

Cytokine	REF-1 (ng/10 <sup>5</sup> cells)		
	-	+	
bFGF	508	546	
TGF-β1	673	3163	4
TGF-β2	Non detectable	Non detectable	
IL-1β	Non detectable	Non detectable	
IL-6	1770	1922	1
IL-8	556	837	1
G-CSF	Non detectable	Non detectable	
GM-CSF	817	1959	2
M-CSF	420	509	1
TNF-α	Non detectable	Non detectable	
EGF	Non detectable	Non detectable	

表1. REF-1 添加による成長因子とサイトカインの分泌

REF-1添加によるRPE細胞の発現解析についてタンパク質発現解析 (Cleavable ICAT®) と遺伝子発現解析 (Microarray) を行った結果、今回は全体像を掴むために1700 ケミルミネッセントマイクロアレイアナライザでの発現解析実験を行った。

■1700 ケミルミネッセントマイクロアレイアナライザを用いた遺伝子発現解析

無血清下で培養中のヒトRPE細胞にREF-1 (10 ng/mL) を添加し、添加後6, 12, 24時間後にRNA-Bee-RA (Tel-Test) を用いてtotal RNAを抽出した。各時間におけるコントロールを含め、合計6つの検体に行われた。その結果、発現遺伝子をシグナル強度がバックグラウンドに比較して3倍以上のものとするなかつたものでは2,186の遺伝子発現が、REF-1添加では10,773の遺伝子発現を認められ、REF-1の添遺伝子に発現が誘導された。これまで培養RPE細胞が発現する遺伝子数やその内容については不明であった遺伝子発現解析を実験プロジェクトの初期の段階で行い、転写レベルではあるが全体像を掴んで移行することが今後重要になるのではないかと考える。今回の解析によって最も発現量の変化が大時間ごとに表したものが表2である。

GenBank accession No.	UniGene	Gene Name
up-regulation (after 6hr)		
A7031353	Hs.105928	La chaperone domain family B (with TM and TTM domains) member 3 (LILKB)
A52373	Hs.155839	Reticulon 4 interactive protein 1 (RTN4IP1)
AK074674	Hs.371334	Solute carrier family 16 (anion/cationic acid transporters), member 11 (SLC16A11)
up-regulation (after 12hr)		
AF129290	Hs.82071	C/EBPβ 300-interacting transcription factor with Gln/Asn-rich carboxy terminus domain 2 (CITED3)
J03261	Hs.2238	Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor) (LIF)
B027960	Hs.15432	Downregulated in ovarian cancer 1 (DOC1), transcript variant 2
up-regulation (after 24hr)		
unknown	unknown	Similar to 60S RIBOSOMAL PROTEIN L21
M18000	unknown	Ribosomal protein S17 (RPS17)
U13223	Hs.96028	Forkhead box D1 (FOXO1)
down-regulation (after 6hr)		
A1277930	unknown	DNA directed RNA polymerase II polypeptide I-related gene (POLR22), transcript variant 1
unknown	unknown	Ribosomal protein L21
AB020667	Hs.112189	Hypothetical protein FLJ13149 (FLJ13149)
down-regulation (after 12hr)		
unknown	unknown	Ribosomal protein L15
unknown	unknown	Similar to ribosomal protein L31
unknown	unknown	similar to dnaK-type molecular chaperone hsc73 - rat
down-regulation (after 24hr)		
unknown	unknown	Arylsulfatase D precursor, isoform b
unknown	unknown	unknown
AY272148	Hs.147644	Zinc finger protein 331 (ZNF331)

表2. 最大の発現量の変化が観察された遺伝子群 (3遺伝子づつ表示)

■遺伝子発現解析プログラムによるクラスター解析

生データについてコントロール等による補正をかけ、DNAアレー間のデータの比較が可能になったところが、遺伝子発現解析プログラムである。今回我々はデータ量に関係なく、解析結果を直感的な視覚表示ソフトウェア (Infocom) を用いてクラスター解析を行った (図1-3)。まずは発現のついて、6, 12, 24時間の発現パターンからクラスター分けを行った。クラスター数は任意に変化させ回は38のクラスターに分けることにより、きれいにグループ化された (図1-1)。今回のクラスター解1-2, 1-3) や12時間 (図1-5, 1-6) ではクラスター内の特定の遺伝子のみが発現し、やがて24時間 (図1-7) が観察された。特に6時間で発現が増加あるいは減少する遺伝子についてはREF-1添加による直接考えられ、特異的なRPE細胞増殖活性との関係を解析中である。

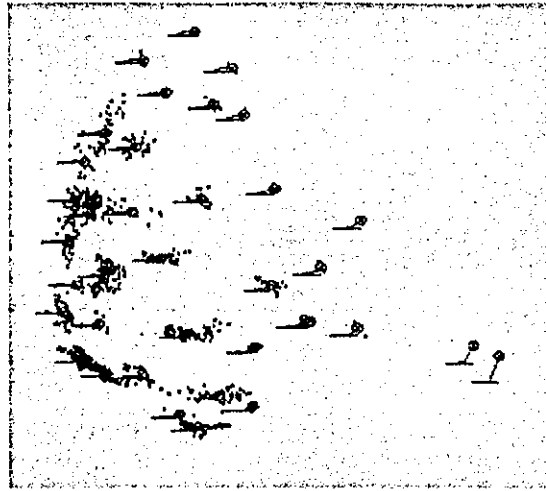


図1-1. 発現パターンによる遺伝子のクラスター分け (青)  
赤線は発現パターンを示し、クラスター間の距離は相関性を表す。

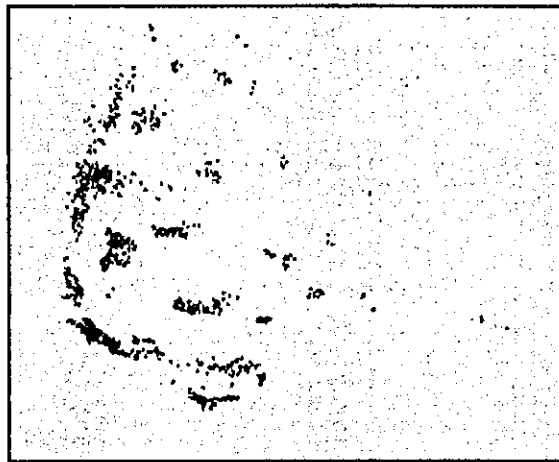


図1-2. 6時間後の発現が>2に増加した遺伝子 (黄緑)

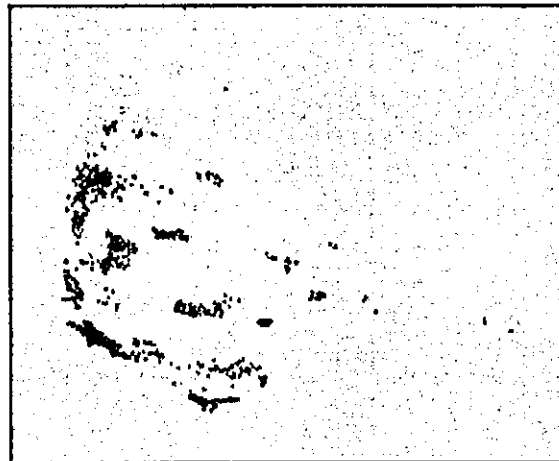


図1-3. 12時間後の発現が>2に増加した遺伝子 (薄黄)

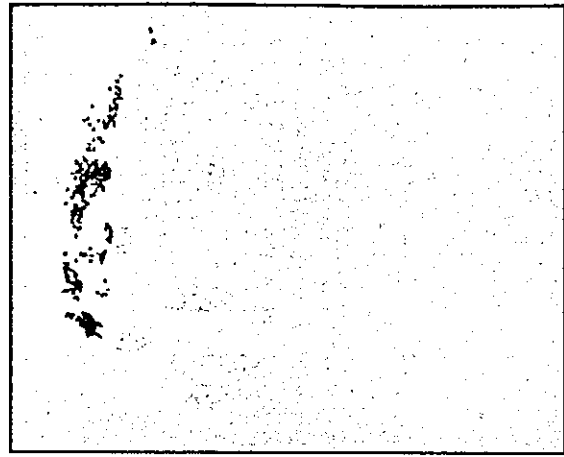


図1-4. 24時間後の発現が $>2$ に増加した遺伝子 (ピンク)



図1-5. 6時間後の発現が $<0.5$ に減少した遺伝子 (緑)

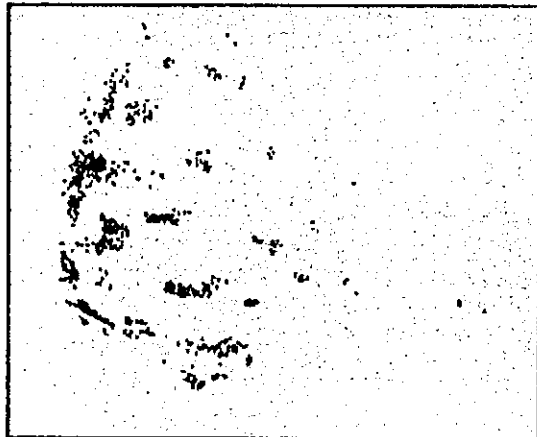


図1-6. 12時間後の発現が $<0.5$ に減少した遺伝子 (黄)



図1-7. 24時間後の発現が<math>0.5</math>に減少した遺伝子 (赤)

#### ■まとめ

今回我々はRPE細胞に対して特異的な増殖活性を持つREF-1の機能解析の一環として、REF-1添加後の遺伝子。1700ケルミネッセントマイクロアレイアナライザを用いた解析によってヒトが発現するほぼ全ての遺伝子を観察することができた。さらにOmniVizデータマイニングソフトウェアを用いることにより、全体を比べて変化する個々の遺伝子に的を絞って観察することができた。さらに、個々の遺伝子の固有IDをそのDISCOVERY SYSTEM™(GDS)で検索することにより、遺伝子だけでなくタンパク質の詳細な情報を待たることができた。これまでの遺伝子解析ではDNAアレーの精度や解析用ソフトの能力に主眼が置かれていたが各遺伝子についての総合的なデータベースと直接リンクしていることにより、目標とする遺伝子の選択可能になった。この転写レベルでの結果を踏まえて、今後予定されているCleavable ICAT法によるタンシメである。(つづく)

#### ■参考文献

Tanaka, Shibuya, Iwata, et al. Purification, Molecular Cloning, and Expression of a Novel G Factor for Retinal Pigment Epithelial Cells, REF-1/TFP1-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2

研究用にもみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。

Applied Biosystems and BioBeat are registered trademarks and AB (Design), Celera Discovery are trademarks of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and/or certain other countries.

ICAT is a registered trademark of the University of Washington, exclusively licensed to the group of Applied Biosystems Corporation.

# 網膜色素上皮細胞増殖因子

## REF-1の機能解析

独立行政法人国立病院機構  
東京医療センター 薬剤科  
主任研究者 渋谷昌彦

### 共同研究者

独立行政法人国立病院機構東京医療センター  
臨床研究センター 細胞・分子生物学研究室

岩田 岳

網膜色素上皮 (Retinal pigment epithelial: RPE) 細胞は、網膜の恒常性を維持し、視細胞と脈絡膜毛細血管の栄養交換や視細胞外節の貪食等の重要な役割を果たすことが知られている。そこでこのRPE細胞の機能低下や消失を治療するために、我々はRPE細胞の増殖を特異的に促進する因子の検索を行った。その結果、サイトカインや増殖因子を豊富に生成する繊維芽細胞抽出液中にRPE細胞の特異的な増殖機能を持つ増殖因子を発見し、Retinal pigment epithelial cell Factor-1 (REF-1) と命名した。そのREF-1の添加によって、どのようにRPE細胞が増殖し、なぜ増殖が促進されるのかを明らかとするために、今回、RPE細胞培養の条件を検討し、RPE細胞におけるREF-1の発現とREF-1添加による成長因子やサイトカインの分泌、さらにRPE細胞内での遺伝子発現の変動を解析した。

### 実験方法

培養細胞はhuman primary RPE (passage 4)、培養液は15% Fetal bovine serum (FBS) を加えた Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)、Plateはコラーゲンコート24well plateを用いて、1wellあたり $2.5 \times 10^4$  cells/0.5

mL medium/wellとなるように播種した。培養温度は37度、5%CO<sub>2</sub>下の条件で細胞培養を行った。m-RNAの発現解析には、human primary RPE細胞からtotal RNAを抽出し、DNase処理後、RT-PCRによってcDNAを作成した。これを更にPCR反応にて増幅し、このPCR溶液を1%アガロースゲルで電気泳動して発現確認を行った。また、REF-1タンパクはWestern Blotにてその発現を確認した。

次に、培養human primary RPE細胞に、REF-1を添加することによって、成長因子とサイトカイン分泌に変動が認められるかを明らかとするために、ELISA kitを用いてその確認を試みた。

更に、培養開始2目のhuman primary RPE (passage 4) 細胞に、REF-1を添加し、6時間、12時間、24時間後毎にtotal RNA isolation kit (RNA-Bee-RNA Isolation Reagent; Tel-Test, Friendswood, TX) を用いてtotal RNAを抽出し、DNase処理後、このRNAを用いて、マイクロアレイによる遺伝子の発現解析を行った。今回、遺伝子の発現解析には、Applied Biosystems 1700 (AB1700) Chemiluminescent Microarray Analyzerを用いた。また、検出されたREF-1処理と未処理のデータ

間の比較には、Celera Discovery System (Applied Biosystems) を用いて解析を行った。

## 結 果

RPE細胞の1 wellに播種する密度を変化させることによって、RPE細胞の増殖率に変化のあることがわかった。今回の実験では、24wellのコラーゲンコートプレートの1wellに播種する密度を $2.5 \times 10^4$ 細胞とすることで、最も高い増殖率を得られることが分かった。

また、human primary RPE 細胞中にREF-1が存在するのかを明らかとするために行ったRT-PCRと Western blot による確認の結果では、RT-PCRでRPE細胞のtotal RNA中にREF-1のm-RNAの発現を確認することができた。しかし、Western blotの結果では、REF-1のタンパクの発現を確認することはできなかった。

次に、培養細胞にREF-1を加え、無血清培地で2日間培養後、培養上清液を用いて11の成長因子とサイトカインの測定を行った結果は、REF-1を添加することによって、TGF- $\beta$ 1で4.7倍、GM-CSFで2.4倍の分泌上昇が認められた。またbFGF, IL-6, IL-8, M-CSFでは、わずかな分泌上昇を認めた。そして、今回TGF- $\beta$ 2, IL-1 $\beta$ , G-CSF, TNF- $\alpha$ , EGFを検出することはできなかった。

更に、培養開始2日目にREF-1を添加した後、各6,12,24時間におけるREF-1処理、未処理の検体(n=6)毎にハイブリダイゼーションを行ったマイクロアレイ(シグナルの検出は33,096の全遺伝子で行った。遺伝子の発現はバックグラウンドに比較して、シグナル強度が3倍以上示すものとした。)による遺伝子発現解析の結果は、REF-1処理を行ったものでは10,773の遺伝子の発現を認め、REF-1処理を行わなかったものでは2,186の遺伝子の発現を認めた。また、今回REF-1処理を行わなかったRPE細胞での遺伝子の発現量に対するREF-1処理を行った

RPE細胞における遺伝子の発現量の比(Ratio)を取り、遺伝子発現の変動パターンについてもOmniViz data mining softwareを用いてクラスター解析を試みた。その結果、全遺伝子の時間ごとの発現パターンを38のクラスターに分けたときに、各時間の発現遺伝子に明らかな変化のあることが分かった。

## 考 察

RPE細胞密度によって、その増殖率に変化はあるが、REF-1を添加することによって、human primary RPE 細胞の増殖を促進することがわかった。そして、RPE細胞でREF-1が独自に供給されているかについては、今回のWestern Blotの結果においてREF-1のタンパクの発現を確認するまでに至らなかったため、明らかではないが、このタンパクの生成に至るためには、RPE細胞中で発現の認められたm-RNAに何らかの特異的な要因が必要なのかもしれない。また、RPE細胞の増殖に関与する他の増殖因子とサイトカインのREF-1添加後の変動について検討を行った結果では、有意にTGF $\beta$ 1の分泌上昇が認められた。我々は、REF-1の処理によって、急速な増殖過程にあるRPE細胞の増殖を調節もしくは抑制するためにTGF $\beta$ 1の分泌上昇が、生じているのではないかと考えた。そして、なぜ骨髄細胞系の増殖因子であることが知られているGM-CSFの分泌が上昇したのかについては、今回得られたマイクロアレイの結果解析とともに他の成長因子やサイトカインも含め調査、検討を継続して進めたいと思う。

## 参考文献

Tanaka Y, et al. Purification, Molecular Cloning, and Expression of a Novel Growth-Promoting Factor for Retinal Pigment Epithelial Cells, REF-1/TFPI-2. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:245-252

# III. 分担研究報告書

## 若年性家族性網膜黄斑変性カニクイザル家系の維持と 繁殖供給システムの構築

分担研究者 寺尾恵治（国立感染研・筑波霊長類センター）  
研究協力者 鈴木通弘（社団法人・予防衛生協会）

### 研究要旨

遺伝性若年性網膜黄斑変性カニクイザル家系の維持と繁殖供給システムの構築を目的として、同家系の子孫で現存するカニクイザル第二、第三世代について黄斑部の眼底検査を実施し、あらたに黄斑変性症を発症した個体の確認調査を行った。その結果、第二世代の13頭（雄2頭、雌11頭）とその子孫の第三世代の10頭（雄7頭、雌3頭）に軽度から重度の黄斑変性が認められ、総計23頭（雄9頭、雌14頭）の発症個体が存在することが明らかとなった。第二世代の雌ザルはすべて繁殖能力を有しており、年齢も10歳から13歳と繁殖適齢期にある。一方で、第二世代の雄ザルはいずれも繁殖行動に問題があり、第二世代の雄ザルを用いた疾患個体の繁殖は困難と判断した。本疾患は常染色体上の優性遺伝形質により支配されていると推測されており、繁殖効率を考慮すれば疾患雄ザルを核にしたコロニー維持と疾患個体の供給が最も妥当な戦略である。第三世代の雄ザルは5歳未満の個体が大半であり、今後繁殖能力を検討した上でコロニー維持の核となる雄個体を選抜する必要がある。

キーワード:カニクイザル、網膜黄斑変性症、  
遺伝性疾患モデル、家系調査

### A. 研究目的

国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センターで見いだされた若年性網膜黄斑変性家系は、ヒトの加齢性網膜黄斑変性症の発症機序および治療法、予防法の開発に有用なモデル動物と考えられている。実験用サル類における家族性（遺伝性）の疾患モデルは内外できわめて少なく、本家系が貴重な研究用リソースであることから、本家系を適正に維持し、発症個体を安定的に繁殖・供給するシステムの構築は緊急の課題である。本研究は、疾患個体の安定的な供給体制を確立することを最終目的として、今年度は現存する疾患発症個体を確認するとともに、疾患個体を繁殖母群とした最も効率のいい繁殖システムを構築するための基礎検討をおこなった。

### B. 研究方法

国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センターで維持されている網膜黄斑変性家系のうち、現存する44頭のカニクイザル（雄18頭、雌26頭；第二、第三世代；1-15歳）について、眼底観察による網膜黄斑部の調査を行った。飼育環境は、室温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、オールフレッシュエア-供給方式、換気回数10回/時、人工照明時間14時間/日に設定された屋内の清浄環境である。飼料としては、よく洗浄されたリンゴを午前各100g、サル用固型飼料(AS型、オリエンタル酵母株式会社)を午後70g給与し、水は水道水を自動給水装置により自由摂取させた。母ザルによる哺育は出生日からとし、約15週齢で離乳した。

眼底観察および撮影の20分ほど前にトロピカミド・塩酸フェニレフリン(ミドリnP, 参天製薬株式会社)を動物の両眼に1-2滴滴下した。散瞳後に、塩酸ケタミン(ケタラー



ル50, 三共製薬株式会社)の10mg/kg(体重)を筋肉内に投与して全身麻酔し, 携帯用眼底カメラ(RC-2, 興和株式会社)により眼底の観察・記録を行った。普通撮影時は国産カラーフィルム(Fujichrome ASA 100, 富士フィルム株式会社)を用いた。

病変部の症状の程度は以下の基準で評価した。

正常: 両眼の黄斑部に異常が認められない

軽度: 両眼の黄斑部に非常に細かい灰白色から黄白色の斑点が約20ヶ認められるもの

中度: 両眼の黄斑部に非常に細かい灰白色から黄白色の斑点が20から50ヶ認められるもの

重度: 両眼の黄斑部に非常に細かい灰白色から黄白色の斑点が50ヶ以上認められるもの

### C. 研究結果および考察

#### 1. 疾患家系に属する個体の眼底観察:

表1に疾患家系の子孫(第二世代、第三世代)51頭について眼底観察を行った結果を示す。第二世代の雌ザルはいずれも繁殖群に所属しており、年齢も10-16歳と繁殖適期にある。第三世代の個体はすべて第二世代の雌ザルから生まれた個体である。今回調べた個体はこれまでの眼底観察結果から発症が確認されている個体が大半であり、今回の調査でも病変部を確認することができ、これまでの常染色体上の優性遺伝形質による支配の仮説を支持する結果が得られた。すなわち、発症雌ザルと正常雄ザルとの交配により約1/2の確率で発症個体が出現している。

一方、病変部の症状(軽度、中度、重度)と年齢との関係を第二世代でみると、

重度: 14歳1頭

中度: 16歳1頭、12歳3頭(平均13歳)

軽度: 14歳1頭、13歳1頭、11歳3頭、10歳2頭(平均11歳)

第三世代でみると

中度: 3歳、4歳、5歳各1頭(平均4歳)

軽度: 2歳2頭、3歳3頭、5歳1頭、8歳1頭(平均4歳)

といずれも加齢に伴い重症化する可能性

について明確な結果は得られなかった。このことから、次世代繁殖用疾患個体の選抜に際しては、症状を考慮する必要があると判断される。

#### 2. 生存個体を用いた繁殖・供給システムの確立:

本疾患は常染色体上の優性遺伝形質により支配されている可能性が高いことから、疾患遺伝子の維持と疾患個体の供給を目的とした繁殖コロニーの作出と繁殖システムの確立では、疾患遺伝子を保有している雄ザルを繁殖用として正常雌ザルとの交配を行うのが最も効率が良い。霊長類センターでは1頭の繁殖用雄ザルは年間平均48頭の雌ザルと交配している。これに対して、最も繁殖能力の高い雌ザルでも2年間で1頭以上の出産は不可能である。繁殖能力のある疾患雄ザルを2頭確保することができれば、年間100頭弱の雌ザルとの交配が可能であり、平均妊娠率を30%、3歳までの育成率を90%としても

$100 \text{ 頭} \times 0.3 = 30 \text{ 頭} \times 0.9 = 27 \text{ 頭}$   
の3歳齢カニクイザルを得ることが可能である。このうち半数が疾患個体と考えられるので、この方式により年間13-15頭の疾患個体の供給が可能となる。

前述したように、変性の程度を考慮して次世代繁殖用雄ザルを選抜する必要があるため、第三世代で中度の変性疾患を示す2頭の雄ザル(1320107074; 3歳、1320009086; 4歳)を次世代繁殖候補とした。これらのサルが繁殖活動を開始するまでに2-3年が必要となるので、その間現時点で繁殖能力が確認されている第二世代の9歳雄(軽度; 1229402027)および第三世代の7歳雄(軽度; 1329602007)を活用し、繁殖コロニーの確立をはかる。本年度は、これら2頭の雄サルの交配により、6頭の妊娠を得た。このうち、2頭については現在も妊娠中である。残りの4頭中1頭は死産、1頭は生後1ヶ月以内に死亡、現在2頭が育成中となっている。

一方、原因遺伝子がホモの個体は本疾患の遺伝支配を解析する上で有用と考えられるので、第二世代の繁殖可能な1頭の雄ザルと9頭の疾患雌ザルとの交配を開始し、ホモ個体の作出を試みる予定である。

## E. 結論

筑波霊長類センターで維持している若年性網膜黄斑変性カニクイザル家系の総計 51 頭について眼底観察により黄斑変性の有無を調査した。その結果、第二世代 13 頭およびその子孫である第三世代 10 頭の合計 23 頭が疾患遺伝子を保有していることが明らかとなった。

疾患遺伝子を保有する 2 頭の雄ザルを繁殖に使用し、6 頭の妊娠例を作出、2 頭の育成仔を得ることに成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Umeda S, Ayyagari R, Allikmets R, Suzuki MT, Karoukis AJ, Ambasadhan R, Zernant J, Okamoto H, Ono F, Terao K, Mizota A, Yoshikawa Y, Tanaka Y, Iwata T. Early-Onset Macular Degeneration with Drusen in a Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Pedigree: Exclusion of 13 Candidate Genes and Loci. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Feb;46(2):683-691.

## G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表1:筑波霊長類センターで維持している網膜黄斑変性カニクイザル家系

発症個体

F1父ザル	F1母ザル	F2母ザル	左眼底所見	右眼底所見	F3ザル	左眼底所見	右眼底所見
1128102041	1118008172	1218812112	中度	中度	1310403044	観察不可	観察不可
					1310211157	正常	正常
					1329602007	軽度	軽度
					1319912107	軽度	軽度
1128102041	1117810028	1219005069	重度	重度	1320502012	観察不可	観察不可
					1310008039	正常	正常
					1320107074	中度	中度
					1320212189	正常	正常
1320401007	観察不可	観察不可					
1128102041	1118011295	1219108141	軽度	軽度	1310305081	正常	正常
1128201004	1118710147	1219307101	軽度	軽度	1310412152	観察不可	観察不可
					1310311132	観察不可	観察不可
					1320209111	軽度	軽度
					1310106057	軽度	軽度
1128203083	1118303087	1219210225	中度	中度	1320405082	観察不可	観察不可
					1320211158	正常	正常
					1320108093	軽度	軽度
					1320007058	観察せず	観察せず
1128203083	1118508113	1219208127	中度	軽度	1310412156	観察不可	観察不可
					1320010091	軽度	軽度
					1310203037	正常	正常
					1310309105	観察不可	観察不可
1128203083	1117908061	1219303032	軽度	軽度	1320401011	観察不可	観察不可
1320210148	正常	正常					
1128203083	1118405041	1219210218	中度	中度	1320009088	中度	中度
					1319907042	中度	中度
					1320310128	観察不可	観察不可
1128210271	1118306158	1219211251	軽度	軽度	1310310127	観察不可	観察不可
					1320207092	軽度	軽度
					1320107081	正常	正常
					1310005037	正常	正常
1128210271	1118303087	1229402027	軽度	軽度	1220410021	観察不可	観察不可
					1310009079	正常	正常
		1329602007	軽度	軽度	1320412148	観察不可	観察不可
1128210271	1118309232	1219509146	正常	正常	1310209108	正常	正常
					1320309106	正常	正常
1128210271	1118209244	1219307108	軽度	軽度			
1128210271	1118001006	1219801007	正常	正常			
1128210271	1118510137	1219410173	軽度	軽度			
1128102041	1118008172	1229005071	重度	重度			
1128102041	1117904026	1229011128	軽度	軽度			

## 質量分析による疾患組織及び血漿の組成解析

分担研究者 西村 俊秀 東京医科大学臨床プロテオームセンター教授

研究要旨：加齢性黄斑変性の疾患マーカー蛋白質(群)を同定するため、その患者より採取した血漿に対してプロテオーム定量解析を行っている。血清アルブミンとIgGを除去したのち、残った血漿総タンパク質をトリプシンによって加水分解し、ペプチド混合物を液体クロマトグラフィー/質量分析装置(LC-MS)によって測定した。黄斑変性6例、対照の白内障6例において、加水分解前のSDS-PAGEによる比較では顕著な相違は見られなかった。LC-MSにおいてもベースピーククロマトグラムでは顕著な差が見られず、現在はLC-MS用の定量解析ソフトを用いてより詳細な解析を行っている。

### A. 研究目的

加齢性黄斑変性は欧米先進国で多く見られ我が国でも患者数が増加している。しかし確実な治療法はなく早期発見・早期治療が重要とされている。そこで血漿中より黄斑変性特異的に変動する蛋白質を見出すことにより、ヒト加齢性黄斑変性発症を早期診断できる蛋白質マーカーを探索する事は有用である。また黄斑は霊長類や鳥類で発達しており、実験動物のラットやマウスなど夜行性ゲツ歯類にはないため、加齢黄斑変性のモデル動物は見いだされていず、その発症過程はいまだ解明されていない。然しながら、最近になり国立感染症研究所筑波霊長類センターにおいてカニクイザルで若年性黄斑変性を発見した。その疾患部である網膜色素上皮細胞であるブルッフ膜に蓄積物(ドルーセン)の分析組成がヒトのそれと類似していることを見出している。このモデル動物は、ヒトの加齢性黄斑変性の発現機構を解明し、今まで対処法がなかった治療の実現に世界的にも貴重である。

本分担研究では、患者血漿を用い黄斑変性において血漿に反映される特異的蛋白質を見出すことにより、ヒト加齢性黄斑変性発症を早期診断できる蛋白質マーカーを探索することを目的とする。また、黄斑変性の発現機構を解明する目的で黄斑変性を発症していないカニクイザルの黄斑部位の試料をコントロールとして用い、黄斑変性により形成されたドルーセンに含まれる低存在量蛋白質を含めたプロテオーム解析研究を行う。

### B. 研究方法

血漿中から黄斑変性関連タンパク質を同定する

方法として、血漿の大部分を占める血清アルブミンおよび免疫グロブリンG(IgG)を解析前に除去する手順を採った。これによって低存在の多様な蛋白質群の定量及び同定解析が期待できる。対照として背景の似た類似の眼疾患である白内障患者の血漿を用いた。検出したペプチドからの蛋白質同定には SEQUEST 及び MASCOT などの検索エンジンを用い、ヒト蛋白質を中心としたデータベースを検索し同定する。ドルーセン蓄積分子類を同定する方法として1)パラフィン固定された既存試料による解析手法の検討、2)新たに若年性黄斑変性カニクイザルからフレッシュのままドルーセン部位を剥離し、これから蛋白質を抽出して、SDS-PAGEによりドルーセン特異的な蛋白質バンドの有無の検討、及び可溶性抽出蛋白質を全消化してペプチド混合物とし液体クロマトグラフィーを中心とした分離分画系とタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いて検出を行う。

本年は、アルブミン、IgG除去血漿を用いた黄斑変性患者のLC-MS/MS測定を行った。

### C. 研究結果

現在までに加齢性黄斑変性16例、白内障12例の血漿を入手している。このうち年齢を比較的揃えた各6例(表1)について測定を行った。血漿よりアルブミン、IgGを除去した試料のSDS-PAGE(図1)では個人差は見られたものの群間で顕著な差異は見られなかった。つぎにLC/MS/MSにて各ペプチドおよびそれらのプロダクトイオンの $m/z$ 値を測定した(図2)。得られたデータをSWISS-PROTデータベースに対して検索したところAngiotensinのシグナルが白内障特異的に検出

された。現在このシグナルが有意かの確認を行っている。

表1 血漿試料

試料番号	疾患名	年齢	性別
A01	黄斑変性	73	女性
A02	黄斑変性	79	女性
A04	黄斑変性	74	女性
A14	黄斑変性	74	男性
A15	黄斑変性	73	男性
A16	黄斑変性	65	男性
C01	白内障	70	男性
C02	白内障	74	女性
C03	白内障	84	女性
C05	白内障	88	男性
C10	白内障	69	男性
C12	白内障	62	女性

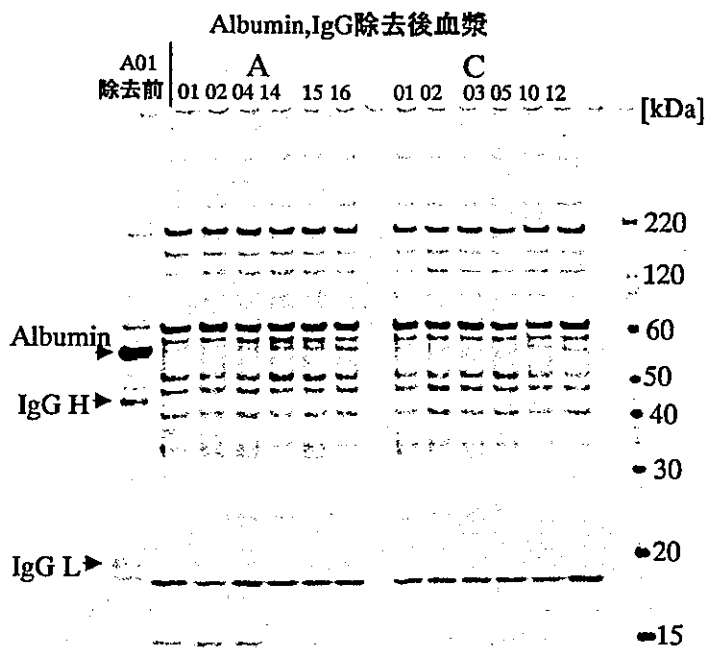


図1 血漿試料の電気泳動像

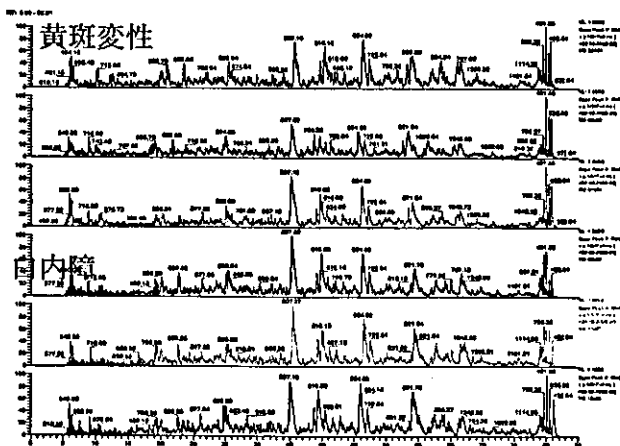


図2 黄斑変性と白内障血漿のベースピーク

ロマトグラム (各々代表的な3試料のみ示した)

#### D. 考察

今回は黄斑変性で特異的に上昇するシグナルは検出されていない。現在、得られたシグナルについて解析ソフトを用いた詳細な定量解析を行っている。これにより黄斑変性特異的なシグナルが検出される事が期待される。

また測定方法についても多次元液体クロマトグラフィーを用いることでより高感度の測定が行え、より多くの蛋白質を同定することが期待される。

#### E. 結論

本年は黄斑変性特異的蛋白質の検出を行う目的で患者血漿の測定を行った。継続して解析中ではあるが白内障と比べ差のある蛋白質が検出されている。さらに詳細な解析を行うことで黄斑変性特異的蛋白質の検出が期待される。さらに高感度な測定を行うため多次元液体クロマトグラフィーを用いた測定も計画している。本分担研究のもう一つ目的であるドルーセン物質の同定、ドルーセン領域のプロテオーム解析は一部昨年度報告しており、現在も平行して進行中である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nishimura T, Ogiwara A, Fujii K, Kawakami T, Kawamura T, Anyouji H, Kato H. (2005) Disease proteomics toward bedside reality. *J. Gastroentrol.* 40[Suppl XVI]: 7-13.

Fujii K, Nakano T, Kanazawa M, Akimoto S, Hirano T, Kato H, Nishimura T. (2005) "Clinical-scale high-throughput human plasma proteome analysis: Lung adenocarcinoma", *Proteomics* 5:1150-59.

Matsumoto M, Hatakeyama S, Oyamada K, Oda Y, Nishimura T, and Nakayama K. (2005) "Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome", *Proteomics* 5: in press.

Nishimura T. (2004) "Proteomics and its role in drug discovery and development", *Seikagaku.* 76:1344-52.

Kawakami T, Tateishi K, Yamano Y, Ishikawa T, Kuroki K, Nishimura T. (2005) "Protein identification from product ion spectra of peptides validated by correlation between measured and predicted elution times in liquid chromatography/mass spectrometry", *Proteomics* 5: 856-64.

Fujii K, Nakano T, Hike H, Usui F, Bando Y, Tojo H, Nishimura T. (2004) "Fully automated online multi-dimensional protein profiling system for complex mixtures", *J Chromatogr A* **1057**:107-13.

Fujii K, Nakano T, Kawamura T, Usui F, Bando Y, Wang R, Nishimura T. (2004) "Multidimensional protein profiling technology and its application to human plasma proteome", *J Proteome Res.* **3**:712-8.

Tanaka Y, Kanai F, Kawakami T, Tateishi K, Ijichi H, Kawabe T, Arakawa Y, Kawakami T, Nishimura T, Shirakata Y, Koike K, Omata M. (2004) *Biochem Biophys Res Commun.* **318**:461-9

Kawakami T, Nagata T, Muraguchi A, Nishimura T. (2003) "Proteomic approach to apoptotic thymus maturation", *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **787**:223-9.

## 2. 口頭発表

川上隆雄 (2004) プロテオミクスの解析技術と臨床応用、第 14 回生物試料分析科学大会、神戸国際会議場、1 月 24-25 日

藤井清永、中野智世、川村猛、碓井史彦、板東泰彦、Rong Wong、西村俊秀 (2004) ヒト血漿のプロテオーム解析法に関する研究 (2) off-line 2D- $\mu$ LC/NSI-MS/MS システムの構築と応用、第 52 回質量分析総合討論会、6 月 2 日-4 日、名古屋市工業研究所

藤井清永、中野智世、碓井史彦、板東泰彦、西村俊秀 (2004) ヒト血漿のプロテオーム解析法に関する研究 (3) on-line 2D- $\mu$ LC/NSI-MS/MS システムの構築と応用、第 52 回質量分析総合討論会、6 月 2 日-4 日、名古屋市工業研究所

藤井清永、中野智世、碓井史彦、板東泰彦、西村俊秀 (2004) 超高速タンパク質プロファイリングシステムの構築と臨床応用、第 52 回質量分析総合討論会、6 月 2 日-4 日、名古屋市工業研究所

Kawakami T, Tateishi K, Nishimura T. (2004) Protein identification from tandem mass spectra of peptides validated by prediction of the retention times in liquid chromatography/mass spectrometry. The 52<sup>nd</sup> Conference of American Society for Mass Spectrometry and Allied Topics (ASMS), Nashville Tennessee USA.

Fujii K, Nakano T, Usui F, Bando Y, Nishimura T. (2004) Fast comprehensive multi-dimensional proteome analysis using 2D-microLC/nanoESI-MS/MS for highly complexed mixture. The 52<sup>nd</sup> Conference of American Society for Mass Spectrometry and Allied Topics (ASMS), Nashville Tennessee USA.

Nishimura T. Prologue to Proteomics Research. BioMass Spectrometry Conference, July 4 - 7, 2004, Fukui.

Kawakami T, Ogiwara A, Anyouji H, Kanazawa M, Akimoto S, Hirano T, Kato H, Nishimura T., Multi-dimensional quantitative protein profiling for clinical proteomics: Metastasis factors in early lung Adenocarcinoma. The 1<sup>st</sup> Human Disease Glycomics/Proteome Initiative (HGPI) Workshop ("Functional Glycomics in Disease", Aug. 23 -24, 2004, Osaka, Japan.

The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, Aug. 28-30, 2004, Tokyo, Japan.

The 49<sup>th</sup> Annual Conference of the Japanese Society of Human Genetics, Oct. 13-15, 2004, Tokyo, Japan.

Nishimura T. Clinical-scale quantitative protein profiling of cancer tissues. The 17<sup>th</sup> Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2004), Industrial Application of Animal Cell Technology, Nov.15-18, 2004, Nagoya, Japan

## 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

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
西村俊秀、秋元信吾	副作用マーカー探索のための proteomics	鎌滝哲也	癌治療と宿主特集：癌治療におけるファーマコジェノミクス	メディカルレビュー	東京	2004	321-330
川村 猛、西村俊秀	蛋白質のプロファイリングと同定	戸田年総 平野 久 伊藤喜久	臨床検査増刊号 プロテオミクスに向かう臨床蛋白質検査	医学書院	東京	2003	1215-1224
川上隆雄、西村俊秀	プロテオーム解析のための基礎	丹羽利光	ポストゲノム・マスペクトロメトリー(生化学のための生体高分子解析)	化学同人	京都	2003	99-114

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishimura T, Ogiwara A, Fujii K, Kawakami T, Kawamura T, Anyouji H, Kato H.	Disease proteomics toward bedside reality.	J. Gastroentrol.	40 [Suppl XVI]	7-13	2005
Fujii K, Nakano T, Kanazawa M, Akimoto S, Hirano T, Kato H, Nishimura T.	Clinical-scale high-throughput human plasma proteome analysis: Lung adenocarcinoma	Proteomics	5	1150-59	2005
Kawakami T, Tateishi K, Yamano Y, Ishikawa T, Kuroki K, Nishimura T.	Protein identification from product ion spectra of peptides validated by correlation between measured and predicted elution times in liquid chromatography/mass spectrometry	Proteomics	5	856-64	2005
Fujii K, Nakano T, Hike H, Usui F, Bando Y, Tojo H, Nishimura T.	Fully automated online multi-dimensional protein profiling system for complex mixtures	J Chromatogr A	1057	107-13	2004
Fujii K, Nakano T, Kawamura T, Usui F, Bando Y, Wang R, Nishimura T.	Multidimensional protein profiling technology and its application to human plasma proteome	J Proteome Res.	3	712-8	2004
Tanaka Y, Kanai F, Kawakami T, Tateishi K, Ijichi H, Kawabe T.	Interaction of the hepatitis B virus X protein (HBx) with heat shock protein 60 enhances	Biochem Biophys Res Commun.	318	461-9	2004

Arakawa Y, Kawakami T, Nishimura T, Shirakata Y, Koike K, Omata M.	HBx-mediated apoptosis				
川上 隆雄、安養寺 久栄、西村 俊秀	プロテオームの定量・同定解析のためにナノ液体クロマトグラフィー/ナノエレクトロスプレーイオン化/イオントラップ質量分析装置を使う	質量分析	51(1)	79-82	2003
Kawakami, T., Nagata, T., Muraguchi, A., Nishimura, T.	Proteomic approach to apoptotic thymus maturation	<i>J. Chromatogr. B</i>	787	223-229	2003
西村俊秀、荻原淳	プロテオーム解析技術の現在と展望 (方法論)	MEDICO	34	169-173	2003
西村俊秀	プロテオミクスからの創薬	現代医療	35(7)	1685-1691	2003
Nishimura, T.	疾患関連蛋白質を如何に探るか?	Japanese Journal of Lung cancer	43(5)	466	2003



## REGULAR ARTICLE

# Clinical-scale high-throughput human plasma proteome analysis: Lung adenocarcinoma

Kiyonaga Fujii<sup>1</sup>, Tomoyo Nakano<sup>1</sup>, Mitsuhiro Kanazawa<sup>3</sup>, Shingo Akimoto<sup>3</sup>, Takashi Hirano<sup>2</sup>, Harubumi Kato<sup>2</sup> and Toshihide Nishimura<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Clinical Proteome Center

<sup>2</sup> Department of Surgery, Tokyo Medical University, Shinjuku, Tokyo, Japan

<sup>3</sup> Medical ProteoScope Co., Ltd., Shinjuku, Tokyo, Japan

Clinical proteomics requires the stable and reproducible analysis of a large number of human samples. We report a high-throughput comprehensive protein profiling system comprising a fully automated, on-line, two-dimensional microflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2-D  $\mu$ LC-MS/MS) system for use in clinical proteomics. A linear ion-trap mass spectrometer (ITMS) also known as a 2-D ITMS instrument, which is characterized by high scan speed, was incorporated into the  $\mu$ LC-MS/MS system in order to obtain highly improved sensitivity and resolution in MS/MS acquisition. This system was used to evaluate bovine serum albumin and human 26S proteasome. Application of these high-throughput  $\mu$ LC conditions and the 2-D ITMS resulted in a 10-fold increase in sensitivity in protein identification. Additionally, peptide fragments from the 26S proteasome were identified three-fold more efficiently than by the conventional 3-D ITMS instrument. In this study, the 2-D  $\mu$ LC-MS/MS system that uses linear 2-D ITMS has been applied for the plasma proteome analysis of a few samples from healthy individuals and lung adenocarcinoma patients. Using the 2-D and 1-D  $\mu$ LC-MS/MS analyses, approximately 250 and 100 different proteins were detected, respectively, in each HSA- and IgG-depleted sample, which corresponds to only 0.4  $\mu$ L of blood plasma. Automatic operation enabled the completion of a single run of the entire 1-D and 2-D  $\mu$ LC-MS/MS analyses within 11 h. Investigation of the data extracted from the protein identification datasets of both healthy and adenocarcinoma groups revealed that several of the group-specific proteins could be candidate protein disease markers expressed in the human blood plasma. Consequently, it was demonstrated that this high-throughput  $\mu$ LC-MS/MS protein profiling system would be practically applicable to the discovery of protein disease markers, which is the primary objective in clinical plasma proteome projects.

Received: May 14, 2004  
Revised: October 13, 2004  
Accepted: November 15, 2004

**Keywords:**

Clinical Proteomics / Human plasma / Linear ion-trap mass spectrometry / Lung adenocarcinoma / Plasma proteome

**Correspondence:** Professor Toshihide Nishimura, Professor of Clinical Proteome Center, Tokyo Medical University, 2-6-1, Nishi-shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-0217, Japan  
E-mail: nisimura@tokyo-med.ac.jp  
Fax: +1-81-3-5321-6624

**Abbreviations:** ABC, ammonium bicarbonate; AID-HP, albumin- and IgG-depleted human plasma; IAM, iodoacetamide; Ig, immunoglobulin; ITMS, ion-trap mass spectrometry;  $\mu$ LC, microflow liquid chromatography; NSI, nanoelectrospray ionization; SCX, strong cation exchange; TCEP, tris[2-carboxyethyl]phosphine; TPX, methylpentene polymer

## 1 Introduction

Human blood plasma is generally the most informative proteome from a medical viewpoint, because it is the primary clinical specimen and it also represents the largest and deepest version of human proteome present in any sample [1–3]. Almost all body cells communicate with the plasma either directly or through tissues/biological fluids, and many of these cells release at least a part of their contents into the plasma upon damage or death. A comprehensive, systematic characterization of the plasma proteome in the healthy and



diseased states will greatly facilitate the development of biomarkers for early disease detection, clinical diagnosis, and therapy of cancer and other diseases. However, broad characterization of the human plasma proteome may pose one of the greatest challenges. This is because it can contain low-level proteins, which are secreted by solid tissues, as well as other important proteins (tissue leakage proteins at pg/mL levels) in the presence of several relatively dominant, high-abundance proteins (particularly HSA at 35–50 mg/mL). The dynamic range of plasma protein concentrations minimally spans nine orders of magnitude. For clinical and diagnostic proteomics using human plasma, it is essential to develop a comprehensive system, which has a high resolution and a wide dynamic range, for large-scale proteome analysis.

Recently, multi-dimensional LC-MS/MS has been developed as a powerful tool, particularly for comprehensive identification of highly complex proteins. This method can achieve a resolving power that is equal to or higher than 2-DE [4–6]. Broad protein identification techniques can detect specific proteins present in low concentrations in a highly complex protein matrix. To characterize the human plasma proteome, Smith *et al.* have achieved a protein identification dynamic range of more than eight orders of magnitude using 2-D LC combined with conventional ion-trap MS/MS instrumentation [6]. This approach has resulted in the identification of >800 plasma proteins from 5  $\mu$ L plasma without the depletion of highly abundant HSA and/or immunoglobulins (Ig). The multi-dimensional LC-MS/MS techniques reported thus far indicate the potential usefulness of broad protein identification with high resolution and wide dynamic range for cataloging the plasma contents. However, these approaches require further improvement in terms of both ease of use and industrial applicability to routine clinical use, because their application to clinical research requires stable and reproducible analyses of a large number of human samples.

The establishment of a simple, robust, and high-throughput protein profiling system as a global platform is extremely important from the viewpoint of clinical proteomics. This is because a large number of human tissue/biological fluid samples could then be quantitatively analyzed, in a routine and reproducible manner, for expressed proteins. Such a system would help discover any protein that is significantly associated with a specific disease status. We have constructed a technically well integrated and high-throughput LC-MS/MS system with RP microflow LC ( $\mu$ LC) and a conventional ion-trap MS/MS equipped with a nanoelectrospray ionization (NSI) interface to detect lung cancer biomarkers and to analyze apoptotic mechanisms [7, 8]. Additionally, the system has been combined with on- or off-line strong cation-exchange (SCX) chromatography to result in a multi-dimensional protein profiling system. This protein profiling system using off-line 2-D SCX/RP  $\mu$ LC-MS/MS was successfully applied to broad protein identification of human plasma proteins [9]. We have also established protein depletion, in-solution digestion, and data-integrating/mining sys-

tems with an automated operation for large-scale human plasma proteome analysis.

The dynamic range and sequence coverage that results from protein identification by LC-MS/MS analysis depends on both the quality of the separation(s) applied and the MS platform [6]. When resolution performance is not considered, the quality of the 2-D LC is substantially related to the number of fractionation steps for the first dimension chromatography and the analytical running time for the second dimension chromatography. Since the dynamic range of the MS platform is based on the performance of the instrument used, the number of the MS/MS acquisition in one run strictly depends on both the scan speed and the analytical time required by the LC-MS/MS analysis. Recently, linear ion-trap MS/MS (2-D ITMS) instruments with a higher scan speed and sensitivity than conventional 3-D ITMS instruments have emerged as new generation instruments. Therefore, we applied the new 2-D ITMS instrument to the fully automated on-line 2-D  $\mu$ LC-MS/MS system developed by us [10].

In this study, we evaluated the performance of the  $\mu$ LC-MS/MS system using the 2-D ITMS instrument for extending the sensitivity, dynamic range, and coverage for comprehensive protein identification. BSA and human 26S proteasome were used as the authentic protein sample and the protein complex sample, respectively. The system, together with the on-line 2-D  $\mu$ LC-MS/MS system, was then applied to proteome analysis of human plasma; HSA- and IgG-depleted samples were obtained from a few healthy individuals and lung adenocarcinoma cases.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Materials

HPLC-grade ACN, formic acid, and TFA were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Milli-Q grade water (Millipore, Bedford, MA, USA) was used. BSA, ammonium formate, ammonium bicarbonate (ABC), and iodoacetamide (IAM) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Human 26S proteasome (PW9310) was obtained from Affiniti Research Products (Devon, UK). Tris[2-carboxyethyl]phosphine (TCEP) was purchased from Pierce (Rockford, IL, USA). Sequencing grade-modified trypsin was purchased from Promega (Madison, WI, USA).

### 2.2 Preparation of the digested BSA and human 26S proteasome samples

BSA (1 nmol) was diluted with 225  $\mu$ L ABC (aq., 100 mM); then, 12.5  $\mu$ L TCEP (10 mM) was added for reduction and the solution mixture was kept at 37°C for 45 min. Further, 12.5  $\mu$ L IAM (50 mM) was added, and the solution mixture was alkylated in the dark at 24°C for 1 h. The resulting solution was digested with trypsin (trypsin:protein = 1:50, w/w),

and the resultant 250  $\mu\text{L}$  solution was incubated in the dark at 37°C for 15 h. In-solution digestion of the 26S proteasome sample was carried out as follows: 26S proteasome sample (50  $\mu\text{g}$ ) was diluted with ABC (aq., 50 mM) containing 10% v/v ACN to a final volume of approximately 190  $\mu\text{L}$ . For reduction, 2.5  $\mu\text{L}$  TCEP (10 mM) was added, and the solution mixture was kept at 37°C for 45 min. Subsequently, 2.5  $\mu\text{L}$  IAM (50 mM) was added, and the solution mixture was alkylated in the dark at 24°C for 1 h. For digestion, trypsin (2  $\mu\text{g}$ ) was added to 5  $\mu\text{L}$  ABC (50 mM), and 200  $\mu\text{L}$  of the resulting solution was incubated in the dark at 37°C for 18 h. All reactions were performed in methylpentene polymer (TPX) microtubes (Hitech Inc. Tokyo, Japan) using an Eppendorf thermomixer R (Brinkmann, Westbury, NY, USA) for 1.5 mL microtubes; the resulting solution was interval-mixed (10 s) at 850 rpm. The digested 26S proteasome sample (50  $\mu\text{L}$ ) was diluted with 125  $\mu\text{L}$  of 2% v/v ACN (aq.) containing 0.005% v/v TFA (aq.) after adjusting the pH to approximately 3 with 50  $\mu\text{L}$  of 1% v/v TFA (aq.); the samples (25  $\mu\text{L}$ ) were then injected into the  $\mu\text{LC-MS/MS}$  system described in this paper.

### 2.3 Sample preparation of the digested human plasma protein mixture

The human blood plasma samples treated with heparin were obtained from Tokyo Medical University (Tokyo, Japan) and acquired from three, healthy, anonymous, male donors (samples: H-N, H-I, and H-S) and two male donors who were diagnosed with adenocarcinoma on the basis of clinical and laboratory criteria (stage: IIIA, samples: AC88 and AC94), after obtaining their informed consent. HSA and IgG in the human plasma samples (500  $\mu\text{L}$ ) was removed by affinity adsorption chromatography using Bio-Rad's Affi-Gel Blue Gel and protein A column (Bio-Rad Hercules, CA, USA), respectively (details not shown). The final concentration of the resulting HSA- and IgG-depleted human plasma (AID-HP) samples were 4.1 (H-N), 8.6 (H-I), 6.6 (H-S), 5.8 (AC88), and 7.2 mg/mL (AC94) in ABC (25 mM). Subsequently, 100  $\mu\text{L}$  of the AID-HP sample was diluted with 400  $\mu\text{L}$  ABC (25 mM) containing 32% v/v ACN. For reduction, 25  $\mu\text{L}$  TCEP (50 mM) was added and the solution mixture was kept at 37°C for 45 min. Subsequently, 25  $\mu\text{L}$  IAM (250 mM) was added and the solution mixture was alkylated in the dark at 24°C for 1 h. For digestion, trypsin (5  $\mu\text{g}$ ) was added and the resulting solution (555  $\mu\text{L}$ ) was incubated in the dark at 37°C for 16 h. All these reactions were carried out using the Eppendorf thermomixer R for 1.5 mL TPX microtubes, and the mixing was carried out at 850 rpm with periods and intervals of 10 s each. For the 1-D  $\mu\text{LC-MS/MS}$  analysis, the digested AID-HP samples (20  $\mu\text{L}$ ) were diluted with 20  $\mu\text{L}$  of 1% v/v TFA (aq.) and 160  $\mu\text{L}$  with 2% v/v ACN (aq.) containing 0.1% v/v TFA, in a TPX auto sampler tube; 20  $\mu\text{L}$  of the resultant samples was injected into the system. In order to prepare individual mixture samples of the healthy and adenocarcinoma groups for 1-D and 2-D  $\mu\text{LC-MS/MS}$  analy-

ses, 33.3  $\mu\text{L}$  of each of the three AID-HP samples from the healthy group and 50  $\mu\text{L}$  of each of the two AID-HP samples from the adenocarcinoma group were mixed with 100  $\mu\text{L}$  of 1% v/v TFA (aq.), respectively; subsequently, 4  $\mu\text{L}$  of the resulting sample solutions was used in these analyses.

### 2.4 1-D RP and 2-D SCX/RP $\mu\text{LC-NSI-MS/MS}$ analyses

The 1-D and 2-D LC-MS/MS system with RP- $\mu\text{LC}$  comprised a Paradigm MS4 dual solvent delivery system (Michrom BioResources, Auburn, CA, USA) for HPLC, an HTS PAL auto sampler with two 10-port injector valves (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland), Finnigan LCQ Deca XP plus 3-D ion-trap, and Finnigan LTQ linear ITMS (Thermo Electron, San Jose, CA, USA) equipped with NSI sources (AMR Inc., Tokyo, Japan). Sample injection for the 1-D and 2-D  $\mu\text{LC-MS/MS}$  analyses as well as SCX separation for 2-D analysis were automatically carried out using the HTS PAL auto sample injection system with no change in the configurations. The SCX separation was performed on an SCX microtrap cartridge (12  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ , 8  $\times$  1.0 mm i.d., Michrom) by step-wise elution on the first injector valve. The solvent system containing 2% v/v ACN was composed of 0.005% v/v TFA (aq.) and 1 M ammonium formate (aq.) adjusted to pH 2.8 with TFA, and the elution solvents (25, 50, 100, 150, 200, and 500 mM) were prepared by mixing these. The effluent from all the SCX fractions was flowed serially into a peptide CapTrap cartridge (2.0  $\times$  0.5 mm i.d., Michrom), present on the second injector valve, for concentration and desalting. After desalting with 0.1% v/v TFA (aq.) containing 2% v/v ACN, the sample was loaded onto a capillary RP column, MAGIC C<sub>18</sub> (3  $\mu\text{m}$ , 200  $\text{\AA}$ , 50  $\times$  0.2 mm i.d., Michrom), for 2-D separation. Digested samples for the 1-D RP analysis were also injected directly into a peptide CapTrap cartridge for concentration and desalting and then applied to RP separation. Solutions of 2% and 90% v/v ACN (aq.) were used as the mobile phases A and B, respectively, and both contained 0.1% v/v formic acid. The gradient conditions in the chromatographic run were as follows: B 5% (0 min)  $\rightarrow$  65% (20 min) for the digested samples of BSA and 26S proteasome, and B 5% (0 min)  $\rightarrow$  40% (70 min)  $\rightarrow$  95% (80 min) for plasma samples. Effluent solvent at 1.0–1.2  $\mu\text{L}/\text{min}$  from the HPLC was introduced into the mass spectrometer by the NSI interface *via* an injector valve with a CapTrap cartridge and the RP column. The NSI needle (FortisTip, OmniSeparo-TJ, Iiyogo, Japan), which was connected directly to the RP column outlet, was used as the NSI interface and the voltage was 1.8 kV, while the capillary was heated to 200°C [11]. No sheath or auxiliary gas was used. Further, the mass spectrometer was operated in a data-dependent acquisition mode in which MS acquisition with a mass range of  $m/z$  450–2000 was automatically switched to MS/MS acquisition under the automated control of the Xcalibur software. The most intense ion of the full MS scan was selected as the parent ion and it was subjected to MS/MS scan with an isolation width of  $m/z$  2.0; the activation amplitude parameter

was set at 30%. For the human plasma samples, the full MS scan was acquired followed by two successive MS/MS scans of the two most intense precursor ions detected in the full MS scan. The trapping time was 100 ms under the auto gain control mode. Data was acquired using the dynamic mass-exclusion windows that had an exclusion of 3.0-min duration and exclusion mass widths of  $-0.5$  and  $+1.5$  Da.

## 2.5 Database searches

All MS/MS data were investigated using the Mascot search engine (Matrix Science, London, UK) [12] against the Swiss-Prot database. The data acquired for BSA digests were investigated against other mammalian subsets of the sequences. The MS/MS data of the human 26S proteasome and plasma samples were investigated against the *Homo sapiens* subsets of the sequences. The database searches allowed for fixed modification on the cysteine residue (carbamidomethylation, +57 Da), variable modification on the methionine residue (oxidation, +16 Da), peptide mass tolerance at  $\pm 2.0$  Da, and fragment mass tolerance at  $\pm 0.8$  Da.

## 3 Results and discussion

### 3.1 Evaluation of the $\mu$ LC-MS/MS analysis using the linear 2-D ITMS instrument

We developed the  $\mu$ LC-MS/MS system with RP separation (1-D RP), which corresponds to the second dimension separation for the on-line and off-line 2-D  $\mu$ LC-MS/MS system [9, 10]. This system comprises a microflow LC system with a variable splitter, a versatile auto-sampler equipped with an injector valve, and a LCQ 3-D (ITMS) with an NSI stage. A flow rate of 1.0–1.2  $\mu$ L/min via the injector valve and the RP column (0.2 mm i.d.) has been adopted as a convenient and efficient condition for routine proteome analysis with high sensitivity and reproducibility. The detection limit for identification of proteins in protein digests was approximately a few fmol. In order to evaluate the sensitivity of the new linear 2-D ITMS instrument (LTQ) for protein identification, we connected our RP  $\mu$ LC system to the LTQ instead of the conventional 3-D ITMS (LCQ) instrument. BSA digests (5–500 fmol) were applied to  $\mu$ LC-MS/MS analysis using the LTQ and LCQ instruments under identical conditions except those used for the mass spectrometer. The base-peak chromatogram for BSA digests (500 fmol) is shown in Fig. 1a. A comparison of the coverage, in terms of protein identification, between the LCQ and LTQ instruments revealed that 25% coverage of the BSA sequence was acquired from 5 fmol of the digests using the LTQ instrument, as shown in Fig. 2. Since the same coverage was obtained from 50 fmol of the digests using the LCQ instrument, the results indicated that the protein identification improved markedly as the sensitivity increased 10-fold using the LTQ instrument.

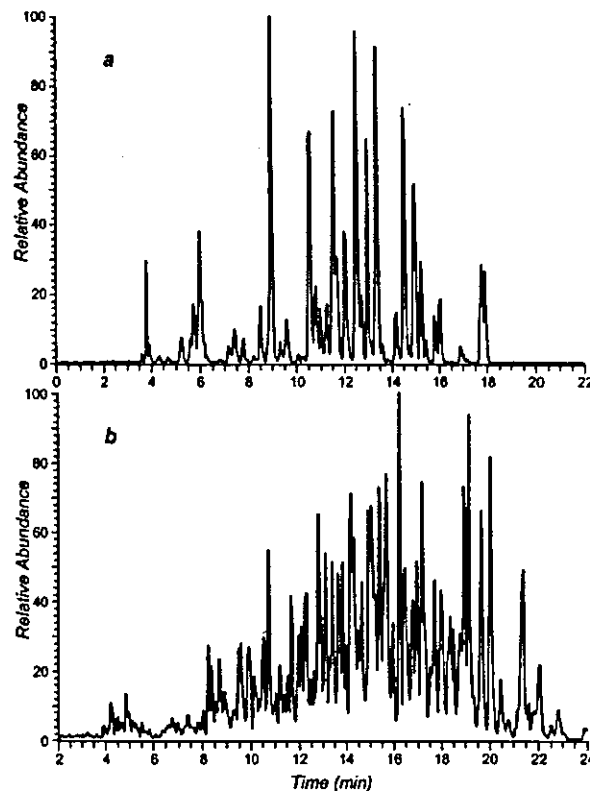


Figure 1. Base-peak chromatograms of the digested BSA (a) and 26S proteasome (b) using 1-D RP  $\mu$ LC-MS/MS analysis.

A dramatic improvement is achieved in the LTQ instrument in terms of the scan speed, which is higher than that of conventional 3-D ITMS instruments. Figures 3a and 3b show the expanded mass chromatograms with stick plotting at  $m/z$  values 710.0–711.5 obtained by  $\mu$ LC-MS/MS analysis of BSA digests using the LTQ and LCQ instruments, respectively. A stick in the peak represents a single full MS or MS/MS scan. The range denoted by the arrow in Fig. 3 shows that 62 events that carried out the acquisition of a full MS and an MS/MS spectra were achieved by the LTQ instrument in comparison with 12 events acquired by the LCQ instrument in 30 s. When conventional LCQ instruments are used, we usually apply three and two microscans for full MS (50 ms trapping time) and MS/MS (200 ms) accumulations, respectively, in order to obtain a better quality spectrum from a single scan. On the other hand, both spectra for peptide sequencing in protein identification were effectively acquired by one microscan of both full MS (50 ms) and MS/MS (100 ms) accumulations by LTQ instrument. As a result, using the LTQ instrument, it is possible to obtain an approximately five-fold higher number of MS/MS spectra in the same analytical run time.

In general, it is necessary to acquire a greater number of MS/MS spectra for the identification of a greater number of proteins using peptide sequencing. In studies where LC-MS/