

# Chip-Based Infusion法によるユビキチン化タンパク質の網羅的解析

○山中秀徳、前田洋祐、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

タンパク質分解機構の異常が様々な疾患につながる事が知られており、中でもユビキチン化タンパク質の網羅的な解析は癌をはじめとする疾患マーカー探索のターゲットとして注目されている。そこで、我々はnanoLC-ESI-MS/MSを用いたショットガン解析と Chip-Based Infusion法の組み合わせによるユビキチン化タンパク質の網羅的解析を試みた。

ユビキチン化タンパク質の分画にはPolyubiquitin Affinity Beadsを用い、ラット肝のタンパク質抽出液からユビキチン化タンパク質のみを回収、濃縮した。濃縮したユビキチン化タンパク質は、トリプシンを用いて消化しペプチド混合物を得た。ユビキチンをトリプシン消化した際に生成するGly-Glyにスルホン酸タグを導入するとMS/MS時にタグに特徴的なパターンが得られることが報告されている<sup>1)</sup>。トリプシン消化物のショットガン解析による網羅的な解析と同時に、スルホン酸タグを導入したペプチドをChip-Based Infusion法で解析することによりショットガン解析で検出できない微量なユビキチン化タンパク質の同定およびユビキチン化部位の決定を試みた。

<sup>1)</sup> Wang, D. et al., *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3681-3687

## 実験

### ユビキチン化タンパク質の濃縮

ラット肝を10倍容の4 °Cに冷却した溶解バッファー (50 mM HEPES, pH7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl and 1% Triton® X-100) で ポリトロン型ホモジナイザーで固形状のものがなくなるまで氷上で処理した。続けて、超音波処理 (20秒間ON+30秒OFFのサイクルを3回繰り返す。) 後、8,000 g x 10分間遠心した上清をユビキチン化タンパク濃縮キット (Ubiquitinated Protein Enrichment Kit, calbiochem社, CA, USA) を使用したキットのプロトコールに従ってポリユビキチン化されたタンパク質を濃縮した。

### SDS-PAGE

電気泳動はMighty Small II SE250/260 (GEヘルスケア バイオサイエンス社, Buckinghamshire, UK) を使用し、泳動バッファー (50 mM Glycine, 6M Tris, 0.1%(w/v) SDS) を循環型冷却装置で20°Cに冷却しながら40 mA一定で、各10μlの試料をゲルにアプライして実施した。免疫ブロッティングは、SDS-PAGEゲルをニトロセルロース膜に転写した後に抗ユビキチン抗体 (Cat. No. 662099, Merck社) を使用して行った。

### 画像解析

Typhoon (GEヘルスケア バイオサイエンス社, Buckinghamshire, UK) を用いて以下の励起、蛍光波長でゲルイメージを取得した。

	励起波長	蛍光波長
Cy3	532nm	588nm
Cy5	633nm	670nm
Sypro® Ruby	480nm	620nm

取得したゲルイメージは、ImageQuant (GEヘルスケア

### 酵素 (トリプシン) 消化条件

分画後の血清蛋白質は、DTT溶液、ヨウダアセアミD溶液で還元処理後に、トリプシン (プロモダ社, WI, USA) で酵素消化 (30°C、一晩) した。

### スルホン酸タグの反応条件

トリプシン消化後のペプチド抽出液 (5 ml) に 5 ml の 4-Sulfothiophenyl isothiocyanate (SPITC) 溶液 (10 mg/mL, 20mM NaHCO<sub>3</sub>, pH9.0) を添加、55 °Cで30分間反応を実施した。1 μlの1%蟻酸溶液を添加して反応を終了させた。MS測定は、反応液を20倍希釈したものを使用した。

### 質量分析の条件

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  
 低コリジョンエネルギー: 20 eV  
 通常測定時のコリジョンエネルギー: 25–35 eV  
 MSスキャン時間: 20 s  
 MSMSスキャン時間: 20 s

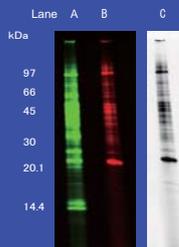
### nanoLC条件

カラム: L-column Micro (CERI, Tokyo, Japan) (75 μmID x 15 cm, 3 μm, 100 Å, S/N C0360521)  
 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 μl/min

### Chip based Infusion条件

ESI Chip: 5.5 μm x 28 μm (Lot A8C230FF)(Advion社, NY, USA)  
 電圧: 2.0 kV  
 ガス圧: 0.6 psi  
 サンプル量: 7.0 μL  
 Aspiration Delay: 1 s  
 Contact Closure Delay: 30 s

## II ポリユビキチン化タンパク質の濃縮



Polyubiquitin Affinity Beads を使用することによりラット肝タンパク質からポリユビキチン化されたタンパク質が濃縮されたことを抗ユビキチン抗体による免疫ブロッティングで確認した。

図-3. ポリユビキチン化タンパク質のSDS-PAGE  
 LaneA; ラット肝タンパク質 Whole Lysate  
 LaneB; アフィニティビーズで濃縮したポリユビキチン化タンパク質  
 LaneC; 抗ユビキチン抗体による免疫ブロッティング

## III ポリユビキチン化タンパク質のショットガン解析

Polyubiquitin Affinity Beads で濃縮したポリユビキチン化タンパク質の nanoLC-ESI-MS/MSによるショットガン解析から75種類のタンパク質が同定された。同定されたタンパク質の中で7タンパク質については、MS/MSデータの解析からユビキチン化部位が特定された。

表-1. ショットガン解析により同定されたポリユビキチン化タンパク質 (MASCOOTスコア上位30種を表示)

Protein ID	Protein Name	ユビキチン化部位
1	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
2	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
3	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
4	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
5	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
6	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
7	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
8	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
9	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
10	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
11	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
12	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
13	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
14	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
15	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
16	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
17	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
18	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
19	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
20	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
21	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
22	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
23	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
24	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
25	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
26	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
27	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
28	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
29	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
30	ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)

表-2. nanoLC-ESI-MS/MSデータの解析からユビキチン化部位が特定されたタンパク質とユビキチン化部位の一覧

Protein Name	ユビキチン化部位
DNA2 DNA replication helicase 2 like	K.LGSDVTGVQVI + 2 GlyGly (K)
ribosomal protein L7	K.LSSPRGDMK + GlyGly (K)
rC61769	K.LMSIHSLLPPPELQ + GlyGly (K)
scaven binding protein	K.LLSDSEPLF + GlyGly (K)
hypothetical protein isoform 3	R.LLNMRQLS + Oxidation (M); GlyGly (K)
immunoglobulin superfamily member 10	K.VYQRD + GlyGly (K)
protocadherin beta 18	K.LLDLDLQDETGRLLNDELV + GlyGly (K)

## IV ポリユビキチン化タンパク質のChip based infusion法による検出

ポリユビキチン化タンパク質をトリプシン消化した際に生成するGly-Gly (ジグリシジル基) にスルホン酸タグを導入した後に、Chip based infusion法でMS/MS解析を行うことによってショットガン解析で検出されなかったポリユビキチン化タンパク質 (dihydrofolate reductase: DHFR) が検出された。また、MS/MSデータの解析からユビキチン化部位が特定された。

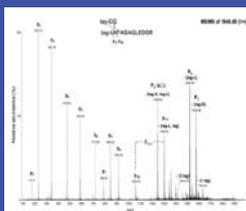
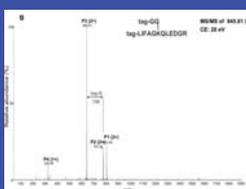


図-5. スルホン酸タグを導入したポリユビキチン化タンパク質の nanoLC-ESI-MS/MS解析のクロマトグラム



collision energy = 20 eVの条件でスルホン酸タグの脱離によるピークが確認された。

図-6. Chip-based infusion測定したMS/MSクロマトグラム

## I ESI chip based infusion法による高感度検出

### ESI Chip technology (Advion BioSciences, Inc.)

通常のナノスプレー (25μmID) の1/5の口径5.5μmIDのノズルからスプレーノズルは測定ごとに新品を使用することでキャリアオーバーフロー



### Tip to Chip Coupling

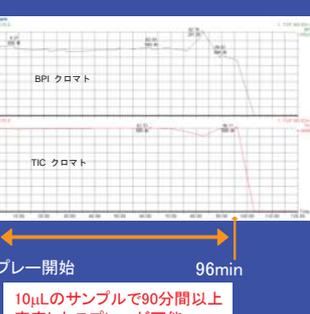
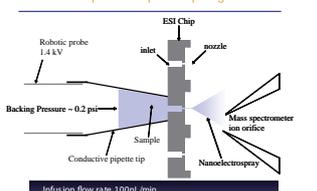


図-1. 10μlのサンプルをスプレーした際のBPIクロマト(上図)およびTICクロマト(下図)

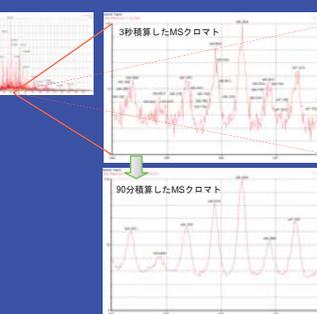


図-2. MS644-648部分を拡大したMSクロマト  
 上図: Survey Modeで通常実施している積算3sのMSクロマト  
 下図: 90min間のデータを積算したMSクロマト

## まとめ

1. Polyubiquitin Affinity Beads を使用することによりラット肝タンパク質から濃縮したポリユビキチン化タンパク質をショットガン解析することによって75種類のポリユビキチン化タンパク質が同定された。
2. 同定されたタンパク質の中で、7種のタンパク質についてはMS/MSデータの解析からユビキチン化部位が特定された。
3. Chip based infusion法により積算時間を延長することによって、ショットガン解析で検出されなかったポリユビキチン化タンパク質 (DFHR) を検出、同定することに成功した。