

ルテニウム錯体型 N 端標識試薬を用いた *Thermus thermophilus* HB8 由来

## の複合タンパク質の解析法

**Determination method of conjugated proteins from *Thermus thermophilus* HB8 using ruthenium complex as an N-terminal labeling reagent**伊藤彰厚<sup>1,2</sup>, 岡村高明<sup>1</sup>, 山本 仁<sup>1,2</sup>, 上山憲一<sup>1</sup>Akihiro Ito<sup>1,2</sup>, Taka-aki Okamura<sup>1</sup>, Hitoshi Yamamoto<sup>1,2</sup>, Norikazu Ueyama<sup>1</sup>( <sup>1</sup> 阪大院理, <sup>2</sup> 理研播磨 )( <sup>1</sup> Grad. Sch. of Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup> Riken Harima Inst. )e-mail: [a-ito@chem.sci.osaka-u.ac.jp](mailto:a-ito@chem.sci.osaka-u.ac.jp)

タンパク質の N 端配列はタンパク質の同定のみならず、N 末端のプロセッシングを知る上でも重要な情報となる。従来のプロテオミクスの分野におけるタンパク質のアミノ酸配列決定法としては、質量分析(MS)を用いた peptide mass fingerprinting (PMF) や peptide sequence tag (PST) 法等が主流である。これらの手法は、MS によりタンパク質サンプルを自動測定しデータベース検索することで、それらをハイスループットに決定できる。しかし、これら手法の場合、必ずしも正確に N 端配列を決定できるわけではない。

当研究室ではこれまでに、Chart 1 に示すルテニウム錯体型タンパク質標識試薬を開発している。この試薬で Lys 側鎖が無保護のタンパク質を標識し酵素消化することで、MS において <Ru>-CO 標識ペプチドが高感度で検出され、N 端アミノ酸配列決定を正確に行えることを示してきた<sup>1)</sup>。しかし、この場合、Lys 側鎖も標識されスペクトルが複雑になる。より容易に N 端アミノ酸配列決定を行うため、Lys 側鎖をグアニジル化により保護し N 端のみを選択的に標識した。

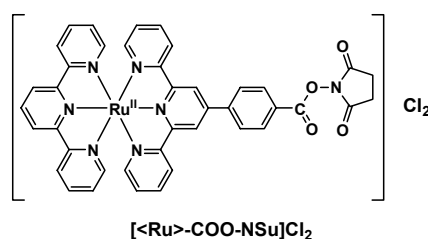
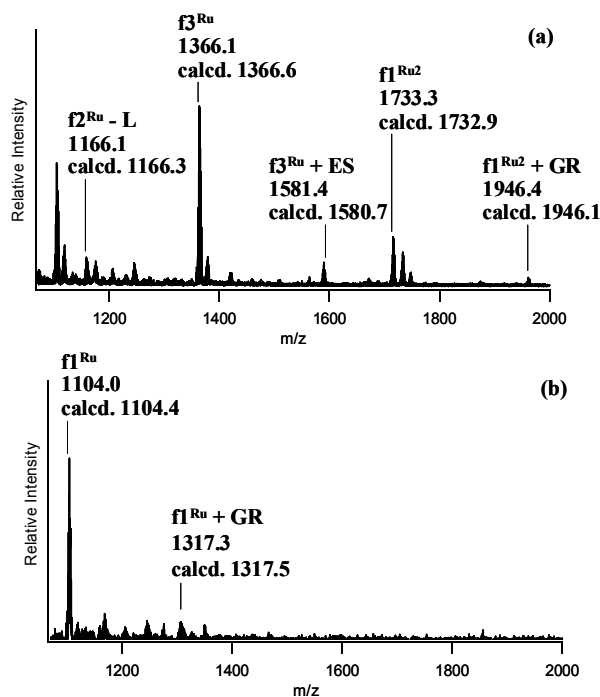


Chart 1.

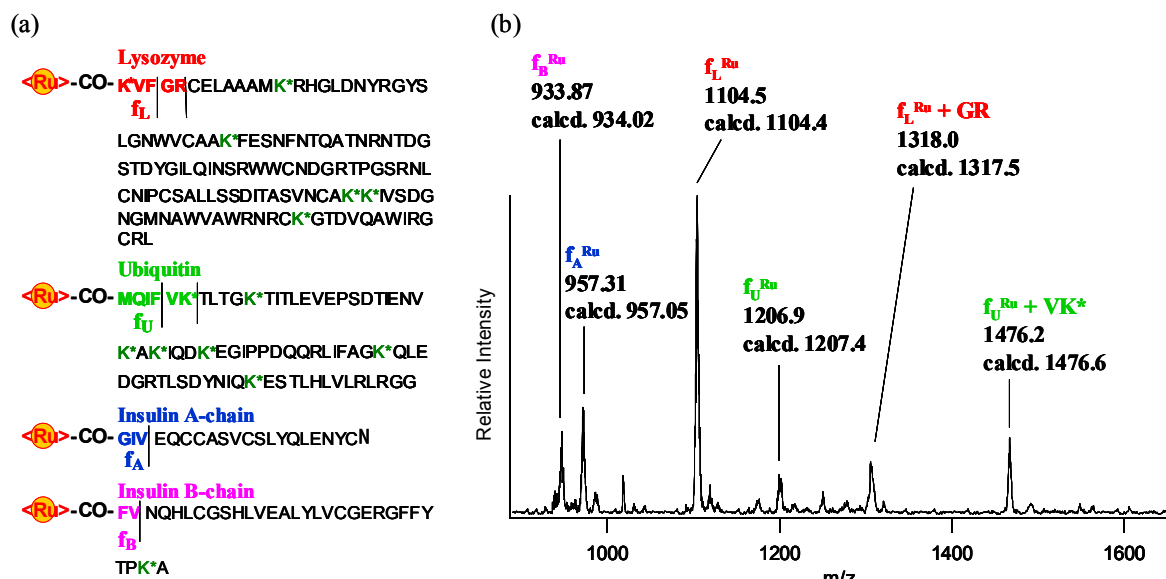
KVF<sub>f1</sub> GRCEL AAAM KRHGL<sub>f2</sub> DNY RGY SI<sub>f3</sub> GNW VCAAKF<sub>f3</sub> ESNF NTQATNRNT  
 DGSTDY GIL QINSRW<sub>f4</sub> W CNDGRTPGSRNL CNIPCSAL<sub>f4</sub> SSDITASVNC<sub>f4</sub> AKK<sub>f4</sub>  
 IVSDGNGM<sub>f5</sub> NAW VAW RNRCKGTDVQAW<sub>f5</sub> IRGRL



**Figure 1.** MALDI-TOF-MS spectra of <Ru>-CO-labeled fragment ions obtained by the chymotryptic digestion of lysozyme (a) without and (b) with guanidination.

Lys 側鎖が無保護のリゾチームを<Ru>-CO 標識すると、Figure 1a のように N 端および Lys 残基を含む<Ru>-CO 標識ペプチドが得られた。一方、Lys 側鎖を保護したものは N 端ペプチドのみが得られ、スペクトルが簡単になった(Figure 1b)。この方法をユビキチン、インシュリン、リゾチームからなるタンパク質混合物に応用することで系中の全ての N 端フラグメントのみを選択的に検出でき、それらの N 端アミノ酸配列を区別して決定できた(Figure 2)。

*Thermus thermophilus* HB8 由来の複合タンパク質を 2D-Native-PAGE で展開し、得られたスポットを 2D-SDS-PAGE で再分離した。得られたタンパク質成分に対し N 端選択標識することで、複合体を構成する各々のタンパク質成分の解析を行った。



**Figure 2.** (a) Amino acid sequences of N-terminal <Ru>-CO-labeled lysozyme, ubiquitin, and insulin A- and B-chain. (b) MALDI-TOF-MS spectrum of <Ru>-CO-labeled fragment ions obtained by chymotryptic digestion of the protein mixture. K\* in the amino acid sequences represents a homoarginine residue.

## Reference

- (1) T. Okamura *et al.*, Chem. Lett., **2005**, 34, 332-333.