細胞内蛋白質発現プロファイルの網羅的解析法

田中幸枝，松川　茂（福井医科大学　医学部附属実験実習機器センター）

TANAKA Yukie, MATSUKAWA Shigeru：Exhaustive analysis of the intraceller protein expression profile

For proteome analysis, in general, protein mixture samples are separated by two-demensional polyacrylamide gel electrophoresis(2D-PAGE) and compared visual differences. After excising the protein spots of interest, we perform protease digestion in gel and then analyze the extracted peptides from the gel using mass spectrometer. In this report we have attempted exhaustive analysis of the proteins on 2D-PAGE gel.

１．はじめに

近年のプロテオーム解析の一般的な手法は，図１ａに示すようなものである。まず，細胞などから蛋白を抽出し，二次元電気泳動（2D-PAGE）で分離し，蛋白染色する。得られた結果の中の興味のあるスポットを切り出し，ゲル内で適当なプロテアーゼによりペプチドに分解する。分子サイズの小さくなったペプチドは，ゲルから流出しやすくなるので，そのペプチドを回収し，質量分析装置を用いてペプチドのアミノ酸配列を解析し蛋白質同定を行う。

今回，我々は，2D-PAGE ゲル上の蛋白質を網羅的，ハイスループットに解析し，発現変動蛋白質を同定・定量する方法の開発を試みた。

２．方法

細胞内蛋白質を 2D-PAGE により分離し，ゲルを適当な大きさに升目状に断片化する。それぞれのゲル片中で蛋白質を変性・還元・ビオチン化後，ゲルを溶解し，アビジンカラムでビオチン化蛋白質を回収する。濃縮後，MALDI/TOF-MS を用いて，含まれる蛋白質の分子量及び発現量を測定する（図１ｂ）。

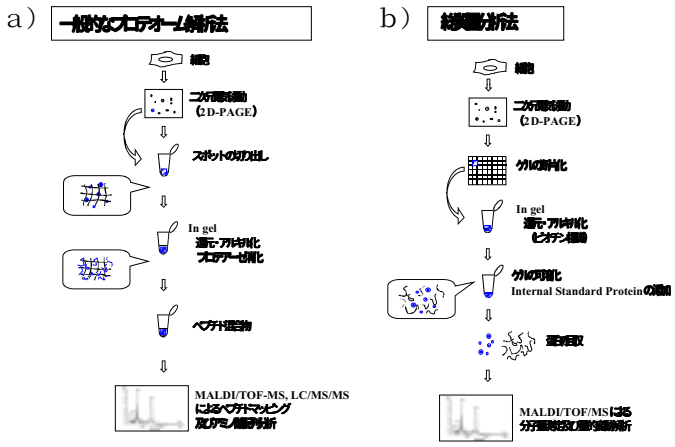

図１．プロテオーム解析の流れ図

３．結果

今回考案した方法について，各ステップの条件検討（【１】～【５】）を行った。control sample として SDS-PAGE 用分子量マーカーを用いた。また，SDS-PAGE 後のゲルを可溶化させるために，acrylamide の架橋剤には，一般に使われている methylenbisacrylamide のかわりに diallyltartardiamide（DATD）を用いた[1]。

【１】ビオチン化の条件検討

protein marker mixture を 5mM Tributylphosphine 存在下，6M Guanidine-HCl/50mM Tris(pH8.8)中で 37℃, 60min incubation し，還元する．その後，1/20N HCl を用いて中和し，8.5mM Biotin-BMCC 5μl を加えて室温で 3 時間または，over night incubation し，ビオチン化の効率を比較する（図２）。

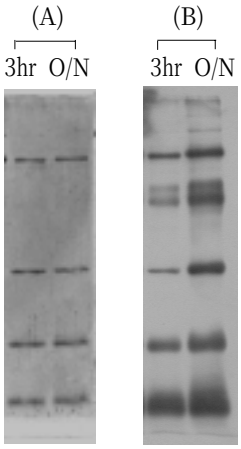

図２．ビオチン化の条件検討

(A) SDS-PAGE ゲルの C.B.B. 染色による蛋白検出
(B)Avidin-HRP を用いた Western Blotting による Biotinyl Protein の検出

【２】ゲル濾過による過剰ビオチン化試薬の除去

ビオチン化蛋白をアビジンカラムで回収する前に未反応の過剰なビオチン化試薬を除去する必要がある。ゲル濾過によりこれを検討した．Sephadex-G25 column（70mm φ ,130mmH) に，0.1M Ammonium bicarbonate により溶出し，90μl/tube で分画した（図３）。

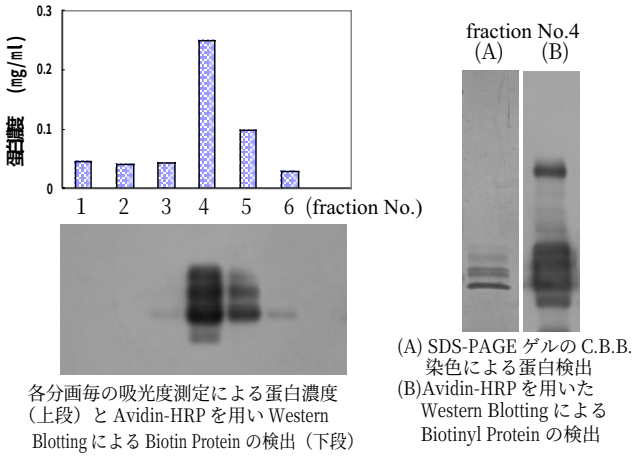

図３．過剰ビオチン化試薬の除去

【３】Biotin Trapping Electrophoresis を用いた溶解ゲルからのビオチン化蛋白質の回収

ビオチン化蛋白の回収にはアビジンカラムが有効であるが，回収率を高めるために，溶解したゲル溶液中からのビオチン化蛋白を電気泳動的に溶出する方法を検討した。ビオチン化蛋白を SDS-PAGE（T=12.5%, C_{DATD}=4%）で分離し，ゲルを C.B.B. 染色する．蛋白バンドをカッターで切り，88mM $NaIO_4$/0.5M Ammonium bicarbonate(pH 3) でゲルを溶解する。予め，アビジンカラム（VECTREX Avidin D）を詰めた 1ml シリンジ（図４）にビオチン化蛋白を含むゲル溶液を流し込み，Tris-Glycine バッファーで 100V,1.5 時間，通電することによりビオチン化蛋白をアビジンカラムに吸着させる。アビジンカラムを 0.1M Ammoniumbicarbonate で洗浄後，0.4% TFA/50% AcCN で溶出させ，得られた蛋白を濃縮し，SDS-PAGE および Western Blotting で確認する（図４）。

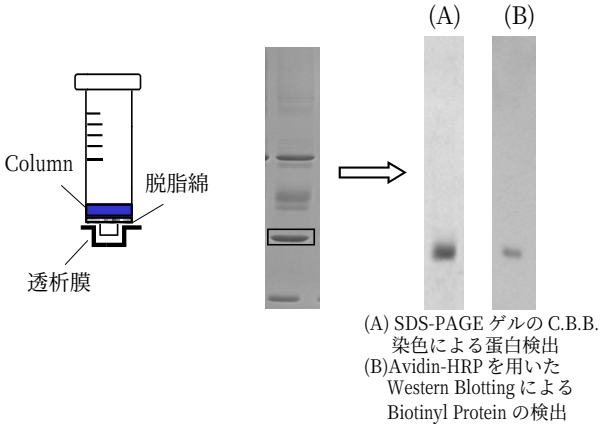

図４．ビオチン化蛋白の回収

【４】MALDI-TOF/MS によるビオチン化蛋白の質量分析

次に，溶液中で還元・ビオチン化した蛋白の MALDI-TOF/MS 分析を試みた。

図５．ビオチン化蛋白の MS 分析

【５】ゲル内ビオチン化

これまでの予備検討実験を踏まえて，蛋白をゲル内で還元，ビオチン化し回収を試みた。control sample の SDS-PAGE（T=12.5%,C_{DATD}=4%）後のゲルを C.B.B. 染色し，乾燥後，50mM Ammoniumbicarbonate で膨潤，acetone で脱水，乾燥する。【１】の方法で，ゲル内で還元・ビオチン化（over night）を行い，ゲルを洗浄，脱水，乾燥後，可溶化させる。ここでのビオチン化蛋白の回収には Avidin Magnet Column を用いた。

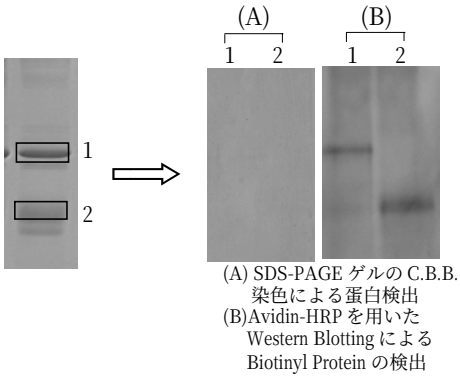

図６．in gel ビオチン化

４．まとめ

以上，2D-PAGE により分離した蛋白質の新たな網羅的解析法を考案し，各ステップの条件検討を行ってみたが，今後は，系の微量化等に取り組み実用化を目指したいと考えている。

５．参考文献

1)P.J.Spath and H.Koblet(1979)Anal.Biochem.93,275-285.