



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; YOSHIDA, Norihiko; 米田, 勤 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 30(1), 92-99
Issue Date	1979-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23676
Type	departmental bulletin paper
File Information	30(1)_P92-99.pdf



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, Sanger¹⁾ によって創案された 2,4 ジニトロフェニール (DNP) 法, Edman によって創案されたフェニ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, ロイシニアミノペプチダーゼを用いる酵素的な方法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わ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。一方ロイシニアミノペプチダーゼを用いる酵素的な方法は, 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。

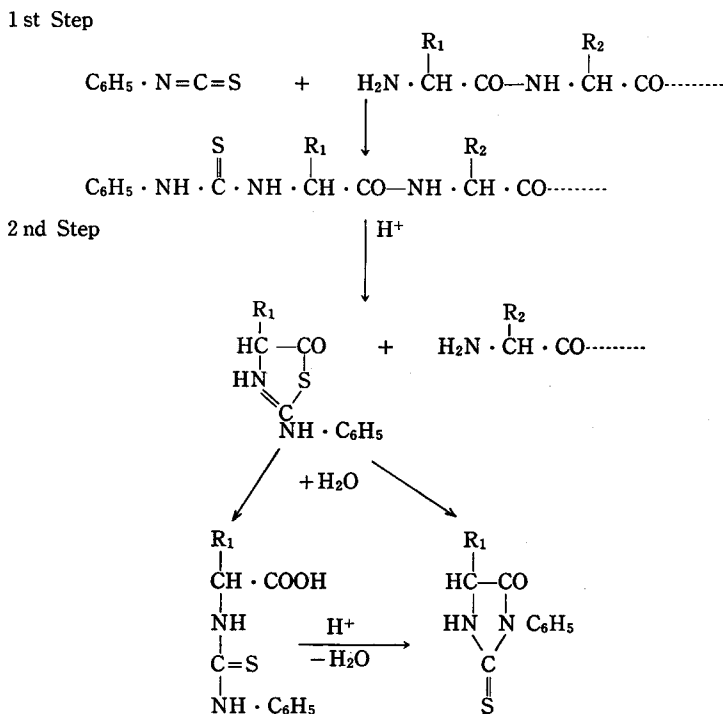


Fig. 1. Chemical reaction of the Edman degradation.

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、ジクロロメタン、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 (0.5 mg について) を試験管 (10×110 mm) にとり 100 μ l の 50% ピリジンで溶解し、これに 5 μ l 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 100 μ l 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 100 μ l の TFA を加えて 15 秒間窒素ガスをゆっくりと吹き込み、パラフィルムで密閉して 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 150 μ l の蒸留水と 500 μ l 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 500 μ l 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) 0.1 μ mole 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-trifluoroacetyl 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 1.1 mg 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 (E₄) 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。

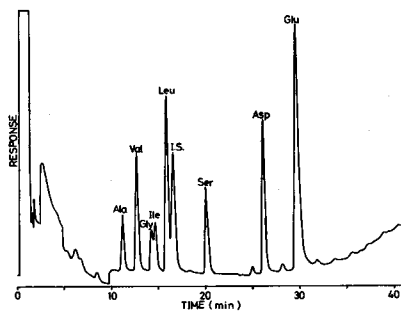


Fig. 2. Chromatogram of oxidized insulin A chain hydrolysate on EGSS-X·DEGS column (4 mm I.D. × 1 m). Program temperature, 60–210°C (4°C/min).

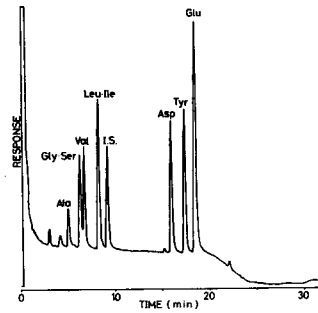


Fig. 3. Chromatogram of oxidized insulin A chain hydrolysate on OV-17 column (4 mm I.D. × 1.5 m). Program temperature, 80–210°C (6°C/min).

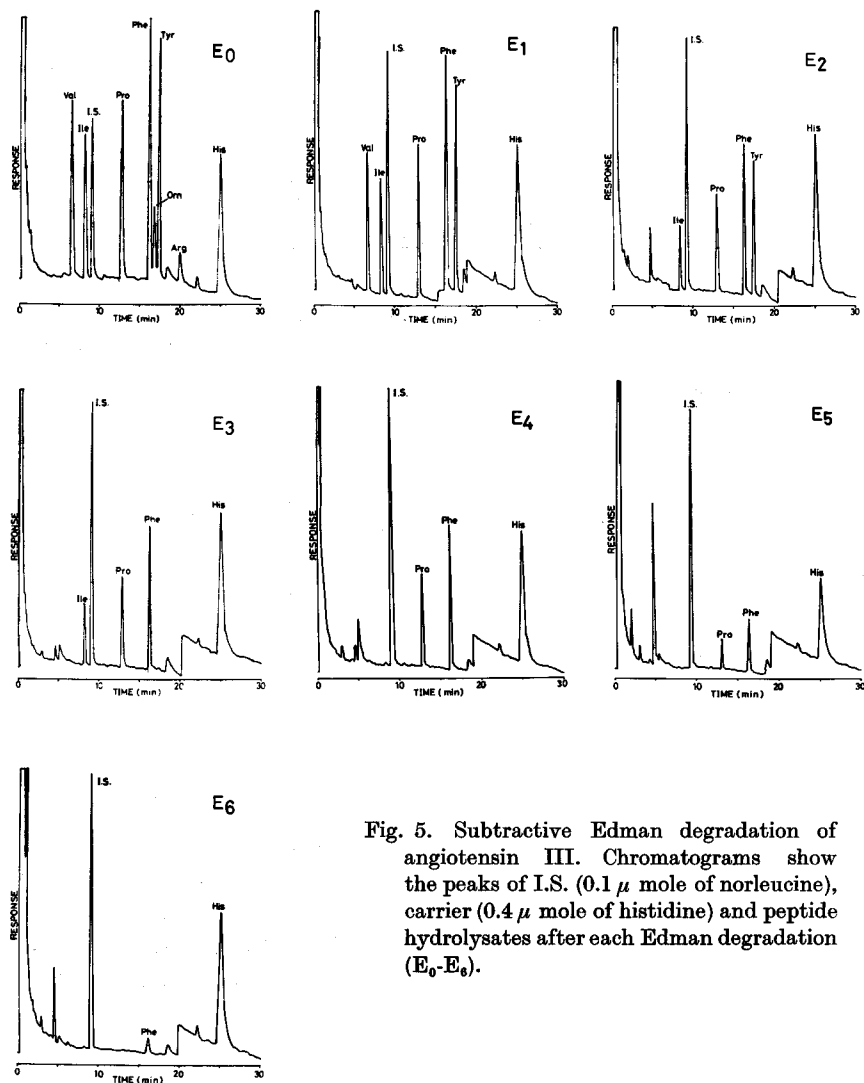


Fig. 5. Subtractive Edman degradation of angiotensin III. Chromatograms show the peaks of I.S. (0.1μ mole of norleucine), carrier (0.4μ mole of histidine) and peptide hydrolysates after each Edman degradation (E_0 - E_6).

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⁾・GLC²²⁾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わせることにより、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²⁶⁾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²⁷⁾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、いずれも 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-CySO₃H... 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²⁸⁾。

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²⁹⁾。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-

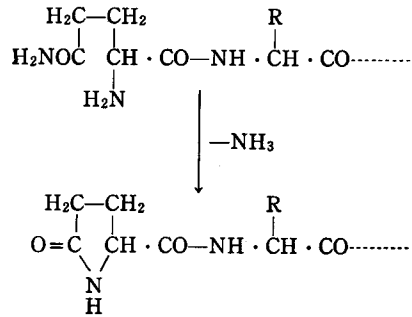


Fig. 6. Occurrence of pyroglutamic peptide at amino terminal of peptide³¹⁾.

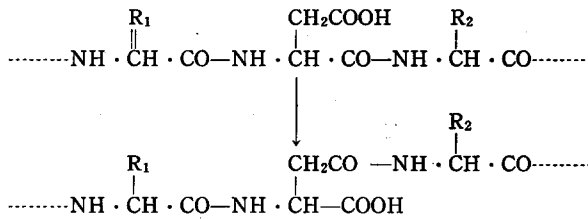


Fig. 7. α , β -rearrangement on asparatic acid residue in peptide^{32,33)}.

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). ロイシニ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. Elsevier 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). タンシル-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 glyceryl 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 Tobacco Mosaic virus. *Ibid.* **76**, 180-183.
 - 20) Sjöquist, J. (1960). Determination of amino acids as phenylthiohydantoin derivatives. II. Quantitative determination of 3-phenyl 2-thiohydantoin from paper chromatograms. *Biochem. Biophys. Acta* **41**, 20-30.
 - 21) Kulbe, K.D. (1974). Micropolyamide thin-layer chromatography of phenylthiohydantoin 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. Biophys. Res. Comm.* **7**, 82-86.
 - 23) Eerd, J.P. (1976). Differentiation of the phenylthiohydantoin 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.