

The use of the Ettan DIGE in the analysis of the 2-D Clean-Up Kit

サンプル調製キット 2-D Clean-Up Kitによる Ettan DIGE 解析精度の向上

Catherine Evans, Sarah Driver and Timothy Stone

GE Healthcare UK Ltd, GE Healthcare Place, Little Chalfont Buckinghamshire, HP7 9NA, UK

Ettan DIGEシステムは、2D DIGE技術を利用して、タンパク質の発現差異を解析する目的で開発されたシステムです。このシステムの利点を生かすためには、蛍光標識条件を考慮した上でタンパク質の抽出試薬や可溶化剤を適宜選択する必要があります。本報では、異なる方法で調製したタンパク質サンプルを用いて2D DIGE解析を行い、調製法の違いによる効果を比較しました。この結果、2-D Clean-Up Kitを用いて調製したサンプル群では、アセトン沈殿法を用いたサンプル群よりも標識効率が向上し、微量発現のタンパク質の検出も可能であることがわかりました。

はじめに

2D DIGE技術は、等電点および分子量の違いでタンパク質を分離後、異なるサンプル群間にみられるタンパク質発現量の差異を定量的に解析できる強力な研究ツールです。この技術を利用したタンパク質発現差異解析システムEttan DIGEでは、分子量および電荷が等しく、異なる蛍光波長をもつ3種類の専用蛍光試薬CyDye DIGE Fluorsを用いてサンプルの標識を行うため、最大3種類の異なるサンプルを同一ゲル上で同時に泳動できるという利点があります。

タンパク質サンプルの調製は、Ettan DIGEにおける標識反応や二次元電気泳動の分離能、差異解析の結果を左右する重要なステップです。一般にタンパク質サンプルに一級アミンなどの夾雑物が含まれていると、CyDyeのカップリング反応が阻害され標識効率が低下します。また、タンパク質の泳動パターンに悪影響を与える問題は多くの場合、細胞からの抽出時に混入するタンパク質以外の夾雑物に起因するという知見が得られています(1)。

2-D Clean-Up Kitの使用により、可溶化および蛍光標識反応の双方に最適な反応条件を実現することができます。このキットによりサンプル中のタンパク質を沈殿・再溶解することで、タンパク質抽出の過程で混入する脂質、核酸、その他の低分子を除去することが可能です。アミノ酸モノマー等の一級アミンの除去により標識効率が改善され、また、SDSなどイオン性の可溶化剤を除去することでよりクリアな泳動結果を得ることができます。夾雑物の結合が原因で特定タンパク質が溶解しにくい場合、その物質を除去すれば可溶化の問題も改善されると考えられています。2-D Clean-Up Kitを用いて調製したサンプル群では、アセトン沈殿サンプルと比較して標識効率の向上し、多くのタンパク質スポットがクリアに検出されました。検出されたタンパク質のうち2種類についてアミノ酸配列を解析した結果、通常の二次元電気泳動法では分離が難しいとされる膜タンパク質のイノ型であることがわかりました(2)。

サンプルの調製

大腸菌 1,647 株をLB培地でOD₄₂₀値が0.5に達するまで培養し、細胞溶解バッファー(7 M urea, 2 M thiourea, 30 mM Tris HCl, 4 % CHAPS, pH8.5)に溶解しました。このライセートを三等分して、そのうち1つを未処理サンプルとし、残りをそれぞれ2-D Clean-Up Kitあるいはアセトン沈殿法で処理しました。タンパク質量は、色素結合法にて定量しました。

1D解析 シグナル強度の比較

未処理(コントロール)アセトン処理および2-D Clean-Up Kit処理した3種類のライセートを等量ずつCy5で標識後、それぞれを12.5 %ゲルに添加してSDS-PAGEを行いました。Typhoonを用いて泳動パターンを確認してから、SYPRO Rubyで染色し再度スキャンしてゲル上のタンパク質の総量を定量しました。定量結果を標準化して、シグナル強度の相対値を計算しました。

2-D Clean-Up Kit処理ライセートのシグナル強度は422 %で、コントロールの約4.2倍、アセトン処理サンプルの約1.5倍でした(図1)。また、操作前後のサンプルロス、アセトン処理では30 %に達したのに対し、2-D Clean-Up Kit使用時は5 %程度でした(データ未掲載)。

Ettan DIGE 解析

内部標準としてコントロールおよび2-D Clean-Up Kit処理ライセートを等量ずつ混和した溶液を用意し、Cy2で標識しました。内部標準とは、各サンプルに含まれる全てのタンパク質を等量ずつ含むもので、ゲル間の泳動パターンをマッチングする際に非常に有用です。コントロールと2-D Clean-Up Kit処理ライセートはそれぞれCy3またはCy5で標識しました(表1)。

標識したサンプルを混合し、Immobiline DryStrip pH3-7 NL, 24 cmに添加し等電点電気泳動を行いました。二次元目のSDS-PAGEでは10 %のSDS-ポリアクリルアミドゲルを用いました。

泳動後、Typhoonを用いてCy2、Cy3およびCy5についてそれぞれスキャンしました。3種類の標識サンプルを同一ゲル上に泳動しているため、1回のスキャンで3枚のゲルイメージを得ることができます。DeCyder

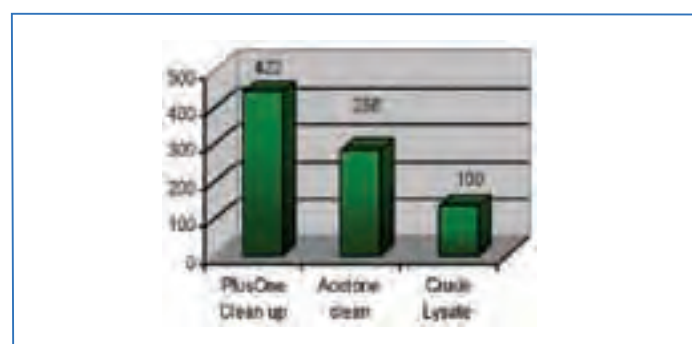


図1. 標識効率の違い

タンパク質サンプルを、2-D Clean-Up Kitまたはアセトン沈殿法により処理を行い、コントロール(未処理サンプル)と比較しました。サンプルをCy5で標識して泳動後染色したゲルを解析した結果、2-D Clean-Up Kit処理サンプルが非常に高い効率で標識されたことがわかりました。

表 1. 二次元目ゲルごとの標識サンプルの組合せ

ゲル番号	Cy2 標識サンプル	Cy3 標識サンプル	Cy5 標識サンプル
1,2,3	内部標準	コントロール	2D Clean-Up Kit 処理ライゼート
4,5,6	内部標準	2D Clean-Up Kit 処理ライゼート	コントロール

2D Softwareを用いて、同一ゲルに由来するCy2/Cy3およびCy2/Cy5 ゲルイメージペアについてスポットを検出・比較したうえで、異なるゲル間でスポットをマッチングしスポットボリュームの定量・標準化を行いました。DeCyder 2D Softwareの解析アルゴリズムにより、サンプルの調製方法の違いに起因する統計学的に有意なタンパク質存在量の差異が計算されます。

Robin Wait博士(Kennedy Institute of Rheumatology, Imperial College of Medicine, London)のご協力により、2つのタンパク質(図2 スポット1のa, b)を切り出し、Q-ToF™ mass spectrometryで質量データを測定しました。

DeCyder 2D Software内蔵のANOVA(分散分析 ; P 値を0.01に設定)で統計処理を行った結果、103のタンパク質で精製処理による影響がみられました(60のタンパク質で増加、43のタンパク質で減少)。最も増加したもので、未処理タンパク質の8.19倍、最も減少したもので1.76倍の差が検出されました。2-D Clean-Up Kit 処理ライゼートの(Cy3) シグナル強度が明らかに向上していた(3倍以上)スポットは5つあり(図2)、いずれもt 検定で 1.5×10^{-5} 以上の信頼性を示しました。2-D Clean-Up Kitを使用してサンプルを調製しEttan DIGE 解析を行ったタンパク質のうち2つを抽出して質量分析を行ったところ、通常の二次元電気泳動の分離能(100 μgのサンプルを添加した場合)では検出されない外膜タンパク質Fの前駆体を同定できました(表2)。

おわりに

本報では、SDS-PAGEおよびEttan DIGEシステムによる解析を行い、タンパク質サンプルの調製法の違いがその後の解析に与える影響についてご紹介しました。2-D Clean-Up Kitを使用することで、未処理のライゼートと比較した場合はもちろんのこと、従来法(アセトン沈殿法)で調製したサンプルと比べた場合も標識効率が約30%改善されました。Ettan DIGE 解析でコントロールに対して有意な差異を示した2-D Clean-Up Kit 処理サンプル中のタンパク質について質量分析を行ったところ、通常の二次元電気泳動では差異を検出できないとされていた外膜タンパク質Fの前駆体(2種の構造異性体)が同定されました。このように、操作が簡便で有用なタンパク質サンプル調製キット2-D Clean-Up Kitとの組み合わせることで、創薬への幅広い応用が期待されるEttan DIGEシステムの利点を最大限に生かすことができます。

参考文献

- Görg A, et al., *Electrophoresis* 21, 1037-1053 (2000).
- Yan J, et al., *Proteomics*, 12, 1682-98(2002).

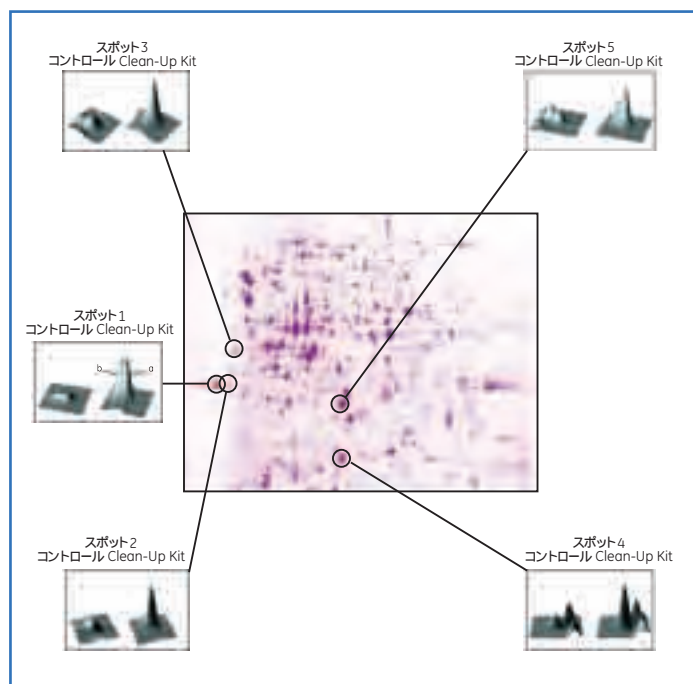


図 2. 重ね合わせたゲルイメージ(Cy3 およびCy5 ゲルイメージペア)
DeCyder 2D Softwareを用いて、同一ゲルに由来するイメージペアを重ね、各スポットの色を比較しました。図中Cy3は赤、Cy5は青で示しています。例えば、あるスポットが青味がかって見える場合には、そのスポットはCy5(コントロール)イメージ上でより多く発現していると言えます。逆にスポットの色が赤味がかっていれば、Cy3(2-D Clean-Up Kit 処理サンプル)イメージ上での発現が多いことがわかります。

表 2. Ettan DIGEによる解析と質量分析の結果

タンパク質	スポット1のa	スポット1のb
増加率	8.18 倍の増加	8.19 倍の増加
t 検定	95%の信頼性、 p 値 1.6×10^{-10} の設定	95%の信頼性、 p 値 8.0×10^{-7} の設定
質量分析の結果	外膜タンパク質Fの前駆物質 (MW 39.3 kDa; pI 4.8)	1α-タンパク質のイソ型
アミノ酸配列の一致率	45.58 %	25.9 %