

組織ダイレクト解析：トリプシン消化物のMALDIイメージング

– On-Tissue Direct Analysis: MALDI Mass Spectrometric Imaging For Tryptic Digested Peptides –

MALDI法を用いた質量分析によるMALDIイメージング法は生体分子の抽出・標識といった操作を必要とせずに、ペプチド・タンパク質などの生体分子の分布を表示できます。これまでに様々な組織切片における生体分子のMSイメージが報告されており、最近では疾患特異的バイオマーカー候補タンパク質の分布を示した例も報告されています。

しかしながら組織切片上で直接質量分析を行って検出したタンパク質を、質量値の情報だけで同定することは非常に困難です。一般に質量分析を組み合わせたタンパク質同定法としては、目的タンパク質の「トリプシン消化ペプチドを利用したPMF（ペプチドマスフィンガープリンティング）法とMS/MSイオンサーチ法が知られています。組織切片上では複数のタンパク質が混在化しているために、PMF法によるタンパク質同定はできません。そのため組織切片上で直接タンパク質同定を行うためには、酵素反応後のトリプシン消化ペプチドに対して、MS/MSイオンサーチを行う必要があります。

このときスプッター装置を用いて酵素溶液を組織切片上に塗布することで、組織上の微小領域に限定した分析が可能となります。またスプレー法による塗布に比べると、高価な酵素溶液の使用が少量で済みます。

ここではラット肝臓組織切片を試料として、微小領域におけるタンパク質同定の例とラット脳組織切片に対するトリプシン消化物のMALDIイメージングの例を示します。

最初に肝臓組織切片の微小領域に対して、ケミカルプリ

ンタ（CHIP-1000）によるトリプシン溶液（40 µg/mL，5 mM NH₄HCO₃）の分注を行いました。トリプシン溶液を500 µm間隔で1.0 nLずつ組織切片に対して、繰り返し分注しました（10 nL/スポット）。外部インキュベータ内で37℃，2時間酵素反応を行ってから、酵素溶液を分注した位置に対して、マトリックス溶液，5 mg/mL DHB（50%メタノール，0.1%トリフルオロ酢酸）を分注しました。Fig.1にマトリックスを分注した肝臓組織切片画像を示します。

次にデシケーター内で乾燥させた後、AXIMA-QITを用いて質量分析を行いました。得られたマススペクトルのうちシグナル強度の強かった m/z 1572.78と m/z 1817.01の分子イオンに対して、MS/MS分析を行いました。測定の結果得られたMS/MSスペクトルとそのデータベース検索の結果をFig.2に示します。

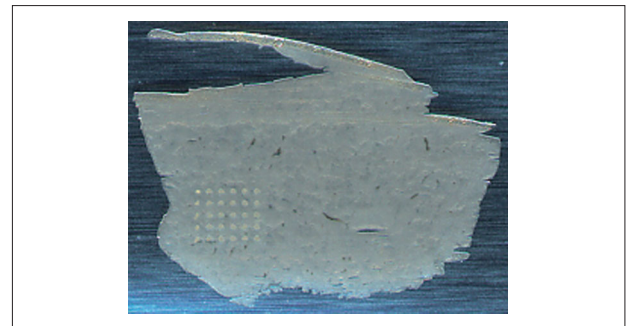


Fig.1 マトリックスを分注した肝臓組織切片
Liver Tissue Section with Matrix Deposition

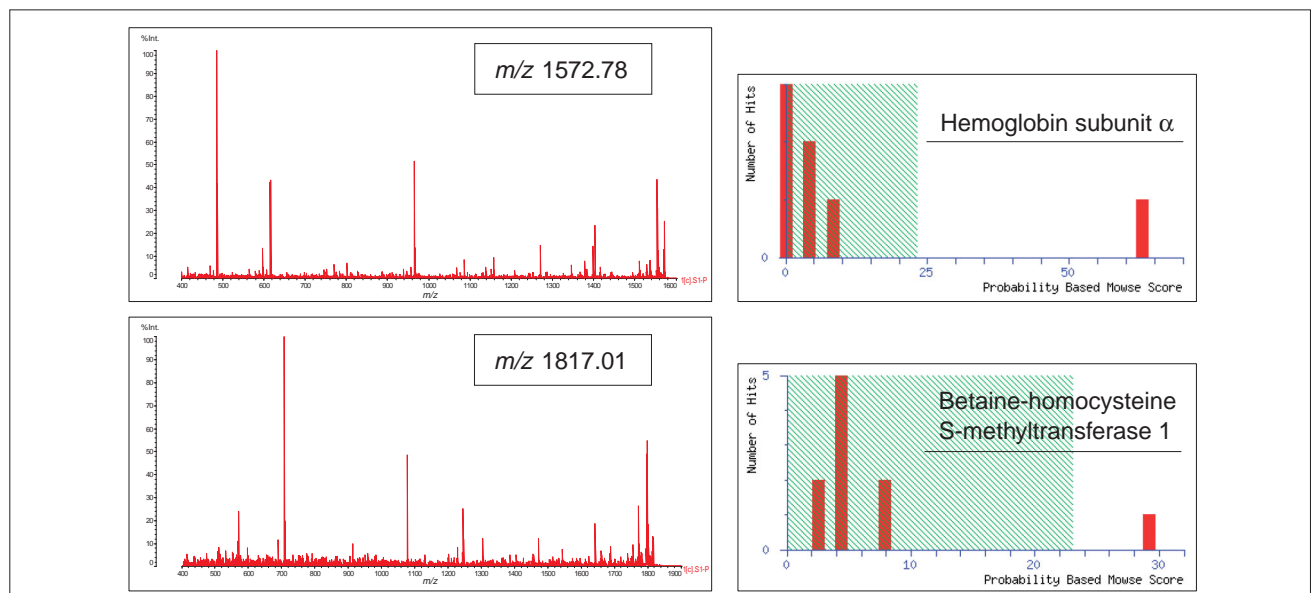


Fig.2 トリプシン消化物のMS/MSスペクトルとデータベース検索結果
MS/MS Spectra of Tryptic Digested Peptides and Database Search Results

Fig.2に示すようにイオントラップ型の質量分析装置であるAXIMA-QITを用いることで、質量値精度の高いMS/MS分析が行えます。またケミカルプリンタによる酵素溶液の微量分注を行うことで、組織切片の微小領域でのダイレクトなタンパク質同定が可能となります。

次にラット脳組織切片を試料として、トリプシン消化物のMALDIイメージングをケミカルプリンタとAXIMA-Performanceを用いて行いました。トリプシン溶液(40 µg/mL)を250 µm間隔で300 pLずつ分注して、酵素反応後に10 mg/mL CHCA (50% アセトニトリル, 0.1% トリフルオロ酢酸)を300 pLずつ分注しました(9 nL/スポット)。AXIMA-Performanceによる分析を行い、得られた質量スペクトルの位置情報と分子イオンの強度比から、MSイメージを作成しました。MSイメージの作成にはBioMapソフ

トウェア (<http://www.maldi-msi.org/>) を用いました。Fig.3には m/z 726.46と m/z 1198.66のそれぞれのMSイメージが表示されています。それぞれの消化ペプチドが特徴的な分布を示すことがFig.3から確認できます。またこれらの分子イオンに対してMS/MS分析を行ったところ、それぞれMyelin basic protein (m/z 726.46)とActin (m/z 1198.66)由来であることが確認されました(Fig.4)。

Myelin basic proteinの分布に関してはすでに文献報告されており、今回の結果は報告されている脳組織におけるタンパク質の分布と一致していました。

このようにケミカルプリンタとAXIMAシリーズを組み合わせた組織上でのタンパク質同定あるいはトリプシン消化物のMALDIイメージングは生体組織切片からのタンパク質情報を調べるために有用であることが確認されました。

T. Nakanishi T. Yamamoto M. Furuta

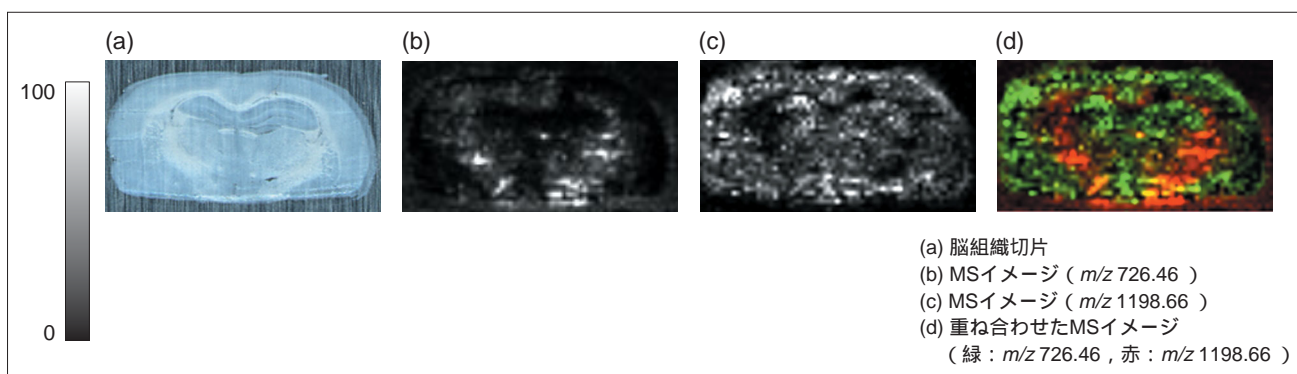


Fig.3 ラット脳組織切片のMSイメージ
MS Images of Rat Brain Tissue

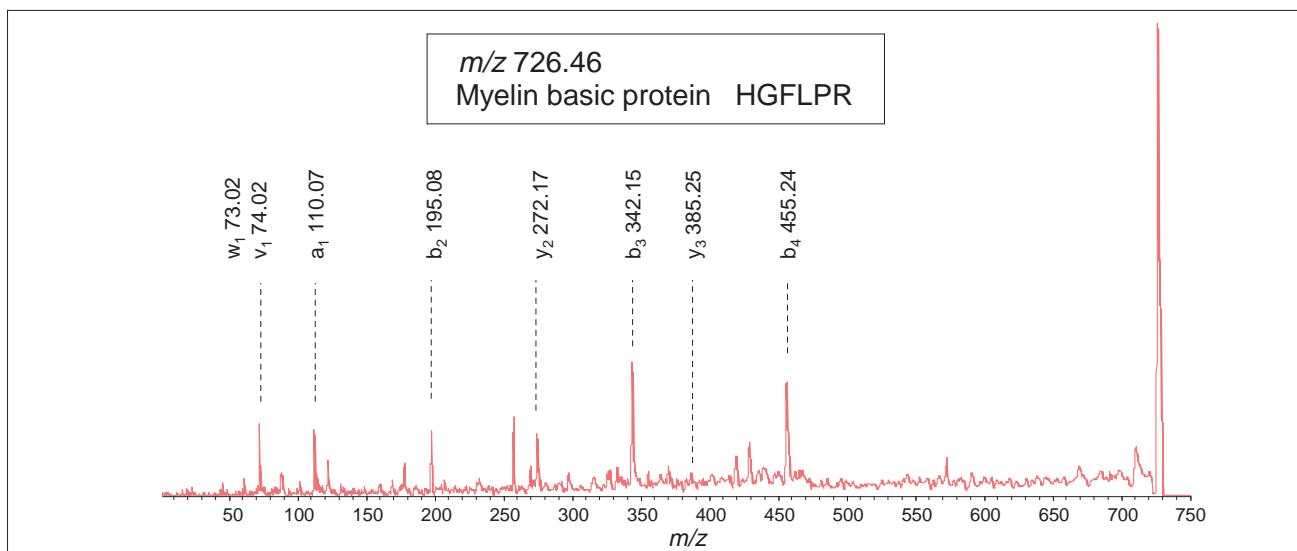


Fig.4 トリプシン消化物のMS/MS スペクトル (Myelin basic protein)
MS/MS Spectrum of Tryptic Digested Peptide (Myelin basic protein)

BioMapのCopyrightはNovartis Institutesに帰属するものです。

初版発行: 2009年3月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

☎ 0120-131691(携帯電話不可)
● 携帯電話専用番号(075)813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。