

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05526

研究課題名(和文) 構造プロテオミクスのための高効率ゲル内タンパク質回収法の開発

研究課題名(英文) Development of a Highly Efficient In-Gel Protein Recovery Method for Structural Proteomics

研究代表者

武森 信暁 (Takemori, Nobuaki)

愛媛大学・学術支援センター・講師

研究者番号：40533047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高感度なタンパク質構造解析法であるトップダウン質量分析は、タンパク質を丸ごとイオン化し、その化学構造情報を取得することを可能にする。トップダウン質量分析を用いて生体サンプルに含まれる目的タンパク質成分の構造情報を効果的に取得するには、複雑なタンパク質成分を質量分析前に分画する処理が不可欠である。本研究で我々は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いてタンパク質成分を高分解能に分画する手法を開発し、高感度なトップダウン質量分析を実現するための前分画ワークフローの確立に成功した。開発手法によるサンプル前処理は化学架橋質量分析によるタンパク質複合体の構造解析にも有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、生化学・分子生物学研究において既にその有効性が証明され、これまでに多くのライフサイエンス研究で採用されているが、トップダウン質量分析への本格的な導入は進んでいない。本研究で開発したSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動をベースとするタンパク質分画技術は、専用装置を必要とせず、簡易かつ低コストなタンパク質回収が可能であり、トップダウン質量分析によるタンパク質構造解析研究の普及を促進することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Top-down mass spectrometry, a highly sensitive structural analysis method for proteins, enables the ionization of intact proteins and the comprehensive acquisition of their chemical structural information. To effectively obtain structural information of target protein components in biological samples using top-down mass spectrometry, it is essential to first fractionate complex protein components prior to mass spectrometry analysis. In this study, we developed a method for fractionating protein components with high resolution using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and successfully established a sample pre-fractionation workflow to achieve highly sensitive top-down mass spectrometry. It was also found that sample pretreatment by the developed method was effective for structural analysis of protein complexes by chemical cross-linking mass spectrometry.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：ポリアクリルアミドゲル電気泳動 トップダウン質量分析 タンパク質構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) トップダウン質量分析によるタンパク質構造解析

超高分解能質量分析装置と強力な分子フラグメンテーション技術を活用したトップダウン質量分析法は、タンパク質の一次構造解析の新たな手法として現在注目されている。トップダウン質量分析による構造解析では、タンパク質をそのままイオン化し、質量分析計内で断片化することにより、化学構造情報の包括的な取得が可能となる。トップダウン質量分析は、翻訳後修飾の解析や全長アミノ酸配列の解析においてその威力を発揮しており、抗体可変領域の配列解読やバイオ医薬品の品質検査における利用が近年急増している。

(2) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いるサンプル前処理

生体サンプルに含まれる目的タンパク質をトップダウン質量分析で高感度に解析するためには、質量分析前に複雑なタンパク質成分を何らかの手法で分離する必要がある。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、簡易な操作でタンパク質を分解能よく分離するための生化学実験手法として広く用いられており、ボトムアップ型の質量分析 (酵素消化後のペプチド解析) を用いた従来のプロテオミクス研究においても中心的な分離手法として採用されている。しかしながら従来の SDS-PAGE に使用される Bis 架橋ポリアクリルアミドゲルは不溶性であり、泳動後にゲル内に捕獲されたタンパク質、特に膜タンパク質に代表される疎水性タンパク質を溶液へ回収することは困難である。

2. 研究の目的

ゲル内タンパク質の回収効率を高めるために、抽出エンハンサー分子としてのクーマシーブリリアントブルー (CBB) 色素の可能性を検討した。タンパク質に対する影響を最小限に抑えた染色を可能にする CBB は、数ナノグラムレベルのタンパク質を検出することができる。CBB は塩基性および疎水性残基を介してタンパク質に結合するが、結合した CBB は必要に応じて完全に脱染できる。一般的に CBB 溶液の調製には、タンパク質のゲル内への固定化を引き起こす有機溶媒が使用されるが、近年では有機溶媒を含有しない水性 CBB 試薬も開発され、市販化されている。水性 CBB 試薬によるゲル内 CBB タンパク質複合体の形成がタンパク質の周辺ゲルに対する親和性を低下させ、抽出効果を高めることが期待できる。そこで本研究では、水性 CBB 試薬を活用したゲル内タンパク質の高効率な受動抽出法の開発をおこなう。さらに開発した抽出条件を SDS-PAGE 分離後のゲル内タンパク質回収に適用することで、高分解能なプロテオーム分画ワークフローを確立し、トップダウン質量分析の検出能力の改善に取り組む。

3. 研究の方法

(1) CBB 色素を活用したゲル内タンパク質の受動抽出

各種生体サンプルから抽出したタンパク質成分は、SDS-PAGE (Invitrogen NuPAGE プレキャストゲル 4-12%) で分離し、固定処理を行わず直ちに水性 CBB 試薬 (ATTO EzStain AQUA) を用いて染色処理をおこなった。染色後のゲルから、目的バンドを切り出し、使い捨て組織ホモジナイザーチューブ (Nippi BioMasher) を用いて微細化し、受動抽出処理 (チューブミキサーで 10 分間の震盪処理) によりタンパク質を回収した。プロテオームワイドな回収率の検証は、iTRAQ 法 (8-plex) による定量プロテオミクスを用いておこなった。

(2) ゲル回収タンパク質のトップダウン質量分析

ゲル内タンパク質の受動抽出溶液は、遠心限外濾過フィルター (Merck Amicon Ultra, MWCO 3kDa) を用いて 50 μ L 程度まで濃縮し、その後にメタノール/クロロフォルム/水 (MCW) 沈殿法を用いた精製処理をおこなった。得られたタンパク質沈殿物は、風乾後に 0.1% ギ酸溶液を用いて再溶解し、LC-MS を用いたトップダウン質量分析に供した。

4. 研究成果

(1) CBB 色素を活用した受動抽出条件の最適化

水性 CBB 染色がゲル内タンパク質の受動抽出効率を改善するかについて検討をおこなった。市販のウシ血清アルブミン (BSA) を SDS-PAGE で分離後、水性 CBB 試薬で染色し、3 つの異なる条件 (0.1% SDS/100 mM 重炭酸アンモニウム溶液、100 mM 重炭酸アンモニウム溶液、および純水) で受動抽出による BSA 回収を行った。純水による受動抽出では、ゲルの染色状態に変化は観察されず、BSA の溶液への放出も生じなかった。一方、0.1% SDS/100 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いた抽出処理では、10 分間の振盪によりゲルから CBB および BSA の迅速な遊離が観察された。また SDS を含まない 100 mM 重炭酸アンモニウムでも同様の結果が得られた。

100 mM 重炭酸アンモニウム溶液による BSA 回収率を定量的に検証した結果 (図 1)、泳動直後のウェットなゲルからは 75.7±4.5% の回収率が得られた。また乾燥処理し室温で 1 週間保存したゲルからでも 43.6±6.1% の回収効率が得られた。乾燥ゲルを 0.1% SDS/100 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いて抽出した場合には、ゲル乾燥前 (71.9±3.2%) とほぼ同じ回収率 (75.0±1.6%) が得られた。

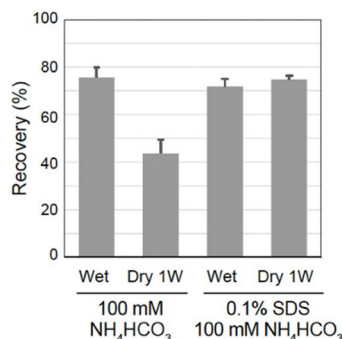


図1: CBB染色BSAの受動抽出効率

CBB 染色による抽出条件をさらに検証するために、異なる pH (3~11) の Britton-Robinson 緩衝液を使用した BSA 抽出実験をおこなった (図 2)。低 pH レベル (3 および 4) ではゲルの脱染および溶液への BSA 放出は観察されなかったが、脱染および BSA 放出は pH の上昇とともに進行し、最大回収効率は高 pH レベル (7-11) で達成された。これらの結果は、CBB 染色タンパク質が pH 依存的にゲルから溶出することを示している。

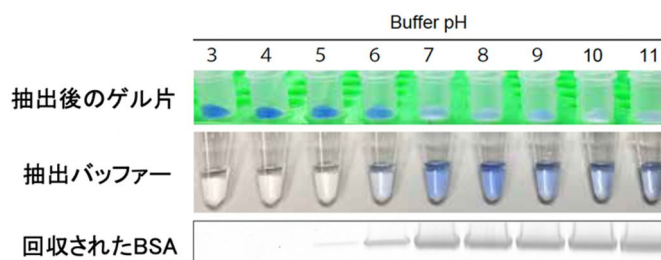


図2: CBB染色BSAの受動抽出におけるpH効果の検証

(2) トップダウン質量分析のためのサンプル前分画法の開発

水性 CBB 染色を活用したゲル内タンパク質の受動抽出ワークフローを開発した。ワークフローは、1) SDS-PAGE 分離、2) 水性 CBB 染色およびゲルバンド切り出し、3) ホモジナイザーチューブによるゲル破碎、4) 10 分間の受動抽出、および 5) 回収タンパク質の精製、から構成される。SDS-PAGE からタンパク質精製までの所要時間は約 3 時間であり、サンプルの損失を減少させるために、ゲル破碎からタンパク質抽出までのステップを同じホモジナイザーチューブ中で連続的に実施した。回収溶液は、必要に応じて限外ろ過により濃縮した。質量分析には、CBB や SDS を回収サンプルから除去するための追加の前処理が不可欠であり、本ワークフローでは MCW 沈殿による精製を選択した。

図 3 は、確立したワークフローによりショウジョウバエ組織抽出タンパク質成分を分画した例を示す。ワークフローの回収率をプロテオームワイドに検証するために、アイソバリック試薬 iTRAQ を用いた定量プロテオーム解析を実施した。その結果、ワークフローによりすべてのゲル内タンパク質成分の回収が達成出来ることが明らかとなった。100 kDa 未満の分子量範囲では、平均タンパク質回収率は 67.7% であった。一方、100 kDa 以上の高分子量領域のタンパク質成分については、平均回収率は 56.7% であった。また同定された 560 タンパク質のうち、全タンパク質の 96.3% (539 タンパク質) が 50% を超える回収率を示した。

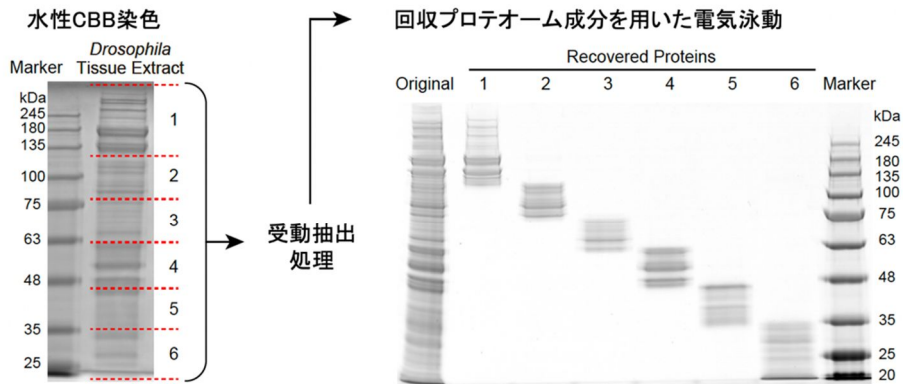


図3: 受動抽出を活用したショウジョウバエ組織プロテオーム成分の分画例

確立したワークフローにより分画処理をおこなったインタクト膜タンパク質成分のトップダウン構造解析も実施した。大腸菌無細胞系で合成したバクテリオロドプシン(7回膜貫通型タンパク質)を SDS-PAGE で分離し、ワークフローで回収したサンプルのトップダウン質量分析を行った結果、メチオニン残基の酸化が一部観測されたものの、インタクト質量の高精度計測およびフラグメント処理による一次構造情報の取得に成功した。

(3) SDS-PAGE と化学架橋質量分析を組み合わせたタンパク質複合体構造解析法の開発

確立した抽出法を、化学架橋質量分析によるタンパク質複合体構造解析のためのサンプル前処理に応用することをさらに検討した。まずは SDS-PAGE で分離した化学架橋タンパク質複合体サンプルを迅速に酵素消化することを目的として、陰イオン交換固相抽出ディスクをピペットチップ内に装填したスピナカラムを使用した酵素消化法 AnExSP (anion-exchange disc-assisted sequential sample preparation)の開発をおこなった。

固相抽出ディスクの表面にタンパク質を捕獲できる AnExSP では、微量サンプルを濃縮して効率的に酵素消化を実施することが可能であり、通常 15 時間を要するトリプシン・Lys-C 消化処理が最短 60 分で完了した。さらにサンプルに含まれる SDS や CBB 色素をディスク上に保持したまま、消化ペプチドをディスクから溶出する最適条件を確立することにより、最小限の損失でサンプル前処理を完結することが可能であった。AnExSP を SDS-PAGE で分離した化学架橋タンパク質複合体(ヘモグロビン)の前処理にも適用可能であり、従来のゲル内で実施する酵素消化法(インゲル消化法)と比較して、特に長鎖の架橋消化ペプチドの検出に優れた性能を発揮することが明らかとなった(図4)。

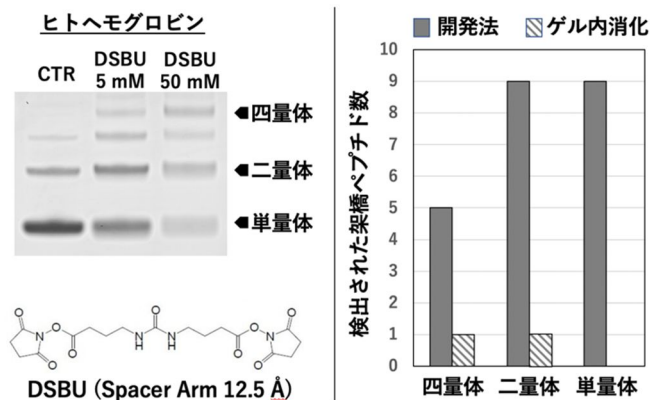


図4. ヘモグロビン複合体の化学架橋質量分析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takemori Ayako, Kawashima Yusuke, Takemori Nobuaki	4. 巻 58
2. 論文標題 Bottom-up/cross-linking mass spectrometry <i>via</i> simplified sample processing on anion-exchange solid-phase extraction spin column	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 775 ~ 778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cc05529a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Johnson James, Harman Victoria M., Franco Catarina, Emmott Edward, Rockliffe Nichola, Sun Yaqi, Liu Lu-Ning, Takemori Ayako, Takemori Nobuaki, Beynon Robert J.	4. 巻 19
2. 論文標題 Construction of a la carte QconCAT protein standards for multiplexed quantification of user-specified target proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-021-01135-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 武森 信暁	4. 巻 65
2. 論文標題 可溶性ポリアクリルアミドゲルを用いた新規プロテオミクス戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 電気泳動	6. 最初と最後の頁 63 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/electroph.65.63	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 武森 信暁	4. 巻 66
2. 論文標題 ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた高分解能プロテオーム分画法の開発とトップダウンプロテオミクスへの応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 電気泳動	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takemori Ayako, Butcher David S., Harman Victoria M., Brownridge Philip, Shima Keisuke, Higo Daisuke, Ishizaki Jun, Hasegawa Hitoshi, Suzuki Junpei, Yamashita Masakatsu, Loo Joseph A., Loo Rachel R. Ogorzalek, Beynon Robert J., Anderson Lissa C., Takemori Nobuaki	4. 巻 19
2. 論文標題 PEPPI-MS: Polyacrylamide-Gel-Based Prefractionation for Analysis of Intact Proteoforms and Protein Complexes by Mass Spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 3779 ~ 3791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.0c00303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takemori Ayako, Ishizaki Jun, Nakashima Kenji, Shibata Takeshi, Kato Hidemasa, Kodera Yoshio, Suzuki Tetsuro, Hasegawa Hitoshi, Takemori Nobuaki	4. 巻 20
2. 論文標題 BAC-DROP: Rapid Digestion of Proteome Fractionated via Dissolvable Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Its Application to Bottom-Up Proteomics Workflow	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 1535 ~ 1543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.0c00749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takemori Ayako, Anderson Lissa C, Harman Victoria M., Brownridge Philip, Butcher David, Shima Keisuke, Higo Daisuke, Ishizaki Jun, Hasegawa Hitoshi, Suzuki Junpei, Yamashita Masakatsu, Loo Joseph A., R. Ogorzalek Loo Rachel, Beynon Robert J., Takemori Nobuaki	4. 巻 1
2. 論文標題 PEPPI-MS: Strategies to Enhance the Extraction of Electrophoretically Separated Proteins from Polyacrylamide Gels and Their Application to Top-Down/native Mass Spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemRxiv	6. 最初と最後の頁 1-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26434/chemrxiv.9917225.v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 武森信暁、石崎 淳、長谷川均	4. 巻 28
2. 論文標題 ANCA関連血管炎のプロテオミクス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 3-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武森信暁
2. 発表標題 Gel-Based Top-Down Proteomics: プロテオミクス研究領域におけるポリアクリルアミドゲル電気泳動の新規活用法
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武森信暁
2. 発表標題 Gel-Based Proteomicsの新戦略 - トップダウン質量分析とSDS-PAGEの融合 -
3. 学会等名 第18回北里疾患プロテオーム研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武森信暁
2. 発表標題 簡単DIY で内部標準ライブラリ構築
3. 学会等名 日本プロテオーム学会第9回プロテオミクストレーニングコース「生命機能解析のためのプロテオミクス」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武森信暁
2. 発表標題 包括的プロテオーム定量のためのQconCAT合成パイプライン
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武森文子, 野並浩, 武森信暁
2. 発表標題 QconCAT法によるトマト腺状トライコームの定量プロテオミクス
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武森文子, 野並浩, 武森信暁
2. 発表標題 A high-throughput quantitative strategy of the targeted proteins in trichome glandular cells using QconCAT
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	リバプール大学		
米国	UCLA	国立高磁場研究所	