

等速電気泳動法によるペプチドのマスキされた N 末端の分析

真 鍋 敬， 笹 川 立， 奥 山 典生*

(1977 年 4 月 25 日受理)

N 末端をマスクされたペプチドを加水分解後，N 末端にあった有機酸の分析を行うために等速電気泳動法を適用した．酸加水分解に用いた塩酸の存在は有機酸の定性を妨げない．アルカリ加水分解の場合は塩酸で中和した後電気泳動すれば分析できる．酸加水分解の場合 アセチルロイシンでは 1N 塩酸，80°C，20 時間の加水分解で，ピログルタミルアラニンでは 1N 塩酸，80°C，1 時間でそれぞれ酢酸，ピログルタミン酸の回収率が最も高く，79%，18% であった．この方法をウシ脳から分離した酸性ペプチドに適用し，アセチルアスパラギン酸と同定した．

1 はじめに

N 末端をマスクされたペプチドやたん白質に対しては，通常の N 末端分析法は使えない．マスクされた N 末端は，ニンヒドリンや，ダンシルクロリド，フルオレスカミンなどの試薬とは反応しないためである．成田は 1958 年，タバコモザイクウイルスの N 末端がアセチル基でマスクされていることを示した¹⁾²⁾．以後の研究により，N 末端のマスクされ方は以下の 3 とおりであることが明らかになった．第 1 は，フォルミル基かアセチル基又はプロピオニル基でアシル化されている場合，第 2 は， γ -グロブリンのようにピログルタミン酸が N 末端にある場合³⁾，第 3 は，グラミシジン S のように環状ペプチドの場合である．しかし現在でも，マスクされた N 末端を分析するには非常な困難がある．例えばアシル化されている場合は，たん白質分解酵素でペプチドを分解し，アシルペプチドをイオン交換樹脂で分離し，ヒドラジンと反応させ，ペーパークロマトグラフィーを行う必要がある．著者らは，等速電気泳動法で有機酸⁴⁾，アミノ酸⁵⁾ が簡単に分析できることに注目し，ペプチドのマスキされた N 末端の分析に適用することを試みた．この方法によればフォルミル基，アセチル基，プロピオニル基，ピログルタミル基のどれが N 末端にあるのかを，1 回の分析で推定できると考えられる．この際ペプチドの加水分解の操作は不可欠であるから，加水分解条件の検討，加水分解後に試料溶液中に存在する酸，アルカリ，塩などの分析に及ぼす効果の検討を行った．

2 試薬及び装置

ギ酸，酢酸，プロピオン酸，グルタミン酸，ヒスチジン，ヒスチジン塩酸塩は試薬特級（和光純薬）を，定沸点塩酸は精密分析用（和光純薬）を使用した．アセチルロイシン，ピログルタミン酸は東京化成より，ピログルタミルアラニンはたん白質奨励会より購入したものをそのまま用いた．先行イオン液の調製には，0.1 M ヒスチジン溶液 50 ml に 0.1N 塩酸 25 ml を加え，250 ml とし，0.02 M ヒスチジン-0.01N 塩酸溶液とした．終末イオン液は 0.01 M グルタミン酸溶液を用いた．

等速電気泳動の測定には，島津細管式等速電気泳動分析装置 1P-1B 型を使用した．泳動管は 0.5 mm ϕ × 20 cm，電位こう配検出器の電極間距離は 0.05 mm である．アミノ酸の分析には，日立 KLA-5 型アミノ酸分析装置を用いた．

3 方 法

3.1 泳動条件

先行イオン液として 0.02 M ヒスチジン-0.01N 塩酸を終末イオン液として 0.01 M グルタミン酸を用いる．感度を上げるためには先行イオン（塩素イオン），終末イオンの濃度を 0.000625 M まで下げることができる．初期電圧 3000V で，75 μ A の定電流で電気泳動する．感度を上げるため，低濃度のイオン液を使用する場合にも，初期電圧を 3000V とする．恒温槽温度は 15°C に設定したが，5°C に設定し，氷水を循環させることにより，3000V より高電圧での泳動の際の気泡の発生を抑えることができる．

3.2 加水分解と試料のサンプリング

小試験管 (0.7 cm ϕ × 5 cm) に試料 0.5mg~10mg を

* 東京都立大学理学部化学教室：東京都世田谷区深沢 2-1-1

入れ、200 μ l の 1N 塩酸又は 1N 水酸化ナトリウム溶液を加えシリコンゴムせんをする。この試験管を 80°C の水浴で一定時間加熱する。水浴より試験管を取り出し、これを -20°C の冷凍庫に 10 分間保つ。この冷却操作は N 末端アシル基からの酸の回収のために重要である。試験管を取り出し、10 μ l のマイクロシリンジの針をシリコンゴムせんに刺し、試料溶液を吸い取る。1N 塩酸で加水分解した場合にはそのまま (1~3) μ l を等速電気泳動装置の試料注入口に注入する。1N 水酸化ナトリウムで加水分解した場合は、試料溶液 10 μ l を 1N 塩酸 10 μ l で中和し、そのうち (1~6) μ l を注入する。塩素イオンが試料中に存在すると泳動時間が長くなる。例えば 1N 塩酸を含む試料 2.4 μ l では、塩酸のないとき (15 分) の 5 倍の泳動時間を要する。そこで試料容量は、実験の能率を上げるため、1N 塩酸を含む場合 3 μ l 以下とした。

3.3 定性及び定量法

Fig. 1 にギ酸、酢酸、プロピオン酸、ピログルタミン酸の泳動分析図を示した。曲線 A は電位こう配変化の記録であり、曲線 B はその微分曲線である。Fig. 1 より明

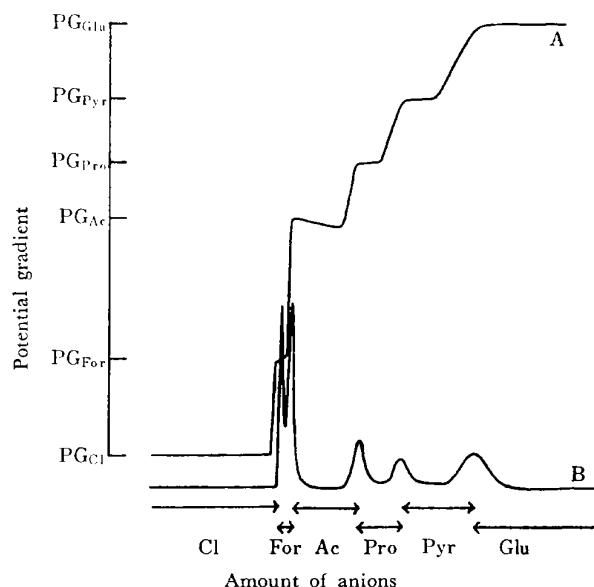


Fig. 1 Isotachopherogram of a mixture of formate, acetate, propionate and pyroglutamate

A : Potential gradient curve; B : Differential curve of potential gradient curve; PG_{Glu}, PG_{Pyr}, PG_{Pro}, PG_{Ac}, PG_{For}, PG_{Cl} : Potential gradient values of glutamyl, pyroglutamyl, propionyl, acetyl, formyl and chloride anions; Arrows indicate the amount of anions; Leading solution : 0.02 M histidine-0.01 N HCl; Terminating solution : 0.01 M glutamate; Initial voltage : 3000 V; Potential gradient range : 64 mV; Differential : Low; 75 μ A constant current

らかなように、4 種の物質は電位こう配の値がそれぞれ異なり、分離される。ペプチドのマスクされた N 末端にはこれら 4 種の物質以外のものは存在しないから、マスクされた N 末端が何であるかを等速電気泳動法で推定できる。先行イオン (塩素イオン)、試料イオン (例えば酢酸イオン)、終末イオン (グルタミン酸イオン) の電位こう配値をそれぞれ PG_{Cl}, PG_{Ac}, PG_{Glu} とすると、酢酸イオンの定性のための電位単位 (PU 値) は宮崎らにより次式で表される⁶⁾。

$$PU_{Ac} = (PG_{Ac} - PG_{Cl}) / (PG_{Glu} - PG_{Cl})$$

ここで PU_{Ac} は酢酸イオンの PU 値である。定量には、曲線 B のピーク間の距離を測り、検量線を用いて計算する。この距離は、先行イオンと終末イオンの濃度に依存し、又初期電圧の値にも依存する。従って定量のためにはこれらの値と、チャート送り速度を記録しなければならない。

4 結果と考察

4.1 酢酸の PU 値に及ぼす共存物質の効果

ペプチドの N 末端をマスクしている物質のうち最もひん度の高い酢酸につき、ペプチド加水分解時に共存することの予想される物質を加え、酢酸の定性に及ぼす効果を調べた。Table 1 にその結果を示す。

Table 1 Effect of additives on PU value of acetate

Additives	Concn. (M)	Volume (μ l)	Amount (nmol)	PU value of acetate
None	—	—	—	0.52
HCl	0.05	2	100	0.52
	0.05	8	400	0.51
	0.8	2	1600	0.53
	1.0	2.4	2400	0.51
NaOH	0.05	2	100	0.50
	0.05	8	400	0.53
Leucine	0.075	8	600	0.50
NaCl	0.2	2	400	0.52
	0.5	2	1000	0.51
NaOH+HCl	0.5 each	1.2	600 each	0.52

Table 1 より、酢酸の PU 値は相対誤差 3% の範囲にあり、共存物質の影響を受けないと考えられる。共存物質のない状態でのギ酸、酢酸、プロピオン酸、ピログルタミン酸の PU 値はそれぞれ 0.20, 0.52, 0.67, 0.86 であるから、PU 値より 4 種の酸を区別することができる。又、内部標準としてこれらの物質を試料中に加えることにより、定性をより確実にすることも可能である。

4.2 酢酸の定量

Fig. 2 に酢酸量とピーク間距離の相関を示す. 先行イオン, 終末イオンの濃度が 0.01 M の場合が A, 0.00125 M の場合が B の直線である. 直線 B の傾きは直線 A の 8 倍であり, 先行イオンと終末イオンの濃度を 1/8 にすることにより, 8 倍の感度を得ることが分かる. イオン濃度を下げた場合も, 初期電圧が 3000 V と同じになるように電流を減らすことが重要である.

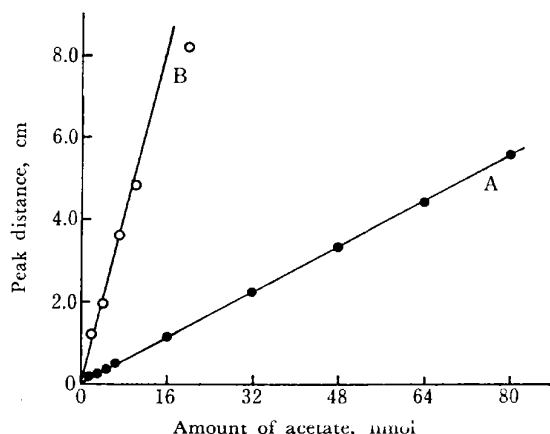


Fig. 2 Standard curve of acetate

A: Leading solution 0.02 M histidine-0.01 N HCl, terminating solution 0.01 M glutamate; B: Leading solution 0.0025 M histidine-0.00125 N HCl, terminating solution 0.00125 M glutamate; Initial voltage: 3000 V; Chart speed: 20 mm/min; Sample volume: (0.2~8.0) μ l

酢酸量を 40 nmol に一定にし, 共存する塩酸の濃度を変化させ, ピーク間距離との相関を求めたのが Fig. 3 である. Fig. 2 及び Fig. 3 より, 一定量の塩酸の共存下での試料溶液中の酢酸の量を求めることができる.

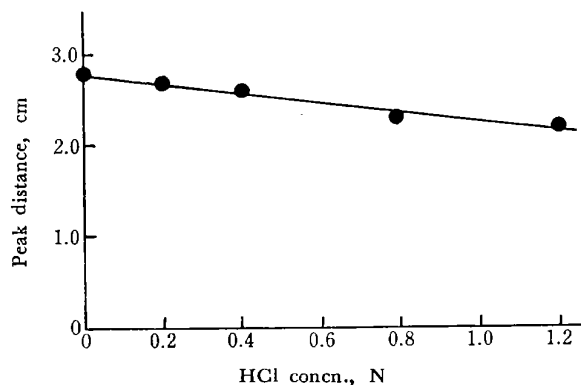


Fig. 3 Effect of HCl concentration on peak distance of 40 nmoles acetate

Leading solution: 0.02 M histidine-0.01 N HCl; Terminating solution: 0.01 M glutamate; Initial voltage: 3000 V; 75 μ A constant current; Chart speed: 20 mm/min; Sample volume: 2 μ l

4.3 アセチルロイシンの加水分解条件

N末端をマスクされたペプチドのモデル物質として, アセチルロイシンを用い, 加水分解条件を検討した. まず 1N 塩酸, 115°C, 24 時間, 試料をガラス管内に封入した状態で酸加水分解したところ, 等速泳動法で 98% の酢酸が, アミノ酸分析で 90% のロイシンが回収された. そこで塩酸濃度を 1N に固定し, 封管を必要としない 80°C の条件で, 分解時間を変化させ酢酸の回収率を求めた. Fig. 4 にその結果を示す. 20 時間の加水分解で 79% の酢酸が回収され, その後加水分解時間を長くしても酢酸の回収率は上昇しない. 諸条件を同じにして塩酸の代わりに水酸化ナトリウムを用いたアルカリ加水分解では, 18 時間で 83% の酢酸が回収された. しかし酸分解に比べ反応速度は小さく, 酸分解では 6 時間で 70% の酢酸が回収されるが, アルカリ分解では 5 時間で 21% の回収にとどまっている. 又, 酸分解後の試料はそのままサンプリングできるのに対し, アルカリ分解後の試料は 1N 塩酸で中和する操作を必要とする. そこで, アルカリ分解も有効ではあるが, 酸分解のほうがより有利であると考えられる.

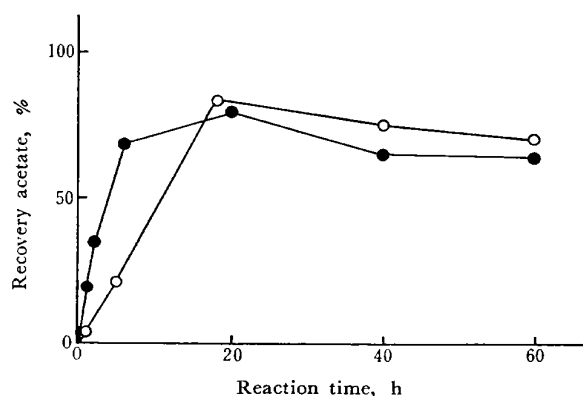


Fig. 4 Recovery of acetate after hydrolysis of *N*-acetylleucine

Leading solution: 0.02 M histidine-0.01 N HCl; Terminating solution: 0.01 M glutamate; Initial voltage 3000 V; 75 μ A constant current; ● 1 N HCl, 80°C; ○ 1 N NaOH, 80°C

4.4 ピログルタミルアラニンの加水分解条件

ペプチドのN末端をマスクしている物質がアシル基, すなわちギ酸, 酢酸, プロピオン酸の場合, 前節で得られた加水分解条件 (80°C, 1N 塩酸, 20 時間) は一般的に使用できると考えられる. しかし, N末端がピログルタミン酸の場合, この条件ではピログルタミン酸が開環反応によりグルタミン酸となり, ピログルタミン酸としては検出されない. そこでピログルタミン酸及びピログルタミルアラニンを酸加水分解した際のピログルタミン

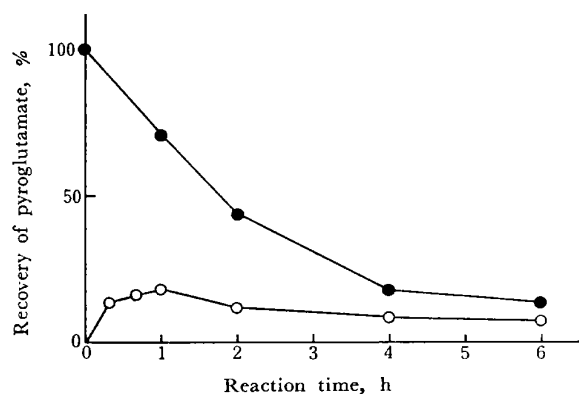


Fig. 5 Recovery of pyroglutamate after acid hydrolysis of pyroglutamate or pyroglutamylalanine

Leading solution : 0.02 M histidine-0.01 N HCl, terminating solution : 0.01 M glutamate; Initial voltage : 3000 V; 75 μ A constant current; ● Hydrolysate of pyroglutamate; ○ Hydrolysate of pyroglutamylalanine; 1 N HCl, 80°C

酸の回収の時間経過を調べた。Fig. 5 に示したように、ピログルタミン酸は 1 N 塩酸、80°C、6 時間でもとの 14% にまで減少する。ピログルタミルアラニンからのピログルタミン酸の回収率が 1 時間の加水分解で 18% となり、以後減少するのは、ピログルタミン酸とアラニンへの加水分解と、ピログルタミン酸の開環反応とが競合しているためであろうと考えられる。しかし Fig. 5 の結果から、N 末端がピログルタミン酸でマスクされたペプチドの場合でも、ピログルタミン酸の検出が可能であることが分かる。ただし、アスパラギン酸を含むペプチドの場合、ピログルタミン酸とアスパラギン酸とは移動度が似ているため、ここに用いた分離条件ではほとんど重なって検出される。従ってこの両者を分別定量するには、加水分解時間を変化させ、数点で定量するなどの方法を適用する必要がある。

4.5 ウシ脳から分離した酸性ペプチドへの適用

以上の結果を、ウシ脳から分離したニンヒドリン発色しないペプチドに適用した。このペプチドの精製法を以下に述べる。

9.1 kg のウシ脳に 4 容の 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.1)-1 mM EDTA-55% 飽和硫酸アンモニウム溶液を加え、ホモジナイズする。2 時間放置後、10000 \times g で 30 分間遠心する。上清に硫酸アンモニウムを 85% 飽和になるように加え、リン酸で pH を 4.7 にする。2 時間放置後、再度同条件で遠心し、上清を採る。上清 2.2 l に 0.88 l のイソプロパノールを加え分液漏斗で 1 分間振とうした後、アルコール層を分取する。0.98 l のア

ルコール層をロータリーエバポレーターで乾固し、13 ml のピリジン-酢酸緩衝液 (ピリジン:酢酸:水=1:10:300, pH 3.5) に溶解させる。不溶物を遠心して除いた後、ロータリーエバポレーターで 4 ml に濃縮する。これをセファデックス G-10 カラム (3.3 cm ϕ \times 28 cm) にかけて、ピリジン-酢酸緩衝液で溶出させる。試料をかけた後 116 ml から 140 ml の間で溶出された画分を乾固し、少量のピリジン-酢酸緩衝液に溶解させる。この試料をワットマン 3 MM ろ紙上で、同じピリジン-酢酸緩衝液を用いて高圧ろ紙電気泳動を行う。電圧こう配は 52 V/cm, 7°C で 1 時間泳動する。アスパラギン酸の移動距離を 1 とし、グルタミン酸の移動距離を 0 としたとき移動度 2.4 の位置にあるニンヒドリン発色しないがヨウ素でん粉で発色するスポットを蒸留水で抽出する。これを更にダウエクス 50 カラムにかけ、0.1 M ピリジン-ギ酸 (pH 3.1) で溶出させたものを 1 回凍結乾燥し、アミノ酸分析及び等速電気泳動による分析に用いた。

6 N 塩酸で 110°C、20 時間加水分解した後アミノ酸分析すると、アスパラギン酸が 92% 含まれていた。1 N 塩酸、80°C、18 時間加水分解した後等速泳動で分析した結果を Fig. 6 A に示す。アミノ酸分析から 93 nmol のアスパラギン酸を含むこと分かっている試料ペプチドから、8.0 nmol の酢酸が検出された。酢酸の回収率

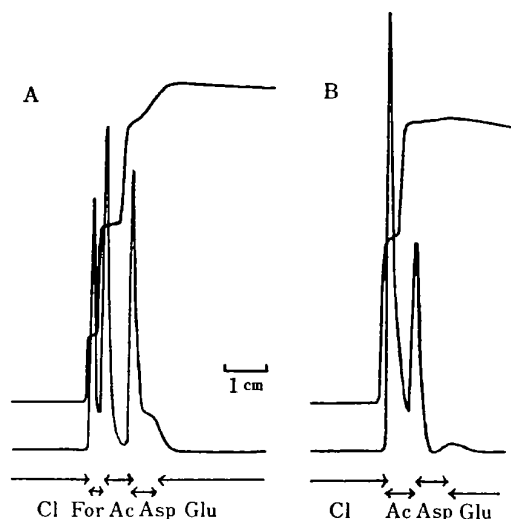


Fig. 6 Isotachopherogram of acid hydrolysate of a peptide purified from bovine brain

A : Lyophilized once after purification; B : Lyophilized 3 times after purification; Leading solution : 0.02 M histidine-0.01 N HCl; Terminating solution : 0.01 M glutamate; Initial voltage : 3000 V; Potential gradient range : 64 mV; Differential : Low; 75 μ A constant current; Chart speed : 20 mm/min; Cl, For, Ac, Asp, Glu : Chloric, formic, acetic, aspartic, glutamic anions; Arrows indicate the amount of anions; Hydrolysis was performed at 1 N HCl, 80°C, for 18 h

を 80% とすると, 10 nmol のN末端アセチル基が存在したことになる. 従って, アスパラギン酸とアセチル基の比はほぼ 1:1 であり, このペプチドはNアセチルアスパラギン酸であると推定される. なお, Fig. 6A ではダウエックス 50 カラムからの溶出の際に用いたギ酸が十分除かれていないが, 更に2回凍結乾燥を繰り返したものの分析例を Fig. 6B に示す. 明らかにギ酸が完全に除かれ, Fig. 6A で検出されたギ酸がペプチド由来のものでないことが分かる. 又, 同様に高圧ろ紙電気泳動で移動度 1.7 の位置にあるニンヒドリン発色しないがヨウ素でん粉で発色するスポットを同じ処理をして分析した結果, N-アセチルアスパルチルグルタミン酸であることが明らかになった.

5 結 論

等速電気泳動法を用いるとペプチドのマスクされたN末端を分析することができる. 1N 塩酸で加水分解後の試料は, 全く脱塩などの前処理なくそのまま電気泳動にかけることができる. 従って, 従来のマスクされたN末端の分析法に比べ極めて簡便で有効な方法であることが明らかとなった. 今後この方法は生物界に広く存在するN末端をマスクされたたん白質へも適用可能であろう.

終わりに, 等速電気泳動装置の使用に際し御尽力くださった島津製作所秋山純一氏に深謝します.

(1976 年 10 月 29 日, 電気泳動学会第 27 回総会において一部講演)

文 献

- 1) K. Narita : *Biochim. Biophys. Acta*, **28**, 184 (1958).
- 2) K. Narita : *ibid.*, **30**, 352 (1958).
- 3) L. Hood, W. R. Grey, W. J. Dreyer : *J. Mol.*

Biol., **22**, 179 (1966).

- 4) T. Haruki, J. Akiyama : *Anal. Lett.*, **6**, 98 (1973).
- 5) 島津細管式等速電気泳動装置 1P-1B データ集, No. 2, 4 (1976).
- 6) H. Miyazaki, K. Katoh : *J. Chromatogr.*, **119**, 369 (1976).

☆

Determination of masked N-terminus of peptides by isotachopheresis. Takashi MANABE, Tatsuru SASAGAWA and Tsuneco OKUYAMA (Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University, 2-1-1, Fukazawa, Setagaya-ku, Tokyo)

A simple method for the determination of masked N-terminus of peptides was investigated by isotachopheresis. Throughout the experiment, isotachopheresis was performed at 75 μ A constant current, leading and terminal electrolytes were 0.02 M histidine-0.01 M HCl and 0.01 M glutamate, respectively. Presence of 2.4 μ mol HCl in a sample solution of 1.2 μ l did not affect the qualitative index (potential unit value) of acetate, which is the most popular masking substance of the N-terminal of peptides. The quantity of acetate in a HCl-containing sample solution was calculated using a calibration curve made by authentic acetic acid and then corrected for HCl amount. The recovery of acetate after acid hydrolysis of N-acetyl-leucine was determined to be 79% (1 N HCl, 80°C, 20 h). As for pyroglutamylalanine, recovery of pyroglutamate was determined to be 18% after acid hydrolysis (1 N HCl, 80°C, 1 h). By applying this method on ninhydrin-negative peptides purified from bovine brain, the peptides were identified as N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartylglutamate.

(Received Apr. 25, 1977)

Keywords

Isotachlophoresis
Peptides