

C. 研究結果

- 1) 質量分析の直前に逆相樹脂担体を充填したカラム ($\Phi 0.3 \times 1\text{mm}$) に試料を保持させ、0.2% 酢酸、5% アセトニトリルを含む水溶液で脱塩、洗浄の後、0.2% 酢酸、80% アセトニトリル水溶液 (流速200~300nL/min) で樹脂に吸着したペプチドを溶出し、直接ESIイオン源へ導入した。1mMのTris-HCl緩衝液を含む蛋白質のトリプシン消化物(100fmol/ μL)をそのままESI-MSにより測定するとTris-HClのクラスターイオンのみが観測され、ペプチド由来のシグナルは得られなかった。同じ試料溶液を用いて上記方法により脱塩、濃縮を行った後のスペクトル(3分間積算し、約1 μl の試料溶液を消費)では、Tris-HClは除かれ、トリプシンペプチド由来の多価イオンシグナルのみが観測された。さらに、シグナル/ノイズ比が大幅に向上することで、サブピコモルレベルのペプチドに対してMS/MS測定が可能となった。
- 2) 血漿、尿から効率的にペプチドを抽出する方法について検討した。血漿では逆相担体による濃縮、ゲルろ過を、尿ではイオン交換あるいは透析後、逆相担体による濃縮、ゲルろ過による分画(ペプチド、タンパク質画分)を順次行い、最終的に逆相ナノLCにより分離、分画する方法を確立した。分離したペプチドを直接MS用試料プレートに直接プロットし、引き続きMALDI-MS/MSによる自動測定とペプチドの同定をハイスルーブットで行える一連の方法を確立し、尿由来のペプチドに応用した。その際、尿ペプチドの日内、日間変動等を調べた。
- 3) ナノESI法においてサブピコモル量の微量ペプチドのミリマス測定(MS/MS)を可能にする新規方法を考案した。これにより、MS/MSにおいて帰属できない断片イオンや翻訳後修飾の帰属が容易に行えるものと思われる。
- 4) ペプチドのMS及びMS/MSスペクトルとデータベース検索等で得られた候補配列や理論値を照合するソフトウェアの試作を行った。
- 5) 微量蛋白質をハイスルーブットで同定する目的で、多検体試料気相化学反応装置によるエドマン分解とMSによる方法について検討した。

気相化学反応装置では、気相で試薬と反応を行うので試料の汚染やロスがなく、また、MALDI-MS用の試料プレート上に塗布した多数(~900検体)の異なる試料に対して複数の化学反応を連続して行うことができる。この装置を用いて、複数の蛋白質消化物に対して、エドマン分解を1~3サイクル行った。反応産物のMALDI-MSでは、分子量情報の他に、N末端1~3残基のアミノ酸配列が得られた。これらの情報を合わせてデータベース検索に供することにより、蛋白質の同定確度は飛躍的に向上した。また、エドマン分解反応条件を最適化することで、サブピコモルレベルの蛋白質に対してMALDI-MSにより同定することが可能となった。

D. 考察

微量試料前処理、及び、分離法の開発については、尿や血漿など様々な共雑物を含む生体試料から直接簡単にペプチドや蛋白質を分画できるようになったが、安定性や微量成分の検出についてはまだ評価できていない。また、MS/MSによる同定ではサブピコモルレベルの蛋白質・ペプチドに対して行うことが可能であったが、実際の同定に必要な最低量(尿や血漿)も調べる必要がある。量的変動解析を行う方法について種々検討したが、微量試料の場合は、2つの比較したい試料間で、吸着や酵素などによる処理に微妙な差が生じるために再現性はまだ得られていない。

ペプチド混合物のエドマン分解反応後のMSスペクトルは一般に複雑になるので、エドマン分解/MALDI-MSをもとに個々のペプチドから効率よくアミノ末端配列情報を抽出し、配列データベースに対し検索できるソフトウェアの開発が必要と考えられ、現在その試作を行っている。

質量スペクトルのデータベースへの収納については、個々の質量分析計付属のデータ解析ソフトウェアに依存するところが大きく、今後の課題と考えられる。一方、解析結果の収納については、ペプチドと蛋白質の場合では収納法が大きく異なり、発見的データベース構築にはそれぞれに対し最適の方法を確立しておく必要がある。

E. 結論

微量試料前処理及び分離法を確立することにより、個人ごとに採取した尿や血漿由来の蛋白質・ペプチドをピコモルレベルで分離、分画することが可能になり、さらに、それらを用いて MALDI 及び ESI-MS/MS と配列データベース検索により蛋白質・ペプチドの同定を行うことができた。また、気相エドマン分解法と MALDI-MS の組み合わせによる新しい方法により、多数の蛋白質を効率よく同定できる方法を考案した。さらに、MS や MS/MS スペクトルで観測される同位体分布を理論分布と照合できる新しいソフトウェアの試作し、データのバリデーションに有効に利用できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Fernandez-de-Cossio J, Gonzalez J, Satomi Y, Betancourt L, Ramos Y, Huerta V, Amaro A, Besada V, Padron G, Minamino N, Takao T: ISOTOPICA: a Tool for the Calculation and Viewing of Complex Isotopic Envelopes. accepted
 - ② Konishi A, Shimizu S, Hirota J, Takao T, Fan Y, Matsuoka Y, Zhang L, Yoneda Y, Fuji Y, Akoultchi AI, Tsujimoto Y: Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell*, 114: 673-688, 2003.
 - ③ Minamino N, Tanaka J, Kuwahara H, Kihara T, Satomi Y, Matsubae M, Takao T. Determination of endogenous peptides in the porcine brain: Possible construction of Peptidome, a fact database for endogenous peptides. *J Chromatogr B*, 792: 33-48, 2003.
 - ④ Kuwahara H, Tanaka-Isoyama J, Kihara T, Matsubae M, Matsui Y, Takao T, Isoyama M, Minamino N. Efficient data acquisition system for Peptidome database. *Peptide Science 2003*, Ed. by Ueki M, The Japan Peptide Society, p.465-466, 2004
 - ⑤ Takao T: Proteomics Research by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *The review of laser engineering*, 31: 13-15, 2003
- ### 2. 学会発表
- ⑥ Tsuchiya K, Kawano Y, Kojima T, Nagata K, Takao T, Okada M, Shinohara H, Maki K, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka N, Watanabe M, Karasuyama H: Molecular cloning and characterization of TPP36 and its isoform TPP32, novel substrates of Abl tyrosine kinase. *FEBS Letters* 537: 203-209, 2003
 - ⑦ Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T: Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science* 16: 1679-1688, 2003
- ① 里見佳典、藤田哲史、田村義典、高尾敏文：Peptide Mass Fingerprinting by Combination of Gas-phase Edman Degradation and MALDI-MS. 第 5 1 回質量分析総合討論会（平成 1 5 年 5 月、筑波）
 - ② Satomi Y, Hirota J, Takao T: Specific Fragmentation on an e-N,N,N-Trimethyllysine in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, Montreal, 2003
 - ③ Yoshinari K, Ohtake A, Sano A, Kobayashi K, Nagai S, Satomi Y, Takao T: Application of a Molecular Orbital Model for Interpreting Fragmentation Profile of Peptides in MS/MS. 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, Montreal, 2003
 - ④ Fukuda H, Shindo M, Nonaka T, Fujita S, Tamura Y, Takao T: Improved Sensitivity in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry by Using a Ceramic Carbon Plate. 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, Montreal, 2003
 - ⑤ 桑原大幹、田中純子、木原孝洋、松八重雅美、高尾敏文、磯山正治、南野直人：ペプチドームデータベースの効率的な構築法について 第 40 回日本ペプチド討論会（平成 15

年 10 月、千葉)

- ⑥ Satomi Y, Matsubae M, Fernandez-de-Cossio J, Takao T: Mass Spectrometry for Peptidomic Analysis. 第 76 回日本生化学会大会 (平成 15 年 10 月、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

里見佳典 (大阪大学蛋白質研究所)

分担研究者 小山博記

研究要旨 癌患者に対するテーラーメイド医療の実現にむけて、2つのアプローチを開始している。1つは抗癌免疫能の増強に関与する遺伝子産物の解析、2つめは癌組織に発現するたんぱく質群の網羅的解析である。前者に関しては、ヒト樹状細胞などにおいてBCG等の免疫活性化物質に応答する遺伝子群の解析や、Toll like receptors 複合体の同定を行っている。後者に関しては癌組織に存在するたんぱく質群を、多次元液体クロマト、nano/ESI/MS/MS システムを用いて網羅的解析し、データベースを構築する準備を開始した。両者は、癌を抗癌免疫という宿主側（ヒト）の要因と癌細胞側の要因との両面から解析していくアプローチであり、癌患者におけるテーラーメイド医療にむけた基礎的データが蓄積されることが期待される。

A. 研究目的

ゲノムのドラフトシーケンスが終了し、プロテオーム解析が基礎研究の他、臨床にも応用されることが期待されている。特に癌などで発現するタンパク質の情報をもとに、悪性度や薬剤感受性を予測するテーラーメイド医療に向けた取り組みも既に開始されている。そこで大阪府立成人病センターでは、癌患者のサンプルを用いたプロテオーム解析の準備を開始した。現在、2つのアプローチを予定している。1.すでにジーンチップ解析などから抗癌免疫能の増強に寄与する遺伝子産物（蛋白・糖など）が判明しており、この分子間反応や4次構造などを解析する。2.がん組織（特に肺がん）で優位に発現する蛋白質群の同定を試みる。これらのデータベースから癌の予後診断、治療法の適応診断を展望する。

B. 研究方法

健常者および癌患者の末梢血からリンパ球や樹状細胞を単離し、BCGやインターフェロンなどで刺激後、変動する遺伝子群を Genechip 法で解析した。また当教室で作製した各種 Toll like receptor(TLR)の抗体を用い、免疫沈降法で TLR 複合体を精製した。

マウスの肺組織およびヒト肺ガン細胞株からたんぱく質を抽出し、8MUrea で変性後、DTT、ヨードアセトアミドで処理し、トリプシンで消化した。生じたペプチド断片を強力カチオンマイクロカラム(SCX)と逆相 C18 マイクロカラムを組み合わせた二次元 HPLC で分離し、nanoESIMS/MS に導入した。Dynamic exclusion scan を用い、測定データセットは Mascot および TurboSequest で解析した。

C. 研究結果および考察

当センターでは手術以外に適切な治療法がな

く、従って予後が悪い肺がん患者について免疫療法を施行している。免疫活性化には BCG の成分など人体に無害で、かつヒト樹状細胞などに対する自然免疫活性化物質を用いている。これらは機能的にはヒト Toll-like receptors (TLRs) のリガンドである。この免疫療法で現在 600 人の肺がん患者 (約 60%) が生存中である。TLR 刺激後の樹状細胞には TLR 分子複合体が形成され、強力な活性化が起きる。この複合体を抽出してプロテオーム解析すればがんに関連した免疫活性化の基盤が明らかになるはずである。TLR 刺激のアウトプットは genechip などで推定がついており、分子間反応の構築を類推できる。また、免疫沈降法につかえる抗体などは当研究室で独自に開発したものを用いており、すでに 60 余の TLR 結合蛋白質が 2 次元電気泳動などで確認できている。これらを LC-Mass で同定していく。

マウス組織およびヒト癌細胞ともに発現しているたんぱく質を 500-1000 程度同定することができた。またアセチル化などの翻訳後修飾されているペプチドに関しても同定可能であった。

本結果は宿主側の抗癌環境を分子レベルで規定する一助となり、癌細胞側の要因と相まって、より適切なオーダーメイド治療をがん患者の適応に応じて用意するために重要な基礎データとなる。

D. 結語

今後は、抗癌免疫に関与する遺伝子産物の解析を押し進めると共に、癌患者の手術標本を用いた解析を開始できる準備を整える必要がある。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1) 論文発表

Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nature Immunol.* 4: 161-167.

Uehori, J., S. Tsuji, M. Matsumoto, C. Kawata, T. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2003. Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin peptidoglycan. *Infect. Immun.* 71: 4238-4249.

Oshiumi, H., K. Shida, M. Sasai, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J. Biol. Chem.* 278: 49751-49762.

Matsumoto, M., K. Funami, H. Oshiumi, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* 171: 3154-3162.

Begum, N. A., M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2004. Mycobacterium bovis BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages.

Infect Immun. 72(2):937-48.

Akazawa T., H. Masuda, Y. Saeki, M. Matsumoto, K. Takeda, S. Akira, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2003. Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* (64:757-764).

2) 学会発表

第33回日本免疫学会総会

1. 瀬谷 司 Toll-like receptor adapters participating in selection of pathways for anti-viral type interferon induction (シンポジウム)
2. 松本美佐子、ヒト樹状細胞における TLR3 の発現と機能解析
3. 舟見健児、TLR3 の細胞内局在, 及び機能部位解析
4. 上堀淳二、樹状細胞成熟化におけるアシル化 MDP の作用機構の解析
5. 石井一夫、BCG-CWS 刺激による樹状細胞の発現プロファイル解析
6. 笹井美和、Toll-like receptor 3 のアダプター分子 TICAM-1 に結合する分子の単離とその機能解析

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

分担研究者 金子 勲 ヒューマンサイエンス振興財団
創薬プロテオームファクトリー
プロジェクトサブリーダー
生体試料解析部門長

研究要旨：

創薬ターゲット探索には患者組織試料と健常人試料との疾患関連蛋白質発現差解析が極めて重要である。そのため、疾患毎に、臨床・病情報と連結した患者100名以上の生体試料（組織＋体液）の疾患関連蛋白質が解析可能な高性能質量分析装置等の機器類およびそれに対応する統合型バイオインフォマティクスシステムを構築した。基本的には、手術時で得られた組織は ICAT 法を用いて創薬ターゲット探索用に、手術前後で採取された体液（血清、尿等）は SELDI-TOF 法を用いて疾患関連マーカー探索用に使用する。また、翻訳後修飾部位解析、蛋白質複合体解析等に有効な精査用高性能質量分析機もセットアップした。以上のことより、試料採取、臨床情報、匿名化、試料・機器管理 (LIMS)、前処理法、分離法、質量分析、大量蛋白同定、創薬ターゲット探索用データ解析までを一括管理できる体制が整ったと考える。今後、病院側より提供される患者組織試料を順次検討しながら解析して行く予定である。

A. 研究目的：

現在、創薬ターゲットの探索には、mRNA 発現(transcription)差解析 (RT-PCR 法による)が重要とされ、主として疾患モデル動物を用いて盛んに行われている。しかし、mRNA 発現差解析は一定の成果を上げているものの、必ずしも充分ではないことが指摘されている。その一つの理由は mRNA 発現と蛋白質発現および機能発現とがあまり一致しないことによる。これは、発現された mRNA は、その後、翻訳(translation)レベルの調節を受け、さらに、de novo の蛋白質はリン酸化・を始めとする種々の翻訳後修飾反応を受けて、初めて活性体に変換するからである。

また、実際の生体内の蛋白質量は生合成系と分解系のバランスにより調節されていることも再認識しなければならない。この点に関しては、寿命の長いヒト（～100歳）では、寿命の短いラット・マウス等の実験動物（～2年）に比べ、大きな意味を持つと考えられる。すなわち、ほんの僅かな分解系の相違が、加齢に伴

い蓄積し、老齢になって顕著になり、発症原因になりえることである。このような疾患の場合、mRNA 発現差解析は殆ど有効ではなく、蛋白質発現差解析が重要になる。この典型的な例は神経変性疾患のアルツハイマー病の原因物質とされるβアミロイドやパーキンソン病のシヌクレインであろう。βアミロイドはアルツハイマー病患者と健常人の脳組織の蛋白質発現差解析から見出されたものである。現在、βアミロイドはアルツハイマー病の本質的治療薬の最も重要なターゲットとして世界中で鋭意研究されている。我々も、加齢に伴い蓄積する神経細胞傷害性ラセミ化βアミロイド断片(D-Ser26β25-40)がアルツハイマー病患者の海馬CA1神経細胞に特異的に蓄積し、発症に深く関与する可能性を報告した(文献1)。

以上、典型例を述べて説明したが、他の疾患に関しても、蛋白質発現差解析が創薬ターゲット探索に極めて重要であることは認識されて然るべきであると考えられる。この場合、疾患モデル実験動物解析よりも、患者試料を用いるヒト疾患関連たんぱく質発現解析が最も重要であることは言うまでもない。特に、現在、有効な治療法が確立していない疾患は、実際の臨床症状とモデル動物症状との乖離が大きい場合が多い。前述のように、ラット・マウスとヒトでは、寿命が異なるだけでなく、サイジング、二足歩行、高度に発達した大脳および進化系統樹も大きく異なる。従って、実際の患者症状を把握している病院側と十分に協議した上で、臨床・病事情報と連結した患者試料を組織的・系統的に解析することが重要である。

そのためには、従来の解析方法の問題点(house keeping gene product の除去、high throughput 性欠如)を克服した上で、多数の患者組織試料から、微量に存在する疾患関連たんぱく質を効果的に抽出し、最新の高性能質量分析機器及びバイオインフォマティクスを用いて同定し、正常組織との発現差解析を行うことが必要である。本年度は、患者組織試料採取、臨床情報、匿名化、試料・機器管理(LIMS)、前処理法、分離法、質量分析、大量蛋白同定、創薬ターゲット探索用データ解析までを一括管理できる体制を構築することを目指した。特に、現段階で蛋白質発現差解析に最も有効と考えられる ICAT 法(同位体標識法(cleavable ICAT))を構築するため、それに適応する組織の前処理方法、微量成分分離技術の確立、新型高性能 MS 機器類の設定および対応する統合型バイオインフォマティクスシステムの確立を主な目的とした。

B. 研究方法：

1) nanoHPLC/ABI4700 および Q-Star-XL による標準蛋白質断片の同定：

BSA トリプシン消化断片を 0.1%ギ酸/アセトニトリル溶媒系(5 - 60% AcCN, 200nl/min)で nanoHPLC(C18 LC Packing, 75um, 150mm, pore 100Å)にて分画し、溶出したピークをプロボットシステムで ABI4700 用金属プレートに分注した。

一方、同様に nanoHPLC より溶出されたピークを直接、ナノスプレイトタイプの Q-STAR XL/MS/MS system で解析した。同定は後述するマスコット検索エンジンを基本とした統合型データ解析ソフトで行った。ともに、10fmole 以下の標準ペプチドの同定が可能であった。

2) 血清前処理法

生体試料（血清）の前処理法は以下の方法で行った。まず、マウス血清を PBS に溶解し、アジレント社のイムノカラム(Mult Aff Rem Column, 4.6 x 50mm)にて分画し、素通り画分を分取後、アセトン処理を行い、蛋白質画分を得た。これにより、主要なアルブミン、イムノグロブリン(IgG, IgA)、トランスフェリン、ハプトグロビン、 α -1-アンチキモトリプシン（合計 5 種）が除かれ、蛋白量はもとの約 1/10 になることを確認した。なお、この画分を血清低濃度蛋白質画分とする。

3) Cleavable ICAT 法

前述の血清低濃度蛋白質画分(final 1mg/ml)を SDS/Urea で可溶化し、TCEP で還元後、1.75mM の Cleavable ICAT 試薬 (ABI 社製、 ^{13}C あるいは ^{12}C 標識) を 37°C、2 時間反応させた。未反応の試薬を 3.5mM の TCEP でクエンチングし、Cleavable ICAT 試薬反応蛋白質を 50mM Tris(pH8), 10 mM CaCl_2 , 1%OG に溶解し、トリプシン(TPCK 処理)で 37°C、16 時間消化した。得られた消化物を陰イオン交換カラム(Poly LC Sulfoethyl A, 10mM KH_2PO_4 , pH3, 25%AcCN, 0 – 500mM KCl)で 15 画分に分画した。各画分をアビジンカラムにかけ、素通り部分を洗浄後、吸着した ICAT 試薬反応ペプチドを 30% AcCN/0.4% TFA で溶出した(Vision Workstation System)。溶出画分を乾燥後、100%TFA で 37°C、2 時間反応させ、ビオチン部分を切断させた ICAT 試薬反応ペプチドを得た。本ペプチドを上述の nanoHPLC/ABI4700MALDI/TOF/TOF system で解析した。同定は前述の統合型データ解析ソフトで行った。

4) 統合型 IT システムの機能・使用法

(1) 匿名化・臨床情報収集システム

本システムでは、プロテオームファクトリー(PF)においてヒト検体を受け入れる際、個人識別情報、検体情報、臨床情報等を取り込み、再度匿名化を行って個人情報への識別を不可能とした上で、解析に必要な情報を解析部門に提供する。

以下、具体的な使用法の一例について述べる。

- ・ 検体提供機関において、検体に匿名化検体番号ラベルを貼った後 PF に送付する。
- ・ PF 個人情報管理室において、検体を再度匿名化し、検体のラベルを貼り替える。検体は保管場所へ移動する。

- ・ 検体提供機関において、当該検体に対応する臨床情報を Text または Excel ファイルで出力し、PF に送付する。
- ・ PF 個人情報管理室において、臨床情報を臨床情報収集システムで収集・匿名化し、匿名化済み臨床情報としてデータベース化する。

(2) 試料管理・機器管理システム(LIMS)

本システムは、各試料に対して、いつ、誰が、どのような作業を行ったかを管理する他、機器についての情報、使用状況、機器のメンテナンスといった運用を支援する。本システムを用いて、試料や機器についての具体的な管理項目を以下列挙する。

- ・ 試料や試薬の保管場所等の物理位置管理
- ・ 試料や試薬に関する付帯情報の管理（処理時期、実験条件等）
- ・ 試料や試薬の状態管理（残量等）
- ・ 試料や試薬の変更履歴管理
- ・ 実験機器管理（状況把握等）
- ・ 実験出力データ（LC、MS 等）管理

(3) データマイニングシステム

本システムでは、HIT 製の PC クラスタ（50 ノード）をプラットフォームとして、膨大な質量スペクトルデータの収集からタンパク質同定結果のデータベース化に至る以下の自動解析機能を実装している。

- ① 自動データ収集機能：データベース構築用の質量分析計：ABI4700 及び Q-STAR について、その測定終了後自動的に測定データをデータベースシステムに格納。
- ② 自動 1 次データ格納機能：格納された測定生データを呼び出し、タンパク質同定エンジン（Mascot）へ投入するための 1 次データ（ピークリストファイル）を自動生成。また、ICAT サンプルに由来するデータの場合は、MS ピークリストより親イオンのクラスタ面積（ピーク強度）情報及びラベル情報（Light、Heavy）を自動収集。
- ③ 自動タンパク質同定機能：生成・格納されたピークリストファイルを自動的に Mascot システムへ送り、タンパク質同定処理を自動実行して結果を保存。
- ④ 自動タンパク質同定結果格納機能：Mascot 処理結果を統合型データベースへ自動アップロードし、同定結果やタンパク質変動結果を閲覧。

なお、タンパク質同定には Matrix Science 社製の Mascot を主要同定エンジンとして利用するが、同定できなかったイオンピークや、同定スコアが低いイオンピークについては、補助同定システムとして、PST 法を用いた de novo シークエンシング機能を実装する。

(4) データベースシステム

データベースシステムは、システム全体の監視、管理、制御、データ保全等に関する一切の機能を担う。プラットフォームとして、Solaris 9 を搭載したサン・マイクロシステムズ社製の Sun Fire 6800 を設置する。また、本システムのリレーショナルデータベースは Oracle 9i で構築する。データベースには、以下の項目が自動的にあるいはユーザにより格納される。

- ① LIMS 関連情報（サンプル情報、臨床情報、機器情報、測定データ等）
- ② 同定システム投入前の初期データ
- ③ タンパク質同定結果、発現変動結果
- ④ タンパク質同定最終結果
- ⑤ アノテーション情報（ターゲットマイニング情報、公共 DB 情報等）
- ⑥ 計算ジョブ管理、ユーザ管理、機器クオリティ管理

(5) バックアップシステム

本システムは、バックアップ対象のサーバ（LIMS サーバ、ファイルサーバ、データマイニング用アプリケーションサーバ、データマイニングシステムの一部のノード）上のファイルやデータベースの領域を、指定された設定情報に従い自動的にバックアップする機能を有する。また、機器制御用パソコン等の指定された領域についても、LIMS サーバを介した自動バックアップを実行する。なお、匿名化・臨床情報サーバについては、オフラインでの運用を行うため、バックアップは DVD-RAM 等のメディアを用いて行うことにする。

(6) 高速ネットワークシステム

統合型 IT システムを構成する各サーバ間の高速ネットワーク接続を実現するための高速スイッチを設置している。これにより、主要なサーバ間は 1Gbps の速度で接続されている。

C. 研究結果

1) 解析ワークフロー（全体像）の設定：

創薬ターゲットの探索を目的として、疾患関連蛋白質の患者と健常人との優位な差を見出すためには、臨床情報と連結可能な多数の検体を、一括管理し、共通のプロトコールで集中的に解析することが重要である。そこで、疾患毎に、100 名以上の健常人・患者検体（組織＋体液）を解析可能にする解析ワークフロー（図 1）を設定した。基本的には、手術時に得られた組織は、同位体標識（ICAT）法を用いてターゲット探索用に（nanoHPLC、ABI-4700 および Q-STAR-XL で解析）、手術前後で採取された体液（血清、尿等）は SELDI-TOF 法を用いてマーカー探索用

に使用する (図 2)。なお、この場合、必要に応じて、アジレントイムノカラム処理などの適切な前処理を行う。2DPAGE 法(Ettan DIGE system)は、主として予試験用あるいは確認用に用いる。また、mRNA 発現解析では解析不可能な翻訳後修飾部位解析、蛋白質複合体解析等の精査解析には、専用の高性能質量分析機を用意した。さらに、試料採取、臨床情報、匿名化、試料・機器管理 (LIMS)、前処理法、分離法、質量分析、大量蛋白同定、創薬ターゲット探索用データ解析までを連結可能にする統合型バイオインフォマティクス系も構築した (図 3)。

2) Cleavable ICAT 法の確立:

組織に多量に存在する house keeping gene protein を除き、疾患に関連がある low abundant protein を効果的に解析するため、¹³C, ¹²Cleavable ICAT 試薬(ビオチンタグがあり Cystein 残基に反応)で正常・患者組織を分別標識し、その後、トリプシンで消化し、得られた断片を自動的に陰イオン交換カラムおよびアビジンカラムで ICAT 試薬反応ペプチドがアフィニティ精製可能な前処理システム (Vision system (3 式)) を構築した。Vision system で精製した画分を逆相 C18 nanoHPLC(LC Packing)でさらに精製し、溶出される各ピークを、直接 Q-TOF タイプの高性能質量分析器 (ABI QSTAR-XL, ESI/4 重極/TOF)) でペプチドの同定、配列決定及び発現差解析を行うことができる Q-STAR-LC/MS/MS system (合計 9 台) を構築した。一方、同様に逆相 C18 nanoHPLC(LC Packing)で溶出される各ピークを Probot 分注器 (8 式) を用いて自動的に MALDI 用金属プレートに分注し、高性能 MALDI/TOF/TOF で同定および発現差解析を可能にする ABI4700-MALDI/TOF/TOF system(5 式)を構築した。Q-STAR system と ABI4700-MALDI system を同一検体に使用するので同定効率が向上するものと思われる。標準ペプチド(BSA trypsin fragments, 10fmol)を用いて、いずれの機器の性能を確認した。また、実際に、マウス血清を用いてアジレントイムノカラムで前処理し、アルブミンなどの主要な 5 種タンパク質を除いた血清低濃度蛋白質画分を上述の Cleavable ICAT 試薬(¹³C, ¹²C 標識)に反応させ、トリプシン処理、陰イオン交換カラム処理、アビジンカラム処理(Vision Workstation System), TFA 処理して得られた ICAT 試薬反応ペプチドを上述の nanoHPLC/ABI4700MALDI/TOF/TOF system で解析した結果、¹³C, ¹²C 標識された各ペプチドが 1 対 1 の割合で検出されることを確認した。検出感度、同定率は 2DPAGE 法よりはるかに優れていた。

今後、ヒト患者組織試料に本 ICAT 法を導入し、さらに後述する最新のバイオインフォマティクス技術の駆使により、一日に約 1 - 3 万のたんぱく質の同定と発現差解析が可能にしたい。

3) Ettan DIGE system の構築 :

従来の二次元電気泳動(2DPAGE)法を改良し、定量性、迅速性を高めた Amsham 社製の Ettan DIGE system を構築した。正常・患者組織を異なる蛍光色素で分別標識後、二次元電気泳動を行い、得られたゲルを画像解析装置(Typhoon 9400 Image analyzer)で発現差解析を行い、ロボット(Ettan Handling Worksttion)を用いて必要なスポットを自動的に切り出し、トリプシン消化を行い、ABI-4700 および Ultraflux 用の MALDI 型プレートに分注するように設定した。

4) SELDI/TOF system の構築 :

患者の体液(主として血清)中の疾患関連バイオマーカーの探索のために、SELDI/TOF system (PBS-II, サイファージェン社製)を構築した。本システムは各種チップ(ケミカルチップ、バイオチップ、抗体チップ等)をコーティングした金属プレート(SELDI-plate)に体液を反応させた後に洗浄し、特異的に吸着したバイオマーカー(たんぱく質)を MALDI-TOF タイプの MS(SELDI/TOF)で解析するものである。バイオマーカーの各種チップへの反応性は Biomex 2000(分注・洗浄ロボット)を用いて迅速に調べることが可能である。また、バイオマーカーの同定のために、SELDI-plate が対応可能な ABI 社製精査用 QSTAR-XL(MALDI 型)を連結した。なお、複数のバイオマーカー探索を有効にするため、多変量解析ソフトも導入した。

5) 精査・研究探索用 MS system の構築 :

上述の大規模・迅速解析システムで得られた結果をさらに詳細に検討するために、精査および研究探索用の MS system を構築した。蛋白質複合体解析、翻訳後修飾解析、蛋白質相互作用解析等に利用する。

- (1) MALDI-Ion Trap-TOF (AXIMA-QIT)(2 式): 島津製作所製 2DLC も利用して、糖鎖解析を行う。納入された直後であるので未だ性能チェックは完了していない。
- (2) ESI-IonTrap-Q (LCQDeca XP)(3 式): 2DLC(microHPLC)に対応する。操作性に優れ、研究用にマニュアルで使用する。標準ペプチド(BSA trypsin fragments)を Magic C18 カラム(5 μ , 200 Å, 02 x 50mm, 0.1% ギ酸 / 0.005% HFBA, AcCN, 5-80%, 1 μ /min)で分画し、各ペプチドを LCQDeca XP で解析した。100fmol のペプチドが同定可であることを確認した。
- (3) ABI-4700 (1 式)。
- (4) Ultraflex (1 式): Bruker 社製。MALDI-TOF-TOF。
- (5) ABI-QSTAR-XL (1 式)

6) プロテオームファクトリー統合型情報系(IT)システムの構築：

本プロテオームファクトリーに必要な以下の6情報系(IT)システムの稼動・運用に必要なハードウェアおよびソフトウェアの納入を完了した(図3)。

- (1) 匿名化・臨床情報収集システム
- (2) 試料管理・機器管理システム(LIMS)
- (3) データマイニングシステム
- (4) データベースシステム
- (5) バックアップシステム
- (6) 高速ネットワークシステム

以下、具体的なサブシステム稼動状況について説明する。

- ・ 匿名化・臨床情報収集システムのセットアップは完了し、PFへのヒト検体及び臨床情報の登録を可能にした。
- ・ LIMSの基本セットアップは完了し、実際のサンプル処理や測定の流れに柔軟に対応した実験情報の登録を可能にした。
- ・ データマイニングシステム・データベースシステムの基本セットアップは完了。各種質量分析計(4700、QSTAR等)の測定生データ収集から、タンパク質同定結果・発現変動結果のデータベース登録に至るデータ解析の全自動処理を可能にした。今後、実際に上記質量分析計によるMS及びMS/MS測定を実施して、システムの動作確認を行う予定である。また、NCBI等の外部公共データベースへのリンクも可能である。
- ・ バックアップシステムの設定は完了し、PFにて生成される全てのデータ・情報の安全なバックアップ機能を整備した。
- ・ 高速ネットワークシステムのセットアップは完了し、各サブシステム間の連携が可能になった。今後、具体的な機器やPC・サーバとの接続を実施する予定。

D. 考察

一部を除いて、ほぼ、計画通り、患者組織試料の受け入れ、保管から、管理、粗分画、蛋白質抽出、各種MSによる解析システムおよびデータベース構築用インフォマティクスまでの一連のシステムに必要な機器類・ソフトの納入・設定ができた。また、標準サンプルを用いて高性能MS機器の性能チェックも完了した。さらに、前処理法、ICAT法も一部であるが検討した。平成16年4月1日より、実際にプロテオームファクトリーが開所し、実験者が入所するので、今後は、実際の生体試料を用いて各システムを稼動させる予定である。当面は、倫理委員会の審査が必要ない市販ヒ

ト組織（血清等）、ヒト細胞株、動物組織を使用し、前処理方法の改良など技術的な問題点をさらに克服するつもりである。また、プロテオームファクトリーの倫理委員会が設立次第、病院からの患者組織試料も受け入れたい。疾患としては、臨床とモデル動物との乖離が大きく、現在、有効な治療法がない疾患を優先したい。現在、試料提供先の病院と具体的な疾患およびそれに伴うプロトコルを協議中である。

E. 結論

創薬ターゲット探索用データベース構築のために、疾患毎に、100名以上の健常人・患者検体（組織+体液）の蛋白質発現差解析を可能にする前処理法、機器類・バイオインフォマティクス（解析ワークフロー（図1））を構築した。今後は、具体的な疾患を試料提供先の病院側と協議し、実際の患者試料の解析を行う予定である。

F. 健康危険情報：

特になし。プロテオームファクトリーでは万全なバイオハザード対策設備を施工している。

G. 研究発表

1. 論文発表：

1) J. Neuro pathology and Experimental Neurology. β -Amyloid racemized at the Ser²⁶ residue in the brains of patients with Alzheimer Disease: Implications in the pathogenesis of Alzheimer Disease. 2003, 62, 248-259, T. Kubo, Y. Kumagae, C. A. Miller and I. Kaneko.

2. 学会発表：

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：

なし。

2. 実用新案登録：

なし。

3. その他

Fig. 1

解析ワークフロー：全体像

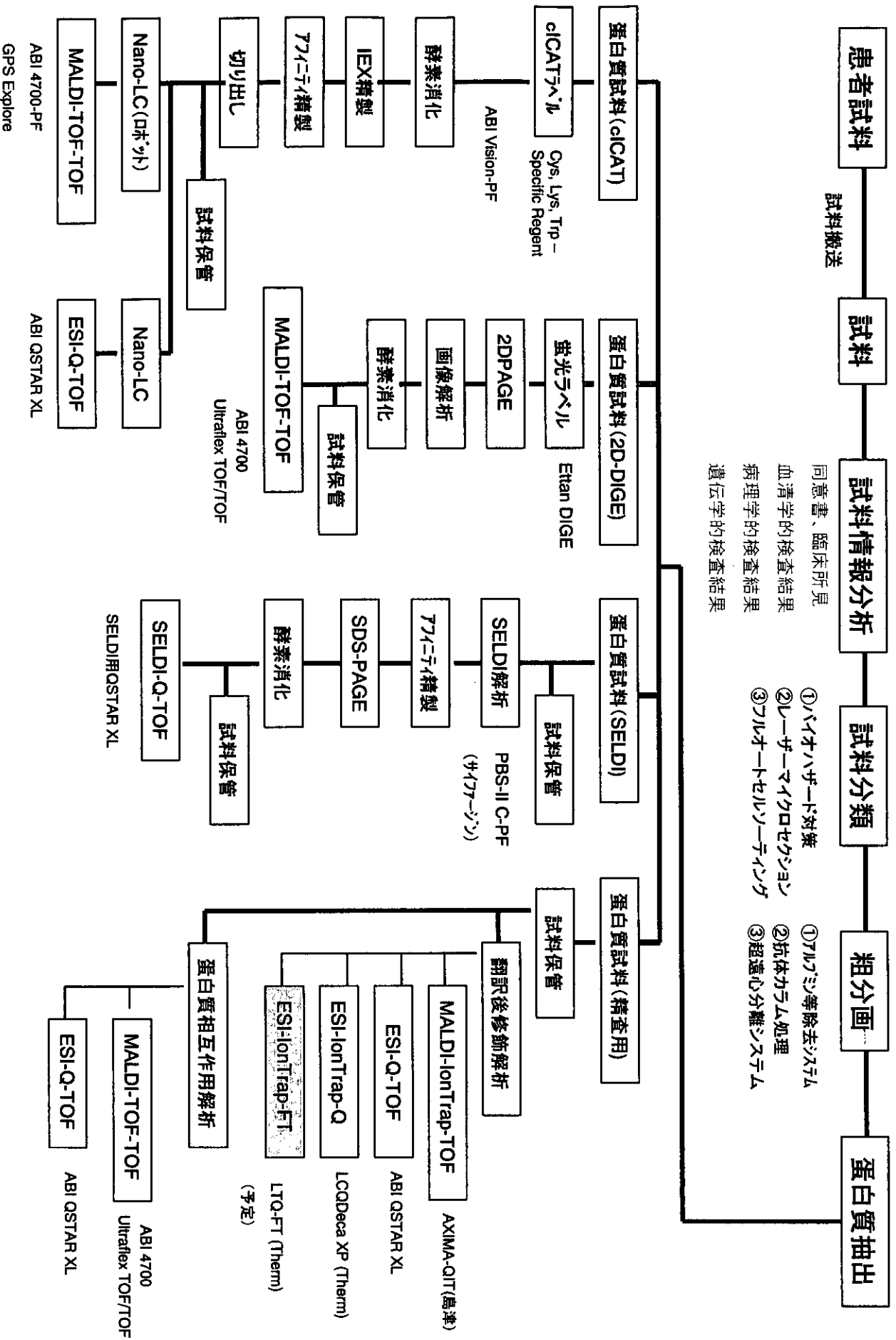
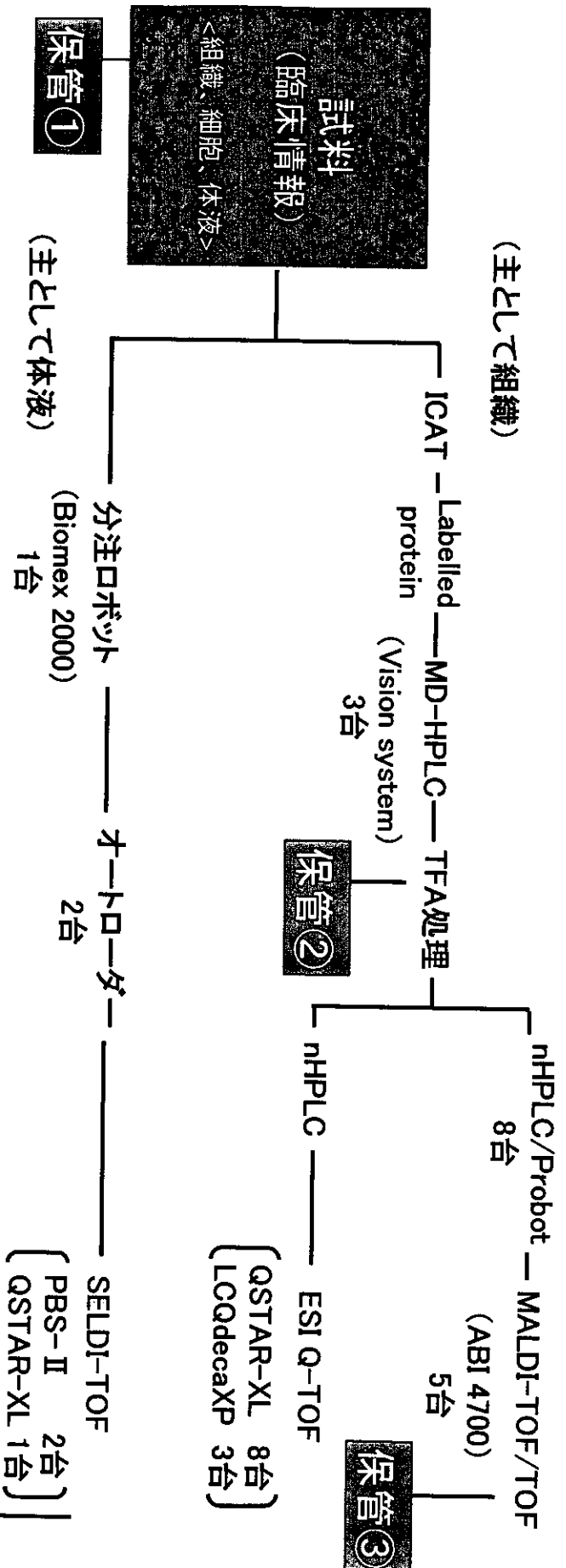


Fig. 2

創薬プロテオームファクトリー クロマトグラフィー

I. データベース構築

(主として組織)

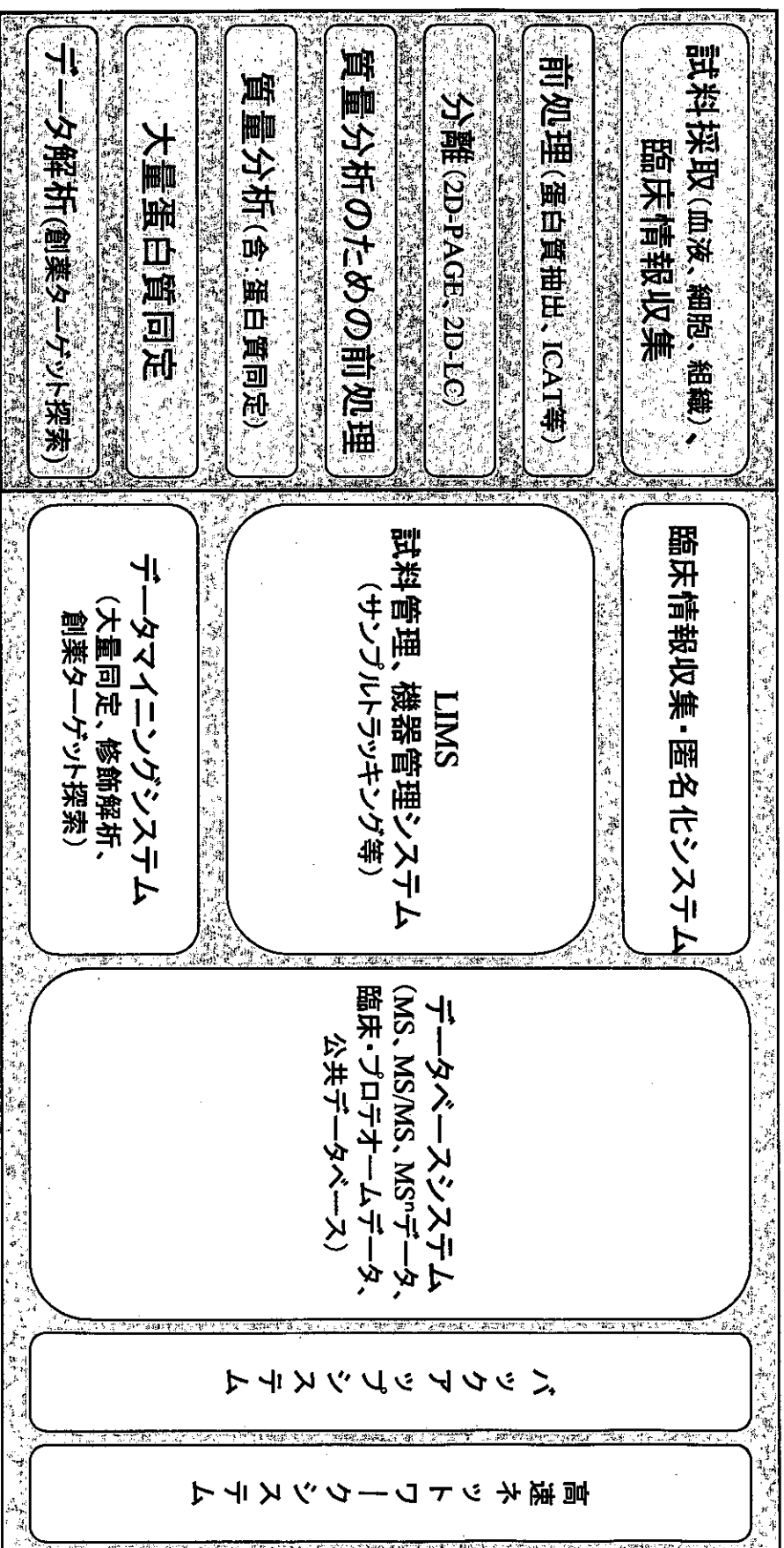


II. 精査用、複合体解析、翻訳後修飾部位解析



Fig. 3 プロテオームファクトリーにおける
 バイオインフォマティクス構成図

計測系 バイオインフォマティクス系



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
早川堯夫、 永田龍二	バイオロジクスの品質と 安全性評価、薬の安全性	長尾 拓		南山堂	東京		印刷中
早川堯夫	バイオテクノロジー応用 医薬品	内藤周幸	臨床試験 2003	薬事日報社	東京	2003	155-179
早川堯夫	品質 (Quality) 分野[バイオ]		ICH 6 最前線 -国際調和の 新潮流-日刊 薬業別冊、特 別企画	じほう	東京	2003	137-144
Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, <u>Takao</u> <u>HAYAKAWA</u>	Analyses of glycoproteins and glycopeptides by liquid chromatography/mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry.	M. I. Aguilar	HPLC of Peptides and Proteins	The humana press inc	Totowa	2003	263-274
H. Kuwahara, J. Tanaka- Isoyama T. Kihara, M. Matsubae, Y. Matsui T. Takao, M. Isoyama, <u>N. Minamino</u>	Efficient data Acquisition System for Peptidome Database.	Ueki M.	Peptide Science 2003	The Japan Peptide Society	Japan	2004	465-466

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Miyako OHTA, <u>Takao HAYAKAWA</u>	Microanalysis of N-linked Oligosaccharides in a Glycoprotein by Capillary Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry.	Anal. Biochem.	316	15-22	2003
Shingo NIIMI, Tadashi OSHIZAWA, Teruhide YAMAGUCHI, Mizuho HARASHIMA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI, <u>Takao HAYAKAWA</u>	Specific Expression Of Annexin III In Rat Small Hepatocytes.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	300	770-774	2003
Toshie KANEYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA, <u>Takao HAYAKAWA</u>	CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peropheral blood as ehdothelial-precursor cells.	J. Cell Physiol.	195	119-129	2003
Y. Gotou, Shingo NIIMI, <u>Takao HAYAKAWA</u> , T. MIYASHITA	Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment.	Biomaterials	25	1131-1140	2003
Tadashi OSHIZAWA, Teruhide YAMAGUCHI, K., Suzuki, Y., Yamamoto, <u>Takao HAYAKAWA</u>	Possible Involvement of Optimally Phosphorylated L-plastin in Activation of Superoxide Generating NADPH Oxidase.	J. Biochem.	134	827-834	2003
Toshie KANAYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI , Tadashi OSHIZAWA, Eriko	The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells.	Biochem. Pharmacol.	66	133-140	2003