

遺伝子発現及び機能情報解析のための次世代プロテオーム解析システムの開発

研究代表者：磯辺 俊明（東京都立大学大学院理学研究科）

I. 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

ゲノム解析の成果を生命科学の基礎および応用分野に活用するための研究が、ゲノム科学の新しい先端として国際的な規模で始まっている。その1つの方向は、機能的ゲノムの動態解析を目的とする領域で、「ジーンチップ」などの新技術を基盤としてゲノムのすぐ下流にある「トランスクリプトーム」を包括的に解析することでゲノムの発現状況を系統的に解析することを目標としている。もう1つの方向が、本提案でとりあげる「プロテオーム」の研究である。プロテオームの研究は、生命活動の瞬間に機能しているゲノム情報が「プロテオーム」として具現化されていると考え、その構造、動態、相互作用、機能を体系的に解析することを目指すものである。プロテオームは、ゲノムの最終産物である蛋白質を細胞内で働いている姿のまま、翻訳後修飾も含めて解析する点で、ゲノムの発現ならびにその機能情報を最も直接的に反映する指標と考えられる。こうしたプロテオーム研究の基礎となる概念や方法論は「プロテオミクス」と呼ばれ、従来とは異なる新しい生命科学の領域を形成しつつある。その基盤技術は、蛋白質の高性能分離解析法、相互作用解析法、ならびに機能解析法であり、この領域におけるシステム開発と技術革新は、基礎生命科学だけでなく、医薬農工などに関連した新規産業創造のための中核的方法論としても注目される。すなわち、プロテオミクスを基盤とした遺伝子機能や細胞情報ネットワークの解析は、多遺伝子疾患や環境ストレスによるアレルギー疾患などの原因の解明や創薬、総合的な健康・臨床診断、遺伝子組換え動植物の生体への影響評価、バイオインフォマティクスを基軸とする新規情報産業など、将来の産業技術創成のための新しい戦略としても期待される。ゲノム解析の成果として得られた膨大な情報を如何に活用できるかは、我が国の将来の科学技術ならびに産業の運命を左右する最重要課題である。本研究は、こうした観点から、ゲノム科学の先端としてのプロテオーム解析の基盤整備と技術開発を目的として、ゲノムの設計図をもとに生命が織りなすさまざまな現象を演出している蛋白質の全体像（プロテオーム）を解析するためのシステムの開発ならびに蛋白質間の相互作用（リンケージ）や働きを解析するシ

ステムの開発を目指すものである。

2. 研究の概要

本プロジェクトでは、遺伝情報として発現し、生体内で実際に機能している蛋白質の種類と動態を迅速かつ系統的に解析するプロテオーム解析システムの開発と相互作用しながら働く蛋白質のリンケージマップ解析システムの開発を目標としている。平成16年度は、過去4年間の研究で蓄積してきた研究成果を基礎として1)蛋白質の系統的高性能分離と同定ならびに翻訳後修飾解析をオンラインで実行するプロテオーム解析システムの完成と実用化、2)蛋白質相互作用を自動的に解析できるシステムの完成と実用化、ならびに3)上記システムを先端医療開発のための実用化技術とするための評価研究を実施し、統合化したプロテオーム解析システムを確立してプロジェクト最終目標の達成を目指す。

a. プロテオーム解析技術に関する研究

(1) 系統的高分離技術とシステム化に関する研究

(a) 分離システムの高度化に関する研究（東京都立大学大学院理学研究科）

プロジェクト4年間の研究で試作と改良を重ねてきた液体クロマトグラフィーと質量分析計、データ解析システムを統合したプロテオーム解析システムについて、分析対象とする生体試料から効率よく蛋白質を分画できる前処理技術について検討するとともに、分離に使用するカラムの種類や1次元分離の分画数、2次元分離の時間など、多次元LC-MS法全体についての最適化を計る。さらに、共同研究機関である東京農工大学で実施される修飾蛋白質分離法についての研究成果を取り入れることで、プロジェクトの最終目標としている1回の解析で2,400種類以上の蛋白質が同定できるシステムを完成する。

(b) 修飾蛋白質分離システムの統合化に関する研究（東京農工大学農学部）

翻訳後修飾蛋白質の系統的解析技術に関し、新規アフィニティー担体による特異的蛋白質の回収・分離技術の実試料への適用を行い、多次元分離システムへの統合技術としての有効性の最終評価を行う。

・第II期の目標

多次元液体クロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせたオンライン型のプロテオーム解析システムの性能向上を図り、一回の操作で2,500成分のタンパク質を同定できるシステムとする。

b. 蛋白質相互作用リンケージマップ解析技術に関する研究

(1) 蛋白質相互作用リンケージマップ解析技術のシステム化に関する研究

(a) 蛋白質相互作用解析技術のシステム化に関する研究（東京農工大学農学部）

蛋白質の相互作用の解析技術に関し、蛋白質の相互作用の検出から同定までをオンライン化した蛋白質相互作用解析システムの稼働と得られた結果の評価を実施し、当初設定した最終目標達成を示す。

(b) マイクロフルイディックスインターフェイス技術に関する研究（東京都立大学大学院理学研究科）

蛋白質相互作用検出装置（SPR）と質量分析計（MS）を連結するためのインターフェイスとして開発したダイレクトナノフロー LC システムを東京農工大学とピアコア社が共同で開発した蛋白質相互作用解析装置に組み込み、全自動の蛋白質相互作用解析システムとして一体化するための連結部分のハードウェアを製作する。具体的には、SPR を装備した蛋白質相互作用検出装置で検出した蛋白質や蛋白質複合体を自動的に LC システムへ導入するために、トラップカラムとスイッチングバルブを利用した連結部分を設計、試作して全体のシステムに装着する。

(c) インターフェイス・ソフト技術に関する研究（ピアコア（株））

表面プラズモン共鳴センサーのセンサーチップ上で検出された蛋白質複合体の回収率の向上を図るために、表面プラズモン共鳴センサーと質量分析計とのインターフェイス・ソフトウェアを改良し蛋白質相互作用解析装置に組み込む。

・第Ⅱ期の目標

タンパク質の相互作用の検出から同定までをオンライン化し、一度の操作で 250 種類のタンパク質リンケージを同定できるシステムとする。

c. プロテオーム解析システムの適用性評価に関する研究

(1) 創薬研究への適用性評価に関する研究（東京医科大学）

前年度に引き続き、アトピー性皮膚炎モデルマウス（NC/Nga）の血漿もしくは組織を多次元クロマトグラフィー・質量分析システムで分析し、疾患関連蛋白質群を定量的に検索する方法を検討する。これにより、疾患に特異的に変動する約 1,000 蛋白質群のうち、特にマーカー及び診断薬のターゲットとなり得る蛋白質を約 20 個以下に絞込み、本プロジェクトにより開発される体系的プロテオーム解析システムの創薬への適用性を評価する。

(2) 診断技術への適用性評価に関する研究

(a) 老人病診断への適用性評価に関する研究（ジーンケア研究所）

早老症関連遺伝子である WRN 遺伝子の発現を特異的に抑制する siRNA を培養癌細胞に導入することによって引き起こされる細胞内蛋白質のリン酸化等修飾の変化を本研究で開発されたシステムによって解析し、WRN 遺伝子の発現抑制が癌細胞特異的に引き起こすアポトーシスの誘導メカニズムについて研究することで、老人病診断へのプロテオーム解析法の適用性を評価する。

(b) 感染症診断への適用性評価に関する研究（厚生省感染症研究所）

感染症の診断／治療法へのプロテオーム解析技術の適用評価に関し、病原体の感染に伴う宿主のプロテオーム変動を本研究で開発されたシステムによって解析し、当該システムの感染症研究への適用性を評価する。本年度の研究では、異常型プリオン蛋白質及び C 型肝炎のコア蛋白質により惹起されるプロテオーム変動を解析する。

(3) 基礎医学への適用性評価に関する研究

(a) ガンの浸潤増殖機構解析への適用性評価に関する研究（東京大学医科学研究所）

昨年度、本プロジェクトで開発したナノ LC-MS/MS の技術を用いて MT1-MMP と複合体を形成する蛋白質の網羅的解析を行ったところ、膜型マトリックスメタロプロテアーゼ（MT1-MMP）と複合体を形成する 100 種類以上の細胞内外の蛋白質が同定された。今年度はこれらの中で細胞表面に発現する蛋白質に注目して次の検討を行う。まず、これら膜蛋白質の MT1-MMP への結合について再査定をすることで、プロテオーム解析から得られた結果の有用性を評価する。また、これら膜由来の MT1-MMP 複合体蛋白質の機能解析を行い、これら複合体蛋白質のガン浸潤増殖機構へ関与を検証することで、プロテオミクス技術のガンの基礎研究への応用性について評価する。

(b) 発生工学への適用性評価に関する研究（九州大学生体防御研究所）

平成 16 年度は、前年度に開発したユビキチン化やリン酸化の定量的フォーカスド・プロテオミクス技術のさらなる高精度化および高感度化を図る。さらに、翻訳後修飾部位の決定のための技術開発も併せて行う。これらの技術を利用して、様々なユビキチン化関連酵素やリン酸化酵素のノックアウトマウスの解析を行い、ユビキチン化やリン酸化の基質探索を行う。

・第Ⅱ期の目標

本プロジェクトで開発されるシステムについて、創薬・診断技術開発の実践的手段としての評価を実施し、疾病の診断あるいは医薬品の効果をモニターするための新規サロゲートマーカーを少なくとも 1 種類同定する。

3. 年次計画

研究項目	12年度	13年度	14年度	15年度	16年度
a. 遺伝子発現及び機能情報解析のための次世代プロテオーム解析システムの開発					
(1) プロテオーム解析技術に関する研究					
(a) 高度分離技術のシステム化に関する研究					
1. 高度分離技術に関する研究	プロトタイプ装置組立	分離技術開発		プロテオーム解析システムの確立	
2. 修飾蛋白質の分離に関する研究	修飾特異的分離系の設計		各種修飾基の解析同定技術開発	システム改良	
(2) 相互作用解析技術に関する研究					
(a) マップ作製技術のシステム化に関する研究					
1. マップ作製技術に関する研究	相互作用解析システムの設計	プロトタイプ装置組立	システム改良	リンケージマップ解析システムの確立	
2. インターフェイス技術に関する研究	インターフェイス部設計及び試作		インターフェイスハードウェア改良		
3. ソフト技術に関する研究				インターフェイスソフト開発	
(3) 適用性評価法に関する研究					
(a) 創薬への適応に関する研究	自動化装置適用準備		プロテオーム解析システムの創薬技術としての評価		
(b) 診断技術への適用評価に関する研究					
1. 老人病への適用評価に関する研究	自動化装置適用準備		プロテオーム解析システムの老人病診断技術としての評価		
2. 感染症への適用評価に関する研究	自動化装置適用準備		プロテオーム解析システムの感染症診断技術としての評価		
(c) 基礎医学への適用評価に関する研究					
1. ガン解析への適用評価に関する研究				ガンの浸潤増殖機構解析への適用評価	
2. 発生工学への適用評価に関する研究				発生工学研究への適用評価	
所要経費(合計)	212百万円	212百万円	212百万円	241百万円	194百万円

II. 平成 16 年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
a. 遺伝子発現及び機能情報解析のための次世代プロテオーム解析システムの開発 (1) プロテオーム解析技術に関する研究 (a) システム化に関する研究 (1. 分離システムの高度化に関する研究 (2. 修飾蛋白質分離システムの統合化に関する研究 (2) 相互作用解析技術に関する研究 (a) システム化に関する研究 (1. システム設計に関する研究 (2. インターフェイス技術に関する研究 (3. インターフェイスソフト技術に関する研究 (3) 適用性評価法に関する研究 (a) 創薬への適応に関する研究 (b) 診断技術への適用性評価に関する研究 (1. 老人病への適用評価に関する研究 (2. 感染症への応用評価に関する研究 (c) 基礎医学への適用性評価に関する研究 (1. ガンの浸潤増殖機構解析への適用評価に関する研究 (2. 発生工学への適用評価に関する研究 b. 研究管理	ピアコア（株） 東京都立大学大学院理学研究科生命分子化学研究室 東京農工大学農学部構造生化学研究室 東京農工大学農学部構造生化学研究室 ピアコア（株） 東京都立大学大学院理学研究科生命分子化学研究室 ピアコア（株） ピアコア（株） 東京医科大学 ピアコア（株） （株）ジーンケア研究所 厚生労働省国立感染症研究所 東京大学医科学研究所 九州大学生体防御研究所 ピアコア（株）	◎ 磯辺 俊明 高橋 信弘 ○ 高橋 信弘 ◎ 磯辺 俊明 橋本 せつ子 ○ 西村 俊秀 杉本 正信 山河 芳夫 清木 元治 中山 敬一 橋本 せつ子

(注：◎は代表者、○はサブテーマ責任者)

III. 研究推進委員会

委員	所属
○ 磯辺 俊明 藤田 芳司 西村 俊秀 高橋 信弘 清木 元治 中山 敬一 山河 芳夫 古市 泰宏 杉本 正信 橋本 せつ子	東京都立大学 大学院理学研究科 教授 東京医科大学 臨床プロテオームセンター センター長 東京医科大学 臨床プロテオームセンター 教授 東京農工大学 農学部 教授 東京大学 医科学研究所 教授 九州大学 生体防御研究所 教授 厚生労働省 国立感染症研究所 細胞化学部 主任研究員 (株)ジーンケア研究所 所長 (株)ジーンケア研究所 主席研究員 ピアコア（株）開発部 部長
【オブザーバー】 横山 茂之 小笠原 直毅 黒澤 良和	東京大学 大学院理学研究科 教授 奈良先端科学技術大学院大学 教授 藤田保健衛生大学 免疫学研究部門 教授

(注：○は研究推進委員長)