



## タンパク質の一次構造解析

村井 稔幸

タンパク質の化学的な一次構造解析は、おもに、アミノ酸組成とアミノ酸配列の分析、そして質量分析からなる。

### アミノ酸分析

アミノ酸分析法 (amino acid analysis) は、タンパク質やペプチドのアミノ酸組成とアミノ酸含量、または遊離アミノ酸を定量する手法である。アミノ酸分析法は、原理的にはほぼ完全なタンパク質定量法であり、実際、タンパク質の種類によらずかなり正確に定量できる。この方法は、タンパク質やペプチドの定量、同定、構造解析に利用できる。

アミノ酸分析法の歴史は、1948年にさかのぼる。米国ロックフェラー医学研究所 (The Rockefeller Institute for Medical Research) において、William H. Stein博士とStanford Moore博士は、デンプンを用いた分配クロマトグラフィー (partition chromatography) やイオン交換クロマトグラフィー (ion-exchange chromatography) によるアミノ酸の分離と、ニンヒドリン (ninhydrin) による比色定量法 (ニンヒドリン法) を開発した<sup>1)</sup>。ニンヒドリン法においては、アミノ酸のアミノ基がニンヒドリンのカルボニル基に求核攻撃して Schiff 塩基 (Schiff base) を形成し、脱炭酸する。その後、Schiff 塩基の解離によりルーヘマン紫 (Ruhemann's purple) を生じる。

Stein博士とMoore博士は、クロマトグラフィーにおける画分収集を自動化するために、自らフラクションコレクター (fraction collector) を発明した。その設計は、現在において研究室で一般に使用されているそれとほぼ同じである。Stein博士とMoore博士は、その後、Daryl Spackman博士と共同で自動アミノ酸分析機 (automatic amino acid analyzer) を開発した<sup>2,3)</sup>。Stein博士とMoore博士は自ら開発したこれらの方法を用いて、世界で初めて酵素 (bovine pancreatic ribonuclease A) の一次構造を解明し、その化学構造と触媒活性の連関の解明における功績により、1972年にノーベル化学賞を受賞した。それは、アミノ酸配列と生化学的に活性なコンフォメーションとの連関について研究したNIH (National Institutes of Health; アメリカ国立衛生研究所) のChristian B. Anfinsen

博士との共同受賞であった。

ニンヒドリン法は、アミノ酸をクロマトグラフィーで分離した後に選択的に誘導体化して検出する方法である。この方法はポストカラム誘導体化法 (post-column derivatization) と呼ばれる方法であり、分析を自動化できることと夾雑物の影響を受けにくいという利点がある。この原理と基本設計は、現在市販されている多くのアミノ酸分析機に受け継がれている。市販のアミノ酸分析機にはプレカラム誘導体化法 (pre-column derivatization) によるものがあり、高感度で迅速である。当初は何週間もかかっていたアミノ酸の分離操作は、1970年代に高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography; HPLC) が登場したことにより大幅に時間短縮された。検出感度については、蛍光試薬によるプレカラム誘導体化法により、高感度化された。アミノ酸分析法は、分析化学や医療などの分野で広範に利用されている。

### アミノ酸配列分析

タンパク質のアミノ酸配列はアミノ末端 (N末端) について分析されることが多く、N末端分析法には、DNP (dinitrophenyl) 法などのN末端アミノ酸のみを分析する方法と、Edman法のようにN末端から順次アミノ酸を同定する方法とがある。

**DNP法** DNP法は、英国ケンブリッジ大学のFrederick Sanger博士により開発されたN末端 $\alpha$ -アミノ基遊離アミノ酸の決定法である。DNP法では、タンパク質やペプチドをSanger試薬 (FDNB; 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene) で処理すると、N末端アミノ基とFDNBとの間で求核置換反応が起こる。その後の酸加水分解により、N末端残基をDNP化アミノ酸として同定する<sup>4)</sup>。Sanger博士はこの業績により、1958年にノーベル化学賞を受賞した。Sanger博士はこの方法とタンパク質の部分加水分解とを組み合わせることにより、インスリン (insulin) の全アミノ酸配列を決定することに成功した<sup>5)</sup>。これは、タンパク質の一次構造が決定された最初の成果である。

N末端アミノ酸残基の決定法には、より感度の高いダ

ンシル (dansyl) 法などがある。

**Edman 法** 代表的な N 末端アミノ酸配列解析法として、Edman 法がある。本方法は、Edman 分解法 (Edman degradation) ともいわれる。これは、スウェーデン・ルンド大学 (University of Lund) の Pehr Edman 博士により開発された逐次分解法である<sup>6)</sup>。Edman 法は3つの反応からなる。第一段階の反応は、Edman 試薬 (PTC; phenyl isothiocyanate) によるカップリング反応 (coupling reaction) である。タンパク質またはペプチドのアミノ基が PTC に求核攻撃し、phenylthiocarbamoyl 誘導体が生成する。これを第二段階において無水の酸で処理すると、 $\alpha$ -アミノ基の誘導体だけが環化してペプチド結合が切断される (cleavage reaction)。第三段階で、環化誘導体を酸性条件下で PTH (phenylthiohydantoin) 誘導体に変換する (conversion reaction)。以上の反応を繰り返し、PTH 化アミノ酸を検出することにより、N 末端から順次アミノ酸を同定する。この方法は、タンパク質の部分ペプチドまたはタンパク質全体のアミノ酸配列の決定を可能にした。

Edman 法には次の利点がある。

- ・長鎖の確実なアミノ酸配列決定が可能である。
- ・予想のたやすくはない翻訳後修飾部位が決定できる。
- ・同じ質量数を有するアミノ酸 (ロイシンとイソロイシン) を判別できる。
- ・データベースに登録されていないタンパク質の同定やアミノ酸配列が決定できる。

1967年にEdman博士らは自動化装置を開発し<sup>7)</sup>、この原理はプロテインシーケンサー (protein sequencer) として広く用いられている。

### 質量分析

質量分析法 (mass spectrometry) では、質量分析計により得られる  $m/z$  からタンパク質の一次構造を決定し、またはタンパク質の同定をおこなう。 $m/z$  は、イオンの質量を統一原子質量単位 (unified atomic mass unit) で割り、さらにイオンの電荷数で割った無次元量の値である。

質量分析法には次の利点がある。

- ・タンパク質の全体の質量がわかる。
- ・微量サンプルの解析が可能である。
- ・スループットが高い (high-throughput)。

質量分析装置は、イオン源、質量分析計、イオン検出器から成る。

イオン源におけるイオン化にはいくつかの方法がある (表1)。プロテオーム (proteome) 解析では、優れたソ

表1. タンパク質の解析に用いる質量分析装置のおもな型

試料導入法
直接導入法
液体クロマトグラフィー (LC; liquid chromatography)
イオン化法
マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI; matrix assisted laser desorption ionization)
エレクトロスプレーイオン化 (ESI; electrospray ionization)
質量分析計
飛行時間型 (TOF; time-of-flight)
四重極型 (Q; quadrupole)
フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型 (FT-ICR; Fourier-transform ion cyclotron resonance)
四重極イオントラップ型 (QIT; quadrupole ion trap)

フトイオン化法であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法とエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法がおもに用いられる。タンパク質の MALDI 法はドイツ・ミュンスター大学 (University of Münster) の Michael Karas 博士と Franz Hillenkamp 博士により 1988 年に報告されたイオン化法で<sup>8)</sup>、サンプルを有機マトリックス剤 (芳香族有機酸) と混合し、これにレーザーを照射することによりサンプルをイオン化する方法である。生体高分子の ESI 法は米国エール大学の John B. Fenn 博士により 1989 年に報告されたイオン化法であり<sup>9)</sup>、この方法では、サンプル溶液のネブライザーガスとのスプレーにより帯電液滴が形成され、高電場下でのクーロン爆発 (Coulomb explosion) によるとされる過程を経て、正電荷にイオン化されたペプチドが得られる。

イオンの分離には、イオン化の方法に合った質量分析計が用いられる。つまり、MALDI 法には飛行時間型 (TOF) 質量分析計が、ESI 法には四重極型 (Q) 質量分析計がよく用いられる。タンパク質の一次構造解析には、これらの分析法を複数組み合わせ合わせたタンデム質量分析法がよく用いられる。

### Edman 法と質量分析

すでに述べたように、Edman 法には、ポリペプチド鎖中のロイシン残基とイソロイシン残基を判別できるという利点がある。これらのアミノ酸はモノアイソトピック質量 (monoisotopic mass) に差がないため、単純な質量分析法では判別できない。質量分析法による *de novo* sequencing において、これがしばしば問題となる。質量分析法においては、おもに高エネルギー CID (collision-induced dissociation) 法を適用することにより、この問題を解決することができる。つまり、MALDI-TOF-TOF 質量分析計などの高エネルギー CID

により、ポリペプチド鎖の主鎖だけでなく側鎖の開裂を誘起することで、ロイシンとイソロイシンを判別できる。ただ、高エネルギーCIDと高精度なフラグメントの質量データとの両立には難しい点がある。また、Q-TOF質量分析計などによる低エネルギーCIDにより、モノアイソトピック質量にわずかな差しかないリジンとグルタミンを判別できる。

タンパク質の一次構造解析は、おもにEdman法によりおこなわれる。これは、その結果の信頼性の高さと、ポリペプチド鎖の鎖長に依存せず比較的長い配列を解読できることによる。質量分析法はこれを補う手法として用いられ、そのデータ解釈の信頼性は向上している。

### 質量分析とプロテオミクス

タンパク質の同定には、近年のプロテオミクス (proteomics) の発展もあって、質量分析による解析手法が一般的に用いられるようになってきている。

質量分析法を用いて、PMF (peptide mass fingerprinting) 法によるタンパク質の同定がおこなえる。また、タンパク質の同定には、タンデム質量分析法であるMS/MS ion search法がよく用いられる。

**PMF法** タンパク質の同定におけるPMF (peptide mass fingerprinting) 法は、タンパク質の酵素消化で生じるペプチド断片を質量分析の測定対象とする。これにより得られたデータ、つまりペプチドマスリスト (peptide mass list) をもとにデータベース検索をおこない、タンパク質を同定する。この方法は、1993年に複数の研究者により同時に発表された<sup>10-14)</sup>。この方法は簡便で、解析が迅速におこなえるため、大規模な解析に適する。

**MS/MS ion search法** MS/MS ion search法では、タンパク質の酵素消化で生じるペプチド断片のMS/MS測定により取得したデータをもとにデータベース検索をおこなう。MS/MS ion search法は、混合物であっても

タンパク質の同定が可能である。この方法でデータベース検索に供されるのは、プロダクトイオン群の質量の組み合わせ、つまり、プロダクトイオンスペクトル (product ion spectrum) である。米国ワシントン大学のJohn R. Yates博士らが開発したSEQUEST<sup>15)</sup>などが解析に適用されてきた。

MS/MSには他に、EMBL (European Molecular Biology Laboratory; 欧州分子生物学研究所) のMatthias Mann博士らが開発したPST (peptide sequence tag) 法<sup>16)</sup>などがある。

MS/MSのほかに、MS<sup>n</sup>やフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型 (FI-ICR) 型などの質量分析計を用いたタンパク質の同定法もある。

### 文 献

- 1) Moore, S. and Stein, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **176**, 367 (1948).
- 2) Moore, S. *et al.*: *Anal. Chem.*, **30**, 1185 (1958).
- 3) Spackman, D. H. *et al.*: *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
- 4) Sanger, F.: *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
- 5) Sanger, F.: *Science*, **129**, 1340 (1959).
- 6) Edman, P.: *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283 (1950).
- 7) Edman, P. and Begg, G.: *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80 (1967).
- 8) Karas, M. and Hillenkamp, F.: *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
- 9) Fenn, J. B. *et al.*: *Science*, **246**, 64 (1989).
- 10) James, P. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 58 (1993).
- 11) Henzel, W. J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5011 (1993).
- 12) Mann, M. *et al.*: *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 338 (1993).
- 13) Pappin, D. J. *et al.*: *Curr. Biol.*, **3**, 327 (1993).
- 14) Yates, J. R. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **214**, 397 (1993).
- 15) Eng, J. K. *et al.*: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **5**, 976 (1994).
- 16) Mann, M. and Wilm, M.: *Anal. Chem.*, **66**, 4390 (1994).