

《forum in FORUM》

飛行時間型質量分析装置 autoflex III の紹介

大学院理工学研究科生命科学部門 小竹 敬久
科学分析支援センター 新美 智久

1. まえがき

一昨年 10 月, 科学分析支援センターに Bruker 社の飛行時間型質量分析装置, autoflex III が導入された(図1). この装置は本学で策定している教育・研究設備整備計画(設備マスタープラン)に則って, 概算要求により整備した大型分析機器である. 本稿では, 生物系試料を分析する場合の実際の手順や操作について紹介したい.



図 1 設置された autoflex III

2. MALDI-TOF/MS とは

最初に飛行時間型質量分析法(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight/Mass Spectrometry, MALDI-TOF/MS)について簡単に説明する. MALDI とはマトリックスと呼ばれる低分子化合物と混合してレーザー光を照射することで試料をイオン化する方法で, TOF/MS は, 試料の飛行時間による質量分析を指す. つまり, MALDI-TOF/MS では, レーザー光でイオン化した試料を真空管内で飛行させ(大きな分子ほど遅く飛行する), 検出部への到達時間から質量を測定する. この方法の特徴は高分子化合物でもイオン化することで精度良く質量分析できる点である. 本学に設置された autoflex III は at mol オーダーの検出感度を売りにしており, 一昔前の質量分析計とは比較にならないほど感度, 精度が高い. MALDI-TOF/MS の基本的な作業は, 試料の塗布, レーザー照射・マス測定, データの回収, とシンプルである. autoflex III は制御ソフトの操作性が良く, 多試料解析でも威力を発揮する.

3. 試料の準備, 分析操作

生物系研究者がこの装置に期待する分析の一つは, タンパク質の同定であると思う. 本稿ではタンパク質試料の分析について説明する. MALDI-TOF/MS によりタンパク質を同定する場合, 目的タンパク質をクロマトグラフィーまたは SDS-PAGE などで精製した上で, 特異的なタンパク質分解酵素(トリプシン, プロテイナーゼ V8 など)で消化してペプチド断片化しておく必要がある. 断片化した試料は乾固により濃縮し, 分析直前に少量の水(1~2 μ l 程度)に溶解する. 試料は, マトリックス溶液と混合した後, 直ちにターゲットプレートにスポットする. この後は, マニュアルに従って, 断片化したペプチドのマス測定するだけである. 図2のようなマスチャートが簡単に得られる. なお, ターゲットプレートに塗布した試料は繰り返し分析ができる. MASCOT というプログラムを利用することで, 得られたマスデータから, 相当するタンパク質の検索(タンパク質の同定)を行うことも可能である.

ペプチド試料を準備するにあたっては, 以下の点に注意していただきたい. autoflex III は非常に高感度であり, SDS-PAGE 後のゲルから切り出した微量のタンパク質でも試料とすることができるが, その場合, 未重合のアクリルアミドが試料にコンタミしやすい. 既成品ゲル(Bio-Rad 社レディーゲルなど)の使用や, SDS-PAGE のプレラン

(試料泳動前に通電しておく)をお勧めする。また、試料に含まれる塩は分析感度を著しく低下させるため、断片化したペプチドは、C18系樹脂などを用いて脱塩しておくことが望ましい。

科学分析支援センターは依頼分析を受け付けている。試しに測定したい、多数の試料を自動分析にかけたい(予めご相談頂きたい)、といった場合には、依頼分析をご利用頂きたい。依頼分析の手順は以下の通りである。

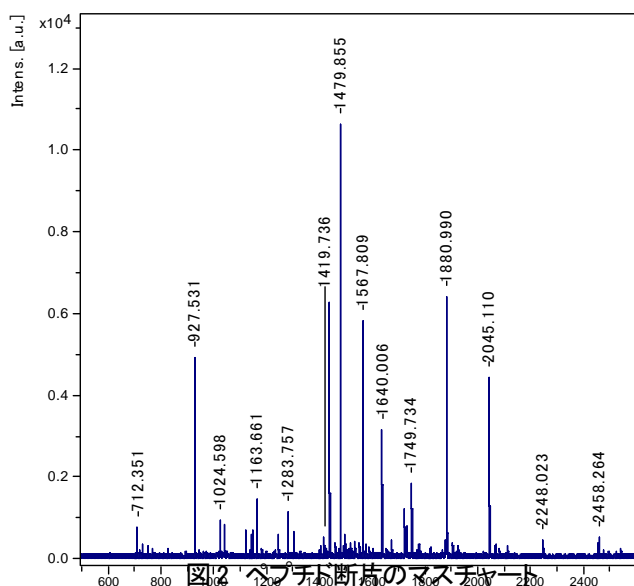


図2 ペプチド断片のマスパターン
ウシ血清アルブミンのトリプシン消化物を試料とした。未知タンパク質を試料とする場合は、ペプチド断片のマスパターンからタンパク質を同定できる。

4. 依頼分析の手順

1. 科学分析支援センターホームページから「生命科学分析分野」→「ダウンロード」とクリックして「MALDI/TOF-MS (autoflex)測定依頼書」をダウンロードする。
 2. 必要事項を記入してセンター事務室(3階)に提出する。
 3. 分析支援センターの分析担当者との日程を調整し、測定日にサンプルを持ち込む。
- * 分析について相談したいため、分析時には依頼者の立ち会いをお願いしている。

試料について

測定分子量	分子量 500 以上(1000 以上推奨) 分子量 1000 以下の場合は JMS-700 の使用をお勧めしている。
測定濃度	10 pmol/μL ~ 100 pmol/μL 程度 濃すぎると装置が汚れる原因となる。
溶媒	水または揮発性の高い有機溶媒(THF,エタノール等) グリセロール,PEG,DMSO 等が混じると測定できないことが多い。
マトリックス	科学分析支援センターで用意しているマトリックス CCA ペプチド用 Sinapic Acid タンパク質用 Dithranol 有機化合物用 DHB 糖用 これら以外のマトリックスを希望する場合はご相談いただきたい。
その他	タンパク質の同定を目的とした分析では、予め試料をトリプシン等で消化しておく必要がある。