

# コアラボ紹介

## コアラボラトリー蛋白質解析室

室長：竹縄忠臣、担当教官：大海忍、  
質量分析技術指導：福田宏之、  
ペプチド合成：市川希

コアラボラトリー蛋白質解析室では、①一次構造解析、②ペプチド合成、③タンパク質の調製と機能解析について研究のサポートをしています。今回は、質量分析計(MS; mass spectrometer)を利用した一次構造解析を紹介します。

MSは文字通り物質の質量を測定する装置です。イオン化した試料を真空中で分離し検出するため、精度良く高感度で質量を知ることができます。MSがタンパク質の解析に汎用され始めたのは1990年代半ばです。医科研でもちょうどRI発生工学棟(4号館)が完成したときに導入を検討しましたが、時期尚早ということで設置を断念した経緯があります。

### 1. 基本的な実験の流れ(図1)

MSによる蛋白質同定について基本的な実験の流れを図1に示します。後に図4でも触れますが、試料や目的によって様々な方法を組み合わせてサンプルの準備をします。蛋白質分画ではポリアクリルアミドゲル電気泳動が主流になっています。より細かな分離を必要とする場合は二次元電気泳動(等電点電気泳動+SDS-PAGE)をして目的のスポットを切り出します。電気泳動で蛋白質を単離したときはゲル内消化によってペプチドに断片化します。クマジーブリリアントブルー(CBB)で染色した蛋白質をゲルごと切り取り、プロテアーゼをゲルの中にしみこませてペプチドに分解します。プロテアーゼとしてトリプシンを使えば、C末端がリシンあるいはアルギニンのペプチドが生成します。短くなったペプチド断片はゲルから遊離するので、濃縮・脱塩してMSのサンプルプレートに載せます。イオン化法のひとつとしてマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption ionization; MALDI)があります。ペプチドをケイ皮酸などのマトリックス飽和溶液とプレートに塗布、結晶化し、これにレーザー照射すると、マトリックスからペプチドヘイオンが転移されます。真空中高電圧下ではペプチドはエネルギー保存則  $eV = \frac{1}{2}mv^2$  にしたがって飛行します。一定距離の飛行時間から質量と電荷の比(m/z)が求まります。一種類の蛋白質から派生したペプチドの質量情報を束にしてデータベース検索を行います。ペプチド断片の質量データだけから蛋白質を推定していく方法が次に述べるペプチドマスフィンガープリント(PMF)法です。

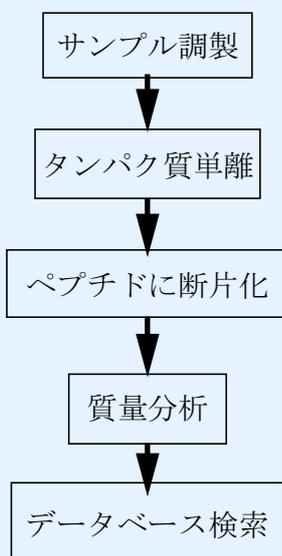
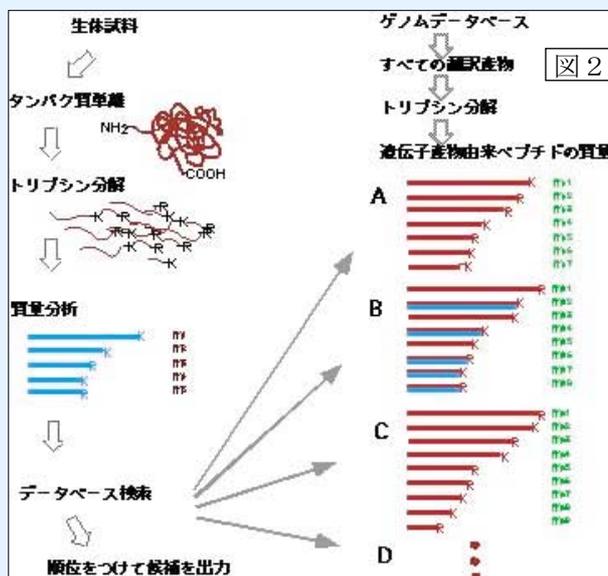


図1

### 2. ペプチドマスフィンガープリント法(図2)

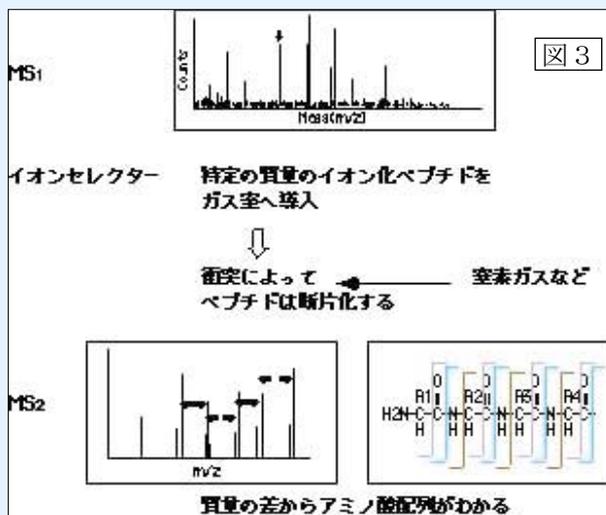
MSでは、トリプシンなどで分解されたペプチドについて、質量情報だけがわかります。一般に蛋白質にはトリプシンが認識するリシン残基とアルギニン残基がいくつもあります。したがって、複数個のペプチドがトリプ



シン消化で生成し、その中でイオン化されて検出できたものの質量が測定されます。データベース検索ソフトウェアを使っていくつかの質量情報を束にしてインプットします。以下は検索エンジンとデータベースとのやりとり(インシリコ)での話です(図4の右側)。塩基配列から翻訳産物のアミノ酸配列がわかります。これをトリプシンで消化するとC末端にリシンかアルギニンをもつペプチドに分割され一義的に質量が算出されます。この値と先にインプットした質量データを照らし合わせて確からしさの高いものから遺伝子産物の候補を一覧にします。実際の蛋白質は翻訳後修飾を受けていますから理論値とぴったり合うことはありません。したがって、スコア(確からしさ)が高くて候補にとどまると考えてください。

### 3. 配列情報を得るには(図3)

PMF法でうまく結果が出せるためには、①蛋白質が



単一になっている、②夾雑する蛋白質が無視できる量である、そして③ゲノムデータベースが確立していることが必要です。多くの場合、特に微量の蛋白質で蛋白質を同定しようとするときは、PMF法だけでは候補を絞り込めずアミノ酸配列情報が必要になってきます。配列情報は実質的にタンデム型質量分析計 (MS/MS) で得られます。図3にMS/MSの概要を示します。文字通り2つのMSが直列になっており、前半は先に述べたMSです。1段目のMS<sub>1</sub>で得られた特定の質量のペプチドをイオンセクターによって捕捉し、ガス衝突室へ導きます。ここで、希ガス分子と衝突したペプチドは更に断片化し、ちょうどペプチド結合が開裂した断片も生じます。派生したペプチドを2番目のMS<sub>2</sub>で測定します。これらペプチド断片の質量差からアミノ酸の並びを決定できます。例えば、5つのアミノ酸の並び方は $20^5=320$ 万通りありますから1本のペプチドから遺伝子産物を推定することも可能です。



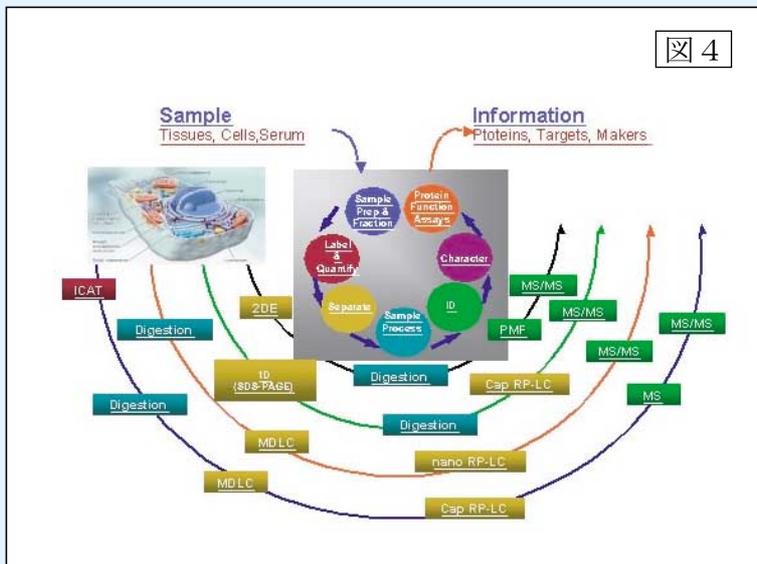
写真 合同ラボ棟1階の質量分析室。

右奥がMS/MS主力機MALDI-TOF/TOF、左はESI-Q/TOF、ナノLCが直結されている。蛋白質をペプチドに断片化するための作業を中央の実験台で行う

#### 4. 多様な方法論 (図4)

蛋白質の性質が多様であるがゆえにそれを扱う方法論も様々です。したがって、MSを利用した蛋白質同定や翻訳後修飾部位の解析はいくつものやり方があります。例えばICAT法は、比較したい状態での蛋白質を安定同位元素を用いて標識、2つのサンプルを混ぜて同時にMSデータを取り、同位体の質量差を使って相対定量します。また、膜蛋白質など水に難溶性の蛋白質では、あえて電気泳動にかけて分画せずに消化 (Digestion) して、可溶性ペプチドだけをMS/MSと直結した液体クロマトグラフィー (nano RP-LC) で分画する方法もとられます。

ル化処理をすることが推奨されます。さらに、電気泳動を行う環境が悪いとケラチンなどの夾雑蛋白質が相当量混入します。夾雑する蛋白質由来のペプチド断片が無視できない量になるとPMF法に支障が出始めます。MSによる蛋白質同定は銀染色レベルの量でも可能といわれていますが、確実に解析できるのはCBBで染色したものと理解下さい。イムノプロット (抗体) で染色してチェックしたサンプルは概して量が足りません。抗体染色は銀染色よりも高感度だからです。このようなサンプルを10倍、100倍と濃縮して電気泳動すると夾雑蛋白質ばかりで分画法を考え直さなければならないということもよくあります。



#### 5. 分析に必要なサンプルの質と量

PMF法で蛋白質を同定する場合は、純度の高い試料をMSにかけする必要があります。トリプシン消化などで生成したペプチドの質量情報に基づいてデータベースを検索していくからです。SDS-PAGEで一眼シングルバンドに見えていても実際は混合物であることが多いと考えてください。また、蛋白質が修飾を受けると当然ペプチド断片の質量も変わりますので、解析がしにくくなります。リン酸化などの生物学的意義のある翻訳後修飾よりはシステイン残基の酸化のほうが影響が大きく出ます。これを防ぐためにサンプル調製の途中で還元アルキ

「MS = プロテオーム解析のツール」と考えられがちですが、医科研では大規模な網羅的解析を行っておりません。個人研究者がプロテオミクス技術が必要とするときに、いつでも対応できるように人材育成を含めたシステム作りをするほうが重要な課題と考えています。一昔前はプロテインシーケンサーを利用していた蛋白質の同定を新しい装置で行えば、少ないサンプル量でより簡単に、より迅速に結果を知ることができます。プロテオームのデータベース作りをするよりも、個々の研究者の目的に合った蛋白質解析ツールとしてMSを活用するほうが有益です。MSをこれから使いたい方は大海 (ohmi@ims.u-tokyo.ac.jp) までご連絡下さい。サンプル調製を含めて実験方法の打ち合わせをしてから解析に入ります。なお、私どもが試料をお預かりして分析結果をお送りするような形式は採っておりませんので、必ず実験者がいらしていただくようお願いいたします。

蛋白質解析室ではペプチド合成のサービスも行っています。こちらはアミノ酸配列と合成量を申し込んでいただくと凍結乾燥物をお渡しするシステムになっています。詳細はコアラボラトリーの利用案内 ([http://157.82.98.20/shonai/documents/guide\\_h14.pdf](http://157.82.98.20/shonai/documents/guide_h14.pdf)) をご覧下さい。また、蛋白質の扱い全般についての相談も可能な範囲でお受けしています。不定期ですがプロテオミクスにかかわる技術セミナーも開催しています。蛋白質解析室がこのような形で皆様のお役に立てることを願っています。(文責: 大海)