

Ettan design integrated proteomics platform

Ettan プラットフォームを用いた哺乳類モデル実験系におけるタンパク質発現差異の検出と同定

病気の進行にともなうタンパク質発現の変動を解析することは、病気のメカニズムを理解するうえで重要です。正常組織と病変組織のタンパク質プロファイルを比較する手法としては、2D-MS解析が広く用いられています。

これからのタンパク質解析では、一連の実験における多数のサンプルを全て同じように処理できるように統合された2D-MS解析システムが必須となります。本稿では、タンパク質の発現差異解析から差異のみられた目的タンパク質の同定までの一連の実験系でのEttan design統合プロテオミクスプラットフォームの有用性についてご紹介します。

はじめに

Ettan designプロテオミクス統合プラットフォームには以下のものが含まれます。

- Ettan DIGEシステム：タンパク質発現差異解析
- Ettan IPGphor / Ettan DALT：二次元電気泳動
- Ettan Spot Handling Workstation：二次元電気泳動ゲルからのタンパク質スポットの切り出し・ゲル内酵素消化処理・質量分析計のサンプルスライドへのスポットニング

本稿では、Ettan designプロテオミクス統合プラットフォームを用いたパーキンソン病哺乳類モデルの経時的変化の検討例をご紹介します。パーキンソン病(Parkinson's disease)は、手足の震え、筋肉の硬直、緩慢な動作などを特徴とする神経変性疾患です。ヒトの病状に似せたいくつかのモデル作製法がありますが、本研究ではマウスを1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine(MPTP)で処理する方法を用いました。本研究では、マウスにMPTPを単回投与し、線条体内のタンパク質発現量の経時的変化を投与後22日目までの間に3点を設定して解析しました。

Ettan DIGEシステムを使用して、MPTP処理後発現量に有意な差異を示したタンパク質スポットを選出しました。このシステムでは、内部標準サンプルを利用した実験系により、タンパク質発現量にみられる差異を統計学的手法を適用することで高精度に定量することができます。Ettan DIGEシステムを用いた発現差異解析により選出された10のタンパク質スポットをEttan MALDI-ToF Pro質量分析計を使用し、peptide mass fingerprinting(PMF)法にて解析しました。全10スポットについてPMFスペクトルが得られ、8種類のタンパク質が同定されました。

方法

サンプル調製

パーキンソン病様の症状を誘発するために17体のC57BL/6マウスをMPTPで処理しました(0日目(1,2))。コントロールとして、6体の未処理マウスを用いました。それぞれの処理条件に対して、5以上の生物学的レプリケートを準備しました。

6コントロール(サンプル名: CA-CF)

処理後1日目の6サンプル(1A-1F)

処理後8日目の5サンプル(8A-8E)

処理後22日目の6サンプル(22A-22F)

サンプルは、氷冷 lysis バッファー(7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris-HCl, pH8.5)中でホモジナイズしました(3)。それぞれのサンプルのタンパク質濃度は通常のタンパク質濃度測定用試薬を用いて測定しました。

脳サンプルは、スウェーデン ウプサラ大学のご厚意により提供。

サンプル標識

凍結乾燥状態のCyDye DIGE Fluor minimal dyesをdemethylformamide(DMF; Aldrich)で溶解し、終濃度400 pmol / μ lに調製しました。前項で準備した各ホモジネートを、タンパク質50 μ gにつき400 pmol / μ lのCyDye DIGE Fluor Cy3 / Cy5 minimal dyeを用い、それぞれ標識しました。標識前の全23サンプルから等量ずつ分取しておいたものを混合し、これを内部標準とします。内部標準については、全てのゲルに添加するのに十分な量をまとめてCyDye DIGE Fluor Cy2 minimal dyeにて標識しました。

電気泳動

等電点電気泳動(Isoelectric Focusing)に先だち、同一ゲルに添加するそれぞれCy2、Cy3、Cy5で標識したサンプルを表1のように混合し、等量の2xサンプルバッファー(7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 20 mg/ml dithiothreitol, 2% Pharmalyte pH 3-10)を添加しました。

解析用ゲル

等電点電気泳動は陽極側カップローディング法を用い、3サンプル(各50 μ g、表1参照)を一次元目ゲル(Immobiline DryStrip pH 3-10 NL, 24cm)上でフォーカスを合わせました。泳動は、Ettan IPGphor Isoelectric Focusing Unitシステムにて実施しました(合計48 kVh)。

泳動後、Immobiline DryStripを平衡化しました(5)。二次元目SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、Ettan DALT twelve Large Electrophoresis Systemに低蛍光ガラスプレート(Ettan DALT LF Glass Plate Set)をセットして行いました。ゲルは1.0 mm厚の12.5% SDSポリアクリルアミドゲルを使用しました。変法Laemmliバッファー(0.2% SDS)を用い、ゲル1枚あたり2Wの一定電力にて16時間泳動しました。

スポット切り出し用ゲル

質量分析のために、切り出し用ゲルを別途作製しました。Immobiline DryStrip pH3-10 NL, 24cmの膨潤時に、500 μ gの未標識内部標準サンプルを添加し、前述の解析用ゲルの際と同様の方法で等電点電気泳動を行いました。二次元目の分離条件についても、解析用ゲルを分離した際と同様です。一枚のガラスプレートをBind-Silane溶液で処理し、スポット切り出し用に2個の蛍光リファレンスマーカーをセットしました。

泳動後、ゲルを固定し、SYPRO Ruby Protein Gel Stain(Invitrogen)にて染色しました。染色方法は製品添付の説明書にしたがいました。蒸留水を用い、2時間かけて4回洗浄し、余分な染色液を除去しました。

画像の取込みと解析

解析用ゲル-イメージング

Typhoon 9400バリアブルイメージアナライザーを用いて解析用ゲルからゲルイメージを得ました。Typhoon 9400は、CyDye DIGE Fluorの検出用に至適化されており、今回使用した設定は以下の通りです。

Cy2: 励起波長488 nm, emission filter 520 nm BP 40 nm

Cy3: 励起波長532 nm, emission filter 580 nm BP 30 nm

Cy5: 励起波長633 nm, emission filter 670 nm BP 30 nm

切り出し用ゲル-イメージング

Typhoon 9400バリアブルイメージアナライザーを使用して、染色済み切り出し用ゲルからゲルイメージを得ました。Typhoon 9400の設定

は励起波長457 nm, emission filter 610 nm BP 30 nmで検出し、DeCyder 2D Softwareを用いて解析用ゲルとのマッチングを行いました。実際のスポット切り出しにむけ、DeCyder 2D Softwareの機能により発現に有意な変動のみられたタンパク質スポットの「Pick list」を作製しました。

イメージ解析

検出されたゲルイメージの解析には、Ettan DIGEシステムのDeCyder 2D Softwareを使用しました。DeCyder 2D Softwareは、それぞれのゲル上の異なる蛍光色素(Cy3またはCy5)で標識されたスポットを各内部標準(Cy2で標識)に照らし合わせ、イメージペア(Cy2&Cy3またはCy2&Cy5のペア)として自動的に認識します。各タンパク質スポットを内部標準中の対応スポットと比較することで相対値化することができます。

ゲル間のマッチングは、それぞれのイメージペアのうち内部標準サンプルのスポットパターンにもとづいて行います。内部標準を利用することで、ゲル間に存在する実験操作などに起因する差異を実際の差異から取り除くことができ、同一ゲル内のサンプル対内部標準の比をベースにしたゲル間のスポット比較が可能になります。内部標準の蛍光シグナル強度をゲル間で比較し相対値を得ることで、ゲル間の標準化ができ、ゲル間変動を効果的に解消することができます。

DeCyder 2D Softwareでは、各スポットに対して独立t検定や一元配置分散分析(one-way ANOVA)などの統計検定を行い、コントロールと処理サンプル間でのタンパク質発現を解析しました。コントロールと処理サンプル間で有意な差異($p > 0.05$)を示したスポットのみを選別しました。

スポットピッキングとMS解析用サンプル調製 - 同定

DeCyder 2D Softwareでの解析により選択されたスポットは1.4 mm径ピッキングヘッドを用いて切り出しました。切り出されたゲル断片は、50 mM重炭酸アンモニウムで洗浄後乾燥させ、20 mM重炭酸アンモニウム中でトリプシンを用いてゲル内消化しました(37℃、70分)、0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸(TFA)を含む50%(v/v)アセトニトリルにてペプチド断片を抽出し、乾燥しました。

各ペプチド混合液(全量の15%)は、Ettan MALDI-ToF Proのサンプルスライド上にスポットしました。マトリックスとして、0.5%TFAを含む50%アセトニトリルで溶解したACH-Cinnamic Acid(CHCA)を使用しました。

Ettan MALDI-ToF Pro質量分析計を用いてPMF(Peptide mass fingerprinting)解析を行いました。Ettan MALDI-ToF Proによるタンパク質同定の手順については参考文献6をご参照ください。

得られたスペクトルはトリプシンの自己消化のピークを基準にして自動的に補正されます。Ettan MALDI-ToF Proは、検出されたピーク質量値を自動的に統合タンパク質データベース検索エンジンに転送し、Expectationに基づいて候補タンパク質のリストを作成します。

Ettan Spot Handling Workstationでのスポット処理に使用されるすべての化学物質、試薬類および製品につきましては、参考文献6をご参照ください。

結果

実験デザイン

Ettan DIGEシステムを用いたタンパク質発現差異解析では、内部標準および最大2種までの処理法の異なるサンプルを同一ゲル上で泳動

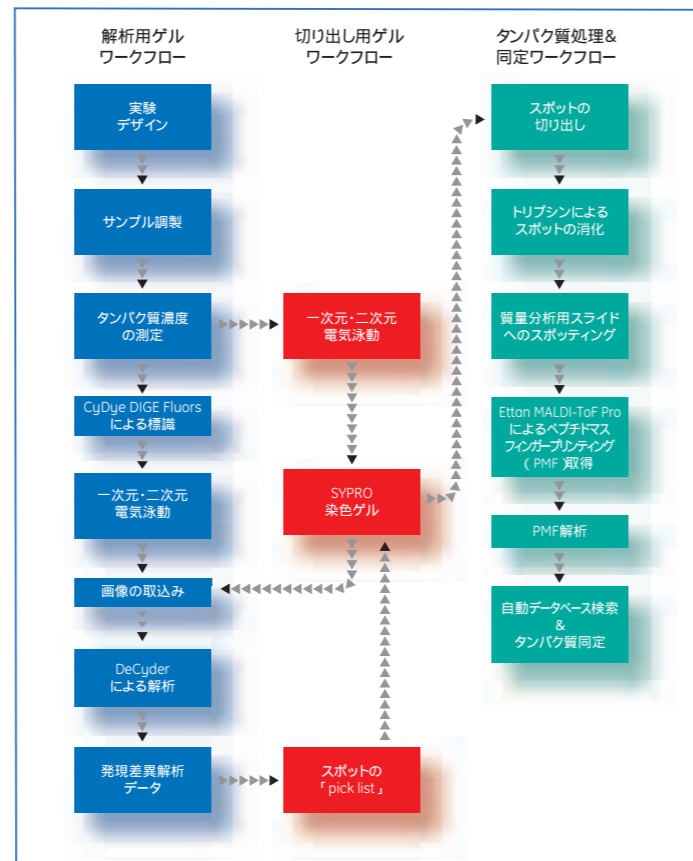


図1. Ettan designプロテオミクスプラットフォームの統合ワークフロー

解析用ゲルワークフローにおいて二次元電気泳動は多重泳動を行い、タンパク質発現量の差異を検出しました。選出したタンパク質スポットは別途準備したSYPRO Ruby染色ゲルから切り出し、Ettan Spot Handling Workstationにて処理しました。その後、Ettan MALDI-ToF Proを用いてタンパク質の同定を行いました。

表1. MPTP処理効果の解析実験モデル

本研究の二次元電気泳動において使用されている全ての化学物質、試薬類および製品につきましては、参考文献3, 4をご参照ください。

ゲル番号	Cy2	Cy3	Cy5
1	内部標準	CA	1D
2	内部標準	CB	8D
3	内部標準	CC	22D
4	内部標準	1A	8E
5	内部標準	1B	22E
6	内部標準	1C	CD
7	内部標準	8A	22F
8	内部標準	8B	CE
9	内部標準	8C	1E
10	内部標準	22A	CF
11	内部標準	22B	1F
12	内部標準	22C	

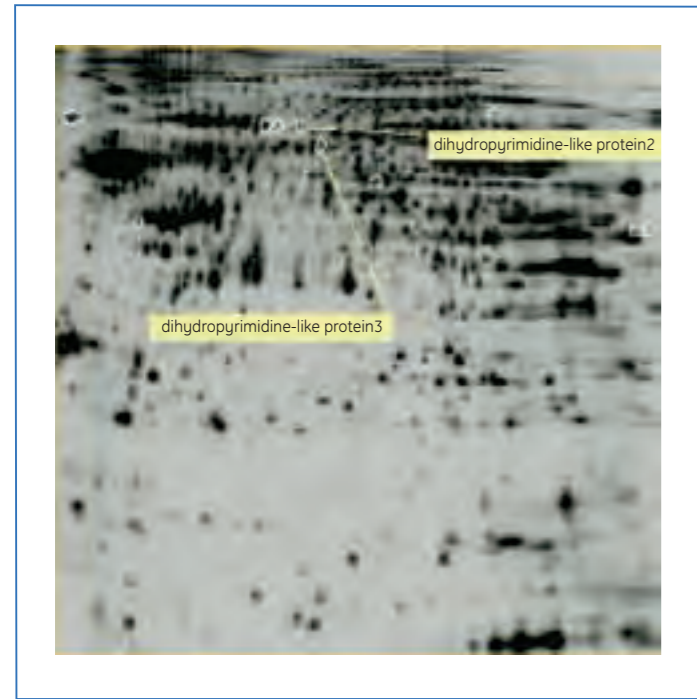


図2. Ettan DIGEシステムにより得られたゲルイメージ
質量分析を行ったタンパク質スポットを白枠で示しています。図3～6で解析した2つのタンパク質スポットには、それぞれのタンパク質名が表示されています。

することが可能になります。

表1に示した実験デザインを本研究に用いることで、動物の個体ごとの生物的多様性をふまえた正確な統計解析が可能になりました。まず、実験に用いるすべてのサンプルから一部を分取・混合し、内部標準とします。したがって、各サンプルに由来するタンパク質がすべて内部標準サンプルに含まれることとなります。Cy3またはCy5で標識したサンプルを内部標準サンプルと比較して相対値化することで、実験を行っている途中で生じるさまざまな操作誤差やゲル間の差を除去することができ、統計学的に信頼性の高いデータを得ることができます。

タンパク質発現差異解析

発現差異解析にDeCyder 2D Softwareを用いることにより、平均3,270スポットが検出され、そのうち2,170スポット (>66%) がマッピングされました。それぞれのサンプルにつき、コントロールに対しての平均比率(それぞれのゲルから得られる2群間のタンパク質の存在比を内部標準によって補正した比の平均;例えばコントロールと処理後1日目の比)を求め、独立t検定を行いました。

それぞれの経時的変化測定点とコントロール間で個別にt検定を行い、タンパク質発現量の差異を10%から検出することができました。質量分析のために平均比率が1.3以上または-1.3以下で危険率(p値)が0.05以下のスポットを選出しました。

表2に、DeCyder 2D Softwareでのゲル解析で得られた結果をまとめました。処理の結果として発現量に最大の変化(対コントロール)がみられたスポット数を経過日数ごとにまとめました。実験期間中、発現量変

表2. 処理後1, 8, 22日目においてタンパク質発現量が統計的に有意な最大変化(コントロールに対して増加または減少)を示したスポット数

処理後日数	合計	増加	減少
1	11	8	3
8	8	4	4
22	15	12	3

化が最大または一定(プラトー)にならなかったタンパク質スポットに関しては、処理後22日目の発現量を最大変化としました。この解析結果を基に、タンパク質スポットの切り出しと同定を行いました。

別途用意した切り出し用ゲルを解析用ゲルとマッチングし、Ettan MALDI-ToF ProでPMF解析を行うために、10スポットを選択しました。全10スポットからPMFスペクトルが得られ、8種類のタンパク質が同定されました。

質量分析用に選択した10スポットは、それぞれ22日間の実験期間において異なる傾向を示しました。図3および4に、同定されたタンパク質の例を示します。両タンパク質ともdihydropyrimidinase-like proteinであることがわかりました。図3はdihydropyrimidinase-like protein 3の相対量に対するMPTP処理の影響についてプロットしています。このタンパク質は、処理を行うことにより相対量のレベルが上昇したあと、1日目から22日目の間では上昇は顕著に鈍化しています。図4はdihydropyrimidinase-like protein 2の相対量に対するMPTP処理の影響についてプロットしています。このタンパク質は、発現量が処理後1日目に急激に上昇し、その後コントロール値に向け穏やかな下降傾向を示しました。

図3, 4に示したタンパク質は、切り出し用2DゲルからEttan Spot Handling Workstationを用いて目的となるタンパク質スポットを切り出し、トリプシン消化を行い、Ettan MALDI-ToF Proにて同定されました。これらのタンパク質から得られたPMFスペクトルを図5, 6に示します。

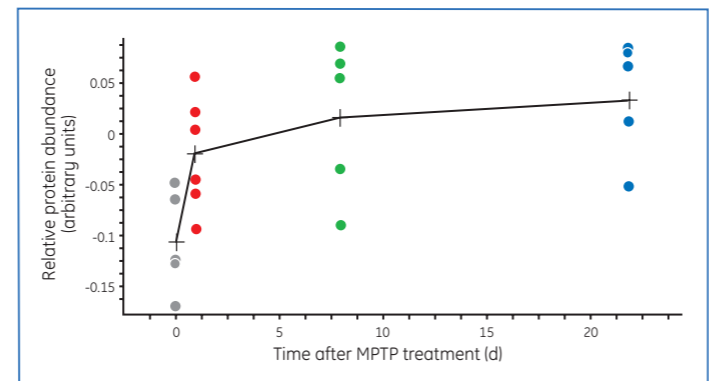


図3. DeCyder 2D Softwareの機能の1つである一元配置分散分析($p=1.7 \times 10^{-3}$)による解析でdihydropyrimidinase-like proteinのMPTP処理後の発現量変化を解析

このタンパク質はデータベース検索の結果、dihydropyrimidinase-like protein 3と同定されました。

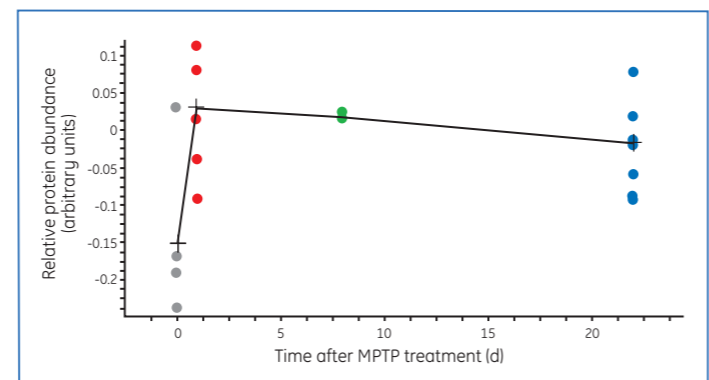


図4. DeCyder 2D Softwareの機能の1つである一元配置分散分析($p=1.7 \times 10^{-3}$)による解析でdihydropyrimidinase-like proteinのMPTP処理後の発現量変化を解析

このタンパク質はデータベース検索の結果、dihydropyrimidinase-like protein 2と同定されました。

Ettan MALDI-ToF Proの統合タンパク質データベース検索エンジンを用いることにより、スペクトルからのタンパク質同定は自動で行われます。

まとめ

本稿では、ハイスループット解析にも対応するEttan design統合プロテオミクスプラットフォームと、タンパク質発現差異の自動解析/同定のプロセスをご紹介します。

- Ettan IPGphor, Ettan DALTwelve : 効果的な高解像度二次元電気泳動を実現
- CyDye DIGE Fluors (Ettan DIGE) : 簡便、迅速に高い再現性をもってタンパク質抽出液を標識
- Typhoonリアプライメーリアライザー (Ettan DIGE) : 高品質のイメージングを実現
- DeCyder 2D Software (Ettan DIGE) : 迅速、かつ統計学的に高精度にタンパク質発現量のわずかな差異を検出可能
- Ettan Spot Handling Workstation : 迅速、効率的な自動タンパク質スポット処理を実現

統合システムを用いることで、図3～6でご紹介したようなパーキンソン病の進行に重要な役割を果たしている可能性のあるタンパク質を同定することができました。現在、タンパク質同定をさらにすすめている段階で、パーキンソン病におけるこれらのタンパク質の生物学的な重要性について研究を行っております。

Ettan designプロテオミクスプラットフォームを用いたモデルシステム研究は他にも行われております。参考文献8～10をご参照ください。

参考文献

1. Sundström, E. et al. Chronic neurochemical and behavioural changes in MPTP-lesioned C57BL/6 mice: a model for Parkinson's disease. *Brain Res.* 528, 181-188 (1990).
2. Sköld, K. et al. Protein characterization in animal models of Parkinson's Disease. *Proceedings of the American Society for Mass Spectrometry, 48th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* (2000).
3. *Ettan DIGE User Manual*, GE Healthcare, 18-1164-40 Edition AA (2002).
4. *2-D Electrophoresis using Immobilized pH Gradients*, GE Healthcare, 80-6429-60, Edition AA (1998).
5. Yan, J.X. et al. Fluorescence 2-D Difference Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry Based Proteomic Analysis of Escherichia coli. *Proteomics* 12, 1682-1698 (2002).
6. Data file: *Ettan Spot Handling Workstation*, GE Healthcare, 18-1159-28, Edition AA (2002).

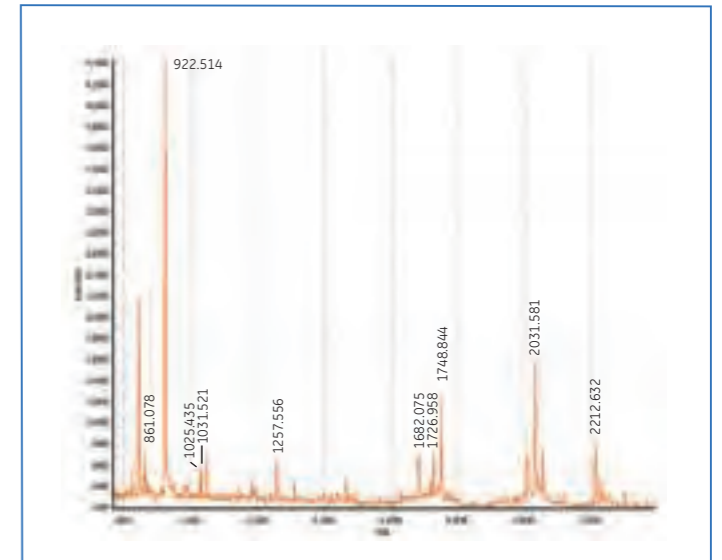


図5. Ettan MALDI-ToF Proでの解析により得られたdihydropyrimidinase-like protein 3のPMFスペクトル

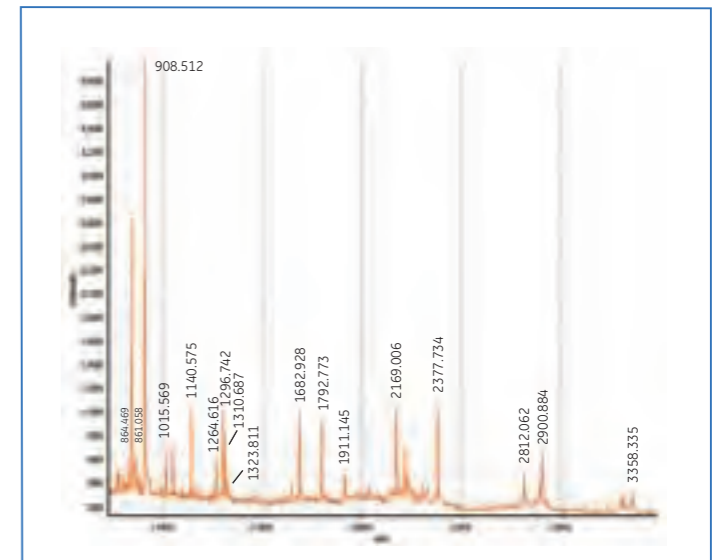


図6. Ettan MALDI-ToF Proでの解析により得られたdihydropyrimidinase-like protein 2のPMFスペクトル

7. *Ettan MALDI-ToF User Manual*, GE Healthcare, 18-1144-01, Edition BB (2002).
8. Gharbi, S. et al. Evaluation of Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis for Proteomic Expression Analysis of a Model Breast Cancer Cell System. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 91-98 (2002).
9. Zhou, G. et al. 2D Differential In-gel Electrophoresis for the Identification of Esophageal Squamous Cell Cancer-specific Protein Markers. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 117-123 (2002).
10. Skynner, H. et al. Alterations of stress related proteins in genetically altered mice revealed by two-dimensional differential in-gel electrophoresis analysis. *Proteomics* 2, 1018-1025 (2002).