

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19890230
 研究課題名（和文）FD-LC-MS/MS 法の臨床プロテオミクスへの展開：C 型肝炎モデルマウスへの適用
 研究課題名（英文）Expansion of FD-LC-MS/MS method into the clinical proteomics: application to a mouse model for hepatitis C

研究代表者

一番ヶ瀬 智子 (ICHIBANGASE TOMOKO)
 武蔵野大学・薬学研究所・助教
 研究者番号：40453956

研究成果の概要：以前開発したタンパク質解析法（FD-LC-MS/MS 法）の利便性を活用して、生体試料（肝臓や血液）への適用性を精査し、C 型肝炎の病態関連タンパク質（バイオマーカー）を明らかにすることを目的とした。その結果、2007 年度では、本法の肝臓試料への適用性並びに有用性が示された。2008 年度では、血液試料への応用性を検討したところ、バイオマーカーの有用性を考察することはできなかったが、血液中タンパク質解析の分野で多用される前処理操作法の欠陥を発見し、この前処理法の安易な採用への警告を世界に発信ことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,290,000	0	1,290,000
2008 年度	1,290,000	387,000	1,677,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,580,000	387,000	2,967,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：プロテオーム解析、高速液体クロマトグラフィー、プロテオーム解析用発蛍光試薬、DAABD-Cl、蛍光誘導体化反応、FD-LC-MS/MS 法、ディファレンシャル解析、C 型肝炎モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトを始めとする哺乳類のゲノム解析の著しい進展により、生命は数万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。一方で、タンパク質は発現遺伝子の最終産物であり、生体内で細胞の形態や機能を直接コントロールしている。その機能は発現量やその局在などにより調節を受けているため、疾患の原因や発症のメカニズムの解明

には遺伝子、m-RNA の変化に加え、タンパク質の量的変化の解析が今後ますます重要になってくると考えられている。プロテオーム解析はすでに多くの生命分析科学研究領域で行われており、基礎研究の分野では様々な成果が報告されている。これまで開発された多くのプロテオーム解析法は二次元電気泳動 (2-DE) でタンパク質を分離し、ゲル内消化と質量分析 (MS) により同定するのが主流

であった。しかしながら、2-DE 法による解析は操作が難しく、再現性を得ることが困難であることから、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に基づくプロテオミクス法が開発された。この方法は本来ならば、2-DE 同様、タンパク質の一次構造を保持した状態で一次元もしくは二次元 HPLC で分離し、その後酵素消化を行い MS を行うべきところであるが、これまでの HPLC カラムでは高分子のタンパク質に対する分解能が低く、ポストカラムで酵素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、あらかじめ酵素消化を行いペプチド混合物としたものを、HPLC で分離し、MS を行うショットガンプロテオミクスが考案された。この方法は自動化が容易であることから、バイオマーカーの探索に多く利用されるようになったが、翻訳後修飾の変化やタンパク質異性体の識別が不可能であるため、未だ 2-DE 法が主流である。申請者のグループは先に、2-DE やショットガンプロテオミクスに代表される HPLC を用いたプロテオーム解析法の欠点を克服し、簡便、高感度で再現性に優れた、新しい手法の解析法 (FD-LC-MS/MS 法) を考案し、基礎的研究を行ってきた。この方法はサンプル中のタンパク質のシステイン残基と選択的に反応するプロテオーム解析用発蛍光試薬

(7-chloro-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide): DAABD-C1) でタンパク質を標識した後、HPLC で分離し、蛍光検出することでタンパク質を定量する方法である。DAABD-C1 はタンパク質と反応し、はじめて蛍光を発するため、バックグラウンドが低く、また、MS での検出にも適した側鎖を有することから、タンパク質の高感度検出 (10^{-15} モルレベル) を可能にしている。また、本法ではタンパク質の分離手段として HPLC を用いていることから、簡便で再現性に優れた方法であり、検出はペプチド混合物ではなくタンパク質そのものであるため、異性体などの識別も可能である。近年、タンパク質分離用カラム (Imtakt Co., Kyoto, Japan) が開発されたことにより、これを用いて線虫より抽出したタンパク質を FD-LC-MS/MS 法に適用し、網羅解析したところ、100 種類以上のタンパク質の検出を可能にした。この他、この原理を用いて、妨害成分なしに、線虫由来の低分子チオール化合物を検出している。

このような背景から、FD-LC-MS/MS 法の簡便性、定量性及び高い感度を活用すれば、本手法が臨床プロテオミクスとして有用な分析法のひとつに成りうるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの検討で達成された

本法の簡便性及び高い感度を活用して生体サンプルへの適用性を精査し (臨床プロテオミクス)、本法の有用性を伸展させるとともに、病態関連タンパク質 (バイオマーカー) を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

FD-LC-MS/MS 法の原理図を図 1 に示す。

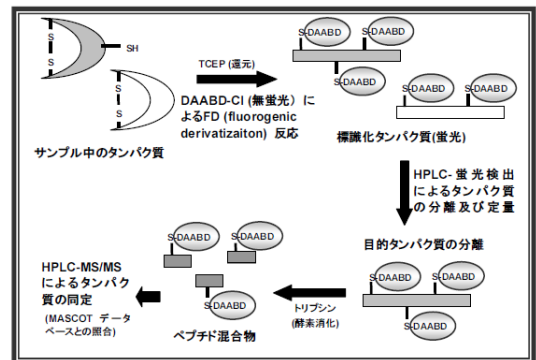


図 1 FD-LC-MS/MS 法の原理図

本研究では FD-LC-MS/MS 法の臨床プロテオミクスとしての適用性及び有用性を広げるため、まず C 型肝炎ウイルス (HCV) のコアタンパクを発現するトランスジェニックマウス (Tg) の肝臓組織を対象に用いて、肝疾患の進行に伴うタンパク質変動を明らかにする。対象とする Tg マウス (オス) の月齢はそれぞれ 6 月齢 (発症初期)、12 月齢 (中期) 及び 16 月齢 (肝腫瘍発症直前) であり、病態組織のステージの違いによる変化を分析する。次に特定タンパク質を血液中でも検出可能かどうかを検討する。研究目的を達成するための研究方法は、大略以下 5 つである。

- (1) 肝臓抽出液中に含まれるタンパク質網羅解析のための分離条件検討
- (2) Tg マウスとコントロール群 (ノントランスジェニックマウス: NTg) の差異分析 (ディファレンシャル解析) 及びタンパク質の同定
- (3) ディファレンシャル解析の結果の統計処理及び比較
- (4) バイオマーカーの候補となるタンパク質検出のための分離条件再構築
- (5) 血液試料への応用

4. 研究成果

2007 年度の成果として下記 3 つの実験を行い、それぞれ結果を得た。

(1) 肝臓抽出液中に含まれるタンパク質網羅解析のための分離条件検討

これまでの HPLC カラムでは、高分子に対する分離能は低かったが、検討の結果、500

本以上のタンパク質ピークを良好に分離することに成功した(図2)。また、本法は、他のプロテオーム解析法と比較して、数十~百倍高感度にタンパク質を定量及び同定することが可能であった。更に、分析法の精度も良好であることから、本法が簡便で、高い感度と再現性を有した方法であることを証明できた。

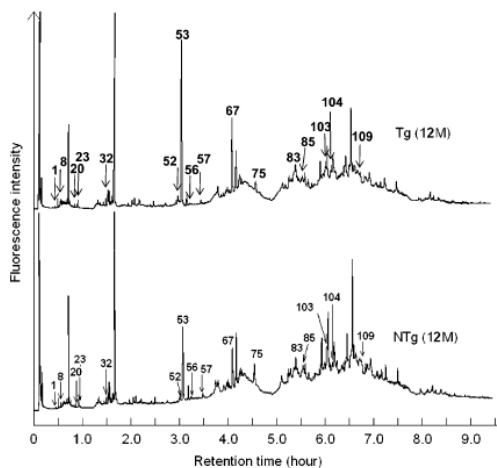


図2 Tg及びNTgマウスの肝臓抽出液中タンパク質のクロマトグラム

(2) トランスジェニック (Tg) マウスとノントランスジェニック (NTg) マウスのディファレンシャル解析及びタンパク質の同定

本研究ではまずC型肝炎ウイルスのコアタンパクを発現するTgの肝臓組織を対象に用いて、肝疾患の進行(発症初期、中期及び肝腫瘍発症直前)に伴うタンパク質変動を明らかにした。具体的には、確立した条件を基に上記3段階の病態ステージでそれぞれTg及びNTgの検体を分析し、Tg/NTg比を算出し、変動するタンパク質の同定を行った。その結果、106種類のタンパク質がTgとNTgの間で変動していることを明らかにした。

(3) ディファレンシャル解析結果の統計処理及び比較

解析の結果、発症初期で、肝細胞がん発生での低下がすでに知られているタンパク質2種類が検出された。この他、中期での体内の酸化を示すタンパク質の発現量上昇や、肝腫瘍発症直前での脂質代謝に関与するタンパク質の有意な発現量の低下等が見られた。これらのタンパク質の変動は、形態学的所見とほぼ一致しており、本法の信頼性を提示できた。

以上のように、2007年度の成果では、本

法の臨床プロテオミクスとしての適用性並びに有用性が示され、更に、バイオマーカーが病態推移とともにどのように変化するかも明らかにすることができた。

2008年度は、FD-LC-MS/MS法の血液試料への応用性を検討するため、前年度肝臓中のプロテオーム解析で使用したマウスの血液試料を対象に用いた。合わせて、前年度に得られたバイオマーカーの候補タンパク質(106種類)の有用性を考察することを目的とし、下記2つの実験を行い、結果を得た。

(1) バイオマーカー候補タンパク質検出のための分離条件再構築

候補タンパク質を迅速に検出するための分離条件を再構築した。前年度に構築した網羅解析の条件では分離に10時間を要したが、再構築した条件では2時間以内に候補タンパク質を分析することが可能となった。

(2) 血液試料への応用

上記条件を基に、FD-LC-MS/MS法を血漿試料へ応用した。その結果、血漿中に大過剰に存在するタンパク質ピークの妨害により、バイオマーカー候補タンパク質を検出することができなかった。そこで、血漿プロテオミクスの分野で最も汎用性の高い市販の抗体カラムで上記妨害成分を取り除く前処理法の導入を試みた。FD-LC-MS/MS法を用いてその使用を検討したところ、除去対象物であるアルブミンのカラムへの吸着がカラム使用回数に比例して減少すること、更に、非特異的吸着が18.3-45.9%存在することを発見し、定量的な解析が困難であることが示唆された。そこで、研究テーマを“定量的血漿プロテオミクスにおけるアルブミン除去カラムの使用評価”に変更し、詳しく解析した。その結果、血漿成分中の疎水性物質が抗体カラムの充填剤表面へ吸着(図3)し、抗体カラム使用限度回数より以前に抗体による特異的吸着から疎水性相互作用による吸着へと変化することが分かった。

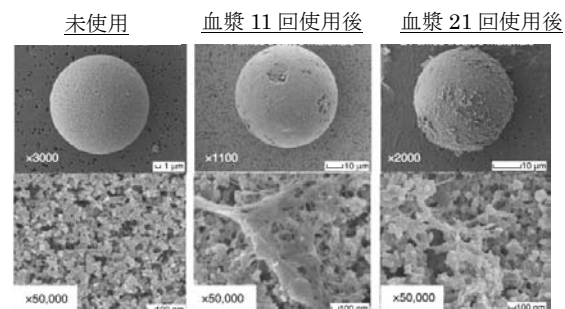


図3 抗体カラム(使用限度回数30回)の充てん剤表面の電子顕微鏡による表面分析

以上のように、バイオマーカー候補タンパク質の有用性を考察することはできなかつたが、血漿プロテオミクスにおいて多用されるアルブミン除去カラムの安易な使用への警告を世界に発信ことができた。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Tomoko Ichibangase, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike, Kazuhiro Imai, Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics, *Biomedical Chromatography*, 23, 480-487, 2009, (査読あり).
- (2) Tomoko Ichibangase, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike, Kazuhiro Imai, A Proteomics Method Revealing Disease-Related Proteins in Livers of Hepatitis-Infected Mouse Model, *Journal of Proteome Research*, 6, 2841-2849, 2007, (査読あり).

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 一番ヶ瀬 智子, 定量的血漿プロテオミクスにおける血漿前処理用抗体カラム使用への提言 / Fluorogenic Derivatization-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method (FD-LC-MS/MS 法) を用いて, 第 129 年会 日本薬学会, 2009 年 3 月 28 日, 京都 (京都大学 (桂キャンパス) 船井哲良記念講堂)
- (2) 一番ヶ瀬 智子, クロマトグラフィーの特性を利用した血漿前処理カラムの使用評価: FD-LC-MS/MS プロテオーム解析法による評価, 第 19 回クロマトグラフィー科学会議, 2008 年 12 月 1 日, 京都 (グランドプリンスホテル京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一番ヶ瀬 智子 (ICHIBANGASE TOMOKO)

武蔵野大学・薬学研究所・助教

研究者番号: 40453956

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者