



Title	タンパク質の質量分析
Author(s)	小澤, 真一郎; 井上, 名津子; 高橋, 裕一郎
Citation	低温科学, 67, 387-395 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39172
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 6. タンパク質 e
File Information	67-057.pdf



[Instructions for use](#)

6. タンパク質

e. タンパク質の質量分析

小澤真一郎¹⁾, 井上(菓子野)名津子¹⁾, 高橋裕一郎¹⁾

光合成生物のゲノム解析の進展と質量分析計の進歩により、微量の光合成タンパク質の解析が容易になった。本章では、二次元電気泳動法で分離したタンパク質を質量分析計で同定する方法について紹介する。

Characterization of photosynthetic proteins by mass spectrometry

Shin-ichiro Ozawa, Natsuko Inoue-Kashino, Yuichiro Takahashi,

Combination of genomic information of photosynthetic organisms and mass spectrometric analyses enables one to identify a large number of proteins and polypeptides separated by one- or two-dimensional SDS-PAGE. In this chapter, we introduce principles and methods of mass spectrometric analyses of proteins.

6.e.1 質量分析の原理

質量分析計は、ポリペプチドをイオン化し、質量対電荷比 (mass-to-charge ratio, m/z) を実測する。イオン化手法として、MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) と ESI (Electrospray ionization) が一般的に用いられる。ESI の中でも、感度を上げるためにスプレーを微量にしたものを NSI (Nano-spray ionization) という。正電荷のイオン化を促進するため、ギ酸や TFA (トリフルオロ酢酸) を溶液に加える。MALDI ではまずマトリックスとサンプルとで結晶を作る。そこにパルスレーザーを照射することで、マトリックスが速やかに昇華しペプチドにエネルギーが伝達され、イオン化する。ESI (NSI) ではペプチドを含んだ溶液を霧状に放出させ、高電場下で溶液を蒸発させ、正電荷にイオン化されたペプチドを得る。

イオン化した物質の分析法には、加速器内の一定距離を飛行する時間を測定する TOF (Time of flight, 飛行時間) 法や、磁場中における荷電粒子の挙動を利用するイオントラップ (Ion trap) 法、四重極 (Quadrupole) 法が利用される。一般に、イオントラップや四重極法は精度で TOF 法に劣るが、データの S/N が高い。市販されている製品は MALDI でイオン化し TOF で分析する MALDI-TOF/MS や、NSI でイオン化しイオントラップと四重極で分析するハイブリッド型 NSI-MS などがある。MALDI-TOF/MS は単独で使用する例が多いが、NSI-MS は数十 nl/min で送液することができるナノ液

体クロマトグラフィー (nano LC, nano Liquid chromatography) と組み合わせ、LC-MS として使用することが多い。

イオントラップ型質量分析計では、質量分析装置内でペプチドを開裂させ、アミノ酸配列の情報を得ることができる。ペプチドイオンをイオントラップ部に導き、ヘリウムなどの化学的に安定なガス中で振動エネルギーを加え互いに衝突させペプチドイオンを開裂させる (CID, Collision Induced Dissociation)。ポリペプチド結合を開裂するようにエネルギーを調節して、N 末端側の b イオンと C 末端側の y イオンを得る (図 1)。開裂前のイオンを前駆体イオン (Precursor ion)、開裂の結果生じたイオンをプロダクトイオン (Product ion) という。図 1 を例にとると、一度の開裂、すなわち MS/MS、により b イオンと y イオンがそれぞれ 3 種類 (ペプチド結合の数と一致する)、合計 6 種類のプロダクトイオンが生じる。この一連の測定によって得られた前駆体イオンとプロダクトイオンの質量のデータ揃いと、データベースに登録されているタンパク質をトリプシンで消化したペプチド (前駆体イオンに相当する) とそこから生じると予測されるプロダクトイオンの質量のデータ揃い、を比較することによってポリペプチドを同定する。MS/MS では前駆体イオンとプロダクトイオンの情報を組み合わせてアミノ酸配列情報を得るので、少ないタンパク質の消化断片からでも高い信頼性でタンパク質を同定できる。また、タンパク質の同定だけでなく化学架橋剤を利用した架橋部位の特定²⁾にも用いられる。

特別に高性能な質量分析計は別として、タンパク質の同定には既存のデータベースを参照するので、正確で信

1) 岡山大学大学院自然科学研究科

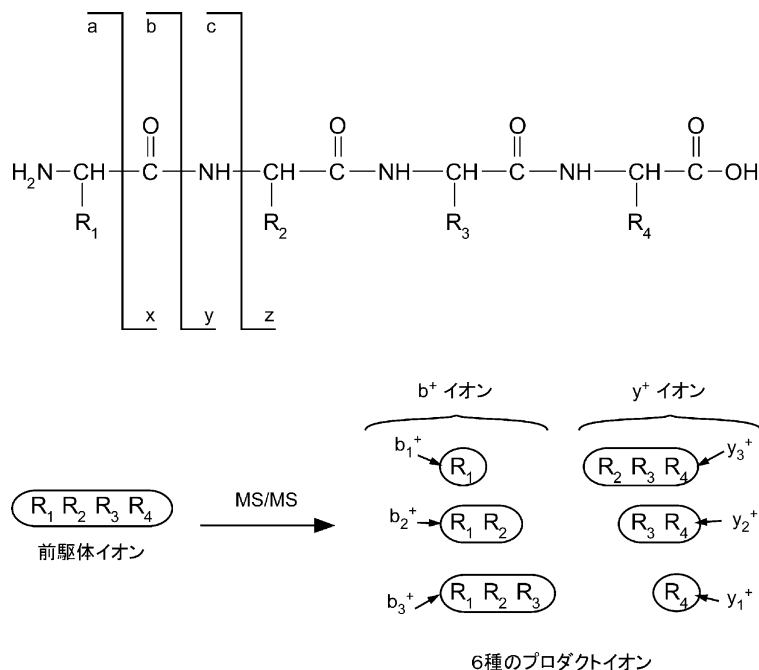


図1：MS/MSによるアミノ酸配列の同定。

質量分析装置内でポリペプチド結合を開裂させ、前駆体イオンからプロダクトイオン (b イオンと y イオン) を得る。ここに示すように、4 残基を含むポリペプチド (R₁R₂R₃R₄) からは 6 種類のプロダクトイオン (b₁⁺, b₂⁺, b₃⁺, y₁⁺, y₂⁺, y₃⁺) が生成される。

頼性の高いタンパク質データベースが必要不可欠である。

6.e.2 二次元電気泳動で分離したタンパク質の質量分析

質量分析計は感度が高いため、タンパク質を精度よく同定するには、可能な限り精製して混合物を除いておくことが良い。特に網羅的な解析には、多種類のタンパク質を高分解能で分離することができる二次元電気泳動法がよく用いられる^{2,3)}。ここでは等電点電気泳動後に二次元目の SDS-PAGE を行いスポットとして分離したタンパク質を質量分析で同定する手法を紹介する。

等電点電気泳動法とは、両性担体 (キャリアアンフォライト) を含む泳動ゲルに高電圧をかけて pH 勾配を形成し、タンパク質の等電点 (pI) によって分離する手法である⁴⁾。等電点電気泳動による膜タンパク質の分離は一般に難しいとされているが⁵⁾、変性剤濃度や緩衝液系の最適化やゲルの支持体にアガロースを使用するなど様々な工夫がされている⁶⁻⁹⁾。等電点電気泳動は、現在ではプレキャストのゲルストリップ (Immobilized pH gradient gel strip; IPG, GE Healthcare や Bio-Rad) を使うのが一般的である。さまざまな pI 値のタンパク質を分離するには pH 範囲の広い (pH 3-11) ものを、pI 値の近

いタンパク質同士を分離するには pH 範囲の狭いものを、それぞれ選択する。

二次元目の SDS-PAGE の後、分離されたタンパク質を染色し、スポットを切りだしてトリプシンなどのタンパク質分解酵素によりゲル内消化を行う。得られたペプチドの質量を質量分析計で求め、ゲノム情報と照合したタンパク質を同定する。表1にまとめたタンパク質検出法のうち、感度の高さ、脱色のしやすさ、そして肉眼でスポットを確認できる簡便さから銀染色がよく用いられる。

6.e.3 脂質除去処理¹⁰⁾

チラコイド膜など脂質を多く含むサンプルを等電点電気泳動にかけるときは、脂質除去¹⁰⁾を行う。水飽和クロロフォルムは、クロロフォルムと水をマイクロチューブに取り、ボルテックスした後静置して、下層に分離して使う。

1. サンプル 100 μl にメタノールを 400 μl 加えボルテックス後、21,500 g で 10 秒間遠心し上清を回収する。
2. 1 で回収した上清に水飽和クロロフォルムを 100 μl 加えボルテックスし、21,500 g で 10 秒間遠心後、上清を回収する。

表 1: 質量分析で使われるタンパク質検出法

検出法	感度	定量性	検出までに要する時間	検出装置
CBB 染色	△	○	2 時間程度	必要なし
銀染色	◎	×	2 時間程度	必要なし
蛍光色素染色	○	◎	5 時間程度	蛍光スキャナー
CyDye	○	◎	泳動直後	蛍光スキャナー

CBB 染色は感度が劣るが手軽に検出できる。しかし、質量分析前の脱色に時間がかかる欠点がある。蛍光色素染色は感度と定量性に優れ、質量分析サンプル調整前の脱色が不要だが、検出に蛍光スキャナーが必要である。CyDye は泳動前にタンパク質を蛍光色素でラベルするので泳動終了後直ちに検出できるが、まだ一般的ではない。銀染色は定量性に劣るものの、比較的短時間に十分な感度でタンパク質を検出できる。蛍光色素染色後の二重染色も可能であり、分析前の脱色も容易なので質量分析では最もよく使われる。

3. 水を 200 μ l 加えボルテックスし、21,500 g で 1 分間遠心する。
4. この遠心により二層に分配された液層の中間に分離されるタンパク質を吸わないように上の相 (水相) を除去する。そして下の相 (有機相) にメタノールを 300 μ l 加えボルテックスし、21,500 g で 2 分間遠心する。
5. 上清を除去し、沈殿に 95% (v/v) メタノールを 500 μ l 加えボルテックスし、21,500 g で 2 分間遠心する。
6. ステップ 5 をもう一度行い、沈殿を遠心濃縮機で乾燥させる。
7. 11 cm 長 IPG ゲルストリップを使う場合は 120 μ l の水で懸濁し、次に示す膨潤液を調製する。

6.e.4 Immobilized pH gradient gel strip (IPG) を用いた等電点電気泳動

ここでは 11 cm 長 IPG ゲルストリップの場合を紹介する。

1. 膨潤液 {サンプル 120 μ l に、以下の試薬を加え、水で 200 μ l に合わせる。尿素 0.096 g (8 M), チオ尿素 0.031 g (2 M), 10% (w/v) DDM 20 μ l (1% (w/v)), イソプロパノール 30 μ l (15% (v/v)), 1 M DTT 5 μ l (25 mM), IPG buffer 4 μ l (2% (v/v)), 0.1% (w/v) Orange G 4 μ l (0.002% (w/v))} をゲルストリップにかぶせ、専用のミネラルオイルで封入する。
2. 20°C, 50 μ A/ストリップ, 10 時間で膨潤させる。
3. 等電点電気泳動を行う。15 分間 300 V, 30 分間 500 V, 60 分間 1000 V, 7 時間 3000 V, 7 時間 8000 V, の順に、段階的に電圧を上げ、泳動終了後は 300 V を維持する。

6.e.5 アガロースゲルを用いた等電点電気泳動⁹⁾

泳動ゲルにポリアクリルアミドを使う IPG ゲルストリップでは、疎水性タンパク質の分離は芳しくない。しかし、ポリアクリルアミドよりも大きな分子櫛を持つアガロースを使うことで、疎水性タンパク質をきれいに分離できる等電点電気泳動法が最近開発された⁹⁾。ディスク泳動用のキャピラリー管にゲルを作成し、ディスク泳動装置で泳動する。アガロースは等電点電気泳動用を使い、ゲル化と泳動は 4°C で行う。

1. ディスク泳動用のキャピラリー管からアガロースゲルを取り出しやすくするため、1 ml サイズのピペットバルブをキャピラリー管の一端に取り付け、シグマコート (Sigma) の吸引・吐出を数回繰り返し、その後立てかけて乾燥させ、内壁をコーティングする。
2. 2 cm 角の透析膜 (dialysis membrane, size 27 (cut-off size ~14,000), 和光) を水で数回洗い、キャピラリー管の一端に透析膜を密着させ、短いゴム管で固定しパラフィルムを巻く。キャピラリー管先端に取り付けた透析膜は、泳動中も外さない。
3. サンプルとゲル溶液を混ぜてゲルを作成する。サンプルを後からロードする場合は、キャピラリー管上部に 5 mm ほど残してゲルを作成し、手順 6 で管をセットしてからサンプルをロードする。2.5 mm x 7 mm x 130 mm (内径 x 外径 x 長さ) のキャピラリー管 4 本分の場合、20 ml の三角フラスコに、ソルビトール 0.48 g, 等電点電気泳動用アガロース 0.04 g, 純水 2 ml を入れ電子レンジでアガロースを完全に溶解させる。手早く尿素 1.2 g とチオ尿素 0.6 g を加え、攪拌する。室温まで温度が下がったら攪拌しながら、20% (w/v) DDM を 200 μ l, Pharmalyte (キャリアアンフォライト) を 400 μ l, 1 M DTT を 8 μ l, サンプルを 20 μ l, の順に加える。{0.66 M ソルビトール, 1% DDM, 5 M

尿素, 2 M チオ尿素, 2 mM DTT, 10% Pharmalyte, 1% アガロース}.

4. 1 mL シリンジの先端にキャピラリー管よりも細いテフロンチューブを取り付け, チューブ先端をキャピラリー管の一番奥まで差し込んで, 液面上昇に合わせてチューブ先端を引き上げながら気泡ができないようにゲル液を注ぎ込む.
5. 4°Cで15時間以上かけてゲル化させる.
6. 下部泳動槽に陽極液{680 μ l リン酸(85%)/1000 ml}を入れ, キャピラリー管をセットする.
7. 泳動槽上部に陰極液{0.2 M NaOH}を入れる.
8. 50 Vで30分間, 100 Vで30分間, 300 Vで約24時間, 4°Cで泳動する.
9. ゲルの温度を十分に下げるため, 泳動終了30分前に電圧を50 Vに下げる.

6.e.6 SDS-PAGE

二次元目の SDS-PAGE は, 6 a 章に述べられた方法を用いる. 分析するタンパク質の性質(サイズ, 膜タンパク質であるか水溶性タンパク質であるかなど)により電気泳動システムを選択する. 一次元目の電気泳動で分離したタンパク質に SDS と SH 基還元剤を加えて変性させる. この時, メルカプトエタノールを還元剤として用いると, システイン残基が不可逆的な架橋産物(分子質量が 75.998 Da 増加する)を形成するので, SDS-PAGE の還元剤には DTT を使う.

等電点電気泳動を一次元目に行った場合, 二次元目の SDS-PAGE の濃縮ゲルは特殊形状のコームを使って作成すると良い(図2). 端のウェルに分子量マーカータンパク質を泳動すれば, 分離されたタンパク質スポットの分子質量を求めることができる.

等電点電気泳動に IPG ゲルストリップを用いた場合の二次元目の電気泳動.

1. ゲルストリップを取り出す.
2. 2.5 ml の平衡化液 A {50 mM Tris-HCl pH 8.8 (25°C) (1 M ストックより調製), 6 M 尿素, 30% (w/v) glycerol, 1% (w/v) SDS (20% ストックより調製), 16 μ M DTT (1 M ストックより調製), 0.00044% (w/v) BPB (1% ストックより調製)} にゲルストリップを15分間漬けて平衡化する.
3. 2.5 ml の平衡化液 B {50 mM Tris-HCl pH 8.8 (25°C) (1 M ストックより調製), 6 M 尿素, 30% (w/v) glycerol, 1% (w/v) SDS (20% ストックより調製), 4.5% (w/v) Iodoacetamid (使用直前に調製する),

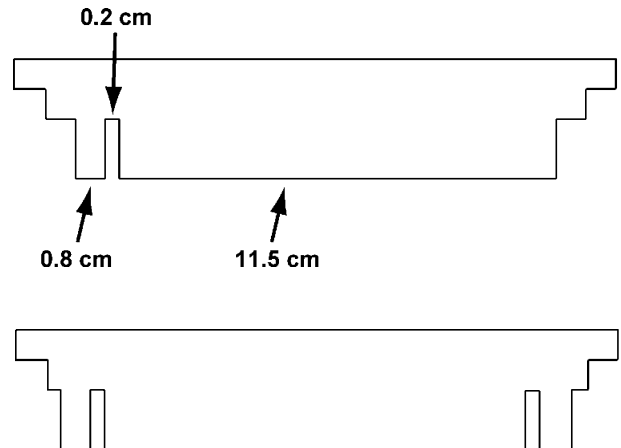


図2: 二次元電気泳動ゲルのコーム

二次元電気泳動では, 一次元目の IPG ゲルを載せるために特殊形状のコームを利用すると便利である. 一次元目のゲルを載せたときに二次元目のゲルとの間に隙間が生じないように, ウェルの深さをゲルの幅に合わせるように濃縮ゲルを作成する.

0.00044% (w/v) BPB (1% ストックより調製) にゲルストリップを15分間漬けて, 平衡化する. 平衡化中に0.5% (w/v) アガロースゲル溶液(核酸泳動用, 溶媒は水.)を準備する.

4. ゲルストリップを二次元目の濃縮ゲルとの間に空間が空かないように SDS-PAGE 上に載せ, 0.5% (w/v) アガロースゲル溶液で封入する.
5. 二次元目の電気泳動を行う.

等電点電気泳動にアガロースゲルを用いた場合の二次元目の電気泳動.

等電点電気泳動にアガロースゲルを用いた場合では, IPG ゲルストリップのようにプラスチック板が付いていないので壊れやすい. このため一次元目のゲルを二次元目の濃縮ゲル上にキャピラリー管から直接押し出す. アガロースゲルと濃縮ゲルの間に隙間を作らないために, 二次元目のゲルは濃縮ゲルをゲル板の上端までつくる.

1. 封入用アガロースゲル{0.8% (w/v) 低融点アガロース(核酸用), 10% (v/v) SDS-PAGE 用変性液{40 mM DTT, 5.2% (w/v) LDS, 172 mM Tris-HCl pH 6.8 (25°C), 0.5 M sucrose, 0.01% BPB}, 電子レンジで作成}を準備する.
2. キャピラリー管を泳動装置から取り出し, 透析膜を外す.
3. キャピラリー管の一端に1 ml サイズのピペットバルブをつけ, アガロースゲルを二次元目の濃縮ゲル上に押し出す.
4. 封入用アガロース液を注ぐ. 溶液の温度が高すぎる

と等電点アガロースゲルが溶けるので注意する。

5. 二次元目の電気泳動を行う。

6.e.7 銀染色

SDS-PAGE が終了したら、タンパク質を銀染色で検出する。通常の銀染色法で用いるグルタルアルデヒドは、タンパク質を化学架橋するので、質量分析が目的の場合は使用しない。高感度な染色法なので、必ず手袋を装着して行う。使用する水は蒸留水または超純水を用い、固定液以外の溶液は必ず使用直前に調製する。ここに示す液量は 15 cm x 15 cm の容器を基準としている。

1. 100 ml の固定液 {40% (v/v) メタノール, 10% (v/v) 酢酸} で 30 分間振盪しゲルを固定する。この状態で中断することができる。
2. 固定液を捨て、水で 10 分間振盪しゲルを洗浄する。3 回繰り返す。
3. 100 ml の 0.02% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ で 1 分間振盪する。
4. 水で 10 分間振盪しゲルを洗浄する。3 回繰り返す。この洗浄操作が不十分な場合、硝酸銀溶液を加えたときにバックグラウンドが茶色に着色する。
5. 100 ml の 0.2% (w/v) AgNO_3 でゲルを 30 分間振盪する。使用済みの硝酸銀溶液は別個に廃液入れを用意し、塩酸を加えて塩化銀の粗大沈殿を生じさせる。後日、廃液の上清をろ過し、低 pH 廃液として処分する。
6. 5 の間に発色液 {3% (w/v) Na_2CO_3 , 0.05% (v/v) HCHO} を 250 ml 調製し冷やしておく。
7. 発色操作のとき、容器の下に白い紙を敷くと、発色してくるタンパクを視認しやすい。廃液入れを二つ (A, B) 用意する。硝酸銀溶液を廃液入れ A に捨てる。水を 100 ml 注ぎ、ゲルが容器の底面につかないように容器を振盪させてゲルを軽くすすぎ、廃液入れ A に捨てる。この操作をもう一度繰り返す (洗いすぎると発色しなくなるので注意する)。発色液を入れ、ゲルを底面につけることなく容器を振盪させ、常に発色液をかくはんさせる。目的とするタンパクが検出されたら使用済みの発色液を廃液入れ B に捨て、速やかに次のステップに移る。
8. 150 ml の固定液を加え 5 分間振盪して発色反応を停止する。
9. 酢酸臭がなくなるまでゲルを水洗する。4°C でゲルを水中に保存可能だが、時間経過に伴いコントラストが失われていくので注意する (図 3)。

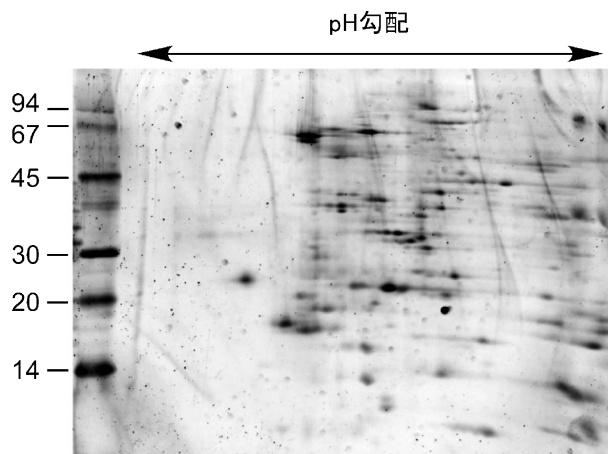


図 3: 二次元電気泳動による膜タンパク質の分離
クラミドモナスの膜タンパク質を多く含むサンプルを分離した後、スポットを銀染色した。左のレーンはタンパク質分子量マーカーである。

6.e.8 タンパク質のゲル内消化 (In-gel digestion)

ゲル内消化では一般的にトリプシンを使うが、Arg 残基で化学架橋した産物を同定するための質量分析には、Lys-C や V8 protease を使うこともある¹¹⁾。還元されたシステイン残基が再酸化されないようにヨードアセトアミド処理をする (カルボキシアミドメチルシステインとなり質量が 57.022 Da 増加する) こともある¹²⁾。しかし、この操作を省略しても質量分析に問題はほとんど生じない^{13,14)}。水は超純水を使い、使用する溶液のうち、ストック溶液以外は必ず使用直前に調製する。作業には手袋を着用し、使用するチップ・チューブはオートクレーブしない。1.5 ml のチューブを使用する例を示すが、非常に小さいゲル片を取り扱う場合は 0.2 ml や 0.5 ml のチューブを使うこともある。ステップ 1, 5, は -80°C で、7 は乾燥した状態で、それぞれ操作を中断することができる。

1. 100% エタノールで刃を洗浄したのち、ゲルからバンド・スポットを切りだし、ゲル片が大きいときは一辺 1~2 mm 程度の立方体 2, 3 個にする (図 4 A)。
2. 水 500 μl を加えボルテックスし、水を捨てる。4 回繰り返す。
3. 銀染色液脱色液 {30 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ と 100 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を等量混合させる。} を 100 μl 加え、8 分間静置する。
4. 脱色液を捨て、水 500 μl を加えてボルテックスし水を捨てる。
5. 4 を 4 回繰り返す。4 回で不十分な場合はゲルが無

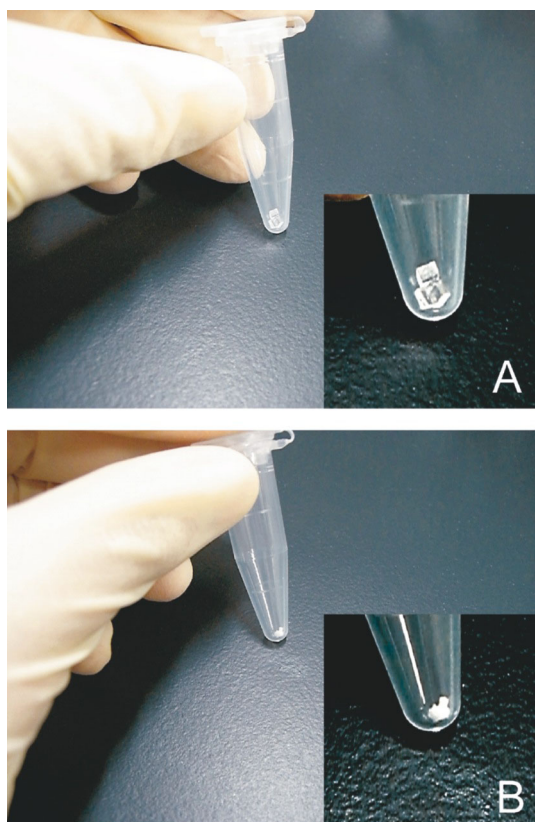


図4：ゲル内消化前後のゲル片の様子
A；切り出したゲル片。一辺1 mm程度の立方体2, 3個に切りそろえておくとう作業しやすい。B；遠心濃縮機によって乾燥したゲル片。白く小さいゲル片になっている。この状態は静電気によって飛びやすいので注意する。

色になるまで繰り返す。

6. アセトニトリル (ACN) 溶液 (ACN：水=3：2, (v/v)) を 500 μ l 加えボルテックス後 20 分間静置する。
7. 溶液を除去して遠心濃縮機で乾燥させる (20 分間程度)。白く小さくなって、ゲル片が十分に乾燥しているかを確認する。乾燥したゲル片は静電気により飛びやすいので注意する (図 4 B)。
8. 50 μ l の 50 mM NH_4HCO_3 (1 M ストックより調製) を加え 10 分間静置する。
9. 50 mM NH_4HCO_3 溶液を除去する。除去した体積を記録し、減少した体積から必要なトリプシン溶液の体積をあらかじめ把握する。
10. 6 から 9 をもう一度繰り返したあと、6 から 7 を行う。
11. トリプシン溶液 {60 ng trypsin/ μ l 溶液, sequencing grade, modified trypsin, Promega (cat. V5111) 20 μ g/vial に, 40 μ l の trypsin resuspension buffer (トリプシンに付属) と 293 μ l の 50 mM NH_4HCO_3 を加

える。調製後は冷蔵保存し 2 週間程度で使い切る。} をゲル片に各 10 μ l 加え、氷上に 20 分間静置する。

12. 余分なトリプシン溶液を除き, 30 μ l の 50 mM NH_4HCO_3 を加える。
13. 30°C で 15 分間インキュベート後 37°C で 16 時間インキュベートする。
14. 50 mM NH_4HCO_3 を新しいチューブに移し, ACN 溶液 (ACN：水=3：2, (v/v)) を 20 μ l 加えて 21,500 g, 25°C で 20 分間遠心する。微少なゲル片を吸わないように上清を回収後, さらに ACN 溶液 {ACN：水=3：2, (v/v)} と ACN を各 10 μ l ずつ加え, 21,500 g, 25°C で 25 分間遠心し, 上清を回収する。
15. 14 で回収した上清が完全に乾固するまで遠心濃縮機で乾燥させる (1 時間程度)。
16. 分析まで -80°C で保存する。

固相カラムによる精製

LC-MS/MS の場合, トラップカートリッジが装着されている機器では精製は必要ない。

1. 乾固させたサンプルに溶液 2 {アセトニトリル 2% (v/v), TFA 0.1% (v/v)} を 30 μ l 加え, ボルテックスする。
2. 微量遠心機で 5 分間最高回転数で遠心して, 沈殿した微少なゲル片を吸わないようにして上清を 25 μ l 回収し, バイアルに入れ, オートサンプラーにセットする。

しかしながら, LC-MS/MS のラインやカラムは非常に細いので, 微少なゲル片の混入は機器の不具合を起こすこともある。遠心分離による微粒子除去が技術的に難しい場合はスピнкаラムを使うこともある (ペプチド低吸着タイプ of メンブレンで, 孔径は 0.2 μ m) が, ここでは固相カラム C-TIP (AMR, Japan) による精製例を紹介する。MALDI-TOF/MS では塩類の混入が分析に影響するので, 固相カラムによる精製は必要である。

1. C-TIP (規格 10 μ l) を 1.5 ml チューブに入れる。
2. 洗浄のために, C-TIP の上側から溶液 1 {アセトニトリル 90% (v/v), TFA 0.1% (v/v)} を 10 μ l 注ぐ。
3. C-TIP を 2,000 g で 15 秒間遠心する。溶液 1 がチップ先端から流れ出ることを確認する。
4. 溶液 2 {アセトニトリル 2% (v/v), TFA 0.1% (v/v)} でステップ 2 と 3 を行い, C-TIP 先端のカラムを湿潤状態にする。
5. C-TIP を入れているチューブを新しいものに替えて, 2,000 g で 10 秒間遠心してカラムの上に液が残らないようにする。

6. 溶液2で懸濁したサンプル溶液を2の方法で注ぐ。カラムの上から液がなくなるまで500gで遠心してサンプルをカラムに吸着させる。
7. 洗浄のために溶液2をステップ2の要領でC-TIPの上側に注入し、2,000gで15秒間遠心する。
8. 7をもう一度行い、C-TIPを入れているチューブを新しいものに替えて、2,000gで10秒間遠心してカラムの上に液が残らないようにする。
9. ステップ2の要領で、溶出のために10 μ lの溶液1をC-TIPに注入する。
10. 500gで約10秒間遠心して溶出させる。
11. 濃縮遠心機で乾固させる。
12. NSI-MS/MSでは溶液2に懸濁しバイアルにセットする。MALDI-TOF/MSでは、0.1%(v/v)TFA溶液に懸濁しマトリックス溶液{様々なマトリックスがあるが、ここでは一例を挙げる。2mg (α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid)を、超音波などを使って100 μ lの50%(v/v)ACN, 0.1% TFA (v/v)に完全に溶解させる。飽和溶液なので沈殿が少し残る。}と混和させターゲットプレート(金属製)の所定スポット上に結晶を作る。

分析例

LC-MS/MSの場合、カラムから分離されるペプチドを連続的にイオン化し分析する。ペプチドの種類が多く検出に十分な濃度である場合やリン酸化部位を同定する場合は、取得する情報を増やすためにLCの溶出溶液のアセトニトリル濃度の勾配をゆるくして長時間かけて溶

出する。ペプチドの種類が少なく検出限界近くの濃度である場合はアセトニトリルの濃度溶液の勾配をきつくして短時間で溶出する。溶液A{アセトニトリル2%(v/v), 酢酸0.1%(v/v)}と溶液B{アセトニトリル90%(v/v), 酢酸0.1%(v/v)}を使う場合をここに紹介する。

比較的短時間な35分間の溶出では、B溶液の濃度を5%から75%まで20分間かけて上げ、その後一気に95%まで上げて5分間維持し、5%に戻す。比較的長時間な60分間の溶出では、B溶液の濃度を5%から95%まで50分間かけて上げ、その濃度で5分間維持し、5%に戻す。

MALDI-TOF/MSの場合は、サンプルとマトリックスを混和させて作った結晶をパルスレーザーで撃つ。分析時間は1スポットあたり数分以内だが、LC-MS/MSと異なり、多数のタンパク質が様々な濃度で混在している場合や低分子質量の夾雑物が多い場合、ペプチドが一本しか存在しない場合は、タンパク質の同定が難しい。

データ解析(図5)

市販の解析ソフトを使うのが一般的である。購入が難しい場合は、データを抽出してWebサイト(<http://www.matrixscience.com/>や<http://prospector.ucsf.edu/>)で解析するか、自作サーバー上で解析する。

解析アルゴリズムはMASCOT¹⁵⁾とSEQUEST^{16,17)}がよく使われる。MASCOTを使った解析では得られた質量の情報を網羅的に検索し、結果はP(Probability)という確率で表される。SEQUESTを使った解析ではシグナル強度の情報も加味して、X-corr(cross correlation)という相関係数の値で結果が表される。いずれの解析ア

A

Scan#	Reference Peptide	MH+	Δ M	z	P (pro)	Sf	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Ions)	Count
1	NCBIChloroplastNP_558377.1psaA, photosystem II protein D1	1.2e-008	3.80	40.2	13.4	35916.3	4 (4 0 0 0 0)					
2	NCBIChloroplastNP_558375.1psaA, PSI P700 apoprotein A1; PsaA, photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	1.9e-011	3.79	40.2	5.3	83110.5	4 (4 0 0 0 0)					
3	NCBIChloroplastNP_558426.1psbD, photosystem II protein D2	3.3e-016	3.78	40.2	12.8	38421.5	4 (4 0 0 0 0)					
4	NCBIChloroplastNP_558404.1psaB, PSI P700 apoprotein A2; PsaB	1.9e-006	2.85	30.2	4.5	82956.4	3 (3 0 0 0 0)					
5	NCBIChloroplastNP_558388.1psbB, photosystem II P680 chlorophyll a apoprotein; P5II 47 kDa protein	2.6e-008	2.75	30.2	6.7	56870.4	3 (3 0 0 0 0)					
6	NCBIChloroplastNP_558422.1psbC, P5II 43 kDa protein; CP43	8.1e-006	1.82	20.2	6.5	56696.4	2 (2 0 0 0 0)					

B

Scan#	Reference Peptide	MH+	Δ M	z	P (pro)	Sf	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Ions)	Count
1	NCBIChloroplastNP_558377.1psaA, photosystem II protein D1	5.9e-010	4.73	50.2	15.3	39616.3	5 (5 0 0 0 0)					
1414	R ETTTETSAGEQYR.F	1459.62	0.53	2	5.9e-010	0.97	4.068	0.548	1203.1		1	19/21
2054	R RENISLWAR.F	1115.57	0.95	2	3.7e-005	0.97	2.775	0.242	510.1		1	14/16
2334	R ANLGMVIMHER.N	1286.80	0.11	2	3.7e-005	0.96	3.228	0.393	1561.7		1	17/20
3090	R LFQYASFINRSR.S	1469.73	1.89	2	1.6e-007	0.98	4.394	0.534	1673.4		1	19/22
3249	R VLVVWQHR.A	1314.72	0.59	2	1.1e-007	0.95	3.950	0.403	1277.1		1	19/20
2	NCBIChloroplastNP_558426.1psbD, photosystem II protein D2	1.7e-010	4.59	50.2	15.3	39421.8	5 (5 0 0 0 0)					
1912	R AWMAAGDQHER.L	1439.65	0.32	2	2.9e-009	0.97	4.274	0.524	1202.3		1	17/22
2694	R AYDFVQGER.A	1227.90	0.14	2	4.9e-005	0.96	3.454	0.420	1227.1		1	15/19
2774	R KILLMEGR.A	1041.51	0.19	2	1.4e-054	0.99	2.330	0.219	515.5		1	15/16
2900	R AAEDREFETPK.N	1547.99	0.54	2	1.7e-010	0.97	4.507	0.442	1119.1		1	20/24
3338	R LVFPEEVLPR.G	1193.88	0.74	2	1.6e-006	0.91	2.645	0.455	689.9		1	15/18

図5: 解析の結果

A; 異なる分子質量のタンパク質が同一サンプルに同定された例。見かけ上66kDa付近に分離されたPsaAとPsaBに相当するバンドを分析した結果、見かけ上32kDaのD1(PsbA)とD2(PsbD)、45kDa付近のCP43(PsbC)とCP47(PsbB)由来のポリペプチドのシグナルも検出された。本来はPsaAとPsaBのみが検出されるはずであるが、D1とD2は凝集しPsaAとPsaBの位置に泳動されたことにより検出されたと考えられる。また、ゲルを切り出すときに刃の洗浄が不十分であったために、直前に切り出したCP43とCP47は混入したと考えられる。B; 同一サンプルに、ほぼ同じ分子質量のタンパク質が同じ程度の確からしきで同定された例。SDS-PAGEによるタンパク質分離が不十分で、D1とD2が重なって泳動されたことが原因と考えられる。

ルゴリズムも得られた値が大きいほど信頼性が高い。MALDI-TOF/MS などペプチドを開裂させない MS 解析では、得られた前駆体イオンの質量とデータベースを照合する解析（前駆体イオンにおける PMF (Peptide Mass Fingerprinting) 解析）を行うことが多いので MASCOT がよく使われ、タンパク質単位で結果を解釈する。これに対してペプチドを開裂させアミノ酸配列情報を得る LC-MS/MS 解析は MASCOT と SEQUEST のいずれかが使われ、ペプチド単位で結果を解釈する。

SEQUEST を使った解析結果の実例を図 5 に示す。明らかに異なる分子質量のタンパク質が同定された場合、凝集産物や分解産物が重なって泳動している、切り出し時に混入した可能性がある (図 5 A)。また、LC-MS/MS の場合は先に分析したサンプルが経路に残って次の分析に持ち越された (キャリーオーバー) 可能性も考えられる。このような場合、LC にインジェクションする量を減らすか、サンプルを含まない溶液 (ブランク) をサンプルの直後にインジェクションし、どれほどのペプチドが次の分析に持ち越されているか様子を見る。似た分子質量のタンパク質が同定された場合、一方が圧倒的に高い値を持っているならば、値の高い方が真のタンパク質、あるいは量の多いタンパク質であるとする。同程度の値の場合 (図 5 B)、電気泳動による分離が不十分であるために、同じバンド・スポットにタンパクが重なっていると解釈する。

リン酸化部位の同定 (図 6)

質量分析計はタンパク質を同定すると同時に翻訳後修飾に関する情報も得られる。例えば、ESI (NSI) -MS では、二度イオンを開裂させる MS/MS/MS によってリン酸化部位を特定できる。

リン酸化されたペプチドは、一度目の開裂ではペプチド結合よりリン酸基の開裂が主に起こる。したがって、リン酸化ペプチドは、一度目の開裂で脱リン酸化に相当する質量が減少するペプチドとして同定される (価数が変わらず質量が減少するため、ニュートラルロス (Neutral loss) という)。もしリン酸化されたペプチド内にリン酸化修飾を受ける可能性のある残基 (Ser, Thr, Tyr) が複数存在すると、リン酸化部位は同定できない。しかし、脱リン酸化には脱水反応が伴うので、18 Da の質量減少が生じる。これを利用して、脱リン酸化した前駆体イオンをさらにもう一度開裂させて脱水により質量減少したプロダクトイオンの情報を利用してリン酸化部位を特定する。図 6 では y_3^+ , y_2^+ , b_3^+ において質量が減少していることから、これらに共通して存在する R_3 で脱リン酸

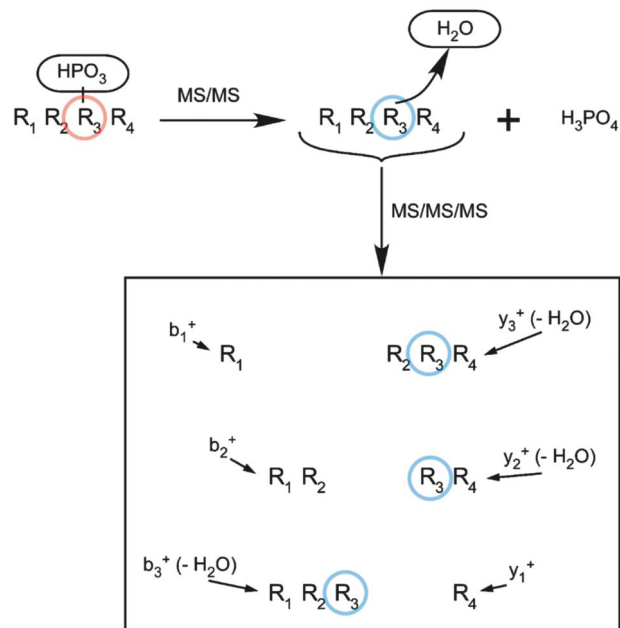


図 6: ニュートラルロスを利用したリン酸化残基の同定
桃色で示した残基 (図では R_3) がリン酸化したペプチドを MS/MS にかけると脱リン酸化し R_3 の側鎖が脱水する。脱リン酸化したペプチドを前駆体イオンとしてさらに MS/MS/MS を行う。水色で示した部位では脱水化により質量が 18 kDa 減少しているとする。

化による脱水反応が起きていると言える。したがって、 R_3 がリン酸化部位であると特定できる。

この手法でリン酸化部位を特定するには比較的大量のリン酸化ペプチドを必要とするので、金属カラム (鉄やガリウム、チタンなどの金属を使った IMAC (Immobilized metal affinity column) を使う) でリン酸化ペプチドを濃縮したサンプルを分析する。ゲル内消化の過程で脱リン酸化しやすいので、リン酸化タンパク質は電気泳動で分離せず、溶液のままトリプシンでタンパク質を消化し (In-solution digestion) 分析することもある^{18,19)}。

参考文献

- 1) F. Sommer, F. Drepper, W. Haehnel, & M. Hippler, *J Biol Chem* **281** (2006) P.35097.
- 2) M. Hippler, J. Klein, A. Fink, T. Allinger, & P. Hoerth, *Plant J* **28** (2001) P.595.
- 3) E. J. Stauber & M. Hippler, *Plant Physiol Biochem* **42** (2004) P.989.
- 4) P. H. O'Farrell, *J Biol Chem* **250** (1975) P.4007.
- 5) Y. Akiyama & K. Ito, *EMBO J* **4** (1985) P.3351.
- 6) T. Rabilloud, C. Adessi, A. Giraudel, & J. Lunardi, *Electrophoresis* **18** (1997) P.307.
- 7) T. Rabilloud, *Electrophoresis* **19** (1998) P.758.

- 8) D. Seigneurin-Berny, N. Rolland, J. Garin, & J. Joyard, *Plant J* **19** (1999) P.217.
- 9) Y. Kashino, T. Harayama, H. B. Pakrasi, & K. Satoh, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **849** (2007) P.282.
- 10) D. Wessel & U. I. Flugge, *Anal Biochem* **138** (1984) P. 141.
- 11) A. Tohri, N. Dohmae, T. Suzuki, H. Ohta, Y. Inoue, & I. Enami, *Eur J Biochem* **271** (2004) P.962.
- 12) A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, & M. Mann, *Anal Chem* **68** (1996) P.850.
- 13) K. Speicher, O. Kolbas, S. Harper, & D. Speicher, *J Biomol Tech* **11** (2000) P.74.
- 14) B. Granvogl, P. Gruber, & L. A. Eichacker, *Proteomics* **7** (2007) P.642.
- 15) D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, & J. S. Cottrell, *Electrophoresis* **20** (1999) P.3551.
- 16) Jimmy K. Eng, Ashley L. McCormack, & John R. Yates, *Journal of the American Society for Mass Spectrom* **5** (1994) P.976.
- 17) J. R. Yates, 3rd, J. K. Eng, A. L. McCormack, & D. Schieltz, *Anal Chem* **67** (1995) P.1426.
- 18) M. V. Turkina, J. Kargul, A. Blanco-Rivero, A. Villarejo, J. Barber, & A. V. Vener, *Cell Proteomics* **5** (2006) P. 1412.
- 19) A. V. Vener, *Biochim Biophys Acta* **1767** (2007) P.449.