

京都大学北部キャンパス機器分析拠点セミナーシリーズ

第7回「LC-MSセミナー」

天然由来分子精密構造解析システムの活用例

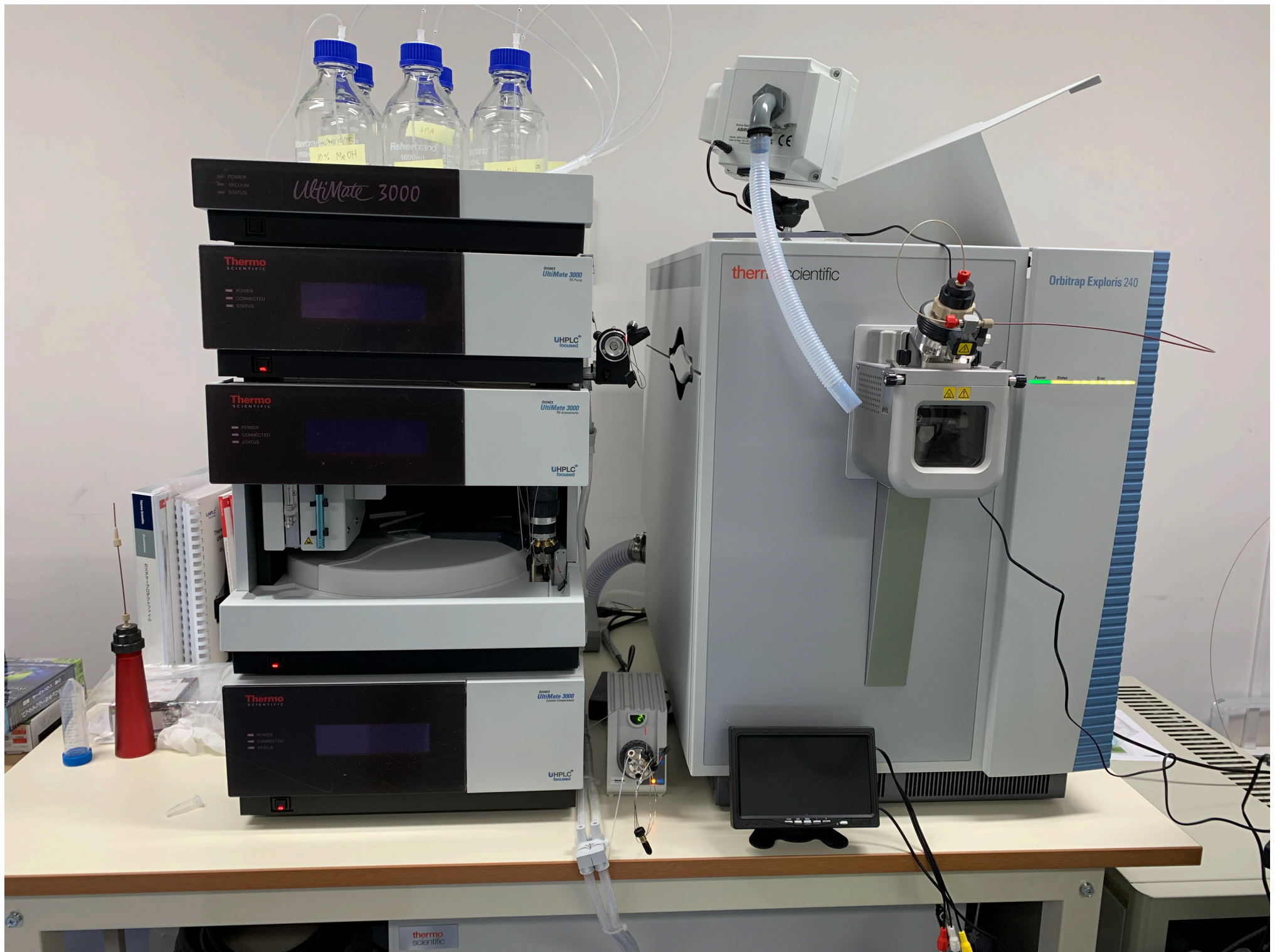
- 1) 宮下正弘：装置概要とペプチド配列解析
- 2) 及川 彰：高分解能低分子分析
- 3) 村井正俊：タンパク質解析（化合物との相互作用）
- 4) 渡邊祐三：タンパク質受託解析の概要

装置概要とペプチド配列解析

農学研究科応用生命科学専攻

宮下正弘

LC/MS 装置の概要



Orbitrap Exploris 240 (Thermo Scientific) の性能

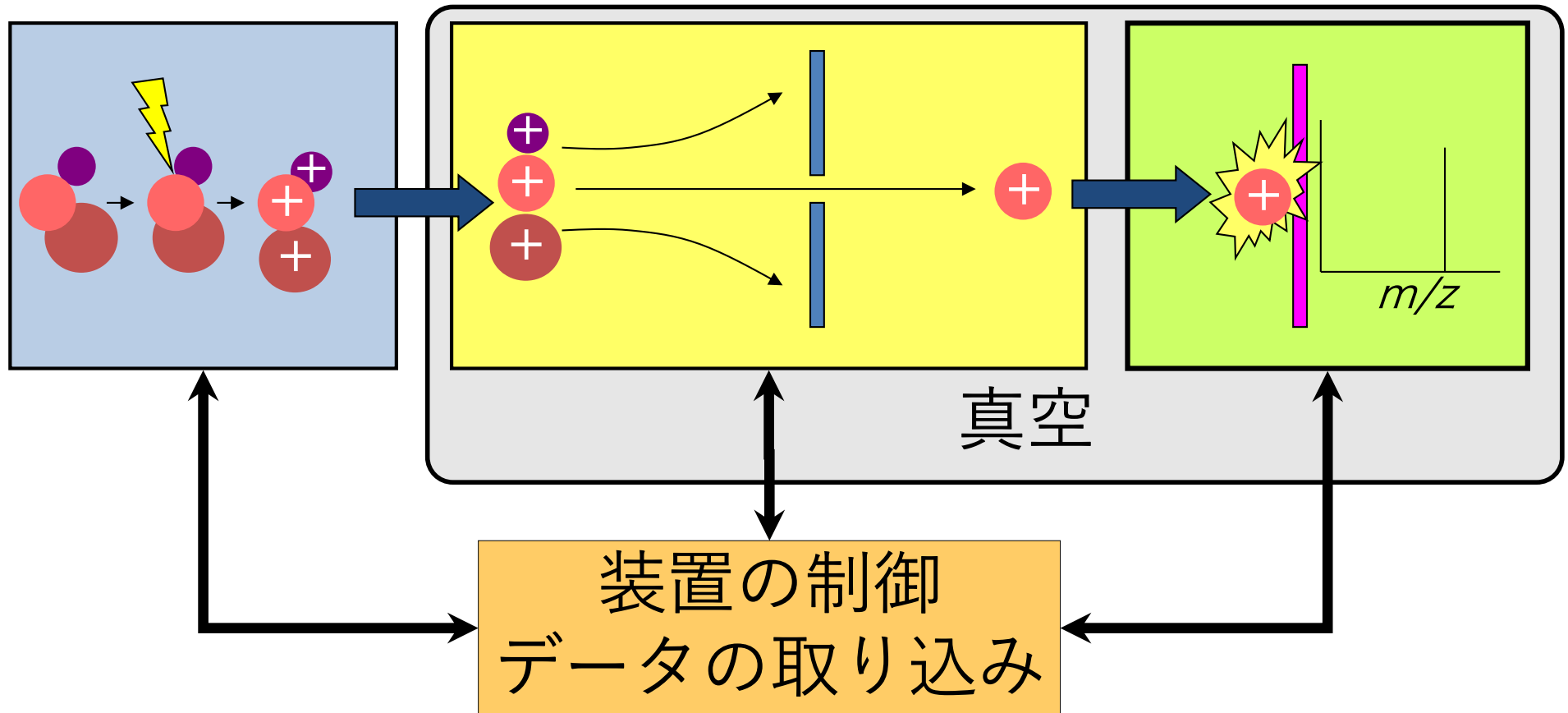
| | |
|--------|--|
| 質量範囲 | m/z 40 – 6,000 |
| 分解能 | 240,000 at m/z 200 (TOF型は10,000程度) |
| スキャン速度 | 22 Hz (22 scan/s) at resolution 15,000 at m/z 200 |
| 質量精度 | 外部標準: < 3 ppm、内部標準: < 1 ppm |
| 感度 | MS/MS: レセルピン 200 fg (330 amol), S/N 100:1 SIM: レセルピン 200 fg (330 amol), S/N 250:1 |

質量分析計の概略

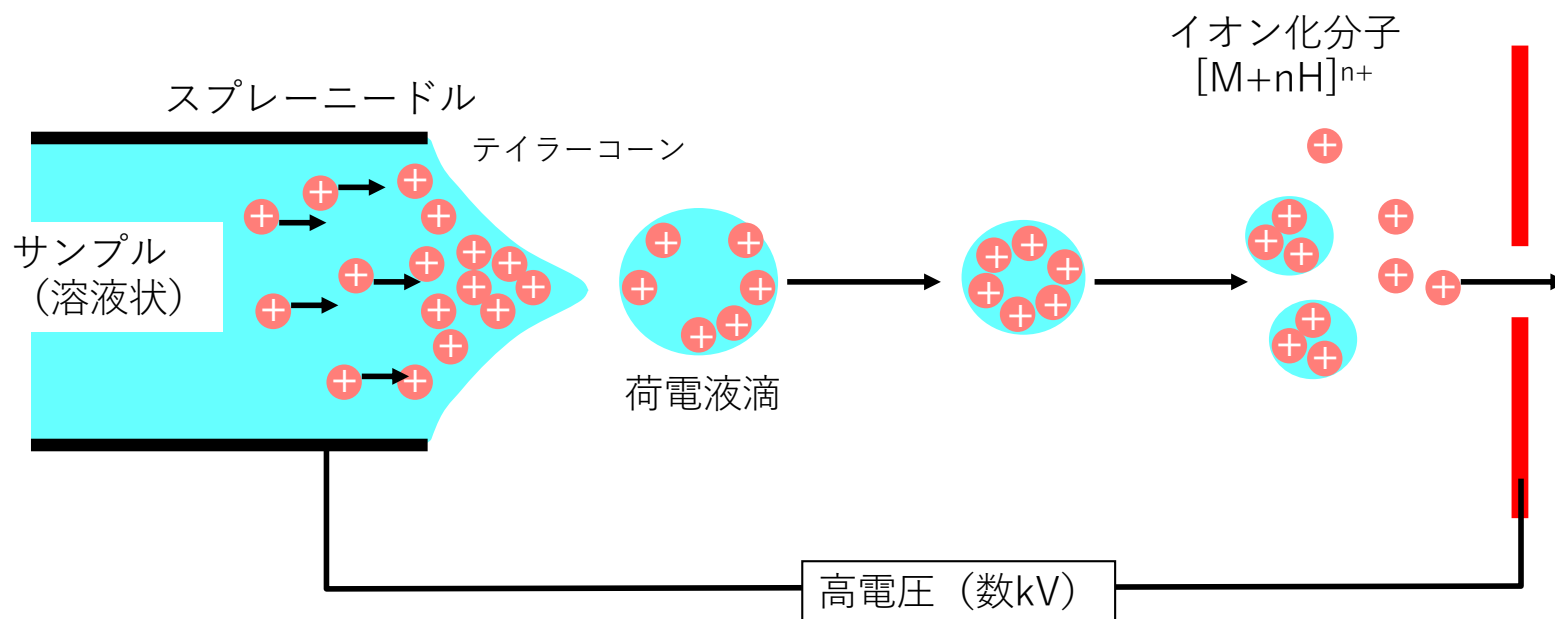
イオン化

質量と電荷に基づく分離

検出

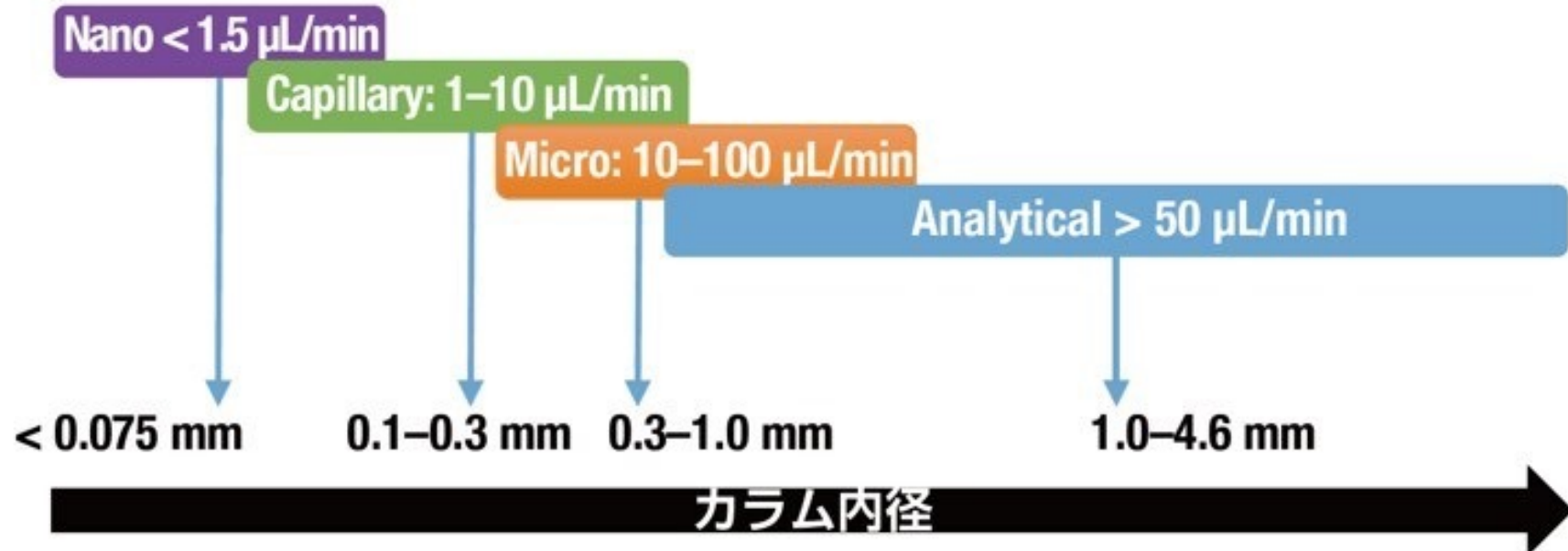


ESI法によるイオン化



- **イオン性、高極性** (特に生体分子) 物質を **大気圧下でイオン化** する
- 溶液状のサンプルを気化しながらイオン化する
- 主にプロトンが付加し、多価イオンも生じる ($[M+nH]^{n+}$)
- 流速を低くする ($1 \mu\text{L}/\text{min}$ 以下) ことにより高感度化が可能 (NanoLC)

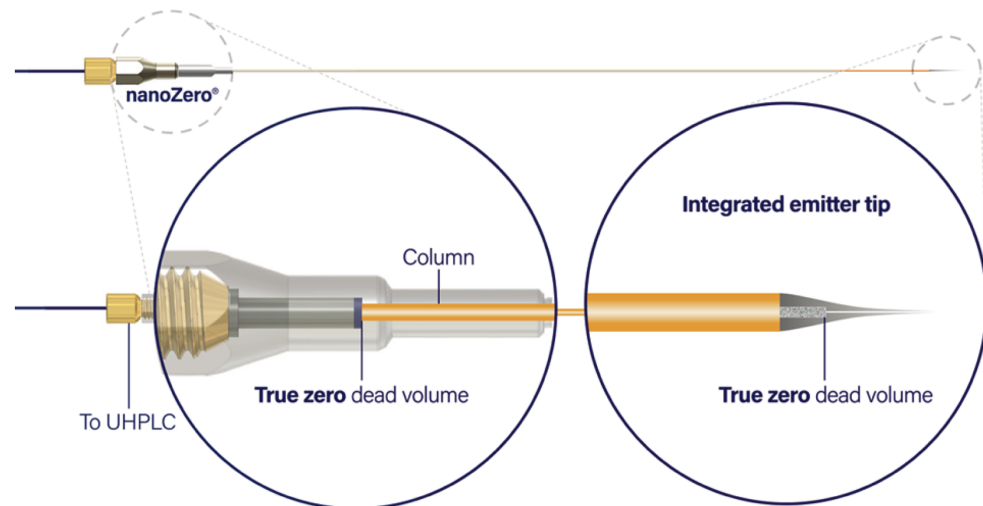
カラムサイズと流速



https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/low_flow_rate_lc/

Aurora Ultimate (IonOpticks)

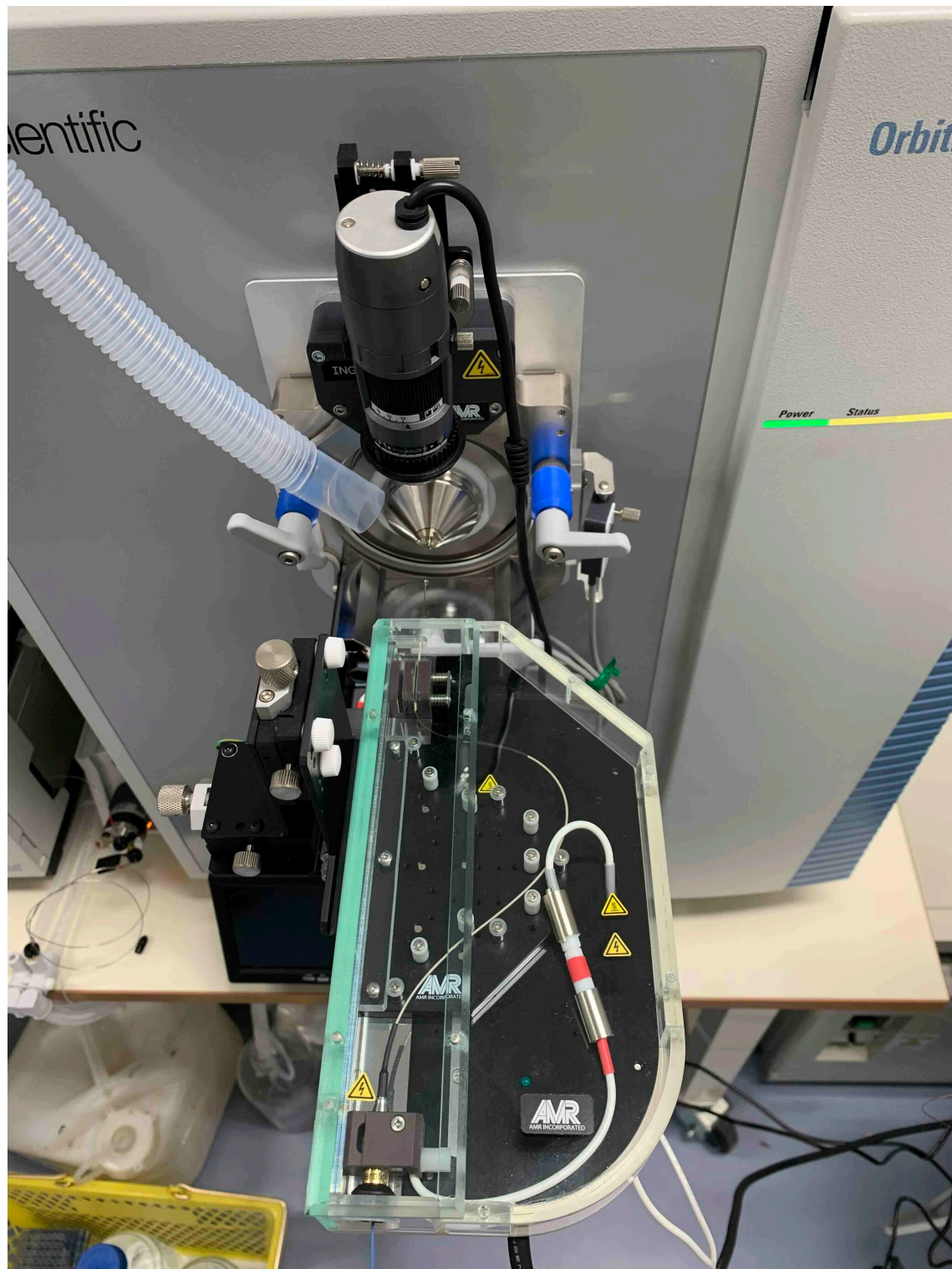
固定相: C18
粒径: $1.7 \mu\text{m}$
内径: $75 \mu\text{m}$
流速: $300 \text{ nL}/\text{min}$



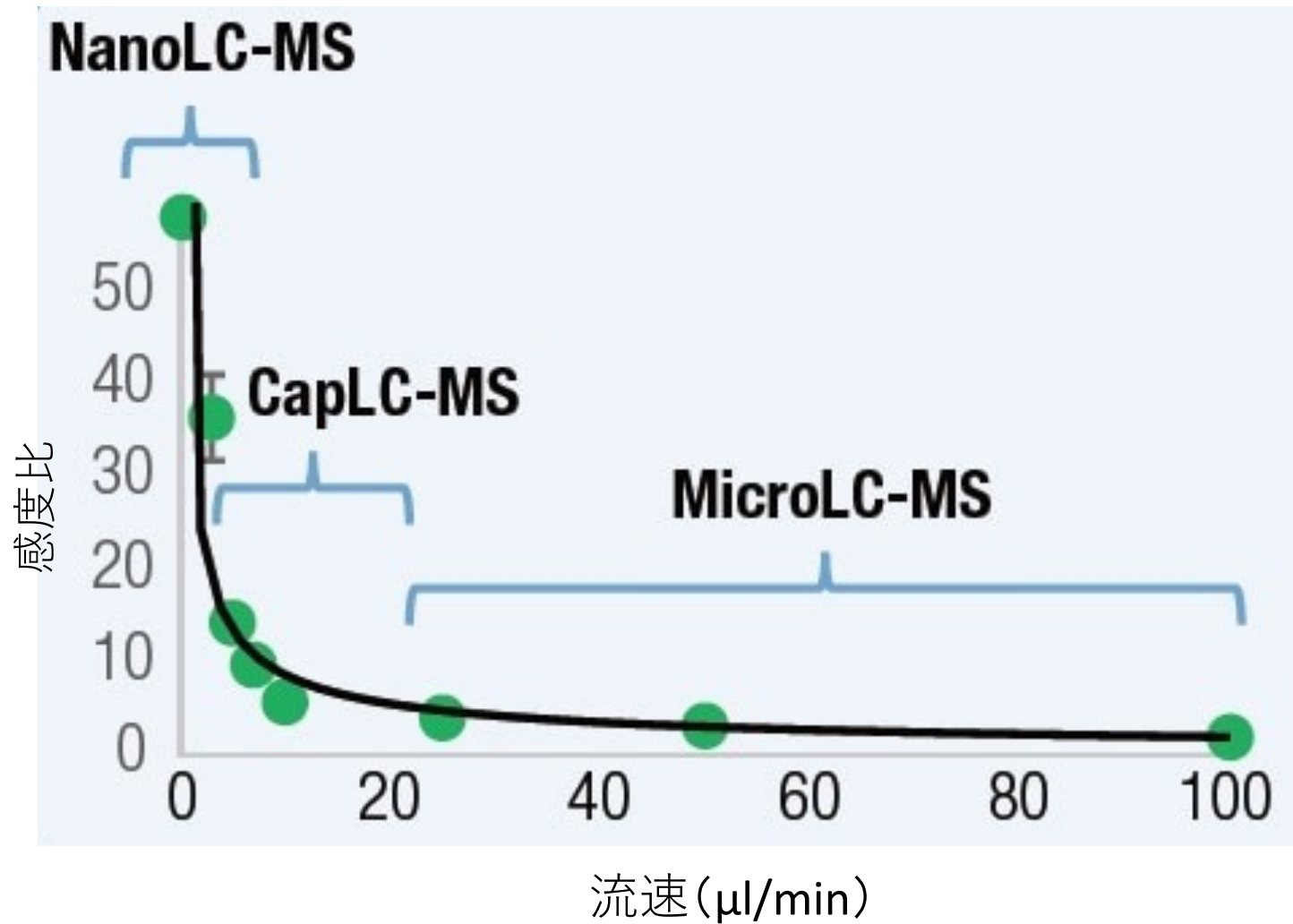
<https://ionopticks.com/resource-hub/>



NanoESI プローブ

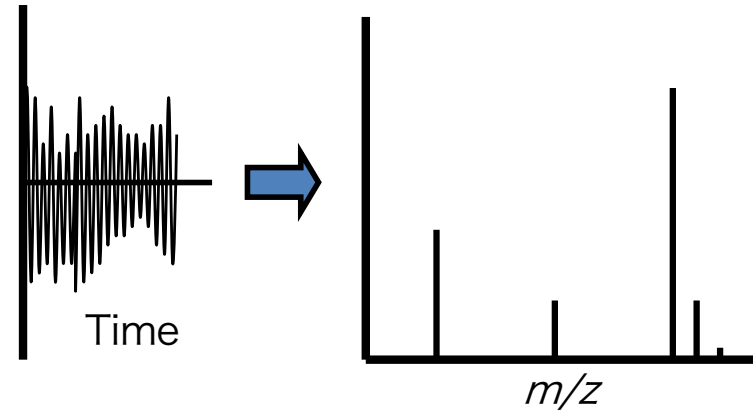
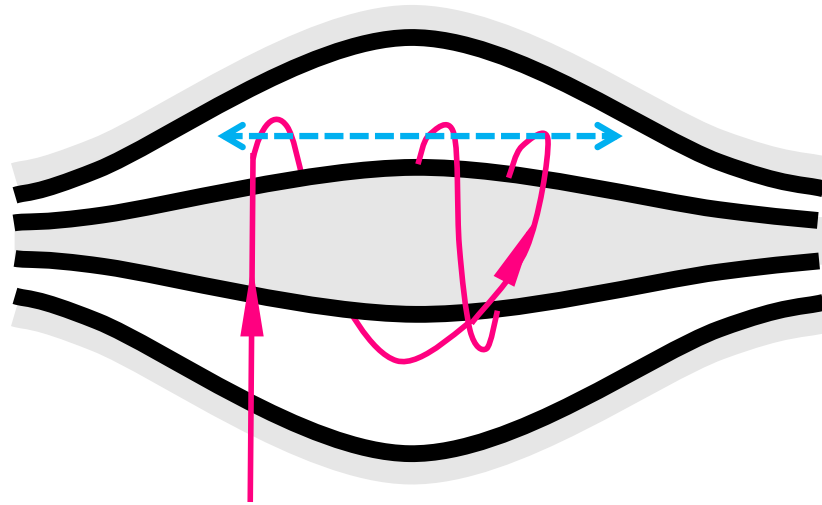


通常のLC/MSとNanoLC/MSの感度の比較



オービトラップの原理

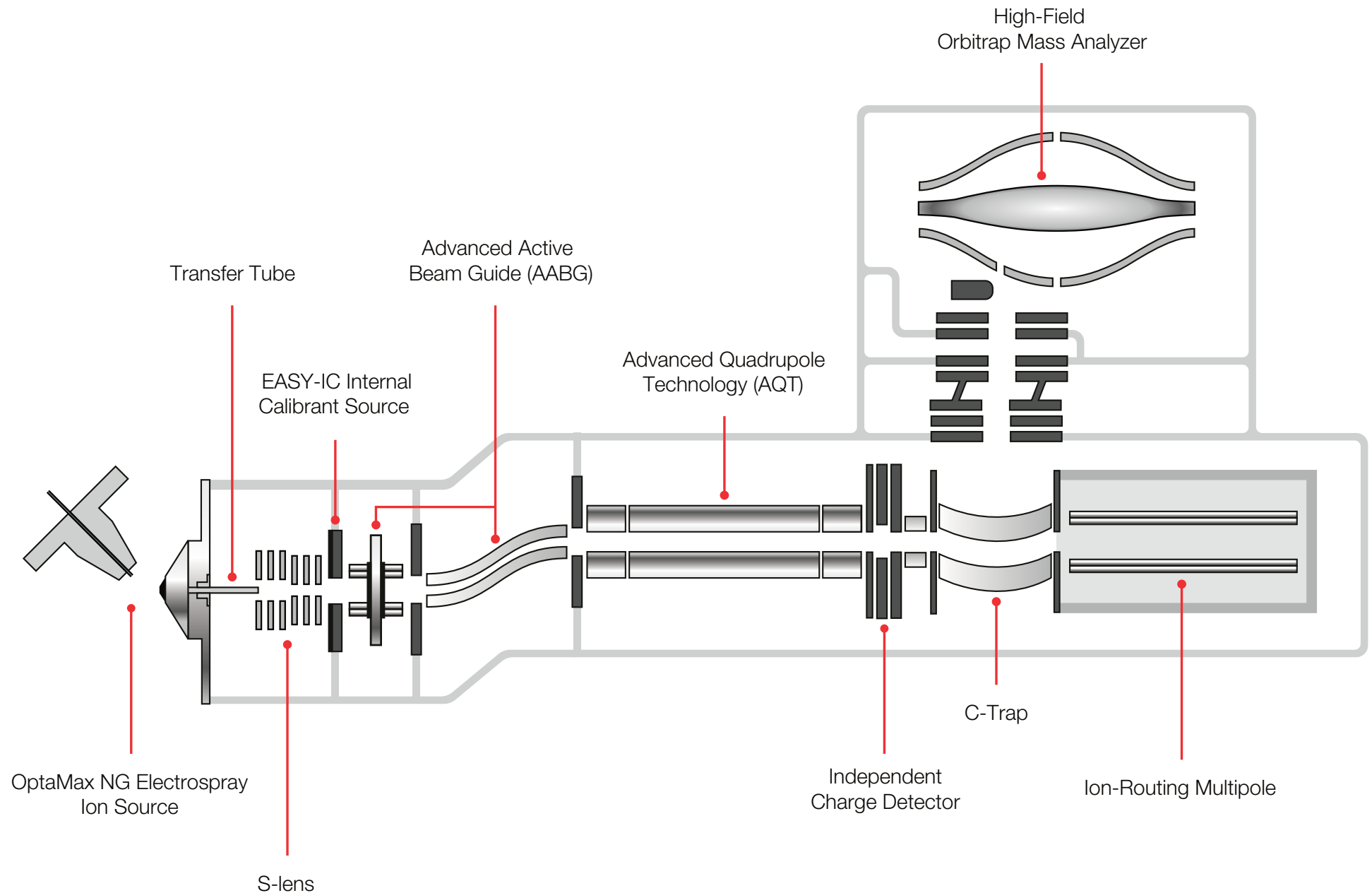
横方向に往復運動



フーリエ変換

- 電場によって起こるイオンの回転運動を利用
- イオン塊の周期的運動をフーリエ変換（電場型FT）
- 分解能・精度が非常に高い
- 装置の小型化が可能
- 主に定性分析に有用

Orbitrap Exploris 240の構成

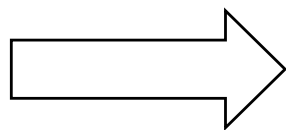


精密質量を測定する意味

CO, N₂, C₂H₄ : 整数質量はいずれも 28 Da

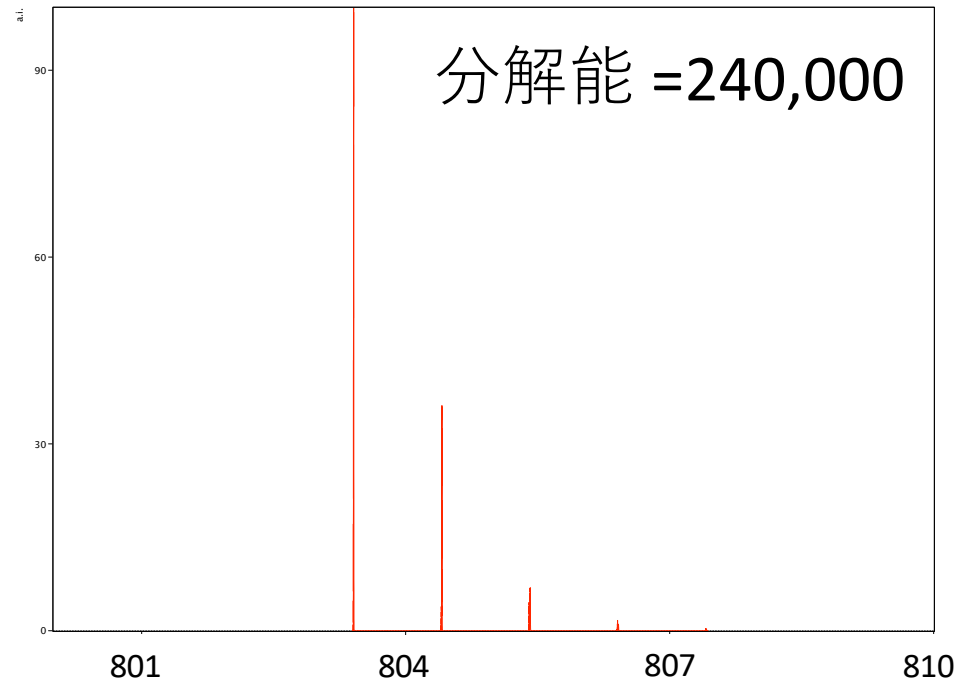
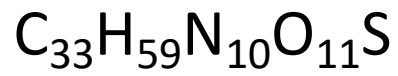
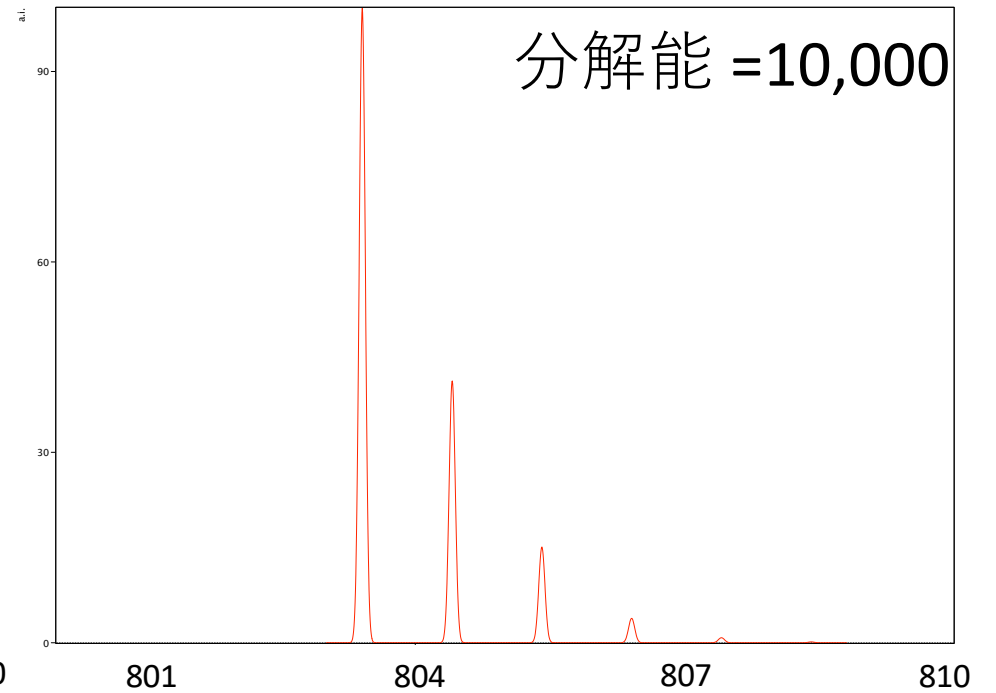
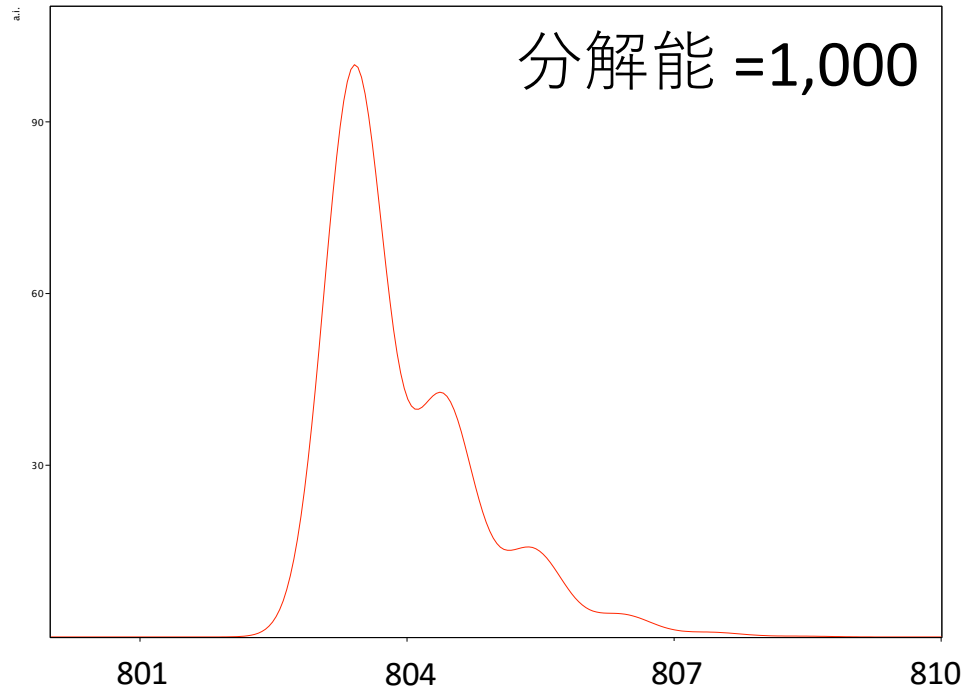
小数点第3位までを考慮すれば区別できる

¹H : 1.0078
¹²C : 12
¹⁴N : 14.0031
¹⁶O : 15.9949



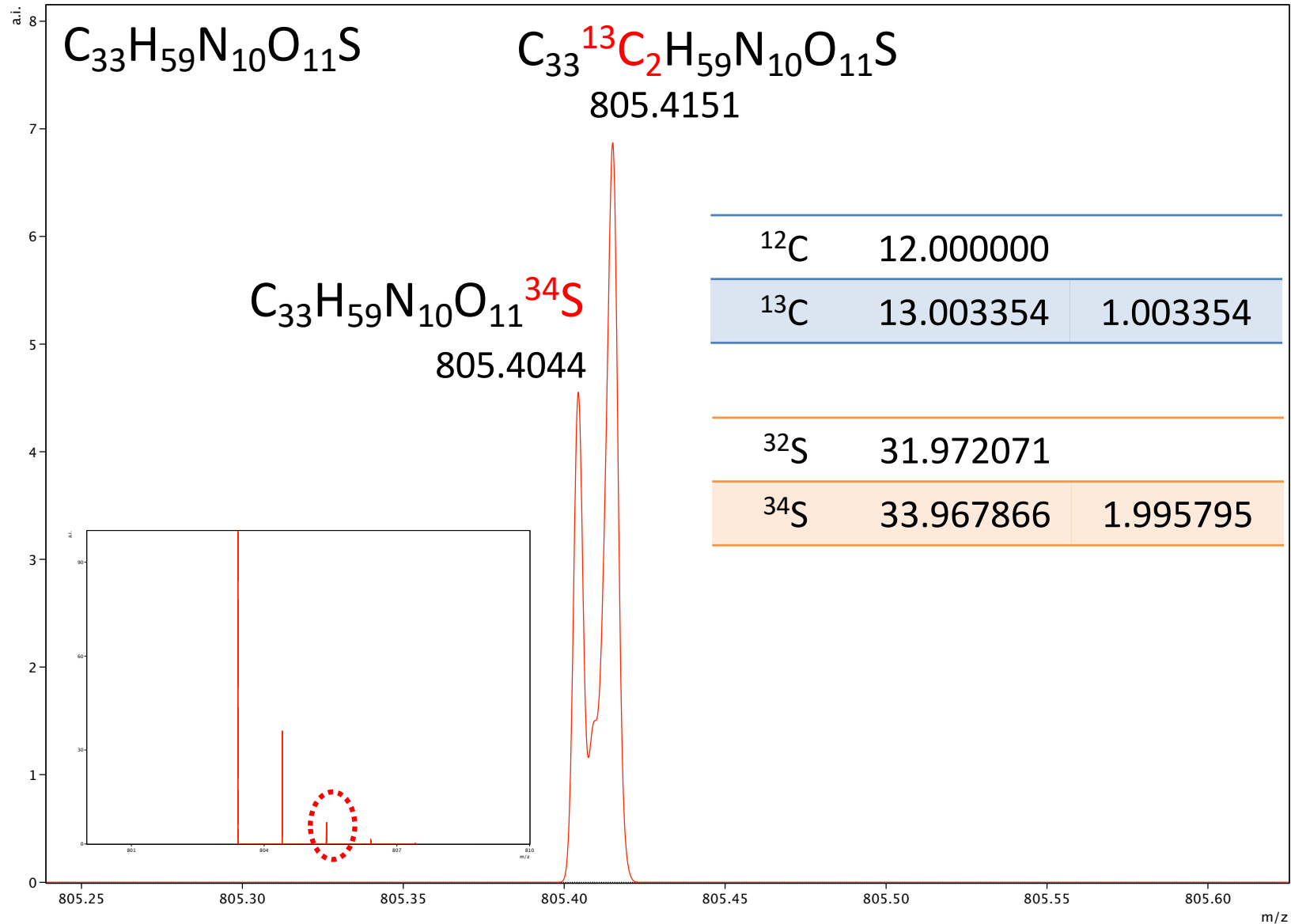
CO : 27.9949 Da
N₂ : 28.0062 Da
C₂H₄ : 28.0312 Da

分解能と同位体ピークの見え方



(シミュレーションのスペクトル)

2番目の同位体ピークで区別できるもの



(シミュレーションのスペクトル)

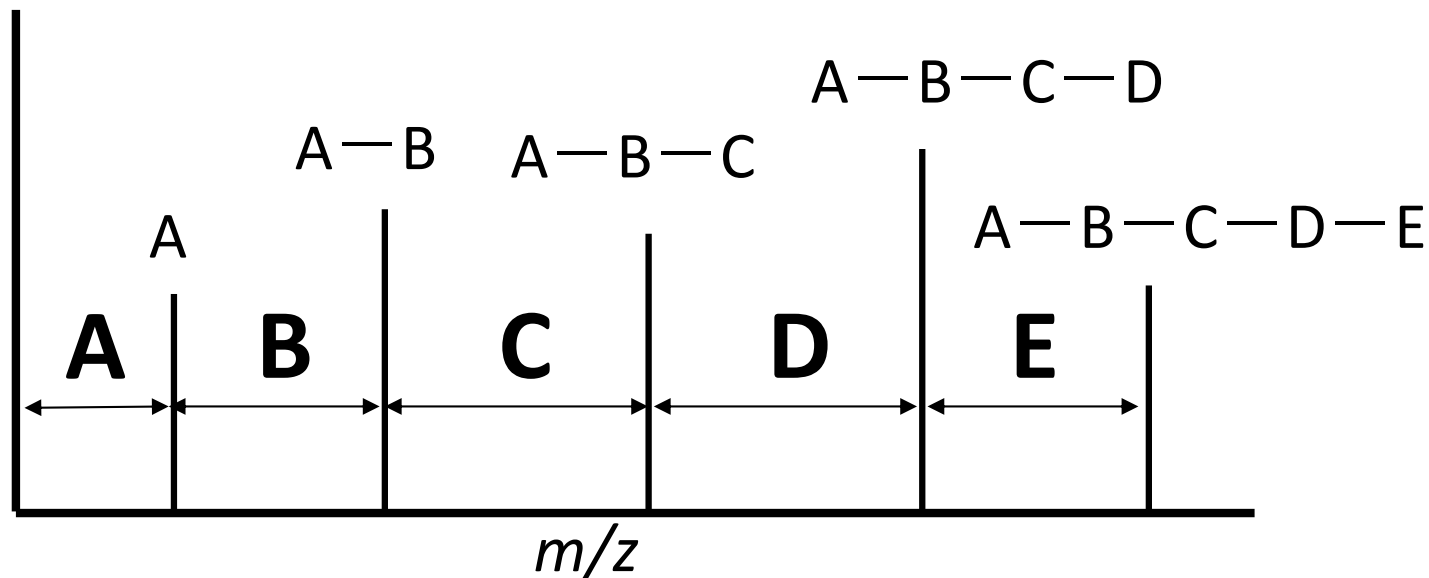
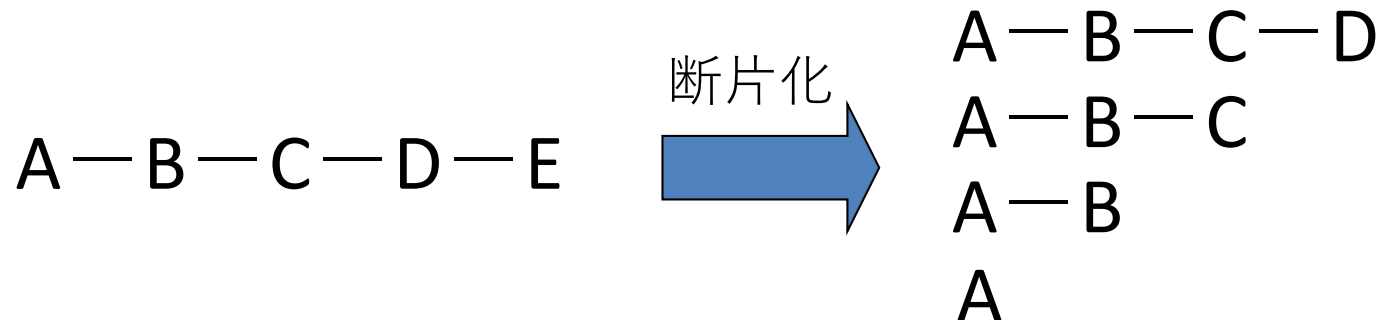
研究でのOrbitrapの活用ポイント

- 高精度が必要な実験
 - 低分子の構造確認（精密質量、組成式）
- 高感度が必要な実験
 - タンパク質の同定（プロテオミクス）
- 構造解析が必要な実験
 - ペプチドの配列解析（ペプチドミクス）

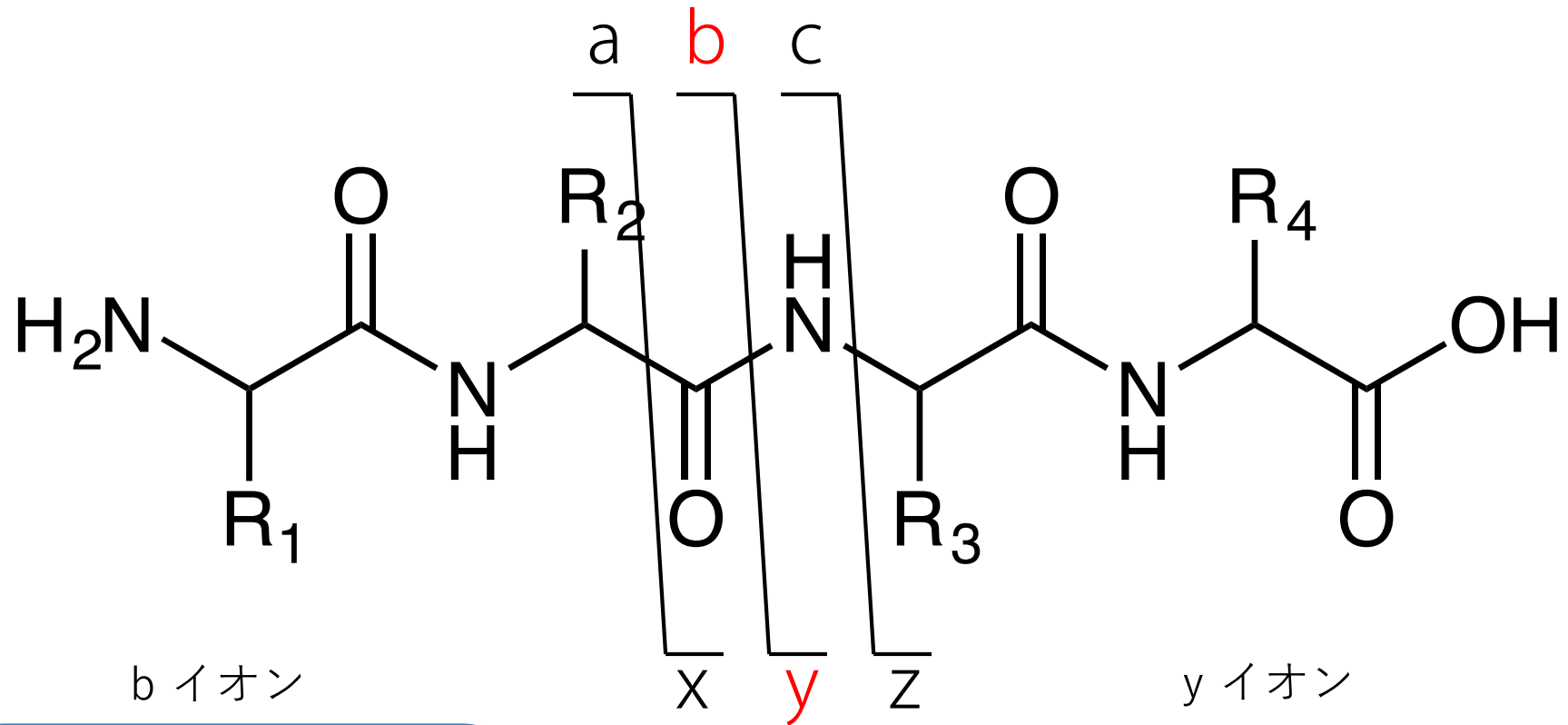
ペプチドの配列解析

質量分析計によるペプチドのアミノ酸配列決定

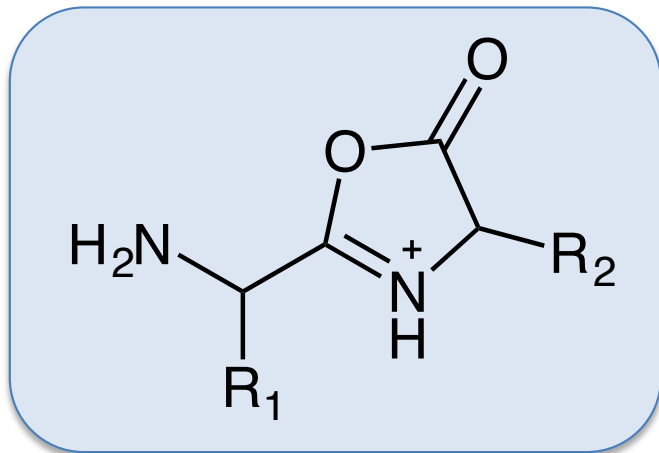
フラグメントの質量差からアミノ酸を同定



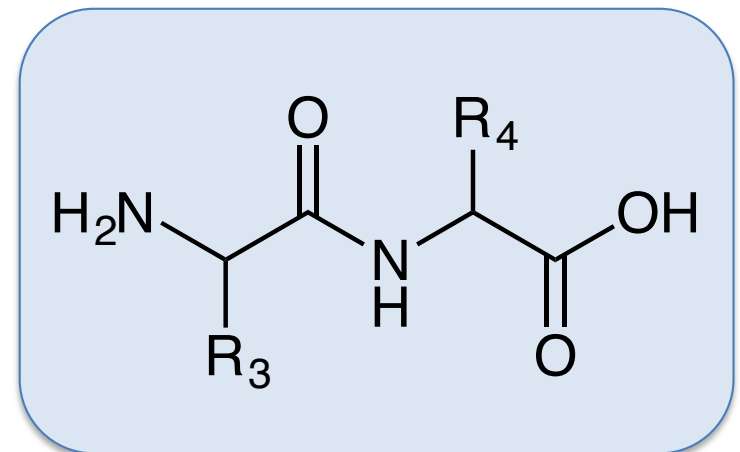
ペプチドの質量分析計での断片化



b イオン

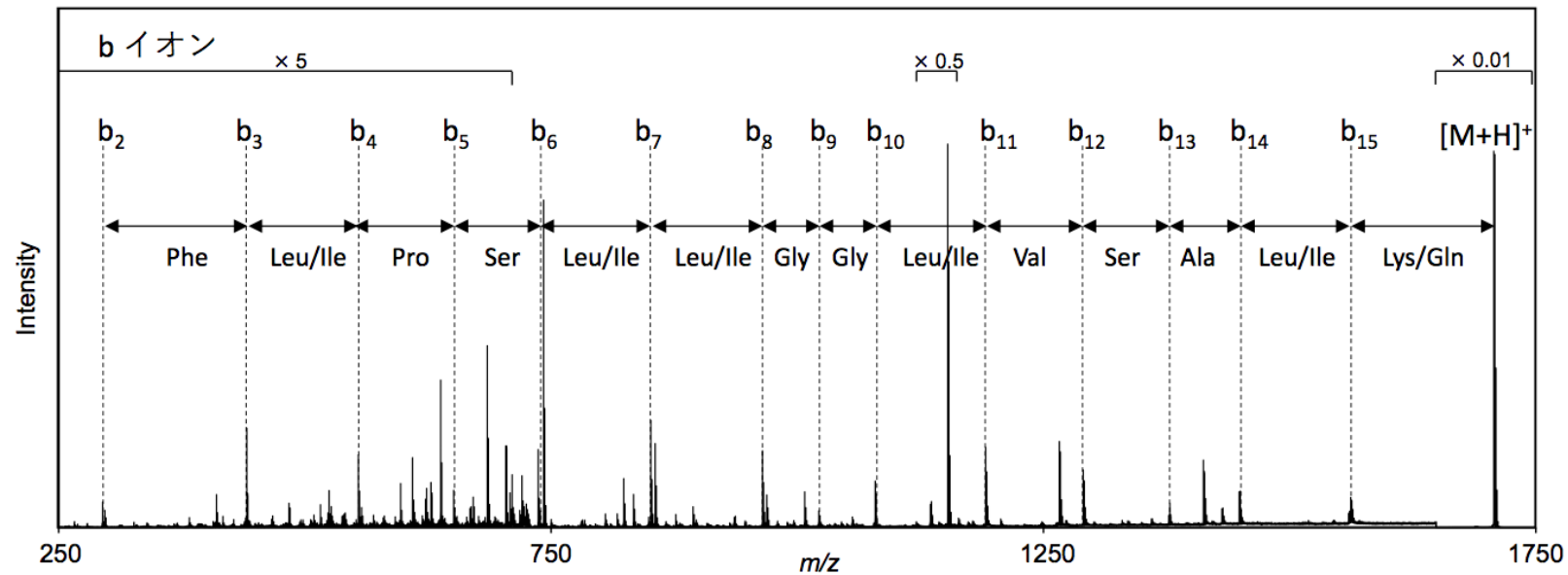
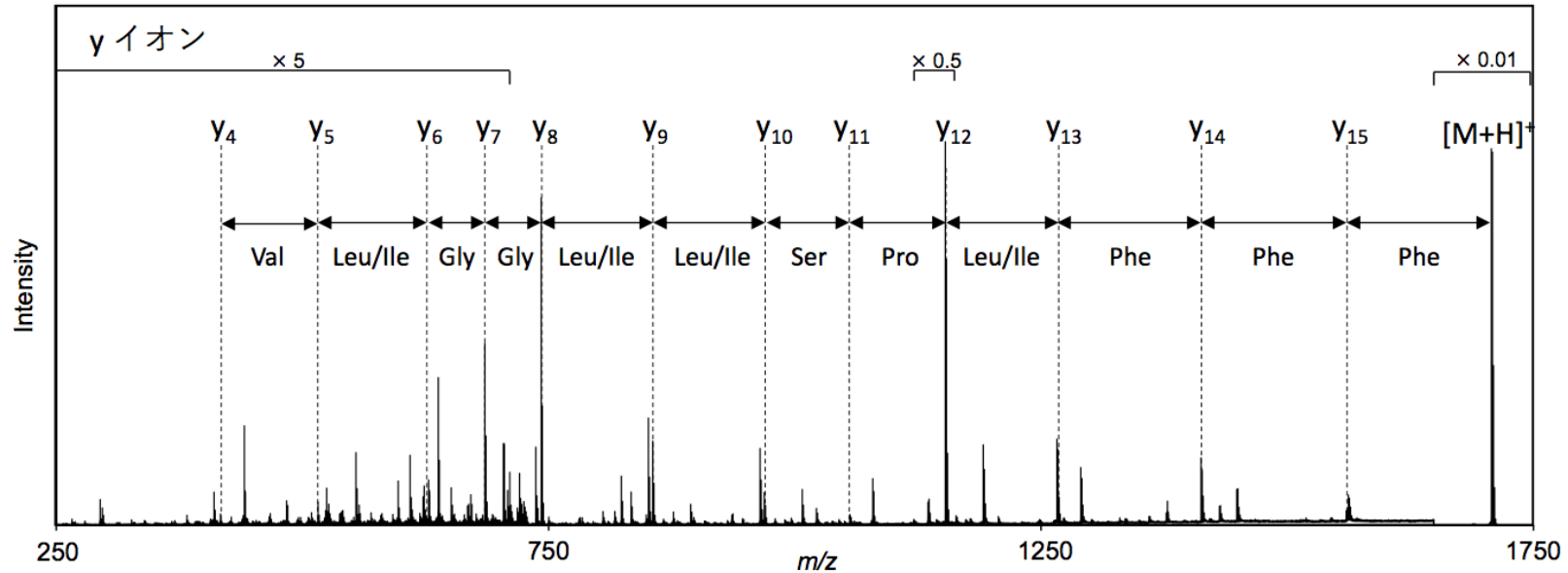


y イオン



実際のフラグメントの帰属例

FFFLPSLIGGLVSAIK-amide



クモ毒液に含まれるペプチドの構造同定



研究室の窓にも生息

【和名】 : クロガケジグモ

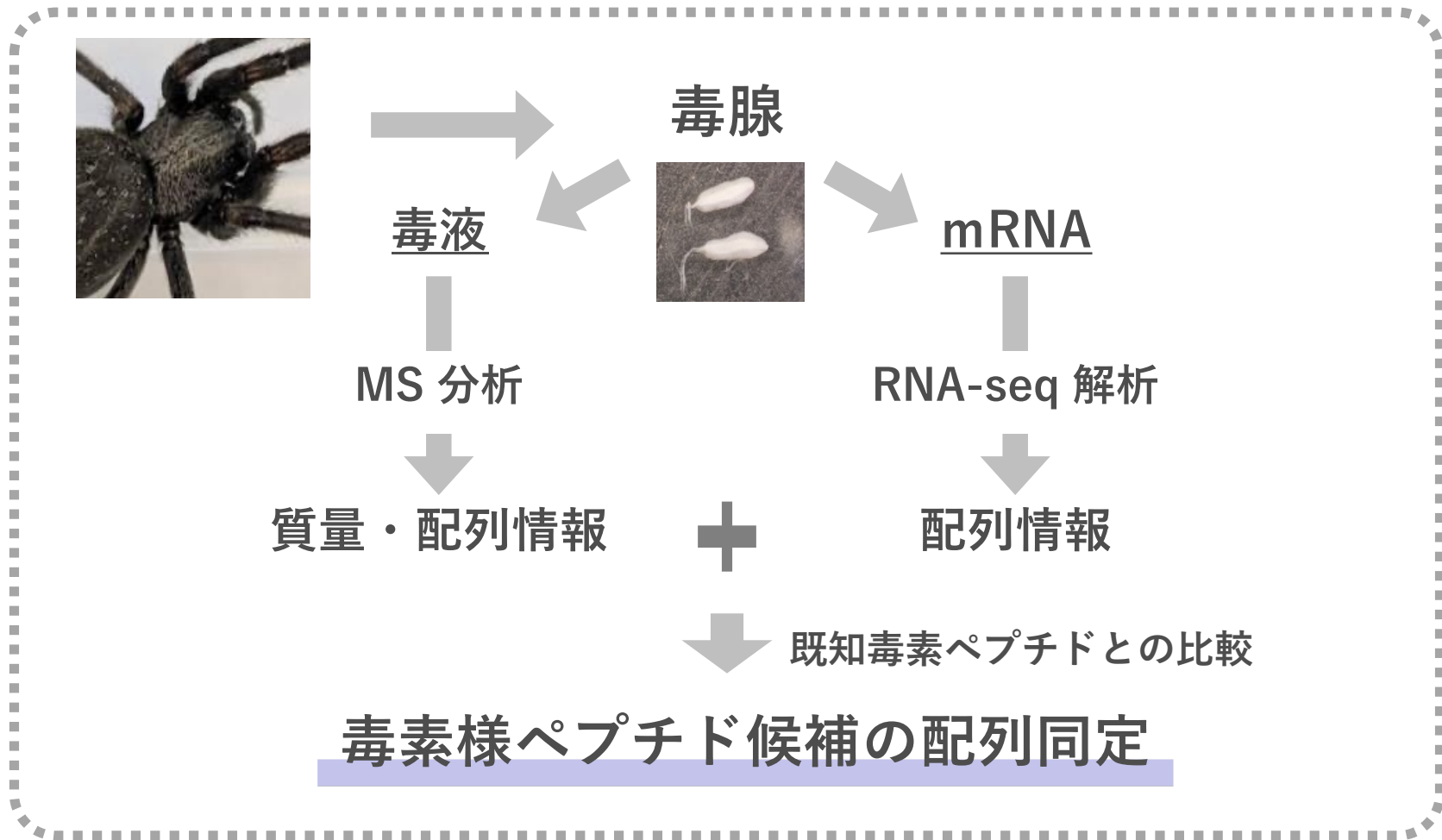
【学名】 : *Badumna insignis*

【体長】 : ♀ 10~15 mm ♂ 4.5~10 mm

【生息地】 : オーストラリア原産であるが日本に近年移入
(京都大学北部構内にも多数生息している)

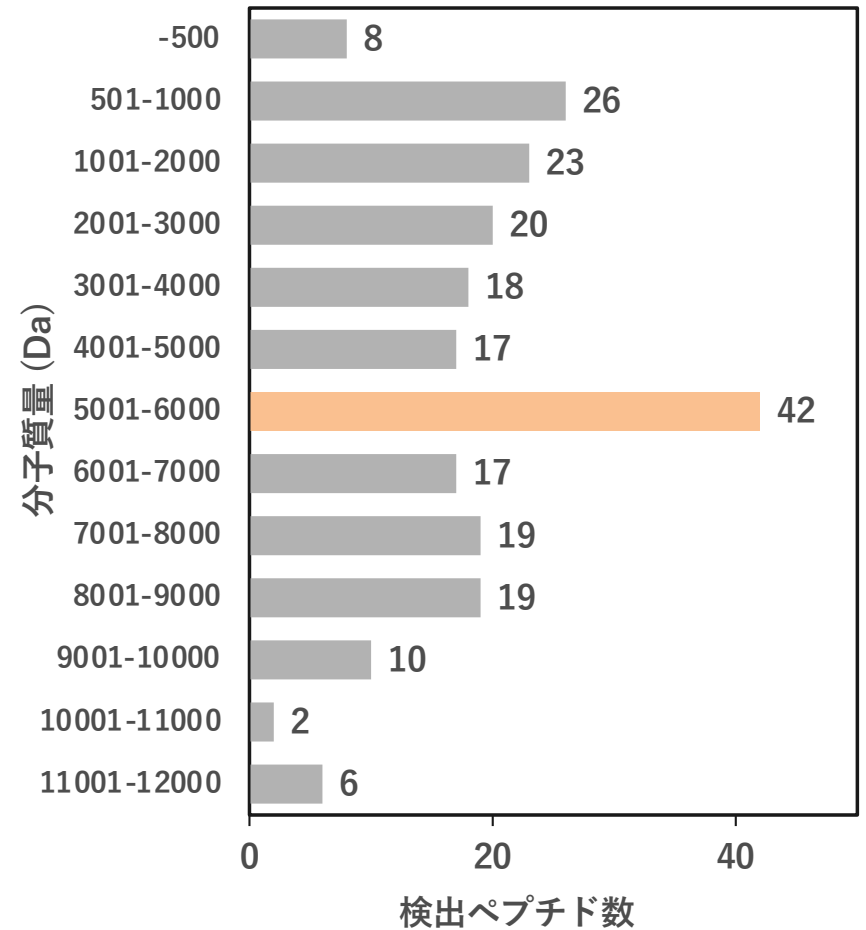
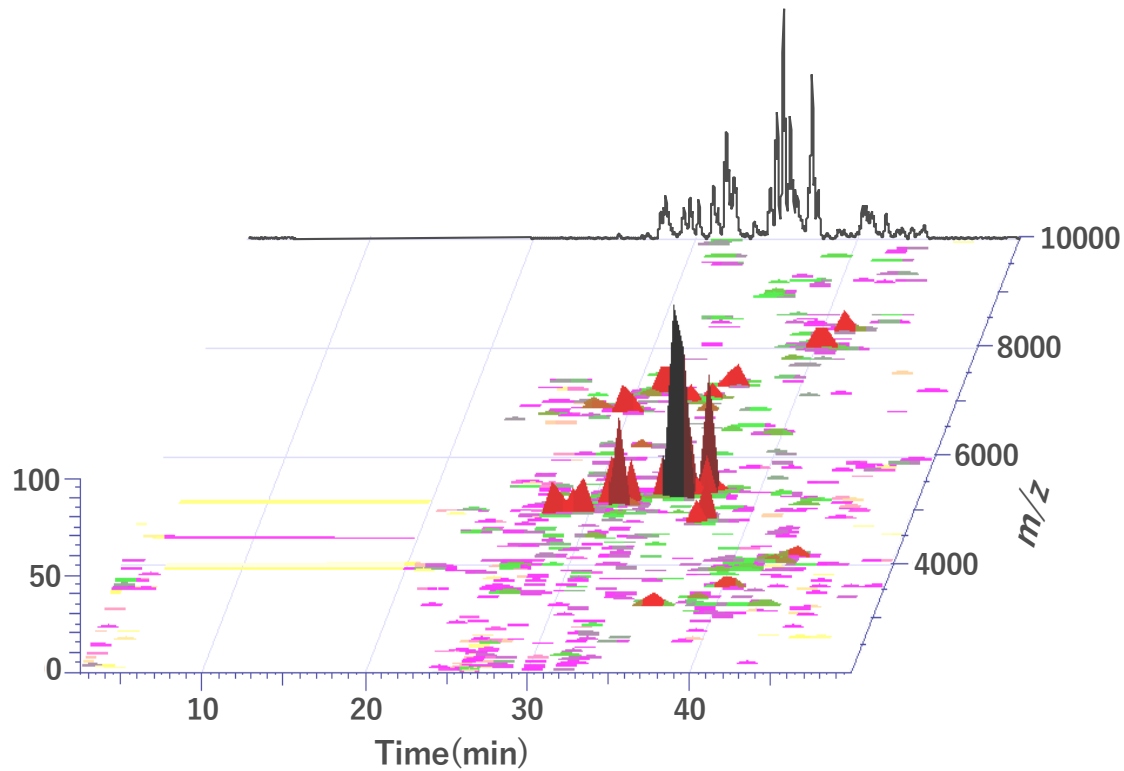
【毒液】 : 酵素活性について報告はあるが、ペプチド毒素の研究例は無い

クロガケジグモ毒液の毒素様ペプチドの探索手法

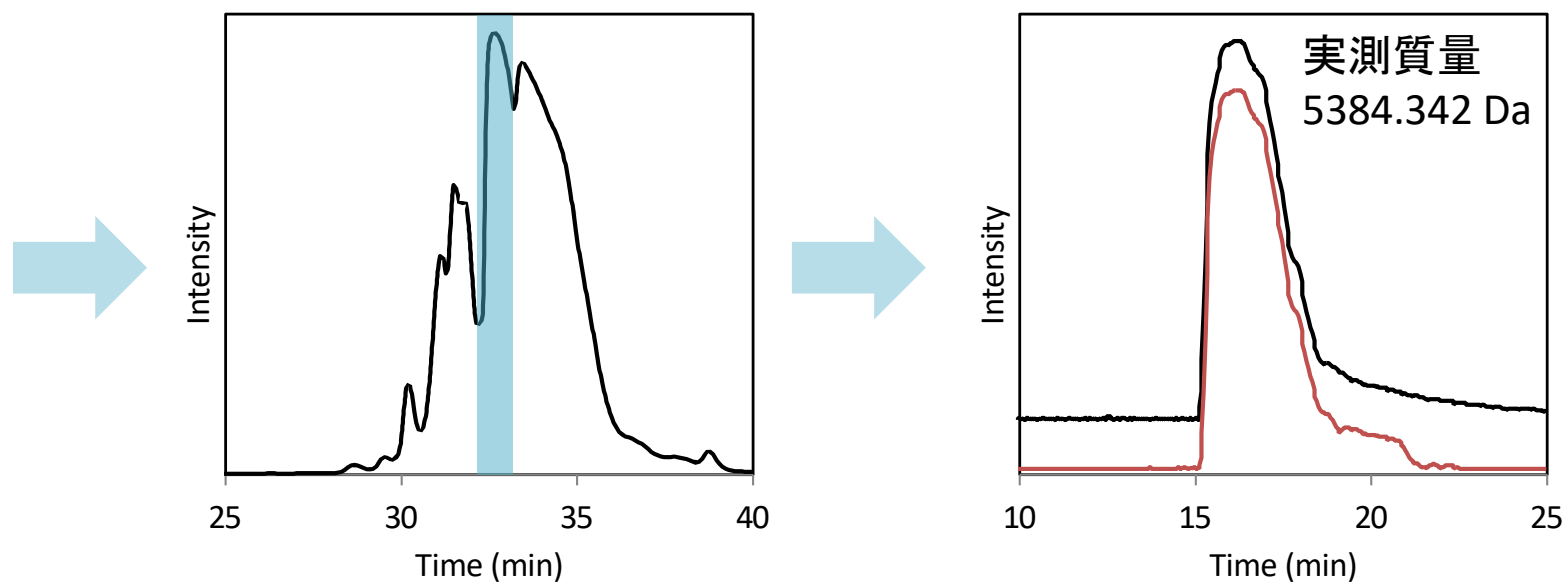
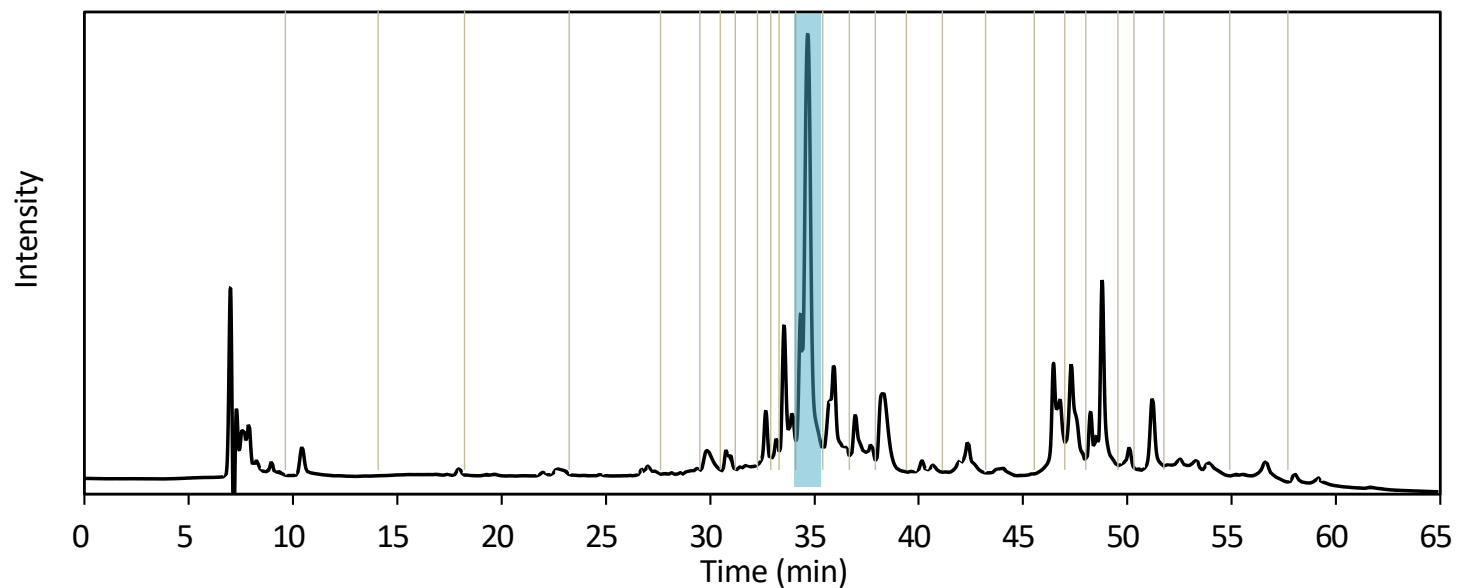


LC/MSによる毒液成分の質量分布の測定

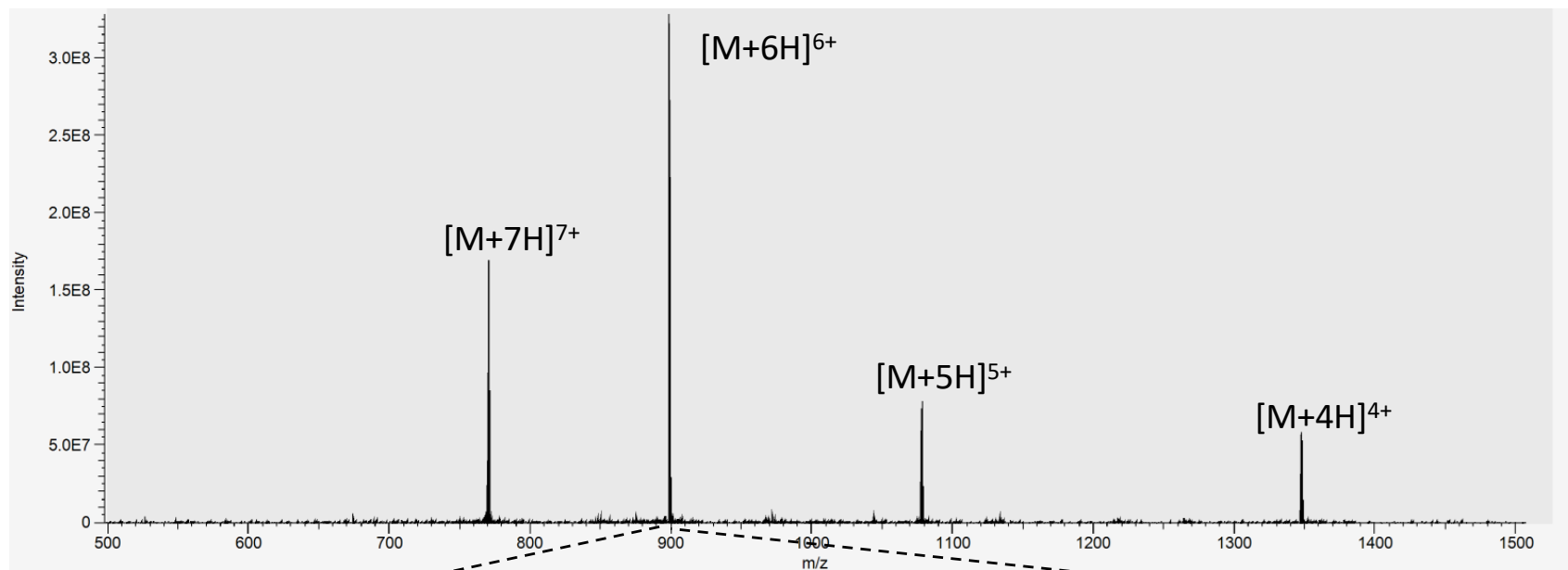
MS : Orbitrap Exploris 240
Column : Vydac Everest C18 250×1.0 mm
Flow : 0.05 mL/min
Eluate : (A) 0.1% HCOOH/H₂O (B) CH₃CN
Gradient : 2-2-60%B/0-5-80 min
Oven : 40°C



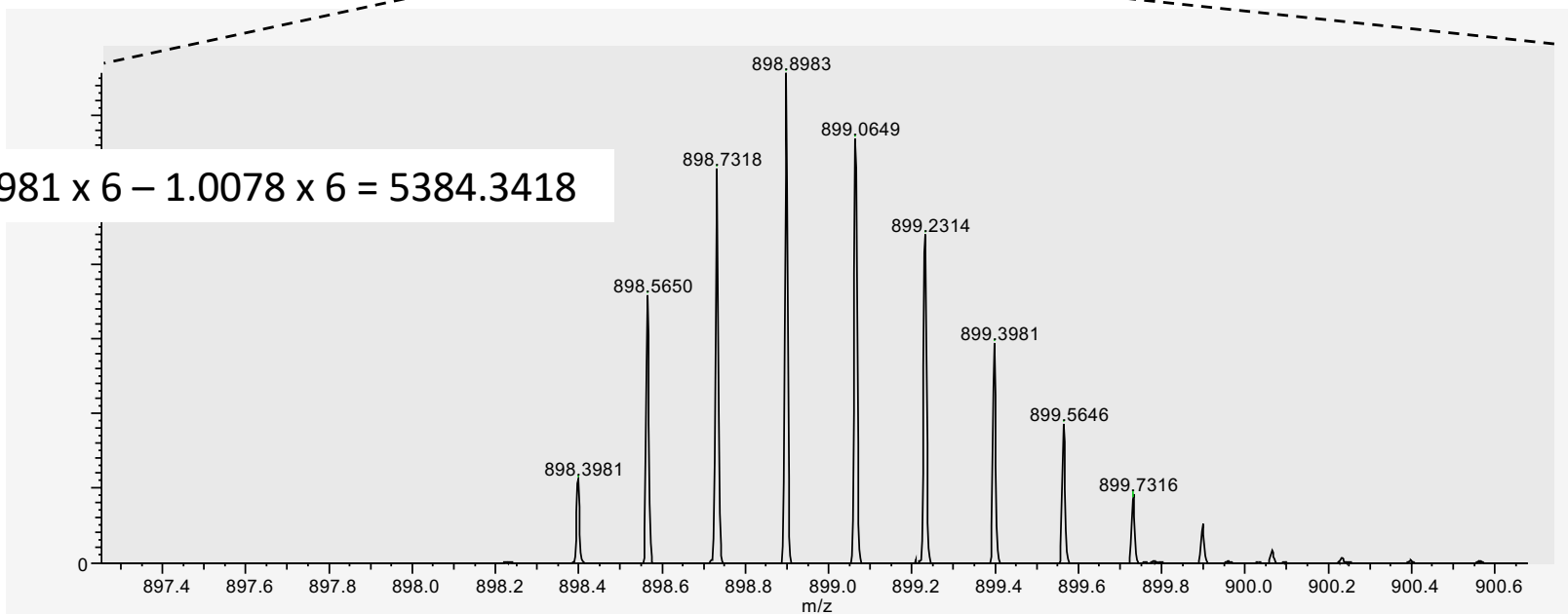
HPLCによる成分ペプチドの単離



多価イオンから質量を求める

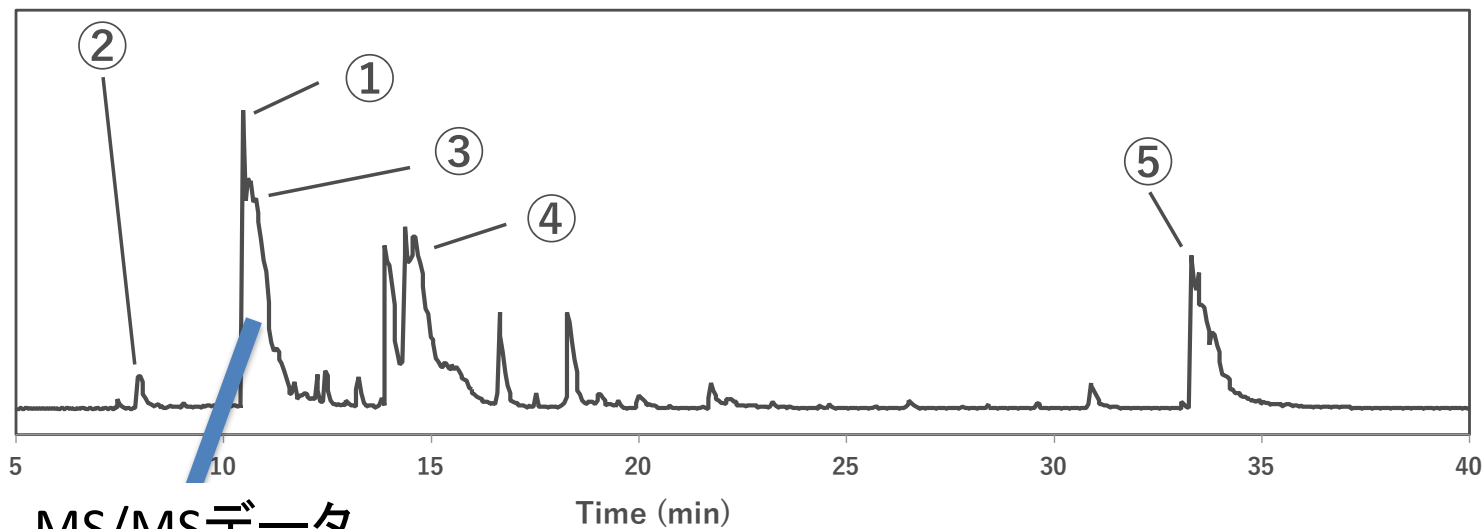


$$898.3981 \times 6 - 1.0078 \times 6 = 5384.3418$$

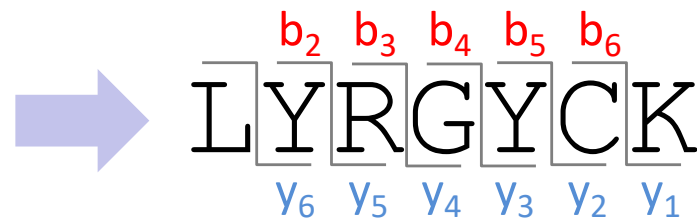
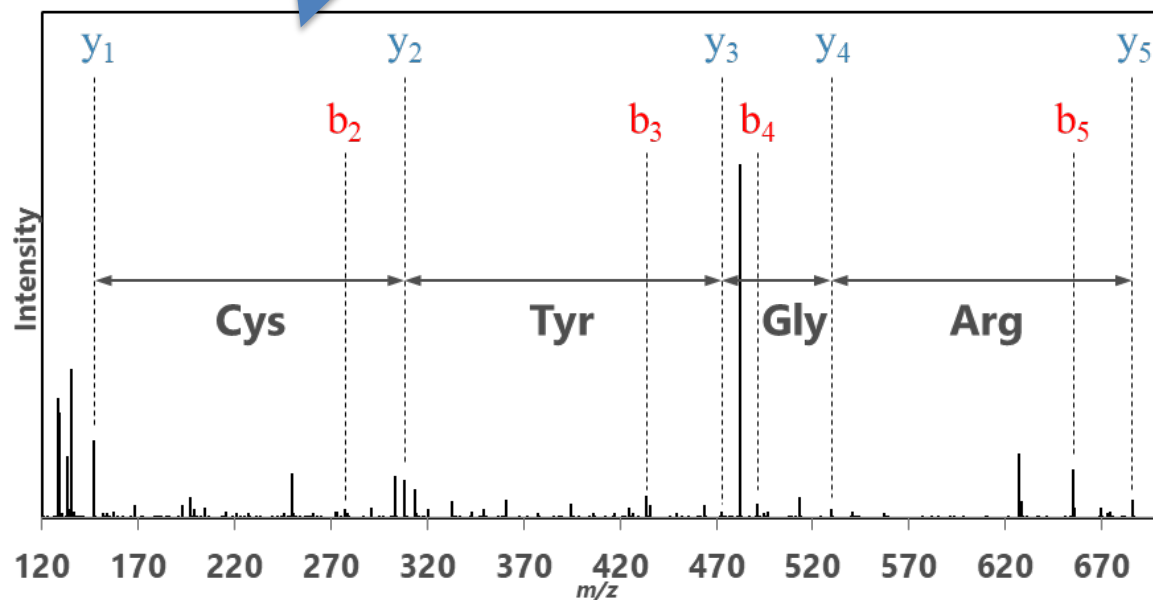


酵素消化ペプチドのMS/MS分析による配列決定

酵素(Lys-C)による消化が必要 (2000 Da以上のペプチドでは難しい)

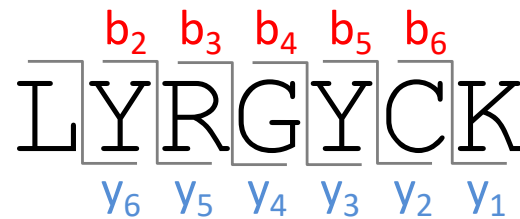
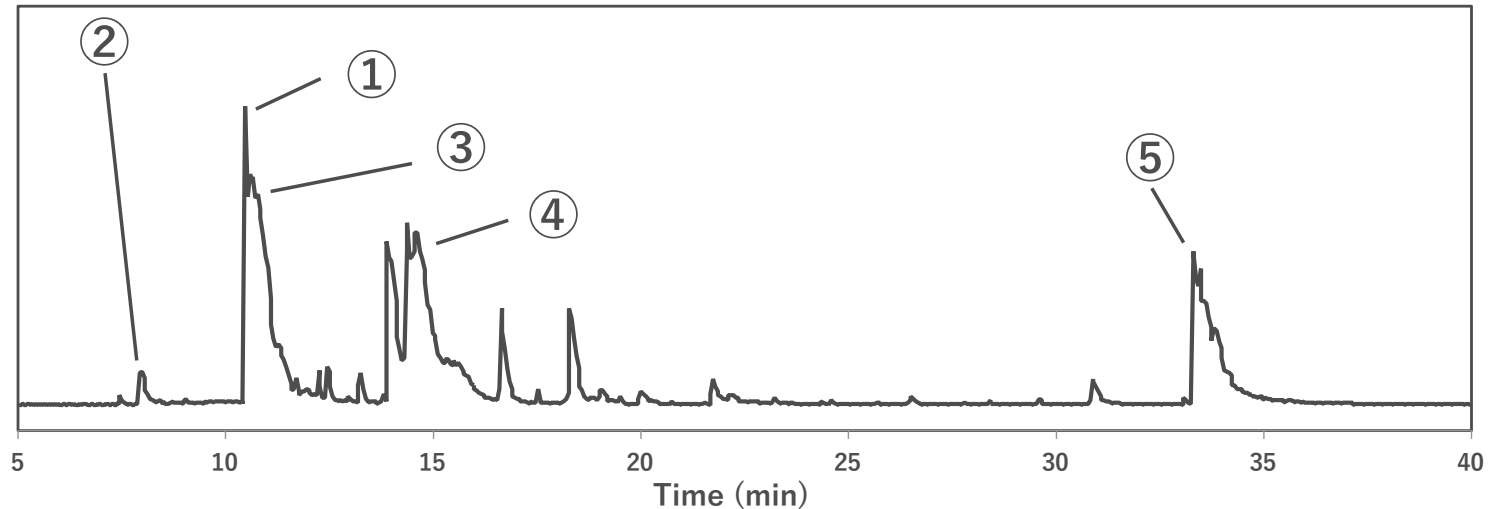


MS/MSデータ



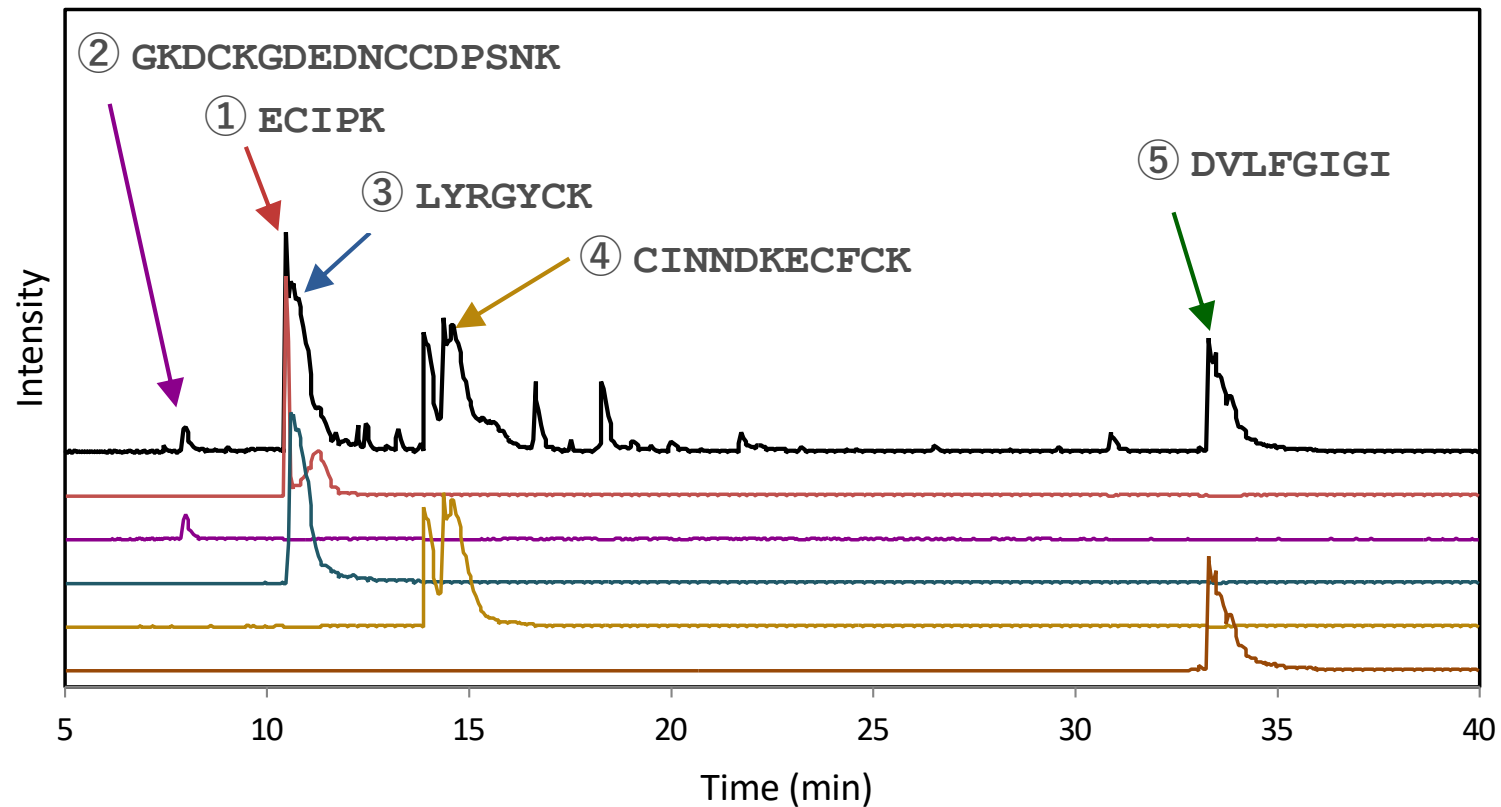
酵素消化ペプチドのMS/MS分析による配列決定

酵素(Lys-C)による消化が必要 (2000 Da以上のペプチドでは難しい)



| b | | b^{+2} | | | | y | | y^{+2} | |
|-----------------|-----------|-----------------|----------|---|------------------|--------|-----------------|-----------------|----------|
| Calcd. | Obsvd. | Calcd. | Obsvd. | | | Calcd. | Obsvd. | Calcd. | Obsvd. |
| --- | | --- | | 1 | L | 7 | --- | --- | |
| 277.1547 | 277.15506 | --- | | 2 | Y | 6 | 847.3767 | 424.1920 | 424.1922 |
| 433.2558 | | 217.1315 | 217.1321 | 3 | R | 5 | 684.3134 | 684.3140 | 342.6603 |
| 490.2772 | 490.27859 | 245.6423 | | 4 | G | 4 | 528.2123 | 528.2123 | 264.6098 |
| 653.3406 | 653.34082 | 327.1739 | | 5 | Y | 3 | 471.1908 | 471.1910 | 236.0990 |
| 814.3552 | | 407.6813 | | 6 | C(Carboxymethyl) | 2 | 308.1275 | 308.1275 | 154.5674 |
| --- | | --- | | 7 | K | 1 | 147.1128 | 147.1128 | 74.0600 |

ペプチド全体の構造決定



| | |
|-------------|-------------|
| 実測質量 | 計算質量 |
| 5384.342 Da | 5384.337 Da |

質量分析によるペプチド配列決定の利点と問題点

- NanoLCによって微量サンプルでも構造決定が可能
- Orbitrapによって正確な配列決定が可能
- × 大きなペプチドは酵素消化が必要
 - ✓ 事前に精製が必要
- × この装置だけではLeu/Ileの区別ができない
 - ✓ MALDI-TOF/TOF MSとの併用、遺伝子情報の活用
- × フラグメントの帰属が難しい
 - ✓ 解析ソフトウェアはまだ不完全

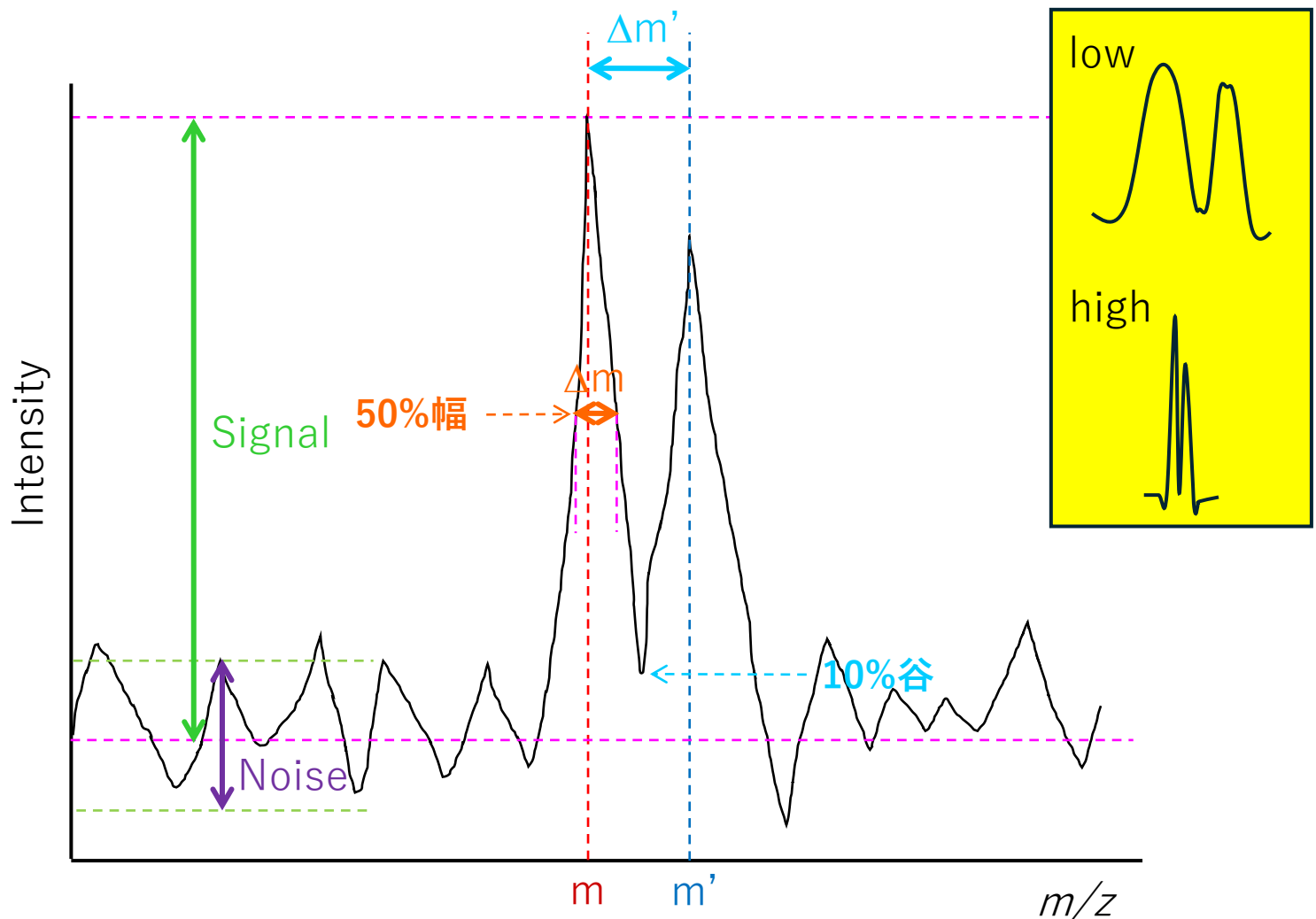


高分解能低分子分析

及川 彰

分解能

質量分解能 (mass resolving power) : 特定の質量分解度の値を得ることができる質量分析計の能力
質量分解度 (mass resolution) : マスペクトル上の隣接したピークの分離状態を客観的に評価するための指標



ピークの半値幅定義による分解度
Full width at half maximum: FWHM

$$R_{\text{FWHM}} = \frac{m}{\Delta m}$$

10%谷定義による分解度
10% valley definition of resolution

$$R_{10\%} = \frac{m'}{\Delta m'}$$

$$\text{S/N比} = \frac{\text{Signal}}{\text{Noise}}$$

分解能

質量分析計の種類と分解能（目安）



Exploris 240
R = 240,000

四重極型 (Q)
イオントラップ型

飛行時間型 (TOF)
扇形磁場型

オービトラップ型
(Orbitrap)

フーリエ変換イオン
サイクロトロン共鳴型
(FT-ICR)

低

分解能 (FWHM)

高

~100

~1,000

~10,000

~100,000

~1,000,000

(検出される m/z 値の例)

120

120.1

120.10

120.098

120.09784

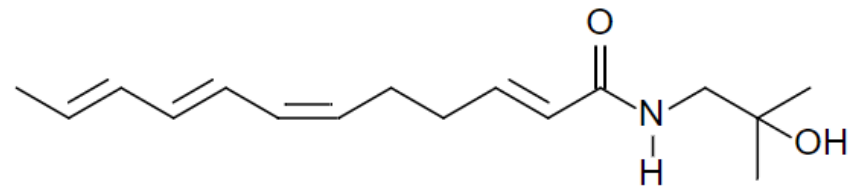
120.097841

オービトラップ型質量分析装置では高分解能分析が可能

高分解能分析でできること

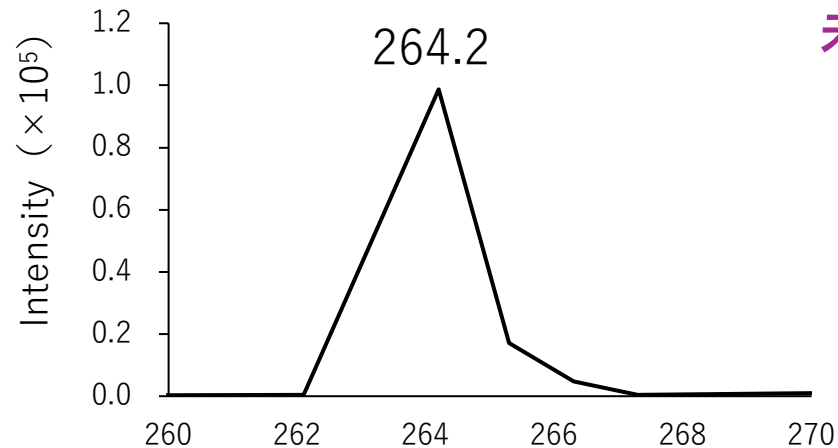
付属のソフトウェア
で簡単にできます！

高確度分析



Hydroxy- α -sanshool
(理論 $m/z = 264.19581$ ($[M+H]^+$))

A社 single quadrupole MS



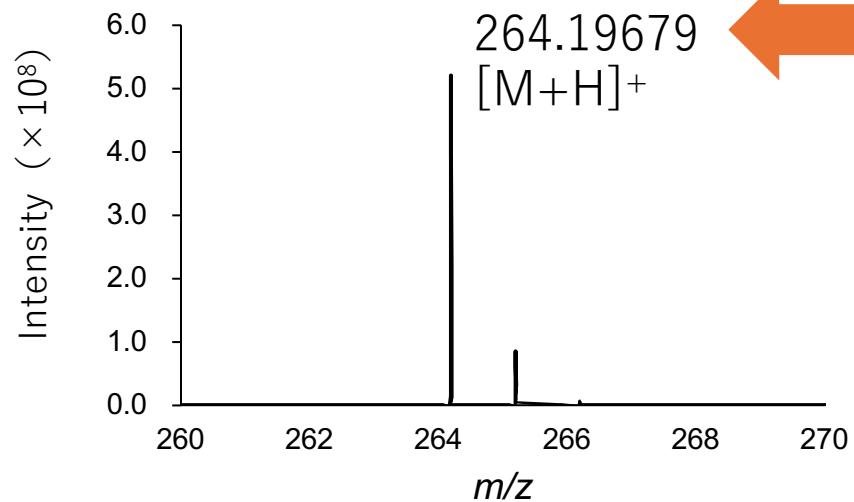
未知化合物の組成式推定



組成式の推定が可能



Orbitrap Exploris 240

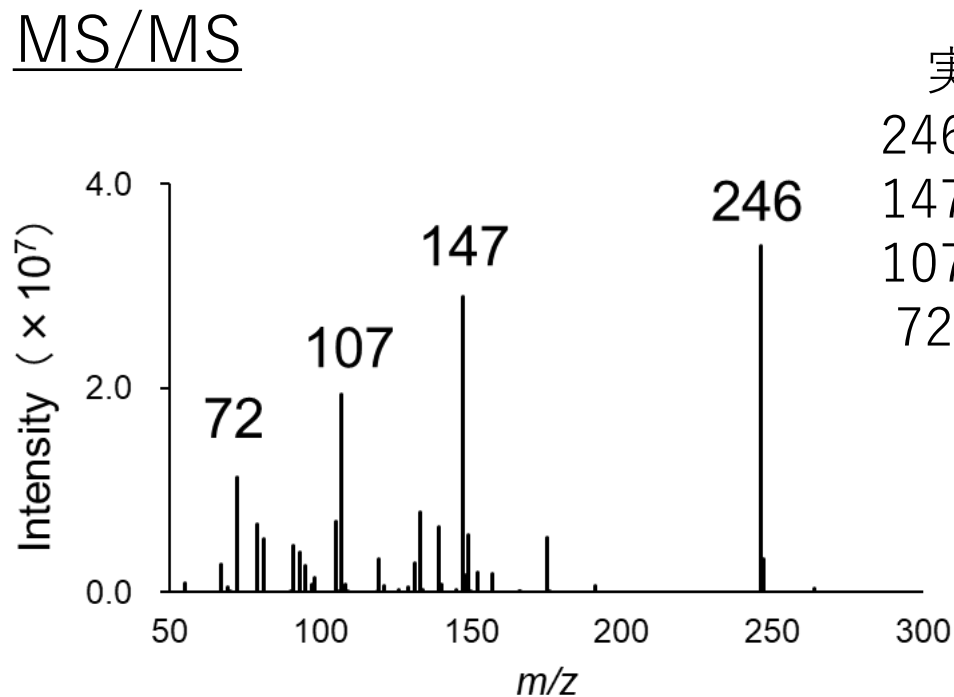
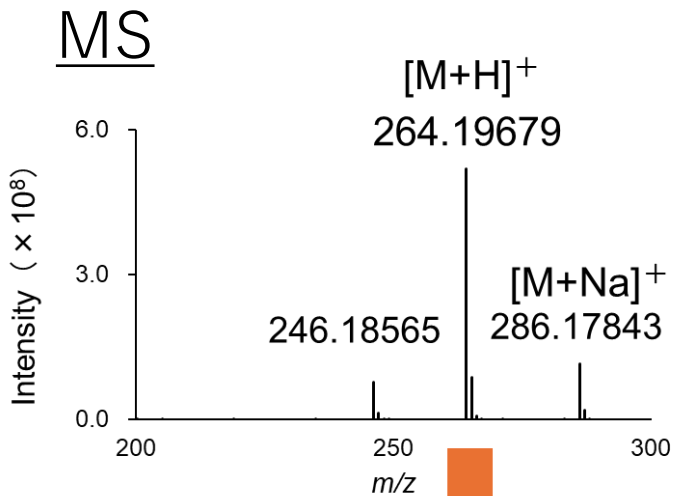
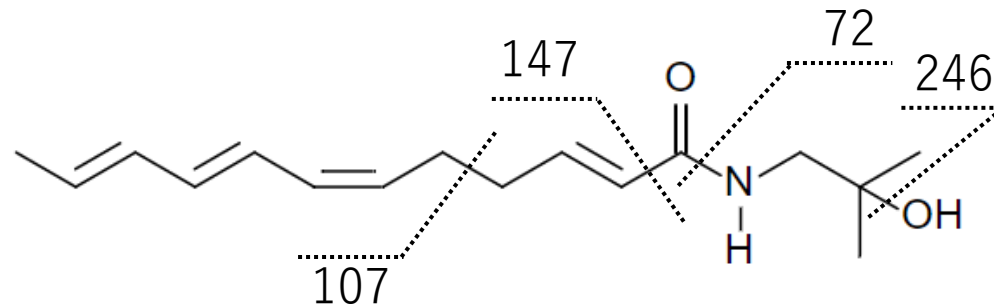


$\Delta m/z = 0.00098$
(3.71 ppm)

！高確度！

高分解能分析でできること

高確度分析 (MSMS)



| 実測値 | 理論値 | $\Delta m/z$ |
|-----------|-----------|--------------|
| 246.18800 | 246.18579 | 0.00221 |
| 147.11642 | 147.11738 | 0.00096 |
| 107.08643 | 107.08608 | 0.00035 |
| 72.08135 | 72.08132 | 0.00003 |

組成式の推定が可能

未知化合物の構造推定

こんな方にオススメ

- 既にLC-qMSで分析を行っている
 - 同じ条件をそのまま適用して高分解能解析ができる
- 未知物質を同定したい
 - 高確度分析（MSMS）や同位体解析から推定できる（かも）
- 安定同位体追跡試験による生合成・分解経路の特定をしたい
 - 硫黄など特異的な同位体組成を持つ元素を含む化合物を追跡できる（かも）

**気軽に使える高分解能質量分析装置
未知化合物の定性分析に最適**

こんな方にはあまりオススメではない

- 他のLCMSやHPLCなどで定量分析を行っている
 - tripleQやqTOFなどの方が定量性や検出感度で勝る場合もある？
- tripleQで行っているMRM (SRM) をしたい
 - できません。SIM-likeな分析は可能です。
- スキャンスピード狂です
 - TOFでどうぞ。Orbitrapではスキャン速度と分解能が相殺します。

研究の目的によってはtripleQやTOFの方が適した手法となる

Q. 植物ホルモンは分析できますか？

A. できます（できません）

- 既に植物ホルモンを分析している方
 - ✓ 同じ条件で高分解能分析が可能です
 - ✓ 定量性や検出感度はtripleQやqTOFと同等か低いです
 - ✓ 既に定量分析ができているならorbitrapにする必要性は低いです
 - ✓ 未知の植物ホルモン（様）化合物を同定したい（未知ピークがある）場合は有用かもしれません
- これから植物ホルモンを分析する方
 - ✓ Orbitrapだから検出できるという植物ホルモンはありません
 - ✓ 他のLCMSで検出できている植物ホルモンは検出可能です（前処理，精製などのステップは必要です）

Q. メタボロミクスはできますか？

A. できます（できません）

- ▶ 分析は可能ですが，データ解析用のソフトウェアがありません
 - ✓ ソフトウェアを買ってください（誰か）
 - ✓ フリーソフト（MS-DIAL）などを頑張って使う

ご清聴，ありがとうございました



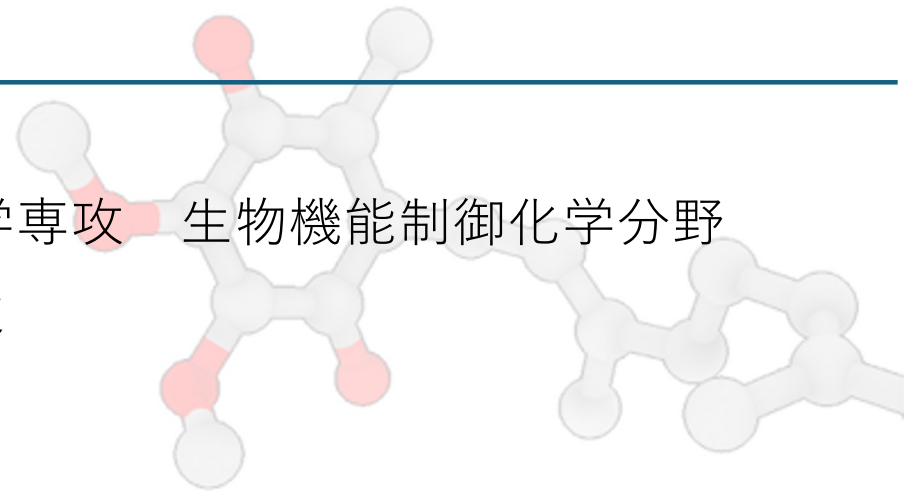


Faculty/Graduate School of
AGRICULTURE
KYOTO UNIVERSITY

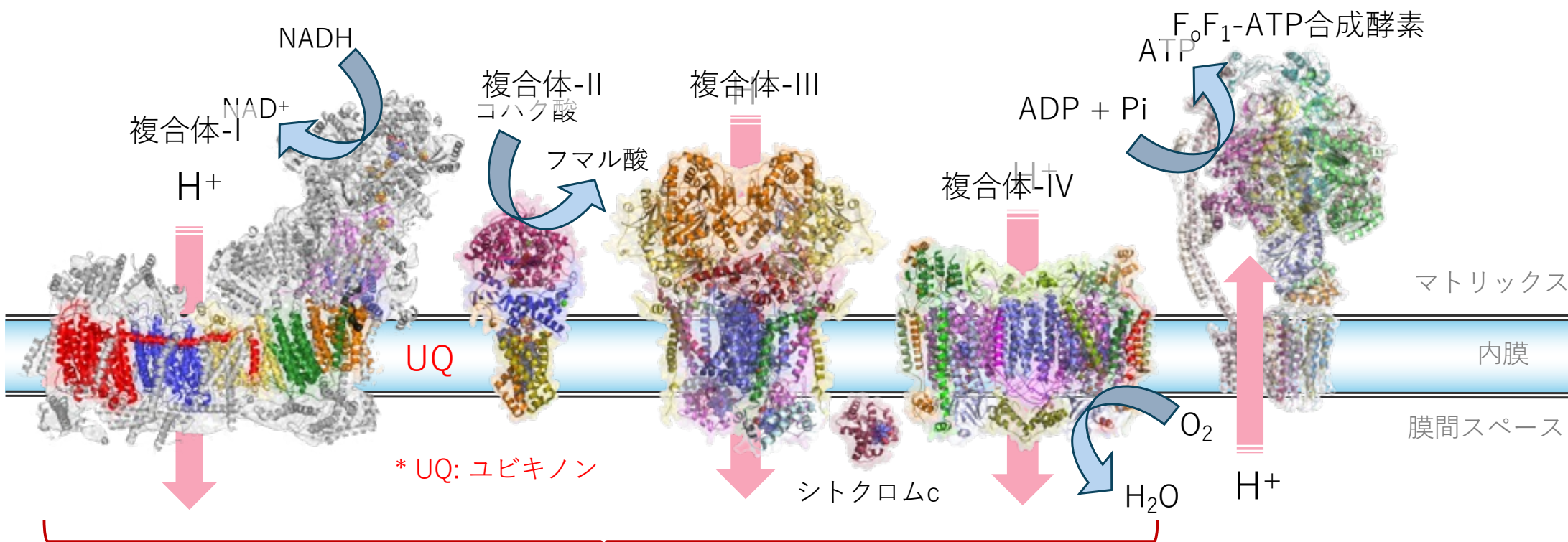
タンパク質解析（化合物との相互作用）

コレラ菌 Na^+ -輸送型NADH-キノン酸還元酵素を例にして

京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 生物機能制御化学分野
村井 正俊



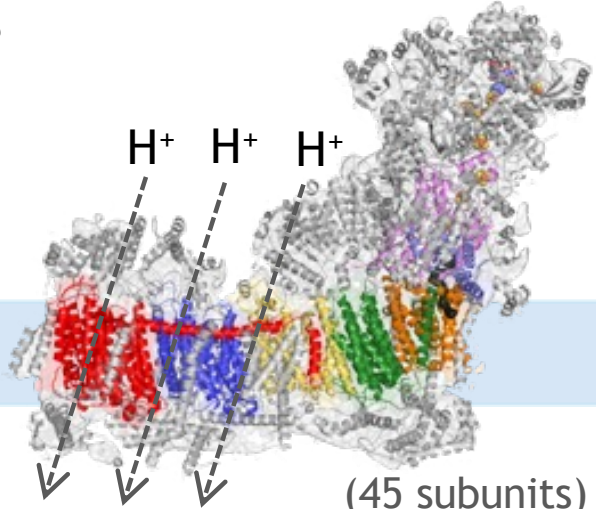

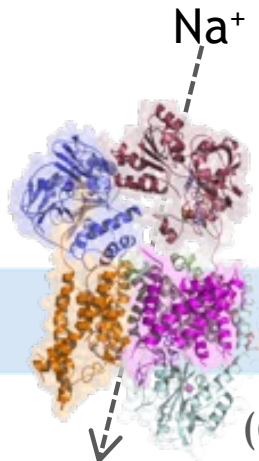
私たちの研究について



呼吸鎖酵素（複合体I~IV）による基質の酸化還元と連動（共役）したプロトンの輸送

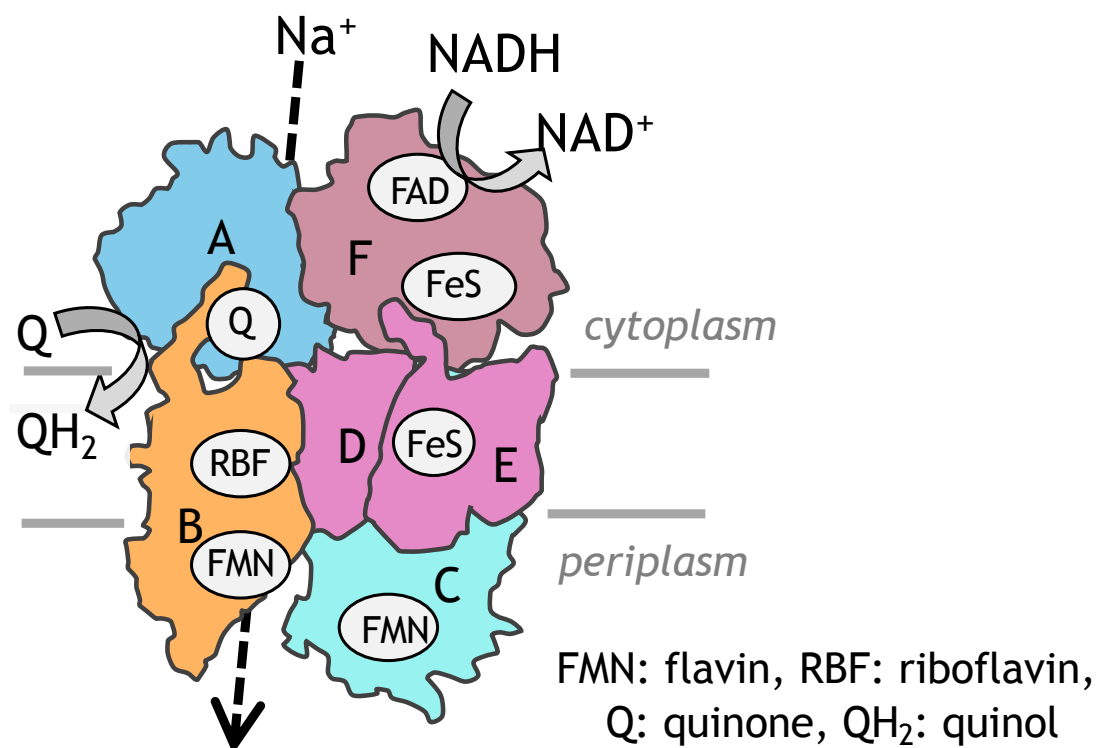
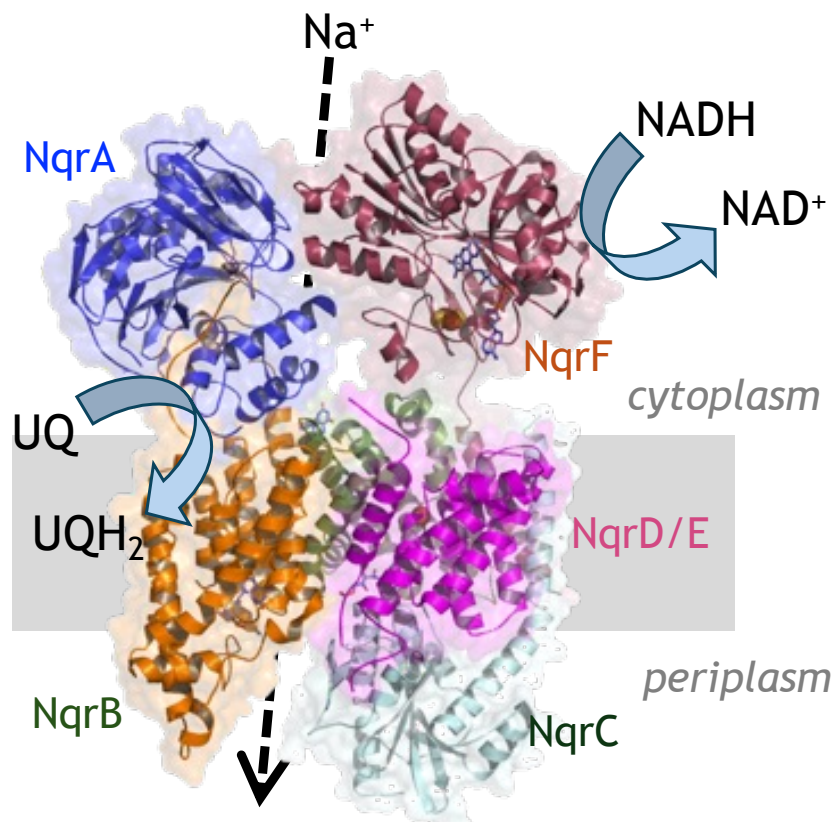
プロトン輸送と連動（共役）したATP合成

NADH脱酸素酵素の多様性

| | Complex I (NDH-1) | NDH-2 (Ndi1) | Na ⁺ -NQR |
|--------------|--|---|---|
| Coupled ion | H ⁺ | - | Na ⁺ |
| Structure |  <p>(45 subunits)</p> |  <p>(single subunit)</p> |  <p>(6 subunits)</p> |
| Cofactor | FMN 2[2Fe-2S] 6 [4Fe-4S] | FAD | 2 FMN [2Fe-2S] FAD and RF |
| Distribution | Mammalia, plant and bacteria | Plant, yeast, and bacteria | Marine and pathogenic bacteria |
| Inhibitor | Rotenone and bullatacin | Aurachin | Aurachin and korormicin |

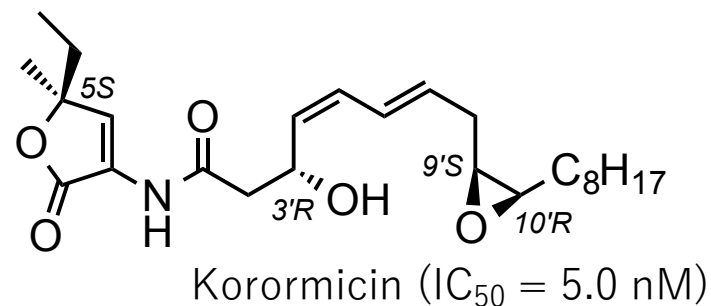
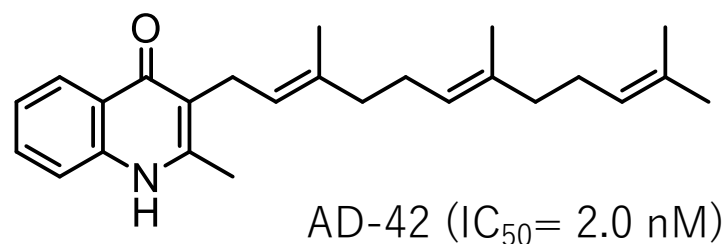
研究対象 (Na⁺-輸送型NADH-キノン酸化還元酵素, Na⁺-NQR)

- ✓ Na⁺-NQR は病原性細菌 (ex: コレラ菌、緑膿菌) におけるエネルギー代謝の基幹酵素
- ✓ 哺乳類型の呼吸鎖複合体-Iとは進化的にも構造的にも異なる
- ✓ 哺乳類には存在しないため、抗菌薬の創薬標的になり得る

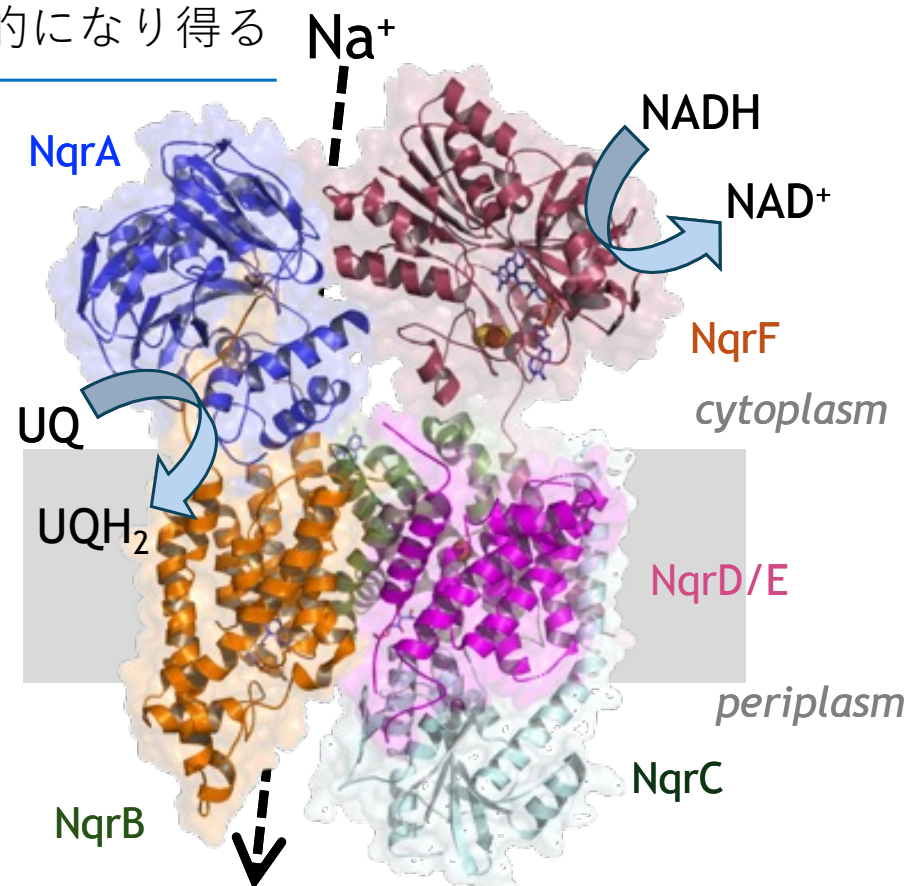


コレラ菌Na⁺-NQRの特異的阻害剤

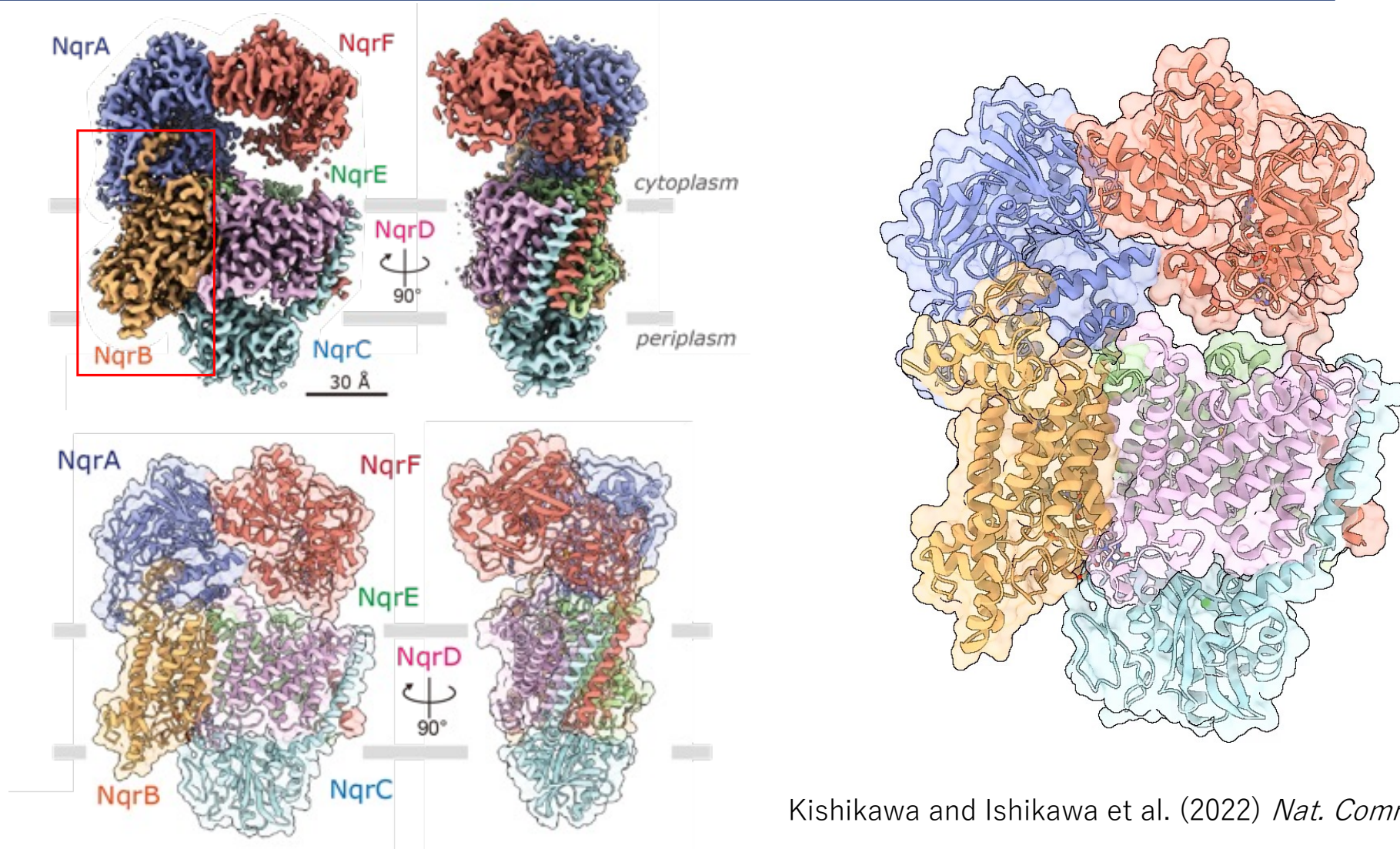
- ✓ Na⁺-NQR は病原性細菌 (ex: コレラ菌、緑膿菌) におけるエネルギー代謝の基幹酵素
- ✓ 哺乳類型の呼吸鎖複合体-Iとは進化的にも構造的にも異なる
- ✓ 哺乳類には存在しないため、抗菌薬の創薬標的になり得る



Ito et al. (2017) *J. Biol. Chem.* 292, 7727-7742.



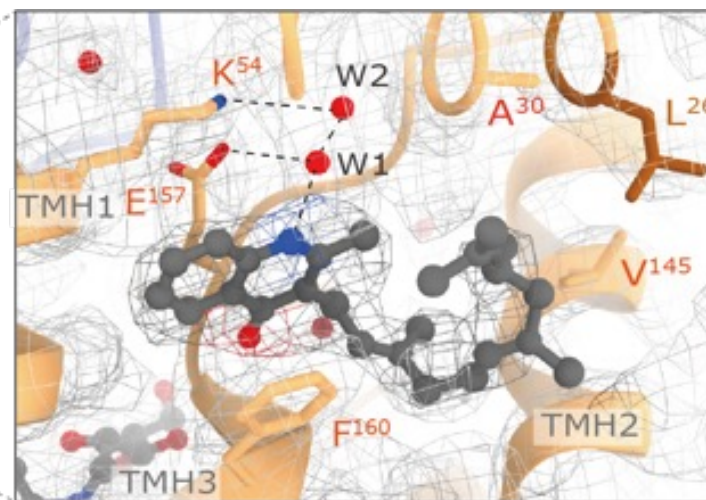
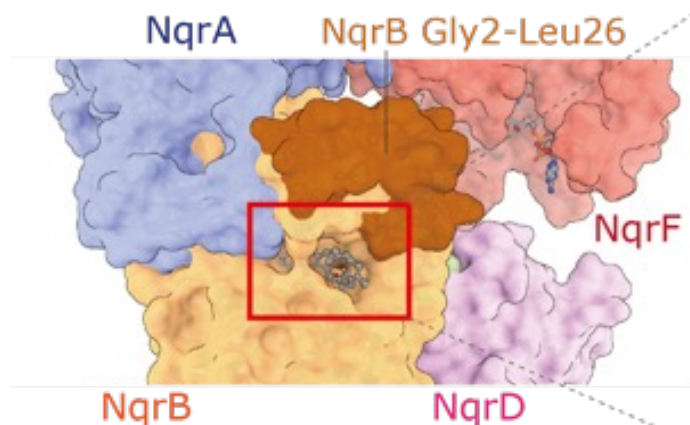
Na⁺-NQRの特異的阻害剤はNqrBサブユニットに結合する



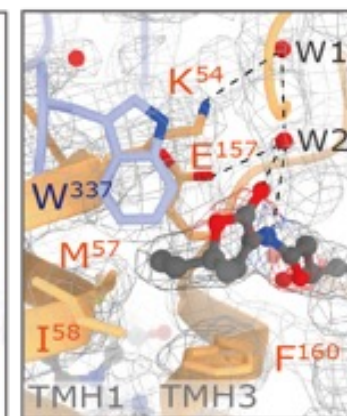
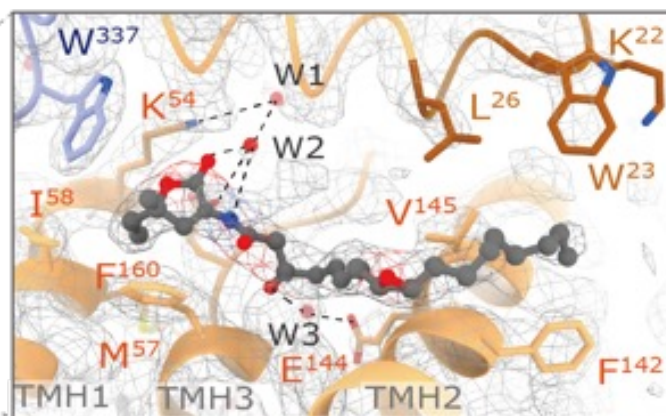
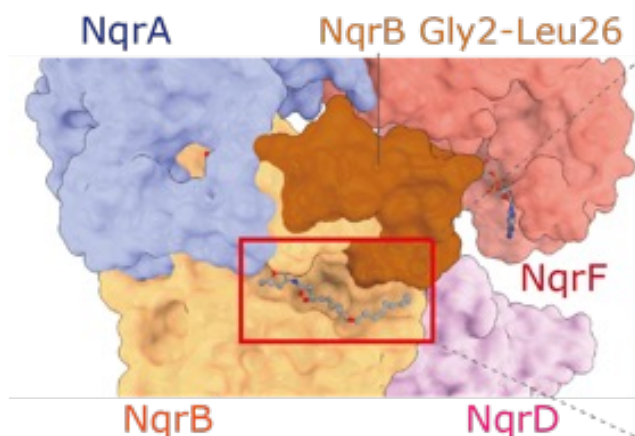
Kishikawa and Ishikawa et al. (2022) *Nat. Commun.* 13, 4082.

Na⁺-NQR阻害剤はNqrBサブユニットN末端に結合する

AD-42 bound structure

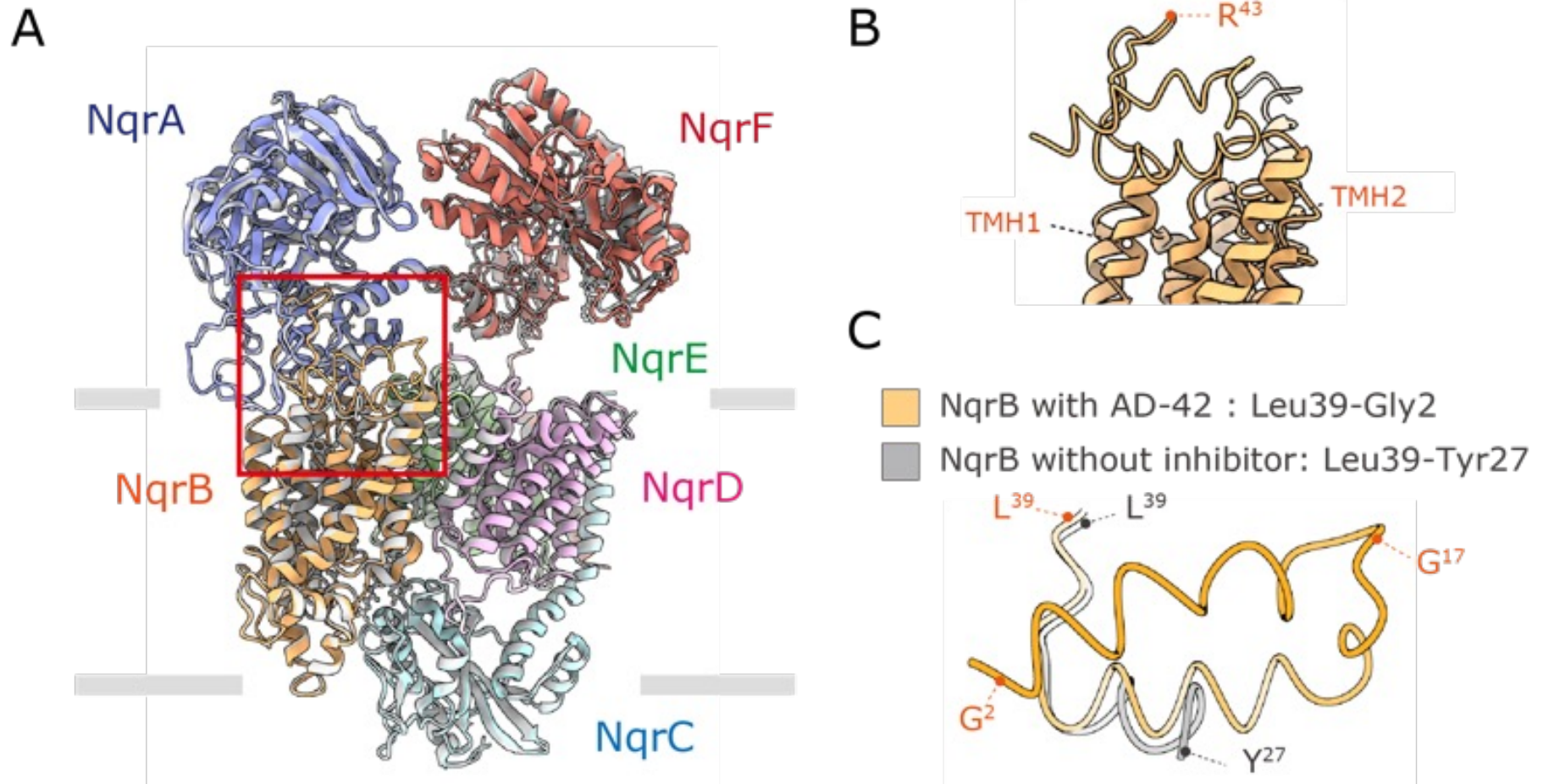


Korormicin bound structure



Kishikawa and Ishikawa et al. (2022) *Nat. Commun.* 13, 4082.

NqrBサブユニットのN末端は最もフレキシブルな領域である

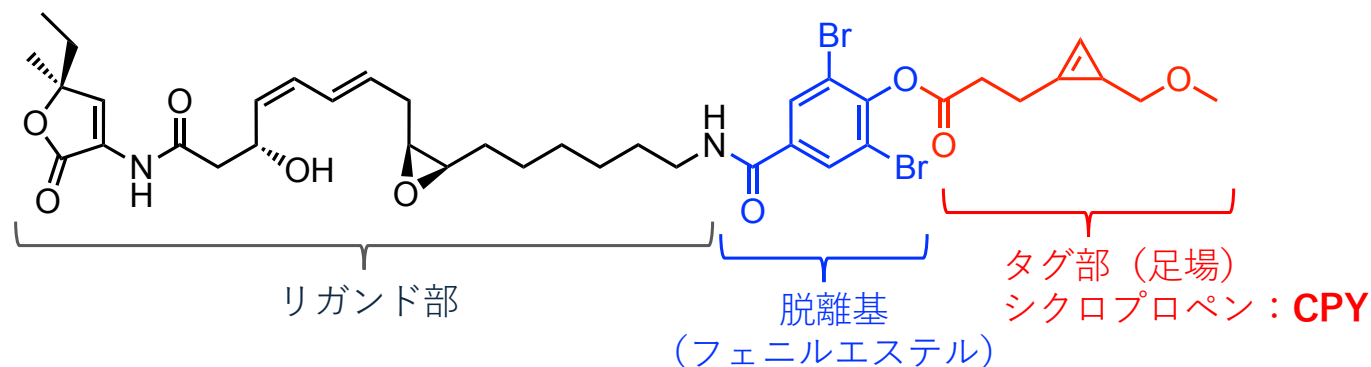


Kishikawa and Ishikawa et al. (2022) *Nat. Commun.* 13, 4082.

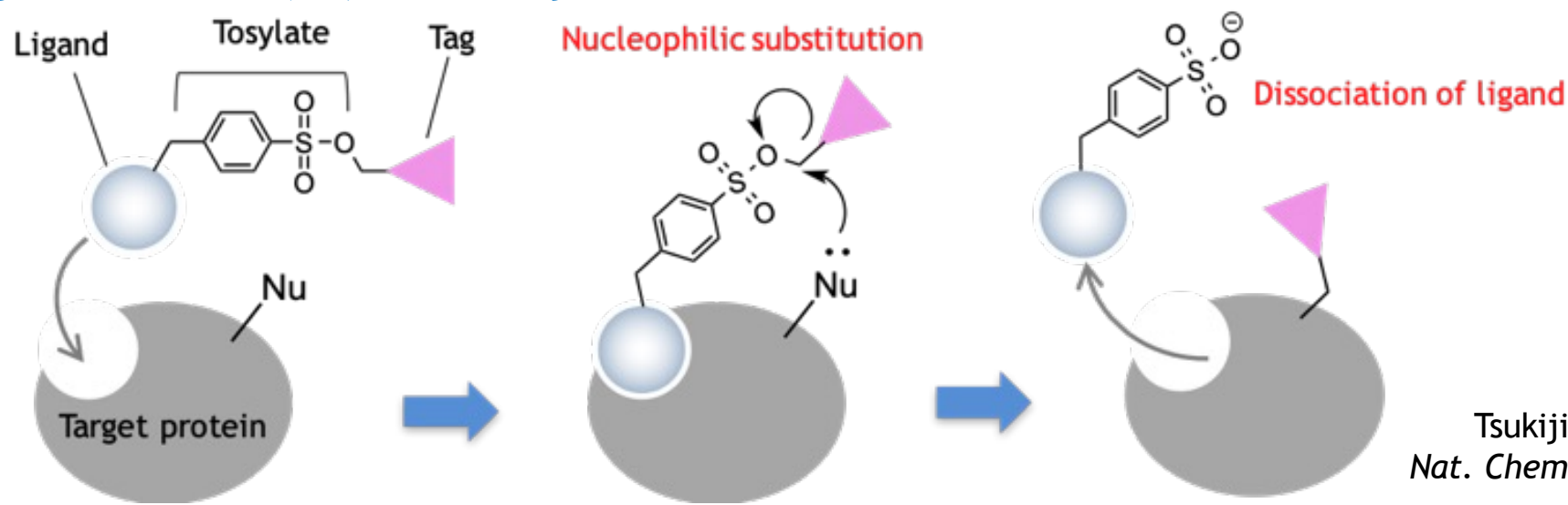
Na⁺-NQRのピンポイント化学修飾の概略

目標：NqrBサブユニットのN末端に、化学プローブを導入する足場を作りたい

■ コロルミシンリガンド (KBCp) の構造



Ligand directed (LD) chemistry



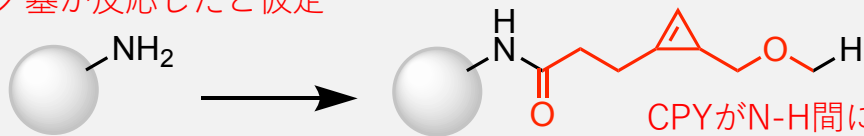
Tsukiji et al. (2009)
Nat. Chem. Biol. 5, 341-343.

Orbitrap Exploris240によるNqrBサブユニットの解析

- ✓ NqrBサブユニットは極端に疎水性の高い膜貫通型のタンパク質である
- ✓ MALDI-TOF MSによる解析での配列カバー率は10%以下 (Ishikawa et al. (2021) BBA)
- ✓ Trypsin消化だけでなく、chymotrypsin, あるいはLys-C/Asp-Nによる消化を実施

1. コレラ菌Na⁺-NQRを1~5等量のKBCpとインキュベート
2. SDS-PAGEでサブユニットを分離
3. NqrBサブユニットを切り出し
4. In gel 酵素消化
5. ナノLC-orbitrapによる消化物の解析
6. Lys, Hisに対してCPY修飾を探索 (Proteome Discoverer)

アミノ基が反応したと仮定



CPYによる増加分 (C₈H₁₂O₂, 138.07) をDynamic modificationとして設定

Proteome Discoverer によるデータ解析 (トリプシン)

■ トリプシン消化物, control, カバー率17%)

The screenshot displays the Proteome Discoverer software interface. The main window is titled "Protein Identification Details" and shows the following information:

- Protein:** Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit B OS=Vibrio cholerae serotype O1 (strain ATCC 39315 / 日 Tor Inaba N16961) OX=243277 GN=nqrB PE=1 SV=2
- Coverage:** 16.63%
- Found Modifications:** A list of modifications is shown, with the following sequence and modifications highlighted in green:

| Sequence | Modification List |
|---|-------------------|
| 1 MGLK K FLE D I EHHFEPGGKH EKWFALY E AA ATLFYTPGLV T KRSSHVR D S VDLKRIMIMV WLAVFPAMFW GMYNAGGQAI AALNHLYSGD QLAATVAGNW | |
| 101 HYWLTEMLGG TMSDAGWGS KMLLGATYFL PIYATVEIVG GFWEVLFMV RKHEVNEGFF VTSILFALIV PPTLPLWQAA LGITFGVVVA K EVFGGTGR N | |
| 201 F LNPALAGRA FLFFAYPAQI SGDLVWTAAD GYSGATALSQ WAQGGAGALI NNATCQTITW MDAFIGNIPG SICEVSTLAL MIGAAFIVYM GIASWRIIGG | |
| 301 VMIGMILLST LFNVIGSDTN AMFNMPWHWH LVLGGFAFGM FFMATDPVSA SFTNSGKWAY GILIGVMCVL IRVVNPAYPE GMLLAILFAN LFAPLFDHVV | |
| 401 VERNIKRRLA RYGMQ | |

The background shows a Windows desktop with icons for "ごみ箱", "FreeStyle", "Proteome Discoverer...", and "Xcalibur". A file explorer window is open, showing the path "PC > DATA (D:) > DATA > biofunction > fasta files".

Proteome Discoverer によるデータ解析 (キモトリプシン)

■ キモトリプシン消化物, control, カバー率50%)

Thermo Proteome Discoverer 2.5.0.400

File View Administration Tools Window Help

Start Page x Study: 230809 x Administration x 01 x 11 x 21 x 31 x 02 x 12 x 22 x 32 x

Proteins Protein Groups Peptide Groups PSMs MS/MS Spectrum Info Input Files Specialized Traces Study Information

| Check | Master | Accession | Description |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------|--------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KPS2 | Na(+)-translocating NA |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KRI2 | Uncharacterized protei |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KL62 | L-threonine 3-dehydro |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KQ16 | Flagellar hook-associat |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KMV4 | Multidrug resistance pr |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KP08 | DNA-directed RNA pol |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KQ14 | Tim44 domain-containi |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KP22 | Uncharacterized protei |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KT86 | Ion-translocating oxido |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | O31020 | Putative carboxypeptid |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KM15 | N-acetyltransferase do |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KSW2 | ATP-dependent Clp pro |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KLN7 | Autoinducer 2 sensor k |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KV37 | Elongation factor Tu-A |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KSC4 | Uncharacterized protei |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KSE2 | Histidine kinase OS=Vi |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KQG8 | Ribonuclease E OS=Vi |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KLN7 | Formate-tetrahydrofol |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KVQ0 | O-methyltransferase-re |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KUU3 | Twitching motility prote |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KRI6 | Magnesium transporter |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KS43 | Toxin TseL OS=Vibrio |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KNZ0 | 30S ribosomal protein |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KQN6 | Lipoprotein OS=Vibrio |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KKP6 | Methyl-accepting chem |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KS99 | Amino acid ABC transp |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KQH4 | Phosphate acyltransfer |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9KVN6 | Delta-aminolevulinic ac |

Protein Identification Details

Coverage ProteinCard

Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit B OS=Vibrio cholerae serotype O1 (strain ATCC 39315 / El Tor Inaba N16961) OX=243277 GN=nqrB PE=1 SV=2

Annotate PTMs reported in Uniprot
 Show only PTMs
 Include PSMs that are Filtered Out

Coverage: 49.16%

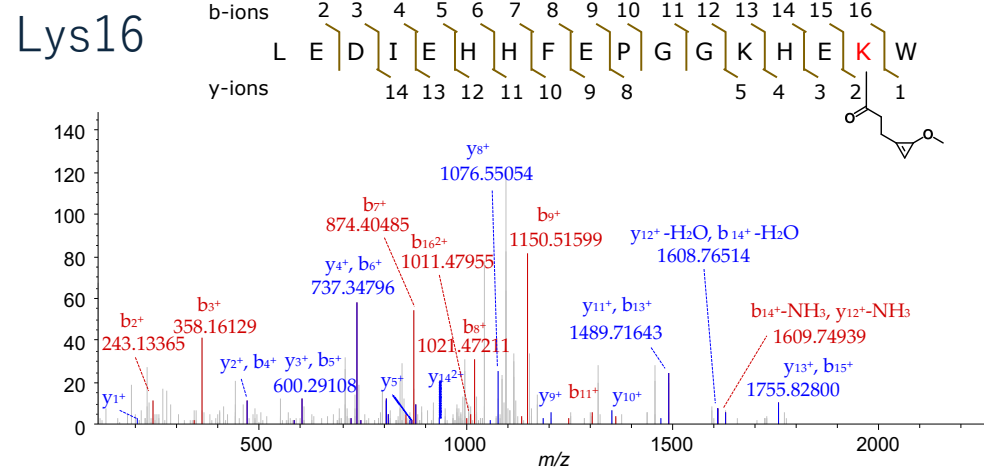
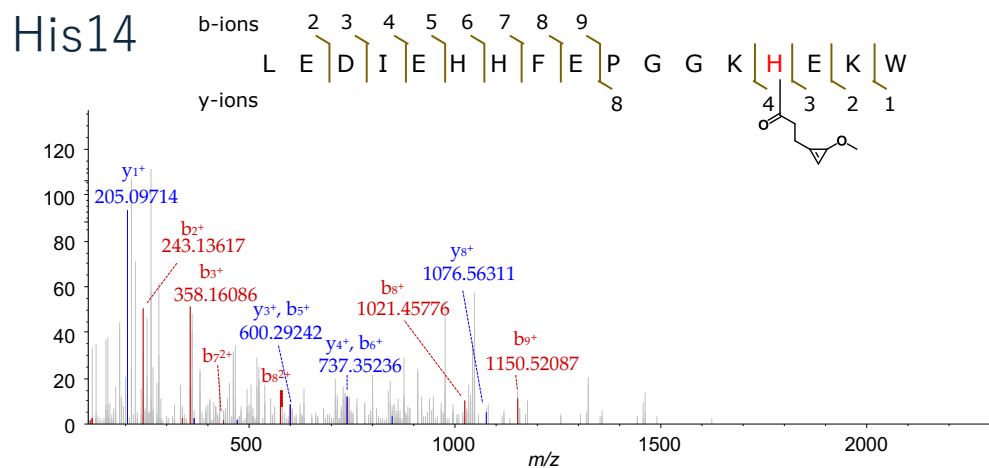
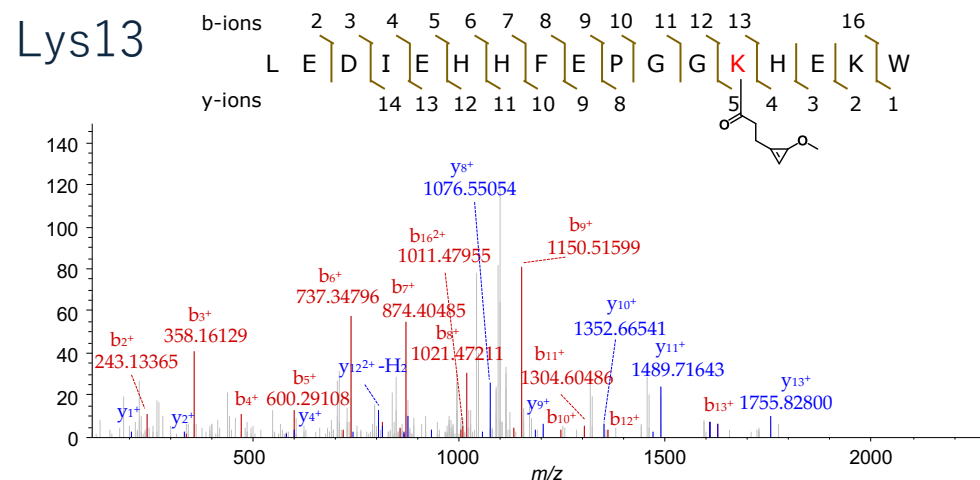
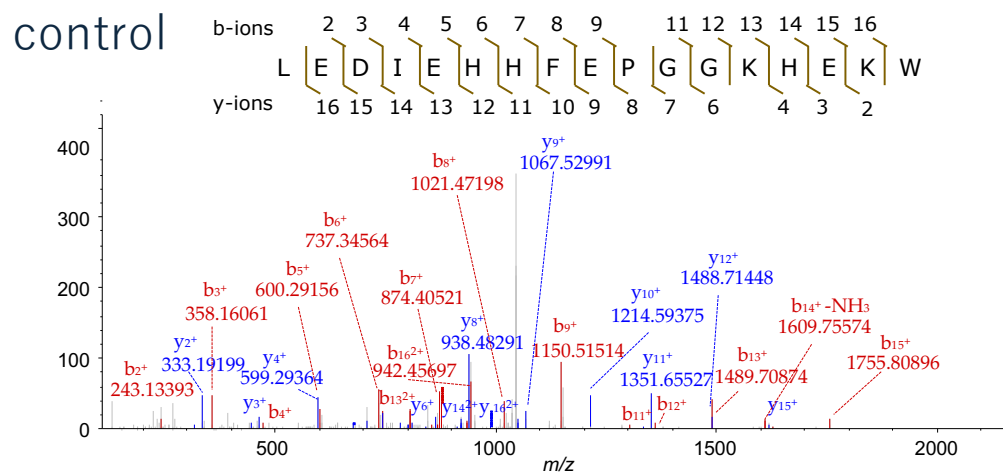
Found Modifications:

Oxidation (M)

Sequence Modification List

| Sequence | Modification List |
|----------|--|
| 1 | MGLKGFLEDI EHHFEPGCKH EKWFALYEA A TLFYTPGLV TKRSSHVRDS VDLKRRIMIV WLA VFPAMFW GMYNAGQAI AALNHLYSGD QLA AIVAGRW |
| 101 | HYWLTEMLGC TMSSDAGWGS KMLLGATYFL PIYATVFI VG GEWEVLECMV RKHEVNEGFF VTSILFALIV PPTLPLWQAA LGITFGVVVA KEVFGGTGRN |
| 201 | FLNPALAGRA FLFFAYPAQI SGLDVTAAAD GYSGATALSQ WAQGGAGALI NNATGQTITW MDAEIGNIPG SIGEVSTLAL MIGAAEIVYM GIASWRIIGG |
| 301 | VMIGMILLST LFNIVIGSDTN AMFNMPWHWH LVLGGEAFGM FEMATDPVSA SFTNSGKWAY GILIGVMCVL IRVVPAYPE GMLLAILFAN LFAPLFDHVV |
| 401 | VERNIKRRLL RYKQK |

Proteome Discoverer によるデータ解析



Orbitrap Exploris240によるタンパク質化学分析の特徴

1. MALDI-TOF MSと比べて圧倒的なカバー率の向上
 - ✓ Orbitrapの威力
 - ✓ ナノLCによるペプチド分離も効いている！
2. シーケンスカバー率の低い膜貫通タンパク質の同定・解析にも威力を発揮
 - ✓ 親水性タンパク質なら7割以上（NqrBのカバー率50%は驚異的）
 - ✓ Trypsin以外の消化酵素もトライすることが重要
 - ✓ Chymotrypsin, Lys-C, Asp-N消化物も解析可能
3. Proteome Discovererは、化学修飾されたペプチドも解析できる
 - ✓ 修飾ペプチドの構造を予測する必要あり（構造式を描いてみる！）
 - ✓ 解析はプログラムが行っている（有機化学系研究者は勘違いしがち！）
 - ✓ 生化学的裏付けも必要（上位のジャーナル掲載には…）

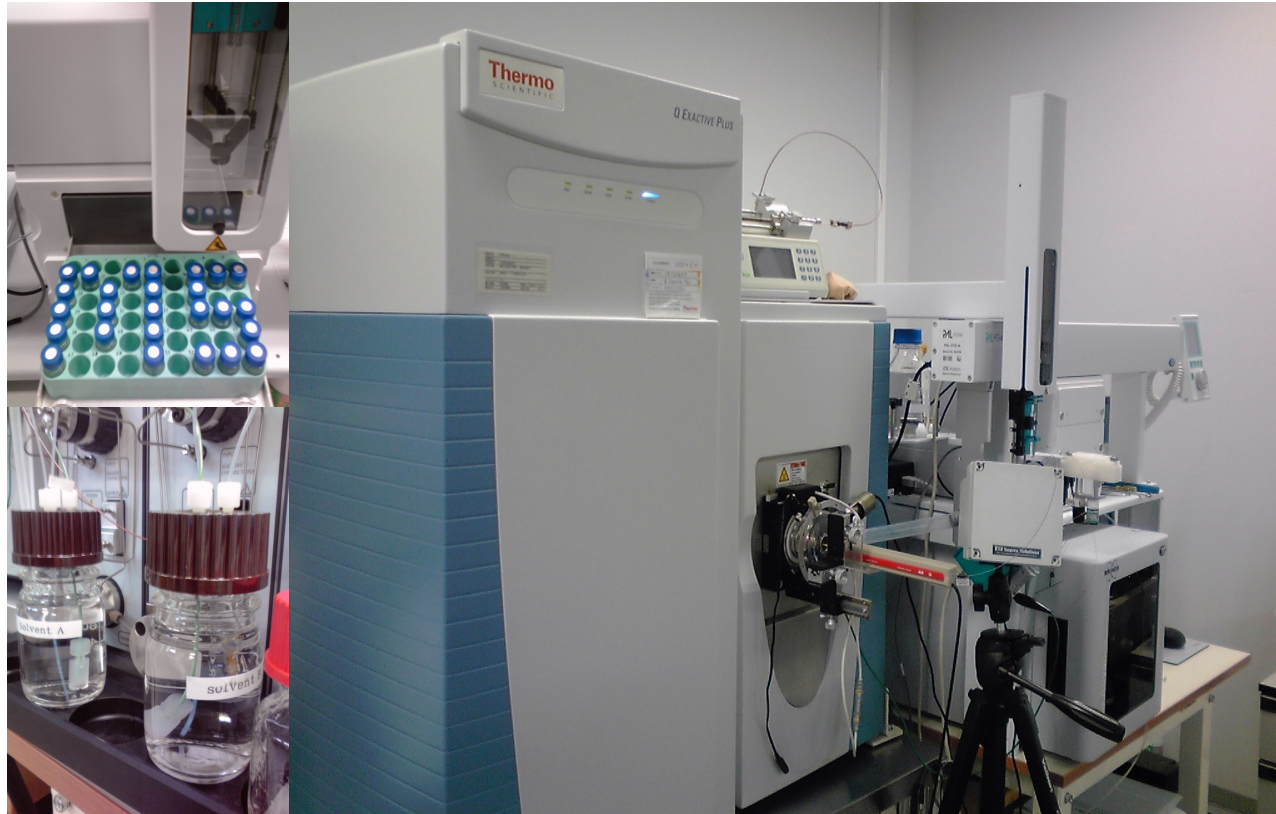
2024年2月29日

北部キャンパス機器分析拠点セミナーシリーズ(第7回)

4) タンパク質受託解析の概要

生命科学研究科 蛋白質解析室 渡邊祐三

生命科学研究科 蛋白質解析室



Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific社製、orbitrap搭載)
での事例を紹介します

今後はOrbitrap Exploris 240でも同様の解析が可能になります

例1

タンパク質Aの変異型と野生型で相互作用する因子の違いを調べたい

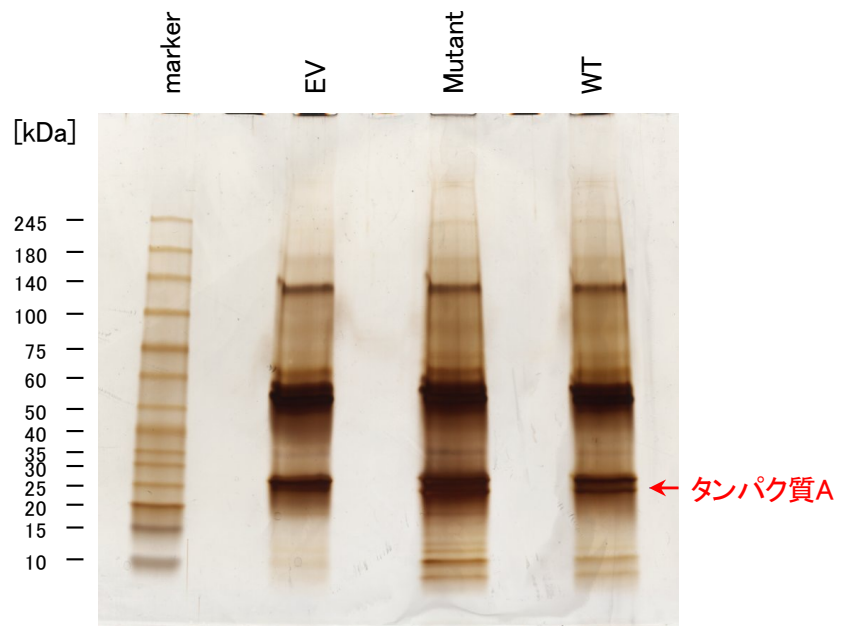
HEK293T細胞に

- Empty Vector (EV)
- A (Mutant)
- A (WT)

をそれぞれ過剰発現した細胞溶解液を用いて抗A抗体による共免疫沈降を行ったサンプル

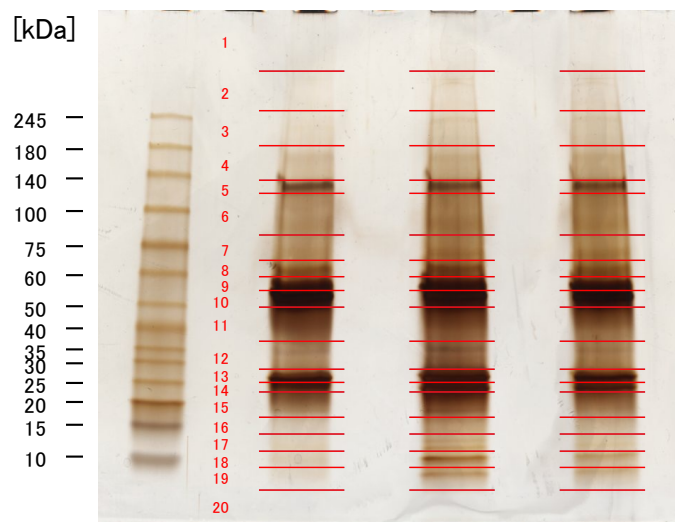
通常のSDS-PAGEに用いるLaemmliバッファー(サンプルバッファー)中に溶解した状態でサンプルをご準備いただければ、SDS-PAGE、ゲルの染色・切り出し、トリプシンによるゲル内消化等の
サンプル調製から測定・解析まで お受けいたします。

泳動結果を切り出し位置の候補とともにお返し

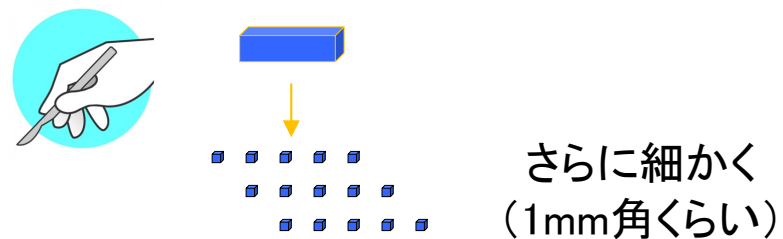


Silver staining
4-15% gradient gel

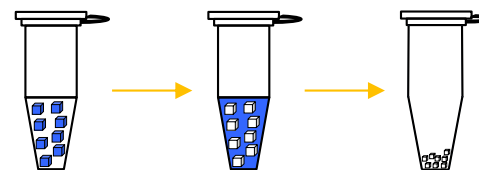
切り出し案



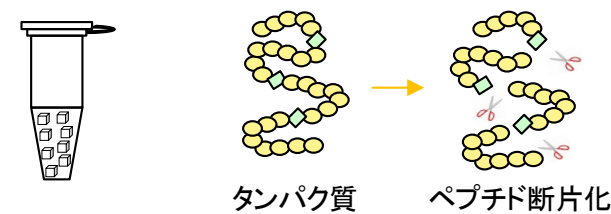
切り出し位置が決まればゲルの切り出し開始



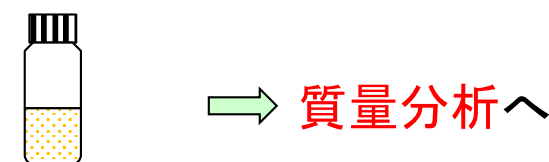
脱色・脱水・乾燥



トリプシン処理(ゲル内消化)



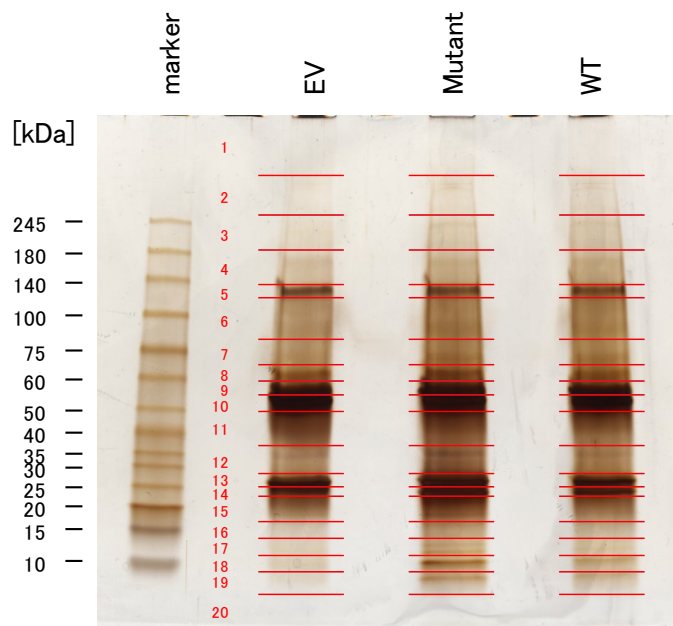
ペプチド抽出・濃縮



解析

蛋白質同定ソフト **Mascot Server** (Matrix Science社)を用いたデータベース検索により解析を行います。

※データベースが充実していない生物種の解析はできません。
FASTA形式のファイルをご準備いただければ、そちらをDBとして解析することは可能



| prot_acc | タンパク質名 | 分子量 | プロテインスコア | ペプチドヒット数 | ゲル番号 |
|----------|--------|--------|----------|----------|------|
| A00001 | A | 468788 | 6645 | 150 | 1 |
| B00002 | B | 532072 | 3980 | 80 | 1 |
| C00003 | C | 481589 | 2964 | 66 | 1 |
| D00004 | D | 573476 | 2436 | 52 | 1 |

| | | | | | |
|--------|---|--------|------|-----|---|
| B00002 | B | 532072 | 5474 | 129 | 2 |
| E00005 | E | 273254 | 3538 | 82 | 2 |
| F00006 | F | 244353 | 3115 | 69 | 2 |
| G00007 | G | 242829 | 2831 | 67 | 2 |

各レーンのゲル1~20で、それぞれでヒットしたタンパク質をMascot Server が算出した**プロテインスコア**とともにExcelファイルでリスト化

レーン内で重複しているタンパク質についてはスコアの高いもののみを抽出してまとめたものもお返しします。

例2

大腸菌で精製したタンパク質を同定したい



サンプルは

- ・サンプルバッファーに溶解した状態
 - ・CBB染色(銀染色)済みのゲルの状態
 - ・染色済みのバンドを切り出した状態
- いずれの状態でも受け入れ可能です。

例1と同様のサンプル調製・解析を実施いたします

※

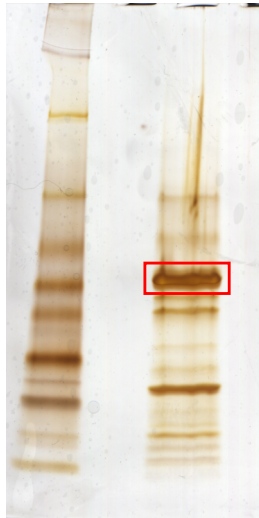
依頼者様でSDS-PAGEを実施する場合は、マーカーや別サンプルのレーンとは1レーン以上空けて泳動することをお勧めします。

※

銀染色はグルタルアルデヒドを使用しないMS用のプロトコールで実施してください。

例3

翻訳後修飾(例えばリン酸化部位)を調べたい



サンプルは

- ・サンプルバッファーに溶解した状態
- ・CBB染色(銀染色)済みのゲルの状態
- ・染色済みのバンドを切り出した状態

いずれの状態でも受け入れ可能です。

※

リン酸化ペプチドはイオン化されにくいので、タンパク量が必要です。
タンパク量が多くても必ずしも同定できるとは限りません。

※

トリプシン処理によって断片化されたペプチドが短すぎたり長すぎる場合は機器の測定レンジから外れてcoverageが十分でなくなる事があります。
解析可能かどうかはあらかじめアミノ酸配列を確認させていただくことになります。