

LC-MALDIシステムによる微量タンパク質の解析(2) [カルボニル化タンパク質の解析]

Identification of Proteins by LC-MALDI System(2) [Analysis of Carbonylated Proteins]

二次元電気泳動～AXIMA MALDI-TOFMSシステムを用いて、虚血再灌流を行ったサル海馬CA1領域に存在するカルボニル化タンパク質の解析を行いました。

活性酸素(ROS)は日本人の死因のトップを占めるガン、心臓病、脳卒中をはじめ、糖尿病や動脈硬化といった生活習慣病など多くの病気に悪影響を与えることが知られています。活性酸素には過酸化水素やスーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシラジカルなどが知られていますが、これらの分子種はいずれも生体内で核酸や脂質、タンパク質などに非生理的な翻訳後修飾を引き起こします。

酸化傷害タンパク質の中でも、カルボニル化タンパク質は酸化傷害タンパク質のマーカースとして用いられています。カルボニル化はタンパク質を構成するアミノ酸のうちアルギニンやリジンなどの側鎖にアルデヒド基が生じることで形成されます(Fig. 1)。

一過性脳虚血において海馬CA1領域では選択的な神経

細胞死が起こり、記憶障害に至ることが示唆されています。

今回、一過性脳虚血後の海馬CA1領域サンプルを用いて二次元電気泳動後にカルボニル化タンパク質と思われるスポットを切り出し、LC-MALDIにより解析を行った結果、細胞死抑制機能を有するHeat shock-70kDa protein1 (Hsp70-1)の469番目のアルギニンがカルボニル化していることを確認しました(Fig. 2, 3)。

T.Minohata

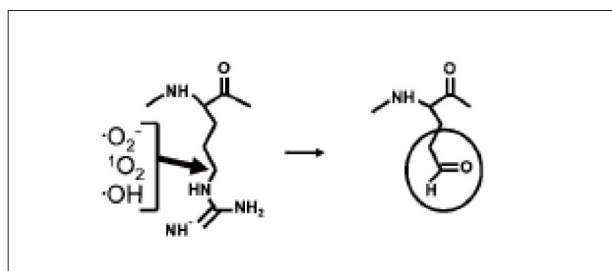


Fig. 1 アルギニンのカルボニル化
Carbonylation of Arginine

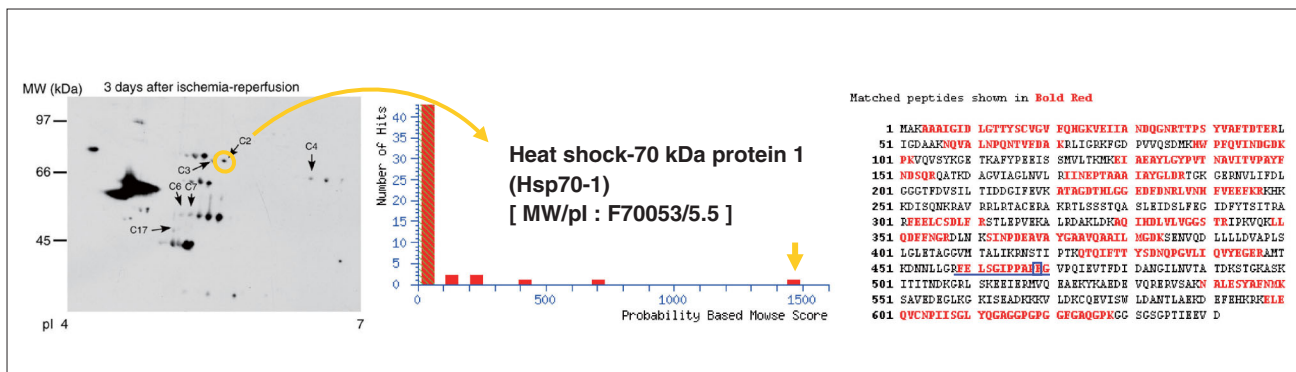


Fig. 2 LC-MALDIによるspot C2(Hsp70-1)の同定結果
Identification of Spot C2(Hsp70-1) by LC-MALDI System

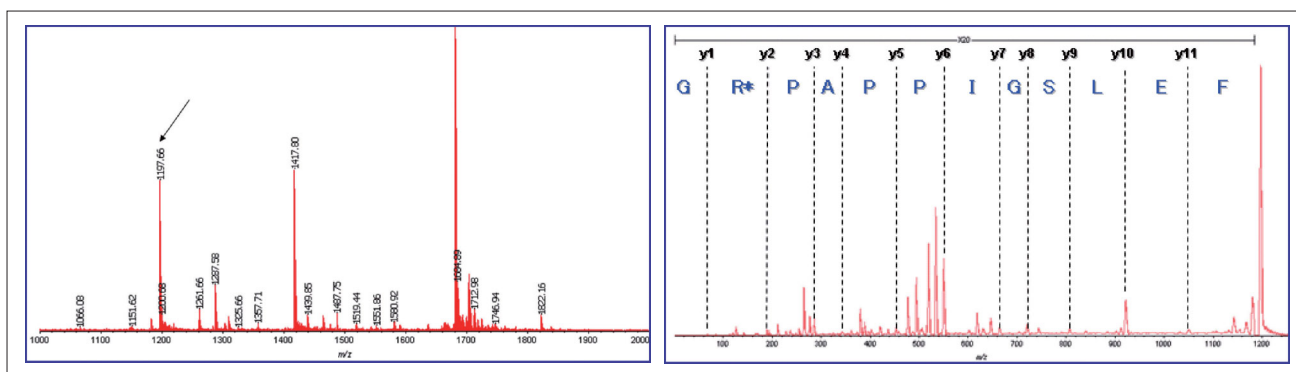


Fig. 3 Hsp70-1のスペクトル (A) 酵素消化後のスペクトル (B) m/z 1197.66(FELSGIPPAPR*G)のMS/MSスペクトル(R*, Carbonylated Arginine)
Mass Spectra of Hsp70-1 (A) Spectrum of the Tryptic Digest of Hsp70-1 (B) MS/MS Spectrum of m/z 1197.66(FELSGIPPAPR*G;R*, Carbonylated Arginine)

一過性脳虚血前と3日, 5日, 7日後のサル海馬CA1領域からタンパク質を抽出した後, 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)で酸化傷害タンパク質をラベルした後, 二次元電気泳動で分離しました。さらに, 抗DNP抗体でウエスタンブロッティングを行ってカルボニル化タンパク質を検出しました (Fig. 4(A))。また, 2D-DIGEを用いて全タンパク質の変動を調べました (Fig. 4(B))。結果, 6箇所のスポットが顕著に変動しており, 且つカルボニル化タンパク質である事を確認しました。この6スポットについてPMF解析を行ったところ,

4種類のタンパク質であることを確認しました (Fig. 5)。

さらにスポットC2について, 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。結果, 469番目のアルギニンがカルボニル化されていることを確認しました。

今回用いた二次元電気泳動~AXIMA Performanceシステムは, 酸化障害タンパク質の一種であるカルボニル化タンパク質の解析結果から示されるように, 翻訳後修飾に対して非常に強力なツールであると言えます。

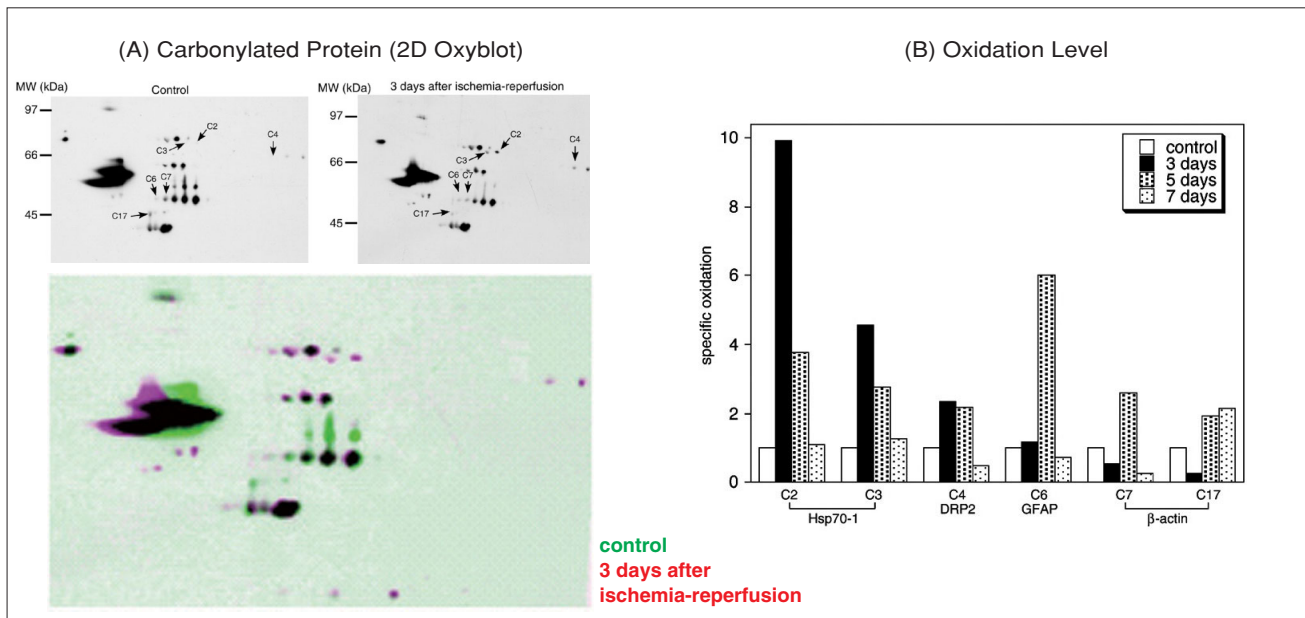


Fig. 4 (A) カルボニル化タンパク質の検出(controlと脳虚血3日後)および画像解析結果(Progenesis PG200)
(B) 脳虚血3,5,7日後のタンパク質酸化レベル
(A) 2D Oxyblot (Control and Day 3 Postischemic CA1 and Image Analysis (Using Progenesis PG200))
(B) Specific Oxidation Levels of Identified Proteins 3, 5, and 7 Days after The Ischemia-Reperfusion Insult

Spot	Protein Name	% Coverage	Theoretical Molecular Mass (Da)/pI
C2	Heat shock-70 kDa protein 1 (Hsp70-1)	22.6	70053/5.5
C3	Hsp70-1	29.0	70053/5.5
C4	Dihydropyrimidinase-like 2 isoform 2	28.2	73583/5.9
C6	Glial fibrillary acidic protein	37.0	47412/5.2
C7	β-Actin	39.7	41737/5.3
C17	β-Actin	32.3	41737/5.3

Fig. 5 カルボニル化タンパク質同定結果
Identification of Carbonylated Proteins

[参考文献]

S. Oikawa et al. / Free Radical Biology & Medicine 46 (2009) 1472-1477
本研究は三重大学医学部/及川伸二准教授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。