〔衛生化学〕
EISEI KAGAKU
36 (6) 503-508 (1990)

熱分解ガスクロマトグラフィーの裁判化学への応用 (第2報)¹⁾ タンパク質試料中のアミノ酸残基の簡易分析

三木昭宏, 土橋 均
大阪府警察本部科学捜査研究所

Application of Pyrolysis Gas Chromatography for Forensic Chemistry. II.¹⁾ Simple Analysis of Amino Acid Residues in Protein Samples

AKIHIRO MIKI and HITOSHI TSUCHIHASHI

Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police Headquarters, 3-1-16 Otemae,
Chuo-ku Osaka 540, Japan

(Received May 24, 1990)

The rapid and simple analysis of protein samples without laborious pretreatments was studied by using pyrolysis gas chromatography (PGC). At first, correlations of the composition ratio of amino acid residues and peak intensity of their degradation products were investigated by PGC of simple protein samples whose composition of amino acid were known. In 13 amino acids, it was possible to determine the composition ratio of amino acid residue in the protein with the peak intensities of their degradation products. This method was carried out in several protein samples (wool *etc.*), in which the results were similar to the reported values. In addition, the present method was possible to discriminate the protein species with the combused residues of protein samples or these proteins contained in KBr disk for infrared spectrometry. This method described in this report was useful for the identification of these protein samples in forensic chemistry.

Keywords — pyrolysis gas chromatography; amino acid; protein; wool; silk; leather

結 言

タンパク質関連物質は自然界で最も重要な化学物質の一つであり、裁判化学分野でも動物性繊維、皮革類、食品片、組織片等、犯罪の捜査や立証を行う上で鑑定要望の多いものである。これらタンパク質関連試料はその種類によってそれぞれアミノ酸組成が異なるので、これらの分析においては、そのアミノ酸組成を明らかにすることが重要であると考えられる。

著者らはこれまでにタンパク質関連物質の分析に、前処理をほとんど必要とせず微小試料でも迅速簡便に分析できる熱分解ガスクロマトグラフィー (PGC) の手法を用いることを目的とし、熱分解装置に再現性の点ですぐれるキューリーポイントパイロライザー²⁾を用いて、主要 L- α -アミノ酸の PGC に

ついて検討を行った。その結果、主要 L- α -アミノ酸 21 種類中、18 種の識別が 1 μ g 程度の試料量で可能であった。また、卵白リゾチーム、ウール等のタンパク質試料の PGC では 13 種の構成アミノ酸由来の熱分解生成物のピークが検出可能であり、0.1 mg 程度の微小試料であってもそのアミノ酸組成の特徴を反映したパイログラムが得られ、各種タンパク質関連試料の識別に有用であることを見だし、前報¹⁾に報告した。

PGC によるタンパク質関連試料の分析例としてはこれまでに、Cope³⁾ によるウール等の分析の試みや、Tsuge ら⁴⁾ による数種の酵素類のキャラクタリゼーション等が散見されるのみであり、PGC による動物性繊維、皮革类等種々のタンパク質試料のアミノ酸組成の分析法としてはまだ確立されていない。

今回著者らは、まずアミノ酸組成既知の単純タン

パク質等のPGCを行い、各試料のアミノ酸残基の構成比率と、そのアミノ酸残基に由来する熱分解生成物のピーク強度との関係を調べ、つぎにそれを基に種々のタンパク質試料の構成アミノ酸組成の簡易分析を行うことを目的として検討を行った。その結果、タンパク質試料中のアミノ酸残基の構成比率とその熱分解生成物のピーク強度との間にはおおむね良好な直線関係が認められ、それを基にして各種タンパク質試料の構成アミノ酸のうち13種のアミノ酸残基の簡易分析が、微小試料でも迅速簡便に行えることがわかった。さらに本法によると、通常のアミノ酸分析では分析困難な著しく焼損して炭玉状になった試料や、赤外分光分析に使用済みの臭化カリウム錠剤についても、そのまま分析可能であり、裁判化学上有用であると思われるので報告する。

実 験

1. 試薬 ペプシン (品番 P-6887), 卵白リゾチーム (品番 L-7001), 牛ヘモグロビン (品番 H-2500), 人血清アルブミン (品番 A-8763) はシグマ社製のものを用い、あらかじめ濃度 1–10 mg/ml の水溶液又はメチルアルコール溶液を調製した。ウール及び絹糸は染色試材社、牛皮革は堀下栄社より供与された標品を用い、その約 100 μ g を切り取りメチルアルコールで洗浄の上、使用した。

2. 装置 熱分解装置：日本分析工業社製 JHP-3 型キューリーポイントパイロライザー、ガスクロマトグラフ：島津 GC-7 AG 型 (CLH-702 スプリット、水素炎イオン化検出器付き)、データ処理装置：島津クロマトパック C-R 3 A, 質量分析計：島津 GCMS-QP 1000。

3. 熱分解装置、ガスクロマトグラフィー及び質量分析の条件 熱分解装置：熱分解温度 590°C (同温度用フェロマグネチックホイル使用)、熱分解時間 3 s, 熱分解炉恒温槽温度 180°C, ガスクロマトグラフィー：分離カラム島津溶融シリカキャピラリーカラム CBP-10 (シアノプロピル OV-1701 相当) 内径 0.2 mm, 膜厚 0.25 μ m, 長さ 40 m, カラム温度 70–260°C (4 分間ホールド後毎分 10°C の昇温分析), 試料注入口及び検出器の温度 280°C, キャリアーガス 窒素, 線速度 30 cm/s, スプリット比 1 : 80, 質量分析：セパレータ温度 280°C, イオン化電圧 70 eV, 他の条件はガスクロマトグラフィーと同じ。

4. 分析方法 単純タンパク質等は 100 μ g となるように、あらかじめ調製したこれらの水溶液また

はメチルアルコール溶液の一定量をフェロマグネチックホイルに滴下、ホットプレート上約 40°C で乾燥させたうえ包み込み加圧密着させ、上記条件で分析した。その他のタンパク質試料については約 100 μ g をフェロマグネチックホイルに包み込み、加圧密着させたうえ分析した。

結果と考察

1. 単純タンパク質等のPGC

アミノ酸組成既知の単純タンパク質等としてペプシン (アラニン : Ala 16, アルギニン : Arg 2, アスパラギン : Asn 12, アスパラギン酸 : Asp 29, シスチン : Cys 6, グルタミン : Gln 13, グルタミン酸 : Glu 13, グリシン : Gly 35, ヒスチジン : His 1, イソロイシン : Ile 25, ロイシン : Leu 26, リジン : Lys 1, メチオニン : Met 4, フェニルアラニン : Phe 14, プロリン : Pro 15, セリン : Ser 44, スレオニン : Thr 26, トリプトファン : Trp 5, チロシン : Tyr 16, バリン : Val 23 計アミノ酸残基数 326, カルボキシル末端 Ile, アミノ末端 Ala), 卵白リゾチーム (Ala 12, Arg 11, Asn 13, Asp 8, Cys 8, Gln 3, Glu 2, Gly 12, His 1, Ile 6, Leu 8, Lys 6, Met 2, Phe 3, Pro 2, Ser 10, Thr 7, Trp 6, Tyr 3, Val 6 計アミノ酸残基数 129, カルボキシル末端 Leu, アミノ末端 Lys), 牛ヘモグロビン (Ala 72, Arg 14, Asn 16, Asp 38, Cys 2, Gln 8, Glu 26, Gly 40, His 32, Ile 0, Leu 74, Lys 48, Met 8, Phe 34, Pro 20, Ser 36, Thr 28, Trp 6, Tyr 10, Val 60 計アミノ酸残基数 572, α 鎖のカルボキシル末端 Arg, アミノ末端 Val, β 鎖のカルボキシル末端 His, アミノ末端 Met) 及び人血清アルブミン (Ala 62, Arg 24, Asn 17, Asp 36, Cys 35, Gln 21, Glu 61, Gly 12, His 16, Ile 8, Leu 61, Lys 59, Met 6, Phe 31, Pro 24, Ser 24, Thr 28, Trp 1, Tyr 18, Val 41 計アミノ酸残基数 585, カルボキシル末端 Leu, アミノ末端 Asp), 以上 4 種のアミノ酸組成既知の単純タンパク質等について PGC を行った。その結果、いずれの試料からも類似したピークパターンを有するパイログラムが得られた。例としてペプシンと牛ヘモグロビンのものを Fig. 1 に示す。また、主要ピークについて質量分析を行ったところそれぞれ Table I に示すアミノ酸残基に由来する熱分解生成物が同定された。ただし、Fig. 1 に示すようにペプシンのパイログラムには Ile に由来する 2-メチルブタナール (ピーク番号 3) と 2-メチルブタンニトリル (ピーク番号 6) が検出されているが、牛ヘモグロビンからはこ

Fig. 1. Pyrograms of Pepsin and Hemoglobin (bovine)

TABLE I. Degradation Products Identified in Pyrogram of Pepsin

Peak No. ^{a)}	Degradation Products	Amino acid residues assigned
1	Acetaldehyde	Ala
2	3-Methylbutanal	Leu
3	2-Methylbutanal	Ile
4	2-Methylpropanenitrile	Val
5	Toluene	Phe
6	2-Methylbutanenitrile	Ile
7	3-Methylbutanenitrile	Leu
8	Pyrrole	Pro, Hyp
9	Phenol	Tyr
10	<i>p</i> -Cresol	Tyr
11	Unknown	Glu, Gln
12	Unknown	Asp, Asn
13	Indole	Trp
14	Skatole	Trp

a) Peak numbers correspond to the pyrogram of Pepsin (Fig. 1).

これらのピークは検出されなかった。これは牛ヘモグロビン中には構成アミノ酸として Ile が含まれていないことによるものと考えられる。⁵⁾

また, Pro(または Hyp)に由来するピロール(ピーク番号 8), Tyr に由来するフェノール(ピーク番号 9)と *p*-クレゾール(ピーク番号 10)のピーク強度についてもペプシンと牛ヘモグロビン間で顕著な差異が見られ, これは各試料のアミノ酸組成⁵⁾の違いを示唆しているものと考えられた。

2. 本法における再現性の検討

タンパク質試料としてウール 100 μ g について PGC を 10 回繰り返し行い, 得られたパイログラムの各ピーク強度の再現性について検討したところ,

結果は Table II に示す通りであり, Pro, Tyr, Trp, Phe の各芳香族系アミノ酸については変動係数が 5.6—6.3% であり比較的良好な再現性が得られたが, 脂肪族アミノ酸のうち, Val, Glu (Gln), Asp (Asn) の変動係数は 10% 以上の値を示した。これは, 芳香族系アミノ酸に由来するピークがパイログラム中でも比較的大きなピークとして検出され, 他のピークとの分離も良好であったのに対し, Val 等の脂肪族アミノ酸についてはピーク強度が小さいためノイズの影響を受けやすく, ピーク分離も不完全であったためと考えられる。

3. 各アミノ酸由来熱分解生成物のピーク強度比 (P 値) と各アミノ酸残基数の構成比率 (N 値) との関係

各試料のアミノ酸組成と各アミノ酸由来熱分解生成物のピーク強度との関係について検討を行うため, ペプシン, 牛ヘモグロビン, 卵白リゾチーム及び人血清アルブミンについてそれぞれ 5 回ずつ繰り返し PGC を行い, 各アミノ酸由来熱分解生成物のピーク強度と各試料のアミノ酸組成⁵⁾をまとめたものを Table III に示す。なお, 種々のタンパク質中に構成アミノ酸として比較的普遍的に含まれる Phe⁶⁾を基準アミノ酸とし, その熱分解生成物であるトルエンのピーク強度を 1 とした場合の他のアミノ酸由来熱分解生成物のピーク強度比 (以下, 各アミノ酸の P 値と呼び, “P (アミノ酸名)”と略記する。ただし熱分解生成物として複数の化合物が検出されるアミノ酸の場合はそれらのピーク強度の合計による。

例えば Tyr の場合, その熱分解生成物であるフェノールと *p*-クレゾールのピーク強度の合計をトルエンのピーク強度で割った値を “P (Tyr)” とする), 並びに各試料中の Phe 残基数を 1 とした場合の他のアミノ酸残基の構成比率 (以下, 各アミノ酸の N 値と呼び, “N (アミノ酸名)”と略記する)を併記した。Table III に示す各アミノ酸の P 値と N 値との相関関係は Table IV に示すように, いずれも相関係数 0.990—0.999 の良好な直線関係を示し, Table IV の式を検量線として用いることにより, 任意のタンパク質試料について P 値から N 値を推定することが可能であると考えられた。

4. タンパク質試料中におけるアミノ酸組成の簡易分析

前報¹⁾で著者らはウール, 絹糸, 牛皮革の各タンパク質試料について PGC を行い, これらの試料からは, それぞれのアミノ酸組成の特徴を反映したパイログラムが得られることを見いだした。本報では,

TABLE II. Reproducibility of Data for Major Degradation Products in the Pyrogram of Wool Fiber

Degradation products ^{a)}	Peak intensity ^{b)} ($\times 10^4$ counts)	CV(%)
Acetaldehyde (Ala)	1.20	7.7
3-Methylbutanal + 3-Methylbutanenitrile (Leu)	0.91	9.2
2-Methylbutanal + 2-Methylbutanenitrile (Ile)	0.40	7.4
3-Methylpropanenitrile (Val)	0.21	11.5
Toluene (Phe)	2.26	6.3
Pyrrole (Pro + Hyp)	1.97	6.0
Phenol + <i>p</i> -Cresol (Tyr)	4.63	5.6
Unknown (Glu + Gln)	0.82	13.8
Unknown (Asp + Asn)	0.68	12.5
Indole + Skatole (Trp)	1.71	5.6

^{a)} Names in parentheses represent the assigned amino acid residues.

^{b)} Average for five repeated measurements.

TABLE III. Amino Acid Content and Peak Intensity of Major Degradation Products^{a)} of Each Amino Acid on Pyrolysis of 4 Protein Samples

Amino acid residues	Ala	Leu	Ile	Val	Phe	Pro+ Hyp	Try	Glu+ Gln	Asp+ Asn	Trp	Others	Total
Pepsin												
Peak ($\times 10^4$) ^{b,c)}	0.62	0.78	0.74	0.23	2.06	1.03	3.40	0.56	0.72	2.88	—	—
P value ^{d)}	0.30	0.38	0.36	0.11	1.00	0.50	1.65	0.27	0.35	1.40	—	—
Content ^{e)}	16	26	25	23	14	15	16	26	41	5	119	326
N value ^{f)}	1.14	1.86	1.79	1.64	1.00	1.07	1.14	1.86	2.93	0.36	—	—
Hemoglobin (bovine)												
Peak ($\times 10^4$) ^{b,c)}	1.17	1.01	0.00	0.27	2.53	0.35	1.04	0.38	0.63	1.98	—	—
P value ^{d)}	0.46	0.40	0.00	0.11	1.00	0.14	0.41	0.15	0.25	0.78	—	—
Content ^{e)}	72	74	0	60	34	20	10	34	54	6	200	572
N value ^{f)}	2.12	2.18	0.00	1.76	1.00	0.59	0.29	1.00	1.59	0.18	—	—
Egg white lysozyme												
Peak ($\times 10^4$) ^{b,c)}	0.83	0.46	0.38	0.13	0.99	0.22	1.34	0.22	0.75	6.40	—	—
P value ^{d)}	0.84	0.46	0.38	0.13	1.00	0.22	1.35	0.22	0.76	6.46	—	—
Content ^{e)}	12	8	6	6	3	2	3	5	2	6	57	129
N value ^{f)}	4.00	2.67	2.00	2.00	1.00	0.76	1.00	1.67	7.00	2.00	—	—
Albumin (human)												
Peak ($\times 10^4$) ^{b,c)}	1.06	0.66	0.20	0.17	2.21	0.55	1.81	0.88	0.62	0.86	—	—
P value ^{d)}	0.48	0.30	0.09	0.88	1.00	0.25	0.82	0.36	0.28	0.39	—	—
Content ^{e)}	62	61	8	41	31	24	18	82	53	1	204	585
N value ^{f)}	2.00	1.97	0.26	1.32	1.00	0.77	0.58	2.65	1.71	0.03	—	—

^{a)} cf. Table I.

^{b)} Peak intensity of degradation products of each amino acid residue.

^{c)} Average of 5 repeated measurements.

^{d)} Relative peak intensity of degradation products of each amino acid residue against to the peak intensity of toluene (1.00).

^{e)} Number of each amino acid residue in molecule.

^{f)} Ratio of the number of each amino acid residue in molecule to the number of Phe (1.00).

TABLE V. N values of 10 Amino Acid Residues of Wool, Silk and Leather Determined by PGC

Amino acid residues	Ala	Leu	Ile	Val	Phe	Pro + Hyp	Try	Glu + Gln	Asp + Asn	Trp
Wool										
Found ^{a)}	2.56	2.31	1.20	1.33	1.00	1.37	1.46	2.63	2.67	0.18
Reported ^{b)}	2.20	2.70	1.25	1.71	1.00	1.60	1.40	4.00	2.40	0.28
Silk										
Found ^{a)}	25.2	1.11	1.56	4.04	1.00	0.78	7.50	2.85	4.35	0.29
Reported ^{b)}	44.0	3.07		5.19	1.00	0.67	7.00	3.30	2.72	0.25
Leather										
Found ^{a)}	3.96	2.33	0.80	1.26	1.00	5.46	0.76	3.92	4.77	0
Reported ^{b)}	3.83	1.39	0.96	1.17	1.00	5.80	0.60	4.96	3.04	0

a) N value determined by PGC using calibration curves (Table IV).

b) N Value determined using reported values.^{6,7)}

これらのパイログラム中の熱分解生成物のピーク強度から Table IV に示す式を用いて各アミノ酸残基の N 値を算出した。その結果は Table V に示す通りであり、ほとんどの場合既に報告されている文献値^{6,7)} から算出した N 値と近似した値を示していたが、絹糸における Ala、ウールにおける Trp と Glu (Gln)、絹糸と牛皮革における Asp (Asn) については大きな差違が見られた。その原因として以下の点が考えられる。まず、絹糸中には構成アミノ酸として Ala が 30.7 mol% 含まれ、⁷⁾ その N 値は 44.0 となり、Table IV に示す検量線の定量範囲 (Ala の検量線は Table III に示す N 値 1.14—4.00 の範囲のデータから作成) を超えたため大きな誤差を生じた

ものと考えられる。ウールにおける Trp と Glu (Gln) については、主成分である羊毛ケラチンのアミノ酸組成がその存在箇所によって著しく変動すること⁷⁾ と、ウールでは脂肪等のタンパク質以外の成分に由来すると考えられるノイズが大きく、使用したデータ処理装置によるピーク面積の分割処理が適切に行われなかった可能性も考えられる。絹糸と牛皮革における Asp (Asn) については、これに由来するピーク強度が比較的小さいため、ノイズの影響を強く受けたことが原因として考えられる。

5. 熱等により変化したタンパク質試料の分析

第 4 項において、PGC によるウール、絹糸、皮革等の識別例を挙げたが、天然繊維の場合、実際の検査においては赤外分光分析と顕微鏡による形態観察のみで十分その判定は可能である。しかし熱等により変化した試料、とりわけ焼損が著しく炭玉状になった試料の場合、顕微鏡検査や赤外分光分析ではこれらの識別は困難である。そこで本報ではウール、絹糸、牛皮革及び参考のためにナイロン-6,6 (各 0.1 mg) のそれぞれについて、都市ガス小火炎中で炭玉状になるまで燃焼させたもの、赤外分光分析用の臭化カリウム錠剤にしたもの、燃焼させて炭玉状になったものを赤外分光分析用の臭化カリウム錠剤にしたものを作成し、これらの PGC を行った。その結果、このような試料においても、それぞれの繊維の元の状態のものと酷似するピークパターンを有するパイログラムが得られた。例としてウールのものを Fig. 2 に示す。つぎに熱に対して比較的安定と考えられ、しかも各試料のパイログラム中でも比較的大きなピークとして検出され、さらに第 2 項における再現性の検討の結果も良好であった芳香族系アミノ

TABLE IV. Calibration Curves for N values of 9 Amino Acid Residues ($N^a = a + b \cdot P^b$)

Amino acid residues	a	b	r ^{c)}
Ala	-0.22	5.27	0.997
Leu	0.04	5.68	0.991
Ile	-0.06	5.24	0.995
Val	0.05	14.41	0.990
Pro + Hyp	0.20	1.34	0.995
Tyr	0.00	0.71	0.999
Glu + Gln	-0.03	7.32	0.997
Asp + Asn	-0.53	10.66	0.997
Trp	-0.06	0.32	0.999

a) N value: Ratio of the number of each amino acid residue in molecule to the number of Phe (1.00).

b) P value: Relative peak intensity of degradation products of each amino acid residue against to the peak intensity of toluene (1.00).

c) Correlation coefficient.

Fig. 2. Pyrogram of Wool Fiber (Raw fiber, KBr disk of raw fiber, Ash ball of fiber and KBr disk of ash ball)

酸残基に由来する、トルエン (Phe 由来, ピーク番号 5), ピロール (Pro または Hyp 由来, ピーク番号 8), フェノールと *p*-クレゾール (Tyr 由来, ピーク番号 9, 10), インドールとスカトール (Trp 由来, ピーク番号 13, 14) の各ピークについて, Table IV に示す式により算出した N 値をプロットしたところ, Fig. 3 に示すように, いずれも燃焼前のものの文献値に近い値が得られた。これらの繊維が燃焼して炭玉状になっている場合, 顕微鏡検査は言うまでもなく, 赤外分光分析によってもアミド結合の存在の有無程度はわかるが, これらの繊維の種類を明確にすることは従来困難であった。しかし, Fig. 3 に示す通り, PGC を行うことにより, 炭玉状になったものや, さらにこれを臭化カリウム錠剤にしたものであっても, その繊維の種類を明確に識別することが可能であった。よって焼損の著しい試料であっても, まず臭化カリウム錠剤法による赤外分光分析を行い, 次にその臭化カリウム錠剤をそのまま PGC に

Fig. 3. Plots of N(Pro), N(Tyr) and N(Trp) on PGC of Wool, Silk, Leather and Nylon 6,6

○: raw fiber, ●: KBr disk of raw fiber,
△: ash ball of fiber, ▲: KBr disk of ash ball,
□: N value determined using reported values^{6,7)}

より分析するといった系統的な分析が可能であり, 本法はこれら試料の識別に有効であるものと考えられた。

ま と め

本報では PGC による種々のタンパク質試料の迅速簡便な分析を行うことを目的として検討を行った。まず最初に, アミノ酸組成既知の単純タンパク質等の PGC を行うことにより, アミノ酸残基の構成比率と各アミノ酸の熱分解生成物のピーク強度比との関係について調べた。その結果, 13 種のアミノ酸について, その熱分解生成物のピーク強度比から各アミノ酸残基の構成比率の簡易分析が可能であった。つぎに, ウール等数種のタンパク質試料について PGC によるアミノ酸残基の構成比率の簡易分析を行ったところ, 文献値に近似する測定値が得られた。また, 本法により, これらタンパク質試料が燃焼し炭玉状になったものや, さらにそれを赤外分光分析用の臭化カリウム錠剤にしたものであっても直接分析可能であり, 裁判化学分野におけるこれら試料の識別に有効であるものと考えられた。

引 用 文 献

- 1) 土橋 均, 三木昭宏, 衛生化学, **34**, 430 (1988).
- 2) 竹内次夫, 拓植新著, “高分子の熱分解ガスクロマトグラフィー,” 化学同人, 京都, 1984.
- 3) J.F. Cope, *Anal. Chem.*, **45**, 562 (1973).
- 4) S. Tsuge and H. Matsubara, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.*, **8**, 49 (1985).
- 5) 日本生化学会編, “生化学データブック 1,” 東京化学同人, 東京, 1979.
- 6) 水島三一郎, 赤堀四郎編, “蛋白質化学 5,” 共立出版, 東京, 1957.
- 7) 繊維学会編, “繊維便覧原料編,” 丸善, 東京, 1968.