

## プロテオーム解析

proteome analysis

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

戸田年総 (TODA Tosifusa)

### はじめに

中枢神経系を含むすべての組織/細胞の構造と機能は、基本的にはゲノムにコードされた遺伝子の情報に支配されている。しかし実際に細胞の中で機能しているのは遺伝子そのものではなく、遺伝子情報にもとづいて転写翻訳された最終産物としての蛋白質である。国際コンソーシアムによるヒトゲノム解読計画の成果として、ヒトのゲノムは当初予想された10万より遥かに少ない2万余りであることが判明したが、実際にはmRNAの段階における選択的スプライシングや翻訳後の蛋白質の段階におけるプロセッシングおよび修飾のために、1つの遺伝子(gene)から2つあるいはそれ以上の異なる蛋白質が作られており、ヒトの体全体では10万種を遥かに超える蛋白質が機能しているものと考えられている(図1)。

そもそもプロテオーム(proteome)とはこの10万種以上にも及ぶ全蛋白質の集まりを指す集合名詞であり、遺伝子の全体を意味するゲノム(genome)に対応するものである。プロテオーム解析とは、この蛋白質の集まりを網羅的に解析することであり、一般にはプロテオミクス(proteomics)とも呼ばれている。

### 1. プロテオーム解析で利用される蛋白質の分離分析同定技術

1995年に“Electrophoresis”誌に掲載されたプロテオーム解析に関する最初の論文<sup>1)</sup>では、蛋白質の網羅的な分離分析同定技術として二次元電気泳動と質量分析が採用された(図2)。二次元電気泳動は、1975年にO'Farrell<sup>2)</sup>によって開発された技術であり、当時すでに開発から20年が経過していたが、二次元電気泳動法を上回る高分解能の蛋白質分離がほかに存在しなかったため、プロテオーム解析における蛋白質の網羅的な分離法として選ばれた。二次元電気泳動は、ペプチドに分解することなく蛋白質をそのまま分離することのできる技術

として、現在でも最高の分解能を誇っている。

二次元電気泳動によって分離された蛋白質は、通常CBB染色や銀染色、蛍光色素染色によって検出され、コンピュータ画像解析によってサンプル間の比較分析が行われる。最近では、比較分析する検体中の蛋白質を波長特性の異なる蛍光標識試薬でそれぞれプレラベルし、両者を混合して1枚のゲル中で二次元電気泳動を行い、直接画像解析する方法(2D-differential gel electrophoresis: DIGE法)<sup>3)</sup>も行われている。さらに、二次元電気泳動をまったく行わない新しいプロテオーム解析法としてショットガン法<sup>4)</sup>やsurface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI)法<sup>5)</sup>も利用されている。ショットガン法では、あらかじめトリプシンなどで消化してペプチドに断片化したものを低流速の二次元のhigh performance liquid chromatography (HPLC)で分離し、次に述べる質量分析計にオンラインで連結して蛋白質を同定するというものである。SELDI法は表面に特定の親和性をもたせたプレートにサンプル中の蛋白質を特異的にトラップし、それを直接イオン化して質量分析するというものである。

従来、蛋白質の同定法としては、もっぱらエドマン分解によるN-末端配列分析法<sup>6)</sup>が用いられていたが、二次元電気泳動によって分離された微量の蛋白質を同定するには感度が低く時間もかかり過ぎるため、プロテオーム解析には不向きであった。

これに対しPMF法(peptide mass fingerprint法)<sup>7)</sup>は、蛋白質をゲル内でトリプシン消化(in-gel消化)し、得られたペプチド断片の質量を分析してデータベースを検索することによって同定するというものであり、エドマン分解法にくらべるとはるかに高感度であるうえに、短時間に多くの蛋白質を同定することができる方法であることから、プロテオーム解析に採用された。

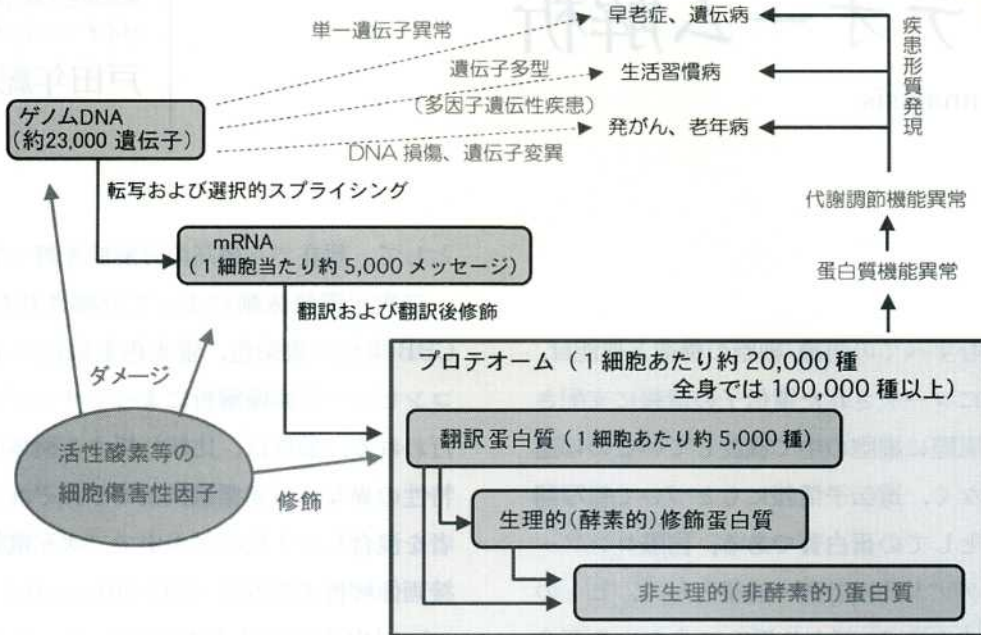


図 1. 疾患における遺伝子と蛋白質のかかわり方  
約 23,000 の遺伝子から転写・翻訳を経て、最終的に 1 細胞あたり約 20,000 種、全身では 100,000 種以上の蛋白質が作られると考えられている。遺伝病も含めすべての疾患は、遺伝子によって作られた蛋白質の機能異常を介して発症する。

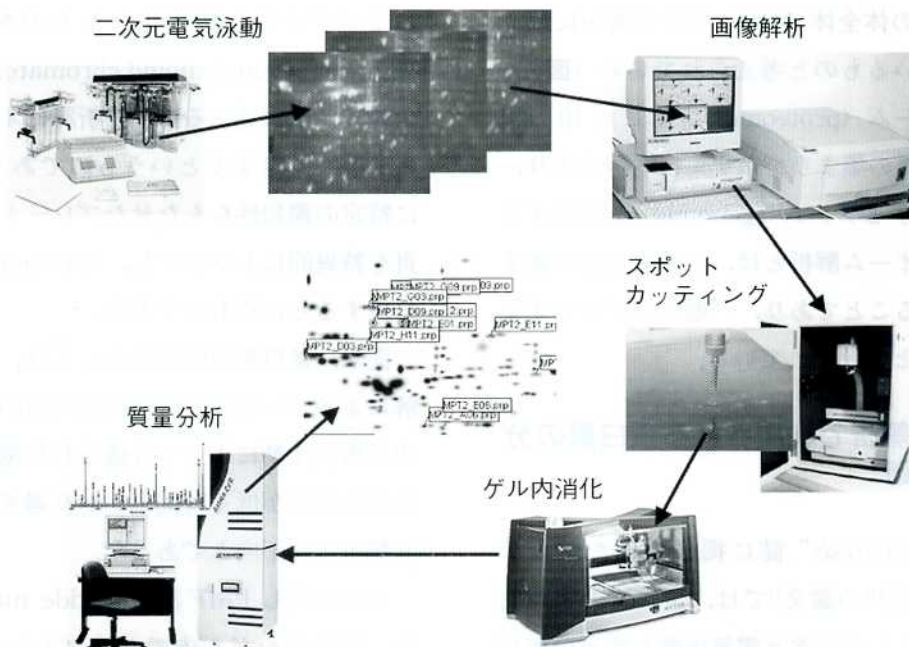


図 2. 二次元電気泳動と質量分析にもとづくプロテオーム解析の流れ  
二次元電気泳動で分離された蛋白質は、画像処理によって定量的に解析された後、ゲルから切り出され、消化されて質量分析にかけられる。

## 2. プロテオーム解析で何がわかるのか

プロテオーム解析では、分析対象の組織や細胞で発現されている全蛋白質を網羅的に分離分析同定することが

できる。したがって、たとえば未分化な前駆細胞と成熟細胞、正常な細胞と腫瘍化した細胞、正常な脳組織と神経変性を起こした脳組織、若い脳組織と老化した脳組織など、あらゆる状態間で蛋白質の変化を解析することが

できる。さらにプロテオーム解析で利用されている質量分析では、リン酸化やユビキチン化、メチル化、アセチル化、ニトロ化、スルホン化、糖鎖の結合などさまざまな翻訳後修飾も検出同定できるので、さまざまな疾患病態における翻訳後修飾の異常性も検出することができる。

### 3. 精神医学とプロテオーム解析

プロテオーム解析は、単に蛋白質の発現レベルの分析だけでなく、翻訳後修飾の分析もできることから、神経発達の初期段階における蛋白質リン酸化シグナルの解析や、神経変性に伴う蛋白質の発現変動、異常な翻訳後修飾、プロテアソーム分解系の異常、蛋白質の不溶化と異常な細胞内蓄積などの探索にも有効な分析手段である。

#### おわりに

基本的にプロテオーム解析は「網羅的な蛋白質解析」である。従来の蛋白質分析では、異常が疑われた項目について個別に検査が行われていたのに対し、プロテオーム解析では多種類の蛋白質が一斉に分析されるので、当初予想もしなかった蛋白質に異常性が見つかる可能性もある。今後、精神・神経疾患においてもプロテオーム解析が実施され、病態と蛋白質異常との関連性に関する情報量が増えてくれば、新たな診断マーカーの発見や治療法の開発につながるものと期待される。

\*\*\*\*\*

#### 文 献

- 1) Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A *et al* : Progress with gene-product mapping of the Mollicutes : Mycoplasma genitalium. *Electrophoresis* **16** : 1090-1094, 1995
- 2) O'Farrell PH : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250** : 4007-4021, 1975
- 3) Zhou G, Li H, DeCamp D *et al* : 2 D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Mol Cell Proteomics* **1** : 117-124, 2002
- 4) Wolters DA, Washburn MP, Yates JR 3<sup>rd</sup> : An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* **73** : 5683-5690, 2001
- 5) Kuwata H, Yip TT, Yip CL : Bactericidal domain of lactoferrin : detection, quantitation, and characterization of lactoferrin in serum by SELDI affinity mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* **245** : 764-773, 1998
- 6) Tschesche H, Dietl T : The amino-acid sequence of isoINHIBITOR K form snails (*Helix pomatia*). A sequence determination by automated Edman degradation and mass-spectral identification of the phenylthiohydantoins. *Eur J Biochem* **58** : 439-451, 1975
- 7) James P, Quadroni M, Carafoli E : Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem Biophys Res Commun* **195** : 58-64, 1993