

- Takao T, Shimotohno K. Identification of a novel p300-specific associating protein, phosphoribosylpyrophosphate synthetase subunit 1 (PRS 1). *Biochem J.* 5: 2896-906 (2005)
- ⑤ Shirakawa T., Takahashi Y., Wada K., Hirota J., Takao T., Ohmori D., Fukuyama K.: Identification of Variant Molecules of *Bacillus thermoproteolyticus* Ferredoxin: Crystal Structure Reveals Bound Coenzyme A and an Unexpected [3Fe-4S] Cluster Associated with a Canonical [4Fe-4S] Ligand Motif. *Biochemistry*, 44, 12402-12410 (2005)
- ⑥ Okutani S., Hanke G.T., Satomi Y., Takao T., Kurisu G., Suzuki A., and Hase T. "Three maize leaf ferredoxin:NADP(H) oxidoreductases vary in sub-chloroplast location, expression, and interaction with ferredoxin." *Plant Physiol.* 139, 1451-1459 (2005).
- ⑦ Hanke G. T., Okutani S., Satomi Y., Takao T., Suzuki A., Hase T.: Multi iso-proteins of FNR in *Arabidopsis*: evidence for different contributions to chloroplast function and nitrogen assimilation. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1146-1157 (2005).
- ⑧ Kassai H, Aiba A, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Xiong WH, Yau KW, Imai H, Shichida Y, Satomi Y, Takao T, Okano T, Fukada Y.: Farnesylation of Retinal Transducin Underlies Its Translocation during Light Adaptation. *Neuron*. 47(4):529-39 (2005).
2. 学会発表
- ① T. Takao, "Profiling of human urinary peptides for biomarker discovery" *Pacificchem 2005 Dec. 15-20, Honolulu, 2005.*
- ② S. Aono, Y. Satomi, K. Amano, S. Marubashi, K. Dono, M. Monden, T. Takao "Protein Profiling of Human Bile" 第78回日本生化学会大会(平成17年10月、神戸)
- ③ Satomi Y, Suto K., Takao T. 九州バイオサイエンスシンポジウム『疾患プロテオミクス最前線』新規テクノロジーの開発から臨床応用まで、”尿ペプチドプロファイリングによる疾患マーカー探索” P147 (平成17年9月、熊本)
- ④ T. Takao, Peptide profiling of human urine for biomarker discovery, "International Symposium on Systems Genome Medicine -Bench to Bedside-" Jul. 22-24, Tokyo, 2005.
- ⑤ Suto K., Satomi Y., Chen Y. and Takao T. "Profiling of human urinary peptides" *Proceedings of the 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics*, 2005.
- ⑥ Satomi Y., Nishiwaki T., Nakajima M., Kiyohara R., Kageyama H., Kitayama Y., Temamoto M., Yamaguchi A., Hijikata A., Go M., Iwasaki H., Kondo T., Takao T. "Quantitative analysis of a singly and doubly phosphorylated peptides in the circadian clock-related protein(Kai C) by nano-flow LC/ESI-MS" *Proceedings of the 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics*, 2005.
- ⑦ Satomi Y., Kudo Y., Sasaki K., Takao T. "An electrospray dual sprayer for accurate mass measurement in nano-ESI or nano-flow LC/ESI-TOFMS" *Proceedings of the 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics*, 2005.
- ⑧ Taya A., Satomi Y., Suto K., Fernández-de-Cossio J. and Takao T. "Quantitative proteomics of human urine by 18O-labeling" *Proceedings of the 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics*, 2005.
- ⑨ 里見佳典, Fernández-de-Cossio J., 高尾敏文: Web アプリケーション "Isotopica"による ¹⁸O 標識定量プロテオミクス、第53回質量分析総合討論会、p. 416-417 (平成17年5月、さいたま)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- ① 発明の名称: 新規ペプチド
発明者: 山崎基生、高橋憲行、南野直人、佐々

木一樹、高尾敏文、里見佳典

出願番号：特願 2005-221635

② 発明の名称：新規ポリペプチド及びその用途

発明者：中里雅光、高尾敏文

出願番号：特願 2005-130191

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

里見佳典（大阪大学蛋白質研究所助手）

須藤浩三（ヒューマンサイエンス財団流動研究員）

研究要旨

癌の転移、浸潤などに糖鎖が深く関与することが知られている。そのため、癌細胞に発現している糖鎖構造を詳細に解析し、浸潤、転移などの悪性度に関与する糖鎖構造を明らかにしていく試みは重要な研究課題と考えられる。しかし、現在までのところ、ヒト癌組織において、糖鎖構造パターンを高精度に解析した例はない。そこで本研究では、糖鎖のなかでも、癌との関わりが示唆されているとともに、比較的解析の容易な N 型糖鎖と酸性糖脂質に焦点を絞り、それらの構造解析を行うための技術の確立を目指した。解析方法としては、まずレーザーマイクロダイセクション法を用いて癌組織から癌細胞のみを高率に抽出し、N 型糖鎖と糖脂質の酸性糖鎖を抽出し、2-アミノピリジンで蛍光標識した後、HPLC による 2 次元糖鎖マッピング法と質量分析法を組み合わせて、糖鎖構造を解析することとした。今年度中に、これらの糖鎖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終了した。今後はこの手法を用いて癌組織の糖鎖構造解析を開始する。

A 研究目的

糖鎖は主に細胞表面および細胞外に分布し、たんぱく質や脂質に物理化学的性質を与えるほかに、受精、発生、免疫システムなどの様々な生命現象に深く関与する。疾患とのかかわりでは、糖鎖そのものが細菌、細菌毒素やウイルスなどの受容体となり感染が成立する場合のほか、糖鎖構造の異常により引き起こされる疾患も最近明らかとなりつつある。癌との関わりでは、1) 癌化にともない糖鎖構造が変化すること、2) 予後や転移能と相関する癌の糖鎖構造があること、3) 癌特異的な抗体には、糖鎖構造を認識するものが多くあること、4) 癌細胞株に糖転移酵素を作用させ糖鎖構造を変化させると転移能が促進あるいは抑制されることがあることなどから、癌化や癌の悪性度に糖鎖が深く関与することが知られてきた。そこで、癌研究分野においては、プロテオーム解析とともに、癌細胞の糖鎖構造を詳細に解析し、浸潤、転移などの悪性度に関与する糖鎖構造を明らかにする試みは重要な研究課題と考えられる。そこで、本研究では、ヒト癌組織

の糖鎖構造、なかでも癌との関わりが示唆されているとともに、比較的解析が容易な N 型糖鎖と酸性糖脂質に焦点を絞り、それらの構造解析を行うための技術の確立を目指した。

B 研究方法

癌組織はヘテロな組織であり、癌細胞以外に様々な細胞が含まれており、癌組織の中で癌細胞が占める割合が 10% 以下である癌もめずらしくない。そこで、解析の精度を上げるため、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、癌組織から癌細胞のみを高率に抽出し、それらの糖鎖構造を解析することとした。N 型糖鎖はヒドラジン分解で N 型糖たんぱく質より切り出す。また、脂質成分をクロロフォルム：メタノール溶液で抽出し、DEAE を用いたイオン交換にて、酸性脂質を分離した。酸性脂質は Endoglycoceramidase II (TAKARA) で処理することにより糖鎖部分を切り出した。N 型糖鎖と酸性糖脂質の解析方法としては、糖鎖を高感度で検出するため糖鎖部分を 2-アミノピリジンで蛍光標識し（ピリジルアミノ化、PA 化）、HPLC を用いた

2次元糖鎖マッピング法と質量分析法を組み合わせ、糖鎖構造を同定する。

(倫理面への配慮)

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

C 研究結果

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 μ m の切片を作成し、ホイルつきのスライドグラスに貼り付けた。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、ピリジルアミノ化試薬と 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。

D. 考察

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。凍結切片作成、固定法、染色法などは、たんぱく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ことにより、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。

E. 結語

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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1) Takachi K, Doki Y, Ishikawa O, Miyashiro I, Sasaki Y, Ohigashi H, Murata K, Nakajima H, Hosoda H, Kangawa K, Sasakuma F, Imaoka S. Postoperative ghrelin levels and delayed recovery from body weight loss after distal or total gastrectomy. *J Surg Res.* 2006 Jan;130(1):1-7.

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

Mitani H, Ishiguro S. Adult capillary hemangioma of the liver: report of a case. Surg Today. 2005;35(9):796-9.

3) Doki Y, Ishikawa O, Takachi K, Miyashiro I, Sasaki Y, Ohigashi H, Murata K, Yamada T, Noura S, Eguchi H, Kabuto T, Imaoka S. Association of the primary tumor location with the site of tumor recurrence after curative resection of thoracic esophageal carcinoma. World J Surg. 2005 Jun;29(6):700-7.

4) Doki Y, Takachi K, Ishikawa O, Sasaki Y, Miyashiro I, Ohigashi H, Yano M, Ishihara R, Tsukamoto Y, Nishiyama K, Ishiguro S, Imaoka S. Reduced tumor vessel density and high expression of glucose transporter 1 suggest tumor hypoxia of squamous cell carcinoma of the esophagus surviving after radiotherapy. Surgery. 2005 May;137(5):536-44.

5) Wada H, Sasaki Y, Yamada T, Ohigashi H, Miyashiro I, Murata K, Doki Y, Ishikawa O,

Nishiyama K, Imaoka S. Successful preoperative treatment for hepatocellular carcinoma with tumor thrombus in the major portal branch by three-dimensional conformal radiation therapy--two case reports. Hepatogastroenterology. 2005 Mar-Apr;52(62):343-7.

6) Eguchi H, Ishikawa O, Ohigashi H, Kasugai T, Yokoyama S, Yamada T, Doki Y, Murata K, Miyashiro I, Sasaki Y, Imaoka S. Surgical significance of superficial cancer spread in early gallbladder cancer. Jpn J Clin Oncol. 2005 Mar;35(3):134-8.

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

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 金子 勲 (財) ヒューマンサイエンス振興財団
創薬プロテオームファクトリー
生体試料分析部門長

研究要旨：

1. 健常日本成人血清と外国人購入血清の血清たんぱく質を、cleavable ICAT(cICAT)法により比較・検討した結果ほぼ同等であったので、外国人購入血清をヒト標準血清として用いることとした。
2. 本標準血清を用いて、平成 16 年度に策定した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た。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。
3. 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するため、その基礎実験として、ヒト胃がん細胞株等を用いて細胞可溶化法、cICAT 標識ペプチド分画条件等を検討し、細胞株間同士の発現たんぱく質の同定・比較定量解析を行った。
4. 低発現血清たんぱく質に関しては、SELDI 法、たんぱく質分画法を取り入れる前処理法を検討した。
5. 得られたデータは、独自スコアリング機能を導入した統合データ解析システム(HiSpec)により解析し、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。また、今後の同定・定量結果の網羅性向上のため、ペプチドマップ技術に関する基礎的検討を行い、解析法を特許出願した。

A. 研究目的：

創薬ターゲットおよび疾患関連バイオマーカー探索には、臨床情報と連結した多数の患者試料（血清・組織等）と健常人試料に存在するたんぱく質を効果的に、分離同定し、比較定量することが重要である。昨年度は cICAT 法による高発現血清たんぱく質(約 100 種類)解

析フローを策定した(1)。本年度は、1) 本解析フローに基づき、各研究協力機関から提供されたヒト血清試料の解析研究（探索・同定・比較定量）を実施する、2) 得られた解析結果を研究協力機関に提供し、関係者と協議しその後の対応を考える、3) がん等の組織試料（細胞等）の前処理法を行い、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(探索・同定・定量)を構築する、4) 低発現血清たんぱく質に関しては、SELDI 法も利用する優れた前処理法を用いて、感度が高い解析システムを検討する、および5) 血清たんぱく質の cICAT ペプチドマップの有用性の検討を行い、高品質な解析研究(MS/MS)に活用することなどを目標とした。

B. 研究方法：

1) 血清の調製法：

患者血清(研究協力機関で実施)および日本人健常人血清(本施設で実施)の調製は、10 ml 真空採血管(ベノジェクト II 血清分離剤・凝固促進剤フィルム入り)を用いて採血した血液(通常は 10-20 ml 程度)を 37℃で 30 分静置(もしくは室温で 1 時間静置)したものを 4℃で、1,500 × g (3,000rpm)で 10 分遠心分離を行うことにより、上清(血清)をえた。得られた血清は 0.2ml ずつ 1.5 ml チューブ(エッペンドルフ製)に分注し、冷凍保存した(-80℃)。必要に応じて融解し、実験に使用した。

なお、健常外国人血清(約 100ml/人、合計 10 名)は Uniglobe Research Corporation(CA, USA)より購入した。本外国人血清は年齢 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 10 人の血清をプールしたものを標準血清(CT02S)とした。ヒト血漿は Rockland Immunochemicals 社(PA, USA)より購入した。

2) 凍結組織切片の調製および LMD による正常・病変部位特異的組織分取：

凍結ヒト組織(ヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSSRB)より購入)を OCT compound(包埋剤, SAKURA 社製)で包埋した組織ブロックをライカ社製のクリオスタット(LEICA 社製

CM1850)を用いて、-20℃で厚さ 10μm の切片(100~200 枚)を作成した。調製した切片を切除用のスライドガラスに貼り付け、風乾後、95%エタノール液で組織を固定化し、ヘマトキシリンの 3 倍希釈液で軽く染色した。Laser Micro Dissection(LMD)(LEICA 社製 AS LMD)を用いて常法(2)により、病変部位あるいは正常部位を指定してレーザーを照射することにより部位特異的に切除し、試験管に集め、必要に応じて可溶化処理を行った。市販組織を用いて技術を習得中である。

3) 組織(細胞)可溶化・たんぱく質抽出法：

(1) 研究協力機関より提供される患者組織の解析を開始する前に、ヒト細胞株を用いて細胞の可溶化、アセトン沈殿によるたんぱく質の単離等の検討を行った。用いた細胞株はヒトがん細胞株(KATO-III, MKN-45, MKN-74, HeLa)であり、HSSRB より購入した。それぞれの培養培地(KATO-III; DMEM/RPMI-1640/10%FBS, MKN-45 and MKN-74; RPMI-1640, 10%FBS, HeLa; DMEM/10% FBS)で大型フラスコを用いて炭酸ガス培養インキュベータで培養し、それぞれ約 10^7 の細胞を得た。得られた細胞は PBS で洗浄後、-80℃で保存し、必要に応じて実験に用いた。エタノール固定化処理のため、細胞($5\sim 8 \times 10^6$ cells)に 0.5 ml の冷 99.5% エタノールを加え、軽く振とうさせ細胞を均一に懸濁した後に、遠心(3,000 rpm, 10 min)し、上清を捨て、沈殿部分(細胞)を得た。細胞の可溶化法には関しては、細胞中の出来る限り多くのたんぱく質を可溶化する目的で以下の方法で行った。

固定化した細胞(KATO-III の場合は 5.75×10^6 cells)を、氷上で 0.5 ml の可溶化溶液(9.8M 尿素(Wako), 4% CHAPS, 1mM EDTA, 1mM TCEP, 100 倍希釈した protease

inhibitors(Sigma, P2714: 100x stock soln))に懸濁し、Vortex を行い、超音波処理 (0.5・1分、数回に分けて、低温を保つ) し、可溶化処理を行った。得られた細胞粗可溶画分 (Total lysate) を 20°C で、12,000rpm, 20 分間の遠心処理を行い、上清を CHAPS/尿素可溶画分とし、沈殿を CHAPS/尿素不溶画分としてそれぞれ分取した。CHAPS/尿素不溶画分を 0.1 ml の 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl, 1mM TCEP(pH8.5)溶液に加え、Vortex と超音波処理を行い、95°C, 10 分間加熱した後に、12,000 rpm, 20 分間の遠心処理を行い、上清(CHAPS/尿素不溶/SDS 可溶画分) と沈殿残渣画分 (フィルム状固形物) を分取した。各画分のたんぱく質の定量は Lowry 法で行った。特に言及しない限り、CHAPS/尿素可溶画分と CHAPS/尿素不溶/SDS 可溶画分とを合わせて細胞全可溶画分とした。

(2) たんぱく質アセトン沈殿処理:

上述の細胞全可溶画分溶液 (5mg/ml に調製) 25 μ l(125 μ g protein 相当)に 100 μ l の MilliQ 水を添加し、攪拌後、960 μ l の冷アセトン (100%, 4°C) を少しずつゆっくり加えて、攪拌した。白濁した懸濁液を -30°C で一晩放置し、アセトン沈殿を完結させ、その後 4°C で 12,000 rpm, 20 分の遠心処理を行い上清を除き沈殿画分 (crude proteins) を得た。この沈殿画分に 200 μ l の 99.5% エタノールを加え、4°C で 12,000rpm, 20 分の遠心処理し、残存する尿素などの不純物 (上清) を除き、たんぱく質沈殿画分を得た (約 100 μ g/tube, -30°C で保存)。この操作によるたんぱく質の回収率は約 80% であった。

4) ヒト血清試料の cICAT 法による解析

アジレント社製抗体カラム (Multiple Affinity Removal Column, 10 x 100mm)

を使用し、Albumin, IgG, α 1-Antitrypsin, IgA, Transferrin, Haptoglobin を血清より除去した。すなわち、200 μ l のヒト血清を 15,000 rpm で遠心後、Agilent binding buffer A (Buffer A) で 5 倍希釈後、0.22 μ m のフィルターでろ過し、上述の抗体カラムにアプライし、素通り画分を分取した。吸着部分は Agilent Buffer B で溶出させ、その後、カラムは Buffer A で洗浄した。素通り画分を Centriprep 遠心式フィルターユニット (YM-3, Millipore) で濃縮し、50mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5) にバッファー交換後、たんぱく質濃度を Lowry 法で測定した。

前述の高濃度たんぱく質を除いた血清たんぱく質画分 (final 1mg/ml) を、常法に従い (3), 50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5) で可溶化し、TCEP (final 1mM, 95°C, 10 min) で変性還元後、2.2mM の cICAT 試薬 (Applied Biosystems)、(¹²C (L 鎖)あるいは ¹³C (H 鎖) 標識) を 37°C、2 時間反応させた (通常は標準血清を L 鎖試薬、疾患患者血清を H 鎖試薬で標識する)。未反応の試薬を 1.0mM TCEP でクエンチングし、H 鎖試料と L 鎖試料を等量混合し、トリプシン (Promega, TPCK 処理) で 37°C、16 時間消化した。得られた消化物を、分取用 HPLC (Vision Workstation System (Applied Biosystems)) を用いて、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column (4.6 x 100mm) にかき、10mM KH₂PO₄, pH2.8, 25% CH₃CN (SCX-binding buffer) で吸着・洗浄後、SCX-binding buffer + 0.5M KCl (SCX-elution buffer) で溶出させた。溶出画分を大型アビジンカラム (6.2 x 66.5mm) にかき、素通り部分を洗浄後、吸着した cICAT 標識ペプチドを 30% CH₃CN/0.4% TFA で溶出した (Vision

Workstation System)。溶出画分を乾燥後、95%TFA(5%Scavenger 含有)で 37°C、2 時間反応させてビオチン部分を切断し、cICAT 標識ペプチド(H 鎖、L 鎖)を得た。本ペプチドは減圧乾固した後 SCX-binding buffer に溶解し、再び SCX column(4.6 x 100mm) にかけて、十分に洗浄後、SCX-binding buffer + KCl (0 ~ 0.5M gradient)でペプチド画分を分画 (25~50 分画) し、それぞれ C18 column で脱塩し、減圧乾固した。得られた cICAT 標識ペプチドは nano-LC/QSTAR XL (Applied Biosystems, ESI-Q/TOF)で質量分析測定を行い、生データをチェック後、統合データベースシステム (HiSpec) を用いてペプチドおよびたんぱく質の同定・比較定量解析をした(1)。

なお、研究協力機関より送付される患者血清試料をルーチン測定する場合は、上述のプロトコールに従い操作し、標準血清 (CT02S)を L 鎖試薬、患者血清を H 鎖試薬でそれぞれ標識し、TFA 切断後、最終的に SCX column(4.6 x 100mm)で 25 分画した各画分を nano-LC/QSTAR XL にて、分析時間 75min の分析条件で測定し、HiSpec のバイオフィアオマティクス手法により、標準血清 (L 鎖標識)と患者血清 (H 鎖標識)の各たんぱく質の比較定量比(H/L)を計算した。

5) 細胞・組織たんぱく質の cICAT 法による解析

細胞由来たんぱく質各 100µg/tube 2 本をそれぞれ 1 unit の H 鎖 cICAT 試薬および L 鎖 cICAT 試薬反応用に用意した。常法(3)に従い、50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5)で可溶化し、TCEP(final 1mM, 95°C, 10 min)で変性還元後、2.2mM の cICAT 試薬 (Applied Biosystems)、¹³C (H 鎖)あるいは ¹²C (L 鎖) 標識) を 37°C、2 時間反応させ

た (反応液各 100 µl)。未反応の試薬を 1.0mM TCEP でクエンチングし、H 鎖試料と L 鎖試料を等量混合し、トリプシン (Promega, TPCK 処理)で 37°C、16 時間消化した。得られた消化物を、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column(4.6 x 35mm) にかけて、10mM KH₂PO₄, pH2.8, 25%CH₃CN (SCX-binding buffer)で吸着・洗浄後、SCX-binding buffer + 0.5M KCl(SCX-elution buffer)で溶出させた。溶出画分をアビジンカートリッジカラム (4 個連結) にかけて、素通り部分を洗浄し、吸着した cICAT 標識ペプチドを 30% CH₃CN/0.4% TFA で溶出した (Vision Workstation System)。溶出画分を乾燥後、95%TFA(5%Scavenger 含有)で 37°C、1 時間反応させてビオチン部分を切断し、cICAT 標識ペプチド(H 鎖、L 鎖)を得た。本ペプチドは減圧乾固した後 SCX-binding buffer に溶解し、再び SCX column(4.6 x 35mm) にかけて、十分に洗浄後、SCX-binding buffer + KCl (0 ~ 0.5M gradient)でペプチド画分を分画 (10 分画) し、それぞれ C18 column で脱塩し、減圧乾固した。なお、1 分画の時は SCX-binding buffer + KCl 0.5M で溶出したのち脱塩処理を行った。得られた cICAT 標識ペプチドは QSTAR で質量分析測定を行い、血清の場合と同様に統合データベースシステム (HiSpec) を用いて、ペプチドおよびたんぱく質の同定・比較定量解析を行った。

6) 細胞・組織たんぱく質のトリプシン断片法 (ショットガン法) による解析

cICAT プロトコールに準じて、細胞由来たんぱく質をヨードアセトアミドで還元カルバミドメチル化後、トリプシン処理を行い、得られたペプチドを分画後、同様に QSTAR で解

析した。すなわち、100 μ g の細胞由来たんぱく質を、常法(4)に従い、50 mM Tris/HCl, 0.1% SDS (pH8.5)で再可溶化し、TCEP(final 1mM, 95°C, 10 min)で変性還元後、2.2mM のヨードアセトアミドで 37°C、2時間反応させた(反応液 100 μ l)。未反応の試薬を 1.0mM TCEP でクエンチングし、トリプシン(Promega, TPCK 処理)で 37°C、16 時間消化した。得られた消化物を、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column(4.6 x 35mm) にか、10mM KH₂PO₄, pH2.8, 25%CH₃CN (SCX-binding buffer)で吸着・洗浄後、SCX-binding buffer + KCl (0 ~ 0.5M gradient)でペプチド画分を分画 (10 分画) し、それぞれ C18 column で脱塩し、減圧乾固した。なお、1 分画の時は SCX-binding buffer + KCl 0.5M で溶出したのち脱塩処理を行った。得られたショットガンペプチドは QSTAR 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。

7) Nano-LC による peptide の分離精製 :

SCX による分画・脱塩したペプチド (cICAT 標識および非標識)を 0.1%TFA-2% CH₃CN にて再溶解し、nano-LC(LC Packing)/QSTAR XL (Applied Biosystems, ESI-Q/TOF)および nano-LC /Probot (LC Packings) にて分析した。カラムは C18PepMap™100, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m x 150mm(LC Packings)を使用し、QSTAR XL 用移動相は A: 5%CH₃CN/0.1% HCOOH, B: 95% CH₃CN/0.1% HCOOH によるリニアグラジエント (流速 : 200 nl/min, 分析時間 75 分) である。4700 proteomics analyzer 用移動相は、A: 5% CH₃CN/0.1% TFA, B: 95% CH₃CN/0.1% TFA による

リニアグラジエント(流速 300 nl/min, 分析時間 55 分) である。なお、QSTAR XL で分析する場合は、一部高発現たんぱく質のペプチドが定量測定範囲を超えないように(飽和しないように) 各画分の injection 量を調整した。

8) QSTAR XL (ESI-Q/TOF) での測定 :

BSA トリプシン消化ペプチド断片 (100fmol)を用いて nano-LC の調整を行い、規定のシーケンスカバレッジ(約 40%以上) が得られるのを確認した後、サンプルの測定を行った。なお、血清試料の一部高発現たんぱく質のペプチドが定量測定範囲を超えないように(飽和しないように) 各画分の injection 量を調整した。測定は MS 1 秒、第一 MS/MS 3 秒、第二 MS/MS 3 秒の合計 7 秒が 1 サイクルの自動測定 (IDA(Information Dependent Acquisition) Mode)であり、Peak detection threshold は 25 count, MS range は m/z 370-1430 である。測定データの信頼性を確保するために、実サンプルを 5~10 回測定する度に 1 回、QC 用の BSA 消化物(100fmol)を測定した。

9) 4700 Proteomics Analyzer (MALDI-TOF/TOF) での測定 :

nano-LC/Probot system で試料を分離し、マトリックス(CHCA, 875ng/well)と共にスポットした。サンプルプレートを装置内に導入後、MS Reflector Mode でキャリブラント (Des-[Arg¹]-Bradykinin [(M+H)⁺ = 904.468]、Angiotensin I [(M+H)⁺ = 1296.685]、ACTH(1-17) [(M+H)⁺ = 2093.087]、ACTH(18-39) [(M+H)⁺ = 2465.199]、ACTH(7-38) [(M+H)⁺ = 3657.929])測定用のレーザー強度を決定する。続いて試料がアプライされている任意

のスポットを数点選び、MS 測定および MS/MS 測定用のレーザー強度の検討を行った後、自動測定用のメソッドを作成、MS・MS/MS 連続測定 (MS 積算:1250、MS/MS 積算:2000)を行った。なお自動測定を開始する直前にプレートキャリブレーションを実施し、プレート自体の補正を行うことで質量精度の向上に努めた。

10) たんぱく質同定・比較定量処理および統合データベースの改良:

ヒト血清 cICAT 試料および細胞・組織 cICAT 試料のそれぞれについて、それら各試料由来の画分データがある程度そろった時点で、順次 HiSpec データ解析システム (Search Manager) に登録して、たんぱく質同定・比較定量処理を行った。HiSpec システム内では、Mascot 投入用のピークリスト作成、比較定量解析用の cICAT ペアイオンの探索および面積強度計算、Mascot サーバへのピークリストの投入、ペプチド・たんぱく質同定結果のデータベースアップロード等の処理を自動で行った。

ユーザ(研究者)サイドでは、コンピュータによる解析結果が全てデータベースに登録された時点で、HiSpec 同定・比較定量結果編集・閲覧ビューワ (Results Viewer) を用いて、その同定結果・比較定量結果についての精査を行った。作業の具体的な内容としては、同一サンプル由来の複数の画分データのコンバイン処理、Mascot スコアやランクによる第1次フィルタリング、類縁たんぱく質のロールアップ処理を行った。また、個別の Mascot 同定ペプチドについて、さらに、個別別の精査・検証済みデータを疾患ごとにソーティングし、疾患の有無により発現量の変動が見られるたんぱく質の抽出を試み、疾患関連たんぱく質のデータベース化および視覚化を検討した。

今年度のソフトウェア開発項目のうち主な

ものとして、cICAT 定量比の精度向上を目的とした Search Manager および Results Viewer の改良、ユーザによるデータ精査の効率化を目的とした、「生データ参照、検証データ確定登録機能」および「PF 独自スコアリング、自動フィルタリング機能」の構築を行った。現在これらは全て実運用ベースで稼働している (詳細は後述)。

また、将来のペプチド・たんぱく質同定数の向上や疾患関連たんぱく質の抽出効率の向上を目的とした、ペプチドマッピング技術について検討を行い、解析法の特許出願するとともに、実データを基にその有用性の検証を進めている。

C. 研究成果 1:

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: 脇舩 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 1 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。

表 1. 研究協力機関からのヒト試料の受け入れ状況一覧表

(2006年1月31現在)

研究協力機関名称	ヒト試料種類	疾患名称	受け入れ状況	
			症例数	試料数
国立成育医療センター	血清	ネフローゼ	16	33
	血清	FSFG	2	7
	血清	IgA 腎症	2	2
	血清	膜性増殖性糸球体腎炎	1	1
国立精神・神経センター	血清	パーキンソン病	12	12
	血清	パーキンソン病症候群(多系統萎縮症)	1	1
国立循環器病センター	血清	急性脳梗塞	8	16
	血清	糖尿病性動脈硬化症	6	12
国立長寿医療センター	血清	骨粗しょう症	13	13
		認知症	2	2
国立国際医療センター	血清	糖尿病	42	42
大阪府立成人病センター	血清	胃がん	7	11
	組織	胃がん (正常部位、病巣部位)	3	3
合 計	血清		110	150
	組織		3	3

なお、ヒト試料等提供者の個人情報 を 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1にまとめる。

プロテオームファクトリーにおけるデータ解析の流れ たんぱく質の同定及び比較定量

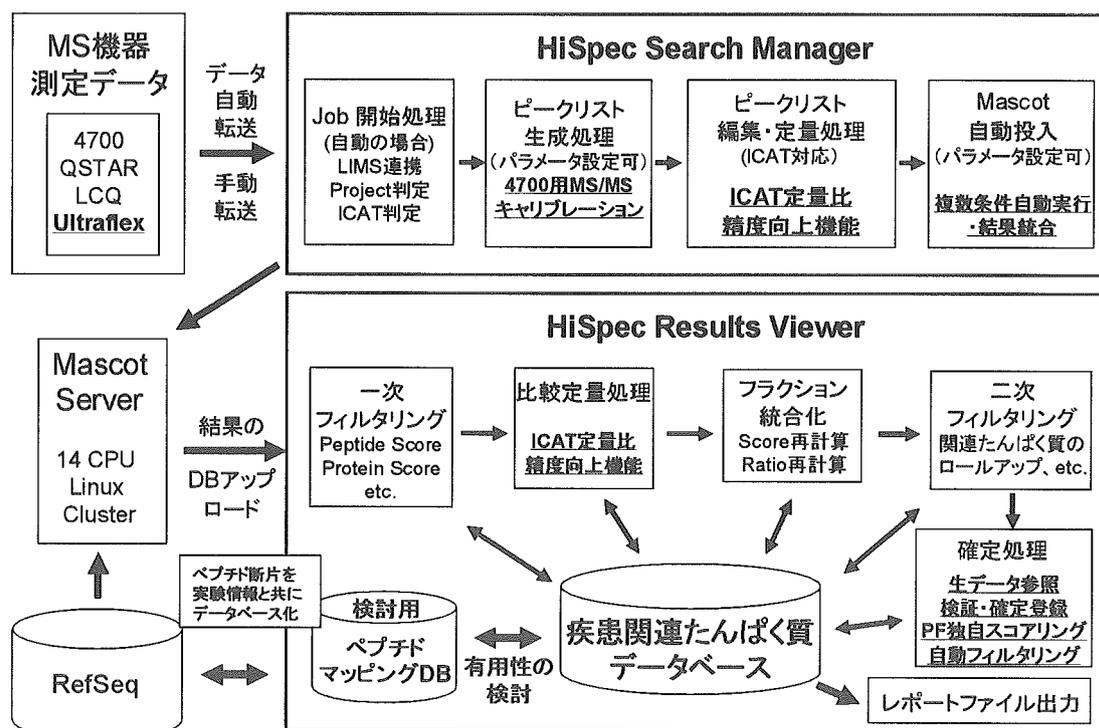


図1. プロテオームファクトリーにおけるデータ解析の流れ

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)、④ Mascot 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

トープーク強度、マスク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ー利便性が向上し、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を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、血清実データの蓄積を進めている。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2を用いて説明する。

ペプチドマッピングDB活用例： たんぱく質の同定・比較定量情報の網羅性向上 (QSTAR)

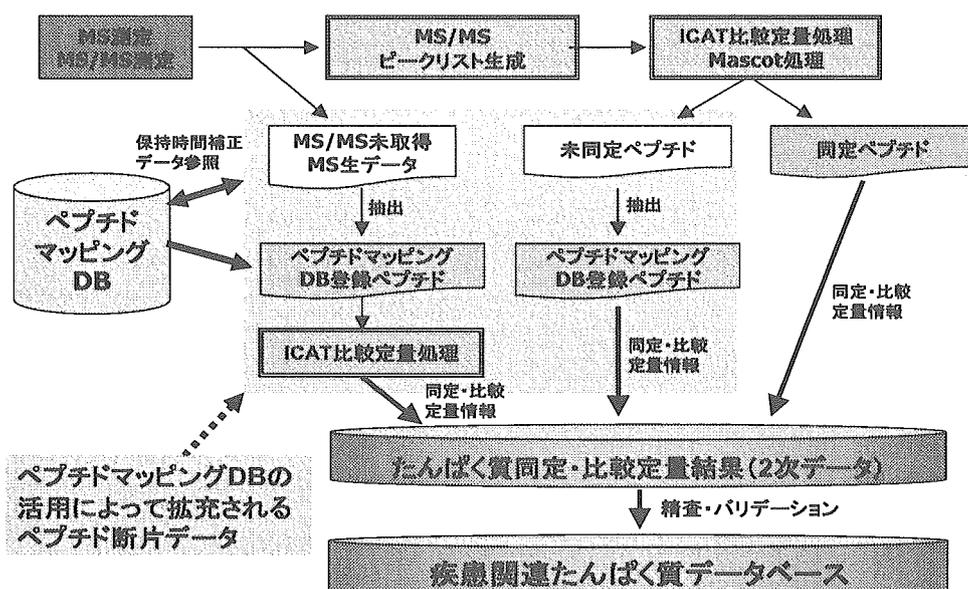


図2. ペプチドマッピング DB の活用例

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 種類の条件によってのみであった。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。

D. 研究成果 2 (実験結果および考察).

1. 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, α 1-Antitypsin, 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 2)。

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。

表 2. cICAT 法による標準血清と個別外国人の血清たんぱく質の比較・検討.

(上位 1-150 たんぱく質) その 1.

	Description	EVVG27	EVVG28	EVVG31	EVVG32
1	H factor 1 (complement); H factor-1 (complement);	1.06	0.84	0.92	0.74
2	plasminogen	0.96	0.90	0.87	0.92
3	coagulation factor II precursor; prothrombin	1.10	0.90	0.96	0.92
4	complement component 3 precursor; acylation-stimulati	1.07	0.92	1.02	0.91
5	alpha 2 macroglobulin precursor	1.09	0.77	0.96	0.73
6	kininogen 1; alpha-2-thiol proteinase inhibitor; bradykinin	1.02	1.07	0.81	0.90
7	ceruloplasmin (ferroxidase); Ceruloplasmin	0.96	0.86	0.90	0.79
8	fibronectin 1 isoform 3 preproprotein; cold-insoluble glob	1.07	1.18	1.02	1.03
9	complement component 7 precursor	1.05	1.03	0.82	0.94
10	vitamin D-binding protein precursor; vitamin D-binding	0.87	0.99	1.00	0.79
11	apolipoprotein B precursor; apoB-100; apoB-48	0.91	0.84	0.99	0.80
12	plasma kallikrein B1 precursor; Kallikrein, plasma; kallik	0.97	0.95	0.89	0.79
13	coagulation factor XIII B subunit precursor; TGase	1.00	0.88	0.90	0.66
14	complement component 5	0.99	0.98	0.87	0.75
15	Complement component 6 precursor	0.87	1.07	1.01	0.89
16	beta-2-glycoprotein I precursor	0.95	1.04	0.84	1.02
17	complement factor B preproprotein; C3 proactivator;	0.99	1.06	0.93	0.58
18	complement component 4 binding protein, alpha;	1.19	0.85	0.89	0.69
19	afamin precursor; alpha-albumin	1.23	1.02	1.04	0.84
20	hemopexin	0.93	0.94	0.89	1.03
21	albumin precursor; PRO0883 protein	1.93		1.73	0.16
22	complement component 4A preproprotein; acidic C4;	0.79	1.00	0.92	0.94
23	I factor (complement)	0.90	0.98	0.86	0.79
24	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor; Alpha-1-	0.84	0.82	0.84	0.92
25	coagulation factor XII precursor; Hageman factor	0.85	1.06	0.78	1.04
26	complement component 8, alpha polypeptide precursor	1.15	0.63	0.99	0.97
27	complement component 1, r subcomponent	0.82	0.92	0.91	0.82
28	lipoprotein, Lp(a); Apolipoprotein Lp(a); antiangiogenic	1.38	0.41	1.86	0.10
29	complement component 1, s subcomponent	0.83	1.09	0.88	0.83
30	alpha-2-HS-glycoprotein; Alpha-2HS-glycoprotein	0.85	1.27	1.05	0.89
31	complement component 8, beta polypeptide	1.00	0.85	1.01	1.37
32	complement component 9	0.74	0.92	1.16	0.61
33	peptidoglycan recognition protein L precursor	0.71	0.98	0.79	1.13
34	properdin P factor, complement	1.30	0.97	1.24	0.67
35	attractin isoform 2; attractin-2; mahogany protein	0.93	0.91	0.91	0.87
36	retinol-binding protein 4, plasma precursor	0.85	0.92	0.72	1.14
37	coagulation factor X precursor; prothrombinase; factor X	1.01	0.89	0.79	1.21
38	vitronectin precursor; serum spreading factor;	0.96	0.81	0.89	1.02
39	inter-alpha (globulin) inhibitor H1; inter-alpha (globulin)	0.88	0.79	0.86	0.80
40	complement component 2 precursor; C3/C5 convertase	1.04	0.88	1.01	0.81
41	protein S (alpha); Protein S, alpha	1.10	0.78	0.87	0.91
42	alpha 1B-glycoprotein	0.95	0.98	0.83	0.88
43	histidine-rich glycoprotein precursor; histidine-proline	0.89	1.55	0.67	0.58
44	tetranectin (plasminogen binding protein); tetranectin	1.10	0.96	0.88	0.80
45	complement component 8, gamma polypeptide	1.06	1.03	1.09	1.14
46	von Willebrand factor precursor; Coagulation factor VIII V	0.83	0.56	0.85	1.41
47	cartilage oligomeric matrix protein precursor; epiphyseal	1.16	0.98	0.89	0.96
48	complement factor H-related 3	0.95	1.47	1.35	0.72
49	clusterin isoform 1; complement-associated protein SP-4	0.82	1.15	0.72	0.85
50	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like	0.68	1.00	1.04	0.93
51	H factor (complement)-like 1		1.00	0.94	0.72
52	Fc fragment of IgG binding protein; IgG Fc binding protein	0.72	1.12	0.39	1.24
53	plasma coagulation factor XI precursor isoform a; plasma	1.29	1.04	1.03	0.71
54	mannan-binding lectin serine protease 1 isoform 1,	1.03	0.68	0.97	1.03
55	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade C (anti	1.02	1.09	0.83	0.92
56	apolipoprotein D precursor	0.80	1.06	0.85	0.91
57	mannan-binding lectin serine protease 1 isoform 2,			0.97	1.03
58	apolipoprotein M; NG20-like protein	0.93	0.76	0.87	0.92
59	alpha-2-plasmin inhibitor; alpha-2-antiplasmin	0.97	0.81	0.67	1.17
60	extracellular matrix protein 1 isoform 1 precursor; secret	1.63	1.18	0.90	1.62
61	hyaluronan binding protein 2; hyaluronic acid binding prot	0.89	0.94	1.04	0.98
62	PREDICTED: similar to Carboxypeptidase N 83 kDa chain	1.04	0.84	0.76	0.89
63	HGF activator preproprotein	1.09	0.82	0.79	1.11
64	pregnancy-zone protein; Pregnancy zone protein	0.42	0.56	0.58	0.62
65	insulin-like growth factor binding protein 3	1.50	1.01	0.94	2.08
66	fetuin B; fetuin-like protein	0.85	0.84	0.80	0.58
67	fibulin 1 isoform C precursor	0.88	1.11	1.21	0.98
68	factor H-related protein 5	1.00	0.96	0.86	0.48
69	protein Z, vitamin K-dependent plasma glycoprotein	1.08	1.08	0.77	0.52
70	complement component 4 binding protein, beta; complem	1.21	0.98	0.97	0.73
71	apolipoprotein A-II precursor	0.81	0.94	0.95	1.09
72	insulin-like growth factor binding protein 4; insulin-like gr	0.86	0.98	0.93	1.26
73	transthyretin; prealbumin	0.95	1.21	0.73	0.97
74	H factor 1 (complement); H factor-1 (complement); comp	0.97	0.98	0.86	1.01
75	plasminogen	0.97	0.98	0.86	1.01