

Detection and identification of tyrosine phosphorylated protein

2D DIGE / ECL Plus Western Blottingを使用したチロシンリン酸化タンパク質の検出

本報では、チロシンリン酸化タンパク質のプロテオーム解析に二次元ウェスタンブロットングを利用した例をご紹介します。まず、二次元電気泳動後のタンパク質をPVDFメンブレンに転写し、イムノプロット解析によりチロシンリン酸化タンパク質を検出しました。つづいて、このイムノプロット解析の結果を、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析（2D DIGE）により検出された発現差異データ、およびタンデムマス解析（MS/MS）によるタンパク質同定結果と関連づけて解析しました（図7-4、7-5）。

Ettan DIGEシステムは、内部標準を利用したプロトコールを用いることで、キトサン処理 / 未処理 *Arabidopsis thaliana*（シロイヌナズナ）抽出サンプルにおいて、リン酸化チロシン抗体により検出されたタンパク質スポットならびにチロシンリン酸化されていないタンパク質の発現差異を明らかにします。ウェスタンブロットングにより検出された87個のタンパク質をMS/MSによる質量分析のために切り出し、また、発現差異のみに基づいて92個のタンパク質を選択しました。この結果、4個のチロシンリン酸化タンパク質で発現量に有意な変動がみられました。

はじめに

タンパク質の可逆的なリン酸化は、細胞周期の進行過程や分化などの細胞のシグナル伝達の調節に重要な役割を果たしています。タンパク質リン酸化の対象は主にセリン、スレオニンおよびチロシン残基で、キナーゼおよびホスファターゼの活性により制御されています。リン酸化の研究の多くで、放射性物質³²Pによる標識が使用されています。この場合、すべてのリン酸化タンパク質が検出可能ですが、どの残基がリン酸化されたのかを明らかにすることは困難であるうえ、培養細胞サンプル以外には使用できません。リン酸化残基に特異的な抗体による免疫検出法を使用すれば、有用な情報を得ることができますが、現在のところリン酸化セリンもしくはスレオニンを網羅的に検出できる抗体の入手が困難なため、抗体を用いた網羅的な解析はリン酸化チロシンの研究のみに限られています。チロシンリン酸化タンパク質の検出にはモノクローナル抗体（例えばPY20（文献1）および4G10（文献2））が使用されます。

イムノプロット解析は電気泳動で分離したタンパク質の特性を解明する目的で用いられます（文献2、3）。弊社では、検出にECL Plus Western Blotting Detection Reagentsを使用し、その蛍光波長とオーバーラップしない蛍光波長の染色物質でプロット全体を染色することでこの手法をさらに改善しました。この結果を2D DIGE解析とあわせて、*Arabidopsis*

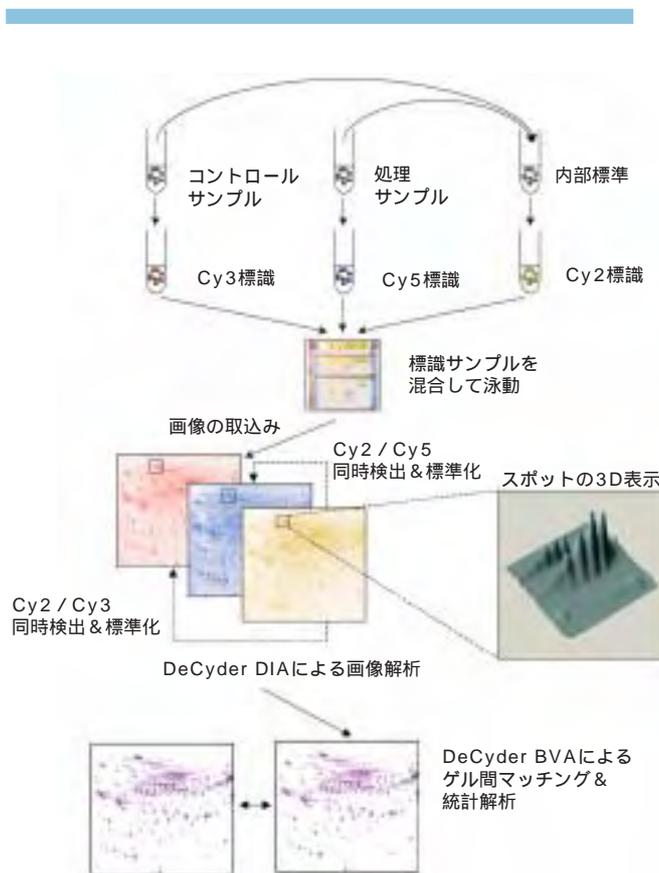


図7-4. 2D DIGE解析のワークフロー

thaliana（シロイヌナズナ）のキトサン処理によるリン酸化タンパク質および非リン酸化タンパク質の発現変動を明らかにしました（図7-5）。

A. thaliana は研究室で簡単に栽培でき、ライフサイクルが短く、他の高等植物と比べゲノムサイズが小さい（約130 Mb）ため、「モデル」生物として頻用される植物です。*A. thaliana* ゲノムの全塩基配列はすでに解読されています（文献4）。

2D DIGE 技術を採用したEttan DIGE（Differential Gel Electrophoresis）システムでは、二次元電気泳動前に、分子量および電荷が等しく、蛍光波長の異なる3種類のCyDye色素（Cy2、Cy3 およびCy5）を使用してタンパク質サンプルを標識し、CyDye標識サンプルを混合してゲルに添加します。多色蛍光標識されたサンプルを同時に泳動することでタンパク質発現変動の検出能が大きく改善されます（文献5）。

ここでは、*A. thaliana*の浮遊培養細胞から抽出した水溶性

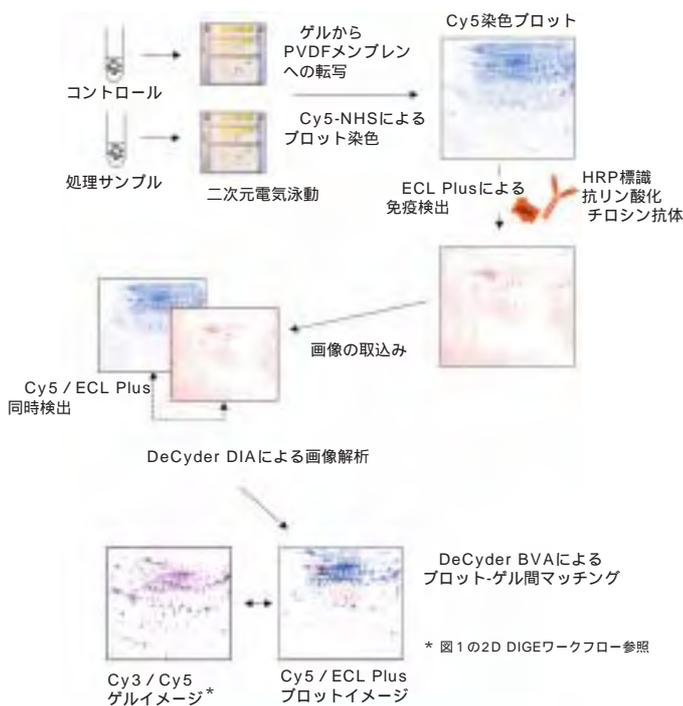


図7-5. チロシンリン酸化タンパク質の解析ワークフロー

チロシンリン酸化タンパク質はHRP標識抗リン酸化チロシン抗体で検出し、また、プロット上の全タンパク質をCy5で染色しました。その後、2D DIGE解析結果と合わせて解析を行いました。

の全タンパク質画分の解析を行い、チロシンリン酸化タンパク質を同定してキトサン（真菌類由来の誘導因子）処理の効果を検証しました。さらに、免疫検出の結果を2D DIGEの結果とマッチングし比較しました。

使用した製品

2D DIGE専用試薬

CyDye DIGE Fluor Cy2 minimal dye, 25 nmol	問合せ
CyDye DIGE Fluor Cy3 minimal dye, 25 nmol	問合せ
CyDye DIGE Fluor Cy5 minimal dye, 25 nmol	問合せ
Pharmalyte pH 3-10	17-0456-01
Immobiline DryStrip, 18 cm, pH 4-7	17-1233-01
Immobiline DryStrip Reswelling Tray	80-6371-84
Immobiline DryStrip Cover Fluid	17-1335-01

サンプル調製試薬

Urea	17-1319-01
CHAPS	17-1314-01

Dithiothreitol	17-1318-02
Tris	17-1321-01
Sodium Dodecylsulfate (SDS)	17-1313-01
Glycerol	17-1325-01
TEMED	17-1312-01
Ammonium Persulfate	17-1311-01
Agarose	80-1130-07
Glycine	17-1323-01
Bind-Silane	17-1330-01

器具・機器

Multiphor II Electrophoresis System	18-1018-06
SE 600 Standard Vertical Electrophoresis Unit*1	
Dual Gel Caster	80-6175-00
EPS 3501 XL Power Supply	18-1130-05
Glass plates, 18 × 16 cm, low fluorescence	80-6442-14
Ettan Spot Picker	問合せ
Reference Markers	18-1143-34
Ettan DIGEシステム基本パッケージ	問合せ

ウェスタンブロットング試薬

Hybond-P	RPN2020F
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	RPN2132
ECL Phosphorylation module	RPN2220
Cy5 mono-Reactive Dye Pack	PA25001

その他の試薬・機器

SYPRO Ruby protein gel stain (Invitrogen)
Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega)
PepMap C18 column (LC Packings)
Tween (ICI Americas Inc.)
Investigator ProGest (Genomic Solutions)
Q-ToF tandem mass spectrometer
CapLC capillary chromatograph, MaxEnt 3 (Micromass Ltd.)

*1 SE 600 Standard Vertical Electrophoresis Unitは現在販売しておりません。同等品としてSE 600 Ruby (80-6479-57) を販売しております。

実験方法

2D DIGE解析

サンプル調製

A. thaliana 細胞を文献1、6にしたがって培養し、培養容器ごとに細胞液を二分して片方を50 µg/ml キトサンで処理しました。処理から10分後および24時間後に細胞を回収し、タンパク質抽出バッファー（10 mM Tris-HCl pH 8.8、1 mM EDTA、2 mM DTT）でホモジナイズして、10,000 ×g で10分間遠心しました。上清に含まれる水溶性タンパク質を80%

アセトン中で-20℃にて1時間静置して沈殿させ、溶解バッファー（9 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS、30 mM Tris-HCl pH 8.5）に再溶解しました。Bradford法で総タンパク質量の定量を行いました。

サンプルの標識

凍結乾燥状態のCyDye DIGE Fluor minimal dyeをそれぞれDimethylformamide（Aldrich）に溶解し、終濃度を1 nmol/μlに調製しました。このストック溶液を使用直前に5倍に希釈し、タンパク質抽出液50 μgに対して400 pmol（希釈溶液 2 μl）ずつ加えました。表7-3にしたがって標識反応を行いました。統計学的に有意なデータを得るため、全ての解析サンプルを等量ずつ混合した内部標準をCy2 CyDye DIGE Fluor minimal dyeで、コントロールおよびキトサン処理サンプルをそれぞれCy3およびCy5で標識しました。暗所で30分間氷上で反応後（文献7）、10 mM lysine（CyDye DIGE Fluor minimal dye 400 pmolあたり1 μl）を加え、さらに10分間氷上に置き、反応を停止させました。

二次元電気泳動

標識サンプル（表7-3）を等量の2×サンプルバッファー（9 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS、20 mg/ml DTT、4% Pharmalyt pH 3-10）に添加し、膨潤液を加えてタンパク質150 μgあたりの総液量が350 μlとなるように調製しました。Immobiline DryStrip Reswelling TrayにImmobiline DryStrip pH4-7、18 cmをセットし、標識サンプルを添加した状態で一晚膨潤しました（ゲル内膨潤法（文献8））。膨潤時はImmobiline DryStrip Cover Fluidでゲル表面を覆いました。Multiphor II Electrophoresis Systemを用いて以下の設定で等電点電気泳動を行いました（20℃）：

ステップ1：500 V for 1,000 Vh

ステップ2：3,000 Vh gradient from 500 V to 3,500 V

ステップ3：70 kVh at 3,500 V

泳動後、平衡化バッファーA（6 M urea、2 M thiourea、50 mM Tris pH 8.8、30% glycerol、10% SDS、1% DTT）でImmobiline DryStripを15分間平衡化してから、平衡化バッ

ファーB（6 M urea、2 M thiourea、50 mM Tris pH 8.8、30% glycerol、10% SDS、4.8% iodoacetamide）中で15分間インキュベートしました。

Dual Gel Caster および低蛍光ガラス板（18×16 cm、1 mm厚スパーサー使用）を用いて作製した12.5%均一SDSポリアクリルアミドゲル上にImmobiline DryStripを設置し、プロモフェノールブルーを含む泳動バッファー（192 mM glycine、0.2% [w/v] SDS、25 mM Tris）に融解したアガロースで封入しました。泳動にはSE 600 Standard Vertical Electrophoresis Unitを用い、ゲル1枚あたり25 mAで30分間、その後ゲル1枚あたり40 mAまで電流を上げ、プロモフェノールブルーがゲル底部に流れきるまで泳動を続けました。

画像の取込み

ガラス板にはさまったままのゲルから、バリアブルイメージアナライザー-Typhoon 9400により蛍光標識タンパク質のイメージを取込みました。検出波長の設定は以下のとおりです。

Cy2：488 nm excitation wavelength、520 nm bandpass (BP) 40 nm (520 BP 40) emission filter

Cy3：532 nm excitation wavelength、580 BP 30 emission filter

Cy5：633 nm excitation wavelength、670 BP 30 emission filter

ゲルはいずれも解像度100 μmでスキャンしました。スキャンしたイメージは通常のビットマップイメージのようにピクセルで構成され、各ピクセルは縦軸に蛍光強度に比例した値をもちます。その最大値（すなわち最も発現量が多いと考えられるタンパク質スポットの部分）が60,000～80,000となるようにPMT電圧を調整し、蛍光強度の飽和を回避しました。解析前に、ImageQuant Tools version 2.3を用いて不要な部分をトリミングしました。

画像解析

Ettan DIGE専用の解析ソフトウェアDeCyder Differential Analysis Software version 4.00を用いてゲル解析を行いました。DeCyderでは、同一ゲルから得られるイメージペア（Cy2/Cy3 イメージ、Cy2/Cy5 イメージ）を統合した合成

表7-3. 2D DIGE によるBVA解析の実験デザイン

ゲル	Cy2 CyDye DIGE Fluor minimal dye	Cy3 CyDye DIGE Fluor minimal dye	Cy5 CyDye DIGE Fluor minimal dye
1	内部標準	10 min control ARA 59*	10 min treated ARA 59
2	内部標準	10 min control ARA 57	10 min treated ARA 57
3	内部標準	10 min control ARA 57B	10 min treated ARA 57B
4	内部標準	10 min control ARA 69	10 min treated ARA 69
5	内部標準	24 h control ARA 1	24 h treated ARA 1
6	内部標準	24 h control ARA 3	24 h treated ARA 3
7	内部標準	24 h control ARA 65	24 h treated ARA 65

* 2 ARAの番号は、異なるプレート由来の*A. thaliana* 培養細胞が使用されたことを示します。

イメージを用いてスポットを検出します。全自動の同時検出アルゴリズムにより、各ゲルイメージ上のスポットがすべて同時に検出されます。検出時の予測スポット数を3,500に設定しました。重要なタンパク質スポットが検出から除外されないように、ホコリなどを除去するフィルタリング操作は最小限にとどめました。検出プロセスにはバックグラウンド補正、定量化、内部標準に対するノーマライゼーションが含まれます。ゲル間マッチングにはDeCyderのBiological Variation Module (BVA; 生物学的変動解析) 機能を用いました。マッチングプロセスを円滑に行うために、Cy2標識の内部標準イメージごとにマスターイメージに対応する「landmark」を入力しました。マッチングプロセスの終了後、サンプル間のタンパク質発現量の差異について統計解析を行いました。マッチング済みスポットセットには由来する培養細胞を区別できるように採番してPaired Student's t-test解析を行いました。

サンプル間に有意な変動のみられる (p 値<0.05) タンパク質スポットは「proteins of interest」に指定しました。

ウェスタンブロット解析

二次元ゲルのウェスタンブロット解析

25 mM Tris、200 mM グリシン、20% メタノールに浸したHybond-Pメンブレンに、非標識のコントロールまたはキトサン処理サンプル (150 µgを添加) を泳動した二次元目のゲルを、30 V、4℃で一晩エレクトロブロットティングしました (図7-5 ①、②)。ブロットティングにはHoefer TransPhor unitsを使用しました。その後メンブレンを室温で風乾し、4℃で保存しました。

ブロットの染色

monofunctional Cy5を0.1% Tween 20 (ICI Americas Inc.) を含むPBSバッファ (10 mM リン酸ナトリウム, pH 7.4 ; 以下PBS-Tとする) に溶解し、ブロットを室温で1時間インキュベートして全タンパク質の染色を行いました。PBS-Tですすいだ後、100%メタノールによる10分間の洗浄を3回繰り返しました。蒸留水ですすぎ、ブロットを風乾しました。

低蛍光ガラス板の下にブロット面を下にしてメンブレンを設置してTyphoon 9400でスキャンしました (633 nm excitation wavelength、670 BP 30 emission filterを使用) (図7-5 ③)。

抗リン酸化チロシン抗体による免疫検出

全タンパク質の染色後、メンブレンをTBS-T (10 mM Tris-HCl pH 7.5、100 mM NaCl、0.1% Tween 20) 150 ml に溶解した3% BSAに室温で1時間または4℃で一晩インキュベートしてブロッキングを行い、TBS-Tで軽く洗浄しました。

その後、3% BSAを含むTBS-Tで1,000倍希釈したHRP標識PY20 (抗リン酸化チロシン抗体; ECL Phosphorylation module) にメンブレンを浸し室温で1時間インキュベートしました。ECL Plus Western Blotting Detection Reagentsを用いて、抗体が結合したタンパク質を検出しました (それぞれ試薬添付のマニュアルを参照)。メンブレンを乾燥させ、Typhoon 9400でスキャンしてCy5とECL Plusを検出しました (ECL Plus検出には457 nm excitation wavelength、505 nm long-pass filterを使用)。Cy5イメージとECL Plusイメージは、それぞれ最適化した設定条件で各プロットを連続してスキャンして取り込みました (図7-5 ④、⑤、⑥)。

イムノブロットの画像解析

メンブレンイメージを解析して先のDeCyder解析結果とマッチングを行いました。ECL Plusによって検出されたスポットは「protein of interest」に指定しました (図7-5 ⑦、⑧)。

質量分析とタンパク質同定

解析に使用した全*A. thaliana*サンプル (総量500 µg) を用いてスポット切り出し用ゲルを作製しました。サンプルはゲル内膨潤法にてImmobiline DryStripに添加しました。タンパク質の添加量が増えたため、等電点電気泳動の時間を最大140 kWhまで延長しました。2Dゲルをキャストする前に、PlusOne Bind-Silaneで処理したガラス板に2個のfluorescent reference markerを設置しました。切り出し用ゲルをSYPRO Ruby (Invitrogen) で染色し、製造元の推奨プロトコールに従って10%エタノール/6%酢酸で固定しました。

Typhoon 9400でSYPRO Ruby染色したゲルをスキャンしました (532 nm excitation wavelength、610 BP 30 emission filter)。DeCyderを使用して、解析ゲルおよびイムノブロット解析で得られたイメージをマッチングしました。ピクセルデータをゲルの裏に固定した2個のリファレンスマーカーに対するx-yデータに変換したPick Listが作成され、Ettan Spot Pickerにエクスポートされました。ゲルスポットは直径2 mmで切り出され (ゲルプラグ)、96ウェルマイクロタイタープレートに回収されました。

文献 (9、10、11) を参考にしてロボット式の消化システムInvestigator ProGest (Genomic Solutions) のプロトコールを最適化し、トリプシンによるゲル内消化を行いました (文献12)。切り出したゲルプラグを50 mM 炭酸水素アンモニウムバッファで洗浄し、アセトニトリルで脱水しました。システイン残基をDTTで還元しiodoacetamideでアルキル化しました。トリプシン (Promega; 25 mM 炭酸水素アンモニウムバッファで作製した6.5 ng/µl 溶液10 µlを使用) を添加する前に、再度炭酸水素アンモニウムバッファでゲルプラグを洗浄してアセトニトリルで脱水し60℃で乾燥しまし

た。消化反応は37℃で1時間行い、25 mM 炭酸水素アンモニウムバッファー/5% ギ酸/アセトニトリルを順に用いて抽出、回収しました。抽出物をプールして凍結乾燥し、質量分析前に0.1%ギ酸水溶液に溶解しました。

Micromass CapLC capillary chromatographに接続されたQ-ToFハイブリッド型飛行時間質量分析計 (Micromass) を用いて、MS/MSスペクトルを測定しました。サンプルを0.1%ギ酸水溶液に溶解し、6 µlをPepMap C18 column (300 µm × 0.5 cm ; LC Packings) に注入し、0.1%ギ酸水溶液で3分間溶出しました (このとき、流路選択バルブを切り替えてカラムからの溶出液が廃液ボトルに流れるようにセット)。その後流速を1 µl/minまで下げ、流路選択バルブをデータ測定 (data acquisition) 位置に切り替えました (カラムからの溶出液は質量分析計へ流れる)。0.1%ギ酸水溶液に溶解したアセトニトリルを5~70%のグラジエントで20分間にわたって送液し、ペプチドを溶出させました。

キャピラリー電圧を3,500 Vに、測定質量範囲を540~1,000に設定し、電荷が2、3、または4価となったペプチドイオンピークについて、Data-dependent acquisitionによるMS/MS測定を行いました。既知のトリプシン自己消化物およびケラチン由来のイオンピークは自動的に除外されました。collision gasはアルゴン、collision voltageは電荷と質量に応じて18~45 Vと可変させました。得られた各ペプチドのプロダクトイオンはMS/MS用デコンボリューションソフトウェア (MaxEnt 3, Micromass) と公共データベース (SwissProt/TrEMBL) を使用し、タンパク質同定を行いました。タンパク質の検索では、消化酵素のmiss cleavagesを1ペプチドあたり1ヶ所まで認め、initial mass tolerance を50 ppmとしました。システインはカルバミドメチル化したと仮定しましたが、他の修飾の可能性については初回検索では考慮しませんでした。この検索で同定できなかったサンプルは、MS/MSスペクトルからマニュアルでアミノ酸配列を推定し、NCBIのデータベース (nr) を用いたBLASTサーチを行いました (文献13)。

結果と考察

本研究に適用した実験デザイン (表7-3) により、異なるサンプル間にみられるばらつきを考慮したタンパク質発現差異の正確な統計学的解析が可能となります。解析に使用する全サンプルの等量混合液 (Cy2で標識し全ゲルで泳動) は内部標準として利用されます。理論上、各サンプルに含まれる全タンパク質がすべてのゲルで泳動され検出されます。Cy3またはCy5で標識した各サンプルは、同一ゲル上の内部標準と比較され、内部標準に対する相対的な発現量が測定されるため、通常ゲル間にみられるばらつきを抑え統計学的な信頼性を高めます。

DeCyderを用いて2D DIGE解析ゲルから平均3,132スポット/ゲルを検出しました。泳動後にSYPRO Ruby染色した切り出し用ゲル (タンパク質500 µgをゲルに添加) を3枚作製し、このうち最もスポット数の多かった (3,315スポット) ゲルをMasterゲルに指定しました。一般的には切り出し用ゲルをMasterに指定することはありませんが、今回のケースでは切り出し用ゲルをMasterゲルに選択した方が続いて行う2D DIGEの解析用ゲルとウェスタンブロットティングの検出結果をマッチングがしやすいことが示されました。7枚の解析ゲルとマスターゲル間で平均1,937スポットがマッチングされました。

キットサン処理から10分後 (10-min control/treated) および24時間後 (24-h control/treated) のデータについてPaired Student's t-testを行ったところ、10分後のサンプルとコントロールの間で発現に明らかな有意差 ($p < 0.05$) を示す94スポットを明らかにすることができました。このうち、厳密にマッチングの確認を行い、アーチファクトを除去した信頼性の高い52スポットを切り出し用を選択しました。キットサン処理から24時間後のサンプルについては、コントロールとの間に有意な発現差異 ($p < 0.05$) のある39スポットが切り出されました。さらに、10分後のコントロールと24時間後のコントロールとの間に (unpaired ; $p < 0.05$) 統計的に有意な発現差異があった25スポットについても、興味深い変動があったものとして選択しました。これらの結果を表7-4に示します。

表7-4. コントロール/処理サンプル間の発現差異

ゲルの種類	統計解析結果	総数	増加	減少
10-min control/treated	Paired < 0.05	52	29	23
24-h control/treated	Paired < 0.05	39	11	28
10-min control/24-h control	Unpaired < 0.05	25	12	13
Phosphorylated	N/A	87	-	-

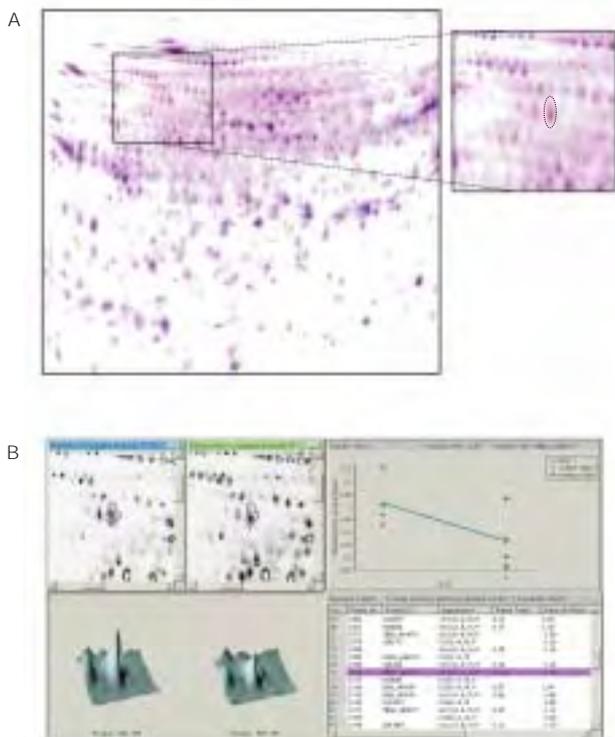


図7-6. A. 処理から10分後のCy3標識非処理コントロール（赤）とCy5標識処理サンプル（青）のイメージを重ね合わせたもの。B. DeCyder BVA画面。

図A左に、発現が抑制されているスポット（スポットが赤に近い）を拡大表示しました。拡大図中で点線で囲んだスポットの統計結果をBに示しました。

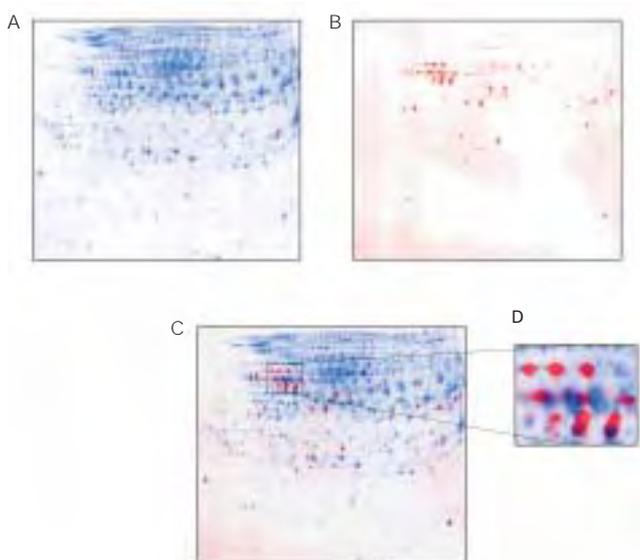


図7-7.

- 全タンパク質のCy5染色の疑似カラーイメージ。キトサン処理から10分後のサンプルのウェスタンブロットをCy5で染色しました。
- ECL Plusシグナルの疑似カラーイメージ。Aのウェスタンブロットでリン酸化チロシンの検出を行った後にECL Plusを検出しました。
- 全タンパク質染色とイムノプロットイメージの重ね合わせたもの。
- Cの一部を拡大したもの。

図7-6Aに、疑似カラーで彩色したCy3標識コントロール（赤）およびCy5標識キトサン処理サンプル（青）イメージを重ね合わせた例を示します。圧倒的に赤色が強いスポットはキトサン処理後に発現が抑制されたタンパク質を含んでいます。図7-6Aの拡大図（右）において点線で囲んだスポットについて行った統計解析結果を図7-6Bでハイライト表示しています。

全タンパク質をCy5-NHS esterで染色した後で、HRP標識モノクローナルPY20抗体を使用してチロシンリン酸化の検出を行いました。検出前に、30 mM リン酸化チロシン溶液にHRP標識PY20抗体をプレインキュベートし、バックグラウンド以外にシグナルが検出されないネガティブコントロールプロットを作製しました（データ未掲載）。処理から10分後の8サンプルについて、プロットの全タンパク質染色とイムノプロット解析をそれぞれ行いました。図7-7に、全タンパク質染色とイムノプロット解析の典型的なプロットイメージ、それらのイメージを重ねたものを示します。ECL Plusで検出したスポットのいくつかは総タンパク質イメージと完全に重ならないことがこの図からわかります。つまり、ECL Plus検出はシグナルを増幅するため、エピトープ（抗原決定基）が存在すれば検出できるものの、発現量が低かったりプロット染色がうまくいっていないなどの理由で相当する全タンパク質シグナルが検出できない場合、この手法には限界があるという可能性が示唆されます。

8枚のプロットについて、平均3,420スポットが検出され、平均1,799スポットをマスターゲルとマッチングしました。

同時検出された全タンパク質のCy5染色イメージをマスターゲルにマッチングすることで、プロット上のリン酸化チロシン特異的なシグナルの位置から、チロシンリン酸化部位を含むタンパク質の同定が可能になりました。図7-8に、Cy5染色タンパク質、ECL Plusによるリン酸化チロシンのイムノプロット解析、およびDeCyder BVAソフトウェアにより検出されたマスターゲルイメージを示します。それぞれ相応するスポットのプロファイルを下に示してあり、マッチングを実行するうえでの全タンパク質染色パターンが重要であることがわかります。図7-9に、キトサン処理から10分後のサンプルとコントロールについて得たリン酸化チロシンのイムノプロットイメージの比較を示します。このように、複数のスポットが変動していると考えられ、リン酸化プロテオームの比較解析への2D DIGEの適用が効果的であることが強く示唆されます。図中g、h、iで示されたタンパク質スポットはいずれも、2D DIGE解析でもコントロール/処理サンプル間で有意なタンパク質発現差異を示しました。2枚のプロット間で最も明らかな差異を示したスポットの一つが図中fで表示されたスポットです。MS/MS配列解析による同定の結果、このスポットには複数のタンパク質が含まれることがわかりました。したがって、このデータのみに基づいて、このスポットでみられ

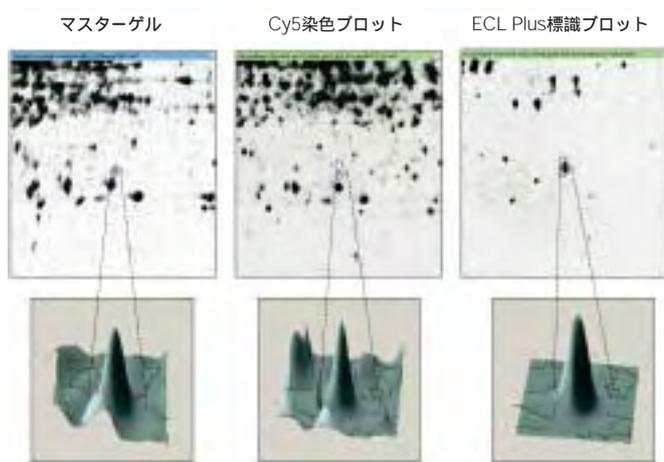
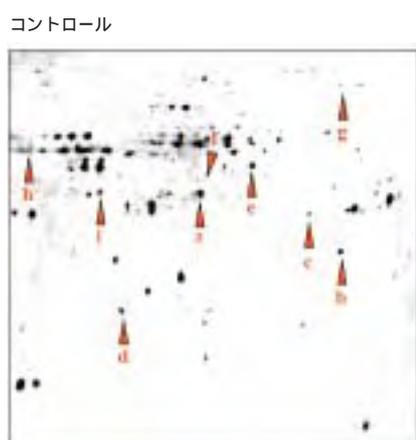


図7-8. マスターゲルと免疫検出されたリン酸化チロシンのマッチング
Cy5による全タンパク質染色イメージを重ね合わせるによりマスターゲルと免疫検出されたリン酸化チロシンのマッチングを行いました。

た明らかな発現差異を単一のタンパク質によるものとは言いきれません。つまり、複雑なサンプルを扱う際のタンパク質の分離能はデータの生物学的説明を行ううえで非常に重要であることが示唆されました。

発現差異とチロシンリン酸化の程度に基づいて切り出し用ゲルから合計179ゲルプラグを選択し、トリプシン消化を行いました(表7-4)。Q-ToF MS/MSによりトリプシン消化したペプチドを解析して、ペプチド配列データベースの検索を行ってタンパク質を同定しました。イムノプロット解析結果に基づいて切り出された87スポットのうち、60スポットからタンパク質



- タンパク質の同定例：
- a. Glutamine synthetase, cytosolic isozyme
 - b. Serine acetyltransferase
 - c. Thioredoxin reductase 2
 - d. Glutathione S-transferase ERD13
 - e. Putative epimerase /dehydratase
 - f. 複数のタンパク質を含むスポット
 - g. 5-methyltetrahydropteroyl-triglutamatehomocysteine methyltransferase
 - h. Tubulin beta-4 chain
 - i. Adenosine kinase 1

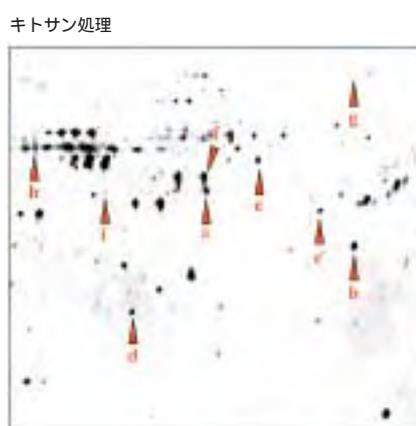


図7-9. キトサン処理から10分後のコントロール/サンプルのECL Plusウェスタンブロットの検出

表7-5.DeCyder BVAにより得られた典型的なタンパク質同定結果およびその統計解析データ

タンパク質名	BVAで検出された変動	p値	チロシンリン酸化の有無
5-methyltetrahydropteroyl-triglutamate-homocysteine methyltransferase	10-min control/treated 1.26倍増加	0.0049	有 *
Putative thioredoxin (probable protein disulfide isomerase 2)	24-h control/treated 1.20倍増加	0.0047	無
Tubulin beta-4 chain	10-min control/treated 1 / 1.40倍増加	0.02	有 *
Adenosine kinase 1	10-min control/treated 1 / 1.16倍増加 control 10-min/control 24-h 1.6倍増加	0.0067 0.039	有 *
Translationally controlled tumor protein-like protein	10-min control/treated 1.28倍増加	1.20×10^{-5}	無
Heat shock protein 81-2	control 10-min/control 24-h 4.57倍増加	0.0028	有 *

* 図7-9参照。

が同定でき、22スポットには複数のタンパク質が含まれることがわかり、残る5スポットは同定できませんでした。2D DIGEの発現差異解析結果に基づいて切り出された92スポットのうち、31スポットからタンパク質が同定でき、12スポットには複数のタンパク質が含まれることがわかり、残る49スポットは同定できませんでした。表7-5に最も顕著なタンパク質同定結果とその統計解析結果を示します。

まとめ

ECL Plus Western Blotting Detection reagentsを使用したチロシンリン酸化タンパク質のイムノプロット検出と併用可能な蛍光色素 (Cy5) を用いて全タンパク質の染色を行いました。多色検出が可能なTyphoon 9400を用いて、Cy5による全タンパク質染色で得られた画像とイムノプロット解析により得られた画像を重ねた画像を得ました。この画像は、DeCyderによる画像解析とマッチングに使用可能です。DeCyderでは、Cy5染色イメージを用いることによりプロットイメージ、すなわちイムノプロット検出されたタンパク質と2D DIGE解析結果のマッチングが可能になります。この結果、興味あるタンパク質の発現差異が明らかになり、同定のための自動切り出しが可能になりました。Ettan DIGEシステムによる解析結果とイムノプロット解析の結果を合わせることで、プロット間に転写効率の差がある場合や、タンパク質発現量とイムノプロット検出されたシグナルの関係が非線形である可能性がある場合にイムノプロット解析だけでは得られにくい興味あるタンパク質に関する定量的な情報も明らかにすることができます。この手法のより一般的なイムノプロット解析への応用が期待されます。たとえば、キナーゼ抗体、ホスファターゼ抗体、またはカスパーゼ (アポトーシス関連

酵素) 抗体などを使用したタンパク質特異的もしくは群特異的な免疫検出は、MSによるタンパク質同定結果を確認する手法として利用できると考えられます。

参考文献

1. Chivasa, S. *et al. Electrophoresis* 23, 1754-1765 (2002).
2. Ducret, A. *et al. Electrophoresis* 21, 2196-2208 (2000).
3. Leimgruber, R. M. *et al. Proteomics* 2, 135-144 (2002).
4. Kaul, S. *et al. Nature* 408, 796-815 (2000).
5. Tonge, R. *et al. Proteomics* 1, 377-396 (2001).
6. May, M. J. and Leaver, C. J. *Plant Physiology* 103, 621-627 (1993).
7. Unlu, M. *et al. Electrophoresis* 18, 2071-2077 (1997).
8. Sanchez, J. C. *et al. Electrophoresis* 18, 324-327 (1997).
9. Jenö, P. *et al. Anal. Biochem.* 224, 75-82 (1995).
10. Wilm, M. *et al. Nature* 379, 466-469 (1996).
11. Shevchenko, A. *et al. Anal. Chem.* 68, 850-858 (1996).
12. Wait, R. *et al. Electrophoresis* 22, 3043-3052 (2001).
13. Altschul, S. F. *et al. Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402 (1997).

More information can be obtained in the Ettan DIGE system section at : <http://proteomics.amershambiosciences.com/proteomics>.

謝辞

本報はUniversity of Durham (Durham, UK) のToni Slabas教授、Stephen Chivasa博士、Bongani Ndimba博士とImperial College of Medicine (London, UK) のRobin Wait博士の協同研究の成果に基づいて作成しました。