

## 質量分析による蛋白質の同定

せきね たいち  
関根 太一<sup>1</sup>かとう ともひろ  
加藤 智啓<sup>1,2</sup>

## はじめに

ヒトゲノムの解読は DNA 解析技術の進歩により急速に進み、ほぼ全解読がなされるに至っている。その結果、ヒトゲノムはおよそ 5 万の遺伝子を含むことが明らかになり、今後の研究の焦点は、それらの遺伝子が生理的あるいは病的状態、あるいは外部刺激によりどのように発現されるかに移っている。技術的にも DNA チップなどの強力な解析手段が登場し、網羅的な遺伝子発現解析を支援している。ところが、遺伝子は発現後蛋白質に翻訳され、さらに翻訳後修飾を受けて生体機能を担うこと、また、mRNA 量と蛋白質量が必ずしも相関しないことなどから、細胞あるいはその集合体である臓器や個体の状態把握には遺伝子発現だけでなく、蛋白質自体の解析も重要である。ところが、網羅的な蛋白質解析の技術は遺伝子発現解析と比べ進んでいるとはいえない。蛋白質の網羅的な検出自体は、2 次元電気泳動法に代表されるように、20 年以上前から行われてきたが、その後の蛋白質の同定が容易でなかったことが主な原因と言える。たとえば、これまでの代表的な蛋白質の同定法であったエドマン分解法では、蛋白質が修飾を受けていると解析が出来ない上に、N 末端から数個のアミノ酸残基の配列情報

しか得られない。また、解析する際に多量のサンプルを必要とすることや時間がかかることなど効率的な同定にとって多くの障害があった。しかしながら、近年、蛋白質をプロテアーゼで処理後にイオン化し、質量分析器によりその質量を正確に測定する方法、そして、その質量データを蛋白質のデータベースと照合して蛋白質を同定するという技術が開発され、蛋白質解析に革新をもたらした。いわゆるプロテオミクスである。また、このイオン化技術に貢献した田中耕一氏がノーベル賞を受賞したことは記憶に新しい。本稿では、この質量分析による蛋白質の同定法について紹介する。

## 蛋白質同定の原理

## ペプチドマスフィンガープリント法

蛋白質はアミノ酸が鎖状に連なった高分子であり、生体では 20 種類のアミノ酸が使われている。目的の蛋白質をトリプシンや Lys-C といった配列特異性の高いプロテアーゼで数-20 残基程度のペプチドに切断する。(たとえばトリプシンで処理すると C 末端がリジンあるいはアルギニンとなるペプチドが生ずる。)切断されてできた複数の短いペプチド群の分子量は質量分析器でかなり正確に測定される。その結果、目的蛋白から生ずるペプチド群が、それらの分子量という情報とともにファイルされる。一方で、蛋白質データベース中の蛋白配列を同様の酵素で切断するとどのような分子量のペプチドが生ずるかをコンピューターで仮想的に行う。目的蛋白の配列がデータベース上であれば、それを仮想的に切断して生ずるペプチド群の分子量と、実際に質量分析器で測定されたペプチド群の

1 難病治療研究センター 生体機能・プロテオーム制御部門  
2 プロテオミクス研究チーム：木村健二郎（腎臓高血圧内科）、加藤智啓（難病治療研究センター）、熊井俊夫（薬理学）、安田隆（腎臓高血圧内科）、岡本一起（生化学）、大谷（金子）律子（解剖学）、長田賢一（神経精神科）、堤康一郎（耳鼻咽喉科）、小泉宏隆（病理学）、太田智彦（乳腺内分泌外科）、西川裕之（大学院付属先端医学研究施設）

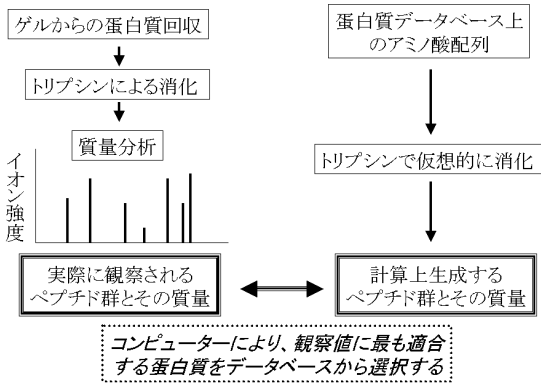


図.1 ペプチドマスフィンガープリント法

分子量とが一致するはずである。この検定をスコア化し、格段に高い一致率を示す蛋白配列をデータベースから引き出してくる。これが、ペプチドマスフィンガープリント (PMF) といわれる蛋白質の同定原理である。(図1)

### MS/MS 解析

上記で、酵素消化後のペプチドの分子量を質量分析器で正確に測定することができることを述べた。その際、ペプチドを構成するアミノ酸はロイシンとイソロイシンが同一の分子量を持っている以外はお互いに異なる分子量を持っている。したがって、分子量が決定されると、そのアミノ酸組成がかなりの確率で同定できる。これに加えて、1 サンプルにつき質量分析を2 回行うことにより、アミノ酸組成だけでなくその配列を特定することが出来る。これが MS/MS 測定と言われる。すなわち、一回目の MS 測定で、測定したペプチドを、ヘリウムなどの不活性ガスと衝突させ、さらに小さな様々なペプチドに分解する。この分解されたペプチド群を大きい順から並べていけば、その質量差が使われているアミノ酸の質量を表すことになり、アミノ酸の配列を特定できることになる。図2 上図では、MS 解析で a から f までの6 つのペプチドを検出しているが、このうち e を指定し、さらに断片化させると、図2 下図のように e が壊れてできた短い断片ができ、その質量数に相当するアミノ酸が脱落したことを示し、基本的には配列が決まる(この場合、CIGEK となる)。ただし、実際の MS/MS 測定ではペ

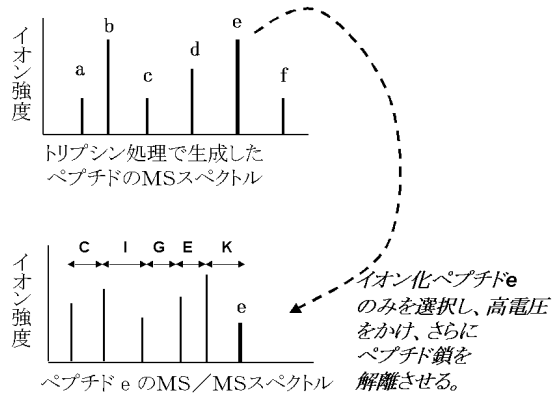


図.2 MS/MS 解析

プチドは C 末側の分解産物と N 末側の分解産物ができることや、衝突により側鎖が切断されたりすることがあるために、もっと複雑である。MS/MS 測定による配列情報と PMF とを組み合わせるとデータベース検索を行うと、PMF と違い、蛋白質の同定率が増す。

### 蛋白質同定の具体的な行程

次に現在プロテオミクス研究部門に導入されているイオントラップ型質量分析器 (LCQ, ThermoFinnigan) による蛋白質同定行程を具体的に紹介する。

#### 1. 蛋白質分子のトリプシン消化及び抽出

上で述べたように、測定ではトリプシンで消化したペプチドを使用する。SDS-PAGE や 2 次元電気泳動などで分離した蛋白質を染色した後、同定したい蛋白質のバンドまたはスポットをゲルごと切り抜き、脱色操作により色素などを除く。このゲル片にトリプシンを浸透させ、ゲル片が乾燥しないように注意しながら 12 時間程度<sup>37</sup> で反応させる。このとき使用するトリプシンは質量分析専用のものを使用するとよい。次にペプチドを回収する。ペプチドが非特異的に吸着されるのを抑えるため、trifluoroacetic acid (TFA) を終濃度 0.1 - 1 % 程度になるように添加し、30 - 50 % のアセトニトリル溶液を加え、超音波などを用いて、ゲル片からペプチドを抽出、回収する。ペプチド量が少ない場合、チューブなどに吸着され回収量が極端に低下することがたびたび認められる。このため、使用す

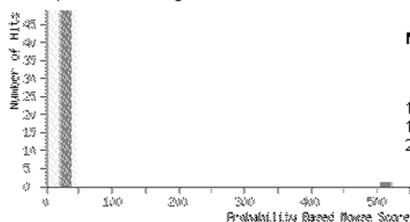
**Protein View**Match to: [gil999892](#); Score: **513****Chain A, Triosephosphate Isomerase (Tim) (E.C.5.3.1.1) Complexed With 2-Phosphoglycolic Acid**

Found in search of D:\#040415Drxiang\Drxiangsample\to602.RAW

Nominal mass ( $M_r$ ): **26522**; Calculated pI value: **6.51**NCBI BLAST search of [gil999892](#) against nrUnformatted [sequence string](#) for pasting into other applicationsTaxonomy: [Homo sapiens](#)Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez: [gil999893](#) from [Homo sapiens](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **39%**

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
18--32	772.16	1542.30	1541.88	0.43	1	<b>KQSLGELIGLTNAAK</b> ( <a href="#">ions score 74</a> )
18--32	772.28	1542.54	1541.88	0.67	1	<b>KQSLGELIGLTNAAK</b> ( <a href="#">ions score 45</a> )
19--32	707.95	1413.89	1413.78	0.11	0	<b>QSLGELIGLTNAAK</b> ( <a href="#">ions score 67</a> )
33--52	1096.42	2190.83	2191.06	-0.23	0	<b>VPADTEVV</b> CAPPTAYIDFAR Carbamidomethyl (C) ( <a href="#">ions score 44</a> )
69--84	819.55	1637.08	1636.81	0.27	0	<b>VTNGAFTGEISPGMIK</b> Oxidation (M) ( <a href="#">ions score 53</a> )
99--112	807.94	1613.86	1613.82	0.05	1	<b>RHVFGESDELIGQK</b> ( <a href="#">ions score 62</a> )
100-112	730.01	1458.00	1457.71	0.29	0	<b>HVFGESDELIGQK</b> ( <a href="#">ions score 65</a> )
113-130	904.69	1807.36	1806.97	0.40	0	<b>VAHALAEGLVACIGEK</b> Carbamidomethyl (C) ( <a href="#">ions score 99</a> )
160-174	802.05	1602.09	1601.88	0.21	0	<b>VVLAYEPVWAI</b> GTGK ( <a href="#">ions score 54</a> )

図 3 マスコットの検索結果の例

るチューブやチップなどはシリコンコートなどを施した蛋白質吸着率の低いものを使用する場合もある。

**2. 質量分析器によるペプチドの分子量測定**

質量分析装置はオートインジェクター、液体クロマトグラフィー (HPLC)、質量分析器本体からなる。まず、最初に適量 (50 fmol-1 pmol) のサンプルを 0.1 % TFA, 2 % アセトニトリル溶液に溶解し、オートインジェクターのトレーにセットする。あとは適当なプログラムを選択しスタートさせる。サンプルは自動で HPLC に注入され、サンプル中のペプチドは逆相のカラムに吸着される。その後、注入する有機溶媒の濃度勾配に伴い、ペプチドが順次カラムから遊離する。遊離したペプチドは高電圧下で気化およびイオン化し、質量分析器内に送られる。

質量分析器内に送られたペプチドは 2 つのエンドキャップ電極及びリング電極に囲まれた分析計の狭い空間に集められる。この両電極間に直流及び交流電圧を掛けることによりペプチドをこの空間内に安定に閉じ

込めておく (トラップする) ことが出来る。また電圧を変化させ特定のペプチドを選択的に排除することもできる。プレスキャンで目的のペプチドの分子量が明らかになったら、電圧を変化させ目的のペプチドだけをトラップし、選択したペプチドだけをヘリウムで分解し MS/MS 測定を行う。LCQ のシステムでは、ソフトウェアが上操作をすべて自動で行うので、実際には測定が終わったら、データファイルを次に示すマスコットというソフトウェアで解析するだけでよい。

**3. 結果の解析**

質量分析で得られたデータを専用のソフトウェアで解析を行なう。現在マトリックスサイエンス社のマスコットという専用ソフトが導入されているのでこれを用いる。すでに導入されているマスコットは LCQ 用に最適化されており、データファイルと条件を指定するだけで自動的に蛋白質の同定を行い、結果の信憑性を評価してくれる。

実際にマスコットでの解析例を図 3 に示す。

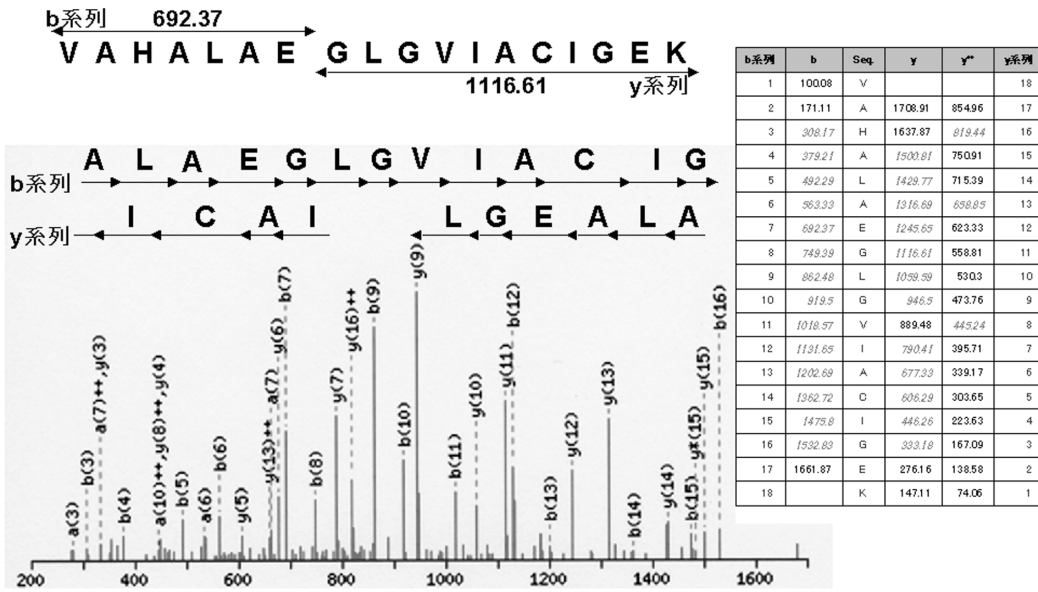


図4 図3の分子量1807をもつペプチドのMS/MS スペクトル

MS/MS 測定の結果、9本(8種類)のペプチドが triosephosphate isomerase と一致しており、スコア500、全アミノ酸配列における一致率は39%、等電点及び分子量は二次元電気泳動で観察された値とほぼ一致していた。このソフトではスコアにより蛋白質同定の確からしさを評価する。図左側に斜線の部分があるが、この境界線が統計的危険率0.05に相当し、同定された蛋白質のスコアがこれを超えるほどより信頼性をもって同定できたと評価される。この場合、triosephosphate isomerase だけが、境界線を大きく右に越えることから、当該蛋白質は triosephosphate isomerase であるということになる。

次に評価に用いたMS/MSの解析例を図4に示す。上記の測定で、分子量1807.36として検出されたペプチドから、図のようなMS/MSスペクトルが得られた。マスコットではMS測定で得られたデータから候補となるペプチド配列を選定。MS/MS測定で得られる理論値をこれら全ペプチドに対してリスト化する。測定の結果、どの程度このリストと一致するか評価する。図4の右側の表はマスコットが作成したペプチドの質量リストでこれと一致した質量は赤字斜体で表記されている。MS/MS測定の際、ペプチドの酸アミド結合が壊れ2つのペプチドになるが、N末端側をb系列、

C末端側をy系列と呼んでいる。MS/MSスペクトルでは両系列のピークが混在しており、両系列からアミノ酸配列を読み取ることができる。

### 質量分析による蛋白質同定法の弱点

質量分析は画期的な蛋白質同定法であるが、もちろん欠点もある。たとえば、エドマン法と違い蛋白質の配列を直接調べているのではなく、ペプチドの質量から推定していることから、上記のスコアが危険率0.05の境界線をかろうじて越えている程度の場合には、それだと決め付けてしまうと、一定の確率で間違えることになる。また、蛋白質データベースを基本にした同定法であるため、ヒト、マウス、大腸菌、イーストなど、データベースの充実した種ではきわめて有効であるが、他の生物種については蛋白質データベースが充実していないために、検索能力が著しく落ちてしまうことなどがある。また、機器面から言うと、LC-MS/MSはデリケートな機器で、ナノフローの部分を含め、常に良い管理をしていないと、最良の状態では動いてくれない。測定前のコンディショニングに半日もかかってしまうこともある。

## おわりに

質量分析器と蛋白質データベース検索を用いた蛋白質の同定法は、従来法と比べ簡単かつ迅速である。基礎的な研究に加えて、疾患に関連した蛋白質などを同定にも大変有効な手段として利用されるようになっていく、本学においても一層普及し、医学研究の有効な手段になれば幸いである。