

ガスクロマトグラフィーによるたんぱく質の定性分析法の検討

片山 翔太*, 森岡 菜摘*, 徳岡 太誠*, 西崎 有美*, 片山 貴之*

Qualitative analysis of proteins by gas chromatography

KATAYAMA Shota *, MORIOKA Natsumi *, TOKUOKA Taisei *, NISIZAKI Yumi * and KATAYAMA Takayuki *

*Kobe Customs Laboratory, 12-1, Shinko-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, 650-0041 Japan

Proteins are classified differently in the Customs Tariff Schedule depending on their components and whether they are mixed or not. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), which is generally carried out for the qualitative analysis of proteins, involves the preparation of the gel requiring skill and experience as well as a complicated measurement procedure. In this study, we examined whether it is possible to carry out a qualitative analysis of proteins by GC. We examined the conditions for decomposing proteins into amino acids and the conditions for derivatizing amino acid derivatives. Next, we examined the GC measurement conditions for the derivatized amino acids and identified proteins based on the obtained amino acid composition ratios. The results suggested the possibility of qualitative analysis of proteins by GC.

1. 緒 言

たんぱく質は、牛乳、卵、大豆などから抽出又は分離して得られるが、その原料や分離された成分により関税率表上の所属区分が異なる。例えば、ミルク由来のたんぱく質であるカゼインは、関税率表第 3501.10 号に分類されるが、同じミルク由来のたんぱく質であるミルクアルブミンは、第 3502.20 号に分類され、関税率も異なることから、関税率表上の所属区分を決定するうえで、たんぱく質の成分を調べることは重要である。

たんぱく質の同定に用いられる SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、「SDS-PAGE」という。）は、たんぱく質をゲルの分子ふるい効果によって、たんぱく質の分子量に基づいた大きさごとに分離後、たんぱく質を染色し、可視化した泳動像を標準品と比較することにより、たんぱく質の同定を行う分析方法であり、広くたんぱく質の分析に用いられている。しかし、SDS-PAGE は、ゲルの作製に技術と経験が必要であり、また、SDS-PAGE の測定機器は一部販売中止となるなど、SDS-PAGE によるたんぱく質の測定が現行よりも煩雑化する可能性がある。

そこで本研究では、ガスクロマトグラフ（以下、「GC」という。）を用いて、たんぱく質の定性が可能か確認することを目的とし、たんぱく質をアミノ酸に分解する条件、アミノ酸を誘導体化する条件及び GC 法において誘導体化したアミノ酸の測定条件を検討した。また、GC 法によって測定した各誘導体化したアミノ酸の含有量を用いてたんぱく質中のアミノ酸組成比を算出し、たんぱく質の同定を行った。

2. 実 験

2.1 試 薬

アセトニトリル、アミノ酸混合標準液 H 型、硫酸、水酸化ナトリウム、N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA)（以上、富士フイルム和光純薬）、塩酸（林純薬工業）
6 N 塩酸：塩酸を 625 g 量り取り、純水で 1 L に定容したもの
10 N 硫酸：硫酸 280 mL を 720 mL の純水に加えたもの
6 N 硫酸：硫酸 169 mL を 831 mL の純水に加えたもの
フェノールフタレイン溶液：フェノールフタレイン 100 mg を 9 mL のエタノールで溶解させ、1 mL の純水を加えたもの
15 N 水酸化ナトリウム：水酸化ナトリウム 300 g を 500 mL の純水に溶かしたもの

2.2 試 料

カゼイン（和光純薬工業）

2.3 装 置

GC : 8890 (Agilent Technologies)
マントルヒーター : Heating mantle (MTOPS)
恒温水槽 : Water Bath BS660 (ヤマト科学)
真空低温乾燥器 : VOS-301SD (東京理化器械)
ヒートブロック : ThermoMixer comfort (エッペンドルフ)

2.4 実 験

2.4.1 誘導体化試薬 MSTFA の検討

アミノ酸（アラニン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、ブ

* 神戸税関業務部 〒650-0041 兵庫県神戸市中央区新港町 12-1

ロリン)各 0.2 mg を 1.5 mL エッペンドルフチューブに量り取り、MSTFA を 50 μ L 加え、ヒートブロックで 37 $^{\circ}$ C, 30 分間加熱したのち、アセトニトリルを 1 mL 加え、ボルテックスミキサーで攪拌したものを GC バイアルに採取し、検液とした。

2.4.2 誘導体化したアミノ酸の GC 条件の検討

アミノ酸混合標準液 H 型 1 mL を 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し、減圧乾燥器により 100 $^{\circ}$ C, 常圧で 20 分間静置したのち、100 $^{\circ}$ C, -0.05 kPa で 10 時間減圧乾燥し、溶液を除去した。これに、MSTFA を 50 μ L 加え、ヒートブロックで 37 $^{\circ}$ C, 30 分間加熱したのち、アセトニトリルを 1 mL 加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、ポアサイズ 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過したものを GC バイアルに採取し、検液とした。また、GC 法による測定条件は以下のとおり行った。

分離カラム	: HP-5MS, 30 m \times 0.25 mm I.D., 膜厚 0.25 μ m (Agilent Technologies)
検出器	: 水素炎イオン化型検出器
検出器温度	: 300 $^{\circ}$ C
注入量	: 2 μ L
注入口温度	: 260 $^{\circ}$ C
スプリット比	: 20 : 1
キャリアガス	: H ₂
燃焼ガス流量	: 400 mL / min
検出器流量	: 30 mL / min (H ₂)
Makeup gas 流量	: 10 mL / min (N ₂)
カラム流量	: 0.45 mL / min
カラム温度	: 60 $^{\circ}$ C - (6 $^{\circ}$ C / min) - 174 $^{\circ}$ C (3 min) - (7 $^{\circ}$ C / min) - 280 $^{\circ}$ C (3 min)

2.4.3 たんぱく質の加水分解方法の検討

2.4.3.1 6 N 塩酸を用いた加水分解

カゼイン 1 g を 100 mL 分解管 (丸形シュレンク) に量り取り、6 N 塩酸を 30 mL 加えた。これを、アスピレーターを用いて 30 分間脱気し、封管したのち、マントルヒーターを用いて 110 $^{\circ}$ C, 24 時間加熱した。加熱後、冷却、開管し、分解管内の試料液を 6 N 塩酸で洗浄しながら全量を 100 mL 容メスフラスコに移し、6 N 塩酸で定容した。これから 10 mL をホールピペットで新たな 100 mL 容メスフラスコに移し、フェノールフタレイン溶液を 3 滴加えたのち、15 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて中和し、超純水で定容した。この溶液から 500 μ L を 1.5 mL エッペンドルフチューブに移したものを、減圧乾燥器により 100 $^{\circ}$ C, 常圧で 20 分間静置したのち、100 $^{\circ}$ C, -0.05 kPa で 6 時間減圧乾燥し、溶液を除去した。これに MSTFA を 50 μ L を加え、ヒートブロックで 37 $^{\circ}$ C, 30 分間加熱し、アセトニトリルを 1 mL 加えたのち、ボルテックスミキサーで攪拌した。そこから全量を、ポアサイズ 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過したものを GC バイアルに採取し、検液とした。

2.4.3.2 10 N 硫酸を用いた加水分解

カゼイン 1 g を 300 mL 三角フラスコ 6 つに量り取り、それぞれに 10 N 硫酸を 50 mL 加えた。これに空気冷却管を装着し、恒温水槽の沸騰浴上でそれぞれ 2 時間、4 時間、8 時間、12 時間、24

時間、36 時間加熱した。加熱終了後、三角フラスコ内の試料液を 10 N 硫酸で洗浄しながら全量を 100 mL 容メスフラスコに移し、10 N 硫酸で定容した。2.4.3.1 と同様の操作を行い、減圧乾燥で溶液を除去し、誘導体化を行ったのち、ろ過したものを検液とした。

2.4.3.3 6 N 硫酸を用いた加水分解

カゼイン 1 g を 300 mL 三角フラスコ 6 つに量り取り、それぞれに 6 N 硫酸を 50 mL 加えた。これに空気冷却管を装着し、恒温水槽の沸騰浴上でそれぞれ 2 時間、4 時間、8 時間、12 時間、24 時間、36 時間加熱した。加熱終了後、三角フラスコ内の試料液を 6 N 硫酸で洗浄しながら全量を 100 mL 容メスフラスコに移し、6 N 硫酸で定容した。2.4.3.1 と同様の操作を行い、減圧乾燥で溶液を除去し、誘導体化を行ったのち、ろ過したものを検液とした。

3. 結果及び考察

3.1 誘導体化試薬の検討

2.4.1 で調製した試料を GC-MS で測定した。誘導体化したアミノ酸はいずれもピークが確認でき、MS スペクトルにおいて、アミノ酸が誘導体化されていることを確認した。誘導体化試薬 MSTFA は反応時間が 30 分間と短く簡易的であり、1 回反応あたりの費用が安価なため、費用対効果が高い。

また、アミノ酸混合標準液 H 型に直接 MSTFA を加える方法を検討したところ、本検討ではアミノ酸の誘導体化を確認することはできなかった。これは MSTFA が水と反応しやすく、アミノ酸混合標準液 H 型中の水と MSTFA が反応してしまったため、誘導体化が阻害された可能性が考えられる¹⁾。さらに、アミノ酸 (アラニン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、プロリン) にアセトニトリル 1 mL を加えた溶液に MSTFA を 50 μ L 加える方法も検討したが、アミノ酸の誘導体化は僅かに確認できたのみであった。これは、MSTFA の濃度が低くなり、溶液中のアミノ酸と反応する確率が下がったためと考えられる。

3.2 誘導体化したアミノ酸の GC 条件の検討

2.4.2 で得られたクロマトグラムを Fig. 1 に示す。アミノ酸混合標準液 H 型に含有している 17 種類のアミノ酸のうち 16 種類のアミノ酸のピークが確認された。確認されたアミノ酸のうち、チロシン (①及び②)、ロイシン (③及び④)、プロリン (⑤及び⑥) は 2 つのピークが確認された。これは、MSTFA を用いたアミノ酸の誘導体化において、主にアミノ酸のカルボキシル基の水素とアミノ基の水素に一つずつトリメチルシリル化されるのに対し、別の反応としてアミノ基の二つ目の水素にトリメチルシリル化されたためと考えられ、これは、GC-MS の結果からも支持される。また、保持時間 15 分付近のイソロイシン及びプロリン並びに保持時間 20 分付近のメチオニン及びアスパラギン酸はピークを完全に分離をすることは難しく、ピーク下端にピークの重なりが認められた。ピーク面積値を算出する際はピークの重なりが極小値となる場所からベースラインに垂直に線を引き、分割したものをそれぞれのアミノ酸のピーク面積とした。

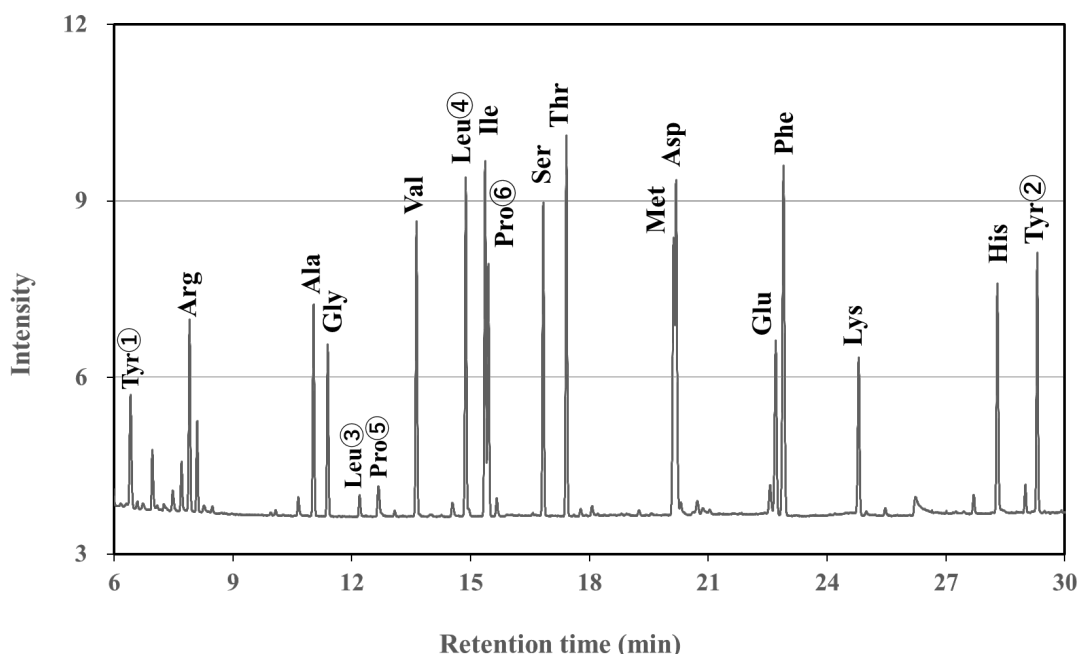


Fig. 1 Gas chromatogram of trimethylsilylation amino acids

Tyr① : L-Tyrosine, 2-TMS derivative, Tyr② : L-Tyrosine, 3-TMS derivative,
 Leu③ : L-Leucine, 2-TMS derivative, Leu④ : L-Leucine, 3-TMS derivative,
 Pro⑤ : L-Proline, 2-TMS derivative, Pro⑥ : L-Proline, 3-TMS derivative

3.3 たんぱく質の加水分解方法の比較

2.4.3.2 で調製した検液のうち、10 N 硫酸で 36 時間加水分解したものを 2.4.2 の条件で GC 法により測定して得られたクロマトグラムを Fig. 2 に示す。ピーク面積値が算出できるアミノ酸として 16 種類のアミノ酸を同定することができた。検出したアミノ酸のうち、チロシン (①及び②)、ロイシン (③及び④)、プロリン (⑤及び⑥) はピークが 2 つ確認できた。これらそれぞれの 2 種類のピークは同一のアミノ酸由来と考えられるため、この 2 つのピークの面積の合計をピーク面積値とした。

2.4.3.1 で調製した検液及び 2.4.3.2 で調製した検液を 2.4.2 の条件で GC 法により測定して得られたクロマトグラムから各アミノ酸のピーク面積を比較したものを Fig. 3 に示す。10 N 硫酸で加水分解した各アミノ酸のピーク面積値は時間経過とともに大きくなることが確認された。6 N 塩酸と 10 N 硫酸で加水分解した結果を比較したところ、6 N 塩酸で 24 時間加水分解した際のピーク面積値と 10 N 硫酸で 36 時間加水分解した際のピーク面積値は全てのアミノ酸において同程度であり、同等の加水分解ができていると考えられる。よってカゼインの加水分解において、硫酸は塩酸の代替として使用できることが確認できた。

2.4.3.1 で調製した検液及び 2.4.3.3 で調製した検液を 2.4.2 の条件で GC 測定して得られたクロマトグラムから各アミノ酸のピーク面積を比較したものを Fig. 4 に示す。6 N 硫酸で加水分解した各アミノ酸のピーク面積値は、10 N 硫酸の加水分解で検討した結果と同様に、時間経過とともに大きくなることが確認された。し

かし、6 N 硫酸で 36 時間加水分解した各アミノ酸のピーク面積値において、6 N 塩酸で 24 時間加水分解した各アミノ酸と同程度のピーク面積値を確認できたのはアルギニンとアスパラギン酸のみであり、他のアミノ酸は 6 N 塩酸で 24 時間加水分解した各アミノ酸と比較してピーク面積値が小さかった。このことから、6 N 硫酸で 36 時間加水分解した各アミノ酸のピーク面積値は、6 N 塩酸で加水分解した際の各アミノ酸のピーク面積値に比べ小さく、6 N 硫酸の条件では加水分解が不十分であった可能性が考えられる。

なお、塩酸を使用する際に用いる分解管は、脱気を行う形状から、開口部が細く、試料や溶液を入れにくいいため、加水分解可能な試料量にも限界がある。また、分解管を加熱するためのヒートブロックも分解管の形状に合わせて準備する必要がある。一方で、硫酸を使用する際に用いる三角フラスコは沸騰浴上で空気冷却管を装着するのみで反応を行うことが可能であり、恒温水槽に設置することができれば、三角フラスコの形状にそれぞれに合わせた恒温水槽を準備する必要はない。三角フラスコは大きいサイズに変更することが容易であり、分解管に比べ多くの試料量を入れることができる。さらに、測定する試料量が多くなれば試料全体の特性をより反映させることができるため、測定値の信頼性が向上すると考えられる。よって、10 N 硫酸による加水分解は 6 N 塩酸よりも加水分解時間が長くなるものの、塩酸による加水分解よりも簡易かつ試料採取量を増やせるメリットがあると考えられる。

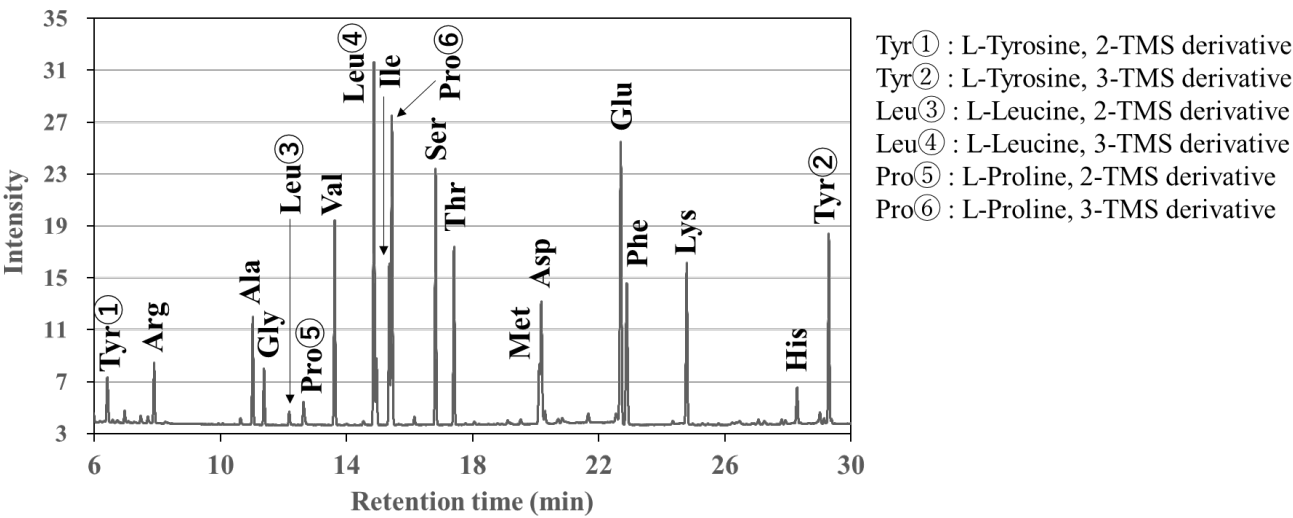


Fig. 2 Gas chromatogram of amino acids hydrolyzed with 10 N Sulfuric acid (36 h)

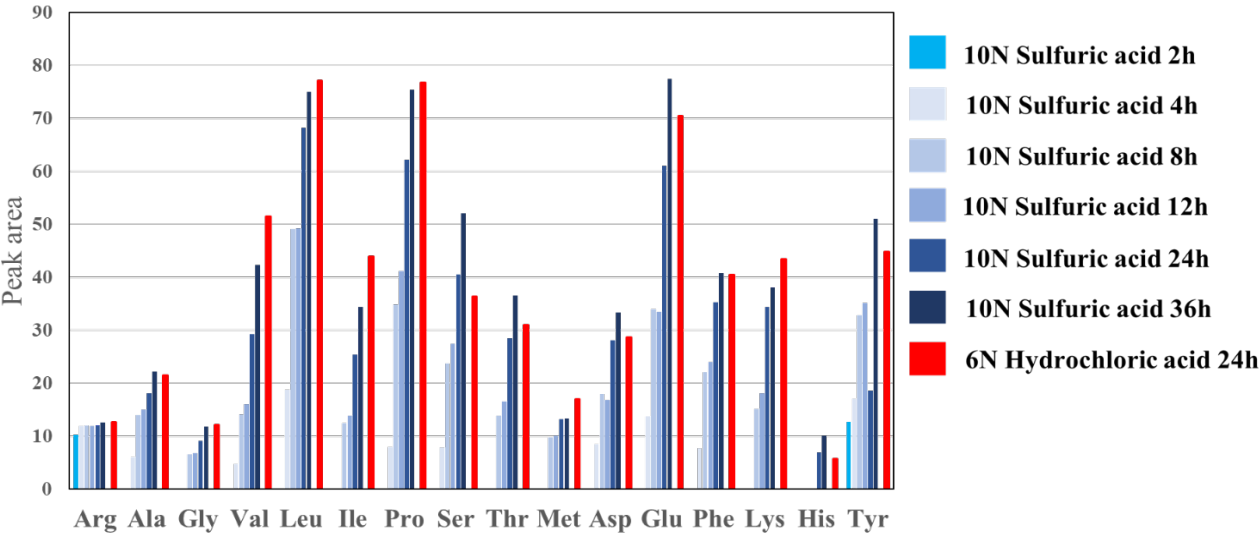


Fig. 3 Comparison bar graph of peak area of amino acids hydrolyzed with 10 N Sulfuric acid and 6 N Hydrochloric acid

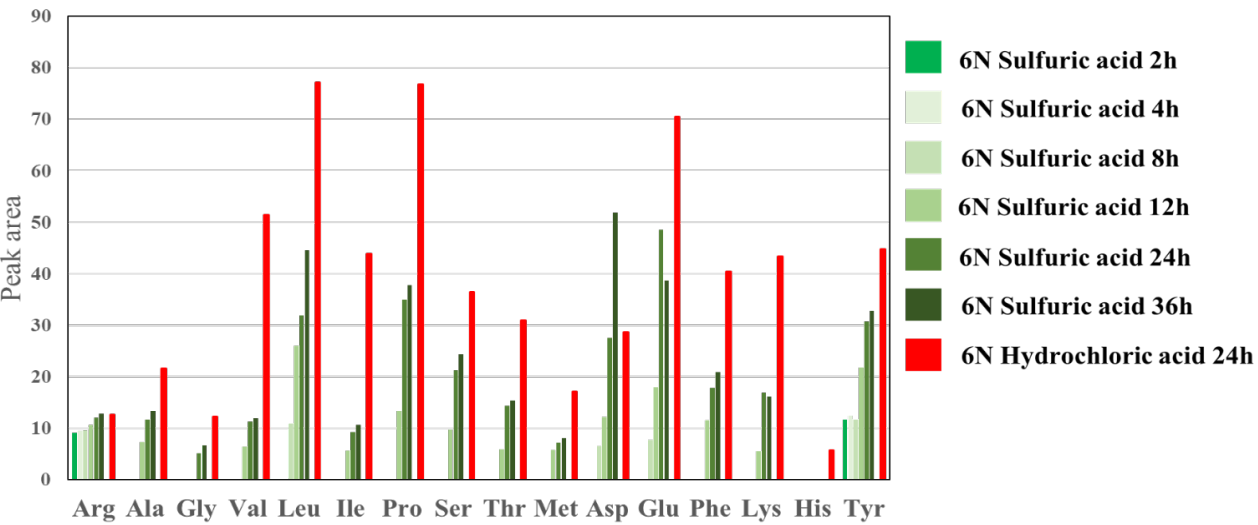


Fig. 4 Comparison bar graph of peak area of amino acids hydrolyzed with 6 N Sulfuric acid and 6 N Hydrochloric acid

3.4 アミノ酸組成の算出

3.3 で得られた 10 N 硫酸で 36 時間加水分解したアミノ酸を MSTFA で誘導体化したもののクロマトグラム及びアミノ酸混合標準液 H 型を MSTFA で誘導体化したもののクロマトグラムを比較し、各アミノ酸のピーク面積値（チロシン、ロイシン、プロリンは 2 つのピークの合計）からカゼインのアミノ酸組成比を算出した。このアミノ酸組成比と日本食品標準成分表²⁾に記載のカゼインのアミノ酸組成比を比較した結果を Fig. 5 に示す。なお、日本食品標準成分表に記載のカゼインのアミノ酸組成におけるシス

チンとトリプトファンは検出されなかったため、アミノ酸組成比の算出からは除外した。両者のアミノ酸組成比を比較すると、組成比が類似していることが確認された。

以上のことから、たんぱく質を 10 N 硫酸で加水分解し、分解物であるアミノ酸を誘導体化し、GC 法から算出したアミノ酸組成比を、日本食品標準成分表に記載のアミノ酸組成比と比較することにより、たんぱく質の定性の可能性が示唆された。

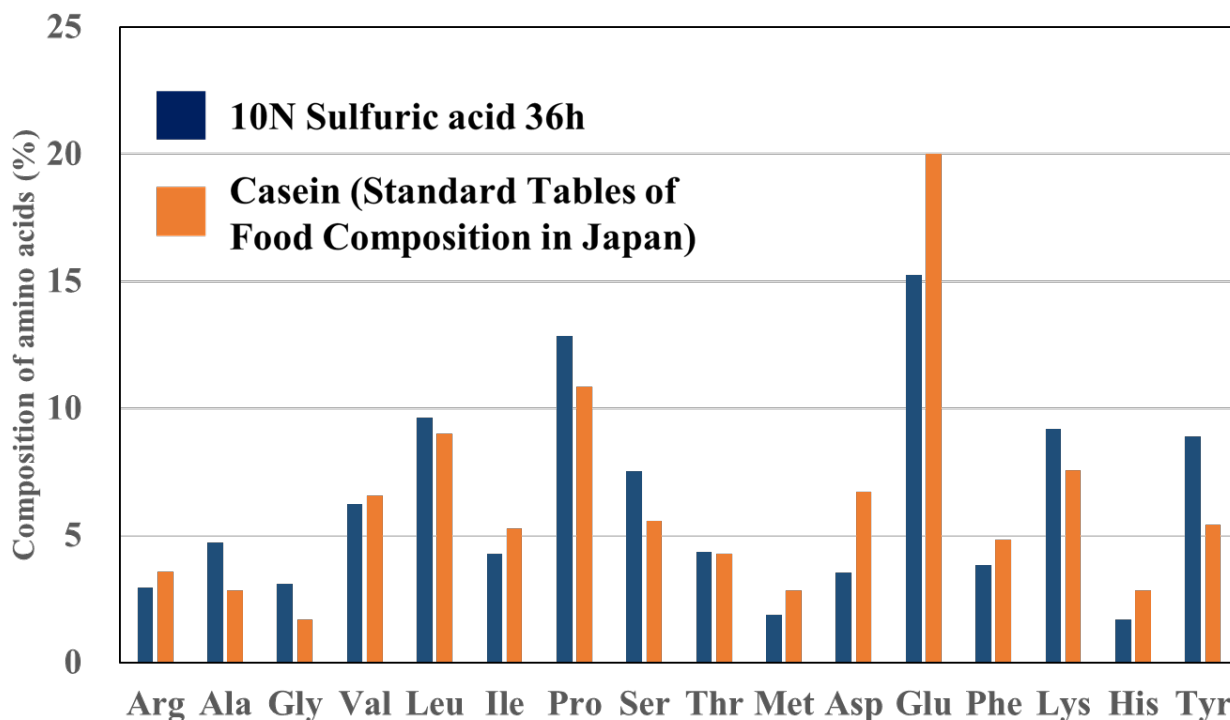


Fig. 5 Comparison bar graph of amino acids composition hydrolyzed with 10 N Sulfuric acid (36 h) and calculated for casein of Standard Tables of Food Composition in Japan

4. 要 約

本研究において SDS-PAGE の代替として GC 法による、たんぱく質の定性方法について検討を行った。10 N 硫酸によるカゼインの加水分解は、一般的な 6 N 塩酸よりも加水分解時間が長くなるものの、簡易的で試料量を増やせると考えられる。加水分解物であるアミノ酸は、MSTFA を用いることで誘導体化が可能であ

った。誘導体化したアミノ酸を GC 法で測定し、得られたクロマトグラムのピーク面積値からアミノ酸組成比の算出が可能であり、日本食品標準成分表のカゼインのアミノ酸組成比と比較することで同定が可能であった。以上の結果から、GC 法を用いたたんぱく質の定性が可能となることが示唆された。

文 献

- 1) 日本分析化学会 “ぶんせき⑦” (2008)
- 2) 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会 “日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）アミノ酸成分表編” (2021)