

chemoresistance in clear cell carcinoma of the ovary. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**, 963-971 (2010).

G-2. 学会発表

1. Matsuzaki, S., Serada, S. & Naka, T.:
Expression of annexin A4 at endometrial cancer and relation to carboplatin sensitivity., 35th European Society for Medical Oncology (ESMO) Congress, Milan (Italy), Oct., 2010.
2. Matsuzaki, S., Serada, S., Kim, A., Yokoyama, T., Miyatake, T., Ueda, Y., Fujita, M., Enomoto, T., Kimura, T. & Naka, T.:
Expression of annexin A4 at endometrial cancer and relation to carboplatin sensitivity., 第69回日本癌学会総会, 大阪, 2010年9月.
3. Serada, S., Fujimoto, M., Terabe, F., Nishikawa, T., Kishimoto, T. & Naka, T.:
Leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) is a novel biomarker for monitoring disease activity during therapy in patients with inflammatory autoimmune disease., 第14回国際免疫会議, 神戸, 2010年8月.
4. 世良田聡、藤本稔、寺部文隆、西川哲平、仲哲治: 自己免疫疾患の新規活動性マーカーとしての leucine rich alpha 2 glycoprotein: Proteomics-based identification of leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel biomarker associated with disease activity of inflammatory autoimmune disorders., 第8回日本プロテオーム学会, 浦安, 2010年7月.
5. Umegaki, N., Tamai, K., Nimura, K., Serada, S., Naka, T., Yamazaki, T., Nakano, H., Kaneda, Y. & Katayama, I.: Investigation of roles and molecular mechanisms of karyopherin alpha2 in keratinocyte proliferative disorders., European Society for Dermatological Research, Helsinki (Finland), Sept., 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.

発明の名称: 創傷治癒剤

出願番号: 特願 2010-151139 号

出願日: 2010年7月1日

発明者 (敬称略): 寿 順久、世良田聡、仲哲治

出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

2.

名称: 血管新生誘導分子

発明者: 仲哲治、世良田聡

出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類: 特許権

番号: 特願 2009-275254

出願年月日: 2009年12月3日

Table 1 List of differentially expressed proteins comparing baseline (pre) or HC with 12 weeks treatment (post)

No	Accession	Protein name	Pre/post	HC/post	
1	IP00027389.1	Proteins upregulated in baseline compared with 12 weeks after treatment	8.83	1.06	
2	IP00045247.6	Isoform 1 of C-reactive protein precursor	1.77	0.71	
3	IP00045247.6	Factor H	4.47	0.75	
4	IP00164623.4	IgH1 kappa protein (immunoglobulin heavy chain 1)	4.10	0.79	
5	IP00021204.1	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	3.95	0.52	
6	IP00004550.5	Keratin-24	3.91	0.86	
7	IP00022471.4	Lactate-rich α_2 -glycoprotein precursor	3.89	0.68	
8	IP00552975.2	Serum amyloid A protein precursor	3.84	0.77	
9	IP00000653.3	Keratin type I cytoskeletal 1	3.33	0.54	
10	IP00000653.3	Keratin type II cytoskeletal 2	2.89	0.96	
11	IP00009865.1	Keratin, type I cytoskeletal 10	2.79	0.86	
12	IP00006859.2	Keratin-75	2.78	0.93	
13	IP00020277.3	Keratin, type II cytoskeletal 1	2.22	1.08	
14	IP00020277.3	Keratin, type II cytoskeletal 5	2.22	0.79	
15	IP00027462.2	Protein S100A9	2.08	0.56	
16	IP00025426.1	Pregnancy zone protein precursor	2.01	0.61	
17	IP00032311.4	Lipopolysaccharide-binding protein precursor	1.98	1.15	
18	IP00007047.1	Protein S100 A8	1.94	0.20	
19	IP00019358.3	Keratin, type I cytoskeletal 9	1.84	1.27	
20	IP00020277.3	Growth-inhibiting 1 inhibitor precursor	1.84	0.84	
21	IP00028186.5	Protein S100A9	1.78	0.57	
22	IP00028413.7	Inhib- α -myosin inhibitor heavy chain IQ precursor	1.75	2.04	
23	IP00022395.1	Complement component C9 precursor	1.72	0.90	
24	IP0004652095.1	Trisphosphate isomerase 1 variant	1.72	0.55	
25	IP000431656.4	Isoform 2 of α_2 -antitrypsin/lysozyme precursor	1.67	0.92	
26	IP00021584.1	Protein S100A9	1.63	0.80	
27	IP00021584.1	Isoform 1 of histone H4.1	1.53	3.80	
28	IP000219077.4	Isoform 1 of heparanase A.1 hydrolase	1.53	0.74	
29	IP000104971.5	Plastin-2	1.51	0.90	
30	IP000216773.4	AI1 B protein	1.51	1.84	
31	IP000752483.11	Calmodulin	1.50	0.19	
32	IP000307359.1	Acylproteinase M	0.43	1.25	
33	IP002162971.11	4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0.43	2.89	
34	IP00216732.3	Serum keratohyalinase/lysozyme 1	0.41	0.66	
35	IP00021684.1	Acylproteinase M	0.41	0.66	
36	IP0021684.1	Acylproteinase F	0.36	2.79	
37	IP00186903.3	Isoform 2 of apolipoprotein-L1 precursor	0.33	0.62	
38	IP00299779.2	Serum keratohyalinase/lysozyme 3	0.29	0.46	
39	IP00021684.1	Apolipoprotein A-I precursor	0.28	0.68	
40	IP0021684.1	Apolipoprotein A-II precursor	0.28	0.78	
	No	Accession	Protein name	Pre/post	HC/post
	1	IP00027389.1	Proteins downregulated in baseline compared with 12 weeks after treatment	0.67	1.27
	2	IP00022333.3	4S UDA protein	0.67	0.75
	3	IP00002745.1	Cathepsin Z precursor	0.67	0.79
	4	IP00038168.1	Isoform 1 of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	0.67	0.90
	5	IP00032203.3	Acylproteinase precursor	0.66	1.35
	6	IP00021817.1	Vitamin K-dependent protein C precursor	0.66	0.62
	7	IP00218795.1	L-lectin precursor	0.66	0.73
	8	IP00029207.4	Isoform 1 of sex hormones-binding globulin precursor	0.65	0.85
	9	IP0029207.4	Protein S100A9 with activating component of the proreceptor precursor	0.65	0.65
	10	IP00215983.3	Carboxic anhydrase 1	0.64	1.28
	11	IP00016103.3	Coilin sub-family member 1 isoform A	0.61	0.83
	12	IP00016103.3	Coilin sub-family member 1 isoform B	0.61	0.81
	13	IP000384290.5	Protein S100A9	0.61	1.12
	14	IP000328555.2	Protein S100A9	0.61	1.28
	15	IP000328555.2	Isoform A of coagulation factor VII precursor	0.61	1.28
	16	IP00021868.2	Seroprotein P precursor	0.58	1.08
	17	IP00048593.1	Bloom syndrome protein	0.58	0.73
	18	IP00022731.1	Apolipoprotein C-II precursor	0.57	5.58
	19	IP00010144.4	PTC and LIM domain protein 1	0.56	0.13
	20	IP00010144.4	PTC and LIM domain protein 2	0.56	0.13
	21	IP00168913.1	Isoform 2 of fibrin	0.55	0.85
	22	IP00015525.1	Mullerin-2 precursor	0.54	1.46
	23	IP00021685.3	Apolipoprotein C-I precursor	0.52	4.51
	24	IP00015525.1	Protein S100A9	0.52	0.52
	25	IP00011689.3	Phlebotomy/cholesterol acyltransferase precursor	0.51	1.75
	26	IP00022331.1	Phlebotomy/cholesterol acyltransferase precursor	0.51	0.72
	27	IP000003974.1	Protein S100A9	0.49	1.91
	28	IP00029455.3	Protein S100A9 with activating component of the proreceptor precursor	0.48	0.62
	29	IP000216910.1	Isoform 1 of interferon-1 receptor accessory protein	0.48	1.62
	30	IP00031785.1	Isoform 1 of interferon-1 receptor accessory protein	0.45	0.59
	31	IP000307359.1	Acylproteinase M	0.43	1.25
	32	IP002162971.11	4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0.43	2.89
	33	IP00216732.3	Serum keratohyalinase/lysozyme 1	0.41	0.66
	34	IP00021684.1	Acylproteinase M	0.41	0.66
	35	IP00021684.1	Acylproteinase F	0.36	2.79
	36	IP00186903.3	Isoform 2 of apolipoprotein-L1 precursor	0.33	0.62
	37	IP00299779.2	Serum keratohyalinase/lysozyme 3	0.29	0.46
	38	IP00021684.1	Apolipoprotein A-I precursor	0.28	0.68
	39	IP0021684.1	Apolipoprotein A-II precursor	0.28	0.78

表1 ITRAQ法による抗TNF- α 阻害抗体投与前後の関節リウマチ患者血清タンパク質の定量的発現解析

ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質解析技術の開発と
バイオマーカー探索への応用

分担研究者 中山敬一 九州大学生体防御医学研究所 主幹教授

研究要旨

有用なバイオマーカーの探索は、検体試料からいかに多くのタンパク質を同定・定量できる技術を開発するかという点にかかっているとと言っても過言ではない。従来型の探索ベースの質量分析を基盤としたプロテオミクスアプローチは現実的には網羅性が低く、定量性に関しても精度が低いという問題を内包していた。われわれは従来バリデーションベースに使用されているターゲットプロテオミクスの代表的な方法である Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を用いて網羅的・高感度にタンパク質を定量するストリームラインの開発を目指して基礎研究を行っている。本年度はMRM法をプロテオームワイドに行うため、全てのタンパク質に対する座標決定取得のための基盤整備を行った。これは将来的にバイオマーカー探索のための巨大な知識基盤となる重要な集積情報である。

A. 研究目的

近年、ゲノム情報の解明を背景に、トランスクリプトーム解析に代表される網羅的解析が盛んに行われ、様々な生命現象をシステムとして理解する試みがなされている。中でも生命現象と直接的に結び付くタンパク質の量的・質的变化をグローバルにとらえるプロテオーム解析の重要性は明白であり、ゲノム情報の整備と質量分析計の高感度化を追い風に、プロテオーム解析への期待が過熱している。プロテオーム解析によってタンパク質の時空間的発現情報のみならず、タンパク質の相互作用や翻訳後修飾情報などの多次元情報を取得することが可能である。ところがこの中でもっとも本質的で重要なタンパク質発現情報の取得に関しては、他に比べて極端に発展途上であり、これを可能にする画期的な技術の開発が渴望されている。

LC-MS/MS解析によるショットガン定量プロテオミクスは基本的にデータ依存的な自動MS/MS解析によっているため、何か意味のあるものが偶然“見つかる”ことを期待しつつ兎に角たくさんのタンパク質を同定し比較する方法である。確かにこの方法である程度の網羅性を得ることが可能であるが、ショットガン法の技術的な問題は、網羅性を上げるためには試料の分画を必要とするため、網羅性とスループット

が完全にトレードオフの関係にあることである。また、偶然に任せている以上、検出されなかったものが、本当は発現しているのにたまたま同定できなかったのか、検出感度以下しか発現していないのかわからないという問題点を内包する。つまりショットガン解析では定量情報はあくまで同定結果に付随して得られるものであり、同定できなければ変動していたのかを知ることはできない。

そこでわれわれは、従来のディスカバリーアプローチから、ターゲットアプローチとして最近注目を集めているMRM (Multiple reaction monitoring)[あるいはSRM (Selected reaction monitoring)]とも呼ばれる]への転換を考えた。MRMは三連四重極型質量分析計の定量用測定モードであり、少数の検体のバリデーションには適するが、多くのタンパク質を網羅的に同定・定量することは本質的に難しいとされてきた。われわれの研究はこの障壁を乗り越えて、抜本的にMRMを改良し、将来的に大深度プロテオミクス（ディープ・プロテオミクス）を達成することによって、新たなバイオマーカー探索の時代を築くことを目的とする。

本年度は特に全てのヒトタンパク質の絶対定量を目標に、全てのタンパク質の座標情報を取得するため、全てのタンパク質の試験管内合成

に関するストリームラインの整備を行い、大規模情報のデータベースを構築することを目標とした。

B. 研究方法

MRM法はQ1にてプリカーサーイオンの選択、Q2にてCIDによる開裂、Q3にてプロダクトイオンを選択・検出する(このとき設定したQ1/Q3の組み合わせをtransitionと呼ぶ)。したがって、MRM法では測定したいペプチドの質量とその部分質量を前もって知っておく必要がある。これにはショットガン解析において得られるMS/MSスペクトルが利用される。つまり、代表的な試料でショットガン解析を行うことで候補ペプチドを同定し、このペプチドに対するtransitionを設定することで様々な試料中のペプチドの定量を行うことになる。MRM法は感度が高いことと、三連四重極型の質量分析計を用いるためダイナミックレンジが広いことが最大の利点であるが、近年では高感度化に伴い一つのtransitionの取得時間が短縮されたことで一度のLCで解析できるtransition数が数千まで増えているおり、大規模な解析にも利用可能な新技術として注目されている。

そこで平成22年度は、完全長ヒトcDNAライブラリーよりロボット技術を用いて全てのタンパク質をコムギ胚芽抽出液中で試験管内翻訳を行い、それをトリプシン消化することによってペプチドライブラリーを構築した。またその人工合成タンパク質の大規模な電気泳動法の確立と定量法の開発も併せて行った。具体的な方法は下記の通りである。

1) タンパク質の可溶化

完全長ヒトcDNAライブラリーよりロボット技術を用いて全てのタンパク質をコムギ胚芽抽出液中で試験管内翻訳を行い、タンパク質試料を調製する。目的の試料に応じて各種タンパク質抽出法が利用できる。タンパク質抽出物にプロテアーゼ阻害剤や界面活性剤はTCA沈殿法やアセトン沈殿法、あるいはメタノール・クロロフォルム法などによって必ず除去する必要がある。得られたタンパク質沈殿物は7Mグアニジン塩酸塩などのカオトロピック試薬を含むiTRAQ/mTRAQバッファー(TRAQ-G液:できるだけ少量)に溶かす。塊がないか確認し、必

要に応じてバス式のソニケーションによってほぐす。BCA法によってタンパク質定量を行い、100 µg相当を新たなチューブに移し、TRAQ-G液で総量を30 µlに揃える。タンパク質試料を100°Cにて15 min加熱する。

2) 酵素消化と還元アルキル化

水上で3倍量の蒸留水を加え、1 µgのLys-Cを添加し、37°Cにて一晚インキュベーションを行う。最終濃度2.5 mM TCEP存在下で、65°Cで30 minインキュベーション後、室温に戻してから15 mMヨードアセトアミド存在下で室温、30 minインキュベーション。等量の蒸留水を加え、ボルテックス後、1 µg相当のtrypsinを加え、37°Cにて一晚インキュベーションを行う。酵素消化後は-80°Cにて凍結後、凍結乾燥を行う。凍結乾燥前あるいは後で冷凍保存可能。

3) mTRAQ 標識

凍結乾燥済みペプチドに15 µlの蒸留水を加え、ボルテックス後、短時間遠心。溶け残りが無いことを確認する。50 µlのイソプロパノールを添加し、よく混和してから1 unit(通常20 µl程度)のmTRAQ113を加え、ボルテックス後、短時間遠心しすべての溶液をチューブ底に集める。室温にて2 hインキュベーション。蒸留水200 µlを加え、室温で30 min放置。終濃度0.5%となるようTFAを加える。この時点で、内部標準用ペプチド(mTRAQ117で標識済み)を加え、遠心濃縮。500 µlの0.5% TFA/2% アセトニトリルに再溶解後、SepPAK(50 mg)を用いて脱塩処理を行い、再び遠心濃縮。発現量が少ないタンパク質を検出するためには若干の分量が必要になることもある。われわれは液相等電点分画法を利用している。

C. 研究結果

われわれは完全長ヒトcDNAライブラリーよりロボット技術を用いて全てのタンパク質をコムギ胚芽抽出液中で試験管内翻訳を行ってリコンビナントタンパク質を作製し、次にこれを液相等電点電気泳動(OFFGELシステム)で分離した後、リテンションタイムマーカースと共に逆相クロマトグラフィーにかけて、各タンパク質に対するPTP(Proteotypic Peptide)をLC-MS/MSによって決定した。この事前情報に基づき、試料とリコンビナントタンパク質を

mTRAQ ラベルして MRM の transition を組み、MRM で得られたクロマトグラムを基に各タンパク質の絶対定量を行った。

D. 考察

本来 MRM 法は特定タンパク質の定量に効力を発揮するものの、多くの試料の同時測定には不向きと考えられてきた。それは MRM 解析の際に、内部標準となる濃度既知の対照が必要だからである。そこでわれわれは全てのヒトタンパク質を試験管内合成すれば、基本的に全てのタンパク質の絶対量を MRM 法によって知ることができると考えた。そのため今年度は完全長ヒト cDNA ライブラリーよりロボット技術を用いて全てのタンパク質をコムギ胚芽抽出液中で試験管内翻訳を行ってリコンビナントタンパク質を作製し、それを用いて大規模 MRM 解析が可能であることを実証した。今後、複雑な試料へ対応を想定した装置の開発やアプリケーションの開発によって MRM 法が実用レベル（現時点でもある意味実用レベルではあるが、プロテオーム解析での真の実用化を意味する）に到達した際には、基礎生命科学はもとより臨床医学における診断や予後判定等に利用され、タンパク質に関する研究法にパラダイムシフトが起きることは必至であろう。われわれは、プロテオーム解析における MRM 法を実用化するために、前処理法の開発やイオン源の改良などを日々行っており、必ず近い将来 MRM 法をベースとしたディーブ・プロテオーム解析が可能になると信じている。

E. 結論

ターゲットプロテオミクスの一方法である MRM 法を用いて大規模解析を行うため、完全長ヒト cDNA ライブラリーよりロボット技術を用いて全てのタンパク質をコムギ胚芽抽出液中で試験管内翻訳を行ってリコンビナントタンパク質を作製し、それを用いて大規模 MRM 解析が可能であることを実証した。この成果を応用して、次年度以降は多数の検体から同時に多くの定量情報を得るための実用的な検討に入る予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Chan, C.H., Lee, S.W., Li, C.F., Wang, J., Yang, W.L., Wu, C.Y., Wu, J., Nakayama, K.I., Kang, H.Y., Huang, H.Y., Hung, M.C., Pandolfi, P.P. & Lin, H.K. Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nature Cell Biol.* **12**, 457-467 (2010).
2. Susaki, E., Kaneko-Oshikawa, C., Miyata, K., Tabata, M., Yamada, T., Oike, Y., Katagiri, H. & Nakayama, K.I. Increased E4 activity in mice leads to ubiquitin-containing aggregates and degeneration of hypothalamic neurons resulting in obesity. *J. Biol. Chem.* **285**, 15538-15547 (2010).
3. Iwatsuki, M., Mimori, K., Ishii, H., Yokobori, T., Takatsuno, Y., Sato, T., Toh, H., Onoyama, I., Nakayama, K.I., Baba, H. & Mori, M. Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance. *Int. J. Cancer* **126**, 1828-1837 (2010).
4. Ohzono, C., Etoh, S., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Hirota, Y., Tanaka, Y. & Fujita, H. Nedd4-interacting protein 2, a short half-life membrane protein degraded in lysosomes, negatively controls down-regulation of connexin43. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 951-957 (2010).
5. Hatano, A., Matsumoto, M., Higashinakagawa, T. & Nakayama, K.I. Phosphorylation of the chromodomain changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **397**, 93-99 (2010).
6. Mizokami, A., Tanaka, H., Ishibashi, H., Umebayashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, K.I., Yokoyama, T., Nabekura, J., Kanematsu, T. & Hirata, M. GABA(A) receptor subunit alteration-dependent diazepam insensitivity in the cerebellum of

- phospholipase C-related inactive protein knockout mice. *J. Neurochem.* **114**, 302-310 (2010).
7. Okumura, F., Matsunaga, Y., Katayama, Y., Nakayama, K.I. & Hatakeyama, S. TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. *J. Cell Sci.* **123**, 2238-2245 (2010).
 8. Ma, H., Yu, L., Byra, E.A., Hu, N., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Kawamoto, T. & Ren, J. Aldehyde dehydrogenase 2 knockout accentuates ethanol-induced cardiac depression: role of protein phosphatases. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 322-329 (2010).
 9. Benirschke, R.C., Thompson, J.R., Nomine, Y., Wasielewski, E., Juranic, N., Macura, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Botuyan, M.V. & Mer, G. Molecular basis for the association of human E4B U box ubiquitin ligase with E2-conjugating enzymes UbcH5c and Ubc4. *Structure* **18**, 955-965 (2010).
 10. Tsukada, Y. & Nakayama, K.I. In vitro histone demethylase assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, pdb prot5512 (2010).
 11. Takeda, H., Kawamura, Y., Miura, A., Mori, M., Wakamatsu, A., Yamamoto, J., Isogai, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Natsume, T., Nomura, N. & Goshima, N. Comparative analysis of human SRC-family kinase substrate specificity in vitro. *J. Proteome Res.* **9**, 5982-5993 (2010).
 12. Hayakawa, H., Fujikane, A., Ito, R., Matsumoto, M., Nakayama, K.I. & Sekiguchi, M. Human proteins that specifically bind to 8-oxoguanine-containing RNA and their responses to oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **403**, 220-224 (2010).
 13. Katagiri, K., Ueda, Y., Tomiyama, T., Yasuda, K., Toda, Y., Ikehara, S., Nakayama, K.I. & Kinashi, T. Deficiency of Rap1-binding protein RAPL causes lymphoproliferative disorders through mislocalization of p27kip1. *Immunity* **34**, 24-38 (2011).
 14. Onoyama, I., Suzuki, A., Matsumoto, A., Tomita, K., Katagiri, H., Oike, Y., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. *J. Clin. Invest.* **121**, 342-354 (2011).
 15. Lu, C., Huang, X., Zhang, X., Roensch, K., Cao, Q., Nakayama, K.I., Blazar, B.R., Zeng, Y. & Zhou, X. MiR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1 and SOCS-1. *Blood* **117**, 4293-4303 (2011).
 16. Iriuchishima, H., Takubo, K., Matsuoka, S., Onoyama, I., Nakayama, K.I., Nojima, Y. & Suda, T. Ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells by quiescence induction through Fbxw7 α : overexpression. *Blood* **117**, 2373-2377 (2011).
 17. Fotovati, A., Abu-Ali, S., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Impaired ovarian development and reduced fertility in female mice deficient in Skp2. *J. Anat.* **218**, 668-677 (2011).
 18. Inoue, S.I., Matsushita, T., Tomokiyo, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kinoshita, T. & Shimazaki, K.I. Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* (2011).
 19. Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R.S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A.W., Xiao, Y., Christie, A.L., Aster, J., Settleman, J., Gygi, S.P., Kung, A.L., Look, T., Nakayama, K.I., DePinho, R.A. & Wei, W. SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* **471**, 104-109 (2011).
 20. Wu, H., Pomeroy, S.L., Ferreira, M., Teider, N., Mariani, J., Nakayama, K.I.,

- Hatakeyama, S., Tron, V.A., Saltibus, L.F., Spyropoulos, L. & Leng, R.P. UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor suppressor p53. *Nature Med.* **17**, 347-355 (2011).
21. Tachiyama, R., Ishikawa, D., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Yoshimori, T., Yokota, S., Himeno, M., Tanaka, Y. & Fujita, H. Proteome of ubiquitin/MVB pathway: possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation. *Genes Cells* **16**, 448-466 (2011).
 22. Matsumoto, A., Tateishi, Y., Onoyama, I., Okita, Y., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Fbxw7beta resides in the endoplasmic reticulum membrane and protects cells from oxidative stress. *Cancer Sci.* **102**, 749-755 (2011).
 23. Rodriguez, S., Wang, L., Mumaw, C., Srour, E.F., Celso, C.L., Nakayama, K.I. & Carlesso, N. The SKP2 E3 Ligase regulates basal homeostasis and stress-induced regeneration of hematopoietic stem cells. *Blood* in press. (2011).
 24. Matsumoto, A., Onoyama, I., Sunabori, T., Kageyama, R., Okano, H. & Nakayama, K.I. Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of stemness and neuronal-glia differentiation in neural stem cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 13754-13764 (2011).
 25. Sistrunk, h., Macias, E., Nakayama, K.I., Kim, Y. & Rodriguez-Puebla, M.L. Skp2 is necessary for Myc-induced keratinocyte proliferation but dispensable for Myc oncogenic activity in the oral epithelium. *Am. J. Pathol.* in press. (2011).
- G-2. 学会発表**
1. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学の新天地: もうウェスタンブロットィングは要らない?! , 第 74 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(招待講演), 名古屋, 2010 年 5 月.
 2. 中山敬一: ユビキチンシステムの網羅的解析基盤の創出, 戦略的創造研究推進事業 (CREST) 「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域・平成 22 年度公開シンポジウム(シンポジウム), 東京, 2010 年 6 月.
 3. 中山敬一: プロテオミクスを用いた酵素-基質関係の網羅的解明: ターゲットプロテオミクスの現状と将来, 日本プロテオーム学会 2010 年会.(招待講演) 浦安, 2010 年 7 月.
 4. Nakayama, K.I., Yumimoto, K., Matsumoto, M.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by proteomics: Say good-bye to western blotting., 6th Global-COE International Symposium: New Horizons for Modern Science - Biology and Medicine at the Crossroads (Invited speaker), Fukuoka, Aug., 2010.
 5. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学の新天地: もうウェスタンブロットィングは要らない?! , Neuro 2010 (シンポジウム), 神戸, 2010 年 9 月.
 6. 久家貴寿, 松下一之, 野村文夫, 松原久裕, 中山敬一, 朝長毅: 大腸癌の大規模リン酸化プロテオーム解析, 第 69 回日本癌学会学術総会, 神戸, 2010 年 9 月.
 7. 中山敬一: 次世代プロテオミクスの現状と将来: もうウェスタンブロットィングは要らない?! , 第 69 回日本癌学会学術総会 (モーニングレクチャー), 神戸, 2010 年 9 月.
 8. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く新時代の医学生物学: もうウェスタンブロットィングは要らない?! , RNA フロンティアミーティング 2010 (特別講演), 裾野, 2010 年 9 月.
 9. Nakayama, K.I.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship in ubiquitylation by differential proteomics: Say good-bye to western blotting., MEXT Priority Research Project "Cell Proliferation Control" International Symposium "Cell Cycle and Cell Differentiation: From A to Z" (Invited speaker), Nagoya, Oct., 2010.

10. 諸石寿朗, 西山正章, 岩井一宏, 中山敬一: ディファレンシャル・プロテオミクス技術を用いた鉄代謝制御ユビキチンリガーゼ Fbx15 の網羅的基質探索と個体における機能解析, 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月.
11. 西山正章, 中山敬一: 発生過程におけるアポトーシスの新しい制御機構: クロマチンリモデリングによる p53 のエピジェネティックコントロール, 第 33 回日本分子生物学会年会(ワークショップ), 神戸, 2010 年 12 月.
12. Shirane, M., Nakayama, K.I.: Protrudin regulates Rab11-dependent synaptic function via interaction with sphingolipid., 第 33 回日本分子生物学会年会.(一般口頭発表), 神戸, 2010 年 12 月.
13. Hayakawa, H., Ito, R., Sekiguchi, M., Matsumoto, M., Nakayama, K.I.: Human Proteins Specifically Bound to 8-Oxoguanine-containing RNA and their Responses to Oxidative Stress., 第 33 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ), 神戸, 2010 年 12 月.
14. 蟹江共春, 小野山一郎, 松本有樹修, 立石悠基, 中山敬一: サイクリン D1 を抑制するユビキチンリガーゼの遺伝学的再検証, 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月.
15. 片山雄太, 西山正章, 中山敬一: クロマチンリモデリング因子 CHD8 の L 型アイソフォームはマウスの個体発生や細胞分化に必須である, 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月.
16. 松崎美美子, 白根道子, 松本雅記, 中山敬一: Protrudin は KIF5 のアダプタータンパク質として働き、神経機能を制御する, 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月.
17. 松本有樹修, 洲崎悦生, 小野山一郎, 星野幹雄, 中山敬一: p57 は E2F 活性を調節することにより脳発生に必須の役割担う, 第 33 回日本分子生物学会年会 (一般口頭発表), 神戸, 2010 年 12 月.
18. 村上裕輔, 岸ちひろ, 松本雅記, 中山敬一, 塩見泰史, 西谷秀男: Cdt1 の M 期安定化分子機構の解析, 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月.
19. 押川清孝, 松本雅記, 中山敬一: ユビキチン化修飾部位を網羅的に同定する方法の開発と応用, 第 33 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ), 神戸, 2010 年 12 月.
20. Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., Sata, T., Fujimoto, K., Tachiyama, R., Ishikawa, D., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Tanaka, Y.: The endosomal vesicles carrying ubiquitylated cargos selectively localizes to the cleavage furrow during cytokinesis., 第 33 回日本分子生物学会年会(一般口頭発表), 神戸, 2010 年 12 月.
21. 足立淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水崇, 松本雅記, 中山敬一, 茂木章, 井倉毅, 高田穰, 朝長毅: DNA 損傷応答ネットワークにおけるリン酸化・ユビキチン化修飾ダイナミクスのプロテオーム解析, 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月.
22. 松本雅記, 中山敬一, 五島直樹, 夏目徹: 次世代プロテオミクスを用いたヒト総プロテオームの絶対定量, 第 33 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ), 神戸, 2010 年 12 月.
23. 宗岡哲也, 坪井智広, 弓本佳苗, 中山敬一: ユビキチンリガーゼ SCFFbx13 は基質 Cry1 の結合に依存して SCF 複合体を形成する, 第 33 回日本分子生物学会年会 (一般口頭発表), 神戸, 2010 年 12 月.
24. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学の新天地: もうウェスタンブロットは要らない?! , 第 33 回日本分子生物学会年会 (パイオニアズレクチャー), 神戸, 2010 年 12 月.
25. Okumura, F., Matsunaga, Y., Katayama, Y., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S.: TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3., 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月.
26. Hatano, A., Matsumoto, M., Higashinakagawa, T., Nakayama, K.I.: Phosphorylation of the chromodomain

- changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3., 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月.
27. 鳴海良平, 久家貴寿, 松本雅記, 中山敬一, 石飛真人, 稲治英生, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長毅: 定量的リン酸化プロテオミクスによる乳癌組織の予後不良群と予後良好群の比較, 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月.
 28. 弓本佳苗, 松本雅記, 小山田浩二, 中山敬一: DiPIUS 法を用いたユビキチンリガーゼ基質の網羅的同定, 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月.
 29. 久家貴寿, 鳴海良平, 村岡賢, 足立淳, 松本雅記, 中山敬一, 松原久裕, 松下一之, 野村文夫, 長野一也, 角田慎一, 朝長毅: 大規模リン酸化プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカー探索, 第 33 回日本分子生物学会年会 (一般口頭発表), 神戸, 2010 年 12 月.
 30. 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 mTOR 下流分子の網羅的探索と機能解析, 第 33 回日本分子生物学会年会 (一般口頭発表), 神戸, 2010 年 12 月.
 31. Tateishi, Y., Matsumoto, A., Nakayama, K.I.: Generation and characterization of mice lacking all CIP/KIP CDK inhibitors., 7th Global-COE International Symposium: Cancer Stem Cells, Inflammation and Immunity. Singapore, Feb., 2011.
 32. Okita, Y., Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Nakayama, K.I.: p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells., 7th Global-COE International Symposium: Cancer Stem Cells, Inflammation and Immunity. Singapore, Feb., 2011.
 33. Muneoka, T., Tsuboi, T., Yumimoto, K., Nakayama, K.I.: Association with Cry1 is essential for Fbx13 to form SCF complex., 7th Global-COE International Symposium: Cancer Stem Cells, Inflammation and Immunity. Singapore, Feb., 2011.
 34. Matsuzaki, F., Shirane, M., Matsumoto, M., Nakayama, K.I.: Protrudin is a novel adaptor protein of KIF5 and regulates neuronal function., 7th Global-COE International Symposium: Cancer Stem Cells, Inflammation and Immunity. (Oral), Singapore, Feb., 2011.
 35. Moroishi, T., Nishiyama, M., Yumimoto, K., Matsumoto, M., Iwai, K., Nakayama, K.I.: Loss of SCFFbx15 results in deregulation of iron metabolism in mice., 7th Global-COE International Symposium: Cancer Stem Cells, Inflammation and Immunity. (Oral), Singapore, Feb., 2011.
- 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
なし

創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用

分担研究者 平野 久 横浜市立大学先端医科学研究センター センター長・
大学院生命ナノシステム科学研究科生体超分子システム科学専攻 教授

研究要旨

本年度は、iTRAQ 法を用いた標識法と Progenesis を用いた非標識法によるタンパク質同定結果の違いについて検討を行った。標識法と非標識法間で共通して検出できるタンパク質数は予想以上に少ないことがわかった。これらの方法では、試料タンパク質の分画方法が異なると共に、同じ質量分析装置ではあるがペプチド解離方法が異なる。また、iTRAQ 法では、iTRAQ 試薬がペプチドに結合している。これらの違いが両法によって共通して検出されるタンパク質数が少ない原因ではないか。従って、網羅的にタンパク質を検出するためには、両方の方法を利用することが望ましい。

一方、これまでに卵巣明細胞腺がん(CCA)では、アネキシン IV の発現が特異的に高まることを明らかにした。本年度は、CCA 特異的な ANX4 発現に重要なシスエレメントや転写因子を同定し、CCA の発症・進展に関わる特徴を明らかにしようと考えた。本年度の研究によって CCA において特異的に増加している ANX4 の発現は転写レベルで制御されており、第一イントロン内の p53 結合配列が重要であることがわかった。CCA では p53 の遺伝子変異は認められず、p53 が直接的に ANX4 遺伝子の CCA 特異的な発現を引き起こしていたことから、ANX4 遺伝子は新規 p53 標的遺伝子であることが明らかになった。

A. 研究目的

疾患プロテオーム解析では、生体や培養細胞中のタンパク質をトリプシンなどのプロテアーゼを用いて消化した後、生じたペプチド混合物をそのまま LC-MS/MS により分析 (ショットガン分析) し、疾患で特異的に発現が変動するタンパク質を検出する。このデフレンシャルディスプレイショットガン分析法には、iTRAQ 試薬などの標識試薬を用いて行う標識法と、標識試薬を使わないでショットガン分析を行い、Progenesis のようなデータ解析ソフトウェアによって比較定量解析を行う方法とがある。本年度は、iTRAQ 試薬を用いた標識法と Progenesis を用いた非標識法によるタンパク質同定結果の違いについて検討を行った。一方、前年度までに、卵巣明細胞腺がん(CCA)では、アネキシン IV の発現が特異的に高まることを明らかにした。本年度は、CCA 特異的な ANX4 発現に重要なシスエレメントや転写因子を同定することで、CCA の発症・進展に関わる分子生物学的特徴を明らかにすることを目的として研

究を行った。

B. 研究方法

1) 分析技術の検討 (iTRAQ 法と非標識法による疾患関連タンパク質の検出)

1.1) 質量分析

液体クロマトグラフィーについては、Ultimate nano-HPLC system を用い、Acclaim PepMap, 75 μ m \times 150mm, 3 μ m, 100 Å にてペプチドの分離を行った。液体クロマトグラフィーで分離されたペプチドは、順次エレクトロスプレーイオン化法によりイオン化し、直接質量分析を行った。質量分析には LTQ Orbitrap Velos を用いた。得られた質量データから、データベース検索ソフトウェア MASCOT を用いてタンパク質の同定を行った

1.2) 標識法と非標識法による疾患関連タンパク質の検出方法の検討

マウス血清(20 μ g)2 検体を試料とした。まず、抗体カラムを用いて含有量の多い 6 種類の血清タンパク質を除去する処理を行った。その後、

iTRAQ 法については、タンパク質をトリブシンによってペプチドに断片化し、各々の検体由来のペプチドを異なる質量レポーター部位をもつ iTRAQ 試薬で標識した。標識後、各検体由来のペプチドを混合し、強陽イオン交換カラム (HiQ sil SCX) を用いて 15 画分に分けた。そして、各画分のペプチドを質量分析装置によって測定した。得られた質量データは、Proteome Discoverer を用いた 2 検体間の相対定量解析に利用した。一方、非標識法については、タンパク質を検体毎に SDS-PAGE により分離し、分子量に応じて 6 つの画分に分けた。その後、各々の画分について、ゲル内でトリブシンを用いてペプチドに断片化した後、質量分析を行い、得られた質量データを、Progenesis ソフトウェアを用いて解析した。

2) 卵巣明細胞腺がん関連タンパク質の発現解析

2.1) 培養細胞株

CCA 由来細胞株 OVTOKO, OVISE, RMG-I, RMG-II, OVMANA, OVSAYO、そして、非 CCA 型の卵巣がん細胞株 MCAS, OVSAHO, OVKATE, RMUG-S、および他のがん組織由来の細胞株 HEK293, LNCaP を用いた。

2.2) ルシフェラーゼアッセイ

CCA 特異的な ANX4 遺伝子の発現に重要なシスエレメントを同定するためにヒトゲノム DNA から ANX4 遺伝子の転写開始点上流および下流域を PCR により増幅し、pGL3-Basic ルシフェラーゼベクターに連結した。作製したプラスミドもしくはその変異体を CCA 細胞株と非 CCA 細胞株に導入し、2 日後、ルシフェラーゼ活性により示される各領域の転写活性を比較した。

2.3) クロマチン免疫沈降

ANX4 の発現に重要なシスエレメントに対する p53 の結合を調べるために、CCA 細胞株と非 CCA 細胞株に対し ChIP-IT kit (Active Motif) を用いてクロマチン免疫沈降法を行った。各細胞株から抽出したクロマチンを DNA 分解酵素とともに 37°C、15 分間反応させ、断片化を行った。断片化したクロマチンに対し、抗 p53 抗体 (DO-1) を用いて免疫沈降を行い、同定したシスエレメントを含む領域を PCR で検出し

た。

2.4) p53 の発現抑制

p53 遺伝子を標的としたステルス siRNA を CCA 細胞に導入し、2 日後、ANX4 プロモーターベクターを導入し、24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。また、ANX4 mRNA の発現量はリアルタイム RT-PCR により測定した。

2.5) 薬剤による p53 の活性化

p53 を活性化させる薬物 (マイトマイシン C、ニュートリン 3) を LNCaP 細胞に投与し、12 時間処理を行ったときの ANX4 の発現量をリアルタイム RT-PCR、ウエスタンブロットにより測定した。

(倫理面への配慮)

提供者の同意が必要な試料は利用していない。

C. 研究結果

1) 分析技術の検討 (iTRAQ 法と非標識法による疾患関連タンパク質の検出)

iTRAQ 試薬を用いた標識法による分析では 548 個のタンパク質を、Progenesis LC-MS を用いた非標識法による分析では 1,642 個のタンパク質が検出された。両方の方法で共通して検出されたタンパク質は 305 であった。また、243 タンパク質は iTRAQ 法でのみ、1,337 タンパク質は Progenesis でのみ検出された (図 1)。

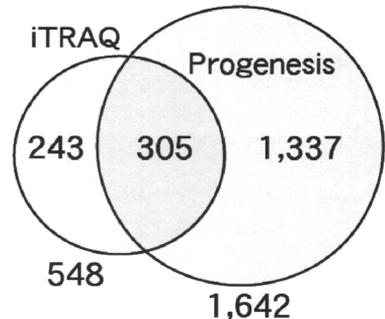


図 1 iTRAQ 法と Progenesis 法で同定されたタンパク質

305 種類のタンパク質はどちらの方法でも検出された。

2) 卵巣明細胞腺がん関連タンパク質の発現解

析

2.1) CCA 特異的な ANX4 の発現

OVISe, OVtoko, MCASにおけるANX4の発現量をウエスタンブロット法により比較したところ、ANX4の発現量はCCA由来のOVISe, OVtokoにて増加していることが確認された。さらに、リアルタイム RT-PCRにより mRNA レベルでも同様の結果が得られていることから、ANX4の発現は転写レベルで制御されていると考えられた。

2.2) ANX4 遺伝子の発現に重要な p53 結合領域の同定

CCA 細胞株および非 CCA 細胞株における ANX4 遺伝子の 5'非翻訳領域を 5'-RACE 法を用いて解析した結果、CCA および非 CCA 細胞株に発現している ANX4 遺伝子については、同じ転写開始点が使われていることが明らかになった。そこで、CCA 細胞特異的な ANX4 遺伝子の発現制御機構を解析するため、転写開始点(+1)の上流約 1.5 kb から下流 1 kb までの領域を用いてプロモーターアッセイを行った。その結果、ANX4 遺伝子の転写活性は非 CCA 細胞と比べて CCA 細胞において非常に高い値を示すことがわかった。様々な ANX4 プロモーター領域の変異体や欠損体を用いた解析から、ANX4 遺伝子上の第 1 イントロン内に存在する +180 領域には転写因子 p53 の認識配列が存在しており、本領域を欠損もしくは変異導入することで、CCA 細胞では転写活性の著しい低下が認められたが、非 CCA 細胞では変化は見られなかった。p53 に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降アッセイを行ったところ、CCA 細胞においてのみ +180 領域を含む DNA 断片が PCR で検出されたため、CCA 細胞において p53 が本領域に結合していることがわかった。次に RNA 干渉法により p53 の発現を抑制すると CCA 細胞においてのみ ANX4 遺伝子のプロモーター活性および ANX4 の mRNA の発現量が低下したため、p53 は ANX4 の発現を制御していることが明らかになった。

2.3) CCA における p53 の機能的状態

本研究で使用した卵巣がん細胞株に対し p53 遺伝子の変異の有無を調べたところ、すべての非 CCA 細胞株では p53 遺伝子の変異が検出されたのに対し、CCA 細胞株では p53 遺伝子の

変異は全く検出されなかった。ウエスタンブロット解析の結果、CCA 細胞株における p53 レベルは非 CCA 細胞株に比べて低かった。p53 標的遺伝子である MDM2、p21 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により測定した結果、非 CCA 細胞に比べ CCA 細胞でこれらの遺伝子の発現が上昇している傾向が見られた。また、野生型 p53 を持つ ANX4 の発現量が低い HEK293 細胞および LNCaP 細胞でも MDM2、p21 の mRNA 発現量は CCA に比べ低く、ANX4 の発現量と p53 機能的状態の間に相関が見られた。

2.4) 野生型 p53 による ANX4 の発現上昇

HEK293 細胞に p53 の発現プラスミドを導入すると ANX4 遺伝子のプロモーター活性および ANX4 mRNA の発現量が上昇した。さらにマイトマイシン C やニュートリン 3 で処理を行った LNCaP 細胞では p53 の活性化とともに ANX4 の発現レベルの上昇を確認することができた。この結果は、ANX4 の発現には p53 の機能的状態が重要であることを示している。

D, E. 考察及び結論

1) 分析技術の検討 (iTRAQ 法と非標識法による疾患関連タンパク質の検出)

今回の解析で、標識法と非標識法間で共通して検出できるタンパク質数は予想以上に少ないことがわかった。これらの方法では、試料タンパク質の分画方法が異なると共に、同じ LTQ Orbitrap Velos でもペプチド解離方法が異なる。また、iTRAQ 法では、iTRAQ 試薬がペプチドに結合しており、これが Progenesis 法とは異なっている。これらの違いから、両方法によって共通して検出されるタンパク質の数が少ないのではないかと考えられる。LTQ Orbitrap Velos の性能を最大限発揮させ、網羅的にタンパク質を検出するためには、両方の方法を利用することが望ましい。

2) 卵巣明細胞腺がん関連タンパク質の発現解析

ANX4 の発現量が高いことは CCA の特徴である。このことは CCA におけるユニークな分子機構により ANX4 の発現が制御されている可能性を示唆する。しかし、これまで ANX4 遺

伝子の発現制御機構については、CCAに限らず明らかにされていなかった。本研究では、*ANX4* 遺伝子の CCA 特異的な発現に重要な p53 結合領域を同定した。siRNA を用いて p53 の発現を抑制すると CCA における *ANX4* 遺伝子の転写が抑制された。また、本研究で用いたすべての CCA 細胞株においては、p53 遺伝子には変異が認められず、p21、MDM2 などの p53 標的遺伝子の発現量が他の細胞株に比べて高かった。さらに *ANX4* の発現が微弱な非 CCA 細胞株に野生型 p53 を強制発現または活性化させると *ANX4* の発現上昇が確認された。以上のことから、CCA において *ANX4* を発現上昇させている転写因子の一つが p53 であると考えられた。

CCA 細胞が特徴的に *ANX4* を発現していることから、*ANX4* は CCA の高い薬剤耐性やがんの進展などの性質に関与している可能性が推測されていた。しかし、*ANX4* 遺伝子は CCA においてがん抑制遺伝子として知られている p53 より直接的に制御されていた。一般的に、p53 は DNA 傷害などの様々なストレスにตอบสนองし、多くの遺伝子発現を制御することで細胞のがん化を抑制している。実際に、様々な組織の進行がんにおいては、p53 遺伝子の変異が高い頻度で検出される。ところが、本研究で用いたすべての CCA 細胞株では p53 遺伝子に変異は認められなかった。野生型 p53 を過剰発現させた細胞では p21 や *ANX4* の転写が上昇していたが、変異型 p53 では変化が見られなかった。従って、野生型 p53 の機能的状態が *ANX4* の発現を左右していると考えられた。実際に HEK293 細胞や LNCaP 細胞は野生型 p53 を持つが、これらの細胞においては、p21、MDM2 の mRNA レベルが低いことから p53 は活性化していないと考えられ、*ANX4* の発現も同様に非常に低いことが本研究の結果により示された。

CCA は卵巣がんの標準的治療法であるパクリタキセル・シスプラチン併用療法に対し感受性が低いため、他の組織型に比べて予後不良である。また、CCA において p53 遺伝子の変異は稀である。いくつかの研究グループが卵巣がんにおける変異型 p53 の存在と治療法との関連性を評価しており、Lavarino et al. (2000)、Ueno et al. (2006) は、野生型 p53 を持つ卵巣がん患者は変異型 p53 を持つ卵巣がん患者より

もパクリタキセル・シスプラチン併用療法に対する反応性が低いことを見だしている。また、*ANX4* は抗がん剤耐性に関与していることを示す報告もある (Han et al. 2000、Kim et al. 2009)。以上のことから p53 による *ANX4* の発現が CCA 細胞の薬剤感受性の低下を引き起こしていることが考えられた。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Akama, K., Horikoshi, T., Nakayama, T., Otsu, M., Imaizumi, N., Nakamura, M., Toda, T., Inuma, I., Hirano, H., Kondo, K., Suzuki, S. & Inoue, N. Proteomic identification of differentially expressed genes in neural stem cells and neurons differentiated from embryonic stem cells of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) in vitro. *Biophys. Biochim. Acta* **1814**, 265-276 (2011).
2. Kamita, M., Kimura, Y., Ino, Y., Kamp, R. M., Polavoda, B., Sherman, F. & Hirano, H. N^o-Acetylation of yeast ribosomal proteins: Identification by 2D-DIGE MS/MS and analysis of the effect on proteins synthesis. **74**, 431-441 (2011).
3. Kawashima, A., Tanigawa, K., Akama, T., Wu, H., Sue, M., Yoshihara, A., Ishido, Y., Kobiyama, K., Takeshita, F., Ishii, K. J., Hirano, H., Kimura, H., Sakai, T., Ishii, N. & Suzuki, K. Fragments of genomic DNA released by injured cells activate innate immunity 1 and suppress endocrine function in the thyroid. *Endocrinology* **152**, 1702-1712 (2011).
4. Masuishi, Y., Arakawa, N. & Hirano, H. Wild-type p53 enhances Annexin IV gene expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. *FEBS J.*, in press.
5. Terasawa, Y., Takata, K., Hirano, H., Kato, K., Kawahara, T., Sasakuma, T. & Sasanuma, T. Genetic variation of

- high-molecular-weight glutenin subunit composition in Asian wheat. *Genet. Resour. Crop Evol.*, **58**, 283-289, 2011.
6. Yoshizawa T., Hashimoto, H., Shimizu, T., Yamada, M., Shichijoa, N., Hanada, H., Hirano, H. & Sato, M. Purification, crystallization and initial X-ray diffraction study of basic 7S globulin from soybean. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 87-89, 2011.
 7. Cong, W., Hirose, T., Yamashita, A., Mizuno, K., Harita, Y., Hirano, H., Ohno, S. Apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) is involved in the PAR complex to regulate epithelial cell polarity. *Current Biol.*, **20**, 1408-1414 (2010).
 8. Goto, E., Yamanaka, Y., Ishikawa, A., Aoki-Kawasumi, M., Mito-Yoshida, M., Ohmura-Hoshino, M., Matsuki, Y., Kajikawa, M., Hirano, H. & Ishido, S. Contribution of K11-linked ubiquitination to MIR2-mediated MHC class I internalization. *J. Biol. Chem.* **285**, 35311-35319 (2010).
 9. Izumi, N., Yamashita, A., Iwamatsu, A., Kurata, R., Nakamura, H., Saari, B., Hirano, H., Anderson, P. & Ohno, S. AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK family and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Sci. Signal.* **3**, 1-13 (2010).
 10. Kato, Y., Kawasaki, H., Arakawa, N. & Hirano, H. Subcellular localization of the interaction of bipolar landmarks Bud8p and Bud9p with Rax2p in *Saccharomyces cerevisiae* diploid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 525-530 (2010).
 11. Kikuchi, J., Iwafune, Y., Akiyama, T., Okayama, A., Nakamura, H., Arakawa, N., Kimura, Y. & Hirano, H. Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast. *Proteomics*, **10**, 2769-2779 (2010).
 12. Kimura, Y., Nagata, K., Suzuki, N., Yokoyama, R., Yamanaka, Y., Kitamura, H., Hirano, H. & Ohara, O. Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis. *Proteomics*, **10**, 3884-3895 (2010).
- G-2. 学会発表**
1. 荒川憲昭, 森田絵理奈, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久: 卵巣明細胞腺癌のセクレトーム解析, 東京ベイホテル, 千葉, 日本プロテオーム機構・日本臨床プロテオーム研究会連合大会, 2010年7月.
 2. 荒川憲昭, 森田絵理奈, 武士田寛人, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久: 卵巣明細胞腺癌細胞株のセクレトーム解析による新規卵巣癌マーカーの探索, 第33回日本分子生物学学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
 3. Arakawa, N., Morita, E., Nomura, A., Miyagi, E., Hirahara, F., Kawasaki, H. & Hirano, H.: Secretome analysis of cell lines derived from ovarian clear cell adenocarcinoma, a highly malignant type of ovarian cancer. 9th Human Proteome Organisation World Congress, Sydney (Australia), Sept., 2010.
 4. 平間翔太, 古久保哲朗, 平野 久, 宮地寛登: Cre-lox systemを用いたタンパク質相互作用解析法の開発, 第33回日本分子生物学学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
 5. 平野 久: 育種対象としてみた塩基性7Sグロブリンの特徴, 日本育種学会, 京都, 2010年3月.
 6. 平野 久: 蛋白質の翻訳後修飾と疾患, 第8回北里疾患プロテオーム研究会, 東京, 2010年9月.
 7. 平野 久: 蛋白質ペプチドの質量分析“なにが見えるか”, 東北農業研究センターセミナー, 盛岡, 2010年11月.
 8. Hirano, H., Arakawa, N., Masuishi, Y., Morita, E., Miyagi, E. & Hirahara, F.: Proteome analysis for the discovery of biomarkers and therapeutic targets., 5th AOHUPO Congress, 14th ADNAT

Convention & 1st PSI Conference,
Hyderabad (India), Feb., 2010.

9. 平野 久, 荒川憲昭, 増石有佑, 飛田直哉, 森田絵理奈: プロテオームと質量分析, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010年6月.
10. 今泉紀明, 井沼道子, 平野 久, 中村 愛, 戸田年総, 肥後大輔, 赤間邦子: プタ精子成熟過程におけるユビキチン化タンパク質, 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
11. Ino, Y., Arakawa, N., Ishiguro, H., Uemura, H., Kubota, Y. & Hirano, H.: Proteomic analysis of androgen-independent prostate cancer cells., 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月8日.
12. Ino, Y., Okayama, A., Arakawa, N. & Hirano, H.: A novel PVDF membrane for on-membrane identification of gel-resolved proteins by MALDI MS., The 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, Uppsala, Sweden, 2010年8月.
13. 木村鮎子, 野村文子, 永田佳代子, 荒川憲昭, 平野 久: 比較リン酸化プロテオーム解析による腫瘍組織型特異的なリン酸化修飾異常蛋白質の探索, 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月10日.
14. 木村弥生, 永田佳代子, 北村 浩, 平野 久, 小原 收: ヘテロ核リボヌクレオタンパク質のモディフィコミクス, 日本プロテオーム機構・日本臨床プロテオーム研究会連合大会, 東京ベイホテル東急, 千葉, 2010年7月.
15. 木村弥生, 永田佳代子, 菅原英俊, 井野洋子, 野村文子, 小原 收, 鶴殿平一郎, 平野 久: ヒト26Sプロテアソームのリン酸化による機能調節, 日本電気泳動学会, 札幌, 2010年9月.
16. 増石有佑, 荒川憲昭, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久: アネキシンIV遺伝子のプロモーター解析から見えて卵巣明細胞腺癌の分子生物学的特徴, 日本プロテオーム機構・日本臨床プロテオーム研究会連合大会, 2010年7月.
17. 増石有佑, 荒川憲昭, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久: 卵巣明細胞腺癌におけるアネキシンIVは新規p53標的遺伝子であり抗癌剤抵抗性に関与する, 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
18. 永田佳代子, 木村弥生, 野村文子, 平野 久: 卵巣明細胞腺がんのチロシンリン酸化プロテオーム解析, 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
19. 野村文子, 荒川憲昭, 山中結子, 勝山真人, 平野 久: 血管型NADPHオキシダーゼによる標的タンパク質のレドックス制御機構の解明, 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
20. Satake, T., Hirano, H., Yamanaka, Y., Ohno, S. & Hirani, S.: Regulator mechanism of Kinesin-1 motor activity through JIP1., 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
21. Takahashi, E., Okamura, T., Hirano, H., Yasuda, K. & Kaburagi, Y.: Proteomic analysis of serum proteins in diabetic LEA/SENDAI rats., 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
22. Yoshizawa, T., Hashimoto, H, Shimizu, T., Hirano, H. & Sato, M.: Crystal structure of xyloglucan specific endo- β -1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*., 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.

H. 知的財産権の出願・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

2DICAL による微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 尾野雅哉 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨

国立がん研究センターが開発した 2DICAL を用いた疾患関連創薬バイオマーカー探索を行っている。本年度は、2DICAL をプロテオームリサーチセンターに導入し、プロテオームリサーチセンターが所有する最新の質量分析計で腎癌血漿バイオマーカー探索を行い、昨年度、国立がん研究センターで行った結果と比較解析を行った。また、すでに国立がん研究センターで試料採取が終了し、倫理審査で承認を受けた 1,000 検体以上の血液サンプルをプロテオームリサーチセンターで解析可能とするためプロテオームリサーチセンターでの倫理審査を行い、承認を得た。さらに、昨年見出した腎癌の血漿バイオマーカー候補の検証を進め、論文への投稿をおこなった。新規に前立腺癌の血漿バイオマーカー開発に着手し、バイオマーカー候補を選別した。2DICAL はその解析能力を改善し、バージョンアップに成功した。

A. 研究目的

2DICAL は国立がん研究センターが開発したプロテオーム解析技術であるが、従来では検出不能であった微量たんぱく質をプロテオームリサーチセンター、国立がん研究センターが所有する最新の質量分析計と 2DICAL を用いて解析し、多数の臨床検体からさまざまな疾患の新規バイオマーカー開発を行うことが本プロジェクトの目的である。

A. 研究方法

1. プロテオームリサーチセンターへの 2DICAL の導入

本年度、2DICAL のシステム一式がプロテオームリサーチセンターに導入され、腎癌血漿 20 例、健常者血漿 20 例の解析を行った。腎癌患者血漿は九州大学大学院医学研究院泌尿器科学分野との共同研究で収集されたもので、国立がん研究センターでは QTOF Ultima、プロテオームリサーチセンターでは SynaptHDMS G1 を質量分析計として用い、各症例 2 回ずつ測定した。両者計 160 測定データを 2DICAL で解析した。

2. 臨床検体解析のための倫理審査

すでに国立がん研究センターで試料採取が終了し、倫理審査で承認を受けた 1,000 検体以上の血液サンプルをプロテオームリサーチセンターで解析可能とするためプロテオームリサーチセンターでの倫理審査を行い、承認を得た。

3. 腎癌血漿バイオマーカーの開発

バイオマーカー開発に用いた腎癌症例群 20 例、健常者群 20 例の平均年齢はそれぞれ 62.25 歳、65.95 歳で、両群間で年齢のへだたりがないように調整した。腎癌症例の病期は 1a 期 11 例、1b 期 5 例、2 期 1 例、3a 期 2 例、3b 期 1 例であった。血漿は ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion Kit（血漿免疫除去キット）を用いて前処理し、albumin、IgG、IgA、IgM、IgD、transferrin、fibrinogen、haptoglobin、 α 1-acid glycoprotein、 α 2-macroglobulin、apolipoprotein A-I、apolipoprotein A-II、apolipoprotein B、ceruloplasmin、 α 1-antitrypsin、complement C1q、complement C3、complement C4、plasminogen、prealbumin の 20 の血中に豊富に存在するたんぱく質を除去し、質量分析計には QTOF Ultima（ウォーターズ社）、液体クロマトグラフィーにはナノフロンティア LC（日立ハイテクノロジ社）を用い、データを採取し、2DICAL にてバイオマーカー候補を選別した。選別された腎癌血漿バイオマーカー候補たんぱく質（Protein A）には既存の抗体があったため、Western Blot によって血中量を確認し、さらに AlphaLISA（バークンエルマー社）を用い腎癌患者血漿 77 例、健常者血漿 130 例、前立腺癌患者血漿 20 例での検討を行った。

4. 前立腺癌血漿バイオマーカーの開発

東レ中空糸膜を用いた分画法による前処理を行い、低分子量タンパク質(～3nm)を選択的に分画し、前立腺癌血漿 27 例、健康者血漿 23 例を 2DICAL で解析したところ、あるタンパク質 (Protein X) が前立腺癌患者において有意に上昇していることを発見した。ELISA を用い、このタンパク質を前立腺癌患者血漿 54 例、健康者血漿 81 例、前立腺炎患者血漿 7 例、前立腺肥大症患者 23 例で測定した。

5. 2DICAL のバージョンアップ

多くの質量分析計に対応し、解析速度を向上させるために 2DICAL のバージョンアップを行った。セントロイドピークを使用したスペクトルデータの簡略化、ピーク検出手順の変更と簡略化、アライメント処理の簡略化を行うことにより、ピーク検出時間が旧バージョンの 1/5 に短縮された。また、オービトラップ、TripleTof5600 などの精密質量分析計に対応するため測定実測値を出力可能とし、質量精度を向上させた。ピーククオリティ、S/N のパラメータを追加することにより擬陽性ピークを除去し、同位体ピーク判定も改善させた。

C. 研究結果

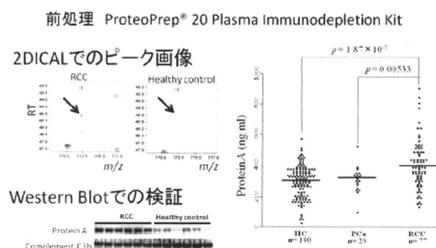
1. 施設間での解析結果の比較

国立がん研究センターでは、検出ピークは 23,640 個、選抜マーカー候補は健康者腎癌群間で TTEST<0.005、iScore>25、Expect<0.05 の条件で 18 ピーク 3 タンパク質であったが、TTEST<0.005 を満たしながらタンパク質同定ができなかったピークが 194 ピークあった。それに対しプロテオームリサーチセンターでは、検出ピークは 25,013 個、選抜マーカー候補は健康者腎癌群間で TTEST<0.005、iScore>25、Expect<0.05 の条件で 27 ピーク 8 タンパク質であったが、TTEST<0.005 を満たしながらタンパク質同定ができなかったピークが 222 ピークあった。国立がん研究センターのデータと比較し、候補ピークはほぼ同数であったが、候補ピークの同定は PRC の方が優れていた。また、同定されたピークを比較すると、PRC のピークの方の質が良かった。未同定ピークに関しては標的 MS/MS を行ったが、参照データとの時間のずれがあり、十分な同定が行えなかった。

2. 腎癌血漿バイオマーカーの開発

腎癌血漿 20 例、健康者血漿 20 例の 2DICAL 解析で腎癌患者において有意に上昇しているタンパク質 (Protein A) を発見した。Protein A に対する特異抗体が存在したので Western Blot でその血中濃度が腎癌患者において上昇していることを確認し、さらに、AlphaLISA (パーキンエルマー社) を用い腎癌患者血漿 77 例、健康者血漿 130 例、前立腺癌患者血漿 20 例の Protein A の血中濃度を測定し、腎癌患者で優位に上昇していることを確認した。(図 1) この結果は論文にまとめ、現在投稿中である。

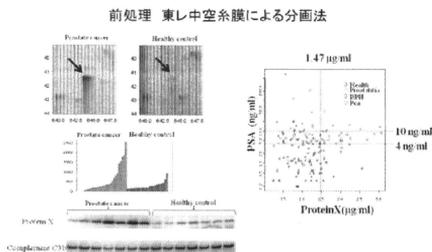
図1. 腎癌の血漿バイオマーカー探索



3. 前立腺癌血漿バイオマーカーの開発

前立腺癌血漿 27 例、健康者血漿 23 例での 2DICAL 解析で、あるタンパク質 (Protein X) が前立腺癌患者において有意に上昇していることを発見した。ELISA を用い、このタンパク質を前立腺癌患者血漿 54 例、健康者血漿 81 例、前立腺炎患者血漿 7 例、前立腺肥大症患者 23 例で測定し、PSA 値のグレーゾーン (4-10 ng/ml) を示す前立腺癌患者血漿で高値を示した(図 2)。前立腺癌診断において PSA 値を補完する新規バ

図2. 前立腺癌の血漿バイオマーカー探索



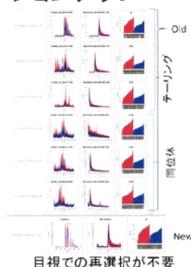
イオマーカーである可能性が示唆された。

4. 2DICALのバージョンアップ

2DICALのバージョンアップにより、旧バージョンではピークのテーリング部、同位体を別ピークとみなし、同一ペプチドに対して複数ピークとして扱われる場合があったが、新バージョンではそれらのピークが一つにまとめられ、目視での再確認が基本的に不要となった(図3)。

図3. 2DICALのバージョンアップ

- ピーク検出時間の短縮
(旧バージョンの1/5)
- スペクトルデータの簡略化
(セントロイドピークの使用)
- ピーク検出手順の変更と簡略化
- アライメント処理の簡略化
- 質量精度の向上
測定実測値の出力
(精密質量分析計への対応)
- 擬隣性ピークの除去
- ピークオリティ
S/Nのパラメータの追加
- 同位体ピーク判定の改善



D. 考察

2DICALでの解析がプロテオームリサーチセンターでも可能となり、新規の質量分析計での測定により、今まで未同定であったタンパク質の同定が可能であることが証明された。また、プロテオームリサーチセンターでの倫理審査が進展し、プロテオームリサーチセンターでのバイオマーカー探索が多くの臨床材料を用いて行えるようになった。また、昨年度から継続の腎癌血漿バイオマーカーの開発は論文発表の段階まで到達し、本年度からは前立腺癌血漿バイオマーカー探索を開始しバイオマーカー候補を選定した。

2DICALのバージョンアップにより、多くの臨床検体を効率よく解析できるようになったため、腎癌、前立腺癌で行った探索方法と同様に、多くの疾患のバイオマーカー開発が期待され、また、多数検体によるバイオマーカーの検証が進められることも今後期待できる。

E. 結論

2DICALを用いて、国立がん研究センターおよびプロテオームリサーチセンター両者でバイオマーカー探索が可能となり、2DICALもバージョンアップし、解析効率が増大したため、今後は、バージョンアップした2DICALを用い、倫理審査の承認を得た臨床材料で、種々の疾患のバイオ

マーカー探索を国立がん研究センターおよびプロテオームリサーチセンターの両者で進めていく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Matsubara, J., Ono, M., Honda, K., Negishi, A., Ueno, H., Okusaka, T., Furuse, J., Furuta, K., Sugiyama, E., Saito, Y., Kaniwa, N., Sawada, J., Shoji, A., Sakuma, T., Chiba, T., Saijo, N., Hirohashi, S. & Yamada, T. Survival prediction for pancreatic cancer patients receiving gemcitabine treatment. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 695-704 (2010).
2. Satow, R., Shitashige, M., Jigami, T., Honda, K., Ono, M., Hirohashi, S. & Yamada, T. Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for canonical Wnt signaling in Xenopus axis formation. *J. Biol. Chem.* **285**, 26289-26294 (2010).
3. Shitashige, M., Satow, R., Jigami, T., Aoki, K., Honda, K., Shibata, T., Ono, M., Hirohashi, S. & Yamada, T. Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Res.* **70**, 5024-5033 (2010).
4. Matsubara, J., Honda, K., Ono, M., Tanaka, Y. N., Kobayashi, M., Jung, G., Yanagisawa, K., Sakuma, T., Nakamori, S., Sata, N., Nagai, H., Ioka, T., Okusaka, T., Kosuge, T., Tsuchida, A., Shimahara, M., Yasunami, Y., Chiba, T., Hirohashi, S. & Yamada, T. Reduced Plasma Level of CXC Chemokine Ligand 7 in Patients with Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **20**, 160-171 (2011).
5. Miyamoto, Y., Kitamura, N., Nakamura, Y., Futamura, M., Miyamoto, T., Yoshida, M., Ono, M., Ichinose, S. & Arakawa, H. Possible Existence of Lysosome-Like Organella within Mitochondria and Its Role in Mitochondrial Quality Control. *PLoS*

ONE **6**, e16054 (2011).

6. Murakoshi, Y., Honda, K., Sasazuki, S., Ono, M., Negishi, A., Matsubara, J., Sakuma, T., Kuwabara, H., Nakamori, S., Sata, N., Nagai, H., Ioka, T., Okusaka, T., Kosuge, T., Shimahara, M., Yasunami, Y., Ino, Y., Tsuchida, A., Aoki, T., Tsugane, S. & Yamada, T. Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Sci.* **102**, 630-638 (2011).
7. 尾野雅哉, 松原淳一, 本田一文, 山田哲司. 血漿・血清プロテオミクス解析による診断、副作用、予後マーカーの開発. 創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析 (小田吉哉, 長野光司編) 90-96, 羊土社, 東京, 2010.
8. 尾野雅哉. 腫瘍マーカー温故知新. がん転移臨床と研究の羅針盤 (丸義朗編) 22-26, 学研メディカル秀潤社, 東京, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

なし

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし

I. 研究協力者

増田 万里, 高倉 美智子 (国立がん研究センター 創薬臨床研究分野)

循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

分担研究者 寒川賢治 国立循環器病研究センター研究所 所長
南野直人 国立循環器病研究センター研究所 部長

研究要旨

循環器系疾患の病態、治療、予後等を評価可能なバイオマーカーとなるたんぱく質やペプチドを発見するには、微量の対象物を高感度に構造解析できる解析系と、対象試料からの標的物質群を生体内に存在する状態で、再現的に濃縮する前処理法の確立が必須である。質量分析計の進歩により前者はかなり達成されたが、後者を可能とする有効な前処理法は依然として確立されてない。本年度の研究では、バイオマーカーとして有望な分子量の大きいペプチドを対象として、微量試料の取扱い手法と解析法の開発を実施した。また、循環器系の最重要疾患である心不全のバイオマーカー探索のため、イヌ心不全モデルを作成して組織、血液検体を収集した。

A. 研究目的

ゲノム遺伝子配列の決定に続き、生体で実在、機能するたんぱく質、ペプチド、代謝物などの実験的解析（プロテオーム、ペプチドーム、メタボローム解析）に基づくファクトデータベース構築が大きな目標となっている。細胞や組織が産生し、血液、尿などに存在するたんぱく質、ペプチド、代謝物などを包括的に解析、利用できれば、医薬品開発をはじめ各種目的に利用可能な物質を探索、発見する上で極めて有用な情報源となるからである。また、正確な臨床情報を伴った血液、尿などの体液、組織や細胞試料のプロテオーム、ペプチドーム解析を疾患発症から追跡、実施できれば、有用なバイオマーカーを発見でき、病因、病態、治療、予後などの診断、医薬品の開発、評価が実施可能と期待される。しかし、生体内に存在するたんぱく質、ペプチドは極めて多様な性質を示す物質の混合物であり、かつ濃度差が極めて大きいことが障害となり、ゲノムやトランスクリプトーム解析のような均一な解析が実施できていない。特に微量たんぱく質やペプチドを生体内の状態に変化させずに取り出し解析することや、翻訳後修飾を受けた微量たんぱく質の正確な構造情報を得ることは、依然として困難である。本研究では、これまで培ってきた前処理法、解析技術を改良し、循環器疾患患者の細胞、組織、血液、尿などに含まれる微量たんぱく質やペプチドの

定量比較、修飾などの構造変化を解析可能とする研究技術を開発することにより、心不全などの心疾患、高血圧症、動脈硬化などの病因、病態、治療、予後などの診断・評価に使用可能なバイオマーカーの発見を目指す。

本年度の研究では、血液試料中の微量たんぱく質、ペプチドについて検討を継続するとともに、細胞や組織が産生する分子量が大きく、一次切断構造を保持するペプチドの解析法確立を目指した。また、循環器疾患の中の最重要疾患として心不全を選定し、バイオマーカー発見のためにイヌモデル系を用いた研究を進めた。

B. 研究方法

1. 血漿試料を用いた前処理法の検討：昨年度までの検討により、ペプチドの数量は前処理により大きく変化し、従来法ではプロテアーゼによる消化、分解の制御は困難であることが示された。そこで原点に戻り、逆相カラムで速やかに濃縮した試料、凍結融解後に同一処理をした試料をゲル過 HPLC で分離し、ペプチドから低分子量たんぱく質に至る画分について質量分析法による解析を行い、比較した。

2. 培養内分泌系細胞株及び初代培養心筋細胞の培養上清中のペプチド解析：バイオマーカーの主たる解析対象は、血液、尿、髄液等の体液成分であり、その主成分は分泌性たんぱく質、ペプチドが大部分であるため、神経内分泌系組