

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 13 年度博士課程 入学

氏 名 寺川 貴裕

指導教官 大久保 明

論文題目 気管支肺胞洗浄液中タンパク質のプロテオーム解析

1. 緒言

プロテオーム解析は、特定の細胞・組織・器官のある時点に存在するタンパク質の全体を網羅的に解析し、別の時点での全体像と比較することでその違いを観察するという手法で、このところ急速に普及した背景には、近年のクロマトグラフィー、質量分析計、蛍光イメージャーを代表とする分析化学技術の進歩と、大量に得られた分析結果の処理を可能にしたハード・ソフトウェア両面でのコンピュータ技術の進歩がある。本研究では、プロテオーム解析技術の生命科学分野への応用を図り、病因・病態の解明、疾病の診断に有用な解析方法の構築を目的とした。今回解析対象としたヒト気管支肺胞洗浄液(BALF)は、肺に挿入した気管支ファイバースコープを通じて生理食塩水を肺内部に注入し、洗浄後回収したものである。これまではその細胞成分のみが解析の対象とされており、タンパク質成分については組成が複雑で分離精製が難しいため解析した報告は少ない。加えて、このような難易度のきわめて高い試料である気管支肺胞洗浄液のプロテオーム解析に取り組むことを通じて、他の動植物の組織、細胞、体液のプロテオーム解析にも応用可能である手法の提示を目指した。

2. BALF プロテオーム解析のための最適泳動法の確立

BALF 中には生理食塩水由来の塩、リン脂質、および末梢気道に存在する細胞が混在しているため、そのまま濃縮して泳動した場合 2 次元電気泳動像は 1 次元目の分離が不十分で、スポット分離がまったく行われなかった。この問題を解決するため、初めに BALF の

脱塩と解析対象であるタンパク質のみに精製することを目的とした前処理法の検討を行った。次に抽出したタンパク質を等電点分離するのに最適な泳動バッファの選択を行った。

BALF の脱塩とタンパク質精製濃縮の方法は、大気圧下での限外ろ過を行った。さらに脱塩濃縮に加え、脂質除去を目的として、アセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールを単独、またはトリクロロ酢酸、2-メルカプトエタノール、リン酸トリブチルと組み合わせたタンパク質沈殿法を行った。これらすべての方法を比較した結果、限外ろ過膜による脱塩濃縮した試料の泳動像では、低分子領域のスポットが消失していた。一方アルコール単独で処理した試料の泳動像はスポット分離能が低下する傾向が見られた。これらのうちでは、アセトンのみ、ないしはアセトンとリン酸トリブチル、アルコールの混合溶媒によって BALF のタンパク質を沈殿させたものの 2 次元電気泳動像のスポット分離が良好であった。また、アセトン沈殿による試料を、2 種類の等電点電気泳動用のバッファで泳動して比較した結果、変性剤として尿素のみを含む泳動バッファよりも、尿素とチオ尿素を含む泳動バッファがスポット分離能が高かった。

その理由として、尿素とチオ尿素を組み合わせた場合、タンパク変性作用が尿素のみの時より強いためと考えられた。これらの最適条件を組み合わせることで、BALF タンパク質を二次元電気泳動し、500 以上のスポットを分離することができた。これにより 2 次元電気泳動を用いた BALF タンパク質のプロテオーム解析が可能となった。

3. 同一人由来の血漿と BALF の 2 次元電気泳動像の比較

次に BALF タンパク質のうち肺に固有なものの割合を調べるために、同一人の血漿と BALF の 2 次元電気泳動像での相同性比較を行った。健常者 5 例の BALF と血漿を pI 3 - 10 の範囲でそれぞれ同時に同じ条件で 2 次元電気泳動した。得られた泳動像を 2 次元電気泳動画像解析専用ソフトウェア PD-QUEST によって解析した結果、同一人の BALF と血漿の 2 次元電気泳動像のマッチ率は最大でも 49% で、同一人でも両者を構成するタンパク質の組成が異なっていることが明らかとなった。

以上の検討から、BALF タンパク質を 2 次元電気泳動で分離したスポットのパターンは血漿とは異なるものであることを確認した。

4. BALF 2 次元電気泳動像の個体差比較

次に BALF 2 次元泳動像の個体差を比較するために、健常者 5 例の 2 次元電気泳動像の相同性比較を行った。pI 3 - 10 の範囲を精密に解析することを目的として、pI 3 - 6, 5 - 8, 7 - 10 の 3 つの範囲に分けて 5 例の BALF を同時に泳動して比較した。

その結果、BALF タンパク質の 2 次元電気泳動スポットは pI 5 - 8 の範囲に特に集中していることが明らかとなった。さらに、どの pI 範囲においても、5 名の健常者 BALF 2 次元電気泳動像の互いのコンピュータ解析によるスポットマッチング率は低く、BALF 構成タンパク質の組成にはかなりの差が認められた。マッチング率が低い原因としては、5 例の BALF タンパク質組成の違い以外に、2 次元電気泳動の再現性と染色効率に起因する誤差の

問題が考えられた。そこで、試料を 2 等分して同じ条件で同時に泳動、染色した 2 次元電気泳動画像を解析した結果、完全にはスポットが一致しなかった。しかしながら、この泳動そのものの誤差を考慮しても、5 例の健常者 BALF の泳動像には差が見られると判断した。これらのことから、BALF を構成するタンパク質は健常者の間で個体差が認められると結論した。

5. 健常ならびに DIP 疾患 BALF の 2 次元電気泳動による比較

前項までで、2 次元電気泳動の高分離能の確立と、実用上の再現の信頼性が確立されたので、この剥離性間質性肺炎(Desquamative Interstitial Pneumonia ; DIP)患者 BALF と健常者 BALF のタンパク組成の相違を解析した。これまでの解析結果より、健常者 BALF には個体差が見られた。患者 BALF と比較するためには、健常者 BALF を規格化する必要がある。そこで、健常者 27 名の BALF を等量プールし混合したものを標準健常者 BALF とした。

患者 BALF としては、5 例の DIP 患者 BALF を個別またはプールしたものを用い、標準健常者 BALF と比較した。また、2 次元電気泳動による泳動誤差を補正するために 2D-DIGE を用いた。この方法は、泳動前に複数のタンパク質試料を複数の蛍光色素で標識し、1 枚のゲルで同時に泳動する方法であり、泳動後の染色が不要で、同じタンパク質ならば位置のずれが生じないという長所を持つ。この方法により泳動した標準健常者 BALF と患者 BALF の泳動像を解析し比較したところ、患者 BALF 泳動像では、標準健常者 BALF と比較して、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン、 $\alpha 1$ -アンチキモトリプシン、イムノグロブリン G (Ig G)、 $\alpha 2$ -マクログロブリンが増加しており、肺サーファクタントプロテイン A(SP-A)、ハプトグロビン、アポリポプロテイン A1 が減少していた。

しかしながら、BALF 中のタンパク質総量の半分以上がアルブミンと Ig G の 2 つの成分で占められており、これらと泳動位置が近い微量タンパク質がマスクされてしまい、泳動画像上で正しく検出できなかった。そこでこの問題を解決するためにアルブミン、Ig G の除去を、モノクローナル抗体アフィニティカラムを用いて行った。その結果、これまで検出不可能であった微量のタンパク質スポットの分離、検出が可能となった。これによって、これらの微量タンパク質の LC-MS による同定も可能となった。そこで、健常者 BALF と患者 BALF の間で違いのあったスポットを切り出した後にトリプシン消化を行い、LC-MS (LC:AMR MAGIC2002, MS:ThermoFinnigan LC-Q DecaXp) による MS/MS 解析を行った。これらの新しく分離可能となったスポットは、その多くが弱い光強度、すなわち微量スポットであるにもかかわらず、67 個ピックアップし、64 個を同定できた。新たに検出できたタンパク質は、マトリックスメタプロテアーゼ 12,C3 補体、ヘモペキシン、ビタミン D 結合タンパク質、アネキシン V、ラミニン、フィブリリンなどであった。これらのタンパク質は、呼吸器疾患の病態を解析する上で、重要な指標となるタンパク質であり、これらの相対的な量を比較することが病勢と、病態解明につながる可能性がある。

6. 健常者ならびに患者 BALF の生化学的解析による検証

次に、健常者 BALF ならびに DIP 患者 BALF の生化学的解析を行なった。総タンパク質濃度、総リン脂質濃度、肺サーファクタントプロテイン(SP)-A,-B,-D 濃度、表面張力、総過酸化脂質濃度を調べたところ、総タンパク質と総リン脂質濃度は両者の間に有意差がなかった。しかしながら、SP-A,-B,-D 濃度、表面張力は DIP 患者 BALF ですべて低下していた。一方、総過酸化脂質濃度は、健常者 BALF と比較して、DIP 疾患 BALF で増加していた。

これら一連の変化は、DIP 肺の症状である肺胞虚脱によって引き起こされていると考えられた。過酸化脂質濃度が DIP 患者 BALF で増加している理由は、DIP 肺が酸化ストレスによって生じた活性酸素に暴露されていることにより、過酸化脂質が産生されたためと考えられた。以上の生化学的解析結果は、2D-DIGE の解析結果を支持しており、患者 BALF の組成が健常者 BALF と明らかに変化していることを示した。今後は、サーファクタントプロテインをはじめとして、前項で示したタンパク質をあわせて解析することにより、より詳細に病因病態の診断が可能になると考えられる。

7. 結言

本研究では、有機溶媒を用いた脱塩処理、アフィニティカラムを用いたアルブミン、Ig G 除去の前処理をすることにより、これまで解析対象とはなり得なかった BALF 中のタンパク質の 2 次元電気泳動による分離を可能にする手法を確立した。この方法を用いて健常者 BALF と DIP 患者 BALF 中のタンパク質を比較して、患者特異的に増加、減少するタンパクを多数検出し得たことにより、2 次元電気泳動が BALF 解析に有用であることを示した。今回解析対象とした DIP 以外の BALF にも、本法は適用可能であるため、他の呼吸器疾患の病因・病態の解明に有用であると考えられた。さらには出発試料の精製が十分であるならば、培養上清や動植物の血液、組織や器官などにも本研究により確立した手法は応用可能であると考えられる。