

つのか興味を持たれる。

SELDI-QqTOF-MS (prOTOF 2000) はピークの正確な m/z を測定できるが、MS/MS でないのでペプチドを同定することはできない。今回、糖尿病性網膜症患者で検出される8個のピークを同定することが重要である。そこで、まず、H50 ProteinChip で見出された m/z 1866.2 のピークの同定を試みた。本物質 m/z 1866.2 は、H50 の SELDI plate より 70%アセトニトリル/0.1% TFA で溶出可能であり、IMAC plate でも同ピークが検出されたので強酸性基等を含む酸性脂溶性物質であると考えられた。そこで、糖尿病性網膜症患者の血清をプールして、C18 逆相カラム (2-90% gradient CH₃CN) で分画・精製し、prOTOF 2000 で調べた結果、RT20min 付近に同ピーク (Na 付加体) 及び 1844.24 (Na 非付加体) 存在することを確認し、その精製画分を得た。しかし、ABI4700 の MS/MS では全くアミノ酸由来ピークは検出されず、本物質

はペプチドとは考えられない。一方、同画分には 1866.2 の他に 614 の倍数のピークが存在するので、614 を構成成分とする高分子と考えられる。そのため、臨床検体より精製したサンプルを ABI4700 の内部標準物質を用いた精密質量数測定法 (ミリマス) で正確な質量数 (m/z 614.3996) を測定し、さらに、NCBI の PubChem Compound database と照合した上で、CID-MS/MS 法を用いて詳細に解析した結果、本物質は界面活性化剤の CHAPS であることが判明した (市販試薬の CHAPS で確認済み) (図 11)。CID-MS/MS による切断部位は 4 級アミンの右側で起こると思われる (m/z 177, 447)。なお、CHAPS は、水溶液中では 10 mer (MW 6140) で存在することが知られている。

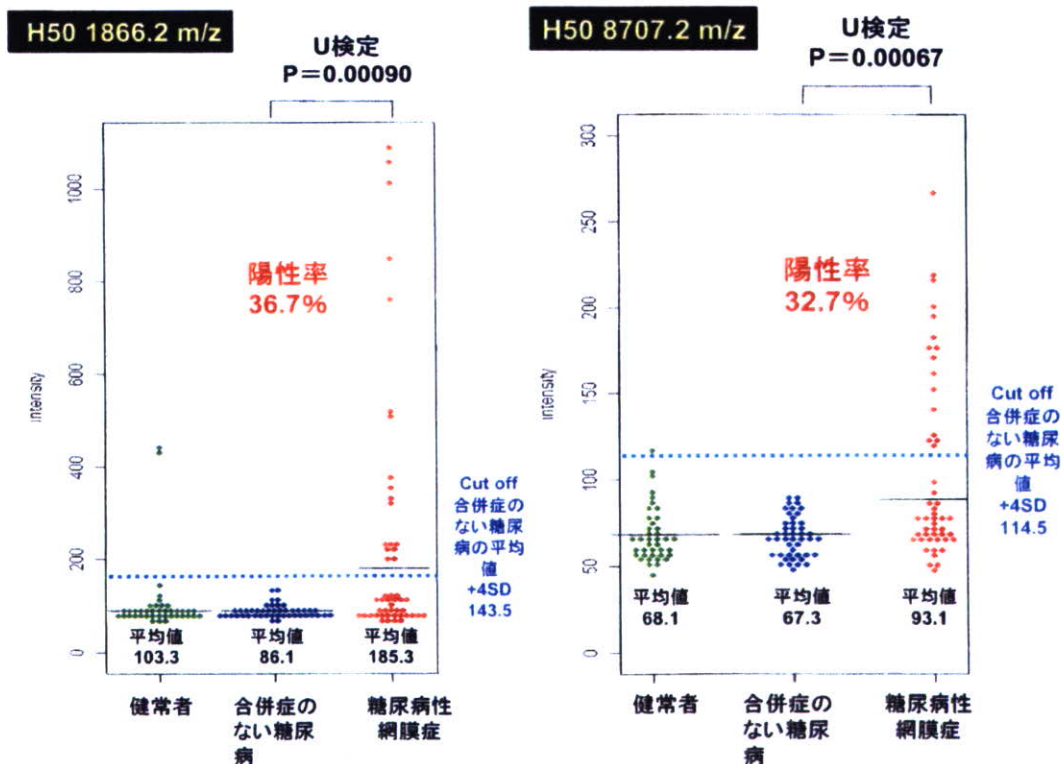


図 8. 健常者 (E 群)、合併症のない糖尿病 (A 群) 及び糖尿病性網膜症あり群 (C 群) での、m/z 1866.2 と m/z 8707.2 の患者毎のイオン強度 (intensity) の分布

H50 1866.2 m/z

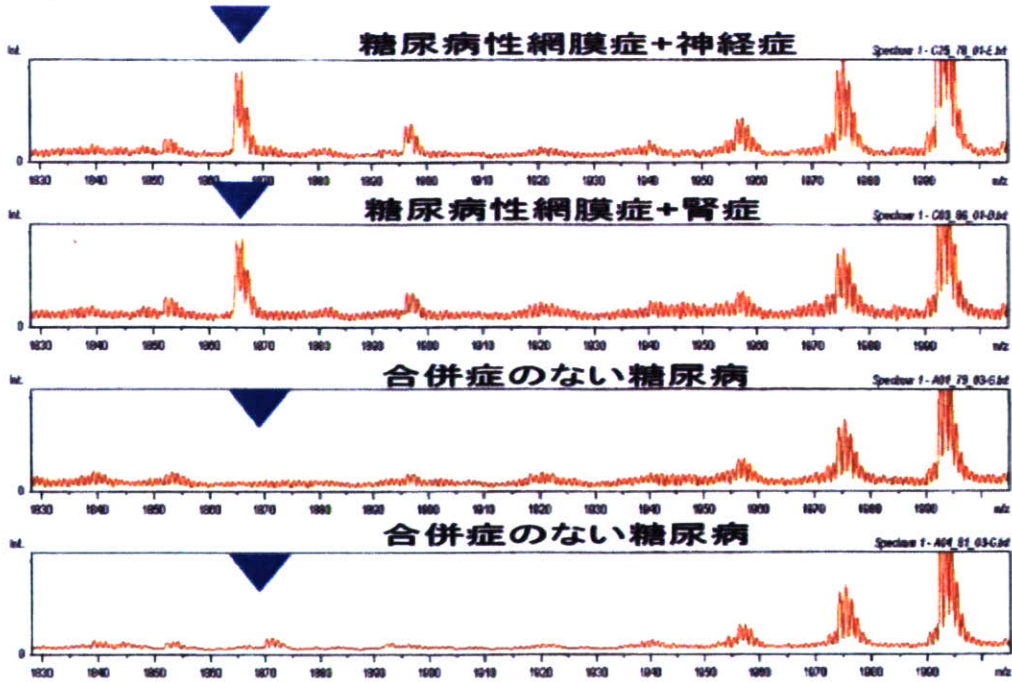


図9. m/z 1866.2 ピーク物質の糖尿病性網膜症あり患者血清のプロファイリング

H50 8707.2 m/z

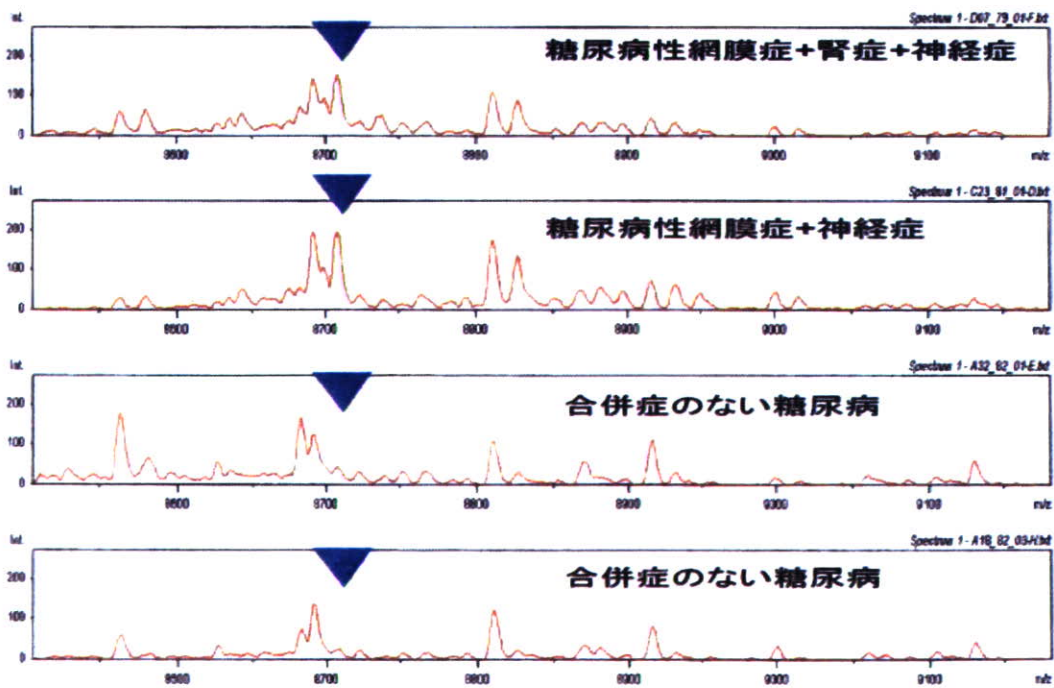
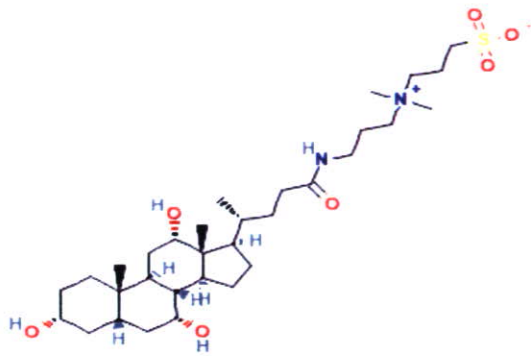


図10. m/z 8707.2 ピーク物質の糖尿病性網膜症あり患者血清のプロファイリング



CHAPS:

Molecular Weight: 614.87712 g/mol

Molecular Formula: C32H58N2O7S

Monoisotopic Weight: 614.39647g/mol

(NCBI PubCHEM Compoundより)

図11. m/z 1866.2 ピーク物質の同定。

今回、糖尿病性網膜症あり群 (C 群) で選択的に検出される 8 個のピークのうちの 1 つ m/z 1866.2 ピーク物質は予想に反してペプチドではなく、ProteinChip 法の標準キット中に含まれる界面活性剤 (可溶化剤) の CHAPS の 3 量体であった。本物質が、なぜ糖尿病性網膜症あり群 (C 群) の一部に検出されるのかは定かではない。しかし、CHAPS が水溶液中では 10 mer (MW 6140) で存在することを考えると、患者血清中で何らかの病的原因でたんぱく質の一部が変性することにより、或いは血清を長期保存する間にたんぱく質変性が起こることにより、CHAPS とたんぱく質との結合様式等が変化して、上述の結

果を生じたことが一つの可能性として考えられる。CHAPS は標準キット中にあるものなので、他の SELDI 血清解析の場合も同様な現象は起こる可能性がある。この点を、今後、留意する必要があると思われる。

しかし、糖尿病性網膜症あり群 (C 群) では、上述のように、他に 7 個のピークが選択的に検出されており、これらについてはペプチドであると推定されている。今後、これらのピークを同様に精製し、ABI-4700 および QSTAR XL 等の精査用 MS で同定をすることが重要であると考えられる。

4) cICAT 法と iTRAQ 法により同定される血清たんぱく質の比較:

PFではこれまで主としてcICAT法を用いて患者血清たんぱく質および組織たんぱく質を解析してきたが、最近では他の同位体標識法の一つ iTRAQ 法による解析が多くなりつつある。

cICAT 法と iTRAQ 法を比較すると iTRAQ 法では次のような利点があるとされる。まず、基本的には cICAT 試薬はシステイン残基を持つたんぱく質にのみ反応するが、iTRAQ 試薬は N 末アミノ酸およびリジン残基の側鎖アミノ基に結合するので全てのたんぱく質に反応できる。また、cICAT 法では H 鎖と L 鎖で各々標識するので 2 種類の検体の比較をするが、iTRAQ 法(4-Plex)では 4 種類の検体を同時に比較することが可能である。さらに、比較定量に関しては、cICAT 法では H 鎖ペプチド及び L 鎖ペプチドの MS のプレカーサーイオン強度 (TOF モード) で比較定量するのに対して、iTRAQ 法は Product Ion モードで同定を行い、レポーターイオンの強度で比較定量する相違がある。また、cICAT 法はアビジンカラムによる精製、クリーピング等の多数の複雑なステップを要するが、iTRAQ 法は簡便であり、スループット性が高い利点を持つ。一方、iTRAQ 法にも短所は存在する。その一つは、ペプチドの段階で標識するため、たんぱく質の酵素消化等などの前処理段階で検体間にバラツキが生じやすいことであり、また、レポーターイオンのイオン強度が弱いために、比較定量値の正確性に問題がある可能性が指摘されている。さらに、通常のショットガン法と同様に非常に多数のペプチドが生じるため、MS でのピークが煩雑になり、測定できないペプチドが存在することが知られている。これに対して、cICAT 法では、たんぱく質レベルで反応させるため、その後の操作による誤差が小さく、また、システイン含有ペプチドのみを精製しているので、MS で煩雑になることが少ないなどの長所もある。また、cICAT 法と iTRAQ 法を比較した論文によると、iTRAQ 法は高発現たんぱく質を多数解析するのに向いているが、cICAT 法は、同定たんぱく質数は

減少するもの、より低発現たんぱく質(存在量が少ない)の解析に向いていると報告されている(12)。実際、PF での臨床検体の測定においても、cICAT 法は極めて精度の高い比較定量値が得られている。

以上のことより、今後、疾患関連たんぱく質の解析研究をさらに推進する上でも、cICAT 法と iTRAQ 法を比較検討し、両法の長所短所を把握することが重要であると考えた。なお、この場合、同一検体(血清)を、同一 HPLC(SCX)の同じ分画数で、同一の質量分析装置で cICAT 法と iTRAQ 法で同定されるたんぱく質数を比較する必要がある。まず、ルーチンアッセイで使用している標準血清(CT02S)をアジレント抗体カラム(Hu6)で主要たんぱく質 6 種を除去した画分を、それぞれの標識法で標識し、得られた標識ペプチドを同一条件下の SCX HPLC で処理した。さらに、ペプチド分画数を 25 分画(SCX HPLC)に揃え、また、同一機種 nano LC(C18)/QSTAR XL で MS データを測定することにより、cICAT 法及び iTRAQ 法で同定されるたんぱく質数を比較検討した。即ち、SCX HPLC 以降は通常の血清ルーチンで用いる cICAT 法と同一である。但し、QSTAR XL の測定パラメータは iTRAQ 用に変更した。なお、標識は常法に基づいて、たんぱく質の同定・比較定量に関しては、cICAT 法は Mascot 解析ソフトを基本とする日立統合データベースシステム(HiSpec)により行い、iTRAQ 法では ABI の ProQuant 解析ソフトと HiSpec の両方を用いた。

その結果、iTRAQ 法で得られたデータを ProQuant で解析すると、一番信頼性が高い Confidence 99%では 94 種のたんぱく質が、また次に信頼性が高い Confidence 95%では、242 種類のたんぱく質の同定が可能であった。なお、一般に、Confidence 95%以上が許容される信頼度の目安とされ、それ以下では false が多くなり信用できない。また、Confidence は ProQuant 独自のスコアリングであり、解析ソフト、使用データベース、スコアリング方法が、cICAT 解析の方法(Mascot)と異なる為、純粋な意味での比較はでき

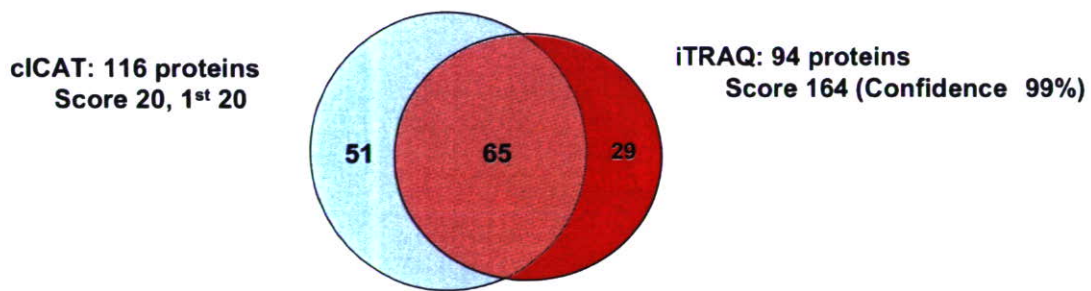
ない。そこで、QSTAR XLのMSデータを Mascot 解析ソフトのパラメーター修飾条件に iTRAQ(N-term, K, Y)入れて解析し、また、データベースを RefSeq に統一して HiSpec で再解析した (1stRankedPepHighScore 20 以上でフィルタリング)。その結果、Confidence 99%に相当する上位 94 番目のたんぱく質の Mascot score は 164 に相当し、Confidence 95%に相当する 242 番目たんぱく質の Mascot score は 52 に相当した。通常のショットガン法で信頼できるたんぱく質の Mascot Score は 50 以上とされているので、上述の Confidence と Mascot Score との関係は妥当なものと考えられる。

一方、cICAT 法による解析では通常のルーチンアッセイの条件では、ペプチド精査済みで確定したデータを解析すると約 130-150 種類のたんぱく質が同定される。この時、1stRankedPepHighScore 20 以上でフィルタリングしたデータを解析した場合、false が認められず、信頼性は 99%以上であると考えられる。また、cICAT 法ではシステムペプチドに特化しているので通常のペプチド断片の Mascot Score と同等に考えるのは妥当ではない。さらに、cICAT 法の Mascot Score 値は H 鎖もしくは L 鎖のみの合計を表記するので、測定した全てのペプチドの Score 値を合算する iTRAQ 法及び通常のショットガン法とでは大きく異なる(単純に考えると cICAT 法の場合、H 鎖と L 鎖の値を合算すると 2 倍になる)。以上のことを考慮して、今回得られた cICAT のデータを、1stRankedPepHighScore 20 以上でフィルタリングして同定された 116 種類のたんぱく質について、

前述の iTRAQ 法で得られた Confidence 99% (94 種類、Mascot Score 164 以上)及び Confidence 95%(242 種類、Mascot Score 52 以上)のたんぱく質について比較検討を行った。

その結果、iTRAQ Confidence 99%のたんぱく質 (94 種類)では、cICAT と共通のたんぱく質は 65 種類、iTRAQ でのみ検出されるたんぱく質は 29 種類であり、cICAT 法でのみ検出されるたんぱく質は 51 種類であった (図 12A)。一方、iTRAQ Confidence 95%のたんぱく質(242 種類)では、共通たんぱく質は 85 種類、iTRAQ でのみ検出されるたんぱく質は 157 種類であり、cICAT 法でのみ検出されるたんぱく質は 31 種類であった(図 12B)。即ち、基準を緩めると、iTRAQ で同定されるたんぱく質が大幅に増えることになる。一方、iTRAQ 法の基準を大幅に緩めても (Score 20 以上、iTRAQ では 419 種類同定)、cICAT 法でのみ検出されるたんぱく質は、29 種類存在し、大幅に減少しないことが分かった(データ省略)。これらのたんぱく質は cICAT 法で選択的に同定されるが、iTRAQ 法では同定されにくいものと考えられる。表 8 に cICAT 法選択的な各たんぱく質名、Gi reference No, Score 値を示す。なお、cICAT 法でのクエンチング試薬を DTT から TCEP にすると、比較定量値正確度は低下するものの同定たんぱく質数は 162 種類に増加し、cICAT 選択的たんぱく質は 73 種類になる(データ省略)。

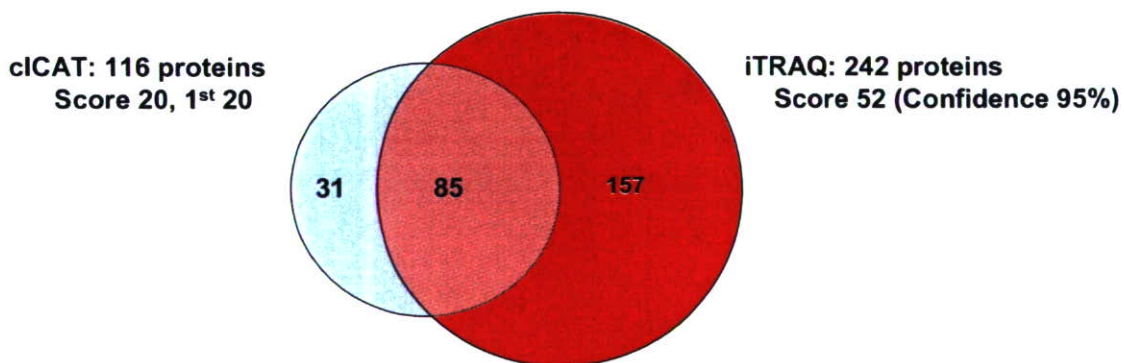
以上のことより、cICAT 法と iTRAQ 法ではそれぞれ長所・短所があり、お互いに補完し合うことが今後の疾患関連たんぱく質の解析に必要であると考えられる。



1stRankedPepHighScore 20以上のペプチドを採用

iTRAQ法はABIのProQuantで99%信頼度(Mascot Score 164以上に相当)を示すたんぱく質を示す。

図 12A. 標準血清 (CT02S) を用いて cICAT 法と iTRAQ 法で同定されるたんぱく質の比較



1stRankedPepHighScore 20以上のペプチドを採用

iTRAQ法はABIのProQuantで95%信頼度(Score 52以上に相当)を示すたんぱく質を示す。

図 12B. 標準血清 (CT02S) を用いて cICAT 法と iTRAQ 法で同定されるたんぱく質の比較

表 8 cICAT 法で選択的に同定される血清たんぱく質

順位	Protein ID	Score	Description
1	gi 21450848	134.7	attractin isoform 3; attractin-2; mahogany protein
2	gi 13540563	118.1	factor H-related protein 5
3	gi 4507907	102.2	von Willebrand factor precursor; Coagulation factor VIII VWF
4	gi 54792787	80.8	complement factor H-related 3
5	gi 31543212	55.9	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)
6	gi 42544239	55.9	complement factor D preproprotein; adipsin; properdin factor D
7	gi 4504965	45.1	L-plastin; Lymphocyte cytosolic protein-1 (plasmin); plastin 2
8	gi 5174411	45.1	CD5 antigen-like (scavenger receptor cysteine rich family)
9	gi 4758146	41.2	defensin, alpha 1 preproprotein
10	gi 10835021	39.4	insulin-like growth factor binding protein 4
11	gi 50355970	38.5	Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor for (CD16)
12	gi 32307161	35.7	cullin 1
13	gi 4758236	33.2	extracellular matrix protein 1 isoform 1 precursor;
14	gi 4506547	28.7	pancreatic ribonuclease precursor; RNase upl-1
15	gi 6005810	28.4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1
16	gi 19923368	27.4	sialidase 3; neuraminidase 3; ganglioside sialidase
17	gi 48255935	27.1	CD44 antigen isoform 1 precursor; cell surface glycoprotein CD44
18	gi 4557871	27.0	transferrin; PRO2086 protein
19	gi 4885457	25.4	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 4
20	gi 5454156	25.0	ubiquitin specific protease 16 isoform a
21	gi 8922787	24.3	hypothetical protein FLJ10948
22	gi 28372497	24.2	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1
23	gi 38569405	24.0	arylsulfatase B isoform 1 precursor
24	gi 4557351	23.8	butyrylcholinesterase precursor
25	gi 24308201	23.6	adipocyte plasma membrane-associated protein
26	gi 4557363	21.5	B-lymphocyte-induced maturation protein 1
27	gi 27545323	21.4	chondroitin polymerizing factor; chondroitin sulfate synthase 2
28	gi 21955172	20.8	pleckstrin homology-like domain, family B, member 2; LL5 beta
29	gi 29788758	20.7	ring finger protein 130; goliath protein
30	gi 44889481	20.5	myosin IB; myosin-I alpha
31	gi 19923899	20.3	hypothetical protein BC009518

5) 低発現血清たんぱく質の解析法の検討：

血清たんぱく質は、非常に高濃度に存在するアルブミン等のたんぱく質からサイトカイン・ホルモン等の低発現たんぱく質等の多数のたんぱく質が存在し、また、その濃度範囲が $1\sim 10^{12}$ に達することが特徴である。我々は、前述のごとく、患者血清 0.1 ml を抗体カラムで主要 6 たんぱく質を除去した画分を cICAT 法で解析することにより、約 120-150 種類程度の高発現たんぱく質の同定と比較定量を行ってきた。この血清 cICAT たんぱく質の上位を占めるたんぱく質は、Factor H、C3、 α 2-Microglobulin、C4BP、C4、Fibronectin、C7、Kininogen、Ceruloplasmin、Kallikrein であり、全体の cICAT たんぱく質の約 30% を占め、また、その殆どが 100K 以上の糖鎖含有高分子たんぱく質であった。従って、当初、これらの上位たんぱく質を除く手段を立てることにより、その分が低発現たんぱく質の方に振り分けられ、同定たんぱく数が増加することを予想した。

そこで、1) 限外ろ過膜 (G100) やゲルろ過カラム (KW802.5) 等で 100K 以上のたんぱく質を除去する、2) アジレント社 (Hu14)、ベックマン社 (IgY-12)・シグマ社 (ProteoPrep 20) 等の新規イムノカラムにかけて上述たんぱく質を除く、3) 上述たんぱく質に対する自前作成の抗体カラム (anti-Factor H column 等) で除去する、4) Con A レクチンカラム等で糖たんぱく質を除去すること等により得た画分を、同様に QSTAR XL で解析した。その結果、確かに、上述の方法により、通常の高発現血清たんぱく質の他に、10-20 種類のたんぱく質の同定・定量が可能になったが、その大部分は高発現血清 cICAT たんぱく質リスト (表 9) に含まれるものであり、予想に反して大幅に同定たんぱく質が増えることはなかった (データ省略)。

この結果は、高発現血清上位たんぱく質を除くことにより低発現たんぱく質の同定たんぱく質数を増加させる戦略がすでに限界にあることを

示唆する。勿論、大量の血清を用い、膨大な処理時間をかけ分画数を大幅に増加させ、質量分析に長時間かけて解析すれば同定たんぱく質数を増加させることも可能であるが (3,4)、多数の臨床検体を迅速に解析し結果を提供する場合には、現実的には殆ど不可能な方法である。新たな視点での低発現血清たんぱく質の解析法が望まれる。その一つとして以下に述べる方法を検討した。

患者血清たんぱく質を解析する目的の一つは、病変組織より血清に漏出した疾患関連組織たんぱく質を検出し比較することである。しかし、上述の 120 - 150 種類の血清 cICAT たんぱく質の中には殆ど組織由来のたんぱく質は含まれていない。その最大の理由は漏出した組織たんぱく質が血液に入るまでに大幅に希釈され、所謂低発現血清たんぱく質として存在するからである。一方、組織・細胞のたんぱく質の解析に関しては、血清たんぱく質と同様に 25 分画数で解析すると、たんぱく質 100 μ g 程度から cICAT 法では約 1000 種類程度のたんぱく質の同定と比較定量が可能である。この差は、組織たんぱく質の場合、血清と異なり、濃度差が小さい多種類のたんぱく質が存在するためと考えられる (図 13)。図 13 は、血清たんぱく質と組織たんぱく質の同定たんぱく数と Mascot Score との関係を示す。血清の場合は、Factor H 等が非常に高い Mascot Score を示すが、その後、たんぱく質数の増加に伴い急速に減衰するパターンを示す。また、QSTAR XL の MS データをみる限り、ピーク数は込み合ってなく、高発現たんぱく質が低発現たんぱく質のピークを妨害しているとは思えない。さらに、正確な MS 値が得られており 9 m/z 差のあるピークが多数存在するが、同定に必要な MS/MS が測定できるほどイオン強度は強くないことが分かった。一方、cICAT 法は、H 鎖或いは L 鎖のどちらかのピークで同定できれば、9 m/z 差のある相手方を見出し、比較定量値 (H/L) の計算が可能になることが特徴の一つである。

表 9. cICAT 法で再現良く同定される血清たんぱく質リスト

補体系(30)	Blood transport and binding protein(20)	Protease inhibitor(15)	その他(82)
complement component C1q, A chain	afamin	alpha 2 macroglobulin	aggrexin 1 isoform 1 precursor
complement component C1q, B chain	beta-2-glycoprotein 1	alpha-1 antiprotease, antitrypsin	amyloid beta A4 protein isoform a
complement component C1q, C chain	cholesteryl ester transfer protein, plasma	alpha-1-antichymotrypsin	atractin isoform 2
complement component 1, r	fc fragment of IgG binding protein	alpha-2-antiplasmin	beta actin
complement component 1, r	hyaluronan binding protein 2	antithrombin III	beta globin
complement component 1, s	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	bitumin	cadherin 1 type 1 preproprotein
complement component 2	insulin-like growth factor 2	complement component 1 inhibitor	camosinase glutamate carboxypeptidase like 2
complement component 3	insulin-like growth factor binding protein 2	cystatin C	cartilage acidic protein 1
complement component 4A	insulin-like growth factor binding protein 3	heparin cofactor II	cartilage oligomeric matrix protein
complement component 5	insulin-like growth factor binding protein 4	inter-alpha (globulin) inhibitor H1	cathelicidin antimicrobial peptide
complement component 6	insulin-like growth factor binding protein 5	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	CD14 antigen
complement component 7	insulin-like growth factor binding protein 6	inter-alpha (globulin) inhibitor H3	CD163 antigen isoform a
complement component 8, alpha	insulin-like growth factor binding protein 7	inter-alpha (globulin) inhibitor H4	CD44 antigen isoform 1 precursor
complement component 8, beta	insulin-like growth factor binding protein, acid labile	kallistatin precursor	CD5 antigen-like
complement component 8, gamma	lactotransferrin	tissue factor pathway inhibitor	CD59
complement component 9	retinol-binding protein 4, plasma		cell adhesion molecule with homology to
complement factor H	selenoprotein P precursor	apolipoprotein(8)	chitinase, di-N-acetyl-
factor H-related protein 1	tetranectin	apolipoprotein A-II	chromosome 20 open reading frame 3
factor H-related protein 2	transthyretin; prealbumin	apolipoprotein B	collectin sub-family member 10
factor H-related protein 3	vitamin D-binding protein	apolipoprotein C-IV	cysteine-rich secretory protein 3
factor H-related protein 4		apolipoprotein D	defensin, alpha 1 preproprotein
factor H-related protein 5	Enzyme(24)	apolipoprotein E	delta globin
complement factor B	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type)	apolipoprotein F	dermcidin precursor
complement factor I	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	apolipoprotein Lp(a)	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix
properdin P factor, complement	biotinidase	apolipoprotein M	extracellular link domain containing 1
complement factor D	butyrylcholinesterase		extracellular matrix protein 1 isoform 1
complement component 4 BP, alpha	carboxypeptidase N 83 kDa chain	Common circulating blood protein(14)	Fc fragment of IgG receptor for (CD16)
complement component 4 BP, beta	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD	alpha 1B-glycoprotein	fetuin B; fetuin-like protein
complement receptor type 2	carboxypeptidase U(carboxypeptidase B2)	alpha-1-microglobulin	fibroblast activation protein, alpha subunit
complement component c1q receptor	dipeptidylpeptidase IV	alpha-2-glycoprotein, zinc	fibulin 1 isoform C
	dopamine beta-hydroxylase	alpha-2-HS-glycoprotein	ficolin 2 isoform a
血液凝固・線溶・キニン系(20)	phosphodiesterase 2	beta-2-microglobulin	ficolin 3 isoform 1
coagulation factor II	fucosidase	ceruloplasmin	foliostatin like 1 precursor
coagulation factor V	lecithin-cholesterol acyltransferase	clusterin isoform 1	galectin 3 binding protein; L3 antigen
coagulation factor V II isoform a	lysozyme precursor	fibronectin 1 isoform 3	haptoglobin related protein
coagulation factor IX	mannan-binding lectin serine protease 1	gelsoin isoform a	heparan sulfate proteoglycan 2
coagulation factor X	mannan-binding lectin serine protease 2	hemopexin	HGF activator preproprotein
coagulation factor XI	matrix metalloproteinase 2 preproprotein	orosomuroid 1	hypothetical protein MGC45378
coagulation factor XII	matrix metalloproteinase 3 preproprotein	orosomuroid 2	immunoglobulin J chain
coagulation factor XIII A chain	matrix metalloproteinase 9 preprotein	peptidoglycan recognition protein L	immunoglobulin superfamily, member 4
coagulation factor XIII B subunit	metalloproteinase inhibitor 1 precursor	vitronectin	interleukin 1 receptor accessory protein
protein C	pancreatic ribonuclease		intracellular adhesion molecule 2 precursor
protein S	paraoxonase 1	血小板由来(9)	keratin 1
protein Z	plasma glutathione peroxidase 3	glycoprotein V (platelet)	keratin 6A
histidine-rich glycoprotein	prenylcysteine oxidase 1; prenylcysteine lyase	glycoprotein VI (platelet)	L1 cell adhesion molecule isoform 1
plasminogen	tryptophan/serine protease	latent transforming growth factor beta BF	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1
plasma kallikrein B		multimerin 1	leukocyte immunoglobulin-like receptor
kininogen(H+L)		platelet factor 4	lipopolysaccharide-binding protein
von Willebrand factor		pro-platelet basic protein	L-plastin 1
fibrinogen, alpha chain isoform alpha		secreted protein, acidic, (osteonectin)	
fibrinogen, beta chain preproprotein		thrombospondin 1	
fibrinogen, gamma chain gamma-A		triggering receptor expressed on myeloid	
分類参照: Molecular & Cellular Proteomics 1:947-955,2002			

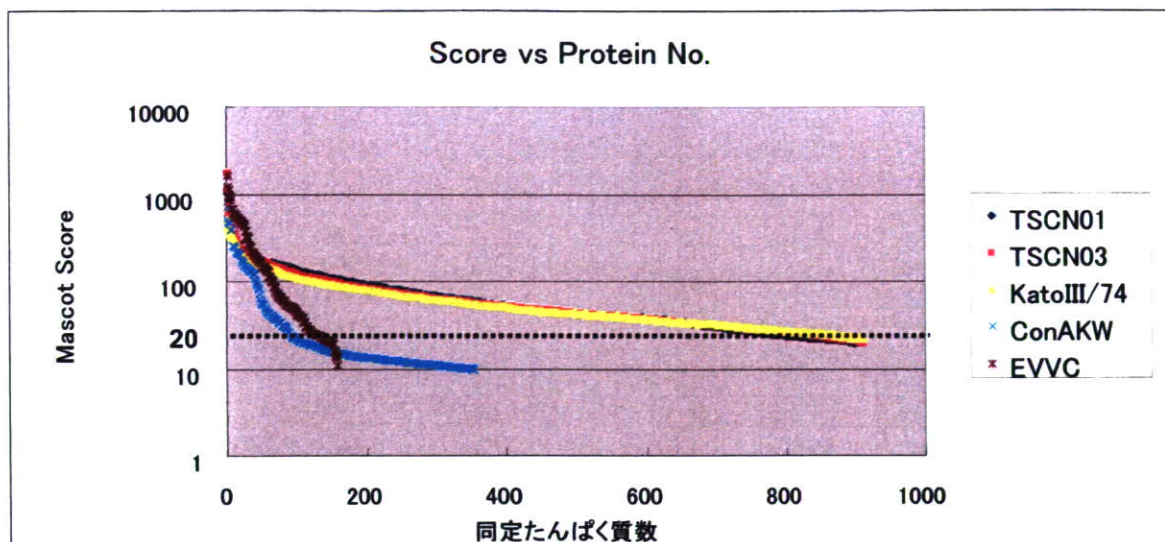


図 13. 血清たんぱく質と組織たんぱく質の同定たんぱく数と Mascot Score との関係

EVVC は通常のルーチンアッセイの血清たんぱく質、ConAKW は ConA カラムと KW802.5 カラムで除去した血清

たんぱく質、KatoIII/74 は Kato-III 細胞株と MKN-74 細胞株を比較した時のたんぱく質、TCSN01 及び TCSN03 は胃がん・正常胃組織を比較した時のたんぱく質の解析結果を示す。

そこで、患者血清と健常人血清を比較する時に、患者病変組織たんぱく質を介在させて、比較することを試みた。即ち、患者(病変部位)組織等より分取したたんぱく質(病変組織由来たんぱく質)と患者血清たんぱく質を cICAT 法で同定と比較定量を行い、次いで、同一の組織由来たんぱく質と健常人血清たんぱく質と同様に比較解析し、連結処理をすることにより、患者と健常人の血清中に存在する多数の組織由来の低発現たんぱく質の同定・比較定量が可能であるかを検討した(以下に、連結処理記載)。なお、この場合、病変組織由来たんぱく質画分とは病変組織部位より抽出したたんぱく質或いは病変組織部位近傍の体液(神経疾患等の場合は脳脊髄液(CSF))を意味する。

連結処理：

- 1) 患者(病変)組織由来のたんぱく質を cICAT 試薬(例えば H 鎖試薬)、健常人血清たんぱく質を cICAT 試薬(L 鎖試薬)で分別標識し、両者を常法により解析し、同定たんぱく質と比較定量値(組織由来たんぱく質/健常人血清たんぱく質)を測

定する。

- 2) 1) と同じ患者(病変)組織由来のたんぱく質と患者血清を同様に cICAT 法で分別標識し、同定たんぱく質と比較定量値(組織由来たんぱく質/患者血清たんぱく質)を測定する
- 3) 1) と 2) で得られた同定たんぱく質とその比較定量値を連結処理することにより、患者血清たんぱく質と健常人血清たんぱく質の比較定量値を得る。

即ち： $(\text{患者組織由来たんぱく質}/\text{健常人血清たんぱく質}) \div (\text{患者組織由来たんぱく質}/\text{患者血清たんぱく質}) = \text{患者血清たんぱく質}/\text{健常人血清たんぱく質}$

具体的には、パーキンソン病患者血清(PDS：10名分をプールしたもの)と健常人標準血清(NHS：CT02S)及びパーキンソン病患者脳脊髄液(PD-CSF：パーキンソン病患者10名のCSFをプールしたもの(病変組織由来たんぱく質として))のたんぱく質を、cICAT法により、同定・比較定量解析を行った。すなわち、アジレント

社製抗体カラム (Hu 14, Column 10 x 100mm) で、Albumin, IgG, IgA, IgM, α 2-Macroglobulin, α 1-Antitrypsin, Transferrin, Haptoglobin, Apo A-I, Apo A-II, C3, Transthyretin, α 1-Acid glycoprotein, α 2-Acid glycoprotein を除去した PD-CSF (100 μ g protein) 及び NHS (100 μ g) を、それぞれ cICAT-H 鎖試薬および cICAT-L 鎖試薬で標識し、常法により得られた cICAT ペプチドを、nano-LC/QSTAR XL で解析を行い、統合データベースシステム (HiSpec) を用いて、脳脊髄液 (PD-CSF, H 鎖標識) と健常人標準血清 (NHS, L 鎖標識) との各たんぱく質の比較定量比 (H/L) を計算した。また、RefSeq の DB を用いて、cICAT ペプチドレベルで Rank 1, score 20 以上を示すたんぱく質及びペプチド精査の結果正しいと判断されたたんぱく質を同定たんぱく質とした。その結果、306 種類のたんぱく質の同定が可能であり、そのうち、ピーク混雑で比較定量不能のものは 9 種類、PD-CSF にのみ存在する ($H/L = \infty$) は 51 種類、血清のみに存在するもの ($H/L = 0$) は 6 種類であり、残りの 240 種類は 0 から無限大までの間の比較定量値が計算可能であった (図 14)。この結果は、同様に処理した血清同士 (PDS と NHS) の比較解析で得られるたんぱく質数 (約 120 種類) よりもはるかに多くのたんぱく質の解析が可能であることを示す。また、上記同定したたんぱく質の約 80% は PD-CSF を cICAT 法で同定したものと同一のたんぱく質であった。このことから、上記の結果は、血清では同定限界以下の病変組織由来の低発現たんぱく質が PD-CSF 中の存在するたんぱく質により同定され、比較定量が可能になったためと考えられる。さらに、この原理を利用して、cICAT 法で同様に PD-CSF を H 試薬で、パーキンソン病患者血清 (PDS) を L 試薬で分別標識し、たんぱく質の同定と比較定量解析を行った。その結果、306 種類のたんぱく質の同定が可能であり、ピーク混雑で比較定量不可のものは 8 種類、PD-CSF にのみ存在する ($H/L = \infty$) は 29 種類、血清のみに存在するもの ($H/L = 0$) は 4 種類であり、

残りの 265 種類は 0 から無限大までの間の比較定量値 (PD-CSF/PDS) が計算可能であった (図 15)。

そこで、上記の 2 つの比較定量値すなわち、PD-CSF/NHS と PD-CSF/PDS が得られた各たんぱく質に関して、(PD-CSF/NHS) 値を (PD-CSF/PDS) 値で割る ($PD-CSF/NHS \div PD-CSF/PDS = PDS/NHS$) ことにより、PDS/NHS を計算した。その結果、比較定量不能なものは 104 種類であり、比較定量可能なものは 202 種類であった。そのうち、PDS にのみ存在するものは 11 種類、NHS にのみ存在するものは 5 種類であり、残りの 186 種類は 0 から無限大までの間の比較定量値が得られた (図 16)、また、その比較定量値とたんぱく質の数 (度数) は正規分布を示した (図 17)。一方、PDS と NHS を直接解析した場合には、同定・比較定量可能なたんぱく質は 120 種類であった。

また、本法による比較定量可能なたんぱく質 202 種を Panther の分類に基づき、たんぱく質の機能別に分類すると、通常血清同士の解析では検出されにくい情報伝達系たんぱく質、細胞接着たんぱく質、受容体たんぱく質が多数存在することが分かった (図 18)。また、比較定量値が 5 以上、もしくは 1/5 以下を示す特異性の高いたんぱく質は合計 31 種類存在した。その中には、脳組織の神経細胞受容体などの低発現たんぱく質が多数含まれていた。これにより、血清同士の直接の比較では検出されなかった病変組織由来の多数の血清低発現たんぱく質の比較定量解析が可能になった。

以上のことより、患者血清と健常人血清を比較する場合、患者病変組織たんぱく質を介在させると、少なくとも病変部位由来の低発現血清たんぱく質の解析が可能になるものと考えられる。今後、他の疾患で同様な解析を行うことは非常に重要である。

健康人血清(NHS)とパーキンソン病脳脊髄液(PD-CSF)の比較

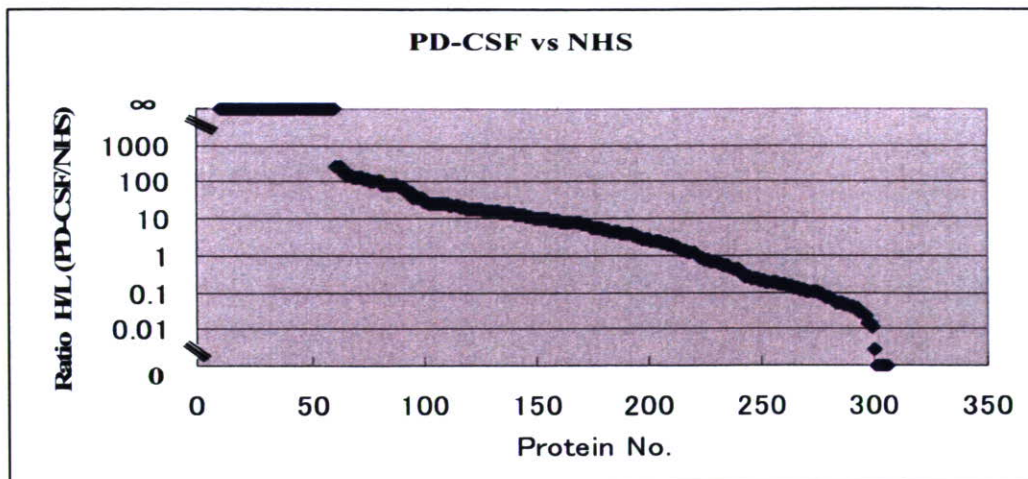


図 14. 健康人血清 (NHS) とパーキンソン病脳脊髄液 (PD-CDS) の解析比較

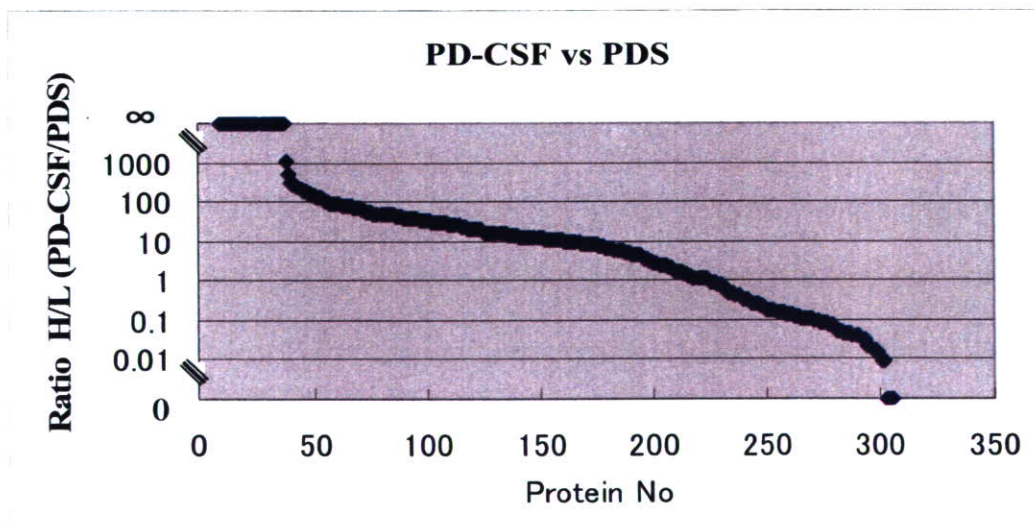
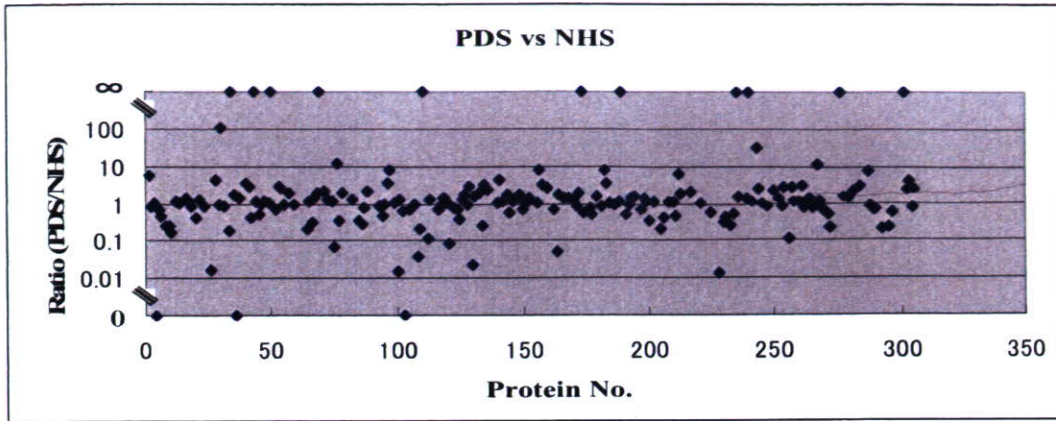


図 15. パーキンソン病患者血清 (PDS) とパーキンソン病脳脊髄液 (PD-CSF) の解析比較

パーキンソン病患者血清 (PDS) と健常人血清 (NHS) の比較



同定された306種類の内、202種類が比較定量可能。比較定量不能なたんぱく質(104種類)の比は表示せず。

図 16. パーキンソン病患者血清 (PDS) と健常人血清 (NHS) の解析比較.

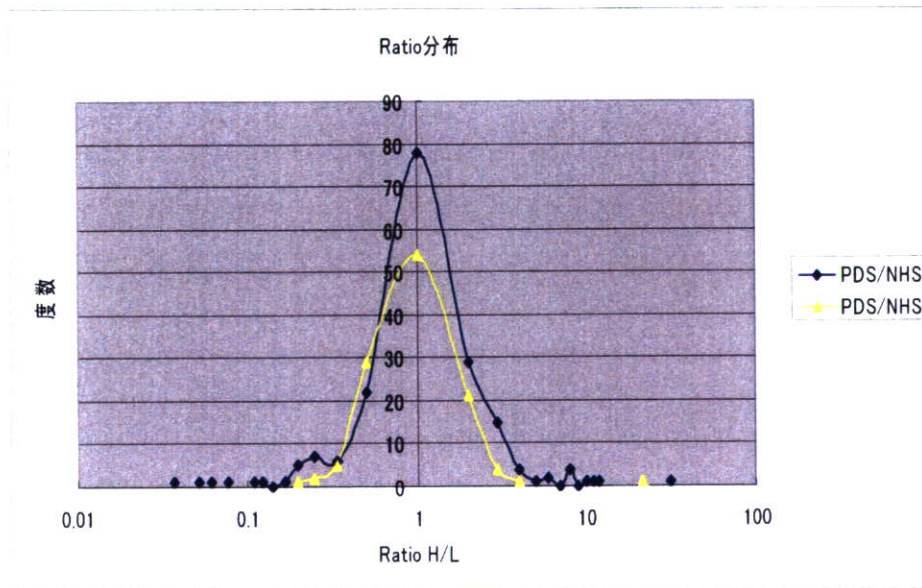


図 17. パーキンソン病患者血清 (PDS) と健常人血清 (NHS) の比較定量値 (H/L) の分布.

青線はPD-CSF を介した時の PDS/NHS を、黄色線は直接血清を比較した時の PDS/NHS を示す。

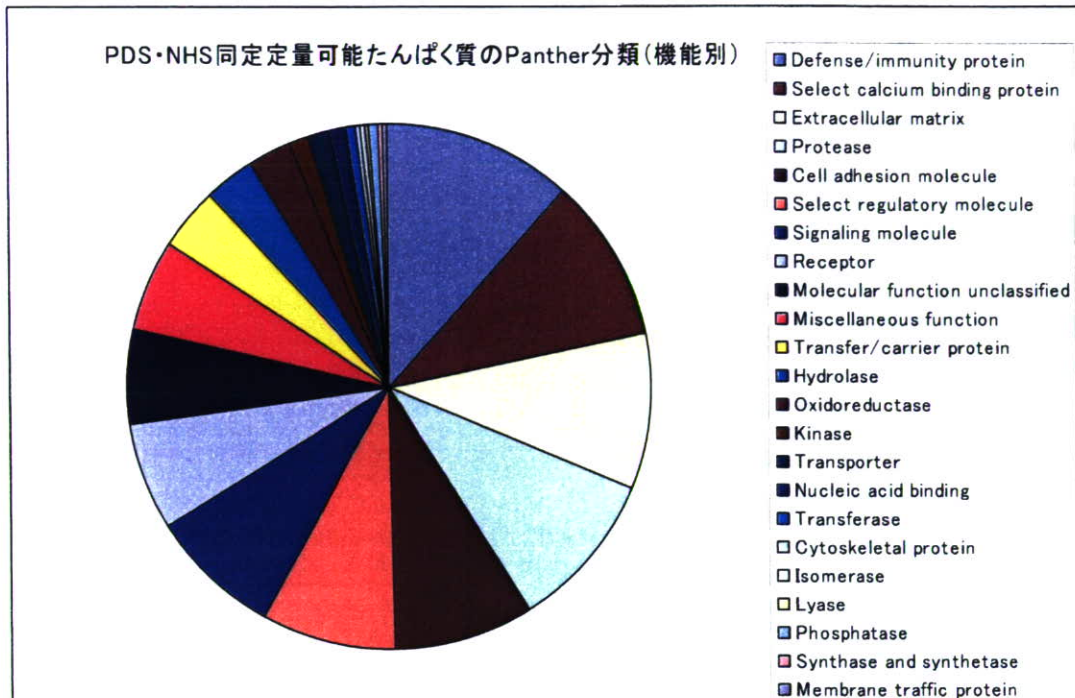


図 18. PDS・NHS 同定定量可能たんぱく質の Panther 分類 (機能別)

6) 脳脊髄液のたんぱく質の解析法の検討：

これまで、パーキンソン病及びパーキンソン症候群の患者血清と健常人血清の高発現血清たんぱく質(上位 120-140 種類)を cICAT 法で解析してきたが、疾患に特徴的なたんぱく質を見出すことは困難であった。その最大の理由の一つとして、原因と考えられる病変組織部位が脳(中枢神経系)であるため、たとえ、その変化があったとしても、血流に入るまでに希釈され、血清にまで反映されないことが考えられる。中枢神経系疾患の疾患関連たんぱく質を探索するためには、より病変部位に近い脳脊髄液(CSF)のたんぱく質解析法を確立することが重要である。今回、基礎検討用検体として、国立精神・神経センターで保存されていたパーキンソン病患者髄液(連結不可能匿名化)を用いて、cICAT 法による CSF たんぱく質解析を検討した。

CSF のたんぱく質濃度は 150-300 $\mu\text{g/ml}$ 程度であり血清の約 1/80 であるが、その 80% は血清アルブミン、補体たんぱく質等の血清主要たんぱく質が占める。残りの 20% に、脳組織選択的たんぱく質及び同組織より漏出したたんぱく質が含まれると考えられている。そこで、パーキンソン病患者脳脊髄液(PD-CSF: パーキンソン病患者 10 名の CSF をプールしたもの)を、血清の場合と同様に、アジレント抗体カラム(Hu 14, Column 10 x 100mm)で分画し、血清主要たんぱく質(14 種類)を除去した画分(PD-CSF 素通り画分)と抗体カラムに吸着・溶出した画分(PD-CSF 吸着画分)に分けて解析を行った。

まず、PD-CSF 素通り画分の解析に関しては、同画分 100 μg protein を常法(方法に記載)に基づき、cICAT-H 鎖試薬および cICAT-L 鎖試薬で 1:1 に標識し、SCX25 分画で得られた cICAT ペプチドを、nano-LC/QSTAR XL で解析を行い、統合データベースシステム(HiSpec)を用いて、脳脊髄液(PD-CSF 素通り画分)のたんぱく質の同定と比較定量比(H/L)を計算した。なお、RefSeq の DB を用いて、cICAT ペプチドレベルで Rank 1, score 20 以上を示すたんぱく質及びペプチド精査の

結果正しいと判断されたたんぱく質を同定たんぱく質とした。その結果、294 種類のたんぱく質の同定が可能であり、そのうち、ピーク混雑で比較定量不能のものは 6 種類、残りの 288 種類は比較定量値が可能であり、その定量比はほぼ、理論どおりに 1:1 であった。同定したたんぱく質を Mascot Score 順に並べると、上位は血清たんぱく質であったが、下位にいくにつれて神経系組織・脳脊髄液由来と考えられるたんぱく質が増加した。一方、PD-CSF 吸着画分を同様に cICAT-H 鎖試薬および cICAT-L 鎖試薬で 1:1 に標識し、解析したところ、52 種類のたんぱく質の同定が可能であり、そのうち 39 種類が血清たんぱく質であり、また、PD-CSF 素通り画分と重複するものは 33 種類であった。残りの 19 種類が PD-CSF 吸着画分のみ検出され、その中には、Hu14 で吸着される血清主要たんぱく質(14 種類)が含まれていた。

以上のことより、PD-CSF 素通り画分の 294 種類と PD-CSF 吸着画分 19 種類の合計 313 種類の脳脊髄液たんぱく質の同定が可能であった。この結果は、通常と同様に処理した 100 μg の血清同士(PDS と NHS)の比較解析で得られるたんぱく質数(約 120 種類)よりもはるかに多く、また、これまでに、cICAT 法で同定した血清たんぱく質リスト(222 種類)より多いことが分かった(図 17)。すなわち、脳脊髄液たんぱく質 313 種類のうち、94 種類は今までに血清解析で検出されたことがあるが、残りの 219 種類は脳脊髄液選択的な低発現たんぱく質と考えられ、血流に入るまでに希釈されたために血清では検出されなかったものと解釈できる。

図 18 には、脳脊髄液たんぱく質 313 種類の Panther 分類図(機能別)を示す。一番多いカテゴリーは受容体(Receptor)であり、次いで、細胞外マトリックス(Extracellular matrix), 情報伝達物質(Signaling molecule), 細胞接着分子(Cell adhesion molecule), 選択的制御分子(Select regulatory molecule), 免疫・生体防御たんぱく質(Defense/immunity protein), たんぱく質分解酵素(Protease), 選択的カルシウム結合たんぱく質(Select calcium binding protein)の順で

あった。また、たんぱく質リン酸化酵素 (Kinase) やトランスポーター (Transporter) も含まれていた。この分類パターンは血清の場合と大きく異なり、むしろ細胞・組織解析の分類パターンに近い。脳組織の細胞・細胞膜及び細胞質のたんぱく質が脳脊髄液に漏出したものと考えられる。なお、脳脊髄液のたんぱく質に関しては、米国のグループが iTRAQ 法で解析を行っている (13)。それによると、パーキンソン病、アルツハイマー病およびレビー小体病 (Dementia with Lewy bodies) の脳脊髄液の解析で、合計約 746 種類のたんぱく質の同定と比較定量が可能と報告されている。そこで、今回 cICAT 法で同定したパーキンソン病の脳脊髄液たんぱく質 313 種類と比較した結果、iTRAQ 法

で同定したたんぱく質と共通なものは 102 種類であり、残りの 211 種類は cICAT 法でのみ同定可能なたんぱく質であった (図 21)。その中には、各種受容体、神経変性疾患等に関与するとされる多数の低発現たんぱく質が含まれていた。なお、iTRAQ 法で使用した ABI4700、解析ソフト、使用データベース (IPI (3. 1) DB)、スコアリング方法が、cICAT 解析法の場合 (QSTAR XL, RefSeq database, Mascot) と異なる為、純粋な意味での比較はできないが、マイナーな SNP 変異をたんぱく質数に加えない RefSeq database を用いれば、iTRAQ で同定したたんぱく数 (746 種類) は大幅に減少すると予想される。

脳脊髄たんぱく質と血清たんぱく質の比較 (ベン図)

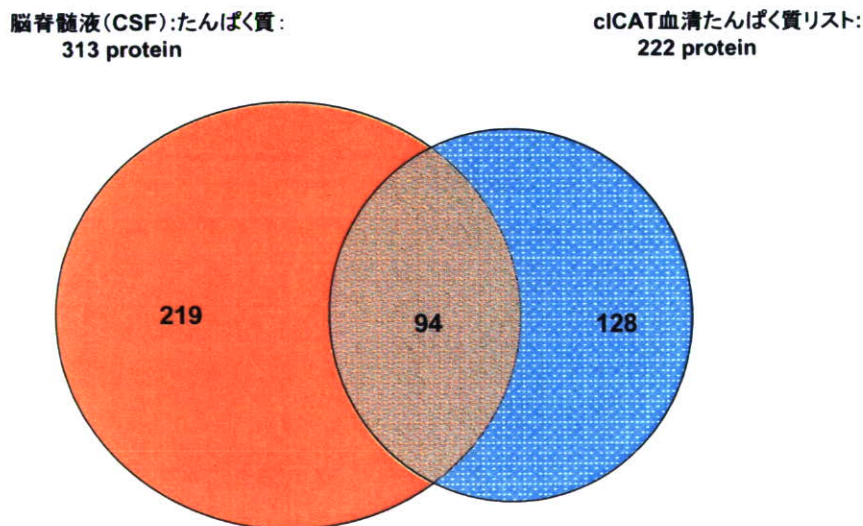


図 19. cICAT 法により同定された脳脊髄液たんぱく質と血清たんぱく質の比較 (ベン図)

脳脊髄液たんぱく質の解析 (Panther分類 機能別)

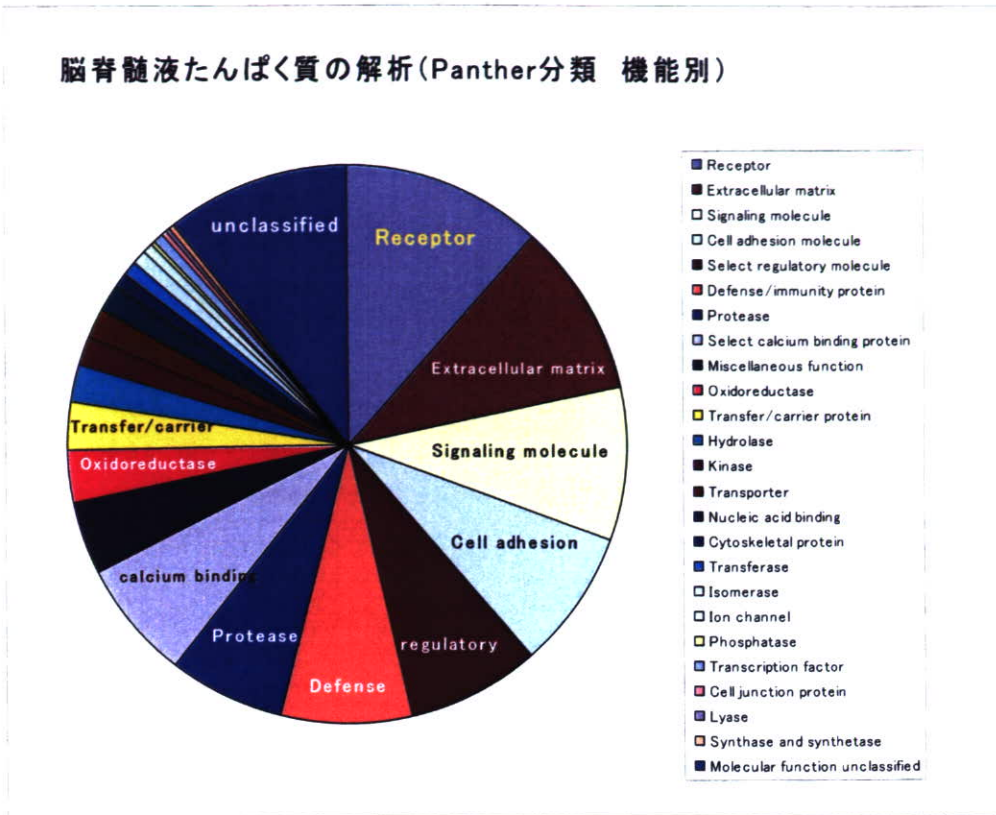


図 20. cICAT 法により同定された脳脊髄液たんぱく質の Panther 分類 (機能別)

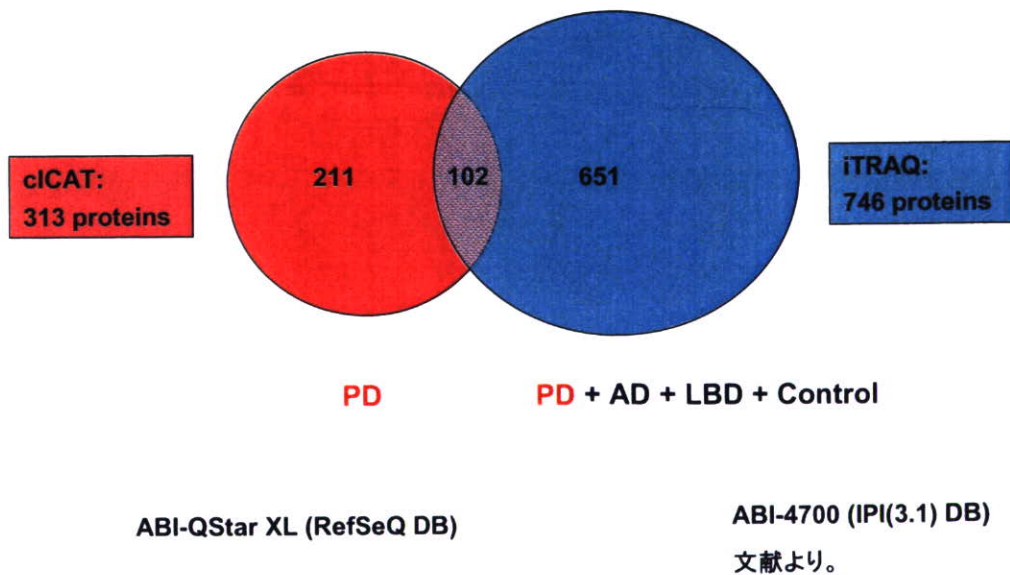


図 21. 脳脊髄液たんぱく質解析での cICAT 法と iTRAQ 法の比較

7) Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGF-receptor 2) の siRNA によるスキルス胃癌細胞株の増殖阻害効果：

(1) 胃癌細胞株を用いた解析：

昨年、各種ヒト胃癌細胞株(スキルス胃癌細胞株 Kato-III、低分化充実型腺癌株の MKN-45 及び中分化型腺癌株の MKN-74)を用いて、その発現たんぱく質を cICAT 法で解析した結果、スキルス胃癌細胞株の Kato III は FGF-receptor 2 を選択的に強発現していることを確認した(4)。このことは、すでに報告されている Kato-III での FGF-receptor 2 mRNA の選択的強発現を、たんぱく質レベルでも確認したことを示す。

そこで、本年度は、Kato-III 以外のスキルス胃癌細胞株すなわち OCUM-1 株及び NUGC-4 株ほどの程度 FGF-receptor 2 たんぱく質が発現されているのかを同様に cICAT 法で検討した。すなわち、Kato-III を L 試薬で、OCUM-1 株或いは NUGC-4 株を H 試薬で標識して比較解析を行った。その結果、ともに約 800 - 1000 種類のたんぱく質の同定と比較定量が可能であったが、FGF-receptor 2 に関してみると、OCUM-1 株では、Kato-III 株の約 5% 程度の FGF-receptor 2 の発現がみられたが、NUGC-4 株では 0.1% 以下の発現しか観察されなかった(データ省略)。一方、EGF-receptor に関しては、OCUM-1 株は Kato-III 株の 3-4 倍、NUGC-4 株では 2.5 倍多く発現していた。また、後述するように、実際のスキルス胃癌患者 2 名での LMD で部位特異的に分取したスキルスがん部位と正常組織部位の比較で約 1000 種類のたんぱく質を同定と比較定量したが、その中には FGF-receptor 2 は含まれなかった。一方、原始血球系のたんぱく質数種類がスキルスがん組織で共通に強発現

していた。従って、FGF-receptor 2 は明らかに Kato-III 株には強発現しているが、他のスキルス株でも共通に強発現しているものとは言えず、むしろ Kato-III 株に特異的なものである可能性が高いと考えられる。しかし、FGF-receptor 2 が Kato-III 株を含めた胃癌細胞株の増殖にどの程度関与しているかは興味あることである。

(2) siRNA によるヒト胃癌培養細胞株の増殖阻害：

一般に、同位体標識法等でたんぱく質の発現差が見出されても、その差が必ずしも機能活性の差を反映するとは限らない。創薬ターゲットなどの疾患関連たんぱく質を探索するためには、たんぱく質発現差解析とともにその機能解析も必要である。上述のように、FGF-receptor 2 は Kato-III 株に選択的に強発現しているので、FGF-receptor 2 の機能解析のために、mRNA レベルでその発現を阻害する siRNA を作成し、各種胃癌細胞の増殖に及ぼす効果を調べた。即ち、FGF-receptor 2 の siRNA (DHARMACON 社製、US) を、各胃癌細胞株 (Kato-III, MKN-45, MKN-75, NUGC-4, OCUM-1) に、Transfection 試薬 (DharmaFECT 1) を用いて Transfection を行い、Transfection 後 1-7 日目の細胞増殖阻害効果(10% 牛胎児血清存在下)を、MTS 法 (Promega) を用いて測定した。なお、FGF-receptor 2 の siRNA としては 4 種類 [Target siRNA-17, -18, -19, -20(表 10)] を混合したもの (ON-TARGET plus SMART pool FGR2) 及びそれぞれ単独の Target siRNA を、また、negative コントロールとしては Non-Target siRNA を使用し、各細胞株への最適濃度条件下で Transfection を行った(ユニテック社依頼)。

表 10

FGF-receptor 2 の siRNA の種類と配列

Anti-sequence	Sense-sequence
Target siRNA-17: 5' P-GAUUGAUGGACCCGUAUUCUU	GAAUACGGGUCCAUCAUUCUU
Target siRNA-18: 5' P-UCAGAUGGGACCACACUUUUU	AAAGUGUGGUCCCAUCUGAUU
Target siRNA-19: 5' P-UGUUGGUCCAGUAUGGUGCUU	GCACCAUACUGGACCAACAUI
Target siRNA-20: 5' P-UUUCGUACCUUGUAGCCUCUU	GAGGCUACAAGGUACGAAAUU
Non-Target siRNA #1: Negative control siRNA at least 4 mismatches to human, mouse or rat gene.	

その結果、siRNA4 種類の混合物 (ON-TARGET plus SMART pool FGFR2) を Transfection させた場合、Kato-III が最も強い阻害効果を受け、また、NUGC-4 株も弱いながら阻害効果を受けた。一方、低分化非充実型腺がん細胞株の MKN-45 及び中分化型腺がん細胞株の MKN-74 は殆ど阻害効果を受けなかった(図

22)。また、スキルス胃がん細胞株の OCUM-1 は、FGF-receptor 2 を Kato-III 株の 5% 程度発現しているにも関わらず、殆ど阻害効果を受けなかった。なお、増殖阻害実験において、MTS 法の変わりに、BrdU 法 (Roche) でも行ってもほぼ同様な結果が得られた(データ省略)。

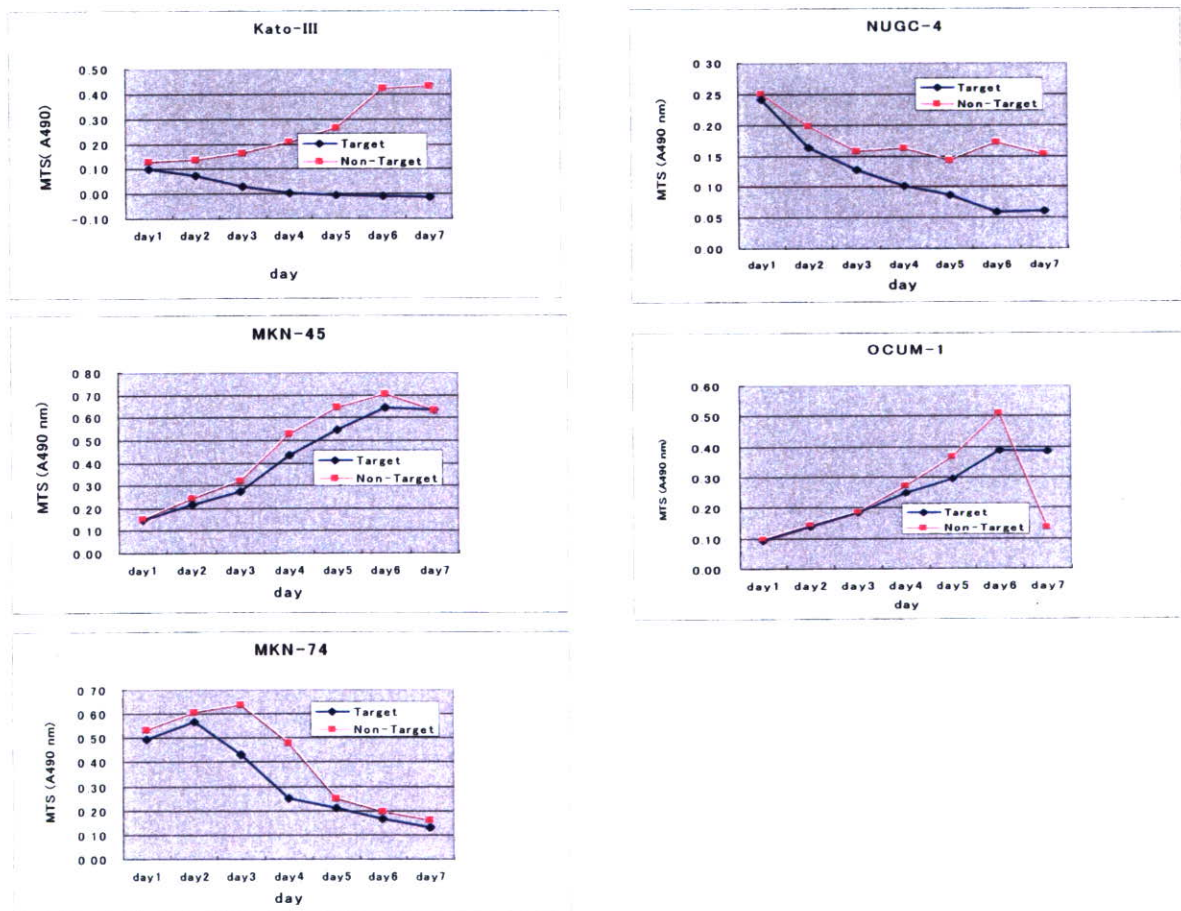


図 22. FGF-Receptor 2 の Target siRNA4 種混合物 (ON-TARGET plus SMART pool FGR2) による細胞増殖抑制試験

次に、4種の siRNA のうち、どの配列を持つ siRNA が最も阻害効果が強いかを、Kato-III、NUGC-4 株を用いて調べた (図 23)。表 10 に各 siRNA の anti-sense sequence と sense-sequence を示す。その結果、Kato-III の場合、いずれの siRNA も negative control の Non-target siRNA より阻害効果は示したが、最も阻害効果が強い siRNA は Target siRNA19

であり、ついで Target siRNA20, Target siRNA18 の順であった。また、NUGC-4 の場合では、Target siRNA19 のみが阻害効果を示した。従って、Target siRNA19 が最も阻害効果が強い siRNA であると考えられる。なお、Target siRNA19 は MKN-45 細胞には殆ど阻害効果を示さなかった (データ省略)。

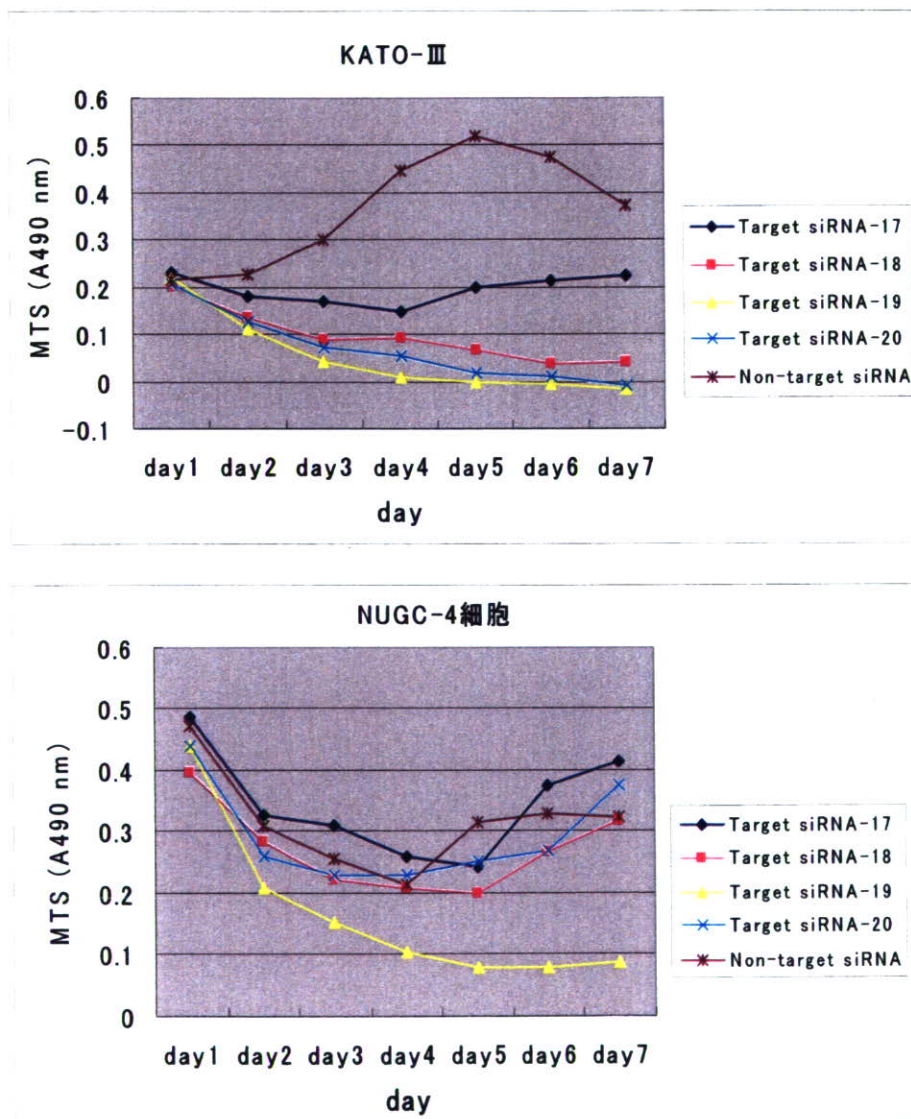


図 23. 各種 FGF-receptor 2 siRNA (Target siRNA-17, -18, -19, 20) による増殖阻害効果