

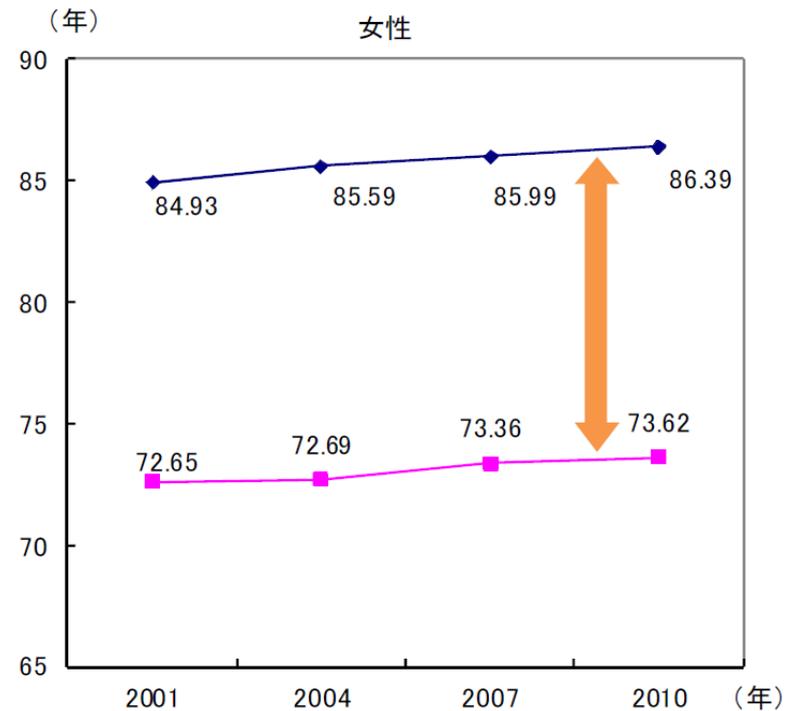
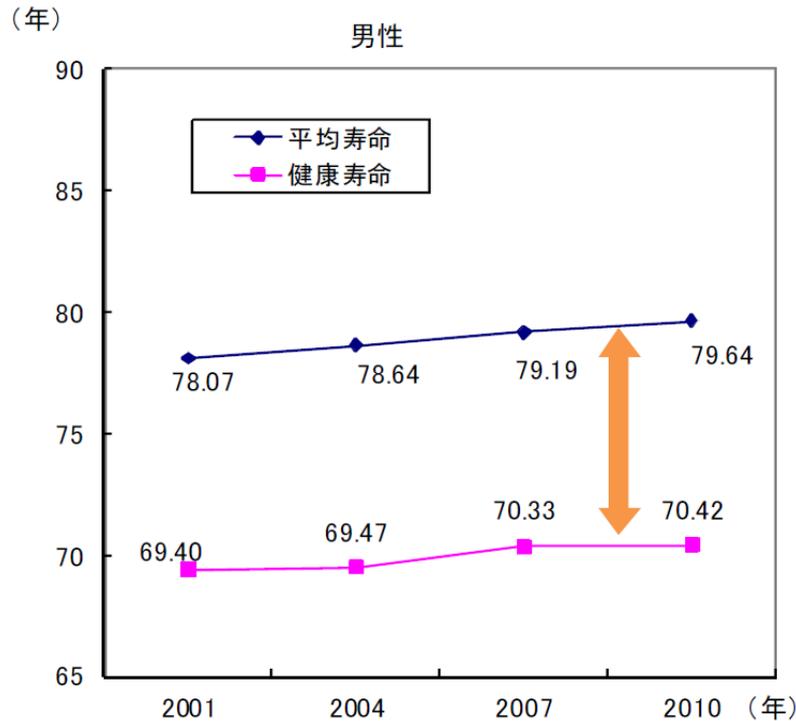
# 生体分子の計測が拓く健康長寿



一般財団法人化学物質評価研究機構

山中 秀徳

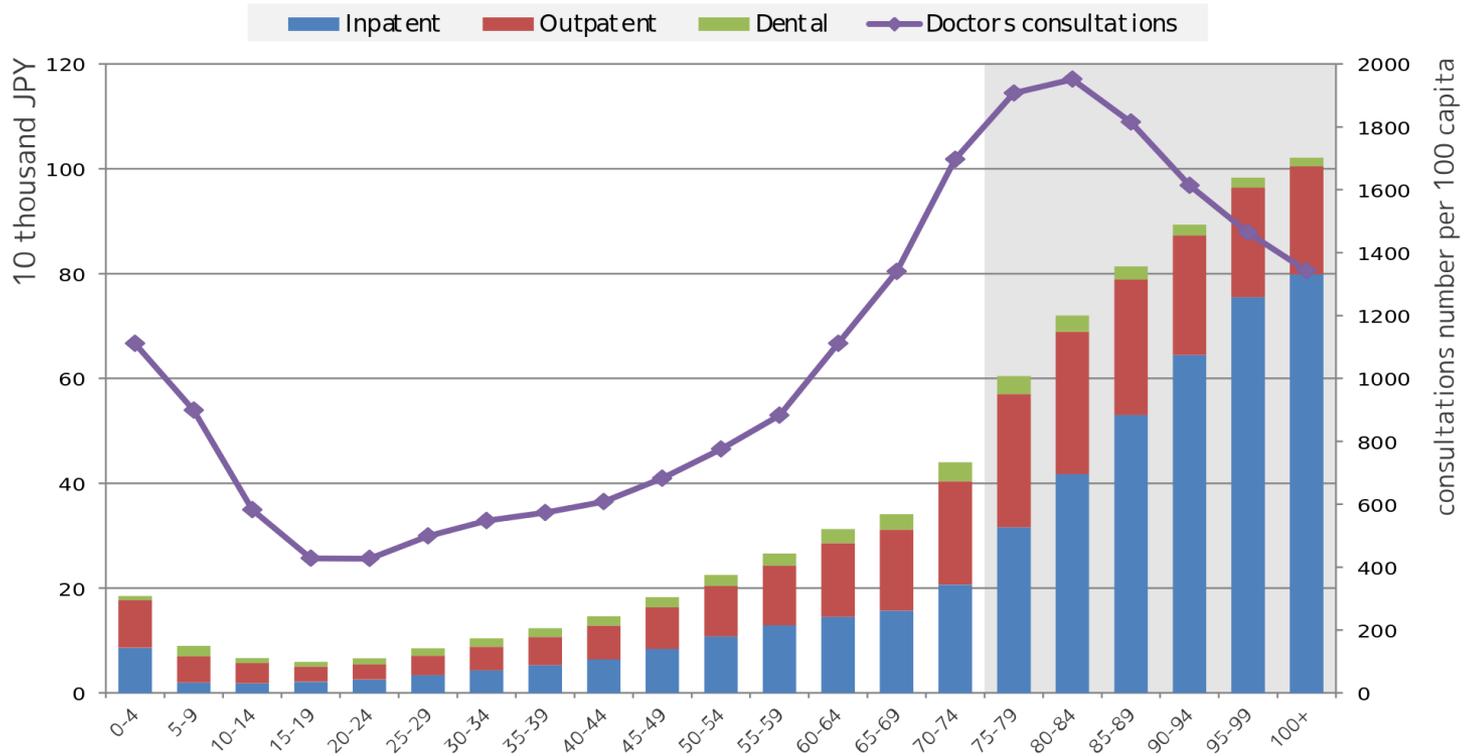
# 健康寿命と平均寿命の推移



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

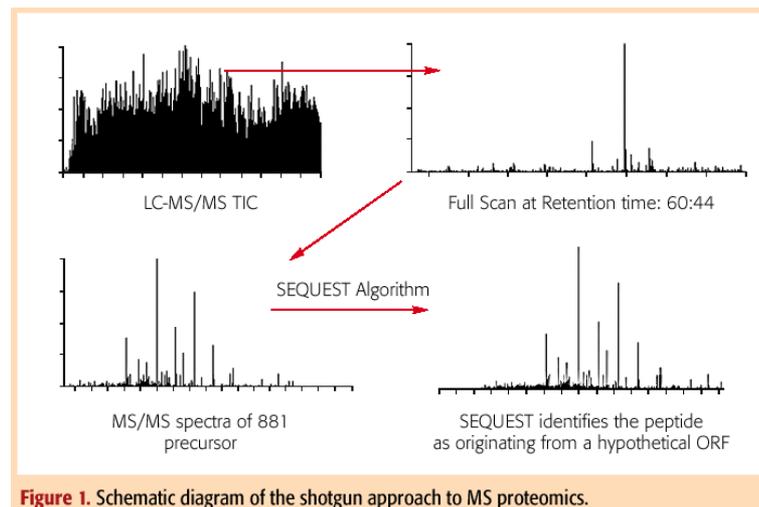
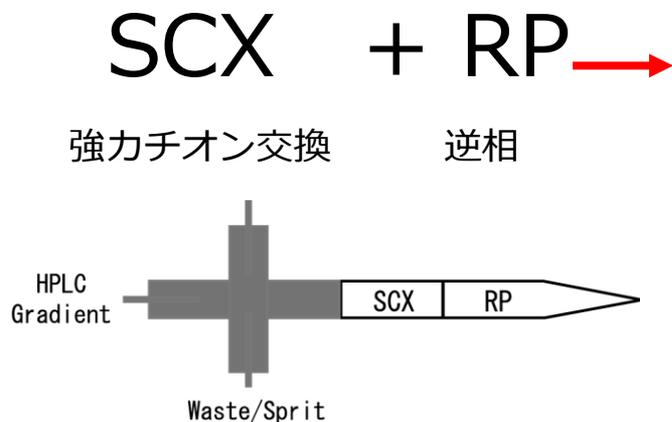


Figure 1. Schematic diagram of the shotgun approach to MS proteomics.

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

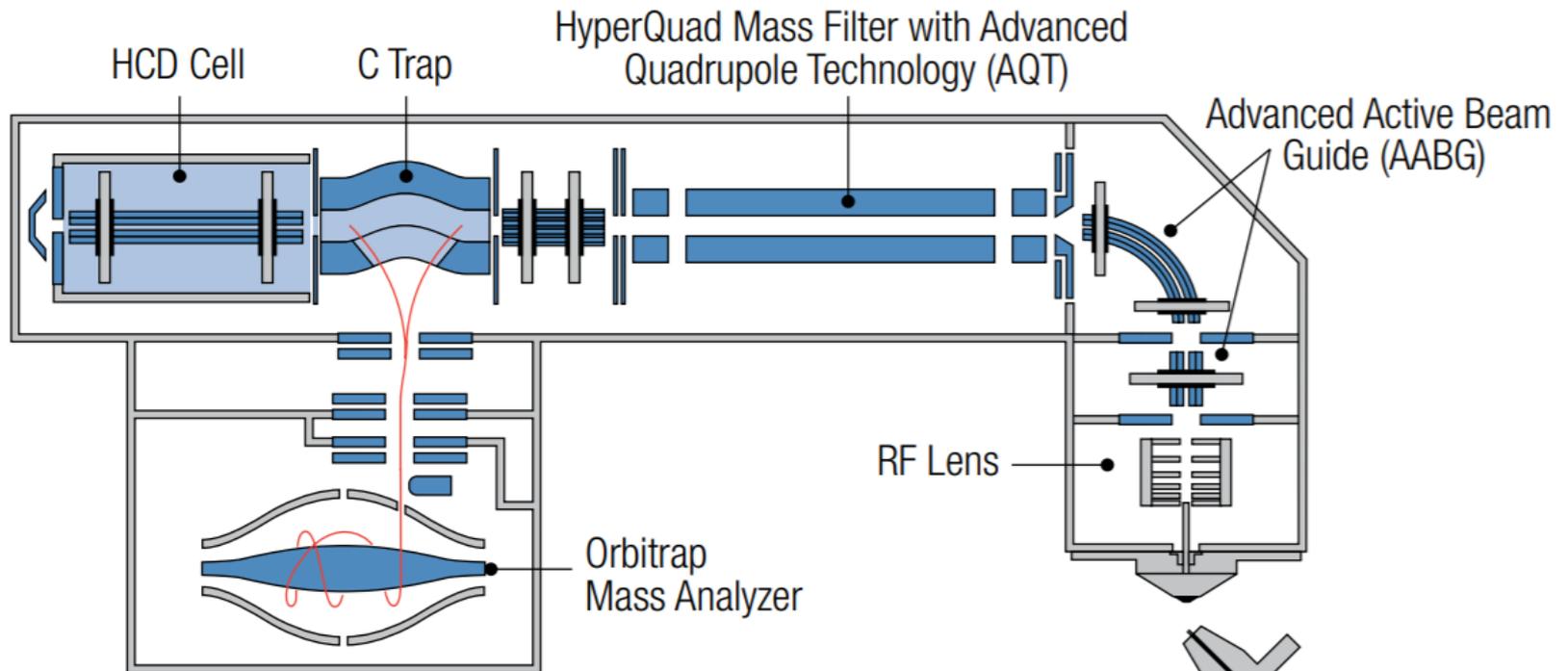
12h gradient, 200 nL/min

**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

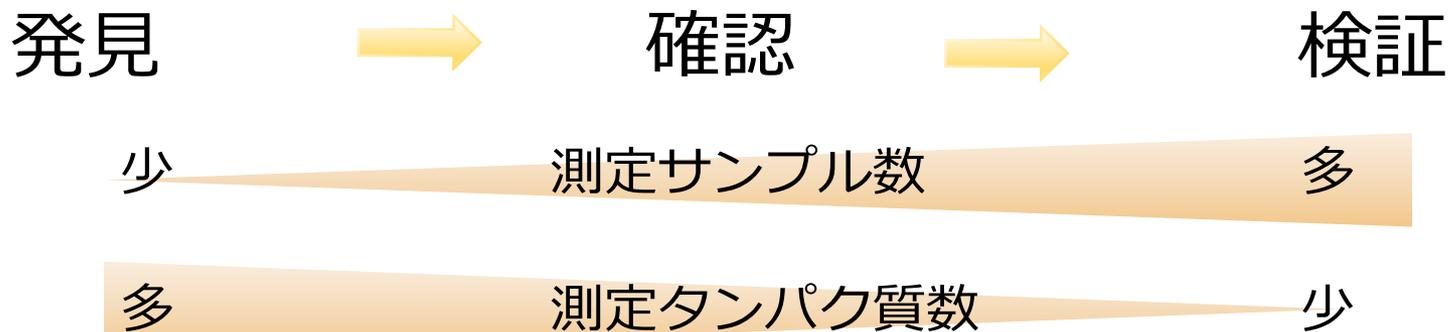
# 質量分析装置の構造



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

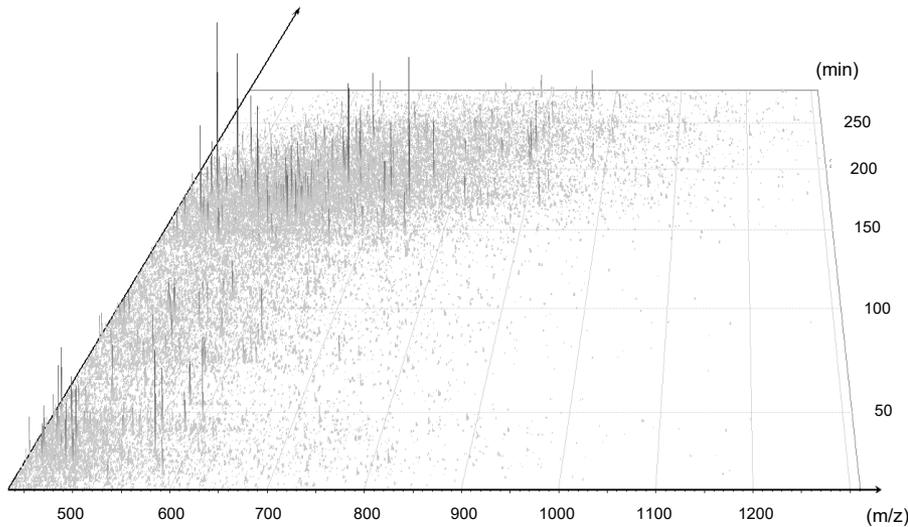


各ステップで質量分析装置を用いた様々な手法を使用

# 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

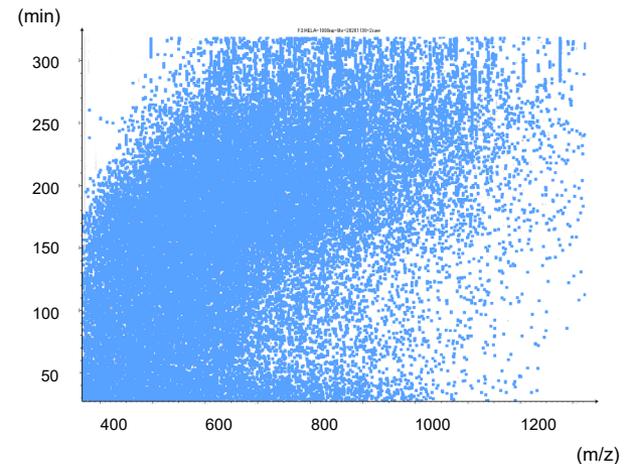
ヒトの細胞中に発現しているタンパク質は約 1 万6000種、消化して生成する約10万種のペプチドを分離定量する必要がある



LCクロマトグラムの3D表示



### ■ 同定されたMS/MSスペクトル



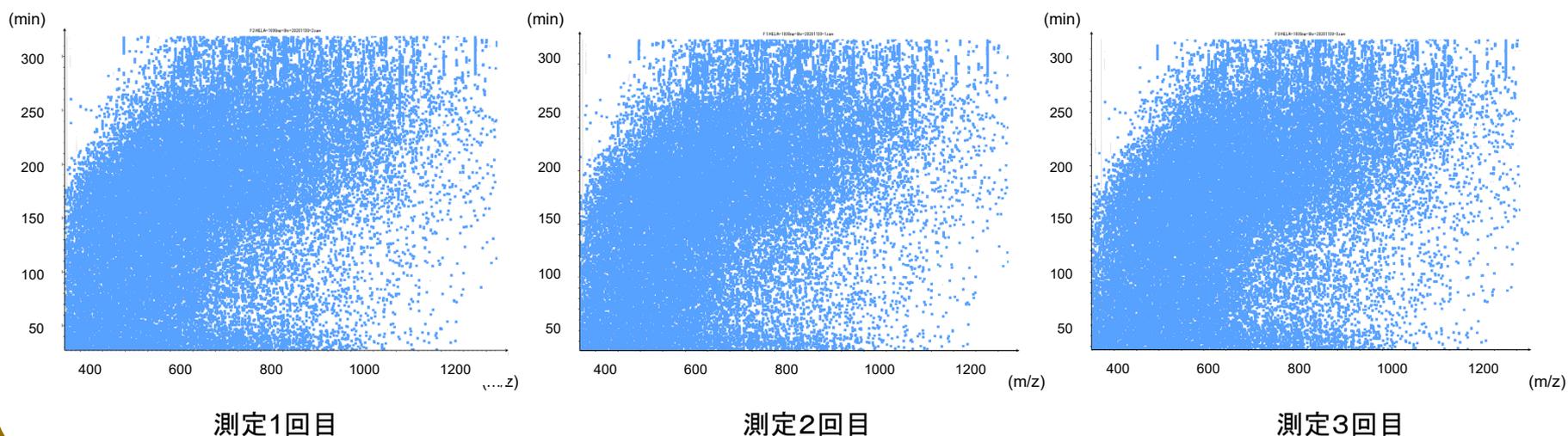
同定されたMS/MSスペクトル取得ポイントのLCクロマトグラム上の位置 (2D表示)

# 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

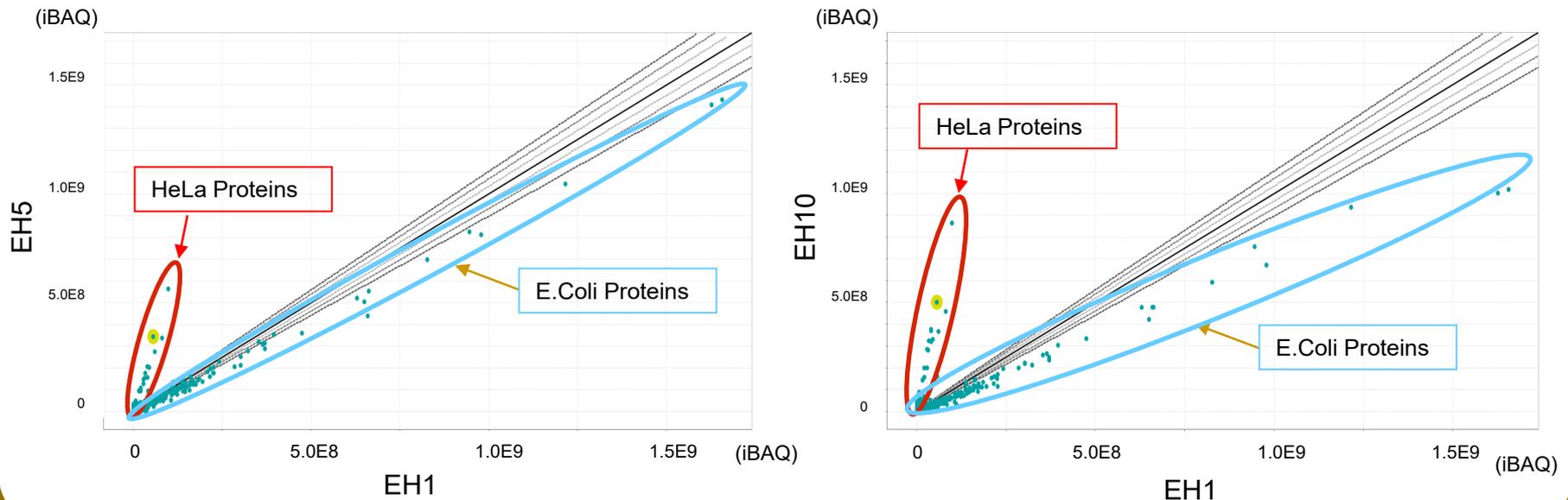


同定されたMS/MSデータを取得しているポイントが全く同じにはなっていない

# 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)

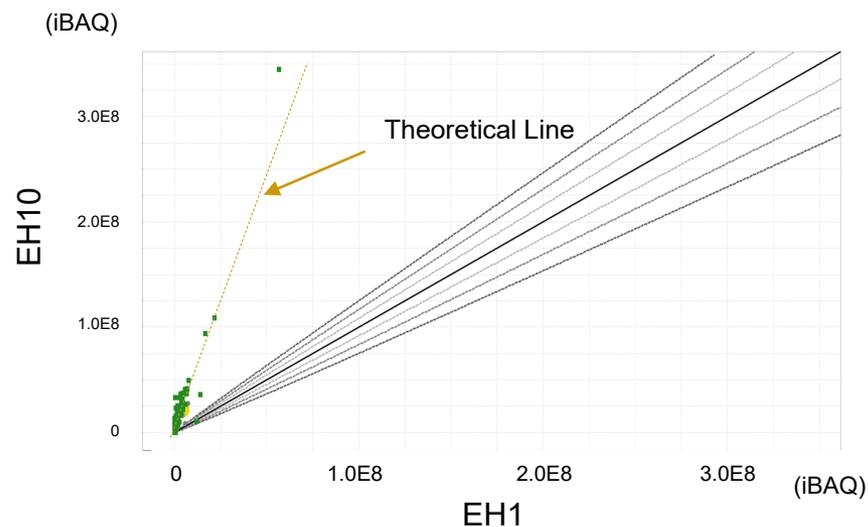
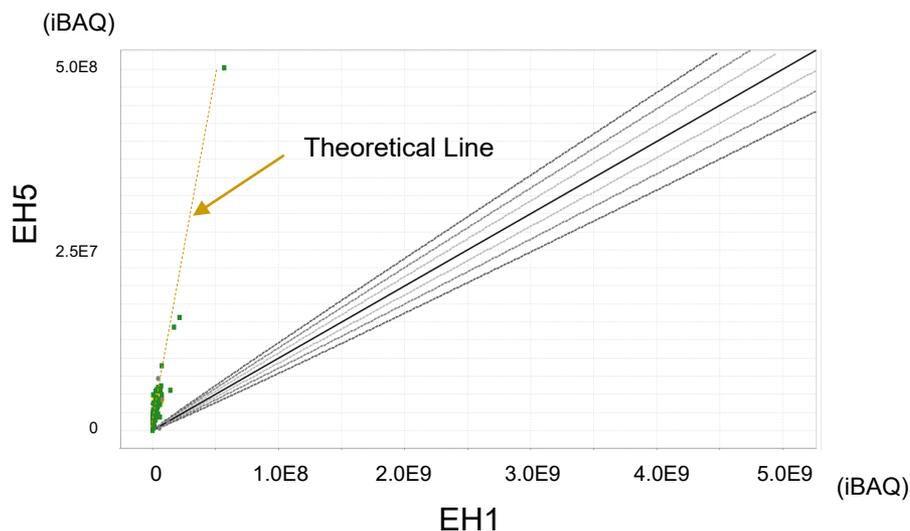


(Waters社 : MassPREP E. coli Digestion Standard、Thermo社 : Pierce™ HeLa Protein Digest Standard)

# 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)

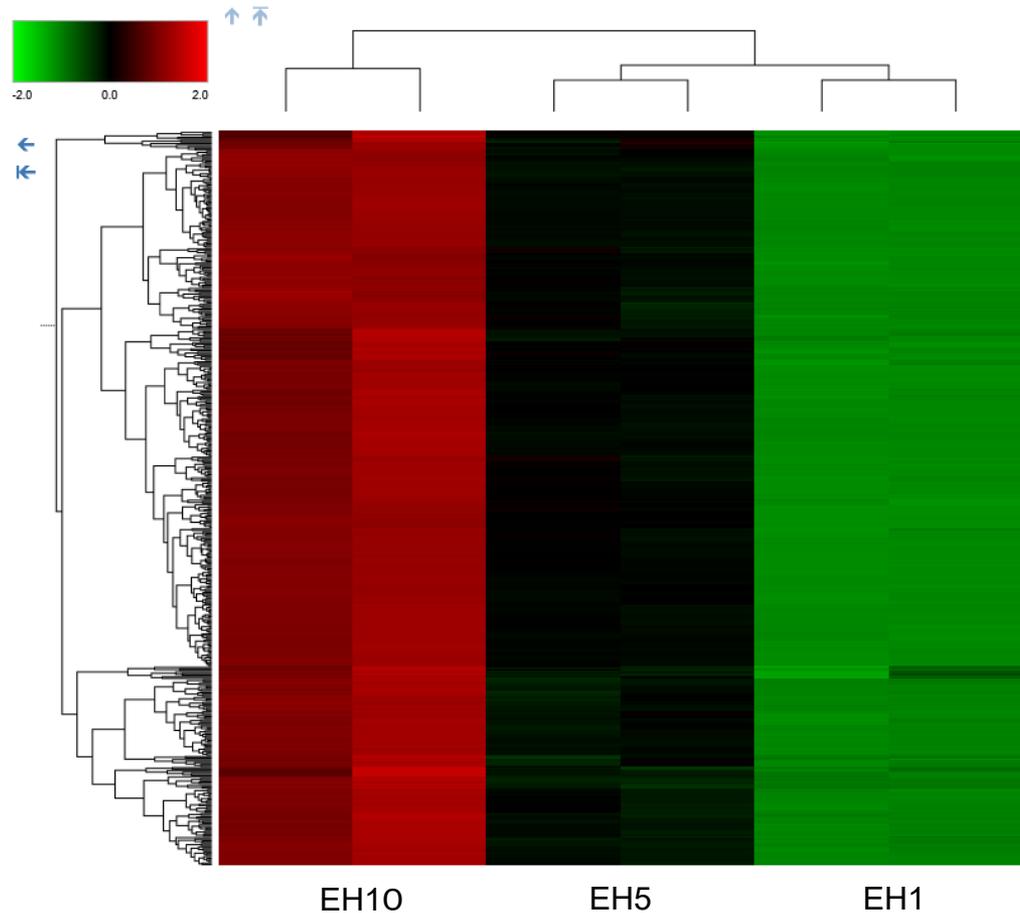


ヒットしたタンパク質全体で見るとおよそ理論値に近い比率

# 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



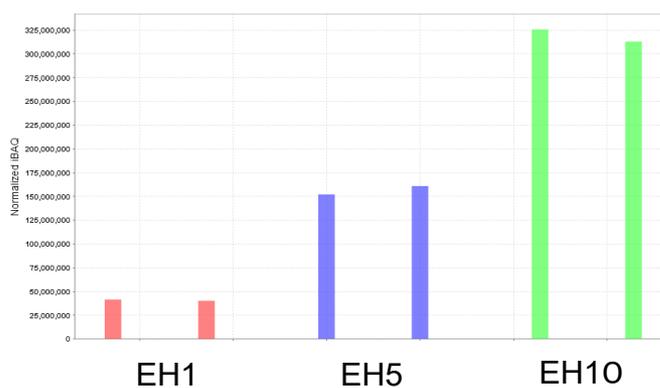
バラツキもみられるが全体的にはおよそ理論値に近い比率

# 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。

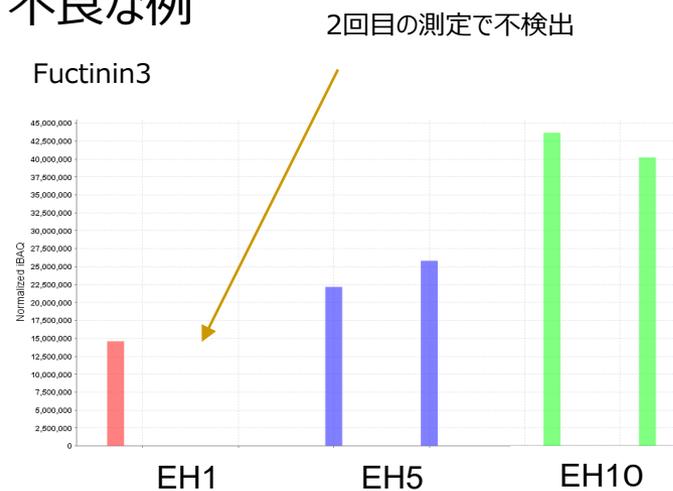
## 良好な例

(iBAQ) Hemoglobin Fetal subunit beta



## 不良な例

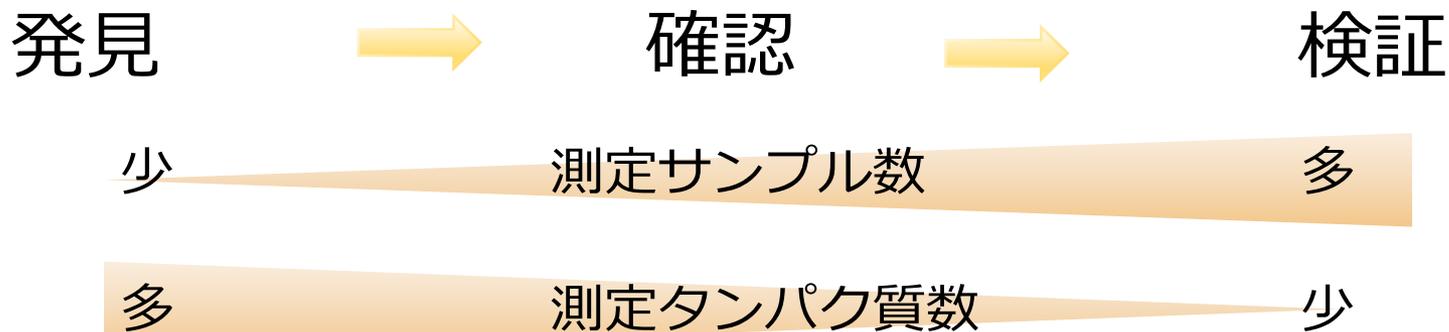
(iBAQ) Fuctinin3



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

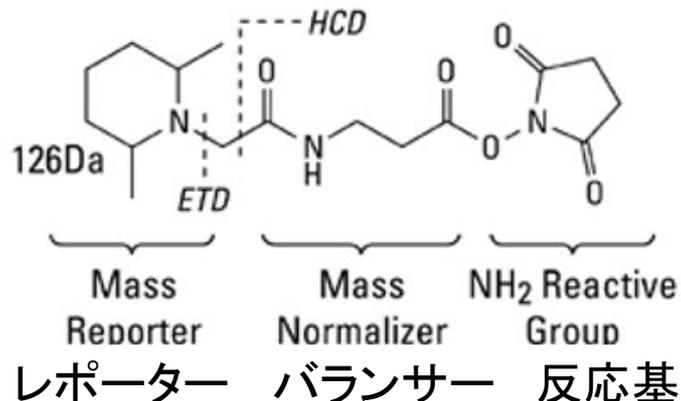


各ステップで質量分析装置を用いた様々な手法を使用

# 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

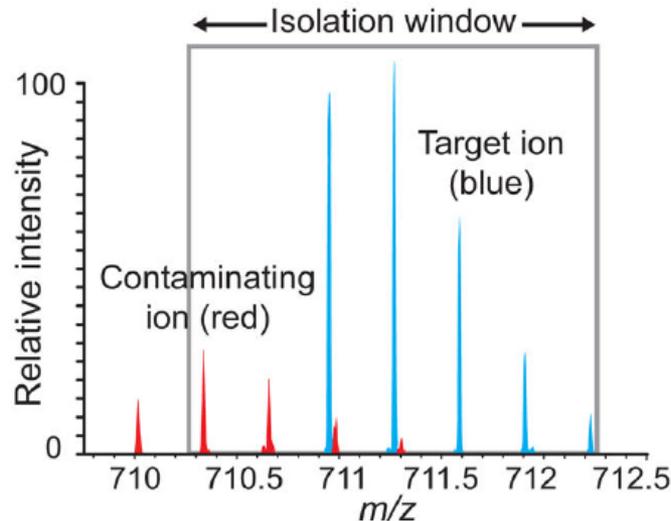
TMT10-127N - 127.124761  
TMT10-127C - 127.131081



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？



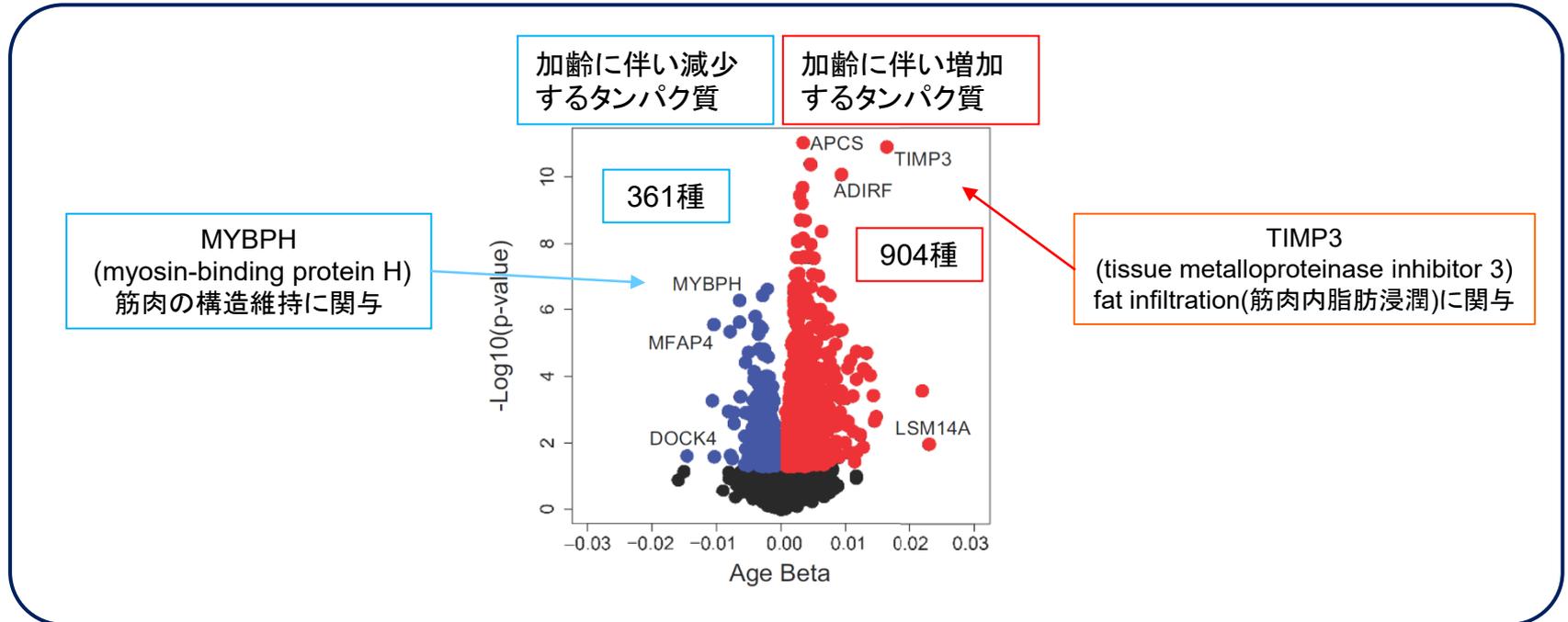
22~87歳までの健康なヒト58名の筋肉中のタンパク質をプロテオーム解析で比較

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