

LC-MSによるタンパク質・ペプチドの分析

Analysis of protein and peptide using LC-MS

生体を構成する主要成分のひとつであるタンパク質は、生体内でアミノ酸より合成され、抗体・酵素・ホルモン・受容体・生体構造の保持など、体内で重要な役割を果たしています。産業界におけるタンパク質の利用例は、摂取による食品栄養学的利用以外にも、洗剤用酵素、治療用医薬品など多岐にわたり、増加傾向にあります。

近年、医薬品としてのタンパク質製剤は、生体からの精製品から組換え技術を用いた製品に移行しており、インシュリン、インターフェロン、エリスロポエチンなどが上市されています。品質管理の観点から、組換えタンパク質の発現確認は重要な工程であり、ペプチドシーケンサーによるアミノ酸配列分析や、簡便な方法として

HPLCによるペプチドマッピング、MALDI-TOFMSによるマスマッピング等が適用されています。

本アプリケーションニュースでは、四重極型質量分析計LCMS-2010EVを用い、ウマ心筋ミオグロビンをモデル試料とした、LC-MSによるタンパク質の分析およびペプチドマスマッピング例をご紹介します。

Fig.1にミオグロビンの正イオンエレクトロスプレーイオン化(ESI)マスマスペクトルを示します。シリンジポンプを用いて、精製タンパク質(5%酢酸水, 50%メタノール溶液)のインフュージョン分析を行いました。 m/z 700-2000の範囲で、9~21価の多価イオンが検出されています。

S.Yamaki

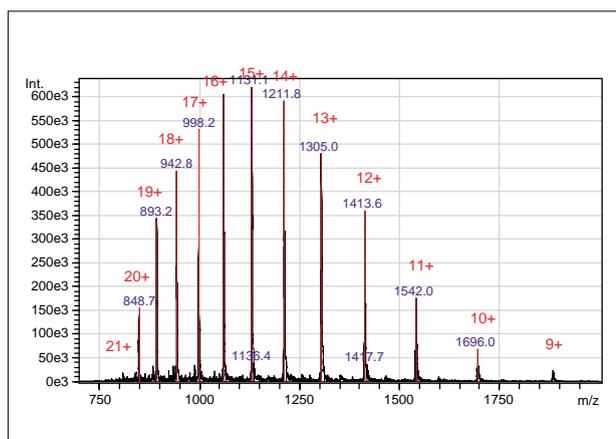


Fig.1 ウマ心筋ミオグロビンのマスマスペクトル
ESI MS spectrum of myoglobin horse heart.

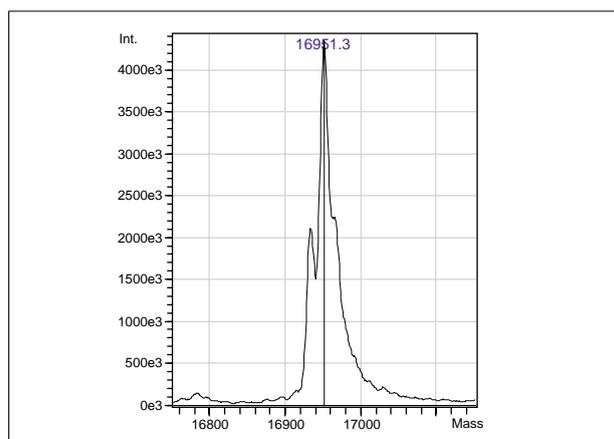


Fig.2 アポミオグロビン中性質量のスペクトル
The zero charged spectrum of apomyoglobin.

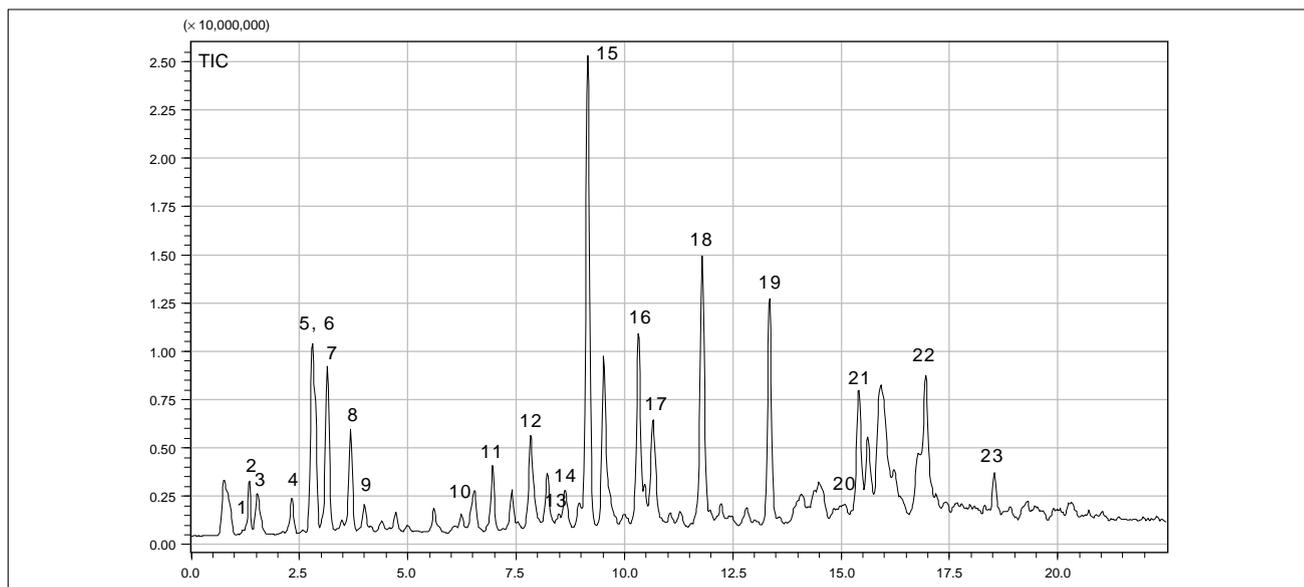


Fig.3 ミオグロビントリプシン消化物の全イオンクロマトグラム
Total ion chromatogram of tryptic digests of myoglobin horse heart.

これら多価イオンマスペクトルを代数的演算処理（デコンボリューション）により中性質量のスペクトルに変換すると（Fig.2），ミオグロビンの分子量は16951と算出されます。アボミオグロビンのアミノ酸組成からの理論分子量16951.5（average mass）と比較し，良好な結果が得られています。このようにESIでは，目的化合物が複数のイオン化部位を持ち，多価イオンが検出される場合，質量分析計の測定質量範囲を超えて分子量測定が可能ながことが知られています。

次にミオグロビンを変性処理後TPCKトリプシンで酵素消化を行い，ODSカラムを用いてエレクトロスプレーLC-MS分析を行いました。Fig.3にトリプシン消化物の全イオンクロマトグラム（TIC）を示します。おおよそ40ピークが検出されました。代表的なピーク成分のマスペクトルをFig.4(a)～(f)に示します。ピーク4では m/z 316, 631にイオンが検出され（Fig.4a），それぞれ2価プロトン化分子 $[M+2H]^+$ および1価プロトン化分子 $[M+H]^+$ と帰

属されます。その結果，このペプチドの分子量は630と計算されます。同様にピーク5のマスペクトルからは分子量2109，ピーク8から分子量1853，ピーク15から分子量1936，ピーク19から分子量1378，ピーク21から分子量3384と計算され，それぞれのペプチドの分子量が算出されます。

Table 1に，各ペプチドピークにおける検出イオン，対応するトリプシン消化ペプチドイオンの理論 m/z 値，ペプチドの分子量一覧を示しました。トリプシンはタンパク質中のリジン，アルギニンのC末端側を切断するプロテアーゼで，タンパク質のアミノ酸配列より酵素消化によって生成するペプチドを推定することができます（Table 1，右欄）。ピーク4のペプチドはミオグロビンの一次構造との比較から，T140-145（N末端140から145番目）に対応すると判断されます。本分析では分子量600～3500のペプチドが確認され，それぞれトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列に対応させることができました。

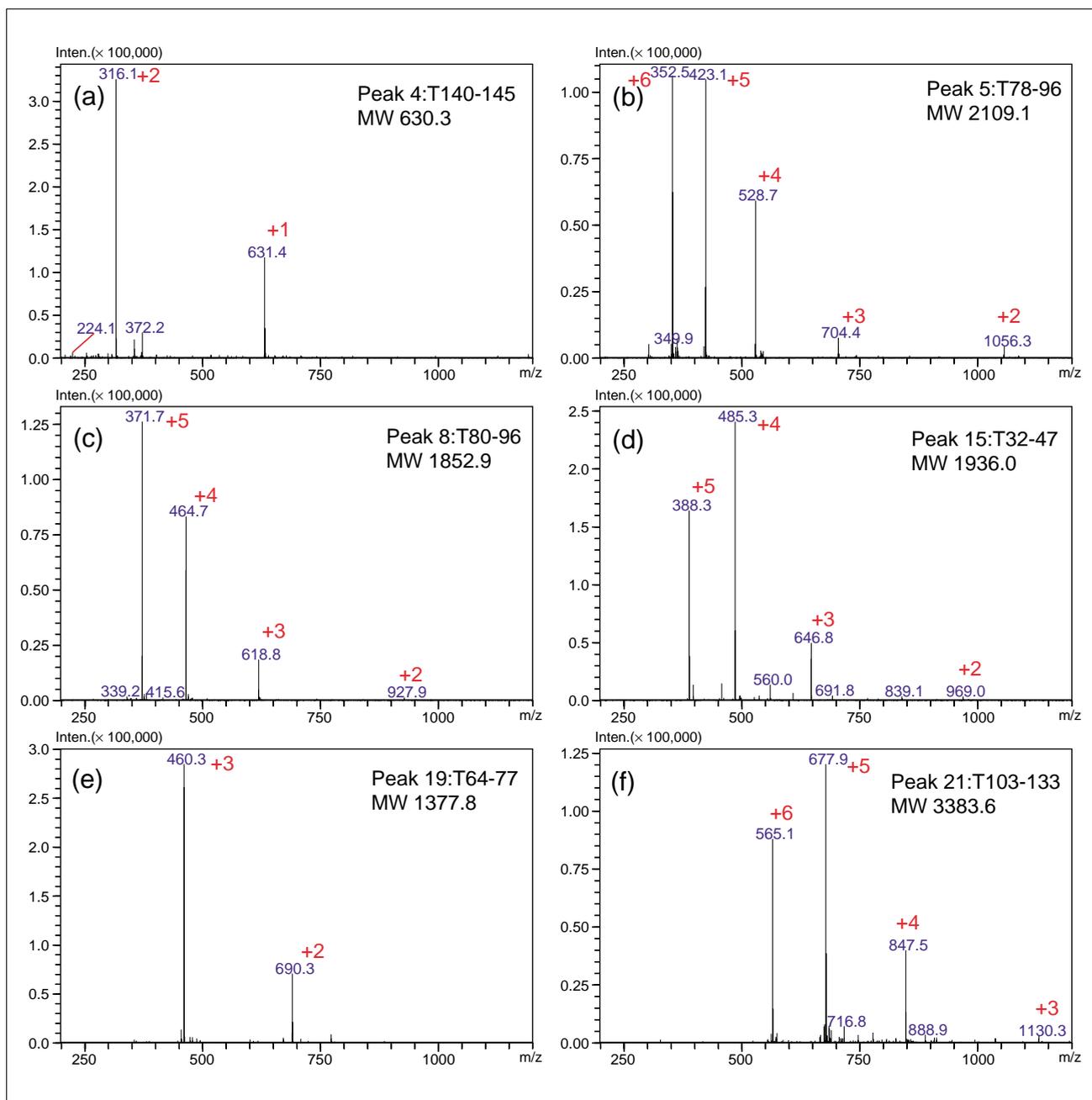


Fig.4 トリプシン消化ペプチド (T140-145, T78-96, T80-96, T32-47, T64-77, T103-133) のマスペクトル
Mass spectra of tryptic peptide T140-145, T78-96, T80-96, T32-47, T64-77 and T103-133

Table 1 トリプシン消化ミオグロビンからの検出ペプチド
Detected peptides of tryptic myoglobin

No	R.T. (min)	Detected ions (<i>m/z</i>)	Theoretical <i>m/z</i> value (charge state)	Molecular weight	Estimated peptides (sequence)
1	1.2	363 724	362.7 (+2) 724.3 (+1)	723.3	T51-56 : TEAEMK
2	1.3	368 552	368.1 (+3) 551.8 (+2)	1101.5	T48-50+T51-56 : HLKTEAEMK
3	1.5	264 396 790	264.1 (+3) 395.7 (+2) 790.4 (+1)	789.4	T57-62+T63 : ASEDLKK
4	2.3	316 631	316.2 (+2) 631.3 (+1)	630.3	T140-145 : NDIAAK
5	2.7	352 423 529 704 1056	352.5 (+6) 422.8 (+5) 528.3 (+4) 704.0 (+3) 1055.6 (+2)	2109.1	T78+T79+T80-96 : KKGHHEAELKPLAQSHATK
6	2.8	246 368 735	245.8 (+3) 368.2 (+2) 735.5 (+1)	734.5	T97-98+T99-102 : HKIPIK
7	3.1	397 496 661 992	397.2 (+5) 496.3 (+4) 661.3 (+3) 991.5 (+2)	1981.0	T79+T80-96 : KGHHEAELKPLAQSHATK
8	3.6	372 465 619 927	371.6 (+5) 464.2 (+4) 618.7 (+3) 927.5 (+2)	1852.9	T80-96 : GHHEAELKPLAQSHATK
9	3.9	229 343 684	228.8 (+3) 342.7 (+2) 684.4 (+1)	683.4	T43-45+T46-47 : FDKFK
10	6.2	501 752	501.5 (+3) 751.8 (+2)	1501.7	T119-133 : HPGDFGADAQGAMTK
11	6.9	424 636	424.5 (+3) 636.3 (+2)	1270.6	T32-42 : LFTGHPETLEK
12	7.8	471 941	471.2 (+2) 941.4 (+1)	940.4	T146-147+T148-153 : YKELGFQG
13	8.3	650	650.3 (+1)	649.3	T148-153 : ELGFQG
14	8.6	536 804	536.3 (+3) 803.9 (+2)	1605.8	T17-31 : VEADIAGHGQEVLR
15	9.2	388 485 647 969	388.2 (+5) 485.0 (+4) 646.3 (+3) 969.0 (+2)	1936.0	T32-42+T43-45+T46-47 : LFTGHPETLEKFDKFK
16	10.3	454 681	454.2 (+3) 680.9 (+2)	1359.7	T134-139+T140-145 : ALELFRNDIAAK
17	10.6	375 748	374.7 (+2) 748.4 (+1)	747.4	T134-139 : ALELFR
18	11.8	377 503 754	377.4 (+4) 502.9 (+3) 753.9 (+2)	1505.91	T63+T64-77 : KHGTVVLTALGGILK
19	13.4	460 690	460.3 (+3) 689.9 (+2)	377.8	T64-77 : HGTVVLTALGGILK
20	15.3	606 909	605.9 (+3) 908.4 (+2)	1814.9	T1-16 : GLSDGEWQQVLNVWGK
21	15.7	565 678 847 1129	564.9 (+6) 677.7 (+5) 846.9 (+4) 1128.9 (+3)	3383.6	T103-118+T119-133 : YLEFISDAIIHVLHSHKHPGDFGADAQGAMTK
22	16.9	472 629 943	472.0 (+4) 629.0 (+3) 943.0 (+2)	1884.0	T103-118 : YLEFISDAIIHVLHSHK
23	18.5	852 1135	851.7 (+4) 1135.3 (+3)	3402.7	T1-16+T17-31 : GLSDGEWQQVLNVWGKVEADIAGHGQEVLR

今回検出したペプチドは、フリーのリジンを除いてミオグロビンのすべてのアミノ酸領域をカバーすることが確認できました (Fig.5)。以上の結果から、エレクトロスプレーLC-MSは、組換えタンパク質の発現確認や、構造既知ペプチド中の構造変化の確認、またペプチドシークエンサーのデータを補完する分子量情報を得る手法として有用であることが分かります。

なお質量分析では原理上、分子量の等しいロイシンとイソロイシンの区別ができません。また四重極型MSの分解能は質量差0.04 Daのグルタミンとリジンの区別は困難です。これらアミノ酸を含むペプチド組成の確定にはアミノ酸組成分析法の併用が有効です。また構造未知ペプチドの*de novo*配列解析には、ハイブリット型質量分析計LCMS-IT-TOFなどのMS/MS装置による分析が有効です。

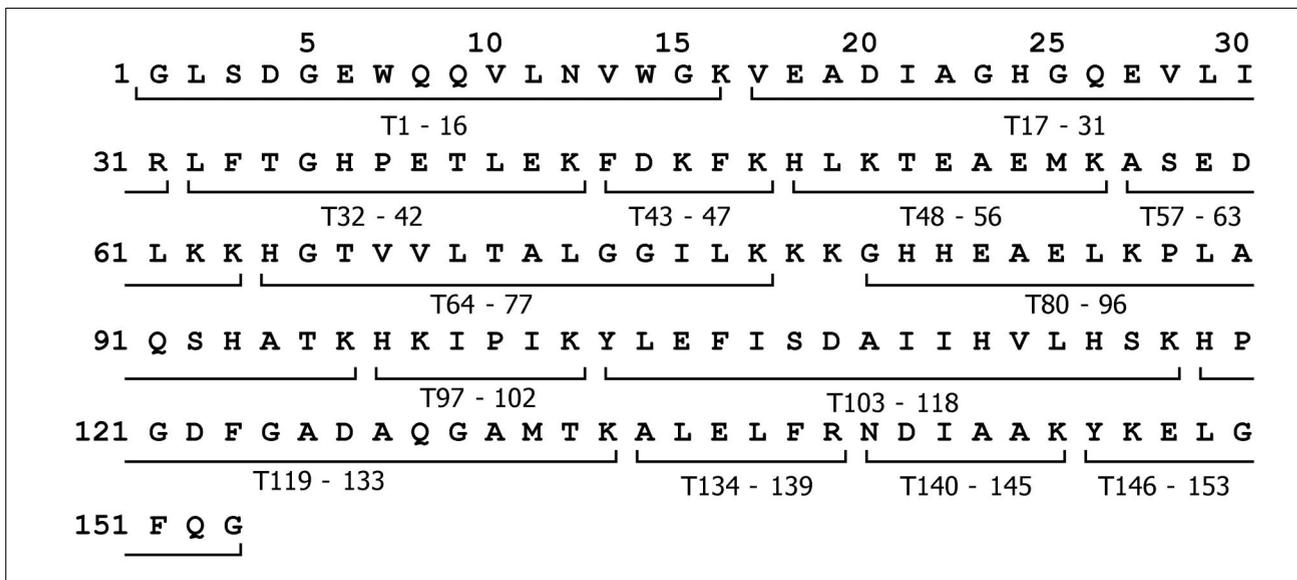


Fig.5 ウマ心筋ミオグロビンのアミノ酸配列
Amino acid sequence of myoglobin horse heart

Table 2 LC-MS分析条件
Analytical conditions for LC-MS

Column	: Imtakt Cadenza CD-C18 (1.0 mmI.D. × 75 mmL.)	Column temperature	: 40 °C
Mobile phase A	: 0.1 % formic acid - water	Block heater temperature	: 200 °C
Mobile phase B	: 0.1 % formic acid - 70 % acetonitrile	Q-array RF voltage	: Scan-mode
Time program	: 5 %B (0 min)→80 %B (30 min)		
Flow rate	: 0.05 mL/min		
Injection volume	: 5 µL		
Probe voltage	: +4.5 kV (ESI-Positive mode)		
CDL temperature	: 250 °C		
Nebulizing gas flow	: 1.0 L/min		
Drying gas pressure	: 0.02 MPa		
CDL voltage	: + 10 V		
Q-array DC voltage	: Scan-mode		
Scan range	: <i>m/z</i> 200-1200 (1.0 sec/scan)		

初版発行：2007年7月

 島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

●東京 ☎(03)3219-1691
●京都 ☎(075)813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は右に示す島津WEBで閲覧できます。

会員制情報提供サービス「Shim-Solutions Club」にご登録下さい。
<http://solutions.shimadzu.co.jp/>
いろいろな情報提供サービスが受けられます。

3100-07702-660-1K
2007.7