

概論

プロテオミクス10年の軌跡と進路

戸田年総

はじめに

プロテオミクス (proteomics) は、今やゲノミクス (genomics) と並び称せられる位置を獲得し、さらにグライコミクス (glycomics) やメタボロミクス (metabolomics) などを含めたいわゆる『omics』時代の幕開けの火付け役となった。しかしこのプロテオミクスも誕生から10年目の節目を迎え、技術的には大きな発展を遂げた反面、応用研究の分野では思いのほか成果が上がらないといった批判も聞こえはじめている。そこでこれを期にプロテオミクス10年の軌跡を辿り、技術的な発展と残された課題、実際の応用研究の分野で報告されている成果や現在進行中の研究などを検証したうえで、今後の進むべき進路をあらためて考え直してみたい。本特集が、すでにプロテオミクスをはじめておられる諸兄や、これからはじめようと考えている若手研究者の方々に、プロテオミクスのもつ潜在的なポテンシャルやプロテオミクスの限界、さらにそれらをすべて踏まえたうえでの今後の展開への新しい扉を見つけるための一助になれば誠に幸いである。

1 プロテオミクスの誕生

プロテオーム (proteome) という言葉が論文上に登場するのは、10年前の1995年のことである。阪神淡路を大きな地震が襲ったその年の7月、Electrophoresisの16巻7号に掲載されたWasingerらの論文¹⁾に「The principle of 'hierarchical' analysis for the mass screening of proteins and the analysis of microbial genomes via their protein complement or 'proteome' is detailed.」という形で登場している。この論文では、バクテリアの機能ゲノムをその最終産物であるタンパク質を介してマススクリーニング（この場合のマスは質量分析の意味ではない）するための『階層的解析法』として、プロテオーム解析が紹介されているが、実はこのような方法論自体は、その前に刊行された同誌16巻3号において、同じグループのCordwellらが発表した「Cross-species identification of proteins separated by two-

The Decade of Proteomics : the track and a course

Tosifusa Toda : Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology (東京都老人総合研究所老化バイオマーカー研究チーム)

dimensional gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption ionisation/time-of-flight mass spectrometry and amino acid composition.」と題する論文²⁾の中ですでに紹介されていた。しかし、この論文ではまだproteomeという言葉は使われてはいなかった。しかも'95年には、まだproteomicsという言い方はされていなかったのであるが、実質的にproteomicsはこれらの2つの論文からスタートしたとあってよい。これらの論文はシドニー大学のIan Humphery-Smithらのグループとマッコリー大学のKeith Williamsらのグループの共同研究の成果として発表されたものであるが、proteomeという言葉を考え出したのは、当時Williams教授の教室の院生としてこのグループで研究を行っていたMarc Wilkinsであるとされている。同じ年のScience10月号³⁾で、「From genome to proteome: looking at a cell's proteins」と題された記事がニュースとして取りあげられ、さらにNature 12月号⁴⁾には「Government backs proteome proposal」と報じられるなど、いかにインパクトが大きかったか伺い知れる。

最初の頃のプロテオーム研究法は、専ら二次元電気泳動法で分離されたタンパク質をトリプシンでゲル内消化しMALDI-TOF型の質量分析で同定するというものであったが、'98年には、逆相HPLCやキャピラリー電気泳動で分離されたタンパク質をESI型の質量分析計に直結し、インタクトな状態のまま分析を行う方法^{5) 6)}が発表され、'99年にはリジン残基のメチル化などの翻訳後修飾の分析にも利用されはじめた⁷⁾。またこの年、アルツハイマー病患者の海馬のタンパク質の分析への応用⁸⁾が報告され、本格的な疾患プロテオミクスがスタートした。

ちなみにproteomicsというよび方が雑誌上ではじめて登場するのは、スイス連邦動物学研究所のPeter Jamesが'97年11月発刊のQuarterly Reviews of BiophysicsというCambridge大学の雑誌に寄せた総説の中であるが、翌'98年には、Julio Celis⁹⁾やIan Humphery-Smith¹⁰⁾、Leigh Anderson¹¹⁾といった著名な研究者が彼らの総説の中で使いはじめ、一気に広まることとなった。

2 さまざまなプロテオミクス技術の開発

「二次元電気泳動 → インゲル消化 → 質量分析」という原法のプロテオミクスには、二次元電気泳動に本来備わっている「定量的なディファレンシャル解析や翻訳後修飾の検出に向いているという特長」がそのまま生かされていたために、それまでは専らメッセージレベルのディファレンシャルディスプレイで調べられていた発現変動がタンパク質レベルでも同様に行えるようになり、多くの研究者に利用されるようになった。しかしその一方で、再現性に優れた二次元電気泳動パターンが得られるようになるまでにはかなりの熟練を要するために、タンパク質の取り扱いに不慣れな研究者には敷居の高い方法でもあった。そこで、だれでも簡単に成果が得られる方法として、自動化された多段のキャピラリーLC (μ LC) とタンデム型の質量分析計を結びつけ、これにタンパク質のトリプシン消化物を流して分離と同定をオンラインで行うという、いわゆる“ショットガン方式”のプロテオミクス^{12) 13)}が開発された。

しかし、ショットガンプロテオミクスは本来タンパク質の分離と同定のスループットを上げるために開発された方法であり、疾患研究への応用を考える研究者は、むしろ疾患マーカーの探索に不可欠な定量的ディファレンシャル解析を高精度でかつ簡単に行うための技術開発を望んでいたのである。先に述べたように、これはそもそも原法のプロテオミクスで実施



表 これまでに報告されたプロテオミクスに関する主な応用研究例 (技術的な開発に関するものは除いた)

Drug discovery	melanosomal proteins Anticancer drugs targeting neuropeptides in the brain targets of quinoline drugs in purine binding proteome protozoan parasite leishmania cell cycle-related drug targets discovery of drugs targetting mitochondrial oxidative damage	Basrur et al Kovarova et al Skold et al Graves et al Drummelsmith et al Flory and Aebersold Gibson	J Proteome Res. 2003 Electrophoresis. 2000 Proteomics. 2002 Mol Pharmacol. 2002 Mol Cell Proteomics. 2003 Prog Cell Cycle Res. 2003 Sci Aging Knowledge Environ. 2004
Probing protein functions	combination of gene knockout myb-like protein ATPases protein phosphatase 1-binding proteins apoptosis-associated protein heat shock proteins protein phosphatase 1 adenomatous polyposis coli gene-mutant p53-null mice lovastatin-induced protein proteases in colorectal carcinoma Saccharomyces cerevisiae cell wall biogenesis protein kinase C epsilon signaling complexes MAP kinase pathway signaling replicon and luteolin interactions serine hydrolase tropomyosin-5b and maspin sodium transporters in kidney srhSR gene pair of Staphylococcus aureus phosphorylation of Cu/Zn SOD rat activin subunits betaC and betaE Myc oncoprotein function heterogeneous nuclear ribonucleoproteins protein kinase C signaling system 14-3-3zeta as a MAP kinase-activated PK2 substrate analysis of ubiquitin-proteasome effects periribosomal ribonucleoprotein complexes identification of modulators regulated by the E7 oncogene	Dainese et al Denis et al Goffeau Damer et al Brockstedt et al Munchbach et al Alms et al Minowa et al Cole et al Steiner et al McKerrow et al Pardo et al Ping et al Lewis et al Chen et al Kidd et al Zucchi et al Knepper and Brooks Throup et al Csar et al Veida et al Shiio et al Gagne et al Pass et al Powell et al Jin et al Takahashi et al Lee et al	Electrophoresis. 1997 Mol Microbiol. 1998 Acta Physiol Scand Suppl. 1998 J Biol Chem. 1998 J Protein Chem. 1999 Eur J Biochem. 1999 EMBO J. 1999 Electrophoresis. 2000 Electrophoresis. 2000 Electrophoresis. 2000 Mol Med. 2000 Electrophoresis. 2000 Circ Res. 2001 Mol Cell. 2000 Electrophoresis. 2000 Biochemistry. 2001 Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Curr Opin Nephrol Hypertens. 2001 Biochemistry. 2001 Proteomics. 2001 J Mol Endocrinol. 2002 EMBO J. 2002 Biochem J. 2003 Methods Mol Biol. 2003 Mol Cell Biol. 2003 Oncogene. 2003 Mass Spectrom Rev. 2003 Proteomics. 2004
Cell response	Osmoresponsive proteins cyclosporine A nephrotoxicity Interferon gamma regulates peroxisome proliferator on hepatocytes environmental signals in Salmonella typhimurium. inversion stimulation low temperature	Blomberg et al Aicher et al Aboagye-Mathiesen et al Edvardsson et al Deiwick et al Choe et al Kaufmann et al	Electrophoresis. 1997 Electrophoresis. 1998 Electrophoresis. 1999 Electrophoresis. 1999 Electrophoresis. 1999 Electrophoresis. 1999 Biotechnol Bioeng. 1999

図 東京都老人総合研究所プロテオーム共同研究センターのホームページ上にリストアップされている文献リストの一部

される二次元電気泳動に備わっていた機能であるが、「二次元電気泳動は再現性が低い」という批判によって一時的に見過ごされていたものである。これを受け、二次元電気泳動法自体も、熟練者でなくても再現性の高い分離結果が得られるように装置や操作法の改良が進み、スポットの検出と定量化、ゲル間でのスポットのマッチングが簡単に精度よく実施できるように電気泳動のサンプルの前処理法や、画像解析ソフトの改良も行われた。その結果生まれた手法の1つが2-D DIGE法である。この方法は、比較の対象となるサンプル中のタンパク質をそれぞれ異なる波長特性をもつ蛍光色素であらかじめ標識しておき、それらを混合して1枚のゲル板上で二次元的に展開することによって、例えば患者サンプルと健常者のコントロールサンプルのように比較したいサンプルを1枚のゲル板上で流せるので、二次元電気泳動の再現性に自信のない研究者でもディファレンシャル解析のデータが出せるようになった。しかしながらこの方法は、東京都老人総合研究所でわれわれが行っている老化研究のように、長い時間経過でゆっくり変わっていく発現動態の経時変化を追いかけるような研究には不向きである。そこで、そのような場合でもゲル間で簡単にスポットをマッチングすることができ、定量的に統計処理が行えるように画像処理ソフトの改良が行われた結果、現在ではある程度二次元電気泳動に習熟した研究者であれば、2-D DIGE法を用いなくとも、比較的容易にディファレンシャル解析を行うことができるようになってきている。また、リン酸化タンパク質や糖タンパク質を特異的に高感度で染色することのできる蛍光試薬も開発されたことから、翻訳後修飾の研究の面でも大きな飛躍を遂げようとしている。

おわりに

このように誕生から10年の間に、技術的には大きく進歩したプロテオミクスであるが、それと同時に最新の技術を基盤としてさまざまな応用研究が数多く行われてきた。今後の研究の方向性を探るうえでの参考になればと考え、これまでに報告されたプロテオミクスに関する応用研究の一部を一覧表の形にまとめて、東京都老人総合研究所プロテオーム共同研究センターのホームページ（図：<http://www.proteome.jp/TMIG-PCC/>）に載せたのでご覧いただきたい。この表から、これまで主にどのような研究にプロテオミクスが応用されてきたのか、おおよその傾向を読み取っていただけるものと思う。

プロテオミクスは、今後さらに幅広い分野で利用されていくものと思われるが、本特集号では、これからプロテオミクスをはじめようとしておられる若手研究者の方々が、今後のプロテオミクス研究が進むべき方向を見定める際の参考になればとの思いから、現在我が国で最先端のプロテオミクス研究を行っておられる諸先生方に筆をお執りいただき、それぞれの分野において、プロテオミクスで何がどこまでわかったか、これからの課題はどこにあるかといったことを論じていただくことにした。

文献

- 1) Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R., Duncan, M. W., Harris, R., Williams, K. L. & Humphery-Smith, I.: *Electrophoresis*, 16: 1090-1094, 1995
- 2) Cordwell, S. J., Wilkins, M. R., Cerpa-Poljak, A., Gooley, A. A., Duncan, M., Williams, K. L. & Humphery-Smith, I.: *Electrophoresis*, 16: 438-443, 1995
- 3) Kahn, P.: *Science*, 270: 369-370, 1995
- 4) Swinbanks, D.: *Nature*, 378: 653, 1995

- 5) Whitelegge, J. P., Gundersen, C. B. & Faull, K. F. : Protein Sci., 7 : 1423-1430, 1998
- 6) Rohde, E., Tomlinson, A. J., Johnson, D. H. & Naylor, S. : Electrophoresis., 19 : 2361-2370, 1998
- 7) Yan, J. X., Sanchez, J. C., Binz, P. A., Williams, K. L. & Hochstrasser, D. F. : Electrophoresis., 20 : 749-754, 1999
- 8) Edgar, P. F., Schonberger, S. J., Dean, B., Faull, R. L., Kydd, R., & Cooper, G. J. : Mol. Psychiatry., 4 : 173-178, 1999
- 9) Celis, J. E., Ostergaard, M., Jensen, N. A., Gromova, I., Rasmussen, H. H. & Gromov, P. : FEBS Lett., 430 : 64-72, 1998
- 10) Humphery-Smith, I. : J. Protein Chem., 17 : 524-525, 1998
- 11) Anderson, N. L. & Anderson, N. G. : Electrophoresis., 19 : 1853-1861, 1998
- 12) Shen, Y., Tolic, N., Zhao, R., Pasa-Tolic, L., Li, L., Berger, S. J., Harkewicz, R., Anderson, G. A., Belov, M. E. & Smith, R. D. : Anal. Chem., 73 : 3011-3021, 2001
- 13) Davis, M. T., Beierle, J., Bures, E. T., McGinley, M. D., Mort, J., Robinson, J. H., Spahr, C. S., Yu, W., Luethy, R. & Patterson, S. D. : J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 752 : 281-291, 2001

Profile

著者プロフィール

戸田年総：1975年大阪大学理学部卒業。'77年大阪大学大学院理学研究科生物化学専攻修士課程修了。東京都老人総合研究所生化学部助手。'88年大阪大学理学博士学位取得。同研究所分子生物学部門研究員。'88～'89年UCSF客員研究員。'98年東京都老人総合研究所遺伝子情報部門主任研究員。2002年より同研究所プロテオーム共同研究グループリーダー（プロテオーム共同研究センターの研究統括を兼任）。

歴史から最新トピックスまで一気にわかる、**新シリーズ創刊!** 発行 羊土社

バイオ研究マスターシリーズ

3月中旬発行予定

免疫学集中マスター

小安重夫 (慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室 教授) / 編

★
本
シ
リ
ー
ズ
の
構
成
★

- 1 歴史編
各分野の研究, 実験法の歴史をダイジェストに理解!
- 2 レビュー編
重要な項目は詳細に勉強!
- 3 UP TO DATE
国内外の研究や技術開発の最新トピックスを紹介



■B5判 ■150頁 ■2色刷り (一部カラー)
■定価3,990円 (本体3,800円+税5%) ■ISBN4-89706-936-X

第2弾「シグナル伝達集中マスター」の
詳細は1136ページへ→