

## Application Note

# S-Trap法によるHeLa細胞の膜タンパク質-LC/MSプロテオーム解析

### Abstract

S-Trap法を適用し、HeLa Cell Lysateタンパク質を酵素消化しLC/MSプロテオーム解析による評価試験を実施した。5%-SDSを含むLysate bufferをタンパク質可溶化Bufferとして使用するこの方法論は膜タンパク質を含む細胞中の全てのタンパク質を可溶化してS-Trapスピナラムにアプライする。タンパク質はスピナラム中に配置されたタンパク質保持充填剤に保持され、充填剤上で酵素消化を行う。トリプシン消化時の温度は47°C、消化時間は1時間であり既存の技術と比較して短時間の処理で済む。今回の評価試験では15cm dishより回収したHeLa細胞 (Cell数  $2.0 \times 10^7$ ) を5% SDSを含むLysate bufferで溶解後、BCA Protein Assayによって精密にタンパク質定量を行い、100 ug相当のタンパク質を出発材料として処理を行い、LC/MSプロテオーム解析に供した。既存のタンパク質消化技術と比較してどの程度の有用性を示すかを評価指標とした。

### Introduction

S-Trap法は5%の高濃度SDSをLysate Bufferとして細胞中に存在する全てのタンパク質の可溶化を行い、S-Trapのスピナラム中に配置されたタンパク質保持用の充填剤に加えて処理を行う方法である。保持されたタンパク質は充填剤上で消化酵素によってペプチドサイズに消化される。また消化効率も高く、トリプシン消化の場合、47°C1時間で酵素消化が完了する。消化されたタンパク質のペプチドは溶出されてLC/MSプロテオーム解析に供する。通常2日かかるタンパク質の酵素消化処理が半日で完了しLC/MSアッセイに供することが可能である。このS-Trap法と既存のゲルショットガン法、コール酸処理法と比較して、その有用性について検証した。

### Materials and Methods

#### ・ S-Trap試薬調製

次の5種類の緩衝液ならびに反応溶液を調製した。5% SDS in 50 mM TEAB (pH 7.55)、12%リン酸、90% Methanol in 100 mM TEAB (pH 7.1)、50 mM TEAB (pH 8)、0.2% HCOOH、0.2% HCOOH in 50% ACN。

#### ・ HeLa Cell Lysate

サンプルにはHeLa細胞を使用した。15cm dishに培養したHeLa Cellを回収し、-80°Cストックされていたサンプルを使用した。細胞数はコンフルエントに達しているとして想定して $2.0 \times 10^7$ と仮定した。

#### ・ HeLa Cell Pellet pretreatment

※全ての操作はアルミブロックで氷冷しながら行う。500 ulの(x1-5% SDS buf.)をCellペレットサンプルTubeに入れる。次に1 ulのBenzonace (Merck)を入れる。VortexでSuspendし、その後4°Cで約20分静置する。2,30分程度静置しておく、溶液はほぼ透明に溶解する。次にProtein Assayに供する

#### ・ BCA Protein Assay

Protein AssayにはBCA Protein Assayを適用した。試薬はBCA Protein Assay Kit(Pierce)を使用した。562 nmの吸収波長によりタンパク質アッセイした。BCA Protein Assayの結果、HeLaサンプル溶液のタンパク質濃度は4.2-4.5 mg/mlであった。500 ulにSuspendしたのでタンパク質総量は2.1-2.3 mgとの結果となった。このサンプルからS-Trapに25 ul(= 112 ug protein)を処理した(S-Trap miniのタンパク質許容量は50-300 ug)。25 ulのHeLa溶液に25 ulの5% SDS in 50 mM TEAB (pH 7.55)を添加し全量を50 uLとした。

#### ・ 還元アルキル化

1M DTTを最終濃度が20 mMになるように添加し、95°C、10分間インキュベーション後に室温に戻した。次に1M IAAを最終濃度40 mMになるように添加し室温、暗所にて30分間インキュベーションした。還元アルキル化後に、サンプル溶液に12%リン酸を最終濃度1.2%になるように添加した。90% Methanol in 100 mM TEAB (pH 7.1)を350 ul添加し全量405 ulとした。

#### ・ サンプルのS-TrapへのApply

2 mlのTubeにセットしたS-Trap miniへサンプルを静かに移す。250 ulの90% Methanol in 100 mM TEAB (pH 7.1)を添加し保持されたタンパク質の洗浄を行った。4000gで1分間遠心した。

#### ・ 消化酵素 (Trypsin) の添加ならびにサンプル回収

Trypsin(Promega, 20 ug/vial)に250 ulの50 mM TEABを添加して溶解し、直ちに125 ulをS-Trap miniへ添加し4000gで1分間遠心した。47°Cで60分インキュベーションし、振とうはしない。新しい2 mlチューブにS-Trap miniを移し、80 ulの50 mM TEABを添加する。ここからサンプルの回収を行う。4000gで1min遠心分離する。次に80 ulの0.2% HCOOHを添加する。さらに4000gで1分間遠心分離し80 ulの0.2% HCOOH in 50% ACNを添加する。4000gで1分間遠心分離し、Speed VacにてDry upの後、回収サンプルは200 ulの0.1% TFA in 2% ACNに再溶解した。

・LC/MS測定ならびにタンパク質同定

解析に適用したLC/MSシステムは次の通り。Mass Spectrometry: LTQ Orbitrap Elite ETD 質量分析器 (Thermo Fisher Scientific製)、micro-HPLC: Paradigm (Michrom BioResources, Inc. 製)、オートサンプラー: HTS PAL (CTC Analytics製)、イオン源: nanospray ionization (NSI) source (AMR Inc. 製)、Capillary: ナノスケール・フューズドシリカ・キャピラリー (Viper; Thermo Fisher Scientific製)。S-Trap法、コール酸処理法、ゲルショットガン処理法のそれぞれの手法にて消化したHeLaサンプルは、前述のLC/MSシステムによってLC/MSプロテオーム解析を行った。

MS/MS スペクトルは Proteome Discoverer (Thermo fisher scientific社)によって抽出し、全 MS/MS データセットは Mascot によって解析した。検索設定は次の通り。DataBase: Swissprot\_2017\_08.fasta (Fungi 選択; 32,833 entries)、Fragment-ion mass tolerance: 0.60 Da、Parent ion tolerance: 5.0 ppm、最大 missed cleavage site 数: 3、修飾: fixed modification: シス테인 Carbamidomethylation (57.021464)、variable modification: メチオニン oxidation (15.994915)、リシンとアルギニンの methylation (14.01565)、リシンとペプチドN末の acetylation (42.010565)、セリンとトレオニンとチロシンの phosphorylation (79.966331)、グルタミンの pyroglutamylation (-17.02655)、同定基準: Mascot significance threshold  $p < 0.05$ 。

Results and Discussions

15cm dishより回収したHeLa細胞を3分割してS-Trap法、ゲルショットガン法、コール酸法の3種類の方法によって処理し、LC/MSによるプロテオーム解析を実施した(Fig. 1)。その結果、3種類の方法全てにおいてHuman由来タンパク質が1000種類以上同定された(Table 1)。また同定されたタンパク質のうち、細胞膜に局在化していると見られるタンパク質も特定数同定されていた(Table 2)。この3種類をタンパク質同定数の観点から比較するとS-Trap法(1730)とコール酸法(1647)はほぼ同等であり、ゲルショットガン法(1097)はやや少ない結果となった。これはゲルショットガン法の場合、ゲル片から抽出されていないタンパク質やペプチドなどが残っていて、タンパク質同定に影響があったものと思われる。しかし、ゲルショットガン法においてもInjection量を増量することによってほぼ同等のタンパク質同定数になることが確認できており、微量に存在するタンパク質であっても同定結果にほぼ影響は与えないと言える。

このようにS-Trap法は既存の方法と比べても遜色のないデータ解析結果を得ることが可能であることが判明し、また5%SDSを含むLysate bufferによって強力に可溶化するため、膜タンパク質解析のような難易度の高いタンパク質解析においても有用であることが明らかとなった。さらに操作自体は他の2つの方法と比較して容易であり、トリプシン反応時間も1時間と短いためハイスループットにも貢献しており、今後、膜タンパク質を始めとした難易度の高いタンパク質のプロテオーム解析に有効な手段として普及していくと思われる。

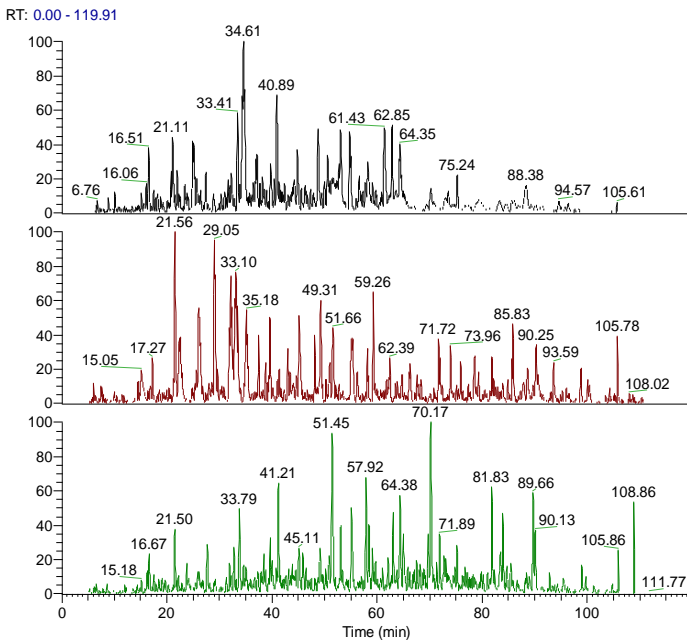


Fig. 1 OrbiTrap Elite(Thermo)によるS-Trap処理と既存の処理法を適用したHeLaサンプルのLC/MS Base Peak Chromatogram  
上: S-Trap処理、中: ゲルショットガン処理、下: コール酸処理

Table 1. LC/MS解析による各処理法のタンパク質・ペプチド同定数  
DOC: コール酸処理、GS: ゲルショットガン処理、S Trap:S Trap処理

	DOC	GS	S Trap
Protein ID	1647	1097	1730
Peptide ID	9571	3840	8506

Table 2. 細胞成分ごとのタンパク質同定数の比較 (%)  
DOC: コール酸処理、GS: ゲルショットガン処理、S Trap:S Trap処理  
\*は細胞成分の膜に局在化するタンパク質

	DOC	GS	S Trap
Golgi apparatus	7.9	6.4	7.9
cytoplasm	80.7	78.3	80.4
*cytoskeleton	16.2	18.4	15.9
endoplasmic reticulum	10.9	8.7	10.5
endosome	3.5	2.8	4.0
extracellular region	7.1	7.0	6.9
intracellular organelle	83.9	85.1	83.6
*membrane	36.9	33.7	36.5
mitochondrion	18.4	16.1	17.7
nucleus	48.1	52.2	48.7
*organelle membrane	18.2	14.8	17.7
organelle part	68.1	70.5	68.0
*plasma membrane	18.3	18.4	18.3
ribosome	5.8	7.3	5.6