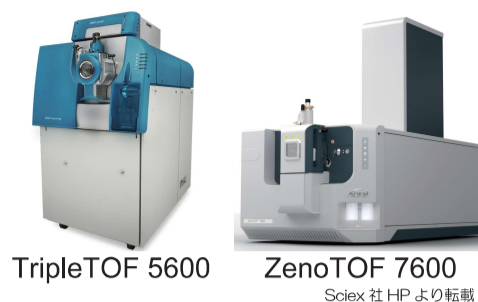


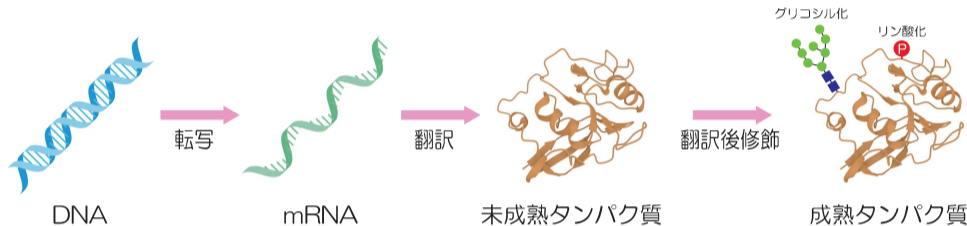
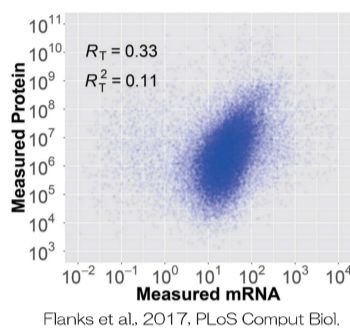
土本 純 (分子医科学研究所, 高度研究機器部門アドバイザー)
内線: 12089, mail: jtsuchi@aichi-med-u.ac.jp

令和3年度, 本学に設置されている高分解能質量分析装置 TripleTOF 5600 が, 最新型の ZenoTOF 7600 へと更新されます。ZenoTOF 7600 では分解能, 検出感度, 定性・定量能力が大幅に向上しており, 本学の基礎・臨床研究の大きな推進力になると考えております。本ポスターで紹介する質量分析装置を用いたプロテオーム解析技術をご活用いただき, ZenoTOF 7600 が研究発展の一助となれば幸いです。



「プロテオミクス」の重要性

近年, 次世代シーケンサーの発展によって mRNA を網羅的に分析するトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) が多くの研究で利用され, 大きな成果を挙げています。一方で mRNA の存在量とそこから翻訳されて生じるタンパク質の存在量には, あまり相関が無いこともわかってきました。細胞種間で翻訳効率に差があり, さらに翻訳後修飾のパターンによって成熟タンパク質の安定性が変化します。その結果, 個々の細胞におけるタンパク質の存在量幅は 10^6 以上とされています。そのため, 機能実態であるタンパク質を直接分析するプロテオーム解析の重要性が高まっています。



プロテオーム解析と RNA-Seq との比較

【メリット】

- 解析対象がタンパク質のため, RNA に比べて取り扱いが容易です。
- 過去のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを利用できるため, これまでに蓄積されてきた病理標本を活用できます。
- 翻訳後修飾の解析ができます。

【デメリット】

- 不溶性のタンパク質は分析できません。
- 網羅性は RNA-Seq に劣ります。
- プロテオームのシングルセル解析はまだ発展途上です。

プロテオーム解析とウェスタンブロッティングとの比較

【メリット】

- 標的タンパク質に対する抗体が不要です。
- 微量サンプルでも解析できます。
1回の分析に必要なタンパク質量は, プロテオーム解析では $0.5 \sim 1 \mu\text{g}$, ウェスタンブロッティングでは $10 \sim 20 \mu\text{g}$ です。
- 1回の分析で培養細胞由来のサンプルの場合, $4000 \sim 6000$ 種類程度のタンパク質を定量できます。血漿由来サンプルの場合, $100 \sim 500$ 種類程度です。

【デメリット】

- サイトカインなどの存在量の少ないタンパク質の検出は困難です。ウェスタンブロッティングでは良い抗体があれば検出できます。

意外と簡単!? サンプル調製

現在, プロテオミクス用サンプル調製プロトコルが数多く開発されていますが, その中でも特に信頼性が高いといわれている方法は, 相間移動溶解剤 (Phase Transfer Surfactant, PTS) を用いた方法, いわゆる PTS 法です (Masuda and Ishihama, 2016, Proteome Letters)。PTS 法は特別な手技を必要としません。定量されたタンパク質試料に対し, プロトコル通りに試薬を加え, 簡単な操作をするだけです。ウェスタンブロッティングなどの操作に慣れている方であれば, 問題なく行えます。

一度試してみたいけれど, いろいろな試薬を買いそろえることは難しいという方には, iST kit (PreOmics 社, 国内販売代理店キコーテック) をおすすめしています。

【サンプル調製を行う上での注意点】

- 使用する試薬は全て質量分析グレードのものを使用してください。
- サンプル調製の際はマスクや手袋を着用し, フィルター付きチップを使用するなどしてサンプルの汚染に注意してください。クリーンベンチ内で操作を行えば安心です。
- 界面活性剤が含まれたサンプルは, 質量分析装置の検出感度低下の原因となります。タンパク質抽出の際に界面活性剤を使用した時は, アセトン沈殿を行い界面活性剤を除去してください。
- ヒト検体や動物組織からタンパク質を抽出した場合も, アセトン沈殿を行い, 不純物を除去してください。
- サンプル調製の際に困ったことがあれば, 各自の判断で進めずにご連絡ください。

質量分析装置は非常にデリケートな機械です。修理に2週間以上かかることもあります。すべての利用者が円滑に使用できるようご協力ください。

プロテオミクス活用事例

1. 臨床プロテオミクス (ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックの活用)

- Multi-level Proteomics Identifies CT45 as a Chemosensitivity Mediator and Immunotherapy Target in Ovarian Cancer
Coscia et al., 2018, Cell
- Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts
Eckert et al., 2019, Nature



2. 臨床プロテオミクス (血漿サンプルの活用)

- High-resolution serum proteome trajectories in COVID-19 reveal patient-specific seroconversion
Geyer et al., 2021, EMBO Molecular Medicine
- Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers
Hoshino et al., 2020, Cell



3. 絶対定量プロテオミクス

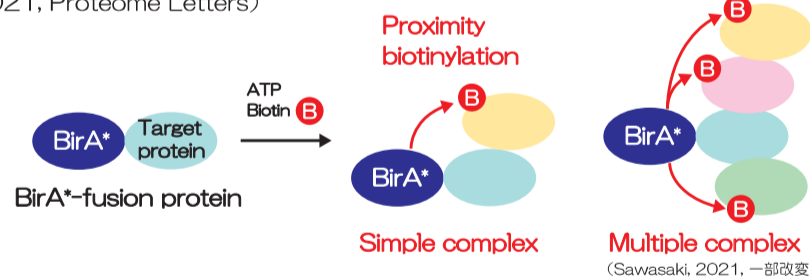
- Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders
Johmura et al., 2021, Science
- A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome
Matsumoto et al., 2017, Nature Methods



近年注目のインタラクトーム解析: Proximity Labeling Proteomics

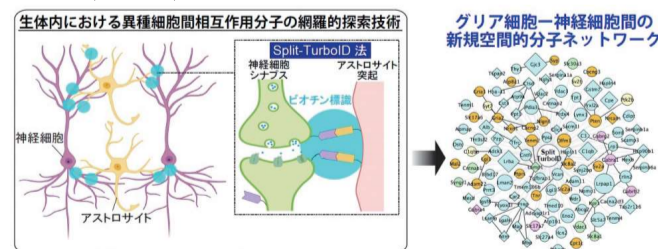
質量分析装置を用いたインタラクトーム解析といえば, 共免疫沈降法 (Co-IP) を利用した IP-MS (AP-MS) が主流でした。しかし, 最近では大腸菌ピオチンリガーゼ酵素 BirA を変異させた BirA* を用いる BioID 法とその改良法が注目を集めています。

BioID 法は, 標的タンパク質と BirA* の融合タンパク質を細胞内で発現させ, ピオチンを添加することによって, その融合タンパク質の近傍 10nm 程度に存在するタンパク質のリジン残基をピオチン化するという方法です。ピオチン化されたタンパク質を抽出し, 質量分析装置で分析することによって, 標的タンパク質が相互作用するタンパク質を網羅的に検出することができます。愛媛大学プロテオサイエンスセンター・澤崎先生の論文に詳細が記載されておりますので, 参考にしてください。(Sawasaki, 2021, Proteome Letters)

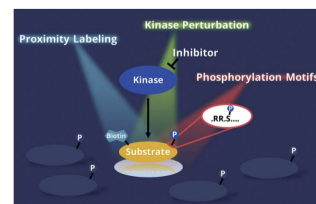


応用例

- Chemico-genetic discovery of astrocytic control of inhibition in vivo
Takano et al., 2020, Nature



- Identification of Endogenous Kinase Substrates by Proximity Labeling Combined with Kinase Perturbation and Phosphorylation Motifs
Niinae et al., 2021, Molecular & Cellular Proteomics



プロテオーム解析にご興味をお持ちいただけましたら, 一度ご連絡ください。サンプル調製やデータ解析についてなど, 一緒に勉強していければと思っております。土本 純 (分子医科学研究所, 内線: 12089, mail: jtsuchi@aichi-med-u.ac.jp)



Flanks et al., 2017



Masuda and Ishihama, 2016



Sawasaki, 2021



ZenoTOF 7600



iST-kit