〔サテライトシンポジウム：プロテオーム解析〕

二次元電気泳動法と nanoLC-nanoES/MS/MS を用いた 発現プロテオームのオンライン高感度解析システムの確立 —疾患関連蛋白質群の大規模解析・同定に向けて—

川上隆雄*・碓井史彦**・西村俊秀*

SUMMARY

We describe an integrated liquid chromatography (LC) -nanoelectrospray/tandem mass spectrometry (nanoES/MS/MS) system for identification of protein in mid atto mole amount. Peptides from enzymatic or chemical digest of protein were injected into the nanoLC column by the auto-sampler linked with the system. The peptide effluents were directly interfaced with the home-made nanoelectrospray ion source on an ion-trap (IT) mass spectrometer equipped with a nanospray capillary needle. Peptides were analyzed by MS and MS/MS. MS/MS scans, containing peptide sequence information, were subjected to the tandem mass correlation algorithm SEQUEST™ and searched against protein sequence databases to identify the authentic protein. Database search with amino acid sequencing is conclusive for protein identification. The present on-line analysis system is capable of analyzing forty samples per day, and applicable to in-gel enzymatic digests of protein stained by silver or a fluorescent dye, SYPRO™ Orange, on one- or two-dimensional polyacrylamide gel. These advantages satisfy the requirements for proteomics research, all-inclusive study of proteins expressed by a genome or tissue.

Key words: proteomics, in-gel trypsin digestion, liquid chromatography, nanoelectrospray, tandem mass spectrometry.

はじめに

ヒトをはじめとするゲノム解析計画が急速に進行しており、いくつかのモデル生物についてはその配列解析がすでに終了している。次の興味はゲノムの機能に関する研究に向けられており、現実には生体内の機能の多くを担っている蛋白質の解析が重要視されている。蛋白質のアミノ酸配列はゲノム配列上に含まれているが、その活性、細胞内の局在性や翻訳後修飾などの情報は蛋白質を直接解析しなければ

得ることができない。ゲノムから発現される全蛋白質に関するこれらの総合情報のことをプロテオーム (Proteome) と呼び^{1,2)}、その解析のための技術開発をふくめた研究全体のことはまとめてプロテオミクス (Proteomics) と総称される。現在、プロテオミクスはポストゲノムの重要な戦略として位置づけられている。

プロテオミクスにおいては、組織・細胞内で発現されている数千以上の蛋白質を分離・同定する方法の確立が重要であり、この目的のために近年主流となっているのが二次

A system for on-line highly sensitive analysis of expression proteome using nanoLC-nanoES/MS/MS and two-dimensional electrophoresis: Towards large-scale analysis and identification of disease-related proteins.

* Takao Kawakami, Toshihide Nishimura; グラクソ・ウエルカム株式会社筑波研究所研究本部基幹技術研究部プロテオミクス課

** Fumihiko Usui; エーエムアール株式会社分析機器事業部

Correspondence address: Toshihide Nishimura, Proteomics Unit, Core Technology Department, Research Division, Glaxo Wellcome K. K. Tsukuba Research Laboratories, 43 Wadai, Tsukuba 300-4247, Japan.

略号一覧: 二次元電気泳動法 two-dimensional electrophoresis, 2-DE; ドデシル硫酸ナトリウム sodium dodecylsulfate, SDS; ポリアクリルアミドゲル電気泳動 polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE; ナノエレクトロスプレー nanoelectrospray, nanoES; 質量分析法 mass spectrometry, MS; タンデム質量分析法 tandem mass spectrometry, MS/MS; ウシ血清アルブミン bovine serum albumin, BSA.

第 50 回日本電気泳動学会総会・サテライトシンポジウム

元電気泳動法 (2-DE) と質量分析法 (MS) の組み合わせによる解析である。2-DE は、O'Farrell³⁾ による報告以来、細胞・組織の蛋白質混合物を分離する手段として現在のところ最も高い分離能を有しており、一度に 1000 個以上の蛋白質を 1 枚のポリアクリルアミドゲル上に分離することができる。1 次元目に固定化 pH 勾配ゲル⁴⁾ が導入され、分離能・再現性ともに向上著しい。ここ数年の間にヒト血漿・酵母・アラビドプシスなどのゲノム生物の二次元ゲルデータベースがインターネット上で公開されている⁵⁾。

2-DE ゲルを用いた大規模なプロテオミクスを行うためには、2-DE ゲル上に分離される多くの蛋白質スポットを効率よく解析するための自動システムが不可欠である。MS による解析は、エドマン法によるアミノ末端配列分析をはじめとする従来の手段に比べて、分析が短時間で終了する、翻訳後修飾の位置と種類を質量数の変化として検出することができる、データベース検索による蛋白質の同定が可能である、ことなどの多くの利点をもつ。

本稿では、2-DE ゲル上の蛋白質スポットを同定するために構築されたオンライン解析システムについて述べる。このシステムでは、ナノスケールの液体クロマトグラフィー (LC) に、自家製のナノスプレーイオン化 (nanoES) インターフェースを介してイオントラップ型タンデム質量分析計 (IT-MS/MS) を連結した nanoLC-nanoES/MS/MS が分析の中心となっており、アトモレベルの微量蛋白質の同定が可能である。そして、ゲル中酵素消化物に対する適用例、およびゲルの染色法の違いが MS の解析結果に与える影響についても示す。また、現在広く行われているマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)-MS を用いた解析との違いについても論じる。

材料および方法

1. 材料

ウシ血清アルブミン (BSA)、ウマミオグロビンおよびオボアルブミンは Sigma 社から購入した。5000 倍濃度の SYPRO™ オレンジ溶液は BioRad 社から購入した。そのほかはすべて分析グレードの試薬を使用した。

2. ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) による蛋白質の分離

Laemmli の方法⁶⁾ にしたがって行った。まず蛋白質を試料緩衝液に溶解し、この溶液を 5 分間煮沸して蛋白質の変性処理を行った。試料緩衝液の組成は、62.5 mM トリス-塩酸、pH 6.8、2% SDS、10% グリセリン、5% メルカプトエタノールおよび 0.0025% プロモフェノールブルーであった。SDS-PAGE は 12.5% の均一濃度のポリアクリルアミドゲルを用いて 20 mA の定電流で行い、プロモフェノールブルーがゲルの下端に達するまで通電した。

3. SYPRO オレンジによるゲルの染色⁷⁾

電気泳動の終了したゲルを染色液中で 4 時間染色した。染色液は SYPRO オレンジの原液を 7.5% 酢酸で 5000 倍に希釈して調製した。水に交換して 30 分間振とうすることにより脱染色した。ゲルは水中で 4°C にて保存した。

4. ゲルの銀染色

全ての工程はゲルと溶液の入った容器を緩やかに振とうしながら行った。電気泳動の終了したゲルを 12% トリクロロ酢酸と 50% メタノールからなる固定液中で 30 分間、ついで 10% エタノールと 5% 酢酸からなる溶液で 20 分間固定した。0.25 mM 過硫酸アンモニウム溶液で 10 分間振とうしたのち、0.1% 硝酸銀にて 30 分間染色した。つぎに、2% 炭酸カリウムと 0.015% ホルマリンからなる現像液にゲルを浸した。この溶液で 10 秒間洗浄したのち、同じ組成の現像液にゲルを移し、いくつかの蛋白質スポットが見えてきたらさらに新しい現像液に交換し、ゲルの縁が黄色くなるまで現像した。ゲルを水で 1 分間洗浄し、最後に 1% 酢酸で現像を停止した。ゲルは水中で 4°C にて保存した。

5. ゲル中トリプシン消化

Shevchenko らの方法⁸⁾ にしたがって行った。染色された蛋白質バンドをゲルから切り取った。蛋白質を含まないゲル片をコントロールとして以下同じように処理した。ゲル片をアセトニトリルで脱水したのち、溶液を除いて減圧下で 30 分間乾燥した。つぎにゲル片を還元 S-カルボキシアミドメチル化処理にかけた。すなわち、ゲル片を 10 mM ジチオトレイトール/100 mM 重炭酸アンモニウム溶液で膨潤し、56°C にて 45 分間還元反応を行った。還元溶液を除き、55 mM ヨードアセトアミド/100 mM 重炭酸アンモニウム溶液を加え、暗条件下 30 分間室温にてシステイン残基の S-カルボキシアミドメチル化反応を行った。溶液を除き、50% アセトニトリルによる洗浄、100% アセトニトリルによる脱水、そして 50 mM 重炭酸アンモニウム溶液/50% アセトニトリルによる洗浄を順次行った。溶液を除き、ゲル片を減圧下で完全に乾燥した。酵素反応は、まず 12.5 ng/μl トリプシン (Roche 社) を含む 25 mM 重炭酸アンモニウムで氷中 4°C にてゲル片を 45 分間膨潤した。残った溶液を除き、酵素を含まない 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液をゲル片が完全に浸るまで加えた。消化反応は 37°C にて 16 時間行った。反応後、ゲル中のペプチド断片を以下の溶液で順次抽出した。25 mM 重炭酸アンモニウム/50% アセトニトリル、つぎに 5% 蟻酸/50% アセトニトリルで 2 回、最後に水で 1 回。抽出液は 1 本のプラスチックバイアルに集めて減圧濃縮し、MS 分析を行うまで -20°C にて保存した。

6. LC-MS および MS/MS 解析

減圧濃縮した試料を 20 μl の 0.1% 蟻酸/2% アセトニトリル

リル溶液に溶解した。CTC Analytics 社製のオートサンプラー PAL LC-1™ を使い、Michrom BioResources 社製の MAGICMS™ C18 キャピラリーカラム（内径 0.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 μ m, 孔径 200 Å）に溶解液を導入した。ペプチドの溶出は MAGIC 2002™ HPLC システム（Michrom BioResources 社）を用いて行った。すなわち、0.1% 蟻酸の存在下でアセトニトリル濃度を 2% から 90% まで直線濃度勾配で上げペプチド断片を連続的に溶出した。このときの流速は約 1 μ l/min であった。LC の溶出液は New Objective 社製の PicoChip™ ニードル（内径 20 μ m）を介し、LCQ™ 四重極イオントラップ型質量分析計（ThermoQuest 社）のイオン源に直接導入した。NanoES ニードルの位置は加熱キャピラリーとの距離を微調整できるようになっている。また、スプレー電圧はニードルではなく、溶離液に直接荷電するように工夫されている。噴霧のためのガスは使用せず、キャピラリーの電圧は 1.4~1.7 kV, スプレー電流は 0.1~0.2 μ A であり、加熱キャピラリーの温度は 210°C であった。測定された MS/MS クロマトグラムは、タンデム質量分析の解析アルゴリズムである SEQUEST™⁹⁾ によって OWL 蛋白質データベース¹⁰⁾ に対して検索された。検索は、システム残基の S-カルボキシアミドメチル化による 57 Da の質量数の増加をあらかじめ設定して行った。

結果と考察

プロテオーム解析においては、細胞内で発現されている蛋白質を網羅的に分析する必要があるため、その解析には (i) 自動的・定常的に稼働し、(ii) 短時間で分析ができ、しかも (iii) 微量試料にも対応できるシステムが要求される。我々は、これらの要求を満たすシステムを nanoLC-nanoES/MS/MS を用いて構築した。

図 1 にシステムの概略を示す。ペプチド溶解液の入ったバイアルはオートサンプラーに付属した冷却プレートの上に並べられる。分析にかけられるまでバイアルを室温で放置しておくことでペプチドの回収率が下がる（未発表データ）。これはバイアル内壁へのペプチドの吸着によると考えられる。吸着を最小限にするためのプレートの冷却機構が重要であり、通常は 4°C に設定している。試料は LC-MS 解析に連動して一定時間ごとにオートサンプラーによって LC に導入され、C18 の逆相カラムによってペプチド断片が分離される。200 nm の吸収をモニターして分離の状況を把握する。各ペプチドはキャピラリーニードルからナノスプレーイオン化され MS 分析部へ導入される。イオン化部では、xyz の各軸での微調整が可能な支持台の上にキャピラリーニードルを固定しているので、イオン化の最適条件を容易に見つけることができる。測定結果は SEQUEST™ プログラムによって直ちに解析される。この一

図 1. 構築した複合システムの概略図。

連のシステムでは、オートサンプラーによる試料導入から MS の解析までの過程が単一のシステムコントローラによって制御されており、1 検体に要する時間は約 40 分である。

LC によるペプチドの分離では、導入された試料中のペプチドはまずトラップカートリッジに吸着される。試料中に混入した微量の塩などの汚染はペプチドのイオン化を妨害するが、これらはペプチドを吸着したときに LC の溶媒によって自動的に洗浄除去されるので問題ない。また、MS の分析に先立って個々のペプチドを分離カラムであらかじめ分離しておくことによって、イオン化の際のサプレッションを防ぐことができる。イオントラップ型質量分析計による MS/MS 解析では、各ペプチドの質量数とアミノ酸配列の情報の両方をあたえるため、蛋白質の同定解析の結果は決定的である。

図 2 はこのシステムの検出感度をみたものである。モデル蛋白質として BSA を用いた。BSA のアミノ酸配列はすでに決定されており、分子量は中程度 (66430) である¹¹⁾。溶液中でトリプシン消化した BSA の分解ペプチドを 100 fmol と 10 fmol の濃度に希釈して解析を行った（図 2 A および B）。10 fmol で十分に解析が可能なペプチドイオンが観察された。図 2 C は、そのひとつである 653.2(m/z) の MS/MS クロマトグラムである。開裂イオンからアミノ酸配列の情報が得られた。

さらに検出感度を上げるための重要な要因は、カラムとリキッドジャンクションインターフェースをつなぐチュー

図2. BSAのトリプシン消化物のMSクロマトグラム。
(A)100 fmol, (B)10 fmol, (C)Bで観察された653.2(m/z) ペプチドイオン (*印) のMS/MSクロマトグラム。

ブの長さと内容積 (図1の'L') である。フローセルを除き、ヒューズドシリカチューブ (内径 50 μ m, 長さ 4 cm) によってカラムの出口とリキッドジャンクションを直接つないだ場合, 500 amol のミオグロビンの消化物を検出することができた (図3)。すなわち, カラムで分離されたペプチドがイオン化されるまでの拡散を最小限にする工夫によって, よりシャープなベースピークを得ること

図3. ミオグロビンのトリプシン消化物のMSおよびMS/MSクロマトグラム。
(A)4 fmol, (B)500 amol.

ができる。

図4 はオボアルブミンのゲル中トリプシン消化物のMSとMS/MSのクロマトグラムである。この結果をSEQUESTによって検索したところ, オボアルブミンの配列中の6箇所 (85-104, 127-142, 264-276, 280-284, 323-339 および 370-381) がヒットした。

ゲル上に分離された蛋白質の染色は, 銀による方法が広く利用されている。最近では, 染色中に起こるメチオニン残基の酸化やトリプトファン残基のインドール環の破壊が最小限になるような工夫もされており, MS解析に適応した方法になっている⁸⁾。一方, プロテオーム解析の際に問題となる銀染色の欠点として以下のことが挙げられる。

すなわち, ダイナミックレンジが狭く, 定量性に乏しい。染色に多くのステップを必要とし, 操作が煩雑である。そして染色の再現性が低いことなどである。1996年にSteinbergらによって報告された蛍光色素のひとつのSYPRO オレンジ⁹⁾ は, ダイナミックレンジが 10^3 と広く,

図 4. オボアルブミンのゲル中トリプシン消化物の MS および MS/MS 解析。

図 5. BSA のゲル中トリプシン消化物の MS クロマトグラム。
SYPRO オレンジ(A), あるいは銀(B)によって染色し、切り
取った BSA のバンドを酵素消化にかけた。T で示したピークは
トリプシン由来のペプチドイオンである。

また、銀染色と同程度以上の検出感度をもつ。また、染色の再現性が高く、操作は染色とそれに続く脱色の 2 ステップで完了することなどの特長をもつ。図 5 は、それぞれ

SYPRO オレンジと銀で染めた BSA のゲル中酵素消化物の MS クロマトグラムである。SYPRO オレンジのほうがもとの BSA のアミノ酸配列に帰属されるペプチド断片の数と量がともに多く、微量分析に適していることがわかる。

2-DE ゲル上の蛋白質スポットの同定は、MALDI-TOF-MS を用いたペプチドマスフィンガープリント法 (peptide-mass fingerprinting, PMF)^{12,13)} によって一般に行われている。PMF では、蛋白質を酵素的あるいは化学的に分解して生じるペプチド混合物の質量数を MALDI-TOF-MS によって測定し、データベース上に登録されている蛋白質のアミノ酸配列から予想される理論的なペプチドの質量数に対して照合してもとの蛋白質を同定する。MALDI-TOF-MS はペプチド断片の質量数をもっとも速く測定する方法のひとつである。また、ひろく普及している理由として、その操作が簡便であることによるところが大きい。しかしながら、質量数の情報しか得られないため、データベースに存在しない蛋白質である場合には同定ができず、また、翻訳後修飾が起きていてもとの蛋白質のアミノ酸配列に帰属できない質量数のペプチドが見つかったときに、その修飾の位置と種類を検索する手段がない。原理的にマトリックス由来の化学ノイズが MS クロマトグラムの上に現れるが、これは微量の試料を測定する際の障害になっている。

以上のとおり、本稿で述べた LC-MS の複合システムでは、オートサンプラーに試料を並べたあとは、LC への試料の導入から蛋白質の同定まですべて自動で行われ、この間に要する時間は約 40 分である。このシステムによって中程度の amol 試料でも定常的な分析が可能になった。イオントラップ型質量分析計による MS/MS 解析では、各

ペプチドの質量数とアミノ酸配列の情報の両方が得られるので、これらのデータによって確実な同定解析を行うことができる。また、MS/MS 解析によれば翻訳後修飾の位置と種類の同定が可能である。一方、二次元ゲルをはじめとするポリアクリルアミドゲル上で分離された蛋白質を解析する際には、ゲルの染色方法がペプチド断片の回収に影響する。蛍光染色法を用いたときの回収率がよく、MS 解析に有利である。定量性および染色手順の簡便性からみてもプロテオーム解析により適している。

新薬探索のゲノム創薬の戦略にプロテオミクスが組み込まれつつあり、疾患モードの蛋白質レベルでの解析、特定疾患の指標となるマーカー（サロゲート, Surrogate）の同定や薬剤の作用モード（drug mode-of-action）の研究に応用されている¹⁴⁾。このような探索研究では、多くの検体を効率よく解析するため、高いスループットを実現する自動解析システムの構築が不可欠である。本稿で示したシステムはこの要請に応えることができる。

本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の支援において行われた。ここに誌面をかりて御礼申し上げる。

文 献

- 1) Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16: 1090-4.
- 2) 安楽泰宏. ゲノム解析の成果とプロテオーム研究の推進. *学術月報* 1998; 51: 1119-24.
- 3) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; 250: 4007-21.
- 4) Görg A, Postel W, Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988; 9: 531-46.
- 5) (<http://www.expasy.ch/ch2d/2d-index.html>)
- 6) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- 7) Steinberg TH, Jones LJ, Haugland RP, Singer VL. SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: One-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal Biochem* 1996; 239: 223-37.
- 8) Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996; 68: 850-8.
- 9) Eng JK, McCormack AL, Yates III JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* 1994; 5: 976-89.
- 10) Bleasby AJ, Akrigg D, Attwood TK. OWL—A non-redundant composite protein sequence database. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 3574-7.
- 11) Hirayama K, Akashi S, Furuya M, Fukuhara K. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 639-46.
- 12) Pappin DJC, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 1993; 3: 327-32.
- 13) Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 5011-5.
- 14) Page MJ, Amess B, Rohlf C, Stubberfield C, Parekh R. Proteomics: A major new technology for the drug discovery process. *Drug Discov Today* 1999; 4: 55-62.

要 旨

アトモルレベルの微量の蛋白質を同定するために構築された、液体クロマトグラフィーとナノエレクトロスプレー/タンデム質量分析装置からなる複合システムについて述べる。蛋白質の酵素的あるいは化学的切断によって得られたペプチド混合物を、システムと連動したオートサンプラーによって逆相カラムに導入する。溶出された各ペプチドは自作のナノスプレーイオン源に固定されたキャピラリーニードルから直接イオン化され、イオントラップ型質量分析計によって MS あるいは MS/MS 解析が行われる。アミノ酸配列の情報をふくむ MS/MS のデータは検索アルゴリズムである SEQUEST によってアミノ酸配列データベースに対して照合され、もとの蛋白質が確実に同定される。このシステムによる試料の導入から蛋白質同定までの過程は全て自動で行われ、一日に約 40 個の試料の解析が可能である。また、銀あるいは蛍光色素のひとつである SYPRO オレンジによってポリアクリルアミドゲル上で染色された蛋白質の酵素消化物に対しても適用できる。以上のような本システムの特長は、ゲノムによってコードされた全ての蛋白質の包括的なスクリーニングが必要とされるプロテオミクス研究に対して有利である。