

Application News

No. B104

MALDI-TOF 質量分析法

卓上型 MALDI-TOF 質量分析計を用いた 獣毛類の定量分析

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、「カシミア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、カシミア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、獣毛の定量分析を行った例を紹介します。

K. Shima

■ 研究手法

試料の前処理は ISO 規格に定められている方法に準じて行いました²⁾。前処理の概要は以下の通りです。カシミア、羊毛の原毛を、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 SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、目的タンパク質を含む部分のゲルを切り出し、50 mM 重炭酸アンモニウム / 50% アセトニトリルを用いて染色液の Coomassie Brilliant Blue (CBB) を除去した後、約 150 ng のトリプシンを加えて 50 °C で一時間消化しました。



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 質量分析計 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。

■ 結果

カシミアと羊毛を 10~90% の割合で混合した試料のトリプシン消化ペプチドのマスペクトルを図2に示します。 m/z 2691 にカシミア特異的、 m/z 2664 に羊毛特異的なペプチドピークが検出されました。各ピークの強度比は混合率に応じて変化していることがわかります。この特異的ピークを用いることにより、獣毛の鑑別および混合比の測定をすることが可能となります。なお、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由来しています。

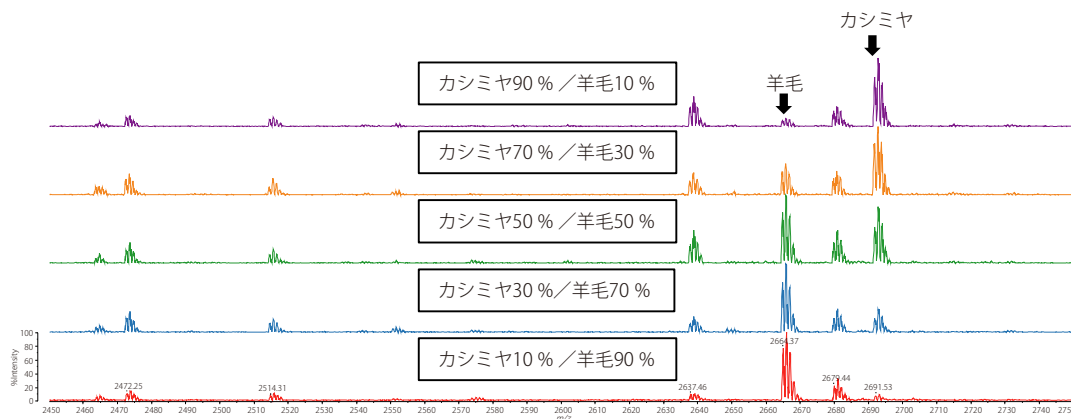


図2 カシミア-羊毛混合物のトリプシン消化ペプチドのマスペクトル

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] ⁺ モノアイソトピック質量*1
カシミヤ	Keratin 33A [<i>Capra hircus</i>]	YSCQLNQVQSLIVNVESQLAEIR	2691.38
ヤク	Keratin type I microfibrillar, 47.6 kDa-like [<i>Bos mutus</i>]	YSSQLAQVQGLIGNVESQLAEIR	2503.32
羊毛	Keratin 33B [<i>Ovis aries</i>]	YSCQLSQVQSLIVNVESQLAEIR	2664.37
ウマ	Keratin 33A [<i>Equus caballus</i>]	YSSQLSQVQGLITNVESQLAEIR	2563.34
イヌ	Keratin 33A [<i>Canis lupus familiaris</i>]	YSSQLNQVQCMITNVESQLAEIR	2711.31
ドブネズミ	Keratin 31 [<i>Rattus norvegicus</i>]	YSSQLSQVQCLITNVESQLGEIR	2652.33
ヒト	KRT34 protein [<i>Homo sapiens</i>]	YSSQLSQVQSLITNVESQLAEIR	2593.35

*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モノアイソトピック質量を計算。

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等についても特異的なことが分かります。

次に、カシミヤ、羊毛特異的なピークの強度を用いて、次式に従ってピークの強度比を求めました。

$$\text{Cashmere Peak(\%)} = \text{PAC} * 100 / (\text{PAC} + \text{PAW})$$

ここで、PAC : カシミヤ特異的なピークの強度
PAW : 羊毛特異的なピークの強度

得られた強度比と混合比の関係プロットした検量線を図3に示します。なお、再現性を確認するために、同じサンプルの SDS-PAGE を二系列行って、それぞれについて検量線を作成しました(図3の赤線と青線)。作成した検量線はいずれも良好な直線関係が認められ、相関係数も1に近い結果が得られました。以上の結果から、卓上型 MALDI-TOF MS の MALDI-8020 を用いて、カシミヤ-羊毛をはじめとした獣毛の混合率の測定が可能であることが示されました。

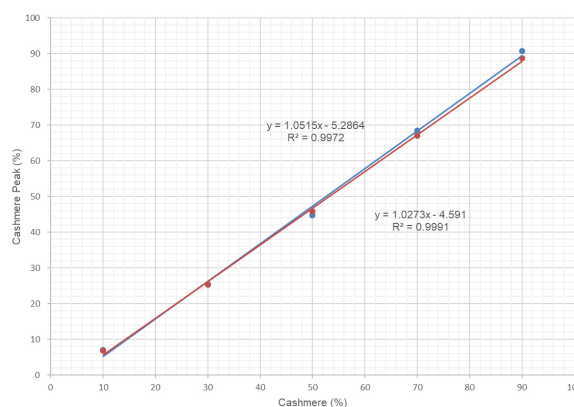


図3 カシミヤ/羊毛混合物の検量線

まとめ

卓上型 MALDI-TOF MS MALDI-8020 を用いて、獣毛の定量分析を行えることが示されました。参考文献¹⁾ではこの手法を用いることにより、カシミヤや羊毛、ヤクを原料とする市販の繊維製品中の獣毛の混合率を MALDI で定量することが可能であることが示されており、MALDI-8020 でも同様の定量分析が可能と考えられます。

卓上型のコンパクトさと獣毛鑑別に必要な性能を兼ね備えた MALDI-8020 は、多様な獣毛繊維製品の評価を簡便・迅速に行える製品として、今後の展開が期待されます。

<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工学研究所教授 大箸信一先生に厚く御礼申し上げます。

<参考文献>

- 1) 大箸 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

ZipTip は、Merck KGaA の登録商標です。

その他、本文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6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。