報 文

液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量
分析法を併用する複合質量スペクトルマッピング法による
血管拡張性組み換えペプチドの構造解析吉田 誠一^{®*}, 田島 正裕^{**}, 高松 翼^{*}Structural characterization of a potent vasodilatory recombinant peptide by a multiple
mass spectrometric approach including LC/electrospray ionization MSSeiichi YOSHIDA^{*}, Masahiro TAJIMA^{**} and Tasuku TAKAMATSU^{*}^{*}Safety & Analytical Research Center, Shiseido Research Center, 1050, Nippa-cho, Kohoku-ku,
Yokohama-shi, Kanagawa 223^{**}Pharmaco Science Research Laboratories, Shiseido Research Center, 1050, Nippa-cho, Kohoku-ku,
Yokohama-shi, Kanagawa 223

(Received 31 July 1997, Accepted 20 October 1997)

The versatility of a multiple mass spectrometric strategy for the structural characterization of proteins and peptides using complementary fast atom bombardment (FAB) and matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) in combination with liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI MS) has been investigated. Recombinant "Maxadilan" (r-Max), a potent vasodilator peptide from *Lutzomyia longipalpis*, was used as a sample. An accurate mass measurement of intact r-Max by LC/ESI MS provided a direct confirmation of the presence of two intramolecular disulphide linkages. The hydrophilic and low-molecular-weight fragment of the chymotryptic digest of reduced and carboxymethylated r-Max could be detected, although it was difficult to detect by either FAB or MALDI alone; also a complete mapping of the primary structure of r-Max was achieved. An LC/ESI MS measurement of the tryptic digest of r-Max revealed fragments containing Cys⁵-Cys⁹ and Cys¹⁸-Cys⁵⁵ linkages, and allowed the locations of the two disulphide linkages to be determined in a single analysis. The results fully support the value and position of LC/ESI MS in a multiple mass spectrometric strategy.

Keywords : Maxadilan; LC/ESI MS; primary structure; disulphide linkage; multiple mass spectrometric strategy.

1 緒 言

^{*} (株)資生堂安全性・分析センター: 223 神奈川県横浜市港北区新羽町 1050

^{**} (株)資生堂薬剤開発研究所: 223 神奈川県横浜市港北区新羽町 1050

スナバエ (*Lutzomyia longipalpis*) のだ液せん(腺)から単離された血管拡張性ペプチド "Maxadilan" (Max, 分子量 6839)¹⁾は、この昆虫が血を吸うために放出するも

ので、その活性はカルシトニン遺伝子関連ペプチドに知られる最高活性よりはるかに高いものである²⁾³⁾。

単離した Max 遺伝子⁴⁾を用い、組み換え DNA 技術により生産される組み換え Max (r-Max)⁵⁾は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパクとして得られ、これをトロンビンで切断した分子量 7423、アミノ酸数 67 のペプチドである。

アミノ酸配列が既知の組み換えタンパク、ペプチドの一次構造の確認、あるいはジスルフィド結合等の翻訳後修飾の解析には、高速原子衝撃 (FAB) イオン化法⁶⁾、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法⁷⁾⁸⁾、及びエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法⁹⁾¹⁰⁾と特徴のあるイオン化法が開発され、特に MALDI に組み合わせられて高分子量測定が可能な飛行時間型質量分析計 (TOFMS) が整備されたことから、質量分析 (MS) 法が広く利用されている^{11)~13)}。著者らも FAB と MALDI-TOFMS を相補的に用い、タンパク、ペプチドを酵素消化して得られる混合物をそのまま MS に供することで構造解析を行う複合 MS マッピング法を提唱し、r-Max の一次構造解析に用いてきた¹⁴⁾¹⁵⁾。

複合 MS マッピング法では、r-Max の場合 MALDI は 1 pmol と微量で測定できたが、FAB では 1 nmol 必要であり、トータルとして数 nmol の試料を必要とした。この手法は、酵素消化物等の混合物をそのまま直接分析に供することができ、短時間で測定できるという利点がある反面、イオン化抑制により完全なマッピングができないことがある^{16)~19)}。

一方、ESI は一般に逆相 LC と組み合わせ、ペプチドマッピングに広く利用されるようになり²⁰⁾²¹⁾、感度的にも複合 MS マッピング法と同等のものが得られてきている。従って、分離を伴うものではあるが、FAB、MALDI に更に LC/ESI MS を組み合わせることで、より完全な複合 MS マッピング法が構築できるものと考えられた。

本報では既に FAB と MALDI を相補的に用いることにより、一次構造確認及びジスルフィド結合位置の決定を実施した r-Max を試料として、複合 MS マッピング法における LC/ESI MS の有用性を検討したので報告する。

2 実 験

2・1 試料及び試薬

r-Max の製法及び精製法は、既報に準じた⁵⁾。その cDNA の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を Fig. 1 に示した。

Fig. 1 Amino acid sequence of r-Max

キモトリプシンとトリプシン (TPCK 処理) は Worthington Biochemical 製を購入した。トリス-HCl, EDTA, グアニジン-HCl, ジチオスレイトール (DTT) 及び炭酸水素アンモニウムは Sigma 製を用いた。ヨード酢酸は和光純薬製を購入した。アセトニトリルはナカライテスク製の高速液体クロマトグラフ用特製試薬を、トリフルオロ酢酸は和光純薬製のアミノ酸配列分析用を用いた。

2・2 r-Max の還元、カルボキシメチル化

200 µg の r-Max をポリプロピレン製バイアルに採り、250 µl の緩衝液 (6 M グアニジン-HCl, 0.25 M トリス-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.5) に溶解した。1 mg の DTT を加え、窒素置換を行った後、室温暗所にて 2 時間放置することにより、ジスルフィド結合の還元を行った。更に、3 mg のヨード酢酸を加え、室温暗所にて 30 分間放置することによりカルボキシメチル化を行った。東ソー製の Ampure™ SA により脱塩した後、凍結乾燥した。

2・3 キモトリプシン及びトリプシン消化

還元カルボキシメチル化した r-Max (c-Max) のキモトリプシン消化は、酵素と基質 (100 µg) の比を 1 : 50 とし、0.4% 炭酸水素アンモニウム緩衝液 pH 8.4 中 37°C、3 時間の条件で行った。トリプシン消化は、消化時間を 4 時間とし、その他の条件は同一とした。酵素

Fig. 2 (a) UV and (b) MS chromatogram of r-Max

A: 0.1% TFA in H_2O , B: 0.085% TFA in acetonitrile; B 10% (10 min) $\rightarrow$ 60% (1%/min) flow rate 50 $\mu\text{l}/\text{min}$

Fig. 3 (a) ESI mass spectrum and (b) deconvoluted spectrum of r-Max

消化後, 反応液をそのまま凍結乾燥し, MS 測定用試料とした。

2・4 装置

LC 装置は資生堂製セミマイクロ LC SI-1 システムを用い, カラムは資生堂製 Capcell Pak C_{18} UG120 (内径 1.0 mm, 長さ 250 mm) を用いた。

ESI MS 装置は, フィニガン MAT 製の MAT 95 型を使用した。各々の測定条件を以下にまとめた。

LC 条件: A 液, 0.1% TFA 水溶液; B 液, 0.085% TFA アセトニトリル溶液; グラジエント条件, B 0% 又は 10% (10 分間) $\Rightarrow$ 60% (1%/分); 流量 50 $\mu\text{l}/\text{分}$, カラム温度 40°C, 検出 UV 214 nm, 1000 ppm を 5 μl 注入した。

MS 条件: 質量スキャン範囲 200~3500, スキャンサイクル時間 6.2 秒, 加速電圧 5 kV, 分解能 1000, ESI キャピラリー電圧 3 kV, ESI キャピラリー温度 280°C

3 結果と考察

3・1 r-Max 及び c-Max の LC/ESI MS による分子量測定

Fig. 2 に r-Max 1000 ppm 溶液 5 μl (5 μg , 約 0.7 nmol) を注入して得られたクロマトグラム, Fig. 3 に ESI 質量スペクトル及びそのデコンボリューション後の

Fig. 4 (a) UV and (b) MS chromatogram of c-Max

A: 0.1% TFA in H₂O, B: 0.085% TFA in acetonitrile; B 10% (10 min)→60% (1%/min) flow rate 50 μ l/min

Fig. 5 (a) ESI mass spectrum and (b) deconvoluted spectrum of c-Max

スペクトルを示した。r-Max の分子量 7422.5 (ジスルフィド結合が 2 か所として計算) に対して実測値 7422.0 であり、誤差は 0.01% 以内の良好な結果であった。この結果より、ジスルフィド結合の形成を除いて、挿入や脱離などの翻訳後修飾が起きていないことが確認された。

又、同様にして得られた c-Max のクロマトグラムを Fig. 4 に、ESI 質量スペクトル及びそのデコンボリューション後のスペクトルを Fig. 5 に示したが、その分子量は 7659.0 となった。1 か所カルボキシメチル化を受けると分子量が 59 増加することより、先の r-Max との分子量の差を 59 で割ることにより (計算結果を Fig. 5 中に示した)、四つのシステイン残基がすべて均一にカルボキシメチル化を受けたことが確認された。この場合の測定誤差も 0.01% 以内となり良好であった。

既報¹⁵⁾においては、カルボキシメチル化の代わりにピリジリエチル化を用い、MALDI-TOFMS により同様の確認を実施した。MALDI と比べると ESI では測定に要した試料量は約 700 倍であるが、分子量測定精度が飛躍的に向上し、MS マッピングの過程における各々の役割が明確となった。

Fig. 6 (a) UV and (b) MS chromatogram of c-Max chymotryptic digest

A: 0.1% TFA in H₂O; B: 0.085% TFA in acetonitrile; B 0% (10 min)→60% (1%/min) flow rate 50 μ l/min

Fig. 8 (a) UV and (b) MS chromatogram of r-Max tryptic digest

A: 0.1% TFA in H₂O; B: 0.085% TFA in acetonitrile B 10% (10 min)→60% (1%/min) flow rate 50 μ l/min

3・2 c-Max のキモトリプシン消化物の LC/ESI MS 測定による一次構造の確認

c-Max を酵素消化し、一次構造のマッピングによる確認を行った。マッピングのための酵素にはトリプシンが用いられているが、r-Max の C 末端領域にトリプシンの標的となるリジン残基が局在化しているため、キモトリプシンを代わりに用いた。キモトリプシンの標的となるのは、ロイシンとフェニルアラニン残基であり、r-Max の場合これらが配列中に適度に分布していることから、マッピングに適切な酵素と考えられた。

Fig. 6 に c-Max のキモトリプシン消化物 1000 ppm 溶液 5 μ l (5 μ g, 約 0.7 nmol) を注入し、LC/ESI MS 測定して得られた UV 214 nm と MS のクロマトグラムを示した。UV 214 nm のクロマトグラムの 30 分付近のブロードなピークは、脱塩処理で除くことのできな

Fig. 7 ESI mass spectra of (a) peak 3, (b) peak 4 and (c) peak 5 of c-Max chymotryptic digest

Table 1 Assignment of peaks in the LC/ESI MS chromatogram of c-Max chymotryptic digest

Peak No.	m/z	Assignment	Amino acid sequence
1	403.1	64~67	KAGK
2	568.1	53~56	KEJM
3	935.6	57~63	KQKKKEF
4	2021.0	12~28	RKAIDDJQKQAHHSNVL
5	1083.6	29~38	QTSVQTTATF
6	1484.2	39~52	TSMDTSQLPGNSVF
7	1273.8	1~11	GSILJDATJQF

The letter 'J' in the amino acid sequence corresponds to a carboxymethylated cysteine residue.

った試薬由来の物質によるものと推定された。MS クロマトグラムの 7 本の主ピークのプロトン付加分子量とその帰属を Table 1 にまとめた。なお帰属には、自製のマッピングプログラム "Fabulous II"¹⁵⁾ を用いた。これは、あらかじめ入力したシーケンスと測定された分子量とを比較し、該当するシーケンスを規定する許容範囲でリストするものである。比較的強度の小さかったピーク 3~5 については、そのスペクトルも Fig. 7 に示したが、いずれも良好なスペクトルが得られ、約 0.7 nmol から解析が可能であった。結果的に 7 本のピークにより全一次構造がマップされたが、分子量が小さいため MALDI では検出されず、又親水性が高いため FAB でも明確に検出できなかったピーク 1, すなわち C 末端のテトラペプチドが検出されたことが、LC/ESI MS 法の有用性を示す結果となった。他の消化物は、FAB, MALDI を相補的に用いることですべて検出されている¹⁵⁾。

3・3 r-Max のトリプシン消化物の LC/ESI MS 測定によるジスルフィド結合位置の決定

r-Max 中には二つの分子内ジスルフィド結合 Cys⁵-Cys⁹ と Cys¹⁸-Cys⁵⁵ の存在が複合 MS マッピング法により既に決定されている。Cys⁵-Cys⁹ は FAB を用い、Cys¹⁸-Cys⁵⁵ は MALDI を用いて決定されているが、1 回の測定により両者を確認するには至っていない。本報では、1 回の測定で両者が確認できるか否かを検討した。そのため r-Max をトリプシンにて消化し、ジスルフィド結合領域を切り出す方法を用いた。

Fig. 8 に r-Max のトリプシン消化物を LC/ESI MS 測定して得られた UV 214 nm と MS のクロマトグラムを示した。主たるピーク 1~3 については、そのスペク

Fig. 9 ESI mass spectra of (a) peak 1, (b) peak 2 and (c) peak 3 of r-Max tryptic digest

トルを Fig. 9 に示した。ピーク 1 のプロトン付加分子量は 1311.7 であり, これは Cys³-Cys⁹ のジスルフィド結合を有する 1~12 位の消化物に相当した。計算値は 1311.6 であり, 極めて良好な一致を示した。

一方, ピーク 2 及び 3 は, (13~20) (21~57) Cys¹⁸-Cys⁵⁵ (14~20) (21~57) Cys¹⁸-Cys⁵⁵ に相当し, これから Cys¹⁸-Cys⁵⁵ のジスルフィド結合を確認することができた。これらについても計算値との誤差は各々 0.03%, 0.01% となり良好な精度が得られた。理論的にはトリプシン消化により (14~20) (54~57) Cys¹⁸-Cys⁵⁵ の生成が予測されたが, この消化物は検出されなかった。これは 53 位のリジンが Cys¹⁸-Cys⁵⁵ のジスルフィド結合による立体障害のため, トリプシン消化を受けなかったものと推察された。

LC/ESI MS により, 血管拡張性ペプチド組み換え Max の全アミノ酸配列の確認と 2 か所の分子内ジスルフィド結合位置の決定が行え, LC/ESI MS 法がペプチ

ドやタンパクの構造解析に極めて有用であることを示した。測定に要した試料量は約 0.7 nmol であり, MALDI での 1 pmol に比較すると大きな開きがあるものの, FAB, MALDI を用いる複合 MS マッピング法に加え, 最終的な確認法として位置付けられるものと考えられた。

文 献

- 1) E. A. Lerner, J. M. C. Ribeiro, R. J. Nelson, M. R. Lerner: *J. Biol. Chem.*, **266**, 11234 (1991).
- 2) S. D. Brian, T. J. Williams, J. R. Tippins, H. R. Morris, I. MacIntyre: *Nature* (London), **313**, 54 (1985).
- 3) A. D. Struthers, M. J. Brown, D. W. R. MacDonald, J. L. Beacham, J. C. Stevenson, H. R. Morris, I. MacIntyre: *Clinical Science*, **70**, 389 (1986).
- 4) E. A. Lerner, C. B. Shoemaker: *J. Biol. Chem.*, **267**, 1062 (1992).
- 5) M. Ohnuma, S. Denda, R. Ehama, F. Kanda, E. A. Lerner, M. Tajima, Y. Morikawa: Proceedings of the 31 st Symposium on Peptide Chemistry, p. 145, Protein Research Foundation, Osaka (1994).
- 6) M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1981**, 325.
- 7) M. Karas, F. Hillenkamp: *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
- 8) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
- 9) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse: *Science* (Washington, D. C.), **246**, 64 (1989).
- 10) R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, H. R. Udseth: *Anal. Chem.*, **62**, 882 (1990).
- 11) J. A. McClosky (Ed.): "*Mass Spectrometry*", Methods in Enzymology Volume 193, (1990), (Academic Press, Inc., San Diego).
- 12) T. Matsuo, R. M. Caprioli, M. L. Gross, Y. Seyama (Eds.): "*Biological Mass Spectrometry, Present and Future*", (1994), (Jhon Wiley, Chichester).
- 13) A. L. Burlingame, R. K. Boyd, S. J. Gaskell: *Anal. Chem.*, **66**, 634 (1994).
- 14) 神田不二宏, 吉田誠一, 高松 翼, 松岡昌弘, 伝田澄美子, 大沼真美, 田島正裕, E. A. Lerner: 第 56 回分析化学討論会講演要旨集, p. 263 (1995).
- 15) S. Yoshida, T. Takamatsu, S. Denda, M. Ohnuma, Masahiro Tajima, Ethan A. Lerner, F. Kanda: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 641 (1996).
- 16) A. Tsarbopoulos, M. Karas, K. Strupat, B. N. Pramanik, T. L. Nagabhushan, F. Hillenkamp: *Anal. Chem.*, **66**, 2062 (1994).
- 17) S. Naylor, F. Findeis, B. W. Gibson, D. H. Williams: *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6359 (1986).

- 18) S. Naylor, G. Moneti, S. Guyan: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **17**, 393 (1988).
19) P. Pucci, C. Sepe, G. Marino: *Biol. Mass Spectrom.*, **21**, 22 (1988).
20) D. N. Nguyen, G. W. Becker, R. M. Riggin: *J. Chromatogr. A*, **705**, 21 (1995).
21) A. L. Burlingame, R. K. Boyd, S. J. Gaskell: *Anal. Chem.*, **68**, 599R (1996).

要 旨

FAB と MALDI を相補的に用いるタンパク、ペプチドの複合 MS マッピング法に更に液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (LC/ESI MS) を組み合わせて、その有用性を検討した。試料としてスナバエ由来の血管拡張性ペプチド組み換え “Maxadilan” (r-Max) を用いた。ESI では質量数測定精度が高いため、r-Max の直接測定により、2 か所の分子内ジスルフィド結合が確認された。還元後、カルボキシメチル化した r-Max のキモトリプシン消化物の LC/ESI MS 測定では、FAB や MALDI では検出が困難であった親水性が高く、かつ質量数が小さい消化物も検出され、全一次構造がマッピングされた。r-Max のトリプシン消化物の LC/ESI MS 測定により、Cys⁵-Cys⁹ と Cys¹⁸-Cys⁵⁵ を含む消化物が検出され、1 回の測定でジスルフィド結合位置も決定された。これらの結果から複合 MS マッピング法における LC/ESI MS 法の位置付けが示された。