

タンパク質・核酸計測機器の発展と 生体制御メカニズムの解明・医療への応用



医療と技術

高 島 成 二*

Advanced Medical and Biological Application of
High Speed Sequencer and Mass Spectrometry

Key Words : Protein, DNA, Gene, Mass Spectrometry, Sequencer

はじめに

21世紀の生命科学の発展に最も大きく貢献したのは高速のDNA情報解読を可能にした超高速シーケンサーであろう。同時に、タンパク質・脂質・小分子の詳細な定性・定量を担う精密質量分析計の精度も21世紀になってすさまじい勢いで上昇し、膨大な遺伝子情報とあわせて生命科学の発展に大きく貢献した。現在これらの技術は、基礎生命科学分野だけでなく、遺伝子診断や血液生化学検査など医療分野でも必須の技術となっている。本総説では、特に生命現象におけるタンパク質の役割を中心にこれらの定性・定量技術の発展と医療のかかわりについて概説したい。

1、生命現象におけるタンパク質の働き

生命現象といえども宇宙の法則には従わなければならない。これは、科学者としては当然持つべき概念であるが、こと生命現象に関しては一種オカルト的な神秘を信じている人が一般には多いのではなからうか。

宇宙の法則であるエネルギー第2法則は、エントロピーの増大に伴う秩序の崩壊へと我々を誘い込む。それに対して生命活動を行うものは、すべからく対抗して秩序の形成を行う。一方で生体は、直線的な自由エネルギーの消失でさえ生体の重要な作用に組み入れることに成功した。たとえばホルモンや増殖因子などが細胞表面の受容体に結合するという現象やワクチンによって作られた抗体が抗原であるウイルス表面のタンパク質を認識するという反応は、人

を含めた多細胞生物にとって必須の生理現象である。ところがこれらの生理現象は、直線的な自由エネルギーの消失を伴う極めて起こりやすい反応である。抗原抗体反応の平衡定数から計算される結合に伴う標準自由エネルギーの消失は10Kcal/M以上にも及ぶ。すなわち、極めて起こりやすい反応であるがゆえに、生体は侵入したウイルスを素早く見つけ排除することが可能となる。それではこのとんでもない結合をもつタンパク質を生体はどのようにして獲得したのであろうか。

2、タンパク質の高次構造

複雑で特異的な生理現象を担い、ブラウン運動や直線的な自由エネルギーの低下でさえ、生体反応として利用できるようになったのは、タンパク質の複雑な構造ゆえである。タンパク質は生体の遺伝情報によってコードされており、セントラルドグマといわれる遺伝情報の翻訳により合成される。すなわちタンパク質の情報はすべて遺伝子に組み込まれており、先祖代々それぞれの生物種において保存されていく。また進化の過程で共通した作用をもつが生物に特有の変化を起こし、より高度な生命現象を担うに至った。遺伝情報をもとに20種類のアミノ酸から構成されるタンパク質は、アミノ酸が200～300個、



* Seiji TAKASHIMA

1963年8月生
大阪大学 医学部 医学科 (1988年)
現在、大阪大学 医学部 医化学 教授
医学博士 循環器内科学
TEL : 06-6879-3492
FAX : 06-6879-3493
E-mail : takasima@cardiology.med.

osaka-u.ac.jp

ある時に1000個以上連なって完成される。この組み合わせはほぼ無限大で20種のアミノ酸が100個つながるタンパク質の組み合わせは当然20の100乗種類にもおよぶ。しかし、ヒトにおいても現在同定されているタンパク質の種類はせいぜい数万というところである。これはアミノ酸のつながりは直線的ではなく複雑な高次構造をもち、かつその高次構造を安定に保つためには最もエネルギー的に安定な構造を持つ必要があったからだと思われる。それにより不安定な構造をもつタンパク質は自然淘汰され、高次構造をたもったまま存在可能な高分子タンパク質が生命活動を担うことになり、今に至ったと考えられる。

こうして出来上がった安定した高次構造をもつタンパク質は、たとえば200アミノ酸からなるホルモンと1000個のアミノ酸からなるタンパク質の非常に特異的な結合という生化学反応を可能とした。双方が結合するために鍵と鍵穴のような非常に複雑で特異的な強い結合が完成するわけである。この結合こそが特定のホルモン作用を厳格に規定し、高度な生命現象を可能にするわけである。タンパク質には上記のような結合部位の複雑さだけでなく、アミノ酸の帯電、疎水性などによるタンパク質構成分子同士の非共有結合もその高い親和性に貢献する。

すなわち、複雑な生命活動はタンパク質の高い高次構造により可能となり、その高度な情報を保存し、複製させるのがDNA配列を有する遺伝子情報である。故にDNA配列情報が全ゲノム上で解読され、さらに微量なタンパク質も瞬時に定性できる時代の到来は生命科学の解明に大きく貢献したとともにこれらを利用した新たな医療分野への応用も急速に進んだことは容易に想像できる。それでは高速シーケンサーと質量分析計がもたらした生命科学の進歩と医療とのかかわりについて各論しよう。

3、超高速シーケンサーがもたらした遺伝性疾患の病因解明と医療への応用

超高速シーケンサーの利用は多岐にわたる。特に医療面では疾患原因遺伝子の検索に多大な成果をもたらした。Exomeと呼ばれる遺伝子のExon領域だけを患者のDNAで判読する技術は、短時間に比較的安価に遺伝性疾患患者の原因遺伝子を同定することを可能にした。これまでの連鎖解析と呼ばれる

手法に比べると、解析手法の方向性が異なるため、両手法を合わせることにより、同定精度が格段に向上した。現在では発症者一人の遺伝子解析でもその原因遺伝子がある程度突き止めることが可能となった。これは高速シーケンス技術の発展がなければ決してなしえなかったことである。比較的浸透率の高い遺伝性疾患が見つかりその原因遺伝子が見つかるということはその患者の治療や予後の予測、出生前診断にも使用できることは言うまでもない。さらに原因となるタンパク質の機能解析にも大きく貢献する。たとえば常染色体優性遺伝の原因遺伝子が単アミノ酸変異を原因としておこっているとすれば、そのタンパク質の機能ドメインと高次の生命活動の間に導線がつながることを意味し、その導線の確実性は浸透率の高い疾患では非常に高くなる。もちろんこの作業は高度な科学的 confirmation science と考えられるかもしれないが、やみくもに遺伝子破壊を行って機能解析を行うノックアウトマウスの解析よりも生物学的・医学的意義は格段に大きい。加えて強調しておきたいのは、このような手法は臨床家が中心となって行うタンパク質工学である点である。近年は臨床家が生物化学を行う機会が徐々に減ってきているが、患者を診て疾患の本質を見極めその新しい治療法を見つけるために、上記の遺伝学的手法はこれからますます重要性が増すと考えられる。

4、超高速シーケンサーにより得られた情報をもとにしたタンパク質定性・定量解析と医療応用

超高速シーケンサーによりDNA塩基解読の完成度が上がったことはタンパク質の定性・定量技術に革命的進歩をもたらした。これはタンパク質解析における質量分析計の応用によるものである。この技術は21世紀になり、DNA配列解読がなされて初めて可能となった技術である。言葉をかえれば、質量分析によるタンパク質解析はDNAの配列情報がなければ高精度で行うことはできない。ペプチドマスフィンガープリンティングと呼ばれるこの手法はまさに生物が遺伝子上に残す指紋を検出する定性手段という意味では非常に興味深い。定性の原理は、定性したいタンパク質をトリプシンなどの決まったアミノ酸の部分で切れるタンパク質で切断する。たとえばトリプシンはリジンとアルギニンを特異的に認識する。一つのタンパク質にリジンとアルギニン

の場所は異なるため切れたタンパク質の断片の長さはほぼ4万種あるといわれているヒトのタンパク質の間ではほぼ唯一である。そのため得られたペプチド断片の長さが一つでも正確に測定できれば、そのタンパク質がなんであるかが同定できるわけである。この原理から理解できるように、本手法は元となるタンパク質の配列情報すなわちDNAの配列情報がなければ利用できない。ところが上記の超高速シーケンサーの進歩によりヒトのみならずさまざまな動物種から細菌に至るまであらゆる生物のDNA配列が解読されるにあたり質量分析によるタンパク質の定性は一挙にタンパク質定性の常套手段となった。また同定されるペプチドの量の測定から単一のタンパク質の量を測定することも可能となり、血液検査などの医療分野でも応用が進んでいる。

5、タンパク質同定方法の変遷

質量分析計による、タンパク質定性が一般化するまでは、生化学者は精製したタンパク質を定性するために、エドマン分解法という解析手法をもちいていた。この方法はN末端から順々に化学反応により切り出したアミノ酸をクロマトグラフィーのパターンから解読していく方法であった。しかしこの方法は1pmol程度のタンパク質を必要とするばかりでなくアミノ断端が修飾をうけている場合には、さらにペプチド分解をしなければならずより多くの精製タンパク質を必要とした。それでも当時、画期的だったこの手法を利用し、多くの生理活性物質や受容体などの創薬対象となるような生理活性物質が1980年代に次々と同定された。その精製規模はウシ何万匹からや培養上清300リットルから精製されるなど膨大でそこから多段階のカラム手法を経て数pmolという最終精製素材を手に入れ同定に至っていた。これらの生理活性物質は多くの場合、創薬標的となりその後、さらにそれらの物質の受容体のクローニング戦争と相まって、ほとんどの研究者が新しい分子の同定に血眼になっていたといっても過言ではない。増殖因子などのリガンドにくらべ量が少なく、精製も困難であった受容体はほとんどの場合発現クローニングという手法を用いて精製されていた。我が国でも多くの生理活性物質を同定した松尾・寒川らや、多くの生理活性物質の受容体のクローニングを行った沼・中西ら極めて優れた研究者が

存在した。すなわちタンパク質大量精製の時代から遺伝子mRNAを直接同定する時代へと定性の手技は徐々に変遷していった。ところが、21世紀に入り定性の手段は一挙に質量分析を利用したタンパク質の定性へと逆シフトしていった。

6、質量分析計の性能向上

ペプチドマスフィンガープリンティング法によるタンパク質の定性は、2000年の初めあたりは、それほど感度の良いものはなかった。加えていまだ遺伝子の配列情報が特にヒト以外の動物種では不完全であったため、同定率はなかなか上昇しなかった。ところがしばらくして超高速シーケンサーが登場し一挙に遺伝子情報が増えたことにより、遺伝子配列の確度があがり、ペプチド断片の分子量がわかればタンパク質を同定できる確率が急激に高まった。これはさらにヒト以外の動物種にも広がり、タンパク質の定性の主流は完全に質量分析に入れ替わっていった。これらの貢献により2002年に主にペプチド・タンパク質のイオン化に貢献した研究者にノーベル賞が授与された。その後の質量分析計の感度、精度、スピードの技術的向上はすさまじく、2010年に入りその定性感度はエドマン解析法の100～1000倍となっている。現在のタンパク質解析の主流となっている質量分析装置は流速が500nl/min程度のnanoLCと呼ばれる微細な液体クロマトグラフィー流路を使用してESI-columnと呼ばれる直径0.1mmの髪の毛のようなイオン化カラムを用いてペプチドを分離し順にイオン化し高速で解析する手法が主流である。

イオン化されたペプチドは四重極とよばれる装置により分子量スキャンされ、さらにコリジョンセルにより分解され、最後に多くはトラップ機能が付いた精密質量分析装置により解析される。トリプシン分解された産物の分子量を測るだけでなく、さまざまな分解産物の分子量まで高速に測定できるため、ある程度のアミノ酸配列情報まで得られ、さらに定性の精度が上昇した。これら第3世代と呼ばれる質量分析計の精度は驚異的でfmolからamolのタンパク質が正確に定性可能な時代になっている。

7、これからの定性解析

非常に感度の高い定性ツールを手に入れた時には

もう新しい興味のある分子はとりつくされていたというのが現実であり、創薬標的の同定を専門としていた製薬企業等はいち早く遺伝子情報を取り入れ新規分子の同定を終えていた。若い研究者にとっては遺伝子がすべて解読され、もうこれ以上のタンパク質はないのだと知らされることは科学的興味をそがれることだろうと想像する。20世紀には未知のタンパク質は無限にあってそれを見つければ新たな治療法が開けるであろうと夢を膨らませていたが、現在は全く未同定のタンパク質が同定されることはまずないと考えられる。それでも複雑な生命現象の全容は、いまだほとんどわかっていないに等しい。それを解き明かして新たな生命現象の解明と疾患治療への道を開くために、上記したような装置を駆使するのが当たり前の時代になっている。

現在の生命科学はすでに同定されている分子のノックアウトマウスを作ってから考えるというような運試的な研究が多いが、新しい分子機構を解明するためにたとえば複雑な構造体の中に含まれるタンパク質を一つ一つ同定し生理的機能解析をすすめたり、結合力の異なる酵素の基質を新たに同定するなどの研究も必要と思われる。そのためには、質量分析で定性に至るまでのさまざまな生化学的な創意工夫が要求されている。21世紀の生化学はこういった工夫を通じて生命機能の解明につなげることが必要と考えられる。定性の感度が極端に上昇した現在は、20世紀のように大量の初期試料は不要である。しかし何も処理していないサンプルを直接質量分析

法にかけるという方法は質量分析計の能力を測定するぐらいの意味しかない。

確かに、溶液ショットガン法といわれる手法は、たとえば臓器から粗精製しただけのサンプルの中に含まれる1000以上のタンパク質を一挙に同定することを可能とした。しかしこのように感度のいい手法が利用可能になった時こそ、カラムや密度勾配を使用した、従来の生化学的手法をうまく併用することの重要性が増していると考える。そういった質量分析を利用したタンパク質定性の一例として、リン酸化酵素の新しい基質を発見した際の手法を紹介する。

8、ATP 感受性酵素 AMP 依存性キナーゼ (AMPK) の基質の検索

生化学的手法と多段階のカラム精製を使用したユニークなタンパク質定性の一例を紹介する。AMPKというリン酸化酵素の新たな基質を同定するために以下に示すような方法を使用した(参考文献)。まず、マウスの心臓をホモジナイズし、高分解能のイオン交換カラムにかけて分離する。そして細かく分けたフラクションでリンが放射性ラベルされたATPとAMPKを混ぜ合わせるにより基質を放射線ラベルする(図1)。最初の高分解能のカラム操作は非常に重要で、臓器の中に非常に大量に含まれる脱リン酸化酵素と自己リン酸化されて同定の邪魔になるリン酸化酵素をフラクションアウトするという意味が含まれる。またこの酵素反応は純粋に生化学的

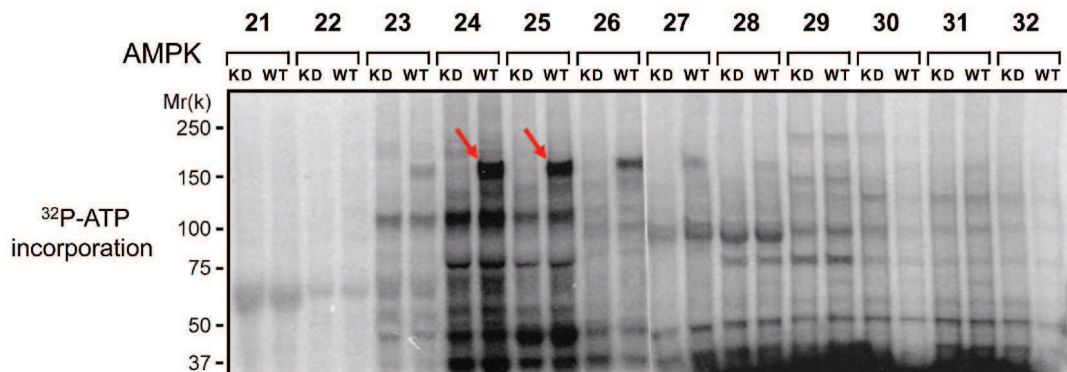


図1、AMPKの新規基質の精製—その1
心臓のホモジネートを高分解能のカラムで精製し、各フラクションでキナーゼ反応を行った。矢印のバンドが野生型(WTと記載)のAMPKとは反応して、活性を失った変異型(KDと記載)とは反応していない。AMPKの基質と考えられる。一方、両方で反応しているものは混入している他のリン酸化酵素が自己リン酸化したものでAMPKの基質ではない。

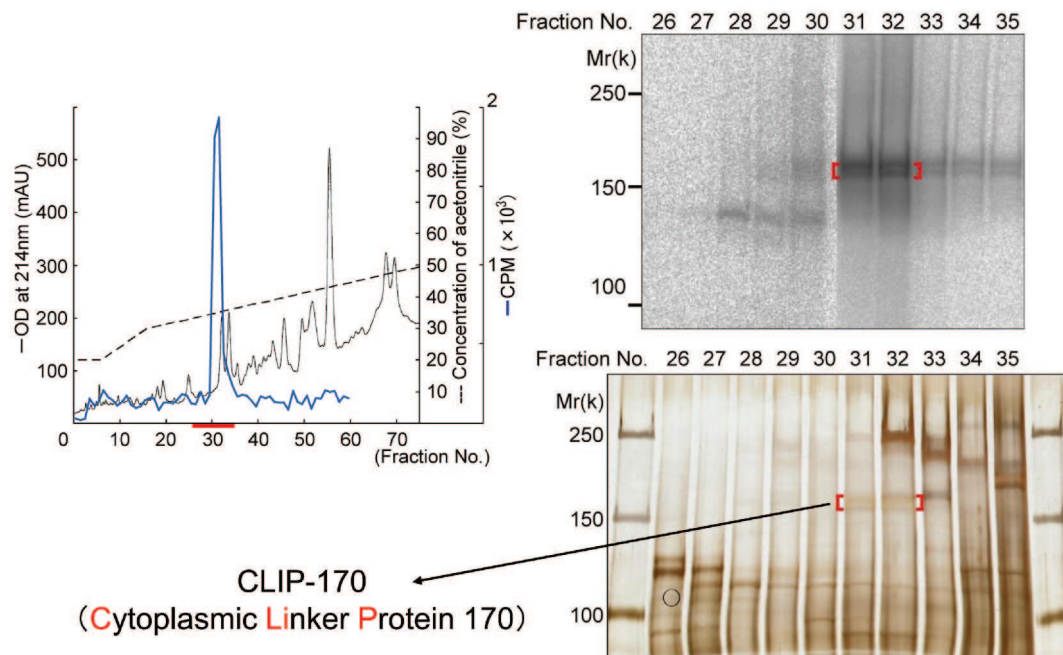


図2、AMPKの新規基質の精製—その2

図1で基質と同定されたものをその後、逆相カラムで精製している。すでに基質は放射性ラベルされているため、放射活性を指標に精製を進行させる(左図)。最高の放射活性をきたした部分を電気泳動し、放射活性を示すバンドを同定(右上図)、同じサンプルを銀染色したもの(右下図)を切り出し質量分析計で解析したところCLIP-170という新規基質であることが判明した。

であるため、反応産物の量はAMPKと基質のKmおよびVmaxに依存する。事実、この手法では非常にKm値の低い、親和性の高い基質が同定できた。いったん放射線ラベルされた基質が同定されればあとは変性状態にタンパク質をさらすことにより分解能をあげ、たとえば逆相カラムにかけてタンパク質を精製する(図2左図)。たった2段階であるが銀染色でうすすらそまる10fmol程度の新規タンパク質が精製できた(図2右図)。これを切り出してそのタンパク質CLIP-170を同定することは容易であった。この発見をもとにAMPKが細胞極性を制御する新規のシグナル経路を明らかにした。またCLIP-170の非リン酸化体を創薬標的とした抗がん剤のデザインも現在進行中である。

9、終わりに

超高速シークエンサーや質量分析装置は、現在の生命科学研究に必須の手段になっている。その技術進歩は留まるところを知らないが、操作にかなりの熟練が必要なことも強調したい。またデータ解析に関しても、大規模なサーバーを取り揃えて行わな

ければならず、専門のオペレーターが存在が必須の装置類である。しかしその応用範囲は非常に広く、いかにうまく利用するかは研究者のセンスにかかっているとよい。大学や研究機関は、部局規模でこれらの装置を研究者が自由に使える体制を整えるべきである。現在、超高速シークエンサー、質量分析等ともに国産メーカーでの開発が大きく遅れているのは大変残念であるが、シークエンサーに関してはかなり性能のよい次世代の国産の一分子シークエンサーが開発されつつある。これらの技術開発が我が国で研究者と共にすすめられ、いち早く応用されていくことを願ってやまない。

参考文献

Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min K-D, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Kaibuchi K, Mochizuki N, Kitakaze M, Takashima S. AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration via CLIP-170 phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 12(6), 583-590 (2010).