

グルタルアルデヒド固定パラフィン包埋組織のプロテオーム解析は不可能か？

瀧澤 勇介

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻
(指導：矢尾板 永信 准教授)

Is it impossible to analyze proteome of tissues fixed with glutaraldehyde and
embedded in paraffin?

Yusuke TAKISAWA

Department of Structural Pathology Institute of Nephrology, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director; Assoc. Prof. Eishin YAOITA)

別冊請求先: 〒950-2181 新潟市西区五十嵐 2 の町 8050 番地
新潟大学 生体液バイオマーカーセンター
瀧澤 勇介

Reprint request to : Yusuke TAKISAWA
Biofluid Biomarker Center, Niigata University
8050 Ikarashi 2-no-cho, Nishi-ku, Niigata, 950-2181, JAPAN

抄録

組織・病理学的研究において、組織の保存や生体分子の不活性化のために、ホルマリンをはじめとする様々な固定剤が使われている。中でも、グルタルアルデヒドは強力に分子間、分子内を架橋する固定剤で、微細構造が保持されるため、電子顕微鏡用試料の固定に広く使用されている。一方、組織のタンパク質を質量分析装置で網羅的に解析するプロテオミクス研究が盛んに行われており、それには主に未固定組織が使われてきたが、近年、長期に保存されているホルマリン固定パラフィン包埋組織への応用が始まっている。しかし、プロテオミクスではタンパク質をトリプシンなどで分解したペプチドが解析対象であるため、ホルマリンで架橋されたタンパク質から良質のペプチドを得ることが容易ではなく、様々な手法が提唱されている。さらに、架橋作用がより強力なグルタルアルデヒド固定はプロテオミクスには供せないとされ、ほとんどその解析結果の報告はされていない。しかし、この強力な架橋作用は裏を返せば、生体内で近接するタンパク質同士をプロテオミクスで網羅的に同定できる可能性を秘めている。

本研究は、私たちが開発した **On-Site Direct Digestion** 法を用いて、グルタルアルデヒド固定組織と架橋しない固定剤（メチルカルノア固定剤）で固定した組織を質量分析装置で解析し、結果を比較した研究である。

結果は、驚くことに、グルタルアルデヒド固定したラットの腎臓組織の同定タンパク質の種類（ 850 ± 30.8 種類, $N=6$ ）は、メチルカルノア固定した腎臓組織の数（ 1060 ± 98.8 種類, $N=6$ ）にほぼ匹敵するものであった。また、非標識質量分析定量法、 SI_N 法で両解析のそれぞれのタンパク質を量的に比較しても、それぞれのタンパク質の SI_N 値は正の相関を示した。この結果から、**On-Site Direct Digestion** 法を用いて、固定組織のプロテオーム解析を行うと、グルタルアルデヒド固定組織標本でも、満足できる解析が可能で、将来、タンパク質相互作用を解析できる可能性に道が開かれた。

キーワード

プロテオーム LC-MS/MS Normalized Spectral Index (SI_N) 固定剤 グルタルアルデヒド

1. 序文

組織・病理学的研究において、組織の保存や生体分子の不活性化のために、ホルマリンをはじめとする様々な固定剤が使われている。特に、グルタルアルデヒドは強力に分子間、分子内を架橋する固定剤⁽¹⁾で、微細構造が保持されるため、電子顕微鏡用試料などに広く使用されている⁽²⁾。

一方、近年は組織のタンパク質を質量分析装置で網羅的に解析するプロテオミクス研究が盛んに行われるようになってきた。それには主として未固定組織が用いられていたが、近年、長期に保存されているホルマリン固定パラフィン包埋組織への応用が始まっている。しかし、プロテオミクス研究ではタンパク質をトリプシンなどで分解したペプチドが解析対象であるため、ホルマリンで架橋されたタンパク質から良質のペプチドを得ることが容易でなく、種々の工夫が提唱されている。そのため、架橋作用がより強力なグルタルアルデヒド固定組織はプロテオミクスには供せないとされ⁽³⁾、ほとんどその解析はされていない。しかし、この強力な架橋作用は裏を返せば、生体内で近接するタンパク質同士をプロテオミクスで網羅的に同定できる可能性を秘めている。

本研究は、われわれの研究室で開発した On-Site Direct Digestion (OSDD) 法を用いて、グルタルアルデヒド固定組織と架橋しない固定剤（メチルカルノア固定剤）で固定した組織を質量分析装置で解析し、結果を比較した研究である。

2. 材料と方法

2.1 腎組織標本の作製

本研究では、Wistar ラット（生後 10 週、オス、Charles River Laboratories Japan）の腎を用いた。ジエチルエーテルにより麻酔したラットを開腹し、腎を摘出した。摘出した腎の腎動脈および腎静脈からリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を灌流し、血液を十分に洗い流した。十分に血液を排除できたことを確認したのち、厚さ約 2 mm の組織切片を作成した。

得られた組織標本の固定液は、試験群としてリン酸バッファーによって 2.5% に希釈した架橋型のグルタルアルデヒド（TAAB Laboratories Equipment 製）を、コントロール群として非架橋型のメチルカルノア液（メタノール 60%、クロロホルム 30%、氷酢酸 10%）を用いた。腎組織の標本を固定液に浸漬し、4 °C で 16 時間固定した。16 時間経過後、組織標本を PBS で洗浄したのちに無水エタノールに 1 時間浸漬、脱水した組織標本をパラフィン包埋後、薄切切片作成まで室温で保存した。

パラフィン包埋された組織切片は厚さ 10 μm に薄切し、メンブレンスライド（Molecular Machines & Industries 製）上に展開後、55 °C において 3 時間恒温処理した。メンブレンスライド上の組織は脱パラフィン処理として、5 分間のキシレン浸漬を 3 回、1 分間の 100%エタノール浸漬を 2 回、1 分間の 95%、85%、75%エタノール浸漬を各 1 回、1 分間の超純水浸漬を 1 回行った。脱パラフィン処理した組織は、110 °C で 10 分間オートクレーブ処理したのち、室温で 16 時間以上静置し、十分に乾燥させた。

2.2 ペプチド精製

顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-S, ニコン製) 下でレーザマイクロダイセクション装置 (MMI Cellcut, Molecular Machines & Industries 製) を用い, メンブレンスライド上の腎臓組織切片から腎皮質を約 3 mm² の面積に切り出し, MMI Isolation Cap (Molecular Machines & Industries 製) に回収した.

切り出した腎皮質組織に含まれるタンパク質は切片上で直接トリプシンで消化し, 得られたペプチドを精製した (On-Site Direct Digestion (OSDD) 法). トリプシン (Agilent technologies 製) を 50 mmol/L 炭酸水素アンモニウム (和光純薬工業製) 水溶液にて 20 ng/μL に希釈して使用した. 37 °C のインキュベータ内で 16 時間消化後, 50%トリフルオロ酢酸 (和光純薬工業製) 2 μL を添加し, トリプシンを失活させた. 消化によって得られたペプチドは Octadecyl-Silica Stop And Go Extraction Tip (C-18 STAGE Tip, Thermo Fisher Scientific 製) を用いて精製した.

精製したペプチドは, 遠心エバポレータ (VEC-260, イワキ製) およびフリーズドライヤ (VD-80, タイテック製) を用いて真空乾燥させたのち, 質量分析に供するまで -80 °C で保存した. メチルカルノア固定群, グルタルアルデヒド固定群とも 6 サンプルを作成し, LC-MS/MS 分析に供した.

2.3 LC-MS/MS 解析

組織を消化して得たペプチドは 0.1%ギ酸 (和光純薬工業製) に溶解し, ボルテックスミキサを用いて十分に振盪攪拌した. 後述の LC への注入量を見積もるため, 事前に超微量分光光度計 (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific 製) を用いて試料溶液のペプチド濃度を計測しておいた.

LC-MS/MS は液体クロマトグラフ (Easy nLC-1000, Thermo Fisher Scientific 製) とタンデム質量分析計 (Q Exactive Plus, Thermo Fisher Scientific 製) からなっており, LC の注入量は 500 μg, 移動相は A 相 0.1% ギ酸, B 相 0.1% ギ酸, アセトニトリル (Thermo Fisher Scientific 製) で, グラジエント条件は 120 分で B2% から 35%とした. LC-MS/MS 分析は 1 本のサンプルチューブあたり 2 度行った.

2.4 タンパク質同定

得られたスペクトルは MSConvert (ProteoWizard Software Foundation 製) を用いて Mascot Genetic Files (MGF) ファイルに変換し, 後述のデータベース検索に供した. LC-MS/MS 分析は 1 本のサンプルチューブあたり 2 度行ったため, サンプルチューブ 1 本分, すなわち 2 つのスペクトルを MASCOT サーチエンジン (Matrix Science 製) によって 1 つのスペクトルにマージし, マージ後のスペ

クトルを同エンジンによってデータベース検索にかけた。なお、MASCOT サーチエンジンによる検索は、2017 年 12 月時点のラットに対する UniProt/Swiss-Prot データベース（欧州分子生物學研究所提供）を用い、検索の条件は下記の通りである。

fixed modifications = none

variable modifications = deamidated (NQ), Oxidation (H, W, M)

enzyme specificity = trypsin

maximum missed cleavages = 2

peptide charge = 2+ and 3+

peptide tolerance = 10ppm

#13C = 0

MS/MS tolerance = 0.02 Da

instrument = ESI-FTICR

データベース検索によりヒットしたタンパク質については、偽発見率 (FDR) が 1%未満となるように閾値 (Threshold p value) を調整してフィルタリングした。この操作によって有意に発現していると判定されたタンパク質は、コードする遺伝子名やアミノ酸シーケンス、アミノ酸残基数等のデータを MASCOT サーチエンジンを用いて Comma-Separated Values (CSV) ファイル形式でエクスポートし、後述するプロテオーム解析に供した。ヒットしたタンパク質のデータのうち、実験操作の際に混入したヒト由来のケラチンの可能性が高いもの (Krt1, Krt2, Krt10) を除去した。

2.5 タンパク質定量

定量にはプロテオーム解析において使用される Normalized Spectral Index (SI_N) を算出した。各タンパク質に対して 6 チューブ分の平均をとった。同定されたタンパク質に対する平均 SI_N 値は対数正規分布に従うものとして、底を 2 として対数変換を行った。R (R Foundation 製) を用いて、対数変換後の平均 SI_N 値に対して Quantile-Quantile Plot (Q-Q Plot) を作成し、対数正規分布に従うであろうことを確認した。さらに、両群でヒットしたタンパク質について、各々のタンパク質に対し、メチルカルノア固定群から求められた平均 SI_N 値 (SI_N MC) とグルタルアルデヒド固定群から求められた平均 SI_N 値 (SI_N GA) の 2 群間の単回帰分析を行い、 SI_N MC と SI_N GA との相関を評価した。

2.6 包含関係分析

各群 6 本のサンプルチューブのうち 5 本以上でヒットした（ヒット率が 3 分の 2 を上回る）タンパク質について、高い信頼度で『同定』できたものとみな

す. 各群で同定できたタンパク質のリストを作成し, Venn 図作成用の web ツールである Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>, スペイン国立バイオテクノロジーセンター提供) を用いて, 両群で同定できたタンパク質, メチルカルノア固定群のみで同定できたタンパク質, グルタルアルデヒド固定群のみで同定できたタンパク質にカテゴライズし, 各々のタンパク質について包含関係を評価した.

3. 結果

3.1 タンパク質同定

MASCOT サーチエンジンによるデータベース検索の結果同定されたタンパク質数を図 2 に示す. メチルカルノア固定群では平均 1063.0 種類のタンパク質が同定され, その不偏標準偏差は 98.8, 変動係数は 9.30%であった. 一方, グルタルアルデヒド固定群では平均 847.5 種類のタンパク質が同定され, その不偏標準偏差は 30.8, 変動係数は 3.64%であった.

3.2 非標識タンパク質定量

同定されたタンパク質に対する SI_N 値の分布を対数横軸で図 3 に, 対数変換後の SI_N 値の Q-Q Plot を図 4 に示す. また, 両群でヒットしたタンパク質について, 各々のタンパク質に対し, 対数横軸に SI_N MC を, 対数縦軸に SI_N GA をとり, 散布図として図 5 に示す. また, 両群の SI_N 値を冪関数に単回帰分析した結果, 決定係数は 0.58 であった.

3.3 包含関係分析

同定できた固定液についてタンパク質をカテゴライズし, それらの包含関係を図 6 の Venn 図に示す. グルタルアルデヒド固定群およびメチルカルノア固定群の双方で同定できたタンパク質数は 600 で全体の 53.5%を, メチルカルノア固定群でのみ同定できたタンパク質数は 400 で全体の 35.7%を, グルタルアルデヒド固定群のみで同定できたタンパク質数は 121 で全体の 10.8%を占めた.

4. 考察

パラフィン包埋組織標本を用いた質量分析によるプロテオミクス研究に際し, グルタルアルデヒド固定を行うことは, これまでは禁忌と考えられてきた. しかし, 本研究で, OSDD 法を用いて組織切片からペプチドを抽出する方法で, グルタルアルデヒド固定組織でも満足できるプロテオーム解析が可能であることが

示された。また、図 3 の分布の形状および図 4 の Q-Q Plot が主たる部分で直線的に配列していることより、 SI_N MC および SI_N GA はともに対数正規分布に従うと考えられる。また、 SI_N MC と SI_N GA を冪関数に単回帰分析した結果、決定係数が 0.58 であったことより、 SI_N MC と SI_N GA の間には、非線形的ではあるものの、正の相関があると考えられる。すなわち、グルタルアルデヒド固定された組織標本を用いても、メチルカルノア固定された組織標本同様の定量結果が得られることも示された。これらの結果は、グルタルアルデヒド固定組織標本でも、OSDD 法を用いて LC-MS/MS 解析すれば非標識的にタンパク質定量が可能であることが示されたと考えられる。

さらに、この手法を応用することで、将来的にはタンパク質相互作用を LC-MS/MS を用いて解析できる可能性がある。今後の課題として、より信頼性の高いデータ収集およびタンパク質相互作用の評価のため、固定条件と同定できるタンパク質との関係を、量的にも質的にも評価することが必要であると考えられる。

5. 結論

本研究により、固定組織のプロテオーム解析を OSDD 法を用いて行うことで、グルタルアルデヒド固定組織標本でも、満足できる解析が可能であることが示された。将来、この手法を応用し、タンパク質相互作用を解析できる可能性に道が開かれた。

6. 謝辞

稿を終えるに際し、ご指導賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻構造病理学分野 准教授 矢尾板 永信 先生、生体液バイオマーカーセンター 山本 格 先生、平尾 嘉利 先生、許 波 先生、山本 恵子 先生ならびにサンプル作成およびデータ解析に関する技術指導を賜りました構造病理学教室ならびに生体液バイオマーカーセンターの皆様に深謝いたします。

また、本研究において開示すべき利益相反はない。

参考文献

- 1) Akihiro Kusumi, *et al.*. Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1746:234-251, 2005.
- 2) John A Kierman. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microscope today*, 00-1:8-12, 2000.

3) Christian Scheler, *et al.*. Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). *Electrophoresis*, 19:918-927, 1998.

Figure legends

Figure 1. 本研究の概念図

Figure 2. ヒットしたタンパク数の比較 (n=6)

Figure 3. ヒットしたタンパク質の SI_N 値の分布

Figure 4. ヒットしたタンパク質の Q-Q Plot

Figure 5. ヒットしたタンパク質の SI_N 値の両群間比較

Figure 6. グルタルアルデヒド (GA) 固定群およびメチルカルノア (MC) 固定群で同定されたタンパク質の包含関係

図 1

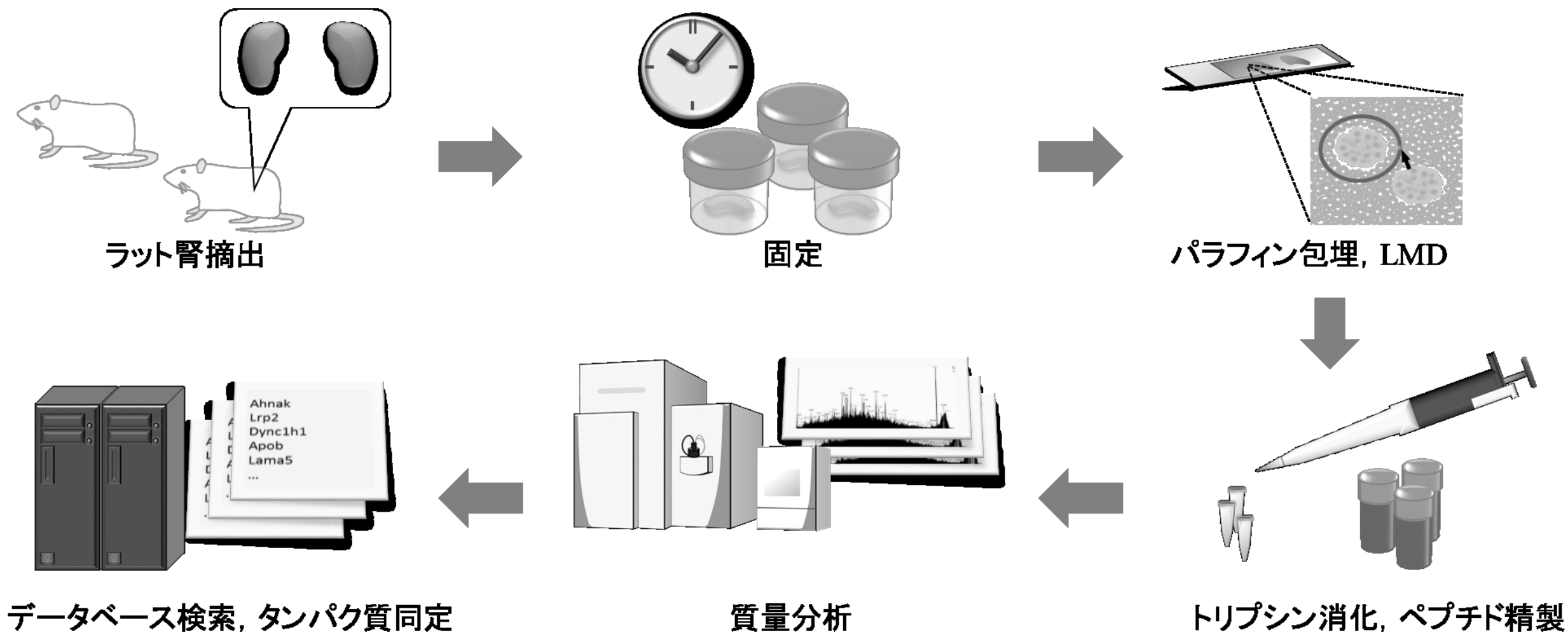


図 2

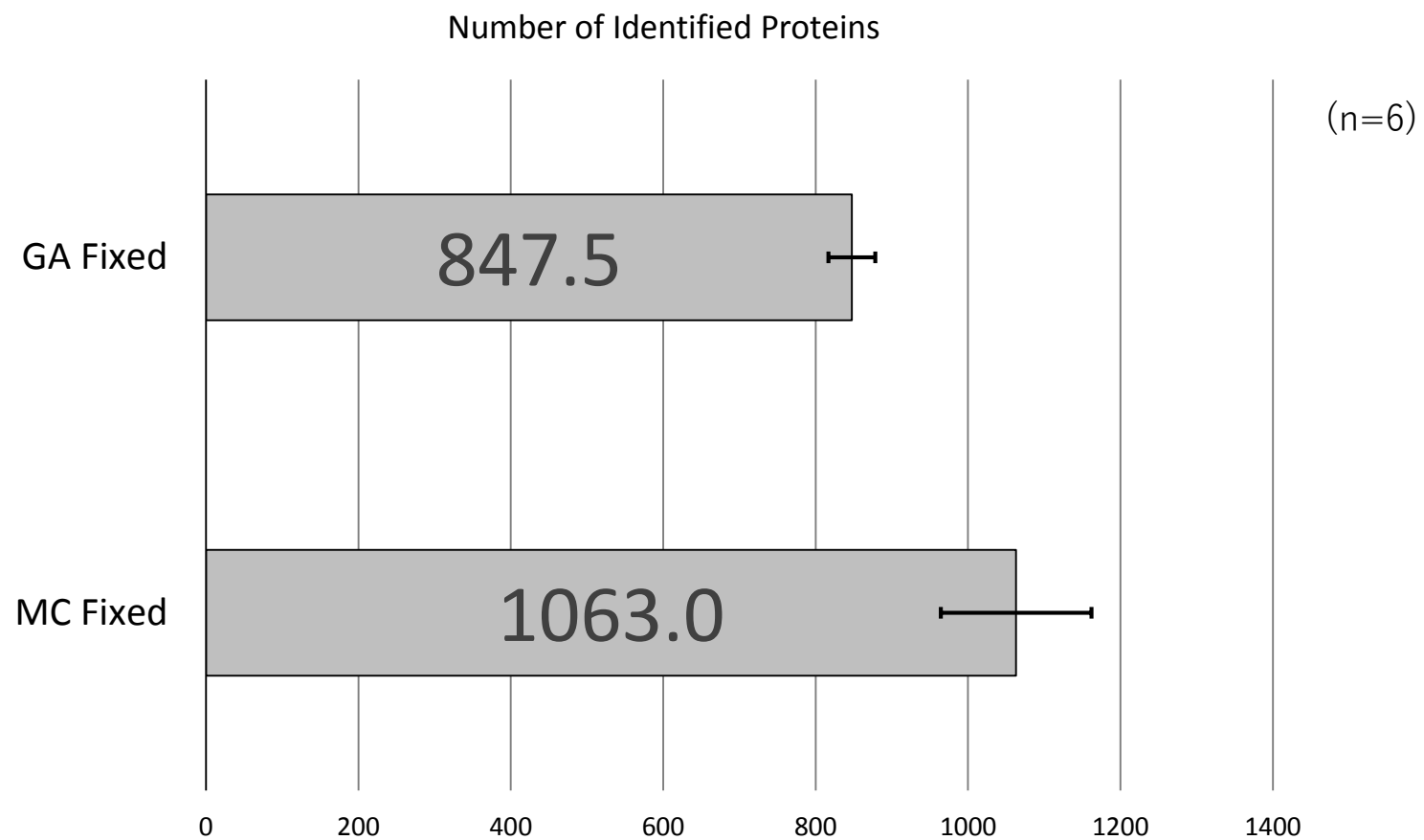
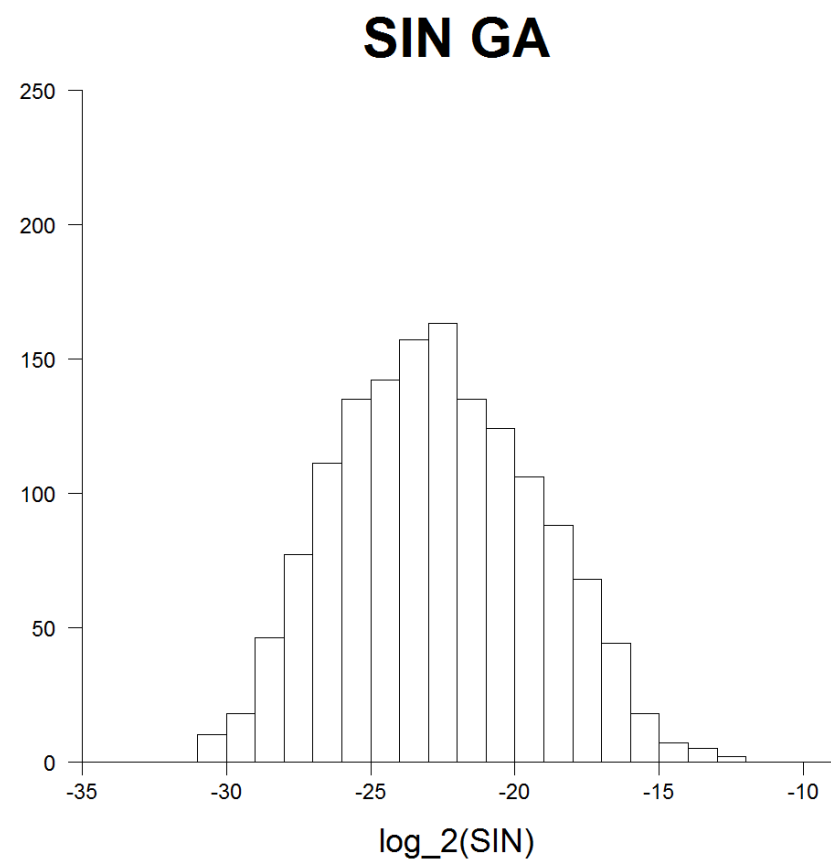
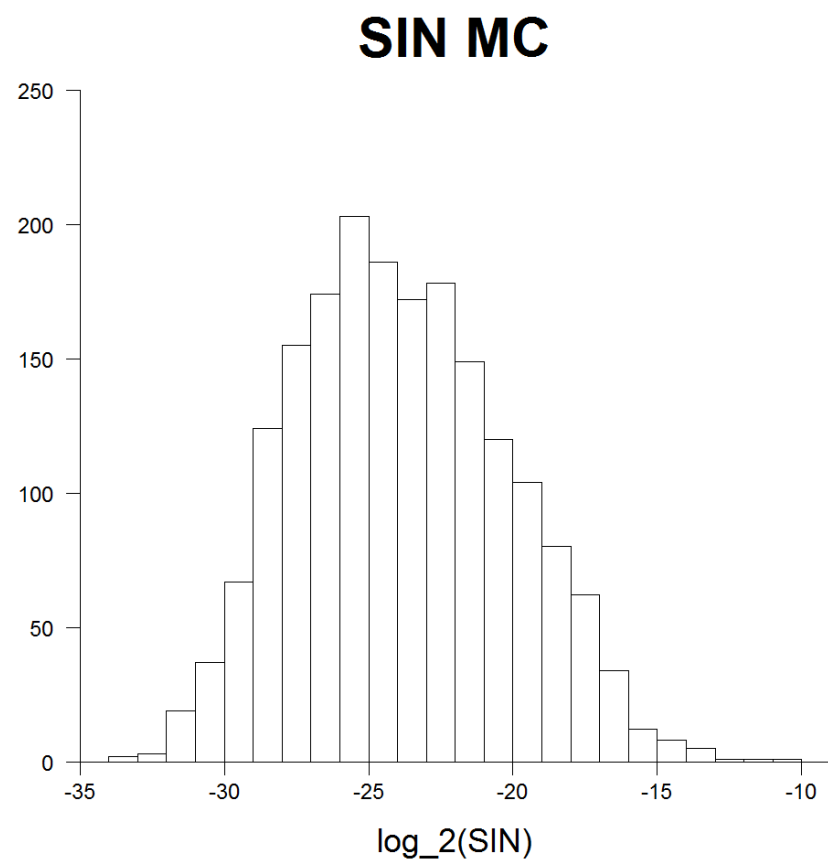
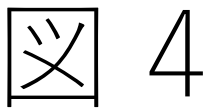


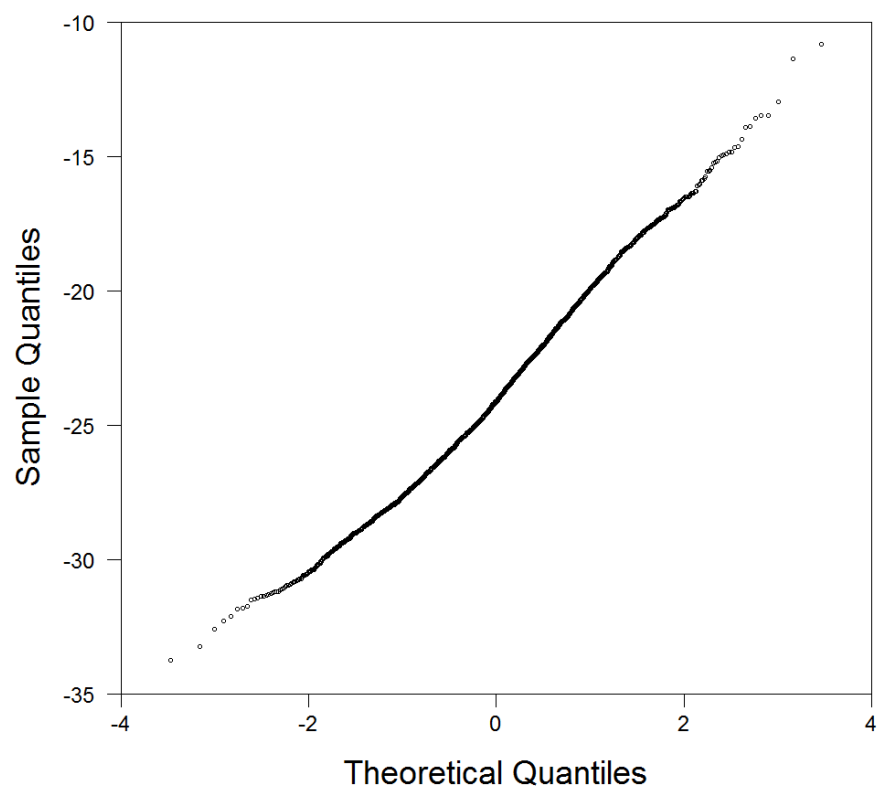
図 3





4

SIN MC



SIN GA

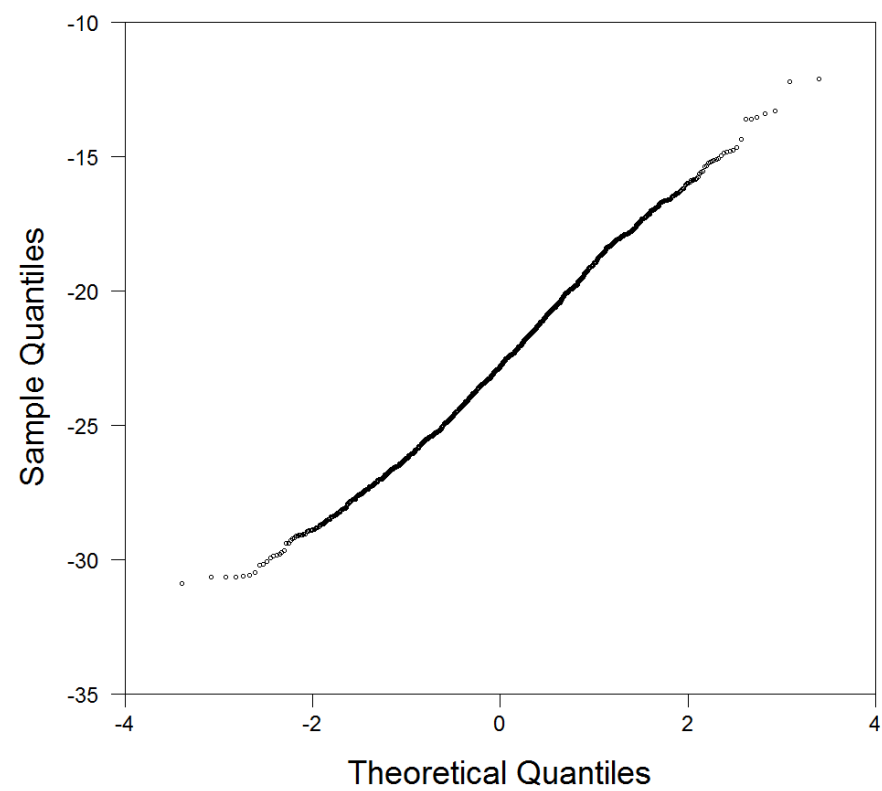


図 5

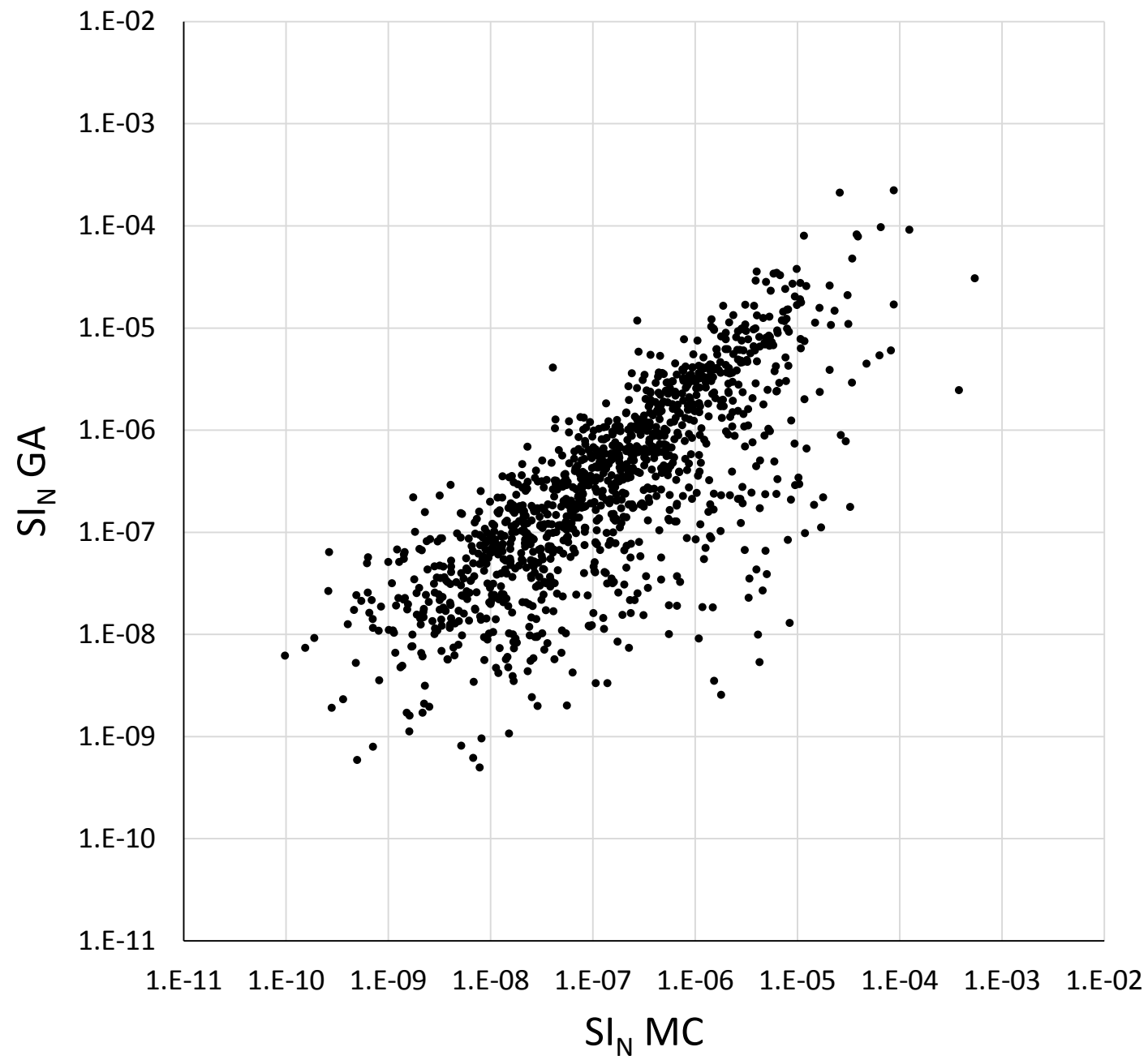


図 6

