COMMENTARY

効率的な発現プロファイリングのためのプロテオーム 解析システムの開発：疾患標的蛋白質の 迅速な同定と定量に向けて

Development of Proteome Analysis Systems for Efficient Expression Profiling: Towards High Throughput Identification and Quantitation of Disease Target Proteins

川上隆雄^{*a)}・安養寺久栄^{a)}・西村俊秀^{a)}

Takao KAWAKAMI, Hisae ANYOJI, and Toshihide NISHIMURA

(Received January 4, 2002; Accepted February 14, 2002)

In the post-genome era, there is an immediate requirement for the analysis of proteome, which gives a great impact on the methodology of disease diagnosis and drug discovery in medicine and pharmaceutical sciences. Mass spectrometry (MS) is essential for high throughput and accurate detection/identification of potential drug target proteins in low abundance localized to intrinsic functions at the extremely early stage of disease progression. Conventional proteome analysis strategy with two-dimensional electrophoresis (2-DE) techniques is not compatible for the drug discovery process and MS analysis, mainly due to poor solubility of many hydrophobic proteins in the current 2-DE sample buffers and its drawbacks including being low reproducibility, time consuming and very labor intensive. Higher throughput identification of proteins, including membrane-binding ones, was accomplished by introducing one-dimensional (1D) sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for protein fractionation coupled with nano-liquid chromatography (nanoLC)/nano-electrospray ionization (nanoESI)/ion trap (IT)-MS/MS. Toward fully automated proteome analysis, a five-dimensional (5D)-LC-based system was constructed, consisting of two-dimensional LC for protein fractionation, followed by proteolytic fragmentation of each protein fraction, and two-dimensional nanoLC for peptide fractionation directly linked with nanoESI/IT-MS/MS. A combination of the isotope-coded affinity tags (ICAT) assay with 1D-SDS-PAGE fractionation or the 5D-LC proteome workstation followed by nanoESI/IT-MS/MS data-dependent measurements under the dynamic exclusion mode will bring a promising approach for identification and quantification of proteins expressed in a disease progression. This strategy leads to the high throughput discovery of key target components related to disease progression or origin.

1. 疾患のプロテオーム解析

大規模ゲノム配列解析計画の集大成としてヒトゲノム配列の概要が明らかになった現在では、ゲノムの機能発現の本態であるプロテオームの解析が急務となっている。プロテオーム (proteome) とは、一つのゲノムから発現されているすべての蛋白質分子群に関する包括的かつ動的な情報を指し、これら蛋白質の発現量、翻訳後修飾、分子間の相互作用や生体内における機能などの情報が含まれる¹⁾。プロテオーム研究のことはプロテオミクス (proteomics) と呼ばれているが、プロテオミクスは特に医薬の分野における診断や創薬の方法論に対して大きなインパクトを与えて

いる。疾患の治療法の確立のためにはまずその疾患の引き金に関連する分子を見つけることが重要である。なぜなら、その分子の量的・構造的変化が病態早期の進行を示していたり、または疾患の原因因子そのものがあるいは原因に直接関連していれば、その分子は創薬のターゲットになりうるからである。多くの場合このような分子は蛋白質であり、主要な生体反応を担う蛋白質分子群の網羅的な解析が新たな創薬の戦略や新規ターゲット分子を見いだすものとして期待されている²⁾。

疾患のプロテオーム解析では、疾患特異的に相関して増加・減少あるいは構造的に変化する蛋白質を見つけ出すために、疾患由来の組織とその対照との蛋白質組成を比較することが最初のアプローチである³⁾。このいわば「宝探し」を効率良く行うためには、比較のためのスクリーニングが十分に自動化されていて、すべての発現蛋白質の量と修飾の変化を広いダイナミックレンジで定量できる解析システ

^{*a)} グラクソ・スミスクライン (株) 研究本部化学研究部
(☎300-4247 つくば市和台 43)
Chemistry Department, Research Division, GlaxoSmith
Kline K.K. (43 Wadai, Tsukuba 300-4247, Japan)

ムが理想的である。このようなシステムを開発することが「発現プロテオミクス (expression proteomics)」の目標の一つである。

我々のグループではこれまでに、ナノエレクトロスプレー (nanoESI) を介してナノ液体クロマトグラフィー (nanoLC) と連結したイオントラップ型質量分析計 (IT-MS/MS) を中心とする解析システムを構築し、低フェムトモル (10^{-15} モル) 量の微量蛋白質の自動分析を日常的に行っている^{4), 5)}。現在のプロテオミクスは、二次元電気泳動 (2-DE) ゲルによる蛋白質の分離・定量とそれに続く蛋白質同定が主流であるが¹⁾、後述するように検出の感度だけでなく運用面などに多くの問題を抱えている。そこで本稿では、まず発現プロテオミクスに必要な検出の感度と現在到達している質量分析計 (MS) のそれとの関係を考察し、次に 2-DE ゲルを用いた従来の方法の問題点について言及する。そして最後に、細胞・組織の蛋白質発現プロファイリングの改善と自動化を目指して導入した二つの方法について述べる。

2. プロテオミクスに要求される質量分析計の検出感度は？

現在のプロテオミクスでは、高い処理能での蛋白質検出・同定が可能な MS の役割が重要な位置を占めていることは言うまでもない。時系列での定量、複合体の解析、およびリン酸化やグリコシル化などの翻訳後修飾の同定など、プロテオミクスが直面している多くの課題に対して MS はこれからも強力な手段であり続けるだろう。

ところで、分析の微量化はプロテオミクスの課題の一つであるが、それではプロテオームの解析を行うための MS にはどの程度の検出感度が要求されるのだろうか。細胞内でシグナル伝達や細胞間の応答などにかかわる蛋白質分子は生体の機能発現の鍵となっており、また、疾患の原因因子も多くはこれら調節分子の中に含まれると考えられている。こういった蛋白質分子の細胞内における存在量は一般にごく微量であるため、現在の MS の検出感度との関係を考察することは重要である。

ある細胞集団において、細胞周期のある時点で発現している蛋白質 X を同定する実験を想定する。その実験手順は、細胞から抽出・分離した蛋白質 X をプロテアーゼ消化によって断片化し、各ペプチド断片の質量分析を行ってそれらの質量数と CID スペクトルを得る、直列のステップからなるとする。細胞集団の細胞周期は同調していると仮定する。すなわち、個々の細胞を構成している蛋白質の組成は等しく、細胞当たりの蛋白質 X のコピー数は一定であるとする。ここで、MS に導入する手前の試料溶液に含まれる蛋白質 X 由来のペプチド Pn の数 $N_{\text{ペプチドPn}}$ は以下の 3 者の積で表される。すなわち、

$$N_{\text{ペプチドPn}} = N_{\text{細胞}} \times N_{\text{蛋白質X}} \times R \quad (1)$$

となる。 $N_{\text{細胞}}$ は分析対象となる細胞集団の細胞数、 $N_{\text{蛋白質X}}$ は細胞当たりの蛋白質 X のコピー数、そして R はペプチド Pn として質量分析計まで到達する蛋白質 X の

正味の回収率である。 R は、細胞からの蛋白質 X の抽出率やプロテアーゼ消化の効率などの実験の各ステップにかかる収率の積であると言い換えて良い。

式 (1) は簡単であるけれども、 $N_{\text{細胞}}$ と $N_{\text{蛋白質X}}$ の値がわかっているときに蛋白質 X を同定するために要する MS の検出感度を見積もる場合や、逆に MS の検出限界を明らかにしておき、 $N_{\text{細胞}}$ 個あるときに細胞当たりどれくらいのコピー数までの蛋白質を同定することができるかなどを見積もるときに便利である。

例えば、細胞数 $N_{\text{細胞}} = 10^7$ 、コピー数 $N_{\text{蛋白質X}} = 10^6$ 、そして回収率が $R = 0.1$ である場合、MS に到達するペプチドの数 $N_{\text{ペプチドPn}}$ は、それぞれの値を式 (1) に代入すればよい。すなわち、

$$\begin{aligned} N_{\text{ペプチドPn}} &= 10^7 \times 10^6 \times 0.1 \\ &= 10^{12} \text{ (個)} \\ &= 1.7 \times 10^{-12} \text{ (モル)} \end{aligned}$$

となり、1.7 pmol のペプチド分子が MS へ導入されることになる。

また、自動試料導入ロボットを備えて定常分析用に最適化された nanoLC/nanoESI/IT-MS/MS でペプチドを測定した場合、その検出限界はおおよそ 1 fmol (10^{-15} モル) である。すなわち、 $N_{\text{ペプチドPn}} = 6 \times 10^8$ (個) に相当する。また、通常の細胞培養では、1 枚のシャーレに培養する細胞の数は 100 万個程度が標準であり、創薬の分野では通常この程度の培養細胞で化合物阻害のアッセイ系が作られる。 $N_{\text{細胞}} = 10^6$ である。回収率 $R = 1$ とすれば、MS で検出できる蛋白質 X の細胞当たりのコピー数は以下のようにして求められる。

式 (1) を変換する。

$$N_{\text{蛋白質X}} = N_{\text{ペプチドPn}} / (N_{\text{細胞}} \times R) \quad (2)$$

式 (2) に対して、先に仮定した $N_{\text{ペプチドPn}} = 6 \times 10^8$ 、 $N_{\text{細胞}} = 10^6$ 、および $R = 1$ を代入すると、

$$\begin{aligned} N_{\text{蛋白質X}} &= 6 \times 10^8 / (10^6 \times 1) \\ &= 6 \times 10^2 \end{aligned}$$

つまり、細胞当たり 600 コピーが検出の限界と見積もられる。

細胞膜表面に発現して最初期のシグナル伝達にかかわる受容体蛋白質群のコピー数は、その種類にもよるが数百前後と言われており、現在の知見では細胞内で一番数の少ない部類に入る。現在の MS の検出感度自体はこの最低の領域に達していると結論される。ところが、従来の 2-DE ゲルと MS を組合せたプロテオーム解析でこれらの微量蛋白質を同定した例はほとんど見られない。先に回収率 $R = 1$ と仮定したのが一番の問題であり、細胞からの抽出から MS に導入するまでの試料の損失が重要な要因である。一般に試料の量が少ないほど回収率は低くなる傾向にある。例えば、数百フェムトモルのペプチドが溶解している試料溶液をポリプロピレン製の使い捨てチップで 1 回吸引・排出すると、ペプチドの種類や溶媒の組成などの条件によってはペプチドの 90% 以上がチップの壁への吸着によって損失してしまう。最初の細胞の数を多くして低い回

収率を補うのも一つの手手段だが、大きな培養器で継代を繰り返すなどの操作がたいへんであり、高処理能解析の目標にそぐわない。また、ヒトからの検体などの場合のように、試料量が著しく限られる事例も多い。

したがってプロテオミクスにおいては、高い回収率で MS への導入が可能な前処理のシステムの開発が重要である。それには手作業を排した完全なオンライン解析システムが理想的であり、本稿の主題でもある。そして、どんなに整備されたシステムにおいても、すべての蛋白質に対して回収率 100% にすることはほとんど無理なので、これを補うためにもさらに MS の高感度化は必要である。また、翻訳後修飾を同定する際にはペプチドのカバー率が高くしなければならないが、この場合は一般に検出限界の 10 倍以上の試料量が必要である。

3. 二次元電気泳動法 (2-DE) を中心とする 発現プロテオミクスの問題点

つい最近まで、プロテオミクスとは 2-DE ポリアクリルアミドゲルの染色パターンと言われるほど両者は一組になって論じられることが多かった。筆者らのグループにおいても、免疫系のアポトーシスに関連する蛋白質の同定⁶⁾や皮膚形質細胞増多症の解析（未発表）をはじめとして一定の成果を上げている。一方で 2-DE ゲルを用いるプロテオミクスの戦略にはおもに以下に挙げる問題点がある。

- i) 蛋白質の溶解性：一次元目の等電点電気泳動に先立って試料蛋白質は一般に高濃度の尿素およびチオ尿素と中性あるいは両性の界面活性剤によって溶解される⁷⁾。この組成で溶解するのは比較的親水性の蛋白質群であり、膜結合性の疎水性蛋白質は一部の例外を除いてほとんど溶けない。特に創薬のターゲットをスクリーニングする際にこの欠点は致命的であり、分離を始める前にこれらの蛋白質は‘捨てられる’。

- ii) 分離の範囲：市販の等電点ゲルは一番広い範囲で pH 3 から 10 であり、最初のスクリーニングに用いられているが、この範囲を超えた等電点をもつ蛋白質は等電点ゲルの両端の電極まで泳動されてしまってゲル上に分離されない。

- iii) 検出感度の限界：銀染色あるいは最近では蛍光色素による染色⁴⁾が行われるが、検出限界はいずれも 5 ng 前後である。分子量 5 万の蛋白質であれば 100 fmol に相当する。しかし、この程度の感度では、 10^6 個の細胞からたとえ回収率 $R=1$ でゲル上へもっていったとしても、6 万コピーの大量に発現されているものまでしか見ていないことになる。ゲル上の染まっていない部分にはこれより低コピー数の蛋白質が分離されているはずである。

- iv) 分離能の限界：2-DE ゲル上で染色される大きなスポットの多くは可溶性のハウスキーピング蛋白質に由来するが、これらに隠れてしまっているスポットは当然検出されない。

以上の 4 点から明らかなように、2-DE ゲル上に検出される蛋白質は試料中に含まれる発現蛋白質のすべてではない。また、2 枚の 2-DE ゲルのパターンを比較するディファレンシャルディスプレイによって選択した蛋白質スポットを MS で解析したときに、複数の蛋白質が一つのスポットから同定され、このうちのどの蛋白質が量的に増減したかわからないことが多くなってきた。これは、MS の高感度化によるところが大きい。また、2-DE は方法の自動化が難しく、再現性のある結果を得るには熟練した手技と多くの経験が必要である。さらに、分離に長時間を要するため、産業界で求められる高処理能解析には向かない。分離後の MS 解析にもっていくまでの操作も手作業の連続である。これらの事実が 2-DE ゲルに代わる新たな解析システムを必要とする理由である。

Fig. 1. Schematic representation of the strategy for ‘shotgun’ protein identification using 1D-SDS-PAGE. Protein extract from cells or tissues is subjected to SDS-PAGE. After the electrophoresis the gel is cut into 2 mm slices, and peptide mixtures resulting from in-gel tryptic digestion of each gel slice are injected into on-line nanoLC coupled with nanoESI/IT-MS/MS. Obtained peptide mass and peptide ion fragment data are searched against protein sequence databases to identify proteins contained in each gel slice.

4. SDS-PAGE と nanoLC/nanoESI/IT-MS/MS による発現プロファイリング

界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl-sulfate, SDS) の存在下で行われるポリアクリルアミドゲ

ル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) は蛋白質のおおよその分子量を見積もるために開発された方法であり⁸⁾, 2-DE の二次元目にも採用されている⁹⁾. この方法が生化学と分子生物学の分野で広範に用いられている理由の一つは SDS による強力な変性作用にあり, ほと

Fig. 2. Protein identification by nanoLC/nanoESI-IT/MS/MS. (a) Base peak profile from nanoLC/nanoESI-IT/MS/MS analysis of a total tryptic digest of gel slice No. 9. (b) Mass spectrum of the highlighted region (retention time 11.74–11.91 min) from (a). The three most intense ions (m/z 1143.2, 1167.0, and 1237.3) were selected for CID-MS/MS by dynamic exclusion scanning.⁵⁾ (c) CID mass spectrum of the m/z 1167.0 ion from (b). This peptide was identified as the fragment SIPDGTEHGDFLALDLGGTNFR (70–91) from mouse hexokinase (EC 2.7.1.1), tumor type (PIR accession No. A35244), using MASCOTTM search software (Matrix Science Ltd.). Despite of CID spectra with sufficient intensity, no significant hit was obtained from other two peptides, m/z 1143.2 and 1237.3, mainly because mouse genome is not completely sequenced at present.

多くの蛋白質は数%の SDS を含む溶液の中で容易に変性・溶解する。我々のグループではこの点に着目し、細胞膜蛋白質を含む発現プロファイルを得るために SDS-PAGE を導入した。この方法と nanoLC/nanoESI/IT-MS/MS を組合せた高処理能の発現プロテオミクスの手順を Fig. 1 に示す。まず、SDS で変性した蛋白質の混合物を SDS-PAGE にかける。電気泳動後、泳動の方向に沿って一定間隔ではしご状に 90 個前後のゲルの切片を切り出す

ことにより‘分画’する。次に各ゲル切片に対してトリプシン消化^{4), 10)}を行い、生じたペプチド混合物を全自動 nanoLC/nanoESI/IT-MS/MS にて連続分析にかける⁴⁾。こうして得られた各ペプチドイオンの m/z 値および MS/MS による開裂イオンのデータをアミノ酸配列データベースに対して検索し、元の蛋白質を同定する。この方法ではゲルの染色および染色画像の解析を必要としない。ちなみに、ゲル染色のステップを省くと、ゲル内プロテアーゼ消

Table 1. Mouse Cortex Proteins Identified from Gel Slices No. 1–10

Database accession No.	Protein name	Membrane binding	Neuron specific	Gel slice No.	Ref.
BAA12914	apg-2			8, 9	14)
O35643	beta-prime-adaptin protein			9	
Q9JIS5	Ca ²⁺ regulator SV2A	M		4, 6, 7, 8, 9, 10	
B54354	calnexin	M		10	
Q9EPU4	cleavage and polyadenylation specificity factor 1, 160 kDa subunit			10	
AAF91078	cytoplasmic dynein heavy chain			1, 3, 4	14)
AAA20670	cytosolic dioxin inducible aldehyde dehydrogenase-3			1	
Q9QWW2	dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6		N	9	
Q9QZ02	ectodysplasin			9	
O55069	erythroid K: Cl cotransporter			2, 3	
P56564	excitatory amino acid transporter 1	M	N	4	
P43006	excitatory amino acid transporter 2	M	N	4	
Q9EQR0	fatty acid synthase			3	
A43769	fodrin alpha chain	M		4	15)
I49143	gastric H(+)-K(+)-ATPase alpha subunit			9, 10	
P16858	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)			1	14), 15)
A35244	hexokinase (EC 2.7.1.1), tumor			9, 10	
BAA28865	HPC-1/syntaxin		N	1	15)
AAA51056	immunoglobulin heavy chain			10	
Q9QXL1	KIF21B			9	
Q9R0U5	matrin 3			7	
QRMSF1	microtubule-associated protein MAP1B			2, 4	
A40115	microtubule-associated protein MAP2			9	
CAA64389	monoclonal antibody Ki-67			10	
Q62079	myelin proteolipid		N	1, 2	
P20917	myelin-associated glycoprotein (L-MAG/S-MAG)	M	N	9	
A46761	myosin heavy chain, dilute			3	
Q9WV27	Na, K-ATPase alpha-4 subunit	M		9, 10	
IJMSNG	neural cell adhesion molecule 1, GPI anchored splice form	M	N	1, 2, 3, 4, 6, 7	
IJMSNL	neural cell adhesion molecule 1, long domain splice form	M	N	1, 2, 3, 4, 6, 7	
P08553	neurofilament triplet M protein		N	6	
S05944	neuronal cell surface protein F3	M	N	6, 7	
Q9QWJ7	non-erythrocyte beta spectrin			2, 3, 6, 7, 8	
Q9R0K7	plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	M	N	1, 2, 3, 7	
BAA09297	PSD-95/SAP90A		N	9	
CAA11450	sarco-endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase SERCA2a			8, 9	
CAB72436	sarco-endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase SERCA2b			8, 9	
AAB04098	sarco-endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase SERCA3b			8, 9	
T14349	Shyc protein		N	7	
Q9WVS3	SIF and TIAM1-like exchange factor			3	
JC5420	smooth muscle myosin heavy chain 1			3	
JC5421	smooth muscle myosin heavy chain 2			3	
Q64357	synaptobrevin 2	M	N	1, 2	
2BU0C	synaptosomal-associated 25K protein		N	1, 2, 3	
O35525	syntaxin 1B		N	1, 2	
Q62317	ubiquitin C			2, 4, 9	15)
JC1254	ubiquitin-protein ligase (EC 6.3.2.19) E1			9	
AAF59918	vacuolar proton-translocating ATPase 100 kDa subunit isoform a1-I			4, 6, 7	
AAF59919	vacuolar proton-translocating ATPase 100 kDa subunit isoform a1-II			4, 6, 7	

化後のペプチドの回収率が上昇する。SYPRO Rubyをはじめとする蛍光色素は検出感度が高く、ペプチドが比較的回収されやすいゲル染色剤として使用されているが、我々のグループでは、このSYPRO Ruby染色の有無によるペプチド回収率の影響を検討した。すなわち、染色せずに固定処理のみを行うことによって回収率が平均して3倍以上増加することを確認している（私信）。

はしご切りの各分画は複数の蛋白質を含むが、MS/MSによって生ずる開裂イオンの質量数がアミノ酸配列の情報を与えるので、一度の質量分析（one shot）で分画中に含まれる複数の蛋白質を同時・確実にヒット（hit）することができる。我々はこれを「ショットガン解析」と呼んでいる^{2), 11)}。また、MS/MS開裂イオンの解析から、リン酸化などの翻訳後修飾の種類と修飾されたアミノ酸残基を同定することもできる。

上記の解析法をマウス大脳皮質の発現プロファイリングに適用したところ、合計約750個の蛋白質を一度の連続分析で同定することができた。Fig. 2に解析結果の一例を示す。同定された蛋白質の中には多くの膜結合型蛋白質が含まれていた^{12), 13)}。これらは従来の2-DEゲルによる解析^{14), 15)}では同定できなかった蛋白質である（Table 1）。このことは、一次元目の等電点電気泳動までの可溶化が不十分であることとともに、本法が細胞内の全蛋白質を視野に入れた発現プロファイリングに有効であることを示している。また、2-DEゲルに比べて解析に要する時間を大幅に低減することができた。さらに、SDS-PAGEを実施するに当たっては高価な装置を必要とせず、操作が単純で再現性が高く、特別な熟練を要しないことなども利点として挙げられる。

なお、Simpsonらは同様の方法を用いて結腸癌細胞の細胞膜蛋白質のデータベース化を行っている¹⁶⁾。また、Blackstockらのグループではゴルジ体膜由来の蛋白質群を同定している¹⁷⁾。これらの例を見るとおり、SDS-PAGEとnanoLC/nanoESI/IT-MS/MSによる発現プロファイリングはポスト2-DEゲルの有力な手段の一つである。

4. 五次元LCによる発現プロファイリング

従来の2-DEゲルだけでなく上記のSDS-PAGEによる方法においても、ポリアクリルアミドゲルを介するシステムは自動化が困難であり、また、解析の下流にあるMSとオンラインで連結することも難しい。そこで発現プロテオーム解析の全自動化を目指して導入・開発を進めているのが五次元液体クロマトグラフィー（5D-LC）自動分画とnanoESI/IT-MS/MSによるショットガン解析であり^{2), 11)}、我々のグループではそのシステムのプロトタイプが稼働している。Fig. 3にその概略を示すとおり、5D-LCシステムは以下の順番の組み合わせで構成されている。

- i) 試料の導入口ポット
- ii) 蛋白質混合物の二次元LC（一次元目と二次元目）
- iii) 高濃度の有機溶媒を含む緩衝液中でのトリプシン消化¹⁸⁾（三次元目）

Fig. 3. The concept of 5D-LC based proteomics workstation with pre-labeling of protein mixtures by isotope-coded affinity tags (ICAT).²⁰⁾

iv) ペプチド断片混合物の二次元LC（四次元目と五次元目）

v) nanoESI/IT-MS/MS

組織・細胞から抽出した蛋白質混合物は、まず一次元目の強アニオン交換樹脂に吸着される。次に8段階の濃度のNaCl溶液を順次導入することによって吸着蛋白質が段階的に溶離される。溶出してきた各蛋白質分画を二次元目のゲルろ過によってさらに12分画する。このようにして合計 $8 \times 12 = 96$ 分画をオンラインで回収し、各分画に対して終濃度80%になるようにアセトニトリルを加えてからトリプシン消化を開始する。アセトニトリルの効果によって、消化反応は10分程度で完了する¹⁸⁾。生じたペプチド混合物に対してさらに強カチオン交換カラムと逆相カラムによる二次元分離が行われる。

5D-LC/nanoESI/IT-MS/MSでは、蛋白質はプロテアーゼ消化を経てナノスプレーでイオン化されるまですべて液体中で処理される。そして前の項でも述べたように、MS/MSスペクトルのデータベース検索によって、混合物から10種類以上の蛋白質を一挙に同定することができる。また、蛋白質試料の導入、バルブの切り替え、サンプリングから蛋白質の同定に至る過程は自動化され、人の手による実験操作を省くことができる。流路系の微小化による微量蛋白質の同定、および膜蛋白質の可溶化が今後の課題である。

蛋白質を分離・分画せずに混合物のまま消化する Yates らのアプローチ¹⁹⁾では、生じたペプチド断片混合物の分析のために、エレクトロスプレーニードルの中にイオン交換樹脂と C18 樹脂を充填する工夫によってナノスケールの二次元分離を実現している。彼らは、この手法を用いてリボソームをはじめとする蛋白質複合体の構成サブユニットの同定などに成果を上げている。5D-LC では、システムの上流にさらに蛋白質分画を加え、かつ全体を自動化することにより、細胞・組織全体を視野に入れた発現プロファイリングおよび定量解析を可能にしている。

5. ま と め

現在のところ、蛋白質の網羅的な発現プロファイリングおよびプロファイル同士の比較は 2-DE ゲルを中心に行われているが、産業レベルではより微量試料に対応でき、そして処理能の高いシステムが求められており、現在はその開発の過渡期であるといつてよい。

本稿では、高感度・高処理能の発現プロファイリングのために新たに導入開発を進めている二つの解析システムについて述べた。今回のアプローチでは、従来の方法では見ることが難しかった膜蛋白質の情報を得ることができ、また、5D-LC では蛋白質分画から同定までの過程の全自動化を実現しつつある。以上のような利点は、大規模プロテオミクスを行うにあたってこれらの方法が 2-DE ゲルに替わる強力な手段であることを示している。

個々の蛋白質の検出はシステムの下流にある MS によっていることが重要である。2-DE ゲルパターンの比較によるディファレンシャルディスプレイでは、染色された蛋白質スポットの濃度を画像解析ソフトによって比較定量するのだが、多くのスポットからなる複雑な「アナログ」パターンを解析するのは容易ではない。また、人の目による補正が必要であるため、どうしても解析した人の主観が入ってしまう。この際の MS の役割はスポットに含まれる蛋白質の同定のための道具でしかない。今回の試みは、MS を蛋白質同定だけでなく「デジタル化」した質量数のデータによる比較定量の手段として用いる可能性を示している。このためには同位体化合物修飾法²⁰⁾などの技術の導入が有力である。2-DE ゲルを用いないこれらの方法は、これまでのプロテオーム解析に要する時間と労力を大幅に減少させる。そして、より高い収量で MS までもっていける分画システムによって、さらに低コピー数の機能的に重要な発現蛋白質の動態を追うことができるだろう。

そして将来的には比較定量の方法を確立し、新薬探索に適用するのがねらいである。すなわち、ある疾患で発現に変化のある蛋白質をできるだけ多く見だし、過去の研究の蓄積よりなる知識ベースおよび相互作用解析などから得られる実験結果と組み合わせながら関連する蛋白質同士を結びつける。これによりその疾患を分子間の連鎖としてとらえることができ、原因を論理的に説明することや疾患に関連するパスウェイの予測が可能となるであろう²¹⁾。

謝 辞 本稿は第 28 回 BMS コンファレンス講演要旨集の原稿²²⁾に対して加筆と修正を施したものである。コンファレンスの関係各位に深謝申し上げる。

文 献

- 1) M. R. Wilkins, K. L. Williams, R. D. Appel, and D. F. Hochstrasser, "Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1997).
- 2) 西村俊秀, 川上隆雄, 丸山由佳, 藤田芳司, 遺伝子医学, 4, 617 (2000).
- 3) 川上隆雄, 西村俊秀, 医学のあゆみ, 196, 428 (2001).
- 4) 川上隆雄, 碓井史彦, 西村俊秀, 生物物理化学, 44, 185 (2000).
- 5) 川上隆雄, 安養寺久栄, 西村俊秀, 発現プロファイリングの基本技術: 蛋白質の分離と同定, 原田健一, 田口 良, 橋本豊編, 講談社サイエンティフィック刊, 生命科学のための最新マスマスプロトメトリー—蛋白質解析と薬物動態解析— (印刷中).
- 6) T. Kawakami, T. Nagata, A. Muraguchi, and T. Nishimura, *Electrophoresis*, 21, 1846 (2000).
- 7) M. Chevallet, V. Santoni, A. Poinas, D. Rouquie, A. Fuchs, S. Kieffer, M. Rossignol, J. Lunardi, J. Garin, and T. Rabilloud, *Electrophoresis*, 19, 1901 (1998).
- 8) U. K. Laemmli, *Nature*, 227, 680 (1970).
- 9) A. Görg, C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, and W. Weiss, *Electrophoresis*, 21, 1037 (2000).
- 10) A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann, *Anal. Chem.*, 68, 850 (1996).
- 11) W. E. Scott, S. P. Duffy, M. E. Carrier, and K. D. Nugent, Proc. 49th ASMS Conf. on Mass Spectrometry and Allied Topics, MPF139 (2001).
- 12) T. Kawakami, H. Anyoji, F. Usui, Y. Bando, and T. Nishimura, Abstracts of the 2nd International Proteomics Conference, POS-2-160 (2001).
- 13) 川上隆雄, 安養寺久栄, 西村俊秀, 生化学, 73, 962 (2001).
- 14) C. Gauss, M. Kalkum, M. Lowe, H. Lehrach, and M. Klose, *Electrophoresis*, 20, 575 (1999).
- 15) A. Tsugita, T. Kawakami, T. Uchida, T. Sakai, M. Kamo, T. Matsui, Y. Watanabe, T. Morimasa, K. Hosokawa, and T. Toda, *Electrophoresis*, 21, 1853 (2000).
- 16) R. J. Simpson, L. M. Connolly, J. S. Eddes, J. J. Pereira, R. L. Moritz, and G. E. Reid, *Electrophoresis*, 21, 1707 (2000).
- 17) A. W. Bell, M. A. Ward, W. P. Blackstock, H. N. M. Freeman, J. S. Choudhary, A. P. Lewis, D. Chotai, A. Fazel, J. N. Gushue, J. Paiement, S. Palcy, E. Chevet, M. Lafreniere-Roula, R. Solari, D. Y. Thomas, A. Rowley, and J. J. M. Bergeron, *J. Biol. Chem.*, 276, 5152 (2001).
- 18) W. K. Russell, Z.-Y. Park, and D. H. Russell, *Anal. Chem.*, 73, 2682 (2001).
- 19) A. J. Link, J. Eng, D. M. Schieltz, E. Carmack, G. J. Mize, D. R. Morris, B. M. Garvik, and J. R. Yates, III, *Nat. Biotechnol.*, 17, 676 (1999).
- 20) S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, and R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.*, 17, 994 (1999).
- 21) T. Kawakami, H. Anyoji, and T. Nishimura, *Proteome Digest* (in press).
- 22) 川上隆雄, 第 28 回 BMS コンファレンス講演要旨集 (2001), p. 182.

Keywords: 5D-LC workstation, Disease proteomics, Expression proteomics, Membrane protein, nanoLC/nanoESI-IT/MS/MS, Protein identification, Relative quantitation, Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis