

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011 ～ 2012  
 課題番号：23659305  
 研究課題名（和文）血清中の疾患特異的なタンパク質変異の探索法開発とその可能性の実証  
 研究課題名（英文）Establishment of a strategy for the detection of disease-related modification of proteins in serum.  
 研究代表者  
 北里大学・理学部物理学科・准教授  
 小寺 義男 (KODERA YOSHIO)  
 研究者番号：60265733

研究成果の概要（和文）：疾患特異的な翻訳後修飾やプロテアーゼによる切断、スプライシング異常等のタンパク質の状態変化（ここでは「変異」と記述する）が様々な点で疾患に関与していることは明らかである。本研究では、独自の前処理技術と最先端の質量分析技術を組み合わせて、血清中の任意のタンパク質の変異を網羅的に分析する方法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Modifications of protein such as post-translational modification, cleavage and alternative splicing are caused by disease. In this study, we have developed the strategy to detect disease-related protein modification in serum.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学，血中診断マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

プロテオーム解析の流行に伴い、2000 年初頭から国内でも数多くの研究グループが血清中の診断マーカータンパク質の探索を目指して研究を進めてきた。しかし、新たなマーカーシーズを探索することなく撤退したグループも多い。この原因は、血清の分析が他の組織、臓器などに比べて非常に難しくメーカーの提案する通り一遍の方法では競争力をもてないこと。さらには、マーカー候補を見つけても、真に診断法確立を目指すためには技術開発と臨床医・検査部を含めた密接な共同研究体制が必要である。

研究代表者は理学部物理学科に所属し、北里大学理学部附属疾患プロテオミクスセンターのセンター長ならびに千葉大学医学部附属病院の検査部を母体とした疾患プロテオミクス研究センターに客員准教授として、臨床医、検査技師の大学院生、Ph.D, 理学部の大学院生(計約 50 名)と研究を進めている。

研究内容は、血清を対象とした新たな診断法を獲得することを目指した包括的な技術開発と、それを元にした研究戦略の提案である。既に、独自の血清の前処理方法を含む高精度分析法を確立し、臨床医・検査技師との共同研究のもとに、1 つは 500 例以上の高精度多検体評価 (MS 利用) を経て、検査薬メーカーにて検査薬作製を開始している [PCT/JP2008/51519]。また、複数のマーカー候補に関しては診断応用に向けた多検体評価を進めている。その中で、現在の解決すべき主な課題は以下の 2 点である。

- (1) 数 100 例の検体を対象とした診断マーカー候補の評価 [多検体評価] の迅速化
- (2) 血清中の未だ詳細分析できていない部分の分析法の確立と応用

(1) に関しては、JST の「先端機器開発プロジェクト」の支援の下、質量分析 (MS) メーカー、検査薬会社とともに、MS による迅速な多検体評価法の開発を進めている。こ

の研究では、現在の診断マーカー確立の問題点（疾患特異的な翻訳後修飾を受けたマーカー候補、特異抗体の作りにくいペプチド、高感度 ELISA 系の市販されていないマーカー候補の多検体評価が困難であること）を新たな MS 分析法で克服し、有用で臨床応用可能なマーカーを検査薬メーカーに提案すべく進めている。(2)に関しては、アルブミンに結合した成分の解析（基盤研究(B), 2010-2012年, 研究代表者：小寺）、そして、本研究提案のタンパク質変異状態の解析である。以上のことを実現することにより、ゲノム解析では困難な、タンパク質の状態変化と疾患との関係を解明することが出来ると考えている。

## 2. 研究の目的

疾患特異的な翻訳後修飾やプロテアーゼによる切断、スプライシング異常等のタンパク質の状態変化（ここでは「変異」と記述する）が様々な点で疾患に関与していることは明らかである。しかし、現状ではリン酸化や糖化などの特定の翻訳後修飾については

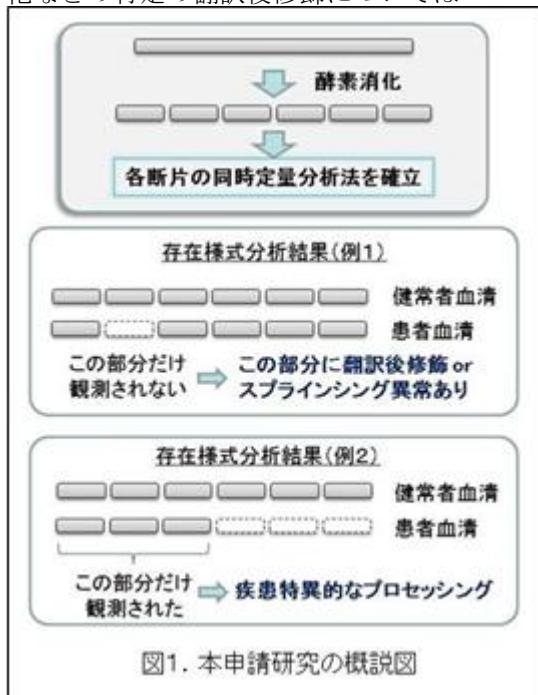


図1. 本申請研究の概説図

その分析が行われているが、それ以外のタンパク質の変異に関しては幅広く探索する方法がない。また、上記のリン酸化や糖化においても複合的な変異やヘテロジニティーの大きい糖鎖に関しては十分とは言えない。そこで、本研究では、独自の前処理技術と最先端の質量分析技術を組み合わせ、血清中の任意のタンパク質の変異を網羅的に分析する方法を開発し、さらに、その変異の各種疾患との相関を解析する（図1）。

## 3. 研究の方法

(1) 定量分析法 (SRM: Selected Reaction

Monitoring) を用いた血中タンパク質の状態変異の解析

多項目同時定量分析が可能な、質量分析計（三連四重極質量分析計）を用いた SRM (Selected Reaction Monitoring) 法を利用して行った。この方法は、まず1段目の四重極フィルター (Q1) によってペプチドを選択し、その後、Q2 にてそのペプチドをガスに衝突させて分解 (CID: Collision Induced Dissociation)、Q3 にてその分解ペプチドの中の1種類だけを選択的に通過させて、通過したペプチドの量を測定する。これによって複雑な試料の中から Q1, Q3 で選択したペプチドだけを定量分析することが出来る。

本研究では、血清中の高存在量タンパク質の除去ならびに複雑性を低減するために独自の血清前処理法などによって目的タンパク質を濃縮し（血清の前処理）、その試料中の目的タンパク質を含む全てのタンパク質をトリプシンにて消化し、その後、SRM 分析によって目的タンパク質の消化断片だけを選択的に定量分析した。

(2) 独自の前処理法と安定同位体標識試薬を用いた比較分析法による血中タンパク質状態変異解析法の確立

(1)の定量分析法では、あらかじめターゲットとしたタンパク質の酵素消化断片しか分析できない。そこで、より幅広いタンパク質の状態変化をタンパク質の存在量変化と共にモニターする方法として、安定同位体標識試薬を使った以下の方法を確立した。

安定同位体標識法としてジメチル化を用いた。ジメチル化反応では、試料に CH<sub>2</sub>O と NaBH<sub>3</sub>CN を加えることでペプチド中の N 端とリジン側鎖のアミノ基の水素原子2つがメチル基に置換される。これにより安定同位体標識試薬を用いない場合、1箇所のジメチル化で分子量が約 28 (Light 標識:L 標識) 大きくなる。これに対して、安定同位体標識試薬 (13CD<sub>2</sub>O と NaBD<sub>3</sub>CN) を用いた場合には、分子量が約 36 (Heavy 標識:H 標識) 大きくなる。一方の試料に L 標識、他方の試料に H 標識を行い、混合して LC-MS 分析することで一つのペプチドを2つのペアの MS スペクトルとして観測し、その量比を調べることで、2種類の試料に含まれるタンパク質・ペプチド量比を比較することができる。2つの試料を同時に測定できるため、LC-MS の測定間における差やイオン化効率を考慮することなく高精度な比較分析が可能である。

## 4. 研究成果

(1) 定量分析法 (SRM: Selected Reaction Monitoring) を用いた血中タンパク質の状態変異の解析分析対象のタンパク質として Apolipoprotein-A1 (Apo-A1) と Transthyreti

(TTR)を選んで、状態変異分析法を確立した。この2種類のタンパク質について定量分析が可能となった部分をそれぞれ図2、図3に赤字で示す。

```

MK AAVLTAVLFLTGSQAR HFWQQDEPPQSPWDR
VK DLATVYVDVLK DSGR DYVSQFEGSALGK QLNLK
LLDNWDSVTSTFSK LREQLPVTOEFWDNLEK ETEGLR
QEMSK DLEEVK AK VQPYLDDFQK K WQEEEM
LYRQK VEPLR AELQEGAR QK LHELQEK LSPLG
EEMR DR AR AHVDALR THLAPYSDEL R QR LAAR
LEALK ENGGAR LAEYHAK ATEHLSTSEK AK PALE
DLR QGILLPVLESFK VSFLSALEEYTK K LNTQ
  
```

図2. Apolipoprotein-A1のアミノ酸配列。定量分析可能となったトリプシン消化断片を赤字で示す。

```

MASHR LLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESK CPLMVK V
LDAVR GSPAINVAVHVR K AADDTWEPFASGK TS
ESGELHGLTTEEEFVEGIYK VEIDTK SYWK ALGISPFH
EHAEVVFTANDSGPR RYTIALLSPYSYSTTAVVTNPK E
  
```

図3. Transthyretinのアミノ酸配列。定量分析可能となったトリプシン消化断片を赤字で示す。

これらのタンパク質断片について健常者8例、肝炎患者2例、肝硬変患者2例、肝癌患者4例の血清中の強度を定量分析した結果、Apo-A1に関しては、全ての断片について疾患特異的な変動は検出できなかった。これに対して、TTRでは、1つのペプチド断片について、肝癌患者血清において平均80%に減少していることがわかった。これは初歩的データであるため、今後の確認ならびに多検体による評価が必要であるが、もし本当であれば、この部分が肝癌特異的に変異を受けていることになる。今後、継続的に進める予定である。

(2) 独自の前処理法と安定同位体標識試薬を用いた比較分析法による血中タンパク質状態変異解析法の確立

(1) で使用した SRM は定量性が高い方法であるが、あらかじめ観測するタンパク質を決めて、ピンポイントでそのペプチド断片を定量する。しかし、各ペプチド断片の定量解析のためのパラメーターを準備する必要がある。このため、ターゲットとなるタンパク質以外を分析することはできない。そこで、疾患に関連して増減するタンパク質マーカーの探索と同時に、タンパク質の状態変化も解析できる方法の確立も試みた。実験方法(2)に記載のジメチル標識法を用いたタンパク質状態変異解析法の確立を行った。

```

MFLKAVVLTALVAVAGARAEVSAQQVATVMWDFYFSQLSNN
AK EAVEHLQK SELTQQQLNALFQDKLGEVNTYAGDQK K
LVFFATELHERLAK DSEK LK EEIGK ELEELR AR LLPHAN
EVSQK IGDNL R ELQQR LEPYADQLR TQVNTQAEQLR R Q
LT PYAGR MER VLR ENADSLQASLR PHADELAK IQQNV
EELKGR LTPYADEFK VKIQDTVEEL R R SLAPYAGDTQEK
LNHQLEGLTFQMK KNAEELK ARISASAEELRQR LAPLAE
DVR GNLR GNTEGLQK SLAELGGHLDQQVEEFR R RVEP
YGENFNK ALVQQMEQLR QKLGPHAGDVE GHLSFLEK DL
RDK VNSFFSTFK EK ESQDK TLSLPELEQQEQEQEQEQ
QEQQVQLAPLES
  
```

図4. Apolipoprotein-A4のアミノ酸配列。ジメチル標識法で比較分析可能となったトリプシン消化断片を赤字で示す。

モデル実験として10μLの血清を2つのチューブに準備し、それぞれ、独自の前処理法でタンパク質を分画後、トリプシン消化し、一方をL標識、他方をH標識した試料を混合してLC-MS分析した。その結果、Apolipoprotein-A4のアミノ酸の約83% (図4)にあたる酵素消化ペプチドを(H標識ピークの強度)/(L標識ピークの強度) = 1 ± 0.1で比較分析できることを確認した (MSスペクトルの一部を図5に示す)。

今後はこの方法を用いてタンパクの増減と個々のタンパク質の状態変異を同時に分析することにより、タンパク質機能状態も含めたマーカー探索を進めていく予定である。

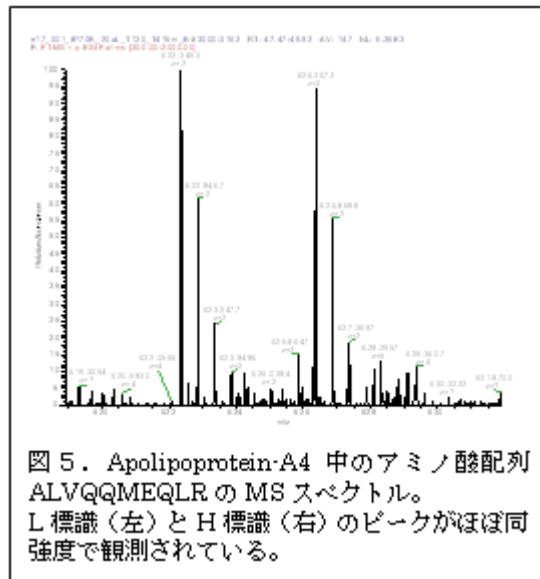


図5. Apolipoprotein-A4中のアミノ酸配列ALVQQMEQLRのMSスペクトル。L標識(左)とH標識(右)のピークがほぼ同強度で観測されている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計21件)(査読あり:19件, 査読なし2件)

① Kawashima Y, Takahashi N, Satoh M, Saito T, Kado S, Nomura F, Matsumoto H, Kodera Y. Enhanced recovery of lyophilized peptides in shotgun proteomics by using an LC-ESI-MS compatible surfactant.

Proteomics. 2013 Mar;13(5):751-5.

② Saito T, Kawashima Y, Minamida M, Matsumoto K, Araki K, Matsui T, Satoh M, Nomura F, Iwamura M, Maeda M, Baba S, Kodera Y. Establishment and application of a high-quality comparative analysis strategy for the discovery and small-scale validation of low-abundance biomarker peptides in serum based on an optimized novel peptide extraction method. *J. Electrophoresis*, 2013;57:1-9, doi: 10.2198/jelectroph.57.1.

③ Tsuchida S, Satoh M, Kawashima Y, Sogawa K, Kado S, Sawai S, Nishimura M, Ogita M, Takeuchi Y, Kobayashi H, Aoki A, Kodera Y, Matsushita K, Izumi Y, Nomura F. Application of quantitative proteomic analysis using tandem mass tags for discovery and identification of novel biomarkers in periodontal disease. *Proteomics*. 2013 May 21. in press.

④ Takada T, Kodera Y, Matsubara M, Kawashima Y, Maeda T, Fujita Y, Shichiri M. Serum monomeric  $\alpha$ 2-macroglobulin as a clinical biomarker in diabetes. *Atherosclerosis*. 2013 May;228(1):270-6.

⑤ Kawashima Y, Satoh M, Saito T, Matsui T, Nomura F, Matsumoto H, Kodera Y. Cyclic sample pooling using two-dimensional liquid chromatography system enhances coverage in shotgun proteomics. *Biomed Chromatogr*. 2013 Jun;27(6):691-4.

⑥ Ichimura K, Kawashima Y, Nakamura T, Powell R, Hidoh Y, Terai S, Sakaida I, Kodera Y, Tsuji T, Ma JX, Sakai T, Matsumoto H, Obara T. Medaka fish, *Oryzias latipes*, as a model for human obesity-related glomerulopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Feb 22;431(4):712-7.

⑦ Yamamoto T, Nakayama K, Hirano H, Tomonaga T, Ishihama Y, Yamada T, Kondo T, Kodera Y, Sato Y, Araki N, Mamitsuka H, Goshima N. Integrated view of the human chromosome X-centric proteome project. *J Proteome Res*. 2013 Jan 4;12(1):58-61.

⑧ Ishii N, Carmines PK, Yokoba M, Imaizumi H, Ichikawa T, Ikenagasa H, Kodera Y, Oh-Ishi M, Aoki Y, Maeda T, Takenaka T, Katagiri M. Angiotensin-converting enzyme inhibition curbs tyrosine nitration of mitochondrial proteins in the renal cortex during the early stage of diabetes mellitus in rats. *Clin Sci (Lond)*. 2013 Apr;124(8):543-52.

⑨ Mochizuki A, Kodera Y, Saito T, Satoh M, Sogawa K, Nishimura M, Seimiya M, Kubota

M, Nomura F. Preanalytical evaluation of serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 measurements using LC-MS/MS. *Clin Chim Acta*. 2013 May;420:114-20.

⑩ Narumi R, Murakami T, Kuga T, Adachi J, Shiromizu T, Muraoka S, Kume H, Kodera Y, Matsumoto M, Nakayama K, Miyamoto Y, Ishitobi M, Inaji H, Kato K, Tomonaga T. A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J Proteome Res*. 2012 Nov 2;11(11):5311-22.

⑪ Kimura A, Sogawa K, Satoh M, Kodera Y, Yokosuka O, Tomonaga T, Nomura F. The application of a three-step serum proteome analysis for the discovery and identification of novel biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Int J Proteomics*. 2012;2012:623190.

⑫ Kikkawa S, Sogawa K, Satoh M, Umemura H, Kodera Y, Matsushita K, Tomonaga T, Miyazaki M, Yokosuka O, Nomura F. Identification of a Novel Biomarker for Biliary Tract Cancer Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Int J Proteomics*. 2012;2012:108609.

⑬ Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Adachi J, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Kodera Y, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Tomonaga T. Strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples. *J Proteome Res*. 2012 Aug 3;11(8):4201-10.

⑭ Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Kawashima Y, Kado S, Sawai S, Nishimura M, Kodera Y, Matsushita K, Nomura F. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. *Proteomics*. 2012 Jul;12(13):2190-202.

⑮ Motofuji Y, Saito A, Koike M, Kodera Y, Maeda T, Komatsu H. Potential of classification of cancer by multiple discriminant analysis for relationship between cancer and expression of human cellular phosphoprotein. *Biomed Res*. 2012 Apr;33(2):139-43.

⑯ Katada K, Tomonaga T, Satoh M, Matsushita K, Tonoike Y, Kodera Y, Hanazawa T, Nomura F, Okamoto Y. Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker

for head and neck squamous cell carcinoma. J Proteomics. 2012 Mar 16;75(6):1803-15.

⑮ Minamida S, Iwamura M, Kodera Y, Kawashima Y, Tabata K, Matsumoto K, Fujita T, Satoh T, Maeda T, Baba S. 14-3-3 protein beta/alpha as a urinary biomarker for renal cell carcinoma: proteomic analysis of cyst fluid. Anal Bioanal Chem. 2011 Jul;401(1):245-52.

⑯ Noda K, Sogawa K, Kikuchi W, Kiyokawa I, Miura T, Kojima R, Katayama K, Kodera Y, Nomura F. Development of a sandwich ELISA for the 5.9-kDa fibrinogen alpha C chain fragment detected by serum proteome analysis. Proteomics Clin Appl. 2011 Apr;5(3-4):141-6.

⑰ Sogawa K, Kodera Y, Noda K, Ishizuka Y, Yamada M, Umemura H, Maruyama K, Tomonaga T, Yokosuka O, Nomura F. The measurement of a fibrinogen  $\alpha$  C-chain 5.9 kDa fragment (FIC 5.9) using MALDI-TOF MS and a stable isotope-labeled peptide standard dilution. Clin Chim Acta. 2011 May 12;412(11-12):1094-9.

⑱ Minamida S, Iwamura M, Kodera Y, Kawashima Y, Ikeda M, Okusa H, Fujita T, Maeda T, Baba S. Profilin 1 overexpression in renal cell carcinoma. Int J Urol. 2011 Jan;18(1):63-71.

21 Sogawa K, Kodera Y, Satoh M, Kawashima Y, Umemura H, Maruyama K, Takizawa H, Yokosuka O, Nomura F. Increased serum levels of pigment epithelium-derived factor by excessive alcohol consumption-detection and identification by a three-step serum proteome analysis. Alcohol Clin Exp Res. 2011 Feb;35(2):211-7.

〔学会発表〕(計 32 件)

主な招待講演、シンポジウム発表を以下に記載する。

① 小寺義男, 血中診断マーカーペプチド獲得を目指したペプチドーム解析法の包括的な開発, 第 19 回遺伝子診療学会/シンポジウム (招待講演), 2012 年 7 月 28 日, 千葉

② 小寺義男, 血中診断マーカーペプチド獲得を目指したペプチドーム解析法の包括的な開発, 第 10 回日本プロテオーム学会 (JHUP0) 年会 (シンポジウム), 2012 年 7 月 27 日, 東京

③ 小寺義男, 血中疾患マーカーペプチド獲得を目指した包括的なアプローチ, 東北大学医学部・最先端学術セミナー (招待講演), 2012 年 6 月 15 日, 東北大学医学部

④ 小寺義男, 血中診断マーカーペプチド獲得を目指した包括的なアプローチ, 第 2 回バ

イオビジネス・スタートアップーバイオマーカー研究と診断への応用ー (招待講演), 2011 年 12 月 20 日, 横浜

⑤ 小寺義男, 血中診断マーカーペプチド開発に向けた様々なアプローチ, 第 224 回液体クロマトグラフィー研究懇談会 (招待講演), 2011 年 10 月 25 日, 東京

⑥ 小寺義男, 共同利用における LC-MS 解析, 第 84 回日本生化学会・フォーラム (フォーラム企画、発表), 2011 年 9 月 23 日, 京都

⑦ 小寺義男, 血中診断マーカー獲得を目指した定量的プロテオミクス, 日本プロテオーム学会 2011 大会 (シンポジウム), 2011 年 7 月 29 日, 新潟

〔図書〕(計 1 件)

① 小寺義男, 朝長毅, 臨床プロテオミクスーバイオマーカー探索から個別化医療へー, 第 3 章 臨床試料の取り扱い「2. 血液 (血漿) および生体試液」, p64-69, 平成 24 年 5 月 15 日 (金原出版株式会社,)

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 2 件)

名称: METHOD FOR CONCENTRATION OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT PROTEINS AND PEPTIDES IN BODY FLUID SAMPLE

発明者: Kodera Y. Kawashima Y. Maeda T.

権利者: The Kitasato Institute

種類: U. S. Patent

番号: No. 8, 399, 260

取得年月日: 2013 年 3 月 19 日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小寺 義男 (KODERA YOSHIO)

北里大学・理学部物理学科・准教授

研究者番号: 60265733

(3) 連携研究者

前田 忠計 (MAEDA TADAKAZU)

北里大学・名誉教授

研究者番号: 90265728

野村 文夫 (NOMURA FUMIO)

千葉大学大学院・医学研究院・教授

研究者番号: 80164739

五島 直樹 (GOJIMA NAOKI)

(独) 産業技術総合研究所生物情報解析

研究センター・主任研究員

研究者番号: 70215482