HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	エドマン分解とガスクロマトグラフィーによるペプチドのアミノ酸配列分析
Author(s)	吉田, 雅彦; 米田, 勤
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 30(1), 92-99
Issue Date	1979-02
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23676
Type	bulletin (article)
File Information	30(1)_P92-99.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大水産彙報
30(1), 92–99. 1979.

エドマン分解とガスクロマトグラフィーによるペプチドのアミノ酸配列分析

吉田雅彦*・米田　勤*

Amino Acid Sequence Analysis of Peptides by Edman Degradation and Gas-Liquid Chromatography

Norihiko YOSHIDA* and Tsutomu YONEDA*

Abstract

One of the methods of sequence analysis of peptides was presented. A gas-liquid chromatography (GLC) was applied to the analysis of amino acid composition of peptides after the Edman degradation. As for the peptides, bovine oxidized insulin A chain (heneicosa peptide) and angiotensin III (hepta peptide) were used. By that method the sequences of four residues of amino acid from N-terminus of insulin A chain and all residues of angiotensin III were determined. In the case of angiotensin III only 0.58 mg was needed for complete analysis.

The results showed the usefulness of the application of amino acid analysis by GLC to Edman degradation sequencing. By this technique the sequence analysis of longer peptides such as insulin A chain were also possible. Especially for small peptides this method is fast and more suitable compared to the general dansylation method.

緒　　言

ペプチドのアミノ末端 (N 末端) 部分のアミノ酸分析法には，Sanger[1] によって創案された 2,4 ジニトロフエニール (DNP) 法，Edman によって創案されたフェニールイソチオシアネート (PTC) 法—すなわちエドマン分解で知られる—の化学的方法と，ロイシンアミノペプチダーゼを用いる酵素的方法[2)-4)] がある。DNP 法はインシュリンの一次構造決定に用いられ，N 末端アミノ酸の同定と部分加水分解とを組み合せることによりアミノ酸配列を決定する方法である。しかし DNP 化は N 末端の α-アミノ基，イミノ基ばかりでなく内部のリジンの ε-アミノ基，チロシンの水酸基，ヒスチジンのイミダゾール基およびシステインのスルフヒドリル基も DNP 化され，また得られる DNP-アミノ酸は光分解を起し易いなどの欠点がある。一方ロイシンアミノペプチダーゼを用いる酵素的方法は，酵素によって遊離するアミノ酸を定量すればよい。しかし酵素の反応速度は N 末端アミノ酸ばかりでなく，次位のアミノ酸によっても影響を受け[5)]，その結果の解析は複雑ではあるが，一つの方法として確立している。

現在，ペプチドの N 末端からアミノ酸配列を決定する方法としてはエドマン分解が多く用いられている。エドマン分解の原理は図 1. に示したごとく，第一段階では微アルカリ性溶液 (pH 8～9) 中でフェニールイソチオシアネート (PTC) がペプチドの末端アミノ基と反応して PTC-ペプチドを作

* 北海道大学水産学部水産高分子化学講座
(*Laboratory of Polymer Chemistry of Marine Products, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

る。第二段階でこれを酸性溶液に入れると，脱離と環化がほとんど同時に進行し，N 末端アミノ酸が PTH-アミノ酸として遊離し，第二番目のアミノ酸を N 末端とするペプチドが残る。この操作を繰り返すことにより N 末端部分のアミノ酸を順次脱離することができる[6]。

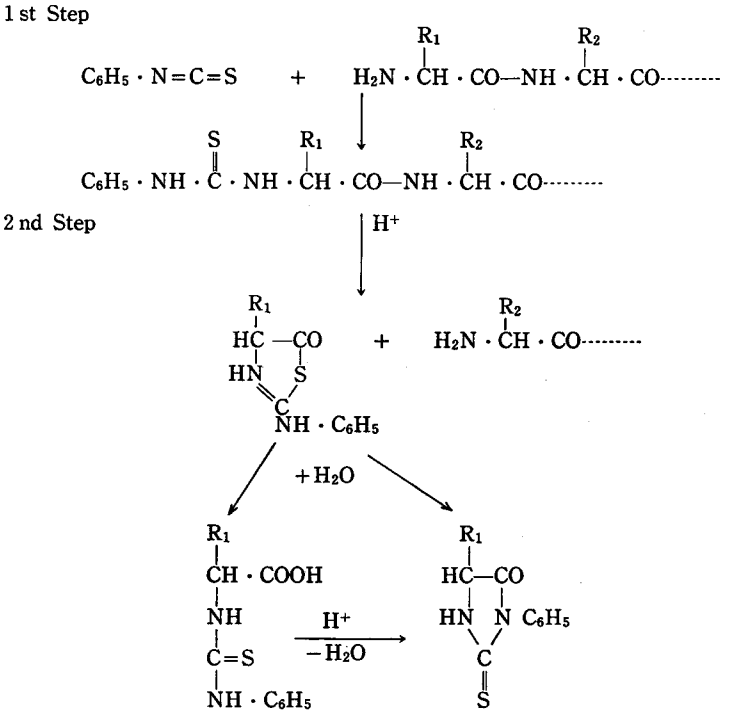


Fig. 1. Chemical reaction of the Edman degradation.

N 末端アミノ酸を決定するには，DNP 法あるいはダンシル (DNS) 法を用いない方法として，1回のエドマン分解後，遊離した PTH-アミノ酸を同定する方法，残ったペプチドのアミノ酸残基組成を求め，間接的に N 末端アミノ酸を分析する方法[7][8] がある。われわれは，ガスクロマトグラフィー (GLC) によるアミノ酸分析の高感度・短時間性・経済性等の利点をいかして，後者の方法を採用した。この方法でウシ酸化インシュリン A 鎖とアンジオテンシン III のアミノ酸配列分析を行ったので，その具体的方法とその成果を報告する。

実 験 方 法

試料・試薬

ウシ酸化インシュリン A 鎖は Boehringer Mannheim 製，アンジオテンシン III は蛋白質研究奨励会製，酢酸エチル，ピリジン，エタノール，フェニールイソチオシアネート (PTC)，トリフルオロ酢酸 (TFA)，n-ブタノール，ジクロルメタン，無水トリフルオロ酢酸 (TFAA) は半井化学薬品 K.K. 製，定沸点塩酸 (5.7N) は和光純薬工業製のものをそれぞれ用いた。エドマン分解には，クロマトグラフ用試薬または特級試薬を用いた。

エドマン分解[9]

試料 (0.5mg について) を試験管 (10×110mm) にとり 100μl の 50% ピリジンで溶解し，これに 5μl の PTC を加え試験管に窒素ガスを 15 秒間吹き込み，空気を除去後パラフィルムで密閉してよく攪拌した。これを 45°C で 10 分ごとに攪拌しながら 1 時間反応後，デシケーター中で減圧乾固した。次に残存しているピリジン・PTC 除去のため 100μl のエタノールを加えて溶解し，同様にしてデシケーター中で除去した。この操作を再度繰り返した。これに 100μl の TFA を加えて 15 秒間窒素ガスをゆっくりと吹き込み，パラフイルムで密閉して 45°C で 20 分間反応させた。反応終了後窒素ガスを吹きつけて乾固し，さらにデシケーター中で減圧下 15 分間乾燥した。次に 150μl の蒸留水と 500μl の酢酸エチルを加え，超音波処理を 10 秒間行いよく攪拌した後，遠心分離 (2000 rpm, 5 min) して二層に分け，有機層を取り除き再び 500μl の酢酸エチルを加えて同様の操作を行い，有機層を除去した。この操作をもう一度行って完全に PTH-アミノ酸を除いた後，水層の一部分を取って加水分解に用い，残りはデシケーター中で減圧下乾固させて，次のエドマン分解に供した。

アミノ酸分析

ペプチドの加水分解は，内部標準 (I.S., ノルロイシン) 0.1μmole を含む定沸点塩酸 (5.7N) で 110°C·20 時間分解した。アミノ酸は前報[10] と同様に N-trifuluoroacetyl n-butyl ester として，0.75% EGSS-X·0.25% DEGS と 1.5% OV-17 の 2 本のカラムで分析した。

実 験 結 果

酸化インシュリンA鎖のエドマン分解

酸化インシュリンA鎖 1.1mg を用いて，連続 5 回エドマン分解を行った結果を表 1 に示した。エドマン分解 4 回目 (E_4) までは順調に反応が進行し，N 末端から 4 番目までのアミノ酸配列は，H-Gly-Ile-Val-Glx- と分析できた。しかし 5 回目のエドマン分解は進まず，5 番目以降のアミノ酸配列を決定することはできなかった。分析した N 末端から 4 残基のアミノ酸配列は，既知のウシインシュリンA鎖のアミノ酸配列[11] と一致した。

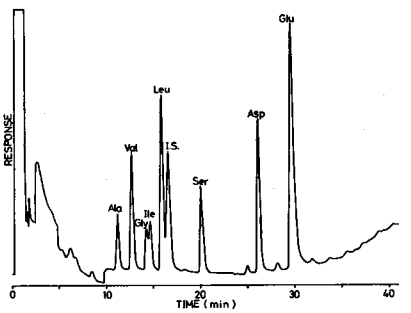


Fig. 2. Chromatogram of oxidized insulin A chain hydrolysate on EGSS-X·DEGS column (4 mm I.D. × 1 m).
Program temperature, 60–210°C (4°C/min).

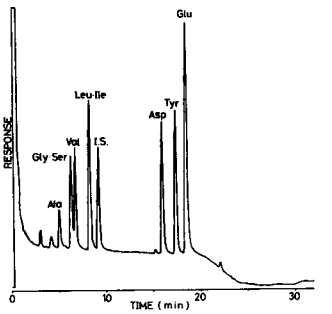


Fig. 3. Chromatogram of oxidized insulin A chain hydrolysate on OV-17 column (4 mm I.D. ×1.5 m).
Program temperature, 80–210°C (6°C/min).

Table 1. *Amino acid composition of the Edman degradation of oxidized insulin A chain.*

Amino acid	Edman degradation step					
	E_0	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5
Ala	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Val	1.68	1.49	1.57	1.17	1.18	1.18
Gly	0.80	0.19	0.34	0.21		
Ile	0.71	0.60	0.13	0.09		
Leu	1.80	1.61	1.62	1.83	2.23	2.35
Ser	1.67	1.56	1.97	2.16	2.25	1.42
Asp	1.75	1.71	1.76	1.91	2.27	1.16
Glu	3.55	3.57	3.13	3.46	2.50	1.52
Tyr	2.44	1.39	1.76	2.22	2.34	0.97

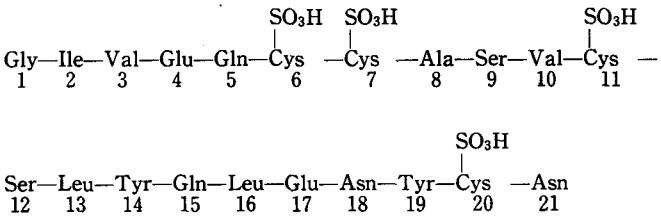


Fig. 4. Amino acid sequence of bovine oxidized insulin A chain[11].

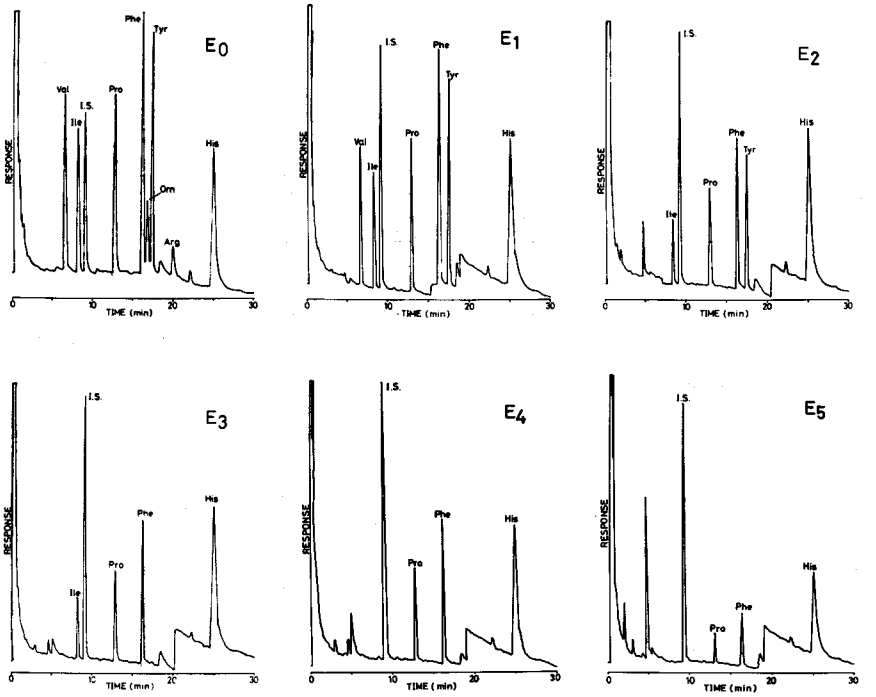
アンジオテンシン III のエドマン分解

アンジオテンシン III 0.58 mg を用いたエドマン分解の各段階のペプチドを GLC で分析した時のクロマトグラムを図5に示した。エドマン分解の各段階において，順次 N 末端から アミノ酸が切り離されていることが，各段階のクロマトグラム（図5）のピークの消失からわかる。各クロマトグラムからの Relative Molar Response (RMR) を求め，フェニールアラニンを1残基として換算した時の各アミノ酸の残基数を表2に示した。これらの結果から分析したアミノ酸配列は，H-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH であり，これは既知のアンジオテンシン III のアミノ酸配列[12] と一致した。

考　　察

タンパク質の一次構造を決定する一般的な方法は，タンパク質分子を適当な大きさのペプチドにまで断片化 (fragmentation) し，それぞれのペプチド断片のアミノ酸配列を決定し[13][14]，そのあともとのタンパク質分子中でのそれらペプチド断片の配列順序がわかれば，このタンパク質の全一次構造が決定できる。

化学的に一次構造を決定するためには2つの要素が必要である。その1つは末端アミノ酸の同定であり，他の1つは末端から1つづつアミノ酸を切り離す操作である。したがって末端から順次アミノ酸をはずしながら新たに現れる末端アミノ酸を同定してゆけばアミノ酸配列が決定できる。1945年 Edman によって創案されたエドマン分解は，N 末端から1つづつ段階的にアミノ酸をはずしてゆくことができる方法[15] であり，分解により産生する末端アミノ酸の PTH-誘導体の同定を行えば，一次構造決定のための2つの要素を満足することになる。PTH-アミノ酸の同定には，この誘導体をアルカリ分解してもとのアミノ酸にもどす方法[16-19] や，誘導体を直接ペーパークロマトグラフィー[20]・薄



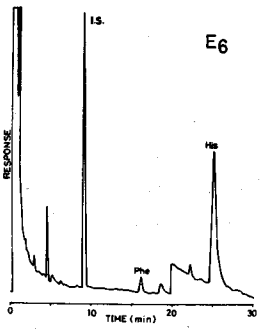


Fig. 5. Subtractive Edman degradation of angiotensin III. Chromatograms show the peaks of I.S. (0.1 μ mole of norleucine), carrier (0.4 μ mole of histidine) and peptide hydrolysates after each Edman degradation (E_0-E_6).

Table 2. *Amino acid composition of the Edman degradation of angiotensin III.*

Amino acid	Edman degradation step						
	E_0	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6
Val	1.01	0.91					
Ile	0.89	0.81	0.72	0.66			
Pro	0.98	0.95	0.96	0.84	0.93	0.84	
Phe	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Tyr	0.96	0.91	0.94				
Arg	0.98						
His	0.99	1.15	0.94	0.69	1.15		

層クロマトグラフィー[21]・GLC[22][23]・液体クロマトグラフィー[24]で分析する方法があり，近年高速化された液体クロマトグラフィーが多く用いられるようになってきている。

また近年のペプチド・タンパク質の精製方法の進歩により，従来不可能であったホルモンなど，生理活性を有する極微量のペプチドを単離・精製することが可能となり，その構造解析のためにアミノ酸配列分析の微量化が必要となってきた。1963年 Gray ら[25]が DNP 法とほぼ同じで，しかもより微量のアミノ酸を分析できるダンシルクロリド (DNS-Cl, ジメチルアミノナフタレンスルホニルクロリド) を用いたダンシル法と上記エドマン分解とを組み合せることにより，微量試料 (2×10^{-8} モル) のアミノ酸配列を N 末端より6番目まで決定した。このダンシル-エドマン法は現在多く用いられている優れた方法であるが，なお DNS-アミノ酸の安定性などに若干の問題を残している。

われわれが用いた方法は，いわゆるエドマン消去法[7][9]であり，エドマン分解によってはずした N 末端アミノ酸を，残ったペプチドのアミノ酸残基を定量することにより決定する方法であり，ダンシル-エドマン法と比較しても，ダンシル化の過程を必要しない点，操作が簡単である。今回われわれが用いたエドマン分解は，木村[9]の方法を，PTH-アミノ酸を酢酸エチルで抽出するなど，多少モディファイして行った。この方法では1回のエドマン分解が約3時間で終了する。

インシュリンA鎖のエドマン分解は7回試みたが，いづれも4段階までは成功するものの，それ以上は進まなかった。知られているウシインシュリンA鎖(酸化型)の一次構造[11]は図4で示したように，H-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-$CySO_3H$-・・・であり，末端から5番目のグルタミンのところで進行しなくなった。この理由として図6に示すように，グルタミン (またはグルタミン酸) が N 末端に出てくると，容易に閉環し，ピロリドンカルボキシペプチドとなり，エドマン分解がそれ以上進行しないことが考えられる[9][26]。

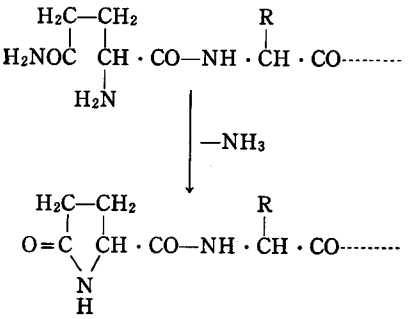


Fig. 6. Occurrence of pyroglutamic peptide at amino terminal of peptide[9].

これとは別に，エドマン分解が進行しない理由の1つとして考えられるものに，図7に示した現象がある。つまり，ペプチド中にアスパラギン酸 (あるいはアスパラギン) 残基が存在すると，そのペプチド結合が α-カルボキシル基から，β-カルボキシル基に転位することがある。この転位は Asp-Gly の配列で起りやすく，β-型の結合をもつアスパラギン酸残基が N 末端に現れた時，エドマン分解を行うと α-アミノ基は PTC 化されるが，TFA 処理しても β 型結合のためペプチド結合が切断されず，エドマン分解は進まない[9]。これは α 位のカルボキシル基が立体障害を起して，ペプチド結合切断を妨害するためと考えられる。このカルボキシル基による立体障害は，グルタチオン (γ-Glu-Cys-

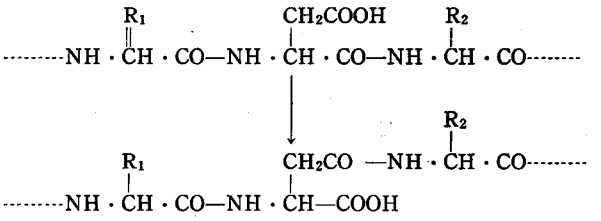


Fig. 7. α, β-rearrangement on asparatic acid residue in peptide[9][26].

Gly) のN末端部位にも見られ，実際にグルタチオンのエドマン分解も試みたが，全く進行しなかった。

アンジオテンシン III の実験結果は，理論値とよく一致した。このペプチド選択の理由は，われわれの設定した条件下でエドマン分解が塩基性アミノ酸のアルギニン・ヒスチジンや，イミノ基をもつプロリン残基に対して十分進行するかどうかの確認のためであった。図5や表2に見られるように，各残基は各ステップで確実に切り離されて消失しており，この方法によってアンジオテンシン III のペプチドのアミノ酸配列の決定が十分行えることを示している。

実験結果の示すとおり，エドマン分解と GLC によるアミノ酸定量を組み合わせたアミノ酸配列分析は，オリゴペプチドについては確実かつ簡単で極めて有効な方法であり，またインシュリンA鎖のように，およそ20残基程度までの比較的長いペプチドのアミノ酸配列分析も行うことができる。

最後に，本報告の御校閲の労を賜った，北海道大学水産学部辻野勇助教授に深謝いたします。

文　　献

1) Sanger, F. (1945). The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* **39**, 507–515.
2) Hill, R.L. and Smith, E.L. (1958). Hydrolysis of mercuripapain by leucine amino peptidase without loss of enzymic activity. *J. Biol. Chem.* **231**, 117–134.
3) Hill, R.L. and Smith, E.L. (1960). Isolation and characterization of an enzymically active fragment of papain. *Ibid.* **235**, 2332–2339.
4) 飛田　享 (1968). ロイシンアミノペプチダーゼによる蛋白質およびペプチドのN末端構造分析. 52–66 p. 蛋白質実験法 (I). 106 p. 共立出版，東京.
5) Spackman, D.H., Smith, E.L. and Brown, D.M. (1955). Leucine aminopeptidase IV. Isolation and properties of the enzyme from swine kidney. *J. Biol. Chem.* **212**, 255–269.
6) Sajó, M. (1974). End-group analysis and stepwise degradation of proteins and peptides. p 238–269. In Devenyi, T. and Gergely, M.D. (ed.), Amino acids, peptides and proteins. 343 p. Eleevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-London-New York.
7) Dopheide, T.A.A., Moore, S. and Stein, W.H. (1967). The carboxyl-terminal sequence of porcine pepsin. *J. Biol. Chem.* **242**, 1833–1837.
8) Vanaman, T.C., Wakil, S.J. and Hill, R.L. (1968). The complete amino acid sequence of the acyl carrier protein of *Escherichia coli*. *Ibid.* **243**, 6420–6431.
9) 木村　滋 (1974). ダンシル-Edman 法による微量ペプチドの一次構造決定法. 分析化学 **23**, 563–575.
10) 吉田雅彦・米田　勤・石原義雄 (1977). タンパク質構成アミノ酸のガスクロマトグラフィー. 北大水産彙報 **28**(3), 165–173.
11) Sanger F. and Thompson, E.O.P. (1953). The amino acid sequence in the glycyl chain of insulin. *Biochem. J.* **53**, 366–374.
12) Dayhoff, M.O. (1972). Atlas of protein sequence and structure. **5**, 418p. National Biomedicine Research Foundation, Washington.
13) 成田耕造 (1968). タンパク質の構造. 194 p. 東京化学同人，東京.
14) 蛋白質核酸酵素編集部編 (1968). 蛋白質実験法 Vol. **1**, 106 p. Vol. 2, 141 p. 共立出版. 東京.
15) 岩永貞昭・鮫島勇次 (1970). PTC 法による蛋白質およびペプチドのアミノ酸配列分析. 蛋白質，核酸，酵素 **15**, 1037–1054.
16) Fraenkel-Conrat, H. (1945). A technique for stepwise degradation of proteins from the amino end. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3606–3607.
17) Fraenkel-Conrat, H., Harris, J.I. and Levy, A.L. (1955). Recent developments in techniques for terminal and sequence studies in peptides and proteins. p. 359–425.

In Glick, D. (ed.), Methods of biochemical analysis. 2, 470 p. Inter Science Publishers, Inc., New York.

18) Fraenkel-Conrat, H. and Harris, J.I. (1954). A general micromethod for the stepwise degradation of peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 6058–6062.

19) Fraenkel-Conrat, H. and Singer, B. (1954). The peptide chains of Tabacco Mosaic virus. *Ibid.* **76**, 180–183.

20) Sjöquist, J. (1960). Determination of amino acids as phenylthiohydantoin derivatives. II. Quantitative determination of 3-phenyl 2-thiohydantoins from paper chromatograms. *Biochem. Biophy. Acta* **41**, 20–30.

21) Kulbe, K.D. (1974). Micropolyamide thin-layer chromatography of phenyl- thiohydantoin amino acids at subnanomolar level. A rapid microtechnique for simultaneous multisample identification after automated Edman degradation. *Anal. Biochem.* **59**, 564–573.

22) Pisano, J.J., Van den Heuvel, W.J.A. and Horming, H.C. (1962). Gas chromatography of phenylthiohydantoin and dinitrophenyl derivatives of amino acids. *Biochem. Biophy. Res. Comm.* **7**, 82–86.

23) Eerd, J.P. (1976). Differentiation of the phenylthiohydantoins of leucine and isoleucine by gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem,* **71**, 612–614.

24) Zimmerman, C.L., Appella, E. and Pisano, J.J. (1977). Rapid analysis of amino acid phenylthiohydantoin by high-performance liquid chromatography. *Ibid.* **77**, 569–573.

25) Gray, W.R. and Hartley, B.S. (1963). The structure of a chymotryptic peptidase from pseudomonas cytochrome C–551. *Biochem. J.* **89**, 379–380.

26) 大野　光・関　得一郎 (1957). 蛋白質化学 (水島・赤堀編) 4, 209 p. 共立出版, 東京.

27) 中嶋暉躬 (1976). 基本操作法　物質の取扱い　5) ペプチド. 代謝 **13**, 77–83.