

[成果情報名] LC-MS/MS を用いたトマトのオスモチン様タンパク質 Protein NP24 の定量法

[要約] 液体クロマトグラフタンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) と安定同位体標識内部標準ペプチドを用いることで、トマトのオスモチン様タンパク質 Protein NP24 を定量できる。

[キーワード] Protein NP24、オスモチン、トマト、LC-MS/MS、安定同位体標識内部標準ペプチド

[担当] 食品機能性・代謝調節利用技術

[代表連絡先] 電話 029-838-7991

[研究所名] 食品総合研究所・食品機能研究領域

[分類] 研究成果情報

[背景・ねらい]

浸透圧ストレス下、タバコ培養細胞内に誘導されるタンパク質であるオスモチンは、アディポネクチン受容体を活性化することから、メタボリックシンドローム抑制効果を期待されている。液体クロマトグラフタンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) と安定同位体標識内部標準ペプチドを用いて、タバコと同じナス科に属し、消費量の多いトマトのオスモチン様タンパク質 Protein NP24 (図 1、オスモチンのアミノ酸配列との同一性: 91%、外皮に多く存在) の定量法を開発する。Protein NP24 に対する ELISA などの正確な定量法は、これまで報告されていない。

[成果の内容・特徴]

1. 本定量法は、内部標準物質として安定同位体標識ペプチド GQTWVINAPR^[¹³C₆,¹⁵N₄] (試薬メーカーへ委託合成) を添加したトマトタンパク質のトリプシン消化物を LC-MS/MS で分析する。Protein NP24 のトリプシン消化ペプチド GQTWVINAPR (図 1) のピークと GQTWVINAPR^[¹³C₆,¹⁵N₄] のピークとを比較することで、Protein NP24 を定量できる。
2. Protein NP24 には、NP24 I と NP24 II のアイソフォームが存在する (図 1)。トリプシン消化ペプチド GQTWVINAPR を生成するアミノ酸配列は、これらの変異部位を含まないので、本定量法は、NP24 I と NP24 II の合計値を与える。
3. Protein NP24 の定量の手順および LC-MS/MS の分析条件を図 2 に示す。
4. 多重反応モニタリング (MRM) クロマトグラムの保持時間 5.6 分の位置に、GQTWVINAPR と GQTWVINAPR^[¹³C₆,¹⁵N₄] のピークが観測される (図 3)。所要時間 15 分で fmol/μl 濃度レベルでの定量分析が可能である。
5. 例として、トマト外皮の Protein NP24 定量値を表 1 に示す。日内および日間の変動係数は、13%以下である。

[成果の活用面・留意点]

1. トマトおよびトマト加工品の Protein NP24 を定量したい研究者等による本成果の活用を想定している。
2. 定量下限値は、使用する LC-MS/MS の性能に依存する。
3. ペプチドの LC 分離モードとして、C18 などの逆相クロマトグラフィーが主に用いられているが、GQTWVINAPR を適切にカラム担体に保持しないため、本定量法では、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を用いている。
4. 複数の試薬メーカーが、安定同位体標識ペプチドの受託合成を行っている。
5. 切断特異性が高い質量分析グレードのトリプシンを使用している。

[具体的データ]

10 20 30 40 50 60
MGYLTSSFLV **FFLLCVITYY** **AATIEVR**NNC PYTVWAA**STP** IGGRRLLNR**G** **Q**TWVINAPRG
 TKMARIWGRT GCNFNAAGRG TCQTGDCGGV LQCTGWGKPP NTLAEYALDQ FSNLDFWDIS
 LVDGFNIPMT FAPTKPSGGK CHAIHCTANI NGECPRALKV PGGCNNPCTT FGGQQYCCCTQ
 GPCGPTELSK FFKKRCPCDAY SYPQDDPTST FTCPGGSTNY RVVFCPNGVA DPNFPLEMPA
 STDEVAK

図1 Protein NP24のアミノ酸配列 赤字：定量に用いるトリプシン消化ペプチドを生成する配列、青字：I, S；NP24 I→F, F；NP24 II、緑字：シグナルペプチド（分泌タンパク質などのN末端に存在する特徴的な配列。一般的にはシグナルペプチダーゼにより切断されて除去される。）

トマト凍結粉末 (100mg) ↓ トリクロロ酢酸/アセトン抽出 ↓ 変性処理 ↓ トリプシン消化 ↓ LC-MS/MS分析 Protein NP24の定量の手順	LC-MS/MSの分析条件		
	LC部		
	カラム	ZIC-HILIC (20×2.1mm+150×2.1mm)	
	移動相	水+0.1%ギ酸:アセトニトリル+0.1%ギ酸=60:40	
	流速	0.1ml/分	
	温度	30℃	
	イオン化部		
	イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法	
	キャピラリー電圧	3kV	
	MS/MS部		
	ペプチド	<i>m/z</i>	
		プリカーサーイオン (+2 価)	プロダクトイオン (+1 価)
	GQTWVINAPR	571.3	669.4
	GQTWVINAPR [¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄]	576.3	679.4

図2 Protein NP24の定量の手順（左図）とLC-MS/MSの分析条件（右表）

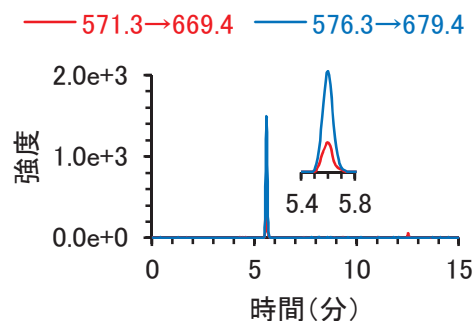


図3 トマトタンパク質トリプシン消化物のMRMクロマトグラム

日	含量 (nmol/g新鮮重)	変動係数 (%)	n
1	2.9	11.4	5
2	3.0	10.7	5
3	2.8	12.7	5
4	3.1	10.5	5
5	3.0	5.2	5
1-5	3.0	10.0	25

*市販品 (2014年4月購入、品種は不明)

(一法師克成)

[その他]

中課題名：代謝調節作用に関する健康機能性解明と有効利用技術の開発

中課題番号：310b0

予算区分：交付金、委託プロ（先端プロ）

研究期間：2012～2014年度

研究担当者：一法師克成、笹沼基恵、大池秀明、小堀真珠子、山本（前田）万里

発表論文等：Ippoushi H. et al. (2015) Food Chem.173:238-242