

島津が発明したMALDI Matrixは？

島津製作所では、1980年代初頭からレーザーイオン化TOFMSの研究を行ってまいりました。その成果の一つとして「無機化合物マトリックス」を開発し、さらにグリセリンを添加することにより 当時としては画期的な $m/z > 100,000$ の測定を可能としました。

質量分析を行うためには、前処理・イオン化・イオン分離・検出・測定・解析(後処理)等が必要です。**質量分析は化合物の「重さ」を量るのではなく、化合物をイオン化した後の m/z 値を計測**します。この観点より、イオン化が最も重要であると判断できます。

MALDIの歴史は、より広範囲の化合物をイオン化するための新規Matrixの開発の歴史、とも言えます。島津グループでも社内外のグループと**共同で**、これまで様々な**Matrixの新規開発・新機能発見**を行ってまいりました。本解説書では、その中の5つに関して概略を紹介します。

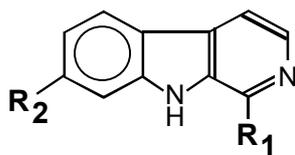
1. *nor*-Harmame

MALDIにおいて、Matrixからの脱離エネルギーと電荷を試料分子が受け取る効果的な手法の一つは、両者を良好に混合させることです。そのためには、**両者が同一溶媒に(良好に)溶ける**ことが必要です。

β -Carbolineの一種である*nor*-Harmame(図1上)は、純水等に対する溶解度は極めて低ですが、その他通常MALDIに汎用される溶媒(例: TFA(100%), AcOH, Me/EtOH, CH₃CN, Acetone, THF)のみならず、Toluene, CHCl₃, CH₂Cl₂にも容易に溶解できるので、合成高分子や脂質等にも適用が期待できます¹。

さらに*nor*-Harmameは 強力なProton Acceptorとなるので、中性糖鎖(例: 図2のMaltosyl- β -Cyclodextrin)からでも[M-H]⁻を生成可能です。これらの性質より、主に負イオン(例: 硫酸化糖鎖²)測定に活用されています。

正負両イオン測定・多種類溶媒に溶解等の特長から、「*nor*-Harmame は Universal な Matrix」と言えます。



	R ₁	R ₂
<i>nor</i> -harmame	H	H
Harmame	Me	H
Harmine	Me	MeO
Harmol	Me	HO

図1 β -Carbolines

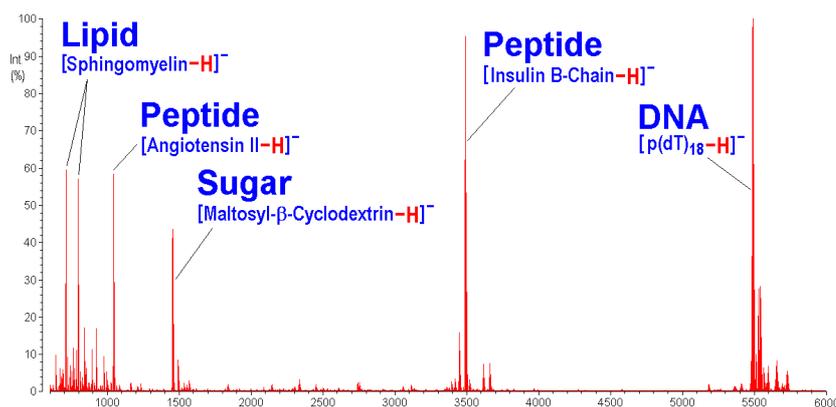
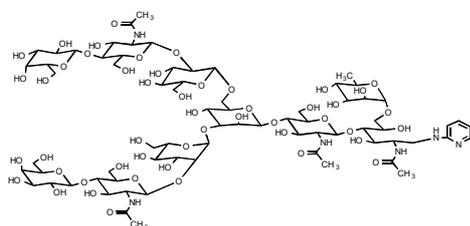


図2 *nor*-Harmameを用いた 脂質・ペプチド・糖鎖・DNA混合物測定

2. DHBA for PA-derivatized Oligosaccharides



DHBAは、ペプチド・糖鎖・(有極性)ポリマー等を代表とした極めて広範囲の化合物測定に用いられており、「試料分子(M)関連イオン」として[M+H]⁺/[M-H]⁻, [M+Cation]⁺/[M+Anion]⁻生成促進が知られています。質量分析で分子量情報を得るためには、このような化学反応以外の発生は避けるべきですが、例えばPA(Pyridyl Amine)化糖鎖を測定した場合、特に[M+H]⁺(図3左)に異常な強度分布(正常[理論分布]は図3右)が得られます。これは、PAの2重結合の一部が還元したため(図4)と考えられます。

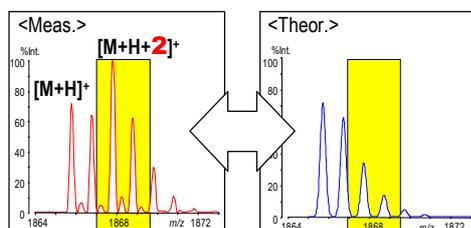


図3 DHBA使用時PA化糖鎖測定例

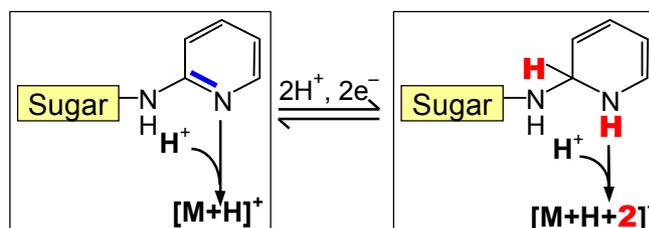


図4 PA還元機構(仮説)

通常、生体由来の糖鎖は分岐構造を持っており、MSⁿ測定を用いても全ての構造情報を入手することは困難です。図5は、PA化糖鎖の[M+H]⁺ (上), [M+H+2]⁺ (下)に対するMS/MS測定 (AXIMA-Resonanceの Prec.Ion高分離能を活用) であり、大部分は"+2u"分ずれていますが、m/z: 528, 690は同一になっています。これは、PAを含まないProduct Ionです。すなわち、還元イオンの生成という欠点を、同位体ラベルが自然に発生したと見なすことにより、構造情報の入手に活用した例と言えます³。

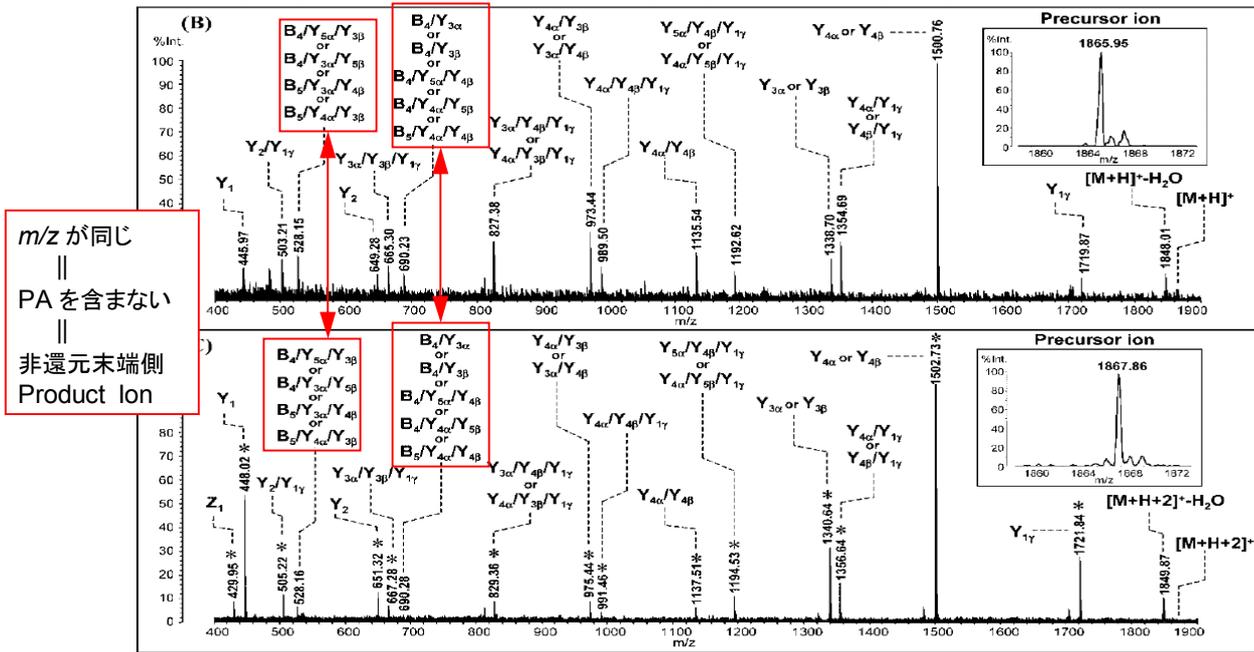


図5 PA化糖鎖[M+H]⁺ (上), [M+H+2]⁺ (下) MS/MS測定例

3. 1,5-DAN for Disulfide Peptide

1,5-Diaminonaphthalene (DAN)は、構造を見ても明らかに酸化剤ですが、窒素レーザー照射時には還元剤になり、Disulfide (S-S)結合を還元するため本来の分子量情報が得られない等の欠点 (図6) が指摘されていました⁴。また、Peptide Mass Fingerprint手法等で酵素消化ペプチド混合物を測定する場合は、前処理としてS-S結合を還元しますので、結合の組み合わせ情報は失われています。

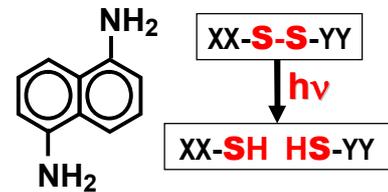


図6 DANのDisulfide結合還元機構

これに対し、例えば図6の様に S-S結合2箇所を有するペプチドに対し DANを用いると、MS測定で未還元・還元1箇所・2箇所還元のパターンが得られました。これをそれぞれMS/MSすることにより、Peptide Sequence情報 (図7右上) のみならず、S-S結合の組み合わせ すなわちDisulfide Mappingが行えました (図7右下)。

これ以外にも、DANを用いることによりHeme結合位置の推定・リン酸化ペプチドの高効率測定・ISD法と組み合わせたより長いSequence情報の入手 (Top-Down Proteomicsへの応用) 等にも一部成功しています⁵。

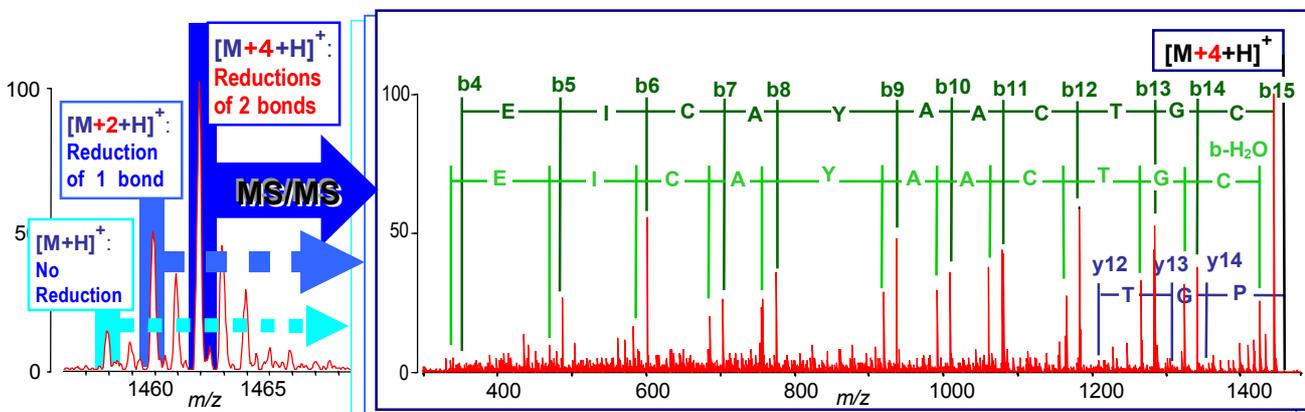


図7 DANによるS-S結合含有ペプチド一部還元MSスペクトル (左上) MS/MSスペクトル (右上) とDisulfide Mapping結果 (右横)



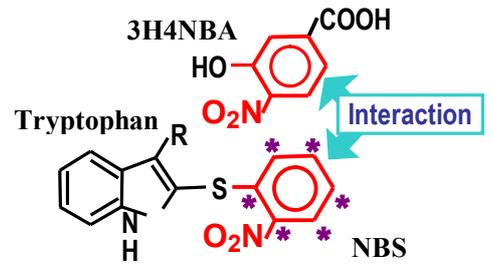
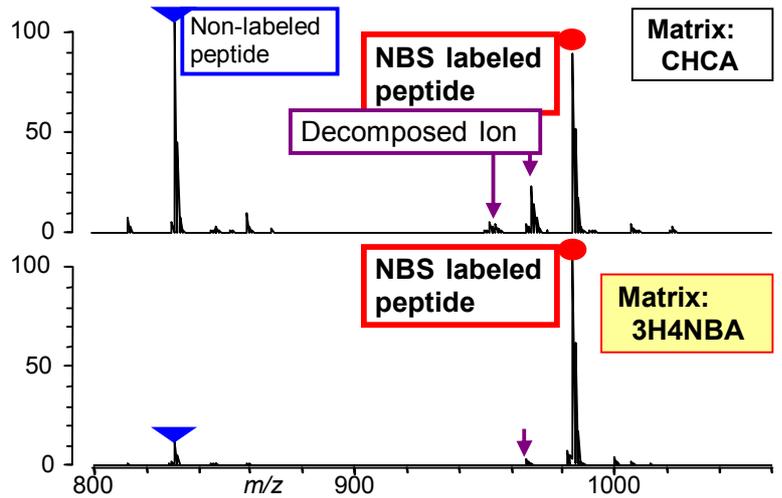
4. 3H4NBA for NBS Labelled Peptide

NBS試薬(2-nitrobenzenesulfonyl chloride; NBS-Cl)は、Tryptophanを同位体Isotopeラベル化し、タンパク質等を(相対)定量分析する方法として注目されています。しかし、従来Matrix(例: CHCA, DHBA)を用いた場合 NBSラベル化Peptideのイオン化では、分解反応や感度低下等の欠点が見受けられました。

これに対し3H4NBA(図8)をMatrixとして用いると、図9に例示される様に分解反応が抑制され NBSラベル化されていないペプチドよりも感度が高くなります。この理由としては、NBSと3H4NBAの構造が類似しており、NBSラベル化されたペプチドと3H4NBAが混合容易となり、その他のペプチドを「イオン化領域」から排除し、結果としてNBSラベル化Peptideが測定容易になったと考えられます。この特長により、混合物中에서도(ラベル化以外を取り除く処理を行わずに)定量分析が行い易くなります。

このNBS法(試薬キットは2005年よりWorldwideで市販中)を用いて、既に大腸⁷・肝臓⁸・乳⁹・腎臓¹⁰・肺¹¹等の(糖)タンパク質が比較検討され、ガンのマーカー候補等が多数見つけ出されています。

図9 NBSラベル化・非ラベル化ペプチド混合物に対し CHCAと3H4NBAをMatrixとしたMS測定比較例



*: ¹²C (Light) または ¹³C (Heavy)

図8 NBSラベル化ペプチドと3H4NBA

5. Liquid Matrix (G₂CHCA, G₃CA) for Oligosaccharide and Glycopeptide Analyses

DHBAは、現在 特に糖鎖一般の測定には1st Choice Matrixとされていますが、(ペプチド測定と比較)感度・ソフトなイオン化度が不十分と見なされる場合もあり、しかも不均一な結晶化により再現性・定量性不良やイオン化容易なHot Spot検索に労力を要する等の問題点が指摘されていました。

これに対し、イオン液体の一種である液体Matrix^{12,13}は、[真空中でも液状保持]・[蒸気圧≒0]等の長を有し、これまでG₂CHCA等が開発されてきましたが、感度は不十分と見なされていました。

島津では、液体Matrixが適度の表面張力を有する特徴に注目し、希釈した液体Matrix溶液と試料溶液を混合乾燥することにより液滴が凝集し、実質的な感度と再現性・均一性を向上させることが出来ました(図12,13)。

特に島津が開発したG₃CA(1,1,3,3-tetramethyl guanidine p-クマル酸塩)は、不安定な硫酸化糖鎖でも1fmolでMS/MS可能であり、他の糖鎖(例: PA化糖鎖・シアル化糖鎖・中性糖鎖)でもDHBAを凌駕する感度が得られています。

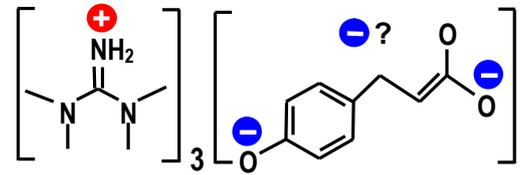


図10 G₃CA推定構造

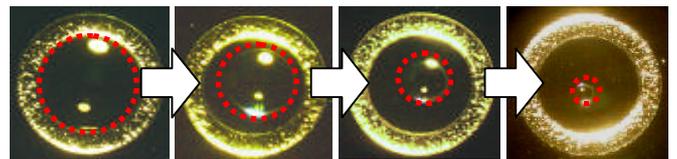
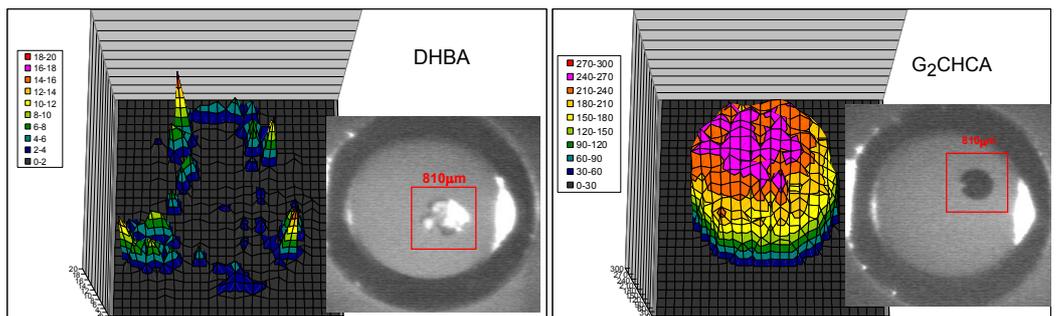


図11 液体Matrix溶液+試料溶液の乾燥フォーカス経過

図12 イオン強度分布比較

DHBAはHot Spotが存在し不均一であるのに対し、G₂CHCAは極めて均一に分子イオンが測定可能



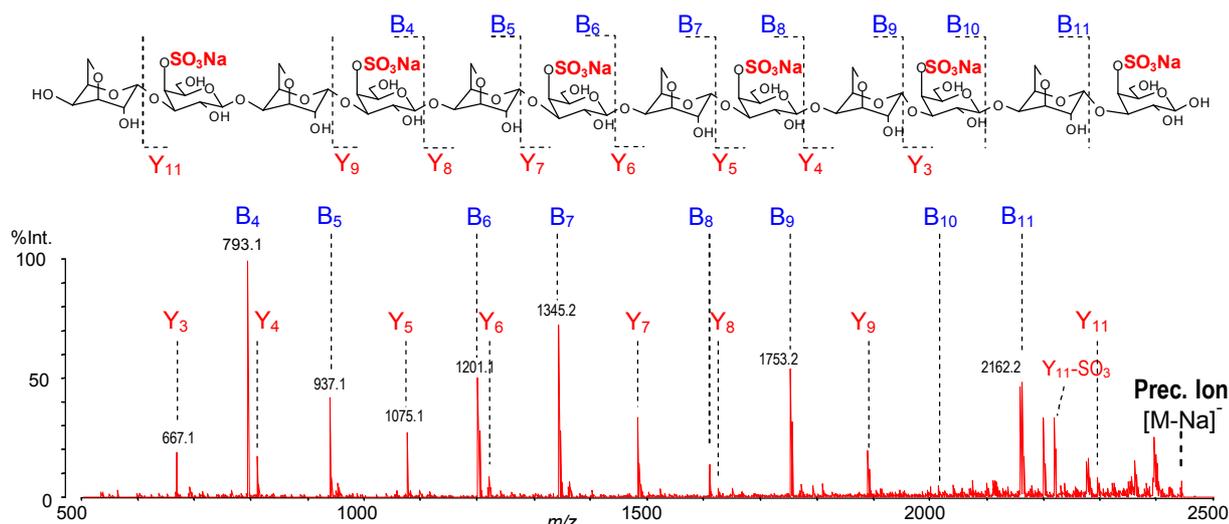


図13 6硫酸化糖鎖の構造と 1fmol MS/MS測定例 (Matrix: G₂CHCA)

さらに、糖タンパク質Ribonuclease B酵素消化混合物に対し液体Matrixを試用したところ、感度の大幅な向上が得られました(図14)。

糖タンパク質酵素消化混合物に含まれるpeptideは糖peptideよりもproton親和力が高い傾向があります。通常のMatrixには、-COOH等のproton供給官能基がついており、DHBA等の従来Matrixでは、peptideの方が優先的にイオン化される傾向がありました。液体Matrixは、図10に例示される通り **Proton供給能力が抑制**されており、しかも液体Matrixと糖peptideが混合容易であるために、糖peptideが相対的に感度を高めた、と推定できます。

これらの測定結果より、液体Matrixを用いることで糖鎖付加を中心とした**翻訳後修飾PTM解析**応用への展開が期待できるといえます。

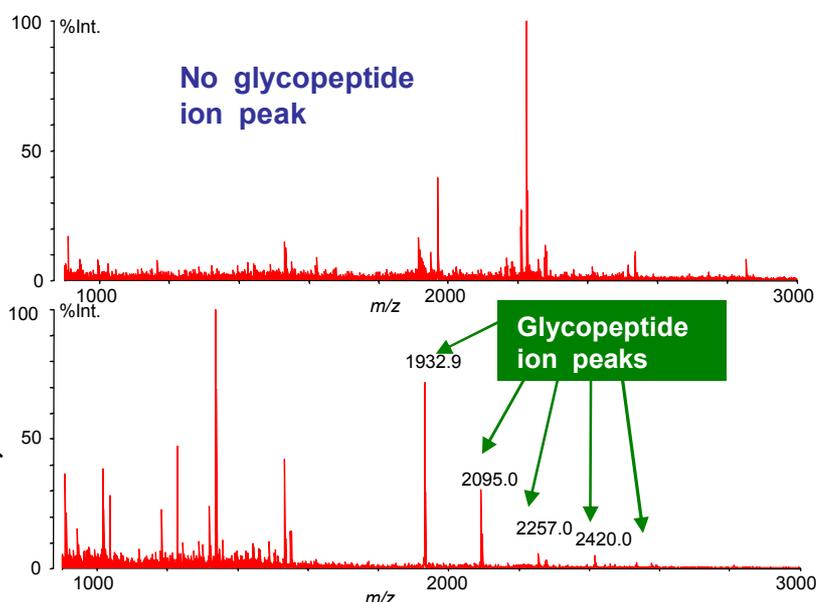


図14 RNase B 酵素消化混合物測定例 DHBA(上)/G₃CA(下)

< 参考文献 >

1. K.Tanaka, H.Nonami, Y.Fukuyama, R.Erra-Balsells, *48th Ann. Conf. Mass Spectrom.* (ASMS1998) WP222
2. M.Barboza, V.Duschak, Y.Fukuyama, H.Nonami, R.Erra-Balsells, et.al., *FEBS J.*, Vol.272 p3803 (2005)
3. S.Sekiya, Y.Yamaguchi, K.Kato, K.Tanaka, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, Vol.19, p3607 (2005)
4. Y.Fukuyama, S.Iwamoto, K.Tanaka, *J. Mass Spectrom.*, Vol.41, p191 (2006)
5. Y.Fukuyama, K.Tanaka, *54th Ann. Conf. Mass Spectrom.* (ASMS2006) WP469
6. E.Matsuo, C.Toda, M.Watanabe, N.Ojima, S.Izumi, K.Tanaka, S.Tsunasawa, O.Nishimura, *Proteomics*, Vol.6, p2042 (2006)
7. M.Watanabe, I.Takemasa, N.Nishimura, T.Matsubara, S.Yoshioka, M.Miyake, K.Nagai, M.Monden, O.Nishimura, *54th Ann. Conf. Mass Spectrom.* (ASMS2006) MP624
8. 竹政伊知朗・永野浩昭・吉岡慎一・丸橋繁・宮本敦史・武田裕・堂野恵三・渡辺真・西村紀・永井克也・松原謙一・門田守人 第64回 日本癌学会学術総会 S16-2 (2005)
9. K.Ou, H.Jikuya, T.Ichikawa, H. Kuyama, E.Matsuo, O.Nishimura, et.al., *J. Proteome Res.*, Vol.5, p2194 (2006)
10. T.Masuda, N.Okamura, K.Suganuma, H.Tanaka, M.Watanabe, E.Matsuo, S.Tsunasawa, A.Gotoh, T.Shirakawa, S.Terao, K.Okumura, O.Nishimura, *54th Ann. Conf. Mass Spectrom.* (ASMS2006) WP557
11. 植田幸嗣・醍醐弥太郎・片桐豊雅・入江新司・佐藤孝明・中村祐輔 第65回 日本癌学会学術総会 O-256 (2006)
12. N.L.Tatiana, et al., *Anal. Chem.*, Vol.79, p1604 (2007)
13. Y.Fukuyama, S.Nakaya, Y.Yamazaki, K.Tanaka, *Anal. Chem.* Vol. 80, p2171 (2008)