

## 肺のプロテオーム解析

(Proteome analysis of lung)

戸田 年総 財団法人東京都老人総合研究所遺伝子情報部門主任研究員  
(Tosifusa Toda)

Key words : プロテオーム, 蛋白質, 二次元電気泳動, ポストゲノム

### Summary

ヒトゲノム DNA の解読計画の完了が目前に迫ってきた現在、蓄積された DNA 塩基配列情報を、基礎医学や臨床医学にどのように活かすべきか、次なる課題が突きつけられている。疾患の原因遺伝子やリスクファクターとなる遺伝子多型が同定されただけで発症の機序が明らかになることはまずない。遺伝子と病態との関係を明らかにするためには、遺伝子がコードする

蛋白質の性質や発現動態、翻訳後の修飾、生理活性、組織特異性、細胞内局在性、蛋白質間相互作用、分解システムなどの情報を集める必要がある。プロテオーム解析は、このような蛋白質レベルの情報を収集する目的に最適な手法であり、特に肺組織では、蛋白質の酸化修飾の解析に威力を発揮することが期待される。

### はじめに

あと数年で、ヒトゲノム DNA の全塩基配列が読み尽くされることはほぼ確実な情勢である。その成果として、多くの遺伝子病の原因遺伝子が同定されることが期待されているが、ウェルナー症候群のヘリケースホモログ遺伝子の例にみられるように、原因遺伝子が同定されても、それで直ちに発症の機序が明らかになることは必ずしも保証されてはおらず、むしろ、原因遺

伝子がコードする蛋白質そのものに対する研究が、これまで以上に重要になってくる。また、近年各種慢性疾患や生活習慣病のリスクファクターとしてさかんに研究されている single nucleotide polymorphisms (SNPs) の場合には、発症に関わる因子が単一ではないために、置換されている 1 塩基の情報のみから発症のメカニズムを推定することはことさら難しい。その遺伝子がコードする蛋白質の発現動態、翻訳後の修飾、生理活性、組織特異性、細

胞内局在性、蛋白質間相互作用、分解系など、蛋白質レベルの情報をできるだけ多く集めることが、その遺伝子の多型性と臨床所見を結びつけるカギとなる。このように、膨大に蓄積される遺伝子レベルの情報を無駄なく生かしつつ、個々の蛋白質の生理的な役割や病因的な意味づけを行おうとすると、「プロテオーム解析」は大変有効な研究手段を与えてくれる。

## I プロテオーム解析とは何か

「プロテオーム解析」、あるいは「プロテオミックス」という言葉を耳にするようになったのはここ数年のことであるが、もともとは二次元電気泳動による蛋白質の分離分析技術に端を発する技法であり、二次元電気泳動の高い分離性能が最大のセールスポイントである。これにコンピュータによる画像処理技術が導入されたことによって、ゲル間のパターンの比較が正確に定量的に行えるようになり、「プロテイン・ディファレンシャル・ディスプレイ」法としての位置づけを得るに至った。そしてさらに質量分析 (Mass spectrometry) の技法が加わり、『ペプチドマス・フィンガープリント/データベース検索法』による同定が行われるようになった時点で、これら一連の技法に対し「プロテオーム解析」という新たな名称が付与された。

実際のプロテオーム解析は、以下の手順で行われる。

- ①分析の対象となる組織あるいは細胞から蛋白質を抽出する。
- ②固定化 pH 勾配ゲル (Immobiline DryStrip や IPG Ready Strip など) を用いて一次元目の等電点電気泳動を行う。
- ③薄層ゲルを sodium dodecyl sulfate (SDS) 処理後、固定化 pH 勾配ゲルを平板ゲルの上端に密着固定し、二次元目の SDS 電気泳動を行う。
- ④色素染色法などで、蛋白質スポット

を検出する。

- ⑤スキャナーなどで蛋白質スポットの濃淡を読み取り、コンピュータで画像解析する (スポットの定量分析および複数ゲル間の比較分析)。

ここまでのプロセスが、「プロテイン・ディファレンシャル・ディスプレイ」である。これ以後のプロセスが、「プロテオーム解析」で新たに加わった部分である。

- ⑥特定の蛋白質スポットをゲルから抽出し (もしくは polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写後に)、Lys-C などのプロテアーゼで消化して、得られたペプチド断片の質量 (ペプチドマス・フィンガープリント) を分析する。

- ⑦ MS-FIT などのプロテオーム解析ソフトを用いてプロテインデータベースもしくは DNA データベースを検索し、ペプチドマス・フィンガープリントが一致する蛋白質を探し出す (蛋白質を同定する)。

- ⑧データベースに蓄積された情報をもとに、当該蛋白質の機能を推定する。

多くの場合ここまでの分析で、標的とする蛋白質の検出から同定および機能の推定までの一連の「プロテオーム解析」は完了するが、ペプチドマス・フィンガープリントに基づく相同性検索で一致するものがデータベース上になかった場合 (データベースに未登録であった場合)、多段の質量分析 (MS/MS 分析) もしくは従来のエドマン分解アミノ酸配列分析 (シーケンスタグ分析) を実施し、配列情報に基づく

ホモロジー検索を行う。これでも相同蛋白質が見つからない場合は、新規の蛋白質である可能性が高いので、得られた配列情報などをもとに、cDNA のクローニングなどを行い、遺伝子を同定することになる。

Medline のキーワード検索によると、「肺のプロテオーム解析」に関する原著論文は、1999年にインディアナ大学の Witzmann らによって雑誌 *Electrophoresis* に発表された「ジェット燃料を吸引した時のプロテオームの変化」1件<sup>1)</sup>のみであるが、プロテオーム解析の前身である「肺の二次元電気泳動分析」に関する論文<sup>2)-7)</sup>は少なくとも198件の報告があり、すでに多くのグループが、二次元電気泳動の高分解能を肺の蛋白質の分析に利用しようと試みてきていることがわかる。しかし、マス・フィンガープリントによる同定法が普及する以前の研究では、二次元パターンの比較 (プロテイン・ディファレンシャル・ディスプレイ) で興味深い蛋白質が見つめだされているにもかかわらず、同定にまで至ったものはごく一部にすぎない。今後は質量分析装置の普及によって、蛋白質の同定および機能の推定、さらには発症のプロセスにおける分子病因論的意味づけにまで踏み込んだ研究が増えてくるものと思われる。

## II プロテオーム解析でできること

プロテオーム解析が最も得意とする

分析は、①特定の組織や細胞種において、生理的なプロセスあるいは病理的な変異に伴って発現量が変化する蛋白質を検出し同定すること(加齢に伴う蛋白質発現の変化の分析や、がん特異的な蛋白質の検出同定などはこの応用例)。②薬物などの影響によって組織内で発現量が変化する蛋白質を検出し同定すること(薬理効果の分析、副作用の分析などはこの応用例)。③リン酸化や糖鎖の結合、酸化ストレスによる修飾、異常な分解中間体の蓄積などの分析(発症機序の解明や病態の解析はこの応用例)、である。

これまでに報告された「肺疾患の二次元電気泳動分析」の多くは、肺がんに関するものであるが、肺の疾患ごとに、今後利用が進むことが期待される分析対象は、次の通りである。

遺伝性肺疾患：病因分析・病態分析  
炎症性肺疾患：

感染源分析・病態分析  
原発性肺がん・転移性肺がん：

病態分析  
酸化ストレス性障害：病態分析

肺の細胞は、特に酸素分圧の影響を受けやすく、常に酸化的ストレスに曝されている。また、大気中の環境汚染物質の影響を真っ先に受ける組織でもある。これらの化学的ストレスの影響は、ゲノム DNA の酸化的修飾(8-OH DG の生成など)のほか、細胞膜や細胞質内の蛋白質の修飾という形でも蓄積され、これが各種肺疾患の原因や増悪因子となっている可能性が指摘され

ている。

感染症や外因性の障害は別として、多くの慢性肺疾患の背景には遺伝的素因があることが考えられ、発症のメカニズムや治療方法を解明するために、原因となる遺伝子を探し出す作業が必要であることはいうまでもないが、遺伝的素因をもちながら発症しないケースや、発症までに長い年月の経過が必要である例も多くみられることから、原因遺伝子の発現の制御や、翻訳蛋白質の機能の制御、蛋白質自体の物理化学的性質や生理活性などが明らかにならないと、実際に発症に至るプロセスを解明したことにはならない。こういった場合、疾患の種類や検査の目的によっては、遺伝子発現の分析(トランスクリプトーム解析)や、発現蛋白質の分析(プロテオーム解析)を行うことがより効果的である場合が多い。

私自身は、細胞の老化のメカニズムを明らかにすることを目的として、増殖性細胞の分裂加齢に伴う細胞内蛋白質の変化を分析するために、ヒト胎児肺由来の線維芽細胞のプロテオーム解析を行っており、その結果をデータベース化してインターネット上で情報公開している<sup>8)</sup>が、これは単に細胞の由来が肺であるというだけであって、真の「肺のプロテオーム解析」ではない。慢性肺疾患の病態をプロテオーム解析したという報告例はまだないようであるが、特殊な利用法として、前述のようにジェット燃料のガスを吸引したときの肺障害に伴う蛋白質の変化をプロ

テオーム解析した例が、インディアナ大学の Witzmann ら<sup>1)</sup>によって報告されている。プロテオーム解析で何ができるかを知るうえで参考になると思われるので、少し詳しく紹介する。

彼らは、Swiss-Webster 系のマウスに、JP-8 というジェット燃料のエアロゾルを、 $1,000\text{mg}/\text{m}^3$  および  $2,500\text{mg}/\text{cm}^3$  の濃度で7日間にわたって毎日1時間吸引させ、肺の細胞質蛋白質を二次元電気泳動で分離展開して、コントロール動物のものとの比較を行った。そしてそこでみつかった JP-8 の吸引によって変化する蛋白質をペプチドマス・フィンガープリント法で同定し、アミノ酸配列で確認する作業を行った。その結果、増加するものとして熱ショック蛋白(hsp)84やグタチオン S-トランスフェラーゼ・ホモログ、カルボニックアンヒドラーゼの I 型および II 型などが同定され、減少するものとしては小胞体 ATPase や熱ショック蛋白70、ラミニン受容体蛋白質などが同定された。まだ不明な点が多いが、彼らはこれらの変化を、①蛋白質合成系、②毒性物質の代謝分解系、③組織の超微形態的变化など、いくつかのカテゴリーごとに分類し、実際に観察された病理的知見と、これらの蛋白質の変化を結びつけようと試みている。この論文自体の科学的な評価はともかく、アプローチの方法としては、最もプロテオーム解析らしい利用の仕方がなされているので、他の領域の研究に応用する際の参考になる。

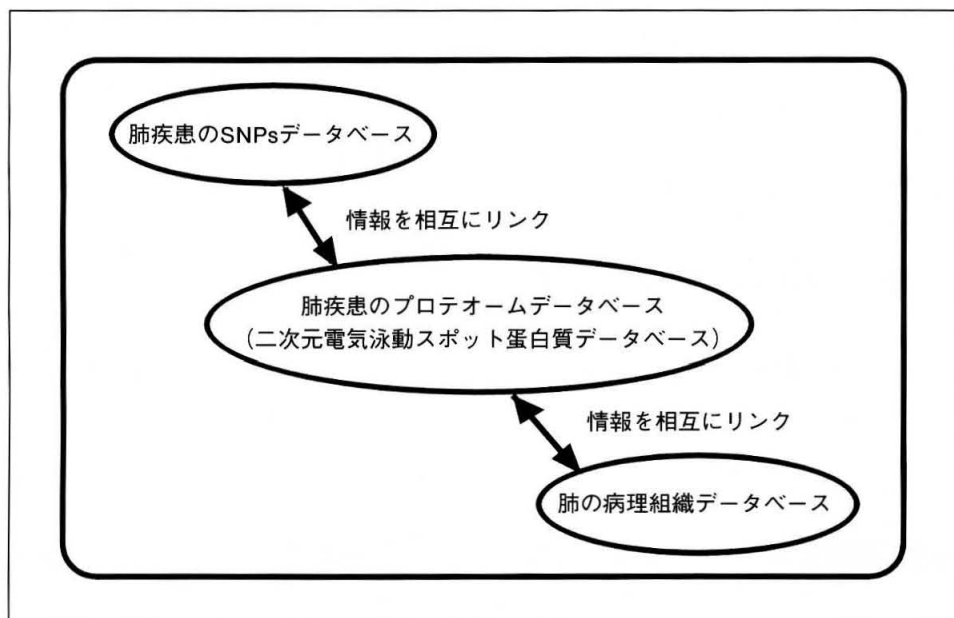


図. 肺疾患のバイオインフォマティクス

将来的には、肺のプロテオーム解析で得られた種々の情報をコアとして、上流のゲノム情報や遺伝子多型、1塩基置換情報、および下流の疾患病態情報、病理組織情報をデータベース化して1つにまとめあげた、統合データベースを利用することによって、総合的に肺疾患のメカニズムを考察する、所謂バイオインフォマティクス(あるいはバイオメディカル・インフォマティクス)の方向に進むことが期待されている(図)。

#### 文 献

- 1) Witzmann FA, Bauer MD, Fieno AM, et al : Proteomic analysis of simulated occupational jet fuel exposure in the lung. *Electrophoresis* 20 (18) : 3659-3669, 1999
- 2) Schmid HR, Schmitter D, Blum P, et al : Lung tumor cells ; a multivariate approach to cell classification using two-dimensional protein pattern. *Electrophoresis* 16 (10) : 1961-1968, 1995
- 3) Lenz AG, Meyer B, Costabel U, et al : Bronchoalveolar lavage fluid proteins in human lung disease ; analysis by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 14 (3) : 242-244, 1993

- 4) Lenz AG, Krombach F, Maier KL : Oxidative stress in vivo and in vitro ; modulation by quartz dust and hyperbaric atmosphere. *Free Radic Biol Med* 12 (1) : 1-10, 1992
- 5) Okuzawa K, Franzen B, Lindholm J, et al : Characterization of gene expression in clinical lung cancer materials by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 15 (3-4) : 382-390, 1994
- 6) Nishio K, Sugimoto Y, Kasahara K, et al : Increased phosphorylation of nuclear phosphoproteins in human lung-cancer cells resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Int J Cancer* 50 (3) : 438-442, 1992
- 7) Endler AT, Young DS, Wold LE, et al : Two-dimensional electrophoresis of proteins in tumors of the lung. *J Clin Chem Clin Biochem* 24 (12) : 981-992, 1986
- 8) Toda T, Kaji K, Kimura N : TMIG-2DPAGE ; A new concept of two-dimensional gel protein database for research on aging. *Electrophoresis* 19 (2) : 344-348, 1998

戸田 年総

昭和52年 大阪大学大学院修了

現在、東京都老人総合研究所主任研究員

専門分野：生化学、老化学、蛋白質化学、プロテオミクス