

### LC-MALDIシステムによる微量タンパク質の解析(1)

#### [凍結組織切片を用いた微量サンプルの解析]

#### Identification of Proteins by LC-MALDI System(1)

#### [Analysis of Samples Obtained from Frozen Tissue Sections]

二次元電気泳動システムとレーザーマイクロダイセクション(LMD: Laser Microdissection)による凍結組織切片を用いたプロテオーム解析を行いました。

二次元電気泳動は定量性・再現性に優れ、今もなおプロテオミクスでは最も普及している解析法です。一度の泳動で数1000種類のタンパク質が確認できること、結果をデータベース化できること、初期投資が小額であることなど多くの利点があります。さらにデータベースが整備され、質量分析が進歩したことでタンパク質同定は圧倒的に簡単になりました。

LMDは、レーザー光を利用して、組織切片上の目的の細胞のみを光学顕微鏡下で1つずつ取り出す技術です。癌組織のプロテオーム解析を行う場合、これまでの研究方法では、癌組織中には癌細胞しか含まれないことを前提

として解析するか、肉眼レベルで検体から癌組織と非癌部組織を分離して解析することしかできませんでした。このような解析精度の実験では、対象外の細胞由来のタンパク質が含まれるため解析結果に誤差が生じ、タンパク質発現のコントラストが低下すると予想されます。

LMDを用いる事により混在した組織標本から均一な細胞集団を単離できるので、その細胞に特異的な遺伝子およびタンパク質の発現を解析できるという利点があります。たくさんの細胞を回収することは難しいですが、蛍光色素(SYPRO Rubyなど)を用いてごく少量の細胞からでも二次元電気泳動を行うことができ、さらにタンパク質のリン酸化部位まで同定できることを示しました。

今回はサンプルとしてヒト舌組織をLMDにより正常粘膜上皮と口腔扁平上皮癌を単離したものをしました。

T.Minohata

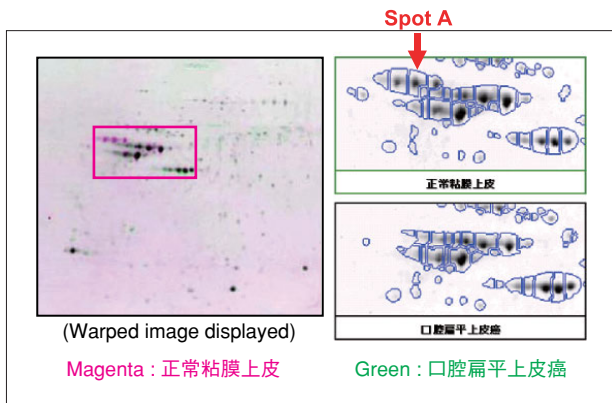


Fig. 1 画像解析ソフトProgenesisによる二次元電気泳動解析結果  
2DE Image Analysis Using Progenesis PG200

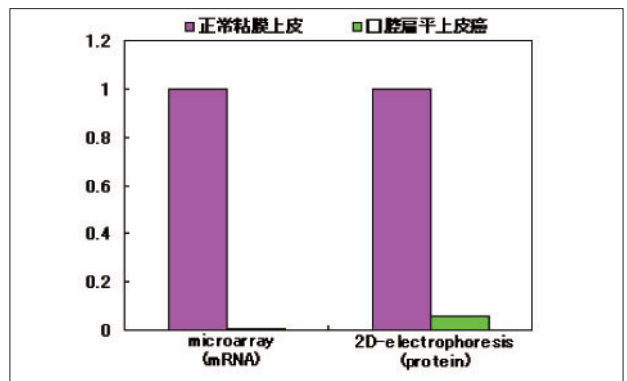


Fig. 2 keratin13の変動結果  
Variation in Keratin13

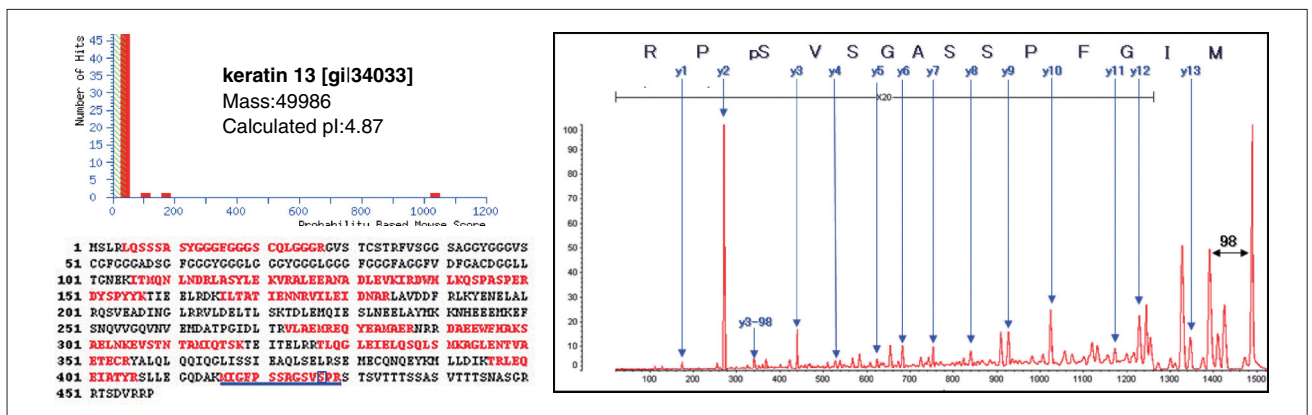


Fig. 3 LC-MALDIによるタンパク質同定結果及びm/z 1488.58(MIGFPSSAGSV\*PR)のMS/MSスペクトル(S\*,リン酸化部位)  
(Left) Identification of Keratin13 by LC-MALDI System  
(Right) MS/MS Spectrum of m/z 1488.58(MIGFPSSAGSV\*PR:S\*,phosphoserine)

二次元電気泳動後、画像解析ソフトProgenesis PG200を用いて解析しました(Fig. 1)。2つの画像を比較すると口腔扁平上皮癌では横並びのスポット群が大きく減少しているのが確認できます。このスポット群はAXIMA Performanceを用いてタンパク質同定を行った結果、keratin13である事が分かりました。ここでマイクロアレイの結果から遺伝子レベルではkeratin13の変化量は0.00036倍減少することが確認されています。今回の二次元電気泳動の結果からタンパク質レベルでは0.0588倍減少することが確認されました(Fig. 2)。

#### 【サンプル調製方法】

1. フィルム上に貼り付けられた7 μm厚の凍結組織切片から各部位を切り出した。  
(回収には組織切片3枚分を用いた)
2. 回収したサンプルにLysis Buffer 100 μlを添加し、超音波洗浄器を用いて30分間抽出を行った。
3. 遠心分離後、上清をサンプルとして用いた。

(Lysis Buffer)

6 M urea, 2 M thiourea, 3 % CHAPS, 1 % Triton X-100

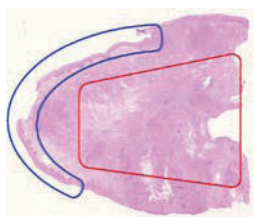
#### 【分析フロー】



さらにFig. 1にあるSpotAを切り出し、In-gel消化を行った後、LC-MALDIによるMS/MS自動測定を行いました(Fig. 3)。結果、タンパク質としてkeratin13が同定され、さらに427番目のserineがリン酸化されていることを確認しました(報告例有)。

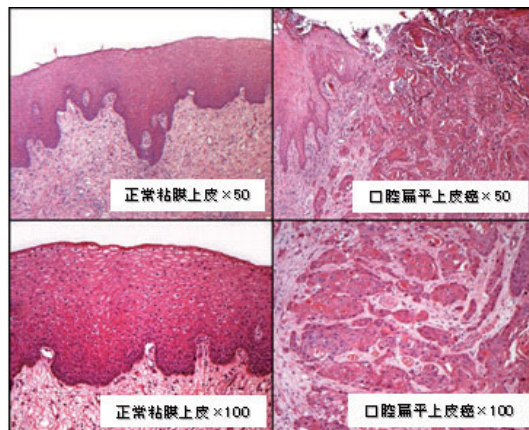
今回の結果からLMDを用いることで微量なサンプルにおいても二次元電気泳動～AXIMA Performanceのシステムが有用であり、リン酸化などの翻訳後修飾の同定まで行える可能性を示すことができました。

提供 昭和大学歯学部口腔病理学教室 山本 剛 先生



部 位 : ヒト舌  
組織型 : 扁平上皮癌 (高分化型)

青い線で囲まれた部位 : 正常粘膜上皮  
赤い線で囲まれた部位 : 口腔扁平上皮癌



(参考) 解析したサンプルの横断切片

[参考文献]

T. Kondo et al. Proteomics 2003, 3, 1758\_1766

本研究は昭和大学歯学部/山本剛先生との共同研究により得られたデータです。

初版発行 : 2009年10月

**島津製作所** 分析計測事業部  
応用技術部

島津分析コールセンター

- ☎ 0120-131691 (携帯電話不可)
- 携帯電話専用番号 (075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>  
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。