

質量分析計を用いたインタクトタンパク質の測定

蔵本技術部門
研究開発支援グループ

西野 耕平 (NISHINO Kohei)

1. はじめに

プロテオミクスのように生体内に存在するタンパク質の情報を一斉に得る手法は非常に有用である。質量分析計 (MS) を用いたプロテオミクスにはボトムアッププロテオミクスとトップダウンプロテオミクスの2通りの方法がある。ボトムアッププロテオミクスではタンパク質を酵素で切断し、分析に適したペプチドにして LC-MS/MS で一斉に測定する。タンパク質を断片化するため、タンパク質の全長の情報は失われ、配列・修飾情報に欠失が生じる。

一方トップダウンプロテオミクスでは酵素で切断せずインタクトタンパク質のまま測定するため、ボトムアッププロテオミクスでは得られない情報を得ることができる。本稿では著者が質量分析計でインタクトタンパク質を測定した結果を報告する。精製度の高いタンパク質に対して、前処理で人工的に修飾を付加した。修飾に相当する質量シフトを確認することが本稿の目的である。

2. 実験材料・実験方法

2. 1 実験材料

Trypsin (Thermo Fisher Scientific, 90058) を測定するタンパク質とし、前処理の試薬には Dithiothreitol (DTT) (Thermo Fisher Scientific, 20291) および Iodoacetamide (IAA) (Thermo Fisher Scientific, A39271) を使用した。

2. 2 還元・アルキル化処理

Trypsin (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 50 mM 酢酸に溶解済み) 6 μl を 95°C で 10 分間インキュベートした (失活処理)。次に、50 mM Tris-HCl 緩衝液を 54 μl 加えて混合した。希釈した Trypsin 溶液を 3 等分し、うち 2 試料に 100 mM DTT を 1 μl 加え 30 分間静置した (還元処理)。静置後、DTT を加えた 2 試料のうち一方に 1 μl の 550 mM IAA 加えて、暗所で 30 分静置し

た (アルキル化処理)。

2. 3 LC-MS 測定

測定には UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific) と Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific) を繋いだ LC-MS システムを使用した。トラップカラムは C₁₈ PepMap100 (Thermo Fisher Scientific) を、分析カラムには 15 cm の C₁₈ 逆相カラム (日京テクノス) を用いた。移動相 A には 0.1% ギ酸-蒸留水、移動相 B には 80% アセトニトリル-0.1% ギ酸をそれぞれ用いた。グラジエントは 0-30 分で移動相 B は 5% を維持し、30-45 分で移動相 B を 80% まで上げた。45-50 分で移動相 B を 95% まで上げ、60 分まで 95% を維持した。60-61 分で移動相 B を 5% まで戻し、70 分まで維持した。

質量分析計の設定はポジティブモードで MS1 の分解能を 24 万に、試料範囲は m/z 1000-4000 に設定した。

各試料は LC-MS へ打ち込む前に 3% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸で 4 ng/ μl に希釈し、4 μl を LC-MS へ導入した (約 16 ng 相当)。

Mass Spectrum の可視化には Xcalibur Qual Browser (Thermo Fisher Scientific) を用いた。多価イオン同位体パターンでのコンボリューションには BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。得られたインタクトタンパク質質量情報の可視化には R の metaMS パッケージを用いた^[1]。

3. 結果・考察

実験手順に従って、3 等分した Trypsin に何も処理しなかった試料を「未処理」、DTT のみ処理した試料を「還元処理」、DTT および IAA の両方で処理した試料を「アルキル化処理」と名付けた。

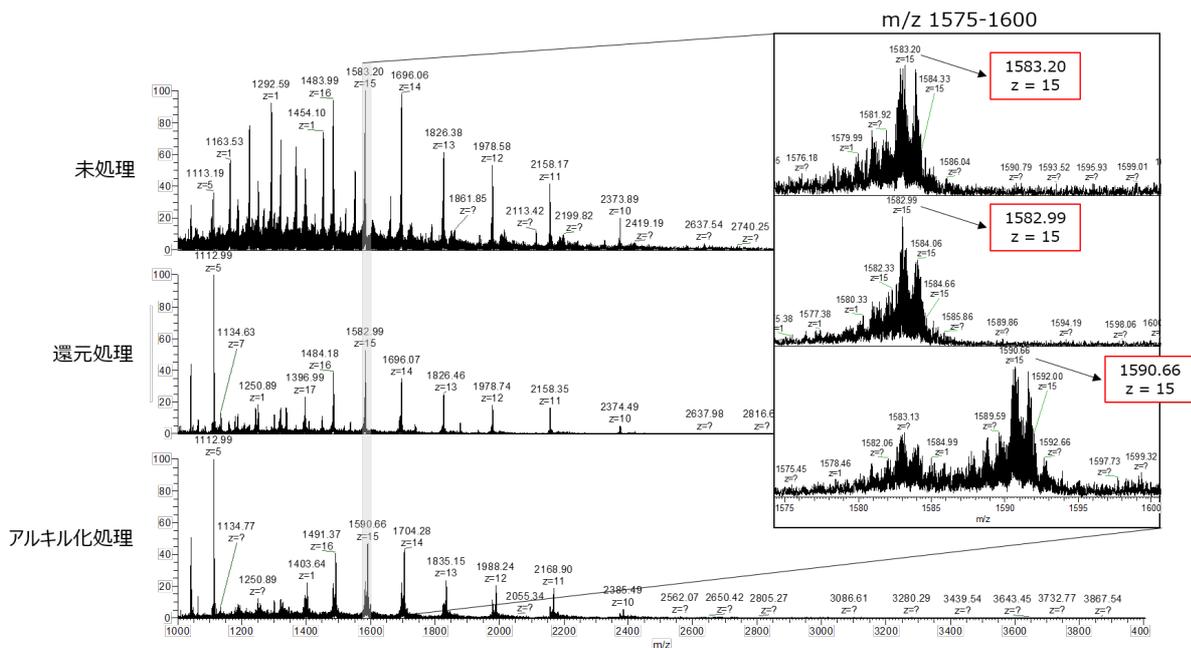


図1 多価イオン同位体パターンの検出

左は m/z 1000-4000 の Mass Spectrum

右は m/z 1575-1600 の Mass Spectrum

赤枠は各試料で最も強度の高い15価のスペクトルを示している。

各試料において、約45分付近にピークが観察された（データ示さず）。この付近の Mass Spectrum を確認すると10~17価の同位体パターンが観察された（図1）。

15価の主イオンの m/z は「未処理」で1583.22、「還元処理」で1582.99および「アルキル化処理」で1590.66であった（図1の赤枠）。

タンパク質の質量を知るためには同位体パターンからモノアイソトピックイオンを見つける必要がある。BioPharma Finder1.0を使用し、価数の異なる同位体パターンからモノアイソトピック質量を求めた。ソフトウェアで求めた質量情報および各スペクトルの強度情報からRを使って図を作成した（図2）。各試料において最も強度の高い質量スペクトルを赤枠で示している。それぞれ、「未処理」では23714.8029、「還元処理」では23716.7896、「アルキル化処理」では23830.8362であった。「還元処理」と「アルキル化処理」の差は114.0466である。これは、アルキル化により起こる質量シフト57.021464のおよそ2つ分に相当する。「未処理」と「還元処理」の差は1.9867で1つのジスルフィド結合が還元処理

された際に起こる質量シフト2.015650に相当する。このことから、Trypsinを還元・アルキル化処理を施した際に生じるシステイン2つ分の質量シフトを確認できた。しかし、UniProt（タンパク質データベース）ではTrypsinは2つ以上のシステイン残基を含んでおり、製造段階でシステイン残基になんらかの処理を施している可能性がある。

また、各試料において1番目と2番目に強度の高いスペクトルの質量差を調べると、「未処理」では14.9701、「還元処理」では13.9927および「アルキル化処理」では15.021である。Trypsinは自己消化を抑える目的でリジン残基の還元メチル化処理が施されている（製品HPより）^[2]。メチル化が起こると14.015650の質量シフトが起こる。これは、「還元処理」においてみられる質量シフトと近似している。「未処理」および「アルキル化処理」で見られる質量シフトはメチル化+ α （例えば脱アミド化）の修飾が起こっている可能性がある。

4. 本分析系の活用方法と今後の課題

本分析では約24 kDaのタンパク質をその

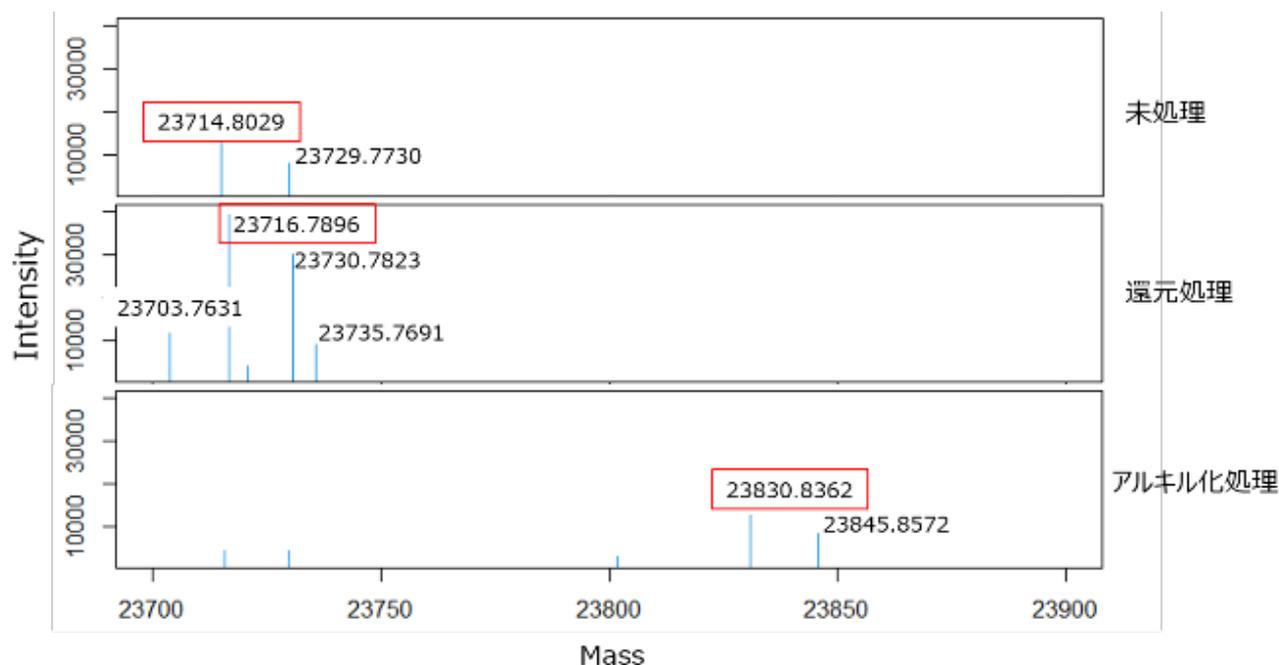


図2 タンパク質の質量スペクトル
赤枠は各試料で最も強度の高いスペクトル

まま質量分析計で検出し、還元・アルキル化による質量シフトを確認することができた。今回の実験がうまくいった理由として、① 夾雑物の少ない試料であった、② 比較的低分子のタンパク質であった、③ 確認できた修飾が既知のものであった、の三点が挙げられる。現段階でも「精製したタンパク質に分解が起こっていないか」、「精製時に余計な修飾が入ったか」等の確認を目的とする場合、十分利用できる。ただし、タンパク質の溶媒には質量分析計で使えるものにする必要がある（課題①）。また、タンパク質の分子量が 30 kDa を超える場合は質量分析計の設定を変更する必要がある（課題②）。

今回は MS1 を使用した解析に留めたが、本来であればタンパク質全長のスペクトルを MS/MS に掛けフラグメントイオンから修飾位置の情報を得ることもできる。これを行うには質量分析計の設定を最適化や別の解析ソフトウェアの選定が必要である（課題③）。

最後に、今回は一種類のタンパク質の解析を行ったが、前段の LC でタンパク質を分離することで複雑性の高い試料も分析可能になる。LC の分離にはカラムの選定やグラジエント条件の検討などが必要である（課題④）。現

段階での分析系に興味のある人がいればお声掛けいただきたい。

謝辞

本稿にご助言を頂きました、徳島大学先端酵素学研究所細胞情報学分野の小迫英尊教授に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Wehrens R, Weingart G, Mattivi F (2014). "metaMS: An open-source pipeline for GC-MS- based untargeted metabolomics." *J. Chrom. B*, **966**, 109-116.
- [2] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/90058#/90058>