

Application of 2D DIGE to the investigation of the mechanism of action of a small molecule anti-tumor drug

低分子抗ガン剤の作用機序研究における2D DIGE技術の応用

Y. Oda¹, T. Owa¹, T. Sato¹, H. Yamanaka², Y. Shinohara², A. Yokoi¹, J. Kuromitsu¹, T. Nagasu¹, and A. Alban³

¹Eisai Co., Ltd. Laboratory of Seeds Finding Technology, Tokyo, Japan, ²GE Healthcare Bio-Sciences KK, Tokyo, Japan,

³GE Healthcare UK Ltd, Grove Centre, England

本研究では2D DIGE(fluorescence difference gel electrophoresis)技術を用いたEttan DIGEシステムを使用し、低分子薬剤であるE7070の作用機序を調べました。E7070およびE7070*(E7070の非活性アナログ)と相互作用するタンパク質をそれぞれアフィニティークロマトグラフィーで分離して2D DIGEにより比較し、E7070アフィニティークラムに特異的に結合したタンパク質スポットを質量分析により同定しました。E7070に特異的に相互作用するこれらのタンパク質は、ガン抑制作用に関与していることが予想されます。

はじめに

抗ガン剤E7070は細胞周期のG1期において進行を抑制することが知られています。しかしこれまでのところ、その作用機序は明らかにされていません。この薬剤の生物学的活性について知見を得るため、アフィニティークロマトグラフィーを使用し、ヒトの大腸ガン由来細胞株HCT116より調製したセルライゼートからE7070と相互作用するタンパク質(以下、活性サンプル)を分離しました。また、非特異的な結合を区別するために、E7070の非活性アナログであるE7070*と相互作用するタンパク質(以下、非活性サンプル)を分離しました。E7070およびE7070*の構造式を図1に示します。

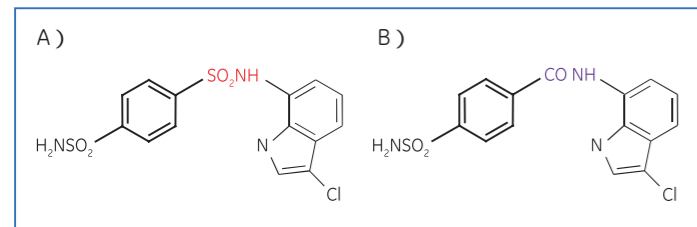


図1. 活性化合物E7070(A)および非活性化合物E7070*(B)の構造

非活性サンプルと比べ、活性サンプルで特異的に結合量が増加しているタンパク質を同定するため、2D DIGE技術を用いてそれぞれのカラムの溶出液に含まれているタンパク質を比較しました。さらに、活性サンプルの中で有意な増加が認められるスポットを切り出し、質量分析によって同定しました。実験のワークフローを図2に示します。

2D DIGE技術は、タンパク質の発現差異解析を目的として確立された技術です。電荷と分子量が同じ3種類のDIGE専用蛍光色素CyDye DIGE Fluorsで異なるタンパク質サンプルを標識して混合し、同一の二次元電気泳動ゲル上で分離します。その後、それぞれの蛍光物質を検出することで単一ゲルに展開した異なるサンプルのイメージが完全に重なった状態で得られます。泳動時には、各ゲルに内部標準を添加します。

DeCyder 2D Softwareに搭載されている独自のアルゴリズムによって、同一ゲル上に泳動したサンプルと内部標準のシグナルを同時に検出できます。これにより実験系に内在する誤差を効果的に排除でき、サンプル間における真のタンパク質発現差異を正確に定量することが可能です(1)。

材料と方法

サンプルの準備

E7070とE7070*の各化合物を塩基性pH下でアミド結合を介したアフィニーター担体に固定しました。固定された化合物の量は、担体1 mlあたりおよそ8 mgになります。ペットボリュウム1 mlの各アフィニーター担体に、HCT116(3.5×10^8 cells)のセルライゼートを添加し、0.05 % CHAPSを含む25 ml PBSで洗浄しました。タンパク質は6M 塩酸グアニジンおよび2 % CHAPSで溶出し、次に10 mM 重炭酸アンモニウムに対して透析を行いました。溶出したタンパク質を真空乾燥し、その後lysis buffer(8 M urea, 4 % w/v CHAPS, 30 mM Tris pH 8.5)で溶解しました。

標識および二次元電気泳動

各サンプルを等量ずつ含む内部標準を調製しました。タンパク質サンプルは、CyDye DIGE Fluor minimal dyesで標識しました(2)。同じゲルで分離する標識済みサンプルを混合し、等量の2x sample buffer(8 M urea, 4 % [w/v] CHAPS, 130 mM DTT, 2 % [v/v] Pharmalyte pH 3-10)を加えました。

その後、カッローディング法によってImmobiline DryStrip pH 3-10、24 cmにサンプルを添加しMultiphor II Electrophoresis Systemで等電点電気泳動を行いました(60 kVh)。泳動後のImmobiline DryStripを6 M urea, 30 % glycerol, 1 % SDS, 50 mM Tris pH 8.8, 65 mM DTTで10分間、その後6 M urea, 30 % glycerol, 1 % SDS, 50 mM Tris pH 8.8, 240 mM iodoacetamideで10分間平衡化しました。

二次元目の分離には、低蛍光ガラスプレートを使用して作製した12.5 % ゲル(26x20 cm)を使用しました。電気泳動はEttan DALT twelve Electrophoresis System(2 W/gel, 15)でプロモフェノールブルーがゲルの下端に達するまで泳動しました。

画像の取得と解析

SDS-PAGE後、ゲルをガラスプレートごとスキャンしました。ゲルのイメージングはTyphoon 9410を使用して100 μmの解像度で行いました。

画像解析は、DeCyder 2D Softwareを使用して行いました。各ゲルに含まれる内部標準を使用して、異なるゲル間のスポットパターンをマッチングさせ、スポットボリュームのレシオの比較および統計解析を行いました。

その後、Student's t-testを利用して、活性サンプルで有意に増加しているスポットを選択しました。

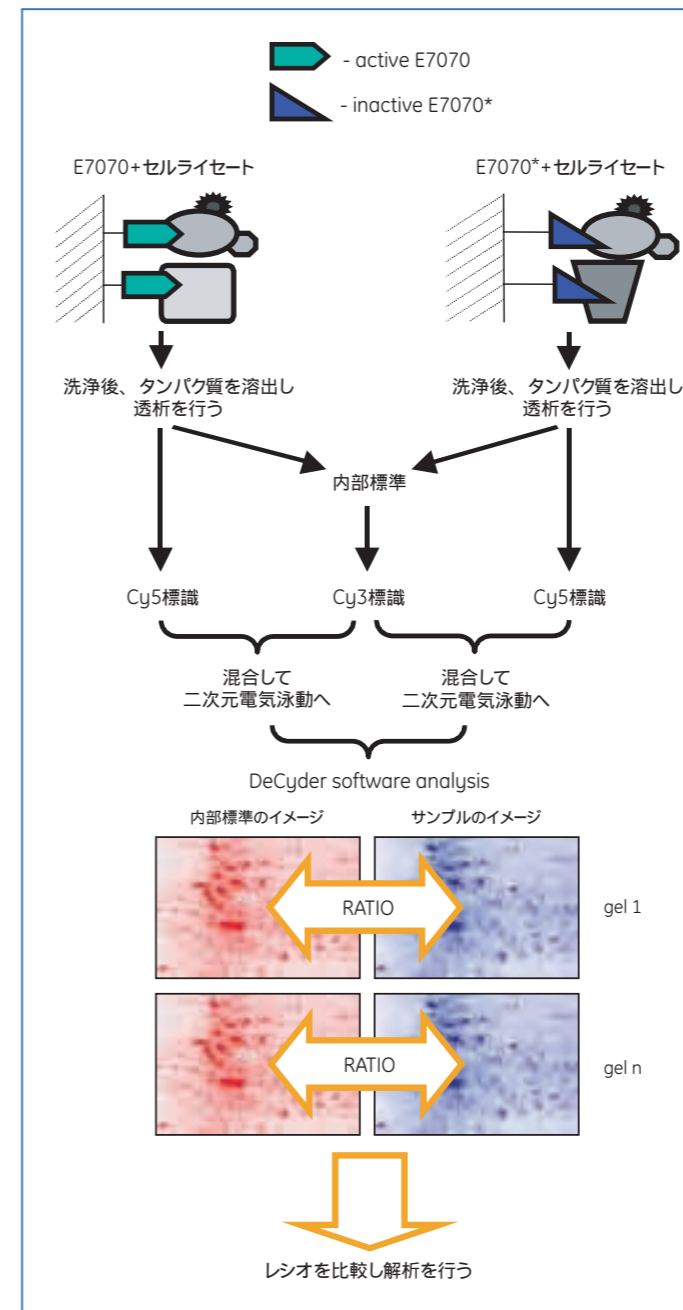


図2. 実験のワークフロー

内部標準は、活性サンプルと非活性サンプルを等量ずつ含みます。差異解析を行うため、内部標準によりサンプルのスポットボリュームのレシオを求め、異なるゲル間で比較し、Student's t-test解析を行いました。(この実験系ではCy3とCy5のみを使用しています)

スポットの切り出しと消化

DeCyder 2D Softwareで作成されたpick listをもとにEttan Spot Pickerで自動的にスポットを切り出し、96ウェル マイクロプレートへ回収後、トリプシンによってゲル内消化しました(3)。

質量分析

C18キャピラリーカラム(150 mm x 0.1 mm)でHPLCを行い、Finnigan LCQ™ ESI ion trap mass spectrometer(Thermo Electron) または QSTAR™ pulsar I ESI QqTOF mass spectrometer(Applied Biosystems)へ直接溶出しました。各スペクトルのうち最も強度の高いピークを選択して衝突誘起解離(CID)を行い、data-dependent modeでMS/MSスペクトルを取得しました。MS/MSスペクトルのデータは Mascot(4) Matrix Sciences)とSonar MS-MS(Genomic Solutions)で解析しました。

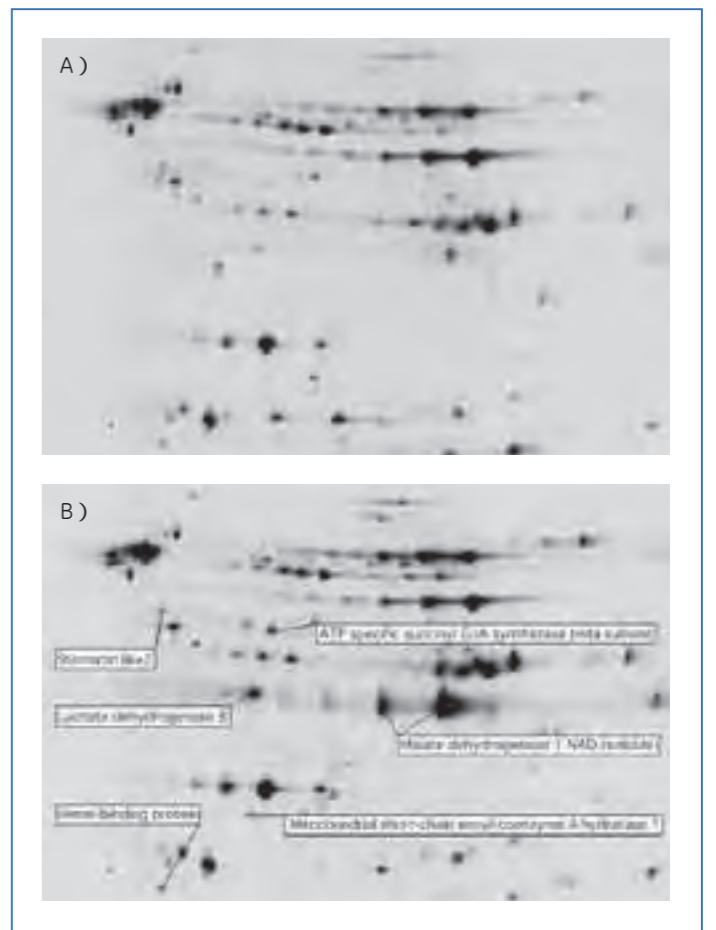


図3. 二次元電気泳動によって分離した溶出タンパク質のスポットパターン
A) 非活性サンプル: E7070* アフィニティークラムから溶出されたタンパク質
B) 活性サンプル: E7070アフィニティークラムから溶出されたタンパク質
活性サンプルで有意な増加が見られるタンパク質は、タンパク質の名称を記載しました。

結果と考察

2D DIGE解析のために、活性サンプルと非活性サンプルを等量ずつ含む内部標準を調製し、比較するサンプルとともに泳動しました。スポットボリュームのレシオの測定は同じゲル内の内部標準とサンプルの間で行い、最終的にこれらのレシオは複数のゲル間で比較しました。これによって、実験系の内在的な誤差が効果的に排除され、サンプル間のタンパク質発現差異解析の精度が改善されるため、活性サンプルと非活性サンプルの違いを高感度かつ正確に定量できるようになります。

DeCyder 2D Softwareによる解析後、スポットボリュームのレシオの平均値についてStudent's t-test解析を行いました。さらに活性サンプルにおいて有意に発現量が増加しているタンパク質スポットを選択し、これらのスポットを切り出して質量分析で同定しました。同定したタンパク質の名称を図3のゲルイメージ上に記載しました。

DeCyder 2D Softwareによる解析結果の一例としてリンゴ酸脱水素酵素 1. NAD(水溶性)のacidic isoformを図4に示します。このスポットボリュームのレシオの平均値は、活性サンプルにおいて7.72倍増加しておりStudent's t-testのp値は 3.4×10^{-7} でした。

標準化した発現量のグラフにおいて、データポイントのばらつきが少ないほど、実験系に内在する誤差が少ないことを示します。このときStudent's t-testのp値は小さく、スポットボリュームのレシオを正確に定量することが可能です。Ettan DIGEシステムによって解析されたタンパク

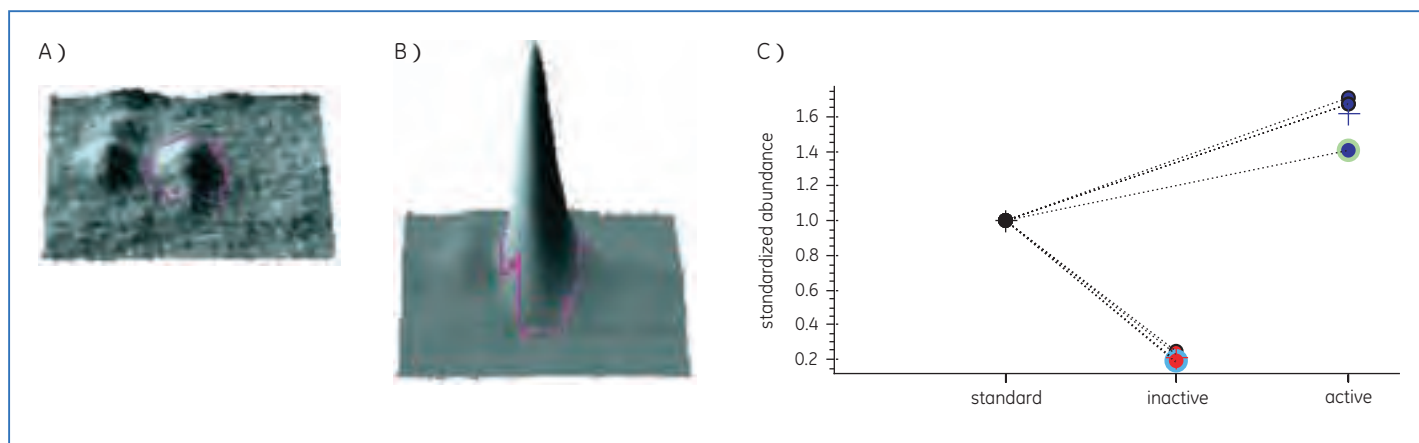


図4. DeCyder Differential Analysis Software による解析結果

リンゴ酸脱水素酵素 1. NAD(水溶性)のacidic isoformの3Dビューとグラフビュー

A) 非活性サンプル: E7070* アフィニティーカラムから溶出されたタンパク質

B) 活性サンプル: E7070 アフィニティーカラムから溶出されたタンパク質

C) 標準化した発現量のグラフ

inactive = 非活性サンプル : E7070* アフィニティーカラムから溶出されたタンパク質

active = 活性サンプル : E7070 アフィニティーカラムから溶出されたタンパク質

グラフビュー内の各ドットは複数のゲルから得られた結果を表しています。標準化発現量の平均値はグラフ内に+で示しています。

質スポットの大部分は、活性サンプルと非活性サンプルの間でスポットボリュームのレシオの平均値に変化は見られませんでした。これらのタンパク質はアフィニティー担体、あるいはE7070とE7070*分子に共通する構造に非特異的に結合していると考えられ、明らかになっている抗ガン作用には直接関与しないことが示唆されます。

まとめ

本研究では、低分子薬剤に結合するタンパク質を網羅的に解析する新たなアプリケーションとして、2D DIGE技術を使用したEttan DIGEシステムが有効であることが明らかになりました。正確なスポットの定量化により、精度の高い統計学的信頼性を実現し、サンプル間の真のタンパク質発現差異を検出することができます。今回は、Ettan DIGEシステムを使用することで、薬剤分子に特異的に結合し、非活性アナログには結合しないタンパク質を同定することができました。同定されたタンパク質を今後さらに解析することで、E7070の*in vivo*における作用機序についてより多くの知見を得ることが可能になるといえます。

参考文献

1. Alban, A. *et al. Proteomics* 3, 36-44 (2003).
2. Yan, J. X. *et al. Proteomics* 2, 1682-1698 (2003).
3. Katayama, H. *et al. Rapid Comm. Mass Spectrom.* 15, 1416-1421 (2001).
4. Perkins, D. N. *et al. Electrophoresis* 20, 3551-3567 (1999).