

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21810014

研究課題名（和文） モノリス材料によるタンパク質超高速多次元分離システムの開発

研究課題名（英文） Development of multi-dimensional system using monolith for protein separation

研究代表者

森坂 裕信 (MORISAKA HIRONOBU)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：20541486

研究成果の概要（和文）：本研究では、プロテオーム解析において、タンパク質分離法として一般的に使用されているゲル電気泳動法に代わる新規システム開発を目的とする。まず、分離媒体であるカラムとして、タンパク質分離に最適化したワイドポアモノリスカラムを開発した。次に、これを用いた二次元高速液体クロマトグラフィーシステムを構築し、プロテオーム解析に適用した結果、酵母細胞のプロテオーム解析が可能となった。

研究成果の概要（英文）：It aims at the new system development that takes the place of the gel electrophoretic method generally used as a protein separation method in the proteomic analysis in the present study. First of all, monolithic column optimized to the protein separation was developed as a column that was the separation medium in chromatography. Next, two dimensional chromatography system using the monolithic column was constructed and applied to proteome analysis of yeast cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	1,050,000	315,000	1,365,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：プロテオーム、分析化学、モノリスカラム、タンパク質分離、液体クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

プロテオーム解析でのタンパク質分離法としてはゲル電気泳動法が一般的に用いられているが、分離要素の制限やゲル間比較での定量性の低さ、また、分析時間等、分析ス

ループットの観点からも根本的に分離手法としての拡張性が乏しい。プロテオーム解析分野において、2002年、「生体高分子同定および構造解析のための手法の開発」に対してノーベル化学賞が贈られ、これによる質量分

析計の急速な発展を背景に、多数の研究成果が報告されたが、その多くは質量分析計を基盤とした技術に着目し、その前段階となるタンパク質分離に焦点をあてたものは少ない。これは、質量分析計の分離能力が、タンパク質分離技術の分離能力と比較して、圧倒的に大きいためであるが、将来的に、未解明のより微量な成分を定量的に分析するためには、タンパク質分離技術の性能向上は必須である。

そこで、液体クロマトグラフィーを用いたフロー系での高速タンパク質分離を行い、分離能、分析時間、定量性、検出感度の比較検討を行う。本研究では、従来の粒子充填型カラムに代わり新規分離媒体として開発されたモノリスカラム(Minakuchi H., *et al.*, *Anal. Chem.* 1996, 68, 3498-3501)を用いることにより、タンパク質分離の高速高性能化を目指す。クロマトグラフィーにおいて、モノリスカラムを使用することで、従来の粒子充填型カラムの限界を超える高速、高性能分離を達成することが可能となり、クロマトグラフィーにおける分離媒体として高いポテンシャルを持っている。

このような高性能なモノリスカラムを有効に活用するために、本研究ではプロテオーム解析への適用を目指す。プロテオーム解析では非常に複雑なサンプルを分析対象とするので、高い分離性能が要求される。そこで、これまでの研究成果として、多次元クロマトグラフィーに展開することで、これに対応した(Morisaka, H., *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 2006, 70, 2154-2159.)。この報告では、モノリスカラムの特徴である高速分析を利用した二次元液体クロマトグラフィー/質量分析計システムを構築し、タンパク質をトリプシン消化したペプチド混合物をサンプルとした分析を行った結果、従来法では分離不十分によるイオンサプレッション効果のため検出できなかったフラグメントの検出が可能となり、タンパク質の同定効率が改善されたことを報告した。

スクリプス研究所のYatesらにより提案された、多次元クロマトグラフィーとタンデム型質量分析計を組み合わせたショットガンプロテオミクスシステムは、現在最もパワフルなプロテオーム解析システムであるが、これを用いてもプロテオームサンプルの全成分を定量的に分析するのは難しい。以上のように、クロマトグラフィーを用いたプロテオーム解析に関する報告は多数あるが、プロテオームサンプルをペプチドに分解してから扱っているものが多く、サンプルをより複雑にしてしまっている。そこで、タンパク質の段階である程度分離する必要があるため、モノリスカラムによるタンパク質の高速分離を検討した。そこで市販されているモノリス

カラムを用いてタンパク質分離を試みたが、分離性能が著しく低下した。液体クロマトグラフィーにおけるタンパク質分離は、拡散係数の大きさ等タンパク質の複雑な性質から分離が困難な場合が多い。そこで、細孔径の大きなワイドポアモノリスカラムを調製し、これによるタンパク質分離を行った結果、タンパク質の分離が改善された(Morisaka H., *et al.*, *J. Sep. Sci.* 2009)。

また、プロテオーム解析の最終段階は質量分析になるが、ゲル電気泳動法を用いたプロテオーム解析では、ゲルの切出し等、オフライン操作が必要であり、再現性やゲルからの回収率等の問題点がある。クロマトグラフィーによるタンパク質分離はフロー系なので、オンライン接続が原理的に可能である。将来的に、微量成分分析は必須となるが、オンライン接続システムでは、自動化によるサンプルロスの軽減や再現性、定量性の向上が期待される。さらに、モノリスカラムを使用することにより、一般的な装置と比較して約10倍という超高速化を付加する。多次元分離システムのスループットは、最終次元分析の分析時間に大きく依存するので、このモノリスカラムの特徴を利用するとハイスループット多次元分離システム構築が可能となり、従来法と比較すると、プロテオーム解析におけるタンパク質の分離時間が、一日から一時間程度に短縮することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、従来のゲル電気泳動法と比較して、ハイスループットな多次元タンパク質分離システムの開発を目的とする。現在プロテオーム解析でのタンパク質分離法としてはゲル電気泳動法が一般的に用いられているが、分離手法としての拡張性が乏しいので、液体クロマトグラフィーを用いたフロー系での高速タンパク質分離を行い、従来法の10倍という超高速分離を達成し、拡張性の高い新規システム構築し、プロテオームサンプルに対応できる分析系の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) モノリスカラムによるタンパク質分離の基礎検討を行う。クロマトグラフィーにおける保持特性(分離様式)は、カラムの担体組成(モノリス構造)と表面修飾に依存する。そこで、異なる構造を持つモノリスカラムを用意し、既に報告されている低分子化合物分離におけるモノリス構造等の物性データと低分子化合物分析結果の相関を参考に、タンパク質の高速分離に適した構造、表面修飾を検討する。

(2) タンパク質高速分離と高性能分離の検討を行う。タンパク質分離における分析時間、さらに実際のプロテオーム解析を視野に入

れたタンパク質分析データを採取し、既存のゲル電気泳動法と比較検討を行う。これらのデータを基に、ピークキャパシティー(分離能力)の増大を測定し、最適な分析条件を検討する(K. Horie, Anal. Chem., 79, 3764-3770 (2007). Calculating optimal modulation periods to maximize the peak capacity in two-dimensional HPLC)。

(3) プロテオーム解析への適用を目指し、多次元分離システムへの展開を行う。この際に、既存のイオン交換クロマトグラフィー分離システムと組み合わせることにより、新規システムに分離の多様性を持たせると同時に、モノリスカラムによる高速分析の有効性、分析目的に応じたシステムの拡張性を検討する。構築した多次元分離システムを評価するため、第一に、標準試料を用いてタンパク質の物性ごとによる分離を確認し、次に、実サンプルである酵母抽出液から調製したプロテオーム試料を用いて解析を試みる。

4. 研究成果

(1) タンパク質分離の基礎検討のため、調製したワイドポアモノリスカラムを用いて、タンパク質混合物の分離を測定した。その結果、一般的な細孔径(ノーマルポア)を持つ従来の粒子充填型カラムや市販されているモノリスカラムと比較して、良好なピーク形状を示す(図1. (A))ことから、タンパク質分離に有利であることが確認できたので、以降の実験はこのワイドポアカラムをモノリスカラムとして用いた。

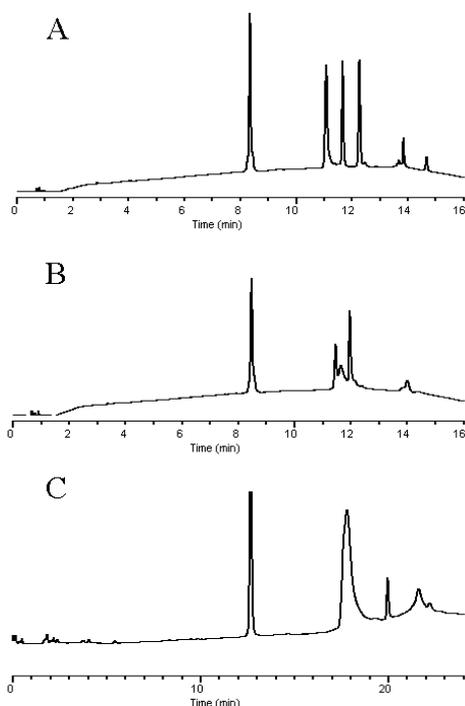


図1. 種々のカラムによるタンパク質分離のクロマトグラム (A) ワイドポアモノリスカラム (B) ノーマルポ

アモノリスカラム (C) ノーマルポア粒子充填型カラム

(2) モノリスカラムのタンパク質分離における優位性を示すために、高流速下での測定を検討した。通常の液体クロマトグラフィーでは、送液圧力と分離性能の問題から線速度1 mm/sで測定を行うが、モノリスカラムはカラム背圧が低い特性を持つので、高流速下(10 mm/s以上)での送液が可能であった。また、分離性能に関しても良好なピーク形状とピークキャパシティーを示した。結果として、一般的に用いられているゲル電気泳動法では1時間以上要するが、モノリスカラムを用いた液体クロマトグラフィーシステムを用いることにより、約10分でタンパク質分離が可能となった。

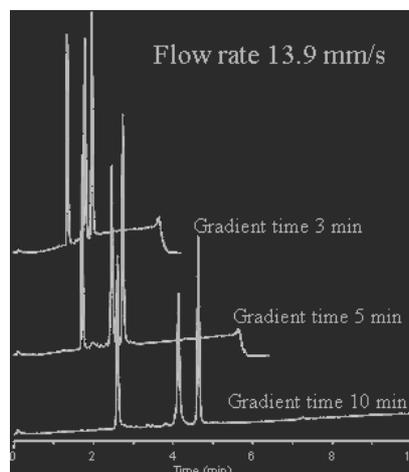


図2. モノリスカラムによるタンパク質高速分離

また、モノリスカラムの特性を利用し、長いカラムによる超高性能分離を検討し、測定結果を図3に示す。通常の測定条件では、カラム長の効果は少ないが、超高性能分離条件(ピークキャパシティー300以上)では、効果が顕著に表れピークキャパシティー約700を示している。プロテオーム試料は、非常にクルードなので、分離性能が不十分な場合には、時間効率が劣るが、このような超高性能分析条件でのタンパク質分離が利用可能となった。

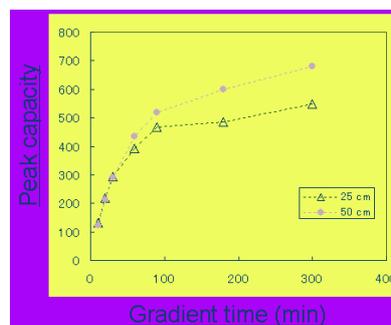


図3. モノリスカラムによるタンパク質超高性能分離

(3) プロテオーム解析への適用を目指し、多次元分離システムを検討した。上記のタンパク質分離の上流にイオン交換クロマトグラフィーシステムをオンライン接続した、二次元液体クロマトグラフィーシステムを構築した。物性の異なる6種類のタンパク質混合溶液を調整し、構築したシステムで分離した結果を図4に示す。一次元液体クロマトグラフィーシステムでは、後半の4種類のタンパク質を完全分離することができなかったが、二次元システムではイオン交換モードでのプレ分離することにより、完全分離が達成された。

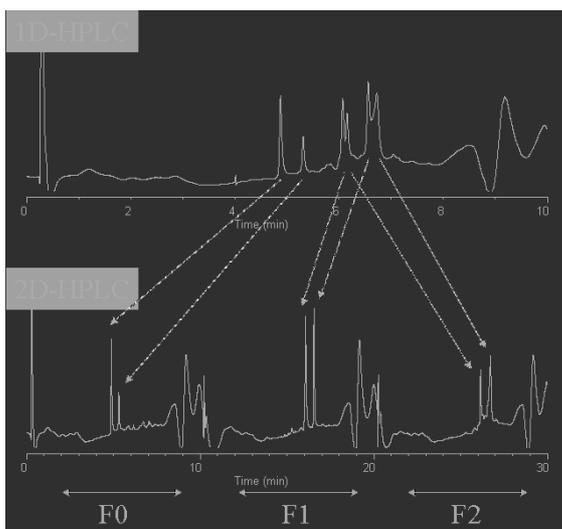


図4. 多次元分離システムによるタンパク質分離

また、これまでに蓄積してきた分析条件と分析メソッドを利用し、システムのチューニングを行い、多様なタンパク質分離が可能となったので、酵母細胞より抽出したプロテオーム試料の分離を試みた。その結果、複雑なタンパク質混合物の分離が達成され、分離後のタンパク質を質量分析に供してタンパク質同定まで可能となった。以上の結果から、ワイドポアモノリスカラムを用いた二次元高速液体クロマトグラフィーシステムによるプロテオーム解析が達成できた。

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1件)

① H. Morisaka, K. Hara, M. Ueda、Construction of online continuous chromatography system using monolithic column for single cell analysis, Proc. IFPT'6, 査読有, 249-250 (2009)

〔学会発表〕(計5件)

① 森坂 裕信、モノリスカラムを用いた酵母表層タンパク質のプロテオーム解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 28 日、京都女子大学 (京都府)

② 森坂 裕信、High performance separation of protein using long monolithic column for single cell proteome analysis、The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis、2011 年 3 月 3 日、武田ホール (東京都)

③ 森坂 裕信、プロテオミクスのための多次元 HPLC を目指したワイドポアモノリスシリカカラムによるタンパク質分離、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東大駒場キャンパス (東京都)

④ 森坂裕信、ワイドポアモノリスシリカカラムを用いたプロテオーム解析システムの構築、第 20 回クロマトグラフィー科学会議、2009 年 11 月 11 日、ヤクルトホール (東京都)

⑤ 森坂裕信、Construction of online continuous chromatography system using monolithic column for single cell analysis、The 6th International Forum On Post-Genome Technologies、2009 年 9 月 17 日、Tsinghua University (中国、北京)

〔図書〕(計1件)

① 森坂裕信、他、シーエムシー出版、シングルセル解析の最前線(第3章 細胞内生体分子群の実測定量解析 第1節 機能発現タンパク質の網羅的実測定量に向けて)、2010、134~141

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森坂 裕信 (MORISAKA HIRONOBU)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：20541486

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者