

次世代のプロテオーム解析へ

interview

疾患とタンパク質異常の 関係解明をめざす

横浜市立大学 平野久

special column

他人のやらないことをやれ！

武蔵野大学 今井一洋

高度に学際的な研究としての 疾患プロテオーム研究を目指して

国立がん研究センター 近藤格

PVDF膜電気泳動が拓く プロテオミクス未開拓領域

産業技術総合研究所 松野裕樹



第12回ヒトプロテオーム機構国際会議（HUPO 2013）情報

2013.09

Labcab(ラボキャブ)は“先端研究者の研究上の問題を解決する一助となれば”という想いから、各メーカー協賛のもと、理科研株式会社、株式会社サグブレインにて企画・制作を行っております。毎回テーマを選定、相応しいソリューションを厳選し、研究者の方々に直接冊子を配布しております。

他人のやらないことをやれ！ BE CREATIVE!

「近頃日本に元気がない」と云われる。マスコミによれば、経済・軍事・外交の全てにおいて中国・韓国に敵わず、両国の後塵を拝するばかりという。暗鬱たる気分で元気が出ないのも納得がいく。そしてこのまま行けば、日本は沈没するほかない。

それでは、科学の面ではどうか。幾人かの日本人研究者は世界の先端を走っている。故に国からの莫大な援助を受けている方もいる。このように研究の質の面では周辺諸国に遅れをとっているようには思われなない。しかし、私の狭い範囲での観察ではあるが、現状では、全体の研究者集団としての迫力を感じることは少ない。以前に比べると、日本の研究者全体の気力が落ちてきているのではないかと思う。それは何故か。

ところで、「独自のもの」は、必ずしも歴史を変えるものである必要はない。私の乏しい経験から一つ。ガスクロマトグラフィーでは、不揮発性の物質を揮発性物質に変えて、カラムに注入する。この際、反応に用いた大量の試薬が検出器に感応してしまい、大きなピークとして検出され、目的検出物質はそれに覆われ隠されてしまう。そこで数十年前、試薬のプレカット装置を試作した¹⁾。詳細は既に記した²⁾が、その後暫くして、大量注入装置として島津製作所から改良型が市販された。現在のキャピラリーガスクロマトグラフィー装置の一部に活かされている。

その二。30数年前に、当時としては画期的な、第一、第二アミンの検出用として作製したベンゾフラザン骨格を有する発蛍光試薬NBD-F(発蛍光試薬とは、光を当ててもそれ自身光らないが、同じく光らない物質(分子)と反応すると、光る物質に変化させる高感度試薬)はアミノ酸の分析試薬

40～50年前には、私達の周りには活気に満ちた人達、既成観念に捕われず、何かをしてやろうという人物が多かった。その基は、その人達が中学・高校・大学時代に、「他人のやらないことをやれ！」と何時も言われて育ったことにある。その後彼らは、少なくとも科学の領域に進出した人達は、「他人のやっていない自分独自の研究をしたい」と思い続けてきたのではない。結果は兎も角、その彼らの醸し出す雰囲気は迫力に満ちていた。私も又、そのような迫力に押されて研究してきたような気がする。

ところが現状はどうか。20～30年前頃から、若い人達は中学・高校の教育において、「他人のやることと同じことをすることが美である」と教育されてきたのではない。彼らは大学に入ってもその調子で学び続ける。

として、D-アミノ酸の分離・定量に使用されて来た³⁾が、最近、漸くアミノ酸の蛍光試薬として日本薬局方(第15改正版)に記載された。有用性を認めてもらうには時を要する。

世の中にそれ自身に蛍光を有する蛍光試薬はたくさんある一方で、NBD-Fのような発蛍光試薬は未だ数少ない。我々は分子の骨格が小さく化学反応に有利であり、長波長に励起・発光波長を有するベンゾフラザン骨格を採用し、創成してきた⁴⁾。

新分析化学の提案

分析化学とは、物質(分子)の検出法と定量法に関する理論と技術について研究する化学の一分野であり、諸々の自然科学研究のための検出法・定量法を提供しそれらを支える学問とされている。そのため従来、分析化学者は測定対象とする物質(分子)を如何に検出・定量するかに力を注いできた。その結果、実用場で実際

武蔵野大学 薬学研究所
プロテオアナリシス客員研究部門

今井一洋

彼らは、他人のやることをそのまま追従するので、全体に迫力が欠けてくるのである。その雰囲気が、多くの研究者の間にも蔓延してきているのではない。「自分独自のことをやるよりは、他人のやることと同じことをすることが美である」という雰囲気のもとで、名の知れた大学教授グループが学術論文の盗作・捏造を平気で行うようになる。これは由々しき問題である。

研究者が、絶えず「他人のやらないことをやる」という意識を持ち、「自分独自の研究」をするようになれば、その属する研究者集団の雰囲気も変わってくる。日本全体の研究に活気が出てくる。是非、そうあって欲しい。波及効果で、研究者集団が日本を元気にすることが出来る。

に使われるためにはどのような工夫・配慮が必要かを考慮せずに、測定法としては新規で面白いが、実際に役に立たない方法が多く発表されていた。しかし、実験科学分野では、創成した検出法・定量法は実用的であるべきであり、ある分子を測定する意義を考えながら検出法・定量法を創るということも必要である。そこで我々は、分子の存在意義を明らかにし、生命機能を解明するための方法を創ることも、分析化学の取り扱う項目に加えたかどうかと考えた。即ち、特に生命に関わる分子(生命関連分子)は、その変動が生命の活動と直接に関係していると考えられるので、その変動を捉えれば、その変動を解析することにより生命を理解できるのではないかと考えた。そこで、「生命機能の解明」、「生命関連分子の検出・定量」、及び「それらの方法の開発」を3本柱とし、これらは互いに関係し同等の関係にあるとし、この分野を生命分析化学(Bio-Analytical Chemistry)と名

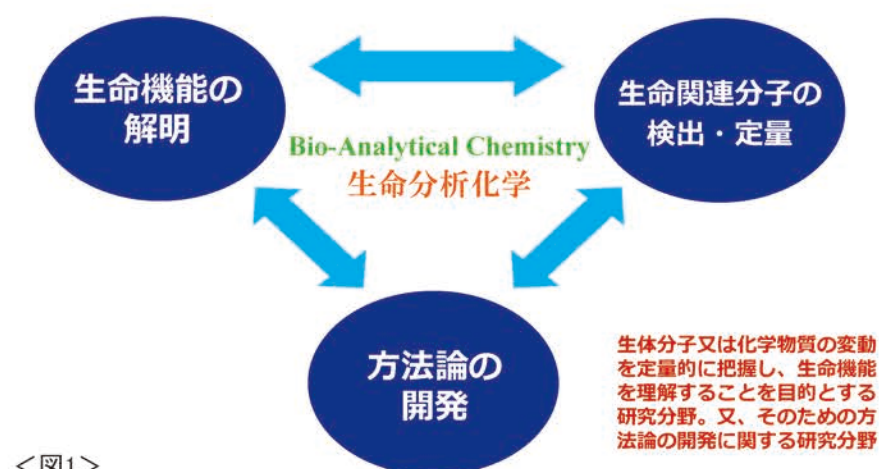
付け、英文(Analytical Sciences, 14, 257 (1998))で発表した。新分野の概念の模式図と説明文を図1に示した。

生命分析化学の内容

生命が誕生し、死に至るまでの行程には様々な現象が見られる。その中でも、生物の個体から、細胞レベルまで、全てに亘って働き生命を維持する生体恒常性維持機能を明らかにするにはどうすれば良いか。まず試みに、個体レベルでの恒常性維持機能を取り上げ実験した例を紹介したい。

ほ乳類の血圧は第一義的に交感神経系によって制御されている。血圧が何らかの原因で下降したとすると、圧受容体がこれを物理的に感知し、交感神経系に伝達されるので、交感神経末端から、ノルエピネフリン(NE)が放出され、筋細胞に届き、筋肉を収縮させる。すると、筋肉の収縮が起こり、血圧は上昇する。上昇するとこれが又、圧受容体に伝達され、交感神経系の興奮は抑えられる。そして、それ以上筋肉が収縮されないように調節されている。このような調節系を知るには、血圧変動量とNE変動量を同時に測定する必要がある。しかし、生体の正常な状態では分子変動が少ないため、分子変動量の捕捉が困難である。そこで、動物に血圧降下剤を投与し、血圧を通常よりも大きく降下させる。すると、既述のように、血圧を元に戻すために、交感神経が興奮し、神経末端よりNEが放出され、過剰なNEが血中に漏れ出てくる。血圧降下剤を徐々に増やしていくと、血中NEも徐々に増えていく筈である。ここで、血圧降下度とNE増加量の関係を求めれば、その生体の交感神経維持機能の程度を知ることが出来る。

ところが、血液中に漏れ出てくるNEを再現性良く測定(定量)するには高感度に精確に測定できる方法が必須である。しかし、実験を始めようとした当時には高感度に精確に測定できる方法が無く、例えば、ラットの血液を一回の測定に1ミリリットル(1 mL)位必要としたが、その採血だけで血圧は一気に上がってしまう。そこで、高感度検出が可能な化学発光検出法と複雑な血液成分からNEを分離でき



＜図1＞

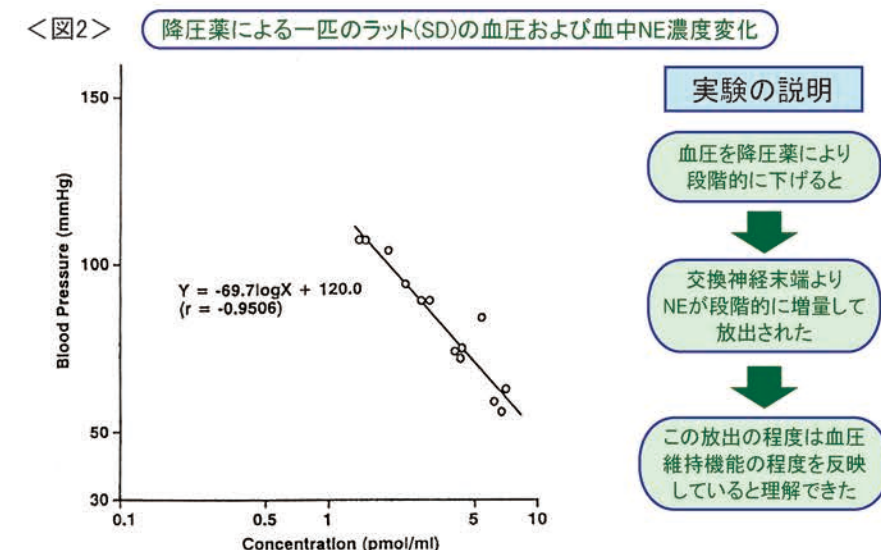
るHPLCとの組み合わせた方法(HPLC-化学発光検出法)を開発し、カテコールアミン類(CA)の超高感度(サブフェムトモル)分離・定量に成功した。10-20マイクロリットル(0.010-0.020mL)の少量の血液で測定可能である⁵⁾。

この方法により得られたNEの濃度を横軸に、血圧を縦軸に目盛ると、降圧薬により段階的に下がる血圧と、交感神経系が働き、神経末端より段階的に増量して放出されたNEが、右肩下がりの直線関係にあることが初めて判明した。この直線の角度が血圧恒常性維持機能を示し、角度が緩やかな場合は維持機能が強力であり、急な場合は維持機能が弱いということが明らかとなった(図2)。

高血圧自然発症ラットでも実験し、正常ラットにおける血圧と血中NE濃度の関係を比べてみたところ、正常ラットに比べ、高血圧ラットの血圧降下度と血中NE増加直線は角度が急であることが分った。これは、高血圧

ラットは交感神経機能が劣っていることを示している。絶えず、高血圧に晒されているため、交感神経機能は衰えているのであろうか。

さらに前記HPLC-化学発光検出法が、NEの代謝物ノルメタネフリン(NMN)も同時高感度定量も可能であったため、NEとNMNの同時定量を行ったところ、高血圧自然発症ラットでNEからNMNへ変換する酵素(COMT)の量が有意に低いことが判明した⁶⁾。即ち、高血圧自然発症ラットでは遺伝的に正常ラットと比べCOMT量が少なく、そのため血中NE量が多く存在し、それにより正常に比べ血圧が高まっているのではないかと推察された。その後の報告によれば、人でもCOMT量低下で血圧異常を示している疾患がある⁷⁾とのことなので、COMT活性化による新規高血圧薬開発の可能性も出てきた。新分野での研究成果が疾患治療への示唆を与えることができたように思う。



＜図2＞

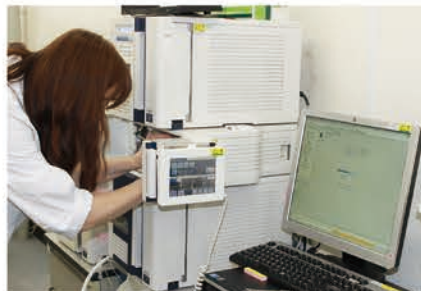
新規プロテオーム解析法

近年、遺伝子の解析は急速に行われ、人の遺伝子の全容は解明されたが、遺伝情報により生成されるタンパク質の解析(プロテオーム解析)は遅れている。その理由はタンパク質の高感度で再現性の良い分離分析法の開発が遅れているためである。

タンパク質は本来無蛍光分子である。これを、先に記したベンゾフラザン骨格を有する発蛍光試薬の一つであるDAABD-CIと化学反応させると蛍光タンパク質に変化する。これを蛍光検出器付きHPLCにて一斉に分離・検出する方法を開発した。即ち、試料Aに還元剤を共存させてDAABD-CIと反応させるとタンパク質中のシステインがDAABD化され、蛍光タンパク質となる。これをHPLCで分離するとクロマトグラムAが得られる。同じようにして、別の試料Bについても反応させてHPLCを行うと、クロマトグラムBが得られ、この両者を比較し、溶出位置が同じで高さの異なるタンパク質ピークがあれば、このピーク高さ比を計算し、タンパク質の存在量比を算出できる。クロマトグラムを見ながら差の有るタンパク質ピーク部分だけを分取し、酵素トリプシンで、加水分解しペプチド混合物にし、



Thermo Fisher
UltiMate3000-LTQ Orbitrap XL



Hitachi
Chromaster

nanoHPLC-タンデム質量分析計(MS/MS)に提供して、各ペプチドのアミノ酸配列解析を行い、データベースと照合し、取り出したタンパク質の名前を決定(同定)できる。

このような方法を、我々は蛍光誘導体化-HPLC-質量分析計の組み合わせという意味で、FD-LC-MS/MS法と名付けた⁸⁾。

マウス脳部位
プロテオーム解析

マウス脳各部位は小さいため、タンパク質解析は困難である。そこで、FD-LC-MS/MS法を使用して、4週齢(幼齢期)、12週齢(成年早期)及び20週齢(成年後期)の、マウス脳幹、大脳皮質、海馬のタンパク質の加齢変動を検討した⁹⁾。得られたクロマトグラム(図3)のそれぞれのピークに対応するタンパク質画分を分取し、酵素水解、LC-MS/MS解析の結果、大脳皮質で15種類のタンパク質の量的変動が見られた。その他の海馬、脳幹についても、それぞれ10種類、3種類の量的変動が見られた。詳細は省くが、大脳皮質においては、青年早期の12週齢で殆どのタンパク質が高濃度になり、以後減衰する。ところが、海馬に於いては、幼齢期に既にタンパク質が高濃度に作られ、以後は減衰を始めるという特徴が見られた。しかし、そのうち一つのタンパク質(Syn2タンパク質)のみが、年齢と共に上昇した。Syn2タンパク質は神経伝達物質の放出制御に関与するタンパク質であり、加齢によるその増

加は神経機能の衰退と深く関与しているのではないかと考えられ、今後詳細な検討が必要である。このようにFD-LC-MS/MS法は、微小なマウス脳部位のプロテオーム解析に使用可能である。

乳がん細胞株の
プロテオーム解析

現在、世界中で乳がん患者が増え続けている。既に幾つかの乳がんバイオマーカータンパク質(がんの生物学的状態の指標となる分子)が明らかにされているが、乳がんの種類が多く、さらに別のバイオマーカーが発見されることが期待されている。

市販の乳がん細胞株(悪性で転移性の乳がん細胞株MDA MB-231、および転移性ではない6種類のがん細胞に対して正常株HMECを対照株とした)を使用して、FD-LC-MS/MS法を用い、転移性及び非転移性ヒト乳がん細胞株タンパク質の定量的な差異解析を行った¹⁰⁾(図4)。その結果、乳がん細胞株にのみ存在し、正常株にないタンパク質が2種類見つかった。細胞増殖に関与するRanBP-1と抗酸化物質peroxiredoxin-1である。この内peroxiredoxin-1はスイスの製薬会社ロッシュが既に特許を出していることが判明したが、RanBP-1については現在迄に乳がんとの関連を報告したものはない。これは治療の標的となるタンパク質やバイオマーカータンパク質候補である。

この他、正常株にしか存在しないタ

ンパク質としてtropomyosin-1(cofflin-1と拮抗してアクチンフィラメントの脱重合を抑制する)が見つかったが、これに関連する細胞骨格の生成・分解に関するRho シグナル系のタンパク質群が、増減するピークとして見つかった。RhoGDI、annexin-2、galec-tin-1、profilin-1の発現量が何れも転移性の細胞株で顕著に多かった。転移性株では、Rho シグナルを介するアクチンフィラメントの重合・脱重合・非繊維化が著しく促進され、細胞が転移・浸潤することを示している。正常細胞株では、annexin-2、galec-tin-1はがん細胞株よりも多いが、tropomyosin-1が特異的に大量に存在していた。これは正常細胞では、上記の脱重合・非繊維化が大きく阻止され、細胞の転移・浸潤が抑制されていることを示している。従って、tropomyosin-1は創薬の標的タンパク質となる。何らかの手段で細胞にtropomyosin-1を増やすことが出来れば、がん細胞の転移は押さえられると考えられる。

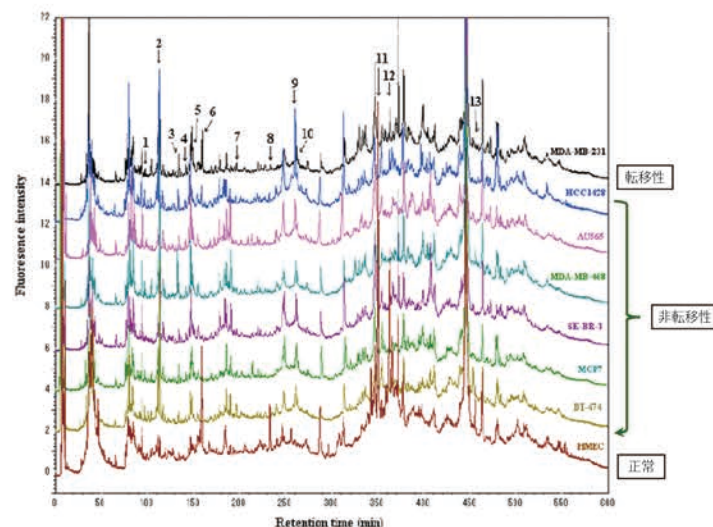
以上、数多くのタンパク質の一斉分析が出来る利点を生かして、FD-LC-MS/MS法によるこれらの結果を細胞骨格の生成・分解という面から眺めると、タンパク質情報伝達経路を考えることが出来る¹⁰⁾。

結腸直腸がん細胞株の
プロテオーム解析

結腸直腸がん患者も年々増加しているが、その効果的な診断法が未だない状態である。そのためのバイオマーカータンパク質発見が期待されている。今回、6種類の結腸直腸がん細胞株を使用して検討した¹¹⁾。

その結果、がん増殖の引き金となる細胞の受容体Her2からの刺激信号を受けて、協調的に量的に増加するタンパク質として新規にFABP5とcyclophilin Aが見つかった。一方で、LDHBの増加とGAPDHが同時に減少することから、転移性の結腸直腸がん細胞では、非解糖系によるエネルギー産生系が大きな働きをしているのではないかと考えられた。

<図4> 乳がん細胞株(7種)及び正常株(1種)



又、減少しているタンパク質として14-3-3 ζ/δ 、cystatin-B、Ran及びthioredoxinが見つかったが、これらは生成されると直ぐに細胞外に放出され血流を巡り、がん細胞が他の場所へ転移するために使われているのではないと思われる。このような結果を基に、がん細胞が増殖し、細胞骨格を破壊し、転移していく過程をタンパク質情報伝達経路として描くことが出来る¹¹⁾。

その他、FD-LC-MS/MS法を用いることにより、C型肝炎ウイルス遺伝子導入によるマウス肝臓内タンパク質変動¹²⁾、 α -synuclein過剰発現による線虫タンパク質変動¹³⁾、IL-6暴露によるタンパク質変動¹⁴⁾、運動負荷による筋肉内タンパク質変動¹⁵⁾、SOD1遺伝子欠損によるニワトリ細胞内タンパク質変動¹⁶⁾等の解析を行うことが出来た。

以上、FD-LC-MS/MS法はプロテオーム解析法として、従来法よりも優れ

最後に

日本に元気がないのは若い人達に元気がないためである。特に研究に志す若い人達には、「何かをやってやろう!」という気魄を示してもらいたい。この一文がそのために少しでも役に立てば幸いである。

皆さん、他人のやらないことをやりましょう!

<参考文献>

- 1) K.Imai, Z.Tamura. Chem.Pharm.Bull., 17, 1076-1077 (1969).
- 2) 今井一洋. ぶんせき. 2003, 99-103.
- 3) K.Hashimoto, T.Fukushima, et al. Arch.Gen.Psychiatry, 60, 572-576 (2003).
- 4) 今井一洋. Dojin News, 83, 3-6 (1997).
- 5) S.Higashidate, K.Imai. Analyst, 117, 1863-1868 (1992).
- 6) K.Imai, M.Tsunoda, et al. Proc.Jap. Acad. 75, Ser.B, 224-227 (1999).
- 7) J.Jordan, A.Lipp, et al., Circulation, 106, 460-46 (2002).
- 8) M.Masuda, M.C.Toriumi, et al. Anal.Chem. 76, 728-735 (2004).
- 9) H.Asamoto, T.Ichibangase, et al. J.Chromatogr. A, 2208, 147-155 (2008).
- 10) K.Imai, T.Ichibangase, et al. Biomed.Chromatogr., 22, 1304-1314 (2008).
- 11) A.Koshiyama, T.Ichibangase, et al. Biomed.Chromatogr. 27, 59-64 (2013).
- 12) T.Ichibangase, K.Moriya, et al. J.Proteome.Res. 6, 2841-2849 (2007).
- 13) T.Ichibangase, H.Saimaru, et al. Biomed.Chromatogr. 22, 232-234 (2007).
- 14) K.Nakata, R.Saitoh, et al. Cytokine. 59, 317-323 (2012).
- 15) T.Ichibangase, K.Imai. J.Proteome.Res. 8, 2129-2134 (2009).
- 16) T.Ichibangase, Y.Sugawara, et al. PLOS ONE, e45483 (2012).
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0045483>
- 17) K.Imai, A.Koshiyama, et al. Biomed.Chromatogr. 25, 59-64 (2011).
- 18) T.Ichibangase, K.Imai, Biol.Pharm.Bull. 35, 1393-1400 (2012).

著者略歴:

今井 一洋(いまい かずひろ)

昭和40年 3月 東京大学薬学部卒業
昭和42年 3月 東京大学大学院薬学研究所 修士課程修了
昭和42年 9月 東京大学大学院薬学研究所 博士課程中途退学
昭和42年10月 東京大学薬学部教務職員に採用
昭和43年 4月 同上助手に昇任
昭和46年 6月 薬学博士(東京大学)取得
昭和52年10月 同上助教授に昇任
平成 5年 8月 東京大学薬学部教授に昇任(平成15年3月まで)
平成 6年度 東京大学総長補佐
平成 9年 7月 東京大学評議員(平成11年3月まで)
平成11年 4月 東京大学大学院薬学系研究科長・薬学部長(平成13年3月まで)
平成15年 4月 武蔵野大学薬学研究所長・教授
平成15年 6月 東京大学名誉教授
平成20年 4月 武蔵野大学 薬学部長・教授
平成21年 4月 武蔵野大学・副学長
平成24年 4月 武蔵野大学薬学研究所・プロテオアナリシス客員研究部門・客員教授
現在に至る



た方法であり、今後、細胞内タンパク質動態の解析からタンパク質情報伝達経路を推測することや、各種バイオマーカー検索に有用な手法となると考えられ、生命分析化学研究の有力な武器になるとと思われる^{17,18)}。