

ロテオグライカンと疾患—最近の知見 神経
筋の発生と疾患におけるパールカンの役割
平成16年1月24日 東京医科歯科大学、
東京

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

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（2）

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
(現；大学院医学研究科、生体分子研究部門)

研究要旨

分担者等はプロテオミクスにおけるタンパク質解析の高精度・ハイスループット化に挑戦した。S-S 架橋を有するタンパク質のシステイン残基をアルキル化するための試薬としてゲル架橋剤であるアクリルアミドを使用した。本来、ゲル電気泳動における副反応とされていたシステイン残基のアクリルアミドによるプロピオン酸アミド (PAM) 化を SDS ゲル電気泳動中でタンパク質システイン残基の積極的なアルキル化法として開発した(*in situ alkylation*, *Proteomics* 2002, 2,1672-1681)。その結果、二次元電気泳動に先立つアルキル化の操作が不要となり、更にはゲル内トリプシン消化前の還元・アルキル化のステップが省略された。操作時間の短縮に加え、タンパク質の解析精度が上昇した。さらに、質量分析前の ZipTip による脱塩処理操作を省略することができ、操作上のハイスループット化にも成功した。平成 15 年度は、ゲル内タンパク質消化の自動化装置 (Intavis AG DigestPro96、ドイツ製)を用いて、我々の開発した *in situ alkylation* 法で処理した試料ゲルに対するプログラムをエムエス機器応用技術課 (Intavis 代理店) 横野健博士と共同開発した。オリジナル法のプロトコールより感度は上昇し、銀染色レベルにおけるタンパク質のトリプシン消化を可能とした。In situ alkylation 及び In gel digestion の自動化に関して 2003 年米国で開催された Association Biomolecular Research Facilities(ABRF)学会で発表した。また、銀染色レベルの微量タンパク質解析を nano HPLC-ESI-TOFMS を用いて (直径 0.2mm、長さ 5 cm の C18 カラム、流速 300nl/min) 検討した結果、25 フェムトモルのウシ血清アルブミンの回収率は約 40% となり、micro LC-ESI-TOF に比較して約 40 倍の感度上昇が得られた。更に、オートサンプラーを取り付け、24 時間体制を導入した結果、従来の 5 倍の処理能力増となった。その結果、プロテオミクス解析法は精度、感度、迅速性のいずれにおいても著しく改良した。

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、筋疾患で起こるタンパク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。タンパク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、タンパク質解析の精度を向上させるために、タンパク質に含まれるシステイン残基を従来のカルボキシアミドメチル化

(CAM) 法から電気泳動上のアクリルアミドの副反応を主反応に変えるプロピオン酸アミド化 (PAM) を用いて、更に、ゲル電気泳動中にアルキル化する方法を確立した (*in situ Alukylation*)。また、質量分析の前処理法をハイスループット化する目的で Intavis 自動消化装置を用いて、本法より得られたゲル中タンパク質に対応したトリプシン消化プログラムを作成した。

更に、銀染色レベルの微量タンパク質解析に対応するために、micro LC から nano LC に変え、

質量分析計 (QSTAR) に接続し高感度化を図った。

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 (1D SDS-PAGE) における *in situ* Alkylation 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 (2D SDS-PAGE) においては、ストリップ上に存在するタンパク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。タンパク質がゲルに移行・濃縮される過程においてシステイン残基を PAM 化した。

ゲル内トリプシン消化には DigestPro96 (Intavis AG, Koeln, Germany) を用いて、新たなプロトコールを作成した。

更に、タンパク質解析における高感度、高精度化を測るために KYA テクノロジーズの nano HPLC システムをアプライドバイオシステムズの ESI-TOF 型質量分析計 (QSTAR) に接続した。カラムサイズ、流速、プログラムの最適化を図った。基本的には micro HPLC に順ずるカラム (C18 0.2x50mm) 及びギ酸アセトニトリル溶液の勾配プログラムを用いて、流速を 1 μ l/min から 300nl/min に変更した。

C. 研究結果

一次元および二次元の SDS-PAGE においてタンパク質のシステイン残基は PAM 化に一元化された。BSA の PAM システインの回収率は 1D SDS-PAGE で 30 個(86%)、2D SDS-PAGE で 34 個 (97%) であったが、1 個の遊離のシステイン残基は観測されなかった。システインの S-S 架橋が十分に壊裂したためか、トリプシンによる消化が進みミスクリベッジが減少し、消化効率が上昇した。さらに、システインを含むペプチドが高収量で回収され、BSA のアミノ酸検出率 (Coverage) は高く、1D/2D-SD-PAGE

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。

ゲル内タンパク質のトリプシン消化には DigestPro96 (Intavis AG, Koeln, Germany) を用いて、オリジナルのプロトコールから還元アルキル化のステップを削除し、脱染色、トリプシン消化反応、ペプチド抽出の至適条件を検討し、我々の *in situ* Alkylation 法への最適化を図った。

オリジナルプロトコールでは切り出した染色ゲルに対して、還元及びヨードアセトアミド (CAM) 化をトリプシン消化前に、再度、実施していた。我々の方法においては、このステップが不要となり削除した。その結果、1 ピコモル BSA の回収率が 11% から 32% へと大幅に上昇した。新たなプロトコールは、感度上昇のみならず、ステップ削減による操作時間の短縮、アルキル化剤試薬の削除から質量分析前の脱塩操作の省略等幾多の改善が図られた。(ただし、MALDI-TOF-MS の場合は少量の塩も妨害となるために ZipTip による脱塩操作は行っているところが多い)。

また、高感度を目的に nano LC を導入し、流速、及び分析条件を種々検討して最適化を図った。流速を 100、200、300 nl/min で検討した結果、低流速では分析時間が著しく長時間を要するために実用的ではなく、最終的には 300 nl/min を選択した。micro LC-MS/MS で 1 ピコモル BSA の Mascot による回収率 (MS/MS で) が約 40% であったのに対して、nano LC-MS/MS では、25 フェムトモル BSA が同じく約 40% を示した。即ち、nano LC の導入で 40 倍の高感度分析が可能となった。オートサンプラーの接続により 24 時間運転が可能となり、約 5 倍倍の分析処理能力増となり、高感度ハイスループットの MS/MS 解析を伴った質の高いプロテオミクス解析が可能となった。

D. 考察

タンパク質に含まれるシステイン残基のアルキル化効率は反応液の pH により変化する。タンパク質のシステインのアルキル化を最大にし且つ、リジンの ϵ -アミノ基のアルキル化を押さ

える限界点である pH8.5 で SDS 電気泳動中の *in situ* alkylation を高効率で行った。その結果、タンパク質脱染色後のゲル内消化が、簡便化がされた。また、Micro LC に比して nano LC によるタンパク質解析の感度上昇は著しいが、その操作に習熟するには時間を要する。しかしながら、高感度分析、オートサンプラー使用のメリットは大きく、nano LC-ESI-TOF は今後のプロテオミクス解析の主流の機器になることは明らかである。

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* alkylation はプロテオーム解析において重要な方法となった。

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。上記、開発に加え、オートサンプラー付き nano LC-MS/MS の導入により高精度・ハイスループット解析が可能となった。

本法はプロテオミクス解析全般は言うに及ばず本プロジェクトの細胞マトリクスに関連する筋疾患のタンパク質変動を明らかにす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

Ezaki J, Takeda-Ezaki M, Koike M, Ohsawa Y, Taka H, Mineki R, Murayama K, Uchiyama Y, Ueno T, Kominami K. Characterization of Cln3P, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein. *J Neurochem.* 87(5): 1296-308, 2003

Yokono T, Mineki R, Taka H, Kotaniguchi H, Murayama K. Improvement of automatic in-gel digestion by *in situ* alkylation of proteins. *J Biom Tech.* 14(3): 191-6, 2003

Hanaguchi A, Suzuki E, Murayama K, Fujimura T, Hikita T, Iwabuchi K, Handa K, Withers DA, Masters SC, Fu H, Hakomori S. A sphingosine-dependent protein kinase that specifically

phosphorylates 14-3-3 (SDK1) is identified as the kinase domain of PKCdelta: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun.* 307(3): 589-94, 2003

Hanaguchi A, Suzuki E, Murayama K, Fujimura T, Hikita T, Iwabuchi K, Handa K, Withers DA, Masters SC, Fu H, Hakomori S. Sphingosine-dependent protein kinase-1, directed to 14-3-3 is identified as the kinase domain of protein kinase C delta. *J Biol Chem.* 278(42): 41557-65, 2003

Kagan N, Soma S, Fujimura T, Seyama K, Fukuchi Y, Murayama K. Quantification of elastin cross-linking amino acids, desmosine and isodesmosine, in hydrolysates of rat lung by ion-pair liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 318(1): 25-9, 2003

Amino H, Osanai A, Miyadera H, Shinjyo N, Tomitsuka E, Taka H, Mineki R, Murayama K, Takamiya S, Aoki T, Miyoshi H, Sakamoto K, Kojima S, Kita K. Isolation and characterization of the stage-specific cytochrome b small subunit (CybS) of *Ascaris suum* complex from the aerobic respiratory chain of larval mitochondria. *Mol Biochem Parasitol.* 128(2): 175-86, 2003

Takamiya S, Yamasaki H, Hashimoto M, Taka H, Murayama K, Tagaya M, Aoki T. Heterologous expression of *Ascaris suum* cytochrome b5 precursor protein: a histidine-tagged full-length presequence is correctly processed to transport the mature protein to the periplasma of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 413(2): 253-61, 2003

Miyadera H, Hiraishi A, Miyoshi H, Sakamoto K, Mineki R, Murayama K, Nagashima KV, Matsuura K, Kojima S, Kita K. Complex II from phototrophic purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* displays rhodoquinol-fumarate reductase activity. *Eur J Biochem.* 270(8): 1863-74, 2003

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.

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): 1031-42, 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 alpha subunits that plays a crucial role in the inside out signaling of alpha IIb beta 3. *J Biol Chem.* 277(32): 28934-41, 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.

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 peroxynitrite 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

Taka H, Kaga N, Mineki R, Fujimura T, Shindo N, Tanokura M, Murayama K. Oxidation of cysteinyl residue in PA-1(pI4.78) parvalbumin from Bullfrog skeletal muscle *in vivo*. 51st ASMS(American Society for Mass Spectrometry) Annual Conference, Montreal Canada, June 7-12, 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. 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.

Kaga N, Kazuno S, Murayama K. Isolation of various molecular species of Lactosyl ceramide. Conformation of the fatty acid moiety and long chainbases using LC-MS.

第76回日本生化学会大会 2003年10月15-18日、パシフィコ横浜。

Nishitani T, Tanida I, Mineki R, Taka H, Murayama K, Ueno T, Tomino Y, Kominami E. Identification of Gate-16 interacting proteins. 第76回日本生化学会大会 2003年10月15-18日、パシフィコ横浜。

Matsumoto T, Yamakura F, Ikeda K, Fujimura T, Takah, Kaga N, Murayama K.

Reactivities of tyrosine and tryptophan residues in lysozyme with pyroxylnitrite.

第76回日本生化学会大会 2003年10月15-18

日、パシフィコ横浜。

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ンシン及びイソデスモン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ー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

著書の種別	整理番号	著者名	表題	出典、巻、頁	発表年
著書	1	平澤恵理	Schwartz-Jampel症候群（軟骨異栄養症）とパールカン	Annual Review神経 2004	2004
原著	2	Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, Saito K, Harada H,	Laminin alpha2 essential for odontoblast differentiation	J Biol Chem. 19;279(12):11402-7.	2004
原著	3	Hassell J, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E.	Role of perlecan in skeletal development and diseases	Glycoconj J. 2003;19:263-267	2003
原著	4	Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Murakami N, Sakuta R, Mochizuki M, Michele DE, Campbell KP, Nonaka I, Nishino I.	POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in alpha-DG.	Neurology. 23;62(6):1009-11.	2004
原著	5	Goto K, Nishino I, Hayashi YK.	Very low penetrance in 85 Japanese families with facioscapulohumeral muscular dystrophy 1A.	J Med Genet. Jan;41(1):e12.	2004
原著	6	Yamanaka G, Goto K, Ishihara T, Oya Y, Miyajima T, Hoshika A, Nishino I, Hayashi YK.	FSHD-like patients without 4q35 deletion.	Neurol Sci. Apr 15;219(1-2):89-93.	2004
原著	7	Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Awaya A, Suzuki Y, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I.	Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma.	Neurology. 24;62(4):620-3.	2004
原著	8	Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Imazawa M, Goto Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I.	Reduction of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles.	J Biol Chem. 19;279(12):11402-7.	2004
原著	9	Hayashi YK.	Membrane-repair machinery and muscular dystrophy.	Lancet. Sep 13;362(9387):843-4.	2003

原著	10	Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, Van Der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM.	Expression profiling of FHSD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation.	Hum Mol Genet. 12: 2895-2907,	2003
原著	11	Driss A, Noguchi S, Amouri R, Kefi M, Sasaki T, Sugie K, Souilem S, Hayashi YK, Shimizu N, Minoshima S, Kudou J, Hentati F, Nishino I.	Fukutin-related protein gene mutated in the original kindred limb-girdle MD 2I.	Neurology 60: 1341-1344,	2003
原著	12	Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK. Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients.	Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients.	J Neurol Sci 211: 23-28,	2003
原著	13	Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Many H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, Van Coster R, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, Nishino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T.	Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease.	Hum Mol Genet 12:527-534,	2003
原著	14	Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, Sekiguchi S, Shiga Y, Takahashi T, Onodera Y, Haginoya K, Kobayashi K, Iinuma K, Nonaka I, Arahata K, Itoyama Y.	Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy.	Neurology 58: 323-5,	2002
原著	15	Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, Noguchi S, Ishihara T, Nonaka I, Arahata K.	Selective deficiency of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy.	Neurology 57:115-121,	2001

原著	16	Ezaki J, Takeda-Ezaki M, Koike M, Ohsawa Y, Taka H, Mineki R, Murayama K, Uchiyama Y, Ueno T, Kominami K.	Characterization of Cln3P, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein.	J Neurochem. 87(5): 1296-308,	2003
原著	17	Yokono T, Mineki R, Taka H, Kotaniguchi H, Murayama K.	Improvement of automatic in-gel digestion by in situ alkylation of proteins.	J Bimo Tech. 14(3): 191-6,	2003
原著	18	Hanaguchi A, Suzuki E, Murayama K, Fujimura T, Hikita T, Iwabuchi K, Handa K, Withers DA, Masters SC, Fu H, Hakomori S.	A sphingosine-dependent protein kinase that specifically phosphorylates 14-3-3 (SDK1) is identified as the kinase domain of PKCdelta: a preliminary note.	Biochem Biophys Res Commun. 307(3): 589-94,	2003
原著	19	Hanaguchi A, Suzuki E, Murayama K, Fujimura T, Hikita T, Iwabuchi K, Handa K, Withers DA, Masters SC, Fu H, Hakomori S.	Sphingosine-dependent protein kinase-1, directed to 14-3-3 is identified as the kinase domain of protein kinase C delta.	J Biol Chem. 278(42): 41557-65,	2003
原著	20	Amino H, Osanai A, Miyadera H, Shinjyo N, Tomitsuka E, Taka H, Mineki R, Murayama K, Takamiya S, Aoki T, Miyoshi H, Sakamoto K, Kojima S, Kita K.	Isolation and characterization of the stage-specific cytochrome b small subunit (CybS) of <i>Ascaris suum</i> complex from the aerobic respiratory chain of larval mitochondria.	Mol Biochem Parasitol. 128(2): 175-86,	2003

原著	21	Takamiya S, Yamasaki H, Hashimoto M, Taka H, Murayama K, Tagaya M, Aoki T.	Heterologous expression of Ascurisuum cytochrome b5 precursor protein: a histidine ̑tagged full-length presequence is correctly processed to transport the mature protein to the periplasma of Escherichia coli.	Arch Biochem Biophys. 413(2): 253-61,	2003
----	----	--	--	---------------------------------------	------

200300732A

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