

# ヒト血清および 血漿からのタンパク質の除去 – 高濃度タンパク質を除去する 高性能アフィニティカラム

## アプリケーション

### プロテオミクス

## 著者

Peter Mrozinski, Nina Zolotarjova, and Haiying Chen  
Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808  
USA

## 要旨

血清と血漿プロテオームは、試料回収の容易さと表現型の複雑性により、生物学研究に適したサンプルです。この複雑性の理由の1つとして、タンパク質濃度のダイナミックレンジが広いことが挙げられます。これらのサンプルの研究は、疾患診断、治療モニタリング、新薬開発などに役立つ新しいタンパク質マーカーの発見につながるものと大いに期待されています。しかし、血漿プロテオームの著しい複雑性は、プロテオーム解析におけるサンプル前処理手法という点で、分析上の大きな課題となっています。本研究では、新たなカラムを用いて、ヒトの生体サンプルから14種類の高濃度タンパク質を選択的に除去した結果を示します。

## はじめに

血清、血漿、その他の生理液に存在する高濃度タンパク質の除去は、一般に認められた日常的な手法になっています。高濃度タンパク質は、質量分析や電気泳動分析のダイナミックレンジを制限するため、重要な低濃度タンパク質の同定や特性解析の妨げとなります。ヒトの血清や血漿には、106種類を超えるタンパク質が存在すると考えられています。加えて、全タンパク質の総質量の約99%を、上位30種類の高濃度タンパク質が占めています。

本研究では、新しいカラムを用いて、血清および血漿から14種類の高濃度タンパク質を選択的に除去した結果を示します。これら14種類の高濃度タンパク質を除去すれば、血漿中のタンパク質の総質量の約94%を除去したことになります。使用したタンパク質除去カラムは、業界標準のHuman 6およびHuman 7と同じ選択性、再現性、効率を持ちます。このカラムにより14種類の標的タンパク質を除去し、酵素結合抗体法(ELISA)により、200回を超える分析について、除去効率と堅牢性の高さを示しています。この除去により、高濃度タンパク質のマスク効果により低濃度タンパク質の検出が妨げられていたプロテオーム解析において、ダイナミックレンジが向上します。さらに、高濃度タンパク質を除去することで、2次元ゲル電気泳動(2DGE)や液体クロマトグラフ/質量分析(LC/MS)の保持容量が向上し、複雑なシステムの単純化と低濃度タンパク質の検出が可能になります。

## 実験

### 試薬と装置

ヒトの血漿および血清は、Rockland Immunologicals (D519-04) およびSigma Aldrich (S7023) から購入しました。プレキャストSDS-PAGEゲルは、Invitrogen(カリフォルニア州)から入手しました。マルチプルアフィニティ除去システム(MARS) Human 14(内径4.6mm × 100mm)と緩衝液AおよびBは、アジレントのものを使用しました。MARS処理には、バイナリポンプ、注入量拡張オプションを追加した温度制御オートサンブラ、温度制御カラム恒温槽、ダイオードアレイ検出器、分析スケールの温度制御フラクションコレクタを備えた、Agilent 1100シリーズHPLCを使用しました。



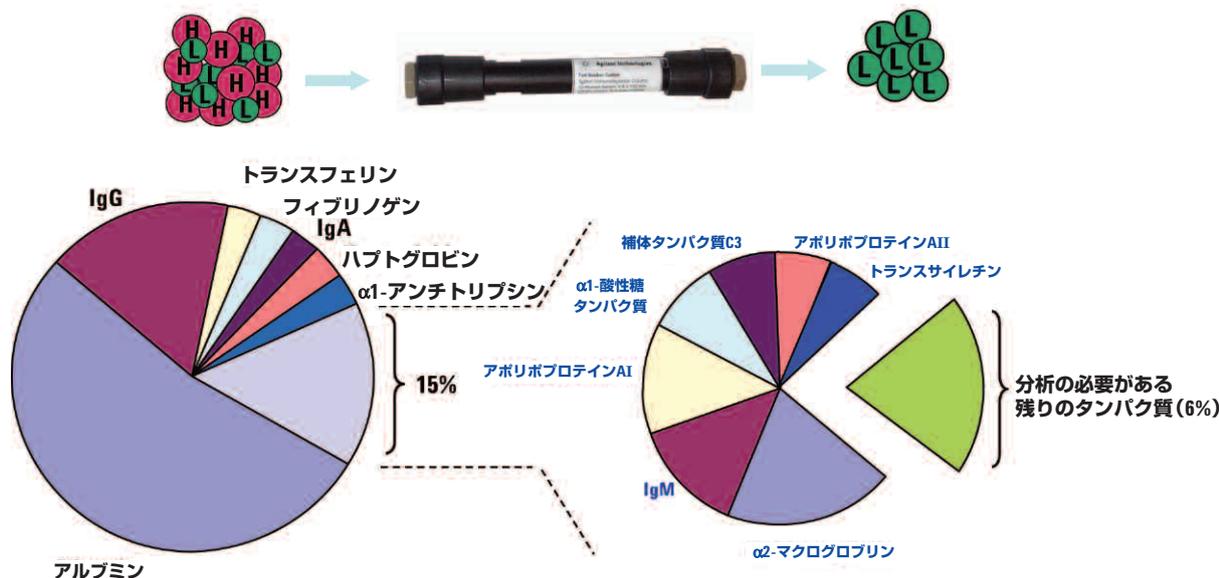


図1. マルチプルアフィニティ除去システムHuman 14

### アフィニティカラム

新開発のアフィニティカラムは、すでに解説および評価が行われたAgilentマルチプルアフィニティ除去システムを拡張および改良したものです[1-3]。アフィニティ精製したポリクローナル抗体を用いたHuman 14カラムは、複数のタンパク質を除去するAffibodyの低分子量リガンドも含んでいます。このカラムを使用するには、2種類の緩衝液が必要です。緩衝液AおよびBは、タンパク質の非特異的吸着を最小限に抑え、カラム性能の再現性と長いカラム寿命を保つように最適化されています。緩衝液Aは塩を含むpH 7.4の中性緩衝液で、サンプルの注入、洗浄、再平衡に使用します。緩衝液Bは低pHの尿素溶液で、結合した高濃度タンパク質をカラムから溶出するために使用します。

### サンプル前処理法

MARSカラムへの注入に先立ち、ヒトの血清および血漿を緩衝液Aで4倍に希釈しました。サンプルを0.22 $\mu$ mのスピニングフィルタに移し、16,000 $\times$ gで1分間、遠心分離して粒子状物質を除去しました。血漿は使用直前に前処理し、注入まで4 $^{\circ}$ Cで保管しました。

### 素通り画分のELISA分析

標準的なサンドイッチELISAを用いて、ヒト血漿からの標的タンパク質除去の程度を測定しました。緩衝液Aで1対10に希釈した素通り画分タンパク質100 $\mu$ Lを、アッセイプレートに短時間で付着しました。一晚4 $^{\circ}$ Cに保冷した後、プレートをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、ブロッカー溶液(1xPBS/Casein Blocker, Bio-Rad)を用いて2時間ブロックしました。PBSでプレートを洗浄した後、抗ヒト抗原抗体100 $\mu$ Lをブロッカー溶液に添加し、プレートに加えしました。その後、プレートを2時間放置し、洗浄しました。西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)共役抗体を加え、1時間放置しました。PBSで洗浄した後、液体基質(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン[TMB] 液体基質系, Sigma)を添加し、655 nmで吸光度を測定しました。

### BCAタンパク質測定法とSDS-PAGE

素通り画分タンパク質と結合タンパク質を、PBSで緩衝液交換し、濃縮しました。タンパク質濃度の測定には、ビスコンニン酸(BCA)タンパク質測定キット(Pierce)を使用しました。分析までサンプルを-80 $^{\circ}$ Cで保管しました。SDS-PAGE分析の実施にあたっては、InvitrogenのTris-Glycineプレキャストゲル(アクリルアミド4%~20%、10ウェル、1mm)を使用しました。GelCodeブルー染色試薬(Pierce)を用いたCoomassie Blue染色により、タンパク質を可視化しました。

## LC/MS/MS分析

MARS処理の特異性を分析するために、結合画分をSDS-PAGEで分離しました。結合画分のレーン全体を切片にし、タンパク質In-gelトリプシン消化キット (Agilent Technologies) で処理しました。Agilent HPLC-Chip/XCT Ultra TrapのLC/MS/MSにより、ペプチドを分析しました。分離条件は次のとおりです。

- RP移動相:[A]- 0.1%FA、/3%/H<sub>2</sub>O、および [B]- 0.1%FA/3%ACN/H<sub>2</sub>O - 流速500 nL/min
- 濃縮移動相:0.1%FA/3%ACN/H<sub>2</sub>O - 流速5μL/min
- RPグラジエント:4分までBが0%、4.25分でBが8%、39分でBが35%、44分でBが50%、44.1分でBが95%、46分でBが95%、47分でBが0%。

スペクトルミル (Agilent Technologies) バージョンA.03.02によりSwiss-Protヒトデータベースを参照し、MS/MSデータを解析しました。データベース検索後、ペプチドスコア > 11、ペプチド% SPI > 70、タンパク質スコア > 20のフィルタを使用しました。完全なトリプシンペプチドのみを考慮して、切断ミスは1か所のみ許容しました。

## 結果および考察

14種類の高濃度タンパク質を除去するマルチプルアフィニティ除去カラム (Human 14) は、Human 6マルチプルアフィニティ除去カラムを基に開発されました。HSA、トランス

フェリン、ハプトグロビン、IgG、IgA、α1-アンチトリプシン (レベルIタンパク質) を除去する親和性樹脂に加えて、Human 14には、フィブリノゲン、α2-マクログロブリン、α1-酸性糖タンパク質、補体タンパク質C3、IgM、アポリポプロテインAI、アポリポプロテインAII、トランスサイレチン (プレアルブミン) (レベルIIタンパク質) を除去するバインダーが含まれています。アフィニティ精製したポリクローナル抗体を用いたHuman 14カラムは、複数のタンパク質の除去を可能にするAffibodyの低分子量バインダーも含んでいます。これらのバインダーは、標的タンパク質に対する結合の選択性および効率と、特定の注入および溶出条件下における機能性を基に選択されました。アフィニティ媒体は、固定表面から離れた結合部位の優先配向において、各種のバインダーが高分子支持剤に共有結合および架橋結合し、標的タンパク質に対する容量が最大になるように前処理しました。

カラム使用のプロトコルは、血漿/血清サンプルの注入、素通り画分 (低濃度) タンパク質の収集、カラムの洗浄、結合タンパク質 (高濃度タンパク質) の溶出という各手順で構成されます。図2に、内径4.6mm×100mmカラムにおける除去プロセスを表す各クロマトグラムを重ねて示します。カラムの平均容量は、内径4.6 mm×50mmカラムで血漿/血清サンプル約20μL、内径4.6 mm×100 mmカラムで40μL、内径7.5mm×75 mmカラムで90μL、内径10mm×100 mmカラムで250μLです。MARS処理は、一般的なHPLCまたはFPLCハードウェアにより容易に自動化できます。

図3に、出発物質 (未処理の血漿および血清) と、そこから生じ

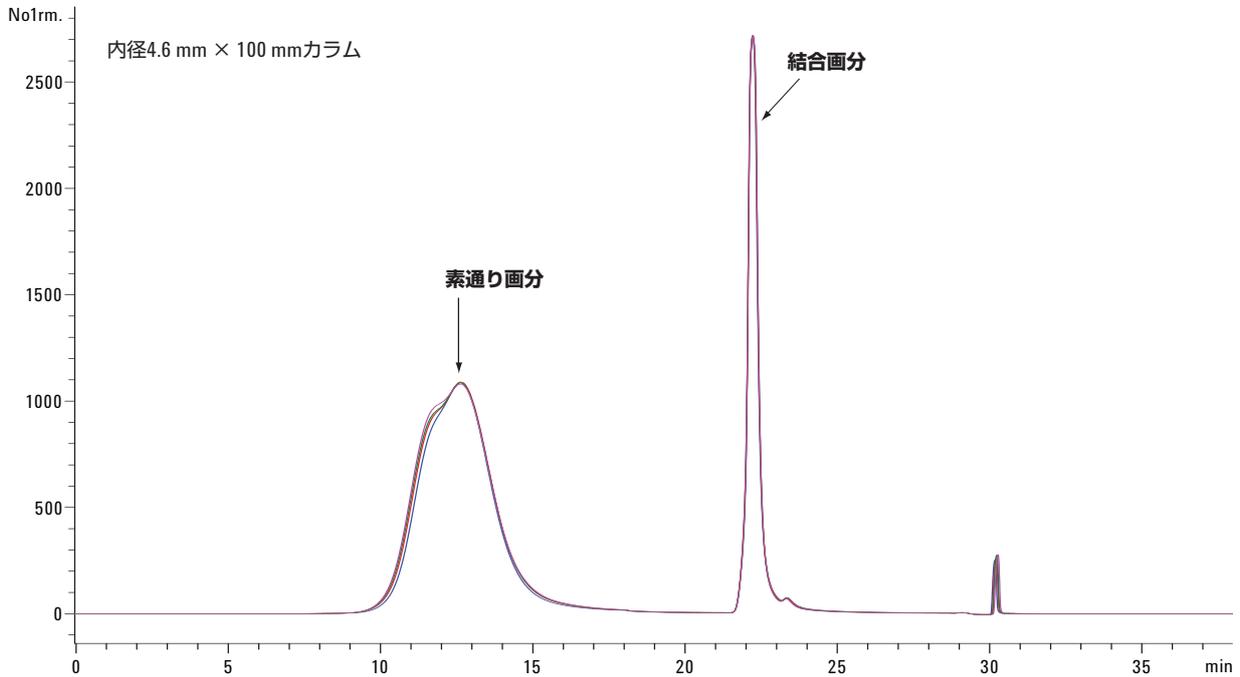


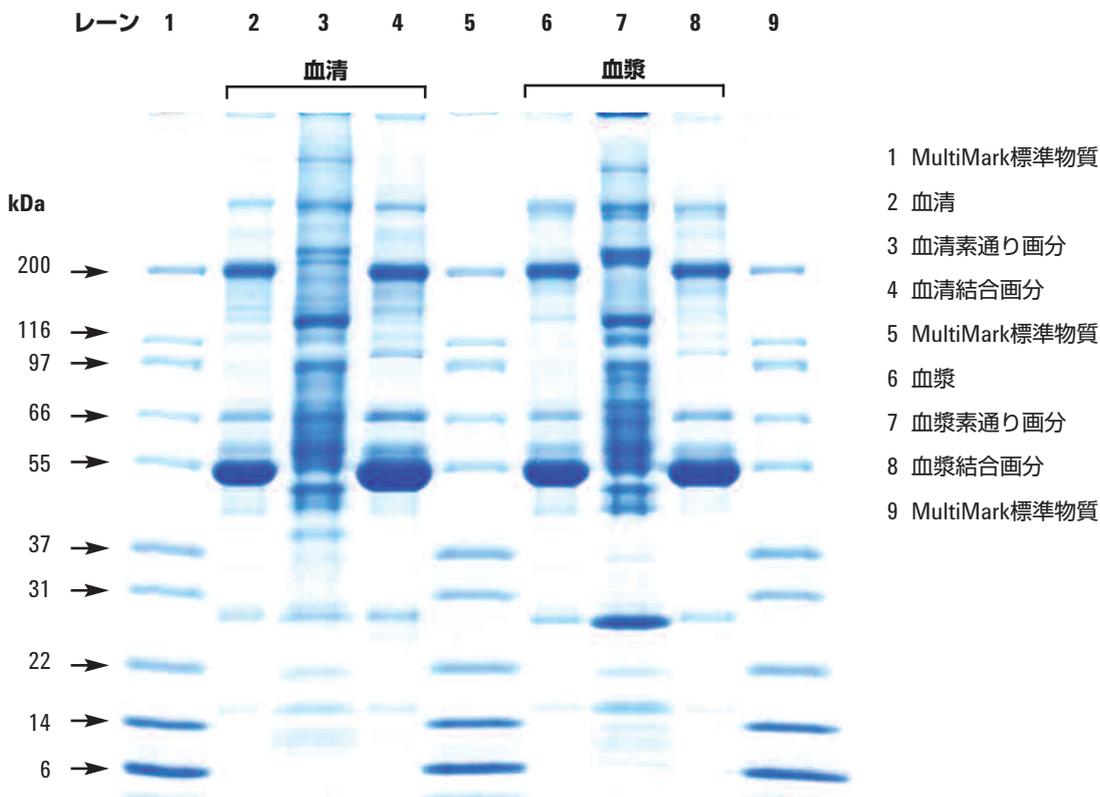
図2. Human 14カラムにおける1、50、100、150、200回目の分析を示すクロマトグラムの重ね合わせ

た素通り画分、結合画分の1Dゲル電気泳動像を示します。このゲル電気泳動像は、MARSカラムの脱マスク効果と、素通り画分における高濃度タンパク質バンドの除去を明確に示します(レーン3および7)。また、未処理サンプルのレーン(レーン2および6)では現れなかった低濃度タンパク質のバンドが見られます。

血漿中の標的タンパク質の可溶性、効率的な結合、洗浄、溶出を可能にするために、緩衝液A(サンプル注入、洗浄、カラムの平衡化)と緩衝液B(溶出)が開発されました。これにより、14種類の高濃度タンパク質の効率的な結合および溶出とカラム寿命の長さに密接に関連しています。分析ごとの除去再現性は、疾患サンプルと対照サンプルを比較するプロテオーム研究には重要な要素です。本研究では、血漿サンプルを単一のカラムに繰り返し注入し、除去の再現性をテストしました。図2のクロマトグラムに示すように、カラムは200回にわたる分析を通して優れた安定性と再現性を維持しました。200回の素通り

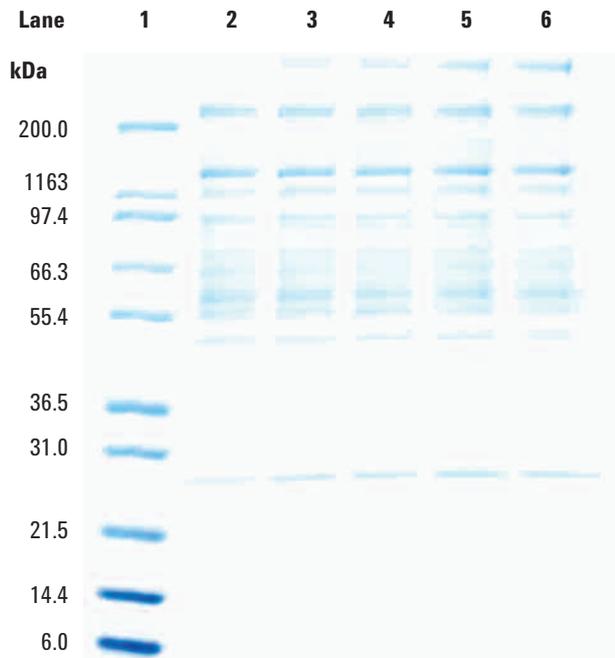
画分を調べたSDS-PAGE分析(図4)でも、クロマトグラムのデータと同様に、除去の再現性が実証されています。また、プロテオーム研究では、分析間のキャリーオーバーや二次汚染を抑えることも重要です。これは、各サンプル分析の間にブランクを注入してテストすることで確認されました。

以降の分析を容易にするためには、MARS処理するタンパク量を多くする必要があります。本研究では、14種類の高濃度タンパク質を除去すると、タンパク質の総質量の大部分(約94%)が除去されることが分かりました。MARS Human 14を用いた全体的な除去量を測定するために、素通り画分の総タンパク量を分析し、出発物質である血清および血漿サンプルと比較しました。この結果、ヒト血漿では総タンパク量の約92%、ヒト血清では約94%が除去されたことが示されました。Human 6カラムと比較すると、総タンパク量中の除去率は10%ほど高くなっています。



**図3. Human 14カラムのヒトの血清および血漿のタンパク質画分のSDS-PAGE分析**

等量(10 $\mu$ g)の未処理血清(レーン2)、血清素通り画分(レーン3)、血清結合画分(レーン4)、未処理血漿(レーン6)、血漿素通り画分(レーン7)、血漿結合画分(レーン8)を非還元条件下の4~20%SDS-PAGEゲルで分離しました。レーン1、5、9はInvitrogenの分子量標準物質(MultiMark 12)です。タンパク質の染色にはCoomassie Blue染色法を用いました。



**図4. Human 14カラムの複数回分析により得られた素通り画分のSDS-PAGE分析**

SDS-PAGE分離により可視化した分析200回におけるカラム性能分析：レーン1 – MultiMark標準物質、レーン2~6 – 分析1~200回の素通り画分を50回ごとに表示。合計8 $\mu$ gのタンパク質を各ウェルに注入。

MARS処理で重要なその他の要素として、各標的タンパク質の除去効率の高さがあります。この測定は、素通り画分を標準的なサンドイッチELISAで分析し、出発物質の血清および血漿サンプルと比較することで行いました。得られた除去効率は、分析を200回実施した後で測定したものです。血清と血漿における14種類の各タンパク質の除去効率を表1に示します。

MARS処理の選択性は、その後のプロテオミクスサンプルの分析を有意義なものにするための重要なパラメータです。優れた選択性を得るためには、標的以外のタンパク質とカラム

**表1. Human 14カラムを用いたヒト血清およびヒト血漿からの高濃度タンパク質の除去効率**

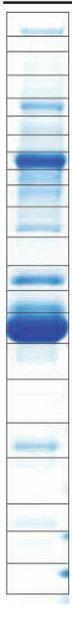
サンドイッチELISA免疫測定法を用いて、免疫除去200回実施後の素通り画分における高濃度タンパク質の濃度を測定しました。

標的タンパク質	血清における除去率(%)	血漿における除去率(%)
アルブミン	99.9	99.9
ハプトグロビン	99.0	98.9
トランスフェリン	99.7	99.9
IgG	99.9	99.9
IgA	99.9	99.9
a1-アンチトリプシン	99.7	99.5
a2-マクログロブリン	99.6	99.3
a1-酸性糖タンパク質	99.0	99.0
アポリポプロテインAI	99.2	98.5
アポリポプロテインAII	98.0	98.0
補体タンパク質C3	99.0	99.0
IgM	99.7	99.5
トランスサイレチン	98.3	97.5
フィブリノゲン	N/A	97.6

媒体との非特異的吸着を最小限に抑える装置が必要です。本研究では、タンパク質の非特異的吸着を測定するために、1D SDS-PAGEゲルで結合画分を分析しました。ゲルのレーン全体を24の切片にし、ゲル内トリプシン消化の手順を行ってから、HPLC-Chip LC/MS/MSでペプチドを同定しました。分析データは、標的タンパク質のすべてが同定されている一方、非特異的吸着タンパク質はきわめて少数であることを示しています(表2を参照)。これらの標的以外のタンパク質が、より高いMS強度による素通り画分分析でも検出されている点が重要です。これは、MARSカラムと非特異的に結合する標的以外のタンパク質がごく少量であることを示します。

**表2. LC/MS/MSにより検出された血清結合画分中のタンパク質**

実験手法のセクションで述べた手順に従い、Human 14 カラムでヒト血清中のタンパク質を除去しました。カラムに結合したタンパク質は溶出され、SDS-PAGE分離されています(図2、レーン4)。ゲルレーン全体を24のゲル切片にし、トリプシン消化により処理し、LC/MS/MS分析で同定しました。太字で示したタンパク質(上から13種類)は、Human 14カラムによる除去対象のタンパク質です。

	1 ヒト血清アルブミン
	2 IgG
	3 IgM
	4 IgA
	5 ハプトグロビン
	6 トランスフェリン
	7 $\alpha$ 1-アンチトリプシン
	8 $\alpha$ 2-マクログロブリン
	9 補体タンパク質C3
	10 $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質
	11 アポリポプロテインAI
	12 トランスサイレチン(プレアルブミン)
	13 アポリポプロテインAII
	14* アポリポプロテインB-100
	15* 血漿プロテアーゼC1阻害物質
	16* 亜鉛- $\alpha$ -2-糖タンパク質
	17* アポリポプロテインL1

\*定量的に除去されなかった標的以外のタンパク質

ELISAとLC/MS/MSのデータを総合して見ると、Human 14カラムを使用することで、標的高濃度タンパク質を総合的に除去する一方で、以降の分析に向けて低濃度タンパク質を収集し濃縮できることが明確に分かります。

## 結論

Agilent MARS Human 14カラムを使用することで、ヒトの血清、血漿、CSFなどの生理液から14種類の高濃度タンパク質を高い再現性と信頼性で除去できます。これにより、タンパク質分離、電気泳動分析、LC/MSなど以降の分析の対象となる低濃度タンパク質を濃縮することができます。このカラムは、200回の分析にわたって、きわめて高い堅牢性と再現性を示しています。

## 参考文献

1. C. Szafranski, J. Bailey, C. W. Turck, G. Nicol, J. Martosella, and N. Zolotarjova, "Enhancing analytical access to low-abundant proteins in the human plasma proteome," *PharmaGenomics*, September 2004, 40-46
2. K. Bjorhall, T. Miliotis, and P. Davidsson, "Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples," *Proteomics*, 2005, 5, 307-317
3. B. A. Chromy, A. D. Gonzales, J. Perkins, M. W. Choi, M. H. Corzett, B. Chang, C. H. Corzett, and S. L. McCutchen-Maloney, "Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins," *Journal of Proteome Research*, 2004, 3, 1120-1127

## 詳細情報

当社の製品およびサービスの詳細情報については、ホームページ、[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。本書に記載されている情報、説明、および仕様は予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan  
January 9, 2008  
5989-7839JAJP

