

氏 名 (本籍)	むら 村	もと 本	こう 光	じ 二
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農博第	242	号	
学位授与年月日	昭和54年	3月	27日	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻			
学位論文題目	微量ペプチド1次構造の蛍光 試薬を用いる分析法			

論文審査委員 (主査)

助教授 目黒 熙 教授 木村 修一

教授 安元 健

序 論 論 文 内 容 要 旨

ペプチドとタンパク質の構造や機能について研究する上で、1次構造分析は重要な位置を占めている。Sanger等によってインシュリンの1次構造が決定されて以来、1次構造の解明されたペプチドとタンパク質は約1000にも達する。これは1次構造分析法の著しい進歩によるものであり、現在でも分析法の開発と改良が多くなされている。

通常、ペプチドの1次構造はN末端アミノ酸から逐次決定される。最も多用される方法は、Edman等の開発したフェニルイソチオシアネート(PITC)を用いるPTC法(Edman法)である。川内等は、PITCのフェニル基を強い蛍光をもつフルオレッツセイン基にかえたフルオレッツセイン・イソチオシアネート(FITC)が、PTC法と同じ反応機構でペプチドの1次構造分析に用いることを見い出した。(図1) フルオレッツセイン・チオヒダントイン(FTH)アミノ酸は 1×10^{-12} モルでもシリカゲル薄層上で検出可能であり、原理的には極微量ペプチドを分析することのできる優れた方法論であった。しかし、川内等は分析法の開発および基礎的一連の研究に重点を置いたため、成績としてはインシュリンB鎖を 300×10^{-9} モル用い、N末端から7位までのアミノ酸配列分析を示すにとどまった。

本研究では、FITCを用いる微量ペプチド1次構造分析法の確立を目的として実験を行い、インシュリンB鎖 2×10^{-9} モルでN末端から16位までのアミノ酸配列分析を可能とする実用的な分析法(FITC-PITC併用法:FTC法)を確立した。

第 I 部 フルオレッツセイン・チオヒダントイン-アミノ酸の分離・同定 および蛍光分光学的特性

ペプチドの1次構造分析にFITCを用いることの利点は、N末端アミノ酸を逐次的に強い蛍光をもったFTH-アミノ酸として得ることができることである。本研究では、FTH-アミノ酸の分離・同定法を、ポリアミド薄層クロマトグラフィー、間接同定法および高速液体クロマトグラフィーを用いて検討した。FTH-Levと-Ile以外のFTH-アミノ酸は2次元ポリアミド薄層クロマトグラフィーにより分離・同定することができ、検出限界は 1×10^{-12} モルであった。(図2)

FTH-LevとIleの識別および他のアミノ酸の同定確認法として、FTH-アミノ酸を酸加水分解後、遊離されたアミノ酸をDNS法で分析する間接同定法を開発した。FTH-アミノ酸を塩化第一スズ 0.2%含有5.7N塩酸中で150℃、12時間加水分解し

た。(表1) 遊離アミノ酸はダンシルクロライド(DNS-Cl)でDNS化後にポリアミド薄層クロマトグラフィーで同定した。(図3)

高速液体クロマトグラフィーでは蛍光検出器と逆相分配系カラムを用い、ホウ酸緩衝液-メタノール系溶媒でFTH-アミノ酸を分離した。(図4)

水溶液中および低級アルコール中におけるFTH-アミノ酸の蛍光分光学的特性について次の諸点を明らかにした。

・FTH-アミノ酸水溶液の蛍光強度は、pH2とpH5を屈曲点として漸次増加し、pH8~11の間で一定となり、pH11以上ではアルカリクエンチングが起きた。これより、FTH-アミノ酸の蛍光強度増大に、フルオレッセイン骨格中のカルボキシル基の解離に伴う電子共役系の転移よりもフェニル性水酸基の解離に伴う電子共役系の転移の方が大きく関与していることが示唆された。(図5)

・FTH-アミノ酸の蛍光強度は低級アルコールの存在により著しく減小した。この現象はジオキサソとアセトンでも観察され、疎水的環境の影響が考えられた。(図6)

低級アルコール中のFTH-アミノ酸は、アンモニア水添加により蛍光強度を回復した。FTH-アミノ酸濃度と蛍光強度には、 1×10^{-12} mole/ml ~ 1×10^{-9} mole/mlの間で比例関係が成立した。

第II部 フルオレッセイン・イソチオシアネートを用いるペプチドの1次構造分析法

FITCとペプチドの反応を検討した結果、FITCはPITCよりもペプチドに対する反応性が劣ることが明らかになった。(表2) これは、フルオレッセイン骨格がフェニル基より大きくかさばっているための立体障害と、骨格中の負荷電とペプチドの電気的共振によるものと考えられた。ゆえに、FITCのみでペプチドのEdman分解を行うと、N末端から限られたアミノ酸配列しか分析できないという実用上の問題があった。この欠点を、“SCAVENGER”としてPITCを用いることにより解決した。FITCとPITCを併用するペプチド1次構造分析法(FTC法)を設定し、構造既知のペプチドでその有用性を明らかにした。(図7、表3) 45×10^{-11} モルおよび 5.6×10^{-9} モルのマツコウクジラアポミオグロビン(153アミノ酸残基)では、各々、N末端から23位と10位までのアミノ酸配列を分析することができた。FTC法の特長は、PTC法と同等にペプチドのN末端から多くのアミノ酸を逐次分析でき、しかも微量ペプチドの分析が可能なことである。N末端アミノ酸をFTH-誘導体として得るまでの1サイクルに要する時間は約90分であり、複数サンプルが分析できることから迅速性についても優れている。

次にF T C法を改良して低分子ペプチドに応用した。(図8, 表4) 改良点は固-液抽出操作を省き液-液抽出のみにしたことであり、ペプチドの有機溶媒抽出損失を小さくすることができた。F T H-アミノ酸に混入した有機塩はポリアミド薄層クロマトグラフにおいては、蒸留水で予備展開することにより除くことができた。 2×10^{-9} モルのインシュリンB鎖(30アミノ酸残基)および 10×10^{-9} モルのブラジキニン(9アミノ酸残基)では、各々、N末端から16位とC末端まで分析することができた。

第三部 フルオレッセイン・イソチオシアネート・ラベル法のゲル電気泳動への応用

F T Cでタンパク質を蛍光ラベルした後、SDS-ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法に応用した。F I T Cでラベルしたタンパク質は、電気泳動中も蛍光バンドとして観察できた。(図9, 10) タンパク質の移動度と分子量の対数値は直線関係を示し、分子量測定に応用できることがわかった。また、F I T CがEdman試薬であることを利用し、ゲルから回収したタンパク質のN末端付近のアミノ酸配列分析を行うことが可能であった。

第四部 フルオレッセイン・イソチオシアネートによるペプチドの1次構造分析法の応用

1次構造未知のペプチドにF T C法を応用して、実際的な方法論の検討を行った。用いたペプチドは、酵母性的接合因子[α substance [A]] (12アミノ酸残基)、ナガス、サイおよびマツコウケジラ副腎皮質刺激ホルモン[ACTH] (39アミノ酸残基)、ナガスクジラフロラクチン(199アミノ酸残基)、サケメラニン細胞刺激ホルモン[α -MSH, β -MSH] (13, 17アミノ酸残基)である。これらのペプチドホルモンは微量では生体より得ることができないが、F T C法によりナガスクジラフロラクチンを除いて、全1次構造を決定した。この時、一般的に用いられているDNS-Edman法も併せて用い、F T C法との比較を行った。F T C法は、現在、マニュアル法として最も微量分析が可能であるDNS-Edman法と比べ、次の点で異なり、相補性があることが明らかになった。

・F T C法では、より微量で長鎖ペプチドのN末端から多くのアミノ酸配列分析が可能であるが、DNS-Edman法に比べ、短鎖ペプチド(アミノ酸残基10以下)の分析では幾分劣った。

・F T C法では、DNS-Edman法でできないTrp, Gln, Asnの同定が可能であるが、Serの同定はDNS-Edman法が優れていた。

総括

本研究では、蛍光試薬フルオレッセイン・イソチオシアネート (FITC) を用いる微量ペプチド1次構造分析法を確立した。

1. 蛍光試薬フルオレッセイン・イソチオシアネートを用いる微量ペプチド1次構造分析法 (FITC法) を、フェニルイソチオシアネートの "SCAVENGER" としての使用およびフルオレッセイン・チオヒダントインアミノ酸の同定法の改良により確立した。

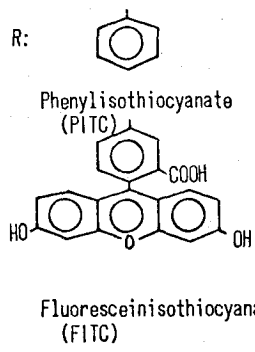
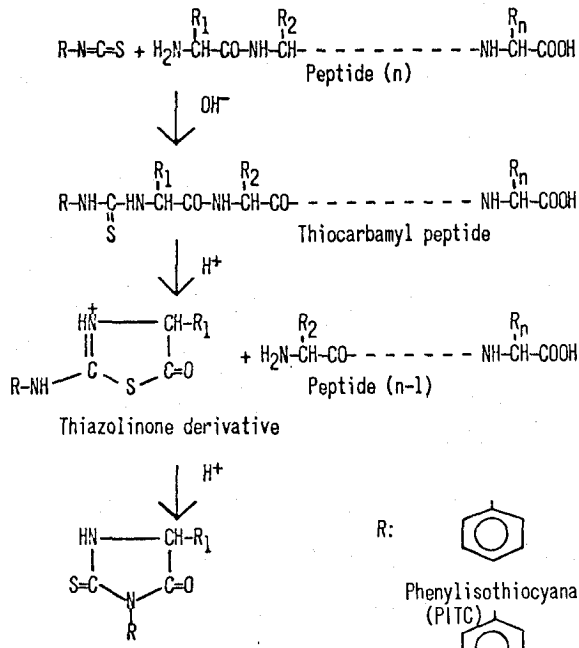
①同法はインシュリンB鎖 2nmoleでN末端より16位までのアミノ酸配列分析を可能とし、現在までに報告されている1次構造分析法の中では、最高水準の微量分析法である。

②同法は手動法として最も微量分析が可能であるDNS-Edman法と相補性がある。

③同法は1サイクルの所要時間が約90分であり、迅速分析が可能である。

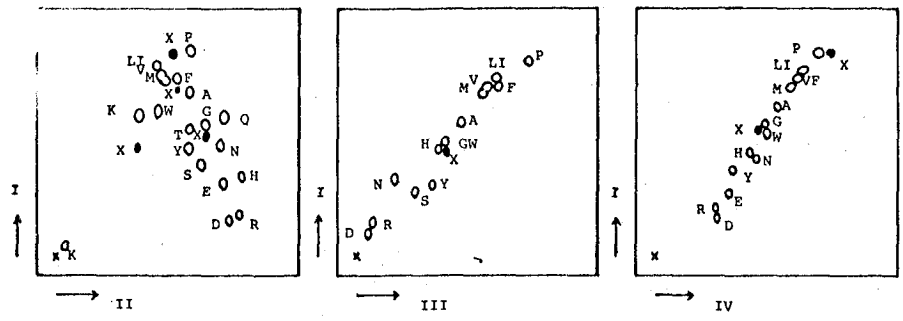
2. FITC法を1次構造未知ペプチドに応用して、方法論の有用性を示した。用いたペプチドは、酵母性的接合因子、3種クジラ副腎皮質刺激ホルモン、ナガスクジラフロラクチンおよびサケメラニン細胞刺激ホルモンである。

3. フルオレッセイン・イソチオシアネートとタンパク質の蛍光ラベルに用い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に応用することにより、タンパク質の分子量測定とN末端付近のアミノ酸配列分析を同時に行う方法を示した。



Edman Degradation Cleavage of Peptide

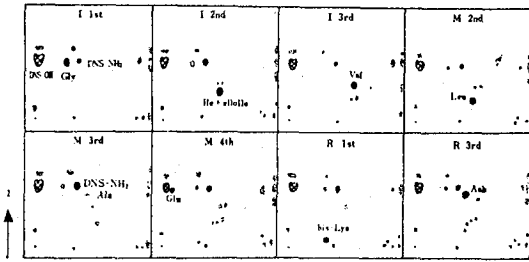
1.



2.

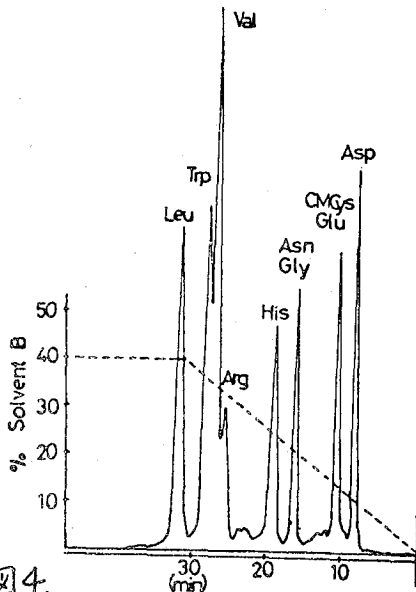
Chromatograms of FTH-Amino Acids on Polyamide Thin-Layer

- Solvent: (I) Acetone:benzene:acetic acid (4 : 2 : 1, v/v/v)
 (II) Water:pyridine:acetic acid (10 : 8 : 1, v/v/v)
 (III) Benzene:methanol:pyridine (10 : 3 : 1, v/v/v)
 (IV) Ethyl acetate:acetic acid:pyridine (15 : 8 : 1, v/v/v)
- Abbreviations: A Ala, Q Gln, L Leu, S Ser, R Arg, E Glu, K Lys, T Thr, N Asn, G Gly, M Met, W Trp, D Asp, H His, F Phe, Y Tyr, C Cys, I Ile, P Pro, V Val, X FITC and its by-products

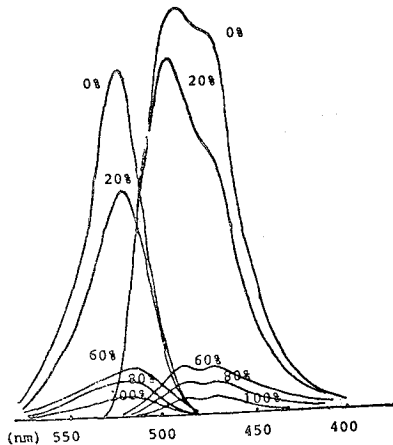


3. Chromatograms on Polyamide TLC of DNS-Derivatives Obtained by Hydrolysis of FTH-Amino Acids.

The numeral of each chromatogram is the cycle number of the Edman degradation. The abbreviations used are: I, insulin A chain; M, apomyoglobin; R, ribonuclease A. Amino acid sequence: Gly-Ile-Val(I); Val-Leu-Ser-Glu(M); Lys-Glu-Thr(R). Solvents: (1) water-formic acid (100:1.5, v/v) (2) benzene:acetic acid (9:1, v/v). Arrows: (black) dominant DNS-derivative; (dotted outline) trace DNS-derivative; (cross-hatch) DNS-OH and DNS-NH₂; (rippled) fluorescent by-product.



4. Chromatogram of FTH-amino acids, Solvent system: A, borate buffer, 0.1M, pH 3.2. B, borate buffer, 0.1M, pH 8.4 — methanol (60 : 40). Flow rate, 0.8ml/min.

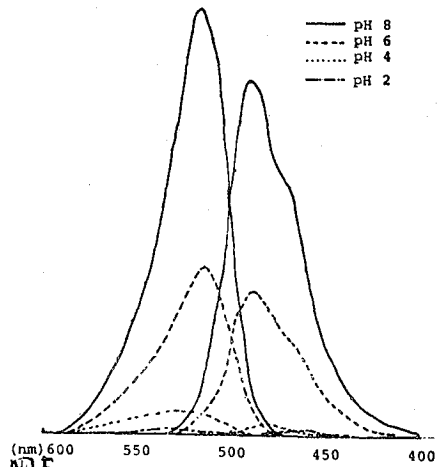


6. Effect of the Methanol Concentration on Fluorescence Spectra of FTH-Amino Acid (FTH-Arg, 10nmole/ml) The emission spectra were measured by excitation at 465nm. The excitation spectra were measured by fluorescence at 515nm.

表 1. RECOVERY OF AMINO ACIDS FROM FTH-DERIVATIVES BY HYDROLYSIS (%)

Amino acid	4 hr ⁽¹⁾		8 hr ⁽¹⁾		12 hr ⁽¹⁾		24 hr ⁽¹⁾	
	0.1 ml ⁽²⁾	0.5 ml ⁽²⁾	0.1 ml ⁽²⁾	0.5 ml ⁽²⁾	0.1 ml ⁽²⁾	0.5 ml ⁽²⁾	0.1 ml ⁽²⁾	0.5 ml ⁽²⁾
Leu	64	68	83	84	89	91	89	72
Ile ⁽³⁾	22	33	62	53	80	79	86	61
Val	35	36	68	66	78	80	82	74
Ala	32	31	43	43	44	44	44	40
Gly	100	100	100	100	100	100	100	100
Met	60	60	93	84	92	84	86	68
Pro	100	100	100	100	100	100	100	100
Tyr	41	44	66	68	73	77	78	68
Phe	44	45	69	70	78	73	52	47
Asp	75	80	100	98	96	99	97	93
Glu	85	92	100	100	100	100	100	96
His	74	77	86	86	86	89	84	65
Arg	66	64	80	80	85	77	80	80

(1) The hours for hydrolysis.
 (2) The volume of 3.7N HCl containing 0.2% SnCl₄.
 (3) Combined values of Ile and alloIle formed from FTH-Ile during the hydrolysis.



5. Fluorescence Spectra of FTH-Amino Acid (FTH-Glu, 3.9nmole/ml) The excitation spectra were measured by fluorescence at 515nm. The emission spectra were measured by excitation at 465nm.

表2. Amino acid composition of the cleaved oxidized insulin B chain

Edman degradation with FITC						
Cycle number	0	1	2	3	4	5
amino acid ^a						
CySO ₃ H (C)	2.00(2)	1.65(2)	1.67(2)	1.79(2)	1.79(2)	1.81(2)
Asx (B)	1.01(1)	0.83(1)	0.82(1)	0.70	0.54	0.39
Thr (T)	0.91(1)	0.72(1)	0.75(1)	0.78(1)	0.79(1)	0.73(1)
Ser (S)	0.91(1)	0.71(1)	0.77(1)	0.77(1)	0.81(1)	0.75(1)
Glx (Z)	3.26(3)	2.57(3)	2.64(3)	2.81(3)	2.82	2.57
Pro (P)	1.90(1)	1.00(1)	1.00(1)	1.00(1)	1.00(1)	1.00(1)
Gly (G)	3.35(3)	2.66(3)	2.74(3)	3.58(3)	3.03(3)	2.93(3)
Ala (A)	2.27(2)	1.78(2)	1.88(2)	2.00(2)	2.06(2)	1.99(2)
Val (V)	3.55(3)	2.84(3)	2.43	2.36	2.36	2.31
Leu (L)	3.96(4)	3.17(4)	3.24(4)	3.46(4)	3.49(4)	3.53(4)
Tyr (Y)	1.56(2)	1.34(2)	1.93(2)	1.47(2)	1.57(2)	1.56(2)
Phe (F)	2.60(3)	1.72	1.53	1.60	1.70	1.67
His (H)	2.08(2)	1.61(2)	1.65(2)	1.77(2)	1.77(2)	1.76
Lys (K)	0.97(1)	0.75(1)	0.77(1)	0.80(1)	0.81(1)	0.82(1)
Arg (R)	1.28(1)	1.06(1)	1.06(1)	0.84(1)	1.11(1)	1.16(1)
Edman degradation with FITC and PITC						
C	2.17(2)	2.05(2)	1.82(2)	1.89(2)	1.89(2)	1.96(2)
B	1.02(1)	0.91(1)	0.20	0.16	0.18	
T	0.77(1)	0.84(1)	0.79(1)	0.79(1)	0.82(1)	
S	0.88(1)	0.89(1)	0.78(1)	0.79(1)	0.85(1)	
Z	3.30(3)	3.01(3)	2.70(3)	2.22	2.25	
P	1.00(1)	1.00(1)	1.00(1)	1.00(1)	1.00(1)	
G	2.93(3)	2.78(3)	2.49(3)	2.59(3)	2.75(3)	
A	2.07(2)	1.93(2)	1.74(2)	1.81(2)	1.92(2)	
V	2.88(3)	1.90	1.69	1.75	1.89	
L	4.11(4)	3.81(4)	3.39(4)	3.55(4)	3.84(4)	
Y	1.74(2)	1.49(2)	1.38(2)	1.40(2)	1.54(2)	
F	1.98	1.75	1.60	1.64	1.77	
H	1.98(2)	1.72(2)	1.52(2)	1.64(2)	1.72	
K	1.04(1)	0.88(1)	0.80(1)	0.77(1)	0.90(1)	
R	0.87(1)	0.80(1)	0.72(1)	0.73(1)	0.83(1)	
Edman degradation with PITC						
C	1.87(2)	1.77(2)	1.90(2)	1.80(2)	1.92(2)	
B	0.91(1)	0.83(1)		0.16	0.18	
T	0.81(1)	0.84(1)	0.87(1)	0.77(1)	0.82(1)	
S	0.83(1)	0.76(1)	0.84(1)	0.75(1)	0.83(1)	
Z	2.84(3)	2.64(3)	2.85(3)	2.69	2.20	
P	1.00(1)	1.00(1)	1.00(1)	1.00(1)	1.00(1)	
G	2.59(3)	2.47(3)	2.61(3)	2.54(3)	2.65(3)	
A	1.82(2)	1.70(2)	1.81(2)	1.77(2)	1.87(2)	
V	2.45(3)	1.72	1.75	1.75	1.79	
L	3.48(4)	3.31(4)	3.50(4)	3.51(4)	3.59(4)	
Y	1.42(2)	1.33(2)	1.41(2)	1.08(2)	1.44(2)	
F	1.61	1.55	1.60	1.62	1.65	
H	1.54(2)	1.45(2)	1.56(2)	1.61(2)	1.66	
K	0.83(1)	0.79(1)	0.81(1)	0.54(1)	0.85(1)	
R	0.77(1)	0.72(1)	0.76(1)	0.68(1)	0.77(1)	

図7.

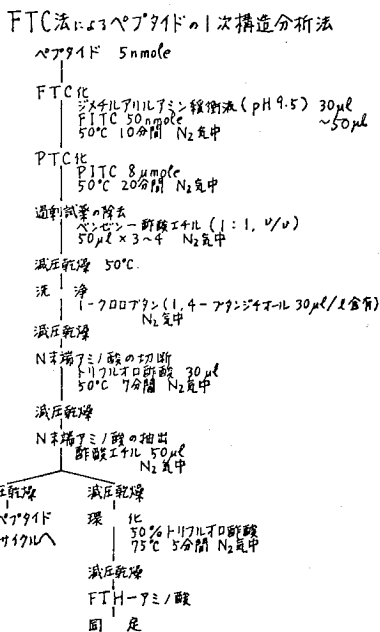


表3.

THE EXTENT TO WHICH THE SEQUENCE COULD BE DETERMINED BY THE PROCEDURE A AND B

Procedure	Amount of peptide (nmoles)
Sperm whale apomyoglobin (153 amino acid residues)	
Val-Leu ^a -Ser ^a -Glu-Gly-Glu-Trp-Gln-Leu ^a -Val-Leu ^a -His-Val-Trp-Ala-	
1 5 10 15	
Lys-Val-Glu-Ala-Asp-Val-Ala-Gly-His-Gly-	
20 25	
A -----23	45
B -----10	5.6
Soybean trypsin inhibitor (181 amino acid residues)	
Asp-Phe-Val-Leu ^a -Asp-Asn-Glu-Gly-Asn-Pro-Leu ^a -Glu-Asn-Gly-Gly-	
1 5 10 15	
Thr ^a -Tyr-Tyr-Ile ^a -Leu ^a -Ser ^a -Asp-Ile ^a -Thr ^a -Ala-Phe-Gly-	
20 25	
A -----25	49
B -----9	5.5
Oxidized insulin B chain (30 amino acid residues)	
Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu ^a -CySO ₃ H-Gly-Ser ^a -His-Leu ^a -Val-Glu-Ala-Leu ^a -	
5 10 15	
Tyr-Leu ^a -Val-CySO ₃ H-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-	
20 25	
B -----24	64
B ---3	5.0

The extent of the sequence determination using FTC-method is indicated below each peptide. Amino acid sequences of these peptides are cited in "Atlas of protein sequence and structure 1972" ed. by M. O. Dayhoff. The amounts of FITC and PITC and the volume of coupling buffer and solvent used at each procedure were as below.

Procedure	FITC (μmol)	Coupling buffer (μl)	PITC (μmol)	Extracting solvent (μl)	Washing solvent (μl)
A	1	100	40	Benzene/ethyl acetate (1:1, v/v) 150 × 3 50% Acetic acid 20 Ethyl acetate 100 × 3	Benzene/ethyl acetate (1:1, v/v) 100
B	0.23	50	8	Benzene/ethyl acetate (1:1, v/v) 50 × 3 ~ 5	1-Chlorobutane 50

^a Leu and Ile could not be distinguished on TLC. Identification of Ser and Thr were uncertain on TLC because of the weak spot.

図8. FTC法による低分子ペプチドの1次構造分析法

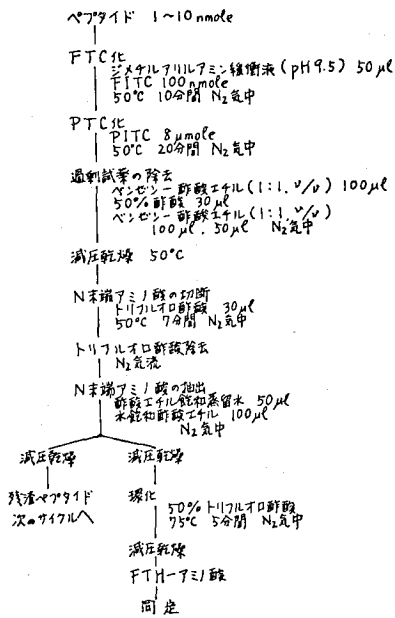


表4. The extent to which the sequence could be determined by FTC-method

Peptide (amino acid residues)	Remarks	Quantity (nmol)	Cycle identified
Bradykinin (9)	A	10	9
	B	10	9
	C	10	9
Angiotensin I (10)	A	10	4
	B	10	7
	C	10	7
Insulin B chain (30)	A	2	16
	B	2	16
apomyoglobin (153)	A	1	6
	B	1	6
	C	1	6

* A: control B: polybrene added C: polybrene+cyclochrome c added

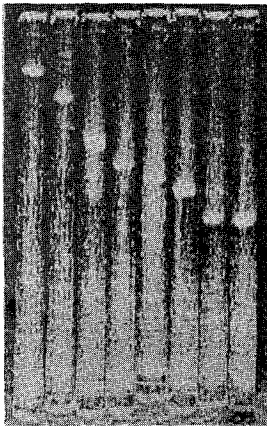


図9. Fluorescent Band Patterns of FITC-labeled Proteins.

From left to right: bovine serum albumin, ovalbumin, carboxypeptidase A, α -chymotrypsinogen A, trypsin, myoglobin, lysozyme, and ribonuclease A.

FITC-labeled proteins were prepared by the manipulation of gel filtration with Sephadex G-25. Other conditions are described in METHODS.

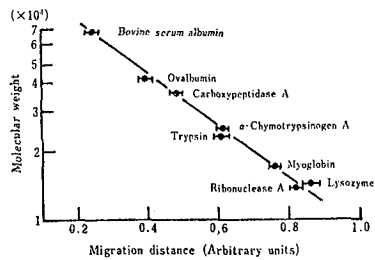


図10. Plot of Logarithm of Molecular Weight Versus Migration Distance for Several Proteins.

審査結果の要旨

同君の研究は、蛍光試薬フルオルエツセイニンソチオシアネート (FITC) 及びフェニルイソチオシアネート (PTC) を用いる新しい超微量ペプチドの一次構造解析法及び、FITC-PTC併用法を開発した点にある。同法は現行の分析法と比して、最も感度が良く、きわめてすぐれた方法である。更に、この方法を用い、酵母の接合因子、各種の脳下垂体ホルモンの一次構造解析を用い、同法の有用性を明らかにした。

FITC は、本研究室の川内等によって開発され、ペプチドと反応し、PTCと同様に逐次切断反応が可能であった。しかしPTCに比して、FITCは大分子であり、反応収率が悪く、結果的にペプチドの切断反応は数残基にとどまった。村本は、FITC反応後、未反応のN端にPTCを反応させ、ひき続く切断反応を完全に行う併用法を完成した。同法はきわめて効率良く、ペプチドの切断を行うことが可能であった。尚、混合物として得られるPTC化アミノ酸は蛍光をもたないため、検出の妨害にならない。これらの切断されたFITCアミノ酸の分析法として、薄層クロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィー等により分離法を開発し、蛍光を用いた超高感度の分析を可能とした。

更に、同君は、ペプチドにFITCを結合させ、これより、ペプチドを蛍光ラベルし、ゲル電気泳動を行う超微量での分子量の決定法も完成させた。

これらは、ペプチドの一次構造解析に寄与することが大きく、農学博士の学位にふさわしいものと思われる。