

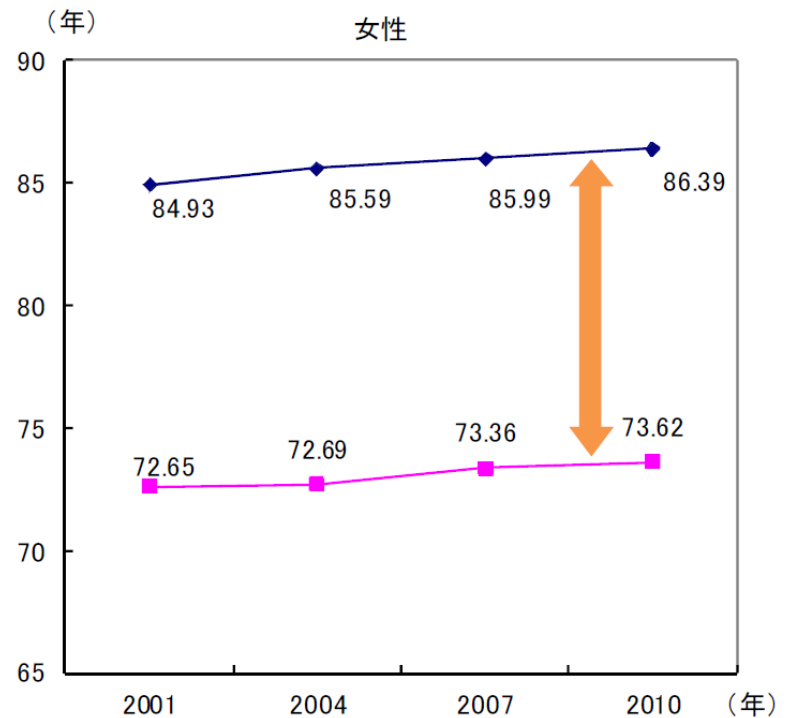
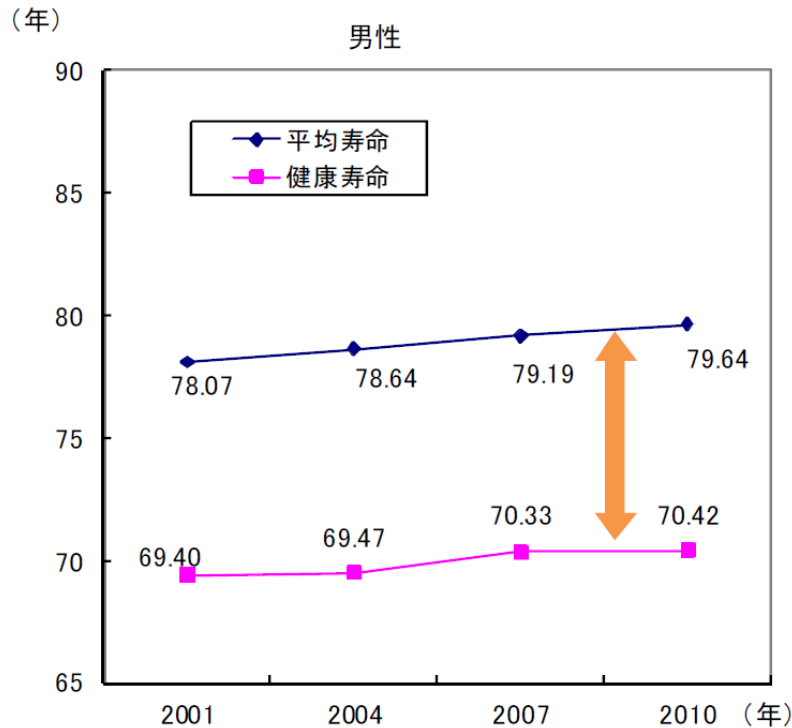
# 生体分子の計測が拓く健康長寿



一般財団法人化学物質評価研究機構

山中 秀徳

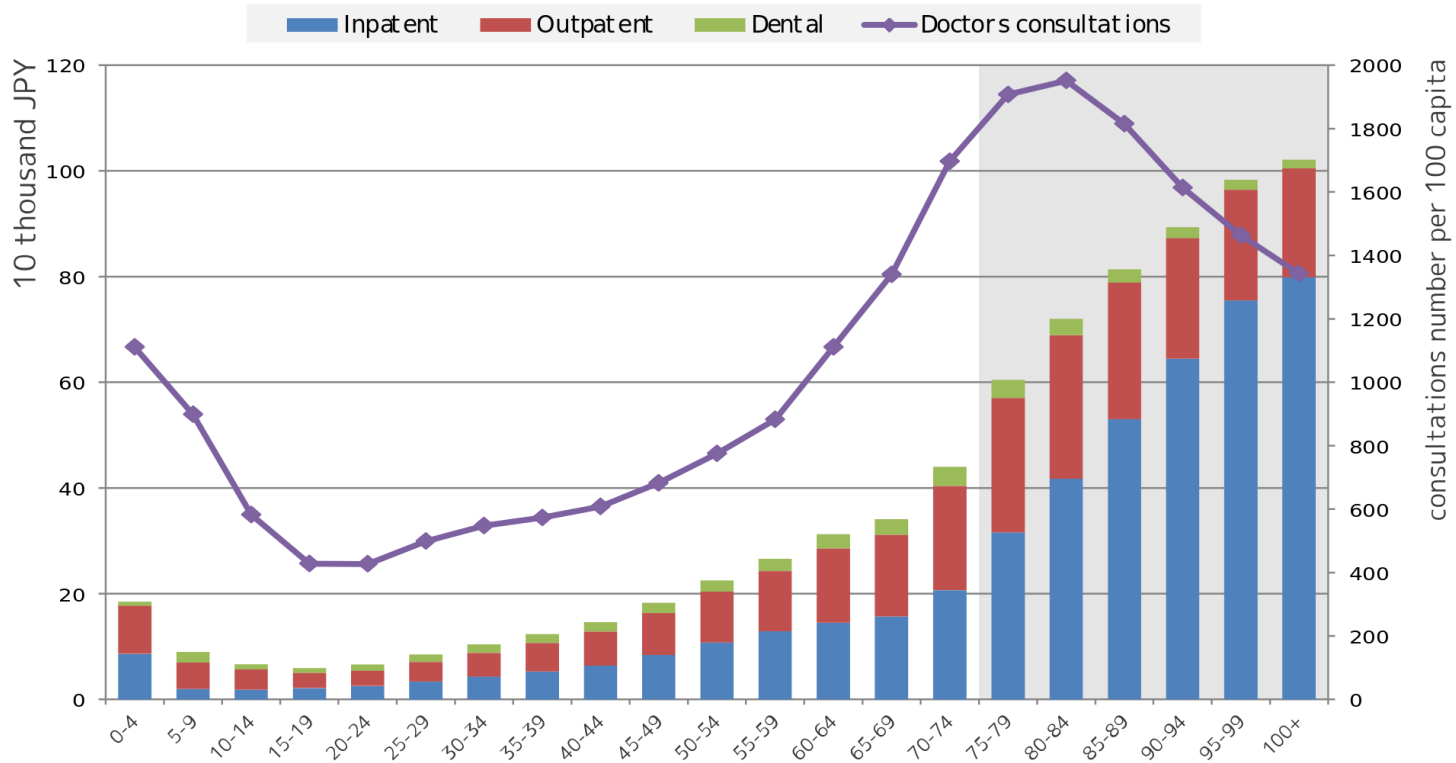
# 健康寿命と平均寿命の推移



健康寿命の伸びは平均寿命の伸びよりも小さい

# 年齢と医療費

Health care expenditures in Japan NHI and  
Latter-Stage Elderly Healthcare by Age (MHLW, 2012)



国民1人あたりの生涯医療費は、男性で2,600万円、女性で2,800万円であり、その50%は70歳以上のステージで発生している(2016年推計)

# 老化を治療する時代へ

若者と老人の違いは何か？



生体分子を網羅的に定量比較解析  
差のある分子を見つける



老化マーカー測定による老化のモニタリング



老化の予防、治療

# 生体分子を網羅的に検出する技術

**High Throuput  
DNA Sequening**

DNA塩基配列解析

**Mass  
Spectrometry**

Gene/タンパク質  
マッピング解析

**Genome**  
ゲノム

**Transcriptome**  
トランスクリプトーム

**Proteome**  
プロテオーム

**Metabolome**  
メタボローム

ゲノム解析  
(SNPsなど)

遺伝子発現解析

タンパク質発現解析

**DNA Microarray**

**Mass  
Spectrometry**

# 生体分子の網羅的解析

ヒトゲノム30億塩基対 ÷ 200万塩基/年 = 1500年

東京大学 和田昭允氏

DNAシーケンサーの開発計画 (1981)

国際的なDNA配列解析の必要性 (米国での講演、1986)

DOE: チャールズ・デリシ氏、1986)

NIH: ジェームズ・ワインガーデン氏 (1987)

日本の経済的脅威 (80年代のバブル期) への対抗処置

➡ **ヒトゲノム計画**

ヒトゲノム概要配列決定終了 (2000. 6. 26)

# 遺伝子の網羅的解析

ヒトゲノム解析を加速した技術

組換え技術と遺伝子クローニング技術

PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）

ハイスループットDNAシーケンサー

強力なコンピューティングパワー



1500年が10年に

# ゲノム解析の現在

ハイスループットDNAシーケンサー



NGS : 次世代シーケンサー



USBタイプのシーケンサー

Nanopore Sequencer



この20年間で

解析時間: 1500年 → 10年 → 数週間  
解析費用: 3000億円 → 14万円



# タンパク質の網羅的解析

## 黎明期のショットガンプロテオミクス

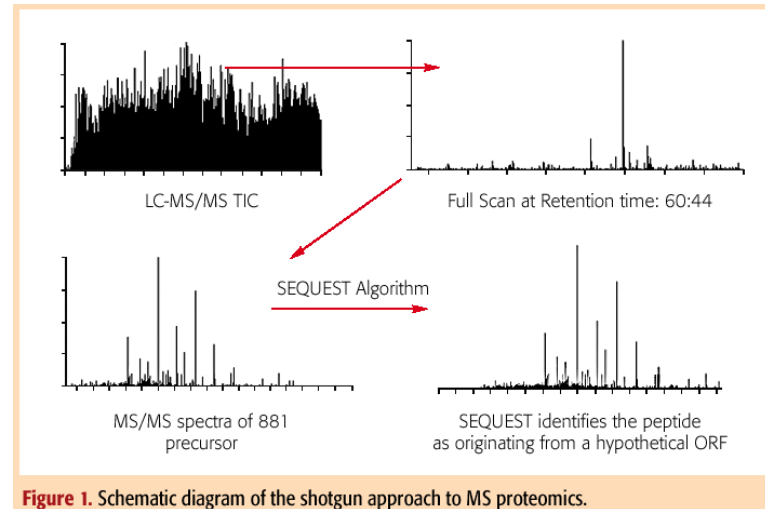
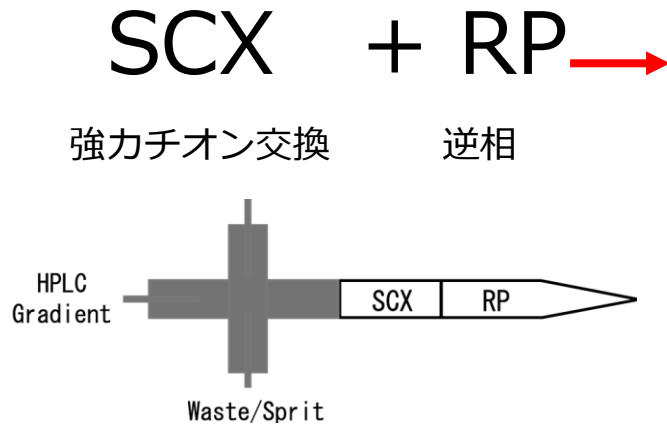


Figure 1. Schematic diagram of the shotgun approach to MS proteomics.

identified: **1484** proteins  
(assigned; 5540 peptides)

Large-scale analysis of the yeast proteome  
by multidimensional protein  
identification technology

Michael P. Washburn<sup>1\*</sup>, Dirk Wolters<sup>1†</sup>, and John R. Yates III<sup>1,2\*</sup>

*Nature Biotechnology*  
2001,19, 242 - 247

# プロテオミクス解析の現在

## モノリス

### モノリスカラム

(4 m, 100  $\mu$ m i.d. ODS column )

4  $\mu$ g HeLa cell lysate proteins

8h gradient, 500 nL/min

**41,319 peptides**

*J Chromatogr A.* **2012**,1228, 292-297.

## CERI L-Column

### 充填型のナノLCカラム

(50 cm, 75  $\mu$ m i.d. ODS column )

1  $\mu$ g HeLa cell lysate proteins

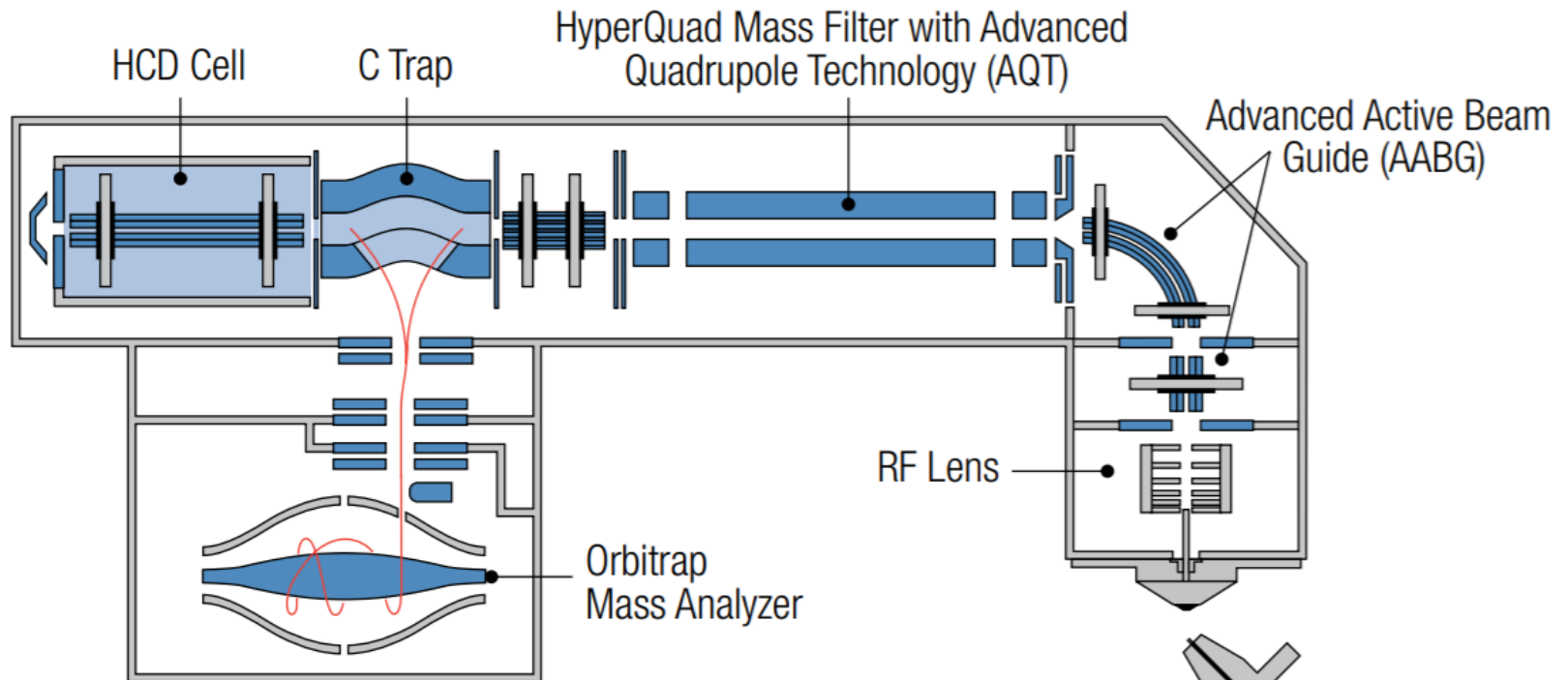
12h gradient, 200 nL/min

**53,657 peptides**



質量分析装置の感度、スキャンスピードの飛躍的な向上  
同定数はこの20年間で 数十倍

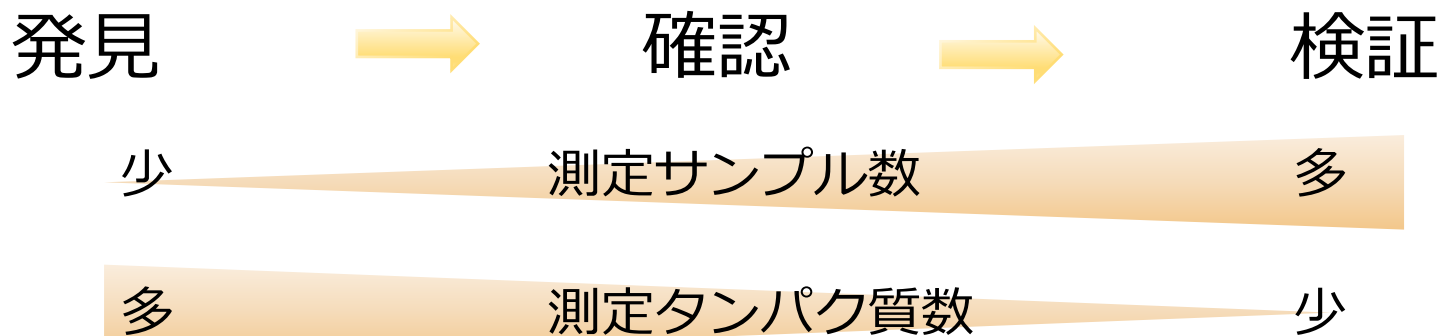
# 質量分析装置の構造



Q-Exacte 質量分析計

# プロテオミクス解析によるマーカー探索

## マーカー探索のステップ



LFQ: ノンラベル定量

ショットガン解析:

DDA: Data Dependent Acquisition

DIA解析:

DIA: Data Independent Acquisition

安定同位体ラベル比較解析

SILAC、ICAT、NBS

iTRAQ、TMT

ターゲット解析

SRM

PRM

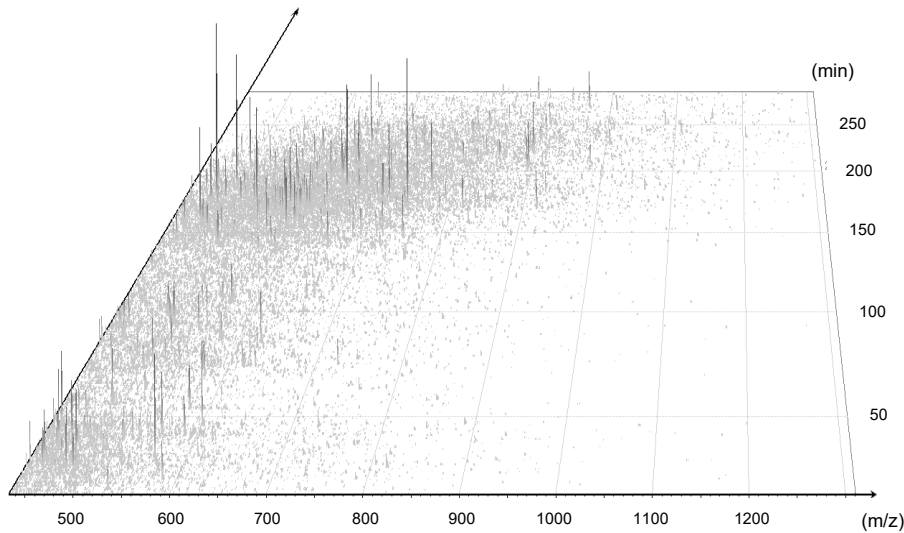


各ステップで質量分析装置を用いた様々な手法を使用

# タンパク質の網羅的比較解析における課題

## LFQ:ノンラベル定量の例

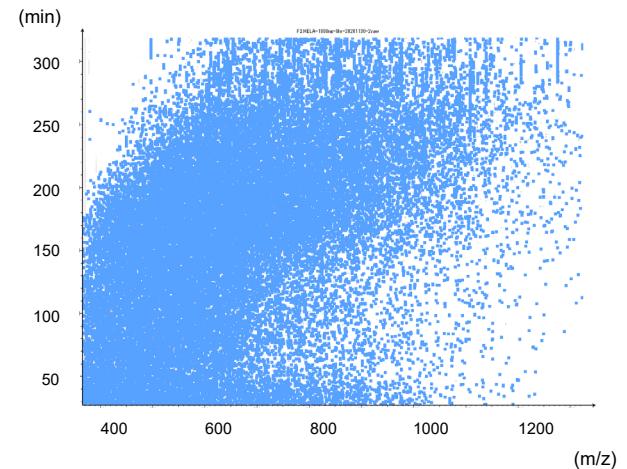
ヒトの細胞中に発現しているタンパク質は約 1 万6000種、消化して生成する約10万種のペプチドを分離定量する必要がある



LCクロマトグラムの3D表示



### ■ 同定されたMS/MSスペクトル



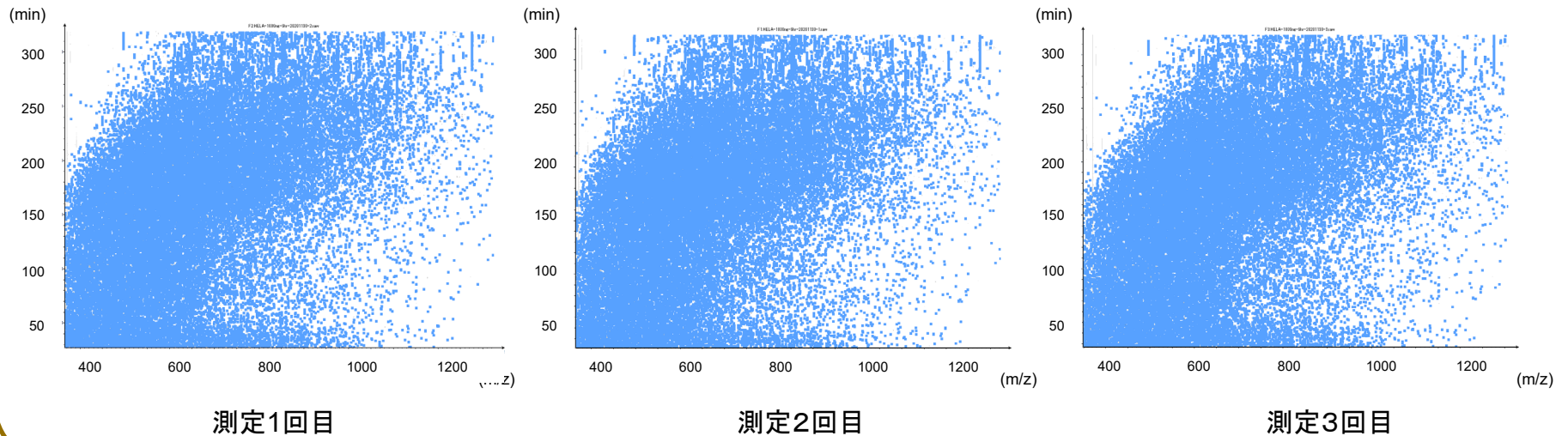
同定されたMS/MSスペクトル取得ポイントのLCクロマトグラム上の位置 (2D表示)

# タンパク質の網羅的比較解析における課題

## LFQ:ノンラベル定量の例

同一サンプルを3回測定した場合のLCクロマトグラムと比較

■ 同定されたMS/MSスペクトル

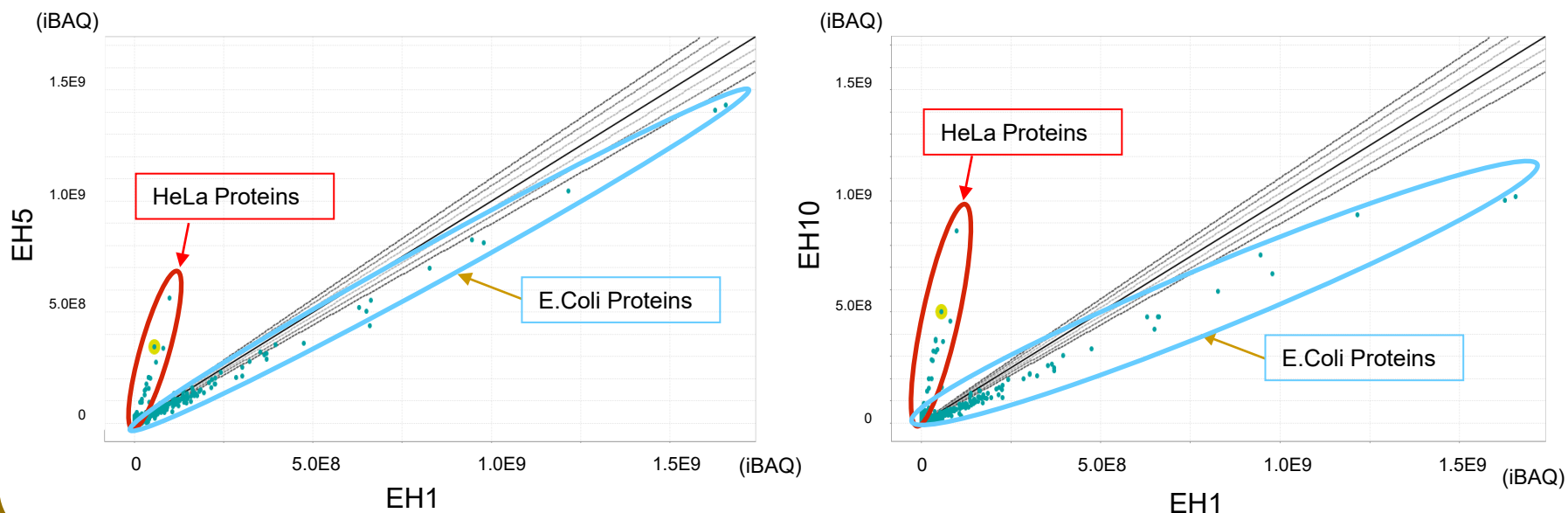


同定されたMS/MSデータを取得しているポイントが全く同じにはなっていない

# タンパク質の網羅的比較解析における課題

ラベルフリー定量における定量比較の値の信頼性を評価するために、一定量(100 ng)のE. coli Digestion StandardにHeLa Protein Digest Standardを1 ng、5 ng、10 ng添加したサンプル (EH1、EH5、EH10)の各々をn=2でショットガン解析した結果をLFQで定量比較した。

ショットガン解析でヒットしたタンパク質全体の相関 (iBAQ)

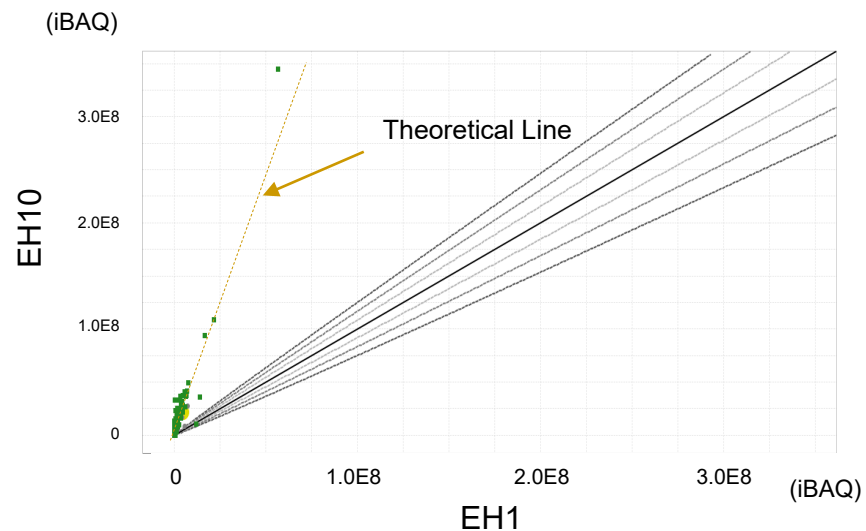
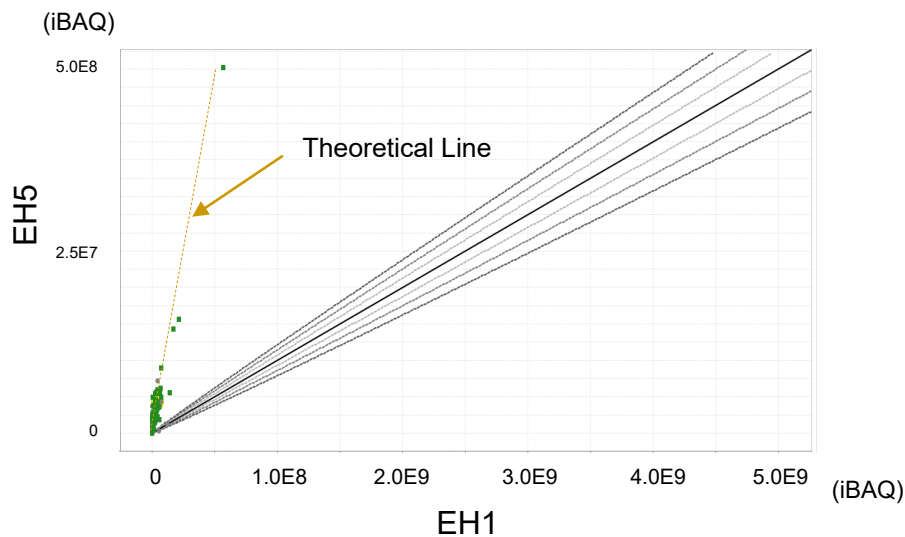


(Waters社 : MassPREP E. coli Digestion Standard、Thermo社 : Pierce™ HeLa Protein Digest Standard)

# タンパク質の網羅的比較解析における課題

前頁の定量解析結果の中でHeLaでヒットしたタンパク質のみを下図に表示

ショットガン解析でヒットしたHeLa由来タンパク質全体の相関(iBAQ)



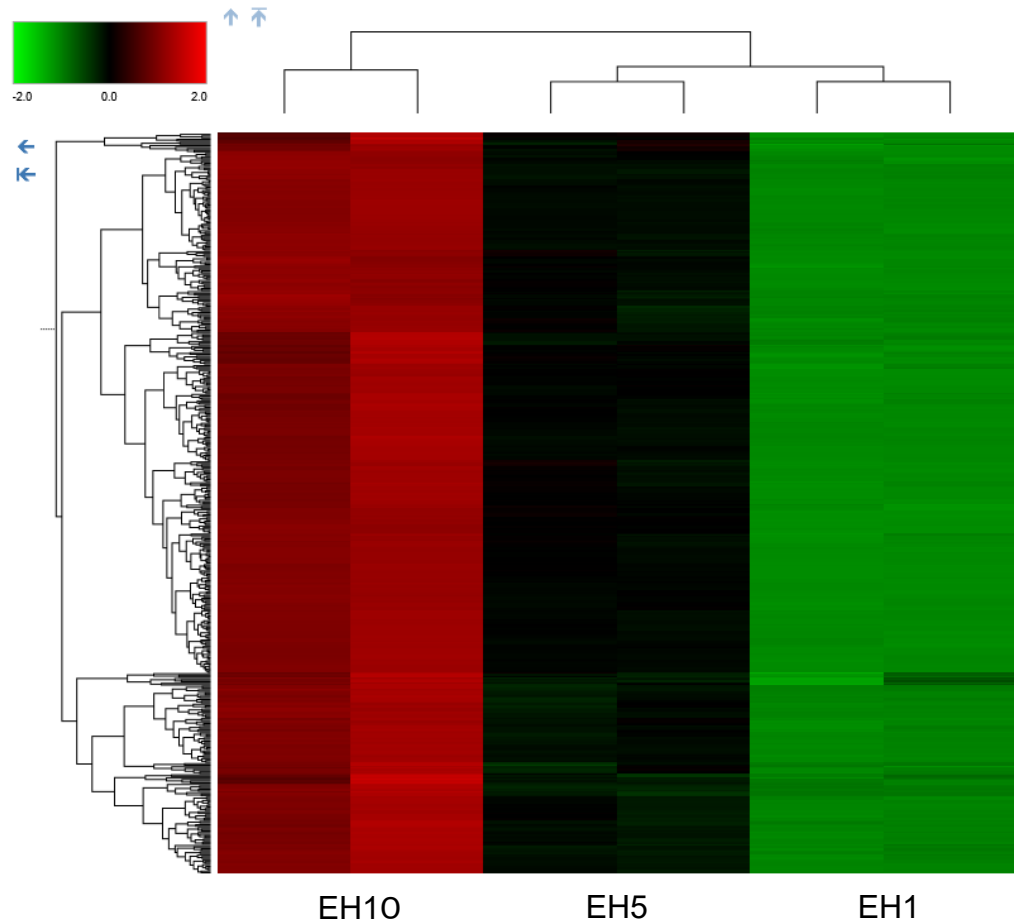
ヒットしたタンパク質全体で見るとおよそ理論値に近い比率



# タンパク質の網羅的比較解析における課題

タンパク質の定量結果をクラスター解析で評価（HeLa由来タンパク質のクラスター）

Data Source: Proteins : Abundances  
Distance Function: Euclidean  
Linkage Method: Complete  
Scaling: Scale Before Clustering



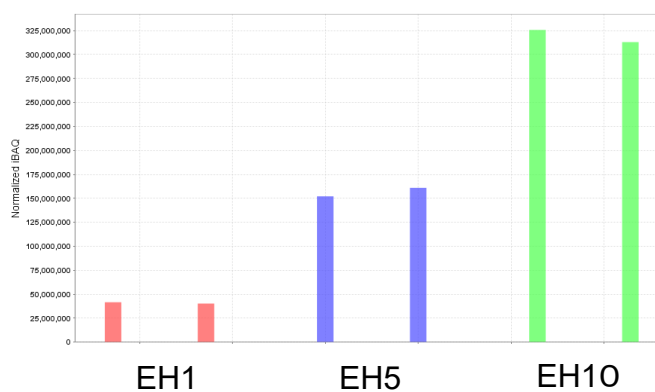
⇒ バラツキもみられるが全体的にはおよそ理論値に近い比率

# タンパク質の網羅的比較解析における課題

定量解析結果の中で良好な例と不良な例を以下に示した。

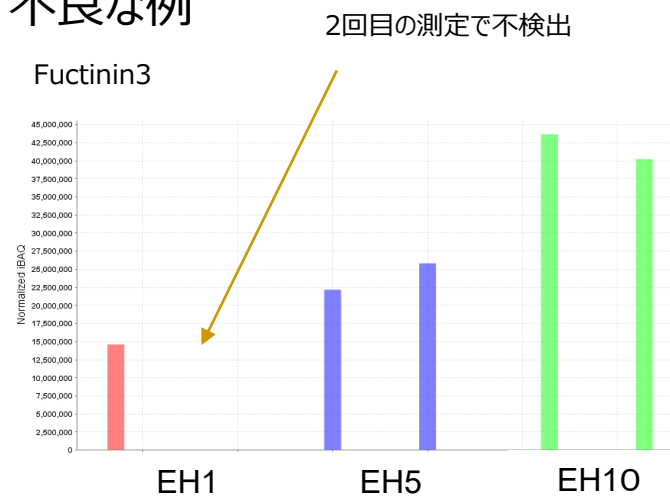
## 良好な例

(iBAQ) Hemoglobin Fetal subunit beta



## 不良な例

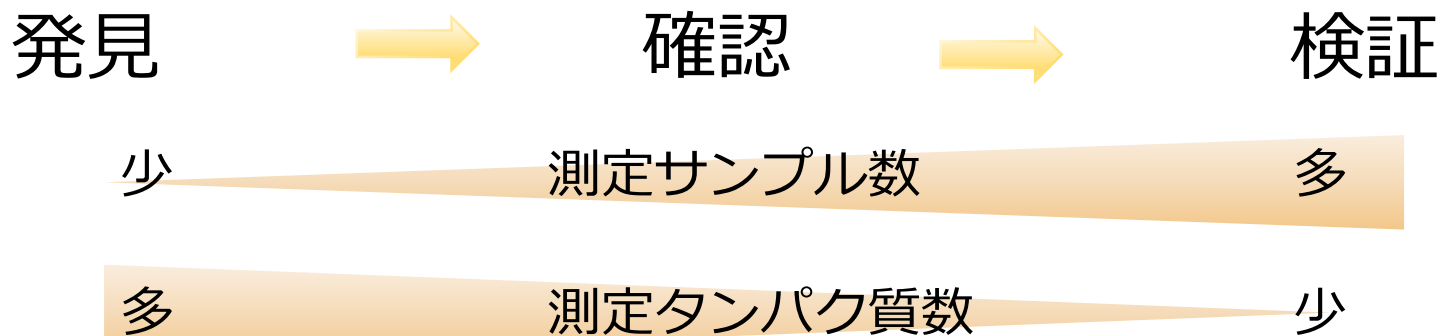
(iBAQ) Fuctinin3



欠損値があったり、定量比が大きすぎるタンパク質も存在する

# プロテオミクス解析によるマーカー探索

## マーカー探索のステップ



LFQ: ノンラベル定量

ショットガン解析:

DDA: Data Dependent Acquisition

DIA解析:

DIA: Data Independent Acquisition

安定同位体ラベル比較解析

SILAC、ICAT、NBS

iTRAQ、TMT

ターゲット解析

SRM

PRM

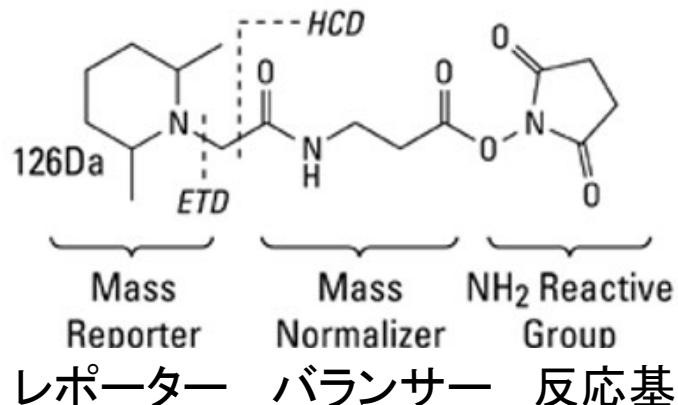


各ステップで質量分析装置を用いた様々な手法を使用

# 安定同位体ラベルを使用した定量比較

## 酵素消化後のペプチドをラベルする方法

TMT (Tandem Mass Tag: Thermo Fisher Scientific社)



基本的な構造はiTRAQで用いる  
タグと同様

Q-Exactiveの高分解能の利点を活かした16plex

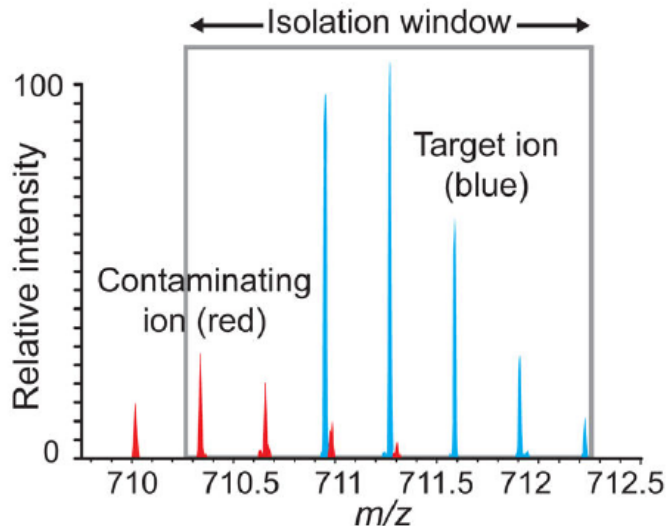
TMT10-127N - 127.124761  
TMT10-127C - 127.131081



N<sup>15</sup>とC<sup>13</sup>の小数点以下の質量数の差を  
利用することで16種のラベル剤が利用可能

# 安定同位体ラベルを使用した 定量比較解析の問題点

## Ratio distortion



MS1でイオンを選択する際のWindow内に存在する他のペプチド由来のイオンも一緒にCIDで壊してしまう。

2つのペプチドに由来するリポーターイオンの区別がつかないため誤差が生じる。

# 安定同位体ラベルを使用した 定量比較解析の問題点の解決策

## Ratio distortion に対する対策

### 1. MS3を使用する

QEでは不可、Rumos等のMS3が可能な装置が必要

### 2. Isotopologueを使用する

### 3. Complement Reporter Ionを使用する

## 具体的な対策

### 4. Windowを狭くする

### 5. 複雑性の低減 分画

### 6. QCサンプルの使用

# タンパク質の網羅的比較解析

1. マーカー探索の段階に対応した複数の手法が存在
2. ノンラベル定量、安定同位体ラベル法等の各々の手法の課題は解決されつつある



遺伝子の解析と比較するとタンパク質の解析は  
スループットが低く高額

# 老化マーカー探索の最新の例

Discovery proteomics in aging human skeletal muscle finds change in spliceosome, immunity, proteostasis and mitochondria

Ceereena Ubaida-Mohien<sup>1</sup>, Richard D Semba<sup>2</sup>,

1:National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, United States

2:Johns Hopkins Medical Institute, Baltimore, United States

老化による筋力低下の原因？



22~87歳までの健康なヒト58名の筋肉中のタンパク質をプロテオーム解析で比較

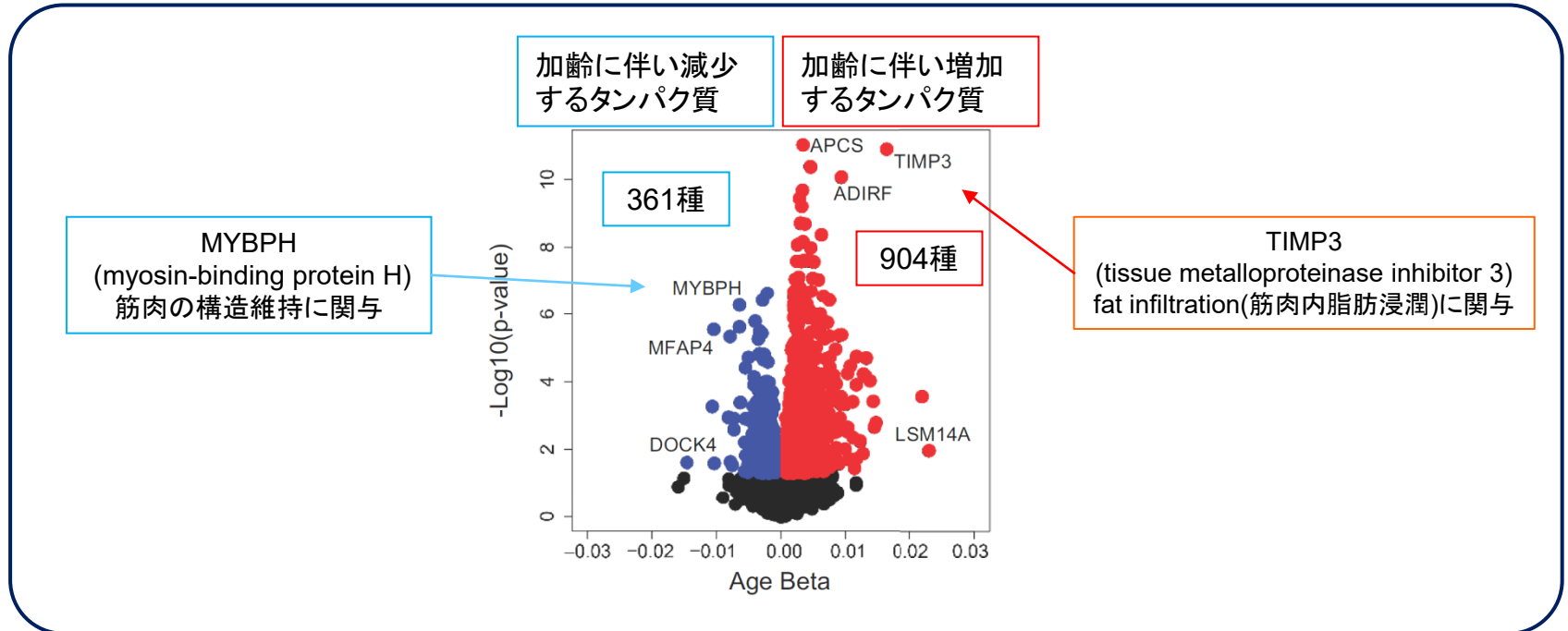
安定同位体ラベル法  
(TMT 6plex 12set)

比較したヒト（一部）

Age	Gender	Race
22	Male	Caucasian
25	Male	Asian
31	Female	Asian
31	Male	African American
42	Female	Caucasian
42	Male	African American
52	Female	African American
52	Female	Caucasian
67	Female	Caucasian
67	Male	African American
73	Female	Caucasian
73	Male	Caucasian
86	Male	Caucasian
87	Male	Caucasian



# 老化マーカー探索の最新の例



マーカーとしての利用に加えて、増減するタンパク質の機能解析から老化の予防、治療法の開発が期待される

# 生体分子計測の今後

世界的な超高齢化社会を皆が快適に生きるために



マーカー探索：より高速、安価な計測方法の開発

機能解析：時間、空間分解能を向上させた計測方法の開発

マーカーのモニター：安価なウェアラブル計測装置の開発

人類は創意工夫で困難を乗り越えられる