

SWATH 質量分析法による高脂肪食誘導肥満マウスの肝臓の定量プロテオミクス

太田 汐海¹, 西端 智也², 山脇 瑛也花¹, 淡路 智貴¹, 大世渡 勇紀¹, 阪上 綾花¹, 岸田 邦博^{2,3}, 永井 宏平^{1,2}

要旨

肝臓は、脂質や糖質代謝の中心であり、肥満に伴うメタボリックシンドロームの進展にも深くかかわる。肥満に伴う肝臓の生化学的・病理学的な変化を包括的にとらえる手法を確立できれば、生活習慣病を予防する薬剤の開発や、生活習慣病予防効果を持つ食品機能性成分の分子機構の解明等に寄与すると考えられる。そこで、本研究では、組織中のタンパク質を網羅的に定量可能な SWATH 質量分析法を用い、高脂肪食誘導肥満マウスの肝臓におけるタンパク質発現プロファイルを解析し、肥満に伴う肝臓の生化学的変化を捉えることができるかどうかを検討した。6 週齢の C57/BL/6J 雄マウスを 0.1% のセルロースを含有した高脂肪食 (HD 群, n=6), および普通食 (ND 群, n=5) で 5 週間飼育し、16 時間の絶食後に肝臓を採取した。肝臓タンパク質をトリプシン処理し、生じたペプチドを nanoLC-MS/MS (AB sciex 社 TripleTOF5600+) で解析した。DDA 法で得た MS/MS データを Uniprot Mouse database に対して検索し、Ion library を作成した。SWATH 測定では Q1 window 幅を 25 Da に固定し、m/z = 400 – 1000 の範囲で 25 window を設定した。各 MS/MS 測定の測定 m/z 範囲は 100 – 1500 とし、積算時間は 100 msec とした。DDA 測定によって、1249 個のタンパク質 (10880 個のペプチド) が同定された。このうち、SWATH 法により 768 個のタンパク質が定量可能であった。これらのタンパク質には、各種代謝酵素、解毒酵素など肝臓を特徴づけるタンパク質が多数確認された。得られた肝臓タンパク質プロファイルを主成分分析 (PCA), および主成分判別分析 (PC-DA) にかけてところ、ND 群と HD 群は明確に分離され、それぞれ特徴的なタンパク質プロファイルを有していることが示された。ND 群に比べて、HD 群では解毒や呼吸鎖に関わる多くの酵素が減少しており、このうち一部は以前の報告と一致していた。また、HD 群では細胞自律的免疫に関わるタンパク質や脂質代謝に関わる酵素が増加していた。脂質代謝に関わる酵素には、ステロール代謝に関わる酵素が多く含まれ、肥満に伴うコレステロールの増加を反映していると考えられた。

キーワード: SWATH 質量分析法, 定量プロテオミクス, 高脂肪食, 肝臓

1. 緒論

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪症候群とも呼ばれるように、内臓脂肪 (腹腔内脂肪) の蓄積を前提として、インスリン抵抗性・高血糖、脂質代謝異常 (高トリグリセライド血症, 低 HDL コレステロール血症), 血圧上昇といった代謝異常が個人に集積する状態を指す⁽¹⁾。メタボリックシンドロームは自覚症状が少なく積極的な治療が行われない場合も多い。しかし、未治療のまま放置するとインスリン抵抗性や動脈硬化などの不可逆的な臓器障害を徐々に進行させ、やがて糖尿病、腎不全、心筋梗塞、脳卒中といった致命的な病気の発症を引き起こす。わが国における調査では、メタボリックシンドロームでは、非メタボリックシンドロームに比べて、2 型糖尿病のリスクが 4~6 倍に、心血管疾患発症および心血管疾患死のリスクが約 1.5 倍~2 倍に増加することが判明している⁽¹⁾。したがって、できるだけ早い段階でメタボリックシンドロームを予防し改善することが、結果的には生活習慣病発症のリスクを回避することにつながると思われる。

受付日 2018 年 8 月 25 日、受理日 2018 年 9 月 27 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.15-III-11, 2016, No.16-III-12, 2017 の助成を受けた。

1. 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
3. 近畿大学生物理工学部食品安全工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

肝臓は、脂質代謝や糖質代謝などの各種代謝の中心であることから、脂肪組織と並んで、肥満に伴う各種代謝異常に深く関わる臓器である⁽²⁾。また、肝臓は、メタボリックシンドロームの進展にともなって、肝細胞に脂肪が大量に蓄積する非アルコール性脂肪肝 (NAFL) という状態に陥りやすくなる。NAFL の多くは良性に経過するが、一部が炎症や繊維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) となり、肝硬変を経て肝臓に至ることが明らかとなっている⁽²⁾。このように肝臓はメタボリックシンドロームおよび生活習慣病の進展に深く関わっているが、その病態生理の全体像はまだ十分に理解されているとはいえない。肥満によるメタボリックシンドロームの進展、そして生活習慣病の発症という各段階における肝臓の生化学的・病理学的な変化を包括的にとらえる手法を確立できれば、メタボリックシンドロームを改善し、生活習慣病を予防する薬剤の開発や、生活習慣病予防効果を持つ食品機能性成分の分子機構の解明等に寄与すると考えられる。

近年の低流速の液体クロマトグラフィー (Liquid chromatography, LC) と質量分析計 (Mass spectrometry, MS) の発展に伴い、LC-MS を用いた組織中のタンパク質の網羅的な定量 (定量プロテオミクス) が盛んに行われるようになってきている。中でも Sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra (SWATH) 質量分析法⁽³⁾ に代表される情報非依存的測定法 (DIA 法) は、一度の測定で数千個のタンパク質を定量できる網羅性の高さと再現性の高さから、近年注目されている^(4,5)。

LC-MS を用いた定量プロテオミクスでは、組織中から抽出してきたタンパク質混合液をトリプシンなどの基質特異性の高いプロテアーゼで分解し、生じた様々なペプチド断片を LC で分離し、溶出した順に MS で測定するショットガンプロテオミクスと呼ばれる方法がとられる。MS では、ペプチド断片をそのまま検出する MS スペクトル測定と、ペプチドを気体分子にぶつけて分解し、生じたフラグメントイオンを検出する MS/MS スペクトル測定の 2 種類の測定が行われるが、どちらのスペクトル上のピーク強度もタンパク質の定量に用いられる。SWATH 質量分析法は、二つの四重極 (Quadrupole, Q) 型 MS と飛行時間型 (Time of flight, TOF) MS が連結された TripleTOF 型質量分析計を用い、MS/MS スペクトル上のフラグメントイオンのピーク強度を用いて定量を行う方法である。一般的に LC-MS/MS 測定で使用される情報依存的解析法 (Data dependent acquisition, DDA) 法と SWATH 法の違いを図 1 に示した。DDA 法では、まず、HPLC から流れてきたペプチドを Electrospray ionization (ESI) でイオン化し、Q1, Q2 を素通りさせて、TOF で MS 測定を行う。その後 MS データに基づいて (情報依存的に)、イオン強度の強いペプチドから順に Q1 で選抜し、Q2 で断片化した後に、フラグメントイオンの測定 (MS/MS スペクトル) を行う (図 1A)。Q1 において単一のイオンを選抜するため、Q1 を通過するイオンの質量電荷比 (m/z) の幅 (Q1 Window 幅) は 0.1 Da 程度に設定される。イオン強度の強いものから測定しているため、MS/MS 測定時にイオン強度の弱いペプチドの取りこぼしが生じる。そのため、DDA 法はペプチドの網羅的な定量には向いていない。一方で、SWATH 質量分析法では、MS スペクトルの情報に基づかずに (情報非依存的に) MS/MS 測定を行う。Q1 の Window 幅を大きく広げ、同時に複数のペプチドを通過させることで、親イオンのイオン強度に関わらず、検出可能な全てのフラグメントイオンの定量を行うことができる (図 1B)。実際には、一度にすべてのフラグメントイオンの検出は不可能なため、Q1 window 幅を 25 Da 程度に設定し、通過させる親イオンの範囲を少しずつずらしながら測定することで、網羅的な定量を目指している。このような原理のため、SWATH 法ではフラグメントイオンの親イオンの質量情報が得られず、タンパク質の同定を行うことができない。そこで、同条件で DDA 法と SWATH 質量分析法を併用し、DDA 法で得られた各ペプチドの溶出時間、フラグメントイオンの質量などの定性情報 (Ion library) を SWATH 質量分析法の測定データに当てはめることで、タンパク質の網羅的な定量を行うことが可能となる。

LC-MS におけるピーク強度は、ESI でのイオン化の状態によって大きく影響を受ける。そのため、

LC-MS を用いた定量方法では、ESI の状態等の影響を補正するための標準化 (normalization) の過程が欠かせない。標準化のための様々な手法が考案されているが、SWATH 法では、全フラグメントイオンの強度に対する相対化を行う方法が一般的である⁽⁶⁾。また、ペプチドのアミノ酸配列の違いによって ESI でのイオン化効率が異なるため、ピークエリアを用いて同一試料内の異なる物質の量を比較することはできない。以上のことから、SWATH 法で得られる定量値は基本的に相対値であり、異なる試料間の同一の物質の存在量を比較することに用いられる。

SWATH 法は、網羅性 (一度に解析できる因子の数) では DNA chip に比べて劣るものの、その再現性の高さから非常に注目を浴びている^(3,7)。例えば、Li らは、様々な条件で酵母のタンパク質の SWATH 解析を行い、同日に 5 回測定した際の変動係数 (CV 値) の中央値が 6 - 10% の範囲に収まることを示した⁽⁵⁾。また、我々が、本実験と同じシステムを用いて血清のタンパク質の SWATH 測定を行った場合にも、同一日に 5 回測定した時の CV 値の中央値が 5.6% となり、8 割以上のタンパク質が CV 値 10% 以下で定量可能であった。この再現性の高さを利用すれば、これまで DNACHIP などで解析できなかったタンパク質のわずかな発現量の変化も捉えられる可能性がある。

このような利点から、SWATH 法は医学分野を中心に利用が広がっており、がん領域での研究例が増加している^(3,4)。しかし、SWATH 法を用いて、メタボリックシンドロームや生活習慣病の進展を解析した例はこれまでにない。そこで、本実験では、高脂肪食の摂取によって肥満誘導したマウスの肝臓のタンパク質を SWATH 法で網羅的に定量し、肥満に伴う肝臓の生化学的・病理学的変化をモニターすることが可能かどうか検証した。

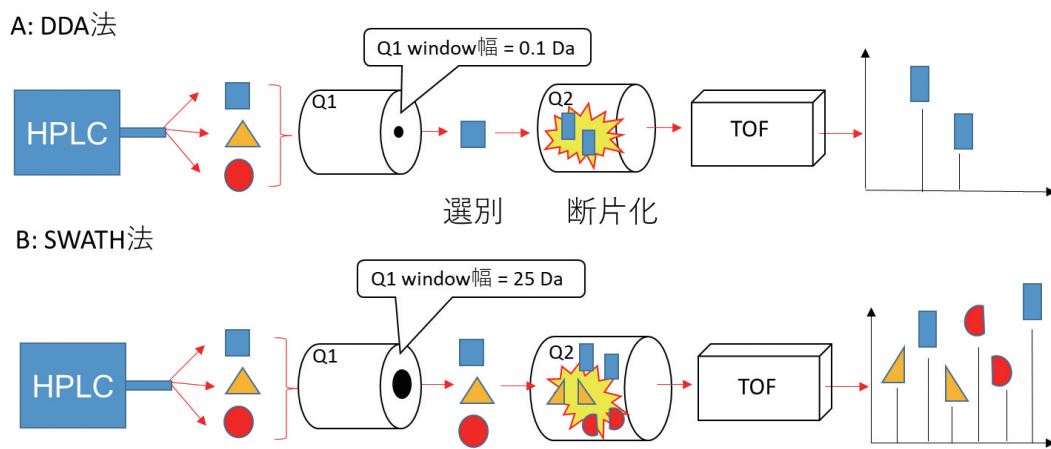


図 1. DDA 法 (A) と SWATH 法 (B) の概略図。Q, 四重極型質量分析計; TOF, 飛行時間型質量分析計

2. 材料と方法

2.1 動物実験

5 週齢の C57BL/6J kwl SPF マウスは株式会社紀和実験動物研究所 (和歌山県紀美野町) より購入した。MF 飼料と HFD-60 飼料はオリエンタル酵母工業株式会社 (東京都板橋区) より購入した。これらのマウスは MF 飼料を与えて 1 週間順化した後、標準食群には MF 飼料、高脂肪食群には HFD-60 飼料 + 0.1% セルロース粉末を 5 週間与えて飼育した。両群とも餌と水は自由に摂取させた。試験期間中 3 日おきに体重を測定した。試験最終日に 16 時間の絶食を行った後に肝臓を採取・重量測定した。両群ともに 6 匹のマウスを用いて実験を開始したが、実験操作上のミス (餌の取り違い) により普通食群の 1 匹を解析対象から外した。その

ため、普通食群は5匹分のデータで以降の解析を行った。本動物実験は近畿大学生物理工学部 動物実験小委員会の承認を得て実施した（承認番号 KABT-26-004）。

2.2 タンパク質抽出

マウス肝臓 0.1 g を計り取り、1 mL の抽出液（7 M 尿素、2 M チオ尿素、4% CHAPS）を加え、氷上に置いた乳鉢上で乳棒を用いてホモジナイズした。抽出溶液を 1.5 mL チューブに移し、4°C、1,4000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清を新しいチューブに移したのちに、同条件で遠心分離を行った。生じた上清を新しいチューブに移し、肝臓タンパク質溶液とした。タンパク質濃度は、 γ グロブリンをスタンダードとし、Bradford 法を用いて測定した。

2.3 肝臓タンパク質のトリプシン消化と脱塩

30 μ g のタンパク質を含む溶液に、6 倍量の氷冷アセトンを加え、-20°C で 16 時間静置してタンパク質を沈殿させた。14,000 rpm で 5 min 遠心し、上清を取り除いた。沈殿に 500 μ L の氷冷アセトンを加えて攪拌し、沈殿を洗浄した後に、14,000 rpm \times 5 min で遠心し沈殿を回収した。沈殿を風乾させた後、10 μ L の溶解 buffer（8M 尿素 in 200 mM Triethylammonium bicarbonate, TEAB）に溶解した。50 mM tris（2-carboxyethyl）phosphine）溶液を 10 μ L 加えてジスルフィド結合を還元した後に、37°C で 2 時間反応させた。更に、200 mM S-Methyl methanethiosulfonate 溶液を 5 μ L 加えて、温室で 30 分反応させ、チオール基のアルキル化を行った。40 μ L の Digestion buffer（300 mM TEAB, 1 mM CaCl_2 ）で溶液を希釈した後に、0.5 μ g/ μ L の Trypsin（Sequence Grade, Promega, Madison, USA）を 3 μ L 加えて、振盪しながら 37°C で 2 時間静置した。更に MilliQ 水 5 μ L、0.5 μ g/ μ L の Trypsin 溶液を 3 μ L 加えて、振盪しながら 37°C で 16 時間反応させた。消化ペプチド溶液に 10% リン酸液を 5 μ L と 1% ギ酸溶液を 0.5 μ L 加えて、反応を停止させた。Ziptip（Millipore, Bedford, MA, USA）で脱塩処理し、溶出液を遠心濃縮機で完全に乾燥させた。得られたペプチドの粉末を 30 μ L の 0.1% ギ酸溶液で溶解し、測定まで -30°C で保存した。

2.4 LC-MS 測定

ペプチドの分離は Ecksigent nanoLC system（AB Sciex, Framingham, USA）を用いて 300 nL/min の流速で行った。Trap カラムとして、ChromeXP C18-CL 3 μ m 120A 200 μ m \times 0.5 mm（AB Sciex）を、分析カラムとして ChromeXP C18-CL 3 μ m 120A 75 μ m \times 15 cm（AB Sciex）を使用した。遊離液として 0.1% ギ酸溶液を A 液、0.1% ギ酸アセトニトリル溶液を B 液として用い、B 液を 125 分かけて 2~90% まで増加させることでカラムに吸着したペプチドを溶出させた（0-120 min: 2-30%; 120-121 min: 30-90%; 121-125 min: 90%; 125-150 min: 2%）。nanoLC によって分離されたペプチドは、ESI イオン源に接続された Triple TOF5600+ system（AB sciex）を用いて分析した。1 回の測定に 3 μ g のタンパク質トリプシン消化ペプチドを用いた。DDA 測定においては、まず MS 測定を m/z 範囲 400-1200、積算時間 250 msec で行った。MS スペクトルで確認された主要なピークについて MS/MS スペクトルを測定し、再び MS 測定を行うというサイクルを 150 分間繰り返した。一つのサンプルに対して、1 本の MS スペクトルにつき 50 msec の積算時間の MS/MS スペクトルを 20 本測定する方法と、100 msec の積算時間の MS/MS スペクトルを 10 本測定する方法の 2 種類の測定を行った。他のパラメーターはメーカーの推奨に従った。SWATH 測定では、400-1000 の m/z 範囲において、幅を 25D に固定した Q1 window を 25 個設定した。第 1 window（m/z = 400 - 425）から順次、100 msec の積算時間の MS/MS 測定を行い、第 25 window（m/z = 975-1000）の測定終了後、再び、第 1 window に戻るというサイクルを 150 分間繰り返した（サイクルタイム 2.6 秒）。他のパラメーターはメーカーの推奨に従った。

2.5 Ion library の作成

IDA 測定によって得られた MS/MS スペクトルのデータを Protein Pilot software ver 4.5 (AB Sciex) を用いてデータベース検索した。検索対象のデータベースは UniProt (<http://www.uniprot.org/>) の Mus Musculus のタンパク質データを用いた。信頼度 95%以上で同定されたペプチドを有意とみなした。また、False discovery rate (FDR) を計算し、FDR 1%以下で同定されたタンパク質を有意と見なした。得られたタンパク質同定データを基に SWATH 測定に用いる Ion library を作成した。

2.6 定量解析

SWATH 質量分析法で得られたデータの分析は、Peak view software ver 2.1 (AB sciex) を用いて行った。Ion library に登録された溶出時間と m/z 値に基づいた各ピークの帰属、ピークの定量、および定量結果の False discovery rate (FDR) と欠損値の存在割合を示す Gap 値の計算はソフトウェアによって自動的に行われた。一つのタンパク質に帰属されたペプチドの中から、Gap 値 (%) が 0 であり、フラグメントイオンのピーク形状が整い、ノイズピークの少ないものを最大で 8 個選択した。同一ペプチドに由来するフラグメントイオンの面積値を全て合計してペプチドの定量値とした。更に、一つのタンパク質に複数のペプチドが選択されている場合には、これらのペプチドの定量値を全て合計し、タンパク質の定量値とした。ESI のスプレーの状態などを補正することを目的に、常法に従い、全タンパク質の定量値の合計に対する相対値を計算することで標準化を行った⁽⁶⁾。

2.7 多変量解析および統計処理

教師無しの多変量解析である主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 解析および、教師ありの多変量解析である主成分判別分析 (PC-discriminant analysis, PC-DA) 解析は Marker view software ver 1.2.1.1 (AB Sciex) を用いて行った。Data scaling は Pareto scaling を用いた。また、普通食群と高脂肪食群間でタンパク質定量値に有意な差が存在するかを片側 t 検定により検定した。

3. 結果

3.1 高脂肪食による肥満誘導

6 週齢の C57BL/6J kwl SPF マウスを 2 群に分け、普通食および高脂肪食を与え 5 週間飼育した。5 週間の体重増加量 (平均値±標準偏差) は、普通食群で 4.13 ± 0.78 g、高脂肪食群で 6.84 ± 2.16 g となり、高脂肪食群で有意に増加していた ($P < 0.05$)。最終日に 16 時間の絶食をしたのちに精巣周囲脂肪と肝臓の採取を行い、臓器重量を測定した。精巣周囲脂肪は普通食群で 279 ± 81 mg、高脂肪食群で 592 ± 361 mg となり高脂肪食群で有意に増加した。また肝臓の重量は、普通食群で 860 ± 76 mg、高脂肪食群で 894 ± 11 mg となり、有意な差はみられなかった。得られた肝臓の一部を用いて、タンパク質の抽出およびトリプシン消化を行った。

3.2 Ion library の作成と SWATH 法による肝臓タンパク質の定量

SWATH 法に必要な Ion library を作成するために、肝臓タンパク質のトリプシン消化溶液を、普通食 5 匹分、および高脂肪食群 6 匹分等量混合したサンプルを作成し、それぞれ DDA 法を用いて LC-MS/MS 解析を行った。得られた MS データを統合し、データベース検索にかけたところ、1249 タンパク質 (10880 ペプチド) が同定された。本検索結果をもとに SWATH 法に用いる Ion library を作成した。

次に、各マウスの肝臓タンパク質の発現プロファイルを得るために、タンパク質 3 μ g 分のトリプシン消化溶液を用いて SWATH 測定を行った。Ion library の情報を基に、SWATH 法で得られたフラグメントイオンの帰属を行った。SWATH 法による定量解析結果の一例として、図 2 に、Glutathione S-transferase

Mu 1 に由来する MLLEYTDSSYDEKR ペプチド ($z = 3$) の定量結果を示した. MLLEYTDSSYDEKR ペプチドの MS/MS スペクトル (図 2A) 上で, 5 つのフラグメントイオンを選び, Extracted ion chromatography (XIC) を作成した (図 2B). 同じペプチドに由来するフラグメントイオンのピークであることから, すべてのピークが同じ Q1 window 上で, 同じ溶出時間で検出された. これにより, 同じ m/z を有しているターゲット以外のフラグメントイオン (ノイズピーク) を誤って定量することを防ぐことができた. 5 つのフラグメントイオンのピーク面積を合計し, 本ペプチドの定量値とした. 更に, Glutathione S-transferase Mu 1 に帰属された別の 2 本のペプチドの定量値を合計し, 本タンパク質の定量値とした.

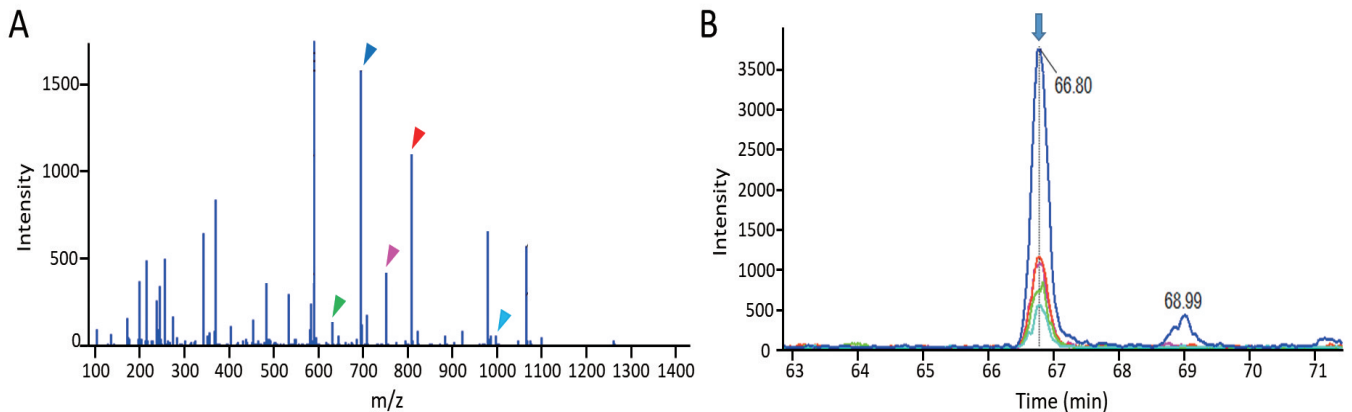


図 2. SWATH 質量分析法により Glutathione S-transferase Mu 1 MLLEYTDSSYDEKR ペプチド ($z = 3$) の定量結果. A. MLLEYTDSSYDEKR ペプチドの MS/MS スペクトル. Δ で示した 5 つのフラグメントイオンを定量に用いた. B. MLLEYTDSSYDEKR ペプチドのフラグメントイオンの Extracted ion Chromatography (XIC). 矢印で検出されたピークを示した.

同様に, Ion library に登録している全タンパク質の定量を試みた. その結果, フラグメントピークの帰属に成功し, かつ 11 サンプル全てで定量が可能 (GAP 値 = 0) だったタンパク質は 768 個であった. Uniprot database 上に記載されたタンパク質のアノテーション情報を基に, 定量可能だったタンパク質を機能分類した結果を図 3A に示す. 最も数が多かったのは代謝酵素であり, 全体の 38.7% (297 個) を占めていた. ほかに, タンパク質プロセッシング (18.0%), 物質輸送 (9.2%), 解毒・薬物代謝 (8.6%) に関わるタンパク質の割合が多く, 代謝酵素と合わせて全体の 75% を占めていた. 割合的には少ないが, RNA のプロセッシング (3.9%), シグナル伝達 (2.6%), 細胞骨格 (2.9%) に関わるタンパク質も含まれていた. 297 個同定された代謝酵素には, 脂質代謝, アミノ酸代謝, 糖質代謝, 呼吸鎖, TCA 回路など幅広い代謝経路に属す酵素が含まれており, グリコーゲンの代謝, ビタミン A の代謝, コレステロール合成, 胆汁酸合成など肝臓に特異的な代謝経路に属す酵素も多く定量された.

3.3 普通食群と高脂肪食群の肝臓タンパク質プロファイルの比較

SWATH 法により得られた肝臓タンパク質プロファイルを分析し, 普通食群と高脂肪食群の比較を行った. まず, 教師無しの変量解析である PCA 解析を行うことで, データの縮約を試みた. 図 4A に各サンプルの第 1 主成分 (寄与度 26.8%) と第 2 主成分 (寄与度 16.4%) のスコアをプロットした結果を示す. 普通食群と高脂肪食群は, 第 1 主成分によって明確に分離され, それぞれ特徴的なプロファイルを示すことが分かった. しかしながら, 高脂肪食群, 普通食群内部でも第 2 主成分の大きい個体と小さい個体に分けられることから, 何らかの個体差が生じている可能性が示された. 次に, 高脂肪食群と普通食群を判別する特徴的なタンパク質をとらえるために, 教師ありの主成分分析である PC-DA を行った.

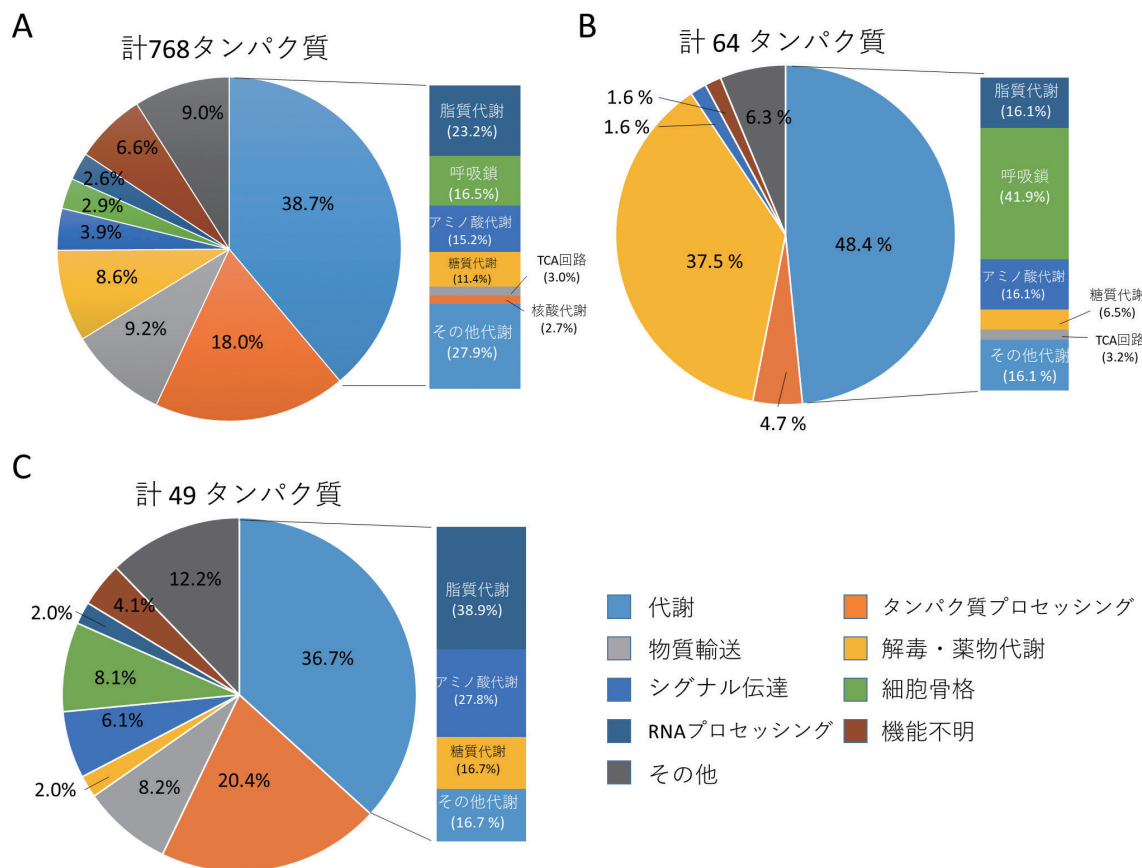


図3. SWATH質量分析法で定量できた肝臓タンパク質の機能分類. A: 定量可能だった全タンパク質の機能分類. B: 普通食群で1.2倍以上有意に増加したタンパク質の機能分類. C: 高脂肪食群で1.2倍以上有意に増加したタンパク質の機能分類.

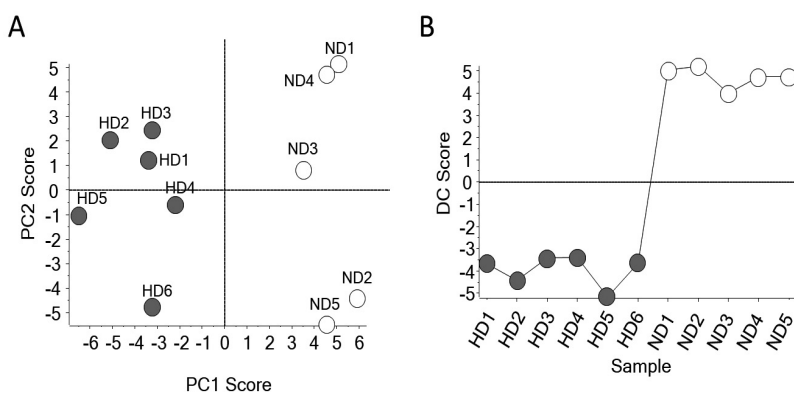


図4. 肝臓タンパク質プロファイルの多変量解析の結果. A: 主成分分析 (PCA) のスコアプロット. 横軸が第1主成分 (PC1) のスコアで, 縦軸が第2主成分 (PC2) のスコアを示す. B: 主成分判別分析 (PC-DA) のスコアプロット. 横軸がサンプル名, 縦軸が判別主成分 (DC) のスコアを示す.

PC-DA では, どの個体がどちらの群に所属するかの情報を与え, 両群が最大限に分離するような主成分 (Discrimination component, DC) を算出する. その過程で, 両群を特徴づけるようなタンパク質に高い Loading score が与えられ, PC2 にみられるような, 普通食-高脂肪食とは無関係に変動する因子は排除される (低い Loading score を与えられる). 図4BのDCのScore plotが示すように, PC-DAによって普通食群と高脂肪食群が明確に区別できた. 両群を特徴づけるタンパク質を調べるために, DCのloading scoreの上位10個のタンパク質と下位10個のタンパク質を, そ

それぞれ表 1 と表 2 にリスト化した。Loading score の高いタンパク質、つまり、普通食群を特徴づけるタンパク質は、上位 10 個中 9 個が、解毒や薬物代謝に関連する酵素であった。それに対して、Loading score の低いタンパク質、つまり、高脂肪食群を特徴づけるタンパク質には、免疫反応、タンパク質分解、小胞体タンパク質、ビタミン A や鉄の輸送タンパク質など様々な機能のタンパク質がリストアップされた。

表 1. 普通食群を特徴づける肝臓タンパク質. PC-DA 解析 (図 3B)において、DC score の上位 10 個のタンパク質をリスト化した。

No.	DC score	Uniprot ID	タンパク質名	機能
1	0.163	CP2CT_MOUSE	Cytochrome P450 2C29	解毒・薬物代謝。モノオキシゲナーゼ活性
2	0.158	EST2A_MOUSE	Pyrethroid hydrolase Ces2a	解毒・薬物代謝。ピレスロイド系農薬の分解に関与
3	0.125	ETHE1_MOUSE	Persulfide dioxygenase ETHE1	解毒・薬物代謝。硫化水素の解毒に関与
4	0.119	PON1_MOUSE	Serum paraoxonase/arylesterase 1	解毒・薬物代謝。脂質酸化物、有機リン酸エステル化合物の分解
5	0.115	GSTM1_MOUSE	Glutathione S-transferase Mu 1	解毒・薬物代謝。抱合反応
6	0.104	GSTT2_MOUSE	Glutathione S-transferase theta-2	解毒・薬物代謝。抱合反応
7	0.0974	CAH2_MOUSE	Carbonic anhydrase 2	炭酸代謝
8	0.0903	CP4AE_MOUSE	Cytochrome P450 4A14	解毒・薬物代謝。モノオキシゲナーゼ活性
9	0.0864	A2A977_MOUSE	Cytochrome P450 4A10	解毒・薬物代謝。モノオキシゲナーゼ活性
10	0.0858	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	TCA回路

表 2. 高脂肪食群を特徴づける肝臓タンパク質. PC-DA 解析 (図 3B)において、DC score の下位 10 個のタンパク質をリスト化した。

No.	DC score	Uniprot ID	タンパク質名	機能
1	-0.154	J7NNX8_MOUSE	Interferon-gamma-inducible GTPase	免疫反応に関与。感染応答。
2	-0.116	A0A068BIT8_MOUSE	Proteasome subunit beta type	プロテアソームの構成要素。タンパク質分解に関与。
3	-0.112	Q3TJD0_MOUSE	Sec61 alpha 1 subunit	小胞体タンパク質。タンパク質輸送に関与。
4	-0.106	Q3U651_MOUSE	Cathepsin D (Ctsd)	細胞内のタンパク質分解に関与。
5	-0.100	Q3TF08_MOUSE	Retinol-binding protein 4	レチノール(ビタミンA)輸送に関与。
6	-0.0992	Q9CPX4_MOUSE	Ferritin	鉄の貯蔵に関与。炎症時に増加。
7	-0.0914	CNPY2_MOUSE	Protein canopy homolog 2	小胞体タンパク質。小胞体ストレスのセンサー
8	-0.0896	Q3U6S1_MOUSE	Vimentin (Vim)	細胞骨格
9	-0.0880	SBP1_MOUSE	Methanethiol oxidase (Selenbp1)	有機硫黄化合物の分解に関与。
10	-0.0866	Q3V2G1_MOUSE	Apolipoprotein A-I(Apoa1)	高密度リポタンパク質(HDL)の構成因子。コレステロール輸送に関与。

次に、普通食群と高脂肪食群の肝臓タンパク質プロファイルを更に詳細に比較するために、768 個のタンパク質の定量値をそれぞれ両群間で比較した (表 3)。全体で 259 個のタンパク質が存在量に有意な差 ($P < 0.05$) がみられた。このうち、普通食群で増加していたタンパク質は 155 個で高脂肪食群に比べて 1.2 倍以上増加していたのが 64 個、2 倍以上増加していたのが 3 個であった。逆に、高脂肪食群で増加していたタンパク質は 104 個で、普通食群に比べて 1.2 倍以上多かったのが 49 個、2 倍以上が 2 個であった。両群間で 2 倍以上差のあった 6 つのタンパク質について、図 5 に散布図を示し、更に、普通食群と高脂肪食群で 1.2 倍以上有意に増加していたタンパク質のリストを表 4 と表 5 に示した。また、普通食群と高脂肪食群で 1.2 倍以上有意に増加

表 3. 普通食群 (ND) と高脂肪食群 (HD) 間で存在量に有意な差があったタンパク質数

比率	タンパク質数
ND/HD \geq 2.0	3
ND/HD \geq 1.2	64
ND/HD $>$ 1.0	155
HD/ND $>$ 1.0	104
HD/ND \geq 1.2	49
HD/ND \geq 2.0	3
計	259

したタンパク質を機能分類した結果を図3Bと3Cに示した。普通食群で2倍以上多かった3つのタンパク質は全て解毒・薬物代謝に関わる酵素であった。特に Cytochrome P450 3A11 は、高脂肪食群に比べて12倍増加していた。これら3つの酵素に加えて、多くの解毒・薬物代謝酵素が普通食群で増加しており、解毒の第一相酵素である CYP P450 酵素群や第二相の抱合酵素など24種類の解毒・薬物代謝酵素が普通食群で多いことが分かった。その他に Cytochrome など呼吸鎖に関わる13種類のタンパク質が増加していた。

高脂肪食群で、2倍以上存在量の多かった3つのタンパク質のうち二つは免疫反応に関わるタンパク質であった。一つは、細胞自律的免疫に関わる Interferon-gamma-inducible GTPase であり⁽⁸⁾、もう一つは、細胞内抗原の提示に関わる MHC class I タンパク質であった。残り一つは、コレステロールの合成にかかわる 7-dehydrocholesterol reductase であった。1.2倍~2倍の範囲で存在量の多いタンパク質に注目すると、タンパク質の合成、輸送、分解に関わるタンパク質が10種類、脂質代謝に関わるタンパク質が7種類含まれていた。脂質代謝に属する7つの酵素の内5つはコレステロールの合成や胆汁酸の合成に関わるステロール代謝酵素であった。

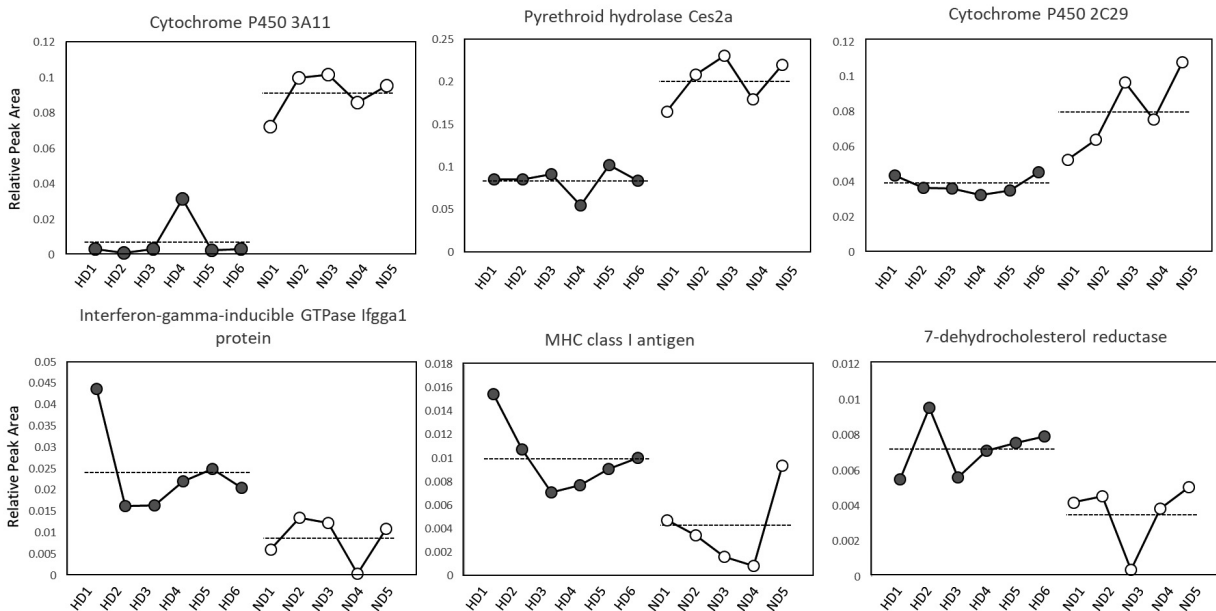


Fig. 5 両群で2倍以上の増加がみられたタンパク質の定量値。点線は各群の平均値を示す。

4. 考察

本研究では、高脂肪食誘導肥満マウスの肝臓のタンパク質プロファイルを SWATH 質量分析法によって解析し、肥満に伴う肝臓の生化学的変化を捉えることが可能かどうかを検討した。5週間という比較的短い肥満誘導期間を設定したが、体重増加量と精巣周囲脂肪の重量は普通食群に比べて優位に増加しており、肥満誘導が行われていることが確認された。それに対して肝臓重量は両群間で差がみられず、肝臓の肥大は確認できなかった。以前に我々の研究室において、同条件で肥満誘導した際には、高脂肪食群の血糖値が140–150 mg/dL、血中コレステロールが80 ng/dL程度、血中中性脂肪が70 mg/dL程度まで増加し、普通食群に比べて優位に増加していることが示されている(未発表データ)。これらのことから判断するに、本実験では肥満誘導によって糖質や脂質代謝異常が起こり始めるが肝臓の臓器病変には至っていないメタボリックシンドロームの初期状態を解析していると考えられる。また、本研究では最終日に絶食を行っているので、摂取した餌の違いが代謝に与える影響を除外することができる。

SWATH 質量分析法で高脂肪食群6匹、普通食群5匹の肝臓タンパク質プロファイルを解析した結果、全部で768個のタンパク質が欠損値無しで定量可能だった。このうち、37.8%のタンパク質は代謝酵素であり、脂質代謝、糖質代謝、アミノ酸代謝等、幅広い代謝系に属する酵素が含まれていた (図 3A)。また、タンパク質合成、フォールディング、修飾等のタンパク質プロセッシングに関わる酵素や、CYP P450 酵素群など解毒・薬物代謝に関与するタンパク質も多く含まれており、各種代謝反応、解毒・薬物代謝、血液タンパク質の合成の場といった肝臓の主要な機能を反映した結果になっていると考えられた。反面、シグナル伝達系のタンパク質や転写調節因子などのタンパク質の数は少なかった。糖・脂質代謝の遺伝子群の発現調節や、炎症反応を誘導するシグナル伝達系のタンパク質が検出できれば、肝臓の生化学的・病理学的変化をより正確にとらえることができるようになると思われる。今後、タンパク質抽出条件の検討、DDA 測定条件の検討による Ion library の改良、SWATH 測定法の条件検討を進め、より多くのタンパク質を定量する実験系の確立を目指したい。

更に我々は、多変量解析 (図 4, 表 1-2) や t 検定 (表 3-5) を用いて、普通食群と高脂肪食群の肝臓タンパク質プロファイルを比較した。PCA 解析 (図 4A)、および PC-DA 解析 (図 4B) によって、普通食群と高脂肪食群は明確に区別され、それぞれ特徴的なタンパク質プロファイルを有していることが示された。普通食群に比べて高脂肪食群では、解毒・薬物代謝に関わる酵素や呼吸鎖の構成要素が減少している傾向が明確に示された。(表 1, 3, Fig 3B)。特に、Cytochrome P450 3A11 (Cyp3a11) は高脂肪食群では普通食群の 8.2% の量にまで減少していた。高脂肪食の摂取によってこれらの解毒・薬物代謝酵素の発現量が減少することは、リアルタイム PCR を用いた手法で、すでに報告されている。Ghose らは、14 週間の高脂肪食の摂取によって肝臓中の第 1 相解毒酵素である CYP3a11, Cyp2b10, Cyp2a4 および第 2 相の解毒酵素である Ugt1a1, Sult1a1, Sultn の発現が低下することを示した⁽⁹⁾。また、Knudsen らは、16 週間の高脂肪食の摂取によって、Cyp2a4, Cyp2b10, Cyp2e1, Cyp3a11 などの酵素が減少していることを示した⁽¹⁰⁾。高脂肪食の摂取によって、これらの解毒酵素が減少する理由は明らかにされていないが、このうち、CYP3a11 の減少は、肥満によって筋組織から放出された炎症性サイトカイン IL6 によって引き起こされていることが示されている⁽¹⁰⁾。我々の研究結果は、5 週間という短期間の高脂肪食の摂取によって、24 種類の解毒酵素が減少していることを示しており、高脂肪食の摂取による解毒酵素の減少という現象が、これまで報告されているよりも早い段階で、より広範囲の解毒酵素で起こっていることを示している。また、我々の結果は、Cytochrome b-c1 complex, NADH dehydrogenase, H⁺ transporting F1 ATP synthase などの呼吸鎖に関わるタンパク質が高脂肪食の摂取によって減少していることを示していたが、我々が知る限り、このような報告は今までにされていない。この現象の生化学的・生理学的な意味は不明だが、Cytochrome b-c1 も CYP P450 酵素群と同じヘムタンパク質であり、ヘムの代謝、鉄の利用可能性などを通じて両者が関連している可能性も考えられた。

普通食群に比べて高脂肪食群で増加していたタンパク質は、減少しているタンパク質群に比べると明確な傾向がみられなかったが、免疫に関わるタンパク質、タンパク質プロセッシングに関わるタンパク質、脂質代謝や輸送に関するタンパク質が多い傾向がみられた (表 2, 5, Fig 3C)。高脂肪食群で 2 倍以上の増加がみられた IFN-inducible GTPases は、細胞内への病原体の侵入が引き金となって機能する免疫タンパク質である⁽⁸⁾。また、細胞内の抗原提示に関わる MHC class I antigen が 2 倍以上増加していることから、細胞自律的免疫 (Cell-autonomous immunity) が活発化していることが示された。Proteasome 関連タンパク質が増加しているのも、細胞内抗原を分解して MHC class I によって提示するプロセスの亢進を反映している可能性が考えられる。しかしながら、これらの免疫応答の活発化と高脂肪食摂取との関連については文献での報告が見られず、生理学的な意味は分からなかった。次に、高脂肪食群で 2 倍増加していた

7-dehydrocholesterol reductase をはじめとして、コレステロール代謝や輸送に関する 5 種類のタンパク質が高脂肪食群で増加していた。これは高脂肪食の摂取によって肝臓に蓄積された脂肪酸が β 酸化され、生じたアセチル CoA を材料としてコレステロールの合成が促進していることを反映している可能性が考えられた。また、脂肪の多い食事を消化・吸収するために、コレステロールから胆汁酸の合成が促進されたことを反映している可能性も考えられる。また、それぞれの増加量は少なかったものの、リボソームタンパク質や小胞体内でのタンパク質の輸送や修飾に関わる 7 種類のタンパク質が高脂肪食群で増加していた (表 5, Fig3C)。肝臓における脂肪の蓄積が小胞体の機能不全や小胞体ストレスを引き起こすことが報告されており⁽¹¹⁾、今回検出された小胞体タンパク質の増加も小胞体ストレスの増加と関わっているかもしれない。この意味で、PC-DA 解析によって、小胞体ストレスを検出するセンサータンパク質である CNPY2⁽¹²⁾が高脂肪食群を特徴づけるタンパク質としてリストアップされていることは非常に興味深い。

以上のことから、SWATH 質量分析法が、肥満に伴う肝臓の生理学的、病理学的な変化を網羅的にとらえる手法として有効であることが示された。今後、肥満誘導の初期から、メタボリックシンドロームの段階、生活習慣病の発症に至るまでの各段階における肝臓の状態を SWATH 法によって解析することで、生活習慣病の病理学的理解が深まることが期待される。こうした研究によって発見されるタンパク質の変動には、代謝異常や生活習慣病発症の原因となるタンパク質と、代謝異常や病気の発症の結果増加するタンパク質の両方が混在することが予想される。SWATH 質量分析法で発見された変動因子の中から、In vitro での機能解析とノックアウトマウスなどの In vivo の実験によって、生活習慣病発症の原因となるタンパク質を見つけ出すことができれば、その分子を標的とした新規な生活習慣病予防薬を開発できる可能性がある。また、血糖値や血中脂質以上の代謝異常が顕在化するのに先駆けて増加するタンパク質をみつけることができれば、メタボリックシンドロームを早期に診断し生活習慣改善の指導に役立てることが可能である。

近年、食品に由来する機能性成分を利用して、生活習慣病を発症前の未病段階で予防しようという研究が盛んに行われている。様々な機能を示す機能性成分が開発されているが、一般的に食品成分の機能性の作用機序を解明することは困難なことが多い。特定の標的分子に作用するように開発された医薬品と異なり、食品成分はどの臓器の、どの細胞の、どの分子に作用するか予測できないことが多く、また複数の成分が異なる作用点に作用して協奏的に効果を表している場合も考えられるからである。このような性質を持つ食品機能性成分の作用機序の解明に、特定の臓器の網羅的なタンパク質発現を分析できる SWATH 法が貢献できる可能性がある。

表 4. 普通食群で 1.2 倍以上有意に増加していたタンパク質のリスト

No.	Uniprot ID	gene name	protein name	相対定量値 (Average±SD)		存在量比 (ND/HD)	P値 (t-test)	機能分類
				ND群	HD群			
1	Q3UEN8_MOUSE	Cyp3a11	Cytochrome P450 3A11	0.0911 ± 0.012	0.0075 ± 0.012	12.11	4.88E-07	解毒・薬物代謝
2	EST2A_MOUSE	Ces2a	Pyrethroid hydrolase Ces2a	0.2006 ± 0.028	0.0839 ± 0.016	2.39	4.98E-06	解毒・薬物代謝
3	CP2CT_MOUSE	Cyp2c29	Cytochrome P450 2C29	0.0795 ± 0.023	0.0382 ± 0.005	2.08	0.00096	解毒・薬物代謝
4	ETHE1_MOUSE	Ethe1	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	0.0322 ± 0.001	0.0169 ± 0.002	1.90	7.12E-08	解毒・薬物代謝
5	PON1_MOUSE	Pon1	Serum paraoxonase/arylesterase 1	0.0368 ± 0.003	0.0202 ± 0.004	1.82	2E-05	解毒・薬物代謝
6	H3BJ51_MOUSE	Retsat	All-trans-retinol 13,14-reductase	0.0038 ± 0.001	0.0022 ± 0.000	1.73	0.00024	その他代謝
7	GSTM1_MOUSE	Gstm1	Glutathione S-transferase Mu 1	0.6044 ± 0.076	0.3662 ± 0.053	1.65	8.7E-05	解毒・薬物代謝
8	GSTT2_MOUSE	Gstt2	Glutathione S-transferase theta-2	0.0217 ± 0.001	0.0135 ± 0.002	1.61	0.00001	解毒・薬物代謝
9	Q8BNF3_MOUSE	Tpp1	Tripeptidyl peptidase I, isoform CRA_a	0.0212 ± 0.002	0.0132 ± 0.006	1.60	0.0136	タンパク質分解
10	A2A977_MOUSE	Cyp4a10	Cytochrome P450 4A10	0.0388 ± 0.006	0.0242 ± 0.004	1.60	0.00053	解毒・薬物代謝
11	H14_MOUSE	Hist1h1e	Histone H1.4	0.0538 ± 0.014	0.0336 ± 0.018	1.60	0.0354	ヌクレオソーム
12	CREG1_MOUSE	Creg1	Protein CREG1	0.0246 ± 0.002	0.0156 ± 0.002	1.58	2E-05	シグナル伝達
13	Q99L15_MOUSE	Acot1	Acot1 protein	0.0143 ± 0.002	0.0096 ± 0.002	1.49	0.00297	脂質代謝
14	CP4AE_MOUSE	Cyp4a14	Cytochrome P450 4A14	0.0558 ± 0.015	0.0376 ± 0.012	1.48	0.0291	解毒・薬物代謝
15	Q5SZA3_MOUSE	Hist1h1c	Histone cluster 1, H1c	0.0292 ± 0.007	0.0197 ± 0.008	1.48	0.0394	ヌクレオソーム
16	NDUA8_MOUSE	Ndufa8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	0.0126 ± 0.001	0.0087 ± 0.004	1.44	0.043	呼吸鎖
17	B6VGH4_MOUSE	Cyp1a2	Cytochrome P450	0.0650 ± 0.008	0.0457 ± 0.008	1.42	0.00139	解毒・薬物代謝
18	Q7TMY2_MOUSE	Acadsb	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	0.0825 ± 0.001	0.0060 ± 0.000	1.38	1.2E-05	脂質代謝
19	GSTM2_MOUSE	Gstm2	Glutathione S-transferase Mu 2	0.0291 ± 0.003	0.0214 ± 0.003	1.35	0.00119	解毒・薬物代謝
20	IDHP_MOUSE	Idh2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	0.0797 ± 0.006	0.0590 ± 0.002	1.35	1.3E-05	TCA回路
21	INMT_MOUSE	Inmt	Indolethylamine N-methyltransferase	0.2596 ± 0.031	0.1932 ± 0.029	1.34	0.00249	解毒・薬物代謝
22	KEG1_MOUSE	Keg1	Glycine N-acyltransferase-like protein Kegl	0.0134 ± 0.001	0.0100 ± 0.001	1.34	3.7E-05	解毒・薬物代謝
23	CY1_MOUSE	Cyc1	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	0.1957 ± 0.010	0.1473 ± 0.027	1.33	0.00219	呼吸鎖
24	Q9ES94_MOUSE	Ctsz	Cathepsin Z	0.0299 ± 0.002	0.0225 ± 0.002	1.33	5.7E-05	タンパク質分解
25	3HIDH_MOUSE	Hibadh	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	0.1175 ± 0.008	0.0886 ± 0.008	1.33	0.00011	機能不明
26	CP4CA_MOUSE	Cyp4a12a	Cytochrome P450 4A12A	0.0143 ± 0.003	0.0109 ± 0.002	1.32	0.0339	解毒・薬物代謝
27	Q9D635_MOUSE	Ldhd	Probable D-lactate dehydrogenase, mitochondrial	0.0332 ± 0.002	0.0255 ± 0.004	1.30	0.00176	糖質代謝
28	Q3UEP4_MOUSE	Ugt2b36	UDP-glucuronosyltransferase	0.0331 ± 0.005	0.0255 ± 0.004	1.30	0.0108	解毒・薬物代謝
29	E9PWK1_MOUSE	Ephx1	Epoxide hydrolase	0.0567 ± 0.010	0.0436 ± 0.012	1.30	0.0458	その他代謝
30	Q8R084_MOUSE	Ugt2b1	Protein UDPglucuronosyltransferase	0.1017 ± 0.012	0.0786 ± 0.009	1.29	0.00286	解毒・薬物代謝
31	Q3TIC8_MOUSE	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	0.2612 ± 0.018	0.2040 ± 0.033	1.28	0.00339	呼吸鎖
32	UCRI_MOUSE	Uqcrcs1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	0.0409 ± 0.002	0.0322 ± 0.006	1.27	0.00874	呼吸鎖
33	NCPR_MOUSE	Por	NADPH-cytochrome P450 reductase	0.0848 ± 0.003	0.0669 ± 0.009	1.27	0.0008	解毒・薬物代謝
34	CP254_MOUSE	Cyp2c54	Cytochrome P450 2C54	0.0317 ± 0.004	0.0250 ± 0.004	1.27	0.0101	解毒・薬物代謝
35	ACSM5_MOUSE	Acsm5	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM5, mitochondrial	0.0222 ± 0.013	0.0176 ± 0.002	1.26	0.00034	脂質代謝
36	SUOX_MOUSE	Suox	Sulfite oxidase, mitochondrial	0.0495 ± 0.018	0.0393 ± 0.005	1.26	0.00113	その他代謝
37	QCR2_MOUSE	Uqcrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	0.0988 ± 0.003	0.0786 ± 0.014	1.26	0.00519	呼吸鎖
38	GLYAL_MOUSE	Gm4952	Glycine N-acyltransferase-like protein	0.0763 ± 0.006	0.0609 ± 0.010	1.25	0.0069	解毒・薬物代謝
39	QCR7_MOUSE	Uqcrb	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	0.1155 ± 0.009	0.0926 ± 0.021	1.25	0.025	呼吸鎖
40	Q3UIZ1_MOUSE	Ugdh	UDP-glucose 6-dehydrogenase	0.0371 ± 0.003	0.0298 ± 0.003	1.24	0.00208	解毒・薬物代謝

表 4. 普通食群で 1.2 倍以上有意に増加していたタンパク質のリスト (続き)

No.	Uniprot ID	gene name	protein name	相対定量値 (Average±SD)		存在量比 (ND/HD)	P値 (t-test)	機能分類
				ND群	HD群			
41	Q4VBC9_MOUSE	Ndufb11	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial	0.0139 ± 0.002	0.0112 ± 0.001	1.24	0.0108	呼吸鎖
42	Q8K169_MOUSE	Ugt2b5	UDP-glucuronosyltransferase	0.1822 ± 0.021	0.1473 ± 0.013	1.24	0.00369	解毒・薬物代謝
43	GLYAT_MOUSE	Glyat	Glycine N-acyltransferase	0.0689 ± 0.003	0.0557 ± 0.004	1.24	0.00013	解毒・薬物代謝
44	B2RXW1_MOUSE	Hal	Histidine ammonia-lyase	0.0250 ± 0.001	0.0202 ± 0.002	1.24	0.00148	アミノ酸代謝
45	Q6VEU5_MOUSE	Atp5e	H+ transporting F1 ATP synthase epsilon subunit	0.0600 ± 0.015	0.0487 ± 0.003	1.23	1.8E-05	呼吸鎖
46	UD11_MOUSE	Ugt1a1	UDP-glucuronosyltransferase 1-1	0.0797 ± 0.009	0.0647 ± 0.009	1.23	0.0108	解毒・薬物代謝
47	B2RS41_MOUSE	Aldh5a1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	0.0260 ± 0.003	0.0211 ± 0.002	1.23	0.00328	解毒・薬物代謝
48	ODO1_MOUSE	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	0.0253 ± 0.000	0.0205 ± 0.001	1.23	3.4E-06	その他代謝
49	B2RXY7_MOUSE	Cbr1	Carbonyl reductase 1	0.0164 ± 0.002	0.0134 ± 0.001	1.23	0.00122	その他代謝
50	GLSL_MOUSE	Gls2	Glutaminase liver isoform, mitochondrial	0.0198 ± 0.002	0.0162 ± 0.003	1.23	0.0169	アミノ酸代謝
51	G3X9L6_MOUSE	Gm10250	ATP synthase subunit d, mitochondrial	0.1978 ± 0.010	0.1619 ± 0.014	1.22	0.00046	呼吸鎖
52	Q9CZ08_MOUSE	Gcat	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial	0.0088 ± 0.000	0.0072 ± 0.000	1.22	3E-10	アミノ酸代謝
53	ECHP_MOUSE	Ehhadh	Peroxisomal bifunctional enzyme	0.1262 ± 0.009	0.1035 ± 0.019	1.22	0.0188	脂質代謝
54	Q545F0_MOUSE	Mif	Macrophage migration inhibitory factor	0.2483 ± 0.017	0.2040 ± 0.019	1.22	0.00156	免疫
55	Q9D9D7_MOUSE	Atp5c1	ATP synthase subunit gamma	0.0971 ± 0.004	0.0798 ± 0.006	1.22	0.00015	呼吸鎖
56	CGL_MOUSE	Cth	Cystathionine gamma-lyase	0.1003 ± 0.007	0.0826 ± 0.008	1.21	0.00179	アミノ酸代謝
57	Q4VAE8_MOUSE	Ndufb4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	0.0147 ± 0.001	0.0121 ± 0.001	1.21	0.00025	呼吸鎖
58	Q4FZE8_MOUSE	Gm21320	Major urinary protein 1	0.2770 ± 0.013	0.2292 ± 0.050	1.21	0.0348	その他
59	NDUB9_MOUSE	Ndufb9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	0.0277 ± 0.001	0.0230 ± 0.002	1.21	0.00023	呼吸鎖
60	Q3TVS6_MOUSE	Ctsb	Cathepsin B	0.0336 ± 0.001	0.0278 ± 0.002	1.21	0.00018	タンパク質分解
61	ACOX1_MOUSE	Acox1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	0.0304 ± 0.002	0.0252 ± 0.005	1.21	0.0271	脂質代謝
62	UGPA_MOUSE	Ugp2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.0863 ± 0.005	0.0717 ± 0.007	1.20	0.00203	糖質代謝
63	ALAT2_MOUSE	Gpt2	Alanine aminotransferase 2	0.0062 ± 0.001	0.0052 ± 0.001	1.20	0.015	アミノ酸代謝
64	COQ9_MOUSE	Coq9	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	0.0066 ± 0.001	0.0055 ± 0.000	1.20	0.00707	呼吸鎖

表 5. 高脂肪食群で 1.2 倍以上有意に増加していたタンパク質のリスト

No.	Uniprot ID	gene name	protein name	相対定量値 (Average±SD)		存在量比 (HD/ND)	P値 (t-test)	機能分類
				ND群	HD群			
1	J7NNX8_MOUSE	Iigp1	Interferon-gamma-inducible GTPase Ifgga1 protein	0.0086 ± 0.005	0.0240 ± 0.010	2.77	0.00741	免疫
2	W5XIT1_MOUSE	H2-K1	MHC class I antigen	0.0040 ± 0.003	0.0100 ± 0.003	2.51	0.00598	免疫
3	Q4FJX5_MOUSE	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	0.0036 ± 0.002	0.0072 ± 0.002	2.00	0.00312	脂質代謝
4	Q9D239_MOUSE	B2m	Beta-2-microglobulin	0.0242 ± 0.010	0.0437 ± 0.014	1.80	0.01342	血液タンパク質
5	A0A068BIT8_MOUSE	Psmb8	Proteasome subunit beta type	0.0051 ± 0.001	0.0091 ± 0.003	1.80	0.00621	タンパク質分解
6	Q5SWR1_MOUSE	Ap2b1	AP complex subunit beta	0.0025 ± 0.002	0.0044 ± 0.000	1.78	0.02825	タンパク質輸送
7	KHK_MOUSE	Khk	Ketohexokinase	0.0089 ± 0.003	0.0156 ± 0.006	1.75	0.02455	糖質代謝
8	B2RTL5_MOUSE	Aldh1a7	Retinal dehydrogenase 2	0.0069 ± 0.004	0.0119 ± 0.002	1.74	0.00992	その他代謝
9	HNRH2_MOUSE	Hnrnp2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	0.0037 ± 0.003	0.0064 ± 0.001	1.74	0.02368	RNAプロセッシング
10	Q66JV3_MOUSE	Xylb	Xylulose kinase	0.0031 ± 0.002	0.0052 ± 0.001	1.65	0.03393	糖質代謝
11	SBP1_MOUSE	Selenbp1	Methanethiol oxidase (Selenbp1)	0.0037 ± 0.014	0.0607 ± 0.010	1.63	0.00513	解毒・薬物代謝
12	Q3U651_MOUSE	Ctsd	Cathepsin D	0.0151 ± 0.009	0.0241 ± 0.002	1.60	0.01703	タンパク質分解
13	Q9CPX4_MOUSE	Ftl1	Ferritin	0.0764 ± 0.010	0.1188 ± 0.024	1.56	0.00231	鉄輸送
14	Q3TF08_MOUSE	Rbp4	Retinol-binding protein 4	0.0129 ± 0.002	0.0197 ± 0.003	1.53	0.00088	ビタミン輸送
15	Q3TJD0_MOUSE	Sec61a1	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1	0.0050 ± 0.003	0.0076 ± 0.001	1.53	0.02617	タンパク質分解
16	Q3U6S1_MOUSE	Vim	Vimentin	0.0285 ± 0.003	0.0432 ± 0.008	1.52	0.00146	細胞骨格
17	TPMT_MOUSE	Tpmt	Thiopurine S-methyltransferase	0.0056 ± 0.001	0.0085 ± 0.001	1.50	0.00172	その他代謝
18	FAHD1_MOUSE	Fahd1	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial	0.0053 ± 0.003	0.0079 ± 0.001	1.49	0.04435	機能不明
19	A0A0A0MQA5_MOUSE	Tuba4a	Tubulin alpha chain	0.0333 ± 0.009	0.0476 ± 0.006	1.43	0.00575	細胞骨格
20	A1AT5_MOUSE	Serpina1	Alpha-1-antitrypsin 1-5	0.0070 ± 0.002	0.0099 ± 0.002	1.41	0.01669	血液タンパク質
21	FRIH_MOUSE	Fth1	Ferritin heavy chain	0.0122 ± 0.002	0.0168 ± 0.003	1.37	0.01685	鉄輸送
22	Q3V2G1_MOUSE	Apoa1	Apolipoprotein A-I	0.1401 ± 0.010	0.1866 ± 0.010	1.33	1.3E-05	脂質輸送
23	Q53YP5_MOUSE	Fabp2	Fatty acid binding protein 2, intestinal	0.0051 ± 0.001	0.0067 ± 0.001	1.33	0.01984	脂質代謝
24	GLNA_MOUSE	Glul	Glutamine synthetase	0.0745 ± 0.011	0.0983 ± 0.008	1.32	0.00116	アミノ酸代謝
25	GBLP_MOUSE	Rack1	Receptor of activated protein C kinase 1	0.0360 ± 0.006	0.0472 ± 0.007	1.31	0.01179	シグナル伝達
26	Q9EP98_MOUSE	Egfr	Epidermal growth factor receptor	0.0138 ± 0.002	0.0181 ± 0.002	1.31	0.00211	シグナル伝達
27	OSTC_MOUSE	Ostc	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC	0.0063 ± 0.001	0.0083 ± 0.002	1.31	0.01932	タンパク質修飾
28	KAT3_MOUSE	Kyat3	Kynurenine-oxoglutarate transaminase 3	0.0053 ± 0.001	0.0069 ± 0.001	1.30	0.0186	アミノ酸代謝
29	Q8BT90_MOUSE	Rps17	40S ribosomal protein S17	0.0570 ± 0.011	0.0737 ± 0.012	1.29	0.0212	タンパク質修飾
30	H7BWX9_MOUSE	Sumo2	Small ubiquitin-related modifier 2	0.0049 ± 0.001	0.0064 ± 0.001	1.29	0.00684	タンパク質修飾
31	Q564E2_MOUSE	Ldha	L-lactate dehydrogenase	0.1821 ± 0.007	0.2334 ± 0.016	1.28	4.9E-05	糖質代謝
32	THIL_MOUSE	Acat1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	0.3551 ± 0.048	0.4546 ± 0.036	1.28	0.00166	脂質代謝
33	TAGL2_MOUSE	Tagln2	Transgelin-2	0.0116 ± 0.001	0.0147 ± 0.003	1.27	0.02742	機能不明
34	Q545X8_MOUSE	Rps4x	40S ribosomal protein S4	0.0085 ± 0.001	0.0108 ± 0.001	1.27	0.00504	タンパク質合成
35	OPLA_MOUSE	Oplah	5-oxoprolinase	0.0136 ± 0.003	0.0171 ± 0.001	1.26	0.01764	アミノ酸代謝
36	CP8B1_MOUSE	Cyp8b1	7-alpha-hydroxycholest-4-en-3-one 12-alpha-hydroxylase	0.0613 ± 0.006	0.0763 ± 0.007	1.25	0.00201	脂質代謝
37	A2ARD6_MOUSE	Kynu	Kynureninase	0.0048 ± 0.000	0.0060 ± 0.001	1.24	0.01079	アミノ酸代謝
38	Q52L87_MOUSE	Tuba1c	Tubulin alpha chain	0.0630 ± 0.006	0.0783 ± 0.008	1.24	0.00261	細胞骨格
39	HEMO_MOUSE	Hpx	Hemopexin	0.0171 ± 0.002	0.0212 ± 0.001	1.24	0.00162	鉄輸送
40	Q3UEJ8_MOUSE	Pipox	Pipecolic acid oxidase	0.0530 ± 0.008	0.0657 ± 0.008	1.24	0.015	アミノ酸代謝
41	FIBA_MOUSE	Fga	Fibrinogen alpha chain	0.0058 ± 0.001	0.0072 ± 0.001	1.24	0.01812	血液タンパク質
42	Q3UB90_MOUSE	Rpl3	60S ribosomal protein L3	0.0283 ± 0.005	0.0348 ± 0.003	1.23	0.01297	タンパク質合成
43	Q3UWT6_MOUSE	Psm2	Proteasome subunit alpha type	0.0184 ± 0.004	0.0227 ± 0.003	1.23	0.03691	タンパク質修飾
44	S14L2_MOUSE	Sec14l2	SEC14-like protein 2	0.0708 ± 0.010	0.0868 ± 0.011	1.22	0.01718	脂質代謝
45	H2B1C_MOUSE	Hist1h2bc	Histone H2B type 1-C/E/G	0.2450 ± 0.010	0.2991 ± 0.043	1.22	0.01164	ヌクレオソーム
46	Q5SX50_MOUSE	Pfn1	Profilin	0.0993 ± 0.013	0.1208 ± 0.010	1.22	0.00606	細胞骨格
47	BAAT_MOUSE	Baat	Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase	0.0445 ± 0.011	0.0540 ± 0.005	1.21	0.03981	脂質代謝
48	MTPN_MOUSE	Mtpn	Myotrophin	0.0043 ± 0.001	0.0052 ± 0.001	1.21	0.01436	シグナル伝達
49	Q3UJ34_MOUSE	Ass1	Argininosuccinate synthase	0.8330 ± 0.082	1.0058 ± 0.104	1.21	0.00745	その他代謝

5. 結論

本研究では、高脂肪食誘導肥満マウスの肝臓のタンパク質プロファイルを SWATH 質量分析法によって解析し、肥満に伴う肝臓の生化学的変化を捉えることが可能かどうかを検討した。SWATH 法の結果、各種代謝酵素、解毒・薬物代謝酵素など肝臓の機能を反映した 768 個のタンパク質の定量プロファイルを取得できた。本手法によって、高脂肪食誘導肥満マウスの肝臓タンパク質のプロファイルを調べたところ、解毒・薬物代謝酵素の減少やコレステロール代謝酵素の増加など、従来報告されている現象をとらえることができた。また、解毒代謝酵素の減少が従来の報告よりも初期から広範囲の酵素において生じていること、呼吸鎖タンパク質の減少、細胞自律的免疫 (Cell-autonomous immunity) の亢進など従来報告されていない現象を捉えることができた。これらの現象は、さらなる追加実験で検証する必要があると思われるが、SWATH 質量分析法を応用することで、従来知られていなかった現象をとらえられる可能性が示された。今後は、タンパク質抽出法や SWATH 質量分析法の条件検討を行うことで、より多くのタンパク質を定量できる系を確立し、肥満に伴う肝臓の生理学的・病理学的変化を詳細にとらえていくことを計画している。

謝辞

本研究の一部は、和歌山県・地域イノベーション戦略支援プログラムの助成を受けて遂行された。研究の遂行にあたりお世話になった、わかやま産業振興財団の関係諸氏に感謝する。

5. 参考文献

- (1) 一般社団法人日本糖尿病学会 (2013) 科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン 2013, pp. 326-341, 南江堂
- (2) 北條 麻理子, 永原 章仁, 宮崎 招久, 渡辺 純夫 (2008) 消化器疾患とメタボリック症候群
- (3) Anjo, S.I., Santa, C., Manadas, B. (2017) SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: From basic research to clinical applications. *Proteomics* 17, 3-4.
- (4) Sajic, T., Aebersold, R. (2015) Using data-independent, high-resolution mass spectrometry in protein biomarker research: perspectives and clinical applications. *Proteomics Clinical Applications* 9, 307-321.
- (5) Vidoba, V., Spacil, Z. (2017) A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. *Analytica Chimica Acta*. 963, 7-23.
- (6) Lambert, T., Ivosev, G., Couzens, A.L., Larsen, B., Taipale, M., Lin, Z.Y., Zhing, Q., Lindquist, S., Vidal, M., Aebersold, R., Pawson, T., Bonner, R., Tate, S., Gingras, A.C. (2013) Mapping differential interactomes by affinity purification coupled with data independent mass spectrometry acquisition. *Nat Methods*. 10, 1239-1245.
- (7) Li, S., Cao, Q., Xiao, W., Guo, Y., Yang, Y., Duan, X., Shui, W. (2017) Optimization of acquisition and data-processing parameters for improved proteomic quantification by sequential window acquisition of all theoretical fragment ion mass spectrometry. *J. Proteome res.* 16, 738-747.
- (8) Kim, B.-H., Shenoy, A. R., Kumar, P., Bradfield, C. J., MacMicking J. D. (2012). IFN-inducible GTPase in host defense. *Cell Host Microbe*. 12, 432-444.
- (9) Ghose, R., Omoluabi, O., Gandhi, A., Shah, P., Strohacker, K., Carpenter, K. C., McFarlin, B., Guo, T. (2011). Role of high-fat diet in regulation of gene expression of drug metabolizing enzymes and transporters. *Life Sciences*, 89, 57-64.

- (10) Knudsen, J.G., Berthlodt, L., Gudiksen, A., Gerbal-Chaloin, S., Rasmussen, M. K. (2018) Skeletal muscle interleukin-6 regulates hepatic cytochrome P450 expression: effects of 16-week high-fat diet and exercise. *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, 162.
- (11) Malhi, H., Gores, G. J. (2008) Molecular Mechanisms of Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 28, 360-369.
- (12) Hong, F., Liu, B., Wu, B.X., Morreall, J.M., Roth, B., Davis, C., Sun, S., Diehl, J.A., Li, Z. (2017) CNPY2 is a key initiator of the PERK–CHOP pathway of the unfolded protein response. *Nature Strunture & Molecular Biology.* 24, 834-839.

英文抄録

Comprehensive quantification of liver proteins in the high-fat induced-obese mouse using a SWATH acquisition method

Siomi Oota¹, Tomoya Nishibata², Sayaka Yamawaki¹, Tomoki. Awaji¹, Yuki Oosedo¹, Ayaka Sakaue¹, Kunihiro Kishida^{2,3}, Kouhei Nagai^{1,2}.

Liver is a center of carbohydrate and lipid metabolism and deeply involved with the development of metabolic syndrome. If a method to comprehensively capture the biological and pathological changes in the liver caused by obesity could be established, it would contribute to the development of drugs to prevent lifestyle-related diseases, or to the elucidation of the molecular mechanism of food functional ingredients having life-style related disease prevention effect. In this study, we performed SWATH-mass spectrometry of livers obtained from high-fat diet (HD)-induced obese mice. Six weeks old C57/BL/6J male mice were fed with HD containing 0.1% cellulose, or normal diet (ND) for 5 weeks. On the day 35, livers were collected after 16 h of fasting. Proteins extracted from the liver-tissues were digested by trypsin, and the resulting peptides (3 ug) were analyzed by nanoLC-MS/MS (AB sciex, TripleTOF5600+ system). Ion library of liver protein digests was built by data dependent analyses (DDA) and database search against Uniprot mouse protein database. In SWATH analysis, Q1 window range was fixed at 25 Da (24 windows along with $m/z = 400 - 1000$). Mass range, and accumulation time of MS/MS were set at 100 - 1500 and 100 msec, respectively. By the DDA analyses and database-search, 1249 proteins (10880 peptides) were identified. Among the identified proteins, 768 proteins were successfully quantified by the SWATH experiments. The quantified proteins containing those involved in carbohydrate metabolism, lipid metabolism, detoxification, and so on. PCA and PC-DA analysis of the liver proteome profiles clearly separated the HD and ND groups, indicating that the two groups had the distinctive proteome profiles. Compared to the ND, the amount of many proteins involved in detoxification and respiratory chain decreased in the HFD group, some of which were consistent with previous reports, while the amount of proteins involved in cell-autonomous immunity or lipid metabolism increased in the HFD group. Especially, many steroid-metabolizing enzymes were increased, which was thought to reflect the obesity-induced increase in liver or serum cholesterol.

Key words: SWATH, quantitative proteomics, high-fat diet, liver.

Received 25 August 2018, Accepted 27 September 2018.

This work was supported by the Project Research of the Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University No.15-III-11, 2016, No.16-III-12, 2017.

1. Department of Genetic Engineering, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan
2. Major in Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan
3. Department of Science and Technology on Food Safety, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University,