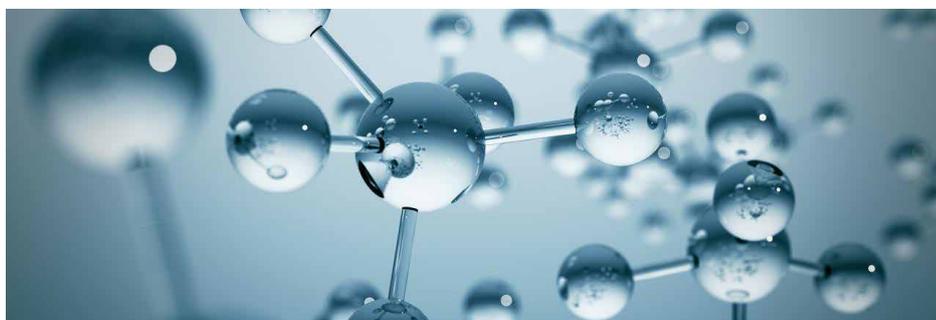


## Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムを用いた電子捕獲解離による アミノ酸異性体の同定



### 著者

Rachel Franklin, Joseph  
Meeuwsen  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

アミノ酸配列の正確な決定は、タンパク質の構造と機能を理解するために極めて重要です。しかし、ロイシン (Leu) とイソロイシン (Ile) は位置異性体であり、従来の衝突ベースのフラグメンテーション技術では識別できないため、それらの区別は困難です。電子ベースのフラグメンテーションは、Leu/Ile と、アスパラギン酸 (Asp) やイソアスパラギン酸 (isoAsp) など、他の同重体残基とを区別するのに使用可能な側鎖フラグメントを生成する有望なソリューションです。このアプリケーションノートでは、電子捕獲解離用の ExD セルを備えた Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムを使用して、ペプチドおよびインタクトタンパク質内の同重体残基を同定する方法を説明します。Agilent ExDViewer ソフトウェアの使用により、Q-TOF データセット内の側鎖のフラグメンテーションを直感的に分析することが可能となり、同重体アミノ酸を識別する能力が向上します。

## はじめに

ヒトプロテオームの約 6 分の 1 は、同重体アミノ酸である Leu または Ile で構成されています。<sup>1</sup> これらのアミノ酸に関連する配列変異は、タンパク質の構造と機能に大きな影響を与える可能性があります。例えば、抗体の相補的決定領域内の Ile または Leu 間の変異は、ターゲット結合の強度に影響を及ぼします。<sup>2</sup> さらに、Asp から isoAsp への自発的な異性化は、タンパク質の老化やさまざまな疾患と関連しています。<sup>3-5</sup> したがって、同重体アミノ酸の同一性を正確に決定することでタンパク質配列解析の曖昧さを減らすことは、タンパク質の機能と疾患のメカニズムを理解するために極めて重要です。

アジレントの革新的な電子解離ソリューションである ExD セルを使用すると、衝突誘起解離 (CID) のみを使用する場合と比較して、タンパク質配列のより包括的かつ補完的な特性解析が可能になります。ラジカル z 型イオンは、アミノ酸側鎖の二次的フラグメンテーションを受け、Leu と Ile を区別するのに使用できる w イオンを生成することができます。<sup>1,6</sup> Asp から isoAsp への異性化によりカルボキシル基がシフトし、予想される c 型イオンおよび z 型イオンから 57 Da のシフトとして検出されません。<sup>4,6</sup>

このアプリケーションノートでは、電子捕獲解離用の ExD セルを備えた Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF によるペプチドとタンパク質の高速かつ高効率のフラグメンテーションについて説明します。同重体アミノ酸は、合成ペプチドおよび完全なユビキチンを使用した MS/MS スペクトルで同定しました。同重体残基の同定に無料で利用できるツールはほとんどありませんが、ExDViewer を使用すると、ペプチドおよびタンパク質スペクトルの側鎖のフラグメンテーションに関するアノテーションがシンプルになり、簡単に解釈できるようになります。<sup>7</sup> 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の感度とフラグメンテーション機能を ExDViewer と組み合わせて分析を行うことにより、同重体アミノ酸の同定をはじめとするタンパク質配列の包括的な特性解析を効果的に行えるソリューションが実現します。

## 実験

### 試薬および標準試料

- メリチン/チューニングミックスチューニング標準ギ酸、99.0 + %、Optima LC/MS グレード (部品番号 A-117-50)、Fisher Chemical
- アセトニトリル、LCMS グレード、99.9 %+、OmniSolv (部品番号 AX0156-6)、Supelco
- REALLYisoD 合成ペプチド (部品番号 4144889)、Bachem
- ウシユビキチン (部品番号 U6253)、Sigma
- Agilent チューニングミックス (G1969-85000)

### サンプル前処理

凍結乾燥処理されたサンプルを、分析するまで -20 °C で保管しました。分析前に、サンプルを 15 % アセトニトリルと 0.01 % ギ酸で再溶解しました。サンプルの最終濃度は、REALLYisoD ペプチドでは 1 μM、ユビキチンでは 10 μM としました。

### 使用機器

- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
- Agilent ExD セル (G1997AA)

### ソフトウェア

- Agilent ExDControl ソフトウェアバージョン、v 3.6
- Agilent MassHunter Acquisition ソフトウェア (LC/TOF および LC/Q-TOF 用)、v. 11.0
- Agilent ExDViewer ソフトウェア、v 4.5.14

## 質量分析メソッド

すべてのサンプルは、500 µL シリンジを使用して 20 µL/min の速度で直接注入しました。注入には New Era シリンジポンプ (モデル番号 300) を使用しました。サンプルは、Agilent Dual Jet Stream (AJS) ソースのネブライザ入口に手締めフェラルで接続された PEEK チューブを使用して導入しました。質量分析は、ExD セルを搭載した 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を使用して実施しました。ターゲット MS/MS メソッドは、MassHunter Acquisition v11.0 に設定しました。フラグメンテーションの結果は、ExDViewer v4.5.14 を使用して解析しました。6545XT LC/Q-TOF の詳細な機器パラメータを表 1 に示します。

表 1. Q-TOF LC/MS データ取り込みパラメータ

パラメータ	設定値
<b>Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム</b>	
イオン源	Agilent Dual Jet Stream エレクトロスプレーイオンソース
極性	正
ガス温度	325 °C
乾燥ガス流量	5 L/min
ネブライザ	20 psi
シースガス温度	275 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリ電圧	4,000 V (ユビキチン)、3,200 V (ペプチド)
ノズル電圧	2,000 V
フラグメンタ電圧	175 V
スキマ電圧	45 V
取り込みレート	1 スペクトル/秒
四重極選択幅	ワイド (9 m/z)
MS1 スペクトル範囲	100 ~ 3,200 m/z
MS2 スペクトル範囲	120 ~ 3,200 m/z (ユビキチン) 120 ~ 2,400 m/z (ペプチド)

## ExD セルの操作

ExD セルは、電子捕獲解離機能を実現する 6545XT Q-TOF LC/MS システムのアドオンです。ExD セルは、ExDControl ソフトウェアを使用して制御されます。このソフトウェアは、MassHunter Acquisition と共に動作し、ExD セルの電圧とフィラメント加熱電流を制御するスタンドアロンのソフトウェアです。ExDControl の機能として、ExD セル電圧を自動的に調整して、透過または電子捕獲解離 (ECD) の機能を最適化する自動調整アルゴリズムがあります。

ExD セル同重体分析の設定は、次のように行いました。まず、適切なフィラメント加熱電流を設定し、20 分間加熱しました。次に、メリチン/チューンミックス標準をボトル B から注入しました。チューンミックスイオンに対して ExDControl オートチューンを実行し、ExD セルレンズ電圧を調整して MS1 透過率を最大化しました。

透過率を最適化した後、メリチン 3 + プリカーサ (949 m/z) を分離しました。ExD セル電圧は、メリチンフラグメント質量に関してオートチューンを実行することにより、フラグメンテーションに対して最適化しました。メリチンの ECD に最適化されたセル電圧プロファイルは大部分のペプチドに対して効果的に機能しますが、タンパク質の ECD を最適化するには追加のチューニング標準が必要になる場合があります。ユビキチンについては、ユビキチン ECD フラグメントの組み込み質量リストに対してオートチューンを実施し、ユビキチンフラグメントの強度を最大化しました (表 2)。ExDControl で MS1 透過率プロファイルと MS2 ECD プロファイルを確立した後、MassHunter を取り込みコンテキストに切り替え、ターゲット取り込みメソッドを作成しました。

表 2. 透過または ECD 用の ExD セルレンズ電圧を最適化するために使用されるチューニング標準の概要。ExDControl オートチューンアルゴリズムは、チューンミックス、メリチン、ユビキチンの質量を含むいくつかの組み込み質量リストとともにインストールされます。ただし、ユーザー定義の質量リストの強度を最適化するために、カスタム質量リストを作成することもできます。

ExD Cell チューニング標準		
	MS1 透過率	MS2 ECD フラグメンテーション
REALLYisoD (1.9 kDa)	チューンミックス	メリチン
ユビキチン (8 kDa)	チューンミックス	ユビキチン

## ExDViewer を用いたターゲット分析

ExDViewer は、Q-TOF MS/MS データ内のすべてのポリペプチドフラグメントタイプを確実に分析可能で、無料で利用できるソフトウェアツールです。ExDViewer は、ペプチドまたは大きなインタクトタンパク質から複雑なフラグメンテーションパターンを分析する迅速で直感的なメソッドを提供します。このソフトウェアの主な機能は、側鎖のフラグメンテーションパターンと isoAsp イオンのアノテーションのサポートです。

フラグメンテーションパターンを既知のシーケンスと照合するためには、ターゲットデコンボリューションワークフローを使用します。ターゲットシーケンスは、ターゲットエディターを使用して定義します。シーケンスと最小および最大の電荷状態を指定します。ターゲットを定義した後、.d ファイルを ExDViewer に直接ロードして、ターゲットデコンボリューションを実行できます。図 1 は、ターゲットデコンボリューションワークフローの入力ページのスクリーンショットです。この文書で紹介されているプロファイルデータは、重複イオンの反復マルチパスマッチングによる ExD フラグメンテーション解析の制限マッチングプリセットを使用して処理しました。

Input Spectrum Selection Peak Picking Deconvolution Matching

Add Spectra:  From file  From instrument  From manual entry

Input File:  .d .raw .mzML .mgf .txt .raw (dir)

Agilent, Thermo, and Waters vendor formats are supported along with open-source and text-based formats.

Input data type:  profile  centroid  read from file

Add Target:  From Target Editor  From MZID  No Target

Variable Modification Search

Batch Analysis

BAD peptide:BclBADp\_complex;bcl-XL Search targets... Target Editor

<input type="checkbox"/> Target name	Sequence	Monoisotopic Weight
<input type="checkbox"/> N protein SR domain	.SGSRGGSQASSRSSRSRNRSSRNSTPGSSRGTSPPARMAGNGGDAALALLLLDRLNLQLESKMSGKGGQQGQTGTENLYFQ.	8271.03809
<input type="checkbox"/> bcl-XL	.SASQSNRELVDVFLSYKLSQKGYSSWSQFSDVVENRTEAPEGTESEMETPSAINGNPNWHLADSPAVNGATAHSSSLDAREVIPMAAVKQALREAGDEFELRYRRAFSDLTSQ	23393.2793
<input type="checkbox"/> REALLY ISO D	.REALLYDELIGHTFLK.	1917.03601
<input type="checkbox"/> Protein G	.MDPYPLPKTDYKLIINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVQKQYANDNGVDGEWYDDATKFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAFAKQYANI	21429.7598
<input type="checkbox"/> IGF	.MFPAMPLSSLVNGPRTL(C(Dehydro)GAELVDALQFV(C(Dehydro)GDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDEC(Dehydro)C(Dehydro)FRSC(Dehydro)DLRRLMYC(I	9105.34863
<input type="checkbox"/> Thioredoxin	.TTFNIODGPDFODRVVNSETPVVWDFHAOW(C(Dehydro)GPC(Dehydro)KILGPRLEKMKVAKQHGKVVMAKVDDIDHTDLAIEYVSAPVPTVLAMKNGDVVDFKFGIKD	11858.0439

MS1 m/z Tolerance (ppm) 20.0 MS2 m/z Tolerance (ppm) 20.0

Add Tasks and Presets:

Average Spectrum  MS1  MS2

RT tolerance (seconds) 5.0

Peak picking  Use centroids and noise threshold from input file

Run baseline filter

Correct precursor m/z and charge if un-reacted precursor found during deconvolution

Re-calibrate m/z based on high-confidence MS/MS fragmentation ions

Use presets [Deconvolution and Matching Settings are now locked]

Ion Identification Quality  Restrictive  Default  Permissive

Fragmentation  CID  ExD

Iterative Matching  Single-pass  Multi-pass (for overlapping ions)

図 1. ExDViewer ターゲットデコンボリューション入力ページ。プリセットマッチ設定は、幅広いペプチドおよびタンパク質の分析対象物に適しています。

## 結果と考察

### Leu/Ile および Asp/isoAsp の同定

ラジカルによる側鎖のフラグメンテーションにより w 型イオンが形成され、Leu/Ile の識別が可能になります。Leu w イオンはイソプロピル基 ( $z - 43$  Da) のラジカル損失によって形成されますが、Ile の対応する w イオンはエチルラジカル ( $z - 29$  Da) の損失を伴います。対照的に、isoAsp の形成は、ペプチド骨格に関する構造変化に基づ

いて検出され、その結果、Asp の対応する c または z イオンから 57 Da のシフトが生じます ( $c + 57$  Da、 $z - 57$  Da)。

ここでは、REALLYisoDELIGHTFLK 配列を持つ合成ペプチドを使用して、電子ベースのフラグメンテーションを利用した Leu/Ile および Asp/isoAsp の同定について示しました (図 2)。

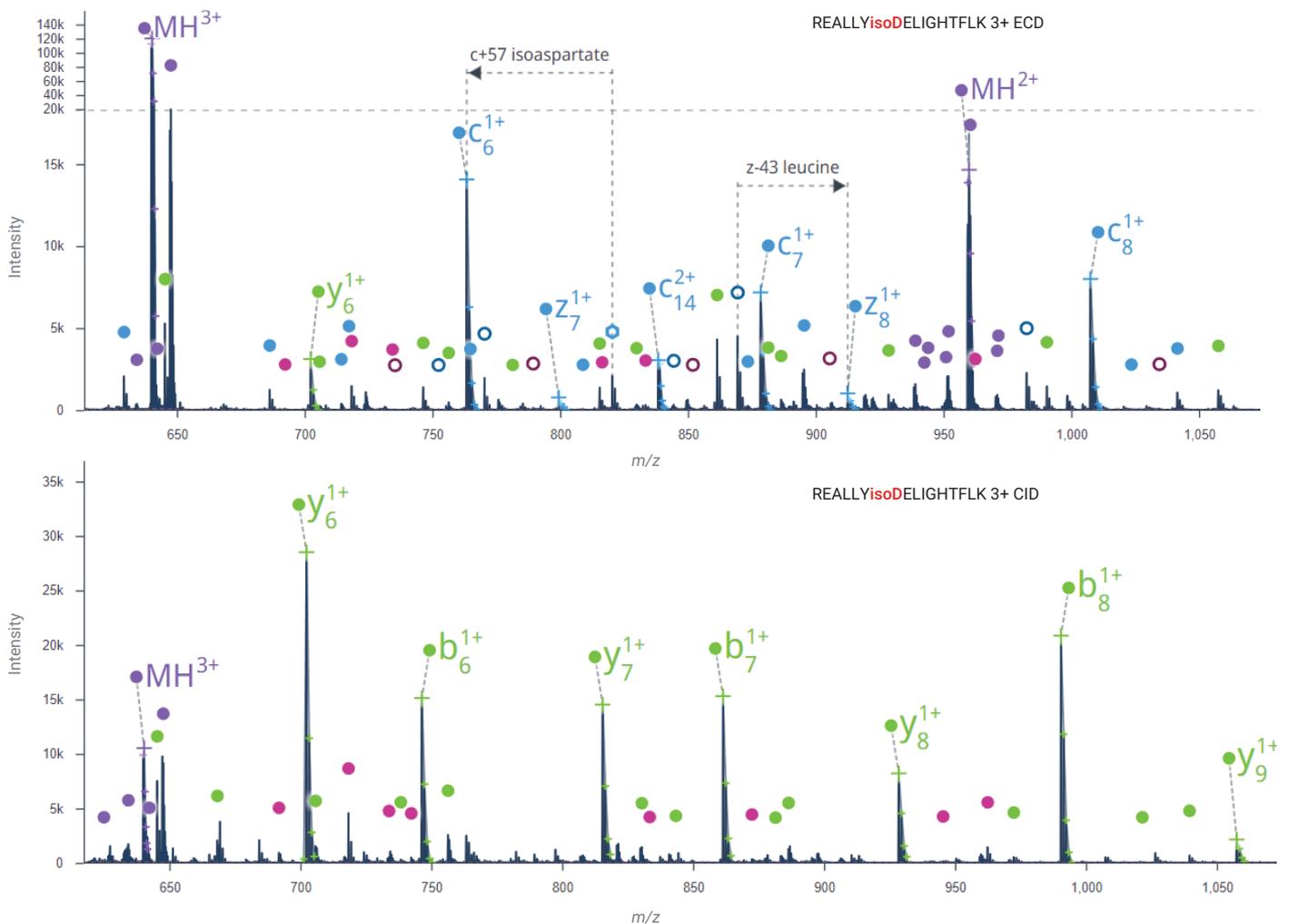


図 2. 上段の質量スペクトルは、合成ペプチド REALLYisoDELIGHTFLK (1  $\mu$ M) の ECD フラグメンテーションスペクトルです。Asp は isoAsp に設計されたもので、赤で強調表示されています。同重体フラグメントの証拠はスペクトル内のテキストでアノテーションされます。下段の図は同じペプチドの CID 質量スペクトルを示しています。ECD タイプのフラグメントは青でラベル付けされ、CID タイプのフラグメントは緑、プリカーサイオンは紫、a イオンはピンクでラベル付けされています。

REALLYisoDELIGHTFLK には 5 つの同重体 Leu/Ile 残基と 1 つの isoAsp があり、同一の理論的 CID スペクトルを持つ 64 以上の同重体配列が生成されます。電子フラグメンテーションで検出された側鎖フラグメンテーションにより、同重体の特異性を持つ正確なペプチド配列の同定が可能になります。図 2 は、ECD または CID フラグメンテーションを使用した 3 + REALLYisoDELIGHTFLK プリカーサの MS/MS スペクトルを比較したものです。ExDViewer を使用すると、Leu、Ile、isoAsp の診断イオンがスペクトル内に直感的にアノテーションされます。電荷が減少したプリカーサもアノテーションされます。

図 3 では、ECD 前の衝突活性化が Leu/Ile および isoAsp の診断イオンの検出に及ぼす影響を調べました。電子捕獲の前の 3 + REALLYisoDELIGHTFLK プリカーサに、さまざまなコリジョンエネルギーを適用しました。全体的に、コリジョンエネルギーが高いほどイオン強度は低下しました。衝突活性化に対してより敏感な 4 + プリカーサと比較して、3 + プリカーサの強度はより緩やかに低下しました。これらの結果は、この例のペプチドの診断イオンを検出するには、ECD のみを使用するのが最も効果的であることを示唆しています。

### トップダウン MS/MS 同重体決定

従来のペプチド分析とは対照的に、トップダウン質量分析では、事前の酵素消化を行わずにタンパク質全体の配列を決定します。酵素消化を回避することでサンプル前処理段階が軽減され、時間を節約しつつ不自然な結果を導入するリスクを最小限に抑えることができます。重要なのは、トップダウン分析により、消化されたペプチドの混合物を使用した場合には定義できない固有のプロテオフォームの特性解析が可能になることです。ここでは、トップダウン分析を使用して、完全なコピキチンの同重体の特性解析を行いました。10  $\mu$ M コピキチンを直接注入しターゲット MS/MS メソッドを使用して、分析を行いました。11 + プリカーサが分離のために選択され、ExD セルで ECD にかかけられました。データは、1 スペクトル/秒で合計 1 分間収集しました。11 + プリカーサの非常に効率的なフラグメンテーションにより、99 % の配列カバレッジと、同重体 Leu および Ile 残基の 16 分の 10 の識別が実現されました。さらに、isoAsp c イオンと z イオンが同定され、アミノ酸位置 39 と 52 に isoAsp が存在することが示唆されました。図 4 は、ExDViewer で生成されたシーケンスカバレッジマップを示しています。これを用いてユーザーは、ターゲットシーケンスをサポートするフラグメントの証拠をインタラクティブに探索できます。図 5 は、Leu と Asp の同定に有用な豊富な ECD イオンと w イオンを特徴とするコピキチンフラグメンテーションスペクトルの 350  $m/z$  幅のスライスを示したものです。

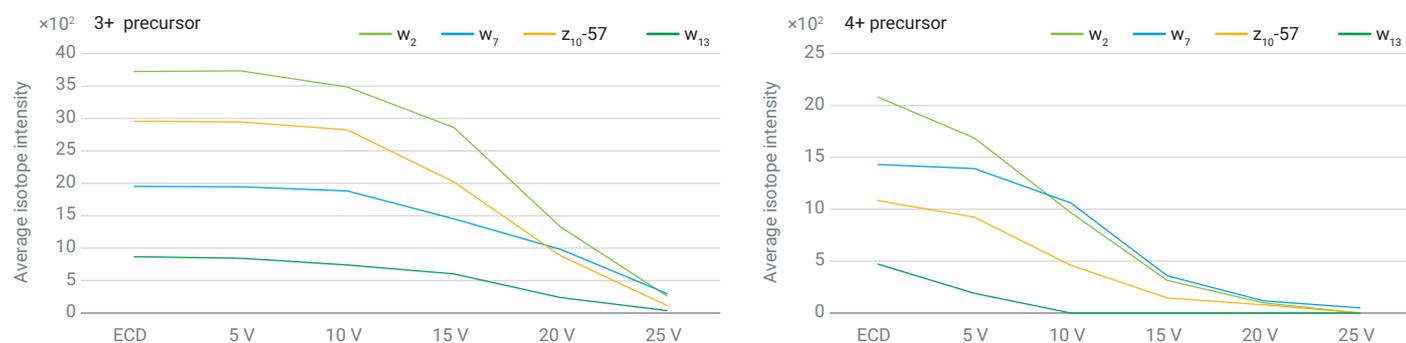


図 3. REALLYisoDELIGHTFLK 同重体診断イオン強度。w<sub>2</sub>、w<sub>7</sub>、z<sub>10-57</sub>、および w<sub>13</sub> の平均イオン強度をコリジョンエネルギーの関数としてプロットしたものです。

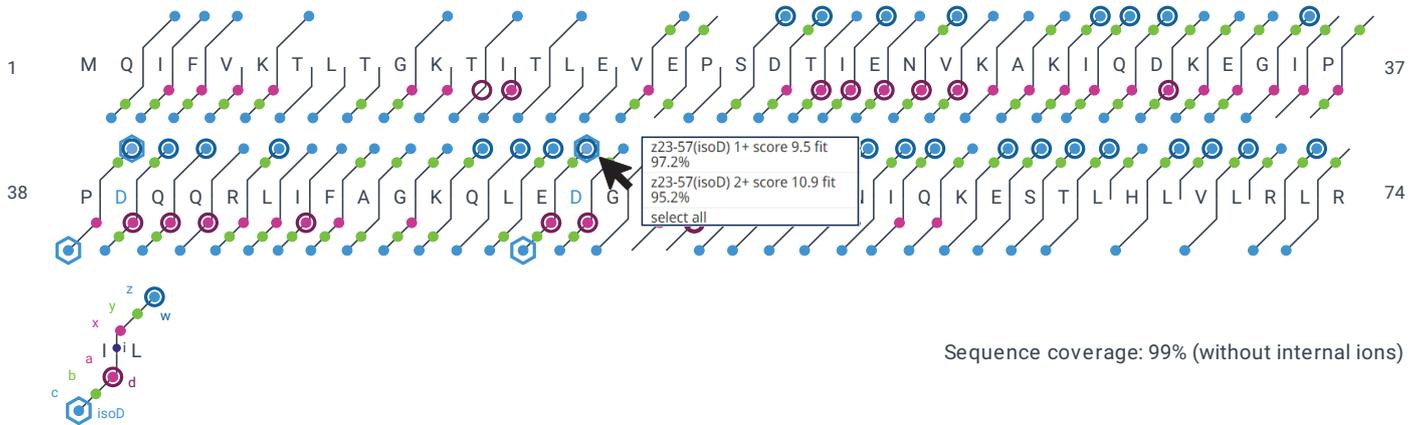


図 4. ExDViewer で生成されたシーケンスカバレッジマップ。色付きのドットはそれぞれ異なるタイプのイオンを表します。CID および ECD タイプのバックボーンフラグメントイオンは、側鎖フラグメントおよび c/z isoAsp イオンとともにアノテーションされています。有益なツールヒントには、検出された各フラグメントのイオンの種類、電荷状態、スコアが表示されます。ここではツールヒントは、z<sub>23</sub>-57 isoAsp イオンに 2 つの電荷状態が検出されたことを示しています。

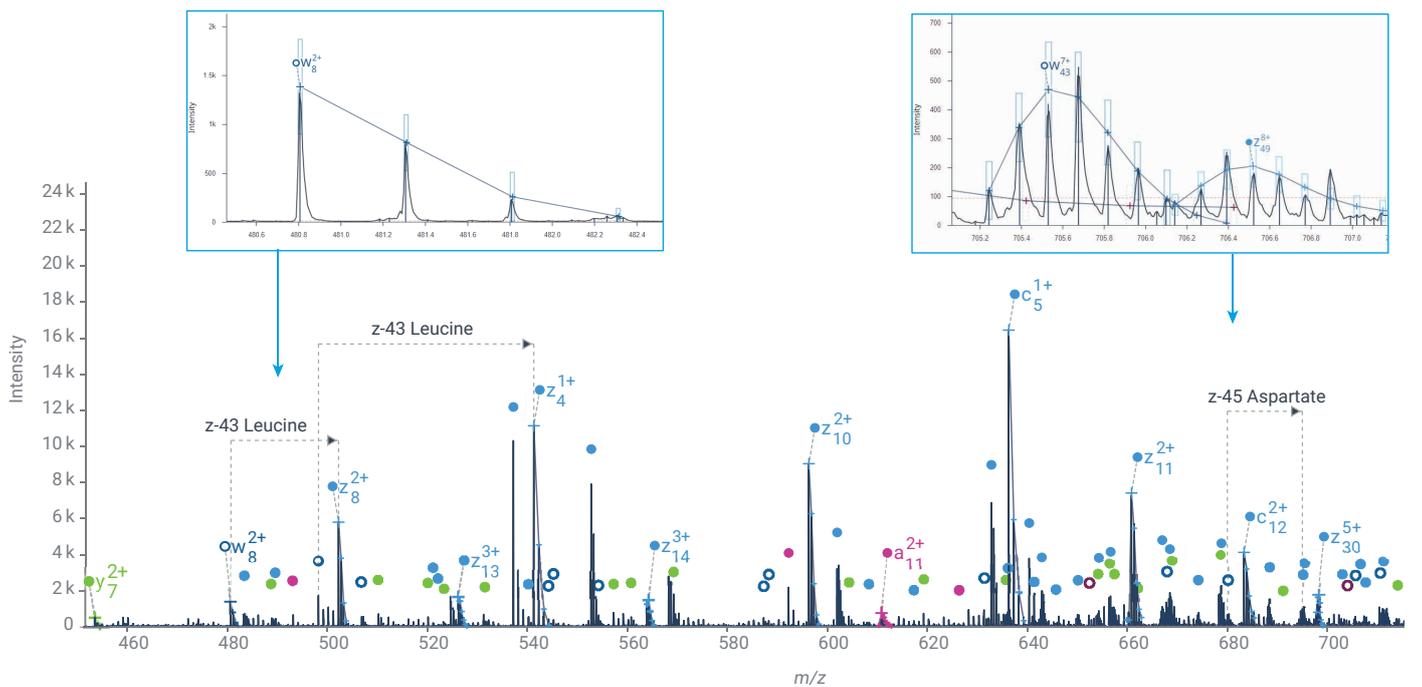


図 5. 11+ ユビキチンの ExD フラグメンテーションスペクトル。Leu と Asp を同定する側鎖フラグメントの証拠がインセットに示されています。同重体の証拠には、破線とラベルで自動的にアノテーションされます。

## 結論

このアプリケーションノートでは、Agilent ExD セルと解析用 Agilent ExDViewer ソフトウェアツールを搭載した Agilent 6545XT AdvanceBio Q-TOF LC/MS システムを使用した同重体アミノ酸の分析について述べました。電子捕獲解離は、CID フラグメンテーションに補足的な情報を提供する強力なフラグメンテーション技術です。これらのメソッドは、さまざまな分子のペプチド骨格と側鎖のフラグメンテーションを調べるのに適用可能で、タンパク質配列分析の曖昧さを低減することができます。ECD フラグメントを検出する Q-TOF の感度とフラグメント解析用の ExDViewer を組み合わせることで、ターゲットアミノ酸同重体同定のための効果的なソリューションが実現されます。

## 参考文献

1. Kjeldsen, F.; Haselmann, K. F.; Sørensen, E. S.; Zubarev, R. A. Distinguishing of Ile/Leu Amino Acid Residues in the PP3 Protein by (Hot) Electron Capture Dissociation in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, *75*(6), 1267–1274.
2. Wakankar, A. A.; Borchardt, R. T.; Eigenbrot, C.; Shia, S.; Wang, Y. J.; Shire, S. J.; Liu, J. L. Aspartate Isomerization in the Complementarity-Determining Regions of Two Closely Related Monoclonal Antibodies. *Biochemistry* **2007**, *46*(6), 1534–44.
3. Wang, J.; Mukherjee, S.; Zubarev, R. A. Isoaspartate and Neurodegeneration. *Aging* **2022**, *14*(22), 8882–8883.
4. Geiger, T.; Clarke, S. Deamidation, Isomerization, and Racemization at Asparaginylnyl and Aspartyl Residues in Peptides. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*(2), 785–794.
5. Yang, H.; Zubarev, R. A. Mass Spectrometric Analysis of Asparagine Deamidation and Aspartate Isomerization in Polypeptides. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 1764–1772.
6. Han, H.; Xia, Y.; McLuckey, S. A. Ion Trap Collisional Activation of c and z' Ions Formed via Gas-Phase Ion/Ion Electron-Transfer Dissociation. *J. Prot. Res.* **2007**, *6*(8), 3062–3069.
7. Beckman, J. S.; Voinov, V. G.; Hare, M.; Sturgeon, D.; Vasil'ev, Y.; Oppenheimer, D.; Shaw, J. B.; Wu, S.; Glaskin, R.; Klein, C.; et al. Improved Protein and PTM Characterization with a Practical Electron-Based Fragmentation on Q-TOF Instruments. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2021**, *32*(8), 2081–2091.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE52891173

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2024  
Printed in Japan, August 7, 2024  
5994-7506JAJP