

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590275

研究課題名（和文） 電気泳動ゲルからのサブフェムトモルタンパク質の同定法の開発

研究課題名（英文） Identification of sub-femto mole protein from gel electrophoresis.

研究代表者

大川 克也（OKAWA KATSUYA）

京都大学・医学研究科・その他（グループリーダー）

研究者番号：20444458

研究成果の概要：

従来法の要素技術の検証を進め、改善点が見出されて来ている。これまでに開発した、従来の10倍程度以上高感度なゲル内タンパク質染色法を活用し、本方法でなければ可視化出来ないサブフェムトモルのモデルとなるタンパク質を調製し、少なくともサブフェムトモルレベルでは従来法の延長線上の解析手法にて対応可能であることが見出された。

また、得られた検証結果を随時、実践のタンパク質解析に応用している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2200000	660000	2860000
2008年度	1300000	390000	1690000
年度			
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子医学

1. 研究開始当初の背景

SDS-PAGE など、電気泳動により分離したタンパク質から目的タンパク質を見出し同定することはこれまでも行われてきているが、簡便さ、得られる情報量の多さなど、様々な手法が利用可能な現在においても、その重要性は些かも衰えていないと考える。

見出されたタンパク質をここから同定することは、研究を大きく進捗させることに貢献する。

電気泳動後のゲルを染色しタンパク質を可視化する手法は現在様々に利用可能だが、最も検出感度の良い方法は銀染色法になる。

一般的に広く用いられているミニゲルの SDS-PAGE にて、1 ナノ (10^{-9}) グラムから数百ピコ (10^{-12}) グラムのタンパク質の検出が可能。これは 50kDa のタンパク質に換算すると、20 フェムト (10^{-15}) モルから数フェムトモル相当になる。

しかし、これらタンパク質量の同定は、一般的には出来ないことになっており、例えば、受託解析会社では 25 フェムトモル以上（A社）や、100 フェムトモル以上（P社）必要と謳っている。

我々は、部分最適ながら手法を工夫することで、数フェムトモル相当のタンパク質を定

常的に解析可能としている。即ち、「見えているものは同定可能」な状態。さらに、明確なバンドを形成していない(見えていない)サブフェムトモルと思われるものであっても、同定されてくることがある。

ただし、見えていないものを積極的に取り扱うことは困難なので、従来の10倍程度以上検出感度のよい銀染色法(特願2004-282227)を開発した。

2. 研究の目的

サブフェムトモルのタンパク質を定常的に解析可能であるかは明確ではなく、本研究課題を通して第一に明らかにしたいと考えていた。

(1) SDS-PAGE など、電気泳動後のタンパク質の同定で、試料量不足などを理由に何度も再調製しなければならぬフラストレーションを解消し、研究効率の向上に資することを旨とする。

(2) この過程で、SDS-PAGE など、簡易かつ重要な手法を用いたタンパク質同定において、サブフェムトモルやさらに微量な試料の解析が、従来法の延長線上にあるのか見極める。

(3) この結果次第で、従来法からのパラダイムシフトの必要性を明確にする。

3. 研究の方法

電気泳動ゲルから切り出したタンパク質の同定・構造解析をする場合、電気泳動ゲルの切り出し、ゲルの脱色、タンパク質を化学的に前処理、タンパク質を特定の酵素により断片化、断片化ペプチドの抽出、抽出ペプチドの質量分析、データベース検索という流れが一般的(PMF)。

我々が開発した染色方法を用いれば、サブフェムトモルタンパク質の可視化、切り出しは充分可能。

現在従来法で数フェムトモルタンパク質の解析は可能となっているが、これは各ステップを最適化した結果達成されているものではない。

タンパク質の分析では、試料損失が最も問題となり、ステップ数および使用器具に改善の余地が多分にある。ここをポイントに改良を加えることで、少なくともサブフェムトモルタンパク質は従来法の延長線上の技術にて解析可能と考える。

タンパク質は化学的性質が多岐に渡り、少なくともサブフェムトモルのものの解析が可能であったとしても、さらに微量なものの解析が可能であることは保証されない。即ち

低濃度になればなるほど、使用器具等にタンパク質は吸着し、ある濃度を境に、急激に検出不能になる可能性がある。この見極めも本研究課題の目標になる。

従来法の延長線上にあれば、引き続き手法の改善に努め、なければ、新たな解析手法を考察する。

4. 研究成果

従来法の要素技術の検証を進め、改善点が見出されて来ている。これまでに開発した、従来の10倍程度以上高感度なゲル内タンパク質染色法を活用し、本方法でなければ可視化出来ないサブフェムトモルのモデルとなるタンパク質を調製し、少なくともサブフェムトモルレベルでは従来法の延長線上の解析手法にて対応可能であることが見出された。

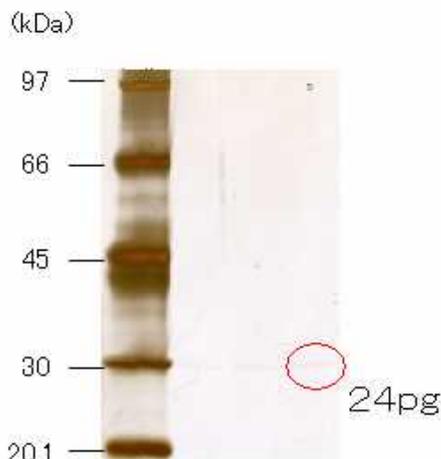


図1:モデルタンパク質(Carbonic anhydrase II)のサブフェムトモルの泳動像

Matched peptides shown in Bold Red

```
1 MSHHGGYGKH NGPEHVKDF PIANGERSQSP VDIOTKAVYG DPALKPLALY
51 YGEATSRMY NNGHSFNVEY DSDQKAVLK DGPLTGTYRL YGFHFHGGSS
101 DDQGSSEITVD RKKYAELHL VHWNTKYGDF GTAAQDPGL AVYGVFLKYG
151 DANPALOKYL DALDSIKTKG KSTDFPFDG GSLLPNVLDY WYVGSLLTP
201 PLLESYTRIV LKEPISVSSQ QMLKFRILNF HAEGEPPELLM LANWHPAQPL
251 KNRQVRGFFPK
```

Start - End	Observed	Sequence
19 - 27	1010.51	D PPIANGER
127 - 140	2253.14	Y GFHGTAAQDPGLAVYGVFLK
90 - 111	2584.37	L YGFHFHGGSSDDQGSSEITVD
227 - 251	2952.47	T LNFHAEGEPELLMLANWHPAQPLK
227 - 253	3122.58	T LNFHAEGEPELLMLANWHPAQPLKNR

図2:24pgモデルタンパク質のPMF

また、得られた検証結果を随時、実践のタンパク質解析に応用している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計20件)

- Miki T, Okawa K, Sekimoto T, Yoneda Y, Watanabe S, Ishizaki T, Narumiya S. mDia2 shuttles between the nucleus and the cytoplasm through the Importin- α / β - and CRM1-mediated nuclear transport mechanism. *J Biol Chem.* 2009;284(9):5753-62. 査読有
- Yoshimoto R, Kataoka N, Okawa K, Ohno M. Isolation and characterization of post-splicing lariat-intron complexes. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):891-902. 査読有
- Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Qi Z, Okawa K, Nakao S. Anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia stimulate peripheral blood mononuclear cells to secrete TNF- α and IFN- γ . *J Immunol.* 2009;182(1):703-10. 査読有
- Omura A, Matsuzaki T, Mio K, Ogura T, Yamamoto M, Fujita A, Okawa K, Kitayama H, Takahashi C, Sato C, Noda M. RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. *J Biol Chem.* 2009;284(6):3461-9. 査読有
- Hori T, Amano M, Suzuki A, Backer CB, Welburn JP, Dong Y, McEwen BF, Shang WH, Suzuki E, Okawa K, Cheeseman IM, Fukagawa T. CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell.* 2008;135(6):1039-52. 査読有
- Nojima H, Adachi M, Matsui T, Okawa K, Tsukita S, Tsukita S. IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol.* 2008;10(8):971-8. 査読有
- Hosokawa N, Wada I, Nagasawa K, Moriyama T, Okawa K, Nagata K. Human XTP3-B forms an endoplasmic reticulum quality control scaffold with the HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex and BiP. *J Biol Chem.* 2008;283(30):20914-24. 査読有
- Yamazaki Y, Okawa K, Yano T, Tsukita S, Tsukita S. Optimized proteomic analysis on gels of cell-cell adhering junctional membrane proteins. *Biochemistry.* 2008;47(19):5378-86. 査読有
- Yamanaka Y, Heike T, Kumada T, Shibata M, Takaoka Y, Kitano A, Shiraiishi K, Kato T, Nagato M, Okawa K, Furushima K, Nakao K, Nakamura Y, Taketo MM, Aizawa S, Nakahata T. Loss of Borealin/DasraB leads to defective cell proliferation, p53 accumulation and early embryonic lethality. *Mech Dev.* 2008;125(5-6):441-50. 査読有
- Higashi T, Ikeda T, Shirakawa R, Kondo H, Kawato M, Horiguchi M, Okuda T, Okawa K, Fukai S, Nureki O, Kita T, Horiuchi H. Biochemical characterization of the Rho GTPase-regulated actin assembly by diaphanous-related formins, mDia1 and Daam1, in platelets. *J Biol Chem.* 2008;283(13):8746-55. 査読有
- Hirayama S, Yamazaki Y, Kitamura A, Oda Y, Morito D, Okawa K, Kimura H, Cyr DM, Kubota H, Nagata K. MKKS is a centrosome-shuttling protein degraded by disease-causing mutations via CHIP-mediated ubiquitination. *Mol Biol Cell.* 2008;19(3):899-911. 査読有
- Kawato M, Shirakawa R, Kondo H, Higashi T, Ikeda T, Okawa K, Fukai S, Nureki O, Kita T, Horiuchi H. Regulation of platelet dense granule secretion by the Ral GTPase-exocyst pathway. *J Biol Chem.* 2008;283(1):166-74. 査読有
- Aoki K, Moriguchi H, Yoshioka T, Okawa K, Tabara H. In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *EMBO J.* 2007;26(24):5007-19. 査読有
- Hiraoka Y, Ohno M, Yoshida K, Okawa K, Tomimoto H, Kita T, Nishi E. Enhancement of alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein by a metalloendopeptidase nardilysin. *J Neurochem.* 2007;102(5):1595-605. 査読有
- Yamashita H, Kawamata J, Okawa K, Kanki R, Nakamizo T, Hatayama T, Yamanaka K, Takahashi R, Shimohama S. Heat-shock protein 105 interacts with and suppresses aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase: clues to a possible strategy for treating ALS. *J Neurochem.* 2007;102(5):1497-505. 査読有
- Masuyama K, Taniguchi I, Okawa K, Ohno

M.

Factors associated with a purine-rich exonic splicing enhancer sequence in *Xenopus* oocyte nucleus.

Biochem Biophys Res Commun.

2007;359(3):580-5. 査読有

Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Okawa K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor.

Immunity. 2007;27(1):145-59. 査読有

Nakaoka Y, Nishida K, Narimatsu M, Kamiya A, Minami T, Sawa H, Okawa K, Fujio Y, Koyama T, Maeda M, Sone M, Yamasaki S, Arai Y, Koh GY, Kodama T, Hirota H, Otsu K, Hirano T, Mochizuki N.

Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function via neuregulin-1/ErbB signaling.

J Clin Invest. 2007;117(7):1771-81. 査読有

Kawahara M, Hori T, Matsubara Y, Okawa K, Uchiyama T.

Cyclin-dependent kinase-like 5 is a novel target of immunotherapy in adult T-cell leukemia.

J Immunother (1997). 2007;30(5):499-505. 査読有

Miki T, Takegami Y, Okawa K, Muraguchi T, Noda M, Takahashi C.

The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways.

J Biol Chem. 2007;282(16):12341-52. 査読有

[学会発表](計15件)

H Nojima ほか: IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signaling cascade: BMB2008:12/9-12: 神戸

細川暢子 ほか: 新規レクチンによる小胞体タンパク質品質管理機構: BMB2008:12/9-12: 神戸

東 智仁 ほか: Daam1, mDia1 によるアクチン重合反応制御機構: BMB2008:12/9-12: 神戸

堀 哲也 ほか: セントロメア DNA に結合する CENP-T 複合体の機能解析: BMB2008:12/9-12: 神戸

T Sasaki ほか: Adaptor Nck1 induces

increased tyrosine phosphorylation of GIT2: BMB2008:12/9-12: 神戸

田原浩昭 ほか: mRNA 切断活性を示す線虫の Argonaute 蛋白についての遺伝生化学的解析: BMB2008:12/9-12: 神戸

山元誠司 ほか: TAP-MS 法によるインテグレート結合因子 Huwe1 の同定とその解析: 第22回日本エイズ学会学術集会・総会: 2008:11/26-28: 大阪

M Shoji ほか: ROLE OF TDRD9 IN MALE MEIOSIS AND REGULATORY PATHWAY OF TRANSPOSON RNA AND DNA METHYLATION: 6th biennial meeting on Germ Cells: 2008:10/1-5: CSH

山崎裕自 ほか: AJ fraction を用いた膜タンパク質のプロテオミクス解析: 第60回日本細胞生物学会大会: 2008:6/29-7/1: 横浜

S Yamamoto ほか: IDENTIFICATION OF CELLULAR INTERACTORS TO MoMLV INTEGRASE USING TANDEM AFFINITY PURIFICATION MASS SPECTROMETRY ANALYSIS: 33rd annual meeting on Retroviruses: 2008:5/19-24: CSH

漆原範子 ほか: 血小板における dynamin の発現 - アクチン重合への関与の可能性: BMB2007:12/11-15: 横浜

蜷川 暁 ほか: 小胞体関連分解構成因子 Derlins に結合するタンパク質の同定と解析: BMB2007:12/11-15: 横浜

佐々木知幸 ほか: Cell adhesion regulates the interaction between Nck and GIT1: BMB2007:12/11-15: 横浜

東 智仁 ほか: Rho によって制御される細胞質中の Formin タンパク質によるアクチン重合: BMB2007:12/11-15: 横浜

田原浩昭 ほか: *C. elegans* における二次型 siRNA の産生と活性についての遺伝生化学的解析: BMB2007:12/11-15: 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://sentan1.hmro.med.kyoto-u.ac.jp/k-okawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大川 克也 (OKAWA KATSUYA)

京都大学・医学研究科・その他(グループリーダー)

研究者番号: 20444458