

〔シンポジウム 1 : ゲノミクス・プロテオミクスを中心に -omics への電気泳動法の応用〕

プロテオミクス

戸田年総

SUMMARY

Proteomics was started in a collaborative research of two groups of Humphery-Smith and Keith Williams in 1995. The proteomics played an initiative role in succeeding development of various “-omics” researches. And it should be pointed out that the two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis originally reported by O’Farrell in 1975 might be the origin of the proteomics. The two-dimensional gel electrophoresis demonstrated its excellent resolution in separation of proteins in crude extracts. However the 2-D gel method had yet several difficulties. The first problem was the lack in imaging analyzer for 2-D gels, and the second was the poorness in reproducibility. Those problems were later resolved by development in computer-aided image analyzers and improvement in the first-dimensional isoelectric focusing on an immobilized pH gradient.

Key words: proteomics, two-dimensional gel electrophoresis, isoelectric focusing, mass spectrometry.

はじめに

ヒトゲノム計画がいよいよ最終段階に入った 1995 年に、シドニー大学の Humphery-Smith らのグループとマッコーリー大学の Keith Williams らのグループの共同研究¹⁾の中で誕生し、その後のペプチドミクスやグライコミクスといったさまざまな -omics 研究の先駆けとなったプロテオミクスは、実はその原点が二次元電気泳動にあったということは意外に理解されていない。1975 年に O’Farrell²⁾によって発表された二次元電気泳動は、大腸菌の粗抽出液中の数千種のタンパク質を、驚くべき高解像度で分離して見せたことから、それまで様々な手法を組み合わせて苦勞をしてタンパク質を分離精製し分析していた生化学者の心を掴み、基礎生物学の分野にじわじわ浸透して行った。しかし、二次元電気泳動は分解能こそ高かったものの、まだ多くの課題を抱えており、これが普及を妨げた。

第一の課題は操作の煩雑性故の再現性の低さであり、第二の課題は、せっかく数千のスポットに分離できるにもかかわらず、定量的な解析を行うためのデンストメータがな

かったということであり、第三の課題は、変化するスポットを見つけてもタンパク質量が微量であるために同定ができないことが多いということであった。

その後これらの問題は、次々と解決されていくことになるが、最初に解決されたのは第二の課題であった。NIH の Lemkin と Lipkin³⁾, Argonne National Laboratory の Anderson ら⁴⁾は、それぞれ独自に、当時としては高性能のミニコンピュータ DEC PDP-11 を用いて二次元電気泳動画像解析用のソフトウェアを開発し、Cold Spring Harbor Laboratory の Garrell⁵⁾らが SUN のワークステーション上で利用できる高性能のソフトウェア QUEST を開発し、これが PDI 社から PDQuest という商品名で販売されるようになったことから、それまで二次元電気泳動後の解析に困っていた研究者から圧倒的な支持を受けることとなった。

次に解決されたのは再現性の課題であった。ドイツの Görg ら⁶⁾は、すでに Righetti ら⁷⁾によって開発されていた固定化 pH 勾配による等電点電気泳動法を 1 次元目に採用し、IPG-DALT 二次元電気泳動法を完成させ、二次元電気泳動法を「熟練が要らない簡単なタンパク質分離法」に変

Proteomics.

Tosifusa Toda; 東京都老人総合研究所

Correspondence address: Tosifusa Toda; Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi, Tokyo 173-0015, Japan.

略語一覧: 2-D, two-dimensional; PMF, peptide mass fingerprinting; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; 2D-DIGE, two-dimensional difference gel electrophoresis.

第 56 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

(受付 2006 年 3 月 19 日, 受理 2006 年 3 月 28 日, 刊行 2006 年 6 月 15 日)

えた。そして最後まで課題として残されていた、「高感度でハイスループットなタンパク質の同定」を実現させたのが、1995年に登場したプロテオミクス¹⁾であった。すなわち端的に言うならば、「二次元電気泳動と質量分析の出会い」である。しかしこの後、二次元 HPLC に基いたショットガンプロテオミクスや、プロテインチップによる SELDI 法などの登場によって、二次元電気泳動の座は一時危機に瀕するが、「定量的ディファレンシャル解析が容易である」ことや「翻訳後修飾の分析に適している」ことが評価され、特に「疾患プロテオミクス」の研究では、「二次元電気泳動に基づいたプロテオミクス」が依然として主流となっている。

このように、-omics の先駆けとなったプロテオミクスでは、二次元電気泳動が大きな役割を演じて来たが、今後もさらに高分解能で高感度、高速なタンパク質分離法の開発が望まれており、電気泳動の基礎研究者に寄せられる期待は大きい。

1. プロテオミクスの出発点となった O'Farrell の二次元電気泳動

O'Farrell の二次元電気泳動²⁾ が J Biol Chem (Fig. 1) に発表されたのは、Proteome という概念が初めて雑誌 ELECTROPHORESIS に紹介される 20 年も前のことである。それ以前から、電気泳動の分解能を上げるために 2 種類の異なる原理に基づく電気泳動を二次元的に組み合わせるといった試みは多くの研究者によって行われていたが、O'Farrell は放射性同位元素で大腸菌のタンパク質を標識し、1 次元目に円柱ゲルによる等電点電気泳動を 2 次元目に平板ゲルによる SDS 電気泳動を行う (Fig. 2) ことで、数千のタンパク質スポットが分離できることを初めて示した

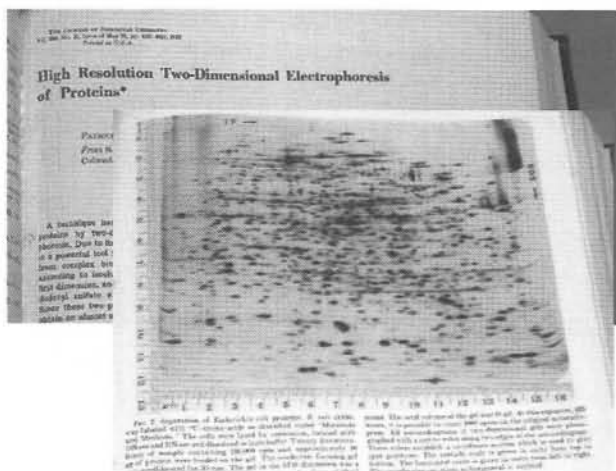


Fig. 1. The original paper of two-dimensional gel electrophoresis reported on the Journal of Biological Chemistry by O'Farrell in 1975.

This paper might be an actual initiation of the succeeding development of proteomics.

点が高く評価され、細胞の分化や癌化などによって変化するタンパク質を見つけ出そうという多くの研究者の支持を集めた。

しかし、当時の二次元電気泳動には多くの課題が残されていた。その第一の課題は、奇しくも二次元電気泳動の分解能の高さ故のものであった。あまりに多くのスポットに分離されパターンが複雑であるために、肉眼で客観的に 2 種類のサンプル間の違いを見つけ出すことが困難であったのである。この問題に取り組んだのは、NIH の Lemkin と Lipkin のグループ³⁾ や Argonne National Laboratory の Anderson らのグループ⁴⁾ であった。彼らは当時 DEC の PDP-11 などの比較的大掛かりなミニコンピュータシステムで行われていた天体観測画像解析技術や人工衛星でとらえられた地上映像の解析技術を二次元電気泳動画像の解析に応用した。その後 Garrels⁵⁾ が、当時普及し始めていた SUN Microsystems の卓上型ワークステーションで利用できるソフトを開発し、これが現在 Windows PC 版や Macintosh 版として広く利用されている PDQuest の原形となった。

2. 質量分析によるタンパク質の同定技術

第 2 の課題は、『二次元電気泳動で分離検出されたタンパク質は極めて微量であるために、ゲルから回収されたタンパク質を用いて直接タンパク質の同定を行うことは困難である』ということであった。当時のタンパク質の同定はア

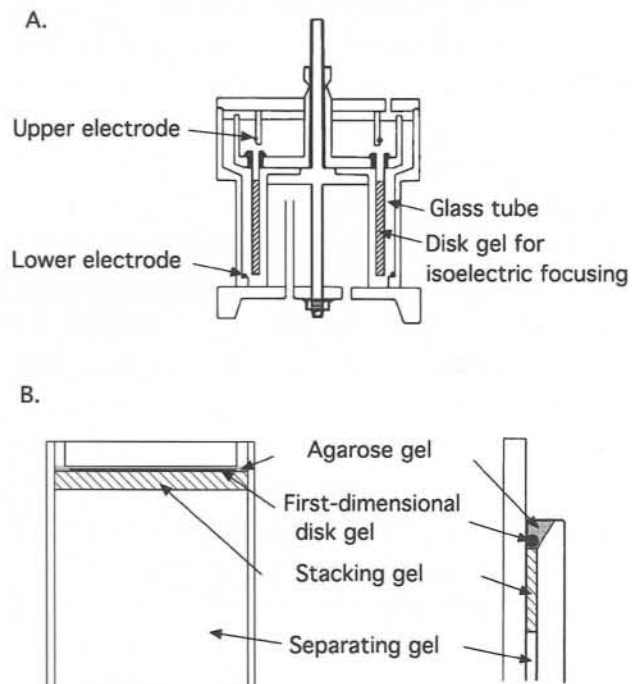


Fig. 2. Apparatus for two-dimensional gel electrophoresis in O'Farrell's method.

A: Apparatus for the first-dimensional isoelectric focusing performed using polyacrylamide gel column. B: Apparatus for the second-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

ミノ酸組成とN末端のアミノ酸配列を求め、これをもとにタンパク質の配列データベースを調べるといふものであったため、少なくとも数十ピコモル以上のタンパク質が必要であった。これに対するブレイクスルーを演出したのが、質量分析計を用いたタンパク質の同定法であった。タンパク質をゲル内でトリプシン消化し、MALDI-TOF型の質量分析計に掛けて、ペプチド質量スペクトル情報（ペプチドマスマフィンガープリント;PMF）を得、これをSWISS-Protなどのタンパク質データベースに投げ掛けて、高いスコアでヒットするタンパク質を探し出すといふものである（Fig. 3）。この方法が発表されるや否や、それまでシークエンサーでタンパク質を同定していた研究者達が、こぞって質量分析計を導入するといふ現象が起きた。

3. 二次元電気泳動技術の改良とあたらしい技術の開発

O'Farrell の二次元電気泳動では、再現性の高い分離パターンを得るために高いスキルが要求されたため、自動化が容易な新しい技術開発が行われた。その一つが、固定化pH勾配ゲルストリップを用いた等電点電気泳動法（Fig. 4）の開発である。これによってパターンの再現性や操作の簡便性が向上し、二次元電気泳動がだれでもどこでも安心して行える方法となった。

2つ目の技術は、異なるサンプル中のタンパク質をSy3やSy5などの蛍光色素であらかじめ標識し、両サンプルを混合して二次元電気泳動を実施、得られたパターンを二波長のスキャナーなどで読み取って比較分析を行おうといふものである（2D-DIGE法）。これによって、二次元電気泳動の再現性に自身のない初心者や検査技師などでも安心して

プロテオーム解析が行えるようになった。この方法は、2種類のサンプルの比較には非常に威力を発揮するが、老化研究や薬物の影響の研究などのように継時的な変化を追跡をする必要がある場合には、各サンプルを別々のゲルで泳動し、SYPRO Rubyなどの高感度蛍光試薬で染色してPDQuestなどで定量的に画像解析を行うというやり方がベストである。

4. 二次元電気泳動以外のタンパク質分離技術をもちいるプロテオミクスの登場

臨床サンプルのプロテオーム解析においては、いまだに二次元電気泳動の煩雑さを避けるために二次元電気泳動以外のタンパク質分離技術を用いてプロテオーム解析を行いたいという要望が高い。これに対して生まれてきた新しい方法の一つが、所謂ショットガン法である。この方法は、血

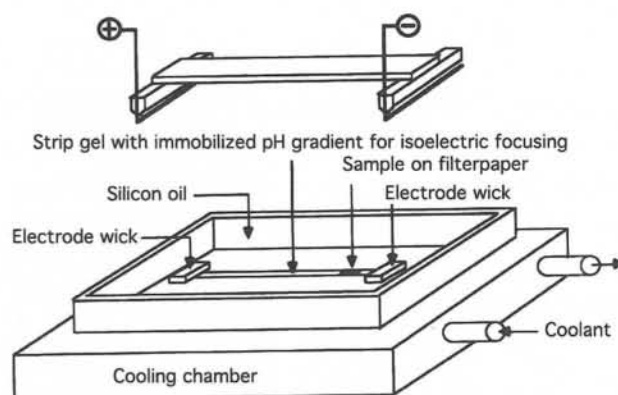


Fig. 4. Apparatus for isoelectric focusing on immobilized pH-gradient gel strips.

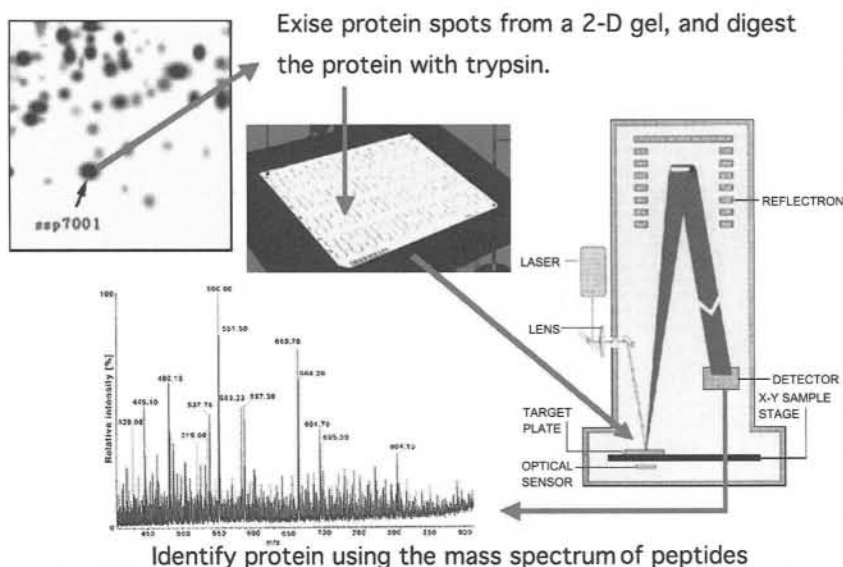


Fig. 3. A general procedure for protein identification by mass spectrometry, peptide mass fingerprinting (PMF).

Proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis are digested with trypsin in-gel. The peptide mass fingerprint is obtained by MALDI-TOF mass spectrometer.

清などのタンパク質混合液をいきなりトリプシンなどで消化し、ペプチド断片にした後で、二次元の HPLC に掛けて分離。ラインから出てくるペプチドを直接イオン化してオンラインで質量分析計に掛けて同定を行うというものである。自動化が容易であることから、大規模解析を行っている東京大学医科学研究所、産業技術総合研究所、東京医科大学などで利用され、大量のデータを生んでいる。しかしリン酸化や糖鎖修飾などの翻訳後修飾修飾のデータが得にくいことや、定量的なディファレンシャル解析困難であることなどから、いまだに二次元電気泳動が主役の座を譲っていない。

これとは別に、脱二次元電気泳動によるプロテオミクスの流れを作っているのは、キャピラリー電気移動と質量分析をオンラインで直結して行う方式のプロテオーム解析である。この方法はまだ実績が少ないが、今後の展開が期待される。

まとめ

このように、スタートの時点からプロテオーム解析に関わってきた電気泳動であるが、今後もタンパク質の解析には欠かせない技術として利用され続けるものと思われる。ゲノム解析において大腸菌で作らせた DNA の精製や塩基配列において大活躍をした電気泳動であるが、ポストゲノム時代にも主役の座を維持していくことは間違いない。

文献

- 1) Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995;16:1090-1094.
- 2) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-4021.
- 3) Lemkin PF, Lipkin LE. GELLAB: a computer system for 2D gel electrophoresis analysis I. Segmentation of spots and system preliminaries. *Comput Biomed Res* 1981; 14:272-297.
- 4) Anderson NL, Taylor J, Scandora AE, Coulter BP, Anderson NG. The TYCHO system for computer analysis of two-dimensional gel electrophoresis patterns. *Clin Chem* 1981;27:1807-1820.
- 5) Garrels JL. The QUEST system for quantitative analysis of two-dimensional gels. *J Biol Chem* 1989;264:5269-5282.
- 6) Görg A, Postel W, Baumer M, Weiss W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, with immobilized pH gradients in the first dimension, of barley seed proteins: discrimination of cultivars with different malting grades. *Electrophoresis* 1992;13:192-203.
- 7) Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 1982;6:317-339.