

タンパク質ArgC消化物からのC末端ペプチド選択的回収法 Selective recovery of C-terminal peptide from protein ArgC digest

○中島ちひろ・丸山浩樹・田中耕一 島津製作所 田中最先端研究所

○Chihiro Nakajima, Hiroki Kuyama, Koichi Tanaka Koichi Tanaka Laboratory of Advanced Science and Technology, Shimadzu Corporation

1. Introduction

翻訳後修飾の一つであるタンパク質C末端プロセッシングはその輸送、分解、高分子の複合体形成など、細胞機能を決定する重要な役割を果たしている。翻訳後修飾の重要性は広く認識されているにも関わらず、タンパク質のC末端構造を分析する標準的な方法は未だに確立されていない。現在、タンパク質の解析はマスマスペクトロメトリーによる方法が感度・スループットなどの点でもっとも有力であるため、マスマスペクトロメトリーを用いたタンパク質末端解析法が今までにいくつか報告されている。しかしながら、C末端解析法はN末端に比べるとはるかに少ないのが現状であり、より効率的で実用的なタンパク質C末端解析法の開発が求められている。

2. Experimental Section

今回、従来より知られている固相担体上に担持されたフェニルボロン酸とペプチド中のアルギニン側鎖グアニジノ基との反応¹⁾²⁾を応用してタンパク質C末端ペプチドを選択的に回収する方法を開発した³⁾。

本手法の概略を図1に示す。まずタンパク質のArgC消化を行い、消化溶液と2,3-butanedioneを反応させる。するとC末端ペプチド以外のペプチドに含まれるアルギニンのグアニジノ基は2,3-butanedioneと反応して *cis*-dihydroxyimidazoline環を形成する(図1a)。続いて、pH8以上の条件下で *cis*-dihydroxyimidazoline環は *m*-aminophenylboronic acid-agaroseとホウ酸エステル結合を形成(図1b)して固相担体上に吸着されるので、溶液中には(アルギニン残基を持たない)C末端ペプチドのみが単離(濃縮)されることとなる。このようにして回収されたC末端ペプチドは誘導体化されておらず、反応性に富むα-NH₂やα-COOHなどの官能基を持っており、それらを利用してmass tagを導入し配列解析を容易にすることが可能である。

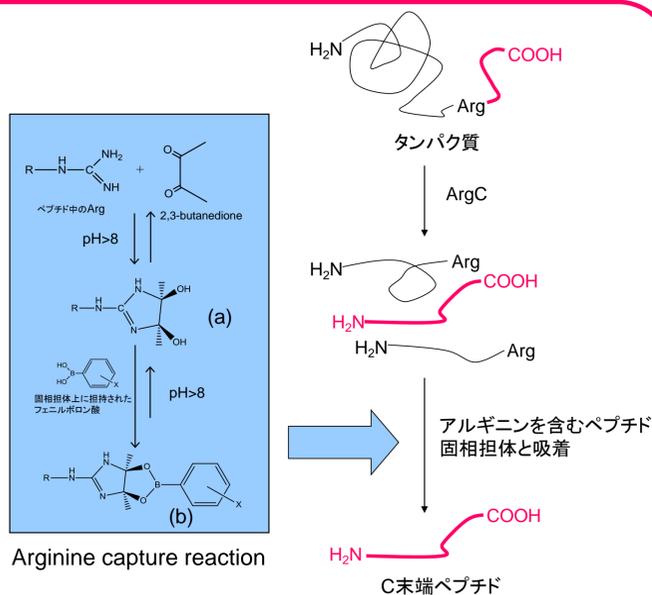


図1 Arginine capture reactionを用いたC末端ペプチド選択的回収法

References

- 1). A. Leitner, W. Lindner, *J. Mass Spectrom.*, **38**, 891-899 (2003).
- 2). A. Foettinger, A. Leitner, W. Lindner, *J. Chromatogr., A*, **1079**, 187-196 (2005).
- 3). H. Kuyama, C. Nakajima, K. Tanaka, *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **22**, 7163-7168 (2012).

Acknowledgments

本研究は、日本学術振興会の最先端研究開発支援プログラムにより、助成を受けたものである。

3. Results and Discussion

・C末端ペプチド選択的回収法(図1)を用いて3種類のタンパク質(SODC_BOVIN, MYG_HORSE, LACB_BOVIN)のC末端ペプチドを単離した。

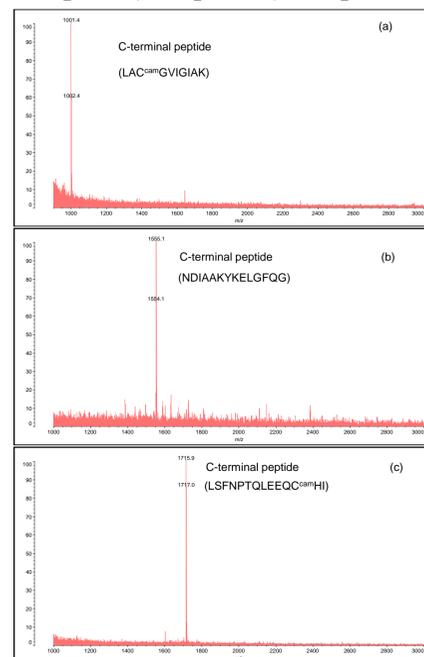


図2 C末端ペプチド単離後のMALDI-MSスペクトル (a) SODC_BOVIN, (b) MYG_HORSE, (c) LACB_BOVIN

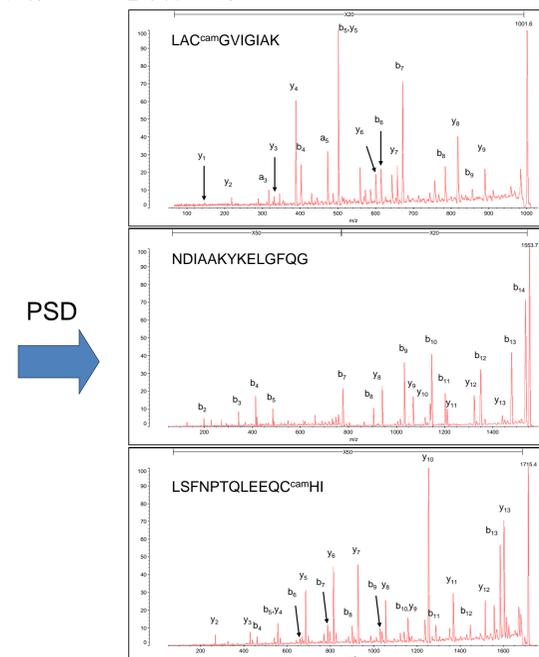


図3 単離したC末端ペプチドのMALDI-PSDスペクトル (a) SODC_BOVIN, (b) MYG_HORSE, (c) LACB_BOVIN

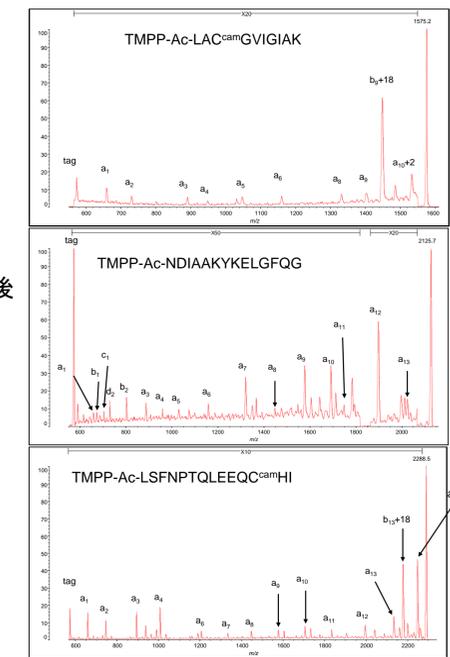
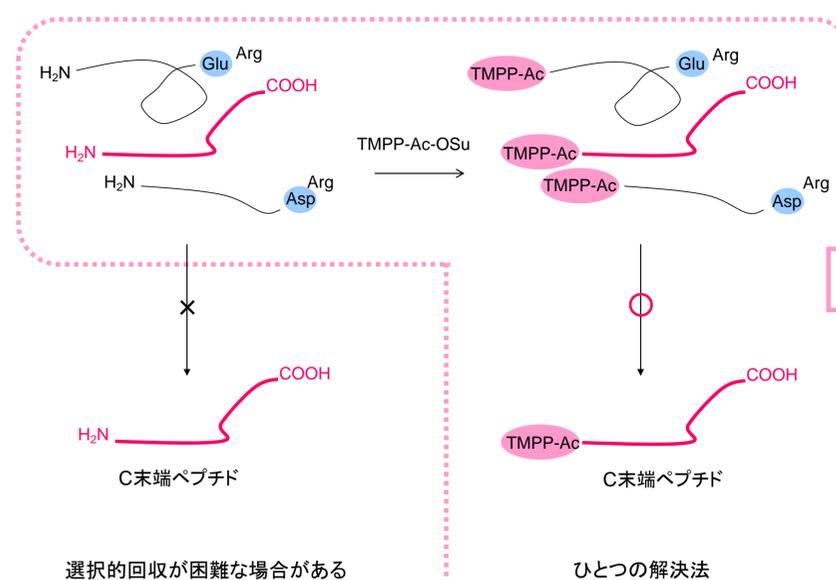


図4 TMPP化したC末端ペプチドのMALDI-PSDスペクトル (a) SODC_BOVIN, (b) MYG_HORSE, (c) LACB_BOVIN



選択的回収が困難な場合がある

ひとつの解決法

C末端Arg付近にAspやGluが存在した場合、その電荷が固定化されたフェニルボロン酸の負電荷と反発するため、capture reactionが起こりにくくなる。従って、C末端ペプチドのみを回収することは困難である。

それぞれのペプチド断片を正電荷をもつTMPP-Ac-OSuで予め誘導体化しておくこと、AspおよびGluの負電荷が中和され、電荷の反発が抑えられるためフェニルボロン酸と反応し、目的物以外のペプチドが捕捉され、C末端ペプチドの濃縮が可能となる。

図5 C末端ペプチド選択的回収法の問題とその解決法

・タンパク質4種類(PYGM_RABIT, ACY1_PIG, CAH2_BOVIN, ALBU_PIG)について図5のように消化後TMPP-Ac-OSuで誘導体化してからArginine capture reaction(図1)を行った。

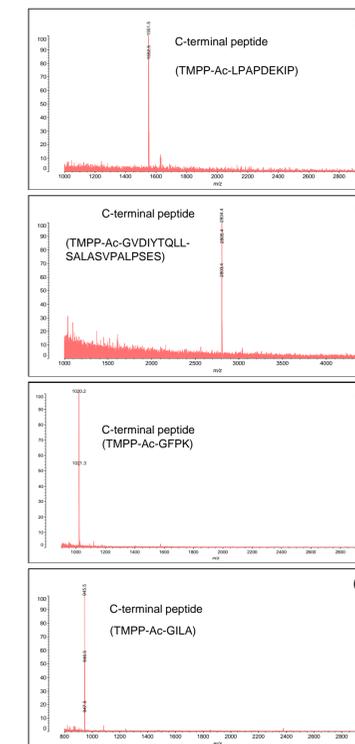


図6 TMPP化してから単離したC末端ペプチドのMALDI-MSスペクトル (a) PYGM_RABIT, (b) ACY1_PIG, (c) CAH2_BOVIN, (d) ALBU_PIG

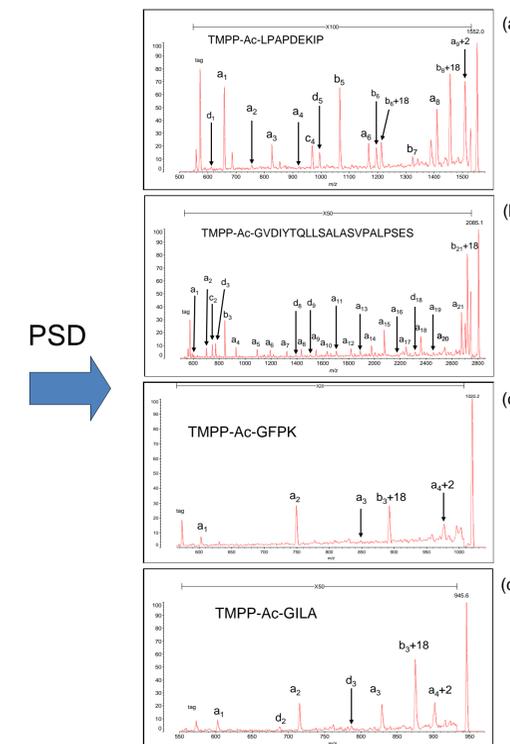


図7 TMPP化してから単離したC末端ペプチドのMALDI-PSDスペクトル (a) PYGM_RABIT, (b) ACY1_PIG, (c) CAH2_BOVIN, (d) ALBU_PIG