

より候補物質を見出す研究を開始した。循環器疾患患者血中のこれらの候補物質の濃度変動より、最終的に循環器疾患関連バイオマーカー候補を探索する試みである。ラット心臓非心筋細胞(主として線維芽細胞)、血管平滑筋細胞を対象にたんぱく質、ペプチドを収集し、実際の解析に着手した。心臓非心筋細胞については解析がある程度進み、機能未知たんぱく質に由来する断片、プロセッシングにより特異的に切断、生成していると考えられるペプチドなどが同定された。

3. 心臓組織試料の解析: 第1期研究で心不全、心筋症患者より剖検時に収集した心臓各部位の組織試料については、2次元電気泳動法で検出される大部分のたんぱく質の同定を終わり、DIGE法での定量比較を開始した。

また、PRCでは第1期研究期間中に収集した血清試料を解析対象としないことが決定されたため、創薬プロテオームファクトリー施設より血清試料の返却を受け、当センターでの解析に使用することにした。

D. 考察

血液試料の解析については、血清、血漿のいずれの試料を分析すべきかという問題が第1期の当初より懸案であったため、本年度は血漿試料を用いて前処理方法の検討を行った。これは、血液中のたんぱく質の状態を正確に反映するのは血漿であり、血清は凝固系の活性化に基づくプロテアーゼの活性化、標的たんぱく質の切断後の状態を観測していると考えられるためである。ペプチド解析の結果から判断できるように、血漿試料においては各種カラム担体への吸着、洗浄、濃縮過程で凝固系を中心としたプロテアーゼが部分的ではあるが活性化され、フィブリノーゲン由来ペプチドなど凝固系たんぱく質に由来するペプチド断片が多数観測される結果となった。また、2次元電気移動後のスポットの同定においても、同一たんぱく質に由来する前駆体、活性化たんぱく質やそれらの部分たんぱく質などが観測され、同一たんぱく質に由来するスポット数が増加する結果が得られた。以上の結果より、ペプチド解析のみならずプロテオーム解析においても、血漿試料を使用する場合は凝固系を中心とした血中プロテアーゼの阻

害や活性化阻害が必須であることが確認された。分離、分析を妨害をしない範囲でインヒビター類の添加は可能であるが、完全な阻害は事実上困難であるため、血漿試料のプロテオーム解析には血清試料以上に厳密な前処理条件の設定が必要と考えられた。

血液のペプチドーム解析には血漿試料の使用が必要であるが、上記の理由によりたんぱく質と一元化した解析を現段階で行うことは難しく、新鮮血漿試料の逆相系担体による抽出法、あるいは限外濾過によるたんぱく質画分とペプチド画分の迅速分離法を取らざるを得ないと考えられる。これらの点については、来年度も更に継続検討する予定である。

アフィニティー担体への非特異的吸着については、現在は主に血漿試料を直接分離しているため顕著と考えられ、組み合わせを工夫して吸着条件や洗浄条件を制御することにより、低濃度たんぱく質の解析が実施可能となる見込みである。これらを総合し、系統的な一連の分離システムを来年度中に作成したい。実際、ヘパリンをはじめとする幾つかのアフィニティー担体では低濃度たんぱく質の濃縮効果が非常に大きいことも確認されており、非特異的吸着などの問題が軽減できれば手法としては有用と考えられる。

心血管系細胞のペプチドーム、プロテオーム解析においては、annotateされていない、あるいはannotateされていても正確な情報が少ないたんぱく質やそれに由来するペプチドが見出されている。今後培養細胞系に生理的変動、病態生理的障害を加えて、特異的に産生、分泌、放出されるたんぱく質やペプチドなどの探索を行う予定である。血液試料についても、簡便な濃縮後に質量分析法で標的候補の一斉検出、定量を可能とするシステムを構築することにより、一度に多数の候補の有用性を検討できるシステムを作成したい。また、非心筋細胞、平滑筋細胞以外の細胞についても、解析対象を拡大する予定である。

第1期研究で収集した心臓組織試料については未だ比較解析の情報が十分得られていないため、DIGE法での定量比較結果が出揃った段階で今後の方針を決定したい。

E. 結論

質量分析計の高速な進歩により、プロテオーム、ペプチドーム解析もさらに進化した状態へ移行できると考えられるが、血液試料の有意な定量解析を低濃度たんぱく質まで実施するためには、適切かつ再現的な前処理方法の確立が最も重要な課題である。血液中に含まれるプロテアーゼやその不活性前駆体の取り扱い、たんぱく質やペプチドの極めて大きい濃度差に対する解決策は容易には提出できないが、個別の問題点を克服しつつ、系統的に低濃度たんぱく質やペプチドまでも解析可能な手法の開発を目指したい。

心血管系細胞を出発点とする血中バイオマーカー探索も、上記のような問題点が完全には克服できない現状を考えると、迂遠ではあるが有効手法と考えられ、有望なマーカー候補が見出された場合は抗体などの測定系を作り、動物モデルや臨床試料の測定へと進める予定である。

第2期の研究体制もほぼ固まり、創薬プロテオームファクトリー施設から無償貸与される質量分析計も搬入、使用可能となるため、これらを活用して試料の前処理から解析までの一連の手法を確立して行きたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- ① 南野直人: ペプチドミクスに基づくバイオマーカーや生理活性ペプチドの発見. 日本プロテオーム機構第6回大会 JHUP02008(平成20年7月, 大阪)
- ② 佐々木一樹, 里見佳典, 山口秀樹, 中里雅光, 高尾敏文, 南野直人: ペプチドミクスに基づく生理活性ペプチド探索. 日本プロテオーム機構第6回大会 JHUP02008(平成20年7月, 大阪)
- ③ N. Minamino, K. Sasaki, H. Yamaguchi, Y. Satomi, T. Takao, M. Nakazato: Peptidomics-based identification and biological characterization of neuroendocrine

regulatory peptide-1 and -2. International Symposium on Biologically Active Peptides: Peptide Diversity (H20年9月, 仙台)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

佐々木一樹, 尾崎司 (国立循環器病センター 研究所薬理部)

認知症等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 高坂 新一 国立精神・神経センター神経研究所 所長

本研究では神経変性疾患(認知症、パーキンソン病など)の治療成績向上を行いまたその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、患者由来サンプル中の蛋白質のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群を同定し、その臨床的応用を図ることを目的とする。これまでの研究でプールした髄液試料を用いた絞り込みで中枢神経特異的は多数の蛋白質を同定し髄液使用の有用性を確認できたことを踏まえ、個々の患者でのプロテオーム解析を可能にするための微量測定法の前処理条件を詳細に検討した。また、神経変性疾患の誘因として重要な酸化ストレスについてその影響を髄液試料で検出可能にするための技術開発を開始し、脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 の酸化修飾体がパーキンソン病原因変異体である I93M UCH-L1 に類似の性状を示し、chaperone 介在型オートファージに影響する可能性を示した。

A. 研究目的

本研究では、神経変性疾患(認知症、パーキンソン病など)の治療成績向上を図り、またその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群の同定とその臨床的活用をめざす。

神経変性疾患では蛋白質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられているが、その成立には免疫機序の関与も認められ、また自律神経症状などを認めることも多い。さらに、生活習慣がその発症に影響を与えることは近年の疫学的調査から明らかになってきており、血液、髄液、尿などの解析から予防・診断に関して新たな知見が得られるとの期待が高まっている。

これまでの血漿と髄液を用いた ICAT 法での研究から、髄液を用いた解析では中枢神経特異的な蛋白質が多数同定されており、その有用性が明らかにできた。しかし、この解析はプールされた髄液 10 ml を初期量として解析したものであり、個々の患者の髄液を解析するまでの微量化はできていない。そこで本研究では臨床的に利用可能な髄液 2ml からのプロテオーム解析技術の開発を行うことを目標とする。さらに、ICAT 法と iTRAQ 法などを比較検

討することで、髄液プロテオーム解析の基準となる方法論を確立する。

また、神経変性疾患の誘因として酸化ストレスの関与が指摘されている。しかしその実体、あるいは発症に到る分子機序については不明の点が多い。髄液中の酸化修飾体の検出は神経変性疾患の診断・予防に有用であると想定されるが、検出法についてはいまだ技術基盤の向上が要求されている。本研究では、前段に加えて、髄液中の酸化修飾体の検出法確立も合わせて目指す。

B. 研究方法

(1)微量測定系の確立

20人 10 ml ずつの髄液をプロテオーム・ファクトリーに送付し、前処理の検討を行った。髄液蛋白量は、血漿に比べて著しく低値であるものの、血漿蛋白成分を効率的に除去する方法の開発が必要である。そこで、血漿成分抗体カラムの使用、蛋白分解酵素不活化などの前処理条件を検討した。

(2)UCH-L1 の酸化修飾に関する研究

脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 について酸化修飾剤に対する感受性、酸化修飾時の凝集性、他の蛋白質との

結合性について生化学的に解析し、I93M 変異体の性状を比較した。

(倫理面への配慮)

今回の研究に用いるヒト由来試料はすべて当センター倫理委員会において承認を得た方法でインフォームドコンセントを取得したものを使用する。髄液の一部は、楢林博太郎博士(順天堂大学名誉教授-故人)から譲り受けたパーキンソン病患者の髄液であり、連結不可能匿名化して研究利用することが当センター倫理委員会で承認されている。動物を使用する研究計画はすべて国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会や分担研究者の所属する施設の倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針並びに米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。

C. 研究結果

(1)微量測定系の確立

これまでの検討では、最初の髄液量が10ml 必要であるという制約はあるものの、Agilent 抗体カラム(Hu14)で分画し、素通り画分と吸着溶出画分を得て、0.1%SDS、50 mM Tris/HCl (pH 8.5)に溶解することで、cICAT 法解析で311種類のタンパク質を同定でき、そのうち294種は髄液特異的蛋白として同定できていた。

髄液 2ml からのcICAT 法測定を可能にするために、以下の点を検討し、概ねその方法論が確立できた。

①抗体カラムの必要性の再評価

血清中に多量に存在している蛋白質は、微量蛋白質を同定・定量する際に障害となるため、アルブミン、IgG、トランスフェリンなどの蛋白質を吸着除去させる方法が一般的である。しかし、カラムを用いることで回収蛋白量が減少することから、髄液についても血清と同様に14種類のタンパクを除去できるカラムを使用する必要があるかないかを再検討した。その結果、髄液においても14種類のタンパクが多く存在していることが判明したため、抗体カラム処理は必要と判断した。

②EDTA、56°C、30分の前処理の必要性

本処理の目的は、抗体カラムによりプロテアーゼ阻害タンパクである α 2マクログロブリンが除去されるため、その後の処理で微量タンパクが分解を受けることを懸念したものである。しかし、本処理によって同定タンパク数に顕著

な差は見られず、タンパク回収量が1/10以下に低下することが判明した。よって、この処理を省くことにした。

③cICAT 法に必要な蛋白量は、初期量 2ml から回収できるか?

50 μ g 以上の回収量であれば、cICAT 法での1回分の測定が可能である。プールされた髄液 2ml を用いると、回収タンパク量は約 124 μ g であった。一方で、個々の髄液検体 5 検体での検討では、まず溶血があった 2 検体を除外、1 検体は極端に低濃度で除外し、残り 2 検体の回収量は 134、67 μ g であり、検体ごとのばらつきが大きいことが判明した。さらに少量の初期量 1ml からの検討では、2 ml からの解析結果に比較し、同定蛋白質数が 2-3 割減少することを確認した。

(2)UCH-L1 の酸化修飾に関する研究

酸化型 UCH-L1 は酸化修飾の程度に応じて酵素活性が減弱することに加えて、生化学的に凝集性が亢進しており、他の蛋白質との結合性も高まることが示された。結合上昇する蛋白質の中には、chaperone 介在型オートファージの構成因子である LAMP2、Hsc70、Hsp90 が含まれていた。これらの性状は I93M UCH-L1 にも認められた。

D. 考察

パーキンソン病など神経変性疾患については近年の分子遺伝学的解析から家族性疾患を中心にいくつかの病因遺伝子が同定された。数多くの孤発性については病因の特定は未だなされていないが、家族性の成果を発展させることで対症療法の高度化だけでなく根本的治療法開発も展望できるとの期待が高まっている。成因に関しては国内外における研究から、蛋白質の構造変化、凝集、蓄積と神経細胞死・神経変性との関連が示されており conformation 病の概念確立とともに、アポトーシスに加えて神経細胞機能不全も神経変性の主因として位置づけられるようになってきた。

一方で、遺伝子の網羅的な解析(ゲノミクス)、遺伝子発現の網羅的な解析(トランスクリプトミクス)、蛋白質の網羅的な解析(プロテオミクス)などの研究手法の進歩が著しい。新たなバイオマーカーの同定や創薬に結びつける本研究の研究手法であるプロテオーム解析を行う場合でも、これらオーミクスを組み合わせた手法が大きな成果を上げるものと考えられている。

すでにこれまでの研究で髄液を用いることで、直接的に

中枢神経の病態を反映している蛋白群をとらえることが判明しており、この技術を生かす為には、元々蛋白量が少ない髄液で、しかも臨床的に許容できる 2ml 以下の初期量での測定法を確立する必要がある。

そこで、今年度は、初期量 10ml で解析可能であった測定系を、初期量 2 ml まで微量化するための検討を行った。結果的には、抗体カラムの使用、EDTA を使用しないなどの改良で、初期量 2ml からでも cICAT 法の必要解析量である 50 μ g を超える蛋白量を得ることに成功した。

さらに、蛋白量の回収を高める方法や血清蛋白質を効率的に除去する方法を開発することで、より多くの中枢神経関連蛋白を網羅的に解析する技術を開発することが今後の課題である。また、解析法として cICAT 法以外に iTRAQ 法との比較検討も今後の検討課題である。

LAMP2 は chaperone 介在型オートファージの重要な構成因子であり、Hsc70、Hsp90 も chaperone 介在型オートファージにおいて重要な役割を果たす。chaperone 介在型オートファージはパーキンソン病発症原因蛋白の一つである α -シヌクレインの分解制御に関わることから、UCH-L1 の酸化修飾が α -シヌクレインの蓄積を引き起こしパーキンソン病発症に結びつく可能性が考えられる。酸化修飾は孤発性神経変性疾患の危険因子と考えられており、今回の成果は孤発性パーキンソン病の発症機序解明にも貢献すると思われる。髄液中の酸化型 UCH-L1 の検出は推進すべき重要な課題と位置づけられる。

E. 結論

精神・神経疾患のプロテオーム解析を行うにあたって、髄液の有用性を最大限活用できるように、微量タンパク測定系の開発を行った。これによって、200 種近くの蛋白量が髄液初期量 2 ml からでも同定できる系を確立できた。また、UCH-L1 の酸化修飾体がオートファジー系機能に影響を及ぼす可能性を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis CA, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME.: Dynamics of

the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J. Neurosci.* 28 (2008) 4283-4292

Irino Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S, Ohsawa K.: Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. *J. Neurosci. Res.* 86 (2008) 1511-1519

Hashimoto M, Ishii K, Nakamura Y, Watabe K, Kohsaka S, Akazawa C.: Neuroprotective effect of Sonic hedgehog up-regulated in Schwann cells following sciatic nerve injury. *J. Neurochem.* 107(2008) 918-927

Namba T, Maekawa M, Yuasa S, Kohsaka S, Uchino S.: The alzheimer's disease drug memantine increases the number of radical glia-like progenitor cells in adult hippocampus. *Glia*(2009) in press

Kabuta T, Setsuie R, Mitsui T, Kinugawa A, Sakurai M, Aoki S, Uchida K, Wada K.: Aberrant molecular properties shared by familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1. *Hum. Mol. Genet.* 17(2008) 1482-1496

Kabuta T, Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K.: Aberrant interaction between Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* 283(2008) 23731-23738

Kabuta T, Wada K.: Insights into links between familial and sporadic Parkinson's disease: Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 4(2008) 827-829

Tomiya H, Mizuta I, Li Y, Funayama M, Yoshiho H, Li L, Murata M, Yamamoto M, Kubo S, Mizuno Y, Toda T, Hattori N.: LRRK2 P755L variant in sporadic Parkinson's disease. *J. Hum. Genet* 53(2008) 1012-1015

Kobayashi A, Arima K, Ogawa O, Murata M, Fukuda T, Kitamoto T.: Plaque-type deposition of prion protein in the damaged white matter of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1 patients. *Acta. Neuropathol.* 116(2008) 561-566

Okamoto T, Ogawa M, Lin Y, Murata M, Miyake S, Yamamura T.: Treatment of neuromyelitis optica: Current debate. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 1(2008) 43-52

Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Miyoshi K, Ogawa N, Murata M.: Preventing effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinone formation. *Neurosci. Res.* 60(2008) 106-113

2. 学会発表

(国内学会)

石井邦弥、橋本学、中村泰子、高坂新一、赤澤智宏：
BDNF を介したソニックヘッジホッグによる損傷神経修復. 第 31 回日本神経科学大会、東京、7.9, 2008

難波隆志、前川素子、鈴木恵里、湯浅茂樹、内野茂夫、高坂新一:NMDA 受容体阻害剤の成体海馬神経細胞新生に対する影響. 第 31 回日本神経科学大会、東京、7.10, 2008

大澤圭子、中村泰子、入野康宏、鈴木恵里、佐柳友規、井上和秀、高坂新一: ATP 受容体 P2Y₁₂ を介したインテグリン β 1 活性化によるミクログリア突起伸長調節. 第 51 回日本神経科学大会、富山、9.12, 2008

株田智弘、節家理恵子、三井丈史 1、衣川亜衣子、櫻井省花子、青木俊介、内田健康、和田圭司:カルボニル化 UCH-L1 とパーキンソン病関連変異型 I93M UCH-L1 に共通した異常な分子的性質. 第 31 回日本神経科学大会、東京、7.9, 2008

Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K.: Aberrant interaction between familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. 第 51 回日本神経化学学会大会、富山、9.11, 2008

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究者

(財) ヒューマンサイエンス振興財団

下田 智久

研究要旨

平成 19 年度までは、主に cICAT 法を使用して様々な疾患の血清を用いて解析を行ってきたが、その間にも、技術の進歩めざましく、近年では cICAT 法に代わって iTRAQ 法が主流になりつつある。そこで、本研究では、iTRAQ 法での解析に当たって、本施設に現有する機器での解析プロトコルの検討を行い、解析機器の比較を含め、血清を使用した解析方法の確立を目的として検討を行った。

また、血清とは異なり、脳脊髄液(CSF)のように、たんぱく質含量が少ない試料での解析を可能とするための解析方法の検討を行う事としたが、それに先立ち、前年度で行われた結果との再現性の確認と試料の前処理操作での影響要因の検討を行った。

なお、報告書は前半の内容と後半の内容を別々にまとめて記載した。

A. 研究目的

A-1 検討 1: iTRAQ 法により同定される

タンパク質の ABI4700 における測定

当施設における質量分析測定機器のうち、QSTAR-XL (ABJ 社製) における iTRAQ 法により前処理した試料が測定可能であることは 2008 年 3 月の PF 活動報告書 (VI-5) において既に報告済みであるが、ABI4700 (ABJ 社製) における iTRAQ 法で前処理した試料の測定が可能であるかどうかを検討するために、当施設の ABI4700 を用いて測定を行い、ABJ 社製質量分析ソフトウェア ProteinPilot を用いて解析した。

A-2. 検討 2: iTRAQ 法により同定される血清タンパク質の比較

当施設ではこれまで主として cICAT 法を用いて患者血清タンパク質および組織タンパク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。2008 年 3 月の PF 活動報告書 (VI-5) において QSTAR-XL における cICAT 法および iTRAQ 法により同定される血清タンパク質の比較については報告済みであるが、iTRAQ 試薬でラベルした試料は 2 種類(いずれもヒト標準血清)であった。

そこで今回は、ヒト標準血清、日赤健常人血清、非糖尿病血清および糖尿病患者血清を用い、それぞれ iTRAQ 試薬でラベルし、測定試料を調製し、QSTAR-XL を用いて質量分析後、ABJ 社製 QSTAR 専用解析ソフト ProQuant を用いて上記の比較定量解析を確認するため実施した。

B. 研究方法

B-1-1. 検討 1: 試料の調製方法

ヒト標準血清 (外国人男女購入血清 5 人ずつプールしたもの) と日赤健常人プール血清 (男女 5 人ずつプールしたもの) を各 200 μ l アジレント抗体カラム Hu-6 (10.0 x 100mm) に通

し、6 種の高濃度タンパク質を除いた。

6 種の高濃度タンパク質を除いた血清を濃縮後、1 検体あたり 40 μ g を標識する計算でそれぞれ 200 μ g 相当 (1 検体分多めに 5 検体分) を分取した (各 2 本ずつの計 4 本)。

各サンプル (4 本) を Dissolution buffer (0.5M triethylammonium bicarbonate) で 80 μ l にメスアップ後、プロトコルの反応系の 4 倍量の計算で、各サンプル (4 本) に Denaturant (2% SDS) 4 μ l、Reducing Reagent (TCEP) 8 μ l を加えて 60°C で 1 時間反応させタンパク質の変性と還元を行った。

次に、各サンプル (4 本) に Cysteine Blocking Reagent 4 μ l を加えて 25°C で 10min 反応を行い、システイン残基の Blocking を行った。

次に、各サンプル (4 本) に 50 μ g のトリプシン (ABI: Cat# 4352157) を加え、各サンプル (4 本) から 29.2 μ l (40 μ g 相当) ずつ 4 本のチューブに分注し (ヒト標準血清 8 本、日赤健常人血清 8 本の計 16 本)、37°C で 16 時間消化した。

iTRAQ 試薬 114, 115, 116, 117 各 4 本ずつ計 16 本にトリプシン消化済みサンプルの全量を各試薬チューブに移し、25°C で 60min 反応させた (ヒト標準血清は 114, 115 試薬で標識、日赤健常人血清は 116, 117 試薬で標識)。

その後、114, 115, 116, 117 試薬で反応させたもの各 1 本 (計 4 本) を 1 セットとして 1 本のチューブに混合し (計 4 セット)、10mM KH_2PO_4 (pH 1.92) を 1.4mL 加えてサンプル溶液の pH を 2.7~3.0 付近になるように調製した。

次に、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column [35 x 2.1mm, 5 μ m, 300 Å]) を使用し、ギ酸アンモニウム系の溶媒で濃度勾配法により 25 分画にして溶出させた。

溶出画分は C18 column により脱塩処理を行い、

蒸発乾固させ MS 解析用サンプルとした。尚、検体数は n=4 とした。

B-1-2. 検討1: 試料測定方法および解析方法

上記の通り、脱塩処理を行った iTRAQ ペプチド試料を nano-LC/QSTAR-XL (ABJ社製, ESI-Q/TOF) および ABI4700 (ABJ社製, MALDI-TOF/TOF) で質量分析を行い、得られた MS データを ABI-ProteinPilot™ 解析ソフトおよび Paragon Method 95% を用いて、ペプチドおよびタンパク質の同定・比較定量解析をした。

なお、QSTAR-XL の測定条件は、ABJ 社の iTRAQ 用測定パラメータに修正した。また、Matrix 展開後の試料を用いて、ABI4700 で 2 回および 3 回の再測定を実施し、同定タンパク質を解析した。

B-2-1. 検討2: 試料の調製方法

ヒト標準血清(外国人男女購入血清 5 人ずつプールしたもの)、日赤健常人血清(1 検体)、非糖尿病患者血清(1 検体)および糖尿病患者血清(1 検体)をアジレント抗体カラム Hu-6(10.0 x 100mm)に通し、6 種の高濃度タンパク質を除いた血清を濃縮後、1 検体あたり 40 µg 標識する計算でそれぞれ 200 µg 相当を分取した。

各サンプルを Dissolution buffer (0.5M triethylammonium bicarbonate) で 80 µl にメスアップ後、プロトコールの反応系の 4 倍量の計算で、各サンプルに Denaturant (2% SDS) 4 µl、Reducing Reagent (TCEP) 8 µl を加えて 60°C で 1 時間反応させ、タンパク質の変性と還元を行った。

次に、Cysteine Blocking Reagent 4 µl を加えて 25°C で 10min 反応を行い、システイン残基の Blocking を行い、50 µg のトリプシン (ABI: Cat# 4352157) を加え、各サンプルから 29.2 µl (40 µg 相当) ずつ 4 本のチューブに分注し、37°C で 16 時間消化した。

iTRAQ 試薬 114, 115, 116, 117 各 4 本ずつ計 16 本にトリプシン消化済みサンプルの全量を各試薬チューブに移し、25°C で 60min 反応させた (ヒト標準血清は 114、日赤健常人血清は 115、非糖尿病患者血清は 116、糖尿病患者血清は 117 試薬で標識)。

その後、114, 115, 116, 117 試薬で反応させたもの各 1 本 (計 4 本) を 1 セットとして 1 本のチューブに混合し、10mM KH₂PO₄ (pH 1.92) を 1.4mL 加えてサンプル溶液の pH を 2.7~3.0 付近になるよう

(4) 体それぞれ QSTAR-XL では 152, 131, 140 および 151 種、ABI4700 では 110, 104, 110 および 109

うに調製した。

次に、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column [35 x 2.1mm, 5 µm, 300 Å]) を使用し、ギ酸アンモニウム系の溶媒で濃度勾配法により 25 分画にして溶出させた。

溶出画分は C18 column により脱塩処理を行い、蒸発乾固させ MS 解析用サンプルとした。尚、検体数は n=1 とした。

B-2-2. 検討2: 試料測定方法および解析方法

溶出画分を C18 column で脱塩した iTRAQ ペプチドは nano-LC/QSTAR XL (AB, ESI-Q/TOF) で質量分析測定を行い、得られた MS データを ABI-ProQuant 解析ソフトを用いて、ペプチドおよびタンパク質の同定・比較定量解析をした。

なお、QSTAR XL の測定条件は ABJ 社の iTRAQ 用測定パラメータに修正した。

C. 実験結果

C-1. 検討1

以下の D-1. 考察の項に結果と考察として記載した。

C-2. 検討2

以下の D-1. 考察の項に結果と考察として記載した。

D. 結果と考察

D-1. 検討1

(1) 測定時間に関しては、QSTAR-XL が 1 検体あたり 50 時間を要するのに対し、ABI4700 では 1 検体あたりの測定平均時間は 72 時間と約 1 日分多く時間を要した。しかし、当施設には、ABI4700 および測定プレートに試料を Matrix 展開する装置である Probot が複数台あり、これらを同時稼働することにより測定時間の問題はクリア可能である。

(2) iTRAQ 法で得られたデータは、ProQUANT および ProteinPilot™ (共に ABJ 社製解析ソフトウェア) で解析可能であるが、ProQUANT は QSTAR-XL システムで構成される統合ソリューションの一部としての解析ソフトであり、Analyst* と連動して解析をするので、ABI4700 で測定した試料の解析は不可能である。そこで今回は、QSTAR-XL および ABI4700 で測定した両データは ProteinPilot™ を用いて解析した。

(3) QSTAR-XL および ABI4700 で測定したデータを ABJ 社製質量分析ソフトウェア ProteinPilot™ を用いて解析すると、4 種類のタンパク質の同定が可能であった。また、QSTAR-XL および ABI4700 いずれにも共通に得ら

れたタンパク質はそれぞれ 97, 88, 95 および 97 種であり、QSTAR-XL のみで得られたタンパク質は 55, 43, 45 および 54 種、ABI4700 のみで得られたタンパク質は 13, 16, 15 および 12 種であった (表 1.)。

- (5) 尚、上記で得られた同定タンパク質の数は、1 検体毎に得られたタンパク質量数であり、測定した 4 検体のうち重複しているタンパクを除外して解析したところ、QSTAR-XL で得られたタンパク質は 210 種あり、ABI4700 で得られたタンパク質は 162 種であった (表 1)。
- (6) また、図 1 に示すように重複を除いた QSTAR-XL および ABI4700 共通のタンパク質は 115 種 (表 2)、QSTAR-XL のみで得られたタンパク質は 95 種 (表 3)、ABI4700 のみで得られたタンパク質は 47 種 (表 4) であった。
- (7) QSTAR-XL および ABI4700 共通に見られた 115 種のタンパク質については、4 検体ともに見られたが、QSTAR-XL のみで見られた 95 種のタンパク質のうち、55 種のタンパク質が 4 検体共通で見られ、35 種のタンパク質がそれぞれ単体の検体で

見られた。また、ABI4700 のみで見られる 47 タンパク質のうち、4 検体に共通するタンパク質がほとんど無く (表 4)、測定する例数を増やすことにより、新たな同定タンパク質を確認することも可能であるかも知れない。

- (8) また、QSTAR-XL では同じサンプルの再測定は不可能ではあるが、ABI4700 に関しては、プレートに試料を Matrix 展開していれば再測定は可能であるので、同試料を用いて同定タンパク質量数等に変化が無いかどうかを 2 回および 3 回再測定して検討した。その結果、1 回目測定時の 156 種に対し、2 回目測定では 144 種 (1 回目に対し 92%)、3 回目測定では 135 種 (1 回目に対し 87%) のタンパク質が同定され、2 回目以降の耐久性は下降傾向にあると言える。これは、平成 17 年 2 月の Research Meeting で既に報告されている cICAT 試薬で処理した試料の 1 枚のプレートにおける耐久性 (2 回目 93%、3 回目 75%) の結果とほぼ同等の結果が得られた (図 2)。したがって、1 枚のプレートの測定は 2 回までが限度と考えられる。

表 1. iTRAQ 法の試料を QSTAR-XL および ABI4700 で測定した時の同定タンパク質量数

	EVJTR01	EVJTR02	EVJTR03	EVJTR04	4 検体合計 (重複は除く)
ABI4700	110	104	110	109	162
QSTARXL	152	131	140	151	210
Both	97	88	95	97	115

表 2. QSTAR-XL および ABI4700 共通で見られた同定タンパク質

1	cont 000086	40	P02760 AMBP_HUMAN	79	P10643 CO7_HUMAN
2	cont 000137	41	P02763 A1AG1_HUMAN	80	P10909 CLUS_HUMAN
3	O00391 QSCN6_HUMAN	42	P02765 FETUA_HUMAN	81	P12259 FA5_HUMAN
4	O14791 APOL1_HUMAN	43	P02766 TTHY_HUMAN	82	P13671 CO6_HUMAN
5	O75636 FCN3_HUMAN	44	P02774 VTDB_HUMAN	83	P14151 LYAM1_HUMAN
6	O75882 ATRN_HUMAN	45	P02775 SCYB7_HUMAN	84	P15169 CBPN_HUMAN
7	O95445 APOM_HUMAN	46	P02776 PLF4_HUMAN	85	P19652 A1AG2_HUMAN
8	P00450 CERU_HUMAN	47	P02790 HEMO_HUMAN	86	P19823 ITIH2_HUMAN
9	P00488 F13A_HUMAN	48	P03951 FA11_HUMAN	87	P19827 ITIH1_HUMAN
10	P00734 THRB_HUMAN	49	P03952 KLKB1_HUMAN	88	P20742 PZP_HUMAN
11	P00736 C1R_HUMAN	50	P04003 C4BP_HUMAN	89	P20851 C4BB_HUMAN
12	P00742 FA10_HUMAN	51	P04004 VTNC_HUMAN	90	P22352 GPX3_HUMAN
13	P00747 PLMN_HUMAN	52	P04070 PROC_HUMAN	91	P22792 CPN2_HUMAN
14	P00748 FA12_HUMAN	53	P04114 APOB_HUMAN	92	P23142 FBLN1_HUMAN
15	P00751 CFAB_HUMAN	54	P04180 LCAT_HUMAN	93	P27169 PON1_HUMAN
16	P01008 ANT3_HUMAN	55	P04196 HRG_HUMAN	94	P27918 PROP_HUMAN
17	P01011 AACT_HUMAN	56	P04217 A1BG_HUMAN	95	P29622 KAIN_HUMAN
18	P01019 ANGT_HUMAN	57	P04278 SHBG_HUMAN	96	P35542 SAA4_HUMAN
19	P01023 A2MG_HUMAN	58	P05090 APOD_HUMAN	97	P35858 ALS_HUMAN
20	P01024 CO3_HUMAN	59	P05155 IC1_HUMAN	98	P36955 PEDF_HUMAN
21	P01031 CO5_HUMAN	60	P05156 CFAI_HUMAN	99	P36980 FHR2_HUMAN
22	P01042 KNG1_HUMAN	61	P05160 F13B_HUMAN	100	P43251 BTD_HUMAN
23	P02647 APOA1_HUMAN	62	P05452 TETN_HUMAN	101	P43652 AFAM_HUMAN
24	P02649 APOE_HUMAN	63	P05543 THBG_HUMAN	102	P51884 LUM_HUMAN
25	P02652 APOA2_HUMAN	64	P05546 HEP2_HUMAN	103	P55056 APOC4_HUMAN
26	P02654 APOC1_HUMAN	65	P06276 CHLE_HUMAN	104	Q02985 FHR3_HUMAN
27	P02655 APOC2_HUMAN	66	P06396 GELS_HUMAN	105	Q03591 FHR1_HUMAN
28	P02656 APOC3_HUMAN	67	P06681 CO2_HUMAN	106	Q06033 ITIH3_HUMAN
29	P02671 FIBA_HUMAN	68	P06727 APOA4_HUMAN	107	Q08380 LG3BP_HUMAN
30	P02735 SAA_HUMAN	69	P07225 PROS_HUMAN	108	Q14520 HABP2_HUMAN
31	P02743 SAMP_HUMAN	70	P07357 CO8A_HUMAN	109	Q14624 ITIH4_HUMAN
32	P02745 C1QA_HUMAN	71	P07358 CO8B_HUMAN	110	Q15582 BGH3_HUMAN
33	P02746 C1QB_HUMAN	72	P07360 CO8G_HUMAN	111	Q15848 ADIPO_HUMAN
34	P02747 C1QC_HUMAN	73	P07996 TSP1_HUMAN	112	Q92954 PRG4_HUMAN
35	P02748 CO9_HUMAN	74	P08519 APOA_HUMAN	113	Q96KN2 CNDP1_HUMAN
36	P02749 APOH_HUMAN	75	P08603 CFAH_HUMAN	114	Q96PD5 PGRP2_HUMAN
37	P02750 A2GL_HUMAN	76	P08697 A2AP_HUMAN	115	Q9UGM5 FETUB_HUMAN
38	P02751 FINC_HUMAN	77	P09871 C1S_HUMAN		
39	P02753 RETBP_HUMAN	78	P0C0L5 CO4B_HUMAN		

表 3. QSTAR-XL のみで見られた同定タンパク質

1	cont 000035	33	P06276 CHLE_HUMAN	65	P61626 LYSC_HUMAN
2	cont 000086	34	P07477 TRY1_HUMAN	66	P61769 B2MG_HUMAN
3	cont 000088	35	P08185 CBG_HUMAN	67	P62328 TYB4_HUMAN
4	cont 000101	36	P08294 SODE_HUMAN	68	P63261 ACTG_HUMAN
5	cont 000141	37	P08519 APOA_HUMAN	69	P63313 TYB10_HUMAN
6	cont 000143	38	P08571 CD14_HUMAN	70	P80108 PHLD1_HUMAN
7	O00391 QSCN6_HUMAN	39	P08637 FCG3A_HUMAN	71	Q01459 DIAC_HUMAN
8	O00533 CHL1_HUMAN	40	P0C0L4 CO4A_HUMAN	72	Q03591 FHR1_HUMAN
9	O14791 APOL1_HUMAN	41	P11226 MBL2_HUMAN	73	Q04756 HGFA_HUMAN
10	O43866 CD5L_HUMAN	42	P12259 FA5_HUMAN	74	Q08380 LG3BP_HUMAN
11	O76031 CLPX_HUMAN	43	P14151 LYAM1_HUMAN	75	Q13093 PAFA_HUMAN
12	P00740 FA9_HUMAN	44	P14209 CD99_HUMAN	76	Q13790 APOF_HUMAN
13	P00742 FA10_HUMAN	45	P15151 PVR_HUMAN	77	Q14515 SPRL1_HUMAN
14	P00746 CFAD_HUMAN	46	P15169 CBPN_HUMAN	78	Q15113 PCOC1_HUMAN
15	P00915 CAH1_HUMAN	47	P16070 CD44_HUMAN	79	Q15582 BGH3_HUMAN
16	P01034 CYTC_HUMAN	48	P17936 IBP3_HUMAN	80	Q16610 ECM1_HUMAN
17	P01344 IGF2_HUMAN	49	P18428 LBP_HUMAN	81	Q6EMK4 VASN_HUMAN
18	P01871 MUC_HUMAN	50	P22105 TENX_HUMAN	82	Q6ZVN8 RGMC_HUMAN
19	P02671 FIBA_HUMAN	51	P22352 GPX3_HUMAN	83	Q8NBP7 PCSK9_HUMAN
20	P02735 SAA_HUMAN	52	P22792 CPN2_HUMAN	84	Q8WZ42 TITIN_HUMAN
21	P02741 CRP_HUMAN	53	P22891 PROZ_HUMAN	85	Q92820 GGH_HUMAN
22	P02745 C1QA_HUMAN	54	P23142 FBLN1_HUMAN	86	Q92954 PRG4_HUMAN
23	P02766 TTHY_HUMAN	55	P26927 HGFL_HUMAN	87	Q961Y4 CBPB2_HUMAN
24	P02768 ALBU_HUMAN	56	P27918 PROP_HUMAN	88	Q96KN2 CNDP1_HUMAN
25	P02776 PLF4_HUMAN	57	P33151 CADH5_HUMAN	89	Q99969 RARR2_HUMAN
26	P02788 TRFL_HUMAN	58	P33908 MA1A1_HUMAN	90	Q9UGM5 FETUB_HUMAN
27	P03951 FA11_HUMAN	59	P48740 MASP1_HUMAN	91	Q9UHG3 PCYOX_HUMAN
28	P04070 PROC_HUMAN	60	P49747 COMP_HUMAN	92	Q9UK55 ZPI_HUMAN
29	P04180 LCAT_HUMAN	61	P49908 SEPP1_HUMAN	93	Q9UNW1 MINP1_HUMAN
30	P04275 VWF_HUMAN	62	P55056 APOC4_HUMAN	94	Q9Y4H2 IRS2_HUMAN
31	P05154 IPSP_HUMAN	63	P55058 PLTP_HUMAN	95	Q9Y6R7 FCGBP_HUMAN
32	P05452 TETN_HUMAN	64	P55290 CAD13_HUMAN		

表 4. ABI4700 のみで見られた同定タンパク質

	EVJTR01	EVJTR02	EVJTR03	EVJTR04
1	cont 000137	O94833 BPAEA_HUMAN	O43520 AT8B1_HUMAN	cont 000097
2	cont 000142	P04180 LCAT_HUMAN	Q13813 SPTA2_HUMAN	O00187 MASP2_HUMAN
3	cont 000147	P04278 SHBG_HUMAN	Q14966 ZN638_HUMAN	P0C0L4 CO4A_HUMAN
4	P0C0L5 CO4B_HUMAN	P05129 KPCG_HUMAN	Q16363 LAMA4_HUMAN	P18428 LBP_HUMAN
5	P11277 SPTB1_HUMAN	P48382 RFX5_HUMAN	Q5KSL6 DGKK_HUMAN	P61626 LYSC_HUMAN
6	P16109 LYAM3_HUMAN	P55058 PLTP_HUMAN	Q86UQ4 ABCAD_HUMAN	Q13790 APOF_HUMAN
7	P36980 FHR2_HUMAN	Q13938 CAYP1_HUMAN	Q8WUY3 CI065_HUMAN	Q15127 PHLD2_HUMAN
8	P49913 CAMP_HUMAN	Q14515 SPRL1_HUMAN	Q8WZ42 TITIN_HUMAN	Q8TDJ6 DMXL2_HUMAN
9	Q02985 FHR3_HUMAN	Q9BW19 KIFC1_HUMAN	Q99666 RGPDS_HUMAN	Q9UBX7 KLK11_HUMAN
10	Q8IWK6 GP125_HUMAN	Q9P0G3 KLK14_HUMAN	Q9P218 COKA1_HUMAN	
11	Q9HCS7 XAB2_HUMAN	Q9Y247 FA50B_HUMAN	Q9UIW2 PLXA1_HUMAN	
12	Q9UNA0 ATS5_HUMAN	Q9Y2G2 CARD8_HUMAN		
13	Q9UPN3 MACF1_HUMAN	Q9Y2L6 FRM4B_HUMAN		
14		Q9Y3Q7 ADA18_HUMAN		
	13	14	11	9

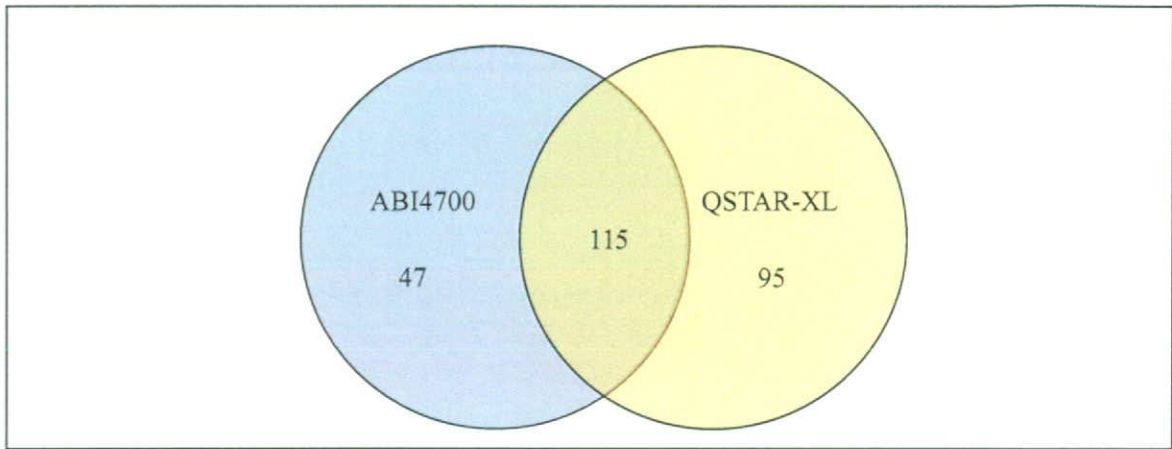


図 1. iTRAQ 標識試料の QATAR-XL と ABI4700 で測定した時の同定タンパク数 (n=4)

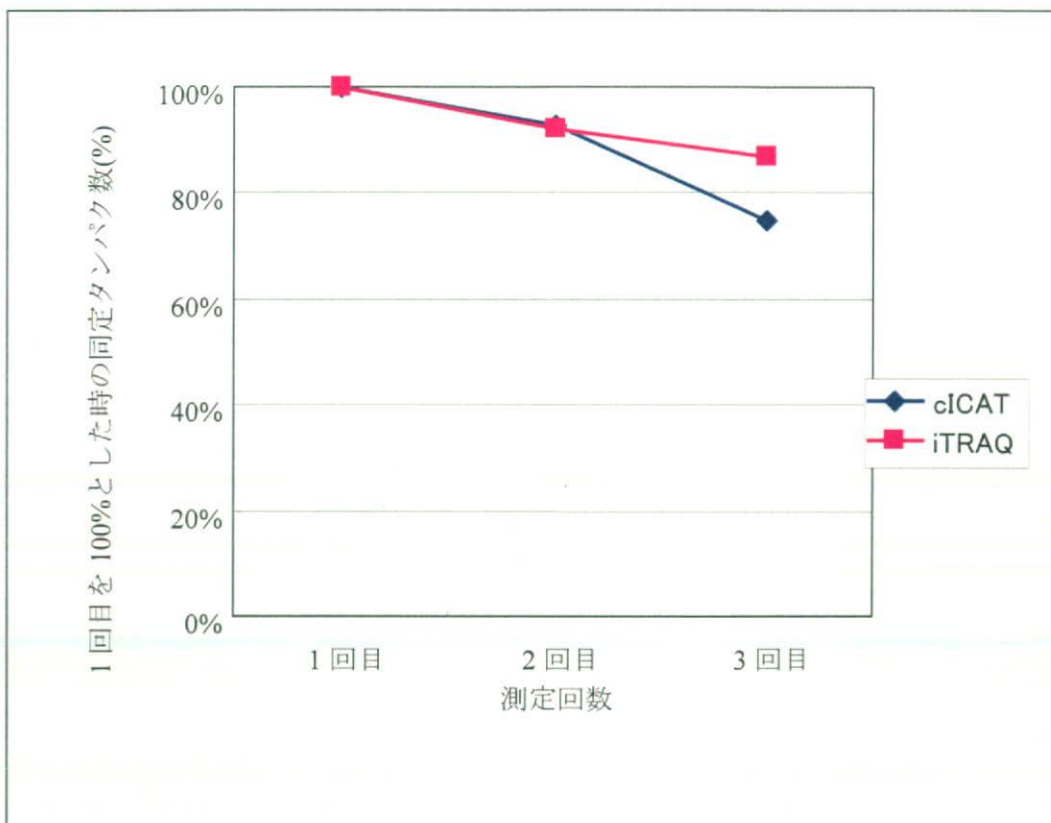


図 2. ABI4700 測定における 1 枚のプレートでの連続測定の耐久性

D-2. 検討 2

iTRAQ 法で得られたデータのヒト標準血清を比較対照検体として ProQuant で解析すると、信頼性が高い Confidence 95% で 317 種類のタンパク質の同定が可能であり、糖尿病患者血清にのみ得られたタンパク質は 12 種類 (表 5)、非糖尿病患者血清にのみ得られたタンパク質は 2 種類 (表 6)、日赤健常人血清にのみ得られた

タンパク質は 5 種類 (表 7)、糖尿病患者血清および非糖尿病患者血清共通のタンパク質は 11 種類 (表 8)、糖尿病患者血清および日赤健常人血清共通のタンパク質は 5 種類 (表 9)、非糖尿病患者血清および日赤健常人血清共通のタンパク質は 58 種類 (表 10)、3 検体共通のタンパク質は 224 種類であった (図 3)。

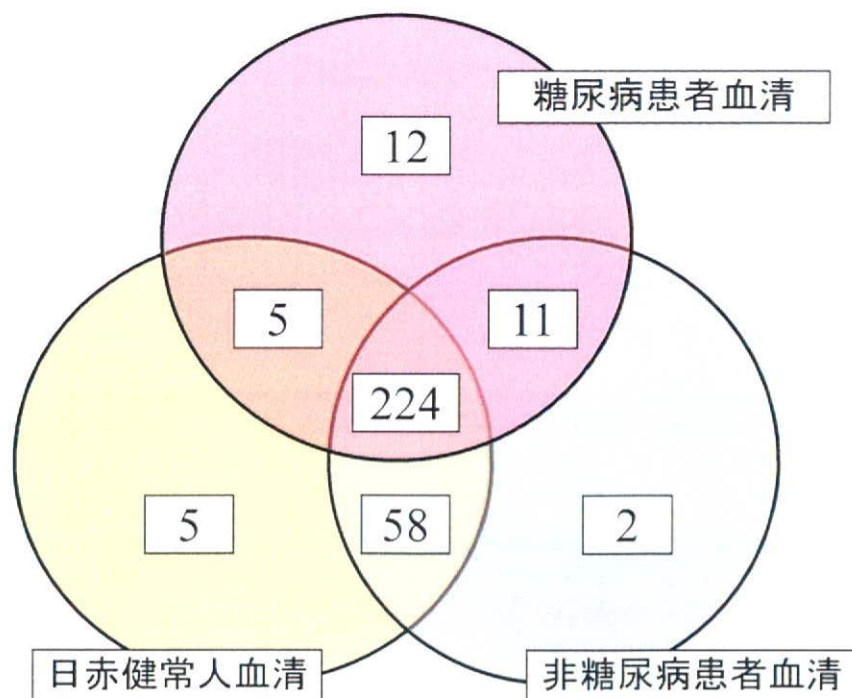


図 3. 標準血清、日赤健常人血清、糖尿病患者血清および非糖尿病患者血清を用いて iTRAQ 法で同定されるタンパク質の比較 (95%信頼度)

表 5. iTRAQ 法で同定された糖尿病患者血清のみに発現したタンパク質 (12 種類)

Protein ID	Description
gi 729167	Complement component C8 alpha chain precursor
gi 543793	Afamin precursor (Alpha-albumin) (Alpha-Alb)
gi 232152	G2/mitotic-specific cyclin B
gi 122696	Hemoglobin beta chain
gi 21542114	Lumican (Keratan sulfate proteoglycan lumican) (KSPG lumican)
gi 113275	ACTIN, CYTOPLASMIC
gi 3183116	Pigment epithelium-derived factor precursor (PEDF) (Stromal cell-derived factor 3) (SDF-3)
gi 2507095	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D 1 precursor (PI-G PLD) (Glycoprotein phospholipase)
gi 1703338	Apolipoprotein E precursor (Apo-E)
gi 17380447	DNA polymerase gamma subunit 1 (Mitochondrial DNA polymerase catalytic subunit) (PolG-alpha)
gi 266693	Oleosin 18.5 kDa
gi 6647944	Hypothetical protein RP548

表 6. iTRAQ 法で同定された非糖尿病患者血清のみに発現したタンパク質 (2 種類)

Protein ID	Description
gi 115877	Carboxypeptidase N 83 kDa chain (Carboxypeptidase N regulatory subunit)
gi 20141203	Monocyte differentiation antigen CD14 precursor (Myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein)

表 7. iTRAQ 法で同定された日赤健常人血清のみに発現したタンパク質 (5 種類)

Protein ID	Description
gi 114062	Apolipoprotein(a) precursor (Apo(a)) (Lp(a))
gi 400068	Plasma serine protease inhibitor precursor (PCI) (Protein C inhibitor) (Plasminogen activator inhibitor)
gi 20178177	Hypothetical protein TM0508
gi 13432109	Vascular endothelial-cadherin precursor (VE-cadherin) (Cadherin-5) (7B4 antigen) (CD144 antigen)
gi 1168249	Alpha-2-antiplasmin precursor (Alpha-2-plasmin inhibitor) (Alpha-2-PI) (Alpha-2-AP)

表 8. iTRAQ 法で同定された糖尿病患者と非糖尿病患者血清共通のタンパク質 (11 種類)

Protein ID	Description
gi 543983	Complement factor H-related protein 2 precursor (FHR-2) (H factor-like protein 2) (H factor-like 3)
gi 12643883	Fetuin-B precursor (IRL685) (16G2)
gi 730496	Plasma retinol-binding protein precursor (PRBP)
gi 399138	Complement C1q subcomponent, A chain precursor
gi 134907	Sex hormone-binding globulin precursor (SHBG) (Sex steroid-binding protein) (SBP) (Testis-specific a
gi 119762	Coagulation factor XI precursor (Plasma thromboplastin antecedent) (PTA) (FXI)
gi 1709662	Phospholipid transfer protein precursor (Lipid transfer protein II)
gi 13124752	Complement factor H-related protein 3 precursor (FHR-3) (H factor-like protein 3) (DOWN16)
gi 1168714	Complement C1q subcomponent, A chain precursor
gi 115213	C4b-binding protein beta chain precursor
gi 1168225	60 kDa inner-membrane protein homolog

表 9. iTRAQ 法で同定された健常人および糖尿病患者血清共通のタンパク質 (5 種類)

Protein ID	Description
gi 130314	Plasminogen
gi 125511	Kininogen, LMW II precursor (Thiol proteinase inhibitor)
gi 125510	Kininogen, LMW I precursor (Thiol proteinase inhibitor)
gi 1351236	Thyroxine-binding globulin precursor (T4-binding globulin)
gi 10720312	Thyroxine-binding globulin precursor (T4-binding globulin)

表 10. iTRAQ 法で同定された健常人と非糖尿病患者血清共通のタンパク質 (58 種類)

Protein ID	Description
gi 3913070	Apolipoprotein E (Apo-E)
gi 2499860	Plasminogen precursor
gi 3121741	ACTIN, MUSCLE-TYPE (A2)
gi 14194431	Actin
gi 728793	ACTIN 3
gi 728792	ACTIN 3
gi 728791	ACTIN 1/2
gi 543801	Insulin-like growth factor binding protein complex acid labile chain precursor (ALS)
gi 543767	ACTIN 2
gi 3182905	Actin, cytoplasmic (BfCA1)
gi 3182899	ACTIN, CYTOPLASMIC 1 (BETA-ACTIN)
gi 3182892	ACTIN
gi 3182891	Actin
gi 3182886	ACTIN 1
gi 2829755	ACTIN 1
gi 2829754	ACTIN 2
gi 2492672	ACTIN
gi 21264389	Actin 2
gi 1703151	ACTIN
gi 1703149	ACTIN

gi 1703136	ACTIN, CYTOSKELETAL (M)
gi 1703135	ACTIN, CYTOSKELETAL IIIA
gi 1703125	Actin, indirect flight muscle (Actin-88F)
gi 1703124	ACTIN 6
gi 1703120	ACTIN 4
gi 1703117	Actin 57B
gi 1703112	ACTIN, CYTOSKELETAL 2 (LPC2)
gi 1703111	ACTIN, CYTOPLASMIC 2 (BETA-ACTIN 2)
gi 1703110	ACTIN 2
gi 1703102	ACTIN, CYTOPLASMIC CYI
gi 14194452	Actin 2
gi 14194451	Actin 1 (Beta-actin)
gi 14194450	Actin 1
gi 14194449	Actin, gamma
gi 1351869	ACTIN
gi 1351867	ACTIN, CYTOPLASMIC 1 (BETA-ACTIN)
gi 125357	Tyrosine-protein kinase transforming protein FGR
gi 1168325	ACTIN 5, MUSCLE-SPECIFIC
gi 1168320	ACTIN 2, MUSCLE-SPECIFIC
gi 113308	Actin
gi 113307	ACTIN
gi 113301	ACTIN, PLASMODIAL ISOFORM
gi 113296	ACTIN, NON-MUSCLE 6.2
gi 113291	ACTIN 1/3
gi 113284	ACTIN, MUSCLE
gi 113277	ACTIN, GAMMA
gi 113273	ACTIN, CYTOPLASMIC
gi 113263	Actin 15 (Actin A8) (Actin 1/100/103)
gi 113247	ACTIN, CLONE 302
gi 113243	ACTIN, CYTOSKELETAL IIB (ACTIN 15B)
gi 113229	ACTIN 2
gi 113226	ACTIN 15A
gi 113218	ACTIN
gi 113213	ACTIN 1
gi 113212	ACTIN 1
gi 130315	Plasminogen
gi 21264515	Potential global transcription activator SNF2L
gi 3024056	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 precursor (ITI heavy chain H3) (Inter-alpha-inhibitor h

E. 結論

E-1.検討 1.

以上の結果より、当施設における ABI4700 を用いて iTRAQ 法で処理した試料の測定は QSTAR-XL との併用により、さらに多くのタンパク質の同定が可能であり、1 枚の測定の限度回数は 2 回までである。

E-2.検討 2.

今回、疾患特有のタンパク質の発現等はみられたが測定は 1 検体のみで行ったため、今後は例数を増やした検討が必要であると考えられる。

F.健康危険情報

なし。

G.研究発表

なし。

H.知的財産権の出願・登録情報

なし。

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）
分担研究報告書

iTRAQ 法に関する微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 中山 敬一 九州大学生体防御医学研究所教授

研究要旨

ヒト生体試料からのバイオマーカー探索のためには高感度に多数のたんぱく質の同定・定量を行うシステムの開発が必須である。われわれは isobaric tag for relative and absolute quantitation（以下、iTRAQ）を用いてたんぱく質修飾情報の網羅的取得方法のための基盤技術開発を行うため、メーカー推奨の標準プロトコルを改変し、より効率的なシステムの開発を行った。また、その技術を応用してリン酸化たんぱく質の網羅的解析技術開発を目指し、その基盤技術の検討を行い、良好な結果を得た。

A. 研究目的

iTRAQ 標識および分画法の検討を行い、さらにたんぱく質修飾情報の網羅的取得方法のための基盤技術開発を行う。

B. 研究方法

iTRAQ 法の標準プロトコルでは SDS が含まれるため、標識後に陽イオン交換樹脂による SDS 除去が必須である。陽イオン交換の素通り分画（SDS を含む）には多くのペプチドが含まれることが判っており、網羅性の低下の原因となる。また、SDS を含む試料では陰イオン交換クロマトグラフィーの適用が困難である。そこで、SDS を含まずに効率よく酵素消化および標識を行うプロトコルを確立した。

C. 研究結果

上記方法の改善の結果、iTRAQ 標識後のペプチドを陽イオン交換および陰イオン交換クロマトグラフィーの二つの異なる分離モードで分画することが可能になり、タンパク質同定の網羅性を著しく向上させることができた。また、金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)によるリン酸化ペプチドの精製法は非特異的な非リン酸化ペプチドの混入が大きな問題である。そこで、IMAC 担体や金属の選定、バッファー条件や洗浄回数などの系統的な最適化を詳細に行い、極めて高い純度でリン酸化

ペプチドを精製する方法を確立した。その結果、わずか 100 μg 程度のタンパク質消化物から 700 種類以上のリン酸化ペプチドを同定できた。また、各種イオン交換クロマトグラフィーを用いた多次元 LC 化と iTRAQ 法による定量法を組み合わせることによって、10000 以上におよぶリン酸化の同定・定量に成功した。

D. 考察

これまでに iTRAQ 法とリン酸化ペプチド精製を組み合わせることでリン酸化の大規模定量解析に成功したが、これらの実験には培養細胞を用いており、バイオマーカー探索に向けては組織を対象とした系の確立が必須である。そこで、今後はヒトおよびマウスの組織を用いた実験系の確立を行い、より汎用性の高いシステムの構築を行いたい。また、さらなる高感度化を図ることで、微量な組織切片への適用への可能性を検討する予定である。

E. 結論

新方法の確立によって iTRAQ 法がさらに高効率・高感度化を達成することができた。またこれをリン酸化修飾に応用するための基盤技術も開発中である。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuoka, S., Oike, Y., Onoyama, I., Iwama, A., Arai, F., Takubo, K., Mashimo, Y., Oguro, H., Nitta, E., Ito, K., Miyamoto, K., Yoshiwara, H., Hosokawa, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Hayashi, Y., Matsuzaki, Y., Nakayama, K., Ikeda, Y., Hata, A., Chiba, S., Nakayama, K. I., Suda, T.: Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev.*, 22: 986-991 (2008).
2. Inoue, S., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Doi, M., Shimazaki, K.: Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 105: 5626-5631 (2008).
3. Mukai, A., Mizuno, E., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Kitamura, N., Komada, M.: Dynamic regulation of ubiquitylation and deubiquitylation at the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Sci.*, 121: 1325-1333 (2008).
4. Song, M. S., Song, S. J., Kim, S. J., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Lim, D. S.: Skp2 regulates the antiproliferative function of the tumor suppressor RASSF1A via ubiquitin-mediated degradation at the G1-S transition. *Oncogene*, 27: 3176-3185 (2008).
5. Shigematsu, N., Fukuda, T., Yamamoto, T., Nishioku, T., Yamaguchi, T., Himeno, M., Nakayama, K. I., Tsukuba, T., Kadowaki, T., Okamoto, K., Higuchi, S., Yamamoto, K.: Association of cathepsin E deficiency with the increased territorial aggressive response of mice. *J. Neurochem.*, 105: 1394-1404 (2008).
6. Chen, Q., Xie, W., Kuhn, D. J., Voorhees, P. M., Lopez-Girona, A., Mendy, D., Corral, L. G., Krenitsky, V. P., Xu, W., Moutouh-de Parseval, L., Webb, D. R., Mercurio, F., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Orlovski, R. Z.: Targeting the p27 E3 ligase SCF^{Skp2} results in p27- and Skp2-mediated cell-cycle arrest and activation of autophagy. *Blood*, 111: 4690-4699 (2008).
7. Shirane, M., Ogawa, M., Motoyama, J., Nakayama, K. I.: Regulation of apoptosis and neurite extension by FKBP38 is required for neural tube formation in the mouse. *Genes Cells*, 13: 635-651 (2008).
8. Agarwal, A., Bumm, T. G., Corbin, A. S., O'Hare, T., Loriaux, M., VanDyke, J., Willis, S. G., Deininger, J., Nakayama, K. I., Druker, B. J., Deininger, M. W.: Absence of SKP2 expression attenuates BCR-ABL-induced myeloproliferative disease. *Blood*, 112: 1960-1970 (2008).
9. Matsumoto, A., Kawamoto, T., Mutoh, F., Isse, T., Oyama, T., Kitagawa, K., Nakayama, K. I., Ichiba, M.: Effects of 5-week ethanol feeding on the liver of aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice. *Pharmacogenet. Genomics*, 18: 847-852 (2008).
10. Sakae, N., Yamasaki, N., Kitaichi, K., Fukuda, T., Yamada, M., Yoshikawa, H., Hiranita, T., Tatsumi, Y., Kira, J., Yamamoto, T., Miyakawa, T., Nakayama, K. I.: Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ1 manifest hyperactivity and enhanced responsiveness to psychostimulants. *Hum. Mol. Genet.*, 17: 3191-3203 (2008).
11. Ishikawa, Y., Onoyama, I., Nakayama, K. I., Nakayama, K.: Notch-dependent cell cycle arrest and apoptosis in mouse embryonic fibroblasts lacking Fbxw7. *Oncogene*, 27: 6164-6174 (2008).
12. Ohsaki, K., Oishi, K., Kozono, Y., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Ishida, N.: The role of β -TrCP1 and β -TrCP2 in circadian rhythm generation by mediating degradation of clock protein PER2. *J. Biochem.*, 144: 609-618 (2008).
13. Kanei-Ishii, C., Nomura, T., Takagi, T., Watanabe, N., Nakayama, K. I., Ishii, S.: Fbxw7 acts as an E3 ubiquitin ligase that targets c-Myb for nemo-like kinase (NLK)-induced degradation. *J. Biol. Chem.*, 283: 30540-30548 (2008).
14. Miranda-Carboni, G. A., Krum, S. A., Yee, K., Nava, M., Deng, Q. E., Pervin, S., Collado-Hidalgo, A., Galic, Z., Zack, J. A., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Lane, T. F.: A functional link between Wnt signaling and SKP2-independent p27 turnover in mammary tumors. *Genes Dev.*, 22: 3121-3134

- (2008).
15. Tamamori-Adachi, M., Takagi, H., Hashimoto, K., Goto, K., Hidaka, T., Koshimizu, U., Yamada, K., Goto, I., Maejima, Y., Isobe, M., Nakayama, K. I., Inomata, N., Kitajima, S.: Cardiomyocyte proliferation and protection against post-myocardial infarction heart failure by cyclin D1 and Skp2 ubiquitin ligase. *Cardiovasc. Res.*, 80: 181-190 (2008).
 16. Minhajuddin, M., Bijli, K. M., Fazal, F., Sassano, A., Nakayama, K. I., Hay, N., Plataniias, L. C., Rahman, A.: Protein kinase C δ and PI3-kinase/Akt activate mammalian target of rapamycin to modulate NF- κ B activation and ICAM-1 expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 284: 4052-4061 (2009).
 17. Mitra, P., Ghule, P. N., van der Deen, M., Medina, R., Xie, R. L., Holmes, W. F., Ye, X., Nakayama, K. I., Harper, J. W., Stein, J. L., Stein, G. S., van Wijnen, A. J.: CDK inhibitors selectively diminish cell cycle controlled activation of the histone H4 gene promoter by p220(NPAT) and HiNF-P. *J. Cell Physiol.*, 219: 438-448 (2009).
 18. Tsukuba, T., Yanagawa, M., Okamoto, K., Okamoto, Y., Yasuda, Y., Nakayama, K. I., Kadowaki, T., Yamamoto, K.: Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in several cell-surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages. *J. Biochem.*, in press. (2009).
 19. Lu, Y., Adegoke, O. A., Nepveu, A., Nakayama, K. I., Bedard, N., Cheng, D., Peng, J., Wing, S. S.: USP19 deubiquitinating enzyme supports cell proliferation by stabilizing KPC1, a ubiquitin ligase for p27Kip1. *Mol. Cell Biol.*, 29: 547-558 (2009).
 20. Nishiyama, M., Oshikawa, K., Tsukada, Y., Nakagawa, T., Iemura, S., Natsume, T., Fan, Y., Kikuchi, A., Skoultchi, A. I., Nakayama, K. I.: CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.*, 11: 172-182 (2009).
 21. Minhajuddin, M., Bijli, K. M., Fazal, F., Sassano, A., Nakayama, K. I., Hay, N., Plataniias, L. C., Rahman, A.: Protein kinase C- δ and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activate mammalian target of rapamycin to modulate NF- κ B activation and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 284: 4052-4061 (2009).
 22. Endo, A., Matsumoto, M., Inada, T., Yamamoto, A., Nakayama, K. I., Kitamura, N., Komada, M.: Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36. *J. Cell Sci.*, 122: 678-686 (2009).
 23. Susaki, E., Nakayama, K., Yamasaki, L., Nakayama, K. I.: Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, in press. (2009).
2. 学会発表
 1. Nakayama, K.I.: Epigenetic control of p53 function by CHD8 through recruitment of histone H1. *The Third International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest Under Stress*. (Invited speaker) Onna, Okinawa, Japan. 4/9 (2008).
 2. Ishikawa, Y., Onoyama, I., Okuyama, R., Nakayama, K.I., Nakayama, K.: Differential specificity of substrate accumulation in ubiquitin ligase SCF^{Fbxw7} deficient fibroblasts and keratinocytes. *Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle"*. Cold Spring Harbor, NY. 5/15 (2008).
 3. Susaki, E., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: A p27-p57 knock-in mouse model uncovers common and specific roles of p27 and p57. *Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle"*. Cold Spring Harbor, NY. 5/16 (2008).
 4. Nishiyama, M., Tsukada, Y.-i., Oshikawa, K., Nakagawa, T., Nakayama, K.I.: Epigenetic control of p53 function by CHD8 through recruitment of histone H1. *Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle"*. Cold Spring Harbor, NY. 5/16 (2008).
 5. Matsumoto, A., Onoyama, I., Matsuoka, S., Oike, Y., Suda, T., Nakayama, K.I.: Fbxw7 is essential for G0 maintenance and functions of the stem cells. *Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle"*. Cold Spring Harbor, NY. 5/16 (2008).

6. Matsumoto, M., Oyamada, K., Nakayama, K.I.: A global map of mitotic phosphoproteome uncovers unexpected signaling pathways in mitosis. *Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle"*. Cold Spring Harbor, NY. 5/16 (2008).
7. Nakayama, K.I., Onoyama, I., Tsunematsu, R., Matsumoto, A., Nakayama, K.: Conditional inactivation of Fbxw7 results in a defect in cell cycle exit and tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle"*. (Invited speaker) Cold Spring Harbor, NY. 5/18 (2008).
8. 中山敬一: 細胞周期とアポトーシスを結ぶ p53 制御の新機構: CHD8/ヒストン H1 によるエピジェネティックコントロール. *第72回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム*. (シンポジウム) 岐阜. 5/24 (2008).
9. 白根道子, 中山敬一: Protrudin ノックアウトマウスにおける痙性麻痺とスフィンゴ脂質結合による神経グリア相互作用への関与. *第60回日本細胞生物学会大会*. (ミニシンポジウム) 横浜. 6/29 (2008).
10. 中山敬一, 白根道子: プロトルーディンは Rab11-GDP に結合し、特定の方向へ向かう膜輸送により神経突起形成を起こす. *第60回日本細胞生物学会大会*. (ワークショップ) 横浜. 6/30 (2008).
11. 中山敬一: 細胞周期と癌. *第19回日本消化器癌発生学会総会*. (教育講演) 別府. 8/29 (2008).
12. 中山敬一: ノックアウトマウスを用いた細胞周期研究: 癌の本質を探る. *第22回モロシヌス研究会*. (招待講演) 東京. 9/12 (2008).
13. Nakayama, K.I.: Cell cycle control during T-cell development. *Japan-German Immunology Seminar "International Conference on Immune Regulation in Health and Disease"*. (Invited speaker) Fukuoka. 11/5 (2008).
14. Nakayama, K.I.: Two ubiquitin ligases control cell cycle in stem, progenitor, and differentiated cells. *The 2nd Global COE International Symposium joint with the 18th Hot Spring Harbor Symposium of Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University "Stem Cells and Regenerative Medicine"*. (Invited speaker) Fukuoka. 11/9 (2008).
15. Nakayama, K.I.: Two F-box proteins Skp2 and Fbw7 control cell cycle exit and re-entry. *ZOMES V: The Fifth International Symposium on the COP9 signalosome, Proteasome, and eIF3: At the interface between signaling & proteolysis*. (Invited speaker) Yokohama. 11/12 (2008).
16. 松本有樹修, 洲崎悦生, 小野山一郎, 中山敬一: 細胞周期ブレーキ因子 p53 は小脳形成に必須の役割を担う: p53 コンディショナルノックアウトマウスからの知見. *第31回日本分子生物学会年会*. (一般口頭発表) 神戸. 12/9 (2008).
17. 山田真生, 田中正和, 中山啓子, 中山敬一, 藤澤順一, 三輪正直: DNA 損傷による中心体増幅を起こす経路の特定. *第31回日本分子生物学会年会*. 神戸. 12/9 (2008).
18. 細田將太郎, 白根道子, 中山敬一: Protrudin の効果的な突起伸長作用には VAMP-associated protein (VAP)が必要である. *第31回日本分子生物学会年会*. (一般口頭発表) 神戸. 12/10 (2008).
19. 雑賀徹, 多田敬典, 岡野栄之, 中山敬一: 新規ユビキチン化酵素複合体 Fbxo45-PAM は神経発達に重要な役割を果たす. *第31回日本分子生物学会年会*. 神戸. 12/10 (2008).
20. 山田政典, 小野山一郎, 恒松良祐, 中山敬一: ユビキチン-プロテアソーム系によるサイクリン D1 の分解における SCF 複合体の機能解析. *第31回日本分子生物学会年会*. 神戸. 12/10 (2008).
21. 石川善則, 奥山隆平, 小野山一郎, 青山慧, 中山敬一, 中山啓子: ユビキチンリガーゼ SCF は表皮角化細胞において増殖と分化を抑制する. *第31回日本分子生物学会年会*. 神戸. 12/10 (2008).
22. 押川清孝, 中川直, 松本雅記, 中山敬一: ユビキチンリガーゼ欠損マウスを用いたユビキチン化標的タンパク質同定法の構築. *第31回日本分子生物学会年会*. 神戸. 12/11 (2008).
23. 遠藤彬則, 山本章嗣, 松本雅記, 中山敬一, 稲田利文, 喜多村直実, 駒田雅之: 脱ユビキチン化酵素 USP36 による核小体機能の制御. *第31回日本分子生物学会年会*. 神戸. 12/11 (2008).
24. 青山慧, 石川善則, 小野山一郎, 中山敬一, 中山啓子: ユビキチンリガーゼ SCF/Fbxw7 は B リン