

プロテインシーケンサを用いた システイン・シスチンの検出

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。生体内で発現したタンパク質は、翻訳後修飾され、様々な機能を有しており、前駆体タンパク質と成熟タンパク質とでは、理論質量数が異なることがあります。データベースを利用せずに行う質量分析装置を用いたアミノ酸配列同定は、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™-50A システム（イソクラティックシステムおよびグラジエントシステム）を用いたシステインおよびシスチンを含むサンプルのアミノ酸配列分析例をご紹介します。

Kuriki

システインおよびシスチンの検出

タンパク質は、そのタンパク質固有の立体構造を構築しています。タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合で脱水縮合された複数のポリペプチド鎖からなり、ポリペプチド鎖のアミノ酸の配列をタンパク質の一次構造といいます。生体内で発現した成熟タンパク質は、構成しているアミノ酸側鎖同士が相互作用によって、熱力学的に安定した特定の立体構造をとることで機能しています。このようなタンパク質の高度な立体構造を高次構造といい、一次構造と区別して二次構造、三次構造、四次構造と段階的に構築されています。二次構造を保ちながら、アミノ酸の側鎖同士が相互作用することで形成される立体構造を三次構造といいます。熱力学的に安定した特定の三次構造を形成することでそのタンパク質が機能的に活性を有します。側鎖同士の相互作用の一つにジスルフィド結合（S-S 結合）があります。ジスルフィド結合を構成するアミノ酸、システインの位置を決定することは、タンパク質の構造解析において必要不可欠なことです。プロテインシーケンサによる分析条件を表 1 および表 2 に示します。

表 1 分析条件（イソクラティックシステム）

| | |
|---------------------------|---|
| Column | : Wakopak® Wakosil® PTH-II (250 mmL, 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 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 |

分析にはポリブレン処理を行ったガラスファイバーディスクをサンプル保持体として使用しました。標準のアミノ酸のシステインおよびシスチンの分析結果を図 1 から 4 に示します。

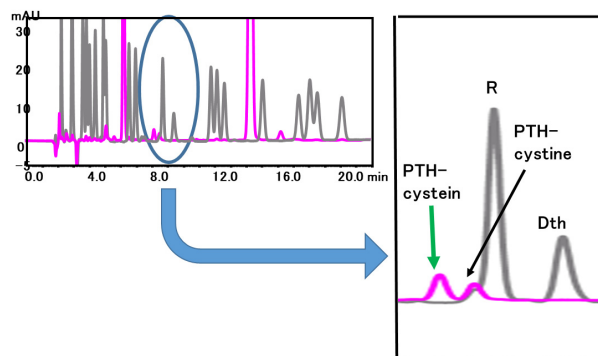


図 1 PTH-アミノ酸標準混合品 (25 pmol) (グレー) とシステイン 100 pmol のエドマン分解のクロマトグラム (ピンク)、図 1 中の青色部分の拡大図 (イソクラティックシステム)

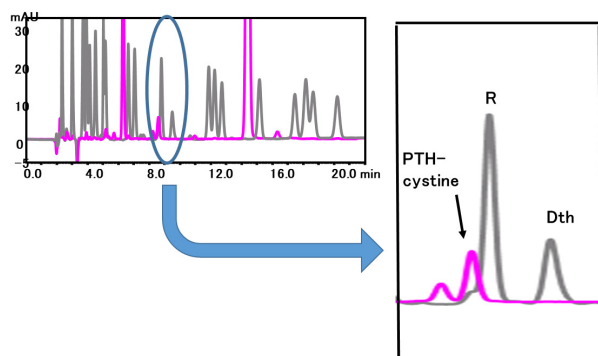


図 2 PTH-アミノ酸標準混合品 (25 pmol) (グレー) とシスチン 100 pmol のエドマン分解のクロマトグラム (ピンク)、図 2 中の青色部分の拡大図 (イソクラティックシステム)

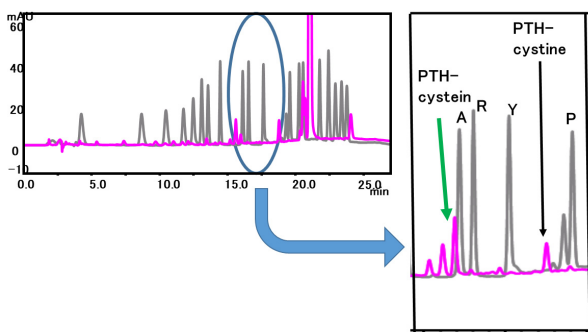


図3 PTH-アミノ酸標準混合物 (10 pmol) (グレー) とシスチン 50 pmol のエドマン分解のクロマトグラム (ピンク)、図3中の青色部分の拡大図 (グラジエントシステム)

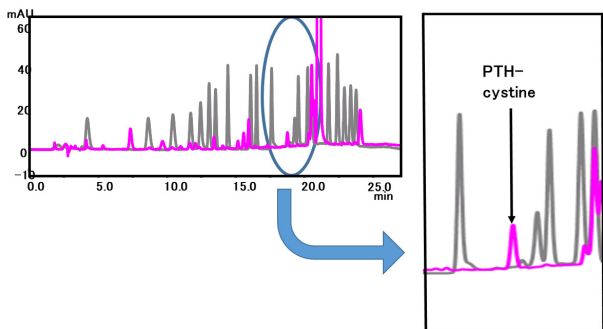


図4 PTH-アミノ酸標準混合物 (10 pmol) (グレー) とシスチン 50 pmol のエドマン分解のクロマトグラム (ピンク)、図4中の青色部分の拡大図各クロマトグラム (グラジエントシステム)

図1から4より、PTH-シスチンおよびPTH-システインの各システムにおける溶出位置を確認することができました。図1および図3よりシステインのシーケンス分析時には、PTH-シスチンも検出されていますが、これは、システインが

エドマン分解中にジスルフィド結合を形成するためであると推測されます。また、イソクラティックシステムの場合、PTH-システインの溶出位置は PTH-アルギニンの近傍になるため (図2)、ソフトウェア上での自動推定は困難ですが、目視で同定することが可能です。

■ N 末端アミノ酸配列分析

今回、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 4084-v) 100 pmol をサンプルとし、ポリブレン処理後のガラスファイバーディスクを用いてプロテインシーケンサ PPSQ-50A システムで分析をしました。アミノ酸配列および1 cycle 目の生クロマトグラムおよび6 cycle 目の差クロマトグラムを図5に示します。1 cycle 目のシステインは、ジスルフィド結合でC末端側の6 cycle 目のシステインと結合しているため、そのサイクルでは特異的に増加している PTH-アミノ酸は検出されません。6 cycle 目は、PTH-シスチンとして検出されています。PPSQ-50A システムでは各 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、6 cycle 目の PTH-シスチンを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 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、システインおよびシスチンの同定も行うことができます。他のアミノ酸と比較して、システインおよびシスチンはエドマン分解中に分解されるため、プロテインシーケンサで溶出位置を確認するためには、ある程度のサンプル量を必要とします。しかしこれからの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システムであるといえます。

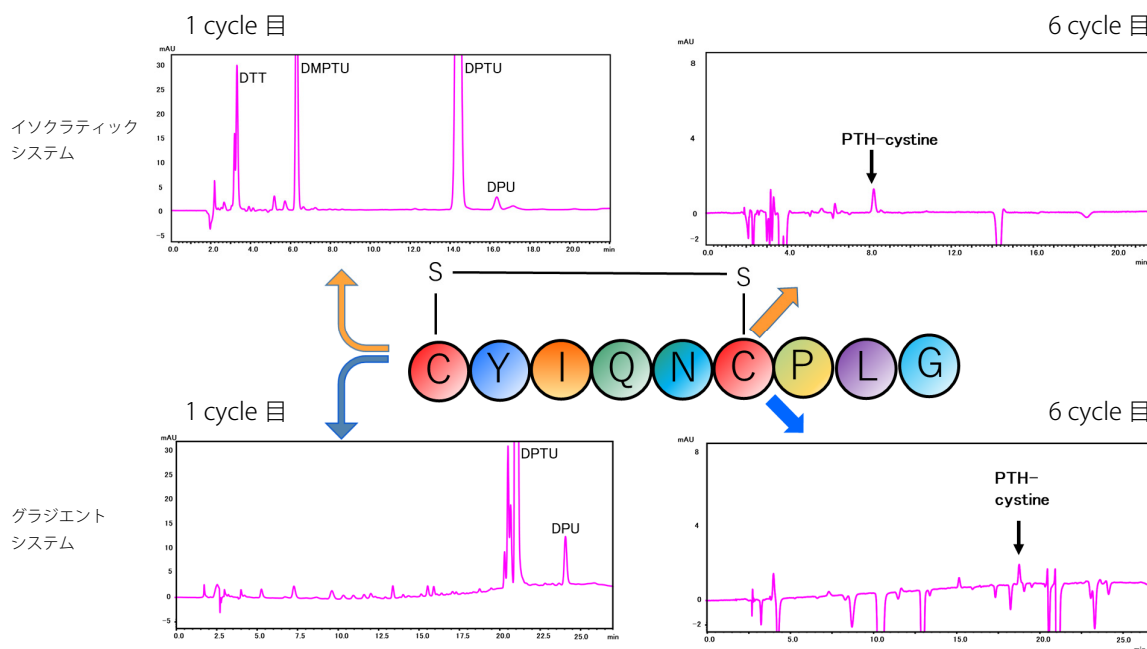


図5 合成ペプチド Oxytocine のアミノ酸配列とそのクロマトグラム

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。

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：2020年3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。