

ICAT(isotope-coded affinity tag)法によるプロテアーゼ基質のスクリーニング

室井 誠

質量分析計(MS)の技術の発達と蛋白質データベースの充実で、蛋白質を網羅的に扱うプロテオーム解析法も日々進歩している。MSを用いたプロテオミクスには2次元電気泳動を用いる方法が古くから用いられているが、もう一つの代表的な方法として安定同位体標識した蛋白質をLC/MSで解析する方法(ICAT法)が知られている。ICATの特徴を利用した研究を紹介する。

紹介論文

Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates. Tam, M. E., et al. & Overall, C. M.* (Univ. British Columbia, Vancouver, Canada), PNAS, 101, 18 6917-6922 (2004)

要旨

プロテアーゼは、シグナリング蛋白質や膜のレセプターのプロテオリティックな修飾によって、分泌後のレベルで細胞の振る舞いをコントロールしている。故に、プロテアーゼの *in vivo* における生物学的な役割を理解するためには、基質の発見が不可欠である。細胞外マトリックスの分解に密接に関与するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)は、生理活性分子の重要なプロセッシング酵素であることが認識されつつある。MSは細胞または組織の蛋白質を検出・同定・定量するための主要なプロテオミクスの技術である。MDA-MB-231 乳ガンにMT1-MMP(human membrane type 1-MMP)をトランスフェクションしたあと、細胞表層、細胞周囲のマトリックスからはずれてきた蛋白質や分解またはプロセッシングされた細胞外の蛋白質を、ICAT(isotope-coded affinity tag labeling)法とMS/MSをインラインで装備した多次元クロマトを用い検出した。不活性型MT1-MPP(E240A)発現株やVectorのみの株と比較して変化のあった蛋白質として、基質の可能性のある蛋白質が検出された。新たな基質は *in vitro* で可溶性リコンビナントMT1-MMPとインキュベーションし生じたフラグメントをMALDI-ToF MSやEdmanシーケンス法によって生物学的に確認した。今までにMT1-MMPの基質として同定されていない、好中球ケモカインIL8、secretory leukocyte protease inhibitor, pro-tumor necrosis factor, death receptor-6,そしてconnective tissue growth factorを含む基質を同定し、このことからMT1-MMPは以前から言われているようにマトリックスリモデリングに重要な役割を持っている他、重要なシグナリングプロテアーゼであることが示唆された。更に、MS/MSと組み合わせたハイスループットで定量的なICAT法は、今まで言われていないプロテアーゼ基質のdegradomicスクリーニング法であり、複雑でダイナミックな生物現象における、プロテオリティックな機能を探るために、他のプロテアーゼにも適応しうる方法である。

参考論文

Mass spectrometry-based proteomics. Aebersold, R. & Mann, M. (Univ. Southern Denmark, Odense, Denmark) Nature, 422, 198-207 (2003)