

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4188701号
(P4188701)

(45) 発行日 平成20年11月26日(2008.11.26)

(24) 登録日 平成20年9月19日(2008.9.19)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483	F
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 33/483	Z
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 27/62	D
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 27/62	V
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/62	X

請求項の数 22 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-588141 (P2002-588141)	(73) 特許権者	503016692
(86) (22) 出願日	平成14年5月7日(2002.5.7)		パーセプティブ バイオシステムズ, インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2004-533610 (P2004-533610A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(43) 公表日	平成16年11月4日(2004.11.4)		1701, フラミングハム, オールド コ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/014369		ネティカット パス 500
(87) 国際公開番号	W02002/090929	(73) 特許権者	503409676
(87) 国際公開日	平成14年11月14日(2002.11.14)		インスティテュート フォー システムズ
審査請求日	平成17年4月28日(2005.4.28)		バイオロジー
(31) 優先権主張番号	09/851,058		アメリカ合衆国 ワシントン 98103
(32) 優先日	平成13年5月8日(2001.5.8)		, シアトル, エヌ. 34ティーエイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100107489
			弁理士 大塩 竹志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質サンプルを分析するためのプロセス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも2つのサンプルの間で目的のタンパク質組成を比較する方法であって、以下：

(a) 該少なくとも2つの異なるサンプルの各々からタンパク質の抽出物を調製する工程；

(b) 各サンプルについて1つ、実質的に化学的に同一であり、そして示差的な同位体標識タンパク質試薬のセットを提供する工程であって、該試薬が、A-L-P R GおよびL-P R Gからなる群より選択される式を有し、ここで、Aは、捕捉試薬に選択的に結合するアフィニティー標識であり、Lは、1つ以上の原子が1つ以上の安定な同位体で示差的に標識されたリンカー基であり、そしてP R Gが所定のタンパク質官能基と選択的に反応するタンパク質反応基であるかまたは酵素に対する基質である、工程；

(c) 工程(a)の各タンパク質サンプルと、工程(b)の該セットからの異なる試薬とを反応させて、同位体標識タンパク質を提供する工程；

(d) 該同位体標識タンパク質の各々を混合して、異なる同位体標識タンパク質の単一の混合物を形成する工程；

(e) 工程(d)の該混合物を、該混合物中のタンパク質を分離し得る電気泳動法により電気泳動する工程；および

(f) 化学的消化または酵素的消化から得られる個々のペプチドに基づく質量スペクトルにより、2つのサンプルにおけるタンパク質の発現レベルの差を検出する工程、を包含する、方法。

【請求項 2】

前記試薬が、式：A - L - P R Gを有し、そして前記サンプル中のアフィニティータグ化タンパク質が酵素的または化学的に処理されて、それらを標識ペプチドに変換する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記試薬が、式：L - P R Gを有し、そして前記サンプル中の標識タンパク質が酵素的または化学的に処理されて、それらを標識ペプチドに変換する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記標識タンパク質の 1 つ以上のタンパク質またはペプチド部分が、タンデム質量分析により配列決定され、前記ペプチドの起源となった標識タンパク質を同定する、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 5】

前記タンパク質が、ペプチド質量フィンガープリントにより同定され、そして前記同位体標識ペプチドが、定量のために使用される、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記サンプル中の 1 つ以上のタンパク質またはペプチドの量がまた、質量分析により決定される方法であって、そして該方法はさらに、定量される該タンパク質の各々についての既知量の 1 つ以上の内部標準をサンプル中に導入する工程を包含する、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記放出された同位体標識タンパク質またはペプチドが、質量スペクトルによる検出前にクロマトグラフィーにより分離される、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記サンプルが、組織、細胞、血清を含む生物学的流体、脳脊髄液、尿、腹水、または上清および種々の膜含有器官もしくは核調製物を含む準細胞画分に由来するタンパク質混合物、あるいはクロマトグラフィー法、キャピラリー電気クロマトグラフィー法、もしくはキャピラリー電気泳動法により分離されるタンパク質調製物からなる、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記タンパク質が、任意のタンパク質染色技術により同定されるか、またはタンパク質含有領域が、系統的な消化および抽出またはトランスプロットおよび消化の任意の組み合わせの後に、質量スペクトルにより局在化される、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記サンプル中の複数のタンパク質またはペプチドが検出および同定される、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記サンプル中の前記タンパク質またはペプチドの 1 つ以上が、化学的または酵素的に処理されて、標識と反応し得る官能基を露出する工程をさらに包含する、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記 P R G が、特定のタンパク質官能基と選択的に反応するタンパク質反応基であり、そして複数のタンパク質またはペプチドが、単一のサンプル中で検出および分離される、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

タンパク質またはペプチドとの反応に対して異なる特異性を有する、2 つ以上の実質的に化学的に同一であり、そして示差的な同位体標識タンパク質反応性試薬が提供され、そして分析される各サンプルと反応される、請求項 12 に記載の方法。

50

【請求項 14】

前記サンプル中の前記タンパク質またはペプチドの全てが検出および同定される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

2 つ以上の異なるサンプル中の 1 つ以上のタンパク質またはペプチドの相対量が決定される方法であって、そして該方法はさらに、前記示差的な標識サンプルを合わせる工程、該合わせたサンプルから同位体標識成分を捕捉する工程、および示差的な標識タンパク質またはペプチドの相対量を測定する工程を包含する、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

1 つ以上の異なるサンプル中の膜タンパク質の相対量を決定する、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

異なるサンプルが、異なる器官または異なる準細胞画分から得られたタンパク質を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

異なるサンプルが、異なる環境条件または栄養条件、異なる化学的刺激または物理的刺激に応答してか、あるいは異なる時点で発現されたタンパク質またはペプチドを表す、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

絶対タンパク質濃度が、既知量の重水素化ペプチド標準または非重水素化ペプチド標準との比較により推定され、ここで、この標準は、化学的合成によって導かれるか、または生物学的サンプルから単離される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

複数のサンプルが、異なる数の重原子を含有する PRG によって標識され、その結果、複数のサンプルが、単一のゲル上で分離され得、そして同時に分析され得る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

特定の情報を有することが以前に知られている特に目的とするタンパク質が、1Dゲルまたは2Dゲル上の位置に基づいて分析され、ここで、これらのタンパク質は、疾患マーカーおよびコントロールタンパク質を含み得る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

特定のタンパク質の翻訳後修飾状態が、ゲル分析によりモニターされる、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、溶解物、細胞抽出物、または組織抽出物のような複雑なタンパク質サンプルの間で、タンパク質組成の差異を検出するためのプロセスに関連する。より具体的には、本発明は、このような差異を検出することが可能である少なくとも 2 つの標識された試薬を使用するゲル電気泳動を用いてタンパク質組成物を分析するためのプロセスに関連する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

2次元(2D)電気泳動は、細胞溶解物またはオルガネラに由来するような、タンパク質の複雑な混合物の定量分析に関して、長きに亘り頼みの網であった。タンパク質を定量するための従来の方法は、このゲルのイメージ解析を実施することである。これらのタンパク質は、タンパク質を染色することによってか、オートラジオグラフィーによってか、

10

20

30

40

50

または、特定のタンパク質について特異的な抗体を使用すること（ウェスタンブロット）によって、検出され得る。ゲル上のあるスポットまで移動したタンパク質量を定量するための強力なソフトウェアが開発されてきたが、このゲルが完全に再生可能である場合でも、そしてこのソフトウェアが重なり合うスポットおよび平坦でないバックグラウンドの曖昧さを解決し得る場合でも、この様な分析によってどれほど多くの情報が得られるかということについては、限界が存在する。近年、質量分析技術は、PCT国際出願W000/11208において公開され、この中では、定量化が質量分析法で実施されているために、安定な同位体が、任意の種類ゲルおよび画像分析についての要件をかいぐるタンパク質の各々に由来するペプチドに取り込まれている。しかし、タンパク質が先立って消化される場合に、タンパク質の化学的変化に関連するほとんど全ての情報が消失しており、かつ検出されるペプチドを共有する様々なタンパク質についての定量的な情報は、まとめて検出されてしまう。

10

【0003】

タンパク質は、事実上のどの生物学的プロセスの制御および実行についても必須である。タンパク質の合成速度およびそのタンパク質の半減期、従って、それらの発現レベルはまた、転写後に制御される。さらに、タンパク質の活性は、転写後の変化、特に、タンパク質のリン酸化によって調節され、そしてDNAおよびタンパク質を含む他の分子とタンパク質との結合に依存する。従って、タンパク質の発現レベルもその活性状態も、遺伝子配列から、または対応するmRNA転写物の発現レベルからも自明ではない。従って、生物学系の完全な記述が、その系を構成するタンパク質の同一性および活性の状態を示す指標を含むことが所望される。細胞または組織において発現されるタンパク質の大規模（完全に全範囲に及ぶ）分析は、プロテオーム解析と称される。プロテオーム解析によって、細胞の構造、機能、および発生における差異を検出およびモニターすることが可能となる。正常細胞と異常細胞（例えば、癌腫細胞）との間のタンパク質が含有量における差異を決定する能力は、価値ある診断ツールである。

20

【0004】

現在において、タンパク質分析ツールは、現在の利用可能であるゲノム技術のスローブットおよびレベルに到達していない。プロテオーム解析の最も一般的な実行は、2Dゲル電気泳動（2DE）およびそれらの別個のタンパク質種のそれに続く同定（特に、質量分析法）による複雑なタンパク質サンプルの分離に基く。このアプローチは、強力な質量分析技術の発達ならびに、タンパク質およびペプチドの質量スペクトルと、配列データベースとを関連付け、そしてそれによって最終的にタンパク質を同定するコンピュータアルゴリズムの発達によって、大革新された。この技術は、従来のタンパク質染色法（銀染色を含む）によって検出可能である、本質的に任意のタンパク質の同定を可能する感度レベルに到達している。2DE/MSⁿ法において、タンパク質は、2DEゲルの染色されたスポットのデンストメトリー、その後の質量分析法（MS）、タンデム質量分析法（MS/MSまたはMS²）あるいは複数ラウンドの質量分析法（MS）ⁿによって定量される。あるいは、この染色工程は省かれ得、そして、これらのタンパク質は、質量分析法、例えば、1Dゲルからのスライスごとの抽出物、または2Dゲルのピースごとの抽出物の分析によってか、または、このようなゲルからの消化物がトランスプロッティングによって附着されたメンブレンをスキャンすることによって、検出され得る（Bienvenu et al., Anal. Chem. 71: 4800-4807, 1999）。

30

40

【0005】

ゲル電気泳動において、タンパク質は、変性条件下にあるポリアクリルアミドゲル中のタンパク質混合物の電気泳動により、質量の差異に従って個々の成分に分離され得る。1次元ゲル電気泳動および2次元電気泳動は、タンパク質を研究するための標準的なツールとなっている。円筒型ゲルまたはスラブ（slab）ゲルを介する、1次元SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）電気泳動によって、試験するサンプル中の主要なタンパク質のみが明らかになる。2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（2D PAGE）は、1つの目の次元で等電点をあわせること（すなわち、電荷）によって、そして、2つ目の次元でサ

50

イズ(大きさ)によって分析することによって、タンパク質を分離し、この2D PAGEは、そのサンプル中に多くのタンパク質が存在する場合には重要である、高い解像倍率(解像検出力)を提供する。このタンパク質は、1次元にゲルにおいては、バンドとして、2次元ゲルにおいては、スポット(点)として、それぞれ移動する。分離されたタンパク質は、タンパク質特異的色素を使用する染色、タンパク質媒介性銀沈殿、放射性標識したタンパク質のオートラジオグラフィ検出、蛍光標識した化合物との共有結合またはそれらとの非共有結合のような種々の方法によって可視化される。電気泳動の直後に、得られたゲルパターンは、肉眼、写真による画像取り込みまたは電子画像取り込み(例えば、冷却した電荷結合素子(CCD))によって可視化され得る。様々な細胞または細胞発生の様々な段階に由来するタンパク質のサンプルを比較するために、様々なサンプルの各々が、現在においては、1つの1次元ゲルまたは別個の2次元ゲルの別個のレーンにおいて泳動される。比較は、肉眼による調査また電子画像(例えば、デジタル化された、1次元または2次元のゲルのコンピュータ支援画像解析)によって行われる。このような研究の目的は、しばしば、無数のタンパク質のうちどのタンパク質においてコントロールサンプルと1以上の実験サンプルとの間の発現レベルにおける変化を検出され得るかということを決定的である。

10

【0006】

2次元ゲル電気泳動は、タンパク質の複雑な混合物を読み解くための強力なツールである。しかし、タンパク質の移動度における差異は、僅かであり得る。このゲルにおける不完全性は、正確な観察を干渉し得る。不完全性を最小化するために、市販される電気泳動システムによって提供されるゲルは、厳密な精度をもって調製されている。精細なコントロール用いた場合でさえも、2つのゲルは同一であることはない。これらのゲルは、pH勾配または一様性において相互に異なり得る。さらに、1回の泳動から次の泳動への電気泳動条件は、異なり得る。様々なゲルの自動アライメントのためのコンピュータソフトウェアが開発されている。しかし、これらのソフトウェアパッケージのうち全ての、2次元ゲルにおける次元の1つまたは両方の線形膨張写像または線形縮小写像(linear expansion or contraction)に基く。このソフトウェアは、これらのゲルにおける局所的な歪みの調整において困難性を有する。このような限界を乗り越えるための理想的な方法は、ゲル電気泳動の前に2つのサンプルを合わせ、これらの2つのサンプルがその分析段階で相互に識別され得ることを仮定することである。

20

30

【0007】

1つのサンプルが第1の色素で染色され、かつ、第2のサンプルが第2の色素で染色される、少なくとも2つのサンプルに由来するタンパク質組成を分析するためのプロセスを提供することが、米国特許第6,043,025号および同第6,127,134号において提案されている。次いで、これらのサンプルは、1Dゲル電気泳動プロセスまたは2D電気泳動プロセスのいずれかによって分離され、複数のスポットへのタンパク質分離を達成する。次いで、目的にスポットは、その色素の蛍光強度における差異を決定するために分析され、それによって、各サンプルからタンパク質濃度を決定する。このカメラは、放射される光線の波長によって2つの色素間を識別し得るが、これらの色素の間のスペクトルの重なり合いの少量の部分に起因して、動的範囲が損なわれ得る。この定量が正確であるために、2種のタンパク質が、正確に、同一スポットに移動するべきであり、理想的には、その改変されていないタンパク質と同一位置に移動されるべきである。いくつかの例において、そのタンパク質の少数の割り合いは、それらの色素で最初に染色されている。染色されていないタンパク質からの染色されたタンパク質の任意の分離が存在する場合、そのいくつかの蛍光発光するタンパク質が、いくつかの関連のない染色されていないタンパク質とともに移動し得、そのタンパク質が電気泳動後に同定される場合、誤った識別を生じる。

40

【0008】

マイクロキャピラリー液体クロマトグラフィ(μ LC)およびデータベース検索と併せて自動データ依存型エレクトロスプレーイオン化(ESI)タンデム質量分析法(MS

50

ⁿ) のための方法および装置の開発によって、ゲル分離されたタンパク質の同定の (検出) 感度および速度が有意に増加された。プロテオーム解析に対する 2DE/MSⁿ アプローチの代替案として、複雑なタンパク質混合物の消化によって生成されたペプチド混合物のタンデム質量分析法による直接的な分析が提案されてきた (Ducretら, Prot. Sci. 7: 706-719, 1998)。タンデムμLC/MSMSはまた、ゲル電気泳動分離をすることなしに、混合物から直接的に個々のタンパク質を大規模同定するために首尾よく利用されている (Yatesら, Methods Mol. Biol., 146: 17-26, 2000; Linkら, Nat. Biotechnol. 17: 676-82, 1999; Opittekら, Anal. Chem. 64: 1518-1524, 1997)。これらのアプローチは、劇的にタンパク質同定を加速する一方で、その分析されたタンパク質の絶対量または相対量は容易に決定されず、そしてこれらの方法は、2DE/MSMSアプローチが直面する動的範囲 (動的レンジ) の問題を実質的に軽減することを示したわけではない (Gygiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 17: 9390-5, 2000)。従って、複雑なサンプル中での低存在度のタンパク質はまた、それらのタンパク質を事前に増幅することなしにμLC/MSMS法によって分析することは困難である。

10

【 0 0 0 9 】

従来のタンパク質染色法または蛍光染色法を用いる染色強度に基いて、SDS PAGEまたは2D PAGEの後に、複雑な混合物中のタンパク質を定量することに対する代替案は、目的の領域に局在するタンパク質染色剤を使用することである。タンパク質分解消化の後に次いで、このペプチドは、安定同位体を用いて、例えば、変性したニコチノイルオキシスクシンイミド (nicotinoxyloxysuccinimide) を用いて標識され (Munchbach, Quadroni, MiottoおよびJames, Anal. Chem. A, 2000)、これによって、質量分析法が、定量のために使用されることを可能にする。このアプローチは、得られるタンパク質の比は、それらのスポットが如何に注意深くそのゲルから切り取られたかに依存するという欠点を被っている。また、コントロールサンプルおよび実験的サンプルは、別個のゲル上で分離されねばならない。

20

【 0 0 1 0 】

あるいは、同位体標識にされたアミノ酸前駆体が、タンパク質分解消化に先立って、これらの2つのサンプルのどちらか1つに特異的に導入され得る (SechiおよびChait, Anal. Chem., 24: 5150-8, 1998, Chen, SmithおよびBradbury, Anal. Chem. 72: 1134-1143, 2000)。このアプローチは、タンパク質が標識されたアミノ酸前駆体により標識されていないアミノ酸前駆体がほぼ完全に置き換えられることを可能にする培養条件から単離されなければならないという欠点を被っており、そうでない場合、各ペプチドの強度が通常よりも大きく同位体クラスターを覆うように広がり、感度および定量を損なってしまう。

30

【 0 0 1 1 】

近年、タンパク質のシステイン含有ペプチドへの安定同位体の取り込みと、これらの改変されたペプチドをアフィニティ精製して、その後に、質量分析法によって、それらのタンパク質を検出する能力とを合わせた、コードアフィニティタグ (ICATTM) に関連するアプローチが開発された (Gygiら, Nat. Biotechnol., 17: 994-9, 1999)。この方法を実施するための有用な試薬は、ICATTM ブランドのもとで、Applied Biosystems (Foster City, CA) から市販されている。タンパク質は、代表的には、少数のシステイン残基を有するので、タンパク質分解性消化の際、産生される少数のペプチドのサブセットに焦点をあて、最も多く存在するタンパク質の数のペプチドに圧倒されることなしにプロテオームへさらすことと突き進むことを可能にすることによって、大多数のタンパク質を同定することが可能である。定量が質量分析法によって実施されるので、2つ以上のサンプルが、分析前に一緒にされ得、その結果、人工的なサンプル処理での差異は、それがシステイン改変の後に生じる

40

50

限りにおいてその結果に影響を与えない。

【 0 0 1 2 】

しかし、特定の場合に、実験から得られる情報を制限する技術に基づき、上記の I C A T 試薬に対するいくつかの限界が存在する。このシステイン含有ペプチドは、タンパク質（または相同性タンパク質のクラス）を一様に同定するのに十分に長いはずである。各ペプチドは、別個に精製されるので、MSⁿ技術が、より単純なペプチド質量フィンガープリンティング (peptide mass fingerprinting) (PMF) 技術の代わりに、ペプチドが由来するタンパク質を同定するために使用される。システイン含有ペプチドが由来するタンパク質のインタクトな分子量についての情報、またはこのタンパク質がリン酸化によって化学的に改変されているか否かに関する情報は保持されていない。最終的に、システインを含有していないタンパク質からは情報はなんら得られない。

10

【 0 0 1 3 】

本発明は、質量分析定量法と 2 D 電気泳動の解像検出力とを合わせ、その結果、複雑な混合物を含む 2 以上のサンプルにおけるタンパク質組成における差異が、単一の 2 D ゲルから決定され得る。I C A T 試薬技術の現在の状態に対するこの伸展によって、前述した限界の各々が克服される。タンパク質は、既に述べたように、同じ I C A T 試薬技術を使用することによって改変される。しかし、2 D ゲルによるタンパク質の分離の全ての利点は、保存される。I C A T 試薬標識ペプチドの分析自体によっては、それらが由来するタンパク質の化学的改変についての情報はなんら生じないが、ゲル上のタンパク質の位置は、タンパク質が改変されたか否かを示している。また、化学的に改変されたペプチド自体が同じスポットに存在し、従って、その I C A T 試薬標識ペプチドは、なお、改変された種の各々の相対量の定量化のために使用され得る。さらに、任意の長さの I C A T 試薬含有ペプチドは、ここでは、任意のスポットが非常に少ないタンパク質を含有しているので、情報を与え得る。また、これによって、PMFの使用がこれらのタンパク質（そのゲル上の同一のスポットに存在し得る任意の非システイン含有タンパク質を含む）を同定することを可能にする。これらの技術は、さらに、2 以上のサンプル（例えば、実験から得られたサンプルおよびコントロールサンプル）の同時処理を可能にする。技術におけるこれと同じ組み合わせはまた、1 D SDS PAGE ゲル分析、1 D 等電集束ゲルなどのような低解像度ゲルシステムにも適用可能である。

20

30

【 0 0 1 4 】

（発明の要旨）

本発明は、1つのユニット操作内で、2以上のサンプルに由来するタンパク質混合物中の、タンパク質またはタンパク質機能についての高速度、定量的な分析のための、1 D ゲル電気泳動および 2 D ゲル電気泳動ならびに質量分析法に基づく方法を提供する。従って、どのタンパク質が、実験サンプルとコントロールサンプルとの間の発現レベルにおいて変化しているかを推定するために、1つのゲルのみが実施されなくてはならない。これは、質量分析法によってこの定量が決定されるためである。この分析方法は、定量、および特に、細胞および組織における、全体のタンパク質発現プロファイルについての定量分析（すなわち、プロテオームの定量分析）のために使用され得る。細胞、組織、または生物学的流体の発現レベルが、刺激（例えば、薬物の投与または潜在的な毒性物質との接触）によってか、環境変化（例えば、栄養レベル、温度、時間経過）によってか、または状態変化またはそのサンプルが由来する、細胞、組織、もしくは器官の条件もしくは細胞の条件もしくは状態（例えば、疾患状態、悪性度、部位特異的変異、遺伝子ノックアウト）によって影響されるようなタンパク質についてスクリーニングするため、そして、それを同定するために、本方法はまた使用される得る。このようなスクリーニングにおいて同定されるタンパク質が、変化した状態のためのマーカーとして機能し得る。例えば、正常細胞と悪性細胞のタンパク質発現プロファイルの比較によって、その存在または非存在がその悪性度の特性および診断上の特徴であるようなタンパク質の同定が得られる。

40

【 0 0 1 5 】

50

本明細書中における方法はまた、生物学的流体（例えば、血液）、または細胞もしくは組織における、所定のタンパク質またはタンパク質機能の、存在、非存在、欠失、または過剰を検出するための種々の臨床的分析および診断的分析を実施するために使用され得る。この方法は、タンパク質の複雑な混合物、すなわち、5以上の別個のタンパク質またはタンパク質機能を含む混合物の分析において、特に有用である。この方法はまた、具体的に較正された基準が標識されたときに、絶対的であり、定量的な変化を調べるために使用され得る。

【0016】

PCT特許出願公開(WO 00/11208)において説明されるような技術と同様に、本発明は、複雑な混合物からのペプチドフラグメントの選択的単離を可能にする、アフィニティ標識タンパク質反応試薬または非アフィニティ標識タンパク質反応試薬のいずれかであり得る同位体によって標識されたタンパク質を使用する。第1に、このコントロールサンプルおよび実験的サンプルは、ICAT試薬の異なる同位体試薬で別個に標識され、次いで、一緒にされている。2つ以上のサンプルのタンパク質成分の分離は、1Dゲル電気泳動または2Dゲル電気泳動、これに続くタンパク質分解によって達成される。この単離されたペプチドフラグメントまたは反応産物は、これらの混合物中のタンパク質の存在の特性である。単離されたペプチドは、質量分析法(MS)技術によって特徴付けられる。最多量のタンパク質は、ペプチド質量フィンガープリンティングによって同定され得る。あるいは、単離されたペプチドの配列は、現在利用可能な配列データベース検索技術を適用することによって、タンデムMS(MSⁿ)技術を使用して決定される得、この配列決定されたペプチドが由来するタンパク質が、同定され得る。本発明のプロセスにおいて使用される試薬は、様々サンプルにおけるタンパク質の相対量の質量分析法によって定量決定を促進する単離されたペプチドの差次的同位体標識化を提供する。また、既知の濃度の内部標準として差次的同位体標識された試薬を使用することによって、サンプル中に存在する1以上のタンパク質または反応産物の絶対量を定量的決定を促進する。

【0017】

一般的に、本発明のプロセスにおいて使用される親和性標識化タンパク質反応試薬は、3つの部分を有する：タンパク質反応基(PRG)に、リンカー基(L)：A-L-PRGを介して共有結合された親和性標識(A)。このリンカーは、(例えば、リンカー内の1つ以上の原子を、それらの安定な同位体に置換することによって)差示的に同位体標識され得る。例えば、水素原子は重水素原子と、または¹²Cは¹³Cと置換され得る。

【0018】

本発明のプロセスにおいて使用される非親和性標識化タンパク質反応試薬は、2つの部分を有する：タンパク質反応基(PRG)およびリンカー基(L)：L-PRG(これは、上記で記載されるとおりである)。

【0019】

親和性標識Aは、分子ハンドルとして機能し、捕捉試薬(CR)に、共有結合的または非共有結合的に選択的に結合する。CRへの結合は、Aを用いて標識されたペプチドの単離を促進する。特定の実施形態において、Aは、ストレプトアビジンまたはアビジンである。親和性タグ化された物質(これらのいくつかは、同位体標識され得る)の親和性単離の後、Aと捕捉試薬との間の相互作用は、単離された物質のMS分析を可能にするために、崩壊または破壊される。利用される場合、親和性標識は、置換リガンド(これは、遊離AまたはAの誘導体であり得る)の添加によってか、または溶媒条件(例えば、溶媒の型またはpH)もしくは温度条件の変更によって捕捉試薬から置換され得るか、あるいはリンカーは、化学的、酵素的、熱的または光化学的に切断され、MS分析のために単離される物質を放出し得る。

【0020】

本明細書中で具体的に提供されるPRG基の型としては、タンパク質官能基と選択的に反応するPRG基が挙げられ、共有結合または非共有結合を形成し、特異的部位でタンパク質をタグ化する。特定の実施形態において、PRGは特定のタンパク質基に対して特異

10

20

30

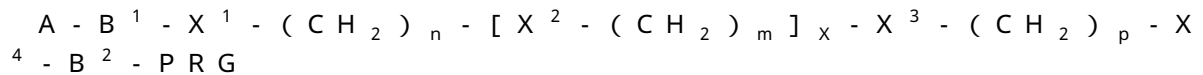
40

50

的反応性（例えば、メルカプト基に対する特異性）を有する基であり、そして錯体混合物において選択的にタンパク質をタグ化するために一般的に有用である。メルカプト基特異的試薬は、システインを含むタンパク質をタグ化する。

【0021】

本発明のプロセスにおいて有用な例示的な試薬は、以下の一般式を有する：



ここで、

Aは、必要に応じて存在し、そして親和性標識であり；

PRGは、タンパク質反応基であり；

X^1 、 X^2 、 X^3 および X^4 は、互いに独立して、かつ X^2 はリンカー基における他の X^2 に独立して、O、S、NH、NR、 NRR'^+ 、CO、COO、COS、S-S、SO、 SO_2 、CO-NR'、CS-NR'、Si-O、アリアルまたはジアリアル基から選択され得るか、あるいは $X^1 \sim X^4$ は、非存在であり得るが、好ましくは、 $X^1 \sim X^4$ の少なくとも1つは存在し；

B^1 および B^2 は、互いに独立して、AまたはPRG基のリンカーへの結合を促進し得るか、またはリンカーからのこれらの基の望まない切断を防ぎ得る付加的部分であり、そして例えば、COO、CO、CO-NR'、CS-NR' から選択され得、そして1つ以上の CH_2 基を単独もしくは他の基（例えば、 $(CH_2)_q - CONR'$ 、 $(CH_2)_q - CS - NR'$ 、または $(CH_2)_q$ ）との組合せで含み得；

n、m、p および q は、0 ~ 約100の値を有し得る自然数であり、好ましくは、n、m、p または q のうちの1つは0ではなく、そしてxはまた、0 ~ 約100の範囲にわたり得る自然数であり、ここで、 $n + xm + p + q$ の合計は、好ましくは、約100未満であり、そしてより好ましくは約20未満であり；

Rは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシまたはアリアル基であり；そして

R'は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシまたはアリアル基である。

【0022】

リンカーの CH_2 基の1つ以上は、必要に応じて、小さな ($C_1 \sim C_6$) のアルキル基、アルケニル基、またはアルコキシ基、アリアル基で置換され得るか、あるいはイオン化を促進する官能基（例えば、永続的に正電荷または負電荷を有する酸性基または塩基性基）で置換され得る。リンカー内の CH_2 基を結合する1つ以上の単結合は、二重結合または三重結合で置換され得る。好ましいRおよびR'アルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアルコキシ基は、1 ~ 約6炭素原子を有する小さな基である。

【0023】

リンカー内の1つ以上の原子は、実質的に化学的に同一であるが、同位体的に識別可能な1つ以上の試薬を生成するために、安定な同位体で置換され得る。例えば、リンカー内の1つ以上の水素は、同位体的に重い試薬を生成するために、重水素で置換され得る。

【0024】

1つの例示的な実施形態において、リンカーは、親和性タグを除去するために切断され得る基を含む。切断可能なリンカー基が使用される場合、これは、代表的に、親和性標識化ペプチドがCRと共に親和性標識を使用して単離された後に切断される。この場合、好ましくは、リンカー内の任意の同位体標識は、タンパク質またはペプチドに結合されたまま維持される。

【0025】

リンカー基としては、とりわけ、以下を挙げられる：エーテル鎖、ポリエーテル鎖、エーテルジアミン鎖、ポリエーテルジアミン鎖、ジアミン鎖、アミド鎖、ポリアミド鎖、ポリチオエーテル鎖（直鎖または分枝および環状になり得る部分）、ジスルフィド鎖、シリルエーテル鎖、アルキル鎖またはアルケニル鎖、アリアル基、ジアリアル基またはアル

10

20

30

40

50

キル - アリール基。リンカー内のアリール基は、1つ以上のヘテロ原子（例えば、N原子、O原子またはS原子）を含み得る。

【0026】

1つの局面において、本発明は、親和性標識化試薬を使用する錯体混合物における1つ以上のタンパク質の同定および定量のための、ゲル電気泳動質量分析法を提供し、ここで、PRGは、タンパク質において代表的に見出される、特定のアミノ酸またはアミノ酸の誘導体と選択的に反応する基（例えば、メルカプト基、アミノ基、カルボキシ基、ホモセリンラクトン基）である。必要に応じて親和性標識および異なるPRG基を含む標識化試薬は、タンパク質を含む混合物に導入され、そしてこの試薬はこれらをタグ化するために特定のタンパク質と反応する。各々の場合において、同位体標識化試薬を用いた化学量論的なタンパク質改変を得ること、またはタンパク質が、使用されるべきゲルシステム上に均質に移動するように同位体標識化試薬を改変することのいずれかが必要である。ジスルフィド結合を減少させるか、さもなければ、標識化を促進するために、タンパク質混合物を前処理することが必要であり得る。標識化試薬との反応の後に、複数のサンプルは（好ましくは、等量で）合わせられ、そして錯体混合物中のタンパク質が、1Dまたは2Dのゲル電気泳動のいずれかによって分離される。次いで、このゲルは、タンパク質の位置を明らかにするために染色される。次いで、目的のタンパク質混合物を含むゲルの領域は、切り取られ、そして多くのペプチドに（例えば、酵素的に）切断されるか、またはこのゲルは、全ての破片が分析され得るように一様にスライスされる。あるいは、タンパク質は、膜に電気プロットングされ得、そして膜上で消化が実行される。第3の選択肢として、このタンパク質は、ゲルの底から連続的に溶出され、そして画分として収集され、次いで消化され得る。この消化工程は、タンパク質が比較的小さい場合は、必要ではないかもしれない。タンパク質が精製された後、このタンパク質は、ペプチド質量フィンガープリンティング（PMF）の手段によって同定され得る。親和性標識で標識した試薬を利用する場合、親和性標識でタグ化されたままのペプチドは、次いで、CRへのこれらの選択的結合を介する、親和性単離工程（例えば、親和性クロマトグラフィー）によって単離される。単離されたペプチドは、Aの置換またはリンカーの切断によってCRから放出され、そして放出された物質は、液体クロマトグラフィー/質量分析（LC/MS）によって分析される。非親和性標識試薬が利用される場合、この親和性単離工程は実施されない。必要な場合、次いで、1つ以上のタグ化ペプチドの配列が、MSMS技術によって決定される。いくつかの場合、タンパク質から誘導された少なくとも1つのペプチド配列は、あるタンパク質の特徴であり、そして混合物においてそのタンパク質の存在を示す。他の場合において、同位体的に標識されたペプチドがあまりにも小さすぎると、タンパク質を独自に同定することができず、そしてPMFデータの使用が、タンパク質の由来を同定するために必要とされ得る。他の場合、同位体的に標識されたペプチドは、密接に関連したタンパク質のファミリー内で同定され得、次いで、これは、混合物に存在する他のペプチド（特定のタンパク質に固有である）のPMF分析またはMSMS分析によって識別され得る。最後に、高分解能の2Dゲル電気泳動は、これらのタンパク質が、他の関係のないタンパク質と空間が重なった場合でさえ、同じタンパク質コード配列の異なる化学的改変形態を識別可能にさせる。従って、ペプチドの配列およびペプチド質量フィンガープリント情報はともに、同位体的に標識されたペプチドの配列がそれ自体によって十分に有益でない場合でさえ、代表的に、混合物における1つ以上のタンパク質の存在を同定するために十分な情報を提供する。

【0027】

タンパク質混合物（例えば、生物学的流体、細胞または組織の溶解物など）を含む1つ以上の異なるサンプルにおけるタンパク質の相対的な量は、化学的に同一であるが、差示的な同位体的に標識された試薬を使用して決定され得る。これらの試薬は、必要ではないかもしれないが、親和性タグを含む。この方法において、比較されるべき各サンプルは、その中の特定のタンパク質を標識するために異なる同位体的に標識された試薬で処理される。異なるサンプルに由来するタグ化ペプチドは、それらのペプチドが同じ化学的組成を

10

20

30

40

50

有していたとしても、ペプチドの質量によって互いに識別される。そのタンパク質の由来を特徴付けるペプチドは、MS技術またはMSⁿ技術を用いて同定され、サンプル中のタンパク質の同定を可能にする。各々のサンプルにおける所定のタンパク質の相対的な量は、あるタンパク質から由来する、任意の差示的に標識されたペプチドから生成するイオンの相対的な存在量を比較することによって決定される。この方法は、異なるサンプルに由来する既知のタンパク質の相対量を同時に評価するために使用され得る。さらに、この方法は、サンプル中に存在され得るタンパク質の型について、事前の知識をなんら必要としないので、試験されるサンプルにおいて異なるレベルで存在するタンパク質を同定するために使用され得る。より詳細には、この方法は、細胞、組織または生物学的流体において差次的な発現を示すタンパク質を、スクリーニングするために、そして同定するために適用され得る。錯体混合物における特定のタンパク質の絶対量を決定することもまた、可能である。この場合、既知の量の内部標準（定量化されるべき混合物において、各特定のタンパク質についての内部標準）が、分析されるべきサンプルに添加される。内部標準は、内部標準が、定量化されるべきペプチドよりも差示的に同位体的に標識されることを除いて、定量化されるべき標識化ペプチドと化学構造において同一であるペプチドである。内部標準は、他の方法において、分析されるべきサンプル中に提供され得る。例えば、特定のタンパク質またはタンパク質のセットは、同位体標識された試薬で化学的にタグ化され得る。この物質の既知の量が、分析されるべきサンプルに添加され得る。また、単一分析において複数のサンプルにおける特定のタンパク質のレベルを定量化することが可能である（多重化）。この場合、異なるサンプル由来の異なる標識化ペプチドに含まれるタンパク質を誘導体化するために使用される親和性タグ化試薬は、質量分析によって選択的に定量化され得る。

10

20

【0028】

本発明の方法は、生物学的流体、細胞または組織における特定のタンパク質の、定量的な測定について提供し、そして異なる細胞および組織において全体的なタンパク質発現プロファイルを決定するために適用され得る。同様の一般的なストラテジーが、プロテオーム-ワイド（proteome-wide）、タンパク質の改変状態の定性的分析および定量的分析を達成するために、改変されたアミノ酸残基との反応に対して異なる特異性を有する標識化試薬を使用することによって、広幅化され得る。本発明の方法は、錯体混合物において少ない存在量のタンパク質を同定するために使用され得、そして特定の基またはタンパク質のクラス（例えば、膜タンパク質または細胞表面タンパク質）、あるいは細胞内小器官、準細胞画分、または免疫沈降のような生化学的画分内に含まれるタンパク質を選択的に分析するために使用され得る。さらに、これらの方法は、異なる細胞状態において発現されるタンパク質における差異を分析するために適用され得る。例えば、本明細書中の方法は、疾患状態（例えば、癌）の指標となる1つ以上のタンパク質の存在または非存在を検出するための、診断アッセイにおいて使用され得る。

30

【発明の開示】

【0029】

（特定の実施形態の説明）

本発明の1局面は、親和性タグがリンカーによってタンパク質反応性基に共有結合した親和性タグ化タンパク質反応性試薬、または親和性タグを含まず、かつリンカーに共有結合したタンパク質反応性基を含む試薬を使用する。このリンカーは、実質的に化学的に同一であるが質量によって識別可能な試薬の対またはセットを生成するために、同位体的に標識されている。例えば、試薬対（このうち一方は、同位体的に重く、そして他方は同位体的に軽い）は、2つのサンプル（このうち一方は、1以上の既知のタンパク質を既知の量で含む参照サンプルであり得る）の比較のために使用され得る。例えば、リンカー中の水素原子、窒素原子、酸素原子または硫黄原子の任意の1以上は、それらの同位体的に安定な同位体²H、¹³C、¹⁵N、¹⁷O、¹⁸Oまたは³⁴Sによって置換され得る。

40

【0030】

利用される場合、適切な親和性タグは、捕捉試薬（CR）に対して、高い親和性で、共

50

有結合的にかまたは非共有結合的にかのいずれかで選択的に結合する。CR - A相互作用または結合は、非選択的に結合した成分を除去するための種々の溶液による頻繁かつ複数回の洗浄後に、インタクトなままであるべきである。親和性タグは、最少に結合するか、または好ましくはこのアッセイ系中の成分にはCRを例外として全く結合せず、そして反応容器の表面に顕著に結合しない。親和性タグと他の成分または表面との任意の非特異的相互作用は、CR - Aをインタクトなままにする複数回の洗浄によって破壊されるべきである。さらに、例えば、置換リガンドの添加または温度条件もしくは溶媒条件を変化させることによって、AとCRとの相互作用を破壊して、ペプチド、基質または反応産物を放出することが可能でなければならない。好ましくは、CRもAも、このアッセイ系中の他の成分とは化学的に反応せず、そして両方の基は、アッセイまたは実験の期間にわたって化学的に安定であるべきである。この親和性タグは、好ましくは、(MS)ⁿ分析の間にペプチド様のフラグメント化を受けない。親和性標識は、好ましくは、分析されるべきサンプル液中で可溶性であり、そしてCRは、アガロースのような不溶性樹脂へ結合してさえ、サンプル液中で可溶性のままであるべきである。CRの場合、用語可溶性は、CRが十分に水和されるか、またはさもなければ溶媒和されて、その結果、CRがAへの結合について適切に機能することを意味する。CRまたはCR含有結合体は、Aを捕捉するために添加される場合を除いて、分析されるべきサンプル液中に存在すべきではない。

10

【0031】

AとCRとの対の例としては、以下が挙げられる：

ビオチンまたは構造的に改変されたビオチンベースの試薬（イミノビオチン(iminobiotin)（これは、アビジン/ストレプトアビジン（これは、例えば、ストレプトアビジン - アガロース、オリゴマーアビジン - アガロース、またはモノマーアビジンアガロースの形態で使用され得る）のタンパク質に結合する）を含む）；

20

任意の1, 2 - ジオール（例えば、1, 2 - ジヒドロキシエタン(HO - CH₂ - CH₂ - OH)）および他の1, 2 - ジヒドロキシアルカン（環状アルカン（例えば、ホウ酸アルキルもしくはホウ酸アリアルまたはホウ酸エステル（例えば、フェニルB(OH)₂またはヘキシル - B(Oエチル)₂（これは、固体支持体材料（例えば、アガロース）へのアルキル基またはアリアル基を介して結合し得る））に結合する1, 2 - ジヒドロキシシクロヘキサンを含む）；

マルトース結合タンパク質に結合するマルトース（ならびに上記で考察した特性を有する、任意の他の糖/糖結合タンパク質対、またはより一般的には、任意のリガンド/リガンド結合タンパク質対）；

30

任意の抗体についてのハプテン（例えば、ジニトロフェニル基）（ここで、このハプテンは、ハプテンを認識する抗ハプテン抗体に結合し、例えば、ジニトロフェニル基は、抗ジニトロフェニルIgGに結合する）；

遷移金属に結合する配位子（例えば、オリゴマーヒスチジンは、Ni(II)に結合し、遷移金属CRは、樹脂に結合したキレート化遷移金属（例えば、ニトリロトリ酢酸キレート化Ni(II)またはイミノジ酢酸キレート化Ni(II)）の形態で使用され得る）；

グルタチオン - S - トランスフェラーゼに結合するグルタチオン。

40

【0032】

一般に、上記で考察された適合性の基準を満たす親和性富化のために一般に使用される任意のA - CR対が使用され得る。ビオチンおよびビオチンベースの親和性タグが好ましい。構造的に改変されたビオチン（例えば、イミノビオチン）が特に目的のものであり、これは、ESI - MS分析に適合する溶媒（例えば、10 ~ 20%の有機溶媒を含む希釈酸）条件下で、アビジンカラムまたはストレプトアビジンカラムから溶出する。イミノビオチンタグ化合物は、pH 4未満の溶媒中で溶出することが予測される。イミノビオチンタグタンパク質反応性試薬は、対応するビオチンタグ化試薬について本明細書中で記載される方法によって合成され得る。1つの好ましい実施形態において、親和性富化媒体は、モノマーアビジンからなり、これは、テトラマーアビジンよりもビオチンについての

50

親和性が低く、従って、多くの画分からのペプチドの精製のために再利用および使用され得る。

【0033】

置換リガンドDLは、必要に応じてCRからAを置換するために使用される。適切なDLは、代表的には添加されない限りサンプル中には存在しない。DLは、分析されるべきサンプル中で化学的および酵素的に安定であるべきであり、そしてサンプル中の(CR以外の)成分と反応も結合もせず、反応容器壁と非特異的に結合もしない。DLは、好ましくは、MS分析の間にペプチド様フラグメント化を受けず、そしてサンプル中のその存在は、タグ化ペプチド、基質または反応産物結合体のイオン化を有意に抑制すべきではない。DL自体は、好ましくは、質量分析の間に最少にイオン化され、そしてDLクラスターから構成されるイオンの形成は、好ましくは最少である。DLの選択は、使用されるA基およびCR基に依存する。一般に、DLは、合理的な時間規模(多くてもその添加の1週間以内であるが、好ましくは数分以内~1時間まで)でCRからAを置換するために選択される。CRに対するDLの親和性は、CRについてのAを含むタグ化化合物の親和性と匹敵するかまたはこの親和性よりも強くなければならない。さらに、DLは、CR由来のAを含むタグ化化合物の溶出の間に使用される溶媒中で可溶性であるべきである。DLは、好ましくは、遊離AまたはAの誘導体もしくは構造的改変体である。DLの例としては、ピオチンまたはピオチン誘導体、特にMSにおけるクラスター形成を抑制するかまたはイオン化を抑制する基を含むものが挙げられる。

10

【0034】

リンカー基(L)は、分析されるべきサンプル液中で可溶性でなければならず、そしてサンプルの成分ならびにA基およびCR基との化学反応に関して安定(例えば、実質的に化学的に不活性)でなければならぬ。Aに結合した場合、リンカーは、AのCRとの特異的相互作用を妨害するべきでなく、あるいは置換リガンドまたは温度もしくは溶媒の変化によるCRからのAの置換を妨害するべきでない。このリンカーは、最少に結合すべきであるか、または好ましくはこの系における他の成分、反応容器表面またはCRには全く結合すべきではない。リンカーの任意の非特異的相互作用は、A-CR複合体をインタクトなままにする複数回の洗浄後に破壊されるべきである。リンカーは、好ましくは、(MS)ⁿ分析の間のペプチド様フラグメント化を受けない。リンカー基中の少なくともいくつかの原子は、安定な重原子同位体で容易に置換可能であるべきである。リンカーは、好ましくは、親和性タグ化試薬、ペプチド、基質または反応産物のイオン化を容易にする基または部分を含む。

20

30

【0035】

イオン化を促進するために、リンカーは、酸性基または塩基性基(例えば、COOH、SO₃H、第一級アミノ基、第二級アミノ基もしくは第三級アミノ基、窒素-複素環、エーテル、またはこれらの基の組み合わせ)を含み得る。このリンカーはまた、恒久電荷(例えば、ホスホニウム基、第四級アンモニウム基、スルホニウム基、キレート化金属イオン、ホウ酸テトラアルキルまたはホウ酸テトラアリアル、あるいは安定なカルバニオン)を有する基を含み得る。

【0036】

AまたはPRGへのリンカーの共有結合は、代表的に、アッセイの間の化学反応または酵素反応によって意図せず切断されるべきではない。いくつかの場合において、例えば、親和性カラムからの放出を促進するために、親和性タグAまたはPRGからリンカーを切断することが所望され得る。従って、このリンカーは、例えば、化学反応、熱反応、酵素反応または光化学反応によって切断可能であり得る。リンカー中の光切断可能な基としては、1-(2-ニトロフェニル)-エチル基が挙げられ得る。熱不安定リンカーは、例えば、核酸の2つの相補鎖から形成される二本鎖の二重鎖、ペプチド核酸の相補鎖を有する核酸鎖、または加熱の際に解離する2つの相補的ペプチド核酸鎖であり得る。切断可能なリンカーはまた、ジスルフィド結合、酸不安定基または塩基不安定基を有するリンカーが挙げられ、とりわけ、ジアリアルメチル基またはトリメチルアリアルメチル基、シリルエ

40

50

ーテル、カルバメート、オキシエステル、チオエステル、チオノエステル、ならびに - フッ化アミドおよび - フッ化エステルが挙げられる。酵素的に切断可能なリンカーは、例えば、プロテアーゼ感受性のアミドまたはエステル、 - ラクタマーゼ感受性の - ラクタムアナログ、およびヌクレアーゼ切断可能またはグリコシラーゼ切断可能なリンカーを含み得る。

【0037】

タンパク質反応性基 (P R G) は、特定のタンパク質官能基と選択的に反応する基であり得る。任意の選択的反應性タンパク質反應性基は、サンプル中のタンパク質の少なくとも一部に存在する目的の官能基と反応するべきである。P R G とタンパク質上の官能基との反応は、分析されるべきサンプル中の化合物の実質的な分解を導かない条件下で生じるべきである。本発明の親和性タグ化試薬における使用に適切な選択的反應性 P R G の例としては、スルフヒドリル基と反応して、システインを含むタンパク質をタグ化するもの、アミノ基、カルボン酸基、エステル基、リン酸反應性基ならびにアルデヒド反應性基および/またはケトン反應性基と反応するか、あるいは C N B r で断片化後にホモセリンラクトンと反応するものが挙げられる。

10

【0038】

チオール反應性基としては、エポキシド、 - ハロアシル基、亜硝酸塩、スルホン化アルキルまたはスルホン化アリールチオール、およびマレイミドが挙げられる。アミノ反應性基は、タンパク質中のアミノ基をタグ化し、そしてこれには、スルホニルハライド、イソシアネート、イソチオシアネート、活性エステル (テトラフルオロフェニルエステルおよび N - ヒドロキシスクシンイミジルエステルを含む)、酸ハロゲン化物および酸無水物が挙げられる。さらに、アミノ反應性基は、 NaBH_4 または NaCNBH_3 の存在下または非存在下での、アルデヒドまたはケトンを含む。

20

【0039】

カルボン酸反應性基としては、カップリング剤 (例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミドまたは 2 , 3 , 5 , 6 - テトラフルオロフェニルトリフルオロ酢酸) の存在下、およびカップリング触媒 (例えば、4 - ジメチルアミノピリジン) の存在下または非存在下でのアミンまたはアルコール ; ならびに C u (I I) フェナントロリンを含む遷移金属 - ジアミン錯体が挙げられる。

【0040】

エステル反應性基としては、例えば、ホモセリンラクトンと反応するアミンが挙げられる。

30

【0041】

リン酸反應性基としては、キレートされた金属が挙げられ、ここで、この金属は、例えば、F e (I I I) または G a (I I I) であり、ニトリロトリ酢酸またはイミノジ酢酸にキレートされている。

【0042】

アルデヒド反應性基またはケトン反應性基としては、アミンおよび NaBH_4 または NaCNBH_3 、あるいは過ヨウ素酸塩で最初に炭水化物を処理した後にアルデヒドまたはケトンを生じるこれらの試薬が挙げられる。

40

【0043】

A、L、P R G について上記で議論された要件は、A - L - P R G のセグメントおよびこれらの試薬を用いて生成される反応生成物に対応するものにまで拡張される。

【0044】

同位体的に適切に標識された内部標準を、本発明の方法において使用して、サンプル中のタンパク質の絶対的な定量的量を測定し得る。これらは、タグ化タンパク質の消化から生じる親和性タグ化ペプチドを生成するために、親和性標識されたタンパク質反應性試薬と目的のタンパク質を含むことが既知の調製物との反応によって調製され得る。あるいは、所望のペプチドは、化学的に合成され得る。親和性タグ化ペプチドの内部標準は、親和性タグ化タンパク質の消化から生じる対応する親和性タグ化ペプチドと、実質的に化学的

50

に同一である。ただし、これらは、差示的に同位体的に標識されて、MS技術によるこれらの独立した検出を可能にする。

【0045】

本発明の方法はまた、これらの正体を同時に決定しながら、2つ以上のタンパク質サンプル中の1つ以上のタンパク質相対的量を決定するためにも適用され得る。各サンプル中のタンパク質は、実質的に化学的に同一であるが差示的に同位体的に標識された標識化試薬と反応される。これらのサンプルは、合わされ、そして1つのものとして処理され、次いでゲル電気泳動によって一緒に泳動される。次いで、特定のバンドまたはスポットに含まれるタンパク質は、消化される。あるいは、タンパク質サンプルを混合した後であるが電気泳動の前に、これらのタンパク質は、アビジン親和性クロマトグラフィーに供されて、

10

【0046】

本発明の方法は、複数の異なるサンプルの分析または比較に適用され得る。本発明の方法によって分析され得るサンプルとしては、以下が挙げられる：細胞ホモジェネート；細胞画分；尿、血液および脳脊髄液を含む生物学的流体；組織ホモジェネート；涙；便；唾液；肺洗浄液または腹腔洗浄液を含む洗浄流体；細胞ホモジェネートまたは組織ホモジェネートの部分的または完全画分化によって生成された、タンパク質、脂質、炭水化物および核酸を含む生物学的分子の混合物。

20

【0047】

本発明の方法は、MS方法および(MS)ⁿ方法を使用する。種々のMSおよび(MS)ⁿが利用可能であり、そしてこれらの方法において使用され得るが、Matrix Assisted Laser Desorption Ionization MS(MALDI/MS)方法およびElectrospray Ionization MS(ESI/MS)方法が好ましい。

【0048】

上記に示されるように、各サンプル中のタンパク質は、(A)親和性標識または非親和性標識された試薬のいずれかで標識され、これらの試薬の両方は、標識されたリンカー部分(L)およびタンパク質反応性基(PRG)を含む。

30

【0049】

標識されたサンプルは、混合され、次いで、好ましくは2D PAGEに供される。1次元SDS電気泳動が、2D PAGE、または1次元等電点電気泳動ゲルもしくはタンパク質を分離するための任意の他の電気泳動方法(ネイティブなタンパク質の電気泳動を含む)の代わりに使用され得る。1次元電気泳動および2次元電気泳動を実行するための手順は、当業者に周知である。

【0050】

2つの細胞サンプルは、タンパク質染色またはゲル細片の直接的MS分析の際に、共通の形態の同時スポットを有する。いずれかのサンプル由来の同一タンパク質間の検出可能な同位体の比率は、大多数のタンパク質について一定である。2つのサンプルが共通に有さないタンパク質は、独立して移動する。従って、1つのサンプルに独自であるかまたは異なる相対濃度のタンパク質は、タンパク質スポットの大多数からの検出可能な同位体の異なる比率を有する。次いで、目的のタンパク質スポットは消化されて標識されたペプチドを形成し、このペプチドは、次いで、(MS)ⁿによって分析される。

40

【0051】

従来分析において、コントロールは、研究される細胞型についての既知のタンパク質を用いた泳動である。サンプルゲル上の既知のスポットは、同定および特徴付けされており、次いでコントロールゲルおよび第二ゲルと比較されて、これら2つのゲル間の差異を決定する。本発明においては、ただ1つのゲルしか存在しないので、印付けが不必要であ

50

る。さらに、タンパク質の差異の比較および対比の前に異なるゲルを整列させるための従来のプロセスに使用されるソフトウェアは、2つ以上のゲル間の局所的な歪みおよび不一致について補正しない。試験される全てのサンプルについての抽出物が混合され、そして同じゲル上で泳動されるので、本発明のプロセスは、このような補正の必要性を排除する。各サンプルは、任意のゲルの歪みを等しく経る。

【0052】

ゲル電気泳動を実施する1つの利点は、特に目的のタンパク質が、ゲル上の再現性のある位置に移動し、その結果、所望の場合、これらのタンパク質のみが分析される必要があることである。これらのタンパク質は、疾患マーカーおよびコントロールタンパク質を含み得る。これらのタンパク質の翻訳後修飾された形態の多くは、ゲル電気泳動によって互いに分離され得、その結果、本発明の方法は、これらの修飾形態の各々の発現における変化を決定および定量するために使用され得る。このようなタンパク質を局在化させる際に任意の困難性が存在する場合、分離されたサンプルの小部分は、ゲルからトランスブロット (transblot) され得、そしてこれらのタンパク質は、イムノブロッティング技術によって位置決めされ得る。あるいは、少量の目的のタンパク質は、電気泳動の前に、移動位置に影響を与えないことが既知の蛍光マーカーによって標識されて、分析されるべき目的の領域を同定し得る。次いで、本発明の方法を使用して、ゲル上の移動の関数としてPRGに基づいてゲル中のタンパク質の大多数の量的変化を測定し得る。

【0053】

本発明の方法は、公開されたPCT出願WO00/11208 (これは、本明細書中で参考として援用される) に記載されるタンパク質組成物を分析するために利用され得る。

【0054】

(親和性標識された試薬を用いる定量的プロテオーム分析)

この方法は、サンプルタンパク質混合物および参照タンパク質混合物中の定量的タンパク質プロフィール測定のために、ビオチン標識したスルフヒドリル反応性試薬を使用することからなる。この方法は、以下の工程を包含する：

(A.還元) サンプルおよび参照混合物中のタンパク質のジスルフィド結合は還元されて、SH基を遊離する。好ましい還元剤は、標準的な条件下で使用されるトリ-n-ブチルホスフィンである。代替的な還元剤としては、トリカルボキシエチルホスフィン、メルカプトエチルアミンおよびジチオトレイトールが挙げられる。必要な場合、この反応は、タンパク質の可溶性を維持するために、可溶化剤 (高濃度の尿素を含む) および界面活性剤の存在下で実施され得る。比較される参照タンパク質混合物およびサンプルタンパク質混合物は、同一の反応条件を適用して、別々に処理される。

【0055】

(B.親和性タグを用いるSH基の誘導体化) 遊離SH基を、ビオチン化試薬であるピオチニル-ヨードアセチルアミジル-4,7,ジオキサデカンジアミンによって誘導体化する。この試薬は、リンカー原子の安定な同位体による置換によって、異なる同位体標識された形態で調製され、そして各サンプルは、異なる同位体標識された形態の試薬を用いて誘導体化される。SH基の誘導体化は、好ましくは、僅かに塩基性の条件 (pH 8.5) で、90分間室温で実施される。2つのサンプルの定量的な比較アッセイについて、各1つのサンプル (参照サンプルおよびサンプルと称される) は、それぞれ、この試薬の同位体的に軽い形態および同位体的に重い形態を用いて誘導体化される。いくつかのサンプルの比較分析について、1つのサンプルは、他のサンプルが関連付けられる、参照と称される。代表的には、参照サンプルは、同位体的に重い試薬で標識され、そして実験サンプルは、この試薬の同位体的に軽い形態で標識されるが、試薬の選択は任意である。これらの反応物はまた、高濃度の可溶化剤の存在下で適合性である。

【0056】

(C.標識化サンプルの比較) 親和性タグ化反応の完了後、同位体的に異なる試薬 (例えば、重い試薬または軽い試薬) で標識されたサンプルの規定されたアリコートは合わされて、そして全ての引き続く工程を、プールされたサンプルに対して実施する。この手順

の初期段階で差示的に標識されたサンプルを合わせることは、引き続き反応および操作に起因する可変性を排除する。好ましくは、等量の各サンプルが合わされ；次いで、以下の周知の技術の1つによって画分化される：

(1.) フロースルーゲル電気泳動)

標識されたタンパク質を、調製的フロー - スルー SDS ゲル (5%) 装置 (Mini Prep Cell, Bio-Rad) によって調製し、そして溶出したタンパク質を、画分中に収集する。このタンパク質を、例えば、アセトン沈殿によって、タンパク質分解性消化がトリプシンのような酵素との一晚インキュベーションによってもたらされる前に、濃縮し得る。

【0057】

10

(2.) 標準的ゲル電気泳動)

このゲルを、スポットまたはバンドを局在化するためにタンパク質について染色し得るか、あるいはこのスポットまたはスライス、この段階でのタンパク質検出なしに処理され得る。ゲル電気泳動によるスポット (2D) またはバンド (1D) 中に存在するタンパク質混合物は、ゲルから除去され、必要に応じて乾燥され、そして酵素で消化される。サンプル混合物中のタンパク質は、代表的にはトリプシンによって消化される。代替的なプロテアーゼはまた、事実上、化学的断片化手順であるような手順と適合性である。この工程は、小タンパク質の分析においては省かれ得る。

【0058】

(3.) ペプチド抽出物についての消化およびトランスプロットングを用いる、標準的ゲル電気泳動)

20

このゲルを、酵素で処置し得、そしてメンブレン上にトランスプロットング (電流の補助有りまたは無しで) し得るか、または活性なプロテアーゼメンブレンを介してトランスプロットングして、第二のメンブレン上に捕捉し得る (Bienvenutら、Anal. Chem. 71: 4800 - 4807、1999)。このメンブレンを、次いで、MSまたはMALDI MSMSによって直接的に分析し得る。

【0059】

(D. ペプチド質量フィンガープリント法) 次いで、タンパク質消化物をPMFに供して、主要なタンパク質成分を同定し得る。好ましい例において、Cys含有ビオチン化ペプチドは、8amu離れた同位体対としてこの段階で検出可能であり、そしてこのタンパク質の相対的な量は、さらなる精製なしに質量スペクトルにおいてこれらのペプチドの強度を比較することによって、決定され得る。

30

【0060】

(E. 捕捉試薬との相互作用による、親和性タグ化ペプチドの親和性単離) 次いで、ビオチン化ペプチドを、アビジン - アガロースで単離し得る。消化後、ペプチドサンプルのpHは、6.5に下げられ、そしてビオチン化ペプチドは、モノマーアビジン (Promega) でコーティングされたビーズ上に固定化される。このビーズは、頻りに洗浄される。最後の洗浄溶媒は、残留SDSを除去するために、10%アセトニトリルを含む。ビオチン化ペプチドを、例えば、アセトニトリルの存在下で0.4%トリフルオロ酢酸を用いて、アビジン - アガロースから溶出する。

40

【0061】

単離された誘導体化ペプチドの分析はまた、データ依存的な断片化を用いて、 μ LC-MSⁿまたはCE-MSⁿによって達成され得る。当該分野で周知であり、かつ例えば、以下: Ducretら、1998; Prot. Sci. 7: 706 - 719、Figey sおよびAebersold、1998 Electrophoresis 19: 885 - 892; Figey sら、1996、Nature Biotech. 14: 1579 - 1583; またはHaynesら、1998 Electrophoresis 19: 939 - 945 (これらは、本明細書中で参考として援用される) に記載される方法および装置制御プロトコルが使用される。この最後の工程において、タグ化されたペプチドが起源するタンパク質の量および配列正体の両方は、自動化マルチステージMSによ

50

て決定され得る。これは、二重モードでの質量分析器の操作によって達成され、ここで、この装置は、キャピラリーカラムから溶出するペプチドの相対的な量の測定と、選択されたペプチドの配列情報の記録との間で、連続的走査を交互に行う。ペプチドは、MSモードで、それぞれ、試薬の同位体的に軽い形態または重い形態でタグ化された（従って、親和性タグ化試薬内にコード化される質量的差異によって質量が異なる）同一配列のペプチドイオン対についての相対的シグナル強度を測定することによって定量化される。ペプチド配列情報は、MSⁿモードで作動する質量分析器において、衝突誘起解離（CID）についての特定の質量対電荷（ m/z ）比のペプチドイオンを選択することによって、自動的に作成される。Link, A. J.ら、Electrophoresis 18: 1314 - 1334、1997; Gygi, S. P.ら、Mol. Cell. Biol. 19: 1720 - 1730、1999およびGygi, S. P.ら、Electrophoresis 20: 310 - 319、1999（これらは、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。次いで、得られたCIDスペクトルは、配列データベースを用いて自動的に関連されて、配列決定されたペプチドが起源するタンパク質を同定する。親和性タグ化ペプチドサンプルおよび差示的標識化ペプチドサンプルのMS分析およびMS/MS分析によって得られた結果の組み合わせは、単一の自動化作動での、タンパク質混合物の成分の相対的な量および配列正体を決定する。

【0062】

この方法はまた、他の親和性タグおよび他のタンパク質反応性基（アミノ反応性基、カルボキシル反応性基またはホモセリンラクトンと反応する基を含む）を使用して実施され得る。

【0063】

定量的プロテオーム分析のために本明細書中で使用されるアプローチは、2つの原理に基づく。第一に、タンパク質由来の連続アミノ酸の短い配列（5～25残基）は、そのタンパク質を独自に同定するために十分な情報を含む。MSⁿによるタンパク質の同定は、高度なコンピュータ検索アルゴリズムを使用してCID質量スペクトルに含まれる配列情報を配列データベースと関連させることによって達成される（Eng, J.ら、J. Amer. Soc. Mass Spectrom. 5: 976 - 989、1994; Mann, M.ら、Anal. Chem. 66: 4390 - 4399、1994; Qin, J.ら、Amer. Chem. 69: 3995 - 4001、1997; Clauser, K. R.ら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92: 5072 - 5076、1995（これらは、本明細書中で参考として援用される））。第二に、軽い親和性タグ化試薬および重い親和性タグ化試薬でそれぞれタグ化された同一のペプチドの対（または2つより多いサンプルの分析において、各セットのメンバーが、差示的に同位体的に標識された、同一のタグ化ペプチドのセット）は、化学的に同一であり、従って、正確な定量のための相互の内部標準として作用する。MS測定は、ペプチドに結合した同位体的に別個の試薬間の差異に起因して、異なるサンプル（例えば、異なる細胞状態を示す）に起源するペプチド間を容易に識別する。所定のペプチドに対するMS強度の応答は、試薬の同位体的組成とは独立なので（De Leenheer, A. P.ら、Mass. Spectrom. Rev. 11: 249 - 702、1992（これは、本明細書中で参考として援用される））、これらのピークの対またはセットの異なる重量の成分の強度間の比率は、元々の細胞プール中のペプチド（従って、タンパク質）の相対的な量の正確な測定を提供する。同位体標識された内部標準の使用は、定量的質量分析において標準的な実施であり、そして例えば、体液中の薬物および代謝の正確な定量において、大変有利に開発されてきた。

【0064】

本発明の方法（特に1Dゲル）は、特定の物理化学的特性（乏しい可溶性、大きい分子サイズまたは小さい分子サイズ、および極端なpI値を含む）を有するタンパク質のクラス分析に適用され得る。低量のタンパク質は、電気泳動の前に、タンパク質親和性サブトラクションを実施して、ほとんどの豊富なタンパク質を除去することによって分析され

10

20

30

40

50

得る。あるいは、ビオチン化反応が、タンパク質（例えば、細胞の外側に露出されたタンパク質、またはオルガネラの精製後に露出されたままであるタンパク質）の微量なサブセットを標識するような方法で実施され得る。次いで、存在する大量の非ビオチン化タンパク質は、そうでなければ電気泳動を妨害するので、コントロール由来のタンパク質と実験タンパク質と一緒に混合した後、タンパク質調製物は、アビジン親和性クロマトグラフィーに供されて、ビオチン化タンパク質について富化され得、このビオチン化タンパク質は、次いで、電気泳動される。

【0065】

本発明の化学および方法の試作的適用は、上記の好ましい方法に従う、複雑なタンパク質サンプルならびに細胞および組織の最終的な総溶解物の定量的プロフィールの確立である。さらに、本発明の試薬および方法は、タンパク質発現プロフィールの決定を超える適用を有する。このような適用としては、以下が挙げられる：

アミノ反応性またはスルフヒドリル反応性の、差示的に同位体的に標識された親和性タグ化試薬の適用は、免疫沈降した複合体中のタンパク質の定量的分析のために使用され得る。この技術の好ましいバージョンにおいて、異なる状態（例えば、異なる活性化状態、異なる疾患状態、異なる分化状態）を示す細胞由来のタンパク質複合体は、特異的試薬（好ましくは抗体）によって沈殿される。次いで、沈殿した複合体中のタンパク質は、上記のように誘導体化および分析される。

【0066】

アミノ反応性の差示的に同位体標識された親和性タグ化試薬の適用は、誘導されたタンパク質リン酸化の部位を決定するために使用され得る。この方法の好ましいバージョンにおいて、精製された（例えば、異なる刺激条件下で細胞から免疫沈降された）タンパク質は、上記のようにフラグメント化および誘導体化される。ホスホペプチドは、ESI-MS装置のイオン供給源におけるフラグメント化によって得られたペプチド混合物中で同定され、そしてそれらの相対的な量は、実験サンプルのイオンシグナル強度を、誘導された同位体的に標識された標準の強度と比較することによって決定される。

【0067】

アミノ反応性の差示的に同位体標識された親和性タグ化試薬は、MSMSスペクトルにおけるN末端イオンシリーズを同定するために使用される。この適用の好ましいバージョンにおいて、分析されるペプチドは、アミノ基に特異的な、同位体的に軽い試薬および重い試薬の50：50混合物で誘導体化される。従って、CIDによるペプチドのフラグメント化は、使用される試薬種の質量の差異によって質量が正確に異なる、2つのN末端イオンシリーズを生じる。この適用は、誘導体化されたペプチドのアミノ酸配列の決定における困難を劇的に低減させる。

【0068】

以下の実施例は、4つの異なる実験を例示し、これらの実験において、ゲル電気泳動分離を実施し、そして定量的データを、ビオチン親和性タグを含むICATTM試薬、8個の重水素原子を有するリンカー、およびヨードアセトアミドタンパク質反応性基を使用して獲得した。これらの実施例は、網羅的ではなく、これらの実験の範囲を限定することを意図しない。

【実施例】

【0069】

（実施例1）

5つの異なる標準タンパク質を、d0 ICAT試薬およびd8 ICAT試薬を用いて別々にアルキル化し、そして、2Dゲル電気泳動を実施する前に異なる比で一緒に混合した。染色後、これらのタンパク質に対応するスポットを切り出し、トリプシンで消化し、そしてPMFに供した。図1は、ゲルの画像および各タンパク質由来のICAT試薬対の1つを含む各質量スペクトルの挿入図を示す。さらに、タンパク質がゲル電気泳動前に一緒に混合された比および、質量スペクトルにより獲得したd0対d8の比を列挙する。全ての5つの場合において、実験上の比と観察された比との間の矛盾は、20%よりもず

10

20

30

40

50

っと下であった。

【0070】

HPLCによるICAT試薬標識ペプチドの分離の問題となる局面の1つは、d8標識ペプチドが、典型的に、対応するd0標識ペプチドの数秒前に溶出することである。ゲル電気泳動の際に、同様の放射性同位体分離効果が存在しないという事実を実証するために、図2に示される、ラクトアルブミンについての2Dスポットを、4象限に分割し、次いで、これらを別々に消化し、抽出し、そしてMALDI MS分析に供した。図2の右手側は、同一のd0対d8比を、これらの4象限の各々について10%以内で獲得したことを実証する。

【0071】

(実施例2)

最小培地(グルコース)の増殖条件について、重水素化ビオチニルヨードアセトアミド試薬を含むICAT試薬で標識されたか、またはリッチな培地(LBブロス)の増殖条件について、非重水素化試薬で標識されたかのいずれかのE. coli細菌溶解物を、等量で混合した。この混合物を、調製用フロースルーSDSゲル(5%)装置(Mini Prep Cell, Bio-Rad)を通して分離し、そしてタンパク質を溶液中に分画した。次いで、この分画したタンパク質を、アセトン沈殿させ、その後、トリプシンと共に一晩インキュベートすることによりタンパク質分解性の消化をした。アビジンクロマトグラフィーにおいて、フロースルー部分および溶出部分の両方由来のタンパク質を、96画分で収集した。フロースルーを、逆相媒体(POROS(登録商標)50R1, Applied Biosystems)において捕捉し、そして蒸留水で洗浄し、そして60% ACNで溶出した。サンプルを真空乾燥させ、そして50% ACN/0.1% TFAに再懸濁した。スペクトルを、Applied Biosystems Voyager MALDI TOF質量分析機を用い、マトリクスとして -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸を用いて獲得した。このストラテジーは、d0/d8比を定量的のために使用しつつ、PMFを用いてタンパク質を同定することであった。

【0072】

図3は、アビジンフロースルーおよび分子量約40,000のタンパク質を含む1つの画分について、アビジンから溶出されたペプチドについて獲得されたスペクトルを示す10個の異なるICAT試薬標識対をマークする。主要タンパク質成分を、ChemApplex PMFソフトウェアプログラム(Applied Biosystems)を用いるPMFにより試験的に同定し、そして6つの成分を以下の表1に列挙する。OmpAが主要な成分であり、総強度の25%を占めた。この同定における信頼性は、カラム5に列挙されるスコアにほぼ比例する。これらのタンパク質の6つ全てが、粗いSDS分離を用いて予測されたように、30Kダルトンと52Kダルトンとの間の分子量を有することに注意のこと。システインペプチドのみを含む特別なペプチドデータベースを作製し、そして溶出したペプチド由来の質量をこのデータベースに対して調査した。上位の6つの候補タンパク質を列挙する。これらのタンパク質の2つは、アビジンフロースルーから同定されたタンパク質と同一である。注目すべきは、フロースルー画分におけるタンパク質のうち2つ(すなわち、リボース結合タンパク質および外膜C)は、システインを有さず、そしてそれ故、いかなるタンパク質もアビジン溶出画分に寄与しない。

【0073】

10

20

30

40

【表 1】

表 1

フロースルー

Acc. #	タンパク質名	MW	#ペプチド	スコア	%強度	ppm
P02990	EF-TU	43156	6	47828	25.4	3.7
P06996	ompC	40344	8	13194	12.7	7.3
P00477	SHT	45289	4	7778	5.1	4.2
P02925	リボース BP	30932	5	4488	7.4	10.7
P06711	グルタミン syn.	51741	4	4196	3.4	7.7
P08200	ICDH	45728	3	1174	1.6	6.6

10

アビジン溶出

Acc. #	タンパク質名	MW	#ペプチド	スコア	%強度	ppm	比
P02990	EF-TU	43156	5	17822	48.2	3.2	0.65
P02934	ompA	37179	2	305	2.2	3.3	0.67
P39342	hypo. 54.3	54299	2	91	0.6	10.3	0.49
P76200	hypo. 43	41368	2	44	1.7	18.4	2.6
P07460	succ.coA syn.	41368	2	21	1.1	14.2	1.5
P00477	SHT	45289	3	1	0.2	28.3	0.13

20

表 I に列挙されるタンパク質を、ChemApplex PMFプログラムを用いて、図 3 におけるスペクトルから同定した。上パネルを、アビジンビーズのフロースルーから獲得し、そして下パネルを、アビジン溶出から獲得した。第 1 カラムは、同定したタンパク質の SwissProt 登録番号を列挙する。第 2 カラムは、タンパク質名の省略形（伸長因子 TU については EF-TU、外膜タンパク質 C については ompC、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼについては SHT、ペリプラズムリボース結合タンパク質についてはリボース BP、グルタミンシンセターゼについてはグルタミン syn、イソクエン酸デヒドロゲナーゼについては ICDH、外膜タンパク質 A については ompA、仮定上のタンパク質については hypo、スクシニル補酵素 A シンセターゼ鎖については、succ.coA syn.）を列挙する。MW カラムは、タンパク質の分子量を列挙し；# ペプチドは、一致したペプチドの数を列挙し（アビジン溶出ペプチドについては d0 質量のみを含む）；スコアを、d0 質量のみを考慮して ChemApplex プログラムにより算出した；%強度は、スペクトルにおける全ての質量の強度の百分率であり、これは、一致した質量によって説明され得（繰り返すが、d0 質量のみ）；そして ppm は、質量スペクトルについての実験上の測定と、ペプチドの理論上の質量との間の、これらの質量についての平均強度重みつき ppm 誤差である。比を、d0 ペプチドの強度を、対応する d8 ペプチドの強度で除算し、そして可能な場合平均化することにより手動で算出した。SHT についての d0 質量の低強度は、ChemApplex プログラムが SHT とノイズとを識別する上で困難を有する理由である；このプログラムは、d8 質量を調査せず、これらの 3 つ全ては、バックグラウンドを超えて検出可能であった。ompC および RBP は、システインを含まず、それゆえ、アビジン溶出画分で不可視であることに注意のこと。同定における信頼性は、最も高いスコアを有するタンパク質について最も高く、そしてフロースルー画分およびアフィニティー溶出サンプルにおいて独立して同定されたタンパク質についても最も高い。第 2 の表の 2 つの仮定のタンパク質を除いて両方の表中のタンパク質の全てを、これらの E. coli 溶解物から反復的に同定した。

30

40

【0074】

(実施例 3)

上記の調製物に類似の 2 つの E. coli 調製物を、ICAT d0 試薬および ICA

50

T d 8 試薬で標識し、一緒に混合し、そして1D SDSゲル分析に供した。ゲルから切片を切り出し、洗浄し、トリプシンで消化し、そしてペプチドを溶出させた。アビジンアフィニティークロマトグラフィーを実施せず、その結果、最も強いICAT試薬標識ペプチドのみが検出可能であった。ChemApplexを用いたPMF分析において、E. coliトリプトファナーゼ(tryptophanase)が、トリプシン自体の後に、最も優勢なタンパク質成分として検出可能であった。これらの条件の下で、ICAT試薬対に対応するペプチドをまた、SDSゲル分析の後に一般的に観察されるメチオニン残基の酸化と類似する、最初のシステイン硫黄原子における酸化に起因する酸化形態で検出した。従って、各ペプチドは、d 0対d 8の比の2つの独立した測定(1つはペプチドの還元形態について、そしてもう1つはペプチドの酸化形態について)を提供する。1581.85で始まる約8amu離れたピークの顕著な四つ組を、検出した。これは、トリプトファナーゼペプチドQLPCPAELLA(配列番号1)、ならびにd 8、d 0+Oおよびd 8+Oのピークに対応する。非改変メチオニンを有するICAT試薬対は、2.1のd 8/d 0比を有したが、酸化された対は、1.9のd 8/d 0比を有した。これらの実験において、同一タンパク質由来のペプチドのICAT試薬対について獲得された比は、一般的に、互いに20%以内であった(最も弱いシグナルおよび他のペプチドと明らかに重複しているシグナル(このことは、それらのペプチドが、すでに同定された同一タンパク質由来の予想されたトリプシン消化産物に対応する場合、特に明らかである)を除く)。トリプトファナーゼ由来の他のICAT試薬対が検出可能であったが、バックグラウンドを超えて十分に分離されなかった。

【0075】

(実施例4)

タンパク質を、正常な筋細胞または虚血状態に供した筋細胞由来のラット心臓細胞から単離した。正常なラットタンパク質を、d 0 ICAT試薬で標識し、そして虚血性細胞タンパク質をd 8 ICAT試薬で標識した。この2つのサンプルを一緒に混合し、そして2Dゲル上で泳動し、そしてクマシーブリリアントブルーで染色した。スポットを切り出し、トリプシンで消化し、そしてPMFに供した。次いで、このデータを、ChemApplexソフトウェアプログラムを用い、SwissProtデータベースにおける全てのヒト、ラット、およびマウスのタンパク質からなるデータベースを用いて調査した。1つのスポットについての上位の候補は、ヒトクエン酸シンセターゼであった。クエン酸シンセターゼのラットおよびマウスホモログは、データベースに存在しなかった。このペプチドの質量フットプリントスペクトルは、1098に、クエン酸シンセターゼペプチドのいずれにも対応しない優勢なICAT試薬対を含んだ。ラットクエン酸シンセターゼタンパク質は、SwissProtデータベースに存在しないので、ラットESTデータベースを、Protein Prospector(University of California - San Francisco)ソフトウェアプログラムにおいて、同定されたクエン酸シンセターゼの理論上の質量に正確に対応する質量を用いて調査した。この手段により同定されたEST配列の1つは、配列YSQCR(配列番号2)を含み、1098のICAT試薬対に対応した。相同なヒト配列は、YTQCR(配列番号3)であり、測定された質量が、データベースにおける配列と一致しなかったことを説明する。このペプチド配列は、短すぎてタンパク質の固有の識別子となり得ず、そしてPMFデータの基準でクエン酸シンセターゼにこのペプチドを割り当てることが不可能であったので、有用ではない。

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1】図1は、本発明に従うICAT^TM試薬対を含む領域を示す質量スペクトルの挿入図を伴う、5つの異なる標準タンパク質をローディングした2Dゲルの画像である。また、列挙されるのは、電気泳動の前に混合したタンパク質の比およびICAT試薬対の強度の測定の際に得た比である。

【図2】図2は、ラクトアルブミンについてのスポットの拡大図(象限にセグメント化し

10

20

30

40

50

た)である。また、1つのI C A T試薬対を含む質量スペクトルの領域、および本発明に従って、これらの各々について決定した強度比を示す。

【図3】図3は、本発明に従うフロースルーゲル装置によって、電気泳動の前にI C A T試薬で個別に標識したE . c o l iの2つの溶解物の混合物の、1つの画分から得た質量スペクトルのセットである。第一パネルは、トリプシンでの消化後、ある特定の画分について得られた全体のペプチド質量フィンガープリントを示し、第二パネルは、この画分に対するアビジンビーズに保持され、そして溶出したペプチドを示す。2つのI C A T試薬対は、挿入図に示される。

【図1】

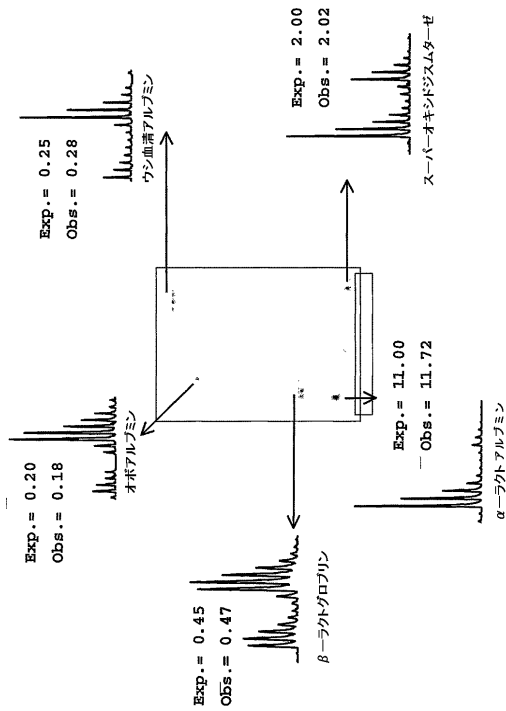


FIG. 1

【図2】

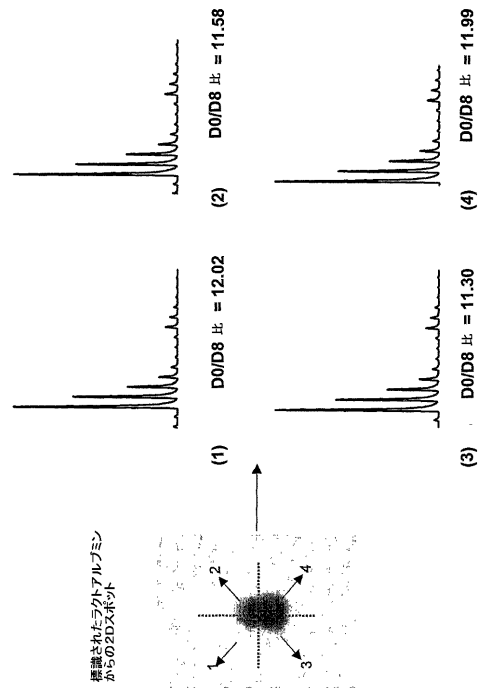


FIG. 2

【 図 3 】

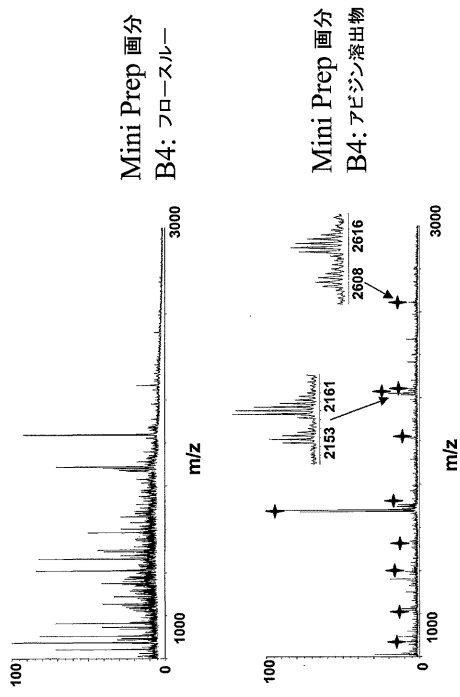


FIG. 3

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 G 0 1 N 33/48 A
 G 0 1 N 33/50 U
 G 0 1 N 27/26 3 1 5 K
 G 0 1 N 27/26 3 3 1 E
- (72)発明者 パーカー, ケニス シー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 4 8, ホプキントン, クリントン ストリート
 6 9
- (72)発明者 ナドラー, ティモシー ケイ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 0 2, フラミンガム, ウィンスロップ ストリート
 9 8
- (72)発明者 ベラ, ジョージ ジェイ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 0 5 3, メドウェイ, レッジウッド ロード 2
- (72)発明者 ハング, ユリン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 0 9 0, ウェストウッド, オーク ストリート 2
 5 8
- (72)発明者 アベレソルド, ルドルフ エイチ.
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 4 0, メーカー アイランド, エスイー 7 8 ティエイチ
 ストリート 8 6 0 9
- (72)発明者 スモルカ, マーカス ビー.
 ブラジル国 サンパウロ, シーイーピー - 1 3 0 8 4 - 0 1 0 サイ パウロ, キャンピナス
 , ユニベルジタリア, 1 8 8 シーアイディー., アール. ルベレイ ポアレト ダ シ
 ルバ

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 国際公開第00/011208(WO, A1)
 特表2003-506718(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G01N33/48~33/98
 G01N27/62
 G01N27/447