

プロテオーム解析の医薬品や化粧品開発への応用を目指して

国立大学法人愛媛大学理学部化学科 大学院理工学研究科環境機能科学専攻 しまぎき ようじ 島崎 洋次

ヒトの細胞などに発現しているタンパク質を一式としてとらえ、タンパク質全体を網羅的に調べるプロテオーム解析に関する研究が進展している。この解析技術の発展は電気泳動法やクロマトグラフィーの技術はもとより、質量分析計の基盤技術の進歩により支えられてきている。さらに、このプロテオーム解析は、疾患に関連するバイオマーカーの発見に繋がると共に、生体内の標的分子と作用する医薬品の開発や、細胞保護作用のある分子を増やす化粧品の開発などに繋がる可能性が期待されている。



1 はじめに

2003年にヒトの全遺伝子情報（ゲノム）の解読が終了して以来、遺伝子の産物である生体タンパク質一式を網羅的に解析する研究が行われるようになり、この研究は生命活動を担うゲノムがどのように働いているかの全体像を知ることが目標とするプロテオーム研究として現在でも盛んに行われている。さらに、このプロテオーム研究は、疾患に関連するタンパク質群や、傷んだ細胞を修復する働きを持つタンパク質群を解析する研究へと広がり、医薬品や化粧品開発に繋がってきている。本稿では、プロテオーム研究の基盤研究がどのような方向で医薬品や化粧品開発などの応用分野へと進展しているかについて紹介する。

2 基盤技術としてのプロテオーム解析

生体タンパク質を網羅的に分析する方法として、ボトムアップ型の方法とトップダウン型の方法が知られている。ボトムアップ型の方法では、取り出したタンパク質を2次元電気泳動法などで分離し、分離されたタンパク質をそれぞれプロテアーゼで酵素消化し、質量分析により解析する（図1）。この質量分析計にはイオン源と分析計部があり、イオン源は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI）、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）、電子イオン化法（EI）、高速電子衝突法（FAB）などがあるが、プロテオーム解析では、MALDIとESIが利用されることが多い。一方、分析計では、飛行時間型（TOF）、

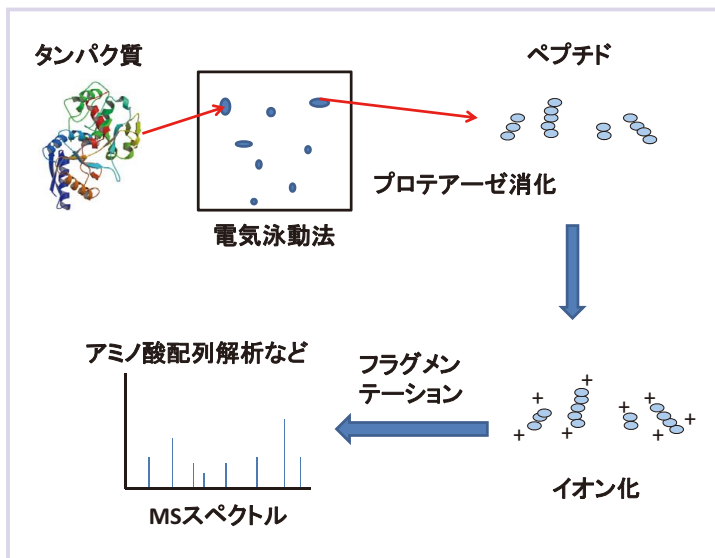


図1 ボトムアップ型プロテオーム解析

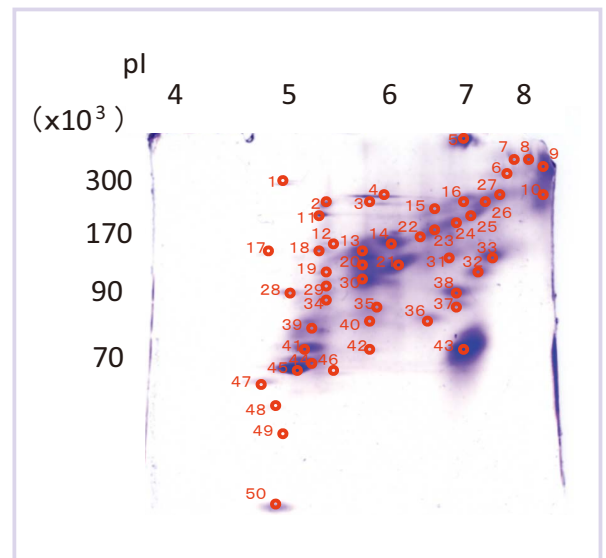


図2 マウス肝臓水溶性タンパク質の2次元電気泳動パターン

イオントラップ型 (IT), 磁場型 (Sector), 四重極型 (Q-pole), フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型 (FT-ICR) があり, 取得する情報の種類により選択する。さらに, TOF を直列に配置したタンデム型を採用することにより, MS/MS 測定を高速化した TOF/TOF も利用されている。このように, 生体から採取したタンパク質を分離し, 次々と質量分析で解析し, 同定することが可能となり, タンパク質の網羅的な分析が可能となってきている^{1)~3)}。図 2 及び表 1-a) b) には, マウス肝臓の水溶性タンパク質を抽出後に, これらを等電点と分子サイズの 2 次元電気泳動法で分離し, 分離されたタンパク質を酵素消化したものを質量分析計で解析してタンパク質同定を行った結果を示す。また, 実際の MALDI-TOF MS や ESI-MS/MS のスペクトル例を図 3-a) b) に示す。スペクトル上の各ピークと理論上のアミノ酸配列を比べ, タンパク質を網羅的に同定していくためには, SWISS-PROT データベースなどのプロテオーム関連のデータベースの構築とそれらを効率的に検索するソフトウェアが必要となる。また,

表 1-a) MALDI-TOF MS によるタンパク質同定結果

Spot No.	Protein identity	Swiss-Prot name or Accession No.	Sequence Coverage	Theoretical pI/ サイズ(10 ³)	Estimated pI/ サイズ(10 ³)
2	ferritin light chain	gil6753914	41%	5.7 / 21	5.5 / 240
11	HSP60 protein	CAA37653	17%	5.5 / 59	5.0-5.2 / 230
15	aldehyde dehydrogenase	DHA1 MOUSE	17%	7.9 / 61	7.2-7.5 / 240
23	betaine homocysteine methyl transferase	AAB87501	30%	8.0 / 45	7.1-7.2 / 170
25			48%		7.9-8.0 / 180
26			34%		8.0-8.1 / 240
27			38%		8.1-8.2 / 250
29	malate dehydrogenase	gil6678918	28%	6.2 / 37	5.0-5.2 / 90
30	transferase	gil17046471	17%	6.9 / 79	6.2-6.5 / 90-100
	fatty acid binding protein 1	gil8393343	79%	8.6 / 14	6.2-6.5 / 90-100
37	carbonic anhydrase III	1071734	50%	6.9 / 29	7.5 / 80
41	selenium-binding protein	gil6677907	12%	6.4 / 53	4.7-5.2 / 75
43	hemoglobin beta chain	HBMS	57%	7.1 / 16	7.5-8.1 / 70-80
45	albumin	gil5915682	32%	5.8 / 71	4.0-5.0 / 70
49	annexin V	CAA13092	23%	4.8 / 36	4.5-4.8 / 60

表 1-b) ESI-MS/MS によるタンパク質同定結果

Spot No.	Protein identity	Swiss-Prot name Accession No.	Theoretical pI/ サイズ(10 ³)	Estimated pI/ サイズ(10 ³)
14	glycogen phosphorylase	AGG00588	6.7 / 98	6.2-6.6 / 150
15	aldehyde dehydrogenase	gil442446	7.8 / 55	7.2-7.5 / 240
19	serum amyloid P-component	gil134198	6.3 / 26	5.3-5.5 / 120
22	sorbitol dehydrogenase	gil2492773	7.0 / 40	7.0-7.2 / 160
26	betaine homocystein methyl transferase	O35490	7.9 / 45	7.1-7.2 / 240
27				
29	malate dehydrogenase	gil6678918	6.5 / 37	5.0-5.2 / 90
30	fatty acid binding protein	gil6015126	9.1 / 14	6.2-6.5 / 90-100
31	fructose bisphosphatase 1	gil9506589	6.5 / 37	7.2-7.5 / 140
32	carbonic anhydrase III glutathione S transferase	P16015 gil227502	7.9 / 30 5.7 / 11	8.0-8.2 / 100
33	glutathione S transferase	gil93690	7.8 / 25	8.3-8.5 / 130
37	carbonic anhydrase	AAG22029	7.4 / 30	7.9-8.1 / 85
39	selenium binding protein	P17563	6.4 / 53	5.0-5.1 / 80
45	albumin	gil5915681	5.8 / 71	4.0-5.0 / 70
49	annexin	gil6753060	4.7 / 36	4.5-4.8 / 60

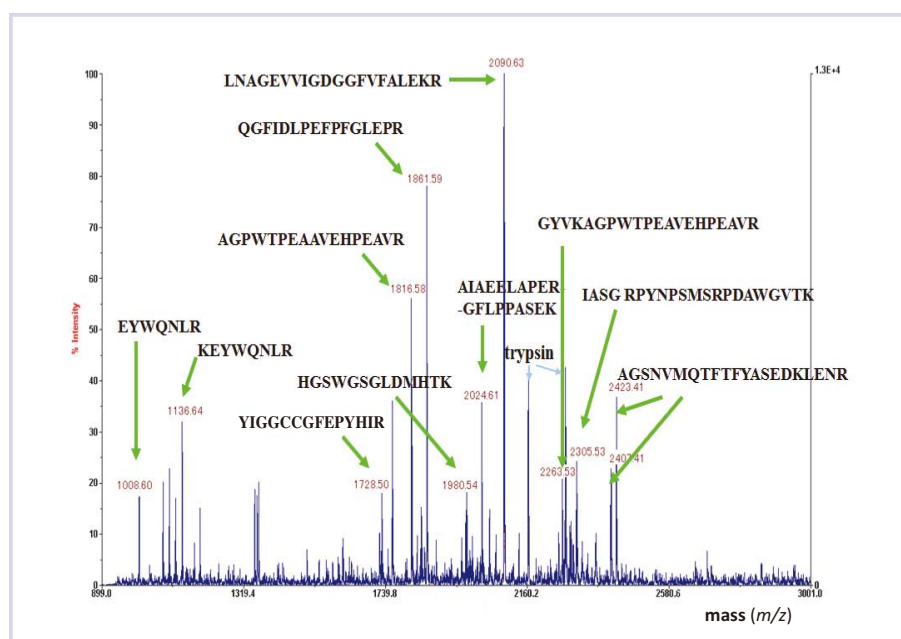


図 3-a) MALDI-TOF MS スペクトル

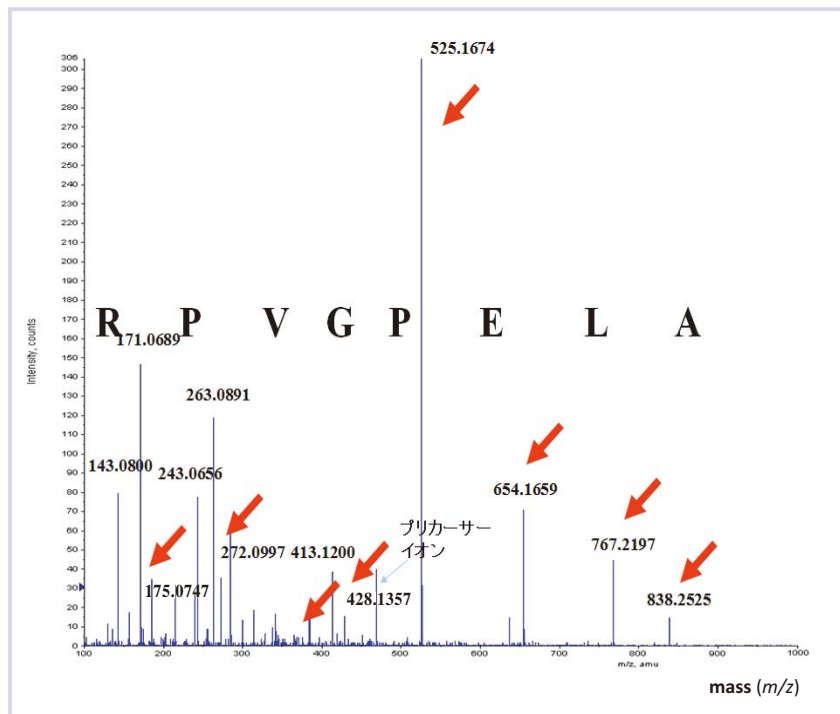


図3-b) ESI-MS/MSスペクトル

わかる。一方、トップダウン型の方法では、取り出したタンパク質を直接 FT-ICR などで解析し、含まれる全タンパク質の詳細な構造を明らかにすることができる。さらに、高性能化された MALDI-TOF/TOF MS によっても、生体から取り出した天然状態のタンパク質の内部配列の情報を得ることが可能となった。

3 プロテオーム解析から疾患マーカータンパク質の解析

多くの疾病は細胞のタンパク質の発現を変化させることで、正常な代謝を攪乱する。そこで、ある疾病の発症や進行に伴う体液、組織、細胞に発現している mRNA の変化を調べると同時に、プロテオーム解析により発現しているタンパク質一式を調べることで、疾患に関連して発現レベルが変動するタンパク質のセッ

この方法の2次元電気泳動法の特徴として、分離されているタンパク質は天然のままの状態にあるので、そのタンパク質の働きや構造を保持したまま測定していると考えられる^{4) 5)}。さらに、この分離法では、酵素活性などのタンパク質機能を抑制する薬剤などを選別することが可能である^{6) 7)}。図4に、ヒト血漿タンパク質を2次元電気泳動法を用い、天然状態で分離後のタンパク質分解酵素(トリプシン)の阻害活性を調べたものを示す。ヒト血漿中の α_2 マクログロブリン(α_2M)やハプトグロビン(Hp)は顕著なトリプシン活性阻害が見られるのに対し、アルブミン(alb)やトランスフェリン(Tf)ではその阻害活性が見られないことが

トを同定することができる。これらの解析により疾病の進行を調べるマーカータンパク質を発見できる可能性がある。さらに、薬剤投与によるこれらのマーカータンパク質発現レベルの回復度を調べることで、投与された薬剤の効果や標的タンパク質などの有益な情報を得ることができると考えられる⁸⁾。事実、血清中の5.9 kDaのフィブリノーゲン α C-chainのnear C-terminal fragmentが慢性肝障害の早期線維化のマーカーとなることがわかっている⁹⁾。しかしながら、1種の細胞に発現するmRNAは約1万種類、さらに各々のmRNAからタンパク質の翻訳後修飾によりその数倍以上のタンパク質が発現していると考えられ、一口に疾病の発症や進行に伴うタンパク質を網羅的に解析するといっても、まだ研究者が行える網羅性には限界があり、課題も多く残されている。

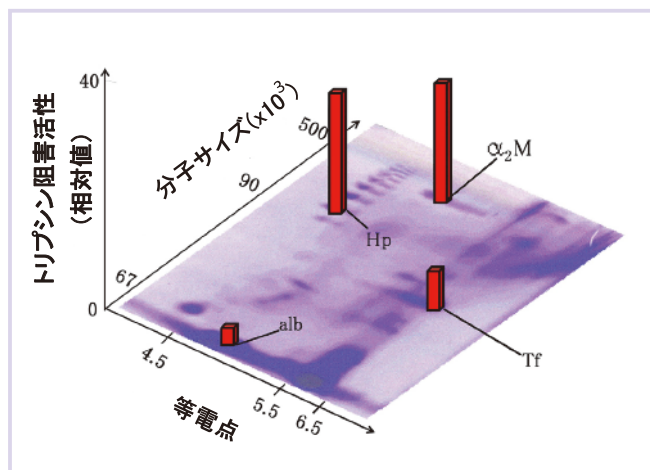


図4 天然状態で分離したヒト血漿タンパク質のトリプシンに対する阻害活性

4 プロテオーム解析から医薬品開発や化粧品開発への応用

プロテオーム解析から分子標的薬を特定する技術が構築されている。具体的には、薬剤候補とされる化合物をヒト子宮頸がん由来の細胞に添加し、細胞内のタンパク質の発現量を2次元電気泳動法により調べ、これを化合物間で比較する。その後、化合物を生体標的分子別や作用機序別に分類し、分析することにより、薬剤の生体内標的分子を予測する方法がとられている¹⁰⁾。この分子標的薬によるがん増殖抑制メカニズムの例を図5に示す。がん細胞の細胞表面にある受容体と増殖因子が結合する

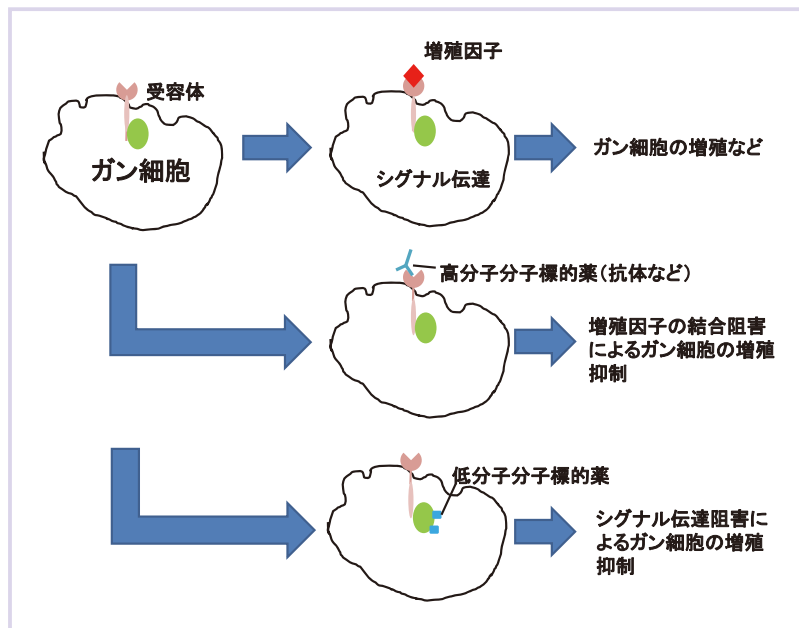


図5 分子標的薬によるガン増殖抑制メカニズム

5 おわりに

人間の体の中には10万種類ものタンパク質が存在し、それらが体内を調節しながら機能している。これらのタンパク質は、私たちが持つ遺伝子により作られてきたことは言うまでもない。プロテオーム解析により、生体内で機能しているタンパク質を網羅的に調べると同時に、これらのタンパク質の機能を抑制したり、機能を積極的に利用したりすることで、病気を治したり、身体を健やかに保つことが可能になると考えられる。一方で、人間を取り巻く外部環境においては、オゾン層破壊や地球温暖化などの課題があり、これらが今後人間の健康に影響を及ぼすことも懸念されている。これらの問題を考慮しながら、プロテオーム解析を利用した医薬品や化粧品などの開発がさらに進展し、より多くの人が健やかで豊かな生活を実現できる未来が来ることを期待している。

ことにより、細胞内のリン酸化などのシグナル伝達を介してガン細胞が増殖する。一方、分子標的薬をガン細胞に投与することにより、ガン細胞の細胞表面の受容体やシグナル伝達系のタンパク質などに分子標的薬が作用するため、ガン細胞の増殖が抑えられる¹¹⁾。このように、プロテオーム解析からの分子標的薬の探索は、ガン細胞の増殖抑制などの機能を有する薬剤の開発につながる可能性がある。しかしながら、多種類の分子標的薬が実用化されているものの、この分子標的薬にも皮膚炎や吐き気などの副作用があることが知られている。

さらに、人間の皮膚を構成しているタンパク質をプロテオーム解析することにより、600以上のタンパク質が解析されている¹²⁾。この中で、特に細胞保護作用のあるヒートショックプロテイン(HSP)が化粧品開発に寄与している。HSPの中でも70 kDaのHSP 70は、細胞保護作用の他に、炎症抑制や、紫外線などによるDNA傷害抑制、DNA修復促進を促すことで皮膚を保護することが知られている。そこで、皮膚の細胞中でこれらの機能を有するHSP 70を増やし、皮膚の保護作用を増強する天然物を見つける研究が進められている。実際に、ヤバツイヤアルニカなどの植物からの天然物にHSPを増やす作用があることが見いだされており、これらの成分が化粧品の中に配合され、紫外線などにさらされている皮膚のダメージを緩和させ、皮膚を保護する作用を促すと言われている¹³⁾。化粧品は医薬品に比べ効能効果が緩和で、清潔にする、美化する、魅力を増す、健やかに保つなどの目的で使用される。そのため、HSPを増やす作用を有しつつ、細胞などにダメージを与えない天然物を広く自然界から探索する研究が行われている。

文 献

- 1) 平野久: ぶんせき, **2005**, 348.
- 2) 戸田年総: 生物物理化学, **51**, 1 (2007).
- 3) 藤澤崇: "TMS研究", **2**, 25 (2010).
- 4) Y. Shimazaki, Y. Ochi, K. Fujimura: *Electrophoresis*, **39**, 1054 (2018).
- 5) Y. Shimazaki, A. Takahashi: *Journal of Microbiological Methods*, **154**, 19 (2018).
- 6) Y. Shimazaki, Y. Sugawara, Y. Ohtsuka, T. Manabe: *Proteomics*, **3**, 2002 (2003).
- 7) Y. Shimazaki, M. Michiro: *Clinica Chimica Acta*, **425**, 48 (2013).
- 8) 磯辺俊明: 化学と生物, **38**, 742 (2000).
- 9) K. Sogawa, K. Noda, U. Umemura, M. Seimiya, T. Kuga, T. Tomonaga, M. Nishimura, F. Kanai, F. Imazeki, H. Takizawa, M. Nakajima, M. Tsutsumi, O. Yokosuka, F. Nomura: *Proteomics-Clinical applications*, **7**, 424, (2013).
- 10) M. Muroi, S. Kazami, K. Noda, H. Kondo, H. Takayama, M. Kawatani, T. Usui, H. Osada: *Chemistry and Biology*, **17**, 460 (2010).
- 11) 石川和宏: "基本まるわかり!分子標的薬", (2011), (南山堂).
- 12) E. Parkinson, P. Skipp, M. Aleksic, A. Garrow, T. Dadd, M. Hughes, G. Clough, CD. O'Connor: *PLoS One*, **9**, e97772 (2014).
- 13) 水島徹: "HSPと分子シャペロン", (2012), (講談社).

著者略歴

- 1994年 横浜市立大学大学院 総合理学研究科 自然システム科学専攻
博士課程修了 博士(理学)
- 1994年 三菱化学生命科学研究所 特別研究員
- 1996年 愛媛大学 理学部 助手
- 2007年 愛媛大学大学院 理工学研究科 准教授
〈研究領域〉
生体タンパク質の分離分析法の開発
〈学界活動等〉
- 2011年 日本分析化学会中国四国支部幹事
- 2016年 日本電気泳動学会 理事, 評議員