

SELDI プロテインチップ®システムによる新しいタンパク質解析技術

サイファージェン・バイオシステムズ株式会社

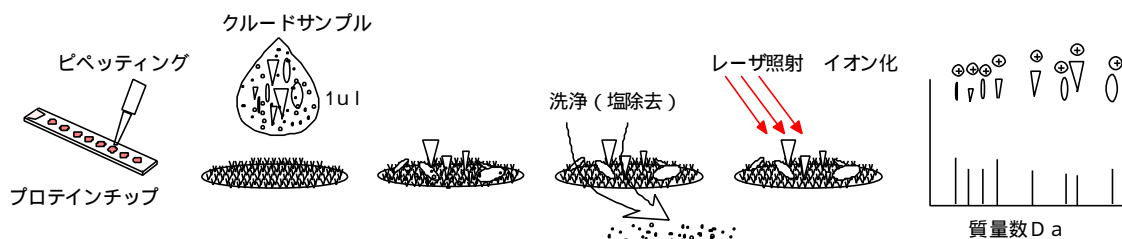
1. はじめに

疾患の原因や疾患に特有なバイオマーカーを検索するためには細胞の機能を担うタンパク質レベルでの発現解析が必須となっています。また、生体内ではタンパク質が他のタンパク質や低分子、DNA などの相互作用を通して機能を果たしており、創薬の観点からはこのようなタンパク質の相互作用自体が主な研究の対象となって来ています。さらに、ゲノムプロジェクトの成果により、多くの遺伝子が同定されてきており、タンパク質レベルでの遺伝子発現の解析や相互作用の実験をよりハイスループットに行う必要が生じてきています。

2. プロテインチップの原理

1) リテンテイトクロマトグラフィー

従来の質量分析ではHPLCやゲル電気泳動等の手法で目的物質を高度に精製しなければなりません。サイファージェンでは金属表面に様々な化学修飾を施した2次元チップを開発して、チップ上に目的物質をトラップしたまま塩などの不純物を水やバッファーで簡便に且つ短時間で洗浄除去するというプロセスを開発しました。



HPLCでは測定したい物を順番にカラムの中で分離し、カラムから溶出させて検出しますが、ここでは発想が逆で、測りたい物をチップ上に修飾した官能基との親和性を利用してチップ上に捕捉・保持(リテン)し、余計な物を洗浄除去してしまいます。捕捉された目的物質は飛行時間型質量分析計(TOF-MS)で解析します。2次元チップ上に均一に分散化して捕捉されている分子はパルスレーザーにより効率的にイオン化されるために再現性よく検知することが出来るのです。これを「リテンテイトクロマトグラフィー」と名付けています。この手法により血清や培養液等のクルードなサンプルに含まれる低分子、ペプチドやタンパク質などの目的物質の質量分析計による解析が簡便になりました。

実際には1つのチップで全ての分子を捕捉することは出来ません。そこで疎水性チップ、イオン交換性チップ、金属イオンアフィニティーチップ等の数種類のチップを用いてそれぞれに同じサンプルを添加し、チップ毎に発現解析を行います。

The ProteinChip® System
CIPHERGEN

Derivatized Surfaces

Surfaces by Chemistry:

- (Reverse Phase)
- (Cation Exchange)
- (Anion Exchange)
- (Metal Ion)
- (Normal Phase)

Surfaces by Biology:

- (PS-1 or PS-2)
- (Antibody - Antigen)
- (Receptor - Ligand)
- (DNA - Protein)

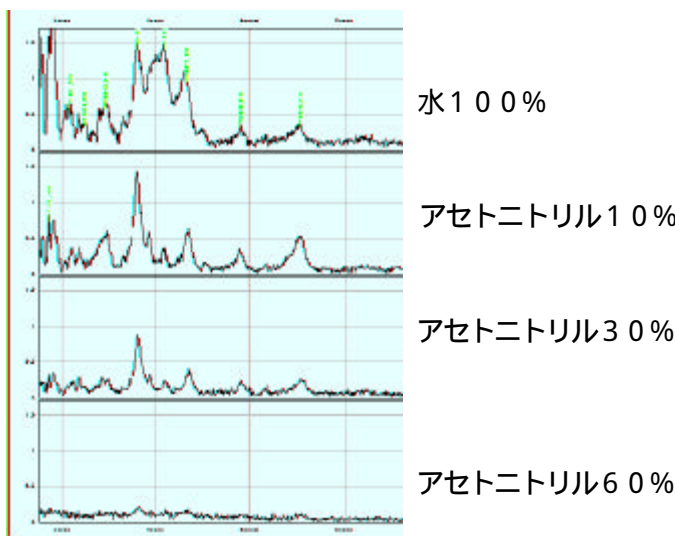
2) SELDI

SELDIはSurface Enhanced Laser Desorption/Ionizationの略で、チップ上に捕捉した目的物質を効率よくイオン化する手法のことです。従来のMALDI(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)とは区別して使う場合があります。質量分析では測定する物質を如何に効率よくイオン化するかが最も重要な問題で、そのために目的物質の精製度を上げて不純物を取り除く必要がありました。従来のMALDI法では、サンプル中に塩や溶媒が若干でも残っているとサンプルのイオン化が著しく妨げられ、イオンピークを見ることが出来ませんでした。また、サンプルはエネルギー吸収分子(マトリックス)という媒体によって分散化、結晶化する必要がありますがサンプルプレートの中で結晶は点在化するので顕微鏡カメラとジョイスティックを使って結晶の位置をあちこち探してレーザーを当てる作業が必要でした。これらの作業は非常に熟練を要するために、バイオリジストが簡単に使いこなせる機械というイメージはありませんでした。

SELDIでは化学修飾されたアフィニティチップによりほぼ均一に目的物質が捕捉されていますからMALDIのように結晶化した場所をあちこち探す必要もありません。質量分析計の未経験者でも数日のトレーニングで簡単にデータを得ることが出来ます。

3) 洗浄条件

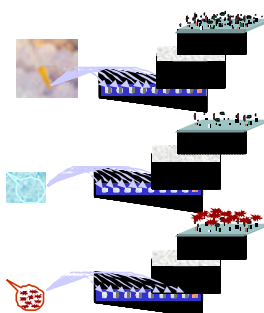
チップの洗浄条件の選定は大変重要な課題です。どのようなバッファーを使い、どのような手順で行うかによって、チップ上に残る物質は大きく変化します。得られる結果は大きく変わります。下の例はHeLa細胞の破碎液を疎水性チップに加え、洗浄液のアセトニトリル濃度を変えたときのスペクトラムを比較した物です。



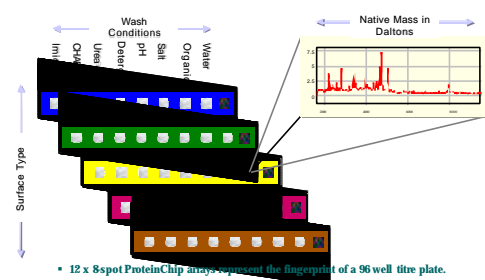
サイファージェンではこうしたアプリケーション毎に必要なプロトコルを準備しています。

ProteinChip Technology: Chip Preparation

1. Apply Crude Sample
Proteins within the sample bind to chemical or biological "docking sites" on the ProteinChip surface through an affinity interaction.
2. Wash ProteinChip
Proteins that bind non-specifically or buffer contaminants are washed away, eliminating sample "noise".
3. Add Energy Absorbing Material
After sample processing the chip is dried and EAM is applied to each spot to facilitate desorption and ionization in the ProteinChip Reader.

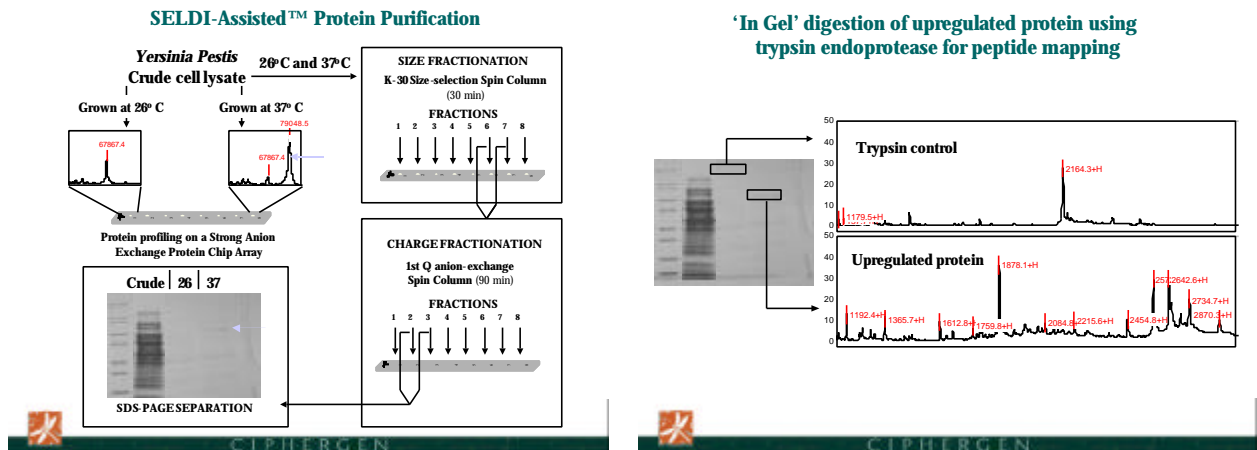


Protein Profiling: three dimensions of separation



4) サンプル前処理

細胞の破碎液の様に成分の数が多い場合、予めスピカラムやイオン交換カラムで分子量やPI毎に分画してチップに掛けると、さらに分解能が上がります。また、アルブミンが大過剰に存在する血清などは、チバクロン等の吸着剤で予め除去すると少ない成分のピークがさらに感度良く解析することが出来ます。HPLCは必須ではありませんが、卓上型遠心機とスピカラムによる精製は手間も簡単で便利な手法です。分子サイズによる分画(3K、30K、70K)及びアニオン交換樹脂をパックしたスピカラムがサイファージェンから用意されています。



4) 精製

前項で説明したスピカラムは、目的ピークの同定のための行う精製で重要な役割を果たします。サイズエクスクルーションスピカラムとアニオン交換カラムで目的ピークを精製、それをSDS-PAGEに掛け、目的バンドをゲルから切り出し、これをトリプシンなどの酵素でゲル内消化します。この消化物を疎水性チップ上で精製すると消化された断片がトラップされ、不純物が除かれるので消化物のピークを効率よくイオン化する事が出来ます。それぞれの断片の質量数をProfoundというデータベースで検索すると目的物質の同定を行うことが出来ます。

アプリケーション

1) マーカー探索

プロテインチップ上では再現性良くイオン化されますから、サンプル間でどれか1個だけ量が変わればそのピークだけ高さが変わります。つまり異なるサンプル間の発現の比較が出来るわけです。病人と健康人の比較からその疾病に関連するタンパク質を探索することが可能です。マーカー探索の研究が既に各地で始まっています。

薬物で処理したラットの肝臓組織や尿から毒性をマーカーを探索する事例もG l a x oから報告されています。

5) 相互作用

抗体をチップに固定化して抗原を検出するアプリケーションも開発されています。ANTI-ANT4 抗体を固定化し、培養細胞が発現するベータアミロイドを解析した論文がSt. George 病院から出ています。

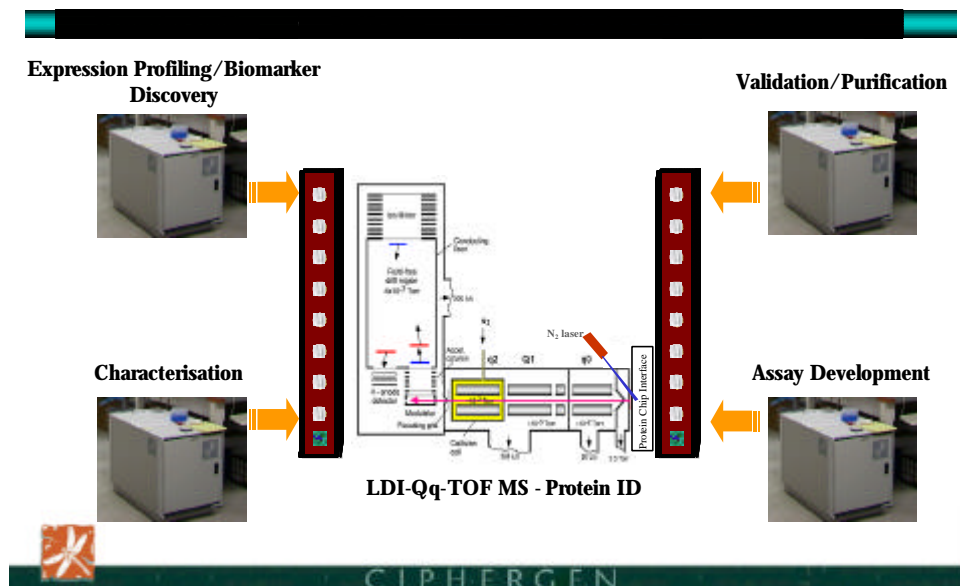
3) アミノ酸配列解析

発現したタンパク質のアミノ酸配列解析はトリプシン消化物のデータベース検索により同定を行って

います。ペプチドマッピングによる手法ではデータベースに存在しない新規タンパク質は調べることが出来ません。その場合は従来のエドマン法でアミノ酸配列を得るか、又は最近MS/MSとプロテインチップを組み合わせた新しいシステムが開発され、チップで精製された3000Da以下のペプチドから遺伝子を同定するプロセスが使われ始めています。

このLDI-MS/MSはサイファージェンが現在世界各地で建設を進めているバイオマーカー探索センターに順次導入され、PBS-IIIユーザーの皆様への委託解析サービスにも供される計画があります。

ProteinChip Technologies in Proteomics: A Single Platform for Rapid Biomarker Discovery, Validation and Characterisation



鎌倉研究所

サイファージェンでは鎌倉市にラボを開設し、プロテインチップシステムの基礎データの作成・アプリケーション開発を行っています。また、システムの見学、デモ実験・共同研究についてもご相談に応じております。

連絡先：

サイファージェン・バイオシステムズ株式会社
本社
〒101-0054
東京都千代田区神田錦町3-6 共同ビル2F
担当 唐沢毅
電話 03-5283-6511
ファクス 03-5283-6513
email karasawa@ciphergen.co.jp

鎌倉研究所
〒247-0063
鎌倉市梶原200
有國 尚・斎藤賢治
電話 0467-42-1401
ファクス 0467-42-1686
karakura_lab@ciphergen.co.jp