

異常血色素に関する研究 X : 異常血色素の 一次構造解析へのペプチドマイクロシーケンス法の応用

川崎医科大学 生化学(III)教室

山崎 壽子・井内 岩夫

(平成 4 年 9 月 30 日受理)

Studies on the Abnormal Hemoglobin X:
Application of Microsequencing of Peptide Amino Acid
to Substantiate the Abnormal Hemoglobin

Toshiko YAMASAKI and Iwao IUCHI

Department of Biochemistry

Kawasaki Medical School

Kurashiki, 701-01, Japan

(Received on September 30, 1992)

概 要

異常血色素の一次構造の確定にペプチドマイクロシーケンス法による解析を応用してみた。検出感度はアミノ酸組成分析法によるものとほぼ同等もしくはそれ以上であった。正常血色素の一次構造は既知なので、本法は 2~3 種のペプチド不純物を含むペプチド試料でもその配列を決定できた。またシーケンス反応に於いてアミノ酸の各段階における分解は事実上考慮する必要がなかった。これらのことよりこのペプチドマイクロシーケンス法は、今後の異常血色素の一次構造解析に非常に有用であると思われた。

Abstract

Peptide microsequencing was applied to determine the amino acid sequence of an aberrant polypeptide chain in hemoglobin variant. The sensitivity of this method was superior to that of traditional amino acid analysis. As the primary structure of control hemoglobin is known, the amino acid sequence of abnormal peptide can be established without difficulty by this method even when other peptides as contaminant are contained in the same sample. Any amino acid was not broken down significantly to lose the recovery during each step of sequence reaction. Therefore, it is worth recommending that this peptide microsequencing was suitable for the analysis of abnormal primary structure of hemoglobins.

はじめに

異常血色素の構造解析にペプチドのアミノ酸組成を調べる分析法はこれまで必須手段のひとつであり、最近では微量試料量でも分析が可能な程に進歩している (機器 PICO TAG

〈Waters社〉では数十ピコモル)。ところがペプチドのアミノ酸組成分析法では前処理に酸加水分解を行なうため、酸や熱に不安定なアミノ酸が分解し、測定不可能になったり他のアミノ酸に変換してしまうなど解析困難な場合もみうけられる。例えばトリプトファンは酸加水分解により完全に分解してしまい、アスパラギン、グルタミンはそれぞれ完全にアスパラギン酸、グルタミン酸に加水分解してしまうので、ひとつのペプチド中にこれらのうちの1種類のアミノ酸を2個以上含む場合のアミノ酸置換は、その同定が困難である。また、数種のペプチドが不純物として混ざっていると、その補正のために、結果の信頼性が失われる。

現在、エドマン分解法¹⁾を自動化したペプチドシーケンサー²⁾が市販されており、今回この装置を用いて異常ヘモグロビンのアミノ酸配列を決定し、その有用性を検討したので以下にその成績を報告する。

材料と方法

異常血色素：本法吟味の代表例として福山地区の患者血液のスクリーニング中に見いだした α 鎖異常ヘモグロビンの構造解析の成績を述べる。すなわちこのヘモグロビンの α 鎖を分離精製後トリプシンで消化し、逆相 HPLC にてペプチドに分け³⁾試料とした。次いでこの試料の HPLC パターンを正常コントロールと比較し、保持時間の異常と思われるペプチドを溶出し、凍結乾燥後、一定量の酸性溶媒に溶かし、その1/3量を試料としアミノ酸配列分析を行なった。

アミノ酸配列の決定法

装置 Applied Biosystems社 (ABI社) の 477 A型プロテインシーケンサー (気相中でのパルス液相法⁴⁾である) を用いた。

本装置の作動原理は気相法エドマン分解法を用いるが、一操作サイクルごとにペプチド (タンパク質) のN末端からアミノ酸を1残基切り離す (図1)。つづいて切り離された PTH-アミノ酸をオンライン PTHアナライザーにかける。

PTHアナライザー分析条件：カラム, PTH-C18 (2.1mm×220mm)；溶媒A, 5%テトラヒドロフラン-44.4mM 酢酸ナトリウム (pH4.1)；溶媒B, 0.5 μ M DMTU* -アセトニトリル；流速 0.2 ml/min；濃度勾配, 10% B/0→0.4min, 10→30% B/0.4→18min, 37% B/18→25min, 37→90% B/25→25.1min, 90% B/25.1→29min

*ジメチルフェニルチオ尿素

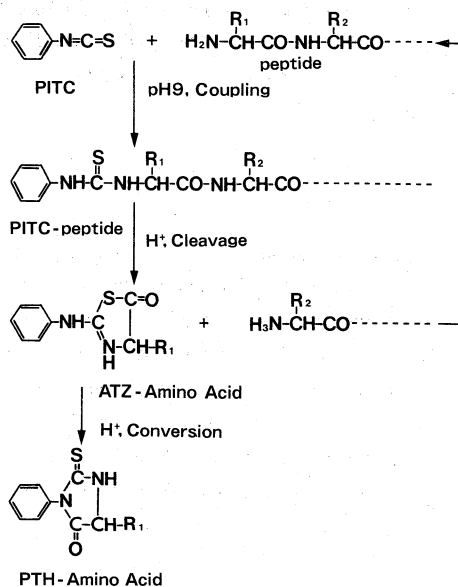


Fig. 1. Principle of Edman Degradation Method employed for Applied Biosystems 477A Protein Sequencer

結 果

患者血液のスクリーニング検査中に見いだされた α 鎖異常の試料より α 鎖を分離精製し、トリプシンで消化後 HPLC により検出した異常ペプチドについてシークエンシングを行なった。このペプチドは正常 Tp-9 より溶出時間が早く、しかも正常 Tp-9 のピークが消失していたことから $\alpha 62-90$ (Tp-9) のうちのいずれかのアミノ酸がより極性の大きいアミノ酸へと置換したものだということが予想された。試料の量が少なかったため (256pmol), HPLC による再クロマトは行わず、そのままシークエンサーにかけた。シークエンシングの結果より主ペプチドは N 末端より Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Thr-Asp-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Phe-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-Asp-Leu-His-Ala-His-Lys であることが確認され、結局本例は異常 α Tp-9 で、アミノ酸置換が $\alpha 68$ Asn \rightarrow Asp である Hb Ube-2⁵⁾であることを確認した(表 1)。この分析で Lys 以後の 30 残基目のアミノ酸は検出限界以下であり事実上認められなかった。またこのペプチドに正常 Tp-5 が混入していることが表 1 より読み取れた。

考 察

タンパク質一次構造解析には主にペプチドのアミノ酸組成分析法、アミノ酸配列決定法およびペプチド質量分析法などがある。このうち組成分析法ではニンヒドリン法⁶⁾、フルオレサミン法等が用いられてきたが、近年では微量分析法として PITC 法 (PICO TAG: Waters 社) が頻用されている。アミノ酸配列分析では N 末端配列決定法、なかでもエドマン解析法を用いた方法が常套手段となっている。一方 C 末端配列決定法にはヒドラジン分解法やカルボキシペプチダーゼ法⁷⁾などがあるが、近年ペンタフルオロプロピオン酸の蒸気を用いた方法⁸⁾も発表され、エドマン法に匹敵する方法として注目されている。

当研究室では従来一次構造解析にニンヒドリン法、エドマン法に立脚した PITC 法を用いてきた。PITC 法はコストが安い (235 円/ペプチド)、分析時間が短い (24 分/ペプチド)、微量試料 (ピコモル) も分析できるなどの利点がある反面、酸加水分解により分解されるアミノ酸の同定ができない場合もあつたり、数種のペプチドが混入していると事実上分析が不能に陥るなどの欠点もある。一方機器を用いた気相系配列決定法 (エドマン法) では、ABI 社の 477A 型を例にとると、アミノ酸の分解によるロスがなく、数種のペプチドが混入していても本例のごとくそれによる判定困難もなく分析が可能、微量試料 (ピコモル) で、再現性がよい分析が達成されるなどの利点があるが、他方コストがやや高く (670 円/アミノ酸残基) 分析時間もやや長い (45 分/アミノ酸残基) 欠点がある。例えばアミノ酸 30 残基のペプチドを試料にした場合、組成分析法では 235 円、24 分を要するのに対し、シークエンス法では約 19000 円 24 時間を要する。しかし微量試料の分析を行なう場合にはできるだけ操作は簡単な方が望ましく、エドマン法を用いたほうが有利な場合が多い。例えば HPLC 等で、隣接するペプチドとの分離の悪いペプチドを分離分取し組成分析を行なおうとする場合、再クロマトによるさらなる精製が必要である。一方マクロシーケンス法では、ヘモグロビンの一次構造は既知なので、再精製を行わなくて

Table 1. Amino Acid Sequence of Abnormal α Tp-9 carried out by Protein Sequencer (ABI Co. Ltd.)

Cycle	ALA	ARG	ASN	ASP	GLU	GLN	GLY	HIS	LEU	LYS	MET	PHE	PRO	SER	THR	TRP	TYR	VAL
1	13.5	1.5		1.3	4.6	6.0		19.3	7.8	<u>202.0</u>	26.3	1.1	4.5	11.1	9.8	0.5	<u>245.7</u>	
2	<u>256.2</u>	2.3	1.3	2.8	41.7	0.6	6.5		16.1		<u>12.4</u>	<u>252.4</u>	1.6	0.5	3.6	10.5	10.5	29.3
3	47.8	1.8		<u>130.5</u>	13.8		5.2		<u>290.8</u>		0.6	42.1	5.8	3.5	6.1	11.5	2.5	4.5
4	<u>201.0</u>	11.0	1.5	27.1			3.8	1.9	13.7	1.3		9.2	13.5	<u>71.2</u>	2.4	15.9	0.2	2.6
5	54.4	4.3	1.4	13.3		1.1	4.1	4.1	<u>205.0</u>	0.8	0.2	<u>172.9</u>	14.1	3.8	4.5	13.3	0.6	3.4
6	18.9	1.0	2.1	11.5		0.2	24.2	2.2	33.2	0.6		32.6	<u>147.5</u>	1.6	<u>128.4</u>	9.9		7.4
7	15.2	0.7	7.8	<u>94.1</u>		0.5		2.0	4.4	1.8		8.2	35.4	1.1	<u>82.3</u>	12.3	0.2	3.8
8	<u>189.7</u>	1.2	4.3	26.9			7.3	2.7	22.5	2.0	0.6	4.8	11.4		<u>76.0</u>	11.3	1.3	4.7
9	36.9	2.5	1.5	16.6		0.8	6.9	2.1	13.2	<u>67.8</u>		2.6	5.4	7.9	18.0	11.7	0.4	<u>168.2</u>
10	<u>165.9</u>	1.7	1.2	14.2		1.1	5.7	2.2	4.1	15.8	0.5	1.5	3.3	2.8	10.8	7.6	0.4	24.3
11	38.6	1.2	2.0	13.3		1.4	9.5	<u>37.8</u>	3.4	4.6	1.2	1.5	10.0	1.8	4.8	9.5	0.2	5.3
12	16.0	1.5	2.1	16.0		1.1	7.5	9.3	3.7	2.3	3.6	1.7	5.8	3.3	3.6	9.5	0.3	<u>150.5</u>
13	18.9	1.3	4.2	<u>70.7</u>		0.6	5.4	2.7	3.8	0.6	1.5	1.6	7.6	1.6	2.2	7.2	0.3	21.4
14	13.9	1.3	6.3	<u>88.8</u>		3.1	4.5	3.2	3.3	0.3	0.9	1.5	5.0	0.6	1.9	9.6	0.2	7.2
15	17.7	2.1	6.7	47.1		3.0	5.5	3.4	5.5	0.8	<u>119.4</u>	1.6	5.1	1.1	1.6	8.8	0.5	18.2
16	10.0	1.1	3.3	15.4		1.2	6.9	2.0	5.2	1.0	10.5	1.3	<u>95.5</u>	1.0	0.6	9.0	0.2	4.5
17	11.4	1.2	<u>84.8</u>	25.7		1.3	6.0	2.3	5.2	1.1	2.1	1.0	26.6	2.2	1.4	13.3	0.3	2.7
18	<u>108.6</u>	1.2	27.8	17.5		1.4	5.2	2.4	4.8	0.2	1.3	1.4	13.4	2.3	1.3	8.1	0.4	2.4
19	34.2	1.7	10.8	19.2		1.5	5.4	3.1	<u>104.5</u>	1.0	1.2	0.8	8.0	2.3	1.2	20.0	0.2	2.4
20	14.1	5.5	6.9	16.7	0.4		4.6	2.7	28.6	2.1	1.1	0.7	4.5	<u>47.0</u>	0.5	12.0	0.2	2.3
21	<u>76.5</u>	2.4	3.0	10.0		1.2	4.5	2.2	7.8	0.1	1.0	1.4	3.7	7.5	1.0	9.2	0.2	2.0
22	23.0	1.6	2.1	8.4		1.3	3.7	2.1	<u>59.1</u>	2.9	0.7	0.7	2.7	2.2	0.9	22.0	0.2	1.8
23	17.7	5.0	3.2	9.5		2.0	5.3	4.1	30.1		0.9	1.7	3.4	<u>35.7</u>	1.2	8.9	0.3	2.5
24	10.5	1.7	2.4	<u>38.3</u>		1.1	4.0	2.5	6.1		0.7	1.4	2.9	6.1	0.7	9.4	0.2	1.5
25	7.3	0.9	1.4	10.2		1.5	4.0	1.9	<u>41.0</u>		0.4	1.6	2.3	2.8	1.2	6.3	0.2	0.9
26	7.3		1.4	5.9		1.3	4.0	<u>15.4</u>	10.9		0.4	1.6	2.4	1.7	1.1	6.9		1.1
27	<u>43.0</u>	1.0	1.6	5.2		1.1	3.4	4.8	4.9		0.4	1.7	2.2	1.1		6.9	0.3	1.1
28	6.1	0.4		1.2		0.8	1.5		1.7		0.4	1.8	1.4		0.7	3.6	0.2	1.0
29	8.0	0.6	0.9	3.6	0.2	1.4	3.5		1.7	<u>13.8</u>	0.5	1.3	1.6	1.5	0.9	6.7	0.4	1.6
30	7.2		0.9	3.6	0.2	1.4	3.9		1.9	5.0	0.6	1.1	2.0	1.5	1.0	8.9		1.3

The numerals boxed and underlined indicate picomol of the amino acid residue of abnormal α Tp-9 and that of contaminant α Tp-5, respectively.

も解析可能な場合が多い。これは今回の実験例でも示されている。さらにひとつのペプチド中に、前述のような酸加水分解に不安定なアミノ酸が2つ以上含まれている場合、加水分解の前にこのペプチドをさらに別の酵素で分解するなどの操作が必要となり、組成分析だけによる微量試料の分析には限界がある。

今回の実験例が示すごとく各サイクルの反復収率は約90%であったのでシーケンス法ではじめの試料量が250ピコモル程度であれば計算上では最長約40残基のペプチドが同定できることになる。

当研究室での異常血色素スクリーニングの例をあげると、病院から送られてくる全血型血液は約2ml, そのうち約1mlをその機能分析に用いるため、構造解析には約1mlの血液が出発原料となる。1mlの血液から得られるペプチドは計算上では数マイクロモルで、分析においては十分な量であるが、実際には精製の各ステップにおいて少なからぬ消失がある。当研究室におけるヘモグロビン精製各段階における平均収率を例にとり示すと脱ヘム時に80~90%, $\alpha\cdot\beta$ 鎖分離時に40~60%, Tp消化時に約90%, HPLCによる各ペプチド分離、および定量時に10~80%であったので分析可能な最小試料量が決まってくる。私共は、さらに微量の試料、例えば一滴の血液からのヘモグロビン一次構造解析法の確立を検討している。この意味でもこのペプチドマイクロシーケンス法は有用な手段となっている。

稿を終えるにあたり技術的御指導をいただきました生化学センター 東山佳代氏に深謝いたします。

本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費 (3-302) により行なわれた。

参 考 文 献

- 1) P. Edman: Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. Acta Chemica Scandinavica 4: 283~293, 1950
- 2) M. W. Hunkapiller and L. E. Hood: Protein Sequence Analysis: Automated Microsequencing. Science 219: 650~659, 1983
- 3) 日高和夫・井内岩夫・島崎俊一: 異常血色素に関する研究 IX: 異常血色素のトリプシン消化物の高速液体クロマト法による分離と同定について。川崎医学会誌 一般教養篇10:49~54, 1984
- 4) 滝尾拓士“タンパク質II”(新生化学実験講座1), 日本生化学会編, p.156 東京化学同人, 1990
- 5) T. Miyaji, I. Iuchi, K. Yamamoto, Y. Ohba and S. Shibata: Amino Acid Substitution of Hemoglobin Ube 2 ($\alpha_2^{68ASP}\beta_2$): An Example of Successful Application of Partial Hydrolysis of Peptide with 5% Acetic Acid. Clinica Chimica Acta, 16: 347~352, 1967
- 6) D. H. Spackman, W. H. Stein and S. Moore: Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. Analytical Chemistry 30: 1190~1206, 1958
- 7) 池内徳治“タンパク質の化学II”(生化学実験講座1), 日本生化学会編, p.186, 東京化学同人, 1976
- 8) A. Tsugita, K. Takamoto and K. Satake: Reaction of Pentafluoropropionic Anhydride Vapor on Polypeptide as Revealed by Mass Spectrometry. A Carboxy-peptidase Mimetic Degradation. Chemistry Letters: 235~238, 1992