

プロテインシーケンサ PPSQ™-50Aシリーズ

プロテインシーケンサを用いたアミノ酸配列の微量分析 —グラジエントシステム—

栗木 智子

ユーザーベネフィット

- ◆ 微量のサンプルでもN末端からのアミノ酸配列を確実に同定することができます。
- ◆ ソフトウェアを用いたアミノ酸配列の自動推定を簡単に行うことが可能です。
- ◆ ゲノムデータベースに登録されていないタンパク質のアミノ酸配列も容易に決定することができます。

はじめに

生体内で機能を有するさまざまなタンパク質は、いろいろなプロセッシングを受け、前駆体タンパク質から成熟タンパク質になり、細胞外に放出されています。それらタンパク質が相互に作用し病気の原因となることがあります。そのため、タンパク質の研究は、病気の原因究明、予防、診断、治療、創薬などの目的で、その重要度が高まっています。さらに、タンパク質の前処理技術の進歩により、微量の未知のタンパク質を精製することが可能になり、微量サンプルのアミノ酸配列を同定するためにプロテインシーケンサの高感度化が必要とされています。本稿では、プロテインシーケンサPPSQ-50グラジエントシステムを用いた微量サンプルの分析例を紹介いたします。

タンパク質の構造解析

生体内のタンパク質は、遺伝子情報から翻訳されたアミノ酸配列の構造をもち、さらにそのタンパク質自身が機能をもつために、さまざまな修飾をされた成熟タンパク質として存在しています。タンパク質の機能を解明するためには、成熟タンパク質の構造を解析することが非常に重要ですが、ゲノムデータベースには前駆体タンパク質として登録されているものがほとんどです。タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合でつながったポリペプチド鎖で、アミノ酸の並び方により、いろいろな構造をとります。その構造は、階層的に分類されています。アミノ酸が一本に配列している構造を一次構造といいます。二次構造は、構成されているアミノ酸どうしの水素結合によって安定化されている部分結合で、らせん状の α ヘリックス構造や屏風を折りたたんだような β シート構造の立体構造をとっています。次に三次構造は、側鎖を含めたタンパク質全体の立体構造を指し、タンパク質を構成するポリペプチド鎖が水素結合、イオン結合、ジスルフィド結合などで複数に折りたたまれた立体構造です。最後に、三次構造を有するタンパク質をサブユニットとして、複数のサブユニットが会合した構造を四次構造といいます。このようにタンパク質は構成するアミノ酸配列によりさまざまな構造を有し、構造の違いにより機能も異なります。タンパク質の一次構造であるアミノ酸配列を解析する方法には、質量分析装置とデータベース検索エンジンを用いた方法と、従来のエドマン分解を手法としたプロテインシーケンサを用いる方法があります。プロテインシーケンサの特長としては、確実に信頼性の高いN末端部からのアミノ酸配列結果が得られること、タンパク質の酵素消化などを行わずそのまま分析が可能なこと、同じ質量数を有するIleとLeuを区別できること、ジスルフィド結合(S-S結合)の有無とその位置が決定できること、操作が容易であることなどが挙げられ、タンパク質のN末端配列解析を行ううえで欠かせないものになっています。



図1 プロテインシーケンサ PPSQ™-50Aシリーズ
グラジエントシステム

表1 分析条件 (グラジエントシステム)

Column	: Wakopak Wakosil PTH-GR (S-PSQ) (250 mm x 2.0 mm I.D.)
Mobile phase A	: PTH-amino Acids Mobile Phase A (for Gradient Elution)
Mobile phase B	: PTH-amino Acids Mobile Phase B (for Gradient Elution)
Flow Rate	: 0.3 mL/min
Time program	: B Conc. 0%(0 min)-0%(4 min)- 100%(17-30 min)- 0%(30.01-45min)
Column temp.	: 35 °C
Detection	: UV 269 nm (SPD-M30A) High Sensitivity Flow Cell

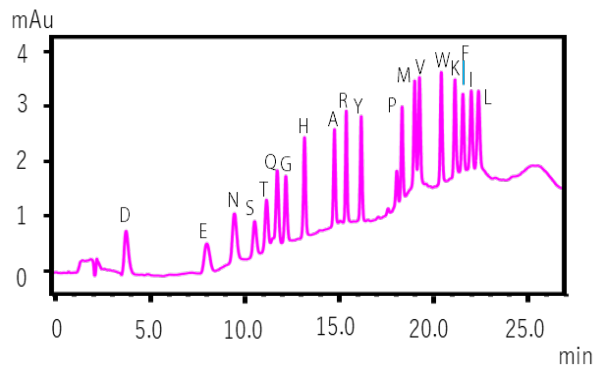


図2 PTH-アミノ酸標準混合品(各500 fmol)の分析

■ Calmodulinのアミノ酸配列分析

プロテインシーケンサPPSQ-50Aグラジエントシステム(図1)を用いて、500 fmolのPTH-アミノ酸標準品を表1の分析条件で分析した結果を図2に示します。微量なPTH-アミノ酸混合溶液も十分に検出可能であることがわかりました。次に、Calmodulin(Merck cat#C4874)を0.1%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、濃度1 pmol/μLのサンプル溶液を調製しました。ポリブレン処理済みのガラスファイバードィスクに2 μLのサンプル溶液を添加し、アミノ酸配列分析を行いました。各サイクルのクロマトグラムを図3に示します。1サイクル目のクロマトグラムは生クロマトグラム、それ以降のクロマトグラムは差クロマトグラムで表示しています。

ピークは小さいながらも、30サイクル目まで、特異的に増加しているPTH-アミノ酸を検出し、アミノ酸配列を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を用いたタンパク質のN末端部アミノ酸配列分析は、サンプルが微量である場合も確実にアミノ酸配列を同定することができました。プロテインシーケンサは、データベースが構築されていない発現量の少ないタンパク質の構造解析の一端を担うことができ、タンパク質のアミノ酸配列分析には不可欠な装置であると考えられます。

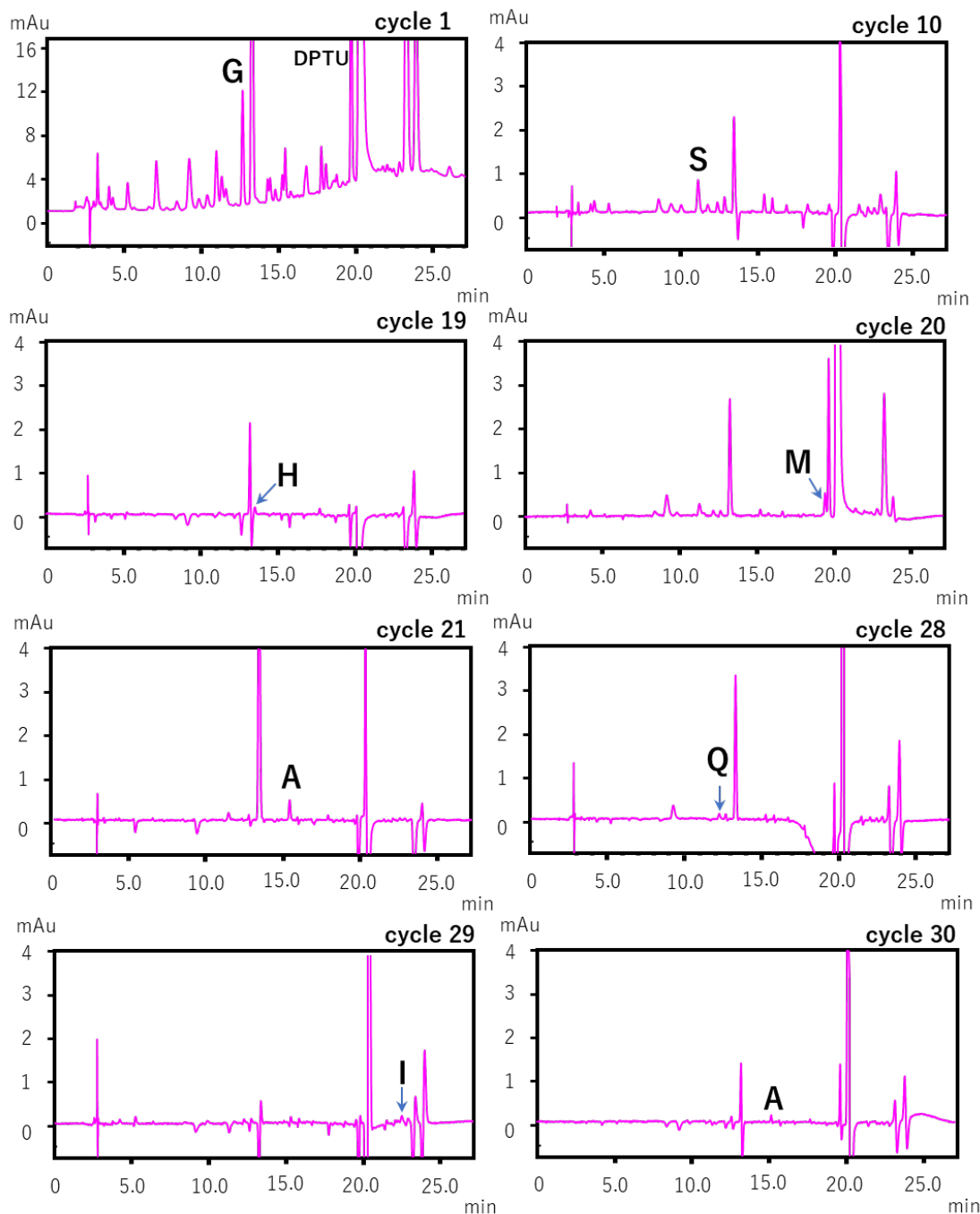


図3 Calmodulin のアミノ酸配列分析のクロマトグラム

PPSQは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

01-00592-JP 初版発行：2023年 9月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

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。
本文中に記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。
本文中では「TM」、「®」を明記していません。

© Shimadzu Corporation, 2023

＞ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ PPSQ-51A/53A
プロテインシーケンサ

関連分野

＞ ライフサイエンス

＞ バイオ医薬品

＞ 特性解析/品質管理

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ