

## 研究報告

# VMOI のキモトリプシン断片のアミノ酸配列

金 喜 美

Amino Acid Sequence Analysis of Chymotryptic Fragments of VMOI

Kim Fimi

### はじめに

鳥類の卵黄膜 (vitelline membrane) は、機械的な損傷から卵を保護したり多受精に対する障壁をつくる機構を持つ<sup>1)</sup>。この膜は、構成成分の異なる内層 (*Lamina pervitellina*) と外層 (*Lamina extravitellina*) の2層から成り、内層は GP-I, GP-II, GP-III と呼ばれる3種類の糖タンパク質を含む<sup>2-4)</sup>。外層では、オボムシンと思われる糖タンパク質が骨格繊維を形づくっており、この骨格に水可溶性のタンパク質であるリゾチームと本研究のテーマである vitelline membrane outer I (VMOI) というタンパク質が吸着していることが明らかにされた<sup>5,6)</sup>。

リゾチームは溶菌活性を持つ古くから知られた酵素であり、N-アセチルグルコサミン重合体の加水分解を行なう分解活性とその逆反応と考えられる糖転移反応を触媒する能力 (合成活性) がある。基質との結合には6個ある Trp 残基のうち少なくとも3個が重要な役割を果たしていることが立体構造の解析から明らかにされている<sup>7)</sup>。一方 VMOI は Back らによって初めて発見され、特に活性を持たない単純タンパク質として報告された<sup>5)</sup>。しかし最近、木戸らによって、VMOI はリゾチーム様活性を持つことが見い出され<sup>8)</sup>、その分解活性はリゾチームと比べて数%以下であるが、合成活性はむしろ高いという結果が得られて

いる (木戸私信, 1989)。VMOI は、N末端のアミノ酸配列、分子量、等電点など化学的諸性質、円二色性スペクトルなどの分光学的諸性質が、リゾチームとは大きく相違しており、リゾチームとは触媒機能の発現機構が全く異なっている可能性が考えられる。もし VMOI がリゾチーム活性を持つとすれば、VMOI の活性部位はリゾチーム活性部位とどのような相同性を示すのだろうか。本実験では、リゾチーム活性に関与している Trp に注目し、芳香族アミノ酸のカルボキシル基側を切断するキモトリプシンを用いて得た断片の配列を調べることにした。また、一次構造決定の際、手動式エドマン法を中心に用いたので、その実験法の詳細についても述べる。

### 方 法

#### 1. VMOI の精製<sup>9)</sup>

##### (1) 卵黄膜の可溶成分の抽出

卵黄膜は、温度が上がると外層の剥離や VMOI の膜からの解離が起こるので<sup>10)</sup>、卵黄膜をとりだすまでの一連の操作は 4°C で行ない、操作時間は1枚あたり4分以内とする。

ニワトリの新鮮卵を割卵し、卵黄を分離し、1% NaCl の入ったシャーレに入れる。卵黄膜の表面に残っているカラザや卵白を注意深く取り除く。シャーレの食塩水を2~3回交換して卵黄をすすいだ後、膜に穴をあけ中の卵黄を取りだす。ピンセットで膜をつまみ食塩水で卵黄を洗い流す。この操作を2~3回繰り返す。白い膜のみになったら、キムワイプで水分を取り、卵1個に対して1.5 ml の10% NaCl を用いて室

温で1~2時間浸す。膜を取り除いたものが卵黄膜可溶成分抽出液である。この10% NaClによる浸漬で卵黄膜外層成分が特異的に抽出されることは、木戸らによって見いだされている<sup>9)</sup>。

## (2)イオン交換クロマトグラフィー

上記のようにして得られた卵黄膜可溶成分抽出液を、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) に4°C で透析する。生じた沈殿はろ過してとり除く。

抽出成分の分離は、陽イオン交換体である CM-トヨパール 650 M を使用し、1.6 cm×25 cm のカラムを用いる。約50個の卵から得た 75.0 ml の抽出液をカラムにのせ、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) でカラムを洗浄する。VMOI の溶出は同緩衝液中で 0.25-0.35 M NaCl (各 200 ml) の直線的塩濃度勾配をかけて行なう。タンパク質の溶出は 280 nm の紫外線吸収により確認し、分画した VMOI は、水透析後、凍結乾燥して冷凍保存する。VMOI の純度は、SDS\*-ポリアクリルアミド電気泳動により確認する<sup>11)</sup>。

## 2. 還元カルボキシメチル化<sup>12)</sup>

凍結した VMOI (500 μg) を 1 ml の 8 M 尿素、25 mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (pH 8.0) 溶液で溶かす。これに2-メルカプトエタノールを 6 mM になるように加えて、8時間室温で放置する。その後遮光しながら 1 N-NaOH に溶かしたモノヨード酢酸 (1.5M) を加えて 12 mM にする。この時、pH が下がるので 6N-NaOH で pH を 8.5 に保つ。暗所で30分間放置後、脱塩のため水透析する。

## 3. アミノ酸分析

試料 (0.1~5.0 nmol) を、6N-塩酸にとかし加水分解用試験管に入れて完全に脱気し封管後、100°C 24時間で加水分解を行なう。還元カルボキシメチル化した VMOI については24時間に加えて48時間の加水分解も行なう。反応終了後、酸を完全に除去し 0.2N-塩酸に溶かす。これをメンブレンフィルターでろ過し、835形日立高速アミノ酸分析計を用いて分析する。

## 4. VMOI のキモトリプシン消化

VMOI は還元カルボキシメチル化により緩衝液では不溶性となるので、未処理の VMOI を用いてキモトリプシン消化を行なった。凍結乾燥した VMOI (750 μg) を 0.1 M トリス、10 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 8.0) の緩衝液で、1.5 mg/ml の濃度に溶かす。同緩衝液で溶かしたキモトリプシンを VMOI 溶液に加え反応を開始させる (重量比、VMOI : キモトリプシン = 100 : 1)。反応温度は 25°C とし、消化時間は、0.7, 2.5, 15時間と

する。反応の停止には、最終濃度 1.5 mM になるようにエタノールに溶かしたフッ化フェニルメチルスルホン酸液 (0.1 M) を水中で加える。キモトリプシン消化した VMOI は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分離する。

## 5. キモトリプシン断片の分離

HPLC による分離は、ウォーターズ社600多溶媒送液システムに481型分光光度計及び740データモジュールの整備されたものを使用する。キモトリプシン消化した VMOI は μBOND APAK カラム (0.78×30 cm) で分離する。流速は 2.0 ml/min である。ペプチドを含んだ画分をあつめ、それぞれ凍結乾燥した後、試料を0.1%トリフルオロ酢酸水溶液でとかし、μBOND-ASPHERE カラム (0.39×15 cm) を用いて再クロマトグラフィーを行う。この時の流速は 1.0 ml/min である。どちらのカラムの場合も溶出は溶液Aに対して溶液Bの濃度を直線的に上げていくことにより行う。溶液Aは0.1%トリフルオロ酢酸水溶液で、溶液Bは0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液である。直線勾配は、試料によって異なるが、溶液Bの最終濃度は30-40%の範囲にある。ペプチドの検出は通常 230 nm の紫外線吸収によるが、Trp を含むペプチドを確認する時は 280 nm の吸収も併わせて測定する。

## 6. トリプトファン含量の測定<sup>13)</sup>

凍結乾燥した VMOI を 6M ゲアニジン塩酸、0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) に溶かし完全変性を行なう。紫外吸収スペクトルを測定し、280 nm および 288 nm におけるモル吸光係数を求める。トリプトファン誘導体のモデル化合物を用いて得られた式、 $N = (\epsilon_{288}/3103) - (\epsilon_{280}/10318)$  に代入して VMOI 1 モルあたりの Trp の数 (N) を求める。ここで  $\epsilon_{288}$ 、 $\epsilon_{280}$  はそれぞれ、288 nm および 280 nm での VMOI のモル吸光係数であり、Cys に由来する吸収 ( $\epsilon_{288} = 73$ ,  $\epsilon_{280} = 120$ ) を補正してある。Cys 含量は還元カルボキシメチル化した VMOI のアミノ酸分析結果より推定した。VMOI の分子量は 17,000 と仮定し<sup>8)</sup>、タンパク質濃度はアクチンを標準として色素結合法によって測定する<sup>14)</sup>。

## 7. アミノ酸配列決定

アミノ酸配列は、手動式又は自動式エドマン法を用いて決定する。

### (1)手動式エドマン法

手動式エドマン法は、ペプチドの大きさによって2つの方法に分ける。小さなペプチド (アミノ酸残基数 1~15) にはパーティショニング法を、大きいペプチド (同10残基以上) およびタンパク質にはフィルム法

\*SDS: ラウリル硫酸ナトリウム

を用いる。試料の量としては 1~5 nmol が最適である。以下の方法は、小林と Tarr による一次構造決定法に基づいている<sup>15)</sup>。

#### ①試料及び試薬の調製

HPLC により精製したペプチドを試料として用いる。これを、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液に溶かしエドマン用試験管 (6×50 mm) に移し凍結乾燥しておく。この時、回収率は予備実験より50~80%である。

試薬は、アミノ酸配列分析用に調製されたものを購入する。酸を除いては、すべて窒素ガス下で保存する。洗浄用および抽出用溶液 (アセトンを除く) には、少量のエタノールを加える。転換に用いる塩酸-メタノール溶液は、混和して2週間以上経たものは使用しない。

#### ②パーティショニング法

##### a) カップリング

カップリング混液の組成は、エタノール：トリエチルアミン：水：PITC\* = 7 : 1 : 1 : 1 である。始めにエタノールとトリエチルアミンと水を混合してねじ口試験管に入れておき、専用のシリンジで PITC を窒素ガス下で加える。この混合液は、1分以内に使用する。乾燥試料のはいったエドマン用試験管に 10  $\mu$ l のカップリング用混液を加える。試験管をバイアル (25 ml) に移し、10秒間窒素ガスを吹き込み、ふたをしてマントルヒーター (55.5°C) に入れ7.5分間反応させる。反応終了後、このバイアルを真空装置につなぎ、55.5°C で加温したまま過剰の試薬を除く。減圧下で5分間以上乾燥し続ける。配列分析を中断する際はこの段階で停止する。

##### b) 洗浄

上記で得られた乾燥試料に 3  $\mu$ l の水を加え、混合後遠心する。次に 0.5%トリメチルアミンを含んだヘプタン：酢酸エチルの混合液 (15 : 1) を約 200  $\mu$ l 加え、サーモミキサーで約 5 秒間攪拌後遠心し (2000×G, 30 秒間)、上層部を捨てる。さらに、ヘプタン：酢酸エチルの混合液 (7 : 1) を約 200  $\mu$ l 加え、同じ操作を繰り返す。洗浄のおわった試験管をバイアルに入れ水流アスピレーターで約 3 分間乾燥した後、真空装置に接続して完全に乾燥する。

##### c) 切断

乾燥した試料に約 10  $\mu$ l の濃塩酸をガラス製マイクロピペットで加える。軽く振った後、バイアルに入れ窒素ガスを約 5 秒間吹きつけ、ふたをし 55.5°C で 3

分間加熱する。反応後、水流アスピレーターに約 4 分間接続した後、バイアル中に残っている酸臭気を窒素ガスを吹きつけてとばす。次に真空装置に接続して完全に乾燥する (6 分間以上)。

##### d) 抽出

この乾燥物に 3  $\mu$ l の水を加え、さらに 40  $\mu$ l のヘプタン：酢酸エチル混液 (1 : 5) を加え、サーモミキサーで攪拌後、遠心し、上澄を新たに用意した試験管に移す。この操作をもう一度繰り返した後、40  $\mu$ l の 20 mM ヘキサフルオロアセトンおよび 16 mM トリメチルアミンを含むヘプタン：酢酸エチル混液 (1 : 5) を加え同様に操作する。上層の抽出液および下層のペプチドの入った試験管をバイアルに入れ、水流アスピレーターに10分間接続し、次に真空装置に接続して完全に乾燥させる。下層の乾固物はアセトン約 50  $\mu$ l で洗浄後乾燥して次のエドマンサイクルへ移す。

##### e) 転換

上記の操作で得られた上層の乾固物に、濃塩酸：メタノール混液 (1 : 10) を 3 滴加え、バイアルに入れ、窒素ガスを吹きつけ、ふたをして 71°C で10分間加熱する。反応後、水流アスピレーターに約 3 分間接続し、続いて真空装置で完全に乾固する。生成したフェニルチオヒダントインアミノ酸 (PTH-アミノ酸) はメタノールで溶かし HPLC で分析する。

#### ③フィルム法

##### a) 試料の調整

乾燥試料の入った試験管に 10  $\mu$ l のトリフルオロ酢酸を加える。サーモミキサーで混和し、バイアルに入れ水流アスピレーターに約10分間接続後、窒素ガスで酸臭気をとばし、さらに真空装置に接続し完全に乾燥させる。この操作で管底に薄いタンパク質の膜が出来る。洗浄操作 (下記参照) を一度行なった後乾燥する。これにトリエチルアミンを 5  $\mu$ l 加え、真空装置で完全に乾燥する。

##### b) カップリング

操作はパーティショニング法同様に行なうが、カップリング混液の組成はジメチルホルムアミド：トリエチルアミン：水：PITC = 7 : 1 : 1 : 1 である。反応は 55.5°C で5分間行ない、その後減圧下で乾燥する。

##### c) 洗浄

それぞれの試験管に約 200  $\mu$ l の洗浄液を加え、軽く振った後洗浄液を捨てる。洗浄液は、次の順に使用する。

(1)ヘプタン：酢酸エチル (15 : 1) (2)酢酸エチル(3)ア

\*PITC: フェニルイソチオシアン酸塩

セトン

この洗浄を2回繰り返した後、水流アスピレーター、真空装置の順で完全に乾燥させる。

d) 切断

上記の操作で得られた乾燥物に、10  $\mu$ l のトリフルオロ酢酸を加え、55.5°C で3分間加熱する。操作はパーティショニング法と同様に行なう。

e) 抽出

試験管に60  $\mu$ l の0.1%酢酸を含むベンゼン：アセトニトリル混液 (1:1) を加え、軽く振った後抽出液を新たに用意した試験管に移す。この操作を2回繰り返した後、以下の操作はパーティショニング法と同様に行なう。

f) 転換

パーティショニング法と同様に行なう。

#### ④HPLC による PTH-アミノ酸の分析

HPLC の装置については前述してある。カラムは、YMC 社製の R-ODS-5 カラム (0.46 $\times$ 25 cm) を用い、カラム温度は 37°C とする。PTH-アミノ酸の検出は 264 nm の紫外線吸収によって行なう。溶媒は 25 mM 酢酸, 1.4 mM トリエチルアミン (pH 4.9) の緩衝液を用い、溶出はアセトニトリルの直線的濃度勾配で行なう。流速は 1.0 ml/min で、サイクルは35分とする。

#### (2)自動式エドマン法

アミノ酸配列分析は、自動気相シーケンサー (Applied Biosystem 社製モデル 470 A) を用いて行う。試料は 1.0~3.0 nmol のペプチドを使用する。PTH-アミノ酸は、Spectra Physics model SP 8100 HPLC システムを用いて、Toyosoda TSK-GEL ODS-80 TM

(0.46 $\times$ 15 cm) カラムで分析する。尚、自動分析機は (株)蛋白質工学研究所のものを借用した。

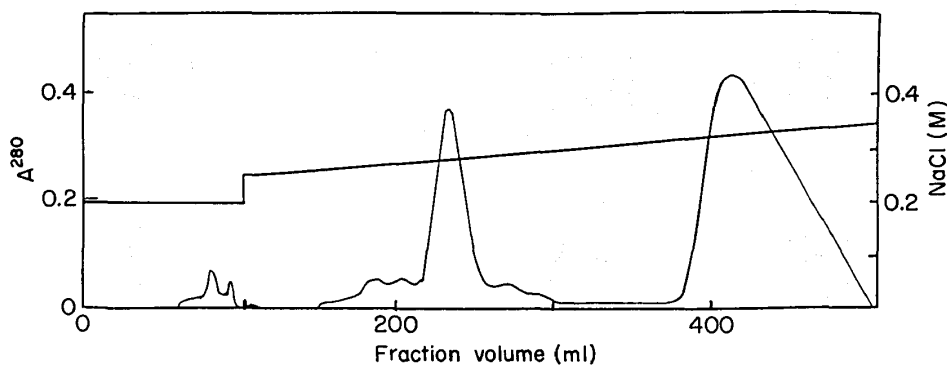
## 結 果

### 1. VMOI の精製

VMOI の精製は、木戸らによって開発された方法に従って行なった<sup>9)</sup>。つまり、卵黄膜の10% NaCl 可溶画分を CM-トヨパール 650 M イオン交換クロマトグラフィーにより分離した。Fig.1 に示すように NaCl 濃度が 0.28 M と 0.32 M のところで2つの大きなピークが溶出された。SDS-電気泳動で調べた結果 (Fig.2), 前半のピークが VMOI, 後半のピークが リゾチームを含むことが確認された。VMOI 画分は、リゾチームを少量含むもののゲルの染色の度合いから純度90%以上と推定できた。標準タンパク質を使って求めた分子量は約 17,000であり、Back らの結果と一致した。鶏卵1個から約 0.4~0.6 mg の VMOI が得られた。

### 2. VMOI のアミノ酸組成

還元カルボキシメチル化後、6N-塩酸で加水分解して得た VMOI のアミノ酸組成を Back らの実験値<sup>9)</sup> およびリゾチームのアミノ酸組成と比較して Table 1 に示す。酸加水分解で崩壊する Trp は、グアニジン塩酸で完全変性後紫外吸収スペクトルを測定して推定した。6個の Trp はリゾチームと同数であり、VMOI の高いモル吸光係数をよく説明できる。全体的には Gly, Pro の含量の多い特徴が見られる。Back らの結果と比べて、Asp, Gly, Lys はやや低く Glu はやや高い。また、Trp 含量は、本実験で約1.5倍高いが、これ



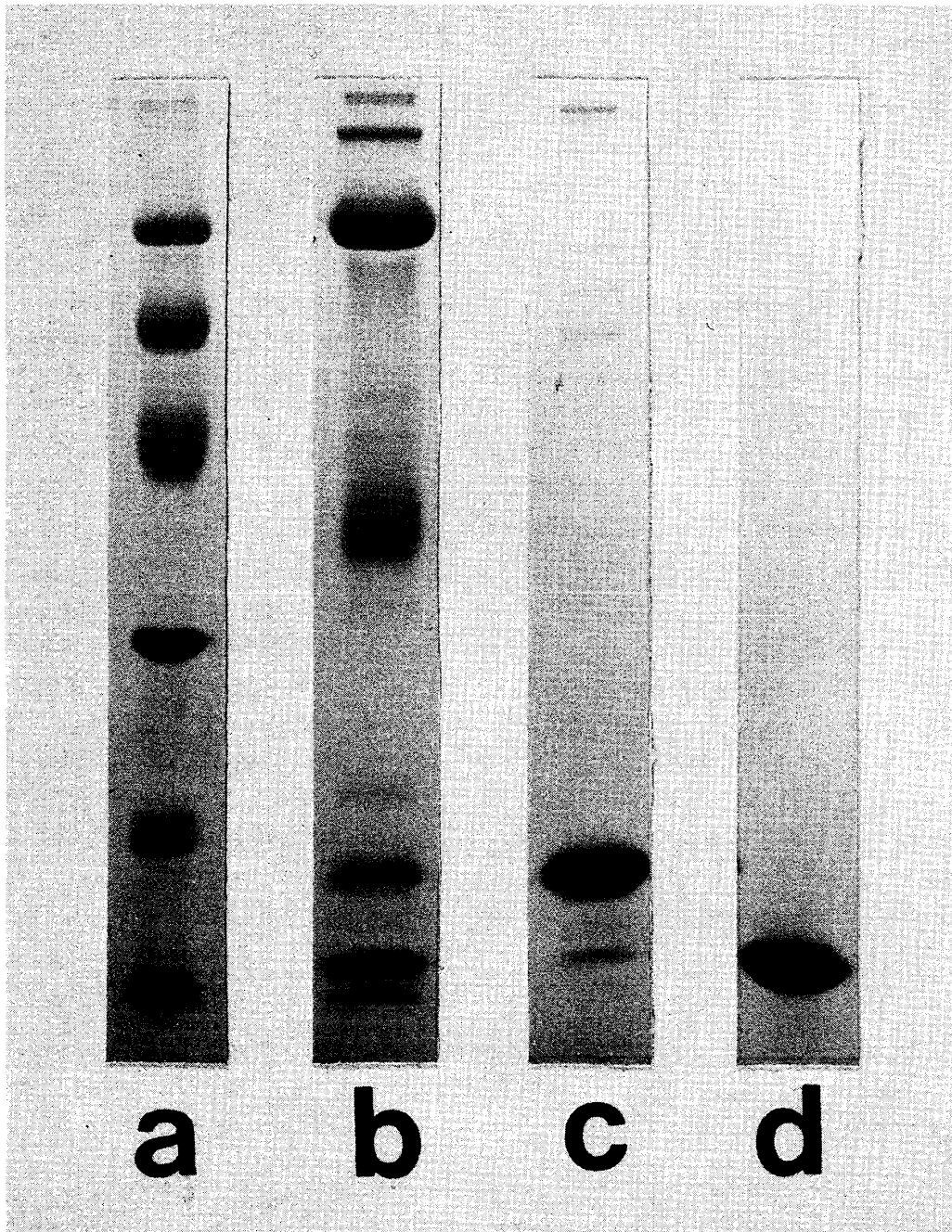
**Fig. 1** Purification of VMOI by CM-Toyopearl chromatography. The protein fraction (46.5 mg) solubilized by 10% NaCl from vitelline membrane was loaded on a CM-Toyopearl 650 M column (1.6 $\times$ 25 cm) previously equilibrated with 0.1 M acetate buffer, pH 4.6. After washing with 0.2 M NaCl in the same buffer, elution was performed by a linear gradient of 0.25-0.35 M NaCl in the same buffer over 400 ml. A flow rate was 38.0 ml/hr. The fractions eluted at 230 ml and 400 ml corresponded to VMOI and lysozyme, respectively.

は測定手段が違ふことからきていると思われる。塩基性アミノ酸の含量は11.9%と高いが、リゾチームの14%よりは少なく、VMOIの等電点(pI=10.0)がリゾチームのもの(pI=11.0)より小さいことと一致した<sup>16)</sup>。またVMOIにはMetが含まれていない。Table 1には、Proを5個持つと仮定した場合のアミノ酸残基

数を参考までに示した。この時の最小分子量は17,016である。

### 3. キモトリプシン処理したVMOI断片の分離

キモトリプシン消化したVMOI断片を逆相HPLCで分離した。カラムは、オクタデシル鎖を結合相として持つ $\mu$ BONDAPAKを使用した。Fig. 3は消化処



**Fig. 2** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Samples applied to the gradient polyacrylamide gel (10-15%) were as follows; marker proteins (lane a), the SDS-soluble fraction obtained from vitelline membrane (lane b), the fraction eluted at 230 ml (lane c) and 400 ml (lane d) in CM-Toyopearl Chromatography as depicted in Fig. 1. The marker proteins used for estimation of molecular weight were, from the top, phosphorylase b (94,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,100),  $\alpha$ -lactalbumin (14,400).

**Table 1** Amino Acid Composition of VMOI.

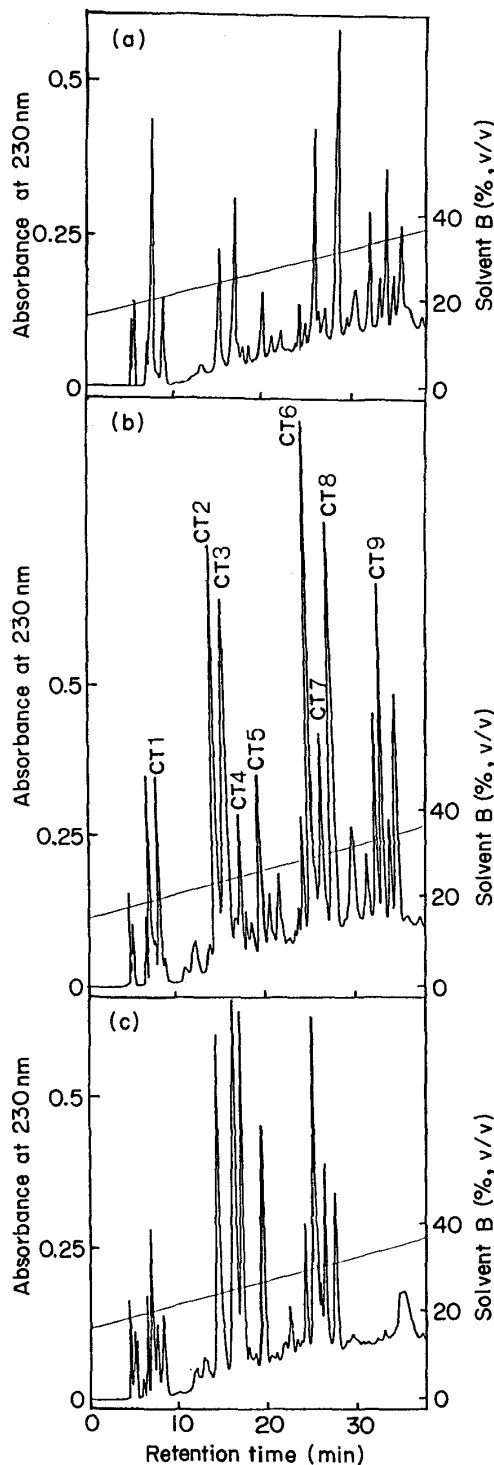
The results are expressed by the residues per 100 residues. In comparison, the amino acid composition of VMOI determined by Back<sup>5)</sup> and that of hen egg lysozyme are shown. The numbers of residues per molecule of VMOI are calculated by taking Pro as the base and given in parentheses.

Amino acid	VMOI	VMOI <sup>1)</sup>	Lysozyme
Asp	10.5( 16)	12.4	16.3
Thr	6.3( 10)	5.9	5.4
Ser	8.7( 13)	8.4	7.8
Glu	8.8( 13)	7.9	3.9
Pro	3.3( 5)	3.5	1.5
Gly	12.8( 19)	14.0	9.3
Ala	4.6( 7)	4.6	9.3
Cys	4.5( 7)	3.8	6.2
Val	6.3( 10)	6.9	4.7
Met	0( 0)	0	1.5
Ile	3.0( 5)	2.6	4.7
Leu	8.3( 13)	7.9	6.2
Tyr	2.4( 4)	2.3	2.3
Phe	4.7( 7)	5.6	2.3
Lys	3.5( 5)	4.7	4.7
His	1.0( 2)	0.9	0.8
Arg	7.4( 11)	6.2	8.5
Trp	4.0( 6)	2.6	4.7
Total	100.1(153)	100.2	100.1

<sup>1)</sup> See Ref. 5)

理時間による経過を見たもので、(a), (b), (c) はそれぞれ0.7, 2.5, 15時間反応させたものである。Fig. 3 では230 nmでの吸収を示しているが、Trpを含むペプチドに注目するため先に280 nmで測定し吸収の大きかったピークを全て教え、CT1~CT9と名づけた。消化時間を0.7から2.5時間に延ばすと、CT2, CT3, CT6, CT9が増え、CT4, CT7が新しく現れた。この結果より十分に分解するには2.5時間程度必要だと思われる。さらに15時間消化した場合、CT3, CT4が増えるがCT8は減少し、CT9は消失する。この場合、キモトリプシンの特異性が失われる可能性もある。従って、ピーク数が多く、また芳香族アミノ酸残基で特異的な切断が行なわれたと思われる2.5時間消化の断片を用いて後の実験をすることとした。尚、溶出時間から考えてCT2, CT3などのピークは短いペプチドで、CT8, CT9などのピークは疎水性アミノ酸を含む長いペプチドと推定される<sup>17)</sup>。

次にCT3, CT4, CT7, CT8, CT9の画分について



**Fig. 3** Separation of the peptides obtained from chymotryptic digestion at 25°C for 0.7 hr (a), 2.5 hr (b) and 15 hr (c).

The chymotryptic digests were directly loaded on a  $\mu$ BONDAPAK reverse-phase column (0.78 $\times$ 30 cm) equilibrated with solvent A. Elution was performed by raising linearly the concentration of solvent B in solvent A from 16% to 36% over 25 min. Solvent A was aq. 0.1% trifluoroacetic acid and solvent B was acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid. A flow rate was 2.0 ml/min. The isolated fragments that were subjected to amino acid sequence analysis were designated as CT1, CT2, and so on.

は、2つ以上のペプチドを含むことがわかったので、再クロマトグラフィーを行なった。使用したカラムは、先程のカラムと同じオクタデシル鎖を結合相として持つが、多少吸着力の違う  $\mu$ BONDASPHERE を使用した。CT9 は分離できなかったが、他のペプチドでは Fig. 4 のように少なくとも2つのピークが見られた。分離されたピークは溶出時間の早いほうから a, b と名付けた。CT3b と CT4a はほぼ同じ溶出位置にあり、同じペプチドと思われる。尚、CT8 では後述するように CT8a を含むより長いペプチドを得ており、これを CT8A と呼ぶ。

#### 4. キモトリプシン断片のアミノ酸組成

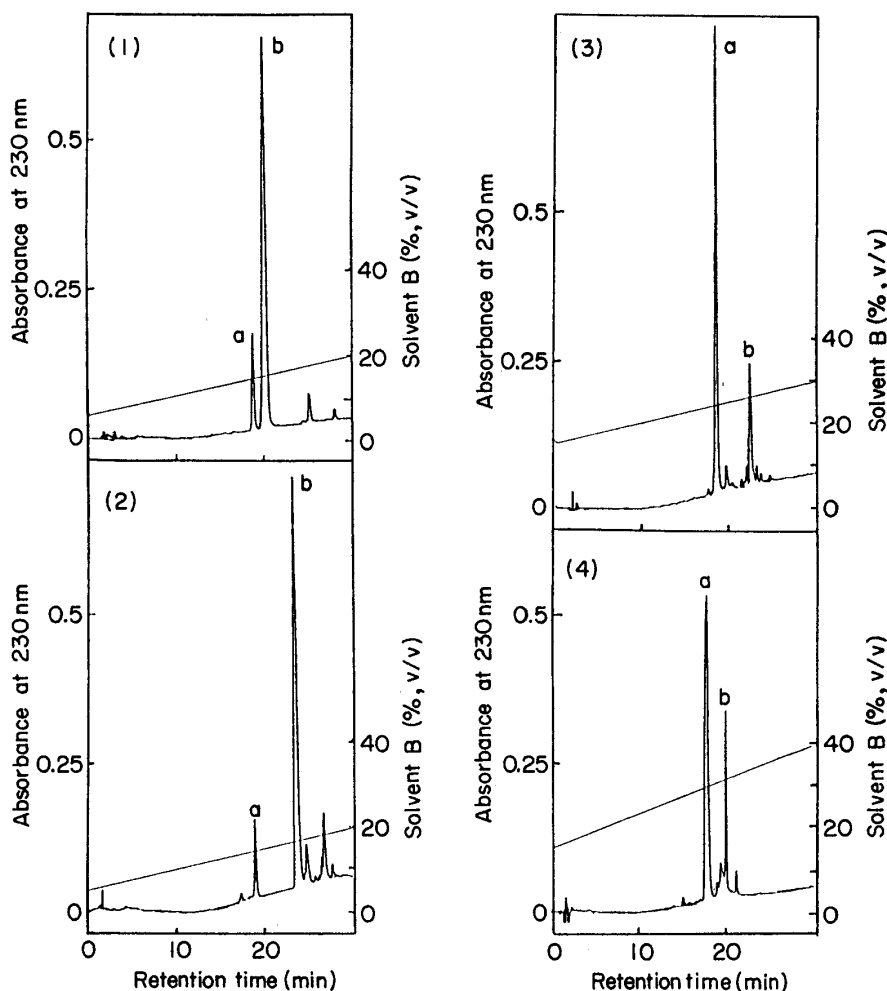
Table 2 に CT 1 から CT 9 までのアミノ酸組成と推定アミノ酸残基数をまとめた。CT1 から CT5 までのペプチドは5残基以下の短いペプチド、CT6 から

CT9 までのペプチドは11残基以上の長いペプチドと思われる。Tyr や Phe を含むペプチドは CT1, CT7b, CT8a, CT8b, CT9 の5つで、残りのペプチドは吸光度が高いことから考えてC末端は Trp で終わっているものと思われる。

尚、CT4a は CT3b と同じ組成を持つため、表にはあげていない。CT8A は試料が少なくアミノ酸分析は行なうことができなかった。

#### 5. VMOI とキモトリプシン断片のアミノ酸配列

手動式エドマン法によって決定した配列を Table 3 にまとめた。CT1 から CT5 はパーティショニング法で、残りはフィルム法を用いて行なった。どちらの方法でも収量はあまり変わらなかった。各断片の配列は、CT8b と CT6 の一部を除き、アミノ酸分析の結果と一致した。キモトリプシン断片のC末端に期待され



**Fig. 4** Rechromatography of the chymotryptic peptides. The chymotryptic peptides, CT3 (1), CT4 (2), CT7 (3) and CT8 (4), obtained from the first chromatography (Fig. 2) were loaded on a  $\mu$ BONDASPHERE reverse-phase column (0.39 $\times$ 15 cm) equilibrated with solvent A. The concentration of solvent B in solvent A was linearly raised as indicated. The composition of solvents A and B were described in the legend to Fig. 3. A flow rate was maintained at 1.0 ml/min.

**Table 2** Amino Acid Composition of The Chymotryptic Fragments.  
Residues per 100 residues are shown. The numbers of residues estimated for the chymotryptic peptides are given in parentheses. A trace amount of amino acid detected is indicated by  $\pm$ .

Amino acid	Chymotryptic fragments											
	CT1	CT2	CT3a	CT3b	CT4b	CT5	CT6	CT7a	CT7b	CT8a	CT8b	CT9
Asp	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	10.7( 1)	16.7( 1)	15.0( 3)	$\pm$	7.9( 2)	6.2( 1)
Thr	20.2( 1)	$\pm$	0	45.3( 1)	$\pm$	0	17.0( 2)	$\pm$	5.4( 1)	$\pm$	11.4( 3)	$\pm$
Ser	$\pm$	$\pm$	100.0( 1)	$\pm$	$\pm$	$\pm$	9.2( 1)	16.7( 1)	13.0( 2)	0	10.2( 3)	14.8( 3)
Glu	20.1( 1)	$\pm$	0	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	13.5( 2)	0	7.6( 2)	6.7( 1)
Pro	0	$\pm$	0	0	$\pm$	46.9( 1)	10.2( 1)	0	$\pm$	17.2( 1)	6.1( 2)	0
Gly	$\pm$	54.1( 1)	$\pm$	54.7( 1)	36.2( 1)	53.1( 1)	21.4( 2)	33.3( 2)	9.6( 2)	37.5( 2)	16.5( 5)	18.2( 3)
Ala	$\pm$	$\pm$	0	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	5.7( 1)	0	4.0( 1)	0
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	$\pm$	0	$\pm$	3.8( 1)
Val	0	0	0	0	31.4( 1)	0	15.0( 2)	14.3( 1)	7.9( 1)	$\pm$	7.9( 2)	9.6( 2)
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	$\pm$	0	$\pm$	$\pm$
Lle	0	0	0	0	$\pm$	0	6.3( 1)	0	5.5( 1)	0	4.2( 1)	4.8( 1)
Leu	$\pm$	$\pm$	0	0	$\pm$	0	$\pm$	19.0( 1)	12.6( 2)	0	6.3( 2)	12.9( 2)
Tyr	22.0( 1)	0	0	0	0	0	$\pm$	$\pm$	0	0	$\pm$	7.2( 1)
Phe	0	$\pm$	0	$\pm$	0	0	0	$\pm$	5.2( 1)	25.0( 1)	3.2( 1)	$\pm$
Lys	$\pm$	45.9( 1)	0	$\pm$	32.4( 1)	0	0	0	$\pm$	0	8.3( 2)	5.7( 1)
His	$\pm$	0	0	0	0	0	10.2( 1)	0	$\pm$	0	3.2( 1)	4.8( 1)
Arg	37.7( 2)	0	0	$\pm$	$\pm$	0	$\pm$	$\pm$	6.6( 1)	20.3( 1)	3.2( 1)	5.3( 1)
Total	100.0( 5)	100.0( 2)	100.0( 1)	100.0( 2)	100.0( 3)	100.0( 2)	100.0(11)	100.0( 6)	100.0(17)	100.0( 5)	100.0(28)	100.0(18)



る芳香族アミノ酸のうち Trp は CT2, CT3a, CT3b, CT5 及び CT6 の各断片で, Tyr は CT1 で確認された。芳香族アミノ酸の確認されなかった CT4a, CT4b, CT7a のうち, CT4a は先に述べたように CT3b と同一断片と判断できるのでこのC末端は Trp であるだろう。CT4b, CT7a はアミノ酸分析の結果と考え併せるとC末端は Trp である可能性が高い。

尚, CT7b の分析では PTH-アミノ酸を検出する事ができなかった。これは, 試料をフィルム状に乾燥した際に不溶性になったためと考えられた。CT8b の配列決定は6サイクル以上進まず, 決定された部分の配列は CT6 と一致した。アミノ酸分析の結果とあわせて考えると, CT8b は CT6 をN末端に含む, より長いペプチドと思われる。

自動式エドマン法によって決めた配列は Table 4 にまとめた。CT8A は37残基のアミノ酸より成り, その末端は Phe であり, 3段目と6段目にあらわれた Phe のところでは, キモトリプシンで切断されなかつ

たことがわかる。CT9 は, 1段目が Arg, 2段目が His, 3段目からは2つのアミノ酸が現れ, 6段目以降は再び1つのアミノ酸であった。2段目から5段目で検出されたアミノ酸のうち, VMOI の27段目から30段目にみられる HSGY に相当するものを CT9-2 とし, 残りの配列を CT 9-1 として推定した。未変性の VMOI は40段目の Pro まで決定できた。この中には5段目の Tyr, 17段目と20段目の Trp, 25段目の Phe が含まれていた。

### 考 察

本研究では, VMOI のキモトリプシン処理によって得られた芳香族アミノ酸を含む14本の断片についてアミノ酸配列分析を行ない, また同時に VMOI のN末端からの配列も一部決定した。

同定できたアミノ酸残基数はキモトリプシン断片で 94, VMOI のN末端からは39であった。一部不明な点はあるが, これら同定したアミノ酸配列のうち重複す

**Table 3** Amino Terminal Sequences of The Chymotryptic Peptides Determined by The Manual Edman Degradation Method. Amounts of peptides used for sequence analysis are given under the fragment names. The values in each cycle show the yields in nmols.

Cycle	CT1	CT2	CT3a	CT3b	CT4a
	16.5	7.6	1.2	7.5	0.8
1	R 3.9	G 6.7	S 0.7	G 1.6	G 0.6
2	T 4.3	K 2.9	W 0.2	T 1.3	T 0.3
3	R 3.7	W 1.0		W 0.8	
4	E 2.9				
5	Y 2.3				
Cycle	CT4b	CT5	CT6	CT7a	CT8b
	4.7	2.6	9.1	1.1	1.0
1	V 4.4	G 3.1	T 5.2	V 1.0	T 0.3
2	G 1.8	P 1.3	S 2.5	G 0.3	S 0.1
3	K 1.7	W 1.6	V 6.0	D 0.3	V 0.2
4			I 3.9	G 0.5	I 0.2
5			T 3.5	L 0.3	T 0.1
6			V 4.7	S 0.0	V 0.1
7			P 1.3		
8			N 0.3		
9			G 0.5		
10			G 0.4		
11			(H) <sup>D</sup>		
12			W 0.4		

<sup>D</sup> The presence of His was indicated from the result of amino acid analysis.

**Table 4** Amino Terminal Sequences of The Chymotryptic Peptides and VMOI Determined by An Automated Sequencer.

The values show the yields in pmoles. In the case of Ser residues, most of PTH-Ser were converted to PTH-dehydro Ser, and were not quantitated, but clearly identified. The amino acid residues indicated by asterisks were not identified.

CT8A		CT9			VMOI	
Cycle	1140	Cycle	(CT9-1) <sup>2600</sup>	(CT9-2)	Cycle	3000
1	G 634	1	R 563	(*) —	1	R 428
2	R <sup>1)</sup>	2	(*) —	H 536	2	T 521
3	F 750	3	L 2430	S —	3	R 1459
4	G 611	4	D 1245	G 2070	4	E 1316
5	P 173	5	G 2633	Y 1148	5	Y 1687
6	W 236	6	S —		6	T 446
7	S —	7	V 1508		7	S —
8	K 184	8	I 1283		8	V 2621
9	(*) —	9	E 683		9	I 1579
10	(*) —	10	S —		10	T 416
11	K 240	11	L 1091		11	V 2516
12	I 308	12	V 844		12	P 769
13	S —	13	G 1028		13	N 1073
14	G 311	14	K 1058		14	G 2126
15	L 293	15	W 176		15	G 2471
16	Q 154				16	H 660
17	T 45				17	W 420
18	K 184				18	G 1643
19	V 173				19	K 780
20	E 135				20	W 458
21	S —				21	G 1759
22	P 49				22	I 983
23	Q 64				23	R 2025
24	G 109				24	Q 713
25	L 86				25	F 960
26	(*) —				26	(*) —
27	D 53				27	H 150
28	D 60				28	S —
29	(*) —				29	G 1151
30	A 173				30	Y 698
31	L 56				31	A 1635
32	N 41				32	N 334
33	N 60				33	G 1058
34	V 26				34	F 551
35	(*) —				35	A 2216
36	F 68				36	L 536
37	F 94				37	K 495
					38	V 874
					39	E 188
					40	P 218

<sup>1)</sup> Determined as Arg by the manual Edman method.

るものを除き、まとめて整理したのが Fig. 5 である。ここに示すように CT1, CT6, CT2 は VMOI の N 末端とよく一致した。ただし CT6 の第11段目の His は配列分析では同定できなかったが、アミノ酸組成より明らかである。Cys と Trp を除外すれば、CT9 のアミノ酸分析の結果は CT9-1 と CT9-2 のアミノ酸配列の結果と一致した。Cys の含量がアミノ酸分析で低かった理由を、還元カルボキシメチル化していない VMOI を試料としたためであるとすれば、CT9-1 の 2 段目と CT9-2 の 1 段目は Cys と推定される。さらにこの 2 つのペプチドは、再クロマトグラフィーでも分離されなかったことから、ジスフィルド結合していることが考えられる。CT5 は CT8A の 3 段目から 5 段目に位置する。CT8a の配列分析は今回行なわなかったが、アミノ酸分析の結果より CT8A の 1 段目から 5 段目と推定された。CT7a は 6 段目まで解析され、アミノ酸分析の結果と一致する。しかし C 末端が Ser で終わることは考えにくく Trp と推定される。また CT3a は Ser-Trp となっており CT7a の C 末端と重複すると考えられる。CT4b はアミノ酸分析の結果と一致するが、やはり C 末端が Lys で終わることは考えにくい。また、これは CT9-1 の 12 段目からの配列によくあてはまる。このことからこのペプチドの C 末端は Trp であると推定された。

以上より、結局、本実験では VMOI の 95 残基の配列を決定したことになり、アミノ酸分析より推定された全アミノ酸残基数 153 の 62% が決定されたことになる。特に 6 個ある Trp の周辺のアミノ酸配列は全て決定された。

Fig. 6 にはリゾチームのアミノ酸配列を示してあり、特に活性部位及び基質結合部位に存在し、活性発現に重要とされているアミノ酸残基は枠で囲んで示してある<sup>7)</sup>。本研究で解明された VMOI の部分配列、つまり VMOI の N 末端部、CT8A, CT9-1, CT7a の各フラグメントをこのリゾチームの配列と比較してみた。各フラグメントの配列順序を考慮せずに比較してみても明らかな類似性は見当らない。そこでジペプチドで類似する箇所を捜してみると Fig. 6 に点線で示すように数十箇所あった。しかし、リゾチームの活性発現に重要となる部位では 2 箇所 (Glu35 と Gln57) だけしか

果と一致するが、やはり C 末端が Lys で終わることは考えにくい。また、これは CT9-1 の 12 段目からの配列によくあてはまる。このことからこのペプチドの C 末端は Trp であると推定された。

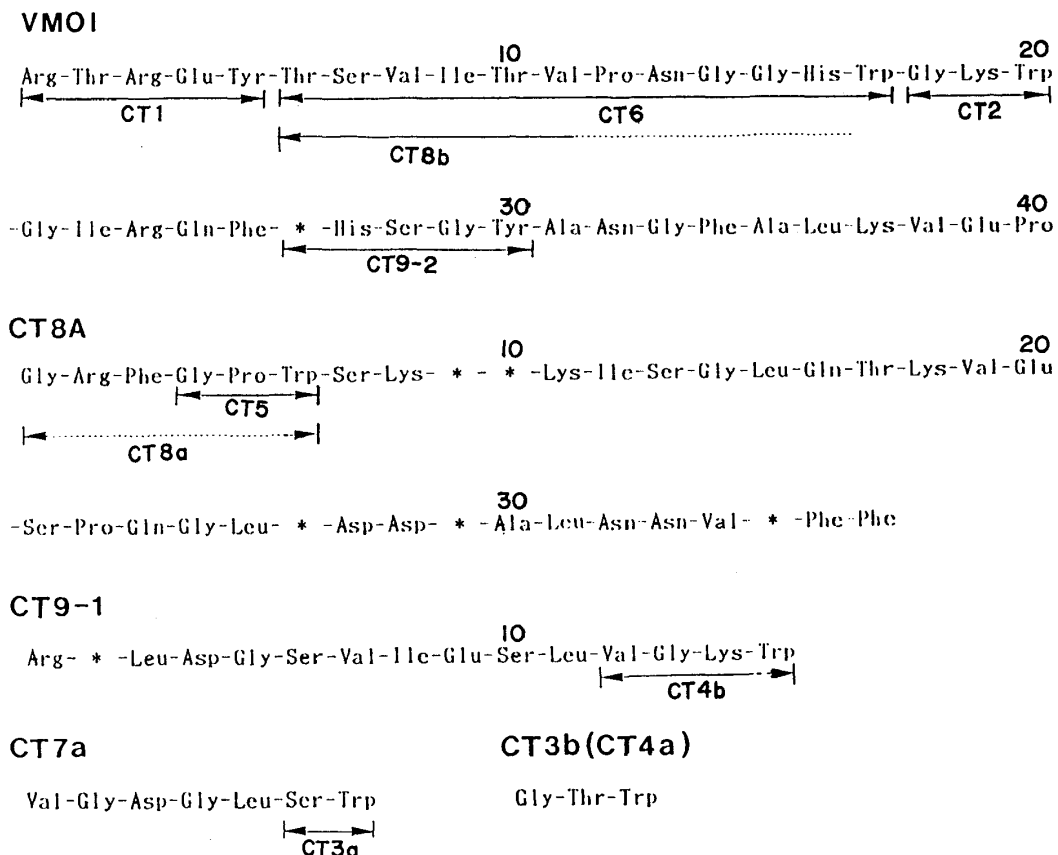


Fig. 5 Summary of the chymotryptic fragment analysis of VMOI. Peptides indicated by solid lines were determined by sequence analysis. Peptides shown by dotted lines were estimated from the results of amino acid composition analysis. The amino acid residues indicated by asterisks were not identified.

見当らず、一致の見られた配列を含む CT8A と CT9-1 のそれぞれの対応する部分でもその周辺における配列は全く異なっていた。さらにトリペプチドに拡げて調べてみると1箇所しか一致する部分はなく、その周辺の配列は全く対応が見られなかった。このようにこれまでに判明した限りでは、VMOI とリゾチームとはそれらの一次構造には部分的にも類似性が見当らず、活性部位に関してもほとんど類似性はないといえる。

また、リゾチームの Trp62 と Trp63 は、水素結合によって基質を安定化させており、Trp108 は Glu35 の活性の発現に必要とされていることが示されている<sup>7)</sup>。そこで Trp の周辺についても注目してみたが、リゾチームと一致するところは全くないことがわかった。今後、配列の決定できなかつた残りの38%の部分にリゾチームとの一次構造上の類似点が見つかる可能性は否定できないが、現時点では VMOI はリゾチームと全く異なる一次構造を持っていると結論できるだろう。

VMOI の二次構造は、円二色分光測定の結果によるとリゾチームとは大きく異なっていると思われる<sup>16)</sup>。もし VMOI にリゾチーム様活性があるとすれば、これら2つの酵素は異なる一次、二次構造を持ちながらも共通する N-アセチルグルコサミンダーゼ活性を持

つことになり、VMOI 触媒機能の発現機構を解明することは極めて興味深い。

VMOI の全一次構造の解析を進めてゆく際に参考になると思われるいくつかの知見が本研究で明らかになった。VMOI の N 末端部に Asn-Gly 結合が2箇所あり、ヒドロキシアミンを用いてこの結合を選択的に切断することは可能である。またアミノ酸分析によれば Lys が5個あり、今回決めたペプチドの配列中にその全てが存在したのでリジルエンドペプチターゼを用いてキモトリプシン断片と重複するペプチドを得ることが出来るだろう。

### おわりに

本実験で、VMOI の約62%に相当するアミノ酸配列を決定することが出来た。特に、キモトリプシン処理によって得られる6個の Trp を含むペプチドについては全て決定した。決定された VMOI の部分配列とリゾチームの一次構造とを比較すると、VMOI にはリゾチームの活性に必須とされる Trp 周辺の配列にも類似性は見あたらず、判明した限りではリゾチームと全く異なる一次構造を持つと結論出来た。また二次構造も異なっていることを考慮すると、もし VMOI にリゾチーム様活性があるとすれば、VMOI の触媒機能

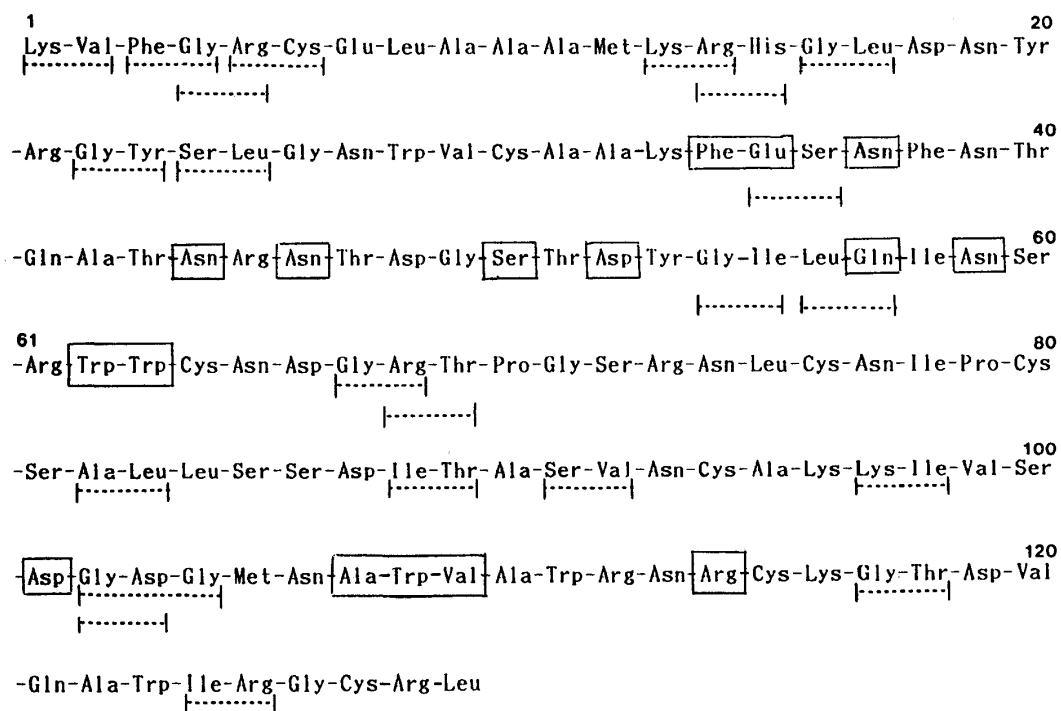


Fig. 6 Sequence comparison between hen egg lysozyme and the chymotryptic peptides of VMOI. The amino acid residues surrounded by lines are those found in the catalytic site and the substrate binding site of lysozyme. The peptides indicated by dotted lines correspond to a part of chymotryptic fragments of VMOI.

の発現機構はリゾチームと大きく異なる可能性が示唆された。

最後になりましたが、御指導頂いた土居幸雄先生、並びに木戸詔子先生、そしてアミノ酸配列自動分析機による解析でお世話頂いた(株)蛋白工学研究所の金谷茂則さんに心からのお礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson: *Molecular Biology of The Cell*, (Garland Pub., New York), Chap. 14 (1983).
- 2) S. Kido, M. Janado and H. Nunoura: *J. Biochem.*, **78**, 261-268 (1975).
- 3) S. Kido, M. Janado and H. Nunoura: *J. Biochem.*, **79**, 1351-1356 (1976).
- 4) S. Kido, M. Janado and H. Nunoura: *J. Biochem.*, **81**, 1543-1548 (1977).
- 5) J. F. Back, J. M. Bain, D. V. Vadehra and R. W. Burley: *Biochim. Biophys. Acta* **705**, 12-19 (1982).
- 6) S. Kido and Y. Doi: *Poultry Science*, **67**, 476-486 (1988).
- 7) Taiji Imoto, L. N. Johnson, A. C. T. North, D. C. Phillips, and J. A. Rupley: *The Enzymes vol. VII*, (Academic Press, New York and London), Chap. 21 (1972).
- 8) 木戸詔子, 金 喜美, 土居幸雄: *生化学*, **60**, 992 (1988).
- 9) 木戸詔子, 土居幸雄, 謝名堂昌信: *生化学*, **59**, 737 (1987).
- 10) J. F. Back: *Biochim. Biophys. Acta* **799**, 319-321 (1984).
- 11) U. K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 12) 高橋礼子: *生化学実験講座*, 第1巻, タンパク質の化学II, 日本生化学編, (東京化学同人), 76-81 (1977).
- 13) H. Edelhock: *Biochemistry*, **6**, 1948-1954 (1967).
- 14) Marion M. Bradford: *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 15) 小林龍二, G. E. Tarr: *蛋白質 核酸 酵素*, **31**, 991-1003 (1986).
- 16) 木戸詔子, 土居幸雄, 金 喜美: 未発表データ
- 17) J. L. Meek: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 1632-1636 (1980).