

アミノ酸配列分析に関する基礎的研究

—カルボキシ末端からの分析について—

吉 田 雅 彦

緒 言

ペプチド・タンパク質のアミノ酸配列分析法でカルボキシ基末端(C末端)から配列を決定する方法としては、還元法⁽¹⁾、ヒダントイン法⁽²⁾、赤堀らによって考案されたヒドラジン分解法⁽³⁾、松尾らによって開発されたトリチウム法⁽⁴⁾、などの化学的方法と、カルボキシペプチダーゼを用いる酵素的方法とがある。ヒドラジン分解法は化学的C末端アミノ酸分析法としては非常に優れた方法であり、その副分解なども、硫酸ヒドラジン触媒を用いることによって少くなっている。しかしながらペプチド・タンパク質のC末端のみを残余部分に何の損害も与えないで分析することはヒドラジン法ではできず、C末端部分からのアミノ酸配列分析には応用できない。このことはトリチウム法についても同様である。現在のところ、アミノ基末端(N末端)部分のアミノ酸配列分析に应用されるエドマン法⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾のような化学的方法はなく、唯一カルボキシペプチダーゼを用いる酵素的方法がC末端からのアミノ酸配列分析に应用できるのみである。

カルボキシペプチダーゼは1929年 Waldschmidt-Leitz⁽¹⁰⁾ によって発見され、1935年 Anson⁽¹¹⁾ によりウシ脾臓から結晶として単離された。これが現在カルボキシペプチダーゼAと呼ばれる酵素であり1956年 Folk⁽¹²⁾ が発見した酵素はカルボキシペプチダーゼBと呼ばれている。カルボキシペプチダーゼAはその基質特異性によりC末端アミノ酸がプロリン、リジン、アルギニンのとき以外は1つずつ切り離すことができる。またカルボキシペプチダーゼBは、C末端アミノ酸がリジンとアルギニンのときこれらを切り離す。したがってC末端アミノ酸がプロリン以外の時には、このカルボキシペプチダーゼAとBを用いればC末端部分からのアミノ酸配

列分析が可能である。⁽¹³⁾ 1967年 Doi⁽¹⁴⁾ らは新しいカルボキシペプチダーゼYを酵母より精製した。この酵素はC末端残基がプロリンでも加水分解して切り離すことができる。⁽¹⁵⁾ 近年この酵素は市販化され、その用途についても研究報告されている。

本報告はウシとクジラより精製したカルボキシペプチダーゼAのアミノ酸配列分析への応用と新しい酵素カルボキシペプチダーゼYのアミノ酸配列分析への応用について検討したものである。

実 験 方 法

試料・試薬

酵素としてのウシカルボキシペプチダーゼ(B-CPaseA)はWorthington Biochemical Co 製、カルボキシペプチダーゼY(CPaseY)はオリエンタル酵母K.K.製のものをそれぞれ用い、クジラカルボキシペプチダーゼA(W-CPaseA)はYoneda⁽¹⁶⁾の報告に従ってイワシクジラの脾臓から調製し、ディスク電気泳動的にホモジニアスに精製したものをを用いた。合成基質としてのcarbobenzoyl-glycyl-L-phenylalanine (CGP), carbobenzoyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-tyrosine (Z·Glu·Tyr), carbobenzoyl-glycyl-L-prolyl-L-leucyl-glycine (Z·Gly·Pro·Leu·Gly), アンジオテンシンⅢは蛋白質研究奨励会製のものをを用いた。ニンヒドリン・シアン化カリは和光純薬工業K.K.製、メチルセロソルブ・トリスバッファー・クエン酸・重炭酸ナトリウムは半井化学薬品K.K.製のものをそれぞれ用いた。

ニンヒドリン反応用混液は、ニンヒドリン溶液(5%ニンヒドリン-メチルセロソルブ溶液)とシアン化カリ-メチルセロソルブ溶液

(0.01M KCN溶液10mlにメチルセロソルブを加えて500mlにする)と0.2Mクエン酸バッファー (pH 5.0) を1 : 5 : 6の割合に混合したものを使用直前に調製して用いた。⁽¹⁸⁾

酵素反応

a) ウシカルボキシペプチダーゼA

ウシ CPaseA (8.76 μ g/ml) 0.5mlを基質溶液 (1% NaCO₃溶液) 0.5mlに加えて20℃又は37℃で反応させた。

b) クジラカルボキシペプチダーゼA

クジラ CPaseA (39.4 μ g/ml) 0.5mlを基質溶液 (1% NaHCO₃溶液) 0.5mlに加えて37℃で反応させた。

c) カルボキシペプチダーゼY

CPaseY (5 mg/ml) 2 μ lを基質溶液 (0.05M 酢酸ナトリウムバッファー, pH 5.0) 0.5mlと0.05M 酢酸ナトリウムバッファー0.5mlに加えて25℃で反応させた。

酵素反応生成物の測定

a) ニンヒドリンによる測定⁽¹⁶⁾

酵素反応溶液 (1ml) から各時間ごとに0.1mlずつすばやくニンヒドリン反応混液1ml

に加えて振り混ぜ 100℃で15分間加熱した。冷却後3mlの60%エタノールを加えて攪拌し、溶液の570nmにおける吸光度を測定した。対照としては、ニンヒドリン反応混液に基質溶液0.05mlと蒸留水0.05mlを加えて同様に操作したものを用いた。

b) ガスクロマトグラフィーによる測定

酵素反応溶液 (1ml) から各時間ごとに0.1mlずつ、予め0.1 μ moleのノルロイシン (内部標準溶液: I.S.) を加えておいたDowex50 $\times$ 8 (H⁺) 0.03mlに加えて基質から切り離されるアミノ酸を吸着させ、3回バッチ法で水洗い後0.1mlの4N NH₄OHで3回溶出し、溶出液を共栓遠沈管に集め40℃で減圧除去した。これをガスクロマトグラフィーで分析した。

ガスクロマトグラフィー

アミノ酸は前報と同様に N-trifluoroacetyl n-butyl ester⁽¹⁷⁾として、0.75% EGSS—X 0.25% DEGS と1.5% OV—17の2本のカラムを用いてガスクロマトグラフィー (GLC) で分析した。条件は表1に示した。

表1 ガスクロマトグラフィーの測定条件

	EGSS—X・DEGS	OV—17
Column temperature :		
Initial—Final (°C)	60—210	80—210
Temperature programming rate (°C/min)	4	6
Detector oven temperature (°C)	245	245
Injection port temperature (°C)	240	240
Sensitivity (M Ω)	10 ²	10 ²
Range (V)	0.4	0.4
Gas flow rate		
Hydrogen (kg/cm ²)	0.6	0.6
Air (kg/cm ²)	0.9	0.9
Carrier gas : N ₂ (ml/min)	40	60

結 果

ウシカルボキシペプチダーゼAについて

ウシCPaseAと各基質溶液との反応結果について、図1は4mM CGP 50mM トリスバッファー溶液との反応を37℃で行った時、図2は4

mM CGP 1%NaHCO₃溶液との反応を20℃で行った時の切り離されたアミノ酸をニンヒドリンで測定した結果である。トリスバッファーはCPaseAの活性測定に通常用いられるが、GLC分析と組み合わせるとそれは不適當であるの

で、そのかわりとして NaHCO_3 をバッファーとして用いた。一般的に用いられる基質(CGP)との反応結果より、このウシ CPaseA は十分な活性を示した。同酵素を用いた 1% NaHCO_3 溶液の 4 mM CGP との反応は、反応温度の違いがあるもののよく進行し十分使用できることを認めた。そこで他の CPaseA の反応はすべて 1% NaHCO_3 溶液の基質を用いて行った。図 3 は 4 mM CGP との反応を 20℃で行い切り

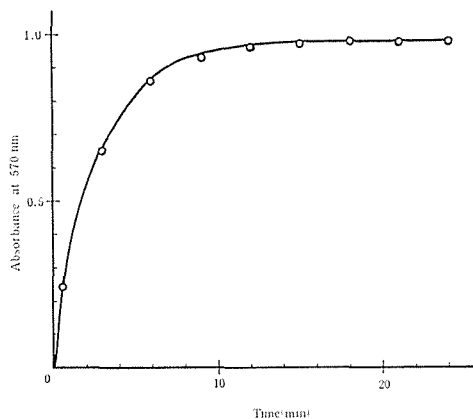


図 1 ウシ CPaseA と 4 mM CGP (50 mM トリス) との酵素反応, (反応温度 37℃ ニンヒドリン測定)

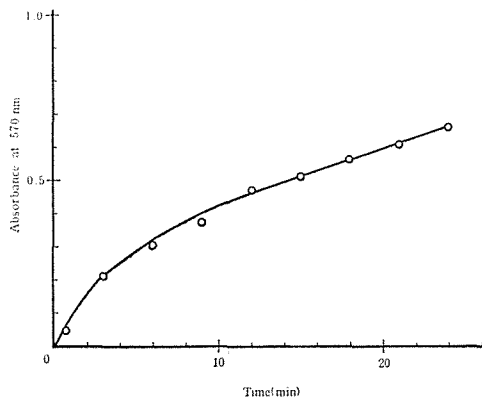


図 2 ウシ CPaseA と 4 mM CGP (1% NaHCO_3) との酵素反応, (反応温度 20℃ ニンヒドリン測定)

離されたアミノ酸を GLC で測定した結果であり、生成物はフェニールアラニンのみであった。24分目のフェニールアラニンは、GLC より $0.052 \mu\text{mole}$ と計算され、これは 26% アミノ酸が切り離されたことになる。このようにして酵素反応生成物の GLC 分析への適応も充分であることを確認した。

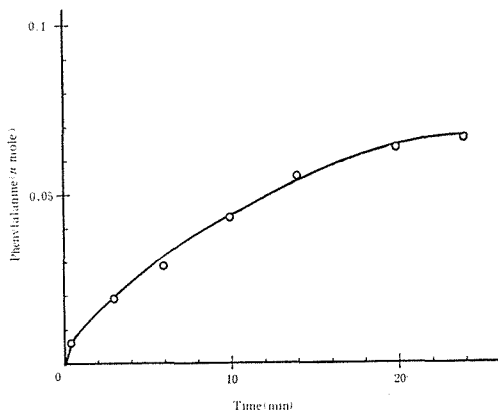


図 3 ウシ CPaseA と 4 mM CGP (1% NaHCO_3) との酵素反応, (反応温度 20℃ GLC 測定)

クジラカルボキシペプチダーゼ A について

クジラ CPaseA と 6 mM Z·Gly·Pro·Leu·Gly の反応生成物をニンヒドリンと GLC で測定した結果を図 4, 5 にそれぞれ示した。反応は 37℃ で行った。ウシ CPaseA はこの合成基質から末端のグリシンをほとんど切り離さないが、クジラ CPaseA は同じ条件下で切り離すことがわかった。しかしこの基質に対する加水分解反応はゆるやかで、90 分後でもまだ反応が同じ速さで進行していた。このような結果より、図 5 はさらに長時間反応させた生成物を GLC で分析したものである。最初にグリシンが約 5 時間ほどで最大量に達し、次にロイシンが 7 時間程度で最大量に達していると考えられる。この結果はこの合成基質の C 末端アミノ酸配列 Leu·Gly と一致している。しかしプロリンは全く検出できなかった。

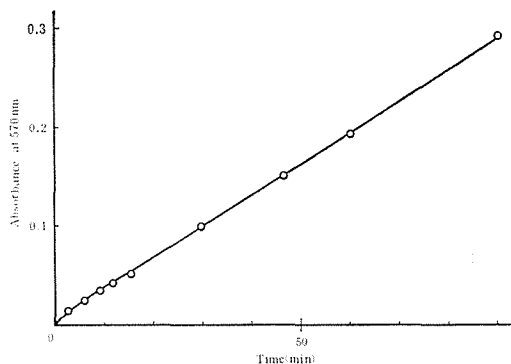


図 4 クジラ CPaseA と 6 mM Z·Gly·Pro·Leu·Gly との酵素反応, (反応温度 37℃ ニンヒドリン測定)

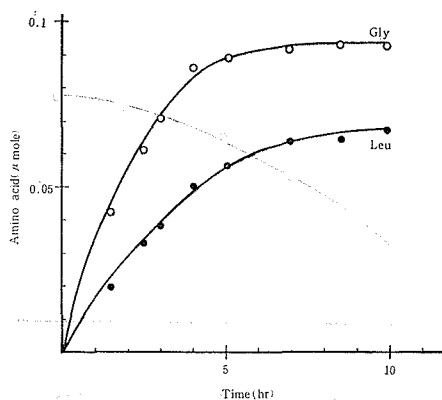


図5 クジラ CPaseA と 6 mM Z·Gly·Pro·Leu·Gly との酵素反応, (反応温度37℃ GLC測定)

酵母カルボキシペプチダーゼYについて

市販 CPaseY の活性測定のため, 合成基質 Z·Glu·Tyr 50mM 酢酸ナトリウム溶液との反応を行った。図6は CPaseY と 4 mM Z·Glu·Tyr との反応生成物を, 図7は CPaseY を1%に希釈した酵素と 4 mM Z·Glu·Tyr との反応生成物をそれぞれニンヒドリンで測定したものである。CPaseY と基質の反応は20分間でほとんど一定値に達するが, 1%希釈 CPaseY は60分間でもまだ一定には達しえなかった。そこで以後の反応には CPaseY を希釈せずに用いた。

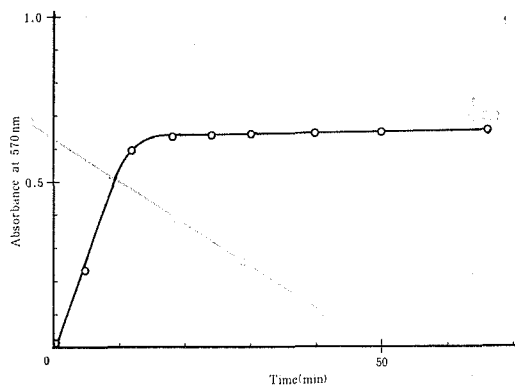


図6 酵母 CPaseY と 4 mM Z·Glu·Tyr (50mM CH₃COONa) との酵素反応, (反応温度25℃ ニンヒドリン測定)

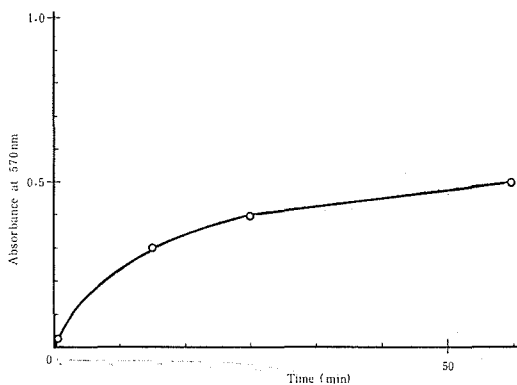


図7 酵母 CPaseY と 4 mM Z·Glu·Tyr (50mM CH₃COONa) との酵素反応, (反応温度25℃ ニンヒドリン測定)

図8は CPaseY と 6 mM Z·Gly·Pro·Leu·Gly 50mM 酢酸ナトリウム溶液との反応生成物をニンヒドリンで測定したものである。反応は10分間で急激に進行し, その後もゆっくりと上昇した。

アンジオテンシンⅢと CPaseY との反応生成物を GLC で分析した結果を図9に示した。フェニルアラニンがすぐに加水分解され約90分ではほぼ一定値に達し, 次にプロリン, そしてヒスチジンがゆるやかではあるが加水分解されている。また約6時間後にイソロイシンが出現した。

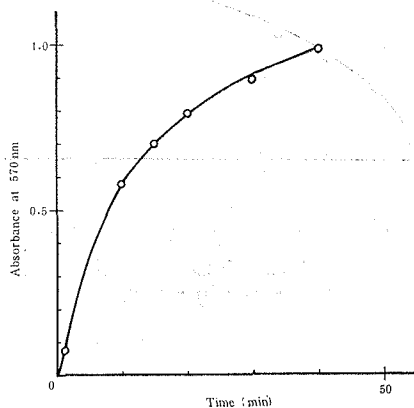


図8 酵母 CPaseY と 6 mM Gly·Pro·Leu·Gly (50mM CH₃COONa) との酵素反応, (反応温度25℃ ニンヒドリン測定)

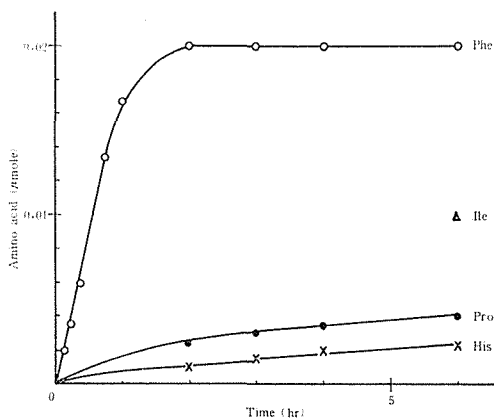


図9 酵母 CPaseY とアンジオテンシンⅢ (50mM CH₃COONa) との酵素反応 (反応温度25℃ ニンヒドリン測定)

考 察

ペプチド・タンパク質のC末端アミノ酸のみを分析する方法としてヒドラジン分解法があるが、C末端から1つずつアミノ酸を切り離して決定する方法としては、N末端分析におけるエドマン法に匹敵する化学的方法はなく、専らカルボキシペプチダーゼを用いる酵素的方法が最良とされている。しかしながら CPaseA や CPaseB では C末端部分のプロリンを切り離すことができず、今まではヒドラジン分解⁽¹⁴⁾などを用いるしか方法はなかった。1967年 Doi⁽¹⁵⁾らは酵母より新しいカルボキシペプチダーゼを分離しその後その1つをカルボキシペプチダーゼYとした。この酵素はC末端部分のアミノ酸がプロリンであっても作用するという CPaseA・CPaseB にない基質特異性を持っている点で有効な酵素である。従って本実験では CPaseA と共に CPaseY を用いた。

ウシ CPaseA について活性測定の検討を行い、ニンヒドリン反応によるときはよいが、GLC 分析による場合、バッファー中のトリスにより分析に大きな妨害をうける。そこでトリスバッファーのかわりとして1% NaHCO₃を用いることを試みたところ充分測定できることを示した。次に酵素反応生成物の GLC による分析方法の検討を試みたところ、切り離されたアミノ酸を Dowex 50×8 に吸着させた後、バッチ法で溶出する方法が最も操作が容易で定量

的にも良い方法であった。そこでこの方法を用いてウシ CPaseA による γ-グルタチオンと Z・Gly・Pro・Leu・Gly の酵素的加水分解反応を試み、その生成物の分析を GLC で行ったが、ウシ CPaseA による反応は進まず、反応産物として考えられるグリシンも GLC で捕えられなかった。しかしクジラ CPaseA を用いた場合は緩慢ではあるが進行し、特に GLC 分析によってグリシンとロイシンが反応生成物として確認された。しかしこの条件下ではプロリンの確認はできなかった。ウシ CPaseA とクジラ CPaseA のこの反応性の違いは両者の基質特異性の差によるものと考えられる。このことは、C末端に Gly がある場合、すべてウシ CPaseA よりクジラ CPaseA が有効であるとはいえないが、ウシ CPaseA で加水分解できないペプチドに、クジラ CPaseA が有効である可能性を示したということになる。つまりウシ CPaseA より、クジラ CPaseA のほうがアミノ酸配列分析について応用範囲が広いものと考えられる。

最後にプロリンをも加水分解する CPaseY の起用を試みた。この酵素はウシ CPaseA やクジラ CPaseA とは異り、至適pHが酸性側にあるため、50mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0)を用いて反応を行った。酵素の反応に適する濃度と反応時間の検討を行ったところ、4mM Z・Gly・Tyr との反応において酵素 10μg では20分間で最大量に達したが、10希釈では60分間でもまだ達しえなかった。6mM Z・Gly・Pro・Leu・Gly との反応では40分間では一定量に達しなかった。次に CPaseY によるアンジオテンシンⅢのC末端部分のアミノ酸配列分析を試みたところ、反応開始後10分でフェニールアラニンが GLC で確認され、およそ60分で最大量に達し、120分になるとプロリンとヒスチジンが現れ、さらに360分になってイソロイシンが現れた。これらの結果から、アンジオテンシンⅢのC末端アミノ酸配列は—Ile・His・Pro・Pheと判断できる。この配列は既知のアンジオテンシンⅢ (Arg・Val・Tyr・Ile・His・Pro・Phe) と一致していた。しかし次のチロシンは長時間の反応後も加水分解されなかった。これはペプチドN末端のアルギニンによる

ためと考えられる。

現在のところ、これらの酵素と GLC を用いてタンパク質・長鎖ペプチドのアミノ酸配列を直接分析することは行っていないが、分析できる可能性はあるものとする。しかしながら、実際にタンパク質の一次構造の解析を行う場合には、種々のプロテアーゼ消化又は化学的断片化により得られるペプチドフラグメントに対して CPase と GLC を組み合わせて用いるこの方法が、極めて有効なものであり、また簡便であるとする。

最後に本研究の実験に対して御協力頂いた北海道大学水産学部水産高分子化学講座 辻野 勇教授・米田 勤助手に深謝いたします。

文 献

- (1) 大野 光, 関 得一郎 (1957). 蛋白質化学 (水島・赤堀編) 4, P.209 共立出版 東京
- (2) Akabori, S., Ohno, K. and Narita, K. (1952). Bull. Chem. Soc. Japan 25, 214.
- (3) 松尾寿之 (1969). 蛋. 核. 酵. 14, 523.
- (4) 吉田久信, 久保博昭 (1969). 代謝 6, 663.
- (5) 蛋白質実験法(1). (2). (1968). 共立出版 東京
- (6) Bradbury, J. H. (1956). Nature 178, 912.
- (7) Edman, P. (1949). Arch. Biochem, 22, 475.
- (8) Edman, P. (1950). Acta. chem. Scand. 4, 283.
- (9) 木村 滋 (1974). 分析化学 23, 563—575.
- (10) Waldschmidt-Leitz, E., Grasman, W. and Schlatter, H. (1927). Ber, 60, 1906.
- (11) Anson, M.L. (1935). Science 81, 467.
- (12) Folk, J.E. (1956). J. Am. Chem. Soc. 78, 3541.
- (13) Ambler, R.P. (1970). In Needleman, S.P. (ed.). Protein Sequence Determination. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- (14) Doi, E., Hayashi, R. and Hata, T. (1967). Agr. Biol. Chem. 31, 160—169.
- (15) Hayashi, R. and Hata, T. (1972). Biochim. Biophys. Acta 263, 673—679.
- (16) Yoneda, T. (1974). Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 25, 61—67.
- (17) 吉田雅彦・米田 勤・石原義雄 (1977). 北大水産彙報 28(3), 165—173.