

Application News

No. B103

プロテインシーケンサ

PPSQ™-50イソクラティックシステムを用いた修飾アミノ酸を含有するタンパク質・ペプチドのアミノ酸配列分析

■はじめに

現在、タンパク質の分析において、質量分析装置とゲノムデータベースを利用した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となっています。このゲノムデータベース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、生体内で発現したタンパク質は、翻訳後修飾され、様々な機能を有します。しかし、前駆体タンパク質と翻訳後修飾を受けた成熟タンパク質とは、理論質量数が異なることがあるため、MS分析と検索エンジンによる検索結果のスコア、信頼性が低くなる場合があります。また、データベースを用いずに行う質量分析装置を用いたアミノ酸配列同定は、かなり煩雑かつ困難になります。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、得られたアミノ酸配列結果の信頼性が高く、データベースが十分でない場合でも容易にアミノ酸配列を同定することが可能です。今回、プロテインシーケンサ PPSQ-50 イソクラティックシステムを用いた修飾アミノ酸を含有するサンプルのアミノ酸配列分析例をご紹介します。

T. Kuriki

■側鎖が修飾された Lys の同定

生物内で発現しているタンパク質の多くは、その N 末端にある α アミノ基が翻訳後修飾によってアセチル化されています。ヒトのタンパク質になると約 80% 以上のタンパク質の N 末端部がアセチル化されています。このアセチル化は N 末端部のアミノ基だけでなく、側鎖にアミノ基を持つ Lys 残基にも起こる翻訳後修飾の一つです。アセチル化された Lys を含有するタンパク質として染色体を構成するヒストンがあります。ヒストンの Lys 残基は、アセチル化またはメチル化されます。ヒストンの Lys 残基のメチル化も転写の制御に関与していることが知られています。ヒストン配列中の何番目の Lys 残基がどのように修飾されているのかを確認することが、様々な細胞の発現、機能について解明するための一つであると考えられています。

最初に、PTH-アセチル化 Lys および PTH-トリメチル化 Lys が PPSQ-50A イソクラティックシステムで分析できるかを検討しました。表 1 に分析条件、図 1 に PTH アミノ酸標準混合品と PTH-アセチル化 Lys のクロマトグラムおよび図 2 に図 1 中の青丸部分の拡大図を示します。

表 1 分析条件

Column	: Wakopak® Wakosil® PTH-II (250 mm L, 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

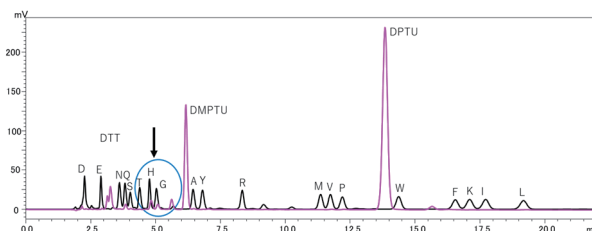


図 1 PTH-アミノ酸標準混合品 (25 pmol) (黒) と PTH-アセチル化 Lys のクロマトグラム (赤)

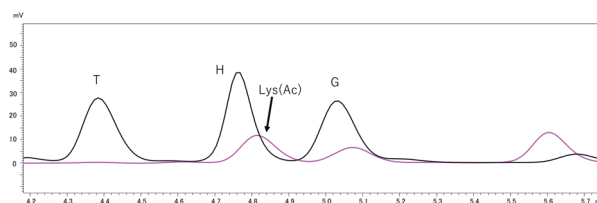


図 2 PTH-アミノ酸標準混合品 (25 pmol) (黒) と PTH-アセチル化 Lys のクロマトグラム (赤) (図 1 中の青色部分の拡大図)

本結果より、PTH-アセチル化 Lys (PTH-Lys(Ac)) は、PTH-His とのピークトップが分離されているため、PPSQ-50A イソクラティックシステムでは容易に PTH-Lys(Ac) を同定することが可能です。

次に、図3に PTH-アミノ酸標準混合品と PTH-トリメチル化 Lys のクロマトグラム、および図4に図3中の青丸部分の拡大図を示します。

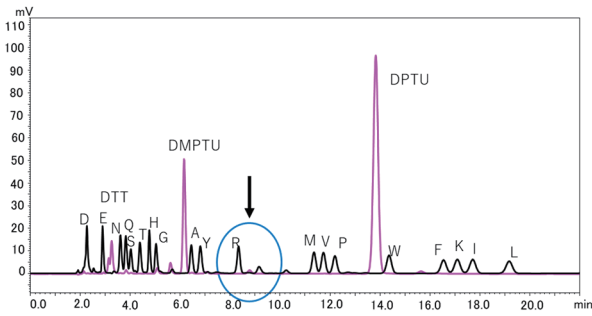


図3 PTH-アミノ酸標準混合品 (25 pmol) (黒) と PTH-トリメチル化 Lys のクロマトグラム (赤)

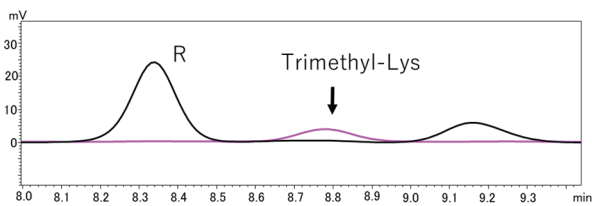


図4 PTH-アミノ酸標準混合品 (25 pmol) (黒) と PTH-トリメチル化 Lys のクロマトグラム (赤) (図3中の青色部分の拡大図)

■ N 末端アミノ酸配列分析

今回、ヒストンの一つであるヒストン H4 の合成フラグメントペプチド誘導体、[Lys(Ac)12/16, Lys(Me)3]20]-Histone H4 (1-25)-GSGSK(Biotin) (AnaSpec, Inc., CA) をサンプルとしました。20 pmol をポリブレン処理後のガラスファイバードイスクを用いてプロテインシーケンサ PPSQ-50A イソクラティックシステムで分析しました。アミノ酸配列および Lys 残基のクロマトグラムを図5に示します。各クロマトグラムは、差クロマトグラムで表示しています。PPSQ-50A イソクラティックシステムは各 PTH-アミノ酸の溶出時間の再現性がよいことから、差クロマトグラムをとることによって、5 サイクル、8 サイクル、12 サイクル、16 サイクルおよび 20 サイクルの非修飾および修飾された Lys 残基がそれぞれのサイクルにおいて特異的に増加しており、容易に同定することができました。

■ まとめ

プロテインシーケンサ PPSQ-50A イソクラティックシステムは、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、さらに修飾されたアミノ酸の同定も行うことが出来ます。これからのプロテオーム解析における翻訳後修飾を同定するためのツールとして有効なシステムであるといえます。

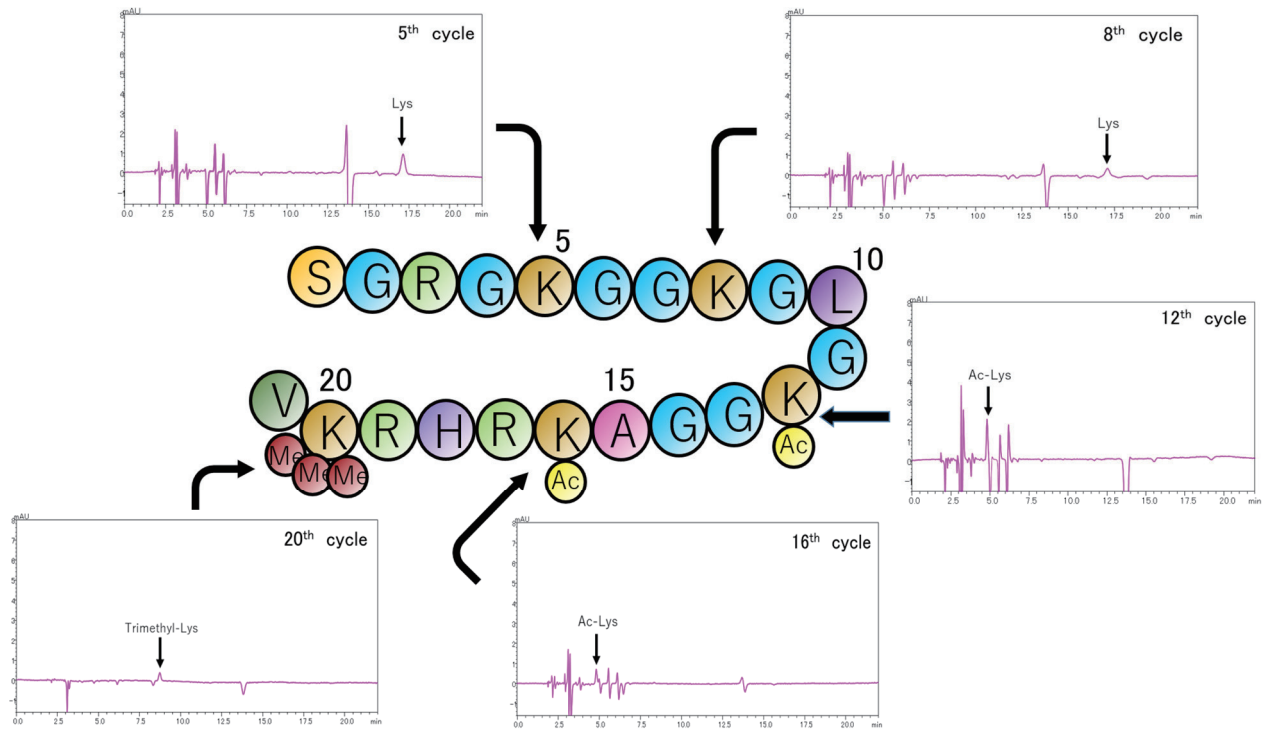


図5 ヒストン H4 の合成フラグメントペプチド誘導体の部分アミノ酸配列とそのクロマトグラム

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6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。