

# MALDI-TOF MSおよびプロテインシーケンサを用いた合成ペプチドのアミノ酸配列解析

山口久美子、赤木 美穂、栗木 智子

## ユーザーベネフィット

- ◆ MALDI-MSDにより、ペプチドのアミノ酸配列の同定が可能です。
- ◆ MALDIの分子量測定またはMALDI-MSDの結果とプロテインシーケンサの結果を補完的に組み合わせることで、ペプチドの構造に依存することなく、全アミノ酸配列を同定することができます。

## はじめに

ペプチド医薬品は、分子量が大きい抗体医薬品などと比較して経口吸収性や細胞膜透過性が高く、化学合成可能でコストを低減できるという特長があることから、近年注目を集めています。ペプチド医薬品が機能を持つためには、特定のアミノ酸配列が必要です。しかし、その合成過程では、ペプチド鎖の伸長反応の停止やアミノ酸の欠如などにより、副生成物が生成される場合があるため、最終合成品のアミノ酸配列の同定を行うことが必要です。

ペプチドやタンパク質のアミノ酸配列解析においては、質量分析装置の技術的発展に伴い、質量分析装置とそのデータベースを用いることで、ハイスループットな解析が主流となっています。問題点として、構成アミノ鎖の側鎖の修飾などで、質量分析から得られた結果と理論質量が異なることがあり、データベースの検索結果が不正確または不確実なものになってしまうことがあります。また、ゲノムデータベース化が完了していない生物種において、質量分析装置を用いたアミノ酸配列同定は煩雑で、得られた配列の信頼性に欠けることがあります。

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つずつ順番に分析し同定するため、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、長い配列情報の解析は、エドマン分解の効率低下や修飾アミノ酸解析が困難であるという限界もあります。

本アプリケーションニュースでは、卓上型MALDI-TOF MS “MALDI-8030”から得られた配列情報と従来のエドマン分解を用いたプロテインシーケンサ PPSQ™-50Aシリーズを使用した、2種類の合成ペプチドのアミノ酸配列同定について報告します。

## 前処理および分析条件

サンプル1：パラトルモン

直鎖型ペプチド、34残基

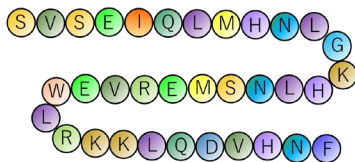


図1 パラトルモンのアミノ酸配列

サンプル2：ソマトスタチン

環状型ペプチド、14残基

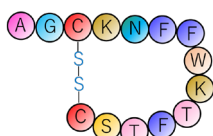


図2 ソマトスタチンのアミノ酸配列

## MALDI-TOF MSの分析条件

MALDI-8030(図3)の正イオンモードで分析を行いました。分子量の測定は、 $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA)マトリックスを使用しました。MALDI-MSD (In-Source Decay)は、1,5-Diaminonaphthalene(1,5-DAN)マトリックスを使用しました。サンプルとマトリックス溶液をステンレス製のMALDIプレート上にアプライし、乾燥後に測定を行いました。



図3 左：MALDIプレートへのアプライ  
右：卓上型MALDI-TOF MS MALDI-8030

## プロテインシーケンサによる分析

プロテインシーケンサPPSQ-50Aシリーズ イソクラティックシステムおよびグラジエントシステム(図4)を用いて、PTH-アミノ酸(アミノ酸のフェニルチオヒダントイン誘導体)混合標準品を分析しました。分析条件は [Application News No.01-00521](#)および[Application News No.01-00549](#)に記載しています。各分析条件のクロマトグラムを図5、図6に示します。



図4 プロテインシーケンサ PPSQ™-50A グラジエントシステム

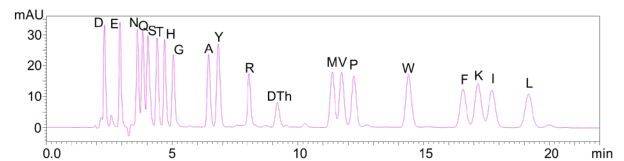


図5 PTH-アミノ酸混合標準品 (25 pmol) のクロマトグラム (イソクラティックシステム)

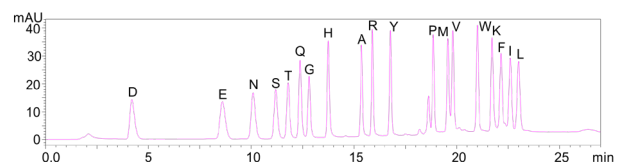


図6 PTH-アミノ酸混合標準品 (10 pmol) のクロマトグラム (グラジエントシステム)

パラトルモンの分析結果

パラトルモンをプロテインシーケンサで分析したクロマトグラムを図7に示します。プロテインシーケンサでは、33残基目までのアミノ酸を同定することができました。しかし、C末端部の34残基目のアミノ酸は、エドマン分解時のサンプル保持体からのウォッシュアウトにより、特異的に増加しているPTH-アミノ酸を検出することができず、同定することができませんでした。

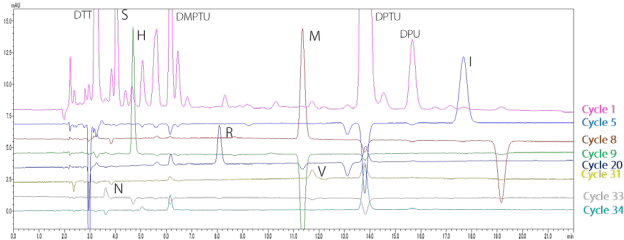


図7 パラトルモンのクロマトグラム

パラトルモンの分子量測定のためのMALDIマスペクトルを図8に示します。図8から得られたパラトルモンの分子量とプロテインシーケンサで同定できた33残基目までの分子量の差(147.2)からC末端部である34残基目のアミノ酸は、Pheであると推測することができました。



図8 パラトルモン MALDIマスペクトル (分子量測定)

次に、パラトルモンのMALDI-ISD測定およびMascot (Matrix Science)のMS/MS ion searchによるデータベース検索を行いました。

MALDI-ISDとは、MALDI-MSのイオン源内において、レーザー照射後のイオン化と同時に直後におこるフラグメンテーションのことです。ISD用マトリックスとペプチド試料との相互作用によってペプチド骨格が切断され、フラグメントイオンを生成します。比較的アミノ酸配列に依存せずフラグメントイオンが生じるので、配列解析に有効です。また、酵素消化しても十分なフラグメント数が得られず、ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) の有効性が低いサンプルから配列情報を引き出すのにも有効です。

パラトルモンのMALDI-ISDマスペクトルを図9に示します。観測されたMALDI-ISD由来のフラグメントイオンをデータベース検索に供した結果、パラトルモンであると同定することができました。

MALDI-ISDではN末端側から8残基目までは同定できませんでしたが、図7のプロテインシーケンサと結果を組み合わせることで、パラトルモンの全アミノ酸配列を同定することができました。

一方、MALDI-ISDのデータベース検索で同定できない場合は、フラグメントイオンの質量差を直接読むde novo sequencingを行うこととなりますが、その際はIleとLeuの異性体を区別することはできません。プロテインシーケンサでは、この異性体の区別を容易に行うことができますので、MALDI-ISDとプロテインシーケンサの結果を補完的に組み合わせることは有効です。

エドマン分解による  
アミノ酸配列分析の結果  
(プロテインシーケンサ)



MALDI-ISDとプロテインシーケンサの組み合わせによるパラトルモンのアミノ酸配列同定

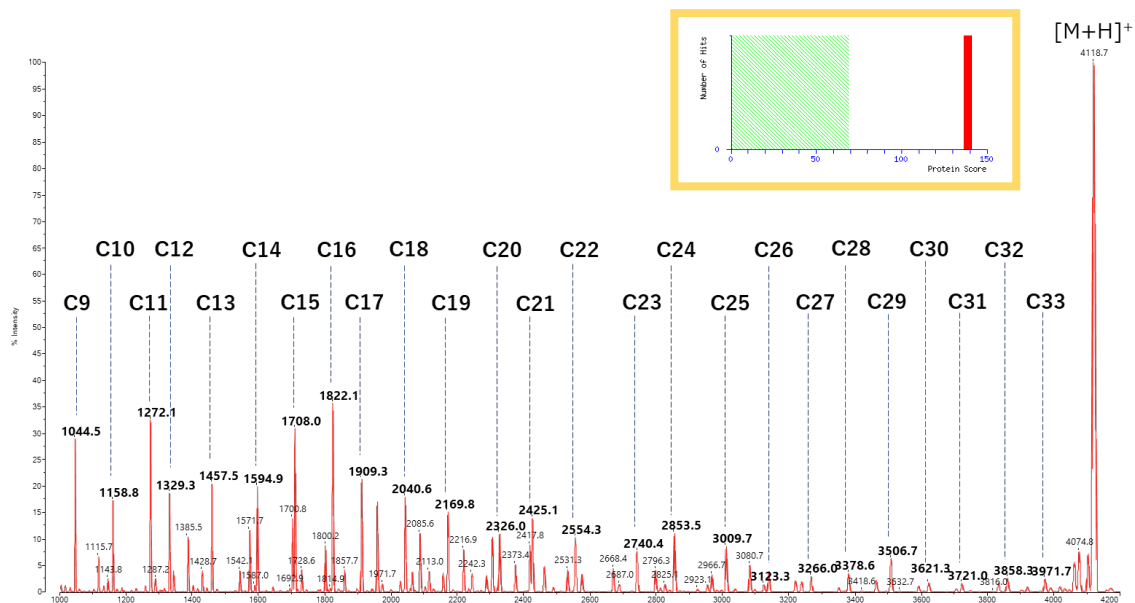


図9 パラトルモンのMALDI-ISDマスペクトル 右上: Mascotデータベース検索結果

## ソマトスタチンの分析結果

14残基の環状型ペプチドであるソマトスタチンをプロテインシーケンサで分析したクロマトグラムを図10に示します。プロテインシーケンサでは、12残基目までのアミノ酸配列を同定することができました。

エドマン分解のサンプル保持体からのウォッシュアウトもありますが、Serや特にCysはエドマン分解中に側鎖が分解し、PTH-アミノ酸としての収量が減るため、13残基目のSerと14残基目のCysは同定することができなかったと推測されます。

ソマトスタチンの全アミノ酸配列を同定するために、MALDI-MS測定およびMascot MS/MS ion searchによるデータベース検索を行いました。ソマトスタチンのMALDI-MSマスペクトルを図11に示します。

データベース検索では、ヒットしたもののスコアが低く信頼性に欠けました。これは、ソマトスタチンの分子量が比較的小さく、得られたフラグメントの情報量が少ないためだと考えられます。このような場合は、検出されたISDフラグメントの間隔を読むことでアミノ酸配列を推定します。

### ■まとめ

MALDIの分子量測定またはMALDI-MSとプロテインシーケンサの結果を組み合わせることで、直鎖型の構造をもつパラトルモンと環状型のソマトスタチンの全アミノ酸配列を決定することができました。

以上から、ペプチドの構造に依存することなく、多機種から得られたデータを組み合わせることにより、目的のペプチドの全アミノ酸配列を得ることができます。

また、MALDI-MSとプロテインシーケンサの結果を補完的に組み合わせることで、合成ペプチドのアミノ酸配列解析に有用と考えられます。

エドマン分解による  
アミノ酸配列分析の結果  
(プロテインシーケンサ)



MALDI-MSとプロテインシーケンサの組み合わせによるソマトスタチンのアミノ酸配列同定

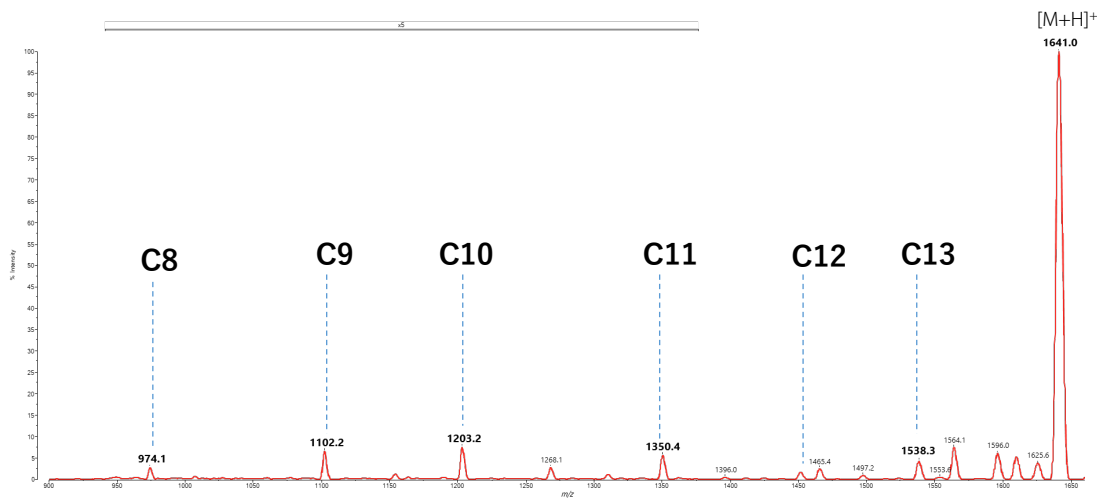


図11 ソマトスタチンのMALDI-MSマスペクトル

PPSQは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
https://www.an.shimadzu.co.jp/

01-00776-JP 初版発行：2024年8月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

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。本文中に記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。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

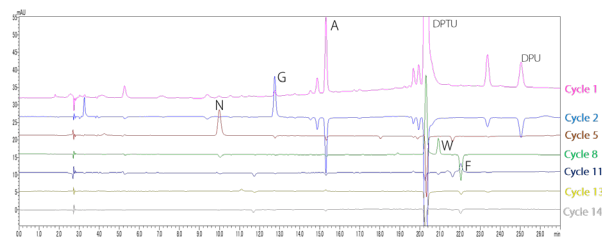


図10 ソマトスタチンのクロマトグラム

MALDI-MSではN末端側から9残基目から14残基目までは同定でき、図10のプロテインシーケンサと結果を組み合わせることで、ソマトスタチンの全アミノ酸配列を同定することができました。

特にCysは、エドマン分解で同定することが困難なアミノ酸です。そのようなアミノ酸でもMALDI-MSを使用することで簡単に同定することができます。

### <関連アプリケーション>

1. プロテインシーケンサを用いたアミノ酸配列の長鎖分析—イソクラティックシステム—[Application News No.01-00521](#)
2. プロテインシーケンサを用いたアミノ酸配列の長鎖分析—グラジエントシステム—[Application News No.01-00549](#)
3. 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—[Application News No.b105](#)

▶ アンケート

**関連製品** 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



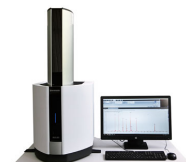
▶ MALDI-8030

マトリックス支援レーザー脱離イオン化  
飛行時間型質量分析計



▶ PPSQ-51A/53A

プロテインシーケンサ



▶ MALDI-8020

マトリックス支援レーザー脱離イオン化  
飛行時間型質量分析計

## 関連分野

▶ 医薬・バイオ医薬品

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ