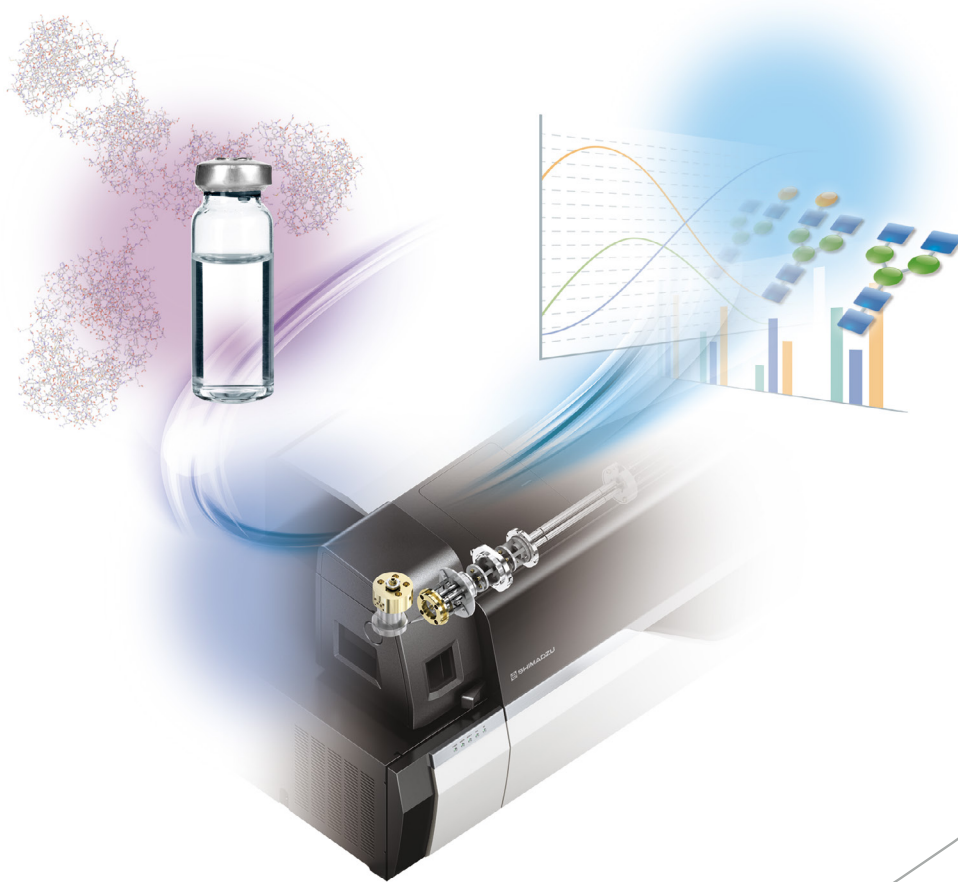


LCMS-8060/8050向け糖鎖定性・定量解析ソフトウェア
Software Platform for Glycan Quantification and Qualification by LCMS-8060/8050

Erexim Application Suite



糖鎖結合部位ごとの糖鎖構造不均一性を簡便に測定

タンパク質上に存在するN-結合型糖鎖の分析は、一般にタンパク質から糖鎖を切り出してから分析されるため、分析された糖鎖がタンパク質のどこに結合していたものかという情報は得られません。タンパク質から切り離れた糖鎖の分析結果と、糖鎖を切り離さずにタンパク質を消化して得られる糖ペプチドを分析した結果とを合わせてどの部位にどのような

糖鎖が存在しているのかを間接的に知ることはできませんが、非常に手間ひまのかかる作業が必要となってしまいます。Erexim Application Suiteは、このような手間をかけることなく、糖ペプチドごとの糖鎖構造不均一性を簡単に知ることを可能にします。

糖鎖構造を容易に作成、カスタマイズ可能

糖鎖構造情報をもとにMRMトランジションを作成

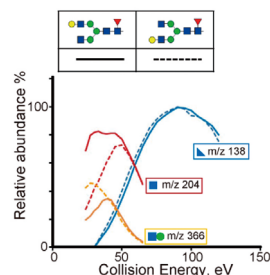
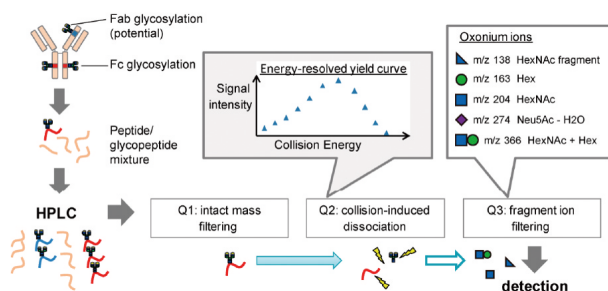
糖鎖存在比率、Ereximプロファイルを自動グラフ化



Erexim™ (Energy-resolved oxonium ion monitoring) とは？

N-結合型糖鎖や、それが結合した糖ペプチドを質量分析計でMS/MS分析すると、糖鎖由来の様々なプロダクトイオンが生じます。それらのプロダクトイオンについて、トリプル四重極型質量分析計を用いたMRM分析を行うと、コリジョンエネルギー (CE) の変化に応じて、これらのプロダクトイオン(オキソニウムイオン)の強度が変化します。このイオン強度変化をグラフにプロットすると、糖鎖構造に特異的なグラフが得られます。これを比較す

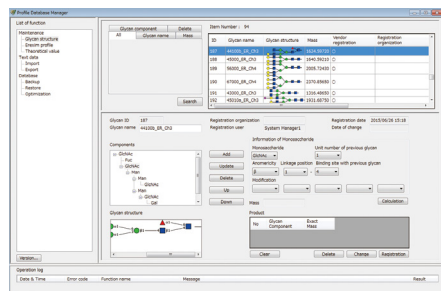
ることで、糖鎖構造の異同を推測することが可能になります。さらに、この糖鎖由来のプロダクトイオンの中には、N-結合型糖鎖のコア構造に由来するプロダクトイオンが存在しており、このイオンをMRMでモニターすることにより、特定の糖ペプチドに結合している様々な構造のN-結合型糖鎖の存在比率を簡単に知る事が可能となります。



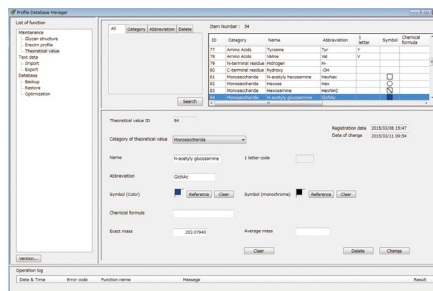
Reference: A Toyama. et al., *Anal. Chem.* 2012, 84, 9655–9662

糖鎖構造をカスタマイズ Profile Database Manager

Erexim Application Suite のデータベースにはあらかじめ45種類のN-結合型糖鎖の構造情報と単糖情報、アミノ酸情報、さらに参照Ereximプロファイル情報などが登録されています。ユーザー自身で新たな糖鎖構造をデータベースに登録することもできます。



糖鎖構造作成画面

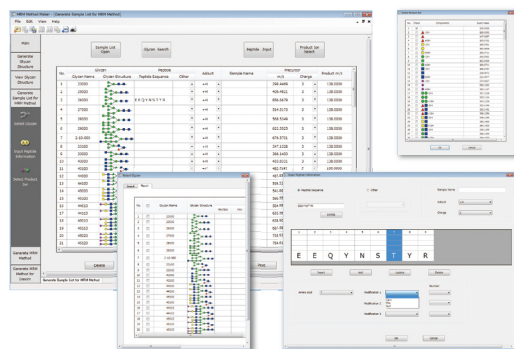


化合物情報作成画面

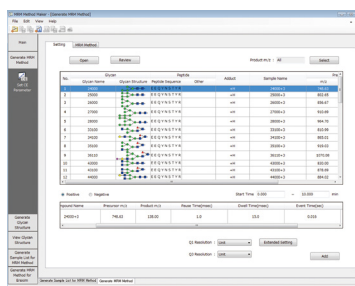
複雑な糖鎖構造に対応したMRMメソッド作成ツール MRM Method Maker

糖鎖構造は複雑な分岐構造を持つため、MRMに必要なプリカーサイオン情報を得るのに労力がかかります。

MRM Method Makerでは、データベースに登録された糖鎖構造を読み出し、そこに簡単にペプチド配列情報やアダクト情報などをつけることが可能です。これらの情報からプリカーサイオンのm/z値が自動計算されるため、トランジションリストを簡単に作成できます。



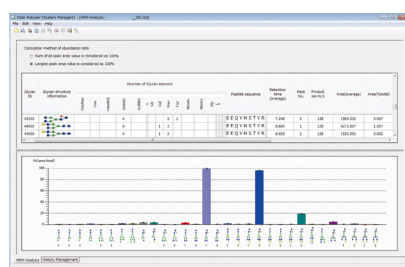
サンプルリスト作成画面



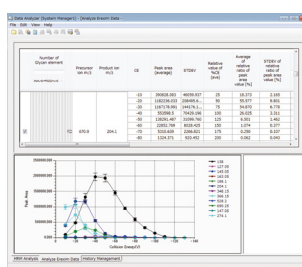
MRM条件設定画面

MRM分析結果から自動でグラフ表示可能 Data Analyzer

糖ペプチドや糖鎖は、様々な価数のイオンとして検出されます。これらを一つにまとめて存在比を明らかにすることは容易ではありません。Data Analyzerでは、サンプル情報とデータを自動で紐付けすることで、複数種の価数に分かれて検出されたイオンを統合してグラフ化してくれます。



糖鎖存在比グラフ

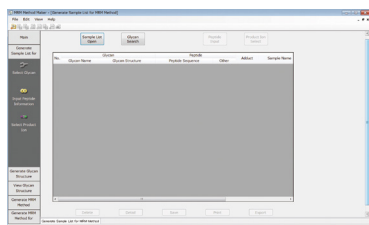


Ereximプロファイルグラフ

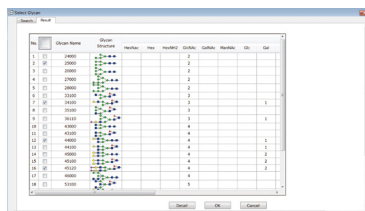
Erexim™ Application Suiteでは、糖鎖構造の記述から MRMメソッド作成、分析データのグラフ化までをサポートします。

1st ステップ 糖鎖存在比の算出 (相対定量)

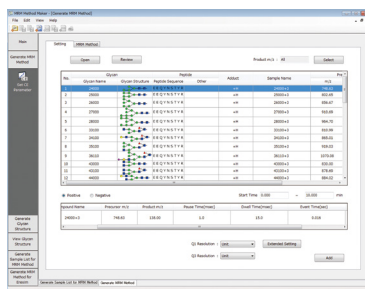
MRM分析ワークフロー



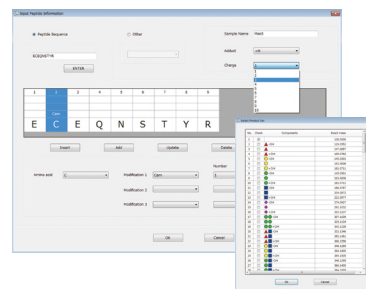
MRM Method Maker 起動



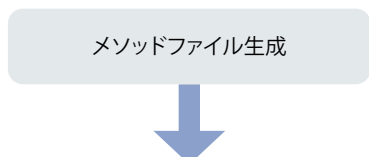
分析対象糖鎖選択



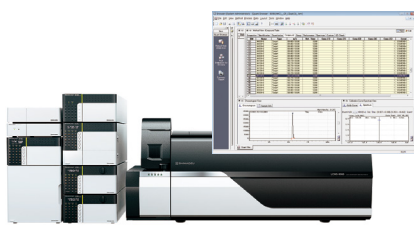
MRM分析条件設定



ペプチド情報・価数入力
検出対象プロダクトイオン選択



メソッドファイル生成



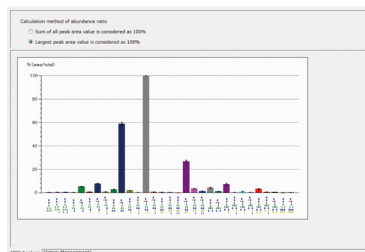
LCMS-8060/8050
分析ピーク波形処理



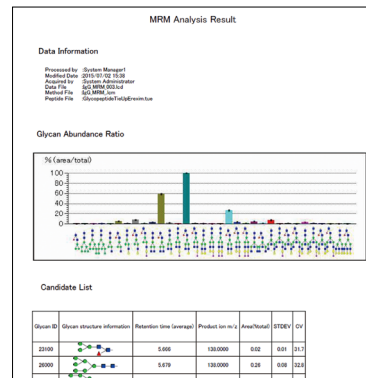
Data Analyzer 起動



分析データ読み込み



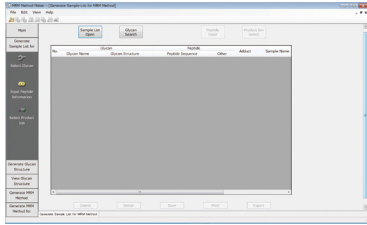
糖鎖存在比グラフ生成



レポート出力

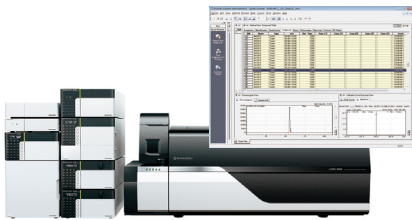
2nd ステップ Exetimプロフィールの作成(定性分析)

Exetim分析ワークフロー



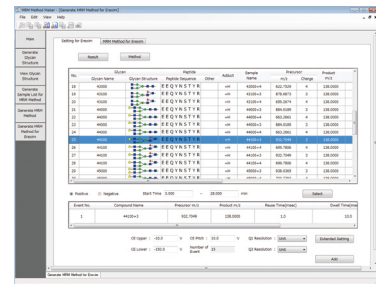
MRM Method Maker 起動

MRM分析情報読み込み
Exetim分析対象選択



LCMS-8060/8050
分析ピーク波形処理

メソッドファイル生成



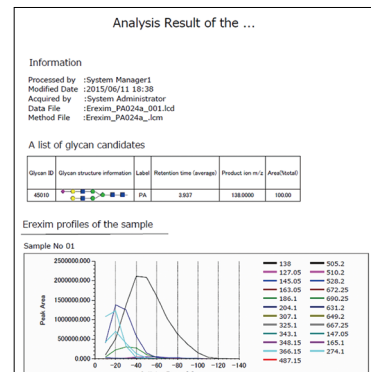
Exetim分析条件設定

Data Analyzer 起動

分析データ読み込み



Exetimプロフィールグラフ生成



レポート出力

市販抗体由来N-結合型糖ペプチドの解析例

市販抗体をトリプシン消化し、Fc領域に存在するN-結合型糖鎖について、Erexim Application Suiteを用いての不均一性を解析した例を示します。市販抗体 (50 µg) を溶液中で2時間トリプシン消化したものを、固相カートリッジ (Supel-Select HLB SPE) に通し、ネガティブセレクションで糖ペプチド画分を得ました。この糖ペプチド画分を分析試料としました。

1 MRM Method Makerを用いて、分析対象とする33種類の糖ペプチドのリストを作成しました。

Glycan ID	Structure	Glycan ID	Structure	Glycan ID	Structure	Glycan ID	Structure	Glycan ID	Structure
26000		44000		45110		53000		54110	
27000		44100		45020		53100		55010	
28000		45000		45120		54000		55110	
23100		45100		34000		54100		56000	
33000		44010		33100		55000		56100	
43000		44110		34100		55100			
43100		45010		34110		54010			

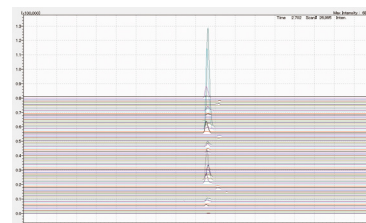
2 作成したリストに対して、Dwell time、Pause timeを設定し、最適CE入力機能を使って各トランジションに対し、最適CE値を入力しました。

No.	Precursor m/z	CE	Precursor m/z	CE
1	802.6500	-40.0		
2	830.0000	-45.0		
3	865.0000	-50.0		
4	878.7000	-55.0		
5	932.7000	-55.0		
6	964.7000	-65.0		
7	986.7000	-60.0		

No.	Glycan Name	Glycan Structure	Peptide Sequence	Adduct	Sample Name	Precursor m/z	Charge	Product m/z
10	45100		EEQYNSTYR	+H		986.7...	3	138.0000
11	45100		EEQYNSTYR	+H		45100+3	3	138.0000
12	45100		EEQYNSTYR	+H		45100+3	3	138.0000
13	45100		EEQYNSTYR	+H		45100+3	3	138.0000
14	45100		EEQYNSTYR	+H		45100+3	3	204.0872
15	45100		EEQYNSTYR	+H		45100+3	3	204.0872
16	45100		EEQYNSTYR	+H		45100+3	3	204.0872
17	45100		EEQYNSTYR	+H		45100+3	3	204.0872
18	45100		EEQYNSTYR	+H		45100+3	3	204.0872
19	45100		EEQYNSTYR	+H		45100+3	3	204.0872
20	45100		EEQYNSTYR	+H		45100+3	3	204.0872

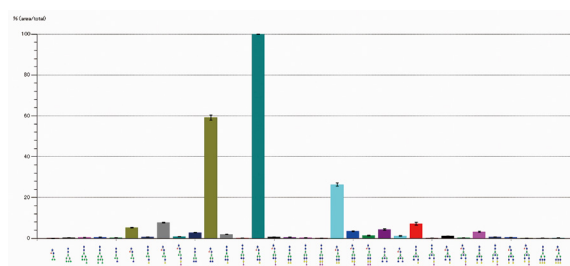
3 2)で作成した情報をLabSolutionsのメソッドファイルとして保存し、LCMS-8060を用いてMRM分析を行いました。分析は3回繰り返しました。

カラム : Aeris Peptide XB-C18 2.1 × 150 mm (Phenomenex)
 A 溶媒 : 0.1%ギ酸
 B 溶媒 : 90%アセトニトリル/0.1%ギ酸
 グラジエント : 0~2 min:2% B, 2~10 min:2~30% B, 10~11 min:30~98% B,
 11~12 min:98% B, 12~15 min:2% B
 流速 : 300 µL/min
 試料注入量 : 10 µL (0.1 µg/µL)



MRMクロマトグラム

4 LabSolutionsの定量ブラウザにてピークの波形処理を行った後、分析データをData Analyzerで読み込みました。その結果、下に示す糖鎖存在比グラフと数値が得られました。



抗体のFc領域に存在するN-結合型糖鎖の存在比グラフ (ペプチド配列:EEQYNSTYR)

Glycan ID	%Area	STDEV	Glycan ID	%Area	STDEV	Glycan ID	%Area	STDEV
23100	0.009	0.003	44010	0.075	0.019	54010	0.079	0.007
26000	0.111	0.036	44100	43.191	0.62	54100	0.482	0.056
27000	0.19	0.052	44110	0.281	0.021	54110	0.114	0.053
28000	0.241	0.037	45000	0.229	0.061	55000	1.382	0.251
33000	0.113	0.007	45010	0.12	0.05	55010	0.264	0.035
33100	2.278	0.104	45020	0.027	0.025	55100	0.17	0.055
34000	0.291	0.039	45100	11.383	0.585	55110	0.014	0.012
34100	3.339	0.049	45110	1.511	0.142	56000	0.034	0.022
34110	0.37	0.043	45120	0.571	0.135	56100	0.084	0.046
43000	1.228	0.127	53000	1.871	0.321			
43100	25.506	1.055	53100	0.521	0.129	Total	100	
44000	0.837	0.102	54000	3.084	0.601			

N-結合型糖鎖の存在比

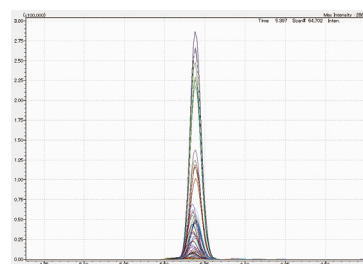
5 MRM Method Makerを用いて、4) で得られた糖鎖のうち、糖鎖ID: 45100、44100について、Ereximプロファイルを得るための方法を作成しました。コリジョンエネルギー (CE) は-10Vから-130Vまで10Vステップで変化させるように設定しました。

Event No.	Compound Name	Precursor m/z	Product m/z	Pause Time (msec)	Dwell Time (msec)
1	44100+3	932.7049	138.0000	1.0	5.0

CE Upper: 0.0 V CE Mid: 130.0 V Q1 Resolution: [Unit] Extended Setting
 CE Lower: -130.0 V Number of Event: 19 Q3 Resolution: [Unit] Add

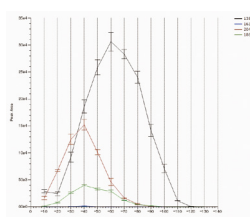
6 5)で作成した情報をLabSolutionsのメソッドファイルとして保存し、LCMS-8060を用いてMRM分析を行いました。分析は3回繰り返しました。

カラム : Aeria Peptide XB-C18 2.1 × 150 mm (Phenomenex)
 A 溶媒 : 0.1% ギ酸
 B 溶媒 : 90% アセトニトリル / 0.1% ギ酸
 グラジエント : 0~2 min: 2% B, 2~10 min: 2~30% B, 10~11 min: 30~98% B,
 11~12 min: 98% B, 12~15 min: 2% B
 流速 : 300 µL/min
 試料注入量 : 10 µL

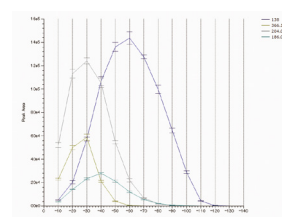


MRMクロマトグラム

7 LabSolutionsの定量ブラウザにてピークの波形処理を行った後、分析データをData Analyzerで読み込みました。その結果、右に示すEreximプロファイルグラフが得られました。



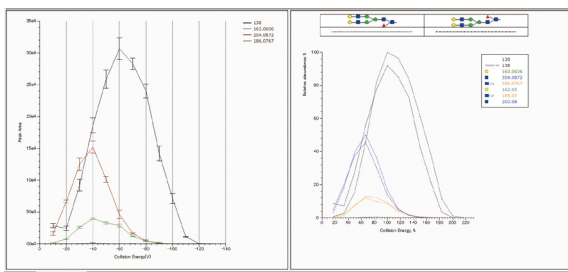
45100のErexim
プロファイルグラフ



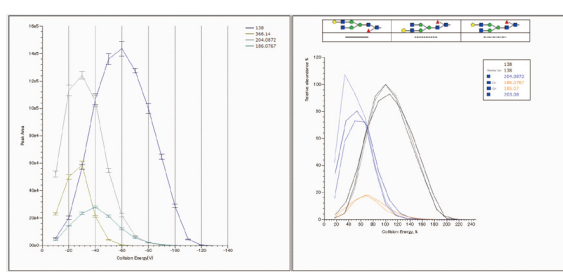
44100のErexim
プロファイルグラフ

8 データベースから同じ質量を持つ糖鎖のEreximプロファイルを検索した結果、サンプル中に検出された糖鎖ID: 45100はデータベースにある下図(左)の構造(45100_ER_Ch3)である可能性が示唆されました。一方、糖鎖ID: 44100は、プロダクト

イオンm/z204のグラフが、データベースにある2つの構造(44100a_ER_Ch3, 44100b_ER_Ch3)の中間に存在していました。このことから、サンプル中の糖鎖ID: 45100は、44100a_ER_Ch3と44100b_ER_Ch3の混合物であることが示唆されました。



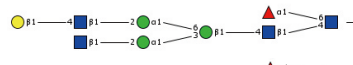
45100のEreximプロファイル比較グラフ(グラフ右側)



44100のEreximプロファイル比較グラフ(グラフ右側)



45100_ER_Ch3の糖鎖構造



44100a_ER_Ch3(上)と44100b_ER_Ch3(下)の糖鎖構造

トラブル解消のため補修用部品・消耗品は純正部品をご採用ください。
外観および仕様は改良のため、予告なく変更することがありますのでご了承ください。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

東京支社 101-8448 東京都千代田区神田錦町1丁目3
(03) 3219-(官公庁担当)5631・(大学担当)5616・(会社担当)5685

関西支社 530-0012 大阪市北区芝田1丁目1-4 阪急ターミナルビル14階
(06) 6373-(官公庁・大学担当)6541・(会社担当)6556

札幌支店 060-0807 札幌市北区北七条西2丁目8-1 札幌北ビル9階 (011)700-6605

東北支店 980-0021 仙台市青葉区中央2丁目9-27 プライムスクエア広瀬通12階 (022)221-6231

郡山営業所 963-8877 郡山市堂前町6-7 郡山フコク生命ビル2階 (024)939-3790

つくば支店 305-0031 つくば市吾妻3丁目17-1
(029)851-(官公庁・大学担当)8511・(会社担当)8515

北関東支店 330-0843 さいたま市大宮区吉敷町1-41 明治安田生命大宮吉敷町ビル8階
(048)646-(官公庁・大学担当)0095・(会社担当)0081

横浜支店 220-0004 横浜市西区北幸2丁目8-29 東武横浜第3ビル7階
(045)311-(官公庁・大学担当)4106・(会社担当)4615

静岡支店 422-8062 静岡市駿河区稲川12丁目1-1 伊伝静岡駅南ビル2階 (054)285-0124

名古屋支店 450-0001 名古屋市中村区那古野1丁目47-1 名古屋国際センタービル19階
(052)565-(官公庁・大学担当)7521・(会社担当)7531

京都支店 604-8445 京都市中京区西ノ京徳大寺町1
(075)823-(官公庁・大学担当)1604・(会社担当)1603

神戸支店 650-0033 神戸市中央区江戸町9-3 栄光ビル9階 (078)331-9665

岡山営業所 700-0826 岡山市北区磨屋町3-10 住友生命岡山ニューシティビル6階 (086)221-2511

四国支店 760-0017 高松市番町1丁目6-1 住友生命高松ビル9階 (087)823-6623

広島支店 730-0036 広島市中区袋町4-25 明治安田生命広島ビル15階 (082)248-4312

九州支店 812-0039 福岡市博多区冷泉町4-20 島津博多ビル4階
(092)283-(官公庁・大学担当)3332・(会社担当)3334

島津コールセンター（操作・分析に関する電話相談窓口） ☎ 0120-131691
IP電話等：(075)813-1691

<http://www.an.shimadzu.co.jp/>