

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-17578

(P2006-17578A)

(43) 公開日 平成18年1月19日(2006.1.19)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)		GO 1 N 33/53	D	4 B O 6 3
GO 1 N 33/566 (2006.01)		GO 1 N 33/566		
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	Z	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2004-195456 (P2004-195456)	(71) 出願人	000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(22) 出願日	平成16年7月1日(2004.7.1)	(74) 代理人	100123788 弁理士 宮崎 昭夫
		(74) 代理人	100106297 弁理士 伊藤 克博
		(74) 代理人	100106138 弁理士 石橋 政幸
		(72) 発明者	吉井 裕人 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
		Fターム(参考)	4B063 QA01 QA13 QA18 QQ79 QR35 QR48 QS15 QS32 QX02

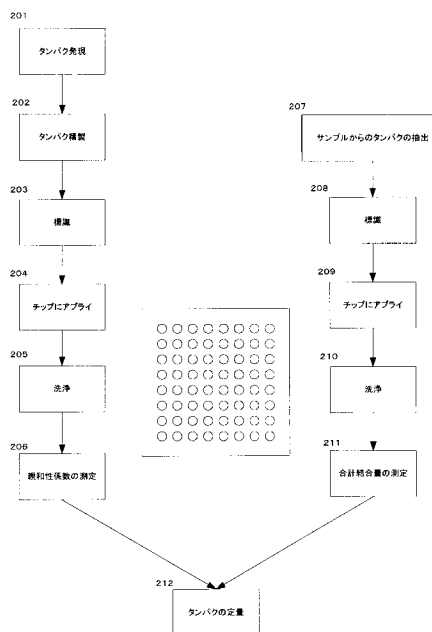
(54) 【発明の名称】 複数のリガンドを用いた蛋白質分析方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 再現性の高い蛋白質の定量と、多くの蛋白質の定量を一度に行うことができる蛋白質分析方法を提供する。

【解決手段】 リガンドを用いた蛋白質分析方法において、既知の蛋白質と複数種類のリガンドとの結合親和性を測定し、該既知蛋白質の各リガンドに対する親和性係数を求める蛋白質親和性測定工程と、サンプルから抽出した未知量の複数種類蛋白質を含む溶液と前記複数種類のリガンドを固定した支持体とを反応させ、各リガンドに付着した蛋白質の量を定量する未知サンプル反応工程と、前記未知サンプル反応工程の結果得られた各リガンドに付着した蛋白質の量と、それから得られる全てのリガンドに付着した蛋白質の合計量と、前記蛋白質親和性測定工程の結果得られたそれぞれの既知蛋白質とリガンドとの親和性係数を用いて、未知サンプル中の既知蛋白質の量を算出する蛋白質質量定量工程と、を有する。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リガンドを用いた蛋白質分析方法において、

既知の蛋白質と複数種類のリガンドとの結合親和性を測定し、該既知蛋白質の各リガンドに対する親和性係数を求める蛋白質親和性測定工程と、

サンプルから抽出した未知量の複数種類蛋白質を含む溶液と前記複数種類のリガンドを固定した支持体とを反応させ、各リガンドに付着した蛋白質の量を定量する未知サンプル反応工程と、

前記未知サンプル反応工程の結果得られた各リガンドに付着した蛋白質の量と、それから得られる全てのリガンドに付着した蛋白質の合計量と、前記蛋白質親和性測定工程の結果得られたそれぞれの既知蛋白質とリガンドとの親和性係数を用いて、未知サンプル中の既知蛋白質の量を算出する蛋白質定量工程と、

を有することを特徴とする蛋白質分析方法。

10

【請求項 2】

前記蛋白質親和性測定工程において、標準サンプルを用いてそれぞれのリガンドに付着する蛋白質の親和性係数を求めることを特徴とする請求項 1 に記載の蛋白質分析方法。

【請求項 3】

前記蛋白質親和性測定工程において、それぞれの既知蛋白質の濃度を段階的に変化させて、リガンドとの親和性をそれぞれ測定し、得られた結果から該リガンドに付着する既知蛋白質の親和性係数を決定することを特徴とする請求項 1 に記載の蛋白質分析方法。

20

【請求項 4】

リガンドを用いた蛋白質分析法において、

フェノタイプが既知であるサンプルから抽出した蛋白質と複数種類のリガンドとの結合親和性を測定し、該フェノタイプが既知であるタンパク質の各リガンドに対する親和性係数を求めるフェノタイプ別蛋白質親和性測定工程と、

フェノタイプが未知であるサンプルから抽出した蛋白質を含む溶液と前記複数種類のリガンドを固定した支持体とを反応させ、全てのリガンドに付着した複数種類の蛋白質の合計量を定量する未知サンプル反応工程と、

前記未知サンプル反応ステップの結果得られた蛋白質の合計量と前記フェノタイプ別蛋白質親和性測定ステップの結果得られたそれぞれのフェノタイプ由来の蛋白質とリガンドとの親和性係数を用いて、未知サンプルのフェノタイプを決定するフェノタイプ決定工程を備えることを特徴とする蛋白質分析方法。

30

【請求項 5】

前記リガンドは、それぞれのフェノタイプに対し特異的な親和性を示すリガンドの中から選ぶことを特徴とする請求項 4 に記載の蛋白質分析方法。

【請求項 6】

前記フェノタイプ別蛋白質親和性測定工程において、サンプル中の蛋白質濃度を段階的に変化させて、リガンドとの親和性を測定し、親和性係数を決定することを特徴とする請求項 4 または 5 に記載の蛋白質分析方法。

【請求項 7】

前記リガンドの種類は分析したい蛋白質の種類と比較して同数以上であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 に記載の蛋白質分析方法。

40

【請求項 8】

前記リガンドが複数種類ごとにスポットの状態で支持体に固定されたりリガンドチップとして供給されることを特徴とする請求項 1 ~ 7 に記載の蛋白質分析方法。

【請求項 9】

前記リガンドが芳香族有機化合物であることを特徴とする請求項 1 ~ 8 に記載の蛋白質分析方法。

【請求項 10】

前記リガンドが特定の疾患の薬効成分化合物、またはその派生物であることを特徴

50

とする請求項 1 ~ 8 に記載の蛋白質分析方法。

【請求項 1 1】

前記リガンドがポリペプチドであることを特徴とする請求項 1 ~ 8 に記載の蛋白質分析方法。

【請求項 1 2】

前記リガンドがアダプターであることを特徴とする請求項 1 ~ 8 に記載の蛋白質分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛋白質の定量技術に関するものである。特にプロテオーム解析に関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来より、いわゆるプロテインチップと呼ばれる蛋白質をガラス基板上に固定したチップが知られている(例えば特許文献 1 参照。)。これは、例えば抗体などの蛋白質をガラス基板上に並べ、これらと結合する蛋白を解析することによって、蛋白質の定量を行う蛋白質分析方法である。一般的に抗体は特定の蛋白質と特異的に結合するので、プロテインチップ上の 1 つのスポットに 1 種類の蛋白質が固定されると考えられる。そして、基板上に多種類の抗体を固定することによって、1 つのサンプルから得られる非常に多種類の蛋白質の定量が実現できることとなる。このような分析手順を用いたプロテインチップは、1 つの細胞の中の蛋白質の全体像を捕らえるいわゆる“プロテオーム解析”に有望な技術だと考えられてきた。

【特許文献 1】特開 2003 - 130877 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかしながら、実際にガラスなどの基板上に抗体などの蛋白質を固定化してみると、その状態が非常に不安定であることがわかってきた。抗体などの蛋白質は水素結合などで非常に複雑な立体構造を形成することによって機能する。しかし、基板上に固定した状態で、その活性が持続することが難しいことがわかってきたのである。また、基板上に多種類の抗体を固定し同時に蛋白質との結合反応を起こすことが前提となるために、アフィニティのそろった抗体、または蛋白質を多種類調整する必要が出てくる。これが非常に面倒な作業となり、実質的に有効なプロテインチップを作製することが難しい場合がある。

【0004】

この点を克服すべくペプチドチップと呼ばれる比較的少ない量のアミノ酸鎖をガラス基板上に固定したチップで蛋白質を分析する方法が提案された。この方法は、前述のプロテインチップで用いる蛋白質に比べて遥かに低分子のアミノ酸鎖を用いることによって、上記課題を克服する技術である。つまり、基板上に安定した活性で固定することができ、かつ、多種類/多量の生産が可能な原料としてペプチドを用いることで上記課題を解決しようとしている。

【0005】

しかしながら、このペプチドチップなどの低分子化合物を基板上に固定したチップを用いると別の課題が発生する。それは、ペプチドなどのスポットする原料が、プロテインチップで用いられた抗体などの蛋白質に比べて特異性が極めて低く、実質的に蛋白質の定量には使えない場合があるということである。この課題を克服すべく、より特異性の高いペプチドを探索する技術などが研究開発されているが、本質的に抗体などの高分子に比べて特異性が低い点には改良の余地がある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

10

20

30

40

50

上記課題を解決するために本発明による第1の蛋白質分析方法は、リガンドを用いた蛋白質分析方法において、

既知の蛋白質と複数種類のリガンド(蛋白質と結合する分子)との結合親和性を測定し、該既知蛋白質の各リガンドに対する親和性係数を求める蛋白質親和性測定工程と、

サンプルから抽出した未知量の複数種類蛋白質を含む溶液と前記複数種類のリガンドを固定した支持体とを反応させ、各リガンドに付着した蛋白質の量を定量する未知サンプル反応工程と、

前記未知サンプル反応工程の結果得られた各リガンドに付着した蛋白質の量と、それから得られる全てのリガンドに付着した蛋白質の合計量と、前記蛋白質親和性測定工程の結果得られたそれぞれの既知蛋白質とリガンドとの親和性係数を用いて、未知サンプル中の既知蛋白質の量を算出する蛋白質定量工程と、

を有することを特徴とする蛋白質分析方法である。

【0007】

上記蛋白質分析方法では、予め精製した蛋白質とリガンドチップとの結合実験を行い、それぞれのリガンドに結合する蛋白質の結合親和性を求め、その親和性係数を用いた連立方程式を解くことにより蛋白質の定量を実現することができる。

【0008】

上記親和性係数は、標準サンプルを用いてそれぞれのリガンドに付着する蛋白質から求めることができ、また、既知蛋白質の濃度を必要に応じて段階的に変化させ、それぞれの蛋白質の濃度におけるリガンドに付着する蛋白質から求めることができる。

【0009】

さらに、本発明による第2の蛋白質分析方法は、リガンドを用いた蛋白質分析法において、

フェノタイプが既知であるサンプルから抽出した蛋白質と複数種類のリガンドとの結合親和性を測定し、該フェノタイプが既知であるタンパク質の各リガンドに対する親和性係数を求めるフェノタイプ別蛋白質親和性測定工程と、

フェノタイプが未知であるサンプルから抽出した蛋白質を含む溶液と前記複数種類のリガンドを固定した支持体とを反応させ、全てのリガンドに付着した複数種類の蛋白質の合計量を定量する未知サンプル反応工程と、

前記未知サンプル反応ステップの結果得られた蛋白質の合計量と前記フェノタイプ別蛋白質親和性測定ステップの結果得られたそれぞれのフェノタイプ由来の蛋白質とリガンドとの親和性係数を用いて、未知サンプルのフェノタイプを決定するフェノタイプ決定工程を備えることを特徴とする蛋白質分析方法である。

【0010】

サンプル中のターゲット蛋白質を厳密に定量するものではなく、上記の方法を用いてサンプル中のターゲット蛋白質の量的なプロファイルを見ることによって、サンプルのフェノタイプを決定することもできる。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、再現性の高い蛋白質の定量ができるという効果がある。また、多くの蛋白質の定量を一度に行うことができるという効果もある。さらに、投薬前診断などに適用できるフェノタイプ判定が蛋白質の定量をもとに行うことができるという効果もある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

以下、図面に基づいて本発明の好適な実施態様例を説明する。

【0013】

<実施態様例1>

図1は、本発明の分析方法で用いるリガンドチップの一例を模式的に表す図である。

【0014】

図1に示すリガンドチップにはリガンドX(LX)とリガンドY(LY)とリガンドZ(LZ)とが

10

20

30

40

50

基板上に固定されており、そこに A、B、C の 3 種類の蛋白質が結合している。リガンド X は蛋白質 A と蛋白質 B に対して親和性が高く、リガンド Y は蛋白質 A と蛋白質 C に対して親和性が高く、リガンド Z は蛋白質 B と蛋白質 C に対して親和性が高い。このようにリガンドでは抗体などの高分子に比べて、蛋白質との親和性は非特異的になるのが一般的である。

【0015】

測定しようとしている未知量の蛋白質を含むサンプルに例えば蛍光標識をして、図 1 にあるようなリガンドチップに滴下した場合、それぞれのリガンド(LX、LY及びLZ)のスポットの蛍光輝度を測定しても、A、B、C の蛋白質の定量は不可能となる。

【0016】

本発明の蛋白質分析方法では、予め精製した A、B、C の 3 種類の蛋白質と図 1 のリガンドチップとの結合実験を行い、それぞれのリガンドに結合する蛋白質の割合を求め、その親和性係数を用いた連立方程式を解くことにより、A、B、C のそれぞれの蛋白質の定量を実現することができる。具体的な実験手順および定量方法は後述する。

【0017】

リガンドとしては、芳香族有機化合物を用いることができ、また市販薬の薬効成分として利用されている低分子化合物やその派生物、また、例えば数十個のペプチドがつながっているポリペプチド、または、リガンドとして機能する DNA や RNA の一本鎖(いわゆるアプタマー)を用いることができる。具体的には、リガンドとして、ビオチン、塩酸イリノテカン、シクロホスファミド、イホスファミド、チオテパ、プスルファン、カルボコン、シタラビン、シタラビンオクホスファート、エノシタビン、リン酸フルダラビン、塩酸ゲムシタビン、メルカプトプリン、6-メルカプトプリンリボシド、フルオロウラシル、ドキシフルリジン、硫酸ピンクリスチン、硫酸ピンブラスチンなどを挙げる事ができる。

【0018】

また、いずれのリガンドを使う場合でも、リガンドと基板の間にいわゆるリンカーと呼ばれる細長い鎖状の分子(例えば一般式(CH₂)_nの化合物)を挿入すると蛋白質とリガンドとの反応がより良好となる。

【0019】

分析方法の詳細を説明する前に、具体的にリガンドチップの作製方法の一例を述べる。

【0020】

以下の例では、基板はガラスを用い、基板とリガンドの固定に、マレイミド基とチオール基との共有結合を用いている。基板としては、インクジェットでの塗布ができる材質からなり、リガンドと蛋白質との反応を妨げないものであればいずれも使用可能である。例えば、ガラスの他にプラスチック基板や繊維素材などの平面的な支持体等を用いることもできる。さらに言うと、本発明の蛋白質分析方法はインクジェットを用いてリガンドチップを作製する製造法に限らず、例えば、いわゆる“ピン法”と呼ばれる金属のピンを用いた機械でスポットを基板に固定させる方法を用いて製造してもよい。また、基板とリガンドの固定方式は、下記の例のような共有結合に限らず、例えばイオン結合や分子間力による結合が含まれていてもよい。

【0021】**[ガラス基板の洗浄]**

合成石英のガラス基板(サイズ: 25mm×75mm×1mm、飯山特殊ガラス社製)を耐熱、耐アルカリのラックに入れ、所定の濃度に調製した超音波洗浄用の洗浄液に浸した。一晚洗浄液中で浸した後、20分間超音波洗浄を行った。続いて基板を取り出し、軽く純水ですすいだ後、超純水中で20分間超音波洗浄を行った。次に80℃に加熱した1N水酸化ナトリウム水溶液中に10分間基板を浸した。再び純水洗浄と超純水洗浄を行い、リガンドチップ用の石英ガラス基板を用意した。

【0022】**[表面処理]**

シランカップリング剤KBM-603(信越シリコン社製)を、1%の濃度となるように純水中に溶解させ、2時間室温で攪拌した。続いて先に洗浄したガラス基板をシランカップリング剤水溶液に浸し20分間室温で放置した。ガラス基板を引き上げ軽く純水で表面を洗浄した後窒素ガスを基板の両面に吹き付けて乾燥させた。次に乾燥した基板を120℃に加熱したオーブン中で1時間バークし、カップリング剤処理を完結させ、基板表面にアミノ基を導入した。次いで同仁化学研究所社製のN-マレイミドカプロイロキシスクシイミド(N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimido、以下EMCSと略す)を、ジメチルスルホキシドとエタノールの1:1混合溶媒中に最終濃度が0.3 mg/mlとなるように溶解したEMCS溶液を用意した。バークの終了したガラス基板を放冷し、調製したEMCS溶液中に室温で2時間浸した。この処理により、シランカップリング剤によって表面に導入されたアミノ基とEMCSのスクシイミド基が反応し、ガラス基板表面にマレイミド基が導入された。EMCS溶液から引き上げたガラス基板を、先述のEMCSを溶解した混合溶媒を用いて洗浄し、さらにエタノールにより洗浄した後、窒素ガス雰囲気下で乾燥させた。

10

【0023】

[リガンド]

チップに固定するリガンドを純水に溶解し、それぞれ、最終濃度(インク溶解時)10 μ Mとなるように分注した後、凍結乾燥を行い、水分を除いた。

【0024】

[BJプリンターによるDNA吐出、および基板への結合]

グリセリン7.5wt%、チオジグリコール7.5wt%、尿素7.5wt%、アセチレノールEH(川研ファインケミカル社製)1.0wt%を含む水溶液を用意した。続いて、先に用意したリガンド溶液を上記の混合溶媒に規定濃度となるように溶解した。得られたリガンド溶液をバブルジェットプリンター(商品名:BJF-850 キヤノン社製)用インクタンクに充填し、印字ヘッドに装着した。

20

【0025】

なおここで用いたバブルジェットプリンターは平板への印刷が可能ないように改造を施したものである。またこのバブルジェットプリンターは、所定のファイル作成方法に従って印字パターンを入力することにより、約5ピコリットルのDNA溶液を約120マイクロメートルピッチでスポッティングすることが可能となっている。

【0026】

続いて、この改造バブルジェットプリンターを用いて、1枚のガラス基板に対して、印字操作を行い、リガンドチップを作製した。印字が確実に行われていることを確認した後、30分間加湿チャンバー内に静置し、ガラス基板表面のマレイミド基とリガンド中のチオール基とを反応させた。

30

【0027】

[洗浄]

30分間の反応後、100mMのNaClを含む10mMのリン酸緩衝液(pH7.0)により表面に残ったリガンド溶液を洗い流し、ガラス基板表面にリガンドが固定したリガンドチップを得た。

【0028】

続いて図2に示した本実施態様例の実験手順を説明する。

40

【0029】

まず、既知の蛋白質に対するそれぞれのリガンドの親和性を測定する。既知の蛋白質を準備する方法はいろいろあるが、例えば微生物にベクターなどを用いてDNAを導入することによって大量の蛋白質を発現させることができる(蛋白質の発現(201))。この方法で発現できない蛋白質は、ターゲットとしている蛋白質が発現している細胞を集めてきてある程度の量(例えば1ナノモル)のターゲット蛋白質を確保する。必要量の蛋白質が得られた後で、ターゲットとしている蛋白質を精製(202)する。蛋白質の精製には、例えば液体クロマトグラフィーや電気泳動などの技術を用いることができる。次に精製した蛋白質を標識(203)する。標識物質は、従来は放射性同位体を用いていたが、最近では人体に害のない蛍光分子を用いることが多い。この時点で既知の蛋白質が純粋な状態で標識されてい

50

る。そして、この蛋白質の濃度(モル濃度)は既知となっている。理想としては203の標識工程は再現性の高い方法が好ましい。つまり、既知蛋白質の各分子に対して常に同一量、あるいは実質的に同一量の標識分子が付着することが好ましく、そのような状態が得られるように標識条件を設定するとよい。上記濃度が既知となっている蛋白質を標準サンプルとして用いることができる。

【0030】

このようにして得られた標識付きの純粋な蛋白質をチップにアプライし(204)、チップ上に固定された多種類のリガンドとの結合反応をさせる。図2にチップの例を示すが、例えば64個のスポットがそれぞれ異なる種類のリガンドに相当する。そして、リガンドと結合しない蛋白質を除くために十分洗浄(205)した後で、標識物質の量を測定を行うことによ

10

【0031】

以上の工程201から205を定量したい蛋白質の数だけ行う。例えば図1の例の場合、蛋白質Aから蛋白質Cまで3回行う。

【0032】

次に蛋白質分析を行うサンプルから蛋白質を抽出する(207)。この時、抽出される蛋白質は、サンプルの中に存在する複数の種類の蛋白質であり、この抽出された様々な種類の蛋白質の定量を同時に行うことができる点に本発明の意義がある。

【0033】

抽出された複数種類の蛋白質は、203と同じ手順で標識分子を付加され(208)、チップにアプライ(209)される。そして、205と同じ手順でリガンドに結合しない蛋白質を洗浄によって除去し(210)、標識物質を定量することによって、リガンドに結合する蛋白質の合計量が求められることができる(211)。

20

【0034】

最終的に、ステップ206の結果得られるターゲット蛋白質毎のリガンドに対する親和性係数をもとにステップ211の結果得られるリガンドに結合する蛋白質の合計量を解析し、それぞれの蛋白質の定量を行う。(212)

ターゲットとする蛋白質がN種類、リガンドの種類がM種類存在し、それぞれの蛋白質とそれぞれのリガンドとの親和性係数を a_{ij} ($1 \leq i \leq N$, $1 \leq j \leq M$)、それぞれのリガンドに結合する蛋白質の合計量を V_j ($1 \leq j \leq M$)、求めるべきそれぞれの蛋白質の量を X_i ($1 \leq i \leq N$)とする。すると、以下に示す式が成り立つ。

30

【0035】

【数1】

$$V_j = \sum_{i=1}^N a_{ij} X_i \quad (1 \leq j \leq M) \quad (\text{数1})$$

40

【0036】

ここで、 V_j ($1 \leq j \leq M$)は例えば図2のリガンドチップの場合、64個のスポットの標識物質の定量結果で、Mは64となる。例えば蛍光分子を標識物質とすると、共焦点スキャナーなどで読み取った蛍光画像からそれぞれのスポットの蛍光値を使って V_j ($1 \leq j \leq M$)を算出する。親和性係数 a_{ij} ($1 \leq i \leq N$, $1 \leq j \leq M$)は基準濃度(例えば1 mol/l)のi番目ターゲット蛋白質をリガンドチップに反応させた時のj番目のリガンドに対する結合量である。

【0037】

(数1)の式は、 a_{ij} と V_j が既知で、 X_i ($1 \leq i \leq N$)を求める式と見ると、線形連立方程式の形をしている。一般に(数1)の形の線形連立方程式は、MがN以上で、行列 a_{ij}

50

($1 \leq i \leq N$, $1 \leq j \leq M$)のランクが N 、かつ行列 a_{ij} ($1 \leq i \leq N$, $1 \leq j \leq M$)とベクトル V_j ($1 \leq j \leq M$)をつなげて作った行列(拡大係数行列)のランクが N の時解くことができる。

【0038】

具体的には、リガンドの種類が定量しようとしている蛋白質の数以上あり、かつそれぞれのリガンドのターゲット蛋白質に対する特異性が高いほど、この連立方程式の解は存在する可能性が高く、それが X_i ($1 \leq i \leq N$)、つまりサンプル中に含まれるターゲット蛋白質の濃度(量)となり、好ましい。言い換えると、連立方程式の解が得られる程度に高い特異性が得られるリガンドとターゲット蛋白質の濃度(量)との組み合わせを選択することが好ましい。

10

【0039】

なお、この実施態様例は、それぞれの蛋白質とリガンドの結合量の関係が線形性であることを条件として設定している。つまり、図1の例で述べると、「蛋白質A～Cのそれぞれを単独でリガンドセットに反応させた場合と蛋白質A～Cを混合してリガンドセットに反応させた場合とは結合する蛋白質の量が同じ」、かつ、「定数倍の濃度の蛋白質をリガンドセットに反応させると定数倍の結合量が得られる」という条件のもとに蛋白質の定量を行っている。例えば、先に述べたリガンドの特異性が発揮され、かつ蛋白質の濃度がこの線形性に関する条件を満たす程度に十分低くして反応を行うことができる。これに対して、蛋白質同士の相互作用があり、リガンドに結合している蛋白質にリガンドとは関係ない蛋白質が結合する場合(例えば、蛋白質濃度が高すぎる場合)などは上記の条件を満たすことができなくなる。

20

【0040】

線形性が有効ではない場合、(数1)は以下に示す(数2)の式のような一般的な関数式になる。

【0041】

【数2】

$$V_j = f_j(X_1, X_2, \dots, X_n) \quad (1 \leq j \leq M) \quad (\text{数2})$$

30

【0042】

この関数の形そのものを決定するためには非常に多くの実験を行う必要がある。よって、変数の数、つまりターゲット蛋白質の数が多い場合、(数1)のような線形性が有効でない場合、リガンドセットへの蛋白質結合合計量から個々の蛋白質の量を見積もることは現実的ではなくなる。

【0043】

次に、 a_{ij} ($1 \leq i \leq N$, $1 \leq j \leq M$)を求める方法を図3を使って説明する。

【0044】

親和性係数 a_{ij} は単位濃度(例えば1モル/1リットル)の i 番目の蛋白質が j 番目のリガンドに付着する量を示している。 a_{ij} は、標準サンプルを用いて、それぞれのリガンドに付着する蛋白質結合量を測定することにより求めることができる。また、一度でもよいが、より好ましい方法としては、標準サンプルを用いて濃度の異なる蛋白質溶液をチップにアプライする実験を複数回を行い、統計的に求める方法がある。例えば図3に示すように、複数回の実験を行い回帰分析を行うことによってより精度が良い a_{ij} を得ることができる。

40

【0045】

図3において、横軸はチップにアプライする既知の蛋白質の濃度、単位は例えば $\mu\text{mol/l}$ であり、縦軸は例えば蛍光標識物質の量を示し、具体的には蛍光スキャナーで読み取っ

50

た蛍光強度を意味する(図2のステップ205、ステップ211のいずれのステップにおいても同じ標識物質の測定方法をする。)。図3に示した実験では、全く蛋白質をチップにアプライしない実験を1回、1 μmol/lの蛋白質溶液をアプライした実験および2 μmol/lの蛋白質溶液をアプライした実験をそれぞれ10回ずつ実施し、その結果に基づいて回帰分析をすることによって蛋白質のリガンドに対する親和性係数をより正確なものとして求めている。

【0046】

なお、チップ上の蛍光量の読み取り手段と、読み取った値に基づいて予め設定されたプログラムに従って先の連立方程式の解を求める計算を行うコンピュータとを少なくとも用いて定量操作を自動化することができる。この自動化システムは以下の各実施態様例にも適用可能である。

10

【0047】

<実施態様例2>

実施態様例1はリガンドがターゲットとなる既知の蛋白質以外には親和性が低い場合の実験手順である。しかし、通常リガンドの特異性は低い場合が多いので、想定している既知の蛋白質以外の蛋白質が付着することも十分考えられる。この場合にも本発明の蛋白質分析方法が実施できるように改良した実験手順が実施態様例2である。

【0048】

想定している既知の蛋白質以外の蛋白質(=非ターゲット蛋白質)が付着した場合、(数1)の式は(数3)の式のような形になる。

20

【0049】

【数3】

$$V_j = \sum_{i=1}^N a_{ij} X_i + K \cdot C_j \quad (1 \leq j \leq M) \quad (\text{数3})$$

【0050】

(数3)の式で、 $K \cdot C_j (1 \leq j \leq M)$ は、j番目のリガンドに付着する、標準的な細胞(サンプル)から得られる非ターゲット蛋白質の全付着量で、Kが標準サンプルの蛋白質合計量、 C_i が単位濃度のリガンドに付着する非ターゲット蛋白質の付着量である。

30

【0051】

図4に本実施態様例の実験手順を示す。

【0052】

まずステップ701からステップ707で標準細胞(サンプル)に含まれる全蛋白質単位濃度あたりの非ターゲット蛋白質の付着量(C_j)を測定する

ステップ701: まず、標準細胞(サンプル)から蛋白質の抽出を行う

ステップ702: 次に抽出した蛋白質の合計量(質量)を測定する。この時抽出した蛋白質は様々な種類のものが混じっているのでモル数は推定できない

40

ステップ703: 次にターゲット蛋白質の除去を行う。このステップは例えば液体クロマトグラフィーなどの手段を用いて行うが、厳密にターゲット蛋白質を除くのは非常に難しい

ステップ704: 残った非ターゲット蛋白質に標識をする。蛍光標識が好ましく用いられる

ステップ705: 標識された非ターゲット蛋白質をチップにアプライする

ステップ706: リガンドと蛋白質の非特異的な結合を洗浄することによって、除去する

ステップ707: 標識物質の濃度を測定することによって、 $K \cdot C_j$ を測定する。ステップ702で蛋白質の合計質量を測定しておいたため、全蛋白質単位濃度あたりの非ターゲット蛋白質の付着量(C_j)が求まる。

50

【0053】

次にステップ708からステップ713の手順で、サンプルの蛋白質合計量を求める。この手順は基本的に図2のステップ207からステップ211と同じ手順であるが、ステップ709でサンプル中の蛋白質合計量を測定する点が異なる。このステップでサンプルの蛋白質合計量を求めることができ、サンプルのKが決定する。

【0054】

最終的に、それぞれのリガンドとそれぞれの蛋白質との親和性は、図2の手順を用いて求めると、(数3)の X_i 以外の項が決定でき、サンプル中のターゲット蛋白質の定量ができる(ステップ714)。

【0055】

<実施態様例3>

本実施態様例の方法は、先の実施態様例と異なり、サンプル中の蛋白質を厳密に定量するものではなく、サンプル中のターゲット蛋白質の量的なプロファイルを見ることによって、サンプルのフェノタイプを決定する技術である。

【0056】

本実施態様例で想定している異なるフェノタイプとしては、例えばがん細胞の抗がん剤感受性の異なるタイプ、転移可能性の異なるガンのタイプなど、特定の症例の異なる経過を辿る細胞などである。特に抗がん剤の中には重篤な副作用を起こすものが少なくない。患者へ投与する前にこの副作用の有無を判定することができれば非常に有用な技術となる。本発明によるリガンドチップを用いると、特定の抗がん剤が効く患者や副作用の少ない患者などの判定が可能になり、飛躍的に薬の効果があがる。

【0057】

まず、ステップ801からステップ808にかけて既知のフェノタイプの細胞から抽出される蛋白質とリガンドの結合プロファイルを求め、辞書(809)を作製する。そして、ステップ810からステップ815にかけて未知のフェノタイプの細胞から抽出される蛋白質とリガンドの結合プロファイルを求め、それぞれの結果を辞書(809)と照らし合わせる。どの既知フェノタイプの可能性が最も高いかを推定することによって未知フェノタイプを判定する。なお、ステップ801からステップ808は判別したいフェノタイプの数と同じ回数実施する。

【0058】

ステップ801からステップ807、及びステップ810からステップ816は基本的に図4のステップ708からステップ713と同じ手順である。異なる部分は、ステップ804とステップ813の「蛋白質の濃度を調整するステップ」である。基本的にはサンプル由来蛋白質のリガンド結合プロファイルを求める一連のステップでは、ステップ805(及びステップ814)のチップにアプライする前の蛋白質の濃度はいずれのサンプルにおいても一定にする。このためステップ802(及びステップ811)で求めた蛋白質の合計質量を基に濃度を調整する。これがステップ804及びステップ813である。

【0059】

但し、蛋白質の合計質量の測定にも誤差が生じる可能性があり、また、ターゲット蛋白質の量も変動する可能性がある。そこで、ステップ804に限っては、例えば基準濃度が $1 \mu\text{g}/\text{l}$ とすると、2倍の誤差範囲の $0.5 \mu\text{g}/\text{l} \sim 2 \mu\text{g}/\text{l}$ の濃度の幅で数種類の調整を行うこともできる。このように複数の異なる濃度のデータを集め、1つのサンプルからより多くのデータを蓄積、809の辞書を拡充することによって、817のフェノタイプ判定をより高い確率で行うことができるようになる。

【0060】

最終的に、それぞれのリガンドとそれぞれの蛋白質との親和性は、図2に示した手順を用いて求めることができる。なお、本発明におけるリガンドは、それぞれのフェノタイプに対して特異的であるリガンドを選択すると良い。すなわち、各フェノタイプ由来の蛋白質に対し、それぞれ異なるリガンドを用いることにより、それぞれの蛋白質の量的なプロファイルが高い精度で行うことができ、したがって、フェノタイプ判定がより高い確率で行うことができる。

10

20

30

40

50

【0061】

最後にフェノタイプ判定ステップ(ステップ817)を概念図を用いて説明する。

【0062】

図6は、例えば図1のようにリガンドが3種類ある場合の例を示す。例えば既知のフェノタイプとして、肺がんの患者の中で、ある抗がん剤が効く患者の細胞と効かない患者の細胞の2つのタイプを選択する。3種類のリガンドに結合する蛋白質の合計量を測定し、各リガンドへの結合量をxyz軸にそれぞれ振り分けると、図6のように3次元空間の1点となり、例えば白い点を抗がん剤が効く患者の細胞の測定値、黒い点を抗がん剤が効かない患者の細胞の測定値が得られたとする。このとき、タイプが未知の肺がん患者から採取した細胞から蛋白質を抽出、リガンドとの結合プロファイルを測定した結果、星形の点(測定値)が得られたとする。この結果より、この肺がん患者に対して抗がん剤が効くか効かないかを判定するのがフェノタイプ判定ステップであり、図6の例でいうと抗がん剤は効くと判断することができる。なおリガンドがM種類の場合は図6の次元はM次元となる。

10

【0063】

本発明の蛋白質分析方法は、このフェノタイプ判定ステップ(ステップ817)においていわゆる“教師付き”パターン認識アルゴリズムを用いる。具体的には、フェノタイプ決定ステップにおいて用いるパターン認識アルゴリズムとしては、例えばk-th Nearest Neighborマッチングアルゴリズム、ベイズ判定アルゴリズム、分類木、ニューラルネット、SVM(Support Vector Machine)やブースティングなどの方法を採用することができる。

20

【0064】

以上のように、本発明の分析方法により、未知サンプルのフェノタイプを決定することができる。

【0065】

また、上記実施形態においては、リガンドチップを用いて分析する方法を具体例として挙げたが、これに限らず、HYPERLINK "<http://bio.hitachi-sk.co.jp/luminex/index2.html>" <http://bio.hitachi-sk.co.jp/luminex/index2.html>に開示されるようなビーズ状の球面の支持体を用いて分析を行なってもよい。

【図面の簡単な説明】

【0066】

30

【図1】本発明のリガンドチップを表す図である。

【図2】本発明の蛋白質分析方法の実験手順を表す図である。

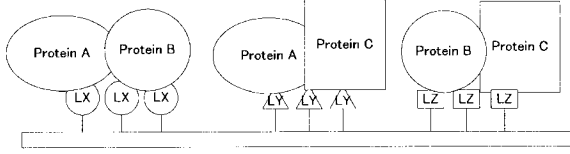
【図3】蛋白質とリガンドの親和性係数を求める図である。

【図4】バックグラウンドを考慮した時の蛋白質定量の実験手順を表す図である。

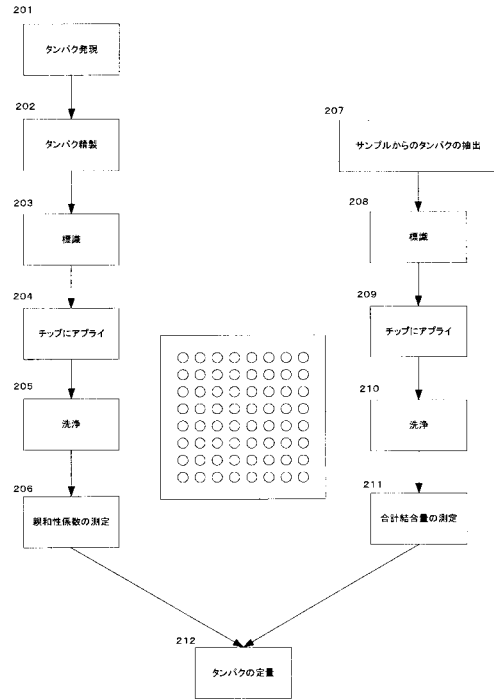
【図5】蛋白質定量に基づくフェノタイプ判定の実験手順を表す図である。

【図6】フェノタイプ判定ステップの概念図である。

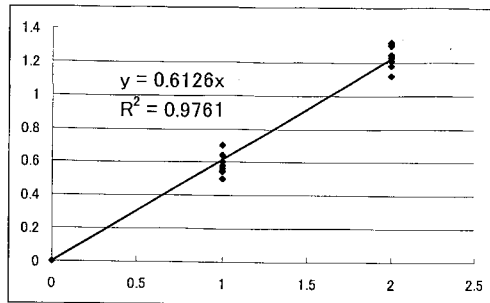
【 図 1 】



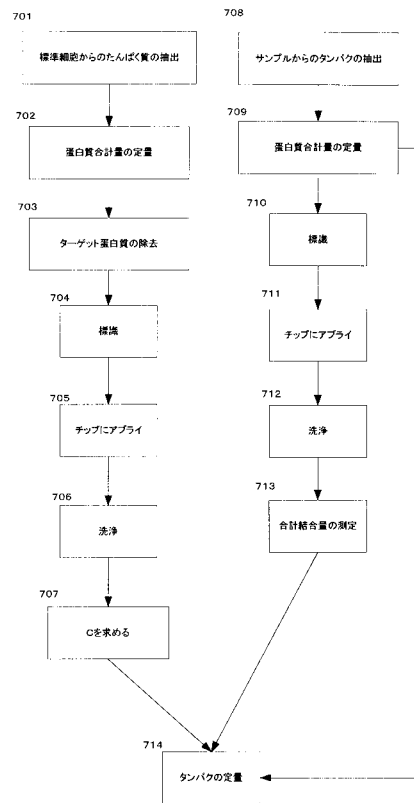
【 図 2 】



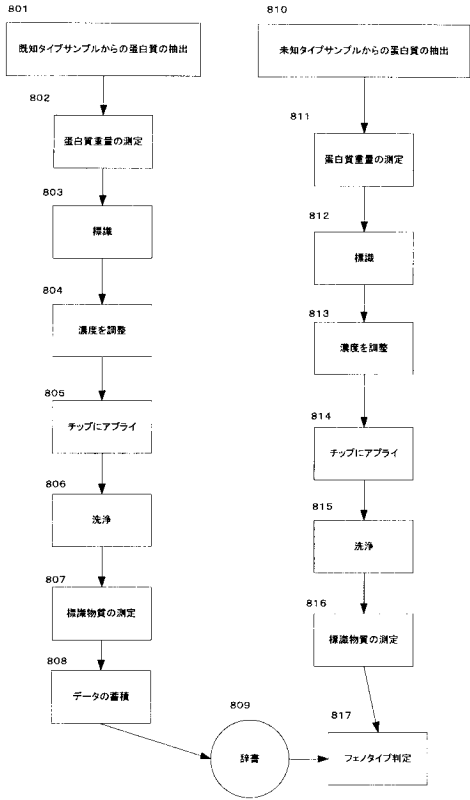
【 図 3 】



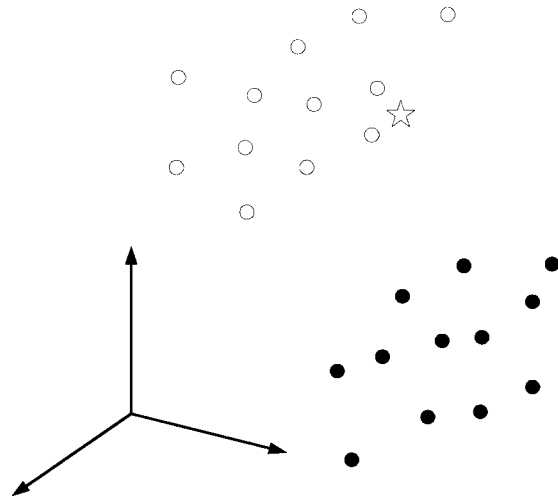
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



专利名称(译)	使用多个配体的蛋白质分析方法		
公开(公告)号	JP2006017578A	公开(公告)日	2006-01-19
申请号	JP2004195456	申请日	2004-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	佳能株式会社		
申请(专利权)人(译)	佳能公司		
[标]发明人	吉井裕人		
发明人	吉井 裕人		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/566 C12Q1/68		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/566 C12Q1/68.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QS15 4B063/QS32 4B063/QX02		
代理人(译)	宫崎昭雄 伊藤 克博		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种蛋白质分析方法，该方法能够定量高度可复制的蛋白质并一次定量许多蛋白质。在使用配体的蛋白质分析方法中，蛋白质亲和力测量步骤是测量已知蛋白质与多种类型的配体之间的结合亲和力，并获得每种配体与样品的已知蛋白质的亲和系数。通过使含有未知量的多种蛋白质的溶液与固定有多种配体的支持物反应，来定量附着于各配体的蛋白质量的未知样品反应步骤，以及未知样品反应步骤 结果获得的与各配体结合的蛋白质的量，与由此获得的所有配体结合的蛋白质的总量，以及作为蛋白质亲和力测定步骤的结果得到的各已知蛋白质与配体的亲和力。蛋白质质量定量步骤，使用性别系数计算未知样品中已知蛋白质的量。[选择图]图2

