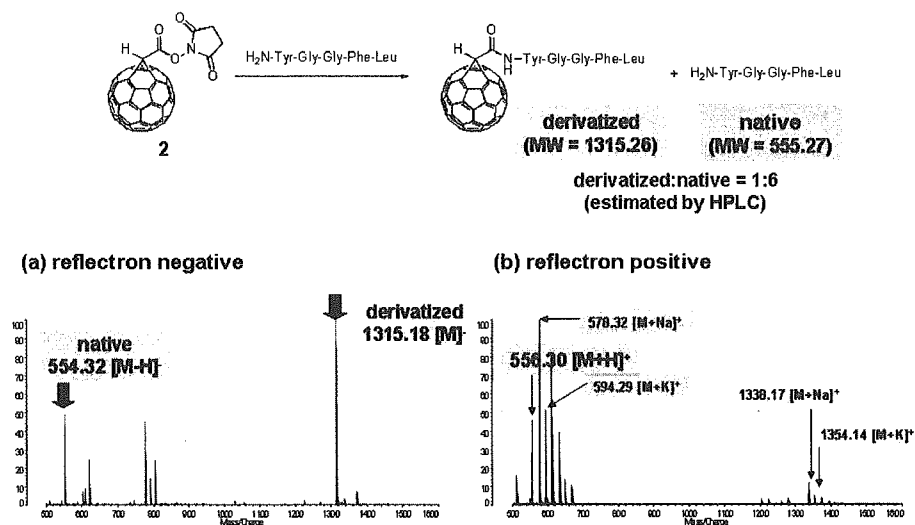


图 11

Comparison of the effect of C_{60} moiety on MALDI-TOF MS signals in negative and positive ion mode

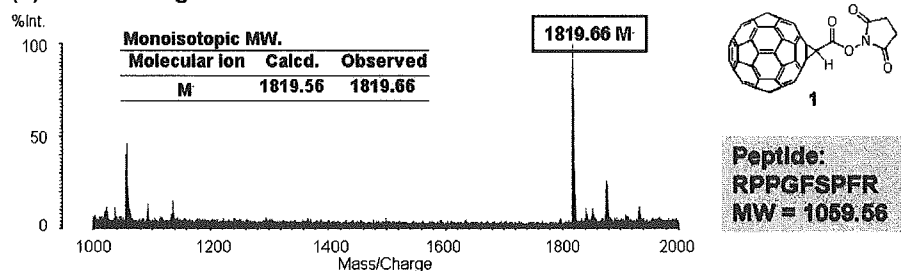


From MALDI-TOF MS analysis of a mixture of native and labeled peptides (6:1), the ionization efficiency of the labeled analytes was enhanced in negative ion mode.

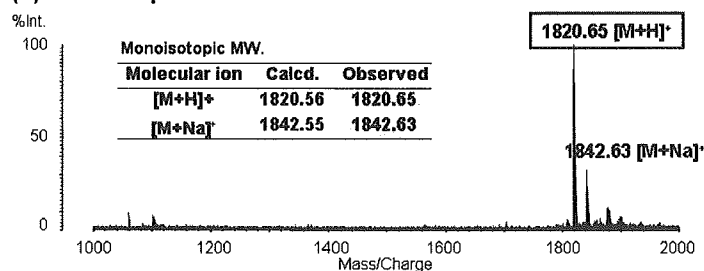
图 12

Derivatization of bradykinin by reagent 1

(A) reflectron negative



(B) reflectron positive



In the case of the titled peptide, MALDI-TOF MS signals of the labeled peptide were observed in negative and positive ion mode sensitively.

图 13

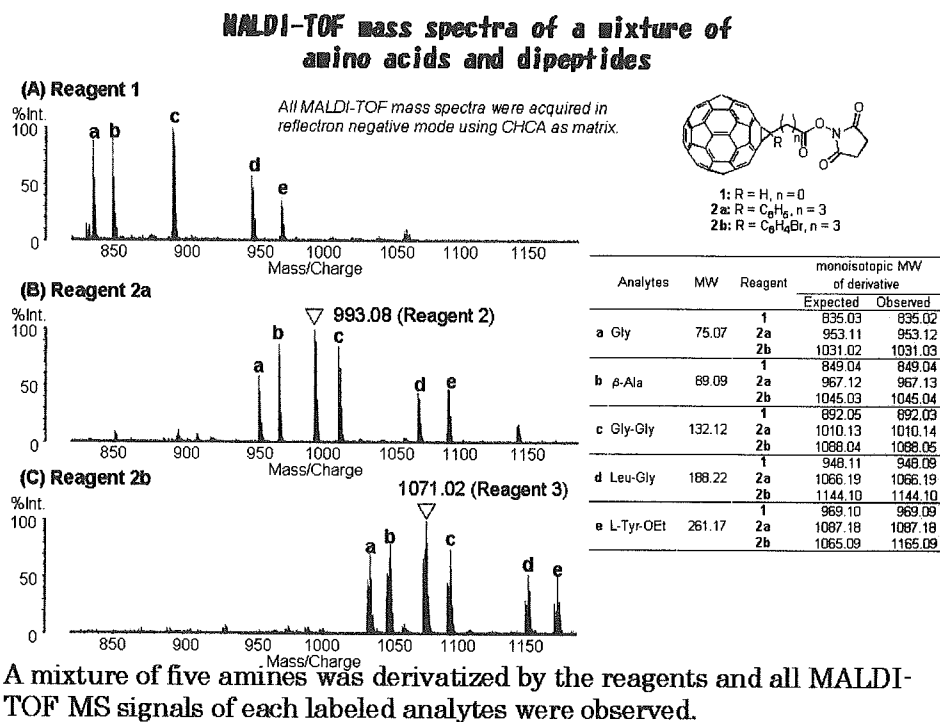
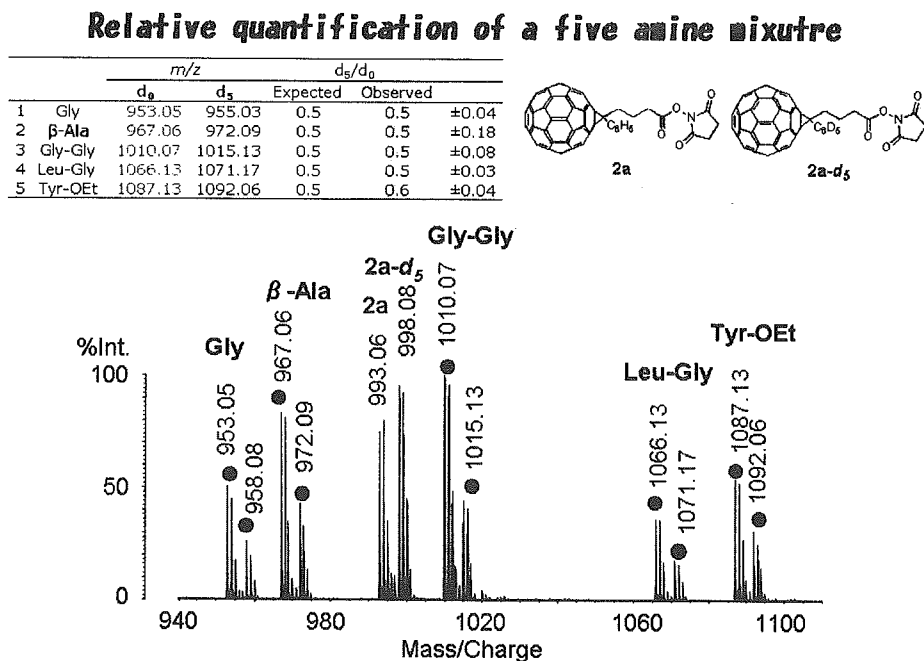


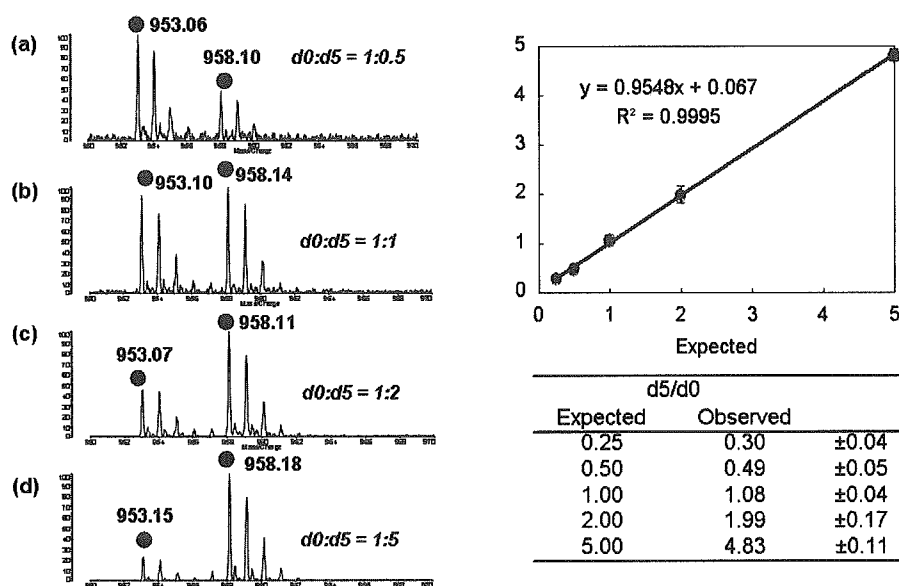
图 14



The MALDI spectrum shows that the peak intensities of doublets spaced by 5 Da is dependent on concentration of analytes (d₀:d₅ = 2:1).

15

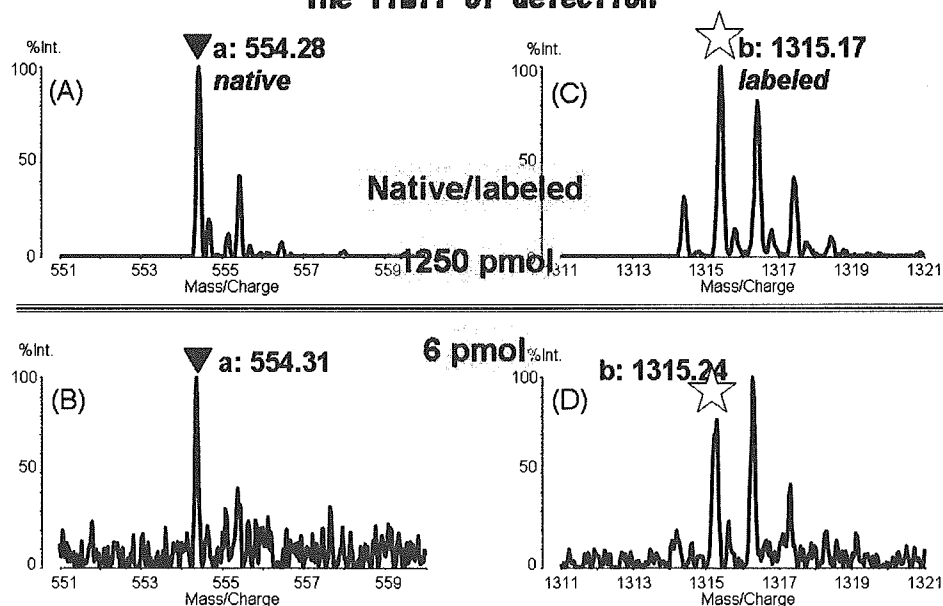
Relative quantification of glycine



The linear correlation coefficients (r^2) is 0.9995, which indicate the utility of this derivatization method for relative quantification by MALDI analysis.

16

The limit of detection



The limit of detection for leucine-enkephalin derivatized by reagent 1 was in the low picomole range using reflectron negative ion mode of MALDI-TOF MS.

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

LC/MS/MS を用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発
ならびに解析

分担研究者：鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長

研究要旨

尿などの非侵襲サンプルを用いた質量分析(MS)による新規プロテオミクス、ペプチドミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、LC-MS/MS を用いた網羅的プロテオーム、ペプチドーム解析手法に関する基礎的検討を行った。網羅的比較解析による安全性予測マーカーの検出のためには、MS にて検出可能なペプチドの数を増やすことが成功への第一条件である。本年度は、LC-MS/MS としての分析条件の検討を行い、本研究の目的に添った解析手法の確立を行った。LC-MS/MS を用いた解析においては、その感度を上げるため LC の流速を落とすことが有効な手段であり、KYA 社のスプリットレスナノフローLC システムを用いることにより、毎分数百ナノリットルの流速で、グラジエントを用いた安定かつ再現性のある測定が可能となった。用いた MS は Q-TOF 型の QSTAR-XL で、MS の特性が解析法の決定に大きな要因となった。QSTAR-XL を用いた場合、流速 200-300 nl/min でエレクトロスプレーを用いた測定が最適であり、データ依存的 MS/MS 測定によりペプチド検出とともに MS/MS 測定による同定が可能であった。通常、親イオンの選択のための TOF マス測定に 1 秒、MS/MS 測定に 1 秒間のサイクルにて切り換え測定を行うため、この所要時間が検出可能な総ペプチド数を規定することになる。30 分程度のグラジエントによる LC 測定を行う場合、この制限により理論上検出可能なペプチドは 900 となる。平均 3 個程度のペプチドによりタンパクが同定されるとすれば、同定可能なタンパク数は 300 となり、一般的な 2 次元電気泳動を用いた解析には及ばないことになる。さらに検出可能なタンパク数を増やすためには、事前にサンプルを複数のフラクションに分離する多次元 LC の手法が必要となるが、本研究の目的上、多数のサンプルの解析結果をもとにマーカーの選択を行わなければならないため、所要時間の上で現実的とは言えない。そこで、ペプチドの検出と同定を分離し、TOF マスにおける網羅性を高める事により、サンプル間のペプチドレベルの発現比較を行い、発現に差があったペプチドピークのみを同一サンプルをもう一度測定することにより同定を行うという 2 段階でのアプローチ (TOF-MS dependent 2-step focussed identification) をとることにした。ラット尿サンプルより、トリプシン消化の後、1 時間のグラジエントによるナノフローLC/MS 測定により、1000 以上のペプチドが検出可能であり、これらを視

覚的に表示させるため、MS の raw データより各ピークを抜き出し、3 次元プロットを行うためのデータ処理法を開発した。今後は、このプロセスを自動化したソフトウェアの開発を行うとともに、同位体ラベル法 (ICAT および ITRAQ) の利用による定量的比較法の利用を検討し、同時に同位体ラベルを用いない定量手法の検討を行う予定である。

研究協力者

押澤 正 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
主任研究官

Suresh Thiruppathi
国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
流動研究員

A. 研究目的

医薬品開発におけるトキシコゲノミクス研究で得られた情報に加えて、毒性に基づく細胞環境変化 (内因性物質の代謝変動) の情報が毒性の早期予測ならびに詳細なメカニズム予測には必須である。本研究は新規メタボロミクス・プロテオミクス高感度安全性予測技術を確立し、また尿サンプルのような非侵襲試料を活用することにより、本予測系のヒトへの外挿性を高め、医薬品開発におけるヒトを対象とした早期毒性予測ならびに詳細なメカニズム予測を実現することを目的とする。尿という非侵襲試料を主に用いることで、実験動物で得られたデータが比較的容易にヒトのデータと比較でき、実際に有用な毒性マーカーの評価が可能となる。トキシコゲノミクス研究で得られた機能タンパク質の発現情報を実際の毒性マーカーに結びつけるための有用な基

礎知見が構築され、ヒトへの外挿性に関する極めて有効な評価を可能にするとともにゲノム創薬におけるリード化合物の評価、医薬品としての最適化 (薬効を維持しながら毒性の抑制) を行う上で重要な基礎知見となる。本研究の成果は、安全性に優れた医薬品の開発に資すると共に、医薬品開発に要する時間・費用を軽減し、実験動物の負担軽減、医薬品価格の低下ならびにテーラーメイド医療に重要な医薬品の多様化につながり、国民の福祉の向上・医療費削減に貢献する。

本分担研究においては、尿中の生体成分のうち、タンパクおよびペプチドに着目し、これらを質量分析装置を用いた網羅的な解析により同定することで、肝毒性等に伴って変化するマーカーの検出を行うことを目的とする。有効なマーカーを検出するためには、いかに高感度に網羅的な検出が可能となるかが課題であり、本年度はナノ LC-Q/TOF 型タンデム質量分析システムを用いた解析手法の確立に向け、測定条件の検討を行った。また、大量に発生する質量分析データの解析についても、独自の解析を可能とするため、raw データからの解析手法に関して検討を加えた。

B. 研究方法

1. サンプル

LC-MS の条件検討のため以下のサンプルを使用した。

a. BSA 消化ペプチド

質量分析装置のキャリブレーションと条件検討のための標準サンプルとして、市販の牛血清アルブミントリプシン消化物 tBSA スタンダード (KYA 社) 10 pmol を 100 μ l のアセトニトリルに溶解して使用した。通常、1 μ l、100fmol を使用。

b. ヒト肝サイトゾル

第一化学薬品より市販されている、ヒト肝サイトゾル (個別ロット HG23、HK27、HG30、HG43) およびプールドヒト肝サイトゾルを使用した。

(還元アルキル化)

グアニジン塩酸塩 133 mg を精製水 175 μ l に溶解させ、sample 溶液 5 μ l (100 μ g protein 相当) を加えた。1.5 M Tris-HCl (pH 8.5) バッファー 40 μ l を加えて混合した後、0.1 M ジチオスレイトール溶液 10 μ l を加え、窒素ガスを 1 分間噴きつけて脱酸素し、密閉して室温で 30 分間放置した。0.2 M ヨードアセトアミド溶液 10 μ l を加え、アルミホイルで遮光し、室温で 1 時間静置した。

(試料の濃縮と脱塩)

試料溶液 (全量 240 μ l) に、氷冷したメタノール 600 μ l、クロロホルム 150 μ l および氷冷した精製水 450 μ l を順次加えて、転倒混和した。12,000 rpm で 3 分間遠心分離 (4°C) を行い、上層 (水相) を除去後、氷冷メタノール 450 μ l を加えて、転倒混和した。15,000 rpm で 5 分間遠心分離 (4°C) 後、沈殿を減圧下で 10 分程度乾燥させた。

(酵素消化)

乾燥した試料に、1.2 M 尿素溶液 in 0.1 M Tris-HCl バッファー (pH 8.5) 50 μ l を加えて溶解させ、トリプシン溶液 (1 μ g/ μ l) を 5 μ l 加えて、37°C で 16 時間保温して消化した。ギ酸 5 μ l を加えて、4°C、12,000 rpm で 5 分間遠心し、上清をナノフロー LC 用の試料とした。

c. ラット尿

共同研究機関の三共 (株) より提供されたラット尿サンプルのうち、コントロールとして蒸留水を 10ml/kg 強制経口投与したラット由来の 0-8 時間尿を使用した。採尿はステンレス製代謝ゲージを用い、1% アジ化ナトリウム水溶液 1ml を採尿管に添加後採取し、3000rpm, 5min 遠心後に分注し、-80°C で保存した。

(タンパクの沈殿)

200 μ l の尿を、アセトン 800 μ l を加えて -20°C で一晩沈殿させ、10,000rpm で 15 分遠心分離することにより沈殿を回収し、乾燥後、200 μ l のリン酸緩衝溶液に溶解した。

(還元アルキル化)

未処理の尿サンプル 200 μ l とともに、100 μ l の 15mM DDT を加え、60°C 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、100 μ l の 60mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。

(トリプシン消化)

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液を 1 μ l (1 μ g/ μ l) 加え、37°C で 60 分消化した。そして、Monotip C18 カラム (ジーエルサイエンス) を用いて脱塩精製を行った

d. 定量用タンパク混合液

ICAT 法の定量性の検証のためのサンプルとして、以下のタンパク質を異なる比率にて混合し、Denaturation Buffer を加え全量を 80 μ l とした。

ICAT Light 用

BSA(1)、LDH(18)、SOD(16)、RNaseA(12) (μ g)

ICAT Heavy 用

BSA(1)、LDH(12)、SOD(8)、RNaseA(18) (μ g)

以上より各タンパク質の量比 (H/L) は、BSA(1)、LDH(0.66)、SOD(0.5)、RNaseA(1.5) となった。これを ICAT 試薬でラベル化後、LC-MS/MS 解析によりそれぞれの量比を解析した。

2. ナノ LC

本研究にはナノ LC として Splitless Nano HPLC System DiNa (KYA テクノロジーズ)を使用した。配管には内径 50 μ m のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (KYA、W-3) およびトラップカラムを使用した。移動相は A (2% アセトニトリル、0.1% ギ酸)、B(80% アセトニトリル、0.1% ギ酸)の2種類の組成の溶媒を用い、A100%から B100%へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた (図 1)。

3. 質量分析装置

本研究に使用した質量分析装置は、ESI-Q/TOF 型 LC-MS/MS QSTAR-XL-PF (Applied Biosystems) であり、前述のナノ LC とオンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。通常の測定は、ポジティブ

モードを使用した (図 2)。ESI ナノスプレー用チップとして、PicoTip™ (New Objective 社製 FS360-75-15-D) を使用した。Valco 社製チタニウムユニオンを使ってチップをカラムと接続し、ナノスプレーインターフェースにて質量分析装置へと挿入した。この際、スプレー電圧は 1400V から 2000V の間でスプレーチップの劣化に応じて変更し、安定したスプレーを得ることを確認した。

質量分析装置の設定に関しては、基本的にメーカー推奨の以下のデフォルト値を使用した。

- TOF マス質量範囲 ; 300-1400m/z
- MS/MS 質量範囲 ; 50-1400 m/z
- same parent ion 30 sec,
- Collision energy: 0 (automatic)
- Accumulation time 1 sec.

その他のパラメーターは、測定を行いながら最適化した。

4. 安定同位体ラベル (ICAT) による定量的解析

基本的にアプライドバイオシステム社より提供された cICAT ラベリングキットとそのプロトコールに従って行った。

(変性と還元)

タンパク質溶液 5 μ l を、Denaturing Buffer を 75 μ l 入れたエッペンチューブに加え、2 μ l の Reducing Reagent を添加、混和し、10 分間煮沸した。

(ICAT 反応)

cICAT チューブ (Light, Heavy) に 20 μ l のアセトニトリルを加え、Vortex で混合し、遠心。サンプル A 溶液、B 溶液を全量を cICAT-Light、Heavy のチューブに移し、混合して遠心後遮光下、37°C で 2 時間

反応させ、Reducing Buffer を 3 μ l 加えて反応を停止させた。

(Trypsin 処理)

Light (サンプル A) と Heavy (サンプル B) を混合し、trypsin 溶液を加え 37°C で 15 時間 (overnight) 反応させた後、Cation Exchange Buffer-Load (CEX Buf-Load) を 2 mL 加え、Vortex で混合、遠心し、反応を停止した (pH2.5~3.3 に調整)。

(カラムによる精製)

陽イオン交換カラムに、CEX Buf-Load を 2 ml 通して平衡化し、前処理後のサンプルをゆっくりとカラムに注入し、1 ml の CEX Buf-Load でカラムを洗浄後、500 μ l の CEX Buf-Elute にてペプチドを溶出させた。

(ビオチン化ペプチドの回収)

Avidine affinity column に Affinity Buffer-Elute (Aff Buf-Elute) を 2 ml 流して活性化し、Aff Buf-Load を 2 ml 通して平衡化した。陽イオン交換カラムで溶出したフラクションに、等量 (500 μ l) の Aff Buf-Load を加えて中和し、カラムに載せた。Aff Buf-Load を 500 μ l を流して ICAT ラベルされていないペプチドの除去した後、Aff Buf-Wash1 および 2、1 ml ずつにてカラムを洗浄し、Aff Buf-Elute を 800 μ l にて ICAT ラベルペプチドを溶出させた。

(ビオチンタグの除去)

Cleaving Reagent A 95 μ l と Cleaving Reagent B 5 μ l を混合し、溶出液に加え、37°C で 2 時間反応させた。遠心濃縮機にて 30~60 分乾燥させた。

(LC-MS/MS による解析)

DiNA ナノ LC を使い、300 nl/min、50 分間のグラジエントによりペプチドを溶出させ、Qstar-XL にて MS/MS 測定を行い、ProICAT ソフトウェアにより同定と定量を行った。

5. データ処理

QSTAR-XL による質量分析データは、基本的に付属のソフトウェアである

AnalystQS を用いて解析される。この際、MS/MS 測定はデータ依存的に行い、一度の TOF マス測定に対し自動的に二つの親イオンを選択し、それぞれ積算時間 1 秒にて MS/MS の測定を行った。

Raw データの解析のため、Analyst にて作成される Wiff 形式ファイルの加工のため、mzXML への変換ツールとして、Systems Biology Institute より提供されている mzStar というソフトウェアを利用した。さらに、mzXML 形式ファイルを、Pep3D というソフトウェアを利用することで、LC-MS データとしての 3D グラフによる可視化を行った。

C. 研究結果

1. LC-MS の測定条件の検討

KYA 社ナノ LC とアプライドバイオシステム社 QSTAR-XL をオンラインにて接続し、図 1 に示すような LC-MS/MS システムを構築した。分析カラムとスプレーチップを Valco 社のユニオンを用いて接続することにより、デッドボリュームを最小化し、ナノスプレーインタフェース上に設置した。各社より販売されているスプレーチップを種々検討した結果、使用する測定条件にお

いてスプレーの安定性および耐久性に優れ、かつ比較的安価であった NewObjective 社の PicoTip を使用した。通常毎分数百ナノリットルの流速で測定を行うが、チップにかけるスプレー電圧は、新品の場合 1400V 程度から安定したスプレーが可能であり、劣化とともに 2000V 程度まで電圧を上げることにより、使用可能であった。

標準サンプルとして、BSA 消化物 100 fmol を用いて LC を含めた条件検討を行い、MASCOT サーチによる同定ペプチドのカバー率 60-80% が得られている (図 3)。LC の流速に関しては、流速を遅くするほど感度は上げられるが、現実的に 100 μ l/min 以下に落とすと安定したスプレーが得られにくいため、200-300 μ l/min を標準的に用いることとした。また、グラジエントに関しては、その所要時間を長くするほどペプチド溶出時間を長くすることができ、特に複雑な混合物の測定においては有効であった。しかし、多検体を測定する場合には、各測定にかかる時間が長くなる程解析に時間を要する事から、60-90 分程度とするのが最も効率が良いと考えた。BSA 消化物の様なそれほど複雑性のサンプルでは、30 分のリニアグラジエントでも十分な結果が得られた。

また、BSA サンプルを使って質量分析計のキャリブレーションを行った場合、図 4 に示すように非常に質量精度の高い結果が得られた。(1 マスのずれは、親イオンの選択ミスによると考えられる)

通常の LC-MS/MS 測定においては、TOF マスを使って質量を正確に測定したのち、そのピークの荷数をソフトウェアにて判断して親イオンとしてのペプチドを選択し、

データ依存的な MS/MS 測定を行う。これは、MS/MS 測定を行うための親イオンの荷数を二価以上と測定する事により可能であり、一度の TOF マス測定に対し通常二つの親イオンを選択して MS/MS 測定を行う。この際に、各測定に要する積算時間は通常 1 秒が用いられるが、この積算時間を伸ばすことによりピーク強度が増し、感度を上げることができるが、測定時間が増えるため、解析可能なペプチド数が減ることになる。十分な MS/MS シグナルを得るためには、最低 1 秒程度の積算時間が必要なことからこの測定時間が解析可能なペプチド数を限定することとなる。

また、効率的にペプチドを親イオンとして選択するためのシグナル強度の最低値としてはデフォルト値である 10 を使用した。この場合、かなり低用量のペプチドシグナルまで検出可能となるが、MS/MS 測定によりデータベースサーチで同定可能なペプチドは、25-30 程度の強度が必要であった。

MS/MS 測定の際に、ペプチドの分解の程度を決める衝突ガスの collision energy の値は、0 を入力することにより親イオンの m/z に応じた最適なエネルギーが選択されるため (Rolling Collision Energy)、通常はこの値を用いた。

同じ親イオンを連続的に選択することを防ぐための機能として、一定期間同じ親イオンの選択を避けることができ、この時間を変化させながらカバー率を指標に最適化を行ったところ、30 秒程度の期間を設定することにより効率的な親イオンの選択が可能となった。通常ペプチドの溶出時間は 30 秒以上の幅を持つため、この程度の時間を設定してもピークの取り逃がしの可能性は

低いと考えられる。

2. 質量分析装置の限界

複雑性の高いヒトサイトゾルを使った解析から、同定されるタンパク数はある程度信頼性の低いものを含めて最高で 142 個であった (表 1)。この際、同定されたペプチドの数は数百に上るが、タンパク質の同定数をさらに増やすためには、物理的な障壁が存在することがわかった。通常、一度の TOF マス測定に対し、二つの親イオンを選択し、それぞれの測定に一秒間の積算時間をかけて分析が行われるが、この測定条件では、最高で一分間に 40 回の MS/MS 測定が可能である。仮にすべての測定で異なるペプチドが同定できたとしても、30 分のペプチド溶出時間中に同定可能なペプチド数は 1200 となる。同定の効率を考えると検出可能なペプチドは半分程度である、一つのタンパク質の同定に複数のペプチドを要することから、2-300 程度のタンパク質の同定が上限であると予想される。積算時間はこれ以上短くできないことから、ペプチドの溶出時間すなわちグラジエント時間を長くすることが検出数を増やす上で重要となるが、一解析に要する時間が長くなり、多検体の解析を必要とする場合には、解析時間がかかりすぎるという問題が生じる。

3. 検出ペプチド数を増やすための方針

複雑なサンプルになればなるほど、TOF マス測定には含まれるが、親イオンとしての選択には漏れる様なペプチドピークが増える事になる。MS/MS 測定に依存した同定法においては、こうした取りこぼしが避けられないが、すべてを同定することをあき

らめ、TOF マス中に検出されるペプチドピークに注目して、その変化を追うことでより多くのペプチドを解析の対象とできる。TOF マスでのペプチドイオンピークの変化を比較することにより、発現の変動したペプチドのみに着目し、次の測定時にそれらのみを MS/MS 測定して同定することにより、より効率的な解析ができると期待できる。このような方針に基づいて、我々はまず TOF マスデータを可視化し、ペプチドシグナルの検出状況を把握する事をめざした。残念ながら Qstar に付属の Analyst QS では、そのような表示機能は付随していないため、raw データの取りだしを含めその他の利用可能なツールを検討することにした。その結果、Systems Biology Institute よりプロテオミクス用のツールとして無償で提供されている、mzStar と Pep3D というソフトウェアが有用であることがわかった (Li X-J, Pedrioli PGA, Eng J, Martin D, Yi EC, Lee H, Aebersold R. (2004) "A tool to visualize and evaluate data obtained by liquid chromatography / electrospray ionization / mass spectrometry." Anal Chem 76:3856-60)。

図 5 に AnalystQS にて得られたデータの例を示すが、mzStar は Qstar-XL にて測定、保存された wiff 形式のデータファイルをより汎用性のある mzXML 形式のデータに変換するためのツールであり、これによりある程度 raw データの内容を把握することが可能となった。次に mzXML 形式のファイルを Pep3D ソフトにより読み込むことにより図 6 に示した様な、LC-MS データの三次元グラフ化が可能となった。グラフにおいて横軸は LC の溶出時間であり、縦軸は

ペプチドの m/z の値である。そして、各スポットの濃さがピーク強度すなわちペプチドの存在量に対応する。0.5 m/z 以内の間隔で同位体ピークが縦に並んで観察されるのがペプチド由来のピークであり、多数のペプチドシグナルを観察することができた。溶出時間と質量数の関係を見ると、溶出時間が遅いほど分子量の大きいペプチドが検出されていることがわかり、逆相カラムによる分離による影響であると考えられる。また、重要な点として、観察できるペプチドの m/z 値の上限は 1200 程度であり、TOF マスの測定範囲としてはこれ以上増やしてもあまりペプチドを検出できなかったことがわかった。これは、Q-TOF 型の質量分析装置の特性とも考えられ、今後注意が必要な点である。

3. ラット尿中のタンパク、ペプチド検出
コントロールのラット尿サンプルを用いて、尿中タンパクおよびペプチドの網羅的解析系確立のための条件検討を行った。まず、尿検体の前処理に関しては、C18 モノリスカラム (MonoTipR C18) によるペプチド精製、アセトン沈殿を検討した。

まず、直接尿検体 200 μ l を MonoTip カラムにかけ MW40,000 以下のタンパク、ペプチドフラクションを濃縮、精製し、50 μ l の 60%アセトニトリル、0.1%TFA にて溶出し、2 μ l を用いて LC-MS/MS による分析を行ったがペプチドピークを検出することができなかった。

次に、同じく 200 μ l の尿検体に 800 μ l のアセトンを加えて -20°C で一晩沈殿させ、200 μ l のリン酸緩衝溶液に溶解した。同時に、未処理の尿サンプル 200 μ l とともに、

還元アルキル化後トリプシンで消化し、Monotip にて脱塩精製を行った。100 μ l の 60%アセトニトリル、0.1%TFA にてタンパク、ペプチドを溶出した後、濃縮乾固後、10 μ l の同溶液に溶解した。

本サンプル 2 μ l を用いて LC-MS/MS 解析を行ったところ、高濃度にペプチドが検出でき、27 倍希釈後も十分な量のピークが観察された。この結果より、尿サンプル量は解析に十分であることがわかった。流速 200 μ l/min による解析によりもっと多くのタンパク質が MASCOT 検索により同定された結果を表 2 に示す。また、アセトン沈殿の有無による差を見たところ、流速 300 μ l/min に解析で、それぞれ MASCOT 検索により同定されたタンパク数は 75 および 79 と同程度であった。しかし、重複して検出されたタンパクは 22 種類にとどまった (表 3)。これは、ペプチドヒット数の少ないタンパクにおいては、同定の信頼性が低い事を示唆するとともに、前処理法により検出されるタンパクが変わる可能性も示唆している。今後、さらに検討を加える必要があるが、アセトン沈殿をした場合、低分子量のペプチドは、沈殿せずに溶液側に残っていることが考えられるため、上清を使ってさらに多くのペプチドを検出できる可能性も考えられる。

4. 安定同位体 (ICAT) を使った定量比較に関する基礎検討

ICAT ラベルによる比較定量法の評価を行うため、既知タンパク質を一定の量比で混合した 2 種類のテストサンプルを調整した。これを用いて、ICAT 法による定量を行

った。ICAT ラベル法では安定同位体にて 9 マス違いの質量タグでラベルされるため、図 7 に示すように、2 サンプル中の対応するペプチドのピークが、2 価イオンの場合で 4.5 m/z 違いのピークとして観察され、それぞれのピークの面積比をアプライドバイオシステムズ社より提供されるソフトウェアである proICAT ソフトウェアにて定量するとともに、MS/MS のデータより同時に同定を行い、結果を得ることになる。当初、ProICAT を用いた自動解析は、理論値とは合わない測定結果を与えた。目視によるデータの確認の結果、これはピークエリアの算出のためのピークの選定に問題があるためと考えられた。そこで、同定されたペプチドに関してマニュアルで対応するピークのエリアを計算した結果、表 4 に示すように、理論値に比較的近い存在比の値が得られ、本手法の妥当性が確認できた。proICAT ソフトウェアに関しては、その後バージョンアップを行うことにより、問題は解決された。

次に実際のサンプルとして、ヒト肝サイトゾルの個人由来の 4 ロットに関して、ブールド肝サイトゾルとタンパクの存在比を比較した。その結果、表 5 に示すように各ロットに関して 50 前後のタンパク質が同定かつ定量された。このうち、多くのタンパク質に関してはすべてのロットにおいて共通に検出された。また、全体として各タンパク質の存在比は 1 に近かった。変化の見られたタンパク質としては、個別サイトゾルで増加したものとして FAS (HK27, HG30)、HBB (HG23, HK27)、KAC (HK27) などが、減少したものとして S108 (HK27)、DOPD (HG23)、ADH4 (HG43) などが観察

された。

D. 考察

プロテオミクスを用いた網羅的発現解析は、タンパク、ペプチドといった生体成分の変化をバイオマーカーとして捉える上で重要な技術であり、本研究においても毒性に伴って変化するマーカーの探索への応用を試みた。プロテオミクスの手法は、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析手法とは異なり、まだ完成した技術として確立されておらず、2 次元電気泳動をはじめ様々な手法が試されている。核酸と違いタンパク質は多様な正常を持った分子であり、増幅手法もないことから、高感度に網羅的な解析が難しく、ここが一番の課題となっている。2 次元電気泳動による解析が一般的に用いられているが、検出感度、網羅性といった観点からはまだ不十分であり、検出できるタンパク質は発現量の多い一部のタンパクに限定されている状況である。分離技術としてのゲル電気泳動は、手軽ではあるが試料のロスなど高感度化をめざす際の障壁も多いため、我々は、液体クロマトグラム (LC) を用いた、オンラインでの LC-MS/MS 解析を用いてより高感度な検出法の確立をめざした。現在、質量分析計 (MS) の技術革新はめざましく、フェムトモルレベルでのペプチドの検出が容易になっている。検出器として MS を用いることにより、高感度なペプチドの検出が期待でき、さらに接続する LC に関しても、その流速を毎分ナノリットルレベルにまで落とすことにより、微量試料からの高感度分析が可能になると期待できる。

こうした背景から我々は、オンラインナノ LC-タンデム MS/MS システムを用いた網羅的ペプチド解析系の構築へ向けて基礎的検討を行うことにした。当研究機関にて利用可能なタンデム型質量分析装置は、四重極/飛行時間(Q-TOF)型の Qstar であり、この装置の特性を生かした分析条件について検討した。即ち、TOF を用いることにより高分解能な測定が可能であるため、複雑なサンプルの分離には向いていることがわかった。一方で、欠点としてはイオントラップ型などに比べ、MS と MS/MS のスイッチングによる測定に要する時間が少し長いため、ペプチドが溶出する一定時間の間に MS/MS 測定可能な親イオンの数が制限されることになり、網羅性を高める上で一番の障壁となることがわかった。この解決策としては、2 次元 LC などの前分離を行い、検出可能な親イオン数を増やすということが考えられるが、少数のサンプルには適応できても、多検体を比較しなければいけない本研究の目的からはやや現実的ではないと考えられた。そこで、精度の高い TOF マス測定を生かす意味で、MS/MS 測定による同定をいったんあきらめ、TOF マスのみを効率的に測定し、その中で発現の違いが見られたピークのみに着目して、もう一度同じサンプルを流し直して、それらのみを同定するというアプローチを取ることにした。幸い、少量の尿サンプルでもペプチドのシグナルは十分検出可能であることがわかり、こうした多重解析は十分実現可能であることが判明した。

次に、既存の解析ソフトウェアである AnalystQS を用いた場合に、どうしても機能上制約があるとともに、解析精度に疑問

点が残ったため、独自の解析を可能とするための生データの取り出しと加工に関して検討を加えた。幸いフリーのツールとして Web 上に利用可能なソフトウェアがあり、これらを用いて、Qstar 独自のファイル形式である Wiff ファイルから raw data を取り出し、一般性のある mzXML ファイルへと変換することができた。さらに、Pep3D という可視化ツールを使うことにより、2 次元電気泳動と類似した 3 次元プロットを得ることができ、全体のペプチド溶出のパターンを把握することができた。今後は、さらに詳細なデータ解析を可能とするため、raw data からのデータ解析のソフトウェアを独自に開発する予定であり、その利用によりさらに効率的なペプチドの検出と同定が可能となることが期待される。

また、ペプチドの溶出パターンから得られた情報として、アルブミンなど一部の発現量の多いペプチドが測定上の邪魔になることがわかった。この点は、血清を用いたプロテオミクスでは既に指摘されている問題で、これらを取り除くため抗体カラムを用いたキットが市販されている（例：アジレント社、Multiple Affinity Removal System）。マウス向けのものが利用可能で Albumin、IgG、Transferrin が除去可能あり、ラットサンプルにも適応可能と思われるため、今後はこうしたキットを利用してメジャーなタンパクの除去の手法も検討する予定である。ちなみに、図 6 において丸印で囲んだピークはアルブミン由来であり、これらを除ける事が期待できる。その他、いくつかの強いシグナルについては一部同定できているが、未同定のものもあり、今後これらの由来とともに、それらの除去も

検討したい。

最後に、定量的解析に向けては、質量分析計の定量性の問題から、安定同位体ラベル法を用いた検討が必要と考えられた。アブライドバイオシステム社から提供されている cICAT 試薬を用いて検討を行ったところ、ある程度信頼性を持った定量比較を行うことが可能であった。今後は、TOF マス分析に ICAT を組み合わせることにより、正確な定量比較を行うとともに、データの複雑性の軽減の上でも有効であることが期待される。通常タンパク質をトリプシン消化することにより複数のペプチド断片になり、試料の複雑性が一気に増すことが解析を困難にしているが、cICAT ラベル化法によりシステイン残基をもつペプチドのみが就職され、カラムで分離されるため、試料の複雑性を落とすことができる。一方、最近では iTRAQ という新しいラベル化法もできており、こちらも 4 種類までのサンプルを同時に比較可能であるという点で注目される。この場合 MS/MS に依存した解析となるが、解析手法を工夫することにより効率的な測定が可能であると期待できる。

E. 結論

オンライン nanoLC-MS/MS を用いることにより、尿中のペプチドおよびタンパクを網羅的に解析する手法の確立を行なった。質量分析計の特性解析から、定量と同定を分離した 2-step のアプローチがより有効であると考えられた。また、大量に得られるマスデータの有効な解析が課題であり、現段階で利用可能なソフトウェアを使って raw data から、TOF マスに関する 3 次元

プロットを作成することができた。今後、有効性を確認した安定同位体を用いたラベル化法を取り入れるとともに、現状で明らかとなったいくつかの課題をクリアし、より高感度で網羅的な解析手法へと改良をし、実際のサンプルの解析へと応用する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Kato TA, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K. Nitrogen-substitution effect on in vivo mutagenicity of chrysene. *Mutat Res.*, 586, 1-17. (2005)

Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa T, Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Sato Y, Sawada J, Inoue K, Shudo K, Ohno Y, Yamaguchi T. HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 94, 303-309. (2005)

Kawakami T, Hoshida Y, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ikenoue T, Obi S, Sato S, Teratani T, Shiina S, Kawabe T, Suzuki T, Hatano N, Taniguchi H, Omata M.

Proteomic analysis of sera from
hepatocellular carcinoma patients after
radiofrequency ablation treatment.
Proteomics. 16, 4287-4295. (2005)

2. 学会発表

鈴木孝昌, 欒 洋, Palanisamy 田中剛太郎,
中嶋圓, 浜田修一, 三浦知弘, 降旗千恵
Collaborative study on the toxicogenomics
in JEMS/MMS: Quantitative RT-PCR analysis
on the selected genes by the GeneChip
日本環境変異原学会第 34 回大会(2005.11)

欒 洋, 本間正充, Suresh Thiruppathi, 小
木 美恵子, 山口照英, 鈴木孝昌
Application of CGH and SNP arrays for
chromosome analysis
日本環境変異原学会第 34 回大会(2005.11)

鈴木孝昌, 降旗千恵
Transcriptomics — Can gene expression
profiles distinguish the genotoxic
hepatocarcinogens?
日本環境変異原学会第 34 回大会(2005.11)

三浦知弘, 欒 洋, 戸部香織, 仲地豊, 近藤
恭光, 鈴木孝昌, 田代英夫, 降旗千恵
DNA マイクロアレイを用いた非遺伝子傷害
性肝発癌物質投与マウス肝臓における遺伝
子発現解析
第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

原田基裕, 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 中
嶋圓, 浜田修一, 鈴木孝昌, 兵庫淳志, 田代

英夫, 榊佳之, 降旗千恵
Original oligonucleotide microarray によ
る 5 種類の遺伝子傷害性肝発がん物質と
phenobarbital と ethanol の遺伝子発現解析
第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

宮島正樹, 欒 洋, 渡辺貴志, 鈴木孝昌, 村
上勝彦, 野村靖幸, 降旗千恵
大脳萎縮を示す老化促進モデルマウス
(Senescence-Accelerated Mouse: SAM)
SAMP10 の原因遺伝子に関する大集積 DNA マ
イクロアレイを用いた解析
第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

鴻野貴司, 欒 洋, 鈴木孝昌, 野村靖幸, 太
田浩良, 降旗千恵
8 ヶ月齢の老化促進モデルマウス
(Senescence-Accelerated Mouse: SAM)
SAMP8 海馬における Transthyretin の発現低
下
第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

Toshie Kanayasu-Toyoda, Tomofumi Fujino,
Tadashi Oshizawa, Takayoshi Suzuki,
Tomoko Nishimaki-Mogami, Yoji Sato,
Jun-ichi Sawada, Kazuhide Inoue, Koichi
Shudo, Yasuo Ohno, Teruhide Yamaguchi
HX531, a retinoid X receptor antagonist,
inhibited the 9-cis retinoic acid-induced
binding with steroid receptor
coactivator-1 as detected by surface
plasmon resonance
第 78 回日本生化学会大会(2005.10)

Declan Mulhern, Shinya Yokokawa, Hitoshi
Shimizu, Arihiro Kohara, Takayoshi,

Suzuki, Haruhiko Okuda, Naoki Miyata, Shin-ichi Ninomiya and Tetsuji Sudo
Gene expression profiles of
hepatotoxin-treated human hepatocytes
can be used to cluster unknown compounds
according to their mode of actions
第32回日本トキシコロジー学会学術年会
(2005.6)

横川 伸也, Declan Mulhern, 清水 和, 小原
有弘, 北島 正人, Jose Martin Ciloy, 鈴木
孝昌, 奥田 晴宏, 宮田 直樹, 二宮 真一, 須
藤 哲司
網羅的遺伝子発現解析データを用いた肝毒
性予測モデルの構築
第32回日本トキシコロジー学会学術年会
(2005.6)

Takayoshi Suzuki
Organ-specific toxicity of aristolochic
acid; studied by the transgenic mouse
mutation assay and the DNA microarray
2nd International Conference and
Exposition on the Modernization of
Traditional Chinese Medicine (成都、中国)

Suzuki, T. , Luan, Y. , Honma, M. , Kogi,
M. , and Yamaguchi, T.
Application of microarrays for chromosome
analysis
第9回国際環境変異原学会サテライトシン
ポジウム”トキシコゲノミクス” (ハワイ、
米国)

C Furihata, K Tobe, Y Nakachi, Y Kondoh,
M Nakajima, S Hamada, C Namiki, T Suzuki,

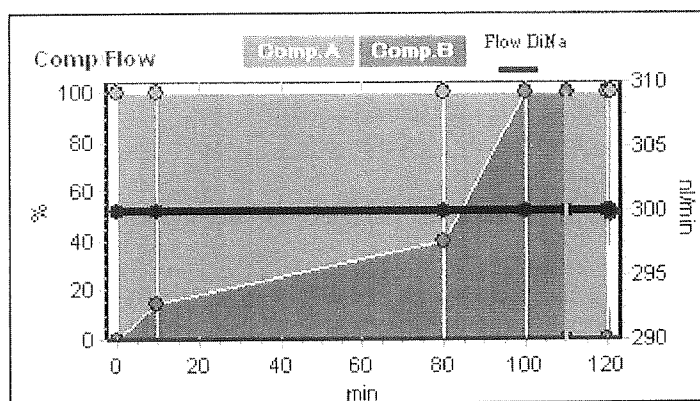
A Hyogo, M Hoshino, M Harada, T Tashiro,
H Ito, H Inazumi, Y Sakaki and H Tashiro
Original oligonucleotide microarray-
based gene expression profile induced by
genotoxic carcinogens and Phenobarbital
in mouse liver
第9回国際環境変異原学会サテライトシン
ポジウム”トキシコゲノミクス” (ハワイ、
米国)

鈴木孝昌
変異原処理による in vivo/in vitro 遺伝子
発現
日本動物実験代替法学会第19回大会
(2005.12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1 LCのグラジエント例



Solvent A; 2% アセトニトリル、0.1% ギ酸

Solvent B; 80% アセトニトリル、0.1% ギ酸

Flow rate; 300 nl./min

図2 オンラインナノ LC-MS/MS (Q-TOF) システム

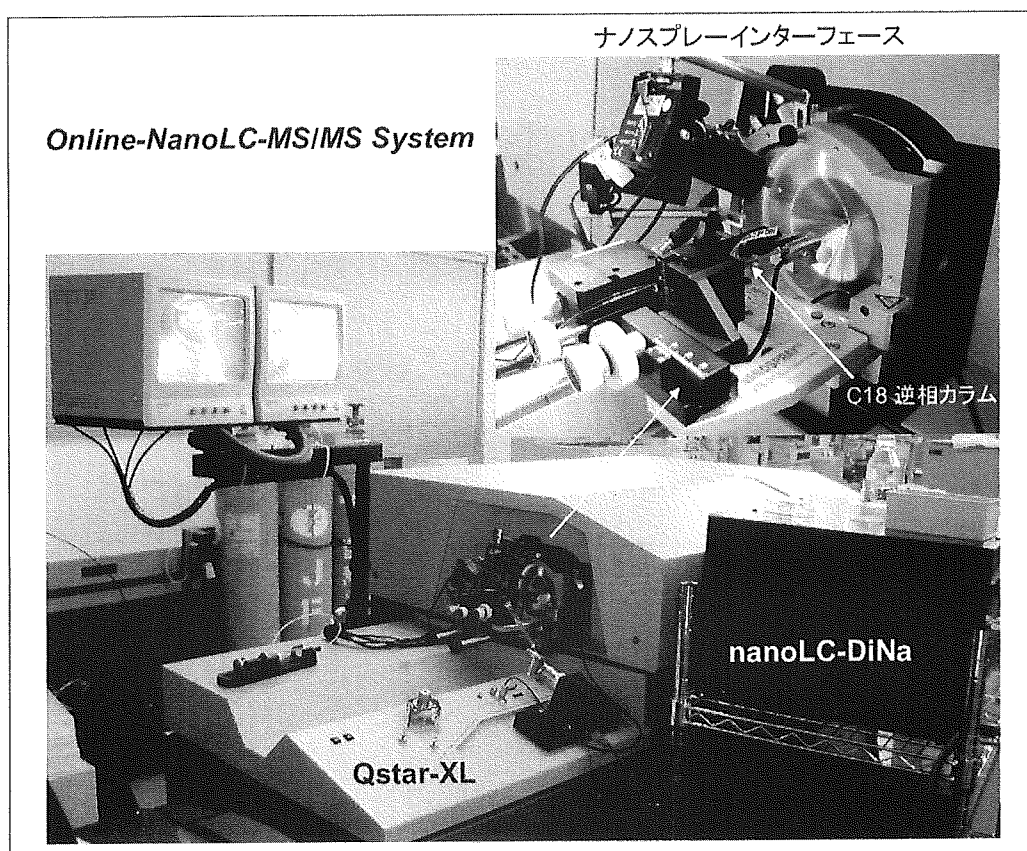


図3 BSA サンプルの MASCOT 検索による同定結果とカバー率

Protein View	
Match to: ALBU_BOVIN Score: 2891	
(P02769) Serum albumin precursor (Allergen Bos d 6) (BSA)	
Sequence Coverage: 81%	
Matched peptides shown in Bold Red	
1	MKWVTFISLL LFFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA
51	FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
101	VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKLK PDPNTLCDEF
151	KADEKKFWGK YLYEIAARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC
201	LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERAKAWVA RLSQKFPKAE
251	FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLCADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
301	CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAQDAFL
351	GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL
401	KHLVDEPQNL IKQNCQFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS
451	RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTGCC
501	TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT
551	ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
601	STQTALA

図4 BSA 消化物のサーチ結果のマス値のずれ

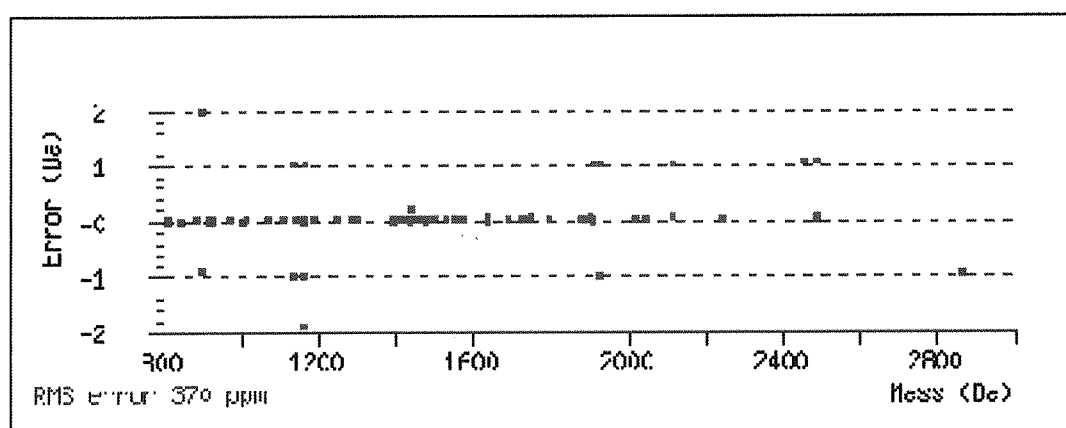


図5 ラット尿サンプルの LC-MS 解析例

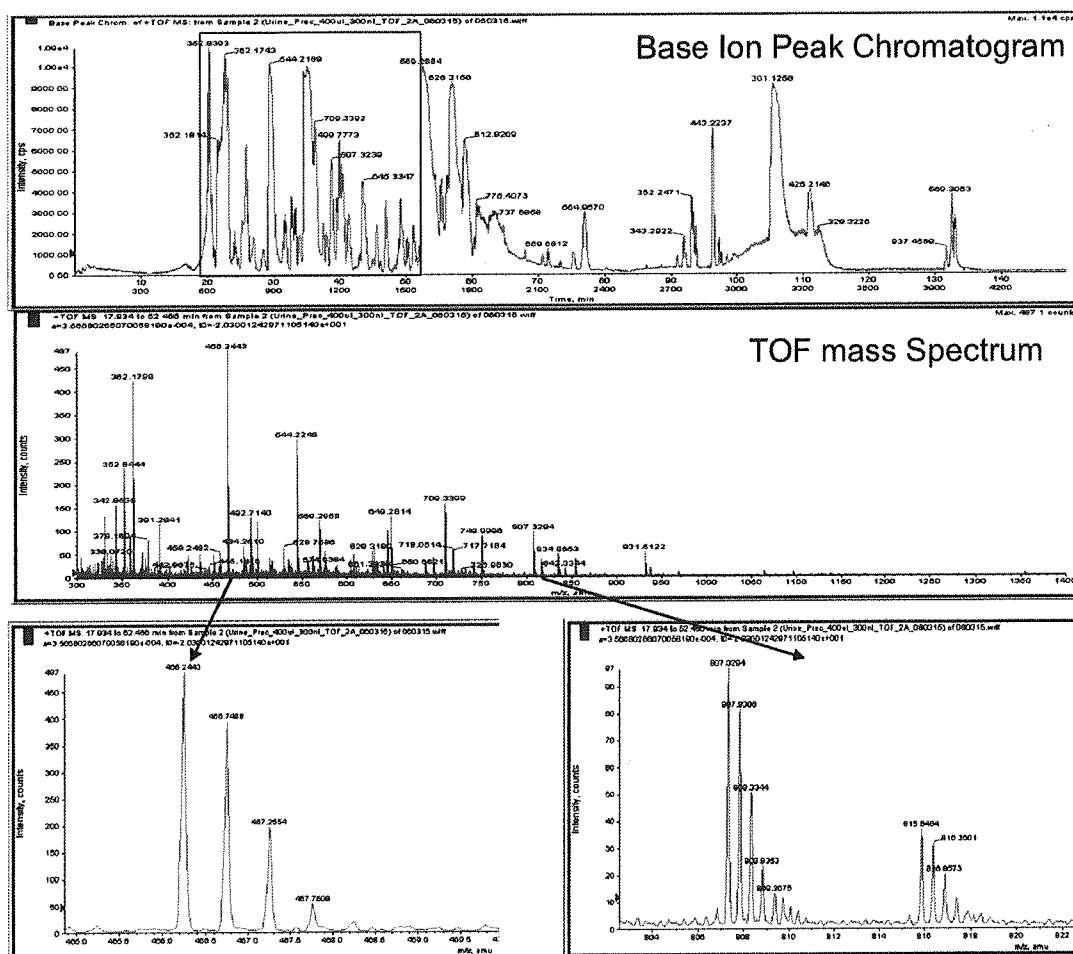


図6 ラット尿サンプルの LC-MS 解析データの三次元プロット

