

ことが示唆された¹⁴⁾(図 2C)。

おわりに

これらの研究成果により、移動の初期段階における多段階の形態変化に加えて、ロコモーション移動のメカニズムも少しずつ明らかとなってきた。しかし、ロコモーション細胞のみで活性化するプロモーターが知られていない以上、多くの分子の機能抑制は移動の初期段階を阻害してしまうという障壁を越えることは困難である。ごく最近、大脳皮質のスライス培養系を用いて、タイムラプス顕微鏡下で移動中のロコモーション細胞を観察している途中に、様々な分子に対する機能阻害剤を添加するという実験系が報告され、ロコモーション移動に関わる分子を直接探索することが可能となってきた¹¹⁾。このような新技術を駆使することにより、神経細胞移動の制御機構を細胞生化学的な観点からより深く理解し、近い将来、様々な脳疾患とも関連する大脳皮質形成のメカニズムが分子および細胞レベルで明らかにされることを期待する。

- 1) Stensaas, L.J. (1967) *J. Comp. Neurol.*, **129**, 71–84.
- 2) Rakic, P. (1972) *J. Comp. Neurol.*, **145**, 61–83.
- 3) Kawauchi, T. & Hoshino, M. (2008) *Dev. Neurosci.*, **30**, 36–46.
- 4) Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., & Hoshino, M. (2003) *EMBO J.*, **22**, 4190–4201.
- 5) Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., & Hoshino, M. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 17–26.
- 6) Itoh, Y., Masuyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., & Gotoh, Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 390–396.
- 7) Kotake, Y., Nakayama, K., Ishida, N., & Nakayama, K.I. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 1095–1102.
- 8) Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A., & Roberts, J.M. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 862–876.
- 9) Nguyen, L., Besson, A., Heng, J.I., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., Philpott, A., Roberts, J.M., & Guillemot, F. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 1511–1524.
- 10) Ohshima, T., Hirasawa, M., Tabata, H., Mutoh, T., Adachi, T., Suzuki, H., Saruta, K., Iwasato, T., Itoharu, S., Hashimoto, M., Nakajima, K., Ogawa, M., Kulkarni, A.B., & Mikoshiba, K. (2007) *Development*, **134**, 2273–2282.
- 11) Nishimura, Y.V., Sekine, K., Chihama, K., Nakajima, K., Hoshino, M., Nabeshima, Y., & Kawauchi, T. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 5878–5887.
- 12) Gdalyahu, A., Ghosh, I., Levy, T., Sapir, T., Sapoznik, S., Fishler, Y., Azoulai, D., & Reiner, O. (2004) *EMBO J.*, **23**, 823–832.
- 13) Kawauchi, T., Chihama, K., Nishimura, Y.V., Nabeshima, Y., & Hoshino, M. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 50–55.
- 14) Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita,

K., Kubo, K., Nakajima, K., Nabeshima, Y., & Hoshino, M. (2010) *Neuron*, **67**, 588–602.

15) Shikanai, M., Nakajima, K., & Kawauchi, T. (2011) *Commun. Integr. Biol.*, **4**, (in press).

16) Kawauchi, T. (2011) *Small GTPases*, **2**, 36–40.

川内 健史

(慶應義塾大学医学部解剖学教室, JST さきがけ)

The *in vivo* cell biology of cortical neuronal migration and morphological changes

Takeshi Kawauchi (Department of Anatomy, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan; PRESTO, JST)

ショットガンプロテオミクスの新潮流

1. はじめに

ヒトゲノム完全解読に高性能 DNA シークエンサーの開発が必須であったように、プロテオーム (タンパク質の総体) 解析にはペプチドシークエンサーである質量分析計 (MS) の果たす役割は極めて大きい。近年の MS の進化は著しく、高性能化が目覚ましいスピードで進行している。それにも関わらず、高等生物のプロテオーム一斉解析はいまだに実現していない。これは、プロテオーム試料が有する「途方もなく複雑で、しかもダイナミックレンジの広い」性質に応えられるだけの性能をまだ MS が有していないからである。しかし、様々な工夫や新しい周辺技術の開発により、そのゴールに我々は着実に近づいている。最前線のプロテオーム解析用 LC-MS システムについて解説するとともに、筆者らが進めている新しいシステムについても紹介する。

2. ショットガンプロテオミクス

タンデム MS を用いてペプチドのアミノ酸配列を決定する試みは 2–30 年前からすでに行われており、例えば Hunt らは 90 年代前半にキャピラリー LC と高速原子衝撃イオン化タンデム MS を組み合わせたシステムを用いた MHC クラス I ペプチドの配列決定を報告している¹⁾。タンデム MS 内に導入されたペプチドは衝突誘起解離 (collision-induced dissociation, CID) により断片化されるわけであるが、この反応では、主にアミド結合の C-N 間で切断が起

き、1 アミノ酸違いのラダーを調製することができる (N 端側からのラダーを b-シリーズ, C 端側からのラダーを y-シリーズと呼ぶ)²⁾。これらのイオンの質量を測定することにより、配列を決定することができる。ところがラダーの調製は配列選択的であり、一般的には不完全な場合が多い。それではこの技術を用いて網羅的なタンパク質の同定を行うにはどうしたらよいか。まずはタンパク質を配列特異的な切断法(通常はトリプシンなどの消化酵素を用いる)によりペプチドに断片化し、これをタンデム MS に導入する。CID により部分的なアミノ酸配列情報を取得したら、次にタンパク質のアミノ酸配列データベース中の完全な配列情報と比較することにより、対象ペプチドのソースとなったタンパク質を決定するのである。この時に用いる比較ソフトウェアやそのアルゴリズムを検索エンジンと呼ぶ。網羅的なタンパク質の同定が可能となったのは、タンデム MS の性能向上もさることながら、ゲノムデータに基づく膨大な量のタンパク質データベースが整ったことや検索エンジンが開発されたことによるところが大きい。本法はボトムアップ法もしくはショットガン法と呼ばれる。

それに対して、ペプチドに断片化せず、直接タンパク質をタンデム MS に導入して、MS 内部でタンパク質イオンを切断しながらその部分構造を読み取る方法もある(トップダウン法と呼ばれる)。この方法の方が原理的には単純であり、ペプチドを経ずに直接タンパク質を同定できるなど一見優れているように思われる。しかし、MS の感度はタンパク質のような高分子よりもペプチドに断片化させた方がはるかに高く、わずかな質量を区別することもペプチドにした方が有利である。さらに MS 内部における切断効率もペプチドイオンの方がよく、試料としての取り扱いもペプチドの方が容易であるため、現状ではプロテオミクスといえばショットガン法によるものを指すことが一般的である。

さて、ショットガン法ではタンパク質混合物試料はそれぞれペプチドに断片化されるため、試料全体の複雑性が数十から数百倍に増加する。しかしタンデム MS 側では一度に大量のペプチドを取り扱うことはできないため、どうしても時間で分割しながら試料をタンデム MS に導入する必要がある。タンデム MS とのオンライン接続可能な分離法が必要不可欠である。現在、最も汎用されているオンライン分離法は LC であり、その LC と MS のインターフェースは主としてエレクトロスプレーイオン化法で構成されている。

さて LC の高感度化、高性能化を実現させる一般的な手

段として、カラム径のマイクロ化がある。1970 年代後半から 80 年代にかけて、内径 20-250 μm のフューズドシリカキャピラリーを用いた充填カラムによるキャピラリー LC が開発され、マイクロ化が一気に進んだ^{3,4)}。MS への試料導入に際しては、試料溶媒を揮発させ、試料分子を気化、イオン化する必要があるため、一般的にはむしろ低流量での試料導入が好ましく、マイクロ化 LC との複合化に適している。1985 年にキャピラリー LC と高速原子衝撃法を用いた MS とのオンライン接続システムが初めて報告され⁵⁾、直ちにペプチドマッピング等に応用された⁶⁾。ちょうど同時期に MS における新しいイオン化法として、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) が開発され⁷⁾、LC とのオンライン接続が比較的容易に行えるようになった。

ESI 法では、スプレーニードル(エレクトロスプレーを行うための導電性の細管。内部に試料溶液を通液する)の先端を細くし、できるだけオリフィス (MS の試料導入口) に近づけ、試料を低流量で注入することにより、感度を上昇させることができる^{8,9)}。これはマイクロ ESI またはナノ ESI と呼ばれ、流速 200-500 nL/min、内径 75-100 μm 、長さ 15-20 cm 程度の粒子充填剤型キャピラリーカラムを用いたナノ LC と MS のインターフェースに用いられている。この ESI スプレーニードル中に充填剤を入れて分離カラムとして用いるニードル一体型カラムでは、ポストカラムデッドボリュームをほぼゼロにすることができ、カラム前のコネクター部の影響も受けにくいというメリットがある。このニードル一体型カラムの調製において、筆者らは先端径よりも小さい充填剤を使用しても石橋のアーチの原理で充填剤を保持可能であることを示し、充填剤をカラム内に保持させるための微細構造物(フリット)の作製を回避した 100% 充填剤のみによるフリットレスカラム作製に成功した¹⁰⁾。図 1 にその先端の拡大図をしめす。このカラムは現在多くの研究室で自作されたりカラムメーカーにより市販化されたりするなどして一般的に使われている。

3. 多次元前分画法と組み合わせたショットガンプロテオミクス

さて以上述べたようなナノ LC-タンデム MS システムを用いたショットガンプロテオミクスの手法で現在どの程度のプロテオーム解析が可能なのであろうか。残念ながら、最新鋭の MS を用いても、遺伝子数の少ないバクテリアでさえ、発現している全タンパク質の一斉解析は不可能であり、LC-MS 前に試料の複雑さをタンパク質レベルもしくはペプチドレベルで軽減する必要がある。タンパク質分離

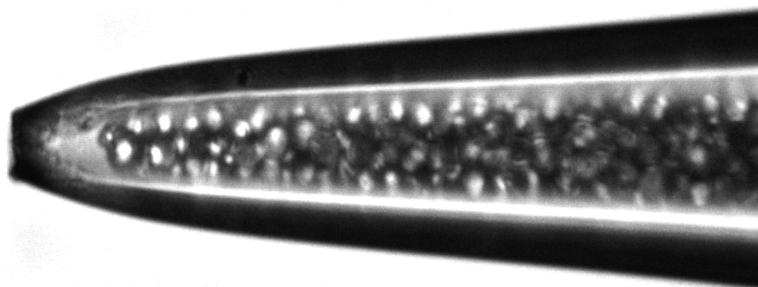


図1 ニードル一体型フリットレスカラムの先端拡大図
100 μ m径のキャピラリーの先端を先細り構造（先端径約5 μ m）にし、3 μ m径のシリカ粒子を充填したもの。

の代表例としては、二次元ゲル電気泳動と銀染色法や蛍光染色法を組み合わせることで定量を行い、目的スポットをゲル内消化して、LC-MSに供する方法がある。この方法の問題点としては測定対象となるタンパク質の範囲（等電点が3-10程度で可溶性タンパク質）が限定される点、あるいはスループットが大規模解析に不向きである点などがあげられる。もっとも一般的なシステムは、ペプチドに断片化後に、イオン交換クロマトグラフィーで分画し、それぞれの分画を逆相クロマトグラフィーを用いたLC-MSを用いて解析するシステムである。自動化が比較的簡単にでき、前者に比べると高い網羅性とスループットを確保できる点がメリットである。しかし、このシステムでも、試料の複雑性と広いダイナミックレンジのため、量の少ないペプチドは量の多いペプチドにマスクされ、MS解析においてイオン化抑制をうける。したがって網羅性を上げるためには更なる徹底的な前分画が必要となる。例えば前述のショットガンプロテオミクス法に、タンパク質レベルでの分画法としてSDS-PAGEを加え、レーン全体を数スライスに分画し、ゲル内消化することにより、上記の影響を軽減する手法も報告されている。その他、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）なども一次元目の分離モードとして用いられている。

最近、出芽酵母を試料とし、徹底的な分画を行うことによって発現プロテオーム全体の解析が可能となったという論文が発表された¹¹⁾。高速スキャン、高精度、高感度な最新MS装置を用いて、細胞内分画、SDS-PAGEによるタンパク質分画、等電点電気泳動によるペプチド分画、MS解析におけるスキャン範囲の細分化による分画を徹底的に行ったものである。約2mgの試料は最終的に417の画分に分けられ、各140分のナノLC-MS測定を行い、発現が別法で確認されている4,000種を超えるタンパク質を同

定・定量することに成功した。LC-MS測定にトータル41日間かけており、とても実用的とは言えないが、ともかくショットガンプロテオミクスという手法で単一生物の全プロテオーム解析が可能であることが初めて証明された。

4. 一次元分離のみで行う“ワンショット”プロテオミクス

上記のような多次元分離はプロテオーム試料の複雑性とダイナミックレンジの問題を解決するのに有効であるが、一方で多次元分離をすればするほど分画数は増え、測定時間や必要試料量がどんどん増えるばかりである。そこで筆者らは原点に戻ってナノLC-MSのLC部分の高性能化を究極まで高めることによって、多次元分離をせずにプロテオーム解析システムを高性能化することを試みた。LCの分離効率を上げるため、充填剤径を小さくしたり、カラム長を長くしたりしてみたが、いずれの場合もカラム背圧により適用範囲に限界があり、若干の改善はあるものの多次元分離法をしのぐほどの効果は認められなかった。一方、充填剤とは異なり連続体構造をもつシリカモノリス担体は同じ表面積でより大きな流路を実現できるため、単位圧力あたりで充填剤よりも高い理論段数を実現可能である。最近、宮本らは全長10メートルのシリカモノリスカラムを用いて理論段数100万段を実現した¹²⁾。プロテオーム解析においては分析時間よりとにかく高効率分離が優先されるので、このメートル長カラムと緩勾配溶出の組み合わせを検討したところ、3.5メートル長カラムを用いたシステム（図2）で、大腸菌の全発現プロテオーム解析を達成した（図3）¹³⁾。本手法は、等電点電気泳動や強カチオン交換クロマトグラフィーを用いた多次元分離法と比べても、必要試料量、全分析時間、同定タンパク質数のすべての面で優れており、また1回のLC-MS測定のみで解析が終了

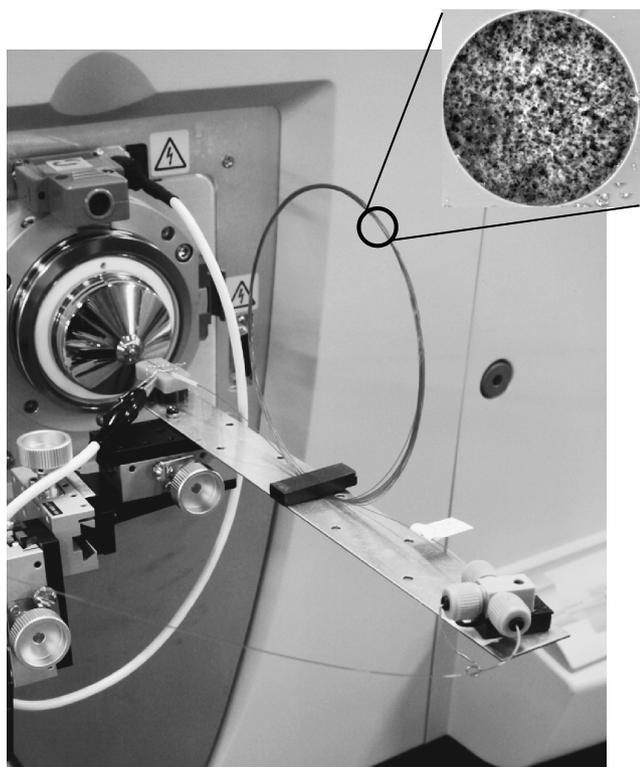


図2 3.5m 長モノリスカラムを用いたナノ LC-MS システム
右上図はモノリスカラム (100 μ m 径) の断面拡大図

することから、試料間の定量的な比較を行う上でも有利であると考えられる。実際、同一試料を用いて従来の粒子充填剤カラムを用いた測定と比較してみると、ピーク面積で約5倍、ダイナミックレンジで約70倍向上しており、LC分離を改善し、試料の複雑性が及ぼす影響を減弱させることでイオン化抑制効果の影響が弱くなり、結果として同定数の大幅増加という効果が現れたと思われる。多次元化の方向にのみ進んでいたショットガンプロテオミクスの技術開発に新たな方向性を示す方法であると考えている。

5. 機能プロテオミクス：リン酸化プロテオミクスの例

ゲノミクスとは異なり、プロテオミクスにおいては、ただタンパク質のアミノ酸配列を読めばよいということではなく、タンパク質が、いつ、どこに、どれくらい、どのような修飾を受けて、どの分子と複合体を作って存在し、細胞のどのような機能を担っているかを調べるのがゴールとなる。このような機能プロテオミクスを行う上では、見たいものにある程度フォーカスして試料調製を行うことが必要である。たとえばタンパク質リン酸化などの翻訳後修飾は、ただ細胞を破碎してショットガンプロテオミクスを行うだけでは検出することは困難である。したがって、リ

15 cm長の粒子充填剤カラム
(4,381ペプチド同定)

350 cm長のシリカモノリスカラム
(18,488ペプチド同定)

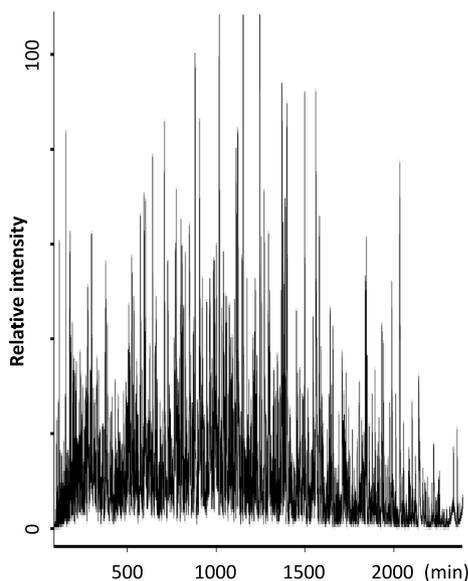
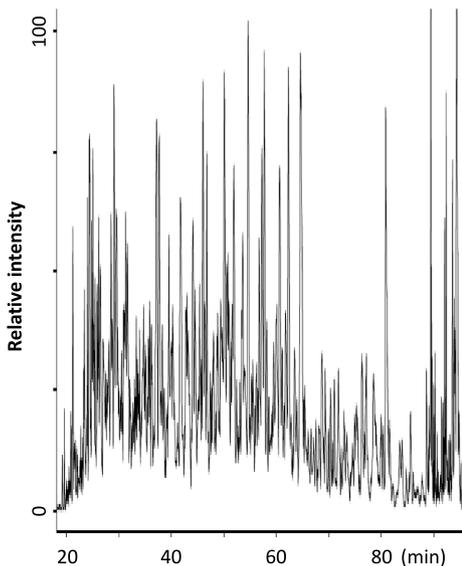


図3 大腸菌発現プロテオームの一斉解析
試料：大腸菌細胞破碎タンパク質 (4 μ g)

ン酸化されているペプチドだけを選択的に濃縮する必要がある。リン酸化ペプチド濃縮法として一般的に用いられている方法は、金属イオンや酸化金属に対するリン酸基のアフィニティーを利用したクロマトグラフィーである。ここ数年の間にこれらのアフィニティークロマトグラフィーを利用したリン酸化ペプチド濃縮法が開発されたことにより、タンパク質公共データベース UniProt に登録されているヒトタンパク質のリン酸化部位数は2007年8月では11,501部位であったが、2010年6月時点で27,939部位と急増している。

筆者らは親水性のヒドロキシ酸の添加が酸化金属クロマトグラフィーによるリン酸化ペプチド濃縮の選択性を飛躍的に向上させ、かつその後のLC-MS測定を妨害しないことを見出し、HAMMOC法 (hydroxy acid modified metal oxide chromatography) と命名した¹⁴⁾。HAMMOC法によりHeLa細胞抽出物のトリプシン消化物からリン酸化ペプチドを濃縮しショットガンプロテオミクスを行うことにより、世界で初めて細胞抽出物から前分画なしに直接数千個のリン酸化ペプチドを同定することに成功した。2007年以降、HAMMOC法によるヒトプロテオームにおけるリン酸化修飾情報を内部データベースとして蓄積しているが、それによると、ヒトタンパク質の約三分の二はリン酸化修飾を受けており、またリン酸化部位数はすでに90,000部位を超えている。また、単一の試料由来のリン酸化部位数も、例えばHeLa細胞の定常状態試料では10,000種以上のリン酸化部位数が同定されている。この場合、リン酸化ペプチド濃縮後に分画を行わずにLC-MS測定を行うと、このような同定数は達成できなかった。これは前述の大腸菌発現プロテオーム解析の場合と同様に、リン酸化ペプチドに標的を絞ったフォーカスドプロテオミクスにおいてですら、試料の複雑性が十分に高く、共存イオンによるイオン化抑制によって同定数が損なわれていると考えられる。HAMMOC法の性能を最大限に生かすにはナノLCシステムのさらなる高性能化が必須であり、筆者らの予備的な実験では前述の超高分離能LCを用いた“ワンショット”プロテオミクスが有効であった。

6. 今後の展望

以上、ショットガンプロテオミクスについて、その最先端のプロテオーム解析用LC-MSシステムについて解説するとともに、筆者らが進めているワンショットプロテオミクスシステムについても紹介した。今回は、すべて具体的な標的分子を定めないプロテオミクスシステムを紹介した

が、最近の大きな進歩の一つに、標的分子を定めて、そのタンパク質を定量する選択反応モニタリング法 (selected reaction monitoring, SRM) がある。方法自体は薬物動態などの分野で古くから用いられてきた定量法であるが、プロテオーム規模で多数のタンパク質分子にも適用可能になってきた。SRM法は、抗体の入手可能性や性能に左右されるウェスタンブロットに代わる新しい定量法として注目されている¹⁵⁾。また、本年9月にヒトプロテオーム機構によって開始が宣言された「Human Proteome Project」でも、中心的な役割を果たしていくと思われる。しかしその場合でも、本稿で述べたイオン化抑制の問題は回避できないため、試料の煩雑な前処理が必要となることに留意する必要がある。

MSの開発スピードは目覚ましく、新しい装置が登場するたびに新しい世界が開拓されてきた。しかしそれでも網羅性という観点では次世代シーケンサーはおろかマイクロアレイにもまだまだ及ばず、真のプロテオーム解析の実現には更なる技術開発が必要となる。特に検出器としてのMSのダイナミックレンジの拡大に大きなブレークスルーを期待している。いずれにしてもまだしばらくはtechnology-driven scienceが続くであろうし、そこに少しでも貢献したい。

- Hunt, D.F., Henderson, R.A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A.L., Appella, E., & Engelhard, V.H. (1992) *Science*, 255, 1261-1263.
- Roepstorff, P. & Fohlman, J. (1984) *Biomed. Mass Spectrom.*, 11, 601.
- Takeuchi, T. & Ishii, D. (1980) *J. Chromatogr.*, 190, 150-155.
- Yang, F.J. (1982) *J. Chromatogr.*, 236, 265-277.
- Ito, Y., Takeuchi, T., Ishii, D., & Goto, M. (1985) *J. Chromatogr.*, 346, 161-166.
- Henzel, W.J., Bourell, J.H., & Stults, J.T. (1990) *Anal. Biochem.*, 187.
- Yamashita, M. & Fenn, J.B. (1984) *J. Phys. Chem.*, 88, 4451-4459.
- Emmett, M.R. & Caprioli, R.M. (1994) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 5, 605-613.
- Wilm, M. & Mann, M. (1996) *Anal. Chem.*, 68, 1-8.
- Ishihama, Y., Rappsilber, J., Andersen, J.S., & Mann, M. (2002) *J. Chromatogr. A*, 979, 233-239.
- de Godoy, L.M., Olsen, J.V., Cox, J., Nielsen, M.L., Hubner, N.C., Fröhlich, F., Walther, T.C., & Mann, M. (2008) *Nature*, 455, 1251-1254.
- Miyamoto, K., Hara, T., Kobayashi, H., Morisaka, H., Tokuda, D., Horie, K., Koduki, K., Makino, S., Nunez, O., Yang, C., Kawabe, T., Ikegami, T., Takubo, H., Ishihama, Y., & Tanaka, N. (2008) *Anal. Chem.*, 80, 8741-8750.
- Iwasaki, M., Miwa, S., Ikegami, T., Tomita, M., Tanaka, N., &

- Ishihama, Y. (2010) *Anal. Chem.*, **82**, 2616–2620.
- 14) Sugiyama, N., Masuda, T., Shinoda, K., Nakamura, A., Tomita, M., & Ishihama, Y. (2007) *Mol. Cell. Proteomics.*, **6**, 1103–1109.
- 15) Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L.N., Domon, B., & Aebersold, R. (2009) *Cell*, **138**, 795–806.

石濱 泰
(京都大学大学院薬学研究科)

New trends in shotgun proteomics
Yasushi Ishihama (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606–8501, Japan)
