

質量分析によるプロテオミクスの手法

生命科学研究所 渡邊 祐三

1. はじめに

近年、生命科学の分野ではオミクス解析と呼ばれる手法が注目されている。オミクスとは、「研究対象+omics」で称される生物学の研究分野で、研究対象が遺伝子 (gene) であればゲノミクス (genomics)、転写産物 (transcript) であればトランスクリプトミクス (transcriptomics)、タンパク質 (protein) であればプロテオミクス (proteomics)、代謝物 (metabolite) であればメタボロミクス (metabolomics) と呼ばれる。本講義では、質量分析によるプロテオミクスに絞ってその手法を紹介したい。

2. タンパク質

人の体の約 15~20%はタンパク質でできており、水分は約 60%である。水分を除くと人の体の重量の約半分はタンパク質で占められていることになり、タンパク質は人の体を構成する重要な物質であることが分かる。タンパク質は多数のアミノ酸が結合してできているが、全てのタンパク質は表 1 で示す 20 種類のアミノ酸の様々な配列で構成されている。

表1 アミノ酸

アミノ酸	略号	分子量	アミノ酸	略号	分子量
アラニン	A	89.04768	メチオニン	M	149.0511
システイン	C	121.01975	アスパラギン	N	132.0535
アスパラギン酸	D	133.03751	プロリン	P	115.0633
グルタミン酸	E	147.05316	グルタミン	Q	146.0691
フェニルアラニン	F	165.07898	アルギニン	R	174.1117
グリシン	G	75.03203	セリン	S	105.0426
ヒスチジン	H	155.06948	スレオニン	T	119.0582
イソロイシン	I	131.09463	バリン	V	117.079
リジン	K	146.10553	トリプトファン	W	204.0899
ロイシン	L	131.09463	チロシン	Y	181.0739

3. タンパク質試料の前処理

3. 1. SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

タンパク質は、ジスルフィド結合等によって3次構造をとっている場合が多いが、還元剤や SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を含むサンプルバッファーにタンパク質を溶かして熱処理をすると、還元剤によりジスルフィド結合が切断され、SDS は負の電荷を持って直鎖状に変性したタンパク質と結合する。これをポリアクリルアミドゲル (アクリルアミドを重合して固めたもので、網目構造を持つ) にアプライし、電圧をかけて泳動すると、タンパク質は陽極側に移動する。小さなタンパク質ほどゲルの網目に引っかからずに早く移動するので、ゲル内で分子量の順にタンパク質を分離することができる。

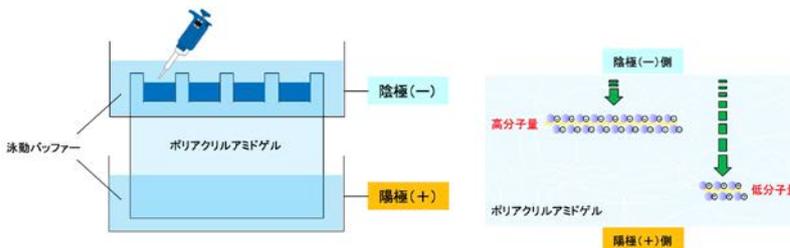


図 1 SDS-PAGE

泳動終了後、ゲルを染色するとタンパク質が存在する領域が染まる。染まった領域を適当な大きさに切り出して分画し、さらに 1mm 角程度に細かく切り、脱色・脱水・乾燥操作を行う。乾燥させたゲルにプロテアーゼ液を吸収させ、ゲル内消化でペプチド断片化させる。ゲルからペ

3. 2. 質量分析サンプルの調製

泳動終了後、ゲルを染色するとタンパク質が存在する領域が染まる。染まった領域を適当な大きさに切り出して分画し、さらに 1mm 角程度に細かく切り、脱色・脱水・乾燥操作を行う。乾燥させたゲルにプロテアーゼ液を吸収させ、ゲル内消化でペプチド断片化させる。ゲルからペ

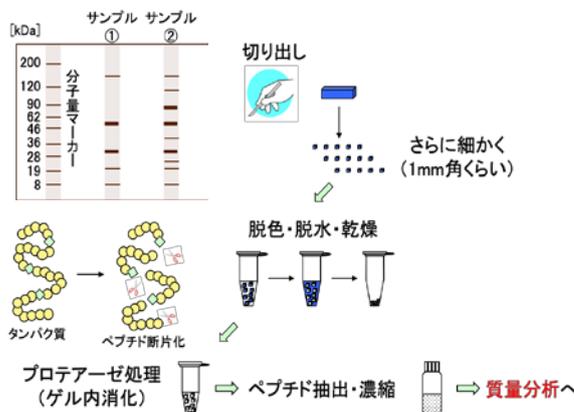


図 2 サンプル調製の流れ

プチドを抽出、濃縮したものを質量分析に供する。

4. 質量分析

質量分析は、物質をイオン化し、その m/z (エムオーバージー) を測定することによって得られたスペクトルを分析して、物質の同定や定量を行う方法である。質量分析の機器の構成は、試料導入部、イオン化部、分析部、イオン検出部、データ処理部というパートに分かれている。

4. 1. 試料導入部

- ・インフュージョン法
- ・On Plate 法
- ・HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 法: HPLC と接続し、移動相 A と B の割合を経時的に変化させることによって試料を分離する。

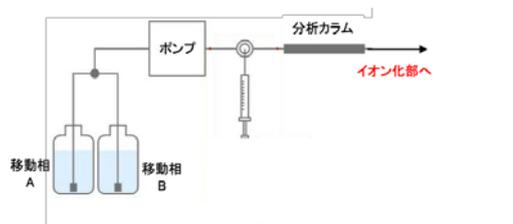


図3 HPLC 法

4. 2. イオン化部

- ・EI (Electron Ionization、電子イオン化) 法
- ・CI (Chemical Ionization、化学イオン化) 法
- ・FD (Field Desorption、電界脱離) 法
- ・FAB (Fast Atom Bombardment、高速原子衝突) 法
- ・MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization、マトリックス支援レーザー脱離イオン化) 法
- ・ESI (Electro Spray Ionization、エレクトロスプレーイオン化) 法: 高電圧を印加したキャピラリーに試料を導入し、噴霧することによりイオン化する。液相の多価イオンから気相の多価イオンが生成する。液体クロマトグラフィー (LC) と接続して使用することが多い。

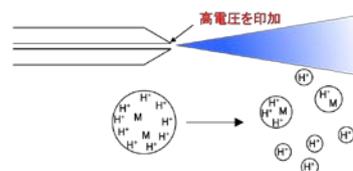


図4 ESI 法

4. 3. 分析部・イオン検出部

- ・磁場偏向型 (Magnetic Sector)
- ・イオントラップ型 (Ion Trap、IT)
- ・飛行時間型 (Time-of-Flight、TOF)
- ・四重極型 (Quadrupole、Q): 4本の電極に直流電圧と交流電圧を印加して四重極電場を発生させると、その電圧に応じて、一定範囲の m/z のイオンのみが四重極を通過できる。
- ・フーリエ変換型 (Fourier Transform、FT): 磁場や電場によって閉じられたセル内部で周期的な運動を行うイオンをモニターし、合成波をフーリエ変換で分離し、各周期成分に応じた m/z を算出する。質量精度が非常に高い。Thermo Fisher Scientific 社の Orbitrap analyzer が有名。

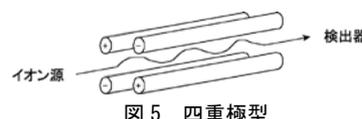


図5 四重極型

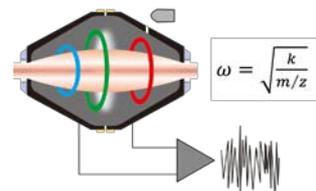


図6 Orbitrap analyzer

4. 4. データ処理部

測定で得られた MS/MS スペクトルとデータベース登録されている質量データをソフトウェア上で比較することによって試料の同定を行う。

5. MS/MS スペクトル からペプチド同定までの手法

Thermo Fisher Scientific 社の質量分析計 Q Exactive Plus での測定を例に挙げて、MS/MS スペクトルからペプチド同定に至るまでの手法を以下に紹介する。

質量分析計 Q Exactive Plus の概略図を図7に示す。試料導入部は LC から試料を連続的に供給するシステムを採用し、イオン化部は ESI、分析・検出部は四重極・フーリエ変換型である。

測定は、まず図 8(A)で示す Full Scan モードで、ある時間帯において供給されたイオン全てが四重極を通過するように電圧を設定し、Orbitrap analyzer で測定レンジ内の全てのイオンをスキャンする。スキャンの結果、図 8(B)のようなスペクトルが得られるが、イオン強度の大きい 10 個のピークの m/z について、引き続き図 9(A)で示す MS/MS モードで測定を行う。MS/MS モードでは、特定の m/z のイオンのみが四重極を通過するように電圧を設定し、コリジョンセルと呼ばれる領域でガスと衝突させることにより、さらに細かくフラグメント化させ、プロダクトイオンを形成させる。このプロダクトイオンを Orbitrap analyzer で測定することによって、MS/MS スペクトルが得られる。10 個のピークの m/z について、MS/MS モードでの測定が終了すれば、再び Full Scan モードの測定を実施し、さらに次の 10 個のピークについて MS/MS モードで測定をするというように繰り返し測定を行う。この方法を Top10 メソッドと呼んでいる。

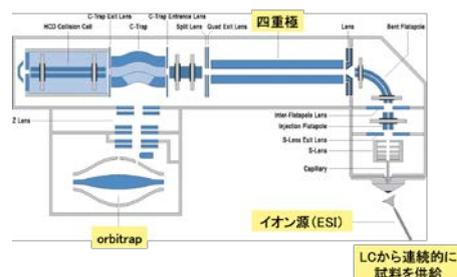


図 7 Q Exactive

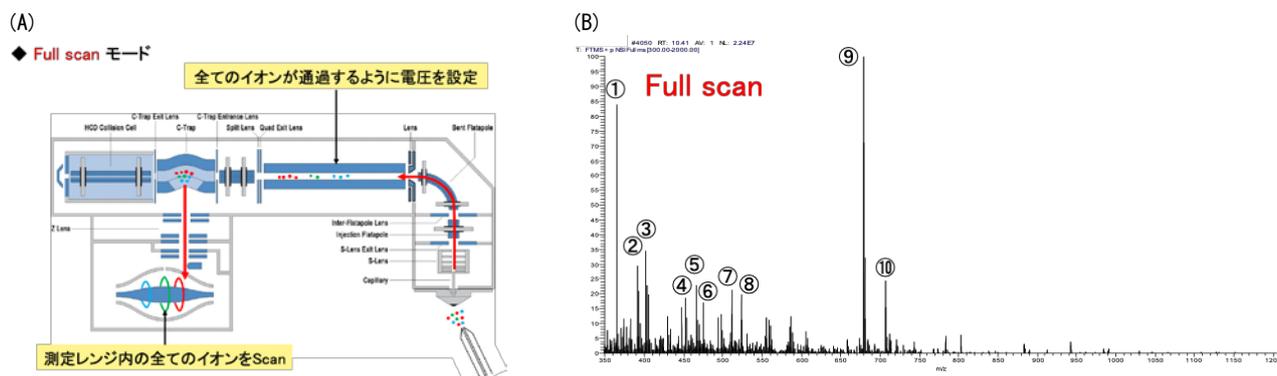


図 8 (A) Full scan モードにおけるイオンの動き (B) Full scan モードで得られた MS スペクトル

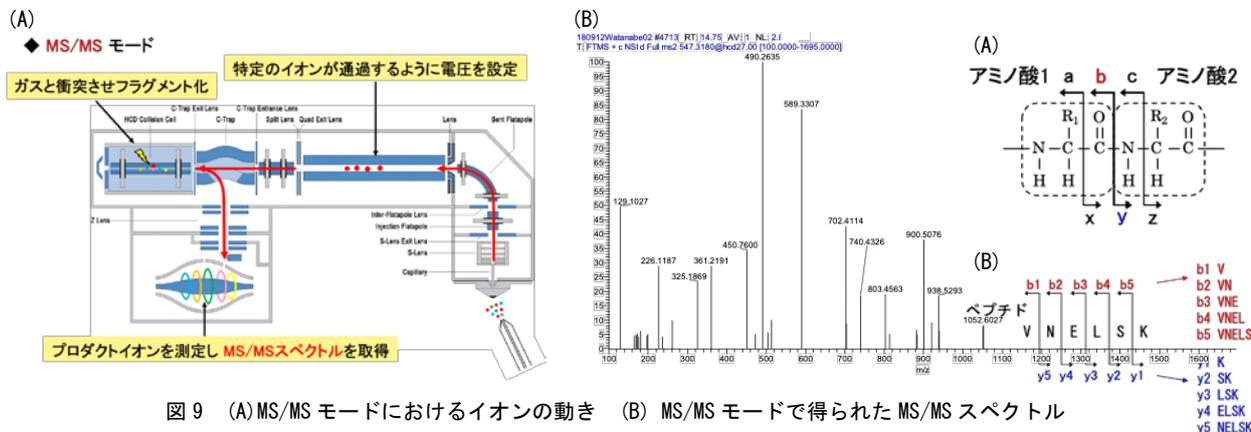


図 9 (A) MS/MS モードにおけるイオンの動き (B) MS/MS モードで得られた MS/MS スペクトル

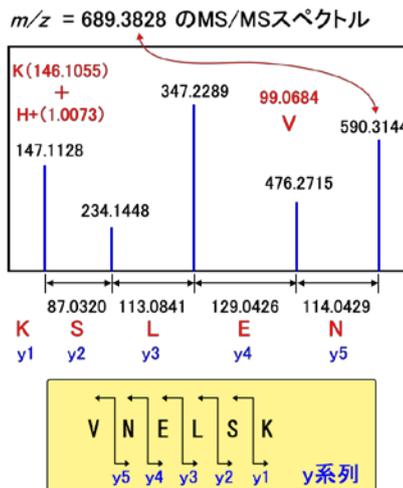
図 10 (A) ペプチドの開裂位置

(B) b、y 系列イオン

さて、コリジョンセルにおいてペプチドをフラグメント化させる場合、開裂方法によって開裂する場所が違い、それぞれ特異的なプロダクトイオンが生成されるが、Q Exactive Plus で採用されている HCD (High energy CID (CID: Collision Induced Dissociation、衝突誘起解離)) という開裂方法では、図 10(A)のように b、y の位置で開裂が起こり、b 系列のイオン、y 系列のイオンが生じる。例えば、「VNELSK」というペプチドの場合、図 10(B)のように b1~b5 の b 系列イオン、y1~y5 の y 系列イオンが理論的には生じることになる。

このようなプロダクトイオンからなる MS/MS スペクトルであるが、図 11 に示した例のようにアミノ酸配列を決定することができる。まず、一番左のピークは $m/z = 147.1128$ であるが、これはリジン (K、146.1055)

とプロトン (H+, 1.0073) を足した値であることが分かる。そして、右隣のピークとの差は 87.0320 であるが、アミノ酸同士のペプチド結合は水分子に相当する分の質量が除かれるので、セリン (S) が該当すると考えられる。このように、113.0841 はロイシン (L)、129.0426 はグルタミン酸 (E)、114.0429 はアスパラギン (N)、99.0684 はバリン (V) が該当し、この MS/MS スペクトルからは「VNELSK」という配列であると推測される。



アミノ酸	略号	質量	-H2O
アラニン	A	89.04768	71.0371
システイン	C	121.01975	103.0092
アスパラギン酸	D	133.03751	115.0269
グルタミン酸	E	147.05316	129.0426
フェニルアラニン	F	165.07898	147.0684
グリシン	G	75.03203	57.0215
ヒスチジン	H	155.06948	137.0589
イソロイシン	I	131.09463	113.0841
リジン	K	146.10553	128.0950
ロイシン	L	131.09463	113.0841
メチオニン	M	148.05110	131.0405
アスパラギン	N	132.05350	114.0429
プロリン	P	115.06330	97.0528
グルタミン	Q	146.09910	128.0586
アルギニン	R	174.11170	156.1031
セリン	S	105.04260	87.0320
スレオニン	T	119.05820	101.0477
バリン	V	117.07900	99.0684
トリプトファン	W	204.08990	186.0793
チロシン	Y	181.07390	163.0633

図 11 MS/MS スペクトルからのアミノ酸配列の同定

このように MS/MS スペクトルからアミノ酸配列を同定することができるが、膨大なデータから網羅的にペプチドを同定し、タンパク質の同定までを行うには、「4. 4. データ処理部」で述べたようにデータベースとソフトウェアを利用するのが一般的である。

図 12 にタンパク質同定ソフトウェアを用いたデータベース検索の概念を示す¹⁾。データベースに登録された配列情報を元に、ソフトウェア上では理論的に断片化され得るペプチド配列の質量データと理論的なプロダクトイオンの質量データが形成される。そして、実際の測定データと比較照合することによってペプチドが同定される。

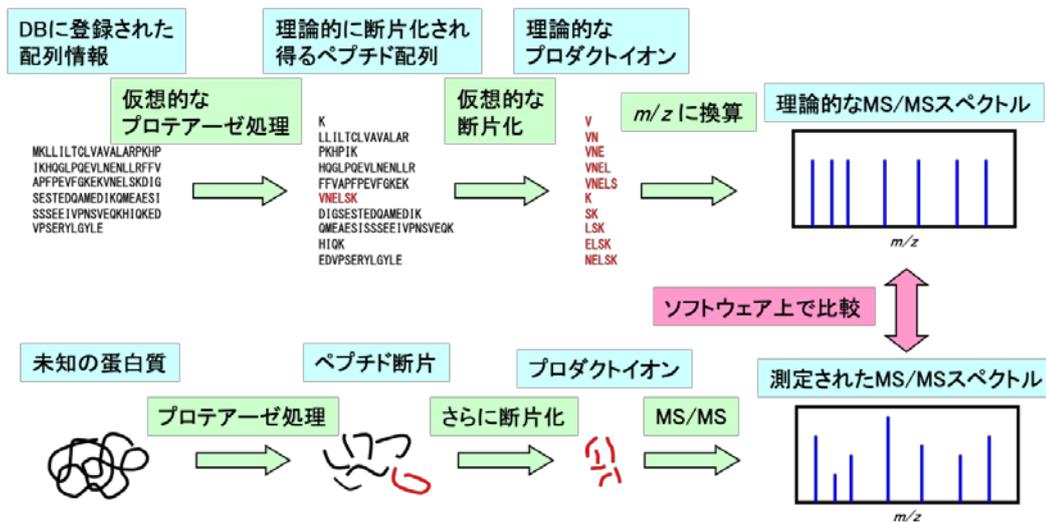


図 12 タンパク質同定ソフトウェアを用いたデータベース検索の概念図

6. タンパク質の同定と確度

MS/MS スペクトルからペプチド同定する手法は先述のとおりであるが、同定の確度についてもタンパク質同定ソフトウェア上で算出される。マトリックスサイエンス社の Mascot というソフトウェアでは、図 13(A) に示すように、理論的なピークと実際のピークの一一致度合いやピークの強度を元にスコアリングされ、ペプチドスコアとして算出され、値が大きいほどペプチドの同定確度が高くなる。

タンパク質としての同定確度は、ペプチドスコア 50 の「VNELSK」という配列以外に、図 13(B) に示すようなタンパク質 A の配列がデータベース検索でヒットした場合、それぞれ算出されたペプチドスコアを足した値がタンパク質 A のプロテインスコアとして算出される。つまり、多くのペプチドがヒットすれば同定されたタンパク質の確度も上がることになる。

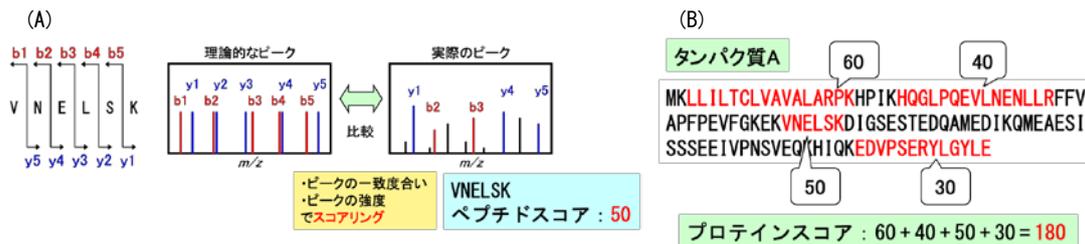


図 13 (A) ペプチドスコア (B) プロテインスコア

7. おわりに

質量分析によるプロテオミクスの手法のひとつとして、タンパク質試料をペプチド断片化し、HPLC/ESI-MS/MS システム に供する方法を紹介した。生命科学分野における質量分析はプロテオミクスだけでなく、メタボロミクスにも利用されており、非常に有用な分析技術である。また、質量分析計はもとより、その周辺機器類や解析ソフトウェアは日々進歩しており、今後も益々発展していくものと思われる。

参考文献

- 1) K. Yoshino, N. Oshiro, C. Tokunaga, and K. Yonezawa, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. Vol.52(2004) No. 3, pp.106-129