

プロテインシーケンサを用いた 還元アルキル化されたシステインの検出

はじめに

現在のタンパク質の解析は質量分析装置とゲノムデータベースに基づく検索エンジンを用いたタンパク質の同定を行うプロテオーム解析が主流です。タンパク質はそれぞれ固有の立体構造を形成しており、その立体構造をもつことでそのタンパク質の機能を有しています。タンパク質の立体構造は、4つの階層から構成されています。その階層の一つにタンパク質を構成しているアミノ酸の側鎖同士から形成される三次構造があります。分子内システインのジスルフィド (S-S) 結合により分子内架橋からつくられる立体構造もその一つです。このジスルフィド結合には、そのタンパク質の立体構造を安定化させる働きがあり、通常、S-S 結合を形成している場合が多々あります。そのため、アミノ酸配列分析でもシステインを同定することが必要となる場合があります。プロテインシーケンサでは、N 末端側の半シスチン残基は、エドマン分解により ATZ-半シスチンに変換されても、C 末端側の半シスチンとジスルフィド結合をしているため、溶出されず、HPLC で検出することができないため、タンパク質の還元アルキル化を行い、ジスルフィド結合を切断してからシーケンス分析を行い、PTH-修飾システインとして同定することが一般的です。

本稿では、還元アルキル化を行ったペプチド・タンパク質をプロテインシーケンサ PPSQ™-50A シリーズ (イソクラティックシステム、グラジエントシステム) を用いて、PTH-修飾システイン (還元アルキル化されたシステインのフェニルチオヒダントイン誘導体) の同定を行った例をご紹介します。

T. Kuriki

還元アルキル化のプロトコール

ジスルフィド結合を含有しているサンプルの還元アルキル化には、いくつかの方法があります。ここでは、還元剤には DTT (ジチオスレイトール) を使い、アルキル化にはそれぞれ、モノヨード酢酸を用いたカルボキシメチル化、ヨードアセトアミドを用いたカルバミドメチル化と 4-ビニルピリジンを用いたピリジリエチル化を行いました。還元アルキル化の反応プロトコールを図 1 に示します。反応溶液には処理サンプルを精製することなく直接 PPSQ-50A シリーズにアプライできるように、エドマン分解に影響が少ない N-エチルモルホリンを使用しました。それぞれのアルキル化剤によって至適な pH が異なるため、N-エチルモルホリンの濃度で調整を行いました。

サンプルは、分子内ジスルフィド結合を 1 つ含有する合成オキシトシン (ペプチド研究所製 Code: 4084-v) 100 pmol を使用しました。

プロテインシーケンサによる分析条件は、表 1 および表 2 に示します。

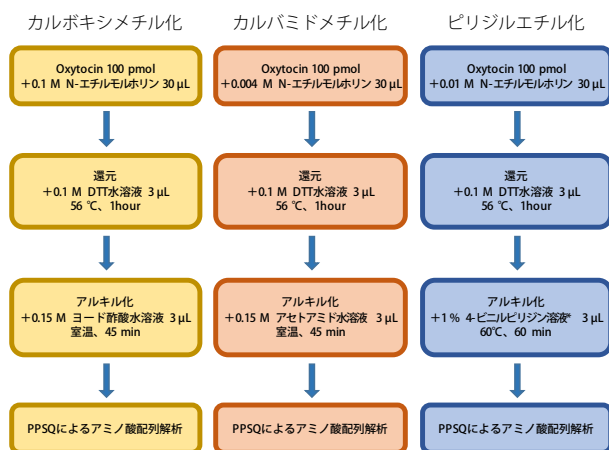


図 1 還元アルキル化の反応プロトコール

表 1 分析条件 (イソクラティックシステム)

Column	: Wakopak® Wakosil® PTH-II (250 mm × 4.6 mm I.D.)
Mobile phase	: PTH-amino Acids Mobile Phase
Flow rate of mobile phase	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Detection	: SPD-M30A (269 nm) with High Sensitivity Flow cell

表 2 分析条件 (グラジエントシステム)

Column	: Wakopak® Wakosil® PTH-GR (S-PSQ) (250 mm × 2.0 mm I.D.)
Mobile phase	: A: PTH-amino Acids Mobile Phase A (for Gradient Elution) B: PTH-amino Acids Mobile Phase B (for Gradient Elution)
Flow rate of mobile phase	: 0.3 mL/min
Column temp.	: 35 °C
Detection	: SPD-M30A (269 nm) with High Sensitivity Flow cell

還元アルキル化を行ったサンプル溶液 3 μL (30 pmol) を PVDF 膜に添加、乾燥を行いました。乾燥後ポブレン溶液を PVDF 膜にさらに添加し、シーケンス分析を開始しました。Oxytocin のシーケンス分析結果を図 2、図 3 に示します。図 3 は図 2 の一部を拡大したものです。

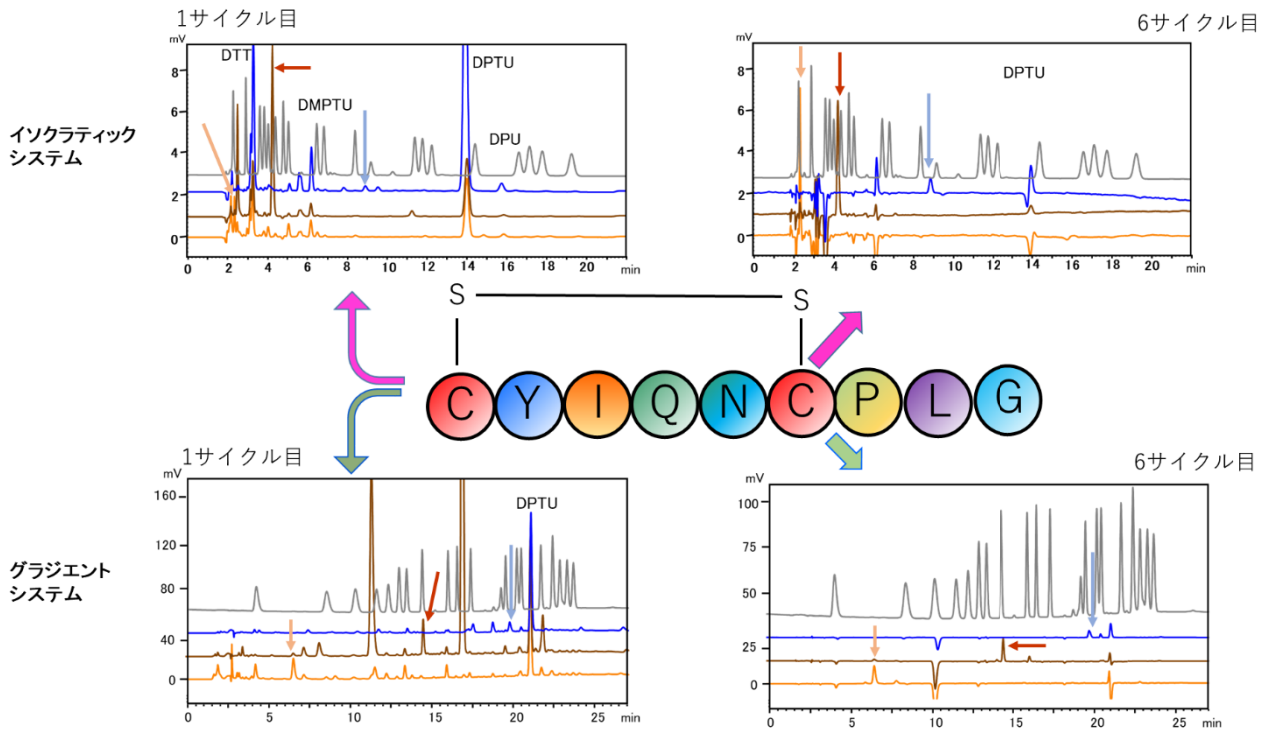


図2 還元アルキル化された Oxytocin のアミノ酸配列とそのクロマトグラム
(橙：カルボキシメチル化 (CM)、茶：カルバミドメチル化 (CAM)、青：ピリジリエチル化 (PE))
(1 サイクル目は生クロマトグラム、6 サイクル目は差クロマトグラム)

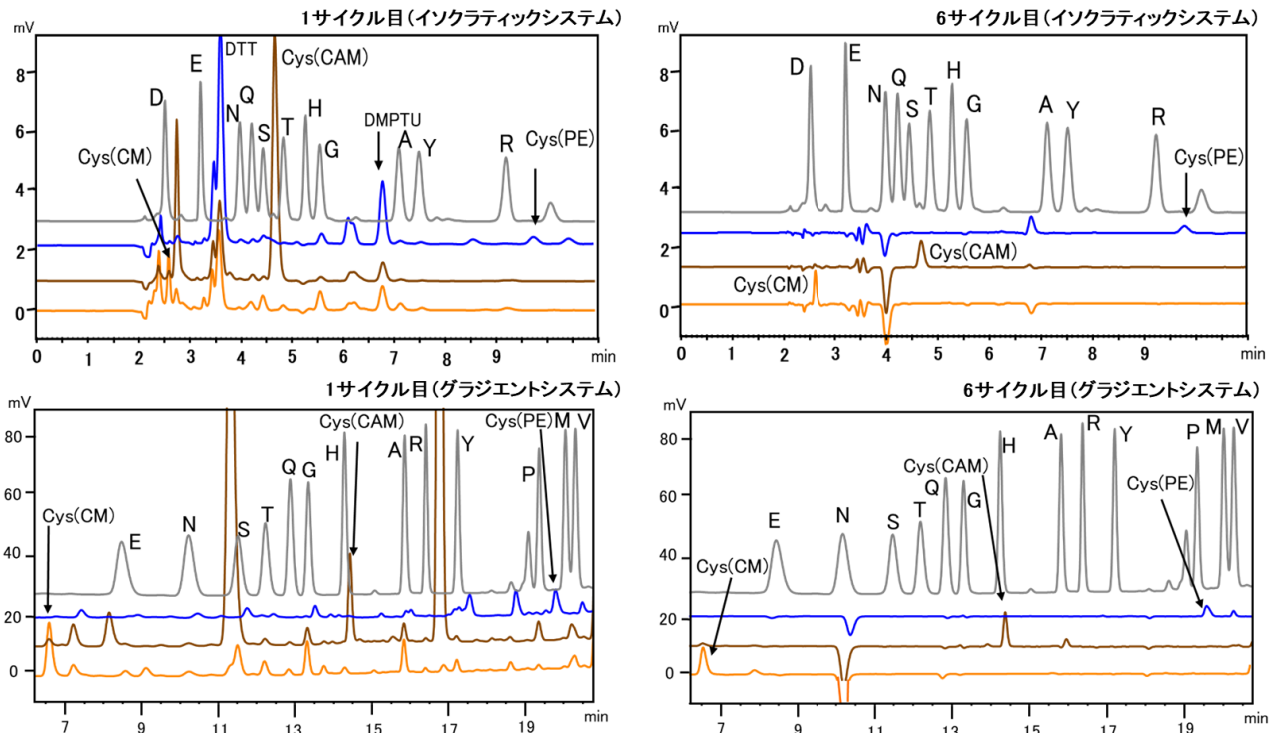


図3 還元アルキル化された Oxytocin のアミノ酸配列とそのクロマトグラム (図2の部分拡大図)
(橙：カルボキシメチル化、茶：カルバミドメチル化、青：ピリジリエチル化)
(1 サイクル目は生クロマトグラム、6 サイクル目は差クロマトグラム)

この分析結果より、イソクラティックシステムでは、PTH-カルボキシメチルシステインは 2.4 分、PTH-カルバミドメチルシステインは 4.3 分、PTH-ピリジリエチルシステインは 8.9 分付近に溶出されました。しかし、PTH-カルボキシメチルシステインは、PTH-Asp の溶出位置、PTH-カルバミドメチルシステインは、PTH-Thr の溶出位置の近傍に検出されるため、同定を行うためには注意が必要です。PTH-ピリジリエチルシステインの溶出は、8.9 分で、ほかの PTH-標準アミノ酸と重なることがないため、容易に同定することが可能です。一方、グラジエントシステムでは、PTH-カルボキシメチルシステインは 6.5 分、PTH-カルバミドメチルシステインは 14.3 分、PTH-ピリジリエチルシステインは 19.7 分付近に溶出されました。PTH-カルバミドメチルシステインは、PTH-His の溶出位置の近傍に検出されるため、同定を行うためには注意が必要です。本来は、プロテインシーケンサのサンプルにはできるだけ塩の混在を避けるため、脱塩の前処理を行うことをお奨めしています。今回の報告では、エドマン分解に影響を及ぼす塩の濃度を下げることで、サンプルの脱塩を行うことなくシーケンス分析を行うことができました。一方、カルバミドメチル化の前処理において、11.2 分および 16.6 分付近に還元アルキル化試薬由来のピークが検出されます(図 2, 3)。これらのピークを除去するためには、サンプルの脱塩処理が必要です。

■ 装置内でのシステイン残基の還元アルキル化

プロテインシーケンサ PPSQ-50A シリーズは、システイン残基の同定を容易に行えるように、装置内で還元アルキル化を行い、そのままエドマン分解を行う分析プログラムを搭載しています。イソクラティックシステムでは、サンプルをリアクタ内でピリジリエチル化、グラジエントシステムではリアクタ内でのカルバミドメチル化の反応プログラムを採用しています。図 4 に反応スキームを示します。図 5 には、リゾチーム (SIGMA-ALDRICH 社製 製造番号 L6876) 30 pmol をシーケンス分析した 6 サイクル目のクロマトグラムを示します。リゾチームは 6 サイクル目に C 末端側システイン残基とジスルフィド結合を形成しているシステイン残基があります。専用の反応プログラム処理により、安定に修飾されたシステイン残基を容易に検出できていることがわかります。

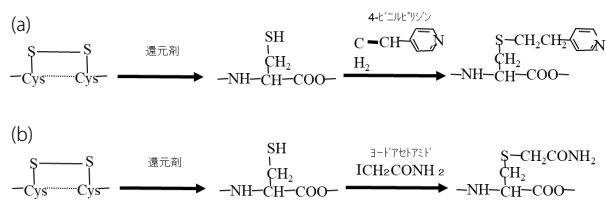


図 4 反応スキーム
(a)ピリジリエチル化
(b)カルバミドメチル化

PPSQ は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。Wakopak および Wakosil は、富士フイルム和光純薬株式会社の登録商標です。

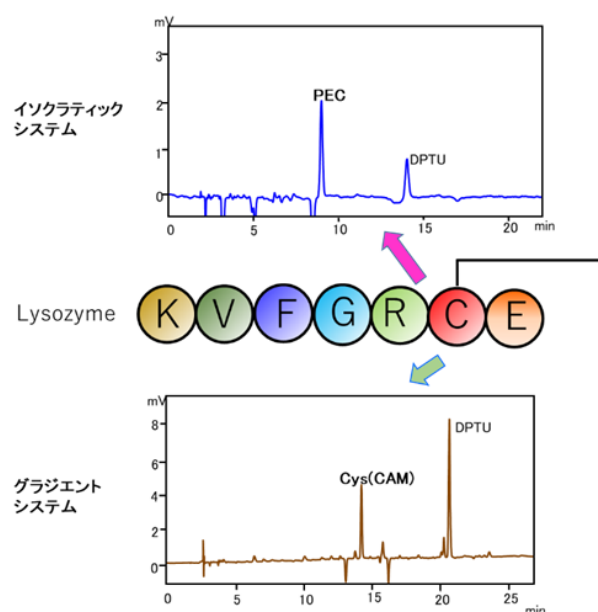


図 5 装置内で還元アルキル化とエドマン分解を行った Lysozyme の 6 サイクル目のクロマトグラム (差クロマトグラム)
PEC: ピリジリエチル化システイン
Cys(CAM): カルバミドメチル化システイン

■ まとめ

システインおよびシスチンの分析は、他のアミノ酸と比較して、そのままの形だとエドマン分解中に分解されるため、安定に検出する前処理 (還元アルキル化) が必要となり、同定にはある程度のサンプル量を必要とします。

プロテインシーケンサ PPSQ-50A システムは、N 末端部の配列を容易に、かつ正確に同定することが可能です。さらに、アプリケーションニュース B111 で報告しましたように、修飾していないシステイン・シスチンの同定、および本報告での還元アルキル化されたシステイン残基の同定も容易に行うことができます。プロテオーム解析の構造解析およびペプチド合成でジスルフィド結合を生成する前の合成中間体としての評価を行うためのツールとして有効な分析手法であるといえます。