

## MALDI-TOF MS による超微量蛋白質解析への挑戦

有本光江<sup>AE</sup>、廣田隆一<sup>B</sup>、柳澤 純<sup>BCE</sup>、馬場 忠<sup>CE</sup>、深水 昭吉<sup>DE</sup>

<sup>A</sup>筑波大学生命環境科学等支援室、<sup>B</sup>株式会社アックス、<sup>C</sup>筑波大学国際地縁技術開発専攻

<sup>D</sup>筑波大学生物機能科学専攻、<sup>E</sup>21 世紀COEプログラム「複合生物系応答機能の解析と農学的高度利用」  
〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

### 概要

MALDI-TOF MS を使用した蛋白質の解析で、使用するエッペンドルフチューブのメタノール洗浄のシグナルへの影響を調べた結果、メタノール処理を無くす事により、1000~2000Da 付近の共雑ピークが大幅に減少してベースラインが安定し、解析の精度が高まった。さらに、目的蛋白質に作用させるトリプシンの量を減らすことにより、より精度の高い解析結果を得ることが可能になった。この方法で BSA を使用し解析したところ、200fmol の蛋白質があれば解析可能であることが分かった。

### 1. はじめに

近年、プロテオーム解析技術は飛躍的に進歩しており、それに伴い解析に用いる蛋白質はより微量になる傾向にある。現在COEテクニカルファシリティーでの蛋白質の同定には主にMALDI-TOF MSを使用しているが、プロテオミクスにおいて重要な位置を占める質量分析の精度を高めるべくサンプルの調製の改善を行っている。測定用サンプルはインゲル消化法<sup>[1][2]</sup>で作製しているが、超微量蛋白質の解析の精度をより高めるためには目的蛋白質固有のシグナルを鮮明にすることが大切であり、サンプル作製中に大気中の塵や溶液由来の不純物の混入を抑える工夫が必要になる。

以前より蛋白質の解析において、ネガティブピークが多数発生し、ベースラインが上がる事により影響を与えていたため、さまざまな可能性について検討していた。我々はサンプルの調整に使用するチューブの中の不純物を除くという理由で別の研究室から調整プロトコルを導入し、エッペンドルフチューブをメタノールで洗浄していた。このメタノール処理を無くす事により蛋白質のシグナルにどのように影響を与えるのかをトリプシンをエッペンドルフ内で自己消化させたものを使用し比較した。

次に、SDS-PAGE により切り出したゲル中の蛋白質をトリプシン消化する際に 20 $\mu$ l のトリプシン溶液を使用していたが、トリプシンの自己消化物のピークが非常に大きく目的蛋白質のシグナルが抑えられていた。そこで BSA の標準サンプルを用い、トリプシンを 1 $\mu$ l に減らし解析を行った。また、以上の方法を試した上で現在の測定限界を調べた。

### 2. MALDI-TOF MS 解析用サンプルの作製と測定方法

#### 2.1 トリプシン自己消化物サンプルの作製

トリプシン (Promega 製) 20 $\mu$ g は添付の 50mM 酢酸溶液 200 $\mu$ l に溶かし、さらに 1.8ml の 5mM の塩化カルシウムを含む 50mM 重炭酸アンモニウムで希釈した。20 $\mu$ l (200ng) のトリプシン溶液をメタノール処理済のエッペンドルフチューブと未処理のものにそれぞれ量り取り 37 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させ、自己消化させた。自己消化したトリプシンのペプチド断片を C-18 逆相カラムのついたチップ (ependorf 製) に吸着させ脱塩した後、サンプルプレートにアプライし、さらに  $\alpha$ -ヒドロキシケイヒ酸 (Sigma 製) の飽和溶液を 0.5 $\mu$ l 添加し、MALDI-TOF MS により測定した。

#### 2.2 トリプシン量を変えインゲル消化した BSA の微量測定用サンプルの作製

微量測定用の標準物質として BSA (PIEACE 製) を使用した。BSA を 200fmol (13.2ng)、100fmol (6.6ng) に希釈し、SDS ゲル電気泳動で分離した。泳動ゲルは Critrion Precast Gel 4-12% Bis-Tris (BIO-RAD 製) を使用した。泳動したゲルは質量分析用銀染色キットにより銀染色した (図 1)。比較のために 500fmol (33ng) に希釈した BSA も同時に流した。

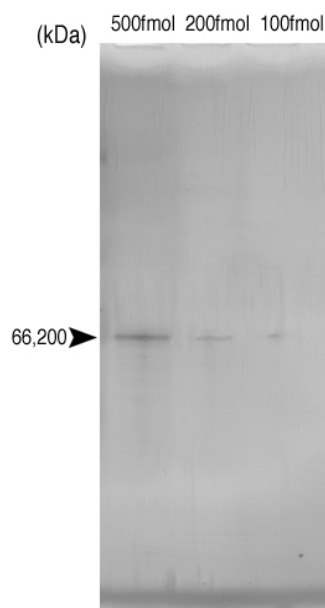


図 1. 希釈した BSA を電気泳動後、質量分析用銀染色キットで染色した

染色された 200fmol、100fmol のバンドを切り出しエッペンドルフチューブにサイコロ状に切断して入れた。ゲル中の BSA はトリプシン量を 1 $\mu$ l と 20 $\mu$ l に添加する量を変えインゲル消化法で切断し、ペプチド断片をゲルから抽出させた後、減圧乾燥させたものを 10 $\mu$ l の 0.1%TFA 溶液に溶解し C-18 逆相カラムのついたチップ (ependorf 製) に吸着させ脱塩した後、サンプルプレートにアプライした。さらに  $\alpha$ -ヒドロキシケイヒ酸 (Sigma 製) の飽和溶液を 0.5 $\mu$ l 添加し、MALDI-TOF MS により測定した。

## 2.3 分析装置と解析方法

分析には MALDI-TOF MS (AXIMA-CFR Plus, 島津/KRATOS 製) を使用。

蛋白質固有のピークの数値を調べ、Mascot 社の検索用ソフトに数値を入力し、表示された結果を調べた。

## 3. 解析結果

### 3.1 トリプシン自己消化物サンプルの解析

メタノール処理をしたエッペンドルフチューブで処理したトリプシンの自己消化物のシグナルを調べたところ、多数のネガティブピークがあることが分かった (図 2A,C)。

ークが確認され、検索ソフトにかけたところ、約半数の 71 個のピークがケラチンであることが分かった。その他のシグナルについては検索にかからない不明の物質に由来するピークであった。メタノール未処理のエッペンドルフチューブを使用したサンプルを調べるとピークが大幅に減少してベースラインが安定した。シグナルを詳しく解析したところネガティブピークは 5 つ存在し、そのうち 2 つがケラチンであることが分かった (図 2B,D)。

### 3.2 インゲル消化におけるトリプシン量の検討

200fmol の BSA に対して、トリプシンを 20 $\mu$ l と 1 $\mu$ l を用いて消化させたものを解析したところ 1 $\mu$ l のトリプシンで消化した BSA は S/N 比が上昇しサンプル由来のピークがはっきりと確認された。1400-1600Da 付近ではその様子が顕著に見られ (図 3 上)、1 $\mu$ l トリプシンで消化させた BSA のシグナルで確認されたピークがトリプシン由来のピークが増えることにより相対的に低下していることが確認された (図 3 下)。

1 $\mu$ l トリプシンで消化させた BSA のシグナルパターンの中から固有ピークをピックアップしたところ、52 個のピークが得られ、検索用ソフトにかけたところ、トップランクに表示され、BSA 由来のピークが

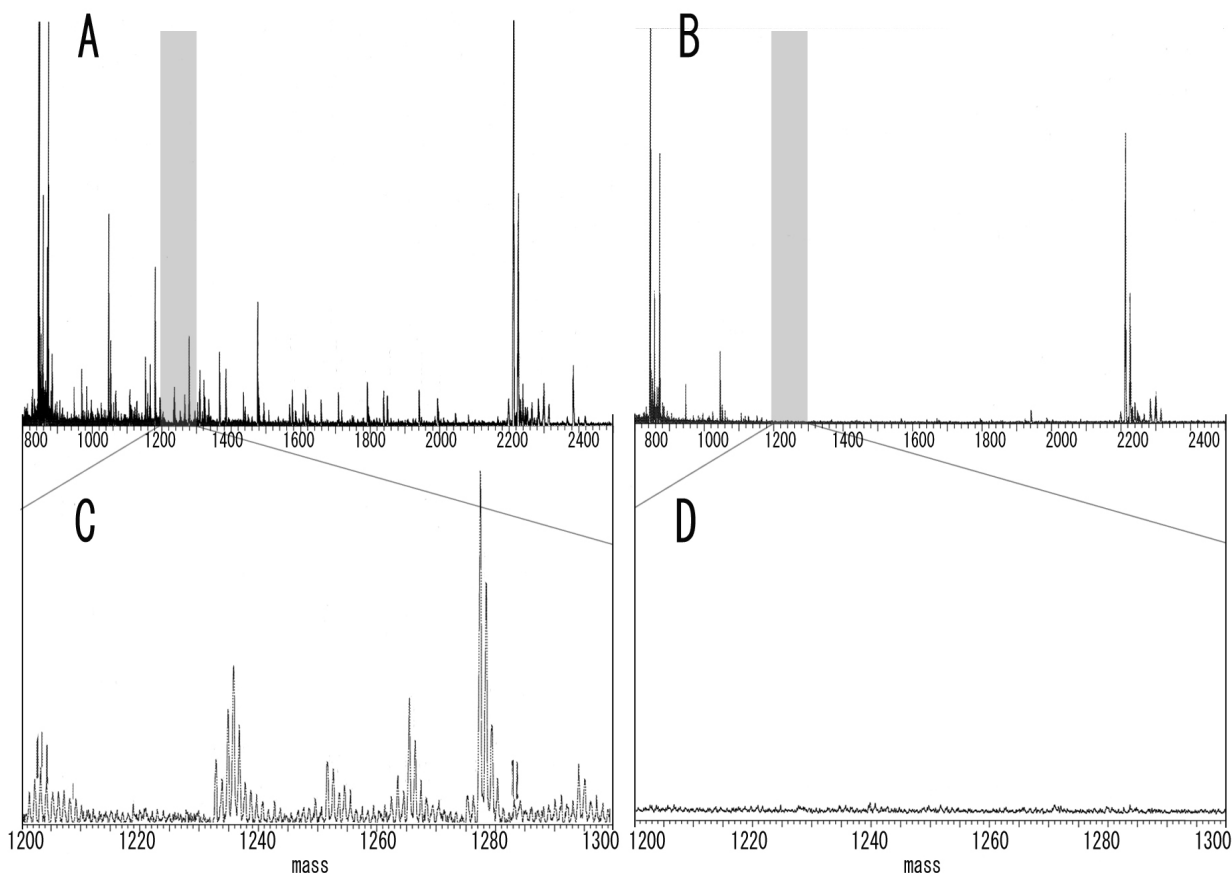


図 2. A はメタノール処理済み、B は未処理のエッペンドルフチューブを使用し、20 $\mu$ l トリプシン溶液を加え 16h で 37 $^{\circ}$ C で自己消化させ、シグナルパターンを比較した。C は A、D は B の 1200-1300 付近のグレイエリアの拡大図。

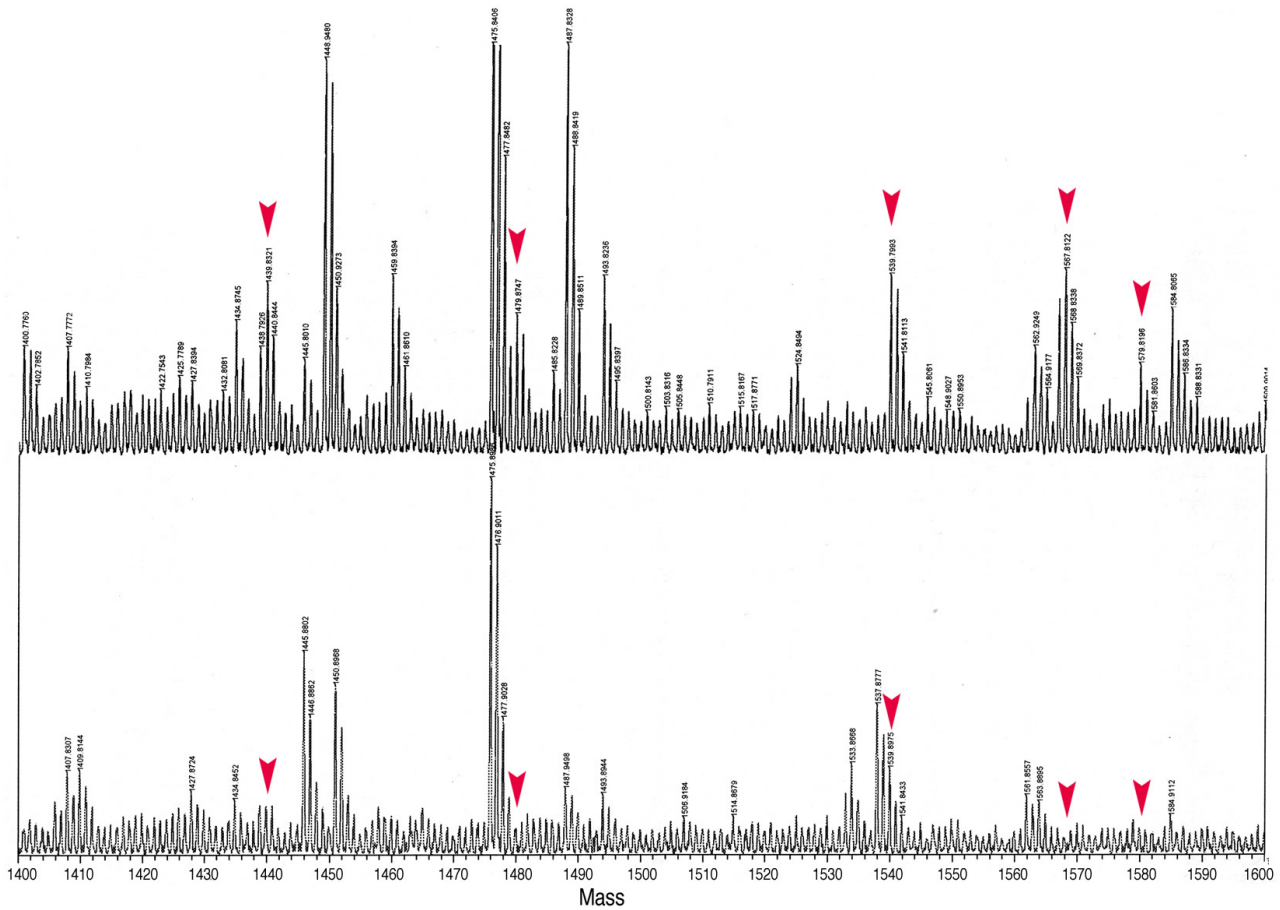


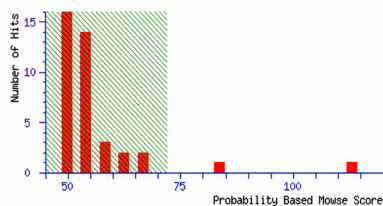
図3. 200fmolのBSAをトリプシン量を変え切断し測定したシグナルパターンを比較した。上のシグナルは1µlトリプシンで切断し、下は20µlトリプシンで切断した。矢印はBSAのトリプシン消化断片。

Database : NCBI nr 20060102 (3153438 sequences; 1084939129 residues)  
 Taxonomy : Metazoa (Animals) (850340 sequences)  
 Timestamp : 24 Jan 2006 at 04:19:23 GMT  
 Top Score : 113 for [gi|162648](#), albumin [Bos taurus]

Database : NCBI nr 20060102 (3153438 sequences; 1084939129 residues)  
 Taxonomy : Metazoa (Animals) (850340 sequences)  
 Timestamp : 24 Jan 2006 at 04:23:41 GMT  
 Top Score : 56 for [gi|55595455](#), PREDICTED: hypothetical protein XP\_515399 [Pan troglodytes]

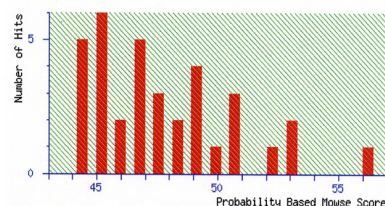
#### Probability Based Mowse Score

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 72 are significant ( $p < 0.05$ ).



#### Probability Based Mowse Score

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 72 are significant ( $p < 0.05$ ).



#### Concise Protein Summary Report

[Switch to full Protein Summary Report](#)

To create a bookmark for this report, right click this link: [Concise Summary Report \(.../data/20060124/F015059.dat\)](#)

Re-Search All	Search Unmatched
1. <a href="#">gi 162648</a> Mass: 71244 Score: 113 Expect: 4.3e-006 Peptides matched: 1 albumin [Bos taurus]	<a href="#">gi 30794280</a> Mass: 71274 Score: 113 Expect: 4.3e-006 Peptides matched: 1 albumin [Bos taurus]
<a href="#">gi 74267962</a> Mass: 71186 Score: 90 Expect: 0.00079 Peptides matched: 14 ALB protein [Bos taurus]	<a href="#">gi 229552</a> Mass: 68083 Score: 82 Expect: 0.005 Peptides matched: 13 albumin
2. <a href="#">gi 76445989</a> Mass: 55487 Score: 83 Expect: 0.004 Peptides matched: 12 serum albumin [Bos indicus]	

#### Concise Protein Summary Report

[Switch to full Protein Summary Report](#)

To create a bookmark for this report, right click this link: [Concise Summary Report \(.../data/20060124/F015060.dat\)](#)

Re-Search All	Search Unmatched
1. <a href="#">gi 55595455</a> Mass: 78929 Score: 56 Expect: 2 Peptides matched: 8 PREDICTED: hypothetical protein XP_515399 [Pan troglodytes]	
2. <a href="#">gi 28302281</a> Mass: 60255 Score: 53 Expect: 4.2 Peptides matched: 10 Meiosis-specific nuclear structural protein 1 [Mus musculus]	
3. <a href="#">gi 229552</a> Mass: 68083 Score: 53 Expect: 4.5 Peptides matched: 8 albumin	<a href="#">gi 162648</a> Mass: 71244 Score: 51 Expect: 6.9 Peptides matched: 8 <a href="#">gi 74267962</a> Mass: 71186 Score: 51 Expect: 6.9 Peptides matched: 8

図4. 200fmolのBSAをトリプシン量を変え切断し測定したシグナルパターンを検索ソフトにかけた結果。左は1µlトリプシンで切断したBSAの検索結果、下は20µlトリプシンで切断したBSAの検索結果。

16 個あることがわかった (図 4 左)。一方、20 $\mu$ l のトリプシンで分解させたものは 27 個のピークが得られた。検索の上位には表示され、BSA 由来のピークは 8 個確認されたものの、スコアが低くはっきりと同定されるには至らなかった (図 4 右)。

また、質量分析銀染色キットの検出限界である 100fmol の BSA でも同様にトリプシン量を変え、測定したところ、1 $\mu$ l のトリプシンを加えた BSA では同定はされなかったものの、6 位にヒットしたのに対し、20 $\mu$ l のトリプシンを加えた BSA では 18 位であった。

#### 4. まとめ

サンプル調製に使用するエッペンドルフチューブをメタノールで洗浄を行うことにより、ネガティブピークが多数発生し、ベースラインが上がる事によって解析に影響を与えていることがわかった。1000~2000 付近は最も固有ピークが現れる場所でもあり、この付近の共雑ピークが大幅に減少してベースラインが安定した。また、ネガティブピークには多数のケラチンが含まれていることが分かり、微量でもイオン化されやすくシグナルが高く出るといった性質があるため、固有ピークを打ち消していたことが考えられる。このケラチンが減少することにより解析の精度が高まった。これらのことから、メタノール処理によりチューブ内に大気中の塵やゲル、溶媒由来の物質が付着しやすくなっていたことが分かった。

次にトリプシン量を 1 $\mu$ l に減らしてゲル内で消化させると S/N 比が上昇し、トリプシンのピークに抑えられていた固有ピークがはっきりと現れるようになり、より解析精度が高まることが分かった。一方、従来の方法で用いられている 20 $\mu$ l のトリプシンで分解させたものは検索の上位には表示されたものの、スコアが低くはっきりと同定されるには至らなかった。これらの改善を行った結果、現在 BSA で 200fmol の濃度まで検出限界を大幅に引き上げることに成功した。

以上のことより、微量の蛋白質解析においては作用させるトリプシンの量が非常に大切であることがわかった。今後はさらなる超微量サンプルに対応すべく改善を行っていく予定である。

#### 謝辞

MALDI-TOF MS を使用した蛋白質の解析において多大なるご指導ご協力を頂きました生命環境科学研究科の川辺洋一助手、日本学術振興会特別研究員の村山明子研究員に深く感謝いたします。また、本報告の作成や業務遂行にあたり多大なご協力を頂きました応用生物化学系技術職員の方々に深く感謝いたします。

#### 参考文献

- [1] Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec 10;93(25):14440-5.  
<http://www.pnas.org/cgi/content/full/93/25/14440>
- [2] プロテアーゼによるインゲル消化. 谷口寿章「プロテオミクス実験プロトコール」秀潤社細胞工学別冊. 23-33.2003