

- 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.
2. 学会発表
- 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.
- 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.

角井宏行・佐々英徳・平野 久・木庭卓人 ニホンナシの花粉で発現する S ハプロタイプ特異的 F-box 遺伝子群 育種学研究 8 別冊 2, 165, 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.

佐々英徳・角井宏行・宮本摩由・平野 久・木庭卓人 リンゴ S 遺伝子座の構造解析 育種学研究 8 別冊 2, 179, 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ピ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.

(予定を含む)

### 1. 特許取得

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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」  
補足資料：

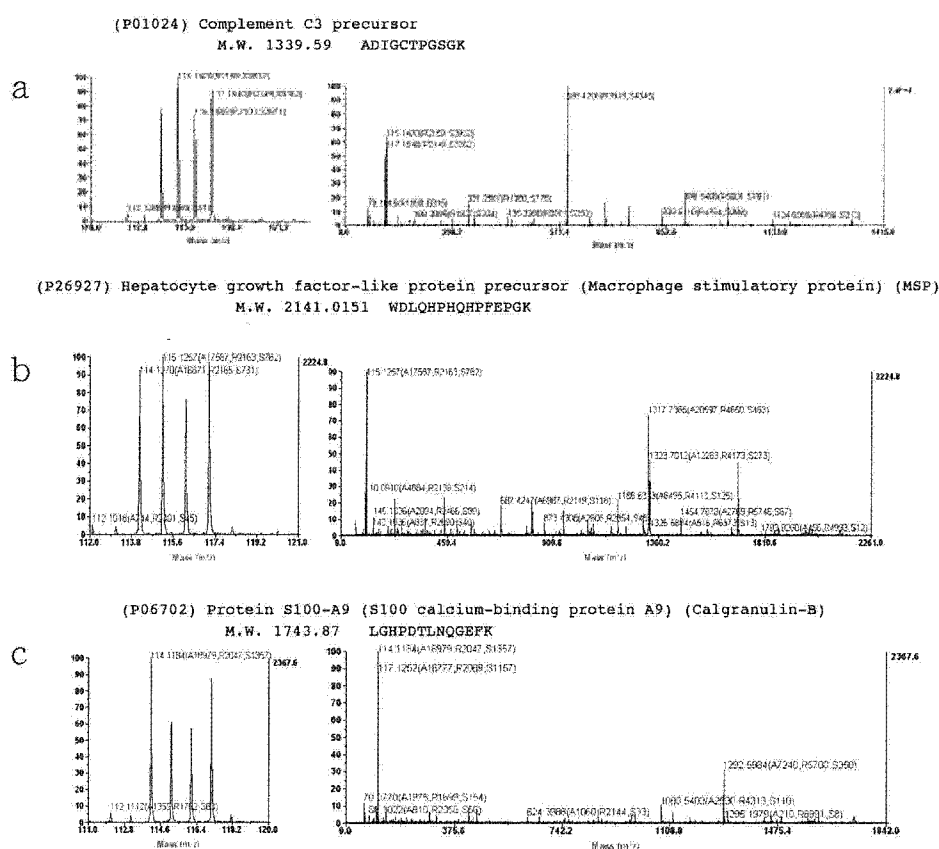


図1 iTRAQ によるタンパク質の同定

4名の健常人の血清タンパク質を iTRAQ 試薬で標識し、nano-2D LC でタンパク質を分離した後、MALDI-TOF/TOF MS で同定した。左の質量スペクトルは、iTRAQ タグの量比を示している。また、右の質量スペクトルは、MS/MS（シークエンシング）の結果を示す；a, Complement C3 ; b, Hepatocyte growth factor-like protein; c, S100 Ca-binding protein A9.

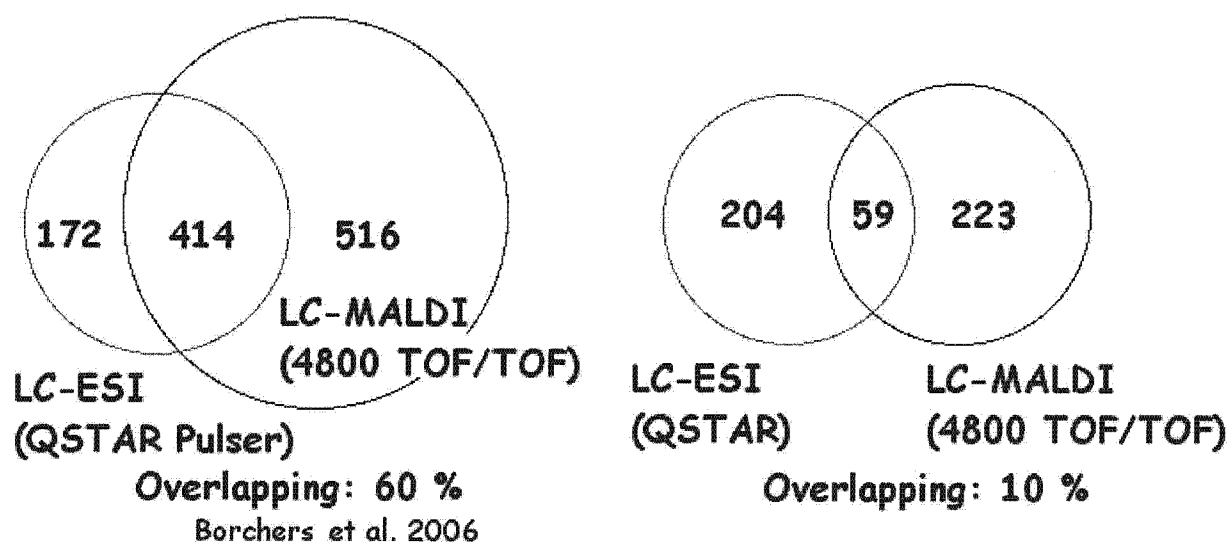


図2 LC-ESI と LC-MALDI によるタンパク質の検出・同定結果

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 を用いた。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 (図 2 左)。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。本研究では、九州大学の LC-ESI(Q-STAR)と横浜市立大学の 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。Borchers らの結果と比べて、共通して検出されたタンパク質の数がかなり少なかった。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。

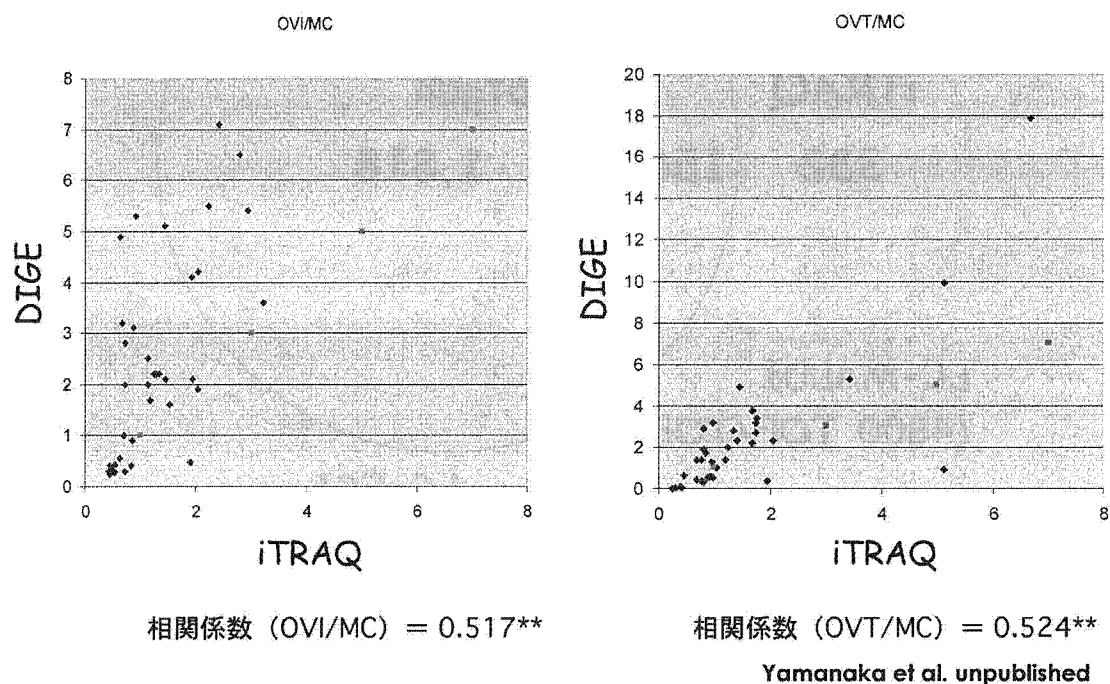


図3 iTRAQ法とDIGE法の定量結果の相関

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ァレンシャルゲル二次元電気泳動(2D-DIGE)を用いた。2D-DIGEとiTRAQ法で得られたタンパク質の定量値を示したものを図3に示してある。両法による定量値の相関係数は約0.5で1%水準で有意であった。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。

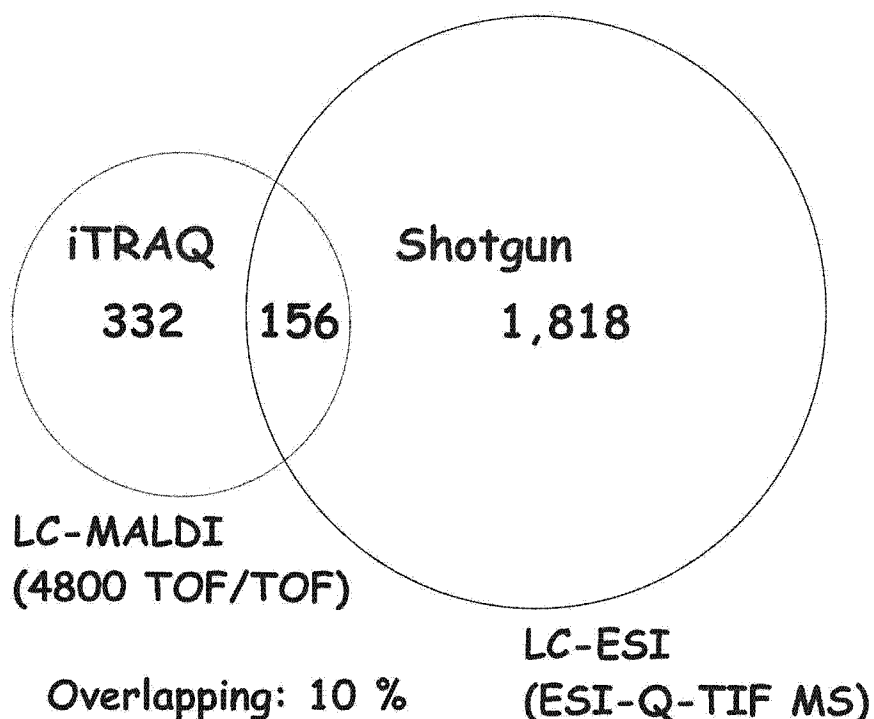


図4 iTRAQ とショットガン分析で同定されたタンパク質の比較

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、Wet Workshop 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。ショットガン分析によって 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（図 4）。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。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 1,818 と少ない原因はこの点にあると推察された。

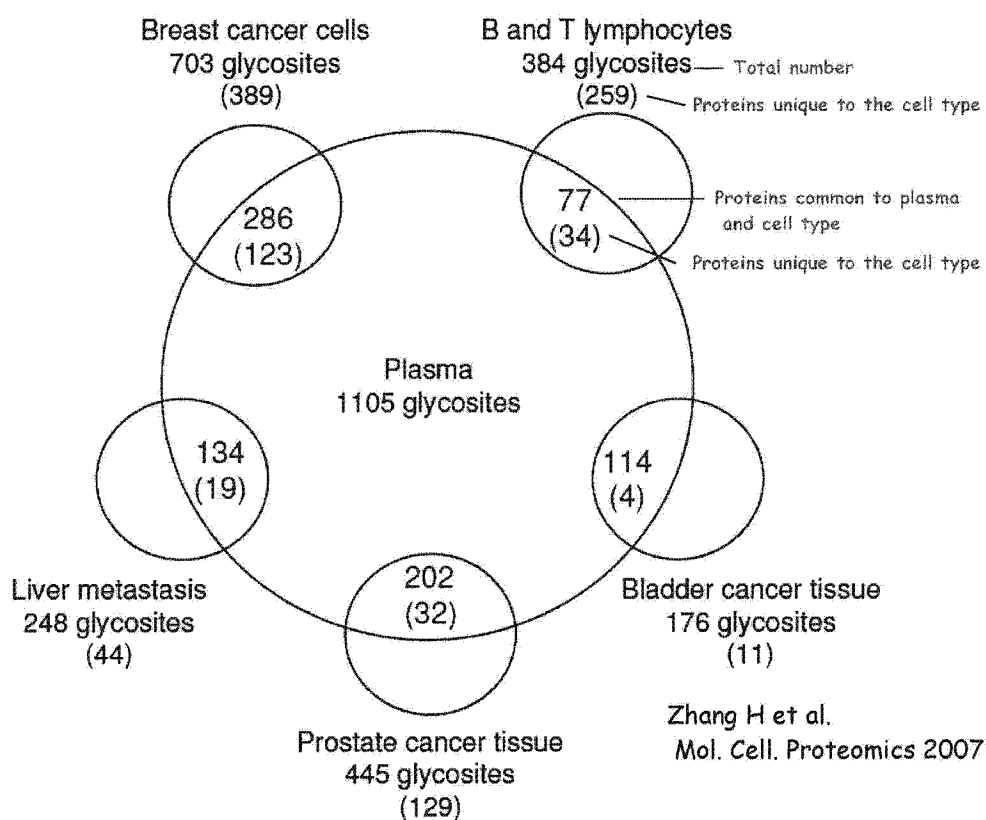


図5 細胞、組織と血漿から検出・同定されたタンパク質の比較 (Zang ら 2007)

Zhang ら(2007)は、血漿で罹病組織からのどの位の数の糖タンパク質が検出できるかを調べた。その結果、図5に示すように多種類の組織タンパク質を血漿で検出することができた。しかし、罹病組織からのすべてのタンパク質を検出できた訳ではない。おそらく血漿に放出されないタンパク質については組織を用いて分析を行う必要があるだろう。創薬プロテオームファクトリーでは、血液試料のみを分析の対象にしているが、疾患に関連するタンパク質を検出する場合、患者の罹病組織を利用すると、より網羅的に疾患関連タンパク質を検出できる可能性がある。

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

分担研究者 中山 敬一  
九州大学・生体防御医学研究所・教授  
「iTRAQ 法によるタンパク質定量解析」

### 研究要旨

創薬プロテオームファクトリーにて行うヒト疾患関連タンパク質探索のための定量的アプローチとして最近開発された iTRAQ 法の有効性の検証を目的として研究を行った。研究用に市販されている健康人4人の血清を用いて、高発現タンパク質を除去後、LC-ESI-hybrid 型質量分析計を用いて iTRAQ 法による定量プロテオーム解析を行った。一回の分析で 200 種類以上のタンパク質の同定・定量が可能であった。また、iTRAQ 法を用いることで従来法(cICAT 法など)と比較して 3-4 倍の処理速度を達成された。今後より多検体処理が可能な iTRAQ 試薬が入手可能であり、より高感度かつハイスループット化が見込めるため、本方法の導入によって創薬プロテオームファクトリーにおけるヒト疾患関連タンパク質探索を十分に加速することが期待される。

### A. 研究目的

近年、質量分析計の高感度化とゲノム情報の蓄積に伴い、極めて高感度にタンパク質の同定を行うことが可能となった。さらに、様々な定量的プロテオーム解析技術が開発され数百から数千のタンパク質の発現情報を網羅的に得ることが可能となった。このような基盤技術の充実を背景に、プロテオミクス技術を用いたバイオマーカー探索への期待が高まるのは必然であり、特に血漿などの血液由来試料を対象としたプロテオーム解析は試料の入手が比較的容易であることから、世界的に注目されている。

しかしながら、血漿プロテオーム解析における最大の問題点は試料中のタンパク質の存在量が著しいダイナミックレンジを有することである。

現存の質量分析計の検出ダイナミックレンジはそれをはるかに下回るものである。したがって、より多くのタンパク質を解析するためにアルブミンなどの量的に優位なタンパク質の除去法が開発され、広く利用されている。しかしながら、このようにして得られた試料も依然、広いダイナミックレンジを持つため、網羅性の高い解析のためには様々な方法論の検証が必要である。

近年、新たな定量解析法として iTRAQ 法が開発され、高いスループットと高感度な定量解析法を提供することが示されており、血漿プロテオーム解析法への適用時にもその能力を発揮することが期待できる。iTRAQ とはトータル質量および物理的性質が同じ標識試薬であるが、MS/MS



スペクトルにおいて低質量領域に質量がわずかに異なるリポーターイオンが生じる特殊な試薬であり、このリポーターイオンの強度から定量を行う。cICAT 法はビオチンタグの導入を行うためペプチド混合物の複雑さを減らすことが可能であるが、一タンパク質あたりの同定・定量に利用できるペプチド数が少なくなることから、現実的に同定タンパク質数が伸びないことが多い。iTRAQ はアミノ基標識試薬であり、トリプシン消化ペプチドに適用した場合、事実上全てのペプチドが標識されるため同定効率の向上が見込める。本研究では、血漿プロテオーム解析における網羅性および処理能力の向上を図るため、iTRAQ 法の有効性を検討することを目的とする。

## B. 研究方法

研究用に市販されている健常人（3人分）の血漿を匿名化し4種類の試料(A-D：二つは同一試料)とした。これらの試料を12種類の高発現タンパク質に対する抗体を結合させたカラム(ベックマン・コールター社製：ProteomeLab IgY-12)に通すことで高発現タンパク質の除去を行った。これらの試料をトリプシン消化し、各々リポーターが異なる iTRAQ 試薬にて標識した。標識後のペプチドは混合した後に、強陽イオン交換クロマトグラフィーによる分画を行った。各々の分画は脱塩後、2種類の LC-ハイブリッド型質量分析計(Q-STAR Elite および NanoFrontier LD: NFLD)によって分析を行った。Q-STAR Elite によって得られたデータは ProteinPilot によってタンパク質の同定・定量を行った。NFLD のデ

ータは MASCOT にてタンパク質の同定を行った後、当研究室において開発したソフトウェアによって取りまとめおよび定量解析を行った。また、同定タンパク質数の比較を行うために Q-STAR Elite のデータに対しても MASCOT による解析を行った。

### (倫理面への配慮)

提供者の同意を得て採取され、匿名化されて研究目的に市販されているヒト血清検体を用いて全ての研究を行ったため、倫理的な問題はないと考えられる。

## C. 研究結果

### 1) 抗体カラムによる高発現タンパク質の除去

各々の血漿試料の濃度を測定した結果、A 及び B:103mg/ml, B: 107 mg/ml, C:121mg/ml であり、ほぼ同程度のタンパク質濃度であった。これらの血漿 20ul をカラム専用のバッファーにて希釈後、抗体カラムに通し、素通り分画を回収した。また、カラムの洗浄後液も回収し素通り分画と合わせ、高発現タンパク質除去血漿とした。上記操作を各々の試料に対して5回繰り返した。得られた高発現タンパク質除去血漿は限外濃縮によって濃縮を行った。これらの試料は SDS 電気泳動にて分析することで高発現タンパク質の除去を確認した。

### 2) iTRAQ による解析

高発現タンパク質除去血漿をアセトン沈澱後、トリプシン消化を行った。得られたペプチドに各々の iTRAQ 試薬標識を施した。試料と標識体の

組み合わせは以下の通りである。

A: 114, B: 115, C: 116, D: 117

(数値はレポーターの質量を示す)

これらの試料を等量混合し、陽イオン交換クロマトグラフィーによる分画を行った。分画条件を以下に示す。

Column: PolySULFOETHYL

Aspartamide

BufferA: 10mM Potassium phosphate, pH3.0, 25% acetnitrile

BufferB: 10mM Potassium phosphate, pH3.0, 25% acetnitrile, 1M KCl

Flow rate: 50 $\mu$ l/min

Gradient: 0%B-30%B/30min

Fraction: 100 $\mu$ l/fraction

40 $\mu$ g 相当の標識ペプチド混合物を注入して得られたイオン交換分画の約 1/5 を各々分析した結果、QSTAR Elite および NFLD とともに 200 種類以上のタンパク質の同定が可能であった(MASCOT score>35 以上を同定と見なす)。

また、試料 A を基準として定量比を算出した結果、2 倍以上の変動があったタンパク質の比率は B/A で 15.8%, C/A で 15.9%, D/A で 3.5% であった(QSTAR の結果)。試料 A と D は同一個体由来であることから、D/A は理想的には 1 に近い値を示すはずであり、実際、多くのタンパク質において D/A はほぼ 1 に近い値であった。また試料 A と試料 D 間での変動係数は QSTAR Elite で 0.166, NFLD にて 0.189 であった。さらに、異なる装置による測定で共通して同定されたタンパク質における挙動(定

量値) 類似しており、本方法の再現性の高さが示された。

#### D. 考察

本研究において、正常ヒト血漿から 200 種類以上のタンパク質の同定・定量に成功した。また、異なるタイプの質量分析計で測定を行ったがほぼ同様な同定数を得ることができた。従って、本方法は比較的再現性の高い解析法であると考えられる。iTRAQ 法では 4 種類の試料を混合後は単一試料として取り扱えるため、従来型の 2 検体間定量法と比較して 3 - 4 倍の作業速度で解析が可能である。また、cICAT 法と比較して前処理が単純であるため試料調製の労力および時間が大幅に削減できる点もメリットである。さらに、iTRAQ 法では一つのタンパク質あたり複数のペプチドで同定・定量されるため、比較的少ない数のペプチドで同定や定量を行う cICAT 法と比較して同定・定量の信頼性が高いと思われる。また、ごく最近発売された 8 検体同時定量可能な iTRAQ 試薬の利用も可能であり、さらにハイスループット化が見込める。

本研究で行った前処理(高発現タンパク質の除去)は十分とは言い難く、実際の分析において同定・定量されたタンパク質の中には本来除去されるべき高発現タンパク質が含まれていた。今回同定数が 200 程度と期待していたより少なかった理由としてこのような高発現タンパク質の混入が挙げられる。今後、他社の抗体カラムの導入などを検討する必要もある。また、今回は用いた質量分析計の感度が十分に高いことから、標識を行った試料のごく一部しか分析に

用いていない。得られたスペクトルの強度と使用している質量分析計のダイナミックレンジから推定して、今回の5-10倍程度の試料の注入も可能であった。今後、大容量のトラップカラムなどの装着によって網羅性の向上を図ることが重要な課題である。

## E. 結論

本研究の結果、血漿プロテオーム解析にiTRAQ法を導入することで、低発現量のタンパク質をハイスループットに同定・定量を行うことが可能になることが示めされた。今回の解析では高感度な最新型のLC-ESI-ハイブリッド型質量分析計を用いたが、予備的な検討ならば創薬プロテオームファクトリーにて現在稼働しているLC-ESI-ハイブリッド型質量分析計やMALDI-TOF/TOF型質量分析計でも十分遂行可能であるため、プロテオームファクトリーにおいてもiTRAQ法の導入を検討することが望ましい。原理的な違いからcICAT法とiTRAQ法で同定・定量されるタンパク質の種類が異なる可能性も十分にあるため、お互い相補的な役割を果たし、より網羅的な疾患バイオマーカー探索に貢献できると思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

(平成18年11月10日以降)

### 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 p27<sup>Kip1</sup> 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 $\delta$  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 $\delta$  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 $\delta$  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 $\delta$  plays a non-redundant role in insulin secretion in pancreatic  $\beta$  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  $\gamma$ 2 subunit-containing GABA<sub>A</sub> 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 N<sup>2</sup>-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- $\delta$  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-X<sub>L</sub> 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.

## 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, 東., 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  
Fbw7 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
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 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  
「同位体標識法(cICAT)による血清タンパク質発現解析研究」

### 研究要旨

ベックマン抗体スピカラムで血清主要タンパク質 12 種類を除去したフランス人血清 4 検体 (A,B,C,D、九州大学提供) を同位体標識法の一つである cICAT 法を用いて解析した。その結果、A,B,C,D の何れの場合も Score 20 以上の判定基準では 131-155 種類のタンパク質が同定された。しかし、その上位タンパク質中に本来除去されるべきタンパク質 (transferrin, albumin, alpha2-macroglobulin, haptoglobin) が含まれていた。この原因は小型スピカラムの容量が充分でなく、一部リークしたためと考えられた。そこで、ベックマン大型抗体カラムで処理すると、上述の主要タンパク質は完全に除去されたが、しかし、同定タンパク質数は減少した (Score 20 以上で 91 種類)。以上のことから、ベックマン抗体カラム処理は、少なくとも、cICAT 解析においては期待したほど有効ではないことが分かった。同定タンパク質数を大幅に増加させるためには、ベックマン抗体カラムシステムの改良が必要と思われる。

#### A. 研究目的

低発現血清タンパク質解析の基礎検討として、各機関（九州大学、横浜市立大学、国立ガンセンター）の特性を活かした技術とプロテオームファクトリー (PF) 施設の ICAT 法技術を、共通の血清試料（フランス人血清）を用いて比較検討することで、新たな解析技術開発へと役立てることを目的とする。今回は、血清主要タンパク質 12 種類を除くことが可能とされる新規ベックマン抗体カラム処理したフランス人血清を cICAT 法で解析する。得られた結果を他の機関との情報交換を行うことにより、今後の PF の研究方針に役

立てたい

#### B. 研究方法

##### 1) 血清の前処理法:

フランス人血清（市販）をベックマン(Beckman) 抗体カラム（スピカラム）で処理した血清サンプル 4 検体 (A, B, C, D、九州大学医学部提供) と、4 検体 (A, B, C, D) を等量混合したものをフランス人標準血清 (R) として使用した。ただし、A と D は同一試料である。なお、ベックマン抗体カラムは、血清主要タンパク質 12 種類(albumin, IgG, IgA, IgM, transferrin, haptoglobin, fibrinogen, alpha2-macroglobulin,



alpha1-antitrypsin, alpha1-acid glycoprotein, apolipoprotein A1, apo-lipoprotein A2)を除去可能な抗体カラムとされている。

cICAT 反応 (1kit) は、常法に基づき、各試料が 100 $\mu$ g/80 $\mu$ L となるように調整した後、フランス人標準血清 (R) を Light(L)鎖試薬で、4 検体 (A, B, C, D) をそれぞれ Heavy(H)鎖試薬で標識した。なお、フランス人血清とは別に、健常外国人 (米国) の年齢 18~50 歳代の男性 5 名、女性 5 名より、採取した血清をプールしたもの (米国人標準血清 (CTS02S)) も使用した (Uniglobe Research Coporation (CA, USA) より購入) (1, 2)。この場合は、大型ベックマン抗体カラム (IgY-12\_LC10) で処理した血清タンパク質画分を L 鎖試薬及び H 鎖試薬で 1:1 に標識し、常法に基づき解析した。

## 2) ヒト血清試料の cICAT 法による解析法

Beckman 抗体カラム或いはアジレント社製抗体カラムで高濃度タンパク質を除いた血清タンパク質画分 (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 (AB)、(<sup>12</sup>C (L 鎖) あるいは <sup>13</sup>C (H 鎖) 標識) を 37°C、2 時間反応させた (フランス人血清を測定する場合は、フランス人標準血清 (R) を L 鎖試薬、A, B, C, D 血清をそれぞれ H 鎖試薬で標識する)。未反応の試薬を 10mM DTT でクエンチングし、H 鎖試料と L 鎖試料を等量混合し、常法に従って、混合溶液に冷アセトン (100%, 4°C) を加え

て、攪拌し、白濁した懸濁液を -80°C で一晩放置し、アセトン沈殿を完結させた。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を得た。この沈殿画分に 99.5% エタノールを加え、4°C で 12,000 rpm, 20 分の遠心処理し、残存する不純物 (上清) を除き、タンパク質沈殿画分を得た。本沈殿画分を 50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5) で可溶化後、常法により、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、常法に基づき、アビジンカラム (6.2 x 66.5mm) にかけて、素通り部分を洗浄後、吸着した cICAT 試薬反応ペプチドを 30% CH<sub>3</sub>CN/0.4% TFA で溶出した (VisionWorkstation 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、0.05% 酢酸 / 25% CH<sub>3</sub>CN に溶解し、SCX column (2.1 x 35mm) にて、0.05% 酢酸 / 25% CH<sub>3</sub>CN - 0.5 M 酢酸アンモニウム / 5.88% 酢酸 / 25% CH<sub>3</sub>CN 系 (酢酸アンモニウム 0~0.5M gradient) でペプチド画分を分画 (25 分画) し、それぞれ C18 column で脱塩し、減圧乾固した。得られた画分は nano LC/Q-Star XL (Applied Biosystems (AB), ESI-Q/TOF) で質量測定を行い (後述)、生データをチェック後、cICAT 用日立統合データソフト (HiSpec) で解析した。

## 3) Q-Star XL (ESI-Q/TOF) での測定:

SCX による分画・脱塩したペプチド (cICAT 標識) を 0.1% TFA-2%

CH<sub>3</sub>CNにて再溶解し、nano-LC (LC-Packing) /Q-StarXL (AB,ESI-Q/TOF)および nano-LC /Probot (LC-Packings))にて分析した。カラムは PepMap™ C18 100, 3μm, 100, 75μm×150mm (LC-Packings) を使用し、Q-Star XL用移動相は A: 5%CH<sub>3</sub>CN/0.1% HCOOH, B: 95% CH<sub>3</sub>CN/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。AB-4700 用移動相は、A: 5% CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, B: 95% CH<sub>3</sub>CN/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、Q-Star XL で分析する場合は、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 55%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タンパク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 Data 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。

## C. 研究結果

### 1) SDS 電気泳動による解析

提供されたベックマン抗体で処理したフランス人血清検体 A, B, C, D 検体を常法に基づき、SDS-

PAGE(8-16% SDS-PAGE mini, Tricine, 1.0 mm 12 well 6ea)で調べた結果、アルブミン等の主要タンパク質の大部分は除去されたことを確認した (図 1)。

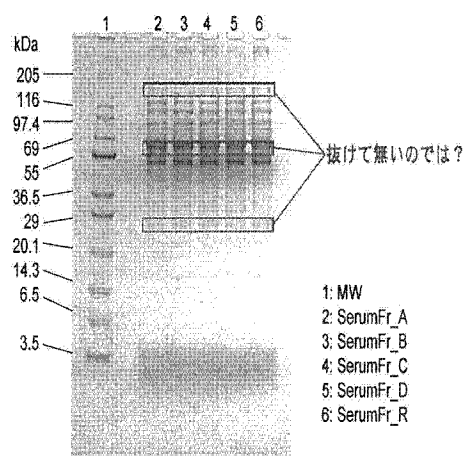


図 1. フランス人血清 (A, B, C, D) の SDS-PAGE

### 2) cICAT 法による解析結果:

各血清検体を B. 方法の血清の処理法に従い、cICAT 法で標識し (フランス人プール血清を L 試薬、A, B, C, D 血清は H 試薬で標識)、常法に基づき、cICAT ペプチドを得た。各得られた各血清の cICAT ペプチドの SCX column (2.1 x 35 mm) での溶出パターンを図 3 に示す。その結果、何れの各血清の溶出パターンはほぼ同一であった。この SCX 画分を 25 分画し、脱塩後、得られた画分は nano LC/Q-Star XL (Applied Biosystems (AB), ESI-Q/TOF) で質量分析測定を行い、生データをチェック後、cICAT 用日立統合データソフト (HiSpec) で解析した。なお、マスコットでの同定はトリプシン切断断

Beckman 抗体カラムで処理した米国人標準血清

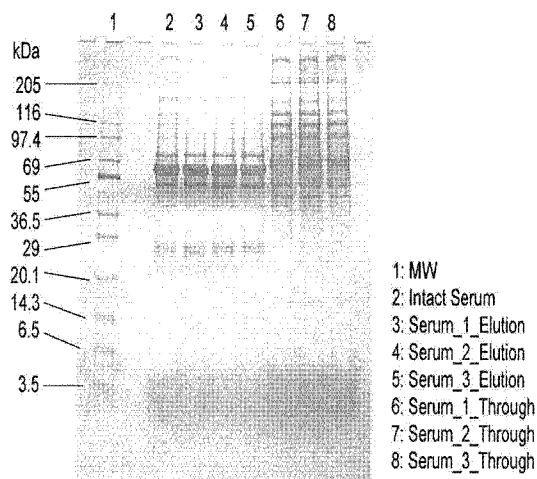


図2. 米国人の血清(6-8)の SDS-PAGE

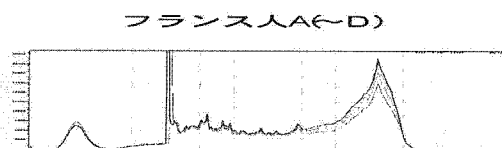


図3. 各フランス人血清の cICAT ペプチドの SCX 溶出パターン

片として処理解析したものである。セミトリプシン切断断片とすると、大幅に同定タンパク質数が増加するが、false positive も増加するので採用していない。その結果、データベースとして、RefSeq database を用いると、A,B,C,D の何れの場合も Score 20 以上の判定基準では 131-155 種類、Score 30 以上では 93-115 種類、Score 50 以上では、75-88 種類のタンパク質が同定された(表 1, 2)。表 1 に、代表例として、フランス人 A 血清の score 順に表示したタンパク質の解析例を示す。また、表 2 には、各血清 (A,B,C,D) の解析

結果 (Score 別同定タンパク質数、H/L Ratio 等) を纏めたものを表示する。

表 1 に示すように、フランス人 A 血清の解析で同定されたタンパク質 (合計 133 種類) を score 順に並べると、上位のタンパク質の中に、本来、ベックマンカラムで除去されるべきタンパク質 (transferrin (第 1 位), albumin (第 3 位), alpha2-macroglobulin (第 7 位), haptoglobin (第 22 位)) が含まれていた。同様に、フランス人血清 B, C, D にもこれらのタンパク質が含まれていた (表 3-1-3)。これは、スピナカラムを使用したため、一部、抗体カラムで除去しきれなかったためと考えられ、図 1 の SDS-PAGE の結果とも一致する。

一方、米国人血清 (CT02S) を大型ベックマン抗体カラム (IgY-12 LC10) で処理し、L 鎖試薬及び H 鎖試薬で 1:1 に標識した場合は、上述の transferrin, albumin, alpha2-macroglobulin, haptoglobin は除去され、また Ratio(H/L) も 1.0 であることが確認された (表 3-4)。しかし、表 2 に示すように、何れの Score で比較しても、同定タンパク質数は低下した (Score 20 以上で 91 種類)。このことは、完全に上記主要タンパク質をベックマン抗体で除くと、恐らくは albumin 等に結合していたタンパク質も除去されるためであると推定される。一方、albumin, IgG, IgA, transferrin, haptoglobin, alpha1-antitrypsin の 6 種類の主要タンパク質を除く既存のアジレント抗体カラムで同様に処理すると、Score 20 以上で比較すると 120-160 種類が同定・定量可能であった (1, 2)。なお、

アジレント抗体カラムシステムは、albumin 等への吸着を防止する工夫がなされている。

#### D. 考察

九州大学医学部より提供された、ベックマン抗体カラムで主要タンパク質(12種類)を除去したフランス人血清(A,B,C,D)をcICAT法で解析した。この場合、A,B,C,D血清をプールした血清をL鎖試薬で標識し、各血清をH鎖試薬で標識した。その結果、Score 20以上を基準とした場合、何れの血清も約131-155種類のタンパク質の同定が可能であった(表1, 2)。従って、同定タンパク質数は、6種類の主要タンパク質を除くアジレント抗体カラムで得られた場合とほぼ同等であった(1, 2)。しかし、同定されたタンパク質をScore順に並べてみると、A,B,C,Dの何れの血清の場合も、本来、除去されるべき主要タンパク質(transferrin, albumin, alpha2-macroglobulin, haptoglobin)が上位に存在することがわかった(表1, 3)。これは、小型のスピナカラムを使用したために、一部、容量不足であったためと考えられた。SDS-PAGEも同様な結果を示した(図1, 2)。また、AとDは同一血清であるので、本来ならばAとDのRatio H/Lは同一値を示すはずであるが、0.882(A)と0.777(D)と必ずしも同一ではない。一方、PFでアジレント抗体カラムで処理した血清の場合は、6種類の主要タンパク質は殆ど完全に除去されている(カラム劣化により、リークした場合は、定量比が正確でないのでデータとして採用しない)。また、この場合の測定間(n=3、前処理も含む)での各ペプチド及びタ

ンパク質の定量比(H/L)のバラツキ幅は、極めて小さく、平均値を1.0とした時に、97%のペプチド及び99%のタンパク質は、1/1.05-1.05(0.952-1.05)の範囲に入ることを確認している。

そこで、米国人標準血清を大型ベックマン抗体カラム(IgY-12\_LC10)で処理したところ、上述のtransferrin, albumin, alpha2-macroglobulin, haptoglobinは除去され、またRatio(H/L)も1.0になることが確認された。しかし、表2に示すように、何れのScoreで比較しても、同定タンパク質数は低下する(Score 20以上で91種類)ことが判明した。このことは、完全に上記主要タンパク質をベックマン抗体で除くと、恐らくはalbumin等に結合していたタンパク質も除去されるため、同定タンパク質数が低下することを示す。

以上のことから、アジレント抗体カラム処理よりも、より多くの血清タンパク質の解析が可能とされたベックマン抗体カラム処理は、少なくとも、cICAT解析においては期待したほど有効ではないことが分かった。同定タンパク質数を大幅に増加させるためには、ベックマン抗体カラムシステムの改良が必要と思われる。

#### E. 結論：

フランス人血清を用いて、12種類の主要血清タンパク質を除去できる新規ベックマン抗体カラム処理により、cICAT法による大幅な血清同定タンパク質数の増加を目論んだ。しかし、既存のアジレント抗体カラムとほぼ同等の131-155種類の血清タンパク質が同定・定量が可能であったが、期待したほど成果は得られな