

Application News

No. B93

プロテインシーケンサ

PPSQ™-51A/53Aグラジエントシステムを用いたマウスIgGのN末端部アミノ酸配列分析

■はじめに

ゲノム解析の技術の進化とともに、ゲノムデータベースが充実され、そのデータベースを利用したポストゲノム解析の一つであるプロテオーム解析も飛躍的に成長してきました。タンパク質のアミノ酸配列解析においては、質量分析装置の技術的発展に伴い、質量分析装置とそのデータベースを用いることで、ハイスループットの解析を実現することができました。ゲノムデータベースに登録されている多くのタンパク質は、前駆体タンパク質として登録されていますが、細胞内で発現している様々なタンパク質は、前駆体タンパク質よりプロセッシングを受けて成熟タンパク質として生体内に運ばれています。そのため、質量分析装置とそのデータベースを用いて成熟タンパク質のアミノ酸配列同定を行う場合、理論質量数と異なることがあるために検索結果のスコアが低くなる場合があります。また、ゲノムデータベース化がまだ完了していない生物種においては、質量分析装置を用いたアミノ酸配列同定は煩雑で、得られた配列の信頼性が欠けてしまう場合があります。一方、従来法であるエドマン分解を用いたプロテインシーケンサは、時間がかかるものの、得られたアミノ酸配列結果は信頼性が高く、データベースが構築されていないサンプルのアミノ酸配列分析には極めて有効です。

今回、微量なタンパク質としてIgG（マウス血清由来）を用いたアミノ酸配列分析についてご紹介します。PPSQ-51A/53A グラジエントシステムは、確実にかつ容易にアミノ酸配列を同定することが出来るため、プロテオーム解析には必要不可欠な装置です。

T. Kuriki

■ PTH-アミノ酸の分析

PPSQ-51A/53A グラジエントシステムでは、エドマン反応で得られた PTH-アミノ酸をグラジエント溶離で分析します。分析条件を表1に示します。イソクラティック溶離と比較すると、PTH-アミノ酸が溶出される順番は異なりますが、グラジエント溶離で得られる PTH アミノ酸のピークの高さは、イソクラティック溶離よりも、全体的に3~5倍程度高く検出されます。また、グラジエント溶離では、500 fmolの PTH-アミノ酸の分離および検出も可能となります（図1）。

表1 分析条件

Column	: Wakopak® Wakosil® PTH-GR (S-PSQ) (250 mm L, 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

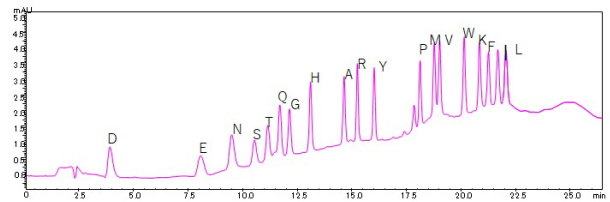


図1 PTH-アミノ酸標準混合品 500 fmol の分析

■方法

IgG の基本的な構造は、それぞれ2本からなるH鎖（重鎖とも言う、分子量の大きい方）とL鎖（軽鎖とも言う、分子量の小さい方）で構成されています。インタクトの抗体は、分子量が大きいため（おおよそ150 kDa）、そのままではプロテインシーケンサによるN末端アミノ酸配列分析は、非常に困難です。この分析例では、マウス血清由来IgG (SIGMA-ALDRICH cat#15381) 2 pmol を還元処理と SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) を用いてH鎖とL鎖にそれぞれ分離した後、PVDF膜へのエレクトロブロットングを行いました。そのPVDF膜をCBB染色した後、L鎖、H鎖それぞれのバンドを切り出し、PPSQ-53A グラジエントシステムで分析しました。

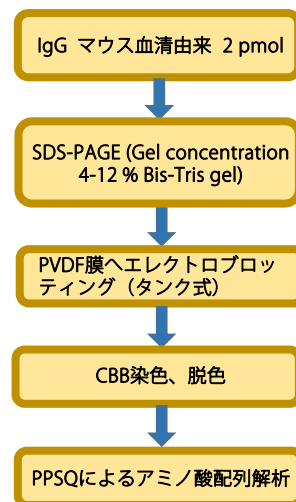


図2 N末端アミノ酸配列のプロトコール

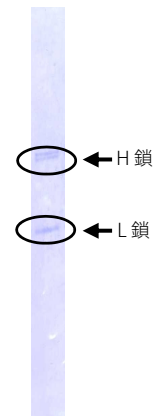


図3 エレクトロブロットング後のPVDF膜

■ N 末端アミノ酸配列分析結果

図 4 および図 5 は、マウス血清由来 IgG (SIGMA-ALDRICH cat#I5381) 2 pmol の L 鎖、H 鎖の N 末端アミノ酸配列分析結果です。それぞれのサンプルの 1 から 5 サイクルまでのクロマトグラム (1 サイクル目は生クロマトグラム、2 サイクル以降は差クロマトグラム) を示します。図 4 より、L 鎖の結果から N 末端のアミノ酸残基はアスパラギン酸 (Asp)、第 2 サイクルの結果から N 末端の 2 番目のアミノ酸残基はイソロイシン (Ile) と同定されました。15 残基アミノ酸まで分析を行った結果、その配列は Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ser-Ala (Val) と同定され、N 末端側から 13 残基までのアミノ酸配列を同定することができました。

データベース検索で Immunogloblin kappa light chain であると確認できました。

同様に図 5 に H 鎖の第 5 サイクルまでの結果を示します。その配列は N 末端側から Glu-Val-Gln-Leu-Gln-Glu-Ser-Gly-Pro-Glu-Leu-Val と同定し、データベース検索の結果、Immunogloblin heavy chain であると確認できました。

■ まとめ

このように、プロテインシーケンサ PPSQ-51A/53A グラジエントシステムは、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あり、微量サンプルの高感度分析に有効なシステムであるといえます。

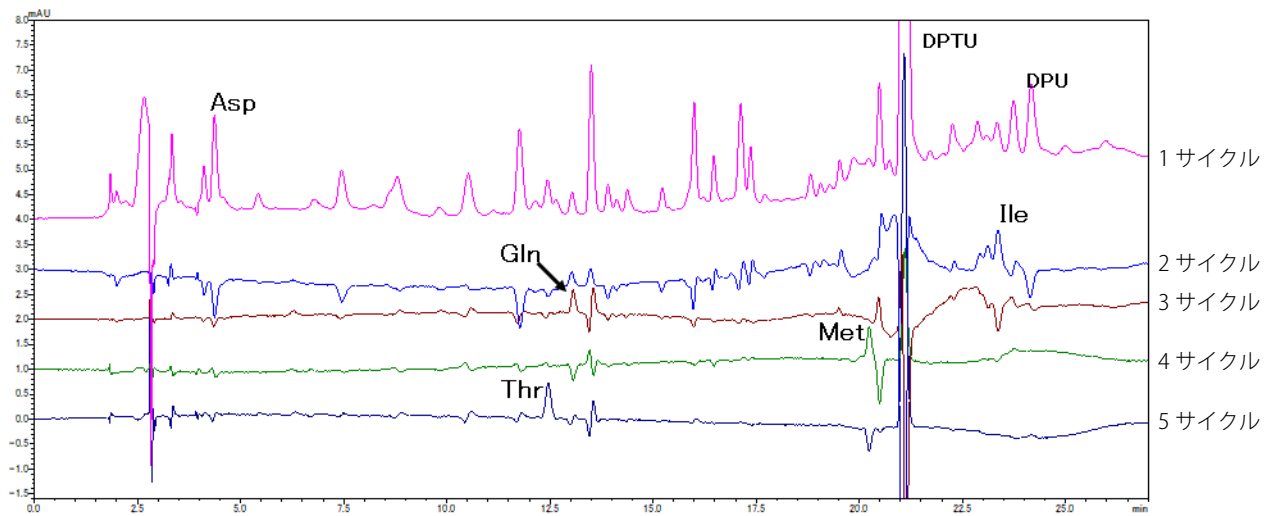


図 4 L 鎖クロマトグラム (1~5 サイクル)

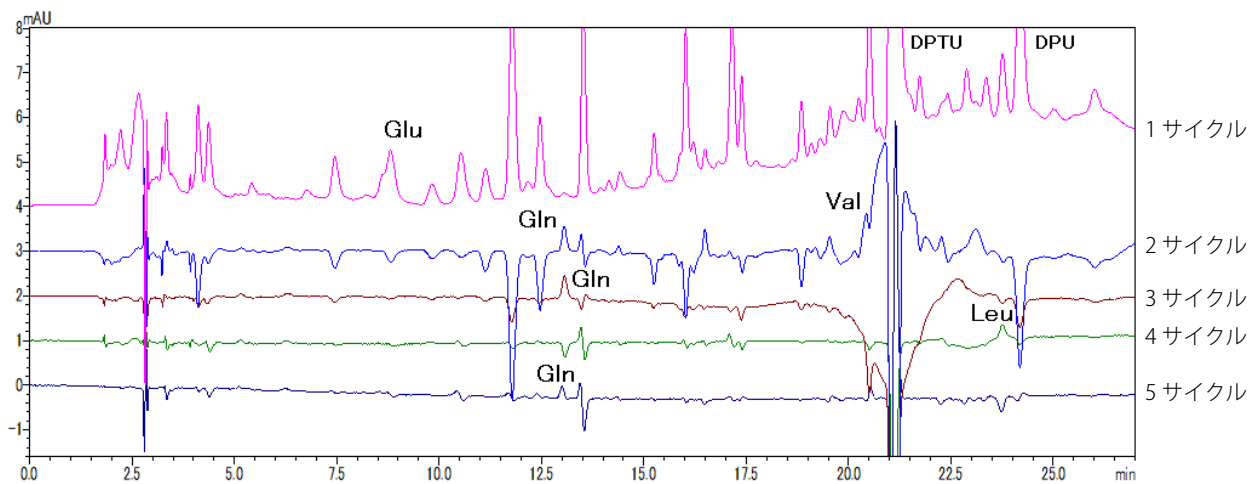


図 5 H 鎖クロマトグラム (1~5 サイクル)

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。
その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。
なお、本文中には、TM、®マークを明記していない場合があります。

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：2019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/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。