

## 尿中蛋白質断片の質量および構造解析

担当責任者 高尾 敏文 大阪大学蛋白質研究所、機能・発現プロテオミクス 教授

研究協力者 奥村 宜明 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻生物科学科 准教授

研究要旨 既に尿中から見出している新規がん診断マーカー候補について、肺腺がん患者の尿を用いて有効性を検証する目的で、生化学的データを得るための試料調製を行うと共に、新たなマーカー候補探索のための解析を行った。今年度は、各施設から肺腺がん患者の尿試料 60 検体と健常人の尿試料 36 検体を受理した。その内、60 検体の試料調製が終了し、28 検体の質量分析を終了した。また、新規がん診断マーカー候補として 16 種類の蛋白質断片を同定しているが、それらに対するポリクローナル抗体を作成した。その内、6 種についてその特異性を確認することができた。

### A．研究目的

鋭敏かつ非侵襲的な早期診断マーカーを開発することを目的として、既に尿中から見出しているがんの新規診断マーカー候補について、複数の施設で採取された患者由来の尿に対して生化学的な検証を行うとともに、それらを用いて新たなマーカー候補の探索も同時に行う。

### B．研究方法

#### ・生化学的検証

16種類の蛋白質断片のC末端アミノ酸配列より抗原ペプチドをデザイン、合成し、それらを抗原として、トリ、或は、ウサギを用いてポリクローナル抗体を作成する（外注）。抗原ペプチドを固定化したアフィニティーカラムを作成し、免疫終了後に得られた血清 1 mL を用いて、アフィニティー精製を行う。ELISA により抗体価を算出した後、8 種について、抗原、及び、偽抗原を結合した BSA を用いてウエスタンブロッティング法により特異性を調べる。

#### ・質量分析によるマーカー探索

尿検体を採取し、前処理、分析データ取得、取得データによる統計解析の手順で研究を行う。まず前処理として、尿検体を 200～250 倍に濃縮し、洗浄を行い、濃縮検体を得る。この濃縮検体の蛋白質定量を行い、得られた値をもとに検体の一部を用いて 10 mg/mL の濃度に緩衝液で

調整して、その後の分析行程に用いる。分析は、まず試料を還元アルキル化の後に、独自の手法により  $H_2^{18}O$  存在下でトリプシン消化する（ペプチドの安定同位体標識）、脱塩、精製後、iTRAQ（8-plex）によるラベル化を行い、8 検体を混合、脱塩、精製した後、蛋白質のC末端由来のトリプシン消化ペプチド（⇒蛋白質断片の解析）のみをイオン交換クロマトグラフィーにより分画する。その画分を脱塩、精製後、Nano-LC-MALDI-MS/MS により測定を行い、C末端由来のトリプシン消化ペプチドのみを独自に開発したプログラム（iSpec）を用いて選別、抽出する。この取得データが統計解析に使用できるだけの条件を満たしているかどうかを、独自のデータベース連動型プログラム（iData）により評価し、採用されたデータのみを用いて統計解析を行う。

#### （倫理面への配慮）

分析に必用な試料量は1回の採尿で得られる尿の一部で十分であり、採取にあたり患者に苦痛を与えることはない。また、試料は全て匿名化された後に送付されており、個人情報流出はない。

### C．研究結果

#### ・生化学的検証

新規がん診断マーカー候補として 16 種類の蛋白質断片を同定しているが、それらに対して作成したポリクローナル抗体の内、8 種について特異性を確認した。その結果、6 種について蛋白質断片に特異的に反応することがわかった。  
・質量分析によるマーカー探索

新規尿中マーカーのデータ解析プロトコルに関して、データの確実性を向上させるための方法を確立した（\*参照）。また、これまでの分析プロトコルを改良し、一連の分析に要する時間を短縮し、スループットを上げた。具体的には、全ての工程： 試料前処理（尿から蛋白質を単離、定量）、イオン交換、及び、逆相クロマトグラフィーによる分画、タンデム質量分析、蛋白質 C 末端の網羅的同定を見直し、一連の分析に要する時間をこれまでの 7 検体 / 12 日・1 人から 14 検体 / 5 日・2 人と大幅にスピードアップした。本年度は、肺腺がん患者の尿試料 60 検体と健常人の尿試料 36 検体を受理し、60 検体の試料調製が終了し、28 検体について上記 ~ の分析を終了した。

#### \* 分析データの精査法の確立

取得データを統計解析により適切な比較を行うために、データ評価を迅速かつ簡便に行えるようなデータベース連動型新規プログラムを構築した（iData）。別のプロジェクト（次世代がん研究戦略推進プロジェクト）で行った 500 検体の分析データを、作成したプログラムにより数値化、グラフ化などで精査し、次の 2 つの観点によるデータ評価法を考案した。すなわち、(1) 1 アッセイ全体（7 検体+コントロール検体 1）の評価基準として MS/MS スペクトル及び基準ピーク(113)の評価、(2) そのアッセイにおける個々の成分である各検体についての評価、の 2 点を改良した。具体的に用いる数値は、(1) では、分析された MS/MS スペクトルの本数、プロダクトイオンピークの強度と本数、Mascot 検索での同定蛋白質数、基準となるコントロール検体のレポーターピーク(113)の強度の中央値と強度基準以下のピーク数（棄却数）、(2) では、各検体のレポーターピーク（114~119、121）の強度の中央値と棄却数、とした。これらの 2 つの観点による評価法により、そのアッ

セイ全体の是非を決定する MS/MS のデータが十分な質であるかどうかの評価と、さらには、含まれる 7 検体のそれぞれについて、サンプル量が不足していたり、他より過剰でなかったかどうかの評価までを、数字と視覚的なグラフの両方から迅速に行うことができるようになった。

#### D . 考察

既に尿中から見出している新規がん診断マーカー候補（次世代がん研究戦略推進プロジェクト）に対して作成した特異抗体を用いて、今年度得られた患者、及び健常人尿について検証を行うとともに、上記分析データの統計解析を行い、新たなマーカー候補の探索を進める予定である。

#### E . 結論

新規がん診断マーカー候補（16 種類の蛋白質断片）に対するポリクローナル抗体を作成した。その内、現時点で、6 種について特異性を確認した。肺腺がん患者の尿試料 24 検体と健常人の尿試料 36 検体の合計 60 検体の試料調製を終了し、その内、28 検体について蛋白質断片の質量分析を終了した。

#### F . 健康危険情報

委託業務成果報告（総括）にまとめて記入。

#### G . 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yamamoto H, Awada C, Matsumoto S, Kaneiwa T, Sugimoto T, Takao T, Kikuchi A.: Basolateral secretion of Wnt5a in polarized epithelial cells is required for apical lumen formation. J Cell Sci, 128: 1051-1063 (2015)

##### 2. 学会発表

なし

#### H . 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

- |                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| 1. 特許取得                              | 3.その他 |
| 1. 新規がん診断マーカーとその検出技術<br>出願予定：2015年6月 | なし    |
| 2. 実用新案登録<br>なし                      |       |

