

Application News

No. B100

MALDI 質量分析計

小型MALDIデジタルイオントラップ 質量分析計"MALDImini™-1"を用いた 糖ペプチド解析

タンパク質の翻訳後修飾の一つである糖鎖は、グルコースやマンノースなどの単糖が複雑に結合した構造不均一性の高い分子です。その複雑な構造はタンパク質の機能調節に関係していることが知られています。しかし、糖鎖の複雑な構造や、糖鎖がタンパク質のどの部位に結合しているかという情報は、遺伝子に直接コードされているものではなく、タンパク質の生合成過程で働く多くの糖転移酵素の働きにより形作られてゆく情報です。そのため、疾病などによって、同じタンパク質骨格を持っていても異なる糖鎖構造を持っていたり、糖鎖が結合していると予想される箇所に実は糖鎖が結合していなかったりといった現象が見られます。そのため、糖タンパク質上の糖鎖の構造や結合部位を知るためには、対象となる糖タンパク質を直接分析する必要があります。この分析には質量分析計が広く使われていますが、ほとんどが大型で高性能な装置によって実施されています。

本稿では、当社独自技術であるデジタルイオントラップ(DIT)を搭載した、小型 MALDI-DIT 質量分析計 "MALDImini-1" を用いた糖ペプチド分析について報告します。

S. Nakaya

■ 小型 MALDI-DIT 質量分析計 "MALDImini-1"

MALDImini-1 (図 1) は MALDI イオン源とデジタルイオントラップを組み合わせた質量分析計です。イオントラップ機構には従来より正弦波 RF が用いられてきましたが、電圧を変調するための正弦波 RF 発生コイルと大きな高電圧電源が必要となり、必然的に装置が大型化するという傾向がありました。今回の分析に用いた MALDImini-1 は、正弦波 RF ではなく矩形波 RF を用いる島津製作所独自技術である「デジタルイオントラップ」を搭載することで、従来装置から大きくサイズダウンし、真空ポンプもすべて内蔵した状態で、A3 サイズを下回るフットプリントと本体重量 25 kg という軽量省スペースを実現しました。



図 1 小型 MALDI-DIT 質量分析計 "MALDImini™-1" 本体外観

■ 糖タンパク質からの糖ペプチド調製

市販モノクローナル抗体を試料として、まず溶液中での還元アルキル化を行いました。その後、この溶液にトリプシンを加えて 37℃ で 3 時間酵素消化し、酵素消化後の溶液を、あらかじめブタノール：エタノール：水 = 4：1：1 で平衡化しておいた Sepharose CL4B ゲルを詰めたピペットチップに通し、糖ペプチドをゲルに吸着させました。その後、平衡化溶液で洗浄してペプチド成分を除き、エタノール水溶液で糖ペプチドを回収しました。回収した糖ペプチドを MALDI ターゲットプレートに載せ、さらにマトリックス溶液を重層して乾燥させました。マトリックスには DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) を用いました。

■ 糖ペプチド画分の MS 測定

回収した糖ペプチドを、MALDI-DIT 質量分析計 "MALDImini-1" を用いて、スキャンスピード 4000 Da/s で MS 測定しました。その結果、主要ピークとして m/z 2269.0、2431.1、2593.3、2634.3、2796.3、2958.2、3119.9、3282.3 が互いに糖由来の質量差を持って検出されました (図 2)。

糖鎖はその構造に不均一性をもつため、1 つのペプチド骨格に複数の異なる糖鎖構造が存在しています。MALDI-DIT 質量分析計ではシグナルが 1 価イオンとなりやすいため、MS 測定で検出されたシグナル間の m/z の差を確認し、糖鎖の構成成分由来の差と合致するものを探索することで、複数の検出シグナルから容易に糖ペプチド由来のシグナルを見つけ出すことが可能です。

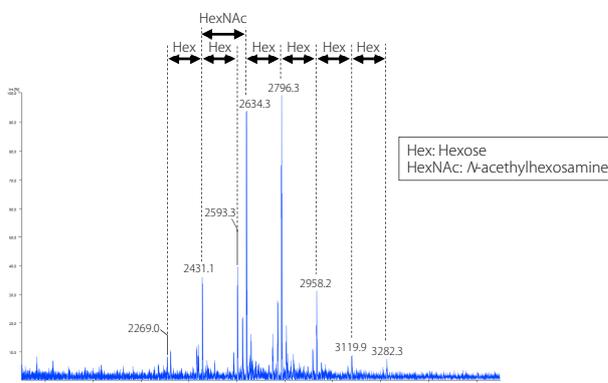


図 2 市販抗体から抽出した糖ペプチド画分のマスペクトル

MSⁿによる糖鎖配列解析と結合部位特定

こうして見つけ出された糖ペプチド由来シグナルの中から、一例として m/z 2796.3 を選択し、MS/MS 分析を実施しました (図3)。その結果、糖鎖由来の開裂イオンが検出され、さらに *N*-結合型糖鎖のペプチド結合部分の GlcNAc に特徴的な質量差 ($\Delta m/z$ 83、120) を持つ三つ組みピークも検出されました。このことから MS/MS スペクトルにみられた m/z 1189.7 のイオンがペプチド骨格由来のイオンであることが分かりました。次いで、ペプチド骨格由来イオン (m/z 1189.7) の MS³ 分析を行ったところ、ペプチド骨格のアミノ酸配列を

確認できました。さらに、ペプチド骨格に根元の糖鎖断片が結合したイオン (m/z 1272.7) について MS³ 分析を行いペプチド骨格由来のスペクトルと比較することで、糖鎖の結合位置を特定することができました (図4)。これらの解析結果から、今回分析に用いた市販抗体の糖ペプチドが図5に示したような構造を有していることが示唆されました。

今回の分析結果は、小型 MALDI-DIT 質量分析計 "MALDImini-1" が、小型ではあっても MSⁿ 分析能力が高く、糖ペプチドのように分子サイズが大きく構造が複雑な成分であっても十分に解析できるだけの性能を有していることを示しています。

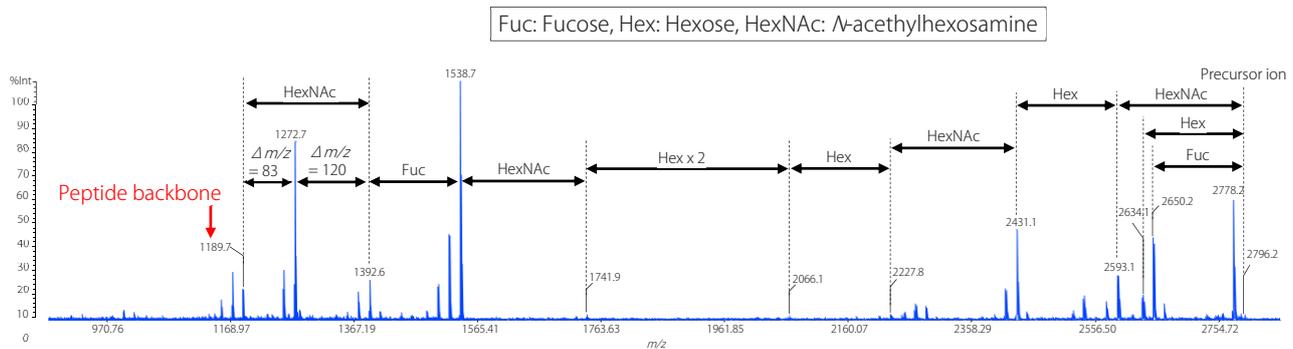


図3 糖ペプチドの MS/MS スペクトル (Precursor ion m/z = 2796.2)

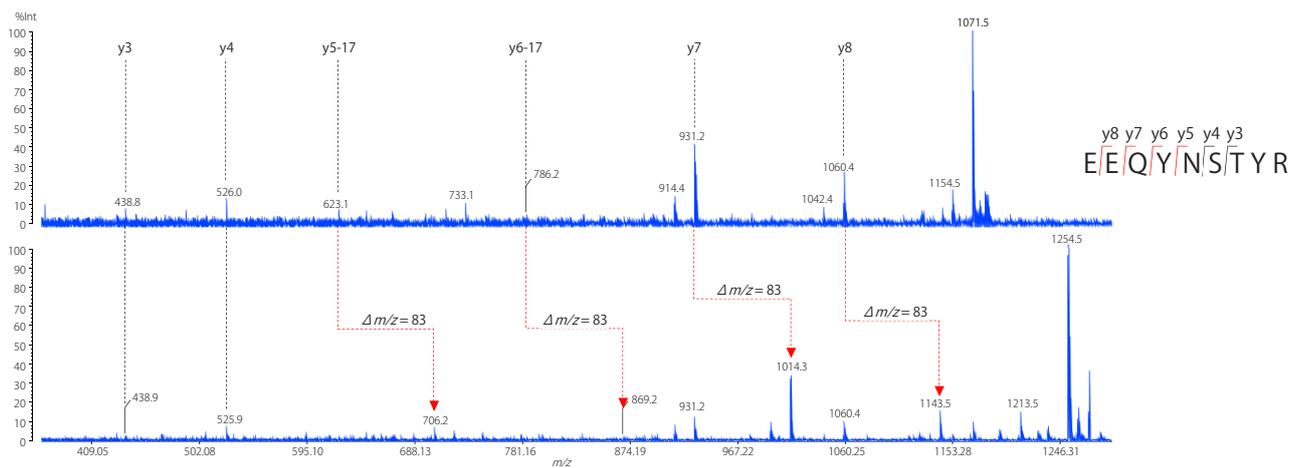


図4 糖ペプチドの MS³ スペクトル

上: ペプチド骨格由来イオン (Precursor ion m/z = 1189.7)、下: 糖鎖断片含有ペプチド骨格由来イオン (Precursor ion m/z = 1272.7)

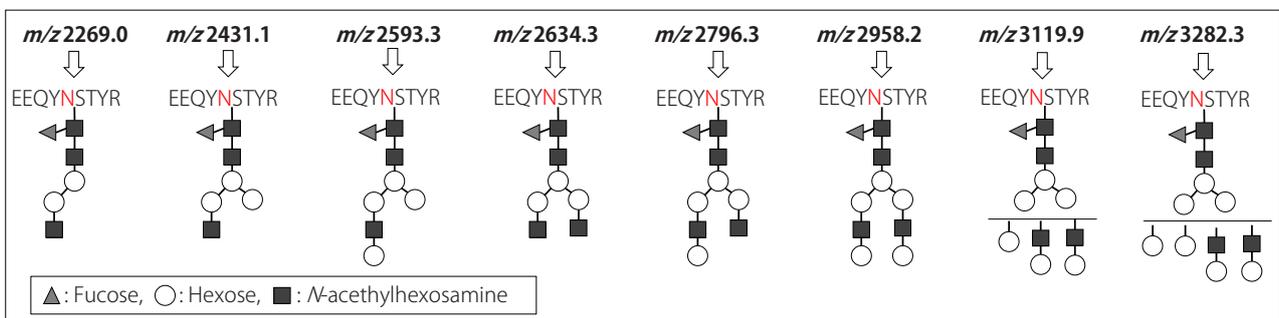


図5 市販抗体由来の推定糖ペプチド構造 (赤字: 糖鎖結合部位のアミノ酸)

MALDImini 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。

Sepharose は、General Electric Company の商標です。

その他、本文中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。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行: 2019年5月

島津コールセンター ☎0120-131691
(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。