

抗体カラム処理後の血中タンパク質の2D-DIGEを用いた定量比較の再現性評価

○前田洋祐・山中秀徳・武吉正博・美濃部安史 財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所

概要

血液は、試料採取の容易さと多数のタンパク質成分を含有していることから、疾患診断・治療モニタリング、新薬開発に有用なタンパク質マーカーの探索が盛んに行われている。タンパク質マーカー探索研究には、網羅性、定量性、再現性が重要な要素でありFluorescence 2D-Differential Gel Electrophoresis (2D-DIGE)法は、これらの条件を満たす方法の一つである。

血中にはアルブミン、IgG等の数種のタンパク質が大量に存在し、血中タンパク質解析にはこれらのタンパク質の除去する前処理が必要不可欠である。前処理には抗体カラム処理が汎用されているが、この方法ではわずかに残留したタンパク質が2D-DIGE法による定量比較解析に影響を及ぼすことがある。また、抗体カラムの繰り返し使用による除去率の低下、非特異的吸着の増加も生じる。そこで我々は、アジレント社製の抗体スピンカラムを用いて効果的な除去法の検討し、あわせてカラムの劣化が2D-DIGE法の結果に与える影響を調べた。その結果、改良法では2D-DIGE法による検出限界以下まで除去することができ、30回以上繰り返ししても同様であった。またカラムの劣化が2D-DIGE法の結果の再現性に多大な影響があることが確認された。抗体カラムを前処理に用いる際はカラムの劣化状況を考えて実験を行わなければ、カラムの劣化による発現量の変動とサンプル間の発現量の変動を誤って検出する可能性があることが分かった。

※ : Ichibangase T. et al., Biomed Chromatogr (2008)

実験

・ヒト血液の前処理

試料にはヒト血清・ヒト血漿を用いた。抗体カラムはアジレント社製マルチプルアフィニティ除去LCスピンカートリッジ Human 6 (アルブミン、IgG、IgA、トランスフェリン、ハプトグロビン、アンチトリプシンを除去) B社製抗体スピンカラム (アルブミン、IgG、フィブリノーゲン、トランスフェリン、IgA、IgM、ハプトグロビン、 α 2-マクログロブリン、 α 1-酸性糖タンパク、 α 1-アンチトリプシン、HDL 8 [アポA-I、アポA-II]、アポB、補体C3を除去) 標準法ではカラムに付随のプロトコールに従った。改良法では、素通り画分を再度カラムに通し、他の条件はプロトコールに従った。

・一次元目電気泳動

一次元目電気泳動は、Multiphore II 及び IPG (Immobilized pH Gradient) Strips (24cm, pI3-10, GEヘルスケアバイオサイエンス社)を用い、サンプルはカップローディングホルダーから添加した。フォーカシングは、トータルで40kVを行った。泳動後、平衡化溶液 (50mM Tris, pH8.8, 6Mウレア、30%グリセロール、2%SDS) に0.25% (w/v) DTTを添加したA液及び同様に4.5% (w/v) モードアセトアミドを添加したB液に対して各々10分間ずつ平衡化を行った。

・二次元目電気泳動

平衡化終了後、Ettan DALT IIシステム (GEヘルスケアバイオサイエンス社) 及び12%均一ゲル (自作)を用いて二次元目のSDS-PAGEを行った。泳動は、3 Ω (15 $^{\circ}$ C) 一定で泳動先端が完全に溶出するまで (約15時間) 行った。

・画像解析

Typhoon (GEヘルスケア バイオサイエンス社)を用いて Sypro[®] Rubyの励起波長(480nm)および蛍光波長(620nm)で画像を取得した。画像解析にはDecyder TM BVAソフト (GEヘルスケアバイオサイエンス社)を用いANOVA解析を行った。質量分析に供する際には染色後に解析用のゲルに対してDecyderTM BVAソフトを用いてマッピングし、スポットピッカー (GEヘルスケア バイオサイエンス社、Ettan Spot Picker) でピッキングした。

・酵素 (トリプシン) 消化条件

1スポットに対し、0.1 μ gのトリプシン (プロメガ社) で酵素消化 (30 $^{\circ}$ C、一晩) した。

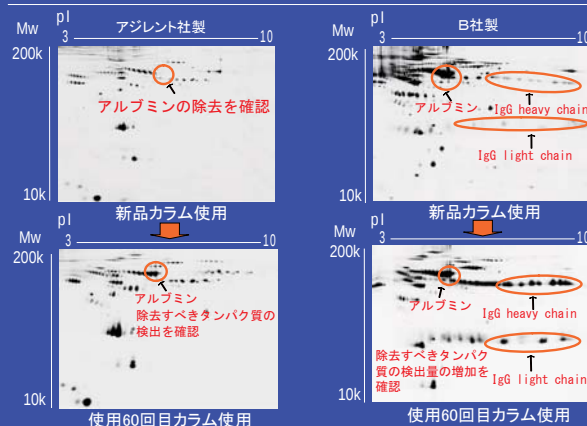
・LC条件

カラム : L column Micro (75 μ m ID $\times$ 15cm, 3 μ m, 100 $\text{\AA}$)
カラム温度 : 室温
移動相 : A液 95/5 水/アセトニトリル 0.1%蟻酸
B液 5/95 水/アセトニトリル 0.1%蟻酸
流速 : 2.5 μ L/min

・質量分析の条件

MS測定はMasslynxソフトウェア (マイクロマス社) のサーベイモードで行った。
キャピラリー電圧 3300 V
コーン電圧 45 V
Collision-induced dissociation (CID) ガス アルゴン
コリジョンエネルギー 25-35 eV

II. カラムの劣化が再現性に与える影響の検証



使用回数を重ねると除去すべきタンパク質が検出された

抗体カラムは共通して、使用回数を重ねることによるカラムの劣化の影響が見られる

III. カラムの劣化による検出量の変化

表1.検出量の変化したタンパク質の一例

検出量の減少したタンパク質	スポット容積の平均比	検出量の増加したタンパク質	スポット容積の平均比
Complement C3	-3.14	Fibrinogen β chain	3.75
Hemicentin-1	-2.19	Skeletal muscle preferentially expressed protein kinase	3.50
Ryanodine receptor2	-1.99	Gelsolin	2.29
Cytochrome b5	-1.54	Fibrinogen γ chain	1.58

同じ試料でもカラム劣化によって有意差が生じたように検出

カラム劣化の差による発現の違いとサンプル間の発現の違いを誤る可能性がある

使用履歴が異なるカラムを用いた相対比較と
使用履歴が近いカラムを用いた相対比較の結果の検証

表2.使用履歴が異なるカラム (新品と60回目)を用いてそれぞれ前処理をした同一試料間の2D-DIGE法による検出量の相対比較結果

全スポット数	検出量-1.5倍以下のスポット数		検出量1.5倍以上のスポット数	
	血漿	血清	血漿	血清
1730	445	320	180	105

表3.使用履歴が近いカラム (60回目と61回目)を用いてそれぞれ前処理をした同一試料間の2D-DIGE法による検出量の相対比較結果

全スポット数	検出量-1.5倍以下のスポット数		検出量1.5倍以上のスポット数	
	血漿	血清	血漿	血清
1730	55	61	24	37

検出量に有意差が生じたスポット数は使用履歴が直近のカラムを用いることで減少した

使用履歴が近いカラムを使用すれば、カラムの劣化が相対的な比較に与える影響を回避することができる

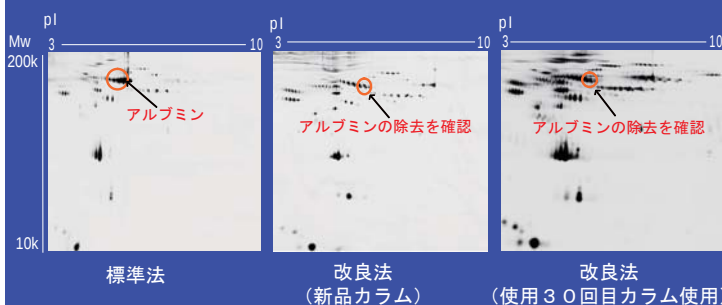
再現性は担保可能

まとめ

1. 素通り画分を再度カラムに通すことで、アルブミン、IgG等の大量に存在するタンパク質を2D-DIGE法の検出限界以下まで除去することができ、使用30回以上までその効果を確認することができた。安価で簡便な抗体スピンカラムの特長を活かしつつ、検出限界以下まで除去できるため、前処理として有効であることが分かった。

2. カラムの劣化が再現性に多大な影響を及ぼすことが確認でき、使用履歴の近いカラムを用いることで、劣化が相対的な比較に与える影響を回避可能であることが分かった。実験を行う際には、カラムの使用履歴を管理し、カラムの劣化状況を考えて使用する必要があることが分かった。

I. 標準法 (メーカープロトコール) と改良法の比較



標準法でサンプルの処理を行うと、2D-DIGE法を行うと、除去しきれなかったアルブミンのような血中に大量に存在するタンパク質がスポットとして検出されてしまう

素通り画分を再度カラムに通す改良法で前処理を行ったところ、検出限界以下まで除去することができた

改良法では30回以上で効果の持続を確認した