

ExD 搭載の Agilent AdvanceBio 6545XT LC/Q-TOF を用いたインタクトタンパク質のトップダウン配列解析

著者

Rachel Franklin and Mike Hare
Agilent Technologies, Inc.

概要

疾病の作用機序 (MOA) を解明し、生物製剤の開発を方向づけるうえで、プロテオフォームの詳細な特性解析がきわめて重要になります。ところが、従来のボトムアッププロテオミクスでは、タンパク質がペプチドの混合物に消化されるためプロテオフォームレベルの情報が交錯してしまい、個々のプロテオフォームを区別できません。それに代わる手法として、プロテオフォームレベルの情報を維持しながらインタクトタンパク質を直接分析できるトップダウンプロテオミクスが有望視されています。

このアプリケーションノートでは、電子捕獲解離 (ExD) セル搭載の Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を用いたトップダウンフラグメンテーションの実施について取り上げます。本書は、初心者を対象に、トップダウン質量分析 (TDMS) ワークフローの設定を手引きし、コリジョンエネルギーとスペクトル平均化などのパラメータによる配列カバー率や検出イオン数のような結果への影響を調べることを目的としています。この知識は、今後、Agilent Q-TOF 質量分析計により TDMS メソッドを開発するための基盤となります。利用可能な機器、再現性の高い結果、そしてエキスパートのエコシステムによるサポートを組み合わせることで、このワークフローは拡張性の高いトップダウンプロテオミクスワークフローとなり、研究者はプロテオフォーム生物学の探求に自信をもって取り組めるようになります。

はじめに

プロテオフォームとは、ユニークなアミノ酸配列とその翻訳後修飾(PTM)から成るタンパク質の特定の形態です。1つの遺伝子から生じる可能性のあるプロテオフォームは数百または数千種類におよび、それぞれリン酸化、グリコシル化、メチル化、アセチル化など特有の修飾パターンを持ちます^{1, 2}。多くの場合、このような配列と PTM のバリエーションが、疾患の MOA においてタンパク質の機能または機能不全を決定するうえで重要な役割を果たします^{3, 4}。

従来のボトムアッププロテオミクスは、タンパク質と PTM の迅速な同定において比類のない威力を発揮しますが、ペプチド混合物に頼った手法であることから、プロテオフォームの完全な特性解析は不可能です。例えば、質量分析計では消化時に生成されるペプチドを観察できないため、配列カバーにギャップが生じます。しかも、タンパク質の消化により PTM の発生について存在し得る相関がわかりにくくなり、さらにスプライス変異が識別できなくなる可能性もあります。

これに対し、トップダウンプロテオミクスではインタクトタンパク質を直接分析するため、プロテオフォームレベルの情報が維持されます⁵。トップダウンプロテオミクスは実用化が進んでおり、いまや脳組織や心組織など複雑なサンプルからプロテオフォームを特性解析する手段として研究者に活用されるようになってきています^{6~8}。インタクトタンパク質の配列分析を効果的に行うには、一般的に実施されている衝突誘起解離(CID)以外の気相フラグメンテーション手法が必要です。電子捕獲解離(ECD)は、最も弱い結合に優先的に働くのではなく、タンパク質配列のアクセス可能な領域にわたりより均等に分散した、ラジカルによるフラグメンテーションが可能です。また、ECD と CID を組み合わせれば、トップダウンフラグメンテーションを強化してフラグメントを相補的に生成し、配列割り当ての信頼性を高めることができます^{9, 10}。

このアプリケーションノートでは、ExD セルを搭載した Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOFへの直接注入によるインタクトタンパク質のトップダウンフラグメンテーションプロセスについて取り上げます。本書は、変性タンパク質を使用したトップダウン質量分析を始める方法についてのガイダンスを示し、CID エネルギーの付加やスペクトル平均化などのパラメータが配列カバー率やイオン検出といった TDMS の結果におよぼし得る影響など、実用に活かせる洞察を提供することを目的としています。これらの洞察から、今後、Agilent Q-TOF プラットフォームで TDMS メソッドを開発するための基礎を築き、研究者は自信をもってインタクトタンパク質の特性解析を進め、バイオ医薬品の革新を加速させることができます。

実験方法

試薬および標準試料

- ESI-L チューニング混合液 (部品番号 G1969-85000)、アジレント・テクノロジー
- ギ酸、LC/MS グレード (部品番号 G2453-85060)、アジレント・テクノロジー
- LC/MS 用 InfinityLab アセトニトリル (部品番号 5191-5101)、アジレント・テクノロジー
- LC/MS 用 InfinityLab 水 (部品番号 5191-5121)、アジレント・テクノロジー
- 小型タンパク質用 ECD チューニング標準液
 - ウシユビキチン、8.6 kDa (部品番号 U6253)、Sigma-Aldrich 社
- 大型タンパク質用 ECD チューニング標準液
 - 炭酸脱水酵素、29 kDa (部品番号 C2624)、Sigma-Aldrich 社
 - アルドラーゼ、39 kDa (部品番号 A2714)、Sigma-Aldrich 社
 - エノラーゼ、46 kDa (部品番号 E6126)、Sigma-Aldrich 社

注: トップダウン分析のチューニング標準液として代替タンパク質を使用することもできます。チューニング標準液を選択する際は、サンプルの入手可能性、純度、保管時の安定性を考慮することが重要です。一般に、ジスルフィド結合によりフラグメントの検出が制限されるため、その存在も重要な要因として考慮します。

使用装置

- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
(部品番号 G6549AA)
- LC/Q-TOF 用 Agilent ExD セル (部品番号 G1997AA)
- Agilent AJS イオン源 (部品番号 G1959A)

ソフトウェア

- Agilent ExDControl、v3.7.8
- LC/TOF および LC/Q-TOF 用 Agilent MassHunter Data Acquisition、v11.0 Update 2
- Agilent ExDViewer、v4.6.28

サンプル導入

サンプルは、15 % アセトニトリルおよび 0.1 % ギ酸を含む溶液で濃度 1 ~ 10 μ M に希釈しました。これらのサンプル溶液をシリジンポンプにより Agilent Dual Jet Stream (AJS) イオン源に流量 10 ~ 20 μ L/min で直接注入しました。直接注入には New Era シリジンポンプ (モデル番号 300) を使用しました。

質量分析メソッド

トップダウン質量分析には、電子捕獲解離用の ExD セルを搭載した 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を使用しました。トップダウン分析に使用したターゲット MS/MS 取り込みメソッドは、LC/TOF および LC/Q-TOF 用 MassHunter Data Acquisition v11.0 で作成しました。コリジョンエネルギーは取り込みごとに固定値に設定し、プリカーサを手動でターゲットリストに追加しました。ECD のみの実験では、コリジョンエネルギーを 0 V に設定しました。その他のメソッドパラメータは表 1 のとおりです。

表 1. Q-TOF LC/MS データ取り込みパラメータ

6545XT Q-TOF MS システム	
イオン源	デュアル Agilent Jet Stream エレクトロスプレーライオノン源
極性	ポジティブ
ガス温度	325 °C
乾燥ガス流量	7 L/min
ネプライザ圧力	35 ~ 50 psi
シースガス温度	275 °C
シースガス流量	11 L/min
キャビラリ電圧	3500 V
ノズル電圧	2000 V
フラグメント電圧	175 ~ 300 V
スキマ電圧	45 ~ 125 V
取り込みレート	1 スペクトル/秒
取り込みモード	2 GHz 拡張ダイナミックレンジ
四重極選択幅	ワイド (9 m/z)
MS スペクトル範囲	200 ~ 3200 m/z
MS/MS スペクトル範囲	200 ~ 3200 m/z

注: 一般に、ネプライザ圧力やフラグメント電圧などのパラメータを高い値 (50 psi と 300 V など) に設定すると、大型タンパク質の透過性が向上します。ただし、フラグメント電圧の設定値が高すぎると、タンパク質が活性化されて不要な解離が起こり、トップダウンフラグメンテーションに利用できるインタクトプリカーサが減少する可能性があります。

小型タンパク質のフラグメンテーションのための機器の準備

以下に、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF MS を、ECD を用いたトップダウン分析用にチューニングする手順を 1 つずつ説明します。これらの手順では、フィラメント電流が最適化され、四重極の単離効率など機器のその他の機能が正常範囲内で実行されていることを前提としています。詳細については、ExD セルのユーザーガイドを参照してください。

注: 本書の目的上、20 kDa 未満のタンパク質を小型タンパク質としています。

タンパク質の透過と ECD のための ExD セルのチューニング

- ExD セルのフィラメントをオンにし、20 分間ウォームアップします。フィラメントをオンにした状態で、チューニング混合液の透過用の ExD セル電圧プロファイルを作成するかロードします。チューニング混合液入りのボトル B をオンにします。機器の分解能、質量精度、高 m/z の透過性を確認します。次の手順に進む前に、イオン源がクリーニング済みであること、スプレーが安定していることを確認します。この評価には、MassHunter Data Acquisition のユーザーインターフェースに表示されるトータルイオン電流のフィードバックグラフを使用できます。
- 15 % アセトニトリルおよび 0.1 % ギ酸を含む溶液で希釈した 10 μM ユビキチンを流量 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で注入します。信号が安定したら、ExDControl を使用して、ユビキチンのプリカーサイオンの透過を最適化するための大まかなオートチューンを実行します。以前にタンパク質の透過用にチューニングしたプロファイルの方が、チューニング混合液に使用したプロファイルより出発点として適している場合は、タンパク質透過用のプロファイルを使用することを検討します。オートチューン済みの電圧プロファイルを、そのプロファイルがユビキチンの透過用にチューニングされていることを示す名前で保存します。
- 保存したユビキチン透過用のプロファイルを ExDControl の MS2 スロットにロードします。MassHunter でユビキチンの 11^+ プリカーサを単離します。次に、ExDControl を使用して、ユビキチンの ECD フラグメントの強度を最適化するためのオートチューンを実行します。ExDControl にはユビキチンのプリカーサとフラグメントの質量リストが付属しており、これをオートチューンに使用できます（表 2）。大まかなチューニングを実行してから微調整して、ユビキチン透過用のプロファイルを有効な ECD プロファイルに変換することをお勧めします。プロファイルを、そのプロファイルがユビキチンの ECD 用にチューニングされていることを示す名前で保存します。

表 2. ユビキチンの 11^+ プリカーサ (m/z 768.8) のフラグメント質量リスト。小型タンパク質の ECD フラグメンテーションを最適化するために ExDControl のオートチューンで使用できます。

プリカーサ	ECD フラグメントの m/z 値
ユビキチン 11^+ (m/z 768.8)	552.9, 596.4, 724.9, 789.0, 800.3, 803.4, 950.5, 957.5, 960.7, 1347.2

注: 一部のベンダーから、C 末端にさらに 2 つのグリシン残基を持つ、質量 8560 Da のウシユビキチンが提供されています。その結果、 11^+ プリカーサイオンは m/z 779.1 に現れます。この種に適した ECD フラグメントリストは 609.9、636.4、717.9、735.0、942.8、946.1、957.5、959.5、965.1、1347.2 です。

4. 「実験方法」に記載したターゲット取り込みメソッドを使用して、ユビキチンの ECD スペクトルを 1 分間採取します。これにより得られる .d ファイルを ExDViewer にロードしてデータ品質を評価します。ECD のみを使用した場合の ECD フラグメントは 200 カウントを超え、全体的な配列カバー率は 95 % を超えます。図 1 に、良好な品質のユビキチンの ECD スペクトルの例を示します。十分な量の ECD フラグメントが得られない場合は、フィラメントの過熱電流を +0.05 A 上げてから追加のオートチューンで微調整して、ユビキチンのフラグメントを最適化します。トラブルシューティングの詳細については、ExD セルのユーザーガイドを参照してください。

注: ExDViewer で自動的に生成されるイオン強度グラフは、同位体分離されたフラグメンテーションスペクトルの品質評価ツールとして役立ちます。図 1B に示すように、一般に、高品質のフラグメンテーションスペクトルには大量のフラグメントイオン信号が示され、割り当てなしのイオンは最小限に抑えられます。

5. これで、ユビキチンを使用して最適化した MS1 および MS2 プロファイルを使用して、目的とするタンパク質の ECD スペクトルを自動またはターゲット取り込みメソッドで採取できます。目的のタンパク質が約 20 kDa より大きい場合は、手順 6 ~ 9 に進み、大型タンパク質のフラグメンテーション用に ExD セルを最適化します。

大型タンパク質のフラグメンテーションのための ExD セルのチューニング

- ExDCtrl で、ユビキチンの透過用にチューニングした MS1 プロファイルと、ユビキチンの ECD 用にチューニングした MS2 プロファイルをロードします。MassHunter でのチューニング中に、15 % アセトニトリルおよび 0.1 % ギ酸を含む溶液で希釈した 10 μM 炭酸脱水酵素の注入を開始します。信号が安定したら、ExDCtrl で炭酸脱水酵素のプリカーサの透過性を高めるための微調整を実行します。
- 1117.3 m/z の変性炭酸脱水酵素のプリカーサを単離します。最も高アバンダンスのプリカーサは、単離および ECD 前に 30K カウントを超えています。炭酸脱水酵素の ECD フラグメントをオートチューンで微調整します。ExDCtrl には炭酸脱水酵素の質量リストが付属していますが（表 3）、目的とする成分用にカスタム質量リストを作成することもできます。

表 3. 炭酸脱水酵素の 26^+ プリカーサ (m/z 1117.3) のフラグメント質量リスト

プリカーサ	ECD フラグメントの m/z 値
炭酸脱水酵素 26^+ (m/z 1117.3)	375.2, 421.2, 506.7, 575.3, 588.3, 626.4, 664.3, 726.4, 755.9, 776.5, 784.6, 816.6, 887.7, 904.2, 939.0, 944.7, 945.7, 960.2, 983.5, 1025.2, 1149.9, 1181.9, 1239.3, 1292.4, 1296.7, 1309.2

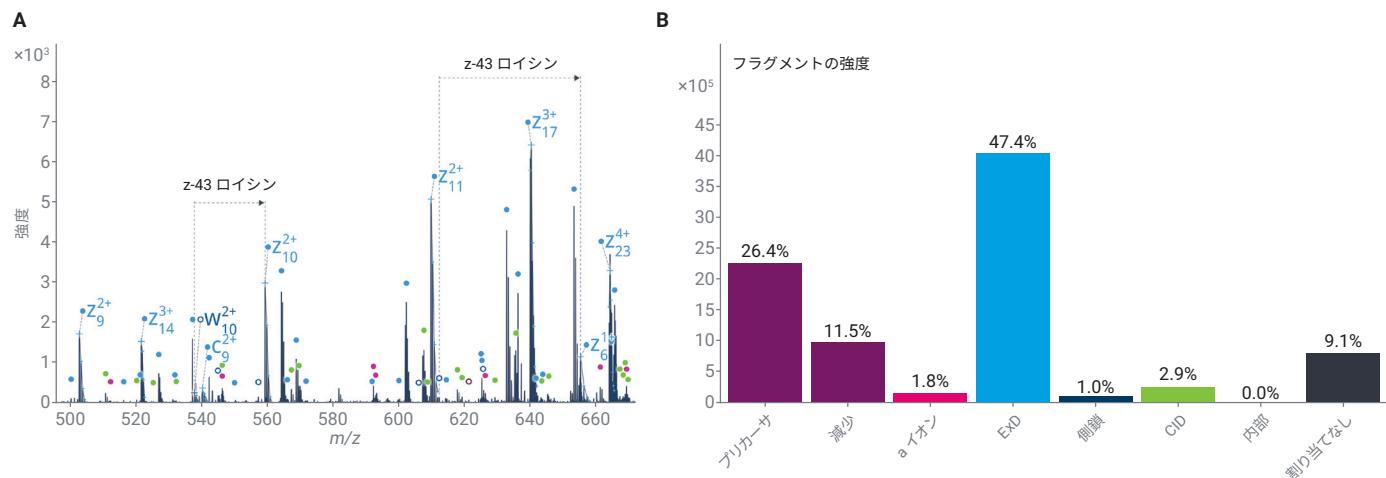


図 1. ユビキチンの ECD スペクトルと対応する強度グラフの例。(A) このユビキチンの ECD スペクトルの例に記載された青色の注釈は ECD タイプのイオンを示し、緑色の注釈は CID タイプのイオンを示します。W イオンで表される二次側鎖フラグメントには、対応する z イオンを指す矢印付きで自動的にラベルが付けられています。(B) ExDViewer に表示された強度グラフ。紫色のバーはそれぞれブリカーサと電荷が減少したブリカーサを示します。割り当たなしのイオン信号は、タンパク質様の同位体比を持つターゲット配列には一致しない同位体クラスタを表します。内部イオンは考慮されていません。

- 「実験方法」に記載したターゲット取り込みメソッドを使用して、炭酸脱水酵素の ECD スペクトルを 1 分間採取します。これにより得られる .d ファイルを ExDViewer にロードしてデータ品質を評価します。ExDViewer のデフォルト設定を使用した場合、26⁺ 炭酸脱水酵素の全体的な配列カバー率は 50 % を超え、ECD のイオン強度は CID のイオン強度より高くなります。
- 配列カバー率が不十分な場合は、ExDCtrl で炭酸脱水酵素の ECD フラグメントの微調整をさらに実行します。それでも十分なカバー率が得られない場合は、フィラメントの加熱電流を +0.05 A 上げ、炭酸脱水酵素のフラグメントを再度チューニングします。フィラメント電流を調整した場合は、MS1 および MS2 プロファイルの再チューニングが必要なことを覚えておいてください。トラブルシューティングの詳細については、ExD セルのユーザーガイドを参照してください。
- これで、炭酸脱水酵素を使用して最適化した MS1 および MS2 プロファイルを使用して、目的とするタンパク質の ECD スペクトルを採取できます。MassHunter の取り込みメソッドの設定とデータ採取に進みます。直接注入を使用できない場合は、サンプルの導入に液体クロマトグラフィーなどの代替手法を使用できます。

トップダウン分析データの解析のための ExDViewer デコンポリューションワークフロー

ExDViewer は、ECD、CID、その他のフラグメントタイプなどタンパク質のフラグメンテーションデータを解析して予想配列を確認するためのツールです。予想配列に関連する未知成分の同定にも役立ちます。ExDViewer のデコンポリューションアルゴリズムは、複雑な MS/MS スペクトルに含まれるタンパク質のフラグメントイオンの同定に優れていることから、トップダウン分析に非常に適しています。ExDViewer によるトップダウン分析データの解析の最初のステップでは、シーケンスエディタでターゲット配列を定義します。配列は JSON ファイルまたは ExDViewer の .target ファイルからインポートするか、手動で貼り付けることができます。固定修飾と可変修飾をどちらも定義できます。

トップダウン分析データの解析を開始するには、デコンポリューションワークフローのインターフェースを開き、ロードする .d ファイルを「Add Spectra」フィールドに指定します。「Add Target」で、ターゲットリストからターゲットを選択します。「Average Spectra」オプションが選択されていることを確認します（図 2）。ペプチドとタンパク質のどちらの場合も、その他すべてのパラメータはデフォルト値のままで問題なく機能します。ターゲットを選択したら、「Spectrum Selection」タブに進みます。平均化するスペクトルを選択します。必要に応じて、TIC プロットのグレーのバーの幅を調整することにより、平均化する範囲を手動で調整できます。スペクトルを選択すると、デコンポリューションワークフローを開始するための「Run Now」ボタンが有効になります。ワークフローのその他のタブ（「Peak Picking」、「Deconvolution」、「Matching」）はワークフローのカスタムパラメータを設定する場合に使用しますが、多くの実験ではデフォルト設定で十分です。

The screenshot shows the 'Input' tab of the ExDViewer interface. At the top, there are tabs for Input, Spectrum Selection, Peak Picking, Deconvolution, and Matching. Below these are buttons for Previous, Next, Run Now, and Cancel.

Add Spectra: Radio buttons for From file (selected), From instrument, and From manual entry. Below this is an 'Input File' field with a browse button, and file type filters for .d, .raw, .mzML, .mgf, .txt, and .raw (dir).

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

Input data type: Radio buttons for profile (selected), centroid, and read from file.

Output Ions: A text input field for the destination of time-stamped deconvolution results as CSV, with a 'Folder' browse button.

Add Target: Radio buttons for From Target Editor (selected), From MZID, No Target, and From Database. There is also a checkbox for Variable Modification Search.

A search bar for 'Search targets...' and a 'Target Editor' button are located below the target list.

Target name	Sequence	Monoisotopic Wei...	Tags
Thymosin	(Acetyl)SDKPDMAIEKFDKSLLKKTETQEKNPLPSKETIEQEKGAGES.	4960.48633	sample
Ubiquitin	.MQIFVKTLTGKTITLEVEPESDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSD	8559.61719	sample
Ubiquitin (C-term clip GlyGly)	.MQIFVKTLTGKTITLEVEPESDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSD	8445.57422	sample
Carbonic Anhydrase (native with zinc)	(Acetyl)SHHWGKGKHNPEHWHKDFPIANGERQSPVDIDTKAVVQDPALKPLAI	29070.61133	sample
Carbonic Anhydrase (denatured)	(Acetyl)SHHWGKGKHNPEHWHKDFPIANGERQSPVDIDTKAVVQDPALKPLAI	29006.68359	sample
Myoglobin	.GLSDGEWQQVLNVWGKVEADIAHGQEVIRLFTGHPETLEKDFKHLKTEAEN	16940.96484	sample

図 2. ExDViewer のデコンポリューションの「Input」ページ。「Add Spectra」フィールドと「Add Target」フィールドが黄色でハイライト表示されています。

結果と考察

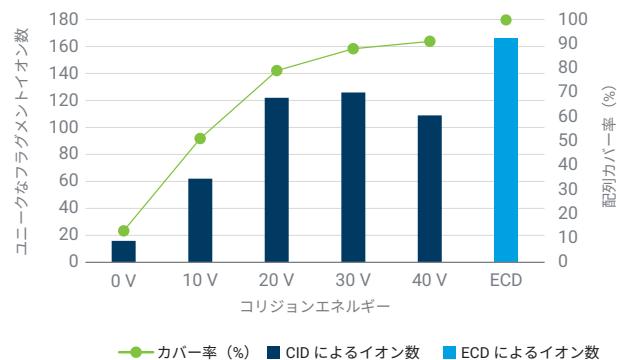
トップダウン質量分析はインタクトプロテオフォームの特性解析に有効なアプローチとして脚光を浴びつつあり、従来のボトムアップアプローチでは通常得られない洞察がもたらされます。ここでは、電子捕獲解離によって Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の機能がいかに拡張され、インタクトタンパク質の配列分析が可能になるのかを説明します。

ECD フラグメンテーションの利点を示すため、CID と ECD を使用したユビキチン (8 kDa) および炭酸脱水酵素 (29 kDa) のフラグメンテーション結果を比較します。ユビキチンの場合、CID では 91 % の配列カバー率を達成して 126 種類のユニークなフラグメントイオンを検出するために、コリジョンエネルギーの最適化が必要でした。これに対し、ECD では

ECDのみで完全な (100 %) 配列カバー率が得られ、166 種類のユニークなフラグメントイオンが検出されました。これにより、複数の相補的イオンが割り当てられ、より信頼性の高い配列確認につながりました (図 3A)。

炭酸脱水酵素は、トップダウンフラグメンテーションがより困難なケースです。例えば、CID のみを使用した場合、炭酸脱水酵素の最大配列カバー率は、CE が 40 V のときの 41 % に留まりました。CE 値をさらに高くすると、検出可能なユニークなフラグメントイオンが減少し、配列カバー率が低下しました。一方、ECD を使用した場合の炭酸脱水酵素の配列カバー率は 62 % で、検出されたユニークなフラグメントイオンは 156 種類にのぼりました (図 3B および 3C)。この結果から、大型タンパク質のフラグメンテーションに対する ECD の有効性が明らかになりました。

A



C 配列カバー率: 62%

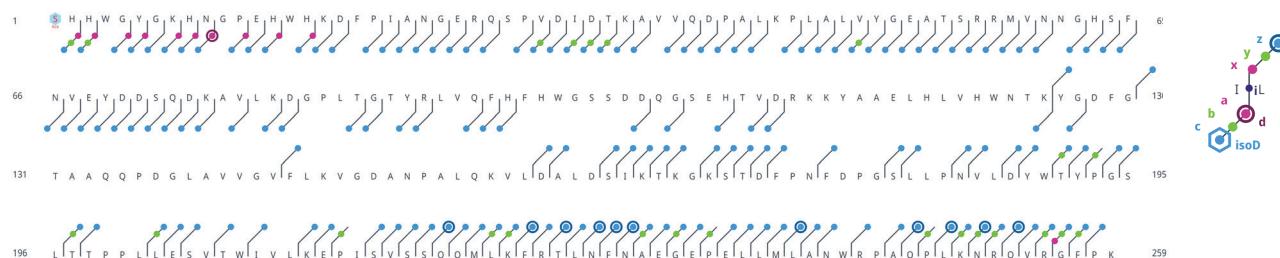


図 3. (A) 11^+ ユビキチンと (B) 26^+ 炭酸脱水酵素のフラグメンテーション結果。コリジョンエネルギーに応じた、または ECD のみを使用した場合のユニークなフラグメントイオンの検出数を示しています。また、配列カバー率が第 2 軸にもとづいて緑色の線で示されています。(C) ECD のみを使用した場合の 26^+ 炭酸脱水酵素の配列カバーマップ。フラグメントがタイプごとに色分けされています。特定位置にあるドットは、その位置に対応する少なくとも 1 つのフラグメントが一致したことを示します。検出された複数の電荷状態は 1 つのドットに集約されていますが、ExDViewer のツールチップ内に表示できます。

ECD と補助的なコリジョンエネルギーの組み合わせにより、特に大型タンパク質の TDMS 結果の改善が可能

プロダクトイオンの解離を伴わない電子捕獲 (ECDnD) はトップダウン分析でよく見られる現象ですが、これによって配列の理解に役立つイオンの検出が制限されます。ECD と低レベルの衝突活性化を組み合わせれば、非共有結合相互作用を妨げ、c 型および z 型フラグメントイオンの解離を促進することができます。衝突活性化では、ECD イオンを補完する CID タイプのフラグメントを生成して、特にプロリンが豊富な配列の配列カバー率を高めることができます。表 4 に、本書に示した最適化された ECD および ECD + CID による配列カバー率の結果と、その達成方法に関する情報をまとめます。

表 4. 8~46 kDa のタンパク質のトップダウン分析メソッドと結果のまとめ

タンパク質	質量	配列カバー率	プリカーサの電荷	メソッド
ユビキチン	8 kDa	100 %	11 ⁺	ECD のみ、47 スペクトル
ミオグロビン	17 kDa	95 %	16 ⁺	ECD のみ、47 スペクトル
炭酸脱水酵素	29 kDa	67 %	26 ⁺	ECD + CE 10 V、47 スペクトル
アルドラーゼ	39 kDa	38 %	29 ⁺	ECD + CE 40 V、47 スペクトル
エノラーゼ	46 kDa	23 %	40 ⁺	ECD + CE 40 V、47 スペクトル

ペプチドとは異なり、インタクトタンパク質の効果的なフラグメンテーションを行うには、実験にもとづいて最適化したコリジョンエネルギー (CE) が必要です。多くの場合、従来ペプチドに用いられてきた CE の推定方法ではタンパク質構造の複雑さを考慮できないからです。分子量、電荷状態、配列組成、ジスルフィド結合の存在などの要因すべてが、タンパク質の衝突活性化への感応性に影響をおぼします。

今回の研究で ECD と低レベルの衝突活性化を組み合わせたところ、分析したすべてのタンパク質についてユニークなフラグメントイオンの検出数が一貫して増加しました (図 4)。ユビキチンについては、完全な配列カバー率 (100 %) を達成するのに ECD のみで十分でしたが、大型タンパク質を分析する場合は、補助的な衝突活性化が有益なことが実証されました。例えば、炭酸脱水酵素の分析に 10 V の衝突活性化を加えることで、配列カバー率は 5 % 向上しました。ただし、10 V を超えると、大量の CID フラグメントが生成されても、全体的な配列カバー率は低下しました (図 4B)。このことは、過剰な衝突活性化が過度なフラグメンテーションと、配列の理解に役立つイオンの損失につながる可能性があることを示唆しています。

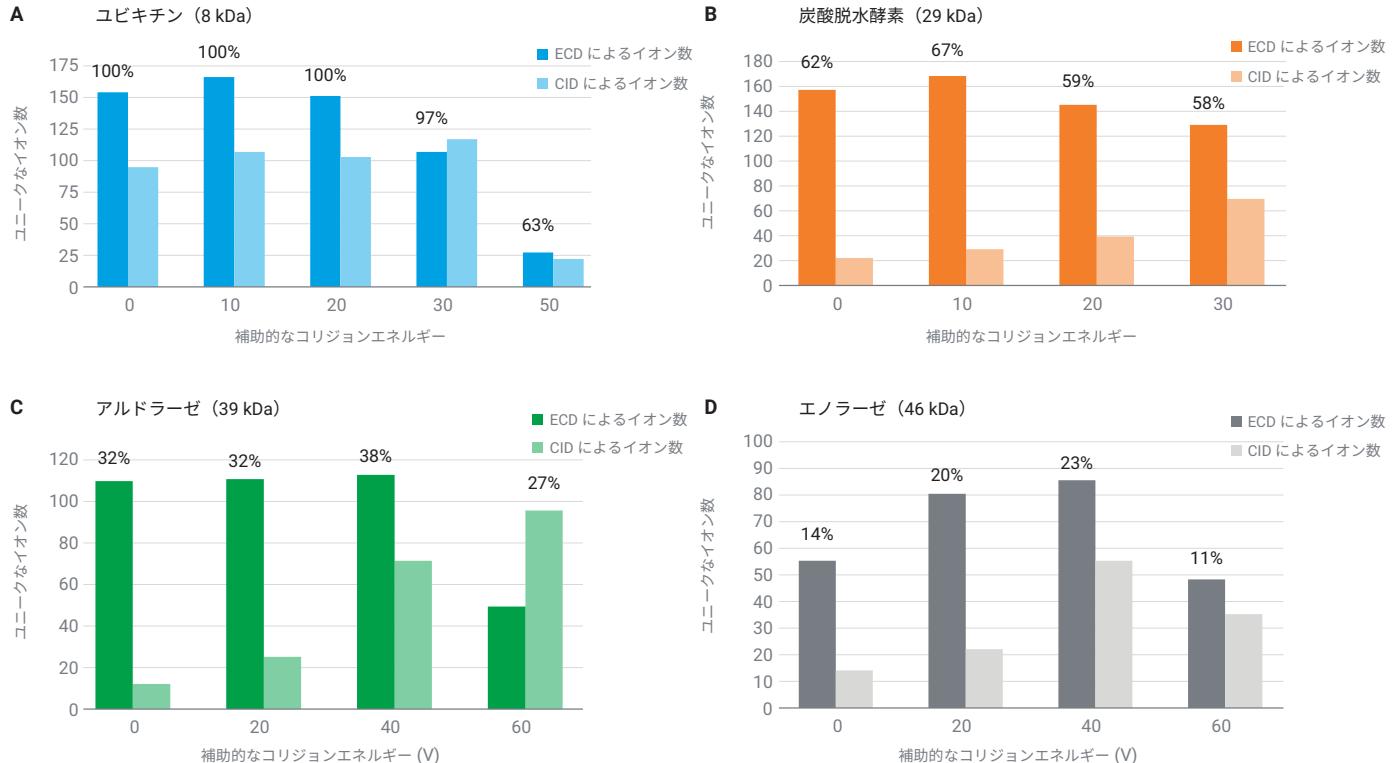


図 4. (A) ユビキチン、(B) 炭酸脱水酵素、(C) アルドラーゼ、(D) エノラーゼをターゲットとする ECD + CID の組み合わせ実験で検出されたユニークなフラグメントイオン数。各バーの上に記載された数値はそれぞれの条件で得られた配列カバー率を表します。

同様の傾向はアルドラーゼ (39 kDa) およびエノラーゼ (46 kDa) でも見られました。どちらのタンパク質も、40 V の衝突活性化を補助的に用いるのが最適なことが判明し、配列カバー率はそれぞれ 6 % および 9 % 向上しました。40 V を超えると、配列カバー率とイオンの同定に悪影響がおよびました (図 4C および 4D)。この結果は、トップダウン分析の配列カバー率を最大化するうえで衝突活性化を最適化することがいかに重要かを強調しています。

スペクトル平均化とメソッド再現性の影響

スペクトル平均化により S/N 比が高まり、多くの場合、トップダウン分析の配列カバー率が向上します。ただし、平均化するスペクトルが増加するほど、観察されるカバー率の改善幅は小さくなります (図 5)。最善の結果は、平均化に必要となる長い取り込み時間に対応できる直接注入などのサンプル導入戦略によって得られます。このように長時間にわたる平均化には利点がありますが、LC/MS の時間スケールでも意味のあるトップダウン分析データは得られます。

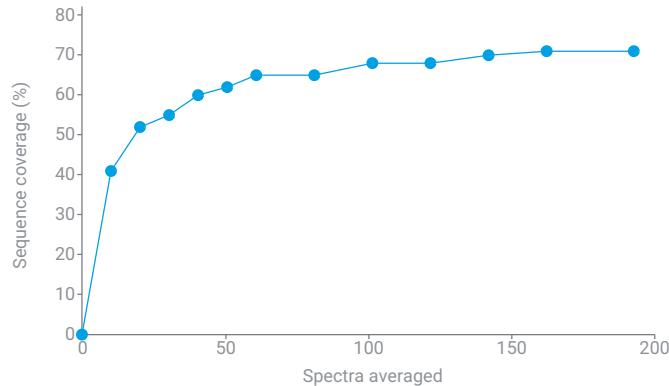


図 5. 炭酸脱水酵素の 26^+ プリカーサの配列カバー率は、平均化されるスペクトル数が多いほど向上します。

トップダウン分析の配列カバー率の再現性を評価するために、前述のチューニング手順を炭酸脱水酵素の 26^+ プリカーサの繰り返し分析に適用しました。表 5 に、繰り返し分析を数日または数週間の間隔をあけて実施して収集した配列カバー率をまとめます。1 ~ 7 日目の繰り返し分析の標準偏差は $\pm 2.15\%$ 、1 日目および 4 日日の同日測定ではより小さい偏差 $\pm 1.51\%$ を示しました。また、2 名のアジレントユーザーが同じ機器でメソッドを適用した結果から、その堅牢性とユーザー間の移管性が実証されました。

表 5. ECD のみを使用して 26^+ 炭酸脱水酵素で得られた配列カバー率の再現性。配列カバー率の再現性を評価するためのサンプリングポイントとして 52 日間にわたる期間の 7 日を選択しました。

繰り返し回数	日数	オペレータ	炭酸脱水酵素サンプル	炭酸脱水酵素の配列カバー率 (26^+)
1,2,3	1 日目	ユーザー 1	サンプル 1	60 %, 61 %, 60 %
4	2 日目	ユーザー 1	サンプル 1	60 %
5	9 日目	ユーザー 1	サンプル 1	62 %
6	36 日目	ユーザー 2	サンプル 2	67 %
7,8,9	44 日目	ユーザー 1	サンプル 2	61 %, 62 %, 64 %
10	49 日目	ユーザー 1	サンプル 2	62 %
11	52 日目	ユーザー 2	サンプル 2	60 %

結論

このアプリケーションノートでは、ExD セル搭載の Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 質量分析計を用いて変性タンパク質のトップダウンフラグメンテーションを実施するための実用的なフレームワークを取り上げました。ここに示した結果は、幅広いサイズと荷電状態のタンパク質に対して予想される結果の基準となります。コリジョンエネルギー取り込み時間などの主なパラメータを最適化することで、研究者はフラグメントイオンの生成を改善し、インタクトタンパク質の配列カバー率を向上させることができます。また、ECD と低レベルの衝突活性化を組み合わせれば、ユニークなフラグメントイオンの検出数が一貫して増加し、信頼性の高いプロテオフォームレベルの分析に役立ちます。このアプローチは、エリスロポエチン、インターロイキン-6、インスリンやヒト成長ホルモンのようなタンパク質ホルモンなど、産業に関連する中型タンパク質に特に有効です。これらのタンパク質のプロテオフォームレベルの分析により、生物製剤の重要な品質特性である構造変異体と修飾を解明することができます。今回紹介したトップダウン分析のための統合ソリューションを用いることで、研究者はプロテオフォーム生物学を通して洞察を深め、バイオ医薬品の革新を加速させることができます。

参考文献

- Smith, L.; Kelleher, N.; The Consortium for Top-Down Proteomics. *Proteoform: A Single Term Describing Protein Complexity*. *Nature Methods* **2013**, 10(3), 186–187.
- Smith, L. M.; et al. The Human Proteoform Project: Defining the Human Proteome. *Science Advances* **2021**, 7(50), eabk0734.
- Keenan, E. K.; et al. Discovering the Landscape of Protein Modifications. *Molecular Cell* **2021**, 81(9), 1868–1878.
- Lutomski, C. A.; et al. Multiple Roles of SARS-CoV-2 N Protein Facilitated by Proteoform-Specific Interactions with RNA, Host Proteins, and Convalescent Antibodies. *JACS Au* **2021**, 1(8), 1147–1157.
- Roberts, D. S.; et al. Top-Down Proteomics. *Nature Reviews Methods Primers* **2024**, 4, 38.
- Adams, L. M.; et al. Mapping the KRAS Proteoform Landscape in Colorectal Cancer Identifies Truncated KRAS4B That Decreases MAPK Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **2023**, 299(1), 102768.
- Fulcher, J. M.; et al. Discovery of Proteoforms Associated with Alzheimer's Disease Through Quantitative Top-Down Proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **2024**, 24(6), 100983.
- Chapman, E. A.; et al. Native Top-Down Mass Spectrometry for Characterizing Sarcomeric Proteins Directly from Cardiac Tissue Lysate. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2024**, 35(4), 738–745.
- Beckman, J. S.; et al. Improved Protein and PTM Characterization with a Practical Electron-Based Fragmentation on Q-TOF Instruments. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2021**, 32(8), 2081–2091.
- Gadkari, V. V.; Ramírez, C. R.; Vallejo, D. D.; Kurulugama, R. T.; Fjeldsted, J. C.; Ruotolo, B. T.; Enhanced Collision Induced Unfolding and Electron Capture Dissociation of Native-Like Protein Ions. *Anal. Chem.* **2020** Dec 1, 92(23), 15489–15496.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマーコンタクトセンタ

0120-477-111

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。

DE-011718

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, December 31, 2025

5994-8839JAJP