◆技術講座◆

プロテオーム解析法

山 縣 彰^{*1*2}, 吉 里 勝 利^{*2*3}

2-D Proteome Analysis

Akira YAMAGATA^{*1*2}, Katsutoshi YOSHIKATO^{*2*3}

Key words : proteome analysis, proteomics, two-dimensional gel electrophoresis

はじめに

私たちはヒトゲノムプロジェクトによって、膨大な遺伝子の配列情報を手に入れることができたが、ホモロジー検索などによる遺伝子間の近似性からすべてのタンパク質の機能を推定することは難しく、いまだ3分の1のタンパク質の機能は不明とされている¹⁾²⁾。今後これらのタンパク質の機能を明らかにすることが重要となる。しかし生命システムは複雑な数多くのタンパク質が相互作用をしているために個々のタンパク質の機能だけを見ることは、生命現象の完全な理解につながらない。プロテオーム解析と呼ばれる細胞や組織内タンパク質の網羅的解析は、生命現象をタンパク質レベルで理解するための有力な方法の一つである。本稿では、プロテオーム解析法の基礎と、それによる研究の実例を私達の研究成果を中心に述べる。

二次元電気泳動によるタンパク質の可視化

プロテオーム解析の基本的な流れを図1に示した。最初のステップは、タンパク質が分子量と等電点によって分画された二次元電気泳動像を得ることである。固定化pH勾配等電点電気泳動とそれに続くSDS-PAGE (dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)を用いた二次元電気泳動は、タンパク質をもっとも高解像度で分離することができ一連のプロテオーム解析の核となる技術といえる³⁾。

組織や細胞からタンパク質を抽出するにあたっては、タンパク質をできるだけ可溶化することが必要である。タンパク質抽出および等電点電気泳動用のバッファーには、変性剤として尿素とチオ尿素を基本に、界面活性剤であるCHAPS等を加えたものが現在よく利用されている⁴⁾。この抽出バッファーを用いることで不

^{*1} 広島大学大学院理学研究科付属両生類研究施設〔〒739-8526 広島市鏡山1丁目3番1号〕
Laboratory for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University [1-3-1 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-8526, Japan.]
Tel : 0824-24-7111

^{*2} 広島県組織再生プロジェクト〔〒739-0046 広島県東広島市鏡山3丁目10番32号〕
Hiroshima Tissue Regeneration Project [3-10-32 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan.]
Tel : 0824-31-0211

^{*3} 広島大学大学院理学研究科生物科学専攻発生生物学研究室〔〒739-8526 広島市鏡山1丁目3番1号〕
Laboratory of Developmental Biology, Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University [1-3-1 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-8526, Japan.]
Tel : 0824-24-7440 Fax : 0824-22-7150

図1 プロテオーム解析の流れ

筆者らの研究室で行っているプロテオーム解析の基本的な流れを示している。左上の写真はラット肝臓におけるKupffer細胞の二次元電気泳動像である。タンパク質同定はMicromass社のエレクトロスプレーイオン化四重極質量分析計Q-TOFを用いて行った。

溶性の膜タンパク質なども可溶化することができる。

等電点電気泳動は、固定化pH勾配ゲル (immobilized pH-gradient gel; IPG) ストリップを用いることにより再現性の高い電気泳動像を得ることができる。従来の両性担体を用いる電気泳動では、長時間の泳動によってゲルのpH勾配が崩れる現象が起き、電気泳動の再現性を確保することが難しかった。IPGではpK値の異なる解離性側鎖を持つアクリルアミドモノマーの重合により、pH勾配がゲルに固定化されている。このIPGゲルの登場により、プロテオーム解析は信頼性と再現性を得ることができたと考えよう。

IPGゲルには長さやpH領域の異なるものが市販されているので研究の目的に応じて使い分けるのがよい。筆者の研究室ではおもに18

cmのIPGゲルを使用しており、これにタンパク質50~100 μ gを溶かした抽出用バッファーを吸収させる。膨潤したゲルの両端に電圧をかけると、タンパク質をそれぞれの持つ等電点に移動させることができる。

筆者らの研究室では、SDS-PAGEのために9~18%の濃度勾配アクリルアミドゲルを作成している。濃度勾配ゲルには広いレンジの分子量のタンパク質を分離できるというメリットがあるが、作成には多少手間がかかる。筆者らは40枚の濃度勾配ゲルを一度に製作できる装置を使用しているが、多数のサンプルを電気泳動する必要がないのであれば市販のゲルを用いるのもよい。

電気泳動後のゲルはクマシーブルー (CBB) 染色や銀染色などでタンパク質を可視化する。銀染色はCBB染色に比べて感度は約50倍と

高いが、タンパク質の特性による染色強度の違いや、タンパク質の濃度が高すぎると染色できない場合がある。また最近になって銀染色に近い感度と高い定量性を持つ SYPRO Ruby などの蛍光染色法が普及しつつある。これら染色方法は分析の目的に応じて使い分けが必要になるだろう。ゲルを長期保存するためには、セロファン膜でゲルを挟み温風で乾燥させるのがよい。筆者らの研究室では1年以上経った乾燥ゲルから切り出したスポットのタンパク質同定にはほとんど問題がないことを確認している。

二次元電気泳動像の解析

二次元電気泳動によって展開されたゲルから興味深い変化を示すタンパク質を見つけるためには、二次元電気泳動解析用ソフトウェアを使用する。おもなソフトウェアとしてはバイオラッド ラボラトリー社の Melanie 3 と PDQuest, アマシャムファルマシアバイオテク社の ImageMaster 2 D Elite ver 3.0 がある。3者ともプロテオーム解析に必要な機能をそろえており、それぞれの特徴としてスポットの検出方法に違いがある。

スキャナーを用いて取り込まれたゲルの画像データから、ソフトウェアのスポット自動検出機能を用いてスポットを検出する。さらに検出されたスポットのそれぞれの位置関係から、複数のゲルから同じタンパク質と推定されるスポットをグループとして認識させることができる。さらに同じグループのスポットにおける濃度の違いを比較して棒グラフや表などの形式でレポートさせることができる。このようにしてそれぞれのスポットの発現量を比較し大きく異なる値を示すものが、タンパク質同定の研究対象となる。つまりこれらのタンパク質が、比較した各サンプルの細胞や組織の種類、培養条件、病態などにおける「原因もしくは結果」に関係する因子である。

質量分析によるタンパク質の同定

現在タンパク質同定において主流となっている質量分析装置には次の2種類が存在する。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) とエレクトロスプレーイオン化四重極質量分析計 (ESI MS) である。

タンパク質を特異的なアミノ酸残基で切断するトリプシンなどのプロテアーゼで処理するとさまざまな分子量を持つペプチドが得られる。データベース上のアミノ酸配列から、このプロテアーゼで切断した時に出現することが期待されるペプチドの分子量の予測値と実測値とを比較することによってタンパク質同定が可能になる。この方法をペプチドマスフィンガープリンティングといい、データベースの充実している生物種の解析に対しては、タンパク質同定方法の主流となっている。この方法には操作が容易で短時間での測定が可能な MALDI-TOF 型質量分析計が用いられる。

多くのタンパク質は翻訳後修飾を受けているが、この修飾のためにペプチドマスフィンガープリンティングではタンパク質同定が不可能な場合がある。このような場合や、より詳細なアミノ酸配列の解析が必要なとき、ESI 型四重極質量分析計を用いて、アミノ酸配列を解析する。四重極はたくさんのイオン化されたペプチドの中から、特定の質量電荷比 (m/z) を持ったペプチドを拾い出すマスフィルターの役割を持っている (図 1)。単離されたペプチドに、アルゴンガスを衝突させることによって、ペプチドをある1カ所で切断させ、さまざまな長さのペプチド断片を生成させる。それらのペプチドの m/z 値が得られるが、その値の差がアミノ酸1残基の質量に対応しているので、アミノ酸配列がわかる。この方法は測定とデータ解析に時間がかかるが、データベースが充実していない生物種において、他生物種のデータベースからホモロジー検索によってタンパク質の推定ができるメ

図 2 ラット肝臓星細胞のプロテオーム
星細胞の二次元電気泳動像を示した。左の電気泳動像は健康なラットの肝臓より単離された非活性星細胞である。中央は四塩化炭素の投与により線維化を起こしたラットの肝臓より単離された活性化星細胞、右は長期培養により自然に活性化した星細胞である。タンパク質の発現量を二次元電気泳動像解析ソフトウェア Melanie 3 によって解析し、その中から 42 個の発現量の異なるタンパク質を同定した。

リットがある。

プロテオームデータベースの構築

同定されたタンパク質の情報は、二次元電気泳動像のスポットにリンクさせる形でデータベース化することが必要になる。これによって、ほかの研究者が容易に彼らの実験データとデータベースを比較することができる。それによってアプローチの異なる研究結果から、新たな発見が生まれる可能性が出てくる。データベース作成に際しての指針がインターネット上に公開されているので参照されたい⁵⁾。

ラット肝臓星細胞のプロテオーム解析

プロテオーム解析の実地例を紹介する。プロテオーム解析は生命現象の分子機構の解明や、疾病に対する医療方法の開発、創薬のためのターゲットタンパク質の探索などに用いられている。ここではラットの肝臓星細胞を用いた肝硬変モデルのプロテオーム解析を紹介する。

肝臓を構成する細胞の一種である星細胞は、

肝臓の線維化に関係が深いことが知られている。正常の肝臓ではビタミン A 貯蔵型の非活性型細胞として存在するが、肝障害によって刺激されると活性化されて、細胞外マトリックスの生産や線維化を引き起こす因子を分泌するようになる。活性化された細胞内で起こっているタンパク質構成の変化をプロテオーム解析によって明らかにした。

図 2 はラットの正常な肝臓と、薬剤（四塩化炭素）によって肝線維化をおこしたラットの肝臓から単離された星細胞と、長期間培養することによって自然に活性化された星細胞のタンパク質地図である。これらのタンパク質地図を比較してみると、非活性星細胞と活性化星細胞とで発現量の異なるタンパク質 42 種が特定された⁶⁾。これらのなかにはコラーゲン (type I/III)、コラーゲナーゼ (type IV)、セリンプロテアーゼのように、細胞外マトリックスやタンパク質分解活性にかかわるタンパク質が含まれており、これらの発現は増加している。また発現の減少が見られるのは alpha-1-antiproteinase, stromelysin-1, セリンプロテアーゼインヒビター 3 であった。これらの結果は、活性化星細胞

は細胞外マトリックスの再構築に関与しているという考えを支持している。また galectin-1, calcyclin, および calgizzarin は細胞の増殖に関与する因子であるが、星細胞の活性化に伴って発現が増加している。これらのタンパク質は分泌タンパク質であることから、肝障害における肝臓の細胞増殖を調節していることが示唆される。

また、活性化星細胞に特異的に発現するタンパク質をコードする新規遺伝子のクローニングに成功した。このタンパク質は STAP (Stellate Cell Activation-associated Protein) と名づけられた⁷⁾。STAP 遺伝子は 591 塩基からなり、197 個のアミノ酸をもつ 21 kDa のタンパク質をコードしている。STAP とミオグロビンの間には 30% のアミノ酸配列の相同性がある。STAP は肝臓においては星細胞にのみ発現していた (図 3)。また、STAP はヘム結合部位を持ち、ペルオキシダーゼ活性を持つことがわかった。これは過酸化脂質が肝臓の線維化を促進するという生化学的知見から考えると、STAP は過酸化脂質を還元することによって肝臓の線維化に拮抗しているのではないかと推測される。今後この STAP を研究することによって、肝臓の線維化機構の解明や肝硬変の臨床診断への応用が期待される。

おわりに

ヒトの遺伝子の総数は約 3 万だと推定されている。これはヒトを構成しているタンパク質の種類が十萬前後とされていることから考えると、驚くほど少ない数である。これは、一つの遺伝子が多数のタンパク質を生み出すと考えることができる。生命現象の実際の担い手であるタンパク質を直接に解析することによって、遺伝子の転写解析では充分には知りえない、生命の本質によりせまる情報を手に入れることができるだろう。

図 3 肝臓での STAP の発現

ラットの肝臓における STAP の発現を確認した。矢印で示される位置が STAP の二次元電気泳動像における座標である。星細胞においてのみ発現しており、線維化によって発現が増加している。

文 献

- 1) Lander ES, Linton LM, Birren B, et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921, 2001.
- 2) Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al.: The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351, 2001.
- 3) O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**: 4007-4021, 1975.
- 4) Rabilloud T: Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**: 758-760, 1998.
- 5) Guidelines for building a federated 2-DE database. (<http://www.expasy.ch/ch2d/fed-rules.html>)
- 6) Kristensen DB, Kawada N, Imamura K, Miyamoto Y, Tatenos C, Seki S, Kuroki T, Yoshizato K: Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **32**: 268-277, 2000.
- 7) Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, Yoshizato K: Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* **276**: 25318-25323, 2001.