

## COMMENTARY

## MSによるアミノ酸配列解析の最前線—微量化と自動化—

The Forefront of Amino Acid Sequencing by Mass Spectrometry  
—Scaling Down and Automation—山田 尚之\*  
Naoyuki YAMADA\*

(Received October 28, 1999; Accepted March 6, 2000)

Proteomics is an effective approach for understanding of biology with the global change in protein expression as visualized by two-dimensional gel electrophoresis and characterized by mass spectrometry. For proteomics to be widely adopted, a robust technology must be established that allows the large-scale discovery research needed for an exhaustive approach to protein science. And a drastic increase in the rapidity and sensitivity of protein identification is needed for proteome analysis. In this paper, I summarize methodology of rapid and micro amino acid sequencing and recent trends toward automation in instrumentation and software for protein identification by mass spectrometry.

## 1. はじめに

1980年代初頭、FABイオン化法の登場により、タンパク質、ペプチドなどの生体高分子が質量分析法の測定対象となってきた。しかし、感度、質量範囲の限界、オペレーションの煩雑さから広く一般的な解析法にはならなかった。これに対し、歴史の古いエドマン分解法は、全自動解析装置の普及により、世界中の多くの研究室で活躍し、科学の進歩に貢献し続けている。ところが、エレクトロスプレーイオン化法(ESI法)やマトリックス支援レーザーイオン化法(MALDI法)といったソフトなイオン化法の登場と、三連四重極型、イオントラップ型、飛行時間型(TOF)質量分析計といった比較的小型で操作の容易な質量分析計が市販されるようになり、質量分析法もまた、タンパク質、ペプチドの構造解析法として、生化学・薬学・医学の分野で猛烈なスピードで普及しつつある。この分野での質量分析法の普及には、もう一つ大きな要因がある。生物のDNAの塩基配列をすべて解読して、データベース化するというゲノムプロジェクトの著しい発展がそれである。サンプルの純度が高ければ、確実にアミノ酸配列を提示することができるエドマン分解法に対し、質量分析法は、これまでCIDスペクトルからだけで、確実にアミノ酸配列を提示することはできなかった。しかし、遺伝子の塩基配列(すなわち、タンパク質のアミノ酸配列)のデータベースが充実することにより、質量分析法で得られるスペクトル情報からデータベース中のタンパク質(あるいは遺

伝子)に到達することができるようになった。このことにより、質量分析法は、微量タンパク質の同定方法として一躍有力な手法となった。さらに、プロテオーム解析という言葉ができたことと、nanoESIMSをはじめとする超高感度化法が登場し、2次元ゲル電気泳動で分離・検出したスポットから直接タンパク質を同定できるようになったことから、質量分析法はポストゲノム解析の主要な技術として注目されるようになった<sup>1)</sup>。

プロテオーム解析において質量分析法に要求されることは、1)スピード、2)高感度、3)自動化、4)翻訳後修飾情報、変異部位情報の取得、の4点である。プロテオーム解析という戦略の登場により、2次元電気泳動で分離し、銀染色で検出されるタンパク質が研究の対象となり、分析対象タンパク質の数が膨大となりかつ微量であることから、測定のスピードアップと高感度化と自動化が望まれている。また、単にタンパク質の同定にとどまらず、翻訳後修飾、変異部位に関する情報を得ることが質量分析法に課せられた大きな役割である。これらの要件が実現可能となることにより、質量分析法はプロテオーム解析の分野で本領を発揮することができる。

本稿では、プロテオーム解析の分野において、質量分析法に期待されるスピード、微量化、自動化について主に解説したい。もちろん、これらの技術はプロテオーム解析、タンパク質・ペプチド構造解析だけではなく、他の分野でも応用可能な重要な基盤技術である。

## 2. ペプチドのアミノ酸配列解析法

## 2.1 MS/MS法によるアミノ酸配列解析

ペプチドのアミノ酸配列を確実に決めるためには、気相法のエドマン分解によるプロテインシーケンサーを用い

\* 味の素(株)中央研究所 (☎210-8681 川崎市川崎区鈴木町1-1)

Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc. (1-1 Suzuki-cho, Kawasaki 210-8681, Japan)

るのが最も良い。一方、未知試料の配列を完全に決めるためには、まだまだハードルは高いが、MS/MS法でも、部分配列情報を得ることができる。マスマスペクトルとCIDスペクトルとデータベース検索を組み合わせることにより、既知タンパク質であれば（塩基配列またはアミノ酸配列がデータベースに登録されていれば）、短時間で容易にタンパク質の同定が可能である。MS/MSの方法は、衝突エネルギーの差によって、高エネルギー衝突 (high-energy collision) と低エネルギー衝突 (low-energy collision) の二つに分けることができる。同じペプチドを測定しても、衝突エネルギーの違いにより、得られるスペクトルは異なる。High-energy collision が測定できる4セクター型質量分析計（磁場型MS/MS装置）の場合、イオンを数keVに加速するため、衝突エネルギーが高く、中性ガスとの衝突により変換される内部エネルギーは大きくなる。したがって、活性化エネルギーの大きな結合も、開裂を受ける確率が高くなり、多くのフラグメント情報が得られる。特に、ペプチドの場合は、主鎖の開裂だけでなく、側鎖の開裂も観測されることから、残基の質量が同じであるLeuとIleの区別も可能である。一方、low-energy collisionのCIDスペクトルの測定ができる三連四重極質量分析計の場合には、イオンを数10eVに加速するため、衝突エネルギーが低く、得られるフラグメント情報は比較的少ない。ペプチドの場合には、主鎖の開裂が主に観測されるため、スペクトルが単純になり解析はしやすい。データベース検索が主流となった今では、既知の可能性のあるペプチドの場合、low-energy collisionで得られるスペクトルで解析は十分である。しかし、データベース検索で該当しなかった未知試料の場合の配列解析においては、より情報量の多いhigh-energy collisionの方が適している。また、low-energy collisionの場合では、酵素消化の際、 $H_2^{18}O$ を添加することにより、yシリーズのイオンを区別することができ、配列解析が容易になる<sup>2)</sup>。これらの手法を用いて、*de novo sequence*を導き出す研究も重要である。その理由は、必ずしも全生物種の塩基配列解析が進められているわけではなく、また、解析されていてもそのデータベースが公開されていないことがあるからである。このような場合、*de novo sequencing*によって解析したアミノ酸配列をもとに、cDNAのクローニングや異種の塩基配列データベースに対するホモロジー検索を行うことが可能となる。

## 2.2 ペプチドラダーシーケンスによる配列解析

比較的短いペプチドの場合には、カルボキシペプチダーゼYによる部分消化物のマスマスペクトルから、シーケンスを読むことができる。酵素量と反応時間を変えて、適当な条件で消化することにより、いくつかのアミノ酸残基がC末端側から欠損したペプチドの混合物となる。この混合物の質量差からC末端側からの配列を読むことが可能である<sup>3)</sup>。

## 2.3 ISD スペクトルによるタンパク質の部分アミノ酸配列解析

MALDI法では、In-source decay (ISD)によりタンパク質のフラグメンテーションが観測される。cシリーズが特異的に観測され、酵素消化をしないでタンパク質のまま部分アミノ酸配列情報を得ることができる点で優れた手法である。試料が高純度でかつ量が必要であることが課題であるが、スピード、自動化の面で今後の発展が期待される<sup>4)</sup>。

## 3. タンパク質同定の微量化、自動化、高速化

質量分析法を用いたタンパク質同定の道筋をFig. 1に示した。いくつかのルートが考えられるが、研究の目的、保有している装置に合わせて、最適な方法を選択することになる。

イオン化法の種類により、微量化、自動化、高速化に対する得手不得手がある。定性的ではあるがこれをTable 1にまとめた。研究の目的やステージの違いにより、微量化、自動化、高速化に対するウエイトが異なってくるため、それぞれ重要視する項目を明確にして、システムを選択、構築することが大切である。例えば、2次元電気泳動で検出した多くのスポットをできるだけ速く、どのようなタンパク質であるかを同定したいのであれば、酵素消化物のMALDI-TOFMSを測定し、複数のペプチド断片の質量と酵素の特異性を用いてデータベース検索をする方法を選択するのが良い。また、試料の純度が低い場合、MALDI-TOFMSの結果で未知タンパク質であった場合や翻訳後修飾、変異部位の情報を詳細に解析したい場合であれば、LC/ESIMSを選択する方が良い。また、質量分析法によるタンパク質の構造解析の微量化・自動化を考える際には、質量分析法だけでなく、サンプルの前処理とインターフェイスの微量化、自動化、高速化を考えることが重要である。さらに、データベース検索アルゴリズムの高速化、高精度化も非常に重要なファクターである。

### 3.1 微量化

3.1.1 質量分析法の高感度化 MALDI-TOFMSとnanoESの登場で、fmol-amolの超微量のペプチドでMSスペクトルが測定可能となった。究極的には、1分子のイオンを検出することが望まれるが、現在のところは、電気泳動やクロマトグラフィーによるタンパク質の検出感度、ハンドリングロスの低減、コンタミネーションの防止、効率の良いサンプル導入などといった、質量分析計に至る前の段階に大きな課題がある。

3.1.2 NanoES 現在、Protana社とNew Objective社より、nanoESイオン源が販売されている。また、質量分析計メーカー各社でも、自社オリジナルのnanoESを販売している。これらのイオン源を用いると、数 $\mu$ Lのペプチド混合物を60分程度と長時間イオン化することができ、多数のペプチドのCIDスペクトルを測定することができる。

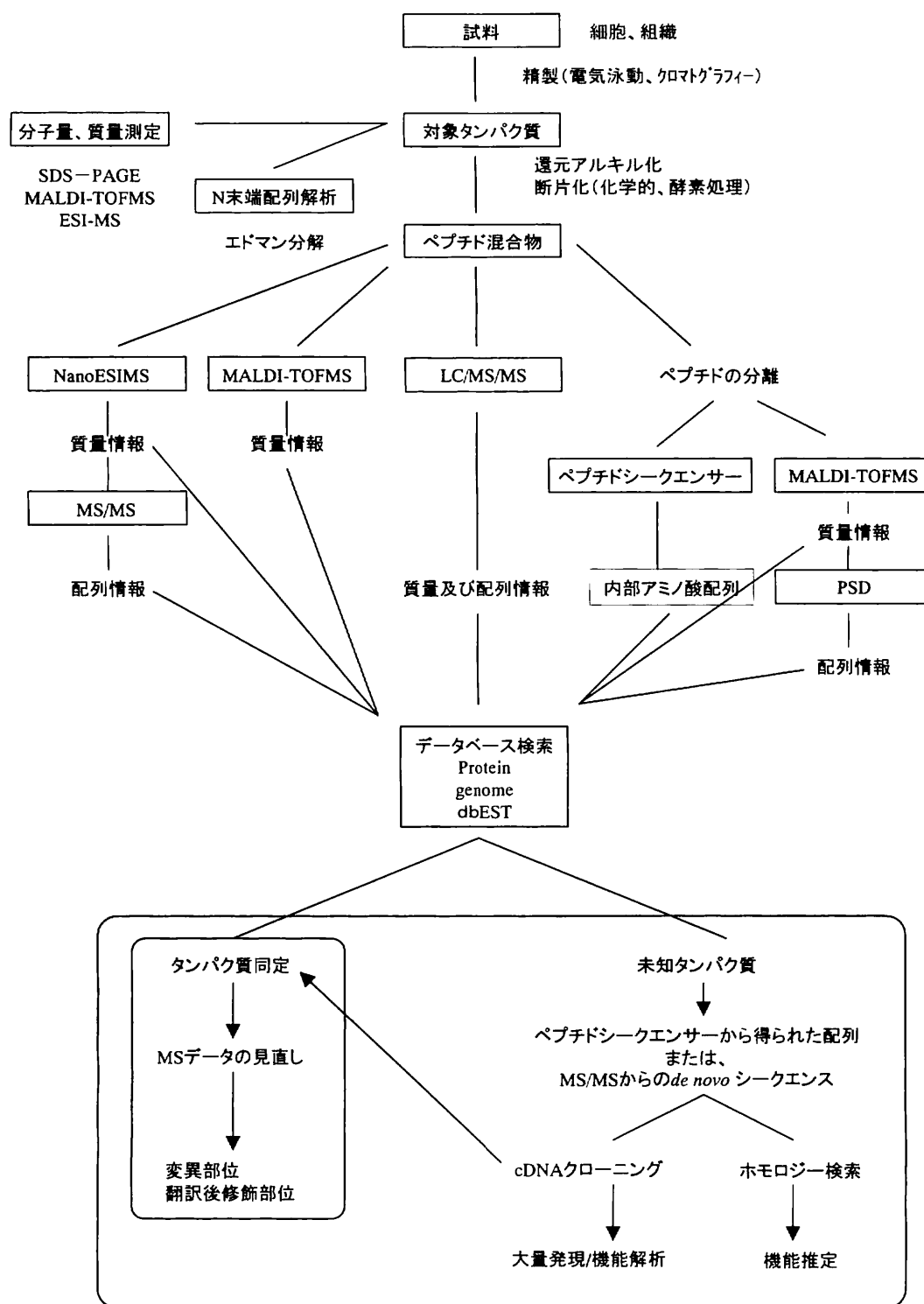


Fig. 1. Strategy of protein identification using mass spectrometry.

Table 1. Rapidity and Sensitivity of MALDI, NanoES, and LC/ESI

	MALDI			NanoES		LC/ESI	
	MS	MS/MS	LC/MS	MS	MS/MS	MS	MS/MS
Automation	○	△	△	×	×	◎	○
Scaling down	◎	◎	○	◎	◎	○	○
Rapidity	◎	△	△	△	×	△	△

Table 2. A Summary of Specification of LC/MS/MS

	Microbore-LC	Capillary-LC	Nano-LC
Column (i.d.)	1-0.8 mm	0.30 mm	50-75 $\mu\text{m}$
Flow rate	30 $\mu\text{L}/\text{min}$	3 $\mu\text{L}/\text{min}$	200-300 nL/min
UV cell vol.	35 nL	35 nL	3 nL
Injection vol.	10-20 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
Interface i.d.	50 $\mu\text{m}$	50-25 $\mu\text{m}$	25 $\mu\text{m}$
Sample amount	—	1-50 pmol	0.1-100 fmol

3.1.3 ペプチド分離法のダウンサイジング MALDI法や nanoES 法の場合、タンパク質の酵素消化物をそのまま測定することが多く、質量分析計の感度がフルに発揮できる。一方、LC/ESIMS の場合、LC のダウンサイジングが質量分析計の感度を活かすための重要なファクターである。LC/ESIMS の利点として、サンプルの濃縮・脱塩ができること、ペプチドを分離して CID スペクトルを測定できること、自動化が可能なが挙げられる。LC のダウンサイジングは、コンベンショナルなカラム (4.6 mm $\phi$ ) から、semi-micro column (2.1 mm $\phi$ ) $\rightarrow$ micro column (1~0.8 mm $\phi$ ) $\rightarrow$ capillary column (0.3 mm $\phi$ ) $\rightarrow$ nano column (75~50  $\mu\text{m}\phi$ ) へと進化してきた。一般的な ESIMS と最も相性が良く使い勝手が良いのは、capillary column である。Table 2 に我々の LC/ESIMS/MS のシステムについてまとめた。

HPLC よりもさらに高感度な分析法であるキャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis: CE) と ESIMS の組み合わせは、サンプル注入量の制限や CE の再現性に課題が残されるが、高感度解析法として有力である。さらに集積回路の技術を応用した microchip CE<sup>9)</sup> と MS を組み合わせれば、次世代の超高感度質量分析法になりうるかもしれない。

### 3.2 自動化

3.2.1 MALDI 法の場合 最新機種 MALDI-TOFMS の自動測定機能は、かなり完成度が高くなっている。364 個 $\times$ 10 のサンプルをのせられるターゲットにロボットでサンプルとマトリックスをのせ、自動ですべてのスポットについて、測定とレポート作成をすることができる。1 サンプル当たり、10 秒程度で測定を終了するため、ハイスループットの測定システムを構築することが可能である。

質量分析計に MALDI-TOFMS を用いて、プロテオーム解析の自動化を行う場合、いくつかの方法が考えられる。一つは、電気泳動のゲルを切り出し、ゲル内で酵素消化し (in-gel digestion)、抽出したペプチド断片混合物溶液を ZipTip (日本ミリポア(株)製) で濃縮・脱塩し、マトリックスを含む有機溶媒で溶出し、直接ターゲットにのせる方法である。もう一つは、2 次元電気泳動のゲルを PVDF 膜またはニトロセルロース膜に転写後、染色し、スポットを切り出す。次に膜上で酵素消化 (on-membrane digestion) を行い、そのまま MALDI-TOFMS を測定する方法である。今一つは、in-gel digestion したペプチド混合物を micro-LC で分離し、PVDF 膜に溶離液を分画し、これを測定する方法である。HPLC での分離を行なうことによ

り、純度が低い場合でも測定することが可能である。いずれの方法も、自動化が可能である<sup>6),7)</sup>。

3.2.2 ESI 法の場合 ESI 法の場合、LC や CE との相性が良いことを利用することで、自動化がなされている。NanoES のように低流量でもイオン化できるイオン源が市販されるようになり、質量分析計は、fmol から amol のサンプル量で検出できるようになってきた。Dee らは、逆相担体を詰めた自作の nanoES を用いて、50~500 fmol レベルで LC/MS/MS を行っている<sup>8)</sup>。これに対して、市販の HPLC の方も、Table 2 に示したように microprobe (1 mm $\phi$ )、capillary (300  $\mu\text{m}\phi$ )、nano-LC (50~75  $\mu\text{m}\phi$ ) とダウンサイジングがなされていて、MS との接続が可能である。自動化を考えたときには、イオン化の安定性とイオン源の耐久性が重要視される。通常 nanoES のイオン源は、低流量でも安定にイオン化することが可能であるが、耐久性に乏しい。我々は、サーモクエスト社のステンレス製のイオン源を装着したイオントラップ型質量分析計 LCQ と nano-LC の組み合わせを開発した。このシステムは、sub-fmol の試料で S/N 比良く測定でき、nanoES や MALDI-TOF に見劣りしない感度が得られる。さらに、安定性や耐久性の面で優れており、自動化に十分対応できる超微量 LC/ESI/MS/MS である。Fig. 2 にリゾチームのキモトリプシン消化物のマスクロマトグラムを示した<sup>9)</sup>。

LC/MS の最大の欠点は、測定時間の長いことである。Non-porus な逆相担体は、シリカベースの担体に比べて背圧がかかりにくいので、流量を上げることができる。したがって、non-porus な担体を用いた LC/MS は測定時間を大幅に短縮することができる<sup>10)</sup>。しかし、注意しなくてはならない点は、シリカベースの RP-HPLC と比べて分離能と保持能力が劣ることと、流量が多い分、結果としてイオン化するときの試料濃度が低くなってしまふことである。

感度、LC の分離能、時間、耐久性のファクターを考慮して、目的に合った最適のシステムを構築することになる。報告されている LC/MS/MS のシステムを Table 3 にまとめた<sup>11)</sup>。いずれの手法も感度、スピード、耐久性のすべてを満足したものではない。

### 3.3 試料調製の自動化

タンパク質を酵素消化する方法には以下の三つの方法がある。

- In-gel digestion
- On-membrane digestion
- On-line digestion

In-gel digestion は最も広く使われている方法である。

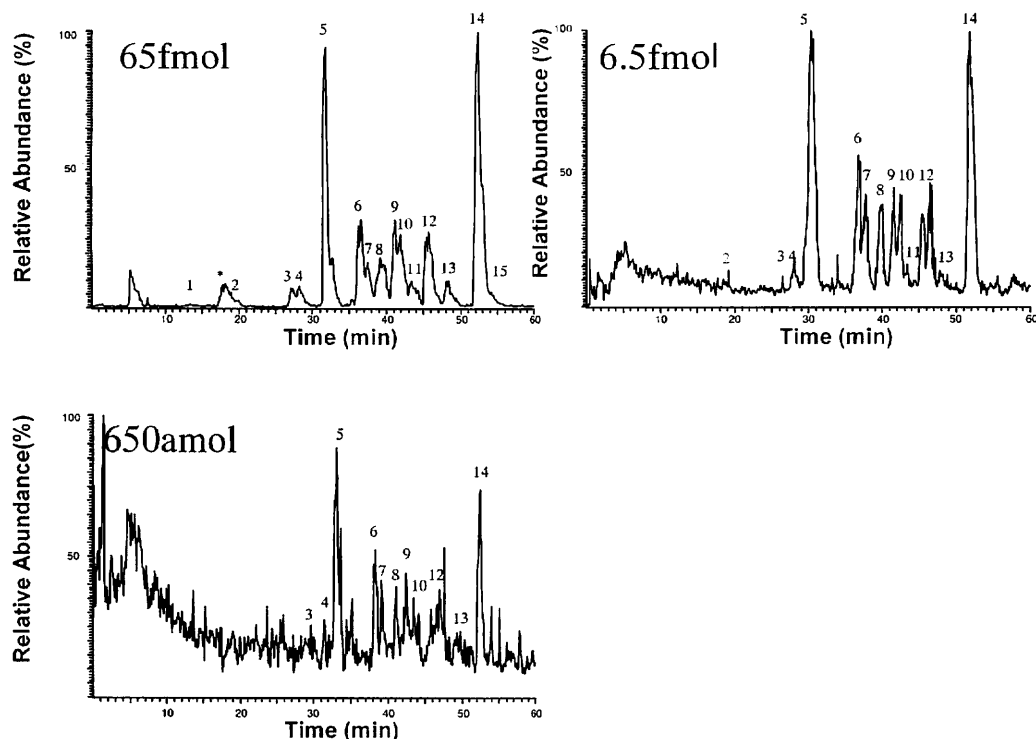


Fig. 2. Basepeak mass chromatograms of chymotryptic digests of carboxy-methylated lysozyme by nano-MS/MS.

Table 3. Automation of Capillary-LC/MS/MS

Rum time	Sensitivity	Column size	Flow rate	Durability	Database search	Reference
10 min	50–500 fmol	75 $\mu\text{m}$ i.d.	1.3–1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$	40 h	MS-Fit, SEQUEST	8
32 min	0.65–6.5 pmol	0.5 $\mu\text{m}$ i.d.	15 $\mu\text{L}/\text{min}$	⊙	SEQUEST	14
5–10 samples/day	>500 fmol	75 $\mu\text{m}$ i.d.	0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$	○	Pep Frag	11
80 min	0.65–65 fmol	50–75 $\mu\text{m}$ i.d.	0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$	⊙	SEQUEST	9

ゲル電気泳動で分離したバンドあるいはスポットを切り出し、ゲルのまま酵素消化を行う方法で、バンドの検出からスポットの認識と画像処理、ゲルの切り出し、酵素消化をロボット化する試みがなされている<sup>12)</sup>。一方、on-membrane digestion 法は、PVDF 膜やニトロセルロース膜に電氣的に転写 (エレクトロブロットング) した後に、酵素溶液を用いて断片化する。エレクトロブロットングの工程が増えるが、膜上での扱いの方が、ハンドリングが容易で、保存しやすいことから全自動化には in-gel digestion よりも適している可能性がある。

トリプシンなどの酵素をパーフェュージョンクロマト担体に固定化したカラムと RP-HPLC, ESI/MS/MS をタンデムにつないだ on-line digestion 法は、比較的簡単なシステムで全自動の LC/ESI/MS/MS が可能である。固定化トリプシンを使っているため、トリプシンの自己消化物のコンタミネーションがほとんどないことも利点である。ただし、LC を二つ結合しているために 1 回の測定が 2 時間程度と長くなってしまうのが欠点である<sup>13)</sup>。

現在、最も一般的なプロテオーム解析の手法は、①サンプル調製、②2次元電気泳動、③染色、④画像処理、⑤スポットの切り出し、⑥酵素消化および抽出、⑦MALDI ターゲットへのスポットティング、⑧MALDI-TOFMS 測

定、⑨データベースサーチ、⑩レポート出力、からなる。現在、この中の複数の工程を自動化した装置が、市販されている。例えば、ゲルスポットの切り出しロボットや、酵素消化ロボット、MALDI ターゲットへのサンプルスポットティング・ロボットなどがそれである。また、すべての工程を自動化したロボットの作製が試みられている<sup>11)</sup>。

### 3.4 データベース検索の自動化

Yates らが開発したデータベース検索アルゴリズム SEQUEST は、CID スペクトルをもとに、塩基配列およびアミノ酸配列のデータベースから検索するものである<sup>14)</sup>。LC/MS/MS の測定データでも、すべてのスペクトルについて自動的にデータベース検索を行い、レポートすることができる。彼らは、微量のオートサンプラーと 0.5 mm $\phi$  × 150 mm の HPLC と ESIMS (TSQ7000; Finnigan) をオンラインでつないで、データベース解析までの自動化を行っている。必要サンプル量は、2~50 pmol 程度で、測定時間は 1 試料 32 分である。プロテオーム解析では、多種類のサンプルを解析し、膨大なデータが蓄積される。それらのデータ (試料の由来、2次元電気泳動のデータベース、同定結果や MS スペクトル、CID スペクトル) を蓄積し、統合し、活用するシステムの構築が重要である。

## 4. おわりに

質量分析法の微量化は、MALDI-TOFMS, nanoESIMSにより、ある程度満足できる域に達したと思われる。自動化についてもいろいろなグループ、メーカーがしのぎを削っており、近い将来、全自動の解析装置が誕生し、プロテオーム解析の有力な武器となるであろう。

次世代のプロテオーム解析とは、タンパク質-タンパク質相互作用、DNA-タンパク質相互作用の解析やシグナル伝達のパスウェイを代表とする生命活動の機構をタンパク質レベルで解明し、その相互作用マップをデータベース化することだと考える。サンプル前処理からタンパク質同定まで、トータルで微量化・自動化・高速化することは相互作用マップの作成に不可欠な要素である。さらに、タンパク質の質的な変化を観測する手法が開発され、タンパク質の翻訳後修飾（例えばリン酸化）の経時変化を追跡できるようになることを期待する。これにより、シグナル伝達などのメカニズム、パスウェイのタンパク質レベルでの解析が可能となるであろう。

一方、タンパク質-タンパク質、DNA-タンパク質相互作用解析に質量分析を応用する試みにもいくつかのアプローチがある。MALDI法のターゲットにタンパク質を固定化し、細胞破碎液などのサンプルからターゲットタンパク質に親和性のあるものをターゲット上にトラップし、それを直接MALDI-TOFMSで測定するAffinity capture MALDI-TOFMSという手法である<sup>15)</sup>。これはDNA chipに対抗しprotein chipとも呼ばれている。また、表面プラズモン共鳴を用いて相互作用を検出、定量するBIA (Bimolecular Interaction Analysis) とMALDI-TOFMSの組み合わせは、定量的な相互作用解析とタンパク質同定ができる有力な手法である<sup>16)</sup>。いずれも複数のタンパク質複合体のまま、同定ができるというMSの優位性を発揮した手法である。しかし、これらの手法では、タンパク質の質量はわかるが、シーケンス情報までを得ることはまだまだ困難である。また、結合の弱い相互作用を検出することも困難である。これらの点が解決されることにより、次世代のプロテオーム解析の主要な技術となりうると考えら

れる。

なお、本解説記事は、第26回BMSコンファレンスの要旨に若干の修正を加えたものである。

## 文 献

- 1) M. Wilm, A. Shevchenko, T. Houthaeve, S. Breit, L. Schweigerer, T. Fotsis, and M. Mann, *Nature*, **379**, 466 (1996); M. Quadroni and P. James, *Electrophoresis*, **20**, 664 (1999).
- 2) W. Mo, T. Takao, and Y. Shimonishi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 1829 (1997).
- 3) D.H. Patterson, G.E. Tarr, F.E. Regnier, and S.A. Martin, *Anal. Chem.*, **67**(21), 3971 (1995).
- 4) J.J. Lennon and K.A. Walsh, *Protein Sci.*, **6**(11), 2446 (1997); V. Katta, D. Chow, and M. Rohde, *Anal. Chem.*, **70**, 4410 (1998).
- 5) C.L. Colyer, M. Shakuntala, and H. Jed, *J. Chromatogr. A*, **781**, 271 (1997).
- 6) T. Stevenson, J. Loo, and K. Greis, *Anal. Biochem.*, **262**, 99 (1998).
- 7) M. Traini, A. Gooley, K. Ou, M. Wilkins, L. Tonella, J. Sanchez, D.F. Hochstrasser, and K.L. Williams, *Electrophoresis*, **19**, 1941 (1998).
- 8) M.T. Davis and T.D. Lee, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **9**, 194 (1998).
- 9) 山田尚之, 湯地玲子, 柏木立己, 田上宇乃, 平山和雄, 1997年度日本質量分析総合討論会要旨集, pp. 230-231.
- 10) Y. Chen *et al.*, *Anal. Biochem.*, **12**, 1994 (1998).
- 11) J. Qin, D. Fenyo, Y. Zhao, W. Hall, D.M. Chao, C.J. Wilson, R.A. Young, and B. Chait, *Anal. Chem.*, **69**(19), 3995 (1997).
- 12) W.P. Blackstock, 西村俊秀, 藤田芳司, 蛋白質・核酸・酵素, **43**, 2214 (1998).
- 13) J. Lippincot, E. Hess, and I. Apostol, *Anal. Biochem.*, **252**, 314 (1997).
- 14) A. Ducret, I. Van Oostveen, J.K. Eng, J.R. Yates, and R. Aebersold, *Protein Sci.*, **7**, 706 (1998).
- 15) T.W. Hutchens and Y. Tai-Tung, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 576 (1993); D.I. Papac, J. Hoyes, and K.B. Tomer, *Anal. Chem.*, **66**, 2609 (1994); H. Brockman and R. Orlando, *ibid.*, **67**, 4581 (1995).
- 16) C. Sonksen, E. Nordhoff, O. Jansson, M. Malmqvist, and P. Roepstorff, *Anal. Chem.*, **70**, 2731 (1998).

**Keywords:** Protein identification, MALDI-TOFMS, Nano-ESIMS, LC/MS/MS, Automation, Data base research, Proteomics