

異常血色素に関する研究 IX：
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

川崎医科大学 生化学

日高和夫・井内岩夫・島崎俊一

(昭和59年9月8日受理)

Studies on the abnormal hemoglobin IX：
An Improved Method of High Performance Liquid
Chromatography for Separation and Identification of
Tryptic Peptides of Abnormal Hemoglobin

Kazuo HIDAKA, Iwao IUCHI and Shunichi SHIMASAKI

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Sept. 8, 1984)

概 要

異常血色素 (abn. Hb) 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高速液体クロマト法の検討を行なった。その結果、現在よく利用されている μ Bondapak C₁₈ (Waters 社, 3.9 × 300mm) のかわりに国産の Cosmosil 5C₁₈P (半井化学, 理論段数11,200, 4.6 × 250mm) を、また展開液として揮発性の0.01M triethylamine acetate (TEA-A, pH=6.0)を用いることによりペプチドの分離法として推奨しうる方法を確立した。即ち、TEA-A で充分平衡化した Cosmosil 5C₁₈P カラムにトリプシン消化物50 μ g を重層し吸着させ、最初の10分間 TEA-A で、次いで TEA-A に対し、40% acetonitrile/TEA-A 溶液を直線勾配的に0%から100%まで70分間変化させ1.0ml/min の流速で展開した。その結果、ペプチドは鋭いピークとしてそれぞれの成分に分離し得た。 α^A 鎖のペプチドの溶出順序は (α T-7, 7・8), 2, 10, 14, 1, 3, 1・2, 11, 4, 10, 11, 6, 5, 9であり、またアミノエチル化 β^A 鎖のそれは (β T-6, 7, 7・8), 15, 1, 3, 12b, 11, 14, 13, 10, 14・15, 12a, 2, 9, 5, 4であった。TEA-A は凍結乾燥だけで溶出ペプチドから完全に除く事から出来た。

最近当教室で検出した8種類の abn. Hb, Hb Albany-Suma (α^X T-2・3), Hb Ube-2 (α^X T-9), Hb J-Habana (α^X T-9), Hb Handa (α^X T-9・10), Hb Ankara (β^X T-2), Hb Coughatta (β^X T-3), Hb Takamatsu (β^X T-12b・13), Hb Syracuse (β^X T-14) にこの方法を用い、それぞれの異常ペプチドの分離同定が極めて容易になし得た。従って、本法は微量試料量で迅速にペプチドの分離精製が可能な推奨しうる方法である。

Abstract

A new improved recommendable method of high performance liquid chromatography (HPLC) for the separation and identification of an aberrant peptide in the tryptic digest of abnormal hemoglobin (Hb) was established.

As for HPLC mechanism, a Cosmosil 5C₁₈P column (Nakarai Co., 4.6 × 250mm, theoretical plate number of 11,200) instead of usual μ Bondapak C₁₈ (Waters Co.) was used and a volatile 0.01 M triethylamine acetate (TEA-A, pH=6.0) was selected as a preferable developer.

The procedure was as follows; amounts of 50 μ g of tryptic digest of either α or β chain was applied onto the column which was previously equilibrated with TEA-A and the development was followed as 1) 10 min running with the same buffer, 2) then a linear gradient running from zero to 100% in combination with TEA-A and 40% acetonitrile/TEA-A solution for 70 min with a flow rate of 1.0 ml/min.

The chromatogram revealed a sharply separated pattern demonstrating the elution order of peptide No. (7, 7 \cdot 8), 2, 10, 14, 1, 3, 1 \cdot 2, 11, 4, 10 \cdot 11, 6, 5, and 9 in α chain and (6, 7, 7 \cdot 8), 15, 1, 3, 12b, 11, 14, 13, 10, 14 \cdot 15, 12a, 2, 9, 5 and 4 in β chain.

The detection and isolation of an aberrant peptide of all Hb variants which were recently discovered in our laboratory was successfully performed by this method. They included Hb Albany-Suma (α T-2 \cdot 3), Hb Ube-2 (α T-9), Hb J-Habana (α T-9), Hb Handa (α T-9 \cdot 10), Hb Ankara (β T-2), Hb G-Coushatta (β T-3), Hb Takamatsu (β T-12b \cdot 13) and Hb Syracuse (β T-14).

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である。

私共はこれまで異常ペプチドの分離手段として、汙紙、セルロース及びシリカゲル薄層プレートによるフィンガープリント法^{1,2)}、ゲル汙過法³⁾および陽イオン交換樹脂(ホスホセルロース)による簡易クロマト法⁴⁾等を用いているが、いずれの方法でも異常ペプチドの同定には少なくとも3日以上かかり、これにペプチドからの脱塩操作が加われば、さらに日数が延長される。こうした煩雑さを克服するため、異常ペプチドの分離精製法として Octadecyl silica (ODS) カラムによる高速液体クロマト法 (HPLC) を追試し、改良法を確立したので、ここに私共の方法と成績を報告する。

試料と方法

A) トリプシン消化ペプチド：常法⁵⁾に従って調整した正常血色素 (HbA) の α^A 鎖およびアミノエチル化処理した β^A (AE- β^A) 鎖をそれぞれトリプシン消化し、pH6.4での可溶性分画を使用した。

B) ODSカラム：半井化学の Cosmosil 5 C₁₈P (4.6×250mm, 理論段数, 11,200) を用いた。

C) 分析装置：Waters 社製の HPLC system を用いた。

D) クロマト展開液：0.01M triethylamine acetate (pH=6.0), TEA-A：0.01M acetic acid を triethylamine で pH6.0に調整し, 0.30m μ のフィルターで濾過した。

40% acetonitrile/TEA-A (pH=6.0)：0.01M acetic acid 60ml と acetonitrile 40ml を混合後, triethylamine で pH6.0に調整した。

E) 操作：2 mgのトリプシン消化物を200 μ lのTEA-Aに溶解し0.45m μ の水系フィルターで濾過後50 μ gの試料をカラムに注入した。カラムはあらかじめ1.0ml/minの流速, 室温でTEA-Aにより充分平衡化しておき, 試料の注入後10分間同一展開液で, その後TEA-Aに対し, 40% acetonitrile/TEA-Aを0%から100%まで70分間直線的に変化させペプチドの分離溶出を行なった。ペプチドの検出は波長214nmでの吸光度測定により行なった。ペプチドの採取が目的の場合, 溶出液は0.5mlずつ分画し, ペプチドを含む溶出液をそれぞれ集め凍結乾燥を行なった。

成 績

正常な α 鎖のトリプシン消化ペプチドの可溶性分画のクロマトグラムをFig. 1に示した。

小ペプチド α T-7と α T-7.8はいっしょに溶出し, また α T-2と α T-10は部分的に重なったが, その他のペプチドは全て単一ピークとして現われた。

また4例の α 鎖異常のabn.Hbの α 鎖のトリプシン消化物から得られた異常ペプチドの溶出位置を矢印でFig. 1に示した。即ち, Hb Albany-Suma (α 11 Lys \rightarrow Asn)⁶⁾の α^x T-2.3と α^x T-1.2.3の両ペプチドはそれぞれa位置に現われた。Hb Ube-2 (α 68 Asn₁ \rightarrow Asp)⁷⁾

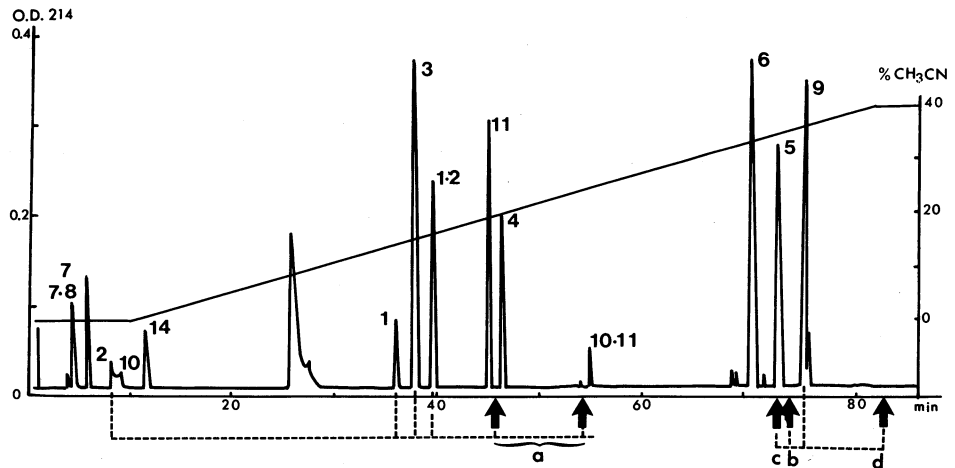


Fig. 1 Separation of the tryptic digest of the α^A chain of normal adult hemoglobin. The number of each peaks reveals for those of the tryptic peptides. The positions of the aberrant peptides of abnormal hemoglobins are shown by the arrows.
a. Hb Albany-Suma, b. Hb Ube-2, c. Hb J-Habana d. Hb Handa

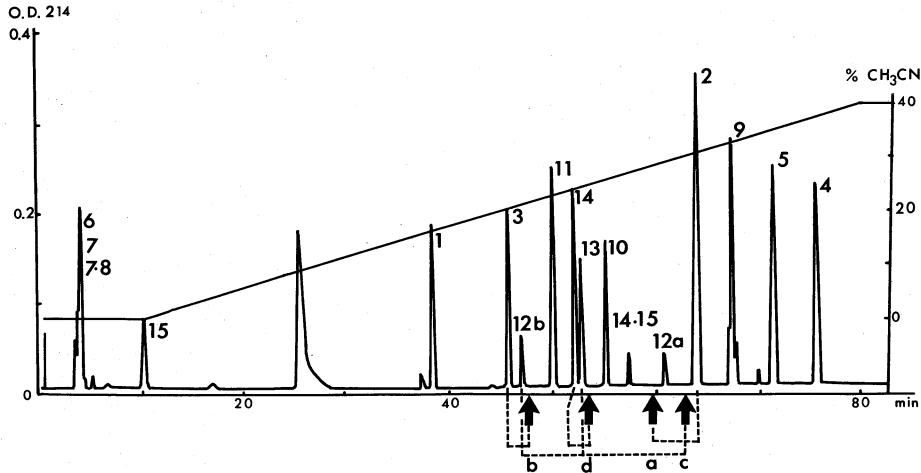


Fig. 2 Separation of the tryptic hydrolysate of the aminoethylated β^A chain of normal adult hemoglobin.

The number on each peaks denotes for those of the tryptic peptides. The positions of the aberrant peptides of abnormal hemoglobins are indicated by the arrows.

a. Hb Ankara, b. Hb Coughatta, c. Hb Takamatsu, d. Hb Syracuse

および Hb J-Habama ($\alpha 71 \text{ Ala} \rightarrow \text{Glu}$)⁸⁾ はともに $\alpha^{\times}T-9$ であり、それぞれ b と c 位置に、また Hb Handa ($\alpha 90 \text{ Lys} \rightarrow \text{Met}$)⁹⁾ の $\alpha^{\times}T-9 \cdot 10$ は d 位置に出現した。正常な AE- β 鎖のトリプシン消化物のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。小ペプチド $\beta T-6$ 、 $\beta T-7$ および $\beta T-7 \cdot 8$ は分離しなかったが、他の 14 個のペプチドは全て単一ピークとして溶出した。また 4 例の β 鎖異常の abn. Hb の β 鎖のトリプシン消化物からの異常ペプチドの出現位置を同じ Fig. 2 に示した。即ち、Hb Ankara ($\beta 10 \text{ Ala} \rightarrow \text{Asp}$)¹⁰⁾ の $\beta^{\times}T-2$ は a 位置に、Hb Coughatta ($\beta 22 \text{ Glu} \rightarrow \text{Ala}$)¹¹⁾ の $\beta^{\times}T-3$ は b 位置に、Hb Takamatsu ($\beta 120 \text{ Lys} \rightarrow \text{Gln}$)¹²⁾ の $\beta^{\times}T-12b \cdot 13$ は c 位置に、Hb Syracuse ($\beta 143 \text{ His} \rightarrow \text{Pro}$)¹³⁾ の $\beta^{\times}T-14$ は d 位置にそれぞれ出現した。

考 察

ODS 系カラムはアルキル基 ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}$) を化学的に結合させたシリカゲルを固定相にしたもので、ペプチド分離のメカニズムはペプチドと固定相との疎水性相互作用に依存している。即ち、アミノ酸の疎水性が強いほど固定相との結合が強く溶出が遅れるので、極性アミノ酸の多いペプチドは速く、逆に非極性アミノ酸の多いペプチドは遅く溶出される。この特性は abn. Hb に矛盾なく適用できた。即ち、非極性アミノ酸が極性アミノ酸に置換した Hb Ube-2、Hb J-Habana および Hb Ankara の各異常ペプチドは相当する正常なペプチドより速く溶出し、逆に極性アミノ酸が非極性アミノ酸に置換した Hb Albany-Suma、Hb Handa、Hb Coughatta、Hb Takamatsu および Hb Syracuse では各異常ペプチドはいずれも相当する正常なペプチド

より遅く溶出した。また ODS 系カラムのもう一つの特性としてペプチドの分子量の大小が溶出順序に影響している。即ち、小ペプチドほど速く溶出する。この特性が作用し Hb Albany-Sama, Hb Handa および Hb Takamatsu の各異常ペプチドはアミノ酸置換による疎水性の増加にさらに分子量の増加が加わり大巾に溶出が遅れたと思われる。

T.H.J.Huisman¹⁴⁾ や W.A.Schreoder ら¹⁵⁾ は abn.Hb のトリプシン消化物の HPLC カラムとして μ Bondapak C₁₈ (3.9×300mm), Altex Ultrasphere ODS (4.6×250mm) および Dupont Zorbax ODS (4.6×250mm) を用いているが私共はこれらのカラムより安価な国産の Cosmosil 5 C₁₈P (4.6×250mm) を用いたが Fig. 1 および Fig. 2 の様にペプチドは鋭いピークとなり、またペプチド同士の分離も良く、ペプチド分離用カラムとして使用可能であった。また彼らは HPLC 用展開液として酢酸アンモニウム緩衝液とリン酸カリウム緩衝液を使用しているが、両緩衝液の塩類は溶出したペプチドから凍結乾燥だけでは、十分に除去できない。従ってペプチドから完全に塩類を除くにはペプチドの部分消失を伴うゲル濾過等の脱塩操作が必要である。そこで私共は揮発性の高い TEA-A を展開液として用いた。TEA-A は凍結乾燥だけでペプチドから完全に除く事が可能であり微量のペプチドに対し特に有効な緩衝液である事がわかった。 Fig. 1 のごとく Hb J-Habana の α^{\times} T-9 は α T-5 と重なり単一ピークとして得られなかったが、TEA-A の代わりに 0.01 M triethylamine formate (pH=4.5) を用いる事により α^{\times} T-9 は α T-5 と完全に分離し単一ピークとして得る事が出来た。HPLC によって得られた 8 例の異常ペプチドはいずれも凍結乾燥だけでそのまま二次酵素水解またはシーケンサー試料として用いられ充分満足すべき成績が得られた。

小ペプチド α T-7, 7・8 および β T-6, 7, 7・8 は分離できなかったため、HPLC 法を満足できる異常ペプチドの同定法として利用するには、さらに分離条件の検討が必要であるが、以上の諸成績から本法は abn.Hb の一次構造解析の一過程である重要な異常ペプチドの分離精製法として推奨しうるものである。

References

- 1) 日高和夫, 井内岩夫, 吉田克子: 異常血色素の α および β 鎖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) 日高和夫, 井内岩夫, 島崎俊一, 青葉宏子: 異常血色素に関する研究 VI: シリカゲル薄層ガラスプレートを用いたフィンガープリント法について。川崎医学会誌, 一般教養篇, 6: 29-36, 1982
- 3) 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ー。蛋白生化学研究会年報 (山口大学医学部), 7: 79-84, 1978
- 4) 日高和夫, 井内岩夫, 島崎俊一: 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。川崎医学会誌, 7(1): 1-5, 1981
- 5) Jonxis, J.H.P. and Huisman, T.H.J.: A laboratory manual on abnormal hemoglobins. Oxford and Edinburgh, Blackwell, 1968
- 6) Webber, B.B., Lam, H., Wilson, J.B. and Huisman, T.H.J.: Hb Albany-GA or $\alpha_211(A9)$ Lys \rightarrow

- Asn β_2 . Hemoglobin 7(3) : 257-262, 1983
- 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) Colombo, B., Vidal, H., Kamuzora, H. and Lehmann, H. : A new hemoglobin J-Habana- α 71(E 20) alanine \rightarrow glutamic acid. Biochem. Biophys. Acta 351 : 1-6, 1974
 - 9) Harano, T., Harno, K., Shibata, S., Ueda, S., Imai, K. and Seki, M. : Hb Handa (α 90(FG2) Lys \rightarrow Met) : structure and biosynthesis of a new slightly high oxygen affinity variant. Hemoglobin, 6(4) : 379-389, 1982
 - 10) Arcasoy, A., Casey, R., Lehmann, H., Cavdar, A.O. and Berki, A. : A new haemoglobin J from Turkey-Hb Ankara(β 10(A7) Ala \rightarrow Asp). FEBS Letters 42 : 121-123, 1974
 - 11) Bowman, B. H., Barnett, D. R. and Hite, R. : Hemoglobin G Coughatta : a bete variant with a delta-like substitution. Biochem. Biophys. Res. Commun. 26 : 466-470, 1976
 - 12) 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 \rightarrow Gln) : A new abnormal hemoglobin detected in three unrelated families in the Takamatsu area of Shikoku. Hemoglobin 4 : 165-176, 1980
 - 13) Iuchi, I., Hidaka, K., Shimasaki, S. and Mizuta, W. : The survey of abnormal hemoglobin in the Kobe district : 1. Hb Ube-2(α 68 Asn \rightarrow Asp) and Hb Syracuse(β 143 His \rightarrow Pro) with high oxygen affinity. Kawasaki Med. J. 10(1) : 21-25, 1984
 - 14) Wilson, J. B., Lam, H., Pravatmuang, P. and Huisman, T. H. J. : Separation of tryptic peptides of normal and abnormal α , β , γ and δ hemoglobin chains by high-performance liquid chromatography. J.Chromatography 179 : 271-290, 1979
 - 15) Schroeder, W. A., Shelton, J. B. and Shelton, J.R. : Separation of peptides by high-pressure liquid chromatography for the identification of a hemoglobin variant. J. Chromatography 174 : 385-392, 1979