

〔特集：最新の電気泳動技術〕

Cy3/Cy5 マレイミド蛍光標識二次元電気泳動法によるタンパク質内 フリーチオールレベルの比較定量解析

戸田 年総

横浜市立大学先端医科学研究センター

Relative quantitation of protein free thiol level using Cy3/Cy5 maleimide type
saturation dyes in 2-DE.

Tosifusa Toda

E-mail: ttoda@yokohama-cu.ac.jp

(受付 2014 年 6 月 16 日, 受理 2014 年 6 月 23 日)

はじめに

タンパク質の多くは mRNA から翻訳されたままの状態
で機能しているわけではなく、リン酸化や糖鎖の結合な
ど様々な翻訳後修飾を受けることによって本来の機能を
獲得し、また、機能の調節が行われている。そのため翻
訳後修飾が正常に行われないと細胞機能に影響が現れ
る。他方、生体内で発生する酸化ストレスによってもタン
パク質は非生理的、非酵素的に修飾を受け、老化や
様々な疾患の発症要因となっている。

タンパク質の酸化的修飾は、色々なアミノ酸残基に生
じることが知られているが、特にシステイン残基のチオール
基(SH 基、スルフヒドリル基とも呼ばれる)は酸化を受
けやすく、分子内や分子間でジスルフィド結合を形成す
る(図1)。このうち、分子内での架橋形成はタンパク質の
立体構造を安定化し、本来の機能を維持する役割を果
たす場合が多いのに対し、グルタチオンやシステインな
どの低分子チオールとの結合は機能を阻害するケース
が多く、例えば Ca^{2+} /カルモジュリン依存性タンパク質
キナーゼ I の活性中心にあるシステイン残基が s-グルタ
チオニル化を受けると失活することが知られている¹⁾。ま
た、疾患との関係では、アルツハイマー病患者脳脊髄液
中のトランスサイレチン(TTR)においてシステインの架橋
性酸化修飾レベルが高値を示すことが報告されており²⁾、
 $\text{A}\beta$ の蓄積との関連も示唆されている。そこで、新たに
Cy3/Cy5 マレイミド蛍光標識二次元電気泳動法によるタ
ンパク質内フリーチオールレベルの比較定量解析を考
案し、脳脊髄液中の TTR の分析に応用した結果、有用

性が確認できたので、その方法について紹介する。

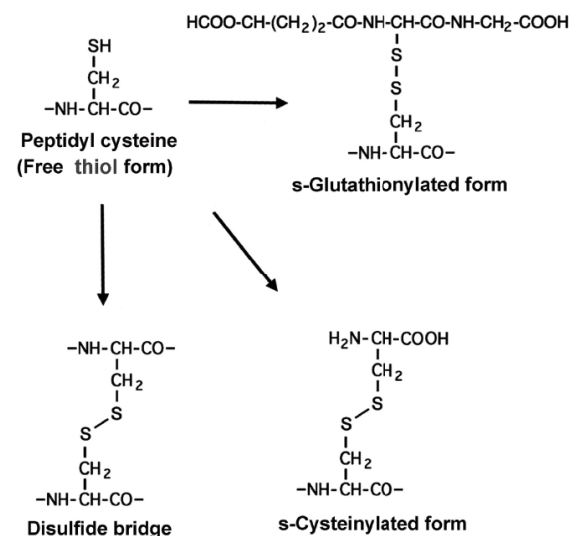


図1 タンパク質内システインチオール基の酸化反応
による各種ジスルフィド結合の形成。

方 法

(1) Cy3/Cy5 マレイミド蛍光試薬を用いたタンパク質内 フリーチオールおよびジスルフィドの二段階標識

個々のタンパク質中に含まれるシステイン残基のフリー
チオール基とタンパク質分子内あるいは分子間でのジ
スルフィド結合を形成しているものを個別に定量するた
めに、励起波長と蛍光波長がそれぞれ異なる2種類のマ

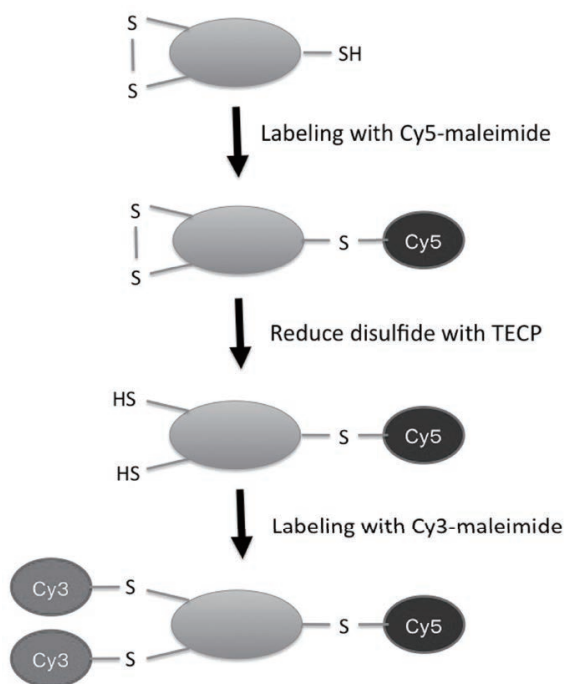


図2 Cy3/Cy5 マレイミド試薬を用いたタンパク質内フリーチオールおよびジスルフィドの2段階標識.

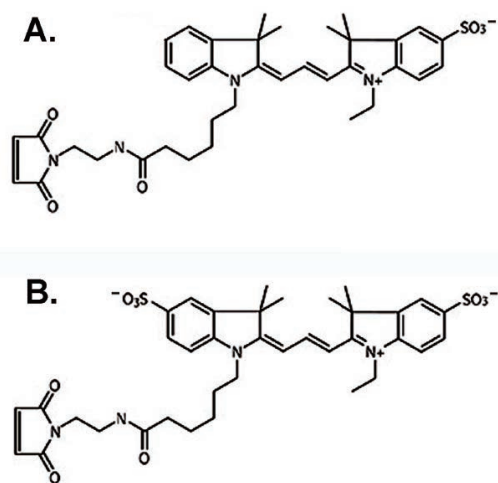


図3 市販の Cy3 マレイミド試薬の化学構造. (A) CyDye DIGE Fluor Labeling kit for Scarce Samples 中の Cy3 Saturation Labeling Dye の構造. (B) 単品で販売されている Cy3 Maleimide Mono-reactive Dye の構造.

レイミド型 Cy3 色素 (GE Healthcare の CyDye DIGE Fluor Labeling kit for Scarce Samples) を用いて, 2段階で標識を行った (図2). なおこの操作では, Cy5 マレイミドによるフリーチオールの標識後に未反応の試薬をシステインの添加によって不活化し, さらにアセトン沈殿法によってタンパク質を回収した. これに対して TECP によるジスルフィド結合部位の還元および Cy3 マレイミドによる標識を行

っている.

GE Healthcare には, 今回使用したDIGE用のマレイミド型蛍光標識試薬キット 25-8009-83 (saturation labeling用) のほか, 主に抗体などの蛍光標識に使用されている Cy3 and Cy5 Maleimide Mono-reactive Dye という製品もあるが, 色素に結合した硫酸基の数が異なり, 標識によってタンパク質の等電点が酸性側にシフトするので, 本法には適さない (図3).

脳脊髄液中のタンパク質の分析

東京都養育院附属病院 (現東京都健康長寿医療センター) において病理解剖時に採取された認知症患者の脳脊髄液検体の一部 (倫理委員会承認) に対し, 本法にてタンパク質内フリーチオールレベルの比較定量解析を実施した (図4).

二次元電気泳動後に, レーザー励起蛍光スキャナー (Bio-Rad の Molecular Imager FX) を用いて Cy5 蛍光画像と Cy3 蛍光画像を読み取り, PDQuest を用いてスポットの検出, 蛍光強度の解析を行った.

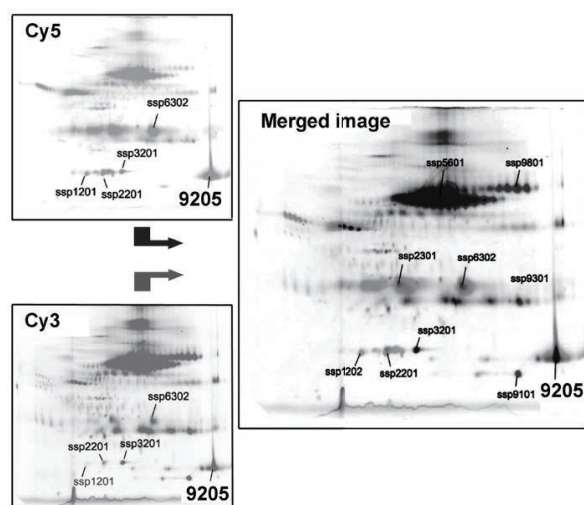


図4 Cy5標識フリーチオールおよびCy3標識ジスルフィドの蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動解析.

内部標準タンパク質スポットとの比較によるタンパク質内フリーチオールレベルの相対定量

蛍光標識による画像解析においてタンパク質スポットの絶対定量を行うことは原理的に不可能である. これを回避するため, 二次元電気泳動を行う試料に内部標準として Cy5/Cy3 (1:9) 標識リゾチームを添加し, このスポット (図4の ssp9205) の蛍光強度積算値をもとに, 各スポットの値を相対的に定量し, その数値から下記の計算式

[1] によってタンパク質内フリーチオールレベルを求めることとした. 実際にこの方法で脳脊髄液中のタンパク質の分析を行った結果の一部を 表 1 に示す.

$$c = a / (a \times 0.01 + b \times 0.09) \dots\dots\dots [1]$$

- a: 内部標準タンパク質スポット(ssp9205)の蛍光強度積算値を 1,000 とする Cy3 標識スポットの相対定量値
- b: 内部標準タンパク質スポット(ssp9205) の蛍光強度積算値を 1,000 とする Cy3 標識スポットの相対定量値
- c: 各スポットのタンパク質内フリーチオールレベル (%)

表1. 内部標準タンパク質スポットとの比較によるタンパク質内フリーチオールレベルの相対定量値

Spot number	a	b	c [%]
1202	123.7	30	31.42
2201	335.4	95.9	27.98
2301	415.4	147.9	23.78
3201	350.5	277.7	12.30
5601	1,145.9	1,633	7.23
6301	99.7	342	3.14
6302	1,199.4	317.6	29.56
6601	299.4	883.7	3.63
6602	513.8	1,216.6	4.48
9101	14.1	328.9	0.47
9205	1,000	1,000	10.00

結 語

Cy3/Cy5 マレイミド蛍光標識二次元電気泳動法によるタンパク質内フリーチオールレベルの比較定量解析は, 様々な疾患病態の背景となる生体内のレドックス状態をタンパク質の酸化レベルを通じてモニタリングする方法として有効であると考えられる. 本法で分析を行った認知症患者の脳脊髄液中のタンパク質では, 特定のタンパク質スポットにおいて, フリーのチオールレベルが低値を示すことがわかり, 今後さらに認知症との関係性を調べる上で基準となるデータが得られた. ただし, システインのフリーチオールは非常に酸化を受けやすいので, 生体内での酸化還元レベルを正確に測定するためには試料の長期保存を避けるなどの注意が必要である.

また, 今回紹介した二次元電気泳動法に基づく方法の他には, 同様にマレイミド型標識試薬によってフリーのチオール基を安定同位体標識後にトリプシン消化を行い,

質量分析によって定量する方法もあるが, 二次元電気泳動法は, タンパク質ごとの酸化還元状態の全体像プロファイリングする目的に適しており, 酸化ストレスとの関わりが疑われる疾患の病態解析に有用であるものと思われる.

文 献

- 1) Kambe T, Song T, Takata T, et al. Inactivation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. FEBS Lett. 2010;584(11):2478-2484.
- 2) Poulsen K, Bahl JM, Simonsen AH, et al. Distinct transthyretin oxidation isoform profile in spinal fluid from patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Clin Proteomics. 2014; 11(1):12.