

開発が期待できる。

今回の結果から、本研究で用いた手法が、エネルギー代謝系の調節に関わる生理活性ペプチドの探索において有用であることが確認された。今後、この手法により脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドの探索を進めることにより、メタボリックシンドロームの発症基盤としての肥満および脂肪細胞機能に關与する新たな生理活性因子の同定が期待できる。

#### D-4:高血圧、心循環器系疾患に關連する微量たんぱく質解析技術の確立

2次元目の逆相 HPLC として nanoLC の検討を行った。この方法では検出に一種の質量分析計しか使用できないが、高感度化が図れる。保持時間などの再現性に問題があるとされていたので検討を加えた結果、初回サイクルを除き、グラジエント終了時からのインジェクト時までの時間を一定に保ち、気泡混入を避けることにより、各ペプチドの保持時間もかなり安定することが確認された。保持時間精度が5回平均で1分以内には収まることが確認できたので、ステップ 2D-HPLC システムの2次元目(カラム:75 micron x 150 mm, 流速:300 nl/min, 60分直線濃度勾配溶出)に使用した。溶出液はマトリックスと混合後、20秒ごとにプレートにスポットした。分子量3000以下の脳ペプチドを対象とした結果では、数 $\mu\text{g}$ のペプチドの使用により1回の逆相 HPLC で30程度のペプチド構造解析が可能であることが分かった。心臓のペプチド画分で同様の実験を行った結果、脳よりペプチド含量が少ないために同定率は高くないが、ANPの断片ペプチド等を同定できた(ANPは分子量が大きく、分析対象に入っていない)。

たんぱく質解析例として、ラット脳よりペプチド画分調製時に残されたたんぱく質画分を還元アルキル化後トリプシン消化し、脳ペプチドに相当する重量を直接逆相 nanoLC で分離、解析した。Maldi 質量分析により同定されたペプチド数は平均して脳ペプチドをかなり上回った。これは、同定ペプチドが主要なたんぱく質に由来すること、C末端がRあるいはKに限定されるためソフトウェア検索での同定率が高いためと考えられる。非特異的に切断されている組織内ペプチドに比して、たんぱく質のトリプシンペプチドは高い効率で構造解析データできることが明らかとなった。一方、トリプシン消化により親水性小ペプチドも多数発生するが、従来のトラップカラム、分離用カラムに吸着されない可能性がある。異なるカラムを検討しているが、より多くのペプチドを検出系に導入するため、両カラムの選択を進める必要がある。

自動リニア 2D-HPLC については、使用前調整に時間が掛かるため、現状ではステップ 2D-HPLC と同様の6-10段階でしか1次元目の分離ができていない。この範囲内で脳ペプチドを用いて検討を行ったが、

再現性にかなりの変動があることが分かり、一つは1次元LCの長い linear gradient の溶出においてポンプ送液精度が大きく影響すること、スポット一部でプレート固定装置に微妙なブレがあることなど分かり、制作会社と改良に努めている。

血液試料からのペプチド抽出については数社の逆相系固相抽出カートリッジを使用した。有機物の回収率などにはかなりの違いがあるが、希釈し弱酸性化した血漿試料からのペプチド回収についてはかなり安定した結果が得られた。ゲル濾過後のペプチド画分量について血液1mLと組織1gを比較すると、分子量3000以下のペプチドの回収量は血漿試料の方が1/10以下と少なく、検出されるペプチドのほとんどが補体、特にC3fに由来するものが多いという結果となった。また、血漿分離までの時間、凍結-融解などによりペプチド量は明確に増加し、補体系以外に凝固線溶系たんぱく質に由来するペプチドも観測されるようになった。このため、血漿試料はペプチド分析を主体とする疾患マーカー探索に有望と考えられるが、採血や血漿の保存、ペプチド回収法の検討が必要であり、これら問題の解決の可否が大きなポイントと考えられた。本年度 Seldi 質量分析計を導入したが、導入時期が遅れたため血液試料の処理方法について有効な解析、比較が行えていない。来年度は両者を並用して処理方法と血液ペプチドの変動を正確に把握し、方法を確立したい。

組織試料からのたんぱく質抽出については、既存の方法で満足すべき物であることを確認したが、ショットガン解析に導入するまでの処理方法で観測されるペプチド種にかなりの変化があることが分かった。そこで、ICAT法などで採用されているように抽出試料を直接還元アルキル化、トリプシン消化後にペプチド画分を回収、分離する手順を検討した。まず還元剤を添加せずに抽出操作を行い、得られた上清を還元アルキル化後、希釈、pH確認、調整し、直接トリプシン消化を行った。ペプチド回収は逆相カートリッジとイオン交換ミニカラムで迅速に行い、濃縮凍結乾燥後、一部を逆相 HPLC で分離検討した。その結果、還元剤とトリプシンの添加量は組織重量当たり一定量以上が必要であり、量的な減少は回収の低下に繋がることが明らかとなった。リジン残基などのアルキル化副反応は、添加還元剤量との比率をほぼ1:1に保つことで回避され、逆に増加すると急激に易反応部位への導入率が増加した。途中のたんぱく質の可溶化状態、消化状態などについては、Seldi 質量分析計を利用して、さらに検討を進めたい。心臓組織については動物試料での検討結果であるが、今回の方法を分離プロファイリング法とし、部分的改良を加え実試料に適用する予定である。

ペプチドーム解析において開発してきた 2D-HPLC システムを活用することにより、ショットガンプロテオ

ーム解析で効率的に多数のたんぱく質消化ペプチドを同定できることが示された。同じ重量の試料を用いた場合、脳ペプチドに比して脳たんぱく質トリプシン消化物ではより多数のペプチドが同定でき、さらに nanoLC の導入により、1/5-1/10 の試料でほぼ同等の解析結果が入手可能と確認された。nanoLC 化に伴い1次元目から2次元目への移行部分などに改良が必要である。リニア自動 2D-HPLC システムについては、限定的ではあるが問題が見つかり、機器側に更なる改良を進め、省力化と効率化を可能とした。

血液中のペプチド量は極めて少なく、疾患マーカー探査に非常に有望であることが示されたが、採血処理、保存、濃縮などの操作で2次的に分解ペプチドが生成する可能性があるため、先ず再現性の高いプロトコル作成が不可欠である。組織試料については、心臓組織を対象として抽出、還元アルキル化、酵素消化、ペプチド回収について一通りのプロトコルを完成できた。疾患モデル動物での比較解析を行うと共に、他組織試料への方法の改訂、適用を図りたい。当センターでは心臓組織を対象とする研究計画も倫理委員会で承認されたため、独自のプロテオーム解析課題として実施に移したい。

#### D-5: 痴呆等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

パーキンソン病など神経変性疾患については近年の分子遺伝学的解析から家族性疾患を中心にいくつもの病因遺伝子が同定された。数多くの孤発性については病因の特定はまだまだなされていないが家族性の成果を発展させることで、対症療法の高度化だけでなく根本的治療法開発も展望できるとの期待が高まっている。成因に関しては国内外における研究から、たんぱく質の構造変化、凝集、蓄積と神経細胞死・神経変性との関連が示されており conformation 病の概念確立とともに、アポトーシスに加えて神経細胞機能不全も神経変性の主因として位置づけられるようになってきた。さらに、近年では免疫学的機序の関与に注目が集まっており、喫煙者にパーキンソン病発症者が少ないという疫学的調査が明らかにされるなど生活習慣との関連でも注目を集めている。

我々はこれらの近年の知見を参考に、血液、尿などの末梢サンプルにおいても新たな知見が生み出される可能性が高いと考え、神経変性疾患患者、特にパーキンソン病における血液、尿中たんぱく質の網羅的解析を行うことにした。

今年度はパーキンソン病患者とパーキンソン症候群、及び、プロテオームファクトリーが保存する正常対照者とを比較検討するための試料を供給し、ファクトリーにおいて第一次解析結果を得る段階まで進展した。

新規試料については、すでに本センターの倫理委員会での承認を得ている、「血液、尿、髄液を用いた脳神経疾患の病因・治療法の開発に関する研究」によって収集・保存が可能な疾患の内、パーキンソン病及びパーキンソン症候群患者の血漿、尿を本研究に利用するための倫理申請を行い、承認を得た。そして、2005年2月までに、10名のパーキンソン病患者血漿をプロテオームファクトリーに供給した。また、カルテ等から臨床情報の抽出を行い、暗号化した情報としてプロテオームファクトリーに提供した。今後は、更なる検体での解析の続行による疾患特異的蛋白の同定を図るとともに、より中枢神経の病態を反映している髄液サンプル活用の戦略を考慮する。

パーキンソン病モデルを用いた研究では、I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスを作製し発症前における初期変化を解析したところ UCH-L1 の凝集性が早期から高まっていることを見出した。この凝集性の亢進はユビキチン系とリソソーム系の連動により生じていることが明らかになった。UCH-L1 の水溶液中の蛋白質構造を解析したところ、I93M UCH-L1 変異体、野生型 UCH-L1、さらに、パーキンソン病発症に防護的である S18Y 型 UCH-L1 が病態に相関した構造を呈することが明らかになった。すでに独自に作成した I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスが既存のパーキンソン病モデル動物に比べ優れた点を多く有している新規モデルであることを見出したが、特にその初期変化としてユビキチン系とリソソーム系の連動による UCH-L1 の不溶性亢進を見出している。今年度はさらにパーキンソン病発症に防護的である S18Y 型 UCH-L1 が病態の相関することを見いだした。本成果の意義は大きく、根本的治療に向けて新たな治療標的が見出される可能性が高まった。

#### D-6: 糖尿病等代謝性疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立に関する研究

##### 【臨床サンプルの収集】

##### ・糖尿病

糖尿病患者由来血清の予備検討のために、過去に他の研究計画(ミレニアム・プロジェクト)の際に採取されていた糖尿病患者24人分の血清サンプルを創薬プロテオームファクトリー施設に平成17年3月発送し、解析結果を待っている。それに加えて、糖尿病診断マーカーの本格的解析に使用する糖尿病患者血清サンプルを本年度28人から収集し、創薬プロテオームファクトリー施設に発送した。

早期糖尿病性腎症の尿たんぱく質プロファイルを本施設内にて解析するために、限外濾過による濃縮及び脱塩の後に、血清で最も多い6種類のたんぱく質を除去するマルチプルアフィニティ除去カラムにて処理し、2DE にて予備的解析を行った。患者検体に

については、微量アルブミン尿のある糖尿病患者及びない糖尿病患者から尿たんぱく質を各10例以上収集しており、健常者コントロールからの尿検体の収集後に2DEにて解析する準備が整った。

・ 糖尿病以外の疾患

気管支喘息及び慢性閉塞性肺疾患の診断マーカー開発を目的として、創薬プロテオームファクトリー施設への血清サンプル受け入れのために同施設の倫理委員会での手続きを行い、検体の収集、提供の体制を確立した。

【2DE, LC-MS を用いたプロテオーム解析】

・ 糖尿病

当センター研究所・代謝疾患研究部にて、臨床サンプルを用いた多次元液体クロマトグラフィーによるたんぱく質の分離、LC-MS を用いたたんぱく質の網羅的同定の予備検討として、ヒト肝細胞由来細胞株 HepG2 の培養上清に含まれる分泌たんぱく質の解析を行った。培養上清回収時に限外ろ過にて低分子量側(50kDa 以下)のたんぱく質を回収、前処理として還元・アルキル化法あるいは熱変性といった方法を組み合わせて、得られたペプチドを 2-D LC-MS/MS により解析することによって、400 以上のタンパク質の同定が可能であった。このシステムを臨床サンプルに応用する一環として、消化器疾患での手術の際に採取した腹壁及び内臓(大腸)の脂肪組織をコラゲナーゼ処理して単離した遊離脂肪細胞を用いて、腹壁及び内臓脂肪細胞由来の分泌たんぱく質の 2DE でのディファレンシャル解析の予備検討を行った。

・ 糖尿病以外の疾患

肺組織内で感染防御に関与している組織マクロファージの機能に重要なたんぱく質を網羅的に解析するために、健常者末梢血液から採取した単球を M-CSF あるいは GM-CSF といったヒトサイトカインで分化させ、分化後に発現量の変化するたんぱく質を 2DE にて網羅的に解析し、それぞれに特異的に発現したたんぱく質の同定を試みた。このなかの1つのたんぱく質を選び、現在その機能解析を免疫的手法にて進めている。また、ヒト気道上皮における自然免疫系遺伝子のアレル特異的発現比の定量法を開発した。さらに、プロテオーム解析に用いる検出器と測定システムを新たに考案した。現在 HS 財団 TLO を通じた特許出願を目指して審査継続中である。

【SELDI-TOF】

糖尿病患者由来サンプル中の低分子量たんぱく質及びペプチドを解析するために、当センター研究所の SELDI-TOF を用いて、健常人の血清プロファイリングのレファランス作りを行った上で、糖尿病教育入院の前後で血糖コントロール改善効果を反映する血清マーカーを検索した。

プロテオームファクトリーのプロジェクトの3年度目として、創薬プロテオームファクトリー施設での糖尿病関連たんぱく質のデータベース構築のための予備検討用の血清サンプルの解析、本格的解析用の血清の収集及び発送が開始された。次年度からは、創薬プロテオームファクトリー施設での予備検討の解析結果によって、特徴的なたんぱく質・プロファイルを示す糖尿病及び合併症の病態を絞り込み、それらの病態を有する患者血清を優先的に収集して創薬プロテオームファクトリー施設にて解析する。尿たんぱく質については創薬プロテオームファクトリー施設での解析が行えないため、本施設内にて今年度確立した方法で前処理した尿たんぱく質を用いて、糖尿病患者及び健常者の尿検体を 2DE にて解析し、アルブミン以外の糖尿病性腎症に特異的な早期診断マーカーを検索する。血清及び尿の低分子量たんぱく質及びペプチドについては、本施設の SELDI-TOF を用いた解析を試みる。

糖尿病以外の疾患については、呼吸器疾患(気管支喘息及び慢性閉塞性肺疾患)患者由来血清の収集を創薬プロテオームファクトリー施設での手続きがようやく完了したため、来年度初めから最初に少数の予備検討用血清サンプルを創薬プロテオームファクトリー施設に発送して解析する。また、今年度から開始した組織マクロファージのプロテオーム解析については、M-CSF あるいは GM-CSF での分化後に発現量の変化するタンパク質・プロファイルを元にして、これらに結核菌や HIV に感染した際の発現パターンの変化から、感染防御に関与するたんぱく質を網羅的に解析していく。また、今年度考案したプロテオーム解析検出器・測定システムを改良する。

in vivo でのインスリンの主要な標的臓器の中で比較的採取が容易な脂肪組織について、今年度までに本施設にて確立された 2D LC-MS/MS による網羅的タンパク質同定の系を用いて、インスリン抵抗性に関与する内臓脂肪由来の分泌たんぱく質を検索する。

D-7:小児免疫・アレルギー疾患関連因子の探索ならびに微量たんぱく質解析技術の確立

本年度は、小児腎疾患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17年度成育医療センターにて採取した検体の16年10月から平成17年11月まで採取した検体は42検体であり、その内訳を図14-17に示す。小児腎疾患の中でも特にネフローゼ症候群に関連する因子の探索同定を行うためにネフローゼ症候群の様々な病態における血清を採取した。現在、コントロール血清との比較、病態間における比較を行い疾患特異的、病態特異的因子のプロテオーム解析を行い、さらに疾患や病

態との関連性について解析を行う必要があると考えられる。

#### D-8: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

認知症および骨粗鬆症患者の血清につき検体採取・保存およびPFへの提供を開始した。今年度は認知症3例、骨粗鬆症14例の提供を行った。

尿は非侵襲的に採取可能な試料として非常に優れているが、通常、尿中のたんぱく質、ペプチドは少なく、解析にあたっては、濃縮が必要となる。過去に報告されている尿のプロテオーム解析においては、その濃縮法として透析後に凍結乾燥するものや、限外濾過法を用いたものがあるが、これらの方法では、低分子量の物は失われてしまい、解析ができない。硫酸沈殿法は古典的方法ながら、サンプル中のたんぱく質やペプチドの損失が無い。

50 mlのヒト尿サンプルから硫酸沈殿法により約0.3 gの沈殿物を得た。沈殿画分を1% Triton X-100, 8 M Ureaで再可溶化することによりSDS-PAGE上損失なくたんぱく質を回収できた。この方法を用いて尿の採取日による変動が見られるか否かを検討した結果、SDS-PAGE上、日差変動は見られなかった。さらに、これらたんぱく質の同定を行うため、MALDI-TOF-MSによる解析、および二次元電気泳動による解析を継続中である。硫酸沈殿における上清は、疎水性クロマトグラフィーを用いて脱塩および蛋白質、ペプチドの濃縮を行った。硫酸沈殿物の再可溶化については、実験結果から、SDS-PAGEで分析可能なたんぱく質はほぼ全て可溶化されていると考えられる。本法により調製した同一人由来の尿サンプルで日差変動がSDS-PAGEで認められなかったことから、個人間、さらには健常者と患者間での比較、検討は可能と思われる。

ラット脳組織のシナプス画分から代表的なシナプスタンパク質 PSD-95、Neurologinなどをラット脳組織より免疫沈降し、共沈降するたんぱく質を正確に同定する実験系が確立できた。さらに、加齢に伴うたんぱく複合体の動態変化をみる系を確立した。今後、AD発症に重要な役割を果たしていると考えられているAPPなどのたんぱく質複合体を精製、同定し、加齢に伴う変化を検討していくこととした。たんぱく質複合体は一見、安定であるように思われがちであるが、今回、加齢に伴うたんぱく質複合体の構成たんぱく質がダイナミックに変動することが明らかになった。今後、AD発症に関与するAPP等のたんぱく質複合体を同定し加齢変化を検討していくことによりバイオマーカーの候補となりうるたんぱく質を同定できることが期待される。

ビスフォスフォネート製剤は骨粗鬆症の治療薬として用いられている。骨芽細胞において、私共はプ

ロスタグランジン F2 $\alpha$ が三量体型 GTP 結合蛋白質を介してプロテインキナーゼCの活性化にいたる経路であるホスホリパーゼCおよびホスホリパーゼDを活性化すること、プロスタグランジン F2 $\alpha$ はプロテインキナーゼC依存性に p44/p42 MAPK を活性化し VEGF 産生を促進することを報告している。

マウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、ミノドロネートは用量依存性(3~100  $\mu$ M)にプロスタグランジン F2 $\alpha$  により惹起される VEGF 産生を抑制した。プロスタグランジン F2 $\alpha$  による Raf-1、MEK1/2 および p44/p42 MAPK のリン酸化は、ミノドロネートにより抑制された。一方、ミノドロネートはプロテインキナーゼ C の活性化物質である TPA による VEGF 産生および Raf-1、MEK1/2、p44/p42 MAPK のリン酸化を抑制した。ミノドロネートがプロスタグランジン F2 $\alpha$  による Raf-1、MEK1/2 および p44/p42 MAPK のリン酸化を抑制したことより、その作用点は Raf-1 の上流と考えられた。さらにミノドロネートは TPA による Raf-1、MEK1/2 および p44/p42 MAPK のリン酸化を抑制したことから、その作用点はプロテインキナーゼ C と Raf-1 の間であると考えられた。ビスフォスフォネート製剤のプロスタグランジン F2 $\alpha$  による VEGF 産生に対する作用については、インカドロネートが増強し、チルドロネートが抑制し、アレンドロネートおよびエチドロネートが影響しないことを報告している。またその作用点はプロテインキナーゼ C と Raf-1 の間であることを報告している。以上から、ビスフォスフォネート製剤の骨芽細胞機能に対する作用に構造の違いによる相違があることが示唆された。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。

認知症および骨粗鬆症について、PF への臨床試料提供が開始された。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。今後、特に認知症の検体採取を重点的に行うこととした。

#### D-9:疾患関連たんぱく質解析に関する研究

組織切片の作成については、担当者を置き、常時再現性のある切片を作成できる体制を確立した。臨床データに関しては、入力を漸次進める体制が出来上がりつつある。また、検体数についても、解析に十分数を確保するため、プロジェクト以前に採取した検体に関しても、承諾を得るよう努力した。

個人情報保護法を尊重しながら、検体数を確保し、研究を進めていく必要があり、これらの諸問題は、ほぼ解決した。臨床データの入力に関しては、採取後の経過も重要であり、最新のデータを入力し、さらに適宜更新していくことが、重要である。

#### D-10:疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法

## の確立

MS/MS データをもとに行うデータベース検索はルーチン化されているが、スペクトルの再現性、検索結果の信憑性には未だ問題がある。前者は試料の調製法や状態に大きく影響される。後者は、タンデム質量分析計のハードウェアに関する性能とペプチドの性質(フラグメンテーションの起こりやすさ)に左右されるが、フラグメントイオンの質量からデータベースを検索、同定する市販の検索エンジンにも少なからず問題がある。すなわち、フラグメンテーションは質量分析計の機種ごとに特徴があり、市販の検索エンジンはそれら個々の情報を考慮してスコアリングを行っていないので、不十分といえる。

### 1) MS/MS スペクトルをもとに行うデータベース検索結果の検証

MALDI-MS/MS スペクトルにおいて観測されるペプチドのフラグメンテーションを蓄積し、配列依存的に切断を受けやすい、あるいは、切断を受けにくいアミノ酸を調べ、それをもとに MASCOT による検索から出力される結果(候補アミノ酸配列)の検証を行った。現在、ペプチド結合での切断が 3 ヶ所以上観測されたスペクトルについて(それ以下のものは有意性がないとした)、以下の 3 条件は必要条件とした。

① 候補アミノ酸配列中に Asp-Pro、あるいは、Glu-Pro があるが、それらのペプチド結合の切断が観測されていない場合は Score を減ずる。② 配列中に Asp または Glu があり、それらの C 端側のペプチド結合の切断が観測されていれば Score にボーナスを加える。③ 配列中に Pro があり、その N 端側で切断が観測されていれば Score にボーナスを加える。これらの条件検証をバッチで行なえるソフトウェア (Peptide-List Extractor) を試作した。

上記の設定条件は、我々の使用している MS では 100%適用できることが経験的にわかっていたので、検索結果の検証に有効に利用できた。さらに、これまで蓄積したスペクトルをもとに統計的にフラグメンテーションの傾向を割り出し、上記条件以外で検索結果の検証に有効な条件を見つけ、それらを検索結果の信憑性の向上に利用していく予定である。

### 2) 内在性ペプチドの生体内での切断(プロセッシング)部位や修飾を可視化するソフトウェアを開発。

尿や血清中に存在する比較的分子量のペプチドは疾患マーカーとして有用であると同時に生理活性ペプチドを含んでいる可能性もある。それらの網羅的解析で同定される膨大な数のペプチドリストを一度に元のたんぱく質群に対してマッピング、可視化できるソフトウェア“ProcessMap”を試作し、WEB 上で利用できるものとした。( <http://coco.protein.osaka-u.ac.jp/procmap/> )

osaka-u.ac.jp/procmap/ ) 入力データとしては、Mascot から出力される結果をペプチドリストとして再編集したテーブルを利用することができる。これを用いることにより、様々なプロセッシングや代謝分解を受けて生成してくる特徴的なペプチドの同定が容易に行えるようになると思われる。

### 3) 尿ペプチドプロファイリングとマーカー探索

前年度に引き続き、健常者及び疾患患者の尿ペプチドプロファイルの取得、蓄積し、個人毎のデータベースを構築した。尿は H15 年度に確立した方法により処理し、回収されるペプチド画分を 2D-LC(イオン交換と nano-LC)により分画し(1344 画分)、MALDI-MS/MS→データベース検索→Peptide-List Extractor(本年度試作、上記参照)により解析し、最終的に得られるペプチドプロファイルを個人毎のデータベースとして蓄積した。また、前年度試作のペプチドプロファイルの可視化と 2 者間比較が行なえるソフトウェア(“Discover”)を改良し、グルーピングやグループ内及びグループ間比較を可能とした。

さらに、疾患マーカー候補となりうるペプチドに対しては免疫沈降法により操作を大幅に簡略化して症例数を増やして検証していくストラテジーを立てた。その一連の操作、方法を以下のように確立した。

① ポリクローナル抗体(IgG)を作成し、ビーズに固定化(糖鎖を利用した共有結合による)する方法を確立した。

② 検出されるペプチドの絶対量を求める方法として、18O 標識されたペプチドを用いて行なう方法を確立した。具体的には尿に別途調製した 18O 標識ペプチドをスパイクし、数段階の単離、精製の後、MALDI-MS を測定する。得られたスペクトルは前年度開発のソフトウェア“Isotopica”(特に、質量差の小さい安定同位体を用いた量変動解析に有用)( <http://coco.protein.osaka-u.ac.jp/isotopica/> )により非標識/標識のピーク強度比を求め、ペプチドの絶対量を算出した。検出されたペプチド量の規格化は、現在のところ、バッチ法で単離されるペプチドの総量を紫外吸収により見積もり、その値に対する相対量として行なった。また、スパイクに用いた内部標準用 18O 標識ペプチドの簡便な調製法を考案した。尿中に存在する比較的量の多いペプチドについては異なる試料間で再現性よく同じ配列のものが排泄されている。また、それらはたんぱく質の特定の部位に由来している。これらのペプチドの代謝分解(或いは、プロセッシング)と種々の病態や健康状態との関連について調べていきたい。

尿ペプチドプロファイルを健常者と種々の疾患患者について取得し、傾向を調べた。個人間および個人内での変動や疾患による変動等を知るためにはさらに多くの試料についてデータを蓄積する必要がある。

1344 画分の MS で観測される 10,000 以上の膨大な MS データの比較を多検体に対して簡便に行なう目的で、昨年度開発の“Discover”に新たな機能を追加したが、ペプチドプロファイルに特化したデータマイニング用ソフトウェアとしたい。

18O 標識法による量変動解析については、標準蛋白質を用いて方法の適用性を検討した。16O(非標識)/18O(標識)比が 1 よりも小さい場合は 1:30、1 よりも大きい場合は 10:1 程度の量比判定が可能であることがわかった。また、16O/18O の量比を精度よく求めるには、観測分子イオン領域において同位体が分離する測定条件を調整することと、分子イオンピークを良好な S/N 比で観測することが重要である。この方法を生理的に異なる状態から得られた 2 つの尿から単離した蛋白質画分に応用し、有用性を確認した。その際、昨年度開発の“Isotopica”を用いることで正確に量比解析を行なうことができた。

マーカー候補ペプチドに対しては抗体を作成し、免疫沈降/MS 法によりスループットを上げ症例数を増やしていく予定だが、検出限界としては、抗体にもよるが、尿(～40 mL)を用いたスパイク実験から 30 fmol 程度まで検出可能であったが、さらに高感度化を図るために試料調製において工夫していく予定である。

#### D-11: 癌組織の N 型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析技術の確立

今年度は、レーザーマイクロダイセクション法で癌組織から癌細胞を高率に抽出し、それらの N 型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析のための技術の確立を目指した。

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サンプルをクリオスタットで 10 $\mu$ 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た。切片をエタノール固定あるいはアセトン固定し、ヘマトキシリン染色後、レーザーマイクロダイセクション法で癌細胞を抽出した。癌組織の切片作成、固定、染色などの操作はヒドラジン分解、脂質の抽出に影響を及ぼすことはなかった。総脂質成分は DEAE カラムにかけた後、200mM 酢酸アンモニウムにて酸性脂質を溶出、分離した。分離した酸性脂質は 0.1% タウロデオキシコール酸存在下で、Endoglycoceramidase II を 37 度、24 時間作用させることにより、セラミド部分から糖鎖部分を高率に切り出すことが可能であった。

N 型糖鎖、酸性糖脂質の糖鎖は、ピリジリアミノ化試薬と 90 度、60 分反応させ、ボランジメチルアミンで還元した。過剰の PA はフェノール/クロロフォルム抽出で除去し、PA 化糖鎖を得た。ただしこの方法で得られる癌細胞由来の PA 化糖鎖は極微量であり、通常の 4.6mm 径の C18 逆相カラム及び Amide 順相カラ

ムを用いた分離では、発現量の多い糖鎖を数種類同定できるのみで、発現量の低い糖鎖の同定は困難である。そこで様々なカラムを検討した結果、ODS80Ts (2mm X 150mm, TOSOH)や、TSK amide 80 (2mm X 250mm, TOSOH)などを用いることにより、4.6mm 径のカラムと同等の分離能を保ちつつ、感度を 5~10 倍程度上げることが可能であった。PA 化糖鎖の質量分析にはイオントラップ型質量分析計 LCQ Deca XP を用いた。C18 逆相カラム(0.2 X 50mm)を装着したナノ LC/ESI-MS/MS 法を用いることにより 1~10fmol 程度の PA 化糖鎖であれば、十分に MS/MS 解析可能であった。

凍結切片作成、固定法、染色法などは、タンパク質の解析方法とほぼ同様の方法が適応可能であった。ヒドラジン分解を用いた N 型糖鎖の切り出し、糖脂質の酸性糖鎖の抽出、PA 化などの条件はほぼ確立できた。PA 化法は高感度と標識糖鎖の高分離能とを兼ね備えた優れた方法である。しかし、レーザーマイクロダイセクション法で取り出した癌細胞由来の糖鎖は、20pmol 程度と極めて微量であったため、通常の方法では同定可能な糖鎖の種類が極めて少ないことが多い。そのため、その後の解析に用いる PA 化糖鎖の順相、逆相の 2 種類のカラム、さらに分離に関しては、溶媒、溶出条件などを詳細に検討し、微量分析可能な条件を確立できたと考えられる。また、PA 化糖鎖の質量分析に関しても、高感度に MS/MS 解析できるシステムを構築した。以上の一連の方法を組み合わせるにより、レーザーマイクロダイセクション法で抽出した癌細胞の N 型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析は可能であると考えられる。但し、現在のところ 1 サンプルの解析に早くても 2~3 ヶ月を要すると予想されるため、解析対象とするサンプルを慎重に選択する必要がある。

#### D-12: 同位体標識法(cICAT)による各種疾患患者試料(血清・組織)のたんぱく質発現解析研究

##### 1) 創薬プロテオームファクトリー施設(PF)倫理審査委員会での審査結果:

本年度は、3 回の PF 倫理審査委員会が開催され、7 研究協力機関およびヒューマンサイエンス研究資源バンク(HHSRB)からのヒト試料の受け入れおよび研究計画(新規および継続)について審議し、いずれも承認された。PF 倫理審査委員会の構成メンバーおよび研究課題を下記に示す。なお、同委員の谷本 剛氏の所属が独立行政法人医薬基盤研究所から同志社女子大学薬学部に変更になった(平成 17 年 4 月より)。

##### 創薬プロテオームファクトリー施設(PF)倫理審査委員会:

同 委員長: 岡田 善雄((財)千里ライフサイエンス

振興財団、外部委員)

同 委員長代行:横田 正幸((財)ヒューマンサイエンス振興財団、内部委員)

同 委員:脇舂 光廣(武田薬品工業(株)、外部委員)

同 委員:神崎 俊彦(一般市民、外部委員)

同 委員:谷本 剛(同志社女子大学薬学部、外部委員)

同 委員:玉岡 かおる(作家、外部委員)

同 委員:手嶋 豊(神戸大学大学院法学研究科、外部委員)

## 研究課題

国立成育医療センター:

腎疾患および免疫・アレルギー疾患における原因たんぱく質の探索

国立精神・神経センター:

パーキンソン病およびパーキンソン症候群における原因たんぱく質の探索

国立長寿医療センター:

痴呆、骨粗鬆および褥瘡疾患における原因たんぱく質の探索

国立国際医療センター:

1) 糖尿病合併症動脈硬化性疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーの探索(1)

2) 糖尿病合併症動脈硬化性疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーの探索(2)

3) 閉塞性肺疾患の原因たんぱく質の探索

国立循環器病センター:

1) 脳動脈閉塞による急性期脳卒中関連たんぱく質の探索

2) 腎血管性高血圧症関連たんぱく質の探索

3) 糖尿病治療前後の動脈硬化関連たんぱく質の探索

4) 冠動脈疾患を有する家族性高コレステロール血症の LDL-アフェレーシス治療施行前後のたんぱく質の探索

5) 急性期心不全関連たんぱく質の探索

6) 高コレステロール血症患者における疾患関連たんぱく質の探索

7) 急性心筋梗塞および類似疾患における疾患関連たんぱく質の探索

8) 心組織における心疾患関連たんぱく質の探索

大阪府立成人病センター:

各種がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索

大阪大学医学部:

1) 運動ニューロン病患者における原因たんぱく質の探索

2) 乳がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索(1)

3) 乳がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索(2)

4) 慢性呼吸器疾患(COPD, 間質性肺炎)における原因たんぱく質の探索

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団(HS 財団)ヒト組織バンク:

ヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSSRB)から提供されるヒト各種組織を利用した疾患プロテオーム解析研究

## 2) 研究協力機関からのヒト試料の受け入れ:

前述の PF 倫理委員会で承認された研究課題に関して、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)の分担研究報告書および協力研究機関への配布試料(「創薬プロテオームファクトリー(PF)へのヒト試料等の提供について」)に基づき、協力研究機関より送付されるヒト試料(臨床情報も含む)の受け入れを開始した。表6に各協力機関より送付された検体数の一覧表を示す。これまでに、各種疾患 114 症例の 153 試料を受け入れ、そのうち、51 症例の 70 血清試料を解析完了または解析中である。

なお、ヒト試料等提供者の個人情報厳重に守るため、研究協力機関で一次匿名化処理、PF で二次匿名化処理を行い、限定された人以外、提供者を特定することができないシステムを運用した。また、実験に使用する場合は必ず「試料請求申請書」に目的、日時、試料の種類、二次匿名化番号、使用量を記入して、総務部門長、生体試料分析部門長、施設長の許可(押印)を得た上で使用した。これにより、試料の残量が正確に把握でき、試料の厳重な管理が可能になった(試料管理システム(Laboratory Information Management System, LIMS を運用)。また、試料管理システムに関しては、解析結果の品質を保持し、将来における解析結果の検証を可能とするために必要となる LIMS 管理情報の見直しを行った。具体的には、解析プロトコール各工程の表示機能、承認機能、再登録機能、一覧表示等の機能改良を行った。

## 3) 統合データベースシステムの改良・機能追加:

現在、稼動している統合データベースシステム(質量分析計の測定データをサーバに転送し、自動解析処理を行い得られるたんぱく質同定結果・比較定量結果を統合データベースに登録するシステム)に関して、以下の改良・機能追加(下線部分)を行ったので図18にまとめる。

本システムは、①ピークリスト生成等の前処理部分(Search Manager)、②たんぱく質同定エンジン(Mascot サーバ)、③同定・比較定量結果の後処理部分(Results Viewer)、④Mascot 検索・後処理の

ための参照データベース (RefSeq (http://www.ncbi.nih.gov/RefSeq)) からなる。以下、改良・機能追加部分の概要を説明する。

#### (1) cICAT 定量比精度向上機能

血清から調製したサンプルに含まれるトリプシン断片ペプチドの濃度分布は、広いダイナミックレンジを示すため、最適化されたインジェクション量で QSTAR XL にサンプルを投入した場合でも、一部の高濃度なペプチド断片は検出器のダイナミックレンジを越えるシグナルを与えることがある。その場合、当該ペプチドのスペクトル、クロマトグラムは飽和しているため、結果として得られる cICAT 定量比は不正確なものとなる。

この問題点を解消するため、cICAT ペアペプチドの面積強度を計算するプログラム中で、飽和ピークに特徴的なパラメータ (モノアイソトープピーク強度、マスキロマトグラムの形状、同位体ピークの強度、等) を各ピークについて計算して保持しておき、Results Viewer における cICAT 定量比計算プログラム中で、上記パラメータによって飽和していると判断されたピークを選別して、たんぱく質の定量比計算から除外することとした。また、Results Viewer のペプチド表示画面において、各々のペプチドの情報 (正常、飽和、微弱、等) を表示できるようにした。以上の改良により、飽和ペプチドを含むたんぱく質においても cICAT 定量比を正確に導出することができるようになった。

#### (2) 生データ参照、検証データ確定登録機能

本システムでは、cICAT サンプルが質量分析計で測定されると、MASCOT によるたんぱく質の同定結果と共に、2 検体間の比較定量結果が自動的に求められる。2 検体間のたんぱく質定量比は、対応するペプチドの MS ピーク面積比から求めるが、MS スペクトル中に多数のピークが重なっている場合など、正確なピーク面積比が得られないことがある。従って、定量比が 1 から離れた結果が得られた場合など、研究者は MS スペクトル生データに戻って定量比の確認を行う必要がある。今回、Results Viewer のペプチド表示画面 (Peptides Details) に表示される全ての cICAT ラベルペプチドに対して、生データ呼び出しのためのチェックボックス「RAW」を設け、それをクリックすることによって、Results Viewer 上から直接調べたい MS スペクトルを表示することを可能にした。その結果、生データの参照と同定・定量等の確認を一体化することでユーザ利便性が向上し、たんぱく質同定・比較定量結果の検証作業が効率化された。

一方、同定結果、比較定量結果には偽陽性が含まれるため、真偽があいまいなデータについては、研

究者自身が個別に検証を行い、データベースに登録するか否かを最終的に判断する必要がある。今回、ユーザによる同定結果、比較定量結果の検証・確定のための支援機能を構築した。具体的には、Results Viewer のペプチド表示画面 (Peptides Details) に表示される全てのペプチドに対して、同定結果の真偽 (Peptide Verification) を入力するための 3 種のラジオボタン (“Y”: Yes, “N”: No, “A”: Ambiguous)、及び、比較定量結果の真偽 (Ratio Verification) を入力するための同様のラジオボタン (“Y”, “N”, “A”) を独立に設置し、ユーザの判断結果 (登録、却下、未確定) を DB 登録することを可能にした。これにより、ユーザによって却下されたデータを除去した確度の高いデータのみで同定スコア、比較定量値等が再計算され、より信頼性の高いデータベースを構築することができるようになった。

#### (3) PF 独自スコアリング、自動フィルタリング機能

(1) で述べたように、PF ではペプチドの同定・比較定量結果を研究者が検証し、真偽判定した結果をデータベースに登録することができる。しかしながら、全てのペプチドについてユーザ側で検証するのは、大量の解析データが産出される PF においては非効率的であると共に研究者の負担も大きなものとなる。この問題点を解消するために、ペプチドの同定・比較定量結果を Results Viewer 上に表示する際に、事前にシステム内で PF 独自基準に基づくフィルタリングを自動実行しておき、ユーザが参照する際には、システム側で「真」と判定したペプチド配列および cICAT 定量比については、それぞれ Peptide Verification および Ratio Verification を「Y」に設定しておく自動機能を構築した (「偽」と判定したものについては「N」)。同定結果の自動判定としては、MASCOT スコアの他に、b-series イオンおよび y-series イオンの連続性やカバー率を考慮した。また「真」と判定する基準を厳しいものから「High Stringency」「Medium Stringency」「Low Stringency」の 3 通り用意した。また、cICAT 定量比の自動判定としては、同じペプチドが複数回検出された場合の定量比のばらつきやクロマトグラムの半値幅を考慮した。

これらのスコアリング、フィルタリング機能の導入により、偽陽性排除のためのフィルタリングの精度が向上し、個人差のない共通の基準に沿って検証された高信頼性データの統合データベースへの登録が可能となった。それと共に、同定、比較定量結果の真偽判定のための研究者の負担が軽減された。

#### (4) ペプチドマッピングデータベースとその有用性の検討

同種のサンプル (例: 血清) を同種の質量分析計

(例: QSTAR XL)で多数回測定する場合、サンプルの調製プロトコルや測定条件が一致していれば、サンプル中に含まれる同種のペプチドは、原理的には誤差範囲内で同じ保持時間(RT)に検出されると考えられる。すなわち、1回のMS測定結果をm/z軸とRT軸の2次元マップとしてとらえた場合、異なる実験で得られる独立なペプチドピークの集団を、2次元マップ上で同一ペプチド由来のピークを一致させるように重ね合わせることが原理的に可能である。このように、相互に重ね合わせることが可能なように正規化された2次元マップのことを「ペプチドマップ」と呼ぶ。また、ペプチドマップ上に再現性よく検出されるペプチドの情報(アミノ酸配列、修飾、分子量、検出価数、正規化された保持時間など)をデータベースとして登録・蓄積したものを「ペプチドマッピングデータベース」と呼ぶ。さらに、新たな実験から得られるペプチドの2次元マップを、正規化されたペプチドマップに重ね合わせる作業を「ペプチドマッピング」という。

ペプチドのアミノ酸配列はMS/MS測定+MASCOT検索という流れの中で決められるのが通常であるが、単独の測定では同定に至らないペプチドであっても、ペプチドマッピングデータベース中の既知ペプチドへのマッピングに成功すれば、アミノ酸配列を決定することができる。この点が、ペプチドマッピングデータベースの有用性を示している。

今回、質量分析計QSTAR XLと4700 Proteomics Analyzerについて、ペプチドマッピングを構成する項目を検討した。また、本データベースの有用性を検討するために、血清データ蓄積を進めている。QSTAR XLにおける、ペプチドマッピングデータベースの活用例について、図19を用いて説明する。

QSTAR XL測定では、各サイクルでMSスペクトルからMS/MSを取得する親イオンをIDA(Information Dependent Acquisition)法によって選別し、MS/MS測定を行っている。血清など非常に多くの種類の独立なペプチドを広いダイナミックレンジで含む試料においては、所定のイオン強度を有していても結果的にMS/MSを測定しないペプチドが多く含まれる(MS/MS未取得MS生データ)。また、MS/MSスペクトルを取得していても、何らかの理由でMASCOTにより同定できなかったペプチドも存在する(未同定ペプチド)。これらについて、ペプチドマッピングデータベースに登録されているペプチドとのマッピングを実行し、同一性が認められたものについては、比較定量結果も含めて疾患関連たんぱく質データベースに蓄積されることになる。フィージビリティスタディによると、通常のQSTAR XL測定では、実際にMS/MS測定されるペプチド数の3-4倍のMS/MS未取得ペプチドが存在することが分かって

いる。これらについて、別途綿密なMS/MS測定を実施して、アミノ酸配列同定・ペプチドマッピングデータベース登録・蓄積を実施しておくことにより、ルーチン解析単独で得られる同定ペプチド数の数倍量のペプチド配列情報、ひいてはたんぱく質情報を蓄積することが可能になると考えられる。

なお、本検討内容を基に、特許出願を行った。

#### (5)統計解析基本機能の追加

現在、統合データベースに同定・定量結果が蓄積されつつある。今後、蓄積されたデータを用いて疾患特異的なたんぱく質を見つけるためには、各種統計処理やクラスタリングなどの手法を用いた解析が必要となる。

そのような解析手法の中で、本年度は、特に初期の探索的な解析を手作業で行う際に必要な機能の一部を整備した。具体的には以下の機能を整備した:

- 複数の検体の結果を、以降の解析に使いやすい表の形にまとめて集約する機能
- これまでの蓄積結果を基に、たんぱく質ごとの平均と分散を計算し、新たに到着した結果をこれまでの蓄積結果と比較する機能
- 集約結果に対する検体ごとの比の分布図や、たんぱく質ごとの比の分布図を作成する機能
- 集約結果を群とみなし、群間の類似度を、統計的検定を用いてチェックする機能

以上の機能により、大規模な解析に入るまえの予備検討作業を効率化することが可能となった。

#### (6)その他の機能追加

本システムでは、従来4700 Proteomics Analyzer、QSTAR、LCQの測定データについてたんぱく質同定・比較定量の自動/半自動処理が可能であったが、今回Ultraflexに対応した半自動処理機能を導入し、Ultraflex測定データから得られるたんぱく質同定・比較定量結果の統合データベースへの登録を可能にした。

たんぱく質の同定精度を向上させるためには、MS/MSデータの質量精度を高めることが効果的であり、今回4700 Proteomics AnalyzerのMS/MS質量精度向上を目的として、MS/MSキャリブレーション用ペプチドのMS/MSスペクトルから質量校正曲線を求め、MS/MSピークリストを自動補正する自動機能を開発した。それにより、MS/MS質量精度は一桁程度向上し、MASCOTの質量誤差範囲(Tolerance)を絞った検索が可能となった。

たんぱく質同定ソフトウェアMASCOTでは、修飾、参照データベース、質量誤差範囲といった検索条件を変化させた検索を行うことによって同定精度・

効率の向上が図れるが、従来のシステムでは自動検索が実行できるのは1種類の条件によるのみであった。今回の開発により、事前に複数種類の検索条件パラメータを設定しておくことにより、最大5種類のMASCOT検索処理を自動実行することが可能になった。

#### 4). ヒト試料血清の cICAT 解析結果

##### (1) cICAT 法による外国人購入血清と日本人血清の血清たんぱく質の比較・検討

cICAT 法により患者試料の血清たんぱく質の同定・比較定量を行うためには、比較の対照となるべき標準血清を大量に使用する必要がある。しかし、日本人の健常成人より大量の血清を調達することは不可能であるので、大量購入が可能な外国人購入血清と日本人健常人との比較を cICAT 法により解析した。外国人血清(約 100ml/person、Uniglobe Research Corporation(CA, USA)より購入)は年齢 18~50 歳代の男性 5 名、女性 5 名より、採取したものであり、この 20 人の血清をプールしたものを標準血清(CT02S)とした。日本人健常人の血清は、患者血清調製と同様なプロトコールに沿って調製を行った(PF 倫理委員会承認済み、実験は平成 16 年度中に完了)。標準血清((CT02S)として用い、各外国人 4 名(男女、各 2 名:EVVC27(Male, Age 22), EVVC28 (Male, Age 55), EVVC31(Female, Age 23), EVVC32(Female, Age 23))と日本人健常人(男女、各 2 名)の高発現血清たんぱく質(上位 1~100 種類)の同定・比較定量を行った。

すなわち、血清の cICAT 解析フローに基づき、0.2ml 血清をアジレントイムノカラム処理により、6 種類のたんぱく質(Albumin, IgG,  $\alpha$ 1-Antitrypsin, IgA, Transferrin, Haptoglobin)を除去した各血清画分(1mg)を cICAT 法の解析に使用した。標準血清(CT02S)を軽鎖 cICAT 試薬(Light)で、各個人の血清を重鎖 cICAT 試薬(Heavy)で標識し(2h, 37°C)、トリプシン処理(16 h, 37°C)、アビジンカラム処理、TFA 処理後、SCX カラムで 50 分画を行い、各画分の cICAT ペプチドを QSTAR で測定した。なお、ペプチド/たんぱく質の同定および H 鎖と L 鎖の比較定量(H/L)は、検索対象 DB として RefSeq (<http://www.ncbi.nih.gov/RefSeq>)を用い、PF で開発し、今回さらに改良した統合データ解析システム(HiSpec)で解析した(表7)。HiSpec は、同定たんぱく質の順位付け(Score 等)、その一般名(Description)、GI 番号、分子量(Mass)、H鎖およびL鎖別 Score 値、H鎖/L鎖比(Ratio, 比較定量値)、実際に同定したH鎖標識およびL鎖標識反応トリプシン消化断片数(NRPepCnt(H, L))、および配列カバー率(Protein Coverage (H, L))等を表示でき

る。

その結果、Refseq の DB を用いて、cICAT ペプチドレベルで Rank 1, score 20 以上を示すたんぱく質を同定たんぱく質とすると、いずれの血清の場合も約 100-150 種類の血清たんぱく質の同定と比較定量比(H/L)が可能であった(表7)。なお、番号順位はたんぱく質レベルでの Mascot score 順に並べた。また、比較定量値が 0.5 未満または 2.0 以上のケースの場合は黄色で示し、定量比がペプチドピークの重複などにより正確な値が算出されなかった場合は N/A で示した。標準血清(外国人プール血清、L 鎖試薬で標識)と外国人個別別の血清(H 鎖試薬で標識)とで比較したところ、少数の例外を除くと、殆どのケース(96.1%)において H/L 比が 0.60~1.67 以内であった。一方、cICAT 法の誤差範囲の閾値を超えて変化(H/L: < 0.5, >2)しているケースは全体の僅か 2.88%であった。また、同定されたたんぱく質数と H/L 比の度数分布を調べると、各個人血清ともほぼ標準血清と同じ分布をした(H/L 比 = 1 付近が最頻値)(図20)。

cICAT 法で定量比測定誤差が 30%程度(参考文献 3)であることを考慮すると、以上のことは、標準血清中の多くのたんぱく質が外国人個別別血清と比較しても殆ど差がないことを示す。一方、特定のたんぱく質に注目し、外国人個別別で比較すると、cICAT 法定量比測定誤差の閾値を越えて変化している個体が存在することが観察された。例えば、4 個体間で、Lipoprotein, Lp(a)の場合は、定量比が大きく変動(1.36, 0.42, 1.82, 0.12)し、また、自立神経失調遺伝子産物である Dopamine-beta-Hydroxylase の定量比も同様に変動していた(0.5, 0.94, 0.31, 1.64)。また、Apolipoprotein F も変動が大きかった。なお、Lipoprotein, Lp(a)は個体間で変動が大きい(ポワソン分布をせず、L 字型分布を示す)ことがすでに ELISA 等による検査結果で報告されている(5)。日本人 4 人の個別別血清に関しても、同様に標準血清を L 鎖試薬で標識し、個別別血清を H 鎖試薬で標識し、比較定量比(H/L)を比較検討した(非公開)。その結果、後述する血小板由来たんぱく質のケースを除くと、発現比率(H/L)が 0.60~1.67 の範囲に入るケースは全体の 93~95%(平均 94.3%)を示し、外国人個別別血清の場合(平均 96.1%)と殆ど同じであった。また、H/L 値の度数分布も標準血清と差がなかった。このことは、標準血清中の多くのたんぱく質が日本人個別別血清と比較しても殆ど差がないことを示す。なお、日本人 4 人において、H/L 値が <0.5, >2.0 を示すケースは 2.4~4.1%の範囲であった(平均 3.5%)。この中には、外国人個体間で変動が観察された Lipoprotein, Lp(a)等も含まれていた。

前述のごとく、日本人血清中の Thrombospondin 1, Platelet factor 4, Pro-platelet basic protein, Glycoprotein V (platelet)等の血小板由来のたんぱく質に関しては、共通して標準血清との定量比が大幅に増加(4倍以上)していた。しかし、この現象は、外国人血清の調製法と日本人血清の調製法の相違に基づくものと考えられた。日本人血清は前述の方法で記載したように行い、血液凝固促進剤を血液に添加し、生じた血餅を遠心して得た上清を血清としたものである。一方、外国人血清の調製は血漿を凝固させフィブリンを除いたものを血清としていると思われ、実際に外国人血清の血小板由来たんぱく質(Platelet factor 4)の定量を測定した結果(参考文献 6)、殆ど存在しないことが確認された。従って、日本人血清で共通して血小板由来たんぱく質が高いのは、凝集した血小板より遊離した血小板由来たんぱく質が血清に混入したためであり、日本人と外国人血清の本質的な相違ではないと考えた。以上のことより、血小板由来のたんぱく質を除けば、外国人購入血清(pool)を標準血清として用い、日本人患者疾患血清サンプルを解析することが一応可能であると結論した。但し、将来、詳細な比較検討を行う場合には、やはり日本人の血清を用いた標準血清あるいは対照血清(Disease control serum, Age-match control serumなど)を使用することが必要と考えられる。

なお、標準血清および臨床血清検体も含め今までに cICAT 法で一度以上同定された血清たんぱく質 222 種類の分類別一覧表を表8に示す。

## (2)cICAT 法によるパーキンソン病患者血清と標準血清の血清たんぱく質の比較・検討

国立精神・神経センターより提供されたパーキンソン病患者 10 名(EVLC01, EVLC02, EVLC03, EVLC04, EVLC05, EVLC06, EVLC07, EVLC08, EVLC09, EVLC10)の血清に関して、cICAT 解析プロトコールに従い、患者血清(H 鎖試薬で標識)と標準血清(L 鎖試薬で標識)との血清各たんぱく質の同定・比較解析を行った(最終 SCX column 分画で 25 分画した画分を用いて解析)。その結果、約 100 種類の高発現血清たんぱく質の同定と比較定量が可能であった。同定されたたんぱく質数と H/L 比の度数分布を図21に示し、標準血清各たんぱく質と患者血清たんぱく質との比較定量比(H/L: 患者血清/標準血清)との関係を図22に示す。

なお、知的財産権確保のため、たんぱく質名は表記しなかった。パーキンソン病患者での H/L 比の度数分布は、標準血清および日本人健常人血清の場合に比べ、やや低値にシフトするものが多く観察された(最頻値が 0.7~0.8 前後)。しかし、後述する血小板由来たんぱく質等を除いて、同定・比

較定量が可能であった約 120 種類に関して、パーキンソン病患者(10 名)血清と標準血清で比較したところ、発現比率(H/L)値が 0.60~1.67 の範囲のケースは平均 92%(87.4~95%)であり、大部分のパーキンソン病患者の血清高発現たんぱく質は標準血清のもの大きく変化していないことが分かった。一方、H/L 値が <0.5, >2.0 を示すケースは 10 人の平均で 4.2%存在し、その範囲は 1.7~6.7%であった。この中には、前述の Lipoprotein, Lp(a), 男女間で差がある pregnancy-zone protein, 凝固系たんぱく質等の他に、患者間である程度共通の変動が見られるたんぱく質も数種類存在するが、いずれも他の疾患でも観察される変動であり、パーキンソン病に選択的である可能性は现阶段では少ない。なお、標準血清との比が大きすぎるたんぱく質群の多くは、血小板由来たんぱく質であり、上述の日本人健常人血清で観察されたのと同様に血清の調製法の違いに基づくものであり疾患によるものではない。以上のことより、パーキンソン病患者 10 名の血清高発現たんぱく質について標準血清と比較したが、その中では本疾患に特異的と思われる血清たんぱく質は見出せなかった。今後は、血清低発現たんぱく質の解析が必要であり、また、病変部位に近い脳脊髄液の解析が必要であると思われる。

なお、本解析結果および匿名化番号照合表を国立精神・神経センターに提示し、解析結果に関して打ち合わせを行った。同センターの意見としては、1)パーキンソン病患者での H/L 比の度数分布が低値にシフトする理由は、パーキンソン病患者が高齢者であるための可能性が考えられるので、いずれ age-match control serum あるいは disease-match control serum との比較が必要であろう、2)そのためにも、パーキンソン病症候群患者血清(10 例)を解析して頂きたい、3)今回の高発現たんぱく質解析結果では疾患によると思われる大きな変化のあるたんぱく質は見られていない、4)従って、より低発現の血清たんぱく質の解析をお願いしたい、5)パーキンソン病の病変部位は脳黒質、線条体なので、脳脊髄液を解析したほうが妥当と考えられる、6)脳脊髄液の解析の基礎検討用として、非連結・匿名化された保存検体があるが、プロテオームファクトリー内で解析することが可能かなどの意見が述べられた。これに対して、PF 側の意見として、2)に関しては検体が送付されれば解析を進めたい、4)に関しては、低発現たんぱく質解析法を現在、鋭意検討中である、6)に関しては、現在の PF 倫理委員会の規定では患者の再同意が必要であるが、今後の検討課題として前向きに考えたいことを述べた。

## (3)cICAT 法によるネフローゼ患者血清と標準血清の血清たんぱく質の比較・検討

国立生育医療センターより送付されてきた6名のネフローゼ患者(EVQC01, EVQC05, EVQC08, EVQC11, EVQC17, EVQC20: 小児(3-4歳)も含む)の血清(合計17検体)に関して、cICAT解析プロトコールに従い、患者血清(H鎖試薬で標識)と標準血清(L鎖試薬で標識)との血清各たんぱく質の同定・比較解析を行った(最終SCX column分画で25分画した画分を用いて解析)。なお、患者6名のうち5名は治療前(発症中、たんぱく尿3+)、治療中(ステロイド投与中、たんぱく尿- or ±)、治療後(ステロイド投与終了、たんぱく尿- or ±、緩解期)の3時点での経時変化を、また1名は治療前と治療中の2時点の経時変化も調べた。その結果、約110~120種類の高発現血清たんぱく質の同定と比較定量が可能であった。同定された患者血清たんぱく質(治療前)数とH/L比の度数分布を図23に、標準血清各たんぱく質と患者血清たんぱく質(治療前)との比較定量比(H/L: 患者血清/標準血清)との関係を図24に示す。なお、知的財産権確保のため、たんぱく質名は表記せず、番号で示した。そのうち、前述のごとく、血小板由来たんぱく質群の変動は疾患によるものではなく血清の調製法の違いによるので考察から除外した。そこで、血小板由来たんぱく質等を除いた約110種類に関して、治療前ネフローゼ患者(6名)血清と標準血清で比較した場合、その発現比率(H/L)値が0.60~1.67の範囲のケースが占める割合は全体の84.0%(82.2~86.3%)であり、日本人健常人(94.3%)やパーキンソン病患者(92%)の場合よりも低かった。これは、ネフローゼ患者の中には小児(3-4歳)の患者も含まれているためかも知れない。同様な低下傾向が、治療中ネフローゼ血清と標準血清を比較した場合(82.2%)および治療後と標準血清と比較した場合(82.4%)でも観察された。一方、cICAT法の定量誤差範囲の閾値を超えて、H/L値が<0.5, >2.0を示すケースの割合は、治療前では8.4%、治療中では11.4%、治療後では9.44%であり、いずれも日本人健常人(3.5%)およびパーキンソン病患者(4.2%)場合よりも多かった。これらの中には、患者である程度共通に変動がみられるたんぱく質、特定の患者に変動があるもの、疾患とは特に無関係と考えられるもの、および治療前、治療中、治療後で変動がみられるものが存在した。なお、たんぱく尿に関しては治療中でも改善が見られている。図25には、一部の患者で治療前・中・後で変化が観察される数種類のたんぱく質の経時変化を示す。この中には、一部補体関連たんぱく質も含まれる。重症の腎炎を発症している一部のネフローゼ患者の場合には補体関連たんぱく質が変動することがすでに報告(参考文献7-9)されているが、腎糸球体炎症を伴わない軽微な小児ネフローゼ患者(MCD)の場合は定かではない。

これらの変化が、疾患特有なものなのか、非特異的なものなのか、薬剤投与のためなのか等の詳細な検討は、今後、協力研究機関と相談の上、症例数を増やし解析することおよび他の腎疾患(Focal and segmental glomerulosclerosis (FSFG)、IgA腎症)等を比較解析することによって明らかになるものと考えられる。

なお、本解析結果および匿名化番号照合表を国立成育医療センター側に提示し、解析結果に関して打ち合わせを行った。国立成育医療センター側の意見として、1)今回送付したネフローゼ患者は殆どが再発ではあるが、腎糸球体の炎症は僅か(微小変化)であり補体関連たんぱく質が関与しているとは考えがたい、2)実際の経時変化をみても病態との関連はあるとは思えない、3)Ratioが標準とずれていること理由は小児のためかも知れないので他の小児疾患患者或いは正常小児血清との比較はいずれ必要になるであろう、4) plasma hemopexin (isoform)は軽微ネフローゼ患者(minimal change disease, MCP)の再発・緩解期で変化することが報告されている(参考文献10)。ネフローゼ患者の血清および血漿での本たんぱく質の挙動について詳細な検討を実施して欲しい、5)治療前と治療後で大きく変動するたんぱく質が疾患に関与すると考えられる等の意見が提出された。今後、さらに患者血清検体を測定し、臨床情報との関係を調べ、必要に応じて打ち合わせを行うことにした。

## 5) 細胞・組織たんぱく質解析法の検討:

### (1) 組織たんぱく質解析ワークフロー構築:

現在、PFでは主として患者血清のcICAT法によるプロテオーム解析を行ない、研究協力機関より送付される臨床検体をルーチン業務で解析する体制を構築している。しかし、創薬ターゲット探索には、血清だけでなく、ヒト臨床組織のたんぱく質の解析が非常に重要であることは言うまでもない。実際、研究協力機関より、各種がん組織、心筋組織、皮膚筋肉組織等の病変部および正常部位組織の比較解析がPF側に依頼されている。そこで、研究協力機関と協議して、cICAT法による組織たんぱく質の解析フローの構築を目指した(図26)。

従来、組織たんぱく質の解析研究においては、手術で切除された病変組織ブロック全体を破碎・ホモジネートして解析することが多かったが、それでは病変組織に正常組織が混在するため、病変部位と正常部位を正確に比較解析することには不十分であった。一方、病変部位特異的に採取することが可能なLMD法は、増幅が可能なmRNA発現解析ではその有効性が証明されていた。最近、質量分析器の感度の上昇および解析技術の進歩により、増幅不可

能なたんぱく質でも LMD 法が有効であることが報告されている(参考文献 2, 11)。そこで、PFとしても、原則として、LMD 法を利用して、正確に病変部位および正常部位に分けて採取した部位選択的組織を cICAT 法で比較解析することにした。なお、多数な検体を処理するルーチン業務を考慮にいて、100 $\mu$ g protein を1アッセイ用に使用する解析ワークフローを設定した(図26)。なお、一次匿名化から切片作成までは研究協力機関で行い、PF 側では送付された検体(切片)の 2 次匿名化、LMD による部位選択的回収、たんぱく質可溶化、cICAT 反応、cICAT ペプチドの質量分析測定および統合データ解析システム(HiSpec)を用いた発現たんぱく質の同定・比較定量解析を行う(図26)。

また、基本方針として、1)組織のプロテオーム解析に必要な、①細胞・組織の可溶化法、②たんぱく質アセトン沈殿法、③cICAT の反応条件検討、④SCX 分画法、⑤同定・比較定量法などの基礎検討を各種ヒトがん細胞株を用いて行う、2)購入ヒト組織を用いて LMD により分取した病変部位と正常部位を cICAT 法によりその発現たんぱく質の同定・比較を行う、3)以上の結果を参考にして、実際の臨床検体の cICAT 解析を開始する、4)対象疾患としては、まず始めは日本人に多い胃がんから開始し、次いで他のがん(乳がん)や他疾患の病変組織を検討することとした。なお、本報告書では、1)に関して、今までに得られた予試験的な結果を報告する。

#### (2)細胞の可溶化およびたんぱく質抽出法の検討:

組織・細胞の可溶化法には使用する界面活性化剤(SDS, CHAPS 等)、変性剤(尿素、グアニジン塩酸等)、還元剤(DTT, TCEP 等)などの組み合わせにより、種々の方法が報告されており、それぞれ長所・欠点がある。また、疾患、臓器、組織、結合組織の有無、細胞種の違いにより、それぞれに最適化した可溶化法を検討する必要があると考えられる。今回は、比較的複雑性が少ないと考えられる培養ヒトがん細胞株(KATO-III, MKN-45, MKN-74, HeLa)を用いて可溶化法の検討を行い、その後の一連の cICAT 法による細胞組織たんぱく質の発現解析を行った。ヒトがん細胞株の由来および性質を下記に示す。

- 1)KATO-III: スキルス印環型胃腺がん株; 浮遊型、極めて悪性。日本人男性 55 歳由来。
- 2)MKN-45: 低分化型充突型胃腺がん株; 浮遊型、悪性。日本人女性 64 歳由来
- 3)MKN-74: 中分化型管状胃腺がん株; 付着型、島形成型、日本人男性 37 歳由来
- 4)HeLa: 子宮頸部腺がん株; 付着型、外国人女性 31 歳由来

なお、細胞の可溶化法は、文献(参考文献 12)の方法を参考にして、B.研究方法の3)に記載した方法で、出来る限り多くのたんぱく質を可溶化することを目指した。すなわち、9.8M 尿素, 4% CHAPS, 1mM EDTA, 1mM TCEP, protease inhibitors 溶液で可溶化処理をした細胞粗可溶画分(Total lysate)を遠心(12,000rpm, 20min)し、上清(CHAPS/尿素可溶画分)と沈殿に分け、さらに、沈殿部分を 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl, 1mM TCEP (pH8.5) 溶液で、95°C, 10 分間加熱処理後、遠心処理を行い、上清(CHAPS/尿素不溶/SDS 可溶画分)と沈殿残渣画分に分離した。可溶化率を調べるために、上述の細胞粗可溶画分(Total lysate)、CHAPS/尿素可溶画分、CHAPS/尿素不溶/SDS 可溶画分の各たんぱく質含量を測定した。その結果、KATO-III を実験に用いた場合、細胞粗可溶画分中のたんぱく質含量 5.9mg を 100%とすると、93.2%(5.5mg)は CHAPS/尿素可溶画分に含まれ、残りの 8.3%(0.49mg)が CHAPS 尿素不溶/SDS 可溶画分に含まれることが分かった(実験により多少変動する)。最後の残渣画分(フィルム状固形物)は不溶のためたんぱく質定量が不可能であったが、CHAPS/尿素可溶画分たんぱく質含量(5.5mg)と CHAPS 尿素不溶/SDS 可溶画分たんぱく質含量(0.49mg)を合計する(5.99mg, 101.5%)と、細胞粗可溶画分の含量(5.9mg, 100%)にほぼ等しくなることから、殆どの細胞たんぱく質はこの両可溶画分に溶出されたと考えられた。他の細胞株でもほぼ同様な結果が得られ、約 75~90%が CHAPS/尿素可溶画分に、残りの 10~25%が CHAPS 尿素不溶/SDS 可溶画分に含まれることが分かった。以上のことより、本可溶化法により、細胞たんぱく質の大部分を可溶化できるものと考え、CHAPS/尿素可溶画分と CHAPS 尿素不溶/SDS 可溶画分を pool したものを「細胞全可溶画分」とし、以後の実験に用いた。

本細胞可溶化画分中からのたんぱく質の単離はアセトン沈殿法により行った。本細胞可溶化画分には通常より高濃度の尿素、CHAPS が含まれているので、通常のアセトン沈殿法では夾雑物の除去が不十分であった。そこで、「方法」で記載したように、アセトン沈殿物をさらにエタノールで洗浄することにより、夾雑物を除去したたんぱく質画分を得ることができた。なお、細胞全可溶画分からのたんぱく質の回収率は約 80%であった。また、尿素的分解物であるイソ尿素によると考えられるカルバミル化したペプチドは殆ど検出されなかった(1.5%以下)。

(3)トリプシン断片法(ショットガン法、non-ICAT 法)によるヒト培養がん細胞株の解析:

ヒトがん細胞株 KATO-III, MKN-45, MKN-75, HeLa より上述の方法により得た細胞たんぱく質各100g□を常法(参考文献 4, 11, 13)より、還元カルバミドメチル化後、トリプシン消化を行い、得られたペプチドを SCX カラムクロマトで 10 分画に分け、脱塩後、nano-LC/QSTAR XL で質量分析測定を行い、統合データベースシステム(HiSpec)でペプチドおよびたんぱく質の同定解析をおこなった。その結果、Refseq data base を用い、MASCOT で Rank 1, Peptide Score 20 以上を選択すると、KATO-III では、228 種類(Rank 指定なし、Score 30 以上では 198 種類)、MKN-45 では 215 種類(Rank 指定なし、Score 30 以上では 189 種類)、MKN-74 では 152 種類(Rank 指定なし、Score 30 以上では 130 種類)、HeLa では 627 種類(Rank 指定なし、Score 30 以上では 914 種類)のたんぱく質が同定された。なお、ここで言う「同定」とは、MASCOT によって上述の基準以上のスコアでヒットしたことを意味しており、偽陽性の結果の排除等の精査を経た最終的な同定数については、別途検討する必要がある。また、上述の同定たんぱく数は複数回の実験の中の代表例を示したものである。

このうち、ヒト胃がん細胞株同士で同定たんぱく質を比較すると、互いに異なる分布(べん図)を示しており、スキルス印環型腺がん株の Kato-III (228 種類)と低分化型充実型腺がん株の MKN-45(215 種類)では 82 種類が共通、Kato-III と中分化型管状腺がん株 MKN-74 株(152 種類)では 61 種類が共通、MKN-45 と MKN-74 では 108 種類が共通であり、3細胞株で共通に観察されたたんぱく質は 47 種類であった(図27)。以上の結果は、がん細胞株により発現たんぱく質が大きく異なることを示すと考える。

しかし、nano-LC/QSTAR XL での分析では非常に多数のピークが観察されている。これに対して、Q-Star XL の IDA Mode には限界があり、全てのペプチドを分析しているわけではなく、取りこぼすピークがあるので、細胞株間で共通に発現しているも片方にのみが観察される可能性は十分に留意する必要があると考える。実際に、MIF は本ショットガン法の解析では、KATO-III にのみに観察されていたが、後述する cICAT 解析により、他の細胞株でもほぼ同レベルで発現されることを観察している。このことは、本ショットガン解析法のみではたんぱく質の同定は可能であるが比較発現定量解析には不十分であることを示す。

#### (4)cICAT 法によるヒト培養がん細胞株の解析:

そこで、cICAT 法による細胞たんぱく質の発現解析を検討した。まず、同一細胞株(KATO-III)を用いて、L鎖とH鎖で標識し、その発現たんぱく質の

同定と比較定量を行った。すなわち、B. 研究方法の4)に記述した方法に従い、KATO-III 細胞たんぱく質(100g□)をL鎖試薬と H 鎖試薬で各々標識(2h, 37°C)し、トリプシン処理(16 h, 37°C)、アビジンカラム処理、TFA 処理(1h, 37°C)を行い、得られた cICAT ペプチドを SCX カラムクロマトで 10 分画し、各画分の cICAT ペプチドを Nano-LC/QSTAR XL で質量分析測定を行い、統合データベースシステム(HiSpec)ペプチド/たんぱく質の同定およびH鎖とL鎖の比較定量比(H/L)解析を行った。なお、検索対象DBとしては、血清の場合と同様にRefSeqを用いた。その結果、Refseq data base を用い、MASCOT で Rank 1, Peptide Score 20 以上を選択すると、188 種類の細胞たんぱく質の同定および比較定量が可能であった。また、殆どのたんぱく質の H 鎖とL鎖の比率(H/L)はで約1であり、同定されたたんぱく質数と H/L 比の度数分布を調べると、その最頻値は 1.0 であった。このことは、cICAT 法による細胞たんぱく質の比較定量法も基本的には満足するものであることを示す。

図28は KATO-III の cICAT 法とショットガン法により同定されたたんぱく質の種類と数の比較(べん図)を示す(SCX10 分画での比較)。その結果、cICAT で同定されたたんぱく質(188 種類)のうち、ショットガン法で同定されたたんぱく質(228 種類)と共通したのは 66 種類のみであり、両方法で同定されるたんぱく質が相当異なることが分かった。このことは、cICAT 法で同定されるペプチドが Cys 含有ペプチドに局限されることを反映したものと考えられる。なお、共通の 66 種類の中には、MIF, pyruvate-kinases, prolyl 4-hydroxylase, calreticulin, cyclophilin A, chaperonin, heat shock 90D, tublin 等が含まれる。

次に、cICAT 法を用いて、異なるがん細胞株同士(KATO-III, MKN-45, MKN-74 etc)での発現たんぱく質の比較定量が可能かどうか検討した。すなわち、KATO-III を L 鎖試薬で、MKN-45 を H 鎖試薬で標識し、同様な方法で得られた SCX10 分画の各画分の cICAT ペプチドを Nano-LC/QSTAR XL で質量分析測定を行い、統合データベースシステム(HiSpec)ペプチド/たんぱく質の同定および H 鎖と L 鎖の比較定量比解析を行った。その結果、Refseq data base を用い、MASCOT で Rank 1, Peptide Score 20 以上を選択すると、本解析で 292 種類の細胞たんぱく質の同定が可能であり、そのうち 261 種類の比較定量が可能であった。残りの 31 種類に関しては、ピークの重複および片方しか存在しなかったために正確な定量比が算出されなかった。

図29には、本解析で同定可能であったたんぱく質(292 種類)のカテゴリ分類を示す。

上位は、核酸結合たんぱく質系、酸化還元系たんぱく質系、アダプター系、細胞骨格系、リボゾームたんぱく質系、加水分解酵素系、たんぱく質分解酵素系、接着分子系、キナーゼなどが占め、下位になると微量成分と推定される細胞膜に存在する受容体系、イオンチャネル系、トランスポーター系が認められた。図30は、KATO-III と MKN-45 の同定各たんぱく質の発現比較定量比(KATO-III/MKN-45)を示す。なお、知的財産権確保のため、たんぱく質名は表記せず、番号で示した。その結果、比が0.5以上、2.0未満のたんぱく質が 231 種類(88.5%)であり、cICAT 法の定量誤差範囲の閾値を超えて変動(0.5未満、2.0以上)しているものは30種類(11.4%)であった。そのうち、KATO-III に選択的なもの(L/H が2.0以上)は21種類(8%)であり、MKN-45 に選択的なもの(H/L が0.5未満)は9種類(3.4%)存在した。なお、上述の比が、 $0.5 < \text{比} < 2.0$ である231種類の中には house keeping gene product が多数含まれていた。また、閾値を大きくこえたものに関しては今後詳細に検討する予定である。なお、前述のごとく、ショットガン法では KATO-III のみに観察された MIF は本 cICAT 法の解析では、KATO-III により多く存在するものの MKN-45 にも相当量存在することが確認された(L/H: 1.87)。cICAT 法の長所を反映したものと考えられる。

なお、同様に、KATO-III と MKN-74 の同定たんぱく質と発現比較定量比を解析した結果、162 種類のたんぱく質が同定され、そのうち、146 種類が比較定量可能であった。KATO-III に選択的(KATO-III/MKN-74 が2以上)なものは、10種類であり、MKN-74 に選択的(KATO-III/MKN-74 が0.5未満)なものは7種類であった。また、KATO-III と HeLa を比較した結果、242 種類のたんぱく質が同定され、207 種類が比較定量可能であった。なお、上述の同定たんぱく数および比較定量比は複数回の実験の中の代表例を示したものである。

以上の結果より、cICAT 法により細胞たんぱく質の同定および比較定量が基本的には可能であると考へた。但し、現段階では、SCX クロマトの分画数は10分画であるが、より詳細な解析には SCX カラムのスケールダウン、cICAT 反応・TFA 切断条件、cICAT ペプチドの溶出条件の最適化を検討し、最終的には血清の場合と同様に25分画を用いて解析する予定である。以上の基礎的実験を行った上で、その後、実際のヒト組織の解析に着手したい。

#### 6)低発現血清たんぱく質の解析検討:

現在、cICAT 法を用いて、各疾患患者の血清中の高発現たんぱく質(上位100種類程度)の発現解析研究を鋭意行っているが、疾患のバイオマーカー探索および創薬ターゲット探索を行うためには、より低

発現の血清たんぱく質の比較・解析研究が非常に重要である。そのため、現在、以下に述べる基本概念で予備的研究を実施中である。

#### (1)基本概念:

血清(血漿)中の各たんぱく質はプロセッシングや分解、修飾を受けて多様な状態、質的に異なる状態で存在していることは周知の事実である。また、疾患により各たんぱく質の総量は変化しなくても、質的に変化している可能性も示唆されている。疾患に関連して変動するたんぱく質をより多く見出すためには、このような質的に異なるたんぱく質を分離・検出することが必要である。また、血清(血漿)たんぱく質の各濃度は非常にダイナミックレンジが大きく、albumin を含む上位22種類で約99%を占める。現在、血清たんぱく質のルーチン解析においては Agilent 抗体カラムにより上位6種のたんぱく質を除去して cICAT 測定を行っているが、測定に使用している QSTAR XL の検出ダイナミックレンジは102程度であるため常に同定・定量できるのは約100~130種類の高発現たんぱく質である。より低発現なたんぱく質を検出するためには、高発現たんぱく質を除去することが肝要である。

以上の問題を解決するために、血清(血漿)試料をたんぱく質レベルで様々な方法で分画することを試みた。たんぱく質レベルで分画することで、質的に異なるたんぱく質を分離し、あるいはより低発現なたんぱく質を検出することが可能になると考へる。ただし、すべてを満足できるような血液たんぱく質の分画方法は存在しない。様々な観点から切り口を変えて分画を試み、疾患に関連して変動するたんぱく質の探索を行う(図31参照)。

たんぱく質の比較定量解析は cICAT 法を原則として用いた。cICAT 化反応させる前に以下に示す方法でたんぱく質レベルの分画を行い、その後 cICAT ルーチン法に準じて試料を調製した。なお、ペプチド画分(Mw 10kDa 以下)に関しては、cICAT 法だけでなく、SELDI-TOF 法(参考文献 14)も用いた。

H17 年度は、逆相分画法、溶媒抽出による低分子量分画法、アフィニティー分画法について条件検討を行った。詳細な方法については、各項目で記述する。

#### (2)たんぱく質分離用逆相カラムによる分画法の検討

標準血清(CT02S)160  $\mu$ L を5倍希釈後に Agilent 抗体カラムに通して、6種タンパク質が除去されたフロースルー画分6mLを得た。これに尿素1080mg 次に TFA0.2%を添加して試料を変性させた。このうち 1/10 量をたんぱく質分離用逆相カラム

(Agilent 社 mRP-C18 4.6×50mm)に注入し、グラジエント法により分離・溶出して、5 分画に分画した(参考文献 15)。この操作を 10 回繰り返して、血清 160 $\mu$ L 相当量を処理した。各画分は凍結乾燥の後、50mM Tris, 0.1%SDS, pH8.5 400 $\mu$ L もしくは 50mM Tris, 5M 尿素, pH8.5 400 $\mu$ L で再溶解し、定法に従って ICAT 化を行った。逆相分画によるクロマトを図32に示す。現在、同定たんぱく質や再現性等について検討中である。

### (3) 低分子量分画法(溶媒抽出法)の検討:

標準血清 (CT02S) あるいは購入血漿 (Rockland 社) 200 $\mu$ L に 0.1%TFA/アセトニトリル 400 $\mu$ L を添加して高分子量たんぱく質を沈殿させた。遠心上清を SpeedVac により乾固し、0.1%TFA/30%アセトニトリル 50 $\mu$ L で再溶解した。これを試料として SELDI-TOF 測定 (CIPHERGEN 社) を行った。一方、溶媒抽出法の効果を確認するために、CIPHERGEN 社推奨プロトコール通りに尿素処理した血清あるいは血漿も SELDI-TOF 測定を行い、溶媒抽出処理と比較した。

溶媒抽出処理による分画効果を CIPHERGEN 社推奨のプロトコールである尿素処理と比較した。カチオン交換チップを使用した場合、溶媒抽出処理により高分子領域 (10kDa~50kDa) の測定では大部分のピークが消失したが、低分子領域 (1kDa~10kDa) の測定ではピーク数およびピーク強度が増大した(図33)。これは溶媒抽出処理により 20kDa 以上のタンパク質が除去され 10kDa 以下のペプチドが濃縮されたこと、および 20kDa 以上のタンパク質が除去されたことにより 10kDa 以下のペプチドに対するイオン化効率が高まったためと考えられた。以上から低分子量画分に焦点を絞って解析する上で、溶媒抽出処理の効果が高いことが明らかとなった。

次に溶媒抽出処理を施した血清と血漿を比較したところ、ピーク数は血清の方が多く観察された。血液を血清に処理する段階で凝固系が働き、プロセッシングを受けて生じたフラグメントが主に観察されていると考えられた。凝固系が活性化されているような疾病においては特に低分子量域を調べることにより変動たんぱく質が発見できることが期待される。

以上より、溶媒抽出によりペプチド画分が濃縮され感度よく SELDI-TOF 解析が可能であることが明らかとなった。今後は、実際に疾患サンプルを測定して比較することを計画している。

### (4) アフィニティー分画法(ヘパリンカラム)の検討:

購入血清 (Lot. CT02S) あるいは購入血漿 (Lot. CT03P) 500 $\mu$ L を 3 倍希釈後にヘパリンカラム (Amersham HiTrap Heparin HP 1mL) に注入

し 10mM Tris, 200mM NaCl, pH7.5 で十分に wash した後、10mM Tris, 1.0M NaCl, 5M 尿素, pH7.5 により溶出させた。溶出液は、10mM Tris, 5M 尿素, pH8.5 で 10 倍希釈して脱塩濃縮、続いて 10mM Tris, 2M 尿素, pH8.5 で 10 倍希釈して脱塩濃縮を行った。濃縮液は定法に従って cICAT 化を行った。現在、血漿と血清を比較サンプルとして、同定タンパク質や再現性について検討中である。

本年度は研究協力医療機関より送付された各疾患患者の血清高発現たんぱく質 (100-150 種類) の cICAT 法による発現解析を最優先に行った。この場合、基準となる標準血清として購入健常外国人血清 (プール血清) を用いたが、日本人健常人血清と比較した結果、血清の調製の際に遊離する血小板由来のたんぱく質を除くと、殆どのたんぱく質 (全体の 94%) がほぼ同等であることが分かった。また、すでに個体間で変異が大きいことが知られている数種のたんぱく質は本解析でも同様の変異が観察された。このことから、本標準血清を用いて日本人患者血清を比較することは基本的に満足するものであると考えた。今後、疾患により、日本人患者の Disease control serum や Age-match control serum との比較検討が必要になる場合があると思われるが、その場合でも本標準血清をリンクすることにより相対的な比較検討が可能になるものと考えられる。

現在、PF で測定している血清高発現たんぱく質 (100-150 種類) は血清たんぱく質全体の 99.9% を占める。その中には、補体系たんぱく質、線溶・凝固系たんぱく質、血清糖たんぱく質系、リポたんぱく質系など機能が解明されている主要成分の他に、いわゆる関連たんぱく質、あるいは類似たんぱく質など遺伝子の配列情報のみからその機能が類推されているたんぱく質が多数存在している。従って、研究協力医療機関から送付される各疾患の血清を網羅的に解析することにより、この未だ機能が十分に解明されていないたんぱく質群が想定外の疾患との関連性がみられ、新規な機能を発見する糸口を提供する可能性は充分にあると思われる。特に、血清あるいは血漿が病気の発症原因に深く関与する可能性のある循環器疾患やネフローゼ等の腎疾患等では、この可能性は少なくないと考えられる。実際、ネフローゼ患者血清の場合、cICAT の誤差の閾値を越えて変動しているたんぱく質が 8.4%~11.4% も存在する。その中には、患者の治療前・中・後の比較により、経時的変化を示すものが観察されている。この変化が、疾患特有なものなのか、非特異的なものなのか、薬剤投与のためなのか等の詳細な検討は、今後、協力研究機関と相談の上、症例数を増やし解析することおよび他の腎疾患 (Focal and segmental glomerulosclerosis (FSFG), IgA nephropathy) 等

を比較解析することによって明らかになるものと考えられる。

一方、病変部位が血液以外である場合、たとえば、各種臓器がん、パーキンソン病(黒質、線条体)、アルツハイマー病(海馬、皮質神経)等では、その病変部位のたんぱく質の発現差異が上述の高発現血清たんぱく質に反映する可能性は比較的低いと考える方が妥当である。これらの変異を捉えるためには、より病変部位に近い体液、例えば脳神経疾患の場合では脳脊髄液での解析が必要であり、また血清中で捉えるためには、より低発現の血清たんぱく質を解析する必要がある。実際、現在までに国立精神神経センターから送付されたパーキンソン病の血清の解析結果から、高発現血清たんぱく質では特に差異のあるものは見出せず、また逆に、変異ユビキチン化酵素など注目たんぱく質は本高発現血清たんぱく質群には含まれていなかった。今後は、ペプチドマッピング技術を有効に利用し、より低発現たんぱく質(例えば200-300種類まで)も同定・定量可能にすることを目標にしたい。

一方、さらに低濃度の低発現たんぱく質解析に関しては、たんぱく質レベルでの分画(網羅的、群特異的)を導入することが必要であると思われる。現在、限外ろ過膜、逆相カラム、ヘパリンアフィニティカラム、溶媒抽出等の手法を用いて予備検討中であるが、今後は具体的な戦略と戦術を選択して要望に応えることが重要である。

さて、創薬ターゲット探索の観点からすると、いわゆる組織・細胞のたんぱく質発現解析が非常に重要である。実際、例えば、ある種のがん疾患で非常に特異的な細胞たんぱく質ががん細胞の表面に局在した場合には、ヒト型モノクロナル抗体医薬のターゲットの一つになる可能性がある。本プロジェクトの残存期間を考えると、cICAT 法による組織・細胞たんぱく質発現解析系を至急に構築する必要がある。

そこで、LMD 法を使用するワークフローを設定し、実際のヒト組織解析の準備段階として、ヒト培養胃がん細胞株(KATO-III, MKN-45, MKN-74 等)を用いて基礎的検討をおこなった。まず、可溶化に関してであるが、実際の難溶の組織にも対応できるように、出来る限り多くのたんぱく質を可溶化する方法を目指した。すなわち、通常(8M)よりも濃い(9.8M)の尿素含有の4%CHAPSで細胞を可溶化(全体の80~90%程度)し、それでも不溶な画分は0.1%SDSで熱処理を行い可溶化(全体の10~20%程度)し、両画分を合わせたものを可溶画分とした。これにより殆ど全て(100%近く)の細胞たんぱく質が可溶化できるものと考えた。さて、我々は、本可溶画分のアセトン沈殿処理等を行い、完全に尿素を除去したたんぱく質を用いて各種実験(ショットガン、cICAT 法)を行っている。実際に、ショットガン法で解

析すると、いずれの細胞の場合でも多数のたんぱく質が同定され(図28)、また尿素による副反応で生じるカルバミル化ペプチドは全ペプチドの1%以下であった。同様に、cICAT 法で解析しても、多数のペプチド・たんぱく質の同定および比較定量が可能であり、またその中でカルバミル化した cICAT ペプチドは見出されなかった。従って、9.8M 尿素を使用することにより、30-40%のペプチドがカルバミル化するとするクレームは当たらない。おそらく、尿素が残存し、トリプシン消化中にカルバミル化したものと思われる。以上のことから、本可溶化法は基本的には一応満足するものであると考える。但し、今後、難溶な組織を解析する場合には、尿素濃度などの一部条件を修正する可能性はあり得る。

さて、前述のごとく、実際のヒト組織のルーチン解析には LMD 法により採取した病変および正常部位(各 100  $\mu$ g protein)を用いて cICAT 解析を行う予定であるが、実際にはどの程度の細胞たんぱく質が同定され比較定量可能なのであろうか? そのための基礎実験を、性質の異なる胃がん細胞株すなわち、スキルス型印環型の KATO-III と低分化型 MKN-74(各 100 $\mu$ g protein)を cICAT 法を用いて検討した。その結果、図30に示すように、SCX カラムの10分画の段階で約290種類が同定され、そのうち約260種が比較定量可能であった。この結果は、Chen Liらによって報告(参考文献9)されたヒト肝臓がん部位と正常部位で cICAT 法により得られた結果(261種類が同定・定量可能)とほぼ同等であることを示す。また、図29に示すように、同定たんぱく質のカテゴリ分類を調べたところ、主要な細胞骨格系、核酸結合系、酸化還元系たんぱく質の他に、細胞膜に微量に存在すると思われる受容体、イオンチャンネル系、トランスポーターも多数含まれていた。一方、Chen Liらの報告では膜受容体などの微量成分の同定はされていなかった(参考文献9)。

以上のことより、PFで検討したcICAT法による細胞たんぱく質の同定比較定量ワークフローは基本的には一応満足するものであると考えた。但し、現段階では、SCXカラムの分画数は10分画しか行っていない。今後は、SCXカラムのスケールダウン、cICAT反応・TFA切断条件、cICATペプチドの溶出条件の最適化を検討し、最終的には血清の場合と同様に25分画を用いて解析したい(なお、現時点でも、SCXカラムの1分画でも130種類のたんぱく質の同定・定量が可能な最適化が進んでいる)。今後は、基本方針に従い、購入ヒト組織を用いて検討した上で、次いで実際の臨床検体の解析を開始する予定である。なお、対象疾患としては、日本人に多い胃がん(特に予後が悪いスキルス型)から開始し、次いで他のがん、他疾患の病変組織を検討したい。

統合データベースに関しては、本年度は、

QSTAR XL の測定で観察される飽和ピークを排除し、適性ピークを自動的に選別する機能を導入することにより、cICAT 比較定量の精度を大幅に向上させた。また、生データの参照機能を導入し、真偽があいまいなデータに関しては、研究者が個別に検証・確認ができる支援機能を充実させ、さらに、PF 独自スコアリングおよび自動フィルターリング機能を導入することにより、個人差のない共通の基準に沿って検証された高信頼データの登録を可能にした。以上のことにより、信頼性の高い疾患関連たんぱく質発現データベースを構築することが可能であると考える。現在、各種疾患検体のたんぱく質発現データが順次統合データベースに蓄積され、それを利用して疾患特異的なたんぱく質を見出す研究が進行している。今後、データベース/バイオインフォマティクス部門としては、①個体ごとに集積されたたんぱく質発現データを疾患群単位で集約して、有意に疾患特異的な変動を示すたんぱく質の抽出や検定を支援する半自動化システムの構築、②臨床情報等を活用した大規模なクラスター解析システムの構築、③特許出願したペプチドマップ技術を活用するための技術開発、④疾患関連たんぱく質ネットワークデータベースの導入、⑤疾患関連・創薬ターゲット候補たんぱく質の上記ネットワーク上へのマッピングなどを検討する予定である。すなわち、プロテオームファクトリーで生み出される多種類かつ大量なたんぱく質データから、良質なマーカー候補、創薬ターゲット候補を効率よく発見して検証するシステムの構築を目指していく。

## E. 結論

本年度の疾患関連たんぱく質解析研究により、以下の結論を得た。

1. 糖鎖ディファレンシャル解析の結果、自己免疫性疾患モデルマウスでは、糖鎖生合成初期段階の  $\alpha$ -glucosidase II の基質糖鎖である Man9-Glc や分解が進んだ糖鎖が蓄積されていること、非還元末端にガラクトースが結合した複合型糖鎖が低下していることが明らかになった。以上のことから、自己免疫性疾患モデルマウスでは、糖鎖・糖たんぱく質生合成過程に異常が生じていること、また、昨年度開発した糖鎖ディファレンシャル解析法は、糖たんぱく質糖鎖が関与する疾患の解析に応用可能であることが示唆された。また、数多くの疾患関連たんぱく質の中から、医薬品シーズあるいは創薬ターゲットとなり得る有用性の高いたんぱく質を迅速に絞り込んでいくため、効率的なたんぱく質の機能解析とその有効活用を行い得る技術の確立を目的に検討を行い、前年度成果をもとに、昨年度作製したライブラリーを改良すると共に、非免

疫ファージ抗体ライブラリーの性能・有用性を評価していくため、3 種類のヒト疾患関連たんぱく質に対する抗体の単離を試み、それら全てにおいて複数のモノクローナル抗体を得ることができた。さらに、たんぱく質等の薬物を、細胞外から細胞内へ効率よく導入可能なペプチド性キャリアを網羅的に探索可能とするペプチドライブラリーを作製した。本ライブラリーを用いることにより、細胞外から細胞内へたんぱく質を導入可能なペプチド候補を複数得た。

- 17 年度末までに、循環器疾患領域で妥当と考えられる 10 種の疾患や病態について、疾患関連たんぱく質探索研究を開始する。研究実施に必要な倫理的、科学的な基盤は確立でき、試料や情報の採取、処理、保管、保護などについては、法令、指針や倫理委員会の結論や指示に従った手順を作成し、実際に運用、実施に移した。より正確かつ高度な情報が得られるよう、更に改訂を加える予定である。
- エネルギー代謝調節に関与する生理活性ペプチドの探索を培養脂肪細胞系を用いて行い、ブタ脳及びラット小腸抽出物より NPY 及び PYY を単離・同定した。脂肪細胞にはこれらペプチドの受容体も発現しており、NPY や PYY が脂肪細胞の増殖・分化や代謝などの制御に重要な役割を担っている可能性が示唆された。
- 2D-HPLC がショットガン法プロテオーム解析のプロファイリングに適していることが確認され、2次元目を nanoLC とすることにより、更なる高感度化が実施可能であることが分かった。省力化、迅速化した広範な分離に必要な自動化リニア 2D-HPLC は、単回分離には有効であるが再現性の問題が残り、機器の改良も含め検討を続けることにした。血液試料の解析から、血中ペプチド量は極めて少なく、再現的な調製法が確立できれば疾患マーカー探索に有望であることが明らかとなった。循環器系組織試料については、抽出、還元アルキル化、消化、分離、検出に至るプロトコールが作成でき、次年度から実際の解析に着手することとした。
- 国立精神・神経センターから供給された患者検体を用いたプロテオーム解析により、パーキンソン病において変動するたんぱく質の第一次候補が得られた。さらに供給数を増加させるとともに、髄液を用いた戦略を考慮する。また、パーキンソン病モデルマウス I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスの病態解析を行った。
- ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を疾患の診断及び治療にいかにかかすかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者：740万人、潜

在的には推計1620万人と患者数が多い上にさらに増加傾向にあること、患者の90%以上を占める2型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。このため、本プロジェクトにて糖尿病患者由来サンプルを大規模に収集し、たんぱく質の網羅的同定を行い、たんぱく質プロファイルと様々な臨床情報との関連性についてバイオインフォマティクス技術を用いて多変量解析することによって、遺伝子要因、環境因子、合併症等の影響が加味された上での病態に合わせた新しい治療法の開発、病態や病期を診断可能な新規のバイオマーカー開発によって、糖尿病の診療に貢献することが期待される。また、呼吸器疾患等の糖尿病以外の疾患においても、同様のアプローチは有用であると考えられる。

7. 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、それぞれの症例や病態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たが、今後さらに症例数を増やす必要がある。
8. 加齢関連疾患(痴呆・骨粗鬆症)の臨床検体のプロテオームファクトリーへの提供を開始した。ヒト尿サンプルのプロテオーム解析に向けたサンプル調整法として硫酸沈殿法を行い、各画分の分析を行った。脳組織よりたんぱく質複合体を正確に同定する方法が確立し、加齢に伴う変化を検討することが可能となった。培養骨芽細胞における骨粗鬆症の発症制御に関する機能たんぱく質解析では、ミドドネートは PKC と Raf-1 の間に作用してプロスタグランジン F2 $\alpha$  による VEGF の産生を抑制することが強く示唆された。
9. 解析に先立つ倫理的問題、技術的課題は、ほぼ解決した。今後臨床データを入力し、難治性疾患として、腫瘍性疾患(乳癌、消化器癌、リンパ腫)の組織、閉塞性肺疾患、運動ニューロン疾患の血清蛋白を網羅的に解析していく予定である。
10. 装置依存的ではあるが、ペプチドの MS/MS におけるフラグメンテーションの経験的な特徴をデータベース検索結果に反映させ、同定確度を向上させることができた。尿中に排泄されるペプチドの多くはある一定の断片化を受け、また、もとの蛋白質のある一定の部位から生成していることが示唆された。健常者および疾患患者由来の尿ペプチドプロファイルを取得、蓄積し、比較解析を行った。マーカー候補ペプチドに対しては抗体を

作成し、免疫沈降/MS 法により解析を行っていくが、実際の尿を用いて検出限界を調べた結果、30 fmol 程度まで検出できることがわかり、疾患マーカー候補の検証に有用と考えられる。

11. 癌の N 型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析に必要な設備は整い、解析のための基礎的な条件検討はほぼ終了した。
12. 疾患関連血清たんぱく質解析フロー(cICAT 法)に基づき、各研究協力機関から提供されたヒト血清試料(糖尿病、がん、認知症、腎疾患及び免疫・アレルギー疾患等)の同定・比較解析研究を実施し、そのうち、腎疾患ネフローゼ患者とパーキンソン病患者血清の解析結果を関係研究協力機関に開示し、病態・治療に伴う変化の解析および追加研究等の対応について検討した。ヒト胃がん細胞株等を用いて、細胞可溶化法、cICAT 法、発現たんぱく質の同定・比較定量解析の検討を行い、cICAT 法によるヒト組織(細胞)たんぱく質解析ワークフロー法を構築の基礎データとした。統合データベースに関しては、統合データ解析システム(HiSpec)に独自スコアリング機能を導入することにより、たんぱく質同定の効率化とたんぱく質同定・比較定量結果の高信頼化を図った。さらに、同定・定量結果の網羅性を高めるペプチドマップ法を検討し、その解析法を特許出願した。以上の実績をもとに、今後、各研究協力機関のヒト試料(血清、組織)のたんぱく質発現解析を鋭意実行する。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. Sugita T., Yoshikawa T., Gao J.Q., Shimokawa M., Oda A., Niwa T., Akashi M., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. : Fusogenic liposome can be used as an effective vaccine carrier for peptide vaccination to induce CTL response., *Biol. Pharm. Bull.*, 28(1): 192-193, 2005.
2. Gao J.Q., Sugita T., Kanagawa N., Iida K., Eto Y., Motomora Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Hayakawa T., Mayumi T., Nakagawa S. : A single intratumoral injection of a fiber-mutant adenoviral vector encoding interleukin 12 induces remarkable anti-tumor and anti-metastatic activity in mice with Meth-A fibrosarcoma., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328: 1043-1050, 2005.

3. Eto Y., Gao J.Q., Sekiguchi F., Kurachi S., Katayama K., Maeda M., Kawasaki K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. : PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability., *J. Gene Med.*, 7: 604–612, 2005.
4. Kunisawa J., Masuda T., Katayama K., Yoshikawa T., Tsutsumi Y., Akashi M., Mayumi T., Nakagawa S. : Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release., *J. Control. Release*, 105(3): 344–353, 2005.
5. Gao J.Q., Sugita T., Kanagawa N., Iida K., Okada N., Mizuguchi H., Nakayama T., Hayakawa T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. : Anti-tumor responses induced by chemokine CCL19 transfected into an ovarian carcinoma model via fiber-mutant adenovirus vector., *Biol. Pharm. Bull.*, 28(6): 1066–1070, 2005.
6. Yoshikawa T., Okada N., Tsujino M., Gao J.Q., Hayashi A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Yamamoto A., Nakagawa S. : Vaccine efficacy of fusogenic liposomes containing tumor celllysate against murine B16BL6 melanoma., *Biol. Pharm. Bull.*, (印刷中) .
7. Yoshikawa T., Imazu S., Gao J.Q., Hayashi K., Tsuda S., Okada N., Tsutsumi Y., Akashi M., Mayumi T., Nakagawa S. : Nonmethylated CpG motifs packaged into fusogenic liposomes enhance antigenspecific immunity in mice., *Biol. Pharm. Bull.*, (印刷中) .
8. Mukai Y., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Phage display and PEGylation of therapeutic proteins., *Comb. Chem. High. T. Scr.*, 8: 145–152, 2005.
9. Ida T, Mori K, Miyazato M, Egi Y, Abe S, Nakahara K, Nishiara M, Kangawa K, Murakami N.: Neuromedin S is a novel anorexigenic hormone. *Endocrinology*, 146: 4217–4223, 2005.
10. Shousha S, Nakahara K, Sato M, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N.: Effect of neuromedin S on feeding regulation in the Japanese quail. *Neurosci Lett*, 391: 87–90, 2006.
11. Mondal MS, Date Y, Yamaguchi H, Toshinai K, Tsuruta T, Kangawa K, Nakazato M.: Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. *Regul Pept*, 126: 55–59, 2005.
12. Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, Nakao K. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology*, 146: 355–364, 2005.
13. Iwakura H, Hosoda K, Son C, Fujikura J, Tomita T, Noguchi M, Ariyasu H, Takaya K, Masuzaki H, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Itoh H, Toyokuni S, Kangawa K, Nakao K.: Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagon promoter-ghrelin transgenic mice. *J Biol Chem*, 280: 15247–15256, 2005.
14. K. Hamano, T. Katafuchi, K. Kikumoto and N. Minamino: Calcitonin receptor-stimulating peptide-1 regulates ion transport and growth of renal epithelial cell line LLC-PK<sub>1</sub>, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330, 75–80 (2005)
15. T. Katafuchi, K. Hamano, K. Kikumoto and N. Minamino: Isolation and characterization of a glycine-extended form of calcitonin receptor-stimulating peptide-1: another biologically active form of calcitonin receptor-stimulating peptide-1, *Peptides*, 26, 2616–2623 (2005)
16. N. Minamino, H. Kuwahara, Y. Kuwahara-Matsui, J. Isoyama-Tanaka, T. Kihara, M. Matsubae, T. Katafuchi, T. Takao, M. Isoyama: Peptidome database and identification of new endogenous/bioactive peptides, “Peptide Science 2004” Ed. Y. Shimohigashi (The Japan Peptide Society, Osaka, 2005) pp. 29–32.
17. 佐々木一樹、南野直人：循環器病学におけるペプチドミクス，分子心血管病， 6, 599–606 (2005)
18. Kamitori, K., Tanaka, M. Okuno-Hirasawa, T., and Kohsaka, S.: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. *B.B.R.C.* 330 (2005) 446–453
19. Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S. and Kohsaka, S.: Visualization of microglia in living tissues by using Iba1-EGFP transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 81 (2005) 357–362
20. Yogosawa, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K I., Miyoshi, H., Kohsaka, S. and Akazawa, C.: Ubiquitylation and Degradation of Serum-inducible Kinase by hVPS18, a RING-H2 Type Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 41619–41627
21. Wang., Y.L., Liu, W., Wada, E., Murata, M., Wada, K. and Kanazawa, I.: Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntigton’s disease by