

## 安定同位体標識法(NBS法)によるプロテオーム解析

安定同位体試薬を用いて、2つの異なる状態（例えば、病態モデルと正常モデルなど）のサンプル中の発現蛋白質を網羅的に定量解析する方法はその定量性、再現性等が従来法に比べて優れているため注目されています。

ここで紹介する方法は、蛋白質・ペプチド中のトリプトファンに着目し、この残基を選択的に標識する安定同位体試薬(NBS試薬) (図1)を用い、標識されたトリプトファンを含む目的ペプチドを質量分析でプロテオーム解析を行うものです。図1に示すように6つの炭素原子を $^{13}\text{C}$ に置換した $^{13}\text{C}$ -6試薬は $^{13}\text{C}$ -0試薬と同じ化学的性質をもち、質量が6Da大きくなります。プロトコールの概略を図2に示しました。

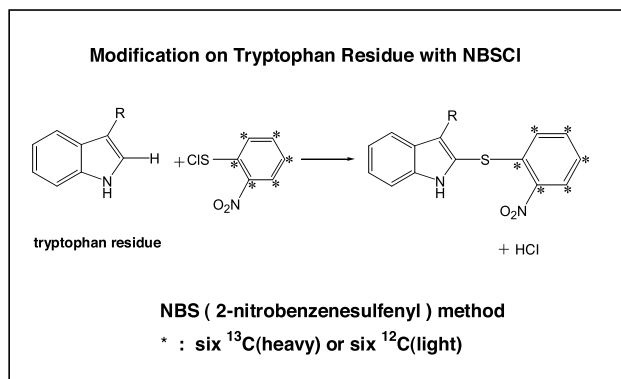


図1 NBS試薬

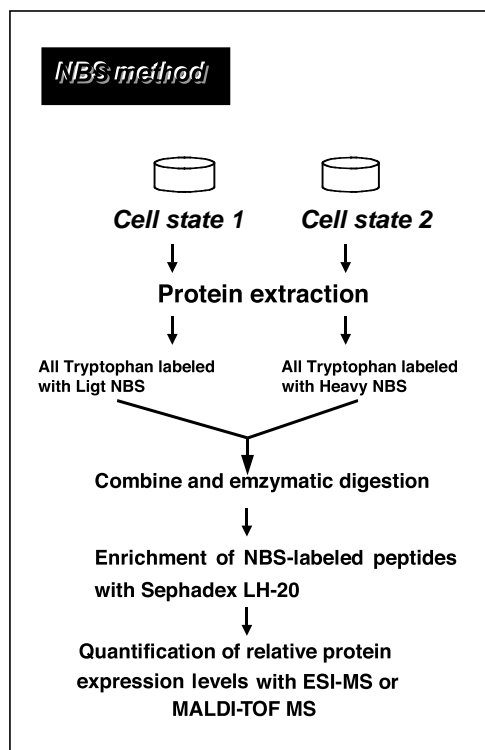


図2 NBS法 プロトコール概略

安定同位体試薬として従来知られているものにICAT™試薬があります。この試薬を用いる方法論は蛋白質・ペプチド中のシステインを標識し、アフィニティカラムによって目的とするシステイン含有ペプチドを得、質量分析によって相対定量などの解析を行うものです。ここで紹介する方法がこの従来法と異なる点は、標識するアミノ酸残基をトリプトファンとしたこと、目的の標識されたペプチド断片をセファデックスで分離・濃縮することです。トリプトファン残基は生体中で重要な働きをしている場合が多く、その存在量が比較的少ないため、得られるマススペクトルがシンプルになり、解析が容易になります。また、セファデックスのカラムにより目的断片の分離・濃縮が比較的簡便にできます。

図3にはモデルペプチド( ACTHおよびgalanin )を用いた相対定量について示しました。サンプル中の標識体の存在比率が理論値通りに得られました( ACTHは1:1, galaninは1:2 )。図4にはラットの血清( 正常 )をサンプルとして、図2に示した一連の工程を経てセファデックスLH20で分離・濃縮した結果を示しています。図4( a )には分離・濃縮前のスペクトル、( b )には分離・濃縮後のスペクトル、( c )には( b )の拡大図( m/z:700-1100 )を示しました。標識ペプチドと非標識ペプチドとのピーク対( 矢印 )が分離・濃縮後の拡大図( c )において多数認められ、各々のピーク対は発現蛋白質の相対量比( この場合は1:1 )を示しています。図5にはラットの血清( 正常および高血糖 )を用いた発現蛋白質の相対定量をESI-MSで行った結果の一部を示しました。図5( a )中にいくつかのピーク対( m/z: 756.5,762.5;826.5, 832.5;883.5,889.5 )が見られますが、そのうちアルブミン由来ペプチドのピーク対( m/z: 826.5,832.5 )からはアルブミン量の相対比が図5( b )に示すように1:1と決定できました。

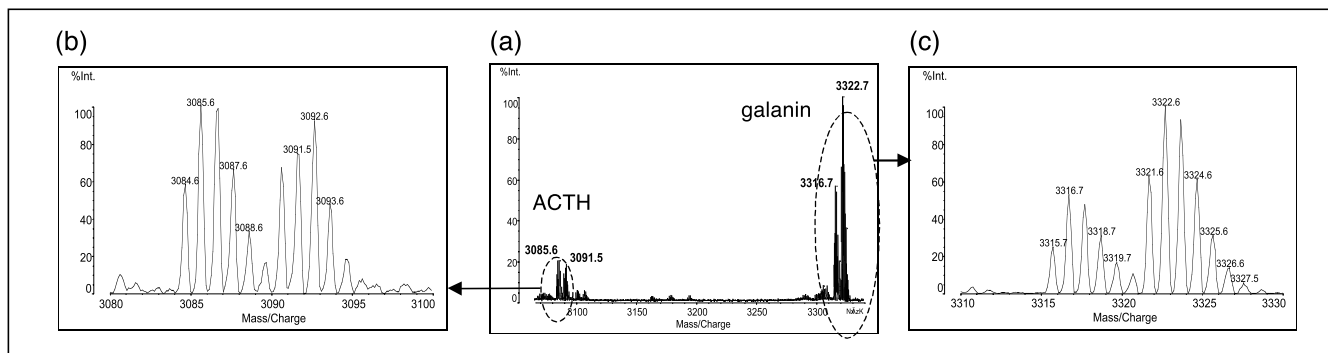


図3 モデルペプチドを用いた相対定量

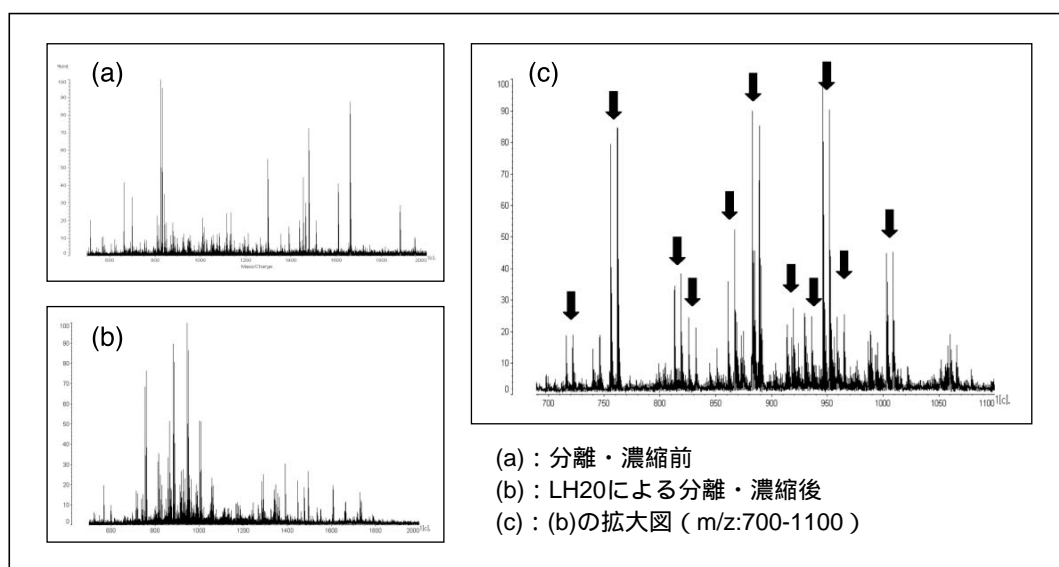


図4 トリプシン処理後のセファデックスLH20による分離・濃縮

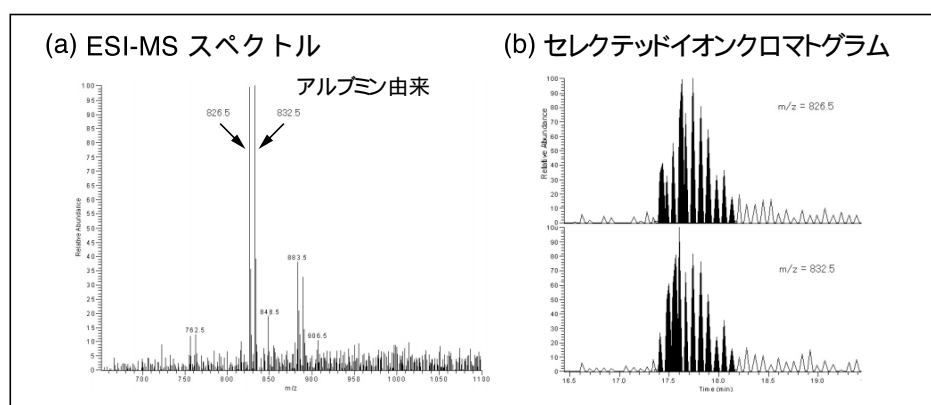


図5 ラット血清( 正常及び高血糖 )を用いた発現蛋白質の相対定量

参考文献 H.Kuyama, M.Watanabe, C.Toda, E.Ando, K.Tanaka, O.Nishimura,  
 “ An approach to quantitative proteome analysis by labeling tryptophan residues ”  
 Rapid Commun. Mass Spectrom., 2003; 17: 1642-1650.