

テクニカルノート

質量分析計による蛋白質同定～シグナル伝達研究への応用～

岸 博子, 張 影, 小林 誠

山口大学大学院医学系研究科生体機能分子制御学分野(生理学第一) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 質量分析, 蛋白質同定, シグナル伝達研究

和文抄録

質量分析計による蛋白質同定は, 相互作用解析やリン酸化部位の決定など, シグナル伝達研究の有力なツールとなるが, サンプルが微量のため, 同定が困難な事が多い. 当研究室では, 微量な蛋白質を質量分析で同定するためのサンプル調製法を独自に開発し, 従来のゲル内消化では困難だった微量な蛋白質を質量分析計で同定する事に成功したので, その方法と実施例について, 紹介する.

はじめに

質量分析計による蛋白質同定は, 蛋白質の網羅的な同定といった大規模解析の他, シグナル伝達研究の有力なツールとなる. 例えば, 免疫沈降やプルダウンアッセイ等の相互作用解析で, ある蛋白質と結合する蛋白質を検出した場合, ウェスタンブロットでは, どの様な蛋白質が結合しているか予測し, それに対する抗体を選択しなければならないが, 質量分析は, 全く情報の無い状態で, あるいは, 良い抗体が入手できない状態でも, 蛋白質を同定する事ができる. 更に, リン酸化などの翻訳後修飾の種類と部位を, 特異的に反応する抗体が無くても質量の変化として直接検出できる. しかし, サンプルが微量なため, 蛋白質の同定が困難な事が多い. 当研究室では, 微量な蛋白質を同定するため, ポリビニリデンジフロリド (PVDF) 膜に蛋白質を転写して,

PVDF膜上で還元Sアルキル化とプロテアーゼ消化を行う事により, 従来のゲル内消化では困難だった微量な蛋白質を質量分析計で同定する事に成功したので, その方法と実施例について, 紹介する.

1. 方法

質量分析のためのサンプル調製の概略を, 図1に示す. この方法は, 微量蛋白質の同定に有効とされるプロトコル¹⁾に独自の改変を加えたものなので, そちらも参考にされたい. 以下, サンプル調製における全般的な注意点と, 個々のステップの詳細を述べる.

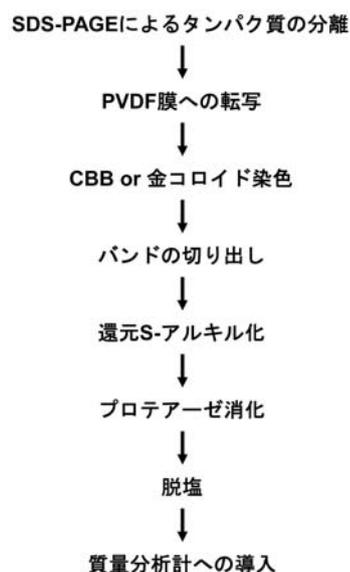


図1 質量分析のためのサンプル調製の概略

(1) 全般的な注意点

質量分析のためのサンプル調製において、注意しなければならないのは、ケラチンによる汚染である。ケラチンによる汚染のリスクを最小限にするために、当研究室では下記の対策をとっている。

- ①サンプル調製中は、手袋、キャップ、マスク、ガウンを着用する。絶対に素手でサンプルや器具等に触らない。手袋も頻繁に新しいものに取り換える事が望ましい。
- ②ケラチンは、手指由来の他、空気中のホコリにも存在するので、器具等は使用前に良く洗浄し、ホコリがかからない状態で乾燥・保管する。
- ③微量の蛋白質を扱うので、チップやチューブは、低吸着性のものを使用する。ただし、コーティングで加工して吸着性を下げているタイプのものは、有機溶媒でコーティングが溶けるので、コーティングタイプではなく、素材自体が低吸着性であるものを選択する。
- ④試薬や器具類は、汎用性が高いものであっても、質量分析専用にする事が望ましい。
- ⑤ゲルやPDVF膜を扱うピンセットや保存容器、電気泳動装置や転写装置なども、質量分析専用にする。
- ⑥できれば、クリーンベンチ内でサンプル調製を行う事が望ましい。

(2) SDS-PAGE

まず、調べたい試料を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって含有される蛋白質を分子量によって分離する。この際も、ゲルは自作より、プレキャストゲルを購入し、泳動用バッファーなどのバッファー類も、調整済みのものを購入して、質量分析専用にする方が望ましい。ただし、自作ゲルからプレキャストゲルへ切り替えの際、泳動パターンが変わる事があるので、切り替えの前後でのバンドの対応関係をあらかじめ確認しておく必要がある。

(3) PVDF膜への転写

SDS-PAGEで分離した蛋白質を、PVDF膜へ転写する。ここでも、転写用バッファーは質量分析専用で調製し、器具や装置も専用とするのが望ましい。

(4) 金コロイド染色

PVDF膜へ転写した蛋白質を金コロイド染色で検出する。蛋白質の量が多い (50-100ng程度) 場合は、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色で

検出可能であるが、CBBの検出感度を下回る様な微量の蛋白質の場合は、金コロイド染色で検出する。

当研究室では、金コロイド染色液 (Bio-Rad Colloidal Gold Total Protein Stain) を使用している。蛋白質の量によって、最適な染色時間は異なり、長すぎるとバックグラウンドが上がってバンドが判別しにくくなるので、注意する。染色後のPVDF膜は、Whatman 3MM濾紙の間に挟み、チャック付きポリ袋等に入れ、室温で長期間保存可能である。

(5) バンドの切り出し

専用のカッターナイフとピンセットを使用し、PVDF膜から目的のバンドを切り出して1.5mLチューブに入れる。1バンド切り出すごとに、カッターナイフの刃は、折って取り換える。ピンセットの先は、メタノールを浸したキムワイプで拭く。この作業もクリーンベンチ内で行う事が望ましいが、風で膜を飛ばさない様に注意する。

(6) 還元S-アルキル化

還元S-アルキル化を行う事により、システイン残基のS-S結合を切断して蛋白質の3次元構造を1次元化して、プロテアーゼによる消化効率を高める事ができる。更に、生成した消化ペプチドが、ランダムにS-S結合して解析を困難にするのを防ぐ事ができる (図2)。PVDF膜上では、確実に還元S-アル

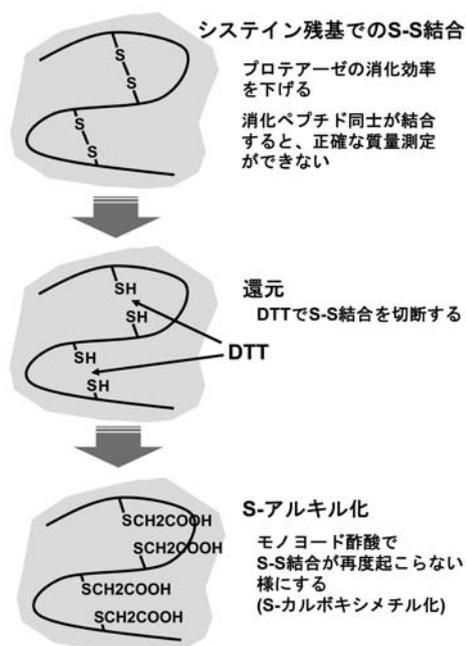


図2 還元S-アルキル化のイメージ

キル化を行う事ができ、更に、PVDF膜が構造的に強いので、還元S-アルキル化後、プロテアーゼの反応を阻害する試薬類の洗浄を確実に行う事ができる。還元S-アルキル化には、S-カルバミドメチル化とS-カルボキシルメチル化があるが、当研究室では、DTTとモノヨード酢酸による、S-カルボキシルメチル化を行っている。

(7) プロテアーゼ消化

還元S-アルキル化後、PVDF膜を洗浄し、Lys-C (和光純薬のAchromobacter protease I) を含む消化用バッファーに入れ、37°Cで一晩消化する。

(8) 脱塩

Lys-Cによって、PVDF膜上の蛋白質は、リシン残基のC末端で切断され、消化ペプチドが、PVDF膜から溶液中へ遊離する。消化用バッファーに含まれる塩が、質量分析の際にペプチドのイオン化を抑制するため、ZipTipC18 (Merck Millipore, 図3) による脱塩を行う。

消化ペプチドはZipTipC18に結合するが、消化液に含まれていた塩類は結合せず、除去される。その後、70%アセトニトリル (ACN)、0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) の吸引・排出を繰り返すと、ペプチドが液中に溶出し、脱塩が完了する。

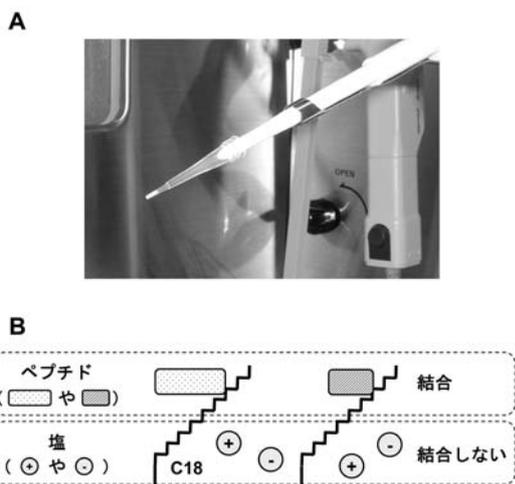


図3

A ZipTipC18
10 μLチップの先に、C18 (炭素数18個のオクタデシル基) カラム担体を充填したもの。

B ZipTipC18の原理
水に溶けた消化ペプチドは疎水性相互作用により、C18と結合するが、塩はイオン化しており、結合しない。ペプチドの結合後、カラムを洗浄して塩を除去し、アセトニトリルなどの有機溶媒を含む溶液で、ペプチドを溶出する。

(9) 質量分析計への導入

脱塩した消化ペプチドは、SpeedVacで溶媒を濃縮し、2%ACN, 0.1%ギ酸に再溶解して、ナノLCを通してタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) へ導入する。もしくは、α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (α-CHCA) 10mg/mL in 70%ACN, 0.1% TFAへ再溶解してMALDIプレート上にスポットし、乾燥後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) で測定する。

(10) 質量分析

LC-MS/MSは、以下のQ1, Q2, Q3の各部分で構成され (図4 A), 消化ペプチドがイオン化され、質量分析計に導入されると、まずQ1で、ペプチドの質量電荷比が測定される。次にQ2で窒素などの不活性ガスがペプチドと衝突し、ペプチドの断片化が起こる。Q3で断片化されたペプチドの質量電荷比を測定し (MS/MS解析)、MS/MSスペクトルを取得する。得られたMS/MSスペクトルの、断片化ペプチドの質量電荷比の差分から、元のペプチドのアミノ酸配列や、リン酸化などの翻訳後修飾の種類

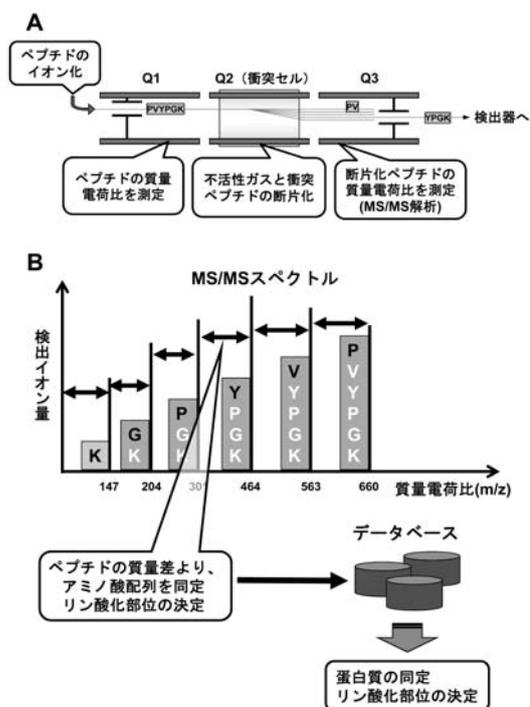


図4

A LC-MS/MSの構造と、MS/MS解析のイメージ
B MS/MSスペクトルからの蛋白質同定とリン酸化部位決定のイメージ

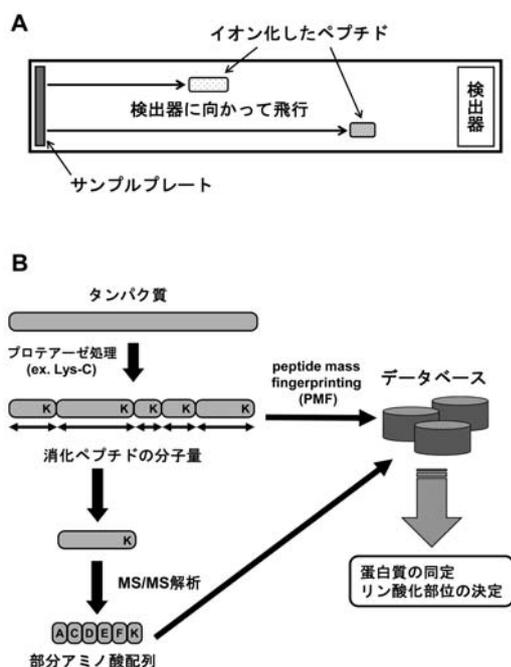


図5

A MALDI-TOF/MSのイメージ
B PMFとMS/MS解析の比較

と部位が分かる (図4B)。更に配列の決定したペプチドを、データベースに照会する事により蛋白質が同定される。

MALDI-TOF/MSは、MALDIプレート上にスポットしたペプチドが、レーザーを照射すると α -CHCAの働きでイオン化し、質量分析計の内部を検出器に向かって飛行し、検出器に到達するまでの飛行時間から、質量電荷比を測定する (図5A)。得られたペプチドの質量電荷比から、分子量を算出し、データベースに照会する事で、元の蛋白質を同定する (peptide-mass fingerprinting, PMF, 図5B)。

2. 実施例

(1) 血管異常収縮新規シグナル分子の同定

血管異常収縮は、脳血管攣縮や虚血性心疾患などの急性発症で致死的な疾患を引き起こし、正常血圧調節を司るカルシウム依存性の正常収縮とは、シグナル伝達経路が異なる。当研究室では、この異常収縮のシグナル伝達経路として、スフィンゴシルホスホリルコリン/Fynチロシンキナーゼ/Rhoキナーゼ (ROK) を見出した²⁻⁴⁾。しかし、FynチロシンキナーゼがROKを活性化する機構は不明であった。そこ

で、Fynの下流で働くシグナル分子を見出すため、血管平滑筋細胞に、HaloTag融合活性型FynとHaloTag融合不活化型Fynを強制発現させ、HaloTagプルダウンアッセイを行い、プルダウン後のサンプルをSDS-PAGE後、PVDF膜に転写し、金コロイド染色したところ、活性型Fynに結合するが、不活化型Fynに結合しない蛋白質が検出された。この蛋白質のバンドをPVDF膜から切り取り、前述の方法でサンプル調製後、MALDI-TOF/MS (Voyager DE-STR, AB SCIEX) により質量分析したところ、ある細胞接着斑に局在する蛋白質が、異常収縮シグナル分子として、同定された (論文未発表)。

(2) リン酸化部位の同定

ミオシンIII Aは、ミオシンスーパーファミリーに属し、アクチン線維に沿って細胞内を移動するモーター蛋白である。ミオシンIII Aは、内耳の有毛細胞に発現し、その遺伝子変異は、進行性の聴覚障害と関連する⁵⁾。ミオシンIII Aの活性は、自己リン酸化により制御されるが、LC-MS/MS (4000QTRAP, AB SCIEX) による質量分析で、6カ所のリン酸化部位を同定した。更に、このうち184番目と188番目のスレオニンのリン酸化が、ミオシンIII Aの活性化に重要であった⁶⁾。

おわりに

当研究室の質量分析のサンプル調製方法について記述した。多くのステップを必要とし、クリーンベンチ内など、不慣れた環境での操作となるため、最初は既知のサンプル (蛋白定量のスタンダードとして販売されているアルブミンなど) で、操作手順に慣れてから、実際のサンプル調製に進むのが良いと思う。

引用文献

- 岡村信子, 篠原あづさ, 岩松明彦. MALDI-TOF/MS分析のためのペプチド断片調製法. 実験医学 2002; 20: 2367-2370.
- Todoroki-Ikeda N, Mizukami Y, Mogami K, Kusuda T, Yamamoto K, Miyake T, Sato M, Suzuki S, Yamagata H, Hokazono Y, Kobayashi S. Sphingosylphosphorylcholine

- induces Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction : Possible involvement of Rho-kinase. *FEBS Lett* 2000 ; **482** : 85-90.
- 3) Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurokawa T, Todoroki-Ikeda N, Mogami K, Mizukami Y, Kuriyama S, Haze K, Suzuki M, Kobayashi S. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for rho-kinase-mediated Ca^{2+} sensitization in the bovine cerebral artery unimportant role for protein kinase C. *Circ Res* 2002 ; **91** : 112-119.
- 4) Nakao F, Kobayashi S, Mogami K, Mizukami Y, Shirao S, Miwa S, Todoroki-Ikeda N, Ito M, Matsuzaki M. Involvement of Src family protein tyrosine kinases in Ca^{2+} sensitization of coronary artery contraction mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway. *Circ Res* 2002 ; **91** : 953-960.
- 5) Walsh T, Walsh V, Vreugde S, Hertzano R, Shahin H, Haika S, Lee M K, Kanaan M, King M-C, Avraham K B. From flies' eyes to our ears : mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ; **99** : 7518-7523.
- 6) An B C, Sakai T, Komaba S, Kishi H, Kobayashi S, Kim J Y, Ikebe R, Ikebe M. Phosphorylation of the Kinase Domain Regulates Autophosphorylation of Myosin IIIA and Its Translocation in Microvilli. *Biochemistry* 2014 ; **53** : 7835-7845.