

## 〔特集：タンパク質分析のための最新質量分析装置〕

## プロテオーム解析のための最新の質量分析装置

戸田年総

## SUMMARY

Proteomics has been established by combination of two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. The most significant advantage of proteomics over the conventional protein analysis is the high-throughput performance in comprehensive analysis of almost all proteins expressed in a specific tissue or cell type under a given condition. Mass spectrometry plays important roles not only in identification of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis but also in analysis of post-translational modifications.

Key words: proteome, proteomics, mass spectrometry, protein identification

## 1. はじめに

プロテオーム解析(プロテオミクス)<sup>1)</sup>は、内容的にはタンパク質分析そのものであるが、これまでの伝統的なタンパク質分析と大きく異なる点は、短時間に非常に多くのタンパク質を一斉に分析することができる「ハイスループットな分離同定技術」が利用されているというところである。このようなプロテオーム解析が1995年にスタートした時に、ハイスループットなタンパク質分離分析技術として最初に採用されたのが二次元電気泳動法<sup>2)</sup>であり、その結果、それまで国際電気泳動学会を支えていた各国の研究者の多くがHUPO (Human Proteome Organization)<sup>3)</sup>の設立へと動いた。

1975年にO'Farrellによって確立された二次元電気泳動法は、分解能が非常に高かったことから、多くの研究者に高く評価され、様々な研究分野で成果を収めたが、チューブゲルを用いる1次元目の等電点電気泳動にはかなりの熟練を要し、再現性の良い綺麗なパターンを得ることが必ずしも容易ではなかったことから、広く利用されるには至らなかった。しかしその後FieldとLee<sup>4)</sup>が1次元目の等電点電気泳動を固定化pH勾配ゲル上で行うという方法を編み出し、当時のファルマシアが、イモビライズドライストリップという形で固定化pH勾配ゲルを商品化したことから、二次元電気泳動は誰でも行える容易な技術へと変貌を遂げた。

次に、「ハイスループット」なタンパク質の同定を可能に

し、プロテオミクスの誕生に貢献したもう一つの大きな技術的発展は、PMF (Peptide Mass Fingerprinting) 法<sup>5)</sup>やMS/MS イオンサーチ (MS/MS Ion Search) 法、ペプチドシーケンスタグ法<sup>6)</sup>などに代表される「質量分析によるタンパク質同定法」の開発である。これらの質量分析による方法が発表される以前は、電気泳動で分離されたタンパク質の同定には専らEdman分解法<sup>7)</sup>によるペプチドシーケンサーが用いられていた。すなわちN末端のアミノ酸配列を逐次解読し、配列相同性検索 (Sequence Homology Search) によって同定するというものであるが、この方法で同定するには少なくとも数ピコモル (pmol:  $10^{-12}$  mol) 程度のタンパク量が必要であることや、N末端がブロックされている場合、脱ブロック<sup>8)</sup>やペプチド断片の精製が必要であることなど、およそ網羅的な同定には不向きな方法であった。

これに対し質量分析計による同定法は、高感度の蛍光染色によって辛うじて検出されるような、わずかに数十ないし数フェムトモル (fmol:  $10^{-15}$  mol) 程度の微量なタンパク質でも、迅速かつ高い成功率で同定できる方法であり、二次元電気泳動によって分離されたタンパク質スポットの網羅的な解析に適した方法である。くわえて質量分析は、タンパク質発現量の相対的な分析や翻訳後修飾の構造解析などにおいても威力を発揮する優れた分析手段であることから、今後さらに基礎研究および臨床研究の両面でタンパク質の分析手段として、広く利用されるようになるものと期待されている。

Advanced systems of mass spectrometry for proteomics.

Tosifusa Toda; 東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー研究チーム

Correspondence address: Tosifusa Toda; Research Team for Molecular Biomarkers, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi, Tokyo 173-0015, Japan.

(受付 2006年11月27日, 受理 2007年1月25日, 刊行 2007年3月15日)

## 2. 質量分析計の原理

質量分析計の中でもとりわけ飛行時間型 (TOF: Time of Flight)<sup>9)</sup> と呼ばれるものは、まさしく「真空条件下での自由電気泳動装置」そのものである (Fig. 1).

Fig. 1 に示した TOF 型質量分析計は標準的な「リニアモード」の装置の原理図であるが、飛行距離が長いほど分離性能 (分解能) が高くなるので、飛行距離を伸ばすためにフライトチューブの先端でイオンを跳ね返し、イオン源方向に戻ってくるイオンを途中で検出するタイプ (リフレ

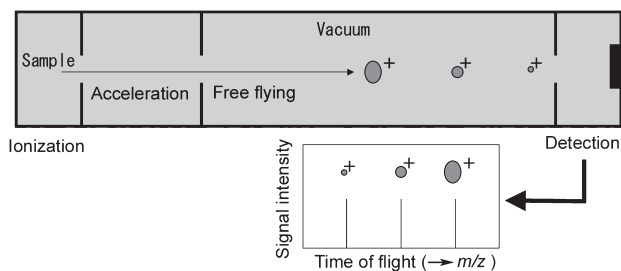


Fig. 1. A schematic architecture of time-of-flight mass spectrometer for linear mode.

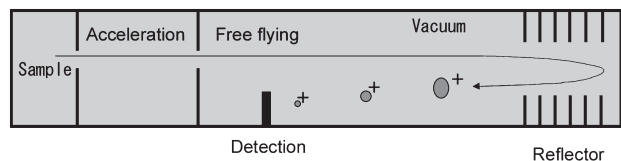


Fig. 2. A schematic architecture of time-of-flight mass spectrometer for reflectron mode.

クトロンモード, Fig. 2) の質量分析計が、一般に利用されている。

## 3. 現在プロテオーム解析でよく利用されている様々な質量分析計

質量分析計には TOF 型の他にも、磁場型 (MS: Magnetic Sector, Fig. 3-A) や四重極型 (Q: Quadrupole, Fig. 3-B)<sup>10)</sup>、四重極イオントラップ型 (QIT: Quadrupole Ion Trap, Fig. 3-C)<sup>11)</sup>、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型 (FT-ICR: Fourier Transformation Ion Cyclotron Resonance, Fig. 3-D)<sup>12)</sup> など様々な測定原理に基づくものがある。このうち四重極イオントラップ型はこの部分だけではイオン検出はできないので、通常 TOF 型と連結して使用される (QIT-TOF 型)。また、四重極型と TOF 型を連結した Q-TOF 型<sup>12)</sup>、TOF 型を 2 つ繋げた TOF-TOF 型<sup>13)</sup> など利用されている。

一方、イオン化ユニット (イオン源) についても、電子イオン化法 (EI: Electron Ionization) や化学イオン化法 (CI: Chemical Ionization)、高速原子衝突法 (FAB: Fast Atom Bombardment)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)<sup>14)</sup>、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI: ElectroSpray Ionization)<sup>15)</sup> など、様々な異なる原理に基づくものが開発されたが、現在プロテオミクスでよく利用されているのは、ESI 法 (Fig. 4-A) と MALDI 法 (Fig. 4-B) の原理に基づくものである。

ESI 法および MALDI 法以外のイオン化法は、イオン化の効率が低かったり、イオン化の際にタンパク質やペプチドが分解されてしまったりといったことから、プロテオーム

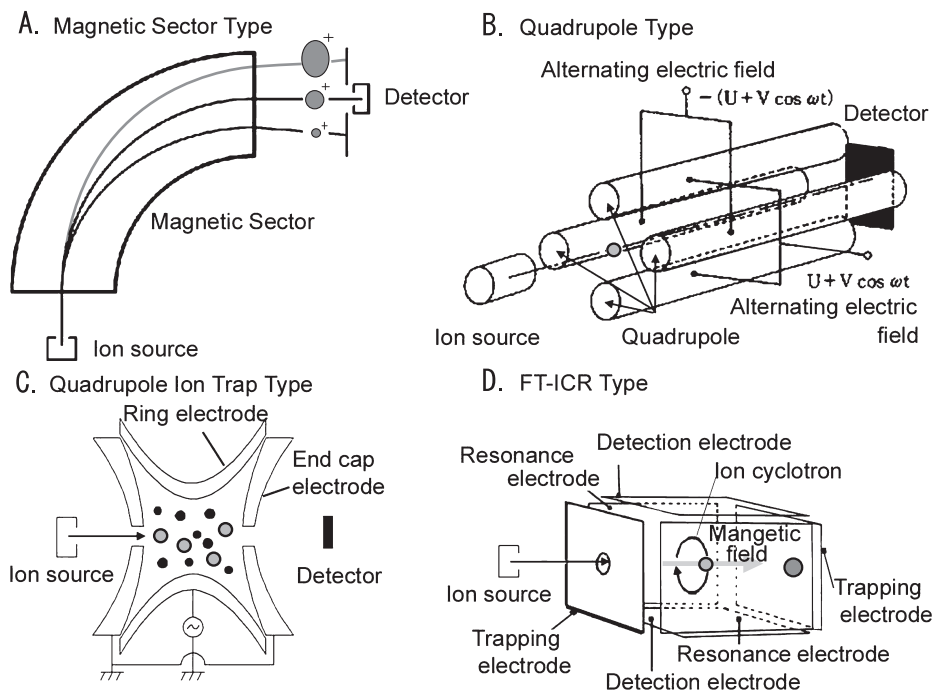


Fig. 3. Various types of mass spectrometers.

解析ではほとんど利用されていない。

#### 4. 質量分析によるタンパク質の同定

1995年、プロテオミクスがスタートしたときに最初に採用された質量分析によるタンパク質の同定法は、所謂PMF (Peptide Mass Fingerprinting) 法の原理 (Fig. 5) に基づくものであり、現在でも、最も頻繁に利用されている。PMF法によってタンパク質の同定を行うには、一般的なシングルモードの質量分析計で十分であるが、同定の成功率を考えると、分解能は10,000以上、質量精度は0.5 Da以上であることが望ましい。

Fig. 5に示した例は、ある二次元電気泳動ゲルからタンパク質スポットから切り出し、トリプシン消化を行った後にマトリックスと混合して試料プレートにアプライ、MALDI-TOF型質量分析計でペプチド断片の質量スペクトルを分析。得られた質量値のテーブル (ペプチドマスフィンガープリント) に対し、今度はSwiss-ProtのExPASy Server (<http://au.expasy.org>) に登録されたアミノ酸配列データの中から、仮にヒト・トランスサイレチンであった場合に生

じる事が予測されるペプチド断片の質量の理論値を求め、類似性を調べる例を示している。Mascot ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) やMS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.7/html/msfit.htm>) のようなインターネット上で公開されている検索エンジンを用いると、Swiss-Protなどのデータベースに登録されているすべての配列データに対して網羅的な検索を実行し、ヒットしたタンパク質をスコアの高いものから順に表示してくれるので大変便利である。

しかし、通常PMF法による同定で効果的に利用できるトリプシン消化ペプチドの質量範囲は500 Daから4,000 Daまでの範囲であり、この例で見られるように、低分子量のタンパク質の場合には、そもそも得られる断片の数が少ないため、微量のタンパク質においては十分に高いスコアが得られないことが多い。そのような場合、所謂「MS/MSイオンサーチ法」が有効である。この方法は、最初の質量分析 (MS分析) で検出されたペプチドのピークを一つ「親イオン」として選び、これをヘリウムなどの希ガス分子と衝突させてペプチド結合を解裂させ、二回目の質量分析 (MS/MS分析) を行うというものである。それによって得られた娘イオンの質量データをMascotなどの検索エンジンに投げ掛けると、そのペプチドを含むタンパク質についての同定結果が返ってくる。MS/MS分析を行うには、先に述べたQ-TOF型やQIT-TOF型 (Fig. 6) などのハイブリッド型や、TOF-TOF型などのタンデム型の質量分析計を使用する。

なお、TOF型の質量分析計の場合、基本的には一つのユニットで一回の質量分析 (MS分析) しかできないが、QIT型とFT-ICR型の質量分析計では、チャンバー内にイオンをトラップしておくことができるために、3回以上 (通常5回程度まで) MS分析を繰り返し実施することができる。タンパク質を同定するだけならこのようなMS<sup>n</sup>分析は必要ないが、糖鎖などの翻訳後修飾構造を分析する場合や、遺伝子多型の分析、点変異の解析などを行う場合には大変効果的な技術である。

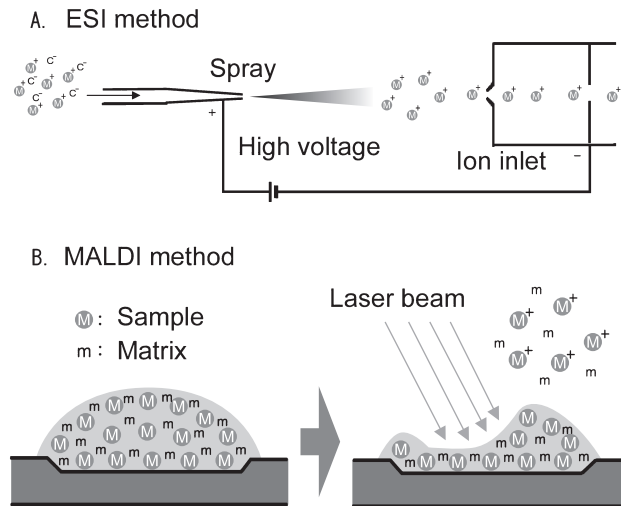


Fig. 4. Various methods in ionization for mass spectrometry.

#### Sequence data in database

P02766 (TTHY\_HUMAN) Human Transthyretin (Prealbumin)

1	11	21	31	41
GPTGTGESKC	PLNVKVLDAV	RGSPAINVAV	HVFRKAADDT	WEPFASGKTS
51	61	71	81	91
ESQRLHGLTT	BEEFVEGIYK	VEIDTKGYWK	ALQISPFHEH	AEVVPTANDS
101	111	121		
GFPRVYIAAL	LSPFYSYSTA	VVTNPKK		

#### Calculation

Theoretical molecular mass	Detected molecular mass	Homology search
13752.89	13752.89	Human Transthyretin (Prealbumin)
2453.1516	49.70	0
2451.2051	81-103	0
2380.2384	105-126	0
1384.6222	35-48	0
1386.7586	22-34	0
853.3986	1-8	0
794.3852	21-26	0
690.3877	10-15	0
672.4038	19-21	0
585.2875	77-80	0
175.1186	104-104	0
148.0804	127-127	0
147.1126	35-35	0

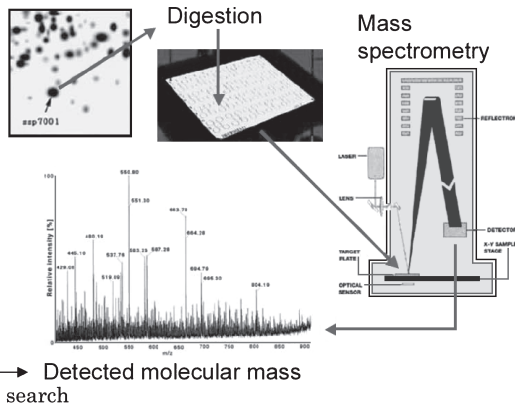


Fig. 5. A general procedure for protein identification by peptide mass fingerprinting.

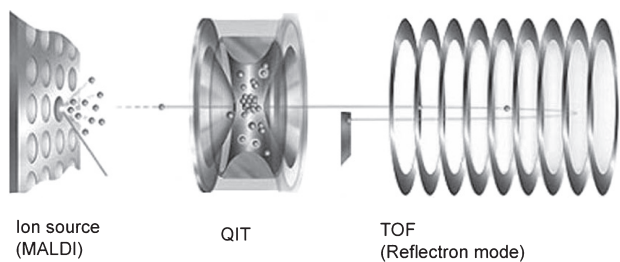


Fig. 6. A schematic architecture of MALDI-QIT-TOF mass spectrometer for MS/MS and MS<sup>n</sup> analysis.

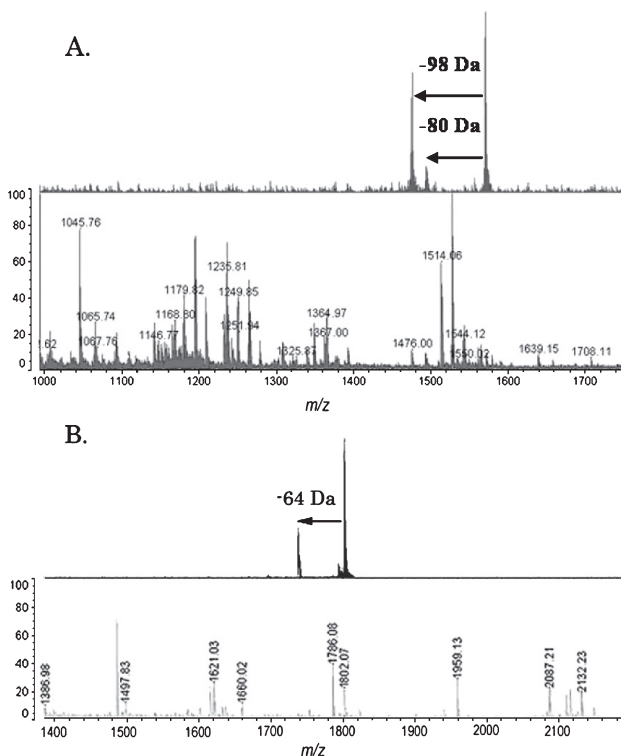


Fig. 7. Examples of PSD-mode mass spectra obtained by of MALDI-TOF mass spectrometry for neutral loss analysis. A) A typical neutral loss, -80 and -98 Da, in a phosphorylated peptide. B) A typical neutral loss, -64 Da, in a peptide containing oxidized methionine.

### 5. PSDモードによるニュートラルロス分析

PSD (Post-source decay) モード<sup>16)</sup> は主にリン酸化やメチオニンの酸化などの翻訳後修飾の分析に利用されている質量分析技術である。MALDI法でイオン化を行うと、レーザーのエネルギーを吸収して不安定化したイオンが、飛行中に自動的に解裂し、若干軽くなったイオンとして検出される。特にセリンやスレオニン、チロシン残基へのリン酸化の場合、Fig. 7-Aのように、80 Daあるいは98 Daのニュートラルロスが見られ、メチオニンの酸化の場合にはFig. 7-Bのように64 Daのニュートラルロスが見られるので、これを利用して修飾されたペプチド断片を探し出すことが可

能である。PSDモードによる質量シフトの測定を行うにはMALDI-TOF型質量分析計が最適である。

### 6. 質量分析によるイメージング

これは、最近ようやく実用化された新しい技術であるが、薄くスライスされた組織切片そのものや、そこからタンパク質をPVDF膜に写し取ったものに、マトリックスを直接吹き付けてMALDI法でイオン化し、出てくるイオンをスクリーン上で画像化するというものである。この方法で検出されたタンパク質やペプチドを同定するには、いわゆる「トップダウンプロテオミクス法」とよばれるトリプシン消化を行わない同定技術が必要となるが、患者の疾患部位の組織を質量分析計で直接分析してタンパク質の異常を検出することができることから、今後の技術開発が期待されている。質量分析によるイメージングを行うためには、イオン源はMALDI法である必要があり、分析部はQIT-TOF型もしくはFT-ICR型の質量分析計であることが望ましい。

### 7. まとめ

このようにプロテオーム解析で利用されている質量分析計には、イオン化を行う部分と分析を行う各部分においてそれぞれ異なる原理に基づくものが組み合わされており、分析の目的に応じて最適な装置を選択する必要がある。高機能のものが必ずしも万能というわけではなく、特に臨床プロテオミクスにおいて患者検体中のタンパク質の異常性を検査するというような目的では、簡便性や迅速性に優れた装置であることが望ましい。一方、翻訳後修飾や遺伝子変異などを詳しく解析するような研究では、多少操作が煩雑であってもMS<sup>n</sup>分析のできる装置であることが望ましい。

### 文献

- 1) Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis 1995;16(7):1090-1094.
- 2) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 1975;250(10):4007-4021.
- 3) Hanash S. Samir Hanash discusses how HUPO aims to globalize proteomics research. Drug Discov Today 2002; 7(15):797-801.
- 4) Field DJ, Lee JC. Isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis of tubulin using immobilized pH gradients under denaturing conditions. Anal Biochem 1985;144(2):584-592.
- 5) Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. Curr Biol 1993; 3(6):327-332.

- 6) Nemeth-Cawley JF, Rouse JC. Identification and sequencing analysis of intact proteins via collision-induced dissociation and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2002;37(3):270–282.
- 7) Hass GM, Nau H, Biemann K, Grahn DT, Ericsson LH, Neurath H. The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *Biochemistry* 1975;14(6):1334–1342.
- 8) Hirano H, Komatsu S, Kajiwara H, Takagi Y, Tsunasawa S. Microsequence analysis of the N-terminally blocked proteins immobilized on polyvinylidene difluoride membrane by western blotting. *Electrophoresis* 1993;14(9):839–846.
- 9) Studier MH, Hayatsu R, Fuse K. Analyses of pyrimidine and purine bases by a combination of paper chromatography and time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 1968;26(2):320–324.
- 10) Hunt DF, Buko AM, Ballard JM, Shabanowitz J, Giordani AB. Sequence analysis of polypeptides by collision activated dissociation on a triple quadrupole mass spectrometer. *Biomed Mass Spectrom* 1981;8(9):397–408.
- 11) Kaiser RE Jr, Williams JD, Lammert SA, Cooks RG, Zakett D. Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry with a quadrupole ion trap mass spectrometer. *J Chromatogr* 1991;562(1-2):3–11.
- 12) Senko MW, Canterbury JD, Guan S, Marshall AG. A high-performance modular data system for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996;10(14):1839–1844.
- 13) Cornish TJ, Cotter RJ. A curved-field reflectron for improved energy focusing of product ions in time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1993;7(11):1037–1040.
- 14) Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 1991;63(24):1193A–1203A.
- 15) Baczynskyj L, Bronson GE, Kubiak TM. Application of thermally assisted electrospray ionization mass spectrometry for detection of noncovalent complexes of bovine serum albumin with growth hormone releasing factor and other biologically active peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1994;8(3):280–286.
- 16) Kaufmann R, Spengler B, Lutzenkirchen F. Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1993 Oct;7(10):902–910.