

Clinical Proteomics: 2D DIGE analysis of membrane proteins in epilepsy-model rats' brains

疾患プロテオミクス: Ettan DIGEシステムを用いたてんかんモデルラット脳の膜タンパク質の変動解析

J. Inagawa^{1,2}, J. Hirano² and S. Hattori¹

¹Division of Cellular Proteomics, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Japan

²GE Healthcare Bio-Sciences KK, Tokyo, Japan

カイニン酸処理ラットおよびコントロールラット脳の各画分を疾患プロテオミクスのモデル実験系として、てんかんモデルラットを用いた脳内タンパク質発現量の変動解析をEttan DIGEシステムにより行いました。ラットにカイニン酸を投与しててんかんを生じさせ、その脳から抽出したサンプルをいくつかの画分にわけて、タンパク質発現の変動を調べたところ、すべての画分で著しい変動が観察されました。また、分析が困難といわれている膜タンパク質についても同様の方法で解析を行った結果、著しい発現の変動を検出することができました。今回の実験から、Ettan DIGEシステムは、疾患プロテオミクスや膜タンパク質解析への適用も可能であることが示唆されました。

はじめに

生体内で起こるさまざまな反応は、そのほとんどがタンパク質の発現調節や翻訳後修飾によって制御されています。そのため、病気の発症のメカニズムやその病態を把握する上で、それぞれの疾患に特異的なタンパク質の発現、修飾あるいは分解などを調べる疾患プロテオミクスがますます重要となっています。Ettan DIGEシステムは、タンパク質の微細な発現変動を感度よく正確に解析することができる技術で、臨床応用を視野に入れた研究にも活発に利用されています。病気の早期診断、治療効果や副作用に関連するマーカーの発見、創薬ターゲットの同定とバリデーションなどへの応用と発展が期待されています。

カイニン酸(kainic acid, 図1)は、海人草(*Digenea simplex*)から抽出単離されたグルタミン酸骨格を含む複素環化合物で、水溶性の興奮性神経活性アミノ酸のひとつです。また、イオンチャネル型グルタミン酸レセプターのサブタイプであるカイニン酸型グルタミン酸レセプターの選択的アゴニストのひとつとしても知られています。このカイニン酸を動物に大量投与すると、中枢神経を刺激し、特徴的かつ持続的な辺縁系けいれんを誘発し、大脳皮質や海馬の神経細胞の選択的変性脱落を起こすことが知られています。われわれは、ラットにカイニン酸を投与し、てんかんを誘発したラットの脳の膜タンパク質の発現変化を、高感度で高い定量性を持つ蛍光色素CyDye DIGE Fluorsを使用したタンパク質発現ディフレンス解析システムであるEttan DIGEシステムを使用して検証しました。

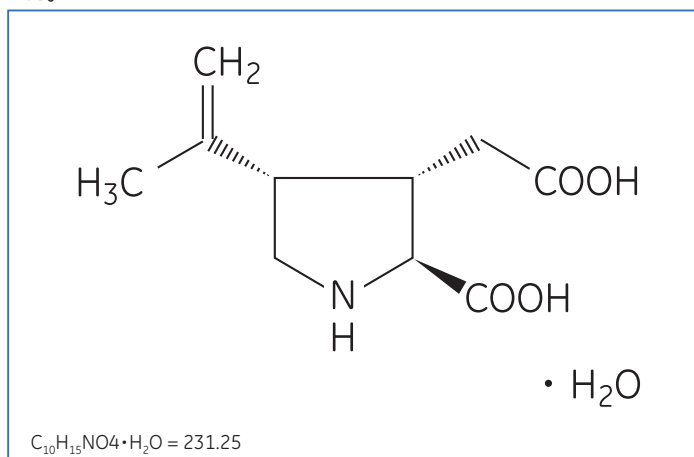


図1. カイニン酸(kainic acid)

ラットのカイニン酸処理

ラットの体重1 kgあたり3 mgのカイニン酸(PBS溶液)を、3週齢のSD雄ラット(体重約85 g)に腹腔内投与しました。同等量のPBSを投与したラットをコントロールとしました。カイニン酸を投与されたラットは約15分後から徐々に興奮状態となり、1時間後には全身性のてんかん状態となりました。投与から1時間後、麻酔下にてラットから全脳(約1.5 g)を摘出し、ホモジネート緩衝液に入れ、テフロン製ホモジナイザーで破碎しました。この懸濁液を図2の手順にしたがって、ホモジネート画分、細胞質画分、膜タンパク質画分、膜タンパク質画分のTriton-X100溶解画分(Triton可溶性画分)およびTriton X-100不溶解画分(粗PSD画分)にそれぞれ分画しました。

各画分は、Lysis Buffer(7M Urea, 2M thiourea, 30 mM Tris-HCl (pH 8.5) 4% CHAPS)に溶解後、2-D Clean-Up Kitで処理し、さらに上記Lysis Bufferに溶解しました。膜画分やPSD画分もLysis Bufferに完全溶解させました。

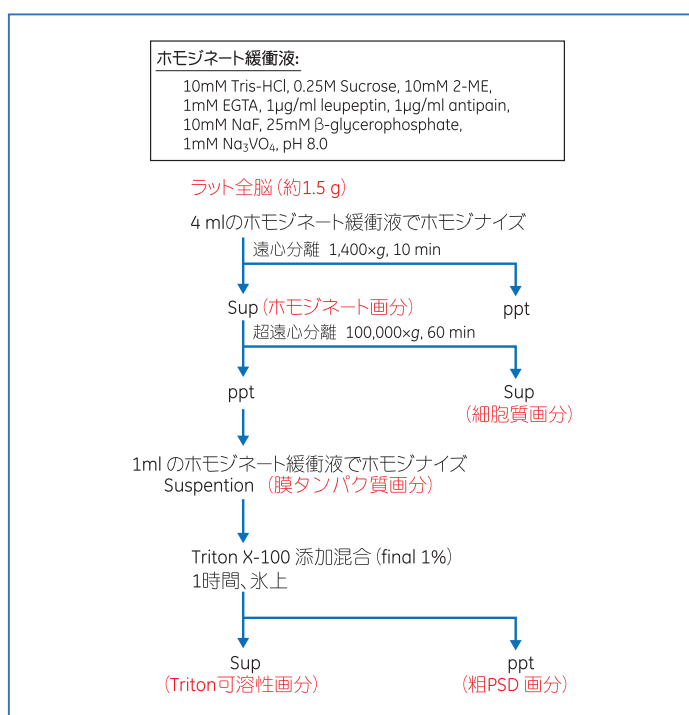


図2. 二次元電気泳動に用いた各画分の調製方法

表 1. 実験デザイン

内部標準はカイニン酸処理サンプル(kainate)と未処理サンプル(control)を等量ずつ混合したものをしました。Cy3とCy5間の標識効率の差異による誤差を避けるためにゲル2では組合せを逆にしました。

ゲル番号	Cy2	Cy3	Cy5
1	内部標準	control	kainate
2	内部標準	kainate	control
3	内部標準	control	kainate

Ettan DIGE システムによる 2D DIGE 解析

カイニン酸処理ラットおよびコントロールラット脳の各画分サンプルを Ettan DIGE システムで解析しました。カイニン酸処理サンプルとコントロールサンプルを等量混合したサンプルを内部標準とし、各サンプルを各種 CyDye DIGE Fluor minimal dyes(Cy2, Cy3, Cy5) で標識しました(表 1)。Pharmalyte 3-10 1 % を含む膨潤液を添加し、Immobiline DryStrip pH 3-10 NL, 24 cm で 12 時間膨潤後、Ettan IPGphor Isoelectric Focusing Unit で一次元目の等電点電気泳動を行いました。泳動条件は、500 V(1 時間)、1,000 V(1 時間)、8,000 V(64,000 Vhr)です。泳動終了後、DryStripを平衡化緩衝液中で還元アルキル化し、12.5 % ポリアクリルアミドゲルを使用して、Ettan DALT twelve Large Electrophoresis System を用いて二次元目 SDS-PAGE を行いました。泳動後のゲルは、ガラス板に挟んだまま、それぞれ Cy2, Cy3, Cy5 の各最適励起波長で Typhoon 9400 パリアプレイメーリアナライザーにてスキャンしました。得られた各イメージを DeCyder 2D Software にて画像解析し、スポット検出、スポット強度の定量化などの統計学的解析を行いました。

各画分を解析した結果、カイニン酸処理することにより、タンパク質スポットの大きな変動が現れることがわかりました。ホモジネート画分(図 3a)においては、検出された 3,109 スポットのうち、1.5 倍以上増加したスポットが 38 個(1.2 %)、0.7 倍以下に減少したスポットが 129 個(4.1 %) 存在

しました。また、細胞質画分(図 3b)においては、検出された 2,620 スポットのうち、1.5 倍以上増加したスポットが 36 個(1.3 %)、0.7 倍以下に減少したスポットが 183 個(7.0 %) 存在しました。一方、膜タンパク質画分(図 3c)においては、検出された 2,192 スポットのうち、1.5 倍以上増加したスポットが 191 個(8.7 %)、0.7 倍以下に減少したスポットが 209 個(9.5 %) 存在しました。さらに、ホモジネート画分で検出された増減スポットは、細胞質画分および膜タンパク質画分に明確に分離されており(図 3d)、ホモジネート画分では検出できない増減スポットも、それ以降の画分により検出されるようになりました。

膜タンパク質画分における顕著な増減スポット

ホモジネート画分でわずかに観察されたイメージ中央の増加・減少のスポットのペア(図 3a)は、膜タンパク質画分では顕著な増減のペアとして観察されました(図 3c, 図 4)。コントロールに大量に存在したタンパク質スポット(図 4, 緑色スポット)は、カイニン酸処理をすることでほぼ全量消失してしまうことがわかります(図 4, 3D 表示参照)。一方、コントロールではほとんど存在しなかったスポット(図 4, 赤色スポット)が、カイニン酸処理をすることにより、新たに大量に生じることがわかりました。これら 2 つのタンパク質スポットはスポット強度がほぼ等しく、存在量がほぼ同量と考えられます。以上のことから、もともと存在していたタンパク質(図 4, 緑色スポット)に何らかの修飾が起き、スポットが移動した(図 4, 赤色スポット)と考えられます。スポットの位置から、カイニン酸処理したタンパク質は等電点で塩基性側に移動し、また、分子量が減少していることから、脱修飾あるいは分解などが起きていることが予想されます。

膜タンパク質画分をさらに Triton-X100 処理し、得られた各画分を解析した結果、上述の緑色と赤色のスポットのペアは、Triton-X100 可溶性画分(Triton 可溶性画分)には存在せず、不溶解画分(粗 PSD 画分)にのみ存在することがわかりました(図 5)。

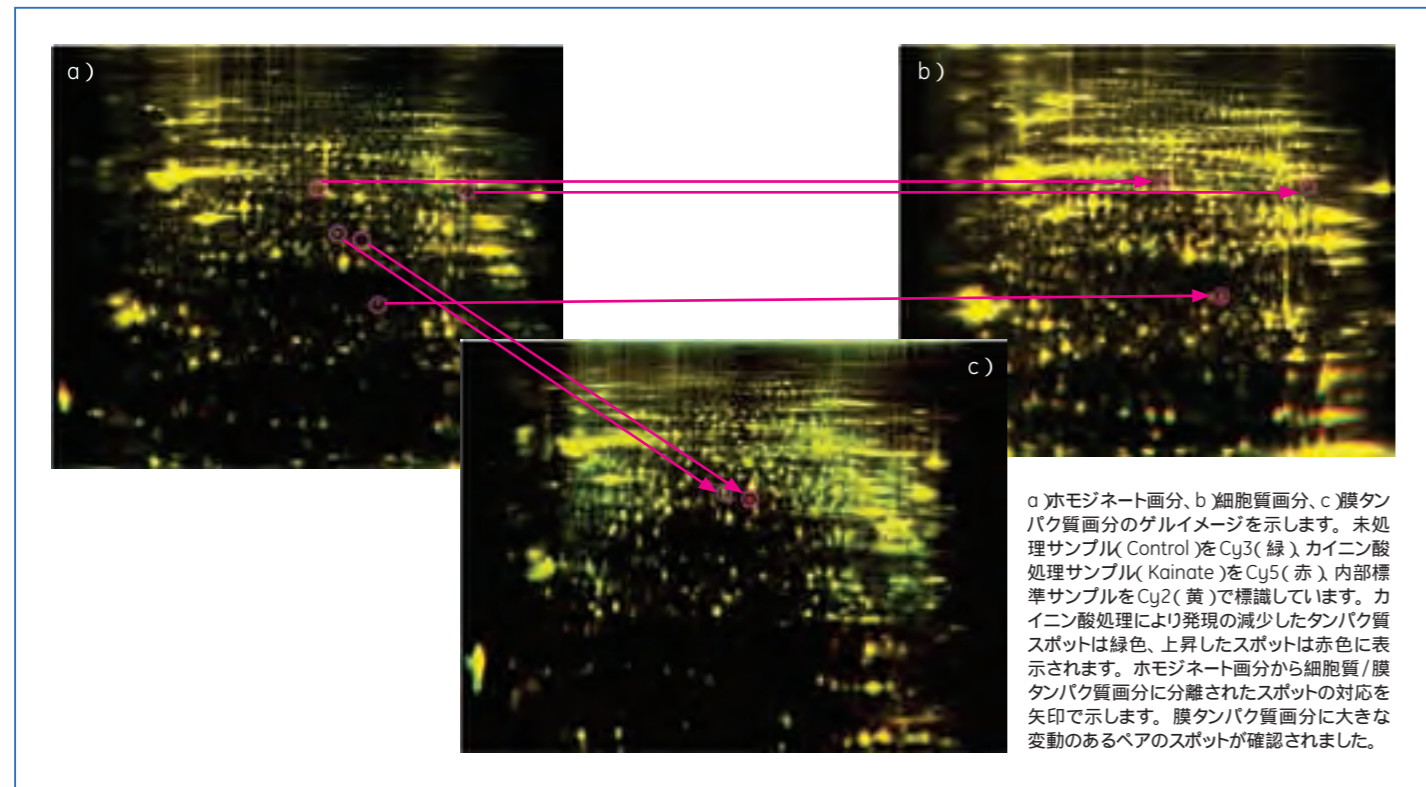


図 3. 各画分の二次元泳動後のゲルイメージ

a) ホモジネート画分、b) 細胞質画分、c) 膜タンパク質画分のゲルイメージを示します。未処理サンプル(Control)を Cy3(緑)、カイニン酸処理サンプル(Kainate)を Cy5(赤)、内部標準サンプルを Cy2(黄)で標識しています。カイニン酸処理により発現の減少したタンパク質スポットは緑色、上昇したスポットは赤色に表示されます。ホモジネート画分から細胞質/膜タンパク質画分に分離されたスポットの対応を矢印で示します。膜タンパク質画分に大きな変動のあるペアのスポットが確認されました。

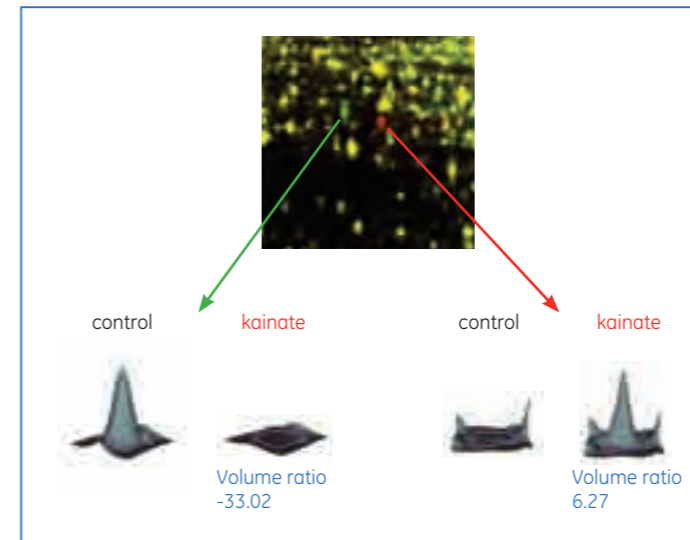


図 4. 膜タンパク質画分において顕著な増減が確認されたタンパク質スポットペア

表 2. 質量分析により同定されたタンパク質(抜粋)

タンパク質名	変動	スポットボリューム
NADH dehydrogenase alpha subunit 10	+ 6.27	1.16e+0.06
Oxygen regulated protein	+ 2.10	4.33e+0.05
ATP-dependent zinc metalloprotease	+ 1.96	1.34e+0.05
Golgi coiled coli protein	+ 1.72	1.24e+0.05
Neural adhesion molecular F3	+ 1.96	1.66e+0.05
Aldehyde dehydrogenase	+ 1.67	2.86e+0.06
Huntingtin interaction protein 1 related protein	+ 4.36	1.91e+0.05
T-cell activation Rho GTPase-activation protein	+ 1.51	2.10e+0.06
Growth factor receptor bound protein	+ 2.34	5.00e+0.05
Ndrogen-induced prostate Proliferative shutoff associated Protein As3	+ 2.02	2.16e+0.05
NADH dehydrogenase alpha subunit 10	- 33.02	1.07e+0.06
FERM, RhoGEF and pleckstrin domain proetin 2	- 1.67	3.45e+0.04
Heat-stable enterotoxinreceptor precursor	- 1.87	1.37e+0.05
ATP synthase beta subunit	- 2.67	2.27e+0.05
F1-ATPase beta subunit	- 2.17	3.39e+0.05
Huntingtin interacting protein related	- 2.63	2.63e+0.05
H+transporting two sector ATPase	- 1.87	1.31e+0.05

Ettan MALDI-ToF Pro 質量分析計による解析

Ettan DIGE システムによる解析の結果、脳膜タンパク質画分で 1.5 倍以上増減が変動しているスポットについて、質量分析計による解析を行いました。2D DIGE 解析用のゲルとは別に、脳膜タンパク質画分 500 μg を、前述と同様の条件で二次元電気泳動し、SYPRO Ruby (Invitrogen) で染色後、Typhoon 9400 でスキャンを行い、スポットを検出しました。検出したスポットのうち、62 スポットを Ettan Spot Picker で切り出し、トリプシンによる酵素消化後、Ettan MALDI-ToF Pro 質量分析計にて、全自動による Peptide Mass Fingerprinting(PMF) 解析

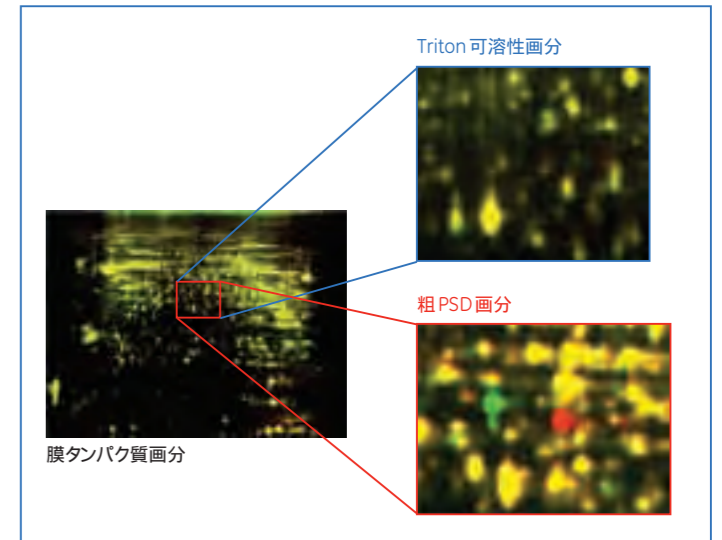


図 5. 膜タンパク質画分に見られる増減スポットペアの解析
PSD: postsynaptic density、シナプス後膜肥厚

同定を行いました。タンパク質同定は、ProFound および Mascot データベースで行いました。切り出した 62 個のスポットのうち、45 個のスポットのタンパク質が同定されました(73 %)。同定されたタンパク質の一部を表 2 に示します。

この結果、膜タンパク質画分のゲルイメージ中央付近に存在していた緑色と赤色の変動スポット(図 5)は、双方とも NADH dehydrogenase I subunit 10-like protein と同定され、同一タンパク質であることが確認されました。このタンパク質はラットをカイニン酸処理することにより、何らかの変化(修飾あるいは分解など)がほぼ全量に生じ、スポットの位置が移動していることがわかりました。また、その他にも多くのタンパク質の発現が変動していることが確認されました(表 2)。

まとめ

てんかんを引き起こすことが知られているカイニン酸をラットに投与し、そのラット脳の各画分のタンパク質発現の変動を Ettan DIGE システムを用いて検証しました。その結果、通常の可溶性画分はもちろん、難溶性の膜タンパク質の発現差異解析を容易に行うことができ、さらには、その変動したタンパク質の同定も可能であることが明らかとなりました。膜タンパク質のうち、Triton X-100 にも不溶解の粗 PSD 画分も Ettan DIGE システムで発現差異解析を行うことができました。

今回は疾患プロテオミクスのモデルとしててんかんモデルラットの脳内タンパク質の発現変動を観察しましたが、同様に各種疾患研究への応用も可能であり、疾患の原因の探索、あるいは疾患マーカーの検索に Ettan DIGE システムが有効に使用できることが期待されます。