

《短 報》

二次元電気泳動とMALDI-TOF-MSによるプロテオーム解析

伊藤達彦・田部一史・大塚健三

はじめに

ポストゲノム研究としてプロテオーム研究が注目されている。この研究はタンパク質がいつ、どこで、どのように、どれだけ発現するのかを網羅的に解析することである。例えば、食品に含まれる有害物質に反応するタンパク質を見つけ出し、このタンパク質が何であるのか、どのような働きを担っているのかがわかれば、これを指標に有害物質の存在を鋭敏かつ簡易に評価することができる可能性が生まれる。

プロテオーム研究において欠かすことのできない解析法として、二次元電気泳動 (2-DE) によるタンパク質の分離法と、質量分析装置を用いたタンパク質の同定法がある。この解析の特徴は、2-DEによって分離したタンパク質スポットのアミノ酸配列を直接分析することなく、質量分析で得られる分子量のみを用いてタンパク質を同定する点である。この同定法の原理はタンパク質をプロテアーゼ消化後に得られる断片化ペプチドの実測による質量値と、データベースに登録されているタンパク質から理論的に計算された断片化ペプチドの分子量を比較検索し照合することである。このようなタンパク質同定法は「peptide-mass fingerprinting (PMF) 法」とよばれている。

この解析法を2種類の2-DEを用いた分析に適用した。1つは一次元目に両性担体 (CA)-等電点電気泳動 (IEF) を用いた2-DE、他方は一次元目に固定化pH勾配 (IPG)-IEFを用いた2-DEである。質量分析装置はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS) を使用した。今回、2-DE、サンプル調製法などを技術的に検討し、改良を加えた結果、50fmolレベルで同定可能になったこと、HeLa細胞抽出液2-DE上の57スポットについて、可能性の高い候補

タンパク質を挙げることができたこと、また培養液中に放出されたタンパク質の検出ができたので報告する。

材料と方法

1 細胞の培養

用いた細胞はヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞で、10%牛胎児血清 (Sigma) を含むDulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, GIBCO) の培養液を使用した。HeLa細胞は液体窒素で凍結保存してある細胞を解凍した後ディッシュ (Corning) に蒔き、37°C、5%CO₂の条件下で培養した。アクリルアミド処理細胞は10mMアクリルアミドで24時間処理した後、無血清培養液で48時間培養したものである。

2 2-DEのための試料調製

(1) 一次元目にCA-IEFを用いた場合

細胞をPBSにて洗浄し100 μ lの溶解液 (9.5M 尿素, 2% NP-40, 2% Ampholine, 5% メルカプトエタノール) で溶解し、1 μ lのProtease Inhibitor Cocktail (Sigma) を加え、タンパク質濃度を測定し分注して-20°C保存した。

(2) 一次元目にIPG-IEFを用いた場合

細胞抽出液の場合、細胞をPBSにて洗浄し200 μ lの溶解液 (8M 尿素, 4% CHAPS, 40mM Tris base) で溶解し、2 μ lのProtease Inhibitor Cocktail (Sigma) を加え、タンパク質濃度を測定し分注して-20°C保存した。

培養液中に放出されたタンパク質を検出する場合、培養液20mlをCentricon (Millipore) を用いて約100 μ lに濃縮した。これに50mM Tris-HCl (pH 8.8) 2mlを加え、約100 μ lに濃縮した。この操作を2回繰り返した。濃縮液を100 μ lの溶解液 (9.8

キーワード: プロテオーム, 二次元電気泳動, MALDI-TOF-MS, PMF法

受 理 日: 2005年2月23日受理

M 尿素, 4% CHAPS) で溶解し, 1 μ l の Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) を加え, タンパク質濃度を測定し分注して -20°C 保存した (Kubota et al., 2003).

3 2-DE

(1) 一次元目にCA-IEFを用いた場合

O'Farrell の原法 (O'Farrell et al., 1977) にもとづき行った. 二次元目は SDS-PAGE ゲルを用いて泳動した.

(2) 一次元目にIPG-IEFを用いた場合

一次元目は Immobiline DryStrip, 11cm (Amersham Biosciences) のゲルを用いた. 膨潤溶液 (8M 尿素, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer, 18mM ジチオスレイトール) に, 銀染色の場合 20 μ g のタンパク質を含む溶解液を混合し 200 μ l を使用した. IPGphor (Amersham Biosciences) を用いて, 20°C で 30V (12時間), 500V (1時間), 1000V (1時間), 8000V (2時間) で一次元目の電気泳動を行った. 一次元目と二次元目の間に, 還元バッファー (1.5mM Tris-HCl (pH8.8), 6M 尿素, 30% グリセロール, 2% SDS, 1% ジチオスレイトール), アルキル化バッファー (1.5mM Tris-HCl (pH 8.8), 6M 尿素, 30% グリセロール, 2% SDS, 2.5% ヨードアセトアミド) の順にそれぞれ 15 分間平衡化を行った (Gorg et al., 2004). 二次元目は SDS-PAGE ゲルを用いて泳動した.

4 染色

泳動後, ゲルを CBB Stain One (Nacalai tesque) を用いてクマシーブルー (CBB) 染色, または Silver Stain MS Kit (Wako) を用いてグルタルアルデヒドを使用しない銀染色 (Shevchenko et al., 1996) を行った.

5 ゲル内消化とゲル片からのペプチドの抽出

基本的には谷口ら (谷口, 菊池 2002a,b) の方法に従った.

(1) タンパク質スポットの切り出し・脱色

ゲルからタンパク質スポットを切り出した. ゲル片を脱色液 (CBB染色の場合: 50% アセトニトリル, 25mM 重炭酸アンモニウム, 銀染色の場合: 15mM フェリシアン化カリウム, 50mM チオ硫酸ナトリウム) を加えて振とうした. 数回洗浄 (CBB染色の場合: 脱色液, 銀染色の場合: 純水)

し, 100% アセトニトリルを加えて脱水した. 真空デシケターを用いてゲル片を乾燥させた.

(2) 還元・アルキル化

ゲル片に還元液 (10mM ジチオスレイトール, 25mM 重炭酸アンモニウム) を吸収させ, 56°C で 60 分加温して, システイン残基を還元した. 還元液を除いてゲル片を 25mM 重炭酸アンモニウムで洗浄したあと, アルキル化液 (55mM ヨードアセトアミド, 25mM 重炭酸アンモニウム) を加えて室温で 45 分振とうし, システイン残基をカルバミドメチル化した. 再びゲル片を脱水乾燥させた.

(3) ゲル内消化・抽出

10 μ g/ml トリプシン溶液をゲル片に吸収させて, 37°C で一晩静置した. 抽出液 (50% アセトニトリル, 1% トリフルオロ酢酸) を 5 μ l 加え, 10 分間超音波処理を行い, 上清を回収した. この操作を 3 回行った.

6 MALDI-TOF-MS

Anchor ChipTM (Bruker-Daltonics) 上に α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA) 溶液 (CHCA飽和アセトン溶液: 0.1% トリフルオロ酢酸, 97:3) 1 μ l を乗せ, 直ちにに取り除いた. その上にそれぞれ 2 μ l の純水, 試料の順に乗せ, 3 分間静置した. 3 μ l の 0.1% トリフルオロ酢酸で洗浄し, Recrystallization mixture (CHCA 0.1g/l エタノール溶液: アセトン: 0.1% トリフルオロ酢酸, 6:3:1) 1 μ l を乗せ風乾させた. MALDI-TOF-MS は Autoflex (Bruker-Daltonics) のリフレクターモードを用いて測定した.

7 タンパク質同定

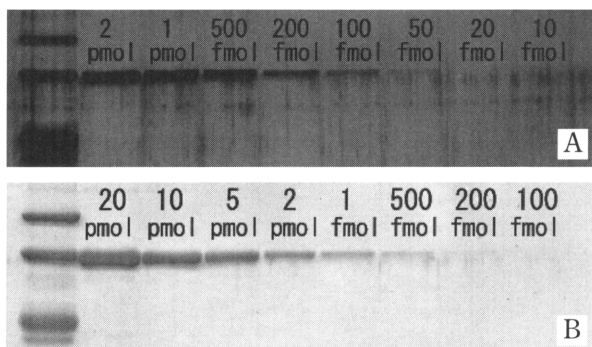
MALDI-TOF-MS によって得られたペプチドの質量リストを MASCOT (http://www.matrix-science.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF) を用いてデータベース上のアミノ酸配列と比較し, タンパク質同定を行った.

結果と考察

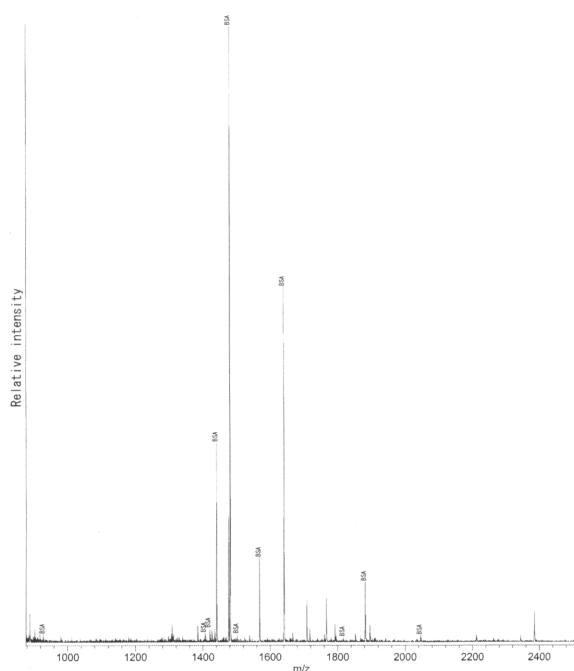
1 検出感度

染色及び MS による検出感度を調べるために, 牛血清アルブミン (BSA, 66kDa) を指標とした実験を行った (Mortz et al., 2001). タンパク質濃度を変えて SDS-PAGE 後, CBB 染色及び銀染色で染色した (第 1 図). CBB 染色では 500fmol (33

ng), 銀染色では50fmol (3.3ng) までバンドが確認できた。MSによる検出感度測定はCBB染色で500fmol, 銀染色で500fmol, 100fmol, 50fmolを用いて行った。各タンパク質濃度でのSequence coverageを第1表に示した。500fmolにおいて、染色法の違いによるSequence coverage 及びMSスペクトルのシグナル強度の差はほとんど見られなかった (MSスペクトルのデータは示していない)。銀染色50fmolでのMSスペクトルを第2図に示した。ケラチン由来のペプチドなどのコンタミネーションにより必ずしも明確な検索結果が得られるとは限らないが、50fmolレベルでもタンパク質同定は可能であることが示された。



第1図. BSAを用いた検出感度の比較
Aは銀染色, BはCBB染色を行った。



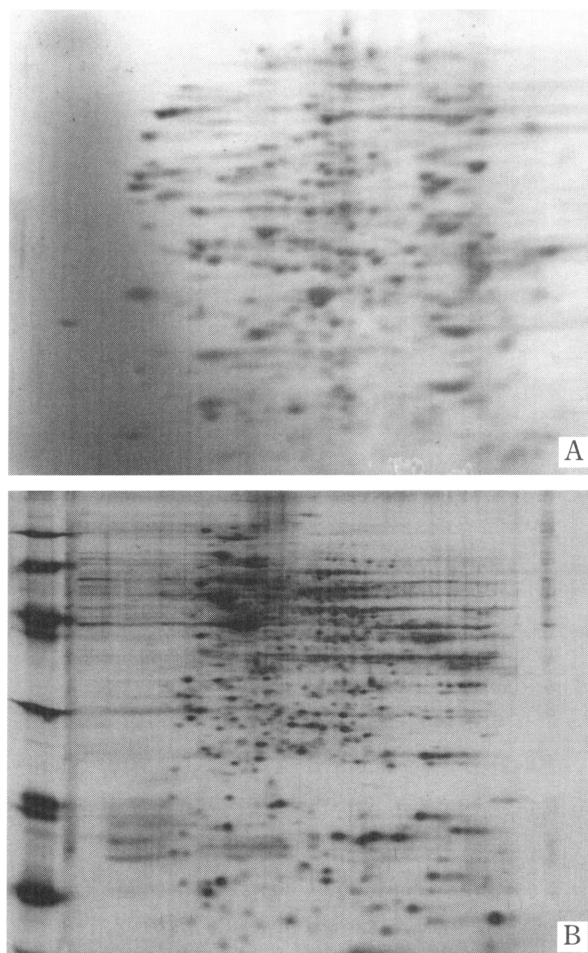
第2図. BSA50fmolのMSスペクトル

第1表. BSAのSequence coverage

	500fmol	100fmol	50fmol
CBB染色	38%	—	—
銀染色	36%	29%	21%

2 2-DE

一次元目にCA-IEFを行った場合、再現性があまり良くなかった。これは電気浸透流によるpHドリフトが起きたためと思われる。一方、一次元目にIPG-IEFを行った場合、CA-IEFに比べ再現性に優れていた。HeLa細胞抽出液の二次元電気泳動パターンを第3図に示した。

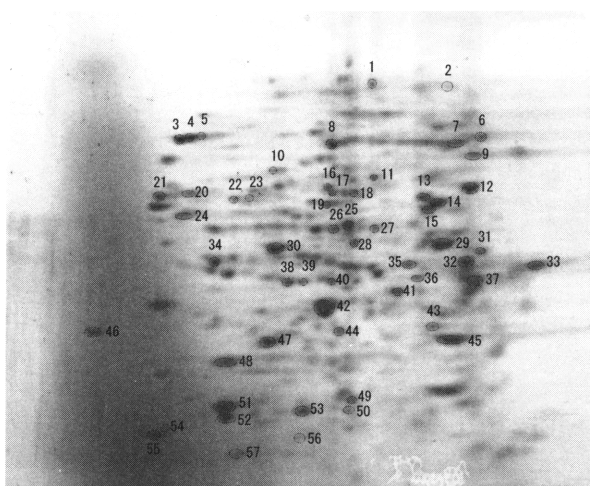


第3図. HeLa細胞抽出液の2-DE

Aは一次元目にCA-IEFを用いたpH範囲3~10の2-DE。二次元目は10%SDS-PAGEゲルで行い、CBB染色にて染色した。
Bは一次元目にIPG-IEFを用いたpH範囲3~10の2-DE。二次元目は13.5%SDS-PAGEゲルで行い、銀染色にて染色した。

3 実験例1

HeLa細胞抽出液をサンプルとして、一次元目にCA-IEFを用いた2-DEで展開して得たタンパク質スポットの内、57個についてPMF法によって可能性の高い候補タンパク質を挙げることができた(第4図, 第2表)。今回同定できたタンパク質は細胞内に量的に多く存在する, 分子シャペロンの働きをもつタンパク質 (Spot No. 9, 12-15, 27, 28, 29, 31, 33, 35), 解糖系の酵素 (Spot No. 30, 42, 47, 48, 50), 細胞骨格を構成するタンパク質 (Spot No. 11, 17, 26, 32, 36, 37, 40, 43, 45) などである。



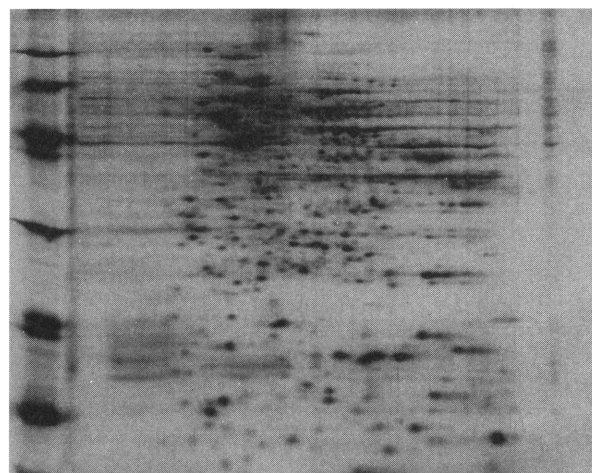
第4図. 候補タンパク質を挙げることができたタンパク質スポット
一次元目にCA-IEFを用いたpH範囲3~10の2-DE. 二次元目は10%SDS-PAGEゲルで行い, CBB染色にて染色した。

4 実験例2

アクリルアミド暴露後のHeLa細胞培養液をサンプルとして、一次元目にIPG-IEFを用いた2-DEで展開した(第5図)。HeLa細胞由来と思われるタンパク質の他に、培養液由来と思われるタンパク質の混在も検出された(第3表)。また、細胞骨格を構成するタンパク質や細胞内でしか発現しないようなタンパク質が検出されたことから、アクリルアミド暴露により細胞がネクロシスを引き起こしたと考えられる。

5 課題

今回、57タンパク質スポットについて可能性の高い候補タンパク質名を挙げることができた。しかし、存在量が多いと思われるタンパク質スポットでも候補タンパク質が得られないということが



第5図. アクリルアミド暴露後, pH範囲4~7のHeLa細胞培養液の2-DE
一次元目はIPG-IEF, 二次元目は12.5%SDS-PAGEゲルで行い, 銀染色にて染色した。

あった。これは1つに見えるようなタンパク質スポットに複数のタンパク質が混在していることが考えられる。解決策の1つとして、2-DEの分離能を高めるためにゲルを大きくすることがある。例えば、Oguriら (Oguri et al., 2002) は多数の狭いpH範囲でIPG-IEFを用いた2-DEを行い、得られたパターンを画像処理して、pH3.5~11の領域をカバーする1枚の巨大ゲルの泳動パターンを合成した。これによって約11,000ものタンパク質スポットを検出している。また、MS/MS解析やプロテインシーケンサー分析によって得られる部分アミノ酸配列の情報を得ることによって、タンパク質同定の確度をより向上させることが必要であると思われる。

謝 辞

本研究は文部科学省ハイテク・リサーチ・センター整備事業、ならびに特定領域研究(がん治療)の援助を受けて行われた。記して謝意を表します。

第2表. 候補タンパク質名 (Spot no.は第4図に対応する)

Spot no.	候補タンパク質名	理論値	
		pI	Mass(kDa)
1	Carbamyl phosphate synthetase	5.7	111
2	Oxygen-regulated protein 150K precursor	5.2	111
3.4.5	PTB-associated splicing factor long form	9.5	76
6	Endoplasmic precursor	4.8	93
7	Probable transitional endoplasmic reticulum ATPase	5.1	90
8	Elongation factor 2	6.4	96
9	Heat shock protein 90-beta (Hsp90)	5.0	84
10	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	8.2	71
11	Erizin	6.0	70
12	BiP protein (Grp78)	5.0	72
13	DnaK-type molecular chaperone precursor mitochondrial (Grp75)	5.9	73
14	DnaK-type molecular chaperone (Hsc70)	5.4	71
15	DnaK-type molecular chaperone HSP70-1 (Hsp70)	5.5	70
16	DEAD-box protein3 (Helicase-like protein2)	6.7	73
17	LaminA	6.6	74
18	Moesin	6.1	68
19	Far upstream element binding protein1 (DNA helicaseV)	7.2	68
20	Long-chain-fatty-acid beta-oxidation multienzyme complex alpha chain precursor	9.2	84
21	Polyadenylate binding protein	9.3	59
22.23	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	8.8	78
24	RNA helicase	9.1	70
25	Transformation-sensitive protein IEF SSP 3521	6.4	63
26	LaminC	6.4	65
27	TCP ring complex protein TRiC5	6.2	61
28	T-complex-type molecular chaperone CCT6	6.2	58
29	Chaperonin GroEL precursor (Hsp60)	5.7	61
30	Pyruvate kinase	8.0	58
31	Protein disulfide-isomerase	4.8	57
32	Vimentin	5.1	54
33	Calreticulin precursor	4.3	48
34	Splicing factor homolog	9.0	54
35	Protein disulfide-isomerase ER60 precursor	6.0	57
36	Keratin,type II cytoskeletal 8	5.5	53
37	Tubulin	4.8	50
38.39	Similar to ATP synthase	9.1	61
40	Fascin	6.8	55
41	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	5.9	50
42	Alpha enolase	7.0	47
43	Keratin,type I cytoskeletal 18	5.3	48
44	Translation elongation factor EF-Tu precursor	7.7	50
45	Actin beta	5.6	41
46	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	9.6	47
47	Phosphoglycerate kinase 1	8.3	45
48	Fructose-bisphosphate aldolase A	8.4	40
49	Annexin A1	6.6	39
50	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2H9	6.8	32
51	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	8.6	36
52	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1	9.0	37
53	Annexin A2	7.6	39
54.55	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9.3	39
56	Voltage-dependent anion channel 2	6.8	31
57	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	8.6	31

第3表. 候補タンパク質名 (Spot no.は第5図に対応する)

Spot no.	候補タンパク質名	理論値	
		pI	Mass(kDa)
1.2	Albumin	5.8	71
3.4	Tropomyosin, fibroblast	4.8	29
5	Triosephosphate isomerase	6.5	27
6	Peroxiredoxin6	6.0	25
7.8	Apolipoprotein A-I precursor	5.7	30
9	Nucleoside-diphosphate kinase	5.8	17

文 献

- 谷口寿章, 菊池美紀 2002a. 最新プロテオーム解析プロトコル3. 細胞工学21, 524-534
- 谷口寿章, 菊池美紀 2002b. 最新プロテオーム解析プロトコル4. 細胞工学22, 637-643
- Gorg, A. et al. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665-3685.
- Kubota, K. et al. 2003. Proteome analysis of secreted proteins during osteoclast differentiation using two different methods: two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tags analysis with two-dimensional chromatography. *Proteomics* 3: 616-626.
- Mortz, E, Krogh, TN, Vorum, H, Gorg, A. 2001. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* 1: 1359-1363.
- O'Farrell, PZ, Goodman, HM, O'Farrell, PH. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1141.
- Oguri, T. et al. 2002. Proteome analysis of rat hippocampal neurons by multiple large gel two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2: 666-672.
- Shevchenko, A. et al. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858.

Title : Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF-MS

Author : Tatsuhiko Ito, Kazushi Tanabe and Kenzo Ohtsuka

Key words : MALDI-TOF-MS, peptide mass fingerprint, proteome, two-dimensional gel electrophoresis