

FD-LC-MS/MS法を用いたタンパク質の高感度分析に関する研究

日大生産工 ○朝本 紘充 日大・薬 内倉 和雄

日大生産工 南澤 宏明 武蔵野大・薬 今井 一洋

【緒言】

近年、ポストゲノム研究の中心として、遺伝情報の最終産物であるタンパク質を網羅的に解析するプロテオミクス研究が急速な発展を遂げている。なかでも、老化や病態組織中などで特異的な発現量変化を示すタンパク質の解析は、各種疾患のマーカータンパク質のみならず、創薬標的の発見にも繋がるため重要である。2次元電気泳動(2-DE)法は、このようなプロテオミクス研究に取り組む多くの機関が採用している主要な解析法であるが、標識化試薬の反応率の低さおよび分離操作の煩雑さ等の理由から、感度と再現性の面で問題点を有する。このため、再現性の高い、高感度なプロテオーム解析法の開発が望まれている。

Toriumiらは、チオール基選択的発蛍光誘導体化試薬であるSBD-Fにより生体試料中のタンパク質を蛍光誘導体化(Fluorogenic derivatization: FD)し、蛍光検出器と組み合わせた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離、検出した後、目的タンパク質のみを抽出し、これを酵素水解してHPLC-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)に付し同定するという新規プロテオーム解析法(FD-LC-MS/MS法)を開発した¹⁾。タンパク質の分離手段にHPLCを適用した同手法は再現性の高い定量解析を実現した。しかし、SBD基は水溶液中で負に荷電することから、その誘導体物はpositiveモードのMSでの検出感度が低いという問題点を有していた。そこでMasudaらは、MSでの高感度検出に適した構造を有する新しいチオール基選択的発蛍光誘導体化試薬であるDAABD-Clを開発した(図1)。DAABD-Clを用いた本手法は高い感度と再現性を有し、実試料中の

プロテオーム解析に有用であることが証明された。こうしたMSでの高感度検出の実現に伴い、本手法の応用により2-DE法などの従来法では困難であったマウスなど小動物の微小組織中タンパク質の高感度なプロテオーム解析が実現できる可能性が示唆された。そこで本研究では、小動物マウスの微小組織である脳各部位(大脳皮質、海馬及び脳幹)内で、加齢に伴い発現量が変動するタンパク質をFD-LC-MS/MS法により同定し、各脳部位の加齢変化の特徴をプロテオームの観点から考察した。

【方法】

蛍光誘導体化反応は、3段階の成長過程(4、12および20週齢)におけるマウスの大脳皮質から抽出した各々の可溶性タンパク質画分にpH8.7の塩酸グアニジン緩衝液で調製したTCEP、EDTA並びにCHAPS溶液を加え、最後にDAABD-Cl/アセトニトリル溶液を添加後、40℃で10分間加熱することで行なった。20% TFA溶液を添加して反応を停止させた後、この反応溶液を直接HPLC-蛍光検出器に注入し、誘導体化タンパク質の

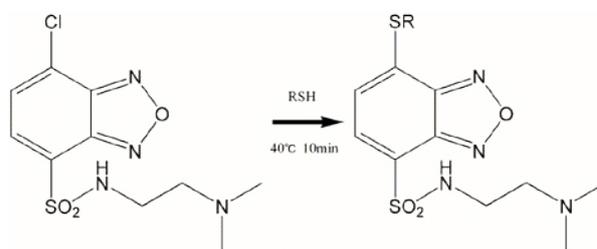


図1. DAABD-Clの化学構造およびチオール基との誘導体化反応

Study on High Sensitivity Analysis of Proteins by FD-LC-MS/MS Method

Hiromichi ASAMOTO, Kazuo UCHIKURA, Hiroaki MINAMISAWA and Kazuhiro IMAI

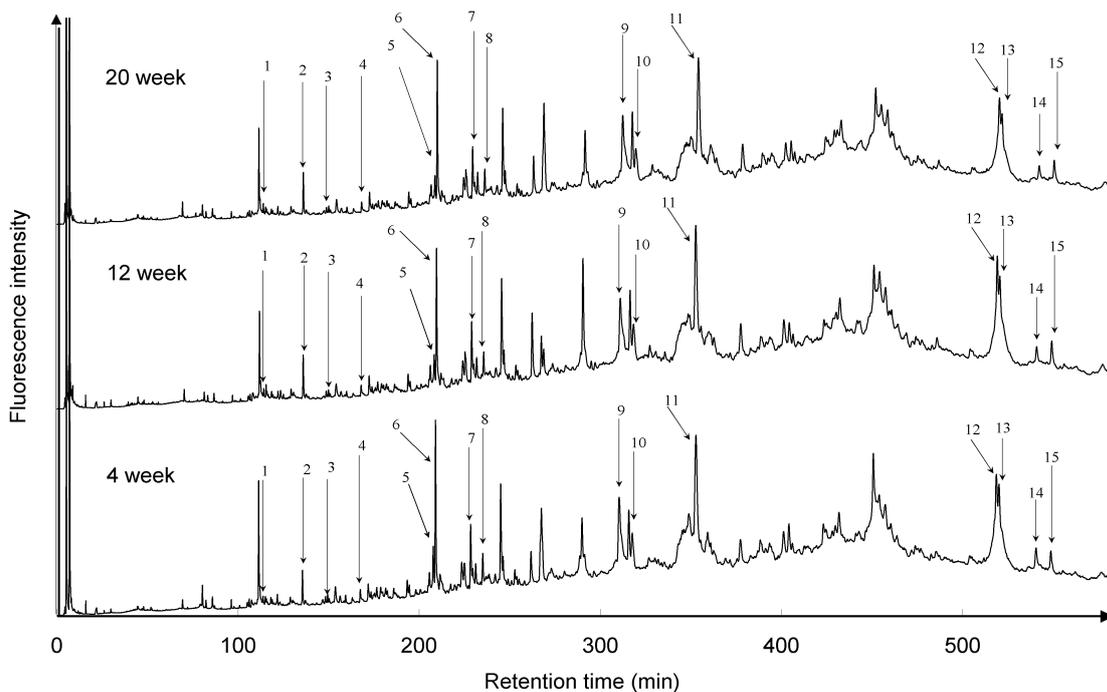


図2. DAABD-CIにより誘導体化された各週齢のマウス大脳皮質中タンパク質のクロマトグラム

分離、検出を行った。HPLCにおけるカラムにはタンパク質分離用カラムを用いた。加齢に伴い有意な変動がみられたピーク ($p < 0.05$, Tukey's test) を分取後、トリプシン消化によりペプチドへと分解した。得られたペプチドのアミノ酸配列をLC-MS/MSより決定し、これをMASCOTデータベースと照合することで変動したタンパク質の同定を行った。海馬および脳幹内の変動タンパク質についても同様の手法により同定した。

【結果と考察】

誘導体化された大脳皮質中タンパク質をHPLCにより分離したところ、約400本のピークが検出され、そのうち15本のピークが加齢に伴い有意に変動した(図2)。同様に、海馬および脳幹からも同程度の総ピーク数を示すクロマトグラムが得られ、それぞれ10本および3本のピークが加齢に伴い有意に変動した。また、これらのピークのLC-MS/MS測定より、計28種類の加齢変動タンパク質が同定された²⁾。このうち7種類は本研究において初めて加齢による変動が確認されたタンパク質であった。なかでも、海馬で同定されたSyn2 protein (神経伝達物質の放出制御に関与)は唯一、加齢に伴い増加した。これはSyn2 proteinが加齢による神経機能の衰退に深く関与していることを

示唆している。大脳皮質では細胞骨格タンパク質であるβ-actinやcofilinなどの神経細胞の維持に関与するタンパク質が12週齢で最大発現量を示し、その後減少した。また海馬では、細胞骨格タンパク質を含むほとんどの変動タンパク質が加齢に伴い減少した。これより、加齢による神経細胞機能の衰退開始時期は、大脳皮質よりも海馬の方が早い可能性が示唆された。一方、変動タンパク質数が他の部位より極端に少なかった脳幹では、細胞骨格タンパク質のγ-actinが12週齢で最小発現量を示して以降、ほぼ変動しなかった。細胞骨格タンパク質は神経細胞数を反映するため、脳幹では加齢による神経細胞の衰退がほとんど起こらない可能性が示唆された。

こうした成果より、DAABD-CIを用いたFD-LC-MS/MS法は、従来法では困難であった微小組織中タンパク質の高感度な分析を可能とし、新たな知見を提供できる有用な解析法であることが証明された。

【参考文献】

- 1) C. Toriumi, K. Imai: *Anal. Chem.*, **75** (2003) pp. 3725-3730.
- 2) H. Asamoto, T. Ichibangase, K. Uchikura, K. Imai, *J. Chromatogr. A*, **1208** (2008) pp. 147-155.