応用講座 II (その 2)

COMMENTARY

プロテオミクスの展望: 夢物語に終わらないために

The View of Proteomics: Because It Does Not End in the Dream

片山博之^{*a)}・小田吉哉^{a)}

Hiroyuki KATAYAMA and Yoshiya ODA

(Received March 12, 2002; Accepted April 10, 2002)

Although the word "Proteome" also appeared in 1995 for the first time, it was hardly observed at that time. On the other hand, some papers about a microarray were released at the same time. The microarray has spread in an instant, and although there is the side in which it is troubled by the interpretation for too much a vast quantity of data, the information which transcriptomics brings about is achieving success certainly, and greatly has begun to contribute not only to drug discovery but to the life science field. Then, how is it about proteomics? Although the result has appeared in the search for a clinical marker for a serum sample without genome, there is almost no example of a success which contributed to life science in proteome analysis. In a transcriptomics and proteomics, a difference is in the amount of information acquired too much. The current proteomics understands only a part very much. Furthermore, proteomics is greatly inferior also in through-put. Just the information which cannot be acquired only from a gene is considered to be the directivity of future proteomics. Therefore, we should focus on protein-complex analysis, post-translational modification study *etc.* and then should contribute to life science by performing more practical proteomics. The key of future proteomics is pursued not only in proteomics but in all fields about high speed, quantity sensitivity, automation, and information processing. Since it has already turned into fixed form business about identification of the protein using MS, it is a point how it utilizes well in a life science field. Application of chemical design like ICAT and genetic design like TAP are expected in a technical side. And breakthroughs, such as development of a protein chip which is located in a line with a DNA chip, and an amplification means of the protein equivalent to PCR, may also appear suddenly.

1. プロテオーム・バブル

ニューズウィーク日本版 2002 年 2 月 27 日号の 56 ページに、「はじけた遺伝子バブル」: バイオとコンピュータの結婚によって新薬開発に革命が起きるといふ期待は夢に終わった, という書き出しで始まるショッキングな文章があった. 新薬開発の特殊性を十分に理解していない一部の欧米企業・大学が作り出した宣伝文句に周りが上手くのせられてゲノムバブルが形成されたわけである. 創薬の世界では, かつてドラッグデザイン, ドラッグデリバリーシステムなどいろいろなブームが起きたが, 現実には甘くなかった. ではポストゲノムシーケンス時代の注目株であるプロテオミクスはどうであろうか? 新たな創薬ターゲットを見つけるために, 疾患由来の系(組織や細胞)とその対象を比較することによって疾患の引き金に関連するタンパク質を探すことがプロテオミクスの重要な目的の一つとされている. しかしそんなことが今すぐに, あるいは数年以内に本当に実現できるのであろうか? 最近ホットになりつつあるプロテオミクスについて, 現状と課題・限界について冷静に考えてみたい.

2. トランスクリプトームとプロテオーム

独立した生活を営む生物の全ゲノムが初めて明らかになったのは 1995 年である. 同じ年に初めて Proteome という言葉も登場したがほとんど注目されなかった. その一方で同じ頃にマイクロアレイに関する論文が幾つか公表されて我々に強い衝撃を与えた. その後メッセンジャー RNA の動きを網羅的に測定する技術は瞬く間に普及した. そして, あまりに膨大なデータのために, その解釈に苦しんでいる側面はあるが, トランスクリプトームがもたらす情報は確実に成果を上げており, 創薬に限らず生命科学分野に貢献し始めた. それではプロテオームについてどうだろうか? ゲノムをもたない血清試料などを対象にした臨床マーカー探しに少し成果が出ているが, プロテオーム解析で生命科学に貢献した成功例はほとんどない. プロテオームの成功例の一つとして酵母のガラクトース代謝経路に関しての網羅的解析例が取り上げられている¹⁾. しかしこの論文での主役は DNA チップ解析とバイオインフォマティクスである. なぜなら酵母の場合, DNA チップ上にすべての遺伝子が存在するのに対してプロテオーム解析では, 全体の 5% 足らずの, しかも発現量の多いタンパク質を調べたに過ぎず, よって細胞内に発現しているタンパク質の全体像を把握するにはあまりにも情報量が少なすぎた (Fig. 1). トランスクリプトミクスとプロテオミクスで

^{*a)} エーザイ(株)シード研究所 (☎300-2635 つくば市東光台 5-1-3)
Eisai Co., Ltd., Laboratory of Seeds Finding Technology
(5-1-3 Tokodai, Tsukuba 300-2635, Japan)

Fig. 1. The conceptual figure of comparison of transcriptome and proteome. Although both are comprehensive analyses, the current proteome understands only a part very much. Furthermore, proteomics is greatly inferior also in through-put.

は得られる情報量に差がありすぎる、つまり労力の割に得られる成果が乏しいプロテオミクスでは、むしろ違ったことを考えるべきである。遺伝子からだけでは知りえない情報獲得こそが、これからのプロテオミクスの目指す道であると思われる。

3. プロテオミクスの得意分野

例えばタンパク質の翻訳後修飾や複合体解析などはタンパク質側から直接調べることが有利でありプロテオミクスの強みであろう。まず複合体解析の手法としてアフィニティー精製を2段階で行うTAPという技術が特許化・論文化された²⁾。このTAPを武器にしたCellzomeとMDS Proteomicsという二つの会社が、酵母における網羅的タンパク質複合体解析について先陣争いを繰り広げて、*Nature* 誌に同時掲載した^{3), 4)}。いずれもアフィニティー精製と質量分析の組み合わせによって複合体解析を行っている。しかし今回新たに見いだされた細胞内ネットワークが生理的条件下でも成立しているかは別の実験系で確認されるまでは定かではない。さらにこの二つのグループでの共通項は意外なほど少ないため、データの信憑性については慎重さが必要であろう。つまり今回の報告は先駆的業績としては評価できるが、これで何かの生命現象が明らかになったわけではない。また複合体形成は細胞の状態、例えば増殖・分化・細胞死あるいは翻訳後修飾の有無によって動的に変化していることが多いが、今回の結果はそこまで踏み込んでいない。一方、翻訳後修飾特にリン酸化については面白い手法が三つほど報告されている。リン酸基特異的化学反应を利用した方法^{5), 6)}と鉄キレートカラムの応用⁷⁾である。いずれも網羅的とは言いがたいデータであるがリン酸化プロテオームの幕開けとなるであろう。どのタンパク質のどこがリン酸化されるか網羅的に知ることが最初の段階であり、そしてリン酸化とは動的なものなので定量的リン酸化プロテオームが次の段階であろう。しかし、これらの実用化まではまだ時間がかかりそうである。

4. プロテオミクスの方向性

細胞内に存在するタンパク質の全体像を理解しようというのが、プロテオーム解析である。よってまずタンパク質の高速分析、大量解析システムの開発が重要視されている。しかしすでに基本技術は確立しているプロテオミクスにおいて多少の改良を加えたぐらいで本当にすべてのタンパク質を同定できるのであろうか？そして何のために同定するのであろうか？今は追い風が吹き予算を獲得しやすいプロテオミクスも生命科学への具体的成果がなければブームは過ぎ去る。よって実用的なプロテオミクスにもっと焦点を当てる必要がある。つまり全体ではなく特定領域に限定して、そこだけ網羅的に調べる Focused Proteome が現実的である (Fig. 2)。Mann のグループは抗リン酸化チロシン抗体を使い、上皮増殖因子 (EGF) で刺激した HeLa 細胞から、リン酸化タンパク質を精製し、質量分析によって EGF レセプターがかかわるシグナル経路のタンパク質を同定したり、成長因子やサイトカイン受容体のシグナル経路にかかわるリン酸化チロシンタンパク質 STAM2 を同定している^{8)~10)}。リン酸化プロテオームというほど網羅的ではないが自分たちが興味をもって取り組んでいる領域に集中し、そのため自分らが同定したタンパク質が本当にリン酸化タンパクであることの確認まで行う慎重さで、生命科学に貢献できる信憑性のあるデータを得ている。また Chait らはプロテオーム解析によって酵母の核膜孔複合体を構成するタンパク質の全容が明らかにしている¹¹⁾。この論文では実際のプロテオーム解析は1カ月足らずで終了したが、本当に複合体の構成成分であるかの確認作業に2年の月日を費やした。よってたいへん質の高いデータであるために *Nature*¹²⁾、*Science*¹³⁾ 両誌から絶賛されている (この論文は当初 *Cell* 誌に投稿したが3人のレフリーのうち一人が最後まで承諾しなかった)。このように小規模プロテオミクスであっても、自分たちが得意な限定した領域であれば世界に通用する、意味のあるデータが取れるのである。

5. 実用的プロテオミクスを支える個々の技術

新しい分野であるプロテオミクスとは生化学と機器分析、情報学の融合体である。網羅的という言葉に目が奪われて、一つ一つの技術を疎かにしてはいけな。すでに述べてきたように網羅的解析は現実的ではない。しかし仮に可能になったとしても全体を眺めているだけでは生命現象を解明するには十分ではない。つまりある事象を確認するために個々のタンパク質やその周辺を入念に調べる必要がある。創薬も同様で、ゲノム創薬といわれてもゲノムから薬は生まれない。薬作りにおいても最終的には特定の標的分子に的を絞ることになる。このように…オーム (網羅的解析) というブームに踊らされているが、生命科学分野において成果を出すためには、最後は各論に落とし込む必要がある。また逆に網羅的でなくても個々の特定の研究からも生命科学の発展につながる素晴らしい成果は生まれてい

Fig. 2. From classical proteome to focused proteome. It is difficult to find low abundant proteins on a two-dimensional electrophoresis from a whole cell extracted sample. But after the enrichment of interesting target mixture, electrophoretic or chromatographic based separation is useful to identify low abundant proteins.

る。よって、プロテオーム解析だけでなく、ピンポイントのタンパク質分析にも役に立つと思われる基本技術について、我々の経験を踏まえながら紹介したい。

5.1 プロテオミクスのための質量分析

現在のプロテオミクスの主役は間違いなく質量分析 (MS) であろう。今からプロテオミクスを始める人には費用対効果を考えると、ESI-イオントラップ型 MS がお勧めである。低価格、省スペース、操作性に優れ、トラブルも少ない。そして分解能が低くとも解釈しやすい MS/MS データが簡単に取れるのでタンパク質同定には十分威力を発揮する。そして実サンプルを高感度分析するにはナノ LC との直結が必要不可欠とされるが、イオントラップ型 MS であれば流速毎分 1 マイクロリットル程度のキャピラリー LC でも十分な感度を得ることができる。またスプレー部分を改良する必要があるが、我々はおそらく国内で最初に市販装置の改造を行った (Fig. 3)。近くの町工場で削って作ってもらったが、手先が器用であれば自作も可能である。他の会社の人が「ぜひ真似させて欲しい」ということで、プロテオーム技術普及のため快く承諾したが、間に入った業者が自社の HPLC ユーザーに限定して提供しているため、当初の期待どおり普及していないのは残念である。興味のある人は気軽に見学にきて欲しい。キャピラリー LC についても同様である。高価な特殊な HPLC を必要だと思っている人が多いが、安い国産のポンプでも対応可能である。さらに一步進めて自動測定を行う場合、スプレーチップの耐久性が問題になる。我々はメタルチップを自作して使用している¹⁴⁾。これなら安心して終夜運転できる。しかしそこまで実施しなくても、何の加工も施していない単なるフューズドシリカキャピラリー (内径 50 μm ,

Fig. 3. Zoom up of lab-made ion source for LC/MS/MS. Spray nozzle is a tapered metal needle.

外形 150 μm) でも意外に良いデータを取ることができる。ペプチドの分析に使われる HPLC の移動相はアセトニトリル・水・TFA の系が分離の点で優れているが、TFA の使用は MS での感度を招く。そこで TFA の代わりにギ酸を使用している人が多い。ところがギ酸は法規制されている物質であるので使いづらい。よって酸として酢酸を使うことになるが、クロマトグラムのピーク形状が悪くなるので、妥協案として 1% 酢酸に 0.01% TFA を加えている。また感度だけを考えるとアセトニトリルよりメタノールのほうが良い。しかしピーク形状が悪くなるので分離と感度の兼ね合いで適宜使い分けている。一方で MALDI はどうだろうか？ MS/MS のデータがないとタンパク質同定はできないと思っている人がいるなら間違いである。MALDI による Peptide Mass Finger Print (PMF) 法でも一定以上のスコアがあれば信頼性は高い。適切なアルゴリズムを用いた検索エンジンであればゲノムサイズが大きくなっても、例えば酵母と線虫の間で PMF 法において信頼性に差がなく、ヒトでも変わらないであろうと予想されて

いる¹⁵⁾。逆に MS/MS データであれば全面的に信頼できるかは疑問である。特に LC/MS/MS データの中身を見ないで Sequest や Mascot でファイルごと検索すると、ノイズピークを帰属して高いスコアを出すことがあるので注意が必要である。またトリプシン消化ペプチドの 2 価イオンをイオントラップ型 MS で MS/MS で解析した場合、Pro 残基の C 末側ではフラグメント化が起きず、逆に N 末側で切れたフラグメントイオンが強く出る (Fig. 4)。Gly 残基も同様の傾向があるが Pro ほど顕著ではない。よって自動検索ソフトでこのような原則から外れる帰属がなされたら、検索結果を疑ったほうがよい。一方 MALDI は測定が迅速かつ簡便で、キャリーオーバーの心配もなく、閉鎖系であるため装置のトラブルも少ない。タンパク質同定はもちろんであるが、例えば還元アルキル化反応や酵素消化のチェックなどサンプルの前処理操作を検討するときにもたいへん便利である。よってもう 1 台 MS を買うゆとりがあれば、MALDI はぜひ欲しい装置である。

5.2 二次元電気泳動：限界と誤解

当初二次元電気泳動とはプロテオームの代名詞のような位置づけであったが、今ではブームは去ってしまったようである。確かに塩基性タンパク質や巨大タンパク質などは二次元電気泳動での分析が難しい。また二次元電気泳動は分離が良すぎるために一つのタンパク質が翻訳後修飾などの違いで複数のスポットを生じる。そのため発現量が非常に多いタンパク質も複数のスポットに分離されるので、ハウスキープ系タンパク質ばかりが目立ってしまう。さ

らに HPLC 法に比べると自動化や再現性などの点でも大きく劣っている。またタンパク質の負荷量についても二次元電気泳動では、せいぜい数ミリグラムが限界であろうが、クロマトグラフィーではグラム単位の負荷量は容易であり、キログラム単位でも難しくない。では二次元電気泳動は本当に不要なのであろうか？ タンパク質の分離では、未だに二次元電気泳動法が最高の分離能を有し、いくら HPLC を組み合わせても到底かなわない。また膜タンパク質など難溶性タンパク質は二次元電気泳動では分析できないと言う人もいるが、我々是非イオン性界面活性剤 Triton に溶けない膜画分である Post Synaptic Density (PSD) のタンパク質を二次元電気泳動で解析した¹⁶⁾。その結果、二次元電気泳動を使わない手法¹⁷⁾よりも多くの PSD タンパク質を同定できた。このように難溶性タンパク質は二次元電気泳動では解析できないという噂があったが PSD のような難溶性膜タンパク質を同定した例はほかにもある^{18), 19)}。しかし SDS にしか溶けない、あるいは SDS にすら溶けない極めて難溶性のタンパク質は二次元電気泳動での分析は困難であるが、同時に HPLC による分離や抗体を使った免疫沈降法による分析でも難しい。極難溶性のタンパク質については二次元電気泳動だけが不向きなのではない。つまり自分たちが興味ある、あるいは得意とする特定の研究分野に焦点をあてた場合、タンパク質の分離能として優れた二次元電気泳動を最初から否定するのは間違いであろう。また最近では SDS-PAGE のような 1 次元ゲル電気泳動ですら省略して行うダイレクト・プロテオミ

Fig. 4. Typical MS/MS spectrum obtained from ESI/ion-trap. It does not cleave on the right-hand (C-terminal) side of proline. Conversely, the fragmentation which went out on the left-hand (N-terminal) side induces a strong signal. Although glycine also has the same tendency, glycine is not so remarkable as proline.

クスが流行している。確かにゲル電気泳動は手動に頼る部分が多いので手間隙はもちろん効率も悪くなる。ではSDS-PAGEは不要かと言われれば、答えはノーである。分離能は優れているし、視覚化から得られる情報は大きい。例えばSDS-PAGE上で10個バンドがあって、うち8個は同定できたとし、残り二つも重要であると考えれば、そこに実験を集中する。しかしダイレクト・プロテオミクスで100個のタンパク質が一度に同定できたとしても、一体何個同定すれば満足できるかつかみ所がない。これまでの論文でも生命科学への貢献度が大きい報告では必ず電気泳動が使われているし、生化学分野ではおそらく使用頻度が最も高い手法が電気泳動であろう。よってプロテオミクスにおいても電気泳動は重要なツールである。

5.3 ゲル内消化

銀染色法は感度良くゲル上のタンパク質を検出でき、検出限界は1 ngと言われ、これは分子量5万のタンパク質では20 フェムトモルに相当する。よって現在のMSの感度を考えれば、銀染色で検出できるタンパク質はすべてMSで分析可能な量である。しかし実際にはMSで何も観測されない場合がある。これはゲル内消化の効率が低いからである。過去さまざまなゲル内消化法が紹介されてきたが、研究現場の人間にとって、どこがポイントなのか今ひとつはっきりしていなかった。そこで我々はワンステップずつ検討を行った²⁰⁾。

ゲルの切り出し 以下に述べるような最適化を図ってもゲル内消化は基本的に効率が悪い。よってゲルの切り出しでは、タンパク質を含まない（染まっていない）部分はできるだけ排除し、多少タンパク質を捨てることになっても構わないくらい、小さく切り出すことが重要である。ゲル片が大きいとそれだけ回収率が悪くなると考えたほうが良い。

脱色 ポジティブ染色後、脱色することでバックグラウンドが下がり、良好なMSスペクトルを得ることができる。CBB染色では、50%のアセトニトリルを含む炭酸水素アンモニウム溶液中で脱色する。銀染色の場合にはフェリシアン化カリウムとチオ硫酸ナトリウム混液を加え、数分間程度振とうするだけでゲルが透明になる。銀染色の脱色として、弱アルカリ条件で過酸化水素水処理する方法もあるが、我々の比較実験では前者のほうが効果的であった。

還元アルキル化 システイン残基を含むペプチドは、還元アルキル化などしてチオール基を保護しないとMSで検出されにくくなる。多くの教科書にはアルキル化剤としてヨード酢酸あるいはヨード酢酸アミドを使っている。一方、チオール基を保護していないタンパク質は、泳動中にその一部がゲル内のアクリルアミド（重合していないモノマー）と反応することがある。その結果、泳動後ゲル内で例えばヨード酢酸でアルキル化反応を行うと、システイン残基を含むペプチドのピークがMS上で2本観測されることがある。よってゲル内での還元アルキル化ではアクリルアミドを使ってチオール基を保護することを勧めた

い。なお還元アルキル化反応の有無で、システイン残基を含まないペプチド鎖への影響はないため、我々はこのステップを省略することもある。

洗浄 脱色や還元アルキル化後、ゲルを水/メタノール/酢酸混液中で振とうし、塩や試薬、界面活性剤などを徹底的に洗い流す。この操作が不十分だとMSスペクトルのバックグラウンドの上昇を招く。我々は標準条件として30分間の洗浄を4回繰り返しているが、時間と手間が許す限り多いほど良く、夜間ずっと洗浄し続けることもある。その代わりに我々はZipTipなどによる脱塩操作を省いている。ZipTip操作によるペプチドの損出や価格の点を考慮しての結論である。なお洗浄の最後に、トリプシン消化を行うため炭酸水素アンモニウム溶液で5分間平衡化を行っている。

消化1 ゲル内消化において効率化のポイントの一つは、消化酵素をゲルに浸透させることである。高分子量であるタンパク質はSDSなどで電荷を持たせ電氣的引力でもない限りゲルには入りにくい。そのために通常、まずアセトニトリルによってゲルの脱水操作を行ってからゲルを乾燥させる。つづいて酵素溶液を加えてゲルが再膨潤するときに溶液とともに酵素も吸い込まれる。しかし酵素溶液が多すぎると、溶液だけが選択的にゲルに吸い込まれ、酵素だけがゲルの外に取り残されることになる。よって加える酵素溶液は全量がゲルに吸い込まれるようなごく少量にすることが大事である (Fig. 5)。溶液が全部浸透すれば酵素も必然的にゲル内に入ると考えている。しかしゲルの奥深くまで効率的に酵素が入り込むか定かではないので、我々はゲル断片を1 mm四方程度に切り刻んでいる。なおあまり細かくすると例えばLC/MCのときなどゲル片を吸い込んでしまい目詰まりの原因となりうるので要注意である。

消化2 および抽出1 界面活性剤である*n*-オクチルグルコシドは20 mM以下であればMALDIに影響を与えず、むしろ分子量が大きいペプチドのピーク強度が大きくなることが知られている。そこで我々も、まず*n*-オクチルグルコシドを結晶化のときに加えてもMALDIに影響がないことを確認した。次にペプチドをゲルから抽出するときに*n*-オクチルグルコシドを加えた。すると*n*-オクチルグルコシドがゲルからのペプチド抽出を助けたり、チップやチューブへの吸着を減らしたりするため、ペプチドの回収が良くなった。そして最初から、つまり酵素消化時から*n*-オクチルグルコシドを加えておくと、さらにペプチドの回収も上がった。これは*n*-オクチルグルコシドがゲル内でのタンパク質の再溶解や変性に効果があり、消化効率を高めるためであると思われる。このように適度な*n*-オクチルグルコシド量であればMSに影響を与えず、ゲルからのペプチドの回収率が高くなる (Table 1)。

抽出2 ゲル内で消化後、アセトニトリル・水・TFA混液を加えて超音波処理によってペプチドを回収する。我々は、振とうよりも超音波の方が若干ペプチドの回収率が良い感触をもっている。抽出操作は1回だけよりも2回

Fig. 5. Effect of rehydration buffer volume. Glutamate dehydrogenase was digested in-gel. (A) 20 μ L of digestion buffer containing trypsin was added to dried gel. (B) 2 μ L of digestion buffer containing trypsin was added. After all the buffer had soaked into the gel, 10 μ L of digestion buffer without trypsin was added. The * attached peaks are autolysis products of trypsin.

Table 1. Effect of *n*-Octyl Glucoside (OG) in Different Steps In-Gel Digestion
A number means the detected peak numbers from target protein.

	With OG ^{a)}	With OG ^{b)}	With OG ^{c)}	With OG
Trypsin inhibitor 21K	11	7	2	2
Carbonic anhydrase	9	5	3	3
Lactate dehydrogenase	8	2	1	1
Glutamate dehydrogenase	10	8	1	1
Bovine serum albumin	16	7	2	2
Glycogen phosphorlase	15	3	1	1
Beta-Galactosidase	21	6	4	4

^{a)} OG was added with trypsin.

^{b)} OG was added when the tryptic peptides were extracted from gel after digestion.

^{c)} OG was added when the sample was loaded onto a MALDI plate.

繰り返したほうが良いが、それ以上行っても改善しなかった。また抽出液中のアセトニトリル含量を変えたり、TFAの代わりにギ酸を使ってみたりしたが大きな違いは認められなかった。

このように一つずつ操作を確認していくことは、プロトコルの最適化を図るだけでなく、実験のコツをつかむ良い練習にもなる。

6. MALDI 測定

代表的なマトリクスとして α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) と 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) がある。純度が高い製品を使うことが基本であるが CHCA の場合、自ら精製することで検出限界が良くなる。CHCA の簡便な精製法は再結晶させることである。それには CHCA をまず希薄アンモニア水に溶かし不溶物を完全に除く。つづいて塩酸で pH3 から 4 にし、今度は沈殿物を集める。この沈殿を希薄塩酸水で 3 回洗う。そしてアセト

ニトリル溶液に溶かし、小分けした後、乾燥させ冷凍保存する。ポイントはガラス製品を使わないことと、可能な限り純度の高い溶媒を使うことである。それでも不純物を除けないときはクロマトグラフィーによる精製も組み合わせる。このようにして得られた高純度 CHCA を使うと、MALDI での検出感度が数倍改善する。なお CHCA はまずアセトニトリルで飽和溶液を作り、つづいて 2 倍量の 0.1% TFA 水で希釈して沈殿物を除いた溶液をマトリクス液として使う。一方、DHB は TFA-水-アセトニトリル = 0.1 : 66 : 33 溶液で飽和溶液を調製し、同溶液で 3~4 倍に希釈したものをマトリクス液とする。CHCA も DHB も MALDI プレート上でマトリクス液と等量のサンプル液を合わせる（混ぜない。混ぜると液滴が広がる）。そしてプレート上で液滴の広がりを抑えるためには、まずプレートを十分に乾燥させて、次にテフロンをプレートに擦り込む。この操作でプレート表面の撥水性が上がり液滴が広がりにくくなる。液滴が広がるとサンプルも希釈されてしま

Fig. 6. The crystallized MALDI matrix. (A) CHCA, (B) DHB. On DHB matrix, laser should hit at spot 2 or the end of crystal to get better signals. Spot 1 is not a good point.

うだけでなく良い結晶が得られず、結果としてスペクトルの質が低下する。なお有機溶媒が多いサンプルでは液滴が広がりやすいので苦労することが多い。液滴を乾燥させ結晶を作るには自然乾燥が良い。しかし梅雨時など結晶化に長時間を要する場合には白熱電球の下でプレートを少し暖めてやると良い。MALDI プレート上で結晶化した CHCA と DHB をそれぞれ Fig. 6(A), (B) に示す。CHCA は均一の細粒状の結晶で、DHB は大きな針状結晶である。CHCA ではレーザーをどこに当てても同じようなスペクトルを得ることができる。しかし DHB ではレーザーを当てる場所によってスペクトルが大きく変わる。そのため CHCA の方が好まれて使われている。しかし MALDI-QqTOF や MALDI-Iontrap のように DHB の方が望ましい MS では DHB を使わざるを得ない。DHB では例えば、Fig. (B) に

Fig. 7. Example of MALDI-MS spectrum of tryptic peptides obtained from enolase derived from two pools of *S. cerevisiae*. The numbers " ^{14}N " and " ^{15}N " denote peaks originating from unlabeled and ^{15}N -labeled tryptic peptides. The ratios of the intensities of the pairs of unlabeled to labeled peaks were used to quantitate the relative levels of the proteins in the two pools.

において、Spot 1 にレーザーを当ててもほとんどピークは観察されないが、針状結晶が交差する端 (Spot 2), あるいは結晶の先端にレーザーを当てると良好なスペクトルを得ることができる。少しコツをつかめば難しいことではない。また DHB マトリクス液をさらに希釈して使うと結晶の数が少なくなり、その分ペプチドが結晶に濃縮されるので感度が上昇する。ただしレーザーを当てる最適スポットを見つけにくくなるので注意が必要である。DHB の結晶にレーザーを当てるコツさえつかめば CHCA と同等の感度が得られる。そして CHCA はペプチドによってイオン化が非常に大きく変わるが、DHB ではそのような傾向が少ないため、カバー率が向上しやすい。我々の経験から CHCA の場合、特に酸性ペプチドがイオン化抑制を受けやすい傾向にあると感じている。

7. 定量的プロテオミクス

タンパク質を同定することがプロテオーム研究の最初の一步であるならば、次の一步は発現量の変化を調べることである。いつ・どこで・何が・どのくらい変化するか知ることが生命現象を解明する上で重要である。タンパク質の定量は従来ゲル電気泳動後の染色法によって行われてきた。しかし再現性に乏しいこと、二次元電気泳動であっても一つのスポットに複数のタンパク質が存在することが多々あること、ダイレクト・プロテオミクスのように電気泳動を使わない方法もあることを考慮すると、全く別の定量手段が必要であった。そこで登場してきたのが安定同位体を使い、一方のサンプルを内部標準物質に見立てて MS でのピーク強度比から相対定量を行う方法である。安定同位体元素標識法には *in vivo* 法²¹⁾ と *in vitro* 法²²⁾ の 2 通りある。我々が開発した *in vivo* 標識法では培養中に同位体を加えるため発現しているすべてのタンパク質を標識でき

る。そしてタンパク質間の相対的な変動解析だけでなく、部位特異的な翻訳後修飾の変動解析にも使える。また MS/MS 法によるタンパク質同定はもちろん PMF 法も利用可能である (Fig. 7)。しかし同位体標識されたタンパク質は本来の分子量と異なるため、一般の検索エンジンは使えないこと、同位体培地での培養ができないサンプルには適用できないなど欠点もある。一方、ICAT (Isotope Coded Affinity Tag) 法に代表される *in vitro* 標識法では基本的にすべてのサンプルに対して標識可能であるため汎用性に優れている。さらに ICAT 法はシステイン残基を含むペプチドだけに限定するのでサンプルの複雑さを軽減でき、特にダイレクト・プロテオミクスには好都合である。しかし ICAT 法の場合、相対量に変化があったとしても、それが発現量の変化なのか、そのペプチドが修飾されたことによる変化なのか曖昧である。また PMF 法を使うことができず、MS/MS 法が必須である。そして MS/MS データの解釈が意外と難しい。ビオチン・タグの存在がフラグメンテーションを複雑化しているため、帰属のできないスペクトルデータがたくさん生じる (Table 2)。実は全く同じ問題が我々の開発したリン酸化セリン・スレオニンをビオチン・タグに置き換える手法でもあった。よって ICAT 法も特別な検索エンジンが必要であろう。また ICAT 法では、標識するまでに行う分画や精製操作でのばらつきは補正できない。つまり ICAT 法では消化効率と MS でのイオン化を補正するに過ぎない (Table 3 に *in vivo* 法と *in vitro* 法の比較)。このように現在の定量的プロテオミクスは完全ではないが、今後の改良や使い方次第ではインパクトの高い実施例が登場してくると思われる。

8. これからのプロテオミクスの鍵は？

高速・高感度・自動化・情報処理についてはプロテオミ

Table 2. The Example of Identified Proteins by ICAT

The position of cysteine is important. If cyteine is located at middle of a peptide, the identification of the protein is difficult. Furthermore, bigger peptides are also difficult to assign.

C*SSILIHGK:	Na/K-ATPase alpha subunit
C*AADLGLNK:	Protein kinase C inhibitor 1
C*GPMVLDALIK:	Succinate dehydrogenase
C*AGNEDITLR:	Proliferating cell nuclear antigen
C*LAPMMSEVIR:	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase
C*NEPAVWSQLAK:	Clathrin heavy chain
C*EFQDAYVLLSEK:	Heat shock 60 kD protein 1
C*IEWMGGVG YTK:	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase
C*GEEIAVQFVDMVK:	3-Phosphoglycerate dehydrogenase
C*SSFMAPPVTDLGELR:	Coproporphyrinogen oxidase
IC*AVGITK:	Cellular apoptosis susceptibility protein
GC*DVVVIPAGVPR:	Malate dehydrogenase 2
VC*DIAAELAR:	Karyopherin beta 3
AVC*MLSNTTAAIEAWAR:	Tubulin, alpha 3
GIFPVLCK:	Pyruvate kinase
AKFENLCK:	Heat shock 90 kD protein 1
STLTDSLCK:	Elongation factor 2
LGPGMADICK:	Prosaposin
VNQIGSVTESLQAC*K:	Enolase alpha
EATGAASGAAAGGPGAGC*VGL:	Hypothetical protein FLJ22477

Table 3. Comparison of *in Vivo* Labeling and *in Vitro* Labeling

Labeling method	Advantages	Disadvantages
<i>In vivo</i> labeling	Since it can correct recovery efficiency in all the steps from a pretreatment to a MS analysis, precision is very high. It can be adapted also for a site specific quantitation of post-translational modification.	There are a lot of cases where <i>in vivo</i> labeling, such as a man organization, are difficult. The use of those other than a stable isotope labeling is difficult. In present search engines, identification of proteins from isotope labeled peptides is difficult.
<i>In vitro</i> labeling	Application is possible to all samples from culture cells to an animal organization. Various labeling tag can be used. Tags other than isotope can also be used. By present seach engines, it can respond to some extent.	The difference in the recovery efficiency in a pretreatment, such as subfractionation, affinity purification, <i>etc.</i> cannot be corrected, because those steps are done before <i>in vitro</i> labeling. Judgment may not be able to do whether it is change of expression level, and whether it is change of post-translational modification. AS for MS data analysis, it is not simple that fragmentation is complicated and protein identification cannot be performed, that the size of peptide in which analysis is possible is restricted since the molecular weight of a tag is large again, <i>etc.</i>

クスに限らず、あらゆる分野で追求されている。MS を使ったタンパク質の同定についてはすでに定型業務と化しているの、生命科学分野で、いかに上手に活用するかがポイントである。技術面においては、例えば ICAT 法におけるシステイン残基のビオチン化²⁰⁾ やリン酸化プロテオームでのリン酸基特異的の化学修飾^{5), 6)} やカルボキシル基の保護⁷⁾ といった Chemical Design や TAP²⁾ のような Genetic Design に注目したい。そして DNA チップに並ぶようなプロテイン・チップの開発、PCR に相当するタンパク質の増幅手段といったブレイクスルーも突然登場してくるかもしれない。Coffee Break にこれから海外留学や共同研究を考えている方に参考になるかもしれない二つの研究室について紹介するのでご一読いただきたい（本誌、p. 148 参照）。

文 献

- 1) T. Ideker, V. Thorsson, J. A. Ranish, R. Christmas, J. Buhler, J. K. Eng, R. Bumgarner, D. R. Goodlett, R. Aebersold, and L. Hood, *Science*, **292**, 929 (2001).
- 2) G. Rigaut, A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin, *Nature Biotechnol.*, **17**, 1030 (1999).
- 3) A. C. Gavin *et al.*, *Nature*, **415**, 141 (2002).
- 4) Y. Ho *et al.*, *Nature*, **415**, 180 (2002).
- 5) Y. Oda, T. Nagasu, and B. T. Chait, *Nature Biotechnol.*, **19**, 379 (2001).
- 6) H. Zhou, J. D. Watts, and R. Aebersold, *Nature Biotechnol.*, **19**, 375 (2001).
- 7) S. B. Ficarro, M. L. McClelland, P. T. Stukenberg, D. J. Burke, M. M. Ross, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and F. M. White, *Nature Biotechnol.*, **20**, 301 (2002).
- 8) A. Pandey, A. V. Podtelejnikov, B. Blagoev, X. R. Bustelo, M. Mann, and H. F. Lodish, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A.*, **97**, 179 (2000).
- 9) A. Pandey, M. M. Fernandez, H. Steen, B. Blagoev, M. M. Nielsen, S. Roche, M. Mann, and H. F. Lodish, *J. Biol. Chem.*, **275**, 38633 (2000).
- 10) H. Steen, B. Kuster, M. Fernandez, A. Pandey, and M. Mann, *J. Biol. Chem.*, **277**, 1031 (2002).
- 11) M. P. Rout, J. D. Aitchison, A. Suprapto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B. T. Chait, *J. Cell Biol.*, **148**, 635 (2000).
- 12) G. Blobel and R. W. Wozniak, *Nature*, **403**, 835 (2000).
- 13) Editor's choice, *Science*, **287**, 1889 (2000).
- 14) Y. Ishihama, H. Katayama, N. Asakawa, and Y. Oda, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 913 (2002).
- 15) J. Eriksson, B. T. Chait, and D. Fenyo, *Anal. Chem.*, **72**, 999 (2000).
- 16) K. Sato, M. Takeuchi, Y. Oda, M. Deguchi-Tawarada, Y. Sakamoto, K. Matsubara, T. Nagasu, and Y. Takai, *Gene Cell.*, **7**, 187 (2002).
- 17) R. S. Walikonis, O. N. Jensen, M. Mann, D. W. Provance Jr., J. A. Mercer, and M. B. Kennedy, *J. Neurosci.*, **20**, 4069 (2000).
- 18) S. Quaranta, M. G. Giuffrida, M. Cavaletto, C. Giunta, J. Godovac-Zimmermann, B. Canas, C. Fabris, E. Bertino, M. Mombro, and A. Conti, *Electrophoresis*, **22**, 1810 (2001).
- 19) E. Gustafsson, K. Thoren, T. Larsson, P. Davidsson, K. A. Karlsson, and C. L. Nilsson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 4280432 (2001).
- 20) H. Katayama, T. Nagasu, and Y. Oda, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 1416 (2001).
- 21) Y. Oda, K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn, and B. T. Chait, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 6591 (1999).
- 22) S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, and R. Aebersold, *Nature Biotechnol.*, **17**, 994 (1999).

Keywords: Proteomics, Mass spectrometry, In-gel digestion, Quantitative proteome, Focused proteome