

キャピラリー HPLC-ICP-MS による、 セレン化酵母中の セレン含有タンパク質の同定

アプリケーションノート

食品サプリメント

著者

Juliusz Bianga and Joanna Szpunar

Laboratoire de Chimie Analytique
Bio-inorganique et Environnement
Pau, France



概要

セレン (Se) はヒトにとって重要な栄養素であり、体内への摂取は食品の含有量と摂取量に左右されます。多くの国で農作物に含まれるセレン濃度が低いため、セレン欠乏症は重要な問題です。サプリメントなどの開発および普及により、ヒトのセレン摂取量は増加し、中でもセレン濃縮酵母はヒトおよび動物へのセレン摂取方法としては最も有効な手段です。

セレン摂取量の情報を得るためには、総 Se 量だけではなく Se の化学種ごとに知る必要があります。しかし、今まで行われてきた研究では、水溶性のものだけに着目したものが多く、水に溶解するものは酵母中の総 Se 量の約 12~20% しかありません。

Verified for Agilent
7800 ICP-MS



Agilent Technologies

これまで行われてきた研究は、Chassaigne および Chéry [1] の、レーザー (LA)-ICP-MS を用いた Se 含有酵母タンパク質のマッピングや、Tastet ら [2] の、独自のナノ HPLC-ICP-MS インターフェースを用いたペプチド中の Se の分析などがあります。ルーチン分析をするためには、総セレンメチオニン量を用い、酵母中のセレン含有タンパク質の定量を行う必要があります。

本研究では、ICP-MS を用い、セレン化酵母中のセレン含有タンパク質を同定しました。溶解しないセレン含有タンパク質は 2D ゲル電気泳動で分離しました。LA-ICP-MS で同定されたセレン含有タンパク質は、ゲルより切り出し、トリプシンにより消化しました。これによりできたペプチドを、キャピラリー HPLC-ICP-MS とエレクトロスプレーイオン化 (ESI-) MS/MS により分析し、セレン化酵母の主成分であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ-3 を同定しました。トリプシンの消化物が少量なため、キャピラリクロマトグラフを用いました。

実験

サンプル

総 Se 2.3 mg/g を含む市販のセレン化酵母を使用しました。

サンプル前処理

参考文献 [3] にある工程に従いタンパク質抽出を行い、2D ゲル電気泳動分離とトリプシン消化を行いました。

HPLC-ICP-MS と ESI-MS/MS 分析

クロマトグラム分離は、Agilent 1100 HPLC にキャピラリーポンプ (部品番号 G1376A)、マニュアルインジェクタバルブ (100nL サンプルループ) で行いました。2% アセトニトリル (ACN)-0.1% ギ酸 (FA) をアイソクラティック流量 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ で流し、8 μL のペプチド試料を濃縮カラム (Agilent ZORBAX 300 SB-C18、35 x 0.5 mm、5 μm) に注入しました。2 分間移動相で洗浄後、分離カラム (Agilent ZORBAX 300SB-C18、150 x 0.3 mm、3.5 μm) にバックフラッシュモードで注入しました。

ペプチドはグラジエント溶液 A : 0.1 % FA 混合の水、溶液 B : 0.1 % FA 混合の ACN を用い、流量 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ により分離しました。溶離プログラムを表 1 に示します。

図 1. HPLC 溶離プログラム

段階	溶離液 (%B)	時間 (分)
1	2	0~2
2	2-5	2~5
3	5-25	5~35
4	25-40	35~40
5	40-97	40~45
6	40-97	45~50
7	97-2	50~55

分離カラムの出口を ICP-MS または ESI-MS/MS に繋ぎました。ICP-MS の測定条件を表 2 に示します。

図 2. Agilent 7700x ICP-MS の測定パラメータ

パラメータ	値
スペクトロメータ	
ネブライザ/スプレーチャンバ	キャピラリー LC インターフェースキット (部品番号 G3680A)
トーチ内径	1 mm
コーン	白金
プラズマ	
RF 出力	1560 W
サンプリング深さ	7.5 mm
キャリアガス流量	780 mL/min
オプションガス (O ₂) 流量	39 mL/min
レンズ	
引出しレンズ 1	3.2 V
引出しレンズ 2	-200 V
セル	
オクタポールバイアス	-100 V
He 流量	10 mL/min
運動エネルギー弁別	7 V

プラズマ条件と検出パラメータは、Y、Li、Tl、Ce 20 ppb を含む 2% 硝酸溶液により最適化しました。高エネルギー He コリジョンセルモードは、Se 同位体に干渉する多原子イオンを低減するために用いました。77Se、78Se、80Sの積分時間は各 250ms としました。

ESI LTQ Orbitrap Velos 質量分析計は、陽イオンモードで測定が行われました。ヒーターとキャピラリの温度はそれぞれ 50 °C と 280 °C でした。測定は MS SIM モードの CID にて (コリジョンエネルギーは 15% で正規化)、300~1100 m/z の質量レンジで行われ、生成イオンはコリジョンエネルギー 55% 設定の HCD セルにて形成されました。

結果と考察

図 1 に、タンパク質分離をしたゲルを示します。LA-ICP-MS の測定結果によれば、このタンパク質スポットはゲル中の他のスポットよりも高濃度の Se を含んでいることが分かりました。

トリプシン消化物のクロマトグラムを図 2 に示します。キャピラリ HPLC-ICP-MS では 6 個のピークを検出し (図 2a)、そのうち 5 個は ESI Orbitrap MS/MS で同定することができました。セレンペプチドの保持時間の同定に ICP-MS は必要不可欠です。検出下限 (LOD) はベースライン 20 ポイントの標準偏差の 3 倍で算出されました。この値を 1 ppm SeMet の信号と比較しました。Se 同位体 80 の LOD は 0.2 pg でした。アミノ酸の略号は表 3 に示してあります。

同定されたセレンペプチドのシーケンスを表 4 に示します。ICP-MS と、図 2c で示した ESI Orbitrap MS でのセレンペプチドの保持時間は完全に一致しました。表 5 にグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ-3 の結果を示します。メチオニン (M) とシステイン (C) 残留物において、タンパク質鎖での硫黄・セレン代用によるセレンの結合の可能性が示されました。システインについては酵母サンプルで初めての事です。

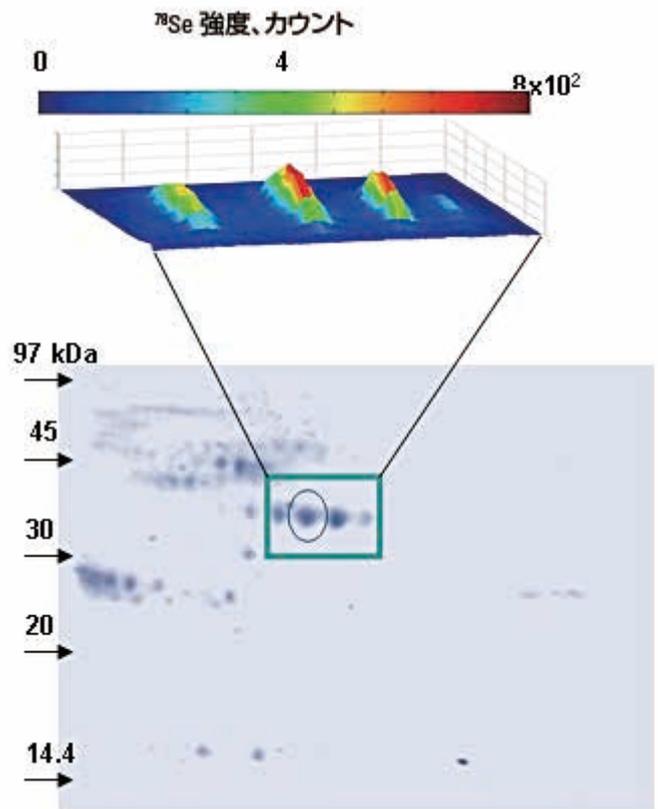


図 1. セレン化酵母タンパク質の 2D ゲル電気泳動分離 (LA-ICP-MS の信号強度は図の上に表示してあります)

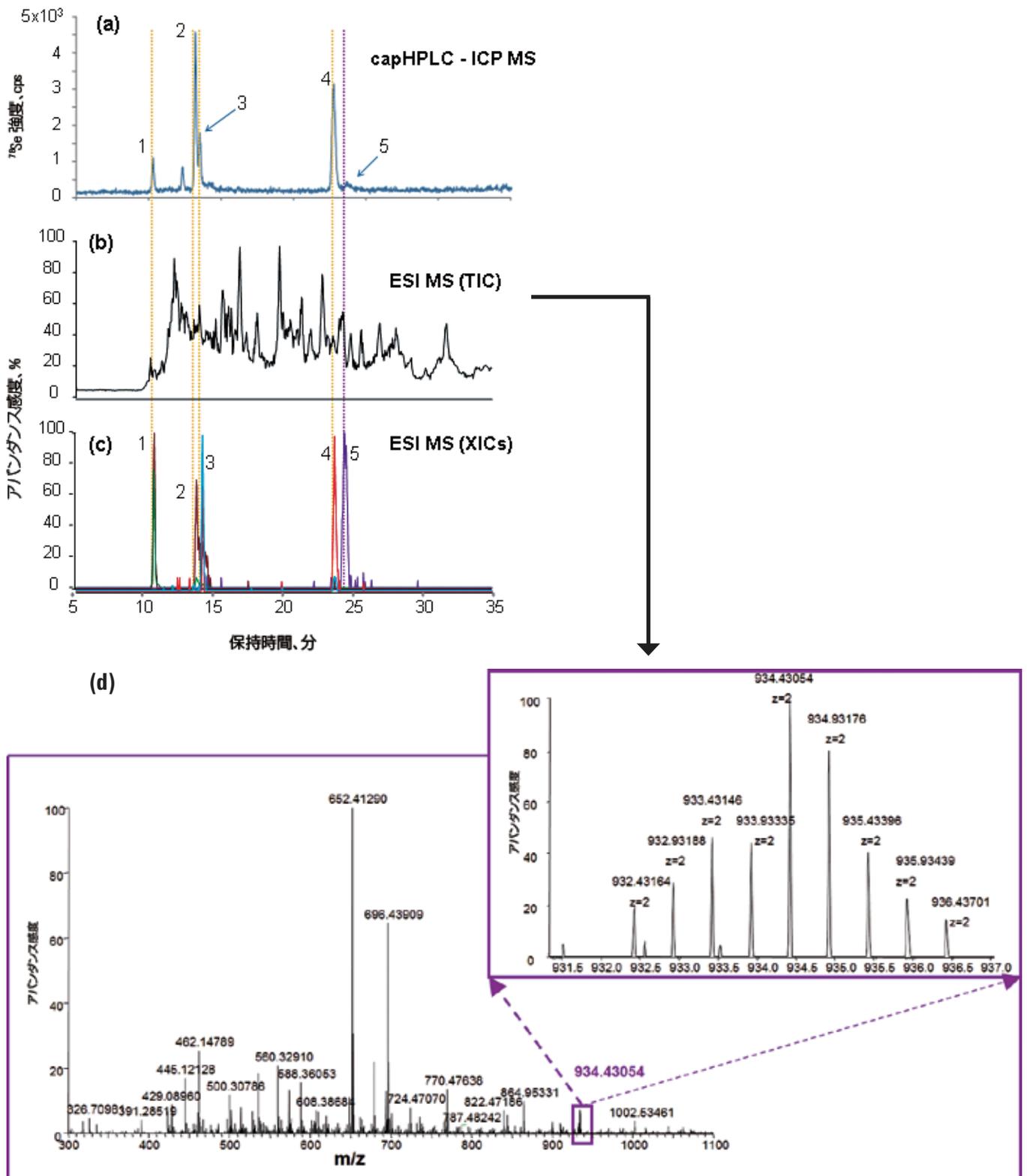


図 2. 図 1 でマークされたタンパク質スポットのトリプシン消化物のセレン含有ペプチドをキャピラリー HPLC で測定した結果。a) ICP-MS の測定結果 b) ESI Orbitrap MS の測定結果 (TIC) c) ESI Orbitrap MS の測定結果 d) Se 種の ESI 質量スペクトラム。ピーク同定は表 4 に示してあります

図 3. アミノ酸の略号

名前	略号
アラニン	A
アルギニン	R
アスパラギン	N
アスパラギン酸	D
システイン	C
グルタミン酸	E
グルタミン	Q
グリシン	G
ヒシチジン	H
イソロイシン	I
ロイシン	L
リシン	K
メチオニン	M
フェニルアラニン	F
プロリン	P
セリン	S
トレオニン	T
トリプトファン	W
チロシン	Y
バリン	V

表 4. 図 1 で同定されたセレン含有ペプチドのシーケンス

ピーク	シーケンス	理論上の質量数	実測の質量数	質量数の差
1	LV SeM(ox) R	582.2523	582.2513	-0.00104
2	LV SeMR	566.2573	566.2564	-0.00094
3	LTG SeM(ox) AFR	430.1793	430.1837	0.004395
4	LTG SeMAFR	422.1822	422.1859	0.00369
5	IVSNASCTTN SeCL LAPLAK または IVSNAS SeCTT NCLAPLAK	934.4278	934.4279	0.00013

図 5. 図 1 で同定されたセレン含有タンパク質、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ-3 のシーケンス。太字で示したペプチドは、クロマトグラム (図 2) と表 4 に示したセレンペプチドに対応しています

ペプチド
1 MVRVAINGFG RIGR LVM RIA LSRPNVEVVA LNDPFITNDY AAYMFKYDST
51 HGRYAGEVSH DDKHIIVDGK KIATYQERDP ANLPWGSSNV DIAIDSTGVF
101 KELDTAQKHI DAGAKKVIT APSSTAPMFV MGVNEEKYTS DLK IVSNASC
151 T TN CLAPLAK VINDAFGIEE GLMTTVHSLT ATQKTVDGPS HKDWRGGRTA
201 SGNIPSSSTG AAKAVGKVLPL ELOGK LTGMA FRV PPTVDVSV VDLTVKLNKE
251 TTYDEIKKVV KAAAEGLKLG VLGYTEDAVV SSDFLGDSHS SIFDASAGIQ
301 LSPKFVKLVS WYDNEYGYST RVVDLVEHVA KA

結論

ICP-MS を用い、セレン化酵母中のセレン含有タンパク質の分析メソッドを開発することができました。セレン含有タンパク質は二次元ゲル電気泳動で分離し、トリプシン消化を行いました。消化ペプチドは LA-ICP-MS、キャピラリ HPLC-ICP-MS、ESI MS/MS にて分析、同定しました。キャピラリクロマトグラフィの導入はトリプシン消化物が少量であったために用いました。セレン化酵母中のセレン含有タンパク質の主成分であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ-3 の同定に開発したメソッドを用いました。メチオニン (M) とシステイン (C) 残留物において、タンパク質鎖での硫黄-セレン代用によるセレンの結合の可能性が示されました。システインについては酵母サンプルで初めてのことです。

参考文献

1. Chassaing, H., Chery, C. C., Bordin, G., Vanhaecke, F. & Rodriguez, A. R. (2004). *J. Anal. At. Spectrom.*, 19, 85.
2. Tastet, L., Schaumlöffel, D. & Lobinski, R. (2008). *J. Anal. At. Spectrom.*, 23, 309.
3. Von Hage, J. (2008). *Proteomics Sample Preparation*. Wiley-VCH, Weinheim.



www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。

本書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2017
Published July 4, 2017
Publication number: 5991-0882JAJP



Agilent Technologies