

and leukemia. *Genome Res* 20:589-599

Wang WX, Huang Q, Hu Y et al (2011) Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter. *Acta Neuropathol* 121:193-205

Zhao H, Kalota A, Jin S et al (2009) The c-myc proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells. *Blood* 113:505-516

Figure legends

Fig. 1. The pathways, diseases, and pathological events relevant to 232 miRNA targetome networks. Among 1,223 human miRNAs examined, Diana-microT 3.0 identified the set of reliable targets from 273 miRNAs. Among them, KeyMolnet extracted molecular networks from 232 miRNAs. The generated network was compared side by side with human canonical networks of the KeyMolnet library, composed of 430 pathways, 885 diseases, and 208 pathological events to identify the canonical network showing the most statistically significant contribution to the extracted network. After top three pathways, diseases, and pathological events were individually totalized, the cumulated numbers of top 10 of (a) pathway, (b) disease, and (c) pathological event categories are expressed as a bar graph. The figure is cited from our recent study (Sato and Tabunoki 2011).

Fig. 2. Molecular network of miR-15a targetome. By the neighboring network-search algorithm, KeyMolnet illustrated a highly complex network of miR-15a targetome, which has the most statistically significant relationship with the pathway of ‘transcriptional regulation by myb’. Red nodes represent miR-15a direct target molecules predicted by Diana-microT 3.0, whereas white nodes exhibit additional nodes extracted automatically from the core contents of KeyMolnet to establish molecular connections. The molecular relation is indicated by solid line with arrow (direct binding or activation), solid line with arrow and stop (direct inactivation), solid line without arrow (complex formation), dash line with arrow (transcriptional activation), and dash line with arrow and stop (transcriptional repression). The transcription factor myb is highlighted by a blue circle. The figure is cited from our recent study (Sato and Tabunoki 2011).

Fig. 3. Molecular network of miR-106b targetome. By the neighboring network-search algorithm, KeyMolnet illustrated a highly complex network of miR-106b targetome, which has the most statistically significant relationship with the pathway of ‘transcriptional regulation by

Rb/E2F'. Red nodes represent miR-106b direct target molecules predicted by Diana-microT 3.0, whereas white nodes exhibit additional nodes extracted automatically from the core contents of KeyMolnet to establish molecular connections. The molecular relation is indicated by solid line with arrow (direct binding or activation), solid line with arrow and stop (direct inactivation), solid line without arrow (complex formation), dash line with arrow (transcriptional activation), and dash line with arrow and stop (transcriptional repression). The transcription factor E2F family is highlighted by a blue circle. The figure is cited from our recent study (Sato and Tabunoki 2011).

Fig. 4. Molecular network of miR-200b targetome. By the neighboring network-search algorithm, KeyMolnet illustrated a highly complex network of miR-200b targetome, which has the third-rank significant relationship with the pathway of 'transcriptional regulation by ZEB'. Red nodes represent miR-200b direct target molecules predicted by Diana-microT 3.0, whereas white nodes exhibit additional nodes extracted automatically from the core contents of KeyMolnet to establish molecular connections. The molecular relation is indicated by solid line with arrow (direct binding or activation), solid line with arrow and stop (direct inactivation), solid line without arrow (complex formation), dash line with arrow (transcriptional activation), and dash line with arrow and stop (transcriptional repression). The transcription factors ZEB1 and ZEB2 are highlighted by a blue circle.

Table 1. Large-Scale Human MicroRNA Targetome Networks

MicroRNA	Number of Targets	Molecules in KeyMolnet Networks	Top Pathway	Score	p-Value	Top Disease	Score	p-Value	Top Pathological Event	Score	p-Value
hsa-let-7a	244	1022	Transcriptional regulation by p53	593	2.69E-179	Viral myocarditis	113	1.21E-34	Cancer	206	1.31E-62
hsa-let-7b	242	1016	Transcriptional regulation by p53	594	1.83E-179	Viral myocarditis	113	9.32E-35	Cancer	206	7.66E-63
hsa-let-7c	243	1020	Transcriptional regulation by p53	593	2.49E-179	Viral myocarditis	113	1.11E-34	Cancer	206	1.10E-62
hsa-let-7d	145	885	Transcriptional regulation by RB/E2F	836	2.18E-252	Chronic myelogenous leukemia	72	1.95E-22	Cancer	130	9.68E-40
hsa-let-7e	236	1111	Transcriptional regulation by p53	575	8.90E-174	Viral myocarditis	116	1.20E-35	Cancer	175	1.86E-53
hsa-let-7f	244	1022	Transcriptional regulation by p53	593	2.69E-179	Viral myocarditis	113	1.21E-34	Cancer	206	1.31E-62
hsa-let-7g	245	1022	Transcriptional regulation by p53	593	2.69E-179	Viral myocarditis	113	1.21E-34	Cancer	206	1.31E-62
hsa-let-7i	245	1022	Transcriptional regulation by p53	593	2.69E-179	Viral myocarditis	113	1.21E-34	Cancer	206	1.31E-62
hsa-miR-9	352	1115	Transcriptional regulation by PPARa	340	5.28E-103	Hepatocellular carcinoma	72	1.69E-22	Cancer	171	3.50E-52
hsa-miR-17	195	961	Transcriptional regulation by RB/E2F	971	3.27E-293	Chronic myelogenous leukemia	92	2.83E-28	Cancer	181	3.58E-55
hsa-miR-19a	226	1094	Transcriptional regulation by RB/E2F	760	2.10E-229	Chronic myelogenous leukemia	113	1.26E-34	Cancer	253	7.04E-77
hsa-miR-19b	225	1094	Transcriptional regulation by RB/E2F	760	2.10E-229	Chronic myelogenous leukemia	113	1.26E-34	Cancer	253	7.04E-77
hsa-miR-20a	165	1038	Transcriptional regulation by RB/E2F	856	1.64E-258	Chronic myelogenous leukemia	87	6.09E-27	Cancer	85	3.33E-26
hsa-miR-20b	198	981	Transcriptional regulation by RB/E2F	962	2.35E-290	Chronic myelogenous leukemia	98	3.39E-30	Cancer	183	6.98E-56
hsa-miR-26a	148	672	Transcriptional regulation by RB/E2F	919	1.76E-277	Chronic myelogenous leukemia	107	6.15E-33	Cancer	181	3.20E-55
hsa-miR-26b	148	672	Transcriptional regulation by RB/E2F	919	1.76E-277	Chronic myelogenous leukemia	107	6.15E-33	Cancer	181	3.20E-55
hsa-miR-27a	229	1192	Transcriptional regulation by CREB	1022	2.23E-308	Chronic myelogenous leukemia	95	1.96E-29	Cancer	194	3.05E-59
hsa-miR-27b	261	1337	Transcriptional regulation by CREB	1022	2.23E-308	Chronic myelogenous leukemia	94	4.51E-29	Cancer	211	4.11E-64
hsa-miR-29a	119	543	Transcriptional regulation by Ets-domain family	430	4.36E-130	Glioma	85	3.46E-26	Cancer	139	1.41E-42
hsa-miR-29b	118	578	Transcriptional regulation by Ets-domain family	422	1.15E-127	Glioma	82	1.55E-25	Cancer	146	1.44E-44

hsa-miR-29c	118	543	Transcriptional regulation by Ets-domain family	430	4.36E-130	Glioma	85	3.46E-26	Cancer	139	1.41E-42
hsa-miR-30a	455	1494	Transcriptional regulation by RB/E2F	777	9.43E-235	Chronic myelogenous leukemia	86	1.11E-26	Cancer	195	2.39E-59
hsa-miR-30b	455	1480	Transcriptional regulation by RB/E2F	781	1.08E-235	Chronic myelogenous leukemia	87	7.01E-27	Cancer	188	1.92E-57
hsa-miR-30c	454	1495	Transcriptional regulation by RB/E2F	778	6.13E-235	Chronic myelogenous leukemia	86	1.15E-26	Cancer	191	3.63E-58
hsa-miR-30d	452	1491	Transcriptional regulation by RB/E2F	778	7.28E-235	Chronic myelogenous leukemia	86	1.01E-26	Cancer	195	1.96E-59
hsa-miR-30e	455	1481	Transcriptional regulation by RB/E2F	780	1.29E-235	Chronic myelogenous leukemia	87	7.25E-27	Cancer	188	2.05E-57
hsa-miR-32	261	905	Transcriptional regulation by RB/E2F	842	2.74E-254	Gastric cancer	80	8.85E-25	Cancer	157	4.19E-48
hsa-miR-92a	219	642	Transcriptional regulation by MEF2	335	1.51E-101	Viral myocarditis	59	1.62E-18	Epithelial-mesenchymal transition	83	7.76E-26
hsa-miR-92b	258	701	Transcriptional regulation by MEF2	328	1.59E-99	Viral myocarditis	60	1.23E-18	Cancer	94	3.97E-29
hsa-miR-93	195	958	Transcriptional regulation by RB/E2F	972	2.37E-293	Chronic myelogenous leukemia	92	2.47E-28	Cancer	181	2.77E-55
hsa-miR-96	142	688	Transcriptional regulation by Ets-domain family	407	3.42E-123	Viral myocarditis	36	1.06E-11	Cancer	106	1.37E-32
hsa-miR-98	162	671	Transcriptional regulation by Myb	549	4.73E-166	Viral myocarditis	85	2.66E-26	Cancer	126	1.42E-38
hsa-miR-101	188	806	Transcriptional regulation by AP-1	492	1.10E-148	Hepatocellular carcinoma	70	6.40E-22	Cancer	127	4.26E-39
hsa-miR-106b	164	1028	Transcriptional regulation by RB/E2F	854	7.21E-258	Chronic myelogenous leukemia	87	5.48E-27	Cancer	85	2.93E-26
hsa-miR-124	285	1346	Transcriptional regulation by RB/E2F	756	3.57E-228	Chronic myelogenous leukemia	83	9.34E-26	Cancer	185	1.90E-56
hsa-miR-137	288	941	Transcriptional regulation by MITF family	339	1.19E-102	Adult T cell lymphoma/leukemia	66	1.30E-20	Cancer	179	1.00E-54
hsa-miR-147	199	867	Transcriptional regulation by RB/E2F	805	4.06E-243	Chronic myelogenous leukemia	113	6.60E-35	Cancer	132	2.57E-40
hsa-miR-153	154	1019	Transcriptional regulation by Myb	507	2.35E-153	Multiple myeloma	60	6.44E-19	Cancer	174	4.31E-53
hsa-miR-218	155	830	Transcriptional regulation by AP-1	344	2.28E-104	Hepatocellular carcinoma	69	1.63E-21	Cancer	136	1.52E-41
hsa-miR-372	101	562	Transcriptional regulation by RB/E2F	1022	2.23E-308	Chronic myelogenous leukemia	85	1.90E-26	Cancer	144	2.75E-44

hsa-miR-429	123	634	Transcriptional regulation by RB/E2F	918	2.45E-277	Chronic myelogenous leukemia	76	1.71E-23	Cancer	130	5.28E-40
hsa-miR-495	156	601	Transcriptional regulation by Ets-domain family	431	2.14E-130	Rheumatoid arthritis	77	5.90E-24	Adipogenesis	79	1.32E-24
hsa-miR-506	394	1536	Transcriptional regulation by Ets-domain family	317	4.69E-96	Viral myocarditis	99	1.73E-30	Cancer	172	1.43E-52
hsa-miR-519a	281	1256	Transcriptional regulation by RB/E2F	811	5.32E-245	Chronic myelogenous leukemia	106	1.34E-32	Cancer	220	8.03E-67
hsa-miR-519b-3p	281	1256	Transcriptional regulation by RB/E2F	811	5.32E-245	Chronic myelogenous leukemia	106	1.34E-32	Cancer	220	8.03E-67
hsa-miR-519c-3p	281	1256	Transcriptional regulation by RB/E2F	811	5.32E-245	Chronic myelogenous leukemia	106	1.34E-32	Cancer	220	8.03E-67
hsa-miR-520a-3p	184	690	Transcriptional regulation by RB/E2F	1022	2.23E-308	Chronic myelogenous leukemia	94	6.95E-29	Cancer	146	1.12E-44
hsa-miR-520b	182	690	Transcriptional regulation by RB/E2F	1022	2.23E-308	Chronic myelogenous leukemia	94	6.95E-29	Cancer	146	1.12E-44
hsa-miR-520c-3p	182	690	Transcriptional regulation by RB/E2F	1022	2.23E-308	Chronic myelogenous leukemia	93	9.28E-29	Cancer	145	1.77E-44
hsa-miR-520d-3p	183	690	Transcriptional regulation by RB/E2F	1022	2.23E-308	Chronic myelogenous leukemia	94	6.95E-29	Cancer	146	1.12E-44
hsa-miR-520e	184	690	Transcriptional regulation by RB/E2F	1022	2.23E-308	Chronic myelogenous leukemia	94	6.95E-29	Cancer	146	1.12E-44
hsa-miR-603	252	1150	Transcriptional regulation by Ets-domain family	344	3.26E-104	Multiple myeloma	84	4.36E-26	Cancer	161	4.24E-49

Among 1,223 human miRNAs examined, Diana-microT 3.0 predicted reliable targets from 273 miRNAs. Among them, KeyMolnet extracted molecular networks from 232 miRNAs. The generated network was compared side by side with human canonical networks of the KeyMolnet library, composed of 430 pathways, 885 diseases, and 208 pathological events. The canonical pathways, diseases, and pathological events with the most statistically significant contribution to the extracted network are shown. The table contains only the large-scale miRNA targetome networks generated by importing targets greater than 100 per individual miRNA into KeyMolnet. The table is cited from our recent study (Sato and Tabunoki 2011).

9

プロトアレイによる タンパク質インタラクトーム解析

佐藤準一

近年、数千種類のリコンビナントタンパク質をスライドガラス基盤上に高密度固定したプロテインマイクロアレイが登場し、目的とするタンパク質の標識プローブさえあれば簡便、迅速かつ網羅的にタンパク質間相互作用・インタラクトームを解析できるようになった。プロテインマイクロアレイを利用することにより、結合タンパク質、酵素の基質、抗体の標的抗原、低分子化合物の標的タンパク質に関して、ハイスループットなスクリーニングが比較的安価で可能であり、創薬研究に重要なプロテオミクス解析ツールとなりつつある。本稿ではすでに商品化されているプロトアレイを中心に、解析方法、応用例、問題点について概説する。

1 技術開発の歴史と現状

2003年にヒトゲノムプロジェクトが完了し、全ヒト遺伝子約22,000の塩基配列が解読された。システムズバイオロジーの観点からすると、ヒトは大規模な分子ネットワークで精密に構築された複雑系であり、多くの難病がシステム固有のロバストネスの破綻に起因すると考えられている¹⁾。したがって難病の病態解明のためには、ゲノムワイドの分子ネットワーク解析が重要な研究課題となる。DNAマイクロアレイは、スライドガラス基盤上に数万遺伝子のオリゴヌクレオチドを高密度に固定したチップであり、一度の実験で個々の細胞における全遺伝子発現情報を、包括的に解析できるツールである。

2000年代前半にDNAマイクロアレイのタンパク質バージョンとして登場したのが、プロテインマイクロアレイである。DNAマイクロアレイと同様に、アレイヤーを用いて高密度のスポットティングが自動

化され、ラージスケールでの定量的解析が可能となっている。プロテインマイクロアレイの登場以前は、タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction: PPI) ・インタラクトーム (interactome) は、主としてイーストツーハイブリッド (yeast two-hybrid: Y2H) 法で解析されていたが、偽陽性と偽陰性が多く労力と時間がかかり、結合条件としてイオン濃度やpHを制御できないなどの問題点があった。プロテインマイクロアレイを用いれば、目的とするタンパク質の標識プローブさえあれば、Y2H法に比較して簡便、迅速、安価でかつ網羅的にPPIを解析可能である²⁾。タンパク質を酵母で発現させるY2H法に比較して偽陽性や偽陰性が少なく、翻訳後修飾、イオン濃度、pHの影響も直接検討できる²⁾。商品化されているプロトアレイ (ProtoArray[®], インビトロジェン (ライフテクノロジーズ)) では、昆虫細胞で発現させたリコンビナントタンパク質を構造や機能が保持されたまま固定しており、PPIの解析のみならず、酵素の基質や核酸、脂質、低分子化

化合物の結合タンパク質のハイスループットスクリーニング (high throughput screening : HTS) にも応用可能である。現在プロテインマイクロアレイは、創薬研究に重要なプロテオミクス解析ツールとなつつある。

2 解析の原理

1) プロトアレイの概要

プロトアレイは、発売当初はヒトと酵母の2種類のタイプがあったが、2010年現在、ヒトプロトアレイのみ入手可能である (最新バージョンはv5.0)。ヒトプロトアレイv1.0は1,928、v2.0は3,017、v3.0は5,004、v4.0は8,222のタンパク質が固定されていた。プロトアレイv5.0では、ニトロセルロースでコートされた1枚のスライドガラス上に過去最大数である9,483種類のリコンビナントタンパク質がデュプリケートでスポットされている。プロテインキナーゼ、転写因子、膜タンパク質、シグナル伝達因子、代謝系制御因子など広範囲な分子をカバーしている。全タンパク質のリストはインビトロジェンホームページからダウンロードできる (<http://www.invitrogen.jp/protoarray/tool.shtml>)。

タンパク質はUltimate human open-reading-frame (ORF) clone collectionをGateway expression vectorにクローニングし、Bac-to-Bac baculovirus expression system (以上、インビトロジェン) を用いて昆虫細胞Sf9で発現させている。高次構造が保持されるように未変性条件下で、グルタチオンセファロース4Bを用いて精製したタンパク質全長または部分長をアレイヤーでスポットしている。各タンパク質にはN末端にglutathione-S transferase (GST) タグと6X histidine (HIS) タグが結合しており、GSTをスペーサーとしてタンパク質の本体がスライドガラス表面から突出し、標識プローブが各スポットのタンパク質の全周囲にアク

セスできるように工夫されている。ポジティブコントロールとして、Alexa Fluor 647標識抗体、ビオチン標識抗マウス抗体 (マウスモノクローナル抗V5抗体と結合) およびV5がスポットされている。ネガティブコントロールとして、bovine serum albumin (BSA)、GST、バッファーのみ、ウサギ抗GST抗体、ヒトIgGサブクラス、抗ビオチン抗体がスポットされている。インビトロジェンではアレイの品質管理のために、各ロットを抗GST抗体と反応させ、GST濃度勾配スポットのシグナルから作成した標準曲線を用いて、各スポットのタンパク質濃度を算出している。ロットごとのタンパク質濃度情報に関してもインビトロジェンホームページからダウンロードできる。

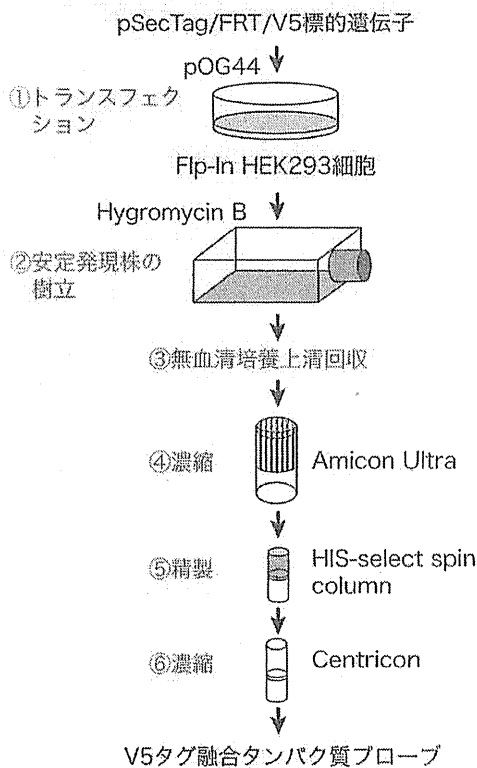
2) プロトアレイによるタンパク質間相互作用解析の流れ

以下、プロトアレイを用いたPPI解析に関して、実験方法の概略を述べる。プロトアレイでは、標識プローブとしてV5タグ融合タンパク質 (PPI kits for epitope-tagged proteins) またはビオチン化タンパク質 (PPI kits for biotinylated proteins) を選択できる。前者ではAlexa Fluor 647標識抗V5抗体を、後者ではAlexa Fluor 647標識ストレプトアビジンを検出系に用いる。本稿ではV5タグ融合タンパク質プローブ作製法について述べる (図)³⁾。構造が保持されていて純度が高いプローブを作製するためには、V5タグ融合タンパク質を無血清培養上清中に分泌させた方がよい (私見)。

❖ Step 1. V5タグ融合タンパク質プローブ作製

目的の遺伝子を分泌型発現ベクターpSecTag/FRT/V5 (インビトロジェン) にクローニングし、Flp recombinase発現ベクターpOG44 (インビトロジェン) とともにFlp-In HEK293細胞 (インビトロジェン) に導入する。遺伝子導入細胞をHygromycin Bで選択し、安定発現細胞株を樹立する。V5タグ融合タンパク質発現細胞を無血清培地DMEM/

Step 1. V5タグ融合タンパク質プローブ作製



Step 2. プロテインマイクロアレイ解析

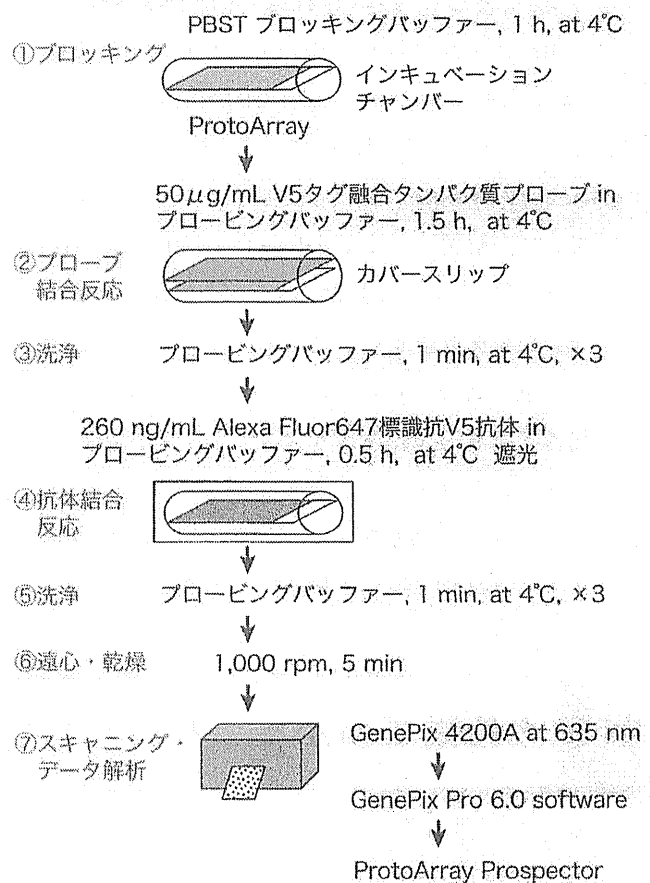


図 プロトアレイによるタンパク質間相互作用の解析

目的タンパク質のV5タグ融合タンパク質プローブを作製し (Step 1), プロテインマイクロアレイ (ProtoArray) と反応させ, 蛍光シグナルをスキャナーで検出する (Step 2). 詳細は本文参照. 文献3より改変

F12で72時間培養し, 培養上清を回収してAmicon Ultra (ミリポア) で濃縮する. 次にV5タグ融合タンパク質にはHISタグも結合していることを利用して, HIS-select spin カラム (シグマアルドリッチ) で精製する. さらにCentricon (ミリポア) で再度濃縮し, 遠心して不溶物を除去後, プロービングバッファーで50 µg/mLに調整する. プローブの一部をSDS-PAGEで泳動し, 銀染色と抗V5抗体のウェスタンブロットで純度を確認する.

❖Step 2. プロテインマイクロアレイ解析

アレイをPBSTバッファーで4°C, 1時間ブロック後, 上記のプローブ120 µLをアレイ上に滴下し, カ

バーリップで封じて4°C, 90分間反応させる. カバーリップをのせる際に, 気泡が入るとシグナル欠損領域を生ずるので細心の注意が必要である. プロービングバッファーで1分間3回洗浄後, Alexa Fluor 647 標識抗V5抗体260ng/mL, 25mLと4°C, 30分間反応させる. プロービングバッファーで1分間3回洗浄後, 50mL遠心管に移して1,000 rpm, 5分間遠心して水分を除去し, 遮光したスライドボックスに収納して室温で1時間乾燥させる. 実験で用いるすべてのバッファーは調製時に泡立てないことと0.22 µm フィルターを通して夾雑物を除去しておくことが非常に大切である.

乾燥後は蛍光シグナルが退色しないうちにスキャナーで取り込む。われわれはGenePix 4200A (Axon Instruments社) を用いて波長635 nmで検出し、GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments社) で数値化して、GenePix Results (GPR) ファイルをProtoArray Prospector (インビトロジェン) で解析している。解析ソフトProtoArray Prospector (最新バージョンはv5.2) は、インビトロジェンホームページからダウンロードできる。デフォルト設定では、有意な結合と判定されるのはZ-score 3.0以上の場合である。またネガティブコントロールとポジティブコントロールのシグナル値から、実験の成否を確認できる。標識プローブ作製 (Step 1) 以降のステップ (Step 2) は5時間程度で遂行できる。

3 本技術でわかること

1) 結合タンパク質の網羅的解析と同定

少量の標識プローブが手元があれば、プロテインマイクロアレイを用いてタンパク質間相互作用のみならず、タンパク質と脂質、核酸、低分子化合物の結合を解析することができる。Singhらは、脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy : SMA) の病態改善遺伝子SMN2の発現レベルを上昇させる低分子化合物に関して、運動ニューロン培養系でスクリーニングし、C5-substituted quinazoline D156844を発見した⁴⁾。125I標識D156844をプローブとして、ヒトプロトアレイv3.0と反応させ、mRNA decapping enzyme DcpSを結合タンパク質として同定した。またDcpSとD156844の共結晶のX線構造解析により、両者の結合関係を確認した。彼らの結果は、プロテインマイクロアレイを用いることにより、種々の創薬シード化合物の標的となるタンパク質を網羅的に解析可能なことを示唆している。

パーキンソン病の中脳では、黒質神経細胞に α -synucleinの凝集封入体を認め、Lewy小体とよばれる

ている。Schnackらは、Alexa Fluor 488標識リコンビナント α -synucleinオリゴマーをプローブとして、ヒトプロトアレイv3.0と反応させ、13種類の結合タンパク質を同定した⁵⁾。 α -synucleinオリゴマー結合タンパク質の多くに、cdc42/Rac interactive binding domainが存在していた。

14-3-3タンパク質は、脳に豊富に含まれている30 kDaの酸性タンパク質で、7種類のアイソフォームが存在する。14-3-3はダイマーを形成し、種々のタンパク質のリン酸化セリンコンセンサス配列 (RSXpSXP, RXXXpSXP) に結合し、細胞内シグナル伝達因子のアダプター分子として働く。われわれはV5タグ融合14-3-3 ϵ をプローブとして、ヒトプロトアレイv1.0と反応させ、20種類の14-3-3結合タンパク質を同定した⁶⁾。免疫沈降法で14-3-3とEAP30, DDX54, STACの結合を確認した。

プリオン病は、proteinase K抵抗性の異常型プリオンタンパク質PrP^{Sc}が脳に蓄積し、神経変性をきたす難病である。健常脳では、神経細胞は正常型プリオンタンパク質PrP^Cを高レベル発現している。 α -helixに富むPrP^Cは分子シャペロンXを介して β -sheetに富むPrP^{Sc}に構造変換されると考えられているが、Xの正体は明らかではない。われわれはV5タグ融合PrP^C23-231をプローブとして、ヒトプロトアレイv3.0と反応させ、47種類のPrP^C結合タンパク質 (Xの候補) を同定した⁷⁾。免疫沈降法と細胞イメージングで、PrP^CとFAM64A, HOXA1, PLK3, MPGの結合を確認した。また47種類のPrP^C結合タンパク質に関して、生命情報統合プラットフォームKeyMolnetで分子ネットワークを解析し、AKT, JNK, MAPKシグナル伝達系との有意な関連性を認めた。

中枢神経系では、軸索損傷時には再生能力がきわめて乏しい。その原因として髄鞘に含まれる神経突起伸長阻害因子Nogoの存在が挙げられている。Nogo-AのC末端部分Nogo-66は、神経細胞膜上のNogo受容体NgRに結合して、神経突起伸長抑制

シグナルを伝達する。NIGとよばれるNogo-A中央部分にも神経突起伸長抑制活性が存在するが、NIG受容体は明らかではない。われわれはV5融合NIG567-748をプローブとして、ヒトプロトアレイv3.0と反応させ、12種類のNIG結合タンパク質を同定した⁸⁾。免疫沈降法と細胞イメージングで、髄鞘形成細胞オリゴデンドロサイト特異的に発現している酵素CNPとNIGの結合を確認した。

2) 抗体のプロファイリング

プロテインマイクロアレイを用いて、がんや自己免疫疾患の血清バイオマーカー、特に自己抗体のスクリーニングが可能である。抗体プロファイリングの場合は、アレイをブロッキング後に、希釈した患者血清または精製IgGと反応させる。次にAlexa Fluor 647標識抗ヒトIgG抗体と反応させて検出する。Lalivieらは、5例の視神経脊髄炎(neuromyelitis optica : NMO)患者の血清IgGをプローブとして、ヒトプロトアレイv1.0と反応させ、神経細胞抗原CPSF3に対する自己抗体を同定した⁹⁾。

実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE)は、マウスやラットを髄鞘タンパク質抗原で感作して惹起される炎症性脱髄疾患で、多発性硬化症の動物モデルである。Robinsonらは、232種類の髄鞘プロテオームアレイを自作し、EAE発症時や再発時の血清をプローブとして反応させ、エピトープ拡散現象を見出した¹⁰⁾。また抗体に対応するさまざまな抗原のDNAワクチンをEAEモデルに投与すると、顕著な治療効果を認めた。Hudsonらは、30例の卵巣がん患者の血清をプローブとして、ヒトプロトアレイv3.0と反応させ、患者で上昇している94種類のIgG自己抗体を同定した¹¹⁾。彼らはlamin A/C、SSRP1をがん特異的バイオマーカーとして選択し、イムノプロットとヒト組織アレイを用いて卵巣がんにおける発現上昇を確認した。Liらは、18例の小児腎臓移植患者の移植前後の血清をプローブとして、ヒトプロトアレイ

v3.0と反応させた¹²⁾。移植後の血清でARHGEP6、STMN3に対する自己抗体を同定し、免疫組織化学的に腎盂における自己抗原の発現を確認した。

3) 酵素基質の同定

アレイに固定されているタンパク質の機能や活性が保持されていれば、酵素をプローブとして基質をスクリーニングできる(functional proteomics)。Boyleらは、チロシンキナーゼAbl-related gene(Arg)をプローブとして、 $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATPの存在下でヒトプロトアレイv2.0と反応させ、Argの基質としてcortactinを同定した¹³⁾。線維芽細胞では、PDGFは非受容体型チロシンキナーゼsrcを活性化し、srcによりAbl、Argが活性化されると、cortactinがチロシンリン酸化されて、アクチン再構成依存性の形態変化(dorsal wave)が誘導されることがわかった。Guptaらは、酵母ユビキチンプロテインリガーE3であるRsp5をプローブとして、E1、E2、FITC標識ユビキチン、ATPの存在下で酵母プロトアレイv1.1と反応させ、ユビキチン化されたタンパク質(Rsp5の基質)を同定した¹⁴⁾。また同時にAlexa Fluor 647標識Rsp5をプローブとして、酵母プロトアレイv1.1と反応させ、Rsp5結合タンパク質を網羅的に解析した。155種類のRsp5結合タンパク質の34%がRsp5の基質となることがわかり、その多くにはRsp5認識配列PPXY、LPXYが存在していた。

4 展望

プロテインマイクロアレイを用いれば、結合タンパク質、酵素の基質、抗体の標的抗原、低分子化合物の標的タンパク質に関して、ハイスループットなスクリーニングが可能である。現在プロテインマイクロアレイは、創薬研究に重要なプロテオミクス解析ツールとなりつつある。しかしながら、以下に述べるような将来解決すべき問題点が存在する。

ヒトには約22,000個の遺伝子が存在するが、これらに由来するタンパク質は50万個を超えると推測されている。ヒト遺伝子の約90%は、選択的スプライシングにより複数の転写産物を発現している。個々の細胞や組織のスプライシングプロファイルは、エキソ型DNAマイクロアレイを用いることにより解析可能である。しかしながら、現時点ではスプライシングバリエーションのタンパク質産物を網羅的にカバーしたプロテインアレイは市販されていない。またPPIの解析では、タンパク質のリン酸化、糖鎖修飾、ユビキチン化、アセチル化、メチル化、脂質修飾などの翻訳後修飾の有無も重要なファクターとなる。プロトアレイでは、昆虫細胞でタンパク質を発現させているので、比較的哺乳類細胞に近い翻訳後修飾を受けているとされている（インビトロジェン社内データ）が、実際には各々のタンパク質の翻訳後修飾の程度は確認されていない。またプロテインマイクロアレイではタンパク質の細胞内局在は考慮されないため、分泌タンパク質が核タンパク質と直接結合するような不自然な結果も観察される。さらに複合体や多量体を形成して初めて結合能や活性を示すタンパク質の検出は不可能である。また解離定数が高いような弱い結合や短時間一過性の結合は見逃される可能性が高い。プロテインマイクロアレイでは、生体内における環境（イオン濃度、pH、補助因子）とは完全には一致していない条件下で反応させているため、人工的な結果を観察している可能性がある。酵素基質のスクリーニングでは、酵素阻害剤による特異的な反応抑制を必ず確認する必要がある。プロトアレイでは各スポット間でプリントされているタンパク質の濃度のばらつきが大きく、PPIの解析の場合、濃度が高いスポットが陽性として検出されやすい（私見）。

上記のような問題点があるため、プロテインマイクロアレイで得られた結合関係は、免疫沈降法、

Y2H法、表面プラズモン共鳴法 (Biacore) などで、必ず検証する必要がある。またプローブXに対する結合タンパク質としてYを同定した場合は、プローブYに対する結合タンパク質としてXを同定できるか検討することも重要である (reciprocal validation)。最終的に、得られた結果が既知の報告に該当するのか、種々のタンパク質インタラクトームデータベース HPRD (<http://www.hprd.org>), IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact>), STRING (<http://string.embl.de>), PubGene (<http://www.pubgene.org>), MINT (<http://mint.bio.uniroma2.it/mint>), BOND (<http://bond.unleashedinformatics.com/Action?>), Genome Network Platform (<http://genomenetwork.nig.ac.jp>) を検索しておくことも非常に重要である。

文献

- 1) Kitano, H. : Nat. Rev. Drug Discov., 6 : 202-210, 2007
- 2) Bertone, P. & Snyder, M. : FEBS J., 272 : 5400-5411, 2005
- 3) Satoh, J. : Protein Microarray Analysis for Rapid Identification of 14-3-3 Protein Binding Partners. In Functional Protein Microarrays in Drug Discovery, ed by Predki, P. F., pp239-259, CRC Press, 2007
- 4) Singh, J. et al. : ACS Chem. Biol., 3 : 711-722, 2008
- 5) Schnack, C. et al. : Neuroscience, 154 : 1450-1457, 2008
- 6) Satoh, J. et al. : J. Neurosci. Methods, 152 : 278-288, 2006
- 7) Satoh, J. et al. : Neuropathol. Appl. Neurobiol., 35 : 16-35, 2009
- 8) Sumiyoshi, K. et al. : Neuropathology, 30 : 7-14, 2010
- 9) Lalive, P. H. et al. : Neurology, 67 : 176-177, 2006
- 10) Robinson, W. H. et al. : Nat. Biotechnol., 21 : 1033-1039, 2003
- 11) Hudson, M. E. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 : 17494-17499, 2007
- 12) Li, L. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 : 4148-4153, 2009
- 13) Boyle, S. N. et al. : Curr. Biol., 17 : 445-451, 2007
- 14) Gupta, R. et al. : Mol. Syst. Biol., 3 : 116, 2007

多発性硬化症(MS)診療のすべて

Mini Lecture

アクアポリン-4 (AQP-4)

佐藤 準一

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科バイオインフォマティクス

〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1

Tel & Fax: 042-495-8678

Jun-ichi Satoh

Department of Bioinformatics, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio,
Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.

Tel & Fax: 042-495-8678

1. AQP4 の発現分布

アクアポリン(aquaporin; AQP)は、水分子を選択的に通過させるチャネルタンパク質ファミリーで、細胞膜を貫通して存在している。哺乳類では 13 種類の AQP ホモログ(AQP0-12)が同定されており、中枢神経系では AQP1, AQP4, AQP9 の発現を認める¹⁾。AQP1 と AQP4 は水分子のみを選択的に通過させるが、AQP9 はグリセロールや尿素も通過させるので aquaglyceroporin と呼ばれている。正常脳では、AQP1 は脈絡叢上皮細胞に分布し、AQP9 は一部の神経細胞(カテコールアミンニューロンなど)に発現している。AQP4 は血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を形成するアストロサイト(astrocyte; AS)の足突起(endfeet)(図 1a)および血液髄液関門(blood-CSF barrier)を形成する軟膜のグリア限界膜(glial limitans)や脳室上皮細胞の基底外側に発現している。AQP4 はシナプスを取り囲む AS の足突起にも発現している。AQP4 は大脳・小脳・脳幹・脊髄・視神経に広く分布し、他には腎集合管・骨格筋・網膜 Müller 細胞でも発現を認める²⁾。しかしながら AQP4 が自己抗体の標的となる neuromyelitis optica(NMO)では、神経組織外病変の報告はない。

2. AQP4 の構造

X 線結晶構造解析³⁾および電子結晶構造解析⁴⁾の結果、AQP4 は 6 つの膜貫通型アルファヘリックスと 2 つの短いアルファヘリックスが 5 つのループ(A-E)により連結された構造を呈していることがわかった(図 1b)。N 末端と C 末端は細胞質に配向し、A, C, E ループは細胞外に露出している²⁾。C 末端の SSV モチーフは、ジストロフィン複合体の構成要素である α 1-syntrophin(SNTA1)の PDZ ドメインと結合し、間接的にアクチンと連絡している。SNTA1 欠損マウスでは AS 足突起に分布している AQP4 の発現量が著減している⁵⁾。ループ E 近傍には、NMO における自己抗体が認識するエピトープが存在している⁶⁾。自己抗体は水分子の通過を妨げることはないが、抗体が結合すると AQP4 のエンドサイトーシスが起これ、エンドゾームにおける分解が促進される(Hinson *et al. Neurology* 2007; **69**: 2221-2231)。AQP4 は側面から見ると漏斗状構造を呈しており、8 つの水分子が 1 列になって細孔の縦方向に配列している。細孔には AQP ファミリーに特徴的な 2 個の NPA(Asn-Pro-Ala)モチーフと水分子以外の通過を妨げるフィルター(Arg-216, His-201)が存在している^{3,4)}。AQP4 には AQP1 の Cys-191 に相当するシステイン残基がないため、mercury に対する感受性はない。AQP4 には開始コドンの相違により、全長型 M1(323 アミノ酸: 32-kDa)と N 末端短縮型 M23(301 アミノ酸: 30-kDa)が存在している。AQP4 はモノマーでも水チャネル機能を有するが、細胞膜では 4 量

体(homotetramer または heterotetramer)を構成し、さらに orthogonal array と呼ばれる多分子集合体を形成して安定化している。M23はASの足突起に多く、大きなアレイを形成し水通過能が高く、M1は4量体の singlet を形成している⁷⁾。M1/M23 mRNA 発現量比は、視神経と脊髄が最も高い(Saini *et al. J Neuroimmunol* 2010; **221**: 68-72)。NMOの自己抗体がアレイの構造エピトープを認識しているとの報告もある⁸⁾。

3. AQP4の機能

AQP4は浸透圧勾配に従って細胞膜を介する両方向性の水分子の輸送を行い、中枢神経系組織における water homeostasis の制御で中心的な役割を果たしている。AQP4欠損マウスでは、血管性脳浮腫は増悪し、細胞性脳浮腫は軽減する¹⁾。AQP4遺伝子多型と中大脳動脈閉塞症における脳浮腫の重症化に相関を認めるとの報告もある⁹⁾。個々の細胞レベルでは、AQP4を介する水分子の流入は葉状仮足(lamellipodium)による細胞の移動を制御している¹⁾。ASの足突起に発現しているAQP4は、SNTA1を介して内向き整流カリウムチャンネル Kir4.1と共存しており、細胞外K⁺イオンの取り込みにも関与している(Nagelhus *et al. Neuroscience* 2004; **129**: 905-913)。さらにAQP4はEAAT2(GLT-1)とも共存しており、グルタメートの取り込みにも関与している¹⁰⁾。AQP4欠損マウスでは、てんかん発作の閾値が上昇している(Binder *et al. Neuroreport* 2004; **15**: 259-262)。AQP4は神経幹細胞にも発現しているが、AQP4欠損マウス由来の神経幹細胞では、カルシウムチャンネル Cav1.2の発現量が著減しており、増殖分化が抑制されている(Kong *et al. J Cell Sci* 2008; **121**: 4029-4036)。

文献

- 1) Verkman AS: More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* 2005; **118**: 3225-3232
- 2) Graber DJ, Levy M, Kerr D, *et al.*: Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4. *J Neuroinflammation* 2008; **5**: 22
- 3) Ho JD, Yeh R, Sandstrom A, *et al.*: Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 7437-7442
- 4) Tani K, Mitsuma T, Hiroaki Y, *et al.*: Mechanism of aquaporin-4's fast and highly selective water conduction and protein exclusion. *J Mol Biol* 2009; **389**: 694-706
- 5) Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, *et al.*: Syntrophin-dependent

- expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:14108-14113
- 6) Tani T, Sakimura K, Tsujita M, *et al.*: Identification of binding sites for anti-aquaporin 4 antibodies in patients with neuromyelitis optica. *J Neuroimmunol* 2009; **211**: 110-113
 - 7) Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KGV, *et al.*: Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 13609-13614
 - 8) Nicchia GP, Mastrototaro M, Rossi A, *et al.*: Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies. *Glia* 2009; **57**: 1363-1373
 - 9) Kleffner I, Bungeroth M, Schiffbauer H, *et al.*: The role of aquaporin-4 polymorphisms in the development of brain edema after middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 2008; **39**: 1333-1335
 - 10) Zeng XN, Sun XL, Gao L, *et al.*: Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 2007; **34**: 34-39

図の説明

図 1. AQP4 の分布と構造.

- (a) 血液脳関門(blood-brain barrier)を形成するアストロサイト(astrocyte)の足突起(endfeet)の細胞膜における AQP4 の発現. AQP4 を砂時計マーク(赤色)で示す。
- (b) AQP4 の 4 量体構造(Protein Data Bank code 3GD8). 各々の AQP4 モノマーが水分子を通過させることが出来る。

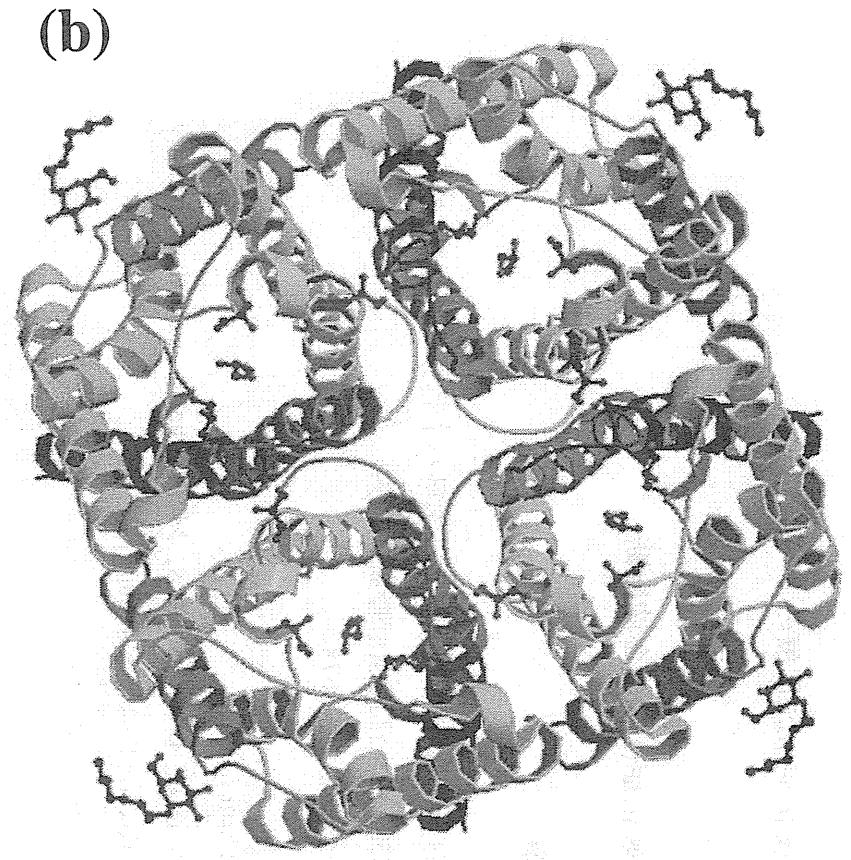
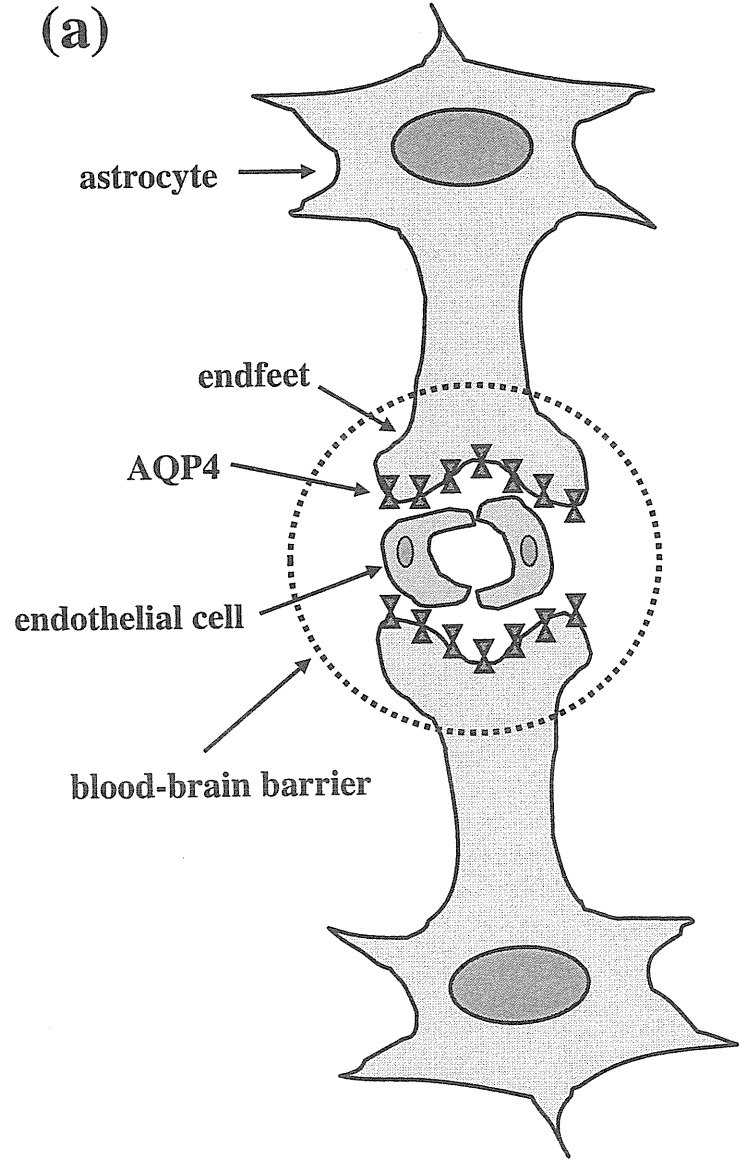


图1

多発性硬化症(MS)診療のすべて

多発性硬化症(MS)の血液診断

佐藤 準一

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科バイオインフォマティクス

〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1

Tel & Fax: 042-495-8678

Jun-ichi Satoh

Department of Bioinformatics, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio,
Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.

Tel & Fax: 042-495-8678

1. MS の血液診断の概要

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は、自己抗原反応性 T 細胞により惹起される中枢神経系炎症性脱髄疾患であり、時間的空間的多発を特徴とする。未だ MS 特異的自己抗原は明らかにされていない。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が遷延化すると髄鞘再生不全や軸索傷害、神経変性を来して、不可逆的な神経機能障害を残す。もし事前に再発を予測出来れば、早期治療が可能となり、後遺症を少なく出来る。しかしながら現在まで再発予測法は樹立されていない。MS は神経学的所見、臨床経過、脳脊髄液所見、MRI 画像に基づいて診断されるが、鑑別診断が多く、正確な診断は必ずしも容易ではない。また通常の血液検査では異常を認めず、特異的なバイオマーカーはなく¹⁾、血液所見単独では診断を確定することは出来ない。以下 MS の血液異常に関する最新の知見²⁾を概説する。

2. MS 血液中のリンパ球異常

MS では遺伝的要因と環境因子の複雑な相互作用を背景に出現した活性化自己反応性 CD4⁺ T helper type 1(Th1)細胞や Th17 細胞が、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化して、TNF α 、一酸化窒素(nitric oxide; NO)などの炎症増強因子の産生を誘導し、脱髄を惹起すると考えられている。MS は臨床経過から relapsing-remitting MS(RRMS), secondary progressive MS(SPMS), primary progressive MS(PPMS)に分類され、病理学的には T 細胞浸潤、抗体補体沈着、オリゴデンドロサイトアポトーシスの所見により 4 タイプに分類されており(Lucchinetti *et al. Ann Neurol* 2000; 47: 707-717)、多様性(heterogeneity)を呈する。病態形成に関与するリンパ球には、Th1, Th17, Th9, Treg, CD8⁺ T, $\gamma\delta$ T, NK, NKT, B があり、Th1, Th17, Th9, CD8⁺ T, $\gamma\delta$ T はエフェクターとして、Treg, CD8⁺ T, $\gamma\delta$ T, NK, NKT はレギュレーターとして働いている(図 1)。1990 年代まで、MS は IFN γ 投与で増悪を認めた臨床試験の結果(Panitch *et al. Neurology* 1987; 37: 1097-1102)より、Th1 病と見なされて来た。現在では、MS の病態形成で中心的役割を果たしているのは、IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 を産生する Th17 細胞であると考えられている(Th17-mediated disease)³⁾。Th17 細胞は、IL-6 と TGF β の存在下で Th0 細胞から分化誘導される。IL-23, IL-1 β , IL-21, IL-7 は、Th17 の分化や増殖を協調的に促進する。活動期 RRMS 患者の血中では、Th17 細胞が非活動期や健常者に比較して 7 倍増加しており、髄鞘抗原 myelin basic protein(MBP)に対して反応性を呈する⁴⁾。Th17 細胞は MS 脳の活動性病巣に集積している(Tzartos *et al. Am J Pathol* 2008;

172: 146-155)。CCR6⁺ Th17 細胞は、脈絡叢上皮細胞上に発現している CCL20 を介して脳内へ侵入する(Rebolidi *et al. Nat Immunol* 2009; **10**: 514-523)。IL-17 は脳血管内皮細胞の tight junction を開くことにより、BBB の通過性を高める(Kebir *et al. Nat Med* 2007; **13**: 1173-1175)。浸潤細胞における Th17/Th1 比の高値が、脳における炎症の局在化を規定している(Stromnes *et al. Nat Med* 2008; **14**: 337-342)。Interferon- β (IFN β)は Th1 病には有効だが、Th17 病には無効であり、RRMS 患者のうち IFN β ノンレスポonderでは血清 IL-17F が増加している⁵⁾。

自己抗原反応性 Th17 細胞の活動性を抑制する細胞として、制御性 T 細胞(Treg)が注目されている⁶⁾。Treg の機能低下により免疫寛容が破綻する。Treg は胸腺由来で転写因子 Foxp3 を発現している CD4⁺CD25⁺ naturally occurring Treg (nTreg)と末梢由来で抗原と IL-10, TGF β , retinoic acid(RA)により誘導される inducible Treg(Tr1, Th3, CD8 陽性 Treg を含む)に分類される(図 1)。主として Tr1 は IL-10 を、Th3 は TGF β を産生する。MS 末梢血では CD4⁺CD25⁺ nTreg 数は減少していないが、nTreg による CD4⁺CD25⁺ T 細胞の増殖抑制機能は低下している(Viglietta *et al. J Exp Med* 2004; **199**: 971-979)。しかしながら CD127(IL-7R α)陽性細胞を除去した純度の高い nTreg の機能は、MS 患者と健常者で変わりがないという報告もある(Michel *et al. J Clin Invest* 2008; **118**: 3411-3419)。MS では CD39⁺ nTreg サブポプレーションの Th17 抑制能が低下している(Fletcher *et al. J Immunol* 2009; **183**: 3411-3419)。また RRMS 末梢血では、Tr1 の誘導能と IL-10 産生が低下している(Astier *et al. J Clin Invest* 2006; **116**: 3252-3257)。さらに寛解期の RRMS 末梢血では、IL-5 産生性 CD95⁺CD11^{low} NK 細胞(NK2)および IL-4 産生性 CD4⁺ NKT 細胞が増加している(Aranami *et al. J Immunol* 2006; **177**: 5659-5667; Araki *et al. Int Immunol* 2003; **15**: 279-288)。

MS 脳病巣における軸索傷害や髄鞘破壊では、MHC class I 拘束性 CD8⁺ T 細胞の直接的関与が示唆されている⁷⁾。MS 脳病巣では、CD4⁺ T 細胞より CD8⁺ T 細胞の方が数多く集積しており、CD8⁺ T 細胞は病巣や cerebrospinal fluids(CSF)、血液中でもオリゴクローナルに増加している(Skulina *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2428-2433)。また近年、MS の免疫病態において、LT, TNF α 産生細胞や抗原提示細胞として働く B 細胞の役割が注目されている⁸⁾。MS 脳のクモ膜下腔では、リンパ濾胞(ectopic B-cell follicles with germinal centers)の形成を認める(Serafini *et al. Brain Pathol* 2004; **14**: 164-174)。MS 脳病巣の反応性アストロサイトは、B 細胞増殖因子 BAFF, APRIL を産生する。B 細胞は CSF 中のオリゴクローナルイムノグロブリン産生細胞となり得る(Obermeier *et al. Nat Med* 2008; **14**: 688-693)。B 細胞の CD20 を標的とす