

学 位 論 文 題 名

微量タンパク質のアミノ酸組成分析法の研究

—ペプチド及びタンパク質の酸気相高速加水分解法の開発、応用及びその自動化に関する研究—

学位論文内容の要旨

生体内で重要な役割を担うタンパク質の構造と活性との関係の解明には、その高次構造を規定する一次構造の解明が必要である。近年、核酸の一次構造解析法が急速に進歩し、遺伝子の塩基配列からタンパク質のアミノ酸配列を推定することが可能となった。しかし遺伝子をクローンする際のプローブを得るためには、タンパク質の部分一次構造が役立つ事が多い。また修飾されたタンパク質を取り扱う場合、生物工学的に産生されるタンパク質の確認の場合にも、配列決定は必要である。

このように一次構造解析の重要性が再認識されてきているが、分析対象となるタンパク質量は、コピー数が少なかったり、安定性、不溶性等から収量が少ない場合が多く極微量の試料を取り扱う解析法が求められている。タンパク質の一次構造を決定するためには、全体のアミノ酸組成、アミノ末端配列、カルボキシ末端配列を決定すること、そしてタンパク質をペプチド断片にし分画した後にアミノ酸組成とアミノ酸配列を決定することが必要である。アミノ末端配列決定法では、エドマン法の自動化が進歩してきているが、決定される残基数には限りがあり、この方法単独ではタンパク質全体の構造決定をするまでには至っていない。全一次構造決定に必要な断片化と全断片の回収率の確認にはアミノ酸組成分析のデータが必要である。

アミノ酸組成分析は、タンパク質の加水分解とアミノ酸分析の2つの要素から成り立っている。アミノ酸分析そのものは高速液体クロマトグラフを用いた装置化が進んでいる。ニンヒドリン発色法を用いると、通常 100pmol（タンパク質量 500ng程度）フルスケールの自動分析機により組成分析が可能である。ダブルクロライドあるいはPITCを用いるプレカラム法では 1pmol（タンパク質 5ng程度）フルスケールの分析

が可能である。一方加水分解については、分析の高感度化に対応した汚染防止、各アミノ酸の定量的な回収、アミノ酸分析との連動・自動化の面で立ち遅れているのが現状である。

本論文では、微量試料のアミノ酸組成分析を正確に行うためのアプローチとその応用例について述べる。

1、酸気相高速加水分解の開発：タンパク質のアミノ酸組成を決定するための新しい迅速な酸加水分解法を開発した。本法は、試験管に酸混合溶液を入れ、その中に試料を底に乾固しておいた小試験管を入れて、減圧封管後加熱して酸の蒸気により加水分解反応を行わせる気相法である。本法では、10%のTFAと0.1%のフェノールを含む7Mの塩酸を用い158℃のオイルバス中で22.5及び45分間加水分解を行う。

本法は、従来の分解法において指摘されていた以下の欠点を克服するものである。

- ①加水分解時間が非常に長い。
- ②液相法であるため酸からの汚染が避けられない。
- ③疎水性タンパク質の分解が不十分である。
- ④分解後の酸の除去操作が煩雑である。

本法が従来の方法に比べて優れている点をまとめると以下のようになる。

①従来の数十時間のスケールの加水分解時間を約1/60即ち数十分のオーダーに短縮した。②蒸気を用いる気相法により、酸溶液に含まれているアミノ酸の混入を制限し、1pmol以下の混入であることを証明することができ、タンパク質量としてナノグラムレベルの組成分析の可能性を拓いた。③真空減圧により、簡便、短時間かつ副反応を起こすことなく残存する酸の蒸発を行えるようになった。加水分解反応終了後、アミノ酸分析機に試料をかけるまでの時間は10分間以内に短縮された。④バリンとイソロイシン等疎水性アミノ酸の回収率を向上させ、且つ②及び③の優位点とも併せてより正確な組成分析を可能とした。Val-Val、Val-Ile、Ile-Valの加水分解率は従来法に比較しておよそ10%向上した。また、これら2つのアミノ酸の含有率の比較的高いタンパク質を試料とした際に、高い回収率が得られることを確認した。

近年報告されたピコタグシステムにおける加水分解法と比較すると次のようになる。

①疎水性アミノ酸の回収率をより高めることができた。Val-Val、Val-Ile、Ile-Valの加水分解率はおよそ30-40%向上した。②分解時間を短縮した。より高温での処理が可能であり、22.5分を標準とし、より十分な分解を必要とする場合でも45分間でその目的を達成することができた。

2、アミノ酸及びアミノ酸誘導体の回収率：次に遺伝子にコードされる20種以外のアミノ酸およびアミノ酸誘導体の本法条件下の回収率を検討した。実際に配列分析するタンパク質の中には翻訳後修飾を受けたものがある。また分析を行うため人工的にアミノ酸を修飾することがある。これらの要求に基づいて以上のようなアミノ酸および誘導体の回収率を測定し、これらを含むタンパク質の組成分析を可能とした。

3、応用：高速気相酸加水分解法を既存の配列分析法に組み合わせて、星口動物に属するスジホシムシモドキ (*Siphonosoma cumanense*) のヘムエリスリンの全一次構造を決定した。この加水分解法は、アミノ酸組成分析と、カラムクロマトグラフィーにおけるタンパク質試料の溶出位置の確認に用いられ、微量試料の定量分析、一次構造解析の方針決定、そして分析時間の短縮に寄与した。溶出位置の確認のために用いた液量は、各分画のおよそ50分の1である。上記両目的のために試料を加水分解し、さらにアミノ酸分析するための時間は、およそ2時間から2時間半であった。

このアミノ酸配列を既知の同族タンパク質のそれと比較したところ、スジホシムシモドキは他のホシムシ系と進化的に離れた存在であることが示唆された。

4、自動化：タンパク質の加水分解操作を行う自動加水分解装置を開発した。この装置は、第2章で述べた酸気相高速加水分解法の持つ特徴を生かし、以下の一連の操作を連続して自動的に行うものである。

①反応系内の除酸素を行う。②試料ホルダーに担持されたタンパク質に塩酸、TFA及び水を含む蒸気を加圧下で作用させて加水分解を行う。③反応終了後の試料ホルダーに少量残る酸の蒸気を除く。④試料（試料ホルダー）を冷却する。⑤加水分解物をクエン酸塩緩衝溶液に溶解してその全量をアミノ酸分析機へ移送する。

この自動化の特徴をまとめると以下ようになる。

①分解時間が短縮されたことにより全操作は60分以内に完了し、アミノ酸分析との同期、連動が可能となった。②試料ホルダーのセットからデータの出力までの、アミノ酸組成分析の全操作が自動化された。③これに要する時間は従来の26時間以上から、2時間あるいは2時間半程度に短縮された。④試料および加水分解物を担持する試料ホルダーは、洗浄および加熱処理による汚染の除去の後、再使用が可能である。

以上の新しい加水分解法の開発とその自動化は、微量タンパク質の一次構造解析を行うための研究の一環であり、正確な組成分析に寄与することを目的としている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 杉 本 和 則

副 査 教 授 谷 口 和 弥

学 位 論 文 題 名

微量タンパク質のアミノ酸組成分析法の研究

ーペプチド及びタンパク質の酸気相高速加水分解法の

開発、応用及びその自動化に関する研究ー

生命現象を分子レベルで理解するためには、蛋白質分子の構造および機能との関連の解明が不可欠である。蛋白質分子は20種類のアミノ酸が様々な順序で配列し、隣り合うアミノ酸2分子間から1分子の水分子が除かれる事により共有結合で結ばれた分子量数千以上の高分子である。

このようなアミノ酸の一次的な配列を持つ蛋白質が、生体内で生合成されると細胞内の溶媒である水中で最も安定な構造をとるために三次元空間に折畳まれ、いわゆる三次元構造を形成して始めて機能を発現できるようになる。蛋白質の高次構造は遺伝子にコードされた塩基配列に基づくアミノ酸の一次的な配列で決められる。従って蛋白質の構造と機能の関連を追求するための最も基本的な情報は、蛋白質分子を構成するアミノ酸の種類と数を定量することである。

蛋白質分子のアミノ酸組成の測定に現在最も多く用いられている方法は、まず蛋白質を6N塩酸溶液中110℃で24時間から72時間加水分解を行う。その後、分解物を高速液体クロマトグラフィーで分離し、適当な発色団或は蛍光団をラベルして吸光度或は蛍光強度を測定することによりアミノ酸組成に換算する方法である。

申請者は蛋白質の加水分解を10%トリフロロ酢酸(TFA)と0.1%フェノール

を含む 7 M 塩酸を用い、158℃の気相中で行う方法を開発した。この方法では加水分解時間が従来の方法にくらべ大幅に短縮され数十分のオーダーでほぼ100%の分解が達成された。また従来法では80ないし90%の分解率をもつバリン、イソロイシンなどの疎水性側鎖を持つアミノ酸の分解率をほぼ100%に向上させることができた。更に、気相法を用いるため酸に混入しているアミノ酸由来の誤差を除く事ができ、ピコモルレベル、すなわち蛋白重量としてはナノグラムレベルの微量分析を可能にする事ができた。また、加水分解後の酸の除去が著しく容易になるという利点も見出された。

このような多くの特質を持つ気相分解法を取り入れることにより、分解から、データのプリントアウトまでをオンラインとしたアミノ酸自動分析装置を開発した。この装置は以下の一連の操作を連続して自動的に行うよう設計されている。

1) バイレックスガラス筒に加熱処理によって融着させた焼結ガラスフィルターを有する試料ホルダーに試料を注入し乾燥する。

2) 試料ホルダーを反応ステージに装着し加水分解反応系の除酸素を行う。

3) 試料ホルダーに担持された蛋白質に7 M 塩酸、10% TFA および0.1% フェノールを含む蒸気を加圧下で作用させて加水分解を行う。反応槽は温度センサーにより160℃に保たれるように調節する。

4) 反応終了後の試料ホルダーに少量残る酸の蒸気を除く。

5) 試料を冷却する。試料ホルダーは冷却ステージに移され冷却水の循環により、1分間以内に60℃まで冷却する。

6) 冷却した試料ホルダーを抽出ステージに移し、加水分解物を0.2 M クエン酸ナトリウム緩衝液に溶解しその全量をアミノ酸分析機へ導入する。

7) アミノ酸自動分析機で組成分析を行う。

以上の操作により、従来最低26時間以上要していたアミノ酸組成分析をわずか2時間半程度に短縮することができた。また、ピコモルというオーダーの微量定量が可能となった。

これら一連の研究開発は、蛋白質化学の研究分野の進展に大きな貢献を成すものと高く評価される。よって審査員一同は、申請者が博士(理学)の学位を受けるに十分な資格があるものと認めた。