

MALDI質量分析における液体マトリックスを用いた糖ペプチド高感度解析 High sensitivity MALDI analyses of glycopeptides using 3-AQ/CHCA as a liquid matrix

○ 福山裕子・船越なつ美・田中耕一 株式会社島津製作所 田中最先端研究所
○ Yuko Fukuyama, Natsumi Funakoshi, Koichi Tanaka Koichi Tanaka Laboratory of Advanced Science and Technology, Shimadzu Corporation

Overview

液体マトリックスを用いた糖ペプチド(糖タンパク質 transferrin のトリプシン消化混合物から単離した糖ペプチド)の高感度分析結果について報告する。**液体マトリックス 3-AQ/CHCA** にリン酸アンモニウムを加えて最適化すると、ポジティブ及びネガティブの両モードで、**100 amolの糖ペプチド**を測定できた。これにより、糖鎖分析で一般的に用いられるマトリックスDHBと比較し、特にポジティブモードにおいて**100倍の感度向上**を確認した。

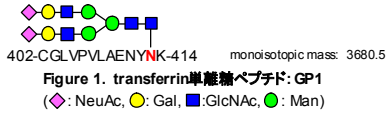
1. Introduction

近年、翻訳後修飾タンパク質に対しさまざまな質量分析手法が開発されている。中でも**糖鎖付加の様々な疾患との関連**が報告されており、分析法の最適化が望まれる。遊離糖鎖は、ESI法ではペプチドより感度が大幅に低いことが知られているが、我々のグループでは、MALDI法では液体マトリックス3-AQ/CHCAによる糖鎖ラベル化法を用いると高感度分析が可能となることを確認した [ASMS2010 WP301]。一方、糖タンパク質の**糖鎖結合位置が疾患に関する重要な情報**を与えることが知られているが、糖タンパク質及び糖ペプチドの、特に高感度分析についてはこれまでほとんど報告がない。今回は、液体マトリックスを用いた**糖ペプチドの高感度分析**について報告する。

2. Experimental

2-1. 試料

- **糖ペプチド試料**: 糖タンパク質 transferrin のトリプシン消化混合物からHPLCで単離したシアル酸2個付き糖ペプチド[CGLVPVLAEN_NYK_N](Nに糖鎖付加)を用いた。
- 糖タンパク質: transferrin (SIGMA, T3309, 98%)
- HPLC: Prominence™ (Shimadzu Corporation, Japan)

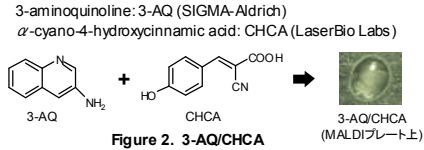


- **試料溶液**: 分取した糖ペプチド(30%アセトニトリル・0.05%TFA水溶液)を、同溶媒で適宜希釈して使用した。

2-2. マトリックス

- **既存液体マトリックス評価と最適化**: 既存液体マトリックス(8種類)を評価した結果、下記**3-AQ/CHCA**を用いて、**最も高感度に糖ペプチドを計測**できた。最適化マトリックス及びプリパレーション方法を以下に示す。

- **液体マトリックス(溶液)**: 3-AQ/CHCA
3-AQ 20 mg/150 μL CHCA飽和溶液 (10 mg/600 μL 10mMリン酸アンモニウム・50%アセトニトリル水溶液) を、50%アセトニトリル水溶液で、1/10希釈して使用した。
- 3-aminoquinoline: 3-AQ (SIGMA-Aldrich)
- α-cyano-4-hydroxycinnamic acid: CHCA (LaserBio Labs)



- **固体マトリックス(溶液)**: DHB(従来法)
DHB 1 mg/mL 50% アセトニトリル水溶液を使用した。
- 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid: DHB (LaserBio Labs)

2-3. プリパレーション

- **滴下手順**:
① pre mix溶液を作成する: 試料溶液+マトリックス溶液 (v/v=1:1)
② ①の溶液を1 μL, MALDIプレート(以下参照)上に滴下する
③ MSで測定する
- MALDIターゲット: **μFocus MALDI plate™ 600μm** (Hudson Surface Technology, Inc. USA)



2-4. MS計測

- **MS測定条件**:
● AXIMA Resonance™ (Shimadzu/Kratos, UK)
● ポジティブ及びネガティブモード
● high mass ion mode

3. Results and Discussion

3-1. 検出限界

Table 1. マトリックスによる糖ペプチドGP1の検出限界の比較

	糖ペプチドGP1の検出限界 (well)	
	positive	negative
DHB (従来のマトリックス)	10 fmol	1 fmol
3-AQ/CHCA	100 amol	100 amol

- 最適化3-AQ/CHCAを用いると、**ポジティブ及びネガティブモード**で、検出限界 **100 amol** で分析できた
- 従来のマトリックスDHBの **10~100倍感度向上**を確認した

10~100倍

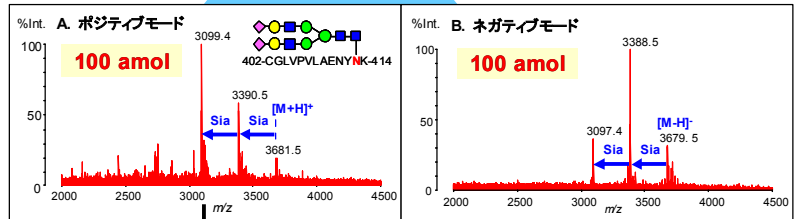
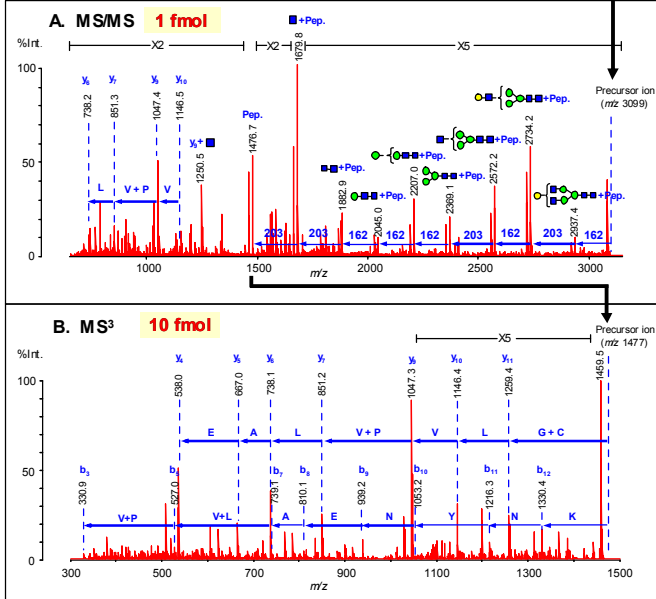
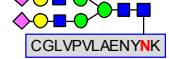


Figure 3. 3-AQ/CHCAを用いて得られた100 amol GP1のポジティブ(A)及びネガティブ(B)モードのマススペクトル

3-2. MS/MS, MS³ (構造解析)



- MS/MSにより、**糖鎖配列**を確認



* 100 amolのMS/MSでは完全なフラグメントピークは得られなかった。

- MS³により、**ペプチド配列**を確認



* 1 fmolのMS³では完全なフラグメントピークは得られなかった。

Figure 4. 3-AQ/CHCAを用いて得られた、ポジティブモードにおけるGP1の1 fmolのMS²(A)、及び10 fmolのMS³(B) スペクトル

4. Conclusion

- **3-AQ/CHCA**を用いることで、固体マトリックスDHBを用いた従来法の**10~100倍感度向上**できることを確認した。

5. 謝辞

本研究は、日本学術振興会の最先端研究開発支援プログラムにより、助成を受けたものである。

6. 参考文献

- Kaneshiro K., Fukuyama Y., Sekiya S., Iwamoto S., Taniguchi K., Montgomery H., Tanaka K., ASMS2010, WP301