

Application News

No. B95

MALDI-TOF 質量分析法

卓上型 MALDI-TOF 質量分析計を用いた 獣毛の鑑別

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) には、ペプチドやタンパク質、合成高分子など、様々な高分子サンプルの分子量情報を簡便・迅速に得られるという特長があります。この MALDI-TOF MS は、研究開発や品質管理の現場において、合成品や天然物の分子量確認等に広く用いられています。

MALDI の新たな用途の一つとして、動物種特異的な獣毛ペプチドを検出することによる獣毛の鑑別法が提唱されています¹⁾。この鑑別法は、「カシミヤ等獣毛繊維のペプチド法による試験方法」として、国際標準化機構 (ISO) で承認され、ISO 規格に定められています²⁾。この鑑別法は、1本の毛であっても分析可能なため、カシミヤ偽装の防止のみならず、食品などへの混入異物検査にも応用できる可能性が考えられます。

ここでは、卓上型 MALDI-TOF MS の MALDI-8020 を用いて、獣毛の鑑別を行った例を紹介します。

K. Shima

■ 試料の前処理

カシミヤ、ヤク、羊毛、アルパカ、ラクダ、ウマ、ウサギの原毛を、ハサミやボールミル等で細かく破碎しました。粉碎した原毛 10~50 mg に、50 mM のジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT) を含む 4% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) と、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) を 0.5 mL 加え、95 °C で 15 分~1 時間加熱しました。加熱後、抽出液に 100 mM の濃度になるようにヨードアセトアミドを加え、室温で 15 分間反応させ、25 mM の DTT 10 μ L を添加して反応を停止しました。この抽出液をトリクロロ酢酸で沈殿、洗浄後、7 M 尿素と、2 M チオ尿素溶液に再溶解させたものを 50 mM 重炭酸アンモニウムで希釈し、2.0 μ g のトリプシンを加えて 37 °C で一晩消化しました。



図1 卓上型 MALDI-TOF MS MALDI-8020

脱塩処理は、ZipTip® μ C18 (Merk Millipore) を用いて行いました。脱塩処理したサンプル溶液を MALDI ターゲットプレートに搭載した後、0.5 μ L のマトリックス溶液を搭載して質量分析を行いました。尚、マトリックスには CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) を 5 mg/mL になるように 50% アセトニトリル/0.05% トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid, TFA) に溶解したものを用いました。

質量分析には卓上型 MALDI-TOF MS "MALDI-8020" (図1) を用い、リニアポジティブモードでの測定を行いました。各マススペクトルから得られたピークリストを、統計解析ソフト eMSTAT Solution™ を用いて解析することにより、各獣毛の識別を試みました。

■ 結果

獣毛のトリプシン消化ペプチドのマススペクトルを図2に示します。 m/z 2450-2750 の範囲に、各動物種特異的なペプチドピークが検出されました。この特異的なピークを用いることにより、獣毛を鑑別することが可能となります。獣毛を構成するタンパク質はケラチンが主であり、検出されているペプチドもケラチンに由来しています。

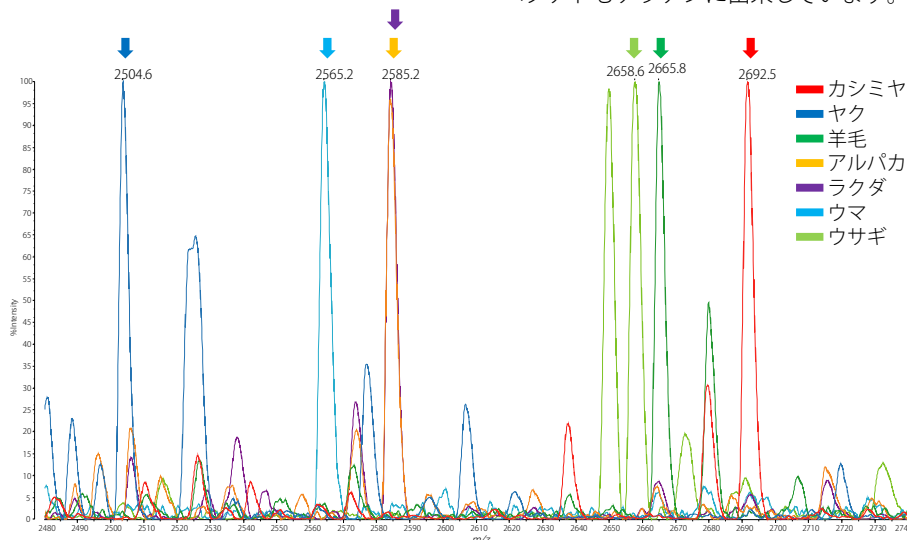


図2 獣毛のトリプシン消化ペプチドのマススペクトル

表1 keratin type I の動物種特異的なアミノ酸配列領域¹⁾

生物種	Keratin Type I Protein	アミノ酸配列	[M+H] ⁺ 平均質量*1
カシミヤ	Keratin 33A [<i>Capra hircus</i>]	YSCQLNQVQSLIVNVESQLAEIR	2692.38
ヤク	Keratin type I microfibrillar, 47.6 kDa-like [<i>Bos mutus</i>]	YSSQLAQVQGLIGNVESQLAEIR	2504.81
羊毛	Keratin 33B [<i>Ovis aries</i>]	YSCQLSQVQSLIVNVESQLAEIR	2666.03
ラクダ/アルパカ	Keratin, type I microfibrillar, 47.6 kDa [<i>Camelus dromedaries</i>]	YGSQSLSQVQGLITNVEHQLAEIR	2584.90
ウマ	Keratin 33A [<i>Equus caballus</i>]	YSSQLSQVQGLITNVESQLAEIR	2564.86
ウサギ	Keratin, type I cuticular Ha3-1 [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	YSSQLSQVQCMISNVESQLGEIR	2657.99
イヌ	Keratin 33A [<i>Canis lupus familiaris</i>]	YSSQLNQVQCMITNVESQLAEIR	2713.07
ドブネズミ	Keratin 31 [<i>Rattus norvegicus</i>]	YSSQLSQVQCLITNVESQLGEIR	2653.98
ヒト	KRT34 protein [<i>Homo sapiens</i>]	YSSQLSQVQSLITNVESQLAEIR	2594.89

*1 システイン残基はヨードアセトアミドによりカルバミドメチル化されたものとして平均質量を計算。

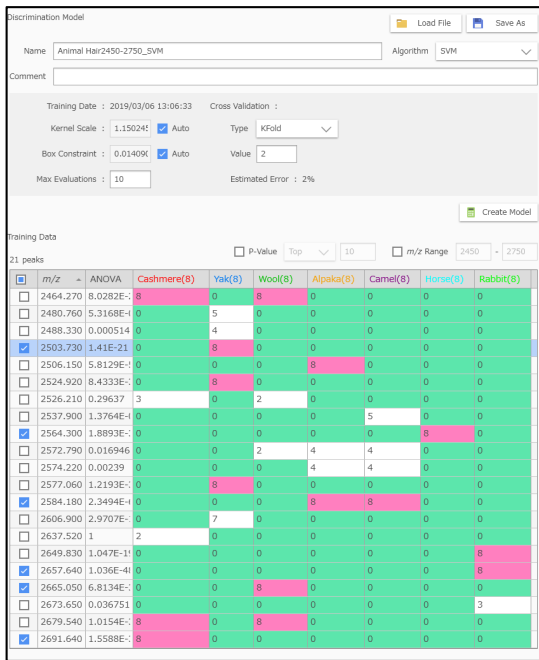
動物種特異的なピークの帰属結果を表1に示します¹⁾。このアミノ酸配列は keratin type I に由来しています。この配列は、今回測定した動物種に加えてヒトやドブネズミについても特異的なことが分かります。なお、アルパカとラクダについてのみ、特異的なピークの質量が一致しているため、互いに識別することはできません。

次に、図2に示した動物種特異的なピークと eMSTAT Solution を用いて、獣毛の動物種を判別するための判別モデル（アルゴリズム：Support Vector Machine）を作成しました（図3左）。作成した判別モデルを用いて、別途測定したカシミヤ、ヤク、羊毛各3サンプルの判別分析を行ったところ、全て正しい動物種と判別することができました（図3右）。

■まとめ

卓上型 MALDI-TOF MS MALDI-8020 と統計解析ソフト eMSTAT Solution を用いて、獣毛を迅速に鑑別できることが示されました。この手法を用いることにより、カシミヤだけでなく、羽毛やヒトの毛髪など、様々な鑑別が可能と考えられます。卓上型のコンパクトさと分子プロファイリングに十分な性能を兼ね備えた MALDI-8020 は、多様な試料の特性評価を簡便・迅速に行いうる製品として、今後の展開が期待されます。

判別モデル作成



判別分析

Name	test1_cr	test2_c	test3_c	test5_w	test6_wc	test7_wc	test9_ya	test10_ya	test11_ya
Group	Cashme	Cashme	Cashme	Wool	Wool	Wool	Yak	Yak	Yak
Score	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2464.2700	---	7121.64	2699.0	3876.0	6225.32	2892.2	---	8174.82	---
2480.7600	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2488.3300	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2503.7300	---	---	---	---	---	---	29521.7	39587.23	9901.4
2506.1500	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2524.9200	---	---	---	---	---	---	7317.98	13846.9	4605.66
2526.2100	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2537.9000	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2564.3000	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2572.7900	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2574.2200	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2577.0600	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2584.1800	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2606.9000	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2637.5200	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2649.8300	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2657.6400	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2665.0500	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2673.6500	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2679.5400	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2691.6400	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2757.0600	---	---	---	---	---	---	10292.5	14461.96	3260.26

図3 獣毛の判別分析（左：作成した判別モデル、右：獣毛の判別分析結果）

謝辞

データ取得及び試料ご提供について、ご支援を頂きました金沢工業大学ゲノム生物学工学研究所教授 大審 信一先生に厚く御礼申し上げます。

<参考文献>

- 1) 大審 信一 ほか：MALDI-TOF 質量分析計によるカシミヤ及び他の獣毛類の定量分析、繊維学会誌、70, 6, 114~120 (2014)
- 2) ISO 20418-2: 2018 Textiles -- Qualitative and quantitative proteomic analysis of some animal hair fibres -- Part 2: Peptide detection using MALDI-TOF MS

eMSTAT Solution は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

ZipTip は、Merck KGaA の登録商標です。

その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中には TM、®マークを明記していない場合があります。

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：2019年4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。