

MALDI-TOFMSによるリン酸化解析(2) Seamless PSDによるリン酸化ペプチドの配列解析

Phosphorylation analysis by MALDI-TOF MS (2)

Phosphopeptide sequence analysis using seamless PSD

近年、タンパク質のリン酸化とリン酸化部位の解析に質量分析が適用されています。様々なタイプのMS/MS(目的のイオンから生じたフラグメントイオンを検出する手法)でリン酸化部位が決められていますが、その多くはエレクトロスプレーイオン化法(ESI)をベースとした装置構成です。一方でMALDI法は汎用性・簡便性を有しているにもかかわらず、リン酸化部位の解析に関する有用性はあまり知られていません。ここでは、seamless PSD(sPSD)を用いたリン酸化修飾部位の解析方法について示します。

MALDI-MS/MSによるアミノ酸配列解析でよく用いられるCID(衝突誘起解離)法では、不活性ガスとの衝突により壊れやすいリン酸基の脱離が著しく、リン酸化部位の情報を得るのが困難です。MS/MS測定において不活性ガスを用いないsPSDにすると、ある程度リン酸基脱離が抑制されたMS/MSスペクトルが得られます。

Fig.1はマトリックスとしてDHBを用いた2リン酸化ペプチドのsPSDを示しています。フラグメントイオンを帰属した結果、Fig.1中に示すようなC末端フラグメントであるy-ionが優先的に生成していることが分かりました。また、フラグメントイオンからのリン酸基脱離も観測されましたがその強度は強くなく(図中y7-98)、リン酸化アミノ酸残基の質量から全配列を読み解くのに十分なMS/MSスペクトルが得られました。

このような効果はDHBを用いたときに特に増幅されることが知られていましたが¹⁾、従来のPSDではフラグメントイオンの検出感度が低く、あまり実用的ではありませんでした。sPSDは従来のPSDに比べ、フラグメントイオン生成効率の良さが大きな特徴です。そのため、実用的な感度でこのようなリン酸化ペプチドのMS/MS測定が可能になりました。

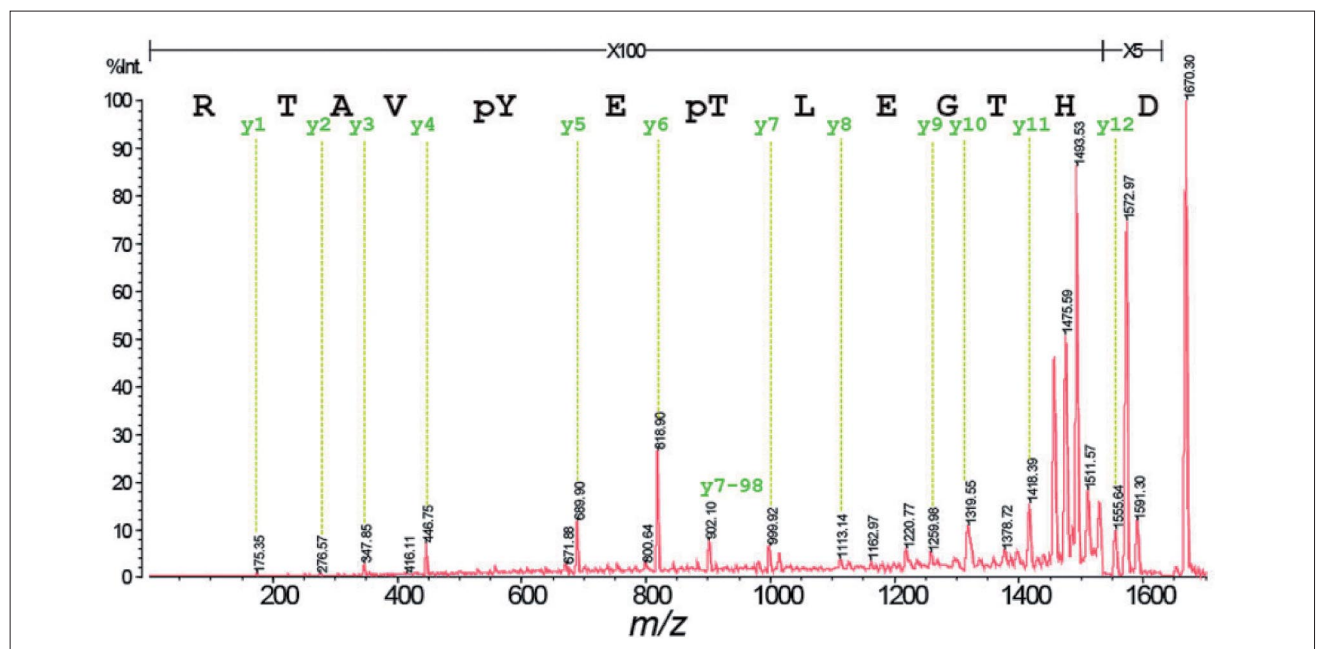


Fig.1 MAP Kinase fragment 177-189 (2リン酸化ペプチド)のsPSD
sPSD spectrum of MAP Kinase fragment 177-189 (a doubly phosphorylated peptide)

<測定条件>

装置 : AXIMA-Performance

マトリックス : 2, 5-DHB (Dihydroxybenzoic acid) 10 mg/mL (50% アセトニトリル, 0.1% TFA)

試料 : MAP Kinase fragment 177-189 (2リン酸化ペプチド) (Invitrogen)

([M + H]⁺ = 1669.7; DHTGELpTEpYVATR)

MALDI用の濃縮プレート(μ Focus plate)を用いるとさらに高感度な測定が可能になります。このプレートは疎水性のエリアと親水性のウェル(直径0.6 mm)から成り、水系溶媒の試料を滴下すると、親水性のウェルに試料が凝縮されるようにデザインされています。標準プレートのウェル径は3 mmなので、面積あたりの試料濃度としては10倍以上になり、感度が向上します。

Fig.2にμ Focus plateを用いた濃縮効果を示しました。モノリン酸化ペプチドで評価すると、750 attomolでMS測定が可能であり、1 femtomol以上であればMS/MS (sPSD) によるリン酸化ペプチドの配列解析が可能であることを示しています。

以上のことから、sPSDとDHBマトリックスの組み合わせは、不安定なリン酸化ペプチドの解析に適したシステムと言えます。

Y. Yamazaki

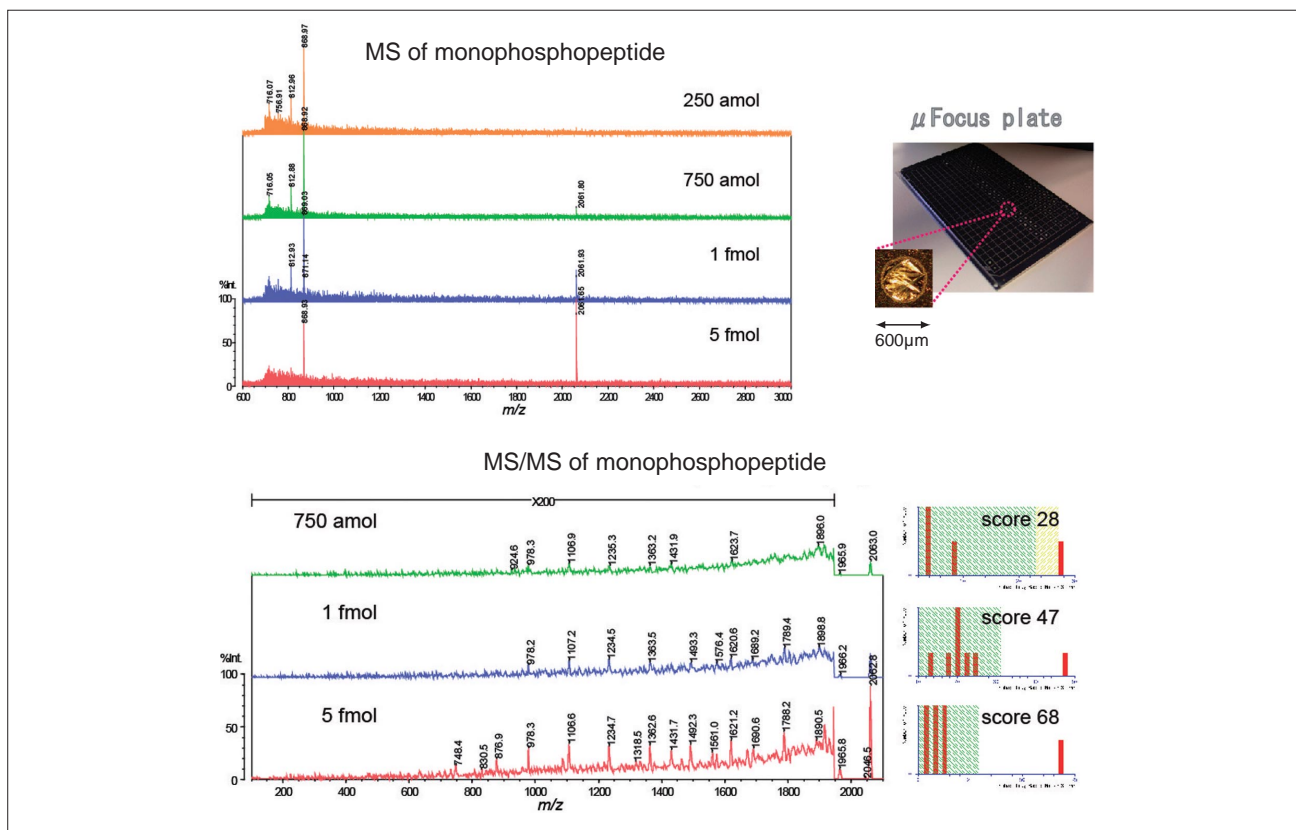


Fig.2 濃縮プレートを用いたリン酸化ペプチドの検出感度の検討
Detection limit of a phosphopeptide using concentration plate (μ Focus plate)

< 測定条件 >

装置: AXIMA-Performance

マトリックス: 2, 5-DHB (Dihydroxybenzoic acid)

10 mg/mL (50% アセトニトリル, 0.1% TFA)

試料: カゼイン由来モノリン酸化ペプチド (SIGMA)

MALDI-TOFMS用濃縮プレート

μ Focus MALDI plate

従来品に比べ10倍以上の感度を持ち、疎水性/親水性の皮膜処理技術の向上
384サンプルに対応
優れたコストパフォーマンス
使い捨てプレートなので、コンタミの心配がありません。

価格表

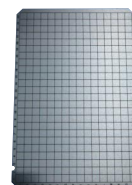
P/N	商品名	入数	定価(円)
HMFP-5M	μ Focus MALDI plate Magnetic Holder for Shimadzu	1枚入	83,000
MFP001BD10	μ Focus MALDI plate 600um Shimadzu (384 well)	10枚入	83,000
MFP002BD10	μ Focus MALDI plate 1000um Shimadzu (384 well)	10枚入	83,000



AXIMA-Performance



HMFP-5M



MFP001BD10

[参考文献]

1) Int J Mass Spectrom Ion Process, 169/170, pp231 (1997)

初版発行: 2008年10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。