

厚生労働科学研究費補助金（こころの研究事業）  
分担研究報告書

プロテオミクスにおけるたんぱく質解析法の  
高精度・ハイスループット化への挑戦

分担研究者：村山季美枝 順天堂大学 医学部 中央機器分析室助教授

### 研究要旨

プロテオミクスにおいて、HPLC 分画法が利用される現在においても、たんぱく質の分子量分布が明らかな SDS ゲル電気泳動法は、精度の高いたんぱく質分離法として用いられている。タンパク質に含まれるシステイン残基はポリペプチドの分子内あるいは分子間に S-S 架橋をつくり、分子の安定を図っている。したがって、タンパク質同定にあたり、還元・アルキル化（カルボキシアミドメチル化；CAM）後、トリプシン消化し、ペプチド混合物を質量分析計で分離分析する。しかしながら、ゲル担体に使用されるアクリルアミドはシステインのアルキル化剤であり、電気泳動中にたんぱく質のシステイン残基を修飾する副反応が知られている（プロピオンアミド；PAM 化）。最終的なデータベース検索において両アルキル化誘導体の混在は同定の精度を下げる結果となる。

分担者等はアルキル化剤にアクリルアミドを用い、積極的に SDS ゲル電気泳動中でシステイン残基を効率よく PAM 化する方法を開発した(*in situ* alkylation)。その結果、タンパク質同定の精度が上がり、蛋白染色後の還元・アルキル化のステップが省略され、さらに質量分析前の脱塩処理操作を省略するハイスループット化に成功した。本法はインゲル消化の自動化装置に最適であり、ドイツの Intavis 社および日本の MS 機器と共同研究開発によりその成果をあげた。

### A. 研究目的

本研究は筋細胞を取り巻く細胞外マトリクス（基底膜）に相互作用する分子の機能を解明するために、筋疾患で起こるたんぱく質変動をプロテオミクス解析により明らかにすることを目的としている。その前段階として、確度の高いハイスループットな方法を模索している。プロテオミクス解析法は SDS ゲル電気泳動法および HPLC 法が繁用されており、いずれの方法もすでに完成された方法として報告されている。しかしながら、いずれの方法においても問題はある。たんぱく質相互作用を免疫沈降法で検索するために、分担者は分子量の情報が得られる SDS 電気泳動法を選択した。ハイスループットで、たんぱく質同定の精度を向上させるために、たんぱく質に含まれるシステイン残基の一元化を図りゲル電気泳動中 (*in situ*) にアルキル化する方法を確立した。

### B. 研究方法

分子中に 35 個のシステイン（S-S 架橋 17 個、遊離 SH 1 個）を有する牛血清アルブミン（BSA）を試料とした。

一次元 SDS 電気泳動における *in situ* アルキル化法は試料を変性還元後、室温に戻し、アルキル化剤としてアクリルアミドを還元剤の 100 倍量加え、直ちにゲルに添加、電気泳動と同時にアルキル化を開始した。二次元 SDS ゲル電気泳動においては、ストリップ上に存在するたんぱく質を一次元目の等電点電気泳動で分離後、還元し、二次元目ゲルのウェルにアクリルアミドを添加し、ストリップを静置した。たんぱく質がゲルに移行・濃縮される過程においてシステイン残基は PAM 化された。

応用例として Nycodenz 密度勾配液でマウス肝臓ミトコンドリアを分画し、二次元 SDS 電気泳

動法でたんぱく質を分離したスポットに適用した。

### C. 研究結果

一次元および二次元 SDS ゲル電気泳動法においてシステイン残基は PAM 化に一元化された。PAM システインの回収率は一次元で 30 個 (86%)、二次元で 34 個 (97%) であった。遊離のシステインは存在せず、トリプシン消化のミスクリリベッジが減少した。さらに、システインを含むペプチドが高収率で回収された。BSA のアミノ酸検出率 (Coverage) は高く、一次元・二次元 SDS ゲル電気泳動法においてそれぞれ 84% (10 ピコモル BSA) および 81% (50 ピコモル) の検出率を示した。マウス肝臓ミトコンドリア分画物 (92 $\mu$ g) の二次元 SDS ゲル電気泳動法により分離したたんぱく質スポットの同定に適用した結果、ATP synthase, Glutamate dehydrogenase, Catalase 等が、70%-76% のアミノ酸配列検出率で同定された。

### D. 考察

システインのアルキル化効率は反応液の pH により変化する。pH8.5 以上では効率が上昇するが、リジン側鎖の  $\epsilon$  アミノ基も同時に修飾受ける。システインのアルキル化を最大にし、リジンのアルキル化を押さえる限界点である pH8.5 を選択した。SDS 電気泳動法は Laemmli 法が現在まで利用されており、スタッキングゲルとランニングゲルの pH 差 (pH6.8 から pH8.8) がタンパク質を濃縮すると言われていた。しかしながら、今回の我々の用いた pH8.5 の差ゼロ条件においても、試料は十分に濃縮された。スタッキングゲル (4%) とランニングゲル (10%) のゲル濃度差と電気泳動に用いる電流の差でたんぱく質は十分濃縮されると考えられた。その結果、電気泳動中のたんぱく質のアルキル化が一段と充進した。

### E. 結論

アクリルアミドによるタンパク質のシステイン残基の *in situ* アルキレーションはプロテオーム解析においてタンパク質検索の精度向上に加え、ハイスループット性を増し、自動化装置への

応用の道を開いた。

本法により細胞マトリクスに関連する筋疾患のタンパク質変動を捕らえる重要な開発となった。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kobayashi H, Kruger R, Markopoulou K, Wszolek Z, Chase B, Taka H, Mineki R, Murayama K, Riess O, Mizuno Y, Hattori N. Haploinsufficiency at the synuclein gene underlies phenotypic severity in familial Parkinson's disease. *Brain* **126** (Pt 1), 32-42, 2003

Mineki R, Taka H, Fujimura T, Kikkawa M, Shindo N, Murayama K. *In situ* alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during one- and two- dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics* **2** (12), 1672-1681, 2002.

Kato A, Kawamata N, Tamayose K, Egashira M, Miura R, Fujimura T, Murayama K, Oshimi K. Ancient ubiquitous protein 1 binds to the conserved membrane-proximal sequence of the cytoplasmic tail of the integrin subunits that plays a crucial role in the inside-out signaling of  $\text{IIB}\beta$ . *J Biol Chem* **277** (32), 28934-28941, 2002.

Takai T, Mineki R, Nakazawa T, Takaoka M, Yasueda H, Murayama K, Okumura K, Ogawa H. Maturation of the activities of recombinant mite allergens Derp1 and Der f1, and its implication in the blockade of proteolytic activity. *FEBS Letters* **531**, 265-272, 2002.

Yamasaki H, Mineki R, Murayama K, Ito A, Aoki T. Characterization and expression of the *Fasciola gigantica* cathepsin L gene. *Int J Parasitol* **32**(8), 1031-1042, 2002.

Sakurada S, Watanabe H, Hayashi T, Yuhki M, Fujimura T, Murayama K, Sakurada C, Sakurada T.

Endomorphin analogues containing D-Pro(2) discriminate different mu-opioid receptor mediated antinociception in mice. *Br J Pharmacol* **137**(8), 1143-1146, 2002.

Hung KC, Wu HE, Mizouchi H, Sakurada S, Okayama T, Fujimura T, Murayama K, Sakurada T, Fujimoto JM, Tseng LF. D-Pro(2)-endomorphin-1 and D-Pro(2)-endomorphin-2, respectively attenuate the antinociception induced by endomorphin-1 and endomorphin-2 given intrathecally in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* **303**(2) 874-879, 2002

Yamakura F, Matsumoto T, Fujimura T, Taka H, Murayama K, Imai T, Uchida K. Modification of a single tryptophan residue in human Cu, Zn-superoxide dismutase by peroxyntirite in the presence of bicarbonate. *Biochim Biophys Acta*. **1548** (1) 38-46 2001.

Murayama K, Fujimura T, Morita M, Shindo N. One-step subcellular fractionation of rat liver tissue using a Nycodenz density gradient prepared by freezing thawing and two-dimensional sodium dodecyl sulphate electrophoresis profiles of the main fraction of organelles. *Electrophoresis* **22** (14), 2872-2880, 2001.

## 2. 学会発表

Mineki R, Taka H, Fujimura T, Kikkawa M, Shindo N, Murayama K. *In situ* alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during one- and two- dimensional sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis. ABRF 2003 meeting “ Translating Biology Using Proteomics and Functional Genomics”, Denver February 10-13, 2003.

Yokono T, Mineki R, Taka H, Kotaniguchi H, Murayama K. Improvement of the automatic in gel digestion by *in situ* alkylation proteins. ABRF 2003 meeting “ Translating Biology Using Proteomics

and Functional Genomics”, Denver February 10-13, 2003.

岩渕和久、Laura Mauri, Alessandro Prinetti, Sandro Sonnino, 小林俊秀、石井久美子、牧野麻美、加賀直子、村山季美枝、長岡功：グリコシグナルドメインの情報伝達におけるスフィンゴ糖脂質・脂肪酸鎖の役割。第75回日本生化学会大会、2002年10月 京都

加賀直子、相馬早苗、瀬山邦明、福地義之助、村山季美枝：ラット脳に含まれるエラスチン架橋物質デスモシン及びびンデスモシンの液体クロマトグラフィー質量分析計による定量法。第75回日本生化学会大会、2002年10月 京都

西谷寛仁、谷田以誠、峯木礼子、高ひかり、村山季美枝、富野康日己、上野隆、木南英紀：GATE-16 に相互作用するタンパク質の解析。第75回日本生化学会大会、2002年10月 京都

藤村務、進藤典子、峯木礼子、高ひかり、吉川美加、村山季美枝：マウス肝臓オルガネラたんぱく質の加齢変化—プロテオミクス解析における群別発現たんぱく質の有意差検定。第75回日本生化学会大会、2002年10月 京都

山倉文幸、松本孝、平岡行博、大森大二郎、内田桂吉、藤村務、高ひかり、村山季美枝：ミエロペルオキシダーゼ反応で生じる活性窒素酸化物によるヒト Cu,Zn-SOD の Trp32 のニトロ化。第75回日本生化学会大会、2002年10月 京都

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

### III 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

	著者名	表題	出典、巻、頁	発表年
1	Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, and Yamada Y.	Perlecan is essential for cartilage and cephalic development	Nature Genetics, 23:354-358,	1999
2	Arikawa-Hirasawa E, Wilcox RL, Govindraj P, Hassell JR, Yamada Y	Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of perlecan	Nature Genetics, 27:431-434,	2001
3	Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, and Yamada Y	Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice	Nature Neuroscience, 5:119-123	2002
4	Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA, Govindraj P, Hassell JR, Devaney JM, Spranger J, Stevenson RH, Iannaccone S, Dalakas MC, Yamada Y.	Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia	Am. J. Hum. Gen., 70	2002
5	Arikawa-Hirasawa E, Wilcox WR, and Yamada Y.	Dyssegmental Dysplasia, Silverman-Handmaker Type: Unexpected role of perlecan in cartilage development	Am. J. Med. Gen., 106:254-257	2002
6	Arikawa-Hirasawa E and Yamada Y	Perlecan mutations in mice and humans: critical role of perlecan in skeletal development and disease	Acta Myologica, XX 2:134-137	2001
7	平澤(有川) 恵理、山田吉彦.	パールカンの骨格形成における役割：ノックアウトマウスとヒト疾患の解析から	細胞工学 20 (8)1091-1094	2001
8	平澤(有川) 恵理、山田吉彦.	発生と疾患におけるパールカンの機能：遺伝子欠損マウスとヒト疾患での機能骨格形成における役割とヒト遺伝子疾患の解明	生化学, 73:1257-1261	2001
9	平澤(有川) 恵理	Schwartz-Jampel 症候群 (軟骨異栄養性筋強直症)	日本臨床 領域別症候群シリーズ 35 126-129	2001
10	Kobayashi H, Kruger R, Markopoulou K, Wszolek Z, Chase B, Taka H, Mineki R, Murayama K, Riess O, Mizuno Y, Hattori N.	Haploinsufficiency at the alpha-synuclein gene underlies phenotypic severity in familial Parkinson's disease.	Brain 126 :32-42	2003

11	Ogawa T, Miyamae T, Murayama K, Okuyama K, Okayama T, Hagiwara M, Sakurada S, Morikawa T.	Synthesis and structure-activity relationships of an orally available and long-acting analgesic peptide, N(alpha)-amidino-Tyr-D-Arg-Phe-MebetaAla-OH (ADAMB).	J Med Chem. ;45(23):5081-9.	2002
12	Sakurada S, Watanabe H, Hayashi T, Yuhki M, Fujimura T, Murayama K, Sakurada C, Sakurada T.	Endomorphin analogues containing D-Pro(2) discriminate different mu -opioid receptor mediated antinociception in mice.	Br J Pharmacol. 137(8):1143-1146.	2002
13	Mineki R, Taka H, Fujimura T, Kikkawa M, Shindo N, Murayama K.	In situ alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during one- and two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.		2002
14	Takai T, Mineki R, Nakazawa T, Takaoka M, Yasueda H, Murayama K, Okumura K, Ogawa H.	Maturation of the activities of recombinant mite allergens Der p 1 and Der f 1, and its implication in the blockade of proteolytic activity.	FEBS Lett. 531(2):265-72.	2002
15	Hung KC, Wu HE, Mizoguchi H, Sakurada S, Okayama T, Fujimura T, Murayama K, Sakurada T, Fujimoto JM, Tseng LF.	D-pro(2)-endomorphin-1 and D-pro(2)-endomorphin-2, respectively, attenuate the antinociception induced by endomorphin-1 and endomorphin-2 given intrathecally in the mouse.	J Pharmacol Exp Ther. 303(2) 874-879	2002
16	Yamasaki H, Mineki R, Murayama K, Ito A, Aoki T.	Characterisation and expression of the Fasciola gigantica cathepsin L gene.	Int J Parasitol. 32(8):1031-42.	2002
17	Kato A, Kawamata N, Tamayose K, Egashira M, Miura R, Fujimura T, Murayama K, Oshimi K.	Ancient ubiquitous protein 1 binds to the conserved membrane-proximal sequence of the cytoplasmic tail of the integrin alpha subunits that plays a crucial role in the inside-out signaling of alpha IIbeta 3.	J Biol Chem. 277(32):28934-41	2002
18	Sakurada S., Hayashi T., Yuhki M., Fujimura T., Murayama K., Yonezawa A., Sakurada C., Takeshita M., Sato T, Zadina JE., Kastin AJ., Sakurada T	Differential antagonism of of endomorphin-2 supraspinal antinociception by naloxonazine and 3-methoxynaltrexone.	Peptides 6369 1-7	2002

19	Murayama K, Fujimura T, Morita M, Shindo N.	One-step subcellular fractionation of rat liver tissue using a Nycodenz density gradient prepared by freezing-thawing and two-dimensional sodium dodecyl sulfate electrophoresis profiles of the main fraction of organelles.	Electrophoresis. 22(14):2872-80,	2001
20	Sugie K, Futamura N, Suzumura A, Tate G, and Umehara F	Hereditary motor and sensory neuropathy with minifascicle formation in a patient with 46XY pure gonadal dysgenesis: A new clinical entity.	Ann. Neurol. 5:385-388, 2002.	2002
21	Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Oh SJ, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Lamperti C, Saitoh S, Byrne EDiMauro S, Nonaka I, Hirano M, and Nishino I.	Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease.	Neurology, Jun 25;58(12):1773-	2002
22	Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimiya J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I.	Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy.	Neurology. 59(11):1689-93.	2002
23	Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I	Ullrich disease: collagen VI deficiency: EM suggests a new basis for muscular weakness	Neurology. Sep 24;59(6):920-3	2002
24	Murata K, Sugie K, Takamura M, Fujimoto T, Ueno S	Eosinophilic major basic protein and interleukin-5 in eosinophilic myositis	Eur J Neurol 10(1):35-8.	2003
25	Murata K, Sugie K, Takamura M, Ueno S	Expression of the costimulatory molecule BB-1 and its receptors in patients with scleroderma-polymyositis overlap syndrome	J Neurol Sci. 15;205(1):65-70	2002
26	張 尚美、石川達也、埜中征哉、塚本東子、斎藤万里子、坂 京子、和田郁雄、杉江和馬、西野一三	早期より整形外科的問題を呈したメロシン陽性型先天性筋ジストロフィー-Ullrich病との関連を含めて。	脳と発達 35(2):159-164	2003
27	杉江和馬、西野一三	複合体IV(チトクロームc酸化控訴酵素)	日本臨床 60(4):490-493	2002

20020859

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
Ⅲの「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。