

レーザーイオン化質量分析計 (Bruker REFLEX™ MALDI-TOF MS)

薬学部 生化学研究室 三隅将吾 ; 内線 4367

§ 1 はじめに

生体高分子は、難揮発性であるため、気相にイオン化するイオン化法の開発が難しく、ようやく1980年代になってタンパク質や核酸等をイオン化できる、いわゆるソフトイオン化法が実用化されてきた。これらのうち高速原子衝撃 (fast atom bombardment; FAB) 法、エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization; ESI) 法、マトリックスアシステッドレーザー励起イオン化 (matrix - assisted laser desorption ionization; MALDI) 法等が、現在広く用いられている。基本的には、各々のイオン化によって生成したイオンは、どの質量分析法でも分離可能であるが、相性があるため、各々のイオン化法に適した質量分析計との組み合わせによって用いられることになる。

ここでは、Bruker REFLEX™ Matrix - Assisted Laser Desorption Time - of - Flight Mass Spectrometer (MALDI - TOF MS) について述べる。

§ 2 原理

MALDI-TOF MS

イオン化法--- MALDI法
質量分析計--- TOF MS

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) 法について

MALDI法では、イオン化のためにマトリックスを用います。(表1参照)

マトリックスはサンプルと同じ溶媒に溶け、かつ溶媒の蒸発とともにサンプル分子を取り込みながら結晶化します。さらに、使用するレーザーの波長に対して吸収を持ち、サンプルをイオン化させます。サンプルのイオン化には、マトリックスがまずレーザー光の照射を受けて、励起状態となり、次にその励起状態のマトリックスから得られるエネルギーによりサンプルが蒸発し、最終的にプロトン移動によってサンプルは、イオン化されます。(図1参照)

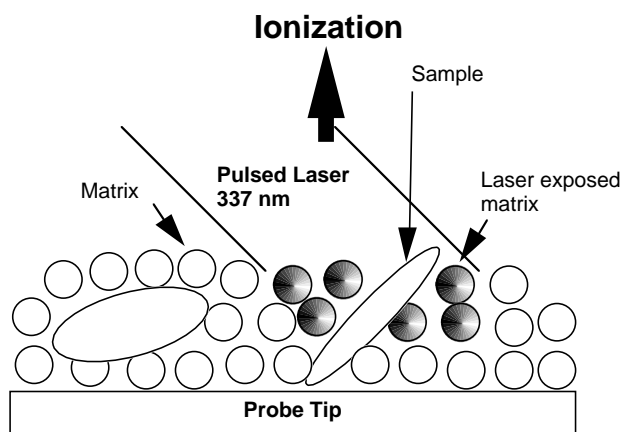


図 1 MALDI法イオン化概念図

Matrix	Application	Structure
Sinapinic acid (SA) MW 224.07	<ul style="list-style-type: none"> • Peptides • Proteins 	<chem>CC(=O)C=Cc1cc(OC)c(O)c(OC)c1</chem>
Alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid (CCA) MW 189.04	<ul style="list-style-type: none"> • Peptides • Proteins 	<chem>CC(=O)C=Cc1ccc(O)cc1</chem>
2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) MW 224.07	<ul style="list-style-type: none"> • Peptides • Carbohydrates • Glycolipids • Polar synthetic polymers 	<chem>OC(=O)c1cc(O)c(O)cc1</chem>

表 1 代表的なマトリックス

Time-of-Flight (TOF) MSについて

イオン化したサンプルは、加速電圧によって運動エネルギーを与えられ、高真空のフライトチューブ内で自由飛行を始めます。フライトチューブ内の反対側にはディ

テクターが設置されています．このディテクターに分子量の低い分子が早く到達し，高い分子は後から到達することで分離が行われ，ディテクターまでの時間を測定することでその分子の分子量が決定できます．（図2参照）

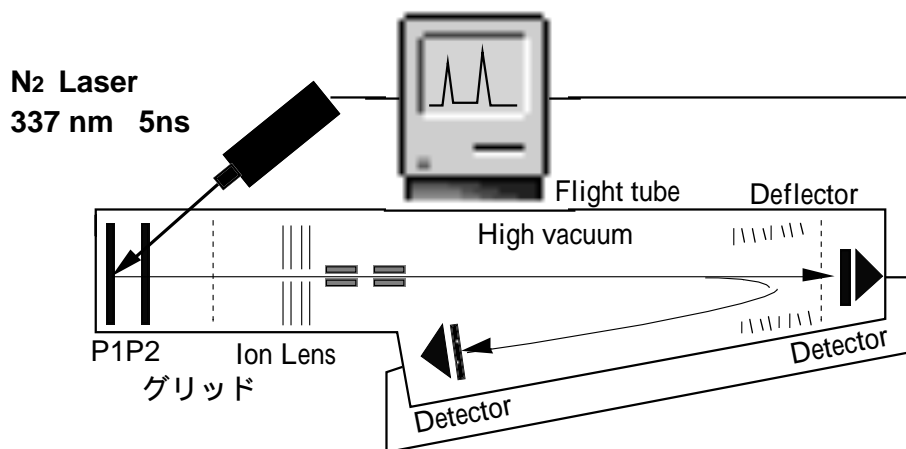


図2 TOF MSの概略

§ 3 理論

加速領域内に存在する質量 m (amu) の z 価イオンは一定加速電圧 V (volt) の電場強度により加速エネルギー (zeV) を与えられる．場の存在しない自由飛行領域に入射されたイオンのもつ運動エネルギーは加速エネルギーと等しいので式 (1) が成立し，この式 (1) よりイオンの速度 v (m/sec) は式 (2) で表される．

$$mUv^2/2=zeV \quad (1)$$

$$v=(2zeV/mU)^{1/2} \quad (2)$$

したがって，イオンが距離 L (m) ($L=X_1+X_2$) を飛行する時間 t (sec) は

$$t=L/v \quad (3)$$

であるので，式 (2)，(3) より基本式である式 (4) が導かれる．

$$m/z=2eV/(t/L)^2/U \quad (4)$$

通常，TOF MSにおいて加速電圧 V と飛行距離 L は一定であるので，式 (4) は次のようにあらわすことができる．

$$m/z=Kt^2 \quad (5)$$

$$K=2eV/UL^2=1.929 \times 10^8 V/L^2$$

e : 電子の電荷【 $e=1.602 \times 10^{-19}$ (c)】

U : 原子質量単位 (atomic mass unit : amu)

$$\text{【}U=1.6605 \times 10^{-27} \text{ (kg)}\text{】}$$

すなわち，イオンの質量 (m/z) は飛行時間 (t) の2乗に比例することがわかる．したがって，実際の測定においては式 (6) における係数 a と b を既知の試料を用いたキャリブレーションにより求めておき，未知試料のイオンの飛行時間を質量数に換算する．

$$m=at^2+b \quad (6)$$

a, b : 定数

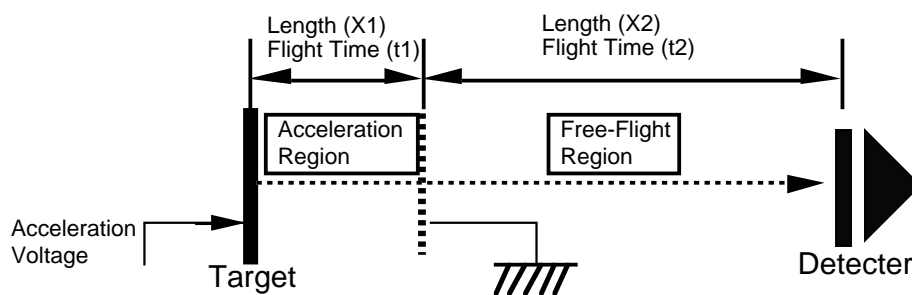


図3 TOF MSの概念図

キャリブレーション: Matrix - Assisted Laser Desorption Ionization Time - of - Flight Mass Spectrometer (Model Reflex) では , Calibrantを用いることで未知試料の真のMassを測定します . 実際には , CalibrantをTA buffer (0.1%TFA/acetonitril (2:1)) で1 ~ 10 pmol/ μ lに調製後 , 未知試料と1:1で混合し , 更にその混合溶液とMatrixを1:1で混合したものを測定することで真のMassを得ます . 以下に推定される分子量と選択すべきCalibrantを示します .

分子量	選択すべきCalibrant
Mw<5000	Angiotensin II human, Substance P, ACTH(18-39), Insulin Bovine
5000<Mw<10000	Insulin Bovine, Ubiquitin, Cytochrome C horse
10000<Mw<60000	Cytochrome C horse, Myoglobin horse, Trypsin bovine, BSA
60000<Mw	BSA, BSA-dimer

表2 代表的なCalibrant

Calibrants	平均分子量	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{++}$
Angiotensin II human	1046.192	1047.200	-
Substance P	1347.728	1348.736	-
ACTH(18-39)	2465.720	2466.728	-
Insulin Bovine	5733.549	5734.557	2867.728
Ubiquitin	8564.835	8565.843	4283.425
Cytochrome C horse	12360.080	12361.088	6181.048
Myoglobin horse	16951.457	16952.465	8476.736
Trypsin bovine	23311.53	23312.54	11656.77
BSA	66430	66431	33216
BSA-dimer	132858	132859	66430

表3 代表的なCalibrantの $[M+H]^+$ および $[M+2H]^{++}$

§ 4 方法

サンプル調整法: サンプル (蛋白質) は, Pharmasia BiotechのResource™RPC等のHPLCカラムで脱塩されることをお奨めいたします。以下にサンプルの調製時に可能な限り除去すべきものを示します。

不揮発性物質

Salts (e.g. NaCl, CaCl₂, KH₂PO₄)

Detergent (e.g. Tween, Triton, SDS)

Chaotropic agent (e.g. Urea, Guanidinium salts)

solvent (e.g. DMSO, Glycerol)

これらの物質が測定サンプル中に混合していた場合には, 正確な分子量が得られない, もしくはシグナルを得られないこともあります。たとえば,

サンプル中に多量の塩が混入していた場合 (溶媒がNaCl溶液), その塩とサンプルがクラスターを形成してMass peakが非常にブロードになり良い結果が得られない, またはシグナルが得られなくなる (イオン化が妨げられる) 可能性があります。

不揮発性の溶媒 (DMSO) を使用した場合, 測定用の結晶を形成することができません。

サンプル量:

分子量 ^{a)}	測定試料の濃度 ^{b)}	Matrix ^{c)}
Mw<5000	1~2 pmol/μl	CCA
5000<Mw<10000	2~3 pmol/μl	CCA, DHB
10000<Mw<60000	3~5 pmol/μl	SA, DHB
60000<Mw	<5 pmol/μl	SA, DHB

表 4 測定試料の分子量と選択すべきMatrix

<注意事項>

a) 測定試料の分子量

b) 測定試料の濃度とは, 最終的にMatrixと混合する直前のサンプル溶液の濃度をいいます。

凍結乾燥品の場合

TA bufferで表 4 の濃度に調製する。

溶液の場合

表 4 の濃度にTA bufferで希釈する。

Internal calibrationをする場合

上記の2倍程度の濃度の測定試料にinternal calibration溶液を等量加え調製する。

- TA buffer: 0.1 % trifluoroacetic acid in water/acetonitrile (2:1) .
- Internal calibration溶液: 測定するサンプルの推定分子量に近いCalibrantを表 2 より選択し、そのCalibrantをTA bufferで1~10 pmol/ μ lに調製したもの。
- c) サンプルの推定される分子量に応じてMatrixを選択する。

<略号説明>

CCA: Alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid

SA: Sinapic acid

DHB: 2,5-dihydroxybenzoic acid

測定概要:

MatrixとしてSA, CCAを用いる場合

- 1) サンプルをTA bufferで適切な濃度の測定試料として調製する。(表 4 参照)
- 2) TA bufferに飽和させておいたMatrix溶液と測定溶液とを1:1で混合する。
- 3) Matrix溶液と測定溶液の混合溶液1~2 μ lをprobe tip上にのせ真空乾燥させる(SAのみ)。
- 4) Microscopeでサンプルの状態を観察する。
- 5) Probe tipをセットし、測定する。

Matrix溶液と測定試料の混合溶液の乾燥操作法

Matrix	乾燥操作
CCA	測定溶液をMatrix溶液と混合後、常圧室温で乾燥する。
SA	測定溶液をMatrix溶液と混合後、真空乾燥させる。

MatrixとしてDHBを用いる場合

- 1) サンプルをTA bufferで適切な濃度の測定溶液として調製する。(表 4 参照)
- 2) DHBを10mg/mlになるように20 % ethanolに溶解する。
- 3) 1 μ lのDHB溶液と3 μ lの測定溶液を混合する。
- 4) DHB溶液と測定溶液の混合溶液1 μ lをprobe tip上にのせる。
- 5) Hair dryerですばやく乾燥させる。
- 6) Microscopeでサンプルの状態を観察する。
- 7) Probe tipをセットし、測定する。

Matrix溶液と測定試料の混合溶液の乾燥操作法

Matrix	乾燥操作
DHB	SampleをMatrixと混合後、Hair dryerですばやく乾燥させる。

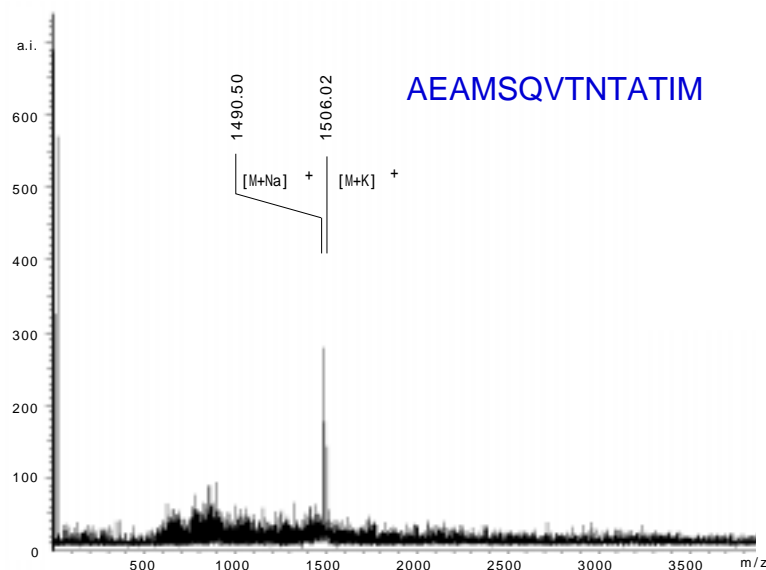


図4 MALDI-TOF MSによる測定例
HIV-1 内因性プロテアーゼインヒビター-p2^{gag} peptideの検出
(マトリックスとしてCCAを使用)
Shoji, S., *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997) in press.

§ 5 仕様

Bruker REFLEX™ Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS)の仕様を以下に示す。

機種	: Bruker REFLEX™ Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometer
反射型MALDI-TOF	: 総飛行距離 165 cm, グリッドレスイオンリフレクター, 正/負イオン測定, 最大加速電圧 30kV
サンプル導入	: SCOUT 26サンプルターゲット, コンピュータコントロールX-Yステージ, CCDカメラによるターゲットモニター
データ処理システム	: SUN, 17インチカラーモニター, XMASSソフトウェア, UNIXソフトウェア
データアキュイジション	: 1GHz デジタイザ

§ 6 . 利用上の注意事項

タンパク質試料溶液は, 一般に無機塩を含んでいるが, 質量分析計による測定では脱塩した試料を用いた方が, 良いスペクトルを得ることができる。

レーザーのパワーは, スペクトルの質を決定する重要なパラメーターである。パワーを上げれば上げるほど初期運動エネルギーのバラツキが大きくなり, 精度が低下する。逆にあまりパワーを下げてしまうと, 検出に十分なイオンを得ることができない。良いスペクトルを得るためには, 目的のタンパク質がイオン化する最低強度の

レーザーパワーを見つけることが重要である。

スペクトルの質は、マトリックス分子の結晶構造がうまくできているかどうかにより大きく依存する。一般的に、無機塩やグリセロールを含む試料や、界面活性剤や高濃度の尿素、TFAなど、タンパク質の変性剤や可溶化剤に溶解した試料では、マトリックスの結晶がうまくできず、良いスペクトルを得ることは難しい。

MALDI法では次の場合にイオン化されやすい。

- 1) 分子量 小>大
- 2) 疎水性 大>小 (分子量が同程度なら)
- 3) 正電荷の数 大>小 (プラスイオンを検出するポジティブモードの場合)

MALDI法でのイオン化を規定している因子や機構は十分に明らかになっていないので、ここにあげたパラメータ以外にも未知のパラメータが関係していると考えられる。

§ 7 応用例

アミノ酸配列分析法

MALDI-TOF MSは、磁場型のMSに比べると分解能の点で劣っていたため、高分解能を保つためにそれなりの測定技術を要していたが、近年この問題を大幅に改善するDelayed Extractionが開発され、MALDI-TOF MSをもちいたアミノ酸配列分析法は飛躍的に進歩した。このDelayed Extractionとリフレクターを用いることにより、フラグメントイオンを分離する『MS/MS』としての機能を重視されるようになった。タンパク質のアミノ酸配列分析法としては、PSD法、CID法、酵素を用いたアミノ酸配列決定法等がある。

Post source decay(PSD)-Low energy collision法

分子がイオン化されることによりもつ過剰エネルギーを使い、Post-source decay (PSD) を起こします。これは分子が飛行中にメタステーブルディケイを起こしフラグメントイオンが生成するものです。ここで生成したフラグメントイオンをリフレクターのポテンシャルを変化させること (V_{ref} を30 kVから徐々に下げていく) によりMassをセレクトし、異なる分子量のイオンを選択的に測定します。その後、Massをキャリブレーション一つのスペクトルとして表し (図6参照)、そのフラグメントパターンからシーケンスを解析する方法です。はじめに余分な分子 (マトリックスや2価イオン) をディフレクターのパルス電場によりカットして測定分子だけをフライトチューブ側に導いて測定を開始します。リフレクターのポテンシャルを数段階ステップさせ測定を開始します。最後にキャリブレーションを行い一つのスペクトルにして結果となります。

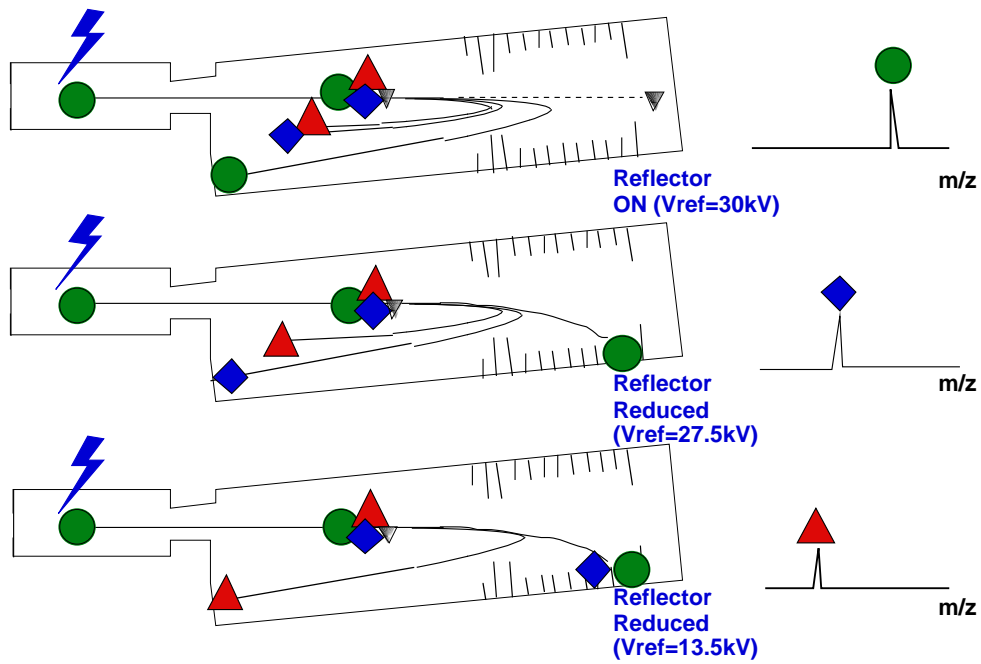


図5 PSDの概念図

リフレクターのポテンシャルを数段階ステップさせ
得られたスペクトルの合成

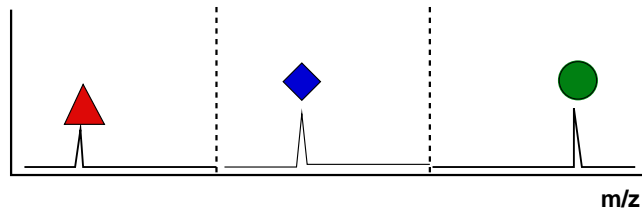


図6 PSDによって得られたスペクトルの合成

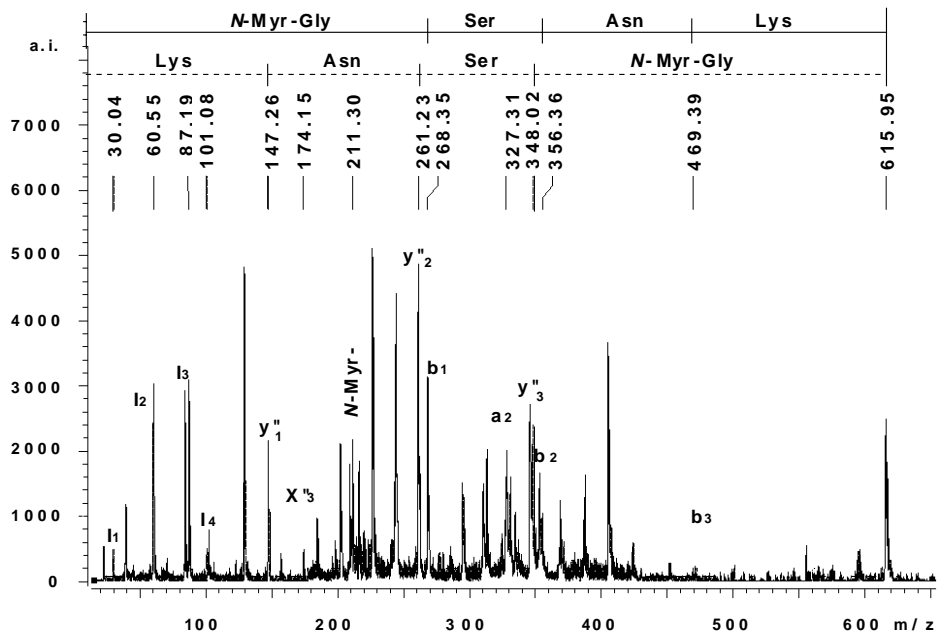


図7 PSD法によって得られたN-Myr-GSNK peptideのアミノ酸配列

Collision induced dissociation(CID)-High energy collision法

衝突活性化により起こるイオンの分解によって生じるフラグメントイオンを、リフレクターで分離してスペクトルを測定する方法。High energy collisionであるためPSDでは生じないフラグメントイオンも積極的に検出できる。具体的にはLeuとIleの違いを質量分析的に決定できるばかりか、翻訳時/後修飾タンパク質の修飾部位周辺構造をより明確にできる。基本的にはフラグメントイオンの分離方法は、PSD法と同じであるが、サンプルプレート上でイオン化された分子イオンにアルゴンなどの不活性ガスを吹き付けることにより、分子イオンを不活性ガスに衝突させ、分子イオンのフラグメントイオンを積極的に生じさせる点がPSD法と異なる。

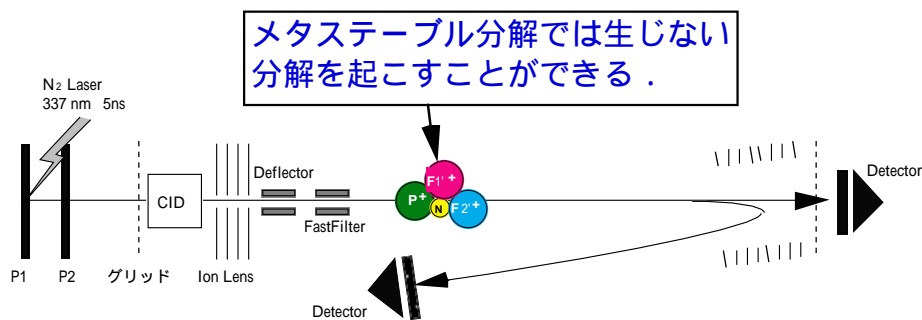
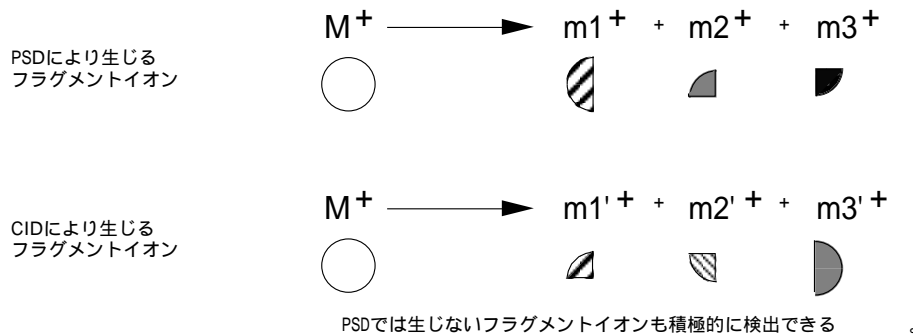


図8 CIDの概念図

酵素を用いたアミノ酸配列決定法

目的のペプチドのN末端またはC末端のアミノ酸が1つずつ欠損したラダー状の反応混合物を調製し、これをMALDI-TOF MSで測定して、各ピークの質量差から相当するアミノ酸を同定する。このラダー状の混合物を調製するには、カルボキシペプチターゼやアミノペプチターゼで目的のペプチドを消化する方法などがある。

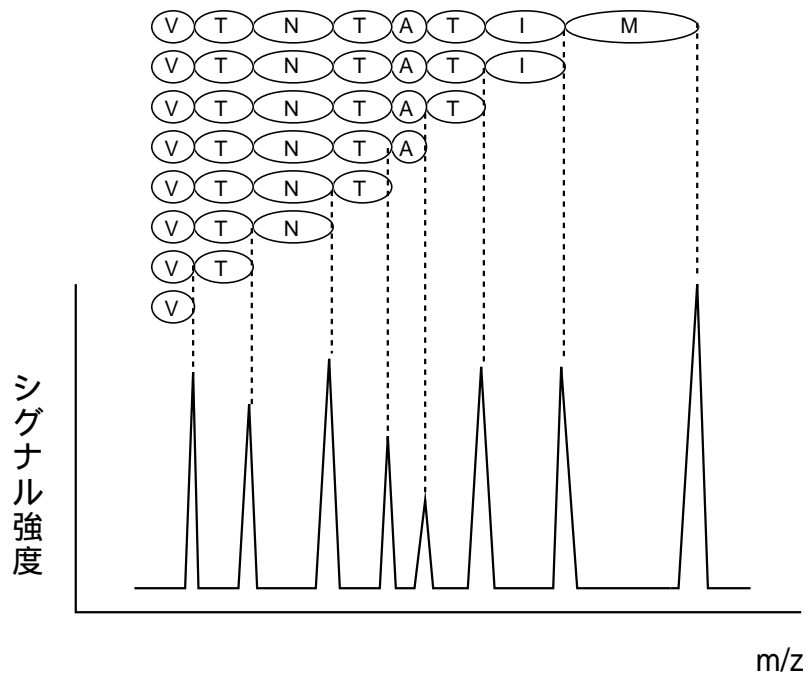


図9 酵素を用いたアミノ酸配列決定法の概念図
(カルボキシペプチターゼの場合)

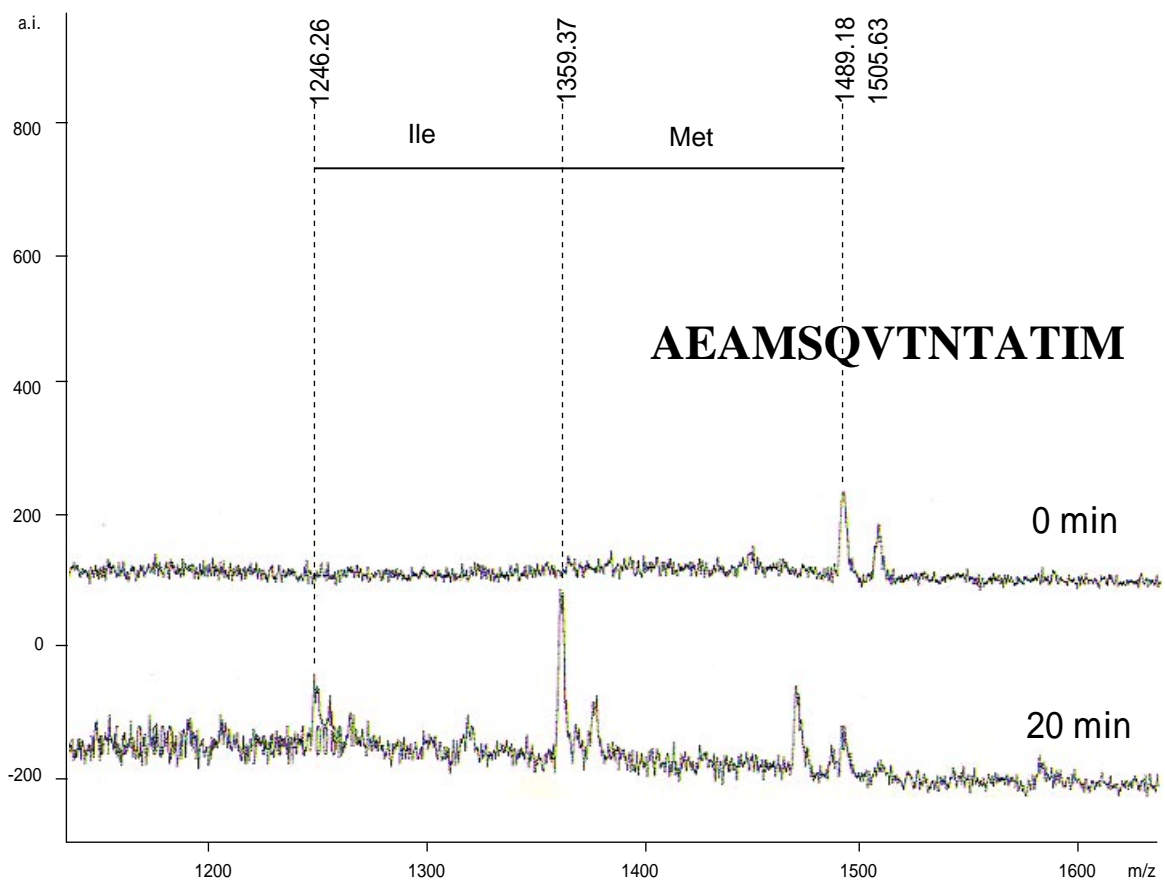


図10 HIV-1 p2^{Gag} peptide (AEAMSQVTNTATIM) のカルボキシペプチターゼYを用いたC末端アミノ酸配列分析 (カルボキシペプチターゼYを用いて20分間酵素反応後, MALDI-TOF MSを用いてC末端のアミノ酸配列を決定した例)

MALDI-TOF MSを用いた翻訳時・後修飾の解析

多くのタンパク質は、その分子自体の細胞内での発現量や合成、分解速度だけでなく、脂肪酸やリン酸、糖鎖の付加や脱離等の翻訳時・後修飾によってもその活性や機能が調節されている。したがって、一般にタンパク質の構造と機能、相互作用を知るためには、の翻訳時・後修飾の解析が必要である。その一例として、ここに翻訳時修飾であるタンパク質のミリストイル化の解析法を示す。

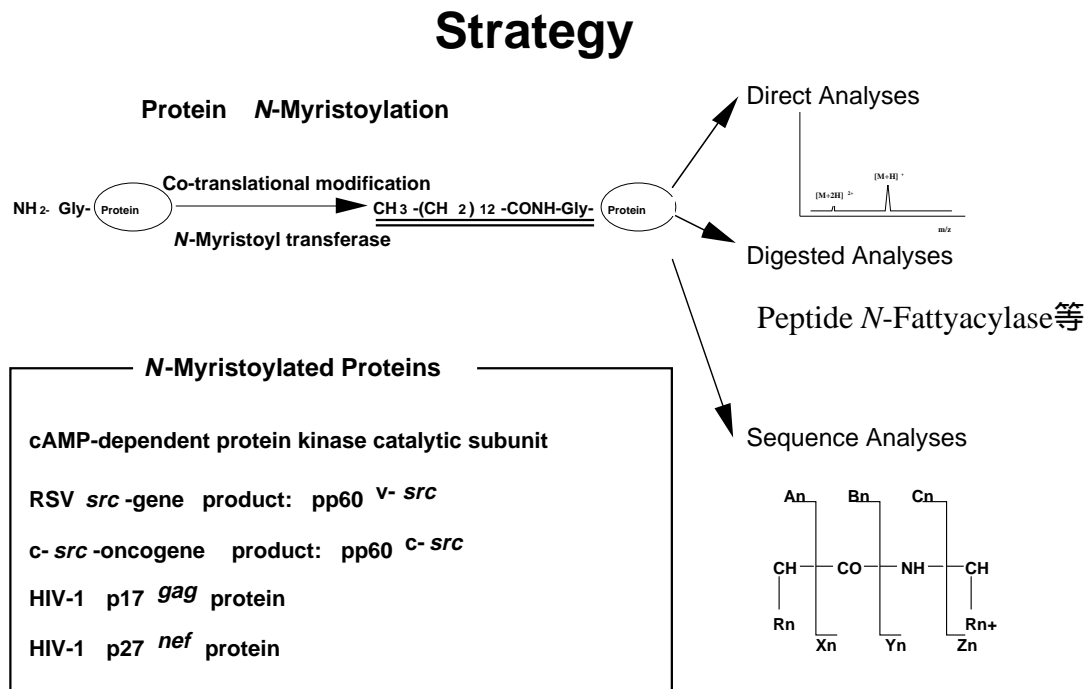


図 1 1 MALDI-TOF MSを用いたタンパク質ミリストイル化解析法のStrategy

アミノ末端ミリストイル化タンパク質のアミノ末端アミノ酸配列の化学的同定法

1982年、仔牛心筋由来cAMP-dependent protein kinase触媒サブユニットの全一次構造決定の際、タンパク質のアミノ末端に炭素数14の長鎖飽和脂肪酸であるミリスチン酸が酸アミド結合を介して共有結合していることが庄司により見いだされて以来、今日までに種々のアミノ末端ミリストイル化タンパク質が報告されている(図1.1参照)。

タンパク質のアミノ末端ミリストイル化は、細胞内に存在するN-myristoyl transferaseによって触媒され、ミリストイル基供与体であるmyristoyl-CoAから、ミリストイル基がタンパク質のアミノ末端Gly残基へ酸アミド結合を介して翻訳時に転移されると考えられている。

これまで、種々のアミノ末端ミリストイル化タンパク質のアミノ末端配列がcDNAから推定されているが、これらアミノ末端ミリストイル化タンパク質のアミノ末端アミノ酸配列を直接化学的に同定する方法は確立されていなかった。そこでここに免疫学的手法およびペパーテクノロジーを駆使し、MALDI-TOF MSを用いたアミノ末端ミリストイル化タンパク質のアミノ末端アミノ酸配列の化学的同定法をここに述べる。

ミリスチル化タンパク質の同定及び分離

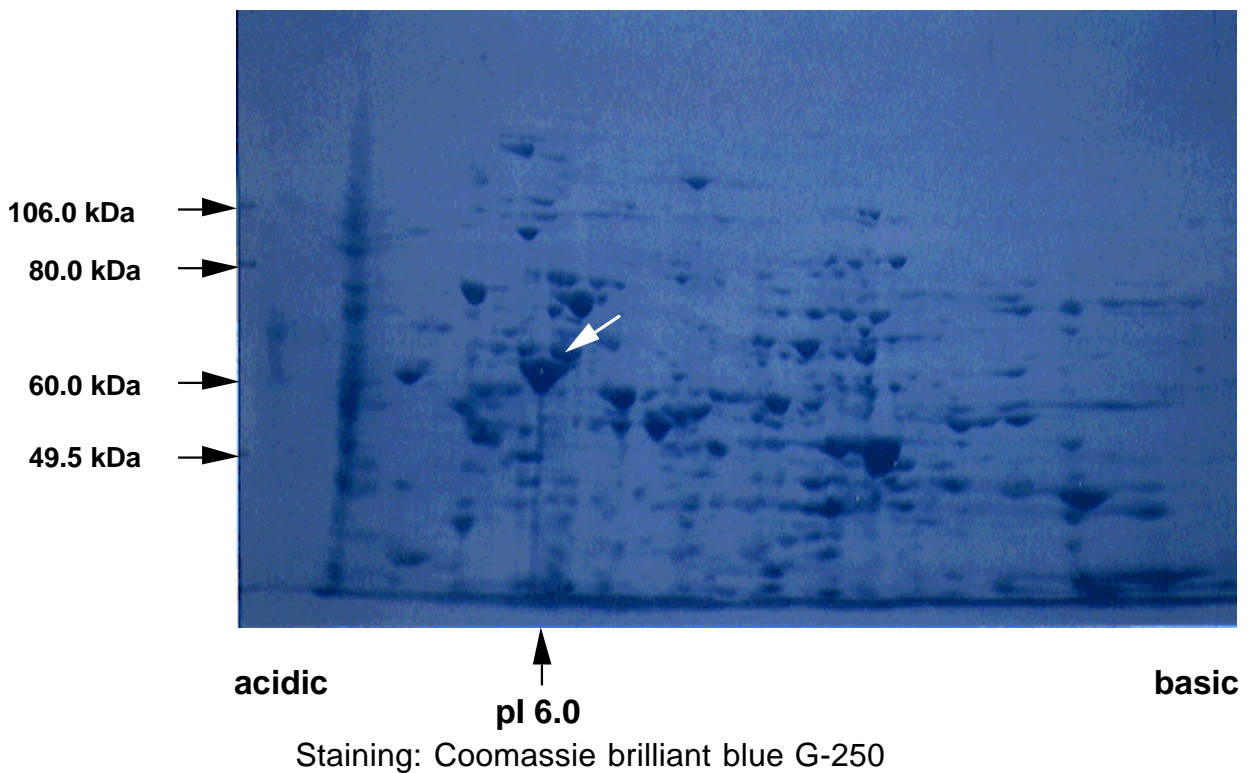
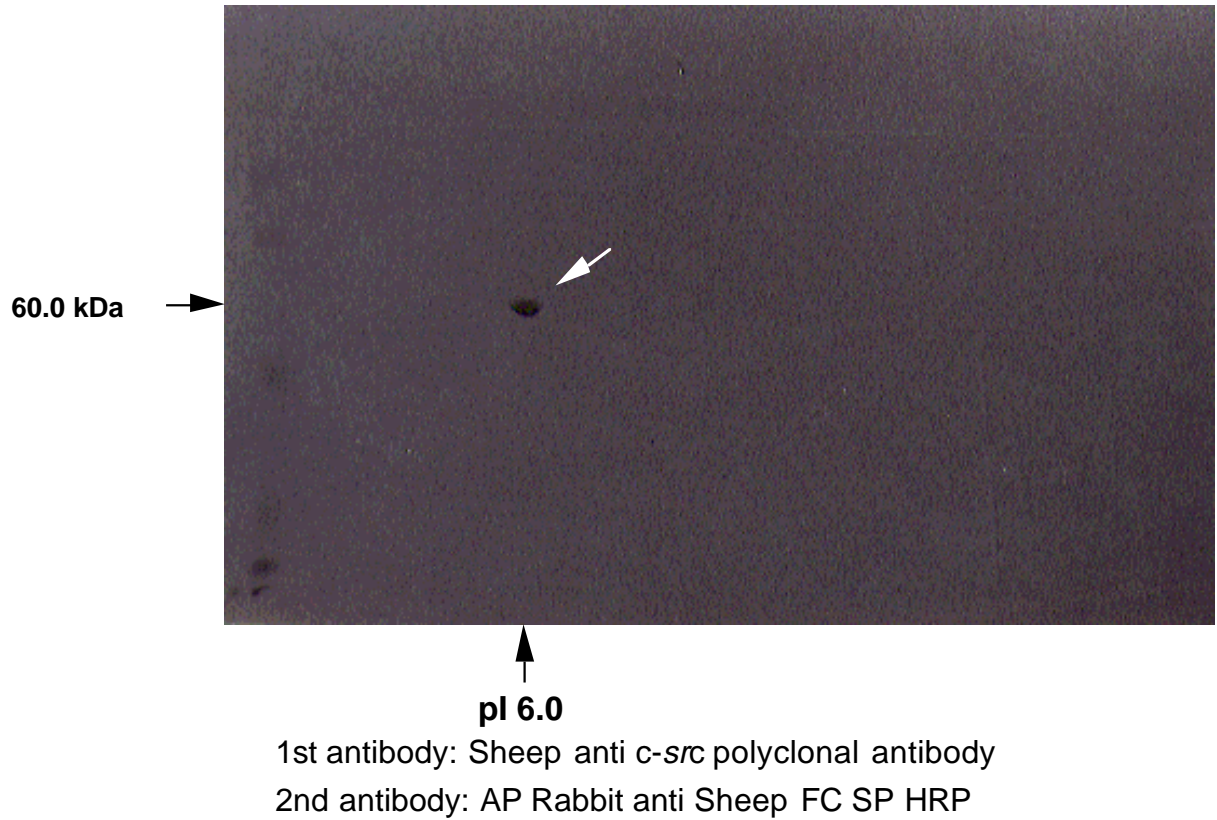


図1 2 Immunoblotting Analysis after Two-Dimensional Electrophoresis
(上: Sheep anti c-src polyclonal antibody を用いた N -Myr-pp60^{c-src} の同定, 下:
Coomassie brilliant blue G-250を用いた N -Myr-pp60^{c-src} の検出)

ヒト結腸腺癌細胞COLO320DMのcell lysateを二次元電気泳動後、プロットティングを行い、一次抗体としてSheep anti c-src polyclonal antibodyを用いてwestern immunoblotting analysisを行ったところ等電点6.0に分子量60kDaのN-Myr-pp60^{c-src}を同定することができた(図12上)。次に、N-Myr-pp60^{c-src}のアミノ末端アミノ酸配列を決定するために先程と同様に二次元電気泳動後、プロットティングを行い、Coomassie brilliant blue G-250で染色し、N-Myr-pp60^{c-src}に相当する部分を切り取り、そのPVDF膜をtrypsin消化後、90% EtOHを用いて12時間振とうし、得られた膜を0.1% TFAを含む30% アセトニトリルを加え、10分間超音波処理した溶液をHPLC (column: PICO・TAG column, A buffer: 30% CH₃CN containing 0.1% TFA, B buffer: 80% CH₃CN containing 0.1% TFA, Gradient: 0 100% B, 30 min) で分離しMALDI-TOF MSで分析する。

アミノ末端ミリスチル化ペプチドの同定

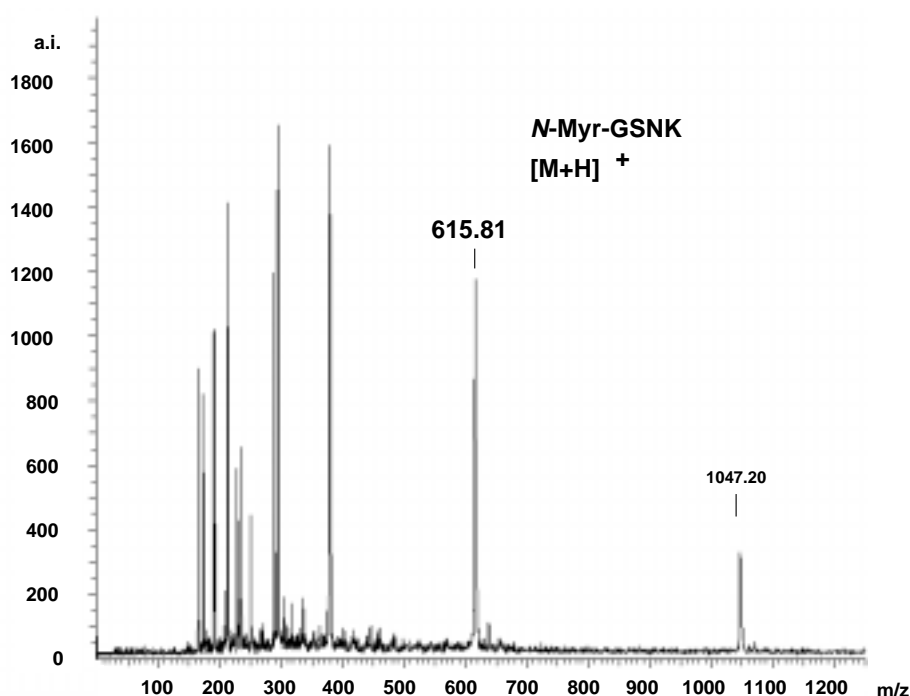


図13 N-Myr-pp60^{c-src}由来N-Myr-GSNK peptideの同定

Shoji, S., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217:632-639 (1995)

で得られたHPLCのフラクション (retention time 18 min) をMALDI-TOF MSで分析したところ、N-Myr-pp60^{c-src}のアミノ末端tetrapeptideであるN-Myr-GSNK peptideを同定することができた。また確認のために、このHPLCフラクションを凍結乾燥後、ミリスチル基切断活性を有するPeptide N-Fattyacylaseを用いて酵素反応後、HPLC (column: PICO・TAG column, A buffer: 30% CH₃CN containing 0.1% TFA, B buffer: 80% CH₃CN containing 0.1% TFA, Gradient: 0 100% B, 30 min) で分離後、得られたフラクション (retention time 2 min) を気相プロテインシーケンサーで分析を行った結果、

GSNK peptideであり，*N*-Myr-pp60^{C-src}のcDNAから推定されたアミノ末端アミノ酸配列と一致し，アミノ末端ミリスチル化タンパク質のアミノ末端アミノ酸配列の化学的同定法を確立することができた．

ミリスチル化ペプチドの化学的同定法

アミノ末端が本当にミリスチル化でブロックされているかどうかは，先程と同様にミリスチル化を受けていると思われるタンパク質のアミノ末端ペプチドを分離した後，Peptide *N*-Fattyacylaseを用いて酵素反応後，Peptide *N*-Fattyacylaseによってミリスチル基が切断されたために生じる質量の差を確認すればよい．

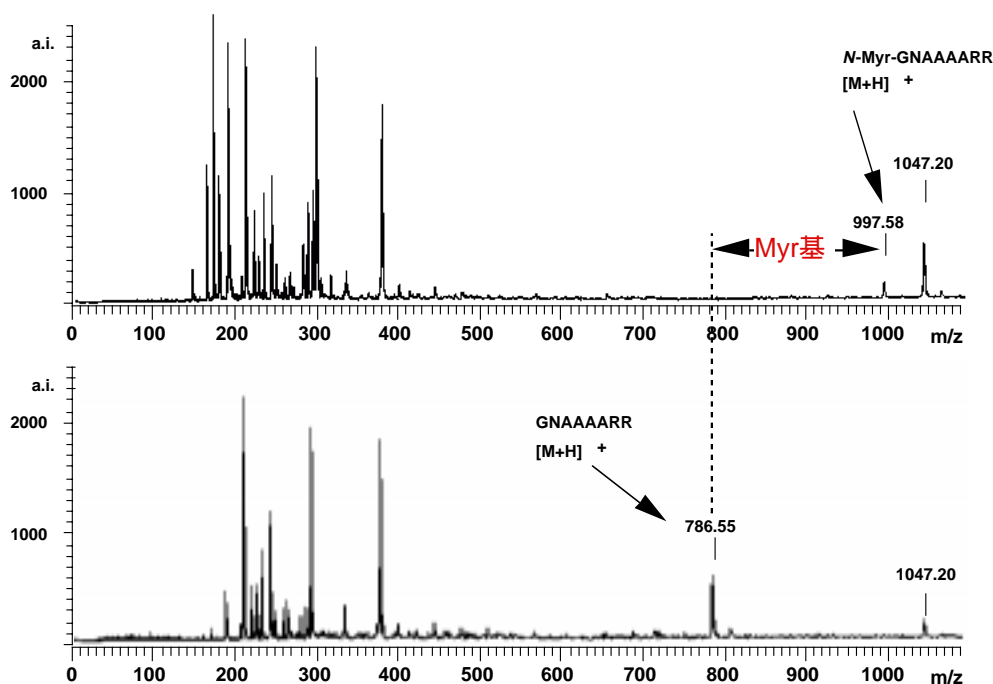


図 1 4 アミノ末端ミリスチル基の同定

Peptide *N*-Fattyacylaseによって*N*-Myr-GNAAAARR peptideのミリスチル基を切断した例