

MALDIによるプロテオミクス

高尾 敏文

大阪大学蛋白質研究所 附属プロテオミクス総合研究センター (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2)

Proteomics Research by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry

Toshifumi TAKAO

Research Center for Structural and Functional Proteomics, IPR, Osaka University, 3-2, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

(Received December 9, 2002)

Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry (MS) represents a well-accepted and reliable method for the characterization of proteins. The method has great advantages in terms of high throughput, high accuracy, and high sensitivity in measurements, which is well suited for the identification of a wide variety of proteins, such those separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE), and for the analysis of post-translational modifications of a protein, which play important roles in various biological events. Taking advantages of an accumulating sequence databases, the former has been a routine task for overall profiling of proteins expressed in a cell or tissue. The latter, the analysis of post-translational modifications, is one of the most important subjects in post-genome era. We report here on the application of MALDI-MS and Edman chemistry to protein identification. The N-terminal sequence tags as well as the molecular masses of peptides revealed by MALDI-MS could be efficiently used for database searching, which increase the reliability of protein identification.

Key Words: Proteomics, MALDI, MS, Edman chemistry, Protein identification

1. はじめに

プロテオミクス研究(Fig. 1)では、対象とする個体、組織や細胞、あるいは、血液等の体液を出発材料として、様々な側面からタンパク質、及びペプチドの存在様式(量や種類等)を厳密に比較することにより、有意な差を見出していくことが極めて重要である。現状では2次元電気泳動パターンを比較するのが一般的であるが、さらに、イオン交換と逆相クロマトグラフィーの組み合わせによる2次元HPLCなどの新しい方法の開発が今後のプロテオミクス研究の発展には必要不可欠である。次に、質量分析により高感度かつハイスループットで差のあるスポットやピークに対して目的のタンパク質が何であるか、あるいは、翻訳後修飾についてデータベースを利用して正確に調べていく。さらに、見出された個々のタンパク質の機能を分子レベルで解明するためには、遺伝子組み換え技術等により目的のタンパク質を大量調製し、X線結晶構造解析やNMR法により高次構造を解析していくわけだが、そのさい、膜タンパク質や翻訳後修飾を有するタンパク質の発現及び調製は一般に困難であり、今後の大きな課題といえる。また、一方では、この一連のプロテオミクス研究手法は、特に、病態・診断マーカーや創薬ター

ゲットの探索研究において新たな知見、成果をもたらしてくれるものと期待され、社会的要請も大きい。ここでは、MALDI法を中心とするタンパク質同定法とMS/MSによるペプチドのアミノ酸配列解析について紹介する。

2. 質量分析法

プロテオミクス研究で用いられる質量分析計のほとんど

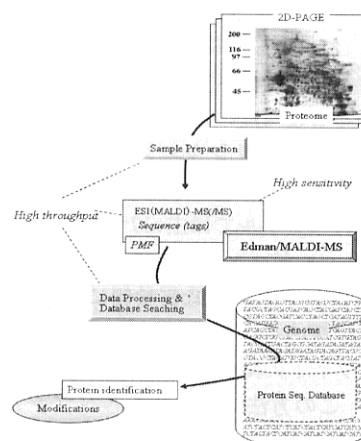


Fig. 1 Scheme of protein identification in proteomics.

Table 1 Mass spectrometry for proteomics.

Ionization	MALDI	ESI
Mass range	~300,000	~150,000
Connection to HPLC	-	+++
Mixture analysis	+++	++
Salt tolerance	++	±
Number of charges (z)	1, 2	n
Resolution in high mass	-	++
Insoluble proteins*	+	-
MS analyzer	time-of-flight ≫ quadrupole, cyclotron resonance, ion trap	FT-ion quadrupole, ion trap, time-of-flight, FT-ion cyclotron resonance

* in the presence of detergents

は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)、あるいは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)を採用している。2つのイオン化法のおもな特徴をTable 1にまとめた。どちらも高感度、高質量域の測定が可能であるが、イオン化特性において少なからず差が見られる。特に、混在する塩の許容性や、混合物での測定では個々の構成成分のイオン化効率が両者で異なる場合がある。また、タンパク質の測定には、イオン化のさいに比較的分解の少ないESI法が、分解能、精度の点で有利であるが、難溶性の膜タンパク質などの測定にはMALDI法が有効である。

分析部は、MALDI法では飛行時間型MS、ESI法ではQフィルター型やイオントラップ型MSが主として用いられている。また、飛行時間型MSは、分解能、感度の点でタンデム質量分析計の第2MSとして非常に優れている。

3. ペプチドマスフィンガープリント(PMF)によるタンパク質の同定

タンパク質の同定は、酵素消化で生成する複数のペプチドの質量値をもとにタンパク質・DNA配列データベース検索によって迅速に行われている。しかし、試料が複数のタンパク質の混合物である場合や、種々の修飾、あるいは、夾雑物を含む場合、PMFのみによる同定はしばしば困難である¹⁾。我々は、PMFによるタンパク質の同定をより確実にを行う目的で、MALDI-MS用試料プレート上の多検体試料に対して、気相で一度にEdman分解できる装置を開発した²⁾。反応産物はそのままMALDI-MSにより測定を行って、各々の試料ペプチドのN末端配列を決めることが可能である(Fig. 2)。

一例として、BSAのリシルエンドペプチダーゼ消化物のEdman分解前後のMALDI質量スペクトルをFig. 3に示す。消化物のスペクトルでは主に7つのシグナルが観測されているが(a)、Edman分解後に測定したスペクトルでは、それぞれのシグナルの低質量側に新たなシグナルを観測することができる。それらのシグナル間の質量差をもとに、各ペプチドのN末端アミノ酸を容易に求めることができる(b)。この方法で得られた各ペプチドのN末端アミノ酸と、もとのペプチドの質量値の両方をデータベース検索に用いれば、(a)のペプチドの質量値のみで行う検

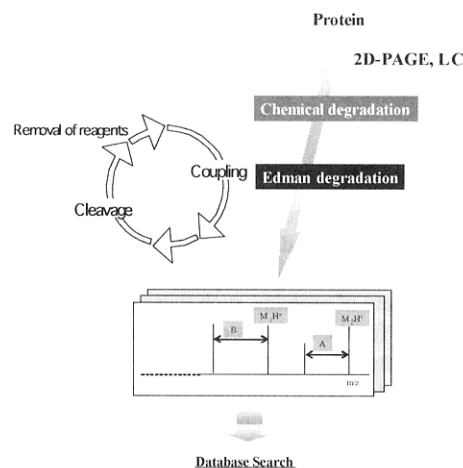


Fig. 2 Scheme of protein identification by a combination of Edman degradation and MALDI-MS.

索よりも高い確度でタンパク質の検索、同定を行うことができる(c)。

4. MALDI-MS/MSによるアミノ酸配列解析

現在、様々な高性能質量分析計の開発により、MS/MSによるペプチドのシーケンシング能力が飛躍的に向上している。同時に、MS/MSデータをもとに自動で配列を構築するソフトウェアが利用できるようになり、MS/MSによる配列解析がより現実のものとなった。Fig. 4は、MALDI-飛行時間型タンデム質量分析計(TOF/TOF)とESI-ハイブリッドタンデム質量分析計(Q-TOF)により得られたMS/MSスペクトルを比較したもので、上段では、高エネルギー衝突活性化開裂、下段では、低エネルギー衝突活性化開裂により生じる典型的なフラグメントイオン(Fig. 4)が観測されている。高エネルギー衝突活性化開裂に特徴的なアミノ酸側鎖におけるフラグメンテーション(d , v , w イオン)は、構造異性であるLeuとIleの区別に有効である。通常、ペプチドのMS/MSにおいて完全な配列を求めるのは難しいが、配列データベースの充実により、多くの場合アミノ酸配列を*de novo*で決定する必要はなく、MS/MSデータをもとに伝えるデータベース検索により非常に短時間で目的ペプチドを同定することが可能となっている。

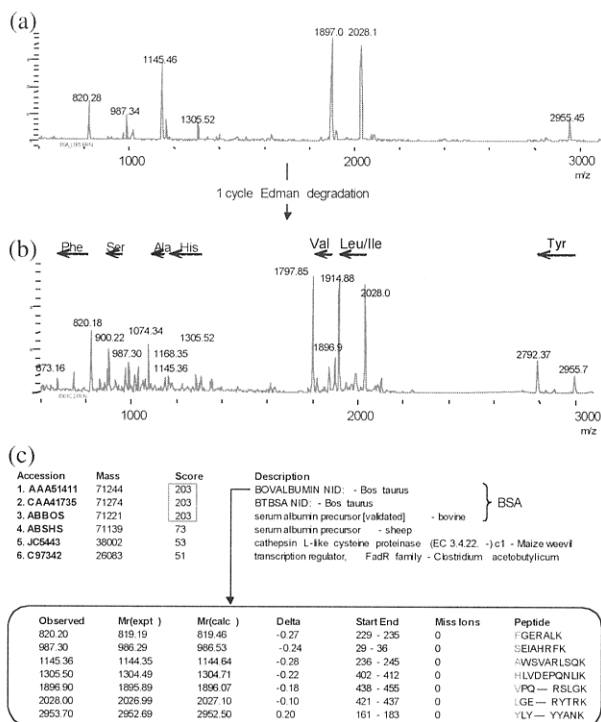


Fig. 3 MALDI-MS of lysyendopeptidase digest of BSA before (a) and after (b) Edman degradation.³⁾ Edman degradation was achieved on a ceramic carbon plate⁴⁾ by using a gas-phase chemical reaction apparatus (GPR, Asahi Technion Co.). The obtained N-terminal amino acids together with the original peptide masses of the individual peptides (b) were applied to database search with MASCOT- (<http://www.matrixscience.com/>) (c). As a result, BSA sequence was hit in the top three candidates with a significant score (203).

5. おわりに

1979年に、下西ら⁵⁾により、エドマン分解法と質量分析の組み合わせによるタンパク質のアミノ酸配列決定法が提案されて以来、質量分析によるタンパク質の一次構造解析が本格化した。当時は10残基程度のペプチドの測定にナノモルオーダーのペプチドを必要とし、測定には数十分という時間を要したが、現在では、質量分析計の進歩により、フェムトモルレベルの試料量で秒単位での測定がルーチンに行えるようになった。しかし、質量分析計は未だなお発展途上にあり、さらに高感度、高分解能、そして高い構造解析能力をもつ装置の開発が進められている。特に、最近の開発では、プロテオミクス研究への応用に大きなウェイトが置かれており、質量分析計と連携、連動する液体クロマトグラフィーや試料前処理用ロボットなど新規な周辺装置の開発も盛んに行われている。

プロテオミクス研究における質量分析の役割としては、現在、タンパク質の同定、タンパク質翻訳後修飾の解析、疾患特異的なタンパク質の探索などがあげられる。タンパク質の同定では、例えば癌組織と正常組織で

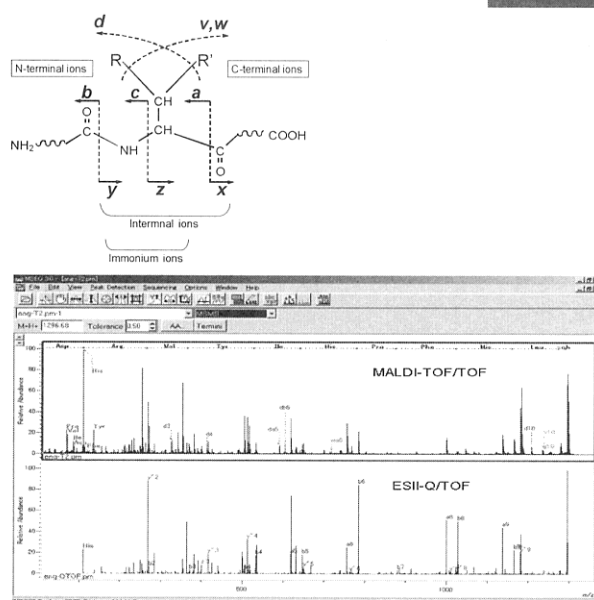


Fig. 4 MS/MS spectra of Angiotensin I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu). The spectra were interpreted by "SeqMS",⁶⁾ a software aid for de novo sequencing. The arrows (->) show the sequence from the C terminus based on *a*- and *b*-series ions, which were produced upon collision-induced dissociation in MS/MS. Amino acids shown in three-letter code denote immonium ions.

発現するタンパク質の非常にわずかな違いを高感度で検出するシステムとしてMSへの期待が高まっている。また、細胞外の環境変化を細胞内に情報伝達するシステムは、タンパク質リガンド、タンパク質-タンパク質間の相互作用によって成り立っており、さらに、そこで働くタンパク質の翻訳後修飾も深く関与している。タンパク質の相互作用や翻訳後修飾などの構造変化を解析するツールとしても質量分析は必要不可欠であり、今後ますます利用されるものと思われる。

参考文献

- 1) 高尾 敏文, 松八重 雅美, 奥村 宣明, 永井 克也: プロテオーム (分析法) 蛋白質・核酸・酵素 **46** (共立出版, 2001) p. 1504.
- 2) 高尾 敏文, 藤田 哲史, 田村 義典: タンパク質又はペプチドのアミノ酸配列を決定する方法およびその装置, 特願2000-333110 (2000); 高尾 敏文, 藤田 哲史, 田村 義典, 南野 直人: ペプチドドーム解析に向けた質量分析法, 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001.
- 3) 高尾 敏文: プロテオミクス研究の新しい展開 医学のあゆみ **202** (医歯薬出版, 2002) p. 291.
- 4) 福田 宏之, 高尾 敏文, 下西 康嗣: 微細で均一な結晶を形成するためのカーボン製支持板及びその応用, 特開2001-13110 (2001).
- 5) Y. Shimonishi, Y.-M. Hong, T. Matsuo, I. Katakuse, and H. Matsuda, Chemistry Lett. **1369** (1979).
- 6) J. F.-Cossio, J. Gonzalez, L. Betancourt, V. Besada, G. Padron, Y. Shimonishi, and T. Takao: Rapid Commun. Mass Spectrom. **12** (1998) 1867; 大須賀 潤一, 里見 佳典, 高尾 敏文, "機能ゲノム研究プロトコール下巻: プロテオーム解析編", 実験医学別冊, 磯辺 俊明, 高橋 信弘編, 羊土社 (2000) p. 137. "SeqMS"は<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/profiling/>からダウンロードできる。