

MALDI-TOFMSによるリン酸化解析 (3) TiO₂によるリン酸化ペプチドの濃縮

Phosphorylation analysis by MALDI-TOF MS (3)
Phosphopeptide concentration technique using TiO₂

タンパク質のリン酸化は生体機能の制御に重要な翻訳後修飾の一つです。近年、リン酸化部位の解析に質量分析が適用されていますが、通常、リン酸化の割合は低く、かつ、リン酸化によりイオン化効率が著しく低下するため、混合物のまま解析するのが困難なケースが多く見られます。ここ数年、IMAC (Immobilized Metal Affinity Chelate)、や二酸化チタン (TiO₂) を用いたリン酸化ペプチド特異的な濃縮方法が研究されて、リン酸化研究に大きな成果をもたらしてきました。ここでは、TiO₂を用いたリン酸化ペプチドの濃縮とMALDI-MS/MS (seamless PSD) を組み合わせたリン酸化解析について説明します。

Fig.1には典型的なTiO₂による濃縮プロトコルを示し

ステップ	溶液
コンディショニング	80 % ACN , 2-2.5 % TFA
試料調製	80 % ACN , 2-2.5 % TFA
吸着	上記 “ 試料調製 溶液 ”
洗浄	80 % ACN , 2-2.5 % TFA
溶出	NH ₄ OH (>pH10) , ACN
脱塩	* ZipTipなど通常の脱塩

Fig.1 TiO₂による濃縮プロトコル
Concentration protocol using TiO₂

ました。TiO₂はFig.2のような原理でリン酸基と親和性を示します。混合物中のリン酸化ペプチドをTiO₂でトラップした後、アルカリ性の溶媒で洗浄することにより、リン酸化ペプチドを濃縮することが可能です。しかし一方で、TiO₂は酸性アミノ酸とある程度の親和性を示すため、いかにして酸性アミノ酸を有する非リン酸化ペプチドの吸着を排除するかが処理のポイントとなります。そのために、高濃度の酸と高濃度の有機溶媒 (アセトニトリル) が必要となります。

Fig.3にはTiO₂の濃縮効果を示しました。リン酸化ペプチドが特異的に濃縮され、脱塩処理だけでは検出できなかったリン酸化ペプチド (*m/z* 1660) も観測されました。

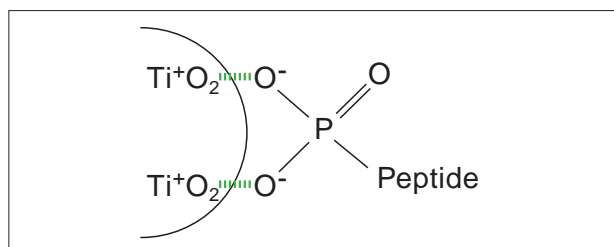


Fig.2 TiO₂のリン酸基親和性 (イメージ)
TiO₂ affinity for phospho-group

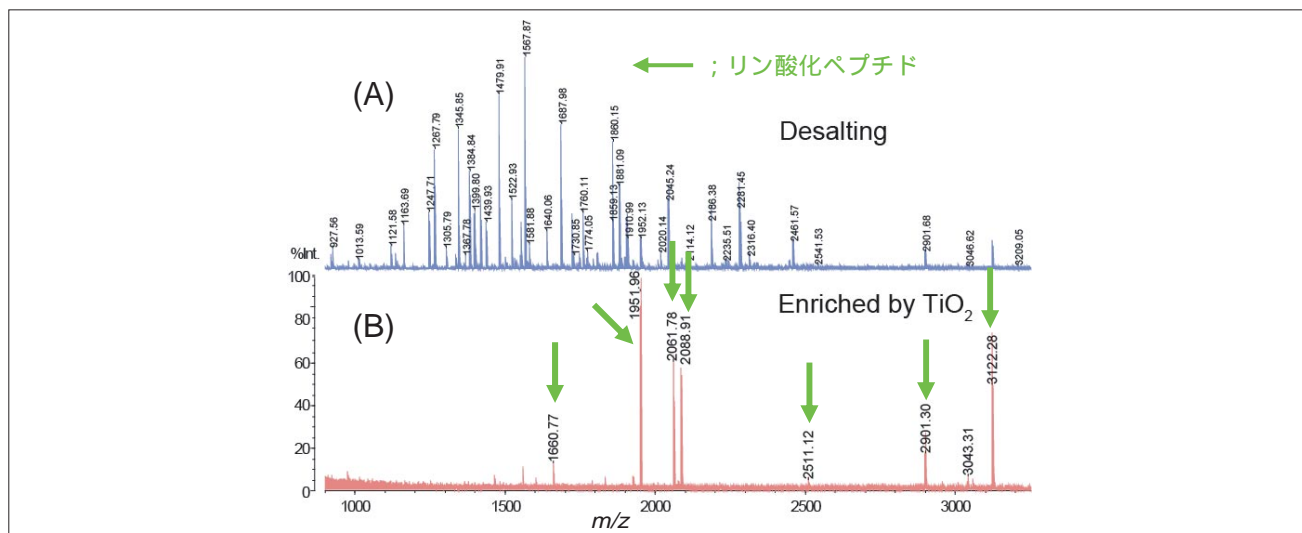


Fig.3 TiO₂によるリン酸化ペプチドの濃縮 (A) C18チップによる脱塩 (B) TiO₂による濃縮
An example of phosphopeptide concentration using TiO₂ (A) Desalted by C18 (B) Concentrated by TiO₂

< 測定条件 >

装置 : AXIMA-Performance

マトリックス : 2,5-DHB (Dihydroxybenzoic acid) 10 mg/mL (50 % アセトニトリル , 0.1 % TFA)

試料 : トリプシンによる消化混合物 (BSA , -casein , -casein , ovalbumin)

Fig.4はリン酸化タンパク質が豊富な細胞溶出成分を電気泳動で分析した結果です。17個のスポットについて、図5のようなMS/MS (sPSD) 測定を行いました。全てのスポットについてタンパク質を同定し、リン酸化部位を特定することができました。

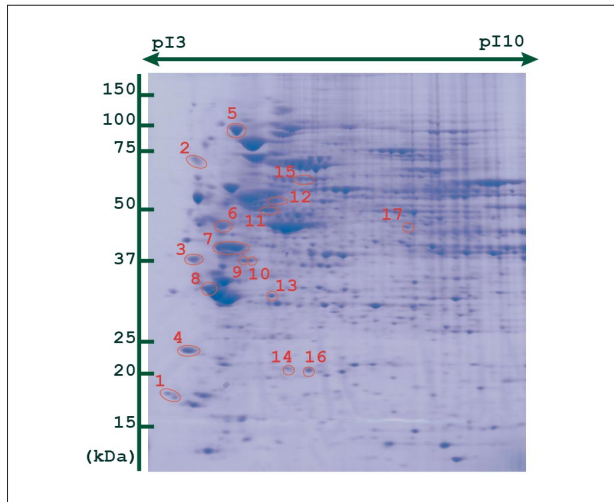


Fig.4 A431 whole cell lysateの二次元電気泳動 (CBB染色)
Two-dimensional electrophoretic profile of A431 whole cell lysate (CBB stained)

特筆すべき点として、スポット11のような3リン酸化ペプチドでもsPSDによりリン酸化部位を含めた配列解析が可能であったことです。

このように、TiO₂による濃縮とsPSDの組み合わせはリン酸化研究に有効な方法と言えます。

Y. Yamazaki

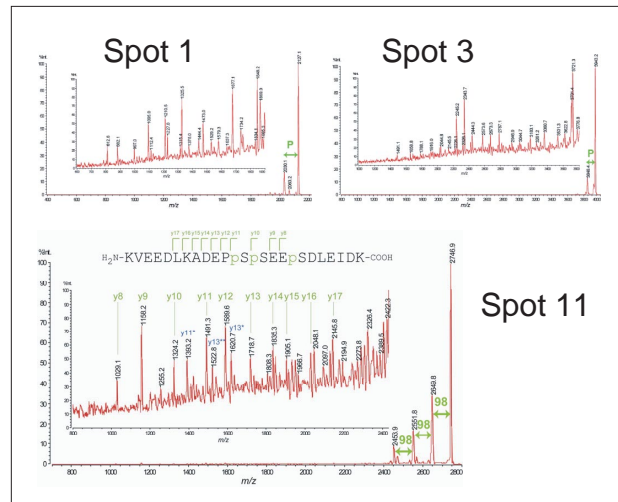


Fig.5 各スポットから抽出したリン酸化ペプチドのsPSD
sPSD spectra of phosphopeptides extracted from spot 1, 3, and 11

Table 1 リン酸化タンパク質の同定結果
Identified phosphoproteins and phosphorylation sites

Spot No.	protein description	score	mass	sequence
1	60S acidic ribosomal protein P1	45	11665	K.KEEpSEEpADDDMGFGLFD.-
2	IQ domain-containing protein E	31	77696	R.VPpSPIAQApTgSpVQEEAIVIIQpSALR.A
3	Nascent polypeptide-associated complex subunit	56	23384	K.VOGEAVSNIQENTQTPTVQEEpSEEEVDETGVVEK.D
4	Prostaglandin E synthase 3 - Homo sapiens	55	18982	K.DWEDDpSDEDMSNFDR.F
5	Endoplasmic precursor - Homo sapiens	17	92753	K.VEEEEPEEETAEDTTEDEQDEDEEoxyMDVGpTDEEEETAK.E
6	CaM kinase-like vesicle-associated protein	26	54695	R.ATPATEESpTVPTTQSSAoxyMLATK.A
7	Hepatoma-derived growth factor	56	26902	K.GNAEGpSpSDEEGKLVIDEPK.E
8	Elongation factor 1-beta	135	24935	K.DDDDIDLFGpSDDEEESSEAK.R K.DDDDIDLFGpSDDEEESSEAKR.L
9	Elongation factor 1-delta	44	31236	K.KPATPAEDDEDDIDLFGpSDNEEDKEAQLR.E
10	Elongation factor 1-delta	73	31236	K.KPATPAEDDEDDIDLFGpSDNEEDKEAQLR.E
11	Hsc70-interacting protein	47	41502	K.KVEEDLKADEPpSpSEEpSDLEIDK.E
12	Probable phospholipid-transporting ATPase 1K	33	149626	R.STRAGPEPpSPAPPGpDpTGSDSVTQEGSGPAGIRGGETVIR.A
13	Proteasome subunit alpha type-3	34	28661	K.ESLKEEDEpSDDDDoxyM.-
14	(Stathmin)			
15	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	108	52221	K.SpSSPAPADIAQTVQEDLR.T
16	Stathmin	73	17302	K.ESVPEFPLpSPPK.K R.ASGQAFELILpSPR.S
17	Septin-2	34	41715	K.IYHLPAEApSDEDEDFKEQTR.L

[参考文献]

1) Nature Methods, 4(3), 231(2007)

初版発行：2008年10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。