

## REVIEW

# 複雑系研究手法としての PROTEOMICS とパースの アブダクション (仮説形成推理)

## Proteomics as a Tool for Studying Complex Systems and the Abductive Inference of C. S. Peirce

松本博行<sup>\*a)</sup>・黒野 定<sup>a)</sup>・小森直香<sup>a)</sup>

Hiroyuki MATSUMOTO, Sadamu KURONO, and Naoka KOMORI

(Received March 11, 2002; Accepted March 25, 2002)

A proteomics approach to the study of protein expression and post-translational modification does not require presumptions of the identity of target proteins. A proteomic investigation begins with the discovery of unidentified proteins of interest under well-defined physiological conditions. The approach involves 1) protein display by two-dimensional gel electrophoresis or other separation technique, 2) determination of protein entities, 3) peptide mass fingerprinting, and 4) genome/proteome database search. We show that the methodology of the proteomics approach is characterized neither by deduction nor by induction in the traditional sense, but is a clear example of what C. S. Peirce described as abductive inference almost a century ago. *The investigation of complex signaling pathways is intractable to deductive and inductive methods due to its extreme complexity.* We show two cases of the proteomics approach as applied to the visual systems of the fruit fly *Drosophila melanogaster*, and rodents. These examples illustrate the role of abductive inference in proteomics, a discipline at the forefront of current studies in molecular biology.

*Et ignotas animum dimittit in artes.*

—Ovid, *Metamorphoses*, VIII, 188

而して彼は未知なる技術に身をゆだねしを。

オヴィッド 変身譚 VIII, 188

### 1. はじめに

過去 20 年間における医学生物学の歴史を見ると、種々の分野における技術が急速に発展し、それから得られた膨大な知識の集積を多面的な方向から解析できる状況を導いたことが特徴であるように思える。昨年 (2001 年) の 2 月中旬に発表されたヒトのゲノムの草稿は、現代の医学生物学を象徴する出来事の一つと見ることもできよう。この時期のもう一つの特徴として、種々の技術、特に分子生物学の手法が一般化し、誰でもその有効性の恩恵にあずかることができるようになった。医学や生物学に関連するあらゆる分野で学術雑誌の数とそれに掲載される論文の数が爆発的に増加したことは、このことが多少影響しているようだ。しかしながら、果たして生物を総体的な対象として理解するという医学生物学研究の究極の目的の達成は、20 年前に比べてより間近になっただろうか？ 現在の生化学分子生物学研究の主流をなす要素還元的論理を推し進める

ことで生命を理解することができるだろうか？ 今世紀、あるいはこの千年紀の始まりを、種々の知識体系と技術の充実をもとに生命の理解をより深く統合的に行う第一歩となすことができるだろうか？

ヒトのゲノムの草稿達成に見られる将来への楽観論とは裏腹に、一方では、これまでの要素還元主義的アプローチでは生命現象の究極的な理解はほど遠いだろうという悲観論も説得力がある。生物現象の基本的な特徴は、生体内で働いている仕組みが非線形で、しかも仕組みを担っている分子の種類 (すなわち考慮すべき変数) が多いことであろう。生物系研究の根底に潜むこのような困難は、生物学的多変数系を、要素還元論的なアプローチではなく (あるいは、要素還元論的なアプローチに加えてと表現する方が妥当であろうか)、むしろ経験主義的に取り扱う新しい方法論への必要性を生ずる。このような状況のもと、現代の質量分析学 (modern mass spectrometry) は、次の第一歩を担う鍵であるように思われる。この小論は proteomics が複雑系を研究する方法として優れていることを示す例として、ショウジョウバエの視覚に関するタンパク質のリン酸化のカスケードと、ネズミ網膜のタンパク質の生合成に種々のストレスがどう影響するかという研究を例として説明する。さらに、proteomics を支える論理が通常行われている 2 種類の論理である演繹法 (deduction) でも帰納法 (induction) でもありえず、むしろ前世紀の初頭にアメリカの経験主義哲学者パースが提案したアブダクション (abduction; 仮説形成推理) にあたることを示す。この小

\*a) オクラホマ大学医学部生化学分子生物学科  
Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oklahoma Health Sciences Center (P.O. Box 26901, Oklahoma City, OK 73190, U.S.A.)

## Every protein has its characteristic “Peptide Mass Fingerprint.”

MVRKALLPMLLCGLTGPFAHLFQPSLVLEMAQVLLDNYCFPENLMGMOGAIEQAIKSOEILSISDPQTLAHLVLTAGVQSSLDNRLVVISYEPSTLEAPPRAVAVNTLLE  
EIIAGLDGLRHEILEGNVGYLRVDDIPGQEVMSKLRSPFLVANVWRKLVNTSALVLDLRHCTGGHVSGIPIYVISYLHPGSTVSHVDTVYDRPSNTTTEIWTLPALGKGYK  
ADKDVVLTSSRTGGVAEDIAYILKQMRRAIVVGERTVGGALNQLKLRVQSDFFLTVVPSRSLGPLEGSGTWEQSGVLPVCGTAPAEQALEKALAVLMLRRALPGVIOQL  
QBALREYTLVDRVALLSHLAAMDLSVVSDEDLVTKLNAGLQAVSEDPRLQVQVVRPKEASSGPEEEAEPEPAVEVPEDEAVRRALVDSVFQVSVLPGNVGYLRFDS  
FADASVLEVLGPIILHVVWEPLQDTEHLIMDLRQNPGGPSSAVPLLLSYFQSPDASVRLVSTYDRRTNITREHFSQTELLGRPYGTQRGVYLLTSHRTATAEELAFLMQ  
SLGWATLVGEITAGSLHHTVSLLETPEGGLALTVPLVTFIDNHGECWLGQVVPDAIVLAEALDRAQEVLEFHRSLGELVEGTGRLLLEAHYARPEVVGQMGALLRAKL  
AQGAYRTAVDLESASQLTADLQEMSGDHRLLVHFHSPGEMVAEEAPPPVVPVSPPEELSYLLEALFKTEVLPGQLGYLRFDAMAELETVKAVGPQLVQLVWQKLVDTAALV  
VDLRYNPGSYSTAVPLLCSPFEEAEPRRHLYSVFDRATSRVTEVWTLPHVTGQRYSKDLVYLVSHTSASAAEFAHTMQDLQRTIIGEPDAGGALSVMYIYQVSSALY  
ASMPTQMAMASSTGEAWDLAGEVDPITVPMVALSTARDIVTLRAKVPTVLQTAGKLVADNYASPELVKMAAELSGLQSRVAVTSEALAEELLQADLQVLSGDPHLLKTA  
HIPEDAKDRIPGIVPMQIPSPPEVPEDLIKFSFHTNVLEGNVGYLRFDMFGDCELLTQVSELLVEHVWKKIVHTDALIVDMRFNIGGPTSSISALCSYFDEGPPILLDKIY  
NRPNNSVSELWTLSQLGEGRYGSKSMVILTSTLTAGAAEFTYIMKRLGRALVIGEVTSGGCQPPQTYHVDDTDLTYLTPARVSGAAGDSSWEGVGVVDPVAVPAEAL  
TRAQEMLQHTPLRARRSPRLHGRKKGHRQSQGRAGSLGRNQGVVPEVLEAPSGQKRLQLCCG

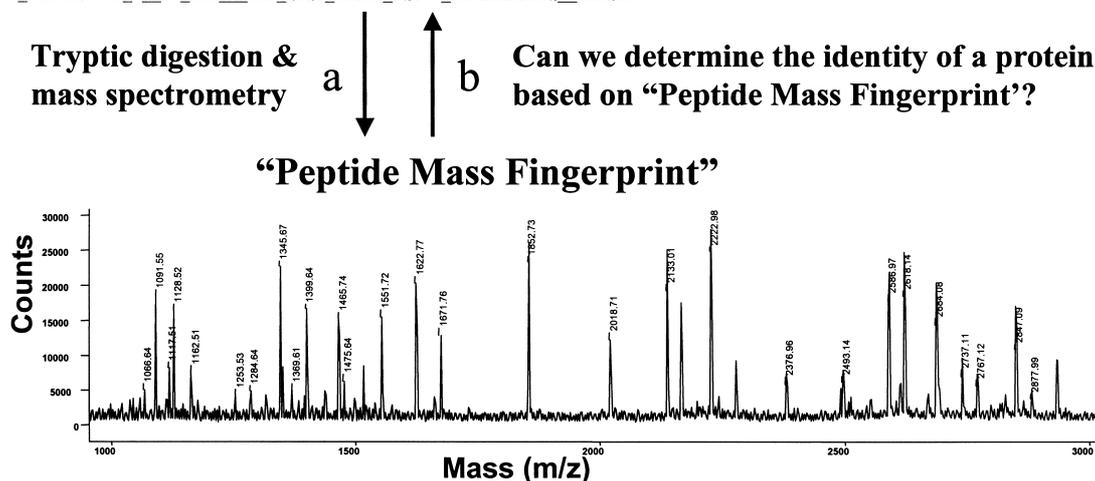


Fig. 1. All proteins can be represented by their specific peptide mass fingerprints. A case of bovine interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is illustrated as an example. A protease trypsin digests the carboxyl termini of both arginine (R) and lysine (K).

論は、2001年7月に賢島で行われた第28回BMS Conferenceで発表した講演に加筆したものである。

### 2. ペプチドマスフィンガープリント (Peptide Mass Fingerprinting)

遺伝子のシークエンスのデータベースをもとに、質量分析法を使ってタンパク質を同定する方法は、1990年代の初めにいくつかのグループによって開発された<sup>1)~5)</sup>。これは、ペプチドやタンパク質などの揮発性でない分子を効率よくイオン化することができるESI (electrospray ionization) とMALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) の2種類の方法が1980年代の末に開発されたことと関連している。その後種々の改良がなされ、特にペプチドマスフィンガープリントと2次元ゲルとの組合せは、複雑なタンパク質混合物の分析に強力な武器であることが示された。1990年代の半ばから後半にかけて、遺伝子シークエンスのデータベースが充実するに伴い、この新しい方法の有効性が認識され始め、proteomeとproteomicsという新しい言葉が考案された。この分野の急速な発展は過去数年に起こった。このあたりの事情を把握するためには、文献6~10に掲げた総説を参照していただきたい。また、筆者のグループから発表されたプロテオミックスの視覚研究への応用例も具体的な参考になると思い掲げておく<sup>11)~14)</sup>。

ペプチドマスフィンガープリントの原理は、すべてのタンパク質は対応する遺伝子によって規定される一義的なア

ミノ酸配列をもっている事実に基づく。あるタンパク質を、アミノ酸配列に特異的に依存した活性を示すエンドペプチダーゼ（例えばトリプシンやキモトリプシンなど）で消化すると、種々の質量をもつペプチドの混合物が得られる。この混合物を構成するペプチドの質量は、元のタンパク質に特有な値をもち、いわば指紋（フィンガープリント）とも言う。ペプチドフィンガープリントの基礎をなすもう一つの要素は、1990年の初頭から開始され、前世紀末から今世紀初頭にかけて完成されつつあるゲノムデータベースである。ここで、ゲノムデータベースの有効性を支える技術として過去数年に起こったマイクロコンピュータとインターネットの発達を無視できない。Fig. 1は、ペプチドマスフィンガープリントの原理を直感的に表している。図で矢印aは実験を示しており、下部のマススペクトルが得られたペプチドマスフィンガープリントである。その逆方向の矢印bによって示される過程、すなわち元のタンパク質の素性を知ろうという試みはいかなる科学的な問題を含んでいるか？ここで忘れてはならないことは、第一に、一般にすべての理論的なペプチドフラグメント (peptide fragments deduced from *in silico* digestion) がすべて観測されることはまずないであろうことである。ペプチドフィンガープリントが元のタンパク質の全シークエンスをカバーしないのは、多くの原因が考えられるが<sup>15)</sup>、このことに関して体系的な研究はあまりなされていないように思われる。例えば、不完全消化、消化後の抽出の不完全さなどの、より注意深い実験によって改良可能なものか

ら、タンパク質の翻訳後修飾 (post-translational modification) やある特定のペプチドがたまたま極端に低いイオン化効率を示すことによるなどの、改良が簡単でない原因が混合しており、真の原因を特定するのは、ほぼ不可能に近い。第二に、質量測定の実験誤差の問題がある。現在のMALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) が比較的簡単にユニットマス (1 Dalton) 程度の精度を出せることは、10年前の常識に照らすと脅威的なことである。しかしながら、1ユニットマス程度の精度では、測定された質量からそのペプチドを一義的に類推したり、ましてや証明したりすることは難しい。これは、別の言葉で言えば、理論的ペプチドマスのある実験精度下における縮退 (degeneration) と言えよう。どれほどの精度があれば、正確なペプチドの確認が1回の質量測定だけでできるかどうかという問題は、質量測定の精度、ゲノム情報の完成度、さらに翻訳後修飾の考察を必要とする複雑な過程であり、ここでは議論しない。第三の問題は、第一と第二で述べた状況が現実であるがために、現在の段階ではペプチドマスフィンガープリントによるデータは予想されるタンパク質がそれであるための必要条件ではあるが、十分条件ではないという事実である。すなわち、あるタンパク質が確かに予想された候補であるためにはペプチドマスフィンガープリントが合うことが必須であるが、その逆は必ずしも真ではない、すなわち、ペプチドマスフィンガープリントは必ずしも絶対的な証明を提供しない。このことは、パースの仮説形成推理と関連して次の章で説明する。

### 3. パースの仮説形成推理 (Abduction)

ここでパースに関して少し述べておく。広辞苑第五版 (新村書店) はパースに関して次のような解説をしている。

パース【Charles Sanders Peirce】(1839~1914) アメリカの哲学者。プラグマティズムの創始者。ある対象について考えるときは、その概念によって考えられる実践的効果を確認すればよいと考え、これをプラグマティズムの確率とした。思考作用を記号活動に還元し、統辞論や意味論の先駆けとなった。

自然科学は事実と論理に基づく議論 (argument) によって進歩する。一般的に、事実と論理に基づく議論は、演繹法 (deduction) か帰納法 (induction) のいずれかに属する<sup>16)</sup>。アメリカが生んだ偉大な哲学者パースは、プラグマティズムの創始者であり、ソシュール (Ferdinand de Saussure) とともに近代記号論 (Semiotics) の源流をなす。ウンベルト・エコー (Umberto Eco) は、deduction, induction, そして abduction の関係を以下に示すように簡明に説明している<sup>17)</sup>。

“もし私が部屋に入っていく、そこで違った種類の豆が入っている幾つかの袋を見つけるとする。テーブルの上には片手に余るほどの白い豆がのっている。そして、少しの間探査した後、その袋のうちの一つは白い豆だけしか入っていないことを見つけるとする。私は、すぐに、テーブル

の上の白い豆は、その袋から取り出されたものと推論するだろう。このような推論は仮説形成 (making a hypothesis) と呼ぶことができよう。”

パースは、このような推論をアブダクション (abduction) と呼んだ。エコーはさらに、次のような例を挙げて説明する。

In the case of logical *deduction* there is rule from which, given a case, I deduce a result: *All the beans from this bag are white—These beans are from this bag—These beans are white.*

In the case of induction, given a case and a result, I infer a rule: *These beans are from this bag—These beans are white—All the beans from this bag are white* (probably).

In the case of hypothesis or *abduction* there is the inference of a case from a rule and a result: *All the beans from this bag are white—These beans are white—These beans are from this bag* (probably).

—Umberto Eco, “A Theory of Semiotics”<sup>17)</sup>

では、本論に戻り、ペプチドマスフィンガープリントの論理を検討しよう。ペプチドマスフィンガープリントは次の三つの命題からなる。

- (1) 遺伝子 X は翻訳され、タンパク質 Y を産生し、タンパク質 Y は  $(y_1, y_2, y_3, \dots)$  からなるペプチドマスフィンガープリントを生ずる。
- (2) タンパク質 A の消化物は、 $(y_1, y_2, y_3, \dots)$  なるペプチドフィンガープリントを与える。
- (3) タンパク質 A は、遺伝子 X にコードされている。

演繹法 (deduction) の構造は以下のように示すことができよう。

**Rule:** 遺伝子 X は翻訳され、タンパク質 Y を産生し、タンパク質 Y は  $(y_1, y_2, y_3, \dots)$  からなるペプチドマスフィンガープリントを生ずる。

**Case:** タンパク質 A は、遺伝子 X にコードされている。

**Result:** タンパク質 A の消化物は、 $(y_1, y_2, y_3, \dots)$  なるペプチドフィンガープリントを与える。

演繹法による議論は常に真である。

これに対して、帰納法 (induction) は以下のような構造をもつ。

**Case:** タンパク質 A は、遺伝子 X にコードされている。

**Result:** タンパク質 A の消化物は、 $(y_1, y_2, y_3, \dots)$  なるペプチドフィンガープリントを与える。

**Rule:** 遺伝子 X は翻訳され、タンパク質 A を産生し、タンパク質 A は  $(y_1, y_2, y_3, \dots)$  からなるペプチドマスフィンガープリントを生ずる。

このケースはたまたま真であるが、このような帰納法による規則の一般化が常に真であるとは限らない。

ではアブダクション (abduction) ではどうであろうか?

**Rule:** 遺伝子 X は翻訳され、タンパク質 Y を産生し、タンパク質 Y は  $(y_1, y_2, y_3, \dots)$  からなるペプチドマスフィンガープリントを生ずる。

**Result:** タンパク質 A の消化物は,  $(y_1, y_2, y_3, \dots)$  なるペプチドフィンガープリントを与える.

**Case:** タンパク質 A は, 遺伝子 X にコードされている. 前例に挙げた豆のケースと非常によく対応していることがわかる. すなわち, “タンパク質 A は, 遺伝子 X にコードされている” という結論は, 仮説 (hypothesis) にあたる. すなわち, アブダクションが仮説形成推理と呼ばれるゆえんである.

#### 4. ペプチドマスフィンガープリントの結果得られる仮説はいかに証明されるか

前章で導かれた結論は, 第 2 章で簡単に述べた “ペプチドマスフィンガープリントは, 必要条件ではあるが, 十分条件ではない” という命題とよく呼応する. では, 実際ペプチドマスフィンガープリントで得られた結果をどうすれば完全に証明できるだろうか? ここで, 二つの大きな考え方の差異が生ずるように思われる. 第一の立場は, 質量分析学の正統的な方法で解決しようとするもので, 例えば, 選択されたイオンの MS/MS 分析でペプチドの構造を直接に証明しようというものである. このような方法は horizontal approach とも呼ぶべきもので, 質量分析学のいわば正統派的な常套手段であろう. 他の立場は, 何かそのペプチドに特異的な特色, 例えばリン酸化されたアミノ酸残基からリン酸基を酵素的に消化することで起こる質量の減少や, Tyr 残基や His 残基がヨード化されることによる質量の増加を確認することによって仮説を確かめる方法で, orthogonal approach とも呼ぶことができよう<sup>18)</sup>. あるいは, 質量分析とは全く違った方法, 例えば消化ペプチドを単離したあと直接エドマン分解でペプチドシーケンスを決める方法, または, より生化学的な考え方の例としては, 抗体でタンパク質を染めることによる証明もありうる. ここで, どの程度までの証拠をそろえれば十分かという疑問に対する答えを単純に与えることは難しい. 例えば, タンデムマススペクトロメトリー (MS/MS) で何個のイオンの構造を証明すれば完璧かという基準を一般的に決めるのは難しいだろう. それは, 一つには, すべての理論から予想されるペプチドを観測することは, ほぼ不可能に近いこと, またある場合には, 遺伝子がキメラ構造をもっていて頭と尻尾で違った遺伝子から由来したシーケンスからなり少数個のイオン構造の証明だけでは足りないこともある. このような極端な例をも含めて一般的に完全な証明の判定基準を決めることは困難なように思われる.

しかしながら, 実際には, ペプチドマスフィンガープリントで得られる結果は, 将来の実験を企画するための仮説を与えるという性質上, 一度立てられた仮説は, 常に検証される状況におかれなければならないし, また実際常に検証される状況におかれるだろう. そして, もしその仮説が間違っていれば, どこかでつじつまの合わない実験結果に遭遇することから, 間違いを避けることができよう. このような状況は, パースが約 100 年程前に提唱したプラグマティズムの方法論とよく呼応することに注目したい.

#### 5. キイロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の視細胞中で起こるタンパク質のリン酸化

次に, 筆者らのグループで過去 20 年間興味をもって研究を続けてきたキイロシヨウジョウバエ (以下単にハエと呼ぶ) の複眼視細胞中で光刺激によって誘起されるタンパク質のリン酸化のカスケードを例に挙げ, ペプチドマスフィンガープリントの有効性を示したい. ハエを暗順応させ, 二つのグループに分ける. 一つのグループはそのまま暗黒中で液体窒素処理し, さらにアセトン中で組織を脱水させる. 他のグループには光を照射することによって明順応させた後, 同じように低温化 ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) アセトン中で脱水させる. アセトンを蒸発させた後に顕微解剖によって非常にきれいな複眼試料が得られることが藤田ら<sup>19)</sup>によって報告されている. 顕微解剖は常温で行われるが, 組織は脱水状態にあるので, 生化学反応は阻害されている. 暗順応と明順応の 2 種類の複眼からタンパク質を抽出し, 2 次元電気泳動にかけることによって, 視細胞に特異的で発現量の多い 3 種類のタンパク質が光刺激によってリン酸化されることを発見した<sup>20)~22)</sup>. リン酸化は, 2 次元ゲル上でスポットが酸性方向へ  $0.2\sim 0.3$  pH 単位移動することによって予測され,  $^{32}\text{P}$ -リン酸の取り込みによって確かめられた. これらのタンパク質はその SDS-PAGE 上での見かけの分子量によってそれぞれ 39 K, 49 K, そして 80 K タンパク質と命名された. 1990 年前後に, 筆者らグループ<sup>23), 24)</sup> と他のグループの研究<sup>25), 26)</sup> によって 39K タンパク質と 49K タンパク質はそれぞれアレスチンのホモログであることが明らかにされた. アレスチンは, G タンパク質とカップルしたレセプター (G protein-coupled receptor; seven-transmembrane-spanning receptor) がアゴニストによって活性化され, そのカルボキシル末端にある Ser と Thr 残基がレセプターリン酸化酵素 (G protein receptor kinase) によってリン酸化されると, そのレセプターに親和性を示し結合する. その結合の結果, レセプターシグナルは緩和される. すなわち, アレスチンは順応 (adaptation) 過程に働く阻害性のファクターである. 筆者らのグループは, この二つのリン酸化されたアレスチン様タンパク質をそれぞれ phosrestin I (PRI; 49K) と phosrestin II (PRII; 39K) と命名した. PRI, PRII はそれぞれ arrestin B, arrestin A と呼ばれてもいる. その後の突然変異株やトランスジェニック株を用いた研究により, PRI (arrestin B) は視細胞が光刺激を受けた後の明順応過程 (light adaptation) に関与していることが示された. PRII (arrestin A) の生理的機能はいまだにはっきり理解されていない.

さらに, 筆者らのグループの研究によると, PRI は視細胞が光刺激を受けるやいなや非常に短時間の間に ( $\sim 500$  ミリ秒以内) リン酸化されることが観察される<sup>27)</sup>. その後, 80K たんぱく質のリン酸化が続き ( $2\sim 3$  秒以内), さらに PRII (arrestin A) のリン酸化が  $\sim 10$  秒程度の時間スケールで起こる. 筆者らはこれらのリン酸化, 特に視細胞内で

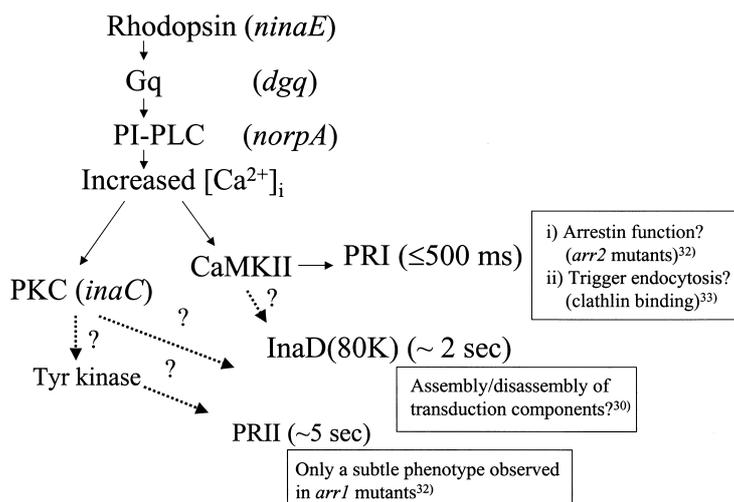


Fig. 2. Protein phosphorylation cascades induced by light stimulus in the photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster*. Photoreceptor excitation induces phosphorylation of at least three classes of photoreceptor-specific proteins within several seconds *in vivo*. Among them, the first phosphorylation takes place at the Ser366 of phosrestin I (PRI) by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) that is triggered by the increase of intracellular calcium.<sup>27), 28)</sup> It is unknown which kinases are responsible for the phosphorylation of INAD (80K) and phosrestin II (PRII). The name of the gene encoding the protein is shown in a parenthesis. Hypothetical roles of protein phosphorylation are described in a box.

最初に起こる PRI のリン酸化がどの種類のリン酸化酵素によっているかを研究した。最初に、生化学の常套手段であるリン酸化酵素の精製を行い、さらに PRI のトランケーションや予想したリン酸化部位を代表する合成ペプチドを基質に使い、PRI の Ser-366 がリン酸化部位で、しかもカルシウム・カルモデュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) が PRI をリン酸化していると結論した<sup>27), 28)</sup>。ここで、筆者らが直面したのは、本当に Ser-366 が生きた視細胞中でリン酸化されているのかという素朴であるが重要な疑問であった。このような *in vivo* でのリン酸化部位の決定・確認は非常に難しい。このことを達成するために、筆者らは、1) *in vivo* でリン酸化された PRI の 2 次元ゲルによる分離、2) 2 次元ゲルスポットの in-gel digestion、そして 3) microbore HPLC と ESI-triple quadrupole mass spectrometer によるオンライン分析システムを開発し、Ser-366 を含むトリプシン消化ペプチドのリン酸化型を確認した<sup>27)</sup>。このような、2 次元ゲル・ゲル内消化・オンライン HPLC-ESIMS によるリン酸化ペプチドの確認は筆者らの報告が世界で初めてであると思う。このような背景を下に 80K タンパク質の素性は果たして何だろうかという疑問が残る。もし 80K タンパク質をコードしているハエの遺伝子がすでにゲノムデータベースに登録されているならば、ペプチドマスフィンガープリントが 80K 遺伝子の発見に役立つだろう。筆者らは、ほぼ 20 年前に展開し乾燥保存されていた 2 次元ゲルでもペプチドマスフィンガープリントの試料を提供することを観察した<sup>29)</sup>。さらに、過去に調製した 2 次元ゲルから 80K タンパク質を切り取ってペプチドフィンガープリントすることにより、80K タンパク質は *inaD* 遺伝子の産物（以下 INAD と呼ぶ）であることを確認した<sup>30)</sup>。（さらに、80K タンパク質消化後のペプチドの数個をエドマン分解することにより INAD を確認し

た。）他の研究グループの過去数年の報告により、INAD は PDZ タンパク質ファミリーに属し、その基本的な生理的役割は scaffolding（足場作り；他のタンパク質と結合し機能を完成させること）にあるとされている。INAD は具体的には、視細胞シグナル変換機構（visual transduction）に関与しているタンパク質、すなわちイオンチャンネル *trp*、エフェクター PLC（phospholipase C）、そしてプロテインキナーゼ PKC を複合体として保つ足場として働いているらしい<sup>31)</sup>。このような状況のもとで、光刺激によって誘起される INAD（80K タンパク質）の可逆的リン酸化が、シグナル変換機構の調節を担っていることは想像するにたかたない。これまでの筆者らのグループの非力な研究でわかったことと他のグループの報告を基に仮説・疑問をも含めてまとめたのが Fig. 2 である。筆者らがここで強調したいのは、ペプチドマスフィンガープリントが（ハエゲノムの情報が入手できたがゆえに）筆者らの研究の中で 80K タンパク質の素性を明らかにし、他の方法とは比較にならないほどプロジェクトの発展に役立ったという事実である。筆者らは、これまでに最初のリン酸化過程の観察後 20 年を費やしたから、Eliot<sup>34)</sup> によれば、“Twenty years largely wasted” とも言えよう。もちろんペプチドマスフィンガープリントは 20 年前にはなかったのであるが。

## 6. 網膜のプロテオミクスとストレスで誘導されるタンパク質合成

次に挙げる例は、前章で挙げた例と趣きを少し異にする。なぜかと言うと、今度はリン酸化タンパク質の素性は何かという単純なあて物式の疑問ではなく、もっと生命の背後に潜む複雑な信号処理の仕組みを彷彿させるかのような例であるからだ。網膜は視覚の初期過程を担う光受容細胞である視細胞（photoreceptor cell）が含まれている組織

### Light-conditioning protects retina from light-damage.

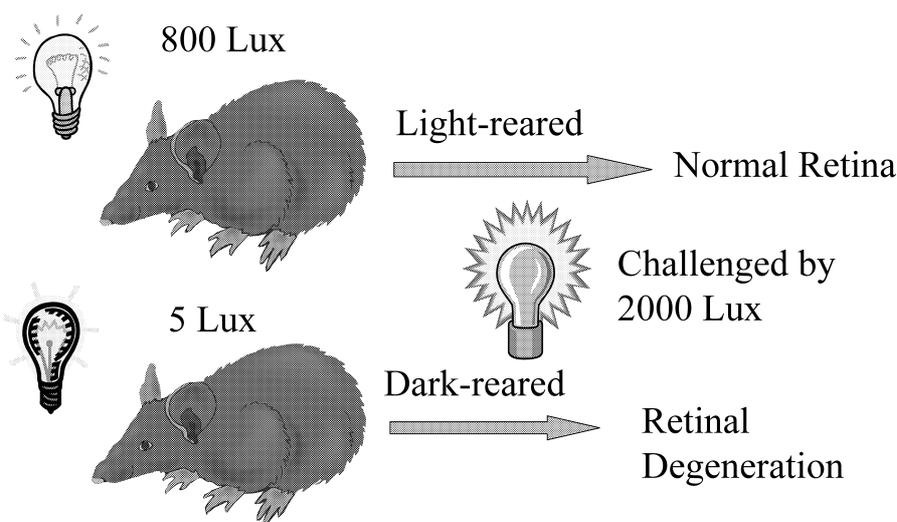


Fig. 3. Neonatal rats reared under bright light conditions develop resistance of photoreceptor cells toward light-damage.

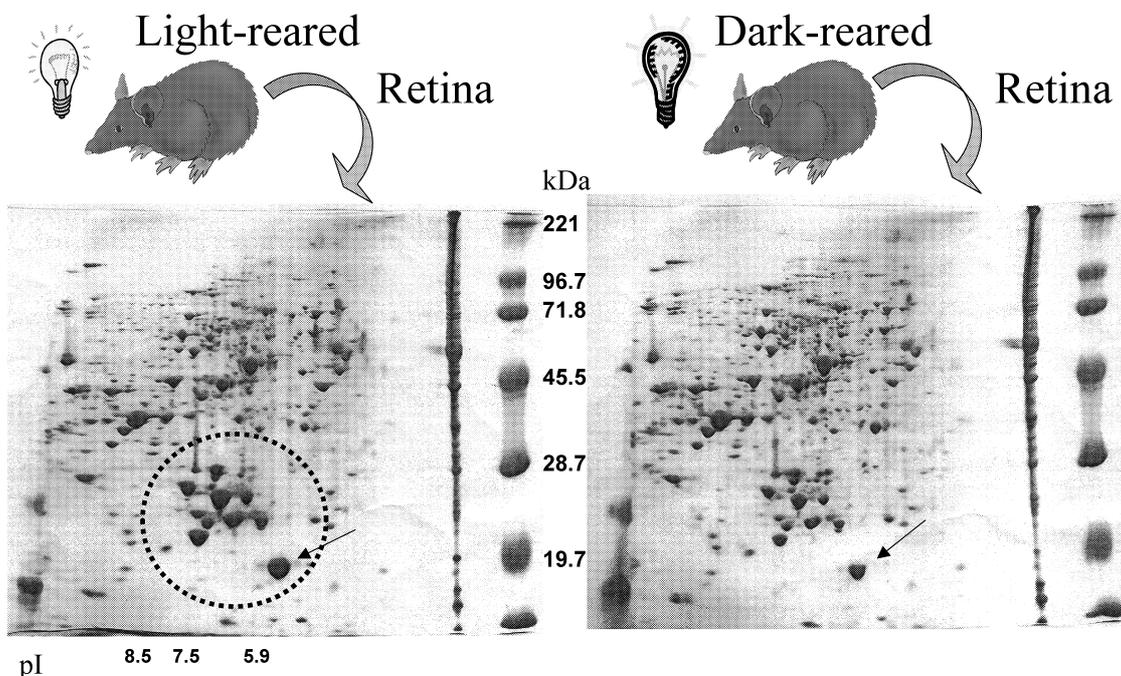


Fig. 4. Two-dimensional gel analyses of retinal proteins of rats reared under different light conditions.

である。それゆえ視細胞が何らかの病理的原因で死に至ると眼が見えなくなるのは言うまでもない。視細胞死の原因には、遺伝病理的要因とともに、特に遺伝学的異常がない場合でも近紫外線照射などによる生理的要因が視細胞に損傷を与え死に至らしめることもある。したがって、視細胞の生存と死のメカニズムを理解することは眼科学の重要な課題の一つであろう。以下に筆者らが最近経験した、視細胞死のメカニズムの複雑さを垣間見るような例を示そう。

#### 例 1. 後天的因子による視細胞変性の予防効果

近紫外線（青色光）による網膜の変性症は約 20 年ほど前にネズミを使って報告され、その後、視細胞死の動物モデルとしてよく使われてきた。約 10 年ほど前に、Anderson のグループは、ネズミの発育条件の違いによって青色

光による視細胞の変性過程に大きい差異を示すことを観察した<sup>35)</sup>。すなわち、ネズミを明るい条件下（800 ルックス）で飼育した場合と薄暗い条件下（5 ルックス）で飼育した場合とでは、前者の方が後者に比べて青色光や極端に強度が強い光（たとえば 2,000 ルックス）に対する抵抗性ができる（Fig. 3）。このように同一な遺伝的背景をもつ動物が、後天的な因子の違いによって異なる表現型を示すモデルは、プロテオミクス研究の格好な材料とも言える。それは、遺伝子型の違いがもたらす効果を心配しなくてよいからである。これらの 2 種類のネズミの網膜のタンパク質を抽出し 2 次元ゲルで分析すると、Fig. 4 に示されるように顕著な違いが観察された。特に Fig. 4 で円で囲んである中性付近の低分子量のタンパク質に注目されたい。明らかに

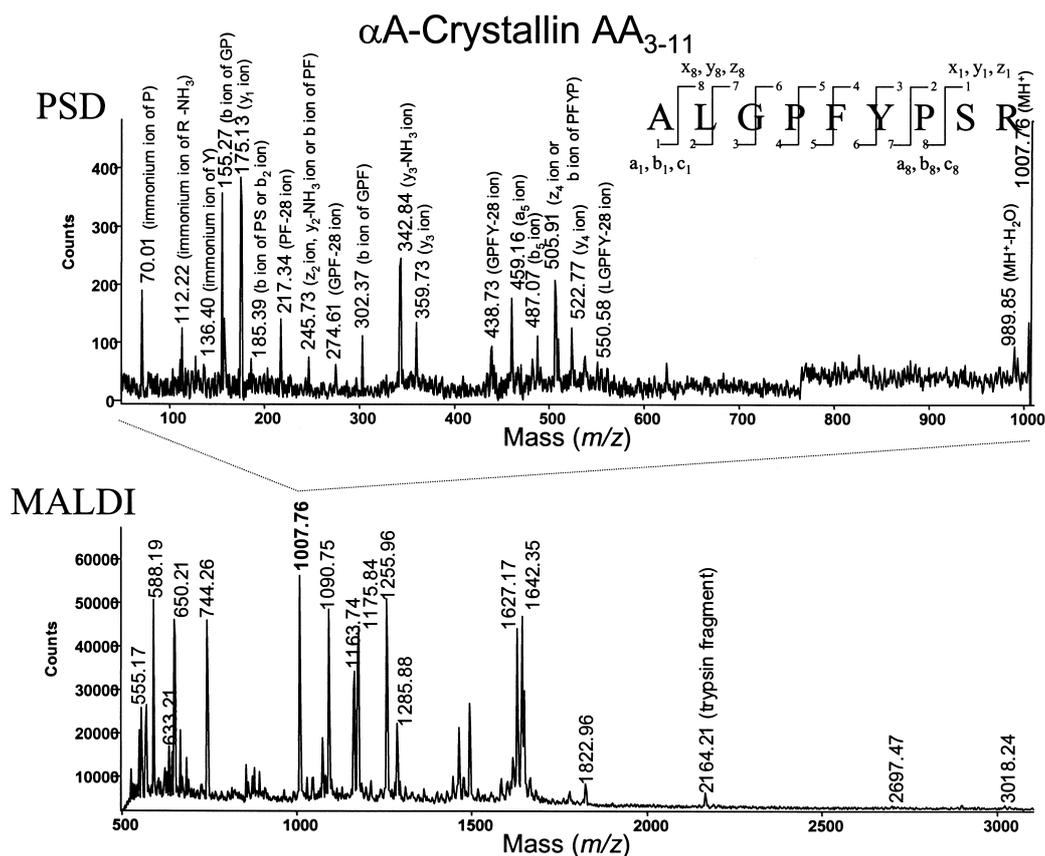


Fig. 5. MALDI-TOF spectrum of the two-dimensional gel spot that was up-regulated by bright-light conditioning. The spot shown by the arrow in Fig. 4 was digested by trypsin and the MALDI-TOF spectrum of the digest was measured (lower). The upper figure illustrate the post source decay (PSD) spectrum of the  $m/z=1007.76$  peak, indicating that the protein is likely to be  $\alpha$ A-crystalline.

これらのタンパク質は、明るい条件下で育てた動物の網膜により多く発現されている。これらのタンパク質をペプチドマスフィンガープリントにかけると、ほとんどすべてのものがクリスタリンに属するものであることが判明した。そのうちの矢印で示されている一つは A-crystalline である。このことは、ペプチドフィンガープリントのピークを PSD (post source decay) で確かめたこと (Fig. 5) と、網膜切片の免疫染色で視細胞に (A-crystalline が存在することが裏づけている<sup>36)</sup>。クリスタリンはレンズ (硝子体) 細胞中の構造タンパク質であるというのが常識的な考えであるが、果たして何が起きているのだろうか？ここでクリスタリンが網膜中に誘導発現されるもう一つの例を示す。

例 2. アポトーシス阻害因子 bcl-2 が強制発現されることによって起こす効果

細胞死が予定されたもの (アポトーシス; apoptosis) と外的原因によるもの (ネクローシス; necrosis) の二つに分類できることは周知の事実であるが、アポトーシスを阻害する因子の一つとして bcl-2 が知られている (Fig. 6). bcl-2 はアポトーシス阻害因子であるから、遺伝子操作されたハツカネズミ (transgenic mouse) の視細胞中に bcl-2 を強制発現させると、視細胞が細胞死を起こさせる何らかの状況下で死に対する抵抗性を示すことが予想できる。確かに、bcl-2 を発現させたハツカネズミでは、SV40 の T-antigen を同時発現させたときに見られる毒性の効

果が弱められる。このようなアポトーシスが抑制された状況下で、網膜中のタンパク質の発現にどのような変化が見られるかを調べた結果が Fig. 7 に示されている。図に示されるように bcl-2 発現ハツカネズミでは、網膜中に少なくとも 5 本のバンドが SDS-PAGE 上で観測できた。一番多く発現されているバンド (Band 1) をペプチドマスフィンガープリントにかけることによって Band 1 は  $\alpha$ A-crystalline であることがわかった<sup>37)</sup>。

上の二つの例を総合すると如何なる推論が可能であろうか？例 1 と例 2 の結果をまとめると Fig. 6 のようになる。要点は、1) 明るい条件下で育てる操作とアポトーシスを阻害する操作が共に視細胞死に対する抵抗性を与えることと、2) 異なる原因によって抵抗性を獲得した 2 種類の網膜中に同一のタンパク質  $\alpha$ A-crystalline が大量に発現されていることが、同時に起こったという事実である。 $\alpha$ A-crystalline が発現されることの意味は何であろうか？このことは、インターネットを使って文献サーチをすると、 $\alpha$ -crystalline ファミリーのタンパク質が“低分子ストレスタンパク質” (small stress protein) グループに属し、細胞が何らかの危機的状態に置かれたときにそれに抵抗する因子として分類されていることから憶測できよう。ここで新しくわかったことは、アポトーシスとストレスとの何らかの連関である。このことは、従来の研究方法ではむしろ気がつきにくいことであろう。それはなぜかと言

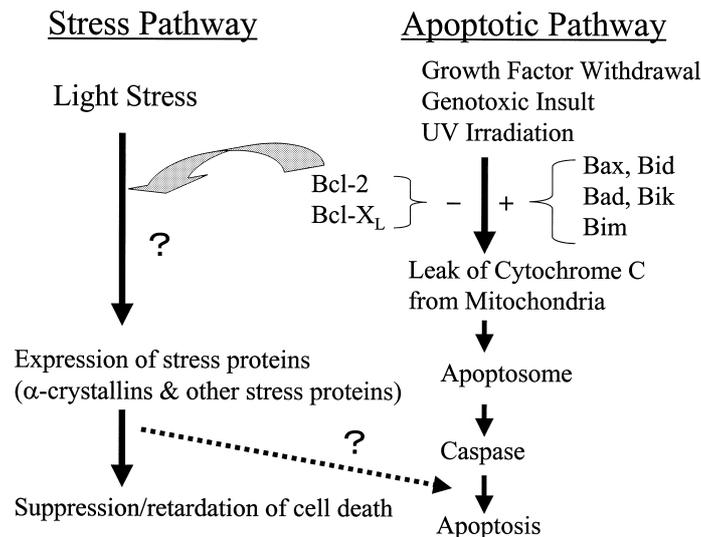


Fig. 6. The apoptotic pathway and the stress-signaling pathway appear to be interacting each other in rat retinal cells.

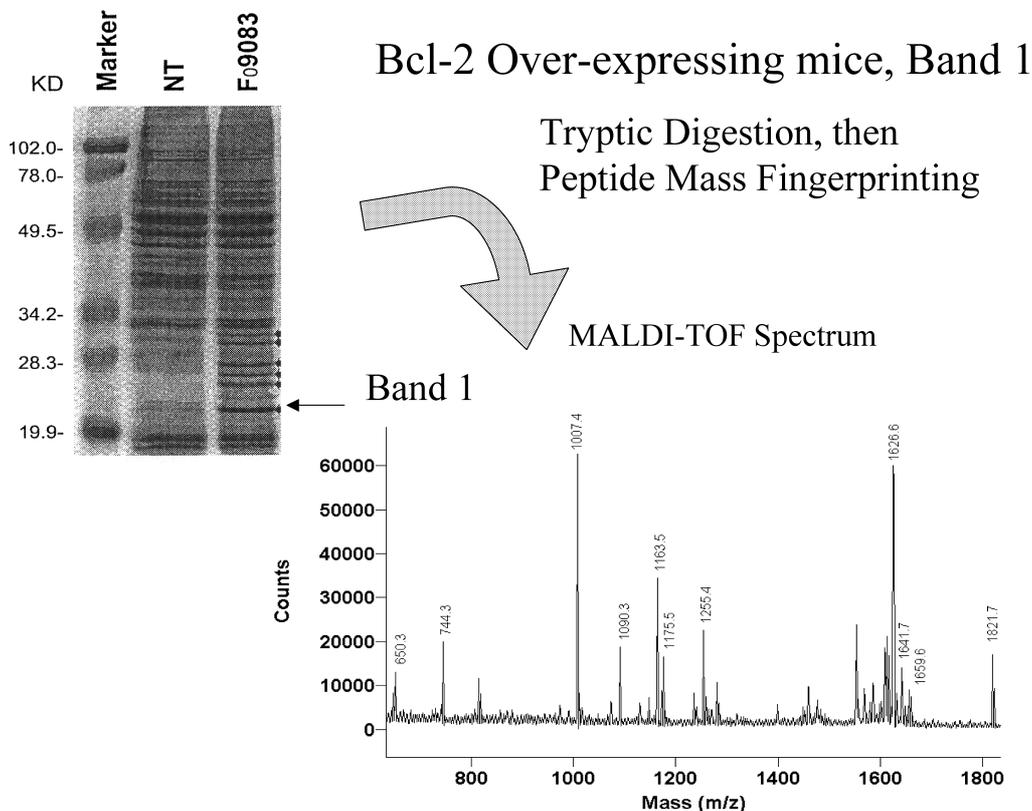


Fig. 7. Over-expression of the *bcl-2* protein in photoreceptor cells up-regulates at least 5 proteins revealed by SDS-PAGE; Fo9083, *bcl-2* over-expressed mouse retina; NT, non-transgenic control. Peptide mass fingerprinting of Band 1 revealed its identity as  $\alpha$ A-crystalline.<sup>37)</sup>

うと、第一に、見かけがかなり違って見える系を観測することがあまりにも非生産的に見えるので、あまりなされる機会が少ないだろうことと、第二に、抽出されたタンパク質をすべて比べて同定する方法論が今までなかったことによる。

ここでこれらの結果をパースのアブダクションに照らして解釈してみよう。二つの独立な外的因子（800 ルックス下で飼育することと *bcl-2* を過剰発現させること）が視細胞の変性に対する抵抗性を与える二つの例は動かしがたい事実である。実験の再現性を信ずる限り、この事実は Rule

と見なしうるだろう。この異なる背景をもつ二つの実験系で得られた結果 (Result) は、ストレスタンパク質  $\alpha$ -crystalline の過剰産生である。これらの命題から導かれる Case は、二つの異なる（と思われる）細胞生理学的信号変換機構 (cellular signal transduction pathways) はどこかで相互作用 (interaction or cross-talk) しているらしいということである。これらの考察をまとめると次のようになるうか。

**Rule:** 800 ルックス下での飼育あるいは *bcl-2* の過剰産生が視細胞の変性に対する抵抗性を与える。

**Result:** 800 ルックス下での飼育あるいは bcl-2 の過剰生産のいずれの場合にもストレスタンパク質  $\alpha$ -crystalline の過剰産生が起こっている。

**Case:** 二つの異なる細胞生理学的信号変換機構 (800 ルックス下での飼育がもたらすストレスと bcl-2 がもたらすアポトーシスの障害) が、どこかで相互作用しているらしい (パースの言うアブダクションあるいは仮説の形成)。

## 7. 結 語

この小論では、プロテオミックスに起用される論理構造が、演繹でも帰納でもなく、むしろ前世紀の初頭にプラグマティズムの創始者パースが提唱したアブダクション (仮説形成推理) であることを示した。さらに、アブダクションの条理は、プロテオミックスを多重的に支配するように見える。例えば、この小論では、プロテオミックスの第一次操作であるペプチドフィンガープリントがアブダクションによること、さらに、ペプチドフィンガープリントを網膜のタンパク質発現に適用した例が、やはりアブダクション過程と呼ぶにふさわしいことを示した。アブダクションの特徴は、伝統的な還元論的生物学と異なり、仮説を基に実験系を組み立てないことである。なぜならば、アブダクションは、むしろ観察や実験の結果に基づき仮説を形成する過程であるからだ。半世紀の還元主義的な立場の下に発展した分子生物学の産物であるプロテオミックスがなぜここに至って、仮説から出発する伝統的な立場をにわかには捨て去ろうとしているのだろうか？ ここにトーマス・クーン (Thomas S. Kuhn) の言うパラダイムシフト<sup>38)</sup> が起こりつつあるのだろうか？ もしそうであるならば、このパラダイムシフトに質量分析学が果たす役割は大きいと思う。この意味で、分子医学生物学の将来が、質量分析学にとって実りの多い時代となることを期待したい。

**謝 辞** この研究は NIH グラント EY 06595, EY 13877, EY 12191, RR15564, ならびに Presbyterian Foundation Grant によって行われた。筆者らは松本昌臣と田中 聡医学博士からの議論と黒野民恵の原稿作成における補助に感謝する。

## 文 献

- 1) W. J. Henzel, T. M. Billesi, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley, and C. Watanabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 5011 (1993).
- 2) P. James, M. Quadroni, E. Carafoli, and G. Gonnet, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 58 (1993).
- 3) M. Mann, P. Hojrup, and P. Roepstorff, *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 338 (1993).
- 4) D. J. C. Pappin, P. Hojrup, and A. J. Bleasby, *Curr. Biol.*, **3**, 327 (1993).
- 5) J. R. Yates, III, S. Speicher, P. R. Griffin, and T. Hunkapiller, *Anal. Biochem.*, **214**, 397 (1993).
- 6) "Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics," ed. by M. R. Wilkins, K. L. Williams, R. D. Appel, and D. F. Hochstrasser, Springer, Berlin (1997).
- 7) "2-D Proteome Analysis Protocols," ed. by A. J. Link, *Methods in Molec. Biol.*, Vol. 112, Humana Press, Totawa, New Jersey (1999).
- 8) "Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods," ed. by T. Rabilloud, Springer, Berlin (2000).
- 9) プロテオーム解析法 (磯部敏明, 高橋信弘・編), 実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座 2, 羊土社, 東京 (2000).
- 10) プロテオーム研究とシグナル蛋白ドメイン (竹縄忠臣・編), 実験医学 18, 羊土社, 東京 (2000) .
- 11) Y. Nishizawa, N. Komori, J. Usukura, K. W. Jackson, S. L. Tobin, and H. Matsumoto, *Exp. Eye Res.*, **69**, 195 (1999).
- 12) H. Matsumoto, E. S. Kahn, and N. Komori, Novartis Foundation Symposium 224, 225 (1999).
- 13) Y. Nishizawa and H. Matsumoto, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **47**, 177 (1999).
- 14) H. Matsumoto and N. Komori, *Methods Enzymol.*, **316**, 492 (2000).
- 15) T. Kinumi, K. W. Jackson, M. Ohashi, S. L. Tobin, and H. Matsumoto, *Eur. Mass Spectrom.*, **3**, 367 (1997).
- 16) I. M. Copi, "Introduction to Logic," 4th Ed., Collier-Macmillan Canada, Ltd., New York (1972).
- 17) U. Eco, "A Theory of Semiotics," Indiana University Press, Bloomington (1979).
- 18) G. L. Corthals, S. P. Gygi, R. Aebersold, and S. D. Patterson, In ref. 8, pp. 196-231 (1999).
- 19) S. C. Fujita and Y. Hotta, *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **24**, 1336 (1979).
- 20) H. Matsumoto, J. O'Tousa, and W. L. Pak, *Science*, **217**, 839 (1982).
- 21) H. Matsumoto and W. L. Pak, *Science*, **223**, 184 (1984).
- 22) H. Matsumoto and W. L. Pak, In "Neurobiology: Current Comparative Approaches," ed. by R. Gilles and J. Balhazart, Proceedings in Life Science. pp. 398-412, Springer-Verlag, Berlin (1985).
- 23) T. Yamada, Y. Takeuchi, N. Komori, H. Kobayashi, Y. Sakai, Y. Hotta, and H. Matsumoto, *Science*, **248**, 483 (1990).
- 24) H. Matsumoto and T. Yamada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**, 1306 (1991).
- 25) D. P. Smith, B. H. Shieh, and C. S. Zuker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 1003 (1990).
- 26) D. R. Hyde, K. L. Mecklenburg, J. A. Pollock, T. S. Vihtelic, and S. Benzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 1008 (1990).
- 27) H. Matsumoto, B. Kurien, Y. Takagi, E. S. Kahn, T. Kinumi, N. Komori, T. Yamada, F. Hayashi, K. Isono, W. L. Pak, K. W. Jackson, and S. L. Tobin, *Neuron*, **12**, 997 (1994).
- 28) E. S. Kahn and H. Matsumoto, *J. Neurochem.*, **68**, 169 (1997).
- 29) H. Matsumoto and N. Komori, *Anal. Biochem.*, **270**, 176 (1999).
- 30) H. Matsumoto, E. S. Kahn, and N. Komori, In: "Rhodopsins and Photo-transduction," Novartis Foundation Symposium No. 224, pp. 225-248 (1999).
- 31) A. Huber, *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 769 (2001).
- 32) P. J. Dolph, R. Ranganathan, N. J. Colley, R. W. Hardy, M. Socolich, and C. S. Zuker, *Science*, **260**, 1910 (1993).
- 33) A. Kiselev, M. Socolich, J. Vinos, R. W. Hardy, C. S. Zuker, and R. Ranganathan, *Neuron*, **28**, 139 (2000).
- 34) T. S. Eliot, Four Quartets. In "The Complete Poems and Plays, 1909-1950," Harcourt, Brace & World, Inc., New York (1971).
- 35) F. Li, W. Cao, and R. E. Anderson, *Exp. Eye Res.*, **73**, 569 (2001).
- 36) R. Arvarez, N. Komori, S. Kuroono, F. Li, H. Matsumoto,

and R. E. Anderson, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, S628 (2001).

- 37) A. B. Quiambao, E. Tan, S. Chang, N. Komori, M. I. Naash, N. S. Peachey, H. Matsumoto, D. Ucker, and M. R. Al-Ubaidi, *Exp. Eye Res.*, **73**, 711 (2001).

- 38) T. S. Kuhn, "The Structure of Scientific Revolutions," The University of Chicago Press, Chicago (1962).

**Keywords:** Proteomics, 2-D gel, Photoreceptor cells, Peptide mass Fingerprinting, Abduction