

## § 2 各グループの研究目的および成果

### §2-1 次世代質量分析システムの開発

島津製作所 田中最先端研究所

#### §2-1-1 革新的前処理法の開発

本プロジェクトでは次世代質量分析システムを前処理、イオン化、ハードウェア及びソフトウェアの4つパートで全面的に開発し、総合能力の向上を目指した。そのなかで「前処理」はシステムが試料(検体)と接するインターフェースとなっている(図 1)。したがって、試料の特性・特徴に応じた処理をすることは必須であり、また次工程であるイオン化、ハードウェアさらにはソフトウェアの特徴も活かす方法にすることが課題であった。



図1 前処理はシステムと試料のインターフェースである

質量分析法における前処理には一般的に免疫沈降法や HPLC 法、2次元電気泳動法などが用いられている[1]。これらの方法を用いるのは、複雑で様々な物質を含み、各成分の濃度もまちまちな生体由来試料から目的物を精製・濃縮するためである。つまり、「見たいものだけを見る」ための作業である。このように適切な処理をされた試料が適切な条件に調製されたマトリックスや装置と組み合わせられた場合にはじめて有用なマススペクトルを得ることができる。このような位置づけからも、試料がシステムと最初に接する前処理はシステム全体の方向性を決める重要部分となっている。

本研究では前処理法として主に免疫沈降法を基本技術とするもの、及び HPLC 法を基本技術にするものを開発した。これらについて、以下のように3つに分けて報告する。

- ① 免疫沈降法を発展させた前処理
- ② HPLC 法を発展させた前処理
- ③ 周辺技術

#### 1 免疫沈降法を発展させた前処理

質量分析システムにおいて、免疫沈降法を応用した前処理は、それに用いる抗体の特異性から精製度の高い目的物を得ることに適している。本開発では、その抗体の抗原結合部位(F(ab'): Fragment, antigen binding)を切り出すなど、種々の改変を加えることなどでさらにシステムの高感度化も可能とした。このような方法で複雑な生体試料から、「見たいものだけを見る」ために高純度で高濃度の目的物を得ることを「フィッシング」とよんでいる。

## 1-1 Hetero F(ab')-PEG ビーズの開発と A $\beta$ 1-28 のスパイク血漿からのフィッシング

### 【研究目的】

一般的な免疫沈降法では抗体(1種類)を磁気ビーズなどの担体に固定し、その抗体に目的物を結合させる(図1のA、従来法)。更にその後の洗浄と溶出などの工程を経て精製・濃縮された目的物を得ている。一方、本研究の方法では同一目的物の異なるエピトープ(抗体が結合する領域)を認識するように複数の抗体を用いることが特徴である。しかし、一般的な抗体の固定方法のままに複数抗体を用いても感度や特異性の向上には限界がある。その理由として目的物質の大きさやエピトープの位置関係などから立体障害が生じるためと考えている。この問題を解決するために、本開発では抗体の F(ab')領域を切り出し、PEG(polyethylene glycol)鎖を介して担体に固定することをおこなった(図1のB、Hetero F(ab')-PEGビーズ法)。これは抗体全体を用いるよりも結合部分である F(ab')を用いたほうが立体障害を起こしにくいからである。また、PEG鎖を介した担体との結合により2つのエピトープ間の位置関係に柔軟に対応できるようになるからである。

アミロイドベータ(amyloid beta, A $\beta$ )は APP(amyloid precursor protein)からプロテアーゼの作用により

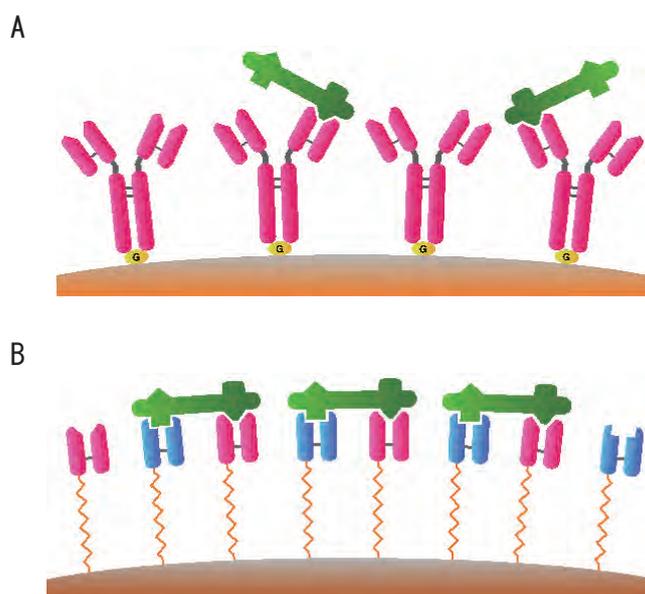


図1 免疫沈降に用いる固定化抗体の模式図

(A)従来法ではprotein Gなどを介して抗体と担体を結合させている。一つの抗体には結合部位が2カ所あるが、それらは相同で目的物と結合するのは一カ所である。(B) Hetero F(ab')-PEGビーズ法では抗体のFab領域を切り出して、PEG鎖を介して固定する。2種類の抗体からFabを調製すれば、目的物と2カ所で結合し、より強い捕捉ができる。

産生されるペプチドで、様々なバリエーションの存在が知られている(表1)。それらのいくつかの髄液中濃度はアルツハイマー型認知症の進行度と関連があるとされている。一方、これまで血漿中の A $\beta$ 1-40 と A $\beta$ 1-42 の濃度が ELISA 法で測られてきたが、MALDI-MS では検出することができなかった。そこで本研究で開発した Hetero F(ab')-PEG ビーズ法が質量分析システムの高感度化に有効であることを実証するため、血漿中の A $\beta$  を MALDI-MS により検出、測定することを試みた。

### 【研究成果】

血漿中の A $\beta$  を MALDI-MS で検出した報告はなく、感度比較に適した生体由来試料は得られなかった。そこで市販血漿に A $\beta$  バリエーションの一つである A $\beta$ 1-28(合成品)をスパイクして用いた。スパイク血漿から

表1 細胞の培養上清から検出されたAβバリエーション([2]より)

Soluble Aβ and its variants detected from cell culture medium conditioned with N2a/APP <sub>770-870/671NL</sub> cells by IP/MS							
<i>M<sub>r</sub></i> (observed)	Aβ	<i>M<sub>r</sub></i> (calculated)	Amino acid sequence				
			1	10	20	30	40
4513.8 <sup>a,b</sup>	1-42	4514.1	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA				
4330.0 <sup>a,b</sup>	1-40	4329.9	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV				
4231.6 <sup>a,b</sup>	1-39	4230.7	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV				
4131.9 <sup>a,b</sup>	1-38	4131.6	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG				
4074.7 <sup>a,b</sup>	1-37	4074.5	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG				
3787.0 <sup>a</sup>	1-34	3787.2	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL				
3673.5 <sup>a</sup>	1-33	3674.0	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG				
3615.8 <sup>a</sup>	1-32	3616.9	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG				
3390.6 <sup>a</sup>	1-30	3390.6	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI				
3262.4 <sup>a</sup>	1-28	3262.5	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG				
3134.3 <sup>a</sup>	1-27	3134.3	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG				
2461.8 <sup>a</sup>	1-20	2461.7	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFF				
2315.0 <sup>a</sup>	1-19	2314.5	DAEFRHDSGYEVHHQKLVF				
2167.3 <sup>a</sup>	1-18	2167.3	DAEFRHDSGYEVHHQKLV				
2068.2 <sup>a</sup>	1-17	2068.2	DAEFRHDSGYEVHHQKL				
1955.0 <sup>a</sup>	1-16	1955.0	DAEFRHDSGYEVHHQK				
1827.0 <sup>a</sup>	1-15	1826.9	DAEFRHDSGYEVHHQ				
1699.0 <sup>a</sup>	1-14	1698.7	DAEFRHDSGYEVHH				
1561.8 <sup>a</sup>	1-13	1561.6	DAEFRHDSGYEVH				
2972.9 <sup>b,d</sup>	14-42	2970.5	HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA				
2786.0 <sup>b,d</sup>	14-40	2786.3	HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV				
2649.8 <sup>b,d</sup>	15-40	2649.1	QKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV				
2393.2 <sup>b,d</sup>	17-40	2392.8	LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV				
2588.5 <sup>b,d</sup>	14-38	2588.0	HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG				
2452.2 <sup>b,d</sup>	15-38	2450.9	QKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG				
3170.9 <sup>d</sup>	6-34	3168.5	HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL				
2916.8 <sup>d</sup>	8-34	2916.3	SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL				
2243.7 <sup>d</sup>	14-34	2243.6	HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL				
2104.8 <sup>d</sup>	15-34	2106.4	QKLVFFAEDVGSNKGAIIGL				
1978.2 <sup>d</sup>	16-34	1978.3	KLVFFAEDVGSNKGAIIGL				
1848.5 <sup>d</sup>	17-34	1850.1	LVFFAEDVGSNKGAIIGL				
2858.4 <sup>d</sup>	5-29	2857.1	RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG				
2672.0 <sup>d</sup>	5-27	2671.9	RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN				
2515.1 <sup>d</sup>	6-27	2515.7	HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN				
2346.8 <sup>e</sup>	2-20	2346.6	AEFRHDSGYEVHHQKLVFF				
2199.5 <sup>e</sup>	2-19	2199.4	AEFRHDSGYEVHHQKLVF				
2053.5 <sup>e</sup>	2-18	2052.2	AEFRHDSGYEVHHQKLV				
1712.2 <sup>e</sup>	2-15	1711.8	AEFRHDSGYEVHHQ				
1583.8 <sup>e</sup>	2-14	1583.6	AEFRHDSGYEVHH				
1446.5 <sup>e</sup>	2-13	1446.5	AEFRHDSGYEVH				
1512.4 <sup>e</sup>	3-14	1512.6	EFRHDSGYEVHH				
1999.4 <sup>e</sup>	4-19 <sup>e</sup>	1999.2	FRHDSGYEVHHQKLVF				
1851.9 <sup>e</sup>	4-18 <sup>e</sup>	1852.0	FRHDSGYEVHHQKLV				
1383.4 <sup>e</sup>	4-14	1383.4	FRHDSGYEVHH				

<sup>a</sup> Detected by both mAbs 4G8 and 6E10.  
<sup>b</sup> 16 Da mass increase was observed when formic acid/water/isopropanol were used for elution.  
<sup>c</sup> Detected by mAb 6E10 only.  
<sup>d</sup> Detected by mAb 4G8 only.  
<sup>e</sup> The molecular mass of Aβ(5-20) is identical to Aβ(4-19) and Aβ(5-19) is identical to Aβ(4-18).

Aβ1-28をフィッシングするための Hetero F(ab')-PEG ビーズは、Aβ に対するモノクローナル抗体の 6E10(エピトープは 3~8 番目のアミノ酸)と 4G8(前記同 18~22 番目)から切り出された F(ab')、担体としての磁気ビーズ、および F(ab')と磁気ビーズを連結するための PEG(24mer)から構成された。対照実験では抗体を protein G を介して磁気ビーズに固定した。

MS 測定における感度は、スパイク血漿をコントロール血漿で段階希釈し、マススペクトルの該当するピーク(*m/z* 3,264)の S/N 比が 3 以上となる最低濃度を検出限界濃度と定め、この値で比較した。Aβ1-28

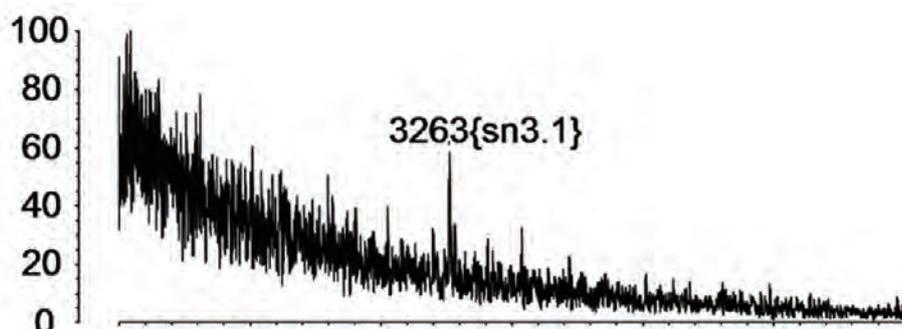


図2 スパイク血漿からフィッシングしたAβ1-28のマススペクトル

1 pgのAβ1-28を50 μLの健常者血漿に加え、界面活性剤を含むトリスバッファーで希釈した後、150 μgの Hetero F(ab')-PEGビーズでフィッシングした。その溶出液にマトリックスとしてCHCAを、添加剤としてMDPNAを加えてMALDI-MS測定の試料とした。マススペクトルはMALDI-TOFMS(島津製作所)を用いて正イオンリアモードで測定した。

の濃度が6.14 pMの血漿から Hetero F(ab')-PEGビーズを用いてフィッシングし、MALDI-TOFMS(島津製作所)で測定したマススペクトルを図2に示す。Aβ1-28のピークがS/N3.1で観察されたが、更に希釈を行うとそのピークのS/Nは3.0を下まわるか、消失した。よって、ピークのS/Nが3.0以上で実測された6.14 pMを Hetero F(ab')-PEGビーズ法の検出限界濃度とした。同様にして従来法(IgG-Protein G)による検出限界濃度を求め、表2にまとめた。その結果、従来法での検出限界濃度は306 pM(6E10)と153 pM(4G8)であった。一方、Hetero F(ab')-PEGビーズ法(6E10/4G8、混合比1:1)では6.14 pMであり、約25倍から50倍の感度向上が実証された。

表2 スパイク血漿からフィッシングしたAβ1-28の検出限界濃度

<b>S/N ≥ 3 のマススペクトルが得られる検出限界</b>			
	<b>血漿 50 μL に対するAβ1-28の添加量</b>		<b>血漿中Aβ1-28の濃度</b>
	(μg)	(fmol)	(pM)
<b>IgG-protein G(従来法)</b>			
6E10	50	15.3	306
4G8	25	7.67	153
6E10/4G8	5	1.53	30.6
<b>Fab-PEG<sub>24</sub> (開発法)</b>			
6E10	2.5	0.767	15.3
4G8	10	3.07	61.4
6E10/4G8	1	0.307	6.14

Protein Gを介して抗体を固定する従来法とPEGを介してFabを固定する開発法を比較した(複数種を使った場合が Hetero F(ab')-PEG法となる)。抗体はAβに対するモノクローナル抗体の6E10と4G8をそれぞれ単独、あるいは両方を用いた。Fabは6E10と4G8から切り出し、同様にそれぞれの単独と両方を用いた。

## 1-2 内在性AβのMALDI-MS測定

### 【研究目的】

スパイク血漿を試料として Hetero F(ab')-PEGビーズ法を用いることで質量分析システムの感度向上が確認できた。その感度と健常人の通常濃度から内在性のAβも検出可能と予測されたので、スパイクしていない血漿を試料として前項と同様の方法を試みた。

### 【研究成果】

得られたマススペクトルのピーク( $m/z$  4,330)がAβ1-40と推定されたので、更にMS/MS解析を行い、Aβ1-40と同定した(図3)。また、同じ血漿試料をELISA法で測定しAβ1-40は51.7 pMと定量された。

血漿中の内在性Aβ1-40を質量分析法で検出した報告はこれまでになく、世界で初めての解析事例となった。これは Hetero F(ab')-PEGビーズ法が従来の免疫沈降法よりも質量分析システムの感度を向上させたから可能となったのである。また、MS/MS解析で目的物を直接的に観測して同定できることも質量分析の優れた特長であり、これを利用したことで効率的に内在性Aβ1-40の同定をおこなうことができた。

## 1-3 血漿中Aβの定量

### 【研究目的】

Hetero F(ab')-PEGビーズ法が質量分析システムの感度を向上させ、血漿中の内在性Aβも検出可能

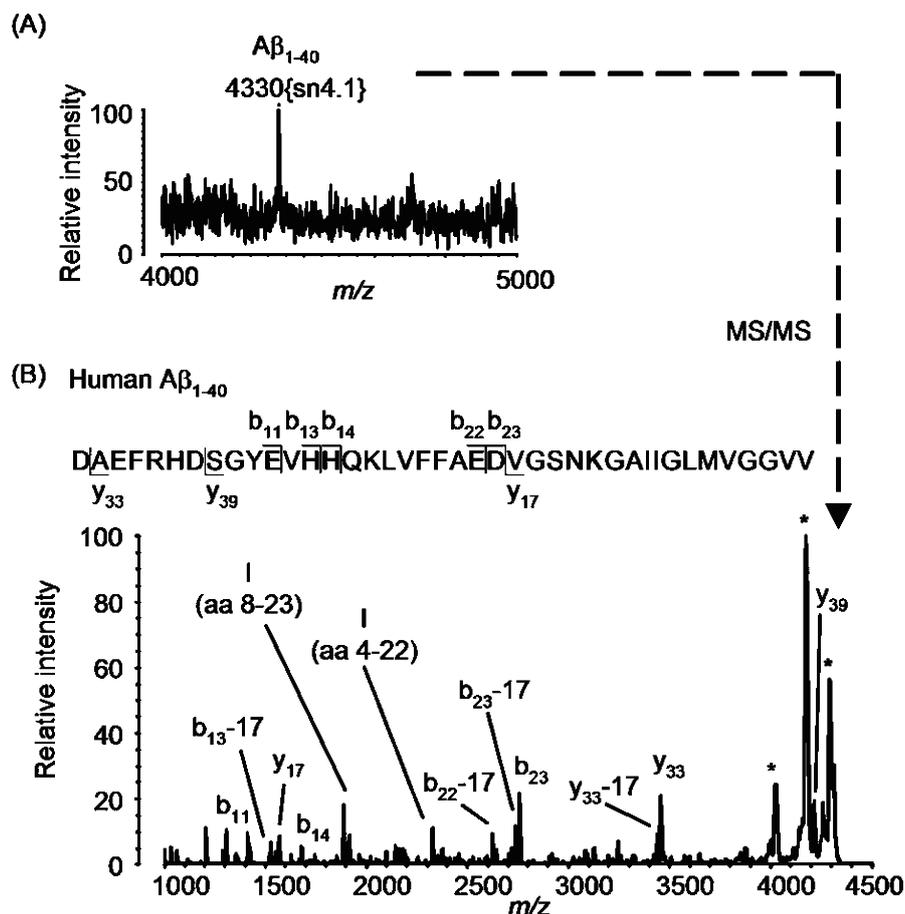


図3 内在性AβのMALDI-MS測定

(A) 250 μLの血漿からHetero F(ab')<sub>2</sub>-PEGビーズ(6E10および4G8のFab)を用いてフィッシングを行い、正イオンリニアモードで測定した。(B) プリカーカーイオンとしてm/z 4,330を選択してMS/MS(CID)解析を行い、Aβ<sub>1-40</sub>と同一した

にすることを明らかにした。そのAβはアルツハイマー型認知症の進行度と関連があるとされている。つまり、疾患バイオマーカーになり得ると考えられているが、それを実証するためには定量的な検討が必要不可欠である。そこでMALDI-MSによる定量的測定が可能であることを示すために安定同位体を用いたAβの検量線を作成した(図4A)。

#### 【研究成果】

得られた検量線は2.5 pMから100 pMの範囲で高い直線性を示した。この検量線はELISA法のそれとほぼ同等である(図4B)。つまり、Hetero F(ab')<sub>2</sub>-PEGビーズ法を用いることによりMALDI法でもELISA法と同等の感度で定量的検討が可能であることが示された。更にMALDI-MSでは質量数が異なれば複数の物質を同時測定できることから、多項目同時の高感度定量も可能と考えられた。

### 1-4 Aβバリエーションの複数同時定量

#### 【研究目的】

アルツハイマー型認知症との関連性を研究するために、髄液中あるいは血漿中のAβ<sub>1-40</sub>およびAβ<sub>1-42</sub>が測定されているが、それには主にサンドイッチELISA法が用いられている。そのサンドイッチELISA法では2種類の抗体が使われ、一つはペプチドのC末端側と、もう片方はN末端側と結合する。この特徴から極めて特異性の高い測定が可能であり、感度も十分である。しかし、Aβ<sub>1-40</sub>とAβ<sub>1-42</sub>はC末端が異なるので、それぞれ別に測らなければならない。もし仮に、末端ではない共通領域と結合する抗体

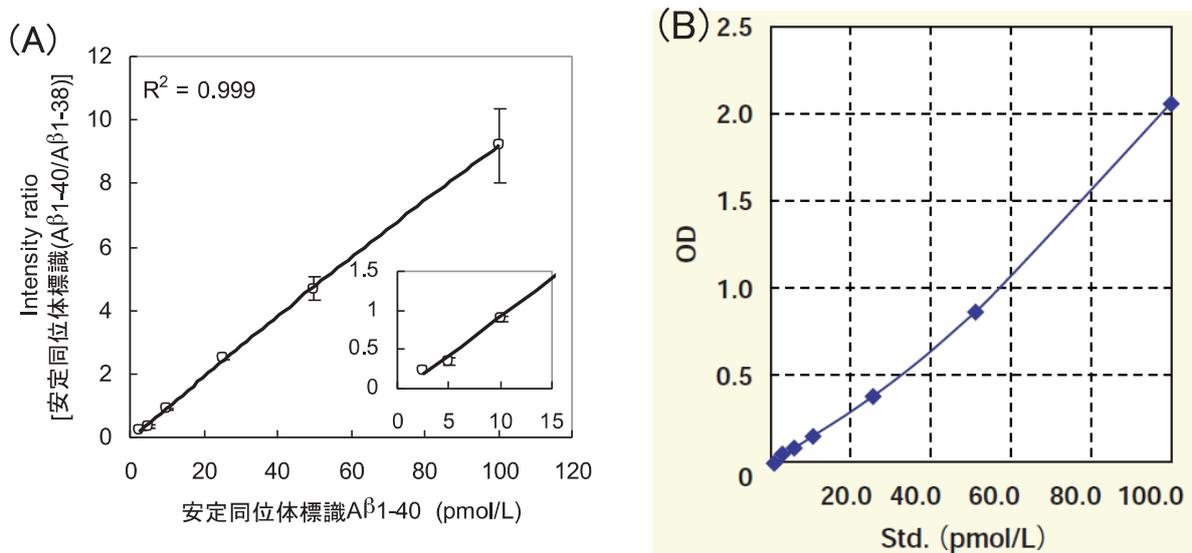


図4 血漿中Aβ1-40測定検量線の比較

(A) MALDI-MS測定による検量線。2.5 pmol/Lから100 pmol/Lの範囲の安定同位体標識Aβ1-40と、10 pmol/Lで一定の安定同位体標識Aβ1-38、を含む検量線用の安定同位体標識Aβ溶液を作成した。その安定同位体標識Aβ溶液と血漿を250 μLずつ混合させた試料をHetero F(ab')-PEGビーズ(6E10および4G8のFab)を用いてフィッシングを行い、マトリックスとしてCHCAを用いて正イオンモードでMALDI-MS測定した。得られたマススペクトルの安定同位体標識Aβ1-40と安定同位体標識Aβ1-38に該当するピーク強度(高さ)の比率を安定同位体標識Aβ1-40の濃度に対してプロットした。(B) Aβ1-40のC末端とN末端のそれぞれに特異的に結合する2種類の抗Aβ抗体を用いたサンドイッチELISAによる検量線(和光純薬工業株式会社の「高感度 βアミロイドELISAキット」の製品説明から引用)

を用いることができて、そのような抗体を用いた系では Aβ1-40 と Aβ1-42 は区別できない。つまり、それぞれを定量することは不可能である。

Aβに対する抗体の“6E10”と“4G8”を用いた Hetero F(ab')-PEGビーズは、それら抗体の抗原認識部位から複数の Aβバリエーションと結合することが予想された。また、検出に MALDI法を使うことから、質量数の異なる複数の対象分子を検出・測定することが可能と考えた。つまり、複数の Aβバリエーションを高感度に定量できると考えられた。これを実証するために、市販血漿を用いた実験を行った。

#### 【研究成果】

“6E10”と“4G8”を用いた Hetero F(ab')-PEGビーズと MALDI法を組み合わせ、ヒト血漿から 22種の Aβバリエーションを検出することができた。また安定同位体標識した Aβ1-38をスパイクし、そのピークとの強度比で内在性の Aβバリエーションを同時定量できることを確かめた。その定量性が有意であることを示すために、その希釈に応じて強度比が増大することも確認できた(図 5)。これらの結果は実際の検体で共通領域をもつペプチドの複数同時定量ができることを示している。

#### 【結論】

Aβはアルツハイマー病の疾患バイオマーカーとなり得ると考えられている。この物質を対象に新たに開発した Hetero F(ab')-PEGビーズ法を適用し、血漿中の内在性 Aβ1-40を世界で初めて質量分析法で検出した。また、Aβに対する安定同位体を用いた定量法を開発し、MALDI法が ELISA法と同等の定量性と感度を持つことを実証した。更に、ヒト血漿中では報告されていない複数の Aβバリエーションを検出し、それら

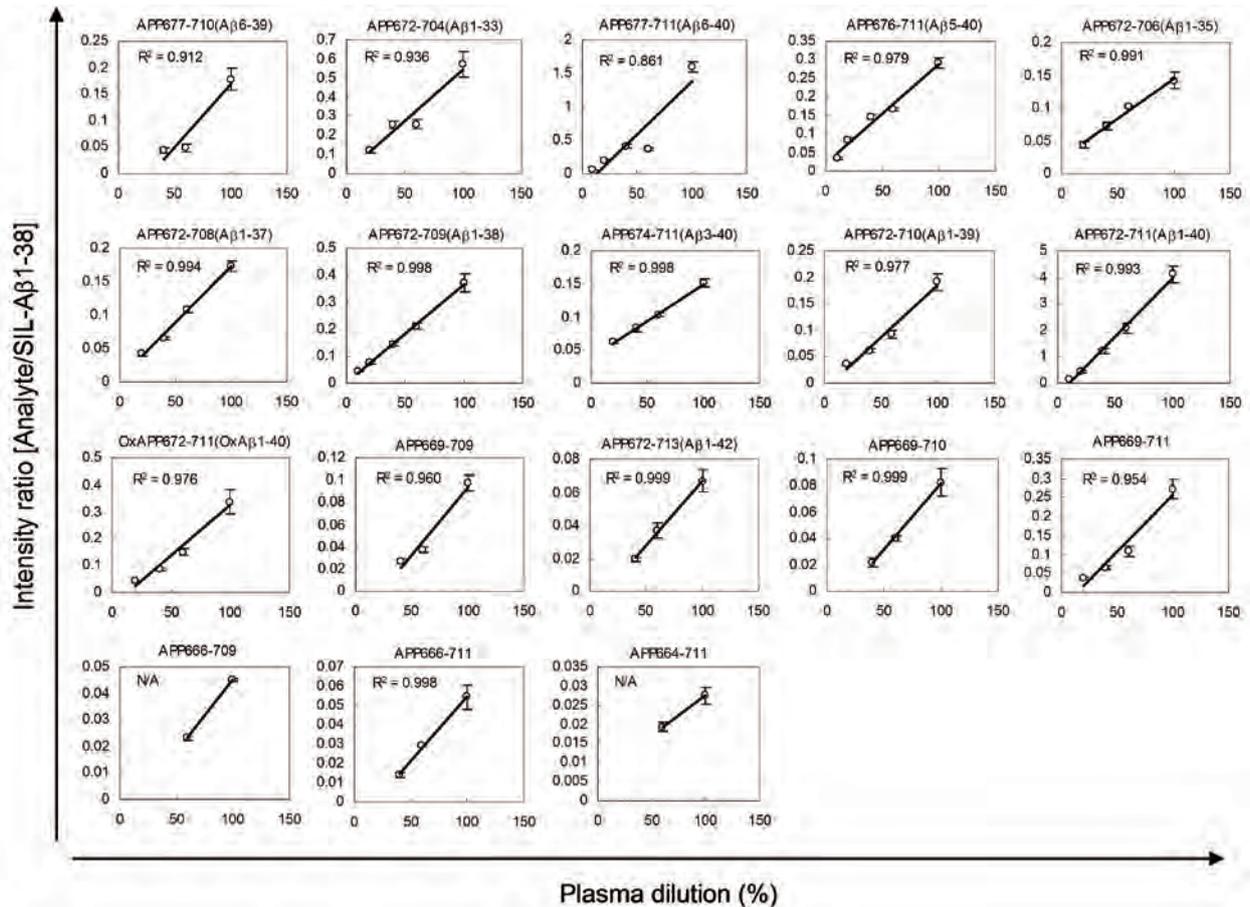


図5 希釈とピーク強度比変化の関連による定量性の評価

APP677-710(Aβ6-39)はAmyloid precursor proteinのアミノ酸677から710番目に相当するペプチドであり、またAmyloid betaの6から39番目に相当するものであることを示している。他も同様である。マススペクトルでのそれら対象ペプチドに該当するピークと一定量をスパイクした安定同位体標識Aβ1-38に該当するピークの強度比を求めた。その強度比が希釈に応じて比例的に変化することを示している。

の定量も可能であることを示した。ここで開発された技術を応用すればアルツハイマー病はもちろんのこと、その他の疾患バイオマーカーも発見できると考えられる。

#### 【成果一覧】

##### 論文発表

- (1) Multi epitope-targeting immunoprecipitation using F(ab') fragments with high affinity and specificity for the enhanced detection of a peptide with matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. Kaneko N, Yoshimori T, Yamamoto R, Capon DJ, Shimada T, Sato TA, Tanaka K. *Anal Chem.* 2013 Mar 19;85(6):3152-9. doi: 10.1021/ac303344h. Epub 2013 Feb 26.
- (2) Identification and quantification of truncated amyloid precursor protein variants in human plasma using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (in press)

##### 【参考文献】

- [1] Mass Spectrometry of Proteins and Peptides (2000) John R. Chapman. Humana Press Inc.

pp.439-451

- [2] The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. Wang R, Sweeney D, Gandy SE, Sisodia SS. *J Biol Chem.* 1996 Dec 13;271(50):31894-902.(PMID: 8943233)

## 2 HPLC法を発展させた前処理

HPLC(高速液体クロマトグラフィー)法は、一般的には定量性の高い分離・分析法として広汎に利用されており、様々な知見の蓄積がなされている。この方法における分離は試料中の様々な物質を、その特性によって分けることであり、すなわち精製と考えることができる。また、微量液中に精製することで濃縮が可能な場合もある。このような特徴を持つHPLC法とMALDI法で開発されたマトリックスやマトリックス添加剤を組み合わせて更に高感度化できることを示した。また、高精度分注装置との組み合わせなどによりスループットを向上させることもできた。

### 2-1 マトリックス添加剤 MDPNA の LC/MALDI-MS への適用

#### 【研究目的】

MALDI法ではLC/MSで広く使われるエレクトロスプレーイオン化(ESI)法と比較して、バッファー塩に起因する感度低下が起りにくい。それでも尚、移動相の溶媒で使用されるような不揮発性塩、あるいは高濃度の揮発性塩に起因する感度低下がしばしば問題となる。本開発では、MALDI法で使われるマトリックス添加剤の一つであるメチレンジホスホン酸をLC/MALDI-MSへ適用することでシステムの耐塩性を向上させること、及び適用できる分離モードの拡充について検討した[1]。

#### 【研究成果】

##### ① MDPNA 添加による MALDI-MS の耐塩性向上

不揮発性アミンバッファーに溶解した7種のペプチド混合物をMALDI-MS測定し、MDPNAの添加がある場合とない場合についてマススペクトルを比較した。マトリックスには $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)、または2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)を用いた。また、同様の比較をタンパク質(BSA)のトリプシン消化物でもおこなった。更に、HPLCによる分離ではpHの影響が大きいことから、pH 4.0, pH 6.0, pH 8.0での比較検討をおこなった。

不揮発性アミンバッファーに溶解した7種のペプチド混合物の試料にMDPNAを添加した場合としない場合のマススペクトルを図1に示す。CHCAとDHBのいずれにおいても、MDPNAの添加により信号ノイズ比(S/N比)は大幅に向上し、特にDHBにおいてその効果は顕著であった。また、ナトリウムやカリウムなど金属付加イオンの生成が抑制された。BSAのトリプシン消化物でも同様の効果が確認できた(図2)。また、バッファーのpHに関しても、その値が4.0, 6.0, 8.0のいずれにおいてもMDPNAの添加によるS/N向上が認められた(図3)。これらの結果から、MDPNAの添加によって、一般的にLCで使われる移動相バッファーをLC/MALDI-MS分析へ適用可能となることが分かった。

##### ② MDPNA 添加による LC/MALDI-MS の分離モード拡大

疎水性相互作用クロマトグラフィー(Hydrophilic Interaction Chromatography; HILIC)は糖ペプチドやリン酸化ペプチド等の親水性化合物の分離に適している。そこで、ギ酸アンモニウムを含む移動相を用いたHILICによりタンパク質のトリプシン消化物を分離し、LC/MALDI-MS分析を行った。マトリックスにはDHBを用いてMDPNA添加の効果を調べた。更にクロマトフォーカシングをLC/MALDI-MSの分離モードに用いることを検討した。クロマトフォーカシングはサンプルの等電点(pI)を利用して分離する方法である。逆相カラムでは分離が難しいアイソフォームや翻訳後修飾の小さな差を分離するのに有効である。不揮発性バッファー塩であるピペラジンと1-メチルピペラジンを含む移動相を用いたクロマトフォーカシングでペプチド混合物を分離し、LC/MALDI-MS分析を行った。マトリックスにはDHBを用いてMDPNA添加の効果を調べた。

HILICを分離モードに用いたLC/MALDI-MSにおいて、MDPNAを添加しなかった場合BSAトリプシン

消化物のペプチドピークは検出されなかったが、MDPNA を添加した場合は明瞭なピークが検出された(図4)。MDPNA の添加により、移動相中に含まれるギ酸アンモニウムによるイオン化阻害が抑制され、MALDI-MS の感度が向上したと考えられる。クロマトフォーカシング-MALDI-MS においても、MDPNA を添加しなかった場合はペプチドの抽出イオンクロマトグラム(XIC)において明瞭なピークは観察されなかったが、MDPNA の添加により S/N 比が向上し、XIC ピーク強度は顕著に大きくなった(図5)。HILIC の場合と同様に MDPNA の添加により、移動相中に含まれる不揮発性塩(ピペラジンおよび 1-メチルピペラジン)によるイオン化阻害が抑制され、MALDI-MS の感度が向上したと考えられる。

### 【結論】

MDPNA は HPLC の移動相として一般的に利用されるバッファーの条件(塩濃度、pH)において、塩による感度低下を十分に抑制できた。また、ナトリウムやカリウム等の不要な付加イオンの生成が抑制された。HILIC のように移動相に塩を必要とする分離モードに対し、MDPNA をマトリックスに添加するだけで高感

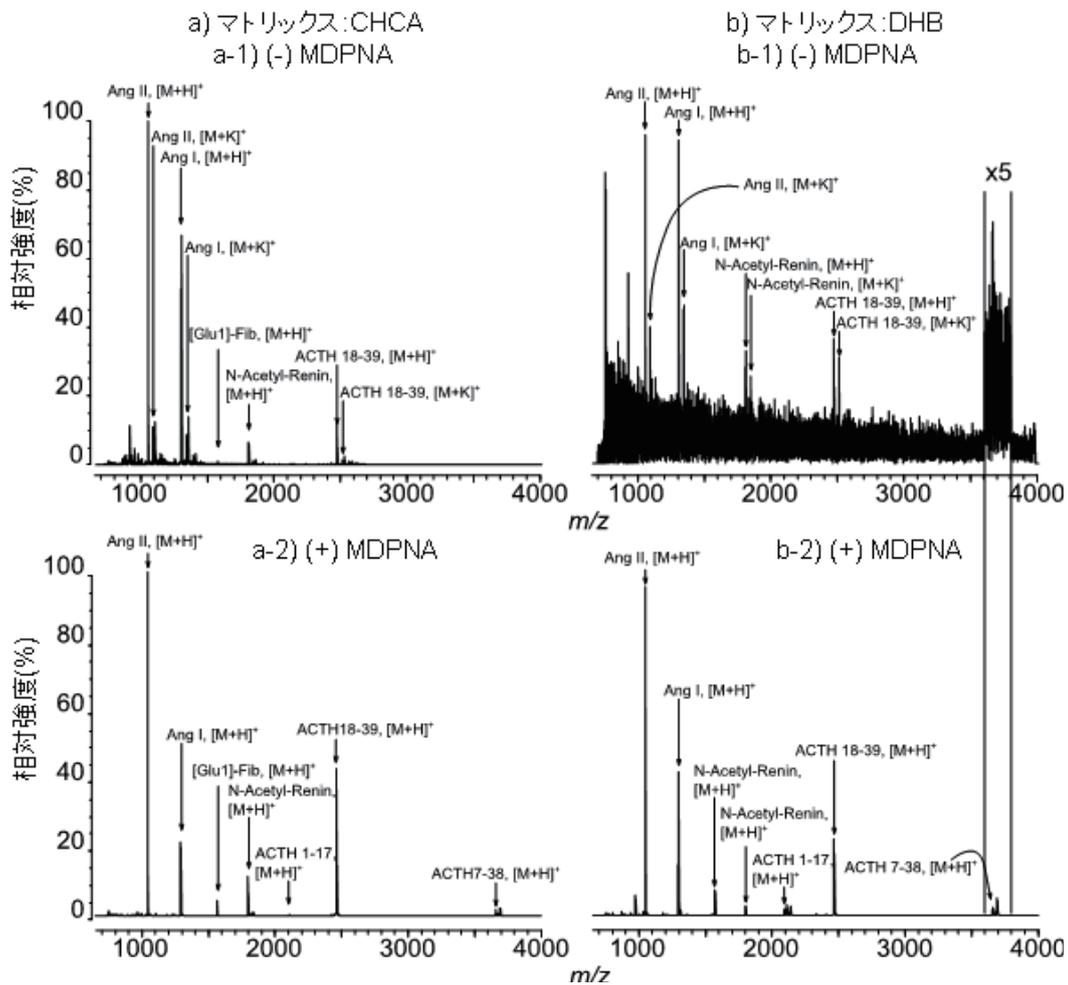


図1 pH 8.0 アミンバッファーに溶解した7ペプチド混合物のマススペクトル

サンプル: 7ペプチド混合物 (300 fmol/mL angiotensin I (Ang I), 300 fmol/mL angiotensin II (Ang II), 300 fmol/mL glu-1-fibrinopeptide B ([Glu1]-Fib), 300 fmol/mL N-acetyl-renin substrate tetradecapeptide porcine (N-acetyl-renin), 300 fmol/mL adrenocorticotrophic hormone (ACTH) fragment 1-17 (ACTH 1-17), 300 fmol/mL ACTH fragment 18-39 (ACTH 18-39), 及び 200 fmol/mL ACTH fragment 7-38 (ACTH 7-38)) / pH 8.0アミンバッファー(5 mM tris, bis-tris, piperazine, imidazole, 1-methylpiperazine, diethanolamine 混合溶液) (0.5  $\mu$ L/well)

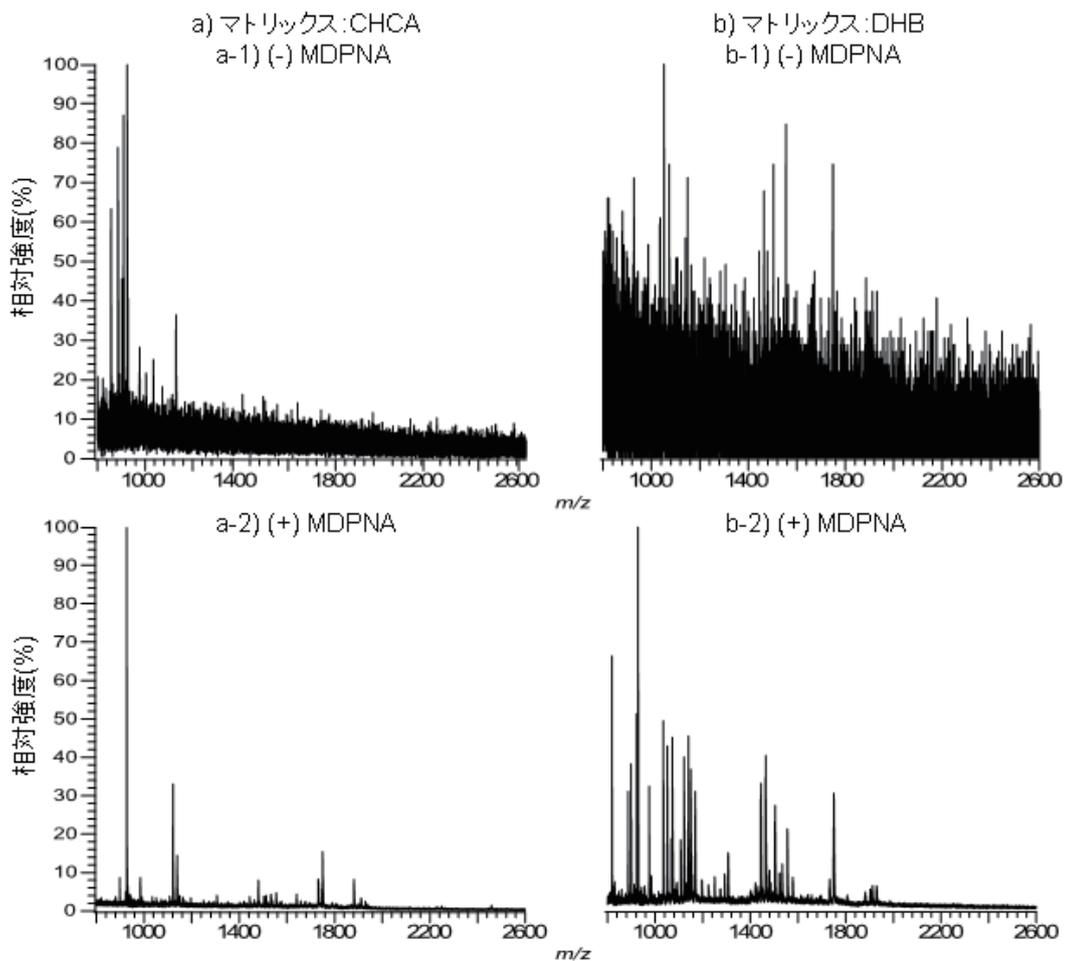


図2 pH 8.0 アミンバッファーに溶解した BSA 消化物のマススペクトル

サンプル: 100 fmol/ $\mu$ L BSAトリプシン消化物 / pH 8.0 アミンバッファー(0.5  $\mu$ L/well)、マトリックス: (a) 5.0 mg/mL CHCA / 0.05% TFA in 50% (v/v) アセトニトリル (MeCN)/水 (0.5  $\mu$ L/well), (b) 5.0 mg/mL DHB / 0.05% TFA in 50% (v/v) アセトニトリル (MeCN)/水 (0.5  $\mu$ L/well)、マトリックス添加剤: (1) (-) MDPNA, (2) (+)1% w/v MDPNA 水溶液 (0.5  $\mu$ L/well)

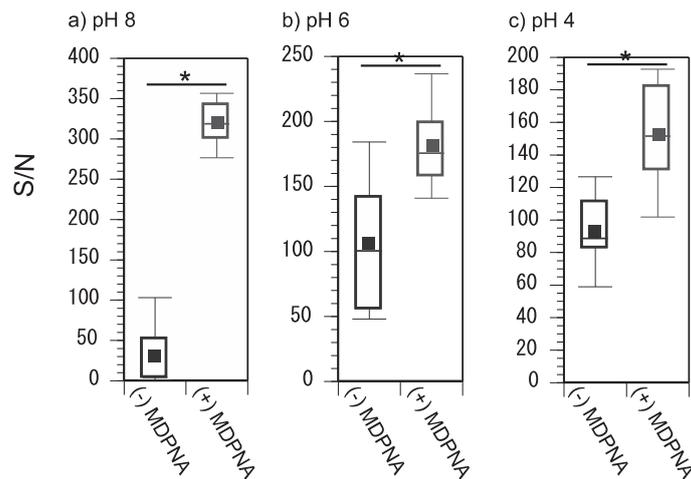


図3 pH 8.0、6.0、4.0のアミンバッファーを用いた場合のMDPNAの効果

サンプル: 300 fmol/mL ACTH18-39 / (a) pH 8.0, (b) pH 6.0, (c) pH 4.0アミン緩衝剤。マトリックス: 5.0 mg/mL DHB / 0.05% TFA in 50% (v/v) アセトニトリル (MeCN)/水 (0.5  $\mu$ L/well)。マトリックス添加剤: (-) MDPNA, (+)1% w/v MDPNA水溶液 (0.5  $\mu$ L/well)

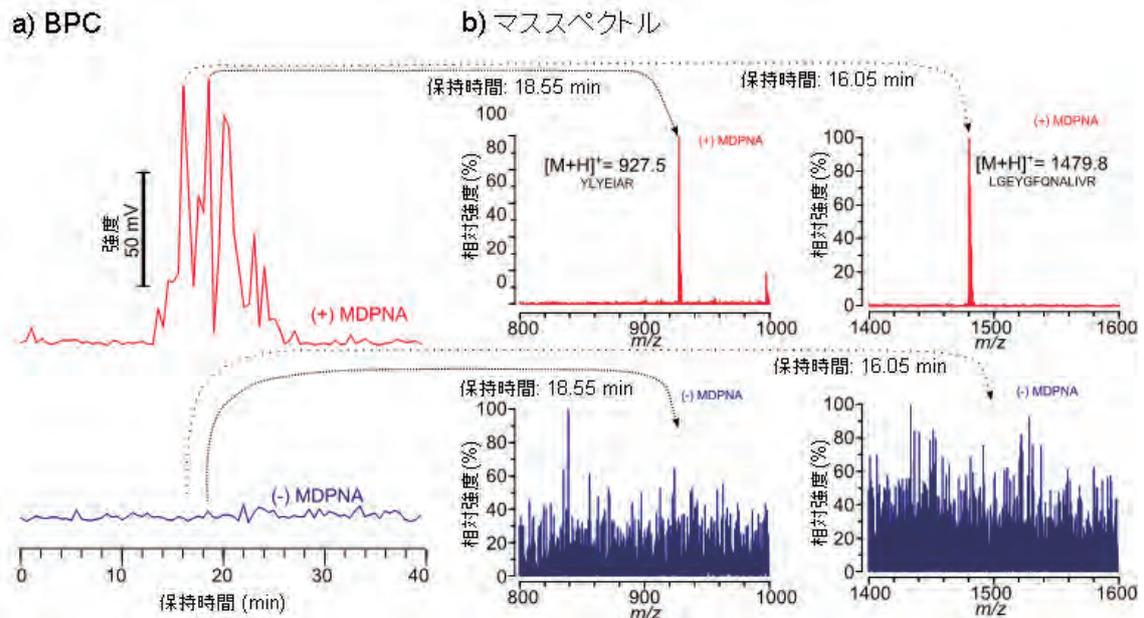


図4 HILICを用いたLC/MALDI-MSへのMDPNAの適用

(a) ベースピーククロマトグラム(BPC), (b) 保持時間16.05分及び18.55分におけるマススペクトル。カラム: Zwitterionic HILIC column (SeQuant ZIC-HILIC, 100 mmx0.1 mm, 3.5  $\mu$ m, 20  $\text{\AA}$ ; Merck Millipore)。移動相: (A) 20 mM ギ酸アンモニウム pH 4.5 / 80% v/v アセトニトリル/水, (B) 20 mM ギ酸アンモニウム pH 4.5 / 水。サンプル: 100 fmol/mL BSAトリプシン消化物 / 移動相A (0.1  $\mu$ Lインジェクション)。マトリックス: (-) MDPNA; 2.5 mg/mL DHB / 25% (v/v) アセトニトリル (MeCN)/水 (1.0  $\mu$ L/well), (+) MDPNA; 2.5 mg/mL DHB, 1% (w/v) MDPNA / 25% (v/v) アセトニトリル (MeCN)/水 (1.0  $\mu$ L/well)

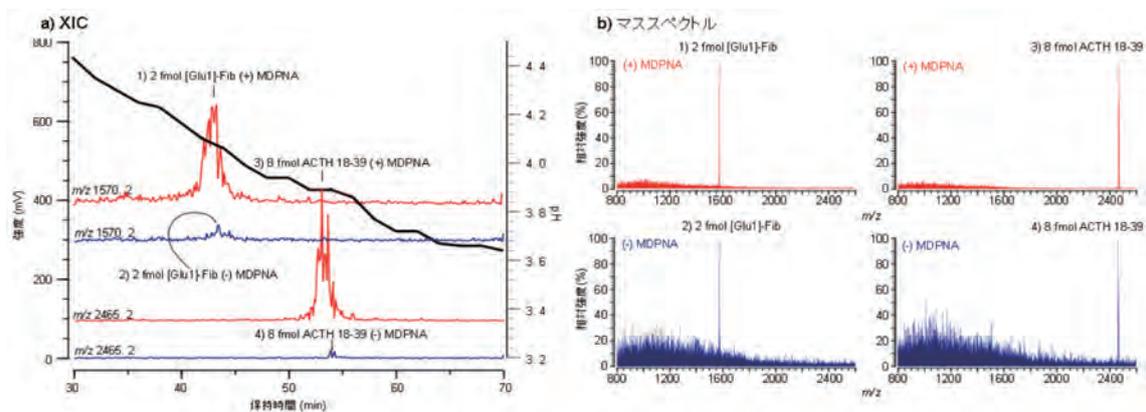


図5 クロマトフォーカシング/MALDI-MSへのMDPNAの適用

(a) 抽出イオンクロマトグラム(XIC)及びpHグラジエント, (b) 分離後のペプチドマススペクトル。カラム: 弱陰イオン交換カラム(DEAE; Inertsil AX 150 mm x 0.5 mm, 5  $\mu$ m; GL Sciences)。移動相: (A) 25 mM piperazine, 12.5 mM 1-methylpiperazine pH 5.0, (B) 25 mM piperazine, 12.5 mM 1-methylpiperazine pH 3.0。サンプル: 20 fmol/  $\mu$ L [Glu1]-fib, 80 fmol/  $\mu$ L ACTH 18-39 / 移動相A (0.1  $\mu$ Lインジェクション)。マトリックス: (-) MDPNA; 2.5 mg/mL DHB / 25% (v/v) アセトニトリル (MeCN)/水 (1.0  $\mu$ L/well), (+) MDPNA; 2.5 mg/mL DHB, 1% (w/v) MDPNA / 25% (v/v) アセトニトリル (MeCN)/水 (1.0  $\mu$ L/well)

度なMALDI-MS分析を実施できた。さらに一般的にはLC/MSでは使用できない不揮発性塩を移動相に用いたクロマトフォーカシングも、MDPNAを使用することで容易にLC/MALDI-MSに適用することができた。MDPNAはマトリックスに添加するだけで、特別な装置やスキルを必要としない点で優れている。これによってMS分析への使用は困難とされていたLCの分離モードを、容易にLC/MALDI-MSへ適用できることがわかった。

#### 【成果一覧】

##### 学会発表

- (1) メチレンジホスホン酸をマトリックス添加剤として用いた不揮発性緩衝剤を利用可能なLC-MALDI-MS、太田悠葵、岩本慎一、川畑慎一郎、谷村里都子、田中耕一、第23回クロマトグラフィー科学会議(2012年)
- (2) メチレンジホスホン酸を用いた不揮発性塩のLC-MALDI-MSへの応用、太田悠葵、岩本慎一、川畑慎一郎、谷村里都子、田中耕一、第61回質量分析総合討論会(2013年)

##### 特許出願

- (1) 液体クロマトグラフィー-MALDI質量分析法、太田悠葵、出願2012-244825

#### 【参考文献】

- [1] H. Kuyama et al., Rapid Commun. Mass Spectrom., 22, 1109-1116 (2008).

## 2-2 液体マトリックスのLC/MALDIシステムへの適用

### 【研究目的】

カラムによる分離をすることなく分析するDirect MALDI-MSにおいては、液体マトリックスを用いることによって、翻訳後修飾ペプチドを高感度に検出できることが報告されている。しかし、生体試料のように複雑なものでは液体マトリックスを用いても、夾雑する化合物や塩に起因するイオン化阻害のために、マススペクトルのS/N比が低下することがある。この問題に対して液体マトリックスと微量試料を高分離、高感度で分析することができるNano-LC/MALDI-MSを組み合わせれば、複雑試料中の翻訳後修飾ペプチドも高感度に分析できると考え、その有効性を検討した。

### 【研究成果】

使用したNano-LC/MALDI-MSシステムの概要を図6に示す。分離には逆相モノリスカラムを用い、分離溶出液はLC/MALDIサンプルスポッターでMALDI試料プレートにマトリックスと同時滴下した。そのプレートはMALDI-QIT-TOFMS装置にセットされた。複雑試料として、次の2つを用いた。

- (1)  $\beta$ -カゼインのトリプシン消化物(1リン酸のペプチドが含まれる)
- (2) 5種のタンパク質(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)のトリプシン消化混合物(5-mix)に糖タンパク質トランスフェリンのトリプシン消化混合物から単離したN型糖ペプチド(Tf-GP1)を目的物としてスパイクしたものの。

これら複雑試料中の翻訳後修飾ペプチドをNano-LCで分離し、液体マトリックスとして3-AQ/CHCAを、固体マトリックスとしてDHB(添加剤としてメチレンジホスホン酸、MDPNAを含む)を用いてMS測定を行った。比較対象として、同じ試料でNano-LCを用いず、手作業の滴下で調製したDirect MALDI-MS測定を行った。

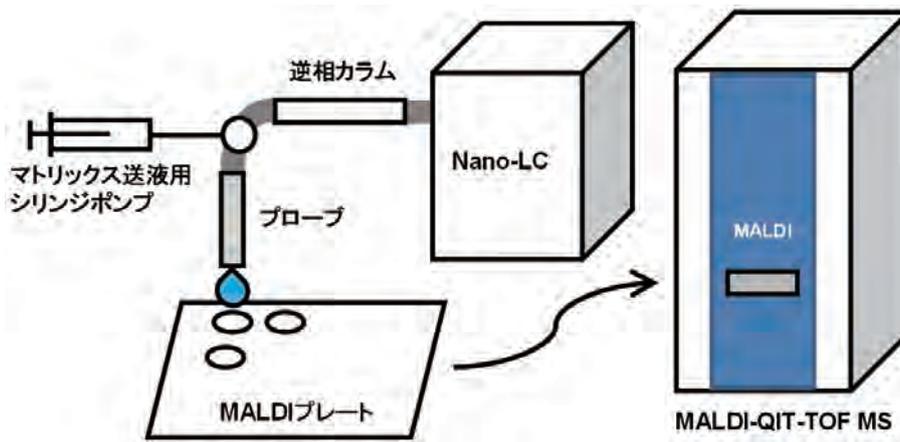


図 6 Nano-LC/MALDI-MS システム

LC システム: Nano pumps(LC-20ADnano), autosampler(SIL-20AC), AccuSpot NSM-1(島津製作所)。カラム: MonoCap FastFlow(GL サイエンス、流速 500 nL/min、注入量 1  $\mu$ L。試料プレート:  $\mu$ Focus plate 700  $\mu$ m (Hudson Surface Technology)。質量分析装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)

① リン酸ペプチドの検出

図 7 は、 $\beta$ -カゼイン由来のリン酸ペプチドを含む複雑試料を 3-AQ/CHCA または DHB(+MDPNA)をマトリックスとして使用した場合の Nano-LC/MALDI-MS、Direct MALDI-MS のマススペクトルである。どちらのマトリックスでも Nano-LC/MALDI-MS システムでは、Direct MALDI-MS と比較し、リン酸化ペプチドのイオ

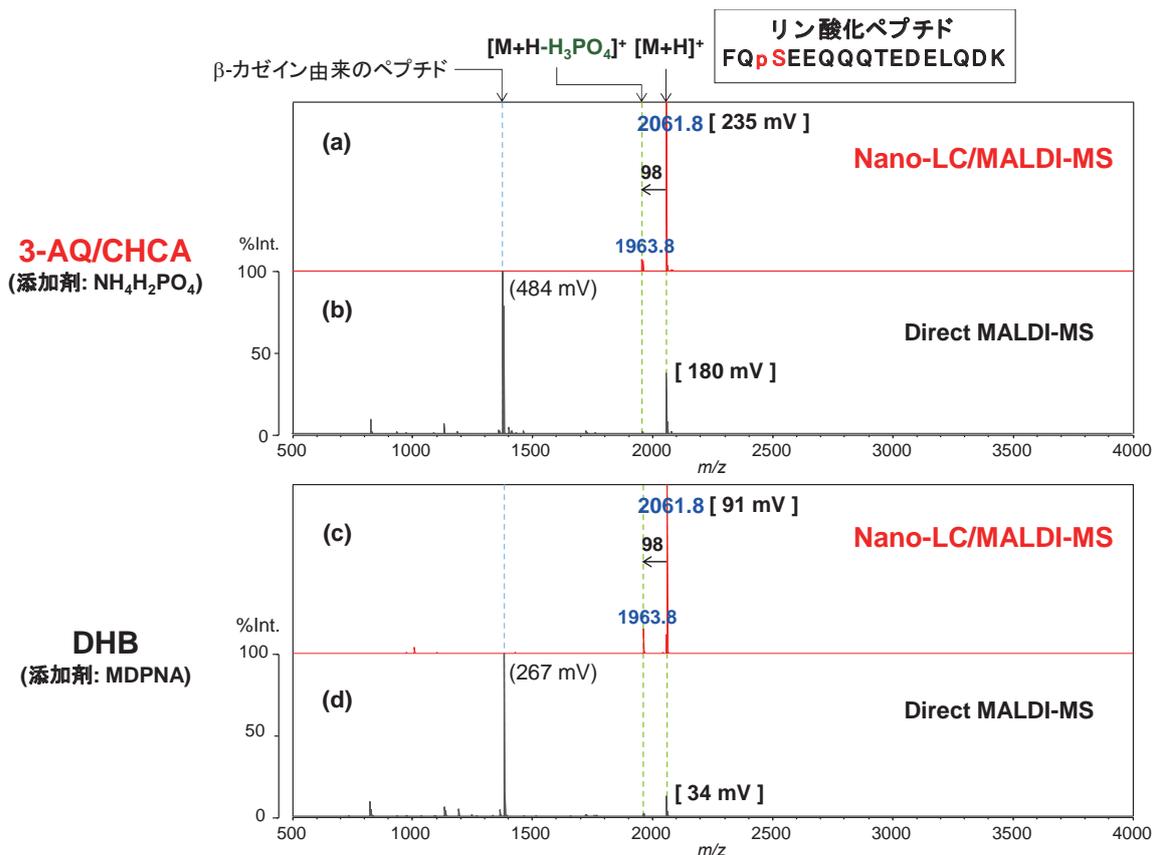


図 7  $\beta$ -カゼイン消化物に含まれるリン酸化ペプチドの MALDI-MS スペクトル

マトリックス: (a,b) 3-AQ/CHCA(添加剤:  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ); (c,d) DHB(添加剤: MDPNA)。分析方法: (a,c) Nano-LC/MALDI-MS; (b,d) Direct MALDI-MS。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。フラクションインターバル: 35 s

ンピークを高い信号強度で検出することができた。Nano-LC で分離することにより、他の  $\beta$ -カゼイン由来のペプチドからのイオン化阻害を受けないことで、高感度に検出できると考えられた。さらに3-AQ/CHCAを使用した場合には、DHB(+MDPNA)の場合と比較して、リン酸化ペプチドのピーク( $m/z$  2,061.8)をより高いS/N比で検出することができた。また、 $[M+H]^+$ 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( $m/z$  1,963.8)の信号強度の割合 ( $[M+H-H_3PO_4]^+ / [M+H]^+$ ) が小さくなっており、リン酸基の脱離がより抑制されたマススペクトルが得られた。

## ② 糖タンパクの検出

図8は、5種類のタンパク質消化混合物にスパイクした Tf-GP1 の 3-AQ/CA または DHB を使用した場合の Nano-LC/MALDI-MS 及び Direct MALDI-MS のマススペクトルである。Nano-LC/MALDI-MS システ

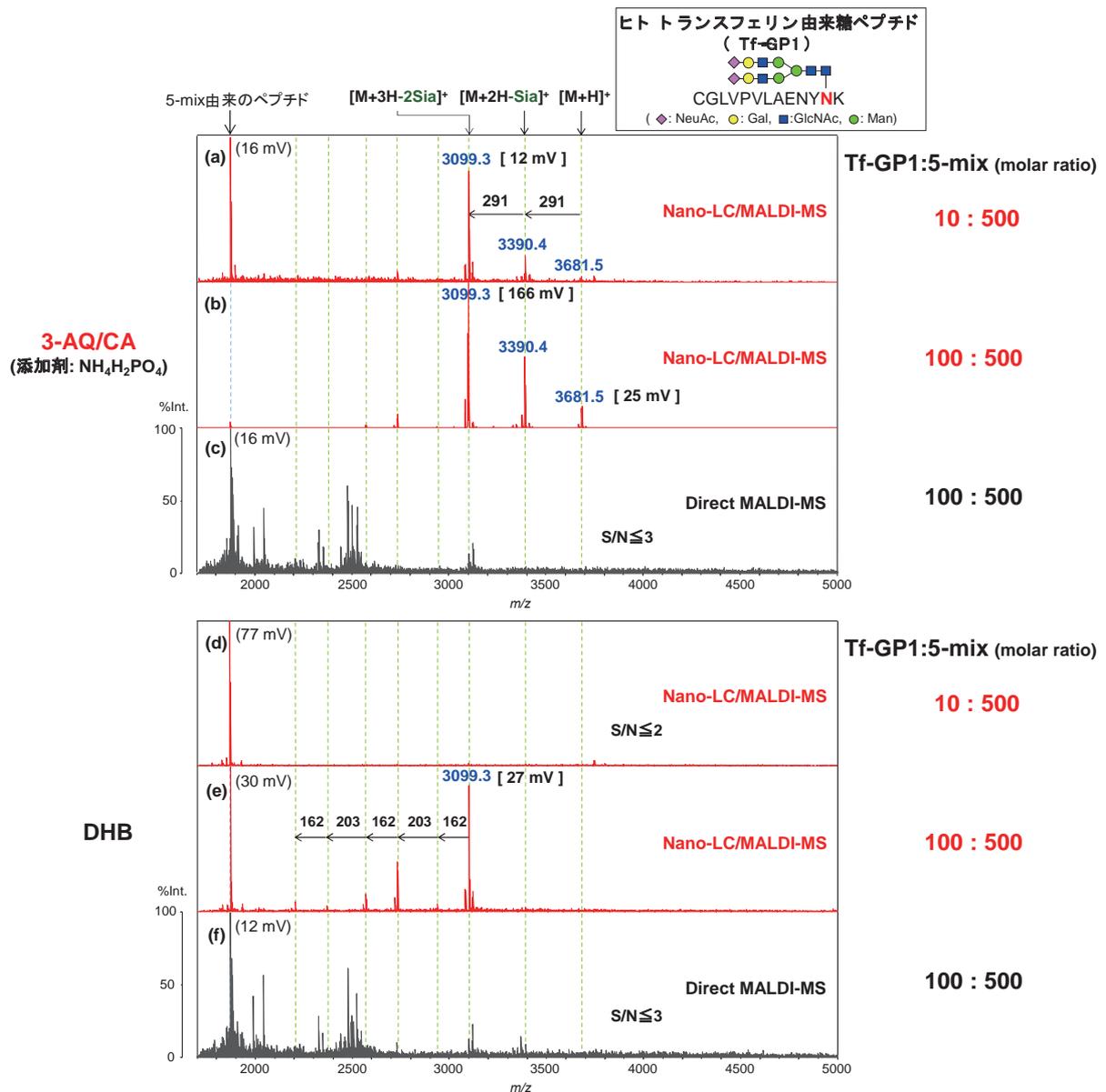


図8 5種類のタンパク質トリプシン消化混合物にスパイクした Tf-GP1 の MALDI-MS スペクトル  
 マトリックス: (a,b,c) 3-AQ/CA (添加剤:  $NH_4H_2PO_4$ ); (d,e,f) DHB。 試料: (a,d) Tf-GP1:5-mix = 10:500 (モル比);  
 (b,c,e,f) Tf-GP1:5-mix = 100:500 (モル比)。 分析方法: (a,b,d,e) Nano-LC/MALDI-MS; (c,f) Direct MALDI-MS。 移動  
 相 A: ACN / 水 / TFA = 5 / 95 / 0.05 (v/v)、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。 フラクションインターバル: 15 s

ムで 3-AQ/CA を使用した場合には、Tf-GP1:5-mix 10:500 の条件で Tf-GP1 [M+H]<sup>+</sup>イオンのピーク(*m/z* 2,681.5)を検出することができた。しかし、DHB を使用した場合や Direct MALDI-MS では検出できなかった(*S/N* ≤ 2)。これは 3-AQ/CA を用いることでシアル酸の脱離がより抑制されたためと考えられた。また、DHB でも Nano-LC/MALDI-MS システムでは、Tf-GP1:5-mix 100:500 の条件で Tf-GP1 のシアル酸脱離 [M+3H-2Sia]<sup>+</sup>イオンのピーク(*m/z* 3,099.3)が Direct MALDI-MS よりも強く検出できた。これは Nano-LC/MALDI-MS システムが高感度化に有効であることを示している。

#### 【結論】

液体マトリックスを使用した Nano-LC/MALDI-MS システムでは、固体マトリックスを使用した場合と比較して、複雑試料中の翻訳後修飾ペプチドを高感度に検出することができた。液体マトリックスと LC を組み合わせることで、生体試料中の翻訳後修飾ペプチドを高感度に分析できる可能性が示された。

#### 【学会発表】

- (1) 液体マトリックス 3-AQ/CHCA 及び 3-AQ/CA を用いた糖ペプチド高感度分析、福山裕子、船越なつ美、岩本慎一、田中耕一、第 59 回質量分析総合討論会(2011)
- (2) 液体マトリックスを用いた LC-MALDI による翻訳後修飾解析、船越なつ美、日置雄策、福山裕子、岩本慎一、田中耕一、第 61 回質量分析総合討論会(2013)

#### 【出願特許】

- (1) 糖ペプチド又は糖タンパク質の質量分析用液体マトリックス、福山裕子、田中耕一、特開 2012-251914

#### 【参考文献】

- [1] Fukuyama, Y.; Nakaya, S.; Yamazaki, Y.; Tanaka, K. *Anal. Chem.*, 80, 2171-2179 (2008)
- [2] Kuyama, H.; Sonomura, K.; Nishimura, O. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 1109-1116 (2008)
- [3] Sekiya, S.; Taniguchi, K.; Tanaka, K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26, 693-700 (2012)
- [4] Fukuyama, Y.; Takeyama, K.; Kawabata, S.; Iwamoto, S.; Tanaka, K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26, 2454-2460 (2012)

### **2-3 Advanced Nano-LC-MALDI システムの構築と翻訳後修飾分析への応用**

#### 【研究目的】

複雑な生体試料を高感度分析する上で、ナノフロー液体クロマトグラフィー(Nano-LC)は不可欠な分析手法である。一方で MALDI-MS は、イオン化適用範囲の広さや翻訳後修飾等の詳細解析に強みがある。両者を組み合わせた Nano-LC/MALDI-MS は、生命科学分野における高感度な詳細分析に強力なツールである。しかし、従来システムは、特に極低流量の Nano-LC と組み合わせた場合に、互いの利点を十分に生かすことが出来ていない。具体的には、カラム後の余分な配管容量(ポストカラム容量)の存在とサブマイクロリットル(0.3–1.0  $\mu$ L)レベルで分画することによる LC 分離能ロスの影響が大きく、無視出来ない。

本テーマでは、これらを改善した Advanced Nano-LC/MALDI-MS システムを構築した。このシステムは、次の 3 つの主要構成要素からなる。1 つ目に、ポストカラム容量を最小化し、ナノリットルレベルの微量滴下を実現するために、Nano-LC 用カラム一体型スポッティングプローブ(カラムプローブ)を製作した。2 つ目に、カラムプローブで分離された微量溶出液を MALDI プレート上で濃縮するために、微小スポット径に MALDI

マトリックス 2,5-dihydroxybenzoic acid(DHB)をあらかじめ塗布した(高濃縮 DHB プレート)を製作した。3 つ目に、極微量液滴の安定的な分注を実現するために、高精度で動作する LC/MALDI スポットティング装置 (高精度スポッター)を製作した。

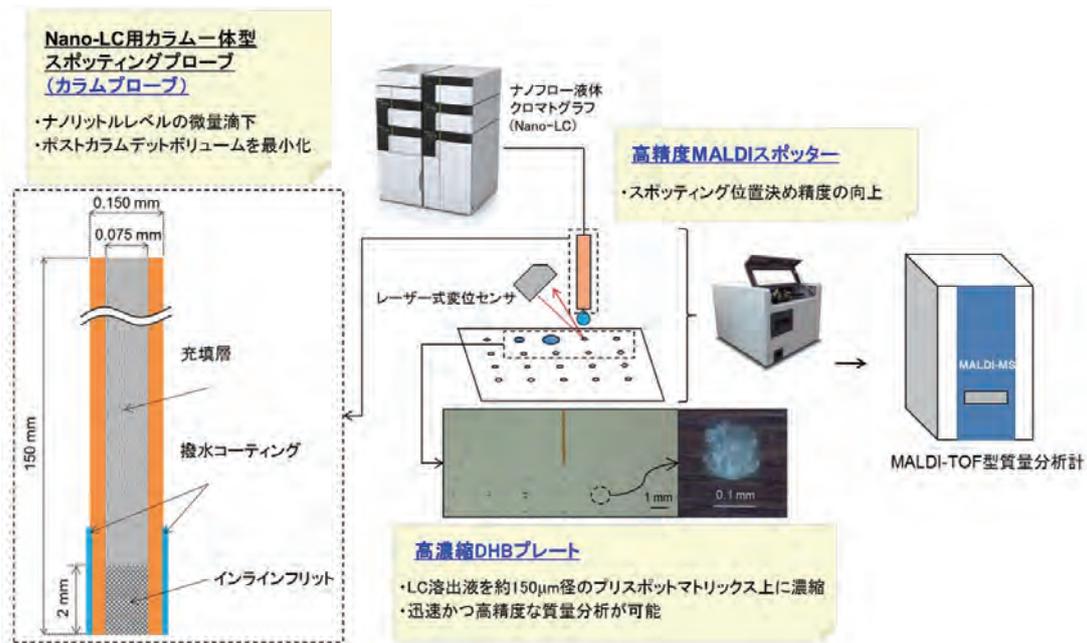
これらによって構成されるシステムの基本性能評価と、多次元 LC と組み合わせた複雑試料分析への適用を行った。

## 【研究成果】

### ① Advanced Nano-LC/MALDI-MS の構築

Advanced Nano-LC/MALDI-MS システムを構築するために、“カラムプローブ、高濃縮 DHB プレート、高精度スポッター”を製作した。図 9 に概要を示す。カラムプローブは、150  $\mu\text{m}$  径の石英キャピラリの片端にインラインフリットを形成後、滴下端面を研磨し、壁面を撥水処理した。その後、他端から逆相担体を充填した。高濃縮 DHB プレートは、ステンレス製の MALDI 試料プレート全面を疎水性コートしたのち、MALDI マトリックス(DHB)を塗布し、150  $\mu\text{m}$  径の分析エリアを作った。分析エリアの配置と数は、1536 ウェルマイクロプレートに倣った。これらカラムプローブと高濃縮 DHB プレートは、高精度スポッターに取り付けて使用した。スポットティングは、プローブと MALDI プレートを近接させ液滴を転写させることで行った。

高精度スポッターは、溶出液の滴下位置の精度とナノリットルレベルの微量滴下の確実性が求められる。



カラムプローブ: インラインフリットは、ケイ酸カリウム水溶液(Kasil 1、PQ コーポレーション)をゾルゲル法で固定化した。撥水コーティングは、CYTOP (CTX-109AE、旭硝子)を使用し、ディップコート後に熱硬化(180 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間)させた。充填層は、多孔質 ODS 3  $\mu\text{m}$  シリカ粒子、Unison UK-C18(インタクト)を高圧スラリー充填法でバックアップした。高濃縮 DHB プレート: DHB とメチレンジホスホン酸(MDPNA)をそれぞれ 0.4、0.2  $\mu\text{g}$ /スポットとなるよう、1,536 マイクロプレート形式で分注した(1 nL/スポットを 20 回重層)。

スポットティング位置の制御は、固定したプローブに対して MALDI プレートを取り付けられた X 軸と Y 軸を動作させて行うため、駆動部の高精度化と安定動作のための構造強化を行った。また確実な微量滴下のためには、MALDI プレートを Z 軸方向に上下させ、カラムプローブと精度よく近接させる必要があるため、位置検出のための高精度レーザー式変位センサを搭載した。これらの結果、プローブに対する MALDI プレートの近接ステージ動作(Z 軸)の停止総合最大誤差は、 $\pm 14 \mu\text{m}$  を達成した。また、最小滴下量は、約 10 nL であった。

## Advanced Nano-LC/MALDI-MS

試料: 100 fmol ウシ血清アルブミンのトリプシン消化物

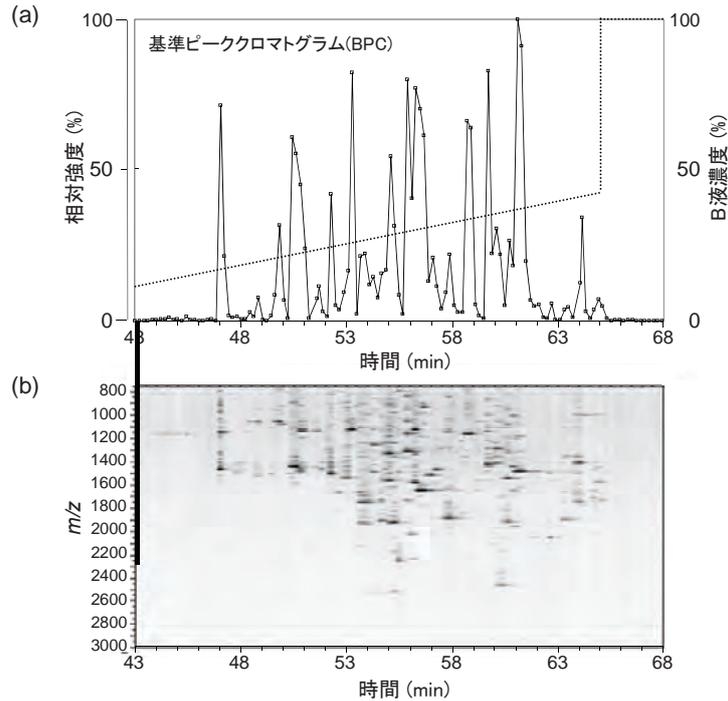


図 10 Advanced Nano-LC/MALDI-MS における LC 分離プロファイル

カラム: カラムプローブ(固定相: Unison UK-C18 粒子径 3  $\mu\text{m}$  細孔径 13 nm, インタクト), 移動相 A: 0.1% (v/v) TFA/H<sub>2</sub>O, 移動相 B: 0.1% (v/v) TFA/CH<sub>3</sub>CN, 流速: 200 nL/min, タイムプログラム: 0-35 min, B 0%; 35-65 min, B 0-40%; 65-72 min, B 100%; 72-90 min, B 0%), スポットティングインターバル: 12 秒(40 nL/スポット).

## ② Advanced Nano-LC/MALDI-MS の性能評価

本システムの性能評価のために、段階希釈した標準試料タンパク質酵素消化物を分析した。比較のために、LCによる分離を行わないMALDI-MS分析(Direct MALDI-MS)との比較を行った。図10に典型的なNano-LCクロマトグラムを示す。流速 200 nL/min で 30 分のリニアグラジエント(グラジエント容量 = 6  $\mu\text{L}$ )においても、良く分離されたピークプロファイルが得られ、ピーク形状、分解能、単一性など、多くの情報を得ることが可能となった。これらは、ポストカラムデッドボリウムがほぼゼロであり、微細分注(間隔: 12 秒、液量: 40 nL/スポット)によって、LC 分解能のロスが最小化されたことによると考えられる。

注入した試料量毎に、ペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)法でマッチしたペプチド数とシークエン

表 1 Direct MALDI-MS との比較における Advanced Nano-LC/MALDI-MS の検出下限

ウシ血清アルブミン のトリプシン消化物 (fmol)	Advanced Nano-LC/MALDI-MS		Direct MALDI-MS			
	高濃縮DHBプレート (直径150 $\mu\text{m}$ スポット)		高濃縮DHBプレート (直径150 $\mu\text{m}$ スポット)		従来型のステンレス製プレート (オンターゲットミックス、試料と2.5-DHBの 各溶液それぞれ0.5 $\mu\text{L}$ をプレート上で混合)	
	マッチ数	カバレッジ (%)	マッチ数	カバレッジ (%)	マッチ数	カバレッジ (%)
100	49	70	39	62	26	48
10	40	64	36	60	7	15
1	30	55	19	38	-	-
0.1	9	20	-	-	-	-

スカバレッジを、Direct MALDI-MS と比較して表 1 に示した。少なくとも 1 本のペプチドがマッチした最小試料量を検出限界(LOD)とした。高濃縮 DHB プレートあるいは従来型のステンレス製プレートを用いて Direct MALDI-MS を行った場合、LOD はそれぞれ 1、10 fmol であった。高濃縮 DHB プレートを使った場合、ステンレス製プレートを使用した場合と比較して、LOD が1桁向上した。カラムプローブと高濃縮 DHB プレートを採用した Advanced Nano-LC/MALDI-MS を行った場合、LOD は更に一桁下がって 100 amol に達した。Nano-LC における分離を損なわない微細スポットティング機構と特別にプリコートした MALDI プレートを組み合わせた結果、約 2 桁の感度向上が全体として達成された。

### ③ 多次元 LC と組み合わせた複雑試料中に含まれる微量成分の分析

本システムを多次元 LC と組み合わせて、複雑試料中の微量生体分子の検出をテストした(図 11)。本評価では、ペプチド混合物中に糖ペプチドをスパイクした評価用試料を調製した。これを、陽イオン交換(SCX)-親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)のオフライン多次元 LC 分画によって試料の複雑性を下げた後、Advanced Nano-LC/MALDI-MS システムを使った分析を行った。

リボヌクレアーゼ B の 5 種(SRNLTK-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5-9</sub>)の糖ペプチドグリコフォームを検出目的物質とした分析結果を図 12 に示す。リボヌクレアーゼ B の Lys-C 消化物の MALDI-MS および MS/MS スペクト

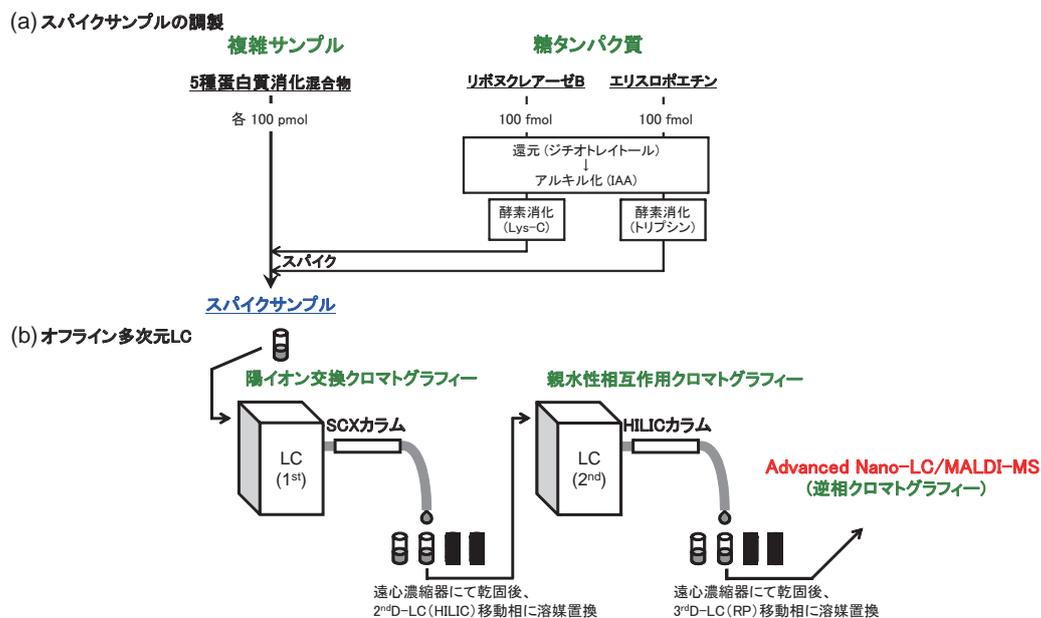


図 11 スパイクサンプルの調製とオフライン多次元 LC と組み合わせたワークフロー図

ルを参照スペクトルとして示した(図 12, (2))。LC 分離前(スパイクサンプル)、1<sup>st</sup>D-LC(SCX)分離後フラクション、2<sup>nd</sup>D-LC(HILIC)分離後フラクションの MS 解析では、リボヌクレアーゼ B 糖ペプチドに由来するイオンピーク群は検出されなかった(図 12 (3), (4), (5))。しかし、3<sup>rd</sup>D-LC(RP)分離後フラクションでは、対象糖ペプチドの[M+H]<sup>+</sup>イオンピーク群は、マススペクトル中に明瞭に観察された(図 12 (6))。更に  $m/z$  1,934.84(SRNLTK-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>)をプリカーサーイオンとした MS/MS スペクトルデータによって、そのイオンピークがスパイクしたものの由来であることが確認された(図 12 (7))。

### 【結論】

ポストカラムデットボリユームの排除とナノリットルレベルの微量滴下が可能な“カラムプローブ”を製作した。また、その液滴を MALDI プレート上で更に濃縮し、且つ自動分析に供することが出来る“高濃縮 DHB プレート”を製作した。加えて、Nano-LC 微量溶出液の高精度分注に向けて、ステージの位置決め精度を

試料:スパイクサンプル  
 検出ターゲットの糖ペプチド:SRNLTK-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5-9</sub>

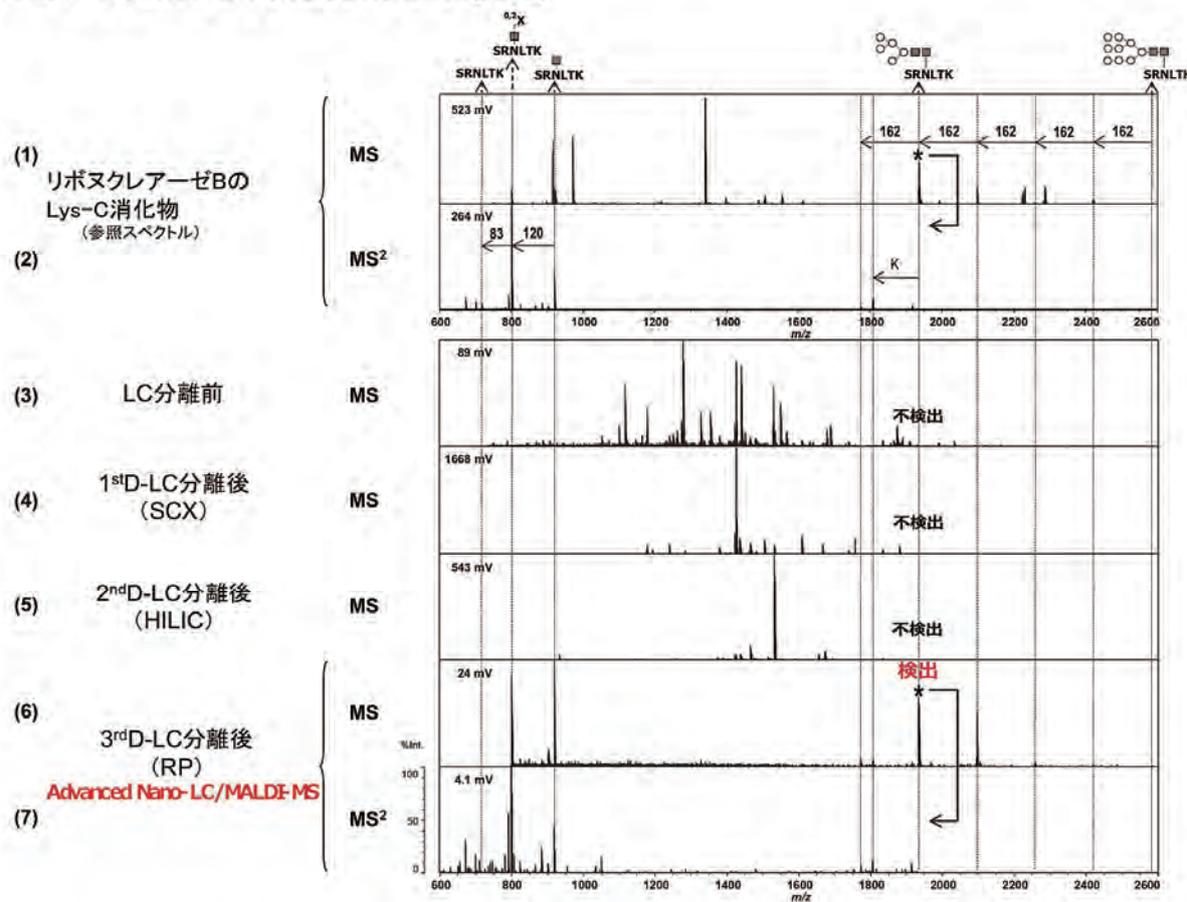


図 12 5 種タンパク質消化混合物にスパイクした糖ペプチドのオフライン多次元 LC 分離における各ステップの MALDI-MS スペクトル

MS<sup>2</sup>分析で選択したプリカーサーイオンは、\*で示されている。

高めた“高精度スポッター”を製作した。これらによって極低流速 Nano-LC への適合性を向上させた Advanced Nano-LC/MALDI-MS システムを使い、その高感度性能を評価した。更には、多次元 LC 分離と組み合わせることによって、大量の複雑成分に含まれる微量糖ペプチドの検出を評価し、本システムの有効性を示した。

### 【成果一覧】

#### 論文発表

- (1) Yusaku Hioki, Ritsuko Tanimura, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka. Nano-LC/MALDI-MS Using a Column-Integrated Spotting Probe for Analysis of Complex Biomolecule Samples. Anal. Chem. (in press)

#### 学会発表

- (1) Shinichi Iwamoto, Yusaku Hioki, Ritsuko Tanimura, Yuki Ohta, Takashi Shimada, Koichi Tanaka “Multidimensional LC-MALDI Workflow for High Sensitivity Detection of Low-Abundance Peptides from Complex Samples”, 19th International Mass Spectrometry Conference(2012)
- (2) ナノ LC-MALDI ダイレクトスポッティングを用いたペプチドの高感度分析、日置雄策、谷村里都子、岩本慎一、田中耕一、第 61 回質量分析総合討論会(2013)

- (3) 複雑系中からの糖ペプチド検出のための多次元 LC-MALDI システムの構築、日置雄策、谷村里都子、岩本慎一、田中耕一、第 61 回質量分析総合討論会(2013)
- (4) Yusaku Hioki, Ritsuko Tanimura, Koichi Tanaka, “Advanced nano-LC-MALDI Spotting System for the Detection of Low-Abundance Glycopeptides from Complex Samples”, HUPO2013

### 3 周辺技術

生体試料に適用する前処理法は対象が複雑であるが故に様々なアプローチがあり得る。ここでは界面活性剤や新規ラベル化試薬を用いた報告をするが、いずれも質量分析システムの高感度化に資する方法として期待できるものである。

#### 3-1 界面活性剤を用いた血清中ペプチド解析の高感度化

##### 【研究目的】

血清中には 10 mg/mL 以上から 1 pg/mL 以下までの様々なタンパク質・ペプチドが含まれている(2ページの図 1)。それら物質の中で、解析対象とする物質は微量であるものが多く、選択的な取得のために免疫沈降法を用いて精製・濃縮することがある。この方法を用いても尚、他のタンパク・ペプチドあるいは不純物が混在し、それらが MALDI 法での感度を低下させる。一般的には、免疫沈降法における非特異的結合を防ぐために界面活性剤の使用が知られるが、MALDI 法においては、これらが試料のイオン化を抑制する問題があった。そこで MALDI 法に影響を与えない界面活性剤の選択が必要と考え、検討した。

界面活性剤として疎水性部にアルキル鎖を持ち、親水性部にグルコースなどの糖を持つ非イオン性界面活性剤を検討対象にした。模擬的な試料としてヒト血漿に A $\beta$ 1-38 をスパイクして用いた。A $\beta$  に対する抗体である 6E10 による免疫沈降を行い、その時に検討対象の非イオン性界面活性剤を添加して MALDI 測定を試料を調製した。

##### 【研究結果】

検討対象に以下の 6 種の界面活性剤を選んだ。

- n*-octyl- $\beta$ -D-thioglucoopyranoside (OTG)
- n*-octyl- $\beta$ -D-maltoside (OM)
- n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM)
- sucrose monocaprato (SMC)
- sucrose monolaurate (SML)
- deoxy BIGCHAP (BIGCHAP)

それぞれを単独で用いた場合と無添加の場合を比較検討した。その結果、対象物質である A $\beta$ 1-38 のピーク強度が大きいこと、非特異ピークが少ないことから OTG と SMC が優れていることがわかった(表 1、図 1)。

表 1 6種の界面活性剤添加によるMALDI-MS測定の改善効果

	Detergent						
	None	OTG	OM	DDM	SMC	SML	BIGCHAP
1) MW		308.4	454.5	510.6	496.6	524.6	862.1
2) Hydrophobic		C8	C8	C12	C10	C12	Steroid
3) Hydrophilic		monosaccharide	disaccharide	disaccharide	disaccharide	disaccharide	dipolyol
4) CMC [mM]		9	23.4	0.17	2.5	0.4	1.4
5) Non-specific peaks	high	low	high	low	low	low	high
6) Signal intensity	0.6	2.7	3.4	0.5	4.3	1.4	1.8
7) Signal / Noize ratio	3	114	93	15	148	43	45

6種の界面活性剤について、疎水性部と親水性部の分子および臨界ミセル濃度値(CMC)を示した。それらを単独で添加した場合と添加しない場合のピーク強度とS/N比を示す。

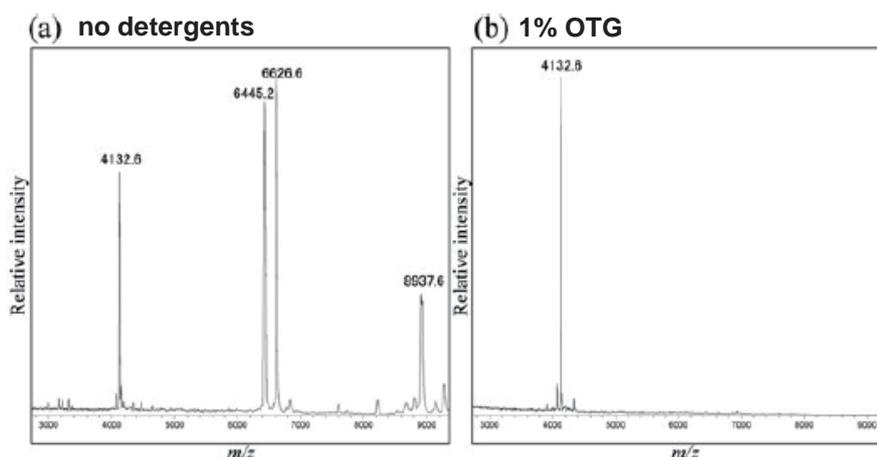


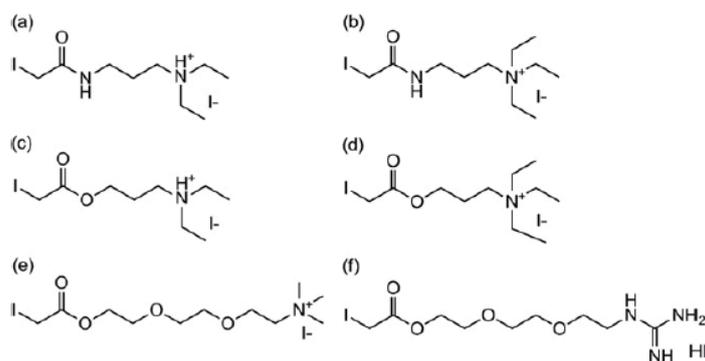
図1 界面活性剤の有無によるマスペクトルの比較

(a)界面活性剤を用いない場合、血清中にスパイクしたAβ 1-38( $m/z$  4,132.8)以外にも夾雑物に由来するイオン( $m/z$  6,445.2, 6,626.6, 8,937.6)が見られた。(b)1%のOTGを用いた場合、Aβ 1-38のイオンだけが観測された。

### 3-2. 新規ラベル化試薬を用いたシステイン含有ペプチドの高感度分析

#### 【研究目的】

タンパク質を質量分析法で測定・解析する場合の前処理として、還元・アルキル化の後に酵素消化によりペプチド断片にするのが一般的である。還元アルキル化はタンパクに含まれるシステイン残基の S-S 結合を切断するため、ジチオスレイトールなどの還元剤を用いることが多い。また、アルキル化は切断した結合が再結合するのを防ぐため、ヨードアセトアミド(IAA)などのアルキル化剤を用いることが多い。この還元・アルキル化によりシステイン残基にアルキル基が導入され、タンパクは”ゆるんだ状態”となり、酵素消化の効率が良くなる。IAA の場合はカルバミドメチル基が導入されるが、これに代わる官能基が導入される6種の新規ラベル化剤を開発した(図 2)。それらの官能基が導入されることにより、システイン含有ペプチドの検出感度がどのように変わるのかを比較検討した。



- (a) DE-IAA, 1-(N,N-diethylamino)-3-iodoacetamidopropane hydroiodide.
- (b) TE-IAA, 3-iodoacetamidopropyltriethylammonium iodide.
- (c) DE-IA, 1-(N,N-diethylamino)-3-iodoacetoxyp propane hydroiodide.
- (d) TE-IA, 3-iodoacetoxyp propane triethylammonium iodide.
- (e) TM-DEG-IA, 8-iodoacetoxyp-3,6-dioxaoctyltrimethylammonium iodide.
- (f) Gu-DEG-IA, 8-guanidino-1-iodoacetoxyp-3,6-dioxaoctane hydroiodide.

図2 新規ラベル化試薬の構造と名称

## 【研究成果】

表 2 は、新規ラベル化試薬 6 種(図 2)を用いた場合のペプチド 4 種の感度向上率を示す。一般的なカルバミドメチル化と比較すると、2~200 倍の感度向上が達成された。これらは微量ペプチドの分析に応用でき、MALDI-MS による分析の感度を向上させる。

## 【結論】

微小粒子(ビーズ)を担体として用いる免疫沈降の場合、通常は抗体に結合している目的物を解離させるが、本開発では、抗体も目的物もビーズに結合した状態のものをそのまま試料とした。このときの洗浄に特定の界面活性剤を用いることでマススペクトルの S/N 比を改善できることがわかった。

タンパクを質量分析法で測定する場合に、システイン残基の結合を還元反応で切断し、再結合を防ぐためにアルキル基導入などのラベル化を行う。このラベル化反応で新規試薬を用いて、システイン含有ペプチドに対する感度が向上することが実証できた。

表2 新規ラベル化法によるシステイン含有ペプチドの感度向上率

Peptides	Tag IL-	Tag IL-					
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
Insulin alpha	Enhanced ratio	44.2	58.0	18.5	121.1	222.5	167.7
Insulin beta	Enhanced ratio	6.4	28.2	4.4	58.1	58.3	30.8
NC4	Enhanced ratio	1.2	3.0	1.3	25.8	33.5	12.4
S26C	Enhanced ratio	1.4	24.2	1.4	16.6	16.5	11.1

本表の a ~ f は、図2の a ~ f の新規ラベル化試薬を用いた場合のそれぞれのペプチドに対する感度向上率を示す。

## 【成果一覧】

### 論文発表

- (1) Direct antigen detection from immunoprecipitated beads using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; a new method for immunobeads-mass spectrometry (iMS). Shimada T, Toyama A, Aoki C, Aoki Y, Tanaka K, Sato TA. Rapid Commun Mass Spectrom. 2011 Dec 15;25(23):3521-6.
- (2) Development of iodoacetic acid-based cysteine mass tags: detection enhancement for cysteine-containing peptide by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Shimada T, Kuyama H, Sato TA, Tanaka K. Anal Biochem. 2012 Feb 15;421(2):785-7.

### 学会発表

- (1) ペプチド質量分析の感度向上を目的とした新規 MS プローブの開発、嶋田崇史、佐藤孝明、田中耕一、第 59 回質量分析総合討論会(2011)

## §2-1-2 超高感度イオン化技術の開発

本プロジェクトが目指す次世代質量分析システムにおいては、微量の生体成分を解析し、さらには標的化合物の分子構造情報を得る手法が求められる。島津製作所のイオン化グループではイオン化技術からのアプローチとして、MALDI法を中心とした新規分析技術開発に取り組んだ。

MALDIイオン化においては、標的成分のイオン化を促進するために添加する「マトリックス」や、検体に対する前処理(化学的修飾や酵素消化処理)などが分析の成否を左右する。ここでは、高感度な測定を実現する新規開発のマトリックス素材や前処理手法、さらにはMS/MS測定などによって生体高分子の分子構造解析を行う際に有用な新規解析技術について述べる。

### 【概要】

#### 1 MALDI法とマトリックス

MALDI法の特徴とマトリックスの役割について概説する。マトリックス素材としては、従来から汎用されている固体マトリックスだけでなく、近年応用がひろがりつつある液体マトリックスについても述べる。

#### 2 マトリックスの改良による検出感度の向上

新規開発の液体マトリックスによって、糖・糖ペプチド・リン酸化ペプチドなどの高感度分析を可能にした事例を述べる。また、既存のマトリックスではイオン化が困難であった疎水性の高いペプチド化合物やS-ニトロシル化ペプチド化合物に適用できる、新規に開発したマトリックスあるいはマトリックス用添加剤について述べる。

#### 3 イオン化技術の改良による構造解析技術の高度化

MS測定やMS/MS測定による分子構造解析を行うためのさまざまな技術を開発した。

- ・糖鎖構造を解析するための液体マトリックスの用法
- ・糖鎖構造を解析際に負イオン検出を活用する手法
- ・タンパク構造解析のための化学的処理あるいは酵素処理
- ・ペプチド鎖のC末端あるいはN末端のみを選択的に解析するための処理

## 1 MALDI法とマトリックス

微量の生体成分分析および疾患マーカー探索には高感度で迅速な分析技術が求められる。マトリックス支援レーザー脱離イオン化(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)質量分析(Mass Spectrometry, MS)は、分析対象試料をマトリックスと呼ばれる物質と混合しイオン化することで試料を分析する手法である。MALDI法で高感度な分析を行うためには高効率なイオン化技術が必要となる。本プロジェクトでは、微量な生体成分あるいはイオン化困難な物質を高い効率でイオン化するマトリックスを開発し、それをを用いて高感度で迅速な生体成分分析を行うとともに、より詳細な構造解析を行った。

イオン化技術の開発としては下記3テーマの研究を進めた。

- ① マトリックスの開発: 微量な標的物質あるいは従来法で検出困難な物質を高感度に検出するマトリックスを開発した。
- ② 翻訳後修飾解析/構造解析技術の開発: 効果的なマトリックスを用い、また修飾法と組合せ、これまで困難だった翻訳後修飾を含む詳細な構造解析を可能にする技術を開発した。
- ③ 疾患マーカー解析: 新たに開発したマトリックスおよび解析技術を用い疾患マーカーのより詳細な解析を行った。

## 1-1 MALDI法の特徴とマトリックスの役割

図1にMALDI法の原理を示す。MALDI法は、分析対象試料をマトリックスと混合し、これにレーザーを照射することで試料をイオン化する手法である。一般に生体高分子は直接レーザーを照射すると分解するが、レーザー光を吸収しやすいマトリックスと混合することでマトリックスを介し間接的にイオン化されるため、試料自身の受けるエネルギーが緩和され分解しにくくなる。特にタンパク質や糖鎖などの熱的に不安定な生体高分子に欠かせない分析手法である。MALDIのイオン化効率率は $10^{-4}$ ~ $10^{-3}$ とも言われているが[1]、マトリックスを改良することで上がる可能性がある。試料を分解せず且つ効率良くイオン化するマトリックスの開発がMALDI法の感度向上の重要な鍵となる。

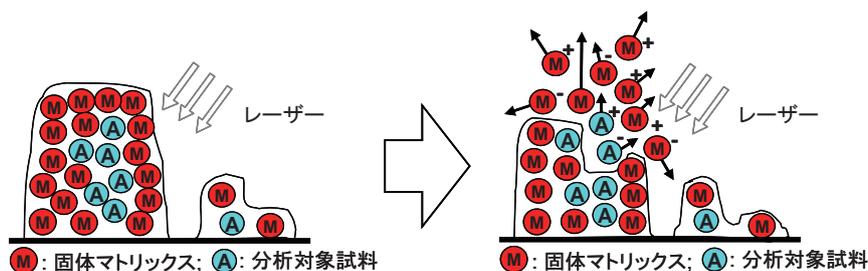


図1 MALDI法の原理

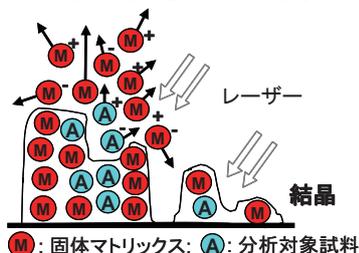
試料(A)と大過剰のマトリックス(M)を混合しサンプルプレート上に置き(左図)、この試料/マトリックス混合物に紫外レーザーを照射すると(左図)、レーザー光を吸収し励起したマトリックスが脱離(気化)すると同時に試料がイオン化される(右図)。

## 1-2 固体マトリックスと液体マトリックス

マトリックスには、固体マトリックスと、近年注目されている液体マトリックスがある(図2)。固体マトリックスは分析対象試料と混合するとサンプルプレート上に結晶を形成する。この混合結晶はプレート上で不均一に分布しレーザー照射位置によりイオン生成が偏り再現性が低い。一方、液体マトリックスは分析対象試料と混合するとサンプルプレート上に液滴を形成する。この混合液滴内では対象試料とマトリックスが均一に分布し再現性の高い分析が期待される。

### 【固体マトリックス】

- ・ レーザ光を吸収し励起される有機化合物(固体物質)
- ・ サンプルプレート上で試料と混合結晶を形成する
- ・ 局所的にイオンが検出されやすい(再現性が低い)



### 【液体マトリックス】

- ・ レーザ光を吸収し励起される液体物質
- ・ サンプルプレート上で試料と混合液滴を形成する
- ・ 均一にイオンが検出されやすい(再現性が高い)

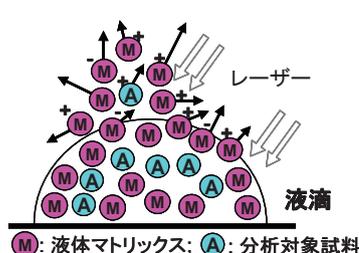


図2 固体マトリックスと液体マトリックスの特性

マトリックスとしては、分析対象試料と均質に混合され、レーザー光を吸収し励起され試料のイオン化を促進する特性が必要である。図3によく使用される固体マトリックスCHCA、DHBおよびSAの構造を示す。いずれも生体分子と親和性が高い親水性のヒドロキシル基をもち、紫外レーザー光を吸収するベンゼン環をもつ。

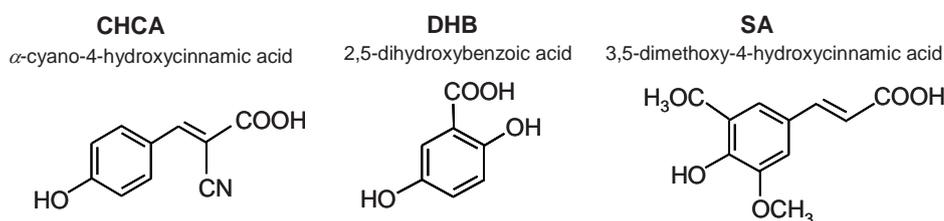


図3 固体マトリックスCHCA、DHB及びSAの構造

一方、液体マトリックスは、上記特性を維持する液体であることが特徴であり、塩基性アミンと酸性マトリックスからなる基本構造をもつ(図4)。

[ 塩基性アミン ]<sup>+</sup> [ 酸性マトリックス ]<sup>-</sup>

Base \ Acid	マトリックス		
	SA	CHCA	DHB
TBA (テトラブチルアミン)	Liquid	Liquid	Liquid
MI (1-メチルイミダゾール)	Liquid	Liquid	Liquid
Py (ピリジン)	Solid	Solid	Liquid

図4 液体マトリックスの構造

参考文献[2]より改編

本章では、糖タンパク質(糖鎖、糖ペプチド)、リン酸化タンパク質、疎水性ペプチドの高感度分析を目的とし、液体マトリックスの改良(3-AQ/CHCA、CHCAB)、新規液体マトリックスの開発(3-AQ/CA)、新規マトリックス添加剤の開発(ADHB)および新規固体マトリックスの開発(ATHAP)について述べる。

#### 【参考文献】

- [1] Richard Knochenmuss, Leonid V. Zhigilei, "What determines MALDI ion yields? A molecular dynamics study of ion loss mechanisms", Anal. Bioanal. Chem., 2012, 402, pp2511-2519
- [2] Andreas Tholey, Elmar Heinzle, "Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives", Anal. Bioanal. Chem., 2006, 386, pp24-37

## 2 マトリックスの改良による検出感度の向上

### 2-1 液体マトリックス3-AQ/CHCAを用いた糖鎖の高感度分析

#### 【研究目的】

図1は液体マトリックス3-aminoquinoline (3-AQ)/CHCAを示す。3-AQ/CHCAは1996年Kolliらにより報告され、固体マトリックス3-AQを固体マトリックスCHCA溶液に溶解して作成する[1]。当初、糖鎖など生体分子のイオンを長時間検出し続けることができるマトリックスとして報告されたが、感度向上効果は確認されていなかった。一方、糖鎖は、PA化、AB化などラベル化することで感度向上できることが知られている。本研究では、3-AQ/CHCAを用いてマトリックス添加とラベル化反応を同時に行うことで、糖鎖の迅速で高感度な分析手法の開発を試みた。

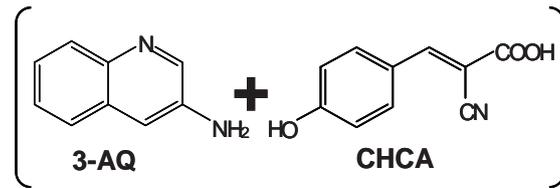


図1 液体マトリックス3-AQ/CHCA(3-AQとCHCAの混合物)

#### 【研究成果】

##### 方法

##### ①糖鎖の3-AQラベル化手法の開発

図2は3-AQ/CHCAを用いた糖鎖のon-targetラベル化法を示す。サンプルプレート上で糖鎖試料と3-AQ/CHCAを混合し熱処理を施すことで、マトリックス添加および3-AQラベル化反応(図3)が同時に行われる。これをMALDI-MS測定すると、糖鎖は3-AQラベル化体として検出される。このon-targetラベル化手法は、これまでのラベル化法に比べ、迅速で、混合物中から糖鎖のみを選択的に検出できる、新しい糖鎖分析法である。

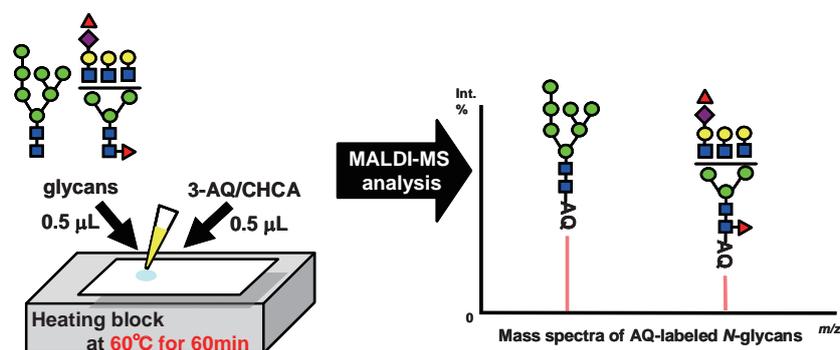


図2 3-AQ/CHCAを用いた糖鎖のon-targetラベル化法

サンプルプレート上に滴下した糖鎖(glycans)溶液0.5 μLに、3-AQ/CHCA溶液0.5 μLを加え、ヒートブロック上で60°Cで60分加熱することで、マトリックス添加及び糖鎖の3-AQラベル化が同時に行われる。これをMALDI-MS測定すると、糖鎖は3-AQラベル化糖鎖として検出できる。

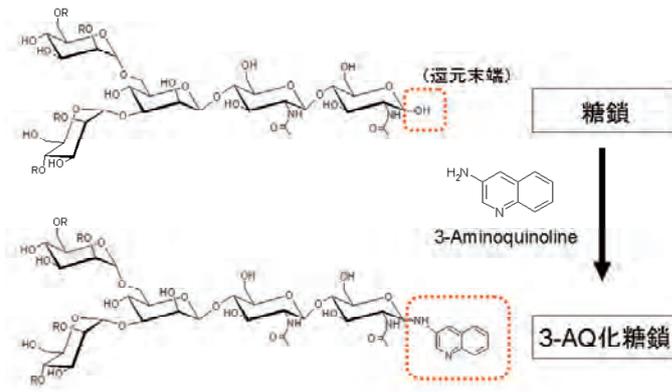


図3 糖鎖還元末端への3-AQラベル化機構

図4は、3-AQ/CHCAを用いた on-target ラベル化法および DHB を糖鎖 (NA2、表1参照) 分析に用いた例を示す。DHB を用いて得られる糖鎖イオンに比べ、3-AQ/CHCA を用いて得られる 3-AQ ラベル化糖鎖イオンの方がピークの S/N 比が高く、3-AQ/CHCA を用いた on-target ラベル化が感度向上に有効であることがわかる。

表1 感度評価に用いた糖鎖

structure	name	M.W.
	NA2	1,641
	NA4	2,372
	A1	1,933
	A2	2,224

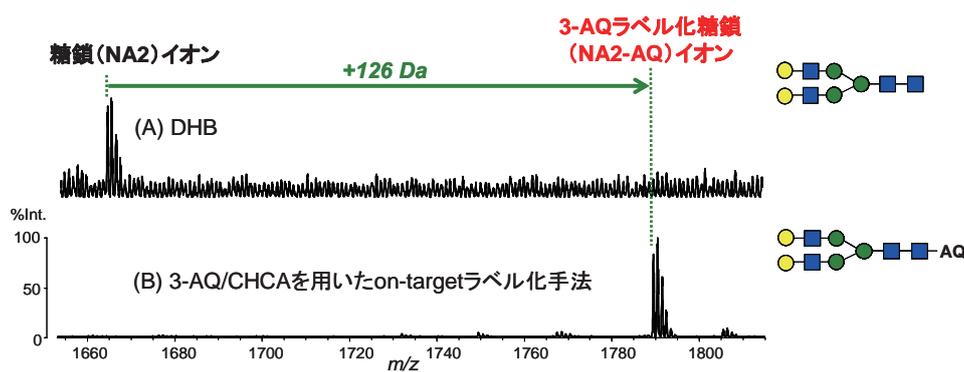


図4 3-AQ/CHCAを用いた糖鎖 (NA2) のマスペクトル

糖鎖 (NA2) 100 fmol に対し、(A) DHB、及び (B) 3-AQ/CHCA を用いた on-target ラベル化法を用いて得られた正イオンモードにおけるマスペクトル。3-AQ/CHCA を用いた場合 (B)、DHB を用いた場合 (A) に対し、糖鎖は 126 Da 高質量側の  $m/z$  に検出される。このとき、糖鎖 (NA2) イオンの S/N 比に比べ、3-AQ 化糖鎖 (NA2-AQ) イオンの S/N 比が向上している。[装置: MALDI-QIT-TOFMS (島津製作所)]

## 結果

### ①3-AQラベル化法を用いた糖鎖の高感度分析

3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化法の感度向上効果を評価するため、糖鎖（表1）の検出限界を測定した。その結果を表2に示す。DHBを用いた従来法に対し、3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化法を使用することで、感度が最大10,000倍向上することを確認した。

表2 3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化法及びDHBを用いた場合の糖鎖4種の検出限界

	positive ion mode		negative ion mode	
	DHB	3-AQ/CHCA	DHB	3-AQ/CHCA
NA2	10 fmol	100 amol	ND	50 amol
NA4	5 fmol	50 amol	ND	50 amol
A1	100 fmol	500 amol	100 fmol	10 amol
A2	100 fmol	500 amol	100 fmol	50 amol

糖鎖A1に対する負イオンモード分析(MALDI-QIT-TOFMS)において、DHBを用いた場合の検出限界100 fmolに対し、3-AQ/CHCAを用いた場合の検出限界は10 amolであり、10,000倍の感度向上が示された。(NDは1 pmolでイオンが検出されなかったことを示す)。

### ②3-AQラベル化法を用いた糖鎖の定量性評価

3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化法により得られる糖鎖のイオンピーク強度が定量的であるかどうかを調べた。その結果を図5に示す。この手法では4桁の濃度範囲にわたりイオンピーク強度と濃度に良い相関があることを確認した。

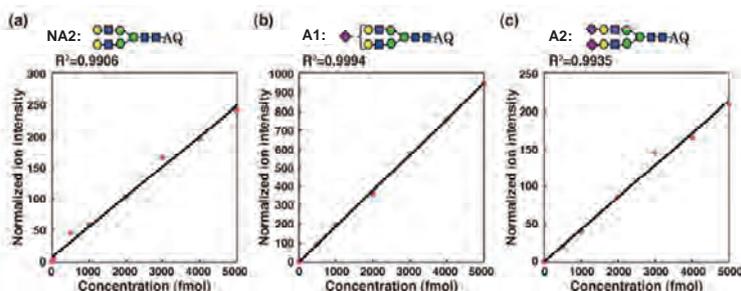


図5 3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化手法により検出した糖鎖の定量性評価

3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化法により検出した3種の糖鎖(NA2-AQ、A1-AQ及びA2-AQ)のイオンピーク強度を、5 fmolのPA化糖鎖(A1-PA)のイオンピーク強度で正規化した値をプロットした。横軸は試料濃度を示す。糖鎖3種とも0.5~5,000 fmol/wellの範囲で優れた直線性( $R^2 > 0.9$ )が確認される。

### ③3-AQラベル化法を用いた乳がんマーカー糖タンパクHER2の糖鎖高感度分析

上記3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化法による糖鎖高感度分析法を用いて、乳がんのマーカー物質である糖タンパクHER2の糖鎖分析を試みた。

糖タンパクの糖鎖構造には多くのバリエーションがあり、その多様性は生体内の分子認識に関与する。糖タンパクHER2は血清中の存在量が少なく(約10  $\mu\text{g/mL}$ )高感度な分析手法が必要である。HER2の糖鎖構造の詳細はこれまで報告されていない。今回我々はHER2糖鎖分析に3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化法を適用し詳細な構造解析を行った。

図6は、2種のHER2高発現細胞株から抽出したHER2糖鎖を測定した結果を示す。多くの糖鎖イオンが検出され、細胞株2種で異なるプロファイルを確認した。これは、世界で初めてHER2の糖鎖プロファイルを明らかにした結果である

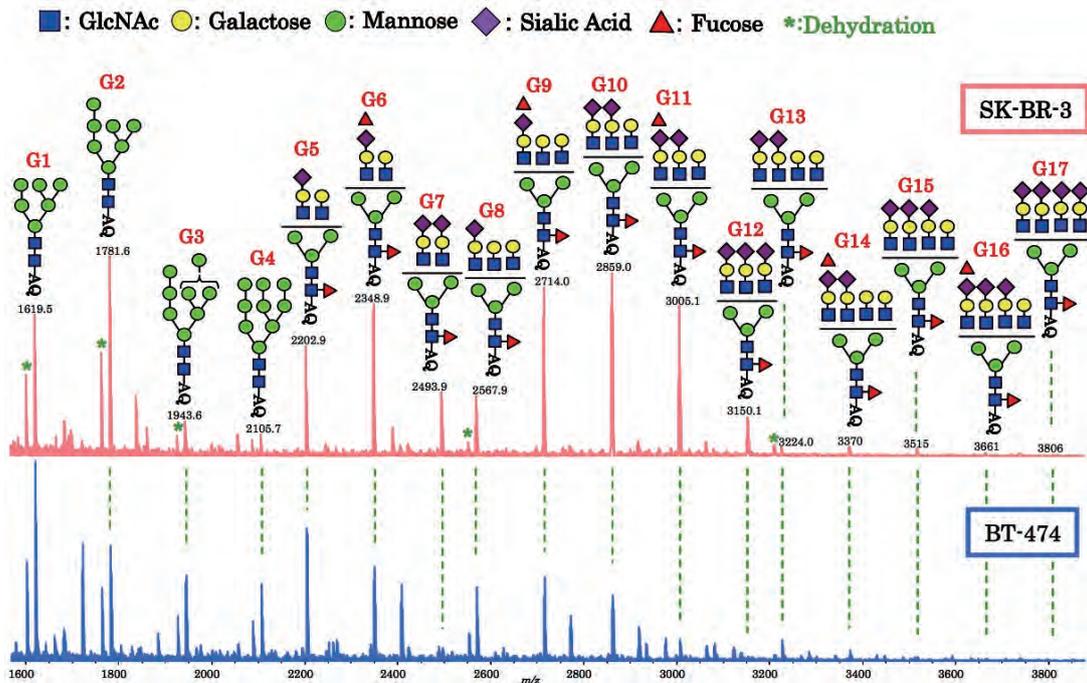


図6 3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化法による2種の細胞株(SK-BR-3及びBT-474)由来のHER2糖鎖のマススペクトル

17種の3-AQラベル化糖鎖(G1~G17)が負イオンモードで検出された。2種のHER2高発現細胞株SK-BR-3及びBT-474由来のHER2糖鎖は異なるプロファイルを示す。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

図7は、3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化手法により検出したHER2 糖鎖(G1~G16)のイオンピーク強度の再現性評価の結果を示す。HER2糖鎖のイオンピーク強度が実験間および試料ロット間において再現性高く検出されており、この手法の高い信頼性を示している。

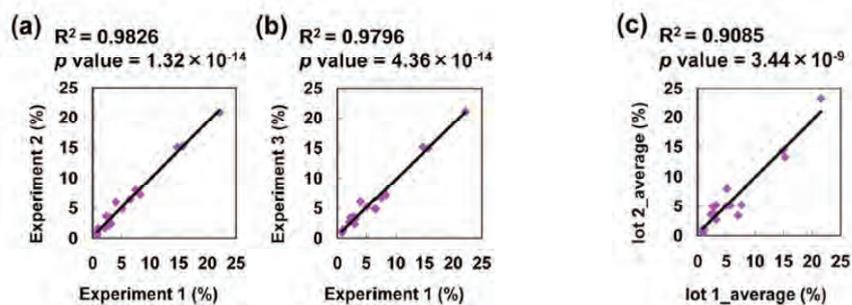


図7 3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化法により検出したHER2糖鎖のイオンピーク強度の再現性評価

この手法により検出したHER2高発現細胞株(SK-BR-3)由来のHER2糖鎖(G1~G16)のイオンピーク強度の(a,b)実験間(Experimental 1, 2及び3)及び(c)試料ロット間(lot 1及びlot 2)の再現性データを示す。(a)及び(b)では、G1~G16の全イオンピーク強度に対する個々のイオンピーク強度の割合(%)をプロットした。いずれも優れた直線性( $R^2 > 0.9$ )と信頼性( $p \text{ value} < 0.05$ )を示し、実験間の高い再現性が確認される。(c)では、同日調製した試料(各試料 $n = 4$ )の平均値として、G1~G16の全イオンピーク強度に対する個々のイオンピーク強度の割合(%)をプロットした。優れた直線性と信頼性( $R^2 > 0.9$ ,  $p \text{ value} < 0.05$ )を示し、試料ロット間の高い再現性が確認される。

図8は、3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化法により検出したHER2 糖鎖(G1~G16)のイオンピーク強度の直線性を示す。酸性糖鎖(図8e~p)では試した濃度範囲中で良好な直線性が得られた。一方、中性糖鎖(図8a~d)では1/32~1/2希釈範囲のみで直線性が得られた。

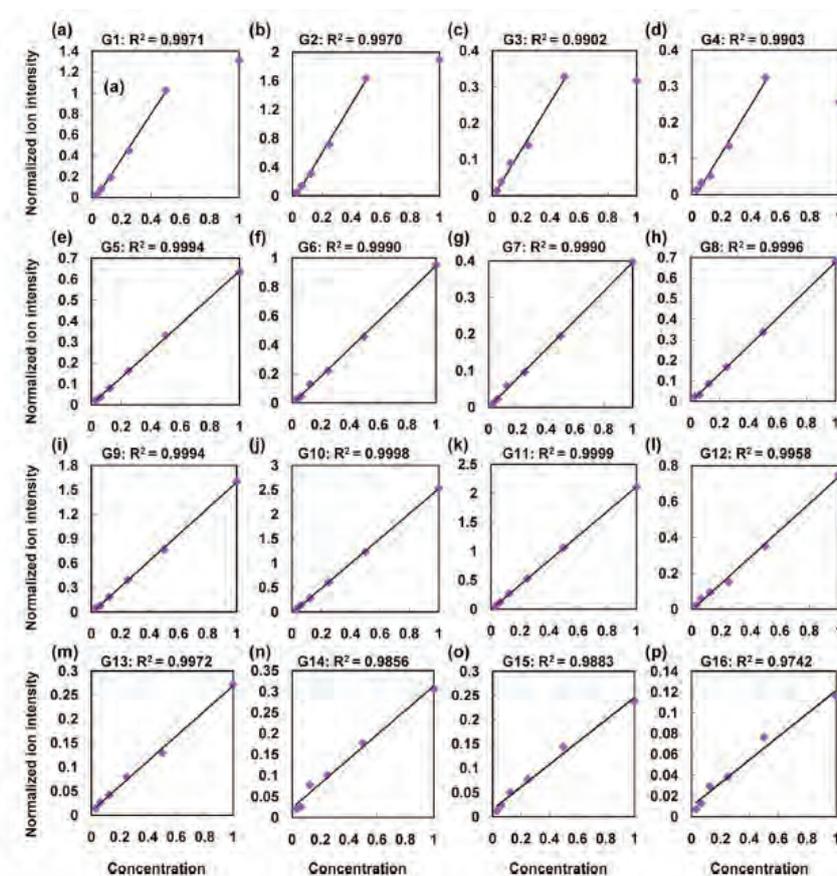


図8 3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化手法により検出したHER2糖鎖の定量性評価

この手法により検出したHER2高発現細胞株(SK-BR-3)由来のHER2糖鎖(G1~G16)のイオンピーク強度を、PA化糖鎖(A1-PA, 5 fmol)のイオンピーク強度で正規化した値をプロットした。横軸は試料の段階希釈濃度、すなわちSK-BR-3より抽出した試料から1/32倍(0.03)、1/16倍(0.06)、1/8倍(0.1)、1/4倍(0.25)、1/2倍(0.5)及び1倍(1)希釈した濃度範囲を示す。糖鎖G1~G16において1/32~1/2希釈の濃度範囲で優れた直線性と信頼性( $R^2 > 0.9$ ,  $p$  value  $< 0.05$ )が確認される。

## 【結論】

以上より、3-AQ/CHCAを用いたon-targetラベル化手法が、感度、再現性および定量性に優れ、微量糖タンパクおよび疾患マーカー候補タンパクの糖鎖分析に有効であることを確認した。特に今回は、同手法を用いて、HER2の糖鎖プロファイルを世界で初めて明らかにした。

## 【成果一覧】

### 論文発表

- (1) Kaoru Kaneshiro, Yuko Fukuyama, Shinichi Iwamoto, Sadanori Sekiya, Koichi Tanaka, "Highly sensitive MALDI analyses of glycans by a new aminoquinoline-labeling method using 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid liquid matrix", *Anal. Chem.*, 2011, 83, pp3633-3667

- (2) Kaoru Kaneshiro, Makoto Watanabe, Kazuya Terasawa, Niromasa Uchimura, Yuko Fukuyama, Shinichi Iwamoto, Taka-Aki Sato, Kazuharu Shimizu, Gozoh Tsujimoto, Koichi Tanaka, "Rapid quantitative profiling of *N*-glycan by the glycan-labeling method using 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid", *Anal. Chem.*, 2012, 84, pp7146-7151

#### 学会発表

- (1) 金城薫, 福山裕子, 田中耕一, 第35回日本医用マスペクトル学会, 2010年  
(2) 金城薫, 渡辺真, 寺澤和哉, 内村浩正, 清水一治, 辻本豪三, 田中耕一, 第59回質量分析総合討論会, 2011年  
(3) 金城薫, 渡辺真, 福山裕子, 寺澤和哉, 内村浩正, 清水一治, 辻本豪三, 佐藤孝明, 田中耕一, 第34回日本分子生物学会, 2011年

#### 【参考文献】

- [1] V.S. Kumar Kolli, Ron Orlando, "A new matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization on magnetic sector instruments with point detectors", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1996, 10, pp923-926  
[2] 金城薫, 福山裕子, 関谷貞規, 岩本慎一, 第58回質量分析総合討論会, 2010年  
[3] Kaneshiro, K.; Fukuyama, Y.; Sekiya, S.; Iwamoto, S.; Taniguchi, K.; Montgomery, H.; Tanaka, K., 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2010

## 2-2 液体マトリックス3-AQ/CHCAを用いた糖ペプチドの高感度分析

### 【研究目的】

前項のHER2糖鎖分析では、糖鎖の構造情報は得られるが、糖鎖の結合部位および多様性に関する情報(どのアミノ酸部位に、どの糖鎖が、どれだけ結合しているか)は得られない。そのため糖ペプチド分析が必要となる。

先に述べたように、液体マトリックスでは均一なイオン生成と、それによる再現性の高い分析が可能である。しかし、3-AQ/CHCAを用いると、糖鎖、糖ペプチドを液滴中央付近に濃縮し、ペプチドをその周辺に存在させることができるため、液滴中央付近にレーザーを照射すると糖ペプチドを高感度に検出できる。この特性を用いて糖ペプチドの高感度分析を試みた。これはCHCAやDHBではみられない特性である。

### 【研究成果】

#### 結果

#### ①3-AQ/CHCAを用いたHER2由来の糖ペプチド分析

図1は3-AQ/CHCAを用いたHER2トリプシン消化物(シアル酸除去後)のマスペクトルを示す。液滴中央付近のみで5種の糖ペプチドイオンを検出した。5種のうち4種は、CHCAおよびDHBを用いた場合は検出されなかった(データ省略)。他のマトリックスに比べ3-AQ/CHCAで糖ペプチドが高感度に検出されるのは、液滴中央部への糖ペプチド濃縮効果によると考えられる。

上記5種の糖ペプチドイオンをMS/MS分析し糖鎖構造を解析した結果を表1に示す。今回N187に3種の糖鎖が結合していることを初めて確かめた。

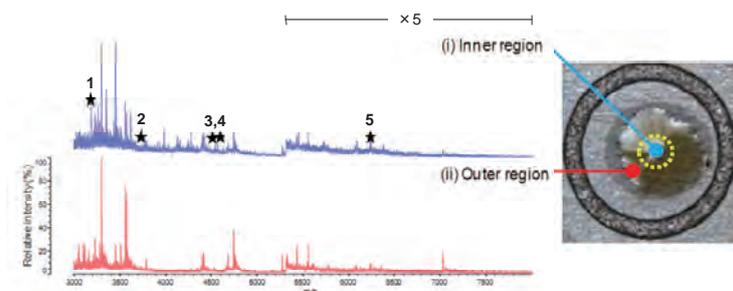


図1 3-AQ/CHCAを用いたHER2トリプシン消化物のマスペクトル

3-AQ/CHCAを用いた細胞株(SK-BR-3)由来のHER2トリプシン消化物の正イオンモードにおけるマスペクトル。星印は糖ペプチドイオンピークを示し、番号は表1のピーク番号を示す。高質量側は5倍に拡大して示す。糖ペプチドは3-AQ/CHCAの液滴中央付近(inner region)のみで検出された。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

表1 3-AQ/CHCAを用いて分析されたHER2糖ペプチド

糖ペプチド	配列番号	糖鎖結合部位	糖鎖構造	ピーク番号
<b>NNQLALTLIDTNR</b>	176-188	<b>N187</b>		1.
				2.
				3.
<b>HSDCLACLACLHFHNSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGR</b>	248-288	<b>N259</b>		5.
<b>GHCWGPPTQCVNCSQFLR</b>	518-536	<b>N530</b>		4.

HER2トリプシン消化物由来の糖ペプチド(シアル酸除去後)。糖鎖構造はMS/MSにより確認した。ピーク番号は、図1の星印の糖ペプチドイオンピークの番号を示す。N259及びN530に糖鎖が結合すること、及び結合している糖鎖構造はすでに報告されており、今回は既報通りの糖鎖結合情報が確認でき、またN187に糖鎖3種が結合する可能性が初めて示唆された。

### 【結論】

以上より、3-AQ/CHCAの液滴内分離法を用いることにより糖ペプチドの高感度分析が可能である。また、これまで得られなかった糖ペプチドの構造に関する新たな知見が得られる可能性があることから、これは極めて有効な手法である。

### 【成果一覧】

#### 論文発表

- (1) Makoto Watanabe, Kazuya Terasawa, Kaoru Kaneshiro, Hiromasa Uchimura, Rie Yamamoto, Yuko Fukuyama, Kazuharu Shimizu, Taka-Aki Sato, Koichi Tanaka, "Improvement of mass spectrometry analysis of glycoproteins by MALDI-MS using 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid", Anal. Bio. Chem., 2013, 405, pp4289-4293

#### 学会発表

- (1) 渡辺真, 寺澤和哉, 金城薫, 福山裕子, 内村浩正, 清水一治, 辻本豪三, 佐藤孝明, 田中耕一, 第

## 【参考文献】

- [1] V.S. Kumar Kolli, Ron Orlando, "A new matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization on magnetic sector instruments with point detectors", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1996, 10, pp923-926
- [2] Sadanori Sekiya, Kenichi Taniguchi, Koichi Tanaka, "On-target separation of analyte with 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid liquid matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2012, 26, pp693-700

**2-3 液体マトリックス3-AQ/CHCAを用いたリン酸化ペプチドの高感度分析**

## 【研究目的】

2-2で述べた3-AQ/CHCAを用いた糖鎖および糖ペプチドの液滴内分離法では、ペプチドに比べ親水性の高い糖鎖および糖ペプチドが液滴中央に濃縮していた。そこで同様に親水性であるリン酸化ペプチドを液滴中央で高感度に検出することを試みた。

## 【研究成果】

## 方法と結果

## ①3-AQ/CHCAを用いたリン酸化ペプチドの高感度分析

サンプルプレート、溶媒、添加剤などを最適化した3-AQ/CHCAを用いて、リン酸化ペプチドの感度(検出限界)をDHBと比較し評価した。表1にその結果を示す。3-AQ/CHCAは、同条件下のDHBに対し1~10倍、最もよく用いられる条件下のDHBに対し10~10,000倍感度向上することが示された。

表1 3-AQ/CHCA及びDHBを用いたリン酸化ペプチドの検出限界

試料種	リン酸化ペプチド		[M+H] <sup>+</sup> m/z	検出限界 (fmol/well) [M+H] <sup>+</sup>			
	単離 /消化物	リン酸化部位		3-AQ/CHCA		DHB	
				① 濃縮プレート (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	② ステンレスプレート no additive	③ 濃縮プレート (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	
$\beta$ -casein 33-48	isolated	1 (S35)	2061.8	0.1	1	1	
$\beta$ -casein 1-25	isolated	4 (S15, S17, S18, S19)	3122.3	0.1	1000	1	
ovalbumin 341-360	digests	1 (S345)	2088.9	0.1	10	1	
ovalbumin 60-85	digests	1 (S69)	2901.3	0.1	10	1	
IRK-3	isolated	1 (Y9)	1702.8	1	1	1	
IRK-1	isolated	3 (Y5, Y9, Y10)	1862.8	1	10	1	

表右側の①及び③ではプレートに濃縮機能プレート、添加剤に(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を用い、②ではプレートにステンレス製標準品を用い添加剤を用いていない(現在最もよく用いられる条件)。3-AQ/CHCAを用いた場合、全てのリン酸化ペプチドが高感度に検出された。 $\beta$ -casein 1-25では、3-AQ/CHCAを用いると(①)、同条件下でDHBを用いた場合(③)に比べ10倍の感度向上、最もよく用いられる条件(②)と比べ10,000倍の感度向上が得られた。

図1は、3-AQ/CHCAを用いたオブアルブミン消化物のマススペクトルとリン酸化ペプチドのMSイメージを示す。3-AQ/CHCAによる感度向上は、そのマトリックス効果に加え、親水性のリン酸化ペプチドが3-AQ/CHCA液滴中央に濃縮されていることによると考える。

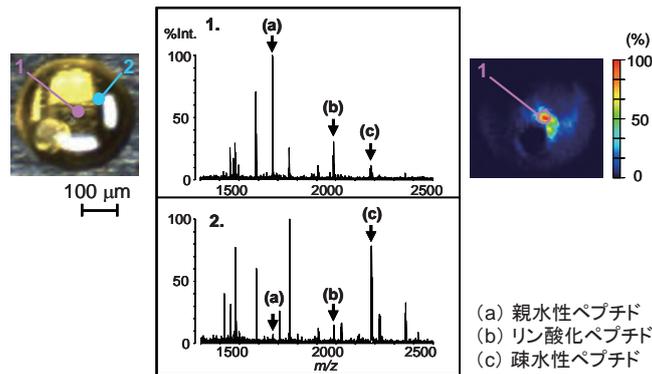


図1 3-AQ/CHCAを用いたオブアルブミン消化物のマスペクトルとリン酸化ペプチドのMSイメージ

左側に3-AQ/CHCA/試料混合液滴の写真、中央に写真中の1(液滴中央)及び2(液滴内周縁)で取得した正イオンモードのマスペクトルを示す。(c)疎水性ペプチドは周縁部に多く分布し、(a)親水性ペプチド及び(b)リン酸化ペプチドは液滴中央部に多く分布することを示唆する。右側に1のマスペクトル中のリン酸化ペプチドイオン(b)のMSイメージ(イオンピークの相対強度分布)を示す。この図からもリン酸化ペプチドが中央部に多く存在することがわかる。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

## ②3-AQ/CHCAを用いたHER2リン酸化ペプチド分析

上記3-AQ/CHCAを用いたリン酸化ペプチド高感度分析法を用いて、乳がんのマーカ物質HER2のリン酸化ペプチド分析を試みた。3-AQ/CHCAを用いて細胞株(SK-BR-3)由来のHER2消化物(リン酸化ペプチドとペプチドの混合物)を精製せずにそのまま測定し、MSおよびMS<sup>n</sup>測定により、リン酸化ペプチドのリン酸基の数を分析した。

図2は、HER2消化物のうち1つのリン酸化ペプチド(表2、配列番号1112-1153)をMALDI-QIT-TOFMS(正イオンモード)で測定したマスペクトルを示す。リン酸化に特徴的な80 Da間隔のピーク4本を検出し、それらをMS/MS解析することでこのペプチドがリン酸基を3つ持つことが推定された。上記の結果に加え、UniProtKB/Swiss-Protに登録されているHER2リン酸化ペプチドについて、リン酸基の数を分析した結果を表5に示す。これら5種のリン酸化ペプチドは全て、UniProtKB/Swiss-Protではリン酸基が1つのみが登録されているが、われわれの測定結果ではそれより多くのリン酸基をもつ可能性が示された。

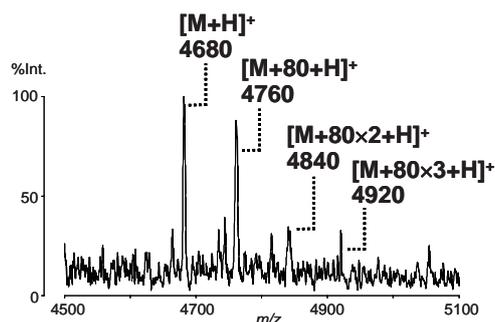


図2 3-AQ/CHCAを用いたHER2消化物のリン酸化ペプチドのマスペクトル

[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

## 【結論】

以上、3-AQ/CHCAを用いリン酸化ペプチドを高感度に分析でき、そのときリン酸化ペプチドが液滴中央に濃縮されていることが示された。この方法を用いHER2リン酸化ペプチドを分析すると、報告されているリン酸化部位付近に、これまで報告されている以上のリン酸基が存在する可能性が示された。

表2 HER2リン酸化ペプチドのリン酸基数のUniProtKB/Swiss-Protと分析結果の比較

リン酸化部位: UniProtKB/Swiss-Prot				リン酸化ペプチドイオン: 分析結果				
トリプシン消化物ペプチド断片		リン酸化		m/z				リン酸化
配列番号	配列	部位	数	M+H	+80×1	+80×2	+80×3	数
725-736	VLG <b>S</b> GAFG <b>T</b> VYK	735	1	1199	1279	1359		2
1054-1072	SGGGDLTLGLEP <b>S</b> EEEEAPR	1054	1	1912	1994			1
1112-1153	Y <b>S</b> EDPTVPLP <b>S</b> ETDGYVAPL <b>T</b> C <b>S</b> PQ PEYV <b>N</b> QPDV <b>R</b> PQPP <b>S</b> PR	1139	1	4680	4760	4840	4920	3
1183-1230	DVFAFGGAVENPEYL <b>T</b> PQGGAA <b>P</b> Q <b>P</b> HPPPAF <b>S</b> PAFDNL <b>Y</b> WDQ <b>D</b> PP <b>E</b> R	1196	1	5272	5352	5434		2
1231-1255	GAPP <b>S</b> TFKG <b>T</b> TAENPEYLGLD <b>V</b> P <b>V</b>	1248	1	2557	2637	2717		2

左側にUniProtKB/Swiss-Protに登録されているHER2のリン酸化の部位と数を示す。リン酸化が報告されているアミノ酸を緑色で、その他のリン酸化される可能性のあるアミノ酸(S/T/Y)を赤色で示す。右側にMS分析で検出したリン酸化ペプチドイオンのm/z値を示す。リン酸基を1つもつごとに80 Da高質量側のm/zにイオンが検出される。配列番号1112-1153におけるリン酸化ペプチドイオンはMS/MS分析でも確認した。

## 【成果一覧】

### 論文発表

- (1) Yuko Fukuyama, Kohei Takeyama, Shin-ichirou Kawabata, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka, "An optimized matrix-assisted laser desorption/ionization sample preparation using a liquid matrix, 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, for phosphopeptides", Rapid Commun. Mass Spectrom. 2012, 26, pp2454-2460

### 学会発表

- (1) 福山裕子, 竹山康平, 岩本慎一, 田中耕一, 第59回日本質量分析総合討論会, 2011年
- (2) 福山裕子, 金城薫, 渡辺真, 寺澤和哉, 内村浩正, 清水一治, 辻本豪三, 佐藤孝明, 田中耕一, 第34回日本分子生物学会, 2011年

## 【参考文献】

- [1] V.S. Kumar Kolli, Ron Orlando, "A new matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization on magnetic sector instruments with point detectors", Rapid Commun. Mass Spectrom., 1996, 10, pp923-926
- [2] Sadanori Sekiya, Kenichi Taniguchi, Koichi Tanaka, "On-target separation of analyte with 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid liquid matrix for matrix-assisted laser desorption /ionization mass spectrometry", Rapid Commun. Mass Spectrom., 2012, 26, pp693-700
- [3] 渡辺真, 寺澤和哉, 金城薫, 福山裕子, 内村浩正, 清水一治, 辻本豪三, 佐藤孝明, 田中耕一, 第34回日本分子生物学会, 2011年
- [4] Makoto Watanabe, Kazuya Terasawa, Kaoru Kaneshiro, Hiromasa Uchimura, Rie Yamamoto, Yuko Fukuyama, Kazuharu Shimizu, Taka-Aki Sato, Koichi Tanaka, "Improvement of mass spectrometry analysis of glycoproteins by MALDI-MS using 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid", Anal. Bio. Chem., 2013, 405, pp4289-4293

## 2-4 新規液体マトリックス3-AQ/CAを用いた糖ペプチド・糖鎖・リン酸化ペプチド高感度分析

### 【研究目的】

前項まで3-AQ/CHCAを用いることで糖鎖およびリン酸化ペプチドの感度を向上し、液滴内分離により親水性の糖鎖、糖ペプチドおよびリン酸化ペプチドを液滴中央付近に優先的に検出できることを確かめた。一方、3-AQ/CHCAはシアル酸、中性糖、リン酸基など不安定部位の脱離を生じやすい問題がある。

今回、この問題を解決し、さらなる感度向上をめざし、新規液体マトリックス3-AQ/CAを開発した。

### 【研究成果】

#### 方法

図1は3-AQ/CAおよび既存マトリックスG<sub>2</sub>CHCA、G<sub>3</sub>CAおよび3-AQ/CHCAを示す。3-AQ/CAは、G<sub>3</sub>CAがG<sub>2</sub>CHCAより糖鎖の不安定部位の脱離を抑制することに基づき、3-AQ/CHCAのCHCAの代わりに

-クマル酸(CA)を用いることで、3-AQ/CHCAより脱離を抑制することを期待して作成した。

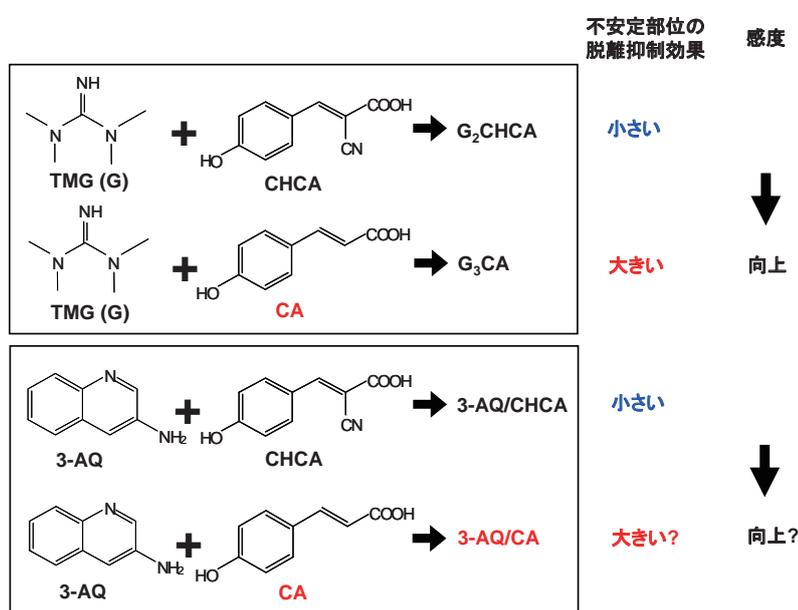


図1 既存マトリックスG<sub>2</sub>CHCA、G<sub>3</sub>CA、3-AQ/CHCA、及び新規マトリックス3-AQ/CA

CHCAで構成されるG<sub>2</sub>CHCAは、CAで構成されるG<sub>3</sub>CAより糖鎖の不安定部位の脱離を生じやすい。今回、不安定部位が脱離しやすい3-AQ/CHCAに対し、このCHCAの代わりにCAで構成される新規マトリックス3-AQ/CAを作成し、脱離を抑制できることを期待した。

### 結果

#### ①3-AQ/CAを用いたシアル酸脱離の抑制

糖ペプチドのシアル酸脱離抑制評価に使用した試料5種を表1に示す。

図2は、fetuin GP1に対し、3-AQ/CAと、3-AQ/CHCAあるいはDHBを用いた場合で、シアル酸の脱離を比較した結果を示す。3-AQ/CAを用いた場合、3-AQ/CHCAあるいはDHBを用いた場合より、シアル酸の脱離が抑制された。この抑制効果は表1に挙げた糖ペプチドのすべてで確認された。

糖ペプチドの場合と同様に、2種のシアロ糖鎖(表2のA1およびA2 glycan)でも、3-AQ/CAを用いた場合、3-AQ/CHCAあるいはDHBを用いた場合より、シアル酸の脱離が抑制された(データ省略)。

表1 評価に使用した糖ペプチド

name	[M+H] <sup>+</sup> (m/z, Ave.)	structure
transferrin GP1	3683.7	
transferrin GP2	4723.8	
fetuin GP1	4605.6	
fetuin GP2	3949.0	
fetuin GP3	6537.7	

■, N-acetylglucosamine: GlcNAc; ●, galactose; ●, mannose; ◆, N-acetyl-neuraminic acid: NANA

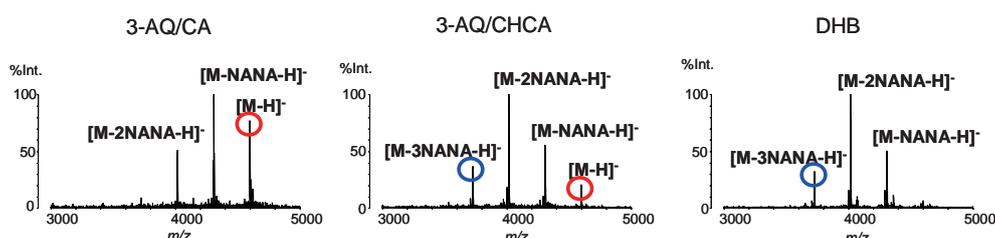


図2 3-AQ/CA、3-AQ/CHCA及びDHBを用いた糖ペプチド (fetuin GP1) のマスペクトル

シアル酸 (NANA) を3つ含む糖ペプチドfetuin GP1 (100 fmol) の負イオンモードにおけるマスペクトル。[M-H]<sup>-</sup>を赤丸で、シアル酸が全て脱離した[M-3NANA-H]<sup>-</sup>を青丸で示す。3-AQ/CAを用いた場合、最も赤丸を検出しやすく、青丸を検出しにくかった。[装置: MALDI-QIT-TOFMS (島津製作所)]

表2 評価に使用した糖鎖

name	[M+H] <sup>+</sup> (m/z, Ave.)	structure
A1 glycan	2010.7	
A2 glycan	2301.8	
NA2 glycan	1719.6	
NA4 glycan	2449.8	

■, N-acetylglucosamine: GlcNAc; ●, galactose; ●, mannose; ◆, N-acetyl-neuraminic acid: NANA; PA, aminopyridine.

## ②3-AQ/CAを用いた中性糖の脱離および環開裂の抑制

糖鎖のシアル酸および中性糖の脱離抑制評価に使用した試料4種を表2に示す。

図3は、NA4 glycanに対し、3-AQ/CAと、3-AQ/CHCAあるいはDHBを用いた場合で中性糖の脱離を比較した結果を示す。3-AQ/CAを用いた場合、3-AQ/CHCAあるいはDHBを用いた場合より、中性糖の脱離が抑制された。この抑制効果は表2に挙げた糖鎖のすべてにおいて確認された。

また、還元末端を持つ糖鎖 (ノンラベル化糖鎖) は、3-AQ/CAを用いてon-targetラベル化反応を行うことにより、3-AQ/CHCAを用いた場合と同様に、3-AQラベル化糖鎖として検出される。中性糖鎖の負イオンは、グリコシド結合の開裂 (構成単糖の脱離) よりも環開裂を生じやすい。図4は、中性糖鎖 (NA2) に対し3-AQ/CAあるいは3-AQ/CHCAを用いて得られた3-AQラベル化糖鎖の環開裂を比較した結果を示す。3-AQ/CAを用いた場合、3-AQ/CHCAを用いた場合より、環開裂を抑制した。

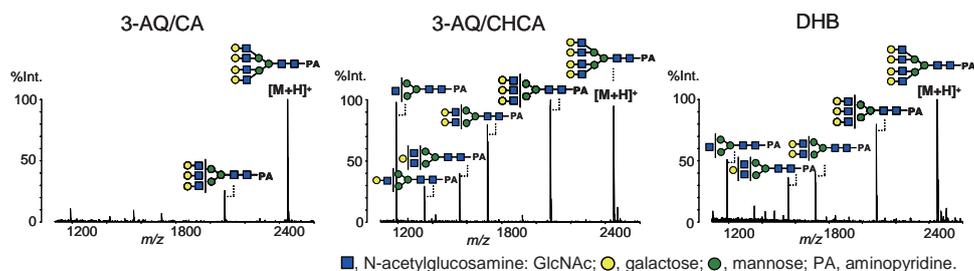


図3 3-AQ/CA、3-AQ/CHCA及びDHBを用いたPA化中性糖鎖（NA4 glycan）のマススペクトル

PA化中性糖鎖NA4 glycanの正イオンモードにおけるマススペクトル。[M+H]<sup>+</sup>より低質量側で生じるイオンは中性糖の脱離により生じたフラグメントイオンピークを示す。3-AQ/CAを用いた場合、フラグメントイオンは最も少ない。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

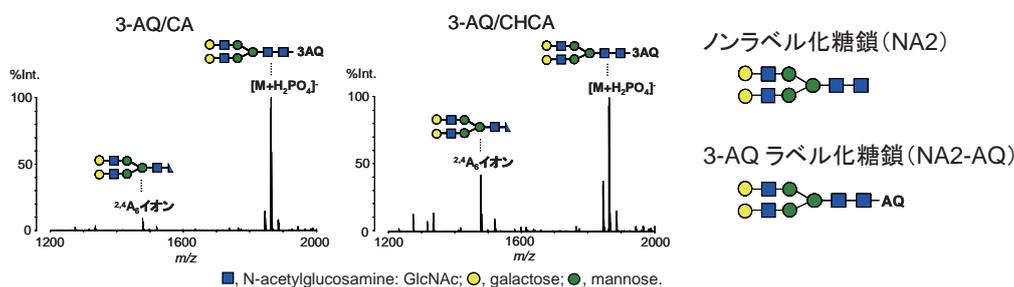


図4 3-AQ/CAあるいは3-AQ/CHCAを用いた3-AQラベル化糖鎖（NA2-AQ）のマススペクトル

ノンラベル化糖鎖（NA2）に対し、3-AQ/CAあるいは3-AQ/CHCAを用いon-targetラベル化反応を行うことで得られた3-AQラベル化糖鎖（NA2-AQ）の負イオンモードにおけるマススペクトル。[M+H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>より低質量側で生じるイオンは環開裂で生じたフラグメント（<sup>2,4</sup>A<sub>6</sub>イオン）を示す。3-AQ/CAを用いた場合、3-AQ/CHCAを用いた場合に比べ、[M+H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>に対する<sup>2,4</sup>A<sub>6</sub>イオンの強度は低くなる。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

### ③3-AQ/CAを用いたリン酸基脱離の抑制

リン酸化ペプチドのリン酸基の脱離抑制評価に使用した試料2種を表3に示す。

表3 評価に使用したリン酸化ペプチド

name	[M+H] <sup>+</sup> (m/z, Ave.)	structure
β-casein 33-48	2061.8	FQ-pS-EEQQTEDELQDK
β-casein 1-25	3122.3	RELEELNVPGEIVE-pS-L-pS-pS-pS-EESITR

図5はβ-casein 1-25に対し、3-AQ/CAと、3-AQ/CHCAあるいはDHBを用いた場合でリン酸基の脱離を比較した結果を示す。リン酸化ペプチドに対し3-AQ/CAあるいはDHBを用いた場合、3-AQ/CHCAを用いた場合に比べ、リン酸基の脱離を抑制した。

以上に述べたように、3-AQ/CAは、3-AQ/CHCAに比べ、糖ペプチド、糖鎖、リン酸化ペプチドの不安定部位の脱離を抑制する効果が確認された。これにより、インタクト分子イオンを高感度に検出できると期待される。そこで、3-AQ/CAの糖ペプチド、糖鎖、リン酸化ペプチドの感度に対する効果を評価した。

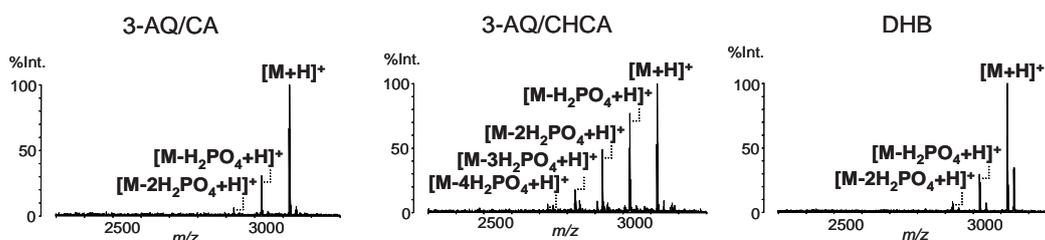


図5 3-AQ/CA、3-AQ/CHCA及びDHBを用いたリン酸化ペプチド ( $\beta$ -casein 1-25) のマススペクトル

リン酸基を4つ含むリン酸化ペプチド $\beta$ -casein 1-25の正イオンモードにおけるマススペクトル。[M+H]<sup>+</sup>より低質量側で検出されているのがリン酸基脱離イオン ([M-H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup>、[M-2H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup>、[M-3H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup>、[M-4H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup>)である。3-AQ/CAあるいはDHBを用いた場合、3-AQ/CHCAに比べ、リン酸基脱離イオンの数は少なく、イオンピーク強度も低い。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

#### ④3-AQ/CAを用いた糖ペプチド、糖鎖およびリン酸化ペプチドの高感度分析

表4は、3-AQ/CA、3-AQ/CHCAあるいはDHBを用いた、糖ペプチド、糖鎖およびリン酸化ペプチドの[M+H]<sup>+</sup>あるいは[M-H]<sup>-</sup>における検出限界を比較した結果を示す。

表4 3-AQ/CA、3-AQ/CHCA及び2,5-DHBを用いた糖ペプチド糖鎖及びリン酸化ペプチドの[M+H]<sup>+</sup>あるいは[M-H]<sup>-</sup>の検出限界

	検出限界 (f mol/well)					
	[M+H] <sup>+</sup>			[M-H] <sup>-</sup>		
	3-AQ/CA	3-AQ/CHCA	DHB	3-AQ/CA	3-AQ/CHCA	DHB
<b>糖ペプチド</b>						
<b>シアロ糖ペプチド</b>						
transferrin GP1	10	10	100	1	1	10
transferrin GP2	10	100	100	10	10	100
fetuin GP1	10	100	100	10	10	100
fetuin GP2	100	100	1000	10	100	100
fetuin GP3	1000	-	-	100	1000	-
<b>アシアロ糖ペプチド</b>						
asialotransferrin GP1	1	1	1	1	1	1
asialotransferrin GP2	1	1	1	1	1	10
asialofetuin GP1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1
asialofetuin GP2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1
asialofetuin GP3	1	1	10	0.1	1	10
<b>糖鎖 (PA-ラベル化糖鎖)</b>						
<b>シアロ糖鎖</b>						
A1 glycan	1	1	100	0.1	0.1	100
A2 glycan	1	1	100	1	1	100
<b>中性糖鎖</b>						
NA2 glycan	0.1	1	1	1	1	10
NA4 glycan	1	1	10	1	1	10
<b>リン酸化ペプチド</b>						
$\beta$ -casein 33-48	1	1	1	1	1	1
$\beta$ -casein 1-25	1	1	10	1	1	10

検出限界は1,000 fmol以下の試料の[M+H]<sup>+</sup>あるいは[M-H]<sup>-</sup>に対し評価した。"-は1,000 fmolでイオンが検出されなかったことを示す。

糖ペプチドの場合、シアロ糖ペプチドは3-AQ/CAを用いると他のマトリックスを用いた場合に比べ約10倍の感度向上がみられたが、アシアロ糖ペプチドはシアロ糖ペプチドほど顕著な差はみられなかった。シアル酸脱離抑制効果は、中性糖脱離抑制効果に比べ、より感度に影響を与えるのかもしれない。

糖鎖の場合、シアロ糖鎖は3-AQ/CAおよび3-AQ/CHCAを用いるとDHBに比べ10-1,000倍感度向上がみられた。中性糖鎖は3-AQ/CAおよび3-AQ/CHCAを用いるとDHBに比べ約10倍感度向上がみられた。糖ペプチドと同様に、シアル酸脱離抑制効果は、中性糖脱離抑制効果に比べ、より感度に影響を与えるのかもしれない。

リン酸化ペプチドの場合、3-AQ/CAは他のマトリックスと比べ同等以上の感度が示された。

#### 【結論】

以上のように、新規液体マトリックス3-AQ/CAを用いると、3-AQ/CHCAおよびDHBに比べ、糖ペプチド、糖鎖およびリン酸化ペプチドのシアル酸、中性糖、リン酸基の脱離を抑制した。糖ペプチド分析で3-AQ/CAを用いると、3-AQ/CHCAおよびDHBに比べ、シアロ糖ペプチドの感度を約10倍向上した。糖鎖分析ではDHBに比べシアロ糖鎖の感度を10-1,000倍向上した。リン酸化ペプチド分析で、他のマトリックスと同等以上の感度を示した。3-AQ/CAは、糖ペプチド、糖鎖およびリン酸化ペプチド分析において現在最も効果的なマトリックスである。

#### 【成果一覧】

##### 論文発表

- (1) Yuko Fukuyama, Natsumi Funakoshi, Kohei Takeyama, Yusaku Hioki, Takashi Nishikaze, Kaoru Kaneshiro, Shin-ichirou Kawabata, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka, "3-Aminoquinoline/*p*-coumaric acid as a MALDI matrix for glycopeptides, carbohydrates, and phosphopeptides", Anal. Chem., 2014, Articles ASAP, DOI: 10.1021/ac4037087

##### 学会発表

- (1) 福山裕子, 船越なつ美, 田中耕一, 第35回日本医用マスペクトル学会, 2010年
- (2) Yuko Fukuyama, Natsumi Funakoshi, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka, 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2011
- (3) 福山裕子, 船越なつ美, 岩本慎一, 田中耕一, 第59回日本質量分析総合討論会, 2011年

##### 特許出願

- (1) 福山裕子, 田中耕一, 糖ペプチド又は糖タンパク質の質量分析用液体マトリックス, 特願2011-125862, 特開2012-251914
- (2) 福山裕子, 田中耕一, リン酸化ペプチドおよび糖鎖の質量分析法, 特願2013-186748

#### 【参考文献】

- [1] V.S. Kumar Kolli, Ron Orlando, "A new matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization on magnetic sector instruments with point detectors", Rapid Commun.Mass Spectrom., 1996, 10, pp923-926
- [2] Tatiana N. Laremore, Fuming Zhang, Robert J. Linhardt, "Ionic liquid matrix for direct UV-MALDI-TOF-MS analysis of dermatan sulfate and chondroitin sulfate oligosaccharides," Anal. Chem. 2007, 79, pp1604-1610
- [3] Yuko Fukuyama, Shuuichi Nakaya, Yuzo Yamazaki, Koichi Tanaka, "Ionic liquid matrixes optimized for MALDI-MS of sulfated/sialylated/neutral oligosaccharides and glycopeptides," Anal. Chem. 2008, 80, pp2171-2179

- [4] Kaoru Kaneshiro, Yuko Fukuyama, Shinichi Iwamoto, Sadanori Sekiya, Koichi Tanaka, "Highly sensitive MALDI analyses of glycans by a new aminoquinoline-labeling method using 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid liquid matrix", *Anal. Chem.*, 2011, 83, pp3633-3667
- [5] Takashi Nishikaze, Kaoru Kaneshiro, Shin-ichirou Kawabata, Koichi Tanaka, "Structural analysis of *N*-glycans by the glycan-labelling method using 3-aminoquinoline-based liquid matrix in negative-ion MALDI-MS", *Anal. Chem.* 2012, 84, pp9453-9461
- [6] Sadanori Sekiya, Kenichi Taniguchi, Koichi Tanaka, "On-target separation of analyte with 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid liquid matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2012, 26, pp693-700
- [7] Takashi Nishikaze, Yuko Fukuyama, Shin-ichirou Kawabata, Koichi Tanaka, "Sensitive analyses of neutral *N*-glycans using anion-doped liquid matrix  $G_3CA$  by negative-ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", *Anal. Chem.* 2012, 84, pp6097-6103
- [8] Yuko Fukuyama, Kohei Takeyama, Shin-ichirou Kawabata, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka, "An optimized matrix-assisted laser desorption/ionization sample preparation using a liquid matrix, 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, for phosphopeptides", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 26, pp2454-2460

## 2-5 新規マトリックス添加剤ADHBを用いた疎水性ペプチドの高感度分析

### 【研究目的】

これまで糖ペプチド、糖鎖、リン酸化ペプチドなど親水性の翻訳後修飾 (PTM) 試料の感度向上について述べた。一方、疎水性ペプチドも難イオン化試料として知られる。疎水性ペプチドがMALDI-MSで分析困難な理由の一つは、通常用いられるマトリックスが親水性で、親水性ペプチドと親和性が高く、これらを優先的にイオン化するためと考えられる。

今回、疎水性ペプチドと親和性が高い疎水性マトリックス添加剤の開発を行った。

### 【研究成果】

#### 方法

広島大学と共同し、疎水性アルキル基をDHBに組合せ、疎水性化合物と親和性の高い添加剤alkylated dihydroxybenzoic acid (ADHB)を合成した(図1)。

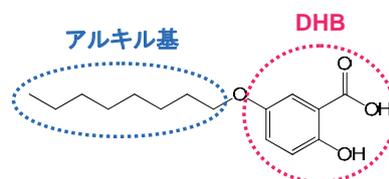


図1 新規マトリックス添加剤alkylated dihydroxybenzoic acid (ADHB)

表1にADHBを固体マトリックスと混合した場合の疎水性ペプチド (humanin) の検出限界を測定した結果を示す。いずれのマトリックスでもhumaninの感度向上が見られたが、CHCAと組み合わせた場合、最も高感度に分析できた。CHCA溶液とADHB溶液を1:1、10:1、100:1 (v/v) で混合すると、10:1 (v/v) で最も感度

向上した(データ省略)。また、アルキル鎖長の異なるADHBを比較すると、C8-ADHBを用いた場合に最も高感度で、CHCA+C8-ADHBは、CHCA単独と比べ100倍感度向上した(表2)。以降の実験では、C8-ADHBとCHCAを10:1(v/v)で混合し、CHCA+ADHBとして用いた。

表1 C8-ADHBをCHCA、DHB、SAと混合して用いた疎水性ペプチドhumaninの検出限界比較

	humanin (fmol/well)	
	positive mode	negative mode
CHCA+C8-ADHB	0.1	1
DHB+C8-ADHB	1	10
SA+C8-ADHB	10	10
CHCA	10	100

CHCA、DHB及びSA溶液(10 mg/mL)と、C8-ADHB溶液(5 mg/mL)を、10:1(v/v)で混合して用いると、CHCAを用いた場合、最も検出限界が低く疎水性ペプチドhumaninを検出した。

表2 アルキル鎖長の異なるADHBを用いた疎水性ペプチドhumaninの検出限界比較

	humanin (fmol/well)	
	positive mode	negative mode
CHCA+C16-ADHB	1	10
CHCA+C10-ADHB	1	10
CHCA+C8-ADHB	0.1	1
CHCA+C6-ADHB	1	10
CHCA+C4-ADHB	10	100
CHCA+C1-ADHB	10	100
CHCA	10	100

CHCA溶液と、アルキル鎖長の異なるC1-, C4-, C6-, C8-, C10-, C16-ADHB溶液を、10:1(v/v)で混合して用いると、C8-ADHBを用いた場合、最も検出限界が低く疎水性ペプチドhumaninを検出した。

## 結果

### ①ADHBを用いた疎水性ペプチドの高感度分析

図2は、CHCA+ADHBを用いて親水性ペプチドであるアミロイドベータ(amyloid beta, A $\beta$ )1-11と疎水性ペプチド(humanin)の混合物を分析した例を示す。CHCA+ADHBを用いると、CHCA単独に比べ、親水性ペプチドのピーク強度は低く、疎水性ペプチドのピーク強度は高くなった。ADHB単独ではイオンが検出されなかった。

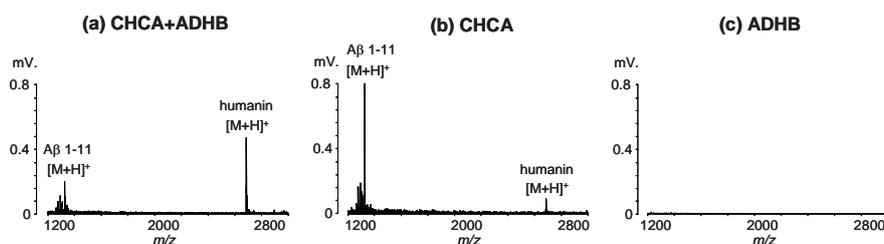


図2 CHCA+ADHB、CHCA及びADHBを用いた親水性ペプチドと疎水性ペプチドの混合物のマススペクトル

親水性ペプチド(A $\beta$ 1-11)と疎水性ペプチド(humanin)の混合物(1:1, mol/mol、それぞれ100 fmol/well)を、(a) CHCA+ADHB、(b) CHCA及び(c) ADHBを用いて測定した。[装置: MALDI-TOFMS(島津製作所)]。

図3は、CHCA+ADHBおよびCHCAを用いた疎水性ペプチド(humanin)のMSイメージを示す。CHCAを用いると、疎水性ペプチドは滴下領域内に広く分布するが、CHCA+ADHBを用いると、疎水性ペプチドおよびADHBは滴下領域外縁に密に分布する。

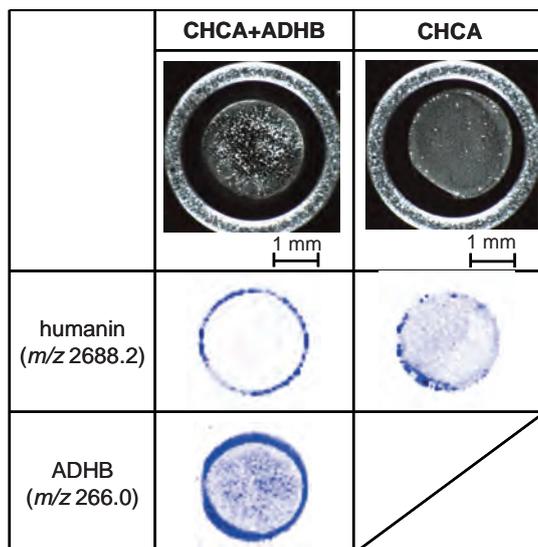


図3 CHCA+ADHB、CHCAを用いたhumaninとADHBのMSイメージ

上は、CHCA+ADHBあるいはCHCA溶液と、親水性ペプチド(Aβ 1-11)と疎水性ペプチド(humanin)の混合溶液をサンプルプレート上に滴下した場合の乾燥後の光学写真を示す。下は、疎水性ペプチドhumaninとADHBのMSイメージ(イオンピークの相対強度分布)を示す。CHCAを用いると、humaninは滴下領域内に広く分布するが、CHCA+ADHBを用いると、humaninとADHBは滴下領域外縁に特に密に分布する。

この現象は次のように説明できると考えられる。ADHBは親水性DHBと疎水性アルキル基からなる両極性化合物であるが、水には溶けず、アセトニトリル水溶液に溶解する。ADHB、CHCAおよび試料を滴下すると、水に溶けないADHBは、アセトニトリルの揮発に伴い、アセトニトリルと水の境界部に蓄積する(この現象はコーヒーリング効果として知られる[1]。このとき滴下領域外縁に濃縮するADHBとともに、疎水性ADHBと相互作用する疎水性ペプチドも外縁に濃縮すると考えられる。

## ②ADHBを用いた消化物分析

表3は、ペプチド14種のCHCA+ADHBによる感度向上率を、疎水性指標SSRCalc Hydrophobicity順に示す。SSRCalc Hydrophobicity(あるいはHPLC index)の高い疎水性のペプチドではCHCA+ADHBによる感度向上が顕著にみられ、その場合、疎水性ペプチドは滴下領域外縁に密に分布する傾向がみられた。

図4は、CHCA+ADHBを用いてphosphorylase b消化物を分析した結果を示す。CHCA+ADHBを用いることで、CHCA単独では検出できないペプチドを2種検出できた。それらは、疎水性のペプチドで、滴下領域外縁に密に分布する。その外縁領域にレーザーを照射することで、疎水性ペプチドを高感度に検出できた。

## 【結論】

以上のように、新規疎水性ペプチド用添加剤ADHBを開発し、CHCAと混合して用いることで、疎水性ペプチドの検出感度を10~100倍向上させることができた。それは、CHCA+ADHBを用いると疎水性ペプチドが滴下領域外縁に分布し、そこに集中してレーザーを照射し検出することで達成された。これにより、これまで検出できなかった疎水性ペプチドを検出することができた。

表3 ペプチド14種の疎水性度とCHCA+ADHBによる感度向上率

no.	試料名	ペプチド			感度向上率 (倍)	MSイメージ	
		SSRCalc Hydrophobicity	HPLC Index	m/z (Av.)		CHCA+ADHB	CHCA
1	NF-κB inhibitor	54.8	200.0	2782.5	100		
2	melittin, honey bee	53.8	117.8	2847.5	10		
3	Aβ 1-42	51.1	110.4	4515.1	100		
4	OVA-BIP hybrid peptide	50.2	100.8	2291.5	100		
5	humanin	50.0	117.4	2688.2	100		
6	[Gly14]-humanin	49.5	120.3	2658.2	10		
7	temporin A, amide	45.6	110.9	1397.8	10		
8	MPGΔNLS	45.2	125.6	2767.2	10		
9	Aβ 22-42	42.4	44.5	2000.3	1		
10	ACTH 18-39	37.9	58.9	2466.7	1		
11	Aβ 1-28	36.3	44.7	3263.5	1		
12	Aβ 1-11	13.5	1.4	1326.3	1		
13	GPHRSTPESRAAV	10.6	3.3	1365.5	1		
14	β-conglycinin 165-178	5.2	-60.2	1848.8	1		

左側の疎水性指標SSRCalc Hydrophobicity順に並べたペプチド14種に対し、中央にCHCA+ADHB及びCHCAを用いた検出限界比較から得られるCHCA+ADHBによる感度向上率を示し、右側に各ペプチドのMSイメージを示す。

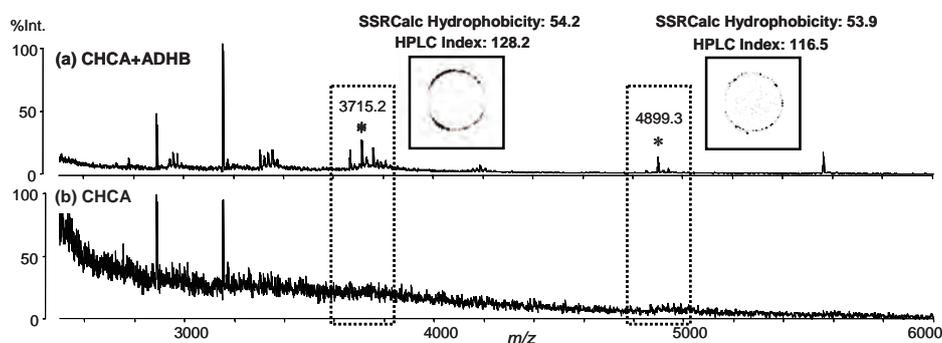


図4 CHCA+ADHB及びCHCAを用いたphosphorylase b消化物のマスペクトル

Phosphorylase bのトリプシン消化物のm/z 2,500~6,000のマスペクトル。星印はCHCA+ADHBを用いた場合のみで得られたペプチドのイオンピークを示す。この2つのペプチドのMSイメージを各ピークの横に示す。これらのペプチドは滴下領域外縁部のみで検出される。[装置: MALDI-TOFMS(島津製作所)]

## 【成果一覧】

### 論文発表

(1) Yuko Fukuyama, Ritsuko Tanimura, Kazuki Maeda, Makoto Watanabe, Shin-ichirou Kawabata,

Shinichi Iwamoto, Shunsuke Izumi, Koichi Tanaka, "Alkylated Dihydroxybenzoic Acid as a MALDI Matrix Additive for Hydrophobic Peptide Analysis", Anal. Chem., 2012, 84, pp4237-4243

#### 学会発表

- (1) 福山裕子, 谷村里都子, 泉俊輔, 岩本慎一, 田中耕一, 第59回質量分析総合討論会, 2011年
- (2) Yuko Fukuyama, Ritsuko Tanimura, Kazuki Maeda, Makoto Watanabe, Shin-ichirou Kawabata, Shinichi Iwamoto, Shunsuke Izumi, Koichi Tanaka, 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2012.

#### 特許出願

- (1) 福山裕子, 泉俊輔, 質量分析用マトリックスの添加剤, 特願2012-055344, 特開2013-190250
- (2) 福山裕子, 泉俊輔, 質量分析用マトリックスの添加剤, 特願2011-283406, 特開2013-134102
- (3) 福山裕子, 泉俊輔, 質量分析用マトリックスの添加剤, 特願2012-076289, 特開2013-068598
- (4) 福山裕子, 泉俊輔, 質量分析用マトリックスの添加剤, 特願2012-086330, 特開2013-217695
- (5) 福山裕子, 泉俊輔, 質量分析用マトリックスの添加剤, 特願2012-028413, 特開2013-164382
- (6) 福山裕子, 泉俊輔, マトリックス添加剤を用いる質量分析法, 特願2013-047229

#### 【参考文献】

- [1] Robert D. Deegan, Olgica Bakajin, Todd F. Dupont, Greb Huber, Sidney R. Nagel, Thomas A. Witten, "Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops", Nature, 1997, 389, pp827-829

## 2-6 新規マトリックスATHAPを用いた疎水性ペプチドの高感度分析

### 【研究目的】

前項では、疎水性ペプチドと親和性の高い疎水性添加剤ADHBをCHCAと組み合わせて用いることで、滴下領域外縁部に疎水性ペプチドを濃縮し、そこにレーザーを照射することで高感度に検出できることを確かめた。今回は、疎水性ペプチドと親和性が高い疎水性マトリックスの開発を試みた。

### 【研究成果】

#### 方法

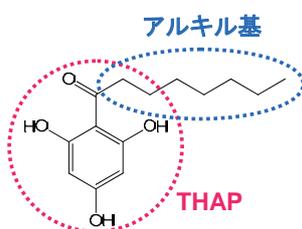


図1 新規マトリックスalkylated trihydroxyacetophenone (ATHAP)

広島大学: 泉俊輔教授と共同し、疎水性と親和性の高いマトリックスとして、親水性マトリックスTHAPに疎水性アルキル基を組合せたマトリックスalkylated trihydroxyacetophenone (ATHAP)を合成した(図1)。アルキル鎖長の異なるATHAPを比較すると、C8-あるいはC10-ATHAPを用いた場合、疎水性ペプチド

humaninを最も高感度に検出し、THAPやCHCAに対し10倍感度向上した(表1)。この結果から、以降の実験ではC8-ATHAPを用いた。

表1 アルキル鎖長の異なるATHAPを用いた疎水性ペプチドhumaninの検出限界比較

	humanin (fmol/well)
	positive mode
C12-ATHAP	10
C10-ATHAP	1
C8-ATHAP	1
C6-ATHAP	10
THAP	10
CHCA	10

## 結果

### ①ATHAPを用いた疎水性ペプチドの高感度分析

表2は、ペプチド11種のATHAPによる感度向上率を、疎水性指標SSRCalc Hydrophobicity順に示す。

表2 ペプチド11種の疎水性度とATHAPによる感度向上率

no.	試料名	ペプチド			感度向上率 (倍)
		SSRCalc Hydrophobicity	HPLC Index	m/z (Ave.)	
1	NF-κB inhibitor	54.8	200.0	2782.6	10
2	OVA-BIP hybrid peptide	50.2	100.8	2291.6	10
3	humanin	50.0	117.4	2688.3	10
4	Aβ 22-42	42.4	44.5	2000.4	10
5	catestatin	38.1	84.0	2327.7	1
6	ACTH 18-39	37.9	58.9	2466.7	1
7	nocistatin	29.8	13.5	1928.1	1
8	neuropeptide S	22.3	16.2	2188.5	0.1
9	Aβ 1-16	18.2	-3.3	1956.1	0.1
10	Aβ 1-11	13.5	1.4	1326.3	0.001
11	β-conglycinin 165-178	5.2	-60.2	1848.8	0.0001

左側の疎水性指標SSRCalc Hydrophobicity 順に並べたペプチド11種に対し、右側にATHAP及びCHCAを用いた検出限界比較から得られるATHAPによる感度向上率を示す。

疎水性の高いペプチドでATHAPによる感度向上が顕著にみられた。一方、親水性のペプチドではATHAPによる感度低下がみられた。

図2は、ATHAPを用いて親水性ペプチド(Aβ 1-11)と疎水性ペプチド(humanin)の混合物を分析したマスペクトル、および疎水性ペプチドのMSイメージを示す。ATHAPを用いると、humaninが滴下領域全域

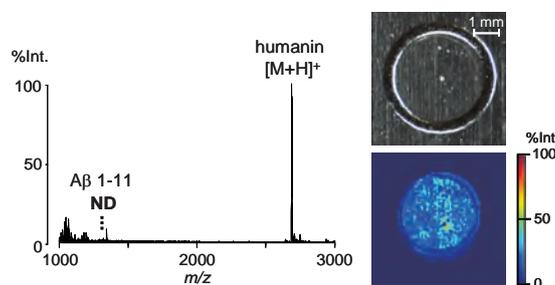


図2 ATHAPを用いた親水性和疎水性のペプチド混合物のマスペクトル及び疎水性ペプチドのMSイメージ

左は、親水性ペプチド(Aβ 1-11)と疎水性ペプチド(humanin)の混合物(1:1, mol/mol、それぞれ 100 fmol/well)を、ATHAPを用いて測定したマスペクトル。NDはイオンが検出されなかったことを示す。右上はその混合溶液をサンプルプレート上に滴下した場合の乾燥後の光学写真を、右下は疎水性ペプチドのMSイメージを示す。疎水性ペプチドは滴下領域全域に分布する。親水性ペプチドは検出されなかったためMSイメージは省略する。[装置: MALDI-TOFMS(島津製作所)]

に分布し優先的に検出され、Aβ 1-11はどこからも検出されなかった。従って、ATHAPは、濃縮効果ではなく、マトリックス効果により、疎水性ペプチドを高感度に検出すると考えられる。

## ②ATHAPを用いた消化物分析

図2および表3は、ATHAPを用いてphosphorylase b消化物を分析した結果を示す。ATHAPにより

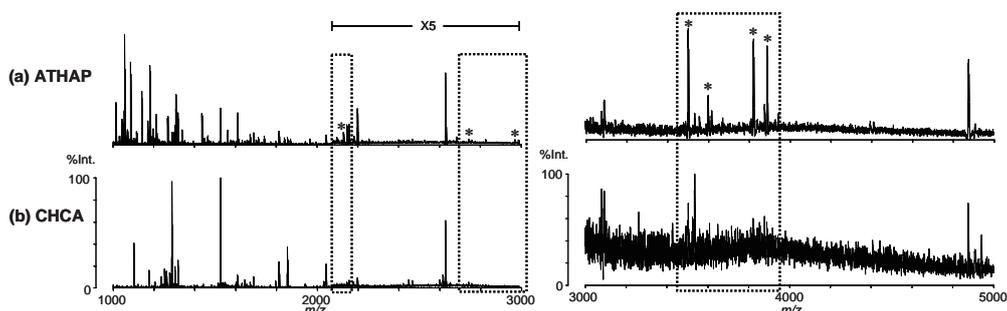


図2 ATHAP及びCHCAを用いたphosphorylase b消化物のマスペクトル

(a) ATHAP及び(b) CHCAを用いて取得したphosphorylase b (LysC消化物) の $m/z$  1,000~3,000及び3,000~5,000のマスペクトル。 $m/z$  2,100~3,000は5倍に拡大して示す。星印はATHAPを用いた場合のみで得られたペプチドのイオンピークを示す。[装置: MALDI-TOFMS(島津製作所)]

表3 図2で検出したペプチドの疎水性度と感度

no.	phosphorylase b Lys-C digests			detection (+/-)		
	SSRCalc Hydrophobicity	HPLC Index	$m/z$ (Ave.)	ATHAP	CHCA	CHCA+ADHB
1	55.9	142.3	3602.2	++	-	-
2	53.9	109.0	3823.5	++	-	-
3	53.1	102.5	3890.3	++	-	-
4	51.0	109.5	3823.5	++	-	+
5	50.7	78.4	2198.6	++	+	++
6	45.8	69.5	2155.6	++	+	++
7	45.1	46.2	2742.0	+	+	++
8	42.8	52.7	2969.5	+	-	+
9	38.9	56.8	3504.9	++	-	+
10	35.1	66.1	1855.1	++	++	++
11	33.9	37.5	1657.0	+	+	++
12	33.6	14.3	2130.5	++	-	++
13	33.4	61.6	2629.0	++	++	++
14	31.4	36.9	1610.9	++	++	++
15	31.4	31.2	1814.1	++	++	++
16	31.2	59.8	1526.8	++	++	++
17	30.9	43.7	2043.3	++	++	++
18	30.4	27.5	1942.3	++	++	++
19	29.9	36.3	2449.7	-	+	++
20	28.4	38.1	1304.7	++	++	++
21	25.8	24.5	1263.4	-	++	++
22	24.7	27.3	1178.3	-	++	++
23	24.5	44.1	1290.5	+	++	++
24	18.9	8.7	1254.5	+	++	++
25	9.3	-0.7	1102.2	-	++	++

図2で検出したphosphorylase b 消化物のペプチドを疎水性度 (SSRCalc Hydrophobicity) 順に並べて示す。++は $S/N \geq 5$ 、+は $S/N = 2-5$ でイオンが検出したこと、-は $S/N < 2$ で検出したか不検出であることを示す。赤枠は、CHCAでは検出されずATHAPで検出されたペプチド7種を示す。緑枠は、CHCA+ADHBでは検出されずATHAPで検出されたペプチド3種を示す。

CHCAでは検出できなかったペプチドを7種検出した。それらは疎水性の高いペプチドで、ATHAPのマトリックス効果により、高感度に検出したと考えられる。

さらにATHAPをCHCA+ADHB[1]と比較すると、ATHAPは、CHCA+ADHBで検出しない疎水性ペプチドを3種検出した(表3)。これは、ATHAPが、疎水性ペプチドを高感度に検出すると同時に親水性ペプチドを

抑制するマトリックス効果をもつため、疎水性ペプチドと親水性ペプチドが存在する混合物中で、親水性ペプチドによるイオン化の抑制なく疎水性ペプチドをイオン化できたことが影響していると考えられる。

#### 【結論】

今回、疎水性ペプチド高感度分析として原理の異なる2つのマトリックス(添加剤)の効果を示した。新規マトリックスATHAPは、前項の添加剤CHCA+ADHBと比べ、より多くの疎水性ペプチドを検出できる一方、親水性ペプチドの検出能力において劣る。従って、疎水性ペプチドの検出に限定する場合はATHAPを使うことが望ましいが、親水性ペプチドを含め幅広くペプチドを分析したい場合はCHCA+ADHBを使うことが有利である。現在、このATHAPを用いてタンパク質の膜貫通ドメイン分析を進めている。

#### 【成果一覧】

##### 論文発表

- (1) Fukuyama, Y.; Nakajima, C.; Furuichi, K.; Taniguchi, K.; Kawabata, S.; Izumi, S.; Tanaka, K. "Alkylated trihydroxyacetophenone as a MALDI matrix for hydrophobic peptides", Anal. Chem., 2013, 85, pp9444-9448

##### 学会発表

- (1) Yuko Fukuyama, Chihiro Nakajima, Keiko Furuichi, Kenichi Taniguchi, Shin-ichirou Kawabata, Shunsuke Izumi, Koichi Tanaka, 61th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2013
- (2) 福山裕子, 中島ちひろ, 古市圭子, 谷口謙一, 川畑慎一郎, 泉俊輔, 田中耕一, 第61回質量分析総合討論会, 2013年

##### 特許出願

- (1) 福山裕子, 泉俊輔, マトリックスを用いる質量分析法, 特願2013-046644

#### 【参考文献】

- [1] Yuko Fukuyama, Ritsuko Tanimura, Kazuki Maeda, Makoto Watanabe, Shin-ichirou Kawabata, Shinichi Iwamoto, Shunsuke Izumi, Koichi Tanaka, "Alkylated dihydroxybenzoic acid as a MALDI matrix additive for hydrophobic peptide analysis", Anal. Chem., 2012, 84, pp4237-4243

## 2-7 ラジカルスカベンジング試薬を添加剤として用いたS-ニトロシル化ペプチド分析

#### 【研究目的】

これまで糖鎖、糖ペプチド、リン酸化ペプチドなど親水性PTMおよび疎水性ペプチドの感度向上について述べた。一方、S-ニトロシル化ペプチドも難イオン化試料として知られる。S-ニトロシル化は細胞間のシグナル伝達に参与し、その分析は伝達機構の解明に重要である。S-ニトロシル化ペプチドがMALDI-MSで分析困難な理由の一つは、ニトロシル基がイオン化過程で脱離するためである。この脱離はレーザー照射直後に生じるラジカルがニトロシル基の結合部位を切断するためと考えられる。

今回、ニトロシル基の脱離を抑制するためラジカルスカベンジング試薬をマトリックスへの添加剤として用いることを試みた。

#### 【研究成果】

##### 方法

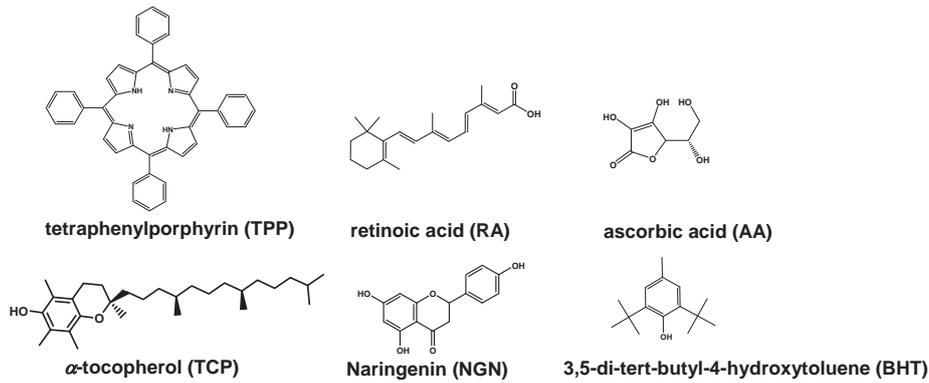


図1 添加剤として用いたラジカルスカベンジング試薬（6種）

広島大学と共同し、レーザー照射時に発生するラジカルを捕捉することが期待される6種のラジカルスカベンジング試薬を用いた(図1)。

## 結果

### ①ラジカルスカベンジング試薬を用いたS-ニトロシル化ペプチドの分析

図2に、DHBにTPP(図1)を添加したDHB+TPPを用いた場合のS-ニトロシル化ペプチド

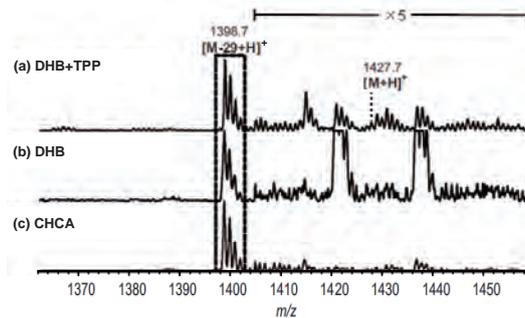


図2 DHB+TPPを用いたS-ニトロシル化ペプチドのマスペクトル

(a) DHB+TPP、(b) DHB、及び(c) CHCAを用いたS-ニトロシル化ペプチド[EMFTYIC(NO)NHIK]のマスペクトル。 $m/z$  1,402~1,455 は5倍に拡大して示す。DHB+TPPを用いた場合(a)、ニトロシル基の脱離したイオン([M-29+H]<sup>+</sup>、 $m/z$  1,398.7) が強く検出されると同時に、 intact分子と思われるイオン([M+H]<sup>+</sup>、 $m/z$  1,427.7)が検出された。[装置: MALDI-TOFMS(島津製作所)]

[EMFTYIC(NO)NHIK] のマスペクトルを示す。DHB+TPPを用いると、DHBあるいはCHCA単独では検出できなかった intact分子と思われるイオン( $m/z$  1,427.7)が検出された。

このイオンをMS/MS分析し、ニトロシル化ペプチドの intact分子であることを確かめた(図3)。DHBあ

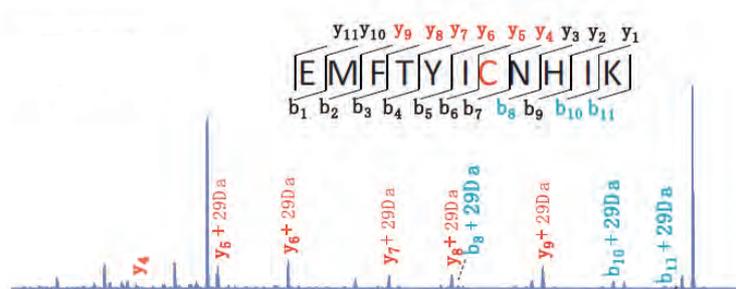


図3 DHB+TPPを用いたS-ニトロシル化ペプチドのMS/MSマスペクトル

図2で検出された intact分子と思われるイオン ( $m/z$  1,427.7) のMS/MSマスペクトル。システインを含むフラグメントはニトロシル化ペプチド ( $[y+29Da]^+$ ) として検出される。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

るいはCHCA単独を用いた場合も、同様にMS/MS分析したが、ニトロシル化ペプチドは検出されなかった。他のラジカルスカベンジング試薬(図1)を用いた場合も同様の効果が得られた。

#### 【結論】

以上より、ラジカルスカベンジング試薬を用いることにより、CHCAあるいはDHB単独ではできなかったS-ニトロシル化ペプチドの分析が可能となった。S-ニトロシル化ペプチド分析は、従来MALDI-MSではできないといわれていたが、この手法を用いることによりMALDI-MSで可能であることが今回初めて示された。

#### 【成果一覧】

##### 論文発表

- (1) Makoto Watanabe, Rie Yamamoto, Shinichi Iwamoto, Yuko Fukuyama, Ritsuko Tanimura, Shin-ichirou Kawabata, Taka-Aki Sato, Shunsuke Izumi, Koichi Tanaka, Int. J. Mass Spectrom. 2013, 333, pp67-71

##### 学会発表

- (1) Makoto Watanabe, Rie Yamamoto, Shinichi Iwamoto, Yuko Fukuyama, Ritsuko Tanimura, Shin-ichirou Kawabata, Taka-Aki Sato, Shunsuke Izumi, Koichi Tanaka, 19<sup>th</sup> International mass spectrometry conference (IMSC), 2012

##### 特許出願

- (1) 渡辺真, 岩本慎一, 佐藤孝明, 田中耕一, 泉俊輔, S-ニトロソ物質の質量分析法, 特願2012-055345, 特開2013-190251

## 2-8 液体マトリックスCHCABを用いたペプチド分析

### 【研究目的】

これまでは、難イオン化試料(糖鎖、糖ペプチド、リン酸化ペプチド、疎水性ペプチド、およびS-ニトロシル化ペプチド)の感度向上をめざし、マトリックスを改良した結果を述べた。一方、一般的な非修飾ペプチドは、CHCAなど従来の固体マトリックスにより、ある程度高感度分析は可能だったが、イオン化持続性が低い(1スポットをレーザー照射する場合、比較的少数ショットでイオンが検出されなくなる)という課題があった。

今回、CHCAと同等の感度を保ちながらイオン化持続性を改良するため、CHCAを構成成分とする液体

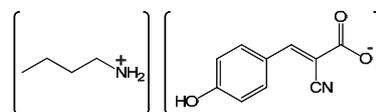


図1 液体マトリックスCHCAB

マトリックスCHCABを用いた(図1)。CHCABは再現性に優れるが感度は極めて劣るということが報告されており、その欠点を補うため濃縮プレートと併せて用いることで感度とイオン化持続性の両立を試みた。

### 【研究成果】

#### 方法

図2aは、濃縮プレート上にCHCABを滴下した場合のペプチド(ACTH 18-39)のMSイメージを示す。このとき、ペプチドは濃縮プレート上に不均一に分布する。これにメタノールを加えることにより(CHCAB+MeOH)、メタノールの急速な揮発とともに濃縮プレート中央にペプチドを集めることができる(図

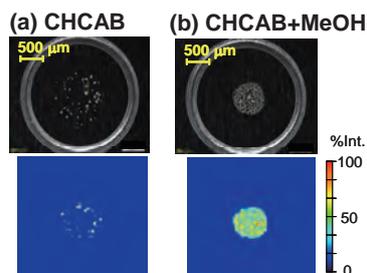


図2 CHCAB+MeOHを用いたペプチドのMSイメージ

(a) CHCAB単独、及び(b) CHCAB+MeOHを用いたACTH 18-39 (100 fmol/well) のMSイメージ。[装置: MALDI-TOFMS(島津製作所)]

2b)。CHCAでも同様な現象がみられ、濃縮プレート中央にペプチドを集約することができた(データ省略)。

## 結果

### ①CHCABを用いたペプチドの感度改良

そこで、CHCAB+MeOHとCHCA+MeOHの比較を行った結果、CHCAB+MeOHは、CHCA+MeOHと同感度(fmolレベル)を示した(データ省略)。この均一性および高感度効果は他のペプチド2種(Angiotensin II、Insulin B-chain)でも確認された。このように、CHCABは濃縮プレートとメタノールを用いることで、同様に処理をしたCHCAと同等な感度を得ることができたので、次にイオン化持続性評価を行った。

### ②CHCABを用いたペプチドのイオン化持続性の改良

図3は、CHCABを用いた1スポットにおけるペプチド(ACTH 18-39)のイオン化持続性を示す。CHCA+MeOHを用いた場合は20ショット程度でイオンが検出されなくなるのに対し、

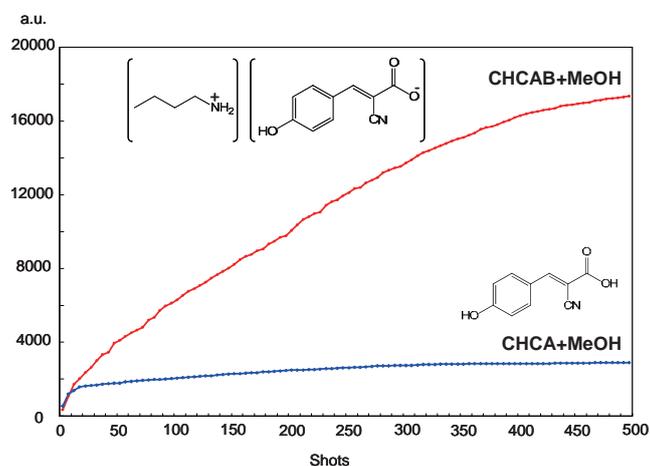


図3 CHCAB+MeOHを用いたペプチドのイオン化持続性評価

CHCAB+MeOHおよびCHCA+MeOHを用いたACTH 18-39 (100 fmol/well)のイオン化持続性評価の結果。横軸に1スポットにおけるショット数、縦軸にインタクト分子イオンピークの5ショット分のmVの平均値の積算値。[装置: MALDI-TOFMS(島津製作所)]

CHCAB+MeOHを用いた場合、500ショット目までイオンが検出し続けた。この傾向はその他ペプチド2種(Angiotensin II、Insulin B-chain)でも観測された。

## 【結論】

以上により、CHCAB+MeOHを用いることで高感度および高イオン化持続性でペプチドを分析できること

が示された。この手法により、滴下領域全域から1スポットまたは数スポットのみを照射し、迅速で信頼性の高いMSおよびMS/MS分析を行うことが可能となる。

#### 【成果一覧】

##### 論文発表

- (1) Yuko Fukuyama, Natsumi Funakoshi, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka, "Adding methanol to  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid butylamine salt as a liquid matrix to form a homogeneous spot on a focusing plate for highly sensitive and reproducible analyses in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", Rapid Commun. Mass Spectrom., 2014, 28, pp662-664

#### 【参考文献】

- [1] 福山裕子, 岩本慎一, 船越なつ美, 田中耕一, 第58回日本質量分析総合討論会, 2010年
- [2] Yuko Fukuyama, Shinichi Iwamoto, Natsumi Funakoshi, Kenichi Taniguchi, Koichi Tanaka, 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2010
- [3] Marko Mank, Bernd Stahl, Günther Boehm, "2,5-Dihydroxybenzoic acid butylamine and other ionic liquid matrixes for enhanced MALDI-MS analysis of biomolecules", Anal.Chem., 2004, 76, pp2938-2950

### 3 イオン化技術の改良による構造解析技術の高度化

前章2では、これまでは感度良く分析できなかった様々な試料を効率よくイオン化し、シグナルを検出する技術の開発について述べてきた。次の段階として、検出されたシグナルが本当に試料由来であるかを確認し、さらにはその構造を解析するためのタンデム質量分析技術(MS/MS または MS<sup>n</sup>)が必要となる。これはイオン化した試料のうち特定のイオンだけを選択し、ガスとの衝突などにより分解し、その分解物の質量電荷比を測定する技術である。(イオンの分解をフラグメンテーション、分解物をフラグメントイオンと呼ぶ)フラグメントイオンの質量やその間隔から、もとの試料イオンの構造を推定できる。例として、アミノ酸のポリマーであるペプチドの構造解析概要を図1に示す。イオンを分解する技術は多数あるが、上に挙げたガスとの衝突によりイオンを分解する手法を衝突誘起解離(Collision-Induced Dissociation, CID)と呼ぶ。

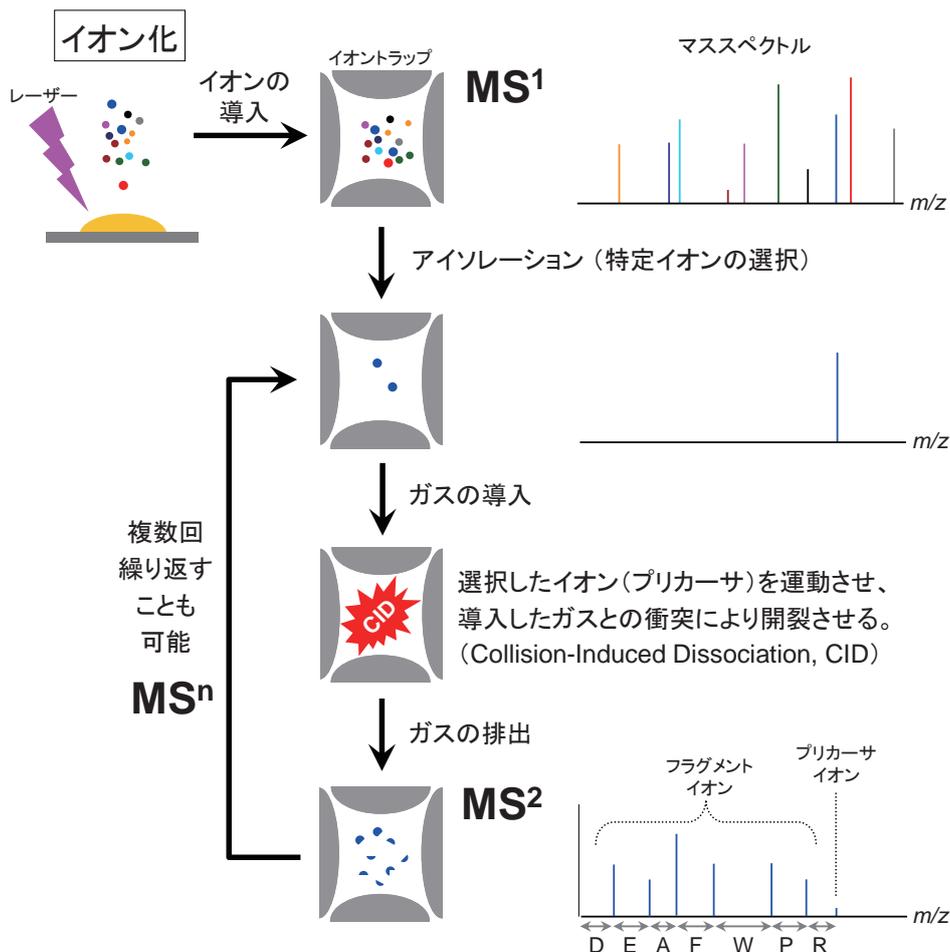


図1 MS/MSまたはMS<sup>n</sup>を用いたペプチドの構造解析概要図

イオン化したペプチド群をイオントラップ内に導入し、その中からあるペプチドだけを選択し、それ以外のイオンは排出する(アイソレーション)。そのイオンをガスとの衝突によりフラグメンテーションさせ、フラグメントイオンの質量電荷比を測定する。生じたフラグメントイオンの質量電荷比やその間隔からもとのペプチドが何であったかを推測する。生じたフラグメントイオンを選択し、さらにガスとの衝突によりフラグメンテーションさせ、より詳細な構造情報を得ることもできる。これを何度か繰り返して行うこともでき、MS<sup>n</sup>分析と呼ぶ。

本章では、前節で述べた技術により生成したイオンの構造解析技術を中心に、より有益な構造情報を取得するための誘導体化法の開発や、対象とする試料を複雑な混合物の中から選択的に濃縮し構造情報を取得する手法の開発など、MS/MS技術に関連する研究開発について述べる。

### 3-1 液体マトリックスG<sub>3</sub>CAを用いた分子構造解析

本項では、N型中性糖鎖を負イオンMS/MSで構造解析を行うためのイオン化法の開発および構造解析法の確立について述べる。

#### 【研究目的】

従来、質量分析による糖鎖の分析はほとんどが正イオンモードで行われてきた。例えば正イオンモードのMS/MS測定によれば単糖単位での切断に相当するイオン群が検出されるので、糖の配列解析に利用できる(図2a)。しかしながらこの手法では糖鎖の枝分かれ構造に関する情報を得ることができず、したがって糖鎖の全体構造を解析する目的には十分ではない。

近年、N型糖鎖のような枝分かれ構造を持つ糖鎖を負イオンモードで開裂させると、枝分かれ構造を反映するフラグメントイオンを生じることが示された[1-5]。枝分かれ構造を反映するフラグメントはDイオンやEイオンと呼ばれ、その質量からもとの構造をブロックの様に組み立てることができるため、構造解析に極めて有用である。(例: 図2b) また、生じるフラグメントイオンは単純な一次開裂に由来するものがほとんどであり、二次開裂(分子内の複数個所での開裂)や脱水、単糖の転移反応を伴わないためスペクトルが単純で解析し易く、より確実な構造解析が可能である。

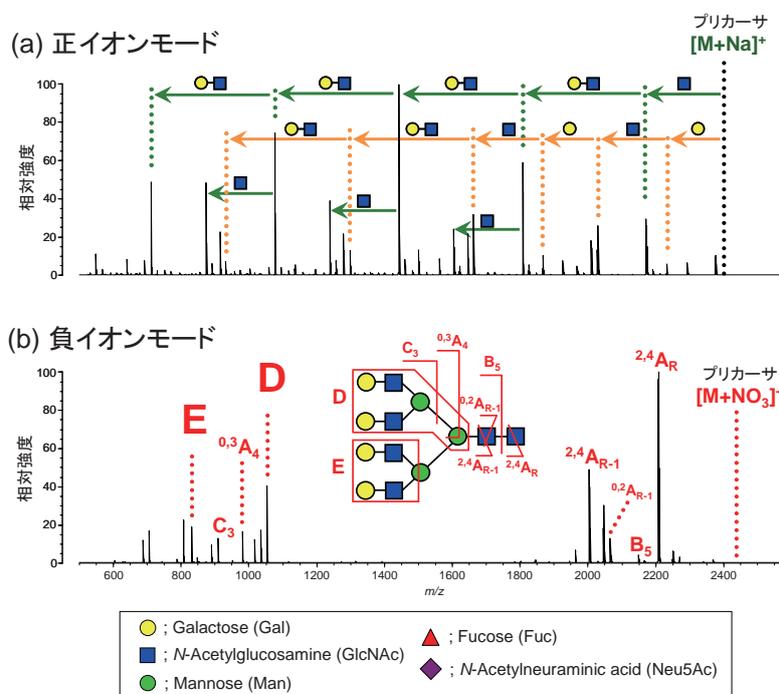


図2 標準糖鎖NA4のMS/MSマススペクトル

標準糖鎖NA4の正イオン及び負イオンMS/MSマススペクトルの比較を示す。(a)はナトリウム付加体をプリカーサとして取得した正イオンMS/MSマススペクトルである。シグナルが多く情報豊富と思われるが、検出されているのは全て構成単糖の脱離によって生じたフラグメントイオンである。(b)は硝酸付加体をプリカーサとして取得した負イオンMS/MSマススペクトルである。シグナルの数は少ないが、DイオンやEイオンなどの分岐構造を反映するシグナルが強く検出される。また、脱水や二次開裂由来のシグナルが検出されないため、スペクトルの解釈が煩雑になることもない。

糖鎖の負イオン構造解析には上記の様なメリットがあるが、そもそもMALDIでは中性糖鎖を効率よく負イオン化することができない。これは、負イオン化に適するマトリックスが無いと考えるとされている。そこで、MALDIにおけるN型糖鎖の負イオン構造解析法を確立するため、糖鎖を高効率に負イオン化する手法の開発を行った。

## 【研究成果】

### 方法

G<sub>3</sub>CAは、福山らが開発したイオン性液体マトリックスで、糖鎖のような親水性化合物に適することが知られている(図3)[6]。このG<sub>3</sub>CAマトリックスにアニオン種を添加し、糖鎖をアニオン付加体として負イオン化することが可能か検討した。アニオン源としては、一般的なアニオンのアンモニウム塩を比較検討した結果、良好な結果が得られた硝酸アンモニウムを採用した。

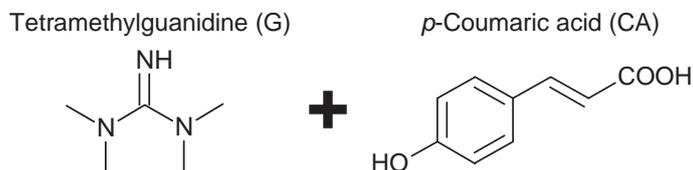


図3 液体マトリックスG<sub>3</sub>CA

G<sub>3</sub>CAは、tetramethylguanidine (G) と *p*-coumaric acid (CA) のモル比3:1からなるイオン性液体である。

### 結果

#### ① アニオン添加液体マトリックスを用いた中性糖鎖の負イオン化

エレクトロスプレーイオン化法(Electrospray Ionization, ESI)において、中性糖鎖を負イオン化するためのアニオン種はこれまでも検討されている。中でも、*N*型糖鎖の負イオン化には硝酸やリン酸の使用が適するとされている。そこで、硝酸アンモニウムを添加したG<sub>3</sub>CAを用いて、中性糖鎖の負イオン化を試みた。比較のため、G<sub>3</sub>CA以外の代表的な液体マトリックスでも同様に検討した。その結果、G<sub>3</sub>CAでのみ中性糖鎖を硝酸付加体として効率よく負イオン化可能であった。図4に各液体マトリックスに硝酸を添加して測定した標準糖鎖NA2の負イオンマススペクトルを示す。

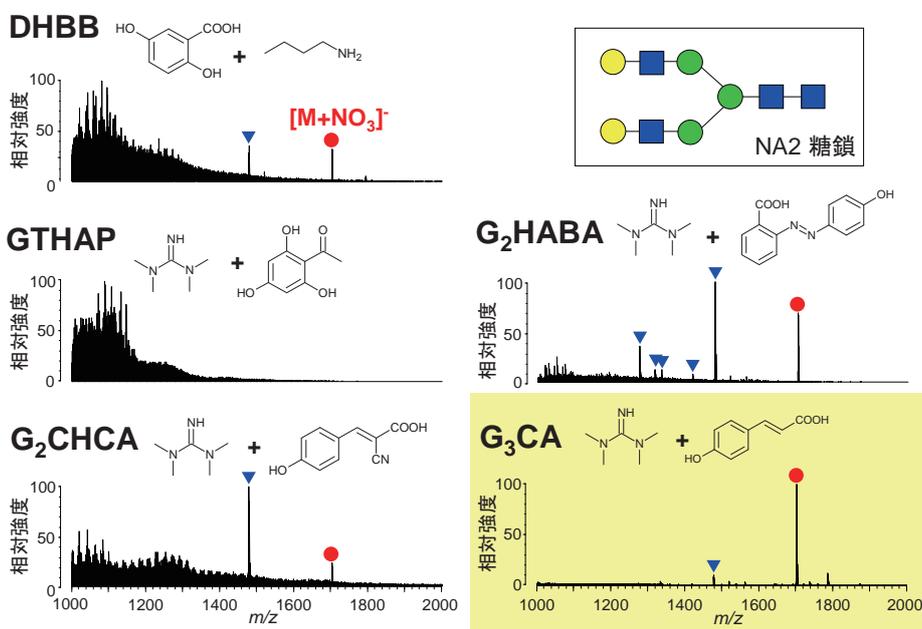


図4 硝酸添加液体マトリックスを用いた標準糖鎖NA2の負イオン化

標準糖鎖NA2 100 fmolを、1 mMの硝酸アンモニウムを添加した各液体マトリックス(DHBB, GTHAP, G<sub>2</sub>CHCA, G<sub>2</sub>HABA, G<sub>3</sub>CA)を用いて負イオンモードで測定した。G<sub>3</sub>CA使用時のみ効率よく硝酸付加体(●)が生成している。他の液体マトリックスでは硝酸付加体のイオン生成量が低く、かつ分解物のシグナル(▼)も同時に観測されているため不適である。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

## ② 硝酸添加G<sub>3</sub>CAを用いた中性糖鎖の検出限界

硝酸添加G<sub>3</sub>CAでのNA2糖鎖の検出限界を評価したところ、1 fmolの微量であっても硝酸付加体のシグナルを検出することが出来た(図5)。先行文献において、MALDIを用いた中性糖鎖の負イオン検出限界は350 fmol ~ 2 pmolと報告されている[7]。硝酸添加G<sub>3</sub>CAを用いることで、少なくとも300倍以上の感度向上が達成されたことになる。

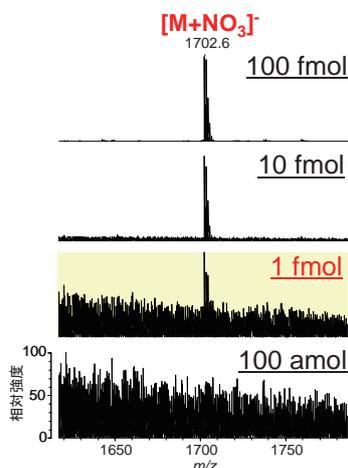


図5 硝酸添加G<sub>3</sub>CAをマトリックスとして用いたNA2糖鎖測定の実出限界

1 mMの硝酸アンモニウムを添加したG<sub>3</sub>CA液体マトリックスを用いた、標準糖鎖NA2の検出限界評価を示す。負イオンモードにおいて1 fmolでもシグナルを検出することができ、ここからMS/MS測定によりフラグメントイオンを検出することも可能であった。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

## ③ アニオン付加中性糖鎖の構造解析

アニオン付加中性糖鎖のCIDにおいては、まずアニオンが糖鎖分子からプロトンを引き抜き、糖鎖の脱プロトン化体を生じることが初期反応である。この脱プロトン化した糖鎖は極めて不安定で、即座に分解して枝分かれ構造を反映する糖鎖のフラグメントイオンを生じる。図6に糖鎖の硝酸付加体の負イオンMS/MSマススペクトルを示す。我々の取得した中性糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトルは、これまでに論文で報告されている同じ糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトルと比べ、二次開裂などが抑制されシンプルであった。これは使用している装置の特性を反映していると考えられる。我々の用いるイオントラップ型質量分析計では、これまでの報告にある四重極型の装置とはCIDの方法が異なるため、不要な二次開裂が抑えられる傾向にある。この装置特性と、もともとの糖鎖の負イオンCIDの特徴である単純な一次開裂によるフラグメントイオン生成との相乗効果により、解析しやすいシンプルかつ十分なフラグメントイオンを含むMS/MSマススペクトルを与えたと考えられる。脱水や二次開裂由来などの不要なフラグメントイオンが生じず、シグナルが分散しないため、MS/MSの感度も高い。検出限界付近である1 fmolの糖鎖からでも、質の高いMS/MSマススペクトルを取得することが出来た(図6b)。

### 【結論】

アニオンを添加したG<sub>3</sub>CAマトリックスにより、中性糖鎖を効率よく負イオン化し、さらにそのMS/MSマススペクトルを取得する技術を確認した。また、イオントラップ型の質量分析計で得られる糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトルは、これまでに報告のある四重極型の質量分析計で取得したものよりシンプルで解析しやすく、構造解析に有用であることも示した。

次項では、ここで得た(ラベル化していない)中性糖鎖の構造解析法を、本プロジェクトで開発した、液体マトリックス3-AQ/CHCAまたは3-AQ/CAを用いる糖鎖のon-targetラベル化法で生じる、3-AQラベル化糖鎖の構造解析へとさらに発展させる。

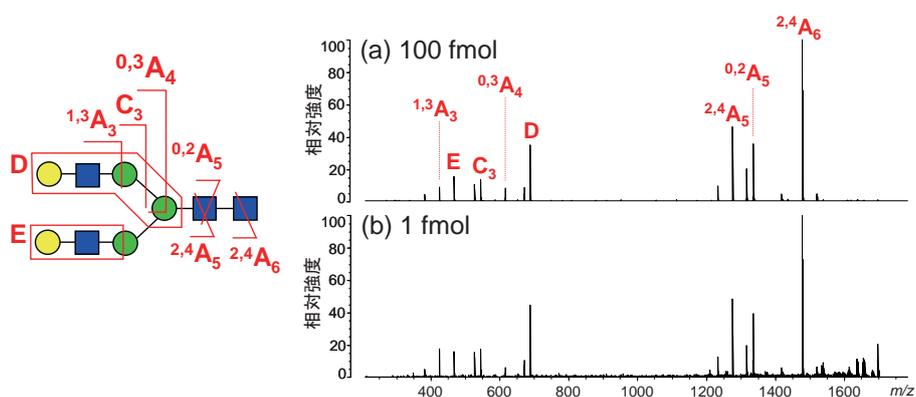


図6 NA2糖鎖の硝酸付加体の負イオンMS/MSマススペクトル

1 mMの硝酸アンモニウムを添加したG<sub>3</sub>CA液体マトリックスを用いて測定した標準糖鎖NA2の負イオンMS/MSマススペクトル。(a)は100 fmolの糖鎖、(b)は検出限界付近の1 fmolから得た負イオンMS/MSマススペクトルである。双方ともパターンは変わらず、微量糖鎖からも問題なく構造情報が取得できることがわかる。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

### 【成果一覧】

#### 論文発表

- (1) Takashi Nishikaze, Yuko Fukuyama, Shin-ichirou Kawabata, Koichi Tanaka, "Sensitive analyses of neutral *N*-glycans using anion-doped liquid matrix G<sub>3</sub>CA by negative-ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", *Anal. Chem.*, 2012, 84, pp6097-6103

#### 学会発表

- (2) Takashi Nishikaze, Yuko Fukuyama, Shin-ichirou Kawabata, Koichi Tanaka, "Sensitive analysis of neutral *N*-glycan by liquid matrix in negative-ion matrix-assisted laser desorption/ionization" 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2012

#### 特許出願

- (1) 西風隆司、中性糖鎖類の質量分析法、特願2012-74558, 特開2013-205221

### 【参考文献】

- [1] Harvey David J., "Fragmentation of negative ions from carbohydrates: Part 1. Use of nitrate and other anionic adducts for the production of negative ion electrospray spectra from *N*-linked Carbohydrates", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, 16, pp622–630.
- [2] Harvey David J., "Fragmentation of negative ions from carbohydrates: Part 2. Fragmentation of high-mannose *N*-linked glycans", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2005, 16, pp631–646.
- [3] Harvey David J., "Fragmentation of negative ions from carbohydrates: Part 3. Fragmentation of hybrid and complex *N*-linked glycans", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, 16, pp647–659.
- [4] Harvey David J., Jaeken Jaak, Butler Mike, Armitage Alison J., Rudd Pauline M., Dwek Raymond A., "Fragmentation of negative ions from *N*-linked carbohydrates: Part 4. Fragmentation of complex glycans lacking substitution on the 6-antenna", *J. Mass Spectrom.* 2010, 45, pp528–535.
- [5] Harvey David J., Rudd Pauline M., "Fragmentation of negative ions from *N*-linked carbohydrates.

Part 5: Anionic *N*-linked glycans”, *Int. J. Mass Spectrom.* 2011, 305, pp120–130.

- [6] Fukuyama Yuko, Nakaya Shuuichi, Yamazaki Yuzo, Tanaka Koichi, “Ionic liquid matrixes optimized for MALDI-MS of sulfated/sialylated/neutral oligosaccharides and glycopeptides”, *Anal. Chem.* 2008, 80, pp2171–2179.
- [7] Domann Paula, Spencer Daniel I. R., Harvey David J., “Production and fragmentation of negative ions from neutral *N*-linked carbohydrates ionized by matrix-assisted laser desorption/ionization”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 26, pp469–479.

### 3-2 液体マトリックス3-AQ/CHCAを用いた分子構造解析

前章2では、液体マトリックス3-AQ/CHCAまたは3-AQ/CAを用いて糖鎖をラベル化し、検出感度を大幅に向上させる技術について述べた。ここでは、その3-AQラベル化糖鎖の構造解析について述べる。

#### 【研究目的】

3-AQをベースとした液体マトリックスを用いた糖鎖のon-target 3-AQ化法の最もユニークな点は、中性糖鎖であってもリン酸付加体として高感度に負イオン化できる点にある。MALDIにおける中性糖鎖の負イオン化は難しく、特殊なマトリックスを使う必要があるが、3-AQをベースとした液体マトリックスは、糖鎖を簡便かつ完全にラベル化するだけでなく、高感度に負イオン化できる優れたマトリックスである。

液体マトリックスを用いたon-targetラベル化法により糖鎖の高効率負イオン化が可能となったので、その次の段階としてこれらの構造解析を行う必要がある。しかしながら、現在のN型糖鎖の負イオン構造解析は、ラベル化していない糖鎖で確立された方法であり、ラベル化した糖鎖でも同様のフラグメンテーションになるかどうかはわかっていない。本項では、3-AQラベル化糖鎖の負イオン構造解析法の確立を中心に、糖鎖還元末端へのラベル化がその負イオンMS/MSマススペクトルに与える影響を調べた。

#### 【研究成果】

##### 方法

糖鎖のon-target 3-AQ化は、MALDIプレート上で糖鎖溶液と3AQ/CHCAマトリックスを混合し、60°Cで1時間加熱することで行った。3AQ/CHCAマトリックスに1 mMのリン酸アンモニウムを添加しておくことで、3-AQ化した中性糖鎖をリン酸付加体として負イオン化し、イオントラップ型質量分析計でMS/MS分析を行った。必要に応じ、既存のラベル化法(PA化や2-AB化)でラベル化した糖鎖も試料として用いた。

##### 結果

#### ① 3-AQ化糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトル

図1に、3-AQでラベル化しリン酸付加体としてイオン化した標準糖鎖NA2の負イオンMS/MSマススペクトルを示す。比較のため、硝酸添加G<sub>3</sub>CAマトリックスを用いて得た(すなわちラベル化していない)NA2糖鎖のMS/MSマススペクトルも示した。両者はラベル化の有無やアニオンの種類が異なるにもかかわらず、同じ種類のフラグメントイオンを同じパターンで生成した。このことから、3-AQラベル化糖鎖は非ラベル糖鎖と同じく負イオンCIDによる構造解析に適することが確認できた。また、3-AQラベル化糖鎖からは<sup>0,2</sup>A<sub>6</sub>+リン酸のシグナル(図1a *m/z* 1,636.5)も観測されており、非ラベル糖鎖よりも構造情報に富む。

#### ② 3-AQラベル化糖鎖と他のラベル化糖鎖との負イオンMS/MSマススペクトルの比較

図2aには、NA2糖鎖と同じ糖鎖構造を持つ市販PA化糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトルを示した。脱水や複数箇所での開裂を生じ、3-AQ化糖鎖とは明らかにスペクトルパターンが異なった。糖鎖の負イオ

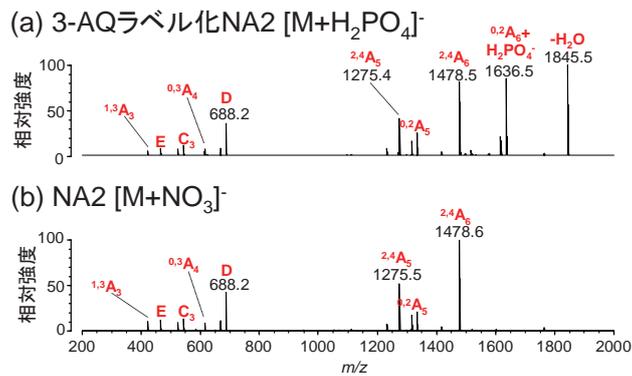


図1 3-AQ化糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトル

(a)は3-AQ化標準糖鎖NA2の負イオンMS/MSマススペクトル、(b)は同じ糖鎖NA2(非ラベル体)の負イオンMS/MSマススペクトルを示す。(b)はリン酸添加3-AQ/CHCAマトリックスを用いてリン酸付加体としてイオン化し、(b)は硝酸添加G<sub>3</sub>CAマトリックスを用い硝酸付加体としてイオン化し、それぞれをプリカーサとして負イオンMS/MSマススペクトルを取得した。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

ンCIDの利点のひとつは、単純な一次開裂のみによってフラグメントイオンが生じるため解析容易なスペクトルが得られる点にあるが、PA化糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトルからはこの利点を感じることは出来ない。図2bにさらに大きなNA4糖鎖の例を示したが、極めて複雑なスペクトルになっている。このようなスペクトルから構造を推定することは困難である。一方で、大きなNA4糖鎖でも、3-AQでラベル化したものからは単純かつ解析に十分なシグナルを有する負イオンMS/MSマススペクトルを得ることが出来た(図2c)。

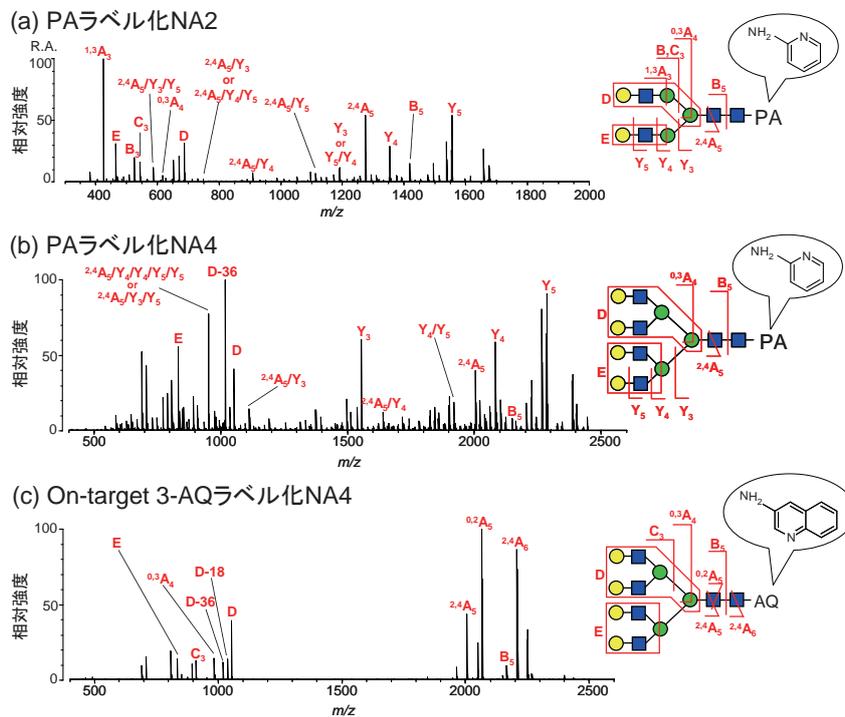


図2 ラベル化糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトルの比較

(a)はPAラベル化NA2糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトルを示す。複数個所開裂や脱水シグナルを多く伴った。スペクトルは省略したが、2-ABラベル化NA2糖鎖も同じスペクトルパターンを示した。(b)はPAラベル化NA4糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトルを示す。極めて複雑なスペクトルになっている。(c)はon-target 3-AQラベル化NA4糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトルを示す。図1に示したNA2糖鎖の場合と同じく、解析しやすいシンプルなスペクトルになっている。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

ここまでの結果では、糖鎖のラベル化を行っても、3-AQであれば非ラベル糖鎖と同様の単純で構造情報に富む負イオンMS/MSマススペクトルが得られている。しかし、ラベル化剤である3-AQが特殊な構造を持っているとは考えにくく、むしろPAや2-ABと構造的には近い。負イオンMS/MSマススペクトルの違いはラベル化試薬の構造以外に原因があると推測される。この点について次の③で考察する。

### ③ ラベル化糖鎖の還元／非還元状態が負イオンフラグメンテーションに与える影響

On-target 3-AQ化と他のラベル化法では、生じる糖鎖の構造に大きな違いがある。すなわち、還元反応によって末端が完全に開環しているか否かである。

図3に糖鎖の還元末端へのラベル化の概要を示した。非ラベル糖鎖の還元末端は鎖状構造とヘミアセタール構造の平衡状態にあるが、これに3-AQやPA, 2-ABなどのアミン化合物を反応させるとシッフ塩基を生成する。(シッフ塩基はグリコシルアミン構造と平衡状態にある)このシッフ塩基の生成自体は平衡反応であるため、逆反応も生じる。そこで、通常はシッフ塩基の状態からさらに還元を行うことで末端を開環し、安定化する。On-target 3-AQ化反応は還元を行わないためシッフ塩基またはグリコシルアミン構造のままになっているが、PA化や2-AB化は還元を行うため完全に開環した構造を持つ。

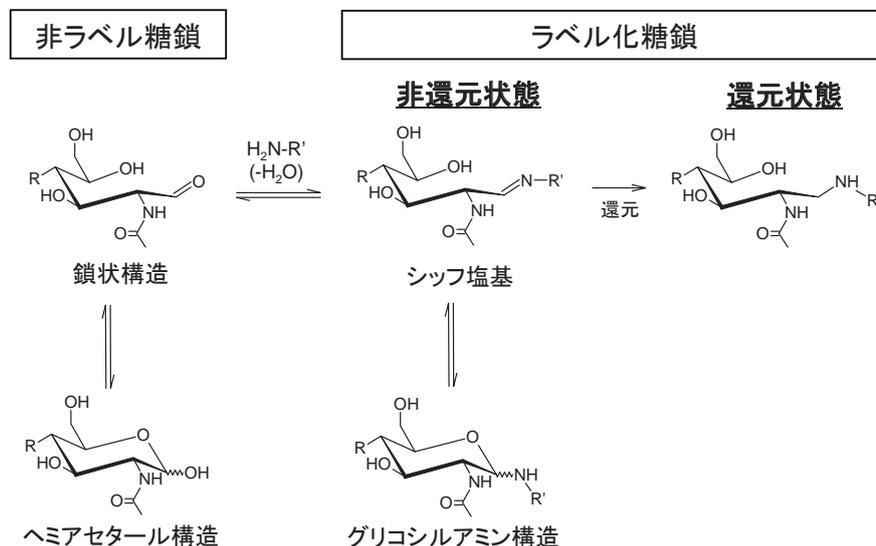


図3 糖鎖の還元末端ラベル化の概要

糖鎖の還元末端のみ図示している。両矢印で示した反応は平衡反応であり、逆反応も伴う。  
片矢印で示した反応は不可逆反応であり、生成物が生じるのみで逆反応は起こらない。

そこで、非ラベルおよびラベル化NA2糖鎖の負イオンMS/MSマススペクトルを、非還元状態と還元状態で比較した(図4)。その結果、非還元状態であればラベル化の種類や有無に関係なく、解析に適する単純な負イオンMS/MSマススペクトルが得られることがわかった。逆に、還元状態であれば3-AQラベル化体であっても複雑なスペクトルパターンを示した。

ラベル化した糖鎖から解析に適する単純な負イオンMS/MSマススペクトルを得るためには、ラベル化後の還元を行わず、非還元のまま測定することが必要であることがわかった。しかし、一般的に非還元ラベル化糖鎖は平衡反応の途上にあるため不安定で、収率が悪く分解しやすい。我々が開発した3-AQベースの液体マトリックスを用いる糖鎖のon-target 3-AQラベル化法では、液体マトリックスの中に糖鎖が存在する限り3-AQラベル化糖鎖は安定で、見かけ上逆反応が起こり分解することはない。また、リン酸付加体として効率よく負イオン化を行うことが可能であり、かつそのMS/MSマススペクトルは単純かつ十分な情報を

含み解析に適する。PAや2-ABなど、3-AQ以外の塩基性化合物をマトリックスや液体マトリックスの原料として用いる系も検討したが、感度やマトリックスとしての使い勝手の面で3-AQベースの液体マトリックスには及ばなかった。3-AQをベースとした液体マトリックスは、負イオンモードを用いた糖鎖解析に対し優れたプラットフォームとなる。

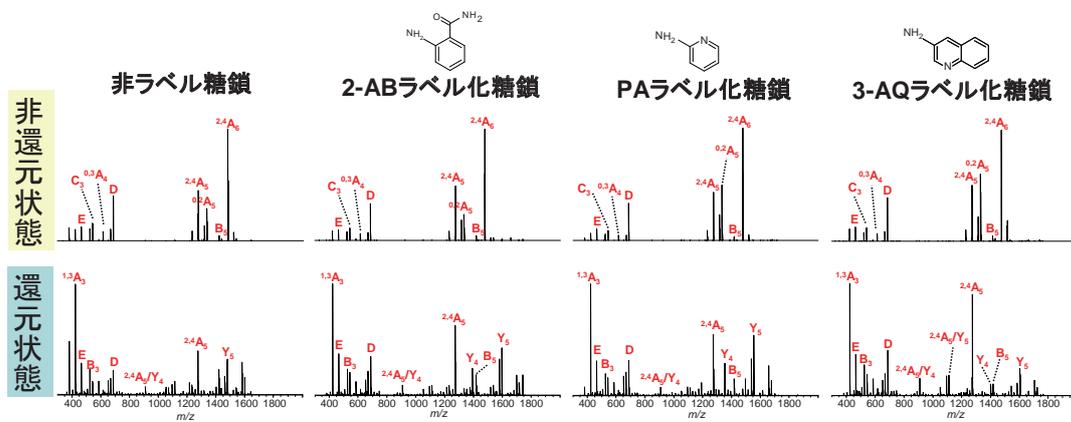


図4 糖鎖の還元／非還元が負イオンフラグメンテーションに与える影響

上部は還元せずに得た負イオンMS/MSマススペクトル、下部は還元を行った後に得た負イオンMS/MSマススペクトルを示す。左から非ラベル、2AB化、PA化、3-AQ化ラベル化NA2糖鎖を示している。スペクトルのアサインは詳しく述べないが、還元の有無によりスペクトルのパターンが異なっていることがわかる。[装置：MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

## 【結論】

N型糖鎖の負イオンフラグメンテーションは、糖鎖還元末端へのラベル化の影響を受けないが、ラベル化の際の還元反応の有無によってフラグメンテーションパターンが異なる。糖鎖の還元末端が還元反応により開環していると、脱水や二次開裂が起き、解析容易な負イオンMS/MSマススペクトルを得ることが出来ない。On-target 3-AQ化は還元反応を必要としないラベル化法なので、非ラベル糖鎖と同じく単純な一次開裂のみによってフラグメントイオンが生じ、解析容易な負イオンMS/MSマススペクトルが得られる。これは、先行文献において報告のある非ラベル糖鎖の負イオンCID構造解析法が、3-AQ化糖鎖にもそのまま適用できることを意味する。On-target 3-AQラベル化糖鎖のフラグメンテーションを明らかにしたことにより、負イオンCIDでの構造解析が容易となり、未知試料への応用が一層進展すると期待される。

## 【成果一覧】

### 論文発表

- (1) Takashi Nishikaze, Kaoru Kaneshiro, Shin-ichirou Kawabata, Koichi Tanaka, "Structural analysis of N-glycans by the glycan-labeling method using 3-aminoquinoline-based liquid matrix in negative-ion MALDI-MS", Anal. Chem., 2012, 84, pp9453-9461.

### 学会発表

- (1) Takashi Nishikaze, Kaoru Kaneshiro, Shin-ichirou Kawabata, Koichi Tanaka, "Negative-ion fragmentation of neutral N-glycans derivatized with 3-aminoquinoline and other non-acidic reagents" 29th International Mass Spectrometry Conference (IMSC), 2012

### 3-3 O-GlcNAc修飾糖ペプチドの新規濃縮法開発と構造解析

#### 【研究目的】

O-GlcNAc修飾はO型糖鎖修飾のひとつであり、GlcNAc単糖がセリンやスレオニン残基に結合する。近年は、MSを用いたO-GlcNAc修飾解析の為に様々な方法論が開発されている。O-GlcNAc修飾率は一般的に低く、O-GlcNAc修飾糖タンパク質を消化しただけでは他のペプチドが大量に混在することとなり、O-GlcNAc修飾糖ペプチドの検出自体が困難である。そこで、O-GlcNAc修飾糖ペプチドのみ選択的に濃縮する手法が開発されてきた[1-3]。しかし、現在提案されている手法は試薬の独自合成が必要となり、簡便とは言いがたい。そこで、市販試薬のみで処理が可能な新規O-GlcNAc修飾糖ペプチド濃縮法の開発を行った。

#### 【研究成果】

##### 方法

確立した新規濃縮法の概要を図1に示す。糖タンパク質消化後、Gal-T1酵素を用いてO-GlcNAc部位にGalNAzと呼ばれるアジド基含有単糖を転移する。さらに、アジド基に対して反応する試薬(3-エチニルベンズアルデヒド)を結合させると、選択的にアジド基部分をアルデヒド基でラベル化することが出来る。最後に、このアルデヒド基でラベルしたO-GlcNAc修飾糖ペプチドをヒドラジド担体で選択的に回収する。

まずは市販O-GlcNAc修飾ペプチド標品を用いて各反応ステップの最適化を行い、確立した反応条件を以ってBSA消化物にスパイクした市販O-GlcNAc修飾糖ペプチド標品の濃縮と、 $\alpha$ -crystallineのトリプシン消化物からのO-GlcNAc修飾糖ペプチドの濃縮を試みた。

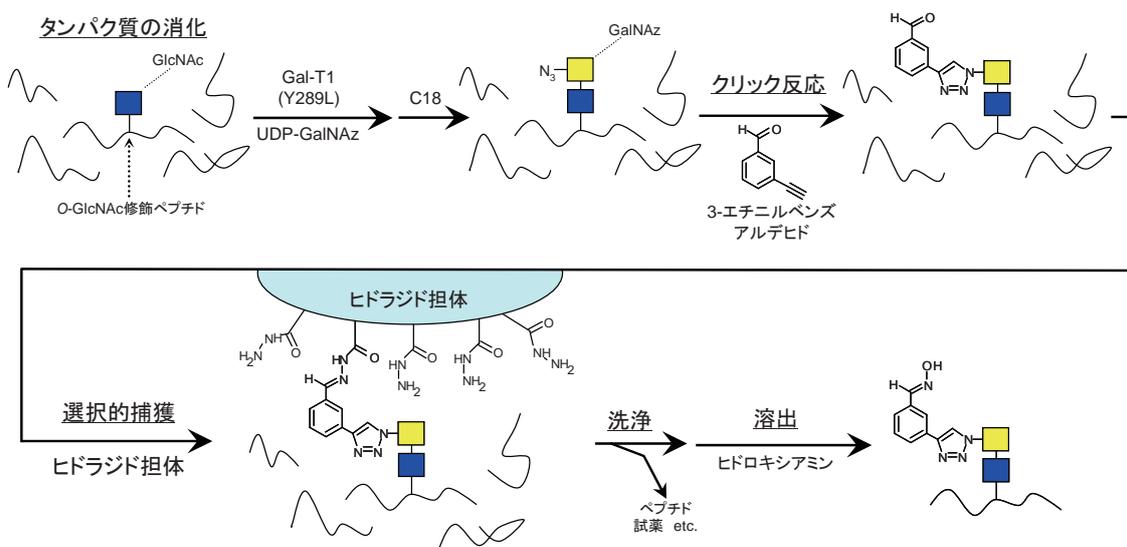


図1 ヒドラジド担体を用いたO-GlcNAc修飾糖ペプチドの新規濃縮法の概要

O-GlcNAc修飾糖タンパク質消化後、Gal-T1 (Y289) を用いてO-GlcNAc部位にGalNAzを転移する。GalNAzはアジド基を有するGalNAcで、このアジド基を足がかりにさらに反応を行うことが出来る。この後、C18担体を用いた脱塩を行い、未反応試薬などを除く。脱塩後GalNAzのアジド基と3-エチニルベンズアルデヒドのエチニル基をクリック反応(ヒュセゲン1,3-環化付加)で特異的に結合させる。これで、もとのO-GlcNAc修飾糖ペプチドはアルデヒド基でラベル化されたことになる。アルデヒド基はヒドラジド基と選択的に結合しヒドラゾン結合を生成するので、ヒドラジド担体にアルデヒド基を介してO-GlcNAc修飾糖ペプチドを結合させ、他のペプチドや試薬を良く洗い流す。最後に、ヒドラゾン結合をヒドロキシアミンで切断し、O-GlcNAc修飾ペプチドを選択的に回収する。実際は、ヒドロキシアミンを除く目的で測定前にC18による脱塩が必要である。

## 結果

### ① 各反応ステップの最適化と標準試料での濃縮確認

はじめに、市販O-GlcNAc修飾糖ペプチド標品を用いて各反応ステップを最適化した。Gal-T1酵素反応後のクリック反応は特異性が高く反応も迅速に進行したが、アルデヒド基の酸化を抑えるために溶媒や銅触媒の濃度を検討する必要があった。これらの検討により、反応効率や反応速度を低下させることなく、アルデヒド基の酸化を数パーセントに抑えることができた。また、ヒドラジド担体からO-GlcNAc修飾糖ペプチドを切り離す際の切断方法や試薬濃度も検討した。

最終的に完成したプロトコルを用いると、10 pmolのBSA消化物にスパイクした100 fmolのO-GlcNAc修飾糖ペプチド標品(モル比にして1/100)を特異的に回収できた(図2a)。濃縮後は、BSA消化物のシグナルが全く観測されておらず、この手法の選択性の高さを示している。同様の手法で、 $\alpha$ -crystallinのトリプシン消化物からO-GlcNAc修飾糖ペプチド5種を選択的に回収できた(図2b)。

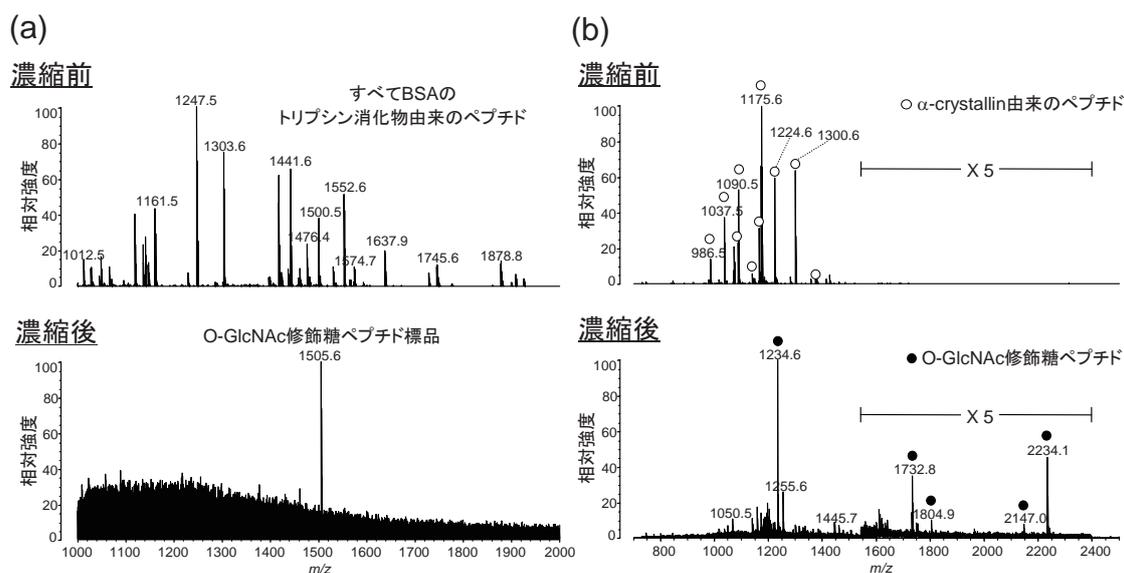


図2 開発した濃縮法を用いたO-GlcNAc修飾糖ペプチドの特異的回収

(a)は10 pmolのBSA消化物にスパイクした100 fmolのO-GlcNAc修飾糖ペプチド標品の濃縮前と濃縮後の負イオンマススペクトルを、(b)は $\alpha$ -crystallinトリプシン消化物の濃縮前と濃縮後の正イオンマススペクトルを示す。それぞれ上が濃縮前、下が濃縮後である。濃縮後、O-GlcNAc修飾糖ペプチドのみが特異的に観測されているのがわかる。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

### ② O-GlcNAc修飾糖ペプチドの構造解析

図2bに示した $\alpha$ -crystallinのトリプシン消化物由来のO-GlcNAc修飾糖ペプチドの構造解析例を図3に示す。回収したO-GlcNAc修飾糖ペプチドはCIDを用いて構造解析が可能だが、O-GlcNAc糖鎖は不安定で、CID条件下では優先的に脱離する(図3a)。結果、糖鎖修飾のないペプチドイオンが生じ、そのMS<sup>3</sup>を取得することでペプチド同定が可能である(図3b)。しかし、そのペプチドが複数のセリン/スレオニン残基を持つ場合、糖鎖がもともとどこに結合していたかの情報は得られない。そこで、不安定な糖鎖そのものをCID条件下で安定な化合物に挿げ替えるBEMAD法( $\beta$ 脱離とマイケル付加により糖鎖部分をジチオトレイトールに挿げ替える手法)を参考に、糖鎖をメルカプトエタノールに挿げ替える手法を試した。そのMS<sup>2</sup>マススペクトルを置換前のMS<sup>3</sup>マススペクトルと比較することで、O-GlcNAc修飾部位を推定することが可能となった。(図3c)。

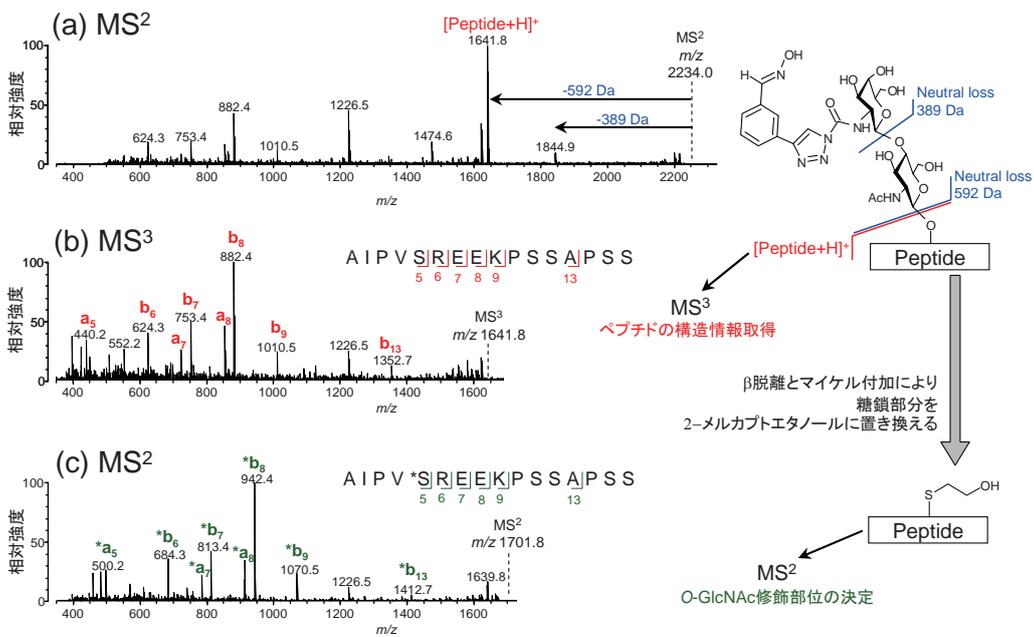


図3  $\alpha$ -Crystallin由来 O-GlcNAc修飾糖ペプチドの構造解析

(a)は $\alpha$ -crystallin由来 O-GlcNAc修飾糖ペプチド( $m/z$  2,234.1)のMS<sup>2</sup>マススペクトル、(b)はそのペプチド部分のシグナルのMS<sup>3</sup>マススペクトル、及び(c)は糖鎖修飾部分を2-メルカプトエタノールで置換したペプチドのMS<sup>2</sup>マススペクトルを示す。(a)では、CIDにより糖鎖部分の脱離したフラグメントが $m/z$  1,641.8に観測され、(b)に示したそのMS<sup>3</sup>マススペクトルからペプチドの配列解析が可能である。(c)と(b)を比較すると、N末端から5番目のセリン残基に2-メルカプトエタノールが挿入されていることが確認でき、この部分がもともとO-GlcNAc修飾を受けていたと推定できる。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

### ③ 構造選択的N型糖ペプチド濃縮への応用

今回開発した手法は、はじめのGal-T1 (Y289) 酵素を用いたGalNAzの転移段階でその濃縮特異性が決まる。Gal-T1 (Y289) はGalNAzなどの人工的に改変した単糖を転移させることが出来るが、O-GlcNAcに対して特異的というわけではなく、非還元末端にGlcNAcが露出している部分に対して特異的である。すなわち、N型糖ペプチドであっても、非還元末端にGlcNAcが存在すればGalNAzが転移されるため、本手法により濃縮が可能である。図4 に例を示す。従来の糖ペプチド濃縮法では全ての糖ペプチドが濃縮されてきているのに対し、本手法は非還元末端にGlcNAcが露出している糖ペプチドのみ濃縮が可能であった。すなわち、構造選択的なN型糖ペプチド濃縮が可能である。O-GlcNAc修飾糖ペプチドのみ濃縮したければ、あらかじめN型糖鎖をPNGaseFで切り出しておけばよい。Gal-T1酵素反応後の脱塩過程で、切り離れたN型糖鎖は取り除ける。

### 【結論】

ヒドラジドとアルデヒドの可逆反応を用いたO-GlcNAc修飾糖ペプチドの新規濃縮法を確立した。反応に用いる試薬類は全て市販されており、特別な試薬の合成などは必要なく簡便である。また、濃縮の選択性も高く、他のペプチドが大量に混在する雑多な試料から、目的糖ペプチドのみを特異的に濃縮し検出することが可能であった。

O-GlcNAc修飾はリン酸修飾と拮抗しており、一例を挙げればアルツハイマー病の進行に関連するタウタンパク質の過剰リン酸化による凝集を防ぐ役割があるとも考えられており、実際の疾病とも関連が深い翻訳後修飾である。今回開発したヒドラジド担体を用いた濃縮法は選択性が高く、特異的なO-GlcNAc修飾糖ペプチド濃縮が可能である。対象以外のペプチドなどはほぼ混じらないので、MALDIのみならずESIを用いた解析にも極めて有効である。

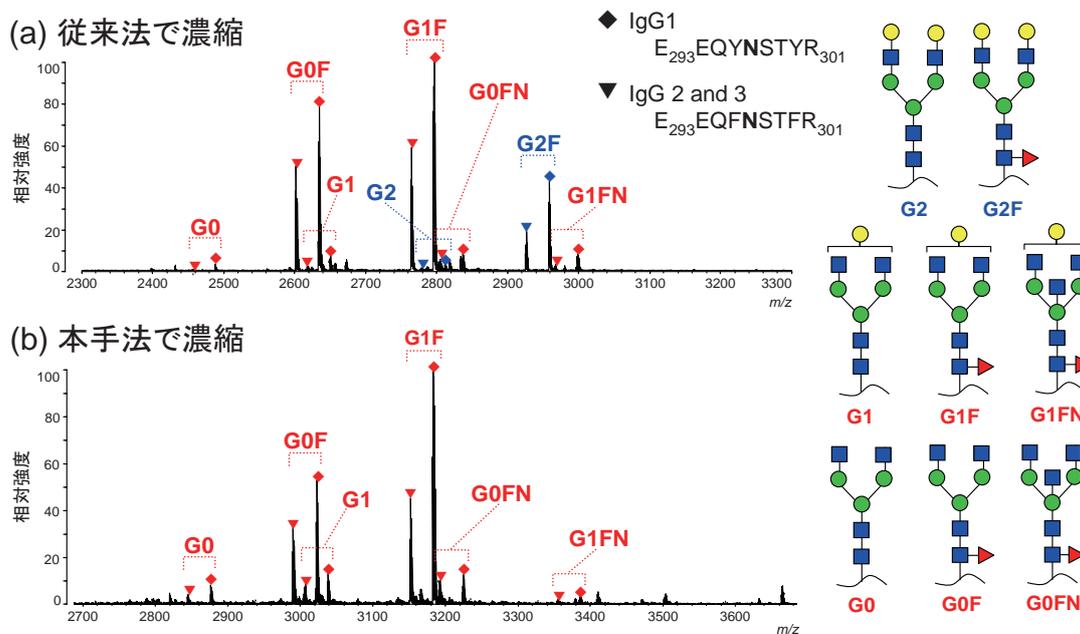


図4 本手法を用いたIgG糖ペプチドの構造選択的濃縮

(a)は従来法で濃縮したIgGのトリプシン消化由来糖ペプチドの正イオンマススペクトルを示し、(b)は今回開発した本手法で濃縮した糖ペプチドの正イオンマススペクトルを示す。従来法では全ての糖ペプチドが濃縮されているのに対し、本手法では非還元末端に露出したGlcNAcを持たないG2やG2F糖ペプチド(スペクトル中に青で表記)は濃縮されない。すなわち、構造選択的な濃縮が可能となる。IgG1にはサブクラス(IgG1-4)があり、トリプシンで消化した場合の糖ペプチドのアミノ酸配列が複数生成する。この場合は、存在量の少ないIgG4以外の糖ペプチドが観測されている。図中に示した糖ペプチドのアミノ酸配列のうち、太字のNは糖鎖付加部位を示す。糖鎖構造は右側に示した。[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

## 【成果一覧】

### 論文発表

- (1) Takashi Nishikaze, Shin-ichirou Kawabata, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka, “Reversible hydrazide chemistry-based enrichment for O-GlcNAc-modified peptides and glycopeptides having non-reducing GlcNAc residues”, *Analyst*, 2013, 138, pp7224-7232.

### 【参考文献】

- [1] Khidekel Nelly, Ficarro Scott B., Peters Eric C., Hsieh-Wilson Linda C., “Exploring the O-GlcNAc proteome: Direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, pp13132–13137.
- [2] Wang Zihao, Udeshi Namrata D., O’Malley Meaghan, Shabanowitz Jeffrey, Hunt Donald F., Hart Gerald W., “Enrichment and site mapping of O-linked N-acetylglucosamine by a combination of chemical/enzymatic tagging, photochemical cleavage, and electron transfer dissociation mass spectrometry”, *Mol. Cell. Proteomics*, 2010, 9, pp153–160.
- [3] Parker Benjamin L., Gupta Pankaj, Cordwell Stuart J., Larsen Martin R., Palmisano Giuseppe. “Purification and identification of O-GlcNAc-modified peptides using phosphate-based alkyne CLICK chemistry in combination with titanium dioxide chromatography and mass spectrometry”, *J. Proteome Res.*, 2011, 10, pp1449–1458.

### 3-4 化学処理を活用したタンパクの構造解析

#### 3-4-1 アミノ基ラベル化によるペプチド構造解析法の予備検討

##### 【研究目的】

MALDI-MS解析におけるペプチドの分析において、定量解析や高感度化を目的としてラベル化剤による化学処理が利用されている。しかし、ペプチドへの修飾がMS/MSにおけるプロダクトイオンの出現パターンに影響することが報告されている。そこで、本実験では標準ペプチドに対して化学処理を行った後にMS/MS解析を行うことで、化学処理の種類におけるMS/MSマススペクトルへ与える影響を調べるための予備検討実験を行った。

##### 【研究成果】

##### 方法

ペプチド鎖に塩基性アミノ酸(リシン、アルギニン、ヒスチジン残基)を含まない市販のペプチドであるDelta sleep-inducing peptide (DSIP, 配列:WAGGDASGE)およびアルギニン残基を含む市販のペプチドであるGlu-1-Fibrinopeptide B (Glu-Fib, 配列:EGVNDNEEGFFSAR)に対して三級アミンを付加するN-Succinimidyl 4-aza-6-(2,6-dimethyl-1-piperidinyl)-5-oxohexanoate (TMT試薬, 商品名:Tandem Mass Tag)、もしくは正電荷を付加するN-Succinimidylloxycarbonylmethyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium (TMPP試薬)を用いて誘導体化を行った。作成した誘導体を精製した後、MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)を用いてMS/MSマススペクトルを取得した。本実験で使用したラベル化剤の反応機構および構造を図1に示す。

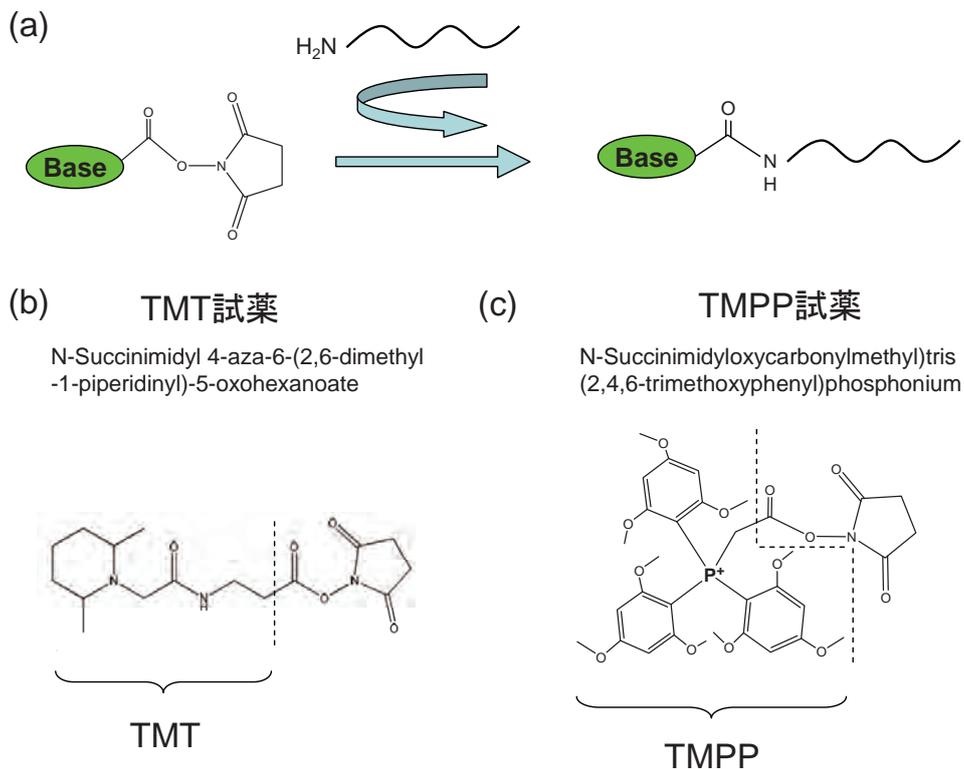


図1 ペプチド鎖アミノ基へのラベル化反応の模式図

(a)アミノ基標識ラベル化剤の反応機構。ペプチドに含まれる全てのアミノ基に対して、N-ヒドロキシスクシニミドの先にラベル構造を保持するラベル化剤を作用させ、ペプチド鎖にTMTやTMPPといった塩基性の構造を付与する。(b)三級アミンを付加するTMT試薬の構造式。(c)正電荷を付与すTMPP試薬の構造式。

## 結果

各誘導体のMS/MSマスペクトルを図2に示す。

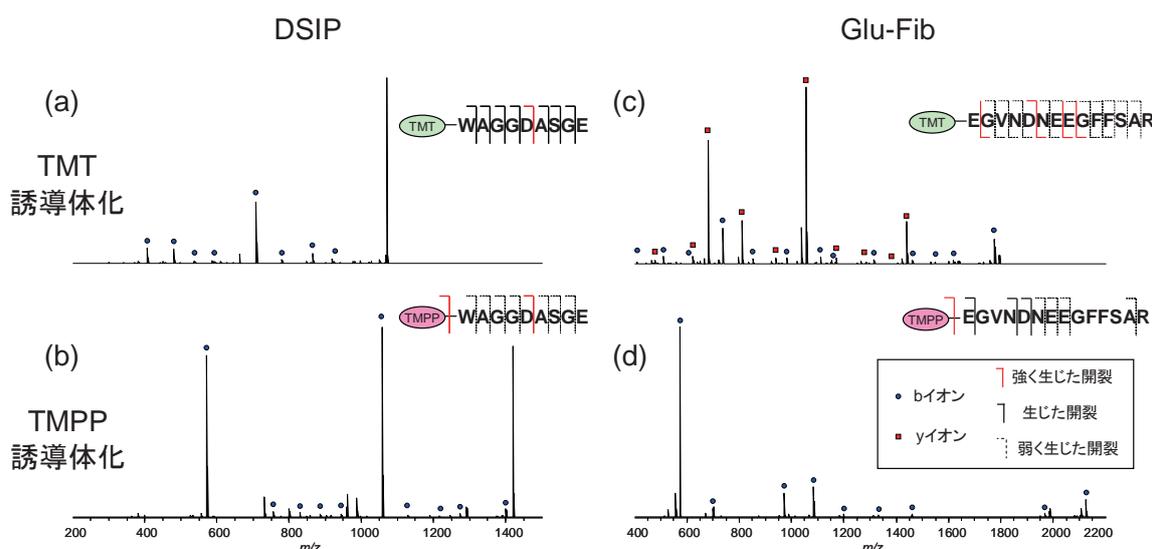


図2 TMT誘導体化もしくはTMPP誘導体化を行ったペプチドのMS/MSマスペクトル

(a)TMT誘導体化したDSIPのMS/MSマスペクトル, (b)TMPP誘導体化したDSIPのMS/MSマスペクトル,  
(c)TMT誘導体化したGlu-FibのMS/MSマスペクトルおよび(d)TMPP誘導体化したGlu-FibのMS/MSマスペクトル[装置: MALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)]

各スペクトルの比較から、以下の知見が得られた。

1. TMT誘導体化では構造由来のプロダクトイオンが出現するが、TMPP誘導体化を行うと構造由来のプロダクトイオンの生成が抑制される(図2a,b)

TMTで誘導体化を行ったDSIPのMS/MSマスペクトルでは、b系列のイオンが多数出現した(図2a)。一方でTMPP試薬を用いて誘導体化を行ったDSIPのMS/MSマスペクトルでは、TMPPが脱離したイオンおよびアスパラギン酸残基のC末端側で開裂したプロダクトイオンが強く検出されたが、他の部位での開裂を示すプロダクトイオンは微弱であり、結果として配列解析は困難であった(図2b)。

2. アルギニン残基が含まれるペプチドでは、構造解析に有用なプロダクトイオンの生成が抑制される(図2a,c)。

TMT試薬で誘導体化したDSIPに対するMS/MS測定の結果、アスパラギン酸残基のC末端側での開裂によるプロダクトイオンが強く検出されたが、他のプロダクトイオンも解析に十分な強度で出現していた(図2a)。しかしTMT試薬で誘導体化を行ったGlu-FibのMS/MS測定においては、誘導体化前と同様にC末端側で切断の生じたプロダクトイオンが強く出現していたが、それ以外のアミノ酸残基のC末端側の開裂により生じたイオンの強度は微弱であった(図2c)。以上の結果から、ペプチド鎖にアルギニン残基が含まれる場合にはアスパラギン酸およびグルタミン酸残基のC末端側での開裂が独占的に進行するため配列解析は困難であることがわかった。

3. TMPP試薬とアルギニン残基が共存すると構造解析に必要なプロダクトイオンがほとんど出現しない(図2b,d)

TMPP誘導体化したDSIPのMS/MSマスペクトルでは、TMPPの脱離したプロダクトイオンとアスパラギン

ン酸のC末端側で切断されたプロダクトイオンが強く出現し、その他のペプチド鎖の開裂に起因するプロダクトイオンは弱いながらも出現していた(図2b)。しかし、TMPPを用いて誘導体化したGlu-FibのMS/MSマススペクトルではTMPPが脱離したプロダクトイオンが強く出現し、アスパラギン酸(D)やそのN末端側のアスパラギン残基(N)、グルタミン酸残基(E)のC末端側で開裂が生じたプロダクトイオンは出現したが、他のペプチド鎖の開裂に起因するプロダクトイオンは得られなかった(図2d)。TMPPとアルギニン残基が共存すると構造解析に必要なプロダクトイオンの生成が抑制されることがわかった。

#### 【結論】

標準的なペプチド化合物に対してTMT試薬またはTMPP試薬で誘導体化を行い、その誘導体のMS/MS解析を行うことで、以下の3つの知見が得られた。

- TMT誘導体化では構造由来のプロダクトイオンが出現するが、TMPP誘導体化を行うと構造由来のプロダクトイオンの生成が抑制される
- アルギニン残基が含まれるペプチドのMS/MSマススペクトルでは構造解析に使用するプロダクトイオンの生成が抑制される
- TMPP試薬とアルギニン残基が共存すると構造解析に必要なプロダクトイオンがほとんど出現しない

以上の知見は、目的試料の定性解析を行う際にマススペクトルを解釈する上で、また化学処理を利用した計測法を構築する上でも重要であると考えられる。

#### 【成果一覧】

学会発表

(1) 谷口謙一, 福山裕子, 伊吹隆, 田中耕一 第59回質量分析総合討論会, 2011年

特許出願

(1) 谷口謙一, 九山浩樹, 田中耕一, 糖ペプチドの質量分析法, 特願2012-097187, 特開2013-224867

(2) 谷口謙一, 田中耕一, 糖ペプチドの糖鎖結合位置決定法, 特願2012-141603, 特開2014-006142

#### 【参考文献】

- [1] Masahiro Miyashita, Yosuke Hanai, Hiroyuki Awane, Toru Yoshikawa Hisashi Miyagawa, "Improving peptide fragmentation by N-terminal derivatization with high proton affinity", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 25, pp1130-1140
- [2] Chungang Gu, George Tsaprailis, Linda Brechi, and Vicki H. Wysocki, "Selective Gas-Phase Cleavage at the Peptide Bond C-Terminal to Aspartic Acid in Fixed-Charge Derivatives of Asp-Containing Peptides", *Anal. Chem.*, 2000, 72, pp5804-5813
- [3] Jun Qin, Brian, T. Chait, "Preferential Fragmentation of Protonated Gas-Phase Peptide Ions Adjacent to Acidic Amino Acid Residues", *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, pp5411-5412
- [4] Anna Pashkova, Hsuan-Shen Chen, Tomas Rejtar, Xin Zang, Roger Giese, Victor Andreev, Eugene Moskovets, and Barry L. Karger, "Coumarin Tags for Analysis of Peptides by MALDI-TOF MS and MS/MS. 2. Alexa Fluor 350 Tag for Increased Peptide and Protein Identification by LC-MALDI-TOF/TOF MS", *Anal. Chem.*, 2005, 77, pp2085-2096

### 3-4-2 アミノ基ラベル化によるカルボキシル基アミド化法の改良

#### 【研究目的】

ペプチド鎖のMS/MS解析においては、酸性アミノ酸残基のC末端側で優先的に開裂が生じることが報告されている[1]。その優先的開裂が生じると他のプロダクトイオンの生成量が低下し、ペプチド配列全体の解析が困難となる。この優先的開裂を抑えるため、アンモニウム塩と脱水縮合剤を用いてカルボキシル基をアミド化する手法が報告されている[2]。しかし、ペプチド鎖にはアミノ基が存在するため、脱水縮合剤を使用すると副反応として分子内のアミノ基とカルボキシル基の脱水縮合による環状化が進行する。環状化したペプチドのMS/MSマススペクトルからは配列を決定するためのプロダクトイオンを得ることができないため、構造解析のためには環状化を防がなければならない。そこで、本研究では誘導体化に伴う脱水縮合による環状化を防ぎながらカルボキシル基のアミド化を行う手法の構築を試みた。その実験スキームを図1に示す。

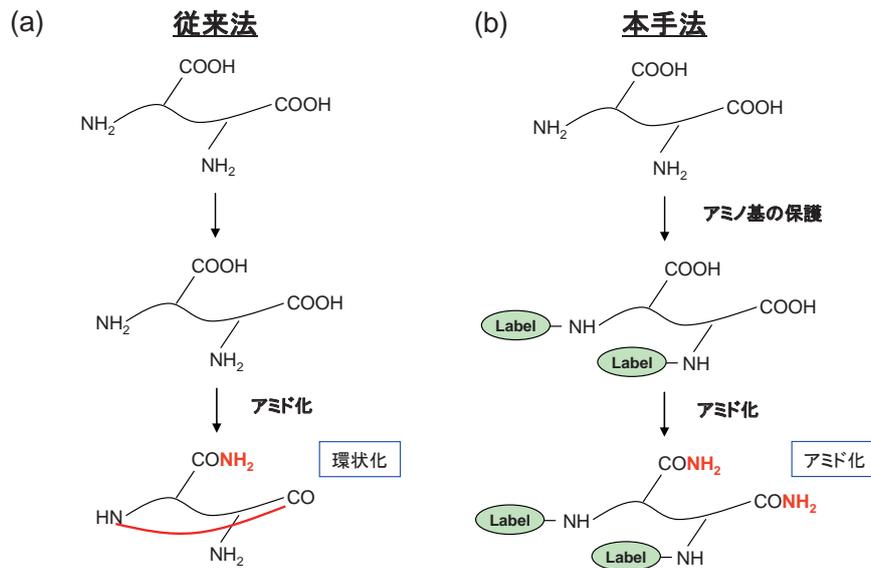


図1 アミノ基保護を組み合わせたカルボキシル基アミド化法の実験スキーム

従来法では脱水縮合剤を用いたアミド化反応の際に、ペプチド鎖中のアミノ基がカルボキシル基と反応して環状化が生じる。一方で本手法では最初にアミノ基をラベル化剤により保護を行った後、脱水縮合剤を用いたアミド化反応を行う。アミノ基の保護工程を加えたことで分子内脱水縮合が抑制され、環状化されていないペプチドのアミド化誘導体を得ることができる。

#### 【研究成果】

##### 方法

標準ペプチドであるGlu-Fibに対してTMT試薬によるアミノ基への誘導体化反応を行った。この反応液の溶媒を除去した後、塩化ナトリウム溶液を添加し、脱水縮合剤であるWSC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) を添加してカルボキシル基へのアミド化反応を実施した。この反応物を脱塩精製した後、DHBをマトリックスとして用いてMALDI-MSあるいはMS/MS解析を実施した[装置: MALDI-QIT-TOFMS (島津製作所) 正イオンモード]。

##### 結果

TMT誘導体化によるアミノ基保護の有無とアミド化の有無、すべての組み合わせのマススペクトルを図2に示す。

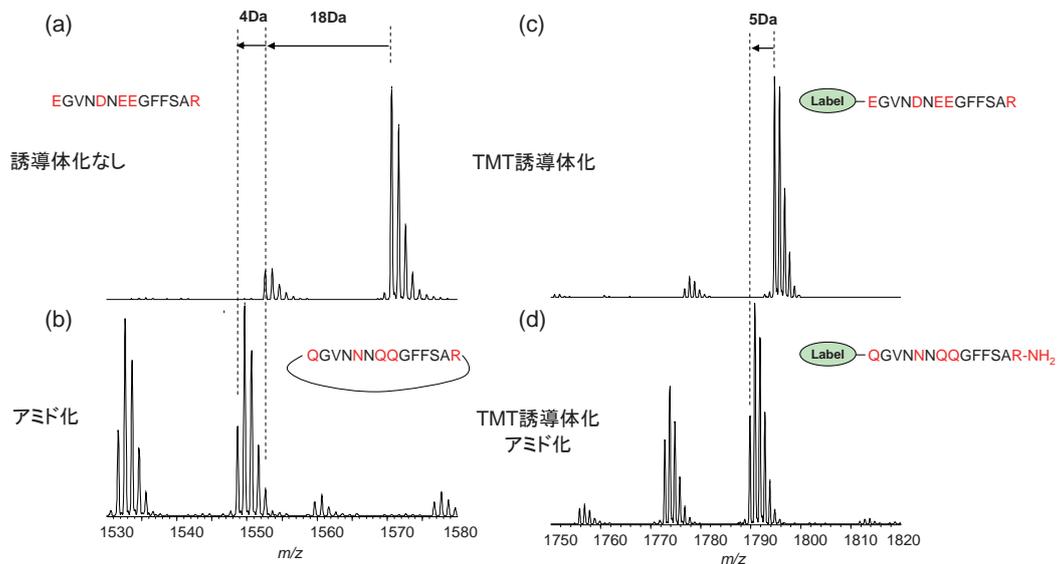


図2 アミノ基保護の有無によるアミド化反応後のMALDIマスペクトル

(a)誘導体化を行っていないGlu-Fibのマスペクトル, (b)アミド化を行ったGlu-Fibのマスペクトル, (c)TMT誘導体化を行ったGlu-Fibのマスペクトルおよび(d)TMT誘導体化とアミド化を行ったGlu-Fibのマスペクトル

アミド化反応により質量は1 Da減少する。アミノ基の修飾を行わないGlu-Fibに対してアミド化反応を行ったところ、アミド化前と比べて22 Da (18 Da+4 Da) 小さい質量のイオンが観測された(図2b)。これは分子内の環状化によって生じる脱水の-18 Daに加えて、環状化に寄与しない4ヶ所のカルボキシル基のアミド化したことを示している。一方でTMTを用いてアミノ基を保護したGlu-Fibに対してアミド化反応を試みたところ、-5 Daのピークが主に出現した(図2d)。これはGlu-Fibに含まれる5ヶ所のカルボキシル基全てがアミド化されたためと考えられる。

次に上記のイオンをプリカーサとしたMS/MSマスペクトルを図3に示す。脱水縮合剤を用いたアミド化反応のみを行った誘導体のMS/MSマスペクトルでは、広い質量電荷比範囲にわたって帰属できない多数のプロダクトイオンが観測された(図3a)。一方でアミノ基を保護してアミド化反応を行った誘導体のMS/MSマスペクトルからは、b系列およびy系列のイオンがほぼ均一に近いピーク強度で多数出現し、構造解析に有用であった(図3b)。

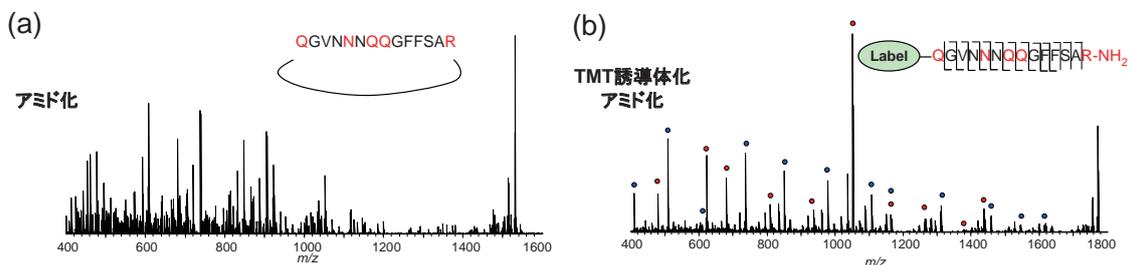


図3 アミド化反応前のTMT誘導体化がGlu-FibのMS/MSマスペクトルに与える影響

(a)アミド化反応のみを行ったGlu-FibのMS/MSマスペクトルおよび(b)TMT誘導体化を行った後にアミド化を行ったGlu-Fibの正イオンMS/MSマスペクトル[装置: MALDI-QIT-TOFMS (島津製作所)]。

## 【結論】

アミノ基を保護した後にアミド化反応を行うことで、環状化を防いで誘導体を得ることができ、その結果均

一な強度でプロダクトイオンを出現させることができた。カルボキシル基のアミド化は、陰イオン交換クロマトグラフィで硫酸化糖ペプチドを単離する際にも使用されているほか[3]、後述する糖鎖結合位置決定法においても必要となるが、その用途でも事前にアミノ基を保護する方法は有効であると考えられる。以上によりアミノ基のラベル化剤による保護工程がカルボキシル基のアミド化反応における環状化を防ぐために有効な手法であることが分かった。

#### 【参考文献】

- [1] Jun Qin, Brian, T. Chait, “Preferential Fragmentation of Protonated Gas-Phase Peptide Ions Adjacent to Acidic Amino Acid Residues”, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, pp5411–5412
- [2] Sadanori Sekiya, Yoshinao Wada, Koichi Tanaka, “Improvement of the MS/MS Fragment Ion Coverage of Acidic Residue-Containing Peptides by Amidation with <sup>15</sup>N-Substituted Amine”, *Anal. Chem.*, 2004, 24, pp5894–5902
- [3] Masaaki Toyoda, Hisashi Narimatsu, and Akihiko Kameyama, “Enrichment Method of Sulfated Glycopeptides by a Sulfate Emerging and Ion Exchange Chromatography”, *Anal. Chem.*, 2009, 81, pp6140–6147

### 3-4-3 アミノ基ラベル化による糖ペプチド構造解析法のための予備検討

#### 【研究目的】

3-4-1においてペプチド鎖へ結合させるラベル化剤の性質に応じてペプチド鎖の開裂に影響が生じることが分かった。しかし糖ペプチドに対してラベル化反応を行った際に開裂工程でどのような影響が生じるかは未だ報告されていない。そこで本実験では糖ペプチドにラベル化修飾を行った後にMS/MS解析を行うことで、ラベル化剤による誘導体化が開裂にどのような影響を与えるか評価するための予備検討実験を行った。

#### 【研究成果】

##### 方法

糖ペプチドへのラベル化反応の概要を図1に示す。ラベル化剤の評価対象としては、市販の生体由来糖ペプチドであるシアリルグリコペプチド (Chicken Egg由来, 配列: KVANKT, NにN型糖鎖が結合) を使用した。シアリルグリコペプチドに対して三級アミン (TMT試薬) もしくは正電荷 (TMPP試薬) を付与するラベル化剤を用いて誘導体化を行った後、誘導体の精製処理を行った。この精製した誘導体に対してDHBをマトリックスとして使用してMALDI-MSおよびMS<sup>n</sup>解析を実施した[装置: MALDI-QIT-TOFMS (島津製作所) 正イオンモード]。

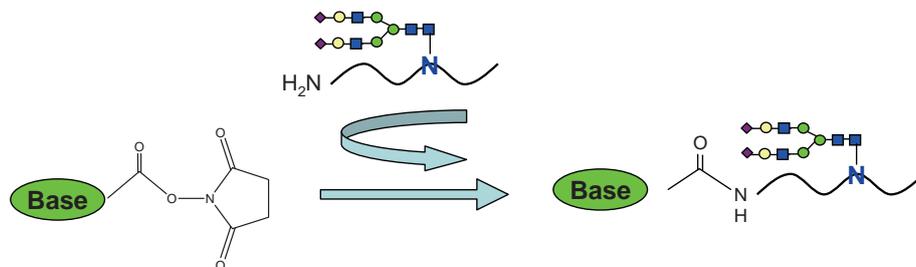


図1 糖ペプチドのペプチド鎖アミノ基へのラベル化反応の概要

ペプチドに含まれる全てのアミノ基に対して、N-ヒドロキシスクシンイミドの先にラベル構造を保持するラベル化剤を作用させ、ペプチド鎖にTMTやTMPPといった塩基性の構造を付与する。

## 結果

TMTおよびTMPPで誘導体化を行ったシアリルグリコペプチドのMS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>マスペクトルを図2に示す。誘導体化を行った糖ペプチドのMS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>マスペクトルを比較することで、以下のような2つの傾向が見られた。

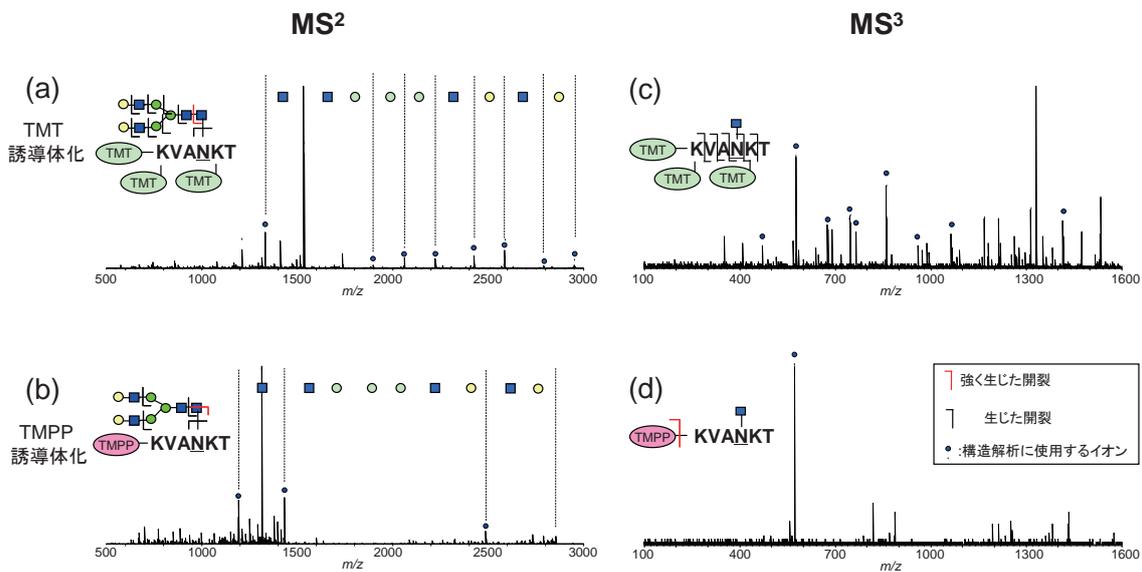


図2 TMT試薬もしくはTMPP試薬で誘導体化したシアリルグリコペプチドのMS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>マスペクトル

(a)TMT誘導体化を行ったシアリルグリコペプチドのMS<sup>2</sup>マスペクトル, (b)TMPP誘導体化を行ったシアリルグリコペプチドのMS<sup>2</sup>マスペクトル, (c)TMT誘導体化を行ったシアリルグリコペプチドのMS<sup>3</sup>マスペクトル及び(d)TMPP誘導体化を行ったシアリルグリコペプチドのMS<sup>3</sup>マスペクトル

1. TMT誘導体化を行った糖ペプチドのMS/MS解析では糖鎖構造由来プロダクトイオンが出現するが、TMPP誘導体化を行った糖ペプチドのMS/MS解析では糖鎖構造由来のプロダクトイオンがほとんど出現しない(図2a,b)。

TMT誘導体化を行ったシアリルグリコペプチドのMS/MSマスペクトルでは、グリコシド結合の開裂により生じるイオンが多数出現しており、糖鎖の組成解析を行うことができた(図2a)。一方でTMPPを用いて誘導体化を行ったシアリルグリコペプチドのMS/MSマスペクトルでは、GlcNAc(■)の末端のグリコシド結合の開裂により出現したプロダクトイオンは微弱ながら観察されたが、ヘキソース(●)の末端のグリコシド結合の開裂で生じるイオンは観察されなかった(図2b)。またTMT誘導体化糖ペプチドのMS/MSマスペクトルではペプチド鎖にGlcNAcが1つ結合したペプチド構造のプロダクトイオンが相対的に強く出現し、MS<sup>3</sup>解析を行うために使用するプリカーサーイオンの識別が容易であったが(図2a)、TMPP誘導体化されたシアリルグリコペプチドのMS/MSマスペクトルではペプチド鎖に結合しているGlcNAcの環開裂により生じるイオンが一番強く出現したため、MS<sup>3</sup>解析を行うためのプリカーサーイオンの識別が困難であった(図2b)。TMT誘導体化とTMPP誘導体化の違いは、MS/MS解析において開裂に必要なプロトンが供給できるかの違いであるため、糖鎖のグリコシド結合由来の開裂を生じさせるためにはプロトンを必要とすることが示唆された。

2. TMT誘導体化した糖ペプチドのMS<sup>3</sup>解析ではペプチド鎖の開裂由来のプロダクトイオンが出現するが、TMPP誘導体化するとペプチド鎖の開裂由来のプロダクトイオンが出現しない(図2c,d)。

TMT誘導体化を行ったシアリルグリコペプチドのMS<sup>3</sup>マスペクトルでは、ペプチド鎖の開裂により生じる

イオンが多数出現しており、ペプチド配列を解析するためのプロダクトイオンを取得することができた(図2c)。一方でTMPP誘導体化を行ったシアリルグリコペプチドのMS<sup>3</sup>マススペクトルでは、TMPPの脱離したイオンが強く出現したがペプチド鎖の開裂に起因するプロダクトイオンは検出されなかった(図2d)。このTMPP誘導体化シアリルグリコペプチドのMS<sup>3</sup>マススペクトルからはペプチド鎖の配列決定を行うためのプロダクトイオンを取得することができなかった。

#### 【結論】

糖ペプチドのMS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>解析において糖鎖構造およびペプチド鎖の配列情報を解析するためには、TMT誘導体化は適切であるがTMPP誘導体化は不適切であることが分かった。この知見は糖ペプチドのMS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>解析を行う上で重要と考えられる。

#### 【成果一覧】

##### 学会発表

(1) 谷口謙一, 福山裕子, 伊吹隆, 田中耕一 第59回質量分析総合討論会, 2011年

##### 特許出願

(1) 谷口謙一, 九山浩樹, 田中耕一, 糖ペプチドの質量分析法, 特願2012-097187, 特開2013-224867

(2) 谷口謙一, 田中耕一, 糖ペプチドの糖鎖結合位置決定法, 特願2012-141603, 特開2014-006142

#### 【参考文献】

[1] 福山裕子, 和田芳直, 山崎雄三, 尾島典行, 山田真希, 田中耕一 “MALDI-QIT-TOFMS を用いた糖タンパク質の新規構造解析手法:リボヌクレアゼB への適用”, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 2004, 52, pp328-338.

### 3-4-4 アミノ基ラベル化とアルギニン残基除去による糖ペプチドフラグメンテーションの改良

#### 【研究目的】

MALDI法におけるペプチドのMS/MS解析では、ペプチド鎖にアルギニン残基が含まれるとペプチド鎖の開裂が抑制され解析が困難となることが報告されている。同様の傾向は糖ペプチドでも確認されており、アルギニン残基がペプチド鎖に含まれると糖鎖の開裂由来のプロダクトイオンの出現が抑制される(図1a)。そのため、糖ペプチド解析においてはアルギニン残基に対応した誘導体化法が求められている。そこで、本研究ではペプチド鎖のアルギニン残基の除去とTMT誘導体化による塩基の補填により、糖ペプチドのMS<sup>n</sup>解析に最適な誘導体化法の構築を試みた。

#### 【研究成果】

##### 方法

アルギニン残基がもたらす課題の解決手段として、アミノ基ラベル化とカルボキシペプチダーゼBを用いたアルギニン残基除去法を構築した(図1b)。まず、糖タンパク質であるHuman  $\alpha_1$ -acid glycoproteinをトリプシンで消化した後にサイズ排除クロマトグラフィーにより糖ペプチドを精製する。次に、精製した糖ペプチドに対しTMT試薬によるアミノ基の誘導体化とカルボキシペプチダーゼBによるアルギニン残基の除去を行い、逆相クロマトグラフィーを用いてペプチド配列の違いで糖ペプチドの分画を行った後、MS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>解析を行った。

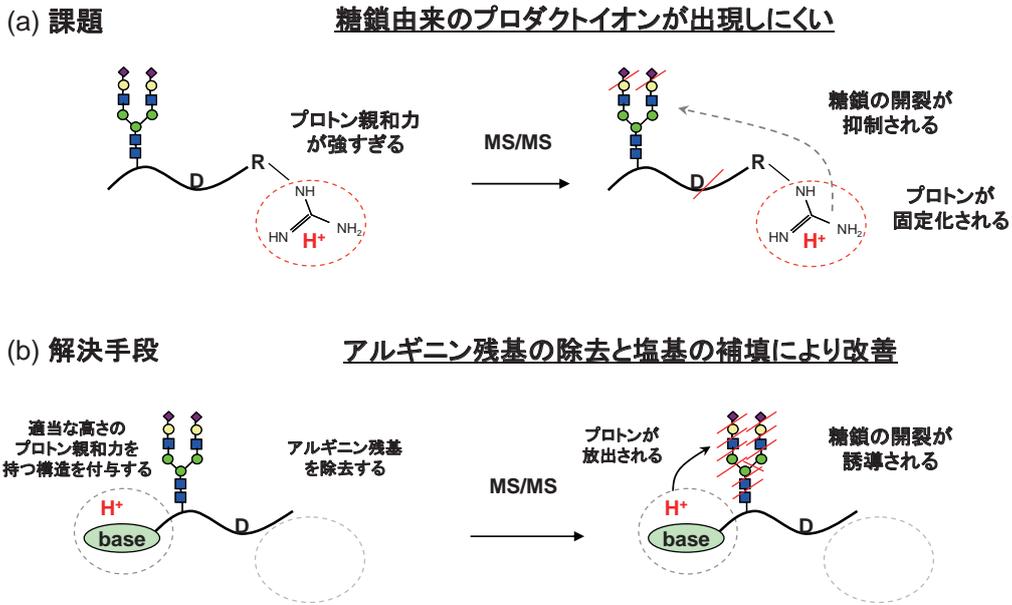


図1 糖ペプチド解析においてアルギニン残基がもたらす課題およびその解決手段

(a) 糖ペプチドのペプチド鎖にアルギニン残基が含まれる場合の課題。糖ペプチド中にアルギニン残基が含まれると、プロトンがグアニジノ基に固定されてしまい、糖鎖の開裂に必要なプロトンを提供することができず、プロダクトイオンが生じにくい問題がある。(b) 糖ペプチド中のアルギニン残基による課題に対する解決手段。課題の解決法としてカルボキシペプチダーゼBを用いてC末端のアルギニン残基を除去し、さらにアミノ基にラベル化剤を用いて塩基を付加する。この工程により糖鎖部分に開裂に必要なプロトンを提供できるようになり、糖鎖構造のプロダクトイオンが出現するようになる。

## 結果

Human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein 1の5ヶ所の糖鎖結合位置のうちの1つであるT4-1(87-101) についてのMS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>マスペクトルを図2に示す。

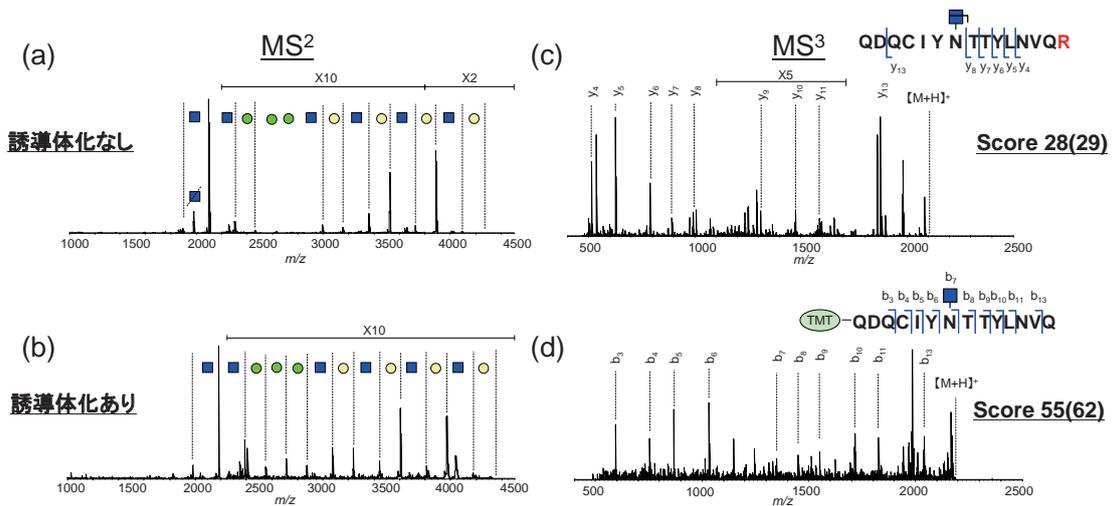


図2 アルギニン残基除去を行ったHuman  $\alpha_1$ -acid glycoprotein 1 由来糖ペプチドT4-1(87-101) のMS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>マスペクトル

(a)誘導体化を行っていないT4-1のMS<sup>2</sup>マスペクトル, (b)誘導体化を行ったT4-1のMS<sup>2</sup>マスペクトル, (c)誘導体化を行っていないT4-1のMS<sup>3</sup>マスペクトルおよび(d)誘導体化を行ったT4-1のMS<sup>3</sup>マスペクトル。()内の数字は、ニュートラルロスイオンの除去処理を行った後のMS/MSイオンサーチのMascot Score。

アルギニン残基が含まれている誘導体化前の糖ペプチドでは、グリコシド結合の開裂に由来するプロダクトイオンがあまり出現せず、糖鎖構造由来のプロダクトイオンがあまり取得できなかった(図2a)。MS<sup>3</sup>マススペクトルにおいても酸性アミノ酸残基のC末端側の開裂であるy13のイオンが強く出現し、他のy系列のプロダクトイオンの強度が低い傾向が見られた(図2c)。一方で、誘導体化を行った糖ペプチドの場合は、MS<sup>2</sup>マススペクトルにおいてグリコシド結合の開裂に起因するプロダクトイオンが全て観測された(図2b)。さらにMS<sup>3</sup>マススペクトルにおいてはb系列のイオンがどのイオンも同じような強度で出現するようになった(図2d)。このMS<sup>3</sup>マススペクトルを用いてMascot検索エンジンを用いたMS/MSイオンサーチを行った結果、誘導体化前よりScoreが27上昇した。さらにMS<sup>3</sup>マススペクトルに対しては、ニュートラルロスにより生じたプロダクトイオンをピークリストから除去する処理を行ったところ、Mascot Scoreがさらに7向上した。

次に、Human  $\alpha_1$ -acid glycoproteinのトリプシン消化物によって生じる糖ペプチドの中で、アルギニン残基を含む5種類の糖ペプチドについて、誘導体化の前後においてMascot Scoreの算出を行った結果を図3に示す。

アルギニン残基を含む5種の糖ペプチドに対し、誘導体化とピーク処理を行うことでMascot Scoreが14から34上昇し、いずれの糖ペプチドでも誘導体化前と比較して優位な結果が得られた。

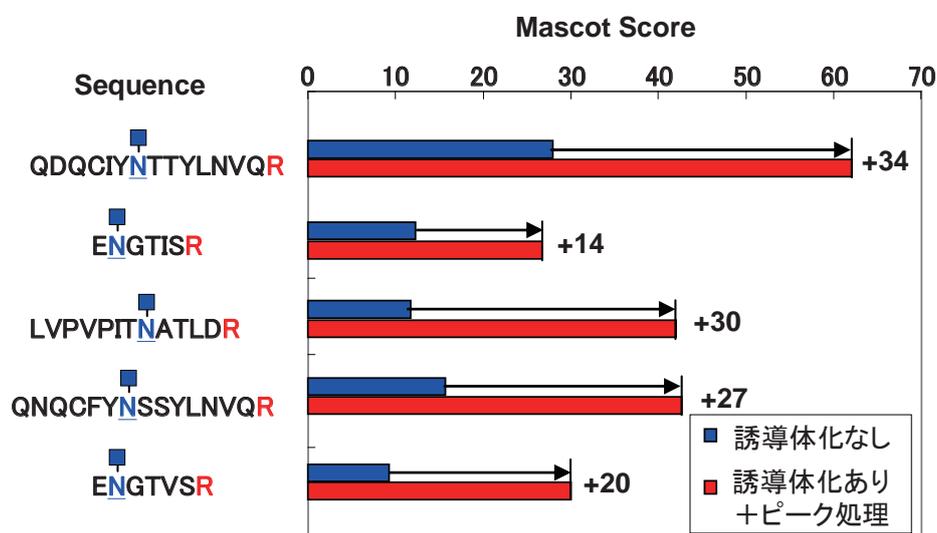


図3 アルギニン残基除去を行ったHuman  $\alpha_1$ -acid glycoprotein由来糖ペプチド全てのMS<sup>3</sup>マススペクトルを用いたMS/MSイオンサーチ結果とMascot Scoreの変化

Human  $\alpha_1$ -acid glycoproteinのTrypsin由来糖ペプチドの中でアルギニン残基を持つ5種類の糖ペプチドに対する誘導体化とピーク処理のMascot Scoreへの影響。Human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein 1と2の混合物に対してTrypsin消化を行った後、サイズ排除クロマトグラフィによる糖ペプチド精製を行った。この糖ペプチドに対して誘導体化を行い、この誘導体化糖ペプチドの混合物を逆相クロマトグラフィを用いてペプチド配列ごとに分画精製を行った後、MALDI-QIT-TOFMS (島津製作所) を用いてMS<sup>3</sup>スペクトルを取得し、Mass++でニュートラルロスイオンの除去処理を行った後、ピークリストを出力しMascotを用いたMS/MSイオンサーチを実施した。

## 【結論】

トリプシン消化物由来の糖ペプチドの解析においてTMT試薬によるアミノ基の誘導体化とアルギニン残基の除去、ニュートラルロスイオンの除去処理がMS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>解析において有効なアプローチであることが分かった。

## 【成果一覧】

### 論文発表

- (1) Kenichi Taniguchi, Hiroki Kuyama, Shigeki Kajihara, and Koichi Tanaka, "MALDI mass spectrometry-based sequence analysis of arginine-containing glycopeptides: improved fragmentation of glycan and peptide chains by modifying arginine residue", *J. Mass Spectrom.* 2013, 48, pp951-960.

### 学会発表

- (1) 谷口謙一, 九山浩樹, 梶原茂樹, 田中耕一, 第61回質量分析総合討論会, 2013年

### 特許出願

- (1) 谷口謙一, 九山浩樹, 田中耕一, 糖ペプチドの質量分析法, 特願2012-097187, 特開2013-224867
- (2) 村瀬雅樹, 関谷禎規, 梶原茂樹, 谷口謙一, 九山浩樹, ペプチド構造解析方法及び装置, 特願2012-266980
- (3) 谷口謙一, 九山浩樹, 田中耕一, ペプチドの解析法, 特願2013-093106

## 【参考文献】

- [1] Jun Qin, Brian, T. Chait, "Preferential Fragmentation of Protonated Gas-Phase Peptide Ions Adjacent to Acidic Amino Acid Residues", *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, pp 5411–5412
- [2] Weibin Chen, Peter J. Lee, Henry Shion, Nicholas Ellor, John C. Gebler, "Improving de Novo Sequencing of Peptides Using a Charged Tag and C-Terminal Digestion", *Anal. Chem.*, 2007, 79, pp1583–1590

### 3-4-5 アミノ基ラベル化とアルギニン残基修飾による糖ペプチドフラグメンテーションの改良

#### 【研究目的】

3-4-4において、糖ペプチドにアルギニン残基が含まれる場合、カルボキシペプチダーゼBによるアルギニン残基の除去とTMT誘導体化により開裂が促進されることを報告した。しかしカルボキシペプチダーゼBはC末端のアルギニン残基しか除去することができないため、トリプシンやArg-C消化によって生じた糖ペプチド以外には適用することができない。一方で糖ペプチドの解析のために他の消化酵素を使用する事例も多数報告されている。そこで本実験ではアルギニン残基をシトルリン残基変換酵素であるペプチジルアルギニンデイミナーゼを用いてシトルリン残基化することでC末端以外のアルギニン残基を修飾し、さらにラベル化により塩基を補填することでMS/MS解析での開裂を促進する手法の開発を試みた(図1)。

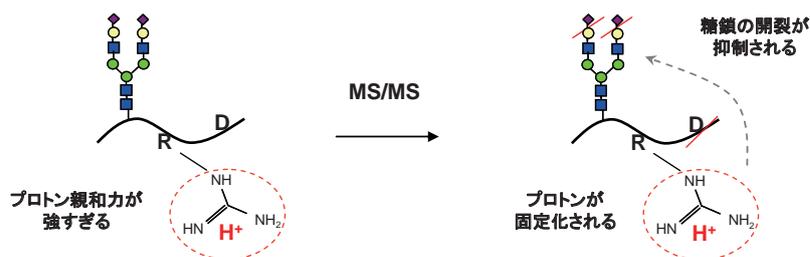
#### 【研究成果】

##### 方法

ペプチド鎖のC末端以外に存在するアルギニン残基の課題に対する方策であるペプチジルアルギニンデイミナーゼを用いたアルギニン残基修飾法を実施した。糖タンパク質であるHuman  $\alpha_1$ -acid glycoprotein 1 に対してGlu-Cで消化した後にサイズ排除クロマトグラフィにより糖ペプチドを精製し、TMT試薬によるアミノ基の誘導体化とペプチジルアルギニンデイミナーゼの一種であるPeptidyl Arginine Deiminase 4 (PAD4) によるアルギニン残基のシトルリン残基化を行い、逆相クロマトグラフィを用いてペプチド配列の違いで分画処理を行った後、MS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>解析を行った。Human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein 1の5ヶ所の糖鎖結合位置のうちの1つについてMS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>マススペクトルを図2に示す。

(a) 課題

糖鎖由来のプロダクトイオンが出現しにくい



(b) 解決手段

アルギニン残基の修飾と塩基の補填により改善

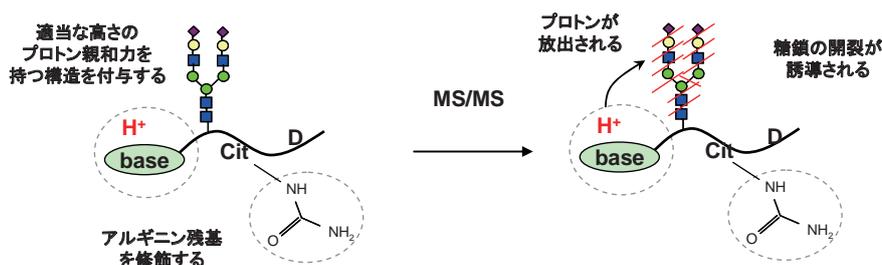


図1 糖ペプチド解析においてアルギニン残基がもたらす課題およびその解決手段

(a) 糖ペプチドのペプチド鎖にアルギニン残基が含まれる場合の課題。糖ペプチド中にアルギニン残基が含まれると、プロトンがグアニジノ基に固定されてしまい、糖鎖の開裂に必要なプロトンを提供することができず、プロダクトイオンが生じにくい。(b) 糖ペプチド中のアルギニン残基に起因する課題に対する解決手段。課題の解決法としてペプチジルアルギニンデヒミナーゼを用いてペプチド鎖のアルギニン残基をシトルリン残基に変換し、さらにアミノ基にラベル化剤を用いて塩基を付加する。この工程により糖鎖部分の開裂に必要なプロトンを提供できるようになり、糖鎖構造由来のプロダクトイオンが出現するようになる。MALDI-QIT-TOFMSを用いてMS<sup>3</sup>マススペクトルを取得し、Mass++でニュートラルロスイオンの除去処理を行った後、ピークリストを出力しMascotを用いたMS/MSイオンサーチを実施した。

誘導体化を行っていない糖ペプチドG5-1のMS<sup>2</sup>マススペクトルでは糖鎖構造由来のプロダクトイオンの種類が少なかった(図2a)。またMS<sup>3</sup>マススペクトルでもGlcNAcの環開裂によって生じたイオンが強く生じ、ペプチド鎖の開裂により生じたプロダクトイオンは微弱な強度でしか出現しなかった(図2a)。一方で誘導体化を行ったG5-1では、MS<sup>2</sup>マススペクトルにおいて糖鎖構造を反映するプロダクトイオンが全て観測され、さらにMS<sup>3</sup>解析に使用するプリカーサーイオンであるペプチド+GlcNAcのイオンが最も強いイオン強度で出現した(図2b)。またMS<sup>3</sup>マススペクトルでもGlcNAcの環開裂に由来するプロダクトイオンの出現が抑制され、ペプチド由来のプロダクトイオンの出現数は増加した(図2d)。この誘導体化のMS<sup>3</sup>マススペクトルを用いたMascot Scoreの評価を行ったところ、修飾後のMascot ScoreがScore 28となり、高い信頼性で同定できることが確認された。次にMass++の機能を用いてMS<sup>3</sup>マススペクトルのピークリストから、43 Daのニュートラルロスイオンを消去し、再度MS/MSイオンサーチを行ったところ、Mascot ScoreがScore 28からScore 37まで増加することが確認された(図2d)。さらに43 Daと203 Daのニュートラルロスイオンを除去した後にMS/MSイオンサーチを行ったところ、Score 37からScore 43までさらに向上することが確認され、誘導体化前よりも高い同定スコアを得ることができた(図2d)。

【結論】

アルギニン残基をペプチド鎖の中央部に有する糖ペプチドに対してアミノ基のTMT誘導体化とアルギニン残基のシトルリン残基化、およびソフトウェアによるニュートラルロスイオンの除去により、MS<sup>2</sup>解析における糖鎖構造の開裂の促進およびMS<sup>3</sup>解析におけるアミノ酸配列解析の改善効果が確認された。

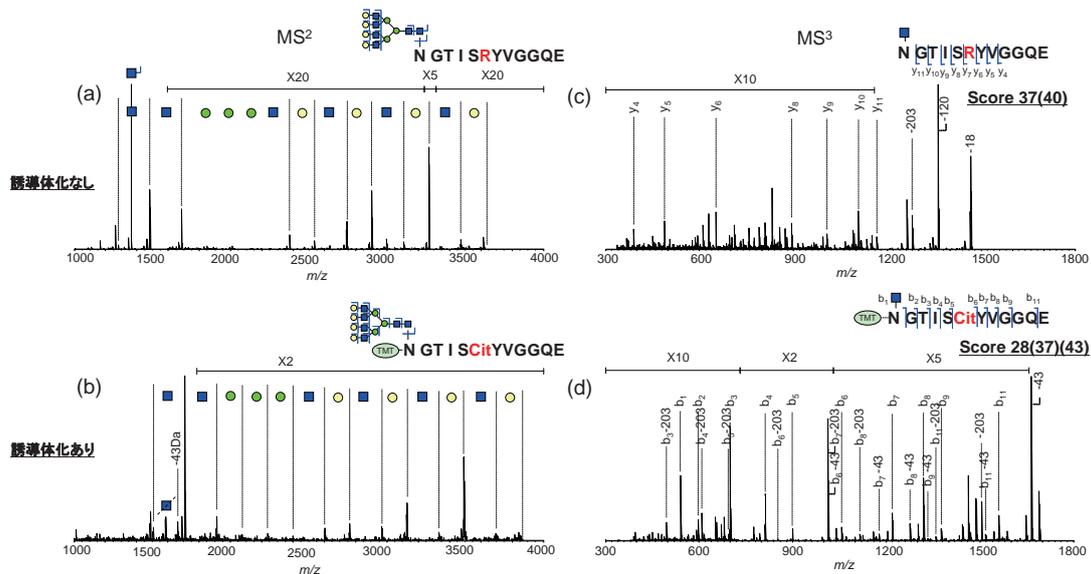


図2 アルギニン残基除去を行ったHuman  $\alpha_1$ -acid glycoprotein 1由来糖ペプチドG5-1(103-114)のMS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>マススペクトル

Human  $\alpha_1$ -acid glycoproteinのGlu-C由来糖ペプチドG5-1(103-114)に対するTMT誘導体化とアルギニン残基修飾のMS<sup>2</sup>およびMS<sup>3</sup>マススペクトルへの影響。(a)誘導体化を行っていないG5-1のMS<sup>2</sup>マススペクトル, (b)誘導体化を行ったG5-1のMS<sup>2</sup>マススペクトル, (c)誘導体化を行っていないG5-1のMS<sup>3</sup>マススペクトルおよび(d)誘導体化を行ったG5-1のMS<sup>3</sup>マススペクトル [装置: MALDI-QIT-TOFMS (島津製作所) 正イオンモード]。()内の数字は、ニュートラルロスイオンの除去処理を行った後のMS/MSイオンサーチのMascot Score。

## 【成果一覧】

### 論文発表

- (1) Kenichi Taniguchi, Hiroki Kuyama, Shigeki Kajihara and Koichi Tanaka, "MALDI mass spectrometry-based sequence analysis of arginine-containing glycopeptides: improved fragmentation of glycan and peptide chains by modifying arginine residue", *J. Mass Spectrom.*, 2013, 48, 951-960

### 学会発表

- (1) 谷口謙一, 九山浩樹, 梶原茂樹, 田中耕一, 第61回質量分析総合討論会, 2013年

### 特許出願

- (1) 谷口謙一, 九山浩樹, 田中耕一, 糖ペプチドの質量分析法, 特願2012-097187, 特開2013-224867
- (2) 村瀬雅樹, 関谷禎規, 梶原茂樹, 谷口謙一, 九山浩樹, ペプチド構造解析方法及び装置, 特願2012-266980
- (3) 谷口謙一, 九山浩樹, 田中耕一, ペプチドの解析法, 特願2013-093106

## 【参考文献】

- [1] Jun Qin, Brian, T. Chait, "Preferential Fragmentation of Protonated Gas-Phase Peptide Ions Adjacent to Acidic Amino Acid Residues", *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, pp 5411–5412
- [2] Gang Hao, Danchen Wang, Jane Gu, Qiuying Shen, Steven S. Gross, and Yanming Wang, "Neutral Loss of Isocyanic Acid in Peptide CID Spectra: A Novel Diagnostic Marker for Mass Spectrometric Identification of Protein Citrullination", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, 20, pp723-727

### 3-4-6 カルボキシル基修飾とN型糖鎖除去による糖鎖結合位置解析法の改良

#### 【研究目的】

N型糖鎖の結合位置はアスパラギン残基に結合することが知られており、ペプチドN-グリコナーゼ (PNGase F) で切り出した後の糖鎖結合位置はアスパラギン酸に変換されることが報告されている。この変換を利用して、従来技術では同定されたタンパク質においてアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置き換わった位置をMS/MSイオンサーチにより識別しN型糖鎖結合位置の決定を行っている。しかし従来法ではアスパラギン残基の脱アミド化によって生じたアスパラギン酸とN型糖鎖結合位置とを区別すること

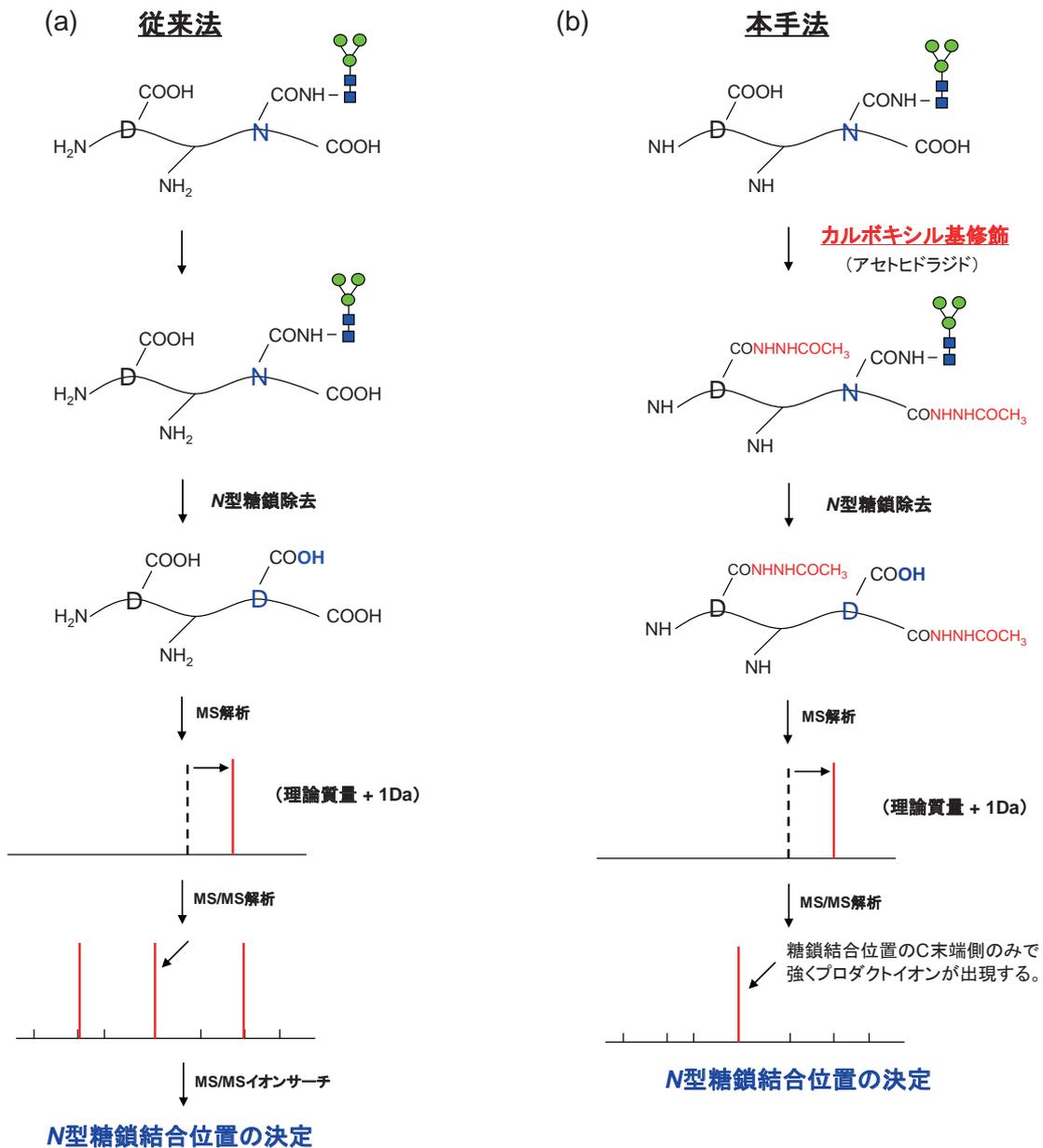


図1 カルボキシル基修飾を用いたN型糖鎖結合位置解析法の実験スキーム

(a) 従来法によるN型糖鎖結合位置の決定法。糖ペプチドのN型糖鎖をPNGase Fで切り出した後、MS/MS解析を行う。その後にMS/MSイオンサーチを行うことでアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換された場所を見つけ出し、糖鎖結合位置を決定する。(b) 本発明手法を用いたN型糖鎖結合位置解析法の実験スキーム。糖ペプチドに対してアセトヒドРАЗドを用いてペプチド鎖のカルボキシル基を修飾した後、PNGase Fを用いてN型糖鎖の除去を行う。このペプチドに対してMS/MS解析を行うと、糖鎖結合位置のC末端側で強くプロダクトイオンが出現する。このプロダクトイオンを診断用イオンとして使用し、糖鎖結合位置を決定する。

ができず、誤同定が生じる可能性が示唆される。この課題に対応するために、 $H_2^{18}O$ 中でPNGase F処理を行うことでN型糖鎖結合位置のアスパラギン残基のみ $^{18}O$ で修飾する手法も報告されているが、安定同位体を使用するため反応条件が煩雑となり実施のための障壁が高い。そこで本実験ではカルボキシル基修飾とMS/MS解析におけるペプチド鎖のアスパラギン酸のC末端側での優先的切断を利用して、安定同位体標識を行わずにN型糖鎖結合位置を決定する手法の開発を試みた。

## 【研究成果】

### 方法

本手法ではまずペプチド鎖の酸性アミノ酸残基を全てアセトヒドライドで修飾した後、PNGase Fにより糖鎖を切り出すことによりN型糖鎖の結合しているアスパラギン残基からアスパラギン酸残基に変換する。このペプチドに対してMS/MS解析を行い、アスパラギン酸残基に変換されたN型糖鎖結合位置のC末端側における優先的切断に起因するプロダクトイオンを指標として糖鎖結合位置の決定を行う。本手法の概要を図1に示す。

### 結果

本手法を用いてFetuinのトリプシン消化物由来の糖ペプチドに対して糖鎖結合位置解析を試みた。その結果、本手法の前処理を行うことでN型糖鎖の結合位置のC末端側での開裂に起因する診断用イオンが強く出現する傾向が見られた(図2)。

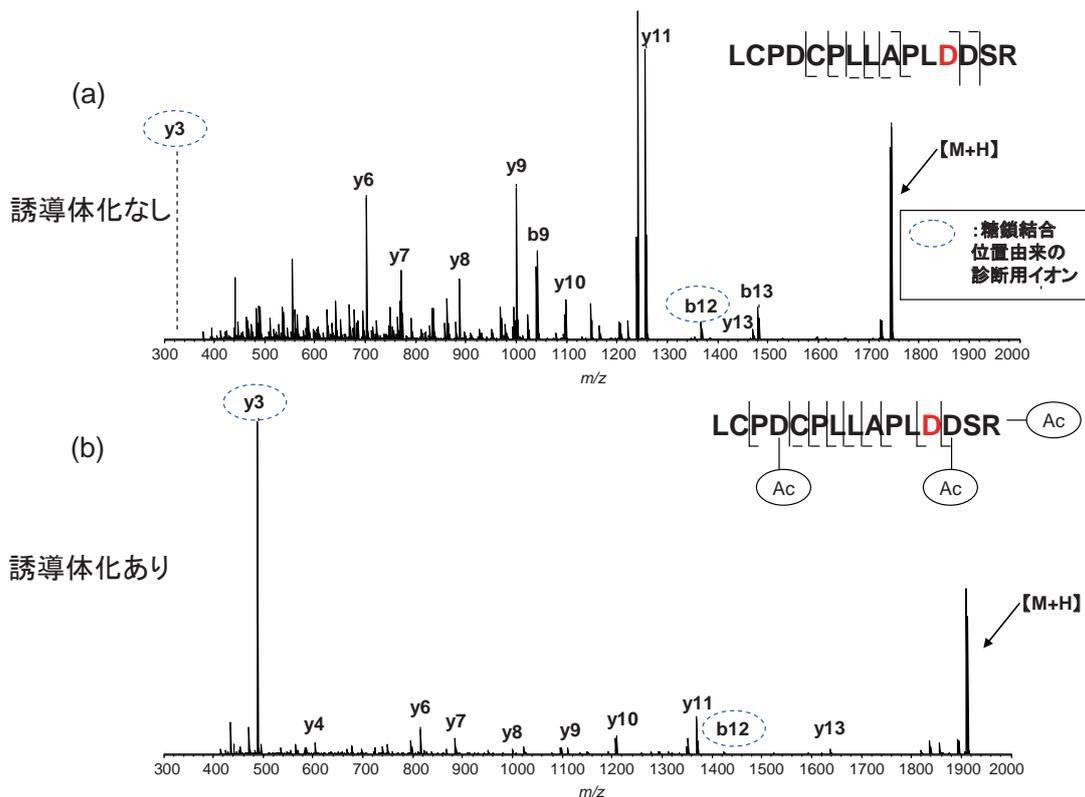


図2 Bovine Fetuinのトリプシン由来糖ペプチドに従来法および本手法を実施したMS/MSマススペクトル

(a) 誘導体化を行わずにPNGase FによりN型糖鎖を除去したBovine Fetuin (145-159)のMS/MSマススペクトルおよび(b) 誘導体化を行った後にPNGase FによりN型糖鎖を除去したBovine Fetuin (145-159)のMS/MSマススペクトル[装置: MALDI-QIT-TOFMS (島津製作所) 正イオンモード]

アセトヒドラジドでカルボキシル基を修飾せずに糖鎖を切り出しMS/MS解析を行うと、ペプチド鎖のアスパラギン酸残基のC末端側の切断に起因するy11イオンが強く出現し、逆にほかのプロダクトイオンの強度は弱く出現した(図2a)。糖鎖結合位置に起因する診断用イオンはy3およびb12のイオンであるが、y3イオンはイオントラップのlow-mass cut offよりも小さい質量となるためMS/MSマススペクトルでは検出されていなかった。もう一つのb12のイオンは他のy系列のイオンと同等以下の強度でしか出現しておらず、糖鎖結合位置と識別することは困難であった。一方でアセトヒドラジドを用いてカルボキシル基を修飾した後にPNGase FでN型糖鎖を除去した誘導体のMS/MSマススペクトルからは、目論見どおり糖鎖結合位置の診断用イオンであるy3イオンが相対的に顕著に強く出現し、逆にアセトヒドラジドで修飾しない場合は強く出現していたy11のプロダクトイオンは微弱にしか出現していなかった(図2b)。このマススペクトルからは、糖鎖結合位置を決定するためのイオンを容易に識別することができると考えられる。

#### 【結論】

カルボキシル基を修飾した後にN型糖鎖を切り出してからMS/MS解析を行うことで、N型糖鎖の結合位置が容易に識別することができた。本手法はデータベース検索に加えてプロダクトイオンのピーク強度比の情報から糖鎖識別位置の情報を得ることができることから、従来法より正確にN型糖鎖の結合位置を同定することが可能であると考えられる。また分子量の大きなペプチドでも結合位置のC末端側での優先的な切断が生じることから、従来法ではMS/MSイオンサーチで同定ができずに見落とされていた高質量のペプチド鎖に対しても糖鎖結合位置の決定を行うことができると期待される。

#### 【成果一覧】

##### 特許出願

(1) 谷口謙一, 田中耕一, 糖ペプチドの糖鎖結合位置決定法, 特開 2014-006142, 特開2014-006142

#### 【参考文献】

- [1] Jia Zhao, Yan-Hui Liu, Paul Reichert, Stefan Pflanz, Birendra Pramanik, "Glycosylation analysis of interleukin-23 receptor: elucidation of glycosylation sites and characterization of attached glycan structures", *J. Mass Spectrom.*, 2010, 45, pp1416-1425
- [2] Hiroyuki Kaji, Jun-ichi Kamiie, Hirotaka Kawakami, Kazuki Kido, Yoshio Yamauchi, Takashi Shinkawa, Masato Taoka, Nobuhiro Takahashi, Toshiaki Isobe, "Proteomics Reveals N-Linked Glycoprotein Diversity in *Caenorhabditis elegans* and Suggests an Atypical Translocation Mechanism for Integral Membrane Proteins", *Mol. Cell. Proteomics*, 2007, 6, pp2100-2109
- [3] Jun Qin, Brian, T. Chait, "Preferential Fragmentation of Protonated Gas-Phase Peptide Ions Adjacent to Acidic Amino Acid Residues", *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, pp 5411-5412
- [4] Sadanori Sekiya, Yoshinao Wada, Koichi Tanaka, "Improvement of the MS/MS Fragment Ion Coverage of Acidic Residue-Containing Peptides by Amidation with <sup>15</sup>N-Substituted Amine", *Anal. Chem.*, 2004, 24, pp5894-5902
- [5] Masaaki Toyoda, Hisashi Narimatsu, and Akihiko Kameyama, "Enrichment Method of Sulfated Glycopeptides by a Sulfate Emerging and Ion Exchange Chromatography", *Anal. Chem.*, 2009, 81, pp6140-6147

### 3-5 化学処理を活用したタンパクのC末端/N末端の構造解析

#### 3-5-1 $\alpha$ -カルボキシル基選択的誘導体化とGluC消化を利用したタンパク質C末端アミノ酸配列解析法 (TMPP-GluC-(AspN)-トシルヒドラジン法) の開発

##### 【研究目的】

タンパク質の機能解析において、その一次構造の決定は基本となる重要事項である。現在よく利用されているタンパク質同定法としてペプチドマスフィンガープリント(PMF)法(図1a)があるが、これはタンパク質の酵素消化物をMS分析し、得られた結果とデータベース内の*in-silico*で得られたタンパク質の理論断片値とを照合し同定する方法である。タンパク質のデータベースは主にゲノムに基づいて構築されたものであるため、末端のプロセッシングや修飾を受け実際に生体内で機能している成熟タンパク質のアミノ酸配列と一致しないことがしばしばある。したがってタンパク質のNおよびC末端部分のアミノ酸配列を明確にすることこそが本来のタンパク質の同定といえる(図1b)。

翻訳後修飾の一つであるタンパク質C末端プロセッシングはその輸送、分解、高分子の複合体形成など、細胞機能を決定する重要な役割を果たしており、その重要性は広く認識されている。それにも関わらず、MSを用いたタンパク質C末端解析法はN末端に比べるとはるかに少なく、標準的な方法は未だに確立されていない。したがって、より効率的で実用的なタンパク質C末端解析法の開発が求められている。以前、LysC消化とTMPP-Ac-OSuによる $\alpha$ -アミノ基の誘導体化[1,2]、そしてアミノ基と反応する

-フェニレンジイソ

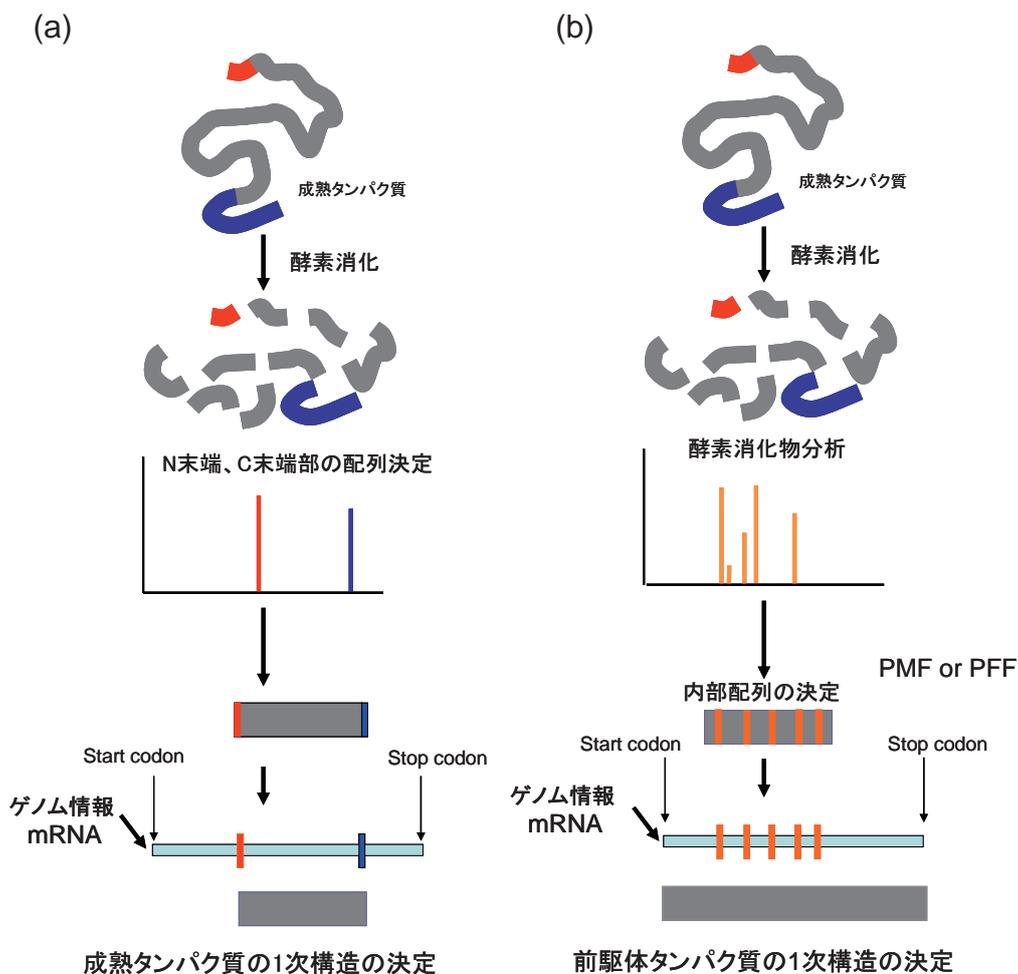


図1 質量分析を用いたタンパク質の同定

- (a) 従来法では末端部位の配列構造が必ずしも明らかになるわけではない。
- (b) 成熟タンパク質は翻訳後修飾やプロセッシングを受けているものが多いため、N末端部位やC末端部位を決定することで全長の同定を行う必要がある。

チオシアネート(DITC)-樹脂とを組み合わせたC末端アミノ酸配列解析法 (LysC-TMPP-DITC法) が開発された[3]。(3-5-3参照) この手法はC末端ペプチドの単離法とその配列解析法として非常に優れた手法であるが、タンパク質のC末端アミノ酸残基がリシンの場合には利用することができない。そこで次に、この部分を補う方法の一つとして、タンパク質のC末端 $\alpha$ -カルボキシル基のTMPP-プロピルアミン (TMPP-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>)による選択的誘導体化を用いた手法が開発された[4]。この手法では、C末端ペプチドのみ電荷を持つTMPP基で修飾されているため、強いイオン強度で検出され、他のペプチドと区別することが可能となる。また、単離のステップが含まれず時間が短縮され、用いる消化酵素の制限がないという利点がある。しかし、C末端以外のペプチドがイオン化しやすい場合、C末端ペプチドのピークが埋もれてしまい検出できないことがある。この問題を解決するため、さらなる改良(C末端ペプチドの単離処理の追加)を試みた。

## 【研究成果】

### 方法 (概要)

本手法の概要を図2に示す。今回、カルボキシル基の有無に着目した。図2aのTMPP-GluC-トシルヒドラジン法は、まずタンパク質の $\alpha$ -カルボキシル基をTMPP-プロピルアミンによりアミド化した後GluCで切断す

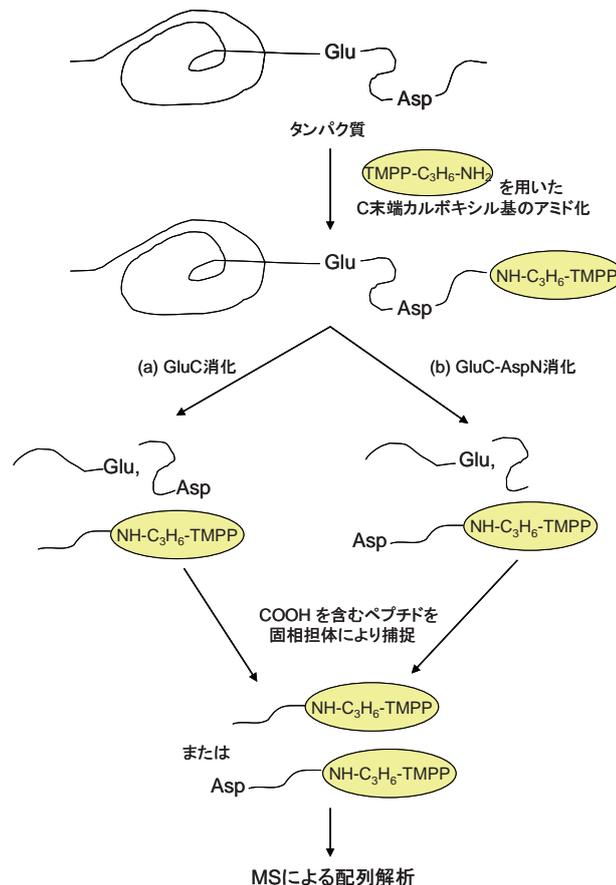


図2 本手法 (TMPP-GluC-(AspN)-トシルヒドラジン法) の概要

まずタンパク質を還元・アルキル化後、ギ酸・無水酢酸・ペンタフルオロフェノールによりC末端 $\alpha$ -カルボキシル基を活性化エステルに変換し、TMPP-プロピルアミン添加により選択的誘導体化を行う。引き続き(a) GluC消化を行うとカルボキシル基を含むC末端ペプチド以外のペプチドと、カルボキシル基を含まないC末端ペプチドが生じる。この消化溶液とN-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)、1 mM HClとをトシルヒドラジン-ガラスに加えて加熱すると、C末端ペプチド以外のペプチドはトシルヒドラジン-ガラスに捕捉されるので、抽出溶液からはC末端ペプチドのみ得られる。(b) GluC消化の後さらにAspN消化を行うと、たとえGluC消化の際にアスパラギン酸の部分での切断が不完全な場合においてもC末端ペプチドの単離が可能となる。

る。すると、C末端ペプチドはカルボキシル基を含まず、C末端ペプチド以外のペプチドはカルボキシル基を含む状態となる。このGluC消化溶液を縮合剤存在下でトシルヒドラジン-ガラスと反応させると、C末端ペプチド以外のペプチドに含まれるカルボキシル基がトシルヒドラジン-ガラスに捕捉されるため、上清からはC末端ペプチドのみ得ることができる。図2bのTMPP-GluC-AspN-トシルヒドラジン法は、アスパラギン酸の部分でGluCによる切断が不完全な場合でも、GluC消化の後AspN消化を行うことでC末端ペプチドの単離が可能となる手法である。

#### 方法（図2 経路(a) TMPP-GluC-トシルヒドラジン法）

モデルタンパク質とモデルペプチド3種類（calmodulin、superoxide dismutase [Mn]、galanin）について本手法を試した。得られたC末端ペプチドのイオン化には、MALDI用マトリックスとしてMDPNAを添加したCHCAを使用した[5]。

#### 結果（図2 経路(a) TMPP-GluC-トシルヒドラジン法）

タンパク質・ペプチド3種類（calmodulin、superoxide dismutase [Mn]、galanin）について得られたC末端ペプチドのマススペクトルとPSDマススペクトルを図3に示す。

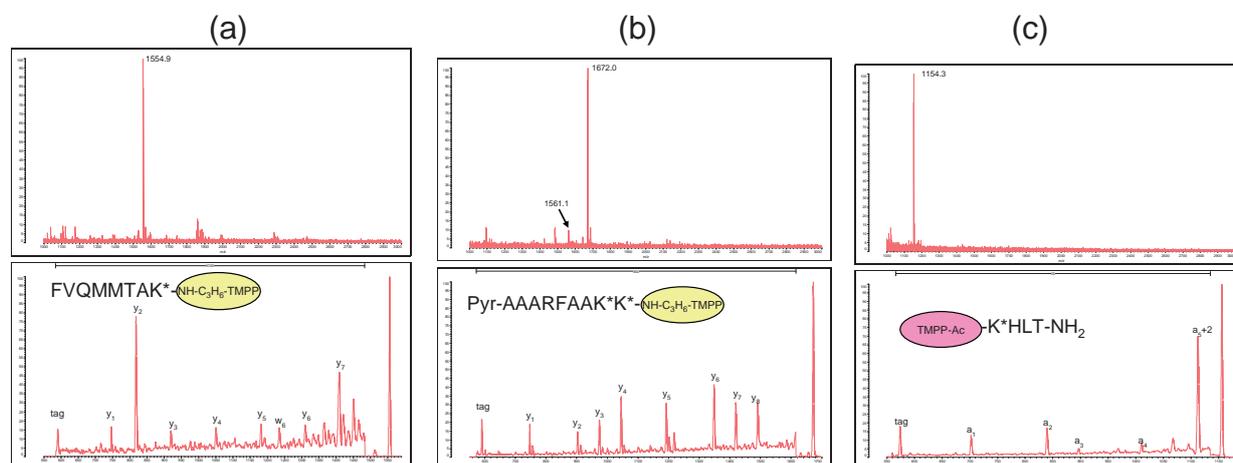


図3 GluC-トシルヒドラジン法を用いたモデルタンパク質・ペプチドのC末端ペプチド単離とその構造解析

(a)はcalmodulin、(b)はsuperoxide dismutase [Mn]、(c)はgalaninを用いた結果を示す。それぞれ上段はC末端ペプチドのマススペクトル、下段はPSDマススペクトルである。K\* はホルミル化リシン残基、Pyrはピログルタミン酸残基を示す。

Calmodulinでは理論値に相当するC末端断片 ( $m/z$  1,554.9) が検出された(図3a上段)。α-カルボキシル基をTMPP-プロピルアミンで修飾したTMPP誘導体のPSDマススペクトルではyタイプイオンが優先的に検出されやすいため、ピーク間の差がアミノ酸残基に相当し配列解析が容易となる。これを踏まえて解析を行うと $m/z$  1,554.9はcalmodulinのC末端ペプチド部分FVQMMTAK\*-(NH-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-TMPP (K\*はε-ホルミル化リシン残基を示す)であることが確認できた(図3a下段)。Superoxide dismutase [Mn]については、予想されたC末端ペプチド断片のピークAAARFAAK\*K\*-(NH-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-TMPP ( $m/z$  1,561.1) は小さな強度のピークとして検出され、 $m/z$  1,672.0のピークが非常に大きな強度で検出された(図3b上段)。PSD解析の結果から、 $m/z$  1,672.0は酵素による切断が完全に進まなかったC末端ペプチドピークEAAARFAAK\*K\*-(NH-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-TMPPのN末端残基グルタミン酸が分子内縮合によりピログルタミン酸になったものPyr-AAARFAAK\*K\*-(NH-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-TMPPであるとわかった(図3b下段)。トシルヒドラジン-ガラスを用いてC末端ペプチドを単離する際にEDCを加えてpH 4.0以下、50°Cの状態加熱したため分子内縮合が進

んで生じたと考えられる。Galaninに関してはC末端カルボキシル基がアミドであるので、TMPP-プロピルアミド化することはできない。そこで、GluC消化後にN末端 $\alpha$ -アミノ基をTMPP-Ac-OSuで誘導体化してから単離を行った。マスペクトルには、予想される理論値に相当するピーク ( $m/z$  1,154.3) が検出された(図3c上段)。 $\alpha$ -アミノ基をTMPP-Acで修飾したTMPP誘導体のPSDマスペクトルはaタイプイオンが優先的に検出されやすい傾向があり、解析を行った結果、 $m/z$  1,154.3のピークはgalanin のC末端ペプチドTMPP-Ac-K\*HLT-NH<sub>2</sub>であることが確認できた(図3c下段)。

#### 方法(図2 経路(b) TMPP-GluC-AspN-トシルヒドラジン法)

GluC消化を行う際にバッファーとして酢酸アンモニウム(pH 4.0)または重炭酸アンモニウム(pH 7.8)を用いるとグルタミン酸のカルボキシル基側を切断するが、リン酸バッファー(pH 7.8)を用いるとグルタミン酸およびアスパラギン酸のカルボキシル基側を切断することが知られている(ただし、アスパラギン酸のカルボキシル基側の加水分解速度はグルタミン酸のカルボキシル基側よりも遅い)。今回の実験ではリン酸バッファーを用いたが、cytochrome cのGluC消化溶液のマスペクトルにおいて、目的とするC末端ペプチド断片ピークLIAYLK\*QATAK\*-NH-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-TMPPは検出されず、アスパラギン酸のカルボキシル基側での切断が不完全なピークRADLIAYLK\*QATAK\*-NH-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-TMPP が検出された(データ省略)。この消化溶液を用いてもC末端ペプチド内にアスパラギン酸が含まれているためトシルヒドラジン-ガラスに捕捉されてしまい単離することはできない。そこで、superoxide dismutase [Mn] の単離の際にN末端のグルタミン酸がピログルタミン酸の形になった状態で単離されたこと(図3b)に注目し、N末端にアスパラギン酸が位置するようにさらにAspNで消化を行ってからトシルヒドラジン-ガラスで処理することにした。triosephosphate isomeraseについても同様にGluC消化を行った後さらにAspN消化を行った。得られたC末端ペプチドをイオン化の際は、MALDI用マトリックスとしてMDPNAを添加したCHCAを使用した[5]。

#### 結果(図2 経路(b) TMPP-GluC-AspN-トシルヒドラジン法)

タンパク質2種類(cytochrome c、triosephosphate isomerase)について行った結果を図4に示す。

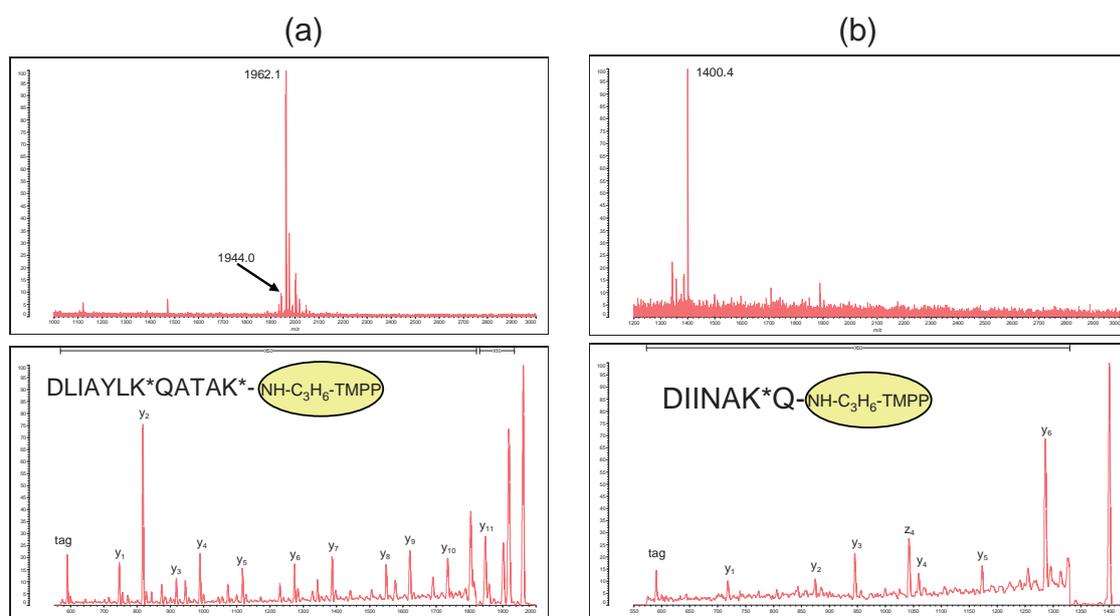


図4 TMPP-GluC-AspN-トシルヒドラジン法を用いたモデルタンパク質のC末端ペプチド単離とその構造解析

(a)はcytochrome c、(b)はtriosephosphate isomeraseを用いた結果を示す。それぞれ上段はC末端ペプチドのマスペクトル、下段はPSDマスペクトルである。K\* はホルミル化リシン残基を示す。

Cytochrome cについてはC末端ペプチドのピークDLIAYLK\*QATAK\*-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-TMPP (*m/z* 1,962.1) を単離することができた(図4a上段)。構造はPSDによって確認した(図4a下段)。ペプチド断片のN末端にアスパラギン酸残基があるにも関わらず単離が可能となったのは、トシルヒドラジン-ガラスを用いてC末端ペプチドを単離する際のpH 4.0以下の条件下で、アスパラギン酸のα-アミノ基と側鎖のカルボキシル基が分子内で「塩」を形成し、トシルヒドラジン-ガラスと反応しなかったためであると考えられる(図5)。Trioisophosphate isomeraseについても同様にC末端ペプチドDIINAK\*Q-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-TMPP (*m/z* 1,400.4) が検出され(図4b上段)、そのPSDマススペクトルから構造を決定することができた(図4b下段)。

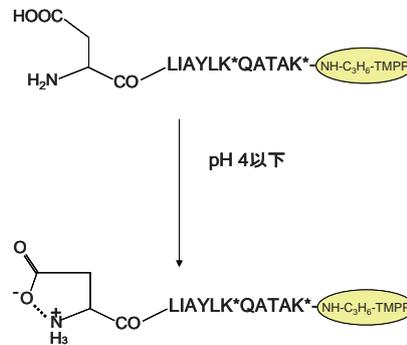


図5 N末端アスパラギン酸残基のα-アミノ基と側鎖カルボキシル基の分子内結合形成

pH 4.0以下の条件下ではN末端アスパラギン酸のα-アミノ基と側鎖カルボキシル基とが分子内で「塩」を形成すると考えられる。

## 【結論】

以上、まずタンパク質のC末端カルボキシル基をTMPP-プロピルアミンで修飾し、続いてGluC消化、トシルヒドラジン-ガラス処理を行うとC末端ペプチド断片のみカルボキシル基を含まないため単離が可能となった。GluC消化が上手く進まず、アスパラギン酸残基がC末端ペプチド断片に存在する場合は上手く単離することができない。この場合はGluC消化の後さらにAspN消化を行い、C末端ペプチド断片のN末端にアスパラギン酸残基が存在する構造にすると、アスパラギン酸残基が分子内イオン結合により環状構造をとるため、トシルヒドラジン-ガラスと反応することなく単離することができた。

## 【成果一覧】

### 論文発表

- (1) Chihiro Nakajima, Hiroki Kuyama, Koichi Tanaka, "Mass spectrometry-based sequencing of protein C-terminal peptide using α-carboxyl group-specific derivatization and COOH capturing", *Anal. Biochem.* 2012, 428, pp167-172

### 学会発表

- (1) 中島ちひろ、丸山浩樹、田中耕一、第19回国際質量分析会議、2012年

### 特許出願

- (1) 丸山浩樹、中島ちひろ、タンパク質のC末端ペプチドを選択的に回収する方法およびそれを用いたタンパク質のC末端ペプチドのアミノ酸配列決定法、特願2011-274692、特開2013-124242

## 【参考文献】

- [1] Zhi-Heng Huang, Jiang Wu, Kenneth D. W. Roth, Ying Yang, Douglas A. Gage, and J. Throck Watson, "A picomole-scale method for charge derivatization of peptides for sequence analysis by mass spectrometry", *Anal. Chem.* 1997, 69, pp137-144
- [2] Zhi-Heng Huang, Tunli Shen, Jiang Wu, Douglas A. Gage, J. Throck Watson, "Protein sequencing by matrix-assisted laser desorption ionization–postsorce decay–mass spectrometry analysis of the N-Tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphine-acetylated tryptic digests", *Anal. Biochem.* 1999, 268, pp305-317
- [3] Hiroki Kuyama, Keisuke Shima, Kazuhiro Sonomura, Minoru Yamaguchi, Eiji Ando, Osamu Nishimura, Susumu Tsunasawa, "A simple and successful C-terminal sequencing analysis of proteins by mass spectrometry", *Proteomics* 2008, 8, pp1539–1550.
- [4] Chihiro Nakajima, Hiroki Kuyama, Takashi Nakazawa, Osamu Nishimura, "C-terminal sequencing of protein by MALDI mass spectrometry through the specific derivatization of the  $\alpha$ -carboxyl group with 3-aminopropyltris-(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide", *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 404, pp125–132
- [5] Hiroki Kuyama, Kazuhiro Sonomura, Osamu Nishimura, "Sensitive detection of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: use of alkylphosphonic acids as matrix additives", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, 22, pp1109–1116

### 3-5-2 ArgC消化とアルギニン捕捉反応を利用したタンパク質C末端アミノ酸配列解析法 (ArgC-(TMPP)-フェニルボロン酸法) の開発

#### 【研究目的】

タンパク質の構造は複雑で多種多様であり、それゆえ全てのタンパク質に適用できる末端配列解析法の開発は難しい。使用する酵素についても、基質特異性やタンパク質の修飾による影響で十分な切断が起これず、目的とする末端ペプチドを得ることができない場合がある。今まで開発してきた手法についても LysC-TMPP-DITC法[1]であればC末端残基がリシン、 $\alpha$ -カルボキシル基の選択的誘導体化を用いた手法[2]ではC末端残基がグリシン、前項で述べたTMPP-GluC-(AspN)-トシルヒドラジン法[3]ではC末端残基がグリシン、グルタミン酸の場合には用いることができない。そこで、さらに新しいC末端配列解析法の開発を試みた。

#### 【研究成果】

##### 方法(概要)

従来から知られている固相担体上に担持されたフェニルボロン酸とペプチド中のアルギニン側鎖上グアニジノ基との反応[4,5]に着目し、それを応用したタンパク質C末端アミノ酸配列解析法を開発した。本手法の概要を図1に示す。単離したC末端ペプチドは誘導体化されておらず、反応性に富む $\alpha$ -アミノ基や $\alpha$ -カルボキシル基などの官能基を持っているため、それらを利用して特徴的な質量変化をもたらず修飾 ('mass tag' と呼ばれる) を導入することで配列解析を容易にできる。

##### 方法(ArgC-フェニルボロン酸法)

まず、3種類のタンパク質 (superoxide dismutase [Cu-Zn]、myoglobin、 $\beta$ -lactoglobulin) を SDS-PAGE で精製し、切り取ったゲル片を用いて本手法の検討をおこなった。得られたC末端ペプチドのイオン化には MALDI用マトリックスとしてMDPNAを添加したCHCAを使用した[6]。

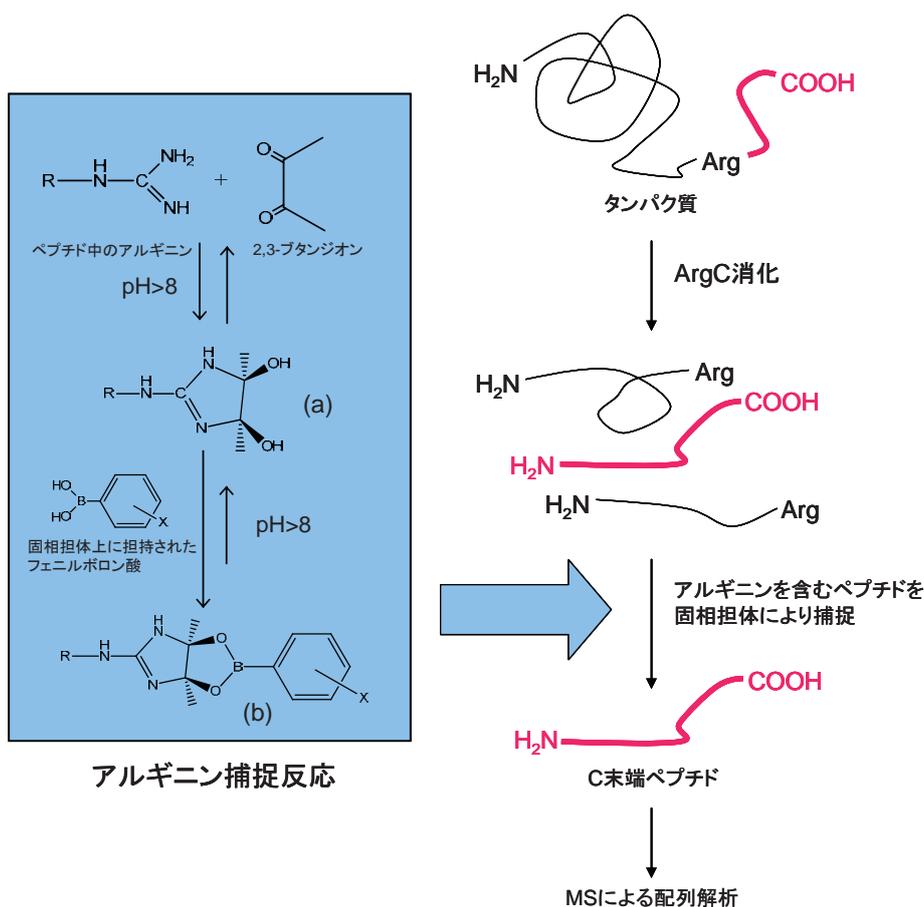


図1 本手法 (ArgC-フェニルボロン酸法) の概要

タンパク質を還元・アルキル化後、ArgC消化を行い、得られた消化断片を2,3-ブタンジオンと反応させる。するとC末端ペプチド以外の(全ての)ペプチドに含まれるアルギニン残基のグアニジノ基は2,3-ブタンジオンと反応して(a) *cis*-ジヒドロキシイミダゾリン環を形成する。続いて、pH 8.0以上の条件にすると*cis*-ジヒドロキシイミダゾリン環は*m*-アミノフェニルボロン酸-アガロースと(b) 環状ホウ酸エステル結合によって結合するので、上清中からは(アルギニン残基を持たない)C末端ペプチドのみを得ることができる

### 結果(ArgC-フェニルボロン酸法)

回収した溶液のマススペクトルおよびPSDマススペクトルの結果を図2に示す。Superoxide dismutase [Cu-Zn]ではそのC末端ペプチドの理論値に相当する強度の強い1本のピーク( $m/z$  1,001.4)が得られた(図2a上段)。このピークのPSDマススペクトルでは、予想されるフラグメントイオンが主に検出され、容易に帰属することが可能であり、C末端ペプチドであると確認できた。(図2a下段)。Myoglobinと $\beta$ -lactoglobulinについても同様に、マススペクトルではそれぞれのC末端ペプチドに一致するピーク( $m/z$  1,555.1 と  $m/z$  1,715.9)が検出され(図2b上段及びc上段)、PSDマススペクトルからC末端ペプチドであると確認できた(図2b下段及びc下段)。よって、以前開発した方法(LysC-TMPP-DITC法[1]、 $\alpha$ -カルボキシル基の選択的誘導体化を用いた方法[2]、TMPP-GluC-(AspN)-トシルヒドラジン法[3])で単離が不可能であったC末端アミノ酸残基がリシンとグリシンのタンパク質についてもそれぞれのC末端ペプチドを単離することが可能となった(図2a,b)。

より正確に配列解析を行うために、得られたC末端ペプチドにTMPP-Ac-OSuを加えて $\alpha$ -アミノ基をTMPP誘導体化し[7,8]、そのPSDマススペクトルを取得した(図3)。TMPP-Ac-OSuでペプチドのN末端を修飾するとaタイプイオンが優先的に検出されるため、*de novo* sequencingによる配列解析が容易となった。

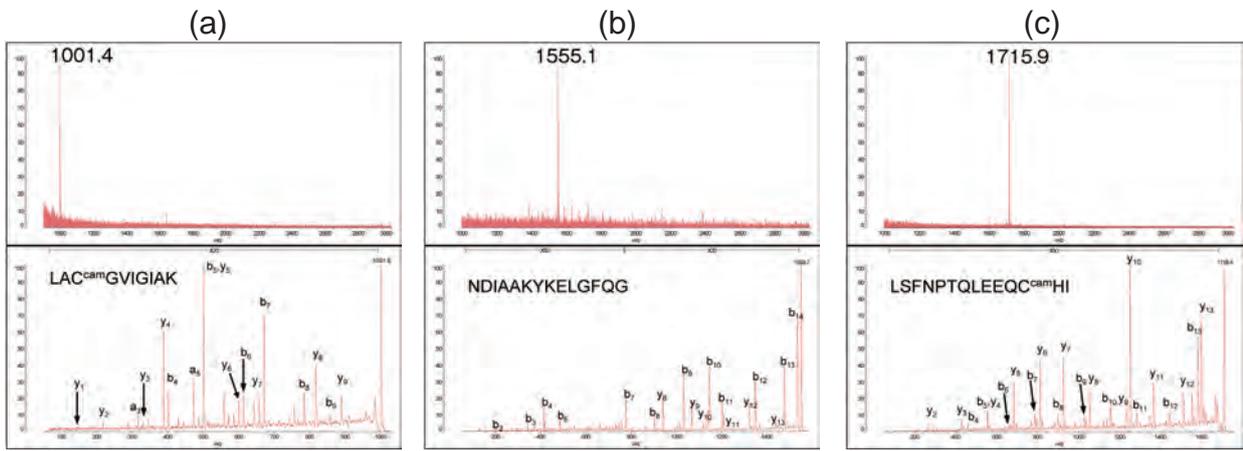


図2 ArgC-フェニルボロン酸法を用いたモデルタンパク質のC末端ペプチド単離とその構造解析

(a)はsuperoxide dismutase [Cu-Zn]、(b)はmyoglobin、(c)は $\beta$ -lactoglobulinを用いた結果を示す。それぞれ上段はC末端ペプチドのマスマスペクトル、下段はPSDマスマスペクトルである。C<sup>cam</sup>はS-カルバミドメチル化システイン残基を示す。

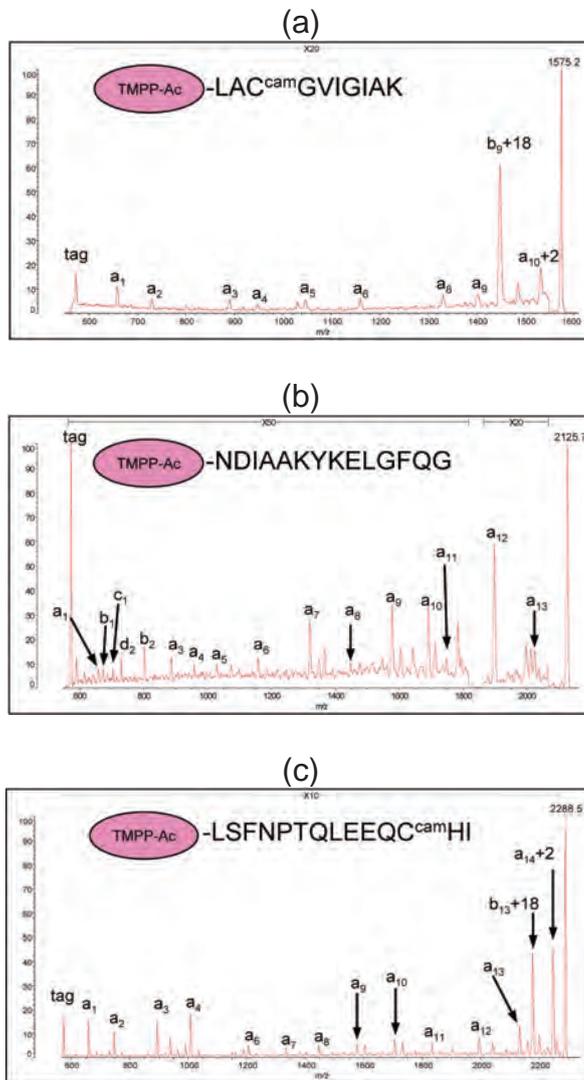


図3 単離したC末端ペプチドのTMPP誘導体化後のPSDマスマスペクトル

(a)はsuperoxide dismutase [Cu-Zn]、(b)はmyoglobin、(c)は $\beta$ -lactoglobulinのC末端ペプチドの $\alpha$ -アミノ基をTMPP-Ac-OSuで誘導体化したピークのPSDマスマスペクトルを示す。C<sup>cam</sup>はS-カルバミドメチル化システイン残基を示す。

## 方法(ArgC-TMPP-フェニルボロン酸法)

目的とするC末端ペプチド以外のペプチド中、特にC末端アルギニン付近にアスパラギン酸やグルタミン酸が存在した場合、その側鎖カルボキシル基の負電荷と固定化されたフェニルボロン酸の負電荷とが反発するため捕捉反応が起こりにくく、C末端ペプチドのみを回収することは難しい場合がある。今回、phosphorylase bとaminoacylase-1について本手法を試したところ、回収溶液中にはC末端以外のペプチド(C末端アルギニン付近にアスパラギン酸やグルタミン酸が存在するペプチド)が複数含まれており、C末端ペプチドのみを濃縮してくることはできなかった。そこで、phosphorylase bとaminoacylase-1をArgCで消化した後、正電荷を有するTMPP-Ac-OSuで消化液中のペプチドを誘導体化し、アルギニン捕捉反応を行った。

## 結果(ArgC-TMPP-フェニルボロン酸法)

Phosphorylase bとaminoacylase-1ともに目的とするC末端ペプチドを得ることができた(図4a上段及びb上段)。これは、アスパラギン酸およびグルタミン酸の負電荷がTMPP基により中和され電荷の反発が抑

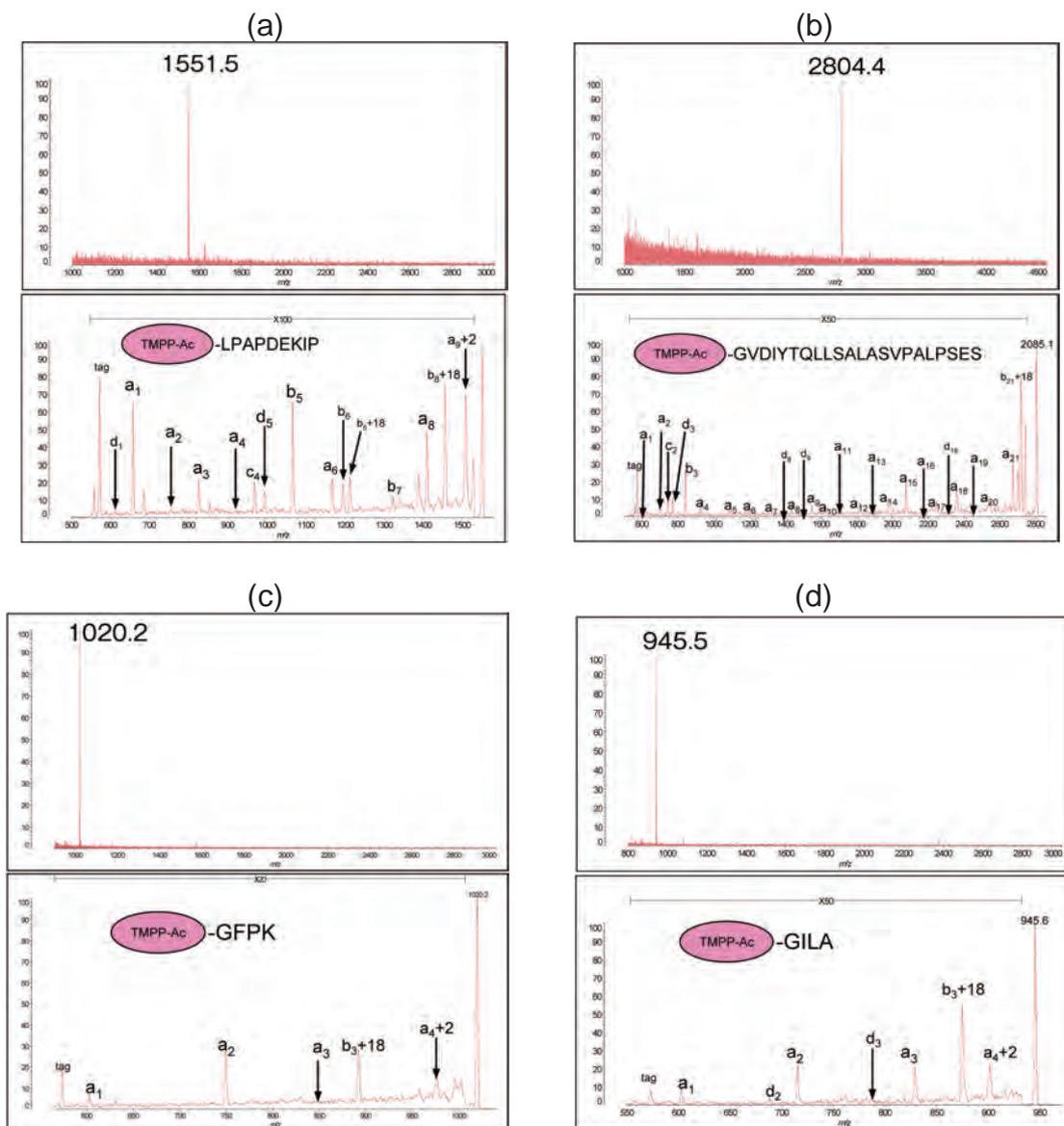


図4 ArgC-TMPP-フェニルボロン酸法を用いたモデルタンパク質のC末端ペプチド単離とその構造解析

(a)はphosphorylase b、(b)はaminoacylase-1、(c)はcarbonic anhydrase 2、(d)はalbuminを用いた結果を示す。

それぞれ上段はC末端ペプチドのマススペクトル、下段はPSDマススペクトルである。

えられるため、ペプチド断片はフェニルボロン酸と反応し、目的物以外のペプチドが捕捉されてC末端ペプチドの濃縮が可能となったと考えられる。dイオンによるロイシンとイソロイシンの区別も含め、配列解析も容易かつ確実に行うことができた(図4a下段及びb下段)。

また、TMPP誘導体化はC末端ペプチドが短い場合にも効果的である。*m/z* 500以下ではマトリックス由来のイオンピークが強く検出されるため、単離した短いペプチド断片のピークは埋もれて検出されない。しかし、TMPPで誘導体化してから濃縮を行うと、C末端ペプチドは検出可能な範囲に存在するためそのピークを確認することができ(図4c上段及びd上段)、PSDマススペクトルより配列を決めることができた(図4c下段及びd下段)。

## 【結論】

今回、以前より開発してきたC末端配列解析法を補う方法としてArgC消化およびアルギニン捕捉反応を利用した新たな手法を開発した。この方法は以前の方法で単離が困難であったC末端アミノ酸残基にリシンとグリシンを持つタンパク質についても適用可能である。用いるタンパク質によっては、単離の際にC末端アルギニン残基付近にグルタミン酸やアスパラギン酸が存在するような他のペプチド断片が同時に溶出されるという問題が生じたが、ペプチドのN末端をTMPP基で誘導体化することにより解決できた。

## 【成果一覧】

### 論文発表

- (1) Hiroki Kuyama, Chihiro Nakajima, Koichi Tanaka, "Enriching C-terminal peptide from endopeptidase ArgC digest for protein C-terminal analysis", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, pp7163-7168

### 学会発表

- (2) 中島ちひろ、九山浩樹、田中耕一、第61回質量分析総合討論会、2013年

### 出願特許

- (1) 九山浩樹、中島ちひろ、タンパク質のC末端ペプチドを濃縮する方法およびタンパク質のC末端配列解析法、特願2012-140782、特開2014-005221

## 【参考文献】

- [1] Hiroki Kuyama, Keisuke Shima, Kazuhiro Sonomura, Minoru Yamaguchi, Eiji Ando, Osamu Nishimura, Susumu Tsunasawa, "A simple and successful C-terminal sequencing analysis of proteins by mass spectrometry", *Proteomics* 2008, 8, pp1539–1550.
- [2] Chihiro Nakajima, Hiroki Kuyama, Takashi Nakazawa, Osamu Nishimura, "C-terminal sequencing of protein by MALDI mass spectrometry through the specific derivatization of the  $\alpha$ -carboxyl group with 3-aminopropyltris-(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide", *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 404, pp125–132
- [3] Chihiro Nakajima, Hiroki Kuyama, Koichi Tanaka, "Mass spectrometry-based sequencing of protein C-terminal peptide using  $\alpha$ -carboxyl group-specific derivatization and COOH capturing", *Anal. Biochem.* 2012, 428, pp167-172
- [4] Alexander Leitner, Wolfgang Lindner, "Probing of arginine residues in peptides and proteins using selective tagging and electrospray ionization mass spectrometry", *J. Mass Spectrom.*

2003, 38, pp891-899

- [5] Alexandra Foettinger, Alexander Leitner, Wolfgang Lindner, "Solid-phase capture and release of arginine peptides by selective tagging and boronate affinity chromatography", J. Chromatogr. A 2005, 1079, pp187-196
- [6] Hiroki Kuyama, Kazuhiro Sonomura, Osamu Nishimura, "Sensitive detection of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: use of alkylphosphonic acids as matrix additives", Rapid Commun. Mass Spectrom. 2008, 22, pp1109-1116
- [7] Zhi-Heng Huang, Jiang Wu, Kenneth D. W. Roth, Ying Yang, Douglas A. Gage, and J. Throck Watson, "A picomole-scale method for charge derivatization of peptides for sequence analysis by mass spectrometry", Anal. Chem. 1997, 69, pp137-144
- [8] Zhi-Heng Huang, Tunli Shen, Jiang Wu, Douglas A. Gage, J. Throck Watson, "Protein sequencing by matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay-mass spectrometry analysis of the N-Tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphine-acetylated tryptic digests", Anal. Biochem. 1999, 268, pp305-317

### 3-5-3 乳がんマーカー糖タンパクHER2のMALDI-MSによるNおよびC-末端アミノ酸配列解析

#### 【研究目的】

開発してきたNおよびC末端配列解析法が実際の細胞由来のタンパク質に適用できるかどうかを確認するため、今回HER2を用いて末端部分のアミノ酸配列解析を行った。

#### 【研究成果】

##### 方法(概要)

以前開発したN末端配列解析法(LysN-TMPP-DITC法)[1]とC末端配列解析法(LysC-TMPP-DITC法)[2]を以下に示す(図1)。用いる酵素が異なるのみで基本的な流れは同じである。まず、目的タンパク質の還元アルキル化を行った後、N末端ペプチドを単離する場合はLysN、C末端ペプチドを単離する場合はLysCを用いて消化を行い、単離する末端ペプチド中にリシンが含まれない状態にする。次に、TMPP-Ac-OSuを加えてTMPP誘導体化を行うと、それぞれの $\alpha$ -アミノ基が修飾される[3,4]。この段階で、末端ペプチドと末端ペプチド以外のペプチドとの大きな違いはリシンの有無でありこれを利用する。*p*-フェニレンジイソチオシアネート(DITC)樹脂を用いると末端ペプチド以外のペプチドに含まれるリシンの $\epsilon$ -アミノ基が反応し樹脂上に捕捉されるので、上清からは末端ペプチドのみ得ることができる。得られた末端ペプチドはTMPP基で修飾されているため、MS/MSで特定のフラグメントイオンが検出されやすく、アミノ酸配列解析が容易となる。

今回、N末端配列解析はLysN-TMPP-DITC法、C末端配列解析はLysC-TMPP-DITC法および前項で示したArgC-TMPP-フェニルボロン酸法[5]を用いて行った。

#### [N末端配列解析]

##### 方法(LysN-TMPP-DITC法[1])

免疫沈降のあとSDS-PAGEで単離精製したHER2(ゲル片、30 pmol)を用いてLysN-TMPP-DITC法によるN末端配列解析を行った。イオン化には、MALDI用マトリックスとしてMDPNAを添加したCHCAを使用した[6]。

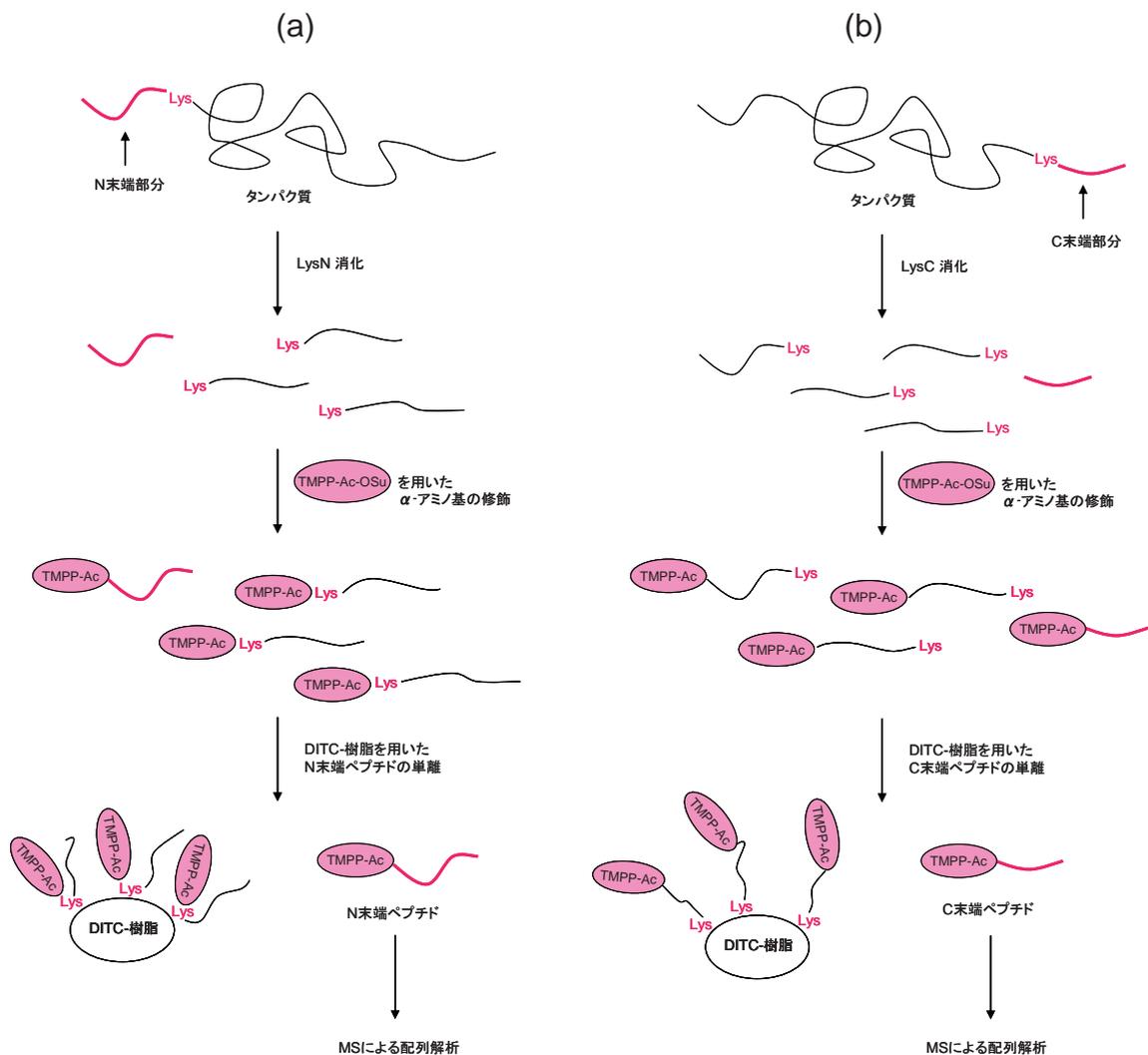


図1 (a) N末端配列解析法 (LysN-TMPP-DITC法) と (b) C末端配列解析法 (LysC-TMPP-DITC法)

どちらも酵素消化、α-アミノ基のTMPP誘導体化、DITC処理を組み合わせた手法である。

### 結果 (LysN-TMPP-DITC法)

LysN-TMPP-DITC法により得られた上清のマスペクトルでは、二つのピーク ( $m/z$  1,584.9 と  $m/z$  1,671.9) が強く検出された(図2)。これらのペプチドの存在比はピーク強度からおおよそ7:3である。今回用いたHER2タンパク質の高発現株である(SK-BR-3、BT-474)から得られたHER2のN末端ペプチドのスペクトルパターンの違いはわずかなものであり、単離したNおよびC末端ペプチドのアミノ酸配列については細胞株による違いは見られなかったため、ここではBT-474のみの結果を示す。

最も強く検出されたピーク  $m/z$  1,584.9のPSDマスペクトルではα-アミノ基をTMPP-Acで修飾したTMPP誘導体で優先的に検出されやすいaタイプイオンが全て検出された(図3)。トレオニンの側鎖部分の切断により生じた $d_1$ 、 $d_7$ イオンやS-カルバミドメチル化されたシステインの側鎖部分の切断により生じた $d_4$ イオンも観測された。また、α-アミノ基をTMPP-Acで修飾したTMPP誘導体中のAspの部分で切断が起こった場合に検出される3本のピーク( $c_7$ 、 $d_8$ 、 $b_8$ イオン)とともに、今回は $a_8$ イオンも検出された。解析の結果、 $m/z$  1584.9のピークはTMPP-Ac-TQVC<sup>cam</sup>TGTD<sup>cam</sup>(C<sup>cam</sup>はカルバミドメチル化システイン残基)であることがわかった。N末端側から2残基目のグルタミン(Q)はリシンと同じ質量(128 Da)であるが、LysNで消化を行っておりN末端にはリシンが含まれていることはないため、グルタミンと帰属することができた。

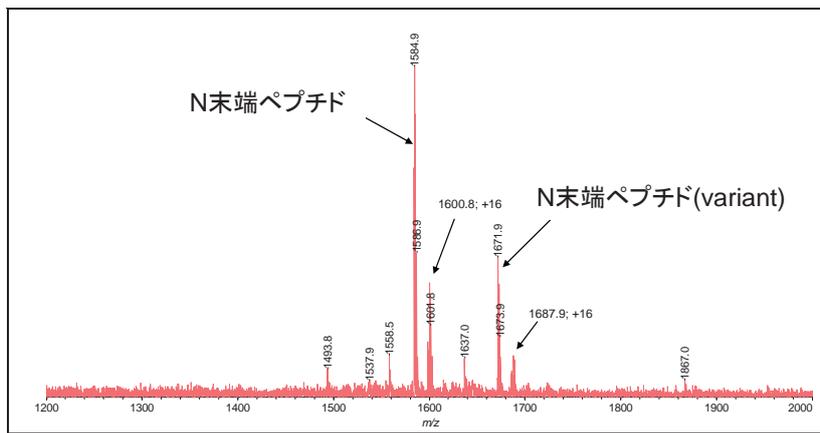


図2 LysN-TMPP-DITC法を用いたHER2のN末端ペプチド単離

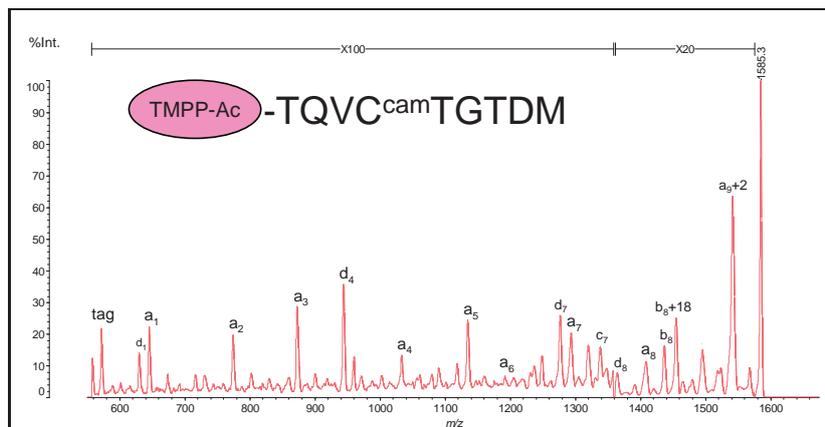


図3 HER2のN末端ペプチド  $m/z$  1,584.9のPSDマススペクトル

$C^{cam}$ はS-カルバミドメチル化システイン残基を示す。

次に、二番目に強く検出されたピーク  $m/z$  1,671.9のPSDマススペクトルでは図3と類似したフラグメントパターンが見られた(図4)。 $m/z$  1,584.9と  $m/z$  1,671.9の質量差が87であることからセリン残基による違いであると考えられ、PSDマススペクトルも似ていることからTQVCTGTDMのN末端かC末端いずれかにセリンが結合したペプチドであると予想される。解析の結果、 $m/z$  1,671.9のピークはN末端にセリンが結合したTMPP-Ac-STQVC<sup>cam</sup>TGTDMであることが明らかになった。上記と同様の理由より、N末端側から3残基目のグルタミン(Q)についてはリシンではなくグルタミンであるとした。また、図3の場合と同様にアスパラギン酸の部分で切断され生じたイオンは通常観測される3本のピークではなく4本のピークとして検出された。

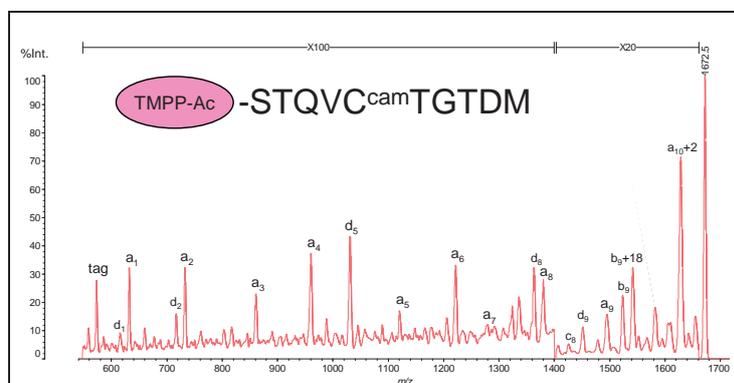


図4 HER2のN末端ペプチド  $m/z$  1,671.9のPSDマススペクトル

$C^{cam}$ はS-カルバミドメチル化システイン残基を示す。

以上、N末端アミノ酸配列解析を行った結果、2つの異なるペプチドの存在が明らかになった。ひとつのN末端ペプチド(TQVCTGDM)に関しては、UniProtKB/SwissProtのデータベース上に登録されているHER2の isoform 1のN末端アミノ酸配列に一致し、これはS<sup>22</sup>とT<sup>23</sup>の間の切断によりM<sup>1</sup>ELAALCRWG LLLLALLPPGAAS<sup>22</sup>がシグナルペプチドとして切除されて生じたものである。そして、もうひとつのN末端ペプチド(STQVCTGDM)についてはA<sup>21</sup>とS<sup>22</sup>の間の切断によりM<sup>1</sup>ELAALCRWG LLLLALLPPGAA<sup>21</sup>がシグナルペプチドとして切除されて生じたと考えられる。知る限りではこのN末端ペプチドの配列(STQVCTGDM)はまだ報告されていない。

UniProtKB/SwissProtによると、HER2は4つのisoformから成る。isoform 2と3はisoform 1と4のおよそ半分の分子量であるので、ゲルを用いた操作で容易に分離することができるが、今回の実験では、免疫沈降によってisoform 2、isoform 3とisoform 1、isoform 4とが分離された。SDS-PAGEで精製し、isoform 1とisoform 4が含まれているであろう185 kDaのバンドを切り出して使用した。得られたN末端アミノ酸配列の結果から、切り出したバンド中にisoform 1は存在したが、isoform 4の存在は確認できなかった。C末端のアミノ酸配列はisoform 1とisoform 4とでは同じであるためこれらを区別することはできないが、N末端のアミノ酸配列の結果はisoform 1とisoform 4を区別するのに有効であった。

※付随して得られた知見:シグナルペプチドの切断部位について

今回使用したHER2ではS<sup>22</sup>とT<sup>23</sup>の間と、そのひとつ上流のA<sup>21</sup>とS<sup>22</sup>との間で切断が起こっていたことが確認された。原核生物と真核生物のタンパク質中のシグナルペプチドの切断部位は(-3,-1)法則[7]とAXBモデル[8](Xは任意のアミノ酸)に従って決まることが経験的に知られている(図5)。AXBモデルとはシグナルペプチダーゼが認識する配列を示している。(-3,-1)法則では-1と+1部位の間で切断が生じ、AXBモデルではB残基のカルボキシル側で切断が起こる。(-3,-1)法則の場合、疎水性残基(フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリン)または小さい中性の残基(アラニン、システイン、セリン、トレオニン)が-3部位、グリシンまたは小さい中性の残基(アラニン、システイン、セリン、トレオニン)が-1部位に位置する。AXBモデルの場合、小さい残基(アラニン、グリシン、セリン)がB部位、疎水性残基(ロイシン、バリン、イソロイシン)または小さい残基(アラニン、グリシン、セリン)がA部位に来る。HER2の場合、S<sup>22</sup>とT<sup>23</sup>の間の切断もひとつ上流のA<sup>21</sup>とS<sup>22</sup>の間の切断も(-3,-1)法に従っている。また、切断位置が異なることによる2種の3残基配列A<sup>20</sup>-A<sup>21</sup>-S<sup>22</sup>とG<sup>19</sup>-A<sup>20</sup>-A<sup>21</sup>もAXBモデルの規則に従っている。

以上のように、N末端の二ヶ所の切断部位は二つの経験則((-3,-1)法則とAXBモデル)と矛盾しない。シグナルペプチダーゼは両方の切断部位を認識したのかもしれない。ただ、これはひとつの仮説に過ぎず、

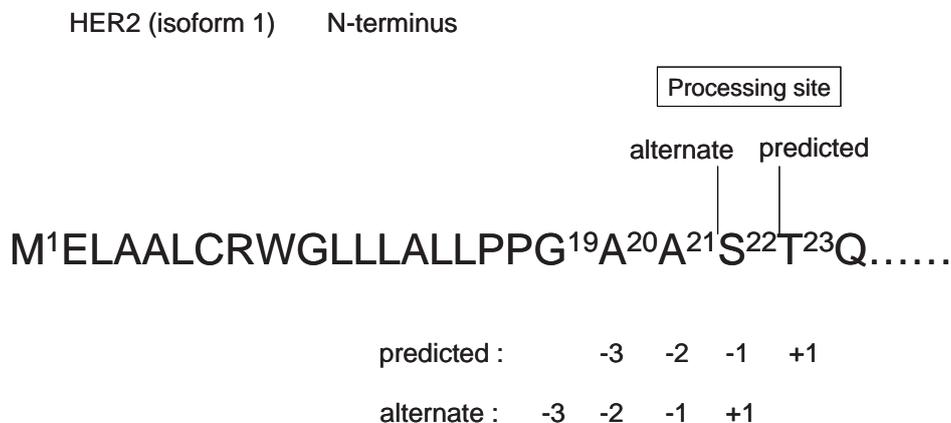


図5 HER2のN末端部分のプロセシング部位

シグナルペプチドの切断部位は(-3,-1)法則とAXBモデルに従って起こることが知られている。HER2の場合はS<sup>22</sup>とT<sup>23</sup>の間の切断もA<sup>21</sup>とS<sup>22</sup>の間の切断も(-3,-1)法およびAXBモデルに従っている。

このペプチド(STQVCTGTDM...)は異なる過程で生じているかもしれない。また、末端部分のプロセッシングは細胞のタイプ(がん細胞・正常細胞)に依存して変化するかもしれないため、HER2のN末端アミノ酸配列の違いが病気の有無に関連があるかどうか明らかにすることは重要であり、今後の研究で明らかにされるべきである。

### [C末端配列解析]

方法(LysC-TMPP-DITC法[2])

続いて、N末端解析と同様にHER2のゲル片(30 pmol分)を用いてC末端アミノ酸配列解析(LysC-TMPP-DITC法)を行った。MALDI用マトリックスとしてMDPNAを添加したCHCAを使用した[6]。

結果(LysC-TMPP-DITC法)

MALDIマススペクトルには1本のピークが観測された(図6a)。そのPSDマススペクトルではaタイプイオンだけではなく、b, d, b+18のイオンピークも複数検出され複雑なスペクトルとなったが、ピークの帰属は可能であった(図6b)。プロリンの部分で切断されたイオンは検出されにくく、グリシン部分で切断されたイオンもまた弱いピークとなることが知られている。今回のペプチドにおいては、グリシン部分のフラグメントイオンである $a_1$ 、 $a_{12}$ ははっきりと検出、プロリン部分のフラグメントイオンである $a_8$ 、 $a_{16}$ についても同様に検出され、 $a_3$ のみ検出されなかった。また、 $d_{11}$ 、 $d_{13}$ イオンから、N末端側から11番目と13番目の残基はイソロイシンではなくロイシンであることがわかった。そして、アスパラギン酸部分のフラグメントイオンについては通常観測される3本の $c_{13}$ 、 $d_{14}$ 、 $b_{14}$ イオンに加えて $b_{14}-COOH$ も検出された。以上の結果は、C末端のアミノ酸配

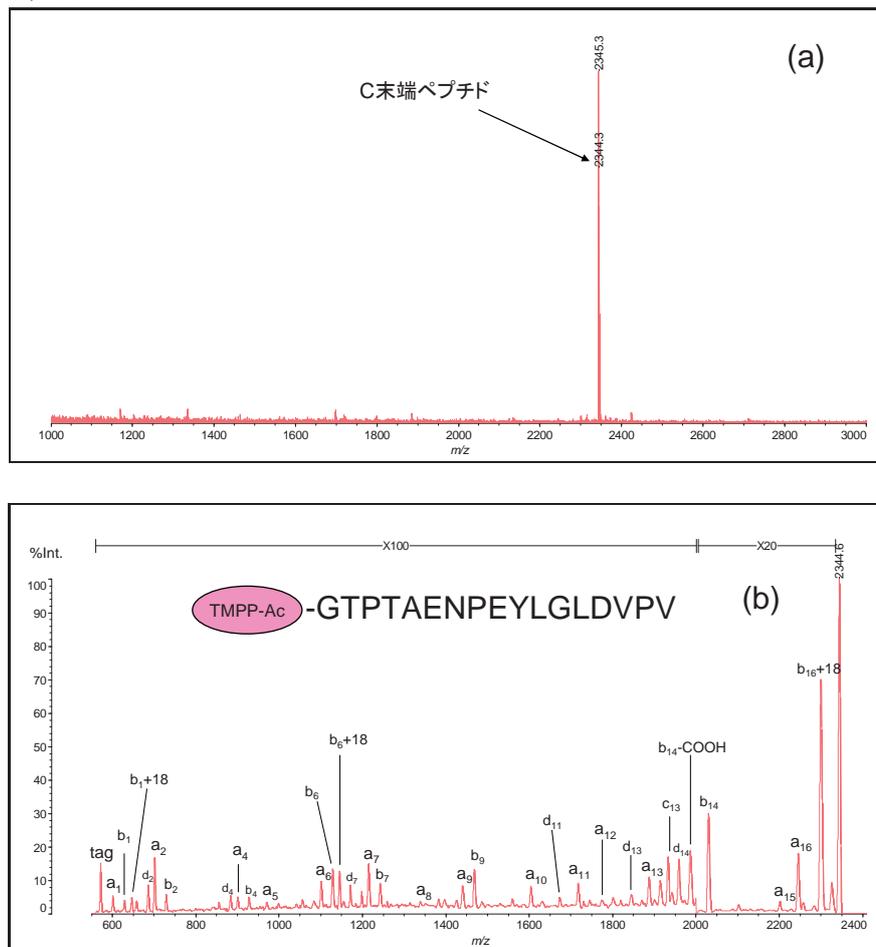


図6 (a) LysC-TMPP-DITC法を用いたC末端ペプチド単離後のマススペクトル  
(b) C末端ペプチドのPSDマススペクトル

列がTMPP-Ac-GTPTAENPEYLGLDVPVであることの裏付けとなる。

#### 方法 (ArgC-TMPP-フェニルボロン酸法[5])

LysC-TMPP-DITC法で得られた結果を補足するために、別法であるArgC-TMPP-フェニルボロン酸法によりC末端解析を行った。MALDI用マトリックスとしてMDPNAを添加したCHCAを使用した[6]。

#### 結果 (ArgC-TMPP-フェニルボロン酸法)

MALDIマスペクトルでは1本のピークが確認できた(図7a)。そして、そのPSDマスペクトル(図7b)ではグリシン部分のフラグメントイオン $a_1$ 、 $a_9$ は検出されたが、 $a_{20}$ は検出されなかった。プロリン部分のフラグメントイオン $a_4$ 、 $a_{11}$ 、 $a_{16}$ は検出されず、 $a_3$ 、 $a_{24}$ については代わりに $b_3$ 、 $b_{24}+18$ が検出された。アスパラギン酸部分のフラグメントイオンについてはLysC-TMPP-DITC法で単離したC末端ペプチドで検出されたフラグメントイオンと同様に、 $c_{21}$ 、 $d_{22}$ 、 $b_{22}-COOH$ 、 $b_{22}$ が検出された。また、 $d_{19}$ 、 $d_{21}$ が観測されたことからN末端から19番目と21番目の残基はイソロイシンではなくロイシンであると判断することが可能であった。

以上、LysC-TMPP-DITC法およびArgC-TMPP-フェニルボロン酸法を用いたC末端配列解析の結果から、C末端部分のアミノ酸配列はGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV でこれはUniProtKB/SwissProtのデータベースに登録されている配列と一致することがわかった。

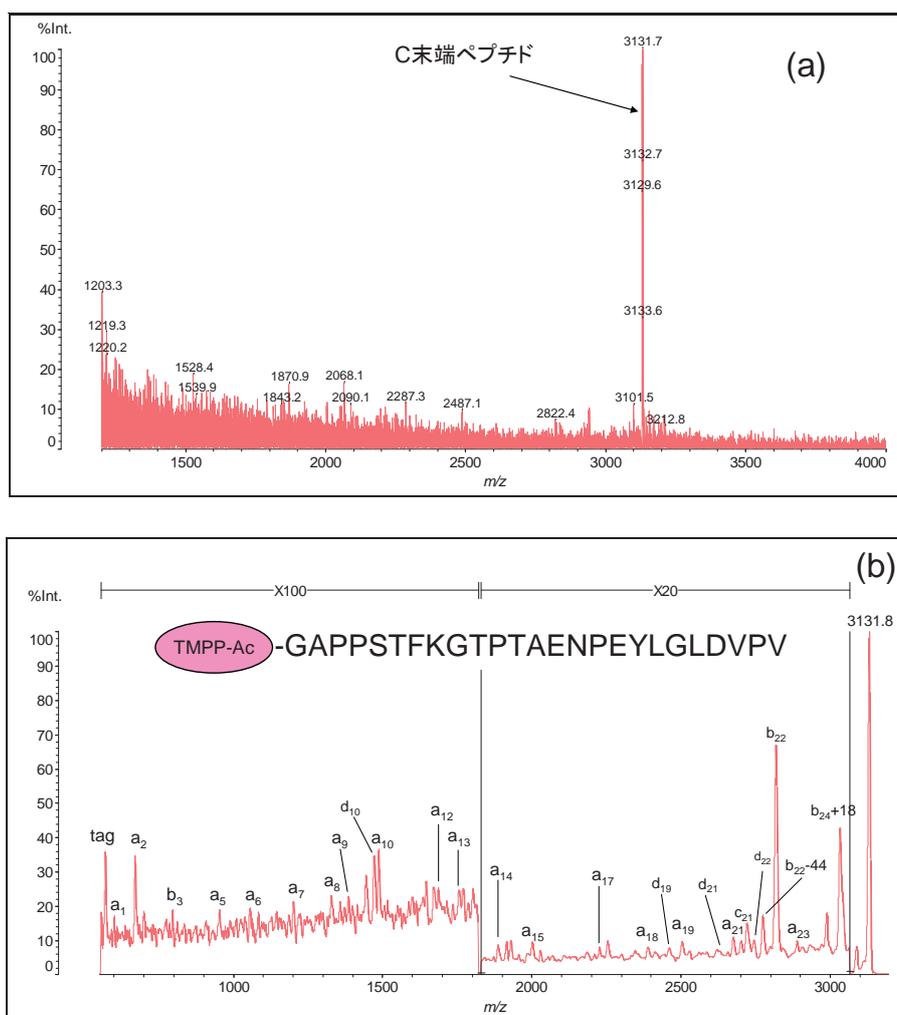


図7 (a) ArgC-フェニルボロン酸法を用いたC末端ペプチド単離後のマスペクトル  
(b) C末端ペプチドのPSDマスペクトル

## 【結論】

NおよびC末端配列解析法を用いてHER2 (isoform 1) の両末端アミノ酸配列を決めることができた。N末端ペプチドについてはデータベース上に登録されている配列TQVCTGTDMと登録されていない配列STQVCTGTDMが得られ、C末端ペプチドについては登録されている配列と一致するGAPPSTFKGTPAENPEYLGLDVPVが得られた。

## 【参考文献】

- [1] Hiroki Kuyama, Kazuhiro Sonomura, Osamu Nishimura, Susumu Tsunasawa, "A method for N-terminal *de novo* sequence analysis of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", *Anal. Biochem.* 2008, 380, pp291–296
- [2] Hiroki Kuyama, Keisuke Shima, Kazuhiro Sonomura, Minoru Yamaguchi, Eiji Ando, Osamu Nishimura, Susumu Tsunasawa, "A simple and successful C-terminal sequencing analysis of proteins by mass spectrometry", *Proteomics* 2008, 8, pp1539–1550
- [3] Zhi-Heng Huang, Jiang Wu, Kenneth D. W. Roth, Ying Yang, Douglas A. Gage, and J. Throck Watson, "A picomole-scale method for charge derivatization of peptides for sequence analysis by mass spectrometry", *Anal. Chem.* 1997, 69, pp137-144
- [4] Zhi-Heng Huang, Tunli Shen, Jiang Wu, Douglas A. Gage, J. Throck Watson, "Protein sequencing by matrix-assisted laser desorption ionization–postsorce decay–mass spectrometry analysis of the N-Tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphine-acetylated tryptic digests", *Anal. Biochem.* 1999, 268, pp305-317
- [5] Hiroki Kuyama, Chihiro Nakajima, Koichi Tanaka, "Enriching C-terminal peptide from endopeptidase ArgC digest for protein C-terminal analysis", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, pp7163-7168
- [6] Hiroki Kuyama, Kazuhiro Sonomura, Osamu Nishimura, "Sensitive detection of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: use of alkylphosphonic acids as matrix additives", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, 22, pp1109–1116
- [7] Gunnar VON HEIJNE, "Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites", *Eur. J. Biochem.* 1983, 133, pp17-21
- [8] Daniel Perlman, Harlyn O. Halvorson, "A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides", *J. Mol. Biochem.* 1983, 167, pp391-404