

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した。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、これまでの検討において、従来の LC-MS/MS を用いた標準的な解析法の問題点が明らかとなった。そして、より高感度かつ網羅的解析をめざすためには、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。さらに、膨大な量の質量分析データからより有効に情報を引き出し、多検体による比較解析を成功させるためには、データ解析ソフトウェアの機能が重要となる。本解析に用いた ICAT 法では、専用解析ソフトウェアは TOF マスのみに依存した我々独自のアプローチによる比較解析が不可能であったため、これを可能とするためのオリジナルなソフトウェアの開発が必要であった。そこで、協力関係にあるインド Rushmore 社の協力により、独自のソフトウェア「mzMore」の開発を進めた。

また、LC-MS 測定条件のリファインメントにより、高感度かつ再現性のある質量分析データが取得できるようになり、ノンラ

ベルによる定量比較も可能であると考えられたため、マウス尿サンプルを使って、ノンラベル法を使った比較法による、肝遺伝毒性マーカーの探索を行った。

以上、動物尿を用いた安全性予測マーカーの検出に関する検討を進めてきたが、LC-MS 測定およびサンプル前処理に関する条件が確立し、高感度測定が可能となったこともあり、最終的な目標であるヒトサンプルでのマーカー探索に向け、ヒト尿サンプルを用いて同様な検討が可能であるかを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 尿サンプル

#### <ラット>

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 0-24 時間尿、およびアセトアミノフェン 500 および 800mg/kg を投与したラット由来の 0-24 時間尿を使用した。一群 5 匹のラットを用い、採尿はステンレス製代謝ゲージにて、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℃で保存した。

#### <マウス>

日本環境変異原学会MMS研究会におけるトキシコゲノミクス共同研究に使用した動物より、強制排尿により採取した尿を用いた。薬物処理に関する情報は以下のとおりである。

#### 遺伝子傷害性肝発癌物質

Quinoline

N-nitrosomorpholine

#### 非遺伝子傷害性物質

clofibrate

1,4-dichlorobenzene and

1-naphthylisothiocyanate

#### <ヒト>

株式会社ケー・エー・シーより購入した正常ヒト男性由来尿サンプルを使用した。本サンプルは、BIOPREDIC international 社にて研究目的の使用について同意を得られたドナーより採取後凍結保存されたものである。

#### (還元アルキル化)

未処理の尿サンプル 200 $\mu$ l とともに、100 $\mu$ l の 15mM DDT を加え、60℃ 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、100 $\mu$ 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 $\mu$ l (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) 加え、37℃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

### 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 $\mu$ 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。

### 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。ESI ナノスプレー用チップとして、KYA 社製スプレーチップを使用した。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、基本的に以下の TOF-MS 測定条件をデフォルト値として使用した。

- TOF マス質量範囲 ; 350-1400m/z
- Total Analysis Time 80 min
- Accumulation time 4 sec.
- Spray Voltage 1600V

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  $\mu$ l を、Denaturing Buffer を 75  $\mu$ l 入れたエッペンチューブに加え、2  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l) の Aff Buf-Load を加えて中和し、カラムに載せた。Aff Buf-Load を 500  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l と Cleaving Reagent B 5  $\mu$ 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 を用い、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. TOF マス測定とデータ処理

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。TOF マス依存解析を行う場合には、積算時間は 4 秒と長めに設定した。

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。また、独自の定量解析ソフトとして“mzMore”と名付けたソフトウェアの開発を進めた。

## 6. フォーカス測定による候補ペプチドの同定

TOF マスデータの比較により選択したマーカー候補ペプチドに対し、質量誤差 100ppm、リテンションタイム幅 10 分間のウィンドウを設定し、これを MS/MSS 測定の際のインクルージョンリストとして設定し、これらのペプチドを優先的に MS/MS 測定に移行させた。

## 7. 抗体結合磁気ビーズの前処理による高発現量タンパク質の除去

LC-MS/MS による同定データおよび二次元電気泳動法と MALD-TOF マス (AB4700) による同定により、ラット尿中の高発現量タンパク質として Major Urinary Protein precursor および Urinary protein precursor1-3 を同定した。これら高発現量のタンパク質を除去する目的で、合成ペプチドを用いたウサギポリクローナル抗体を作成した。この抗体を市販の磁気ビーズ Dynabeads® ProteinA (Invitrogen) へ結合させ、尿サンプルを直接処理することにより、高発現たんぱく質の除去を行った。

## 8. データ解析ソフト「mzMore」の開発

ソフトウェアシステムの開発は、インド RUSHMORE 者のシステムエンジニアである Ramesh Kanagapathy 氏の協力の下、進められた。今年度は、日本公定所協会の支援事業により、Ramesh を 2 週間日本へ招聘し、直接問題点に関してディスカッションを行うことにより相互理解を深め、ピーク検出アルゴリズムに関する改良を加えた。

## B. 研究結果

### 1. ラット尿中のタンパク、ペプチド検出

#### 1-1. ノンラベル化法による比較

まず、安定同位体標識を使わずに、別々の LC-MS 分析のデータを、サンプル間で比較する手法について検討を行った。これまでに確立した Pep3D を用いた LC-MS データの可視化により、異なるランの間の LC-MS データを、3次元グラフとして比較する事が可能となった。これにより、実際に2サンプル間の発現量の比較を、2次元電気泳動等と同じく、イメージデータとして目視で比較することは可能であり、明らかに発現量の異なるスポットについては、この方法でも十分検出が可能であることがわかった。しかし、同一サンプルを2回分析し LC-MS の再現性を検討したところ、LC によるリテンションタイムのずれ、質量分析装置によるペプチドピーク強度の再現性に問題があることがわかった。

このうちリテンションタイムのずれに関しては、すでに報告があるように、 $m/z$  値の正確性を手がかりに測定後にソフトウェア的に補正も可能であると考えられ、実際に MSlight というフリーソフトウェアを使って、二つのデータの重ね合わせを行った(図1)。

その結果、許容範囲を超えてリテンションタイムがずれていたためか、重ね合わせがうまくいかない部分があり、独自のアルゴリズムでの検討が必要であることが判明した。グラフからも水平方向にずらすことによる重ね合わせは可能だと見られ、リテンションタイムのずれは補正可能と考えら

れるが、より深刻な問題として、シグナル強度の再現性が課題となった。

同一サンプルを測定した図2において、全体としてのデータの再現性は良さそうであるが、細かい点を見てみると図中○囲みの部分に、強度の差のあるスポットが見受けられた。このペプチドピークのイオン化が何らかの理由により妨げられたか、LC からの溶出過程での問題かは不明であるが、同一サンプルを測定して、このような差が見られることは定量的比較の上では重要な問題である。相対的なシグナル強度の差については、一定時間領域の総シグナルや基準ピークを用いたノーマライゼーションによる補正が可能であると考えられ、ソフトウェア的にそれを行うための技術開発を進めているが、その補正を超えた変化が起こりうる可能性が示されたことより、当面はノンラベルではなく、2サンプルを同時に測定することにより、より定量的な比較が可能となる安定同位体ラベルを用いた方法を優先させて、系の開発を行うこととした。

#### 1-2. オリジナル解析ソフト **mzMore** の開発

ノンラベル化法での利用を念頭に置いて、LC-MS データに基づいた発現差解析のためのオリジナルソフトウェア“**mzMore**”の開発を、インド Rushmore 社の協力を得て進めてきた。

まず、データ解析のための基本的要素を図3に示した。質量分析装置から得られる生データは、Qstar の場合 wiff 形式という独自のフォーマットをもつため、テキスト(数値)データとして扱いが可能なようにまず **MZstar** というフリーソフトにて

MZxml 形式のデータに変換した。その後、ピーク認識以降の一連のデータ処理を行うことになるが、最初のピーク認識の部分のアルゴリズムが一番難しくかつ重要なステップであり、改良を進めている段階にある。開発中のソフトウェアの機能として、具体的なピークの認識例を図4に示す。左側のウィンドウ内にはある一時点での TOF マスデータが数値データとして表示されているが、独自のアルゴリズムを用いてピークの認識を行っており、ピークとして認識された領域がオレンジ色で示されている。紫色の部分がピークトップに相当する。この例では、上側のピークは比較的うまく認識されているが、下側のピークの裾野部分がうまく認識されていない。さらにアルゴリズムに改良を加えることで、このピーク認識を改善したい。右側のウィンドウにリストされているのがこのスキャンに置いて認識された全てのピークの情報である。

図3のピークのグループ化以降の部分は比較的開発が進んでおり、最初のピーク認識の問題が解決されれば、以後の操作はスムーズに進められることが予想される。ただし、今後の課題としては、前述のように、ピーク強度の補正をどのように行うかという点にあり、この解決がノンラベル化法の成否を握っている。ピーク検出等基礎的なデータ解析は、ICAT ラベル化法にも利用できるため、ICAT 法用の解析法と併せて検討を進める予定である。

図5に現状におけるソフトウェア開発における具体的課題と、その戦略をまとめた。ピーク同定と定量、ノイズの除去、データの標準化、可視化、データのアウトプットという課題に対し、ICAT 法については、デ

ータの標準化の問題は解決されているため、ピーク認識と定量の部分のみが重要な課題となっている。各スキャンにおいて、荷数の異なるペプチドピークの存在も考慮して、一つのペプチドの定量をより正確に行うことをめざしている。

### 1-3. ICAT ラベル法による比較

ICAT ラベル法に関しては、すでに昨年度に基礎的な検討を行ったが、今回実際のラット尿サンプルを用いてそのパフォーマンスのチェックと解析系の確立を行った。ラットコントロール尿およびフェノバルビタール処理尿 (120 $\mu$ g protein 相当、300 $\mu$ l 程度) をそれぞれ、ICAT heavy および light reagent にて標識した。反応液 10 $\mu$ l (24 $\mu$ g protein) ずつを混合した後、トリプシン消化し、アビジンカラムにて精製を行った。ピオチンタグを除去後、20 $\mu$ l の最終反応液を得、このうち 4 $\mu$ l を LC-MS 分析に用いた。得られた LC-MS データの例を図6に示す。各スポットは、ラベル化タグの質量数差に対応するツインスポットとして観察されている。この対応するスポット間の定量比較を行えばよいことになる。しかし、現状で ICAT 解析を行うためのソフトウェアである ProICAT は、MS/MS データによる同定操作を前提として要求するため、まず通常の測定法である MS/MS 測定を含めた解析を行い、ProICAT によりタンパクの発現比を求めた。図6右側のグラフは MS/MS 同時測定を行った際の TOF-MS データであり、図中で青印をつけたスポットは自動 MS/MS 測定が行われたスポットである。自動測定によりかなり多くのスポットが MS/MS 測定されているが、図7に示

したように、よく見ると MS/MS 測定に至らなかったピークも多く存在する。図 8 に示したように LC-MS チャート上は、明らかに差のあるペアのペプチドピークが観察されているにもかかわらず、右側のペアに関しては MS/MS 測定がされなかったため、同定されず、定量結果が得られなかった。ProICAT の解析結果では、図 9 に示したように、十分な信頼性を持って同定されたのは Ig kappa タンパクのみにとどまり、LC-MS 上存在量の多いことがわかった(後述) MUP や UP も同定されなかった。これは、QstarXL の MS to MS/MS の切り換えによる測定スピードが遅いことと、ピーク上の立ち上がり等で MS/MS 測定がされるため、十分な強度の MS/MS シグナルが得られないことに起因すると思われる。この 2 点については Qstar Elite という最新機種において改善が見られているため、質量分析装置の性能によりある程度カバーできる部分である。

今回の尿サンプルを用いて、他の各種質量分析装置を使った依頼解析を行い、得られたデータを比較したところ、感度においてはアプライドバイオシステムズ社の Qstar Elite が最も良いペプチドのカバー率を示し、我々の目的においては一番有望であることがわかった。LC-MS データの再現性、特にリテンションタイムの安定性といった観点からは、Agilent 社の HPLC チップを用いた Q-TOF データが優れており、ノンラベル化法での応用に期待がかかる。また、分解能という点に置いては、測定原理からもサーモエレクトロン社の LTQ Orbitrap™ が優れていたが、感度の面でやや問題があった。今後、これらの新機種が

利用可能になれば、それらを活用した分析法の開発も試みたい。

## 2. サンプルの前処理による高発現量タンパク質の除去

ラット尿中には、血清中と同様に高発現量で存在するタンパクがあり、これらが原因となって、LC-MS に導入するサンプル量が制限されるため、より高感度な解析をめざして、これら高発現量のタンパク質を前処理にて除去することを考えた。

### 2-1. 高発現量タンパクの同定

昨年度の、LC-MS/MS 解析を行った結果から、サンプル中にはラット血清アルブミンと同定されたスポットが数多く存在したため、尿中でもある程度アルブミンが主要なタンパク質となっていることがわかった。しかし、これ以外にもより強度の強いスポットが存在したため、これらの分子量を知り、LC-MS/MS データと併せた同定を行うために、2次元電気泳動を用いた解析を行った。

通常の 1次元目に等電点電気泳動、2次元目に SDS-PAGE を用いた分子量分画による 2次元電気泳動法を用いて、尿中タンパク質を分離した図を 10 に示す。ラット尿中における、クマシーブルー染色により染色される比較的発現量の高いタンパク質の種類はそれほど多くなく、2D ゲルイメージ上で、番号を付けたスポットについて、切り出し、ゲル内トリプシン消化の後、MALDI-TOF/TOF マス解析を行い、TOF マスデータによる PMF 解析および MS/MS データによる MS/MS イオンサーチにより同定されたタンパク名を下の表に示した。主要なタンパクとして同定されたのは、

alpha-2u-globulin (Major urinary protein precursor) の他、urinary protein 2 precursor、serum albumin、

Alpha-amylase、prostatic steroid-binding protein chain C3 precursor、AY327506、RATVPSP であった。また、LC-MS による同定からは、urinary protein 2 precursor (UP2) のホモログとして、urinary protein 1 precursor (UP1) urinary protein 3 precursor (UP3) も検出された。

## 2-2. 血清中アルブミン除去キット

アルブミンに関しては、マウス用ではあるものの血中のアルブミン等主要タンパクを除去するためのキットが市販されていたことから、ラットとマウスの交差性を期待して使用してみた。図 11 にこのキットでの処理後のペプチドマップを示す。期待されたように、アルブミン由来のピークはある程度除去できたが、依然として残っているアルブミンピークが存在するとともに（ラットとマウスの配列の差による可能性あり）、アルブミン以外のメジャーピークはそのままであった。また、同じようなペプチドマップ得るためにより多くのサンプル量を必要としたことより、アルブミンに結合したタンパク等が非特異的に除去されてしまった可能性も考えられた。以上の結果より、血清中アルブミン除去キットはラット尿サンプルにはあまり有効でないことがわかった。

## 2-3. 分子量分画フィルター (microcon)

主要タンパクとして同定された alpha-2u-globulin (MUP) の分子量は 15.5 kDa であり、urinary protein precursor 類

の分子量もそれ以下と比較的小さめのため、これらを分子量による分画フィルターを使って除去することを考えた。

MICROCONYM-30 フィルターは分子量 30kDa のカットオフ値を持つが、このフィルターを用いた場合にも MUP 等の主要タンパクは除去できず、50kDa カットオフの YM50 フィルターおよび VIVASPIN50K を用いても、完全には除去できなかった。また、全体として検出されるピーク数も減少しており（図 12）、再現性等の問題からも効率的な方法ではないという結論に達した。

## 2-4. 抗体結合ビーズ

尿中の主要タンパクとして同定された MUP および UP1-3 を効率的に取り除くために、これらに対する特異的抗体を作製し、除去用の抗体ビーズの作製を試みた。MUP、UP に対する抗体の作製については、これらのアミノ酸配列情報より、特異的かつエピトープとして相応しい 7-8 残基を選択し（UP1-3 については共通部分の配列より選択）、これらに対する合成ペプチドを作製した。この 2 種の合成ペプチドを混合し、アジュバントとともに 2 匹のウサギに対して 2 週間間隔で計 5 回感作を行い、最終感作より 1 週後に採血を行った。得られた血清を、免疫に用いた合成ペプチドを結合したアフィニティーカラムにより精製した。溶出したフラクションに対して、合成ペプチドを抗原とした ELISA 法により反応性を確認したところ、12500 倍希釈においても安定した力価を示し、目的の抗体が得られていることが確認された。現在得られた抗体を結合させて目的タンパクを取り除くため、Dynabeads ProteinG (Invitrogen)



および温度応答性ナノ磁性体ビーズである Thermo Max LPA proteinG,(Magnaheat) を用いた条件検討を行っている (図 13)。

### C. 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 XL 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。

昨年度の検討より、この質量分析装置の限界として、MS/MS 測定時のスキャンスピードに制限があり、網羅性を上げる上での障壁となることがわかったため、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事にした。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。

また昨年度の検討で、生データを取り出して加工し、LC-MS データの全体像を既存のフリーソフトウェアを用いて可視化することができたので、この方法を使いながら検討を進めた。ノンラベル化法による2サンプルの比較も、こうした可視化による3次元プロットを元にある程度目視にて発現差のあるピークを同定できる事が確認されたが、より正確な定量のためには、リテンションタイムのずれ、イオン化効率を反映したシグナル強度の補正が必要であった。これらを達成するための新規ソフトウェアの開発を行っているが、前者はソフトウエ

ア的に対応が可能であるが、後者は質量分析装置がもともと抱える本質的な課題でもあり、その補正は非常に難しい課題となる。現状で、サンプルインジェクション間のデータの再現性に関して十分な保証が得られなかったため、より定量性の高い方法として安定同位体ラベル化法の検討を進めた。

アプ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。しかし、ICAT 解析のために用いる ProICAT というソフトウェアは、標準的な MS/MS 自動測定に基づくタンパク同定を基本として 2 サンプル間の発現量の比較を行うため、適切な MS/MS データが得られない場合には、定量比較が不可能となる。しかし、TOF-MS 上は十分な量のペプチドが検出されているため、やはり TOF-MS データに基づいた発現差解析を行う事が有効であると考えられた。現在、ICAT 法による測定データを元に定量比較を行うためのオリジナルなソフトを開発しているが、生データからのピークリストの抽出など、残された課題を今後クリアして最終的に使えるプロダクトの開発につなげたい。また、今回同定率が低かった原因として、タンパクあたりの ICAT 精製される Cys 含有ペプチドの数の少なさ、および尿中における部分的分解などの可能性が考えられ、MS/MS データの de novo シークエンス法による同定法などの併用を含めて、より精度の高い同定手法に関しても検討を加える必要があることがわかった。

#### D. 結論

オンライン nanoLC-MS/MS を使い、定量と同定を分離した 2-step のアプローチにより、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。ノンラベル化法によるサンプル間の比較では、これまでに開発した可視化ツールにより全体像を把握することができたが、リテンションタイム、シグナル強度の補正が課題となり、特にシグナル強度の補正については質量分析装置自体のもつ課題であり、解決にはやや時間がかかると思われた。そこで、原理的にこの補正は必要としない安定同位体を用いたラベル化法 (cICAT 法) による検討を進めた。これについても、既存の解析ソフトでは機能面で限界があったため、TOF-MS のみを利用した ICAT 解析を可能とするために、独自の解析ソフトウェアの開発を進めた。実サンプルの測定により、感度的にはある程度満足できる比較が可能であると考えられ、今後ソフトウェアの開発と平行して、薬物投与サンプルでの発現変動の解析を進めていきたい。

また、より高感度化をはかるための手段として、尿中の高発現量タンパク質の除去が、血清等での報告と同様に有効であると考えられたため、これらのタンパク質の同定をするとともに、それらに対する抗体を作製し、前処理用の抗体ビーズの開発を進めた。来年度は実サンプルを用いた評価を行い、有効な結果が得られれば、この技術の特許化する予定である。

#### E. 健康危険情報

特になし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Watanabe T, Tobe K, Nakachi Y, Kondoh Y, Nakajima M, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Maeda S, Tadakuma A, Sakurai M, Arai Y, Hyogo A, Hoshino M, Tashiro T, Ito H, Inazumi H, Sakaki Y, Tashiro H, Furihata C. Differential Gene Expression Induced by Two Genotoxic N-nitroso Carcinogens, Phenobarbital and Ethanol in Mouse Liver Examined with Oligonucleotide Microarray and Quantitative Real-time PCR. *Genes and Environment*, 29:115-127, 2007.

Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat Res.*, 619:113-123, 2007.

Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133-positive cells. *J Biol Chem.*, 282:33507-33514., 2007.

Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, Ueda R. Proteome analyses of the growth inhibitory effects

of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells. *Leukemia*. 21:2344-2353, 2007.

Kanayasu-Toyoda T, Suzuki T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T, Yamaguchi T. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase Ci in neutrophilic differentiation cells. *J. Cell Physiol.*, 211: 189-196, 2007.

### 2. 学会発表

田邊思帆里, 鈴木孝昌, 山口照英, 鈴木和博, 佐藤陽治: 細胞治療薬応用を目的とした骨髄由来間葉系幹細胞のゲノムプロファイリング  
日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会(2007年5月)

鈴木孝昌 生殖細胞特異的変異原物質は存在するか? ~トランスジェニックマウスを用いた突然変異試験結果より~  
第34回日本トキシコロジー学会(2007年6月)

Y. Luan, T. Suzuki, M. Honma, J. Ren Application of SNP and CGH arrays for Chromosome analysis.  
International Congress on Toxicology (2007年7月)

T. Suzuki, Y. Luan, D. Prabha, M. Kogi, M. Honma, T. Koizumi, S. Tanabe, Y. Sato, K. Suzuki, and T. Yamaguchi

CGH and SNP Arrays; as New Tools for Detailed Analysis of Chromosome  
The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007年10月)

T. Suzuki, T. Koizumi, D. Prabha, M. Honma, S. Hamada, M. Nakajima, T. Watanabe, C. Furihata Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II: High-throughput Quantitative Real-time PCR analysis by the TaqMan Low Density Array  
The 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens (2007年11月)

C. Furihata, T. Watanabe, A. Tadakuma, M. Sakurai, T. Suzuki, S. Hamada, K. Narumi, M. Nakajima, A. Koeda, T. Sakuma, K. Oshida, H. Sanada, M. Hirayama Collaborative study of JEMS/MMS/Toxicogenomics: Quantitative real-time PCR analysis on mouse liver carcinogens.  
The 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens (2007年11月)

田邊 思帆里, 佐藤 陽治, 鈴木 孝昌, 鈴木 和博, 山口 照英 遺伝子発現プロファイリングによる新規ヒト骨髄由来間葉系幹細胞継代培養時系列マーカー遺伝子の探索  
BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会) (2007年12月)

押澤正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、

鈴木和博、山口照英 カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球分化において増殖・分化に重要な働きをする  
BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会) (2007年12月)

T Suzuki, T Suresh, K Ramesh, T Oshizawa, K Suzuki Searching for the hepatotoxicity-related makers in urinary proteome by the nano-LC MS/MS and original software "mzMore"  
International Conference on Toxic Exposure Related Biomarker, Genome and Health Effects (2008年1月)

G. 知的所有権の取得状況

なし

SNP ARRAYS ARE POWERFUL TOOLS FOR  
CHROMOSOME ANALYSIS EMS Annual Meeting  
2006 (2006年9月)

C. Furihata, K. Tobe, T. Watanabe, S.  
Maeda, M. Hirayama, M. Harada, M. Nakajima,  
S. Hamada, C. Namiki, T. Suzuki, Y.  
Nakachi, Y. Kondoh, T. Tashiro and C.  
Furihata Differentially expressed genes  
in mouse liver induced by N-nitroso  
carcinogenic compounds, phenobarbital  
and ethanol. 第20回国際生化学・分子生  
物学会 (2006年6月)

S. Yokokawa, D. Mulhern, Y. Ohshima, Y.  
Adachi, A. Kohara, T. Suzuki, H. Okuda, N.  
Miyata, S. Ninomiya T. Sudo  
Environmental factors outweigh  
drug-response factors at early time  
points in toxicogenomic experiments. 第  
33回日本トキシコロジー学会学術年会  
(2006年7月)

#### H 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1 ノンラベル法によるマウス尿サンプル TOF-MS データの比較

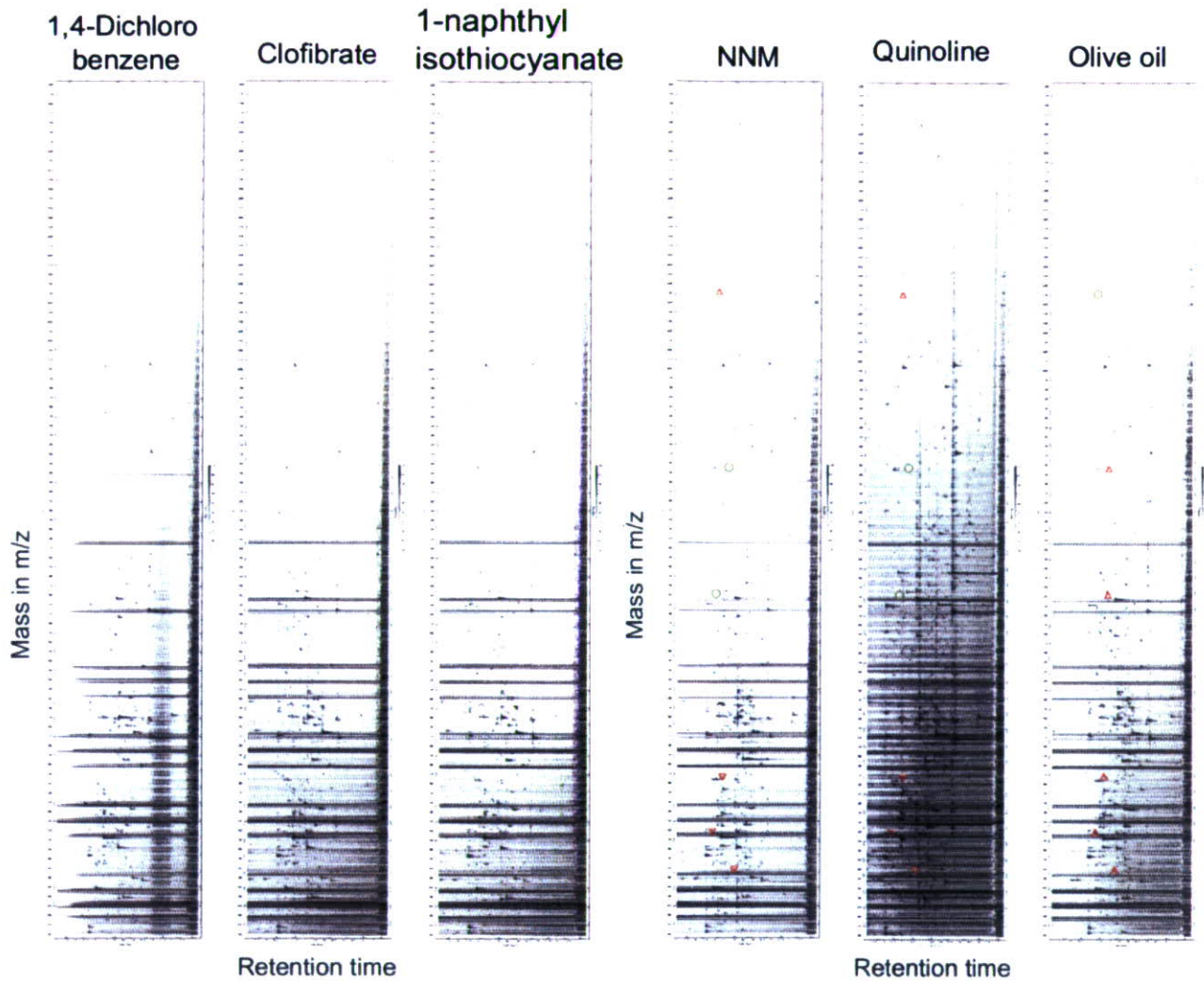


図2. 発現差の見られたピークの抽出

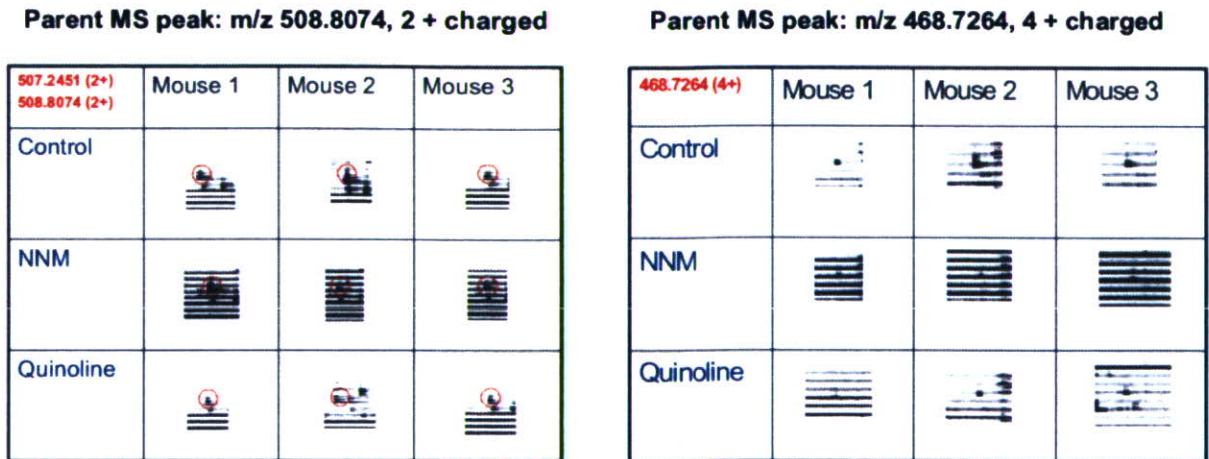


図3 マーカー候補ペプチドのフォーカス MS/MS 測定による同定

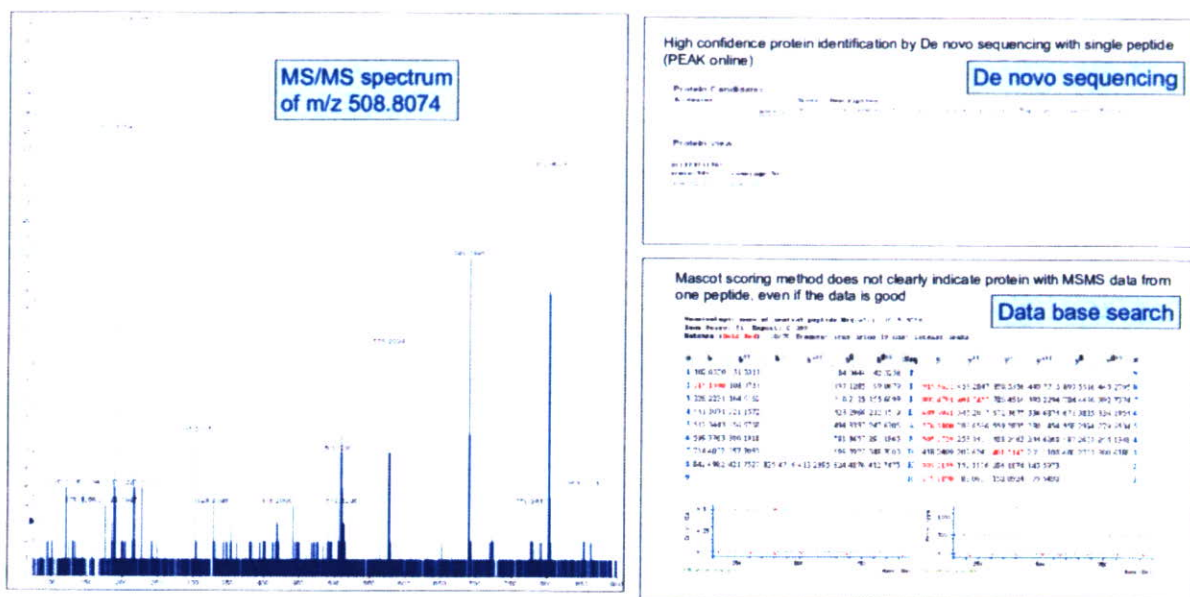


図4 cICAT ラベル化と比較実験のデザイン

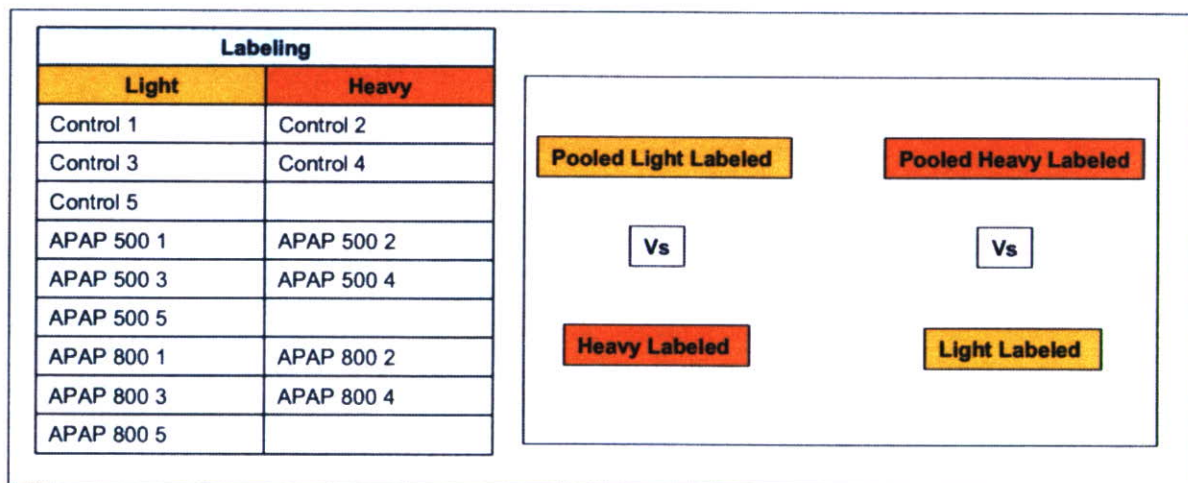




図5 cICATデータの3次元可視化

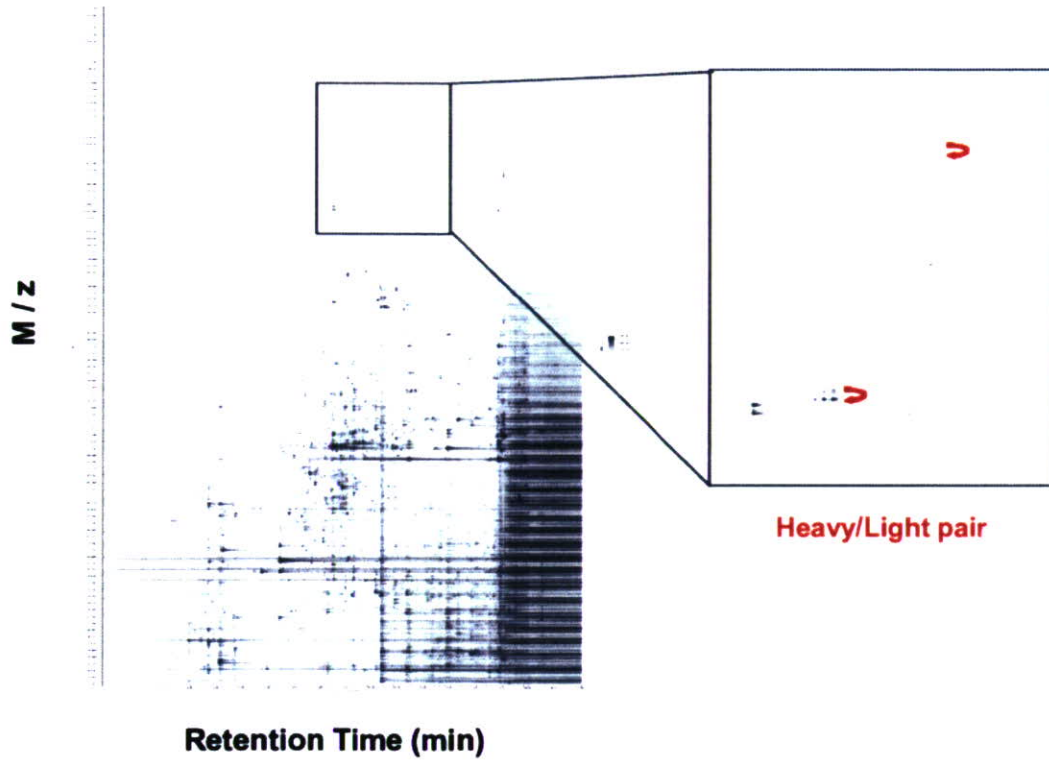


図6 目視による Heavy/Light タグペプチドピークの比較とマーカー候補の選択

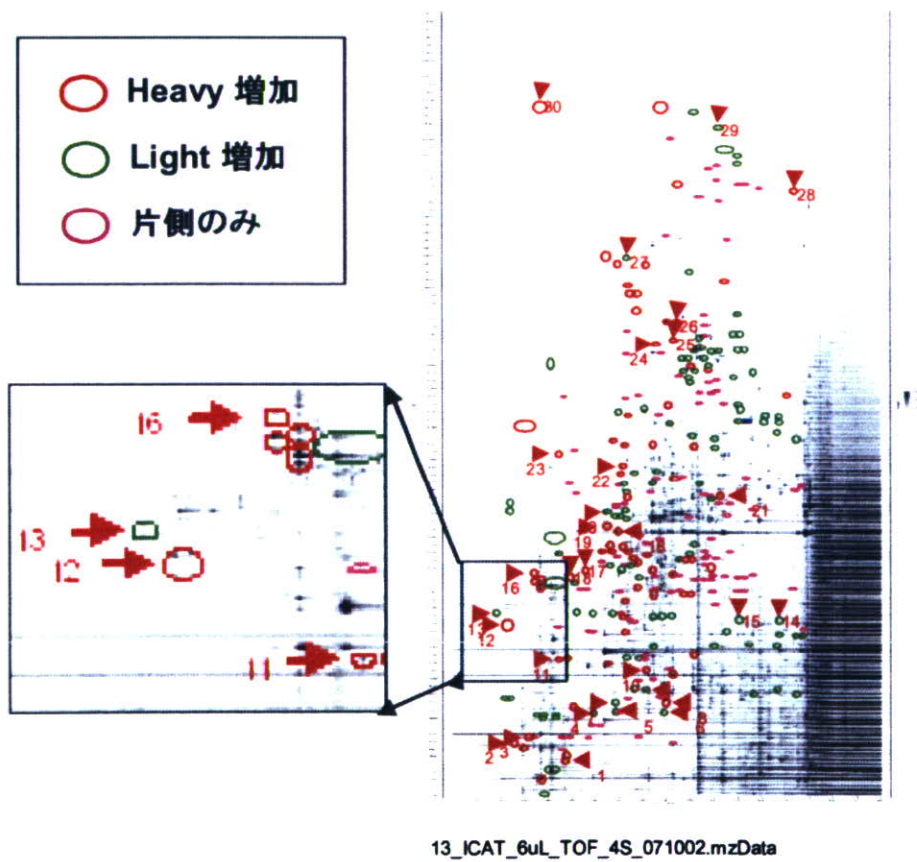




図7 mzMore によるピーク検出のストラテジー

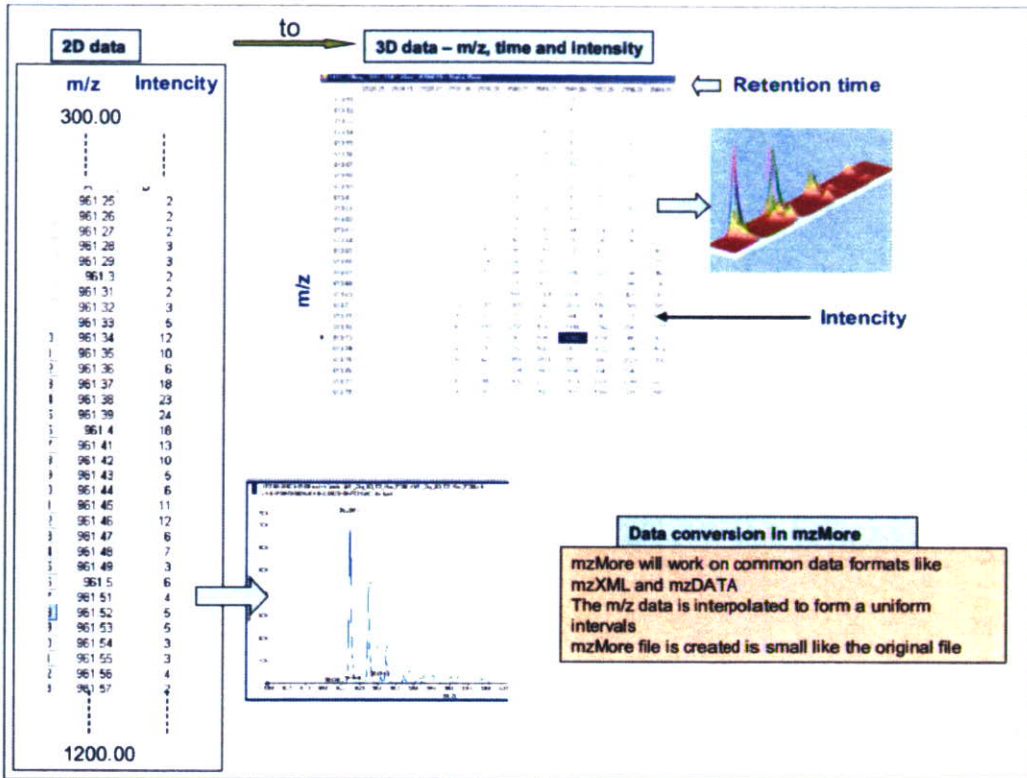


図8 mzMore によるデータアウトプット

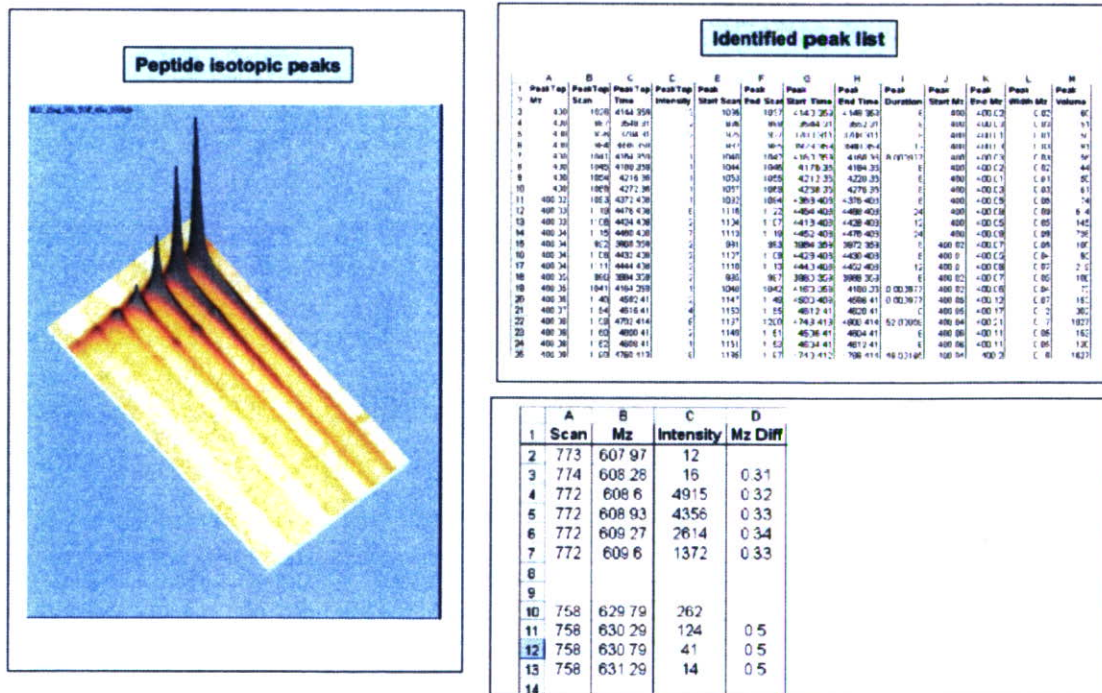


図9 Fast Fourier Transform (FFT)によるノイズ除去のアプローチ

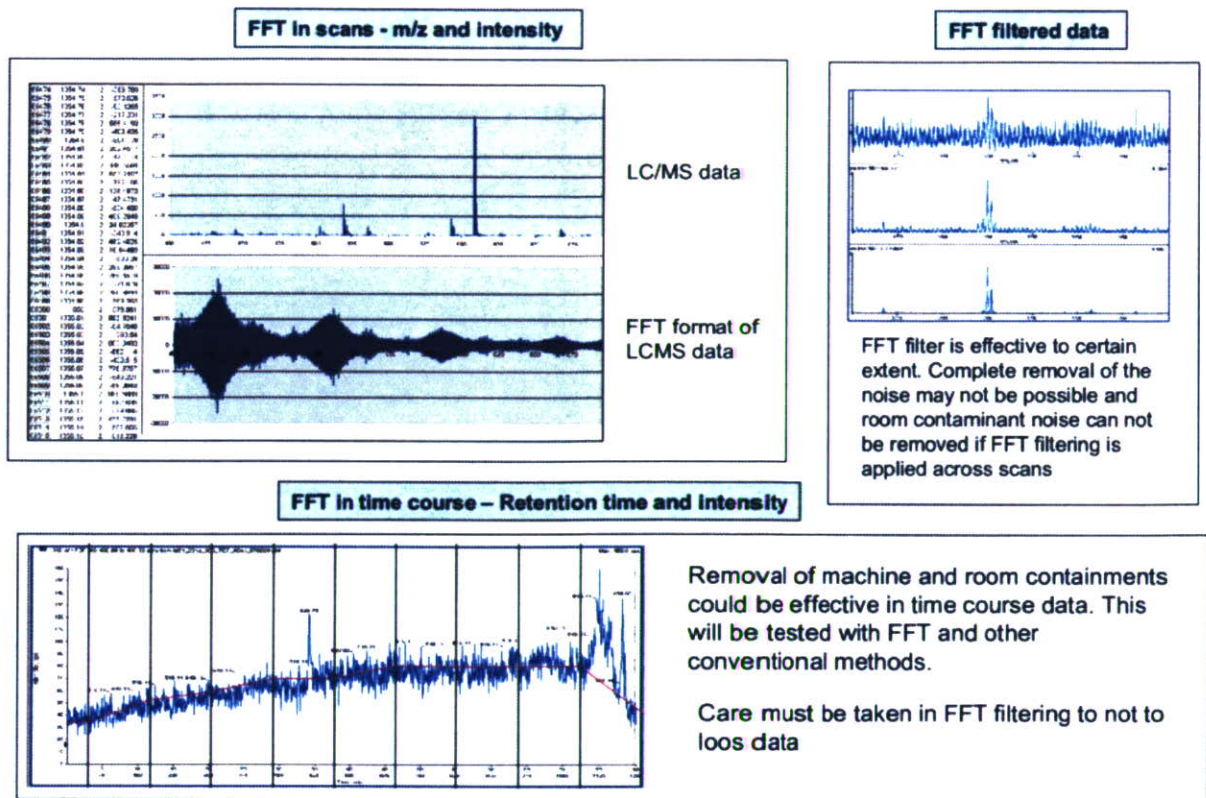


図10 抗体結合磁気ビーズによる高発現タンパク質の除去

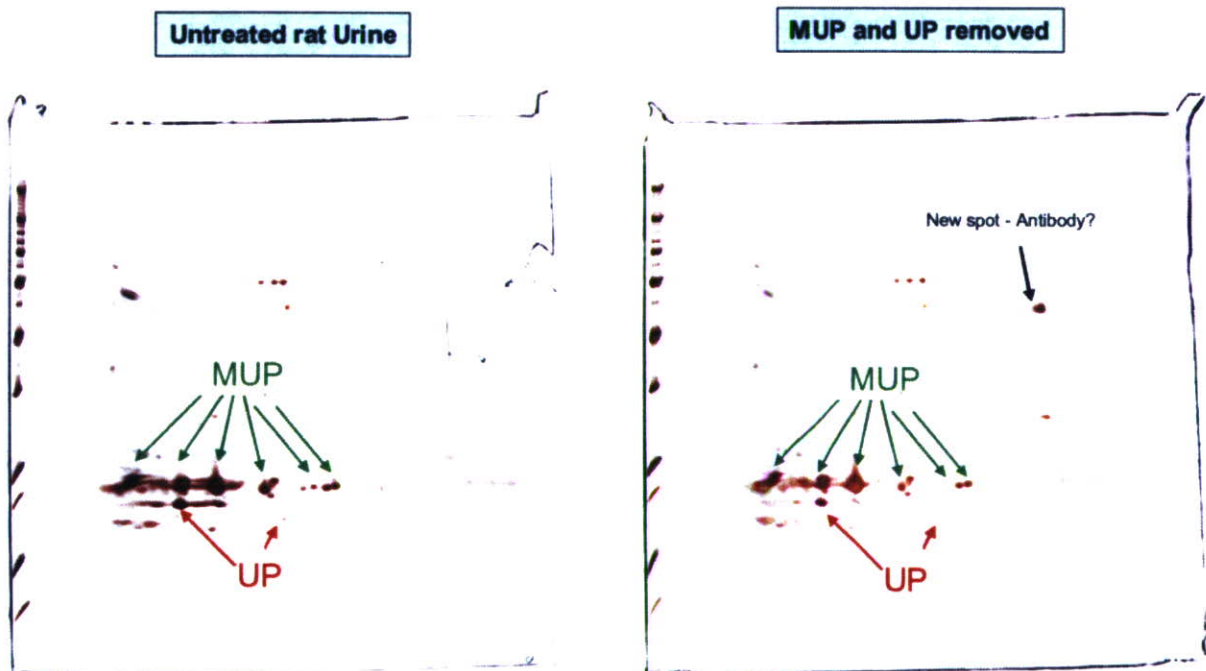
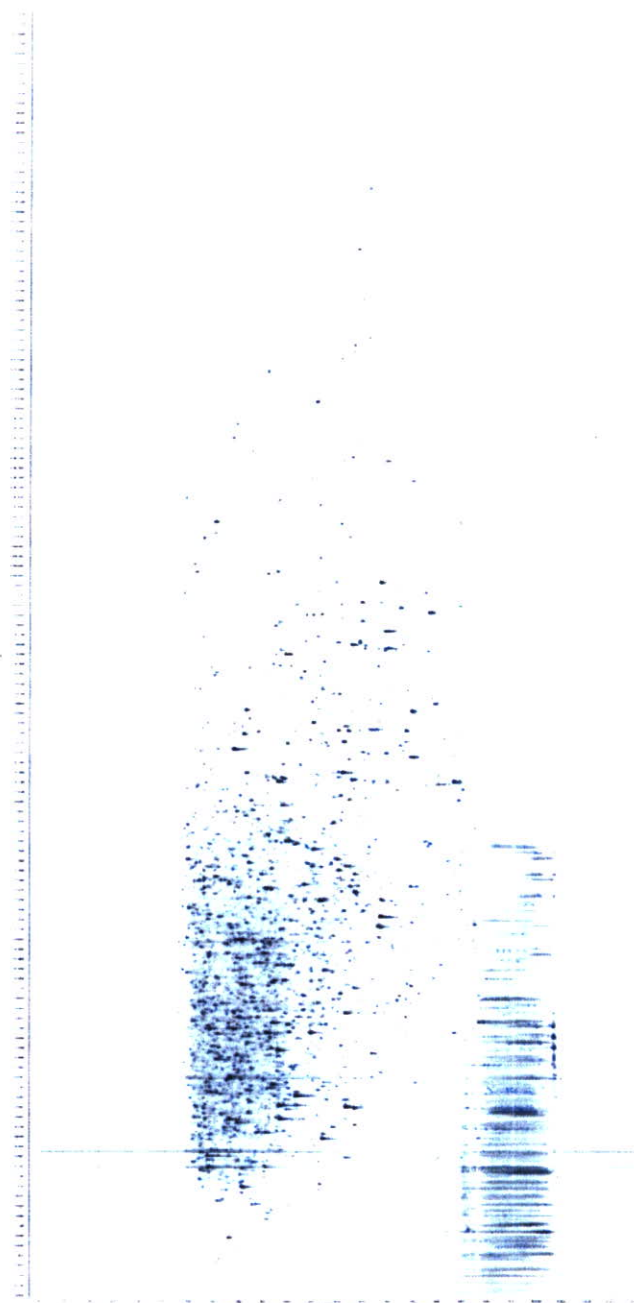


図 11 ヒト正常コントロール尿サンプルのプロテオーム解析



**Mascot Search Results**

Search  
 Search title: E:\Project\MSL File\MSL\Human\Human\Human 21\_HUMAN\_HUMAN\_000111.mz.ms  
 MS data file: E:\Project\MSL\Human\Human\Human\Human 21\_HUMAN\_HUMAN\_000111.mz.ms  
 Database: UniProt  
 Mascot engine: 2.7.0  
 Mascot version: 2.7.0  
 Mascot date: 13 Feb 2006 at 09:00:00 GMT

Protein list

Protein	Score	Accession	Protein Name
000111	100.0	P00001	Albumin
000112	95.0	P00002	Immunoglobulin heavy chain constant region
000113	90.0	P00003	Immunoglobulin light chain constant region
000114	85.0	P00004	Immunoglobulin heavy chain variable region
000115	80.0	P00005	Immunoglobulin light chain variable region
000116	75.0	P00006	Transferrin
000117	70.0	P00007	Urea
000118	65.0	P00008	Creatinine
000119	60.0	P00009	Glucose
000120	55.0	P00010	Fructose
000121	50.0	P00011	Sucrose
000122	45.0	P00012	Maltose
000123	40.0	P00013	Galactose
000124	35.0	P00014	Glucose-6-phosphate
000125	30.0	P00015	Fructose-6-phosphate
000126	25.0	P00016	Glucose-1-phosphate
000127	20.0	P00017	Fructose-1,6-bisphosphate
000128	15.0	P00018	Glucose-5-phosphate
000129	10.0	P00019	Fructose-1,6-bisphosphate
000130	5.0	P00020	Glucose-6-phosphate

**50 proteins was identified by standard LC/MSMS analysis**



表1 マウス個体におけるシグナル変化の共通性の検索

Spot No	m/z	Olive oil								NMR								Quinolone							
		Charge	mouse-1	RT	mouse-2	RT	mouse-3	RT		mouse-1	RT	mouse-2	RT	mouse-3	RT	mouse-1	RT	mouse-2	RT	mouse-3	RT				
1	568	2+	UP	25	UP	24	UP	28		DN	24	DN	24	AB	22										
2	554	2+	AB	24	AB	25	AB	29		UP	22	UP	24	UP	28										
3	598	1+	UP	15	UP	18	PR	20		DN	15	DN	18	DN	20		DN	20	DN	22	DN	20			
4	484	2+	UP	30	UP	30	UP	35		AB	27	AB	30	AB	34										
5	488,7515	2+	UP	30	UP	32	UP	35		DN	30	DN	30	AB	27		DN	32	DN	34	DN	33			
6	437	2+	UP	22	UP	25	UP	25		AB	18	AB	22	AB	27		DN	25	PR	26	DN	26			
7	791	2+	AB	15	AB	18	AB	22		UP	15	UP	15	UP	15										
8	789	1+	AB	22	AB	22	AB	22		UP	20	UP	24	UP	22										
9	780	2+	UP	27	UP	27	UP	32		AB	25	AB	25	AB	30		AB	30	DN	25	AB	30			
10	738	1+	AB	40	DN	45	AB	44		UP	44	UP	46	UP	46										
11	889	2+	AB	22	AB	22	AB	22		UP	20	UP	25	UP	25										
12	889	2+	DN	45	DN	45	DN	45		UP	44	UP	43	UP	49										
13	861	2+	UP	25	UP	22	UP	30		AB	25	AB	25	AB	28										
14	880	2+	PR	49	PR	38	DN	43		AB	36	AB	37	AB	40										
15	613.7	2+	AB	70	AB	70	AB	70		UP	70	UP	70	UP	70										
16	889	2+	UP	33	UP	36	DN	40		DN	33	DN	36	AB	40										
17	842	2+	UP	55	UP	58	DN	58		AB	55	DN	53	AB	60										
18	839	1+	AB	43	AB	40	AB	45		UP	44	UP	44	UP	48										
19	823	2+	UP	50	UP	52	UP	57		DN	50	DN	51	DN	55										
20	895	2+	UP	28	UP	27	UP	30		AB	25	AB	27	AB	29		DN	30	DN	30	AB	30			
21	821	2+	PR	28	UP	28	UP	33		DN	25	DN	28	DN	28										
22	818	2+	AB	25	AB	25	AB	25		PR	25	DN	27	DN	27										
23	1081	2+	AB	20	AB	20	AB	20		UP	20	UP	24	UP	26		UP	24	UP	22	UP	20			
24	1952	2+	UP	27	UP	27	UP	27		DN	25	DN	28	DN	25										

DN: down regulated UP: upregulated PR: no change ---: not checked  
RT: Retention time

表2 シグナル強度に差が見られた ICAT ペアとその普遍性

ID	m/z-L	m/z-H	Mass Diff	APAP 800 mg/kg												Control											
				11 int	RT	14 int	RT	12 int	RT	13 int	RT	2 int	RT	3 int	RT	5 int	RT	1 int	RT	4 int	RT						
12-1	1253.71	1255.74	2.03	np		LL w	35.7-36	HH w	35-36	np		LL w	33.9-34.1	rps		LL w	36-36.5	HH w	36-36.5	HH w	37.4-38						
12-2	1186.99	1191.52	4.53	nc	w	47.4-47.7	LL w	44.5-45	HH w	44.3-44.8	HH w	45.7-46.1	HH w	42.3-43.4	nc	w	44.6-44.9	HH w	45.7-46.2	HH w	44.4-45						
12-3	Ratio is not high																										
12-4	1075.42	1081.11	5.69																								
12-5	884.86	887.87	3.01	L	s	41.8-42.8	LL s	38.3-38.8	HH s	39-40.3	HH s	40.4-41.2	LL s	37.4-38.8	L	s	38.8-39.8	LL s	38.7-40.8	HH s	39.8-41						
12-6	1003.00	1004.80	1.80	HH	s	37.9-38.9	LL s	35.6-36.6	HH s	35.3-36	HH s	36.9-37.1	LL s	33.9-34.55	LL w	35.3-36	LL s	35.6-36.8	HH s	35.6-36.6	HH s	37.2-38.1					
12-7	886.82	891.33	4.51	np		LL w	72.2-72.9	LL s	72.7-73.2	L	s	73-73.6	LL w	70.9-71.5	np		L	w	72.5-73.1	L	w	73-73.6					
12-8	841.39	845.91	4.52	LL	s	41.6-42.4	LL s	38.8-39.5	LL s	38.8-41	LL s	40-41.2	LL s	37.2-38	LL w	38.8-39.3	LL w	39.6-40.15	LL s	39.25-40	LL s	40.7-41.8					
12-9	843.89	847.00	3.02	nc	s	23.3-24.5	HH w	26-26.3	HH w	22.5-23	HH w	22.7-23.1	nc	s	19.4-20.2	nc	s	20.6-21.2	nc	m	21.9-22.4						
12-10	725.89	729.89	3.91	LL	w	61-61.3	LL s	60-60.5	HH s	59.5-60	HH s	60.4-60.8	HH		np		L		nc		HH						
12-11	Not consistent			nc					HH		HH		L						nc		HH						
12-12	699.78	694.30	4.52																								
12-13	530-531	Not consistent																									
12-14	497.53	500.54	3.01	LL	Not consistent	L		LL																			
12-15	491-492	Not consistent																									
12-16	Not consistent																										
12-17	448.70	453.22	4.52	Not consistent																							
12-18	Not real peptide peak																										
12-19	Not real peptide peak																										
12-20	888.78	893.30	4.52	np		L	s	44.8-45.5	HH w	44.7-45.4	HH s	41.5-42	HH s	43.3-44.2	HH w	45-46.2	m	s	46.3-47.1	L	s	40.5-41					
13-1	393.85	398.36	3.91	L	s	24-25	LL s	9.5-9.8	HH w	23-25.8	HH s	23.3-24.2	HH s	18.9-20.5	HH s	21.1-22.3	m	s	21.3-22.5	L	s	22.4-23.7					
13-2	Not real pep																										
13-3	nc																										
13-4	Not consistent																										
13-5	456.70	461.22	4.52	Not consistent		LL		LL				LL		H		rps		rps		LL							
13-6	456.89	459.90	3.01	Not consistent		LL		LL				LL									LL						
13-7	Not consistent																										
13-8	Not consistent																										
13-9	Not consistent																										
13-10	599.99	612.91	3.91	L	s	39.5-39.9	LL s	36.3-36.8	HH w	35.1-36.8	HH s	40.3-41	HH s	37.5-39.2	L	w	38.3-38.5	m	s	38.8-40.8	L	s	39.5-40.4				
13-11	523.89	526.90	3.01	nc		LL		HH		HH		HH		nc		HH		nc		nc		HH					
13-12	Not consistent																										

int: peak intensity of higher one  
s: 100+  
m: 50-100  
w: <50

Heavy peak is: HH Very high, H High, nc no change, L Low, LL Very Low

Sample-label: np Not observed, rps Not observed because of no spray, nA Not seen in Analyst

Light Heavy