

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05322

研究課題名(和文) プロテオーム研究を新たな次元に導く革新的なMSサンプル調製方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of an innovative MS sample preparation method that takes proteome research to a new dimension

研究代表者

市村 徹 (Ichimura, Tohru)

防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群)・応用科学群・教授

研究者番号：50213012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プロテオーム研究を新たな次元に導くには、あらゆる試料の分析に共通に適用できる標準的なMSサンプル調製方法の確立が重要である。我々は、イオン液体を可溶化剤として用いる新しいプロテオミクスのプラットフォーム(pTRUST法)を開発した。本法は、ゆで卵を10分以内に可溶化し、超高感度にLC-MS分析できる性能を有している。また、本法をヒト赤血球および培養細胞の膜内在性タンパク質と、精製した枯草菌から単離した超難溶性構造物(芽胞)の高感度プロテオーム解析に適用しその有効性を確認した。本法は、様々な不溶性分子のプロテオミクス分析のために、有力なプラットフォームになると結論する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質を高い感度で分析できる普遍的な技術の開発は、プロテオミクスの研究分野において重要課題である。本研究では、イオン液体を可溶化剤として用いる新しいプロテオミクスのプラットフォーム(pTRUST法)を開発した。pTRUST法の性能(感度、再現性)は古典的可溶化剤を用いる従来法の分析性能を大きく上回っていた。本研究の成果は、細胞膜プロテオミクス、創薬プロテオミクス、疾患プロテオミクスなどの研究・医療の場において、新規創薬標的分子や新規疾患バイオロジーを発見するなどの大きなブレークスルーをもたらすことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Establishing a standard MS sample preparation method that can be commonly applied to the analysis of any sample is important to take proteome research to a new dimension. We have developed a new proteomics platform (pTRUST method) that uses an ionic liquid as a solubilizer. The method enables the successful solubilization of heat-aggregated hen egg whites within 10 min and supports sensitive mass spectrometry (MS) analysis. We also applied this method to highly sensitive proteome analysis of integral-membrane proteins of human erythrocytes and cultured cells, and super-insoluble structures (spores) isolated from purified *Bacillus subtilis*, and confirmed the effectiveness of the method. We conclude that this method provides a powerful platform for proteome analysis of a variety of insoluble molecules.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス イオン液体 pTRUST法 膜内在性タンパク質 枯草菌芽胞 不溶性タンパク質 LC-MS/MS

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生理機能のみならず疾患における病態生理の解明にも、プロテオーム研究は欠くことのできない分析手段になってきている。不溶性タンパク質のプロテオーム研究では、有機溶媒や界面活性剤、カオトロピック試薬などを用いてタンパク質をまず可溶化し、ついでこれらの可溶化剤を希釈或いは除去後にトリプシン消化を行う。実際、このフローに従って数々の手法 (FASP, i-FASP, SP3, SISPROT, SPEED, STRap など) が考案されており、大学・企業におけるプロテオーム研究を後押ししている。しかしながら、これまでの手法はいずれもギ酸、尿素、塩酸グアニジン、SDS といった古典的可溶化剤を、半ば“盲目的”に用いるタンパク質化学の応用技法にすぎない。実際、これらの可溶化剤の可溶化力は様でなく、また不溶画分や硬組織からのサンプルには適用できないものもある。結果として、それらは MS 分析においてさまざまなタンパク質やペプチドの回収ロスに通じる。それゆえ次世代プロテオーム研究の成否は、あらゆる試料の分析に適用できる“感度”と“再現性”をもつユニバーサルな MS サンプル調製法の確立にあると考える。

2. 研究の目的

我々はイオン液体の 1 種である 1-butyl-3-methylimidazolium thiocyanate ([bmim][SCN]) と強アルカリ水溶液の高濃度混合溶媒 (*i*-soln と命名) が、タンパク質を効率よく溶かすことのできる新しい型の可溶化剤になることを発見した[1]。また、疎水性マイクロビーズ担体を用いるタンパク質の前処理法 (BOPs) を考案し、これと組み合わせることで、*i*-soln に溶解したタンパク質をダイレクトにトリプシン消化する方法 (*i*BOPs) を開発した[1]。さらに、この *i*BOPs 法を実際に適用することで、従来法では可溶化すら困難 (10% SDS にも不溶) であった超難溶性凝集物 (ゆで卵や線虫 1 匹の老化凝集体) を高感度にプロテオーム分析し、比類ないその分析性能を明らかにした[1,2]。

本研究では、プロテオミクスの未経験者でも *i*BOPs 法を容易に実現できるようにするため、ステージチップ法を組み合わせた新しい *i*BOPs 法の改良型 (pTRUST 法と命名) を創出する。また、様々な生物組織からの不溶物を対象に pTRUST 法が従来法に比べてより有効な MS サンプル調製方法になることを証明する。

3. 研究の方法

(1) pTRUST 法の開発: *i*BOPs 法にステージチップ法を組み合わせることで、*i*BOPs 法の各工程を遠心操作のみで実現できるようにした。

(2) 細胞膜サンプルを用いた解析: IMP (integral membrane proteins) を、少数個 ($10^3 \sim 10^6$ 個) のヒト赤血球と 3 種類のヒトがん細胞の細胞膜画分から、*i*-soln または古典的可溶化剤 (SDS や尿素など) を用いて抽出した。抽出は、超音波処理 (のみ) で達成した。抽出したタンパク質は還元アルキル化後、pTRUST 法または FASP 法、i-FASP 法を用いてトリプシン消化し、LC-MS/MS 分析した。データベース検索は、Uniprot のヒトプロテオームデータベースに対して行った。タンパク定量は Bradford 法を用いて行った。

(3) 枯草菌芽胞を用いた解析: 精製した枯草菌芽胞 ($\sim 10^7$ cfu) を、*i*-soln または SDS などを用いて可溶化した。*i*-soln に溶解したタンパク質は、還元アルキル化後、pTRUST 法を用いてトリプシン消化し LC-MS/MS 分析した。データベース検索は、Uniprot の枯草菌プロテオームデータベースに対して行った。

4. 研究成果

(1) pTRUST 法の開発 図 1 に本研究で創出した pTRUST 法のプロトコールを示す [3]。不溶性タンパク (IMP など) を *i*-soln 中で可溶化し、システイン残基を S-カルバモイルメチル化して分子内・分子間のジスルフィド結合を切断する (30 分)。アルキル化したサンプルは疎水性マイクロビーズを用いて捕捉し (10 分)、ビーズ表面に吸着したサンプルをステージチップ容器に移す。装置をストレーナーとして使用して溶媒洗浄を行う (5 分)。容器を密閉したあと、洗浄したサンプルにアセトニトリル-水溶液 (*i*BOPs 消化バッファー [1]) を加えて一晩トリプシン消化する。消化物は LC-MS/MS 分析する。



図 1 のプロトコールにおいて、*i*-soln の使用は、還元アルキル化とその後の MS 分析操作に悪影響を及ぼさないことをモデルタンパク質 (BSA と

図 1 pTRUST 法のプロトコール

リゾチーム)を用いて確認した。またステージチップを利用した溶媒洗浄と容器内トリプシン消化も有効に機能することを確認した。そこで、確立した pTRUST 法を様々な不溶性サンプルに実際に適用した。

(2) ヒト細胞膜サンプルを用いた解析 [3]

(a) ヒト赤血球 IMP への適用 図 2 に *i*-soln を用いてヒト赤血球膜から可溶化したタンパク質の量を従来までの可溶化剤 [8 M urea, 7 M 塩酸グアニジン (Gud-HCl), 60 % メタノール(MeOH), 0.3 M NaOH, 4 % SDS, 10 % C12Im-Cl]を用いて可溶化した量と比較した結果を示す。*i*-soln の可溶化能を 1 とした場合、他のすべての変性剤は常に <1 であり、*i*-soln の可溶化能が最も高いことが示された。同様の結果はこの実験を還元剤存在下において行った場合にも認められた。したがって、*i*-soln は他の変性剤に比べて優れた可溶化力を有していることが明らかとなった。次に、タンパク質を同定するため、*i*-soln で可溶化した 0.5 μg のタンパク質を pTRUST 法で消化した。実験は 3 回繰り返し、一次元 LC-MS/MS アプローチを使って分析した。pTRUST 法では、各 MS ランで約 500 種類のユニークなタンパク質が一貫して同定された(図 3)。一方、これまで広く使われてきた 4% SDS を用いた FASP と 10% C12Im-Cl を用いた *i*-FASP では、同条件のもと同定されたタンパク質はわずかであった(図 3)。pTRUST 法によって同定されたタンパク質には、バンド 1-7 と呼ばれる赤血球膜に特徴的なすべてのタンパク質が、ペプチド回収率は 4 から 140、配列カバー率は 17% から 60% の範囲で見いだされた。またこれらのバンドタンパク質のうち 4 つは本物の IMP (バンド 3, 4.5, 7) またはミリスチル化膜アンカータンパク質 (バンド 4.2) であった。さらに、SOSUI と TMHMH プログラムを用いた検索によって、他にも多くの IMP が同定されていることが確認された。それゆえ、*i*-soln システムと結合した pTRUST 法は、高感度なヒト赤血球膜 IMP 分析のための強力なプラットフォームになると結論した。

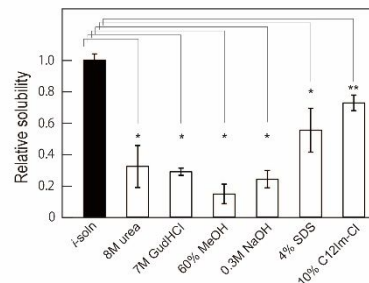


図 2 *i*-soln と従来の可溶化剤における赤血球膜タンパク質の相対的溶解度の比較

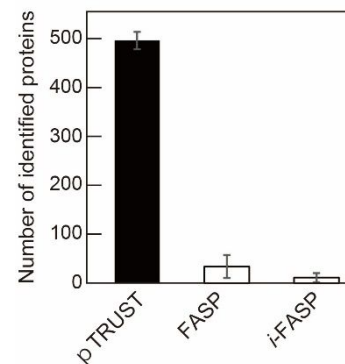


図 3 赤血球膜タンパク質の pTRUST, FASP, *i*-FASP による同定数人の比較

(b) ヒトガン細胞株 IMP への適用 [3] より複雑な膜プロテオームサンプルに対する pTRUST 法の効率と適用性を評価するため、3 つのヒトがん細胞株 (A549, HeLa, HepG2) から細胞膜画分を調製し、これら (各 1 μg) を *i*-soln を用いて可溶化後、pTRUST 法で 3 回トリプシン消化した。LC-MS/MS 分析により、pTRUST 法はこれらの膜調製物を前回同様に効果的に処理できることが明らかになった。実際、各 MS ランで 700 個以上 (A549 の場合)、1000 個以上 (HeLa と HepG2 の場合) のユニークなタンパク質が常に同定され、微量レベルでも分析の再現性が高いことが確認された。これらのすべての実験から同定された 2049 個のタンパク質のうち、545 個が 1 ~ 2 4 個の膜貫通領域をもつ IMP であることが、SOSUI および TMHMH 法を用いて確認された。

このように、本研究で開発した pTRUST プロトコールは様々なヒト培養細胞の IMP に直接 (修正を必要とせず) 適用可能であった。

(3) 枯草菌芽胞を用いた解析 芽胞は、熱、毒性化学物質、溶菌酵素、細胞損傷因子に対して極めて強い抵抗性を持つ。*i*-soln がこの構造を破壊できるかどうかを調べるため、高度に精製した枯草菌孢子 (位相差顕微鏡による評価で純度 99% 以上) を *i*-soln 中で 10 分間超音波処理と攪拌を行い、得られた溶液の濁度 (OD600 nm) を 0, 1, 24 時間後に分光光度計で測定した。この実験のコントロールとして、同じ孢子サンプルを水に懸濁したもの (無処理)、水中で超音波処理したもの、1% SDS 中で 100、3 分間煮沸したものをそれぞれ用意した。*i*-soln はすべての時間で最も低い濁度値を示した (図 4)。特に *i*-soln の値は、0 時間後に無処理対照値の約 20% であったのに対し、1% SDS の値は 24 時間後でも無処理対照値の 60% 以上であった (図 4)。1% SDS で煮沸後に観察された破壊効率の悪さは、1% SDS、5% メルカプトエタノールを含む 2% SDS、または 2.5% TCEP を含む 5% SDS (Strap の抽出溶媒) で超音波処理しても改善されなかった。したがって *i*-soln は孢子プロテオミクス研究のための優れた可溶化剤であると考えられる (論文投稿中)。次にタンパク質を同定するために、精製芽胞 ($2-3 \times 10^6$ cfu) を *i*-soln に可溶化し pTRUST 法でトリプシン消化した。消化物を LC-MS/MS 分析

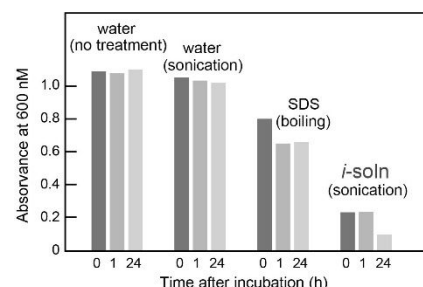


図 4 枯草菌芽胞の *i*-soln による可溶性

したところ、445 個のタンパク質が特異的に同定された。同定されたタンパク質の内の 52 個は既知の芽胞タンパク質であったが、残りの 393 個は未知のタンパク質成分であった。これら未知の成分から、20 個の成分について、蛍光蛋白質 GFP を融合させた実験を行い、芽胞に確かに局在していることを確認した。したがって、pTRUST 法は、新規芽胞成分を同定するための高感度かつグローバルなプロテオミクススクリーニングにも有効であることが明らかとなった（論文投稿中）。

「結論」*i*-soln システムを用いた pTRUST 法は大変シンプルであり、様々なヒト細胞に内在する IMP や枯草菌胞子のプロテオームを高感度にショットガン分析することを可能にする。トリプシン消化を除けば、この手法に必要な時間は 45 分未満であり、通常数時間を要する従来型アプローチよりも優れている。この技術は、安定同位体標識法やラベルフリー法のような従来の定量的手法と併用すれば、大幅な変更を加えることなく、高感度なタンパク質の動態解析にも適用できと期待される。したがって pTRUST は、生物学および治療的応用のための広範な不溶分子のプロテオーム解析を促進する有力なアプローチであると結論する。

- [1] Taoka M., Horita K., Takekiyo T., Uekita T., Yoshimura Y. & Ichimura T. An Ionic Liquid-Based Sample Preparation Method for Next-Stage Aggregate Proteomic Analysis. *Anal. Chem.* **91**, 13494-13500 (2019).
- [2] Tozawa T., Matsunaga K., Tizumi T., Uekita, T., Taoka M. & Ichimura, T. Ubiquitination-coupled liquid phase separation regulates the accumulation of the TRIM family of ubiquitin ligases into cytoplasmic bodies. *PLOS ONE* **17**, e0272700 (2022).
- [3] Taoka M., Kamei K., Kashima A., Nobe Y., Takekiyo T., Uekita T. & Ichimura, T. An ionic liquid-assisted sample preparation method for sensitive integral-membrane proteome analysis. *Anal. Biochem.* **683**, 115349 (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takafumi Tozawa, Kohichi Matsunaga, Tetsuro Izumi, Naotake Shigehisa, Takamasa Uekita, Masato Taoka, Tohru Ichimura	4. 巻 17
2. 論文標題 Ubiquitination-coupled liquid phase separation regulates the accumulation of the TRIM family of ubiquitin ligases into cytoplasmic bodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0272700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0272700	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 Takahiro Takekiyo, Natsuki Yamada, Taku Amo, Chikako T. Nakazawa, Atushi Asano, Tohru Ichimura, Minoru Kato, Yukihiro Yoshimura	4. 巻 369
2. 論文標題 Dissolution of amyloid aggregates by direct addition of alkali halides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Liquids	6. 最初と最後の頁 120849
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molliq.2022.120849	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 Masato Taoka, Kota Kamei, Akiko Kashima, Yuko Nobe, Takahiro Takekiyo, Takamasa Uekita, Tohru Ichimura	4. 巻 683
2. 論文標題 An ionic liquid-assisted sample preparation method for sensitive integral-membrane proteome analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 115349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2023.115349	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市村 徹、竹清貴浩、田岡万悟
2. 発表標題 ゆで卵を溶かせる可溶化剤とそれを用いた細胞膜蛋白質の高感度プロテオミクス分析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市村 徹、田岡万悟
2. 発表標題 高感度な膜プロテオーム解析のためのイオン液体支援MSサンプル調製法
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023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
研究分担者	竹清 貴浩 (Takekiyo Takahiro) (00545981)	防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群)・応用科学群・准教授 (82723)	
研究分担者	田岡 万悟 (Taoka Masato) (60271160)	東京都立大学・理学研究科・准教授 (22604)	

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
---------	---------