九州大学
九州大学広報室
〒819-0395 福岡市西区元岡 744
TEL:092-802-2130 FAX:092-802-2139
MAIL:koho@jimu.kyushu-u.ac.jp
URL:http://www.kyushu-u.ac.jp

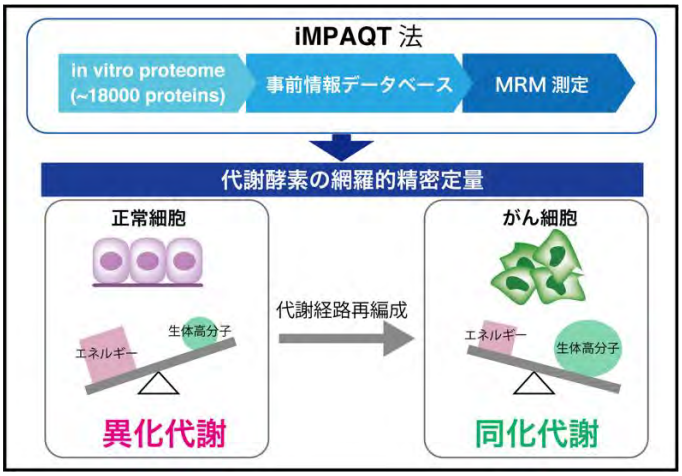
PRESS RELEASE（2016/12/27）

タンパク質の大規模精密定量法の開発に成功　ー　がん研究等への応用に期待　ー

九州大学生体防御医学研究所の中山敬一主幹教授と松本雅記准教授の研究グループは、網羅的なヒトタンパク質ライブラリー(in vitro proteome)と高感度な定量プロテオミクスの手法であるMRM 法（※1）を組み合わせることで、あらゆるタンパク質の存在量を正確に測定できる新規テクノロジー『iMPAQT(in vitro proteome-assisted MRM for protein absolute quantification)法』の開発に成功しました。この iMPAQT 法を用いて、正常細胞およびがん細胞において 1000 種類近くある代謝酵素タンパク質の存在量を全て計測することで、がん細胞に特徴的な変化である代謝経路再編成（※2）の全体像を明らかにしました（図）。

様々な生命現象の理解や各種疾患の原因解明および診断法開発に向けて、生命現象の直接的な担い手であるタンパク質の存在量を大規模かつ正確に測定することが求められています。しかしながら、現在普及している従来の解析法では定量精度や再現性、および分析速度が不十分でした。一方、タンパク質の精密定量が可能な MRM 法は従来法の欠点を解消できる手法として注目されていますが、MRM 測定前に高感度ペプチド（プロテオティピックペプチド：PTP）（※3）の選定や測定条件最適化などの手間を要することから普及が遅れていました。この度、本研究グループは、網羅的な組み換えタンパク質リソース（18,000 以上のタンパク質）を利用することで MRM 法に必要な事前情報および内部標準ペプチド（※4）を網羅的に取得し、これを用いて容易に多数のタンパク質の絶対定量が実施可能な新規解析基盤 iMPAQT 法の構築に成功しました。この iMPAQT 法で正常細胞とがん細胞における代謝酵素タンパク質の存在量を比較したところ、正常細胞では異化代謝と呼ばれる経路が主であるのに対し、がん細胞ではむしろ同化代謝が盛んであることがわかり、がん細胞は細胞増殖に有利な代謝状態へ変化していることが明らかとなりました。今後は、がん細胞特有の弱点を見つけるなどの治療標的の探索を進めるとともに、タンパク質発現変化に基づく各種疾患の診断法や治療効果モニタリング法の開発が期待されます。

本研究成果は、2016 年 12 月 26 日（月）午後 4 時（英国時間）に英国科学雑誌「Nature Methods」で公開されました。なお、用語解説は別紙を参照。



研究者からひとこと：
全てのタンパク質の存在量を正確に計測できる iMPAQT 法の開発によって、がんにおける変化が総合的に追跡できるようになりました。今まで「点」の研究だったものが「面」の研究に広がりを持つようになり、がんの弱点が明らかになりました。将来的にはこの知見ががんに対する薬剤の開発に役立つものと考えています。

図　新規プロテオーム解析法 iMPAQT によるがん代謝全体像解明

【お問い合わせ】生体防御医学研究所　主幹教授　中山 敬一（ナカヤマ ケイイチ）
Tel：092-642-6815　Fax：092-642-6819
E-mail：nakayak1@bioreg.kyushu-u.ac.jp

別　紙

タンパク質の大規模精密定量法の開発に成功ーがん研究等への応用に期待

＜研究の背景と経緯＞

近年、ゲノム情報の解明を背景に、網羅的解析が盛んに行われ、様々な生命現象や疾患をシステムとして理解する試みがなされています。中でも生命現象と直接的に結び付くタンパク質の変化をグローバルにとらえるプロテオーム解析（※5）の重要性は明白ですが、もっとも本質的で重要なタンパク質発現量を正確に知ることは困難であり、これを可能にする技術の開発が渇望されています。

これまで質量分析を用いたプロテオーム解析は DDA 法（※6）とよばれる手法が主流であり、比較的遺伝子数が少ない大腸菌や酵母では発現しているほとんどタンパク質の検出が可能です。しかしながら、ヒトなどの高等真核生物のプロテオームは非常に複雑なため、低発現量のタンパク質の検出は困難で、たとえ検出できたとしても定量精度や再現性が不十分でした。また、DDA 法では一般に長い分析時間を必要とするため、多数の検体を処理できる能力が乏しいという問題もありました。一方、MRM 法などのターゲットプロテオミクス（※7）は低発現量タンパク質も再現性よく定量可能であり、多数の検体に対して特定のタンパク質定量解析を実施できる優れた手法です。しかしながら、個々のペプチドに対して MRM アッセイ（※8）を設定・精査するなど時間と労力がかかる前準備が必要となり、多数のタンパク質を一斉に MRM 法で解析することは非現実的だと考えられていました。

＜研究の内容＞

ヒト完全長 cDNA ライブラリーを鋳型とした小麦胚芽抽出液中での試験管内タンパク質合成によって網羅的な組み換えタンパク質リソース(in vitro proteome: 18,000 タンパク質)を作製しました。これらの組み換えタンパク質から酵素消化によって得られたペプチド断片を DDA 法で解析し、ヒト全ゲノムの 9 割以上を網羅する MRM 法に必要な事前情報を得ました。このようにして得られた情報を用いて各ペプチドに対する MRM アッセイを全て設定し、実際に MRM 測定が可能か否かを組み換えタンパク質消化物を実測することで評価しました。得られた評価済み MRM アッセイに様々な公共データベースにある機能情報を付加することで、任意の生命現象や機能に関与するタンパク質群の MRM アッセイを抽出できるデータベースを作成し、公開しました（http://impaqt.jpost.org/iMPAQT/）。また、組み換えタンパク質消化物は内部標準ペプチドとして利用することで精度の高いタンパク質絶対定量が可能となりました。この新たなプロテオーム定量解析基盤を iMPAQT (in vitro proteome-assisted MRM for protein absolute quantification)法と名付けました（図 1)。

iMPAQT 法によってヒト正常線維芽細胞における代謝酵素の網羅的絶対定量を実施したところ、代謝酵素は 10^3 分子/細胞から 10^8 乗分子/細胞と極めて広い幅で発現していることがわかりました(図 2 左図)。例えば、解糖経路の後期段階に関わる酵素の多くは極めて発現量が高いのに対して、前期段階に関わるヘキソキナーゼやホスホフルクトキナーゼは発現量が低く、これらの酵素の発現量が制限されることが律速段階を生み出している可能性が示唆されました（図 2 右図)。

正常細胞は酸素の有無に応答して呼吸鎖による酸化的リン酸化と解糖（乳酸産生）を切り替えているのに対して、がん細胞は酸素の有無に関わらず常に解糖が亢進しています（図 3)。この現象は 90 年以上も前からワールブルグ効果として知られていますが、その機構や意義は未だ明確ではありません。そこで、正常細胞にがん原遺伝子を導入することで人工的にがん化した細胞を作製し、ワールブルグ効果が再現できることを確認しました（図 4)。これらの細胞を対象に iMPAQT による代謝酵素の発現量比較をおこないました（図 5)。がん化に伴い多数の解糖酵素の発現量が増加していることや、がん細胞が必要とする早い増殖に必要な核酸や脂質の合成に関与する多数の酵素の発現亢進が認められました。これらの結果は、正常細胞が糖質から主にエネルギーを産生するのに対して、がん細胞は糖質を自らの構成成分(脂質や核酸)合成に利用することに特化した代謝状態に遷移している可能性を示唆しています(図 6)。このように iMPAQT 法の開発は細胞システム全体の変遷をプロテオーム情報として計測することで、代謝のような複雑な現象を定量的に評価することが可能としました。

＜今後の展開と医学応用への期待＞

本研究では微細な代謝酵素発現量変化からがんの代謝的特徴をあぶり出すことができました。今後は、これらの結果を元にがん細胞特有の弱点を見つけるなどの治療標的の探索を進めたいと考えています。また、高い定量精度や再現性を有する iMPAQT 法の普及によって、タンパク質発現変化に基づく各種疾患の診断法や治療効果モニタリング法が開発されることが期待されます。

＜参考図＞

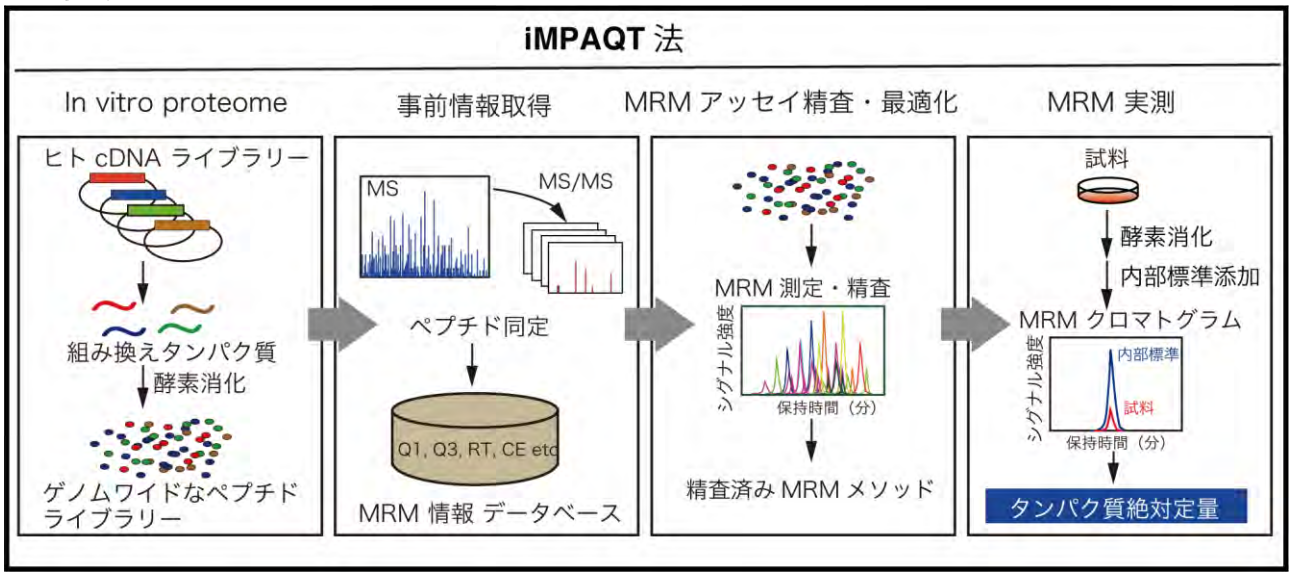


図１　iMPAQT 法の概要

組み換えタンパク質を酵素消化することで得たペプチドライブラリーを用いて MRM 法に必要な事前情報を取得し、データベース化しました。これらの情報を用いて MRM アッセイ（各ペプチド単位の定量法）を作成し実測に基づく評価を実施しました。得られた精査済み MRM アッセイを用いることで迅速に任意のタンパク質の MRM による絶対定量解析が実施可能となります。

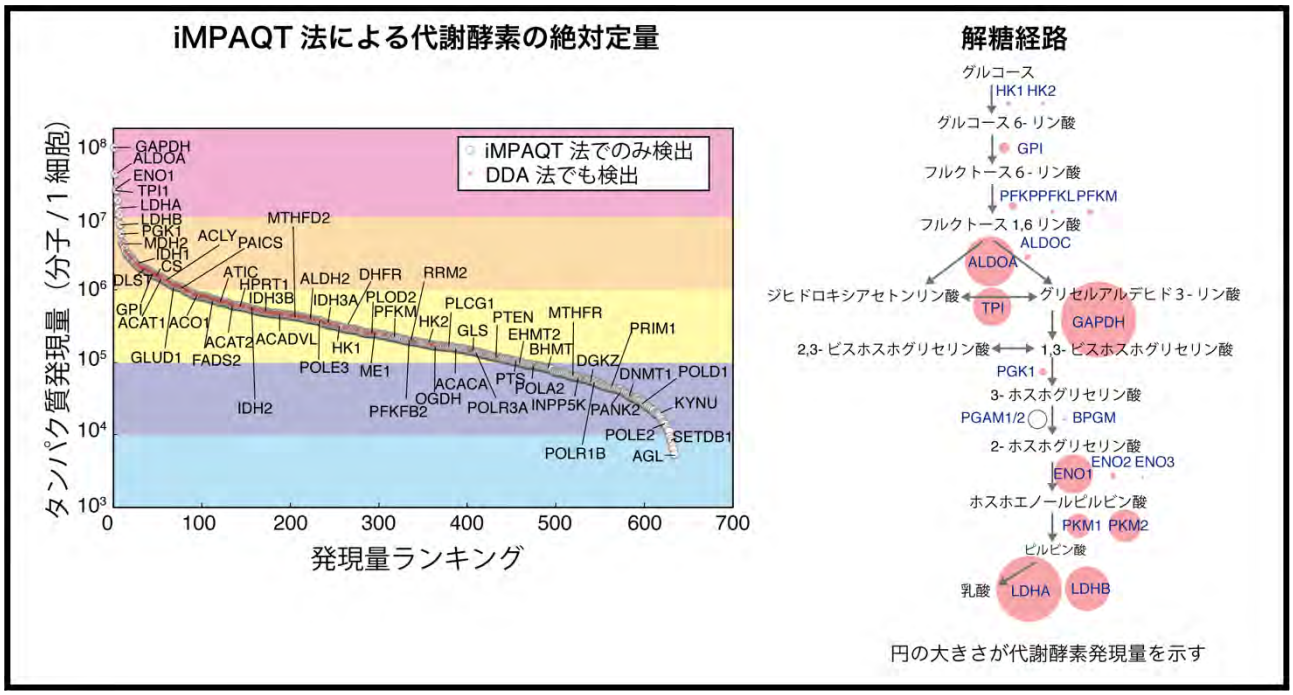


図２　代謝酵素の絶対量計測による定量代謝マップ構築

生命維持に重要な代謝反応は多数の代謝酵素によっておこなわれており、代謝経路の特性を理解する上ではこれらの酵素の発現絶対量を知ることが重要です。iMPAQT 法を用いてヒト正常線維芽細胞に発現している全代謝酵素の定量を実施しました。グルコースの代謝に関わる解糖経路は入り口が狭く出口が広い構造になっていることが明らかとなりました。

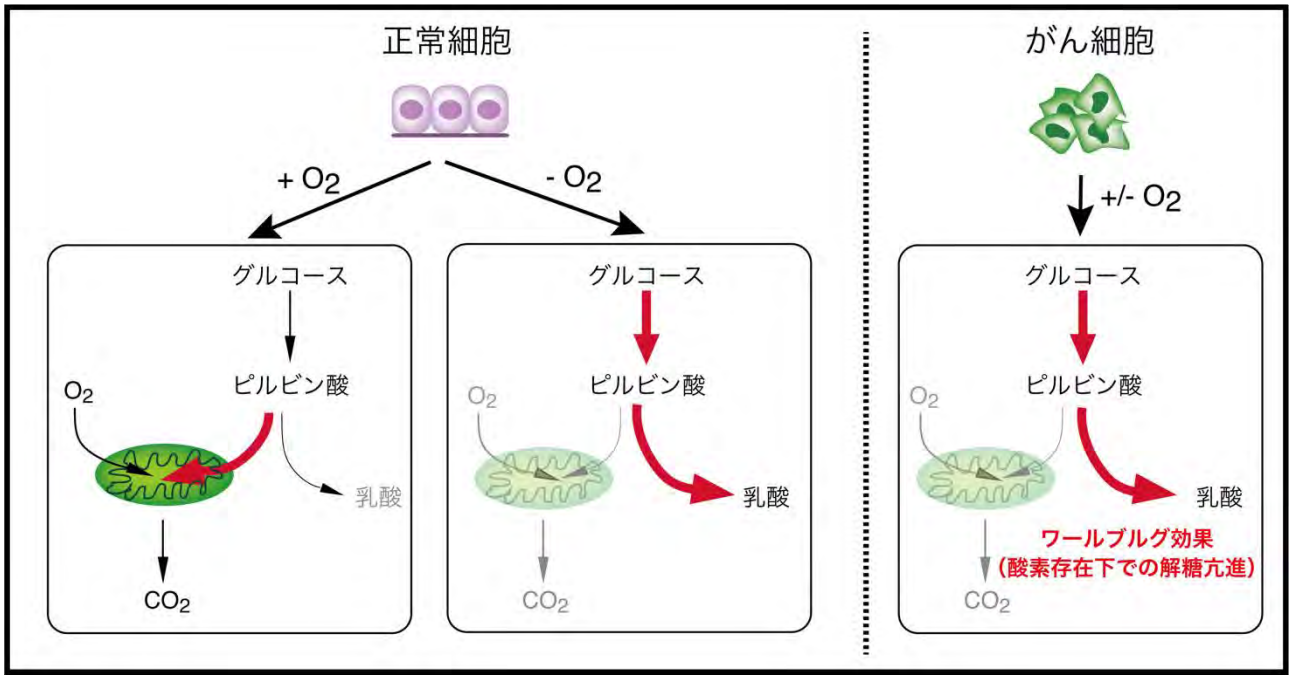


図３　がん細胞に特徴的な代謝状態：ワールブルグ効果

正常細胞が酸素の有無に応答して代謝特性を切り替えるのに対して、がん細胞は常に解糖が亢進している（＝ワールブルグ効果）は 90 年以上前から知られていましたが、その意義や機構は不明でした。

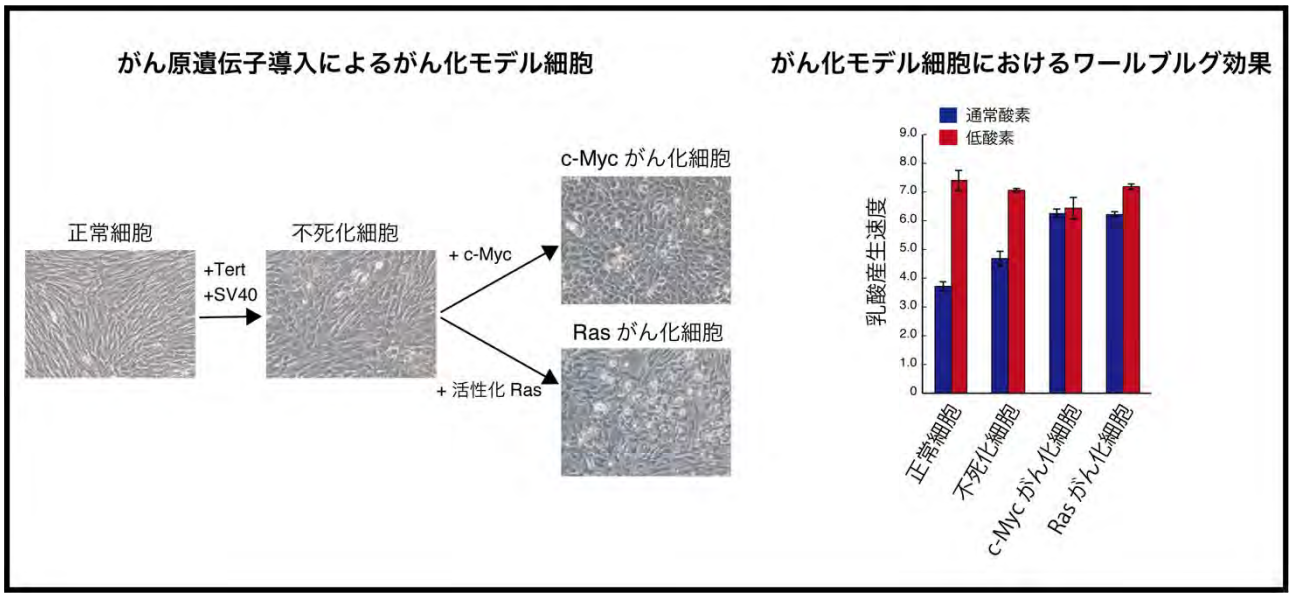


図４　がん原遺伝子導入による人工がん化は代謝変化を引き起こす

正常ヒト細胞にいくつかのがん原遺伝子を導入すると人工的にがん化した状態を作り出せます。このようにして作製した細胞は通常酸素条件で解糖（乳酸産生）が亢進しており（＝ワールブルグ効果）、私たちの体の中で生じるがん細胞と類似した性質を持っていました。

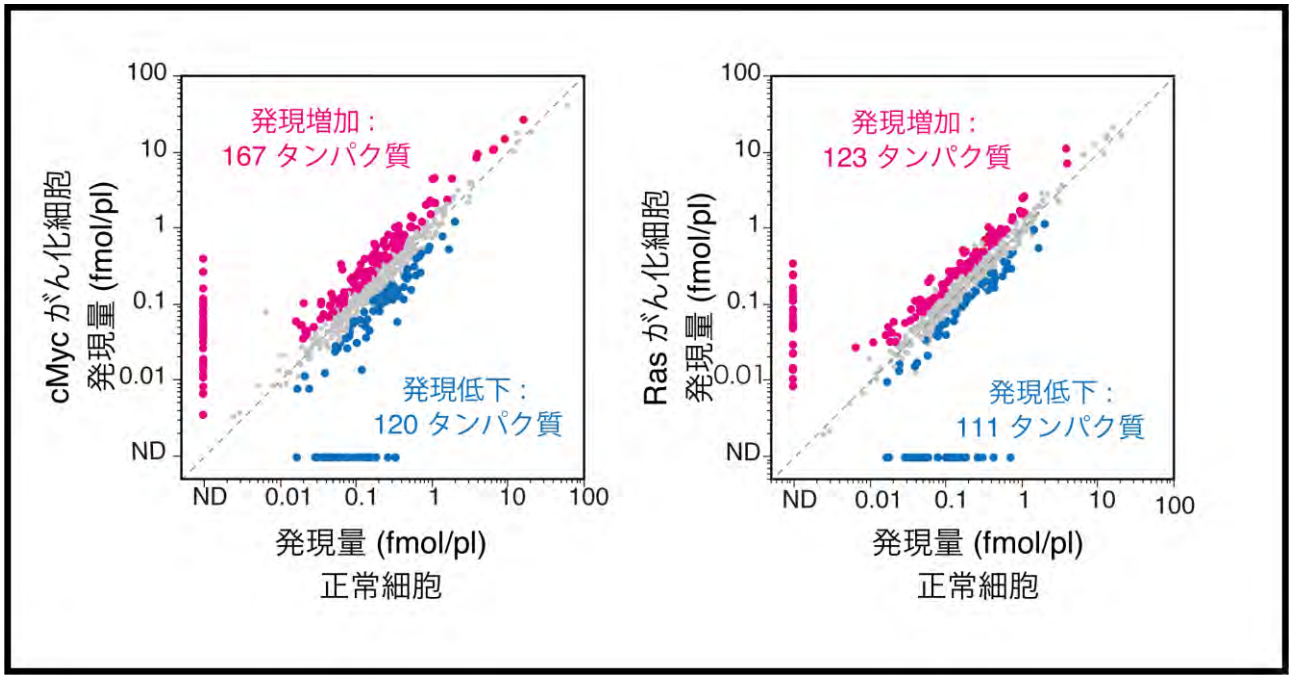


図５　がん細胞で生じる広範な代謝経路再編成

iMPAQT を用いて正常細胞とがん化細胞における代謝酵素発現絶対量を比較したところ、200 種類以上の代謝酵素の発現量が有意に変化していることが判明しました。特に解糖や核酸・脂質合成に関わる酵素の発現増加が顕著でした。

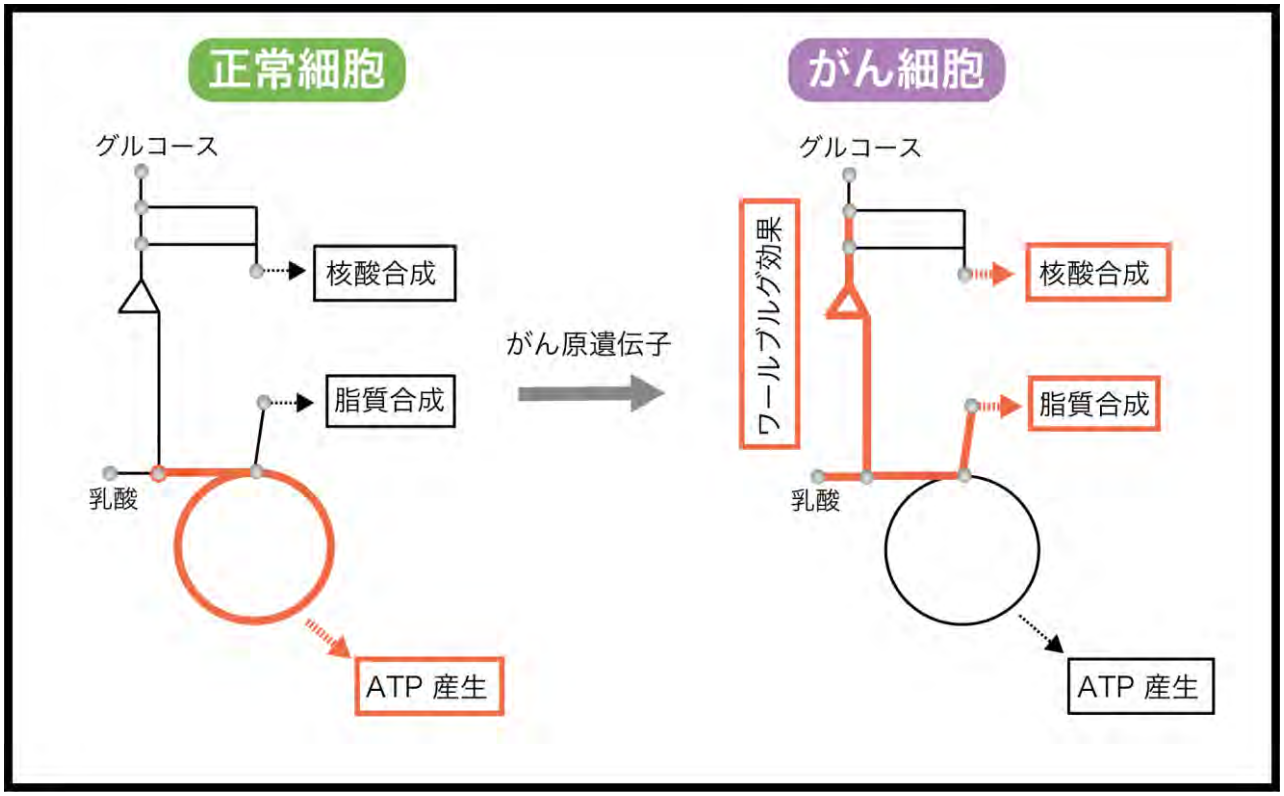


図６　がん細胞は物質産生に偏った代謝状態にある

細胞がん化に伴い細胞内代謝酵素の発現量が広く変動することで代謝経路の再編成を引き起こし、エネルギー産生優位な状態から核酸や脂質合成などの物質産生優位な状態に変化していると考えられます。

＜用語解説＞

（※1）MRM 法：

Multiple reaction monitoring（多重反応モニタリング）の略です。三連四重極型質量分析計において、特定質量を持ったペプチドイオンを通す質量フィルターと開裂反応後に生じるペプチド断片イオンを通す質量フィルターの組み合わせ(MRM トランジッション）を多重に設定することで、特定のペプチドを特異的に検出し、そのシグナル強度から定量を行う分析法です。

（※2）代謝経路再編成：

細胞は自身が置かれた環境に応じて、各代謝酵素の量や活性を変化させ、新たな代謝状態を作り出すこと。

（※3）プロテオティピックペプチド(PTP)：

質量分析計での検出に用いる各タンパク質に特異的なペプチドのことを示します。MRM 法を実施するためには多数の PTP の中から高感度に検出可能なペプチドを選定する必要があります。

（※4）内部標準ペプチド：

MRM 法で正確なペプチド定量を行うためには各ペプチドに対応した評品ペプチドを試料中に添加する必要があります。このようなペプチドを内部標準ペプチドと呼び、試料中に存在するペプチドと質量分析計で識別できるよう質量タグが付加されています。

（※5）プロテオーム解析：

ゲノムにコードされているタンパク質の総体をプロテオームと呼び、それを解析することをプロテオーム解析と呼びます。また、プロテオームを研究する学問領域をプロテオミクスと呼びます。

（※6）DDA 法：

Data-dependent acquisition 法の略です。MS スペクトルで検出されたイオンを順次に自動で MS/MS スペクトルを取得する手法で、プロテオミクスで最も一般的に使用される分析法です。実質的にランダムに MS/MS スペクトルが取得されるためノンーターゲット分析とも呼ばれています。

（※7）ターゲットプロテオミクス：

特定のペプチドの質量や液体クロマトグラフィーでの溶出時間を指定するプロテオーム解析法でで、主に定量を目的とします。再現性は高いですが、一度に指定できるペプチド数に限りがあります。MRM 法はターゲットプロテオミクスで最も利用されている分析手法です。

（※8）MRM アッセイ：

各ターゲット分子（ペプチド）を同定・定量するための 1 組の MRM トランジションセットのことを MRM アッセイと呼びます。一つの MRM アッセイは一つのペプチドの特異的検出法となります。

＜論文名＞

“A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome”
（in vitro ヒトプロテオームに基づく大規模ターゲットプロテオミクスのアッセイリソース）
Nature Methods, in press (Advance Online Publication), 2016

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。
科学研究費補助金・基盤研究(S)
研究課題名：「幹細胞維持分子の機能解析と全身の幹細胞の可視化を目指した総合的研究」
研究代表者：中山 敬一（九州大学 生体防御医学研究所　主幹教授）
研 究 期 間：平成 25 年 4 月～平成 30 年 3 月

【お問い合わせ】
中山 敬一（ナカヤマ ケイイチ）
生体防御医学研究所　主幹教授
Tel：092-642-6815　Fax：092-642-6819
E-mail：nakayak1@bioreg.kyushu-u.ac.jp