

# 技術習得報告書

提出日 23年 7月 11日



申請者	氏名	島 弘季
	所属・職	医学系研究科 生物化学分野
出張期間	23年 7月 5日 ~ 7月 5日	
出張先	東京コンファレンスセンター品川 (東京都港区)	
出張目的	技術習得	
研究課題名	タンパク質のトップダウン質量分析法	

技術解説・プロトコル・得られた成果など

質量分析計メーカーであるサーモフィッシャーサイエンティフィック社がユーザー向けに開催しているフォーラムに参加した。同社の新しい機器、メソッドの紹介や、それらを用いて研究を行っている大学・研究機関の研究者自身による成果報告を聞くことができた。また、同社の技術部門の方々から、いくつかの技術的な提案や示唆を得られた。それらのうち、当プラットフォームでの質量分析に特に有用であろうと思われる手法を紹介する。

現在、タンパク質をサンプルとした質量分析で広く用いられているのは、サンプルをトリプシンなどのプロテアーゼで消化して得られるペプチドの質量と MS<sup>2</sup> でのフラグメンテーションのパターンから、サンプルに含まれるタンパク質の同定やタンパク質の修飾の検出を行う「ボトムアップ法」と呼ばれる手法である。その有効性はこれまでの多くの報告から明らかだが、この方法には以下のような限界が存在する。

- ペプチドの長さや物理化学的性質によっては検出が困難な場合があるため、種類のプロテアーゼを用いただけでタンパク質の全長にわたる情報を得ることは難しい。
- バリエント、パラログの相同領域、タンパク質間あるいはタンパク質内で高度に保存されたモチーフなどから生じる、全く相同なアミノ酸配列のペプチドの由来は区別できない。
- 一つのタンパク質について、例えば二種類のペプチドに修飾が検出されたとして、得られる情報は2箇所のアミノ酸残基が修飾されうるということだけであり、修飾の組み合わせや比率は分かりにくい。

これらは特にタンパク質修飾の解析において大きな問題となる。そこでボトムアップ法に加えて、インタクトなタンパク質をそのまま質量分析に持ち込む「トップダウン法」と呼ばれる手法を併用することが行われている。トップダウン法自体はごく最近のものというわけではないが、近年の技術進歩により研究室レベルで運用できる装置でも十分な正確さ、精密さで結果を得られる選択肢となっている。

市販のウシ $\cdot$ カゼインを質量分析器に導入すると、サンプル中のタンパク質は十数価～二十数価のイオンとして検出される。たとえば  $m/z=1400$  付近のピーク群は  $z=17$  のイオンの一群であり、それぞれのピークは異なる質量を持つ分子、つまり $\cdot$ -カゼイン、それ以外の不純物タンパク質、それらのバリエント、それらが修飾をうけたもの、あるいは金属イオンなどが付加されたものだと考えられる。このスペクトルをデコンボリューションすると、二つの大きなピークについて 23982 と 24023 の平均質量が得られる。これらはそれぞれ、牛乳中でのマチュアな $\cdot$ -カゼインのバリエント A2 と A1 が五箇所リン酸化されたときの平均質量 23983 と 24023 にほぼ等しい。これらが本当に $\cdot$ -カゼイン A2、A1 であるかどうか、またどの残基がリン酸化されているかは、それぞれのピークの MS<sup>2</sup> を測定しフラグメンテーションのパターンを理論値と照合することで確認することができる。

MS<sup>2</sup>での開裂方法や効率を変えることによって、タンパク質全長にわたってフラグメンテーションを生じさせたり、あるいは局所的な連続数残基間での開裂で配列情報を得てシーケンスタグ検索を行うこともできる。最近ではオンライン化されたLC/MSを用いてトップダウン法のみでサンプル中のタンパク質を分離、同定している文献も見られる。また、ヒストンのようなトリプシンを用いたボトムアップ法が困難なタンパク質の修飾の検出にトップダウン法を活用した文献も見られるようになっており、今後、特にタンパク質修飾解析の面では、ボトムアップ法とトップダウン法の両方を併用していくことが主流になるとと思われる。

技術解説・プロトコル・得られた成果など

