

プロテオーム解析法の現状と将来 ～新規プロテオーム解析法の開発と応用について～

日大生産工 〇朝本 紘充 南澤 宏明
日大・薬 内倉 和雄 武蔵野大・薬研 今井 一洋

【はじめに】

2003年にヒトゲノムの解読完了が宣言されて以降、病因遺伝子を特定するための研究が進んでいる。しかし、生体内で疾患の発症に直接的に関与するのは遺伝情報の最終産物であるタンパク質であることから、それら疾患の発症機構を解明するためにはゲノムのみならず、プロテオームの解析が重要である。近年では、正常組織と疾患発症部位内で存在量に変化しているタンパク質またはある組織内で加齢に伴い発現量が変動するタンパク質の検出・同定などを目的とした「プロテオミクス研究」が急速な発展を遂げている。

本講演では、プロテオミクス分野で汎用されているいくつかのプロテオーム解析法を紹介するとともに、筆者を含むグループが開発した新規解析法の特長並びに同手法を用いて得られた最近の研究成果について紹介する。

【プロテオーム解析法について】

2次元電気泳動 (2-DE)法は、等電点による分離 (1次元)と分子量による分離 (2次元)の組み合わせにより生体試料中の各タンパク質を分離後、標識化試薬などを用いてそれらを定量する手法であり、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。しかし、2-DE法は分離においては高分解能ではあるものの、操作が煩雑で熟練を要することから、タンパク質の微小な発現量変化を判別するだけの再現性を確保することが難しい。一般に、2-DE法を用いてタンパク質発現量を解析した場合、再現性を示すスポット強度の相対標準偏差 (RSD)の値は約40%程度とされているが、タンパク質の種類によってはその値が70%にも達することが知られている¹⁾。最近では、こうした再現性

並びに感度の向上を目指し、Cye Dyeなどのシアニン系色素を蛍光標識化試薬として用いた手法が開発されているが、これらの試薬は高い疎水性を示すことからタンパク質との反応率が低いという問題点を有している。

こうした2-DE法に次いで汎用されているのが高速液体クロマトグラフィー (HPLC)と質量分析計を組み合わせたショットガン法と呼ばれる手法である。同手法ではまず初めに試料中のタンパク質を全て酵素処理し、得られたペプチド混合液を1次元もしくは多次元HPLCで分離する。次に得られた各ペプチドの分子量とアミノ酸組成を質量分析計で解析し、最終的にデータベース上でこれらを照合することで検出された全タンパク質の同定を行う。このように、ショットガン法では老化や疾患で発現量が変動したタンパク質だけでなく、検出された全てのタンパク質が同定の対象となるため、何万ものペプチド断片を質量分析計で解析しなければならず、膨大なデータ解析が必要となる。また、タンパク質の一次構造を切断した後に分離、解析するため、同一の遺伝子からコードされたアイソフォームのタンパク質の識別が困難であることが知られている。

Toriumiらは、親水性のチオール基選択性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。タンパク質

Current Status and Future Potential of Methods for Proteome Analysis
～Development and Application of a Novel Method for Proteome Analysis～

Hiromichi ASAMOTO, Hiroaki MINAMISAWA, Kazuo UCHIKURA
and Kazuhiro IMAI

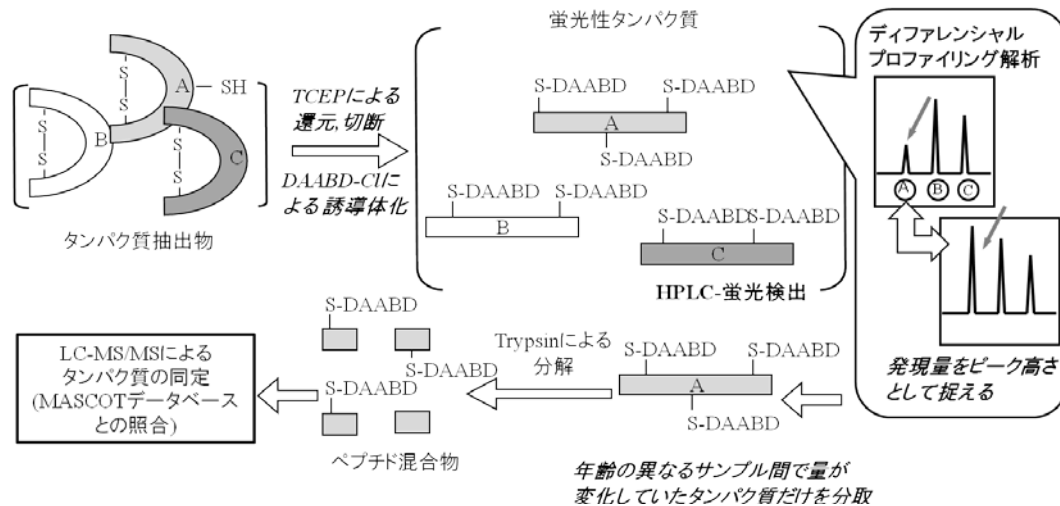


図1. FD-LC-MS/MS法の概略図

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帯電することから、その誘導体物はpositiveモードのMSでの検出感が低いという問題点を有していた。そこでMasudaらは、水溶液中で正に帯電する構造を有する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²⁾。DAABD-Clを用いたFD-LC-MS/MS法(図1)は、タンパク質の誘導体化試薬として発蛍光誘導体化試薬並びに分離手段としてHPLC-蛍光検出を適用することで感度と再現性の高い定量解析を実現した。また、標識化試薬自体が親水性かつ無蛍光性であることから、誘導体化反応中に十分量の試薬を用いることができ、試料中のチオール基の完全標識が可能である。さらに、その基礎的および応用的な研究から、同手法は線虫およびマウス肝臓の疾患プロテオーム解析に有用であることが証明された。実際に、マウス肝臓におけるプロテオーム解析では、発現量を示すピーク高さはRSDで23%以下と、FD-LC-MS/MS法が従来の2-DE法よりも優れた再現性を有することが示された。また、従来法よりも10倍以上高い感度でのタンパク質の検出および同定が可能であった。最近では、2-DE法などの従来法による解析が困難であったタンパク質抽出量の少ない小動物(マウス)の微小組織(脳各部位)内の高感度なプロテオーム解析が同手法の適用により実現された³⁾。

【本研究の目的】

本研究では、脳内で老化に関連しているタンパク質を明らかにするために、FD-LC-MS/MS法を用いてラットの海馬内で老化に伴い発現量が変動するタンパク質の検出・同定を行った。

【方法】

蛍光誘導体化反応は、3段階の老化過程(8週齢、12および24月齢)におけるラットの海馬

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。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なった。

【結果と考察】

誘導体化された海馬内タンパク質のHPLC測定において約400本のピークが検出され、そのうち8本が老化に伴い有意に変動した。また、LC-MS/MS測定より8種類のタンパク質が同定された。なかでも、synapsin II(神経伝達物質の放出制御に関与)は加齢により顕著に増加することがわかった。これは同タンパク質が老化に伴う神経機能の変化に深く関与していることを示唆している。

【おわりに】

プロテオーム解析法を用いた老化または疾患関連タンパク質の発見は、直接創薬に繋がる可能性もあることから極めて重要である。現在では、より微小な細胞組織中でのプロテオーム解析への関心が高まっており、これら手法の感度および分離能の更なる向上が期待されている。

【参考文献】

- 1) S. Schroder et al., *J. Proteome Res.* (2008) **7**, p.1226.
- 2) M. Masuda et al., *Anal. Chem.*, (2004) **76**, p.728.
- 3) H. Asamoto et al., *J. Chromatogr. A*, (2008) **1208**, p.147.