

## MALDI-TOF MSを用いた 菌体内の組成タンパク質の同定

山口久美子、栗木 智子、阪下 七海

### ユーザーベネフィット

- ◆ eMSTAT Solutionの多変量解析とアノテーション機能により、変動している菌体タンパク質を簡単に抽出できます。
- ◆ MALDI-ISDにより、酵素消化せずに液体クロマトグラフで単離したタンパク質の同定が可能です。
- ◆ ペプチドマスフィンガープリンティングの有効性が低い低分子量のタンパク質の同定に有効です。

### ■はじめに

微生物は培養時間や培養する培地の種類、温度等によって、分析した際に検出される物質に変化が生じます。これは環境ストレスや培養フェーズによって、菌体内の産生物質に変化が生じるためです。このことから、微生物の解析や識別をする場合には、未知菌体の培養・分析を行う前に標準的な菌体を用いて目的物質が産生される培養条件や前処理方法を最適化する必要があります。これらの条件検討では複数の要因を検討する必要があり、分析・解析するサンプル数が多量になることは少なくありません。

Application News No.01-00627では、MALDI-TOF MSと統計解析ソフトウェア eMSTAT Solutionの多変量解析により、外見や菌体数では確認できない差異を明らかにすることができました。また、菌体のような多数のピークが得られるサンプル(図1)であっても、遺伝子情報とアノテーション機能を活用することで、推定されたタンパク質の情報を基にグループ間の特徴の違いを考察できました。

eMSTAT Solutionのアノテーション機能により、培養する時間に伴い発現量が変化すると推定されたタンパク質HdeAは、分子量が一万程度のタンパク質のため、酵素消化しても十分なフラグメント数が得られず、ペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)の有効性が低いと考えられます。

本アプリケーションニュースでは、HdeAを一体型液体クロマトグラフ LC-2050Cで単離し、卓上型MALDI-TOF MS “MALDI-8030”(図2) のイオン源内におけるフラグメンテーション (ISD: In-Source Decay) を利用することでHdeAを同定しました。

### ■前処理および分析条件

#### 菌体培養

菌体は、微生物同定の際に校正試料として使用する大腸菌 DH5α株を使用しました。培地には市販の液体LB培地を使用しました。37℃で18時間振盪培養し、培養液を作成しました。培養液を3,200 gで5分間遠心分離して上清をデカント後、重炭酸アンモニウムで懸濁し、3,200 gで5分間遠心分離して上清をデカント後、再度重炭酸アンモニウムで懸濁しました。

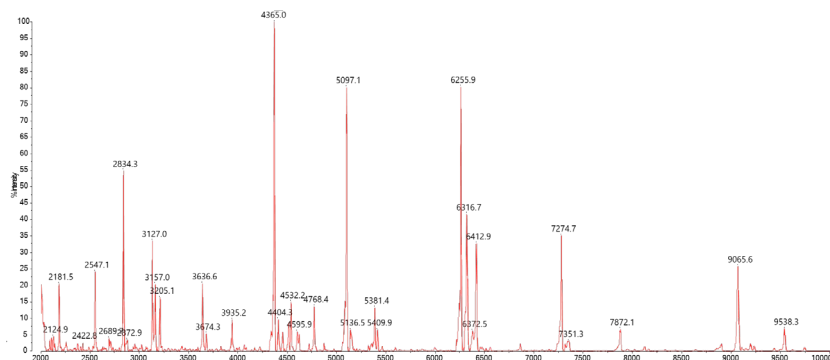


図1 大腸菌 DH5α 株のMALDIマスペクトル

### タンパク質抽出

風袋を取った空チューブに懸濁液を移し、4℃14,000 gで10分間遠心分離しました。上清を取り除いた後、ペレットの重量を測定しました。1 gのペレットにつき5 mLのBugBuster試薬(Merk社 70584)を加えピペッティングにより再懸濁し、DNase I (ROCHE社 10104159001) 1 mg/mLを懸濁液の1%量添加し、室温で20分間振盪しました。その後、4℃16,000 gで20分間遠心分離し、上清を回収しました。上清を0.22 μmのメンブレンフィルターで遠心濾過し、ろ液をタンパク質抽出液としました。

### タンパク質分離精製

表1の条件でタンパク質抽出液を分離精製しました。分取後、遠心エバポレーターにより濃縮・乾固し、0.1% トリフルオロ酢酸(TFA)を10 μL加えて再溶解しました。

表1 LC-2050Cの分析条件

System	: LC-2050C
Column	: Shim-pack™ VP-ODS <sup>1*</sup> (150 mm L × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile Phase A	: 5% CH <sub>3</sub> CN, 0.1% TFA
Mobile Phase B	: 90% CH <sub>3</sub> CN, 0.1% TFA
Time Program	: B Conc. 25% (0-5 min) → 38% (5-25 min) → 100% (25.01-35 min) → 25% (35.01-40 min)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 25 °C
Detection	: 220 nm with conventional cell

\*1 P/N : 228-34937-91

### MALDI-TOF MS

MALDI-8030の正イオンモードで分析を行いました。分子量の測定には、α-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA)マトリックスを使用し、MALDI-ISD測定には1,5-Diaminonaphthalene(1,5-DAN)マトリックスを使用しました。マトリックス溶液と分取後のサンプルをステンレス製のMALDIプレート上にアブライしました。



図2 卓上型MALDI-TOF MS “MALDI-8030”

## ■タンパク質同定

LC-2050Cで得られたLCクロマトグラムを図3に示します。図3の13.0 min(緑矢印), 14.2 min(青矢印), 15.8 min(赤矢印)の各画分を分取し、MALDI-TOF MSで分子量の測定を行いました(図4)。その結果、 $m/z$  9740.6のシグナルが得られた15.8 min(赤矢印)の画分がHdeA由来であると推測されました。

この確証を得るため、MALDI-MSD測定およびMascot(Matrix Science)のMS/MS ion searchによるデータベース検索を行いました(図5)。 $m/z$  5000以下に観測されたMALDI-MSD由来のラダー状のフラグメントイオンをデータベース検索に供し、このタンパク質が HdeAであることが同定できました。

## ■まとめ

菌体のような多数のタンパク質が含まれるサンプルであっても、液体クロマトグラフでの単離精製とMALDI-MSDの併用により、タンパク質を同定することができました。分子量数千〜万程度の小さなタンパク質のように、酵素消化してもPMFのための十分なフラグメント数が得られない場合は、単離精製後のMALDI-MSDおよびMascot検索は同定のための有効な選択肢になり得ます。

<関連アプリケーション>

1. 菌体培養時間による組成タンパク質の挙動解析

[Application News No.01-00627](#)

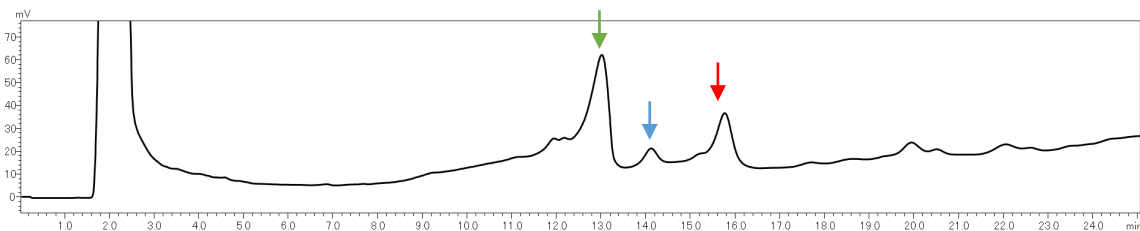


図3 タンパク質抽出液のLCクロマトグラム

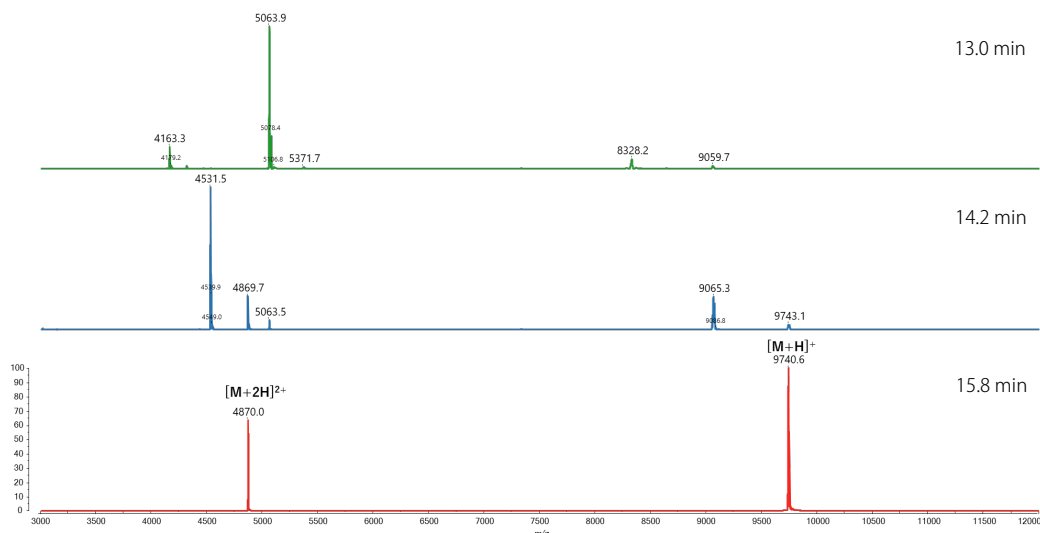


図4 上から順に13.0 min, 14.2min, 15.8 minの画分のMALDIマススペクトル

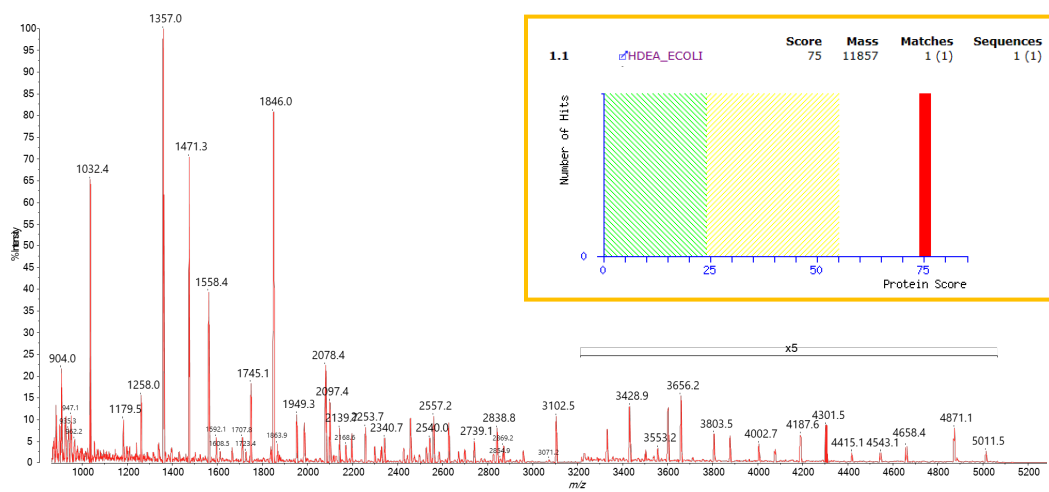


図5 15.8 minの画分のMALDI-MSDマススペクトル 右上：Mascotデータベース検索結果

eMSTAT SolutionとShim-packは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00727-JP 初版発行：2024年 3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

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。本文中に記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。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。