

効や副作用評価など、基礎から臨床まで幅広い適応範囲を有する。多くの薬物の直接的な標的となるたんぱく質を解析の対象とするプロテオミックスは、先駆医療とりわけ「メカニズムに基づく合理的な創薬」を加速するテクノロジーとして期待される。現在知られているヒトの一生で疾患の原因となる遺伝子の第一位はほとんどが酵素遺伝子であるが、現在用いられている薬物の標的は受容体が約半数を占めている。このことは、酵素が代謝の恒常性維持に重要であるという事実とともに解析可能な疾患や開発可能な医薬品の種類や増加が医薬品の標的となる分子の探索や評価のためのテクノロジーの発展に依存していることを示しているものと考えられる。従って疾患の原因を調査し、薬物をスクリーニングするための新しいテクノロジーが開発されれば、従来とは異なる遺伝子やたんぱく質を標的とする新しい医薬品が生み出される可能性がある。複数の遺伝的因子と環境因子の複雑な相互作用によって生じる生活習慣病などの疾患原因の解明にはゲノミックスからの情報とともに病理組織などでの現場検証、すなわちプロテオミックスからの情報が必要不可欠である。プロテオミックスは癌をはじめとする様々な疾患のマーカーの探索や病院の解明、創薬に向けた研究に応用されているが、本研究課題では、小児の免疫アレルギー疾患の解明に、患者由来の組織・血清・尿を用いて発現プロテオミックスの研究に取り組む。本年度は、小児腎疾患の代表例である糸球体腎炎・ネフローゼ症候群の患者より血清を採取し血清中のプロテオーム解析を行った。平成16

年度成育医療センターにて採取した検体の内訳は以下の通りである。

採取検体（血清）総数：31検体

疾患内訳：ネフローゼ症候群21例（このうち3例はステロイド抵抗性）、IgA腎症2例、巣状硬化症7例（このうち6例は腎移植後の症例）、膜性増殖性糸球体腎炎1例であった。

血清中のプロテオームについては、現在解析中である。

D. 考察

免疫アレルギー疾患に関する研究のみならず、様々な疾患・生体システムにおける遺伝子発現や形態変化から生物機能を解明しようとする研究には、プロテオーム解析の技術はcDNAマイクロアレイなどのトランスクリプトーム解析の技術とともに非常に有効となる。しかしながら、たんぱく質の解析には当然ながらDNAに対するPCRのような増幅手段は使えず、さらに、疾患関連分子は、一般に細胞内発現が少なく修飾や変動が激しいものが多い。従って、現状においても病態に関連する非常に微量なたんぱく質の検出や同定などに関しては技術的に諦めざるおえない場面にしばしば遭遇する。しかし、質量分析機器(MALDI-TOF MS, LC-ESI MS/MS)とその周辺機器(蛋白分離・検出・抽出処理装置やHPLCやデータ解析ソフトなど)を中心にたんぱく質の分析感度・分離能は格段に進歩し、さらにより高い感度と分離能と解析速度をもつたんぱく質構造解析技術開発も世界中で盛んに行われている。また、これらの解析結果をもとに、出来るだけ多くのその分子に関連する情報が短時間

で得られるようなバイオインフォマティクスも世界中で開発されてきている。このことは、プロテオミクス解析の将来的な可能性に対する世界中の研究者の期待の現れであると考えられる。ゲノム解析におけるPCRやcDNAマイクロアレイなどに匹敵するような生体蛋白質の翻訳後修飾を含むたんぱく質構造と機能の解析システムが今後どこまで高度に構築できるか更にはゲノム科学・たんぱく質科学・医学・情報科学・細胞生物学・医薬化学等の相互作用による効果的な共同体が如何に形成されるかが今後の治療と予防を目指した疾患研究におけるプロテオーム解析の課題となると考えられる。

特に、小児免疫アレルギー疾患の中でもネフローゼ症候群や糸球体腎炎はその原因ならびに根治療法が確立していない疾患である。このような疾患において、遺伝子レベル、たんぱく質レベルで疾患関連因子の網羅的検索は疾患の原因究明とともに診断の指標・治療の標的として今後有用になるものと期待されさらに解析の検体を増やすことにより、関連因子の同定が可能になる物と考えられる。

E. 結論

小児の腎疾患の病態解明・薬物標的因子の探索において患者由来の血清のプロテオーム解析は非常に有望と考えられる。しかしながら、解析結果のデータベースを作製し、疾患関連因子の探索を行うには、それぞれの症例において少なくとも10例の解析を必要とする。現在、ネフローゼ症候群においては、データベース作製・関連因子の探索が可能となる症例数が集まってきているが、今後他の疾患についても症例

数を増やす必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得 なし

2) 実用新案登録 なし

3) その他 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

加齢関連疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

分担研究者 太田壽城 国立長寿医療センター 病院長
田平 武 国立長寿医療センター 研究所長
研究協力者 徳田治彦 国立長寿医療センター 臨床検査部長

研究要旨

本年度は加齢関連疾患（痴呆・骨粗鬆症・褥創）の臨床検体のプロテオームファクトリーへの提供体制を整備した。また、疾患関連たんぱく質の網羅的解析に使用する各種分析装置の設置・調整を行い、アルツハイマー病(AD)に関連する尿中たんぱく質・ペプチドの解析条件を検討した。さらに、続発性骨粗鬆症の疾患モデルとして甲状腺機能亢進状態に着目し、細胞レベルでの機能たんぱく質について検討した。骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、トリヨードサイロニン (T3) は p38 MAP kinase の活性化を介してオステオカルシン産生を促進することが明らかとなった。一方、ジブチル cAMP (DBcAMP)、フォルスコリンおよびコレラ毒素は T3 によるオステオカルシン産生を抑制した。cAMP 依存性キナーゼ(PKA)の選択的阻害剤である KT5720 は、T3 によるオステオカルシン産生に対するフォルスコリンあるいは DBcAMP の抑制作用を減弱した。フォルスコリンおよび DBcAMP は T3 により惹起される p38 MAP キナーゼのリン酸化を抑制した。さらに pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)は T3 によるオステオカルシン産生促進作用を減弱した。以上より、骨芽細胞において、アデニル酸シクラーゼ・cAMP 経路は p38 MAP キナーゼ活性化の抑制を介して、T3 によるオステオカルシン産生促進作用を制御している可能性が強く示唆された。臨床検体の解析を効率的に進める上で、疾患モデルにおける細胞レベルでの機能たんぱく質の動態を明らかとすることは、非常に有用であると考えられる。

A.研究目的

高齢化社会の進行に伴い、加齢関連疾患の急増が知られている。昨年度の本研究において、痴呆および骨粗鬆症患者の臨床検体について、病院から研究所へのサンプル提供体制を確立した。

本年度は、痴呆・骨粗鬆症・褥創の3疾

患について、病院から創薬プロテオームファクトリー (PF) へのサンプル提供体制を整備・確立することを目的とした。また、研究所における疾患関連たんぱく質およびペプチドの分析態勢を整備し、AD に関連するたんぱく質・ペプチドの網羅的解析技術の確立に資することとした。さらに、続

発性骨粗鬆症の疾患モデルとして甲状腺機能亢進状態に着目し、機能たんぱく質について細胞レベルで解析し、臨床検体での微量蛋白質解析の一助とすることとした。

B.研究方法

PF から示された検体搬送手順を、当院臨床検査部の現状を踏まえて調整し、患者選択、同意の確認、患者情報のワークシートへの入力、検体採取、匿名化、検体の一時保存および搬送の各段階について整備した。ワークシートは、痴呆・骨粗鬆症・褥創の各疾患について、患者選択を行う当院研究者の意向を入れて PF において作成されたものを使用することとした。

研究所において、二次元電気泳動装置、高速クロマトグラフィー装置、MALDI-TOF-MS、アミノ酸配列分析装置、および NanoLC-MC/MS システムの設置・調整を行い、尿中たんぱく質の解析条件を検討した。ヒト尿を採取後直ちに氷冷し、プロテアーゼインヒビター添加後、遠心分離上清を回収、0.45 μm のフィルター処理を行い、解析試料とした。試料の脱塩・濃縮には ZipTip を用いた。また、低分子ペプチド画分の分離およびたんぱく質画分の濃縮には、硫安沈殿法を行った。これらの処理済試料を SDS-PAGE、MALDI-TOF-MS あるいは二次元電気泳動法にて解析した。

さらに、新生仔マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を 10%FCS を含む α -MEM 培地にて培養し、5 日後培地を 0.3%FCS を含む α -MEM として 48 時間後実験に供した。細胞に T3 を作用させ、骨芽細胞の分化の指標であるオステオカルシンの産生を ELISA 法にて、

p44/p42 MAP kinase あるいは p38 MAP kinase のリン酸化を Western blot 法にて解析した。オステオカルシン mRNA の発現については Northern blot 法にて解析した。
(倫理面への配慮)

PF への臨床試料提供については、当院倫理委員会および PF 倫理委員会の承認を得た上で、搬送を開始することとした。

C.研究結果

PF との協議により、当初対象疾患の典型例について、血清サンプルの提供を行うこととなった。ワークシートへの入力、匿名化・保存および搬送については、専任のリサーチレジデントの業務とし、検体採取・保存を開始した。

SDS-PAGE あるいは MALDI-TOF-MS による解析では、ヒト尿には、分子量 1 万以上のシグナルは得られなかった。硫安沈殿法で得られた沈殿は 6 M 尿素にて溶解し、二次元電気泳動法による解析を試みた。これは健常者由来の尿たんぱく質マップ作成に供することとした。上清は凍結保存し、疎水性クロマトグラフィーあるいは逆相クロマトグラフィーによる解析を予定した。

MC3T3-E1 細胞において、T3 は p38 MAP kinase のリン酸化を促進した。p38 MAP kinase の阻害剤である SB203580 および PD169316 は T3 により惹起されるオステオカルシンの産生を抑制した。それに対して、p44/p42 MAP kinase の上流の kinase である MEK の阻害剤、PD98059 および U0126 は T3 により惹起されるオステオカルシンの産生に何ら影響しなかった。DBcAMP は、T3 により惹起されるオステオカルシン産生および mRNA の発現を減

弱した。Gsの活性化物質であるコレラトキシンはT3によるオステオカルシン産生を減弱した。アデニル酸シクラーゼの活性化物質であるフォルスコリンはT3により惹起されるオステオカルシン産生およびmRNAの発現を減弱した。PKAの阻害剤であるKT5720はフォルスコリンのT3によるオステオカルシン産生抑制作用を部分的に解除した。DBcAMPおよびフォルスコリンはT3によるp38 MAP kinaseのリン酸化を減弱した。さらにPACAPはT3により惹起されるオステオカルシン産生を抑制した。

D. 考察

痴呆、骨粗鬆症および褥創の三疾患について、PFへの臨床試料提供が可能となった。これらの疾患はいずれも高齢者医療においてその対策が急務となっているものであり、疾患関連たんぱく質の解析が待たれる。

ADの治療には疾患の早期発見が極めて重要であり、血清あるいは尿など採取の容易な試料での疾患関連たんぱく質が見出されれば、臨床への貢献は大きい。尿中たんぱく質の分析から、健常者の尿たんぱく質マップ作成についてはAD疾患関連たんぱく質の探索に有力な情報が得られることが期待される。

一方、本年度は続発性骨粗鬆症の疾患モデルとして甲状腺機能亢進状態に着目し、培養骨芽細胞を用いて細胞レベルでの機能たんぱく質の解析を行った。甲状腺機能亢進状態において、オステオカルシンの血中レベルが高値となることが良く知られている。一方でMAP kinase スーパーファミリーは種々の細胞において、細胞機能の制御

に関与することが知られている。既に私も骨芽細胞様MC3T3-E1細胞においてT3によって活性化されるp44/p42 MAP kinaseが、アルカリホスファターゼ活性を抑制的に制御することを報告している。このたび本細胞においてT3によりp38 MAP kinaseのリン酸化が促進されたことから、p38 MAP kinaseを活性化することが明らかとなった。さらにT3によるオステオカルシン産生の促進作用はp38 MAP kinaseの阻害剤で抑制されたが、MEKの阻害剤は何ら影響しなかったことから、p44/p42 MAP kinaseではなくp38 MAP kinaseを介することが強く示唆された。

アデニル酸シクラーゼ-cAMP経路は、骨芽細胞において様々な刺激のメディエーターとして重要である。今回、本経路の活性化がT3によるオステオカルシン産生促進およびp38 MAP kinaseのリン酸化促進に抑制的に作用することが明らかとなった。オステオカルシンは成熟骨芽細胞により産生・分泌される γ -カルボキシル化されたカルシウム結合蛋白質で、骨のリモデリングにおいて重要な役割を果たしていると考えられている。骨芽細胞におけるアデニル酸シクラーゼ-cAMP経路の活性化が、甲状腺機能亢進状態における骨リモデリングの亢進に対し、p38 MAP kinase活性化の減弱を介して抑制的に作用する可能性が強く示唆された。これら細胞レベルでの機能たんぱく質の解析結果は、疾患関連たんぱく質の動態を詳細に解析する際、極めて重要な示唆を与えるものと考えられる。

E. 結論

加齢関連疾患（痴呆・骨粗鬆症・褥創）

の臨床検体のプロテオームファクトリーへの提供体制の整備を完了した。研究所におけるたんぱく質・ペプチド分析態勢を整備し、尿中たんぱく質の分析を試みた。続発性骨粗鬆症の主因の一つである甲状腺機能亢進状態に着目して行った基礎的検討では、骨芽細胞におけるアデニル酸シクラーゼ-cAMP経路の活性化がp38 MAPキナーゼ活性化の抑制を介して、T3によるオステオカルシン産生促進を抑制的に制御している可能性が強く示唆された。

F.健康危機情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1: Yasuda E, Tokuda H, Ishisaki A, Hirade K, Kanno Y, Hanai Y, Nakamura N, Noda T, Katagiri Y, Kozawa O.
PPAR- γ ligands up-regulate basic fibroblast growth factor-induced VEGF release through amplifying SAPK/JNK activation in osteoblasts.
Biochem Biophys Res Commun. 2005, 328:137-143.
- 2: Kanno Y, Ishisaki A, Yoshida M, Nakajima K, Tokuda H, Numata O, Kozawa O.
Adenylyl cyclase-cAMP system inhibits thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts.
Mol Cell Endocrinol. 2005, 229:75-82.
- 3: Kanno Y, Tokuda H, Nakajima K, Ishisaki A, Shibata T, Numata O, Kozawa O.
Involvement of SAPK/JNK in prostaglandin

E₁-induced VEGF synthesis in osteoblast-like cells.

Mol Cell Endocrinol. 2004, 220:89-95.

- 4: Tokuda H, Niwa M, Ishisaki A, Nakajima K, Ito H, Kato K, Kozawa O.
Involvement of stress-activated protein kinase (SAPK)/c-Jun N-terminal kinase (JNK) in prostaglandin F_{2 α} -induced heat shock protein 27 in osteoblasts.
Prost Leukot Essent Fatty Acids. 2004, 70:441-7.
- 5: Ishisaki A, Tokuda H, Yoshida M, Hirade K, Kunieda K, Hatakeyama D, Shibata T, Kozawa O.
Activation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts.
Mol Cell Endocrinol. 2004, 214:189-95.
- 6: Tokuda H, Kanno Y, Ishisaki A, Takenaka M, Harada A, Kozawa O.
Interleukin (IL)-17 enhances tumor necrosis factor- α -stimulated IL-6 synthesis via p38 mitogen-activated protein kinase in osteoblasts.
J Cell Biochem. 2004, 91:1053-61.

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

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

疾患関連たんぱく質解析に関する研究

分担研究者 佐古田 三郎 大阪大学大学院 医学系研究科 教授

研究要旨 倫理的問題も解決され、乳癌、消化器癌の残余組織をプロテオーム解析する準備が整った。リンパ腫の生検組織と閉塞性肺疾患や運動ニューロン病の血清をプロテオーム解析する倫理的問題につき検討中である。

A. 研究目的

腫瘍性疾患、肺疾患、運動ニューロン疾患の組織や血清の蛋白を網羅的に解析し、治療方法の開発、診断マーカー、治療評価マーカーなどを見出し、これら難治性疾患の新たな展開を行う。今後は、蛋白解析の疾患を広げていく。

B. 研究方法

腫瘍性疾患、閉塞性肺疾患、運動ニューロン病の組織や血清に見出される蛋白を網羅的に解析し、正常者と比較し、増加しているあるいは減少している蛋白を見出す。見出された蛋白について、どのような意義があるか臨床データと併せて検討する。微量の生検材料については、網羅的蛋白解析技術について検討する。組織の保存方法、正常組織と癌組織の切り出し方法などについても検討する。

(倫理面について)

患者さんの組織や血清は大阪大学医学倫理委員会で研究として許可申請をし、同意が得られた検体についてのみまず保存する。臨床データについては匿名化して、個人情報省いた形で検体とペアーで保存する。

C. 研究結果

乳癌、消化器癌の臨床データと残余組織の保存については倫理的問題が解決され、保存の準備が整った。リンパ腫の生検組織と閉塞性肺疾患の血清については現在倫理的問題について検討中である。リンパ腫については、すでに臨床データと生検

組織の準備は整っている。運動ニューロン病の血清については現在倫理的問題について検討を開始した。

D. 考察

検体保存については、検体採取から保存場所までの時間を如何に短縮でき、蛋白解析が均一なサンプルで行えるかなどの問題がある。また、生検材料の場合は、採取して保存までの時間に問題はないが、得られる残余検体量が少なく、現在の手法での解析が可能かどうか問題が残る。また、臨床データをどこまで記載するか、また臨床の様々なパラメーターと組織の蛋白解析で得られた疾患特異的蛋白の統計学的解析方法をどうするかなどの問題も残った。これら研究は個人情報保護法に抵触しないよう慎重に研究を進める必要がある。

E. 結論

倫理的問題の解決はいくつかの疾患で終わり、保存体制が整った。今後疾患範囲を広げていく。臨床データの保存については、その範囲を検討した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立

分担研究者 高尾敏文 大阪大学蛋白質研究所 教授

質量分析法を用いた生体内蛋白質・ペプチドの構造解析をフェムトモルレベルという微量で精度よく行うための方法論の確立を目指し、質量分析に関連する分析的手法やハードウェアの開発、並びに、データを効率よく、確実に解析するためのソフトウェアの試作を行った。また、尿から分子量1万以下のペプチドを簡便に単離する方法を確立し、尿中に有効な疾患マーカーを探索する目的で、健康人由来の尿ペプチドのプロファイルを作成し、疾患患者由来の尿ペプチドプロファイルとの比較解析を行った。

A. 研究目的

蛋白質の一次構造および翻訳後修飾を微量かつ高感度で解析するには、化学・分析的手法、ならびに、質量分析に関するハード・ソフトウェアの開発研究は必要不可欠である。本研究では、疾患関連蛋白質の同定を個人から得られる試料をもとに行うことを想定して、特に、尿から得られる限られた微量蛋白質及びペプチドを効率よく分離・抽出するための方法とそれらの構造解析を確実に効率よく行うための質量分析法を確立する目的で行った。

本年度は、上記目的を達成するために、以下の7つの研究内容を実施した。

- ① イオン交換、及び、逆相樹脂担体を主に用いて尿ペプチド・蛋白質を効率よく分離する方法を開発し、正常ヒト尿中のペプチド・蛋白質の存在様式を調べた。
- ② ^{18}O や ^{13}C 等の安定同位体を利用した質量分析による比較定量解析を支援するWEBアプリケーション（“Isotopica”）を開発した。
- ③ 質量スペクトルを効率よく比較解析するためのソフトウェア（“Discover”）を試作した。
- ④ 新規なナノESI精密質量測定法を開発した。
- ⑤ 糖蛋白質糖鎖の不均一な構造に対し、糖ペプチドにより部位特異的に効率よく解析できることを示した。
- ⑥ 脂質修飾蛋白質を直接MS/MSにより測定することで修飾構造を推定できることを示した。

- ⑦ 複数のリン酸化部位を持つペプチドの分離と部位の決定がナノLC-MS/MSにより微量で行えることを示した。

B. 研究方法

既設の2つのタンデム質量分析計（ESI-MS/MS, MALDI-MS/MS）を用いて、尿から抽出、単離した蛋白質・ペプチドの測定を行ない、同定及び修飾構造解析を行った。質量スペクトルの解析には、一次構造解析支援ソフトウェア“SEQMS”（1998年に開発）を、データベース検索による蛋白質同定には、市販の検索エンジン“MASCOT”を用いた。

尿ペプチドの分離には、内径1mmの強陽イオン交換担体カラム、内径75 μm の逆相担体カラムを用いた。

リン酸化蛋白質、及び、糖蛋白質の酵素消化物の分離、分析は、内径75 μm の逆相担体カラムを装着したナノLC/ESI-MS/MSにより行った。

微量脂質修飾蛋白質における修飾構造解析は、ESI-MS/MSにより低エネルギー衝突活性化分解（Arガス）により行った。

ナノESI精密質量測定は、今年度開発したデュアルスプレーヤー/高電圧スイッチング法により行った。

量変動解析は、安定同位体 ^{18}O による標識を酵素消化により行い、非標識のものと混合してナノLC/ESI-MS及びMALDI-MSを用いて行った。量比の算出は、今年度開発した“Isotopica”を用いて質量スペクトル中に観測される各々のシグナ

ルに対して同位体比を計算することにより行った。

C. 研究結果

1) 尿蛋白質・ペプチドのプロファイリングとマーカー探索

癌などの早期診断及び予後診断においてマーカーとなる物質の存在は重要である。最近、蛋白質や糖鎖をターゲットとした分野において疾患マーカーの探索研究が盛んに行われるようになった。我々は、その材料として、比較的未知の領域で、採取が最も容易な尿中の蛋白質・ペプチドに注目した。尿中には膨大な量の代謝産物や塩などが存在するので、まず、これら複雑な混合物の中から蛋白質・ペプチドの単離を迅速に行える方法を確立した。次に、尿蛋白質・ペプチドの変動や個体間での差などについて検討した。特に、尿ペプチドの多くは蛋白質の分解産物であるため、これまでその全体の存在様式はほとんど調べられていなかった。

まず、健常者から採取した尿を用いて、単離した尿ペプチドの安定性や、個人での日内変動、個体間での差を1D-LC(RP-HPLC)により調べた。その結果、凍結融解(2回)では全く分解は起こらず、37℃で24hインキュベーションを行うと一部のペプチドについて分解が見られた。日内変動については非常に少なく、また、個体差についてはプレリミナリーな結果ではあるが、年齢による差が見られた。

今回さらに、より多くのペプチドリストを得る目的で2D-LC(イオン交換とnano-LC)による方法を確立し、この方法を用いて健常者、及び、疾患患者の尿について分析を行った。その結果、いくつかの検体から健常者と有意に異なるペプチドが同定された。

2) デュアルスプレーヤー/高電圧スイッチングによる精密質量測定法の開発

新規なデュアルスプレーヤー/高電圧スイッチング法により、ナノESI、及び、ナノLC/ESI-MSにおいてサブピコモル量の微量ペプチドや蛋白質消化物のミリマス測定が可能となった。カルボキシメチル化BSAのLEP消化物100fmolのLC/ESI-MSにおいては±2mDa以内の精度での測定を達成できた(文献3)。本システムは蛋白質

質の同定確度の向上や未知修飾の構造解析に有効と考えられる。実際に、本装置を装着したMS/MSにより、マウス由来トランスデュースィンγサブユニットのC末端ファルネシル化修飾を決定することができた(文献4)。

3) 安定同位体標識(¹⁸O)による量変動解析のためのソフトウェア(Isotopica)の開発(キューバ国立遺伝子工学・バイオテクノロジーセンターとの共同研究)(文献9,10)

本ソフトウェアにより、MSあるいは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分子式を自動で照合することが可能となった。さらに、同位体分布を詳細に解析することができるので、¹⁸O標識のようにわずかな質量差(2Da)しか与えない場合においても、標識体と非標識体の比を解析することが可能となった。本ソフトウェアは、

<http://coco.protein.osaka-u.ac.jp/isotopica/>にて既に公開しており、インターネットにより利用可能である。

4) 糖ペプチドの分析による糖蛋白質糖鎖の部位特異的解析

糖ペプチドの質量分析による部位特異的糖鎖構造解析の有用性を検証するため、ヒト血清トランスフェリンを用いて実験を行った。カルボキシメチル化したヒト血清トランスフェリン(100fmol)の酵素消化物をnanoLC/MSにより解析したところ、既知の2箇所の糖鎖結合部位(Asn432, Asn630)の他に、Asn491にも全体の2%だけ糖鎖が結合していることを見出した。この部位は、Asn-X-Cysモチーフという非常にまれな糖鎖結合部位で、ヒト血清トランスフェリンで8例目となる(文献7)。Asn491には、2分岐複合型の糖鎖のみが検出されたが、Asn432とAsn630では2分岐複合型糖鎖に加え、Fucの結合した糖鎖、3分岐複合型の糖鎖も微量成分として検出された。ESI-MSで得られた糖ペプチドのシグナル強度比から、それぞれの糖鎖結合部位に結合している糖鎖の種類と存在比を求めた。次に、質量情報のみでは分からないFucの結合部位を調べるため、糖ペプチドのMS/MS解析を行った。これまでの報告からFucの結合部位は、還元末端のGlcNAcに結合したFuc(α1-6)修飾と分岐の

GlcNAcに結合したFuc(α 1-3)修飾 [Le^x] が考えられる。Asn432では、Le^xの存在を示すオキシニウムイオン(512, 803)のみが検出され、Le^x型のFucのみが含まれていることが分かった。一方、Asn630はLe^x型Fucの他に、Fuc(α 1-6)修飾の存在を示す還元末端側フラグメントイオンが検出された。そこで、 α 1-3/4フコシダーゼによりFuc(α 1-3)修飾を除き、それにより残存する還元末端Fuc(α 1-6)結合型糖ペプチドの存在比をシグナル強度から割り出した。以上の結果より、それぞれ3つの糖鎖結合部位での糖鎖構造と存在比を明らかにすることができた。今回の解析で、ヒト血清トランスフェリンにおいてAsn630にのみ2分岐複合型の糖鎖にFuc(α 1-6)修飾が存在することが明らかとなったが、この糖鎖構造は、山下らによって肝臓癌患者で増加することが報告されている。山下らの報告はトランスフェリンの糖鎖全体の変化についてのものだが、今回の結果から、Asn630における糖鎖変異

(Fuc(α 1-6)付加)が肝臓癌における糖鎖の主要な構造変化であることが推測される。(文献6)

5) リン酸化部位の決定

概日リズムに関わる蛋白質のリン酸化部位をナノLC/ESI-MS/MSにより決定した。その結果、隣り合うSer-431とThr-432の2箇所がリン酸化されたもの、どちらか一方がリン酸化されたもの、そして、リン酸化されていないもの計4種類の分子種が同定された(文献8)。確認のため、上記4種のリン酸化ペプチドを化学合成したものにに対し同様な測定を行い、観測されたフラグメントイオンの検証を行った。

D. 考察

尿の前処理、及び、ペプチド・蛋白質の分離法については、ほぼルーチン化できた。現在、分子量1万以下の低分子ペプチドについて個々人のプロファイルを蓄積しているが、高分子量画分のプロファイルを今後データとして追加していく予定である。また、現プロトコールにおいては、陽イオン交換、逆相クロマトグラフィーを用いて1200画分に分画してプロファイルを得ているが、微量成分の検出には未だ十分とは言えない。今後、自動化のための装置開発を検討し、より多くの分画を効率よく得て分析できる方法を確立したい。

量変動解析については、蛋白質画分に対しては、既に、酵素消化による¹⁸O標識と“Isotopica”を用いて量変動解析が行えることを実証したが(文献9)、ペプチド画分については量変動解析は行えないため、今後の最重要課題として取り組みたい。

健常人と疾患患者の尿のペプチド画分の比較解析から幾つかの疾患マーカー候補が得られている。今後、再現性と症例を増やして検証していく予定である。

尿中には糖蛋白質や糖ペプチドが多く存在している。糖蛋白質糖鎖のプロファイルを効率よく取得でき、それらの構造解析を高感度で行える方法を確立し、糖蛋白質糖鎖と病態との関連を精査する予定である。特に、本年度の成果で見出したトランスフェリンのAsn630における還元末端Fuc修飾については、(肝)癌との関連において、実際の患者血清由来のトランスフェリンを用いて調べることで実証したい。

データ処理に関しては、尿の分析で得られる膨大な質量スペクトルデータを自動で効率よく解析するに至っていないが、質量分析計付属のデータ解析ソフトウェアにより作成される二次データをもとに視覚的に解析が行えるソフトウェアを開発している。一方、安定同位体を利用する変動解析は今後の重要な課題であるが、ハイスループットで量変動解析を行うことのできる方法を開発する予定である。

E. 結論

尿の前処理、及び、分離法の確立により、個々人の尿(~50 mL)を用いてペプチド・蛋白質のプロファイルを取得することが可能となった。また、糖蛋白質糖鎖やリン酸化等の翻訳後修飾解析について興味ある結果を得ることができ、疾患マーカー探索に応用できるものと考えられる。

ナノESIによる精密質量測定法を開発し、LC/ESI-MSに適用した。それにより、従来困難であったLC/ESI-MSにおける精密質量測定が可能となり、蛋白質の同定確度の向上や未知翻訳後修飾の構造解析に威力を発揮するものと期待される。

MSやMS/MSスペクトルで観測される同位体分布を理論同位体分布と自動で照合できる新しいソフトウェア“Isotopica”を開発した。スペクトルのバリデーションのみならず、量変動解析に用

いられている種々の安定同位体標識の含有率を生データから直接算出することが可能になった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Uchiyama S, Kobayashi S, Takata H, Ishihara T, Hori N, Higashi T, Hayashihara K, Sone T, Higo D, Nirasawa T, Takao T, Matsunaga S, Fukui K.: Proteome analysis of human metaphase chromosomes. *J Biol. Chem.* in press.
- ② Wada A, Wang AP, Isomoto H, Satomi Y, Takao T, Takahashi A, Awata S, Nomura T, Fujii Y, Kohno S, Okamoto K, Moss J, Millan JL, Hirayama T.: Placental and intestinal alkaline phosphatases are receptors for *Aeromonas sobria* hemolysin. *Int J Med Microbiol.* 294, 427-35 (2005)
- ③ Satomi Y, Kudo Y., Sasaki K., Takao T. Accurate Mass Measurement in Nanoflow Electrospray Ionization Mass Spectrometry by Alternately Potentiating Sample and Reference Sprayers. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 540-546 (2005).
- ④ Kassai H., Satomi Y., Fukada Y., Takao T. Top-Down Analysis of Protein Isoprenylation by Electrospray Ionization Hybrid Quadrupole-TOF Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 269-274 (2005).
- ⑤ Teranishi H, Muneoka Y, Takao T, Shimonishi Y, Kojima M.: Isolation and characterization of four VIP-related peptides from red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Regul. Pept.* 15:123, 173-9 (2004).
- ⑥ Satomi Y., Shimonishi Y., Takao T. Site-specific Carbohydrate Profiling of Human Transferrin by Nano-flow Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 2983-2988 (2004).
- ⑦ Satomi Y., Shimonishi Y., Takao T. N-glycosylation at Asn491 in the Asn-Xaa-Cys motif of Human Transferrin. *FEBS letters*, 576, 51-56 (2004).
- ⑧ Nishiwaki T., Satomi Y., Nakajima M., Lee C., Kiyohara R., Kageyama H., Kitayama Y., Tamamoto M., Yamaguchi A., Hijikata A., Go M.,

Iwasaki H., Takao T., Kondo T. Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 101, 13927-13932 (2004).

- ⑨ Fernández-de-Cossio J., Gonzalez L.J., Satomi Y., Betancourt L., Ramos Y., Huerta V., Besada V., Padron G., Minamino N., Takao T. Automated Interpretation of Mass Spectra of Complex Mixtures by Isotope Peak Matching. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 2465-2472 (2004).
- ⑩ Fernandez-de-Cossio J., Gonzalez L.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. *Nucleic Acids Res.* 32, 674-678 (2004).

2. 学会発表

- ① Fernandez-de-Cossio, J., Gonzalez, J., Satomi, Y., Takao, T.: Software tools for proteomic analysis. "Frontiers of Proteomics" -Aims and Perspectives-, Nov. 15-16, 2004 at Osaka
- ② 高尾敏文、里見佳典、佐々木一樹：質量分析による尿蛋白質のプロファイリング、“プロテオミクスによるがん研究の新戦略”、第63回日本癌学会シンポジウム、平成16年9月29日、福岡
- ③ Toshifumi Takao: Mass Spectrometric Survey of Biological Peptides. 第75回日本動物学会シンポジウム、平成16年9月12日、神戸
- ④ 高尾敏文：質量分析とプロテオミクス、第70回日本生化学会東北支部例会シンポジウム、平成16年5月28-29日、秋田
- ⑤ Takao, T., Satomi Y, Fujita S., Tamura Y.: Identification of gel-separated proteins by mass spectrometry. 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science (workshop), Apr. 14-18, 2004 at Yokohama

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助手）

須藤浩三（ヒューマンサイエンス財団流動研究員）

研究要旨 癌のプロテオーム解析の精度を向上させるためには、癌組織から癌細胞のみを選択的に取り出して解析する必要がある。本研究では、癌組織の凍結切片を作成し、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いて、顕微鏡下で癌細胞のみを切り出し、癌細胞で発現しているたんぱく質を効率よく抽出する前処理法の検討を行った。固定法、染色法などのパラメーターを検討し、2次元電気泳動や2次元液体クロマトグラフィー/MS/MS システムなどのプロテオーム解析に十分適応したプロトコルを確立した。今後は、多くの癌組織を本法を用いてプロテオーム解析し、癌の悪性度やマーカーとなるような癌関連たんぱく質の同定を目指す。

A. 研究目的

ヒトゲノムのシーケンスが終了し、現在そのシーケンス情報を利用した研究、ポストゲノム研究が注目されている。細胞、組織に存在するたんぱく質をその種類、量、翻訳後修飾などを網羅的に解析するプロテオミクス研究はその一つであり、現在様々なアプローチが行われており、今後の生命科学研究の一役を担うものと期待されている。癌研究の分野では、癌患者の手術サンプルを用いたプロテオーム解析もすでに世界中で行われている。その研究の中心は、正常組織と癌組織のたんぱく質発現パターンを比較し、癌化に伴うたんぱく質の変動を調べるもの、あるいは癌組織に発現するたんぱく質で、発現量が予後に関与するものを解析するものである。ただし従来の研究はそのほとんどが癌組織全体を用いて解析が行われている。しかし、癌組織はヘテロな組織であり、癌細胞以外にリンパ球などの炎症細胞、血管、間質など他の細胞群が多く含まれ、癌組織のなかでの癌

細胞自身の占める割合が10%以下である癌組織も決してめずらしくない。そのため、得られた結果は癌細胞に由来するたんぱく質を反映しているとは限らない。本研究は、癌細胞のプロテオーム解析の精度を向上させるための癌組織の前処理法の確立を目的とした。

B. 研究方法

癌組織の切片を作成し、顕微鏡下で癌細胞のみを切り出すレーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いて、癌細胞由来のたんぱく質を効率よく回収する方法の検討を行った。レーザーマイクロダイセクションにはライカ社製、AS LMDを用いた。

手術で採取された大腸癌あるいは肺癌サンプルは手術場でOCTコンパウンドに包埋し、液体窒素で急速凍結し、使用するまで-80℃に保存した。クリオスタットで10 μ mの切片を作成し、ホイルつきのスライドガラスに貼り付ける。以下、組織の固定法、脱脂処理、染色法、レーザーマイクロダイセクションで切り出すまでの

時間、ホイルからのたんぱく質の抽出法などのパラメーターを変え、たんぱく質の抽出効率、電気泳動での分離パターンなどを比較した。さらに、抽出したたんぱく質は、2次元電気泳動での分離、および2次元液体クロマトグラフィー/MS/MSシステム(ショットガン法)での網羅的たんぱく質同定を行った。2次元電気泳動はAmershamのIPG strip(13cm, pH3-10)を用い、たんぱく質50 μ gをアプライした。泳動後のゲルはSYPRO Rubyで蛍光染色し、イメージを取得した後、いくつかのスポットに関してはin gel digestを行い、LC/MS/MSシステムにてたんぱく質の同定を行った。2次元液体クロマトグラフィー/MS/MSシステムでの解析には、抽出たんぱく質20 μ gをDTT、ヨードアセトアミドで還元アルキル化後、トリプシンで切断した。切断されたペプチド群はon lineで結ばれた強カチオンマイクロカラム(25mM~500mM ギ酸アンモニウム、pH 3.0で溶出)と逆相C18マイクロカラム(0.2 X 50mm, 0.1% ギ酸、アセトニトリルの溶媒を使用)で分離し、直接ESIイオン源に挿入し、イオントラップ型質量分析計(LCQ Deca XP)にて解析を行った。測定データのセットは検索エンジン、MascotあるいはTurbo Sequestを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究内容は、大阪府立成人病センターに設けられた倫理審査委員会において既に承認されている。今回使用した癌組織は、手術前に患者さんに対して文書を用いて説明し、同意の得られた患者さんのサンプルである。

C. 研究結果

組織の固定は、95%エタノール、1分で、たんぱく質の流出、分解は認められなかった。脱脂

処理に関してはアセトン、クロロホルム:メタノール(2:1)の処理を検討したが、脱脂処理により膜たんぱく質が効率よく可溶化される傾向は認められなかった。染色法では、癌細胞の顕微鏡下での観察、同定されやすさにより、ヘマトキシリンの希釈率を変える必要がある。通常は原液の3倍希釈が適当である。また、エオジン染色は、エオジンがたんぱく質から解離されにくく、その後の解析に悪影響を及ぼす可能性があるため、極力避けるべきである。組織染色後、切片を自然乾燥させ、レーザーマイクロダイセクションを行うが、できるだけ早急にダイセクションを行うほうがホイルからのたんぱく質の回収率がよい。乾燥後1週間以上経過すると、ホイルからのたんぱく質の抽出率は非常に低下する。レーザーマイクロダイセクションで回収された癌細胞は8M Urea, 2% CHAPS、50mM Tris buffer(pH 7.4)に溶解させるが、その際、超音波処理を5分間行うことにより、ほぼ全量のたんぱく質が回収できる。たんぱく質を200 μ g程度回収するには、比較的癌細胞が密に存在する癌組織であれば、癌切片5-10枚、癌細胞密度が低い癌組織では、癌切片30枚程度必要であった。

上記方法で大腸癌サンプルから回収した癌細胞を可溶化後、2次元電気泳動に供した。SYPRO Rubyで非常に薄く染色されたものから濃く染色されたものまで10スポットをカットし、in gel digest後、LC/MS/MSを行った結果、全スポットのたんぱく質が同定可能であった。同じサンプルをトリプシン処理後、2次元液体クロマトグラフィー/MS/MSシステムでの解析を行った。約500種類のたんぱく質が同定でき、そのほとんどが癌細胞に由来するたんぱく質と

思われる。しかし、一部にコラーゲンなどの間質の成分、血管内の残存血液成分が含まれており、わずかではあるが癌細胞以外のたんぱく質成分が混入していた。

D. 考察

癌組織のプロテオーム解析のクオリティを高めるため、レーザーマイクロダイセクション法により癌細胞を選択的に切り出し、たんぱく質を抽出する前処理法を検討し、プロトコールはほぼ確立された。ただし、たんぱく質量で200 μ g 得るには、癌細胞の組織内の密度によるが、半日から2日要する。この方法で抽出された癌細胞由来のたんぱく質は、2次元電気泳動や2次元液体クロマトグラフィー/MS/MS システムなどの通常のプロテオーム解析に用いることができる。

E. 結語

今回の研究で確立された方法を用いることにより、癌のプロテオーム解析のデータは精度を増すものと考えられる。今後は各種癌サンプルを解析し、データを蓄積することにより、予後、転移能などの悪性度に関わるたんぱく質、あるいは癌のマーカーとなるたんぱく質の発見をめざす。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Wada H, Doki Y, Nishioka K, Ishikawa O, Kabuto T, Yano M, Monden M, Imaoka S. Clinical outcome of esophageal cancer patients with history of gastrectomy. *J Surg Oncol.* 2005;89(2):67-74.

- 2) Murata K, Miyoshi E, Ihara S, Noura S, Kameyama M, Ishikawa O, Doki Y, Yamada T, Ohigashi H, Sasaki Y, Higashiyama M, Tarui T, Takada Y, Kannagi R, Taniguchi N, Imaoka S. Attachment of human colon cancer cells to vascular endothelium is enhanced by N-acetylglucosaminyltransferase V. *Oncology.* 2004;66(6):492-501.
- 3) Uemura M, Sasaki Y, Yamada T, Eguchi H, Ohigashi H, Doki Y, Murata K, Miyashiro I, Ishikawa O, Takami H, Kobayashi T, Imaoka S. Surgery for hepatocellular carcinoma with tumor thrombus extending into the right atrium: report of a successful resection without the use of cardiopulmonary bypass. *Hepatogastroenterology.* 2004 ;51(59):1259-62.
- 4) Ishikawa O, Ohigashi H, Eguchi H, Yokoyama S, Yamada T, Takachi K, Miyashiro I, Murata K, Doki Y, Sasaki Y, Imaoka S. Long-term follow-up of glucose tolerance function after pancreaticoduodenectomy: comparison between pancreaticogastrostomy and pancreaticojejunostomy. *Surgery.* 2004 ;136(3):617-23.
- 5) Fujito T, Sasaki Y, Iwao K, Miyoshi Y, Yamada T, Ohigashi H, Ishikawa O, Imaoka S. Prognostic significance of beta-catenin nuclear expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2004 ;51(58):921-4.
- 6) Ohigashi H, Ishikawa O, Eguchi H, Yamada T, Sasaki Y, Noura S, Takachi K, Miyashiro I, Murata K, Doki Y, Imaoka S.

Early ligation of the inferior pancreaticoduodenal artery to reduce blood loss during pancreaticoduodenectomy.

Hepatogastroenterology. 2004 ;51(55):4-5.

7) Akita H, Doki Y, Ishikawa O, Takachi K, Miyashiro I, Sasaki Y, Ohigashi H, Murata K, Noura S, Yamada T, Eguchi H, Imaoka S.

Total removal of the posterior mediastinal gastric conduit due to gastric cancer after esophagectomy.

J Surg Oncol. 2004 ;85(4):204-8.

8) Komori T, Sasaki Y, Yamada T, Ohigashi H, Ishikawa O, Inoue E, Ishiguro S, Seki T, Imaoka S.

Unusual atrophic change after repeated arterial therapy for hepatocellular carcinoma: report of a case.

Surg Today. 2004;34(1):76-9.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

平成16年度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 (財) 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
生体試料分析部門長

研究要旨：

創薬ターゲット探索には、研究協力機関（7 医療機関）から提供される患者試料（血清・組織等）と健常人試料との疾患関連たんぱく質の発現差解析が極めて重要である。そのため、研究協力機関からの臨床試料の受け入れに必要な施設内の創薬プロテオームファクトリー施設倫理審査委員会、個人情報保護のための匿名化システム、試料機器管理システム（LIMS）を確立した。ヒト標準血清を用いて同位体標識法（cICAT 法）を検討し、血清前処理法、cICAT peptide の分離法、nano-LC system/高性能質量分析(Q-Star XL, ABI-4700 等) 解析法、および大量たんぱく質同定・定量解析法(HiSpec System)までの一連の疾患関連血清たんぱく質解析フローをほぼ完成させた。本システムにより、ヒト血清疾患関連たんぱく質（トップ#1- 100 種類）の同定と比較定量（発現差解析）が可能になると考える。

A. 研究目的：

創薬ターゲットおよび疾患関連バイオマーカー探索には、臨床情報と連結した多数の患者試料（血清・組織等）と健常人試料から、微量に存在する疾患関連たんぱく質を効果的に同定し、比較定量することが重要である。本年度は、1) 研究協力機関からの臨床試料の受け入れに必要な創薬プロテオームファクトリー施設（PF）倫理審査委員会の設立、2) 個人情報保護のための匿名化システムおよび試料・機器管理システム(LIMS)・情報セキュリティシステムの確立、3) 高感度、精密かつハイスループット性の高い質量分析のための創薬プロテオームファクトリー施設（以下 PF とする）特別仕様の技術構築、4) 抗体カラムを用いる血清たんぱく質の前処理法の確立、5) 同位体標識法（cICAT）によるヒト標準血清たんぱく質の発現差解析法の確立、および6) 大量のたんぱく質の同定・比較定量を可能にする統合データ解析システムの構築を目標とした。

B. 研究方法：

1) アジレント抗体カラムによる血清主要たんぱく質の除去：

アジレント社製抗体カラム（Albumin, IgG, α 1-Antitrypsin, IgA, Transferrin, Haptoglobin 除去用、10 x 100mm)を使用した。200 μ l のヒト血清（Rockland 社）を 15000 rpm で遠心後、

Agilent Binding Buffer A で 5 倍希釈後、0.22 μ m のフィルターでろ過し、上述の抗体カラムにアプライし、素通り画分を分取した。吸着部分は Agilent Buffer B で溶出させ、その後、カラムは Buffer A で洗浄した。素通り画分を Centriprep 遠心式フィルターユニット (YM-3, Millipore) で濃縮し、50mM Tris/HCl, 0.1% SDS (pH8.5) にバッファー交換後、たんぱく質濃度をローリー法で測定した。

2) ヒト標準血清の cICAT 反応:

前述の高濃度たんぱく質を除いた血清たんぱく質画分 (final 1mg/ml) を 50 mM Tris/HCl, 0.1% SDS (pH8.5) で可溶化し、TCEP (final 1mM, 95°C, 10 min) で還元後、2.2mM の Cleavable ICAT 試薬 (Applied Biosystem (ABI), ¹³C (H鎖) あるいは ¹²C (L鎖) 標識) を 37°C、2 時間反応させた。未反応の試薬を 1.0mM TCEP でクエンチングし、H 鎖試料と L 鎖試料を等量混合し、トリプシン (Promega, TPCK 処理) で 37°C、16 時間消化した。得られた消化物を、Vision Workstation system (ABI) を用いて、SCX column ((Poly LC Sulfoethyl A Column (4.6 x 100mm)) にか、10mM KH₂PO₄, pH2.8, 25%CH₃CN (SCX-binding buffer) で吸着・洗浄後、SCX-binding buffer + 0.5M KCl (SCX-elution buffer) で溶出させた。溶出画分を大型アビジンカラム (6.2 x 66.5mm) にか、素通り部分を洗浄後、吸着した ICAT 試薬反応ペプチドを 30% CH₃CN/0.4% TFA で溶出した (Vision Workstation System)。溶出画分を乾燥後、95%TFA (5% Scavenger 含有) で 37°C、2 時間反応させてビオチン部分を切断し、ICAT 標識ペプチド (H 鎖、L 鎖) を得た。本ペプチドは減圧乾固した後 SCX-binding buffer に溶解し、再び SCX column にか、十分に洗浄後、SCX-binding buffer + KCl (0 ~ 0.5M gradient) でペプチド画分を分画 (50 分画) し、それぞれ C18 trap column で脱塩し、減圧乾固した。

3) nano-LC による cICAT peptide の分離精製:

SCX による分画・脱塩した ICAT 標識ペプチドを 0.1%TFA-2% CH₃CN にて再溶解し、nano-LC (LC-Packing)/Q-Star XL (ABI, ESI-Q/TOF, 以下, Q-Star とする) および nano-LC/Probot (LC-Packings)/ABI-4700 Proteomics Analyzer (ABI, MALDI-TOF/TOF, 以下, ABI-4700 とする) にて分析した (カラム; PepMap™ C18 100, 3 μ m, 100Å, 75 μ m i.d. x 150mm (LC-Packings)、Q-Star 用移動相; A: 5% CH₃CN/0.1% HCOOH、B: 95% CH₃CN/0.1% HCOOH によるリニアグラジエント、ABI-4700 用移動相; A: 5% CH₃CN/0.1% TFA、B: 95% CH₃CN/0.1% TFA によるリニアグラジエント)。各分析は、以下の条件で行い、分析精度の向上を図っている。

4) Q-Star XL (ESI-Q/TOF) での測定:

BSA 消化物 (50fmol) を用いて nano-LC の調整を行い、規定のシーケンスカバレッジ (約 40% 程度) が得られるのを確認した後、試料の測定を行った。測定は MS 1 秒、第一 MS/MS 3 秒、第二 MS/MS 3 秒の合計 7 秒が 1 サイクルの自動測定 (IDA Mode) であり、試料を 5 ~ 10 回測定する度に 1 回、QC 用の BSA 消化物 (50fmol) を測定することで、測定データの信頼性を確保している。

5) ABI-4700 (MALDI-TOF/TOF) での測定:

nano-LC/Probot system で試料を分離し、マトリックス(CHCA, 875ng/well)と共にスポットした。サンプルプレートを装置内に導入後、MS Reflector Mode でキャリブラント (Des-[Arg¹]-Bradykinin [(M+H)⁺ = 904.468]、Angiotensin I [(M+H)⁺ = 1296.685]、ACTH(1-17) [(M+H)⁺ = 2093.087]、ACTH(18-39) [(M+H)⁺ = 2465.199]、ACTH(7-38) [(M+H)⁺ = 3657.929])測定用のレーザー強度を決定する。続いて試料がアプライされている任意のスポットを数点選び、MS 測定およびMS/MS 測定用のレーザー強度の検討を行った後、自動測定用のメソッドを作成、MS-MS/MS 連続測定(MS 積算:1250、MS/MS 積算:2000)を行った。なお自動測定を開始する直前にプレートキャリブレーションを実施し、プレート自体の補正を行うことで質量精度の向上に努めている。

6) ヒト血清の2次元電気泳動法:

アジレント抗体カラム素通り画分のヒト血清たんぱく質 500 μ g 分を2次元電気泳動した(1)。2次元電気泳動後、ゲルを SYPRO Ruby 染色し、Typhoon Image Analyzer (Amersham) により、ゲルのスキャンを行った。解析したゲルイメージから、DeCyder Software を用いてたんぱく質発現スポットを確認し、ピッキングリストを作成した。そのリストをもとに、Ettan Spot Handling Workstation を用いて、たんぱく質発現スポットを切り出し、切り出したゲルを96ウェルプレートに回収した。切り出したゲルは、インゲル消化法(2)にてトリプシン消化を行った。即ち、切り出したゲルを100% CH₃CN で、5分間洗浄した。洗浄後、10mM DTT で37 $^{\circ}$ C、10分間、還元反応後、100% CH₃CN で10分間、ゲルを洗浄し、50mM ヨードアセトアミドでCAM化反応を行った。CAM化反応後、100% CH₃CN で10分間、ゲル洗浄後、4 μ g/ml トリプシン溶液を50 μ l 加えて、37 $^{\circ}$ C、1時間、トリプシン消化を行った。トリプシン消化後の溶液、および残ったゲルに、20% CH₃CN 50 μ l 加えて、室温、30分間、静置して得たペプチド溶液を、別の96ウェルプレートに回収した。同様に、0.1%TFA/50% CH₃CN 50 μ l、0.1%TFA/70% CH₃CN 50 μ L で回収した溶液も前述の96ウェルプレートに回収した。回収ペプチド溶液は、SpeedVac で乾固後、0.1%TFA/2% CH₃CN 100 μ l に溶解し、Q-Star にてペプチド/たんぱく質の同定を行った。

7) 統合データベースシステム関連:

創薬プロテオームファクトリー施設(PF)において稼動している統合データベースシステムの構成を機能別にまとめると、以下の通りとなる。

- (1) データ前処理モジュール
- (2) ペプチド・たんぱく質同定モジュール
- (3) 統合データベース
- (4) データ後処理モジュール

この中で、(2)については市販のたんぱく質同定エンジン: Mascot を使用した。(1)、(3)、(4)はPF用に構築したデータマイニング・データベースシステムであり、HiSpec と総称した。また、(1)と(4)はデータ解析ソフトウェアモジュールであり、それぞれ「Search Manager」

「Results Viewer」とした。以下、これら2つのモジュールの役割と機能を示す。

(1) Search Manager

Search Manager は、質量分析計から出力された測定データをサーバに取り込み、各種解析処理を行い、ピークリストを生成し、Mascot に自動投入する処理までを、実行・管理するソフトウェアモジュールである。以下の5つの機能から構成される。

- データ登録 (Data Registration) : 質量分析計 ABI-4700、Q-Star、LCQ(Thermo ELECTON) の測定データを自動的にシステムに取り込む機能と研究者がデータを個別に登録するためのユーザインターフェイス機能からなる。
- ピークリスト生成 (Peaklist Generation) : Mascot 同定処理のために、MS/MS スペクトルからピークリストを生成する機能。機器付属ピークリスト作成標準ソフトウェアの互換機能を利用し、ピークリスト生成に関連する各種パラメータの設定も可能である。
- ピークリストフィルタリング (Peaklist Filtering) : ICAT 法による比較定量解析のために、MS スペクトルから親イオンのピークリストを生成し、ICAT ペアイオンの探索やピークごとのクラスタ面積の計算処理を実行し、Mascot 投入用のピークリストファイルに情報付加する機能。比較定量精度向上用のソフトウェア改良済。
- Mascot 自動投入 (Mascot Search Submission) : 生成されたピークリストを Mascot に自動で投入する機能と研究者がサーチパラメータを変更できるユーザインターフェイス機能を装備。
- データベース登録 (Database Upload) : Mascot 出力結果を統合データベースに自動アップロードする機能。統合データベースに登録された Mascot 同定結果と ICAT 比較定量結果は、後述の Results Viewer によって閲覧・編集等が可能となる。

(3) Results Viewer について

Results Viewer は、Search Manager を用いてデータベース化されたペプチド・たんぱく質の同定結果、ICAT 比較定量結果を表示・編集するモジュールである。複数の Mascot 検索結果（すなわち複数の実験結果）を統合化した表示が可能で、各種フィルタリングを利用することによって、たんぱく質同定結果・比較定量結果の評価・検証をリアルタイムに実現できる。

Results Viewer は、以下に示す4つの基本画面で構成される。

- Configuration : Mascot 出力データから、統合データベースに登録する内容、Viewer に表示する内容を選別するためのパラメータ設定を行う画面（ペプチドの Mascot スコア下限値、たんぱく質の Mascot スコア下限値、ペプチドのアミノ酸数下限値、等々）。
- Combine Mascot Results : 統合化して一覧表示したい Mascot 出力結果の設定を行う画面。同一サンプルに由来する複数フラクションの測定結果・Mascot 同定結果をまとめて一つの Combine Group に集約できる。ICAT サンプルの場合は、light 標識サンプルの Mascot 結果を集約すると、自動的に対応する heavy 標識ラベルサンプルの Mascot 結果も集約することが可能である。