

異常血色素に関する研究 VII: 異常血色素の異常鎖のトリプシン消化物の ホスホセルロースカラムクロマト法による 分離について

川崎医科大学 生化学教室
日高 和夫, 井内 岩夫, 島崎 俊一

(昭和55年11月17日受付)

Studies on Abnormal Hemoglobin VII: An Improved Phosphocellulose Column Chromatography for the Separation of Peptides in Tryptic Hydrolysates of the α and the β Chain of Abnormal Hemoglobin

Kazuo Hidaka, Iwao Iuchi
and Shunichi Shimasaki

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

(Accepted on November 17, 1980)

異常血色素のトリプシン消化物からの異常ペプチドの分離精製法として Ribonuclease A の構造解析に使用されていたホスホセルロース (P. セルロース) カラムクロマト法を改良し, 推奨しうる良い方法を確立した. 即ち, 0.02 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.90) で平衡化した P. セルロースをカラム (0.8×40 cm) に充填し, その上端にトリプシン消化物 15 mg を重層し吸着させ, 0.02 M 酢酸アンモニウム (pH 3.90) と 0.2 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.06) を組合せてこしらえたアンモニウムイオンの直線勾配液を用い流速 9 ml/hr で展開するとペプチドはそれぞれの成分に分離した. 溶出液中のペプチドの有無は波長 225 nm の吸光度を連続測定する方法により調べた. 本法の特徴はきびしい条件規制もなく容易な操作で従来の濾紙フィンガープリント法では分離不充分であった中性分画 (α Tp-1, 4, 9, 11 および β Tp-1, 11, 13) がきれいな単一分画として分取出来ることである. 最近当教室で検出した Hb Matsue-Oki (α 75 Asp→Asn), Hb Ube-2 (α 68 Asn→Asp) および Hb Takamatsu (β 120 Lys→Gln) を例にし, 本法の構造解析への有用性を論じた.

A phosphocellulose (P-C) column chromatography originally used for ribonuclease A analyses was contrived in order to separate and purify the tryptic peptides of abnormal hemoglobin.

An amount of 15 mg of the tryptic digest of either α or β chain was applied on a P-C column (0.8 × 40 cm) and developed it by ammonium acetate buffer solution with a linear ammonia gradient (0.02~0.2M) at a flow rate of 9 ml/hr.

The eluates from the column were continuously monitored by the absorbance at wave length of 225 nm.

This method was easy to carry out and gave a characteristic clear cut separation of neutral peptides (α Tp-1, 4, 9, 11 and β Tp-1, 11, 13) from the other coexistent peptides contrasting to the results of a traditional paper fingerprint or any other chromatographies.

Thus, the abnormal peptides of α Tp-9 of Hb Matsue-Oki and Hb Ube-2 and the abnormal peptide of β Tp-12b.13 of Hb Takamatsu detected by our laboratory were separated in pure form by this method and contributed much to further analyses.

はじめに

異常血色素の一次構造解析において、異常鎖のトリプシン消化物から特定の異常ペプチドを分離精製する事は置換アミノ酸の部位と種類を決定するうえで非常に重要な操作の一つである。我々はこれまでトリプシン消化物からの異常ペプチドの分離手段として濾紙フィンガープリント法¹⁾を主体にし、ゲル濾過法²⁾、陽イオン交換樹脂を用いたクロマト法³⁾等を用いて異常血色素の構造決定を行ってきた。しかしながら異常血色素の中にはフィンガープリント法で異常ペプチドが単一成分として分離されず他のペプチドと重なり合うためその後の解析に困難をきたすことも少なくない。こうした困難を克服する為、今回異常ペプチドの分離精製法としてのホスホセルロース (P-C) カラムクロマト法の吟味を行なった。その結果、本法はフィンガープリント法を補う良法であることがわかったので、ここに我々の方法と成績を報告することにする。

試料と試薬

A) トリプシン消化ペプチド: 常法⁴⁾に従って調製した正常血色素 (Hb A) の α^A および β^A 鎖をトリプシン消化し、pH 6.4 での可溶分画を凍結乾燥し、本法の材料とした⁵⁾。またアミノエチル化処理³⁾をしたそれぞれの鎖の水解物も使用した。

B) カラムクロマト用試薬:

1) ホスホセルロース (P-C) (whatman P-

II 型): 市販の P-C を充分量の 0.5 N- 水酸化ナトリウム溶液次いで 0.5 N- 塩酸で洗浄し、その後大量の蒸留水で数回洗浄して活性化し、後述の緩衝液 I で平衡化したものを使用した。

2) 展開用緩衝液: 試薬としての酢酸アンモニウム、酢酸およびアンモニア水は市販の特級品をそのまま使用した。

緩衝液 I ($[\text{NH}_4^+] = 0.02 \text{ M}$): 酢酸アンモニウム 1.54 g を 900 ml の蒸留水に溶解し、酢酸で pH を 3.90 に調整後全量を 1,000 ml とした。

緩衝液 II ($[\text{NH}_4^+] = 0.2 \text{ M}$): 酢酸アンモニウム 15.4 g を蒸留水 900 ml に溶解し、酢酸で pH を 5.06 に調整後全量を 1,000 ml とした。

緩衝液 III ($[\text{NH}_4^+] = 0.3 \text{ M}$): 酢酸アンモニウム 23.1 g を蒸留水 900 ml に溶解し、アンモニア水で pH を 8.50 に調整後全量を 1,000 ml とした。

3) 紫外線吸収モニター: カラム 溶出液中のペプチドはペプチド結合にもとづく波長 225 mm の吸光度をモニター用計器 (ギルソン, SPECTROCHROM-M 型) を用いて測定し検出した。

4) ペプチドの同定: 溶出ペプチドの同定は得られた成分を塩酸で加水分解し、アミノ酸分析機にかけ、アミノ酸残基の種類と数を調べておこなった。

操 作

異常血色素のペプチド解析用に改良した P-C カラムクロマト法は以下の如くである。平衡化

した P-セルロースを 0.8×43 cm のガラスカラムに 40 cm の高さに充填し、9.0 ml/hr の流速で 3 時間以上緩衝液 I を流し十分に平衡化する。トリプシン消化物 15 mg を 0.5 ml の蒸留水に溶解し、希ギ酸を添加して溶液の pH を 2.4 ~ 2.6 に調整し遠心 (3,000 rpm, 5 min) し、上澄液をカラムに重層する。カラムよりゆっくり液を流出させてカラム上端に試料を吸着させる。次いで緩衝液 I を約 1.0 ml カラム上部に満し、カラムと展開液溜めとを連結する。クロマト展開は緩衝液 I の 275 ml と緩衝液 II の 275 ml を用いてアンモニア濃度が 0.02 M \rightarrow 0.2 M の直線勾配となる装置を使用し同じ流速でおこなう。総展開液量が約 350 ml になったら緩衝液 III に切り換えカラム残留ペプチドを溶出する。溶出液は 2.5 ml ずつ分画して収集する。各ペプチド峰に該当する分画は 1 つの容器に集め減圧濃縮する。次いで 0.2 N-酢酸で平衡化した Sephadex G-15 カラム (0.4×12 cm) に重層し、0.2 N-酢酸をカラムから自然溶出させ最初の 10 ml を集め採ることにより酢酸アンモニウムを除去する。最初の 10 ml の酢酸溶液を乾固し、目的のペプチドを得る。ペ

プチドのアミノ酸分析が必要ならば濃縮した各ペプチド分画の 1/5 量を加水分解用試験管に移し入れ、窒素ガス中、110°C、20 時間加水分解を行なえば充分の感度をもってアミノ酸の分析をなし得る。

成 績

α^A およびアミノエチル化 β^A 鎖のトリプシン消化物の P-C カラムクロマト溶出パターンを Fig. 1 の a, b に示す。 α^A 鎖では α Tp-1, 2, 2, 3, 4 が重なり 1 ヶの峰となり分離出来なかったが、他のペプチド類はよい分離を示した。またアミノエチル化 β^A 鎖では β Tp-1 と 8.9 は重なり、 β Tp-4 と 9 および α Tp-14 と 15 に部分的重なりが見られたがそれ以外のペプチドはよく分離していた。

現在最も汎用されている Baglioni のフィンガープリント法¹⁾では異常ペプチドが周辺の正常ペプチドと重なり分離が困難な異常血色素である Hb Matsue-Oki (α Tp-9 異常; α 75 Asp \rightarrow Asn)⁶⁾, Hb Ube-2 (α Tp-9 異常; α 68 Asn \rightarrow Asp)⁷⁾ および Hb Takamatsu (β Tp-12 b と 13 が連なった新しいペプチド; β 120 Lys \rightarrow

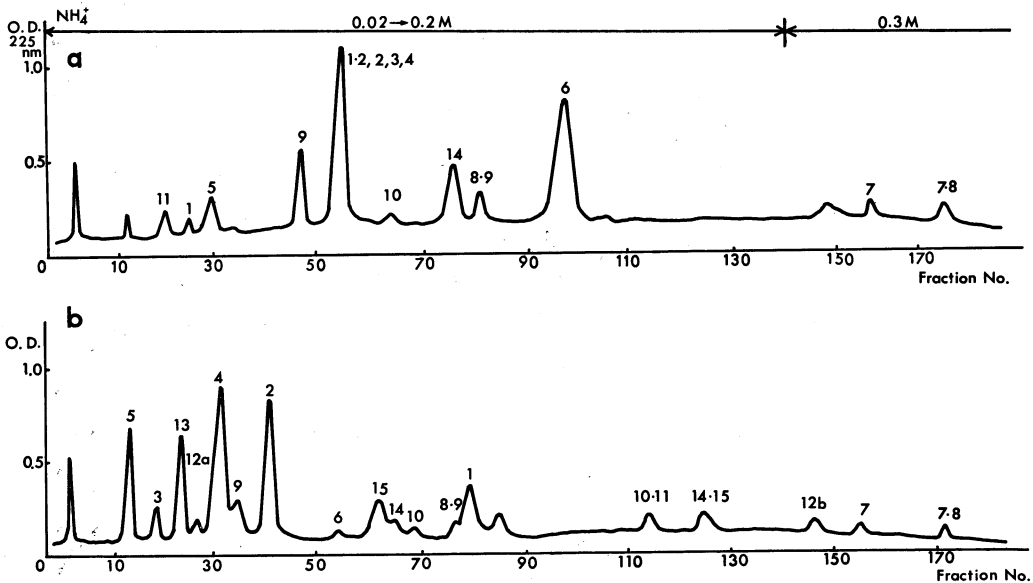


Fig. 1. Elution pattern of the tryptic hydrolysates of the α^A and the aminoethyl- β^A chain of normal adult hemoglobin. The number on each peak denotes for those of the tryptic peptides.

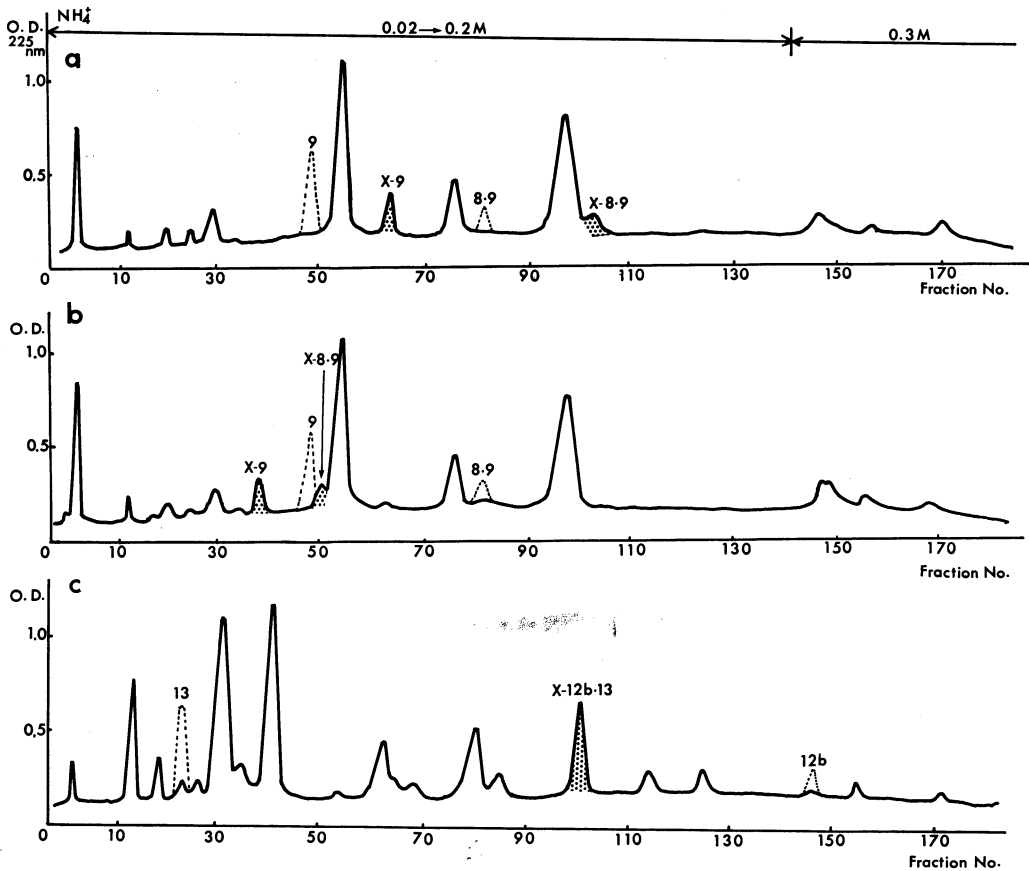


Fig. 2. Elution pattern of the tryptic hydrolysates of abnormal hemoglobins. The position of the abnormal peptides is shown by a shaded area and the position of the corresponding normal peptides is indicated by a broken line area.

a) Hb Matue-Oki, b) Hb Ube-2, c) Hb Takamatsu.

Gln)⁹の例を **Fig. 2** の **a, b** および **c** に示す。各 Hb の異常ペプチドがきれいに分離している有様が理解しえよう。即ち、Hb Matsue-Oki および Hb Ube-2 では破線で示した正常な α^A Tp-9 と α^A Tp-8.9 のピークがその位置より消失し、代りに前者の場合、 α^X Tp-9 と α^X Tp-8.9 のピークがそれぞれの正常な溶出位置の後方に、後者の場合、異常ペプチドが正常な α^A Tp-9 と α^A Tp-8.9 の溶出位置の前方にそれぞれ移動し、純粋なピークとして分離している。Hb Takamatsu の異常アミノエチル化 β 鎖のトリプシン消化物においては β^A Tp-12b と β^A Tp-13 の位置にピーク (破線で示した) がなく、代りに両者の結合した異常 β Tp-12b-

13の単一ピークが両者の中間に出現している。

考 察

α および β 鎖のトリプシン消化物の一般的カラムクロマト法として従来から使用されてきた Dowex 系イオン交換樹脂法³⁾に比し、クロマト条件の規制が緩和と考えられる P-C カラムクロマト法を Hb の解析に適用してみた。本法は C. C. Q. Chin ら⁹⁾により oxidized ribonuclease A のトリプシン消化物の分離に使用されていたものである。実際、本法は Dowex 法の場合³⁾と異なり厳密な条件規制 (カラム温度) が不要でペプチドの tailing もなく非常に簡単に実施しうる。原著者はペプチド展

開にリン酸緩衝液 (KCl 直線勾配) による P-C カラムクロマト法を行なっているが、我々はより揮発性の高い酢酸アンモニウム緩衝液を展開液に用い以後の塩類からのペプチドの精製をより容易にした。本法によるペプチド溶出は少数のペプチドを除き全ペプチドが良い分離を示している。しかも少数の分離困難なペプチドは Baglioni 法により極めてよく分離されているペプチドである。従って本法の分離の特徴はフィンガープリント法で相互分離が困難な依然巨大分子量である中性ペプチド類 (α Tp-9 とその周辺の α Tp-1, α Tp-4 および β Tp-13 とその周辺の β Tp-1, β Tp-11 等) が効率よく分離される点であり、Baglioni 法の相補的方法であると云えよう。溶出ペプチドの検出は各ペプチドのペプチド結合の光吸収にもとづく波長 225 nm の吸光度測定により行なったが、この方法はニンヒドリン発色法に比べ、ペプチドの損失汚染が

ない利点がある。しかしその半面、ペプチド結合の数の少ないジマー、およびトリペプチドは概してその吸収ピークが小さく検出しにくい。故に α Tp-8, β Tp-8 の如く Lys のみの成分ではペプチド結合がないので溶出が最も遅いうえに検出されない。また α Tp-7, 7.8, 10, 15 および β Tp-6, 7, 7.8, 15 の各ペプチド類も検出感度がやや鈍い例であるが、検出に特に支障はなかった。溶出ペプチドの脱塩のための Sephadex G-15 ゲル濾過によるペプチド損失は 10% 以下であった。また試料量 15 mg のかわりに 3 mg のトリプシン消化物について同じ装置でクロマトをおこなった場合でもアミノ酸分析機による解析は充分可能であった。以上の諸成績から本法は異常血色素の一次構造解析の一過程である異常ペプチドの分離と精製のための Baglioni のフィンガープリント法と併用すれば、その欠点を補う良法であり推奨に値すると思う。

文 献

- 1) 日高和夫, 井内岩夫, 吉田克子: 異常血色素の α および β のトリプシン消化法, ならびにフィンガープリント法による異常ペプチドの分離と同定について. 川崎医学会誌, 一般教養篇 2: 37—47, 1976
- 2) 大庭雄三, 松岡美代子, 宮地隆興: 異常血色素の同定法, II. トリプシンペプチドの Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィ. 蛋白質化学研究会年報 (山口大学医学部), 7: 79—84, 1978
- 3) Jones, R. T.: Structural studies of aminoethylated hemoglobins by automatic peptide chromatography. Cold Spring Harbor Symp. quant Biol. 29: 297—308, Tokyo Univ. Press, 1964
- 4) Jonxis, J. H. P. and Huisman, T. H. J.: A laboratory manual on abnormal hemoglobins. Oxford and Edinburgh, Blackwell. 1968
- 5) Ingram, V. M.: Abnormal human hemoglobins. 1. The comparison of normal human and sickle-cell hemoglobins by "Finger print". Biochim. biophys. Acta 28: 529—545, 1958
- 6) Ohba, Y., Miyaji, T., Matsuoka, M., Fukuba, Y. and Shibata, S.: Hemoglobin Matsue-Oki: α 75(EF4) Asp→Asn. Hemoglobin 1: 383—388, 1977
- 7) Miyaji, T., Iuchi, I., Yamamoto, K., Ohba, Y. and Shibata, S.: Amino acid substitution of Hb Ube-2 (α_2 68 Asp β_2): An example of successful application of partial hydrolysis of peptide with 5% acetic acid. Clin. chim. Acta 16: 347—352, 1967
- 8) Iuchi, I., Hidaka, K., Harano, T., Ueda, S., Shibata, S., Shimasaki, S., Mizushima, J., Kubo, N., Miyake, T. and Uchida, T.: Hemoglobin Takamatsu (β 120 (GH3) Lys→Gln): A new abnormal hemoglobin detected in three unrelated families in the Takamatsu area of Shikoku. Hemoglobin 4: 165—176, 1980
- 9) Chin, C. C. Q. and Wold, F.: A convenient method for preparative peptide separation. Anal. Biochem. 46: 585—593, 1972