

## 電気泳動で分離されたタンパク質をプロテインチップ用基板に 転写・同定する技術の開発

横浜市立大学大学院 国際総合科学研究科 平野 久・岩船裕子  
東洋鋼鉄株式会社 技術研究所 丹花通文・大場光芳・亀井修一 SUS  
株式会社 NB 開発室 岡田 毅

### 【はじめに】

横浜市地域結集型共同研究事業において、横浜市立大学、東洋鋼鉄(株)技術研究所、SUS(株)が共同でステンレス上にダイヤモンド様炭素被膜処理を行った基板を使って、高密度集積型プロテインチップを作製する技術の開発研究を行った。従来のプロテインチップ用基板にはゲル電気泳動で分離されたタンパク質を転写することはできなかったが、電気泳動ゲルの厚さ、電気泳動後のゲル洗滌液の種類・濃度・洗滌の時間、基板の材質、ブロッキング溶液の種類、ブロッキング時間・電圧などの分析条件の改良を進めた結果、電気泳動で分離された多数のタンパク質を新規な基板（ダイヤモンド様炭素被膜処理基板）に効率的に転写（転写効率 30-70%）してプロテインチップを作製できるようになった。さらに、タンパク質をダイヤモンド様炭素被膜処理基板へ転写後、ペプチドを作用させ、相互作用したペプチドをマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置によって直接検出・同定できることが明らかになった。この研究の過程で、ゲル電気泳動で分離されたタンパク質をダイヤモンド様炭素被膜処理基板に転写した後、基板上でプロテアーゼ分解を行えば、基板上のタンパク質、すなわち、電気泳動で分離されたタンパク質を質量分析によって簡単に同定できる可能性が生まれた。

プロテオーム解析では、二次元電気泳動、液体クロマトグラフィーなどによって多種類のタンパク質を分離精製し、分離精製されたタンパク質を質量分析装置などによって同定してタンパク質の発現プロファイルを明らかにする必要がある。二次元電気泳動の場合、従来は、分離されたタンパク質のスポットを切り取り、ゲル内でプロテアーゼによって消化し、生じたペプチドの質量スペクトルやアミノ酸配列分析結果からタンパク質を同定していた。しかし、ゲル内消化は煩雑で時間もかかる。ゲル内消化を行う装置も開発されているが、価格の割には分析の効率がよくない。電気泳動で分離されたタンパク質をダイヤモンド様炭素被膜処理基板上に電気泳動的に転写し、質量分析装置で同定できれば、簡便迅速なタンパク質同定技術として利用できると考えられた。そこで、電気泳動で分離されたタンパク質を基板に電気泳動的に転写し、質量分析装置で同定する技術の確立を目指して研究を行った。

### 【方 法】

ステンレス基板の表面にイオン化蒸着法によってダイヤモンド様炭素を被膜処理した（図1）。ダイヤモンド様炭素膜の水素を塩素に置換した後、これをアミノ基、カルボキシ基、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルで化学修飾した（図2）。タンパク質を蛍光試薬 Cy3 で標識した後、二次元電気泳動または SDS-ゲル電気泳動で分離し、エレクトロブロッキングによって化学修飾したダイヤモ

ンド様炭素被膜処理基板に転写・固定化した。そして、ダイヤモンド様炭素被膜処理基板上のタンパク質にリシルエンドペプチダーゼまたはトリプシン溶液を添加し、タンパク質を消化した。ダイヤモンド様炭素被膜処理基板をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置に設置し、ペプチドマスフィンガープリンティングによってタンパク質の同定を試みた。

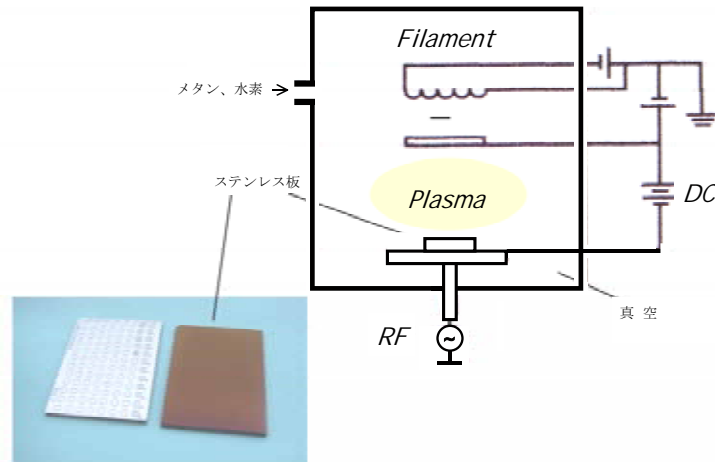


図1 イオン蒸着法によるステンレス板表面へのダイヤモンド様炭素の成膜

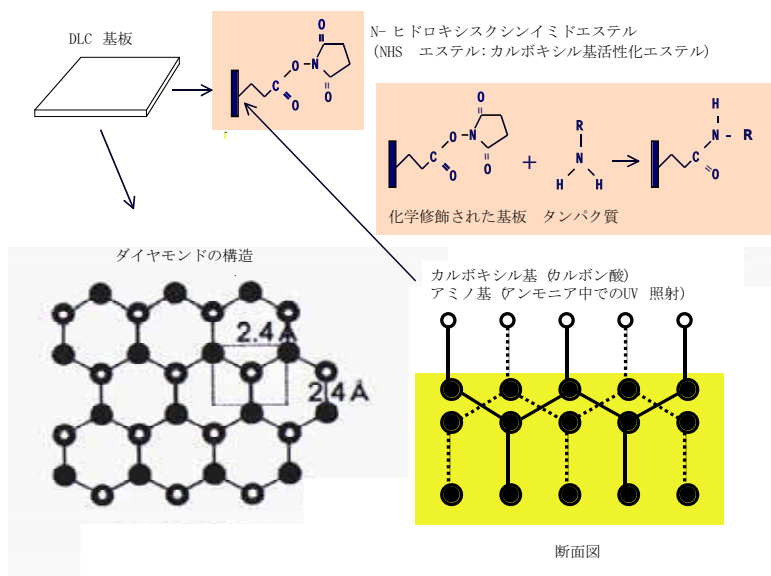


図2 ダイヤモンド様炭素被膜処理基板の化学修飾

ダイヤモンド様炭素被膜処理基板は、ダイヤモンドとは異なり、かなりアモルファスな構造を有する。表面に露出する水素を塩素で置換した後、アミノ基、カルボキシル基を付加し、これにN-ヒドロキシスクシンイミドエステル（カルボキシル基の活性化エステル）で修飾した。N-ヒドロキシスクシンイミドで修飾された基板にはタンパク質が共有結合によって固定化される。

## 【結果】

### 1) ダイヤモンド様炭素被膜処理基板上に固定化されたタンパク質の同定

6種類のタンパク質を含む LMW マーカー (GE Healthcare Amersham Bioscience 社) (10~100 pmol)を SDS-ゲル電気泳動で分離した後、ダイヤモンド様炭素被膜処理基板に転写した。ついで、リシルエンドペプチダーゼで消化し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置により検出を試みた。得られた質量スペクトル (ペプチドマスフィンガープリント) からアルブミンやカーボニックアンヒドラーゼなどのタンパク質を同定することができた。

次に、酵母の粗抽出液を二次元電気泳動により分離し、ダイヤモンド様炭素被膜処理基板に転写した。上記実験と同様に、ダイヤモンド様炭素被膜処理基板上に固定化したタンパク質をリシルエンドペプチダーゼにより消化した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置を用いて解析を行ったところ、ペプチドマスフィンガープリンティングにより 2-グリセロリン酸脱水素酵素やフルクトース-2 リン酸アルドラーゼなどのタンパク質を同定することができた (図3)。以上の結果から、ゲル内消化のような煩雑な操作を行わずに、新規のプロテインチップを用いて簡便にタンパク質を同定できることが明らかになった。

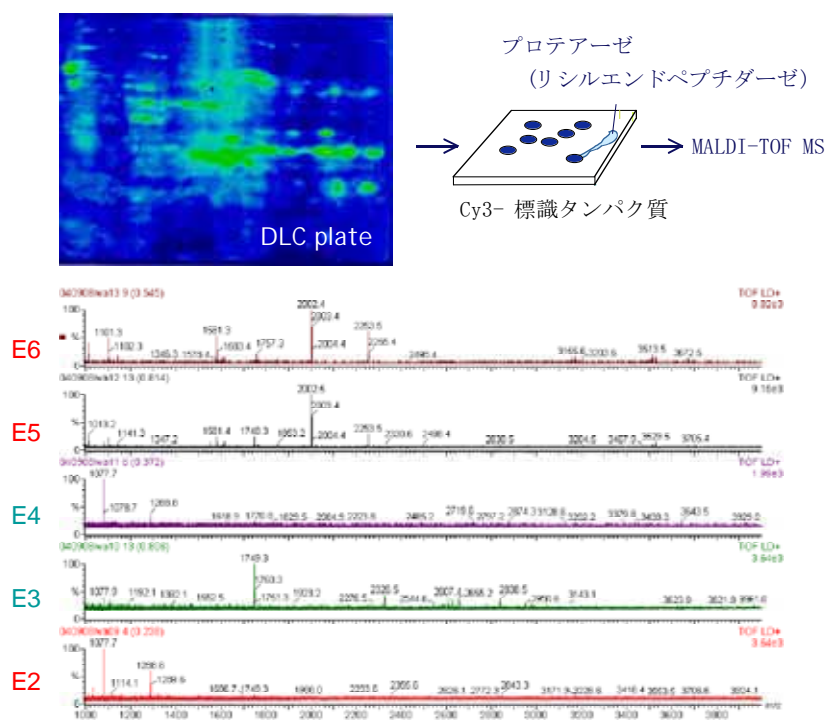


図3 ダイヤモンド様炭素被膜処理基板上に転写されたタンパク質の同定

ダイヤモンド様炭素被膜処理基板に転写されたタンパク質にリシルエンドペプチダーゼを作用させた後、マトリックスを添加してマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置で分析すると E2~E6 のようなペプチドの質量スペクトル (ペプチドマスフィンガープリント) を得ることができる。このスペクトルから E2~E6 のペプチドマスフィンガープリントをもつタンパク質が何かをデータベースを使って同定することができる (未発表データ)。

DLC 基板: ダイヤモンド様炭素被膜処理基板、MALDI-TOF MS: マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析装置

## 2) ダイヤモンド様炭素被膜処理基板上で相互作用したタンパク質の同定

ダイヤモンド様炭素被膜処理基板にプロテイン A (〜100 pmol) を固定化し、これに IgG を相互作用させた。リシルエンドペプチダーゼにより相互作用したタンパク質を消化し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析装置を用いて解析を行った (図 4)。図 4c は、得られた質量スペクトルを示してある。図 4a および b にそれぞれプロテイン A と IgG の質量スペクトルを示してある。図 4c のスペクトルには、プロテイン A と IgG のペプチドシグナルが含まれていることがわかる。実際に、ペプチドマスフィンガープリントから MASCOT ソフトウェアを用いてプロテイン A と IgG を同定することができた。この実験は、ダイヤモンド様炭素被膜処理基板上で相互作用したタンパク質の同定も可能であることを示している。

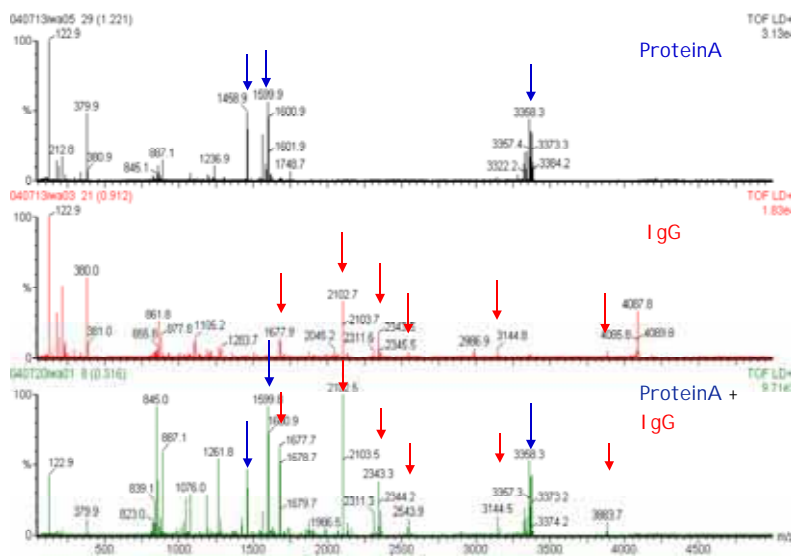


図 4 ダイヤモンド様炭素被膜処理基板上でプロテイン A と相互作用した IgG の同定

ダイヤモンド様炭素被膜処理基板上で相互作用したプロテイン A と IgG をリシルエンドペプチダーゼで消化し、消化物をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置で分析し、質量スペクトル (下段) からタンパク質を同定することができた。下段のスペクトルには、プロテイン A (上段) と IgG (中段) 両方のスペクトルを含んでいることがわかる (未発表データ)。

## 3) ダイヤモンド様炭素被膜処理基板上でのタンパク質同定の自動化

ゲル電気泳動で分離されたタンパク質をダイヤモンド様炭素被膜処理基板上に転写する装置の開発を行い、同装置を試作した。試作機は、電気泳動用ガラス板上のゲルを質量分析の試料固定板であるダイヤモンド様炭素被膜処理基板の寸法にカットした後、ガラス板から剥離して保持する。剥離されたゲル膜の表面を洗浄し、ダイヤモンド様炭素被膜処理基板上への搭載を自動的に行う。分析の自動化によって実験が省力化されると共に、再現性の高い結果が得られるようになると期待される。固定化されたタンパク質に溶液中のタンパク質を相互作用させる操作を自動的に行うことができる。なお、試作機は、タンパク質を電気泳動したゲルを他の室内空気中の浮遊タンパク質や他の物質の汚染を防ぐ仕様になっている。

一方、ゲル電気泳動で分離された LMW マーカータンパク質(10~100 pmol)をダイヤモンド様炭素被膜処理基板に転写し、ケミカルプリンター（島津製作所、CHIP-1000）を用いてトリプシンによる断片化とマトリックスの添加を行った。そして、基板をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置に設置して分析した。その結果、基板上的タンパク質を効果的に同定することができた。上記、転写装置とケミカルプリンター、ならびにマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置を組み合わせることで電気泳動でタンパク質を分離しさえすれば、あとはすべて自動で基板上的タンパク質を同定できるようになると考えられる。

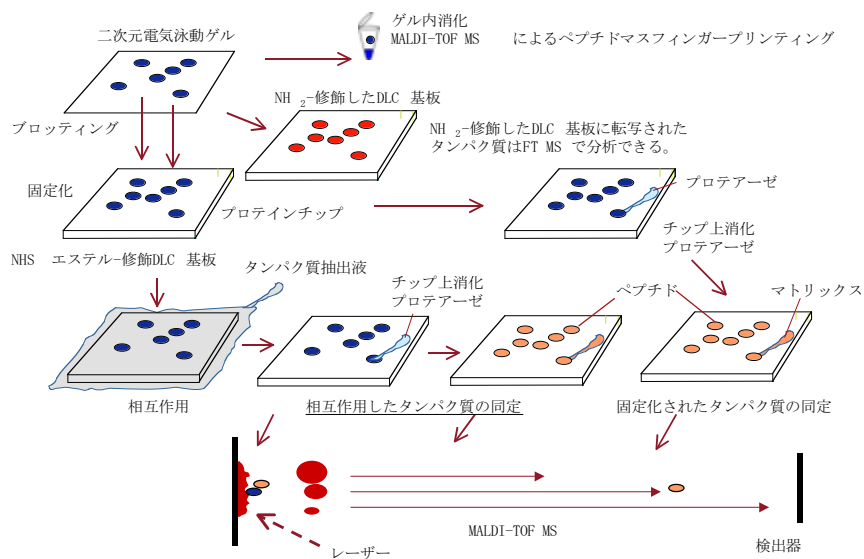


図5 二次元電気泳動で分離されたタンパク質、ならびに相互作用したタンパク質の同定の方法

DLC 基板：ダイヤモンド様炭素被膜処理基板、MALDI-TOF MS：マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析装置、FT MS：フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計

本研究によって、ダイヤモンド様炭素被膜処理基板上に転写されたタンパク質あるいは基板上で相互作用した複数のタンパク質をダイヤモンド様炭素被膜処理基板上でプロテアーゼ消化した後、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置で得られるペプチドマスフィンガープリントから基板上的タンパク質を同定できるようになった（図5）。二次元電気泳動で分離されたタンパク質をゲル内消化と質量分析装置を用いたペプチドマスフィンガープリンティングによって同定していた従来の方法に比べると、遙かに効率的にタンパク質が同定できるようになった。

基板上的タンパク質の分子量が大きい場合には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置では直接質量を測定できないので、これまでは、大きな分子量のタンパク質の質量を直接測定できるフーリエ変換型イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置などの利用を考えていた。しかし、上記の方法の開発によってマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置のような汎用機で、相互作用した高分子量タンパク質を同定できるようになった。