

異常血色素に関する研究 XI : Lysylendopeptidase を用いた異常血色素の一次構造解析法について

川崎医科大学 生化学 (III) 教室

山 崎 壽 子・井 内 岩 夫

(平成 5 年 10 月 6 日受理)

Study on the Abnormal Hemoglobin XI : Application of Lysylendopeptidase
for the Analysis of Primary Structure of Abnormal Hemoglobins

Toshiko Yamasaki and Iwao Iuchi

Department of Biochemistry,

Kawasaki Medical School

Kurashiki, 701-01, Japan

(Received on October 6, 1993)

概 要

異常血色素の構造解析法は現在ほぼ確立されているが、異常 α 鎖の解析においては酵素 Trypsin で消化しても、一部の難溶性ペプチド (core) が存在するため、 β 鎖と比べてより複雑な過程を経ねばならない。前回の報告に引き続き、超微量試料の解析を目的とした新しい解析法確立の一環として α 鎖のより簡便な酵素消化法について検討した。即ち、従来 α 鎖の core を断片化するため Trypsin 消化後、Chymotrypsin 消化を行なうといった 2 段階での酵素処理を行なってきたが、今回、尿素存在下、Lysylendopeptidase^{1),2),3)} を用いることにより 1 段階で α 鎖の全域に由来するペプチド断片の解析を行なうことができた。しかしこの方法でも core は完全に回収されず他のペプチドの約半分の収率しか得られないなどの問題もあり、今後の検討課題も残している。

Abstract

This paper describes the application of lysylendopeptidase instead of trypsin for the digestion of α - and β -globin chains for determination of primary structure of abnormal hemoglobins. The enzyme cleaved C-terminus of lysyl residue of urea denatured α - and β -chains producing new core originated peptides of α Tp 12 and α Tp 13. However, some challenges for this method still remain for raising up the recoveries of α Tp 12 and α Tp 13, the value of which are low as compared with those of other chainfragmented peptides. This method may not yet be an ideal at present moment but superior to the old traditional way of combined successive digestion with trypsin and chymotrypsin.

はじめに

異常ヘモグロビンの一次構造解析法は一般に、1) 溶血液の作成、2) 脱ヘム、3) α 鎖、 β 鎖の各構成鎖へ分離、4) 酵素による加水分解、5) HPLC によるペプチド分離、6) アミノ酸組成、アミノ酸配列決定の段階を踏む。 β 鎖では 4) の酵素消化の前処理として鎖のアミノエチル化を行なえば Trypsin のみにより 146 個のアミノ酸残基が全て 30 残基以下のペプチドに断片化され、配列決定が可能となる。一方 α 鎖では鎖のアミノエチル化はさほど有効ではなく、更に Trypsin 消化の後の core と呼ばれる不溶性ペプチドを分取し、

それを過ギ酸酸化, Chymotrypsin 消化を行なうことにより, はじめてすべてのペプチドが可溶化し分析が可能となる(従来法)。しかし微量試料の場合これら各過程における収率が重要であり, 分析段階がより簡単になることがよりよい収率につながることは論を待たない。そこで今回はこの α 鎖の解析法についての検討成績を報告する。

材料と方法

- 1) グロビン鎖の分取: 常法にしたがって調製した正常血色素のグロビンを陽イオン交換クロマト(CMカラム)により, α 鎖と β 鎖とに分離した。
- 2) 酵素消化: グロビン 2 mg を 500 μ l の 8 M 尿素水溶液に溶かし, 37°C, 1 hr, 攪拌しながら変性させる。続いて10 μ l の Lysylendopeptidase [1 mg/ml, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 和光純薬] と 500 μ l の 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 9.0) を加え, 37°C, 3 hr 攪拌しながら消化を行なう⁴⁾。室温にもどし, 未消化のタンパク質を遠心して除き, 上清を塩酸で pH 3.0 にする。次いで凍結乾燥する。
- 3) クロマトグラフによるペプチド分離, 精製: HPLC法, カラムは半井化学の Cosmosil 5 C₁₈P (4.6 \times 250mm) を用いた。緩衝液は, A: 0.01 M ギ酸緩衝液 (pH 3.0) と B: 80 % アセトニトリル/0.01 M ギ酸緩衝液 (pH 3.0) を用い, 最初の 10分間はA緩衝液 100%, 続いてB緩衝液を 0 \rightarrow 50%まで 70分間直線的勾配で変化させ溶出した。流速は 1 ml/min ペプチドの, 検出は 214 nm で行なった。

結 果

α 鎖の Lysylendopeptidase 消化後のHPLCパターンを図1に示す。酵素消化の前処理として尿素で1時間, 37°Cでグロビン蛋白を変性させて加水分解を行なうと, coreを含む α 鎖のすべての配列が Lysine のC末端で切断され, 12本のペプチドとして検出できた。前処理を行なわない場合, または尿素処理の代わりに 100°C, 10分の前処理を行なった場合, いずれの場合でも α Tp 12 は溶出しなかった。Trypsin による α 鎖の加水分解⁵⁾では α Tp 10~13 は不溶性であり, 同条件でのHPLCでは, α Tp 7, α Tp 7 \cdot 8, α Tp 2, α Tp 10, α Tp 14, α Tp 1, α Tp 3, α Tp 1 \cdot 2, α Tp 4, α Tp 11, α Tp 10 \cdot 11, α Tp 6, α Tp 5, α Tp 9の順に溶出し, α Tp 12, α Tp 13が欠落した。しかし Lysylendopeptidase は Lysine

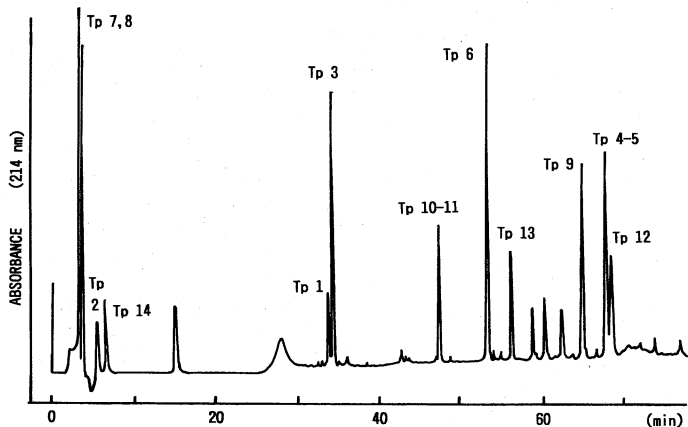


Fig. 1. HPLC of urea denatured α globin chain digest with lysylendopeptidase

Table 1. Enzymatic digestion
 α Tp: Tp number of α chain
 LE: Lysylendopeptidase method
 Tp: Trypsin method

α T p	T p	LE
1	+	+
2	+	+
1-2	+	-
3	+	+
4	+	-
5	+	-
4-5	-	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
7-8	+	+
9	+	+
10-11	+	+
11	+	-
12	-	+
13	-	+
14	+	+

のC末端だけを切断し Arginine のC末端は切断しないので、今回は α Tp 4・5, α Tp 10・11がそれぞれ1本のペプチドとなって溶出された。また6例の平均であるが Lysylendopeptidase 消化ペプチドを加水分解し、アミノ酸分析値から測定すると α Tp 13, α Tp 12が他のペプチドに比較して約60%, 30%と低い収率を示した(表2)。これはこれらのペプチドが完全に切断されていない結果と考えられる。

一方 β 鎖においても Lysylendopeptidase 消化により全ての Lysine のC末端が切断された(図2)。この場合も Trypsin 消化⁵⁾と異なり、Arginine のC末端は切断されないので

Table 2. Averaged recovery of some lysylendopeptidic peptides of α chain (6 specimens) in regard with Tp 6 as 1.0

Tp 4-5	/Tp 6	1.01 \pm 0.11
Tp 9	/Tp 6	0.90 \pm 0.06
Tp 10-11	/Tp 6	0.98 \pm 0.09
Tp 12	/Tp 6	0.31 \pm 0.05
Tp 13	/Tp 6	0.67 \pm 0.08

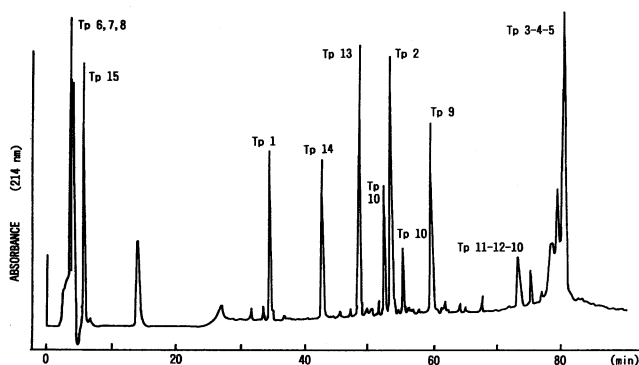


Fig. 2. HPLC of urea denatured β globin chain digest with lysylendopeptidase

β Tp 3・4・5, β Tp 11・12 といったペプチドとなり、それぞれの単独ペプチドが欠落するが、 β -core である β Tp 10 は単独、あるいは β Tp 11・12と-S-S-結合によりつながった β Tp 10-11,12 として分離された。しかし、この分離も α 鎖の場合と同様に収率のバラツキがみられた。

考 察

私共はこれまで微量の異常血色素試料の解析法を模索してきたが、本紙第18号では最終段階である配列決定法を報告し⁶⁾、今回は、 α 鎖の酵素による消化の優劣を検討した。 α 鎖にはいわゆる core と呼ばれる、Trypsin では消化できない不溶性となる部分がある。 β 鎖にも core は存在するが、Trypsin 消化の前にアミノエチル化することにより、酵素消化が可能となる。そこで α 鎖でも Trypsin 消化の前処理としてアミノエチル化、過硝酸酸化、メルカプトエタノールによる還元、尿素による変性などを試みたが、いずれも良い結果が得られなかった。そこで新たな酵素とし

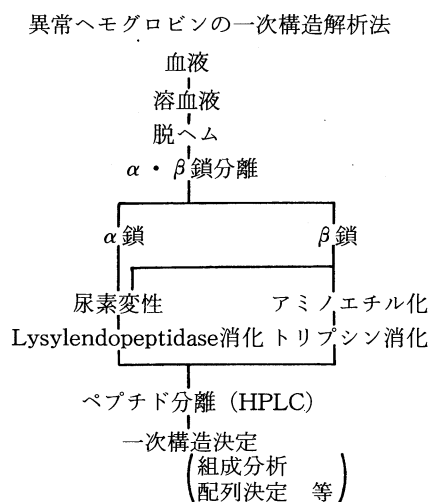


Fig. 3. Flow chart for determination of amino acid substitution of abnormal hemoglobin

て、Lysylendopeptidase を用いた(図3)。この酵素でも単独使用では core を消化することができなかつたが⁷⁾、前処理として尿素変性をさせることにより、一段階の酵素作用ですべてのペプチドを分取することができた。本酵素は4 Mの尿素中でも活性が阻害されず、しかも特異性が高いので再現性の良い結果が得られた。しかし分取されたペプチドを定量してみると、 α 鎖では、通常 core と呼ばれる α Tp 10, α Tp 11, α Tp 12, α Tp 13 のうち α Tp 12 と α Tp 13 が他のペプチドの収率と比べて低かつた。これは消化が完全に行なわれていない結果と考えられ、その原因のひとつに、 α Tp 12 に含まれる Cysteine の関与が考えられる。そこでまずこの酵素消化の前処理としてメルカプトエタノールによる還元を行なつた。しかし各ペプチドの収率への影響はほとんどなかつた。次に別の前処理として過ギ酸酸化を行なつた。すると α Tp 12 の収率は上がったが、 α Tp 5 や α Tp 9 に含まれる Methionine が酸化され、スルフォキサイド、またはスルホンになり、さらに重大な結果としてTp 3が消失するなど、他のペプチドへの影響も無視できなかつた。

α 鎖を1段階の酵素処理により分析するという本来の目的は達せられたが、すべてのペプチドを等しい収率で回収するという課題が残り、本法にはまだ改良の余地が残されている。

本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費(4-307)の援助により行なわれた。

文 献

- 1) Masaki T, Tanabe M, Nakamura K, Soejima M: Studies on a new proteolytic enzyme from *Acromobacter lyticus* M497-1, I Purification and some enzymatic properties. *Biochim Biophys Acta* 660: 44-50, 1981
- 2) Masaki T, Fujihashi T, Nakamura K, Soejima M : Studies on a new proteolytic enzyme from *Acromobacter lyticus* M497-1, II Specificity and inhibition studies of *Acromobacter* protease I. *Biochim Biophys Acta* 660: 51-55, 1981
- 3) Tsunasawa S, Masaki T, Hirose M, Soejima M, Sakiyama F: The primary structure and structural characteristics of *Achromobacter lyticus* protease I, a lysine-specific serine protease. *J Biological Chemistry* 264(7): 3832-3839, 1989
- 4) 滝尾拓士: 新化学実験講座1「タンパク質II, 一次構造」(日本生化学会編). 東京化学同人. 1990; pp.96-98
- 5) 日高和夫, 井内岩夫, 島崎俊一: 異常血色素に関する研究 異常血色素のトリプシン消化物の高速液体クロマト法による分離と同定について. *川崎医学会誌 一般教養篇* (10):49-54, 1984
- 6) 山崎壽子, 井内岩夫: 異常血色素に関する研究 異常血色素の一次構造解析へのペプチドマイクロシーケンス法の応用. *川崎医学会誌 一般教養篇* (18): 21-25, 1992
- 7) Landin B, Jeppsson JO: Rare β chain hemoglobin variants found in swedish patients during Hb A_{1c} analysis. *Hemoglobin* 17(4): 303-318, 1993