

## MALDI-TOF MSによるタンパク質C末端アミノ酸配列解析の新技术法

## A Simple and Highly Successful C-terminal Sequence Analysis of Proteins by Mass Spectrometry

タンパク質の同定は、タンパク質を酵素消化することにより得られる消化物を質量分析計で分析し、得られたピークリストをデータベース検索にかけることにより行えます。しかし、1)タンパク質のN、C末端の配列はプロセッシングや翻訳後修飾を受けていることが多い2)イオンサプレッション効果のため質量分析計で検出することができるのはタンパク質の配列の一部、という二点の理由により、データベース検索時にN、C末端の配列も帰属することは容易ではありません。

タンパク質のN末端部位アミノ酸配列決定は、プロテインシーケンサ(PPSQ-31A/33A)やタンパク質のN末端配列解析キット(ORFinder-NB™)により行えます。しかし、C末端部位については、既存の手法と比較し、より微量の試料を迅速に分析できる手法が求められていました。

日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)で合意され、通知された「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定」においても、目的物質が末端アミノ酸に関して不均一であることが認められた場合には、タンパク質C末端アミノ酸配列を適切な分析方法により測定することが要求されています。近年、世界の承認医薬品の中でバイオテクノロジー/遺伝子組み換え技術を応用した生物薬品の占める割合は年々増加の傾向にあり、そういう意味からも、タンパク質の末端アミノ酸配列解析の重要性は以前にも増して高くなってきています。

今回、タンパク質C末端部位を選択的に回収し質量分析計によりそのアミノ酸配列を決定する新しい手法の開発に成功したのでその分析例をご紹介します。

K. Shima H. Kuyama

医薬審発第571号(平成13年5月1日)

島津テクノロジーにて抗体医薬品を中心とした高分子医薬品、バイオ医薬品の特性解析試験・規格試験を受託しています。

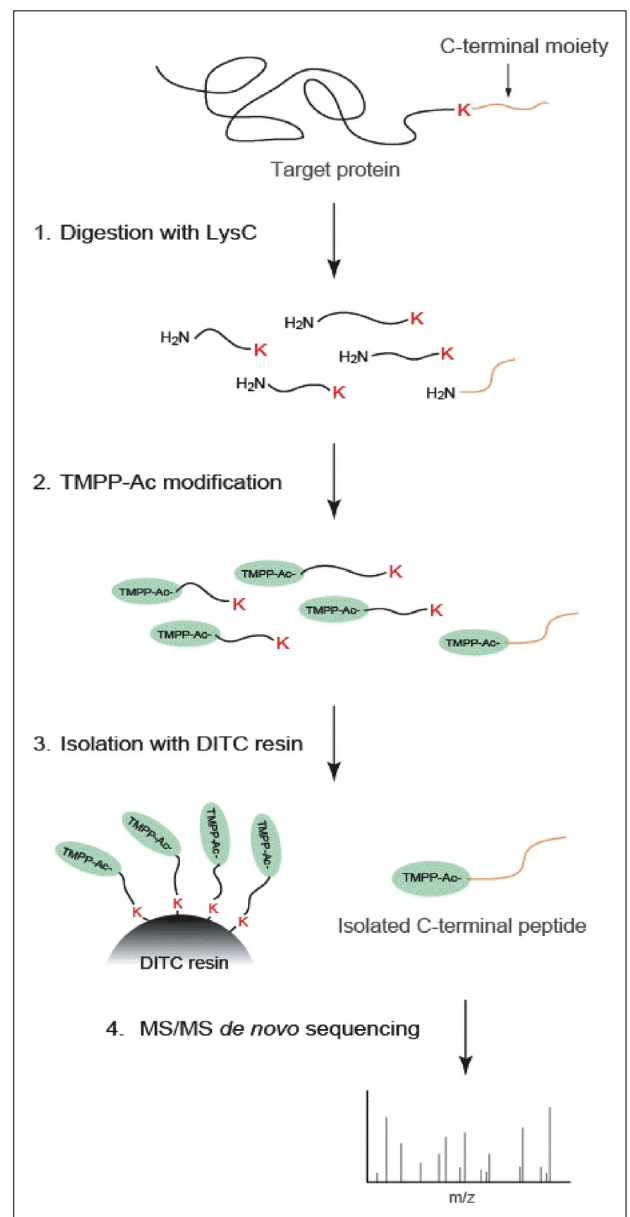


Fig.1 タンパク質C末端アミノ酸配列解析のながれ  
Schematic Overview of The C-terminal Sequence Analysis of Proteins by Mass Spectrometry.

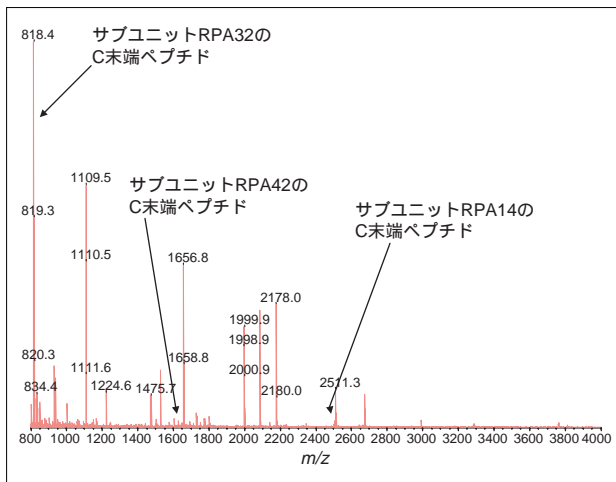


Fig. 2 リコンビナント複合タンパク質PfuRPAのLysC消化, TMPP-Ac修飾後のMALDI-MSスペクトル  
MALD-TOF Mass Spectrum after TMPP Modification of LysC Digest from PfuRPA Protein Complex.

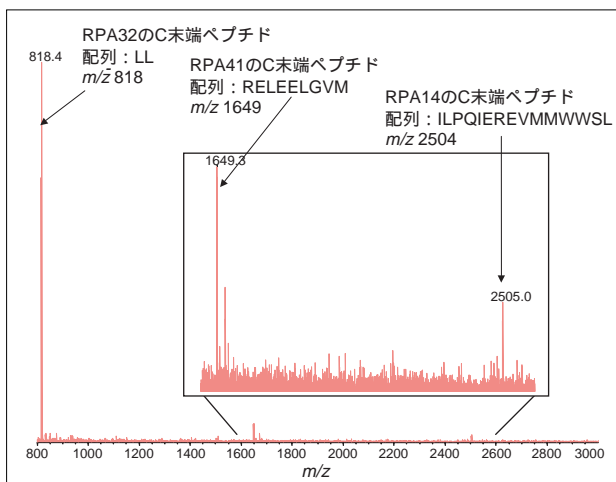


Fig. 3 PfuRPAのC末端ペプチド単離後のMALDI-MSスペクトル  
MALD-TOF Mass Spectrum after Isolation of Three C-terminal Peptides Using DITC Resin.

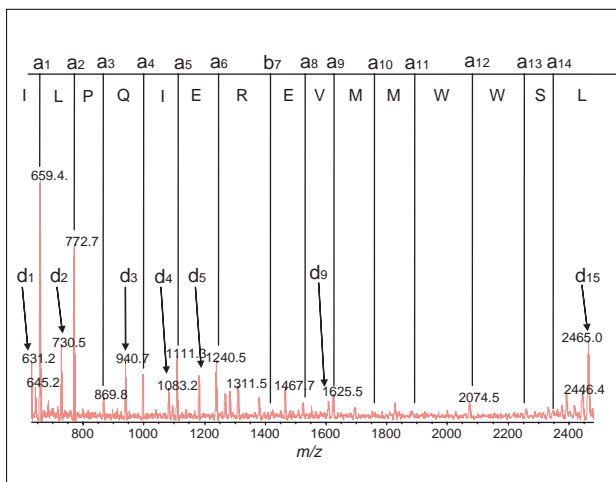


Fig. 4 サブユニットRPA14のC末端フラグメントのMS/MSスペクトル  
MS/MS Spectrum of The Isolated C-terminal Peptide from RPA14

#### [参考文献]

1) Kuyama, H., Shima, K., et al., *Proteomics* 2008, 8, 1539-1550.

Fig. 1にタンパク質C末端アミノ酸配列解析のながれを示します。1)目的タンパク質をリジルエンドペプチダーゼ(LysC)で消化すると、消化ペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸は、タンパク質C末端部位由来のもの以外は全てリジンとなります(タンパク質C末端のアミノ酸がリジンの場合を除く)。2)LysC消化物と(Succinimidyl)oxycarbonylmethyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide(TMPP-Ac-OSu)を反応させると、消化ペプチドのアミノ基が選択的にTMPP-Ac修飾されます。3)*p*-phenylenediisothiocyanate-resin(DITC resinあるいはglass)にTMPP-Ac修飾を行ったLysC消化物を加えると、側鎖がアミノ基であるリジンを配列内に有するペプチドは全てDITC resinにトラップされます。一方、フリーのアミノ基を持たないタンパク質C末端部位由来の消化ペプチドはDITC resinにトラップされません。4)単離したタンパク質C末端ペプチドをMS/MS測定すると、強い正電荷を持つTMPPを含むフラグメントのみがMS/MSスペクトル上に観測されます。このフラグメント間の質量差を、遺伝子配列から推定される末端アミノ酸配列と比較することにより、タンパク質C末端アミノ酸配列を帰属することが出来ます。

3種類のサブユニットからなるリコンビナント複合タンパク質PfuRPAのLysC消化, TMPP-Ac修飾後のMALDI-MSスペクトルをFig. 2に示します。各サブユニットRPA14, RPA32, RPA42由来の消化ペプチドがMSスペクトル上に観測されていますが、RPA14, RPA42についてはC末端ペプチドが殆ど見えていない状態です。次に、PfuRPAのTMPP-Ac修飾LysC消化物をDITC resinと反応させ、各サブユニットのC末端ペプチドを単離した後のMSスペクトルをFig. 3に示します。内部配列由来のペプチドは全てDITC resinにトラップされ、各サブユニットのC末端ペプチド由来のピークのみがMSスペクトル上に検出されています。これら3種全てのC末端ペプチド由来のピークについてMS/MS測定を行い、遺伝子配列から推定される末端アミノ酸配列と検出されるフラグメント間の質量差を比較することにより、各々のサブユニットのC末端配列を帰属することが出来ました。ここでは、その一例としてm/z2504のピークについてAXIMA Performanceの特長である高エネルギーCID法を用いたMS/MS測定の結果を示します(Fig. 4)。

初版発行：2010年1月

**島津製作所** 分析計測事業部  
応用技術部

島津分析コールセンター

☎ 0120-131691(携帯電話不可)  
● 携帯電話専用番号(075)813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>  
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。