

MALDI質量分析における液体マトリックス3-AQ/CHCAを用いたAQラベル化法による糖鎖の超高感度解析 High sensitivity MALDI analyses of glycans by a 3-AQ labeling method in 3-AQ/CHCA liquid matrix

○金城薫・福山裕子・田中耕一 株式会社島津製作所 田中最先端研究所

○ Kaoru Kaneshiro, Yuko Fukuyama, Koichi Tanaka Koichi Tanaka Laboratory of Advanced Science and Technology, Shimadzu Corporation

1. Overview

近年、タンパク質翻訳後修飾における糖鎖付加は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ている。
酵素処理などによりタンパク質から切り離された遊離糖鎖は、ペプチド等に比ベイオン化効率が高いため、糖鎖の還元末端に蛍光化合物(例: 2-aminopyridine (PA))等を付加するラベル化法が多く用いられている。
しかしながら、通常のラベル化は、過剰なラベル化剤や反応副産物の除去が必要となるため、操作が簡便性や収率に問題点がある。

そのような中、我々は液体マトリックス3-Aminoquinoline(3-AQ)/CHCAを用いたMALDIターゲット上での糖鎖のAQラベル化法を考案した。
本方法で得られたAQラベル化糖鎖の検出限界は10 amolで、一般的な固マトリックスDHBを用いた場合の10,000倍の検出感度であった。
同様のラベル化法で、5 amolの糖鎖をMS/MSし、構造解析を行なった結果も示す。

2. Introduction

3-AQ/CHCA

3-Aminoquinoline/ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (3-AQ/CHCA) は、1996年に報告され[1]、主にペプチドのMALDI-MS分析に使用されてきた。
カチオン部位である塩基性の3-AQとアニオン部位である酸性のCHCAからなる。常温真空下で液状を保つ。均一性・再現性が高い[2]。

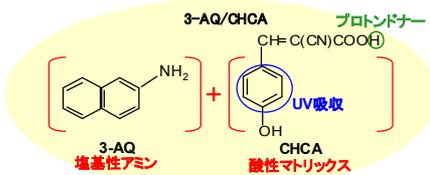
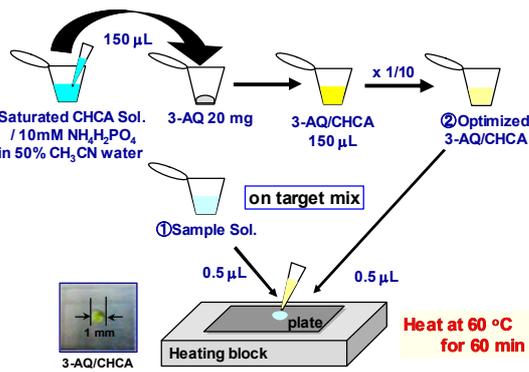


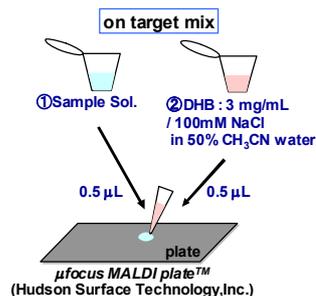
Figure 1. 3-AQとCHCAからなる3-AQ/CHCA

3. Experimentals

3-1. 液体マトリックス3-AQ/CHCAを用いたAQラベル化法



3-2. DHB



3-3. MS装置



4. Results and Discussion

4-1. MSの検出限界 (AQラベル化法による糖鎖の高感度検出)

Table 1. DHBと3-AQ/CHCAを用いたときのN型糖鎖 (1 amol – 1 pmol/well) 検出限界

		Positive		Negative	
		DHB	3-AQ/CHCA	DHB	3-AQ/CHCA
中性	10 fmol	100 amol	ND	100 amol	
	5 fmol	50 amol	ND	100 amol	
酸性	100 fmol	500 amol	100 fmol	10 amol	
	100 fmol	500 amol	100 fmol	100 amol	

ND: 糖鎖イオン検出不可。

■: GlcNAc ●: Galactose ○: Mannose ◆: Sialic Acid

本方法によるAQラベル化糖鎖と、固マトリックスDHBを用いたノラベル化糖鎖の検出限界を比較した。その結果、Positive IonモードではDHBの100-200倍良好だった。一方、Negative Ionモードでは、DHBでは1 pmol/wellでも検出できていなかった中性糖鎖を100 amolまで検出することができ、酸性糖鎖では1,000-10,000倍の検出感度を示した。

4-2. MS/MS (構造解析)

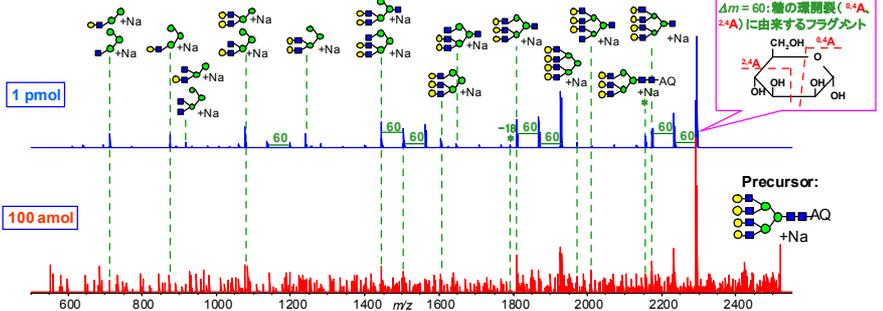


Figure 2. Positive Ionモードにおける、1 pmolと100 amolのAQラベル化糖鎖[M+AQ+Na]⁺のMS/MSスペクトル

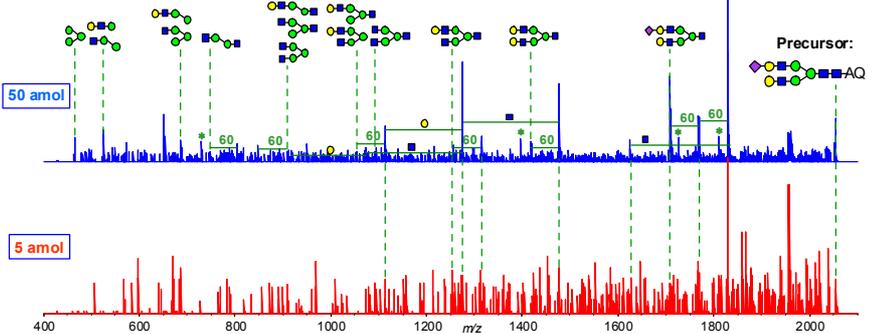


Figure 3. Negative Ionモードにおける、50 amolと5 amolのAQラベル化糖鎖[M+AQ-H]⁻のMS/MSスペクトル

本方法によるAQラベル化糖鎖は、Positive Ionモードでは100 amol、Negative Ionモードでは5 amolでも糖鎖の構造推定に有力なMS/MSフラグメントを得ることができた。また、Negative Ionモードの方が、より多くの糖の環開裂が起きていた。

5. Conclusions

MS: 本方法によるAQラベル化糖鎖は、Positive Ionモードでは**50 amol**の糖鎖を、Negative Ionモードでは**10 amol**の糖鎖を検出できた。これは、一般的な固マトリックスDHBを用いたノラベル化糖鎖より、Positive Ionモードでは**100-200倍**、Negative Ionモードでは**1,000倍以上**の感度に相当する。

MS/MS: 本法によるAQラベル化糖鎖は、Positive Ionモードでは**100 amol**、Negative IonモードではMSの検出限界を超える**5 amol**で糖鎖の構造推定に有力なMS/MSフラグメントを得ることができた。

6. Acknowledgement

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。

7. References

- [1] Kolli, V.S.K. et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10, 923
- [2] ASMS2009 MP569