

P-4 蛍光標識内部標準を用いた補正による Pro-Q Diamond 染色リン酸化タンパク質 二次元電気泳動スポットの比較定量解析手法の開発

◎井野洋子¹⁾、木之下節夫²⁾、平野 久¹⁾、戸田年総¹⁾

1) 横浜市立大学 先端医科学研究センター、2) プロメディコ株式会社

【背景と目的】Pro-Q Diamond 染色によるリン酸化タンパク質の解析では、検出後に Sypro Ruby で二重染色する方法が一般的に行われている。しかし蛍光波長の重複が大きいため、Sypro Ruby 染色後のゲルで、リン酸化タンパク質と全タンパク質を検出し分けることはできない。本研究では、1枚のゲル上でリン酸化タンパク質と全タンパク質を検出し分けるためにあらかじめ蛍光標識したサンプルを泳動し、Pro-Q Diamond 染色後にそれぞれの波長で検出する手法の開発を目指した。また、共通の内部標準を用いることで、サンプル間でのリン酸化タンパク質比較定量解析をさらに高精度化することを目指した。【方法】①サンプル標識用蛍光試薬の検討: Pro-Q Diamond とは波長の異なる Cy2 と Cy5 で標識したタンパク質を電気泳動後 Pro-Q Diamond 染色し、各波長で検出し分けることができるか検討した。②共通内部標準の有効性評価: 内部標準を用いたスポットマッチングに優れたプロメディコ社の画像解析ソフトを使用。全タンパク質量とスポット位置の補正用内部標準(内部標準 1)として細胞抽出タンパク質の混合

物を、リン酸化タンパク質定量補正用内部標準(内部標準 2)として α -casein を用いて実際に解析が可能であるか検討した。【結果】①Cy2 の蛍光波長は Pro-Q Diamond 染色の蛍光波長とは重複しないが励起波長との重複が大きく、染色後の検出はできないことが確認されたため、サンプルは Cy5 で標識することとした。②解析は2つの電気泳動操作の結果を統合することで行った。操作 1 で得られた全タンパク質量と位置の補正情報は操作 2 に反映。操作 2 では Pro-Q Diamond により検出されたリン酸化タンパク質量を α -casein のスポット強度により補正した。

標識	泳動操作 1	泳動操作 2
Cy3	内部標準 1	(Pro-O Diamond)
Cy5	サンプル	サンプル
Cy2		内部標準 2

この解析手法により、異なるサンプル間で同じ内部標準による補正を行うことが可能となり、ミニゲル上で約 2000 スポットの比較解析を行うことができた。さらに、この手法により前立腺癌細胞の解析を行い、その結果をショットガン解析による結果と比較したので報告する。