

質量分析による蛋白質一次構造の決定

生体内のペプチド・ポリペプチド(以下説明の便宜上、蛋白質あるいはポリペプチドという)は DNA の情報に従って、通常 20 種の α -アミノ酸より構成されている。生体内の蛋白質は、これらのアミノ酸だけからなる単純蛋白質と、核酸・リン酸・脂質・糖・金属などを含む複合蛋白質に大別されるが、大部分は複合蛋白質として存在する。



アミノ酸の中心炭素原子 1 個には、塩基性のアミノ基[$-\text{NH}_2$]と酸性のカルボキシル基[$-\text{COOH}$]が結合し、さらに結合する側鎖[$-R$]の原子団の違いは、個々のアミノ酸の性質を決める。蛋白質を構成する個々のアミノ酸の単位を「アミノ酸残基」とよぶ。蛋白質のそれぞれのアミノ酸残基は隣り合うアミノ酸残基のアミノ基とカルボキシル基が縮合してペプチド結合を形成する。そのうち、アミノ基が遊離したままのアミノ酸残基は、蛋白質のアミノ末端(N 末端)であり、カルボキシル基が遊離しているアミノ酸残基は、蛋白質のカルボキシル末端(C 末端)である。N 末端と C 末端の間のアミノ酸残基はペプチド結合で結ばれて 1 分子を形成する。蛋白質の蛋白質の一次構造であるアミノ酸残基の配列(以下、アミノ酸配列情報という)は、N 末端アミノ酸残基を「1 番目」とし、C 末端へ向けて順番に記述する。

【蛋白質のアミノ酸配列分析法の変遷】

Edman が最初にポリペプチド N 末端からアミノ酸残基を順に切断する方法(エドマン分解: Edman degradation)を報告したのは 1950 年のことである。また 1940 年代よりアミノ酸配列分析法を手がけてきたイギリスのケンブリッジ大学の Frederick Sanger は、1956 年にインスリンの全アミノ酸配列(51 アミノ酸残基)を決定することに成功、全アミノ酸配列が判明した最初の成果となった。Sanger は 1958 年にノーベル医学生理学賞を受賞[<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1958/sanger-lecture.pdf>]、その後、遺伝子配列決定法の確立によって再びノーベル賞を 1980 年に受賞している。蛋白質のアミノ酸配列決定法は、時代とともに原理的あるいは技術的な発展を遂げた。より微量の試料によって、より速く、より多くのアミノ酸配列情報を得るためには、次の 1)~4) に代表されるような各種の手段の進歩が必要であった。例えば 2)に関連して、アミノ酸残基の分析では、初期にはペーパークロマトグラフィーやペーパーイオン電気泳動(Paper Ionophoresis)が利用され、その後に薄層クロマトグラフィーやイオン交換カラムクロマトグラフィー、そして現在では、逆相系を用いた高速高性能なカラムクロマトグラフィー(HPLC)が常用されている。

- 1) 夾雑する生体分子群から調べる蛋白質を分離純化する
- 2) 蛋白質のペプチド結合を切断し、ペプチド断片を切り出し、分離する
- 3) 蛋白質あるいはペプチド断片から、アミノ酸残基を切り出し、分離する
- 4) アミノ酸残基を標識・同定する

近年に生物学者が経験した最も大きな変化は三つある。第一は、1980 年代になって実用化された気相アミノ酸シーケンサーの登場である。気相アミノ酸シーケンサーは、まず Edman 分解によって蛋白質の N 末端側から順次アミノ酸残基を切断し、PTH(phenylthiohydantoin)化するまでをオンラインで自動に行う。続いて PTH アミノ酸の種類を同定する逆相 HPLC で構成されるシステムである。第二は、気相アミノ酸シーケンサーの登場と相前後して急速に進行した遺伝子工学的な手

法の発展であり、特定の蛋白質配列をコードする遺伝子の cDNA クローニング、および遺伝子発現系を構築することによって、発現宿主に遺伝子組換え蛋白質を生産させることが可能となった。第三は、これら生体分子の各種情報がインターネット上に集積(データベース)されるようになったことである。これら三つの手段を併せて、未知蛋白質の部分的なアミノ酸配列情報を解析すれば、その配列情報をもつ cDNA をクローニングし、遺伝子配列から全アミノ酸配列情報を知ることが効率良く可能となった。そして多数の蛋白質あるいは遺伝子が同定され、分子レベルの生物機能・制御の解明と、世界的な成果共有が実現した。

21 世紀に入って、私達はさらに全く新たな手段を手中にした。その一つは、生物のゲノム情報の獲得、もうひとつは、これに関連して本実習で学ぶ「質量分析による蛋白質一次構造の決定」の手法である。

【各種の質量分析法】

質量分析計は、その原理により幾つかに分類される。

1) 試料をイオン化室に導入する方法の違い

- そのまま導入する → 直接導入法
- 他分子を分離して導入する → ガスクロマトグラフィー (GC)
- 他分子を分離して導入する → 液体クロマトグラフィー (LC)

2) 試料のイオン化の方法の違い

- マトリックス支援レーザー脱離イオン化 / レーザーイオン化マトリックス支援 (MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
- 電子イオン化 (EI: Electron Ionization)
- 化学イオン化 (CI: Chemical Ionization)
- 電界脱離 (FD: Field Desorption)
- 高速原子衝撃法 (FAB: Fast Atom Bombardment)
- エレクトロスプレーイオン化 (ESI: Electrospray Ionization)
- 大気圧化学イオン化 (APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

3) 分析計による違い

- 飛行時間型 (TOF: Time-of-Flight)
- 四重極型 (Q: Quadrupole)
- 磁場偏向型
- イオントラップ型
- フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型 (FT-ICR: Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance,)
- タンデム型

本実習では、島津製作所 AXIMA-CFR plus を使用する。この質量分析計は、MALDI- TOF MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型 質量分析計)である。

島津製作所 AXIMA-CFR plus

<http://www.shimadzu-biotech.jp/products/tofms/index.html>

田中耕一記念質量分析研究所

http://www.shimadzu.co.jp/aboutus/ms_r/qa.html



図 1 MALDI-TOF MS 分析の概要

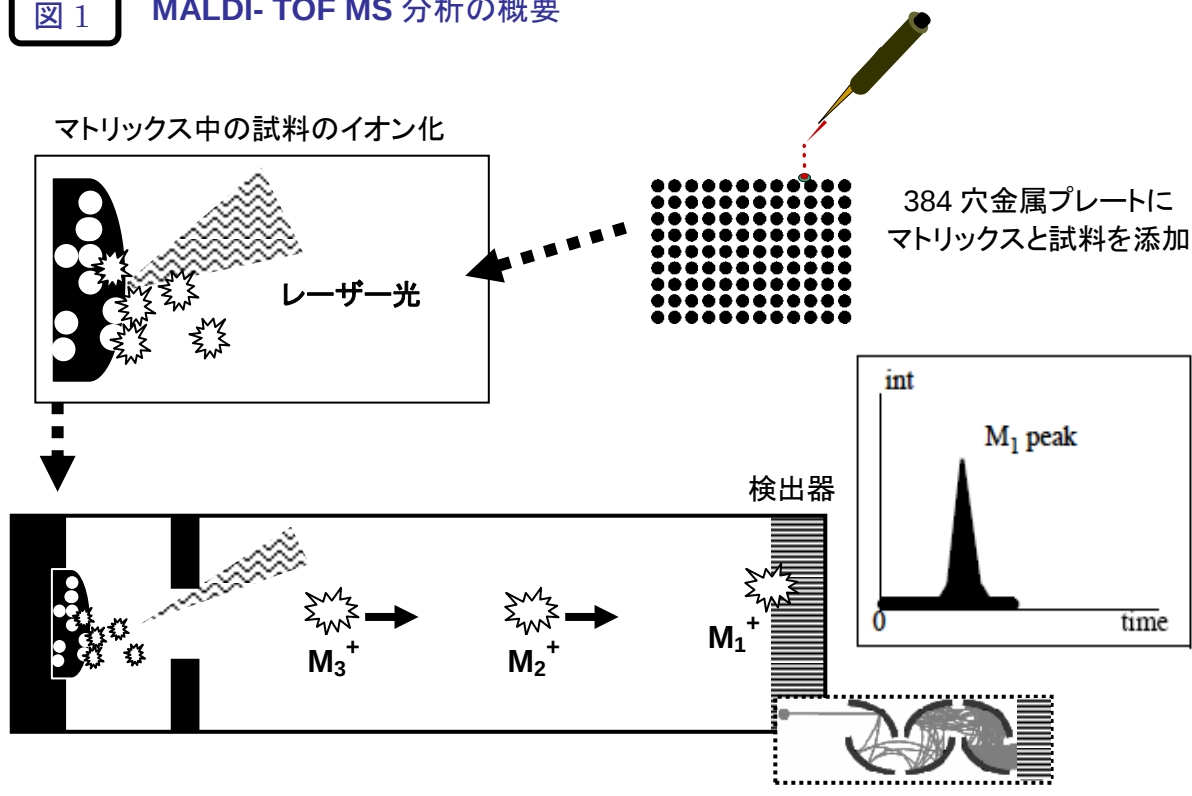
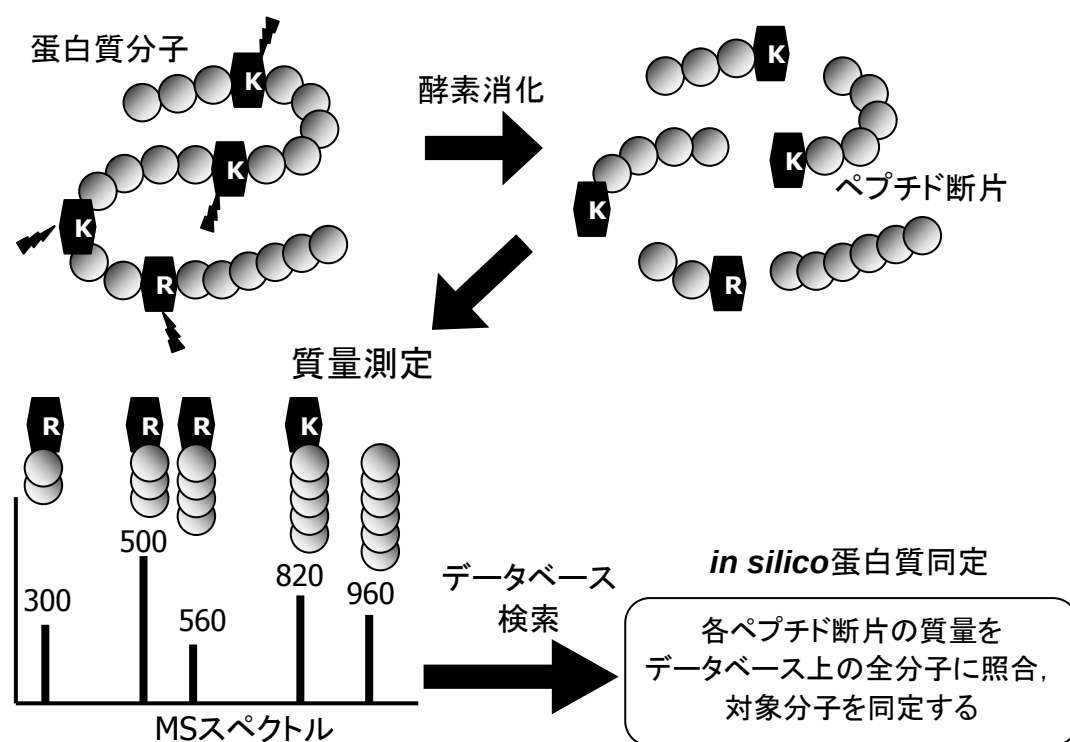


図 2 Peptide Mass Fingerprinting (PMF)



【予め準備しておくこと】

予習課題（極めて重要！）

<http://www.f.waseda.jp/tkato/> のメニューから[担当授業]に入り, 課題ファイル2種をダウンロードして各自予習を済ませて持参し, 実験レポートに添付して提出のこと。

- 課題 1: 蛋白質のモチーフ配列検索
STEP 1 【部分未知配列の同定と帰属, 全長配列の取得】
STEP 2 【シグナルペプチド配列の推定】
STEP 3 【Motif 配列の検索】
- 課題 2: PMF[Peptide MS Fingerprint]法
MALDI-TOF MS による MS フィンガープリント法を理解する。
質量値をデータベースに照合し, 解析対象分子を特定, 帰属させる。

【試薬】

- 蛋白質試料 X (2mg/ml)
- DTT (Dithiothreitol), ヨードアセトアミド (IAA; Iodoacetamide)
- 1M 重炭酸アンモニウム: Ammonium bicarbonate (Sigma 社)
- TPCK-Trypsin: TPCK treated, from Bovine (Worthington 社)
- 8M 尿素 (Sigma 社) [Sep-Pak Plus C18 Cartridges (Waters 社) で前処理精製した溶液]
- CHCA: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma 社)
- CH₃CN: アセトニトリル: Acetonitrile (Merck 社)
- TFA: トリフルオロ酢酸 (和光純薬)
- ヒトアンジオテンシン II: Human Angiotensin II
[M+H]⁺=1,046.5423, monoisotopic (Sigma 社)
- ヒト副腎皮質刺激ホルモン[18-39 部分ペプチド]: Human Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH)
[M+H]⁺=2,465.1989, monoisotopic (Sigma 社)

【機器・器材】

- マイクロピペットチップ・マイクロチューブ (1.5ml)
- ZipTip™ C18 (MILLIPORE 社), 384 穴サンプルプレート, 37°C インキュベーター
- AXIMA-CFR plus (島津製作所)
- データ搬出用のウイルスフリーの電子記憶媒体 (各自持参のこと: USB メモリを推奨する)

【実験のスケジュール(例)】

1 日目	13:00	6 号館集合・出欠調査	2 日目	11:00	集合・出欠調査
		実験説明			実験説明
	13:30	分析試料調製		11:30	分析試料調製
	15:30	片付け		12:00	昼食
		予習課題: 質疑実施		13:00	質量分析 [710 室]
		総括		15:00	データベース検索
				17:00	片付け・総括議論

【実験操作】

[1 日目] 酵素消化によるペプチド断片化: TPCK-トリプシンによる蛋白質の限定分解

- 1) 2mg/ml の蛋白質 X の試料溶液 12.5 μ l と, 8M 尿素 6.25 μ l をマイクロチューブに取り, 37°C で 1 時間反応させる。
- 2) 1M DTT を 1.2 μ l 添加し, 55°C で 15 分反応させる。 → 反応
- 3) IAA(ヨードアセトアミド)を 1.6 μ l 添加し, 室温で 15 分反応させる。 → 化
- 4) 1M 重炭酸アンモニウムを 2 μ l, 250 μ g/ml Trypsin を 2 μ l, 超純水を 74.45 μ l 加える。
- 5) 37 °C で終夜反応させ, 断片化ペプチド試料とする。

試料	液量	最終濃度
2mg/ml 蛋白質溶液 X	12.5 μ l	250 μ g/ml
8M 尿素	6.25 μ l	0.5 M
1M DTT	1.2 μ l	
IAA	1.6 μ l	
1M 重炭酸アンモニウム	2 μ l	20 mM
250 μ g/ml Trypsin 溶液	2 μ l	5 μ g/ml
超純水[MillQ 水]	74.45 μ l	

[2 日目 a] 酵素分解の停止

- 6) 1%TFA を 100 μ l 調製する。
- 7) 酵素分解試料に 1%TFA を 5.3 μ l 添加し, 酵素反応を停止させる。

[2 日目 b] 質量分析の準備: サンプルプレートへペプチド断片化試料を滴下する

ZipTip™ C18(ベツト容量 0.6 μ l)は, 蛋白質やペプチドなどと疎水結合する C18 逆相ゲルをチップに充填したものであり, ペプチド断片溶液中の不純物などを洗浄除去(クリーンナップ)するために用いる。以下の手順で, 測定試料を ZipTip™ で前処理し, 質量分析用サンプルプレートの表面へスポットングする。



- 8) 6)で調製した 1%TFA より, 0.1% TFA 超純水溶液 400 μ l(平衡化溶液), 0.1%TFA-50% アセトニトリル(CH₃CN)溶液(洗浄溶液)200 μ l, それぞれ調製する。
- 9) ZipTip™をマイクロピペットに装着し, 採取容量を 10 μ l に固定する。
- 10) 【ZipTip™の前処理】洗浄溶液(0.1%TFA-50% アセトニトリル溶液)を 30 μ l とり, 極端にゆっくりしたピペッティング操作で, 10 回通液させる。この操作によって, 充填剤に付着した不純物を予め脱離洗浄し, 充填剤を溶媒に暴露(ウエッティング)させる。

- 11) 【ZipTip™の平衡化】10)と同様にして、平衡化溶液(0.1%TFA 超純水溶液)を 40 μ l とり、極端にゆっくりしたピペッティング操作で、10 回通液させる。この操作によって、ペプチドが ZipTip™充填剤に結合可能となるように平衡化する。
- 12) 【ZipTip™への試料吸着】断片化ペプチド試料溶液に ZipTip™の先端を入れ、極端にゆっくりしたピペッティング操作で、試料を ZipTip™へ吸い込み、排出させる。これを 15 回行う。
- 13) 【ZipTip™非吸着物の洗浄】洗浄溶液(0.1%TFA 超純水溶液)60 μ l を極端にゆっくりと ZipTip™へ吸い込み、排出させる。このようなピペッティングを 20 回繰り返し、ZipTip™充填剤に非吸着の塩類や不純物を除去する。
- 14) マイクロピペットの採取容量を 5 μ l に固定する。
- 15) 【ZipTip™からの溶出とマトリックスとの混合】2 μ l の 0.1%TFA 50%アセトニトリル超純水溶液)を吸い込み、極端にゆっくりと吸い込み、排出するピペッティングを 20 回繰り返し、ZipTip™充填剤からペプチド混合物を溶出する。
- 16) CHCA マトリックスと混合しつつ、質量分析サンプルプレート上でゆっくりと3回ピペッティングし、マトリックスとともにペプチドをサンプルプレート上へ移す。
- 17) 【標準試料】質量校正用の標準ペプチド混合溶液とマトリックス溶液を混合したものをサンプルプレート上へ移す。
- 18) 自然乾燥させる。

2 日目の質量測定が不首尾で蛋白質が同定できない場合がある。例えば、ZipTip™へのペプチドの吸着を最大にするためには、GuHCl(グアニジン塩酸)などのカオトロピック塩の添加が有効な場合があるが、それは何故か？また、このような処置を実施するかどうかについては、適宜、TA より指導を受けること。

[2 日目 b] 質量分析計による測定と、データベース検索による分子同定・帰属

19) サンプルプレートを質量分析装置に挿入し、解析を行う。[地下 MS 室]

20) 得られたデータを元に、各人でデータベース検索を行う。

下記どれかのサーバーにアクセスし、必要とするデータを入力して配列解析を行う。

予習書の課題 2 には、**ProteinProspector** を利用する場合の手順例が紹介されている。
本実習書の次ページ以降は、**Mascot Server** を利用する場合の手順例が紹介されている。
解析アルゴリズムの特徴により検索結果が各サーバーそれぞれで異なる場合（特に ExPASy-Aldente）があるので、試行、比較しながら結果をまとめることを推奨する。

Mascot Server → Matrix Science Ltd.より提供

<http://www.matrixscience.com/>

ProteinProspector → University of California at San Francisco より提供

<http://prospector.ucsf.edu/>

ExPASy – Aldente Peptide Mass Fingerprinting tool

→ the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)が展開する Expert Protein Analysis System

<http://br.expasy.org/tools/aldente/>

不完全修飾による主な副生成物（補足）

反応	アミノ酸残基	化学式	質量シフト (Da)	コメント
アセチル化	N末端	+CH ₃ CO	+42.04	大腸菌発現たんぱく質で起きやすい
カルバミル化	K, N末端	+CHNO	+43.01	尿素存在下で起きやすい
酸化	M	+O, O ₂	+16.00, +32.00	酸性条件化で起きやすい
ピログルタミル化	E, Q		-17.03	中性から塩基性で起きやすい
アクリルアミド付加	C	+C ₃ H ₅ NO	+71	ポリアクリルアミドゲル内の未反応のモノマーが付加

完全修飾

ヨードアセトアミド付加 +H₂CONH₂

「質量分析による蛋白質一次構造の決定」のレポート作成について

本実習書の内容と重複する記載は不要である。

以下を A4 版 6 枚以内に工夫してまとめ、提出する。

- 測定条件, 測定値, 測定値の諸属性などを表に分かりやすく整理してまとめる。
- 帰属同定の根拠, 帰属された蛋白質, 全配列に対する帰属率等, 基礎結果をまとめる。
- 分子同定に至るまでの問題や試行錯誤について整理し, 明解にまとめる。
- 検出された翻訳後修飾, 人為的(人工的)修飾などについて考察を加え, まとめる。
- 蛋白質の帰属同定が不首尾の場合, 成功確率を改善するための手段や提案をまとめる。
- 各種の蛋白質一次構造同定法を比較し, 本方法の利点や問題点を提示する。
- 予習課題の解答 2 枚を必ず添付すること。

【ポイント: TPCK-トリプシンを用いたタンパク質試料の消化】

- Q1 TPCK-トリプシンの TPCK とは何か? またトリプシン溶液を保存する際に起こりうる問題点とその解決策について述べよ。
- Q2 質量分析に用いられる蛋白質分解酵素では、トリプシンや API (Achromobacter Protease I) が一般に選択される。これらの酵素が汎用される理由を説明せよ。
- Q3 分子内ジスルフィド結合を決定する方法を述べよ。

【ポイント: 質量分析とデータベース検索】

- Q4 特定の蛋白質に帰属同定できなかった質量値の由来について考察せよ。
- Q5 monoisotopic 質量, average 質量とは何か? PMF 法での使い分けは?
- Q6 データベース検索では、目的蛋白質のアミノ酸配列以外に、類似した配列をもつ蛋白質も多数検出される。一方で、目的の蛋白質が検出されないことも多い。検出されなかったとすれば、どのような原因が考えられるか? 逆に、より確実に検出するにはどうすればいいか?
- Q7 マトリックスの使い分け, 添加方法について述べよ。
- Q8 今回実施した MALDI-TOF-MS 解析と, LC-MS/MS 解析とを比較せよ。

1. Mascotへアクセス

Internet Explorerを起動し、Mascotサーバーへアクセスする。
<http://www.matrixscience.com>

注: 分からない項目については、Mascot のHELPを参照。

The image shows two screenshots of the Mascot website. The top screenshot is the homepage, and the bottom screenshot is the search page. Annotations with arrows point to specific links.

Homepage:

- Navigation bar: HOME | WHAT'S NEW | MASCOT | **HELP** | PRODUCTS | SUPPORT | CONTACT (The 'HELP' link is circled and annotated with "まずはここをクリックする。")
- Search bar: Search [Go]
- Section: **Welcome**
- Text: "This site features **Mascot**, a powerful search engine that uses mass spectrometry data to identify proteins from primary sequence databases. To assist you, the help text for Mascot forms a substantial knowledge base concerning protein identification by MS." (The word 'Mascot' is circled and annotated with "まずはここをクリックする。")
- Text: "If this is your first visit, please check for browser compatibility and read the small print. If you include results from Mascot in a publication, please cite either this URL or Electrophoresis, **20(18)** 3551-67 (1999) (abstract)." (The text '20(18)' is circled)
- Text: "We value your feedback and suggestions for new features. If you find any problems, errors, oversights, or just get unexpected results then please let us know."
- Text: "For information on licensing Mascot for in-house use, please refer to our Products and Support pages. For recent news, check What's New."
- Text: "Matrix Science develops and markets software products which integrate mass spectrometry into bioinformatics. Our interests extend to all aspects of mass spectrometry in the life sciences. Please contact us to discuss:"
- List:
 - Developing new applications
 - Consultancy in mass spectrometry and bioinformatics
 - Systems analysis and integration
- Section: **Collaborations**
- Logos: Cancer Research Technology, Bio Vision, LabVantage LEADING SOLUTIONS, swissprot

Search Page:

- Navigation bar: HOME | WHAT'S NEW | MASCOT | HELP | PRODUCTS | SUPPORT | CONTACT (The 'HELP' link is circled and annotated with "まずはここをクリックする。")
- Search bar: Search [Go]
- Section: **Mascot Search**
- Left sidebar (Mascot Help):
 - Mascot Help
 - Mascot Overview
 - Search parameter reference
 - Sequence databases
 - Data file format
 - Scoring algorithm
 - Results format
 - Error tolerant search
 - FAQ's
 - User Meeting Presentations
 - 2005
 - More Help
 - Help Topic Index
 - Useful Links
- Main content:
 - **Peptide Mass Fingerprint:** The experimental data are a list of peptide mass values from an enzymatic digest of a protein.
 - Example of results report
 - More information
 - **Sequence Query:** One or more peptide mass values associated with information such as partial or ambiguous sequence strings, amino acid composition information, MS/MS fragment ion masses, etc. A super-set of a sequence tag query.
 - Example of results report
 - More information
 - **MS/MS Ion Search:** Identification based on raw MS/MS data from one or more peptides.
 - Example of results report
 - More information
- Text: **Search Form Defaults:** Follow this link to save your preferred search form defaults as a browser cookie.

Annotation: "PMFの時はここをクリックする。" points to the "Peptide Mass Fingerprint" option.

Copyright © 2005 Matrix Science Ltd. All Rights Reserved. Last Updated 06/15/2005 20:19:04

2. 検索条件の設定

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name Email

Search title

① Database

② Taxonomy

③ Enzyme

④ Allow up to missed cleavages

⑤ Fixed modifications

⑥ Variable modifications

Protein mass kDa

⑦ Peptide tol. $\pm$ Da

⑧ Mass values ☒ MH⁺ ☐ M_r ☐ M-H⁺

⑨ Monoisotopic ☒ Average ☐

Data file

⑩ Query
 NB Contents of this field are ignored if a data file is specified.

Overview ☐

⑪ Report top hits

⑫

- ①: 検索に用いるデータベースを選択。
- ②: 検索対象の生物種を選択。不明の時はAll entriesを選択。
- ③: 消化に用いた酵素を選択。
- ④: 酵素の切断ミスの許容数を選択。1～2が適当。
- ⑤: 100%修飾されている修飾を選択。
- ⑥: 一部修飾されている可能性のある修飾を選択。本実習ではN末端のアセチル化, N末端のグルタミン, グルタミン酸のピログルタミル化, リシンのカルバミル化を選ぶとよい。
- ⑦: 誤差の許容範囲を設定する。±0.5Da程度から検索をはじめめる。
- ⑧: ペプチドのイオン化の状態。MALDI-TOFのPMFではMH⁺を選択する。
- ⑨: 測定した質量がモノアイソトピック質量か平均質量か選択する。
- ⑩: ピークリストを入力する。
- ⑪: 検索結果の上位何位までを表示するか選択する。
- ⑫: Start Serchボタンをクリックすると検索が始まる。

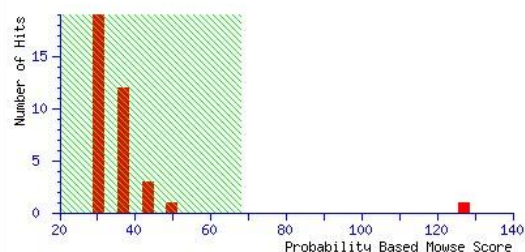
3. 検索結果例

Mascot Search Results

User :
Email :
Search title :
Database : NCBI nr 20050217 (2329303 sequences; 789829196 residues)
Taxonomy : Mammalia (mammals) (342299 sequences)
Timestamp : 22 Sep 2005 at 07:00:26 GMT
Top Score : 127 for **gi|162648**, albumin [Bos taurus]

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 68 are significant ($p < 0.05$).



横軸はスコア。縦軸はそのスコアでヒットした蛋白質の数。
網掛けの部分は統計的にランダムヒットと考えられる。

Concise Protein Summary Report

Format As: [Help](#)
Significance threshold $p <$ Max. number of hits

1.	gi 162648	Mass: 71244	Score: 127	Expect: 6.8e-008	Queries matched: 22
	albumin [Bos taurus]				
	gi 30794280	Mass: 71274	Score: 127	Expect: 6.8e-008	Queries matched: 22
	albumin [Bos taurus]				
	gi 418694	Mass: 71221	Score: 103	Expect: 1.7e-005	Queries matched: 20
	serum albumin precursor [validated] - bovine				
	gi 229552	Mass: 68083	Score: 73	Expect: 0.016	Queries matched: 18
	albumin				
	gi 25527314	Mass: 24057	Score: 44	Expect: 13	Queries matched: 8
	spermatogenesis-related factor 1, SRF-1 - rat				
	gi 24658648	Mass: 34378	Score: 35	Expect: 1.1e+002	Queries matched: 7
	FMRI protein [Homo sapiens]				

ヒットした蛋白質が表示される。

Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint
Enzyme : Lys-C
Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Acetyl (N-term), Carbamyl (K), Oxidation (M), Pyro-glu (N-term E), Pyro-glu (N-term Q)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 0.5 Da
Peptide Charge State : 1+
Max Missed Cleavages : 1
Number of queries : 27

検索条件が表示される。

4. トップヒットの蛋白質に関する詳細

Mascot Search Results

Protein View

Match to: [gi|162648](#) Score: 127 Expect: 6.8e-008
albumin [Bos taurus]

Nominal mass (M_r): 71244; Calculated pI value: 5.82
NCBI BLAST search of [gi|162648](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Bos taurus](#)
Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
[gi|1351907](#) from [Bos taurus](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Acetyl (N-term), Carbamyl (K), Oxidation (M), Pyro-glu (N-term E), Pyro-glu (N-term Q)
Cleavage by Lys-C: cuts C-term side of K unless next residue is P
Number of mass values searched: 27
Number of mass values matched: 22
Sequence Coverage: 47%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRDRTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA
51 FSQYLQCCPF DEHVKLVLNEL TEFKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
101 VASLRETYGD MADCCCKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPLKL PDPNTLCDEF
151 KADEKKFWGK YLYEIAARRHP YFYAPPELLYY ANKYNQGVFQK CCQAEDKQAC
201 LLPKIETHRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA RLSQKFPKAE
251 FVEVTKLVTD LTRVHKECCH GDLLCADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
301 CDCKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAQDAFL
351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKYEATL EECCKADDPH ACYSTVDFKL
401 KHLVDEPQNL IKQNCDFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS
451 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRCVLHEKT PVSEKVTKCC
501 TESLVNRRPC FSALTPEDET VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT
551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTALA
```

アミノ酸配列中で帰属に成功(マッチ)したペプチドが赤色で表示される。

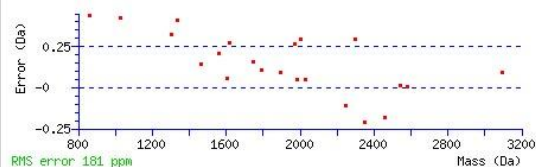
Show predicted peptides also

マッチしたペプチドについての詳細が表示される。

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
29 - 44	1985.04	1984.03	1983.98	0.05	1	K.SEIAHRFKDLGEEHFK.G Acetyl (N-term)
89 - 100	1462.84	1461.83	1461.69	0.14	0	K.SLHTLFGDELCK.V Carbamyl (K)
101 - 117	2005.14	2004.13	2003.84	0.29	0	K.VASLRETYGDMADCCCK.Q
118 - 138	2541.18	2540.17	2540.16	0.01	1	K.QEPERNECFLSHKDDSPDLPLK.L
184 - 197	1790.82	1789.81	1789.70	0.11	0	K.YNGVFQCCQAEDK.G Carbamyl (K)
198 - 211	1748.04	1747.03	1746.88	0.16	1	K.GACLLPKIETHREK.V 2 Carbamyl (K); Oxidation (M)
229 - 235	863.91	862.90	862.47	0.44	0	K.FGERALK.A Carbamyl (K)
236 - 248	1561.07	1560.06	1559.86	0.21	1	K.AWSVARLSQKFPK.A Carbamyl (K)
236 - 248	1603.93	1602.92	1602.86	0.06	1	K.AWSVARLSQKFPK.A 2 Carbamyl (K)
267 - 285	2247.83	2246.82	2246.94	-0.11	0	K.ECCHGDLLECADDRADLAK.Y
298 - 309	1618.07	1617.06	1616.79	0.27	1	K.LKECCDKPLLEK.S Acetyl (N-term); Carbamyl (K)
300 - 309	1335.02	1334.01	1333.60	0.41	0	K.ECCDKPLLEK.S Carbamyl (K)
310 - 336	3094.56	3093.53	3093.46	0.09	1	K.SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDK.D Acetyl (N-term); Carbamyl (K)
319 - 340	2458.00	2456.99	2457.17	-0.18	1	K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK.N
402 - 412	1306.04	1305.03	1304.71	0.32	0	K.HLVDEPQNLK.Q
421 - 437	2028.15	2027.14	2027.10	0.05	0	K.LGEYGFQNALIVRYTRK.V
438 - 455	1897.17	1896.16	1896.07	0.09	0	K.VPQVSTPTLVEVSRSLGK.V
490 - 498	1031.00	1029.99	1029.57	0.42	1	K.TPVSEKVTK.C Acetyl (N-term)
524 - 544	2584.21	2583.20	2583.20	0.01	1	K.AFDEKLFTHADICTLPDEK.Q 2 Carbamyl (K)
562 - 580	2301.40	2300.39	2300.10	0.29	1	K.ATEEQLKTVMENFVAFVDK.C 2 Carbamyl (K); Oxidation (M)
569 - 587	2347.79	2346.78	2346.99	-0.21	1	K.TVMENFVAFVDKCCAADDK.E Acetyl (N-term); 2 Carbamyl (K)
581 - 597	1971.07	1970.06	1969.80	0.27	1	K.CCAADDKEACFAVEGPK.L Carbamyl (K)

No match to: 1079.89, 1476.91, 2085.15, 2952.58, 2952.68



理論値からのずれが図示される。