

抗体の糖ペプチド解析編 (Ver.2)

トリプシン消化によるペプチドマッピングは最も効率のよい、タンパク質の1次構造解析手法である。既知のアミノ酸修飾は、ペプチドマッピングにより解析可能であるが、糖鎖修飾を解析しようとする場合、いくつかの問題点に直面する。そもそも糖ペプチドはイオンサプレッションによる感度低下を招きやすく、主に、共溶出する他のペプチドや TFA, Tris 等の影響を受けるものと考えられる。また、ペプチドマッピングで通常用いられる C18 カラムの分離条件では、糖鎖の違いによる分離がほとんど期待できなことも主な問題点となっている。今回、これら問題点を克服し、糖ペプチドの解析を可能にするプロトコルを作成した。すなわち、糖ペプチドを濃縮する前処理を追加することにより、共溶出する成分による影響を抑え、かつ C18 カラムの分離条件を一部改変することにより、NISTmAb の糖鎖構造をペプチドレベルで解析する方法となっている。

NIST mAb は世界中のラボが測定対象としており、様々な糖鎖構造が報告されている。最近それらの情報をまとめ、NIST mAb の糖鎖を評価した総説が発表された(参考文献 1)。これによると NIST mAb にはおよそ 50 種類程度の糖鎖構造を含有している。本プロトコルでは、これら構造をデータベースとして質量分析結果を検索することにより、このうち 40 種類程度の糖ペプチドが検出可能であった。

<Tips>

2020 年に公開した Ver.1 からの主な変更点は、① 糖ペプチド濃縮処理をバッチ法からスピニングカラム法に変更したこと、② NIST mAb について、これまでに報告されている 57 種類の糖鎖構造に対して検索したこと、の 2 点である。

【材料】

微結晶セルロース : Alfa Aesar, Cat#A117730(Lot#102221810)

空スピニングカラム : MobiSpinColumn" F", MoBiTec #M105010S

0.22 μm 遠心フィルター : Ultrafree HC-GV, Millipore, #UFC30GVNB

その他、抗体標品、分析カラム、移動相溶媒、トリプシン、グアニジン、ヨードアセトアミド、DTT、トリス緩衝液、脱塩カラム等は「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

【装置】

質量分析計、LC システム、遠心エバポレータは「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

注意 : 本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

【調製液】

80% アセトアミド, 3%ギ酸

100% アセトニトリル, 3%ギ酸

80% アセトニトリル

20% アセトニトリル

移動相液、トリプシン溶液、ヨードアセトアミド溶液、DTT 溶液等は「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

【酵素処理によるペプチドの調製】

「抗体のペプチドマッピング」と同様に還元変性トリプシン処理を行い、得られたトリプシン消化物について、微結晶セルロースを用いて糖ペプチドを濃縮する。

<Tips>

糖ペプチドが特異的にセルロースに吸着するわけではないことに留意する。

① 酵素処理方法

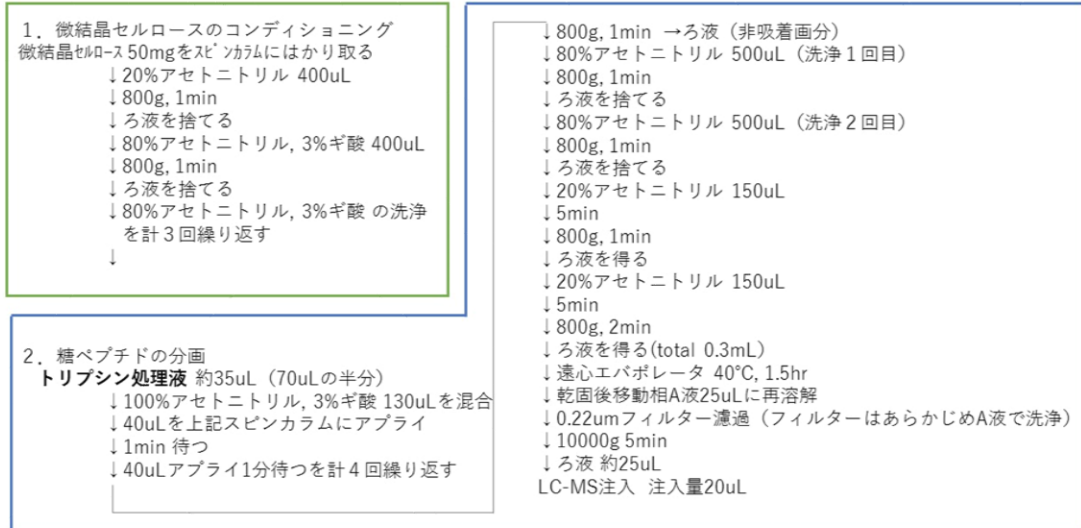
ペプチドマッピングと同じ操作を行い、トリプシン処理液約 70 μL を得る。(終タンパク濃度: 最大 50 $\mu\text{g}/70 \mu\text{L}$)。半分(35 μL)は通常のペプチドマッピング用試料として、残り半分(35 μL)を糖ペプチド解析用試料として用いる(−70°C 保存)。

② 微結晶セルロースによる糖ペプチドの濃縮

糖ペプチドの濃縮方法は  1 のフローチャートを参照。

図1

糖ペプチド濃縮処理のフローチャート（スピンカラム法）



【LC-MS 条件】

流速: 0.1 mL/min
 カラム温度: 20°C
 分析時間: 65 min
 注入量: 10~20 µL

グラジエント

| min | B% |
|-----|----|
| 0 | 2 |
| 0.5 | 4 |
| 15 | 6 |
| 30 | 20 |
| 50 | 40 |
| 51 | 98 |
| 58 | 98 |
| 59 | 2 |
| 65 | 2 |

➤52~52.3min のタイミングでキャリブレーション液に切り替える。

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

<Tips>

カラム温度について、ペプチドマッピングの 55°C に比べて 20°C に下げることにより、わずかではあるが糖ペプチドが分離傾向を示す。ピークトップがわずかにずれるだけでもインソースフラグメンテーション^{a)}由来のシグナルと区別するには有効である。ただし、圧力は 50 MPa 程度まで上昇するので注意が必要。

Bruker TOF/MS (maXisII) の主要パラメータは「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

【データ解析】

データ解析方法はソフトウェアによって異なるため詳述しない。現在、我々が使用しているマニュアル用解析ソフト (Bruker 製 DataAnalysis[®]) による解析処理の流れは次のとおり。

1. 測定ごとのキャリブレーションデータを使って、測定データごとに再キャリブレーション。
2. ベースピーククロマトを表示させ全溶出ピークを確認。
3. モノアイソトピック質量の値と溶出時間から糖ペプチドを同定。

NISTmAb の N 結合糖鎖について、これまで報告されている糖鎖構造 (表 1) から (参考文献 1, 2)、糖ペプチドとしてのモノアイソトピック質量を算出した (図 2)。実際の測定において、NISTmAb 由来糖ペプチドのほとんどは 3 価イオンで検出された。一方、自動解析ソフト (Bruker 製 BiopharmaCompass[®]) では、検出量が小さい糖ペプチドを捉えることができなかったため、MS/MS フラグメントイオンについてもマニュアル解析でその妥当性を評価する必要があった。

表1

NISTmAb RM8671の糖鎖構造の種類

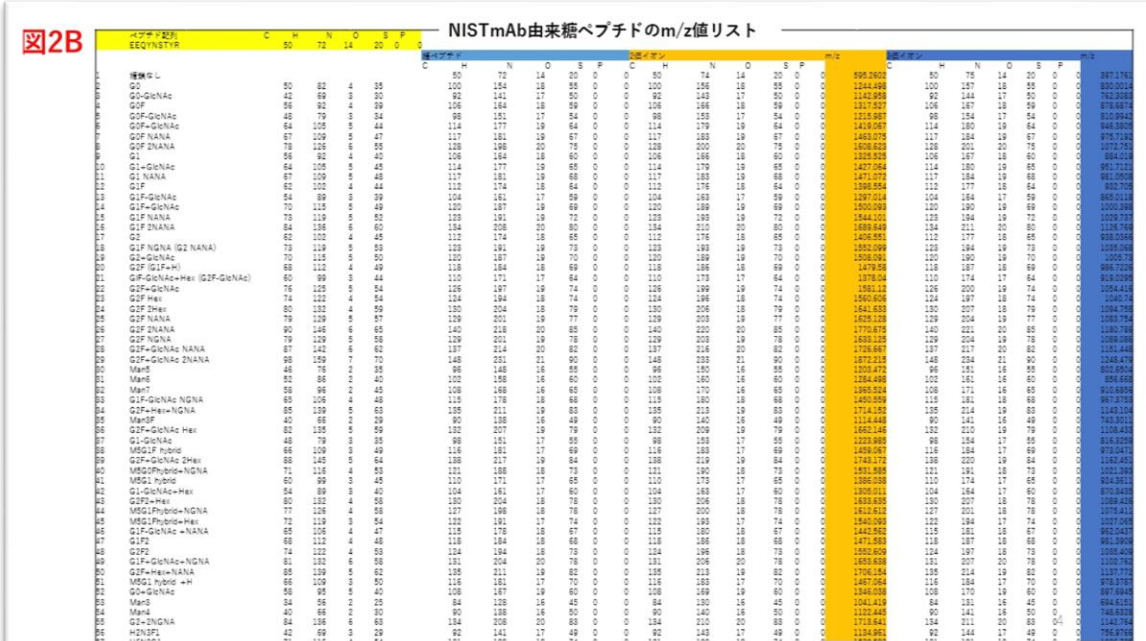
| 糖鎖構造 | 糖鎖 | C | M | N | O |
|--------------------|----------------------------|----|-----|---|----|
| GC | Hex3ManNAc(3) | 50 | 82 | 4 | 35 |
| GC-GlcNAc | Hex3ManNAc(3) | 42 | 89 | 3 | 37 |
| GP | Hex3ManNAc(4)Hex(1) | 56 | 92 | 4 | 39 |
| GP-NANA | Hex3ManNAc(4)Hex(1)NANA(1) | 67 | 109 | 4 | 49 |
| GP-NANA(2) | Hex3ManNAc(4)Hex(1)NANA(2) | 79 | 125 | 6 | 55 |
| G1 | Hex4ManNAc(4) | 56 | 92 | 4 | 43 |
| G1-GlcNAc | Hex4ManNAc(4) | 64 | 105 | 5 | 46 |
| G1-NANA | Hex4ManNAc(4)NANA(1) | 75 | 122 | 6 | 58 |
| GP | Hex4ManNAc(4)Hex(1) | 62 | 102 | 4 | 44 |
| GP-GlcNAc (GP-N+H) | Hex4ManNAc(4)Hex(1) | 60 | 99 | 3 | 44 |
| GP-NANA | Hex4ManNAc(4)Hex(1)NANA(1) | 73 | 119 | 5 | 53 |
| GP | Hex5ManNAc(4)NANA(1) | 62 | 102 | 6 | 48 |
| G2-NANA | Hex5ManNAc(4)NANA(1) | 73 | 119 | 6 | 53 |
| G2-GlcNAc | Hex5ManNAc(4) | 70 | 115 | 5 | 50 |
| GP | Hex5ManNAc(4)Hex(1) | 68 | 112 | 4 | 49 |
| GP-GlcNAc | Hex5ManNAc(4)Hex(1) | 76 | 120 | 5 | 54 |
| GP-Hex | Hex5ManNAc(4)Hex(1) | 74 | 122 | 4 | 54 |
| GP-Hex | Hex7ManNAc(4)Hex(1) | 80 | 132 | 4 | 59 |
| GP-NANA | Hex5ManNAc(4)Hex(1)NANA(1) | 79 | 129 | 5 | 57 |
| GP-NANA(2) | Hex5ManNAc(4)Hex(1)NANA(2) | 90 | 146 | 6 | 63 |
| GP-NGNA | Hex5ManNAc(4)Hex(1)NGNA(1) | 79 | 129 | 6 | 58 |
| GP-GlcNAc-NANA | Hex5ManNAc(4)Hex(1)NANA(1) | 87 | 142 | 6 | 63 |
| GP-GlcNAc-NANA(2) | Hex5ManNAc(4)Hex(1)NANA(2) | 98 | 159 | 7 | 70 |
| GP-GlcNAc | Hex3ManNAc(3)Hex(1) | 48 | 79 | 3 | 34 |
| GP-GlcNAc | Hex3ManNAc(3)Hex(1) | 64 | 105 | 5 | 44 |
| GP-GlcNAc | Hex4ManNAc(4)Hex(1) | 54 | 99 | 4 | 39 |
| GP-GlcNAc | Hex4ManNAc(4)Hex(1) | 70 | 115 | 5 | 49 |
| Man5 | Hex5ManNAc(2) | 46 | 75 | 2 | 39 |
| Man6 | Hex5ManNAc(2) | 62 | 88 | 2 | 43 |
| Man7 | Hex7ManNAc(2) | 58 | 95 | 2 | 45 |
| GP-GlcNAc-NGNA | Hex4ManNAc(4)Hex(1)NGNA(1) | 69 | 106 | 4 | 46 |
| GP-NGNA | Hex4ManNAc(4)Hex(1)NGNA(1) | 73 | 119 | 5 | 51 |
| GP-Hex-NGNA | Hex5ManNAc(4)Hex(1)NGNA(1) | 85 | 139 | 5 | 60 |
| Man8F | Hex3ManNAc(3)Hex(1) | 40 | 65 | 2 | 36 |
| GP-GlcNAc-Hex | Hex5ManNAc(4)Hex(1) | 82 | 135 | 5 | 59 |
| G1-GlcNAc | Hex4ManNAc(4) | 48 | 79 | 3 | 39 |
| MSG1F-Hybrid | Hex5ManNAc(4)Hex(1) | 65 | 109 | 5 | 49 |
| GP-GlcNAc-Hex | Hex7ManNAc(4)Hex(1) | 88 | 145 | 5 | 64 |
| MSG1F-Hybrid-NGNA | Hex5ManNAc(4)Hex(1)NGNA(1) | 71 | 118 | 4 | 53 |
| MSG1F-Hybrid | Hex5ManNAc(4) | 60 | 99 | 3 | 45 |
| G1-GlcNAc-Hex | Hex5ManNAc(4) | 54 | 89 | 3 | 43 |
| GP-Hex | Hex5ManNAc(4)Hex(1) | 60 | 102 | 4 | 50 |
| MSG1F-Hybrid-NGNA | Hex5ManNAc(4)Hex(1)NGNA(1) | 77 | 120 | 4 | 58 |
| MSG1F-Hybrid-Hex | Hex7ManNAc(4)Hex(1) | 72 | 119 | 3 | 54 |
| GP-GlcNAc-NANA | Hex4ManNAc(4)Hex(1)NANA(1) | 65 | 105 | 4 | 47 |
| GP | Hex4ManNAc(4)Hex(1) | 68 | 112 | 4 | 48 |
| GP | Hex5ManNAc(4)Hex(1) | 74 | 122 | 4 | 59 |
| GP-GlcNAc-NGNA | Hex4ManNAc(4)Hex(1)NGNA(1) | 81 | 132 | 6 | 60 |
| GP-Hex-NANA | Hex5ManNAc(4)Hex(1)NANA(1) | 89 | 139 | 5 | 63 |
| MSG1F-Hybrid-H | Hex7ManNAc(4) | 66 | 109 | 5 | 51 |
| G2-GlcNAc | Hex5ManNAc(4) | 68 | 95 | 3 | 43 |
| Man3 | Hex3ManNAc(2) | 34 | 55 | 2 | 25 |
| Man4 | Hex4ManNAc(2) | 40 | 65 | 2 | 35 |
| G2-INGNA | Hex5ManNAc(4)INGNA(2) | 54 | 105 | 6 | 60 |
| Man5F | Hex2ManNAc(2)Hex(1) | 42 | 69 | 3 | 29 |
| Man5GL | Hex5ManNAc(3)INGNA(1) | 71 | 118 | 4 | 54 |

図2A

NISTmAb由来糖ペプチドの構造



注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません



| 糖鎖 | C | H | N | O | S | F | 分子量 | NISTmAb一致率 |
|----------------------------|----|-----|---|----|---|---|------|------------|
| 糖鎖なし | 50 | 82 | 4 | 35 | 0 | 0 | 1000 | 100% |
| G0 | 42 | 69 | 3 | 30 | 0 | 0 | 1044 | 100% |
| G1-GlcNAc | 56 | 82 | 4 | 39 | 0 | 0 | 1056 | 100% |
| G2-GlcNAc | 48 | 79 | 3 | 34 | 0 | 0 | 1018 | 100% |
| G0F-GlcNAc | 64 | 105 | 5 | 44 | 0 | 0 | 1114 | 100% |
| G1F-GlcNAc | 67 | 109 | 5 | 47 | 0 | 0 | 1158 | 100% |
| G2F-GlcNAc | 78 | 125 | 6 | 55 | 0 | 0 | 1266 | 100% |
| G1-GlcNAc | 86 | 92 | 4 | 40 | 0 | 0 | 1106 | 100% |
| G1-NANA | 64 | 105 | 5 | 45 | 0 | 0 | 1152 | 100% |
| G1-NANA | 87 | 109 | 5 | 48 | 0 | 0 | 1206 | 100% |
| G2F | 62 | 102 | 4 | 44 | 0 | 0 | 1112 | 100% |
| G1F-GlcNAc | 54 | 89 | 3 | 39 | 0 | 0 | 1044 | 100% |
| G1F-GlcNAc | 70 | 115 | 5 | 49 | 0 | 0 | 1158 | 100% |
| G1F-NANA | 73 | 119 | 5 | 52 | 0 | 0 | 1206 | 100% |
| G1F-NANA | 84 | 138 | 6 | 60 | 0 | 0 | 1314 | 100% |
| G2 | 62 | 102 | 4 | 45 | 0 | 0 | 1112 | 100% |
| G1F-GlcNAc (G2-NANA) | 73 | 119 | 5 | 53 | 0 | 0 | 1206 | 100% |
| G2-GlcNAc | 70 | 115 | 5 | 50 | 0 | 0 | 1158 | 100% |
| G2F(GlcNAc) | 88 | 112 | 4 | 49 | 0 | 0 | 1188 | 100% |
| G1F-GlcNAc+Hex(G2F-GlcNAc) | 60 | 99 | 3 | 44 | 0 | 0 | 1074 | 100% |
| G2F-GlcNAc | 76 | 115 | 5 | 54 | 0 | 0 | 1206 | 100% |
| G2F-Hex | 74 | 122 | 4 | 54 | 0 | 0 | 1242 | 100% |
| G2F-Hex | 80 | 132 | 4 | 59 | 0 | 0 | 1326 | 100% |
| G2F-Hex | 79 | 129 | 5 | 57 | 0 | 0 | 1308 | 100% |
| G2F-2NANA | 90 | 146 | 6 | 65 | 0 | 0 | 1470 | 100% |
| G2F-NGNA | 79 | 129 | 5 | 58 | 0 | 0 | 1326 | 100% |
| G2F-GlcNAc NANA | 87 | 142 | 6 | 62 | 0 | 0 | 1374 | 100% |
| G2F-GlcNAc 2NANA | 98 | 159 | 7 | 70 | 0 | 0 | 1494 | 100% |
| Man5 | 46 | 78 | 2 | 35 | 0 | 0 | 966 | 100% |
| Man6 | 52 | 86 | 3 | 40 | 0 | 0 | 1026 | 100% |
| Man7 | 58 | 96 | 3 | 45 | 0 | 0 | 1086 | 100% |
| G1F-GlcNAc-NGNA | 65 | 105 | 4 | 48 | 0 | 0 | 1134 | 100% |
| G2F-Hex+NGNA | 85 | 139 | 5 | 63 | 0 | 0 | 1356 | 100% |
| Man5F | 40 | 68 | 2 | 33 | 0 | 0 | 900 | 100% |
| G2F-GlcNAc+Hex | 62 | 105 | 5 | 50 | 0 | 0 | 1122 | 100% |
| G1-GlcNAc | 48 | 79 | 3 | 39 | 0 | 0 | 990 | 100% |
| MBS1F hybrid | 88 | 109 | 3 | 49 | 0 | 0 | 1158 | 100% |
| G2F-GlcNAc 2Hex | 68 | 145 | 5 | 64 | 0 | 0 | 1338 | 100% |
| MBS2F hybrid-NGNA | 71 | 116 | 4 | 53 | 0 | 0 | 1212 | 100% |
| MBS1 hybrid | 60 | 99 | 3 | 45 | 0 | 0 | 1104 | 100% |
| G1-GlcNAc+Hex | 54 | 89 | 3 | 40 | 0 | 0 | 1044 | 100% |
| G2F+Hex | 80 | 132 | 4 | 58 | 0 | 0 | 1326 | 100% |
| MBS1F hybrid-NGNA | 77 | 126 | 4 | 56 | 0 | 0 | 1278 | 100% |
| MBS1F hybrid+Hex | 72 | 119 | 3 | 54 | 0 | 0 | 1224 | 100% |
| G1F-GlcNAc=NANA | 65 | 106 | 4 | 47 | 0 | 0 | 1122 | 100% |
| G1F | 68 | 112 | 4 | 48 | 0 | 0 | 1134 | 100% |
| G2F | 74 | 122 | 4 | 53 | 0 | 0 | 1212 | 100% |
| G1F-GlcNAc-NGNA | 81 | 132 | 6 | 58 | 0 | 0 | 1338 | 100% |
| G2F-Hex=NANA | 85 | 139 | 5 | 63 | 0 | 0 | 1356 | 100% |
| MBS1 hybrid-H | 66 | 109 | 3 | 50 | 0 | 0 | 1158 | 100% |
| G0-GlcNAc | 58 | 95 | 3 | 40 | 0 | 0 | 1056 | 100% |
| Man3 | 34 | 56 | 2 | 25 | 0 | 0 | 840 | 100% |
| Man4 | 40 | 66 | 2 | 30 | 0 | 0 | 900 | 100% |
| G2-GlcNAc | 84 | 136 | 6 | 63 | 0 | 0 | 1344 | 100% |
| H2N3F1 | 42 | 69 | 3 | 39 | 0 | 0 | 924 | 100% |
| H2N3F1 | 47 | 77 | 3 | 44 | 0 | 0 | 1002 | 100% |

【結果】

NISTmAb 10 µg に相当する試料を注入して測定したときの、糖ペプチドに相当する代表的なマスクロマトグラムを図 3 に示した。糖鎖が付加していないペプチドとシアル酸が付加した糖ペプチドに関しては LC 上で分離するが、他の糖ペプチドはほぼ同じ保持時間で溶出した。本プロトコルを用いた解析で検出された全糖鎖種を表 2 に示した。特に、マイナー糖鎖種についてはそのマスクロマトグラムを図 4 に示した。

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

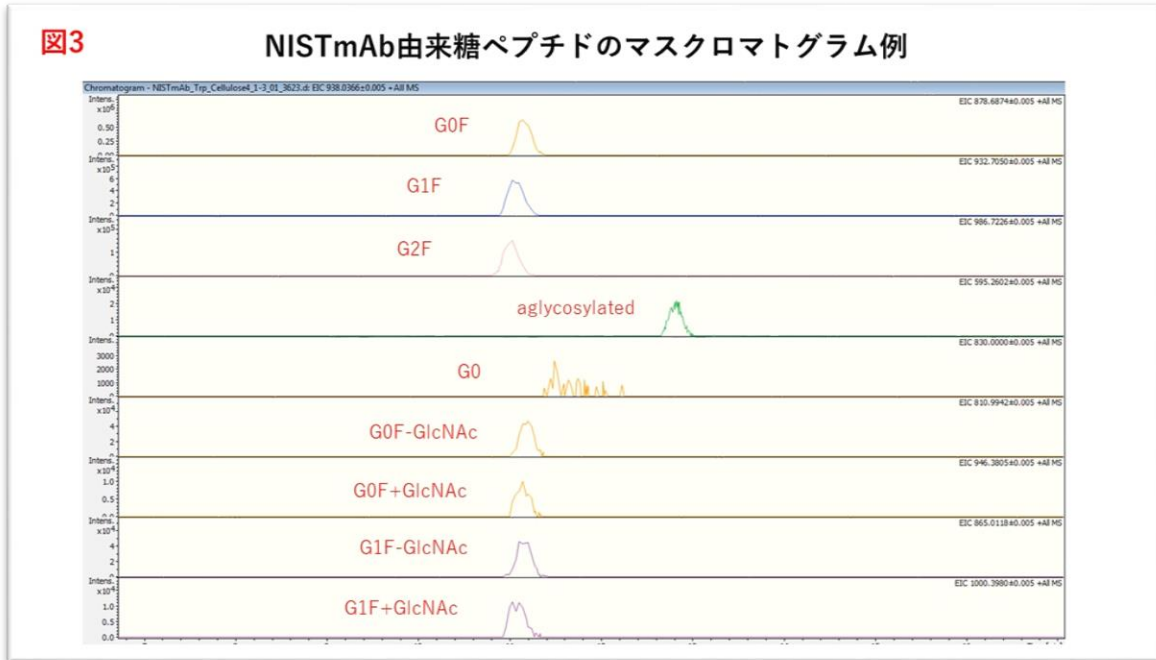
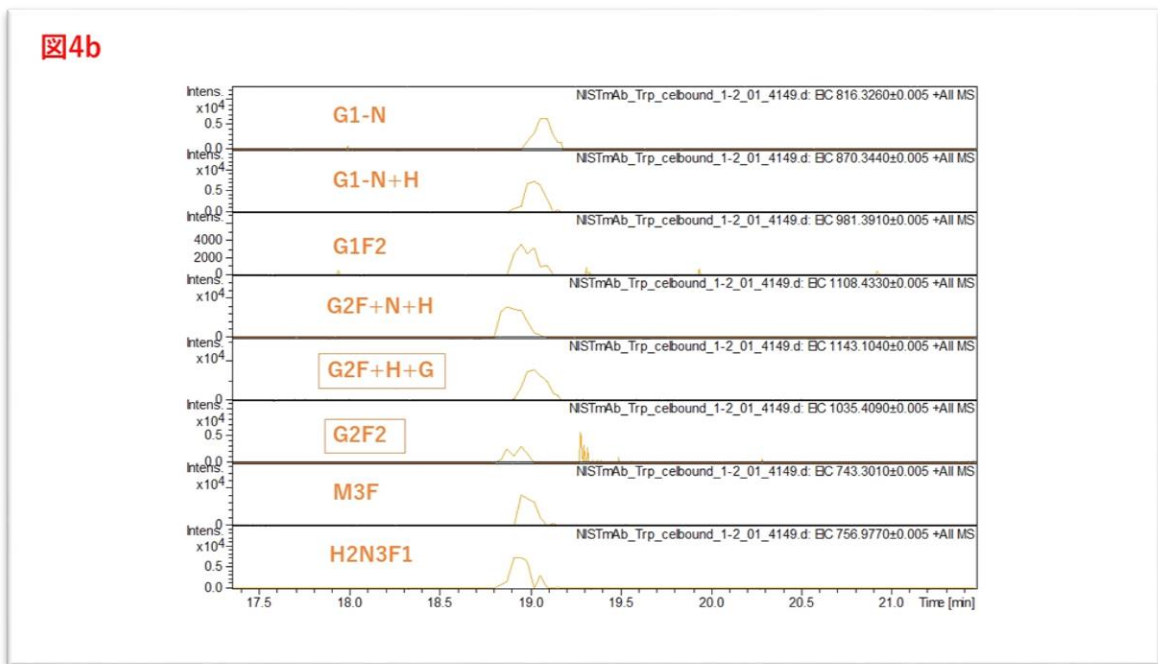
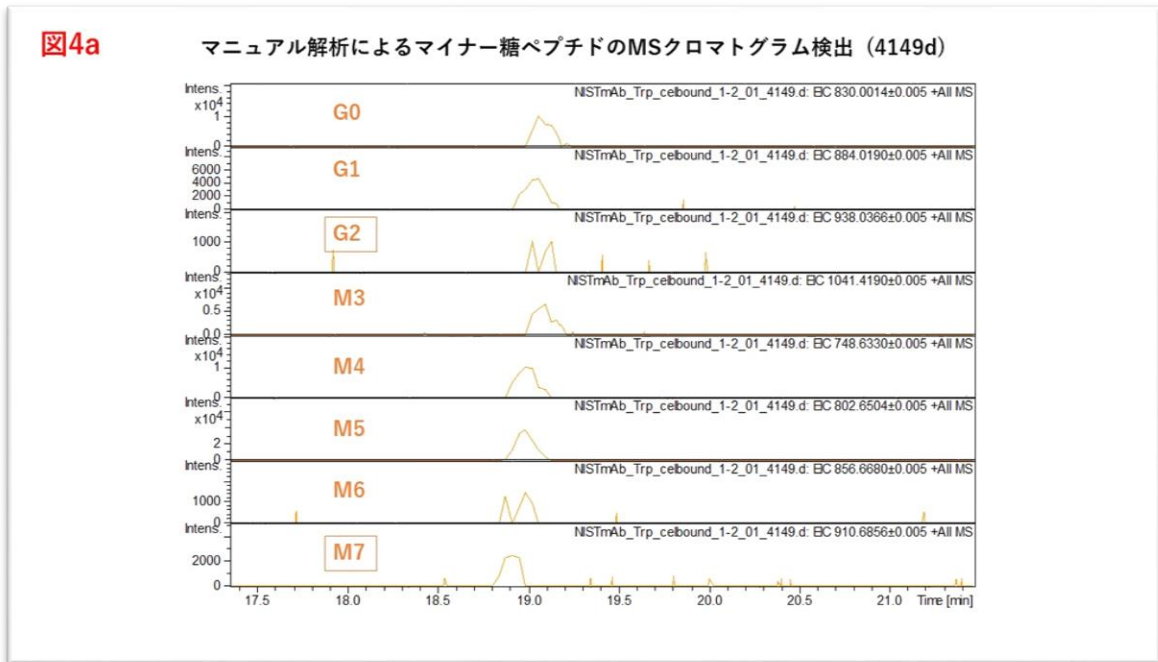


表2 Metaboscape®によるNISTmAb由来糖ペプチド検出 (4149d)

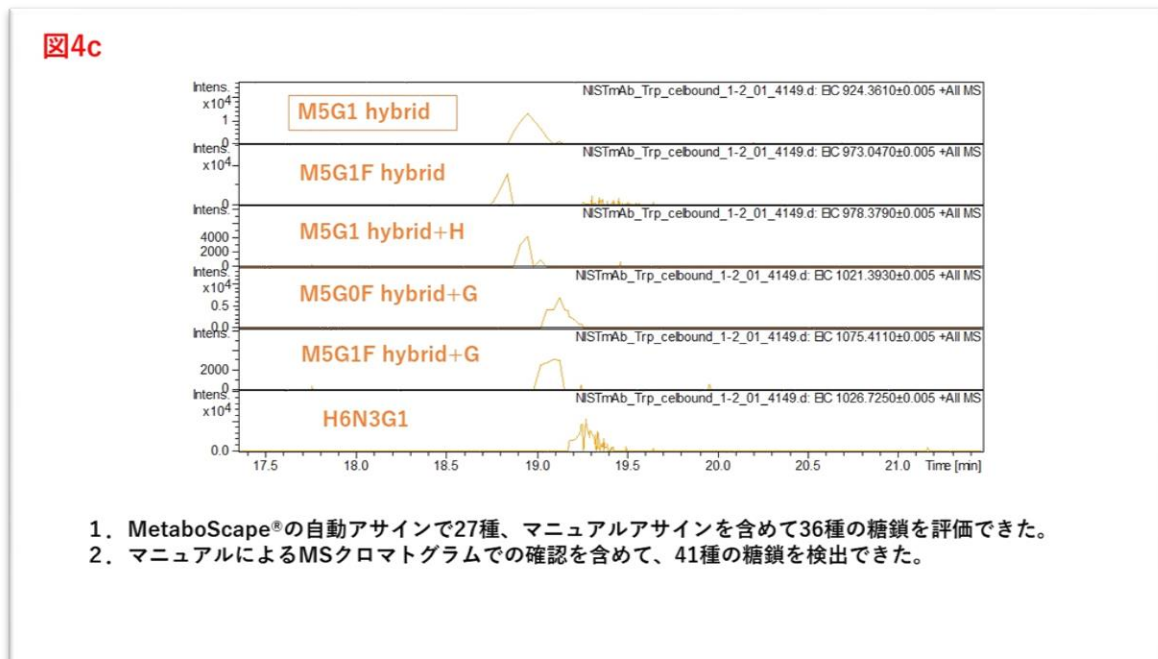
| No. | RT [min] | m/z meas. | Δ m/z [mDa] | M meas. | mSigma | Ions | Name | Molecular Formula | Annotations | Area | % |
|-----|----------|-----------|--------------------|----------|--------|------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------|----------|
| 1 | 18.95 | 878.5872 | 0.336 | 2833.04 | 35.9 | [M+H+H2]3+ | G0F | C106H164N18O59 | Analyte List 201121 | 1786526 | 35.89405 |
| 2 | 18.88 | 932.7048 | 0.363 | 2795.093 | 32.4 | [M+H+H2]3+ | G1F | C112H174N18O64 | Analyte List 201121 | 1685680 | 33.67919 |
| 3 | 18.84 | 986.7223 | 0.221 | 2957.145 | 33.9 | [M+H+H2]3+ | G2F (G1F+H) | C118H184N18O69 | Analyte List 201121 | 457410 | 9.138864 |
| 4 | 18.92 | 1215.987 | 0.556 | 2429.96 | 16.5 | [M+H+H]2+ | G0F-N | C98H151N17O54 | Analyte List 201121 | 158880 | 3.174357 |
| 5 | 18.95 | 865.0118 | 0.47 | 2592.013 | 39.1 | [M+H+H2]3+ | G1F-N | C104H161N17O59 | Analyte List 201121 | 136236 | 2.70196 |
| 6 | 18.84 | 1040.739 | -0.393 | 3119.196 | 44.9 | [M+H+H2]3+ | G2F+H | C124H194N18O74 | Analyte List 201121 | 99538 | 1.989728 |
| 7 | 19.19 | 967.3754 | 0.685 | 2899.104 | 13.7 | [M+H+H2]3+ | G1F-N+G | C115H178N18O68 | Analyte List 201121 | 90898 | 1.816105 |
| 8 | 19.82 | 595.26 | 0.319 | 1188.505 | 37 | [M+H+H]2+ | aglycosylated | C50H72N14O20 | Analyte List 201121 | 78320 | 1.574791 |
| 9 | 18.88 | 919.0283 | -0.574 | 2754.063 | 62.9 | [M+H+H2]3+ | G1F-N+H | C110H171N17O64 | Analyte List 201121 | 60716 | 1.213081 |
| 10 | 18.8 | 1084.757 | -0.459 | 3281.249 | 26.5 | [M+H+H2]3+ | G2F+2H | C130H204N18O79 | Analyte List 201121 | 54184 | 1.082574 |
| 11 | 18.95 | 1203.472 | 0.965 | 2404.93 | 64.5 | [M+H+H]2+ | M5 | C96H148N16O55 | Analyte List 201121 | 53728 | 1.073463 |
| 12 | 19.06 | 1142.959 | 0.922 | 2283.903 | 140.7 | [M+H+H]2+ | G0-N | C92H141N17O50 | Analyte List 201121 | 51176 | 1.022475 |
| 13 | 18.95 | 1000.398 | 0.113 | 2998.171 | 49.2 | [M+H+H2]3+ | G1F+N | C120H187N19O69 | Analyte List 201121 | 36058 | 0.720424 |
| 14 | 19.16 | 1035.068 | 0.15 | 3102.182 | 40.8 | [M+H+H2]3+ | G2+A | C123H191N19O73 | Analyte List 201121 | 29882 | 0.59703 |
| 15 | 18.92 | 1054.416 | 0.442 | 3160.225 | 50.1 | [M+H+H2]3+ | G2F+N | C126H197N19O74 | Analyte List 201121 | 26722 | 0.533895 |
| 16 | 19.1 | 1089.086 | 0.137 | 3264.235 | 105.4 | [M+H+H2]3+ | G2F+G | C129H201N19O78 | Analyte List 201121 | 24544 | 0.490379 |
| 17 | 18.95 | 946.3777 | -2.263 | 2836.111 | 63.5 | [M+H+H2]3+ | G0F-N | C114H177N19O64 | Analyte List 201121 | 23784 | 0.475195 |
| 18 | 18.90 | 1114.447 | -0.266 | 2226.879 | 71.7 | [M+H+H]2+ | M3F | C90H138N16O49 | Analyte List 201121 | 21256 | 0.424686 |
| 19 | 18.84 | 973.0416 | -4.942 | 2916.103 | 109.7 | [M+H+H2]3+ | M5G1F hybrid | C116H181N17O69 | Analyte List 201121 | 18582 | 0.371261 |
| 20 | 18.95 | 924.3995 | -1.075 | 2770.057 | 90.5 | [M+H+H2]3+ | M5G1 hybrid | C110H171N17O65 | Analyte List 201121 | 16420 | 0.328065 |
| 21 | 18.88 | 1108.433 | 0.331 | 3322.277 | 33.6 | [M+H+H2]3+ | G2F+N+H | C132H207N19O79 | Analyte List 201121 | 12224 | 0.24423 |
| 22 | 19.1 | 830.0006 | -0.244 | 2486.98 | 148.1 | [M+H+H2]3+ | G0 | C100H154N18O55 | Analyte List 201121 | 11256 | 0.22489 |
| 23 | 18.92 | 1134.961 | 0.278 | 2267.907 | 95 | [M+H+H]2+ | H2N3F1 | C92H141N17O49 | Analyte List 201121 | 11252 | 0.22481 |
| 24 | 19.13 | 1021.393 | 0.833 | 3061.158 | 66.5 | [M+H+H2]3+ | M5G0F hybrid+G | C121H188N18O73 | Analyte List 201121 | 9070 | 0.181215 |
| 25 | 18.99 | 748.6329 | 0.708 | 2242.877 | 101 | [M+H+H2]3+ | M4 | C90H138N16O50 | Analyte List 201121 | 8322 | 0.16627 |
| 26 | 19.06 | 816.3265 | 1.121 | 2445.958 | 162.8 | [M+H+H2]3+ | G1-N | C98H151N17O55 | Analyte List 201121 | 7166 | 0.143174 |
| 27 | 19.03 | 870.3429 | 0.968 | 2608.01 | 181.3 | [M+H+H2]3+ | G1-N+H | C104H161N17O60 | Analyte List 201121 | 6170 | 0.123274 |
| 28 | 19.28 | 1026.725 | | 1025.717 | | [M+H]+ | H6N3G1 (3+) | | Manual | 5002 | 0.099938 |
| 29 | 19.06 | 884.0192 | | 883.0119 | | [M+H]+ | G1 (3+) | | Manual | 4748 | 0.094863 |
| 30 | 18.95 | 978.3784 | | 977.3711 | | [M+H]+ | M5G1 hybrid+H (3+) | | Manual | 4258 | 0.085073 |
| 31 | 18.95 | 981.3894 | | 980.3821 | | [M+H]+ | G1F2 (3+) | | Manual | 3638 | 0.072686 |
| 32 | 19.1 | 1075.409 | | 1074.401 | | [M+H]+ | M5G1F hybrid+G (3+) | | Manual | 3112 | 0.062176 |
| 33 | 19.1 | 694.6163 | | 2080.827 | | [M+H+H2]3+ | M3 (3+) | | Manual | 2204 | 0.044035 |
| 34 | 18.99 | 856.6662 | | 1711.318 | | [M+H+H]2+ | M6 (3+) | | Manual | 2016 | 0.040279 |
| 35 | 19.27 | 1539.586 | 4.042 | 3077.158 | 124.4 | [M+H+H]2+ | H6N3G1 | C121H188N18O74 | Analyte List 201121 | 1762 | 0.035004 |
| 36 | 19.4 | 1027.062 | | 1026.054 | | [M+H]+ | M5G1F hybrid+H (3+) | | Manual | 1704 | 0.034045 |
| 37 | 19.13 | 1102.763 | | 3305.267 | | [M+H+H2]3+ | G1F+N+G | | Manual | 1174 | 0.023456 |

N, GlcNAc; H, Hex; G, NGNA; A, NANA; 色 値自動判定; マニュアル検索

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません



注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません



【考察】

糖鎖の不均一性評価法として一般的に行われる遊離糖鎖解析では、糖鎖の結合位置が特定できないことや、糖鎖修飾の割合も明らかにできない等の限界がある。一方、糖ペプチドマッピングでは、結合位置やその修飾割合を明らかにできることから、極めて有効な手段と考えられている。ところが、通常のペプチドマッピングにおいて糖ペプチドを再現性良く測定することは困難であった。通常のペプチドマッピングでも糖ペプチドは検出されることがあるものの、サンプル溶解液や流路の長さ等、実験条件が変わると全く検出されなくなることがあった。今回提示したプロトコールを用いると、注入量を増しても再現よく糖ペプチドが検出されており、糖鎖構造の不均一性を糖ペプチドレベルで評価することが出来る。

【参考文献】

1. NIST interlaboratory study on glycosylation analysis of monoclonal antibodies: Comparison of results from diverse analytical methods. De Leoz et al., Mol. Cell. Proteomics, 2020, 19, 11-30.
2. Analysis of NIST monoclonal antibody reference material glycosylation using LC-MS/MS-based glycoproteomic approach. Zhao et al., J. Proteome Res., 2021, 20, 818-830.

* 用語説明

a) インソースフラグメンテーション：分子をイオン化するために高温、高電圧をかけたときに起こる分子のフラグメント化。MS/MS スペクトルを測定するために意図してフラグメント化させるのとは違い、熱等に弱い化合物が意図せずフラグメント化してしまう現象。