

特集：プロテオミクス

## プロテオミクスの試料調製

許 波

### はじめに

近年、質量分析計の技術やタンパク質解析をサポートするさまざまなソフトの進歩により、プロテオミクス研究は広く普及してきている。プロテオミクスの研究対象は臨床試料から動植物試料まで幅広い。プロテオミクスは単なるタンパク質の同定だけではなく、安定同位体で標識した合成ペプチドを内部標準として用いて、きわめて高感度の相対・絶対定量も可能になっている。

現在、プロテオミクスを用いてバイオマーカー探索や疾患関連タンパク質の発見を目的とした研究が精力的に行われており、正常組織と病変部組織のプロテオミクス解析により、質・量的に差異のあるタンパク質が見出され、多くのバイオマーカー候補が見出されている。しかし、質量分析計の検出感度が高くなるにつれ、プロテオミクス研究で取り扱うことのできるサンプル量が微量になり、試料の汚染の除去や、サンプルの安定性を保つことなどが正確な解析結果を得るためにきわめて重要になっている。したがって、サンプル調製はプロテオミクス研究では非常に重要なステップである。本稿では、われわれの経験を基にした、基本的なプロテオミクスの試料調製方法について述べる。

### 生体試料の準備について

プロテオミクスの試料調製は、基本的には従来のタンパク質のハンドリング法に準じ、通常の生化学的な方法でタンパク質の抽出、可溶化、分画を行う。研究対象に応じて、異なる処理方法を選択することは当然であるが、網羅的解析のためには、試料からすべてのタンパク質を抽出するために、界面活性剤、尿素や SDS を含む溶液を利用すること

が一般的である(表 1)。ホモジナイズは効率良く、短い時間で行ったほうがよく、事前に試料や組織を可能な限り細かくしたうえで、可溶化処理するほうがよい。よく使われる方法の一つに、液体窒素温度下で凍結試料を粉末状にすることがある。酸化の影響を避けるため、窒素をフラッシュすることも効果的である。タンパク質を抽出した後、組織によっては、脂質を除去するため、アセトン沈殿やメタノール・クロロホルム沈殿法を用いて前処理する必要が生じることもある。

また、組成が異なるバッファーで可溶化した試料のタンパク定量を行う際には注意が必要になる。一般的に、紫外吸収を用いた定量法はペプチド結合に由来する紫外吸収(215 nm 付近)と芳香族アミノ酸(チロシン, トリプトファン)の側鎖に由来する吸収(280 nm)が用いられるが、215 nm 付近はノイズが多く、主に 280 nm における吸光度を用いてタンパク質の濃度測定をしたほうが正確になる。しかし、プロテオミクス試料調製によく使う還元剤の DTT や界面活性剤の Triton X-100 は 280 nm の吸収が高く、この方法に干渉する。現在、さまざまなタンパク質濃度定量キットが発売されているが、これらの特徴と限界については注意すべきである。

実験中使われているバッファーの組成とキットの相性などについて表 2 に整理した。場合によっては、影響が出る物質濃度を下げるため、サンプルを希釈して測定することもある。われわれは腎組織を 2D-PAGE で解析する場合には、2D-PAGE 可溶化液中のタンパク質の定量に Ramagli 法をよく用いている。この方法、基本原理は Bradford 法と同じであるが、反応時間が短く、尿素やチオ尿素を高濃度を含む可溶化液中のタンパク質の定量に最適である。

近年、対応性をさらに高めたタンパク質定量キットも続々開発されている。実験の状況に応じて、その他の定量法も選択肢になる。

表 1 タンパク質抽出法の適応性

処理法	抽出液		
	SDS を含む緩衝液	尿素を含む緩衝液	Tris-HCl 緩衝液
SDS-PAGE	◎	○	◎
2-DE	×	◎	○0.01 M 以下
In-solution digestion	○ (0.1 % 以下)	○ (1 M 以下)	◎

◎：適切，○：条件付き，×：非対応

表 2 バッファーの組成とキットの相性

基本原理名	反応詳細	注意点	排除すべき物質
Bradford 法	CBB G-250 とタンパク質の反応	還元剤に耐性 界面活性剤によって干渉を受ける。 BSA の吸光度が高くなる。	SDS
BCA 法	BCA 存在下で銅イオンと着色錯体とタンパク質の反応	界面活性剤には比較的耐性がある。	
Lowry 法	酒石酸銅と Folin 試薬とタンパク質の反応	還元剤により干渉が発生、 界面活性剤に比較的耐性、 アミノ基を有する化合物に影響される。	DTT や尿素、チオ尿素
Ramagli 法	Bradford 法と同様	還元剤に耐性	SDS

### プロテオミクス試薬の準備について

実験結果を安定させるために、タンパク質の可溶化バッファーは、基本的には多量に用意したうえで、小分けした後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し、使うときに少量ずつ使用するようにしたほうが再現性の良い結果が得られる。特に 2D-PAGE によく使われている尿素、チオ尿素を含むタンパク質可溶化液には、試薬のロットや作るときの温度などによって多少性質が異なってくることがあるため、1つのプロジェクトで多くの試料を長期間にわたって解析する際には、ときにタンパク質の定量に支障が生じることがある。自家製ゲルを使う場合はゲル液の安定性に留意すべきである。長期間保存して溶液の pH などが変化した場合は 2D-PAGE 泳動結果の再現性に大きく影響する。特に分離ゲル緩衝液の pH は室温  $20^{\circ}\text{C}$  で pH 8.8 に調製し、低温でしばらく保管した後、実験前に pH を再確認することをお勧めする。pH が変わったまま使用すると、タンパク質スポットの泳動距離が異なる結果になる。

それ以外の試薬は、基本的には用時調製することを推奨する。銀染色を用いる場合は、染色液や増感剤の保存時間

が長いと染色性が大きく変わるので、必ず用時調製を守らなければならない。

### 試料調製中における注意点

生体試料を取り扱う際には、最初から最後まで、さまざまなコンタミネーションに細心の注意が必要である。操作は基本的に氷上で行うべきであり、溶媒は氷上で冷却したものを使用する。血液の付着はできるだけ除くべきであり、冷却した PBS などで洗浄除去する。血漿タンパク質の混入を防ぐことによって解析対象の組織試料に存在するタンパク質の解析をより正確に行うことができる。また、外部のタンパク質(実験者や実験環境から混入するケラチンが特に問題になる)の混入は、標本の可溶化過程において特に重要な注意が必要となる。

タンパク質の酵素消化の方法は大きく 2 つに分かれる。電気泳動でタンパク質を分離した場合には、ゲル内で酵素消化する方法(In-gel digestion)が一般的である。また、可溶化されているタンパク質を溶液中で消化することもよく行われる(In-solution digestion)。そのうち In-solution digestion

は事前にタンパク質の変性や還元・アルキル化が必要であるが、その後の操作や反応はチューブ内で行うため、操作しやすく、比較的簡単にでき、ペプチドの回収率も高い。しかし、消化産物は複雑で、塩類も含まれるため、脱塩処理しないと質量分析計による解析に干渉する場合がある。また、複雑なペプチド混合物となるため、質量分析の前に分画する必要が生じることがある。

In-gel digestion は多くの試料に適用可能で、プロテオミクス研究において最も一般的に利用されている、しかしゲル内消化操作が煩雑で、外部からのタンパク質の混入が起りやすいので、特に初心者場合は安定した実験結果を出すことが大変難しい場合がある。

われわれは、ケラチン混入の問題を解決するために詳細な検討を行った。その結果、2D-PAGE や SDS-PAGE からタンパク質スポットやゲルスライスの酵素消化、消化したペプチドの回収、MS 解析における一連の操作過程中、最も混入が起りやすい過程はゲル内消化のステップであることがわかった。ヒトの組織を対象とした実験や微量タンパク質を解析する目的とした実験に、実験者や実験環境由来のケラチンの混入は致命的になることが考えられる。質量分析計による同定結果の信頼性は著しく損なわれる。微量ペプチドは強いケラチンのペプチドシグナルにより排除されやすく、同定率はかなり低下することが確認された。ここでは、われわれの教室で検証した、ケラチンをはじめ、さまざまな汚染物質の混入を効率良く防ぐゲル内消化操作法の注意点を述べる。

まず、操作環境や実験器具を清潔にすること。通常 80% エタノール溶液を用いて実験器具を拭き取る。実験台、クリーンベンチを利用する際には表面と周りをよく拭き取り、ほこりやエアダストをなくし、特にクリーンベンチの空気を循環するために設けた下部のスリット吸込口などに注意する。クリーンベンチのエアカーテンの風でコンタミネーションを引き起こす場合がある。使用器具はプラスチック製品を避け、チューブラックなどは紙製かステンレス製のものを選び、マイクロチューブは有機溶媒に強いもの、蓋は多くの開閉回数に耐えるものを推奨する。

次は、実験者の着衣、帽子、手袋などについての注意点である。ゲル内消化操作する際に、毛 100% のセーターや衣服類を避け、綿製のものを利用したほうがケラチンの混入は少なくなる。実験を始める前に粘着性のロールテープを用いて、着衣に付着したダストを除去することは効果的である。帽子はしっかり髪の毛を納めるようにかぶる。メガネを着用しているときにはメガネの洗浄も必要である。

手袋はダスト混入を減らすためには最も重要な部分と考えられる。手袋はニトリル製のものが多い。その他の素材は薬品に耐性が悪いか、もしくは汚れが付きやすく、それによって調製中のサンプルヘダストが混入しやすくなる。ゲル内酵素消化操作する際、手袋の手先の部分をこまめに清潔な蒸留水で洗いダストを除去するのが望ましい。

われわれの研究室では大量サンプルを処理する場合には、溶液のハンドリングを迅速にするため分液器 (Eppendorf Multipipette 4780 など) と廃液を除去するために使う真空ポンプに接続された吸引装置を用いている。分液器 (dispenser) と真空キットを利用することは、操作時間が短縮されると同時に消耗品の節約にもなる。通常操作で毎回チップを交換するたびに起こすコンタミ率もかなり低下する。また、静電気除去装置を用いる場合もある。ゲル内消化操作中、有機溶媒の使用、循環空気の摩擦、人体の動きによる静電気の発生は避けられない。特にゲル内消化操作によく使われるマイクロチューブに静電気が発生しやすく、その結果、空中ダストや実験者の手先や衣服類に付着したダストがチューブに移りやすくなる。プロテオミクス実験には低吸着性チューブの使用が望ましいが、われわれの実験結果では、低吸着性チューブに静電気が発生しやすく、除去しにくいことがあり、ケラチンの混入がひどくなることもしばしば経験した。静電気除去装置を使用することで上記の問題が改善される。これまでわれわれは、いくつかのメーカーが発売した異なるタイプの除電装置の効果を検討した。そのなかで KEYENCE 社 SJ-F030 シリーズの除電装置が効果的だった。設置が容易で、除電範囲が広く、操作しやすいことが特徴である。

実験中使われるマイクロチューブは最も重要なポイントでもある。ケラチン混入以外に、もうひとつ指摘しておきたいことは、低吸着性チューブを用いてゲル内消化したペプチドを MS で測定すると、同じプロトコルで通常のチューブを使った場合に比べて、バックグラウンドがむしろ高くなっていた点である。数十のメーカーから提供を受けたマイクロチューブを比較検討し、最も適応性の良かったものを選び、実験に使っている。

上記の注意点をしっかり守って実験すれば、初心者であっても、ゲル内消化操作はうまくいくと考えられる。

### 質量分析計を用いた解析中の注意点

タンパク質が酵素消化された後、最終的に質量分析計によりペプチドの質量数を測定し、断片化したペプチドの

MS/MS スペクトルを取得してアミノ酸配列情報を得ることがプロテオミクスの重要な手段である。ペプチドサンプルの調製を適切な方法で行わないと検出不能になることもある。特に微量タンパク質を扱う場合、ゲル内消化した後、通常アセトニトリルを含む溶媒を用いて、ペプチドを抽出し、その後、アセトニトリルを除くためペプチド抽出液を乾燥する。その際に、溶媒を少し残したほう(10 $\mu$ L 以下)がペプチドのチューブ壁への吸着が少なく、溶出しやすく、質量分析計測定結果が良くなる。乾燥後すぐに測定しない場合は、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保管する。

今回紹介した試料調製の注意点はプロテオミクス実験の一部分にすぎないが、より多くの研究者に役立つことを期待する。

#### 文 献

1. Xu Bo, Yoshida Y, Zhang Y, et al. Two-dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney : differential protein expression in glomerulus, cortex, and medulla. *Journal of Electrophoresis* 49 ; : 5-13, 2005.
2. 平野 久. プロテオーム解析—理論と方法. 東京 : 東京化学同人, 2001.
3. 森山達哉. 検出と定量のコツ. 東京 : 羊土社, 2006.
4. 磯辺俊明, 高橋信弘(編). プロテオーム解析法. 東京 : 羊土社, 2000.