

$\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I、II およびウシ血清アルブミンの  
一次構造に関する研究  
—FABMS、タンデムMS、LC/MS による構造研究—

1991 年

明石知子

## 目次

|  |    |
|--|----|
| 略語表および用語の説明                                    | 1  |
| 序論   | 8  |
| 第1章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I の一次構造決定       |    |
| 序  | 21 |
| 第1節 Paim I および RCM-Paim I の分子量の決定              | 27 |
| 第2節 酵素消化で得られるペプチドの FABMS                       | 28 |
| 第3節 エドマン法による RCM-Paim I のアミノ酸配列の決定             | 31 |
| 第4節 Paim I の一次構造決定                             | 38 |
| 第5節 考察   | 40 |
| 第2章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I の S-S 結合位置の決定 |    |
| 序  | 45 |
| 第1節 Paim I を酵素消化して得られるペプチドの FABMS              | 47 |
| 第2節 HPLC によるペプチドの単離とその FABMS                   | 49 |
| 第3節 2つの S-S 結合の位置の確認                           | 53 |
| 第4節 考察   | 55 |

### 第3章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim II の一次構造決定

|   |    |
|---|----|
| 序   | 61 |
| 第1節 RCM-Paim II の FABMS   | 62 |
| 第2節 RCM-Paim II の <i>Staphylococcus aureus</i> V8 protease による<br>消化と FABMS | 65 |
| 第3節 RCM-Paim II の N末端部分のペプチドのアミノ酸配列   | 66 |
| 第4節 RCM-Paim II の全一次構造  | 68 |
| 第5節 考察  | 70 |

### 第4章 ウシ血清アルブミンの一次構造の訂正

|   |    |
|---|----|
| 序   | 72 |
| 第1節 BSA の ESIMS   | 75 |
| 第2節 トリプシン消化で得られるペプチドの FRIT-FAB LC/MS  | 76 |
| 第3節 タンデム MS および気相法エドマン分解法による該当す<br>るペプチドの決定   | 80 |
| 第4節 リジルエンドペプチダーゼおよび <i>Staphylococcus</i><br><i>aureus</i> V8 protease で消化して得られるペプチドの<br>FRIT-FAB LC/MS | 84 |
| 第5節 考察  | 87 |

|         |     |
|---------|-----|
| 第5章 総括  | 91  |
| 実験      | 96  |
| 論文リスト   | 113 |
| 参考論文リスト | 115 |
| 参考文献    | 117 |
| 謝辞      | 122 |

## 略語表および用語の説明

Paim : pig pancreatic  $\alpha$  - amylase inhibitor from microbes

RCM-Paim I : Reduced and Carboxymethylated Paim I ; 還元カルボキシメチル化した Paim I

RCM-Paim II : Reduced and Carboxymethylated Paim II ; 還元カルボキシメチル化した Paim II

BSA : Bovine Serum Albumin ; ウシ血清アルブミン

HSA : Human Serum Albumin ; ヒト血清アルブミン

RSA : Rat Serum Albumin ; ラット血清アルブミン

EIMS : Electron Impact Mass Spectrometry ; 電子衝撃イオン化質量分析法  
加速された電子を試料分子にあてることにより生じるイオンを質量分析する方法

CIMS : Chemical Ionization Mass Spectrometry ; 化学イオン化質量分析法  
試料分子を反応イオン（通常は反応ガス）との反応によりイオン化し、得られるイオンを質量分析する方法

FDMS : Field Desorption Mass Spectrometry ; フィールドディソープション質量分析法

エミッター（炭素やシリコンのひげを多数生成させたタングステン線）に塗った試料から、高電界によって生じるイオンを質量分析する方法

SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry ; 二次イオン質量分析法

イオンビームを試料に照射したときに放出される二次イオンを質量分析する方法

FABMS : Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry ; 高速原子衝撃質量分析法

高速 (数 KeV) の原子を金属板上に塗った試料に衝突させて生じるイオンを質量分析する方法

PDMS : Plasma Desorption Mass Sepctrometry ; プラズマ脱離イオン化質量分析法

$^{252}\text{Cf}$  核分裂断片である  $^{106}\text{Tc}$  放射高速粒子 (100 MeV) のような高エネルギー粒子を一次ビームとして、ニッケルホイル上に塗布した有機試料を衝撃してイオン化し、生じるイオンを質量分析する方法

LDMS : Laser Desorption Mass Spectrometry ; レーザー脱離イオン化質量分析法

レーザーパルスで試料を照射することにより生じるイオンを質量分析する方法

ESIMS : Electrospray Ionization Mass Spectrometry ; エレクトロスプレーイオン化質量分析法

液体試料を数 kV の電場をかけたキャピラリーから噴出させることにより、電荷をもった微粒子状の霧を大気圧下に生成させ、生じたイオンを質量分析する方法

GC/MS : Gas Chromatography / Mass Spectrometry ; ガスクロマトグラフ質量

## 分析法

ガスクロマトグラフと質量分析計とを結合した装置を用いて分析する方法

LC/MS : Liquid Chromatography / Mass Spectrometry ; 液体クロマトグラフ質量分析法

高速液体クロマトグラフと質量分析計とを結合した装置を用いて分析する方法

TSP : Thermospray ; サーマスプレーイオン化導入法

液体試料を加熱した金属ノズルから減圧下に噴出させ、生じるイオンを質量分析する方法

$[M+H]^+$  : protonated molecular ion ; プロトン化分子

分子にプロトンが付加したイオン

MW : Molecular Weight ; 分子量

monoisotopic molecular weight ;  $^{12}\text{C}=12.000000$ ,  $\text{H}=1.007825$ ,

$^{14}\text{N}=14.003070$ ,  $^{16}\text{O}=15.994920$ ,  $^{32}\text{S}=31.972070$  で組成式を計算して得ら

れる質量数で、天然で存在比率の高い同位体の質量数で計算した値

average molecular weight または chemical molecular weight ;  $\text{C}=12.011113$ ,

$\text{H}=1.007976$ ,  $\text{N}=14.006706$ ,  $\text{O}=15.999369$ ,  $\text{S}=32.067888$  で組成式を計算

して得られる質量数で、天然に存在する安定同位体の存在比を考慮し

て求めた質量数

nominal mass ;  $\text{C}=12$ 、 $\text{H}=1$ 、 $\text{N}=14$ 、 $\text{O}=16$ 、 $\text{S}=32$  で組成式から算出され

る整数質量数

exact mass ; 精密質量数

\* 質量数の取り扱いについて

低質量の化合物の分子量決定では nominal mass で分子量を論じて問題にならなかったが、高分子量の化合物の分子量を決定する際には、nominal mass でなく、exact mass で求める必要がある。それは、高分子量では nominal mass と exact mass が一致しないことによる。また、average mass と monoisotopic molecular weight が一致しないことにも注意する必要がある。

天然には各元素に安定同位体が存在し、炭素には  $^{12}\text{C}$  の他に  $^{13}\text{C}$  が約 1% 含まれており、水素には  $^2\text{H}$  が、窒素には  $^{15}\text{N}$ 、酸素には  $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、イオウには  $^{33}\text{S}$ 、 $^{34}\text{S}$ 、 $^{36}\text{S}$  が安定同位体として存在する。分子量が 1000 程度の化合物のマススペクトルであれば、同位体の存在を考慮せずに分子量を決定できるが、高質量の化合物のマススペクトルにはこれら同位体由来するピークが顕著に検出され、そのために、分子量の決定が難しくなる。このことを Bovine Insulin ( $\text{C}_{254}\text{H}_{377}\text{O}_{75}\text{N}_{65}\text{S}_6$ ) の FAB マススペクトル (図 1) で説明する。

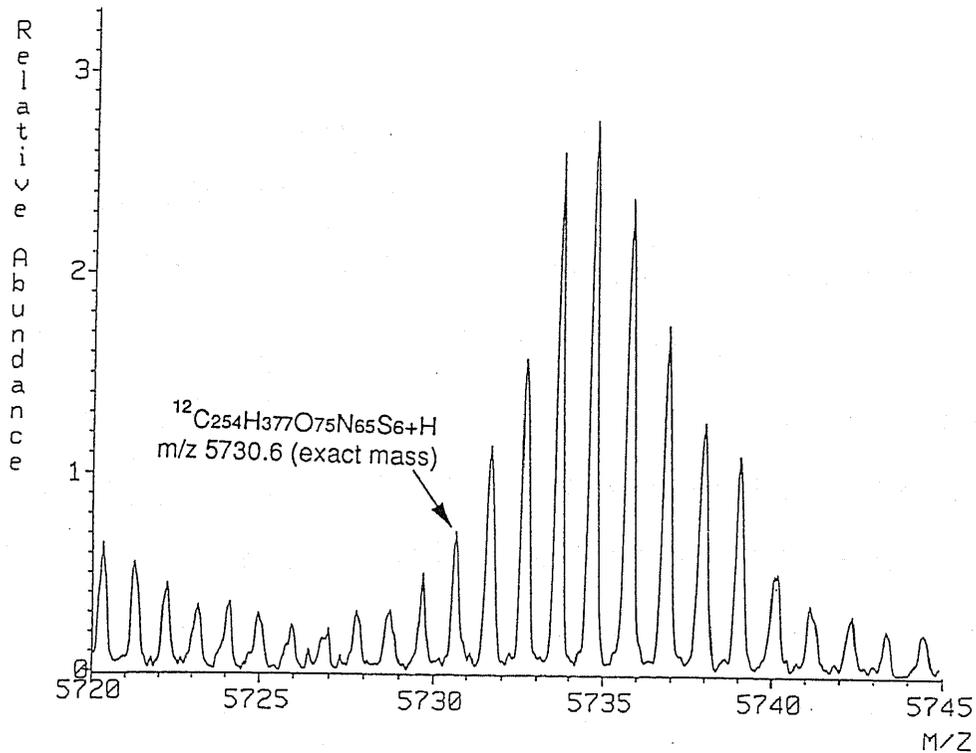


図1 Bovine Insulin の  $[\text{M}+\text{H}]^+$  付近の FAB マススペクトル

図1に示したように、monoisotopic molecular weightを示しているのは左下のピークで、その exact mass は 5730.6 で、nominal mass は 5728 である。しかし、最も強度の強いピークは主に  $^{12}\text{C}_{250}\text{C}_4\text{H}_{377}\text{O}_{75}\text{N}_{65}\text{S}_6 + \text{H}$  によるもので、その exact mass は 5734.6 で、nominal mass は 5732 である。分子量 1000 程度の化合物の場合には、monoisotopic molecular weight を示すピークと一番強度が強いピークは一致し、また exact mass の整数部分と nominal mass も一致するが、高質量の化合物の場合には、インシュリンで示したよう

に大きくずれてくるため、記述したり議論する場合にはどの質量数を扱っているのか区別が必要である。

図1の Bovine Insulin の場合、 $[M+H]^+$  の average mass は 5734.6 で、同位体由来するピークを含めた  $[M+H]^+$  を示す部分の面積のほぼ中心となり、monoisotopic molecular weight を示すピークより 4 マスユニット大きい。分子量が 1000 程度の化合物は monoisotopic molecular weight を示すピークの質量数と  $[M+H]^+$  の average mass はほぼ一致し、分子量 1500 程度であれば monoisotopic molecular weight を示すピークよりも 1 マスユニット大きいピークが、分子量 3000 程度であれば 2 マスユニット大きいピークが、分子量 7500 程度であれば 5 マスユニット大きいピークが  $[M+H]^+$  の average mass となる。

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography ; 高速液体クロマトグラフィー

$^1\text{H-NMR}$  : Proton Nuclear Magnetic Resonance ; プロトン核磁気共鳴

TFA : Trifluoroacetic Acid ; トリフルオロ酢酸

R. T. : Retention Time ; 保持時間

CmC または CmCys : Carboxymethyl Cystein ; カルボキシメチルシステイン

アミノ酸の略号

| アミノ酸          | 組成式                  | 3文字表記 | 1文字表記 |
|---------------|----------------------|-------|-------|
| Alanine       | $C_3H_7NO_2$         | Ala   | A     |
| Arginine      | $C_6H_{14}N_4O_2$    | Arg   | R     |
| Asparagine    | $C_4H_8N_2O_3$       | Asn   | N     |
| Aspartic acid | $C_4H_7NO_4$         | Asp   | D     |
| Cystein       | $C_3H_7NO_2S$        | Cys   | C     |
| Glutamic acid | $C_5H_9NO_4$         | Glu   | E     |
| Glutamine     | $C_5H_{10}N_2O_3$    | Gln   | Q     |
| Glycine       | $C_2H_5NO_2$         | Gly   | G     |
| Histidine     | $C_6H_9N_3O_2$       | His   | H     |
| Isoleucine    | $C_6H_{13}NO_2$      | Ile   | I     |
| Leucine       | $C_6H_{13}NO_2$      | Leu   | L     |
| Lysine        | $C_6H_{14}N_2O_2$    | Lys   | K     |
| Methionine    | $C_5H_{11}NO_2S$     | Met   | M     |
| Phenylalanine | $C_9H_{11}NO_2$      | Phe   | F     |
| Proline       | $C_5H_9NO_2$         | Pro   | P     |
| Serine        | $C_3H_7NO_3$         | Ser   | S     |
| Threonine     | $C_4H_9NO_3$         | Thr   | T     |
| Tryptophan    | $C_{11}H_{12}N_2O_2$ | Trp   | W     |
| Tyrosine      | $C_9H_{11}NO_3$      | Tyr   | Y     |
| Valine        | $C_5H_{11}NO_2$      | Val   | V     |

## 序論

### (1) タンパク質の構造研究の意義

生体内の反応に大きく関与する種々の酵素や、異物を認識し自己を防衛する免疫系の抗体、情報伝達物質の受容体など、生命の維持に重要な役割を果たすものの多くはタンパク質であり、タンパク質の総重量は細胞乾燥重量の約 50% を占める。また、医薬品としてのタンパク質に対する期待も大きい。例えば糖尿病に対して古くから治療薬として用いられているインシュリンはその典型である。近年では、免疫調節作用を有するタンパク質は免疫療法剤・抗ガン剤として大きな期待がかけられており、数々の製薬メーカーでの開発が盛んになっている。これらのタンパク質の機能を解明する上で、その構造を明らかにすることは重要であり、現在までに種々のタンパク質の構造に関して多くの研究がなされている。

DNA の塩基配列決定法<sup>1),2)</sup> が確立されて以来、分子量が数万の大きなタンパク質でも、その一次構造情報をもつ遺伝子または mRNA から容易に一次構造を推定できるようになった。しかし、この方法で得られる一次構造はあくまでも推定構造であって、実際に機能しているタンパク質にみられる翻訳後の修飾残基の有無やその位置を決定することはできない。

また、近年、遺伝子工学・細胞工学などの技術の進歩により、遺伝子組換え法により生産されたタンパク質が医薬品として製造されるようになってきた。このようなタンパク質を人命にかかわる製品として供給する場合

には、品質面・有効性・安全性の面から可能な限りの多角的検討がなされ、有用であるとの評価が下される必要がある。従って、cDNA の塩基配列に基づいて作られる遺伝子工学由来のタンパク質を医薬品として開発する場合には、一般の新医薬品の評価のために求められる製造方法、物理化学的性質、規格および試験方法、安定性、毒性試験、薬理作用、体内動態、臨床試験などの他に、遺伝子組換え法という新技術により生産されたタンパク質であるという特殊性に基づく品質の保証が必要とされる。すなわち、最終産物として得られるタンパク質が目的のアミノ酸配列を有するか、正しい S-S 結合が形成されているか、活性な高次構造が得られたかなど構造の確認が必要である。さらに、生産される過程で生じる不純物のチェックおよびその同定も行なわなくてはならない。

タンパク質の一次構造研究に従来から用いられている分析方法は以下のようなものである。アミノ酸分析法<sup>3)</sup>によりタンパク質を加水分解して構成しているアミノ酸の組成を求められる。エドマン分解法<sup>4)</sup>によりタンパク質の N 末端から数十残基のアミノ酸配列を決定できる。エドマン分解法で決定できなかった部分については、タンパク質を化学的切断もしくは酵素消化によりペプチドに断片化後、クロマトグラフィーにより各ペプチドを分画・単離して、さらにエドマン分解法により構造解析を行なう。このような従来からの方法で構造研究を行なう場合の問題点として、結果がでるまでに多くの時間と手間がかかることがある。

著者はこのような方法に加えて質量分析法を有効に利用して迅速にタン

パク質の一次構造研究を行なうことを目的に、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I、II およびウシ血清アルブミンの一次構造について解析した。

## (2) タンパク質の構造解析手段としての質量分析法の進歩

1970年代までは、質量分析法で用いられていたイオン化法はEI (Electron Impact) 法<sup>5)</sup>、CI (Chemical Ionization) 法<sup>6)</sup>で、揮発性の化合物のみが測定の対象となっていた。そのため、タンパク質の研究に質量分析法を用いる場合には、酸や酵素などで部分加水分解してペプチドにし、その混合物を揮発性誘導体にした後、GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) で分析していた。この方法で得られるスペクトルには、GCで分離された各ピークに含まれているペプチド誘導体の構造を反映するようなフラグメントイオンが検出されるので、それを解析することによりもとのペプチドの構造を決定するものであった。この方法では、エドマン分解法に比べて多量の試料、誘導体化のための面倒な操作、そして得られたスペクトルからの複雑なデータ解析を必要とする。そのため、タンパク質についてはほとんど適用されず、主にN末端がブロックされていてエドマン分解法で分析できないペプチドの構造決定に用いられていた<sup>7)</sup>。

その後、FD (Field Desorption)<sup>8)</sup>が開発され、難揮発性の化合物の測定が可能となり、誘導体化をせずにペプチドの分子量を決定できるようになった。

さらにSIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry)<sup>9)</sup>やFABMS (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry)<sup>10), 11)</sup>が開発され、測定の対象となる化合物

がますます多くなり、測定可能な質量範囲も非常に広がった。近年では、PDMS (Plasma Desorption Mass Spectrometry)<sup>12)</sup>や LDMS (Laser Desorption Mass Spectrometry)<sup>13)</sup>、さらに ESIMS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry)<sup>14)</sup>の開発により分子量数万を越えるようなタンパク質の分子量でも測定が可能となってきた。以下、本研究で用いた質量分析法の原理や特徴について説明する。

いろいろなイオン化法の中でも、ペプチドをはじめあらゆる有機化合物の分子量決定や構造解析に広く用いられているのが FABMS である。FABMS は、数 KeV の Xe や Ar の高速中性原子 (Fast Atom) でステンレス製のターゲット上の液状試料を衝撃し (Bombardment)、生成するイオンを測定する方法である。試料を数 mg/ml 程度の濃度となるように溶媒に溶かし、グリセリンやニトロベンジルアルコールの様なマトリックスを加えて測定する。この方法は、熱をかけたり、電圧差を生じさせてイオン化する方法ではない "ソフトなイオン化" である。得られるスペクトル上には構造情報を与えるフラグメントイオンも化合物により検出されることがあるが、ほとんどの場合、主に分子量の情報を与える  $[M+H]^+$  (正イオン検出の場合) や  $[M-H]^-$  (負イオン検出の場合) が比較的強いイオン強度で検出される。そのため、得られるスペクトルから容易に化合物の分子量を決定できるという特徴がある。タンパク質を化学的な手法や酵素消化により切断しペプチドとした後、FABMS で分析すれば各ペプチドの分子量を求めることができる。したがって、cDNA の配列の解析からすでにその一次構造が予測

されているタンパク質のような場合には、推定された一次構造の正誤が各ペプチドの FABMS の結果から判断できる。

この FABMS に比べ、分子量が数万の大きな化合物の分子量、特にタンパク質の分子量測定を可能にした ESIMS の原理は以下のものである。液体試料を数 kV の電場をかけたキャピラリーから噴出させることにより、電荷をもった微粒子状の霧を大気圧下に生成させ、生じたイオンを後に続く質量分析計で分析する。この方法では、多価イオンの形で分子量を示すイオンが検出されるため、四重極質量分析計のように測定可能な質量範囲が狭い装置でも分子量が 10 万程度のタンパク質の分子量を決定することができるという特徴がある。この方法で得られる分子量の精度は、従来、用いられている超遠心法やゲル電気泳動法で得られる分子量に比べはるかによいので、ESIMS で得られる分子量からタンパク質の一次構造を確認できる。

一方、分離分析と質量分析を組み合わせた方法である 2 台の質量分析計を直結したタンデム MS (Tandem Mass Spectrometry)<sup>15)</sup> や、HPLC と質量分析計をオンラインでつないだ LC/MS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)<sup>16),17)</sup> といった分析手法も技術的な進歩により実用化され、これらの手法もタンパク質の一次構造解析にも用いられるようになってきた。

タンデム MS による混合物の分析の原理を Biemann が Science に発表した図 (図 2)<sup>18)</sup> を引用して説明する。

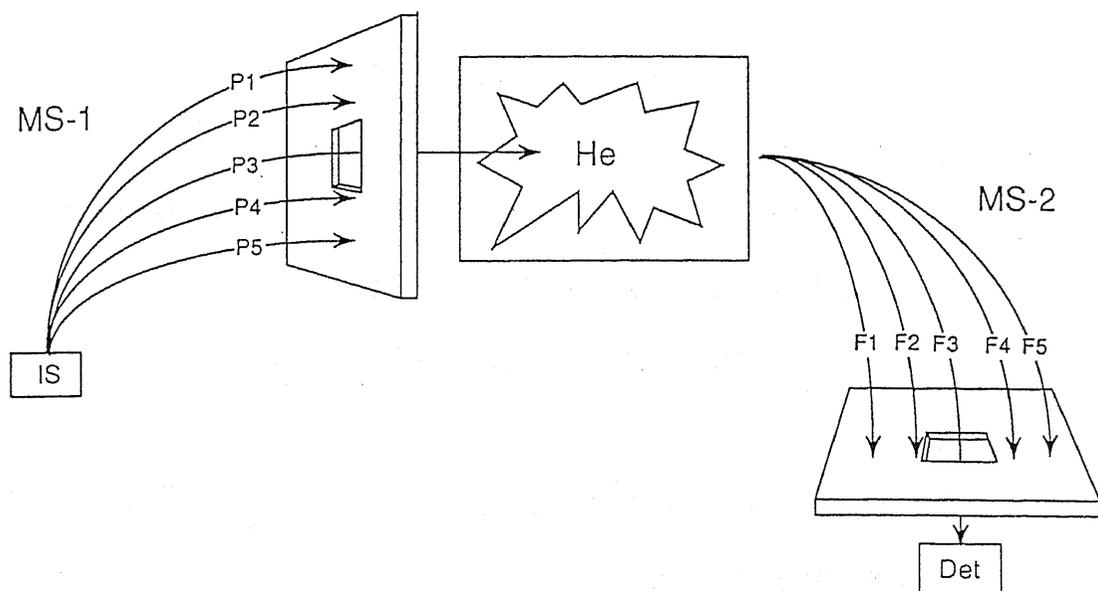


図2 タンデム MS の原理

混合物を FAB でイオン化して MS-1 (第 1 MS) で通常の測定を行ない、P1 から P5 の  $[M+H]^+$  が得られたとする。次に、詳しい構造情報を知りたい P3 のイオンのみが MS-1 を通過できるように、MS-1 の磁場強度を設定する。MS-1 を通過してきた P3 は He ガスが存在するコリジョンチャンバーに導かれ、He 分子との衝突によりドーターイオン F1 から F5 に開裂する。P3 に由来するドーターイオン F1 から F5 は、MS-2 の磁場強度 (B) と電場強度 (E) を  $B/E = \text{一定}$  でリンクドスキャンすることにより、MS-2 の検出器で検出される。そのため、混合物のままでも、MS-1 で検出されたイオンについては、コリジョンチャンバーで He ガスと衝突した後、MS-2 で得られるドーターイオンスペクトルを用いて構造解析を行なうことができ

る。ペプチドのドーターイオンスペクトルではアミノ酸配列に関する情報が得られる。タンデム MS をアミノ酸配列決定に用いる利点は以下のとおりである。

- ・ペプチド混合物を単離することなく、それらの一次構造を決定できる。
- ・エドマン分解法に比べ、短時間で分析できる。
- ・エドマン分解法が適用できない、N 末端が保護されたペプチドも分析できる。
- ・生体内でタンパク質が合成された後、リン酸化やアシル化などをうけている場合でも適用できる。
- ・化学合成されたタンパク質や、遺伝子工学またはタンパク質工学で作られたタンパク質の一次構造を迅速に確認できる。

タンデム MS によるペプチドの一次構造解析の概略を、Angiotensin I を例に説明をする。図 3 に Angiotensin I のドーターイオンスペクトル（タンデムマススペクトル）を示す。

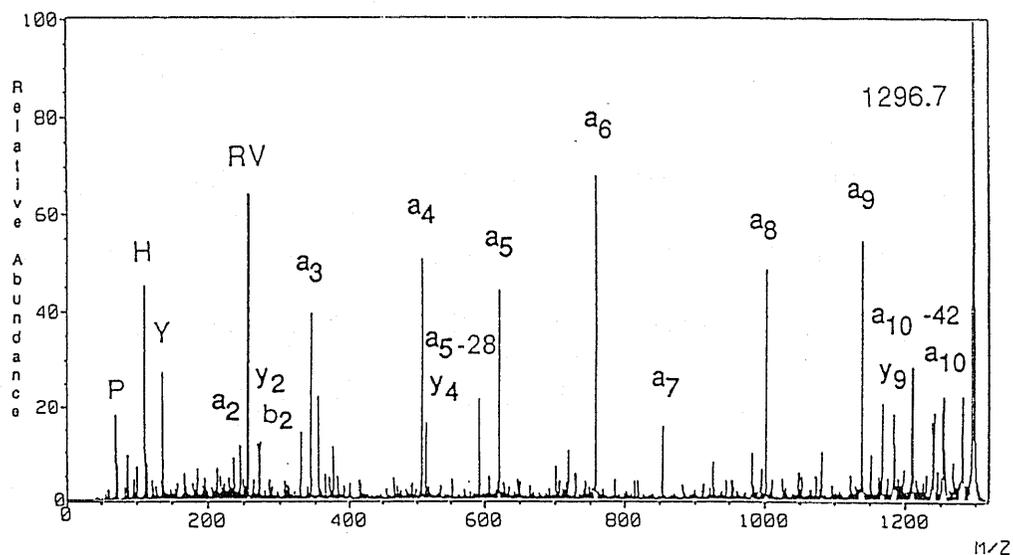
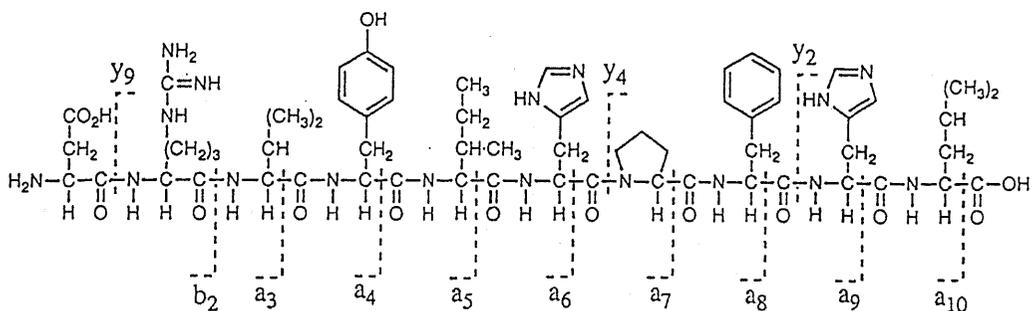


図3 Angiotensin I のドーターイオンスペクトル  
(タンデムマススペクトル)

Angiotensin I の一次構造は、主鎖の切断を示す  $a_2$ ,  $a_3$ ,  $a_4$ ,  $a_5$ ,  $a_6$ ,  $a_7$ ,  $a_8$ ,  $a_9$ ,  $y_9$  のドーターイオンで決めることができる。ペプチドの一次構造を決める際に、これらの主鎖の切断で生成するイオンが重要な役割を果たしている。ペプチドのドーターイオンの命名のしかたについては図4に示した Roepstorff らが提案した FABMS で得られるペプチドのフラグメントイオン

の命名法の A、B、C、X、Y、Z の表記<sup>19)</sup>を小文字で用いるのが一般化している。

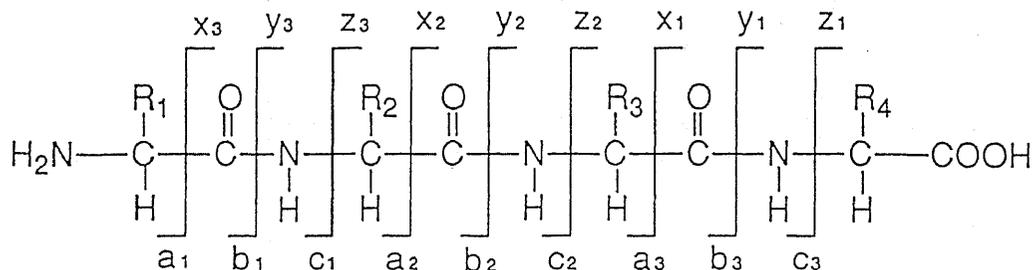
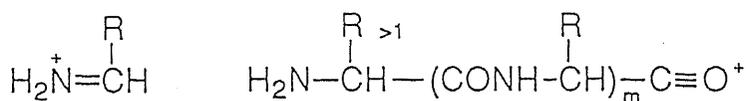


図4 タンデム MS でのペプチドの主鎖の切断位置

図3には主鎖の切断を示すイオンの他に P、H、Y、RV、 $y_2$ 、 $b_2$ 、 $y_4$ 、 $a_5-28$ 、 $a_{10}-42$ 、 $a_{10}$  のドーターイオンが観測されている。図3で検出されている P、H、Y はインモニウムイオンと呼ばれ、また、RV は -Arg-Val- から生じるインターナルフラグメントで、ともに、図5に示したような構造をしている<sup>20)</sup>。



インモニウムイオン

インターナルフラグメント

図5 インモニウムイオンおよびインターナルフラグメントの構造

$a_5-28$ 、 $a_{10}-42$  は質量数が同一である Ile 残基と Leu 残基を区別することができるイオンで、Ile 残基の場合には  $a_n-28$  が、Leu の場合には  $a_n-42$  が観測される<sup>21)</sup>。

このように、タンデム MS はペプチドのアミノ酸配列の解析に有効な分析方法である。

もう一つの、分離分析と質量分析を組み合わせた分析方法である LC/MS の中でも現在、最も利用されているのは TSP(Thermospray) 法の LC/MS<sup>16)</sup> である。LC からの 1 ~ 2 ml/min 程度の溶出液の全量が 150 ~ 200 °C の一定温度で電気加熱されている金属ノズル (内径 0.1 ~ 0.15 mm) から少量の電解質とともに数 torr 以下の減圧下に噴出し、脱溶媒される過程で試料溶質のソフトなイオン化が起こる現象を利用したものである。TSP のイオン化の安定性、測定の対象となる化合物の範囲が広いことから、TSP 法は最も利用されている LC/MS のシステムである。この方法は、広義の気体イオン-分子反応である CI 法を利用したものであるので、熱に不安定な化合物には適用できない。

一方、FABMS でのイオン化を利用した FRIT-FAB 法<sup>17)</sup>も実用化されてきている。これは、グリセリンを 1 % 程度の濃度でマトリックスとして加えた溶媒を HPLC の溶出液とし、HPLC と MS とのインターフェース部分のフリット (FRIT ; 網目状の金属板) を介して、MS の高真空中に溶出液を連続的ににじみ出させて、そのフリット表面のグリセリン層を FAB の方式でイオン化する LC/MS である (図 6)。通常 of 分析に用いる HPLC の流速は、毎分 0.5 ~ 2 ml/min であるが、この流速のまま、高真空の質量分析計に導入することは不可能である。そこで、実際には以下の 2 つのどちらかの方法で質量分析計に導入される溶出液の流量を数  $\mu$ l/min にして用いる。

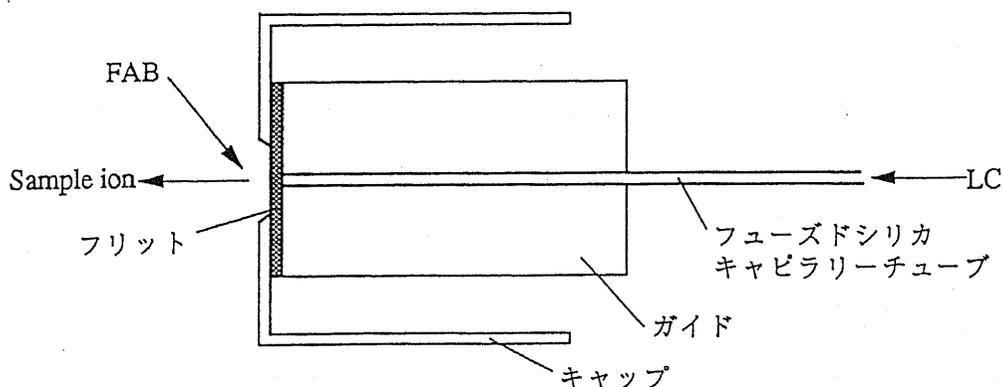


図6 フリットーFABターゲットの構造

1つの方法は、HPLCの装置にはマイクロLCを用いることである（図7(a)）。この方法では、分析に要する試料の量が少なくてすむという利点がある一方、通常の分析で用いるHPLCの条件をそのままLC/MSの測定に利用することはできないという欠点がある。もう一つの方法は、分離には通常のHPLCの装置を用いるが、質量分析計に導入される前にスプリッターにより2つに分け、溶出液の約100分の1の量が質量分析計に導入され、残りの99%は廃液とされるというシステムである（図7(b)）。この方法はルーチン分析で用いるHPLCの分析条件をそのままLC/MSの条件として用いることができるという反面、HPLCに注入したほとんどの試料がスプリッターで分けられた後廃液とされ、質量分析計には導入されないため、必要とする試料の量が多いという欠点がある。

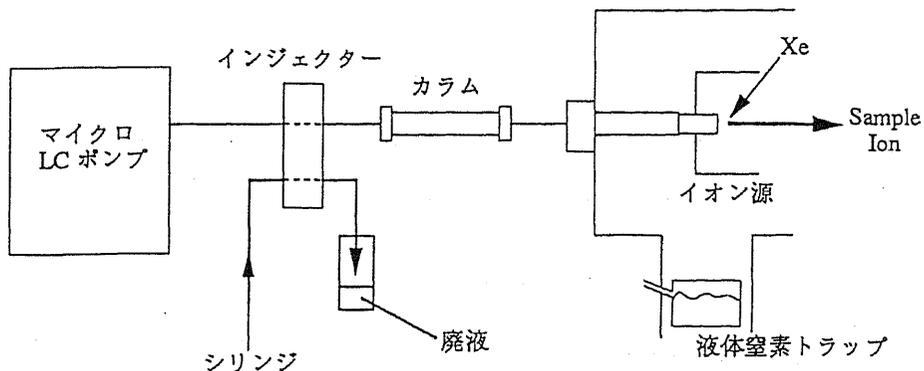


図 7 (a) マイクロ LC を用いた FRIT-FAB システム概略図

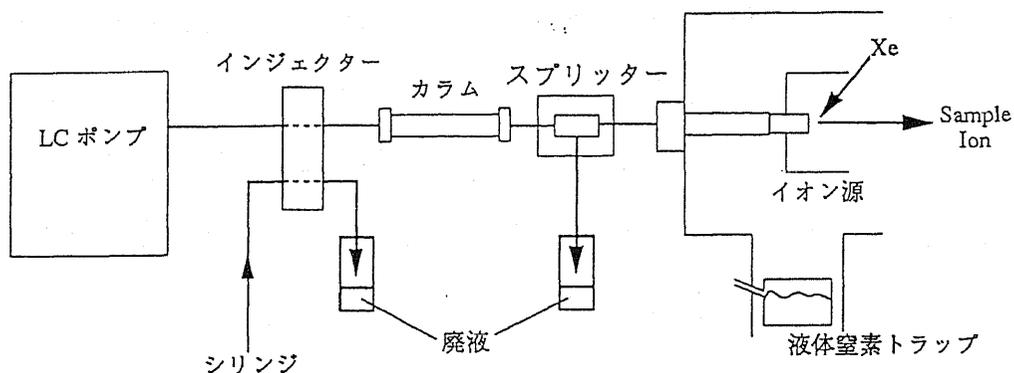


図 7 (b) スプリッターを用いた FRIT-FAB システム概略図

どちらの導入系を用いるにしても FAB によりイオン化を行なうので、比較的イオン強度の強い  $[M+H]^+$  もしくは  $[M-H]$  が得られ、ペプチドの分子量を決定するのに適した方法である。この方法で分析することにより、LC のクロマトグラムで検出された各ピークとそれに含まれる化合物の分子量を迅速に対応付けることができる。また、タンパク質を酵素消化して得ら

れたペプチドに適用すれば、従来であれば HPLC でペプチドマッピングを行ない、次に各ピークを分取して分子量決定を行っていたのに対し、HPLC からオンラインで各ピークに含まれるペプチドの分子量を決定できるので、非常に短時間に各ペプチドの分子量を決定できる。

本論文で以下に述べる研究は、主に FABMS をタンパク質の構造研究に有効に用いることにより、従来から用いられている分析法の弱点とも言える "タンパク質の構造研究には多くの時間を要する" という点を克服したもので、タンパク質の構造決定を、あたかも低分子の構造決定のように行うことができることを示している。また、タンデム MS や LC/MS といった分離分析と質量分析を組み合わせた方法を用いて、従来からタンパク質の構造研究に用いられている方法では不得意であった "混合物の一次構造研究" を、正確にしかも迅速に行なえることを本研究では示している。

## 第1章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I の一次構造決定

### 序

$\alpha$ -アミラーゼは、デンプンやグリコーゲンなどを加水分解する酵素で、 $\alpha$ -1,4 グリコシド結合を切断し、 $\alpha$ 型の糖を生成する酵素である。1833年、Payen と Persoz によって麦芽抽出液中に、初めて存在が知られて以来、 $\alpha$ -アミラーゼは *Bacillus* 属を中心とする細菌、放線菌、*Aspergillus* 属を中心とするカビ類、イネ科およびマメ科の植物の種子、ヒト・ブタなどの哺乳動物の消化腺など多くの生物から単離されている<sup>21)</sup>。ほとんどの  $\alpha$ -アミラーゼについては、実用面では研究が盛んになされ、ブドウ糖製造や酒造などの産業に大いに利用されているのに対し、酵素としての学術的な研究は遅れており、立体構造をはじめ、一次構造、活性中心など構造に関する情報はほとんど得られていない。明らかになっている事項は、 $\alpha$ -アミラーゼは大部分が分子量が 50000 前後のタンパク質で、ほとんど単一のポリペプチドであること、活性発現には Ca 分子が必要で、 $\alpha$ -アミラーゼ 1 分子あたり何分子かの Ca が結合していること、至適 pH は動物起源のものが中性付近、植物起源のものが pH 5.5 ~ 6.0 であることなどである<sup>22)</sup>。今日のタンパク質工学の発展を考えると、タンパク質工学により、さらに機能性の高い  $\alpha$ -アミラーゼが得られることは容易に想像されることから、 $\alpha$ -アミラーゼの構造や作用機作を解明することは大変重要である。そのためには  $\alpha$ -アミラーゼインヒビターについて研究を進めること

も有効な手段である。

$\alpha$ -アミラーゼインヒビターは、植物や微生物から多くの種類が単離・精製されている<sup>23)26)</sup>。その中には、哺乳類の $\alpha$ -アミラーゼは特異的に阻害するが、植物や微生物の $\alpha$ -アミラーゼは阻害しないものもある<sup>27)</sup>。このことは、哺乳類の $\alpha$ -アミラーゼは、基質に対して結合する箇所他に、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターに対して結合する箇所も持っていることを示している。よって、これらのインヒビターによる阻害のメカニズムを解明することは、哺乳類の $\alpha$ -アミラーゼの性質を明らかにするためには重要な情報となる。

動物の $\alpha$ -アミラーゼは唾液腺型と膵臓型の2つに大別されるが、それぞれは多くのアイソザイムからなっている。血清中もしくは尿中のこれらの $\alpha$ -アミラーゼの活性は、膵臓疾患、唾液腺疾患、腎疾患、肺炎、悪性腫瘍などの場合に大きく変動することが既に明らかになっているので、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターは診断薬として、 $\alpha$ -アミラーゼのアイソザイムの活性を測定する目的にも用いられている<sup>28)</sup>。

このような背景の元に、大阪府立大農学部村尾研究室において、*Streptomyces corchorushii* の培養液から、ブタ、ウシ、イヌ、ウマの $\alpha$ -アミラーゼは阻害するが、ヒトの唾液腺型および膵臓型の $\alpha$ -アミラーゼは阻害しない（表1）という、興味深い性質を持つ $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim (pig pancreatic  $\alpha$ -amylase inhibitor from microbes) I および II が単離された<sup>29)32)</sup>。Paim I および II はヒトと他の動物の $\alpha$ -アミラーゼを区別す

表1 種々の $\alpha$ -アミラーゼに対するPaim I と Paim II の活性

| Enzyme (Origin)                  | pH  | Inhibition |         |
|----------------------------------|-----|------------|---------|
|                                  |     | Paim I     | Paim II |
| Pig pancreas                     | 7.0 | +++        | +++     |
| Dog pancreas                     | 7.0 | +++        | +++     |
| Cow pancreas                     | 7.0 | ++         | ++      |
| Horse pancreas                   | 7.0 | ++         | ++      |
| Sheep pancreas                   | 7.0 | +          | +       |
| Rabbit pancreas                  | 7.0 | —          | —       |
| Human pancreas                   | 7.0 | —          | —       |
| Human saliva                     | 7.0 | —          | —       |
| Human saliva                     | 7.0 | —          | —       |
| Cock pancreas                    | 7.0 | —          | —       |
| Carp pancreas                    | 7.0 | +++        | +++     |
| <i>Cambarus</i> alimentary tract | 7.0 | —          | —       |
| Earth worm                       | 7.0 | —          | —       |
| Bacterial liquefying             | 5.5 | —          | —       |
| Bacterial saccharifying          | 5.5 | —          | —       |
| Malt                             | 5.5 | —          | —       |

ることができるタンパク質の  $\alpha$ -アミラーゼインヒビターで、 $\alpha$ -アミラーゼの性質について研究するのに非常に有効である。Paim I および II のいくつかの物理化学的性質については研究され、以下のように求められている<sup>31)</sup>。ポリアクリルアミドゲル電気泳動で求めた分子量は Paim I が 4300、Paim II が 4800 である。等電点は Paim I は 4.2、Paim II は 4.0 である。アミノ酸分析値は表 2 のようである。アミノ酸分析の結果から Paim I、Paim II の分子量を求めると、それぞれ 4085、4387 となる。この値はポリアクリルアミドゲル電気泳動で得られた分子量 4300、4800 とほぼ一致している。以上の知見を参考にして、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I の一次構造を、質量分析法とエドマン分解法<sup>4)</sup>を組み合わせることにした。一次構造決定を行なう方法には、最初に FABMS で Paim I の分子量を決定し、続いていくつかのフラグメントに切断して、必要最小限の部分について構造決定を行ない、最後に各フラグメントをつなぎ合わせてもとのタンパク質の全一次構造を決定する方法を用いることにした。また、Paim I と同様に哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害する  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Haim II<sup>33)</sup>、Hoe-467A<sup>34)</sup>、Z-2685<sup>35)</sup>、AI-3688<sup>36)</sup> の一次構造と Paim I の一次構造を比較し、ホモロジーを検討することにした。

表2 Paim I および Paim II のアミノ酸分析結果

| アミノ酸  | Paim I | Paim II |
|-------|--------|---------|
| Lys   | 0      | 0       |
| His   | 2      | 2       |
| Arg   | 1      | 1       |
| Asp   | 3      | 4       |
| Thr   | 4      | 4       |
| Ser   | 3      | 4       |
| Glu   | 3      | 3       |
| Pro   | 2      | 2       |
| Gly   | 4      | 4       |
| Ala   | 6      | 6       |
| Cys   | 2      | 2       |
| Val   | 3      | 4       |
| Met   | 1      | 1       |
| Ile   | 0      | 0       |
| Leu   | 2      | 2       |
| Tyr   | 2      | 2       |
| Phe   | 0      | 0       |
| Trp   | 1      | 1       |
| total | 39     | 42      |
| MW    | 4085   | 4387    |

実験の概略を以下に示す。

1) Paim I および Paim I の S-S 結合を還元カルボキシメチル化した RCM-Paim I の分子量を FABMS で決定する。

2) RCM-Paim I (Reduced and Carboxymethylated Paim I; S-S 結合を還元カルボ

キシメチル化したPaim I) を、*Staphylococcus aureus* V8 protease (タンパク質、ペプチドのペプチド結合を Glu 残基 (条件により Asp 残基) の C 末端側で切断する酵素) で消化し、得られるペプチドの分子量を FABMS で決定する。各ペプチドの分子量と RCM-Paim I の分子量から、Paim I の一次構造を決定するのに必要最小限のペプチドを選ぶ。

3) 各ペプチドのアミノ酸配列を気相法アミノ酸シーケンサー (自動エドマン法) で決定し、消化に用いた酵素の特異性を考えて、得られたペプチドをつなぎあわせることにより RCM-Paim I の全一次構造を決定する。

4) トリプシン (タンパク質、ペプチドのペプチド結合を Arg 残基、Lys 残基の C 末端側で切断する酵素)、キモトリプシン (タンパク質、ペプチドのペプチド結合を Tyr、Phe、Leu など疎水性アミノ酸残基の C 末端側で切断する酵素) で Paim I を消化し、得られるペプチドの分子量と酵素の特異性を考え合わせて、3) で得られた Paim I の一次構造を確認する。

ここで用いた方法は、最初に分子量を決定し、続いていくつかのユニットに切断して必要な部分について構造決定を行い、最後に得られた結果をつなぎ合わせて全体の構造を決定するという、低分子の化合物の構造決定を行なう際に用いる方法と非常に類似している。このような手法や考え方は従来のタンパク質の構造研究には用いられておらず、そのため、一次構造決定には多大な時間を必要とした。本研究は、タンパク質も低分子の化合物同様に迅速に構造決定が行なえることを示している。

### 第1節 Paim I および RCM-Paim I の分子量の決定

Paim I および RCM-Paim I の分子量を FABMS で測定した。図 8 に示すように Paim I は  $m/z$  7423.0 に、RCM-Paim I は  $m/z$  7657.0 にそれぞれ  $[M+H]^+$  (average mass) が観測された。

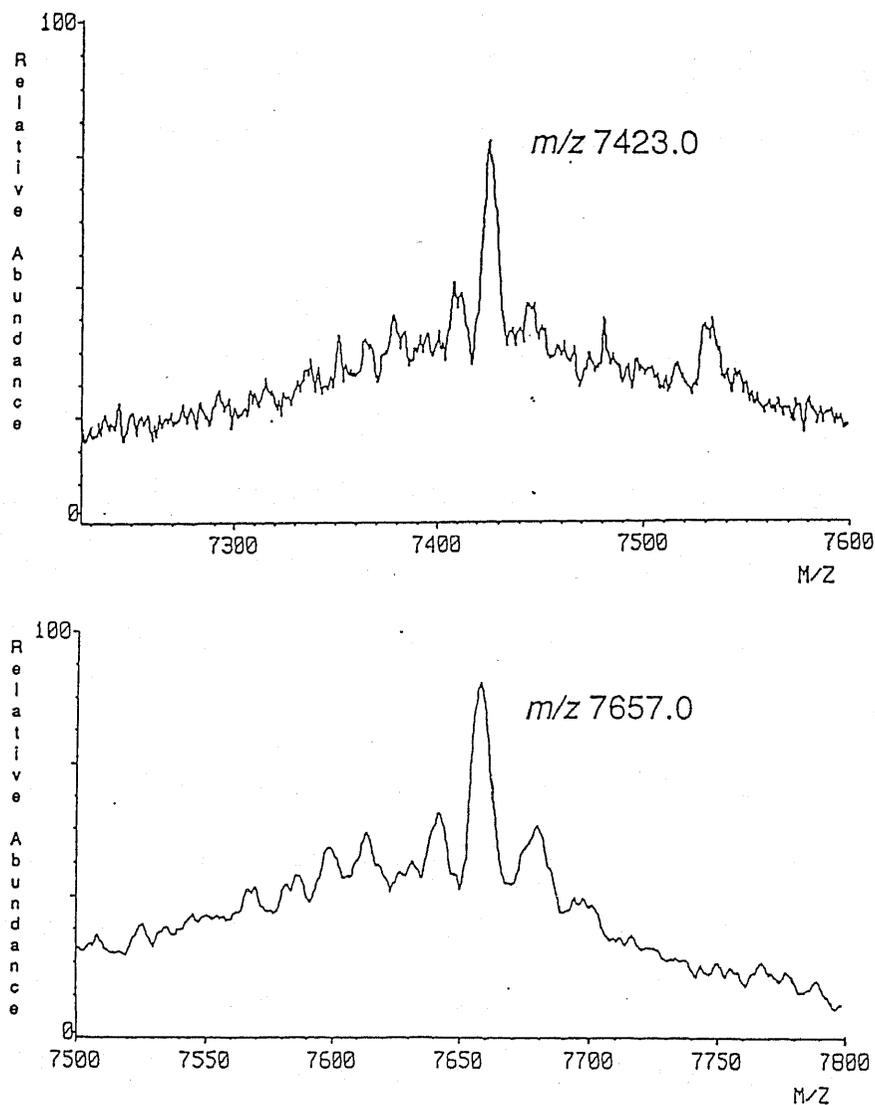


図 8 Paim I (上) と RCM-Paim I (下) の  $[M+H]^+$  付近の FABMS

分子量が 7500 程度のタンパク質の monoisotopic molecular mass は average mass よりも 5 マス程度小さくなる（用語の説明参照）ので、Paim I、RCM-Paim I の monoisotopic molecular weight は 7417.0、7651.0 と計算される。この 2 つの分子量の差は、S-S 結合を還元して導入されたカルボキシメチル基によるものである。カルボキシメチル基 1 残基の質量は 59.05 であることから、Paim I には RCM 化により 4 残基のカルボキシメチル基が導入されたことがわかる。

## 第 2 節 酵素消化で得られるペプチドの FABMS

RCM-Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で 8 時間消化することにより、S1 から S6 のペプチドが得られた。それぞれの分子量を、消化で得られたペプチド混合物のまま、もしくは HPLC でそれぞれを単離した後 FABMS で決定した。図 9 に各ペプチドの  $[M+H]^+$  付近の FAB マススペクトルを示す。

S1、S2、S3 の分子量 1946.8、1423.7、4317.1（いずれも monoisotopic molecular weight）をたして 2 mol の水の分子量 36.0 を引くと 7651.6 となり、FABMS で求めた RCM-Paim I の分子量 7651.0 (monoisotopic molecular weight) にほぼ一致する。このことから、S1、S2、S3 の各ペプチドのアミノ酸配列と並びかたを決定すれば RCM-Paim I の全一次構造を決定できることがわかった。そこで、S1、S2、S3 が多く得られる条件で、RCM-Paim

I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化し、HPLC で分取した。そのクロマトグラムを図 10 に示す。

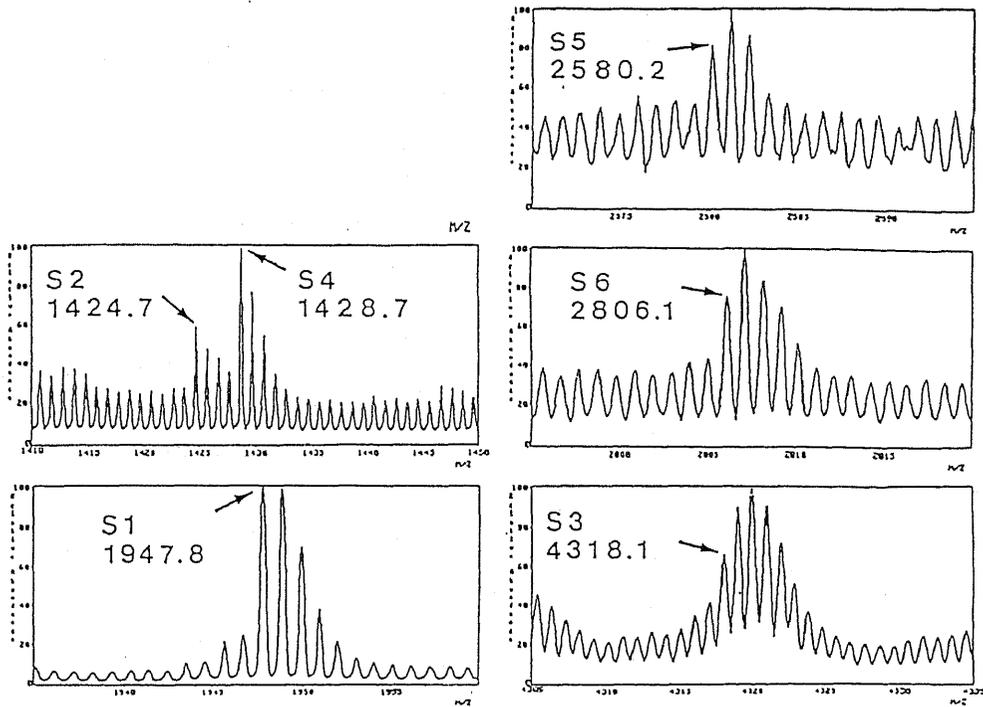


図 9 RCM-Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチドの  $[M+H]^+$  付近の FABMS 質量数はすべて monoisotopic peak の exact mass で示している。

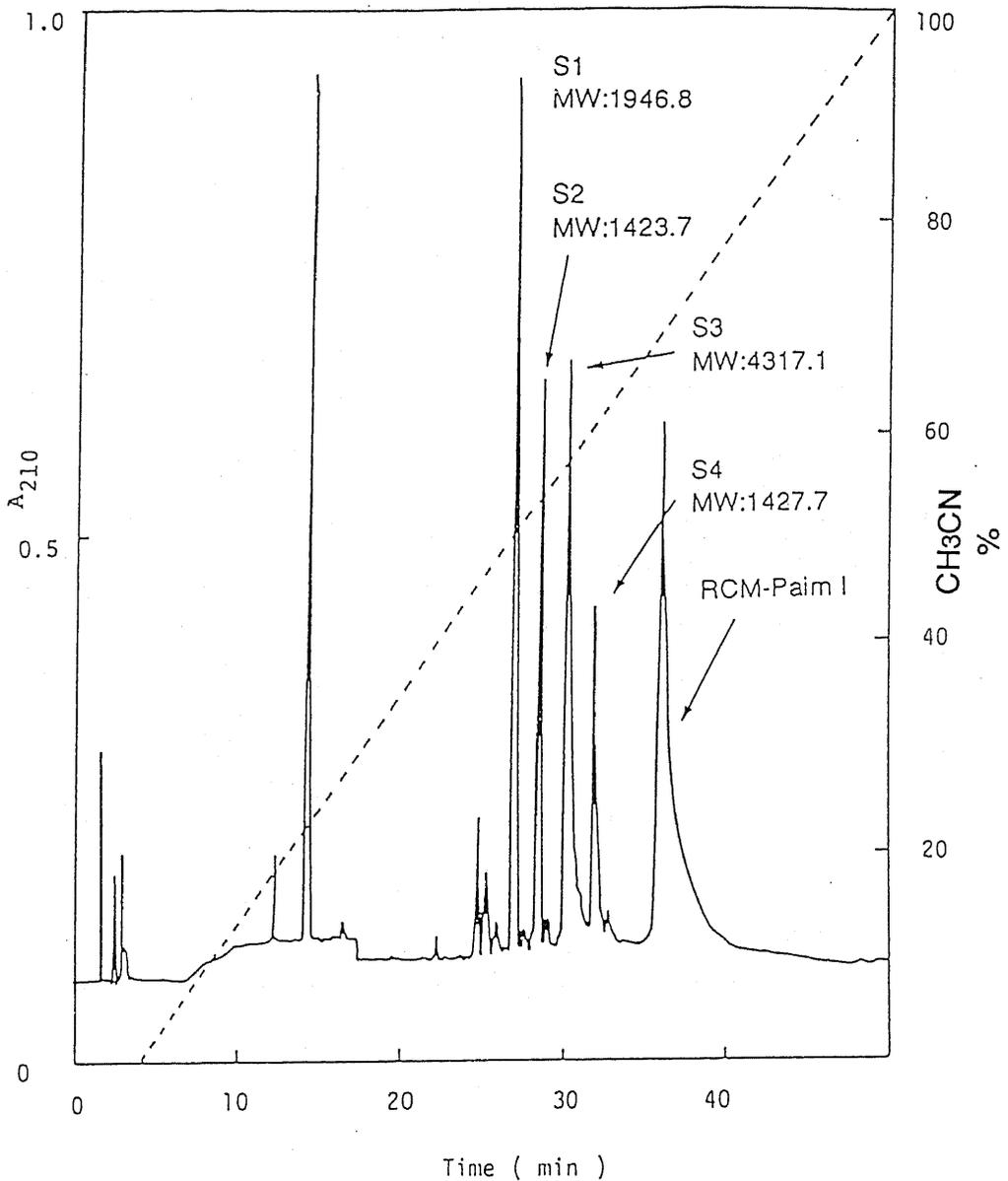
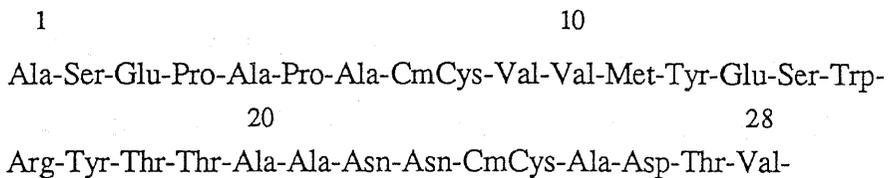


図 10 RCM-Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチド混合物の HPLC クロマトグラム  
 ペプチド S1、S2、S3 が生成しやすい酵素消化条件を選んでいるため、ペプチド S5、S6 はクロマトグラム上に現われていない。  
 分子量は monoisotopic molecular weight で表示してある。

### 第3節 エドマン法による RCM-Paim I のアミノ酸配列の決定

タンパク質の N 末端から数十残基程度のアミノ酸配列は気相法アミノ酸シーケンサーで決定できるので、ペプチド S1、S2、S3 について分析する前に、RCM-Paim I を気相法アミノ酸シーケンサーで分析した。その結果、以下のように N 末端の Ala から 28 番目の Val までのアミノ酸配列を決定できた。



一方、ダンシル法<sup>37)</sup>で S1、S2、S3 の N 末端のアミノ酸を決定したところ、それぞれ Gly、Ala、Ser であることがわかった。S2 の N 末端のアミノ酸は Ala で、分子量が 1423.7 であることから、S2 は上に示したアミノ酸配列の Ala(1)-Glu(13) に相当することがわかる。S2 の C 末端のアミノ酸が Glu であることは用いた酵素である *Staphylococcus aureus* V8 protease の特異性に一致している。したがって、ペプチド S2 は RCM-Paim I の N 末端部分のペプチドであり、そのアミノ酸配列は決定する必要はないことになる。

14 番目のアミノ酸残基が Ser であることから、S2-S3 の順に並んでいることになる。S2 は N 末端のペプチドであることから RCM-Paim I は S2-S3-S1 の構造であることがこの時点で明らかとなった。

S3 を気相法アミノ酸シーケンサーで分析したところ、以下のように



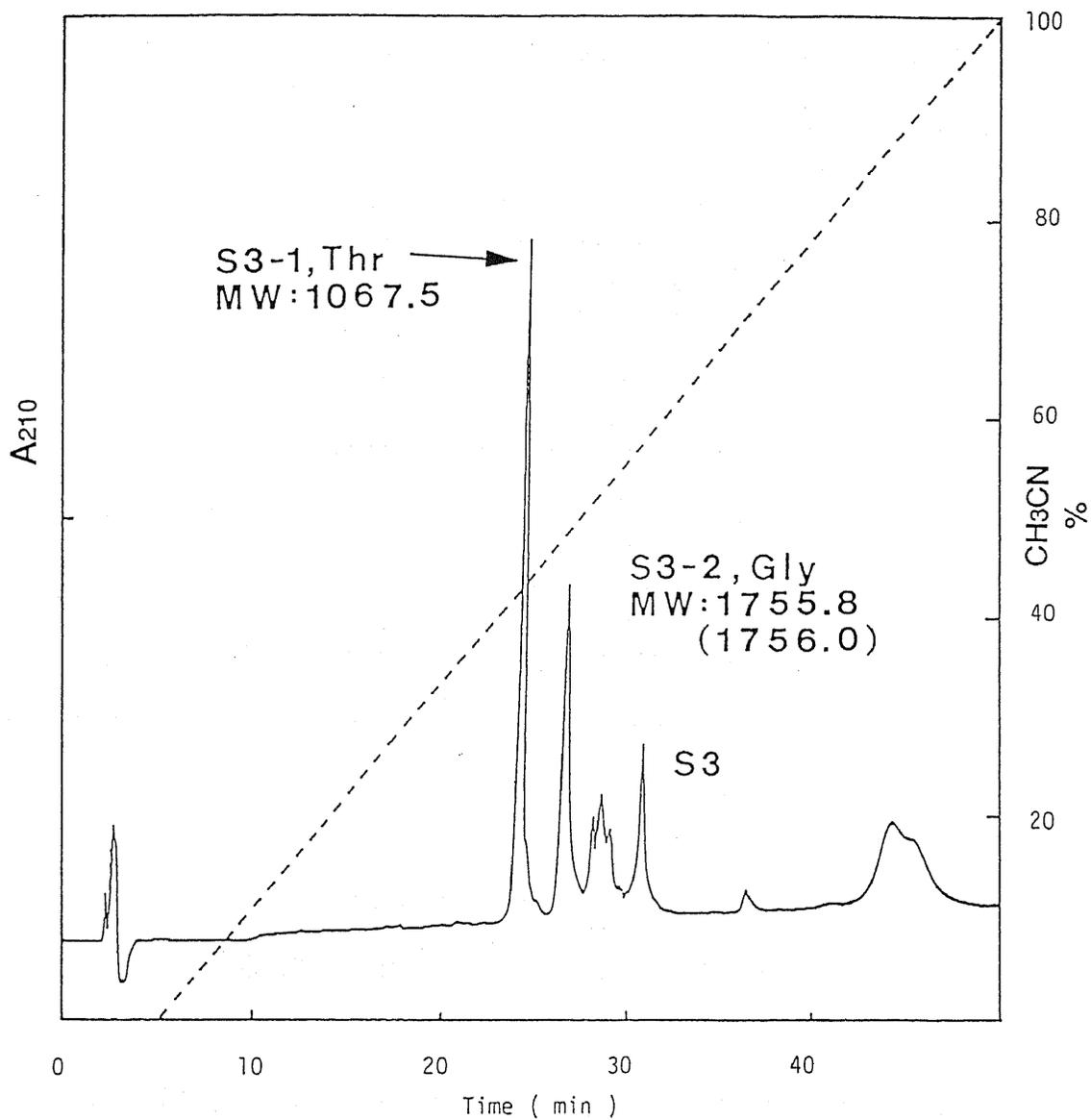


図 11 S3 を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチドのクロマトグラム  
 分子量は monoisotopic molecular weight で表示してある。

FABMS で得られた S3-2 の分子量 1755.8 が、予想された分子量 1756.0 とよく一致していることから、S3-2 は S3 の C 末端部分のペプチドであることが確認できた。

表3 ペプチド S3-2 のアミノ酸分析結果

| アミノ酸  | 残基数      |
|-------|----------|
| Thr   | 3.7(4)   |
| Glu   | 1.2(1)   |
| Gly   | 4.0(4)   |
| Ala   | 3.2(3)   |
| Val   | 2.2(2)   |
| Leu   | 1.2(1)   |
| Pro   | 3.2(3)   |
| CmCys | 0.7(1)   |
| 計     | 19.4(19) |

( ) 内の数値は実測値を四捨五入して得られた整数値

S3-2 について気相法アミノ酸シーケンサーで分析した結果、以下のよう  
に 37 番目の Gly から 54 番目の Gly までのアミノ酸配列を決定できた  
(X、Y は不明)。

37

40

50

54

Gly-Ala-Thr-Gly-Pro-CmCys-Ala-Thr-Leu-Pro-Pro-Gly-Ala-Val-X-Y-Val-Gly-

表3のアミノ酸分析の結果と、酵素の特異性から54番目のGlyがS3-2のC末端のアミノ酸でないことは明らかである。アミノ酸分析の結果からは、Gluが1残基、Thrが4残基あるのに対し、上の一次構造にはGluは存在せず、Thrは2残基しか存在しない。以上と酵素の特異性を考えて、S3-2のC末端のアミノ酸はGluで54番目のGlyに続く55番目のアミノ酸と推定され、51、52番目のXとYはともにThrであると推定される。このことを確認するために、S3を*Staphylococcus aureus* V8 proteaseで消化して得られるペプチド混合物をカルボキシペプチダーゼY（タンパク質、ペプチドのC末端側からアミノ酸を1つずつ遊離させる酵素）で消化し、その経時変化をFABMSで観測した<sup>38),39)</sup>。図12にカルボキシペプチダーゼYによる消化の経時変化を追ったFABマススペクトルを示す。図12の質量数はすべて[M+H]<sup>+</sup>の monoisotopic peak の exact mass で示している。

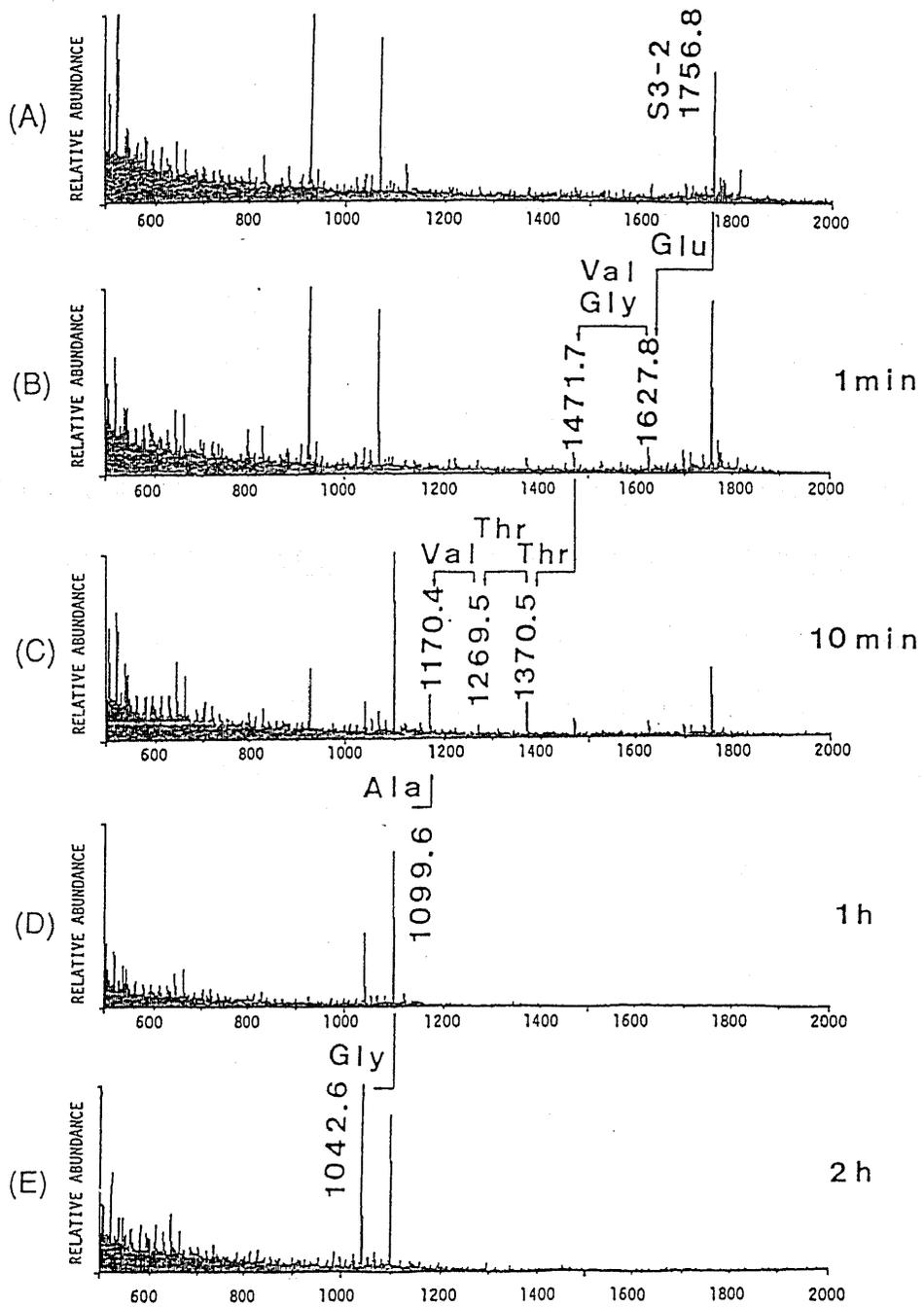


図 12 ペプチド S3-2 をカルボキシペプチダーゼ Y で消化した際の経時変化を観測した FAB マススペクトル

(A) は、ペプチド S3 を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られたペプチド混合物の FAB マススペクトルである。m/z 1756.8 に S3-2 の  $[M+H]^+$  が観測されている。カルボキシペプチダーゼ Y による消化を開始してから、1 分後 (B) には m/z 1627.8 と m/z 1471.7 に、10 分後 (C) には m/z 1370.5、m/z 1269.5、m/z 1170.4 に、1 時間後 (D) には m/z 1099.6 に、2 時間後 (E) には m/z 1042.6 にそれぞれ  $[M+H]^+$  が観測されている。これは、カルボキシペプチダーゼ Y の消化により、S3-2 の C 末端から順次 Glu、Gly+Val、Thr、Thr、Val、Ala、Gly が遊離されていることを示している。このことから、S3-2 の C 末端部分のアミノ酸配列は -Gly-Ala-Val-Thr-Thr-(Gly, Val)-Glu であることがわかった。よって、気相法のシーケンサーで決定できなかった X、Y と Gly に続く 55 番目のアミノ酸は、それぞれ Thr、Thr、Glu であると決定された。

最後に残った C 末端のペプチド S1 を気相法シーケンサーで分析した結果、次のように 56 番目の Gly から 73 番目の Ser までのアミノ酸配列を決定できた。

56                      60                                      70                      73  
Gly-Tyr-Leu-Gly-Glu-His-Gly-His-Pro-Asp-His-Leu-Ala-Leu-CmCys-Pro-Ser-Ser

この配列から S1 の分子量を計算すると 1946.9 となり、FABMS で得られた S1 の分子量 1946.8 とよく一致する。

以上から、Paim I の一次構造式を、図 13 のように決定した。

|   |    |
|---|----|
| Ala - Ser - Glu - Pro - Ala - Pro - Ala - Cys - Val - Val - Met - Tyr - Glu - Ser - Trp - Arg - Tyr - Thr - Thr - Ala - | 10 |
| Ala - Asn - Asn - Cys - Ala - Asp - Thr - Val - Ser - Val - Ser - Val - Ala - Tyr - Gln - Asp - Gly - Ala - Thr - Gly - | 20 |
| Pro - Cys - Ala - Thr - Leu - Pro - Pro - Gly - Ala - Val - Thr - Thr - Val - Gly - Glu - Gly - Tyr - Leu - Gly - Glu - | 30 |
| His - Gly - His - Pro - Asp - His - Leu - Ala - Leu - Cys - Pro - Ser - Ser   | 40 |
|   | 50 |
|   | 60 |
|   | 70 |

図 13 Paim I のアミノ酸配列

#### 第 4 節 Paim I の一次構造の確認

Paim I の一次構造は、RCM-Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られたペプチドのアミノ酸配列を決定し、それらをつなぎ合わせるにより決定した。この場合、つなぎ目のアミノ酸配列を別の方法で確認する必要がある。また、酵素をかえて RCM-Paim I を消化して得られるペプチドの分子量が得られた一次構造や酵素の特異性と矛盾しないことを確認することも必要である。

以上の観点から、Paim I の一次構造を確認する目的で、RCM-Paim I をトリプシン、キモトリプシンで消化を行ない、得られるペプチドの分子量を FABMS で測定した。その結果を表 4 に示す。示した質量数は \* 以外のペプチドについてはすべて monoisotopic peak の exact mass である。トリプシンによる消化では、T1、T2 の 2 つのペプチドが得られ、FABMS から得られたそれぞれの  $[M+H]^+$  の値 1853.8 (monoisotopic molecular mass)、5820.5 (average molecular mass) は、一次構造から計算される値と一致している。ま

表4 RCM-Paim I を酵素消化して得られるペプチド

T1、T2; トリプシンで消化して得られるペプチド

C1~C7; キモトリプシンで消化して得られるペプチド

S1~S7; *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチド

| ペプチド | [M+H] <sup>+</sup><br>観測値 | [M+H] <sup>+</sup><br>理論値 | RCM-Paim I の配列<br>で該当する箇所 |
|------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| T1   | 1853.8                    | 1853.8                    | Ala(1)-Arg(16)            |
| T2   | 5820.5*                   | 5820.3*                   | Tyr(17)-Ser(73)           |
| C1   | 1295.7                    | 1295.6                    | Ala(1)-Tyr(12)            |
| C2   | 1744.8                    | 1744.8                    | Thr(18)-Tyr(34)           |
| C3   | 3929.2                    | 3929.2                    | Gln(35)-Ser(73)           |
| C4   | 1111.7                    | 1111.5                    | Leu(58)-Leu(67)           |
| C5   | 1727.9                    | 1727.8                    | Leu(58)-Ser(73)           |
| C6   | 635.3                     | 635.3                     | Ala(68)-Ser(73)           |
| S1   | 1947.8                    | 1947.9                    | Gly(56)-Ser(73)           |
| S2   | 1424.7                    | 1424.6                    | Ala(1)-Glu(13)            |
| S3   | 4318.1                    | 4317.9                    | Ser(14)-Glu(55)           |
| S3-2 | 1756.8                    | 1756.8                    | Gly(37)-Glu(55)           |
| S4   | 1428.7                    | 1428.6                    | His(61)-Ser(73)           |
| S5   | 2580.2                    | 2580.1                    | Ser(14)-Asp(36)           |
| S6   | 2806.1                    | 2806.3                    | Thr(27)-Glu(55)           |
| S7   | 1068.5                    | 1068.5                    | Thr(27)-Asp(36)           |

\* 測定は分解能 1000 で行なったため、得られた数値は average mass である。

た、トリプシンの基質特異性にも矛盾していない。キモトリプシンによる消化では、C1 から C6 の 6 つのペプチドが得られ、FABMS から得られたそれぞれの  $[M+H]^+$  の値 1295.7、1744.8、3929.2、1111.7、1727.9、635.3 (いずれも monoisotopic molecular mass) は、一次構造から計算される値と一致している。また、キモトリプシンの基質特異性にも矛盾していない。以上のようにして、Paim I の一次構造が正しいことを確認した。

#### 第5節 考察

Paim I 以外にも哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼのみを特異的に阻害するタンパク性の  $\alpha$ -アミラーゼインヒビターが、放線菌から数種類単離されているが、なかでも Haim II<sup>33)</sup>, Hoe-467A<sup>34)</sup>, Z-2685<sup>35)</sup>, AI-3688<sup>36)</sup> については活性だけでなく構造に関する研究もなされている。Hoe-467A、Z-2685、Haim II、Paim I の一次構造を比較すると、図 14 に示したように、高いホモロジーをもっていることがわかる。



活性発現部位であるという推定を支持する結果が得られた。

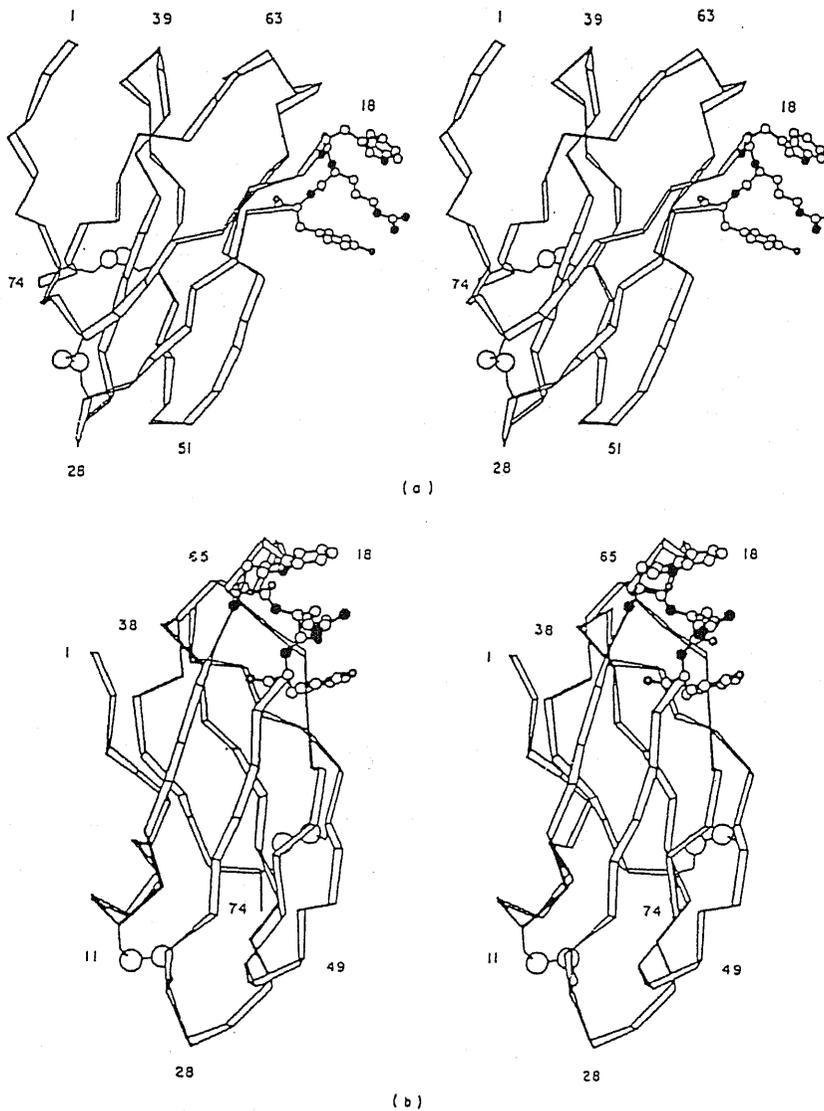


図 15 Hoe-467A の高次構造 (C<sup>α</sup>鎖についてリボンで表示)  
 (a)、(b) は異なる角度から見たもの  
 -Trp(18)-Arg-Tyr- は ball and stick 表示で示している

ブタ、ウシ、イヌ、ウマの $\alpha$ -アミラーゼについては Paim I も Haim II も阻害するのに対し、ヒトの唾液腺型および膵臓型の $\alpha$ -アミラーゼについては Paim I は阻害しないが、Haim II は阻害する。このことから、 $\alpha$ -アミラーゼに結合する部位のアミノ酸配列が、Paim I と Haim II では異なると考えられる。図 14 を見ると、Paim I の Leu(58) から Ala(68) までのアミノ酸配列と Haim II の Gly(55) から Val(65) までのアミノ酸配列が、極めて違うことがわかる。従って、この部分に $\alpha$ -アミラーゼに対する結合部位が存在すると予想される。

Paim I の一次構造決定には、FABMS と気相法のアミノ酸シーケンサーを組み合わせて用いることにより、従来から行なわれている質量分析法を用いず、気相法のアミノ酸シーケンサーのみで決定する場合に比べ、一次構造を効率的にしかも正確に決定することができた。特に、研究の初めの段階で Paim I の分子量を FABMS で決定できたことは、一次構造を迅速に決定するための大きなポイントであった。ここで得られた分子量 7417.0 はポリアクリルアミドゲル電気泳動で得られた分子量 4300<sup>31)</sup>と大きく違っており、タンパク質の一次構造決定において、質量分析法により決定される分子量の正確さ、そして質量分析法の重要性を認識できた。低分子の化合物の構造決定では、最初に分子量を決定し、続いていくつかのユニットに切断して必要な部分について構造決定を行ない、最後に得られた結果をつなぎ合わせて全体の構造を決定する。タンパク質では分子量が数千以上

と大きいため、分子量を質量分析法で決定することは難しく、このような方法は用いられていなかった。しかし、FABMSの開発<sup>10),11)</sup>や装置の大型化により、Paim Iのように7500程度のタンパク質の分子量決定が可能となった。本研究では、最初にPaim Iの分子量を決定し、続いて酵素で消化して得られたペプチドの分子量を求めて構造決定に必要な部分についてアミノ酸配列を決定し、最後に得られた結果をつなぎ合わせて全一次構造を決定した。この方法は先に述べた低分子の化合物の構造決定と同じ考え方に基づいている。本研究は、低分子の構造決定の考え方がタンパク質にもあてはまることを示した最初の例である。

## 第2章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I の S-S 結合位置の決定

### 序

$\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I は、第1章で明らかにしたように 73 コのアミノ酸残基からなり、その一次構造には4つの Cys 残基が存在することがわかった。第2章では、この4つの Cys 残基による S-S 結合の位置を酵素消化と FABMS を用いてどのように決定したかについて述べる。

タンパク質の S-S 結合の位置を決定するために従来から一般的に行なわれている方法は以下のとおりである。最初に、タンパク質をペプシンやサーモライシンのような基質特異性の比較的低い酵素で消化してペプチドとする。酵素消化は、S-S 結合の巻き変えが起こらない酸性条件下で行なう。次に、酵素消化によって得られたペプチドの中から S-S 結合を含むペプチドを単離し、アミノ酸分析計もしくはアミノ酸シーケンサーで分析する。この方法の場合、消化には基質特異性の低い酵素を用いるために、得られるペプチドの数が多く、どのようなペプチドが得られるのか、その予想が難しいという問題がある。また、アミノ酸分析やアミノ酸シーケンサーで分析する場合には、目的のペプチドを高純度にしなくてはならないため、精製に多くの時間を要する。そこで、Paim I の S-S 結合を決定する場合に、これらの問題を解決できるような方法を用いた。

消化に用いる酵素には基質特異性の高い *Staphylococcus aureus* V8 protease

を用いた。*Staphylococcus aureus* V8 protease は、酸性アミノ酸（主に Glu）の C 末端側で特異的に切断する酵素なので、得られるペプチドは Paim I の一次構造から容易に予想できる。また、高純度の精製を要求しない分析法として、FABMS を用いることにした。即ち、酵素消化により得られるペプチドの分子量を、ペプチド混合物のままもしくは逆相 HPLC で粗く分画した後に、FABMS を用いて求め、該当するペプチドを酵素の特異性を考え合わせて一次構造の中から選び出し、S-S 結合の位置を決定することにした。

タンパク質の S-S 結合の位置の確認に FABMS を用いる方法は既に確立されており、インシュリン<sup>45)</sup>、ニワトリ卵白リゾチーム<sup>46), 47)</sup>、ウシリボヌクレアーゼ<sup>47)</sup> について報告されている。しかし、これらはすべて S-S 結合位置が既に決定されている化合物に対して行なわれており、S-S 結合位置が未決定のものについてはこれまで応用されている例はない。

Paim I の S-S 結合位置の決定のために行なった実験の概略を以下に示す。

1) S-S 結合の交換が起きないように条件下で、Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化し、ペプチド混合物とする。S-S 結合を持つペプチドの分子量を FABMS で決定し、ペプチドの分子量と酵素の特異性から S-S 結合の位置を決定する。

2) ペプチド混合物のままの FABMS 測定では、すべてのペプチドの  $[M+H]^+$  が検出されるとは限らないので<sup>48)</sup>、 $[M+H]^+$  が検出されないペプチドは、HPLC で単離して FABMS を測定する。

3) S-S 結合をもつペプチドについてアミノ酸分析することにより、1)、2) で得られた結果を確認する。

第1節 Paim I を酵素消化して得られるペプチドの FABMS

図 16 に、Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で酵素消化して、得られたペプチド混合物の FAB マススペクトルを示す。

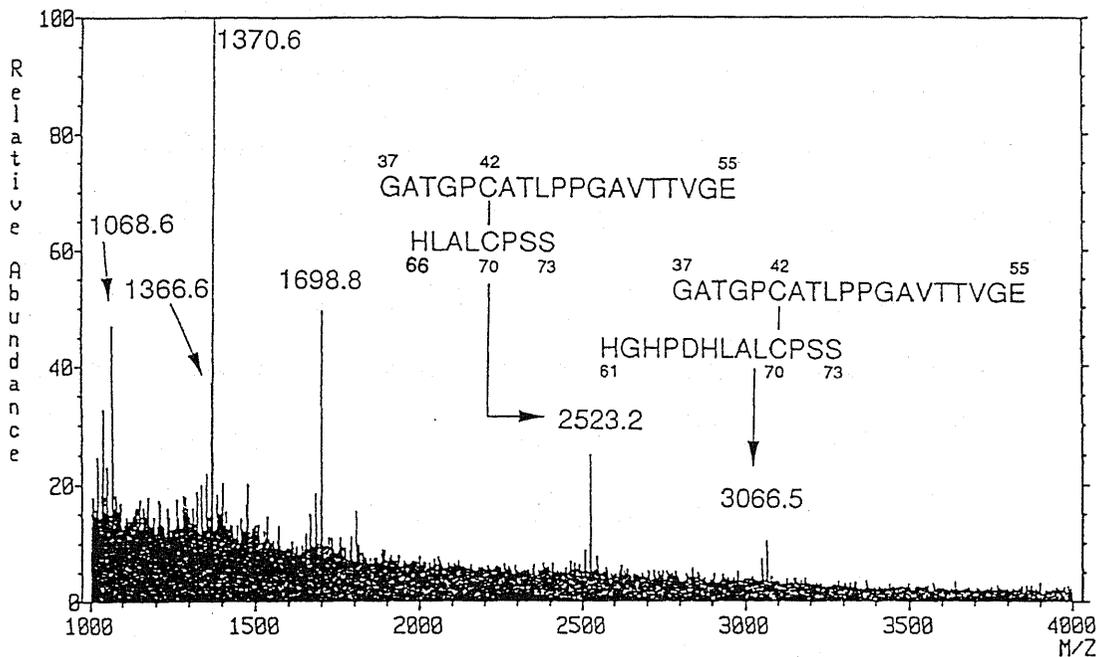
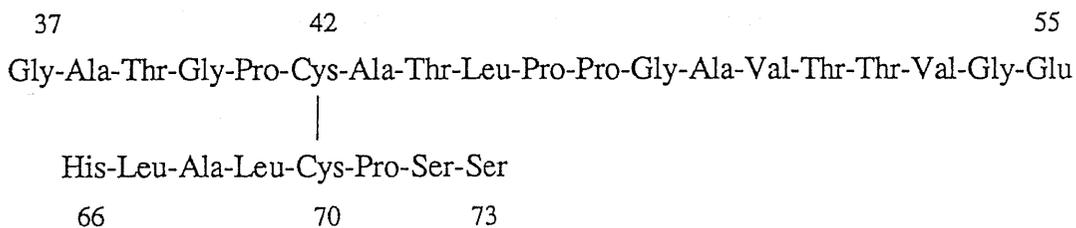


図 16 Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して、得られたペプチド混合物の FAB マススペクトル  
質量数は monoisotopic molecular peak の exact mass で表示してある。

得られたペプチドの分子量と酵素の特異性を考え合わせて、該当するペプチドを Paim I の一次構造から選び出した。S-S 結合を持つペプチドの FABMS では、S-S 結合を保持しているペプチドの  $[M+H]^+$  が検出されるが、それに加えて、イオン化の過程のフラグメンテーションもしくは還元反応によって生じると推定される S-S 結合が開裂し、-SH となったペプチドの  $[M+H]^+$  も検出される<sup>49), 50)</sup>。図 16 の  $m/z$  1068.6 は Thr(27)-Asp(36)、 $m/z$  1366.6 は Ala(1)-Glu(13)、 $m/z$  1370.6 は His(61)-Ser(73)、 $m/z$  1698.8 は Gly(37)-Glu(55) の  $[M+H]^+$  で、それぞれ S-S 結合が開裂し、-SH となったペプチドの  $[M+H]^+$  と考えられる。しかし、 $m/z$  2523.2 と  $m/z$  3066.5 の 2 つのイオンは、Paim I の一次構造のどの部分にもあてはまらない。従って、これらのイオンは S-S 結合を持つペプチドの  $[M+H]^+$  と考えられる。4 つの Cys 残基による S-S 結合の組み合わせは 3 通り考えられるが、Paim I の一次構造と酵素の特異性を考えあわせて、これらはそれぞれ、Gly(37)-Glu(55) + His(66)-Ser(73) と Gly(37)-Glu(55) + His(61)-Ser(73) の  $[M+H]^+$  で、下に示すような構造と決定した。このことは、Cys(42) と Cys(70) が S-S 結合をしていることを示している。

$m/z$  2523.2 に  $[M+H]^+$  が検出されたペプチド





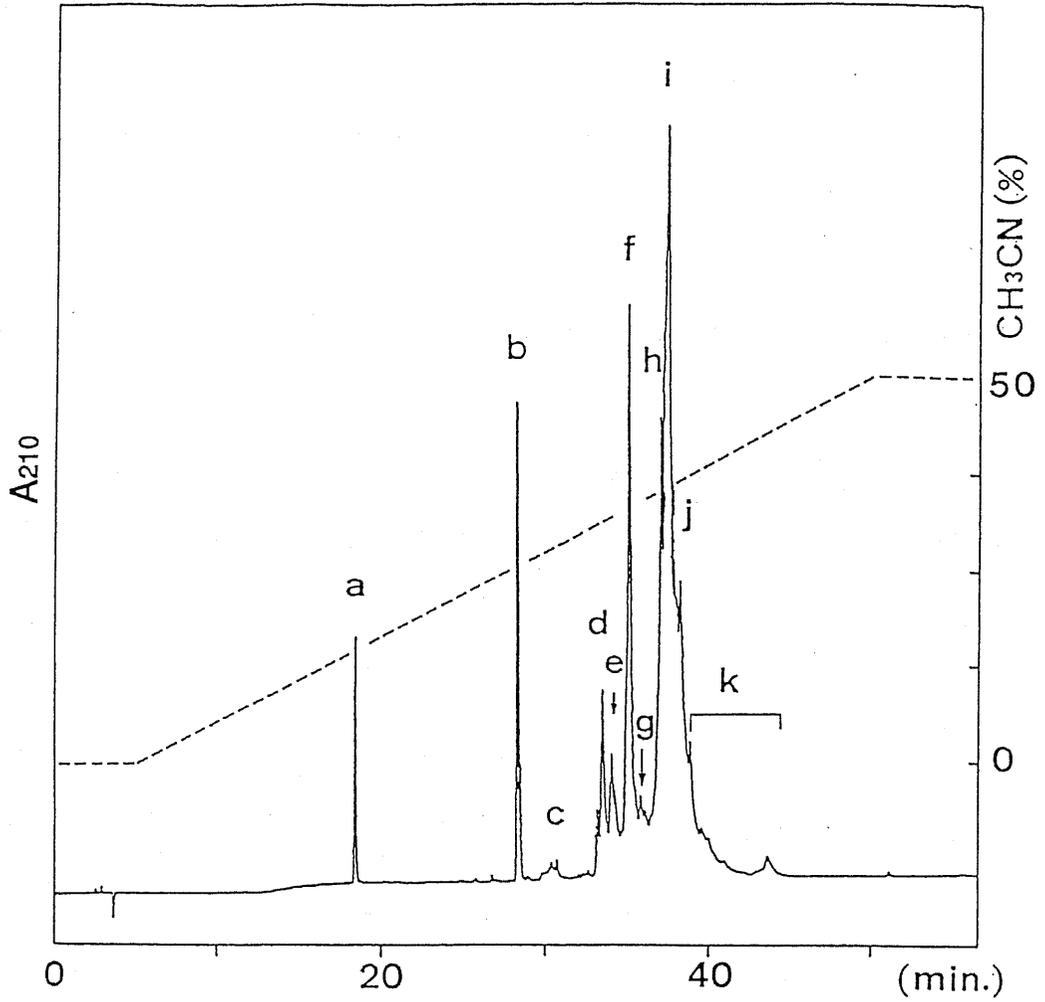


図 17 Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して、得られたペプチドの HPLC クロマトグラム

表5 Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化し、HPLC で分取して得られるペプチドの  $[M+H]^+$

| fr.         | $[M+H]^+$<br>観測値       | $[M+H]^+$<br>理論値 | Paim I の配列で該当する箇所               |
|-------------|------------------------|------------------|---------------------------------|
| a           | 561.9                  | 562.2            | His(61)-Asp(65)                 |
| b           | 538.2                  | 538.2            | Gly(56)-Glu(60)                 |
| c           | 1068.5                 | 1068.5           | Thr(27)-Asp(36)                 |
| d           | 3066.5                 | 3066.4           | Gly(37)-Glu(55)+His(61)-Ser(73) |
| e           | 2523.0                 | 2523.2           | Gly(37)-Glu(55)+His(66)-Ser(73) |
| f           | 2836.2                 | 2836.2           | Ala( 1)-Glu(13)+Ser(14)-Asp(26) |
| g<br>l<br>k | no peak under m/z 5000 |                  |                                 |

表5からわかるように、分画後の FABMS では混合物の場合には検出されなかったイオンもいくつか観測された。フラクション (g) から (k) では  $m/z$  5000 以下には  $[M+H]^+$  と思われるピークは検出されなかったことから、これらのフラクションに含まれるペプチドの分子量は 5000 を超えると考えられ、分子内に2つの S-S 結合を持っていると推定される。従って、これらのフラクションに含まれるペプチドは S-S 結合の位置を決定するのに

は有効でないと考えられた。図 18 にフラクション (f) の FAB マススペクトルを示す。

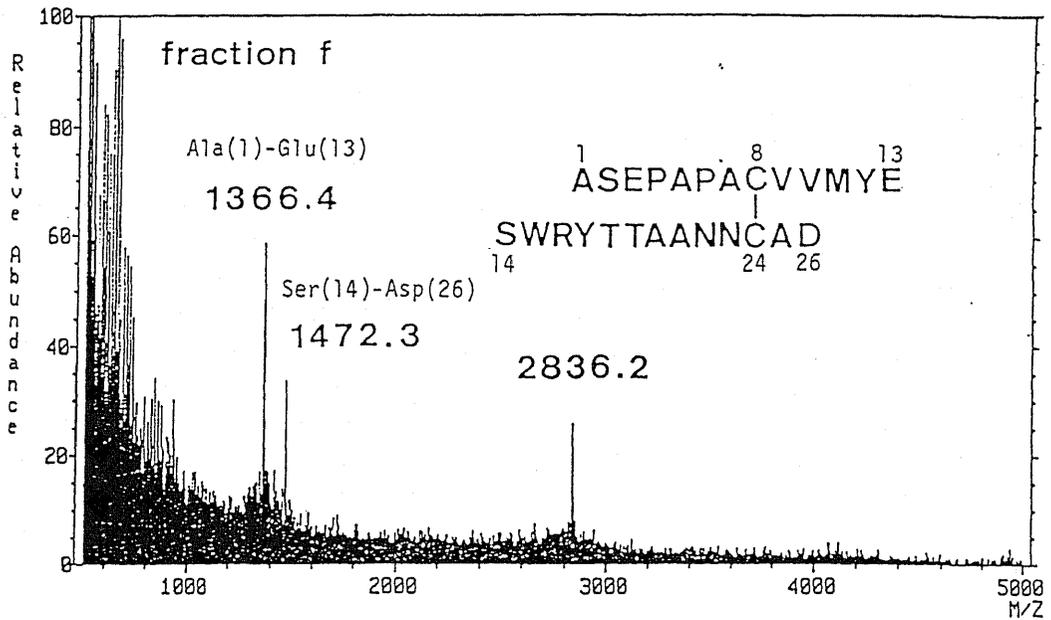
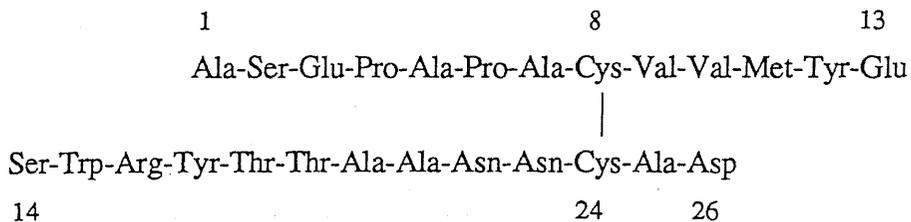


図 18 Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化し、HPLC で分取して得られたフラクション (f) の FAB マススペクトル  
質量数は monoisotopic molecular peak の exact mass で表示してある。

m/z 1366.4、1472.3、2836.2 にピークが検出された。m/z 1366.4、1472.3 は、それぞれ S-S 結合が開裂して生じたペプチド Ala(1)-Glu(13) と Ser(14)-Asp(26) の  $[M+H]^+$  で、m/z 2836.2 は、次に示した Cys(8) と Cys(24) に S-S 結合をもつペプチドの  $[M+H]^+$  であることがわかる。



以上の結果から、Paim I には Cys(8) と Cys(24)、Cys(42) と Cys(70) 間に 2 つの S-S 結合が存在することが明らかになった。また、どの FAB マススペクトルにも他の S-S 結合の存在を示唆するピークは検出されなかった。

### 第3節 2つの S-S 結合の位置の確認

2つの S-S 結合の位置を確認する目的で、フラクション (d) と (f) を HPLC でさらに精製した後、アミノ酸分析をした。結果を表6に示す。どちらの分析値も理論値とよく一致しており、Cys(8) と Cys(24)、Cys(42) と Cys(70) の間に S-S 結合が存在することを確認できた。

以上から、Paim I の S-S 結合位置は Cys(8)-Cys(24)、Cys(42)-Cys(70) であると決定した。

表6 フラクション (d) と (f) のアミノ酸分析結果

| アミノ酸             | (d)                 | (f)                 |
|------------------|---------------------|---------------------|
| Cys <sup>a</sup> | 1.7(2) <sup>b</sup> | 1.7(2) <sup>b</sup> |
| Asp              | 1.1(1)              | 3.1(3)              |
| Met <sup>a</sup> | 0.0(0)              | 0.8(1)              |
| Thr              | 3.7(4)              | 2.1(2)              |
| Ser              | 2.0(2)              | 2.5(2)              |
| Glu              | 1.2(1)              | 2.6(2)              |
| Gly              | 4.9(5)              | 1.4(1)              |
| Ala              | 4.0(4)              | 6.0(6)              |
| Val              | 2.0(2)              | 1.8(2)              |
| Leu              | 2.8(3)              | 0.5(0)              |
| His              | 2.7(3)              | 0.2(0)              |
| Arg              | 0.1(0)              | 1.0(1)              |
| Pro              | 4.6(5)              | 2.1(2)              |

<sup>a</sup> 過ギ酸酸化後、加水分解してアミノ酸分析を行ない、Cys はシステイン酸として、Met はメチオニンスルフォンとして検出した。Tyr や Trp は過ギ酸酸化により分解されてしまうので、これらのアミノ酸は検出されなかった。

<sup>b</sup> ( )内の数値は、Paim I のアミノ酸配列に基づいて計算した値である。

#### 第4節 考察

S-S結合をもつタンパク質を酵素消化する場合、S-S結合の交換が起こらないように、通常は酸性条件下で消化を行なう。しかし、熱変性した Paim I を基質特異性の高い *Staphylococcus aureus* V8 protease で pH 4.0、6.9、8.8 で消化を試みたが、pH 8.8 の場合しか消化できなかった。pH 8.8 では S-S 結合の交換が心配されたが、消化で得られたペプチド混合物の FABMS や分画して得られたペプチドのアミノ酸分析、FABMS では S-S 結合の交換を示す結果は得られなかった。従って、一連の実験では、Paim I の S-S 結合の交換はなかったと結論できる。

図 14 に、Paim I と構造が類似する  $\alpha$ -アミラーゼインヒビターである Haim II<sup>33)</sup>、Hoe-467A<sup>34)</sup>、Z-2685<sup>35)</sup> の一次構造を Paim I の一次構造とあわせて示した。これからもわかるように、この4つの構造は非常に高いホモロジーを示しており、特に活性発現部位とされている Trp(15)-Arg-Tyr(17) や Cys 残基の位置は、4つともに共通している。実験の結果、Paim I の S-S 結合は Cys(8)-Cys(24)、Cys(42)-Cys(70) であることがわかり、Haim II、Hoe-467A、Z-2685 の S-S 結合の位置と同じであることが明らかになった。このことから、これら4つのインヒビターは高次構造<sup>41)・44)</sup>も類似していると推定される。

Paim I を消化して得られたペプチド混合物の FAB マススペクトルでは、S-S 結合を持つすべてのペプチドの  $[M+H]^+$  が検出されたわけではなく、

Cys(42) と Cys(70) の間の S-S 結合の存在を示すピークは観測されたが、もう一方の S-S 結合を含むペプチドの  $[M+H]^+$  は観測されなかった。しかし、酵素消化で得られたペプチドを HPLC で分画することにより、Cys(8)-Cys(24) で S-S 結合したペプチド Ala(1)-Glu(13)+Ser(14)-Asp(26) の  $[M+H]^+$  も FABMS で検出できた。これは、グリセリンをマトリックスとして用いたペプチド混合物の FAB マススペクトルでは、疎水性のペプチドの  $[M+H]^+$  は観測されやすいが、親水性のペプチドの  $[M+H]^+$  は観測されにくいことによると考えられる。

Naylor らは、ペプチド混合物の FABMS で  $[M+H]^+$  が検出されるか否かを、各ペプチドの親水性／疎水性を Bull & Breese のインデックス（以下、B & B index とする）<sup>51)</sup> と関連づけている<sup>48)</sup>。親水性のペプチドと疎水性のペプチドの混合物の FABMS 測定を行なうと、グリセリンの液滴の表面に疎水性のペプチドが、液滴の内部に親水性のペプチドが存在しやすくなる。この状態で FABMS 測定を行なうと、表面にある疎水性のペプチドが Xe 原子によりはじき出されやすいので、その  $[M+H]^+$  が検出されやすく、液滴の内部に存在する親水性のペプチドの  $[M+H]^+$  は検出されにくい (ion suppression effect)。しかし、これらのペプチドをそれぞれ単離してしまえば液滴の表面での分子種の局在化はなくなるので、親水性のペプチドでも FABMS で  $[M+H]^+$  を検出できるようになる。Naylor らはペプチドの親水性／疎水性の指標として、Bull & Breese が算出した、アミノ酸の水溶液において溶質であるアミノ酸を水溶液の内部から空気と水の界面に運ぶのに必

要なエネルギーを用いている。すなわち、各ペプチドを構成するアミノ酸の B & B index の数値を加算して、得られた値を構成するアミノ酸の数で割ってそれぞれのペプチドの親水性／疎水性の指標と定義している。この値が正で絶対値が大きいほど親水性が高く、負で絶対値が大きいほど疎水性が高いことを示している。Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られた各ペプチドについてこのインデックスを求めると表 7 のようになる。表 7 の質量数は monoisotopic molecular peak の exact mass で表示してある。

表7 Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチドの Bull and Breese のインデックスと各ペプチドの図 16 での  $[M+H]^+$  の検出の可否

| フラグメント                          | Bull & Breese<br>インデックス <sup>a</sup> | $[M+H]^+$<br>理論値   | 図 16 で $[M+H]^+$ の<br>検出可(+)<br>否(-) |
|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Ala(1)-Glu(13)                  | -23                                  | 1366.6             | +                                    |
| Ser(14)-Asp(26)                 | +280                                 | 1472.6             | -                                    |
| Thr(27)-Asp(36)                 | -36                                  | 1068.6             | +                                    |
| Ala(37)-Glu(55)                 | +181                                 | 1698.8             | +                                    |
| Gly(56)-Glu(60)                 | -190                                 | 538.2 <sup>b</sup> | c                                    |
| His(61)-Glu(65)                 | +526                                 | 562.2 <sup>b</sup> | c                                    |
| His(66)-Glu(73)                 | +128                                 | 1366.6             | +                                    |
| Ala(1)-Glu(13)+Ser(14)-Asp(26)  | +128                                 | 2836.2             | -                                    |
| Gly(37)-Glu(55)+His(61)-Ser(73) | +159                                 | 3066.4             | +                                    |
| Gly(37)-Glu(55)+His(66)-Ser(73) | +91                                  | 2523.2             | +                                    |

<sup>a</sup> 各アミノ酸の水溶液において、溶質であるアミノ酸を水溶液の内部から空気と水の界面に運ぶのに必要なエネルギー  $\Delta F$  をそれぞれのペプチドについて合計し、構成するアミノ酸の数で割った数値

<sup>b</sup> HPLC で分取した後に測定した FABMS で得られた質量数

<sup>c</sup> Paim I を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチド混合物については、 $m/z$  1000 から  $m/z$  5000 までの質量範囲で FABMS 測定を行なったので、図 16 のスペクトルでは検出されていない。

図 16 の FAB マススペクトルでは、表 7 で負の値を示しているペプチドは  $[M+H]^+$  がすべて検出されている。一方、消化によって得られた混合物の FAB マススペクトル (図 16) では検出されず、HPLC で分画した後の FAB マススペクトル (図 18) では検出されたフラクション (f) のペプチド Ala(1)-Glu(13)+Ser(14)-Asp(26) のインデックスは +128 と比較的大きな正の値となっている。このペプチドは親水性が高いために、混合物の FABMS では  $[M+H]^+$  が検出されなかったと考えられる。しかし、フラクション (d) のペプチド Gly(37)-Glu(55)+His(61)-Ser(73) は、このインデックスが +159 と大きな正であるにもかかわらず、混合物の FABMS でもその  $[M+H]^+$  を検出できている。従って、この Naylor らの説は絶対的なものではなく、ペプチド混合物の FABMS を測定する時のめやすと考えられる。

グリセリンをマトリックスとするペプチド混合物の FABMS でその  $[M+H]^+$  をすべて検出できない場合には、グリセリンよりも低極性のニトロベンジルアルコールをマトリックスに用いたり、添加物を加えたりして種々の測定を試みることにより、検出されていなかった  $[M+H]^+$  を検出できるようになる可能性がある。今回は HPLC により精製した後、アミノ酸分析も行なって、FABMS の結果から決定した S-S 結合の位置を確認することも目的の一つであったので、FABMS の種々の測定条件を検討せずに、HPLC での分取を行ない、FABMS で得られるペプチドの分子量から S-S 結合の位置を決定した。また、ペプチドの分子量決定に LC/MS を利用すれば

分取の手間が省けるので、より迅速にタンパク質の S-S 結合の位置を決定できると考えられる。そして、分子量がもっと大きなタンパク質についてであっても、LC/MS を用いることにより S-S 結合の位置を決定できると予想される。

### 第3章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim II の一次構造決定

#### 序

Paim II は Paim I と同じ *Streptomyces corchorushii* の培養液から単離された  $\alpha$ -アミラーゼインヒビターで、その活性は Paim I と同様にブタ、ウシ、イヌ、ウマの  $\alpha$ -アミラーゼは阻害するが、ヒトの  $\alpha$ -アミラーゼは阻害しない<sup>29)~32)</sup>。Paim II は Paim I と同様にポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一のバンドとなり、その等電点は pH 4.0 で、Paim I の pH 4.2 とは若干異なる値を示す<sup>31)</sup>。Paim II のアミノ酸分析値は Paim I とはほとんど同じである<sup>31)</sup> (表 2)。以上の点と、同じ培養液から単離されたという点を考え合わせると、Paim II は N 末端もしくは C 末端部分だけが Paim I と異なる予想される。従って、Paim II の場合には全一次構造を決定する必要はなく、Paim I と比べて一次構造の異なる部分についてのみ決定すればよいと思われる。このような考えのもとに、以下のように研究を進めることにした。

- 1) Paim II の S-S 結合を還元カルボキシメチル化し、分子量を FABMS で決定する。
- 2) RCM-Paim II を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチドの分子量を FABMS で決定する。
- 3) RCM-Paim I を同様に処理して得られるペプチドの分子量と比較し、分子量の一致しないペプチドのアミノ酸配列をタンデム MS で決定する。
- 4) 分子量が一致するペプチドで構成される部分は、RCM-Paim I と同じ構造

をしていると推定されるので、その確認を以下のように行なう。  
RCM-Paim II をキモトリプシンで消化して得られるペプチドの分子量を  
FABMS で決定し、すべてのペプチドが Paim II の一次構造に対応すること  
を確認する。

### 第1節 RCM-Paim II の FABMS

Paim I と同様に Paim II を還元カルボキシメチル化して RCM-Paim II を得  
た。図 19 に RCM-Paim II の  $[M+H]^+$  付近の FAB マススペクトルを示す。

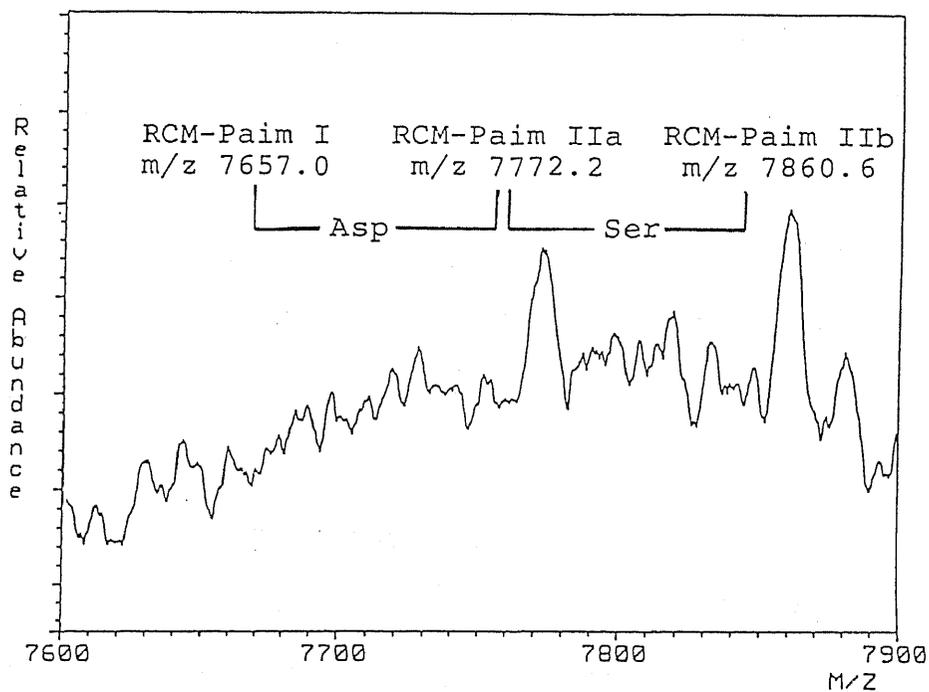


図 19 RCM-Paim II の  $[M+H]^+$  付近の FAB マススペクトル

ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動の結果から、Paim II は単一のタンパク質と考えられていたが<sup>31)</sup>、FABMSでは  $m/z$  7772.2 (RCM-Paim IIa) と  $m/z$  7860.6 (RCM-Paim IIb) に  $[M+H]^+$  が検出されている。このことは、RCM-Paim II は2種類のタンパク質の混合物であることを示している。RCM-Paim IIa の  $[M+H]^+$  は RCM-Paim I の  $[M+H]^+$  ( $m/z$  7657.0) よりも Asp 残基1つ分に相当する 115.0 だけ大きく、RCM-Paim IIb はさらに Ser 残基ほぼ1つ分に相当する 88.4 だけ大きいことがわかる。Paim II と Paim I は同じ培養液から単離され、同様の阻害活性を示し、その物理化学的性質も類似しているため<sup>31)</sup>、Paim IIa は Paim I より Asp 残基1つ分大きく、Paim IIb は Paim IIa よりさらに Ser 残基1つ分大きいと推定される。RCM-Paim IIa と RCM-Paim IIb の  $[M+H]^+$  の質量数の差 88.4 マスは Ser 残基1つ分の質量数より 1.4 マス大きい。このことについては以下の様に考えた。二重収束型の装置による FABMS 測定の際、磁場のわずかな振れをなくすことはできず、この磁場の振れのために測定誤差が生じてしまう。この測定誤差を仮に測定質量数の 0.02% とすると、質量数 1000 に対しての測定誤差は 0.2 マスユニットであるが、質量数 7000 に対しての測定誤差は 1.4 マスユニットとなる。また、高質量になるほど検出されるピークの強度は弱くなり、ノイズが大きくなる。そのため、高質量域のマススペクトルでは低質量域の場合に比べて S/N が悪くなり、ピーク判定が難しくなる。図 19 に示すように、Paim II の  $[M+H]^+$  領域の FABMS の測定は、ピークの強度を強くするためにスリットを広げ、分解能 500 で行なっているため、

得られた分子量は average molecular weight である。これは、低質量域 ( $m/z < 3000$ ) でピーク強度の強い場合の 1 マスユニットの分解能での monoisotopic molecular weight の測定の場合と比べて、測定誤差が大きくなることが考えられる。以上のことから、RCM-Paim IIb の分子量は RCM-Paim IIa よりも Ser 残基 1 つ分大きいと考えた。同じ培養液から単離されたタンパク質で、そのアミノ酸配列にいくつかのバラエティがあるのは、一般的に N 末端や C 末端が不揃いの場合が多い。Paim II の場合も同様に考え、Asp、Ser 残基は Paim II の N 末端もしくは C 末端に位置していると考えた。もし、これらの残基が RCM-Paim I の N 末端にあるならば RCM-Paim II を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化すると下記の A のペプチドが得られるはずであり、C 末端にあるならば B のペプチドが得られるはずである。

N 末端にある場合、*Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチド A

1

10

(Ser, Asp)-Ala-Ser-Glu-Pro-Ala-Pro-Ala-CmCys-Val-Val-Met-Tyr-Glu (MW:1625.7)

Asp-Ala-Ser-Glu-Pro-Ala-Pro-Ala-CmCys-Val-Val-Met-Tyr-Glu (MW:1538.6)

C 末端にある場合、*Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチド B

61

70

His-Gly-His-Pro-Asp-His-Leu-Ala-Leu-CmCys-Pro-Ser-Ser-(Asp, Ser) (MW:1629.7)

His-Gly-His-Pro-Asp-His-Leu-Ala-Leu-CmCys-Pro-Ser-Ser-Asp (MW:1542.6)

第2節 RCM-Paim II の *Staphylococcus aureus* V8 protease による消化と

FABMS

RCM-Paim II を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化し、得られたペプチドを HPLC で6つのフラクション (S1-S6) に粗く分取した。これらについて FABMS 測定を行なった結果を表8に示す。表8の質量数は monoisotopic molecular peak の exact mass で表示してある。

表8 RCM-Paim II を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られたペプチドの  $[M+H]^+$

| ペプチド | $[M+H]^+$<br>観測値 | $[M+H]^+$<br>理論値 | RCM-Paim I の配列で<br>該当する箇所 |
|------|------------------|------------------|---------------------------|
| S1   | 562.3            | 562.2            | His(61)-Asp(65)           |
| S2   | 538.3            | 538.2            | Gly(56)-Glu(60)           |
| S3   | 1068.7           | 1068.5           | Thr(27)-Asp(36)           |
| S3   | 1530.8           | 1530.6           | Ser(14)-Asp(26)           |
| S4   | 885.3            | 885.4            | His(66)-Ser(73)           |
| S4   | 1428.5           | 1428.6           | His(61)-Ser(73)           |
| S5   | 1757.0           | 1756.8           | Gly(37)-Glu(55)           |
| S6   | 1539.7           | 1539.6           | なし                        |
| S6   | 1626.8           | 1626.7           | なし                        |

9つのペプチドの  $[M+H]^+$  が検出されたが、これらの中で RCM-Paim I を同様に消化して得られるペプチドの  $[M+H]^+$  と異なる値を示したのは S6 の2つのペプチドで、 $m/z$  1626.8 と  $m/z$  1539.7 に  $[M+H]^+$  が観測された（図20）。このことは、Asp および Ser 残基は RCM-Paim I の N 末端方向についていることを示している。

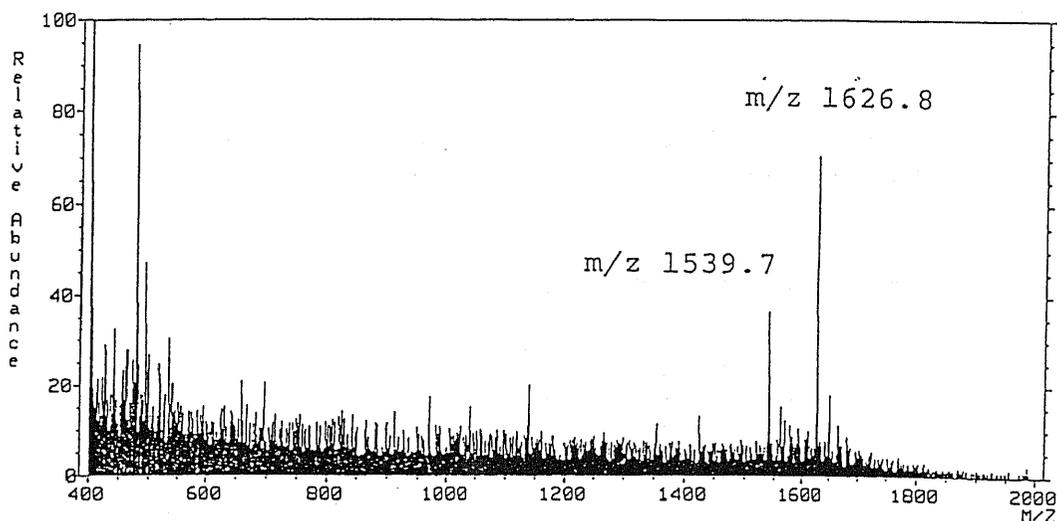


図20 ペプチド S6 の FAB マススペクトル  
質量数は monoisotopic molecular peak の exact mass で表示してある。

Asp、Ser の位置を確認するために、 $m/z$  1626.8 と  $m/z$  1539.7 をプリカーサーイオンとしてタンデム MS を測定することにした。

### 第3節 RCM-Paim II の N 末端部分のペプチドのアミノ酸配列

図21 に  $m/z$  1626.8 をプリカーサーイオンとして測定したドーターイオンスペクトルを示す。図に示した略号は、図3、4 の Roepstorff らの命名法

19)に基づいている。

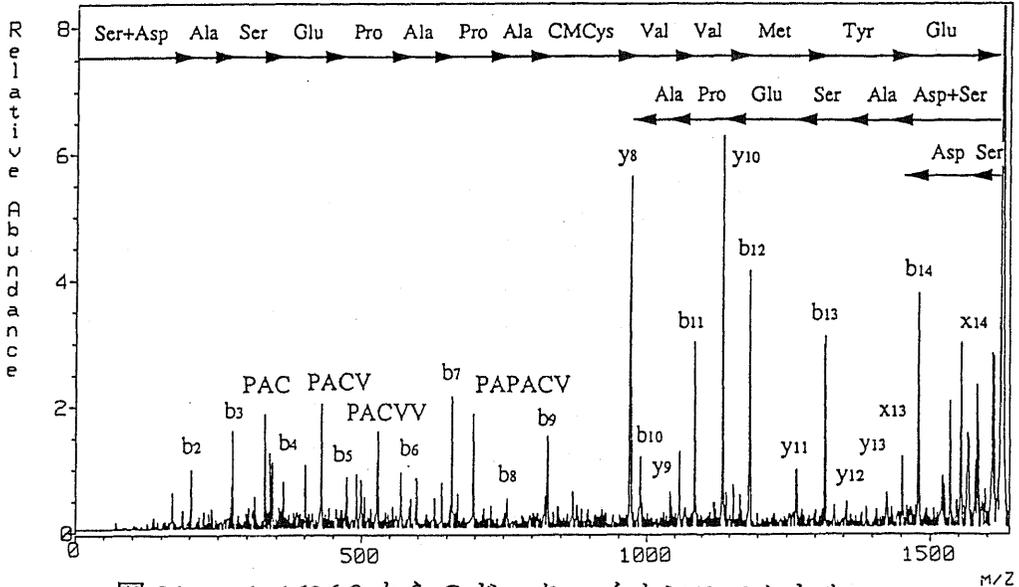


図 21  $m/z$  1626.8 からのドータイオンスペクトル

$b_2$ 、 $b_3$ 、 $b_4$ 、 $b_5$ 、 $b_6$ 、 $b_7$ 、 $b_8$ 、 $b_9$ 、 $b_{10}$ 、 $b_{11}$ 、 $b_{12}$ 、 $b_{13}$ 、 $b_{14}$ 、 $x_{14}$  のイオンから、MW 1625.8 のペプチドのアミノ酸配列は Ser-Asp-Ala-Ser-Glu-Pro-Ala-Pro-Ala-CmCys-Val-Val-Met-Tyr-Glu であると決定できた。同様にもう一方の  $m/z$  1539.7 からのドータイオンスペクトルでは、 $b_2$ 、 $b_3$ 、 $b_4$ 、 $b_5$ 、 $b_6$ 、 $b_7$ 、 $b_8$ 、 $b_9$ 、 $b_{10}$ 、 $b_{11}$ 、 $b_{12}$ 、 $b_{13}$  が検出され、このペプチドのアミノ酸配列は (Asp, Ala)-Ser-Glu-Pro-Ala-Pro-Ala-CmCys-Val-Val-Met-Tyr-Glu であると決定できた。しかし、N 末端部分の配列が Asp-Ala- か Ala-Asp- かは決定できなかった。そこで、Paim II をそのままアミノ酸シーケンサーで分析したところ、N 末端から 1 段目のアミノ酸として Ser と Asp が検出された。MW 1627.8 のペプチドの N 末端がすでに Ser と決定されているので、MW 1528.7 のペプ

チドのN末端は Asp となる。従って、このペプチドの N 末端部分の配列を Asp-Ala- と決定した。図 22 にその結果をまとめる。

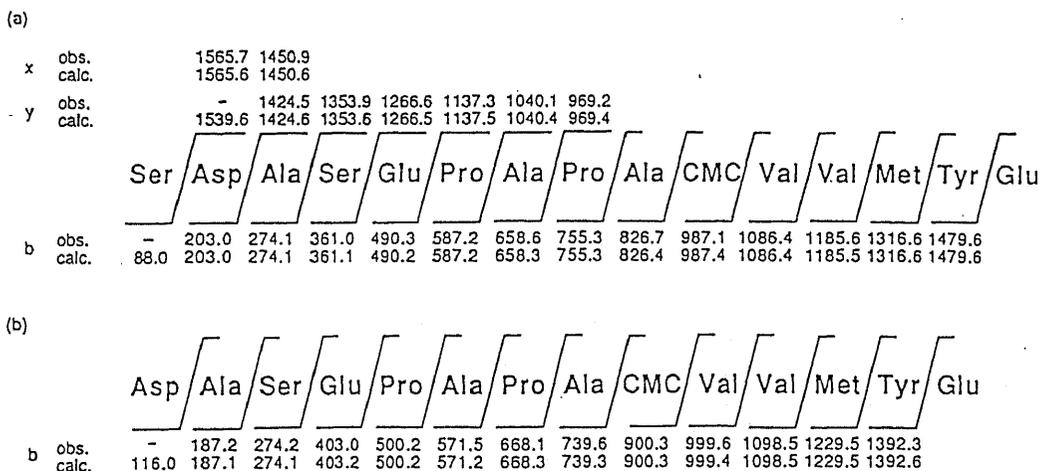


図 22 (a) m/z 1626.8 と (b) m/z 1539.7 からのドーターイオンスペクトルから決定された N 末端ペプチドのアミノ酸配列  
 数値は各ペプチドのタンデム MS で得られたドーターイオンの実測値と理論値 (アミノ酸配列から計算)

#### 第 4 節 RCM-Paim II の全一次構造の確認

RCM-Paim II の全一次構造を確認するために、RCM-Paim II をキモトリプシンで消化し、得られたペプチドの分子量を FABMS で求め、その結果を表 9 にまとめた。表 9 の質量数は monoisotopic molecular peak の exact mass で表示してある。

表9 RCM-Paim II をキモトリプシンで消化して得られるペプチドの [M+H]<sup>+</sup>

| ペプチド | [M+H] <sup>+</sup><br>観測値 | [M+H] <sup>+</sup><br>理論値 | RCM-Paim II の配列で<br>対応する箇所 |
|------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| C1   | 421.1                     | 421.2                     | Glu(15)-Trp(17)            |
| C2   | 740.4                     | 740.3                     | Glu(15)-Tyr(19)            |
| C3   | 1411.0                    | 1410.6                    | Asp( 2)-Tyr(14)            |
| C4   | 1498.0                    | 1497.6                    | Ser( 1)-Tyr(14)            |
| C5   | 1728.1                    | 1727.8                    | Leu(60)-Ser(75)            |
| C6   | 1745.1                    | 1744.8                    | Thr(20)-Tyr(36)            |
| C7   | 2219.9                    | 2220.0                    | Gln(37)-Tyr(59)            |

すべてのペプチドが、一次構造にあてはまることから、Paim II の一次構造を図 23 に示した構造であると決定した。

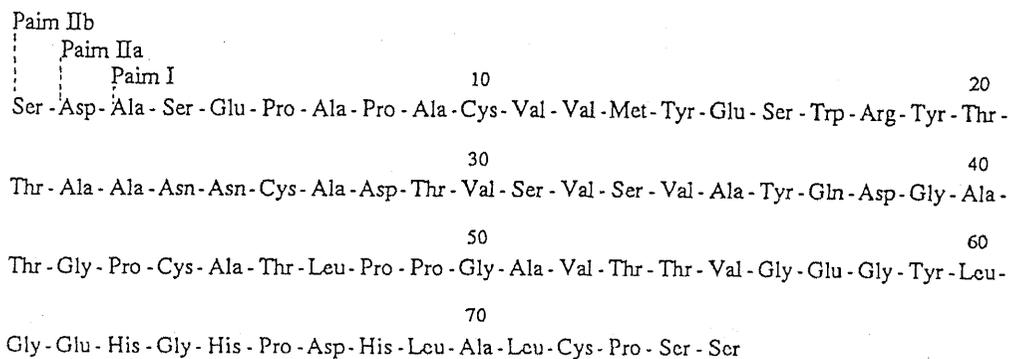


図 23 Paim II の一次構造

## 第5節 考察

タンパク質の一次構造決定に従来から使われていた方法では、単一のタンパク質を対象としているため、まず、最初にタンパク質の精製が必要であった。本研究では、単一のタンパク質であると思われていた Paim II が、実験を進めていくにつれて2種類のタンパク質であることがわかったが、それぞれを単離せずにタンデム MS を利用してアミノ酸配列を決定できた。混合物以外にもタンデム MS は以下のようなタンパク質やペプチドの構造決定には有効である。N末端が保護されているタンパク質やペプチド<sup>52), 53)</sup>、部分修飾を受けているペプチドや翻訳後に部分修飾を受けているタンパク質<sup>52), 54)</sup>、環状ペプチド<sup>55), 56)</sup>などの場合である。これらの例は、タンデム MS を有効に用いることによってアミノ酸シーケンサーを用いる場合に比べ、構造決定に要する時間や労力を少なくし、しかも正確に構造決定を行なえることを示している。

本研究では、Paim II を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチドを、HPLC でそれぞれ単離してから FABMS により分子量を決定した。消化によって得られるペプチドの分子量を、混合物のままでも FABMS を測定することにより決定できれば構造決定に要する時間や労力は非常に少なくなる。しかし、第2章第4節で論じた "ion suppression effect" のために、混合物のままではすべてのペプチドの  $[M+H]^+$  を検出できなかったため HPLC による分取を行なった。また、タンデム MS でアミノ酸配列の解析が可能なドータイオンスペクトルを得るには、ピーク強

度が強いプリカーサーイオンが必要である。逆相系のカラムを用いて分取を行なうと、各画分には極性の近いペプチドしか含まれなくなるので、"ion suppression effect" が弱くなり、得られるイオン強度が強くなるので、タンデム MS の測定には大変有利になる。また、オンラインで HPLC と FABMS を連結した Continuous-flow FAB(CF-FAB)<sup>57)</sup> や FRIT-FAB<sup>17), 58)</sup> を用いれば、"ion suppression effect" を少なくすることができるので、HPLC での分取なしに親水性のペプチドでもその  $[M+H]^+$  を検出できるようになると考えられる。

## 第4章 ウシ血清アルブミンの一次構造の訂正

### 序

天然のタンパク質の機能を解明する場合のみならず、生体に対して機能をもつタンパク質を遺伝子工学やタンパク質工学で設計する場合、タンパク質の高次構造が重要なポイントとなる。タンパク質の高次構造についての研究は、X線結晶解析<sup>59)</sup>やNMR<sup>60)</sup>を用いて一般的に行なわれている。これらの研究を行なうには、目的のタンパク質の一次構造が明らかになっていることが必要で、誤った一次構造を基にした場合には、正しい高次構造が導かれず、タンパク質の活性発現機構について誤った推論がなされてしまう可能性がある。そのため、DNAの塩基配列のみから一次構造が推定されているタンパク質や、自動の場合に比べ誤りの生じる可能性が高い手動のエドマン分解法で決定されているタンパク質に関しては、高次構造の研究の前に迅速に一次構造の確認をする必要がある。

第3章までに述べたタンパク質の構造研究は、いずれも分子量が8000以下の小さなタンパク質に関するものであった。そのため、目的のタンパク質を酵素消化して得られるペプチドを、HPLCでそれぞれ分取するのはそれほど困難ではなかった。しかし、機能をもつタンパク質の多くは分子量が数万のものであり、先に述べた方法をそのまま適用することは難しい。そこで、分子量数万のタンパク質の一次構造を迅速に確認する手法を確立することを目指して、ウシ血清アルブミンを試料としてLC/MSを用いて検

討を行なうことにした。

アルブミンは血漿中のタンパク質の約 60 % を占め、浸透圧調節や物質輸送に関与している。ウシ血清アルブミン (BSA) は、582 残基からなり、その一次構造は 1982 年までにタンパク質側からエドマン分解法を用いて研究され、図 24 のように決定されている<sup>61)~63)</sup>。一方、ヒトやラットの血清アルブミン (HSA、RSA) の構造は、遺伝子側から図 24 のように決定されている<sup>64), 65)</sup>。この 3 者の一次構造を比較すると、ホモロジーが非常に高いことがわかるが、BSA の一次構造の中で疑問に思われる箇所がいくつかある。例えば、116 番目と 156 番目のアミノ酸残基については BSA のみが欠損している。94 番目と 95 番目の配列順序が HSA、RSA では -Gln-Glu- であるのに対し、BSA では -Glu-Gln- である。このほかにも、BSA のみか他の 2 つと異なるアミノ酸残基となっている箇所がいくつか存在する。

以上の点から、BSA の一次構造を迅速に確認し、誤っている箇所については訂正することを目的として以下のような方法で実験を行なった。

- 1) BSA の分子量を ESIMS で決定する。
- 2) BSA の S-S 結合を還元カルボキシメチル化した後、トリプシンで消化して得られるペプチドについて FRIT-FAB LC/MS を測定して、HPLC で検出された各ピークに含まれるペプチドの分子量を決定する。得られたペプチドの分子量を RCM-BSA の一次構造と照らし合わせ、また酵素の特異性を考慮して、各ペプチドが元のタンパク質のアミノ酸配列のどの部分に相当

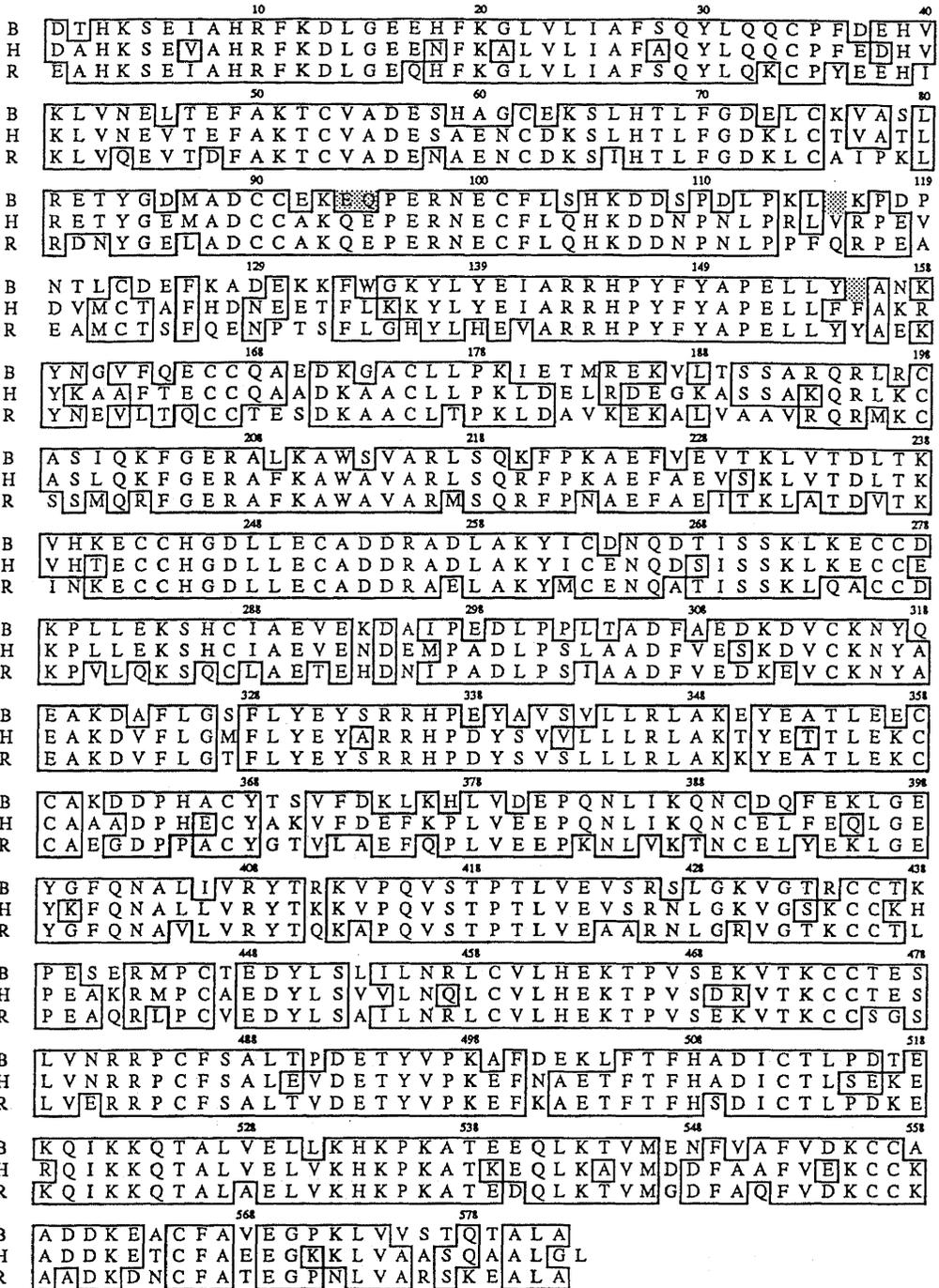


図 24 BSA、HSA、RSA の一次構造

アミノ酸残基の番号は本研究により訂正される前の数字を用いている。

するかを決定する。

3) 2) の結果、該当するアミノ酸配列が複数ある場合、もしくは該当するアミノ酸配列がない場合には、そのペプチドについてタンデム MS もしくは気相法のエドマン分解法を用いてアミノ酸配列を決定する。

4) 2)、3) で一次構造を確認できなかった部分については、消化に用いる酵素をリジルエンドペプチダーゼ（タンパク質・ペプチドのペプチド結合を Lys 残基の C 末端側で切断する酵素）または *Staphylococcus aureus* V8 protease にかえて消化し、得られるペプチドの分子量を FRIT-FAB LC/MS で決定する。得られた分子量と酵素の特異性を考え合わせて、各ペプチドがもとのアミノ酸配列のどの部分に相当するかを決定する。

### 第 1 節 BSA の ESIMS

BSA の分子量を決定する目的で、ESIMS を測定した。その結果、図 25 のように多価イオンの形で分子量を示すピークを検出できた。このスペクトルから分子量を算出すると MW 66465.8 となり、既に決定されている 582 残基のアミノ酸からなる BSA の一次構造<sup>61)~63)</sup>から計算される MW 66267.1 より 198.7 大きい。この観測値と理論値の差は 0.3% を超えているので、ESIMS の精度<sup>66)</sup>を考えると、測定誤差と判断するには大きいものである。従って、この差は報告されている BSA のアミノ酸配列に誤りがあるため生じたものと考え、BSA の全一次構造を見直し、誤っている箇所を訂正することとした。

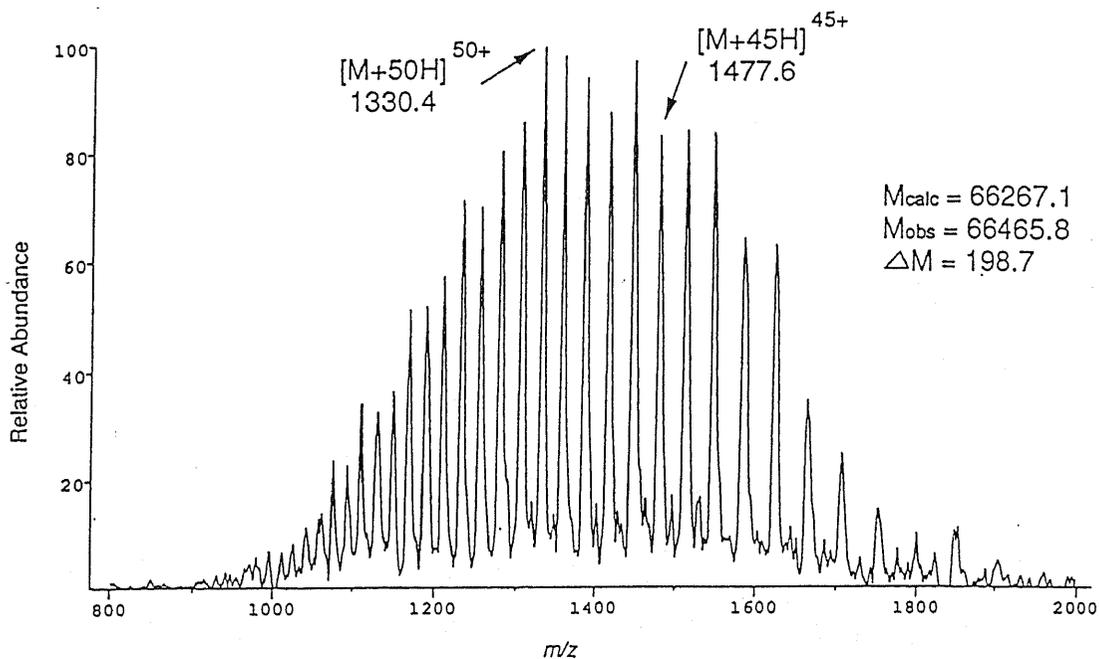


図 25 BSA の ESI マススペクトル

## 第 2 節 トリプシン消化で得られるペプチドの FRIT-FAB LC/MS

BSA の S-S 結合を還元カルボキシメチル化し、トリプシンで消化 (37℃、8 時間) を行ない、得られたペプチド混合物について FRIT-FAB LC/MS を測定した。UV 210 nm で検出した HPLC のクロマトグラムを図 26 に示す。

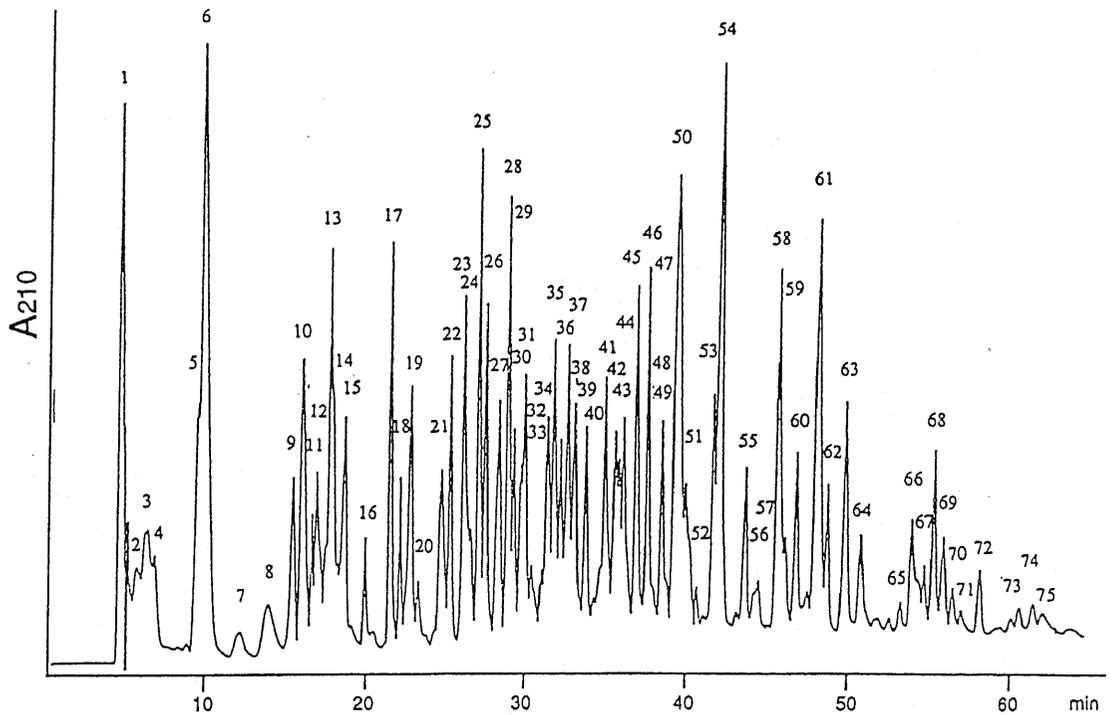


図 26 RCM-BSA をトリプシンで消化して得られたペプチドの HPLC クロマトグラム

図 26 に示したよ 75 本のピークに含まれるペプチドの分子量を FRIT-FAB LC/MS で決定した。ここで得られた分子量と酵素の特異性を考え合わせて、各ペプチドが RCM-BSA のアミノ酸配列のどの部分に相当するかを求めた。その結果を表 10 に示す。表 10 および本文中に示したペプチドの位置を示す数字は、本研究により訂正された一次構造に基づいている。C はカルボキシメチルシステインを示している。また、質量数は monoisotopic molecular peak の exact mass で表示してある。

表 10 RCM-BSA をトリプシンで消化して得られたペプチドの [M+H]<sup>+</sup>

| Peak No. | position  | sequence            | [M+H] <sup>+</sup> | [M+H] <sup>+</sup> |
|----------|-----------|---------------------|--------------------|--------------------|
|          |           |                     | calculated         | observed           |
| T-1      | 1 - 4     | DTHK                | 500.2              | 500.2              |
| T-9      | 5 - 10    | SEIAHR              | 712.4              | 712.5              |
| T-37     | 11 - 20   | FKDLGEEHFK          | 1249.6             | 1249.3             |
| T-69     | 21 - 27   | GLVLIAF*            | 732.5              | 732.5              |
| T-46     | 28 - 41   | SQYLQQCPFDEHVK*     | 1779.8             | 1780.4             |
| T-53     | 42 - 51   | LVNELTEFAK          | 1163.6             | 1163.4             |
| T-17     | 52 - 64   | TCVADESHAGCEK       | 1465.5             | 1465.1             |
| T-58     | 65 - 76   | <u>SLHTLFGDELCK</u> | 1420.7             | 1420.4             |
| T-15     | 77 - 81   | VASLR               | 545.3              | 545.5              |
| T-28     | 99 - 106  | NECFLSHK            | 1035.4             | 1035.3             |
| T-21     | 107 - 114 | DDSPDLPK            | 886.4              | 886.4              |
| T-50     | 115 - 127 | LKPDPNTLCDEFK       | 1577.8             | 1577.4             |
| T-24     | 133 - 136 | FWGK                | 537.3              | 537.3              |
| T-43     | 137 - 143 | LYYEIAR             | 927.5              | 927.4              |
| T-12     | 144 - 147 | RHPY*               | 572.3              | **572.4            |
| T-66     | 148 - 156 | FYAPELLYY*          | 1178.6             | **1178.3           |
| T-42     | 160 - 173 | YNGVFQECCQAEDK      | 1749.7             | 1750.0             |
| T-34     | 174 - 180 | GACLLPK             | 759.4              | 759.4              |
| T-16     | 181 - 185 | IETMR               | 649.3              | 649.4              |
| T-1      | 186 - 187 | EK                  | 276.1              | 276.3              |
| T-15     | 188 - 194 | VLTSAR              | 733.4              | 733.5              |
| T-1      | 195 - 196 | QR                  | 303.2              | 303.3              |
| T-3      | 197 - 198 | LR                  | 288.2              | 288.3              |
| T-11     | 199 - 204 | CASIQK              | 707.3              | 707.4              |
| T-10     | 205 - 208 | FGER                | 508.2              | 508.3              |
| T-25     | 212 - 217 | AWSVAR              | 689.4              | 689.5              |
| T-22     | 218 - 224 | LSQKFPK             | 847.5              | 847.5              |
| T-31     | 225 - 232 | AEFVEVTK            | 922.5              | 922.4              |
| T-27     | 233 - 239 | LVTDLTK             | 789.5              | 789.5              |
| T-39     | 240 - 256 | VHKECCHGDLLECADDR   | 2116.8             | 2116.4             |
| T-6      | 257 - 261 | ADLAK               | 517.3              | 517.4              |
| T-26     | 262 - 273 | YICDNQDTISSK        | 1444.6             | 1444.3             |
| T-35     | 274 - 285 | LKECCDKPLLEK        | 1534.7             | 1534.6             |
| T-22     | 286 - 294 | SHCIAEVEK           | 1073.5             | 1073.3             |
| T-61     | 295 - 312 | DAIPEDLPPLTADFAEDK  | 1956.9             | 1957.0             |
| T-4      | 313 - 316 | DVCK                | 522.2              | 522.2              |

|      |           |                      |        |          |
|------|-----------|----------------------|--------|----------|
| T-67 | 323 - 335 | DAFLGSFLYEYSR        | 1567.7 | 1567.4   |
| T-55 | 336 - 347 | RHPEYAVSVLLR         | 1439.8 | 1439.4   |
| T-35 | 351 - 362 | EYEATLEECCA K        | 1504.6 | 1504.3   |
| T-41 | 363 - 375 | <u>DDPHACYTSVFDK</u> | 1555.6 | 1555.8   |
| T-45 | 378 - 388 | HLVDEPQNLIK          | 1305.7 | 1305.4   |
| T-18 | 389 - 396 | <u>QNCDOFEK</u>      | 1069.4 | 1069.5   |
| T-60 | 397 - 409 | LGEYGFQNALIVR        | 1479.8 | 1479.5   |
| T-50 | 413 - 427 | KVPQVSTPTLVEVSR      | 1639.9 | 1639.6   |
| T-4  | 428 - 431 | SLGK                 | 404.2  | 404.4    |
| T-2  | 432 - 435 | VGTR                 | 432.2  | 432.4    |
| T-13 | 436 - 444 | <u>CCTKPESER</u>     | 1168.5 | 1168.5   |
| T-60 | 445 - 454 | MPCTEDYLSL*          | 1229.5 | 1229.2   |
| T-15 | 455 - 458 | ILNR*                | 515.3  | 515.0    |
| T-30 | 459 - 465 | LCVLHEK              | 899.5  | 899.4    |
| T-8  | 466 - 471 | TPVSEK               | 660.3  | 660.4    |
| T-1  | 472 - 474 | VTK                  | 347.2  | 347.3    |
| T-27 | 475 - 483 | CCTESLVNR            | 1140.5 | 1140.3   |
| T-54 | 484 - 499 | RPCFSALTPDETYVPK     | 1881.9 | 1882.1   |
| T-10 | 500 - 504 | AFDEK                | 609.3  | 609.3    |
| T-48 | 505 - 509 | LFTFH*               | 664.3  | 664.3    |
| T-37 | 510 - 520 | ADICTLPDTEK*         | 1263.6 | 1263.3   |
| T-2  | 521 - 523 | QIK                  | 388.2  | 388.3    |
| T-55 | 524 - 533 | KQTALVELLK           | 1142.7 | 1142.4   |
| T-1  | 534 - 537 | HKPK                 | 509.3  | 509.4    |
| T-14 | 538 - 544 | ATEEQLK              | 818.4  | 818.4    |
| T-40 | 545 - 550 | TVMENF*              | 740.3  | 740.3    |
| T-23 | 551 - 556 | VAFVDK*              | 678.4  | 678.4    |
| T-30 | 557 - 563 | CCAADDK              | 841.3  | 841.4    |
| T-36 | 564 - 573 | EACFAVEGPK           | 1108.5 | **1108.2 |
| T-44 | 574 - 583 | LVVSTQ TALA          | 1002.6 | 1002.4   |

消化には TPCK(N-Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone) 処理 (キモトリプシン活性を除去する処理) したトリプシンを用いたにもかかわらず、若干のキモトリプシンの活性が見られ、表 10 の \* のようなペプチドの  $[M+H]^+$  が検出された。また、\_\_ を引いたペプチドの分子量は、FRIT-FAB LC/MS からは決定できず、HPLC でその画分を分取して FABMS 測定を行ない決定したものである。

### 第3節 タンデム MS および気相法エドマン分解法による該当するペプチドの決定

表 10 のうち、T-12、T-36 の MW 571.3 と MW 1107.2 については、酵素の特異性を考え合わせても該当するペプチドとしてそれぞれ2つの可能性が存在した。また、T-66 の MW 1177.3 に該当するペプチドは、図 24 の一次構造から検索しても、対応するアミノ酸配列を決定することができなかった。これら3つのペプチド（表 10 で MW に \*\* を付したペプチド）については、次のような方法で、それぞれ表 10 に示したアミノ酸配列であると決定した。

T-12 の  $m/z$  572.4 に  $[M+H]^+$  が観測されたペプチドについては、RHPY (Arg<sup>144</sup> から Tyr<sup>147</sup>) と QRLR (Gln<sup>195</sup> から Arg<sup>198</sup>) の2つの可能性が考えられた。そこで、T-12 の画分を HPLC で分取した後タンデム MS を測定し、アミノ酸配列を求めた。その結果、図 27 のようなドーターイオンスペクトルが得られ、このペプチドは RHPY (Arg<sup>144</sup> から Tyr<sup>147</sup>) であると決定した。

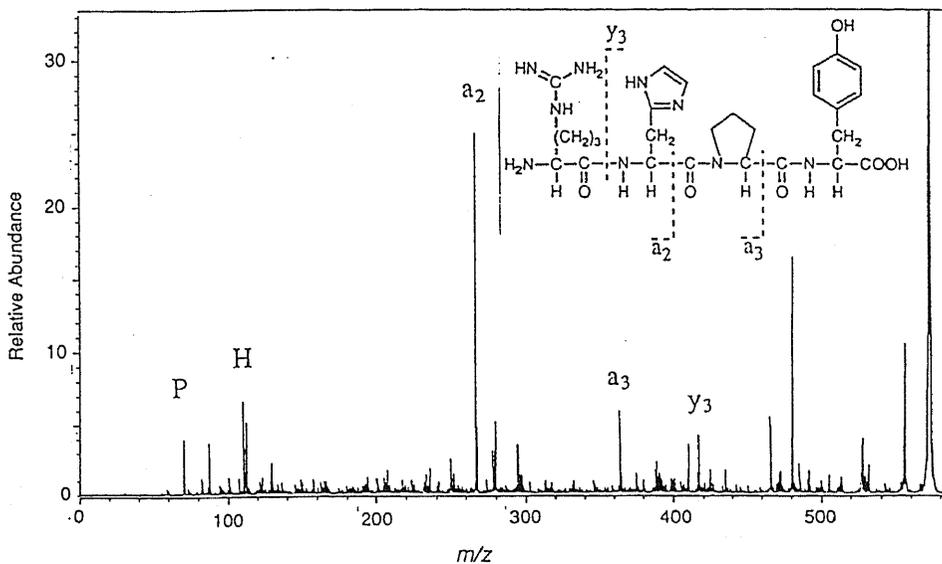


図 27 m/z 572.4 からのドーターイオンスペクトル

T-36 の m/z 1108.2 に  $[M+H]^+$  が観測されたペプチドについては、ADEKKFWGK (Ala<sup>128</sup> から Lys<sup>136</sup>) と EAC\*FAVEGPK (Phe<sup>564</sup> から Lys<sup>573</sup>) の 2つの可能性が考えられた (C\* はカルボキシメチルシステインを表している)。そこで、T-12 と同様に、T-36 の画分を HPLC で分取した後、タンデム MS を測定し、アミノ酸配列を求めた。その結果、-VEG- の配列が存在することを示すドーターイオンスペクトル (図 28) が得られ、このペプチドは EAC\*FAVEGPK (Phe<sup>564</sup> から Lys<sup>573</sup>) であると決定した。

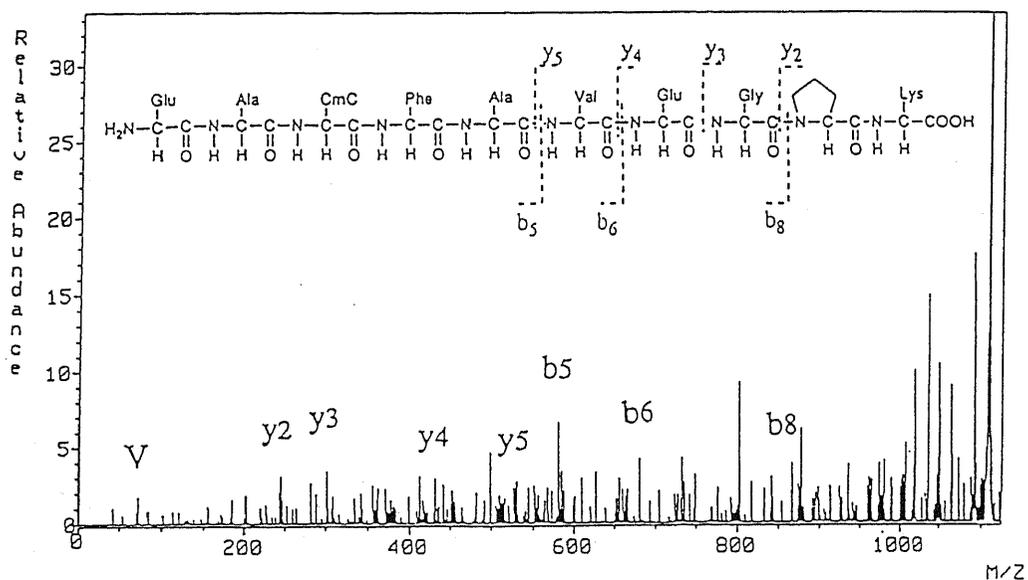


図 28  $m/z$  1108.2 からのドーターイオンスペクトル

T-66 の  $m/z$  1178.3 に  $[M+H]^+$  が観測されたペプチドについては、報告されている一次構造式からは対応するアミノ酸配列をもつペプチドを決定できなかった。そこで、T-66 の画分を HPLC で分取した後、気相法のエドマン分解法で分析し、アミノ酸配列を求めた。その結果、FYAPELLYY のアミノ酸配列であることがわかった。一方、このペプチドについて、タンデム MS を測定すると、-LYY の配列が存在することを示すドーターイオンスペクトル (図 29) が得られた。2 つの結果から得られたアミノ酸配列である FYAPELLYY の分子量を計算すると、1177.6 となり、FRIT-FAB LC/MS で得られた分子量 1177.3 とよく一致する。

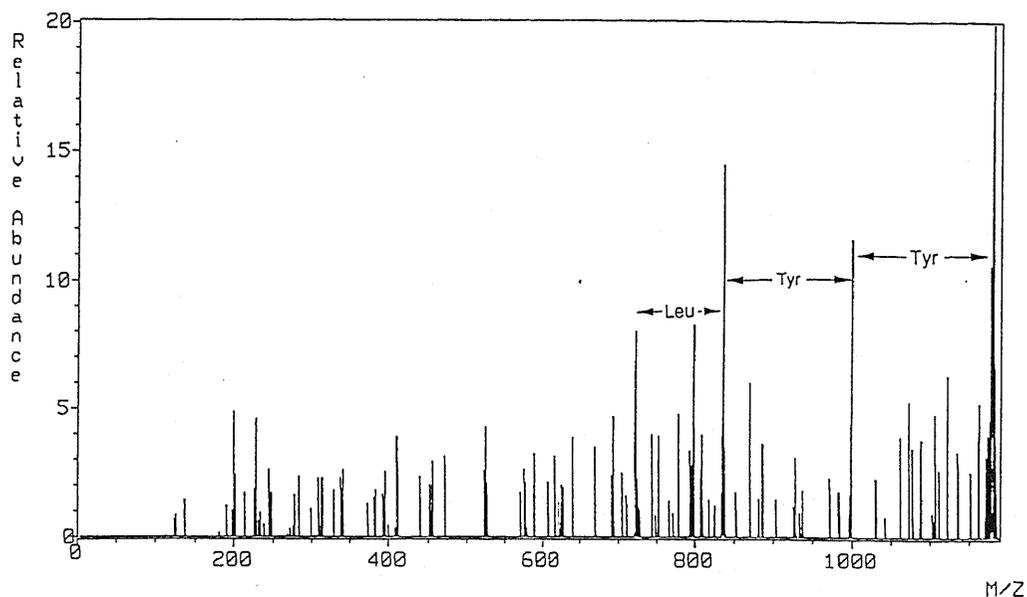


図 29  $m/z$  1178.3 からのドーターイオンスペクトル

このペプチドが BSA の一次構造のどこに対応するかを決定するために、図 24 に示した BSA、HSA、RSA の一次構造を比較すると、156 番目のアミノ酸残基については BSA のみが欠損していて、HSA、RSA のこの部分のアミノ酸配列（148 番目から 156 番目）はそれぞれ FYAPELLFF、FYAPELLYY となっていることがわかる。よって、T-66 の MW 1177.3 のペプチドは FYAPELLYY (Phe<sup>148</sup> から Tyr<sup>156</sup>) に該当し、図 24 の BSA の一次構造の 155 番目の Tyr の後にもう 1 残基 Tyr が存在することが明らかになった。

また、156 番目の Tyr と同様に、HSA、RSA のアミノ酸配列と比較して BSA のみに欠損している 116 番目のアミノ酸残基については、表 10 に示

すように T-50 の MW 1576.4 のペプチド LKPDNTLC\*DEFK の  $[M+H]^+$  が FRIT-FAB LC/MS で検出されていることより、この部分の構造は図 24 の通りであることが確認された。

この段階で 66 コのペプチドについて RCM-BSA の一次構造に該当する箇所を見つけることができ、全一次構造の 93% を確認することができた。確認できていない部分のアミノ酸配列は ETYGDMADC\*C\*EKEQPER (Glu<sup>82</sup> から Arg<sup>98</sup>)、ADEKK (Ala<sup>128</sup> から Lys<sup>132</sup>)、ANK (Ala<sup>157</sup> から Lys<sup>159</sup>)、NYQEAK (Asn<sup>317</sup> から Lys<sup>322</sup>)、YTR (Tyr<sup>410</sup> から Arg<sup>412</sup>) の、計 34 残基である。また、LK に該当するペプチドは 115 から 116 番目、274 から 275 番目、376 から 377 番目の 3 箇所あり、また、ALK (Ala<sup>209</sup> から Lys<sup>211</sup>) と LAK (Leu<sup>348</sup> から Lys<sup>350</sup>) は分子量からだけでは区別できない。従って、これらの部分については LK や ALK、LAK の配列を含むより大きなペプチドの分子量を確認することとした。そこで、残る 7% の部分のアミノ酸配列をもつペプチドの分子量を確認する目的で、異なる酵素で消化を行ない、得られたペプチドについて FRIT-FAB LC/MS の測定を行なった。

#### 第 4 節 リジルエンドペプチダーゼおよび *Staphylococcus aureus* V8

protease で消化して得られるペプチドの FRIT-FAB LC/MS

RCM-BSA をリジルエンドペプチダーゼで消化 (37°C、8 時間) を行ない、得られたペプチド混合物について FRIT-FAB LC/MS を測定し、各ピークについて含まれるペプチドの分子量を求めた。得られた分子量と酵素の特異

性を考え合わせて、RCM-BSAの一次構造にあてはめた。その結果、MW 2005.4、1673.8、2027.5のペプチドは、それぞれ VASLRETYGDMADC\* C\*EK (Val<sup>77</sup>から Lys<sup>93</sup>)、QEPERNEC\*FLSHK (Gln<sup>94</sup>から Lys<sup>106</sup>)、LGEYGFQNALIVRYTRK (Leu<sup>397</sup>から Lys<sup>413</sup>)のアミノ酸配列をもつペプチドに相当することがわかった。これにより、トリプシン消化によって得られたペプチドの分子量から確認されていなかったアミノ酸配列のうち、ETYGDMADC\*C\*EKEQPER (Glu<sup>82</sup>から Arg<sup>98</sup>)と YTR (Tyr<sup>410</sup>から Arg<sup>412</sup>)についてはその部分を含むペプチドの分子量を確認することができた。

また、RCM-BSAを *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化 (37℃、4時間) し、得られたペプチド混合物について FRIT-FAB LC/MS を測定し、各ピークについて含まれるペプチドの分子量を求めた。分子量と酵素の特異性を考え合わせて、RCM-BSAの一次構造にあてはめた。その結果、MW 608.2、1360.4、1721.1、2468.2、1360.2のペプチドはそれぞれ FKADE (Phe<sup>126</sup>から Glu<sup>130</sup>)、KKFWGKYLE (Lys<sup>131</sup>から Glu<sup>140</sup>)、LLYYANKYNGVFQE (Leu<sup>153</sup>から Glu<sup>166</sup>)、DLPPLTAFEDKDVCK\*KNYQE (Asp<sup>300</sup>から Glu<sup>320</sup>)、AKDAFLGSFLYE (Ala<sup>321</sup>から Glu<sup>332</sup>)のアミノ酸配列をもつペプチドに相当することがわかった。これにより、未確認であった ADEKK (Ala<sup>128</sup>から Lys<sup>132</sup>)、ANK (Ala<sup>157</sup>から Lys<sup>159</sup>)、NYQEAK (Asn<sup>317</sup>から Lys<sup>322</sup>)についてはその部分を含むペプチドの分子量を確認することができた。

LK、ALK、LAKの配列を含むペプチドについては以下のように確認した。Leu<sup>115</sup>-Lys<sup>116</sup>、Leu<sup>274</sup>-Lys<sup>275</sup>については RCM-BSA をトリプシン消化して得ら

れたペプチド LKPDNTLC\*DEFK (Leu<sup>115</sup> から Lys<sup>127</sup>)、LKEC\*C\*DKPLLEK (Leu<sup>274</sup> から Lys<sup>285</sup>) の分子量により確認した。Leu<sup>376</sup>-Lys<sup>377</sup> については RCM-BSA を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチド C\*C\*AKDDPHAC\*YTSVFDKCLKHLVDE (CmCys<sup>359</sup> から Glu<sup>382</sup>) の分子量により確認した。ALK (Ala<sup>209</sup> から Lys<sup>211</sup>) と LAK (Leu<sup>348</sup> から Lys<sup>350</sup>) については、RCM-BSA をリジルエンドペプチダーゼで消化して得られるペプチド FGERALK (Phe<sup>205</sup> から Lys<sup>211</sup>) と RCM-BSA を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチド YAVSVLLRLAKE (Tyr<sup>340</sup> から Glu<sup>351</sup>) の分子量により確認した。

94 番目と 95 番目のアミノ酸配列 -Glu-Gln- は、BSA と一次構造のホモロジーの高い HSA や RSA のアミノ酸配列では -Gln-Glu- であることから配列が疑問に思われた。このことを確認する目的で、RCM-BSA をリジルエンドペプチダーゼで消化して、得られる MW 1673.8 のペプチド (94 番目から 106 番目) について気相法エドマン分解法で N 末端からのアミノ酸配列を決定した。その結果、QEPEXNEXFL- (X は不明) と決定されたので、94 番目と 95 番目については BSA も HSA、RSA と同様のアミノ酸配列 Gln<sup>94</sup>-Glu<sup>95</sup>- であることが明らかとなった。

決定された BSA の一次構造を図 30 に示す。

10 20 30 40 50 60 70  
 DTHKSE IAHRFKDLGEEHFKGLVLIASFQYLQQCFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLF  
 80 90 100 110 120 130 140  
 GDELCKVASLRETYGDMADCC<sup>Q</sup>EPERNECF<sup>Q</sup>FLSHKDDSPDLPK<sup>Q</sup>KLKDPDNTLCDEFKADEKKFWGKYL<sup>Q</sup>YE  
 150 160 170 180 190 200 210  
 IARRHPYFYAPELLY<sup>Q</sup>YANKYNGVFQ<sup>Q</sup>ECCQAEDK<sup>Q</sup>GACLLPKIETMREKVLTSARQRLRCASIQKFGERAL  
 220 230 240 250 260 270 280  
 KAWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSK<sup>Q</sup>LKECCDK  
 290 300 310 320 330 340 350  
 PLLEKSHCIAEVEKDAIPEDLPPLTADFAEDKDVCKNYQ<sup>Q</sup>EAKDAFLG<sup>Q</sup>SFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAK  
 360 370 380 390 400 410 420  
 EYEATLEECCA<sup>Q</sup>KDDPHACYTSVFDK<sup>Q</sup>LKHLVDEPQNLIK<sup>Q</sup>NC<sup>Q</sup>DQFEK<sup>Q</sup>LGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTP  
 430 440 450 460 470 480 490  
 TLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESE<sup>Q</sup>RMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVESKVT<sup>Q</sup>KCTESL<sup>Q</sup>VNR<sup>Q</sup>RPCFSAL  
 500 510 520 530 540 550 560  
 TPDETYVPKAFDEKLF<sup>Q</sup>TFHADICTLPDTEK<sup>Q</sup>IKKQTALVELLKH<sup>Q</sup>KPKATEEQ<sup>Q</sup>LKTVMEN<sup>Q</sup>FAV<sup>Q</sup>VDKCCAA  
 570 580  
 DDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA

図 30 決定された BSA の一次構造

## 第 5 節 考察

分子量が 6 万を超えるタンパク質の一次構造を、質量分析法を用いずに従来から行なわれている方法で確認するには非常に多くの時間を要する。しかし、本研究では最初の段階で BSA の分子量を ESIMS で決定し、続いて RCM-BSA をトリプシンで消化して得られるペプチドの分子量を FRIT-FAB LC/MS を用いて求め、報告されている BSA の一次構造にあてはめて該当するアミノ酸配列を確認した。約 2 週間で BSA の一次構造のうち、93% について確認することができた。残りの 7% の部分については、*Staphylococcus aureus* V8 protease やリジルエンドペプチダーゼで RCM-BSA を酵素消化して得られるペプチドについて FRIT-FAB LC/MS を測定することにより約 1 週間で確認できた。この際、BSA の 156 番目の Tyr 残基が欠落していることを FRIT-FAB LC/MS、気相法エドマン分解法、タンデム MS 法を組み合わせることで迅速に明らかにできた。また、94 番目と 95 番目のア

ミノ酸配列順が報告されている配列順とは逆で、-Gln-Glu-であることを気相法エドマン分解法を用いて明らかにした。このように、最初に分子量を決定し、続いていくつかのフラグメントに切断して各部分について構造を確認するという低分子の構造決定と同じ考え方が、質量分析法を有効に用いることにより分子量6万を超えるタンパク質の構造確認の場合でも適用できることを本研究では示している。

遺伝子工学やタンパク質工学でタンパク質を開発・生産していく際には、ロットごとの構造確認による品質管理が必須である。このようなタンパク質に関しては、迅速に構造確認を行なわなくてはならない。実際に遺伝子工学で生産された IL-2 の一次構造を確認する目的で、還元カルボキシメチル化した IL-2 約 200  $\mu$ g を *Staphylococcus aureus* V8 protease で消化して得られるペプチドについて FRIT-FAB LC/MS の測定を行なった。その結果、一次構造の 97% について確認することができた。構造確認に要した時間は、HPLC の分離条件の検討など FRIT-FAB LC/MS の測定までが 4 日、データの解析に 1 日の計 5 日程度であった。従来から用いられている方法、即ち、タンパク質を酵素消化後、得られたペプチドを HPLC で分取し、FABMS やアミノ酸シーケンサーで分析してペプチドマッピングを行なう方法に比べると、迅速にタンパク質の全体像をつかめたといえる。この様に、遺伝子工学やタンパク質工学で生産されたタンパク質の迅速な一次構造の確認には FRIT-FAB LC/MS は極めて有効である。

訂正された BSA の一次構造から計算される分子量は 66430.3 (average

molecular weight) である。本研究とは独立して R. Feng らは ESIMS により BSA の分子量を決定し、66423.3 (average molecular weight) と報告している<sup>67)</sup>。582 残基の BSA の一次構造から計算される理論値 66267.1 との差 156.2 マスは、ほぼ単糖 1 つ分に相当することから、この差は、DNA からの翻訳後に修飾されて糖 1 つが結合した結果生じたものと彼らは推定している<sup>67)</sup>。しかし、本研究で BSA の一次構造は一部訂正され、583 残基からなることが明らかとなり、訂正された BSA の一次構造から計算される分子量 66430.3 と R. Feng らが ESIMS で求めた BSA の分子量 66432.3 とは極めてよく一致している。ESIMS で得られるタンパク質の分子量は、従来より用いられている超遠心法やゲル電気泳動法で得られる分子量に比べはるかに精度の良いものである。ESIMS の測定ではこのように精度良くタンパク質の分子量を求められるので、タンパク質の構造決定・確認には非常に有効で、BSA の場合のようにアミノ酸 1 残基の欠損も容易に検出できる。現在、実用化されている ESIMS の装置は Electrospray のイオン源を四重極型の質量分析計に取付けたものである。四重極の質量分析計は電場と磁場を組み合わせた二重収束の質量分析計に比べて測定可能な質量範囲が狭く、また分解能も低い。従って、Electrospray のイオン源と二重収束型の質量分析計を接続することにより、現在得られている質量数よりもさらに精度良く、高質量のタンパク質の分子量も決定できる可能性がある。

以上のように、ESIMS や FRIT-FAB LC/MS などの質量分析法をタンパク質の一次構造確認に用いる方法は、非常に正確かつ効率的であるため、今

後、一般化すると考えられる。

## 第5章 総括

タンパク質は生体の中で種々の機能をつかさどり、生命体の維持には欠かせない物質である。さらに、医薬品としてのタンパク質に対する期待も大きく、天然由来のものだけでなく、遺伝子工学由来のタンパク質を含め、数々の製薬メーカーでの開発が盛んになっている。これらのタンパク質の機能を解明する上で、その構造を明らかにすることは重要である。タンパク質の一次構造決定は、従来では非常に多くの時間と労力を必要としている。本論文では、タンパク質の分子量を質量分析法で決定することにより、全体像を把握し、酵素消化して得られるペプチドの分子量をもとに必要なペプチドのみを選び、一次構造を正確にしかも迅速に決定する方法を示した。また、既に決定されている、または、DNAの塩基配列から推定されているタンパク質の一次構造の迅速な確認・訂正法を示した。

タンパク質は分子量が数千を超える高分子であるために、その構造決定・確認は難しく、構造決定には多くの時間が要求されると一般的に考えられている。しかし、質量分析法を有効に利用することによりタンパク質の構造研究は低分子の構造研究と同様に行なえることを本論文では明らかにした。

### 第1章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I の一次構造決定

*Streptomyces corchorushii* の培養液から単離された、ブタ、ウシ、イヌ、

ウマの  $\alpha$ -アミラーゼは阻害するがヒトの唾液腺型および膵臓型の  $\alpha$ -アミラーゼは阻害しないという性質を示す  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I の一次構造を決定した。Paim I は 73 コのアミノ酸残基からなる下に示すような構造であることを明らかにした。

|   |    |
|---|----|
| 10  | 20 |
| Ala - Ser - Glu - Pro - Ala - Pro - Ala - Cys - Val - Val - Met - Tyr - Glu - Ser - Trp - Arg - Tyr - Thr - Thr - Ala - |    |
| 30  | 40 |
| Ala - Asn - Asn - Cys - Ala - Asp - Thr - Val - Ser - Val - Ser - Val - Ala - Tyr - Gln - Asp - Gly - Ala - Thr - Gly - |    |
| 50  | 60 |
| Pro - Cys - Ala - Thr - Leu - Pro - Pro - Gly - Ala - Val - Thr - Thr - Val - Gly - Glu - Gly - Tyr - Leu - Gly - Glu - |    |
| 70  |    |
| His - Gly - His - Pro - Asp - His - Leu - Ala - Leu - Cys - Pro - Ser - Ser   |    |

構造決定には、最初に Paim I の分子量を FABMS で決定し、続いて酵素で消化して得られたペプチドの分子量を求めて構造決定に必要な部分についてアミノ酸配列を決定し、最後に得られた結果をつなぎ合わせて全一次構造を決定するという方法を用いた。これは、低分子の構造決定に用いられる考え方がタンパク質の一次構造決定にも当てはまることを示したものである。

## 第 2 章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I の S-S 結合位置の決定

第 1 章で一次構造を決定した Paim I の S-S 結合の位置を以下のように FABMS を用いて決定した。Paim I を S-S 結合の交換が起きないような条件下で酵素消化して得られたペプチド混合物について FABMS を測定し、各ペプチドの分子量を決定した。得られた分子量と酵素の特異性を考え合わ

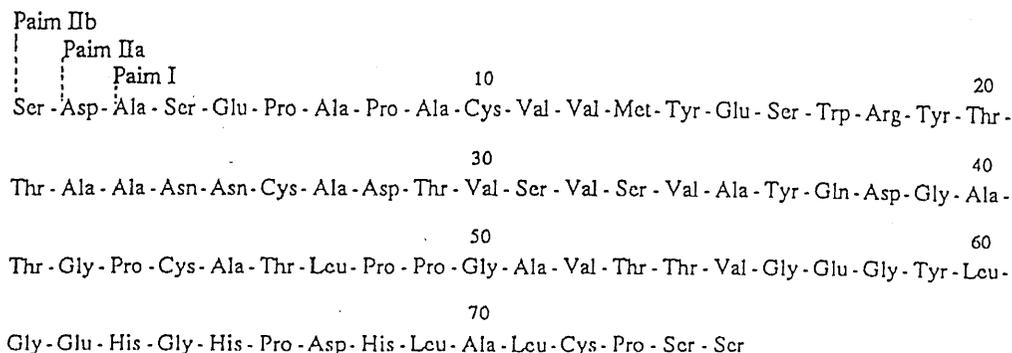
せて Paim I は Cys(42)-Cys(70) に S-S 結合を持つことがわかった。混合物のまま分子量を決定できなかったペプチドについては逆相 HPLC で分画して FABMS を測定し、得られた分子量と酵素の特異性を考え合わせて Paim I のもう一方の S-S 結合の位置を Cys(8)-Cys(24) であると決定した。

タンパク質の S-S 結合位置を決定する従来の方法では、S-S 結合をもつペプチドについてアミノ酸分析計やアミノ酸シーケンサーで分析するため、各ペプチドを高純度に精製しなくてはならず、多くの時間と労力を要する欠点がある。ここで用いた方法では、混合物の状態で、もしくは極性が同じペプチドのみが存在するように逆相の HPLC で粗く分画した後に FABMS を測定することにより、S-S 結合の位置を決定できるので、従来法に比べてペプチドを高純度に精製する必要はなく、迅速に S-S 結合位置を決定できるという利点がある。

### 第3章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim II の一次構造決定

Paim I と同じ *Streptomyces corchorushii* の培養液から単離された、ブタ、ウシ、イヌ、ウマの  $\alpha$ -アミラーゼは阻害するがヒトの唾液腺型および膵臓型の  $\alpha$ -アミラーゼは阻害しない  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim II の一次構造を決定した。Paim II は、物理化学的性質が Paim I と非常に類似すること、Paim I と同じ培養液から単離されたことから、その一次構造は Paim I と N 末端もしくは C 末端部分だけが異なると推定された。従って、Paim I と一次構造の異なる部分について、タンデム MS を用いてアミノ酸

配列を決定し、Paim II の一次構造を下に示す構造であると決定した。



Paim II は単一のタンパク質であると推定されていたが、分子量測定の結果、2つのタンパク質の混合物であることがわかった。しかし、それぞれを単離せずにタンデム MS を利用して迅速にアミノ酸配列を決定することができた。

#### 第4章 ウシ血清アルブミンの一次構造の訂正

ウシ血清アルブミン (BSA) は分子量が6万を超えるタンパク質で、その一次構造は1982年までにタンパク質側から手動のエドマン分解法を用いてアミノ酸582残基からなると決定されていた。しかし、遺伝子側からは一次構造についての検討はなされおらず、ホモロジーが高いヒトやラットの血清アルブミン (HSA、RSA) の一次構造と比較すると疑問に思われる箇所がいくつかあった。このBSAについて、ESIMS、FRIT-FAB LC/MS、タンデム MS、気相法エドマン分解を用いて全一次構造を迅速に確認し、誤っている箇所については訂正を行なった。その結果、BSAは583残基か

らなり、155番目の Tyr と 156番目の Lys の間には Tyr が 1 残基存在すること、94番目、95番目の順序は -Glu-Gln- でなく -Gln-Glu- であることがわかった。下に訂正後の BSA の一次構造を示す。

```

DTHKSEIAHRFKDLGEEHF10KG20LVLI30AFSQYL40QQCPFDEHV50KLVNELTEFAKT60CVADESHAGCEKSLHTLF
GDELCKVASLRETYGDMADCCEK80Q90EPERNECFLSHKDDSPDLP110KLKPD120PNTLCDEFKADEKKFWGKYLYE
IARRHPYFYAPELLY150M160ANKYNGVFQ170ECCQAEDKGA180CLLPKIETMREKVL190TSSARQRLRCASIQK200FGERAL
KAWSVARLSQK220FPKAEFVE230VTKLVTD240LT250KVHKECCHGDLLE260CADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDK
PLLEKSHCIAEVEKDAIPEDLPP290LTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAK
EYEATLEECCA320KDDPHACY330TSVFDKLKHLVDEPQNL340IKQNC350DQFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTP
TLVEVSRSLGKVGTRCCTK380PESE390RMPCTEDYLSLILNRLC400VLHEKTPVESK410VTKCCTESLVNRRPCFSAL
TPDETYVPKAFDEKLF440TFHADIC450TLPDTEKQIKKQTALVELLKH460KPKATEEQ470LKTVMENFVAFV480DKCCAA
DDKEACFAVEGP510KLVVST520QTALA

```

ESIMS や FRIT-FAB LC/MS などの質量分析法をタンパク質の一次構造の確認に用いる方法は正確かつ迅速であることため、タンパク質の構造研究には大変有効であることを本研究で示した。

## 実験

### 第1章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I の一次構造決定

#### 1. Paim I 試料

大阪府立大学農学部村尾研究室において単離・精製された Paim I の一部を用いた。

#### 2. Paim I、II およびペプチドのアミノ酸分析

Paim I および II 500  $\mu$ g を 6N 塩酸 200  $\mu$ l に溶解し、110°C、18 時間加水分解後、日立 835 型アミノ酸分析系で各アミノ酸の同定・定量を行なった。

#### 3. 還元カルボキシメチル化

Paim I の凍結乾燥品 10 mg を 8M 尿素と 0.2% EDTA を含む 0.5M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.2) 2ml に溶解後、ジチオスレイトール 25.5 mg (166  $\mu$ mol) を加え、窒素置換し、50°C で 3 時間、続いて一晩還元した。その後、100  $\mu$ l の 1 N 水酸化ナトリウム水溶液に溶かしたモノヨード酢酸 62 mg (333  $\mu$ mol) を、1 N 水酸化ナトリウム水溶液で pH を 8.0 から 8.5 に保ちながら約 30 分間で添加した。続いて反応溶液を透析膜 (スペクトラポア、分画分子量 1000) を用い、0.2N 酢酸 1l、続いて水 1l で 3 回透析し、凍結乾燥して RCM-Paim I を得た。

#### 4. Paim I および RCM-Paim I の分子量測定

約 30  $\mu\text{g}$  の Paim I を溶かしたグリセリン - チオグリセリン - 1N 塩酸水溶液 (1:1:2) の試料溶液 1.5  $\mu\text{l}$ 、もしくは約 30  $\mu\text{g}$  の RCM-Paim I を溶かしたグリセリン - チオグリセリン - 29% アンモニア水溶液 (1:1:2) の試料溶液 1.5  $\mu\text{l}$  をターゲットにのせ、質量分析計のイオン源に導入し、以下のような条件で測定した。

機種：JMS-HX110 型二重収束質量分析計

加速電圧：10 kV

高速中性原子：Xe

イオン銃電圧：6kV

エミッション電流：20 mA (タングステンフィラメント使用)

分解能：1000

測定質量範囲：m/z 6800 ~ 8000

スキャンニング時間：46 秒

データ処理システム：JMA-DA5000

#### 5. 酵素消化

(1) RCM-Paim I の *Staphylococcus aureus* V8 protease による消化

*Staphylococcus aureus* V8 protease (Miles Laboratories, Inc.(ICN Immunobiologicals, U.S.A.) 製) 10  $\mu\text{g}$  を 5mM 炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.8) 50  $\mu\text{l}$  に溶解し、RCM-Paim I 500  $\mu\text{g}$  を加え、37°C で 8 時間消化した後、凍結

乾燥し、HPLC、FABMS の試料とした。

(2) ペプチド S3-2 のカルボキシペプチダーゼによる消化

カルボキシペプチダーゼ Y (オリエンタル酵母社製)  $5\mu\text{g}$  を 0.05% ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 6.0)  $50\mu\text{l}$  に溶解し、ペプチド S3-2  $250\mu\text{g}$  を加え、 $37^\circ\text{C}$  で消化した。酵素消化開始後、0分、1分、10分、1時間、2時間後にサンプリングし、凍結乾燥してFABMS の試料とした。

(3) RCM-Paim I のトリプシンによる消化

トリプシン (Sigma 社製、TPCK 処理済み)  $2\mu\text{g}$  を 5mM 炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.8)  $10\mu\text{l}$  に溶解し、RCM-Paim I  $100\mu\text{g}$  を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 18 時間消化した後、凍結乾燥し、HPLC、FABMS の試料とした。

(4) RCM-Paim I のキモトリプシンによる消化

キモトリプシン (Sigma 社製)  $2\mu\text{g}$  を 5mM 炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.8)  $10\mu\text{l}$  に溶解し、RCM-Paim I  $100\mu\text{g}$  を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間消化した後、凍結乾燥し、HPLC、FABMS の試料とした。

## 6. 酵素消化によって得られたペプチドの FABMS 測定

酵素消化によって得られたペプチド  $10\sim 20\mu\text{g}$  を溶かしたグリセリン-チオグリセリン-1N 塩酸水溶液 (1:1:2) の試料溶液  $1.5\mu\text{l}$  をターゲットにのせ、質量分析計のイオン源に導入し、以下のような条件で測定した。

機種：JMS-HX110 型二重収束質量分析計

加速電圧：10 kV

高速中性原子：Xe

イオン銃電圧：6kV

エミッション電流：20 mA（タングステンフィラメント使用）

分解能：3000

データ処理システム：JMA-DA5000

各ペプチドの測定質量範囲とスキャンニング時間は下の表の通りである。

| ペプチド    | 測定質量範囲          | スキャンニングタイム |
|---------|-----------------|------------|
| S1      | 1935.0 - 1960.0 | 27 秒       |
| S2      | 1410.0 - 1450.0 | 49 秒       |
| S3      | 4300.0 - 4340.0 | 27 秒       |
| S4      | 1410.0 - 1450.0 | 49 秒       |
| S5      | 2570.0 - 2595.0 | 22 秒       |
| S6      | 2795.0 - 2820.0 | 22 秒       |
| T1      | 500.0 - 4500.0  | 40 秒       |
| T2      | 5500.0 - 5950.0 | 30 秒       |
| C1 - C6 | 500.0 - 4500.0  | 40 秒       |

## 7. 酵素消化によって得られたペプチドの HPLC

機種：日立 HPLC 装置 655 型（高圧グラジエント）

カラム：TSKgel ODS-120T 4.6  $\phi$  × 250 mm（東洋曹達工業（現 東ソー））

カラム温度：室温

溶離液：A 液 水：TFA = 100：0.1

B 液 水：アセトニトリル：TFA = 50：50：0.1

溶離条件：A 液 100 % (5 min.)

↓ 直線グラジエント (45 min.)

B 液 100 % (10 min.)

検出：UV 210 nm

流速：1ml/min.

#### 8. ダンシル法による N 末端アミノ酸の分析

ダンシル法の常法に従って行なった。凍結乾燥した 1nmol のペプチドに 10  $\mu$ l の 0.2M 炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、遠心乾燥機（スピードバック）を用いて遠沈乾固した。次に、10  $\mu$ l の蒸留水、10  $\mu$ l のダンシルクロライド（1-ジメチルアミノナフタレン-5-スルホニルクロライド）のアセトン溶液 (2.5 mg/ml) を加え、37°C、1 時間反応させた。反応液を乾固後、6N 塩酸 50  $\mu$ l を加え、減圧脱気後封管し、105°C、18 時間加水分解を行なった。冷却後、乾固し、95% エタノールに溶解し、ポリアミドシートによる二次元薄層クロマトグラフィーで、ダンシルアミノ酸として同定した。

展開溶媒：1. 1.5 % ギ酸

2. ベンゼン：酢酸 (9:1 (v/v))

3. 酢酸エチル：メタノール：酢酸 (20:1:1 (v/v))

1. で展開後、2. 3. では 1. と垂直方向に展開し、各ダンシルアミノ酸を同

定した。

## 9. 気相法シーケンサーによるN末端からのアミノ酸配列の分析

Applied Biosystems 社製気相法アミノ酸シーケンサー 470A を用いて行なった。

## 第2章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim I の S-S 結合位置の決定

### 1. Paim I の *Staphylococcus aureus* V8 protease による消化

*Staphylococcus aureus* V8 protease (Miles Laboratories, Inc.(ICN Immunobiologicals, U.S.A.) 製)  $2\mu\text{g}$  を 5mM 炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.8)  $10\mu\text{l}$  に溶解し、RCM-Paim I  $100\mu\text{g}$  を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間消化した後、凍結乾燥し、HPLC、FABMS の試料とした。

### 2. 酵素消化によって得られたペプチドの FABMS 測定

酵素消化によって得られたペプチド  $10\sim 20\mu\text{g}$  を溶かしたグリセリン - チオグリセリン - 1N 塩酸水溶液 (1:1:2) の試料溶液  $1.5\mu\text{l}$  をターゲットにのせ、質量分析計のイオン源に導入し、以下のような条件で測定した。

機種：JMS-HX110 型二重収束質量分析計

加速電圧：10 kV

高速中性原子：Xe

イオン銃電圧：6kV

エミッション電流：20 mA (タングステンフィラメント使用)

分解能：5000

データ処理システム：JMA-DA5000

スキャンニングタイム：40～50秒

測定質量範囲：m/z 1000～5000 (ペプチド混合物の場合)

m/z 100～2000 (HPLCで単離した MW 1000 以下のペプチドの場合)

m/z 100～2000 (HPLCで単離した MW 1000 以下のペプチドの場合)

### 3. 酵素消化によって得られたペプチドの HPLC

機種：日立 HPLC 装置 655 型 (高圧グラジエント)

カラム：TSKgel ODS-120T 4.6φ×250 mm (東洋曹達工業(現東ソー))

カラム温度：室温

溶離液：A 液 水:TFA = 100:0.1

B 液 水:アセトニトリル:TFA = 50:50:0.1

溶離条件：A 液 100% (5 min.)

↓ 直線グラジエント (45 min.)

B 液 100% (10 min.)

検出：UV 210 nm

流速：1ml/min.

#### 4. アミノ酸分析

ペプチドを過ギ酸酸化した後、6N 塩酸に溶解し、110℃、24 時間加水分解後、日立 8500 型アミノ酸分析系で各アミノ酸の同定・定量を行なった。

### 第 3 章 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター Paim II の一次構造決定

#### 1. Paim II 試料

大阪府立大学農学部村尾研究室において単離・精製された Paim II の一部を用いた。

#### 2. 還元カルボキシメチル化

Paim II の凍結乾燥品 10 mg を 8M 尿素と 0.2% EDTA を含む 0.5M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.2) 2ml に溶解後、ジチオスレイトール 25.5 mg (166  $\mu$  mol) を加え、窒素置換し、50℃で 3 時間、続いて一晩還元した。その後、100  $\mu$ l の 1 N 水酸化ナトリウム水溶液に溶かしたモノヨード酢酸 62 mg (333  $\mu$  mol) を、1 N 水酸化ナトリウム水溶液で pH を 8.0 から 8.5 に保ちながら約 30 分間で添加した。続いて反応溶液を透析膜 (スペクトラポア、分画分子量 1000) を使い、0.2N 酢酸 1l、続いて水 1l で 3 回透析し、凍結乾燥して RCM-Paim II を得た。

#### 3. RCM-Paim II の分子量測定

約 30  $\mu$ g の RCM-Paim II を溶かしたグリセリン-チオグリセリン-29%

アンモニア水溶液 (1:1:2) の試料溶液 1.5  $\mu$ l をターゲットにのせ、質量分析計のイオン源に導入し、以下のような条件で測定した。

機種：JMS-HX110/HX-110 型タンデム質量分析計の第 1 MS

加速電圧：10 kV

高速中性原子：Xe

イオン銃電圧：6kV

エミッション電流：20 mA (タングステンフィラメント使用)

分解能：500

測定質量範囲：m/z 6800 ~ 8000

スキャン時間：46 秒

データ処理システム：JMA-DA5000

#### 4. 酵素消化

(1) RCM-Paim II の *Staphylococcus aureus* V8 protease による消化

*Staphylococcus aureus* V8 protease (Miles Laboratories, Inc.(ICN Immunobiologicals, U.S.A.) 製) 20  $\mu$ g を 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) 100  $\mu$ l に溶解し、RCM-Paim II 1mg を加え、37°C で 18 時間消化した後、凍結乾燥し、HPLC、FABMS の試料とした。

(2) RCM-Paim II のキモトリプシンによる消化

キモトリプシン (Sigma 社製) 2  $\mu$ g を 5mM 炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.8) 10  $\mu$ l に溶解し、RCM-Paim II 100  $\mu$ g を加え、37°C で 30 分間消化

した後、凍結乾燥し、FABMS の試料とした。

#### 5. 酵素消化によって得られたペプチドの FABMS 測定

酵素消化によって得られたペプチド 10 ~ 20  $\mu$ g を溶かしたグリセリン - チオグリセリン - 1N 塩酸水溶液 (1:1:2) の試料溶液 1.5  $\mu$ l をターゲットにのせ、質量分析計のイオン源に導入し、以下のような条件で測定した。

機種：JMS-HX110/HX110 型タンデム質量分析計の第 1 MS

加速電圧：10 kV

高速中性原子：Xe

イオン銃電圧：6kV

エミッション電流：20 mA (タングステンフィラメント使用)

分解能：3000

データ処理システム：JMA-DA5000

測定質量範囲：m/z 200 ~ 3000

スキャンタイム：47 秒

#### 6. 酵素消化によって得られたペプチドの HPLC

機種：日本分光 HPLC 装置 880 型 (高圧グラジエント)

カラム：TSKgel ODS-120T 4.6  $\phi$   $\times$  250 mm (東洋曹達工業 (現 東ソー))

カラム温度：室温

溶離液：A 液 水 : TFA = 100 : 0.1

B 液 水：アセトニトリル：TFA = 50：50：0.1

溶離条件：A 液 100 % (5 min.)

↓ 直線グラジエント (45 min.)

B 液 100 % (10 min.)

検出：UV 210 nm

流速：1ml/min.

## 7. タンデム MS の測定

酵素消化によって得られたペプチド 10 ~ 20  $\mu$ g を溶かしたグリセリン - チオグリセリン - 1N 塩酸水溶液 (1:1:2) の試料溶液 1.5  $\mu$ l をターゲットにのせ、質量分析計の第 1 MS のイオン源に導入し、以下のような条件で測定した。

機種：JMS-HX110/HX110 型タンデム質量分析計

加速電圧：10 kV (第 1 MS、第 2 MS とも)

高速中性原子：Xe

イオン銃電圧：6kV

エミッション電流：20 mA

第 1 MS 分解能：2000 (測定するペプチドの分子量と同程度)

第 2 MS 分解能：1000

データ処理システム：JMA-DA5000

コリジョンガス：ヘリウム (プリカーサーイオンの強度が約 20 % 程度に

なるように導入)

測定質量範囲：m/z 0～プリカーサーイオンの  $[M+H]^+$  まで

スキャンニングタイム：約 45 秒

積算回数：2 または 3 回のスキャン

## 8. 気相法シーケンサーによるN末端からのアミノ酸配列の分析

Applied Biosystems 社製気相法アミノ酸シーケンサー 470A を用いて行なった。

## 第4章 ウシ血清アルブミンの一次構造の訂正

### 1. ウシ血清アルブミン試料

ウシ血清アルブミン (BSA) は Sigma 社より fatty acid free のものを購入して用いた。

### 2. BSA の ESIMS 測定

ESIMS の測定は Finnigan MAT 社に依頼して、測定していただいた。

機種：Finnigan MAT TSQ700

### 3. 還元カルボキシメチル化

BSA 50 mg を 8M 尿素と 0.2% EDTA を含む 0.5M トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.2) 10 ml に溶解後、ジチオスレイトール 113 mg ( $731 \mu\text{mol}$ ) を加え、窒素

置換し、50℃で3時間、続いて一晩還元した。その後、15 mlの1 N水酸化ナトリウム水溶液に溶かしたモノヨード酢酸 272 mg (1.46 mmol) を、1 N水酸化ナトリウム水溶液で pH を 8.0 から 8.5 に保ちながら約 30 分間で添加した。続いて反応溶液を透析膜（スペクトラポア、分画分子量 3500）を用い、50mM 炭酸アンモニウム水溶液 1l、続いて水 1l で 3 回透析し、凍結乾燥して RCM-BSA を得た。

#### 4. 酵素消化

##### (1) RCM-BSA のトリプシンによる消化

トリプシン（Sigma 社製、TPCK 処理済み）16  $\mu$ g を 50mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液（pH 7.8）270  $\mu$ l に溶解し、RCM-BSA 800  $\mu$ g を加え、37℃で 8 時間消化した後、凍結乾燥し、HPLC、FABMS の試料とした。

##### (2) RCM-BSA のリジルエンドペプチダーゼによる消化

リジルエンドペプチダーゼ（和光純薬製）16  $\mu$ g を 50mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液（pH 8.4）300  $\mu$ l に溶解し、RCM-BSA 820  $\mu$ g を加え、37℃で 8 時間消化した後、凍結乾燥し、HPLC、FABMS の試料とした。

##### (3) RCM-BSA の *Staphylococcus aureus* V8 protease による消化

*Staphylococcus aureus* V8 protease（Miles Laboratories, Inc.(ICN Immunobiologicals, U.S.A.) 製）13.5  $\mu$ g を 50mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液（pH 7.9）300  $\mu$ l に溶解し、RCM-BSA 675  $\mu$ g を加え、37℃で 4 時間消化した後、凍結乾燥し、HPLC、FABMS の試料とした。

## 5. 酵素消化によって得られたペプチドの HPLC

機種：日本分光 HPLC 装置 880 型（高圧グラジエント）

カラム：Vydac 社製 C4 カラム 4.6  $\phi$   $\times$  250 mm

カラム温度：室温

溶離液：A 液 水:TFA = 100:0.1

B 液 水:アセトニトリル:TFA = 10:90:0.095

溶離条件：A 液 100 % (2 min.)

↓ 直線グラジエント (88 min.)

A 液 38 %、B 液 62 % (5 min.)

検出：UV 210 nm

流速：700  $\mu$  l/min.

## 6. FRIT-FAB LC/MS の測定

図 7 (b) に示したFRIT-FAB LC/MS システムを用いて測定した。HPLC は、5. に示した条件と同様に行ない、溶離液にマトリックスとして 0.8 % のグリセリンを加えたものを用いた。測定に用いた RCM-BSA の酵素消化物は約 300  $\mu$  g である。

機種：JMS-HX110/HX110 型タンデム質量分析計の第 1 MS

加速電圧：8 kV

高速中性原子：Xe

イオン銃電圧：6kV

エミッション電流：10 mA（レニウムフィラメント使用）

分解能：1000

データ処理システム：JMA-DA5000

測定質量範囲：m/z 25 ～ 3000

スキャンニングタイム：7.5 秒

スプリッター圧：1.6 Kg/cm<sup>2</sup>

## 7. 酵素消化によって得られたペプチドの FABMS 測定

酵素消化によって得られたペプチド 10～20 μg を溶かしたグリセリン - チオグリセリン - 1N 塩酸水溶液 (1:1:2) の試料溶液 1.5 μl をターゲットにのせ、質量分析計のイオン源に導入し、以下のような条件で測定した。

機種：JMS-HX110/HX110 型タンデム質量分析計の第 1 MS

加速電圧：10 kV

高速中性原子：Xe

イオン銃電圧：6kV

エミッション電流：20 mA（タングステンフィラメント使用）

分解能：3000

データ処理システム：JMA-DA5000

測定質量範囲：m/z 200 ～ 3000

スキャンニングタイム：47 秒

## 8. タンデム MS の測定

酵素消化によって得られたペプチド 10 ~ 20  $\mu\text{g}$  を溶かしたグリセリン - チオグリセリン - 1N 塩酸水溶液 (1:1:2) の試料溶液 1.5  $\mu\text{l}$  をターゲットにのせ、質量分析計の第 1 MS のイオン源に導入し、以下のような条件で測定した。

機種：JMS-HX110/HX110 型タンデム質量分析計

加速電圧：10 kV (第 1 MS、第 2 MS とも)

高速中性原子：Xe

イオン銃電圧：6kV

エミッション電流：20 mA

第 1 MS 分解能：2000 (測定するペプチドの分子量と同程度)

第 2 MS 分解能：1000

データ処理システム：JMA-DA5000

コリジョンガス：ヘリウム (プリカーサーイオンの強度が約 20 % 程度になるように導入)

測定質量範囲：m/z 0 ~ プリカーサーイオンの  $[\text{M}+\text{H}]^+$  まで

スキャンタイム：約 45 秒

積算回数：2 または 3 回のスキャン

## 9. 気相法シーケンサーによる N 末端からのアミノ酸配列の分析

Applied Biosystems 社製気相法アミノ酸シーケンサー 470A を用いて行

なった。

## 論文リスト

### 第1章

Title; Primary Structure of Paim I, an  $\alpha$ -Amylase Inhibitor from *Streptomyces corchorushii*, Determined by the Combination of Edman Degradation and Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry

Authors; Kazuo Hirayama, Rei Takahashi, Satoko Akashi, Ken-ichi Fukuhara, Naoki Oouchi, Asao Murai, Motoo Arai, Sawao Murao, Kazuo Tanaka and Ittetu Nojima

Journal; *Biochemistry*, **26**, 6483 (1987).

### 第2章

Title; A Determination of the Positions of Disulphide Bonds in Paim I,  $\alpha$ -Amylase Inhibitor from *Streptomyces corchorushii*, Using Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry

Authors; Satoko Akashi, Kazuo Hirayama, Tadatoshi Seino, Shin-ichi Ozawa, Ken-ichi Fukuhara, Naoki Oouchi, Asao Murai, Motoo Arai, Sawao Murao, Kazuo Tanaka and Ittetu Nojima

Journal; *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **15**, 541 (1988).

### 第 3 章

Title; Determination of the Primary Structure of Paim II, an  $\alpha$ -Amylase Inhibitor from *Streptomyces corchorushii*, by High-Performance Tandem Mass Spectrometry

Authors; Satoko Akashi, Kazuo Hirayama, Asao Murai, Motoo Arai and Sawao Murao

Journal; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158**, 514 (1989).

### 第 4 章

Title; Rapid Confirmation and Revision of the Primary Structure of Bovine Serum Albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS

Authors; Kazuo Hirayama, Satoko Akashi, Mami Furuya and Ken-ichi Fukuhara

Journal; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 639 (1990).

## 参考論文リスト

- (1) Title; Field Desorption Mass Spectrometry of Anthracycline Antibiotics,  
Cosmomycin A, B, A', B', C and D  
Authors; Kazuo Hirayama, Satoko Akashi, Toshihiko Ando, Issei Horino,  
Yuzuru Etoh, Hajimu Morioka, Hiroshiro Shibai and Asao Murai  
Journal; *質量分析*, **35**, 31 (1987).
- (2) Title; Field Desorption Tandem Mass Spectrometry of Anthracycline Antibiotics,  
Cosmomycin A, B, A', B', C and D  
Authors; Kazuo Hirayama, Satoko Akashi, Toshihiko Ando, Issei Horino,  
Yuzuru Etoh, Hajimu Morioka, Hiroshiro Shibai and Asao Murai  
Journal; *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **14**, 305 (1987).
- (3) Title; Histidine Microenvironment Analyses of Recombinant Human Interleukin-  
2 by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry and Proton Magnetic  
Resonance Spectrometry  
Authors; Hiroshi Miyano, Ei-ichiro Suzuki, Satoko Akashi, Mami Furuya,  
Takashi Tsuji, Kazuo Hirayama and Nobuya Nagashima  
Journal; *Anal. Sciences*, **5**, 759 (1989).
- (4) Title; The Primary Structure of Human EGF Produced by Genetic Engineering,  
Studied by High-Performance Tandem Mass Spectrometry  
Authors; Mami Furuya, Satoko Akashi and Kazuo Hirayama  
Journal; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 1100 (1989).

(5) Title; Total Synthesis of (+)-Tryptoquivaline

Authors; Masako Nakagawa, Manabu Ito, Yuko Hasegawa, Satoko Akashi and  
Tohru Hino

Journal; *Tetrahedron Lett.*, **25**, 3865 (1984).

## 参考文献

- 1) A. M. Maxam & W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 560 (1977).
- 2) F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463 (1977).
- 3) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, *Anal. Chem.* **30**, 1190 (1958).
- 4) P. Edman, *Arch. Biochem. Biophys.* **22**, 475 (1949).
- 5) A. J. Dempster, *Phys. Rev. II* **316** (1918).
- 6) M.S. B. Munson, F.H. Field, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 1621 (1966).
- 7) T. Takaishi, M. Suzuki, A. Tatematsu, *Org. Mass Spectrom.* **9**, 635 (1974).
- 8) H. D. Beckey, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **2**, 500 (1969).
- 9) A. Benninghoven and W. K. Sichtermann, *Anal. Chem.* **50**, 1180 (1978).
- 10) M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *Nature* **293**, 270 (1981).
- 11) M. Barber, R. S. Bordoli, G. J. Elliot, R.D. Sedgwick, A.N. Tyler, *Anal. Chem.* **54**, 645A (1982).
- 12) R. D. McFarlane, D. F. Torgerson, *Science* **191**, 920 (1976).
- 13) M. A. Posthumus, P. G. Kistemaker, H. L. C. Meuzelaar and M. C. Ten Noever de Braw, *Anal. Chem.* **50**, 985 (1978).
- 14) C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita and J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **57**, 675 (1985).

- 15) F. W. McLafferty, "Tandem Mass Spectrometry" (1983) (J. Wiley & Sons Inc., New York).
- 16) C. R. Blakley, M. L. Vestal, *Anal. Chem.* **55**, 750 (1983).
- 17) Y. Ito, T. Takeuchi, D. Ishii, M. Goto, *J. Chromatogr.* **346**, 161 (1985).
- 18) K. Biemann & H. Scoble, *Science* **237**, 992 (1987).
- 19) P. Roepstorff & J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).
- 20) K. Biemann, *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 237 (1989).
- 21) R. S. Johnson, S. A. Martin, K. Biemann, J. T. Stults, J. T. Watson, *Anal. Chem.* **59**, 2621 (1987).
- 22) 生化学データブック (日本化学会編) (1979).
- 23) H. Ashauer, L. Vértesy, G. Neemann, G. Braunitzer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**, 1347 (1983).
- 24) K. Maeda, T. Hase, H. Matsubara, *Biochem. Biophys. Acta* **743**, 52 (1983).
- 25) J. J. Marshall, C. M. Lauda, *J. Biol. Chem.* **250**, 8030 (1975).
- 26) S. Murao, A. Goto, Y. Matsui, K. Phyama, M. Arai, *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2599 (1981).
- 27) M. D. O'Donnell, O. FitzGerald, K. F. McGeeney, *Clin. Chem. (Winston-Salem, N.C.)* **23**, 560 (1977).
- 28) M. Ogawa, G. Kosaki, K. Matsuura, K. Fujimoto, N. Minamiura and T. Yamamoto, *Clin. Chim. Acta* **87**, 17 (1978).
- 29) S. Murao, N. Oouchi, A. Goto, M. Arai, *Agric. Biol. Chem.* **47**, 453 (1983).

- 30) S. Murao, N. Oouchi, A. Goto, M. Arai, *Agric. Biol. chem.* **49**, 107 (1985).
- 31) N. Oouchi, M. Arai, S. Murao, *Agric. Biol. Chem.* **49**, 793 (1985).
- 32) M. Arai, N. Oouchi, S. Murao, *Agric. Biol. Chem.* **49**, 987 (1985).
- 33) H. Murai, S. Hara, T. Ikenaka, A. Goto, M. Arai, S. Murao, *J. Biochem.* **97**, 1129 (1985).
- 34) H. Aschauer, L. Vértesy, G. Braunitzer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**, 465 (1981).
- 35) O. Hofmann, L. Vértesy, G. Braunitzer, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **366**, 1161 (1985).
- 36) L. Vértesy, D. Tripier, *FEBS Lett.* **185**, 187 (1985).
- 37) B.S. Hartley, V. Massey, *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 58 (1956).
- 38) Y. Shimonishi, Y.-M. Hong, T. Takao, S. Aimoto, H. Matsuda, Y. Izumi, *Proc. Jpn. Acad.* **57 (B)**, 304 (1981).
- 39) K. Hirayama, T. Ando, R. Takahashi, A. Murai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **59**, 1371 (1986).
- 40) M. Arai, N. Oouchi, A. Goto, S. Ogura, S. Murao, *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1523 (1985).
- 41) M. Yoshida, T. Nakai, K. Fukuhara, S. Saitoh, W. Yoshikawa, Y. Kobayashi, H. Nakamura, *J. Biochem.*, **108**, 158 (1990).
- 42) A.D. Kline, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **183**, 503 (1985).
- 43) A. D. Kline, W. Braun, K. Wuthrich, *J. Mol. Biol.* **189**, 377 (1986).

- 44) J. W. Pflugrath, G. Wiegand, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **189**, 383 (1986).
- 45) H. R. Morris, P. Pucci, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 1122 (1985).
- 46) T. Takao, M. Yoshida, Y. M. Hong, S. Aimoto, Y. Shimonishi, *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 549 (1984).
- 47) R. Yazdanparast, P. C. Andrews, D. L. Smith, J. E. Dixon, *J. Biol. Chem.* **262**, 2507 (1987).
- 48) S. Naylor, A. F. Findeis, B. W. Gibson, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 6359 (1986).
- 49) A. M. Buko, B. A. Fraser, *Biomed. Mass Spectrom.* **12**, 577 (1985).
- 50) K. L. Clay, L. Wahlin, R. C. Murphy, *Biomed. Mass Spectrom.* **10**, 489 (1983).
- 51) H. B. Bull, K. Breese, *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 665 (1974).
- 52) K. Biemann, H. A. Scoble, *Science* **237**, 992 (1987).
- 53) D. J. Harvan, J. R. Hass, W. E. Wilson, C. Hamm, R. K. Boyd, H. Yajima, D. G. Klapper, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **14**, 281 (1987).
- 54) H. Michel, D. F. Hunt, J. Shabanowitz, J. Bennett, *J. Biol. Chem.* **263**, 1123 (1987).
- 55) K. B. Tomer, F. W. Crow, M. L. Gross, K. D. Kopple, *Anal. Chem.* **56**, 880 (1984).
- 56) R. B. Cody Jr., I. J. Amster, F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 6367 (1987).

- 57) R. M. Caprioli, W. T. Moore, T. Fan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1**, 15 (1987).
- 58) Y. Ito, T. Takeuchi, D. Ishii, M. Goto, T. Mizuno, *J. Chromatogr.* **358**, 201 (1986).
- 59) D. C. Carter, X.-M. He, S. H. Munson, P. D. Twigg, K. M. Gernert, M. B. Broom, T. Y. Miller, *Science* **244**, 1195 (1989).
- 60) K. Wüthrich, in *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, (John Wiley & Sons, New York (1986).
- 61) J. R. Brown, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **34**, 591 (1975).
- 62) R. G. Reed, F. W. Putnam and T. Peters, Jr., *Biochem. J.* **191**, 867 (1980).
- 63) J. R. Brown and P. Shockley, in *Lipid-Protein Interactions*, P. Jost and O. H. Griffith, Eds, (Wiley, New York, 1982), vol.1, pp 25-68.
- 64) N. Takahashi, Y. Takahashi, B. Blumberg and F. W. Putnam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 4413 (1987).
- 65) T. D. Sargent, M. Yang and J. Bonner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 243 (1981).
- 66) J. A. Loo, C. G. Edmonds, R. D. Smith, M. P. Lacey and T. Keough, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **19**, 286 (1990).
- 67) R. Feng, Y. Konishi and A. Bell, *Proceedings of the 38th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Tucson, Arizona, 3-8 June (1990).

## 謝辞

千葉大学在学中そして本研究をまとめるにあたり、ご指導ご鞭撻賜りました、千葉大学薬学部薬品合成化学教室 日野亨教授、中川昌子助教授に深く感謝いたします。

協同研究者として試料を提供して下さいました熊本工業大学応用微生物工学科 村尾澤夫教授（大阪府立大学農学部名誉教授）、大阪府立大学農学部 荒井基夫教授に厚くお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導ご鞭撻賜りました、味の素株式会社 前田聿紀中央研究所長、加藤哲也前分析研究所長、村井朝夫分析研究所長、平山和雄主任研究員、福原健一主任研究員、安東敏彦氏に深く感謝いたします。

第1章、第2章で述べた Paim I およびその酵素消化物の FABMS 測定の際に、装置の便宜を図っていただきました日本電子株式会社、測定をしていただきました田中一夫氏、野島一哲氏に深く感謝いたします。第4章で述べたウシ血清アルブミンの ESIMS 測定で、装置の便宜を図っていただきました Finnigan MAT 社に深く感謝いたします。

第1章、第2章で述べた Paim I の研究で、アミノ酸分析をしていただきました制野忠敏氏、小沢真一氏に厚くお礼申し上げます。第1章で述べた Paim I の研究で、アミノ酸シーケンサーによる分析をしていただきました江島大輔氏、第3章で述べた Paim II の研究および第4章で述べた BSA

の研究で、アミノ酸シークエンサーによる分析をしていただきました丹尾式希氏に厚くお礼申し上げます。

また、協同研究者の高橋麗さん、古屋真美さんに深く感謝いたします。