



蛋白質の新しい一次構造決定法

下 西 康 嗣*

化合物の構造解明がその性質を知る上で必須であることは言を待たない。我々の研究分野であるペプチドや蛋白質化学においても、ペプチドや蛋白質の一次構造すなわちアミノ酸配列を解明することは研究のスタートであると同時に構造を知ることによってペプチドや蛋白質の生物活性発現のメカニズムを理解することが可能となってくる。蛋白質の研究が、Sanger¹⁾らによって開発されたペプチドの一次構造決定法によって飛躍的に進展した歴史や、また最近考案された核酸の塩基配列決定法が生物学における分子レベルでの認識を一層深める端緒となっている事実は優れた構造決定法の開発が研究や学問の進歩に如何に貢献しうるかを如実に物語っている。

私共の研究室では、三年程前から本学教養部物理学教室の松田久教授らとペプチドの質量分析測定に関する共同研究を行なってきたが、その過程でペプチドのアミノ酸配列を決める全く新しい方法²⁾を考案した。その概略を既知の方法と比較しながら紹介してみたい。

ペプチドや蛋白質のアミノ酸配列を決めるには、一般にポリペプチドや蛋白質をそれらを構成する小ペプチドに切断し、得られる多数の小ペプチドのアミノ酸配列を決める。そしてそれらからもとのポリペプチドや蛋白質のアミノ酸配列を再構成する方法がとられる。この際、小ペプチドの混合物から単一なものを分離、精製し、個々の小ペプチドの構造を決める方法と混合物のまま各構成成分の構造を一挙に決める方法がある。前者はエドマン分解法³⁾と呼ばれている方法で1回の反応サイクル毎にペプチドの末端から1ケのアミノ酸残基を切りとり、そ

れを同定する。アミノ酸残基の切り取れた残りのペプチドについて同じ反応サイクルを繰返していけば、どのような種類のアミノ酸がどのような順序で切り取れてくるか、すなわちアミノ酸配列がわかる。一方、後者はポリペプチドや蛋白質を部分加水分解して得られる小ペプチドを混合状態のまま揮発性誘導体に変換し、ガスクロマトグラフィーにて混合物を分離しながら、分離された各成分を連続的に質量分析計に導入し、電子衝突イオン化(EI)または化学イオン化(CI)法で分析を行う方法である。質量分析計で測定される莫大なデータはコンピュータで処理され、個々の小ペプチドのアミノ酸配列が決められる。二つの方法を比べると、大まかに言って前者は化学的手法を、後者は物理的手法を主とした分析法と見ることが出来る。両者にはその分析的手法に依拠する長所、短所がある。前者では、昨今クロマトグラフィーの技術が進歩して微量の混合物からでも構成成分を効率よく分離できるようになってはいるが、ペプチドの分離、精製は一般に試行錯誤で、割合、時間と労力を必要とする。後者においては混合状態にある難揮発性ペプチドを揮発性誘導体に変えるための反応が必要であって、そのため混合物の複雑さが一層増幅されるといふ欠点がある。

分析法は簡単、迅速かつ信頼性の高いことが望ましいから、上記二つの方法を比べてみた場合、我々には原則的には後者の考え方のように混合物を各成分に分けることなく分析できる方法が有利に思われた。このような立場から考察するうちに、私共の研究室では前者の方法においてほぼ確立されつつある化学反応の利点を生かしながら、これに後者の方法で用いられているものとは異なった質量分析法(Field-desorption mass spectrometry, FD-MSと

*下西康嗣 (Yasutsugu SHIMONISHI), 大阪大学蛋白質研究所, ペプチドセンター, 助教授, 理学博士, 生物有機化学

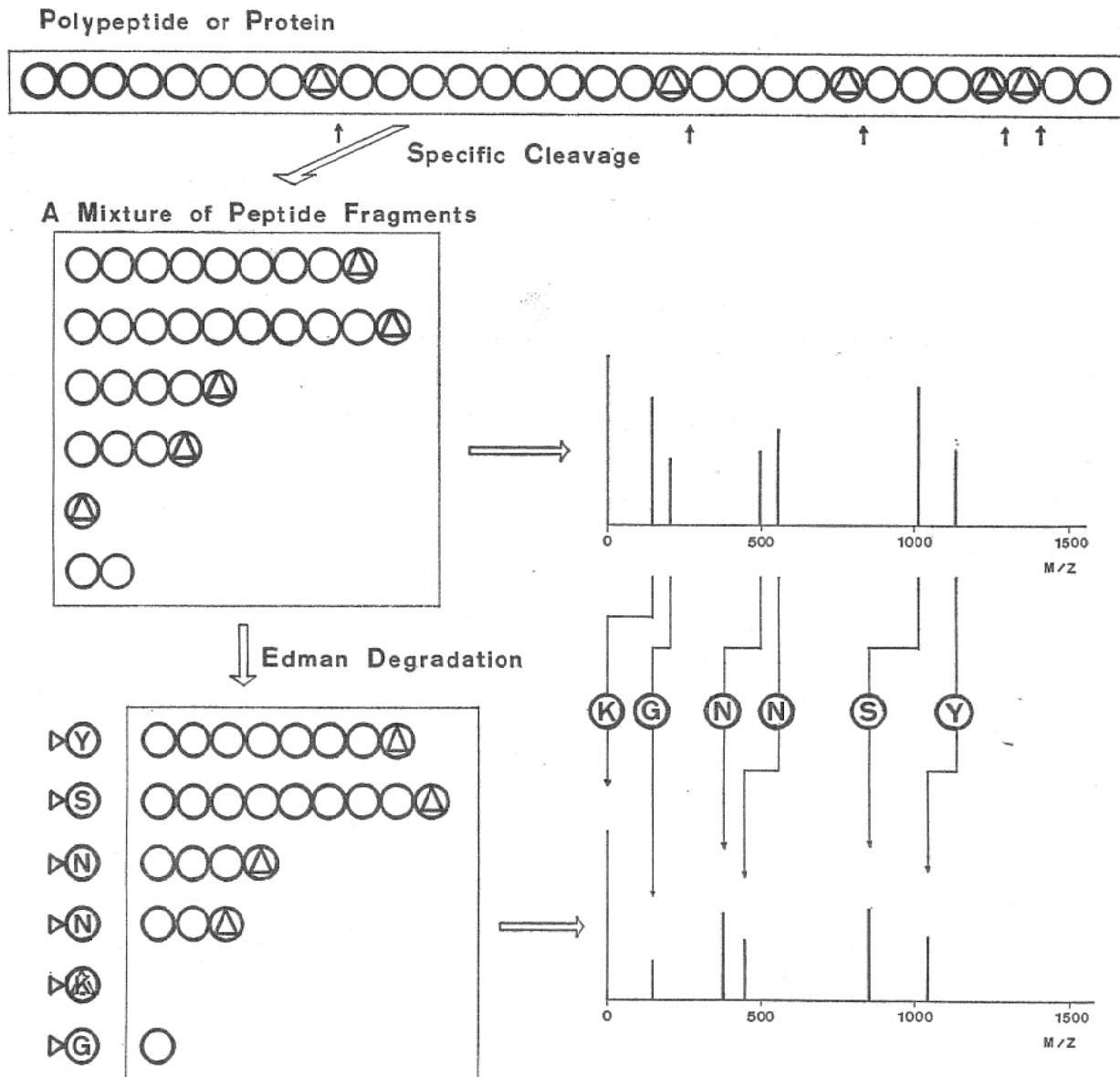


図1 エドマン分解とFD-MSを用いたペプチド混合物の末端アミノ酸残基を決める方法。

略記)を組合せて混合状態のペプチドのアミノ酸配列を決める方法を思いつくに至った。

方法の原理を簡単に記せば次の如くなる。

1) ペプチド混合物を個々のペプチドに分離することなく、FD-MSで測定し個々のペプチドの分子量を知る。2) 1)の混合物を先述したエドマン分解法で処理し、個々のペプチドの末端アミノ酸残基を同時に切断する。3) 2)で遊離するアミノ酸誘導体はクロマトグラフィーによって同定する。4) 2)で末端アミノ酸残基の取り除かれた残りのペプチドの分子量を1)と同様な方法で測定する。1)～4)の測定の様子を模式的に書けば図1のようになりペ

プチド混合物中の個々のペプチドの末端アミノ酸残基の種類が一度に決められることになる。また、1)～4)の操作を繰返すことによって混合状態のまま個々のペプチドのアミノ酸配列が解明される。

FD-MSは約10年余り前、西ドイツ・ボン大学のBeckey⁴⁾教授によって考案された質量分析法の一種である。これは直径約 10μ のタングステン線にはやした炭素のwhiskerをエミッターとして、その上に試料を塗布しエミッターと対向電極間に高圧(～3KV)をかけると試料はイオン化されると同時にエミッターから剥ぎとられるように放出され、磁場を通過させ

た後検出するという方法である。現在汎用のガスクロマトグラフと連結させて使われている EI-または CI-MS は分子内部の構造に関する情報は多く得られるが、分子量を示す分子イオン或るいは擬分子イオンは測定しがたい。これに対して FD-MS では分子の内部構造を知る手掛りとなるイオンは余り観測できないが、ペプチドのような難揮発性化合物の分子イオン又は擬分子イオンを特徴的に観測できる。我々はこの FD-MS の特色を逆手に利用すればペプチド混合物中の個々のペプチドの分子量を一度に知ることができると考えたわけである。

実際に種々の構造既知のペプチド混合物について測定したところ、個々のペプチドの分子量（遊離ペプチドは一般に擬分子イオンとして観測される）が一度に観測できることがわかった。また、上記 1) ~ 4) の操作を行なってペプチドのアミノ酸配列を簡単に決定できることも実証された²⁾。

私共の考案した方法が単に、ペプチド混合物でもアミノ酸配列をきめることができるということのみならず、もう一つの大きな特徴は個々のペプチドの分子量を正確に知ることができるといふことにある。測定しようとするペプチドが蛋白質由来の 20 種類のアミノ酸から構成されている場合には各アミノ酸の残基量はロイシンとイソロイシン及びグルタミンとリジンを除いてすべて異なった値をとっているから、ペプチドの分子量がわかればそのペプチド中に含まれるアミノ酸残基の数と種類すなわち組合せは簡単に計算できることになる。先にポリペプチド或るいは蛋白質のアミノ酸配列を決めるには、これらを構成する小ペプチドに切断すると記したが、ここでポリペプチド或るいは蛋白質を二つ以上の異なった方法によって小ペプチドに切断すれば二つ以上の異なった小ペプチドの混合物が得られる。上記のようにこれら混合物中の

個々の小ペプチドの分子量を測定すれば、それらに含まれるアミノ酸残基の組合せがわかり、この組合せを基にしたコンピュータープログラム⁵⁾によってポリペプチドや蛋白質のアミノ酸配列を検索できる。またこの検索法によれば、必ずしもペプチドのすべてのアミノ酸配列を調べなくても部分的な配列のみで、もとのポリペプチドや蛋白質のアミノ酸配列を決めることができる。このように正確な分子量を知ることが配列決定の測定回数が少なくすみ、微量の試料で構造を決めることが可能となる。事実、この検索法と上記 1) ~ 4) の測定とを組合せ構造未知のポリペプチドのアミノ酸配列を僅かな測定によって決めることができた⁶⁾。

私共はここに記述した方法がポリペプチドや蛋白質の一般的な一次構造決定法として利用されるためには、なお測定精度の向上が必要と考えている。特に FD-MS におけるイオン化効率をもっと上げることによって、微量の試料の測定や m/z 数千のイオンの測定が可能となるように願っている。

文 献

- 1) F. Sanger : *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
- 2) Y. Simonishi, Y.-M. Hong, T. Matsuo, I. Katakuse, and H. Matsuda, *Chemistry Lett.*, 1369 (1979); Y.-M. Hong, T. Kitagishi, T. Matsuo, H. Matsuda, and I. Katakuse : *Eur. J. Biochem.*, **112**, 251 (1980).
- 3) P. Edman and A. Henschen : "Protein Sequence Determination", (Needleman, J. M. ed) pp. 232 (1975). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- 4) H. D. Beckey : *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **2**, 500 (1969).
- 5) T. Kitagishi, Y.-M. Hong, and Y. Shimonishi : *Int. J. Pept. Protein Res.*, in press.
- 6) Y. Shimonishi, Y.-M. Hong, T. Kitagishi, I. Katakuse, T. Matsuo, H. Matsuda, S. Hara, T. Ikenaka, and Y. Izumi : *Chemistry Lett.*, to be submitted.