

平成22年5月1日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19790397
 研究課題名（和文） 血中シアロ糖タンパクと病態との関連性に関する研究
 —病態シアロームの提唱—
 研究課題名（英文） The Study of Relationship between Blood Sialoproteins and
 Pathological Condition —Proposal for Pathological Sialoproteome—
 研究代表者
 青木 義政 (AOKI YOSHIMASA)
 九州大学・大学病院・主任臨床検査技師
 研究者番号：80419514

研究成果の概要（和文）：新たな病態マーカーの探索を目的として、血中に存在するシアル酸含有タンパク（シアロ糖タンパク）について、二次元電気泳動法により複数の健康人血漿を用いて解析したところ、その候補となり得るタンパクが数種類見つかった。今後、これらのタンパクについて、各種疾患群との比較を行ったり、糖鎖修飾を詳細に解析したりすることで、新たな臨床的意義を見出せる可能性が高く、本研究の高い有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：To explore novel pathological marker proteins, blood sialoproteins in a number of healthy subjects were analyzed by the two dimensional electrophoresis. Several proteins that were able to become the candidates were found. Hereafter, when these proteins are compared with the various group of disease and analyzed the sugar chain modification in detail, new clinical significance may be found. Thus, as for this study, utility is very high.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：血中シアロ糖タンパク、シアル酸、ノイラミニダーゼ、プロテオミクス、
二次元電気泳動、質量分析

1. 研究開始当初の背景

ヒトの血中に存在するタンパクは、少なくとも数千以上になることが知られているが、

そのほとんどは糖鎖が結合している糖タンパクである。糖鎖は核酸、蛋白質に次ぐ第3の生命鎖と呼ばれて久しく、すでに多くの研究分野においてその成果が出てきており、近

年、生命科学の領域では、多くの疾患において糖鎖との関連性が明らかにされてきている。

一般にさまざまな糖鎖において、その非還元末端にはシアル酸（N-アセチルノイラミン酸）が結合しており、このシアル酸の結合がタンパクのマイクロヘテロジェニティ形成に大きく関わっている。そして、このマイクロヘテロジェニティが糖タンパク解析、特に二次元電気泳動での解析を困難にする大きな要因となっていた。

本研究代表者は、これまで病態検査学領域でさまざまな血中の異常タンパクを解析してきた経験と実績を持つが、血中に γ_3 H鎖病タンパクの存在を確認し得た悪性リンパ腫患者症例を経験した。この症例の血中 γ_3 H鎖病タンパクでは、著明なマイクロヘテロジェニティを検出できたが、シアル酸を切断するエキソグリコシダーゼであるノイラミニダーゼによる処理によりこのマイクロヘテロジェニティが消失した。すなわち、この γ_3 H鎖病タンパクに結合する糖鎖の非還元末端には、多量のシアル酸が結合していることを明らかにした。本症例を経験したことでシアロ糖タンパクと病態との関連性に新たな臨床的有用性を見出せる可能性があることをつかんだ。

すでに糖タンパクの糖鎖末端に結合するシアル酸を切断し、その総量を定量分析することが炎症性疾患のマーカーとして臨床応用され今日に至っている。当初、他に有用な炎症マーカーが存在しなかったため、汎用的に測定されたこともあったが、現在、特異性、感度の両面で総シアル酸定量よりも優れたマーカーが登場してきたために、総シアル酸定量の臨床的有用性が薄れつつある。しかしながら、上述のごとくシアル酸の存在によりマイクロヘテロジェニティが形成されることから、シアル酸の結合様式は多様性に富み、さらに、シアロ糖タンパク個々の多様性や動態は一定ではないと考えられるため、それらの変化を観察・解析することで、新たに臨床的有用性をもつシアロ糖タンパクを見出せる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

(1) 血中シアロ糖タンパクの検出法の確立

臨床的有用性をもつ可能性のある血中シアロ糖タンパクを見出すためには、まずはその検出法を確立することが必須である。既存のプロテオミクスの手法を参考にして、①血液の採取・保存方法、②試料の前処理方法、③二次元電気泳動法、それぞれについ

での最適化条件の確立を行う。

(2) 健常者血漿を用いた血中シアロ糖タンパクの探索

(1) で確立した手法を駆使し、「研究開始当初の背景」で述べたごとく、新たな臨床的有用性のあるシアロ糖タンパクを見出すため、まずは複数の健常者血漿を用い、ノイラミニダーゼ処理の有無の違いにより、個々の血漿タンパクの二次元電気泳動像がどのようになっているのかを確認する。併せて、シアル酸の結合様式を踏まえ、候補となるタンパクをスクリーニングする。

3. 研究の方法

(1) 血中シアロ糖タンパクの検出法の確立

① 抗凝固剤の選択

試料として用いる血漿を得る際の抗凝固剤として、EDTA、ヘパリン、クエン酸のどれを採用すべきかを評価した。

② 試料の前処理方法

血中タンパクの8割以上を占めるアルブミン、IgG などのアバンダントなタンパクの除去するために、Agilent 社製の Multiple Affinity Removal Spin Cartridge (MARS) システムを採用し、アルブミン、IgG だけでなく、IgA、フィブリノーゲン、 α 1-アンチトリプシン、トランスフェリン、ハプトグロビンの計7種類のタンパクをあらかじめ除去することとした。

③ ノイラミニダーゼ処理

タンパクへのシアル酸結合の有無をノイラミニダーゼによる酵素的除去前後の試料を用い評価した。

④ 試料の脱塩・濃縮

二次元電気泳動の一次元目として最適な等電点電気泳動を行うために、試料を限外ろ過膜法により十分に脱塩し、脱塩後の試料はアセトン沈澱により濃縮した。

⑤ 二次元電気泳動の一次元目（等電点電気泳動）

血中シアロ糖タンパクを網羅的に解析するため、一次元目の等電点電気泳動の pH レンジを3~10のノンリニアタイプとし、長さ13cmのドライストリップを用いることとした。

⑥ 二次元電気泳動の二次元目 (SDS-PAGE)
二次元目の SDS-PAGE についても網羅的な解析を行うにあたり必要十分な条件として、アクリルアミド濃度を 10%とした。なお、1枚の二次元電気泳動ゲルにアプライするタンパク量は 100 μ g とした。

⑦ タンパクの検出
スポットを感度良く検出するために、高感度コロイド CBB 染色により行った。

⑧ 二次元電気泳動ゲル画像解析
PDQuest Software for 2-D Gel Analysis (BioRad) を用いて解析を行い、血中シアロ糖タンパクの二次元電気泳動マッピング (マスターゲル画像の作成) を行った。

⑨ スポットタンパクの同定
二次元電気泳動により検出されたスポットタンパクは、個々にインゲル消化法によりペプチドに分解し、そのペプチド抽出液を Agilent 社製 1100 シリーズ LC-MSD-Trap により質量分析 (MS/MS) を行った。得られた測定値を Mascot Search (Matrix Science) によりデータベースサーチし、タンパクを同定した。

(2) 健常者血漿を用いた血中シアロ糖タンパクの探索

健常者 27 名分 (男性 11 名、女性 16 名、21~59 歳 (平均 40.4 歳)) の EDTA 加血漿を用いて、血中シアロ糖タンパクの網羅的比較を行った。

二次元電気泳動画像ゲル解析ソフトを用いて非常に数多く存在する血中シアロ糖タンパクを詳細に比較・解析し、さらに、これまで同定 (マッピング) できていなかったスポットタンパクについては、その都度 LC-MS/MS 分析により同定を行った。

4. 研究成果

(1) シアロ糖タンパクの検出法の確立

当初血清を試料として研究を開始する予定であったが、血清は血液を凝固させて得られるものであり、生体内における血中タンパクの動態をより網羅的にとらえるためには、血液凝固というプロセスを介さずに得られる血漿を試料として用いる必要がある。すなわち、血漿を用いることで、血液凝固に伴うフィブリノーゲンをはじめとする血液凝固因子やその他諸因子の分解や損失を回避で

きる。また、世界的な動向として、HUPO ((The Human Proteome Organisation) が主催する HPPP (Human Plasma Proteome Project) を踏まえたうえでも、やはり試料には血漿を用いるべきと考え、血漿を試料としたときの前処理条件を検討した。

血漿を得るためには、血液を採取する際に抗凝固剤の添加が必要となるが、現在、臨床検査に用いられる抗凝固剤は複数種存在し、頻度良く用いられるものとしては、EDTA、クエン酸、ヘパリンがあるため、これら抗凝固剤の種類の違いによる検討を行った。抗凝固剤の違いにより、アバンダントな蛋白の除去効率が異なるという結果が得られた。特にフィブリノーゲンの除去効率には明らかな違いが認められ、EDTA を用いたとき残存率が高いことがわかった。しかしながら、クエン酸、ヘパリンを用いた際においても、必ずしもフィブリノーゲンが完全に除去されるわけではなく、むしろ、安定してフィブリノーゲンが残存すること、検査室の現場において使用しやすいことを考えると、血漿を試料とする場合には、むしろ EDTA が望ましいと判断した。

これまで血漿を試料として二次元電気泳動を行う際、用いる抗凝固剤についてはあまり議論されることは無かったが、我々は臨床検査に応用することを想定しているため、検査室の現場で安定して、再現性ある結果を出すためには、今回の検討は非常に意義があるものと考えている。

(2) 健常者血漿を用いた血中シアロ糖タンパクの探索

① 血中シアロ糖タンパクの二次元電気泳動マッピング (マスターゲルの作成)

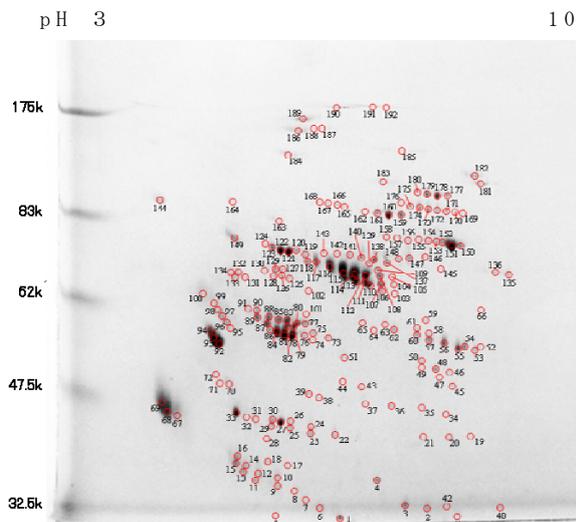
今回確立した手法を用い、最終目標となる疾患特異的な病態解析を行うためには、比較対照とすべき健常者血漿での二次元電気泳動像が必要であり、そこに検出される全てのタンパクスポットがどのタンパクであるのか明確になっていなければならない。さらに、ノイラミニダーゼ処理後の血漿についても処理前と同様に全てのタンパクスポットが明確になっている必要がある。そこで、比較対照の基本となるマスターゲルを作成するために、健常人 1 名の血漿を用い、ノイラミニダーゼ処理前後でのタンパクスポットのマッピングを行った (図 1)。

ノイラミニダーゼ処理なしの血漿では、336 個のスポットタンパクを検出し、内 314 個のスポットが LC-MS/MS 分析により同定可能であった。1 つのタンパクスポットから複数種のタンパクが同定されることもあり、デ

ータベースサーチでのタンパクのヒット総数は 546、種類としては 158 種のタンパクが同定された。このうち、スポットが 2 つ以上存在したタンパクは 78 種、1 つのスポットしか検出されないタンパクは 80 種であった。

一方、ノイラミニダーゼ処理ありの血漿では、272 個のスポットタンパクを検出し、内 261 個のスポットが同定可能であった。データベースサーチによるヒット総数は 389 で、111 種類のタンパクが同定された。2 つ以上のスポットが検出されたのが 69 種、1 つのみのスポットは 42 種であった。

ノイラミニダーゼ (-)



ノイラミニダーゼ (+)

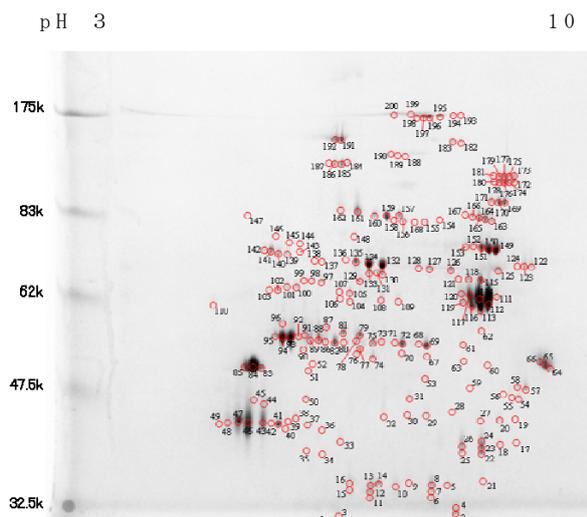


図 1. 二次元電気泳動マスターゲル (同定したタンパクスポット例)

ノイラミニダーゼ処理によりシアル酸修飾を除去することで、検出されるスポットタンパクの数が減っていることから、血中シアロ糖タンパクにおけるシアル酸修飾の多様性が改めて確認できたとともに、病態変化に伴う多様性の変化を詳細に解析することの意義や必要性を再確認できる結果となった。

また、シアル酸修飾を受けているタンパクは、ノイラミニダーゼ処理により、検出される pH の位置が酸性側からアルカリ側に移動しているものの、検出されたタンパクのなかには、Gelsolin などのように、ノイラミニダーゼ処理前後で全く移動度の変化を受けないタンパクも検出された。このことは健康人に限ったことなのか、あるいは、病態によって変化するのか、非常に興味深い。

以上の結果から、ノイラミニダーゼ処理前後での二次元電気泳動像を詳細に比較・解析することで、血中に存在するシアロ糖タンパクの動態把握が可能であり、疾患や病態との関連性を明らかにできる可能性が示唆された。

② 臨床的有用性が可能性がある候補タンパクのスクリーニング

健康者間で量比の変動が著しいタンパクは、患者群との比較を行う際の疾患マーカーとしての候補には成り得ないと考え、まずは健康者群内での比較・解析を行うことにより疾患マーカーの候補タンパクを探索した。

ノイラミニダーゼ未処理ではマイクロヘテロジェニティが確認されるものの、ノイラミニダーゼ処理によりマイクロヘテロジェニティが解消されるタンパクを中心に候補を絞るとともに、少なくとも健康者群では、ノイラミニダーゼ処理前後で移動度の変化がないタンパク、すなわち、病態によってシアル酸修飾を受ける可能性があるタンパクなども候補に加えていった結果、今回のスクリーニングでは、疾患マーカー候補として以下のタンパクが挙げられた。

- Adipocyte plasma membrane-associated protein (BSCv protein)
- Afamin
- Alpha-1-microglobulin (Protein HC)
- Alpha-1B-glycoprotein
- Apolipoprotein D
- Apolipoprotein-L1
- Beta-2-glycoprotein I (Apolipoprotein H)
- Gelsolin
- Glutathione peroxidase 3 (GPx-3)
- Hepatocyte growth factor-like protein (Macrophage stimulatory protein, MSP)
- Histidine-rich glycoprotein

(Histidine-proline-rich glycoprotein, HPRG)

- Leucine-rich alpha-2-glycoprotein
- Zinc-alpha-2-glycoprotein

これらほぼ全てのタンパクは、従来の臨床検査項目として日常的には測定されることはない、血中には微量にしか存在しないタンパクばかりであった。

今後これらのタンパクについて、各種疾患群との比較を行ったり、糖鎖修飾（特にシアル酸修飾）を詳細に解析したりすることで、それぞれのタンパクにおける新たな臨床的意義が見出せる可能性が高い。今回の成果はさらなる発展が期待できるものであり、本研究の高い有用性を物語る結果となった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計2件）

- ① 青木義政、ほか、血漿を試料としたプロテオーム解析の臨床検査応用への取り組み、第57回日本医学検査学会、2008年5月30日、札幌市
- ② 青木義政、ほか、二次元電気泳動による血清シアロ糖タンパクの解析、第56回日本医学検査学会、2007年5月19日、宮崎市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 義政 (AOKI YOSHIMASA)
九州大学・大学病院・主任臨床検査技師
研究者番号：80419514

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：