

厚生労働科学研究費補助金
厚生労働科学特別研究事業

疾患関連タンパク質解析手法の比較検討と追加手法の検討

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 平野 久

平成19(2007)年4月

目 次

I. 総括研究報告	
疾患関連タンパク質解析手法の比較検討と追加手法の検討-----	1
平野 久	
II. 分担研究報告	
1. iTRAQ法およびショットガン法によるタンパク質の検出・同定-----	14
平野 久	
補足資料-----	21
2. iTRAQ法によるタンパク質定量解析 -----	26
中山敬一	
3. 同位体標識法(cICAT)による血清タンパク質発現解析研究 -----	34
金子 勲	
4. SELDI法によるタンパク質定量解析-----	43
山田哲司	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	48
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	58

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別事業）
「疾患関連タンパク質解析手法の比較検討と追加手法の検討」
総括研究報告書

主任研究者 平野 久
横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻 教授

研究要旨

近年、質量分析やその周辺技術が発達し、cICAT 法だけでなく、iTRAQ 法や SELDI 法、ショットガン法なども疾患関連タンパク質の効率的な検出・同定に利用できる可能性が出てきた。そこで、本研究では、iTRAQ 法や SELDI 法などを用いて市販の健常人血清を分析し、それぞれの方法の利点と欠点を明らかにした。cICAT と iTRAQ 法を比較した結果、iTRAQ の方が多数のタンパク質を検出・同定、定量することができること、再現性や誤差に関しては、両方法に差がないこと、スループットは iTRAQ の方が 3~10 倍高いことなどがわかった。iTRAQ 法では、質量分析装置の種類によって検出・同定、定量できたタンパク質数に違いはなかった。しかし、cICAT と iTRAQ 法、LC-MALDI と LC-ESI、どちらを用いるかによって検出されるタンパク質の種類にはかなり違いが見られた。今後、疾患関連タンパク質をより網羅的に検出するためには、同じ試料を異なる方法を用いて分析することが重要であろう。一方、通常の SELDI 法ではなく、Q-TOF MS を用いた SELDI 法によって再現性よく多数のタンパク質を検出し、定量できることが明らかになった。SELDI 法は、アミノ酸配列を決定できないので、タンパク質の同定は容易でないが、同位体標識やプロテアーゼ消化を必要としないため、ハイスループットな分析が可能であるので短期間の分析に適した方法であると考えられた。

分担研究者氏名・所属機関及び所属機関における職名

平野 久・横浜市立大学大学院国際総合科学研究科・教授
中山敬一・九州大学生体防御医学研究所・教授
山田哲司・国立がんセンター研究所化学療法部・部長
金子 勲・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施設）・生体試料分析部門長

トリー施設では同位体標識法（ICAT 法）を用いて疾患関連タンパク質の探索・同定を実施してきたが、近年、質量分析やその周辺技術が発達し、cICAT(同位体標識)法だけでなく、iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation) 法や SELDI (Surface enhanced laser desorption-ion ionization)法、ショットガン法のような手法も疾患関連タンパク質の効率的な検出・同定に利用できる可能性が出てきた。しかし、これらの手法によって cICAT 法より効果的あるいは効率的に測定ができ

A. 研究目的

これまで創薬プロテオームファク

るのか、どの手法でも同じ測定結果を得ることができるのかなどについてはまだよくわかっていない。そこで本研究では、市販健常人血清のタンパク質を cICAT 法、iTRAQ 法、SELDI 法などで検出・同定し、それぞれの結果を比較することにより、各測定方法の利点及び問題点を明らかにすることを目的とする。本研究の成果を基盤として、創薬プロテオームファクトリー施設に新しい技術が導入されれば、施設機能の充実と、データの信頼性の向上を図ることができると考えられる。

B. 研究方法

試料の調製

BIOPREDIC International 社より購入したヒト血清試料 A~D を九州大学生体防御医学研究所の中山敬一教授が抗体カラムで処理し、高発現タンパク質を除去した後、共同研究機関（横浜市立大学、国立がんセンター研究所、創薬プロテオームファクトリー）に配布した。試料 A と D が同じ試料であることは分析終了時まで各機関の研究者には知らせなかった。

cICAT 法による分析

血清試料 4 検体 (A~D) と、4 検体を等量混合した標準血清 (R) をそれぞれ Heavy(H)試薬と Light(L)試薬で標識した。H 及び L 試薬標識試料を等量混合し、アセトン沈殿によって脱塩濃縮した後、トリプシンで消化した。得られた消化物中の標識されたペプチドをアビジンカラムで精製した。ついでペプチドを 25 画分に分画し、それぞれの画分を C18 カラムで脱塩し、nano LC/Q-Star XL(Applied Biosystems 社 (AB社)),

ESI-Q/TOF MS)で質量分析を行った。得られたデータを cICAT 用日立統合データソフト (HiSpec) で解析した。

なお、Q-Star XL で分析する場合は、ウシ血清アルブミン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 55%以上)が得られることを確認した後、測定を行った。

iTRAQ 法による分析

4 種類の試料中のタンパク質を還元アルキル化した後、トリプシンにより消化した。消化後、生じたペプチドを iTRAQ 試薬で標識した。試料 A のタンパク質由来のペプチドについては 114 Da のタグを、B には 115 Da、C には 116 Da、そして、D には 117 Da のタグを標識した。標識したペプチドを 2D-nano LC によって分離した。2D-nano LC では、一次元目に陽イオン交換カラム、二次元目にはトラップ用逆相カラムと分析用逆相カラムを用いた。分離されたペプチドのアミノ酸配列を 3 種の MS、すなわち、ESI-Q/TOF MS(AB 社 QSTAR)、ESI-LIT/TOF MS (日立 Nano Frontier LD)、MALDI-TOF/TOF MS (AB 社 4800) によって分析した。ESI-Q/TOF MS 及び ESI-LIT/TOF MS の場合には、2D-nano LC から溶出されたペプチドを直接 MS に注入して分析を行った。また、MALDI-TOF/TOF MS を用いる場合には、分離されたペプチドとマトリックスを混合しながら MALDI の試料ターゲットにスポットとして添加した。30 秒で 1 スポットの割合で、全部で 191 スポットのペプチド画分が添加

された。そして、各スポット中のペプチドのアミノ酸配列を MALDI-TOF/TOF MS によって分析した。

ショットガン分析

血漿に多量に含まれるタンパク質を中空糸膜や抗体カラムを用いて除去した後、逆相 HPLC によって7画分に分離した。そして、各画分を還元アルキル化し、トリプシンで消化して 2D-nano LC ESI-Q/TOF MS(Micromass 社 Q-TOF Premier) で分析(ショットガン分析)した。この実験で得られた結果と上記の iTRAQ で分析した結果とを比較した。

SELDI 法による分析

血清 4 検体(A-D)をバイオラッド社のプロトコールに従い変性させ、3種類 4条件のプロテインチップ H50、CM10 pH4、CM10 pH7、IMAC、(Bio-Rad 社)に乱数計算にてランダムに各 8 スポットずつ(合計 128 スポット)バイオメック 2000(Beckman Coulter 社)を用いてスポットティングした。国立がんセンターと Perkin Elmer 社と共同開発したプロテインチップ計測用アダプターを用い、四重極搭載高分解能質量分析計 proTOF 2000 (Perkin Elmer 社)で計測した。このアダプターの開発によって質量分析計にプロテインチップが計 6 本搭載できるようになった。各検体は 8 回の重複計測し、国立がんセンター研究所で開発した高速度計算システム NCC-ProteoJudge を使用した。

研究分担関係

平野 久(横浜市立大学) : MALDI-TOF/TOF MS を用いた iTRAQ 分析、ショットガン分析

中山敬一(九州大学) : ESI-Q/TOF MS 及び ESI-LIT/TOF MS を用い

た iTRAQ 分析

山田哲司(国立がんセンター研究所) :

SELDI 分析

金子 勲(創薬プロテオームファクトリー施設) : cICAT 分析

(倫理面への配慮)

提供者の同意を得て採取され、匿名化された市販血清検体を用いて研究を行った。

C. 研究結果

cICAT と iTRAQ 分析結果の比較

cICAT で標識したペプチドを ESI-Q/TOF MS で、また、iTRAQ で標識したペプチドを ESI-Q/TOF、ESI-LIT/TOF MS 及び MALDI-TOF/TOF MS で分析したところ、iTRAQ で標識して分析した場合は、MASCOT スコア 35 以上で約 100 ペプチドを、cICAT 標識ではその約 1/2、MASCOT スコア 25 以上では iTRAQ 標識で 400~600、cICAT ではその約 1/3、そして、MASCOT スコア 20 以上では iTRAQ 標識で 700~1,000、cICAT 標識ではその約 1/5 のペプチドを検出・同定することができた。このように iTRAQ 法が cICAT 法よりかなり多数のタンパク質を検出・同定できることが明らかになった。

また、スループット(単位時間当たり処理試料数)に関しても、cICAT 法よりも iTRAQ 法の方が 3~10 倍高かった。

なお、再現性や誤差に関しては iTRAQ と cICAT の間で大きな違いはなかった。いずれの方法でも同一試料である試料 A と D の分析値の分散は、試料 A と B、及び試料 A と C の分散に比べてかなり小さかった。分析にかかる経費についても差はな

かった。

一方、cICAT 法で同定された 77 のタンパク質 (MASCOT スコア 20 以上) が iTRAQ 法でいくつ検出できるか調べた。その結果、77 のうち 69 タンパク質が iTRAQ 法で検出されていることがわかった。cICAT 法でのみ検出されたのは 8 タンパク質だけであった。

iTRAQ とショットガン分析結果の比較

これまでの研究では、血漿に多量に含まれるタンパク質を中空糸膜や抗体カラムを用いて除去した後、逆相 HPLC によって 7 画分に分離した。そして、各画分を還元アルキル化し、トリプシンで消化して 2D-nano LC ESI Q-TOF MS で分析(ショットガン分析)した。こうして分析することによって 3,000 近くの血漿タンパク質を半定量的に検出・同定できることがわかった。そこで、本研究では、血清 1 試料についてこの方法に準じて分析を行った。そして、この実験で得られた結果と上記の iTRAQ で分析した結果とを比較した。ショットガン分析では、1,818 のタンパク質を検出することができた。この際、MASCOT スコアが 50 以上のものを検出した。Minimum Ion Score Confidence Interval 85 % レベル (MASCOT スコア 25 以上に相当) で MALDI-TOF/TOF MS で検出された 488 のタンパク質がショットガン分析によって検出されているかどうか調べたところ、156 タンパク質(約 10 %)だけが検出されていることがわかった。共通して検出されたタンパク質の数は、予想以上に少なかった。

質量分析装置の比較

LC-ESI(Q-STAR)による分析結果

と LC-MALDI(4800 TOF/TOF MS) による分析結果を比較した。検出されたタンパク質の総数はあまり多くはないが、LC-ESI で 263、LC-MALDI では 282、両法で共通して検出・同定されたタンパク質はわずか 59(約 10 %)であった。

なお、スループットに関しては、LC-ESIの方が LC-MALDI より 2 倍程度高かった。

SELDI 法による分析

血清 4 検体(A-D)をプロテインチップにスポットティングした。四重極搭載直行型高分解能質量分析計にプロテインチップが計 6 本搭載できるプロテインチップ計測用アダプターを用い、四重極搭載高分解能質量分析計 proTOF 2000(Perkin Elmer 社)で計測した。proTOF 2000 の質量誤差は 0.015%程度であった。1000~30000 m/z の範囲で S/N 比 5 以上、存在比率 15%以上のピークが各プロテインチップあたり 495-823 本、4 種のプロテインチップで合計が 2366 本検出された。8 回の測定の間関係数(Log10 平均)は 0.9664-0.9868 で、再現性は高かった。変動係数は 0.1718-0.2663 であった。2366 全ての peak の値を用い階層的クラスタリングを行ったところ、検体 A と D が近似し、B と C とは大きく異なるという結果が得られた。実際に検体 A と D は同一個人から得られたものであった。症例間で異なるピークは肉眼でも多数認められた。

D. 考察

iTRAQ 試薬を用いた分析では、MASCOT スコア 25 以上で 400~600 のタンパク質が検出・同定された。血漿中には 4,000~5,000 のタ

ンパク質が存在すると推定されるので、今回検出されたタンパク質数は多いとはいえない。これまでの研究で、血漿タンパク質をトリプシンで消化する前に HPLC によって7画分ほどに分画すると、分画しない場合に比べて約 10 倍多数のタンパク質を検出できることがわかっている。また、健常人と川崎病患者の血漿の分析で、Protein iTRAQ 法を用いてタンパク質を iTRAQ 試薬で標識した後、ゲル濾過で分画、得られた画分をトリプシンで消化し、MALDI-TOF/TOF MS で分析したところ、通常の iTRAQ 分析より多数のタンパク質を同定することができた。おそらく上記の実験でもトリプシン消化する前にクロマトグラフィーで分画すれば、検出できるタンパク質数は飛躍的に多くなると考えられる。

Borchers ら(2006)は、iTRAQ 試薬で標識したタンパク質の検出・同定に LC-ESI と LC-MALDI のどちらが効率的なのかを調べた。彼らは、LC-ESI で 1,828 のペプチドを、また、LC-MALDI によって 4,133 のペプチドを検出し、MS/MS 分析を行った。そして、LC-ESI で 586 の量的に差異のあるタンパク質を、また、LC-MALDI で 930 のタンパク質を同定した。これらのタンパク質のうち、2 種類の方法で共通して検出・同定されたタンパク質は 414 (約 40 %) であった。これは、両方の方法で分析した方がより多数のタンパク質の解析ができることを示している。本研究でも LC-ESI(Q-STAR)と LC-MALDI(4800 TOF/TOF MS)を用いた分析結果を比較した。検出されたタンパク質の総数はあまり多くはないが、LC-ESI で 263、LC-

MALDI では 282、両法で共通して検出・同定されたタンパク質はわずか 59(約 10 %)であった。共通して検出されたタンパク質の数は、Borchers らの結果よりもさらに少なかった。本研究結果も、Borchers らの結果と同様、両方の方法で分析をした方がより多数のタンパク質が解析できることを示している。

なお、LC-ESI に比べ、LC-MALDI ではかなり多量の試料の調製が必要である。また、分析の速度もかなり遅い。しかし、LC-MALDI では試料を MALDI ターゲット上に固定して分析を行うため、繰り返して分析ができるという長所もある。

なお、cICAT 法で同定された 77 のタンパク質 (MASCOT スコア 20 以上) が iTRAQ 法でいくつ検出できるか調べたところ、77 のうち 69 タンパク質が iTRAQ 法で検出されていることがわかった。これは、おそらく cICAT 法では主として高含量タンパク質が検出されているためではないかと考えられた。

本研究では、iTRAQ 法の定量性を評価するため、二次元電気泳動で得られたタンパク質の相対量と iTRAQ 法で得られたタンパク質の相対量の相関を調べた。その結果、両法で得られた定量値の相関係数は約 0.5 であった。期待していた値より若干低いのは、2D-DIGE ではアイソフォームや翻訳後修飾を受けたタンパク質が複数のスポットとして検出されるのに対し、iTRAQ 法では単一のタンパク質として検出されてしまうためではないかと推察される。

ショットガン分析では、1,818 のタンパク質を検出することができた。同じ方法を用いて通常 3,000 近くの

血漿タンパク質を検出しているのに、今回のショットガン分析の効率はあまり高くなかった。今回の試料にはまだアルブミンをはじめとして高分子量のタンパク質がかなり残っていた。そのため、nano LC のカラムがしばしば詰まり、分析に支障を来した。検出されたタンパク質の総数が少ない原因はこの点にあると推察された。このことは、cICAT 分析においてもタンパク質同定に影響を及ぼした。

SELDI 法に関しては、プロテインチップ計測用アダプターの開発と四重極搭載高分解能質量分析計 proTOF 2000 の利用によって作業が顕著に効率化された。また、長期間にわたり質量分析計を安定的に維持することができるようになった。

E. 結論

本研究結果をまとめると次のようになる。

cICAT と iTRAQ の比較

- 1) iTRAQ の方が多数の血清タンパク質を検出・同定、定量を行うことができる。
- 2) 再現性や誤差に関しては、両方法に差がない。
- 3) スループットは iTRAQ の方が 3~10 倍高い。
- 4) 分析経費は差がない。

質量分析装置の比較

- 1) iTRAQ 法では、質量分析装置の種類によって検出・同定、定量できるタンパク質数に違いはないが、種類はかなり異なる。
- 2) スループットは LC-MALDI よりも LC-ESI の方が 2 倍程度高い。

SELDI 法による分析

- 1) 通常の SELDI ではなく、Q-TOF

MS を用いた SELDI 法によって再現性よく 1 試料約 1,000 タンパク質に相当する 2,000 ピークを検出し、定量することができる。

2) 同位体標識やプロテアーゼ消化を必要としないため、ハイスループットな分析が可能。21 検体/日の分析ができる。

3) プロテインチップは高価である。

4) アミノ酸配列を決定できないので、タンパク質の同定はむずかしい。

今後の研究手法

タンパク質は、種類によって性質が異なることが多いため、1 種類の方法ですべてのタンパク質を解析することは容易でない。このことは本研究結果からも明白である。同じ試料を異種の方法を利用して分析することが重要である。創薬プロテオームファクトリーには、各種 MS が装備されている。また、cICAT、iTRAQ、SELDI など様々な手法を利用できる環境がある。この優位性を利用して今後、研究を遂行することが望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shirane, M., Nakayama, K.I.:

Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science*, 314: 818-821 (2006).

Matsumoto, A., Onoyama, I.,

Nakayama, K.I.: Expression of mouse Fbxw7 isoforms is regulated in a cell cycle- or p53-dependent manner. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun., 350: 114-119 (2006).
- Hara, K., Nakayama, K.I., Nakayama, K.: Geminin is essential for the development of preimplantation mouse embryos. *Genes Cells*, 11: 1281-1293 (2006).
- Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H., Hara, E.: Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nature Cell Biol.*, 8: 1291-1297 (2006).
- Gao, Y., Kitagawa, K., Hiramatsu, Y., Kikuchi, H., Isobe, T., Shimada, M., Uchida, C., Hattori, T., Oda, T., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Tanaka, T., Konno, H., Kitagawa, M.: Up-regulation of GPR48 induced by down-regulation of p27Kip1 enhances carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Cancer Res.*, 66: 11623-11631 (2006).
- Pula, G., Schuh, K., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Walter, U., Poole, A.W.: PKC δ regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation. *Blood*, 108: 4035-4044 (2006).
- Shukla, A., Lounsbury, K.M., Barrett, T.F., Gell, J., Rincon, M., Butnor, K.J., Taatjes, D.J., Davis, G.S., Vacek, P., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Steele, C., Mossman, B.T.: Asbestos-induced peribronchiolar cell proliferation and cytokine production are attenuated in lungs of protein kinase C δ knockout mice. *Am. J. Pathol.*, 170: 140-151 (2007).
- Tu, X., Joeng, K.S., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Rajagopal, J., Carroll, T.J., McMahon, A.P., Long, F.: Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKC δ activation promotes bone formation. *Dev. Cell*, 12: 113-127 (2007).
- Yanagawa, M., Tsukuba, T., Nishioku, T., Okamoto, Y., Okamoto, K., Takii, R., Terada, Y., Nakayama, K.I., Kadowaki, T., Yamamoto, K.: Cathepsin E deficiency induces a novel form of lysosomal storage disorder showing the accumulation of lysosomal membrane sialoglycoproteins and the elevation of lysosomal pH in macrophages. *J. Biol. Chem.*, 282: 1851-1862 (2007).
- Itoh, Y., Masuyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Gotoh, Y.: The cyclin-dependent kinase inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex. *J. Biol. Chem.*, 282: 390-396 (2007).
- Sakai, T., Sakaue, H., Nakamura, T., Okada, M., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Kasuga, M.: Skp2 controls adipocyte proliferation during the development of obesity. *J. Biol. Chem.*, 282: 2038-2046 (2007).
- Uchida, T., Iwashita, N., Ohara-Imaizumi, M., Ogihara, T., Nagai, S., Choi, J.B., Tamura, Y., Tada, N.,

- Kawamori, R., Nakayama, K.I., Nagamatsu, S., Watada, H.: Protein kinase C δ plays a non-redundant role in insulin secretion in pancreatic β cells. *J. Biol. Chem.*, 282: 2707–2716 (2007).
- Mizokami, A., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Yamaguchi, T., Tanida, I., Takenaka, K., Nakayama, K.I., Fukami, K., Takenawa, T., Kominami, E., Moss, S.J., Yamamoto, T., Nabekura, J., Hirata, M.: Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of γ 2 subunit-containing GABAA receptors to the cell surface. *J. Neurosci.*, 27: 1692–1701 (2007).
- Matsuda, T., Matsumoto, A., Uchida, M., Kanaly, R., Misaki, K., Shibutani, S., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Tomokuni, K., Ichiba, M.: Increased formation of hepatic N²-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice treated with ethanol. *Carcinogenesis*, (2007).
- Liu, Z., Liu, X., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Ye, K.: Protein kinase C- δ phosphorylates Ebp1 and prevents its proteolytic degradation, enhancing cell survival. *J. Neurochem.*, 100: 1278–1288 (2007).
- Moller, C., Karlberg, M., Abrink, M., Nakayama, K.I., Motoyama, N., Nilsson, G.: Bcl-2 and Bcl-XL are indispensable for the late phase of mast cell development from mouse embryonic stem cells. *Exp. Hematol.*, 35: 385–393 (2007).
- Nakagawa, T., Shirane, M., Iemura, S., Natsume, T., Nakayama, K.I.: Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38. *Genes Cells*, in press.
- Miyamoto, K., Araki, K.Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Harada, M., Motoyama, N., Suda, T., Hirao, A. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, in press.
- Sassa, H., Kakui, H., Miyamoto, M., Suzuki, Y., Hanada, T., Ushijima, K., Kusaba, M., Hirano, H. and Koba, T. S locus F-box brothers: Multiple and pollen-specific F-box genes with S haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. *Genetics* in press
- Asakawa, H., Sasabe, M., Miyazaki, R., Matsuda, H., Fukai, F., Hanada, K., Hirano, H. and Takasaki, S. The analysis of N-glycolilneuraminic acid (NeuGc) of hepatoma tissue and K562 cell ferritins using HPLC and mass spectrometry. *Proc. Japan Acad. Ser. B*, 82, 181–187, 2006.
- Ino, Y., Okayama, A., Iwafune, Y., Arakawa, N., Kikuchi, J., Kamita, M., Kawasaki, H., Okada, T. and Hirano, H. Efficient electroblotting of gel-resolved proteins onto diamond-like

- carbon-coated plate for protein-chip. *J. Electrophoresis* 33-37, 2006.
- Morita, A. Miyagi, E., Yasumitsu, E., Kawasaki, H., Hirano, H., and Hirahara, F. Proteomic search for potential diagnostic markers and therapeutic targets for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Proteomics* 6, 5880-5890, 2006.
- Sassa, H. and Hirano, H.. Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT. *Mol. Genet. Genomics* 275, 97-104, 2006.
- Tanaka, Y., Akiyama, H., Kuroda, T., Jung, G., Tanahashi, K., Sugaya, H., Utsumi, J., Kawasaki, H. and Hirano, H.. A novel approach and protocol for discovering extremely low-abundance proteins in serum. *Proteomics*. 6, 4845-4855, 2006.
- Yokoyama, R., Kawasaki, H. and Hirano, H.. Identification of yeast aspartyl aminopeptidase gene by purifying and characterizing its product from yeast cells. *FEBS J.* 2173, 192-198, 2006.
- Hirano, H.. 4-kDa peptide. In: *Handbook of Biological Active Peptides* (Kastin, A. J. ed.) Academic Press, London, pp. 1-4, 2006.
- 岩船裕子・平野 久 プロテインチップと医療応用 バイオ解析・診断技術のテーラーメイド医療への応用, 山本重夫監修, シーエムシー出版, 東京, pp. 63-72, 2006.
- 荒川憲昭・岩船裕子・平野 久 プロテインチップを用いた蛋白質間相互作用分析 臨床検査, 50, 1467-1476, 2006.
- Idogawa, M., Masutani, M., Shitashige, M., Honda, K., Tokino, T., Shinomura, Y., Imai, K., Hirohashi, S., and Yamada T. Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: Possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res.* 67, 911-918, 2007.
- Hara, T., Honda, K., Shitashige, M., Ono, M., Matsuyama, H., Naito, K., Hirohashi, S., and Yamada, T. Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing actinin-4 in prostate cancer cells. *Mol Cell Proteomics.* 6, 479-491, 2007.
- Shitashige, M., Naishiro, Y., Idogawa, M., Honda, K., Ono, M., Hirohashi, S., and Yamada, T. Involvement of Splicing factor-1 in β -catenin/T cell factor-4-mediated gene transactivation and pre-mRNA splicing. *Gastroenterology.* 132, 1039-1054, 2007.
- Kakisaka, T., Kondo, T., Okano, T., Fujii, K., Honda, K., Endo, M., Tsuchida, A., Aoki, T., Itoi, T., Moriyasu, F., Yamada, T., Kato, H., Nishimura, T., Todo, S., and Hirohashi, S. Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by

- multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Up-regulation of leucine-rich alpha-2-glycoprotein in pancreatic cancer. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life. (in press)
- Kikuchi, S., Honda, K., Handa, Y., Kato, H., Yamashita, K., Umaki, T., Ono, M., Tsuchida, A., Aoki, T., Hirhashi, S., and Yamada, T. Serum albumin-associated peptides of in patients with uterine endometrial cancer. Cancer Sci. (in press).
- 山田哲司、本田一文 プロテオミクス解析による膵臓がんの血漿マーカーの開発. ファルマシア 43, 32-36, 2007.
- 山田哲司 プロテオミクスによるバイオマーカー探索 社会保障 61(2417):61, 2007.
- 下重美紀、本田一文、尾野雅哉、山田哲司 プロテオミクスの臨床応用への期待 Annual Review 呼吸器、中外医学社 20;208-213, 2007.
- 尾野雅哉、本田一文、山田哲司 バイオテクノロジーのがん検診への応用とその将来性 公衆衛生 71, 100-102, 2007.
- 尾野雅哉、本田一文、山田哲司 腫瘍マーカークリニカル プラクティス 26, 235, 2007.
- 本田一文、尾野雅哉、山田哲司 血漿・血清がん診断法、新たな検診方法はあるのか。-血漿ペプチドプロファイルによる難治がん患者検出の可能性-呼吸器コモンディジーズ 肺がんのすべて (印刷中)
- 本田一文、尾野雅哉、下重美紀、山田哲司 質量分析をもちいた血清・血漿プロテオーム解析によるがん診断マーカー開発法 細胞工学 (印刷中)
- 本田一文、山田哲司 がん転移・浸潤に対するアクチン結合たんぱく質アクチニン-4 の生物学的機能 生化学 (印刷中)
- 佐藤礼子、山田哲司 エクソンアレイを用いた癌特異的スプライシングバリエーションの探索 バイオテクノロジージャーナル (印刷中)

2. 学会発表

- 中山敬一. 2006 11/30 ユビキチン化による細胞増殖の制御：その破綻としての癌 (教育講演) 第19回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (福岡)
- 平松良浩, 北川恭子, 鈴木亨, 内田千晴, 服部隆行, 菊池寛利, 小田敏明, 畠山鎮次, 中山敬一, 山本雅, 今野弘之, 北川雅敏. 2006 12/7 癌抑制遺伝子産物Tob1のSkp2によるユビキチン依存的分解機構 日本分子生物学会2006 フォーラム「分子生物学の未来」(名古屋)
- 中山敬一. 2006 12/15 神経の突起伸長に必要な膜輸送制御分子Protrudin (シンポジウム)「生物の発生・分化・再生」第5回公開シンポジウム (東京)
- 雑賀徹, 多田敬典, 岡野栄之, 中山敬一. 2006 12/15 シナプス形成に重要なF-boxタンパク質Fbxo45 「生物の発生・分化・再生」第5回公開シンポジウム (東京)
- 洲崎悦生, 山田哲也, 尾池雄一, 片桐秀樹, 中山敬一. 2006 12/15 新規ユビキチン化酵素E4Bは摂食中枢の機能維持に関与する 「生物の発生・分化・再生」第5回公開シンポジウム (東京)
- 小野山一郎, 松本有樹修, 松岡佐保子, 尾池雄一, 中山啓子, 中山敬一. 2006 12/15 Fbw7によるG0期維持とその

- 破綻による発がん：種々のコンディショナルノックアウトマウスによる解析 「生物の発生・分化・再生」第5回公開シンポジウム（東京）
- 西山正章, 菊池章, 中山敬一. 2006 12/15 クロマチンリモデリング因子CHD8はp53依存的なアポトーシスを抑制する新規がん遺伝子である 「生物の発生・分化・再生」第5回公開シンポジウム（東京）
- 裕一, 束., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., Zhang, Y. 2006 12/15 Jmjドメイン含有タンパク質によるヒストンの脱メチル化 「生物の発生・分化・再生」第5回公開シンポジウム（東京）
- 中川直, 押川千恵, 松本雅記, 中山敬一. 2006 12/15 哺乳類のE4（ユビキチンポリマー伸長因子）のノックアウトマウスおよびコンディショナルノックアウトマウスの機能解析 「生物の発生・分化・再生」第5回公開シンポジウム（東京）
- 中山敬一. 2007 3/3 細胞周期を制御するユビキチン化機構（シンポジウム）第1回産業医科大学大学院シンポジウム「世界最先端の科学者たちから学ぶ」（北九州）
- Nakayama, K. I. 2007 3/26 Fbx7 is required for G0 maintenance and tumor suppression: Lessons from a series of conditional knockout mice (Invited speaker) The Second International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest (Onna, Okinawa, Japan)
- Ishikawa, Y., Onoyama, I., Nakayama, K. I., Nakayama, K. 2007 3/26 Accumulation of Notch induces cell cycle arrest in the tumor suppressor gene Fbxw7 deficient MEFs The Second International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest (Onna, Okinawa, Japan)
- Kitagawa, K., Hiramatsu, Y., Suzuki, T., Uchida, C., Hattori, T., Kikuchi, H., Oda, T., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Yamamoto, T., Konno, H., Kitagawa, M. 2007 3/26 Tob1 is a novel target for degradation by the SCFSkp2 ubiquitin ligase The Second International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest (Onna, Okinawa, Japan)
- 中山敬一. 2007 4/6 分化における細胞周期停止のメカニズムと発がん（シンポジウム）第27回日本医学会総会（大阪）
- Akita, Y., Kawasaki, H., Imajoh-Ohmi, S., Fukuda, H., Ohno, S., Kikkawa, Y., Ono, Y., Toda, T., Hirano, H., Arai, K. and Yonekawa, H. proteomic analysis of PKC epsilon-signaling in pituitary CH4C1 cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Abstract 648, 2006.
- Enomoto, K., Kurisaki, A., Intoh, A., Yamanaka, Y., Hirano, H., Sugino, H. and Asashima, M. Proteome analysis of the chromatin-bound proteins required for maintenance of pluripotency in mouse ES cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th

- FAOBMB Congress, Abstract 553, 2006.
- 林賢太郎・川崎博史・平野久・鈴木厚・大野茂男 細胞極性制御タンパク質 PAR-1 ノックダウン細胞のプロテオーム解析 生物物理化学 50, 121, 2006.
- 平野久 翻訳後修飾のプロテオミクス JHUPO 第4回大会ランチョンセミナー, 2006.
- 平野久 疾患プロテオーム解析の戦略 第65回日本癌学会学術総会ランチョンセミナー講演, 2006.
- 平野久 食物アレルギーの構造と性質 神奈川県食物アレルギーフォーラム、食物アレルギーの現状と対策要旨, 2006.
- 平野久 植物のホルモン受容体様タンパク質の翻訳後修飾とその機能の解析 地球環境・食糧・資源のための植物バイオ第160委員会第1回研究会, 植物プロテオミクス研究の現状と展望, 資料18-20, 2006.
- 平野久・石津有理・キクチユリア・高田真由美・佐々英徳・香川裕之・高岡素子・山中結子・桑原裕尚・談建中 ダイズレグインスリン結合タンパク質アイソフォームの特徴 育種学研究 8 別冊1, 123, 2006.
- Intoh, A., Kurisaki, A., Yamanaka, Y., Hirano, H., Sugino, H. and Asashima, M. Proteome analysis of the membrane proteins expressed in mouse embryonic stem cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Abstract 552, 2006.
- 石垣宏尚・亀子文子・藤田清貴・山中結子・平野久・佐藤裕久・石原康
- Monoclonal IgA が反応する Hep-2 細胞成分の解析 生物物理化学 50, 137, 2006.
- Iwafune, Y., Tan, J. Z., Ino, Y., Okayama, A., Ishigaki, S., Saito, K., Suzuki, N., Arima, M., Oba, M., Kamei, S., Tanga, M., Okada, T. and Hirano, H. High-throughput on-chip identification and interaction analysis of gel-resolved proteins. 56th Japanese Electrophoresis Society Symposium, Genomics, Proteomics and Clinical Applications, and Asia and Oceania Human Proteome Organization Symposium, Human Liver Proteomics in Asia and Oceania, Abstract 10, 2006.
- Iwafune, Y., Tan, J. Z., Ino, Y., Okayama, A., Ishigaki, S., Saito, K., Suzuki, N., Arima, M., Oba, M., Kamei, S., Tanga, M., Okada, T. and Hirano, H. High-throughput on-chip identification and interaction analysis of proteins separated by gel electrophoresis. 16th Meeting for Methods of Protein Structure Analysis, Abstract 52, 2006.
- 佐々英徳・平野久 ペチュニアにおける自家不和合性因子HT様の新規タンパク質 育種学研究 8 別冊1, 41, 2006.
- 高橋枝里・荒川憲昭・川崎博史・平野久・宮城悦子・平原史樹 卵巣癌におけるプロヒビチンの量的並びに質的変動 生物物理化学 50, 133, 2006.
- 田口宏美・川崎博史・平野久・成戸卓也・今川智之・横田俊平 川崎病患者に特異的な血漿中の低分子量タンパク質の検出と同定 生物物理化学

- 50, 132, 2006.
- 山中結子・荒川憲昭・川崎博史・平野 久
DIGE法とiTRAQ法を用いた酵母N-
アセチル化タンパク質の網羅的解析
生物物理化学 50, 120, 2006.
- Hara, T., Honda, K., Umaki, T., Ono,
M., Hayashida, Y., Naito, K.,
Hirohashi, S., and Yamada, T. Two
serum biomarkers of renal cell
carcinoma by surface-enhanced
laser desorption/ ionization mass
spectrometry. The 28th Congress
of the Society of International
Urology_(Nov, 2007)
- Yamada, T., Honda, K., Ono, M., and
Hirohashi, S. Biomarker discovery
strategy of Japanese ICBC team.
The 2nd International Cancer
Biomarker Consortium
Conference (Dec, 2006)
- Ono, M., Honda, K., Hirohashi, S.,
and Yamada, T. Plasma biomarker
discovery by a new proteome
platform 2DICAL. The 2nd
International Cancer Biomarker
Consortium Conference (Dec,
2006)
- Honda, K., Ono, M., Hirohashi, S.,
and Yamada, T. Development of a
biomarker discovery software
platform NCC-ProteoJudge for
large-scale clinical proteomics.
28th Congress of the Society of
International Urology (Nov, 2007)
- Yamada, T. Proteomic analysis of β
-catenin-mediated colorectal
carcinogenesis. International
Symposium on Tumor Biology in
Kanazawa 2007 (Jan, 2007)
- Seki, K., Honda, K., Yamada, T., and
Hirohashi, S. Actinin-4 Expression
in 187 Cases of Gastrointestinal
Stromal Tumor (GISTs) of the
Stomach and Intestine: An
Immunohistochemical (IHC) Study.
The 96th United States and
Canadian Academy of Pathology
(March, 2007)
- 山田哲司
プロテオミクスによる新規バイオマーカ
ー探索.第9回ヒューマンサイエンス
総合研究ワークショップ (Nov,
2007)
- 山田哲司 プロテオーム解析による発が
ん機構の解明と新しい診断法の開発.
第3回千葉疾患プロテオミクス研究
会 (Nov, 2007)
- 山田哲司 臨床応用を目指したプロテオ
ーム研究の現況と展望.第9回癌治療
増感研究シンポジウム (Feb, 2007)
- 山田哲司 臨床応用を目指した疾病プロ
テオミクスの現状と展望. 第16回泌
尿器科分子・細胞研究会 (Feb, 2007)
- 原智彦、本田一文、下重美紀、松山豪、
内藤克輔、山田哲司 Actinin-4によ
る前立腺がん細胞増殖抑制効果およ
びエンドサイトーシスに関するプロ
テオーム解析. 第16回泌尿器科分
子・細胞研究会 (Feb, 2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

「糖ペプチドタンデムマスデータの解析
方法」平成18年3月16日 特許出
願(特願2007-68651)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別事業）
「疾患関連タンパク質解析手法の比較検討と追加手法の検討」
分担研究報告書

分担研究者 平野 久

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻 教授
「iTRAQ 法およびショットガン法によるタンパク質の検出・同定」

研究要旨

市販健常人血清を用いて iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation)法やショットガン法によってタンパク質を効率的に検出・同定できるかどうか調べた。まず2種類のタンデム質量分析装置 MS/MS (MALDI-TOF/TOF MS と ESI-Q/TOF MS) で分析した結果を比較したところ、多数のタンパク質がいずれかの MS/MS でのみ検出された。また、iTRAQ やショットガン法によって分析したところ、この場合も多数のタンパク質がどちらかの方法によってのみ検出された。より網羅的に疾患関連タンパク質を解析するためには、同じ試料を複数の手法を利用して解析することが重要であると考えられた。

A. 研究目的

これまで創薬プロテオームファクトリー施設では同位体標識法 (ICAT 法) を用いて疾患関連タンパク質の探索・同定を実施してきたが、近年、質量分析やその周辺技術が発達し、ICAT 法だけでなく、iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation)法や SELDI (Surface enhanced laser desorption ionization)法、ショットガン法のような手法も疾患関連タンパク質の効率的な検出・同定に利用できる可能性が出てきた。しかし、これらの手法によって ICAT 法より効果的あるいは効率的に測定ができるのか、どの手法でも同じ測定結果を得ることができるのかなどについてはまだよくわかっていない。そこで本研究では、市販健常人血清のタンパク質を iTRAQ 法及びショットガン法で

検出・同定し、それぞれの結果を比較することにより、各測定方法の利点及び問題点を明らかにすることを目的とする。本研究の成果を基盤として、創薬プロテオームファクトリー施設に新しい技術が導入されれば、施設機能の充実と、データの信頼性の向上を図ることができると考えられる。

B. 研究方法

試料のタンパク質量

九州大学生体防御医学研究所より送付された4種類の試料（主要タンパク質を除いた試料）について Bradford 法を用いてタンパク質の定量を行った。

iTRAQ 試薬による分析

4種類の試料（140～170 μ l）中のタンパク質を還元アルキル化した後、トリプシンにより 37°C で 14 時

間消化した。消化後、生じたペプチドを iTRAQ 試薬で標識した。試料 A のタンパク質については 114 Da のタグを、B には 115 Da、C には 116 Da、そして、D には 117 Da のタグを標識した。試料を脱水後、400 μ l の 2 % (v/v)アセトニトリル/0.1 % (v/v)ギ酸に可溶化し、200 μ l を 2D-nano LC に注入してペプチドを分離した。2D-nano LC では、一次元目に陽イオン交換カラム (HiQ Sill SCX, 0.8 mm x 35 mm) を用いた。流速 5,000 nl/min で、ギ酸アンモニウムのステップワイズ濃度勾配によってペプチドを溶出した。二次元目にはトラップ用逆相カラム (HiQ Sill C18-3 W-3, 0.8 mm x 30 mm) と分析用逆相カラム (HiQ Sill C18-3 W-3, 0.15 mm x 50 mm) を用いた。2 % (v/v)アセトニトリル/0.1 % (v/v) TFA、流速 300 nl/min でペプチドを保持させ、アセトニトリルの直線濃度勾配を用いて溶出させた。溶出したペプチドとマトリックスを混合しながら MALDI の試料ターゲットにスポットとして添加した。30 秒で1スポットの割合で、全部で 191 スポットのペプチド画分を添加した。そして、各スポット中のペプチドのアミノ酸配列を MALDI-TOF/TOF MS (AB 4800) によって分析した。

iTRAQ 法の定量性

iTRAQ 法の定量性を評価するため、良性卵巣腫瘍患者と卵巣癌患者の血漿を用いて二次元電気泳動で得られたタンパク質の相対量と iTRAQ 法で得られたタンパク質の相対量の相関を調べた。二次元電気泳動には 3 種類の CyDye を用いた蛍光ディフュージョンゲル二次元電気泳動 (2D-DIGE) を用いた。

ショットガン分析

血漿に多量に含まれるタンパク質を中空糸膜や抗体カラムを用いて除去した後、逆相 HPLC によって7画分に分離した。そして、各画分を還元アルキル化し、トリプシンで消化後、2D-nano LC ESI Q-TOF MS で分析 (ショットガン分析) した。この実験で得られた結果と上記の iTRAQ で分析した結果とを比較した。

(倫理面への配慮)

提供者の同意を得て採取され、匿名化された市販血清検体を用いて研究を行った。

C. 研究結果

試料のタンパク質量

4 種類の試料 (主要タンパク質を除いた試料) について Bradford 法を用いてタンパク質の定量を行った結果、試料 A の濃度は 0.50 μ g/ μ l、B は 0.56 μ g/ μ l、C は 0.52 μ g/ μ l、そして、D は 0.50 μ g/ μ l であることがわかった。以下の実験では、試料のタンパク質量を揃えて分析を行った。

iTRAQ 試薬による分析

4 種類の試料 (140~170 μ l) を還元アルキル化した後、トリプシンにより消化し、生じたペプチドを iTRAQ 試薬で標識した。そして、タンパク質を 2D-nano LC によって分離した。溶出したペプチドをマトリックスと混合しながら MALDI の試料ターゲットに添加した。30 秒で1スポットの割合で、全部で 191 スポットを添加した。各スポット中のペプチドのアミノ酸配列を MALDI-TOF/TOF MS によって分析した結果、Minimum Ion Score Confi-

dence Interval (C.I.%) 95 %レベルで282タンパク質、C.I.% 85 %レベルで488のタンパク質を検出・同定することができた。このうち、4試料で量的差異が2倍以下のものはC.I.% 95 %レベルで48%(136)、また、85 %レベルでも48%(235)であった。このことから、個人差が2倍以上のタンパク質は52 %程度であると推定することができた。なお、試料AとDは、(後日、同一試料であることが明らかにされたが)極めてよく似たタンパク質組成をもっていることがわかった。

LC-ESIとLC-MALDI

共同研究を行っている九州大学のLC-ESI(Q-STAR)による分析結果とLC-MALDI(4800 TOF/TOF MS)を用いた本研究の結果を比較した。検出されたタンパク質の総数はあまり多くはないが、LC-ESIで263、LC-MALDIでは282、両法で共通して検出・同定されたタンパク質はわずか59(約10%)であった。

iTRAQ法の定量性

iTRAQ法の定量性を評価するため、良性卵巣腫瘍患者と卵巣癌患者の血漿を用いて二次元電気泳動で得られたタンパク質の相対量とiTRAQ法で得られたタンパク質の相対量の相関を調べた。二次元電気泳動には3種類のCyDyeを用いた2D-DIGEを用いた。2D-DIGEとiTRAQ法で得られた定量値の相関係数は約0.5で1%水準で有意であった。

ショットガン分析

これまでの研究では、血漿に多量に含まれるタンパク質を中空糸膜や抗体カラムを用いて除去した後、逆相HPLCによって7画分に分離した。そして、各画分を還元アルキル化し、

トリプシンで消化して2D-nano LC ESI Q-TOF MSで分析(ショットガン分析)した。こうして分析することによって3,000近くの血漿タンパク質を半定量的に検出・同定できることがわかった。そこで、本研究では、九州大学より得た1試料についてこの方法に準じて分析を行った。そして、この実験で得られた結果と上記のiTRAQで分析した結果とを比較した。ショットガン分析では、1,818のタンパク質を検出することができた。この際、MASCOTスコアが50以上のものを検出した。C.I.% 85 %レベルで検出された488のタンパク質が検出されているかどうか調べたところ、156タンパク質(約10%)だけが検出されていることがわかった。共通して検出されたタンパク質の数は、予想以上に少なかった。

D. 考察

iTRAQ試薬を用いた分析では、C.I.% 95 %レベルで282タンパク質、C.I.% 85 %レベルで488のタンパク質が検出・同定された。血漿中には4,000~5,000のタンパク質が存在すると推定されるので、今回検出されたタンパク質数は多くはない。これまでの研究で、血漿タンパク質をトリプシンで消化する前にHPLCによって7画分ほどに分画すると、分画しない場合に比べて約10倍多数のタンパク質を検出できることがわかっている。また、健常人と川崎病患者の血漿の分析で、Protein iTRAQ法を用いてタンパク質をiTRAQ試薬で標識した後、ゲル濾過で分画、得られた画分をトリプシンで消化し、MALDI-TOF/TOF MSで分析した

ところ、通常の iTRAQ 分析より多数のタンパク質を同定することができた。おそらく上記の実験でもトリプシン消化する前にクロマトグラフィーで分画すれば、検出できるタンパク質数は飛躍的に多くなると考えられる。

Borchers ら(2006)は、iTRAQ 試薬で標識したタンパク質の検出・同定に LC-ESI と LC-MALDI のどちらが効率的なのかを調べた。彼らは、LC-ESI で 1,828 のペプチドを、また、LC-MALDI によって 4,133 のペプチドを検出し、MS/MS 分析を行った。そして、LC-ESI で 586 の量的に差異のあるタンパク質を、また、LC-MALDI で 930 のタンパク質を同定した。これらのタンパク質のうち、2 種類の方法で共通して検出・同定されたタンパク質は 414 (約 40%) であった。これは、両方の方法で分析した方がより多数のタンパク質の解析ができることを示している。本研究でも LC-ESI(Q-STAR)と LC-MALDI(4800 TOF/TOF MS)を用いた分析結果を比較した。検出されたタンパク質の総数はあまり多くはないが、LC-ESI で 263、LC-MALDI では 282、両法で共通して検出・同定されたタンパク質はわずか 59 (約 10%) であった。共通して検出されたタンパク質の数は、Borchers らの結果よりもさらに少なかった。本研究結果も、Borchers らの結果と同様、両方の方法で分析した方がより多数のタンパク質が解析できることを示している。

なお、LC-ESI に比べ、LC-MALDI ではかなり多量の試料の調製が必要である。また、分析の速度もかなり遅い。しかし、LC-MALDI では試料

を MALDI ターゲット上に固定して分析を行うため、繰り返して分析ができるという長所もある。

本研究では、iTRAQ 法の定量性を評価するため、良性卵巣腫瘍患者と卵巣癌患者の血漿を用いて二次元電気泳動で得られたタンパク質の相対量と iTRAQ 法で得られたタンパク質の相対量の相関を調べた。その結果、両法で得られた定量値の相関係数は約 0.5 で有意な相関があった。iTRAQ 法によって定量的な解析が可能であることを示唆している。相関係数が期待していた値より若干低いのは、2D-DIGE ではアイソフォームや翻訳後修飾を受けたタンパク質が複数のスポットとして検出されるのに対し、iTRAQ 法では単一のタンパク質として検出されてしまうためではないかと推察される。

ショットガン分析では、1,818 のタンパク質を検出することができた。同じ方法を用いて通常 3,000 近くの血漿タンパク質を検出しているので、今回のショットガン分析の効率はあまり高くなかった。今回の試料にはまだアルブミンをはじめとして高分子量のタンパク質がかなり残っていた。そのため、nanoLC のカラムがしばしば詰まり、分析に支障を来した。検出されたタンパク質の総数が少ない原因はこの点にあると推察された。

E. 結論

今回の実験では、同じ試料中のタンパク質を iTRAQ 試薬で標識し、2 種類の MS/MS、すなわち、MALDI-TOF/TOF MS と ESI-Q/TOF MS で分析した。検出されたタンパク質の多くはどちらか一方の

MS でのみ検出された。タンパク質は、種類によって性質が異なることが多いため、1 種類の MS ですべてのタンパク質を解析することは容易でない。このことは本研究結果からも明白である。同じ試料を可能な限り異種の MS を利用して分析することが重要である。また、現在、疾患関連タンパク質の検出には、ICAT だけでなく、二次元電気泳動（蛍光ディファレンス二次元電気泳動）、iTRAQ、protein iTRAQ、SELDI などの手法を利用することができる。網羅的に疾患関連タンパク質を解析するためには、同じ試料をこれらの手法をうまく利用して解析することが重要である。創薬プロテオームファクトリーには、各種 MS が装備されている。また、ICAT、iTRAQ、SELDI など様々な手法を利用できる環境がある。この優位性を利用して今後、研究を遂行することが望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Sassa, H., Kakui, H., Miyamoto, M., Suzuki, Y., Hanada, T., Ushijima, K., Kusaba, M., Hirano, H. and Koba, T. S locus F-box brothers: Multiple and pollen-specific F-box genes with S haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. *Genetics* in press
- Asakawa, H., Sasabe, M., Miyazaki, R., Matsuda, H., Fukai, F., Hanada, K., Hirano, H. and Takasaki, S. The analysis of N-glycolilneuraminic acid (NeuGc) of hepatoma tissue and K562 cell ferritins using HPLC and mass spectrometry. *Proc. Japan Cad. Ser. B*, 82, 181-187, 2006.
- Ino, Y., Okayama, A., Iwafune, Y., Arakawa, N., Kikuchi, J., Kamita, M., Kawasaki, H., Okada, T. and Hirano, H. Efficient electroblotting of gel-resolved proteins onto diamond-like carbon-coated plate for protein-chip. *J. Electrophoresis* 53, 33-37, 2006.
- Morita, A. Miyagi, E., Yasumitsu, E., Kawasaki, H., Hirano, H. and Hirahara, F. Proteomic search for potential diagnostic markers and therapeutic targets for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Proteomics* 6, 5880-5890, 2006.
- Sassa, H. and Hirano, H. Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT. *Mol Genet Genomics*. 275, 97-104, 2006.
- Tanaka, Y., Akiyama, H., Kuroda, T., Jung, G., Tanahashi, K., Sugaya, H., Utsumi, J., Kawasaki, H. and Hirano, H. A novel approach and protocol for discovering extremely low-abundance proteins in serum. *Proteomics*. 6, 4845-4855, 2006.
- Yokoyama, R., Kawasaki, H. and Hirano, H. Identification of yeast aspartyl aminopeptidase gene by purifying and characterizing its product from