

Application News

No. B105

MALDI-TOF 質量分析法 / プロテインシーケンサ

タンパク質分析プラットフォーム

MALDI-TOF MS (MALDI-8020) とプロテインシーケンサ
(PPSQ™-50A グラジエントシステム) の組み合わせによる
ペプチドのN末端部アミノ酸配列解析

■はじめに

質量分析法は、ペプチドのアミノ酸配列の決定に不可欠なツールとなっています。MALDI-TOF MS を用いたインソース分解 (In Source Decay (ISD)) は、比較的簡便にアミノ酸配列を得ることができますが、その反面、同一質量のアミノ酸の識別、データベース依存性および低分子量の測定困難さ等により、信頼できる配列情報を得るためには課題を有しています。

一方、エドマン分解によるアミノ酸配列解析は、N末端から各アミノ酸を1つずつ順番に分析するため、質量およびデータベース依存性等の問題はありません。しかしながら、長い配列情報を得ようとするとうエドマン反応の効率が低下すること、修飾アミノ酸の解析が困難であるという限界もあります。

本稿では、MALDI-8020 (ISD) から得られた質量・配列情報と PPSQ-50A グラジエントシステムから得られたN末端アミノ酸配列情報とを組み合わせることの利点をご紹介します。組み合わせられた情報を使用することにより、目的とするタンパク質およびペプチドのより正確なアミノ酸配列情報を得ることができます。

PPSQ-50A グラジエントシステムと
MALDI-8020 の結果を補完的に組み合わせることで、より確実に正確な N 末端アミノ酸配列の情報を得ることができます



PPSQ™-50A
グラジエントシステム



MALDI-8020

MALDI-8020 および PPSQ-50A グラジエントシステムによる脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の分析例

ISD およびエドマン分解によるN末端アミノ酸配列解析の結果を補完的に組み合わせた分析サンプルとして、BNP を分析しました。この45残基の環状ペプチドは、利尿作用と血管拡張作用を有するホルモンとして働きます (図1)。ペプチドの環状部分を形成するジスルフィド結合の分析をする場合、PPSQ-50A グラジエントシステムでは、サンプルの還元アルキル化を必要としますが、MALDI-TOF MS を用いる場合は、プレート上で還元することが可能であるため、直接分析することが可能です。

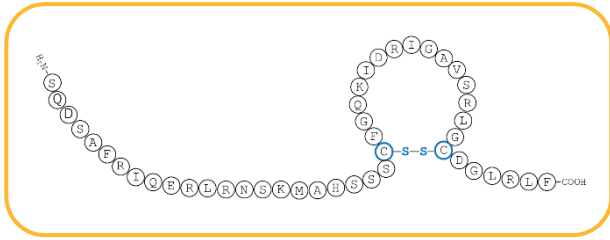


図1 環状ペプチド BNP の構造

PPSQ-50Aグラジエントシステム：エドマン分解によるN末端アミノ酸配列分析

エドマン分解によるN末端アミノ酸配列解析では、質量依存性を排除することによって確実な N 末端アミノ酸配列情報を得ることができます。タンパク質は、N末端から一つずつ誘導体化・切断・転換反応で PTH-アミノ酸が生成され、HPLC で分離後、標準品の保持時間と比較することで、同定されます。図2は、PTH-アミノ酸標準混合品 10 pmol のクロマトグラムを示します。

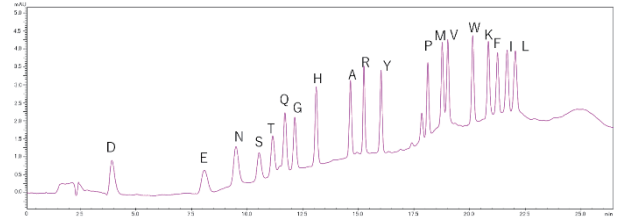


図2 PTHアミノ酸標準混合品 10 pmol のクロマトグラム

図3は、PPSQによるBNPのシーケンス分析結果です。1~7サイクル目までのクロマトグラムを示します。2サイクル目以降では、解析を容易にするために差クロマトグラムを作成することが可能です。本結果より、N末端アミノ酸配列は、SQDSAFRと同定できます。

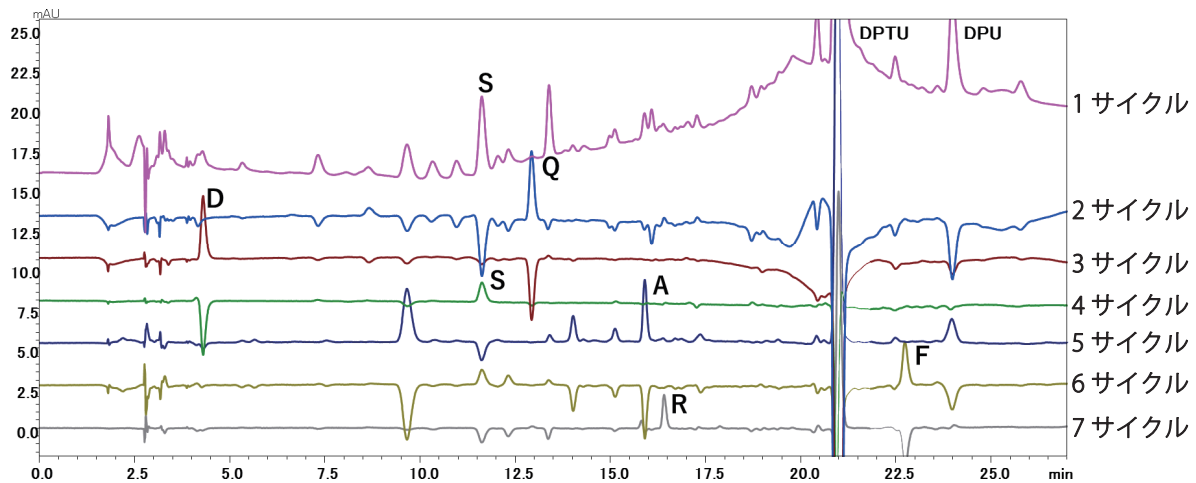


図3 PPSQ-50A グラジエントシステムを用いた BNP のシーケンス分析 (1 サイクル目：生クロマトグラム、2 サイクル目以降：差クロマトグラム)

MALDI-8020 : ISDによる配列分析

MALDI-TOF MS を用いた ISD によるアミノ酸配列分析

質量分析によるアミノ酸配列解析では、フラグメントイオン間の質量差を利用してペプチドのアミノ酸配列を決定します。インソース分解では、レーザー出力を増加させること

によって分析物を不安定化し断片化させます。その結果、ペプチドの N-Cα 結合での開裂による様々なフラグメント (典型的には c-イオン) が得られます。図 4 は、BNP の ISD スペクトルを表しています。

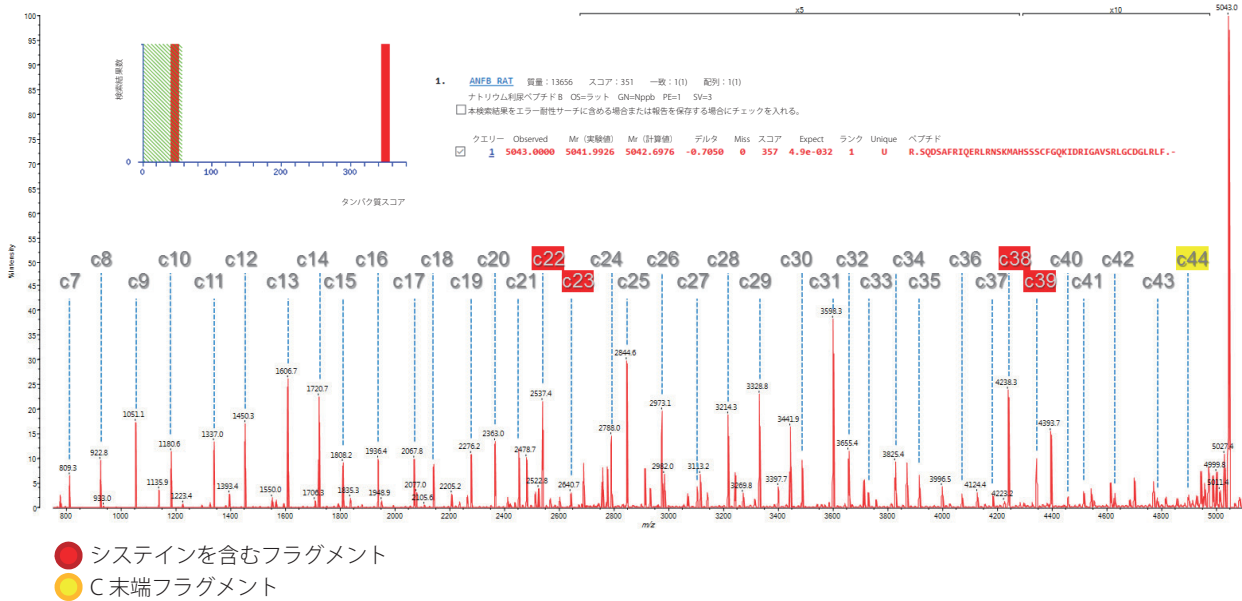


図4 MALDI-8020 を用いた BNP の ISD スペクトル (DAN マトリックスを使用、図中に MASCOT の同定結果を表示)

■ 分析条件

ISD

- 装置：MALDI-8020 (リニアモード)
- マトリックス：1,5-ジアミノナフタレン

分子量測定

- 装置：MALDI-8020 (リニアモード)
- マトリックス：α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸
- マトリックスの塗布：Thin Layer

このデータから、データベース検索または *De novo* シークエンシングいずれかの方法を利用してアミノ酸配列を決定することができます。データベース検索では、測定された質量をデータベースと比較し、ペプチドのアミノ酸配列を決定します。これは最も簡単で速い方法ですが、この方法はデータベースの内容に依存するため、不正確または不確実になることがあります。*De novo* シークエンシングではデータベースを使用しませんが、解析により多くの経験と習熟を必要とし、人為的なミスを起こしがちです。Mass++™などのソフトウェアは、この分析を容易にし、手動でデータを解釈する必要がなくなります。

■ MALDI-8020 : 分子量測定

正確な分子量測定から、ペプチドまたはタンパク質について多くの情報が得られます。この分子量は、誤ったアミノ酸組成、可能性のある分解、または修飾の存在を迅速に判断するのに役立ちます。ペプチドの正確な平均分子量は、適切なマトリックスの選択によって容易に決定することができます (表 1)。単純なリニアモード専用機の MALDI-8020 を用いた場合でも、質量は理論分子量の 20 ppm 以内の精度で検出されました。

表 1 BNP の理論質量と実測質量

ペプチド	予測質量 (MH+)	実測質量 (MH+)	質量精度 (ppm)
BNP	5038.6	5038.5	20

図 5 は MALDI-8020 を用いた BNP のマススペクトルを示しています。

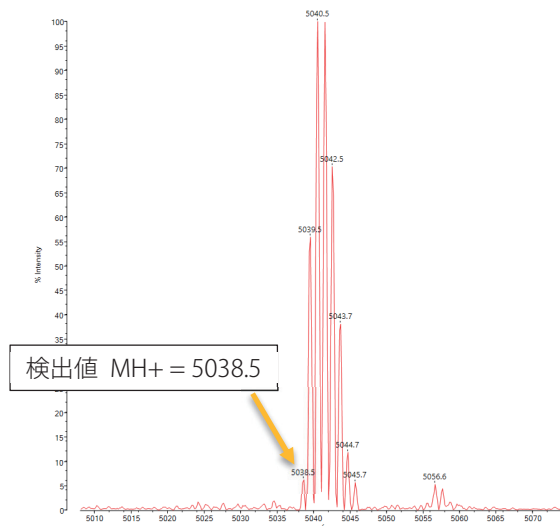


図5 BNP の質量スペクトル

■ 結果とまとめ

表 2 に示すように、MALDI-TOF MS とエドマン分解による N 末端アミノ酸配列解析はいずれもアミノ酸配列を同定することに大きな利点をもたらします。現在利用可能なすべての方法の中で、エドマン分解による N 末端アミノ酸配列解析法は、依然として、タンパク質、またはペプチドの実際の N 末端を決定するための最良の方法です。ISD もまた配列情報を得るための信頼できる手段ですが、N 末端に関連する低質

量フラグメントについては一般にマトリックスからの干渉のため観測できません。

図 6 に、BNP の分析について PPSQ と MALDI-8020 との組み合わせの結果を示します。これらの方法のうちの 1 つを使用するだけでは、配列の一部しか得ることができませんが、2 つを補完的に使用することにより、全長の正確な配列情報が得られました。



図 6 ISD とエドマン分解シーケンシングの組み合わせによる BNP の配列決定

表 2 PPSQ-50 グラジエントシステムと MALDI-8020 によって特定できる機能の概要表

機能	PPSQ-50 シリーズ	MALDI-8020
N 末端部アミノ酸配列分析	☑	
内部、または C 末端部アミノ酸配列分		☑
同一質量アミノ酸の識別	☑	
データベースの使用回避	☑	
データ解釈の容易性 (アミノ酸配列)	☑	
簡便性	☑	☑
分析速度		☑
質量測定		☑

PPSQ および Mass++ は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中には TM、® マークを明記していない場合があります。