

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：82723

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14427

研究課題名(和文)細胞内異常蛋白質凝集体を効率よく分析できるプロテオミクス新手法の開発

研究課題名(英文)A new proteomics sample processing method of intracellular insoluble aggregates

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質の凝集は生命現象にとって極めて重大な影響を及ぼす。本研究では、レーザーマイクロカッターなどにより培養細胞から単離された少数個の凝集体でも、高感度にMS分析できる新規のプラットフォームを考案した。本法(BOPs法と命名)は、疎水性マイクロビーズ担体をもつ蛋白質に対する安定な吸着性と、水-アセトニトリル混合溶媒中でのトリプシンの高い消化効率を、単一チューブ内のワークフローとして利用している。本法は、さまざまな変性剤の存在下や過度に希釈された状態の微量サンプルを簡便かつ高感度に分析できる。本法は、極微量または量が限定される凝集体を分析するために極めて有効な方法である。

研究成果の概要(英文)：Protein aggregation causes severe damages to cell and tissue functions. In the present study, we developed a new proteomics sample preparation method that is applicable to minute amounts of aggregates including those isolated from cultured cell lines with laser microdissection systems. This method, which we call BOPs, combines two advantages of current techniques, (1) unbiased binding of reversed-phase polymeric microbeads to any type of protein and (2) enhanced trypsin digestion efficiency in CH₃CN-aqueous solvent systems, into a single-tube workflow. BOPs can readily be adapted to a wide range of diluted or denaturant-contaminated samples with high sensitivity, reproducibility, and reliability. The availability of the present BOPs make it especially attractive for next-stage proteomics of rare and limited aggregates.

研究分野：生化学

キーワード：プロテオミクス アグリゲート LC-MS BOPs トリプシン消化

1. 研究開始当初の背景

(1) アミロイドやオリゴマーなどの蛋白質凝集体の沈着は、加齢に伴う多くの疾患に共通に観察される現象である。しかしながら、こうした不溶性凝集体の全容を蛋白レベルで解明しようとする試みは、国内外を問わずまだほとんど成功していない。この理由は、これらの凝集体は細胞溶解後にただちに不溶沈殿となり溶媒中に安定に存在できないため、既報のツールによる分離分析が極めて難しいこと、また分離分析のための戦略も凝集体ごとにまちまちであり、一般的な対応策がまだ十分に整備されていないことなどがあげられる。高齢化社会が急速に進み、蛋白質凝集に関わる疾患が深刻な社会問題として認識されてきている今日、蛋白質を直接取り扱うプロテオミクスの挑戦は極めて重要である。

(2) 研究代表者は、研究分担者の田岡と共同で細胞刺激に応じて形成されるシグナル伝達複合体などの機能性蛋白質複合体を、LC-MS/MS法を用いて高速かつ高精度に分析するための技術開発を進めてきた。また、本申請課題と関連して TRIM32 ユビキチンリガーゼが形成する JUNQ 型蛋白質凝集体の生化学的性質について基礎的検討を加えてきた。研究分担者の八谷は、プリオン蛋白質が形成する異常蛋白質凝集体の研究を推進してきた。また、超微小領域(直径1 μ m以下)の切り出しが可能な新規マイクロレーザーカッター(ALMD; Advanced LMD)を開発し、細胞や組織からダイレクトに異常凝集体を分離する手法を検討してきた。研究分担者の竹清は、物理化学的視点から蛋白質凝集とその可溶化問題に取り組んできた。

2. 研究の目的

本研究では、セルソーターやレーザーマイクロカッターなどにより細胞や組織から単離された少数個の異常蛋白質凝集体でも、高感度にプロテオミクス分析できる新しいプラットフォームを開発することを目的とした。また、開発した手法を生体サンプルに実際に適用することでその有用性を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BOPs 法の手順

疎水性マイクロビーズ吸着体としては POROS R2 ビーズ (PerSeptive Biosystems; 粒子径 50 μ m) を用いた。マイクロチューブ内のサンプル溶液に、1 μ L (250 μ g) の R2 ビーズを加えインキュベートすることで、タンパクサンプルをビーズに吸着させた。遠心して上清を除去した後に、緩衝液を用いてビーズを洗浄した。SDS などの界面活性剤を含むサンプルの場合、アセトン洗浄をこの洗浄操作手順に加えた。トリプシン消化は、洗浄後

のビーズに 60% CH₃CN を含む 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8) を 10 μ L 加え、トリプシンとともに 37 °C でオーバーナイトインキュベートした。消化後のペプチドは 0.1% ギ酸で希釈または乾燥後に 0.1% ギ酸に再溶解したのち LC-MS 分析用の試料とした。

(2) 質量分析操作

LC-MS は、Waters 社製 nanoACQUITY UPLC-Xeno G2-S QToF システムを使用して行った。LC-MS/MS は、quadrupole-orbitrap hybrid 質量分析系を用いたナノスケール LC-MS/MS システムを使用して行った。

(3) その他の方法

試薬や標準蛋白質は市販品を用いた。トリプシン (MS グレード) は Promega 社のものを使用した。In-solution 消化は、10 μ L の Tris 緩衝液中 (pH 8) で行った。On-bead 消化は、BOPs 法の手順と同様であったが、トリプシン消化は 10 μ L の Tris 緩衝液中 (pH 8) で行った。線虫 (*C. elegans*) は、大腸菌 OP50 を塗布した NGM プレート上で飼育した。HEK293 細胞は、10% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地中で、CO₂ インキュベーターを用いて培養した。

4. 研究成果

本研究で開発したサンプル前処理技術 (microbead-based organic media-assisted proteolysis strategy; BOPs 法と命名) の概略を Fig. 1 に示す。

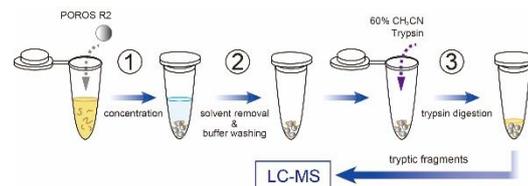


Fig.1 BOPs 法の操作手順

BOPs 法は、連続する三つのステップによって構成されている: (1) RP 支持体への試料の濃縮 (2) 試料溶液中の変性剤の洗浄 (3) CH₃CN 溶液中でのトリプシン消化である。POROS R2 ビーズは幅広い pH レンジ (pH 0-14) で使用でき、また蛋白質に対して高い吸着性能 (~ 15 μ g/1 μ L R2 ビーズ) をもつ。

(1) 従来の in-solution 消化法や on-bead 消化法との比較

Fig.2(A-C) に、ウシ血清アルブミン BSA (1.5 μ M) を、in-solution 法 (A)、on-bead 法 (B)、BOPs 法 (C) でそれぞれ消化し、LC-MS 法で分析したクロマトグラムを示した。BOPs 法は in-solution 法に比べて、高いペプチド検出率と回収率を示すことが明らかとなった。一方、並行して行った on-bead 法では、まったくペプチドが検出されなかった。In-solution 法は、希薄タンパク質溶液では十分に適用できないことが報じられている。

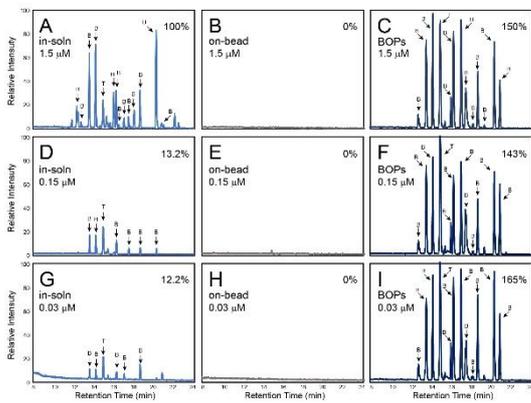


Fig.2 LC-MS クロマトグラムの比較

そこで、先の BSA 溶液を緩衝液で 10 倍 (Fig. 2D-F) 50 倍 (Fig. 2G-I) 希釈し、トリプシン消化を行った。その結果、in-solution 法の消化効率、予想通り希釈の程度とともに低下した (Fig. 2D, G)。しかしながら、BOPs 法は試料希釈の影響を受けなかった。一方、on-bead 法はいずれの実験においても、ペプチドが産生されなかった。以上の結果より、BOPs 法は希薄試料においても効果的にトリプシン消化を行えることが明らかとなった。

(2) 70% ギ酸、8M 尿素、7M 塩酸グアニジンで可溶化した試料の BOPs 法による分析
 ギ酸や、尿素、塩酸グアニジンは不溶性凝集体の可溶性に汎用される試薬である。しかしながら、これらの試薬はタンパク質の変性作用を持つため、トリプシン消化の前までに完全に除去、または十分に希釈する必要がある。こうした操作はいずれも複数のハンドリング操作を含み、サンプルロスやペプチド回収率の低下につながるため、微量試料に対して適用することは困難であった。

Fig.3 にこれらの変性剤の存在下に、BOPs 法で BSA (左図) とチトクローム C (右図)

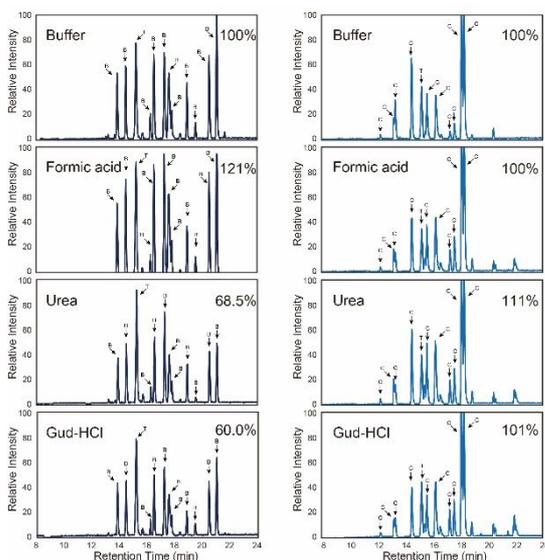


Fig.3 変性剤存在下における BOPs 分析

をそれぞれ消化した LC-MS クロマトグラムを示した。BOPs 法はこれらの変性剤存在下でも操作を変更することなしにそのまま使用できることが明らかとなった。

(3) 界面活性剤を含むサンプルの BOPs 分析

不溶性凝集体の可溶性にさまざまな界面活性剤が用いられる。BOPs 法においてこれらの界面活性剤は、タンパク質の場合と同様に R2 ピーズに結合し、その後のトリプシン消化の CH₃CN 溶液でピーズから解離する。解離した界面活性剤は LC-MS 分析で妨害イオンを生じるため、これらを除去する必要がある。さまざまな溶媒洗浄を検討した結果、試料吸着後のピーズをアセトンで洗浄することで、タンパク試料はピーズに吸着した状態で、界面活性剤のみをピーズから洗い流せることを見出した。Fig.4 に BSA を様々な界面活性剤 (0.1%, 100 μL) の存在下にアセトン洗浄をしたのち、BOPs 法でトリプシン消化を行った LC-MS クロマトグラムを示した。

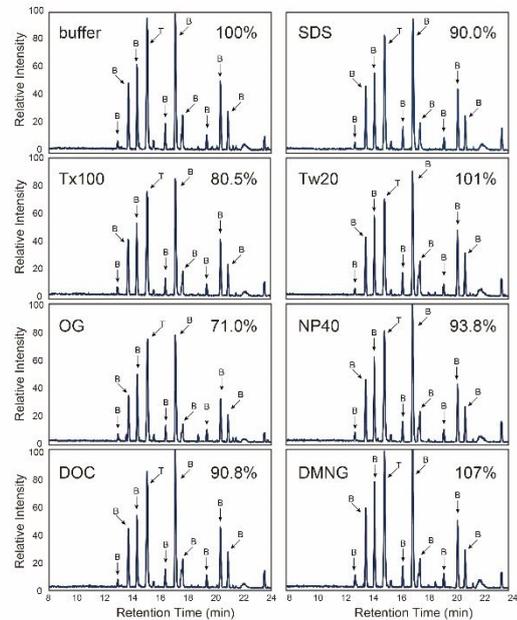


Fig.4 界面活性剤存在下における BOPs 分析

Fig.4 の結果から明らかなように、アセトン洗浄を加えることで、BOPs 法は様々な界面活性剤の存在下でも感度よく LC-MS 分析ができることが分かった。

(4) 微量生体サンプルへの適用

本法の有用性を証明するために、二つの微量サンプルに対して BOPs 法を適用した。

[線虫 1 匹の構成蛋白質分析]

1 匹の親線虫 (*C. elegans*) を 7M 塩酸グアニジン中で破碎し、可溶化したタンパクを直接 BOPs 法で処理し LC-MS/MS 法でタンパク質を同定した。また同様の操作を 3 回行い結果の再現性も検討した。その結果、各々の分析からいずれも 1,000 個を超すタンパク質が特徴的かつ再現よく同定できることが明らか

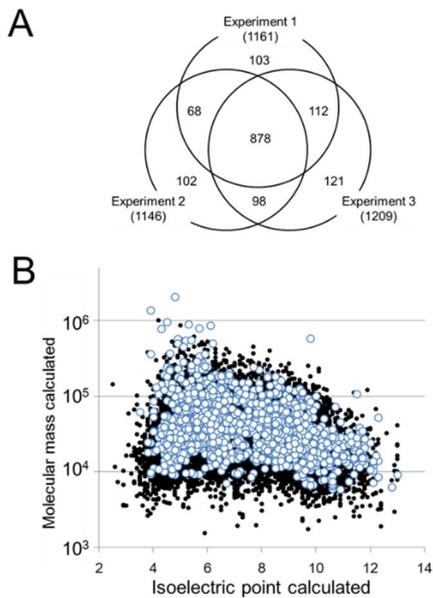


Fig.5 BOPs 法による線虫 1 匹の分析

となった (Fig.5A)。Fig.5B は、同定したタンパク質の等電点と分子量を、*C. elegans* のゲノムデータベースに存在する全タンパク質のそれと比較して二次元プロットしたものである。この比較により、BOPs 法によって分析できるタンパク質の範囲は全タンパク質の 99%以上であることが明らかとなった。この結果は、BOPs 法は線虫タンパク質の分析に対して特定のタンパク質に対してバイアスを持たないことが明らかとなった。

[2,000 個の HEK293 細胞のタンパク分析] 250 μ L の 0.1% TritonX-100 溶液に可溶化した 2,000 個の HEK293 細胞の構成蛋白を BOPs で処理し LC-MS/MS 分析した。また先の場合と同様にこの操作を計 3 回行いデータの再現性も検討した。その結果、各々の分析からいずれも 1,400 個を超すタンパク質が再現的に同

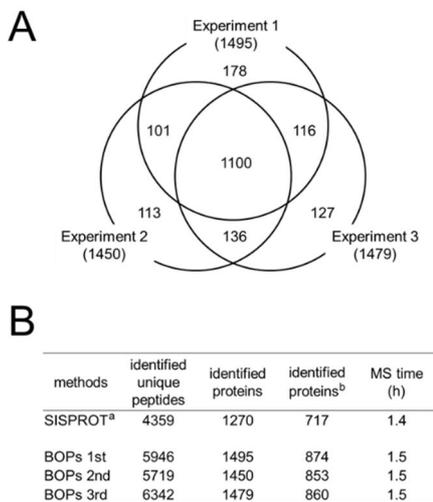


Fig.6 BOPs 法による 2,000HEK293 の分析

定されることが明らかとなった (Fig.6A)。Fig.6B では、BOPs 法の同定結果を Chen らが報告している SISPROT の結果と比較したものである。BOPs 法は SISPROT とほぼ同様の感度を持つことが分かった。しかしながら、SISPROT は特定の界面活性剤に可溶化したサンプルにしか適用できず、BOPs 法と比べてその適用範囲が著しく限定されるという欠点を持っている。

[終わりに]

本研究で考案した MS サンプルの処理法 (BOPs 法) は、非常に簡便で、すべてのハンドリング操作を単一のマイクロチューブ内の連続操作で行うことができる。また本法は、様々な変性剤や界面活性剤存在下に、微量サンプルをロスなく MS 分析することもできる。それゆえ、BOPs 法は微量な凝集体を含むサンプルを高感度に LC-MS 分析することのできる新しい分析プラットフォームであると結論する。一方、本研究課題において、一般的な可溶化剤 (SDS やギ酸など) に不溶な多くの凝集体 (例えばゆで卵: 加熱卵白凝集体) でも、迅速 (10 分以内) かつ高濃度 (3-4 mg/ml) に可溶化できる “新しい” イオン液体混合型の抽出溶媒システムも見出すことができた (未発表)。今後、この溶媒システムを BOPs 法と組み合わせることで、より高感度な凝集体 (アグリゲート) プロテオミクスを可能にする新しいシステムを構築したいと考えている。

<引用文献>

Ichimura T, Taoka M, Shoji I, Kato H, Sato T, Hatakeyama S, Isobe T, Hachiya N. 14-3-3 proteins sequester a pool of soluble TRIM32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitylation and cytoplasmic body formation. *J. Cell Sci.* Vol. 126, 2013, 2014-2026.

Kimura T, Hosokawa T, Taoka M, Tsutsumi K, Ando K, Ishiguro K, Hosokawa M, Hasegawa M, Hisanaga S. Quantitative and combinatory determination of in situ phosphorylation of tau and its FTDP-17 mutants. *Sci Rep.* Vol. 6, 2016, 33479.

Chen W, Wang S, Adhikari S, Deng Z, Wang L, Chen L, Ke M, Yang P, Tian R. Simple and Integrated Spintip-Based Technology Applied for Deep Proteome Profiling. *Anal Chem.* Vol. 88, 2016, 4864-4871.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Taoka M, Fujii M, Tsuchiya M, Uekita T, Ichimura T.

A Sensitive Microbead-Based Organic Media-Assisted Method for Proteomics Sample Preparation from Dilute and Denaturing Solutions.

ACS Appl Mater Interfaces, 査読有, Vol. 9, No. 49, 2017, pp. 42661-42667, DOI:10.1021/acsami.7b16095

Kawaguchi Y, Taoka M, Takekiyo T, Uekita T, Shoji I, Hachiya N, Ichimura T.

TRIM32-Cytoplasmic-Body Formation Is an ATP-Consuming Process Stimulated by HSP70 in Cells.

PLoS ONE, 査読有, Vol. 12, No. 1, 2017, e0169436, DOI: 10.1371/journal.pone.0169436

〔学会発表〕(計5件)

市村 徹、田岡 万悟，変性剤混入サンプルの超高感度プロテオミクス分析，第90回日本生化学会大会，2017年

T. Ichimura, T. Sakuma, An improved on-bead proteolysis procedure for micro-proteomics with denaturing solvent systems, 第40回日本基礎老化学会大会，2017年

市村 徹、河口 祐樹、八谷 如美，分子シャペロン HSP70 はアグリゲート形成を促進する，第89回日本生化学会大会，2017年

市村 徹、河口 祐樹、八谷 如美，HSP70によるTRIM32封入体の形成促進，平成28年度日本生化学会関東支部例会，2016年

市村 徹、河口 祐樹、八谷 如美，Hsp70のATPase活性はTRIM32のcytoplasmic body形成に必要である，第88回日本生化学会大会，2016年

6. 研究組織

(1)研究代表者

市村 徹 (ICHIMURA TOHRU)

防衛大学校・応用科学群・教授

研究者番号：50213012

(2)研究分担者

八谷 如美 (HACHIYA Naomi)

東京都立産業技術研究センター・バイオ応用技術グループ,主任研究員

研究者番号：30408075

研究分担者

竹清 貴浩 (TAKEKIYO Takahiro)

防衛大学校・応用科学群・准教授

研究者番号：00545981

研究分担者

田岡 万悟 (TAOKA Masato)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：60271160