

ルテニウム錯体型標識試薬によるタンパク質の
選択的 C 端標識と C 端アミノ酸配列決定

Selective C-terminal labeling of protein and determination of C-terminal amino acid
sequences using ruthenium(II) complex

大門 武^{1,2}, 伊藤彰厚¹, 岡村高明¹, 山本 仁^{1,2,3}

Takeshi Daimon^{1,2}, Akihiro Ito¹, Taka-aki Okamura¹, Hitoshi Yamamoto^{1,2,3}

(¹ 阪大院理, ² 理研播磨, ³ 阪大安管)

(¹Grad. Sch. of Sci., Osaka Univ., ²Riken Harima Inst., ³Dept for the Administration of Safety and Hygiene, Osaka Univ.)

e-mail: daimon@chem.sci.osaka-u.ac.jp

現在、タンパク質の配列解析法として質量分析(MS)を用いた解析が行われており、より感度の高い方法として当研究室では、ルテニウム(II)錯体骨格を持つタンパク質 N 端標識試薬を開発し、高感度 N 端配列解析法を確立している¹⁾。しかしこの方法では N 端が修飾されている場合解析ができないため同様の骨格を持つルテニウム錯体型タンパク質 C 端標識試薬(Chart 1)を新規に合成した。まず、水溶性カルボジイミド(WSCD)を用いてこの試薬で側鎖カルボン酸を持たない 5 残基程度のペプチドに対する標識を行った。その結果、試薬での標識が確認され、標識物を MS/MS 測定することで C 端配列を解析できることが確認できた。次に、報告されている²⁾オキサゾロンを経由し C 端を選択的に活性化する方法を用い、本試薬による C 端の選択的標識と配列解析を行った。

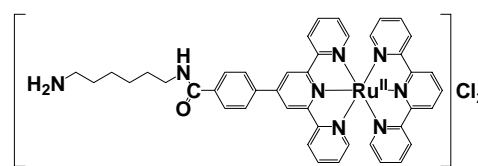


Chart 1. [NH₂-C₆-<Ru>]Cl₂

側鎖にカルボン酸を 1 つ持つ angiotensin II (DRVYIHPF) をオキサゾロン経路で活性化させ、C 端標識試薬と反応させ、MS 測定した結果、 $m/z = 1843.4$ に試薬で C 端と側鎖のどちらか一箇所が標識されたものとみられるピーク(calcd, $m/z = 1843.1$)が検出され、両方が標識されたもの(calcd, $m/z = 2614.0$)は確認されなかった。次に、 α -chymotrypsin で酵素消化して MS 測定を行い、得られた $m/z = 1281.2$ のピークに対して MS/MS 測定することで、主に y_n 系列のフラグメントが観測されその間隔から C 端側 4 残基の消化断片と確認できた(Figure 1)。側鎖が標識されたフラグメントは確認されなかった。以上の結果からこの方法によって C 端のみを標識できたと分かった。この方法を用いたタンパク質の C 端アミノ酸配列解析を行う。

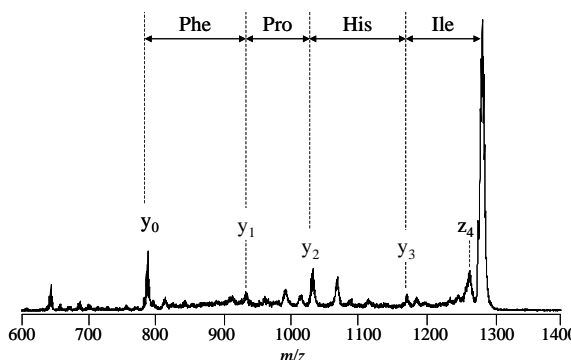


Figure 1. MALDI-LIFT spectrum of <Ru>-C₆-NH-labeled angiotensin II digested by α -chymotrypsin.

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

2) Nakazawa, T. et al. *Anal Chem.*, **2006**, 78, 7861-7869.