

Application News

No. B78

MALDI-TOF 質量分析法

卓上型MALDI-TOF MSを用いたインソース分解 (ISD) による酸化ペプチドの解析

MALDI-TOFMSは、ペプチドまたはタンパク質の分子量および一次構造に関する情報を得るための、迅速かつ簡便な方法です。現在様々な断片化方法がある中で、タンパク質の配列を得るために、“Top-down”プロテオミクスとしてインソース分解 (ISD) が用いられています。ISDでは、水素ラジカル移動を利用して c-および z-フラグメントイオン系列を生成することができます。ポストソース分解 (PSD) に対する ISD の利点の 1 つは、理論的には試料の質量による制限がないため、酵素消化せずに直接大きなタンパク質のシーケンシングが可能であることです。MALDI-ISD ワークフローの概要を図 1 に示します。

製薬業界では、バイオ関連医薬品開発において、失活や毒性など治療に影響する可能性をモニターするため、品質管理プロセスの一環として、製剤処方あるいは劣化などによる変化を追跡することが重要になっています。分解を伴って起こりうる修飾のひとつの例として、ペプチドまたはタンパク質のメチオニン残基の酸化が挙げられます。このメチオニンは他のアミノ酸に比べ非常に酸化しやすいことが知られています。

ここでは、卓上型 MALDI-TOFMS である MALDI-8020 による Top-down 配列解析により Exendin-4 ペプチドのメチオニン酸化 (Met-O) 部位を決定した例をご紹介します。この方法は、バイオ関連医薬品の QC において、生産プロセスにおける望ましくない変化を特定する有用な方法と言えます。

S. Salivo, (Y. Yamazaki)

■ 試料と方法

Exendin-4 ペプチドは Sigma-Aldrich から購入しました。Exendin-4 を 1%過酸化水素 (H₂O₂, pH 中性) と 37 °C で 15 分間インキュベートして酸化した後、試料溶液を酸性化し、ZipTip® C₁₈ (Millipore 製) を用いてペプチドを精製しました。

天然及び Met-O ペプチドを α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA, 5 mg/mL, 50 %アセトニトリル/0.1 %トリフルオロ酢酸) と混合し、1 μL をターゲットに滴下乾燥しました。ISD 分析のために、天然および酸化型ペプチドを 1,5-ジアミノナフタレン (1,5-DAN, 50 %アセトニトリル/0.1 %トリフルオロ酢酸で飽和) と混合し、1 μL をターゲットに滴下乾燥しました。

装置は卓上型 MALDI-TOFMS である MALDI-8020 を用い、図 1 中に記載した測定条件で分析しました。

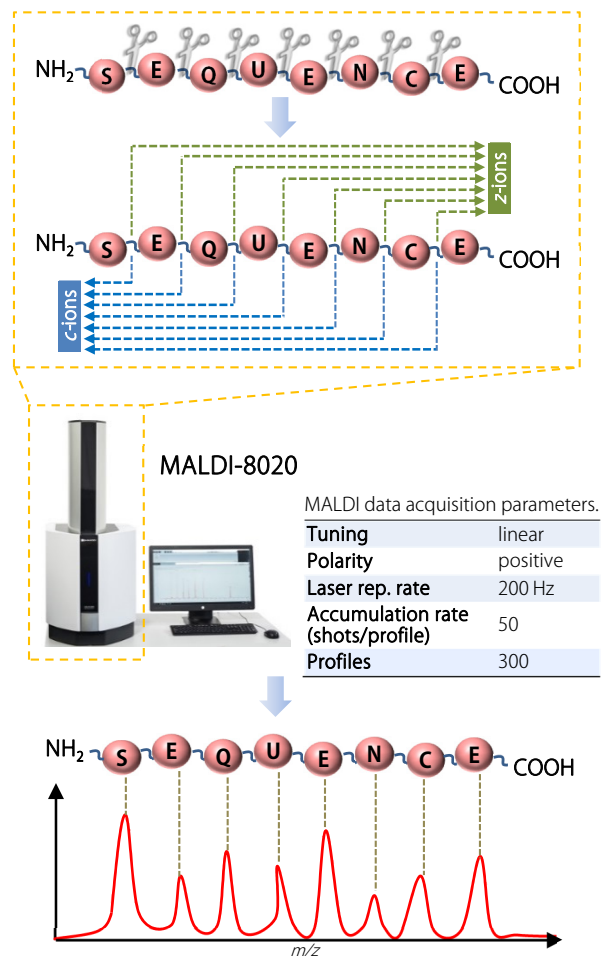


図 1 MALDI-ISD のワークフローおよび測定条件

結果

Exendin-4は、アメリカドクトカゲ (*Heloderma suspectum*) の唾液中に存在する天然のペプチドです。合成型のペプチドは Exenatide として 2 型真性糖尿病の治療に使用されています。

マトリックスとして 1,5-DAN を用いて得られた天然 Exendin-4 の MALDI-MSD スペクトルを図 2 a) に示します。図中に記載された質量表示はモノアイソトピックピークに対応します。

図 2 b) の上段に示されているカメラ画像には、最適化した試料調製により得られた試料表面の非常に良好な均一性が示されています。質量スペクトルの拡大領域 (図 2 c) および d) には、フラグメントイオン (m/z 1200-2800 範囲) のシグナルが良好に同位体分離されている状態が分解能の値 (カッコ内) と共に示されています。

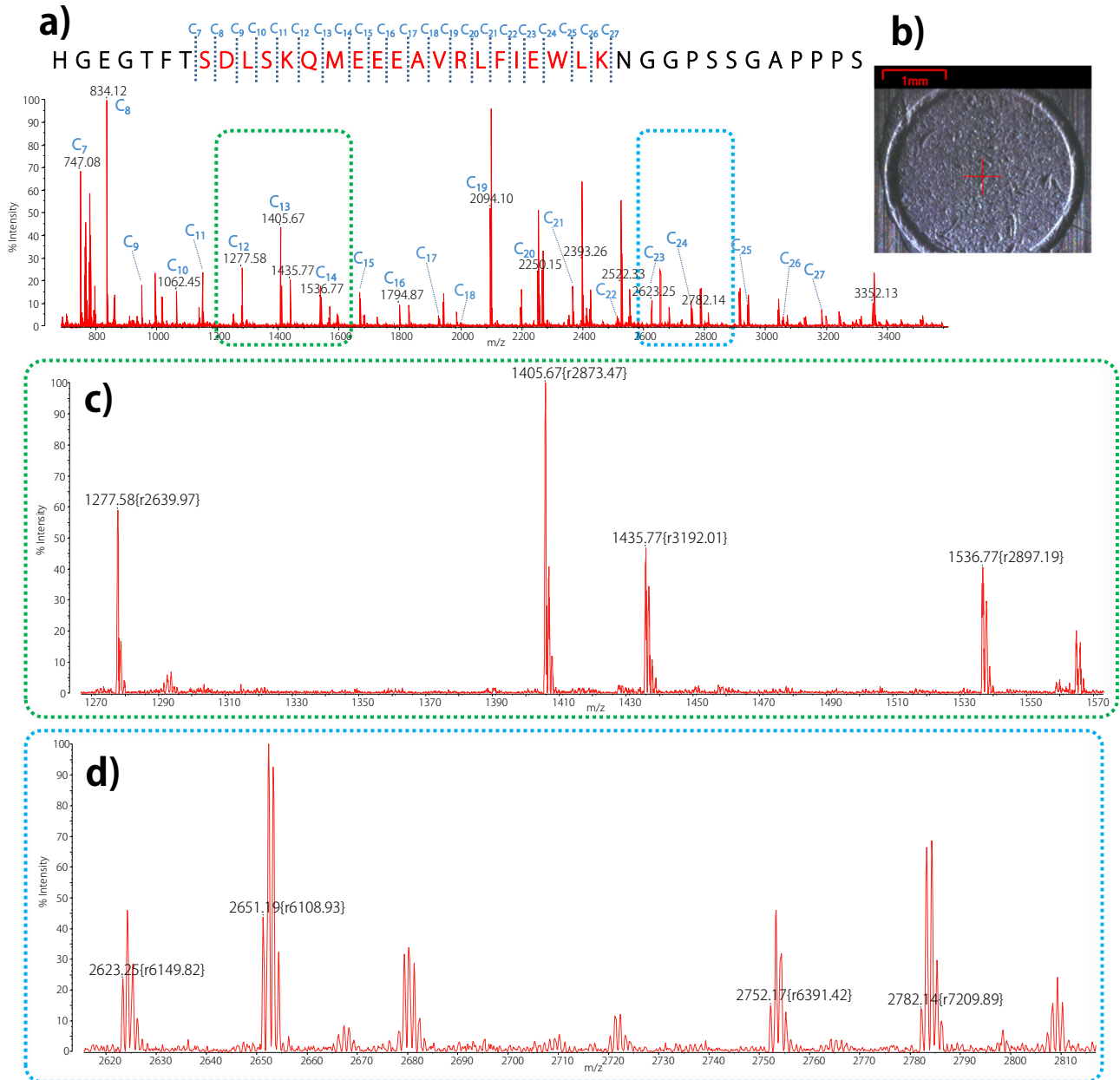


図 2 a) 天然 Exendin-4 の MALDI-MSD スペクトル; b) マトリックスとして 1,5-DAN を用いたウェルのカメラ画像; c) & d) ISD スペクトルの拡大図

Mascot-ISD 検索を実行するために、Exendin-4 のシーケンスを追加したカスタムバージョンの Swiss-Prot データベースを作成し、次に、MALDI Solutions ソフトウェアの検索ツールから Mascot-ISD 検索を行いました。図 3 に示されたとおり、Exendin-4 を同定するに十分な有意スコア (図 3 a) および配列カバレッジ (72% ; 図 3 b) を得ました。

酸化反応の後、ペプチドの分子量測定を行って、酸化反応が成功裏に行われたことを確認しました。CHCA マトリックスを用いて得られた図 4 のスペクトルには、天然型 (赤線) および酸化型 (青線) Exendin-4 の質量が良好な質量精度および分解能で得られたことを示しています。予想通り、Exendin-4 中に一箇所あるメチオニン側鎖が酸化されて生成したスルホキシドに対応する+16Da の質量シフトが検出されました。

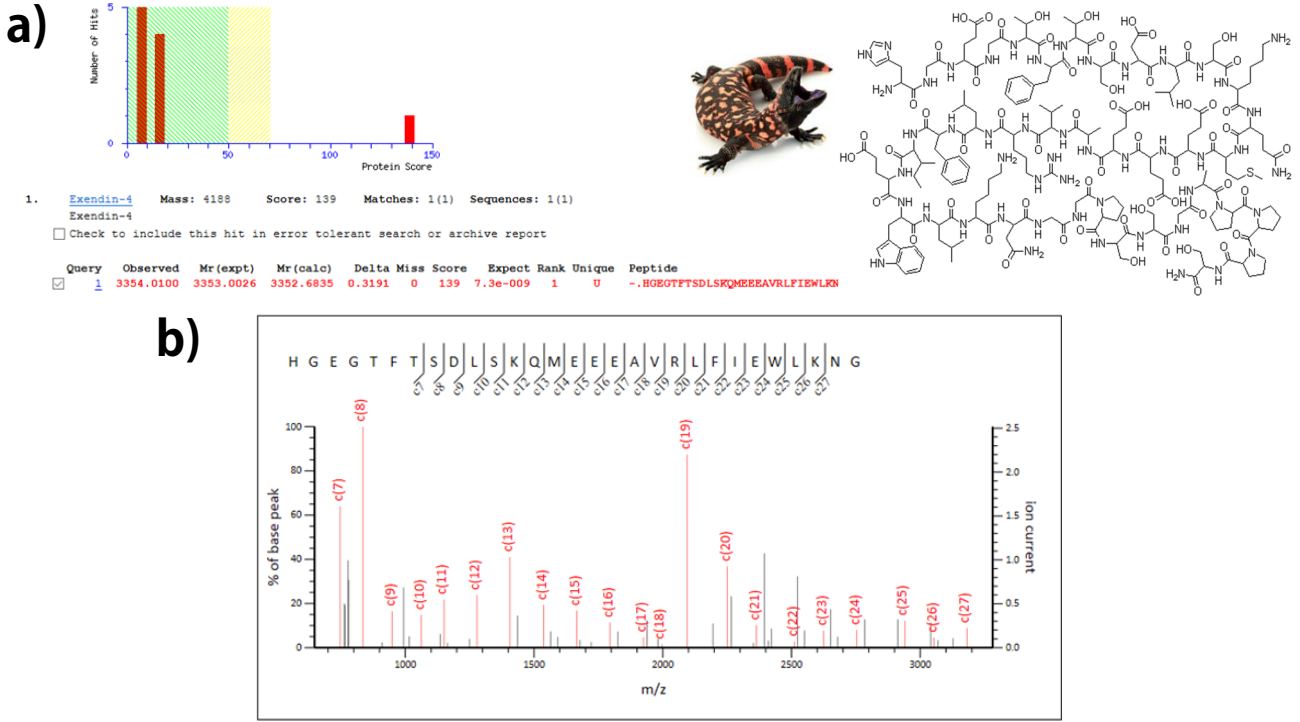


図 3 a) Mascot による同定結果と Exendin-4 のアミノ酸配列 ; b) アミノ酸配列とマッチしたフラグメントイオンの表示

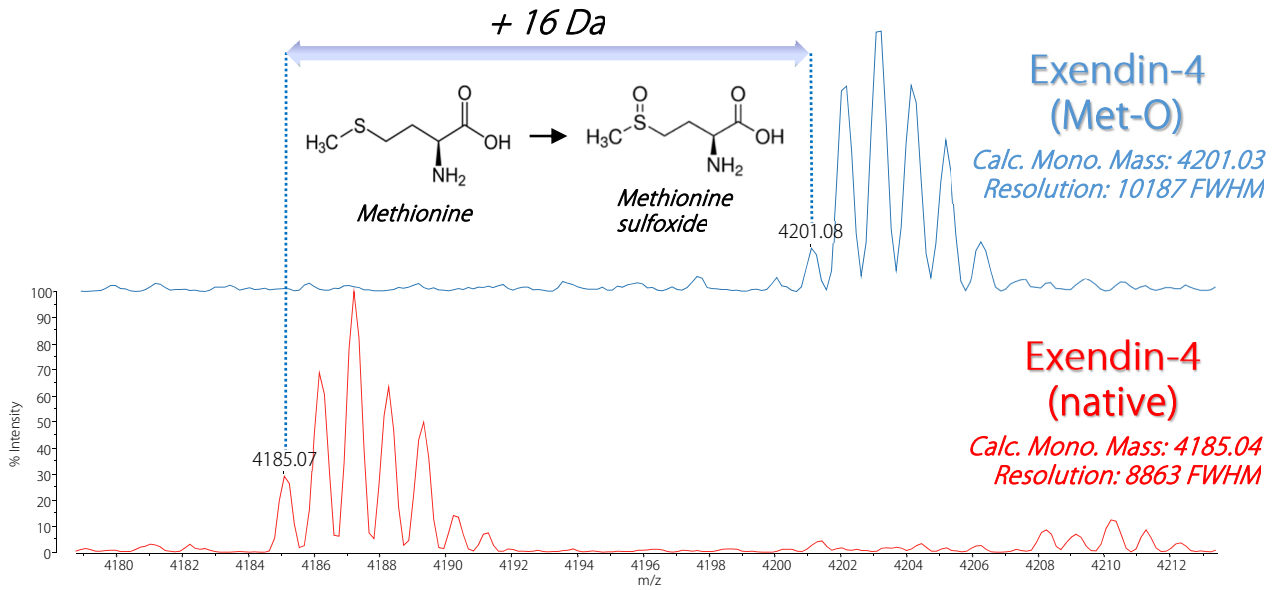


図 4 天然型 Exendin-4 とその酸化体の MS (マトリックス : CHCA)

酸化型 Exendin-4 の MALDI-MSD スペクトルを図 5 a) に示します。ISD により N 末端側から生成した c-ion シリーズ (C₉-C₁₃) および 16Da シフトした c-イオン (C₁₄-C₂₉) が検出されました。C₁₄ イオン (緑色で表示) は、メチオニン残基を含む酸化部位に対応したフラグメントイオンです。

図 5 b) には、天然 (赤線) および酸化体 (青線) Exendin-4 のフラグメントイオン (m/z 1400-1650) を比較しました。ここでもフラグメントイオンのシグナルは良好に同位体分離されています。

期待したとおり、C₁₄ イオン (HGEGTFTSDLSKQM) はメチオニンの酸化に対応する 16Da の質量シフトを示しました。Mascot 検索は、先ほど作成したカスタムデータベースを用いて実施されました。ここでは検索パラメーターとしてメチオニン酸化 (固定) を指定して、酸化型 Exendin-4 の ISD スペクトルから得たピークリストをクエリーとしました。その結果を図 5 c) に示します。酸化体でもペプチドを同定するに十分な有意なスコアを得ることができました。

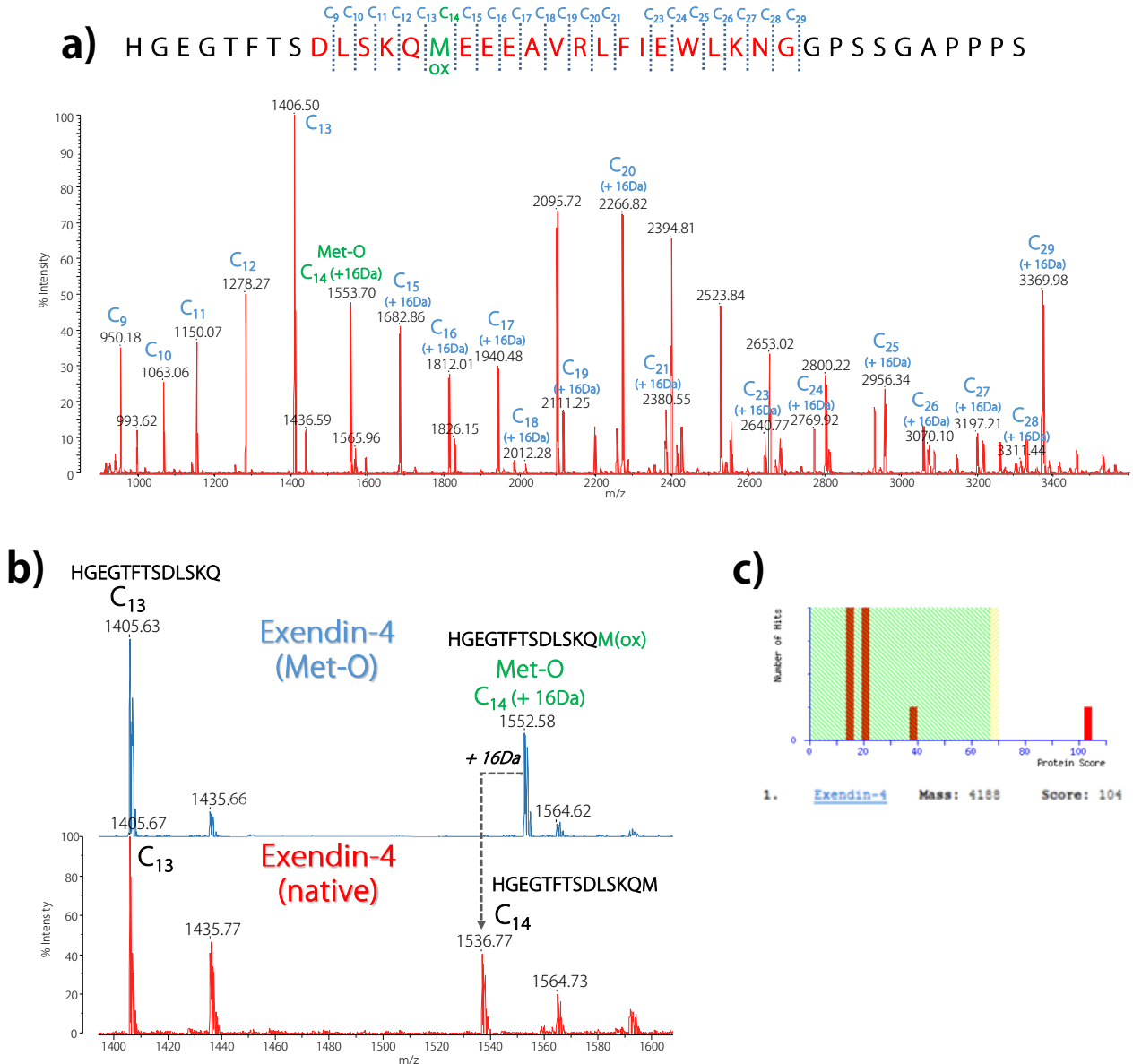


図 5 a) 酸化型 Exendin-4 の MALDI-MSD スペクトル ; b) メチオニン酸化による質量シフトを示すフラグメントイオン (C₁₄) 付近の拡大図 ; c) Mascot による酸化型 Exendin-4 の同定結果

ZipTip は、Merck KGaA の登録商標です。