

LC-MALDIシステムによる熱ショックタンパク質 Hsp27のメチルグリオキザール修飾解析

Analysis of Methylglyoxal Modification of Heat Shock Protein 27 Using LC-MALDI System

解糖系及び非酵素的糖化反応（メイラード反応）のカルボニル化合物中間体で、反応性が高いメチルグリオキザール (MG) は、標的タンパク質と安定な付加体 (Advanced Glycation End-product; AGE) を生じます。MGによる特異的な修飾は糖尿病合併症の発症に関与することが示唆されており、発症前段階の診断に有用なバイオマーカーの候補としての研究がすすめられています。

アルギニンのMG修飾によって生じる生成物の一つであるアルグピリミジンの生成過程をFig. 1に示します。アルグピリミジン以外にも、Fig. 2に示した種々のMG修飾付加体について考慮し、解析を行いました。MG修飾Hsp27はトリプシンもしくはトリプシン+V8プロテアーゼにより酵素消化を行ってからLC-MALDIによる解析に供しました。解析の結果、複数箇所において5-ヒドロ-5メチルイミダゾロン、カルボキシルエチルリジン等の生成が、さらにシャペロン機能を発揮するArg-188にアルグピリミジンの生成が確認されました (Table 1, Fig. 3)。アルグピリミジンは抗MG修飾タンパク質抗体の抗原決定基であり、MG修飾Hsp27におけるその生成を世界に先駆けて初めて同定することができました。

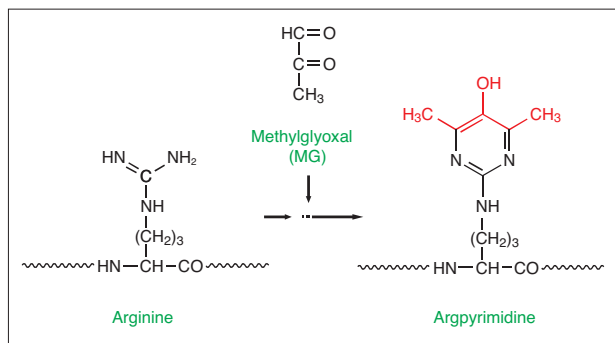


Fig. 1 アルグピリミジンの生成過程
Production of Argpyrimidine

今回、種々のストレス（酸化ストレス、化学物質等）に応答して発現誘導される熱ショックタンパク質であるHsp27のMG修飾をLC-MALDIシステム (Prominence nano-AccuSpot-AXIMA® Performance) を用いて解析し、新規に複数の修飾を見出すことが行えた結果をご紹介します。

K. Shima

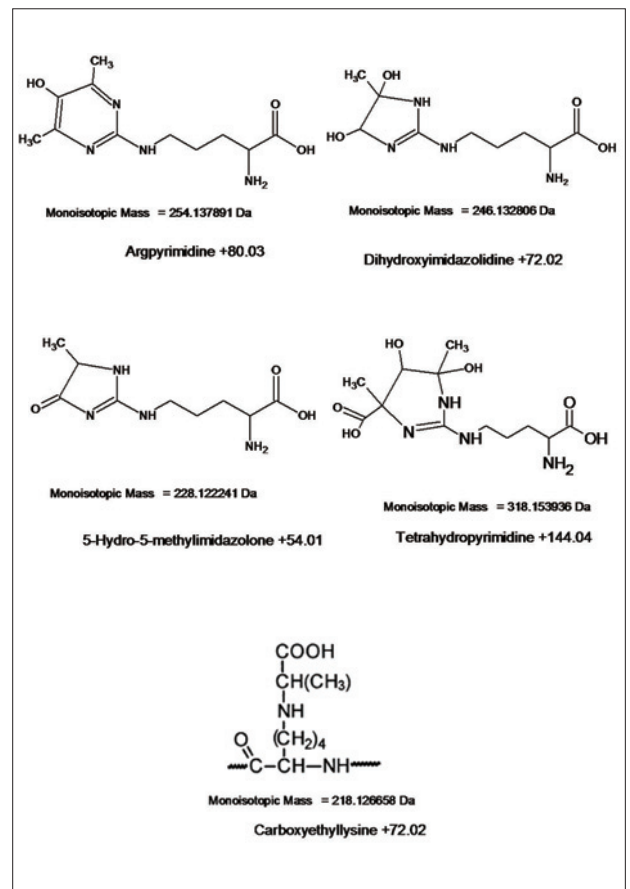


Fig. 2 メチルグリオキザールによる修飾
Modifications by Methylglyoxal

LC-MALDIにより帰属できたMG修飾Hsp27の配列は、全配列の93%に達しました (Fig. 4)。カバーしていない部分の多くは一般的に帰属が難しいN, C末端部分でした。なお, N, C末端を除いた場合の配列カバー率は96%でした。

以上の結果から, LC-MALDIシステムにより, 目的タ

ンパク質の詳細な解析が可能であることが示されました。サンプルプレート上に搭載した試料を複数回分析することができるというLC/MS/MSには無い特長を持つ本システムは, タンパク質を詳細解析する際に特に有効なツールとなることが期待されます。

Table 1 LC-MALDIにより同定されたMG-修飾Hsp27酵素消化ペプチド
Peptides Identified by LC-MALDI Analysis for Enzymatic Digests of MG-modified Hsp27

Theoretical Mass	Start	End	Sequence	Modifications	Enzyme
1041.25	5	12	RVPFSLLR	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin
1556.76	28	40	LFDQAFGLPRLPE	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin+V8
2738.01	41	64	EWSQWLGGSSWPGYVRLPPAAIE	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin+V8
1570.75	65	79	SPAVAAPAYSRLSR	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin+V8
2412.61	65	87	SPAVAAPAYSRLSRQLSSGVSE	2x 5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin+V8
1318.44	88	96	IRHTADRWR	2x 5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin+V8
2180.42	95	112	WRVSLDYNHFAPDELTVK	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin
1769.91	113	127	TKDGVVEITGKHEER	Carboxyethyllysine (K)	Trypsin
2856.02	113	136	TKDGVVEITGKHEERQDEHGYISR	Carboxyethyllysine (K)	Trypsin
1540.63	115	127	DGVVEITGKHEER	Carboxyethyllysine (K)	Trypsin
2626.75	115	136	DGVVEITGKHEERQDEHGYISR	Carboxyethyllysine (K)	Trypsin
2680.79	115	136	DGVVEITGKHEERQDEHGYISR	5-Hydro-5-methylimidazolone (R); Carboxyethyllysine (K)	Trypsin
1709.73	124	136	HEERQDEHGYISR	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin
2274.39	124	140	HEERQDEHGYISRCFTR	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin
1722.84	128	140	QDEHGYISRCFTR	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin
1350.50	131	140	HGYISRCFTR	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin+V8
1376.54	131	140	HGYISRCFTR	Argpyrimidine (R)	Trypsin+V8
1532.72	131	141	HGYISRCFTRK	2x 5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin+V8
2883.17	172	198	LATQSNITIPVTFESRAQLGGPEAAK	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin
2883.17	172	198	LATQSNITIPVTFESRAQLGGPEAAK	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin
1238.35	187	198	SRAQLGGPEAAK	5-Hydro-5-methylimidazolone (R)	Trypsin+V8
1256.37	187	198	SRAQLGGPEAAK	Dihydroxyimidazolidine (R)	Trypsin+V8
1264.39	187	198	SRAQLGGPEAAK	Argpyrimidine (R)	Trypsin+V8

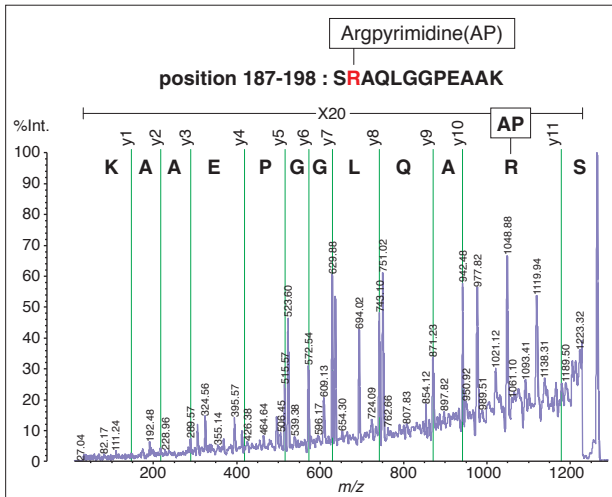


Fig. 3 アルグピリミジン修飾をうけたペプチドのMS/MS スペクトル
MS/MS Spectrum of Argpyrimidine Adduction on MG-modified Peptide

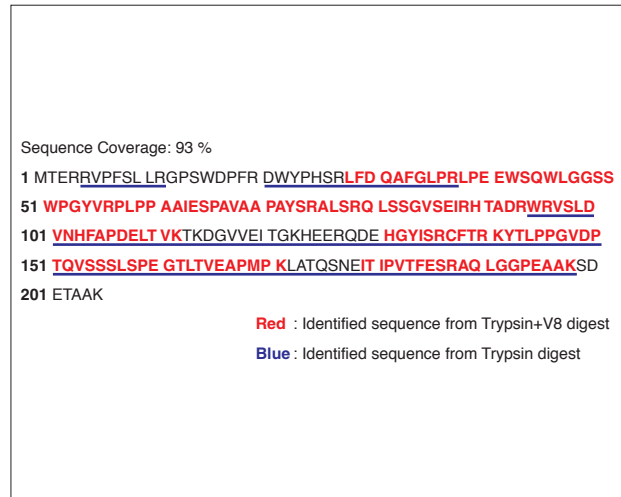


Fig. 4 LC-MALDIにより帰属できたMG修飾Hsp27の配列
Sequence Coverage of MG-modified Hsp27 by LC-MALDI Analysis

参考文献:

1) Oya, T. et al. J. Biol. Chem. 1999;274:18492

謝辞:

本アプリケーションニュースは京都府立医科大学医学部生体機能分析医学講座 大矢 友子准教授, 京都府立医科大学大学院医学研究科消化器内科学教室 内藤 裕二准教授, 吉川 敏一教授との共同研究によって得られた結果をもとに作成しています。

初版発行: 2010年10月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

☎ 0120-131691 (携帯電話不可)
● 携帯電話専用番号 (075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており, 予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制 Web の閲覧だけでなく, いろいろな情報サービスが受けられます。