

Separation of proteins from human embryonic kidney cells on narrow-range IPG strips

narrow レンジ固定化pH勾配IPGストリップを用いたヒト胎児腎臓タンパク質の解析

H. Langen and D. Roder

Roche Genetics, F. Hoffmann-La Roche, 4070 Basel, Switzerland

分離能とサンプル添加許容量は、二次元電気泳動によるプロテオーム解析の結果を大きく左右する要素です。18 cmのnarrowレンジ固定化pH勾配 (IPG) ストリップを使用すると、分離能・サンプル添加量の限界を克服できます。pH 5.5-6.7のnarrowレンジIPGストリップを使用した場合、pH 3-10のIPGストリップに比べて約4倍の数のスポットが検出可能です。また、0.025 pIユニット以下の等電点差も分離可能です。narrowレンジIPGストリップにより、これまでは解析不可能であったプロテオームの解析が可能になります。

はじめに

「プロテオーム」とは元来、ゲノムにコードされたタンパク質の総称を表す言葉です。今日「プロテオーム」は、1つの組織において、時間的および空間的なタンパク質発現パターンの差異を示す言葉としても用いられます。

二次元電気泳動とそれに続く分析法との組み合わせは、全てのプロテオームを解析可能な唯一の手法です。しかしながら、分解能・サンプル添加許容量に技術的な限界があるために、これまでは一部のタンパク質の解析にしか対応できませんでした。

これらの限界は、narrowレンジIPGストリップの導入により克服することができます。従来のwide ~ mediumレンジIPGストリップに比べると、より多くのサンプルを添加でき、高い分解能を得ることが可能です。このため、タンパク質の複雑な発現パターンの比較を効果的に行うことができます。今回、このnarrowレンジIPGストリップを用いてヒト胎児腎臓の細胞 (Human Embryonic Kidney cell, HEK cell) 細胞質画分中のタンパク質の解析を行いました。

HEK細胞の細胞質画分の調製

HEK293細胞 (ATCC CRL-1573) を無血清培地で培養した後、Ca²⁺-フリーのヘパリンを含む培地に移して培養しました (1)。細胞を遠心回収し、1 mM NaHCO₃ でけん濁後、遠心しました。上清を捨て、ペレットを10 mM Tris, pH 7.5 にけん濁しました。この細胞けん濁液をホモジナイズし、遠心した上清を、遠心型膜濃縮器によりタンパク質濃度が38 mg/mlとなるまで濃縮しました。これを泳動サンプルとしました。

一次元目の電気泳動：等電点電気泳動

一次元目の等電点電気泳動は、恒温循環装置MultiTemp® IIIに接続したMultiphor® IIで行いました。Immobiline® DryStripは8 M ウレア、2 % CHAPS、0.4 % DTE (dithioerythritol) 2 % Ampholine®を含む膨潤バッファーで一昼夜膨潤しました。IPGストリップの両端からサンプルカップを用いてそれぞれ500 µg (1 mg/strip) のタンパク質

を添加しました (2)。150 Vで1時間泳動した後、電圧を150 Vから5,000 Vまで3 V/minずつ上昇させ、5,000 Vで48時間泳動しました。

二次元目の電気泳動：SDS-PAGE

二次元目の泳動前に、IPGストリップをSDS平衡化バッファーで処理しました (3)。二次元目の泳動には1.5 mm厚の9 ~ 16 % グラジエントのアクリルアミドゲルを使用し、CBB染色により検出しました。

質量分析

Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectroscopy (MALDI-MS) を用いて質量分析を行いました (4)。スポットを切り出し、0.1 M炭酸水素アンモニウムを含む30 % アセトニトリルで脱色後、ゲルを超純水で洗浄しました。この切り出したスポットを酵素消化の後、超音波破砕によりタンパク質を溶出させました。この抽出液を、質量分析計により解析しました。分析にはreflectorとdelayed extractionを採用した飛行時間型 (time-of-flight Bruker) 質量分析計 (Reflex 3) を用いました。加速電圧は20 kVに設定してモノアイソトピック分子量を算出し、SWISS-PROT による検索を行いました。

結果および考察

narrowレンジIPGストリップでHEK293細胞由来のタンパク質を分離した場合、wideレンジIPGストリップと比較して、より高い分解能が得られました。ストリーキングなどの

過剰負荷による影響を受けることなく、より多種のタンパク質を分離することができました。従来のpH 3-10のIPGストリップを使用した二次元電気泳動の結果をImageMaster®により解析したところ、pI 5.5 ~ 6.5の範囲に約200のスポットが検出され

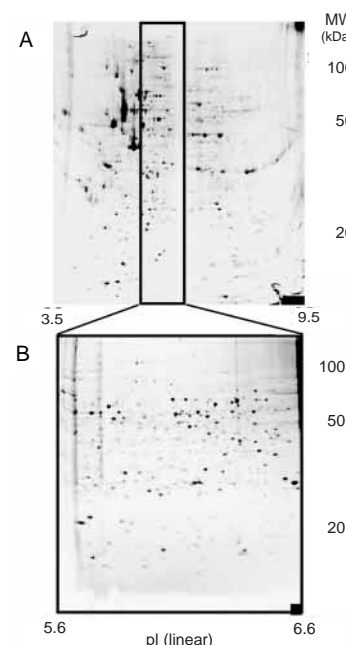


図1. HEK細胞の二次元電気泳動。Immobiline DryStrip pH3-10 (A) とImmobiline DryStrip pH 5.5-6.7 (B) にそれぞれ1 mgの細胞質画分由来のタンパク質を添加しました。二次元目の泳動には9 ~ 16 % のグラジエントゲルを使用し、CBB染色により検出しました。Aで長方形で示した領域はBの全体像 (pH 5.5-6.7) に対応します。

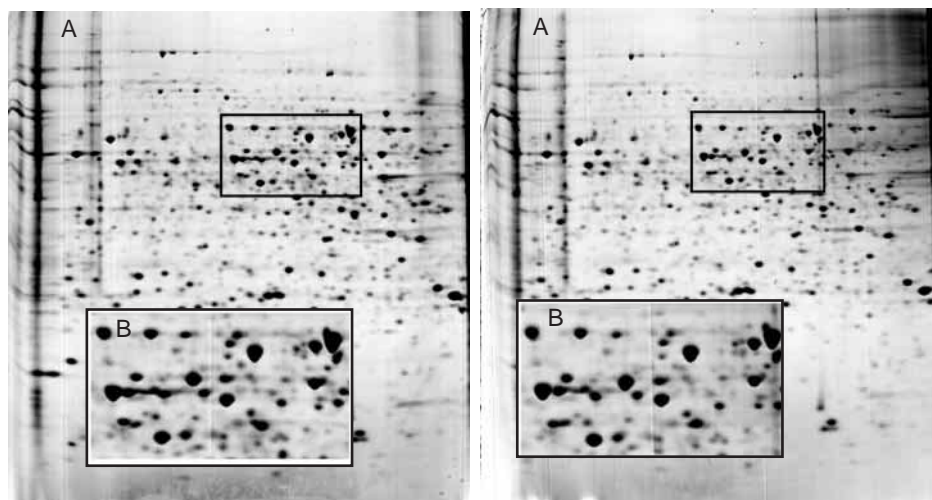


図2. narrowレンジIPGストリップ (pH 5.5-6.7) の再現性を検討しました。2例とも、1 mgのHEK細胞の細胞質画分タンパク質を添加しました。Aの長方形に囲んだ領域の拡大像をBに示しました。

表1: 同定されたHEK細胞のタンパク質

| SWISS-PROT number | protein name | pI | MW | number of peptide matches |
|-------------------|---|------|-------|---------------------------|
| P49368 | T-complex protein 1, gamma subunit | 6.61 | 60862 | 7 |
| P55809 | succinyl CoA:3-oxoacid CoA-transferase | 7.44 | 56578 | 6 |
| P40227 | T-complex protein 1, zeta subunit | 6.66 | 58443 | 8 |
| P31939 | formyltransferase | 6.83 | 64938 | 13 |
| P31948 | transformation-sensitive protein IEF | 6.78 | 63226 | 13 |
| 008651 | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase | 6.68 | 57255 | 7 |
| P49419 | antiquitin | 6.84 | 55844 | 5 |
| P05455 | lupus la protein | 7.13 | 46979 | 6 |
| P06733 | alpha enolase | 7.39 | 47350 | 8 |
| JC5521 | TATA-binding protein-interacting protein 49 | 6.39 | 50524 | 11 |
| P50580 | proliferation-associated protein 1 | 6.85 | 44013 | 5 |
| P80314 | T-complex protein 1, beta subunit | 6.38 | 57753 | 6 |
| P08107 | heat shock 70 kDa protein 1 | 5.41 | 70294 | 9 |

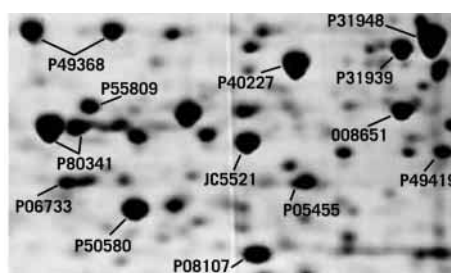


図3. 図2 Bで示した領域のスポットマッチングの結果。各番号はSWISS-PROT上のスポット番号に対応しています。

ました (図1A)。これに対しpH 5.5-6.7のIPGストリップを使用した例では、約700のスポットが検出されました (図1B)。

一次元目の泳動の再現性は非常に高く (図2) わずかな等電点の差異 (0.025 pIユニット) も容易に検出できました。例えば、transformation sensitive protein (P31948) とformyltransferase (P31939) は個々のスポットとして検出され、質量分析を行うことができました (図3)。従来のpH 3-10のIPGストリップでは分離できなかったいくつかのタンパク質が、今回narrowレンジIPGストリップを用いて分離することができました (表1)。

まとめ

narrowレンジIPGストリップを使用することで、より多くのタンパク質スポットの解析が可能になりました。より多くのタンパク質を分離できるため、発現量の少ないタンパク質の解析も可能です。これを用いて二次元電気泳動を行う場合、異なるpH範囲のゲルを複数泳動する必要がありますが、スポットの検出・スポットマッチングは簡便になります。narrowレンジIPGストリップにより、プロテオーム解析の質が劇的に向上することが期待されます。

参考文献

- Schlaeger, J. *et al.*, *Cytotechnol.* 30, 71-83 (1999)
- Langen, H. *et al.*, *Electrophoresis* 18, 2085-2090 (1997)
- Bjellqvist, B. *et al.*, *Electrophoresis* 14, 1357-1365 (1993)
- Fountoulakis, M. and Langen, H., *Anal. Biochem.* 250, 153-156 (1997)

ORDERING INFORMATION

| 製品名 | 包装 | コード番号 | 価格 |
|-------------------------|-----------|------------|---------|
| Immobiline DryStrip | | | |
| pH 3.5-4.5, 18 cm | 12 strips | 17-6001-83 | ¥16,700 |
| pH 4.0-5.0, 18 cm | 12 strips | 17-6001-84 | ¥16,700 |
| pH 4.5-5.5, 18 cm | 12 strips | 17-6001-85 | ¥16,700 |
| pH 5.0-6.0, 18 cm | 12 strips | 17-6001-86 | ¥16,700 |
| pH 5.5-6.7, 18 cm | 12 strips | 17-6001-87 | ¥16,700 |
| pH 6-9, 18 cm | 12 strips | 17-6001-88 | ¥16,700 |
| IPG Buffer pH 3.5-5.0*1 | 1 x 1 ml | 17-6002-02 | ¥4,500 |
| IPG Buffer pH 4.5-5.5 | 1 x 1 ml | 17-6002-04 | ¥4,500 |
| IPG Buffer pH 5.0-6.0 | 1 x 1 ml | 17-6002-05 | ¥4,500 |
| IPG Buffer pH 5.5-6.7 | 1 x 1 ml | 17-6002-06 | ¥4,500 |
| IPG Buffer pH 6-11*2 | 1 x 1 ml | 17-6001-78 | ¥4,500 |

*1 Immobiline DryStrip pH3.5-4.5、4.5-5.0と一緒にご使用ください。

*2 Immobiline DryStrip pH6-9と一緒にご使用ください。