著作権はRIKENにあります。
無断複製・転載を禁止します。

他の教育セミナーへの
リンクはココをクリック

バイオ解析チームHPへの
リンクはココをクリック

第151回農林交流センターワークショップ　H22年11月19日
第２４回タンパク質構造解析シリーズ
～生物機能解明のためのプロテオーム解析～

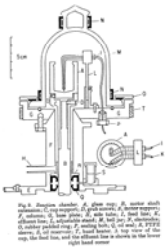
プロテインシークエンサーを用いてのタンパク質構造解析

独立行政法人理化学研究所
堂前　直

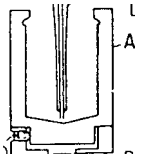
プロテインシークエンサーの歴史

- 1950年　エドマンがN末端からの逐次分解法を開発
- 1967年　自動化装置を開発
  A protein sequenator.
- 1969年 Beckman Instruments' Spinco Division was able to introduce its "protein sequencer

ベックマンスピニングカップ



Aのガラスのカップが回転することで遠心力で生じる薄い膜としてタンパク質を固定化した。



この際の、試料の流出が大変問題だったが、ポリブレンという4級アミンがタンパク質をガラス表面に固定化するのに役立った。

Polyquarternary amines prevent peptide loss from sequenators
George E. Tarr, James F. BeecherMichael Bell and David J. McKean
Analytical Biochemistry
Volume 84, Issue 2, February 1978, Pages 622-627

気相法のシークエンサー
Applied Biosystems 47x

ポリブレンの開発により、ガラスフィルターにタンパク質を固定化する気相法のシークエンサーが出来た。（1981）

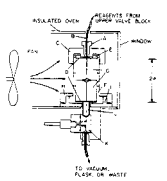
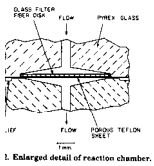


Fig. 3. Cartridge assembly. A, aluminum top fitting; B, Teflon tubing; C, aluminum cap; D, Teflon washer; E, keyed aluminum washer; F, 304 stainless steel cartridge body; G, Pyrex glass rod; H, aluminum locking ring; I, aluminum mounting base; J, Kel-F bottom fitting; K, Kel-F valve block.



2. Enlarged detail of reaction chamber.

この後1990年代には、ABI，島津、Proton→Beckman、HPの4社が競合するプロテインシークエンサーの全盛期があった。

現在

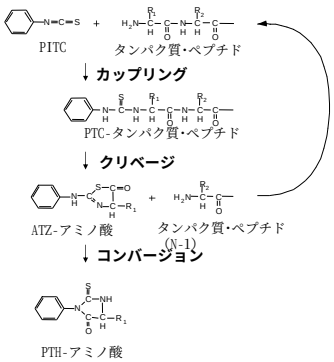
- ベックマン、HPの撤退。
- Applied Biosystems 2008年販売終了
- メーカーとしては島津のみが装置販売

しかし、需要があるため

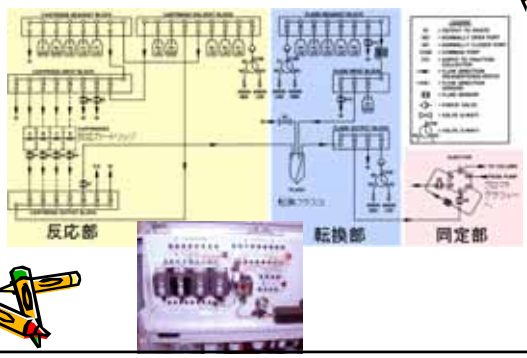
- Mediracsというベンチャーが ABの消耗品の販売開始

プロテインシークエンサーの原理と装置

エドマン分解法



プロテインシークエンサーの流路図



ProciseHTでの標準試薬とその供給に使用するガス圧

	試薬	圧力(psi)
R1	PITC/n-ヘプタン	2.5
R2	NMPip/MeOH/水 (R2B)	1.0
	NMPip/BuOH/IP/水 (R2C)	1.0
R3	TFA	1.5
R4	25%TFA/水	3.5
R5	PTH-アミノ酸/AN	2.5
S1	使用しない (MeOH)	1.7
S2	酢酸エチル	1.7
S3	塩化n-ブチル	1.7
S4	20%AN/水	3.5
X1	50%MeOH/水	2.5
X2	使用しない (MeOH)	2.5
X3	使用しない (MeOH)	3.0
Cart Dry	Ar	3.5
Flask Dry	Ar	3.0
Flask Bubble	Ar	1.8
Load Injector	Ar	1.1

PITC	フェニルイソチオシアネート
NMPip	N-メチルピペリジン
MeOH	メタノール
BuOH	ブタノール
IP	イソプロパノール
TFA	トリフルオロ酢酸
AN	アセトニトリル

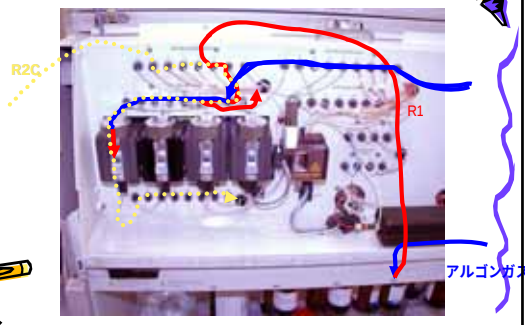
シークエンサーのプログラム

Cartridge Cycle : Cart-PL 6mmGFF cLC

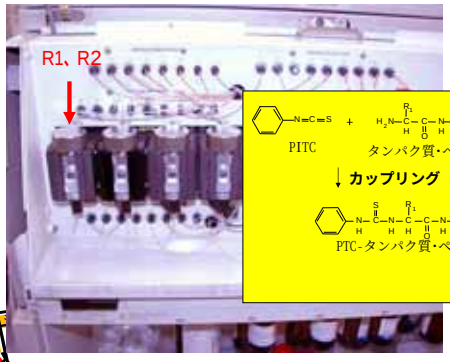
Step	Fxn#	Function Name	Time	El.Time
1	258	Begin	0	0:00
2	139	Flush Small Loop (Cart)	10	0:10
3	135	Flush Cart Reagent Block	10	0:20
4	137	Flush Input Block	5	0:25
5	11	Del R2g, Cart (top)	20	0:45
6	140	Flush Large Loop (Cart)	10	0:55
7	6	Load R1, Cart (lg loop)	25	1:20
8	131	Dry Cart (top)	30	1:50
9	140	Flush Large Loop (Cart)	5	1:55
10	135	Flush Cart Reagent Block	5	2:00
11	11	Del R2g, Cart (top)	170	4:50
12	131	Dry Cart (top)	30	5:20
13	140	Flush Large Loop (Cart)	5	5:25
14	6	Load R1, Cart (lg loop)	25	5:50
15	131	Dry Cart (top)	30	6:20
16	140	Flush Large Loop (Cart)	5	6:25

バルブとは？ NASAの技術を応用したミクロ電磁弁

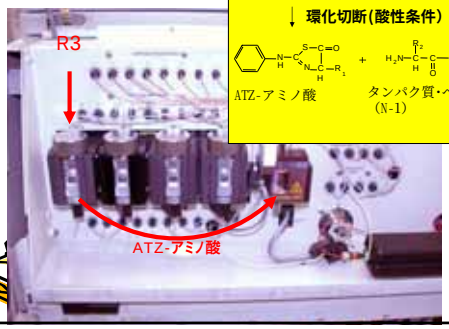
自動にバルブが開閉してエドマン分解が行われる

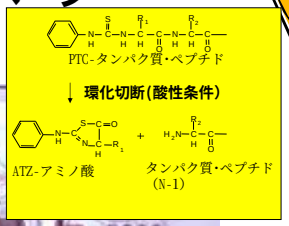


カップリング

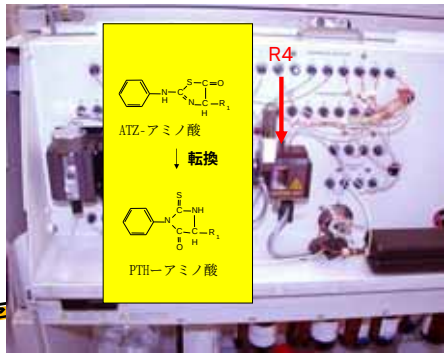


クリベージ

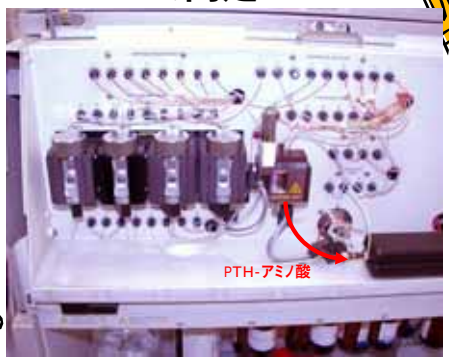




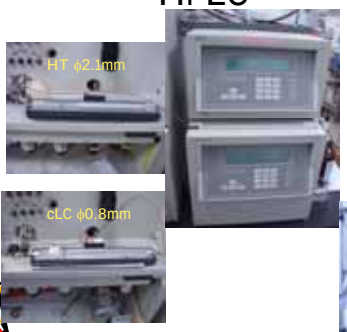
コンバージョン



HPLCで同定

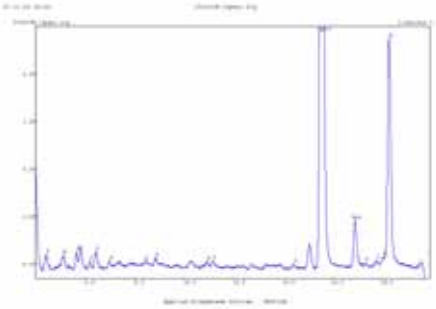


HPLC

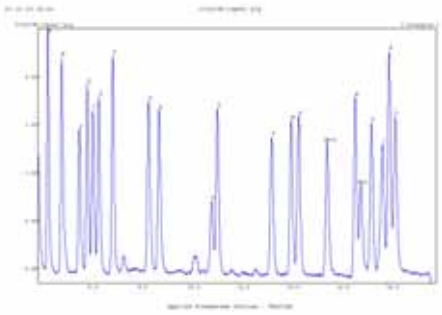


269nm

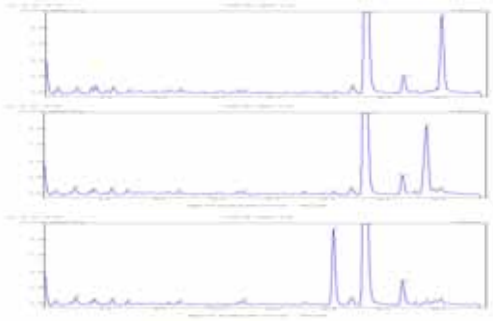
βラクトグロブリンの一残基目のクロマトグラム



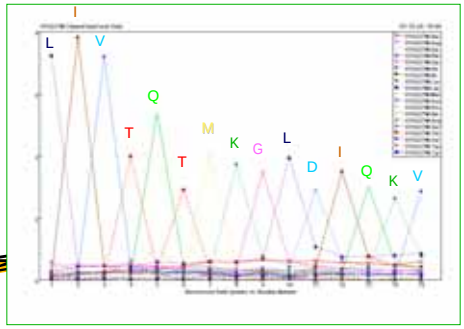
PTHアミノ酸の分離



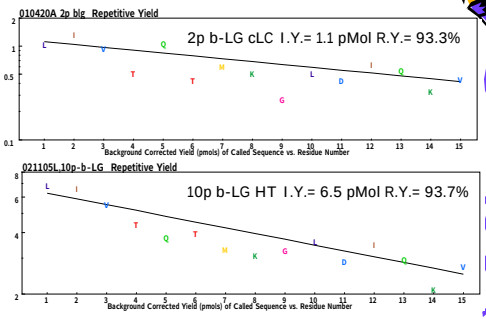
各サイクルのクロマトグラムを比べることで配列を決める。



各サイクルのアミノ酸をプロットすると配列がわかる



一つの反応は90%以上の効率で行われている



酵素タンパク質の分析例

操作法

- 昨日の実習を行っているので、今日は特に説明しません。

MEMO

プロテインシークエンサーの操作の簡単な流れ

（＊試料はPVDF膜またはガラスフィルターに添加したもの）

1. 試料＊をガラスブロックに入れて、カートリッジを組み立てる。
2. カートリッジをセットしてリークテストする。
3. 試薬、アルゴンガス、スタンダード、LCの溶媒に不足が無いか確認して、不足があれば交換する。
4. メソッドを選んで、スタートする。

試料と前処理

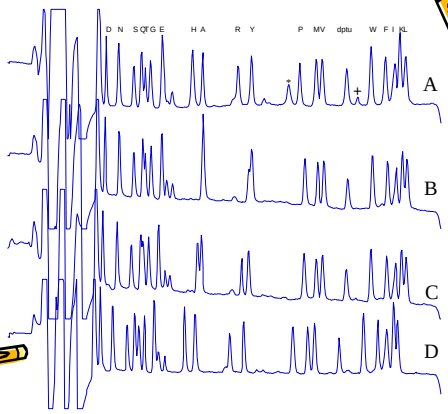
環境からの汚染を最小限にする。

- 装置や器具の洗浄
- グローブボックス、クリーンベンチの利用など
- 脱塩処理
- 回収率

トラブルシュート

- 自分でしたい保守
  ボトルリーク、カートリッジリーク
  クロマトグラムの微調整
  バックグランドの低減
- 装置に関しては、メーカーに電話する。

0120－477－392（ライフテクノロジース）



試薬瓶のトラブル

瓶の口の形状：平らでない
リークがとまらない。中の試薬の劣化
：ネジの不良
取り付け口の破損

瓶の破損：運転中に試薬瓶が壊れる事故が日本で数件起きている

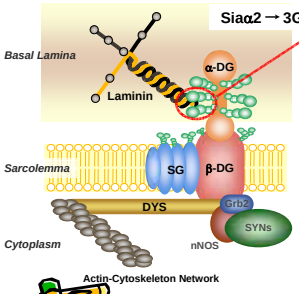
応用例：翻訳後修飾の解析
トレオニンのマンノシル化

α-dystroglycanモデルペプチドに対するprotein O-mannosyltransferase（POMT）のマンノシル化特異性の解明

（財）東京都高齢者研究・福祉振興財団東京都老人総合研究所
老化ゲノム機能研究チーム
萬谷　博／遠藤　玉夫研究部長
との共同研究

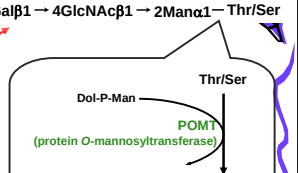
Manya H, Suzuki T, Akasaka-Manya K, Ishida HK, Mizuno M, Suzuki Y, Inazu T, Dohmae N, Endo T.
Regulation of mammalian protein O-mannosylation: Preferential amino acid sequence for O-mannose modification.
J Biol Chem. 2007 Jul 13;282(28):20200-6.

dystrophin-glycoprotein complex (DGC)

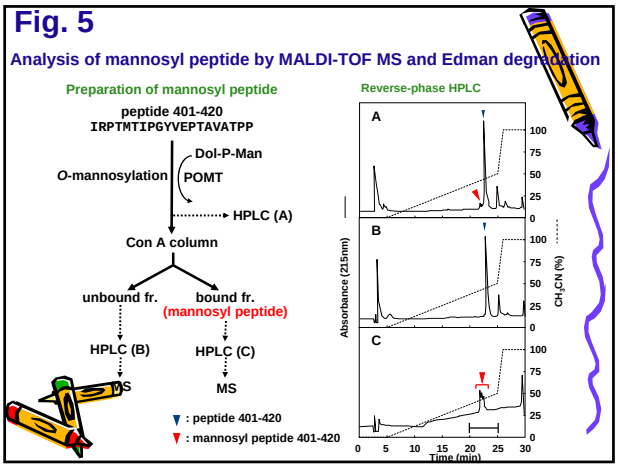


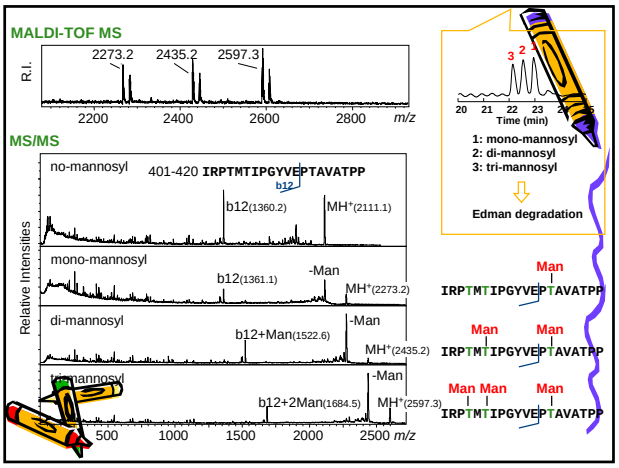
O-mannosyl glycan

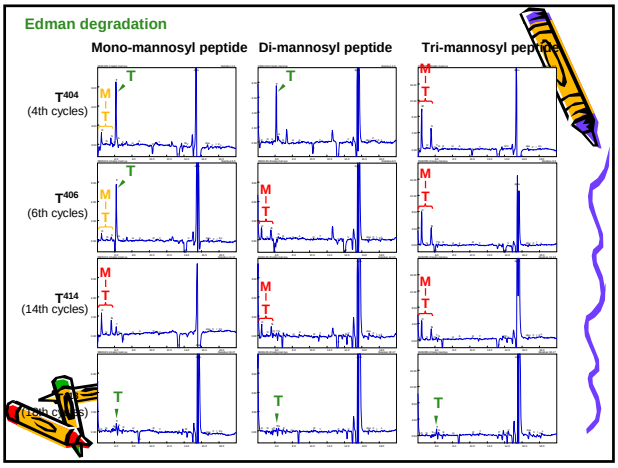
Siaα2 → 3Galβ1 → 4GlcNAcβ1 → 2Manα1 — Thr/Ser

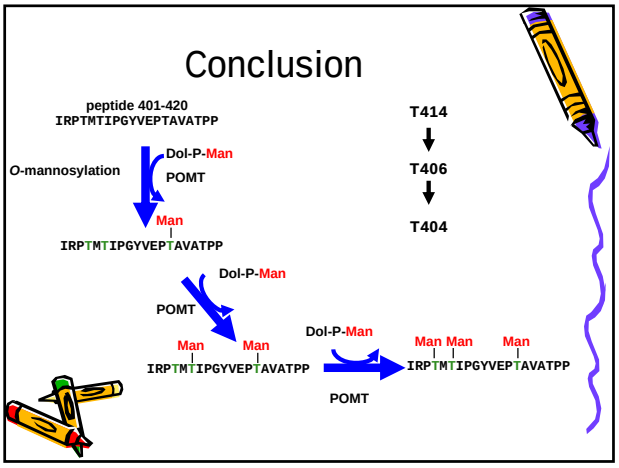


α-DG: α-dystroglycan, β-DG: β-dystroglycan,
SG: sarcoglycan, DYS: dystrophin, SYNs: sytrophins,
nNOS: neuronal nitric-oxide synthase, Sia: sialic acid,
Gal: Galactose, Man: Mannose,
GlcNAc: *N*-acetylglucosamine,
Dol-P-Man: mannosylphosphoryldolichol,









プロテインシークエンサーとは

- データベースに依存せず、アミノ酸配列を決定できる。
- O-型糖鎖のような予想の出来ない翻訳後修飾部位も決定できる。
- 高感度な装置を製造販売していたABが撤退した後の状況は混沌としている。
- 機会があれば、高感度シークエンサーを作成したい。