

短鎖およびイソペプチドの配列分析の新展開

— Phenylthiocarbamyl (PTC) ペプチドのオフライン分離

およびその後の転換反応の利用 —

佐藤 健 司⁽¹⁾・奥 村 毅⁽²⁾・樋 垣 典 子⁽³⁾

中 村 考 志⁽⁴⁾・大 槻 耕 三⁽⁵⁾

Advancement in Sequence Analysis of Short Chain Peptides and Isopeptides

— Off-Line Preparation and Subsequent Conversion of Phenylthiocarbamyl (PTC)-peptides for Protein Sequence Analysis —

by Kenji SATO, Noriko HIGAKI, Yasusi NAKAMURA and Kozo OHTSUKI

*Department of Food Sciences and Nutritional Health,
Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan*

and

Takeshi OKUMURA

Life Science Department, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan

(Received January 22, 1999)

Abstract

It has been difficult to isolate hydrophilic short chain peptides by reversed phase HPLC, as they frequently can not be retained on column under normal elution condition. It has been, therefore, difficult to determine amino acid sequence of them. To solve this problem, a hydrophilic short chain peptide was derivatized with phenylisothiocyanate. Resultant phenylthiocarbamyl peptide was successfully isolated by reversed phase HPLC and analyzed by a protein sequencer (PPSQ-10/21, Shimadzu) of which program was changed to start from cleavage reaction. By using the present approach coupled with pyroglutamate aminopeptidase digestion, amino acid sequence of some pyroglutamyl peptides in a wheat gluten hydrolysate can be determined. In addition, this approach coupled with off-line HCl hydrolysis enables to determined ϵ -(γ -glutamyl) lysine isopeptide structure in sardine meat.

Keywords : Peptide isolation, Peptide sequence, Short chain peptide, Deblocking, Pyroglutamic peptide, Isopeptide, Pyroglutamate aminopeptidase, ϵ -(γ -glutamyl) lysine

要 旨

逆相 HPLC (高速液体クロマトグラフィー) での分離が困難な親水性短鎖ペプチドをフェニルイソチオシアネート (PITC) で誘導化し、フェニルチオカルバミル (PTC)-ペプチドとして逆相 HPLC で分離後、切断反応から開始するようにプログラムを変更した島津プロテインシーケンサ (PPSQ-10/21) により配列分析を行った。本法により食品中の短

注⁽¹⁾ 京都府立大学 人間環境学部 農博 (4) 京都府立大学 人間環境学部 薬博
 (2) ライフサイエンス機器部 (5) 京都府立大学 人間環境学部 理博
 (3) 京都府立大学 人間環境学部

鎖アミノ末端閉鎖ペプチドのデブロック後の配列分析が容易となった。また、 ϵ -(γ -グルタミル)リジンイソペプチドの配列分析にも、PTC 誘導化物を分離後のフェニルチオヒダントイン (PTH) 化および塩酸加水分解が有効であった。

1. はじめに

タンパク質およびペプチドの配列分析は、気相シーケンサの普及によりもはや通常の分析手段となり、そこから得られる知見は生命科学全般で広く用いられている。特に抗体を得るための抗原のデザイン、遺伝子の解析などを目的としたタンパク質の部分一次構造解析では、電気泳動後のサンプルを PVDF (ポリビニリデンジフリオリド) 等の膜に転写し、それをそのままシーケンス分析することが可能となり、著しく簡便化されている。また、タンパク質の構造解析においても特異性の高いエンドペプチダーゼの発見、およびその限定分解により生じるペプチドを分離するための逆相 HPLC (高速液体クロマトグラフィー) をはじめとする高性能充填剤の開発によりかなり容易となっている。しかし、意外なことに現在においても親水性短鎖ペプチドの配列分析が困難である場合がしばしば見られる。

現在構造解析を目的としたペプチドの分離には、0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) 等を用いた酸性条件下での逆相 HPLC が一般的に用いられている。しかしながら、親水性アミノ酸から構成される短鎖ペプチドの分離が困難で、しばしば逆相カラムにほとんど保持されず緩衝液成分とともに溶出されてしまう。そのため、タンパク質の限定分解により生じたペプチドの一部が、しばしば逆相 HPLC で分離されず、タンパク質中の配列の一部を見落としてしまう場合がある。また生体や食品中にこのような短鎖ペプチドがしばしば存在し、これらのペプチドの分離も同様に困難である。

本稿ではこのような場合の解決法の一つとして、親水性短鎖ペプチドをエドマン分解の初期反応であるフェニルチオカルバミル (PTC) 誘導化物とし疎水性を増し、この PTC ペプチドを揮発性緩衝液を用いて逆相 HPLC により分離し、分取した PTC ペプチドをプロテインシーケンサにより切断反応から分析する手法を開発した。本法はアミノ末端が不安定なグルタミン残基を持つペプチドのアミノ末端の保護にも有効であった。さらに塩酸加水分解と組み合わせ合わせた側鎖結合を持つイソペプチドの構造解析にも応用可能であった。

2. 材料および方法

2.1 試薬

グルタミル-グルタミン酸 (Glu-Glu)、および ϵ -(γ -グルタミル)リジンは、それぞれ Peptide Institute 社および SIGMA 社より購入した。その他の試薬および酵素の由来は参考文献に記載している。

2.2 装置

ペプチドおよびその PTC 誘導化物の分離、アミノ酸分析にはグラジエントバルブユニット FCV-9AL, デガッサーユニット DGU-2A, 紫外可視吸光分光計 SPD-6AV, 送液ユニット LC-9A ポンプ, およびマニュアルサンプルインジェクタ Model 7125 から構成される島津低圧グラジエント HPLC システムを用いた。データは島津インテグレート CR-6A, またはデータ処理装置 AI-450 (Dionex) により処理した。島津プロテインシーケンサは PPSQ-10 または PPSQ-21 を用いた。

2.3 ペプチド標品の調製およびその分画

小麦グルテンペプチドは Matoi の方法¹⁾で調製した。小麦ペプチド中のアミノ末端が閉鎖されたペプチドは図 1 に示すように、50 mM ギ酸で平衡化した AG50 \times 8 強カチオン交換樹脂 (Bio-Rad 社) を用いて Mini-Spin Column (ATTO 社) により調製した²⁾。アミノ末端閉鎖ペプチドは、20 mM ギ酸で平衡化した polyHYDROXYLETHYL A Column (PolyLC) を用いたゲルろ過モード、および 0.1% TFA で平衡化した Cosmosil MS 5C18 Column (ナカライテスク社) を用いた逆相モードにより、アセトニト

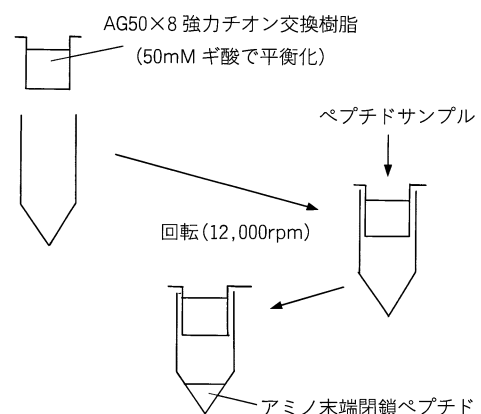


図 1 アミノ末端閉鎖ペプチドの調製
Preparation of amino terminal-blocked peptides

リルのグラジエント溶出によりさらに分画した。単離したアミノ末端閉鎖ペプチドはピログルタメートアミノペプチダーゼ分解を行った²⁾。

マイワシ肉より調製した筋肉ゾルを25°Cで24時間放置した。この処理によりマイワシ肉中のトランスグルタミナーゼによりタンパク質中のリジンとグルタミンの側鎖間がペプチド結合した ϵ -(γ -グルタミル)リジンイソペプチドが導入される³⁾。この架橋された筋肉タンパク質を完全酵素分解し、 ϵ -(γ -グルタミル)リジンイソペプチドを遊離させた³⁾。

2.4 ペプチドの配列分析

短鎖ペプチドは Bidlingmeyer らの方法⁴⁾により PTC 誘導化物として 150 mM 酢酸アンモニウム緩衝液, pH 6.0 とアセトニトリルのグラジエント溶出を用いた Sato らの方法³⁾で分離した。カラムは Cosmosil AR/MS C18 (250 × 4.6 mm I.D.) を用いた。分離された PTC 誘導化物は減圧

乾固し、さらにアンモニアを除去するためメタノール：トリエチルアミン：水=7：2：1溶液 10 μ l を加え再乾固した。PTC 誘導化物を37%アセトニトリルに溶解しポリブレン処理を行ったガラスデスクに添加し、プロテインシーケンサで分析した。ただし、この場合は TFA による切断反応から開始するようにプログラムを変更した。PTC- ϵ -(γ -グルタミル)リジンは Tarr の方法⁵⁾によりマニュアルでフェニルチオヒダントイン(PTH)- ϵ -(γ -グルタミル)リジンに変換し、PTH 誘導化物を脱気下で150°Cの塩酸蒸気により気相加水分解を行った。生じた PTH-アミノ酸も酢酸アンモニウム緩衝液を用いて前述の方法で分離した。

3. 結果および考察

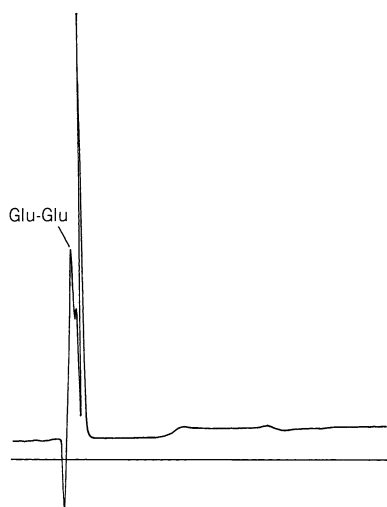
3.1 標準短鎖ペプチドの構造解析

図2に示すように、Glu-Glu は通常のパепチドの分離条件である 0.1% TFA 酸性下では逆相モードではほとんどカラムに吸着せず、水の負のピークや緩衝液成分と重なって溶離する。一方、PTC-Glu-Glu は比較的早く溶出するが、ポイドボリュームより後に溶出し、他の成分との分離が可能となった。この画分をプロテインシーケンサにより分析した。ただし、1 サイクル目はシーケンサ内で誘導化処理を行わず、切断、転換反応のみを行っている。2 サイクル目からは通常プログラムにより分析を行った。

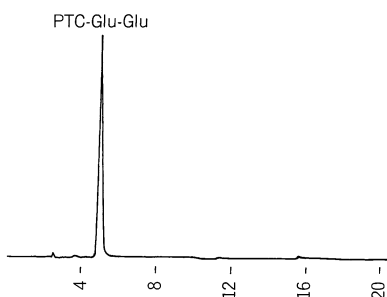
その結果、図3に示すように1 サイクル目は誘導試薬由来のピークがほとんど見られない PTH-Glu のピークが認められた。2 サイクル目も PTH-Glu が検出され、Glu-Glu の配列を読みとることが可能となった。この実験により短鎖ペプチドの分離および解析が本法により可能であることが示された。特に1 サイクル目は、通常分析条件であれば、環境からのアミノ酸の混入によりしばしば多くの不純ピークが現れ同定が困難になる場合があるが、本法は PTC-ペプチドを HPLC で分離するため、1 サイクル目のクロマトグラムにはアミノ末端のアミノ酸のみのピークが認められ、同定が著しく容易となっている。

3.2 短鎖ピログルタミルペプチドの構造解析

小麦グルテンのようにグルタミン残基を豊富に含むタンパク質を酵素分解するとかなりの割合でアミノ末端がグルタミンとなるペプチドが生じ、その後の加熱等によりアミノ末端がピログルタミン酸に変化することを見いだしている²⁾。アミノ末端のピログルタミン酸残基はピログルタメートアミノペプチダーゼにより切断することが可能である。しかし、小麦グルテンにはグルタミンの連続した配列が見られるため、アミノ末端のピログルタミン酸残基を切断しても新たにアミノ末端にグルタミン残基が生じ、その後の精製操作中に再びピログルタミン酸が生じる可能性がある。

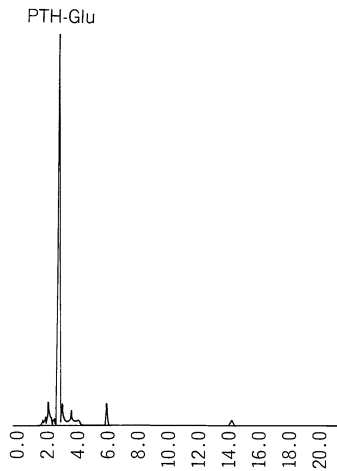


(a) 0.1% TFA 存在下で20分間のアセトニトリル0~40%の濃度勾配溶出 (1 ml/min)。検出は 214 nm
Mobile phase: 0.1% TFA with gradient of acetonitrile (0-40% at 1 ml/min. for 20 minutes.)
Detection: UV: 214 nm

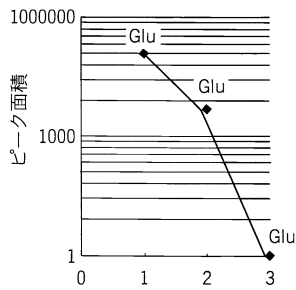


(b) Sato らの方法³⁾で溶出。検出は 254 nm
HPLC under the operational conditions proposed by Sato et al.³⁾

図2 Glu-Glu および PTC-Glu-Glu の逆相 HPLC による分離パターン
Reversed phase HPLC of Glu-Glu and PTC-Glu-Glu



(a) 1サイクル目のクロマトグラム
Chromatogram of the first cycle



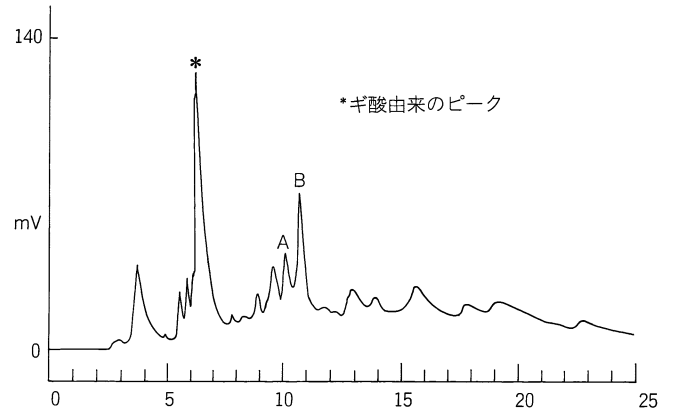
(b) サイクル
Cycle

図3 切断反応からスタートした PPSQ-10 の PTC-Glu-Glu のシーケンス結果

Sequence data of authentic PTC-Glu-Glu obtained by the PPSQ-10 protein sequencer, programmed to start analysis at the cleavage reaction

そのため、著者らはピログルタメートアミノペプチダーゼ分解物をただちに PITC (フェニルイソチオシアネート) で誘導化し、新たに生じたグルタミンのアミノ末端を PTC 化することで保護した。この操作により末端アミノ基の保護と同時に疎水性を増すことで生じた短鎖ペプチドの分離を容易にすることができる。また、PTC 化により 254 nm での特異的な検出が可能となり、ピログルタメートアミノペプチダーゼにより切断された成分の特異的な検出が可能となった。そのため、未反応物と反応生成物の分離が容易となる。

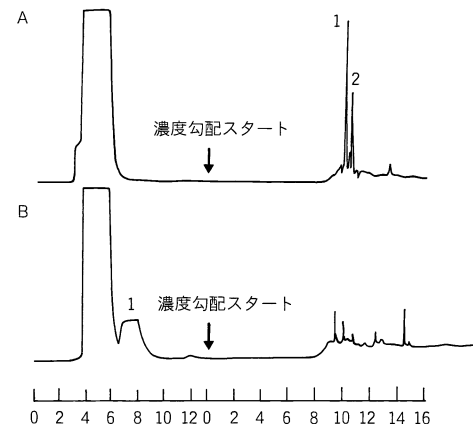
図4に小麦グルテンペプチドのアミノ末端閉鎖ペプチド画分を polyHYDROXYLETHYL A カラムにより分離した結果を示す。多くのピークが分離しているが主要なピーク (A, B) をさらに逆相 HPLC で分画した。その結果 A のピークはさらに2つに分画した。一方、B はカラムに強く結合する成分(1)が主成分であった。A-1, B-1 画分をピログルタメートアミノペプチダーゼで消化し、PTC 化した



(a) polyHYDROXYLETHYL A カラムによるゲルろ過モードでの分離

Separation by gel filtration HPLC with a polyHYDROXYLETHYL A column

*Peak attributable to formic acid



(b) 逆相 HPLC による分離 (15分間の0~40%のアセトニトリルの濃度勾配により溶出)

Separation by reversed phase HPLC

Mobile phase: 0.1% TFA with gradient of acetonitrile (0-40% at 1 ml/min. for 15 minutes, starting at the position of arrow.)

図4 小麦グルテンアミノ末端閉鎖 (ピログルタミル) ペプチドの分離

Separation of amino terminal-blocked (pyroglutamyl) peptides in wheat gluten hydrolysate

後、酢酸アンモニウム緩衝液を用いた逆相 HPLC で分離し、酵素ブランクにないピークを分取した。図5に示すように A-1 中の矢印で示すピークを前述の方法でプロテインシーケンサで分析したところ Gln-Pro-Gln のピークが読みとれた。このペプチドはアミノ末端閉鎖画分に存在し、ピログルタメートアミノペプチダーゼ消化によりアミノ基が遊離してきたため、pyroGlu-Gln-Pro-Gln と同定した。一方、B-1 からは PTC-Gln のピークが生じ、この画分はシーケンサで分析を行うまでもなく pyroGlu-Gln と同定できた。これらのペプチドと類似した配列が男性生殖巣に存在することが報告されているため、経口摂取した時の生理機能の有無について早急に評価する必要があると考えてい

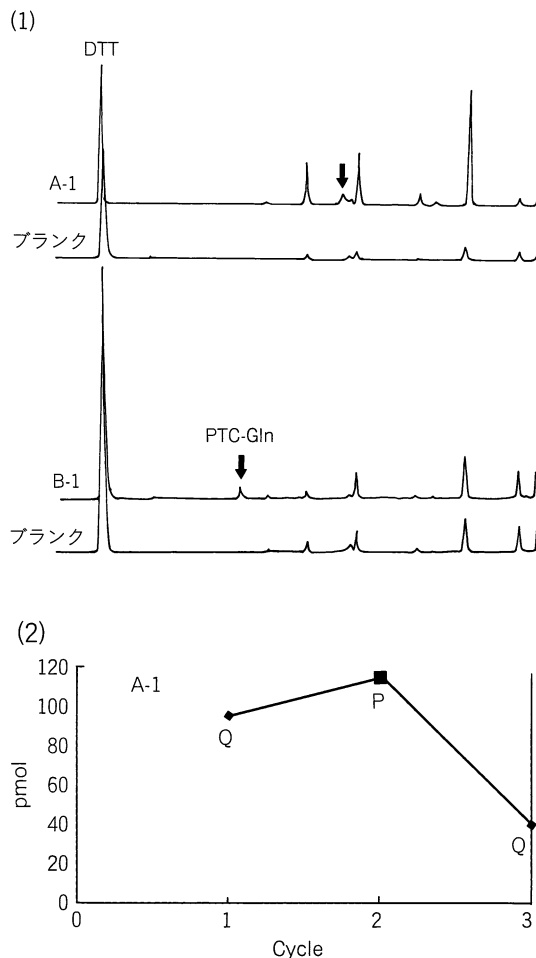


図5 ピログルタメートアミノペプチダーゼ消化した小麦グルテンピログルタミルペプチド (A-1, B-1) の PTC-誘導体の分離(1) および配列分析(2)

Separation of PTC-derivatives of pyroglutamate aminopeptidase digests of the pyroglutamyl peptides (A-1, B-1) from the wheat gluten hydrolysate and its sequential analysis

る。このようなペプチドを従来法で分析した場合、ピログルタメートアミノペプチダーゼ消化により生じた Gln-Pro-Gln のような小ペプチドを酵素反応溶液から逆相 HPLC で分離するのは困難であり、また迅速に分析を行わないと再びピログルタミルペプチドにさらに変化することが考えられる。今回のアプローチではアミノ末端の保護とその分離が可能である。この手法を用い、現在までにこの小麦グルテンペプチドから14種のピログルタミルペプチドの構造を決定した。PPSQ-10/21 プロテインシーケンサではアンモニア誘導化物が PTH-Gln の近くに溶出するため、サンプルに混入しているアンモニアを除去するためにメタノール：トリエチルアミン：水、7：2：1の溶液を10 μ l ほど加えて乾固し、アンモニアを蒸発除去している。今回 PTC ペプチドの分離に酢酸アンモニウム緩衝液を用いているため、この操作は必要である。また一般のプロテインシーケンサの分析においても、ガラスデスクにサンプルを

乾固した後に上記のトリエチルアミン溶液を加え乾燥操作を行った方が1サイクル目のノイズが減少することを経験している。

3.3 ϵ -(γ -グルタミル)リジンイソペプチドの構造解析

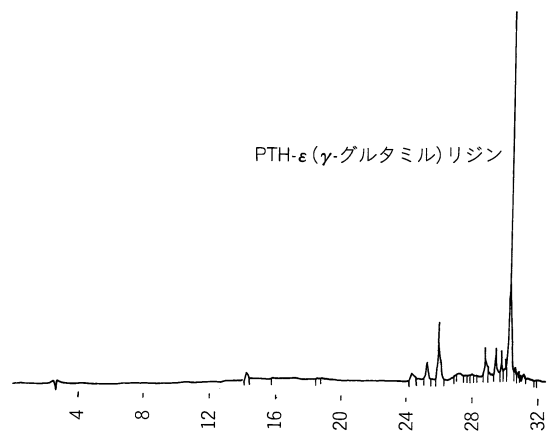
タンパク質のグルタミンおよびリジン残基の一部を架橋し、 ϵ -(γ -グルタミル)リジンイソペプチドを生じるトランスグルタミナーゼが生体試料、食品中に見いだされその生理機能や食品の物性への影響が調べられている。また近年微生物由来のトランスグルタミナーゼが大量に調製され、食品の品質改良材として実際に商業ベースで用いられている。このようなトランスグルタミナーゼにより架橋された ϵ -(γ -グルタミル)リジンイソペプチドの同定を行った。

これまでに ϵ -(γ -グルタミル)リジンイソペプチドは酵素分解により遊離させた後、OPA (オルトフタルアルデヒド) または PTC 化し、その誘導化物の逆相 HPLC の分離時間により同定されているが、酵素分解物中の ϵ -(γ -グルタミル)リジンイソペプチド量はかなり少なく、直接的な構造解析はほとんど行われていなかった。そこで著者らはエドマン反応と塩酸加水分解を併用した ϵ -(γ -グルタミル)リジンイソペプチドの同定法を考案した。

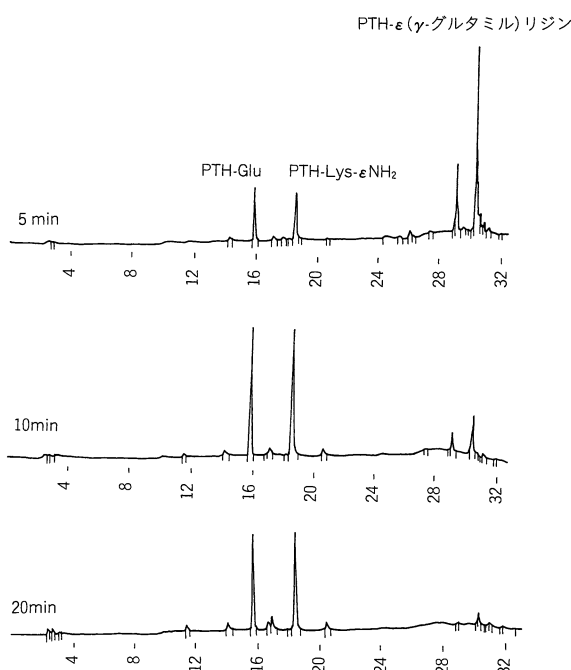
内因性トランスグルタミナーゼにより架橋したマイワシ肉の酵素分解を行い³⁾、遊離してきたアミノ酸、ペプチドを PTC 化し、酢酸アンモニウム緩衝液を用いて逆相 HPLC により分離した。その結果、ほとんどのタンパク質構成アミノ酸残基は遊離のアミノ酸にまで分解されていた。

しかし、バリンとメチオニンの中にアミノ酸の標準物質に見られないピークが認められた。このピークは標準の ϵ -(γ -グルタミル)リジンイソペプチドの PTC 誘導化物の分離時間と一致した (図 6(c): 1) が、このピークをシーケンサに直接導入すると PTH-Lys および PTH-Glu とは異なる 1 本のピークが生じた (図 6(a))。これはエドマン分解によってはイソペプチド結合は切断されず、PTH-Lys と PTH-Glu とがイソペプチド結合した成分が生じていると考えられる。そこで、この産物を150°Cの塩酸蒸気により加水分解を行ってみた。図 6(b)に示すように加水分解時間の進行とともに2本のピークが生じてきた。両ピークは15分までは増加し、その後緩やかに減少した。片方のピークは PTH-Glu と一致し、他方は、Lys を PTH 化し、それを同様に加水分解したピークと一致し、 α 位のアミノ基が PTH 化され、 ϵ 位のアミノ基が遊離のリジン誘導化物である PTH-Lys- ϵ NH₂ であると考えられる。この結果は PTH 誘導化イソペプチドは150°Cの塩酸加水分解によりイソペプチド結合の切断が生じ、かつ誘導化物は比較的安定であることを示す。

実際のマイワシの酵素分解物中に認められた PTC- ϵ -



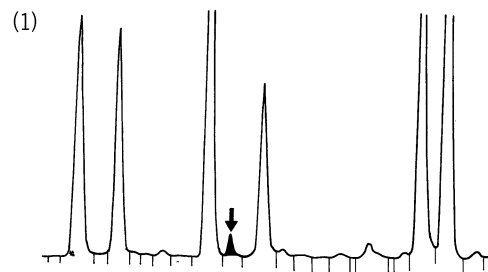
(a) 標準 PTH- ϵ (γ -グルタミル) リジン
Standard PTH- ϵ (γ -glutamyl) lysine



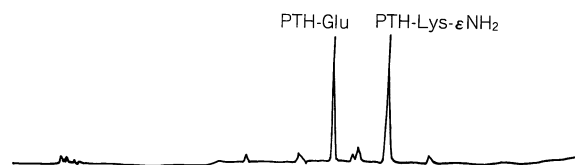
(b) 標準 PTH- ϵ (γ -グルタミル) リジンの塩酸加水分解時間により生じる PTH-Glu および PTH-Lys- ϵ NH₂
PTH-Glu and PTH-Lys- ϵ NH₂ produced in HCl hydrolysis of the standard PTH- ϵ (γ -glutamyl) lysine

(γ -グルタミル) リジンイソペプチドに相当するピークに同様の処理を行ったところ、標準と同じく PTH-Glu と PTH-Lys- ϵ NH₂ のピークが認められた (図 6(c): 2)。そのため図 6 ((c): 1) の矢印のピークは Glu-Lys, Lys-Glu ではなく ϵ -(γ -グルタミル) リジンイソペプチドであることが証明された。なぜならば Glu-Lys, Lys-Glu であるならば PTC 誘導化物をシーケンサで分析すると PTH-Glu または PTH-Lys が 1 サイクル目に出現するはずである。塩酸で加水分解される結合を持ちその産物が PTH-Glu と ϵ -NH₂-PTH-Lys となるには、このペプチドが ϵ -(γ -グルタミル) リジンイソペプチドである以外に考えられない。

以上の結果により、PTC ペプチドをシーケンサで分析し



(2)



(c) マイワシ肉酵素分解物中に認められた PTC- ϵ (γ -グルタミル) リジン (1: 矢印) とその PTH 誘導化物の加水分解 (2)
PTC- ϵ (γ -glutamyl) lysine derived from proteolytic digest of sardine muscle (1) and HCl hydrolysate of its PTH derivatives (2)

図 6 標準 PTH- ϵ (γ -グルタミル) リジンおよびマイワシ肉の酵素分解物中に認められた PTC- ϵ (γ -グルタミル) リジンの PTH 誘導化物の定沸点塩酸蒸気による加水分解物の分離パターン
Elution patterns of HCl hydrolysates of authentic PTH- ϵ (γ -glutamyl) lysine and that derived from the exhaustive enzymatic hydrolysate of sardine muscle

た時に前述のようにシーケンスが読めない場合、そのピークを分取し加水分解等を行うことでイソペプチドのような複雑な構造を決定できる可能性がある。糖結合アミノ酸などもペプチド結合の加水分解より穏和な条件でアミノ酸を遊離させることができるため、シーケンサにより未知のピークが生じたときそのピークを分取し切断反応を行えば、修飾アミノ酸の同定も可能であると考えられる。

4. む す び

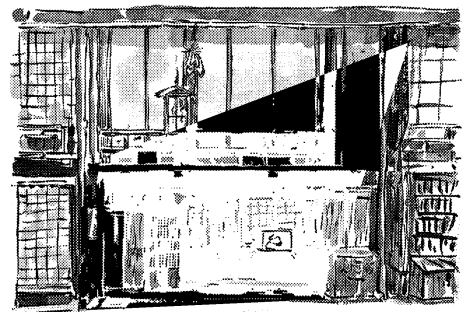
逆相 HPLC で分離が困難な親水性ペプチドの分離、またアミノ末端が不安定なグルタミンを持つペプチドのアミノ末端保護に PITC による誘導化が有効であり、その結果生

じた PTC-ペプチドは 1 サイクル目を切断反応からスタートするようにプログラムを改変した島津プロテインシーケンサ (PPSQ-10/21) により同定可能であった。またイソペプチドのような通常のシーケンサで配列の読めないペプチドも PTC-ペプチドとして分取し、安定な PTH 誘導体へ変換後、酸加水分解により生じる成分を PTH アナライザで分析できる可能性を示した。これらの短鎖ペプチド、イソペプチドは必ずしも希な成分ではなく食品の加工中などかなりの量が生じていることを見いだしている。現在遺伝子の解析は飛躍的に進歩しキット化されているが、食品の加工や、生体での生理的病理的な反応によって生じるペプチド成分の構造解析は直接タンパク質化学的な解析を行う必要がある。そのような場合、本稿で述べている通常のシーケンサで配列分析が困難なペプチドの構造解析法の開発、およびその普及が今後重要な問題となると考えている。

参 考 文 献

- 1) H. Motoi: Jpn. Kokai Tokyo Koho 6-245790, Int. Cl. C12P 21/06 (1994)
- 2) K. Sato, R. Nishimura, Y. Suzuki, H. Motoi, Y. Nakamura, K. Ohtsuki and M. Kawabata: Occurrence of indigestible pyroglutamyl peptides in an enzymatic hydrolysate of wheat gluten prepared on an industrial scale, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3403~3405 (1998)
- 3) K. Sato, Y. Tsukamasa, C. Imai, K. Ohtsuki, Y. Shimizu and M. Kawabata: Improved method for identification and determination of ϵ -(γ -glutamyl) lysine cross-link in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by high-performance liquid chromatography separation, *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 806~810 (1992)
- 4) B. A. Bidlingmeyer, S. A. Cohen and T. L. Tarvin: Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization, *J. Chromatogr.*, **336**, 105~113 (1984)
- 5) G. E. Tarr: In *Methods of protein microcharacterization*, J. E. Shively Ed., Humana Press, Totowa, NJ, **56**, 1105~1112 (1990)

1) H. Motoi: Jpn. Kokai Tokyo Koho 6-245790, Int. Cl.



旅籠屋の店構(妻籠)



石置屋根(妻籠)