

Application News

No. B83

MALDI-TOF 質量分析法

N 末端がブロックされたタンパク質の電気泳動ゲルからの抽出と卓上型 MALDI-TOF MS による配列解析

タンパク質の同定は、トリプシン消化による前処理と質量分析計を用いることにより、機器分析の専門家でもなくとも簡単に行えるようになってきています。しかし、Mascot (Matrix Science 社製) 等の検索エンジンを用いた、単なるデータベース検索によるタンパク質同定ではなく、プロセッシングを受けたタンパク質の末端配列解析や、データベースに登録されていないマイナーな生物種のタンパク質の同定を、質量分析計を用いて行うためには、高価なハイエンドの装置や熟練者による分析技術が未だ必要とされています。また、タンパク質の末端配列解析を行うための手法として、プロテインシーケンサーが一般的に用いられていますが、N 末端がブロックされているタンパク質だと、デブロッキングの前処理が必要となります。この前処理は、タンパク質の種類によってはうまくいかない場合もあり、誰でも使える手法とはなっていません。

近年、MALDI-TOF MS のイオン源内におけるタンパク質のフラグメンテーション (ISD: In-Source Decay) を利用することにより、N 末端がブロックされているタンパク質やデータベースに登録されていないタンパク質の配列解析を行うことが可能となっています。また、ISD は、理論的には試料の質量による制限がないため、トリプシン消化せずに直接大きなタンパク質のシーケンシングを行うことが可能です。しかし、ISD は目的タンパク質の単離精製が必要なことから、質量分析の専門家以外が ISD によるタンパク質の配列解析を行うことは、まだ一般的ではありません。

本アプリケーションニュースでは、上記の ISD によるタンパク質配列解析の課題を克服するために、電気泳動ゲルからのタンパク質抽出と卓上型 MALDI-TOF 質量分析計 MALDI-8020 (図 1) を組み合わせ、N 末端がブロックされたタンパク質の分子量測定と ISD による配列解析を行った例を紹介します。

K. Shima

■ 試料と方法

N 末端がアセチル化されているタンパク質のウシカルボニックアンヒドラーゼ (Sigma-Aldrich) をモデル試料としました。試料を電気泳動用バッファーに溶解し、95 度で 5 分間加熱した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ATTO 12.5% プレキャスト e-PAGE) を行いました。電気泳動終了後のポリアクリルアミドゲルを CBB 染色し (ATTO EzStain AQUa)、タンパク質スポットを検出しました (図 2)。

切り出したカルボニックアンヒドラーゼのタンパク質スポットから、界面活性剤を含む抽出バッファーを用いることによって、ゲル内のタンパク質を抽出しました。クロロホルム/メタノールを用いて抽出溶液中のタンパク質を沈殿させることによって界面活性剤や塩を除去した後、MALDI-TOF MS による測定を行いました。タンパク質の分子量測定にはシナピン酸、ISD による配列解析には 1,5-ジアミノナフタレン (DAN) をマトリックス試薬として用いました。



図 1 卓上型 MALDI-TOF MS MALDI-8020

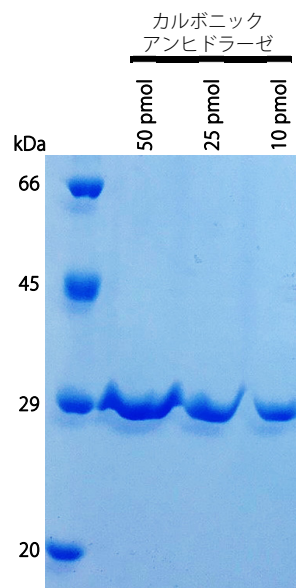


図 2 カルボニックアンヒドラーゼの電気泳動画像

■ 結果

ゲルから抽出したカルボニックアンヒドラーゼをシナピン酸と混合し、MALDI-8020 のリニアモードにより測定した例を図3に示します。10 pmolのタンパク質スポットから抽出したカルボニックアンヒドラーゼにおいても、 m/z 29030付近に一価のプロトン化分子のピークを検出することができました。

次に、25 pmolのタンパク質スポットから抽出したカルボニックアンヒドラーゼを DAN と混合し、MALDI-8020 のリニアモードにより測定した結果を図4に示します。ISD によりタンパク質の N 末端側から生成したフラグメントである c イオンのピークが主に検出されました(図4中央、図4下)。フリーソフトウェアの Mass⁺⁺™ と、タンパク質のアミノ酸配列のシーケンスアライメントを行うためのツールである BLAST を用いて、検出されたピークから得られたアミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、カルボニックアンヒドラーゼが最上位候補としてヒットしました(図4右下)。さらに、検出された c イオンの質量とデータベース登録されているカルボニックアンヒドラーゼのアミノ酸配列に基づき、N 末端の配列が SHHWGYGKH...であることとアセチル化していることを推定することもできました(図4上)。

■ まとめ

電気泳動ゲルからのタンパク質抽出と卓上型 MALDI-TOF 質量分析計 MALDI-8020 を組み合わせ、N 末端がブロックされたタンパク質の分子量測定と ISD による配列解析を行いました。

今回の結果は、本手法を用いることにより、Mascot では同定できないデータベース未登録のタンパク質でも近縁のタンパク質を特定できることや、プロセッシングを受けたタンパク質の末端配列解析が行えることを示しています。なお、今回、電気泳動ゲルから抽出したタンパク質の ISD による配列解析が行えた最低濃度は 25 pmol/ゲルであり、さらなる高感度化が必要とされていますが、可溶性ポリアクリルアミドゲルから高い収率でタンパク質を回収し質量分析計で配列解析を行った例¹⁾も報告されており、今後の展開が期待されます。

<参考文献>

- 1) Takemori N, Takemori A, Wongkongkathep P, Nshanian M, Loo RRO, Lermyte F, Loo JA., 2017. Top-down/Bottom-up Mass Spectrometry Workflow Using Dissolvable Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.*, 89 (16), pp. 8244-8250

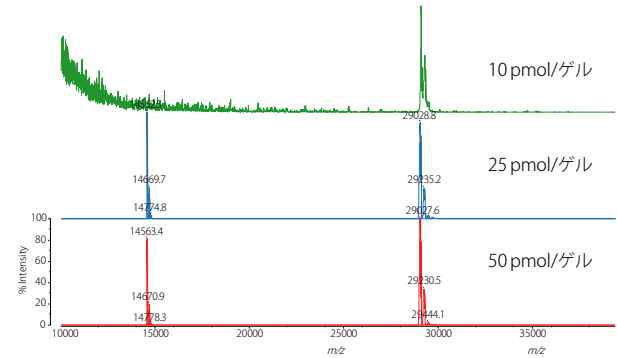


図3 ポリアクリルアミドゲルから抽出したカルボニックアンヒドラーゼのマススペクトル

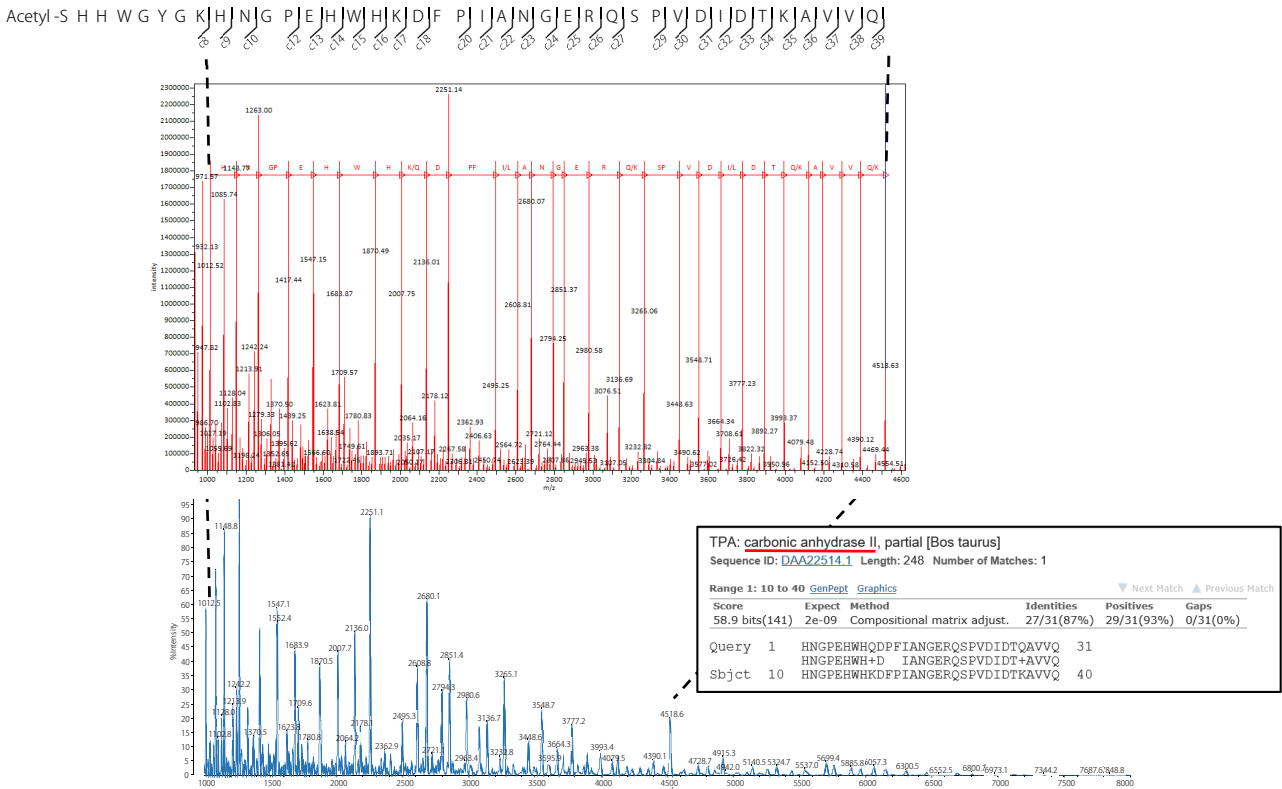


図4 ポリアクリルアミドゲルから抽出したカルボニックアンヒドラーゼの MALDI-ISD 分析結果
上：推定アミノ酸配列、中央：Mass⁺⁺による帰属結果、下：ISD スペクトル、右下：BLAST 検索結果

Mass⁺⁺は、株式会社島津製作所の商標です。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2018年8月

島津コールセンター ☎0120-131691
(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。