K. J., Kawai T., Sasaki S., Hirano H., Ishii N., Okuda K., Suzuki K. Extra-chromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA. *J Virol* 84: 822-32, 2010.
4. Shinya T., Osada T., Desaki Y., Hatamoto M., Yamanaka Y., Hirano H., Takai R., Che F.-S., Kaku H., Shibuya N. Characteri-

- zation of receptor proteins using affinity cross-linking with biotinylated ligands. *Plant Cell Physiol* 51:262-70, 2010.
5. Islam N., Campbell P. M., Higgins T. J. V., Hirano H., Arkurst R. J. Transgenic peas expressing an α -amylase inhibitor gene from beans show altered expression and modification of endogenous proteins. *Electrophoresis* 30:1863-8, 2009.
 6. Intoh A., Kurisaki A., Yamanaka Y., Hirano H., Fukuda H., Sugino H., Asashima M. Proteomic analysis of membrane proteins expressed specifically in pluripotent stem cells. *Proteomics* 9: 126-37, 2009.
 7. Kato Y., Arakawa N., Mashuishi Y., Kawasaki H., Hirano H. Mutagenesis of longer inserts by the ligation of two PCR fragments amplified with a mutation primer. *J Biosci Bioeng* 107: 95-7, 2009.
 8. Kobiyama K., Takeshita F., Ishii K. J., Koyama S., Aoshi T., Akira S., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Yamanaka Y., Hirano H., Suzuki K., Okuda, K. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class vaccine adjuvant. *J Immunol* 182:1593-601, 2009.
 9. Yokoyama R., Iwafune Y., Kawasaki H., Hirano H. Isoelectric focusing of high-molecular-weight-protein complex under native conditions using agarose gel. *Anal Biochem* 387:60-3, 2009.
 10. Yamashita A., Izumi N., Kashima I., Ohnishi T., Saari B., Katsuhata Y., Muramatsu R., Morita T., Iwamatsu A., Hachiya T., Kurata R., Hirano H., Anderson P., Ohno, S. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 23:1091-105, 2009.
 11. 平野 久 : タンパク質のアミノ酸配列と翻訳後修飾の分析, やさしい原理からはいるタンパク質化学実験法, タンパク質をみる一構造と挙動—. 長谷俊治高尾敏文, 高木淳一編, 化学同人, 京都, pp1-32, 2009.
 12. Kamp K. Hirano H. N-Terminal sequencing of N-terminally modified proteins. In: *The Protein Protocols Handbook* (Walker, J. M. ed.) Humana Press, New York, pp1063-80, 2009.
 13. 木村弥生, 平野 久 : iTRAQ 試薬を用いた疾患バイオマーカー探索, 明日を拓く新次元プロテオミクス. 中山敬一, 松本雅記編, 秀潤社, 東京, pp 116-21, 2009.
 14. 丸山伸之, 平野 久, 内海 成 : 種子成分の合成と生化学, 原田久也監修, 種子の科学とバイオテクノロジー, 学会出版センター, p 49, 種子生理生化学研究会編, 学会出版センター, 東京, 2009.
 15. 平野 久 : 医学略語辞典, 橋本信也監修, 中央法規, 東京, 印刷中.
 16. 尾野雅哉, 松原淳一, 根岸綾子, 山田哲司 : 2DICAL を用いた疾患バイオマーカー探索. 細胞工学別冊「明日を拓く新次元プロテオミクス」 pp122-30, 学研メディカル秀潤社, 東京, 2009.
- G-2. 学会発表**
1. 安東秀晃, 山中結子, 川崎博史, 森雅 亮, 横田俊平, 平野 久 : 川崎病原因蛋白質の探索及び翻訳後修飾の解析. 第 82 回日本生化学会大会, ポートアイランド, 神戸, 2009 年 10 月.
 2. 荒川憲昭, 田矢史織, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久 : 卵巣明細胞腺癌におけるアネキシン IV 複合体の機能解析, 日本ヒトプロテオーム機構第 7 回大会, 北里大学白金キャンパス, 東京, 2009 年 7 月.
 3. 荒川憲昭, 田矢史織, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久 : 卵巣明細胞腺癌におけるアネキシン IV 複合体の構成因子の同定, 第 82 回日本生化学会大会, ポートアイランド, 神戸, 2009 年 10 月.

4. 平野 久:プロテオーム解析による食品安全性評価, 日本農芸化学会シンポジウム, 福岡, 2009年3月.
5. 平野 久:蛋白質複合体の翻訳後修飾のプロテオーム解析, 第73日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 名古屋, 2009年5月.
6. 平野 久:バイオマーカー及び創薬ターゲット探索のプロテオーム研究における質量分析, 第61回日本細胞生物学会, 名古屋, 2009年6月.
7. 平野 久:分析技術の発達により見えてきた蛋白質の翻訳後修飾とその異常, 第1回公開シンポジウム科学技術振興調整費先端融合領域イノベーション創出拠点の形成, 翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成, 横浜, 2009年6月.
8. 平野 久:診断マーカーのプロテオミクス, 探索, バリデーション, 利用の方法. 第60回日本電気泳動学会総会, 松本, 2009年9月.
9. 平野 久:プロテアソームの翻訳後修飾プロテオミクス. 日本生化学会, 神戸, 2009年10月.
10. 平野 久:育種対象としてみた塩基性7Sグロブリンの特徴, 日本育種学会, 京都, 2010年3月.
11. Hirano H.: Clinical proteomics, What can we see by mass spectrometry? The 7th Kitasato Symposium for Disease Proteomics, Sagami-hara, Jul. 2009.
12. Hirano H.: Identification and validation of ovarian cancer-associated proteins. YCU-FDA CBER Joint Workshop, Yokohama, Mar. 2009.
13. Hirano H.: Proteomics of post-translational modification. Yamaguchi University Life Science Seminar, JHUPO Satellite Symposium, Jul. 2009.
14. Hirano H.: Proteomic analysis of co- and post-translational modifications in the yeast 26S proteasome. 11th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Vienna, Aug. 2009.
15. Hirano H., Arakawa N., Masuishi Y., Morita E., Miyagi E., Hirahara F.: Proteome analysis for the discovery of biomarkers and therapeutic targets. 5th AOHUPO Congress, 14th ADNAT Convention & 1st PSI Conference, Hyderabad, India, Feb. 2010.
16. 井野洋子, 小池里紗, 石黒 斉, 窪田吉信, 荒川憲昭, 平野 久: 前立腺癌細胞におけるアンドロゲン非依存性獲得機構に関与するリン酸化タンパク質の解析. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 北里大学白金キャンパス, 東京, 2009年7月.
17. 加藤 悠, 川崎博史, 平野 久: 出芽酵母二倍体における Bud32p 複合体による極性制御機構. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 北里大学白金キャンパス, 東京, 2009年7月.
18. 加藤 悠, 川崎博史, 大山良文, 岩崎博史, 古久保哲朗, 平野 久: 二倍体出芽酵母 Bud32 複合体の細胞極性制御に関する機能. 第82回日本生化学会大会, ポートアイランド, 神戸, 2009年10月.
19. 木村弥生, 永田佳代子, 鈴木信勇, 横山 亮, 北村 浩, 山中結子, 平野 久, 小原 収: リン酸化アフィニティー二次元電気泳動を用いた Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K の質的・量的変動モニタリング. 日本電気泳動学会第60回総会, M ウイング文化センター, 松本, 2009年9月.
20. 倉田洋一, 木村弥生, 名古屋博之, 岡本裕之, 正岡哲治, 荒木和男, 森山俊介, 平野 久, 森 司: 成長ホルモン遺伝子組換えアマゴの研究-5: 脳下垂体のプロテオーム解析. 日本水産学会日本大学生物資源科学部, 藤沢, 2010年3月.
21. 増石有佑, 荒川憲昭, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久: 新規 p53 ターゲット ANX4 は卵巣明細胞腺癌の p53 活性を低下させる. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 北里大学白金キャンパス, 東京, 2009年7月.

22. 野村文子, 荒川憲昭, 山中結子, 勝山真人, 川崎博史, 平野 久: レドックスプロテオミクスによる血管型 NADPH オキシダーゼの標的タンパク質の同定. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 北里大学白金キャンパス, 東京, 2009年7月.
23. 野村文子, 荒川憲昭, 山中結子, 勝山真人, 川崎博史, 平野 久: 血管型 NADPH オキシダーゼが標的とするタンパク質チオール網羅的解析. 第82回日本生化学会大会ポートアイランド, 神戸, 2009年10月.
24. 寺沢洋平, 高田兼則, 河原太八, 平野 久, 笹隈哲夫, 笹沼恒男: アフガニスタンのコムギ在来品種の遺伝的多様性・硬軟質性の解析. 日本育種学会, 北海道大学, 北海道, 2009年9月.
25. Terasawa Y., Takata K., Kawahara T., Hirano H., Sasakuma T., Sasanuma T.: Evaluation of high molecular weight-glutenin subunit of Afghan wheat landraces and identification of a novel Glu-D1 allele. Xth International Gluten Workshop Clermont-Ferrand, France, Sep. 2009.
26. 飛田直哉, 高橋枝里, 荒川憲昭, 宮城悦子, 平原史樹, 川崎博史, 平野 久: 卵巣癌におけるプロヒビチンのリン酸化. 日本生化学会大会, ポートアイランド, 神戸, 2009年10月.
27. 平野 久: プロテオミクスによる疾患関連タンパク質の解析. 富士フィルム講演会, 小田原, 2009年2月.
28. 平野 久: プロテオミクス研究の変遷, 将来への課題. バイオテクノロジー研究開発動向に関する調査委員会講演会, 経済産業省, 東京, 2009年2月.
29. 平野 久, 倉田洋一, Islam N., 森 司: プロテオーム解析による食品安全性評価. 日本農芸化学会講演会, 福岡国際会議場, 福岡, 2009年3月.
30. Hirano H.: Proteomics for the discovery of biomarkers and therapeutic targets. The 2nd International Workshop Co-sponsored by Yokohama City University and FDA (United States Food and Drug Administration), 講演要旨 13-14, 横浜, 2009年3月.
31. 叢 偉立, 廣瀬智敬, 山下暁朗, 水野恵子, 倉田理恵, 平野 久, 大野茂男: P160 は PAR-3 と複合体を形成して上皮細胞客性を制御する. 日本細胞生物学会要旨集, p44, 名古屋, 2009年6月.

H. 知的財産権の出願・登録情報

H-1. 特許

1. 発明の名称: 卵巣明細胞腺癌に特異的に発現しているタンパク質とその応用
出願番号: 特願2010-035737
出願日: 2010年2月22日
出願人: 公立大学法人横浜市立大学
発明者: 荒川憲昭, 増石有佑, 山中結子, 平野久, 川崎博史, 平原史樹, 宮城悦子
2. 発明の名称: 電気泳動ゲルのタンパク質を固定化し、質量分析できる膜フィルター (申請予定、学内承認済み)
発明者: 平野 久他

H-2. 実用新案登録

なし.

H-3. その他

なし

2DICAL 法に関する微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 尾野雅哉 国立がんセンター研究所 室長

研究要旨

国立がんセンターが開発した 2DICAL を用いた疾患関連創薬バイオマーカー探索を行っている。本年度は、2DICAL を用いた腎癌バイオマーカー探索を行い、プロテオームリサーチセンターへの 2DICAL システム移行のための基礎実験を行った。

A. 研究目的

2DICAL は国立がんセンターが開発したプロテオーム解析技術であるが、本プロジェクトではプロテオームリサーチセンターが所有する最新の質量分析計での測定データを解析することにより、従来では不可能だった微量たんぱく質の解析を可能にすることを目的としている。本年度は、国立がんセンターで倫理承認を受けている腎癌患者血漿の測定を国立がんセンターとプロテオームリサーチセンターの両者で行い、2DICAL を用いて両者間の性能を比較解析するとともに、腎癌血漿バイオマーカーの開発を行った。

B. 研究方法

プロテオームリサーチセンターで、国立がんセンターで倫理承認を受けている腎癌患者血漿の測定を可能とするために、プロテオームリサーチセンターでの倫理審査を行い、承認を受けた。

腎癌患者血漿は九州大学大学院医学研究院泌尿器科学分野との共同研究で収集されたもので、腎癌患者血漿 78 例、健常者血漿 132 例、前立腺癌患者血漿 54 例の内訳である。このうち腎癌血漿 20 例、健常者血漿 20 例を用いて、国立がんセンターおよびプロテオームリサーチセンターの質量分析計でデータ採取し、2DICAL で解析した。尚、プロテオームリサーチセンターでは StageTip を用いた脱塩処理の前処理を加えた。

測定した腎癌症例群 20 例の平均年齢は 62.25 歳に対し健常者群の平均年齢は 65.95 歳で、両群間で年齢のへだたりにないように調整した。腎癌症例の病期は 1a 期 11 例、1b 期 5 例、2 期 1 例、3a 期 2 例、3b 期 1 例であった。血漿は ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion Kit（血漿免疫除去キ

ット）を用いて前処理し、albumin、IgG、IgA、IgM、IgD、transferrin、fibrinogen、haptoglobin、 α 1-acid glycoprotein、 α 2-macroglobulin、apolipoprotein A-I、apolipoprotein A-II、apolipoprotein B、ceruloplasmin、1-antitrypsin、complement C1q、complement C3、complement C4、plasminogen、prealbumin の 20 の血中に豊富に存在するたんぱく質を除去した。国立がんセンターでは質量分析計には QTOF Ultima（ウォータース社）、液体クロマトグラフィーにはナノフロンティア LC（日立ハイテクノロジー社）を用い、プロテオームリサーチセンターでは質量分析計には QSTAR XL（アプライドバイオシステムズ社）、液体クロマトグラフィーには Ultimate（Dionex 社製）を用い、各症例 2 回ずつ測定し、計 160 計測データを 2DICAL で解析した。

国立がんセンターで得られた結果より、腎癌血漿バイオマーカー候補となったたんぱく質には既存の抗体があったため、Western Blot によって血中量を確認し、さらに AlphaLISA（パーキンエルマー社）を用い腎癌患者血漿 77 例、健常者血漿 130 例、前立腺癌患者血漿 20 例での検討を行った。

（倫理面への配慮）

国立がんセンターの倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が出ることが無いように匿名化が厳重に行われるように配慮したがん患者および健常者ボランティアの血漿検体を用いた。

C. 研究結果

国立がんセンターで計測されたデータを 2DICAL で解析したところ、23407 個のピークが

検出された。ピーク強度最大値が 30 より大きく、外れ値解析の P 値が 0.05 より小さいピークを選出し、さらに目視確認して、59 個のマーカ候補が選抜された。尚、外れ値解析の基準はコントロール群の平均値+標準偏差×1.96 とした。これら 59 個のマーカ候補に対して標的タンデムマス測定を行い、57 ピークに対応するタンデムマスデータを取得することができた。タンデムマス測定で同定されたたんぱく質のうち、外れ値 $p=0.004$ 、U 検定 $p=0.01$ 、ROC AUC=0.70 を示し、複数のペプチドフラグメントでヒットしたたんぱく質を第一の腎癌血漿バイオマーカー候補として、さらなる検討を行った。

同たんぱく質の血中量を Western Blot で確認したところ、腎癌症例群で明らかに増加していることが確認された。(図 1) AlphaLISA により多数例を検討したところ、健常者群と比較し、腎癌症例群で有意に血中量が増加しており、前立腺癌患者群と比較しても、有意に増加していることが確認された。

(図 2) 健常者と腎癌症例の間で ROC 曲線を引くと AUC 値は 0.722 であった。(図 3)

腎癌血漿 20 例、健常者血漿 20 例を用いた国立がんセンターおよびプロテオームリサーチセンターの質量分析計での測定より得られたデータを 2DICAL 解析したところ、プロテオームリサーチセンターでの計測では、保持時間の変動が大きいことが明らかになった。国立がんセンターの計測では各測定曲線の傾きは 45 度線上にのり保持時間の変動が少ないことが分かるが、プロテオームリサーチセンターでは 45 度線からの変動の激しいことが示された。

(図 4) プロテオームリサーチセンターでの計測のうち変動の少ない 38 測定データ (腎癌 7 例、健常者 12 例) を用いマーカー探索を行い、国立がんセンターの計測結果と比較した。TTEST<0.01、iScore >25、Expect<0.05 を満たすたんぱく質を検索したところ、プロテオームリサーチセンターでは 26 たんぱく質が選択されたのに対し、国立がんセンターでは 6 たんぱく質とプロテオームリサーチセンターでの計測から得られたマーカー候補が多かった。しかし、検討対象数が減少しているため、間違えて選ばれた可能性も高くなっている。

図 1. WesternBlotで確認

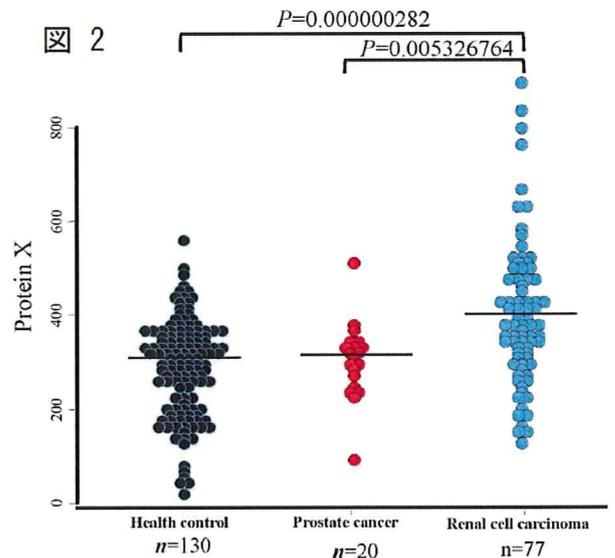
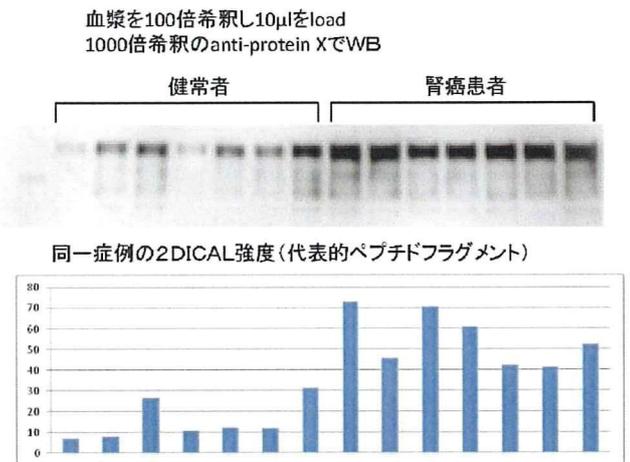


図 3 Protein XのROC曲線

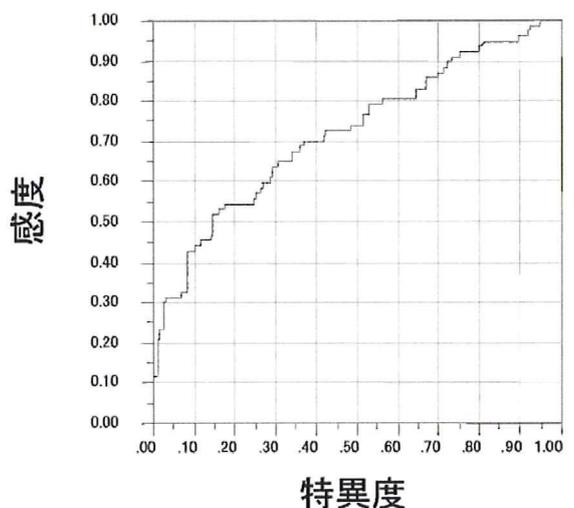
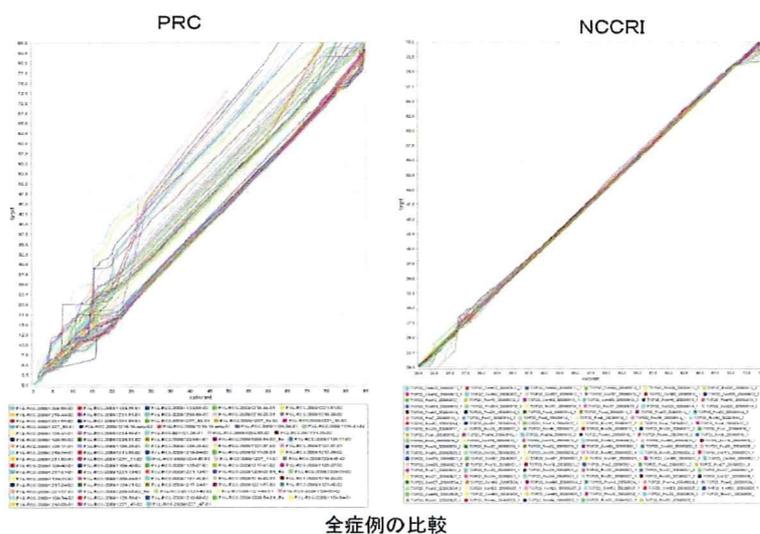


図 4 保持時間(RT)



D. 考察

すでに確立している国立がんセンターでの2DICALでの解析が、プロテオームリサーチセンターでも解析可能であるかという点がこのプロジェクトの重要課題であったが、国立がんセンターとプロテオームリサーチセンターで同一材料を用いた計測を行うことにより、十分可能であることが証明された。なおかつ、2DICALの解析を通して、両者間の違いを明確にでき、今後の対策を講ずることが可能となった。具体的には、プロテオームリサーチセンターにおいて、質量分析計に試料を流す液体クロマトグラフィーの再現性を高めることが今後の重要課題となった。また、プロテオームリサーチセンターではペプチドの同定数が高くなっており、質量分析計の違いとともに、StageTipを用いた脱塩前処理の有用性が考えられた。最新の質量分析計を用いる今後の計測では、以上の点を改善させて行う必要性が確認できた。

また、同時に行った腎癌血漿バイオマーカーの開発に関しては、腎癌血漿 20 例、健常者血漿 20 例の質量分析計による計測と2DICALによる解析で、23,407 ピークの網羅的解析から、バイオマーカー候補を探索することに成功した。そのひとつのたんぱく質に対して腎癌患者血漿 77 例、健常者血漿 130 例、前立腺癌患者血漿 20 例を用いた検証実験を行い、健常者群、前立腺癌患者群と比較し、腎癌症例群で血中濃度が亢進していることが確かめられた。同一試料はプロテオームリサーチセンターで次世

代質量分析計を用いて再計測する予定であり、新たなバイオマーカー候補が探索される期待がある。

E. 結論

2DICALにより、国立がんセンターおよびプロテオームリサーチセンター両者の質量分析計での測定データの比較解析が行え、両者間の差異を見出すことができた。また、腎癌患者血漿を用いたバイオマーカー探索は、プロテオームリサーチセンターでも可能であることが示された。今後は、保持時間の再現性を高めたうえで、プロテオームリサーチセンターが所有する最新の質量分析計を用い、2DICALによる微量たんぱく質の解析を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 尾野雅哉, 松原淳一, 根岸綾子, 山田哲司 : 2DICALを用いた疾患バイオマーカー探索.細胞工学別冊「明日を拓く新次元プロテオミクス」pp122-30, 学研メディカル秀潤社, 東京, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録情報

H-1. 特許

なし

H-2. 実用新案登録

なし

循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

分担研究者 寒川賢治 国立循環器病センター研究所 所長
南野直人 国立循環器病センター研究所 部長

研究要旨

循環器系疾患の病態、治療、予後などを正確に評価可能なバイオマーカーとなるたんぱく質やペプチドを発見するためには、微量の対象物を高感度に分離、検出し、構造解析できるシステムと、試料からの標的物質群を効率的に分離し、分解を抑制して再現的に濃縮する前処理法の確立が必須である。質量分析計などの高感度、高精度化により前者の目的はかなり達成されつつあるが、微量のたんぱく質やペプチドを解析可能とする前処理法については依然として対象ごとに研究、開発が必要である。本年度の研究では、微量試料の取扱い手法と、定量解析に向けた取り組みを継続、実施した。また、心不全におけるバイオマーカー探索のため、イヌモデルでの実験計画を作成、着手した。

A. 研究目的

ゲノム遺伝子配列の決定に続き、生体で実在、機能するたんぱく質、ペプチド、代謝物などの実験的解析（プロテオーム、ペプチドーム、メタボローム解析）に基づくファクトデータベース構築が大きな課題となっている。細胞や組織が産生し、血液、尿などに存在するたんぱく質、ペプチド、代謝物などを包括的に解析、利用できれば、医薬品をはじめ各種産業に利用可能な物質を探索、発見する上で極めて有用な情報源となるからである。また、正確な臨床情報を伴った血液、尿などの体液、組織や細胞試料のプロテオーム、ペプチドーム解析などを疾患発症から経時的に実施できれば、有用なバイオマーカーを発見でき、病態、治療、予後などの診断、医薬品の開発、評価が正確に実施可能となると期待される。しかし、生体内に存在するたんぱく質、ペプチドは極めて多様な性質を示す物質の混合物であり、かつ濃度差が極めて大きいことが障害となり、ゲノムやトランスクリプトーム解析のような均一な解析が実施できていない。特に微量たんぱく質やペプチドまでを定量的に解析することや、翻訳後修飾を受けた微量たんぱく質の正確な構造情報を得ることは、依然としてきわめて困難である。本研究では、これまで培ってきた前処理法、解析技術を改良し、循環器疾患患者の組織、血液、細胞などに含ま

れる微量たんぱく質やペプチドの定量解析、修飾などの構造変化の解析を可能とする研究技術を開発することにより、高血圧、心疾患、動脈硬化などの病態、治療、予後などの診断・評価に使用可能なバイオマーカーの発見を目指す。

本年度の研究では、血液試料中の微量たんぱく質、ペプチドの濃縮法について検討を継続するとともに、培養細胞上清に分泌されるペプチド、たんぱく質の解析法の確立を目指した。また、定量的な解析法として有用性が示されている多重反応モニタリング(Multiple Reaction Monitoring: MRM)法の実施可能な機器が導入されたため、その定量性や感度について検討を行った。さらに、循環器疾患におけるバイオマーカー探索の対象疾患として心不全を選定し、モデル系を用いた研究計画を作成、着手した。

B. 研究方法

B-1. 血漿試料を用いた前処理方法の検討：昨年度の血漿を対象とした解析で、前処理による変化、変動を最も鋭敏に反映することが示されたペプチド画分について、数種のアフィニティーカラムの素通り画分の限外口過濃縮物と、単純な限外口過濃縮物との比較解析を行った。これは、アフィニティーカラムなどの前処理により、分解ペプチドの生成が観測されたためであ

る。プロテアーゼインヒビターカクテルなどを添加した試料も調製し、ゲルろ過 HPLC 分離後の画分について、ABI 社 Proteomics 4800 による分析を行った。

B-2. 培養細胞上清の解析：バイオマーカーの解析対象としては、通常、血液、尿、髄液等の体液成分がほとんどである。体液成分では、分泌性たんぱく質、ペプチドが大部分を占めるので、各種培養細胞上清に分泌されるたんぱく質、ペプチドを分解なく回収、分析する方法について検討した。まず、細胞内に分泌顆粒を有する内分泌系細胞を対象として検討を進めた。次に、作成した方法論をラット新生仔由来の心筋細胞、心臓線維芽細胞等に適用し、ペプチド、たんぱく質の解析を実施したが、かなりのたんぱく質分解物が観測されたので、培養方法や回収方法を改良して、分析を行った。いずれの場合も、無血清培地で細胞を十分洗浄して血清成分を除去した後、一定時間に無血清培地に分泌されたペプチド、たんぱく質を逆相系カートリッジで回収し、ゲルろ過 HPLC 分離後のペプチド画分を LTQ Orbitrap XL にて分析した。

B-3. MRM 法によるペプチド定量法：ABI 社 QTRAP5500 を使用し、質量分析計用の標準物質と、細胞培養上清や組織抽出物中より同定したペプチドの合成品（900～4,200Da）を用いて検討した。ナノ LC で分離した試料を質量分析計に導入し、設定した MRM transition について解析を行った。

B-4. 循環器疾患のプロテオーム解析対象：バイオマーカーの必要度、これまでの基礎研究、プロテオーム解析用試料の有無、モデル動物系の有無などを規準として、解析を行う対象疾患を検討し、研究計画を作成した。

（倫理面への配慮）

血液試料は第 1 期プロテオーム研究時に当センター倫理委員会で承認を受けて採取したもので、本研究での使用承認を受けると共に、20 年度に研究協力者の意思確認を行い、同意が得られた試料を使用した。動物実験については、当センター動物実験委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

C-1. 血漿試料を用いた前処理方法の検討：血漿試料を対象に、各種アフィニティーカラム、限外ろ過ユニット、逆相カートリッジで系統的に濃縮することにより、微量ペプチド画分の再現的な濃縮・調製法を検討した。今年度はペプチド画分に絞って解析し、分析の結果同定されたペプチドについて検討を行った。限外ろ過ユニットについては昨年度と同じ分子量 10,000 カット膜を使用したため、実際には分子量 2,500 以下のペプチドの解析結果である。血漿成分を希釈後、直ちに限外ろ過ユニット、逆相カートリッジで調製した試料のペプチド量が、マスキロマトグラム上のピーク面積を規準にして最も少なかった。各種カラム操作により吸着、減少するペプチドは少なく、昨年度の観測結果と同様に、補体系たんぱく質由来のペプチドが急激に増加することが確認された。他に検出されたペプチドの大部分は凝固系たんぱく質、リポたんぱく質と一部アノテーションのないたんぱく質に由来するペプチドであった。実際の処理過程においても、カラム溶出液でフィブリン形成が認められるものもあった。凍結血漿溶解時にプロテアーゼインヒビターカクテルを一定量添加、処理した場合には、血漿成分を直接処理した場合とほとんど差異が認められなかったが、各種アフィニティーカラムを通過させた試料のペプチド量は、無添加よりは減少したが、直接処理群よりは増加していた。アフィニティーカラム機材の違いについても検討したが、基本的に接触時間、面積などが増加すると、ペプチド量も増加する傾向が認められた。

C-2. 培養細胞上清の解析：1. に記載の通り、異なる血液試料等から微量たんぱく質、ペプチドの差分解析を行い、変化・変動するたんぱく質を見出すことは非常に困難である。問題を回避する方法として、培養細胞の産生、分泌するたんぱく質、ペプチドを包括的に同定し、生理的変動、病態生理的ストレス等による変化を解析して候補物質を見出す研究を昨年度より開始した。最終的には、循環器疾患患者血中のこれらの候補物質の変動を解析し、循環器疾患関連バイオマーカー候補を探索する試みである。循環器系組織構成細胞と並行して、本年度はホルモン産生、分泌が確認されている細胞

株について検討を行った。分泌顆粒を有する細胞群では、分泌刺激により非常に効率的なペプチドの回収、分析が可能であった。特に甲状腺髄様癌由来の TT 細胞では、カルシトニン、CGRP、ガストリン放出ペプチド、グレリン等のペプチドホルモン前駆体由来のペプチド、クロモグラニン B 等のグラニン類由来ペプチド、プロホルモン変換酵素 2、アミド化酵素等に由来するペプチドが観測され、細胞内たんぱく質に由来するペプチド断片はごく少数であった。豊富に存在するたんぱく質については、前駆体のプロセッシング経路の予測も可能であった。

ラット心臓非心筋細胞（主として線維芽細胞）、心筋細胞については、分泌ペプチド、たんぱく質を内分泌系細胞と同様の方法を時間を延長して回収し、今回はペプチド画分について分析を行った。心筋細胞で多量に分泌されている心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)も、当初は優位に検出されなかったが、細胞の調製法や純度、維持・管理法などの改良により観測されるペプチド大きく改善され、主要なペプチドとして観測されるようになった。心臓非心筋細胞の大部分は線維芽細胞であるために細胞外マトリックス由来ペプチドが主体であるが、その中にはアドレノメデュリンや分泌たんぱく質由来ペプチドも多数存在した。

C-3. MRM 法によるペプチド定量法：下垂体抽出物をマトリクスとし、様々な濃度の合成ペプチドを添加してナノ LC で分離し、MRM 法で解析、定量を行った。11 種のペプチドについて検討したが、5 種のペプチドについて良好な添加量・ピーク面積の関係が得られた。質量が小さい（900-1,300Da）ペプチドについては、sub-fmol からの検出が可能であったが、他については 15 fmol 程度のペプチドが必要であった。検出限界はペプチドのイオン化効率に大きく依存するが、質量 4,120Da のペプチドでも良好に検出できた例もあった。

4. 循環器疾患のプロテオーム解析対象：国立循環器病研究センター内でのこれまでの研究成果、治療法や創薬も含めたバイオマーカーの必要性、第 1 期研究で採取した保存試料等の利用も考慮し、心不全を対象とすることに決定した。ゲノム遺伝子配列が決定された動物種で明

確な心不全が作成できること、ヒト心不全症例と同様に循環パラメータ等の情報を入手できることから、イヌ・ペーシングモデルでの実験を選択し、精度の高いプロテオーム解析を目指して各種条件の設定を行い、研究に着手した。

D. 考察

血液試料では、マーカーとして使用頻度の高い低分子量たんぱく質やペプチドの探索において、血清、血漿のいずれを分析すべきかという問題が懸案となっていた。インタクトなペプチド、たんぱく質の回収が可能であれば、有力な解析対象となるためである。昨年度に引き続き、より単純化した系で血漿試料を用いて前処理法の検討を行った結果、補体系をはじめとするプロテアーゼ群の活性化、たんぱく質の分解が、どの様なカラム担体であっても分離作業中に大きく促進されることが判明した。プロテアーゼインヒビターの添加はたんぱく質分解をある程度抑制できたが、エキソペプチダーゼ等の抑制は困難と考えられた。血清試料は血漿試料に比して凝固系関連たんぱく質由来のペプチドが非常に多く見出され、血液の状態を反映しているとは言えないため、プロテアーゼによる分解反応が顕著に現れるペプチド画分については、差分析からのバイオマーカー探索は極めて困難で、血漿試料は実質的に解析対象試料とは成り難いと考えられた。

培養細胞上清に分泌されるペプチド、たんぱく質の解析において、内分泌系培養細胞では良好な結果が得られた。TT 細胞より培養上清に分泌されたペプチド画分の解析から、たんぱく質プロセッシング経路に従うペプチドが優位に同定された。一部の新規ペプチドについては抗体を作成しており、実際に血液中を循環している可能性が示されている。この細胞株はモデル系として使用したが、甲状腺髄様癌等においては、今回観測されたペプチドがマーカーとなる可能性も考えられる。

心臓構成細胞の培養上清についても、本年度はペプチド解析のみを実施した。心筋細胞は構成性分泌機構を取るため、ペプチドやたんぱく質の量的回収には時間を延長した無血清培養が必要となる。このため、培養期間内でも細胞死を起こす細胞がある程度の数に達すると考

えられ、細胞内の筋線維や細胞骨格、ミトコンドリア等に含まれるたんぱく質の分解ペプチドが多数観測されたが、ANP、BNP については活性構造ペプチドが主体となる段階まで改善できた。心臓非心筋細胞においては、細胞内たんぱく質由来ペプチドの割合は低く、培養条件下でのペプチド、たんぱく質回収が順調に行うことができた。既知のたんぱく質以外にもアドレノメデュリン、サイトカイン、成長因子等に由来するペプチド、プロホルモン変換酵素による切断を受けて生成したと推定されるペプチドも同定された。来年度以降、これらの細胞系に生理的な変動、病態生理的なストレスを変えることにより、変化・変動するペプチド、たんぱく質の解析を行いたい。

MRM 法は混合物中の微量ペプチドの定量に有望な方法であることが確認された。トリプシン消化物で比較的小さいペプチドを対象とする場合は、高感度での定量が期待できるが、比較的大きいペプチドをマーカーとする場合には、質量増加に伴うイオン化効率の低下が障害となる可能性がある。同一前駆体由来のペプチドが複数存在する事例では、実試料での解析を行い、検出感度の高いペプチドを選択する必要がある。

プロテオーム研究センターと共同実施する循環器病領域でのバイオマーカー探索対象疾患として、心不全を選定した。イヌの機械的刺激による心不全モデルについて、心組織各部位のプロテオーム解析を実施し、組織採取前に心行動態指標、心機能指標などを詳細に測定すると共に、組織、血液等の検証も行う研究計画を作成し、実験系を立ち上げた。可能であれば他の解析方法も併用して研究を進め、対照正常心組織に比して不全心組織で有意に変化するたんぱく質が同定できれば、保存中の試料も含めた臨床試料の解析へと展開したい。

E. 結論

血液試料を対象として微量たんぱく質、ペプチドの解析を実施するために、血漿試料の分離、解析法について検討を行ったが、少なくとも血液中のペプチド状態を正確に反映する試料を再現的に調製することは困難と考えられた。

内分泌系細胞株が産生、分泌するたんぱく質、

ペプチドの解析については、たんぱく質のプロセッシング経路も予測可能な良好な試料調製方法を確立できた。心筋構成細胞の内、非心筋細胞培養系では分泌たんぱく質等が主体を占め、今後の生理、病態生理的变化を追跡可能と考えられた。心筋細胞についても、ANP、BNP について意味のある結果が得られたので、更に方法の改良を行い、培養細胞系を用いた新規バイオマーカー探索に展開したい。MRM 法による定量解析法については、解析対象中の標的ペプチドの定量性を確認し、実試料に適用予定である。

循環器病領域でのバイオマーカー探索対象として、イヌの機械的刺激による心不全モデルを選定し、プロテオーム解析の結果、各種心機能や心行動態パラメータとの比較解析より、新規バイオマーカー探索を目指すことにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Sasaki K., Satomi Y., Takao T., Minamino N. Snapshot peptidomics of the regulated secretory pathway. *Mol Cell Proteomics* 8:1638-47, 2009.

G-2 学会発表

1. 佐々木一樹, 里見佳典, 高尾敏文, 南野直人: 調節性分泌経路のペプチドミクス. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 東京 2009年7月.
2. 佐々木一樹, 南野直人: 分泌顆粒内ペプチドの解析から明らかになる世界. 第82回日本生化学会大会シンポジウム「ペプチドの多様性と機能」, 神戸, 2009年10月.
3. 尾崎 司, 佐々木一樹, 南野直人: 分泌ペプチドーム解析による新規活性ペプチドの探索. 第62回ペプチド討論会, 小倉, 2009年11月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

なし

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

I. 研究協力者

佐々木一樹, 尾崎 司 (国立循環器病センター
研究所薬理部)

北風政史, 朝倉正紀 (国立循環器病センター
病院心臓血管内科)

精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 高坂新一 国立精神・神経センター 神経研究所 所長

研究要旨

本研究では精神疾患（統合失調症、気分障害など）、神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）の治療成績向上やその発症機序の解明及び診断技術の高度化を図るため、患者由来サンプル中の蛋白質のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群を同定し、その臨床的応用を図ることを目的とする。これまでの研究でプールした髄液試料を用いた絞り込みで中枢神経特異的な多数の蛋白質を同定し髄液使用の有用性を確認できたことを踏まえ、個々の患者でのプロテオーム解析を髄液 2 ml から可能にするための微量測定法の前処理及び質量分析条件を詳細に検討した。

A. 研究目的

本研究では、神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）の治療成績向上を図り、またその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群の同定とその臨床的活用をめざす。

神経変性疾患では蛋白質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられているが、その成立には免疫機序の関与も認められ、また自律神経症状などを認めることも多い。さらに、生活習慣がその発症に影響を与えることは近年の疫学的調査から明らかになってきており、血液、髄液、尿などの解析から予防・診断に関して新たな知見が得られるとの期待が高まっている。

これまでの血漿と髄液を用いた cICAT 法での研究から、髄液を用いた解析では中枢神経特異的な蛋白質が多数同定されており、その有用性が明らかにできた。しかし、この解析はプールされた髄液 10 ml を初期量として解析したものであり、個々の患者の髄液を解析するまでの微量化はできていない。そこで本研究では臨床的に利用可能な髄液 2 ml からのプロテオーム解析技術の開発を行うことを目標とする。さらに、ICAT 法と iTRAQ 法などを比較検討することで、髄液プロテオーム解析の基準となる方法論を確立する。

B. 研究方法

B-1. 髄液前処理の検討

(1) プロテアーゼ不活化

これまでは EDTA 添加、熱処理を行っていたが、その処理によってタンパク収量の著しい低下があった。そこで市販されているプロテアーゼ阻害剤を用いての検討を行い、同定タンパク数の変化を検討する。

(2) 抗体カラム

血清中に多量に存在する 14 種類のタンパク質を除去する目的で、市販の抗体カラム (Agilent Hu14) を用いていたが、他社の同様なカラム (IgY14LC2) 及び 66 種類の血清タンパクを除去する抗体カラム (SuperMix) を検討した。

B-2. cICAT 法に特異的な前処理法の工夫

H 試薬、L 試薬でラベルしたあとの試料を処理する過程で、SCX カラムを用いた分画を取る際に、ペプチド数が多い早期の分画をゆっくり、後期のペプチド数の少ない分画はまとめて取る工夫をした。

(倫理面への配慮)

今回の研究に用いるヒト由来試料はすべて当センター倫理委員会において承認を得た方法でインフォームドコンセントを取得したものを使用する。髄液の一部は、檜林博太郎博士（順天堂大学名誉教授・故人）から譲り受けたパーキンソン病患者の髄液であり、連結不可能匿名化して研究利用することが当センター倫理委員会で承認されている。