

疾患プロテオミクス

戸田年総

Tosifusa TODA

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



はじめに

プロテオミクスは、ヒトゲノム計画がいよいよ最終段階に入った1995年にシドニー大学のHumphery-Smithらとマッコーリー大学のKeith Williamsらのグループの共同研究¹⁾の中で誕生し、ペプチドミクスやグライコミクスといった様々な~omics研究の先駆けとなった。誕生から10年が経過し、多くの分野で広く利用されるようになった一方で、「思いのほか成果が上がらない」という声も耳にするようになってきているが、疾患プロテオミクスに関する論文数は図1に示すように、2000年頃を境に著実に増えている。そこで本稿ではこれまでの流れを振り返り、今後疾患プロテオミクスはどのような方向に進もうとしているのかを論じてみたい。



疾患プロテオミクスとは何か

ヒトゲノム計画の成果によって、ヒトの生命はたかだか2万~2万5千の遺伝子によって維持されていることが明らかとなった。²⁾ さらに、これらの遺伝子はすべてが利用されているわけではなく、個々の分化細胞ごとに約10%ほどの遺伝子だけがタンパク質にまで転写翻訳され、細胞の形態形成や生命の維持活動(エネルギー代謝、物質代謝)及び分化細胞としての特化された機能の発現に寄与していると考えられている。プロテオームとは、このような発現遺伝子群の終産物であるタンパク質群を機能的集合体として一括りにした概念であり、プロテオームこそが細胞の形態や機能を直接コントロールしている物質的裏付けである。したがって細胞の分化やがん化(不死化)、環境への適応、老化、疾患病変などの過程で、プロテオームを構成するタンパク質群の

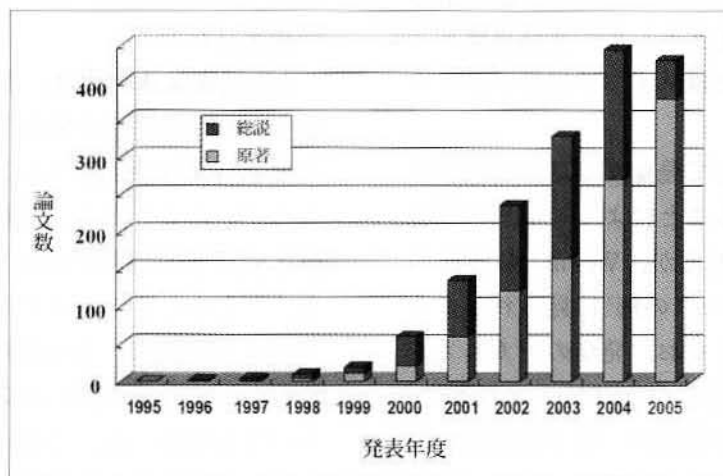


図1 疾患プロテオミクス関連の論文数の推移

PubMed 検索によって確認された論文数。2005 年は1~4 月の間の論文数を元に推定している。

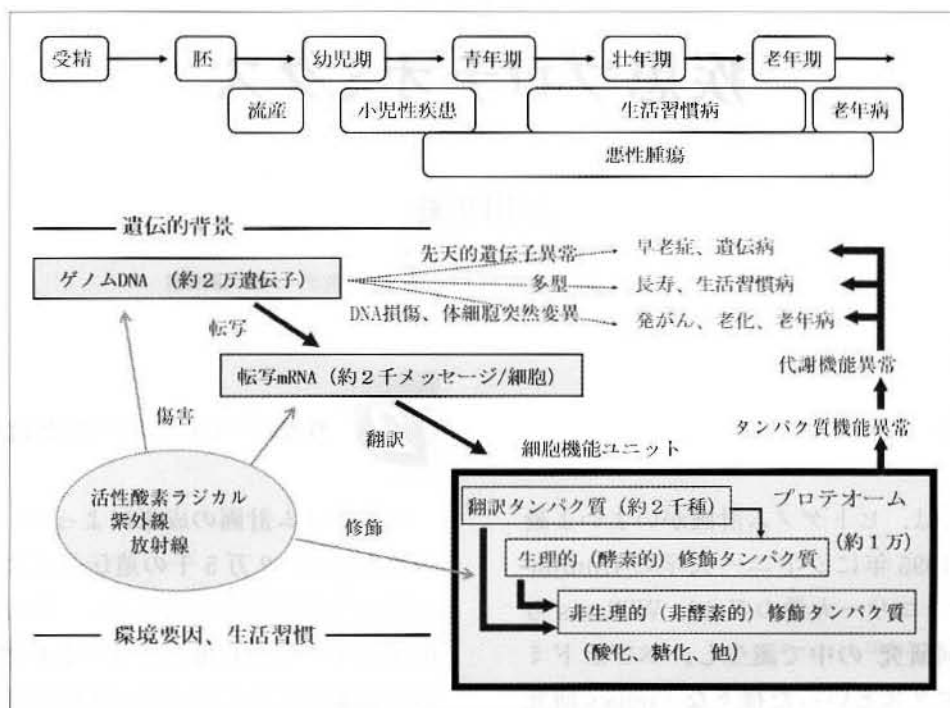


図2 各種疾患の発症に関わる遺伝的背景と環境要因及び生活習慣

疾患によってそれぞれの寄与は異なるが、いずれの場合でも、実際に疾患が発症する段階では、ゲノムから転写翻訳されたタンパク質の機能異常が病態をもたらしているものと考えられている。

種類や個々のタンパク質の発現レベル、翻訳後の修飾、細胞内の局在、分解の半減期などが変化する。そのような変化の中から早期診断に利用できる疾患特異的なバイオマーカーを探索したり、疾病の発症や増悪に関わるタンパク質群を特定し、そこに直接作用する予防薬や治療薬の標的を探索したり、投薬による副作用の作用点を探し出したり、さらに特定の治療法や投薬が個々の患者に有効か否かを事前に把握して治療方針を決定するための薬効指標タンパク質を探索する研究などは、すべて疾患プロテオミクスの範疇に入る。

単一遺伝子の異常によって発症する遺伝病の場合は、原因遺伝子を特定することによって疾患の機序を明らかにできることもあるが、Werner 症候群の RecQ タイプ DNA ヘリケースの例³⁾に見られるように、遺伝子が特定されてもなお、発症のメカニズムの解明や治療薬の開発には至らないケースも多い。まして複数の遺伝子多型を背景に、様々な環境要因や生活習慣、加齢といったファクターが加わって発症する多くの生活習慣病や老年病(図2)では、遺伝子多型の解析だけで創薬の標的を特定したり、機序

を明らかにしたりすることは大変難しい。

3 疾患プロテオミクスの技術的側面

1995 年、Electrophoresis 誌に最初にプロテオームの概念が紹介された論文¹⁾の中で、「2 次元電気泳動で数タンパク質を分離し、ゲル内消化と質量分析によって同定する」というハイスループットな方法が提案された。

2 次元電気泳動法は、さらに 20 年前の 1975 年に O' Farrell¹⁾によって発表され、1 枚のゲル板で数千のタンパク質を分離することができる高い分解能を有していたことから、基礎生物学的研究のみならず臨床病理学的研究においても利用されるようになった。^{5,6)}しかし、プロテオミクスが登場するまでのタンパク質同定は、もっぱらペプチドシーケンサーで行われ、発現が低いタンパク質は同定に至らないケースが多かった。これに対し、プロテオミクスの出現で質量分析による高感度な同定手段が加わり、2 次元電気泳動で検出されたタンパク質の多くが効率良く同定できるようになった。そのため、既に 2 次

元電気泳動を行っていた基礎系のラボで、2次元電気泳動に基づいたプロテオミクスが続々と開始された。実は、我々のラボもその1つである。しかし、それまではほとんど2次元電気泳動を行ってこなかった臨床系の教室や、もっぱらゲノム解析を行ってきた分子生物学系の研究室では、2次元電気泳動の職人芸的操作法をマスターできず、綺麗な電気泳動パターンが得られないという事態が起きてきた。これを解決するために開発された脱2次元電気泳動法の1つが「2次元 HPLC (2-DLC) に基づくプロテオミクス」である。

本来ならば、2次元電気泳動と同様に1次構造を保ったままの状態でタンパク質を分離し、その後にトリプシン消化を行って質量分析を行うべきところであるが、HPLCは高分子のタンパク質に対する分解能が低く、ポストカラムでトリプシン消化を行った場合さらに脱塩が必要になることなどから、あらかじめトリプシン消化を行いペプチド断片化したものを、2次元 HPLC で分離し質量分析を行う「ショットガンプロテオミクス⁷⁾」が考え出された。この方法は自動化が容易であったため、多くの臨床医学系の研究室で疾患マーカーの探索に利用されるようになった。しかし、これにも幾つか課題が残されていた。第1は定量的なディファレンシャル解析が難しいということであり、第2は翻訳後修飾の変化を見逃す恐れがあるということであった。第1の課題は、サンプルごとに異なる安定同位体であらかじめ標識し、両者を混合して質量分析に掛ける方法 (ICAT 法⁸⁾, iTRAQ 法⁹⁾, NBS 法¹⁰⁾) が開発されたことによって解決されたが、第2の課題については、現在もまだ完全に解決されてはいない。

これに対し2次元電気泳動法に基づくプロテオミクスは、操作こそ煩雑であるがこれらの課題が基本的にクリアされていることから、いまだに根強い人気を保っている。そのような2次元電気泳動志向の中で生まれた新しい方法の1つが2D-DIGE 法¹¹⁾である。この方法は、比較の対象となる2種類のサンプルに含まれるタンパク質をあらかじめ2種類の異なる蛍光色素で標識し、これを混合して1枚のゲルで2次元電気泳動を行い、2波長の蛍光スキャナーで画像を取り込んでディファレンシャル解析を行う

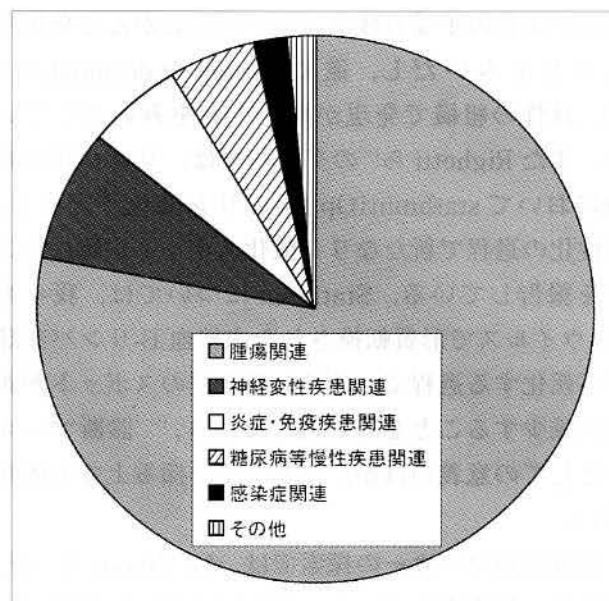


図3 疾患プロテオミクス関連の論文数の分野別の比率

2005年4月の時点でPubMed検索によって確認された論文数を元に推定している。

というものである。あまり再現性を気にしなくても済むことから、特に臨床系の研究グループによって好んで利用され、疾患マーカーの探索に利用されている。このほか、SELDI 法¹²⁾などのプロテインチップ法も開発され、やはり疾患マーカーの探索研究において成果を納めている。

4 疾患プロテオミクスで何が分かってきたか

1995年にスタートしたプロテオミクスであったが、当初は総説や技術開発に関する報告が中心で、疾患研究における成果は少なかった。しかし2000年を境に急速に成果が出始め、報告数は年々増え続けている。分野別に見ると腫瘍マーカーの探索に関するものが圧倒的に多く、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患に関するもの、炎症や免疫疾患に関するもの、糖尿病などの慢性疾患に関するものなどが続いている (図3)。

腫瘍関連のプロテオミクスは、腫瘍の悪性度などを知るための病理組織マーカータンパク質の探索と、腫瘍をスクリーニングするための血液診断マーカータンパク質の探索の2つに大きく分けられる。前者では、Czerwenka ら¹³⁾が、正常組織には見ら

れない成長因子受容体タンパク質が乳がんで発現することをみいだし、逆に maspin や desmoglein 3 は、良性の組織で発現が高いことをみいだしている。また Righetti ら¹⁴⁾のグループは、リンパ腫の細胞において stathmin (Op 18) のリン酸化が上昇し、悪性化の過程で新たなリン酸化スポットが現れることを報告している。Stathmin については、我々も EB ウイルスで形質転換された末梢血 B-リンパ芽球が不死化する過程で、非リン酸化型のスポットが顕著に減少することをみいだしており、¹⁵⁾ 診断マーカーとしての意義のほか、創薬標的を探る上でも興味深い。

血液診断マーカーの探索では、Le Naour ら¹⁶⁾が、興味深い報告をしている。彼らはまず、ヒト乳がん由来細胞株 SUM-44 の抽出タンパク質を 2 次元電気泳動で分離し、これを PVDF 膜に転写、30 名の乳がん患者と 116 名の他のがんの患者血清を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、30 例中 4 例の乳がん患者の血清において特異的に反応するタンパク質を見つけ、RS/DJ-1 であることを突き止めた。さらに彼らは、RS/DJ-1 に対する特異抗体を用いて、SUM-44 細胞は培地中に RS/DJ-1 を分泌していること、及び 38% の乳がん患者血清中で RS/DJ-1 が検出されたことを報告している。

神経変性疾患マーカーの探索では、京都大学の下濱ら¹⁷⁾が、アルツハイマー病患者脳とコントロール脳組織を比較し、多くのスポットで増減をみいだしているが、なかでも著明に増加するスポットの 2 つと、減少するスポットの 1 つはいずれも GFAP と同定されたことから、何らかの修飾やプロセッシングが起きている可能性がある。また Righetti ら¹⁴⁾は、孤発性ヤコブ病患者の脳脊髄液の 2 次元電気泳動で、他の神経変性疾患では見られない 14-3-3 タンパク質スポットが出現することをみいだしており、神経変性疾患の新しい鑑別診断マーカーとして期待がもたれる。

疾患プロテオミクスは、染色体異常によって引き起こされる疾患病態のメカニズムの解明においても有効な手段であることが示されている。例えば、ダウン症では第 21 染色体がトリソミーになっていることから、ダウン症患者に見られる脳の発達異常や

心奇形の原因は第 21 染色体上にコードされたタンパク質の働きにあるものと考えられていたが、鳥取大学の押村教授ら¹⁸⁾は、ヒトの第 21 染色体を持ったキメラマウス(ダウン症モデルマウス)を作成し、我々との共同研究で心筋のプロテーム解析を行った。その結果、心房の形成過程において重要な役割を果たしているタンパク質 mlc 2 a が、ダウンレギュレートされていること(発現が抑制されていること)がみいだされ、これが心奇形の直接的な原因の 1 つであることが分かった。

5 疾患プロテミクスの今後の展望

プロテオミクスの誕生は、それまで個別に行われていたタンパク質研究を「網羅的研究」へと向かわせた。これは、ちょうどヒトゲノム研究が終盤に差し掛かり、すべての遺伝子が解明し尽くされる時期と一致したために、いずれは全タンパク質が解明されるであろうと期待された。しかし、タンパク質の発現コピー数には 10^6 以上の幅があり、しかも翻訳後に様々な修飾を受けていることから、現実的には全タンパク質を調べ尽くすことはできないであろう。それならば疾患プロテオミクスでは、どの程度までの網羅性を追求する必要があるのだろうか。

例えば、ある疾患のバイオマーカーを探索する場合、プロテオミクスでは、その疾患で変化するタンパク質をできるだけ多く拾い上げ、その中から最も有効なマーカーを絞り込むか、もしくは複数のマーカーの組み合わせによって総合的に判断するアルゴリズムを考え出すことになる。したがって、その疾患で変化するタンパク質をすべて見つけ出す必要はない。最近よく耳にする focussed proteomics あるいは targetted proteomics は、もともと技術的には網羅性を追求できるプロテオミクスの手法を利用しながらも、実際には標的を絞り込んで解析を行ったり、最初から標的を特定してプロテオーム解析を行うというものである。例えば、ある疾患で細胞膜のタンパク質が変化していることが分かれば膜分画を調製し、そのタンパク質だけをプロテオーム解析するというのが focussed proteomics であり、ある疾患が自己抗体によるものであると分かれば、標

的となる抗原タンパク質を探しにいくのが targeted proteomics である。

網羅的であるはずのプロテオミクスで網羅性を捨てるのは一見矛盾に思われるが、後者の例の場合、2次元電気泳動で分離された全タンパク質スポットに対し、患者血清中の抗体が反応する標的タンパク質を探索し同定する過程では、網羅的なプロテオミクスと全く同じ分析手法が利用される。研究の効率を上げることが重要であり、標的を絞り込むことができるのであれば、闇雲に網羅的探索を行う必要はない。がんのプロテオミクスの例で取り上げた Le Naour ら¹⁶⁾の乳がんバイオマーカー探索も targeted proteomics の1例である。

疾患のメカニズムを解明するためにプロテオーム解析を行う研究者は、できるだけ微小な変化も見逃したくないと思うものである。しかしながら、ただ網羅的に行えばよいというものではない。ダウン症モデルマウスの例では、第21染色体の影響が出やすいモデル動物をつくり心筋のタンパク質に絞り込んで *mlc 2a* のダウンレギュレーションを見つけ出したが、ほかにも小さな変化を示すタンパク質が多数見られている。それらは、いずれも何らかの形でトリソミーの影響を受けている可能性があり、特に第21染色体上にコードされたヒト由来の発現タンパク質が *mlc 2a* のダウンレギュレーションに関わっている可能性があるため、それらに標的を絞ってさらに詳しく調べる必要がある。

このように、疾患プロテオミクスが目指すべき可及的網羅性は、研究者のこだわり次第でいかようにも変わるものである。探しものが膜タンパク質であれば膜フラクションを、核やミトコンドリアにあると思えばそれらを狙った focussed proteomics を行えばよい。プロテオミクスは、手法的には網羅性を追求できるものであるが、研究の効率を上げるためには絞り込みも必要であり、そこに各研究者のアイデアが生かされる。疾患プロテオミクスに関する研究論文の数は年々増え続けており、今後ますますヒートアップしていくものと思われる。

引用文献

- 1) Wasinger V. C. *et al.*, *Electrophoresis*, **16**, 1090 (1995).
- 2) International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature*, **431**, 931 (2004).
- 3) Goto M., *Mech. Ageing Dev.*, **98**, 239 (1997).
- 4) O'Farrell P. H., *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007 (1975).
- 5) Harrington M. G., Merrill C. R., *Clin. Chem.*, **30**, 1933 (1984).
- 6) Daufeldt J. A., Harrison H.H., *Clin. Chem.*, **30**, 1972 (1984).
- 7) Wolters D. A. *et al.*, *Anal. Chem.*, **73**, 5683 (2001).
- 8) Zhang R. *et al.*, *Anal. Chem.*, **73**, 5142 (2001).
- 9) DeSouza L. *et al.*, *J. Proteome Res.*, **4**, 377 (2005).
- 10) Kuyama H. *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 1642 (2003).
- 11) Unlu M. *et al.*, *Electrophoresis*, **18**, 2071 (1997).
- 12) Kuwata H. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 764 (1998).
- 13) Czerwenk K. F. *et al.*, *Cancer Detect. Prev.*, **25**, 268 (2001).
- 14) Righetti P. G. *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, **357**, 123 (2005).
- 15) Toda T. *et al.*, *Electrophoresis*, **21**, 1814 (2000).
- 16) Le Naour F. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **7**, 3328 (2001).
- 17) Tsuji T., Shimohama S., *Dis. Markers*, **17**, 247 (2001).
- 18) Nishigaki R. *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.*, **295**, 112 (2002).

