

化学的手法によるリン酸化ペプチドの脱リン酸化

蛋白質のリン酸化は細胞の情報伝達，成長，代謝，増殖，運動，分化等様々な機能調節に重要な役割を果たしており，哺乳動物細胞中の蛋白質の約3分の1がリン酸化されていると推定されています。リン酸化蛋白質の解析はこのような生命現象の解明に重要であると考えられています。

リン酸化蛋白質のリン酸化の程度およびその部位を解析するためには，酵素消化後のペプチド混合物のマススペクトルにおける数多くのシグナルの中からリン酸化されたペプチド由来のシグナルを判別することが必要です。このための一つの方法は脱リン酸化で，この方法によってシグナルの判別とリン酸化の程度の解析ができます。次いで，ここで判別したリン酸化されたペプチド由来のシグナルについてMS/MSを行ってリン酸化部位の解析を行います。この際行われる脱リン酸化は酵素的な方法が採られてきましたが，ここではより簡便で，基質による反応性の差がない化学的な手法による方法を紹介します。

1) フッ化水素酸 ピリジン(70%)による脱リン酸化を検討した。

モデルペプチドとして

(A)WAGGDpSGE

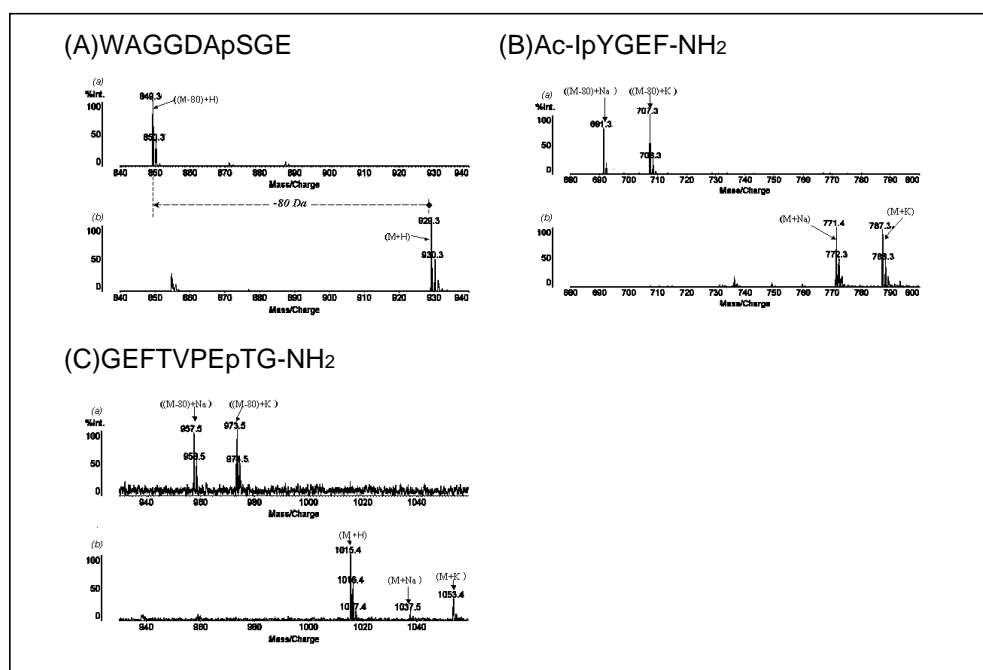
(B)Ac-IpYGEF-NH₂

(C)GFETVPEpTG-NH₂

の3種を用いた。いずれのリン酸化ペプチドも氷冷下，1時間で脱リン酸化された。

下段(b)が原料のリン酸化ペプチド，上段(a)が反応処理後のスペクトルである(図1)。

測定はAXIMA-CFRを用い positive reflectron modeで行った。



2) カゼインのトリプシン消化物中リン酸化ペプチドの脱リン酸化を 50%フッ化水素酸水溶液を用いて検討した。

酵素消化後 α カラム濃縮したサンプルのマススペクトル上で観測されたリン酸化ペプチド由来のシグナル(1661.2,1952.3)はいずれも氷冷下 3時間で脱リン酸化された(図2)。下段(b)が処理前、上段(a)が処理後のスペクトルである。測定は1)と同じくAXIMA-CFRを用い positive reflectron modeで行った。

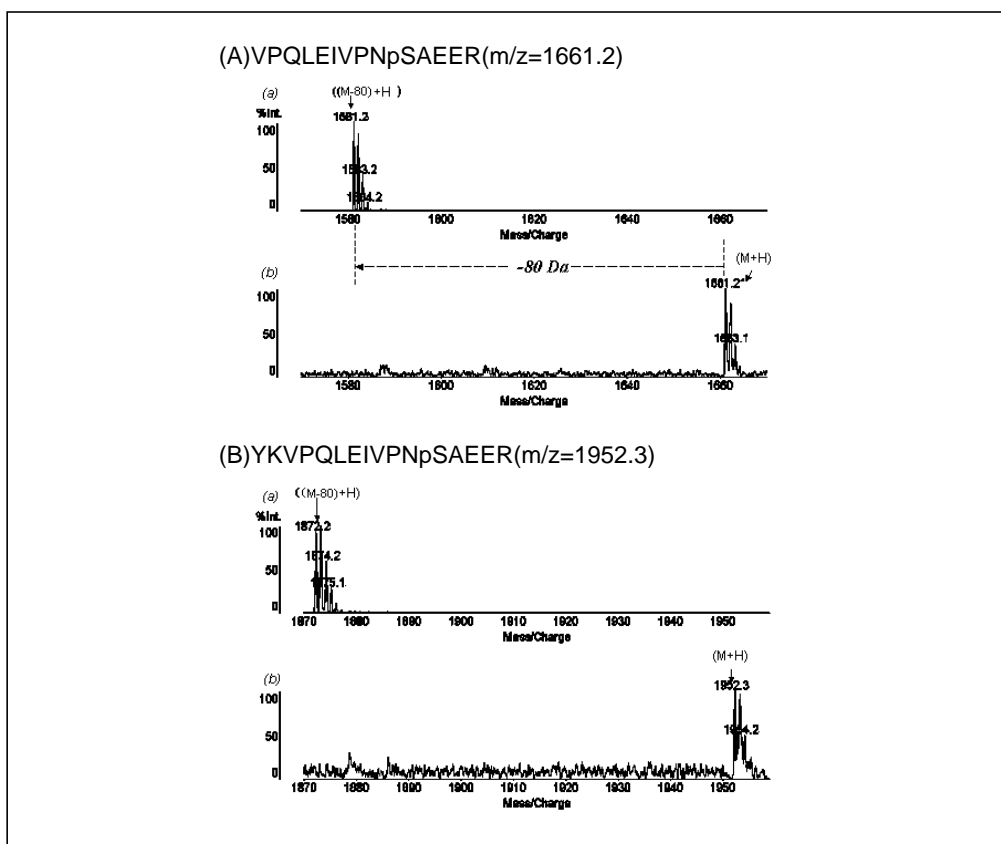


図2

参考文献 : H.Kuyama, C.Toda, M.Watanabe, K.Tanaka, O.Nishimura,
 “ An efficient chemical method for dephosphorylation of phosphopeptides ”
 Rapid Commun.Mass Spectrom., 2003;17: 1493-1496.