

〔原 著〕

## プロテオーム解析におけるリン酸化タンパク質の高感度分析法に関する基礎的検討とミエリン塩基性タンパク質への応用

秋山翹一<sup>1</sup>・島田信子<sup>2</sup>・木村成道<sup>3</sup>・戸田年総<sup>1</sup>

### SUMMARY

Protein phosphorylation is one of the most significant post-translational modifications that regulate protein functions. In most researches on protein phosphorylation, autoradiography of <sup>32</sup>P-labeled proteins and/or western blotting with specific antibodies has been generally employed. In this paper, we assessed the effectiveness of affinity purification of phosphorylated proteins and phosphorylated peptides prior to mass spectrometric analysis. We primarily confirmed that MALDI-TOF-MS is actually effective in assignment of phosphorylation sites on phosphoseryl/phosphothreonyl authentic peptides and tryptic peptides derived from natural casein, whereas this technique is not efficient for phosphotyrosyl peptides. We subsequently optimized the procedure of immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) for enhancement of MALDI-TOF-MS signals in PSD of phosphorylated peptides. We further assessed the effectiveness of affinity concentration of phosphorylated proteins performed prior to electrophoretic separation using a commercially available kit. The optimization of these methods allowed us to assign a novel phosphorylated site on myelin basic protein (MBP) isolated from rat spinal cord.

Key words: MALDI-TOF-MS, post-source decay, neutral loss, Immobilized metal ion affinity chromatography, myelin basic protein.

### はじめに

タンパク質のリン酸化は、細胞内シグナル伝達系、癌化、アポトーシス、免疫応答、代謝調節など、様々な生物学的過程において最も重要な翻訳後修飾の一つである。プロテオミクスによるタンパク質リン酸化の研究は、二次元電気泳動後のゲルを Pro-Q Diamond 蛍光色素などで特異的に染色し、細胞内タンパク質のリン酸化動態を総合的に解析するという、いわゆる網羅的なアプローチと、特定のタンパク質に絞り込んでリン酸化の有無やリン酸化部位の特定を行うという掘り下げ的なアプローチの両面で行われる。しかし蛍光染色法や、ウェスタンブロット法では、リン酸

化の存在は確認されても、どの位置のアミノ酸残基にリン酸化が起きているかを知ることはできない、これに対し PSD (post-source decay) モードによる MALDI-TOF-MS 質量分析や、CID (collision-induced dissociation) モードによる MALDI-Q-TOF-MS/MS, MALDI-QIT-MS/MS, ESI-Q-TOF-MS/MS などの多段階質量分析は、リン酸化の有無のみならずリン酸化部位の特定にも有効であり、とりわけ PSD モードの MALDI-TOF-MS 質量分析は最も簡便で、解析が容易であることから、今後広く利用されるようになるものと考えられている。しかしながらその一方で、生体内のリン酸化タンパク質は極めて微量であり、しかもリン酸化ペプチドは MS でのイオン化効率が低いという問題があ

Proteomic analysis of phosphoproteins and its application to myelin basic proteins.

<sup>1</sup> Kyoichi Akiyama, 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

<sup>2</sup> Nobuko Shimada; 東京都老人総合研究所 老化ゲノム機能解析研究チーム

<sup>3</sup> Narimichi Kimura; 高崎健康福祉大学・薬学部

Correspondence address: Tosifusa Toda; Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan.

略号一覧; PSD, Post-source decay; MALDI-TOF, Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; MS, Mass spectrometry; OVA, Ovalbumin; IMAC, Immobilized metal ion affinity chromatography; MBP, Myelin basic protein; CFR, Curved field reflectron; BSA, Bovine serum albumin; CHCA,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid; DTT, Dithiothreitol.

(受付 2005 年 3 月 29 日, 受理 2005 年 6 月 6 日, 刊行 2005 年 9 月 15 日)

り、実際の生体サンプル中のリン酸化タンパク質を高感度でプロテオーム解析することは現実的には難しいとされている。この問題を解決するために、これまでに様々な分析方法の改良<sup>1~4)</sup>や新技術の開発<sup>5~7)</sup>が報告されているが、実際に PSD モードによる MALDI-TOF-MS を実施して生体サンプル中のリン酸化タンパク質が分析できたという報告例は少ない。そこで我々は、電気泳動に掛ける前のリン酸化タンパク質の段階と、ゲル内消化を行った後のリン酸化ペプチドの段階で2回濃縮を行い PSD モードによる MALDI-TOF-MS のシグナルを最大限に増強することができれば、生体サンプル中の微量のリン酸化タンパク質も高感度で分析できるようになるはずであると考える、実際のサンプルでそれを確認するために本研究を行った。

まず最初に、そもそも一般に言われているように PSD モードによる MALDI-TOF-MS はセリン、トレオニン、チロシンの全てのリン酸化に適用が可能な方法であるか、複数の残基で多重にリン酸化されたペプチドの場合、どのようなシグナルが得られるのか、あたためて調べ直すことにした。次に、トリプシン消化後のリン酸化ペプチドを固定化金属キレートアフィニティークロマトグラフィー法(以後 IMAC 法)で濃縮することによって、PSD モードの MALDI-TOF-MS におけるシグナル強度を増強させることができるか否か、Casein  $\alpha$ 、Casein  $\beta$  および Ovalbumin(以後 OVA) のトリプシン消化物をサンプルとして検討した。さらに、電気泳動に掛ける前にサンプル中のリン酸化タンパク質を濃縮しておくことが、その後の MS 分析における検出感度の向上にどの程度有効であるか、実際にラットの脊髄のタンパク質を用いて調べた。ただし、ここで私たちは、IMAC 法によるリン酸化ペプチドやタンパク質の特異的精製では、アフィニティ担体のわずかな条件の違いによって結果が大きく左右されることをすでに確認していたので、多くの研究者が容易に実施できる方法を確立するためには、品質が安定している市販のキットを用いる方法をベースに最適化を行うのがベストであると考えて本研究を行った。その結果、生体試料中のリン酸化タンパク質を高感度分析するためには、まずタンパク質の段階でリン酸化タンパク質特異的な吸着濃縮キットを用いて濃縮し、さらにトリプシン消化後にリン酸化ペプチドとしての IMAC 法を実施するという二段階の濃縮が有効であることを確認した。この結果を踏まえ、我々が最適化したプロトコルに従ってラット脊髄由来のミエリン塩基性タンパク質(MBP)のプロテオーム解析を行い、これまでに報告のなかった新しい部位にリン酸化を見いだしたので報告する。

## 材料および方法

### (1) 装置

蛍光染色ゲルの画像の取り込み、および画像解析には、

Bio-Rad の Molecular Imager FX および PDQuest System を用いた。質量分析には、島津製作所の AXIMA-CFR を用いた。

### (2) ミエリンおよびミエリン塩基性タンパク質の調製

ミエリンは、ラットの脊髄を出発材料とし、Norton らの方法<sup>8)</sup>に従い、シヨ糖密度勾配遠心法によって調製した。ミエリン塩基性タンパク質の可溶化は、通常一般に用いられている塩酸抽出法に加え、QIAGEN 社の培養細胞用 PhosphoProtein Purification Kit に添付された Lysis Buffer を用いて行った。

### (3) リン酸化標準ペプチドおよびリン酸化標準タンパク質

セリンリン酸化標準ペプチドとしては Sigma 社の TP-1P (FQpSEEQQQTEDELQDK)<sup>9)</sup>T1-2(4P) (RELEELNVPGEIV EpSLpSpSpSEESITR)<sup>9)</sup>、P (Ser<sup>392</sup>)-p53 (KTEGPDpSE) を、トレオニンリン酸化標準ペプチドとしては ASI 社の P-24514 (RRREEEpTEEEAA-OH) を、チロシンリン酸化標準ペプチドとしては CBC 社の Src Peptide 521-533 (TSTEPQ pYQPGENL)<sup>10)</sup> を用いた。またリン酸化標準タンパク質としては Sigma 社の Casein  $\alpha$ 、Casein  $\beta$ 、OVA を、コントロールの非リン酸化タンパク質には BSA (Sigma) を用いた。

### (4) リン酸化タンパク質の電気泳動とスポットの同定

リン酸化タンパク質の電気泳動は、7.5%T SDS-PAGE ゲルを、ラットミエリンタンパク質の電気泳動には、15%T SDS-PAGE ゲルを用いて行った。全タンパク質の染色には、SYPRO Ruby (Genomic Solutions) を、リン酸化タンパク質の検出には Pro-Q Diamond (Molecular Probes) を用いた。

### (5) リン酸化ペプチドの濃縮

リン酸化ペプチドの濃縮は Pierce 社の Phosphopeptide Isolation Kit を用いて行った。トリプシン消化後のリン酸化タンパク質溶液を SpeedVac で濃縮し、0.5 ~ 5  $\mu$ g/ml となるように 5.0% 酢酸に再溶解し、キットの Mini-spin column に注入した。基本的な操作はマニュアルに従ったが、Matrix solution についてはマニュアルでは  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (以後 CHCA) を 3% 蟻酸、50% アセトニトリルに溶解して使用するところを、我々はアセトン可溶性画分を除いた CHCA を終濃度が 10 mg/ml となるように 50% アセトニトリル、40% メタノールに溶解して使用した。

### (6) リン酸化タンパク質の濃縮

リン酸化タンパク質の濃縮は、QIAGEN 社の培養細胞用 PhosphoProtein Purification Kit を用いて行った。基本的な操作はメーカーのマニュアルに従ったが、一部改変したので我々が実際に行った方法を以下に述べる。まず最初にリン

酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質の混合溶液を、あらかじめ10%のCHAPSを含むLysis Bufferで平衡化しておいたPD-10カラム(Sigma社製)に通し、脱塩とバッファー置換を行った。タンパク濃度が高い時は、上記バッファーで希釈してタンパク濃度を0.1 mg/mlに調整し、PhosphoProtein Purification Kitの濃縮カラムに添加して、リン酸化タンパク質を吸着させた。このカラムに6 mlのLysis Bufferを流して非リン酸化タンパク質を除いた後、0.25%のCHAPSを含むPhosphoProtein Elution Buffer 500  $\mu$ lを数回に分けて流し、リン酸化タンパク質を溶出した。タンパク質のピーク画分を集めてNanoSep 限外ろ過カラムに添加し、10,000 $\times$ gで10分間遠心し、50  $\mu$ l程度まで濃縮した。非吸着画分も同様に濃縮した。なお、尿素等の変性剤を含むバッファーを用いて組織などから抽出されたリン酸化タンパク質は、そのままではカラムへの吸着性が低く、またこれをキットのLysis Bufferにバッファー置換するとタンパク質が不溶化することがあるので注意を要する。

#### (7) リン酸化タンパク質のin-gel消化とリン酸化ペプチドのMS分析

SDS-PAGEを行った後、ゲルからタンパク質のバンドを切り出し、ホームページ([http://proteome.tmg.or.jp/2D/J\\_2DEmethod.html](http://proteome.tmg.or.jp/2D/J_2DEmethod.html))で公開している戸田らの方法に従って、トリプシンによるin-gel消化を行った。以下に操作手順を簡単に述べる。(1)還元処理液(1.5 mg/ml DTT, 100 mM 重炭酸アンモニウム)中で30分インキュベート、(2)アルキル化処理液(10 mg/ml ヨードアセトアミド, 100 mM 重炭酸アンモニウム)中で30分インキュベート、(3)脱色液A(50% メタノール, 50 mM 重炭酸アンモニウム)中で15分間 $\times$ 2回インキュベート、(4)脱色液B(50% アセトニトリル, 50 mM 重炭酸アンモニウム)中で10分間 $\times$ 3回インキュベート、(5)10%アセトニトリル中で5分間インキュベート、(6)液を除いてゲルを風乾する。(7)これに、トリプシン消化液(5  $\mu$ g/ml トリプシン, 30% アセトニトリル, 50 mM 重炭酸アンモニウム)30~50  $\mu$ l加え、30 $^{\circ}$ Cで一夜インキュベートした。MS分析用のサンプルプレート(MALDIターゲットプレート)には、この消化液1  $\mu$ lをマトリックス溶液(10 mg/ml CHCA, 50% アセトニトリル, 40% メタノール)1  $\mu$ lと混合して塗布した。なお一般には、ゲル中消化後のペプチドを1% 蟻酸や50% アセトニトリル, 0.1% TFAなどで抽出するという方法が行われているが、我々はトリプシン消化液のアセトニトリル濃度を30%とすることで、インキュベーション中に80%以上の消化ペプチドがゲル外に溶出されることを確認しており、抽出操作は必要ないと考えている。

PMF法によるタンパク質の同定およびPSD法によるリン酸化ペプチドの分析には、島津製作所のMALDI-TOF型

質量分析計(AXIMA-CFR)を用いた。またデータベースの検索にはExPASy ServerのMS-Fit検索エンジンを利用した。

#### 結果および考察

##### (1) PSDモードのMALDI-TOF-MSによるリン酸化ペプチドの解析

近年のプロテオーム研究では、リン酸化ペプチドの解析に質量分析が利用されている。特にPSDモードによるMALDI-TOF-MSでは、イオン化されたペプチドのうちリン酸化が疑われる質量を持つもの(データベース上の質量より80 Daの整数倍大きい質量をもつもの)だけをイオンゲートで選択的に通した場合、質量分析計内を飛行している間に、熱力学的に不安定なリン酸化構造部分が $\beta$ 脱離(cis-elimination)を起こし、質量の減少が起こる現象(ニュートラルロス)が観察されるとされている<sup>11-14</sup>。

我々は、この現象がすべてのリン酸化で同じように発生するものか疑問を抱き、実際に標準ペプチドを用いて分析した結果、セリンリン酸化ペプチドTP-1P(Sigma)<sup>9</sup>、P(Ser<sup>392</sup>)-p53(Sigma)、トレオニンリン酸化ペプチドP-24514(ASI)ではいずれも98 Daのニュートラルロスが観察された(図1A, B)。これに対しチロシンリン酸化ペプチドSrc Peptide 521-533(CBC)<sup>10</sup>では、イオン化の際のレーザー光のエネルギーをさらに上げて行ってもニュートラルロスは観察されず、チロシンのリン酸化は見逃す可能性があることがわかった(図1C)。

また、1分子中に4箇所のセリンがリン酸化された標準ペプチドT1-2(4P)(Sigma:分子量3122.29)では、リン酸基が1つ外れた3025.08, 2つ外れた2928.76, 3つ外れた2831.21, 4つとも外れた2734.37のピークが検出された(図2)。このとき、リン酸基が2つ外れたペプチドイオンでは、さらに-HPO<sub>3</sub>が外れて80 Da減少したイオンが観察されており、多重リン酸化ペプチドでは、リン酸基が外れるにつれて98 Daのニュートラルロスに比し80 Daのニュートラルロスが増加する傾向がみられた。

##### (2) リン酸化ペプチドの濃縮

既に述べたようにリン酸化ペプチドの検出感度は低く、通常のペプチドの1/5以下である。そこで我々は、金属(特に3価の鉄, ガリウム)にリン酸化ペプチドが強く結合する性質を利用したIMAC法<sup>9, 12, 15</sup>)を用いることによって、MSにおけるリン酸化ペプチドの検出感度を上げられるのか検討した。クロマト担体としては、His-Tag組換え体タンパク質の濃縮に使用されるIDA agarose<sup>9</sup>)を用いた。

Pierce社のIMAC法では、非特異的な吸着を防ぐ為に、洗浄液に10-30%のアセトニトリルあるいは0.01% Tween 20などの非イオン性界面活性剤を加えることが必須であると

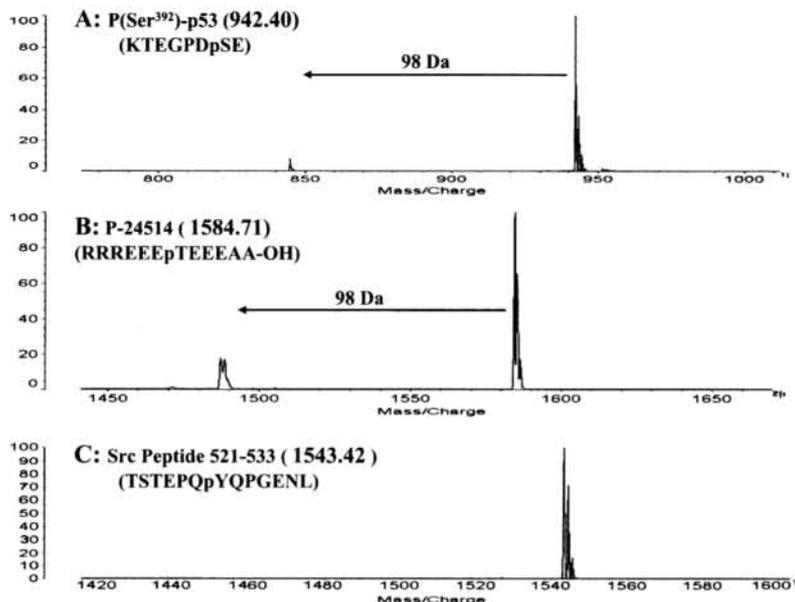


Fig. 1. Neutral loss analysis of phosphoserine (A), phosphothreonine (B) and phosphotyrosine (C) peptides by PSD mode of MALDI-TOF-MS. Neutral loss of 98 Da was observed from phosphoserine and phosphothreonine peptides.

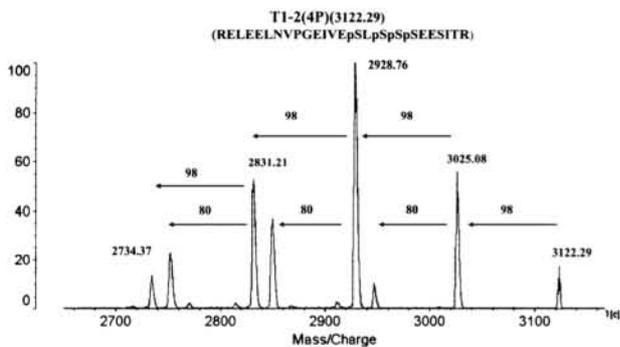


Fig. 2. Neutral loss analysis of tetraphosphorylated peptide T1-2(4P).

されている。標準の一リン酸化ペプチド TP-1P, および四リン酸化ペプチド T1-2 (4P) を用いて, 溶出溶液を 0.1 M から 0.8 M 重炭酸アンモニウムまで (pH は 9.0 から 10.0 まで), アセトニトリル濃度は 10% から 20% まで変えて溶出を試みたが, 溶出効果に違いが見られなかったため, 以後の実験では 0.1 M 重炭酸アンモニウム (pH 9.0), 10% アセトニトリルを用いることにした。リン酸化タンパク質 Casein  $\alpha$ , Casein  $\beta$  をトリプシン消化後に IMAC を行ない, 先のサンプルと吸着溶出後のペプチドの MS と PSD を行った結果を図 3 および図 4 に示す。Casein  $\beta$  のトリプシン消化物中の 2061.8 Da ペプチドイオンでは 98 Da のニュートラルロスが (図 3C), Casein  $\alpha$  の 1952.3 Da と 1660.9 Da では, 98 Da と 80 Da のニュートラルロスが観察された (図 4C)。

Casein  $\beta$  の消化ペプチドで観察されたニュートラルロ

スは, 同じアミノ酸配列のリン酸化標準ペプチド TP-1P (Sigma) のそれと一致した。また, リン酸化標準ペプチドを用いた分析では, セリン, トレオニンのニュートラルロスは主に 98 Da であったが, casein  $\alpha$  では, 80 Da のニュートラルロスも観察された。四リン酸化ペプチド T1-2 (4P) (Sigma) の結果 (図 2) と合わせて考えると, リン酸化ペプチドのニュートラルロスは, ペプチドの長さや周囲のアミノ酸の影響を強くうけているものと思われる。

### (3) リン酸化タンパク質の濃縮

一般にリン酸化タンパク質は, 非リン酸化タンパク質に比べて微量であることが多く, 発現量の低いリン酸化タンパク質を電気泳動後に同定し, さらにどのアミノ酸がリン酸化を受けているのかということ MS で分析するためには, 検出感度を上げるために何らかの前処理を行う必要がある。そこで我々は QIAGEN 社の培養細胞用 PhosphoProtein Purification Kit<sup>16,17)</sup> による濃縮の効果を, リン酸化標準タンパク質 (Casein  $\alpha$ , Casein  $\beta$  および OVA) および非リン酸化コントロールタンパク質 (BSA) の混合液サンプルとして用い検討した。その結果が図 5 である。

「材料および方法」の (6) の記述に従ってカラム非吸着画分と吸着溶出画分を得, 7.5%T のゲルで SDS-PAGE を行った。このゲルに対し Pro-Q Diamond によるリン酸化タンパク質特異的蛍光染色を行ったところ, 吸着溶出画分には Casein  $\alpha$ , Casein  $\beta$  と OVA が濃縮されていることが確認された (図 5A-3)。さらにこのゲルを SYPRO Ruby で再染色し, 全タンパク質を検出した結果, BSA は非吸着画分に

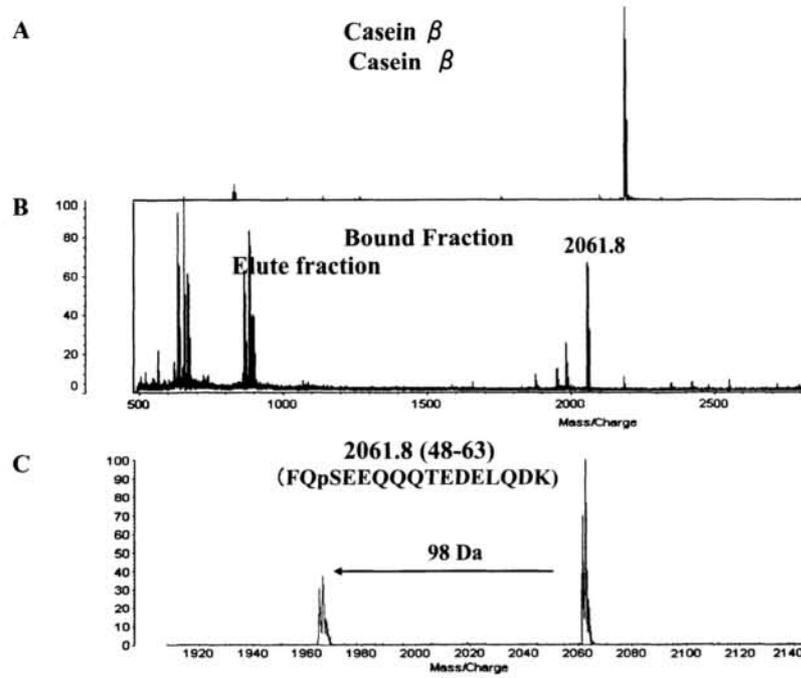


Fig. 3. Mass spectra of tryptic digests of casein  $\beta$  before (A) and after (B) phosphopeptide purification by IMAC.

Neutral loss of 98 Da was observed by gating 2061.8 Da peptide in PSD mode of MALDI-TOF-MS (C).

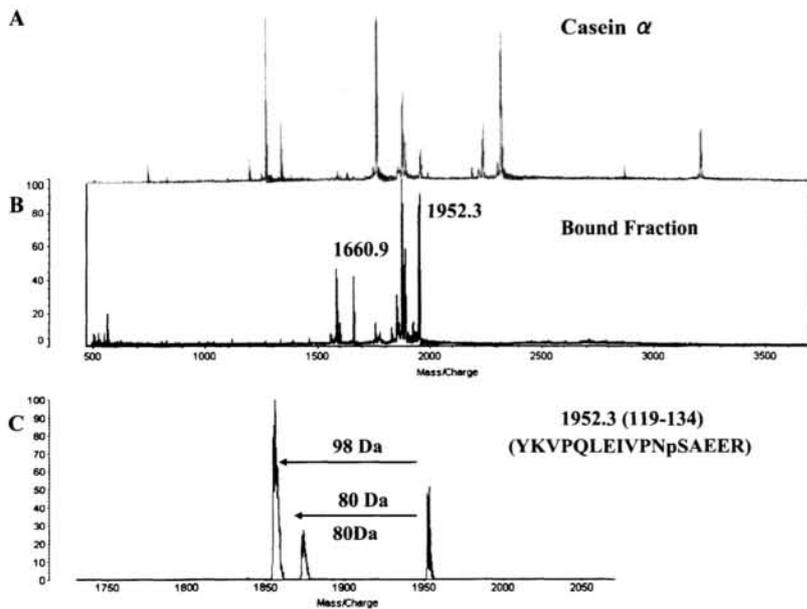


Fig. 4. Mass spectra of tryptic digests of casein  $\alpha$  before (A) and after (B) phosphopeptide purification by IMAC.

Neutral loss of 80 Da and 98 Da was observed by gating 1952.3 Da peptide in PSD mode of MALDI-TOF-MS (C).

来ていることが確認された (図 5B-2).

#### (4) ラットミエリン塩基性タンパク質の分析

標準タンパク質を用いて至適化された方法を, 有髄神経細胞のミエリン鞘を構成する塩基性タンパク質 (MBP)<sup>18)</sup> の

リン酸化部位の特定に応用した. Norton らの方法<sup>18)</sup> で調製したラットのエリン画分を 4°C のエタノールで 2 回脱脂後, 10% の CHAPS を含む Lysis Buffer にさらに QIAGEN 社のプロテアーゼ阻害剤 1 錠と 10  $\mu$ l の Benzonase ストック溶液を添加して調製したバッファー 5 ml に混和し, 4°C

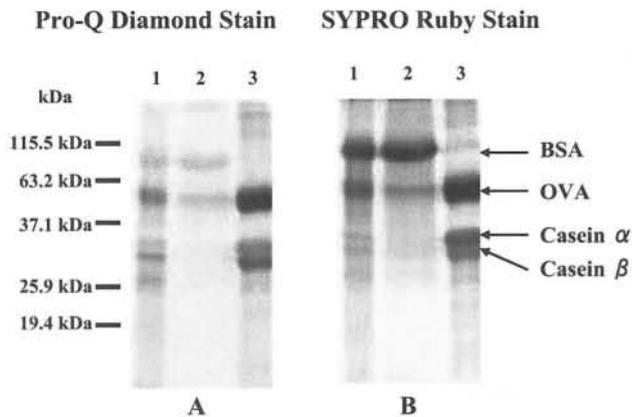


Fig. 5. SDS-PAGE of authentic phosphorylated proteins purified using PhosphoProtein Purification Kit.

Phosphorylated proteins were detected by staining with Pro-Q Diamond (A). Total proteins were visualized by staining with SYPRO Ruby (B). Lane 1, mixture of casein  $\alpha$  and  $\beta$ , OVA and BSA; Lane 2, flow-through fraction of the phospho-affinity column; Lane 3, bound and eluted fraction of the phospho-affinity column.

で30分間インキュベートしてMBPを可溶化した。これを4°C、10,000×gで30分間遠心し、上清を得た。さらにこれを上記のバッファーで希釈して、タンパク質濃度を0.1 mg/mlとし、その20 mlをPhosphoProtein Purification columnに添加して、非吸着画分と吸着溶出画分を得た。それらの画分のタンパク質約7.5  $\mu$ gをSDS-PAGE電気泳動で分離、Pro-Q DiamondおよびSYPRO Rubyで蛍光染色し(図6)画像解析を行った後に、各画分の矢印で示したリン酸化MBPを含むバンドの一部(SYPRO Ruby染色後のデンストメトリーでタンパク質量は約50 ngと推定)を切り取ってIn-gel消化した。さらにこれをMALDI-TOF-MS分析しMS-Fitによるデータベース検索を行った。

その結果ラットのMBPであることが確認され(図7)、QIAGEN社のリン酸化タンパク質濃縮カラムの吸着溶出画分では、リン酸化ペプチドである可能性が高い944.5 Daと1571.8 Daのシグナルが検出された(図8)。引き続き同じサンプルを用いて実施されたPSDモードのMS分析において、1571.8 Daでは典型的なニュートラルロスが観察された(図9)。944.5 Daはシグナルが弱く、このままではニュートラルロスの検出が困難であったが、さらにIMAC法でリン酸化ペプチドを濃縮することによって、十分なシグナル強度に達することが確認された。

MBPのリン酸化部位については、これまでにウサギのMBPでセリン、トレオニンが5ヶ所リン酸化されているとする報告<sup>19)</sup>、牛のMBPでThr<sup>97</sup>とSer<sup>165</sup>がリン酸化されているとする報告があり<sup>20)</sup>、さらにMAPキナーゼによって牛のMBPのThr<sup>97</sup>が特異的にリン酸化されることが、MS分析によって同定されたとする報告<sup>21)</sup>などがある。今回我々が、ラットのMBPでリン酸化を確認した1571.8

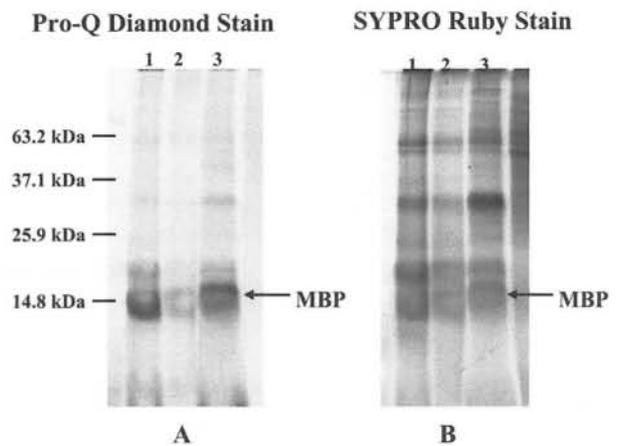


Fig. 6. SDS-PAGE of rat brain phosphorylated MBP.

Phosphorylated MBP was detected by staining with Pro-Q Diamond (A). Total proteins were visualized by staining with SYPRO Ruby (B). Lane 1, myelin crude extract; Lane 2, flow-through fraction of the phospho-affinity column; Lane 3, bound and eluted fraction of the phospho-affinity column.

Daのペプチドには、2ヶ所のトレオニン(Thr<sup>119</sup>, Thr<sup>122</sup>)と1ヶ所のセリン(Ser<sup>126</sup>)があり、PSDではそのうちのどれがリン酸化されたかを決定するにはいたっていないものの、図7に示すように121位のア르기ニンでのミスクリーページ(不消化)があり、この位置で消化された2つのペプチド断片(699.4 Daと811.5 Da)にはリン酸化が見られないことから、ア르기ニンのすぐ隣のThr<sup>122</sup>がリン酸化されたために消化をうけにくくなったものと思われる。いずれにせよ、今回我々が確認したペプチド領域でのリン酸化はこれまでに報告がなく、新規のリン酸化部位を見つけたものと考えている。

標準のリン酸化ペプチドを用いた実験では、post-source decayモードによるMSで80 Daおよび98 Daの質量減少(ニュートラルロス)が観察されることが、すでに報告されているが、実際の生体サンプルを用いたin-gel消化ペプチドでは、特に不安定なリン酸化セリンやリン酸化トレオニンをMALDI法でイオン化する際にリン酸基が外れることが多く、成功例は極めて少ない。実際Marcusら<sup>22)</sup>は、ヒト血小板のリン酸化タンパク質の分析例を報告しているが、PSDによるニュートラルロスは観察されていない。またTalboら<sup>23)</sup>は $\kappa$ カゼインのマクロペプチドのリン酸化部位の分析にMALDI-TOF-MSのPSDモードを利用したが、「リン酸化セリンは非常に不安定であるためペプチド骨格のフラグメンテーションの過程で外れてしまった可能性が高い」と報告している。我々は、標準ペプチドを用いて最適化した操作法を用い、実際にラットの脊髄から抽出されたミエリン塩基性タンパク質(MBP)のリン酸化セリンの部位を特定することに成功した。今後この方法は、臨床サンプルを含めた生体サンプル中のセリン/トレオニリン

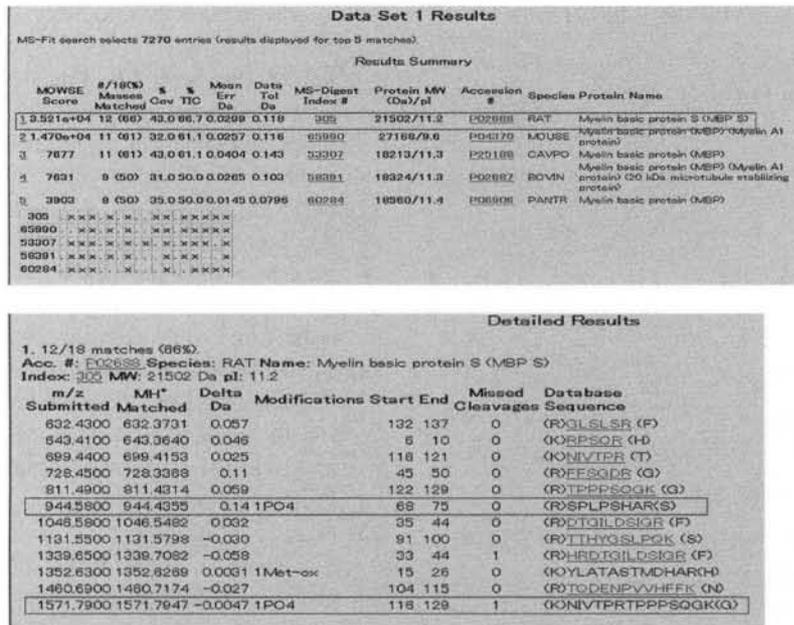


Fig. 7. MS-Fit search results of peptide mass fingerprint of phosphorylated rat MBP.

Swiss-Prot database was searched by sending a query to the ExPASy Proteomics server computer. The protein was identified as rat MBP (P62088) at a high MOWSE Score of  $3.521 \times 10^4$ . Two MS signals at 944.58 Da and 1571.79 Da were assigned to phosphorylated peptides of rat brain MBP.

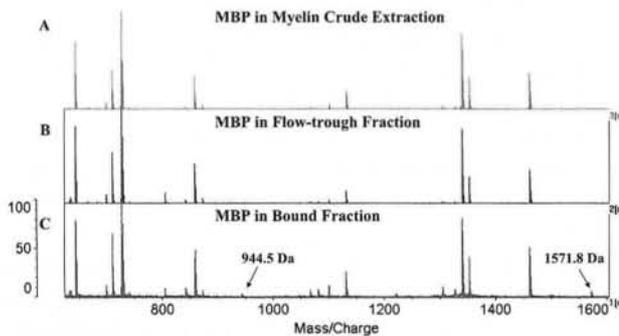


Fig. 8. Mass spectra of tryptic digests of rat MBP.

MBP preparations in a myelin crude extract (A), in a flow-through fraction (B) and in a bound/eluted fraction (C) were subjected to in-gel tryptic digestion and MALDI-TOF-MS.

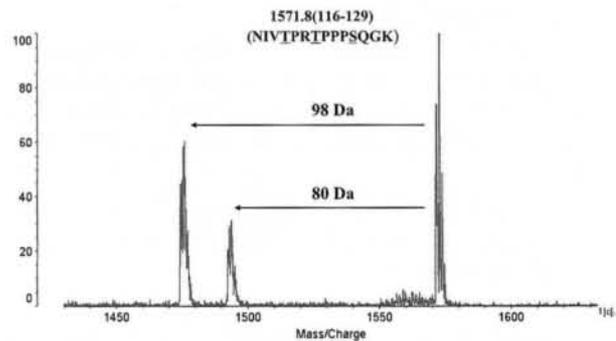


Fig. 9. Neutral loss of 1571.8 Da peptides detected in mass spectra of tryptic digest of MBP preparation in a bound/eluted fraction shown in Fig. 8.

リン酸化タンパク質の分析に有用であると考えられる。ただし、すでに述べたようにリン酸化ペプチドはイオン化の効率が低く、質量分析で定量分析を行うことは困難である。したがってリン酸化タンパク質の定量分析を行う必要がある場合には、電気泳動ゲルの段階で染色法によってあらかじめ定量をした後に、本法による定性分析を実施すべきである。

今回の実験結果を踏まえ我々は、図 10 に示す操作手順で分析を行うことによって、生体中の微量なリン酸化タンパク質の同定とリン酸化部位の特定が可能になるものと考えている。今回は、特にリン酸化タンパク質の濃縮とトリプシン消化後のリン酸化ペプチドの濃縮、および質量分析に

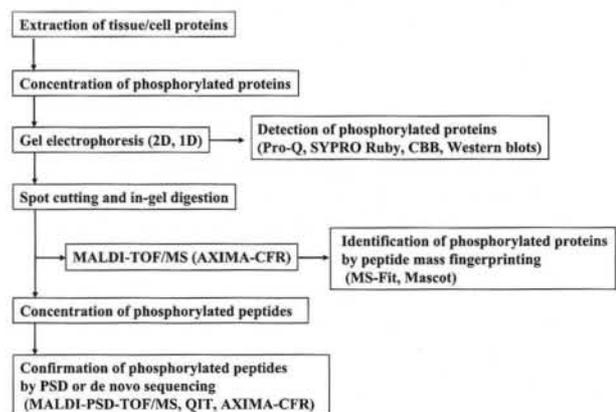


Fig. 10. A proposed procedure for proteomic analysis of phosphorylated proteins.

よるリン酸化部位の特定をMALDI-TOF-MSのPSDモードで行う場合に絞って条件の最適化を行ったが、この他に、リン酸化ペプチドを特異的に修飾するPhos-tag (NARD)<sup>7)</sup>法なども開発されており、プロテオーム研究におけるリン酸化タンパク質の分析は今後さらに発展するものと考えられる。

### 謝 辞

有益な御助言を頂いた、(株) Pro Proenixの大房 健博士、NARD institut, Ltd.の川崎昭彦氏、三菱化学生命研究所・生体分子解析室の大森 彬博士、東京都老人総合研究所脳機能改善研究グループの阿相 皓晃博士に感謝いたします。また、蛍光染色ゲルの画像解析では日本バイオラッドの佐藤 元氏に、リン酸化ペプチドのMS分析では島津製作所の西根 勤氏、尾島典行氏に技術的な協力をいただいたことを感謝いたします。

### 文 献

- 1) Larsen MR, Sorensen GL, Fey SJ, Larsen PM, Roepstoff P. Phospho-proteomics: Evaluation of the use of enzymatic de-phosphorylation and differential mass spectrometric peptide mass mapping for site specific phosphorylation assignment in proteins separated by gel electrophoresis. *Proteomics* 2001;1:223-238.
- 2) Yamagata A, Kristensen DB, Takeda Y, Miyamoto Y, Okada K, Inamatsu M, Yosizato K. Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase. *Proteomics* 2002;2:1267-1276.
- 3) Kalo MS, Pasquale EB. Multiple in Vivo Tyrosine Phosphorylation Sites in EphB Receptors. *Biochemistry* 1999; 38:14396-14408.
- 4) Corte VDE, Demol H, Goethals M, Damme JV, Gettemans J, Vandekerckhove J. Identification of Tyr 438 as the major in vitro c-Src phosphorylation site in human gelsolin: A mass spectrometric approach. *Protein Sci* 1999;8: 234-241.
- 5) Oda Y, Huang K, Cross FR, Cowburn D, Chait BT. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:6591-6596.
- 6) Oda Y, Nagasu T, Chait BT. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat Biotechnol* 2001;19:379-382.
- 7) Takeda H, Kawasaki A, Takahashi M, Yamada A, Koike T. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of phosphorylated compounds using a novel phosphate capture molecule. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:2075-2081.
- 8) Norton WT, Cammer W. Isolation and characterization of myelin. In: Morell P, editor. *Myelin*, 2nd, New York: Plenum Press. 1984:147-180.
- 9) Zhou W, Alex MB, Khaledi MG, Tomer KB. Detection and sequencing of phosphopeptides affinity bound to immobilized metal ion beads by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2000;11:273-282.

- 10) Robert RR, Scott RB, David S, Andrew PL. Selective binding of activated pp60<sup>C-SRC</sup> by an immobilized synthetic phosphopeptide modeled on the carboxyl terminus of pp60<sup>C-SRC</sup>. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:10696-10700.
- 11) Susan LC, Michael JH, Wenying S, Raymond JD, Roland SA, Steven AC. Mass spectrometry-based methods for phosphorylation site mapping of hyperphosphorylated proteins applied to Net1, a regulator of exit from mitosis in yeast. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:186-196.
- 12) Neville DCA, Rozanas CR, Price EM, Gruis DB, Verkman AS, Townsend RR. Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Protein Sci* 1997;6:2436-2445.
- 13) Allan S, Ole NJ, Jesper VO, Kim FH, Roman AZ. Electron capture dissociation of singly and multiply phosphorylated peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14:1793-1800.
- 14) McLachlin DT, Chait BT. Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* 2001;5:591-602.
- 15) Posewitz MC, Tempst P. Immobilized Gallium(III) Affinity chromatography of phosphopeptides. *Anal Chem* 1999;71:2883-2892.
- 16) Ueda K, Kosako H, Fukui Y, Hattori S. Proteomic identification of Bcl2-associated athanogene 2 as a novel MAPK-activated protein kinase 2 substrate. *J Biol Chem* 2004;279:41815-41821.
- 17) Metodiev MV, Timanova A, Stone DE. Differential phosphoproteome profiling by affinity capture and tandem matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* 2004;4:1433-1438.
- 18) Akiyama K, Ichinose S, Omori A, Sakurai Y, Asou H. Study of expression of myelin basic proteins (MBPs) in developing rat brain using a novel antibody reacting with four major isoforms of MBP. *J Neurosci Res* 2002;68:19-28.
- 19) Martenson RE, Law MJ, Deibler GE. Identification of multiple in vivo phosphorylation sites in rabbit myelin basic protein. *J Biol Chem* 1983;258:930-935.
- 20) Chou FC-H, Chou C-HJ, Shapira R, Kibler RF. Basis of Microheterogeneity of myelin basic protein. *J Biol Chem* 1976;251:2671-2679.
- 21) Erickson AK, Payne DM, Martino PA, Rossomando AJ, Shabanowitz J, Weber MJ, Hunt DF, Sturgill TW. Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1990;265: 19728-19735.
- 22) Marcus K, Immler D, Sternberger J, Meyer HE. Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. *Electrophoresis* 2000;21:2622-2636.
- 23) Talbo GH, Suckau D, Malkoski M, Reynolds EC. MALDI-

PSD-MS analysis of the phosphorylation sites of caseinomacropeptide. *Peptides* 2001;22:1093-1098.

### 要 旨

従来タンパク質のリン酸化は、ラジオアイソトープ標識法やウエスタンブロット法を用いて研究されてきたが、我々は質量分析法による高感度分析法の有効性について基礎的な検討を行った。まずリン酸化部位が既知の標準ペプチドやカゼインを用いて、Post-source decay モードによる

MALDI-TOF 質量分析を行い、セリンおよびトレオニンリン酸化ペプチド検出における有効性を確認した。しかしチロシンリン酸化ペプチドには、必ずしも有効ではないこともわかった。検出感度を上げるために、市販のリン酸化ペプチドおよびリン酸化タンパク質濃縮キットの使用法の最適化を行い、有効性を確認した。さらに我々はこの方法をラットミエリンのミエリン塩基性タンパク質の分析に応用し、リン酸化ペプチドの高感度検出と、新しいリン酸化部位の特定に成功した。