

# Application News

## No. B58

PPSQ  
Protein / Peptide Sequence Analysis

### LCMS-2020 を用いた修飾 PTH-システインの測定 Measurement of Phenylthiohydantoin Modified Cystein with LCMS-2020

タンパク質の構造には、4つの階層があります。一次構造はアミノ酸配列、二次構造は部分的にみられる立体構造（ $\alpha$ ヘリックス構造、 $\beta$ シート構造など）、さらに三次構造は、1つの分子内の三次元構造になります。四次構造は、いくつかのポリペプチド、タンパク質の複合体を形成します。分子内のシステインによるジスルフィド（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ます。そのためタンパク質の構造解析においてアミノ酸配列分析でシステインを同定することは重要な情報となります。

システイン残基は、立体構造を安定化させるため、通常 S-S 結合を形成している場合が多く、その結果 N 末端側の半シスチン残基は、エドマン分解により ATZ (Anilinothiazolinone)-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ます。その結果、HPLC で検出することができません。

そのため、タンパク質の還元アルキル化により、ジスルフィド結合を切断してから配列分析、PTH (Phenylthiohydantoin)-修飾システインとして同定することが一般的です。

プロテインシーケンサでは、還元アルキル化の種類によって HPLC での同定が困難な場合があるため、使用できる還元アルキル化の方法を制限されることがありました。一方、MS では、PTH-アミノ酸の質量の測定を行うことによって、アルキル化法に依存することなく同定が可能となります。

本稿では、エドマン分解で得られた 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）を LCMS-2020 を用いて同定を行った例をご紹介します。

T. Kuriki

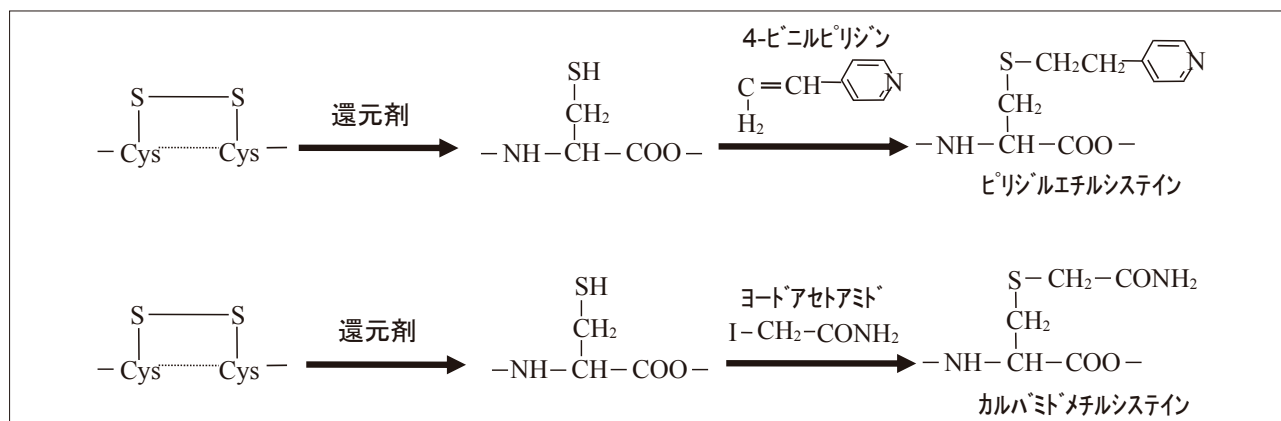


Fig. 1 ジスルフィド結合の還元アルキル化  
Reductive Alkylation of Disulfide Bond

Table 1 分析条件  
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack FC-ODS (75 mm L. x 2.0 mm I.D., 3 $\mu$ m)
Mobile Phase A	: 5 mM HCOONH <sub>4</sub>
Mobile Phase B	: CH <sub>3</sub> CN
Time Program	: B. Conc. 15 % → 15 % (2 min) → 20 % (3 min) → 55 % (10 min)
Flow Rate	: 0.3 mL/min
Column Temperature	: 40 °C
Injection Volume	: 50 $\mu$ L
Analysis Time	: 17 min
Ionization Mode	: ESI (+)
Probe Voltage	: +4.5 kV
Nebulizing Gas Flow	: 1.5 L/min
Drying Gas Flow	: 15.0 L/min
DL Temperature	: 250 °C
Block Heater Temperature	: 400 °C

## 測定結果

### Analytical Results

分子内ジスルフィド結合をもつ Oxytocin (オキシトシン Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly) を 2 種類のアルキル化剤 (4-ビニルピリジンおよびヨードアセトアミド) で還元アルキル化を行い、インタクトでの分析とそれぞれ還元アルキル化法オキシトシンのアミノ酸配列分析を行いました。各サイクルにおけるイオンクロマトグラムを Fig. 2 に示します。インタクトの場合、N 末端側にある Cys 残基は溶出され

ないため検出されません。さらに、PTH-Cystein が不安定であるため、本来なら検出可能であるはずの C 末端側にあるシスチン残基も検出することが難しいことがわかりました。前処理としてサンプルの還元アルキル化を行うことにより、N 末端側および C 末端側のシステイン残基を容易に検出することができました。

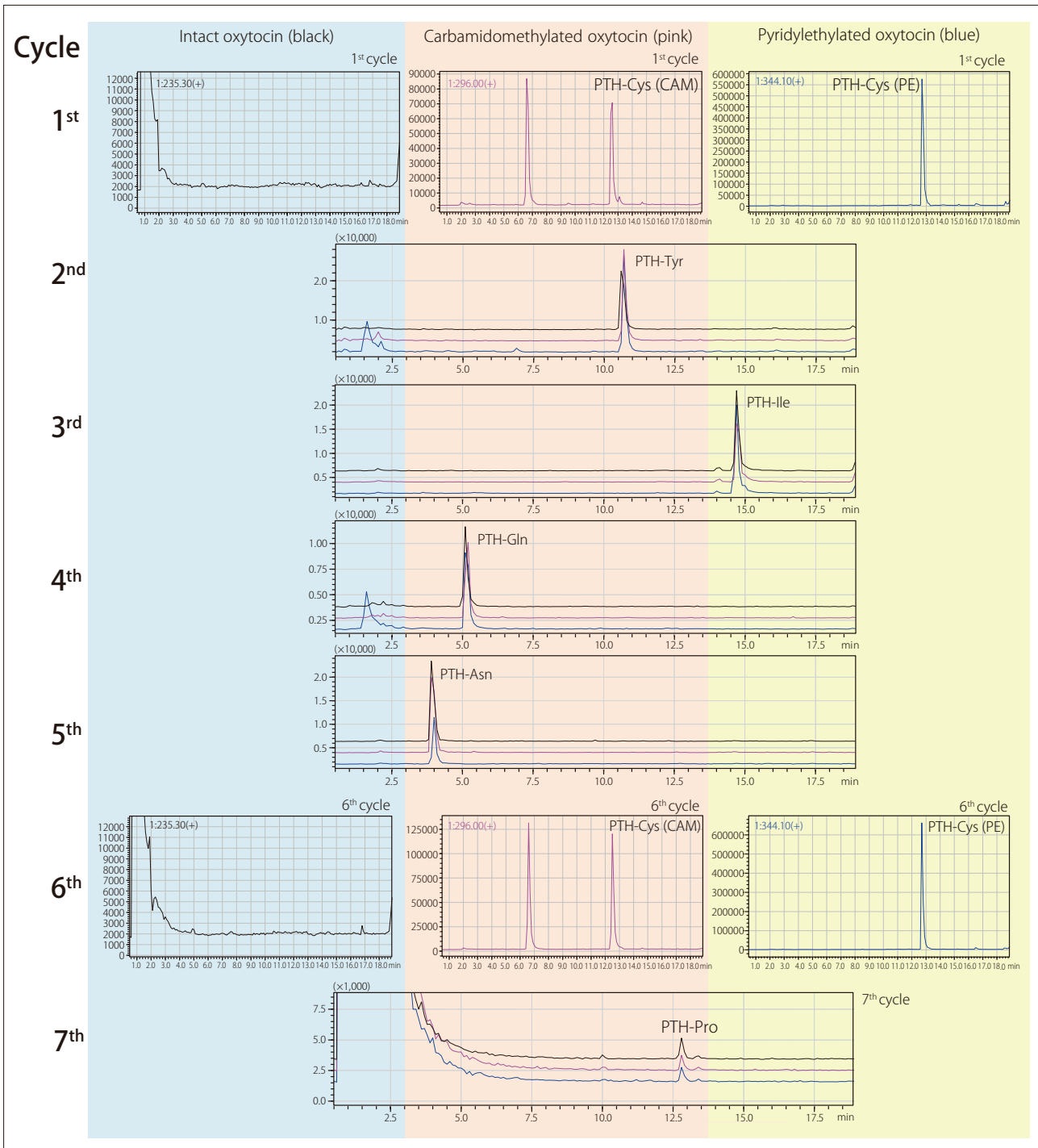


Fig. 2 Oxytocin のシーケンス分析 (イオンクロマトグラム)  
Sequence Analysis of Oxytocin 20 pmol  
(CAM; carbamidomethyl, PE; pyridylethyl)

## <補足> LCMS-2020 を用いた PTH-アミノ酸の測定

現在、タンパク質の同定の手法として最も一般的に使用されているのがMSです。MSはPMF (Peptide MS Fingerprint) 法やMS/MS イオンサーチ法がタンパク質同定のツールとして使用されています。また、未知のタンパク質およびペプチドのアミノ酸配列を同定する手法として、MSによるPSD (Post Source Decay) 法や *de novo* sequence 法があります。これらの手法では、Ile と Leu など同じ質量の物質の判別が困難です。また、アミノ酸配列によってフラグメントイオンの強度が小さいなどの問題があります。そのため、アミノ酸配列のデータベースが全くない場合、そのサンプルのアミノ酸配列を同定することが容易ではないことがあります。一方、エドマン反応部と高速液体クロマトグラフィーとを組み合わせたプロテインシーケンサを用いるアミノ酸配列同定法は、操作性がよく、解析法も簡便であり、信頼性の高いデータが得られます。

最近では、タンパク質・ペプチドの精製法がより微量化されており、そのため、信頼性の高いプロテインシーケンサの高感度化も期待されています。

本稿では、エドマン分解で得られた PTH-アミノ酸（アミノ酸のフェニルチオヒダントイン誘導体）を高感度の LCMS-2020 を用いて同定を行った例をご紹介します。

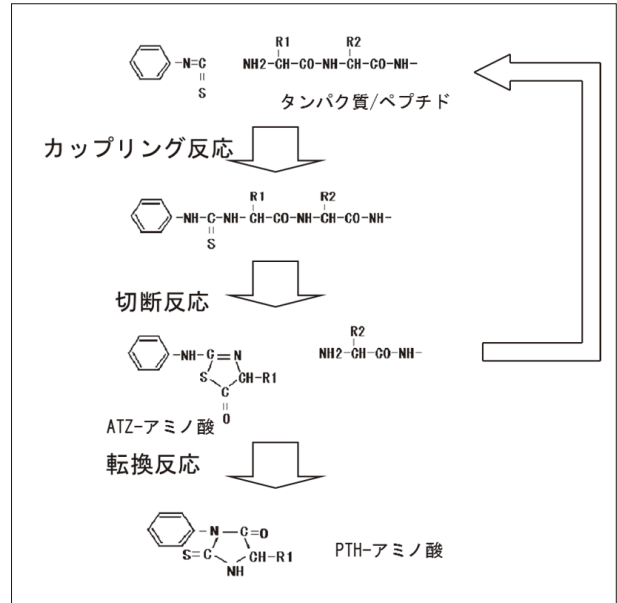


Fig. 3 エドマン分解  
Edman Degradation



Fig. 4 島津ペプチド・プロテインシーケンサ PPSQ-50A シリーズ  
Protein Sequencer PPSQ-50A Series

## ■測定結果

### Analytical Results

Fig. 5 に、測定結果を示します。結果として、PTH-アミノ酸を LCMS を用いて 17 分で同定することができました。プロテインシーケンサとオンラインで接続することにより、今ま

で溶出位置が近接しているため同定が困難であった修飾アミノ酸の同定、また MS を検出器として用いることで、実現できなかった微量サンプルのシーケンス分析に応用が可能です。

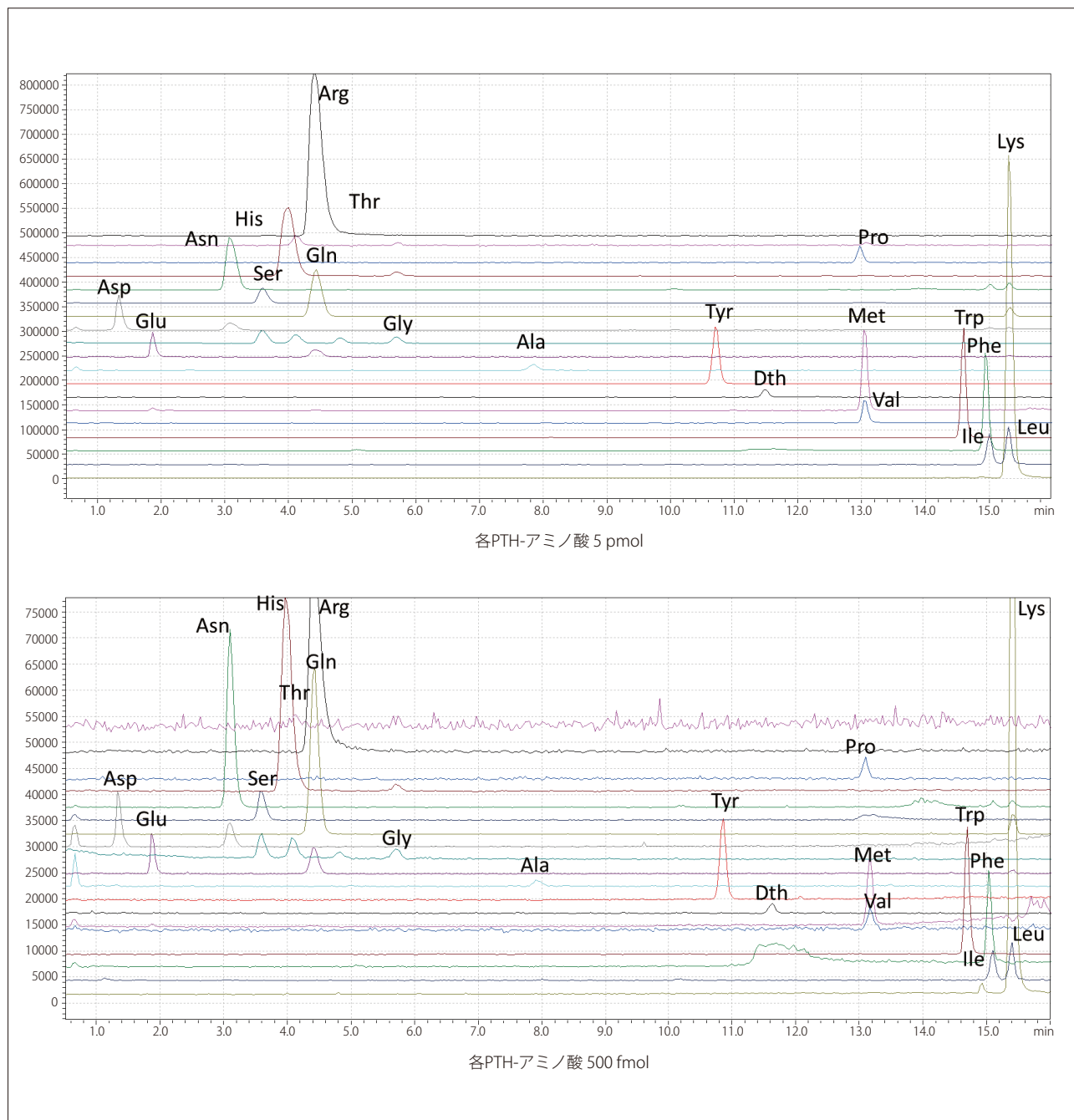


Fig. 5 PTH-アミノ酸のイオンクロマトグラム  
Extract Ion Chromatograms of Each PTH-Amino Acids

株式会社 島津製作所

分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2016年4月

島津コールセンター ☎ 0120-131691  
(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/solnavig/solnavig.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。