



特集●Vol.35 No.1 疾患プロテオーム

プロテオミクスによる 疾患病態の解析

戸田年総*

1. はじめに

ヒトゲノム計画が終了し、タンパク質をコードしているヒトの遺伝子は約2万余りであることが明らかとなった¹⁾。これにより、今後は各遺伝子の機能の解明や、疾患との関連を解析する研究に向かうものと思われる。疾患の多くは遺伝的背景の上に生活習慣などの影響が加わって発症するが、このうち単一遺伝子の変異に起因し、保因者では極めて高い確率で発症する疾患がいわゆる遺伝子病であり、複数の遺伝子多型に基づくものの発症には生活習慣などの環境要因が大きく作用する疾患が生活習慣病である。そのため一部の遺伝子疾患では、遺伝子検査によるリスクの予測が可能になりつつある一方で、ウェルナー症候群のDNAヘリカーゼホモログ遺伝子の例に見られるように、原因遺伝子が特定されても発症の予防や治療には直接結びつかないこともある事がわかってきた。このような疾患においては、原因遺伝子によってコードされるタンパク質の機能や、協働的に働く他の分子との相互作用、細胞内における局在性、原因遺伝子産物の量的・質的な異常によって引き起こされる二次的な

影響など遺伝子の解析だけでは得られないタンパク質のレベルの情報を集めることが必要になってくる。このようなポストゲノム時代の状況を背景に1995年に登場した新しいタンパク質解析法がプロテオーム解析²⁾である。スタートした当初は、主に基礎生物学的研究や基礎医学研究で利用されが、その後、臨床医学的な分析にも利用できることがわかり、「疾患プロテオミクス」なるカテゴリーが誕生するに至った。図1に示すように、疾患プロテオミクスに関する論文は2000年頃から増え始め、その後はほぼ直線的に増加の一途を辿っている(2005年の数字は1月から11月までの集計)。近年は総説が減り、代わって原著論文が増える傾向にある。

2. 疾患プロテオミクスのカテゴリー

現在、疾患プロテオミクスと呼ばれているものの中には、診断のためのバイオマーカーを探る「臨床プロテオミクス」の他に、医薬品の開発を目的とする「創薬プロテオミクス」や、発症の機序を解明し疾患の病態を分子レベルで把握するための「病態プロテオミクス」などが含まれる(図2)。もともと「プロテオーム」は、「ゲノム」に対応する機能的な実体として定義された概念であり、特定の生物種

* 東京都老人総合研究所老化ゲノムバイオマーカー研究チーム 研究副部長

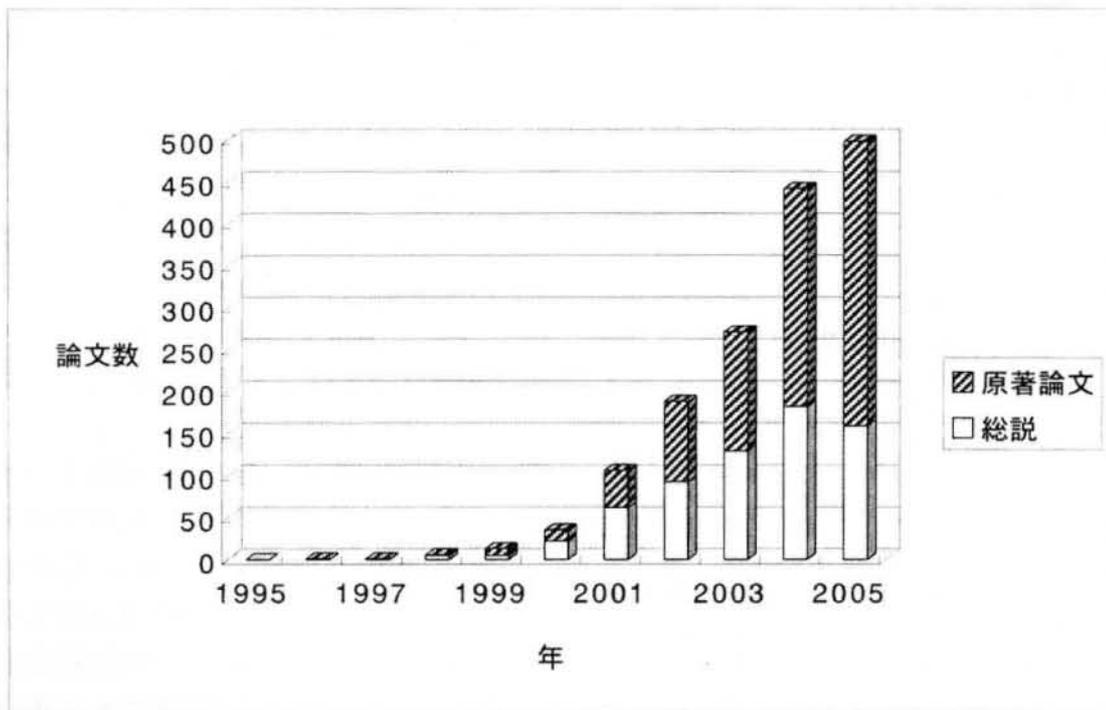


図1 疾患プロテオミクスに関する論文数の推移

2000年頃から論文数が増え始め、ここ数年はほぼ直線的に増加し続けている。2005年は1月から11月までの集計。

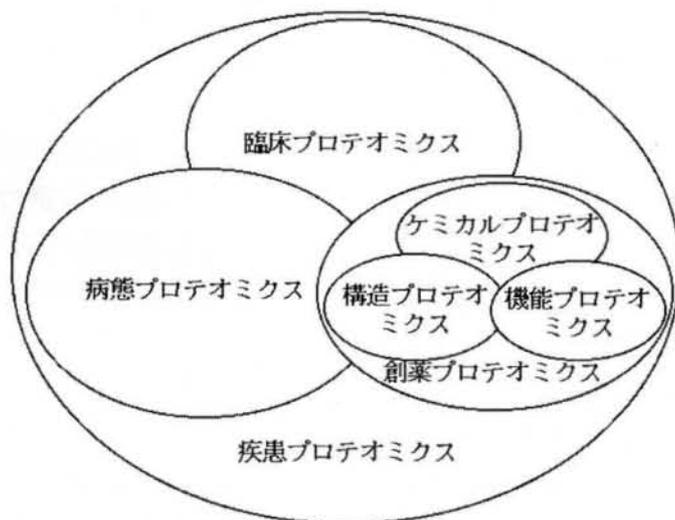


図2 疾患プロテオミクスのカテゴリー

疾患プロテオミクスの中には、検査や診断を目的とする臨床プロテオミクス、疾患の発症機序や原因の特定を目的とする病態プロテオミクス、および治療薬の開発を目的とする創薬プロテオミクスなどが含まれる。

がいずれかの組織細胞で、いつかの時期に発現する「全タンパク質のセット」を意味する。ゲノム解析においては、どの体細胞も基本的には同じ染色体を持っており、「全遺伝子のセット」としてのゲノムの概念は比較的理解しやすく、網羅的な解読も実現可能であった。しか

しプロテオーム解析の場合には、組織や細胞によって発現されているタンパク質が異なり、さらに分化の時期や増殖のサイクル、細胞の置かれた環境などによっても変化するために全容が把握しにくく、全てのタンパク質を完璧に解析し尽くすことは事実上不可能である。その

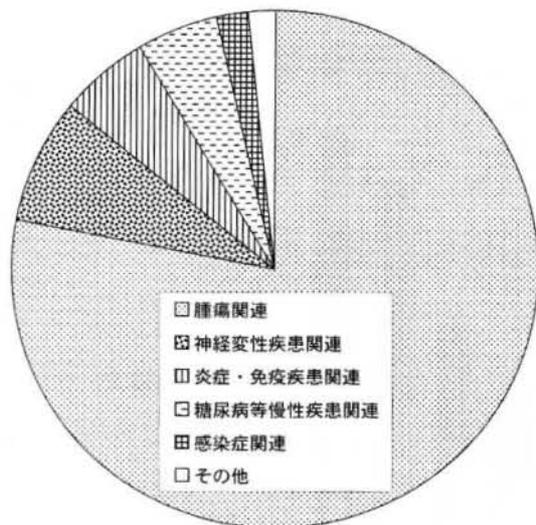


図3 疾患群ごとの疾患プロテオミクス関連の論文数
腫瘍関連の論文が圧倒的に多く、神経変性疾患関連、炎症免疫疾患関連、糖尿病等の慢性疾患関連の論文がそれに続く（2000年から2004年までの論文をPubMedで検索）。

ため近年は、「特定の組織や細胞において、特定の時期に、特定の条件下で発現されている全タンパク質」というように、現実的に解析が可能な狭義のプロテオームが定義されるようになってきている。これを受け、疾患プロテオミクスにおいても、「血漿のプロテオーム」や「尿のプロテオーム」といったように、由来する組織や細胞にはこだわらず、特定の体液中に存在する全タンパク質などもプロテオームと定義されるようになってきている。図3に、これまでに発表された疾患プロテオミクスに関する論文を疾患群ごとに分類した結果をまとめた。腫瘍関係の論文が圧倒的に多く、神経変性疾患や炎症・免疫疾患、糖尿病などの慢性疾患がそれに続く。腫瘍関連の論文が多いのは、サンプルの得やすさや、解析の容易さによるものと思われる。

3. 疾患プロテオミクスにおけるタンパク質の解析技術

前述のように最近のプロテオミクスでは、いたずらに網羅性を追求することは少なくなったが、本来プロテオミクスでは、細胞の粗抽出液のように多種類のタンパク質を含むサンプル

ル中から個々のタンパク質をできるだけ短時間で分離し、サンプル間での発現の違いを定量的に比較分析した上で、それぞれのタンパク質を高感度に同定することを目指して、様々な技術開発が行われてきた。そのようなプロテオーム解析における網羅的なタンパク質分離法として最初に採用されたのが二次元電気泳動法であった。O'Farrell³⁾によって開発された二次元電気泳動法は、プロテオーム解析がスタートした1995年当時、最も分解能の高いタンパク質分離法であり、1枚のゲル板上で数百~数千種のタンパク質を独立したスポットとして分離できる高い分解能を有していた。また二次元電気泳動によって分離されたタンパク質を高速・高感度で同定する方法として採用されたのは、ゲル内消化 (in-gel digestion) と質量分析の組み合わせによるペプチドマスマフィンガープリント法 (PMF: Peptide Mass Fingerprinting) であった。

二次元電気泳動では疎水性の高い一部の膜タンパク質は分析できないという問題や、等電点が極めて高いタンパク質の分析は困難であるという課題があるものの、定量的なディファレンシャル解析を容易に行うことができ、さらにリン酸化や糖鎖の結合などの翻訳後修飾の解析にも有効な手段であることから、現在でも多くの疾患プロテオミクス研究において広く利用されている。その後、全自動化が可能な二次元HPLCを組み合わせたプロテオーム解析法も開発されたが、高分子のタンパク質をそのままの状態では分離しようとすると、二次元電気泳動より遥かに分解能が劣るため、止むを得ずあらかじめトリプシンなどで消化し断片化した上で、ペプチドとして2次元のHPLCで分離しMSで分析するという、いわゆるショットガン方式⁴⁾が生まれた。

疾患プロテオミクスは、診断のためのバイオマーカー探索や、創薬標的の探索といった目的の他、発症のメカニズムや分子病態を解明する目的においても非常に有効な研究手法である。このような研究を行う場合、患者と健常者間の比較分析を行う必要があるが、二次元電気泳動では、スポットの濃さを画像解析することに

よって定量分析を容易に行うことができる。異なるゲル間でこのような比較分析を行う場合、二次元電気泳動の再現性が要求されるが、現在は既製の固定化pH勾配等電点電気泳動ゲルストリップや、既製のSDS-PAGEゲル板を利用すれば、熟練者でなくても再現性の高い二次元電気泳動を行えるようになっている。また、画像解析ソフトも改良され、少々パターンがひずんでいても、確実にスポットのマッチングが行えるようになっている。さらに最近では、比較するサンプル中のタンパク質を Cy3, Cy5 など波長特性が異なる蛍光色素であらかじめ標識し、それらを混合して1枚のゲル上で二次元電気泳動することによって発現レベルの違いを色調の違いとして検出する方法 (2-D DIGE 法)⁵⁾ も行われている。

これに対し質量分析計で定量分析を行うための方法としては、あらかじめ質量の異なる安定同位体でそれぞれのサンプルを標識し、混合して質量分析に掛ける方法 (ICAT法⁶⁾, iTRAQ法⁷⁾, NBS法⁸⁾ など) が開発され利用されている。

4. プロテオミクスによる疾患病態の解析例

東京都老人総合研究所の主要な研究課題は老化のメカニズムを解明することであるが、それに加えて病院や他の研究所、大学等の研究者と共同で様々な疾患のプロテオーム解析も行ってきた。

我々が最初にプロテオミクスの手法を用いて解析を行った疾患の例は、九州大学の神経内科の吉良教授らのグループが熊本大学の荒木令江博士らとの共同研究で行っていた「橋本脳症の患者血清中に見られる自己抗体の標的抗原の同定」であった。そもそも橋本病は甲状腺を標的とする自己免疫疾患であるが、橋本病の患者の極く一部では脳にも炎症が見られ、橋本脳症として区別されている。そのため橋本脳症では、甲状腺を標的とする自己抗体の他に中枢神経組織を標的とする自己抗体も作られているのではないかと考えられていた。そ

こで荒木らは、肺炎で死亡した患者の脳組織タンパク質を、遺族の同意を得て二次元電気泳動で展開し、これに対して橋本脳症の患者の血清でウエスタンブロットを行って、分子量が同じで等電点が異なる一連のタンパク質スポットが自己抗体の標的抗原であることを突き止めた。そこでプロテオミクスの定法に従ってスポットを切り出し、トリプシンで消化した上で我々のラボに同定を依頼してきた。我々は、このトリプシン消化ペプチドをMALDI-TOF型の質量分析計を用いて分析、ケラチン等のシグナルを排除し、カリフォルニア大サンフランシスコ校 (USCF) のグループがインターネット上で公開している検索エンジン (Protein Prospector) を用いてPMF (Peptide Mass Fingerprinting) 法によるデータベース検索を行い、これらの抗原タンパク質はすべて α エノラーゼのアイソフォームであることを突き止めた。さらに市販の抗 α エノラーゼ抗体を用いてウエスタンブロットを行い、これらのタンパク質が確かに α エノラーゼであるということを確認した。この結果を踏まえ、荒木らは大学病院に保存されていた橋本脳症の患者血清を改めて調べ直した結果、95%の橋本脳症患者において抗 α エノラーゼ抗体が陽性であり、橋本脳症では抗 α エノラーゼ抗体によって神経細胞が攻撃を受けているらしいということが明らかとなった⁹⁾。もともと α エノラーゼは解糖系の糖代謝酵素であり、その大部分は細胞室内で機能しているが、神経細胞においては一部が細胞膜にも存在し、プラスミノーゲン受容体として機能していることが報告されており¹⁰⁾、橋本脳症では、神経細胞の膜上に局在するプラスミノーゲン受容体に自己抗体が結合することによって炎症を引き起こしているものと思われる。

第2の実施例は、第21染色体のトリソミーが原因となって発症するダウン症の患者に見られる、心房の形成異常 (心奇形) の原因タンパク質の同定である。この研究は、そもそも鳥取大学の押村研究室で行われていたもので、ヒトの第21染色体をマウスの胚細胞に導入し、妊娠マウスの子宮に戻してヒトの染色体を持つキ

メラ個体を作成し、ヒトのダウン症患者のモデルマウスとして用いて研究を行っていた。このキメラマウスは、行動に異常が認められ、ヒトのダウン症同様に脳の発達異常が起きている他、ヒトでも認められる心奇形が起きており、ヒトのダウン症のモデルとして利用できることが確かめられていた。押村研究室では、このキメラマウスの遺伝子発現の違いをメッセージレベルで解析していたが、有意な差異を検出するには至っていなかった。そこで当時押村研の院生であった西垣竜一氏が研究生として老人研に長期滞在し、我々と共同でプロテオーム解析を行った。キメラマウスの心筋とコントロールマウスの心筋のタンパク質を二次元電気泳動で分離し、プロテオームレベルでディファレンシャル解析を行ったところ、もともとマウスの心筋で発現しているタンパク質の一つが、ヒトの第21染色体を導入されたキメラマウスの心筋でダウンレギュレートされていることがわかった。そこでこのタンパク質スポットをゲルから切り出し、インゲル消化してPMF解析を行った結果、心房特異的に発現するミオシン軽鎖結合性タンパク質 (MLC2a) であることが判明した¹¹⁾。このタンパク質は、心房の形成に重要なタンパク質であることがすでに報告されており¹²⁾、第21染色体のトリソミーが原因であるダウン症は、単にその染色体上にコードされたタンパク質の過剰発現による直接の影響ではなく、遠隔の染色体上にコードされた別のタンパク質の発現が抑制されることによって発症するものであるという意外な分子病態が浮かび上がってきた。

3つ目はグリオーマの解析例である。脳腫瘍は細胞の形や性質によりタイプ分けされるが、その中でもグリオーマが全脳腫瘍の34%と最も多い。ヒトのグリオーマ細胞の特徴の一つとして知られているのは、1番染色体短腕(1p)や19番染色体長腕(19q)の染色体異常であるが、他にDNAメチル化によるインプリンティングの異常も観察されることから、これらの染色体上の遺伝子の発現異常がグリオーマの発症や病態と深く関わっているものと考えられている。

鳥取大学の押村研究室では、長年にわたり様々な角度からヒトのグリオーマ細胞の遺伝子異常を解析してきたが、押村研の平塚らはゲノムレベルでは検出が困難なグリオーマの成立に関わる因子や診断のバイオマーカーをタンパク質レベルで探索するために、我々との共同研究でグリオーマ細胞のプロテオーム解析を行った。切除されたヒトのグリオーマと非癌部の組織からそれぞれタンパク質を抽出し、二次元電気泳動で分離、タンパク質の発現パターンを定量的に比較検討した。その結果、グリオーマで増加するタンパク質を11種、減少するタンパク質を4種見つけた¹³⁾。それらの中で、我々が特に注目をしたのはSIRT2 (sirtuin homologue2) tubulin deacetylaseの減少である。SIRT2は、19番染色体長腕上でしばしば欠損が見られる19q13.2領域にコードされており、遺伝子欠損の表現系の一つと考えられる。またSIRT2は、NAD依存的にチューブリンの脱アセチル化を行う酵素であり、染色体分離を調節する重要な因子である¹⁴⁾。したがってこのタンパク質が減少することによって紡錘糸形成のチェックポイントが正常に機能しなくなることが、グリオーマの成立の要因となっているものと考えられる。

まとめ

もともとは、網羅的なタンパク質解析法として誕生したプロテオミクスであるが、微量のタンパク質を用いて短時間でディファレンシャル解析が行え、さらにタンパク質の同定まで行えるという特徴を活かして、特定の疾患に標的を絞った臨床研究が盛んに行われるようになってきた。今後さらに疾患プロテオミクス研究の底辺が広がれば、多くの疾患において新たな分子病態が明らかになっていくものと思われる。

文献

- 1) Schmutz J, Wheeler J, Grimwood J, Dickson M, Yang J, Caoile C, Bajorek E, Black S, Chan YM, Denys M, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D,

- Garcia C, Gomez M, Gonzales E, Haydu L, Lopez F, Ramirez L, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salazar A, Tsai M, Myers RM: Quality assessment of the human genome sequence, *Nature*, **429**(6990), 365-368, 2004.
- 2) Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I: Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*, *Electrophoresis*, **16**(7), 1090-1094, 1995.
 - 3) O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem*, **250**(10), 4007-4021, 1975.
 - 4) Wu SL, Choudhary G, Ramstrom M, Bergquist J, Hancock WS: Evaluation of shotgun sequencing for proteomic analysis of human plasma using HPLC coupled with either ion trap or Fourier transform mass spectrometry, *J Proteome Res*, **2**(4), 383-393, 2003.
 - 5) Unlu M, Morgan ME, Minden JS: Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts, *Electrophoresis*, **18**(11), 2071-2077, 1997.
 - 6) Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R: Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, *Nat Biotechnol*, **17**(10), 994-999, 1999.
 - 7) DeSouza L, Diehl G, Rodrigues MJ, Guo J, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KW: Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *J Proteome Res*, **4**(2), 377-386, 2005.
 - 8) Kuyama H, Watanabe M, Toda C, Ando E, Tanaka K, Nishimura O: An approach to quantitative proteome analysis by labeling tryptophan residues, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **17**(14), 1642-1650, 2003.
 - 9) Ochi H, Horiuchi I, Araki N, Toda T, Araki T, Sato K, Murai H, Osoegawa M, Yamada T, Okamura K, Ogino T, Mizumoto K, Yamashita H, Saya H, Kira J: Proteomic analysis of human brain identifies alpha-enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy, *FEBS Lett*, **528**(1-3), 197-202, 2002.
 - 10) Nakajima K, Hamanoue M, Takemoto N, Hattori T, Kato K, Kohsaka S: Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane, *J Neurochem*, **63**(6), 2048-2057, 1994.
 - 11) Nishigaki R, Shinohara T, Toda T, Omori A, Ichinose S, Itoh M, Shirayoshi Y, Kurimasa A, Oshimura M: An extra human chromosome 21 reduces mlc-2a expression in chimeric mice and Down syndrome, *J Gastroenterol*, **35**(4), 304-309, 2000.
 - 12) Franco D, Markman MM, Wagenaar GT, Ya J, Lamers WH, Moorman AF: Myosin light chain 2a and 2v identifies the embryonic outflow tract myocardium in the developing rodent heart, *Anat Rec*, **254**(1), 135-146, 1999.
 - 13) Hiratsuka M, Inoue T, Toda T, Kimura N, Shirayoshi Y, Kamitani H, Watanabe T, Ohama E, Tahimic CG, Kurimasa A, Oshimura M: Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene, *Biochem Biophys Res Commun*, **309**(3), 558-566, 2003.
 - 14) North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E: The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase, *Mol Cell*, **11**(2), 437-444, 2003.

Proteomics in Clinical Pathology

Tosifusa Toda*

**Research Team for Molecular Biomarkers, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology*