〔特集：最新の電気泳動技術〕

蛍光二次元電気泳動法を用いたがんのバイオマーカー開発

近藤 格

国立がん研究センター研究所創薬プロテオーム研究分野

Cancer biomarker study using two-dimensional difference gel electrophoresis

Tadashi Kondo

E-mail: takondo@ncc.go.jp

(受付 2014 年 6 月 13 日, 受理 2014 年 6 月 20 日)

はじめに

がんの臨床では個別化医療のためのバイオマーカーが必要とされている。がんは多様性に富んだ疾患であり、同一の臨床病期に診断される症例であっても治療への応答性は様々である。がんの分子背景の理解に基づき、多種多様な治療法が開発されている。一方、どの症例にどの治療法が有効かを治療前にみきわめる手段はごく一部の治療法にしか開発されていない。がんの多様性の克服と個別化医療の実現を目指して、我々はがんのバイオマーカーの開発を行っている。

がんはゲノムに発生した異常が原因で発生し、進展する疾患である。プロテオームはゲノムの機能的な翻訳産物であることから、バイオマーカー開発の恰好の素材であると考えている。

プロテオーム解析の手法として、我々は蛍光二次元電気泳動法を用いてきた。蛍光二次元電気泳動法は従来からある二次元電気泳動法の発展系である。二次元電気泳動法は長年にわたり医学・生物学研究で活用されてきた。多くの研究成果が二次元電気泳動法で得られてきた。一方、二次元電気泳動法に特有の技術的な困難さや限界が指摘されてきた。

過去に二次元電気泳動法は3つの大きな技術革新があった。一つ目の技術革新は、等電点電気泳動法におけるイモビライゼーションの応用である。イモビライゼーションによって等電点電気泳動法の再現性が著しく向上した。2つ目は、質量分析によるタンパク質同定である。エドマン分解によるタンパク質同定に比べ著しく少ない試料でタンパク質同定が可能になり、技術的には二次元電気泳動法で観察されるほぼすべてのスポットについてタンパク質の同定が可能になった。3つめの技術革新が、本稿で述べる蛍光二次元電気泳動法である。

我々は 2001 年から蛍光二次元電気泳動法を使い始め

図1. 蛍光二次元電気泳動法の原理。A 比較したい試料をそれぞれ異なる蛍光色素で標識し、混合し、一枚の二次元電気泳動ゲルで分離する。レーザースキャナーでスキャンすることで3つの試料の画像を得ることができる。この方法で、最大で3つの試料が一枚のゲルを用いて比較解析することができる。B 内部標準試料を用いた解析。内部標準試料をCy3、個別試料をCy5で標識する。内部標準試料は、比較解析するすべての個別試料の少量ずつを等量に混合したものを用いる。標識した試料を混合し、一枚の二次元電気泳動ゲルで分離する。この方法では個別試料の数がいくらであっても、2種類の蛍光色素しか使用しない。多数検体を用いるバイオマーカー開発では、Bのプロトコルを使用する。

た. バイオインフォマティクスの手法を蛍光二次元電気泳動法のデータに応用してバイオマーカー探索を行ったり, 超高感度の蛍光色素を用いたレーザーマイクロ大セクション技術を蛍光二次元電気泳動法で確立したり, レーザースキャナーのスキャン面積に合わせた大型の電気泳動装置を作製したりした.

本稿では蛍光二次元電気泳動法の基本的な原理について言及し, その利点と限界について述べる.

蛍光二次元電気泳動法の原理

蛍光二次元電気泳動法では, 複数のタンパク質試料を異なる蛍光色素で標識し, 混合し, 一枚のゲルを用いて二次元電気泳動法で分離する(図1). 電気泳動のゲルをレーザースキャナーでスキャンすることで, 比較したい試料に由来する二次元電気泳動の画像を得る. 比較したい試料を一つずつ異なる蛍光色素で標識することもできるし(図1A), 内部標準となる試料と個別試料をそれぞれ別の蛍光色素で標識することもできる(図1B).

蛍光二次元電気泳動法で用いられる蛍光色素はGE社より入手可能である. 標識するアミノ酸によって2種類の異なる蛍光色素がある. 一つはリシン残基を標識するCyDy DIGE Fluor minimal dye(ミニマルダイ)であり, もう一つはCyDy DIGE Fluor saturation dye(サチュレーションダイ)である. ミニマルダイには3種類の蛍光色素(Cy2, Cy3, Cy5)が市販されているが, サチュレーションダイには2種類の蛍光色素(Cy3とCy5)しか市販されていない. ミニマルダイの感度は通常の銀染色とほぼ同等であるのに対し, サチュレーションダイの感度は数10倍でありレーザーマイクロ大セクションで得られるような少数の細胞からのタンパク質でも解析が可能である. 一方, ミニマルダイで標識した試料は, MALDI TOF MA/MSを用いたタンパク質同定実験が可能であるが, サチュレーションダイで標識した試料では同定実験は著しく難しい. LC-MS/MSを用いたタンパク質同定実験はいずれの色素で標識したタンパク質でも可能である. 電気泳動のパターンは, ミニマルダイに関しては標識前後でずれないが, サチュレーションダイでは有意にずれる. そのため, サチュレーションダイを用いる場合, タンパク質の同定実験を行う際には全量を標識して分取ゲルを作製する必要がある. ミニマルダイの場合は一部の標識あるいは別の方法のゲル染色でタンパク質の同定実験が使用可能である.

蛍光二次元電気泳動法の利点

二次元電気泳動法ではゲル間のばらつきが問題になっていた. オペレータの経験や手技の問題とされることがあ

多いが, 必ずしもそうではない. 再現性よく実験するためにポイントを押さえた詳細なプロトコールが一般に普及していないことや, 適切な指導者が不足していること, なども大きな原因である. いわゆる分子生物学の興隆によって二次元電気泳動法の技術の継承がある時期, 途絶えてしまったことが遠因となっているのかもしれない. 蛍光二次元電気泳動法では比較した試料を一枚のゲルで電気泳動したり(図1A), 共通の内部標準試料をすべてのゲルに電気泳動したりすること(図1B)によってゲル間のばらつきを解消している. いずれの手法によっても, 二次元電気泳動法による実験の再現性が著しく向上した.

従来の二次元電気泳動法では銀染色やクマシーなどの色素を使ってタンパク質の検出を行っていた. これらの色素でタンパク質を検出する場合, タンパク質の発現量と測定される濃度の濃さの間に直線的な相関を得ることが困難である. すなわち, リニアなダイナミックレンジが狭い. 蛍光二次元電気泳動法ではタンパク質の発現量は蛍光シグナルとして測定される. 測定される蛍光シグナルはリニアなダイナミックレンジが広く, 定量的な比較解析が可能である.

二次元電気泳動法で観察されるタンパク質の数は, 電気泳動の分離能・泳動距離にある程度比例する. すなわち, ゲルの面積が広ければ広いほどスポットの重なりが軽減され, 観察されるタンパク質スポットの数が増加する. 従来の二次元電気泳動法でもこの事情は変わらず, 網羅性の高い解析のためにはできるだけ大きなゲルを用いた二次元電気泳動法が行われていた. しかしながら, 大きなゲルを銀染色やクマシーで染色するのはたいへんで, 染色の過程でゲルがしばしば破損していた. この問題を解決するために引っ張り強度の高いゲルを用いたり, ゲルにサポートフィルムを張り付けたりするなどの工夫が行われていた. 蛍光二次元電気泳動法では電気泳動終了後のゲルをスキャナーでスキャンするだけで画像を得る. しかも低蛍光ガラス板を用いた実験を行うことでガラス板に挟んだままでスキャンすることができる. 従って, ゲルの物理的な脆弱性はまったく問題にならない. スキャナーのスキャン面積いっぱいサイズのゲルから楽々と画像を得ることが可能である.

二次元電気泳動法の律速段階はゲルの染色だった. 電気泳動装置の台数を増やすことで並行して何枚でもゲルを使用することができるので, 電気泳動自体はハイスループットに行うことができる. しかし, 銀染色やクマシー染色は一枚一枚手作業で行われており, 多数のゲルを用いた解析は労力的に著しく困難だった. 蛍光二次元電気泳動法では前述のようにレーザースキャナーを用いた画像取得が可能であり, スキャナーの台数に応じていくらかでもハイスループットな二次元電気泳動法が可能である.

腫瘍組織を用いたプロテオーム解析ではレーザーマイクロダイセクションで目的の細胞だけを回収することが必要である。多種多様な細胞が含まれる腫瘍組織をすり潰してしまえば、再現性の高い詳細な発現解析は望めない。蛍光二次元電気泳動法で用いられるサチュレーションダイの感度はさわめて高く、わずか 3000 個の細胞からでも発現解析が可能である。

我々は蛍光二次元電気泳動法を用いたがんのバイオマーカー開発を行ってきた。蛍光二次元電気泳動法がバイオマーカー開発において優れているのは、前述の再現性、定量性、網羅性、スループット性、微量検体への対応、などにおいてバランスよく優れているからである。また、機械として電気泳動装置はまず壊れないということも、バイオマーカー開発では重要である。

蛍光二次元電気泳動法の限界

蛍光二次元電気泳動法の限界(欠点)は2つある。1つ目は観察されるタンパク質の数・種類に限りがあるということである。大型のゲルを使ってもたかだか 5000 スポットしか観察できない。フォーマットの異なるゲルを組み合わせることである程度の解決を図ることが可能である。しかしながら、転写因子や受容体のような発現量の低いタンパク質を網羅的に観察することはできない。2つ目の限界は労力である。電気泳動に関連する機器を組み立て、使用後に洗浄するという操作は、手軽な実験に慣れたオペレータにとっては著しく敷居が高い。本稿では言及しなかったが、画像解析にもかなりの忍耐力が必要である。ある程度のレベルを超えた研究への情熱が、蛍光二次元電気泳動法には要求されるようである。

文 献

Kondo T, Hirohashi S. Nat Protocols 2007;1(6):2940-2956.