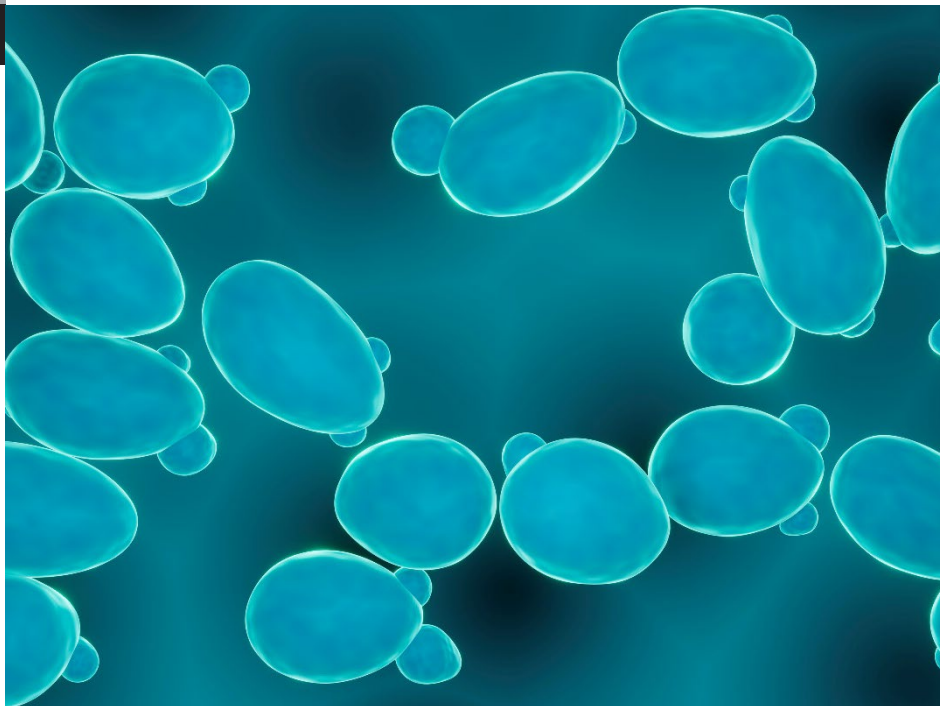


高速トリプル四重極質量分析計を用いた ターゲットプロテオミクス法による タンパク質過剰発現確認法

松田 史生^{1,2,3}、馬越 泰⁴



Life Science

■ 要旨

タンパク質発現量を人為的に増加させる過剰発現は、さまざまな研究分野で行われる実験操作です。もっともよく行われるウェスタンブロッティング法による発現確認では、対象タンパク質毎に検出用抗体を用意する必要があります。一方、ターゲットプロテオミクス法は、対象タンパク質由来のトリプシン消化ペプチドを、トリプル四重極質量分析計のMRMモードで、選択的に検出、定量する分析手法です。

本稿ではホスホグルコキナーゼ (Pgk) タンパクを過剰発現した遺伝子組み換え大腸菌株の発現確認にターゲットプロテオミクス法を適用しました。既存の優れた実験プロトコルに従い、トリプシン消化サンプルを調製しました。ターゲットプロテオミクス用ソフトウェアであるSkylineの機能で、Pgkのアミノ酸配列から自動作成した110個のMRMトランジションをLCMS™-8060にエクスポートしました。ナノLC-トリプル四重極質量分析計 (LCMS-8060)を用いた測定でPgkの過剰発現を確認することに成功しました。

1. はじめに

タンパク質は生体中で様々な機能を担っています。タンパク質発現量を人為的に増加させる過剰発現は、タンパク質機能を解明する基礎研究、バイオプロダクション用の改変微生物の構築、抗体タンパク質などのバイオ医薬生産などで行われる実験操作です。実験が計画通り行われたことを確認するには、タンパク質発現量を測定する必要があります。通常、タンパク質の発現量の測定は、ウェスタンブロッティング法が用いられますが、発現タンパク質毎に検出用の抗体が必要です。基礎医学研究用には、さまざまなタンパク質用の抗体が市販されています。一方、非モデル生物由来の遺伝子を微生物中で過剰発現する代謝工学分野では、対象タンパク質毎に抗体の作成が求められます。

1 大阪大学大学院情報科学研究科

2 大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所

3 大阪大学先導的学際研究機構産業バイオイニシアチブ研究部門

4 株式会社島津製作所 分析計測事業部 Solutions COE

2. ターゲットプロテオミクス法による大腸菌 Pgcタンパク質過剰発現の確認

ターゲットプロテオミクス法は、粗タンパク質抽出物をトリプシン消化し、トリプシン消化ペプチド混合物を得ます。この中に含まれる対象タンパク質由来のトリプシン消化ペプチドを、逆相液体クロマトグラフィーで分離後、トリプル四重極質量分析計のMRMモードで、選択的に検出、定量することで、タンパク質発現量を測定する分析手法です。本法を用いると、抗体作成なしで、タンパク質の過剰発現を確認できると期待されます。また、測定対象のタンパク質からは、多数のトリプシン消化ペプチドが生成します。そこでアミノ酸配列情報を用いて、生成が予想されるトリプシン消化ペプチド毎に、専用のMRMトランジションを設定します。非常に多くのMRMトランジションが必要となることから、高速動作可能なトリプル四重極質量分析計が威力を発揮すると期待されます。

ホスホグルコキナーゼ (Pgc) は解糖系のATP再生を担う鍵酵素の一つで、大腸菌 *Escherichia coli* の代謝工学研究においてもその過剰発現が試みられています。そこで、大腸菌Pgc過剰発現株の発現確認にターゲットプロテオミクス法を適用することにしました。

大腸菌K-12株と大腸菌過剰発現ライブラリー (ASKAライブラリー¹⁾)のPgc過剰発現株をLB培地中で培養し、IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 誘導後、濁度がOD1.0の培養液から、遠心分離法で菌体を回収後、細胞可溶性バッファーでタンパク質を抽出しました。大腸菌をはじめとする微生物では、酵母のタンパク質抽出法を適用して良好な結果を得ています (表1)²⁾。また、トリプシン消化法は公表されている優れた実験プロトコル通りに作業を実施しました³⁾。ヒト培養細胞からのタンパク質の抽出やトリプシン消化には市販のキットの利用が便利です (<https://www.funakoshi.co.jp/contents/8038>)。

表1 微生物のタンパク質抽出法^{2,3)}

1	液体培地に培養した微生物細胞の吸光度を測定し必要量あることを確認する(濃度300 µg/mLのタンパク質溶液が調製できる細胞量を事前に検討しておく)。
2	液体培地全量を15 mLのファルコンチューブにうつし、遠心分離(3000 rpm、5 min)。
3	上清を捨てて、氷上で冷やした溶菌バッファー(50 mM HEPES/バッファー(pH 7.5)、5 % グリセロール、15 mM Dithiothreitol(DDT)、100 mM KCl、5 mM EDTA、cComplete protease inhibitors cocktail 1粒)を1 mL添加する。
4	よくボルテックスした懸濁液を1.5 mLチューブにうつし、ジルコニアビーズを入れる(6 mm × 1、0.6 mm × PCRチューブで1杯分)。
5	2.5 min破砕後、一度氷上で冷やしてからさらに2.5 min懸濁液が白濁するまで破砕する。
6	遠心分離(15000 rpm、5 min)。
7	上清をプロテオーム解析用の1.5 mLチューブ(低タンパク吸着性チューブ)にうつす。
8	Bio-RAD RC DC protein assay(Bio-Rad)を用いてタンパク質の量を測定する。

3. Skylineを用いた自動MRMメソッド作成

ターゲットプロテオミクスでは、いくつかの経験則が知られています。たとえば、トリプシン消化ペプチドには、アミノ酸残基数が6-16程度のもので、LC-MS分析に適していること、トリプシン消化ペプチドからは、エレクトロスプレーイオン化法で、2価のプロトン化分子が生成すること、衝突誘起乖離によるフラグメント化で、y系列と呼ばれるフラグメントイオンが主に生成することなどです。これらのルールを利用すると、測定対象タンパク質のアミノ酸配列情報から、LC-MS分析に適したトリプシン消化ペプチドを選択し、各ペプチドを選択的に検出するMRMトランジションを設定することが可能となります。しかし手作業で行うには、非常に煩瑣です。

Skylineとは米国University of Washingtonで開発されているWindows用ソフトウェアです⁴⁾。無償で公開されているにも関わらず、ターゲットプロテオミクスのメソッド作成からデータ処理にいたるほぼ全ワークフローに対応しており、島津製作所のトリプル四重極質量分析計のメソッドファイル、データファイルを直接読み書きすることが可能です。

Skylineには、タンパク質アミノ酸配列からMRMトランジションを自動生成する機能がありこれを利用しました⁵⁾。まずデータベースからPgcタンパク質のアミノ酸配列データ (FASTAフォーマット) を取得しました (図1a)。このテキストデータをSkylineのターゲット枠にコピー&ペーストしました (図1b)。自動的に16個のトリプシン消化ペプチドが選ばれ、それらを選択的に検出するための総計110個のMRMトランジションが生成されました (図1c)。これをLC-MSのメソッドファイルとしてエクスポートしました (図1d)。詳細な方法はSkylineのチュートリアルを参照ください。

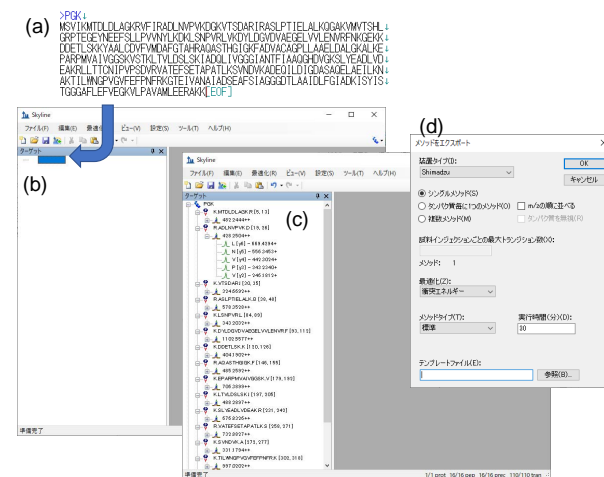


図1 Skylineを用いたMRMトランジションの自動生成ワークフロー

4. ナノLC-トリプル四重極質量分析計を用いた大腸菌 P_{gk} タンパク質過剰発現の確認

大腸菌K-12株とP_{gk}過剰発現株から作成したトリプシン消化物を、ナノLC-トリプル四重極質量分析計(LCMS-8060)にて測定しました(図2)。装置の構成及び分析条件を表2に示しました。大腸菌P_{gk}過剰発現株由来のサンプルの分析では、P_{gk}タンパク質由来のトリプシン消化ペプチドのシャープかつ高強度なピークを、複数観測することができました。これらのシグナル強度は、大腸菌野生(K-12)株のものより著しく増加していました。P_{gk}タンパク質由来のトリプシン消化物のMRMトランジションと、これほどよく合致するタンパク質が偶然生成することはあり得ないことから、本結果より、P_{gk}タンパク質の過剰発現を確認できました。

また図2のように感度に余裕がある場合は、ナノLCに代わりセミマイクロLCを用いても検出することが可能となります。つまり、低分子化合物分析用のセミマイクロLC-トリプル四重極質量分析計でそのままターゲットプロテオーム解析を始めることが可能です。

また、P_{gk}過剰発現の結果から、高感度に検出可能な3-4種のトリプシン消化ペプチドを選抜すると、P_{gk}発現量測定用のMRMアッセイ法を構築できます。筆者らのグループでも、大腸菌や出芽酵母の主要タンパク質のMRMアッセイ法を構築しています^{6,7)}。

表2 ナノLC-トリプル四重極質量分析計の構成及び分析条件例

LC	: LC-20ADnano
溶離液A	: 0.1% 酢酸 + 5% アセトニトリル水溶液
溶離液B	: 0.1% 酢酸 + 95% アセトニトリル水溶液
溶離液C (トラップ用)	: 0.1% 酢酸水溶液
オンラインデガッサ	: 溶離液Aと溶離液B用を2台用意 (混合防止のため)
配管	: nanoViper fingertight fitting (Thermo Scientific)
流量	: 400 nL/min
グラジエント	: B. conc 0%(0-7 min)-65%(45 min)-100%(50-65 min)-75%(67 min)-0%(75-90 min)インジェクションバルブは5分にサンプル導入側に切り替え
トラップ流量	: 40 µL/min
カラム温度	: 調節なし
カラム	: L-column Micro L-C18 0.1×150 mm, 3 µm (CERI)
トラップカラム	: L-column Micro L-C18 0.3×5 mm, 5 µm (CERI)
チップ	: Fortis tip 150-20 (AMR)
インターフェイス	: nano-spray interface (AMR)
MS	: LCMS-8060
ネブライザーガス流量	: なし
DL温度	: 150°C
ヒートブロック温度	: 200°C
ドライイングガス流量	: なし
Q1分解能	: Low
Q3分解能	: Low
CIDガス	: 270 kPa
インターフェイス電圧	: 1.4-1.7 kV
検出法	: MRMモード

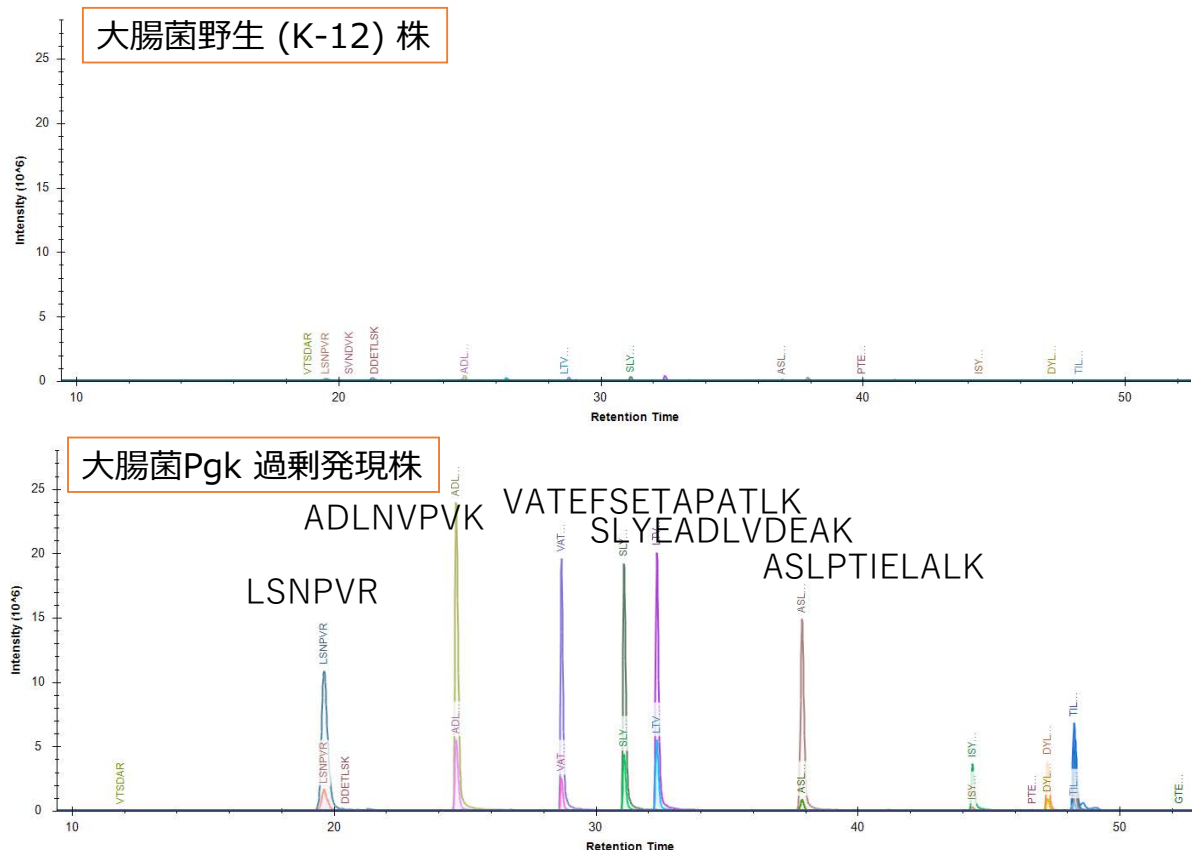


図2 大腸菌 P_{gk} タンパク質の発現確認例
P_{gk} タンパク質由来の16トリプシン消化物をMRMメソッドで測定しました。

5. まとめ

代謝工学研究は、バイオプロダクションを担う微生物の構築を目指しており、複数の酵素タンパク質の過剰発現を行います。また、ヒトを対象とした基礎医学研究でも、タンパク質の過剰発現はよく行われる操作であり、検出用抗体が不要なターゲットプロテオミクスは、その迅速な確認に有用と考えられます。また、高速動作可能なトリプル四重極質量分析計が多数のMRMトランジションを必要とするターゲットプロテオミクスの成功に寄与すると期待されます。

謝辞

本研究の実施に当たりプロテオーム解析に技術面でご協力いただきました大阪大学大学院情報科学研究科、脇坂恵都子様、北野博司様、富田淳美様（当時）に御礼申し上げます。

<参考文献>

- 1) M. Kitagawa, T. Ara, M. Arifuzzaman, T. Ioka-Nakamichi, E. Inamoto, H. Toyonaga, H. Mori. Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (a complete set of *E. coli*/K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*12: 291-299, 2005.
- 2) Picotti P, Bodenmiller B, Mueller LN, *et al*. Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell*, 2009;138:795-806.
- 3) Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, *et al*. A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS*, 2013; 10:21.
- 4) MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, *et al*. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*, 2010; 26:966-968.
- 5) Skyline ホーム ページ : <https://brendanx-uw1.gs.washington.edu/labkey/project/home/software/Skyline/begin.view> (2023年10月10日参照)
- 6) Matsuda, F., Tomita, A., Shimizu, H., 2017. Prediction of hopeless peptides unlikely to be selected for targeted proteome analysis. *Mass Spectrometry*. 6, A0056.
- 7) Uebayashi, K., Shimizu, H., Matsuda, F., 2018. Comparative analysis of fermentation and enzyme expression profiles among industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7071-7081.

LCMSは、株式会社 島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2023年10月

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。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。