

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32680

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870798

研究課題名(和文)核プロテオミクス分析法の開発と蛋白質ネットワークの解明

研究課題名(英文)Development of nuclear proteome analysis and study on the protein networks

研究代表者

一番ヶ瀬 智子 (ICHIBANGASE, Tomoko)

武蔵野大学・薬学研究所・客員講師

研究者番号：40453956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタンパク質の網羅的定量解析の中でも、タンパク質生合成に関与する核内のタンパク質を対象とする核プロテオミクス分析法の開発を行った。具体的には、核抽出法の開発及び抽出再現性評価を行い、その後、核タンパク質を網羅的に定量分析できる条件の構築を行った。その結果、使用した細胞の核膜の脆弱性が判明し、定量的に再現良く核タンパク質を回収することが困難であると分かった。そこで、核抽出法の最適化を行った結果、核タンパク質を定性的には再現良く抽出を行うことが可能となった。これまで核タンパク質の抽出は定量性・再現性の面から評価が行われておらず、核タンパク質抽出法の開発は今なお進行中である。

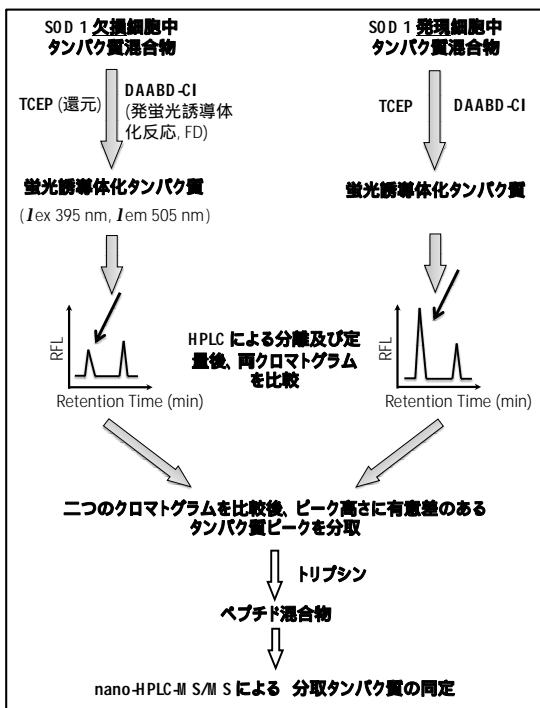
研究成果の概要(英文)：Among the comprehensive and quantitative proteome analysis, we tried to develop the nuclear proteome analysis. The nuclei proteins relate to biosynthesis of proteins. In this study, the nuclear extraction method was developed and validated from point of view of quantitative analysis. Additionally, the conditions for the comprehensive and quantitative analysis for nuclei proteins were optimized. As a result, it was demonstrated that the nuclear membrane of the used cells, DT40, was extremely weakness, so that it was difficult to extract reproducibly the nuclei proteins. After the conditions were studied, the nuclei proteins were not quantitatively but qualitatively able to be extracted. As far as we know, the extractions of the nuclei proteins have never been validated from point of view of quantitatively and reproducibly, and the development is now proceeding.

研究分野：分析化学

キーワード：核タンパク質 プロテオーム解析 抽出再現性 高速液体クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで新しい手法のプロテオーム解析法 FD-LC-MS/MS を開発し、その実用化における研究を行ってきた<sup>(1-2)</sup>。FD-LC-MS/MS の原理図を Fig. 1 に示す。ある刺激を与えた細胞 (例えば抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) 欠損細胞) より抽出したタンパク質混合物中のインタクトなタンパク質を蛍光試薬 (それ自身は蛍光を持たず、反応して初めて蛍光を発する試薬) の DAABD-Cl で蛍光誘導体化 (Fluorogenic Derivatization: FD) した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) - 蛍光検出器で網羅的に分離・定量する。対照試料 (SOD1 発現細胞) を新たに FD 反応し、同様に HPLC へ注入、クロマトグラムを得る。保持時間とピーク高さにより、定性と定量が可能となるので、両クロマトグラムを比較解析すると、有意差のあるタンパク質ピークが SOD1 の欠損により増加した活性酸素種 (スーパーオキシド ( $O_2^-$ )) の影響を受けて変動



したタンパク質であると分かる。この有意差のあるタンパク質ピークだけを分取し、ペプチド混合物とした後に、nano-HPLC で分離、タンデム質量分析計 (MS/MS) で解析・タンパク質同定を行う。

Fig. 1 | FD-LC-MS/MS 法の原理図

先に行った SOD1 欠損細胞中の細胞質内タンパク質変動解析の結果においては、 $O_2^-$  が細胞骨格破壊に与関するタンパク質の発現を促進していることを明らかにしている他、翻訳などのタンパク質合成に与関するタンパク質の変動も報告している (財団法人薬理研究会研究助成金 平成 24 年度 採択; 2012 年 9 月 20 日 日経バイオテックに掲

載)<sup>(1)</sup>。本研究では、これまでに達成された FD-LC-MS/MS の高い感度並びに再現性を活用し、 $O_2^-$  がタンパク質合成の第一段階に与関する核タンパク質の発現量に与関する影響を明らかにし、先に得られた細胞質網羅解析の結果と統合することで、核から細胞質へのシグナル伝達を行うタンパク質ネットワークの解明を行う。

2. 研究の目的

本研究では核プロテオミクス分析法の開発と  $O_2^-$  のタンパク質ネットワークの解明を行う。具体的には、核タンパク質の抽出再現性が定量結果に重大な影響を与えるため、核抽出法の開発及び抽出再現性評価が重要な項目である。その後、核タンパク質を網羅的に解析できる HPLC 条件を開発、SOD1 欠損及び発現細胞の核タンパク質を比較解析し、 $O_2^-$  の影響を明らかにする。得られた結果は、細胞質網羅解析の結果と統合し、最終的には核から細胞質への  $O_2^-$  によるタンパク質ネットワークを包括的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では  $O_2^-$  による細胞内のタンパク質ネットワークを包括的に解明するため、以下に示す方法で研究を進めた。

(1) SOD1 欠損細胞と SOD1 発現細胞の入手

SOD1 の欠損及び発現細胞は研究協力者である武蔵野大学薬学研究所 榎本武美教授より得た。用いる SOD1 欠損細胞はニワトリ DT40 細胞に Tet-off system を導入した条件破壊株で、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン (Dox) の添加培養により human SOD1 遺伝子 (*hSOD1*) の発現が抑制される。先に報告した SOD1 欠損細胞の細胞質内の解析では、ウェスタンブロットで *hSOD1* が検出下限となる Dox 96 時間処理の細胞を用いたため、本研究でも同様に Dox 96 時間処理で SOD1 の発現が欠損した細胞を用いることとした。

(2) 核タンパク質抽出法の開発と抽出再現性の評価

これまで核タンパク質の抽出は定量性・再現性の面から評価が行われておらず、キット化された手法を用いても十分な核抽出に至らないため、まずは核タンパク質抽出法の開発を行った。予備的検討で試したキットで核を抽出できなかった原因として、緩衝液中の界面活性剤と塩類が混合されており、強イオン強度下で界面活性剤が添加されたことで、タンパク質の塩析が起こり、抽出できなかったと考えられた。また、核タンパク質の可溶性における界面活性剤の選択も重要である (Anal. Biochem 150, 337-344, 1985)。そこで、最も一般的な遠心分画法による抽出 (Blobel, G. et al., Science, 154: 1662-5, 1966) を基にした EzSubcell Extract キット (アトー株式会社) を用い抽出を行った。抽出の際、他のオルガネラと分離できたが、更に、核タン

パク質抽出のための緩衝液を入れ、ホモジナイズ後、核膜が破壊されたかどうかを電子顕微鏡でその都度確認を行った。

抽出再現性の評価は核内タンパク質の網羅解析が目的のため、全抽出核タンパク質を評価の対象とした。抽出した核タンパク質を DAABD-Cl で FD 化し、HPLC へ注入、蛍光検出する。効率的に研究を進めるため、分離条件は細胞質タンパク質で確立した分離条件<sup>(1)</sup>を利用し、更にそれを最適化した。また、キットプロトコール通りに抽出後、核タンパク質をロート型ゲル電気泳動にて濃縮する方法の評価は回収したタンパク質の濃度をブラッドフォード法で定量することで行った。

### **(3) 核抽出液中に含まれるタンパク質網羅解析のための HPLC-蛍光分離抽出の開発:**

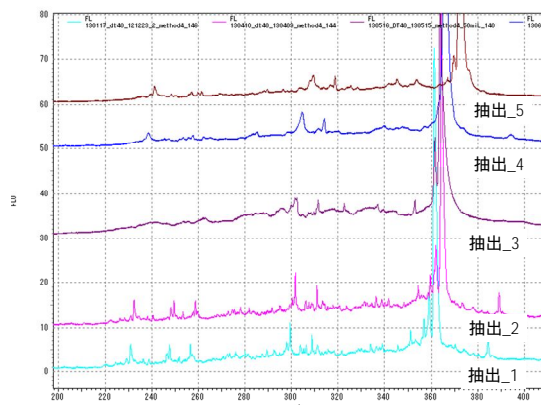
FD 化したタンパク質そのものを HPLC にて分離し、その発現量を網羅的に定量するため、分離条件の開発を行った。具体的には HPLC 分離カラムの評価、溶離液組成(アセトニトリル、イソプロパノール、水及びトリフルオロ酢酸)の検討、グラジエント溶離条件の検討である。なお、(2)の抽出再現性評価の時点でこの検討を同時進行で行い、研究計画の効率化を図った。

### **(4) ニワトリ DT40 細胞並びに SOD1 欠損(発現)細胞中のタンパク質ピークの同定:**

(3)で確立した条件を基に、各細胞中核タンパク質の同定を行った。抽出した核タンパク質を FD 反応後、HPLC-蛍光分析へ注入・分取し、トリプシン消化後、nano-HPLC-MS/MS へ注入し、タンパク質の同定を行った。

## 4. 研究成果

上述のように、これまで核タンパク質の抽出は定量性・再現性の面から評価が行われておらず、核タンパク質抽出法の開発には膨大な時間を要し、今なお進行中である。はじめに核タンパク質抽出条件の再現性評価並びに検討、及び核抽出液中に含まれるタンパク質網羅解析のための HPLC-蛍光検出条件の検討を同時進行で行った。この際、遺伝子操作前の細胞である DT40 細胞を用いることで、従来よりも 1/3 の培養期間で検討に用いることが可能となった。また、市販の抽出キットで再現性が取れないことで早めに実験を切り替えたことが功を奏し、研究初年度は当初の計画以上に進展していると考えられた。しかし、この検討で、取り扱う細胞の核膜が文献に記載されている以上に極めて脆弱であることが判明し、再現性のある核タンパク質の回収が困難であることが判明した。その結果、SOD1 の欠損による変化よりも、抽出再現性による変動が大きく、現状の核抽出条件では差異解析できないと判断した(Fig. 2)。

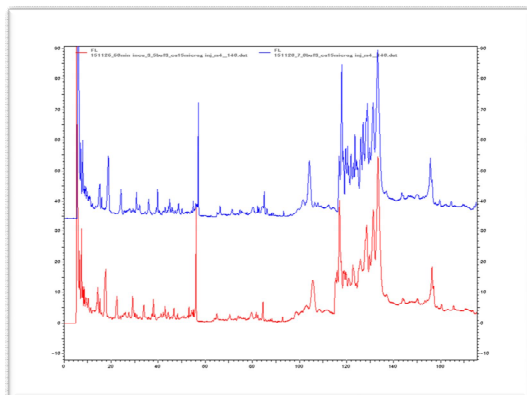


**Fig. 2| HPLC-蛍光のクロマトグラム**

抽出ごとにタンパク質ピークの本数やピーク高さが違うことが示された。

そこでキットプロトコール通りに抽出後、核タンパク質をロート型ゲル電気泳動にて濃縮する手法の導入を試みた。濃縮方法はロート管状の筒にポリアクリルアミドゲルを充填したゲルを、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)の原理で濃縮する手法(Nativen, アトー株式会社)で、予備試験にてタンパク質の非特異的吸着が少なく、回収率が高いことが明らかとなっていた。しかしながら、この手法は本来、SDS-PAGE の原理に則り、濃縮ゲルにて添加試料を濃縮後、分離ゲルにて分子量の順に試料を分離していく方法であり、添加試料の濃縮のみに使用する例は初めてであったため、条件の最適化、並びに評価を行う必要性があった。濃縮条件の最適化項目は、濃縮ゲルのゲル濃度、ゲル作製時間、ゲル長、泳動時間、及び電流値である。最適化の結果、それぞれの条件は、3.0%、120 min、5.0 cm、85 min、及び 10 mA であった。また、個々のロート管により、体積が若干異なるため、常に同一のゲル管を用いること、更にゲル作製前にゲル作製用緩衝液を 37°C、10 min 間加温、ゲル作製時の室内温度を常に 25°C と一定にすることで、濃縮操作の再現性を得ることができた(BSA で日間 RSD  $\leq$  25%)。次に複数のタンパク質を混合した試料を用いてこの濃縮手法を評価したところ、回収部分に詰りが生じ、濃縮した混合タンパク質をひとつの分画で再現良く回収することができなかった。そこで、上記濃縮操作の導入を断念し、キットの核抽出プロトコールの最適化を新たに行った。具体的には、抽出前の細胞の状態や、抽出スケール、核膜を分解し核タンパク質を抽出するための緩衝液の容量とインキュベーション時間である。その結果、核抽出前の細胞を冷凍保存しないこと、抽出に用いる細胞数を 1/10 ( $10^6$  cell)に減らし、15 mL 遠沈管から 1.5 mL チューブで一連の抽出操作を行うこと、加えて、核膜を分解し核タンパク質を抽出するための緩衝液容量を細胞数に対し一定量( $X \times 10^6$  cell に対して、3.5X  $\mu$ L の緩衝液)とし、60 min 間のインキュベーションを行うこととした。その結

果、核タンパク質を定性的には再現良く抽出を行うことが可能となった (Fig. 3)。



**Fig. 3| 核抽出法最適化後の HPLC-  
蛍光のクロマトグラム**

得られた蛍光ピークを分取し、nano-HPLC/MS/MS に供した結果、histone H3-IV や heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 など多くの核内タンパク質が確認することができ、細胞質成分の汚染を受けることなく核抽出できた。しかしながら、抽出した核タンパク質をブラッドフォード法でタンパク濃度を測定後、同一濃度の試料を蛍光標識し、HPLC-蛍光計に注入しているにも関わらず、得られるクロマトグラムのピーク高さは抽出操作ごとに変動することが明らかとなった。そこでタンパク質量に問題があると判断し検討したところ、核抽出用緩衝液がブラッドフォード法の定量値に影響を与えることが明らかとなった。現在は定量値への影響がブラッドフォード法よりも低い BCA (ピシンコニン酸) 法でタンパク質濃度定量法の最適化を検討している。

このように、当初予期していなかった細胞膜の脆弱性により、核抽出法の開発と評価に多くの時間が割かれた。今後の展望は、核抽出用緩衝液存在下、タンパク質濃度を定量する方法を確立し、今回の成果で得られた HPLC-蛍光検出条件を用いて、SOD1 欠損及び発現細胞の核タンパク質の比較解析を行い、最終目標である核から細胞質への  $O^2$  によるタンパク質ネットワークを包括的に明らかにする予定である。

#### <引用文献>

1. Ichibangase T, Sugawara Y, Yamabe A, Koshiyama A, Yoshimura A, Enomoto T, Imai K: An FD-LC-MS/MS Proteomic Strategy for Revealing Cellular Protein Networks: A Conditional Superoxide Dismutase 1 Knockout Cells, PLOS ONE, 2012, 7, e45483, <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0045483>.
2. Ichibangase T, Imai K: FD-LC-MS/MS method for understanding protein expressions in tissues and cells, Biological &

#### 5. 主な発表論文等 該当なし

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.musashino-u.ac.jp/proteomic/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
一番ヶ瀬 智子 (ICHIBANGASE, Tomoko)  
武蔵野大学・薬学研究所・客員講師  
研究者番号: 40453956

(2) 研究協力者  
榎本 武美 (ENOMOTO, Takemi)  
吉村 明 (YOSHIMURA, Akari)