

技術習得報告書

提出日 24年 6月 15日



申請者	氏名	安藤 亮
	所属・職	生物化学分野 大学院生
出張期間	2012年 6月 7日 ～ 月 日	
出張先	エービーサイエックス東京本社	
出張目的	技術習得、情報収集	
研究課題名	リン酸化タンパク質解析の技術習得	

技術解説・プロトコル・得られた成果など

はじめに

現在私は、「液性免疫応答における転写因子Bach2のリン酸化修飾機構の解明」をテーマに学位取得に向けて研究を行っている。本研究はB細胞におけるシグナル経路とBach2のリン酸化機構の関係を解明し、その生理的意義を明らかにすることを目的としている。

本研究を進めるには、Bach2のリン酸化を特異的リン酸化抗体などを用いて定量的に検出することが必要であるが、マウスB細胞におけるBach2のリン酸化部位は不明であり、使用可能なリン酸化抗体も存在しない。最近、質量分析により、タンパク質のリン酸化部位の同定や多くのシグナル因子のリン酸化状態を網羅的に評価することが可能となり、多くの研究に使用されている。我々の研究グループでも質量分析を用いて、タンパク質複合体の解析を行い報告しているが、リン酸化修飾に関しても質量分析による解析は非常に有用である。

今回私は、GCOE プログラムの国内出張支援を受け、エービーサイエックス社主催のリン酸化タンパク質解析ワークショップに技術習得、情報収集を主目的として参加してきたので報告する。

ショットガンリン酸化プロテオミクスの実用的展開

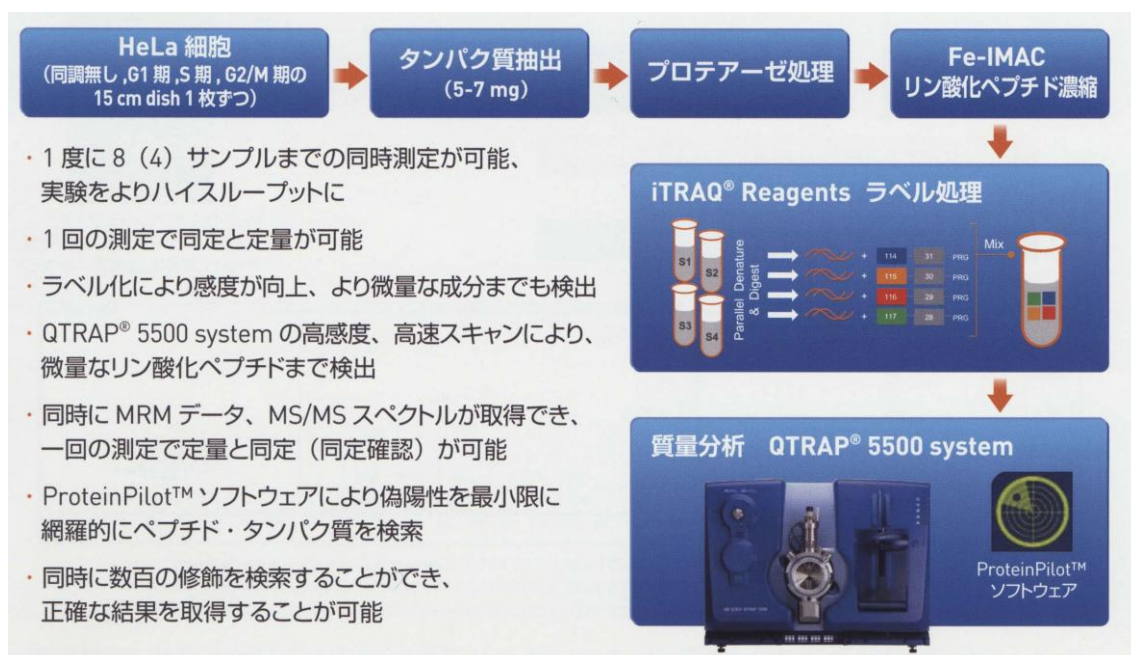
ショットガンリン酸化プロテオミクスとは組織や細胞から抽出したタンパク質から、リン酸化ペプチドを濃縮して、質量分析器で解析することでリン酸化タンパク質を定量的に解析し、どのようなシグナル経路が変化しているかを解析する手法である。たとえば、この手法を用いて、正常組織と腫瘍組織を比較することで腫瘍化に重要なシグナルを同定することができる。

しかし、この手法は様々な手法による前分画やリン酸化ペプチドの濃縮という複数の手技を要するため難易度が高く、個人の技量の差が大きくなってしまったり実験間でのばらつきが問題となされている。これを演者らはLC-MSの効率を上昇させることで前分画を行わずに、リン酸化ペプチドを濃縮する条件を検討し、より安定して濃縮できる条件を設定した。こうして、手技の難易度を下げ個人の技量によらず安定した結果のでるシステムを開発した。これにより、より少ないサンプルでリン酸化ペプチドの解析が可能になり、FFPE(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded)スライドなどのサンプルでもリン酸化プロテオーム解析が可能となり、様々な疾患の病因の解明に有用となる可能性がある。

ターゲットが決まったリン酸化タンパク質の分析方法および定量解析

質量分析にて特定のリン酸化タンパク質を解析する際にはターゲットのタンパク質を精製して、消化し、得られたペプチドを LC-MS/MS で解析する。分離精製方法としてアフィニティークロマトグラフィや免疫沈降、プルダウンアッセイ、SDS-PAGE などが組み合わせて用いられる。精製したタンパク質はトリプシンなどでペプチドへ消化するが、トリプシン消化では検出されずらい場合にはリシルエンドペプチダーゼや V8 プロテアーゼ、キモトリプシンなどをあわせて用いる。

またリン酸化ペプチドの定量解析には SILAC などのメタボリックラベリングや iTRAQ, Dimethyl label などのタグラベリングによる相対定量が有用である。



成果

今回のワークショップに参加することで、質量分析を用いて Bach2 のリン酸化を解析する際に有用な情報を得ることができた。iTRAQ などのタグラベリングを用いた定量的なリン酸化の解析やショットガンリン酸化プロテオミクスなどを行い、B 細胞の分化や生存に関与するシグナルと Bach2 の関係の解明を進めていきたい。今回学んだ質量分析によるリン酸化解析の手法は多くのタンパク質の解析に有用であり、今後さまざまな分野の研究に生かすことができる。

- ※ 出張後 10 日以内に報告書を提出してください。HP に掲載することがあります。
- ※ 技術解説・プロトコルに焦点をあてたものを記載してください。
- ※ 可能であれば写真も添付してください。
- ※ 用紙が不足する場合は、適宜加えてください。