

タンパク質のネットワーク解析から創薬へ

— 超高感度質量分析システムをどのように実現したか —

家村 俊一郎、夏目 徹*

生体を構成するそれぞれの細胞の中には、10万種類以上の様々なタンパク質が機能し生命現象をつかさどっている。これらのタンパク質はグループや組織を構成し、ネットワークとして機能している。毎分100ナノリッターという超低流速の液体クロマトグラフィー技術を独自に開発することにより、大規模なタンパク質ネットワーク解析を高感度で再現性高く、かつ高効率に行うことを可能にした。解析から得られた大量の結果は、生命現象の解明にとどまらず、疾患の発症メカニズムを分子レベルで理解することに貢献し、新たな診断・治療法の開発や、重要な創薬のターゲット発見へと直接的に連なる本格研究へと発展した。

1 研究の背景

人体は約30兆個の細胞からなり、それぞれの細胞の中には10万種類以上の様々なタンパク質が機能し生命活動をつかさどっている。そして、これらのタンパク質はバラバラに働いているのではなく、グループや組織を構成しネットワークとして機能している。このような細胞内の個々のタンパク質が生み出すネットワークをマッピングする作業を、タンパク質ネットワーク解析とよぶ。

ネットワーク解析の重要性は生命現象の解明にとどまらず、疾患の発症メカニズムを分子レベルで理解することに繋がり、新たな診断・治療法の開発や、創薬のターゲット発見へと直接的に貢献する(図1)。しかし、タンパク質ネットワーク解析は技術的に容易ではなく、これといった確立された方法論はない状況であった。それは、実際にタンパク質ネットワーク解析を行うには、数100あるいは数1000といった数のタンパク質を一挙に分析し切らなければならないという要請があったからである。

この要請に応えることは1990年代までの技術では現実的に不可能であった。しかし、鳥津製作所の田中耕一氏らが発明したタンパク質のイオン化質量分析法が成熟し、21世紀になって1つのターニングポイントを迎えた。これまでたった1つのタンパク質の同定に数10時間を費やさなければならない作業が、質量分析の手法を用いれば、ものの数分あるいは数秒で行えるようになった。また、感度も理論的にはこれまでの数100倍以上になり、試料を大量に精製しなければならないという制約からも解放されたかに思われた。しかし、タンパク質化学者が質量分析とい

うハイテク機器を手にした後でも、予想通りの高感度解析がたちどころに可能になったわけではない。それは、10万種類のタンパク質の1つ1つが、千差万別の形状と大きさをもち、化学的な性質も様々でかつ不安定だからである。微量なタンパク質は僅かな時間、容器に保持するだけで分解あるいは変性し、容器の壁に吸着し、検出不可能となってしまう。質量分析機自体は極めて高感度な「検出器」なのであるが、この試料の消失問題が分析感度とスループットの現実の限界点を決めていた。従ってこの問題を解決しない限り、質量分析機の現在の能力を十分に活かした形でタンパク質の微量解析を行うことができない。また将来質量分析機の能力がさらに向上したとしても、その利点を活かさない懸念された。

2 解決しなければならない真の問題(液体クロマトグラフィ技術)

微量なタンパク質を取り扱うときの最も重要な方法は、なるべく微小な空間になるべく濃縮した状態に試料を保持し続けることである。しかし、生物試料由来のタンパク質を質量分析により解析するには、脱塩・洗浄のプロセスが必要であり、それほど容易なことではない。そこでこれまで盛んに行われてきたのは、逆相の高速液体クロマトグラフ(HPLC)を質量分析機に直接連結してオンライン化することであった。試料をHPLCのカラム上で濃縮脱塩し、液体クロマトグラフの溶出分画をそのままイオン化し、質量分析装置に導入する。しかし、市場で入手できる既存のHPLC装置は、我々が目的とするタンパク質ネットワーク解

析を行うには満足できないほど低い感度とスループットであった。特に、既存のHPLCのポンプはせいぜい毎分マイクロリッターの流速が下限であり、その上分析の再現性が悪く、大規模な繰り返し解析を安定的に行うことは不可能であった。その大きな理由の1つは、毎分マイクロリッターという低流速での溶媒の均質な混合が困難だったからである。

液体クロマトグラフィを行うには、初期溶媒でタンパク質ペプチドをカラム担体に吸着・濃縮し、脱塩をした後に、溶出溶媒を流し、溶出されてきた試料を分析する。通常、溶出溶媒は少しずつ初期溶媒に混合し、濃度勾配を作り出して送液される。そのためには、初期溶媒と溶出溶媒の2系統のポンプを接続し、混合送液を行う流路が必要となる。このとき流路中には必ず逆止弁、ミキサー等のデッドボリューム（溶媒同士をよく混和するためのスペース）が存在する。そのため、1回の分析に長い時間がかかる上、低速では溶媒が均一に混合されない。1990年代になり、ポンプの送液速度を下げずに、送液をスプリットすることにより分析流速を下げるという試みが盛んになされた。送液流路の途中に分岐を作り、溶媒のほとんどを廃液し、一部のみを分析カラムに送る。すなわち、10対1にスプリットす

れば、9の溶媒を捨てて、流速を10分の1に下げることができる（図2の上部）。この方法は、分析カラムの背圧とスプリット部分の抵抗が常に一定でなければ定めた流速で分析することはできない。しかし、測定の実際には、試料の負荷量や容積により、分析カラムの背圧は必ずしも一定ではない。また、分析回数が増えるにつれてスプリット抵抗も増してしまうのが常であった。従って微量分析を再現的に行うのはほとんど不可能ということになる。これが本当に解決しなければならない問題であった。

3 新たなシナリオと要素技術開発（液クロと環境の問題）

我々が、この問題を解決するために採用したシナリオは、液体クロマトグラフィの高度化を原点とするものである。液体クロマトグラフィを高度化することを初めに行い、その結果順次出てくる個別の要素問題を解決して、最終的にタンパク質の高精度かつ効率的な解析手法を達成しようと考えた。

液体クロマトグラフィの高度化において、具体的には溶出溶媒に濃度勾配を作り出すためにポンプを2系統使用せず、1系統のポンプだけで実現する全く新規な方法を創出

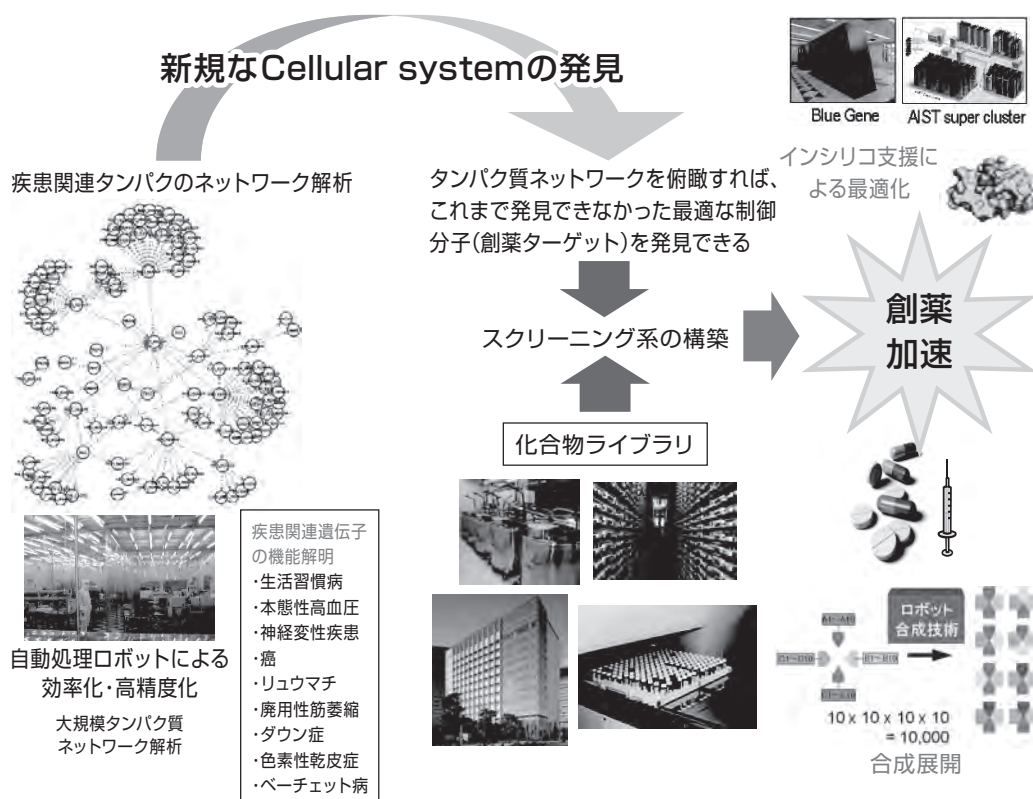


図1 タンパク質ネットワーク解析から展開する創薬

タンパク質は互いに相互作用し合い、ネットワークを形成している。このタンパク質ネットワークを知ることにより個々のタンパク質の機能が分かる。また、ネットワークを俯瞰することにより、疾患の発症メカニズムや新規な創薬ターゲットを発見出来る。これらの情報を基に創薬スクリーニングを展開する。

した。1系統のポンプにすることにより流路を劇的に単純化することができ、低流速の送液を行う上での最大の障害であるデッドボリュームを最小化できる。また、これが可能であるならば送液スプリットを行わずとも低速送液は可能である。ここで我々が考案したのが、一定の濃度間隔でステップワイズにあらかじめ別のポンプで作っておいた溶出溶媒をリザーバーに蓄えておき、これを1系統の低速ポンプで押し出す、というものである。各リザーバーは複数ポートを有する1つのバルブを経時的に切り換え濃度勾配を作り出す。

このアイデアを一言で言えば、「大きな世界であらかじめ十分均質に混ぜておいて、それをそのまま小さな世界にデリバリーする」という、ある意味「コロブスの卵」的なものである。また、あらかじめ作っておいた各ステップの溶媒を相互に混ざらない状態におくことは重要なことであるが、微小の流路中では溶媒が混ざりにくいという2系統ポンプの欠陥を、ここでは逆手に取っている（図2の下部）。この方法は、液体クロマトグラフの極めて高い再現性と連続運転・自動化を可能にした。これにより、スプリットを用いない直接送液で毎分100ナノリッター以下のHPLCを世界で初めて質量分析機とオンライン化した^[1]。この結果、実質的に従来の20～50倍の高感度化に成功した。

さらにこれらの高感度化を最大限に活かすための解析環境の改善を行った。なぜなら、微量の試料を解析できる感度が達成されても、通常の実験環境では人間由来の

大量のケラチンが存在するため、夾雑するケラチンにより微量な試料由来のシグナルがかき消されてしまうからである。また、デッドボリュームを極力排除した分析流路は内径10マイクロメートルという極小の配管であるため、空気中の発塵パーティクルで容易に流路が閉塞する。従って、人間が動き回る通常的环境での連続運転は不可能であった。発塵パーティクルとケラチンの排除は容易ではなかったが、開発したシステムを少しずつ稼働させ実際の解析を開始した。

2000年、技術開発を行ってきた東京都立大学において実際の試料を使った解析を開始した。当時クリーンルームの設備はなかったため、解析室への人の出入りを極力制限することによって実験環境の問題を回避した。そして、解析室内を徹底的に整理整頓して発塵源を排除し、帯電防止シートで極力被い、静電気で塵が吸着しないようにした。また起毛した衣服で入室しないことにした。さらに、解析室の扉の開閉をした後、塵が静まるまでそのまま長時間待機して解析を行った。

このシステムを用いた解析で、初めて100を超えるタンパク質を瞬時に同定できたときの感激は何物にも代え難いものがあった。結果の優位性を理解した周囲の人々の協力を徐々に得て、その後解析室に簡易なクリーンブースを設置することができた。しかしながら現実問題としては、質量分析機から発生する熱量が大き過ぎ、ブース内の温度は容易に35℃以上になってしまい、装置にダメージを与える

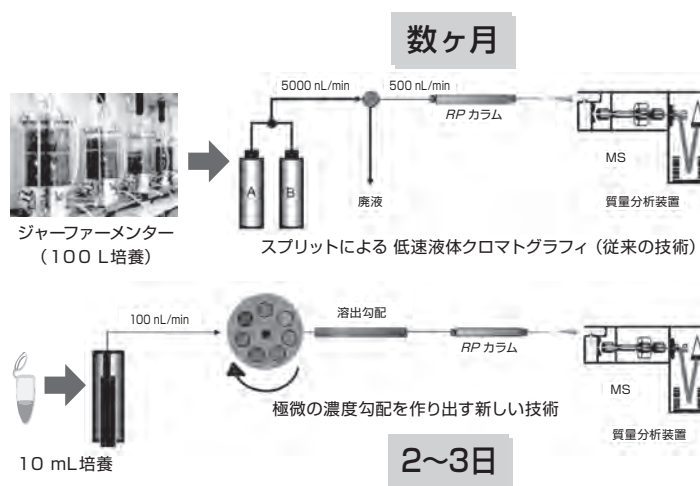


図2 新しい技術と従来の技術との比較

従来技術は、2系統のポンプにより溶出勾配を作り出す。初期溶媒を送液するAポンプと、溶出溶媒を送液するBポンプの送液速度を変化させ濃度勾配を生み出す。しかし、この方法はデッドボリュームが大きく低速混合は出来ない。そのため分析カラムの間にスプリッターを設け、送液のほとんどを捨てることにより低速化を図る。図では1/10を捨てることにより、流速を5000 nLから500 nL/minにしている（上段）。

新技術は、複数に分岐した各リザーバーに、別系統のポンプシステムで予めステップの溶出溶媒を充填しておく。ポートバルブを回転させ、各ステップを1系統の低速ポンプで押し出していくことにより溶出勾配を作り出す。デッドボリュームがなく、スプリッターも必要としない（下段）。

従来の技術では1回の解析に大量培養によるサンプル調製が必要だった。ジャーファーマンターによる100 Lスケールの培養も珍しくなかった。そのため1回の解析に数ヶ月の準備期間を要することもあった。しかし、我々が開発した技術では10 mL培養由来のサンプルから数回の解析が出来る程の感度を達成した。このスケールとなるとサンプル調製は2～3日で可能であり、複数サンプルを同時並行的に調整することもできる。

恐れがあるため、長時間の使用には耐えなかった。安定的に連続解析を行うには本格的なクリーンルームが必要であると痛感させられた。

2001年の春、産総研臨海副都心センターが完成し、クリーンルームを設置するチャンスを得た。我々は幾つかの半導体メーカーのクリーンルームを訪問し、初歩からクリーンルームの知識を学んだ。しかし、最終的には臨海副都心センターの別館が2005年に完成し、第二世代のスーパークリーンルームができるまで塵の問題は解決しなかった。

4 第2種基礎研究の実行（試料調整の問題）

液体クロマトグラフィの要素技術の開発に成功した後、そのハードウェアを普及一般化するという製品化研究も重要と考えた。しかし前節で述べたように、開発した技術を活かす解析環境を構築しなければ役に立たないことも判明した。私自身の真の狙いは、世界最高感度の質量分析システムを構築し、タンパク質ネットワーク解析を大規模・高精度に行い、ここから疾患の発症メカニズムや新規な創薬ターゲットを効率的に発見することである。

実際に、開発した質量分析システムの効果は非常に大きいものであった。あらかじめ電気泳動などで試料を分離する必要がなく、たった1時間ほどで、サブ・フェムトのレベルで200以上の異なるタンパク質から構成される相互作用複合体を一網打尽に同定し尽くすことができた。すなわち、これまで数10～100リッターというスケールから試料調製し、数ヶ月かかる解析が、2～3日で行えるようになった。また、複数の解析を10～20件並行して行うことも可能であるため、大規模な解析をハイスループットに行うことが現実のこととなった。

ハイスループット化により、高精度な解析を行うための試料調製条件を詳細に検討することができるようになった。

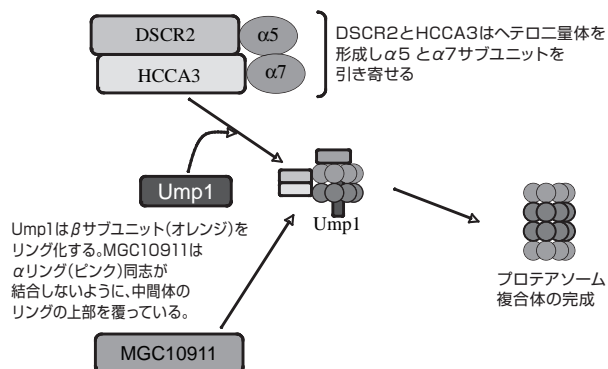


図3 プロテアソームのアッセンブル因子の発見
プロテアソームを組み立てる4つのアッセンブル因子を発見した。プロテアソームそのものを阻害するよりも、このアッセンブル因子を阻害する方が副作用がなく広範囲のガン細胞に有効である可能性が高く、よりよい創薬ターゲットである。

た。タンパク質のアフィニティ精製、反応時間、細胞の可溶化法等、様々なパラメータが存在する。これらの複数のパラメータを種々に組み合わせるには、数1000回の解析をしなければならない計算となり、従来の方法では1人の研究者が一生かかっても行えない程である。従って、このような網羅的で徹底した試料調整の条件検討はかつて行われたことがなく、各自の経験や直感に頼った試行錯誤的な試料調製が行われるのが通常であった。実際に、我々は数1000回の解析を通して試料調製の最適化を求め、極めて精度の高い、疑似陽性を極力排除する方法を得ることができた。

このプロセスで実に様々なパラメータを検討したが、得られた結論は単純であった。「素早く作業する」ことである。これまでの解析方法では感度が低かったため、試料の回収量を少しでも多くするように調製することが常識であった。しかし、回収量をあげようとするとその分だけ作業に時間がかかり、その間に不安定なタンパク質は変性・凝集し「汚い」データを生んでいたということが分かった。高感度な解析が可能となった暁には、もはや試料の「量」に過度にこだわる必要はない。それよりも「質」を高めるため、タンパク質が変性・凝集する前に少しでも早く試料を調製することが最重要の要件となった。しかし、これを実際に実行するのは容易ではなく、担当者は徹底的な試料調製の技法の開発を行った。それは試験管の持ち方や実験ベンチ上の試薬類の配置の仕方に始まり、作業者が最も合理的な動きができるように配慮した。また、実技者の動きをビデオに収め無駄な動きがないか何度も検討した。最終的には、数時間あるいは終夜で行っていた作業を、1時間以内で終えるプロトコルを完成させて実行した。

5 研究成果と産業化への展開

これらの技術開発を経て、我々は約5年間で、2,200個のヒトcDNAを用いた大規模なタンパク質ネットワーク解析を実施した。それに要した解析回数は16,000を超える。それによりタンパク質が生み出す新たな細胞の仕組みを明らかにすることができた。これらの成果は*Nature* 本誌2報、姉妹紙6報を含む30報近い論文として既に報告した。また当初の予想以上に多くの疾患関連遺伝子のタンパク質ネットワーク解析に成功した。癌、生活習慣病、神経変性疾患、色素性乾皮症、ダウン症、バーチエット病、本態性高血圧等の原因・関連遺伝子の機能解析や、病態・発症の分子メカニズム解明や理解に繋がる知見を得た。また、疾患との関連が全く予想されなかったタンパク質も、ネットワークを解きほぐすことにより、全く新しい創薬ターゲットとなり得る例も幾つか発見した^{[2] - [14]}。その中で非常に象

徹的であったネットワーク解析について触れたい。

細胞の中にはプロテアソームと呼ばれる巨大なタンパク質複合体が多数存在する。これは細胞内の不要なタンパク質を分解する工場である。この巨大タンパク質複合体は60個以上のパーツから成るのであるが、これがどのように組上げられるかは長らく謎であった。我々はこのプロテアソームを組上げるアッセムリー因子群と、そのプロテアソームとのネットワークを発見した。すなわち巨大なタンパク質複合体はタンパク質同士の助けを借りてでき上がる、という学問上非常に大きな発見であった^{[4][11]}。図3に示すように、DSCR2とHCCA3と呼ばれるアッセムリー因子が協調し、プロテアソームの α サブユニットをリング状に配列させる。その後Ump1とMGC10911が β サブユニットをリング構造にし、 α と β リングが正しい方向で接着する。それと同時にこれは新規の創薬ターゲットの発見でもあった。

プロテアソームは、古くなりくたびれてきたタンパク質を分解するという「品質管理」の役割を担っているだけではない。多様な生体反応を統御するため、複数のタンパク質を厳密に制御するという重要な機能も担っている。細胞というものは、生体反応のために新たにタンパク質が必要になった場合、必要になったときに作り始めては間に合わない。そのような状況が生じるまで、必要になることが見込まれるタンパク質を常に作り続けており、その裏でプロテアソームがこれを常に分解し続けているのである。そして、必要な瞬間に分解を停止することによって必要なタンパク質をタイムリーかつ即時に出現させる。

例えば細胞が分裂するためには、多数のタンパク質が一方向に協調して厳密に働かなければならない。これをつかさどっているのがプロテアソームである。常に増殖し続ける癌細胞は正常の細胞よりもプロテアソームが沢山必要だとされている。プロテアソームの働きを阻害する薬が、強い抗癌作用を持つことは古くから知られている。しかし、このような阻害剤を作用させると、プロテアソームは正常細胞にも必須の機能であるから強い副作用を伴う。従って他に治療法のない特殊な癌にしか、この阻害剤は用いられない。ところが、我々の発見したプロテアソームのアッセムリー因子の働きを阻害すると、新生プロテアソームの量が減り、やはり癌細胞にとっては致命的であるが、正常細胞にはほとんど影響を与えない。正常細胞は癌細胞ほどプロテアソームを必要としないので、少くともプロテアソームの量が減っても耐えられるのであろう。また、プロテアソーム機能を完全に阻害してしまうのとは異なり、副作用も少ないことが予想された。このアッセムリー因子は新規でより適切な創薬ターゲットと言える。

これらの成果は、直ちに産業化へと結びつけられると考え、2006年から、製薬企業に共同研究を提案した。その結果、国内大手・中堅製薬企業のほとんどが参画する創薬研究プロジェクトへと発展した。このプロジェクトの当初の提案は、各製薬企業が創薬ターゲットとして興味がある遺伝子・タンパク質のネットワーク解析を行い、より適切な創薬ターゲットを発見するというものであった。しかし、そこからさらに一步踏み込み、タンパク質ネットワーク解析から明らかになった情報をもとに、化合物スクリーニング系を構築し、実際に産総研内でスクリーニングを実施し、得られたヒット化合物を基に医薬品開発を試みるという形へと展開した。さらに、産総研内で当研究センターのみならず、同じ臨海副都心センター内の生命情報工学センターと共同^[注]、ヒット化合物のドッキング・最適化シミュレーションを、大規模な並列計算機を用いて効率よく行い、コンビナトリアルケミストリーへの橋渡しも行うことにした。このように、製薬企業、あるいは民間研究機関が単独では行いきにくい、タンパク質ネットワークチームのクリーン施設、大規模天然化合物ライブラリ、研究センターのブルージン^{用器}¹等の研究リソースを産総研が提供し、ともに製品化研究、つまり「医薬品を創る」という実証研究を行うこととなった^[15]。

6 考察：本格研究へと発展させる戦略

我々が、タンパク質ネットワーク解析を立案しプロジェクトをスタートさせた時点で考えた最も基本的な戦略は、「奇をてらった新しいイノベーションを目指さない」、というものであった。どんなに素晴らしい技術・技法が創出されたとしても、それが解析法として定着し、データを生み出すにはどんなに早くても10年の月日がかかるのが普通である。実際、田中耕一氏が世界で初めてマトリックスを用いてペプチド・タンパク質をイオン化し質量分析をしたのは1980年代前半であり、この発見が契機となりMALDI法という形に発展し、世界中のタンパク質化学者やバイオリジストが盛んに使い始めたのは1990年代後半～2000年になってからである。

当時我々が10年の月日を解析技術の開発に費やすということは、非現実的と考えた。我々は現状の質量分析技術における最大のボトルネックを最小化する、という最も現実的かつ泥臭い、ある意味「正攻法」なやり方に固執した。その「正攻法」とは「微量の試料をロスなく質量分析機に送り込む」ことであり、その一点に徹底的にこだわった。その代わりに、質量分析装置の改良やイオン化の効率化であるといった新しい試みには手を出さないことにした。質量分析機自体は既に十分高感度であり、試料を失うことなくイオン化させられれば、目的とする感度が得られることに

賭けた。

このような徹底的な高感度化を達成することができれば、ハイスループットで大規模な解析が実現できる。タンパク質の実験の最大のボトルネックは、言うまでもなく試料調製である。そこで、「徹底的な高感度化」により解析のスループットを向上させ、限られた人員と時間で、欧米の50～150人規模のビッグプロジェクトに数人で立ち向かおうと考えた。実際に新たなグラジエント（濃度勾配）方式という要素技術を創出し「想定以上」の高感度化を達成したが、このままでは実際の役には立たなかった。環境からのノイズ等でS/N比はかえって悪くなったからである。あらためて高感度化とはS/N比の向上、すなわちノイズとの戦いであることを思い知らされると同時に、世界的にこのような極小の液体クロマトグラフィ技術の開発が十分に行われない理由も理解された。

プロトタイプの開発品は耐久性に劣り、その上発塵パーティクルにより大きなダメージを受けるため、メンテナンスに大変な手間がかかった。すなわち、1つの成功は次の苦難の始まりだった。しかし、故障の多いプロトタイプの完成度を高める開発研究は後回しにし、「壊れたらすぐ直せる」体制を構築した。これはネジ1本から自身の手でデザインした装置であるからできることであった。そして、欠点だらけの装置・システムであっても、それを「使い、データを出す」ことが何より大事であると考え、最優先させた。また、解析の対象は当初、非常に良く研究された既知分子に絞った。未知の分子を研究対象にするのが常道であろうが、これには2つの考えがあった。1つは、自分自身が開発した解析システムが真に高感度でありハイスループットであるのなら、研究し尽くされたと考えられている分野からも必ず新しい発見があるはずである。また、新しい発見があった場合は、周辺情報が多いため考察が行いやすく、そのインパクトも大きい。これが我々の狙いであった。

7 おわりに

自身が開発したシステムを「高感度」あるいは「ハイスループット」であると謳うのであるなら、当然その結果、高精度なデータが大量に得られる訳である。従って、なるべく質の高い論文を、なるべく早く多く出版することを心がけた。これ以外には、新しく開発した研究手法の優劣を客観的に示す方法はないと考えていた。特に、我々のとった戦略が、地道な改良とノウハウの蓄積そのものであるからなおさらである。方法論の目新しさや、革新性などを謳い論文を出版し、知財等で成果として示すことが困難であった。実際、これまでの開発研究の中で、新規なイノベーションと呼べるものは、単一ポンプでのグラジエント（濃度勾

配）方式のみで、その他は全て、他分野（半導体・産業ロボット）の既存の要素技術の導入である。そしてこれらを駆使し、古典的な生化学実験手法を徹底的に最適化しただけである。しかし、幸いにして、この戦略・戦術は功を奏し、毎分100ナノリッター以下という極小の「流れ」が実現した。これが創薬という大河への一滴となることを期待している。

謝辞

新規グラジエント方式の開発は科学技術振興事業団、タンパク質ネットワーク解析はNEDOの支援を受けました。ここに深謝いたします。

注) 生命情報工学研究センター創薬分子設計チーム・広川貴次研究チーム長が参画

用語説明

用語1: 8,000CPUの超並列計算機、チェスの名人に勝ったというエピソードが有名

キーワード

プロテオミクス、質量分析、タンパク質ネットワーク、創薬、タンパク質微量解析

参考文献

- [1] T. Natsume, Y. Yamauchi, H. Nakayama, T. Shinkawa, M. Yanagida, N. Takahashi and T. Isobe : A direct nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for interaction proteomics. *Anal Chem*, 74(18), 4725-4733 (2002).
- [2] M. Komatsu, T. Chiba, K. Tatsumi, S. Iemura, I. Tanida, N. Okazaki, T. Ueno, E. Kominami, T. Natsume and K. Tanaka : A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *Embo J.*, 23(9), 1977-1986 (2004).
- [3] T. Higo, M. Hattori, T. Nakamura, T. Natsume, T. Michikawa and K. Mikoshiba : Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell*, 120(1), 85-98 (2005).
- [4] Y. Hirano, K.B. Hendil, H. Yashiroda, S. Iemura, R. Nagane, Y. Hioki, T. Natsume, K. Tanaka and S. Murata : A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature*, 437(7063), 1381-1385 (2005).
- [5] N. Matsuda, K. Azuma, M. Saijo, S. Iemura, Y. Hioki, T. Natsume, T. Chiba, K. Tanaka and K. Tanaka : DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquitylated by Cullin 4A-based ubiquitin ligase complex. *DNA Repair (Amst)*, 4(5), 537-545 (2005).
- [6] T. Moriguchi, S. Urushiyama, N. Hisamoto, S. Iemura, S. Uchida, T. Natsume, K. Matsumoto and H. Shibuya : WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases,

- SPAK and OSR1. *J. Biol. Chem.*, 280(52), 42685-42693 (2005).
- [7] K. Yoshida, T. Yamaguchi, T. Natsume, D. Kufe and Y. Miki : JNK phosphorylation of I4-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.*, 7(3), 278-285 (2005).
- [8] A. Hishiya, S. Iemura, T. Natsume, S. Takayama, K. Ikeda and K. Watanabe : A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *Embo J.*, 25(3), 554-564 (2006).
- [9] T.S. Kitajima, T. Sakuno, K. Ishiguro, S. Iemura, T. Natsume, S.A. Kawashima and Y. Watanabe : Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature*, 441(7089), 46-52 (2006).
- [10] J. Hamazaki, S. Iemura, T. Natsume, H. Yashiroda, K. Tanaka and S. Murata : A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes. *Embo J.*, 25(19), 4524-4536 (2006).
- [11] Y. Hirano, H. Hayashi, S. Iemura, K.B. Hendil, S. Niwa, T. Kishimoto, M. Kasahara, T. Natsume, K. Tanaka and S. Murata : Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Molecular cell*, 24(6), 977-984 (2006).
- [12] H. Iioka, S. Iemura, T. Natsume and N. Kinoshita : Wnt signalling regulates paxillin ubiquitination essential for mesodermal cell motility. *Nat. cell biol.*, 9(7), 813-821 (2007).
- [13] R.H. Lee, H. Iioka, M. Ohashi, S. Iemura, T. Natsume and N. Kinoshita : XRab40 and XCullin5 form a ubiquitin ligase complex essential for the noncanonical Wnt pathway. *Embo J.*, 26(15), 3592-3606 (2007).
- [14] M. Komatsu, S. Waguri, M. Koike, Y.S. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y. Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka : Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 131(6), 1149-1163 (2007).
- [15] 夏目徹 : 日本におけるケミカルバイオロジープロジェクト, *ファルマシア*, 42(5), 457-461 (2006).

(受付日 2008.1.17, 改訂受理日 2008.2.8)

執筆者略歴

家村 俊一郎 (いへむら しゅんいちろう)

1991年鹿児島大学大学院農学研究科(農芸化学専攻)修士課程修了。1999年理学博士(基礎生物学研究所・分子生物機構論専攻)。2002年産業技術総合研究所入所。現在、バイオメディカル情報研

究センター主任研究員。本論文では質量分析計を用いたタンパク質相互作用の大規模解析に従事。直ぐに失われてしまうような微量タンパク質複合体の精製技術を開発し、クリーンルームにおけるハイスルーブット解析システムの構築と運用を担当した。

夏目 徹 (なつめ とおる)

4大学1企業1国研、合計9研究室を渡り歩いた後、2001年産総研入所。東大・九大・首都大客員教授。2006年よりNEDOケミカルバイオロジープロジェクト・プロジェクトリーダー。1986年東京大学大学院修士課程修了。タンパク質相互作用解析を極めることがライフワーク。本論文ではダイレクトナノLCの開発を担当した。

査読者との議論

議論1 要素技術の統合について

質問 (湯元 昇)

本論文のオリジナリティーは、「タンパク質のネットワーク解析のために超高感度質量分析システムを構築する」という目標に対して、①送液系の新しいシステム構築、②解析環境の改善、③デッドボリウムを極小化した分析流路の調製、④サンプル調製の至適化という要素技術の統合化に成功したことがあげられます。②③④についても①と同様に詳述し、選択した要素技術をどのように統合して目標を実現したのかを記述して下さい。

回答 (夏目 徹)

②③④にかけての技術は基本的にノウハウの蓄積や他からの技術の導入であり、既存のもの組み合わせとその最適化であるため、単なる苦勞話となる恐れがあるため割愛しました。しかし、ご指摘の通り重要であると考え、論文の内容がほげないよう最小限の内容を追加しました。

議論2 研究目標と社会とのつながりについて

質問 (一條 久夫)

課題の解決に向けた研究は非常に詳しく説得力がありますが、「研究目標と社会とのつながり」、「結果の評価と将来の展開」が若干不足しているように感じます。

「タンパク質ネットワーク解析を大規模・高精度に行い、疾患の発症メカニズムや新規創薬ターゲットを発見する」という目標が一部達成されていることをもう少し詳しく記されると分かり易くなるのではないのでしょうか。

回答 (夏目 徹)

新規創薬ターゲットの発見についての具体的な内容を、*Nature*誌に発表したプロテアソームのアッセンブル因子を例に取り具体的に記述しました。