NOTE

プロテオーム基本技術—インゲル消化法—

Standard Techniques in Proteomics —In-gel Digestion—

和 田 芳 直*
Yoshinao WADA

(Received September 6, 2001; Accepted September 19, 2001)

The “in-gel” digestion followed by peptide mass fingerprint is an innovative method of identifying the proteins separated by one- or two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. It is now widely used in various applications in proteomics, e.g., differential display of proteins in specific biological conditions, or exhaustive identification of the components that physically interact in a protein complex. In this NOTE, the standard procedures including silver-staining and in-gel digestion are described, and the peptides derived from skin keratins that are often mixed in the process are listed.

アクリルアミドゲル電気泳動で一次元 (1D) あるいは二次元 (2D) に展開したタンパク質をいわゆるインゲル消化 in-gel digestion によってペプチドに分解し、質量分析によって得たペプチド質量をもとにデータベース検索を行い、もとのタンパク質を同定する手法 peptide mass fingerprinting は質量分析関連のプロテオーム技術の中で最も基本的なものである。ポストゲノム時代を象徴するこの手法の威力は質量分析の専門家以外にも広く知られるようになり、質量分析にかかわる者は共同研究や助言を求められることが多い。

この方法のプロトコールは多くの実験書やホームページにも掲載されているが、ここに標準と思われる方法について、インゲル消化の部分を重点的に、その他の部分についてはポイントのみを筆者の経験を加えて示す。なお、染色とインゲル消化の部分はおおむね Shevchenko らの論文¹⁾を踏襲している。

分析の全体は次のような段階から構成されている。

- (1) 試料調製からアクリルアミドゲル電気泳動
- (2) 染色
- (3) インゲル消化 (バンドあるいはスポットの切り出しからペプチドの溶出・濃縮・脱塩)
- (4) 質量分析
- (5) データベース検索

(1) 試料調製からアクリルアミドゲル電気泳動

1D は通常の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE), 2D については一次元目に Immobiline dry strip を用い二次元目に SDS-PAGE を行うのが主流であ

る。後者は若干の熟練を要するが、柿谷の記述²⁾は親切である。さらに、Immobiline dry strip を供給する Amersham Pharmacia Biotech のマニュアル “2-D Electrophoresis” にはトラブルシューティングが詳細に記載されており (<http://www.electrophoresis.apbiotech.com/> では英語であるが、同じ内容を閲覧できる)、うまくいかない場合には是非とも熟読されたい。

(a) 1D と 2D の違い 2D は 1D の単純な二次元展開版ではないので、違いに注意して使い分けことが肝要である。すなわち、1D では難溶試料をイオン性の界面活性剤によって強引に可溶化できる場合が多いが、2D では一次元目の等電点電気泳動に使用できる可溶化剤に限られており、試料成分の一部しか分析できないと考えておいた方がよい。また、二次元目の前の還元アルキル化やゲル平衡化の段階で試料が一部失われる可能性もある。したがって、試料に含まれるタンパク質成分数がそれほど多くない場合にはあえて 2D にこだわる必要はない。2D のための試料可溶化には我々は通常 CHAPS を使用している。

泳動に使用するゲル板などは使用前に十分に洗剤により洗浄しておくこと。

(b) 試料作製 分析試料容量は、1D ではウェルサイズにもよるが 20 μ L 程度まで、2D では dry strip のサイズによって異なるが 100 μ L 程度までである。塩濃度については 1D では 0.2 M 以下、2D では 50 mM 以下が望ましい。高濃度の塩に溶解している場合や試料量が多くて濃縮の必要がある場合には我々はアセトン沈殿³⁾を行っている。

* 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 (〒594-1101 和泉市室堂町 840)

Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health (840 Murodo-cho, Izumi, Osaka 594-1101, Japan)

³⁾ アセトン沈殿: 試料溶液に対して 4 倍容量のアセトンを加え混和。-80°C で 30 分以上冷却放置した後、12,000 g 以上、4°C で 30 分以上遠沈。上清を注意深く捨て、残ったアセトンを乾燥により除去し、ベレットを試料溶解液に溶解する。

(2) 染色

ここでは標準的な銀染色法について記述する。通常の銀染色法と異なる点は、染色前にグルタルアルデヒドによる固定を行わないことと、銀濃度が比較的低いことである。ヘッドキャップと手袋を装着して作業し、使用する葉匙は200℃以上で焼いたものを使用する。泳動後のゲルを適当なバットに入れ、次の手順で染色を行う。

1. 50% メタノール/5% 酢酸で20分間振とう〔固定〕
2. 50% メタノールで10分間振とう
3. 水で10分間振とう（酸を除く）
4. 0.2% チオ硫酸ナトリウム（作り置き可）で3分間振とう〔増感〕
5. 水で軽く2回洗浄。（洗いすぎるとバンド/スポットが薄くなるので素早く数秒間で行うことが必要）
6. 1% 硝酸銀（4℃ 1カ月保存可）で20分間振とう（使用後は過剰量の塩化ナトリウムを加えて塩化銀として保管し、適切に廃棄する）
7. 水で軽く2回洗浄
8. 35% ホルムアルデヒド（ホルマリンのこと）を2% 炭酸ナトリウム（用時調製）で2,000倍に希釈した現像液中で激しく振とう〔現像〕。すぐに現像液が黄色になるので、新しい現像液を手元に用意しておいて手早く交換すること。現像は透明の液中で行うこと。
9. 現像が終わったら、5% 酢酸でゲルを5分間洗浄（バンドがうすくなるなら途中で止める）
10. 1% 酢酸4℃で保存

追加事項：二次元電気泳動でマルチプルスポットを形成する糖タンパク質と免疫グロブリンの泳動パターンの特徴について

糖タンパク質はアミノ酸一次構造が同じであるにもかかわらずマルチプルにスポットを形成する。糖タンパク質では、糖鎖末端に付加するシアル酸の数の違いによって等電点の異なるアイソフォームが個別のスポットを形成するが、糖鎖分の質量増加にSDS-PAGE移動度に対する荷電の影響が加わってスポットは斜めに並ぶ。一方、免疫グロブリンも糖タンパク質であるが、付加する糖鎖の本数が少なく、むしろアミノ酸一次配列の異なる可変領域によってマルチプルスポットを形成する。この場合、SDS-PAGEで検出されるほど大きな質量差がないため、スポットはほぼ平行に並ぶ。

(3) インゲル消化（バンド/スポットの切り出しからペプチドの溶出・濃縮・脱塩）

染色後すぐに以下の操作を行うにこしたことはないが、100 ng 程度以上のタンパク量があれば、1カ月程度保管したゲルでも使用に耐える。

切り出しにはナイフやメスを用いる。2Dのスポットに対してはピペットチップの先を適当な内径になるようにカットしたものをゲルに突きあててスポットを吸い取るこ

ともできる。対照としてタンパク質のない部分から同様に切り出して以下の操作を行う。

2Dで二次元目に入る前に還元アルキル化を行った場合はステップ6から開始する。

サンプルチューブおよびペプチド溶液を扱うピペットチップはシリコナイズしたものを用いる。

1. ゲルを切り出して数片にカットするか刻みを入れ、アセトニトリル300 μLを加えて30分間ミキサーで振とう〔脱水〕
2. アセトニトリルを捨ててサンプルチューブの口をパラフィルムで覆い、針で穴をあけたのち、15分間真空乾燥（時間は真空度によるが、十分に乾燥することが必要）
3. 100 μLの10 mM ジチオスレイトール（DTT）/100 mM 重炭酸アンモニウム溶液で56℃ 1時間インキュベート〔還元〕
4. 室温に冷やした後に上のDTT溶液を捨てて、同量の55 mM ヨードアセトアミド100 mM 重炭酸アンモニウムに置換して、45分間暗所で時々振とう〔アルキル化(carbamidomethylation)〕
5. ゲル片に100 μLの100 mM 重炭酸アンモニウムを加え、10分間振とう〔洗浄〕
6. アセトニトリル300 μLに置換して15分振とう〔脱水〕
7. 100 μLの100 mM 重炭酸アンモニウムに置換して振とう15分〔膨潤〕
8. 再びアセトニトリル300 μLに置換して15分振とう
9. 液を捨てて、真空乾燥15分
10. 水中で50 mM 重炭酸アンモニウム（100 mMだとカルシウム不溶）、5 mM 塩化カルシウムに溶かした10 μg/mLのトリプシン溶液100 μLを加え、静置してゲルを45分間膨潤^{*2}
11. トリプシン溶液を除き10 μLの同上バッファー（トリプシンなし）を加えて、37℃ 終夜インキュベート
12. 5% ギ酸50 μLを加え、1時間振とう〔ペプチドの溶出〕
13. 遠心後に上清をチューブに集め、残ったゲル片にさらに5% ギ酸50 μLを加えて1時間振とう
14. 2回分の上清を合わせ、必要に応じてスピードバックなどにより濃縮（乾燥によって著しく回収率が落ちるので、乾燥させないこと。）
15. ziptip C18（ミリポア）やPOROS Tip R2（アプライドバイオシステムズ）のような逆相樹脂を用いた微量用脱塩器具で脱塩して、7 μL程度の0.1% TFA/50% MeCNで溶出（7 μLを3回に分けて溶出）

^{*2} この段階はトリプシンをゲル内に浸透させることが目的であり、この後でトリプシン溶液を除き、ゲル内（とゲル表面）に入ったトリプシンで以後の消化を行う。これが「インゲル消化 (in-gel digestion)」の意味である。

Table 1. Contaminating Peptides Derived from Human Keratins

[M+H] ⁺	Type	Sequence
807.4001	Cytokeratin 10	LAADDFR
832.4892	Cytokeratin 1	SISISVAR
847.4525	Cytokeratin 10	SEITELR
960.5002	Cytokeratin 13	SLLEGQDAK
973.5318	Cytokeratin 1	IEISELNR
1003.5536	Cytokeratin 10	SEITELRR
1007.5162	Cytokeratin 13	YENELALR
1033.5166	Cytokeratin 1	TLLEGEESR
1037.5267	Cytokeratin 2E	YLDGLTAER
1042.5897	Cytokeratin 13	VILEIDNAR
1060.4733	Cytokeratin 13	KNHEEEMK (Met-ox)
1064.6104	Cytokeratin 10	LASYLDKVR
1082.5999	Cytokeratin 2E	FASFDKVR
1090.5315	Cytokeratin 10	VTMQNLNDR (Cys-am)
1104.5472	Cytokeratin 13	ITMQNLNDR
1107.5435	Cytokeratin 2E	AQYEEIAQR
1109.4904	Cytokeratin 10	DAEAWFNEK
1118.5091	Cytokeratin 10	HGNSHQGEPR
1142.4788	Cytokeratin 13	EQYEAMAER (Met-ox)
1157.5149	Cytokeratin 1	DYQELMNTK (Met-ox)
1165.5853	Cytokeratin 10	LENEIQTYR
1179.6010	Cytokeratin 1	YEELQITAGR
1193.6166	Cytokeratin 2E	YEELQVTVGR
1193.6279	Cytokeratin 2E	RYLDGLTAER
1201.6905	Cytokeratin 1	LRSEIDNVKK
1217.6166	Cytokeratin 1	FVSTTYSQVTR
1234.6796	Cytokeratin 10	LKYENEVALR
1254.6079	Cytokeratin 2E	GFSSGSASVSGGSR
1265.6378	Cytokeratin 1	TNAENEFVTIK
1300.5302	Cytokeratin 1	NMQDMVEDYR
1301.6589	Cytokeratin 13	ALEEANADLEVK
1308.6548	Cytokeratin 1	NKYEDEINKR
1320.6721	Cytokeratin 8	SLDMDSIIAEVK
1329.6399	Cytokeratin 2E	NVQDAIADAEQR
1329.7266	Cytokeratin 2E	NLDLDSIIAEVK
1340.6923	Cytokeratin 10	QSVEADINGLRR (pyroGlu)
1357.7188	Cytokeratin 10	QSVEADINGLRR
1365.6399	Cytokeratin 10	SQYEQLAEQNR
1373.6549	Cytokeratin 10	QSLEASLAETEGR (pyroGlu)
1383.6909	Cytokeratin 1	SLNNQFASFIDK
1383.6909	Cytokeratin 1	SLNNQFASFIDK
1390.6814	Cytokeratin 10	QSLEASLAETEGR
1465.7069	Cytokeratin 8	TEISEMNRNISR (Met-ox)
1475.6987	Cytokeratin 8	LESGMQNMSIHTK
1475.7494	Cytokeratin 1	WELLQQVDTSTR
1475.7858	Cytokeratin 1	FLEQQNQVLQTK
1493.7348	Cytokeratin 10	SQYEQLAEQNRK
1638.8604	Cytokeratin 1	SLNNQFASFIDKVR
1657.7934	Cytokeratin 1	SGGGFSSGSAGIINYQR
1699.8251	Cytokeratin 1	QISNLQQSISDAEQR
1707.7727	Cytokeratin 10	GSLGGGFSSGGFSGGSFSR
1716.8517	Cytokeratin 1	QISNLQQSISDAEQR
1774.8400	Cytokeratin 13	DAEEWFHAKSAELNK
1993.9772	Cytokeratin 1	THNLEPYFESFINNLR

Origin

Cytokeratin 1: (P04264) KERATIN, TYPE II CYTOSKELETAL 1 (CYTOKERATIN 1) (K1) (CK 1) (67KDA CYTOKERATIN) (HAIR ALPHA PROTEIN)

Cytokeratin 2E: (P35908) KERATIN, TYPE II CYTOSKELETAL 2 EPIDERMAL (CYTOKERATIN 2E) (K2E) (CK 2E)

Cytokeratin 8: (P05787) KERATIN, TYPE II CYTOSKELETAL 8 (CYTOKERATIN 8) (K8) (CK 8)

Cytokeratin 10: (P13645) KERATIN, TYPE I CYTOSKELETAL 10 (CYTOKERATIN 10) (K10) (CK10)

Cytokeratin 13: (P13646) KERATIN, TYPE I CYTOSKELETAL 13 (CYTOKERATIN 13) (K13) (CK13)

Table 2. Peptides from Bovine Trypsin Autolysis

[M+H] ⁺	Sequence
1020.5036	APILSDSSCK
1111.5610	VCNYVSWIK
1153.5741	SSGTSYPDVLK
1364.6917	CLKAPILSDSSCK
1433.7211	LQGIVSWGSGCAQK
2163.0570	LGEDNINVVEGNEQFISASK
2273.1600	SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK
2289.1549	SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK (Met-ox)

16. 必要であれば、弱い陰圧で濃縮し、質量分析へ

追加事項: 脱色

インゲル消化の前に脱色すればペプチドの回収率が向上するという報告³⁾がある。フェリシアン化カリウムを用いる方法は http://www.chem.arizona.edu/facilities/msf/in-gel/in-gel_SD.html に書かれているが、次の Sumner らによる方法⁴⁾はさらに簡単である。すなわち、ステップ 1 のあとで 100 mM 重炭酸アンモニウム 40 μ L に 0.4 μ L の過酸化水素水の入った溶液を添加して透明になるまで振とうする。液を捨ててステップ 2 に移る。2D などで還元アルキル化がすすんでいる場合には、ステップ 7 でこの処理を行う。

(4) 質量分析と (5) データベース検索

質量分析とデータベース検索については他書に譲る。

ペプチド質量からのタンパク質検索には MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/>), Mascot (<http://www.matrix-science.com/>), ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/>) などが使われている。いろいろと試していたきたい。

最後に、一連の操作のうちに混在するヒトケラチン由来ペプチドのリスト (Table 1) をウシ・トリプシンの自己消化ペプチド (Table 2) とともに示す。トリプシンはアルキル化されていないが、ケラチンも通常 (混入する段階によるが) 還元アルキル化されていない。これらは確かにやっかいな混在物であるが、質量校正の内部標準として重宝する場合がある。

文 献

- 1) Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann, *Anal. Chem.*, 68, 850 (1996).
- 2) 柿谷 誠, イモビラインを用いた二次元電気泳動法, 無敵のバイオテクニカルシリーズ改訂タンパク質実験ノート (下) 分離同定から一次構造の決定まで (岡田雅人, 宮崎香編), 羊土社 (1999), pp. 97-103.
- 3) F. Gharahdaghi, C. R. Weinberg, D. A. Meagher, B. S. Imai, and S. M. Mische, *Electrophoresis*, 20, 601 (1999).
- 4) L. W. Sumner, S. White, B. Wolf-Sumner, and V. S. Asirvatham, 49th ASMS Conference (2001), abstract ThPF 137.

Keywords: In-gel digestion, Electrophoresis, Peptide mass fingerprint, Silver stain