タンパク質一次構造の決定法

成 田 耕 造*

タンパク質はアミノ酸がペプチド結合によって高度に縮合した高分子物質であり、そのポリペプチド鎖中におけるアミノ酸の配列順序をタンパク質の一次構造と呼んでいる。単一のアミノ酸のみから成るポリアミノ酸とは異なって、タンパク質中では 20 種のアミノ酸が何十〜何百と含まれており、これらアミノ酸の種類とその配列順序によって一定の分子形が生体中で保持され、また生理的な機能を営んでいる。したがって生命のからくりを司るタンパク質の機能を理解するためには、タンパク質の一次構造を知ることが先決問題である。しかし非常に数多くのアミノ酸から構成されているタンパク質中で、それらがどんな順序で配列しているか明らかにすることは非常に根気のいる研究であり、現在一次構造が完全に解明されたものはまだ十指に達していない。

ここではタンパク質の一次構造がいかにして決定されるか順を追ってそのあらましを説明しよう。

1. 末端基の決定

タンパク質はすでに述べたように α -アミノ酸の高縮合物であるから、その鎖の一端には α -アミノ基があり、他端には α -カルボキシル基が存在している。前者をアミノ末端基あるいは N 末端基と呼び、後者をカルボキシル末端基あるいは C 末端基と呼んでいる。

このような末端基を決定するためには、なんらかの方法で末端基にしるしをつけ、そのしるしがこわれないようにしてしるしつけられたアミノ酸のみを取り出して、その定性および定量分析すれば良いわけである。末端基の定量分析を精度高く行なえば、そのタンパク質の純度も知ることができるし、また逆に分子量を推定することも可能である。

1-1. N 末端基

広く使用されている方法には、DNP 法と呼ばれる方法と、PTC 法と呼ばれる 2 方法がある。タンパク質に 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene を弱アルカリ性、室温で

作用させると、黄色の dinitrophenyl (DNP) 誘導体が得られる。タンパク質中のアミノ基、システイン残基の SH 基、チロシン残基のフェノール性水酸基、ヒスチジン残基のイミダゾール基などに DNP 基が導入される¹⁾。ここで問題になるのは α 位のアミノ基に導入された DNP 基であるが、DNP-タンパク質を 6N 塩酸、110°C に 10 数時間加熱しても、二三の例外を除いて著しい分解は生じない。しかしペプチド結合は完全に加水分解されるので、N 末端アミノ酸のみ α -DNP-アミノ酸として回収される。したがって α -DNP-アミノ酸を分離、クロマトグラフィーで確認、360 m μ の吸収極大を利用して定量分析すれば良い。DNP 基の導入された他のアミノ酸残基は、塩酸加水分解後も DNP 基はヒスチジンを除きなお結合しているが、これら DNP 基は側鎖に導入されていて、アミノ基およびカルボキシル基は遊離している。したがって加水分解後の酸性溶液からエーテルで抽出する際、 α -DNP-アミノ酸のみ抽出され、他は水層に残るので分離は簡単である。

また phenylisothiocyanate をタンパク質にアルカリ性で作用させると、phenylthiocarbamyl (PTC) 誘導体が得られる。PTC 基はタンパク質中のアミノ基に導入されている。条件は種々報告されているが、PTC-タンパク質を温和な条件下で酸処理すると次式のごとく N 末端アミノ酸のみ閉環してアミノ酸の thiohydantoin (PTH) として遊離される²⁾。

したがって残部は N 末端アミノ酸が 1 個のみ除去されたタンパク質となる。PTC 法を順次くり返せば、N

* Kozo Narita 大阪大学蛋白質研究所教授・理博
Determination of Primary Structure of Proteins

末端基から順次タンパク質の一次構造を決定できるはずであるが、反応は必ずしも定量的には進行しがたい。遊離したアミノ酸の PTH は酢酸エチルで抽出し、クロマトグラフィーで確認後、抽出して 269 mμ の吸収極大で比色し定量分析する。普通はこの方法でせいぜい数個のアミノ酸の配列を N 末端から決定できる程度であるが、本法の考案者である Edman は N 末端から 14 個のアミノ酸配列の決定に成功している⁵⁾。

1-2. C 末端基

C 末端基を化学的に決定する方法のうち現在使用されているのは赤堀らの考案によるヒドラジン分解法⁴⁾のみである。タンパク質を無水ヒドラジンと加熱すると、ヒドラジンがペプチド結合に作用してアミノ酸ヒドラジドを与えるが、C 末端アミノ酸のカルボキシル基はペプチド結合に関与していないので遊離アミノ酸になる。ヒド

ラジン分解物をベンツアルデヒドのようなアルデヒドと処理すると、ヒドラジドはアルデヒドと縮合するので、C 末端遊離アミノ酸と容易に分別できる。

ヒドラジン分解法以上により多く使用されているのは酵素による方法である。脾臓に分泌される carboxypeptidase (Cpase と略す) は、その特異性として α-カルボキシル基が遊離しているアミノ酸残基の関与するペプチド結合のみ加水分解する。したがってまず C 末端アミノ酸を遊離し、新たに生じた C 末端基にさらに作用するという具合に、C 末端基から 1 個ずつアミノ酸を加水分解する。遊離されたアミノ酸を時間的に分析すれば C 末端付近のアミノ酸配列を決定できる⁵⁾。しかし C 末端に位置するアミノ酸の種類によって加水分解される速度が非常に異なるので、結果の解析にしばしば困難を伴う。比較的側鎖の大きいチロシン、フェニルアラニン、ロイシンなどはすみやかに加水分解されるが、グリシンなどは加水分解速度が小さく、また塩基性アミノ酸であるアルギニン、リジン、それにイミノ酸であるプロリンには全く作用しない。一方 C 末端アルギニンおよびリジンのみに特異的に作用する Cpase も見出され、これを Cpase B と呼んで前者の Cpase A と区別されている。したがって Cpase A と B の混合物を使用すれば、プロリンを除いてすべて C 末端基を酵素法によって決定できるわけである。第 1 図に Taka-amylase に Cpase A を作用させた際、アミノ酸が遊離される状態を一例として示しておく。

末端分析をタンパク質に応用した際、ときおり 1 分子のタンパク質から 2 モル以上の末端基を検出する場合に

第 1 図 Taka-amylase にカルボキシペプチダーゼ A を作用させて遊離されるアミノ酸 (この図から C 末端構造は—Leu·Ser·OH であることがわかるがそれ以上については何もいえない)

遭遇する。これはタンパク質が 2 個以上のポリペプチド鎖からできていることを示しており、このような鎖間結合は主としてシスチン残基の SS 結合によるものである。シスチンは 1 分子中に 2 個ずつのアミノ基とカルボキシル基を持ち、ペプチド鎖に 2 カ所に関与する。したがってシスチン含有タンパク質の場合にはあらかじめ SS 結合を切断しなければならない。過酸で酸化的に切断する方法⁶⁾と、多量の SH 化合物で還元的に切断する方法⁷⁾とがある。

後者の場合には、還元によって生じたシスチン残基の SH は容易に酸化されるので、アルキル化して再酸化を防がねばならない。この目的にはモノヨード酢酸でカルボキシメチル化する方法が広く知られている。

このような SS 結合はペプチド鎖間のみならず、鎖内にも存在するので、一次構造決定の際には前もって切断しておかねばならない。

シスチンを含まないタンパク質でも、複数個のペプチド鎖から構成されているものはかなり知られている。代表的なものは、4 本のペプチド鎖からできているヘモグロビンである。このような場合には、通常鎖間の水素結合の関与が大きいと考えられており、タンパク質を変性すると subunit に解離するので、それぞれのペプチド鎖に分離できる。

2. ペプチド結合の選択的切断⁸⁾

末端決定法のみでタンパク質の一次構造を決定することは前述のようにほとんど不可能である。したがってよ

り小さな断片として得られた断片ペプチドの構造を決定し、もとのタンパク質の構造を推定しなければならない。小さな断片とする場合、非特異的にどのペプチド結合でも切断するような方法は好ましくない。ある特定のアミノ酸の関与するペプチド結合のみを、選択的に切断する方法として広く使用されているのは酵素の特異性を利用する方法である。

タンパク質分解酵素の中で最も特異性の狭いのはトリプシンで、リジンおよびアルギニン残基のカルボキシル基の関与するペプチド結合のみ特異的に加水分解する。

(T, C はそれぞれトリプシンおよびキモトリプシンを現わす)

トリプシンに次で特異性の狭いのはキモトリプシンであり、この酵素は芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン残基のペプチド結合をほとんど例外なく切断するが、これ以外にもロイシン、メチオニン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン残基のペプチド結合も部分的に分解する。しかしトリプシンの場合でも同様であるが、酵素の特異性に合致したアミノ酸残基が存在しても、これがN末端にあったり、あるいはこれらアミノ酸の次にプロリンが結合していると酵素は作用しない。

上記2種の酵素以外にもタンパク質の構造決定にペプシン、パパイン、細菌のプロテアーゼなども使用されているが、これらは主として大きなペプチド断片をさらに小さくするような場合に使用される。

酵素を使用しない有機化学的なペプチド結合の選択的切断方法も、いくつか報告されている⁹⁾が、タンパク質に直接応用され、しかも確実性のあるものは現段階ではメチオニル結合の切断のみであろう。pH 1~3 付近でプロトミアン作用させると、次式のようにホモセリンラクトンを形成してメチオニル結合が開裂される¹⁰⁾。

この他にトリプトフィル、チロシル、ヒスチジル、システニル結合の有機化学的切断方法が報告されているが、タンパク質については定量的でなかったり、あるいは

は反応例が乏しいのでこれ以上ここでは述べない。

3. ペプチドの分離および精製

タンパク質を選択的に分解した産物中には、通常多くのペプチドが含有されており、その大きさはまちまちである。これらペプチドのいずれをも失うことなく相互に分離するのに最も適した方法はイオン交換クロマトグラフィーである。ペプチドは例外なく両性電解質であるので、媒体の pH によって陽イオンにも陰イオンにもなりうる。したがって陽イオン交換体でも陰イオン交換体でも適当な条件を選べばクロマトグラフィーの担体として使用できる。クロマトグラフィー用展開緩衝剤として、古くは不揮発性緩衝剤が使用されていたが、大量の溶出液中に微量のペプチドしか含有されていないので、ペプチド量の何百~何千倍の緩衝物質からペプチドを損失なく分離することは非常に困難であった。この困難を克服するために、最近ではギ酸・ピリジン混合物、酢酸・ピリジン混合物などのような揮発性緩衝液が使用されるようになった。このような場合には、ペプチド存在溶出液部分を凍結乾燥して容易にペプチドを分離することができる。

このクロマトグラフィーの手段は文献¹¹⁾に譲ることにして、ここではパン酵母チトクローム c のキモトリプシン分解物中のペプチドの分離状態を第2図に示す¹²⁾にとめておく。

第2図 パン酵母チトクローム c のキモトリプシン分解物中のペプチドの Dowex 50-x2 カラムによるクロマトグラフィー

4. ペプチドの構造決定

すでに述べたように、ペプチドに含有されているアミノ酸が数個程度であれば、既述の末端基決定法を適当に組み合わせてその構造を決定できる。しかしより大きなペプチドの場合には、他の切断方法を用いてさらに小さな断片とし、各断片を分離、その構造を決定してもとのペプチドの構造を推定しなければならない。パン酵母チトクローム c のトリプシン分解によって得られたアミノ酸18個含むオクタデカペプチドの構造決定経過¹³⁾を第1

第 1 表 オクタデカペプチドの構造決定の概要*

分 析 法	分 析 結 果	電 気 化 学 的 性 質
DNP 法	H · Asp—	
PTC 法	H · AspNH ₂ · Val · Leu · Try · Asp · [Glu, Asp, Asp, Met, Ser, Glu, Tyr, Leu, Thr, Asp, Pro, Lys] · Lys · OH	
ペプシン分解	H · AspNH ₂ · Val · Leu · OH $\xrightarrow{\text{H} \cdot \text{Try} \cdot \text{Asp} \cdot \text{Glu} \cdot \text{AspNH}_2 \cdot \text{AspNH}_2 \cdot \text{OH}}$ $\xrightarrow{\text{H} \cdot \text{Met} \cdot [\text{Ser}, \text{Glu}] \cdot \text{OH}}$	中 性 強 酸 性 酸 性 塩 基 性
BrCN 切断	H · Tyr · Leu · Thr · [AspNH ₂ , Pro, Lys] · Lys · OH H · Asp · [Val, Leu, Try, Asp, Glu, Asp, Asp] · Homoserine lactone $\xrightarrow{\text{H} \cdot \text{Ser} \cdot \text{Glu} \cdot [\text{Tyr}, \text{Leu}, \text{Thr}, \text{Asp}, \text{Pro}, \text{Lys}] \cdot \text{Lys} \cdot \text{OH}}$	
推 定 構 造	H · AspNH ₂ · Val · Leu · Try · Asp · Glu · AspNH ₂ · Asp(NH ₂) · Met · Ser · Glu · Tyr · Leu · Thr · [AspNH ₂ , Pro, Lys] · Lys · OH	

* —→ は PTC 法によって決定したことを示し、他の N 末端は DNP 法によって決定した。DNP 法の場合には塩酸で加水分解するので、酸性アミノ酸残基の側鎖のカルボキシル基が遊離状態かあるいはアミド態かわからない。[] はこれらのアミノ酸を含有しているが、その配列順序は未決定であることを示している。

図中 T, C, P はそれぞれトリプシン、キモトリプシンおよびペプシンを示し、これらの記号の箇所の縦の実線および点線はこの3酵素が完全あるいは部分的に加水分解したことを示している。なおゴシック体のアミノ酸残基はウマの心筋から得られたチトクローム c と同一であることを示している。

第 3 図 パン酵母チトクローム c の一次構造

番号 1 が N 末端基で、124 が C 末端アミノ酸である。図中 I と VI, II と VII, III と VIII, IV と V のシステイン残基間で SS 結合ができています。

第 4 図 ウシのリボヌクレアーゼ A の一次構造

表に示す。このペプチドの C 末端基は直接には決定しなかったが、このペプチドはトリプシン分解によって得られたので、既述したようにトリプシンの特異性からしてリジンと推定した。なおアミノ酸配列順序の未決定部分中のアミノ酸残基については、その側鎖カルボキシル基が遊離状態かアミド態かは、構成アミノ酸とロ紙電気泳動での移動状況、すなわち電気化学的性質とから推定した。ペプチドの構造決定法の一例を第 1 表に示したが、他のペプチドの構造決定法も大同小異である。

5. タンパク質の完全な一次構造の決定

タンパク質をある一種の選択的切断方法で分解し、得られた全ペプチドの構造を完全に決定しても、それら各ペプチドの相互の配列順序を知らねば全構造は決定できない。そのためには、全く異なった特定のアミノ酸残基のペプチド結合を選択的に切断する他の方法を使用し、得られたペプチドを分離、さらにアミノ酸組成、必要とあればその構造を決定する。このような全く異なった 2 種の方法で得られたペプチドの構造が、互に重なり合う場所が必ずあるはずである。このようにモザイク状のパズルを解くように、重なり合う部分を探して最後に 1 本のポリペプチド鎖を組み立ててタンパク質の完全一次構造を決定する。第 1 表の 18 個のアミノ酸からなるペプチドを、小さなタンパク質とみなせば、PTC 法、ペプシン分解ペプチド、BrCN 切断で得られたペプチドの互に重なり合う部分を求め、その構造を決定したのと全く同一原理である。このようにして筆者の研究室で完全に構造を決定したパン酵母チトクローム c の全構造¹⁴⁾を第 3 図に示そう。

チトクローム c の場合には幸いにしてシステインによる SS 結合は全く含まれていなかった。SS 結合を含んだタンパク質では、既述したように最初に SS 結合を切断し、1 本のポリペプチド鎖として構造を決定するのであるから、その一次構造が完全に決定されても、もとのタンパク質分子中で、どの半システイン残基とどの半システイン残基が結合していたか不明である。これを知るためには、SS 結合を切断しないタンパク質をペプシンで消化し、システイン含有ペプチドを分離、そのペプチドについて SS 結合の切断反応を行なって 2 種のペプチドを分離し、それらのアミノ酸組成、必要な場合にはその構造も決めてもとのタンパク質中 SS における結合の位置を推定する。2 種以上のシステインペプチドが共存すると容易に SS 結合の交換反応が生じする¹⁵⁾。

前記のペプシン分解は pH 2 で通常行ない、酸性条件ではこのような SS 結合の交換反応が比較的生じにくい¹⁶⁾。このようにして決定されたウシ膵臓リボヌクレアーゼの構造¹⁷⁾を第 4 図に示しておく。

6. むすび

タンパク質の一次構造決定法の全貌を解説することはできなかったが、本稿によってタンパク質の一次構造決定がいかにやっかいな仕事であるか推察していただけたと思う。まだ全一次構造の決定されたタンパク質は数える程度しかない。したがってタンパク質の機能と構造との関係についてより良く理解するためには、さらに多くのタンパク質の一次構造の決定をしなければならない。

(754 ページへつづく)

反応の形をとらざるをえないのではなからうか？ 置換反応が起こるためには分子は分極していなければならない。分子を分極せしめることはすなわち酸化することにはかならない。したがって酸化反応は生体がエネルギーを得るための必然的なことがらではなからうか？

ここでは一応反応機構について述べたけれども、本当の反応機構というべきものはほとんど明らかにされていない。反応を触媒する酵素タンパク質の構造を知ることが、解決の第一歩であろう。これらの構造、反応機構が明らかになったときには、人工触媒、人工酵素もつくられて、現在のところ、ムダな熱として失われている化学エネルギーを有用な形で取り出すことが可能になり、現在の生物を上回るような反応を行わせることも可能となるであろう。

文 献

一般的参考書

赤堀四郎・松井邦夫：“生体反応論 I”，岩波講座現代化学，岩波書店（1956）

佐藤 了：“細胞呼吸の生化学”，科学，33，No. 3～11，（1963）

“The Enzymes”（ed. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck）2nd edition, 6, Academic Press, New York（1962）

1) F. M. Huennekens, H.R. Whitely: “Compara-

tive Biochemistry”（ed. M. Florkin, H. S. Mason），1, 107, Academic Press, New York（1960）；M. R. Atkinson, R. K. Morton: *ibid.*, 2, 1

2) J. L. Gamble, Jr., V. A. Najjar: *Science*, 120, 1023（1954）

3) L. V. Eggleston, R. Hems: *Biochem. J.*, 52, 156（1952）；W. J. Bowen, T. D. Kerwin: *Arch. Biochem. Biophys.*, 64, 278（1956）

4) Rose, Grunberg-Manago, Korey, Ochoa: *J. Biol. Chem.*, 211, 737（1954）

5) D. E. Koshland: “The Mechanism of Enzyme Reaction”（ed. W. D. McElroy and B. Glass），539, 608, The Johns Hopkins University, Baltimore（1954）

6) S. Kaufman: *J. Biol. Chem.*, 216, 153（1955）

7) I. C. Gunsalus, R. A. Smith: “Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto, 1957”（ed. K. Ichihara），77, Academic Press, New York（1958）

8) M. Cohn: *J. cell. comp. Physiol.*, 54, 157（1959）

9) L. P. Hager: *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 4864（1957）

10) A. Kornberg, I. Lieberman, E. S. Simms: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 2027（1954）；*J. Biol. Chem.*, 215, 389（1955）

（成田耕造著「タンパク質一次構造の決定法」730 のページよりのつづき）

またタンパク質の構造の問題はわれわれの日常生活とも無縁ではない。より良い合成繊維を得るためには、天然繊維である羊毛ケラチン、絹フィブロインの全一次構造を明らかにし、その一次構造に基いて規制されるタンパク質の立体構造を解明しなければならない。これら天然繊維の構造が明らかになって、はじめて、天然繊維特有のあの触感を再現できる合成繊維も生れてくることであろう。

文 献

1) F. Sanger: *Biochem. J.*, 39, 507（1945）；実験法については岩井浩一，藤岡英子：蛋白質・核酸・酵素，8，No. 5, 5（1963）を参照されたい

2) P. Edman: *Acta Chem. Scand.*, 4, 283（1950）；実験法については千谷晃一，山科郁男：蛋白質・核酸・酵素，8，No. 5, 27（1963）を参照されたい

3) P. Edman: *Ann. New York Acad. Sci.*, 88, 602（1959）

4) S. Akabori, K. Ohno, K. Narita: *Bull. Chem. Soc. Japan*, 25, 214（1952）；実験法については川西康博，成田耕造：蛋白質・核酸・酵素，8，No. 5, 66（1963）を参照されたい

5) 実験法については飛田亨：蛋白質・核酸・酵素，8，No. 5, 83（1963）を参照されたい

6) F. Sanger: *Biochem. J.*, 44, 126（1949）

7) A. M. Crestfield, S. Moore, W. H. Stein: *J. Biol. Chem.*, 238, 622（1963）

8) E. O. P. Thompson: *Adv. in. Org. Chem.*, 1, 149（1960）

9) B. Witkop: *Adv. in Protein Chem.*, 16, 221（1961）の総説を参照のこと

10) E. Gross, B. Witkop: *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 1510（1961）；*J. Biol. Chem.*, 237, 1856（1962）

11) 千谷晃一，矢追義人：蛋白質・核酸・酵素，8, 453, 509, 575, 636, 696, 808（1963）；9, 29, 96, 208, 279, 404（1964）の総説を参照のこと

12) 矢追義人，村上宏規，木村正巳，千谷晃一，成田耕造：日本化学会第16年会，講演（1963，4月，東京）

13) K. Narita, K. Titani: *J. Biochem.*, 投稿中

14) K. Narita, K. Titani, Y. Yaoi, H. Murakami: *Biochem. Biophys. Acta*, 77, 688（1963）

15) F. Sanger: *Nature*, 171, 1025（1963）

16) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore: *J. Biol. Chem.*, 236, 648（1960）

17) D. G. Smyth, W. H. Stein, S. Moore: *J. Biol. Chem.*, 238, 227（1963）

（全般にわたってのより広い知識をご希望の読者は，小著“蛋白質の構造”，東京化学同人出版（1963）を参照されたい。）