

MALDI-TOF/MS による *de novo* ペプチドシーケンスを容易にする 2 種の化学修飾法の比較

佐々 美里、松川 茂 （福井大学 総合実験研究支援センター バイオ実験機器部門）

SASSA Misato, MATSUKAWA Shigeru : Two chemical modifications facilitating *de novo* peptide sequencing by MALDI-TOF/MS

The CAF is known as a measure of peptide sequencing by mass spectrometry for increase of efficiency. There are two methods in this strategy. Both N-terminal derivatization method using 4-sulfophenyl isothiocyanate, and C-terminal lysine derivatization method using 2-methoxy-4,5-dihydroimidazole have been reported. These methods have become an effective derivatization strategy in facilitating *de novo* peptide sequencing by the formation of predominate y-type ion series in MALDI PSD spectra. In this paper, we describe a comparative characteristic of these methods. The methods are applied to three model peptides and tryptic digests of two proteins, egg lysozyme and horse myoglobin. The results indicate that N-terminal derivatization results in high efficiency peptide sequencing of C-terminal arginine peptide, and also that efficiency of sequencing and sensitivity of mass detection of C-terminal lysine peptide can be increased by C-terminal lysine derivatization using 2-methoxy-4,5-dihydroimidazole.

1. 目的

質量分析法によるペプチドシーケンスの能率化をめざした方法として CAF (Chemically Assisted Fragmentation)法が提唱されており、L.N.Marekov らが開発した SPITC 法と E.C.Peters らの MODHImd 法がある。前者はペプチドの N 末端に 4-sulfophenylisothiocyanate を結合させ、後者は 2-methoxy-4,5-dihydroimidazole をトリプティックペプチドの C 末端リジンに結合させる。その誘導体ペプチドについて PSD(post source decay)測定によりランダムにペプチド結合を開裂した後の断片の質量から配列を推定する方法である。元のペプチドの PSD は、a,b,Y 系列の複雑な開裂ピークを示すが、誘導体化すると単純な Y 系列のみのピークが得られる点で *de novo* シーケンスの効率が高くなる。今回は両方法の特徴について MALDI-TOF/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight/ Mass Spectrometry)で比較した結果を示す。

2. 方法

モデルペプチドとして C 末端リジン含有ペプチド（中性のヒト amyloid β -protein(1-16)、塩基性のラット cortistatin14、強塩基のヒト dynorphinA(1-13)の 3 種）に対し、それぞれ SPITC 法と MODHImd 法により N 末端と C 末端を修飾した。また、Lysozyme(卵白)と Myoglobin のトリプティックペプチドに対して修飾を

行い、各々の *de novo* シーケンスを比較検討した結果も示す。

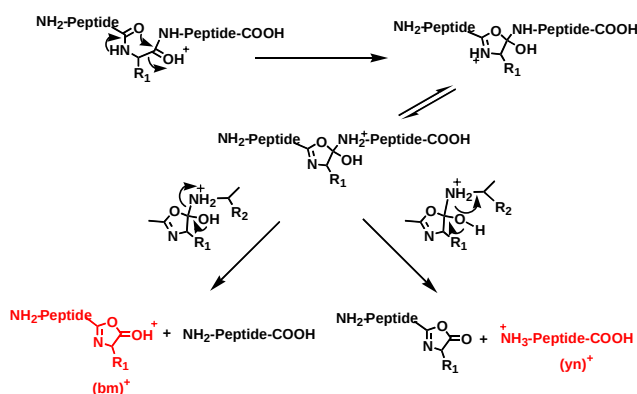


図 1. b、y イオン生成過程

3. CAF 法の原理

MSでは図1のようにb,yイオンが生成され、正電荷が付加されているので両方のイオンがpositive mode MSで検出される。SPITC法ではN末端側にSO₃⁻が付加されるため、bイオンは電氣的に中性となり検出されなくなる。MODHImd法ではC末端側のリジンにimidazoleが付加され、さらに正電荷を帯びやすくなるため相対的にyイオンのintensityが高く検出されやすくなる。以上のことにより、これら2法でペプチドを誘導体化すると単純なY系列のみのピークからなるスペクトルが得られる。

4. 結果

モデルペプチドの修飾

I. Amyloid β -protein(N-DAEFRHDSGYEVHHQK-c)
両法での修飾が MS で確認でき (図 2, 上)、そのピークに対してそれぞれ PSD 測定を行った。Y 系列のピークが相対的に高く現れ配列がほぼ決定でき、SPITC 法 (図 2, 中) に比べ MODHImd 法 (図 2, 下) でより容易にシーケンスを得ることができた。

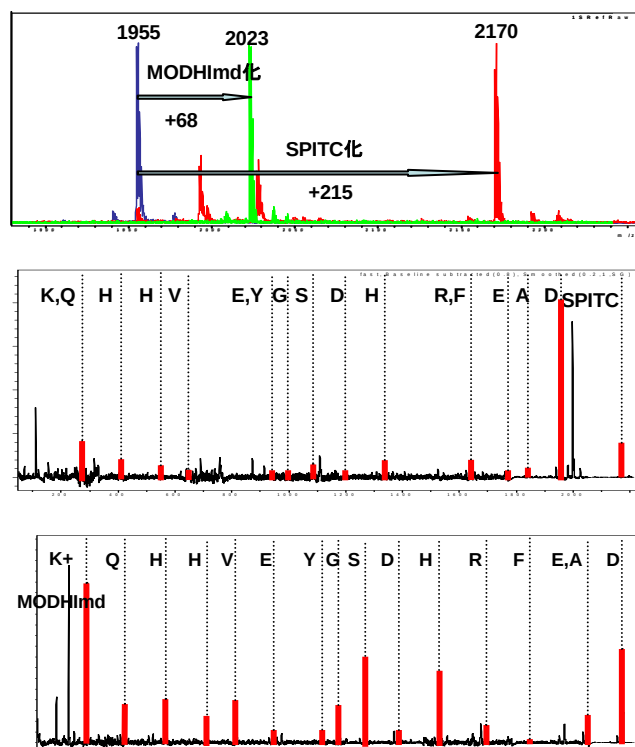


図 2. Amyloid β -protein の修飾と PSD 測定

II. DynorphinA(N-YGGFLRRIRPKLK-c)

両法の修飾はされていることが確認できたが、PSD によるスペクトルの測定では Y 系列以外の系列も含まれていたために配列の決定はできなかった。

III. Cortistatin(N-PCKNFFWKTFSSCK-c)

両修飾とも効率が悪く誘導体化ペプチドのピークは確認できなかった。しかし、トリプシン処理により断片化すると PCKNFFWK ペプチドの MODHImd 法では修飾が確認でき、PSD 測定により配列が決定できた。

Tryptic peptides の修飾

I. Lysozyme の SPITC 修飾

C 末端がアルギニンであるペプチドはリジンであるペプチドよりも検出しやすい傾向があり、SPITC 修飾が確認できたピークは全て C 末端アルギニンペプチドであった。(図 3) さらに、修飾が確認できたペプチド (*) は PSD により配列がほぼ決定できた。

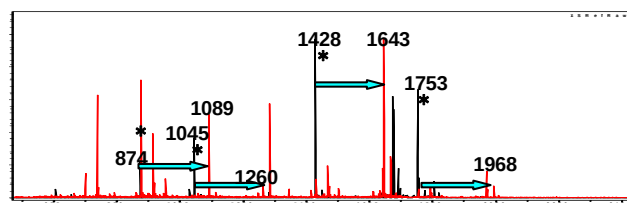


図 3. Lysozyme tryptic peptides の SPITC 修飾

II. Myoglobin の MODHImd 修飾

MODHImd 法では C 末端がリジンであるペプチドのみが修飾されるので、Myoglobin の Tryptic peptides のうち、C 末端がリジンであるペプチドは修飾され C 末端がアルギニンであるペプチドは修飾されていないことが確認できた。修飾により、Intensity が相対的に高くなるペプチドも見られた。(図 4) 修飾が確認できたペプチド (*) は PSD により配列がほぼ決定できた。

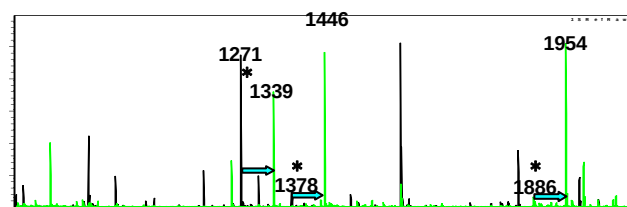


図 4. Myoglobin tryptic peptides の MODHImd 修飾

4. 考察

質量分析法によるペプチドシーケンスの能率化と確実性をめざした今回の 2 種の方法は、どちらも元の PSD に比べ単純なピークが得られた。完全な Y 系列のみではなかったが、*de novo* ペプチドシーケンスを行う際には、かなり有用なデータを得ることができ、配列決定の効率が上がることが期待できる。

今回のデータからは 1 つのペプチド断片に 2 種の修飾をそれぞれ試して比べてみるのが困難であった。C 末端リジンペプチドについては C 末端に対する MODHImd 修飾の効率が良く、C 末端アルギニンペプチドについては N 末端に対する SPITC 修飾の効率が良い、という結果だった。

また、全てのペプチドに対して同じ条件では修飾できず、今回修飾が確認できなかったり、PSD 測定で開裂ピークが十分に得られなかったペプチド断片については、現在検討中である。