

## 1. Introduction

MALDI-MSはプロテオミクス研究、特に翻訳後修飾やその詳細分析において強力なツールとなっている。MALDIにおけるイオン化補助剤はCHCAやDHBなどの固体マトリックスが一般的であるが、最近液体マトリックスと呼ばれる、真空条件下でも液状を保つマトリックスの応用例が報告されている。液体マトリックスの特徴として、試料マトリックス液滴の均一性を向上させ、かつ信号の持続性を増大させる。また分解しやすい化合物をよりソフトにイオン化し、その結果高いS/N比の質量分析を実現している。

本研究では、Nano-LC/MALDI-MSシステムを構築し、マトリックスに液体マトリックスを用いて翻訳後修飾ペプチドの分析を行った。液体マトリックスとしては3-AQ/CHCAと3-AQ/CAを用いた。翻訳後修飾ペプチドとしてはβ-Caseinのトリプシン消化物のうち1リン酸を含むペプチド断片及び5種タンパク質消化混合物にスパイクしたヒト トランスフェリン GP1 (N型糖ペプチド)を用いた。LCを用いないMALDI-MSにおいて液体マトリックスを用いることで、翻訳後修飾ペプチドを高感度で検出できることが報告されている<sup>1,2</sup>。本システムを使った分析においても同様の結果が得られ、より複雑な試料に対しても効果的であることが確認された。

## 2. Experimental Section

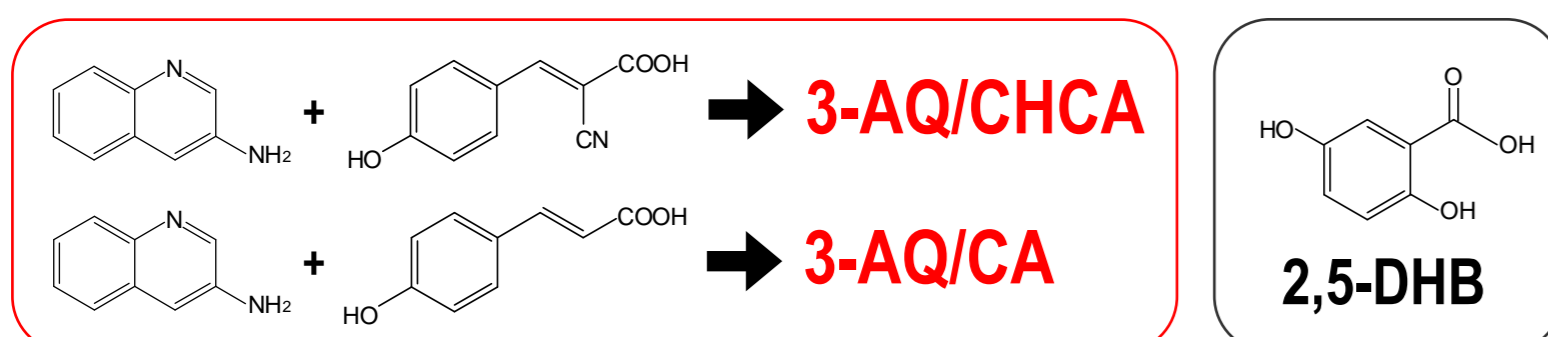


Figure 1. 液体マトリックス (3-AQ/CHCAと3-AQ/CA) と固体マトリックス (2,5-DHB)

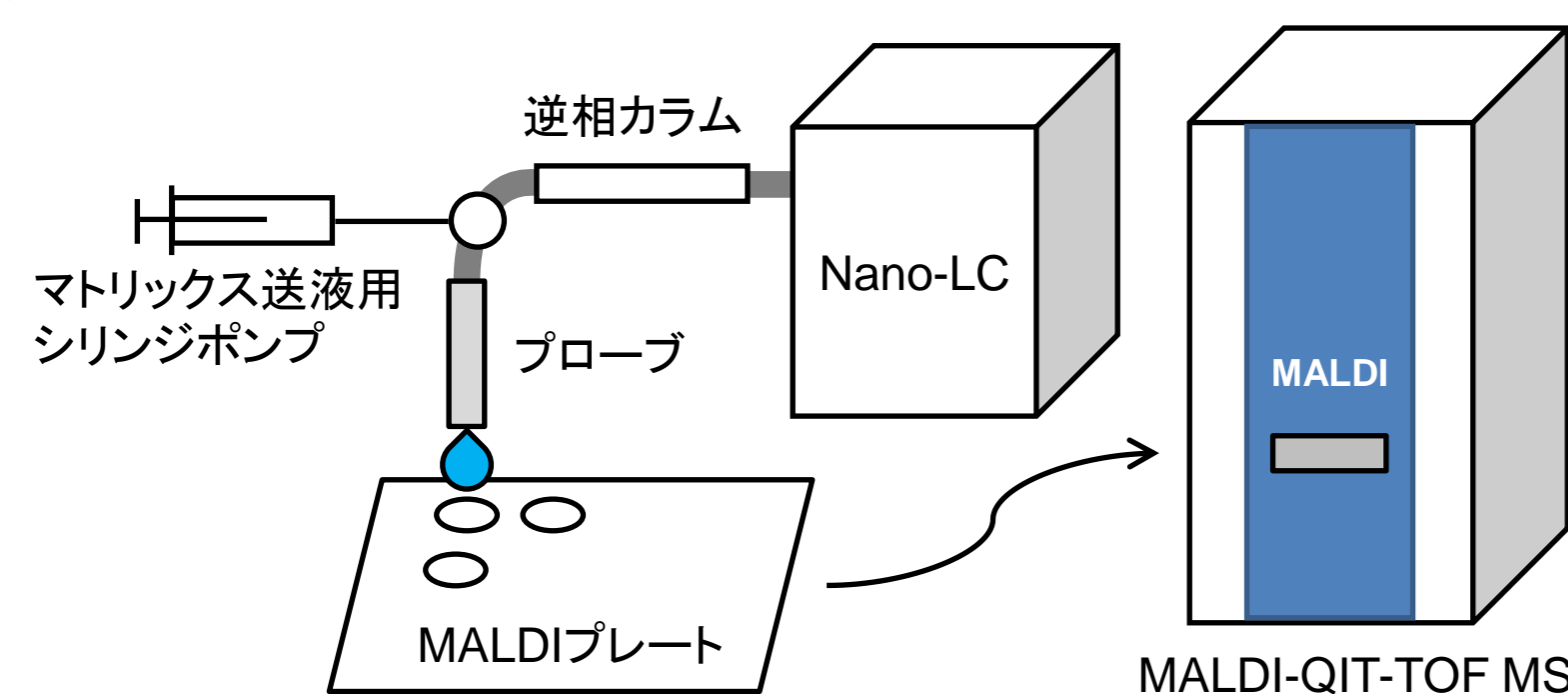


Figure 2. Nano-LC/MALDI-MSシステム

サンプル: β-Caseinトリプシン消化物 (Bruker Daltonics, Germany)  
単離ヒトトランスフェリン GP1 (ジシアリルN型糖ペプチド)  
5種タンパク質消化混合物 (5-mix: 酵母 エノラーゼI, ウサギ グリコーゲンホスホリラーゼb, 酵母 アルコール脱水素酵素, ウシ 血清アルブミン, ウシ ヘモグロビン; Waters Corp., Milford, MA)

添加剤: リン酸アンモニウム (AP), メチレンジホスホン酸 (MDPNA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)  
MALDIプレート: μFocus plate 700 μm (Hudson Surface Technology, Korea)  
質量分析: MALDI-QIT-TOF MS (AXIMA-Resonance, Shimadzu/Kratos), positive ion mode  
ナノLC: Nano pumps (LC-20ADnano), autosampler (SIL-20AC), AccuSpot NSM-1 (Shimadzu Corp., Japan)  
LC条件: カラム: MonoCap FastFlow 0.1x150 mm (GL Sciences, Japan)

流速: 500 nL/min  
注入量: 1 μL  
注入時間: 15 min (500 nL/min)

## 4. Conclusion

- ◆ 液体マトリックス (3-AQ/CHCA, 3-AQ/CA) を使用したNano-LC/MALDI-MSシステムを構築し、複雑試料中の翻訳後修飾ペプチド (リン酸化または糖ペプチド) を高感度に検出した。
- ◆ 液体マトリックスは、LCと組み合わせて使用することで、特に翻訳後修飾ペプチドを高感度に分析するための強力なアプローチとなり得る。

## 3. Results and Discussion

## リン酸化ペプチド

サンプル: 500 fmol β-Casein digest

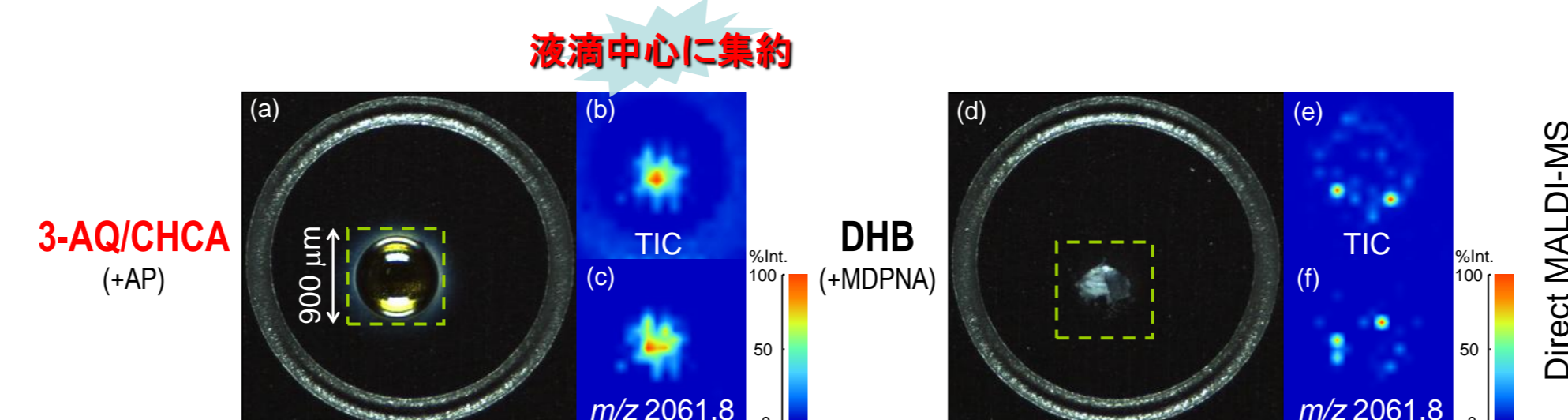


Figure 3. Matrix/analyte crystal photos (a, d) on a sample plate and MS images of (b, e) TIC and (c, f) β-Casein 1P for a 500 fmol β-Casein digest using 3-AQ/CHCA or DHB.

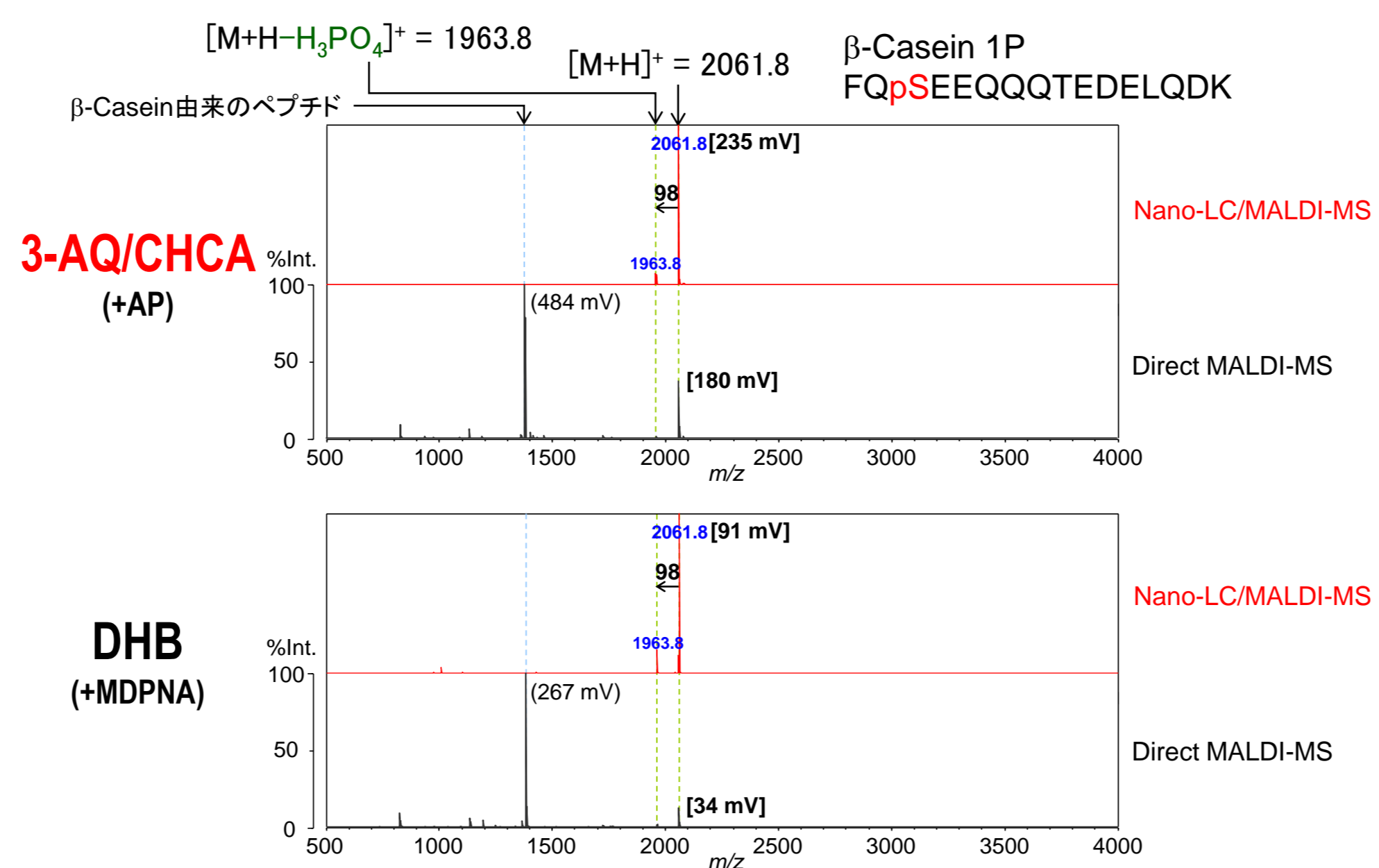


Figure 4. MALDI-MS spectra of tryptic digest of β-Casein using 3-AQ/CHCA and DHB.

移動相A: ACN / 水 / TFA = 4 / 96 / 0.1 (v/v), 移動相B: ACN / 水 / TFA = 80 / 20 / 0.1 (v/v), 移動相C: 水 / TFA = 100 / 0.1 (v/v)  
グラジエント: 0% B: 0-20 min, 0-40% B: 20-60 min, 40-100% B: 60-70 min, 100% B: 70-80 min, 100-0% B: 80-85 min, 0% B: 85-95 min  
フラッシュインターバル: 35 s

## 3-AQ/CHCAを使用した場合DHBを使用した場合と比較して、

- ◆ β-Casein 1P (リン酸化ペプチド) の[M+H]<sup>+</sup>イオン (m/z 2061.8) をより高いS/N比で検出した。
- ◆ [M+H]<sup>+</sup>イオンピークに対するリン酸基のニュートラルロスピーク (m/z 1963.8) の信号強度の割合 ([M+H-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>/[M+H]<sup>+</sup>) が小さくなり、リン酸基の脱離がより抑制されたMSスペクトルが得られた。

## いずれのマトリックスを使用した場合も、

- ◆ Direct MALDI-MSを使用した場合と比較してNano-LC/MALDI-MSを使用した場合、[M+H]<sup>+</sup>イオンをより高いS/N比で検出した。

## 糖ペプチド

サンプル: 10, 100 fmol Tf-GP1 / 500 fmol 5-mix

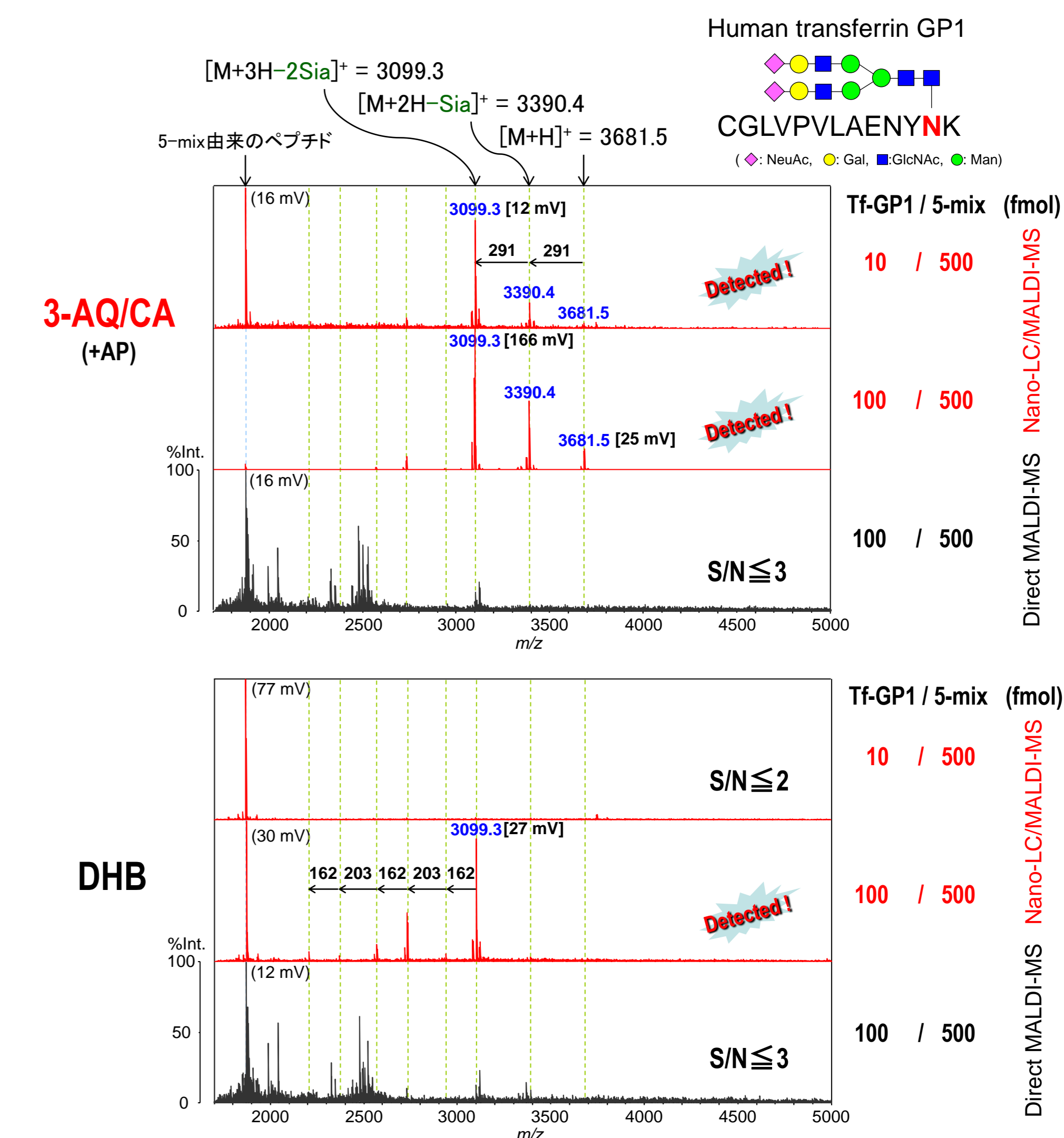


Figure 5. MALDI-MS spectra of Tf-GP1 spiked in 5-mix using 3-AQ/CA and DHB.

移動相A: ACN / 水 / TFA = 5 / 95 / 0.05 (v/v), 移動相B: ACN / 水 / TFA = 95 / 5 / 0.05 (v/v), 移動相C: 水 / TFA = 100 / 0.05 (v/v)  
グラジエント: 0% B: 0-20 min, 0-40% B: 20-50 min, 40-100% B: 50-51 min, 100% B: 51-54 min, 100-0% B: 54-55 min, 0% B: 55-75 min  
フラッシュインターバル: 15 s

## 3-AQ/CAを使用した場合DHBを使用した場合と比較して、

- ◆ Nano-LC/MALDI-MS分析により、500 fmol 5-mixにスパイクした10 fmol トランスフェリン GP1 (糖ペプチド) を検出した。
- ◆ トランスフェリン GP1の[M+3H-2Sia]<sup>+</sup>イオン (m/z 3099.3) をより高いS/N比で検出した。
- ◆ シアル酸の脱離がより抑制されたMSスペクトルが得られた。

## References

- [1] Y. Fukuyama, N. Funakoshi, S. Iwamoto, K. Tanaka. Highly sensitive MALDI analyses of glycopeptides using liquid matrices 3-AQ/CHCA and 3-AQ/CA. 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2011, Denver, USA.
- [2] Y. Fukuyama, K. Takeyama, S. Kawabata, S. Iwamoto, K. Tanaka. An optimized matrix-assisted laser desorption/ionization sample preparation using a liquid matrix, 3-aminoquinoline/α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, for phosphopeptides. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2012, 26, pp2454-2460

## Acknowledgements

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。