

Fluorescent derivatization of amino acids with 4-(1'-cyanoisoindolyl)aniline or 4-(1'-cyanoisoindolyl)phenylisothiocyanate for sequence analyses of peptides and phosphorylated peptides

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 Moses Njoroge Wainaina

[目的]

エドマン分解は古くから用いられているタンパク質の一次配列決定法であり、N末端のアミノ酸残基と phenylisothiocyanate (PITC)との反応によってアミノ酸を順次同定していくことから、最も確実なアミノ酸配列決定法である。しかし、最終生成物である phenylthiohydantoin (PTH)誘導体を UV 吸収によって検出するため、感度が低いという問題がある。また、生体内のタンパク質の多くはリン酸化によって活性が調節されているが、従来のエドマン分解はリン酸化アミノ酸を検出できないという欠点を有する。

本研究では、フィルターディスク上での固相エドマン分解及び HPLC による蛍光分析法を組み合わせることによって、新しいペプチド/リン酸化ペプチドの配列決定法を開発した。まず、蛍光誘導体化試薬である 4-(1'-cyanoisoindolyl)aniline (CIA)を用いて、ペプチドの N 末端から切断された anilinothiazolinone (ATZ) 誘導体を蛍光ラベル化し、生成した phenylthiocarbamoyl (PTC)-CIA-アミノ酸を同定することにより配列決定を試みた (Fig.1 (A))。次に、蛍光性のエドマン型試薬である 4-(1'-cyanoisoindolyl)-phenylisothiocyanate (CIPIC)¹を用いた、4-(1'-cyanoisoindolyl) phenylthiazolinone (CIP-TZ) -アミノ酸の高感度検出およびリン酸化ペプチドの配列決定への応用を行った (Fig.1 (B))。

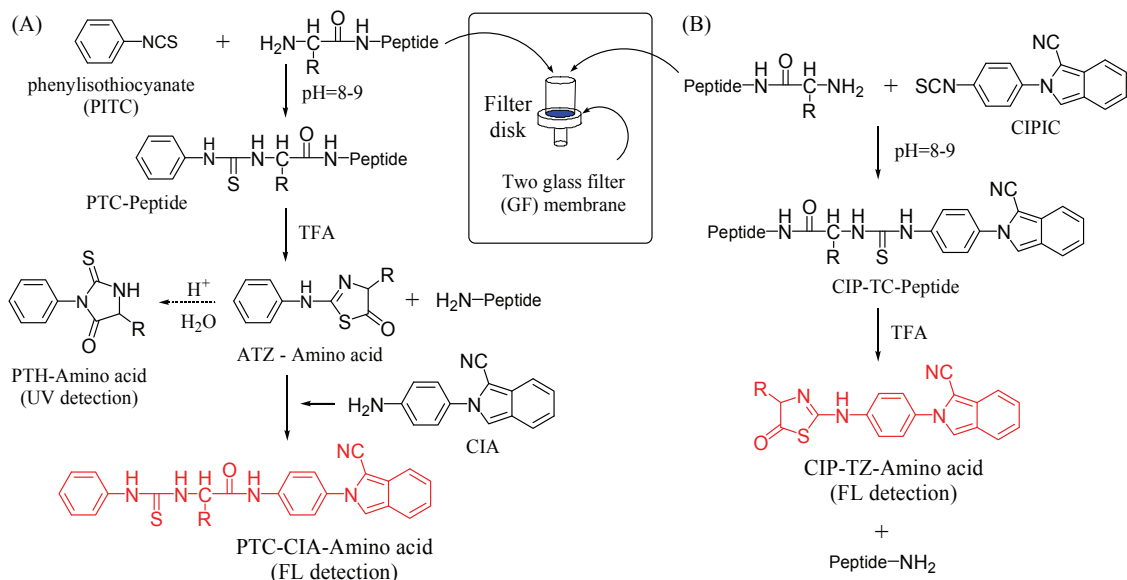


Fig. 1: Reaction scheme for the derivatization of peptides with (A) CIA and (B) CIPIC.

[結果及び考察]

a) CIA を用いたポスト切断-蛍光誘導体化法²

ポリプロピレンフィルターディスクにGF膜を挿入し、膜に各種アミノ酸アミドを吸着させてエドマン分解操作を行った。その後、生成したATZ-アミノ酸を膜から抽出してCIAと反応させたところ、対応するPTC-CIA-アミノ酸が平均収率85%で得られた。反応に用いたアミノ酸量とPTC-CIA体の蛍光強度との間には相関係数0.988以上の直線性が得られ、相対標準偏差は2.6%以下(n=3)であった。本法の検出限界は0.1-0.5 pmol (S/N=3)であり、PTH-アミノ酸のUV検出と比較して10倍以上高感度であった。効率よくペプチドの配列決定を遂行するには、ペプチドの膜からの脱離を最小限に抑える必要がある。そこで、PITC反応後の膜の洗浄条件を検討したところ、トルエンを用いた場合に最も高い収率でPTC-CIA-アミノ酸が得られた。また、ATZ-アミノ酸の膜からの抽出時において、酢酸エチルを用いた場合にATZ-アミノ酸を効率よく溶出でき、且つペプチドを膜に保持できることが分かった。酸によるPTC-ペプチドの切断反応において、TFAを直接ディスクに添加するとTFAによるディスク由来の副反応物が生成し、以降のカップリング反応を妨害することが分かった。そこで、TFAの蒸気をディスクに通過させることにより反応を行ったところ、反応は5分という短時間で終了し、さらにその副反応物の生成を劇的に減少できることが分かった。

これらの条件を用いて、30アミノ酸残基から成るインスリンB鎖の配列決定を行った結果、大部分のアミノ酸残基をPTC-CIA体として同定でき (Fig. 2)、20残基まで配列を決定できた。1、2、4サイクル目の検出における相対標準偏差は3.3~4.1% (n=3)であった。しかし、リン酸化ペプチドであるXVFAL (X=リン酸化チロシン(Yp)、リン酸化トレオニン(Tp)、リン酸化セリン(Sp))の配列決定を試みたところ、Ypに相当するPTC-CIA体は低収率ながら検出できたものの、Tp及びSpは全く検出されなかった。これは切断反応時におけるリン酸基の分解に起因するものと考えられた。

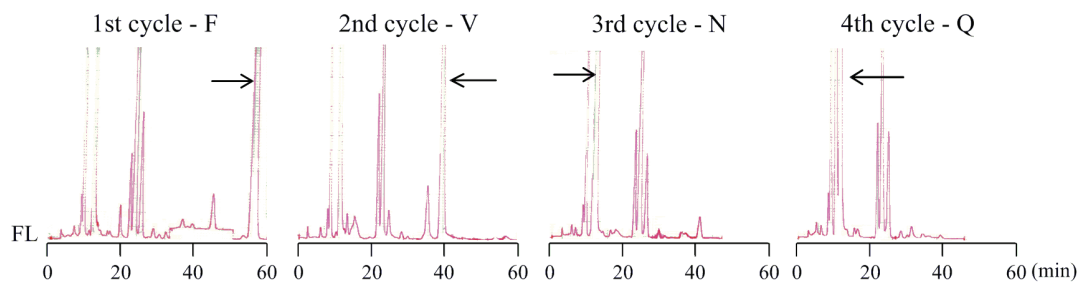


Fig.2. Chromatograms of PTC-CIA derivatives obtained by sequencing of insulin chain-B (oxidized) on GF membranes using gas phase TFA cleavage method for the first 4 cycles. HPLC mobile phase: 55:10:35% of CH₃CN: 0.12 M AcOH containing 0.14% SDS: H₂O and separated on Wakosil PTH column, 250 x 4.6 mm i.d. maintained at 40°C. UV detection: 269 nm, FL detection: λ_{ex} at 340 nm and λ_{em} at 400 nm.

b) CIPIC を用いたリン酸化ペプチドの配列決定³

TFAによる膜チップ由来の生成を抑えるため、本反応はガラス性フィルターディスクを用いて行った。反応条件を検討した結果、PITC反応に共存させる塩基として50%ピリジンのアセトニトリル溶液、ペプチドに対し100当量のCIPIC、60°Cで25分間のCIPIC反応、60°Cで2.5分間の気相TFA反応という条件下において、CIPICはペプチドと高い反応

性を示し、TFA反応後において対応するアミノ酸のCIP-TZ体を高収率で与えた。本法をリン酸化ペプチドの配列決定に応用するために、リン酸化アミノ酸のCIP-TZ体の膜からの溶出条件を検討した。トルエンと酢酸エチルの混合溶液 (3:1)を用いることで、ペプチドを膜に保持しつつ62~79%の収率でYp、Tp、SpのCIP-TZ体を抽出することに成功した。そこで、ペンタペプチド(XVFAL、X=T or Tp)の配列決定を試みた。その結果、1~4サイクル目まで全てのCIP-TZ-アミノ酸を同定でき、またCIP-TZ-TpのピークとCIP-TZ-Tのピークをそれぞれ異なる保持時間で検出できた(Fig.3)。TpVFAL の2、3サイクル目におけるV及びFのCIP-TZ体のピーク高さは、TVFAL の場合と比較して60~70%であった。またTpVFALの場合、3、4サイクル目において2、3サイクル目のF、Aがそれぞれ観測された。これらの結果より、リン酸化アミノ酸は、非リン酸化アミノ酸に比べてエドマン型試薬との反応性が低いことが示唆された。

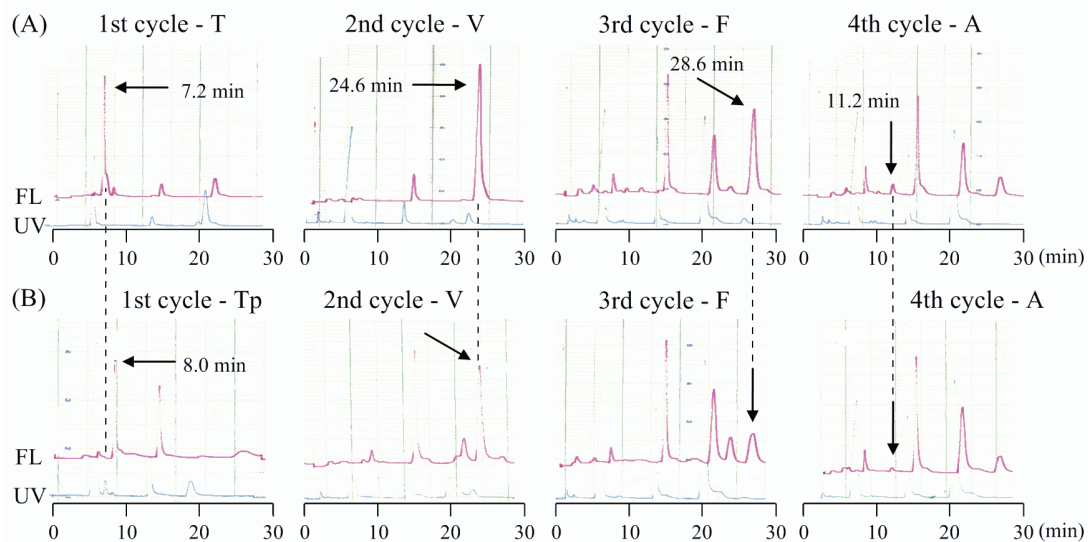


Fig.3. HPLC chromatograms of CIP-TZ amino acids derivatives obtained by sequencing of pentapeptides (A) TVFAL and (B) TpVFAL on GF membranes in glass-Teflon filter disk and extracted using toluene: EtOAc (3:1). HPLC mobile phase: 70% MeOH, 10% of 1.6 M AcOH 20% H₂O. ODS 80 Tm column, 150 x 4.6 mm i.d., maintained at 40°C. UV detection: 280 nm, FL detection: λ_{ex} at 360 nm and λ_{em} at 410 nm.

[結論]

本研究では、蛍光誘導体化試薬 CIA を用いた、簡便かつ高感度なマニュアル配列決定法を開発した。また、蛍光性エドマン型試薬である CIPIC を用いた、リン酸化ペプチドの配列決定の可能性を示した。これらの手法により、生体サンプルに含まれる極微量ペプチドの直接配列決定が可能になると期待できる。

[基礎となった学術論文]

1. Kai M., Morizono M., Wainaina M.N., Kabashima T., Lee M., Lu J., Anal. Chim. Acta, **53**, 153-159 (2005).
2. Wainaina M.N., Shibata T., Smanmoo C., Kabashima T., Kai M., Anal. Biochem., **374** (2), 423-425 (2008).
3. Wainaina M.N., Shibata T., Kabashima T., Kai M., *in preparation*.