

機関番号：22701
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2008～2010
課題番号：20310121
研究課題名（和文）新規な機能プロテインチップ技術の確立とその臨床応用
研究課題名（英文）A novel PVDF membrane for on-membrane identification of gel-resolved proteins by mass spectrometry
研究代表者 平野 久 (HIRANO HISASHI)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授
研究者番号：00275075

研究成果の概要（和文）：ゲル電気泳動で分離した後、PVDF 膜に転写したタンパク質を膜上で直接 MALDI-MS で測定し、質量スペクトルからタンパク質を同定する技術が 1990 年代に発達した。しかし、膜上のタンパク質のイオン収量は低く、技術が実用的なものにならなかった。本研究で孔径 0.1- μm の PVDF 膜を用いると効率的にタンパク質をゲルから膜に転写し、質量分析装置によって膜上でタンパク質を同定できることがわかった。実際に物理化学的性質の異なる多数の蛋白質をこの方法で同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：In the 1990s, techniques were developed to transfer proteins from gels onto PVDF membranes, and to identify the proteins on the membranes by MALDI-MS. However, the low ionization efficiency of peptides and proteins immobilized on the membranes often renders these techniques useless. Therefore, it is essential to develop membranes on which peptides and proteins can be efficiently ionized for MS analysis. In this study, we found that 0.1- μm pores PVDF membranes can be used for highly efficient and effective electroblotting and MALDI-MS analysis. This membrane showed high ion yield in MALDI-MS analysis of peptides compared to conventional PVDF membranes. In all, 38 yeast proteins with various physicochemical characteristics were separated by 2-DE, immobilized onto the 0.1- μm pore PVDF membranes, and successfully identified by MALDI-MS/MS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：タンパク質、翻訳後修飾、プロテインチップ、質量分析装置

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、ほぼ例外なく翻訳後(翻訳

中を含む)にプロセッシングやアミノ酸の修飾を受ける。翻訳後修飾の種類は極めて多く、

アミノ酸の修飾だけでも300種類以上が知られている。また、多くのタンパク質は翻訳後修飾を受けてはじめて本来の機能を獲得することがわかっている。そのため、翻訳後修飾に異常が生じるとタンパク質の機能に変化が見られるようになる。そして、その変化が様々な疾患の原因となる。たとえば、タンパク質の脱イミノ化を触媒するペプチジルアルギニン脱イミノ化酵素の発現異常（フィブリンやビメンチンの脱イミノ化の異常）は関節リウマチの一因となる。また、ラセミ化の異常はアルツハイマー病、リン酸化やユビキチン化の異常はパーキンソン病やアルツハイマー病の原因に、グリコシル化の異常は癌などの原因になることはよく知られている。他にも翻訳後修飾の異常を原因とする数多くの疾患の存在が明らかにされている、また予測もされている。従って、翻訳後修飾異常と疾患の関係を究明する研究は、病気の診断、治療、予防にとって極めて重要であると考えられる。

近年、タンパク質やペプチドの質量分析技術が急速に発達した。その結果、質量分析装置を用いることによって、翻訳後修飾されたタンパク質あるいはペプチドの検出や翻訳後修飾部位の同定が従来に比べてかなり効率的に行えるようになった。また、高精度なイオントラップ型質量分析計を使えば、タンパク質に付加されている糖鎖の構造まで解析できるようになった。しかし、翻訳後修飾異常と疾患の関係を”より”迅速かつ網羅的に解析するためには、翻訳後修飾をハイスループットで分析する方法の開発が不可欠である。

プロテインチップは、ハイスループットな翻訳後修飾タンパク質の検出方法として注目されている。プロテインチップは、3種類、すなわち、分析、逆相、機能プロテインチップに分類される。分析プロテインチップは、

タンパク質間の結合親和性、タンパク質の特異性や発現レベルの解析に使われている。抗体プロテインチップは代表的な分析プロテインチップである。逆相プロテインチップは、チップ上に固定化された細胞抽出液中に含まれるターゲットタンパク質を抗体により検出するために用いられる。翻訳後修飾分析に用いるプロテインチップは、タンパク質とタンパク質、DNA、あるいは薬物との相互作用の解析にも利用されるプロテインチップと同様に、機能プロテインチップの範疇に属する。米国のSnyderら(2005)は、酵母細胞内で発現させたプロテインキナーゼを基板に固定化して機能プロテインチップを作製し、酵母の87のプロテインキナーゼによりリン酸化される多数の基質を明らかにした。また、Snyderら(2009)は、発現タンパク質をプロテインチップに固定化し、これに抗 α -グリカン抗体を反応させた。そして、チップ上で既知のNおよびO結合型糖タンパク質をそれぞれ108および171検出した。また、NおよびO結合型糖タンパク質それぞれ109および73を含む新規な糖タンパク質217を検出し、プロテインチップが翻訳後修飾分析に有力な方法であることを示した。

Snyderらの研究は、発現タンパク質を固定化したチップを使っているため、生体内で翻訳後修飾されているタンパク質を検出したり、疾患によって翻訳後修飾がどう変化するか分析したりすることができない。生体内のタンパク質の翻訳後修飾を解析するためには、生体内中のタンパク質を抽出精製し、チップ上に固定化する必要があった。

2. 研究の目的

筆者らは、数年前から新しいプロテインチップ基板の開発を手がけた。電気泳動で分離されたタンパク質を電気泳動的に転写(プロット)、固定化してプロテインチップにする

ことができ、チップ上のタンパク質を直接質量分析できる導電性の基板の開発を目指した。そして、ステンレス板にダイヤモンド様炭素を成膜した基板(DLC 基板)の開発に成功した(Iwafune ら 2007)。この DLC 基板表面の水素を塩素に置換し、これにアミノ基、カルボキシル基を付加し、さらに N-ヒドロキシスクシンイミドエステルで化学修飾した。この化学修飾によってタンパク質を DLC 基板に共有結合させることができるようになった。

これまでのプロテインチップ用基板にはゲル電気泳動で分離されたタンパク質を転写することはできなかったが、DLC 基板にはゲル電気泳動で分離されたタンパク質を 30-70%の収率で転写することができた。電気泳動は、簡便かつ迅速で極めて分離能が高い。特に、二次元電気泳動(2-DE)は優れている。短時間で千~数千のタンパク質を 1 枚のゲル上に分離することができる。タンパク質分離の方法には様々な方法があるが、2-DE ほど分離能が高い方法はない。従って、クロマトグラフィーなどの煩雑な方法でタンパク質を精製しなくても、電気泳動で精製すれば、直ちに高密度集積型プロテインチップを作製できる。また、タンパク質を DLC 基板へ転写後、基板上のタンパク質や、それと相互作用したタンパク質をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置(MALDI-TOF MS)によって直接同定できるようになった。

筆者らは、このプロテインチップを用いれば、チップ上に固定化されたタンパク質が翻訳後修飾されているかどうか簡便迅速に分析でき、質量分析装置を用いることによって修飾されているタンパク質が何かを明らかにする(同定する)ことができると考えた。すでに 2-DE で分離した酵母のタンパク質をチップ上に転写してグリコシル化されたタ

ンパク質を検出し、検出されたタンパク質を MALDI-TOF MS で同定することに成功した(Iwafune ら 2007)。この方法を様々な翻訳後修飾タンパク質の分析に応用できると考えるに至った。

しかし、DLC 基板には欠点があった。まず、簡単に基板を作製することができない。価格が高い。ブロッティングは容易でなく、効率も特に高くない。もし、DLC 基板に代え、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜のような膜フィルターを用いて同様の分析ができれば、DLC 基板の欠点を補うことができる。予備的な実験を行ったところ、電気泳動で分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、質量分析装置によって分析してタンパク質を同定できる可能性があることが明らかになった。

そこで、本研究では、ブロッティングや質量分析に適した膜フィルターのスクリーニングを進めると共に、膜フィルターを用いた実用的な技術の確立を目指すことにした。

3. 研究の方法

(1) 電気泳動とエレクトロブロッティング

トリプシンインヒビター、アルブミン、インスリンなどの標準タンパク質、ならびに酵母から抽出したタンパク質を実験に用いた。標準タンパク質については、定量解析に用いるため、蛍光試薬 Cy3 によって標識した。これらのタンパク質を SDS ゲル電気泳動(SDS-PAGE)または 2-DE によって分離し、ゲル上のタンパク質をセミドライブロッティング装置を用いて膜フィルターに電気泳動的に転写(エレクトロブロッティング)した。

ブロッティングには、PVDF 膜、ニトロセルロース膜など 22 種類の膜フィルターを用いた。また、PVDF 膜に関しては孔径が 0.1, 0.22 および 0.45- μm のものを用いた。

ブロットされた蛍光標識は、イメージアナ

ライザーによって、また、タンパク質タンパク質については、ダイレクトブルーあるいはクマシーブルーで染色して検出した。

(2) 膜フィルター上のタンパク質の質量分析

ゲルから膜フィルターにタンパク質を転写した後、膜フィルターをMALDI試料基板に導電性両面粘着テープを用いて貼り付けた。各タンパク質スポットに0.5 μ Lの100 μ g/mLトリプシンを添加し、37°Cで一晩消化した。消化後、イオン化を促進するため、マトリックスを添加し、MALDI-TOF MS または MALDI-TOF/TOF MS でペプチドの質量を測定した。そして、質量スペクトルからデータベースを検索し、タンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) ブロッキング効率

22種類の膜フィルターのブロッキング効率を比較した。SDS-PAGEによってCy3で標識された4種類の標準タンパク質を分離し、22種類の膜フィルターに転写した。ブロッキング効率はPVDF膜が最も高かった。ニトロセルロース膜も比較的高い効率を示したが、タンパク質の種類によっては効率が悪かった。ブロッキングには、PVDF膜が適していると考えられた。

PVDF膜には、孔径0.1-、0.22-および0.45- μ mのものがある。孔径によってブロッキング効率に差があるか調べた。その結果、孔径0.45- μ mのPVDF膜は、ブロッキング時間が長くなると、タンパク質が膜フィルターを通過してしまうことがわかった。従って、ブロッキングには孔径0.1-か0.22- μ mの膜フィルターが適していると考えられた。

(2) 質量分析効率

まず、SDS-PAGEで分離したカーボニックアンヒドラーゼを0.1-および0.22- μ mの孔径のPVDF膜に転写した。この膜フィルターをMALDI試料基板に固定し、タンパク質のバ

ンドにトリプシンを添加し37°Cで一晩消化した。消化後、マトリックスを加え、MALDI-TOF MSで質量を測定した。その結果、孔径0.22- μ mのPVDF膜より0.1- μ mの膜フィルターの方が質量分析でのイオン収量が高いことが明らかになった。

(3) 2-DEで分離された多数のタンパク質の質量分析

酵母のタンパク質を2-DEで分離し、孔径0.1- μ mのPVDF膜に電気泳動的に転写した。PVDF膜上に固定化された多数のタンパク質の中から、物理化学的な特徴が異なる38種類のタンパク質を選抜し、トリプシン分解を行い、マトリックスを添加してMALDI-TOF/TOF MSで解析した。そして、質量スペクトルからタンパク質の同定を試みた。選抜したタンパク質には、分子量の大きなタンパク質、等電点が低いあるいは高いタンパク質、量的に少ないタンパク質などが含まれていた。転写された38種類のタンパク質についてはすべて同定することができた。これらのタンパク質の中に、リン酸化タンパク質が31種類、アセチル化タンパク質が14種類、そして、ユビキチン化タンパク質が4種類含まれていることがわかった。

これまでにも同じような方法で質量分析を試みた例があった。しかし、いずれの方法も普及していない。その理由は、ブロッキング膜上のペプチドの質量分析においてペプチドのイオン収量が極めて低かったためであると推察される。今回、この種の分析に適した膜フィルターを探索し、孔径0.1- μ mのPVDF膜を見いだした。この膜フィルターを用いることによってこれまでの収量の最大10倍のイオン収量が得られた。その結果、様々なタンパク質を確実に同定できるようになった。孔径が小さいと、ロットしたタンパク質が膜の内部に入り込め

ず、膜表面に留まる。そのため、レーザー脱
理によるイオン化がより効率的に行われる
ものと考えられた。

効率的に質量分析ができる膜フィルターの
発見し、それを利用したタンパク質同定技
術を開発することができたので、研究の所期
の目的を達成することができたと考えられ
る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件) すべて査読有

Masuishi Y, Arakawa N, Hirano H. Wild-type
p53 enhances Annexin IV gene expression in
ovarian clear cell adenocarcinoma. FEBS J,
in press.

Akama K, Horikoshi T, Nakayama T, Otsu M,
Imaizumi N, Nakamura M, Toda T, Inuma I,
Hirano H, Kondo K, Suzuki S, Inoue N.
Proteomic identification of
differentially expressed genes in neural
stem cells and neurons differentiated from
embryonic stem cells of cynomolgus monkey
(*Macaca fascicularis*) in vitro.
Biophys. Biochim. Acta 1814, 265-276,
2011.

Kamita M, Kimura Y, Ino Y, Kamp RM,
Polavoda B, Sherman F, Hirano H. N^α-
Acetylation of yeast ribosomal proteins:
Identification by 2D-DIGE MS/MS and
analysis of the effect on proteins
synthesis. J Proteomics 74, 431-441, 2011.

Kikuchi J, Iwafune Y, Akiyama T, Okayama
A, Nakamura H, Arakawa N, Kimura Y, Hirano
H. Co- and post-translational modificat-
ions of the 26S proteasome. Proteomics 10,
2769-2779, 2010.

Kimura Y, Nagata K, Suzuki N, Yokoyama R,
Yamanaka Y, Kitamura H, Hirano H, Ohara O.
Characterization of multiple alternative
forms of heterogeneous nuclear
ribonucleoprotein K by phosphate-affinity
electrophoresis. Proteomics 10, 3884-3895,
2010.

Itoh A, Kurisaki A, Yamanaka Y, Hirano H,
Fukuda H, Sugino H, Asashima M. Proteomic
analysis of membrane proteins expressed
specifically in pluripoten stem cells,

Proteomics 9, 126-137, 2009.

〔学会発表〕(計 31 件)

Ino Y, Okayama A, Arakawa N, Hirano H. A
novel PVDF membrane for on-membrane
identification of gel-resolved proteins
by MALDI MS, The 17th Meeting of Methods
in Protein Structure Analysis, 2010年8月
25-28日, ウプサラ.

Hirano H, Arakawa N, Masuishi Y, Morita E.,
Miyagi E, Hirahara F. Proteome analysis
for the discovery of biomarkers and
therapeutic targets. 5th AOHUPO Congress,
14th ADNAT Convention & 1st PSI Conference,
2010年2月24日, ハイデラバード.

平野 久. 診断マーカーのプロテオミクス,
探索, バリデーション, 利用の方法. 第 60
回日本電気泳動学会総会, 2009年9月20日,
松本.

Hirano H. Proteomic analysis of co- and
post-translational modifications in the
yeast 26S proteasome. 11th International
Congress on Amino Acids, Peptides and
Proteins, 2009年8月6日, ウィーン.

平野 久. バイオマーカーおよび創薬ター
ゲット探索のプロテオーム研究における質
量分析. 第 61 回日本細胞生物学会, 2009年
6月4日, 名古屋.

平野 久. 蛋白質複合体の翻訳後修飾のブ
ロテオーム解析. 第 73 日本生化学会中部支
部例会・シンポジウム, 2009年5月23日, 名
古屋.

増石有佑, 荒川憲昭, 川崎博史, 宮城悦子,
平原史樹, 平野 久. 卵巣明細胞腺癌特異
的なアネキシンIV遺伝子の発現に関わる転
写制御因子の同定, 第 31 回日本分子生物学
学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会,
2008年12月10日, 神戸.

田矢史織, 荒川憲昭, 川崎博史, 宮城悦子,
平原史樹, 平野 久. 卵巣明細胞腺癌にお
けるリン脂質結合タンパク質アネキシン IV
の性状解析, 第 31 回日本分子生物学学会年
会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008
年12月10日, 神戸.

野村文子, 荒川憲昭, 山中結子, 勝山真人,
川崎博史, 平野 久. レドックスプロテオ
ミスによる血管型 NADPH オキシダーゼの標的
タンパク質の探索, 第 31 回日本分子生物学
学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会,

2008年12月10日, 神戸.

Hirano H. Proteomics for co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. Taiwan-Japan Proteomics Symposium, 2008年12月4日, 台北.

Takahashi E, Okamura T, Ikari K, Hirano H, Yasuda K, Kaburagi K. Proteomic analysis of serum from diabetic LEA/Sendai rats, 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, 2008年8月27日, 札幌.

Kawasaki H, Arakawa N, Hirano H. Protein identification and quantification using a proteome database of liquid chromatography-mass spectrometric data. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis. 2008年8月27日, 札幌.

Arakawa N, Masuishi Y, Yamanaka Y, Kawasaki H, Miyagi E, Hirahara F, Hirano H. New potential therapeutic targets for ovarian clear cell carcinoma. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, 2008年8月27日, 札幌.

Kamita M, Kamp RM, Hirano H, N^α-Terminal acetylation of ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae* and its function. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, 2008年8月27日, 札幌.

Hirano H, Arakawa N, Kawasaki H, Masuishi Y, Takahashi E, Yahagi S, Yamanaka Y, Miyagi E, Hirahara F. Identification and validation of ovarian cancer-associated proteins. 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science/4th Asian-Oceania Human Proteome Organization, 2008年6月25日, ケアンズ.

Arakawa N, Masuishi Y, Kawasaki H, Miyagi E, Hirahara F, Hirano H. Proteomic analysis for identification of therapeutic targets of ovarian clear cell carcinoma. 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science/4th Asian-Oceania Human Proteome Organization, 2008年6月23日, ケアンズ.

Hirano H. Proteomic approach to discover biomarkers and therapeutic targets. 13th Joint Biophysics Conference, 2008年5月

21日, 台湾.

〔図書〕(計5件)

平野 久. タンパク質のアミノ酸配列と翻訳後修飾の分析, やさしい原理からはいろタンパク質化学実験法, タンパク質をみる一構造と挙動-. 化学同人, 京都, 1-32, 2009.

Kamp K, Hirano H. N-Terminal sequencing of N-terminally modified proteins. In: The Protein Protocols Handbook, Humana Press, New York, 1063-1080, 2009.

木村弥生, 平野 久. iTRAQ 試薬を用いた疾患バイオマーカー探索, 明日を拓く新次元プロテオミクス, 秀潤社, 東京, 116-121, 2009.

平野 久. タンパク質の事典. 朝倉書店, 東京, 621-627, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 電気泳動で分離されたタンパク質を膜フィルターに転写し質量分析する方法

発明者: 平野 久, 井野洋子

番号: 2010-112156

出願年月日: 2010/05/14

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ:

<http://proteome.sci.yokohama-cu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 久 (HIRANO HISASHI)

横浜市立大学

生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号: 00275075

(2) 研究分担者

川崎 博史 (KAWASAKI HIROSHI)

横浜市立大学

生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号: 70169704

荒川 憲昭 (ARAKAWA NORIAKI)

横浜市立大学

生命ナノシステム科学研究科・助教

研究者番号: 60398394