

SYPRO[®] Ruby を用いたタンパク質染色法の 湯浴加熱による迅速・高感度化

尼子 克己

仁愛大学人間生活学部

Increased Speed and Performance of Protein Staining with SYPRO[®] Ruby Protein Gel Stain using Hot Water Incubation

Katsumi AMAKO

Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life, Jin-Ai University

The author presents a novel rapid, low-cost staining protocol (hot water protocol) for proteins in a polyacrylamide gel using the fluorescent dye SYPRO[®] Ruby. Compared to the supplier-recommended protocol, the hot water protocol showed equivalent dynamic range and linearity, and a lower detection limit. Peptides prepared with in-gel digestion extracted from polyacrylamide gels stained using the hot water protocol showed a sequence coverage ratio equivalent to that obtained using the supplier-recommended protocol, and de novo sequencing could also be carried out without issue. In addition, use of the hot water protocol dramatically decreased speckling noises owing to prolonged staining time or storage of the dye solution. These results demonstrate the superiority of the hot water protocol over the supplier-recommended protocol.

キーワード：蛍光染色，プロテオミクス，湯浴

Science Citation Index 創刊 50 周年を記念して、過去の論文の被引用回数ベスト 100 が Nature 誌に発表された (Van Noorden et al. 2014) が、その 1 位はフェノール法によるタンパク質の検出法 (Lowry et al. 1951)、2 位は SDS-PAGE 法を開発しそれを用いてバクテリオファージ T4 の頭部タンパク質の構造を解析したもの (Laemmli 1970)、3 位はクマシーブリリアントブルー (CBB) によるタンパク質の検出法に関する論文 (Bradford 1976) であり、タンパク質研究が近年の科学の進展に極めて重要な役割を果たしてきたことがわかる。

ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) におけるタンパク質の検出は、タンパク質の分析において重要な最初のステップである。SYPRO[®] Ruby によるタンパク質の蛍光染色法は、従来の銀染色や CBB 染色に比べて検出の感度・

ダイナミックレンジが高く、近年二次元電気泳動法と組み合わせてタンパク質の網羅的解析に頻用される。この手法は、検出されたタンパク質の量的変動を網羅的に把握できるだけでなく、質量分析を組み合わせることによってさらに有用な解析手段となる。すなわち、検出されたスポットを切り出し、トリプシンなどで消化されたペプチドを質量分析し、それと一致するタンパク質をゲノム・プロテオミクスデータベース内で検索することにより、タンパク質の同定が極めてハイスループットで行われる (Yoshino et al. 2004)。エドマン分解法はかつてタンパク質一次構造解析のデファクトスタンダードであったが、質量分析に比べると同定に何百倍も多量の精製タンパク質が必要であり、アミノ末端に修飾があると分析が不能である、タンパク質の同定にはさらに何らかのスクリーニングが必要である (これは当時の他の技術やデータの蓄積状況といっ

た要因にも左右されるが) など, 様々な制約がある. 現在の質量分析計では, 蛍光染色の検出限界付近程度のタンパク質であっても測定は可能であり, むしろ毛髪ケラチンなど, 従来は顧みられることの殆どなかった実験者からのコンタミネーションをいかに排除するかが微量分析の巧拙を左右するようになってきている(夏目 2004).

ただし蛍光染色法に難点がないわけではない. 検出に高価な蛍光像撮影装置が必要であること, 試薬自体も高価であること, 染色に時間がかかることなどがその一例である. 染色時間に関しては, 90 分程度に時間を短縮したプロトコールも示されているが, 標準方法として推奨されているのは終夜放置であり, また長時間の染色に伴って, speckling とよばれる非特異的な斑点像が生じる. そこで本研究では, これらの難点を解消する手段として, ゲルを染色液とともにハイブリバッグに入れ, 湯浴加熱するプロトコールを考案し, 検証を行った.

材料と方法

試料と電気泳動 分析用試料として, 電気泳動用タンパク質分子量マーカーⅢ (第一化学) を用いた. 蒸留水で段階的に希釈した分子量マーカーに, 当量 (v/v) の 2xSDS- ローディングバッファーを加えたあと, 沸騰水浴中で 5 分間処理し, 常温に戻したあと分析に供した. SDS- ポリアクリルアミド電気泳動は Laemmli (1970) の方法を用いた. 12% (w/v) ポリアクリルアミドのミニゲル (90 × 83 × 1 mm) を常法により自作し, 試料をアプライした後, 20 mA の定電流モードで 1 時間通電した.

染色法 湯浴加熱法による染色のフローチャートを図 1 に示す. ①電気泳動後のゲルを 10% メタノール / 7% 酢酸で試料を 60 分間振とうして固定を行った. ②固定後のゲルを蒸留水で軽くすすぎ, ろ紙などで端の水滴を取り除いた後, ハイブリバッグ (コスモ・バイオ) 内に 8 mL の SYPRO[®] Ruby (Molecular Probes) と共に入れ, ヒートシーラーで密封した. ③つぎにゲルを入れたハイブリバッグを 85°C で 5 分間湯浴加熱した. ④ゲルを再び取り出した後 10% メタノール / 7% 酢酸で 30 分間, 溶液を交換してさら

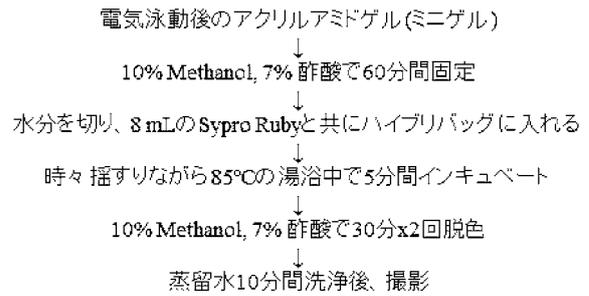


図1 湯浴加熱法のフローチャート

に 30 分間 (計 1 時間) 脱色した. 一方, これとは別に対照として同一の試料を電気泳動したゲルを, SYPRO[®] Ruby に添付の取扱説明書の記載に従い染色したものを調製した (従来法). 従来法は, ① 50% メタノール, 7% 酢酸で 30 分 × 2 回固定し, ② 正常なプラスチック容器などに移したあと, ③ 60 mL の SYPRO[®] Ruby で終夜染色し, ④ 10% メタノール, 7% 酢酸で 30 分脱色するものである.

SYPRO[®] Ruby は適宜フィルターろ過を行った後に使用した. 蛍光染色像の撮影は, FluoroPhore-Star3000 (アナテック) で撮影し, Windows 7 上で Java によるフリーソフトウェアである ImageJ で定量化した.

ゲル内消化法と質量分析 ゲルからのタンパク質の抽出はゲル内消化法を用い, ペプチドマスフィンガープリンティング法で正しいタンパク質同定ができるかどうかを検証した. 方法は Shevchenko et al. (1994) に基づいて行った. それぞれの染色法で検出した SDS-PAGE 上のタンパク質を含むゲルを, 鋭利なナイフで切り出し, 1 ~ 2 mm 角に刻んでマイクロチューブ 131-415C (Watson) に入れた. これに 100 mL の 30% アセトニトリル (ACN), 100 mL の 25 mM 重炭酸アンモニウムを加え, 室温でチュプレミキサー TWIN3-28N (イワキ) を用いて最高速度で 10 分間振とう後, 溶液を取り除いた. これを 4 ~ 5 回繰り返した. 次に 100 mL のアセトニトリルを加えて 5 分間振とうし, ゲルが白濁したのを確認後, ACN を取り除き, SpeedVac SPD-1010 (Thermo Scientific) で 30 分間減圧乾燥させた. 続いて 100 mL の 10 mM ジチオスレイトール, 25 mM 重炭酸アンモニウムを吸い込ませ, 56°C で一時間振とうして

チオールを還元した。室温に戻し、溶液を取り除いた後、100 mLの55 mM ヨードアセトアミド、25 mM 重炭酸アンモニウムを加え、暗所で45分間振とうすることでアルキル化した。さらにゲルを、100 mLの25 mM 重炭酸アンモニウムで洗浄後、200 mLの50% ACN、25 mM 重炭酸アンモニウムで再び脱水し、SpeedVacで乾燥させた。これに50 mM 重炭酸アンモニウムに溶解させた2 mg/mLの修飾トリプシン Sequencing Grade modified Trypsin (プロメガ)を加え、ゲルに吸い込まれなかった溶液を取り除いた後30°Cで一晩放置し、タンパク質を加水分解した。これに50 mLの50% ACN、5%トリフルオロ酢酸(TFA)を加えて30分間振とうし、溶出したペプチド溶液を新しいマイクロチューブに移した。再度50 mLの50% ACN、5% TFAを加えて得た抽出液をこれと併せ、トリプシン消化したペプチド溶液とした。トリプシン消化したペプチド溶液は、SpeedVacで10 μ L以下にまで濃縮後、TFAを0.1 ~ 0.5%になるように加え、ZipTip C₁₈ (Millipore)に吸着させ、5 mg/mL α -シアノ-4-ヒドロキシシケイ皮酸(CHCA)を含む1 μ Lの50% ACN、0.1% TFAで溶出させた。

この試料を、Ultraflex MALDI TOF-TOF (Bruker Daltonics)を用いて質量分析を行った。ZipTip溶出液をMALDIプレートの上に滴下し、室温で5分間放置してCHCAを結晶化させた後、MALDI-TOFモード、およびTOF-TOFモードでそれぞれ測定した。MALDI-TOFモードでの質量プロファイルはペプチドマスフィンガープリンティングで、TOF-TOFモードでの質量プロファイルはde novo シークエンスで、いずれもMascotデータベース(Koenig et al.2008)に照会し、試料タンパク質の同定を行った。

結果と考察

湯浴加熱法で染色したときのタンパク質の染色特性

種々のタンパク質量で分子量マーカーを試料としてSDS-PAGEを行ったときのSYPRO® Ruby染色について、湯浴加熱法を行った。分子量マーカーに含まれるタンパク質のうち、Bovine serum albumin(分子量66.3 kDa)、Carbonic anhydrase(分子量31.0 kDa)、およびTrypsin inhibitor(分子量21.5

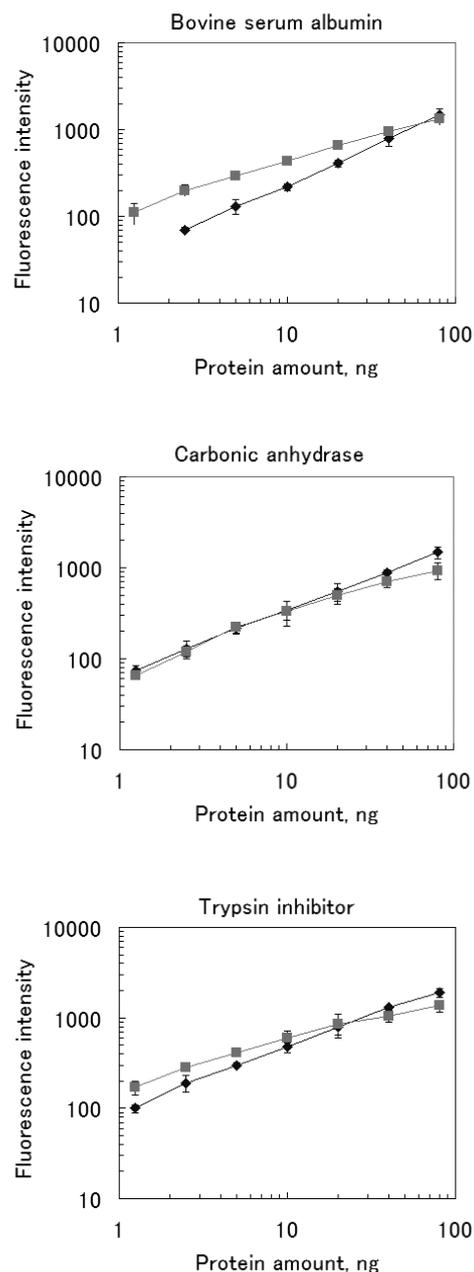


図2 湯浴加熱法(■)と従来法(◆)によるタンパク質量と蛍光染色強度との関係

kDa)について蛍光イメージャによる蛍光強度とタンパク質量との関係を検討したところ、両対数グラフ上でいずれも高い直線性とダイナミックレンジを示した(図2)。湯浴加熱法は従来法と比較すると濃度変化に対する勾配が小さかった。またその傾向はBovine serum albuminで大きく、分子量の小さいCarbonic anhydraseやTrypsin inhibitorでは小さかった。さらに検出限界量は、従来法が1.3(Lysozyme) ~ 4.2

(Aldolase) ng/lane と、タンパク質の種類によって3倍程度の開きが見られたのに対し、湯浴加熱法では1.3 ~ 1.7 ng/lane とほぼ一定の値を示し、全体的に従来法よりも低い値を示した(表)。現在の SYPRO® Ruby の販売元である Thermo Fisher Scientific が示す検出限界は 0.25 ng である (<https://www.thermo-fisher.com/jp/ja/home/life-science/protein-biology/protein-gel-electrophoresis/protein-gel-staining-imaging/fluorescent-protein-gel-stains.html>) が、1D ゲルでの電気泳動ではタンパク質がスポットではなくバンドで検出されるため、今回の実験結果は蛍光試薬の性能を損なうことなく染色が行われたと判断できる。また、SYPRO® Ruby の染色原理の詳細は明らかにされていないが、染色時の温度を上げることによって、試薬自体がポリアクリルアミドゲルに浸透する効率が増す、あるいは試薬とタンパク質の間で起こる相互作用の制約要因が、温度を上げることによって軽減されたことが考えられる。

湯浴加熱法で染色したタンパク質の質量分析への適用

近年の質量分析技術の向上は、一般的なタンパク質染色法における検出限界に届かないほど微量のタンパク質から、それを同定することを可能にした。質量分析によるタンパク質同定は主に、ペプチドマスフィンガープリンティングと de novo シークエンスによって行われる。ペプチドマスフィンガープリンティングは、タンパク質をトリプシンやリジルエンドペプチダーゼなどの基質特異性の高い endo 型消化酵素によって加水分解したときに生じるペプチドの質量プロファイルが、それぞれのタンパク質に固有の値をとることを同定の基盤としている。また de novo シークエンスは、endo 型消化酵素によって生じた特定の m/z

表 湯浴加熱法によるタンパク質の検出限界 (n=3) 人数 (%)

	従来法	湯浴加熱法
Phosphorylase B	2.5 ± 0.0	1.3 ± 0.0
Bovine serum albumin	2.1 ± 0.7	1.7 ± 0.7
Aldolase	4.2 ± 1.4	1.7 ± 0.7
Carbonic anhydrase	2.5 ± 0.0	1.7 ± 0.7
Trypsin inhibitor	1.7 ± 0.7	1.3 ± 0.0
Lysozyme	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.0

を持つペプチドを選択的に通過させたあと、衝突性解離を起こさせることでランダムにペプチド結合を切断し (MS/MS)、得られるピークリスト同士の m/z 差を読み取ることでペプチドのアミノ酸配列を明らかにする。したがって、酸化や非特異的分解といった修飾が染色操作中にランダムに生じると、タンパク質の同定精度が大幅に低下する。そこで、湯浴加熱染色の条件がタンパク質の同定精度に影響をあたえるかどうかを、試料を実際に質量分析に供することによって検証した。

湯浴加熱法で染色したゲルから切り出してゲル内消化法により得た Bovine serum albumin の Trypsin 分解産物は、ペプチドマスフィンガープリンティングにおいて配列全体の 26.6% のペプチドを検出することができた (図 3 A)。これは従来法で染色したゲルから抽出した Trypsin 分解産物の結果 (22.9%) よりもむしろ高かった。Carbonic anhydrase に対して行ったシークエンスカバー率は湯浴加熱法、従来法ともに 40.5% であった (データ示さず)。シークエンスカバー率が Carbonic anhydrase の方が高いのは、分子量マーカーに含まれるそれぞれのタンパク質が質量ベースで揃えられており、その結果分子質量の小さいものほど物質質量が多いためだと考えられる。

試料タンパク質として Bovine serum albumin を用いたときの、MS/MS スペクトラムのひとつを図 3 B に示す。第 1 段階の MS で得られた m/z=1567.72 のペプチドイオンについて、更に衝突性解離を行わせたところ、そのピークリストから y 系列として L-G-S-F-L-Y- (y3) -Y- (y1) -R というアミノ酸配列が読み取られた (y3, y1 は 1 つに特定できないアミノ酸)。これは NCBI Protein Database にある Bovine serum albumin のアミノ酸配列 (Accession No. CAA76847) 中の L-G-S-F-L-Y-E-Y-S-R と一致し、また Mascot によるデータベースサーチでもトップヒットした。第 1 段階で得られた他の m/z を示すペプチドにおいても同様にして良好な de novo シークエンスの結果が得られ (データ示さず)、これらことから湯浴加熱法によって染色されたタンパク質は従来法と遜色のない状態にあり、その後の質量分析に供せられることが示された。

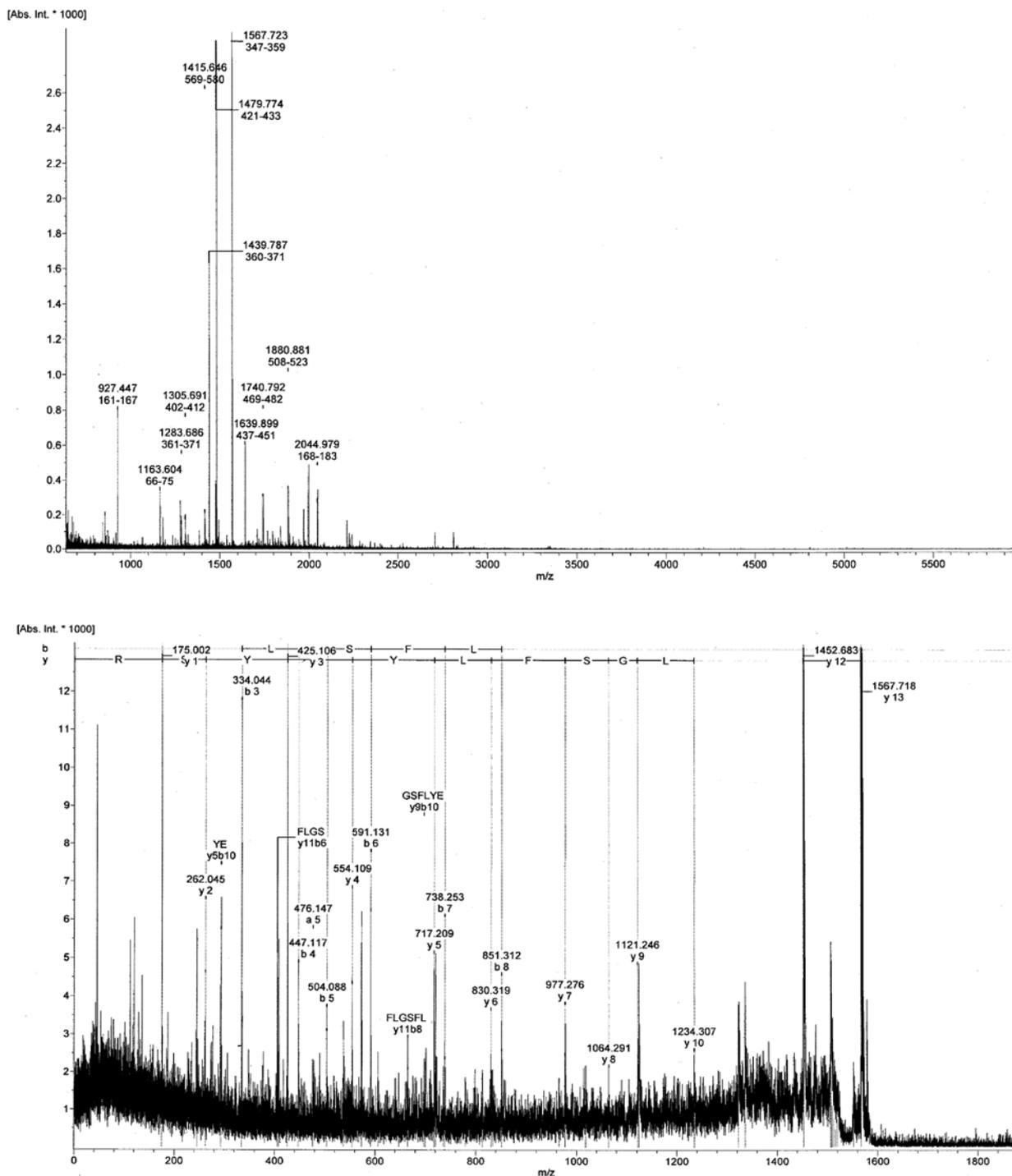


図3 湯浴加熱法により染色された Bovine serum albumin タンパク質ゲル内消化産物のペプチドマスフィンガープリンティングプロファイル (A) および、 $m/z=1567.72$ を示すペプチドの MS/MS スペクトラム (B)

湯浴加熱染色は Speckling ノイズを劇的に軽減させる Speckling ノイズ（斑点状の非タンパク質性の染色像）が湯浴加熱法においてどの程度生じるかを検討した（図4）。SDS-PAGE を行った後のゲルを、室温で1年間保存していた SYPRO® Ruby 染色液を用

いて従来法で染色を行ったところ、1D 泳動像では原理的に出現するはずのない斑点状の染色像が見られ、これらは speckling ノイズと考えられる。一方、温浴加熱法で染色を行った場合は、このようなノイズはほぼ完全に抑えられていた。SYPRO® Ruby の取扱説明

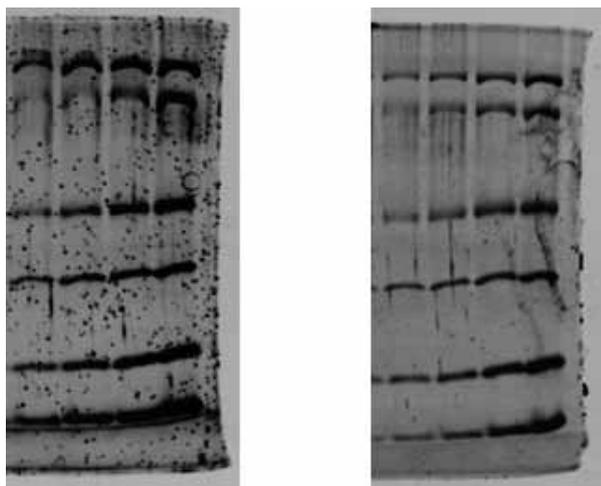


図4 従来法（左）および湯浴加熱法（右）による，長期間保存した SYPRO[®] Ruby 染色液を用いた染色結果。

書には，長時間の染色はタンパク質の定量性を損なうことは少ないものの，非特異的な speckling ノイズを増加させる傾向にある，と記されている。また購入直後の染色液では殆ど speckling ノイズは発生せず，長期間保存で増加すること，染色液を予めフィルターを通すことによってノイズを低減できることを筆者は経験的に確かめていた。このため，保存中に生じる不溶性沈殿が speckling ノイズの原因であることが予想されるが，それが加熱によって再溶解したものと考えられる。

以上のことから，湯浴加熱法による SYPRO[®] Ruby 染色は，染色品質やその後の質量分析の結果を損なうことなく，操作時間の短縮を図ることが可能であることが示された。加えて，1枚のゲルに必要な染色液の量も 10 mL 以下と極めて微量で済むこと，特別な装置を必要としないことから，特に実験のランニングコストにおいて低廉化が可能になることも本法の優れた点であるといえる。

謝辞

質量分析とタンパク質同定に関して，ご協力とアドバイスを頂いた岡山大学農学部の村田芳行教授，岡山大学資源植物科学研究所の森泉准教授に御礼申し上げます。

引用文献

Van Noorden, R., Maher, B. and Nuzzo, R. The top 100 pa-

pers -Nature explores the most-cited research of all time. (2014) *Nature* **514**: 550-3.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**: 265-75.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) *Nature* **227**: 680-5.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (1976) *Anal. Biochem.* **72**: 248-54.

Yoshino, K., Ohshiro, N., Tokunaga, C. and Yonezawa, K. Mass spectrometry-based protein identification by correlation with sequence database. (2004) *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **52**: 106-29.

夏目徹 完全長ヒトcDNAを用いた大規模タンパク質ネットワーク解析 (2004) *蛋白質核酸酵素* **49**: 2222-9.

Shevchenko, a., Jensen, O.N., Podtelejnikov, a.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, a., Boucherie, H., and Mann, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14440-5.

Koenig, T., Menze, B.H., Kirchner, M., Monigatti, F., Parker, K.C., Patterson, T., Steen, J.J., Hamprecht, F.A., and Steen, H. Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. (2008) *J Proteome Res.* **7**: 3708-17.

SUMMARY

SYPRO[®] Ruby によるタンパク質電気泳動を行ったゲルの，廉価で迅速な新しい染色法（湯浴加熱法）を考案した。従来法に比べ，湯浴加熱法はタンパク質量に対して遜色のない直線性，ダイナミックレンジを示し，検出限界はむしろ従来法より低かった。湯浴加熱法で染色したポリアクリルアミドゲルより抽出したタンパク質消化ペプチドの質量分析スペクトラムは，従来法で染色したものと同等のシークエンスカバー率を示し，また de novo シークエンスも問題なく行うことができた。加えて，湯浴加熱法では従来法で問題となる speckling ノイズがほとんど抑えられており，本法の優位性が示された。