REGULAR PAPER

質量分析計によるタンパク質分子の多様性解析
—肝細胞癌グルタミン合成酵素の翻訳後修飾—Mass Spectrometric Study of Protein Molecular Diversity
—Posttranslational Modification of Liver Glutamine
Synthetase in Hepatoma—藏満保宏^{*a)}・戸田年総^{b)}・岡 正朗^{c)}・沖田 極^{d)}・中村和行^{a), e)}Yasuhiro KURAMITSU, Toshifusa TODA, Masaaki OKA,
Kiwamu OKITA, and Kazuyuki NAKAMURA

(Received May 27, 2003; Accepted July 30, 2003)

Mass spectrometric analysis of molecular diversity of human liver glutamine synthetase (GS) is described. An acidic isoform of GS, which is highly expressed in human well-differentiated hepatocellular carcinoma, and that caused by posttranslational modification of protein phosphorylation which was determined by post source decay (PSD) analysis using matrix assisted laser deionization/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The peptide mass fingerprinting (PMF) of tryptic peptides of the GS isoform showed a loss of the signal of 899.5 Da corresponding a peptide of SASIRIPR and a gain of the signal of 1,059.5 Da which was submitted to PSD analysis. The PSD analysis showed the neutral loss by elimination of two phosphate groups which were supposed to be on serine residues of 899.5 Da peptide from serine 320 to arginine 327 in GS. The PMF followed by PSD analysis is useful for the determination of phosphorylation site(s) of proteins showing molecular heterogeneity.

1. 緒 言

ヒトゲノムを構成するすべての遺伝子の解読が 2003 年

(4 月現在で 99%の解読率)に完了し (http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/project/50yr.html), 人類の夢である「生命システムの解明」の実現に大きな一歩を踏み出した。「生命システムの解明」にはゲノムを構成するすべての遺伝子からつくられるタンパク質群(プロテオーム)が「いつ、どこで、どれほど」機能するかを明らかにすること(プロテオミクス)が必要である。そのためには遺伝子の構造や遺伝子発現の情報からタンパク質の構造や量を予想するだけでなく、実際に細胞を構成するタンパク質を網羅的に解析し、時系列でタンパク質の量や細胞内局在と機能の変化を解析することが必須となる。現在、ゲノムを構成する遺伝子の種類は 30,000 から 35,000 種類と予想されているが、実際に個々のタンパク質が本来の機能を発揮するためには遺伝子再配列や転写後修飾さらにはリン酸化などの翻訳後の修飾によって多様性を示すことになり、その種類は 10 万種類を超えると予想される。細胞を構成する微量の多様化したタンパク質群の構造と機能との連関を網羅的に解析するには、2 次元電気泳動やクロマトグラフィーと質量分析計を複合させたタンパク質分析法は有用である。MALDI-TOF/MS^{1), 2)} による peptide mass fingerprinting (PMF) は、2 次元電気泳動法で微量の細胞構成タンパク質群を網羅的に分離した後にゲノム情報を用いて簡便に同定でき、さらに MALDI-post-source decay (PSD) フラグメント法によりアミノ酸

*a) 山口大学医学部分子医科学講座・生化学教室 (☎755-8505 宇部市南小串 1-1-1)

Department of Biochemistry and Biomolecular Recognition, Yamaguchi University School of Medicine (Minami-kogushi 1-1-1, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan)

b) 東京都老人総合研究所 (☎173-0015 東京都板橋区栄町 35-2)

Proteome Research Center, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology (Sakaemati 35-2, Itabashi, Tokyo 173-0015, Japan)

c) 山口大学医学部先端分子応用医科学講座・消化器外科 (☎755-8505 宇部市南小串 1-1-1)

Department of Gastro-intestinal Surgery and Advanced Molecular Applied Medicine, Yamaguchi University School of Medicine (Minami-kogushi 1-1-1, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan)

d) 山口大学医学部先端分子応用医科学講座・消化器内科 (☎755-8505 宇部市南小串 1-1-1)

Department of Gastro-intestinal Medicine and Advanced Molecular Applied Medicine, Yamaguchi University School of Medicine (Minami-kogushi 1-1-1, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan)

e) 山口大学医学部附属実験実習機器センター (☎755-8505 宇部市南小串 1-1-1)

Central Laboratory for Biomedical Research and Education (Minami-kogushi 1-1-1, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan)

配列の決定や翻訳後修飾部位の同定が容易となっている。^{3), 4)}

今回、ヒト肝臓プロテオーム計画の一環としてヒト肝細胞癌に高発現するタンパク質群の解析を行ったところ、その候補としてグルタミン合成酵素 (GS) が同定されるとともに、GS が分子多様性を示したことから翻訳後修飾の種類と修飾部位を明らかにする目的で PMF における PSD 分析を行った結果を報告する。

2. 実験

2.1 試料調製

山口大学医学部附属病院において 1998 年から 2000 年にかけて、医学部臨床研究審査委員会の承認を得て十分な研究説明を行った後に同意の得られた患者のうち C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染後 (B 型肝炎ウイルス非感染) に肝細胞癌を発症した患者に肝部分切除術を施行して得られた肝細胞癌の癌部と非癌部組織を試料とした。切除した肝臓組織は、直ちに液体窒素中で凍結し、 -80°C で保存した。肝臓組織は、10% NP-40, 1 mM sodium vanadate, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 10 mM EDTA, 165 mM NaCl, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5 中で 4°C , 1 時間ホモジナイズして、 $15,000\times g$ で 30 分間遠心後、その上清を 2 次元電気泳動用の試料とした。試料のタンパク質濃度は Lowry 法で決定した⁵⁾。

2.2 2 次元電気泳動 (Two-dimensional gel electrophoresis: 2DE)

試料は、8 M 尿素, 2% CHAPS, 2.8 mg/mL dithiothreitol (DTT) を含む 0.5% Immobiline polyacrylamide gel (IPG) を緩衝液中で調製し、タンパク質量 300 μg を含む試料液 125 μL を IPG ストリップ (pH 3.0~10, 長さ 7 cm, Amersham Bioscience, 東京) に添加して IPG を 4°C で 14 時間膨潤させた。膨潤した IPG ストリップを、等電点電気泳動装置 (IPGPhor, Amersham Bioscience, 東京) にセットして、500 V で 1 時間, 1,000 V で 1 時間, さらに 8,000 V で 2 時間通電した。泳動終了後、IPG ストリップを 6 M 尿素, 30% グリセロール, 2% SDS を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液中で 2 回それぞれ 10 分間平衡化した。

最初の平衡化には DTT を加え、2 回目には iodoacetamide を加えた。平衡化した IPG ストリップは、12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル (24.5 cm $\times$ 11 cm) を用いた水平式 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置 (Multiphor II, Amersham Bioscience, 東京) にセットして、15 mA/gel の定常電流で約 100 分間通電した。泳動終了後、ゲル中のタンパク質スポットは 30% メタノール, 10% 酢酸, 0.1% Coomassie Brilliant Blue (CBB) R250 溶液中で 1 晩染色した。その後、30% メタノール, 10% 酢酸中で 30 分間、さらに 7% 酢酸中でゲルの背景がなくなるまで脱色した。2 次元電気泳動ゲル中のタンパク質スポットは 2 次元画像解析ソフト (PDQUEST version 5.1, d3, TOYOBO, 大阪) で解析した。癌部と非癌部の組織で

異なる染色強度を示すタンパク質スポットについては、該当するスポットをゲルから切り出し質量分析に供した。

2.3 質量分析 (MALDI-TOF/MS)

2.3.1 ゲル内消化 (in-gel digestion) 切り出されたタンパク質スポットゲルを 50 mM 重炭酸アンモニウムと 5 mM DTT を含む 60% メタノールで 15 分間 2 度洗浄した後、50 mM 重炭酸アンモニウムと 5 mM DTT を含む 50% アセトニトリルで CBB 色素を除いた。脱色されたゲルは 100% アセトニトリル中で脱水した後に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度にトリプシン (シーケンス用, Promega V5111) を加えた 50 mM 重炭酸アンモニウムと 5 mM DTT を含む 30% アセトニトリル中で 30°C , 一晩再膨潤しながら、ゲル内のタンパク質を消化した。

2.3.2 ペプチドマスフィンガープリンティング (peptide mass fingerprinting: PMF) ゲル内消化した後に、消化液 1 μL を採取して 1 μL のマトリックス液 (10 mg/mL α -cyano-4-hydroxycinnamic acid を含む 50% アセトニトリル, 40% メタノール, 0.1% trifluoroacetic acid 溶液) を混合して MALDI ターゲットプレート上に滴下した。

MALDI-TOF/MS による PMF および PSD 分析は、AXIMA-CFR ((株)島津製作所, 京都) を用いて行った。タンパク質の同定は、ProteinProspector web site (<http://prospector.ucsf.edu/>) の MS-Fit データベース検索によって行った。

3. 結果と考察

C 型肝炎ウイルスに感染した後に発症した肝細胞癌の 21 例について癌部と非癌部組織から得たタンパク質の 2DE 解析を行ったところ、分化型肝細胞癌の癌部で高率に濃染される分子量 42,000 の等電点 (pI) が異なるタンパク質スポット群が認められた (Fig. 1a)。これらのタンパク質スポットについて MALDI-TOF/MS による PMF 解析を行ったところ、Fig. 1b に示す MS スペクトルを得た。この MS スペクトルから ProteinProspector web site の MS-Fit でデータベース検索したところ、グルタミン合成酵素 (Glutamine synthetase: GS) と同定された (Table 1)。この MS スペクトルを詳細に比較検討したところ、最も pI の低い GS スポットの 899.5 Da のシグナルが完全に消失し (Fig. 1c)、逆に 1,059.5 Da に弱いシグナルが出現していた (Fig. 1d)。この 1,059.5 Da を標的にして post-source decay (PSD) 分析したところ、Fig. 1e に示すように質量が 160 減少するシグナルが認められた。899.5 Da のシグナルに対応する GS のトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列は、320 番目のセリン残基から 327 番目のアルギニン残基に対応する SASIRIPR と同定されたことから、このペプチドに 2 個のセリン残基が含まれており、この二つのセリン残基がリン酸化されることによって 1,059.5 Da のシグナルが出現すると予想された。さらに、PSD 分析の結果 neutral loss elimination による 160 の質量減少が示され、320 番目と 322 番目の二つのセリン残基がリン

Fig. 1a. 2-DE patterns of intracellular proteins of cancerous and non-cancerous tissues in well-differentiated HCC tissues from the patients infected with HCV. The left shows cancerous tissue and the right shows non-cancerous tissue. In the square arrows indicate strongly stained three protein spots of M_r 42,000 and pI 6.4–6.8.

Fig. 1b. Peptide mass fingerprinting (PMF) by MALDI-TOF/MS. The strongly stained three protein spots shown in Fig. 1 were cut out and in-gel digested with trypsin. After digestion the samples were analyzed by MALDI-TOF/MS. MS spectra of PMF in the spot of the center of three spots (pI 6.6) is shown.

酸化されることが強く示唆された。今後、癌部組織から得られたタンパク質試料を λ ホスファターゼで処理することによって目的のGSスポットが2DE解析で pI は上昇するか否かなどを検討する必要がある。

今回、2次元電気泳動法により明らかにされた分化型ヒト肝細胞癌に高発現するGSは分子多様性を示し、そのMALDI-TOF/MSによるPMF解析とPSD分析から320番目のセリン残基と322番目のセリン残基がリン酸化されることによって分子多様性が生じることが示唆された。

最近、肝細胞癌で高発現するGSがユビキチン化されて分子多様性を示すことが報告され、抗ユビキチン抗体を用いたイムノプロット染色で二つのスポットが陽性となっているが⁶⁾、リン酸化については未だ報告がない。今回の2DE解析では少なくとも三つのGSスポットが検出され、我々も抗ユビキチン抗体によるイムノプロット染色を試みている。Retinoid X receptorが肝細胞癌でリン酸化されることによりユビキチン化されることが抑制されてプロテアソームを介したタンパク質分解速度が低下することも報告

Fig. 1c. The comparison of MS spectra in low molecular weight area of PMF. The spectra of GS spot were shown. The spectra in upper side correspond to the most basic spot, and they in lower side correspond to the most acidic spot. The spectra in lower side lost the signal of 899.5 Da. From MS-Fit data base this signal was identified as SASIRIPR corresponds to the amino acids from the Ser 320 to the Arg 327.

Fig. 1d. The comparison of MS spectra of PMF. The spectra of GS spot were shown. The spectra in upper side correspond to the most basic spot, and they in lower side correspond to the most acidic spot. The spectra in the lower side gained the faint signal of 1,060.5 Da. This signal was gated.

されている⁷⁾が、分化型肝細胞癌の癌部でのGSの増加については、トランスクリプトーム解析でGS遺伝子の発現は著名な増加が認められないことから⁸⁾、GSのタンパク質分解速度の低下が考えられる。一方、肝癌細胞ではGS酵素活性が著名に低下するとの報告もあり⁹⁾、ユビキチン化やリン酸化によるGSの酵素活性の変化について検討が必要である。

ヒトGSは、遺伝子解析から373個のアミノ酸からなる分子量42,065、pI 6.4のタンパク質と報告されているが¹⁰⁾、N末端のメチオニン残基がとれた新たなN末端部はアセチル化され、メチオニン残基が酸化修飾されることも考えられる。大腸菌GSでは全メチオニン残基の半数が酸化されてメチオニンスルホキドとなるが、酵素活性には大きな影響がないとの報告もある¹¹⁾。一方で、癌化や老化

Fig. 1e. MS spectra in post-source decay (PSD). PSD analysis was performed using 1,060.5 Da signal as a parent ion. The signal of 899.5 Da, decreasing molecular weight of 160 by neutral loss elimination, was detected.

Table 1. The Result of Peptide Mass Fingerprinting (PMF) for the Spot (M_r 42,000/ pI 6.6)

Start-end residues	Expected mass (Da)	Measured mass (Da)	Sequence
107-104	956.5278	956.3200	RPAETNLR
174-181	1002.5009	1002.2900	DIVEAHYR
280-286	1009.5444	1009.3400	RHQYHIR
260-268	1047.5257	1047.3500	AMREENGLK
1-11	1087.5384	1087.3200	TTSASSHLNK
15-25	1279.6356	1279.4300	QVYMSLPQGEK
96-106	1440.7673	1440.5600	LVLCEVFKYNR
170-181	1449.7239	1449.5200	AYGRDIVEAHYR
26-41	1808.9005	1808.6100	VQAMYIWIDGTGEGLR
358-373	1928.8700	1928.5200	TCLLNETGDEPFQYKN
341-357	1932.9602	1932.6000	RPSANCDPFSVTEALIR
300-319	2150.0267	2149.6500	LTGFHETSNINDFSAGVANR
299-319	2306.1278	2305.7500	RLTGFHETSNINDFSAGVANR

において酸化ストレスを受けた細胞にメチオニンスルホキシド還元酵素が高発現することも報告されている¹²⁾。2DEで分離された三つのGSタンパク質スポットのPMF解析では、ほとんどのメチオニンが酸化されて、メチオニンスルホキシドになることが示唆されたことから、2DEの分離中にタンパク質内部のメチオニン残基の酸化修飾はDTTなどの還元剤の添加では防げないと考えられ、MSに供する前のタンパク質の分離段階でメチオニンの修飾を防ぐ方法を開発する必要がある。

文 献

- 1) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, S. Yoshida, and T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
- 2) M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
- 3) R. Kaufmann, D. Kirsch, and B. Spengler, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **131**, 355 (1994).
- 4) R. Kaufmann, *J. Biotechnol.*, **41**, 155 (1995).
- 5) U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 6) T. Osada, M. Sakamoto, H. Nagawa, J. Yamamoto, Y. Matsuno, A. Iwamatsu, T. Muto, and S. Hirohashi, *Cancer*, **85**, 819 (1999).
- 7) S. Adachi, M. Okuno, R. Matsushima-Nishiwaki, Y. Takano, S. Kojima, S. L. Friedman, H. Moriwaki, and Y. Okano, *Hepatology*, **35**, 332 (2002).
- 8) N. Iizuka, M. Oka, H. Yamada-Okabe, M. Nishida, Y. Maeda, N. Mori, T. Takano, T. Tamesa, A. Tangoku, H. Tabuchi, K. Hamada, H. Nakayama, H. Ishitsuka, T. Miyamoto, A. Hirabayashi, S. Uchimura, and Y. Hamamoto, *Lancet*, **361**, 1 (2003).
- 9) T. Matsuno and H. Hirai, *Biochem. Int.*, **19**, 219 (1989).
- 10) C. S. Gibbs, K. E. Campbell, and R. H. Wilson, *Nucl. Acid Res.*, **15**, 6923 (1987).
- 11) R. L. Levine, L. Mosoni, B. S. Berlett, and E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 15036 (1996).
- 12) S. Jung, A. Hansel, H. Kasperczyk, T. Hoshi, and S. H. Heinemann, *FEBS Lett.*, **527**, 91 (2002).

Keywords: Proteome, Hepatitis C virus (HCV), Hepatocellular carcinoma (HCC), Glutamine synthetase (GS)