

## プロテオームによる糖尿病の病態解析法の開発

●前田忠計<sup>1)</sup> ◆大石正道<sup>1)</sup> ◆亀谷徹<sup>2)</sup> ◆古舘専一<sup>2)</sup> ◆松崎尹雄<sup>3, 4)</sup> ◆大森彬<sup>4)</sup> ◆河野俊之<sup>4)</sup> ◆藤田芳邦<sup>2)</sup>

1) 北里大学理学部 2) 北里大学医学部 3) 三菱化学(株)横浜総合研究所 4) (株)三菱化学生命科学研究所

### 〈研究の目的と進め方〉

現在、日本には約700万人の糖尿病患者が存在し、世界的にも患者数は急増している。糖尿病や心疾患などの多因子病では、遺伝要因と環境要因が複雑に関連するため、その原因遺伝子やSNPsを発見しただけでは、直接的な診断・治療になかなか結びつかない。そのため細胞・組織内のタンパク質を網羅的に解析する、いわゆるプロテオーム解析が期待されるようになった。

特定研究「ゲノム医科学」がスタートした2000年当時(そして2006年現在においても)、プロテオーム解析に対する一般的認識は、(1)タンパク質を分離し、(2)個々のタンパク質の存在量を調べ、(3)タンパク質の同定を行うこと(発現プロテオーム解析)であった。我々もこの認識のもとに本計画研究をスタートさせ、さまざまな疾患モデル動物の発現プロテオーム解析を進めた結果、タンパク質の発現量の違いを調べるだけでは疾患プロテオーム解析を行ったことにはならないことに気付いた。

その発端となったのは、2001年に行った酸化傷害タンパク質検出法の開発である。すなわち、糖尿病ラットOLETFの骨格筋と心筋ではコントロールラットLETOの臓器に比べて、クマシー染色したアガロース二次元電気泳動(2-DE)パターンにはほとんど差が無いにもかかわらず、酸化傷害タンパク質含量ではまったく異なっていた。このことから、疾患プロテオーム解析を行う際には、発現量の比較だけではなく、酸化傷害を含めた生理的・非生理的翻訳後修飾の網羅的解析が必要であると考えに至った。以降、我々の認識は徐々に修正されていった。

疾患プロテオミクスについての我々の考えは、現時点では次の通りである。

糖尿病等を含む多因子疾患を対象としたプロテオーム解析を進めるには、(1)「タンパク質の網羅的同定と含有量決定(発現プロテオーム解析)」だけでは不十分である。(2)「(正常&病的)翻訳後修飾によるタンパク質の機能状態変化の網羅的解析(機能プロテオーム解析)」と、(3)「診断・治療のターゲットタンパク質群を発見するための多変量解析(バイオインフォマティクス)」が必要である。現在の重点課題は上記(2)を実行するためにタンパク質機能状態検出プローブを多数開発することである。

2004年から、北里大学ではヒト培養細胞を免疫源として網羅的にモノクローナル抗体を作成し、それらの中から疾患診断、病態解析に使えるものを絞り込むプロジェクトを開始した。2006年現在、700種のモノクローナル抗体を作成済みであり、その中から疾患診断に有用な抗体の候補を複数個見出している。多くの患者について病気の診断・治療に有用であると判定された抗体は、臨床の現場で実際に使えるプロダクトとなる。

個別疾患を対象にプロテオーム解析をする目的は、病気の診断・治療に役立つプロダクトを創出することである。ここで最も重要なことは臨床医が日々感じている診断・治療に対する要求を具現化することである。この目的を達成するためには臨床医(MD)と基礎研究者(PhD)

との密接なコラボレーションが必要となる。PhDが装置オタクや、ただ単なるデータ出し役にとどまっていたのでは、MDの要求に的確に答えることはできない。重要なことは、MDとPhDがそれぞれの強みを発揮しつつ主体的に参加できる共同研究環境を構築し、個々の疾患に最適化した疾患プロテオーム解析のあり方について考えながら、共に研究を進めていくことである。

### 〈研究開始時の研究計画〉

- ①プロテオーム解析環境の構築
- ②糖尿病モデル動物の各種臓器と糖尿病患者病理検体の発現プロテオーム解析。
  - a: 糖尿病モデルマウス ob/ob, db/db のプロテオーム解析
  - b: 遺伝性2型糖尿病モデルラット OLETF のプロテオーム解析
  - c: ヒト病理検査標品を使った糖尿病特異的プロテオーム解析
- ③二次元電気泳動画像データベースの構築。
- ④ヒト・組織と体液のティッシュバンク開設

### 〈研究期間の成果〉

#### ①プロテオーム解析環境の構築

われわれは計画研究の開始以前の1995年からはじめから、一次元目のアガロースゲルを用いた二次元電気泳動法(アガロース2-DE)を使ってタンパク質を分離し、ペプチド・シーケンサーを使ってアミノ酸配列を決定し、タンパク質を同定していた。この環境は疾患プロテオミクスの本格的推進には力不足であったので、計画研究初年度には高速液体クロマトグラフィーとイオントラップ型質量分析計(LC-MS)を導入し、疾患プロテオーム解析の環境を構築することから研究をスタートさせた。発現プロテオーム解析の定量性を改善するため、2003年には多重蛍光標識タンパク質発現ディファレンス解析法(2D-DIGE)を導入した。2006年現在、以下に述べるようなプロテオーム解析環境を実現した。

- ・二次元電気泳動および質量分析計システム
  - \* 二次元電気泳動: アガロース二次元電気泳動+2D-DIGE
  - \* 質量分析計: LCQDECA
  - \* 液体クロマトグラフィー: 資生堂 ナノスペース SI-2改良型、(カラムスイッチ機能付)
- ・タンパク質同定感度: 数100 fmol (in gel)
  - \* クマシー染色で可視化できる全てのタンパク質(ゲル中に0.1 μg以上)を分析可能
- ・タンパク質同定率: MS解析した試料の90-95% (データベースの整ったヒト, マウス)
- ・タンパク質同定速度: 1日約80試料

上記の環境を構築するにあたり、次の事柄を重視した。

質量分析計の感度は日進月歩で伸びている。しかし、質量分析計の感度が10倍になったからといって、あるタンパク質を分析するために必要な生体組織の量が1/10で良くなったというわけではない。また、安定しない高感度システムよりもその1/10感度で安定したシステムの方が有効である。プロテオーム解析においては質量分析にかける試料を調製するには多くの時間と労力、そして複雑な操作が必要である。したがって適切な試料調製技術が無い状態では高感度質量分析計は宝の持ち腐れである。また、当然のことながら分析計の安定性を欠いた状態で、その上流の複雑な試料調製法を最適化することは困難である。

プロテオーム解析環境立ち上げに向けて重視した点は、我々のグループの強味であるアガロース2-DEの利点を最大限に生かすこと。そして、2-DE、ゲル内酵素消化、LC-MS測定からなる一連の解析技術を1つのシステムととらえて、トータルシステムとして安定した高感度なプロテオーム解析環境を構築することであった。

プロテオーム解析の感度を向上する方法は大きく分けて2つある。1つはMS感度を上げること、もう1つは生体試料中のタンパク質の分離・精製時の損失を最小限に抑えて質量分析試料を効率よく調製することである。多くのグループでは前者を選択しているが、そのためには多大な労力と経験が必要であり、安定して高いスループットを実現することは非常に難しい。

我々はアガロース2-DEの特徴を最大限に活かし、出発材料である生体試料から効率よくタンパク質を分離・

精製することを選択した。ここでいう生体試料とは、研究対象の組織片であり、細胞であり、血液等の体液である。アガロース2-DEは一次元目の等電点電気泳動担体にアガロースを使用しているため生体組織約5mgから抽出した500 $\mu$ g~1mgのタンパク質を効率よく一度に分離することができる。この分離可能なタンパク量は広く使われている固定化pH勾配2-DE法(イモビライン法)の10倍以上である。アガロース2-DEゲル上の各タンパク質の量は固定化pH勾配2-DEゲル上のタンパク量の10倍以上ある。したがってアガロース2-DEの使用により、MS感度が他に比べて1/10であっても、プロテオーム解析のトータル感度は同じレベルを保つことができる。

アガロース2-DEの使用によって10倍以上のタンパク質が分離できる利点は、MS感度にたいする要求をゆるめるLCQばかりではない。目的タンパク質に比べて夾雑物の量を相対的に減少させる、ゲル内消化等の試料調製時の試料損失を相対的に減少させるなど、有利な点が多い。またプラスチック容器、チップなどの試料調製に使用する全ての器具をシリコナイズ化して、試料調製時の試料損失を防ぐこともトータル感度向上には重要である。LC-MS測定では既知の夾雑物や消化酵素の自己消化物を自動的にタンデムMS(MS/MS)測定対象から除外することが可能であるため、自己消化物の生成を気にせず目的タンパク質の完全消化物を少しでも多くするように消化酵素を選択し、消化条件を至適化している。このこともトータル感度を上げることに寄与していると考えている。

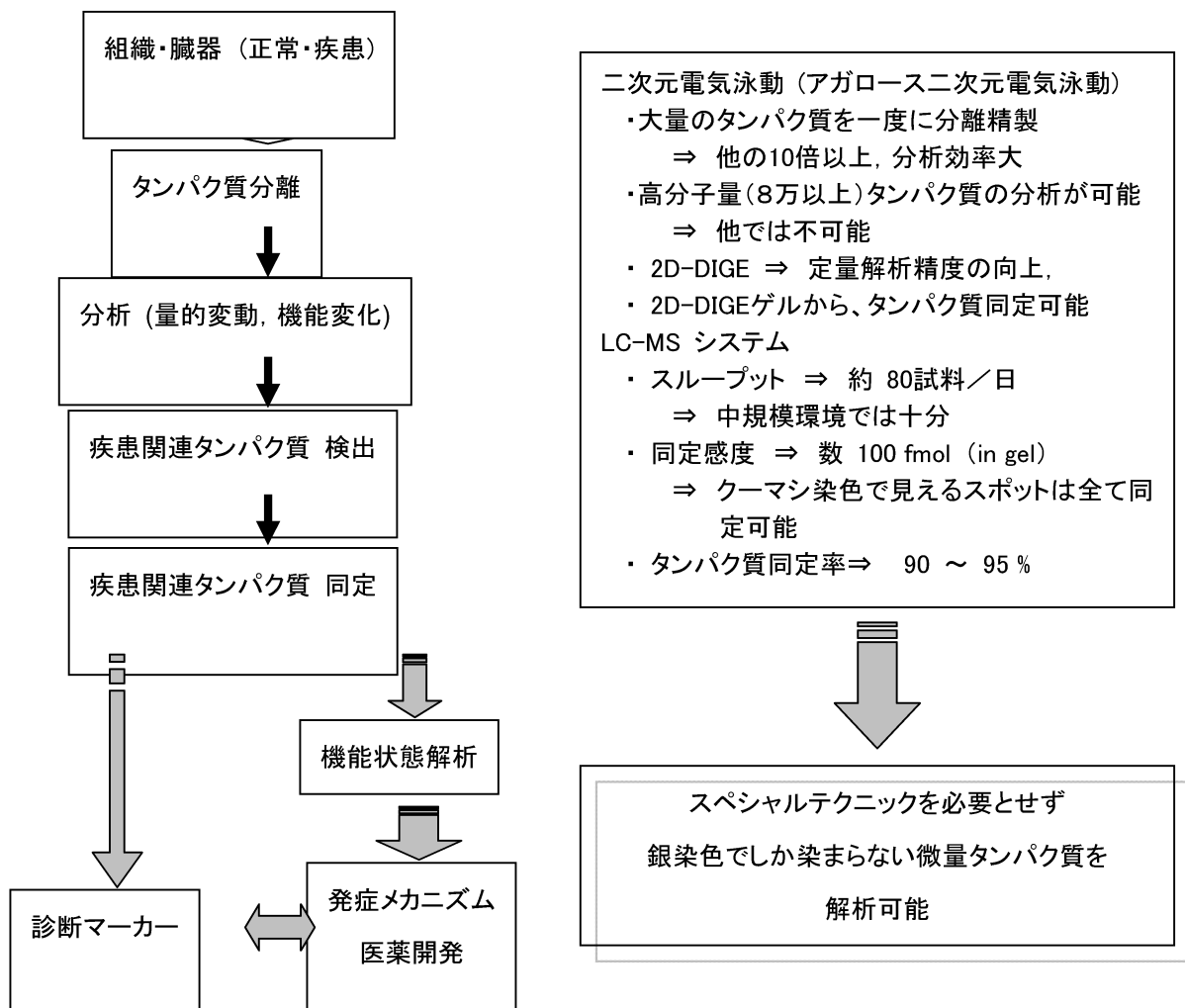


図1：北里大学の疾患プロテオミクスの特徴

以上、プロテオーム解析環境を一つのシステムと考えて、トータルシステムとして感度向上を行う考え方について説明した。この考えのメリットは全体として極端に難度の高い部分が無いことにある。これにより、臨床医、大学院生といったプロテオーム解析の素人が、2-DE、ゲル内消化、MS測定用バイアルへの充填、MS測定結果の解析までのLC-MS測定以外の全過程を自ら行うことが可能としている。さらに重要なメリットは、臨床医自ら参加することによって、技術面、研究面における我々との共通認識が生まれる点である。これによって、臨床医の考えに基づいた疾患プロテオーム解析が可能となり、かつ、臨床医の考えと我々のプラスαの技術を加えた独自の疾患プロテオーム解析、つまり、個別疾患に最適化した真の疾患プロテオーム解析が可能となるわけである。ここまで、良い点について記述したが、もちろん、プロテオーム解析のほぼ全過程を素人が行うと、時として様々なエラーが発生する。しかし、そのエラーはLC-MSの測定結果にすぐに反映されるため個々の技術の確認により問題の解決が可能である。この点では、非常に安定した最終分析技術の安定化が全体を支えているといっても過言ではない。時として、あるいはゲル内消化を行う人によって消化物の質にバラつきはある。しかし、LC-MS結果をもとに試料がダメであることを明確に判断し、伝えることにより、PhDとMDの共同研究が成り立ち、成果を出すに至っている。

プロテオーム解析の上記の全過程を習得するまでには少なくとも3週間は必要である。この期間は技術習得とともにPhDとMDとのコミュニケーションを作り上げる期間でもある。この期間に、ネガティブなことも含めて率直にディスカッションのできる関係を築き上げておくことも個々の疾患に最適化した疾患プロテオーム解析にとって必要不可欠な部分であると我々は感じている。

## ②糖尿病モデル動物の各種臓器と糖尿病患者病理検体の発現プロテオーム解析。

a：遺伝性肥満／糖尿病モデルマウス ob/ob、db/db のプロテオーム解析

20週齢マウスの17種類の組織（視床下部、大脳、小脳、脳幹、下垂体、肺、腸間膜脂肪組織、皮下白色脂肪組織、骨格筋、膵臓、肝臓、腎臓、脾臓、小腸、精巣、心房、心室）についてプロテオームを解析した。肝臓、膵臓、脾臓、心房、小腸、腸間膜脂肪組織および皮下白色脂肪組織で、プロテオームの異常が認められた。とくに肝臓では異常が著しく、またdbとob間でもプロテオームが異なっていた。（群馬大・医：森昌朋・清水弘行との共同研究）

b：遺伝性2型糖尿病モデルOLETFラットのプロテオーム解析

OLETFラットとそのコントロールLETOの28種類の臓器を経時的に（6週齢、12週齢、20週齢、30週齢、40週齢で）プロテオーム解析を行った。糖尿病発症以前の6週齢でも、28組織中12種類で、OLETFラットとLETOラットの間で発現プロテオームに相違が検出された。この違いのある臓器の種類とタンパク質の数は、ラットの週齢が進むにつれてともに増加した。OLETFラットでは30週齢から糖尿病が発症するが、発現プロテオームには発症前後での急激な変化は認められなかった。

OLETFラットとLETOラットのプロテオームの直接的比較は系統間の相違を検出することになり、

糖尿病の病態解析法の開発には有効ではない。これに比べ、OLETFラットのこの臓器のプロテオームを経時的に比較することは、病態の進行に伴うプロテオーム変化を見ることであり、糖尿病の病態解析法の開発につながる。

しかし、OLETFラットが糖尿病を発症する30週齢の前後で、発現プロテオームに急激な変化が認められなかった事実は、糖尿病の病態解析にこの方法がそれほど有効ではないことを示唆するものである。

c：ヒト病理検査標品を使った糖尿病特異的プロテオーム解析

糖尿病患者の血清、皮膚角化層、トログリタゾンによる劇症肝炎で死亡した2型糖尿病患者の肝臓のプロテオーム解析を行った。

(A)糖尿病患者の皮膚および血清のプロテオーム解析：変異は検出されたが、個人差と疾患依存的変化との区別の必要がある。

(B)糖尿病治療薬（トログリタゾン）投与後死亡患者の肝臓プロテオーム解析：解糖系酵素群の顕著な低下、小胞体の分子シャペロン群の顕著な減少が確認された。

(C)抗体および蛍光を用いた血清中のAGE (Advanced Glycosylation End-product、終末糖化産物) 化タンパク質の検出：3種類の抗体を使ったが違いは検出されなかった。コントロールに比べ患者血清の蛍光強度は約3倍高く、分子量1万以下のペプチドがその原因であることを同わせるデータが得られている。

## ③タンパク質の酸化ダメージ検出法(1)

前項bで述べたように、計画研究初年度から2年目にかけて糖尿病モデルOLETFラットの発現プロテオーム解析を経時的に行った結果、糖尿病発症前後での急激な変化は認められなかった。このため、タンパク質発現量だけでは糖尿病の病態を把握しきれないのではないかと考え、活性酸素種（ROS）によるタンパク質の酸化ダメージを検出する試みを開始した。

ROSによってタンパク質が攻撃されると、アミノ酸側鎖に部位特異的な酸化修飾の生成、ペプチド鎖の切断、タンパク質分子間のS-S結合形成による凝集物の形成、表面電荷の変化などが起こり、プロテアーゼによる分解を受けやすくなる。酸化されやすいアミノ酸残基には、含硫アミノ酸（メチオニン、システイン）、塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン、ヒスチジン）、脂肪族アミノ酸（ロイシンやバリン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン）などがあり、段階的に酸化が進む場合や酸化部位の違いによって、生じる非生理的翻訳後修飾構造は数十種類にも及ぶ。

これらのアミノ酸のうちメチオニンとシステインは特に酸化されやすいが、たとえ酸化されてもタンパク質の機能にはほとんど影響を与えない。すなわち、酸化されたメチオニンはメチオニンスルフォキシドレダクターゼにより還元され、酸化されたシステインはグルタチオンまたはチオレドキシンの酸化還元系により還元される。従って、メチオニンやシステインの酸化は、ROSによる不可逆的な酸化傷害からタンパク質を保護する働きがあるとされる。一方、リジンやアルギニンの酸化により生じたカルボニル化は不可逆的な酸化傷害であるため、タンパク質の機能にダメージを与えられられている。また、酸化された糖がリジンまたはアルギニンの側鎖に結合して最終的にAGE (advanced glycation endproducts)

化と総称される複雑な構造を形成することが知られているが、これもアミノ酸側鎖の不可逆的な酸化修飾である。

タンパク質が酸化修飾を受けると生理的機能が変化する。特に、各種酵素では、活性部位またはその近傍に金属イオンが存在する 경우가多いが、活性酸素は金属イオンを触媒として近傍のアミノ酸を酸化するため、酵素活性を失いやすい。一方、タンパク質の酸化に伴う機能変化についてはアクチンをモデルに研究が進められてきた。精製アクチンを過酸化水素で軽く酸化すると、アクチンの重合が著しく阻害されF-アクチンが形成されなくなるが、この機能変化にはアクチン分子C末のHis371とCys374の酸化が関わっていることが示されている。

前にも述べたが、タンパク質の酸化修飾のうち、カルボニル化がタンパク質の機能にダメージを与えるという点で注目されてきたため、タンパク質カルボニルが酸化タンパク質のマーカーとして用いられてきた。タンパク質カルボニルは、タンパク質を構成するアミノ酸のうち、アルギニンやリジンの側鎖にアルデヒド基が生じることで形成される。カルボニル化された部位は化学的に比較的安定であるので、酸化傷害を表す指標として利用される。すなわち、アルデヒド基はヒドラジン試薬と共有結合してヒドラゾン形成するので、ヒドラジン試薬に蛍光色素や2,4-ジニトロフェノール(DNP)など何らかのタグを付加することによってカルボニル化タンパク質が検出可能になる。

組織や血清中に含まれるタンパク質カルボニルの存在量を調べるため、2,4-ジニトロフェニルヒドラジド(DNPH)でタンパク質カルボニルをラベルする方法が行われてきた。DNPHが結合したタンパク質カルボニルは黄色に発色するので、未反応のDNPHを除去した後、370nmの吸光度測定で定量できる。さらに、カルボニル化タンパク質の種類を調べるには、DNPHでラベルしておいてからSDS-PAGE法でタンパク質を分離し、次にPVDF膜にタンパク質を転写し、最後に膜上のカルボニル化タンパク質を抗DNP抗体で検出する。さらに、タンパク質の分離能を高めた場合は、SDS-PAGEの代わりに2次元電気泳動法を用いる方法が試みられてきた。

しかし、2001年に我々が新しい標識法を開発するまでは、2次元電気泳動法でカルボニル化タンパク質を分析する試みはあまり良い結果を与えなかった。その最大の理由は、DNPHとタンパク質カルボニルを、通常2N塩酸存在下で1時間反応させることにある。この反応後のタンパク質は難溶性の凝集物を形成し、高濃度の尿素とチオ尿素を含む抽出液中でホモジナイズしても容易に溶かすことはできない。しかもポリアクリルアミドゲルを1次元目等電点電気泳動の単体として用いる固定化pH勾配2次元電気泳動法(イモビライン法)では分子量10万以上の高分子量タンパク質は検出できないので、これらの凝集物を含むサンプルの分析はますます困難になる。これらの困難のため、DNPH標識したカルボニル化タンパク質を2次元電気泳動で分離・検出する試みは良い結果を与えなかった。

我々は、この問題を打開するために、次の2点を考案した。すなわち、(1) DNPHの代わりに、よりマイルドなpH条件(pH5.5)でアルデヒド基と反応できるビオチンヒ

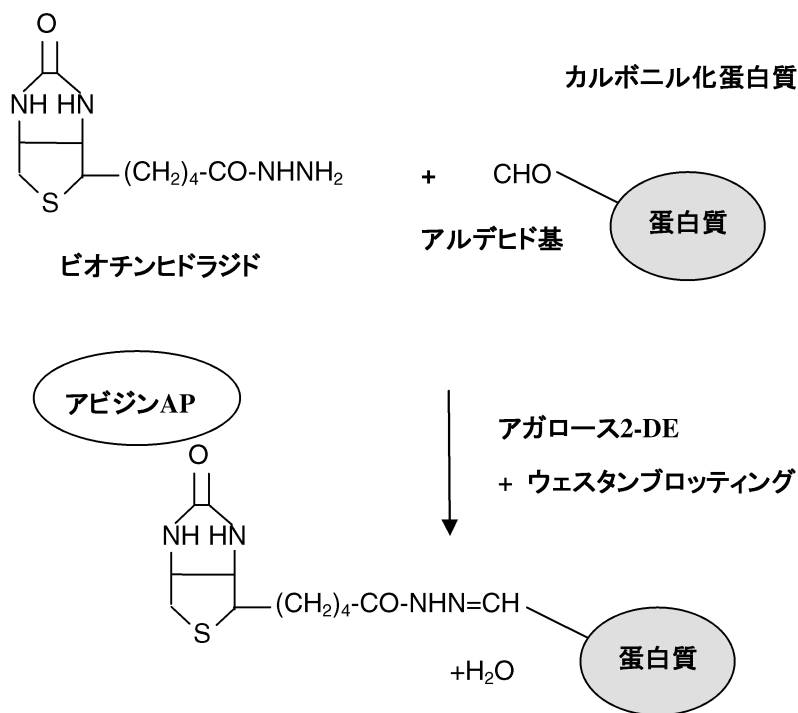


図2: カルボニル化タンパク質の検出

ドラジド(BHZ: D-biotin-hydrazide)を用いたこと、および(2)分子量500kDa程度までの高分子量タンパク質の分離が可能なるアガロース2-DE法を用いたことであった。

我々が開発したカルボニル化タンパク質検出法の概要を図2にまとめた。まず、凍結保存しておいた筋肉肉片を、0.1M 酢酸ナトリウムを含むバッファー(pH5.5)中でホモジナイズした。それにBHZの粉末を加えて攪拌し、カルボニル化タンパク質をBHZと反応させてヒドラゾン形成させた。それに尿素とチオ尿素の粉末を加え、反応を止めると同時にタンパク質を可溶化し、超遠心した上清をアガロース2-DE法にかけた。1次元目の等電点電気泳動後のアガロースゲルをトリクロロ酢酸を含む固定液でかん流固定すると、未反応のBHZを洗い流すことができる。この操作は非特異的なBHZの結合を抑えるために必須な操作である。ウェスタン・ブロットイング後、BHZで標識されたビオチン化されたカルボニルタンパク質をアビジン結合-アルカリホスファターゼ(アビジンAP)と反応させ、基質を含む溶液中で発色させた。最後に、PVDF膜を蒸留水で洗って発色を停止させ、ドライヤーで乾燥後にPVDF膜を観察した。

糖尿病モデルOLETFラットの筋肉タンパク質成分をそのコントロールのLETOと比較した。

図3に50週齢ラットのひ腹筋と左心室の2次元電気泳動パターン(部分拡大図)を示す。図3a, c, e, gがクマシー染色パターン、図3b, d, f, hがカルボニル化タンパク質染色パターンである。LETOとOLETFを比較すると、クマシー染色像ではほとんど違いが認められなかったが、ひ腹筋、左心室ともアクチン(ACT)のカルボニル化タンパク質含量はOLETFの方がLETOよりも多かった。ひ腹筋においてはクレアチンキナーゼ(CK)のカルボニル化タンパク質含量はOLETFの方がLETOよりも多かった(図3b, d)。また、左心室においてはデスミン(D)およびミトコンドリアATPアーゼβ鎖(B)のカルボニル化タンパク質含量もOLETFの方がLETOよりも多かった(図3e-h)。しかし、トロポミオシン(TM)についてみると、ひ腹筋、左心室ともカルボニル化タンパク質は検出

されなかった。筋細胞において、トロポミオシンはアクチンを主体とする細い繊維上に載っているにも拘わらず、カルボニル化タンパク質含量に違いが認められたことから、ROSによるタンパク質のカルボニル化の程度の違いはタンパク質分子種の違いによるものだと考えられた。しかも、アクチンとトロポミオシンに含まれるリジンやアルギニンのようなカルボニル化タンパク質を生じやすい塩基性アミノ酸残基の組成もほとんど変わらないことから、酸化傷害の受けやすさはアクチンとトロポミオシンの立体構造の違いが反映していると推測された。

以上のことから、カルボニル化タンパク質含量を指標とした酸化傷害プロテオーム解析を行った結果、クマシー染色パターンから得られる質的情報（タンパク質の等電点的移動度および分子量的移動度の違い）と量的情報（タンパク質のスポットの大きさおよびスポットの濃さ）だけでは、糖尿病特異的プロテオーム変動を検出できないことが分かった。すなわち、疾患プロテオーム解析においては、二次元電気泳動パターン同士を比較するディフレンシャルディスプレイだけではカルボニル化タンパク質などといった重要な情報を見逃す可能性があり、本研究で用いたBHZのようなタグを用いた検出法が必要であることが明らかになった。

以上の結果から、当初の計画に含まれていた二次元電気泳動画像データベースの構築は糖尿病病態解析には有効なツールになり得ないと結論し、取りやめることにした。

④タンパク質の酸化ダメージ検出法(2)

生体中の非生理的な酸化傷害蛋白質に結合する安定同位体標識アフィニティー・タグ (TOP: Tags for Oxidized Proteins) を開発した。図4Aにその概略図を示し、図4Bに使用方法を示す。TOPは生体内のフリーラジカルによって誘導された蛋白質側鎖のアルデヒド基に結合する reactive group と、TOPに結合した酸化傷害蛋白質を分取するための affinity tag と、それらをつなぐ linker region からなる。linker region を安定同位体で標識することにより分子量の違う2種類のTOP (TOP1, TOP2) を調製することができる。図4Bの(a)過程で、正常組織から抽出した蛋白質混合物にTOP1を、疾病個体の同組織から抽出した蛋白質混合物にTOP2を添加して付加し(図4B(b)過程)、両組織の蛋白質混合物を混ぜ合わせた後に図4B(c)~(f)の過程を行って質量分析計で分析する。これによって疾病特異的に酸化傷害を受けた蛋白質を同定することができる。さらに、そのタンパク質中で酸化傷害を受けている部分を特定することによって、酸化傷害が及ぼす蛋白質の機能障害について議論することが可能となる。図5に分子量1016.8のペプチド(Kpep: GIAKGSIGALM)を人工的に酸化した試料を用いて図4B(a)~(c)の過程を模倣的に行ったモデル実験の結果を示す。

従来の酸化障害蛋白質検出法はDNPHまたはBHZを使っている。これらの方法は電気泳動を使って蛋白質成分を分離するため、一度に分析できる組織の量に限界がある(数mg

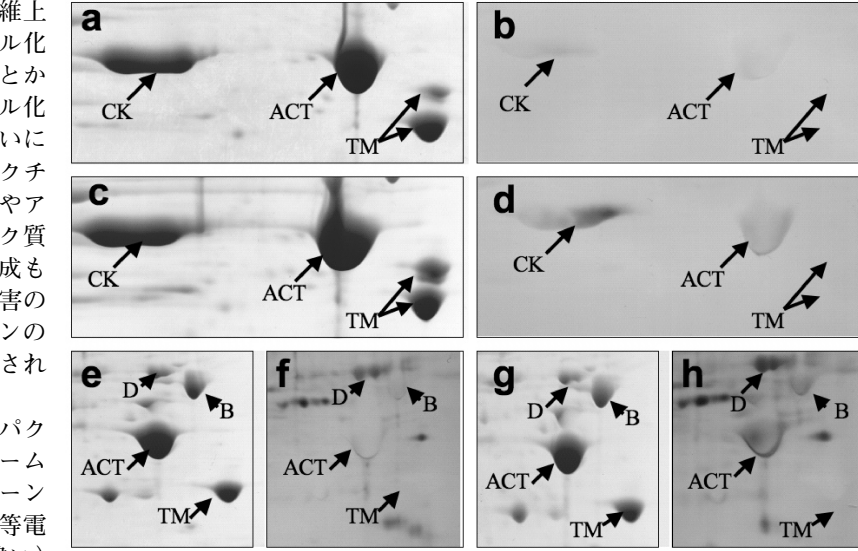
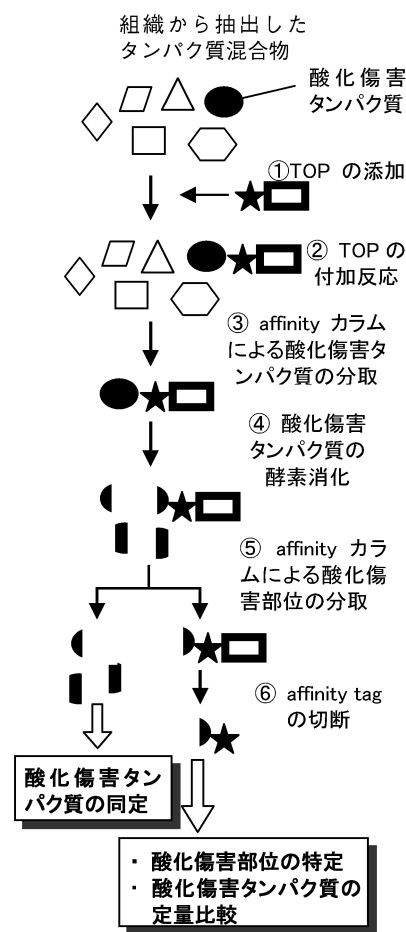
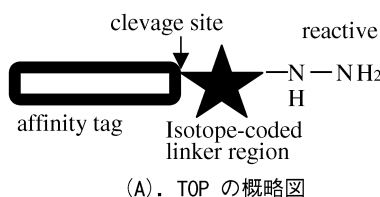


図3: 糖尿病ラット筋肉におけるカルボニル化タンパク質の検出。a, b:LETO 右腹筋。c, d:OLETF 右腹筋。e, f:LETO 左心室筋。g, h:OLETF 左心室筋。a, c, e, g: クマシー染色。b, d, f, h: カルボニル化タンパク質染色。

以下)。このため、組織中に微量しか存在しない蛋白質の酸化傷害を分析することは非常に困難である。これに対してTOPは初期の段階でアフィニティーカラムを使って酸化傷害蛋白質を分取するため、分析する組織の量をふやすことによって、組織中に微量蛋白質の酸化傷害に関しても分析することが可能となる。この点は、組織、体

図4: 酸化傷害蛋白質に結合する安定同位体標識アフィニティー・タグTOPの概略 (A)と使用法 (B)

液を分析する上で非常に重要な点である。

疾病個体と正常個体の組織中の蛋白質存在量を定量比較するための試薬 (ICAT: Isotope-Coded Affinity Tags) が既にApplied Biosystems より発売されている。TOPの基本的なアイデア (affinity tag, isotope-coded linker region, reactive group) はこの試薬と同じである。しかし、ICAT試薬の reactive group はヨウジアセトアミドであり、Cys残基のSH基と反応するようにデザインされている。このためICAT試薬による酸化傷害蛋白質の分析は不可能である。また、両試薬の affinity tag, isotope-coded linker region も全く異なっている。未反応残余試薬の除去が容易である点、膜蛋白質等の難溶性蛋白質の分析にも利用できる点はTOPの大きな特徴である。

### ⑤ 独自のペプチド抽出法を用いた疾患ペプチドーム解析

ペプチドはホルモン、神経伝達、循環調節因子として生体情報の伝達・制御において重要な役割を担っている。基質が不明なオーファン・レセプターが多く存在しているといわれている現状では、未だに知られていないペプチドホルモンが存在する可能性は大きい。また、生理活性ペプチド以外のペプチド成分においても疾病特異的に量的・質的に変動しているペプチド (疾病関連ペプチド) であれば、疾患マーカー、疾患メカニズム解明において重要な意味を持っている可能性は大きい。しかし、正常および疾病個体の組織、体液から網羅的にペプチドを抽出して定量的に比較するための定法は存在しない。そこで我々は生体組織、体液中に存在する個々のペプチドの量的情報を失うことなく、再現性良く、高効率でペプチドを抽出するためのペプチド抽出法を開発した。ポイントは分子量約10,000以上のタンパク成分を完全に除去する点である。これによって質量分析計およびHPLCで正常および疾病個体の組織、体液中に存在するペプチドを定量比較することが可能となった。

このペプチド抽出法は2段階からなる。1段階目で組織中のタンパク成分を大まかに除去し、2段階目でタンパク成分を完全に除去する。両段階ともに、使用容器、カラム担体へのペプチドの吸着とプロテアーゼの影響を避けるためゲル濾過等のカラム操作は行っていない。また、ゲル濾過、フィルター、透析膜による分子量分画は上記理由に加えて分画の切れが悪いこと、さらに分画の特性が分画前のタンパク量に依存するため使用していない。

図6は正常マウス (+m/+m) と糖尿病モデルマウス (db/db) の腎皮質中のペプチドを上記方法で抽出し、20フラクションに粗分画した成分の1つを高分解能のマイクロHPLC分析した結果である。db/dbの分析結果 (上) と+m/+mの分析結果 (下) を比較すると大部分のピークが非常に良く対応していることが分かる。この中で明確に違いのあったピーク (矢印部分) を分取してアミノ酸配列を解析することにより糖尿病特異的なペプチドを同定することに成功した。

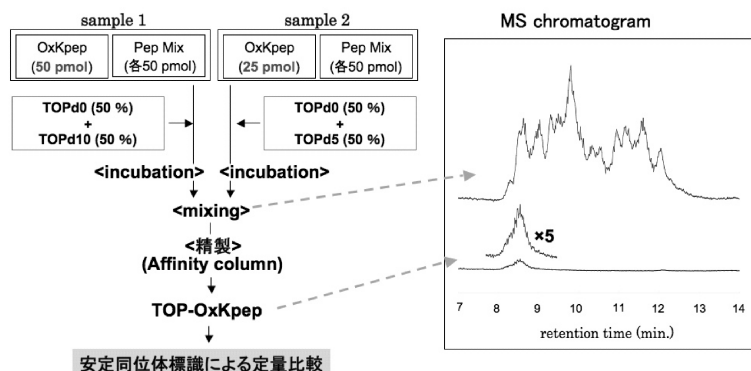


図5：標準ペプチドサンプル Kpep を酸化し (OxKpep)、重水素化 TOP (TOPd0、TOPd5、TOPd10) で標識した。これをペプチド混合物に混ぜたものを TOP にたいするアフィニティカラムで選択的に濃縮した。各段階の試料の MS クロマトグラムを右側に示す。また、TOPd0、TOPd5、TOPd10 で標識された OxKpep の量比も MS クロマトグラムで測定し、d10/d5、d0/d5、d0/d10 の理論値、2:3:1.5 に近い値が得られている。

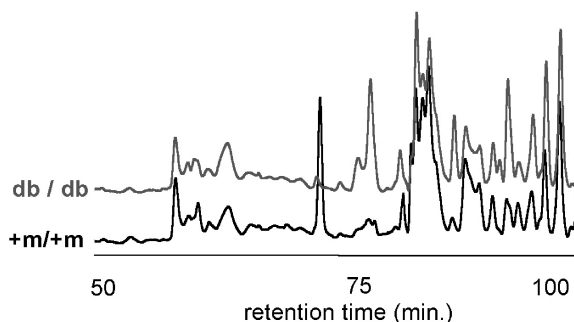


図6：正常マウス (+m/+m) と糖尿病マウス (db/db) のペプチド抽出物の定量比較

### ⑥ 血清中の疾患関連ペプチドの探索

血清には、ペプチドホルモン、サイトカインなどの生理的に重要なものから、細胞の壊死、アポトーシスによって血流に放たれるタンパク質のペプチド断片が含まれている。したがって、これらのペプチド成分を定量的に分析できれば疾患に関する多くの情報を得られることが期待できる。しかし、血清中の各タンパク質存在量のダイナミックレンジは非常に広く、圧倒的に多く存在しているタンパク質の中からペプチドだけを取り出すことが組織以上に困難である。このため、血清中のペプチド分析に関しては簡単な前処理後の試料を直接質量分析して得られる断片的なペプチド情報の解析が主流となっている。

そこで我々は組織を対象としたペプチド抽出法 (上記) を血清中のペプチド分析に至適化し、血清を対象とした疾患ペプチドーム解析の土台となる抽出法の開発を行っている。方法開発にあたっての難点は、血清中のペプチド成分の種類と量があらかじめわかっていないことである。このため開発した方法がどの程度有効な方法であるか評価することが困難である。そこで、血清にあらかじめ6種類の標準ペプチド混合物 (SP) を混ぜてペプチド抽出を行い、低分子用電気泳動法 (tricine-SDS PAGE) を用いて高分子タンパク質の除去効率を知るとともに、SPの残量でペプチドの抽出効率を評価した。

方法開発において最も大きな問題点は、高分子量タンパク質の除去に伴いペプチド成分も大きく損失する点である。これはペプチドがアルブミン、グロブリンなどのキャリアプロテインと結合しているためと考えられる。

我々は様々な条件検討の結果、ある程度のスループット(数10血清の同時処理可能、処理時間:待ち時間を含めて約5時間、実労時間2時間)でキャリアプロテインの影響を受けずに高効率で再現性良く、血清中のペプチドを濃縮する方法の開発に成功した(図7参照)。

⑦がん細胞を免疫源とした疾患診断に有用なモノクローナル抗体の獲得網羅的獲得

我々は、廣橋説雄らが1984年に報告した未精製抗原を使う免疫法に独自のアイデアを加えて、修飾特異的な抗体を含む多数の抗体を高効率的に得られる手法を開発してきている。

まず、腫瘍部位の組織もしくは腫瘍細胞株から取得したタンパク質の混合物をそのままマウスに免疫する。さらにマウスの脾臓細胞を摘出しB細胞のハイブリドーマを作製する。限界希釈しながら細胞培養を行い、免疫染色によって抗体の働きを期待できる細胞株をバンク化している。

抗原タンパク質そのものが特定されていないものの、獲得した抗体は腫瘍組織・細胞や血中等に流出した腫瘍関連タンパク質と反応し、非腫瘍性組織や健康人血清とは反応しないものがある。試験的に数種類の肺癌組織を用いて確認した結果、肺癌の各種組織型数種に鑑別可能な複数の抗体が得られている。さらにこの抗体は、癌疾患部位から出るタンパク質断片を対象とした抗体であるため、DNAチップとは異なり、生理的な状態の影響を受けにくい安定な検査が実現できる点でも重要である。

2004年にがん細胞を免疫源として網羅的にモノクローナル抗体を獲得し始めてから2005年秋までに、約700個の抗体ライブラリを構築した。今後専任の人材を確保することで大幅にスループットを上げることが可能である。

現在、疾患診断に有用であるかどうかで抗体を評価しているが、その方法は手作業によるドットプロット法を用いている。まず、各被験者の血清や腫瘍細胞などからタンパク質を抽出する。次に抽出タンパク質をそのまま混合状態で数段階に希釈し、メンブレンに吸着させたあと、メンブレン全体の非特異的吸着を防ぐため、スキムミルクなどでブロッキングする。つぎに抗体を反応させ、化学発光を用いてサンプルごとの抗原抗体反応を定量的に測定する。さらに罹患者と健康者の定量結果を統計的に評価することで、有意な差をもつ抗体を選択する。という手順である。

しかし、現在の方法では、今後急激に増加する抗体数と検体数の積でドットプロットしなければならない数が飛躍的に増加することになるため、省力化・自動化を急いでいる。

我々はすでに、腫瘍組織・細胞と特異的に反応する抗体、腫瘍患者血清とのみ反応する抗体が数多く獲得した(図8参照)。これは、従来法ではまったく困難であったような、疾患でタンパク質の修飾状態や立体構造が変わる、いわゆる疾患特異的翻訳後修飾を受けたタンパク質に対しても抗体を手に入れることができる点で重要である。

また産生される抗体は、マウスの脾臓から回

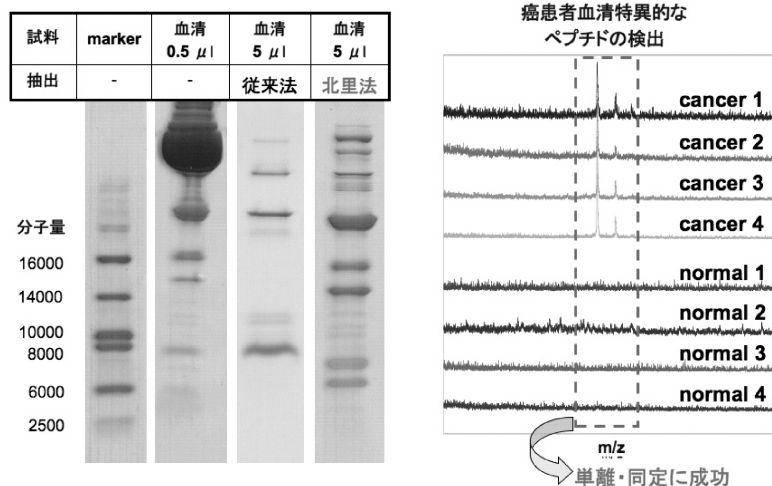


図7：血清中のペプチドの濃縮法。左側：ペプチドマーカー、血清 0.5 μl、血清 5 μl 中のペプチドをアセトン沈殿法(従来法)と我々の開発した方法(北里法)で濃縮したものを、それぞれ Tricine SDS PAGE で分析した。血清 0.5 μl を電気泳動すると、多量に存在するアルブミンが邪魔になり電気泳動がうまく行かない。従来法ではアルブミンは除去できるが、それとともにペプチド成分も失われる。我々の開発したペプチド濃縮法では、これらの弱点が克服されている。右側：北里法を使ってがん患者血清 4 人分と健康者血清 4 人分に含まれるペプチドを濃縮し、HPLC で分画した。がん患者血清に含まれるがん特異的ペプチドを単離・同定することに成功した。

収したB細胞を限界希釈法などと組み合わせてハイブリドーマを作製し、モノクローナル化しており、さらに無血清培地でハイブリドーマを安定して培養する技術も有していることから、いつでも必要なだけ動物血清の混入のない抗体を産出させることができるのである。この新規抗体創出方法を用い、すでに何らかの抗体としての作用を持つもの約700個が、抗体産生細胞ライブラリとして構築されている。また、この手法は、一人の実験担当者を専任で配置すれば、年間1,000個のペースで抗体を創出できるほど、高効率な手法である。さらに、試験的に数種類の肺癌組織を用いて確認した結果、肺癌の各種組織型数種を鑑別可能な複数の抗体が得られており、十分高い確率で所望の抗体を作製できることも分かっている。これらの方法によって得られた抗体は、癌疾患部位から

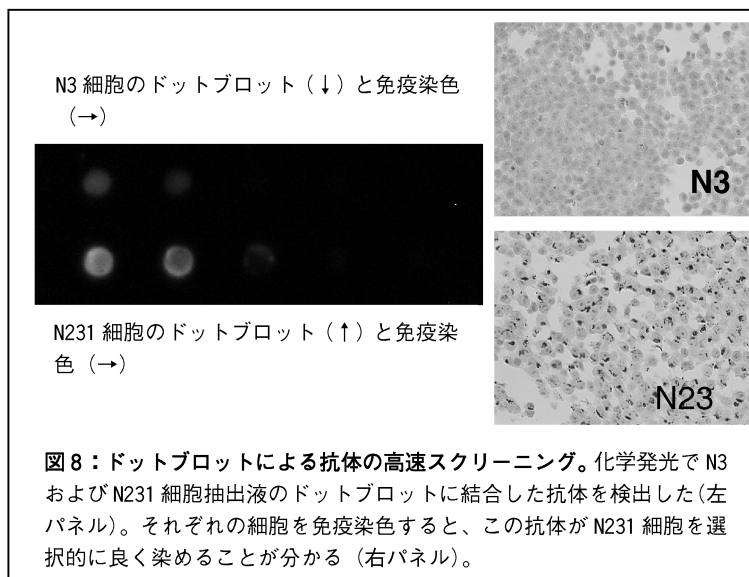


図8：ドットプロットによる抗体の高速スクリーニング。化学発光で N3 および N231 細胞抽出液のドットプロットに結合した抗体を検出した(左パネル)。それぞれの細胞を免疫染色すると、この抗体が N231 細胞を選択的に良く染めることが分かる(右パネル)。

出るタンパク質断片を対象とした抗体であるため、DNAチップとは異なり、生理的な状態の影響を受けにくい安定な検査が実現できる点でも重要である。

今後、この手法により疾患診断に有用な抗体を多数獲得することが可能になるだろう。

### ⑧量子ドット (Quantum dotまたはQ-dot) によるタンパク質翻訳後修飾の多波長同時検出。

第⑦項で、疾患診断に有用な抗体を多数獲得したとしても、複数抗体を同時に使って多重ウェスタンブロットングの方法を実用化しなければならない。

量子ドットは、直径数nmの半導体からなるナノクリスタルで、粒径のサイズによって波長400~700nmの範囲で半値幅30nmの蛍光を発する。また、量子ドットは1つの光源ですべての量子ドットの励起が可能で発光波長の分布がシャープであるため、分光器と冷却CCDを組み合わせることで10種類程度の標識を同時に解析できる。量子ドットは蛍光色素と違い、退色が遅く長期間安定している。

本研究では、まず、2種類の翻訳後修飾を同時に検出するところから実験を始めた。すなわち、遺伝性糖尿病モデルラットOLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)の骨格筋を材料に用いて、ピオチンヒドラジドでタンパク質上のアルデヒド基を標識した後、アガロース2-DEでタンパク質を分離しPVDF膜へタンパク質を転写した。ピオチン化されたカルボニル化タンパク質はストレプトアビジン結合-量子ドットA(565nm)で、ユビキチン化は抗ユビキチン抗体とプロテインA結合-量子ドットB(605nm)で、それぞれ標識した(図2A)。

冷却CCDカメラを搭載した多波長同時検出用蛍光イメージアナライザー(浜松ホトニクス社製)で、1枚のPVDF膜上のそれぞれの量子ドットを別々の波長のバンドパスフィルターを通して検出した。2枚の蛍光画像が得られたので、それらを1枚の画像に重ね合わせることで2種類の翻訳後修飾の同時検出を行った。その結果、糖尿病ラット骨格筋において、これら2種類の翻訳後修飾の同時検出に成功した。また、個々のタンパク質の蛍光染色パターンを比較してみたところ、カルボニル化タンパク質の多くがユビキチン化されていなかった。特に、アクチンはカルボニル化タンパク質が生じているにもかかわらず、抗ユビキチン抗体では検出されなかった(図9)。「変性タンパク質はユビキチン化されてプロテアソームに運ばれ、そこで分解される」という考え方が定説になっているが、糖尿病ラット骨格筋においては、アクチンを含むカルボニル化タンパク質の多くが分解されずに細胞内に蓄積されていることが示唆された。現在では、タンパク質の糖化(HHE化: 4-hydroxy-2-hexanal)を抗HHEマウスモノクローナル抗体と抗マウスIgG抗体結合-量子ドットC(655nm)で標識し、上記2種の標識とあわせて合計3種類の翻訳後修飾を同時に検出することに成功している。

同時に細胞内では壊れたタンパク質は、一般にはユビキチン化されプロテアソームで壊されると考えられている。活性酸素種(ROS)により酸化障害を受けたタンパ

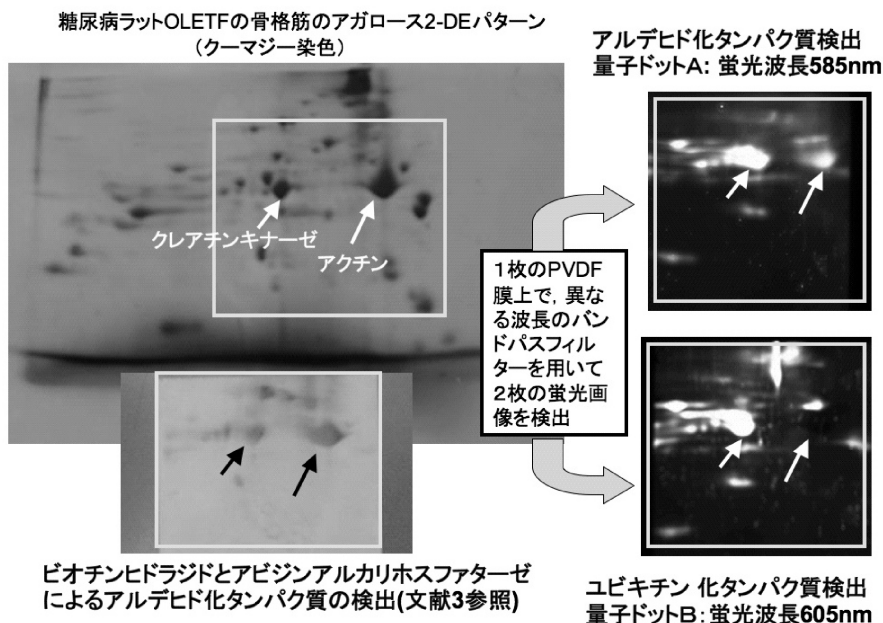


図9: 量子ドットを用いたタンパク質のアルデヒド化とユビキチン化の同時検出

ク質は、そのルートには乗っていないことを示唆するデータを得た。図9に糖尿病モデルOLETFラット骨格筋タンパク質を2次元電気泳動し、その中に含まれるカルボニル化タンパク質とユビキチン化タンパク質を2種類のQ-dot(緑と赤)で標識・検出した結果を示す。図9の結果から、前者は25スポット以上存在するのに対し、後者は高々3スポット程度しか観測されていないことが分かる。細胞内での寿命はカルボニル化タンパク質の方がユビキチン化タンパク質よりもかなり長いことを伺わせる。

⑨ ヒト組織バンクの設立。

北里大学病院および東病院においては、年間2万件の手術検体が生じる。この病院と連携してヒト組織バンクを構築し、先端的医学研究の基盤的環境を整備した。北里大学医学部にVial-Bio Archive System (Air Water社製)を導入し、2003年5月試運転を開始した。2 mlバイアル14,000本の検体を凍結保存でき、バーコードによる検体個別管理、ロボットアームによる自動保管、液体窒素自動供給システム等を備えている。検体収集の速度は当初の想定より低い。検体収集には、患者、ご遺族からのインフォームドコンセントを得ることはもちろんであるが、外科医師グループのモチベーションを高め、協力を得ることが不可欠である。この点が今後の実践的課題である。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

欧米でのヒト関連プロテオーム解析計画は特定臓器または特定の疾患のみを対象とし、発現プロテオミクスに集中している。われわれは発現プロテオミクスと同時に(病的翻訳後修飾を含む)機能プロテオミクスを追求する点で、世界的にオリジナリティの高い研究である。

ROSにより生じたタンパク質カルボニルのプロテオームレベルでの検出は我々が世界に先駆けて達成し、外国グループも我々の方法を採用している。

網羅的に抗体を作出するプロジェクトは、M. Uhlen等を始めとして複数のグループが進めているが、我々の知る限りではすべてゲノム情報をもとに個別タンパク質の一部をペプチドとして作り、それを抗原として抗体を作出する方針である。これで得られた抗体は、タンパク質の翻訳後修飾を検出する道具としては使えない。機能プ



ロテオミクスの道具として抗体を作出するには、多種多様な翻訳後修飾を受けたタンパク質にたいする単クローン性抗体を網羅的に作出することを計画しなければならない。現在のところ経費的な問題（単クローン抗体一つを作るのに100万円以上かかる）と技術的困難さ（抗原精製）のために、機能プロテオミクスに有用な抗体作出を企てているグループは我々以外には存在しないと思われる。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

ROSによる酸化ダメージなどの病的翻訳後修飾がおきると、修飾されたタンパク質は多分散となる。これらのタンパク質は2ではスポットを結ばず、バックグラウンドに広がってしまう。また、質量分析法は極めて敏感にこの差異を検出するため、かえって研究が困難になる。病的修飾を特異的に検出するプローブの開発を進めることが必要である。

#### 〈今後の課題〉

タンパク質機能状態を検出するためのモノクローナル抗体の網羅的獲得を引き続き進める。2004年春から現在までに約700種のモノクローナル抗体を獲得してきた経験から判断すると、テクニシャン一人をこの作業に専念させると年間1000種程度の抗体を獲得することは十分可能である。現在のボトルネックは、獲得した抗体の中から疾患診断に使える有用抗体を絞り込むプロセスである。現在、タンパク質アレイヤー製造技術を有するメーカーと連携し、有用抗体絞り込みのための自動化機械を設計中である。

ゲノム分野と比べると、プロテオーム分野でのバイオインフォマティクスは遅れている。我々が進めている網羅的抗体作成プロジェクトでどれくらいのデータを解析するべきか試算してみよう。年間1000種の抗体をヒト血清100人分（健康者50人分、患者50人分）を使って疾患10種類にたいして有用性を判定すると仮定する。抗体の反応性を判定するのに血清または抗体濃度を5段階でチェックするものとするれば、年間5 x 10<sup>6</sup>個のデータに対して多変量解析を行う必要がある。そのためのプログラムの開発を急ぎ、データ解析能力を引き上げる必要がある。多重蛍光標識ウェスタンブロッティングのために量子ドットを使うことは有力ではあるが、量子ドットに抗体を化学結合するための条件がまだ最適化されていない。昨年、産総研発ベンチャーで量子ドットを作るメーカーとこの問題で話し合った。今後連携を強め、量子ドット利用法の最適化を進めたい。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文／プロシーディング

- 1) 0303191428  
Oh-Ishi, M., Ueno, T., Maeda, T. Proteomics method detects oxidatively induced protein carbonyls in muscles of a diabetes model Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) Rat, *Free Radic. Biol. Med.*, 34, 11-22 (2003).
- 2) 0303191441  
Oh-Ishi, M., Maeda, T. Separation techniques for high-molecular-mass proteins, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 771, 49-66 (2002).
- 3) 0303281008  
Tanaka, T., Sugai, M., Kobayashi, K., Kataoka, M. and Kohno, T., Complete assignments of the 1H, 13C, and

15N resonances of the DNA binding domain of the TraR protein. *J. Biomol. NMR* 23, 161-162 (2002).

- 4) 0404091905  
前田忠計、大石正道、上野剛、小寺義男. 糖尿病ラット筋肉における酸化傷害タンパク質の検出. *J. Mass Spectrom.* 51, 509-515 (2003).
- 5) 0404091911  
大石正道、小寺義男、前田忠計. 遺伝性疾患モデル動物を用いた疾患プロテオーム解析. *J. Mass Spectrom.* 51, 516-523 (2003).
- 2) データベース／ソフトウェア
- 3) 特許など
- 1) 特開2005-80524 「前立腺癌マーカーポリペプチド、該ポリペプチドに対する抗体、及び該ポリペプチドを利用した前立腺癌の診断方法」
- 2) 特開2005-291836 「標的物質濃縮用機能性タグ、及び該機能性タグの使用方法」
- 3) 特開2005-315688 「酸化傷害タンパク質解析用タグ、及び該タグを用いる酸化傷害タンパク質の検出方法」
- 4) その他  
データベース登録済み (0404091943)
- 1) 大石正道、小寺義男、前田忠計. 病態解析へのタンパクレベルでのアプローチ、ゲノム医学解析In ゲノミクス・プロテオミクスの新展開-生物情報の解析と応用- (監修：今中忠行)、エヌ・ティー・エス (2004).  
データベース登録漏れ
- 1) Satoh M, Sato-Haruta E, Omori A, Oh-Ishi M, Kodera Y, Furudate S-I, Maeda T; Effect of thyroxine on abnormal pancreatic proteomes of the hypothyroid rdw rat. *Proteomics* 5, 1113-1124 (2005).
- 2) Kuruma H, Egawa S, Oh-Ishi M, Kodera Y, Satoh M, Chen W, Satoh T, Baba S; High molecular mass proteome of androgen independent prostate cancer. *Proteomics* 5, 1097-1112 (2005).
- 3) Fukutomi T, Kodera Y, Kogo T, Furudate S, Omori A, Maeda T; A simple method for purification of peptides as a basis for peptidome analysis. *J. Electrophoresis* 49, 15-21 (2005).
- 4) Oh-Ishi M, Maeda T; 2-D PAGE of high-molecular-mass proteins. *The Proteomics Protocols Handbook* (ed. Walker JM, Humana Press) 145-149 (2005).

##### 新聞記事

- 1) 読売新聞 (大阪本社版) 2004年4月7日 (13版) 28面、「たんぱく質 くつつかれて“怠け者”に変身」
- 2) 日本経済新聞2005年9月17日付け、「悪性胃がん早期発見、千葉大など血液診断法を開発」
- 3) 日経産業新聞2005年11月4日付け、「前立腺がん検査精度向上、慈恵医大など血液診断技術」
- 4) 日経産業新聞2005年12月16日付け、「糖尿病治療の検出技術 活性酸素で傷ついたたんぱく質、北里大と千葉大 治療薬開発、実用化目指す」