

アミノ酸のエドマン型蛍光試薬の開発

今給黎, 修
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

<https://doi.org/10.11501/3075410>

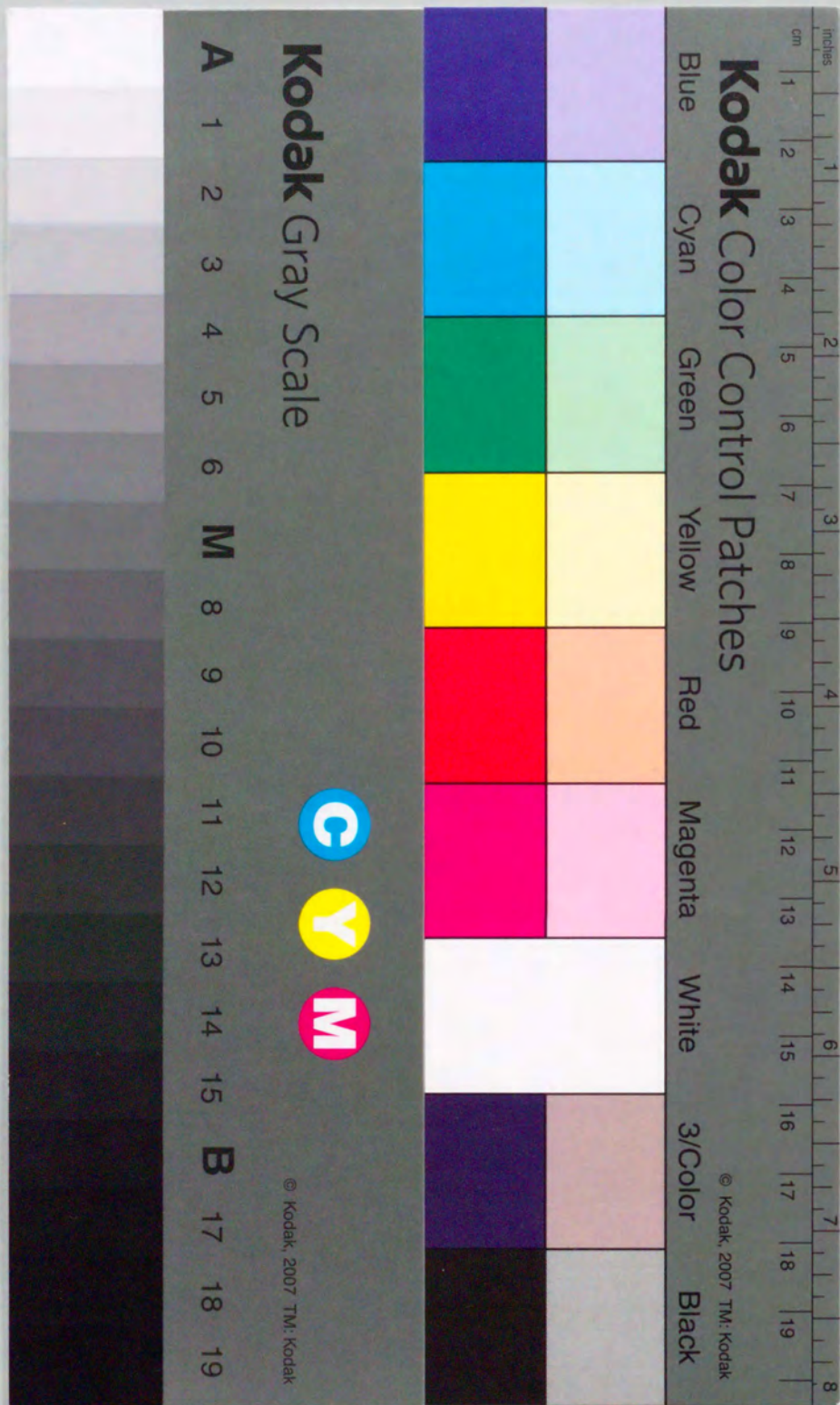
出版情報：九州大学，1993，博士（薬学），課程博士
バージョン：
権利関係：



アミノ酸のエドマン型蛍光試薬の開発

(1994)

今給黎 修



①

アミノ酸のエドマン型蛍光試薬の開発

(1994)

今給黎 修

目次

緒論	1
第1章 3-(2-フェナンスラオキサゾリル)フェニルイソチオ シアネートによるアミノ酸のプレカラム蛍光誘導体 化とHPLC	7
1-1 基準操作	7
1-2 蛍光スペクトルと安定性	10
1-3 m-POPTC-アミノ酸及びm-POPTH-アミノ酸のHPLC分離 条件	15
1-4 誘導体化反応条件	23
1-5 反応収率, 検量線及び検出限界	31
1-6 トリペプチドのエドマン分解	33
1-7 小括	40
第2章 4-(2-フェナンスラオキサゾリル)フェニルイソチオ シアネートによるアミノ酸のプレカラム蛍光誘導体 化とHPLC	42
2-1 基準操作	42
2-2 蛍光スペクトルと安定性	44
2-3 アミノ酸誘導体のHPLC分離	47
2-4 誘導体化反応条件	51

2 - 5	反応収率, 検量線及び検出限界	55
2 - 6	小括	58
第3章	4-(2-シアノイソインドリル)フェニルイソチオシア ネートによるアミノ酸及びジペプチドのプレカラム蛍 光誘導体化とHPLC	61
3 - 1	基準操作	61
3 - 2	蛍光スペクトルと安定性	64
3 - 3	アミノ酸誘導体のHPLC分離	67
3 - 4	ジペプチド誘導体のHPLC分離	69
3 - 5	誘導体化反応条件	69
3 - 6	反応収率, 検量線及び検出限界	78
3 - 7	小括	78
第4章	4-(2-シアノイソインドリル)フェニルイソチオシア ネートを用いたトリペプチドの蛍光エドマン分解	81
4 - 1	基準操作	81
4 - 2	カップリング反応条件	83
4 - 3	反応収率と検量線	86
4 - 4	トリペプチドのエドマン分解	89
4 - 5	小括	95
総括		96

謝辞	98
実験の部	99
参考文献	105

緒論

近年、医学や分子生物学などの幅広い研究分野においてタンパク質及びペプチドの遺伝子レベルでの研究が行われ、またタンパク質の機能を調べるためにも、タンパク質あるいはペプチドのアミノ酸組成及びそのアミノ酸配列順序の決定は欠くことのできない重要な分析手法である。

ペプチドのアミノ酸分析及びアミノ酸配列決定を行うにあたってまず必要なことは、アミノ酸及びペプチドのN末端アミノ基と選択的に反応する試薬を見出すことである。また近年の生体成分の分析においては、測定対象物質が微量であることが多いので、高感度な測定法も要求されている。そこで高選択的かつ高感度測定が期待できる手法として蛍光法が挙げられる。発蛍光性の官能基を蛍光プローブとしてアミノ基と反応する試薬に導入するか、あるいはそれ自身は無蛍光性でありながらアミノ基と反応し発蛍光するような試薬を新たに開発し、アミノ酸及びペプチドを蛍光誘導体に導くことにより高選択的かつ高感度な測定が可能になる。

アミノ酸分析法の開発は、1951年のSteinとMooreのニンヒドリン反応¹⁾の条件確立及びイオン交換クロマトグラフィーの導入²⁾が最初である。さらに改良が加えられ1958年にはアミノ酸の自動分析計が考察された^{3・4)}。その後1970年頃から高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が導入され始め、現在自動分析計のポストカラム反応検出システムの中にはpmol単位の微量アミノ酸分析が可能なものもある⁵⁾。アミノ酸のHPLCにおけるポストカラム誘導体化反応に用いられる種々の蛍光試薬が開発されている。代表的な試薬として、第一

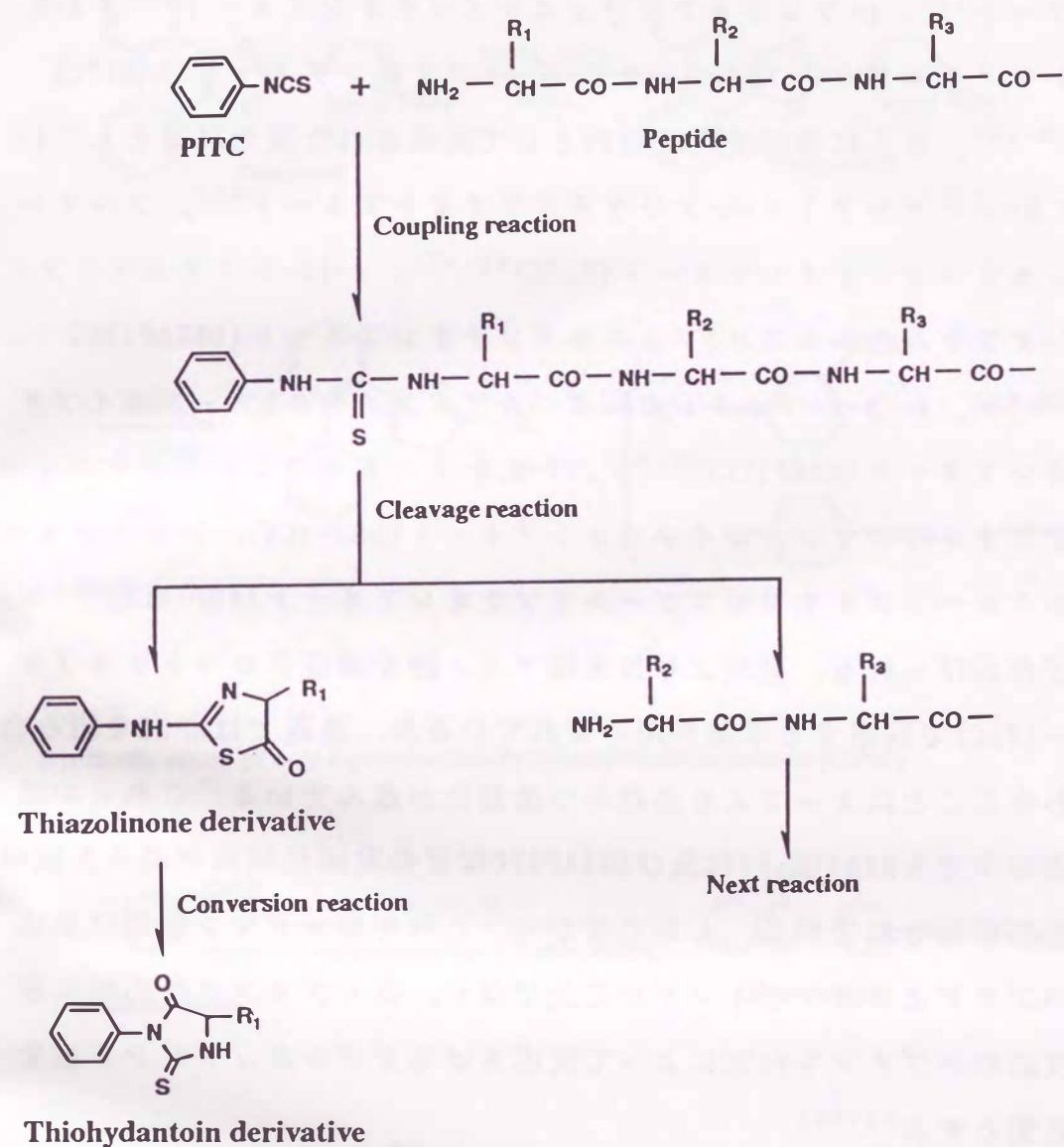
級アミンと反応するフルオレッサミン^{6,7)}及びo-フタルアルデヒド(OPA)⁸⁻¹⁴⁾, また第一, 二級アミンとも反応する4-フルオロ-7-ニトロベンゾオキサジアゾール(NBD-F)¹⁵⁻¹⁸⁾などがある。

またアミノ酸のプレカラム誘導体化試薬としては上述の試薬のほかに, 2,3-ナフタレンジアルデヒド(NDA)¹⁹⁻²²⁾及び1-ジアミノナフタレン-5-スルホニルクロライド(ダンシルクロライド)²³⁻²⁷⁾などが挙げられ, 高感度アミノ酸分析にしばしば用いられている。

一方ペプチドのN末端アミノ酸決定法としては, 1945年にSangerが開発した1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンを用いる方法(DNP法)が最初である²⁸⁾。さらにSangerはこの方法を用いて1953年に初めてインシュリンの全一次構造を決定した²⁹⁾。DNP法は低感度で長時間を要するという欠点があったが, Grayらが開発したダンシルクロライドを用いるDNS法³⁰⁾は高感度なN末端アミノ酸分析を可能にした。しかし数種のアミノ酸の同定ができないという問題点があり一般的に使用するのが難しい。これに対し1949年にEdmanにより開発されたフェニルイソチオシアネート(PITC)法³¹⁻³⁴⁾はエドマン分解法と呼ばれ, PITCとペプチドを塩基性条件下で反応させ, 生じるチオカルバモイル誘導体からN末端アミノ酸をチアゾリノン誘導体として遊離させ, 酸性条件下でチオヒダントイン誘導体に導き分離測定する(Chart 1)。この手法は段階的にペプチドのN末端側からアミノ酸を1残基ずつPITC誘導体として遊離させることができるので, アミノ酸配列決定に最も効率が良く, 現在でも多くの研究者の間で広く利用されている。

今日まで, 多くのPITC類似試薬が開発されている。UV試薬として4-ジメチルアミノ-3,5-ジニトロフェニルイソチオシアネート³⁵⁾,

Chart 1 Edman degradation of peptide with PITC



ナフチルイソチオシアネート³⁶⁾, ペンタフルオロフェニルイソチオシアネート³⁷⁾, 発色試薬としてジフェニルインドニルイソチオシアネート³⁸⁾, p-フェニルアゾフェニルイソチオシアネート³⁹⁾, 4-N,N-ジメチルアミノアゾベンゼン-4'-イソチオシアネート(DABITC)⁴⁰⁻⁴⁴⁾, さらに高感度化を目的として開発された蛍光試薬として4-N,N-ジメチルアミノ-1-ナフチルイソチオシアネート⁴⁵⁾, フルオレッセインイソチオシアネート(FITC)^{46, 47)}, 4-(5-ジメチルアミノ-1-ナフチルスルホニル)フェニルイソチオシアネート(DNSAPITC)^{48, 49)}, 4-(N-t-ブトキシカルボニルアミノメチル)フェニルイソチオシアネート(BAMPITC)^{50, 51)}, 7-N,N-ジメチルアミノスルホニルベンズオキサジアゾールイソチオシアネート(DBD-NCS), 7-アミノスルホニルベンズオキサジアゾールイソチオシアネート(ABD-NCS)⁵²⁾などがあげられる。従来よりN末端アミノ酸を薄層クロマトグラフィー(TLC)で同定する手法が用いられているが, 最近ではHPLCを組み合わせることによってより迅速かつ微量化が進んでいる。これらの試薬の中でもDABITC, FITC及びDNSAPITCなどの実用化研究が進み多数の報告がなされている。しかしながら, これらのエドマン類似試薬はペプチドとのカップリングが完全でなく, カップリング反応時に未反応のペプチドをPITCによって反応させるダブルカップリング法を必要とする⁵³⁻⁵⁵⁾。

著者は, 分子内にイソチオシアネート基を有し, かつより高感度, 高反応性が期待できるエドマン類似蛍光試薬の開発を目的とし, 3-及び4-(2-phenanthra[9',10'-d]oxazolyl)phenylisothiocyanate (m-及びp-POPIC)(Chart 2), 及び4-(2-cyanoisoindolyl)phenylisothiocyanate(CIPIC)(Chart 3)の3種を合成した。これらのエドマ

Chart 2

Synthetic route of 3- or 4-(2-phenanthra[9',10'-d]oxazolyl)phenylisothiocyanate (m- or p-POPIC)

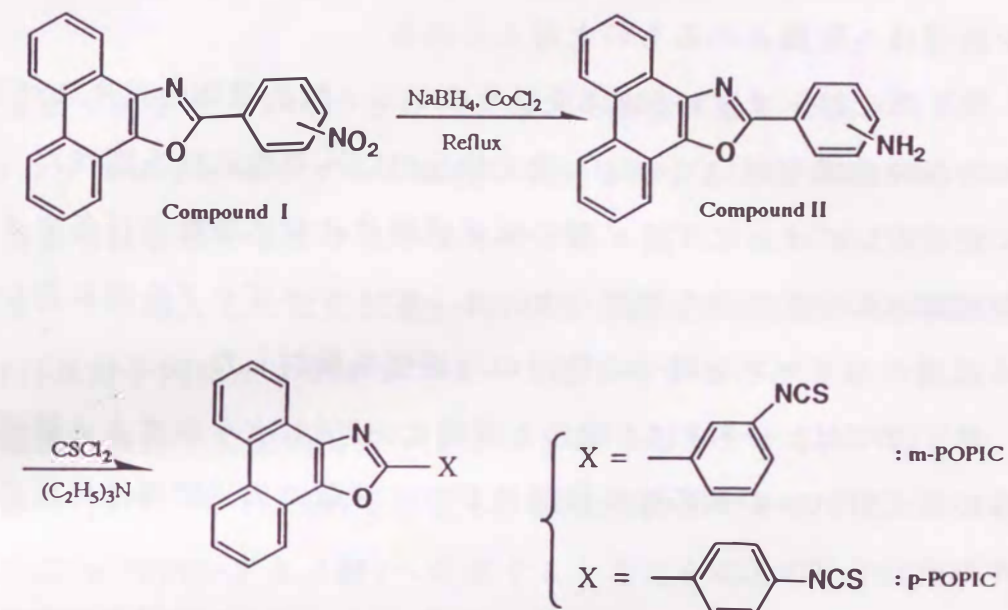
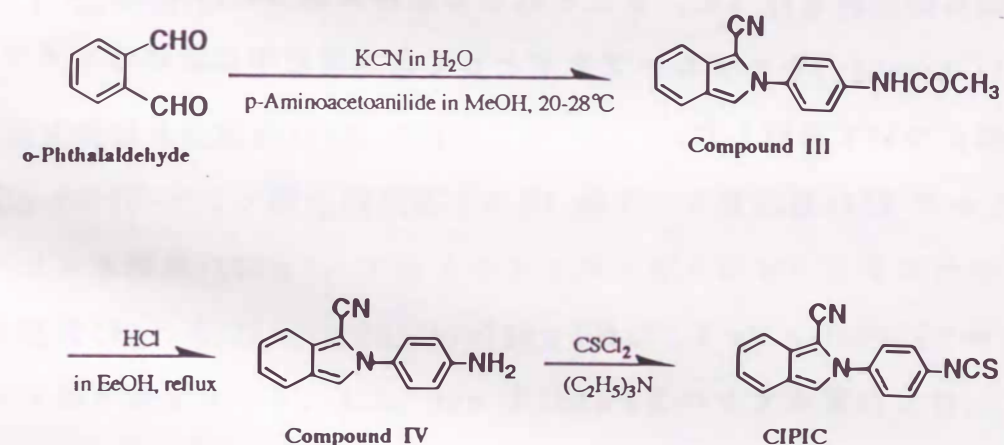


Chart 3

Synthetic route of 4-(2-cyanoisoindolyl)phenylisothiocyanate (CIPIC)



ン類似試薬はPITCと同様に塩基性条件下でアミノ酸とカップリングしチオカルバモイル誘導体を形成し、酸性条件下でチオヒダントイン誘導体へ変換されるものと考えられる。

第1章では、まずm-POPIC及びそのアミノ酸誘導体の蛍光スペクトルを各種溶媒を用いて測定し蛍光検出HPLCへの適応性を調べた。次に逆相HPLCによってアミノ酸の蛍光誘導体化反応条件及び各アミノ酸誘導体の分離条件を検討した。さらにトリペプチドを例に用いて本試薬のエドマン分解への応用の可能性を検討した。

第2章では、m-POPICと場合と同様にp-POPICとそのアミノ酸誘導体の蛍光HPLCへの適応性の検討及びアミノ酸の蛍光誘導体化反応条件の検討を行った。

第3章では、CIPICとそのアミノ酸及びジペプチド誘導体の蛍光HPLCへの適応性を検討し、蛍光誘導体化反応条件の検討を行った。またジペプチドのN末端アミノ酸分析を行った。

第4章では塩基触媒としてピリジンを用いて新たにカップリング反応条件の検討を行った。またそれらの条件に基づき、トリペプチド(Ala-Leu-Gly)をモデルペプチドとして含水溶液中におけるエドマン分解について検討した。

第1章 3-(2-フェナンスラオキサゾリル)フェニルイソチオシアネートによるアミノ酸のプレカラム蛍光誘導体化とHPLC

フェナンスラキノンにニトロベンゼンを縮合させて合成される⁵⁶⁾ フェナンスラオキサゾールは強い蛍光を発することが知られている。著者らはこのフェナンスラオキサゾール基にフェニルイソチオシアネートを導入した蛍光試薬m-POPICを合成した(実験の部参照)。m-POPICは分子内にイソチオシアネート基を有することより、アミノ酸と塩基性条件下で反応しカップリング体であるチオカルバモイル誘導体(m-POPTC-アミノ酸)を形成し、酸性条件下でチオヒダントイン誘導体(m-POPTH-アミノ酸)へ変換すると考えられる(Chart 1-1)。

本章ではm-POPICによるアミノ酸誘導体の蛍光検出HPLCによる分析条件の検討を行った。更に、その条件を用いて、トリペプチドのエドマン分解を試みた。

1-1 基準操作

(1) 蛍光誘導体化反応(Fig. 1-1)

① m-POPTC-アミノ酸生成反応: 0.05 mMアミノ酸溶液(90% アセトニトリル水溶液)100 μ l, アセトニトリル-ピリジン-トリエチルアミン混液(90 : 8.75 : 1.25, v/v)50 μ l及び1.5 mM m-POPIC(アセトニトリル-ジオキサン, 1:1, v/v 中)50 μ lをバイアル管にとり, 100°Cで10分間加熱する。氷冷して反応を止める。反応液に20 mMリン酸塩緩衝液(pH 8.5)250 μ lを加え, さらに四塩化炭素300 μ lを加える。バイアルを約10回強く振り混ぜ, 遠心分離し, 水層20 μ lを

Chart 1-1
Possible derivatization of amino acid with m- or p-POPIC

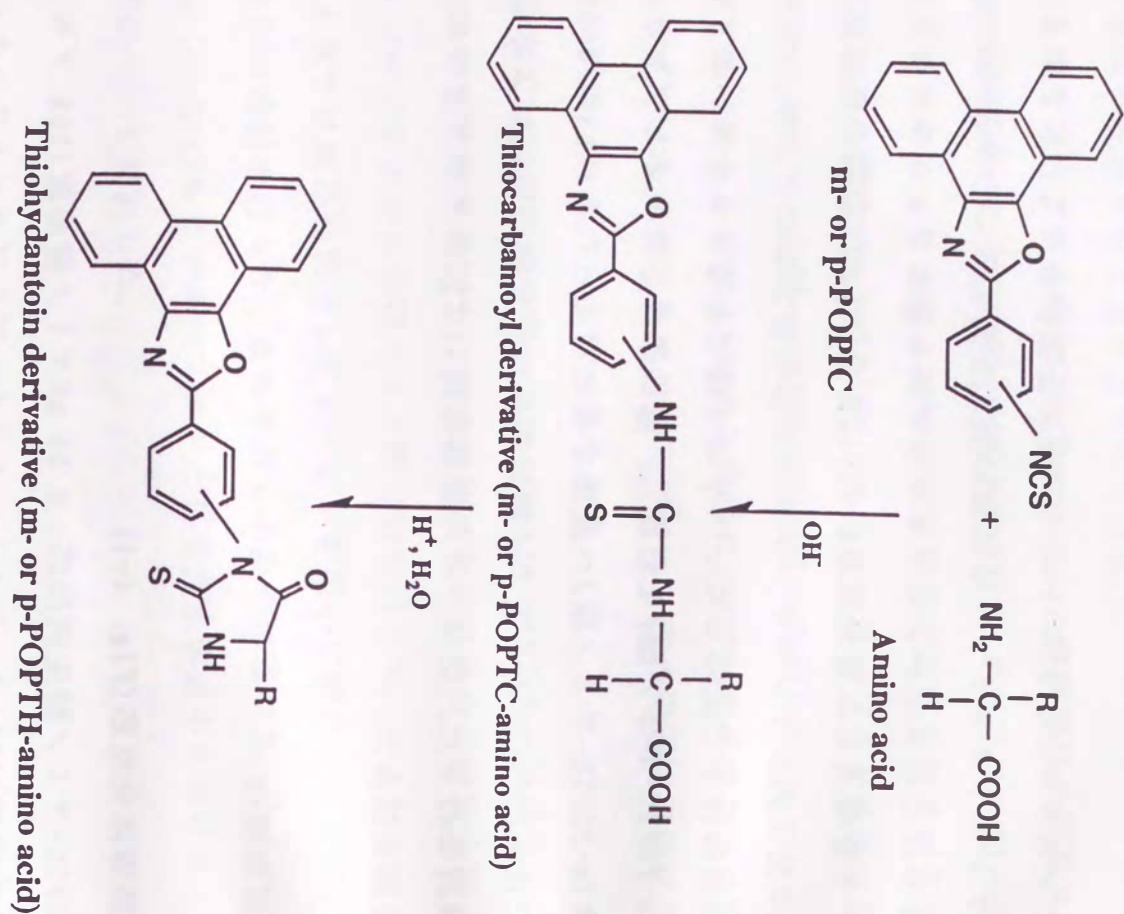


Fig. 1-1

Procedure for the derivatization of amino acids with m-POPIC

<u>Amino acid (in 90 % acetonitrile) 100 μ l</u>	
↓	Acetonitrile-pyridine-triethylamine (90:8.75:1.25, v/v) 50 μ l
↓	1.5 mM m-POPIC(in acetonitrile:dioxane, 1:1, v/v) 50 μ l
<u>100 $^{\circ}$C, 10min</u>	
↓	20 mM Phosphate buffer(pH 8.5) 250 μ l
↓	Carbon tetrachloride 300 μ l
↓	Centrifuge
<u>Aqueous layer</u>	→ Apply 20 μ l to HPLC
(100 μ l)	
↓	10 M Hydrochloric acid 50 μ l
<u>100 $^{\circ}$C, 10min</u>	
↓	4 M Sodium hydroxide 50 μ l
<u>Apply 20 μ l to HPLC</u>	

HPLCに付した。

②m-POPTH-アミノ酸生成反応：上記の水層100 μ lを10M 塩酸50 μ lに加え，100℃で10分間加熱する。氷冷して反応を止め，反応液に4M 水酸化ナトリウム水溶液50 μ lを加える。その20 μ lをHPLCに付した。

(2) H P L C

逆相分配型のTSKgel ODS-120T カラム(150 x 4.6 mm i.d., 粒径5 μ m, 東ソー)を使用した。溶離液にはアセトニトリル，テトラヒドロフラン，0.1M トリエチルアミン-0.1M 酢酸混液(pH 8.5)及び水の容量比が，45 : 5 : 10 : 40 (v/v)及び85 : 5 : 10 : 0 (v/v)の2種類を用いた。流速は1.0 ml/minで，アセトニトリル濃度を30分間で45-85%まで変化させる直線グラジエントで行った。検出は励起波長330 nm及び発光波長400 nmで行った。操作は室温(22 $\pm$ 4 $^{\circ}$ C)で行った。

1 - 2 蛍光スペクトルと安定性

(1)m-POPICの蛍光スペクトル

m-POPICはジオキサン，テトラヒドロフラン及びクロロホルムに可溶であるが，水，アセトニトリル，メタノール及びベンゼンには難溶であった。試薬が可溶な溶媒に溶かしスペクトルを測定した。得られた蛍光励起及び発光極大波長をTable 1-1に示す。

m-POPICをジオキサン，テトラヒドロフラン，クロロホルム及びジオキサン-アセトニトリル混液に溶かしたときは，その蛍光励起及

び発光極大波長ともに大差はなかった。m-POPICをジオキサン-アセトニトリル (1:1, v/v)溶液に溶かしたときのスペクトルをFig. 1-2Aに示す。またm-POPICの酸性あるいは塩基性における蛍光励起及び発光極大波長の変化を調べるために，m-POPICのジオキサン-アセトニトリル溶液のpHの異なる2種の溶液(pH 8.5 及び pH 5.0 の0.1M トリエチルアミン-0.1M 酢酸混液)で10 倍希釈して蛍光スペクトルを測定した。しかし，pH による著しいスペクトルの変化は認められなかった。ジオキサン-アセトニトリル溶液中でm-POPICは4 $^{\circ}$ Cの冷所保存したとき少なくとも2カ月は安定で，一定の蛍光強度を示した。

(2) m-POPTC-アミノ酸及びm-POPTH-アミノ酸の蛍光スペクトル

Ala, Hyp, His 及び Asn (1mM)を基準操作にしたがって反応させた。この反応液をHPLCに付し，m-POPTC-アミノ酸及びm-POPTH-アミノ酸の蛍光ピークを前述のpHの異なる2種の溶離液で分離分取した。各分画の蛍光励起及び発光極大波長をTable 1-2 に示す。m-POPTC-Ala 及びm-POPTH-Ala から得られた蛍光スペクトルは，互いに類似した形を示し (Fig. 1-2 B, C)，他の3種のアミノ酸蛍光体のスペクトルも互いに類似していた。また，pH 変化によるスペクトルの違いも認められなかった。m-POPTC-アミノ酸は約3時間，m-POPTH-アミノ酸は約1時間安定であった。アミノ酸誘導体の励起波長はm-POPICのそれに比べ約30nm短波長域にあるので，HPLC検出では未反応の試薬が検出されにくいと考えられる。よってm-POPIC及びその蛍光アミノ酸誘導体はHPLCにおいて励起波長340 nm，発光波長400 nmで検出した。

Table 1-1

Excitation and emission maxima of the fluorescence of m-POPIC in various solvents

Solvent	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)
Dioxane	365	395
Tetrahydrofuran	365	395
Chloroform	365	395
Dioxane-acetonitrile(1:1,v/v)	360	400
Dioxane-acetonitrile-0.1M triethylamine -0.1M acetic acid mixture(pH 5.0)(1:1:18,v/v)	359	401
Dioxane-acetonitrile-0.1M triethylamine -0.1M acetic acid mixture(pH 8.5)(1:1:18,v/v)	359	401

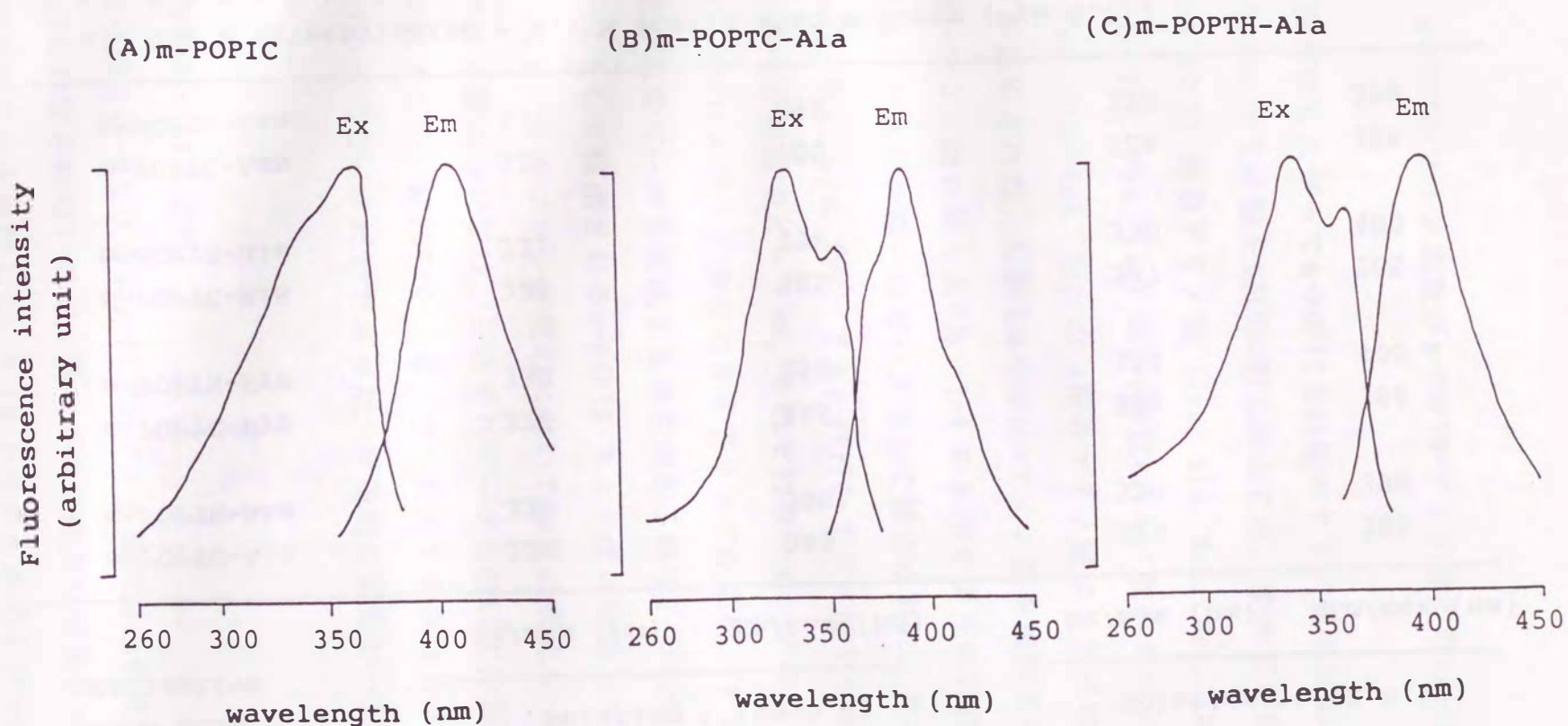


Fig.1-2 Fluorescence excitation and emission spectra of (A)1.5 mM m-POPIC in dioxane-acetonitrile(1:1,v/v), (B)m-POPTC-Ala and (C)m-POPTH-Ala in aqueous acetonitrile containing 0.1M triethylamine-0.1M acetic acid mixture (pH 8.5).

Table 1-2

Excitation and emission maxima of the fluorescence of m-POPTC- and m-POPTH-amino acids in solutions with pHs 5.0 and 8.5

Amino acid derivative	Solution a) (pH 5.0)		Solution b) (pH 8.5)	
	Ex/max (nm)	Em/max (nm)	Ex/max (nm)	Em/max (nm)
m-POPTC-Ala	328	385	328	385
m-POPTH-Ala	330	398	330	398
m-POPTC-Hyp	327	386	328	386
m-POPTH-Hyp	330	398	330	400
m-POPTC-His	328	385	327	385
m-POPTH-His	331	398	330	400
m-POPTC-Asn	328	385	328	386
m-POPTH-Asn	331	398	330	398

a) 0.1 M triethylamine - 0.1 M acetic acid mixture (pH 5.0)
 b) 0.1 M triethylamine - 0.1 M acetic acid mixture (pH 8.5)

1-3 m-POPTC-アミノ酸及びm-POPTH-アミノ酸のHPLC分離条件

基準操作にしたがってm-POPICと21種のアミノ酸を反応させ、生成するm-POPTC-アミノ酸をHPLCに付したところ、すべてが検出できた。Fig. 1-3 Aに11種のアミノ酸 (Asp, Glu, Met, Ser, Thr, Hyp, Ala, Pro, Val, Phe, Leu) のm-POPTC-アミノ酸のクロマトグラムを示す。Asp, Glu, Met, Hypの4種のアミノ酸にそれぞれ2本の蛍光ピークが認められた。しかしm-POPTC-アミノ酸を酸性条件下でm-POPTH-アミノ酸に導くとFig. 1-3 Bに示すように11種のアミノ酸の蛍光体はそれぞれ単一のピークとして検出された。その他のアミノ酸 (Arg, His, Lys, Cys) でもm-POPTC-アミノ酸からm-POPTH-アミノ酸に導くと複数のピークが、それぞれ単一ピークになった。したがってm-POPICとアミノ酸とのカップリング反応は、アミノ酸によって複数の蛍光ピークを生成する場合があるので、それぞれ単一の蛍光ピークとして検出されるm-POPTH-アミノ酸に変換して分離を検討した。なお、カップリング反応において複数の蛍光ピークが確認されたアミノ酸については、それぞれピークをHPLCで分取し酸性反応に用いたところ、m-POPTH-アミノ酸へ変換するのは各アミノ酸につき一つの蛍光ピークだけであった。その他の蛍光ピークの構造は不明である。

(1) 移動相のpHと溶媒

1-2-(2)で述べたようにm-POPTH-アミノ酸の蛍光強度及びスペクトルはpHに影響されないので、弱アルカリ性及び弱酸性pHの緩衝液を用いて分離条件を検討した。0.1M トリエチルアミン-0.1M 酢酸混

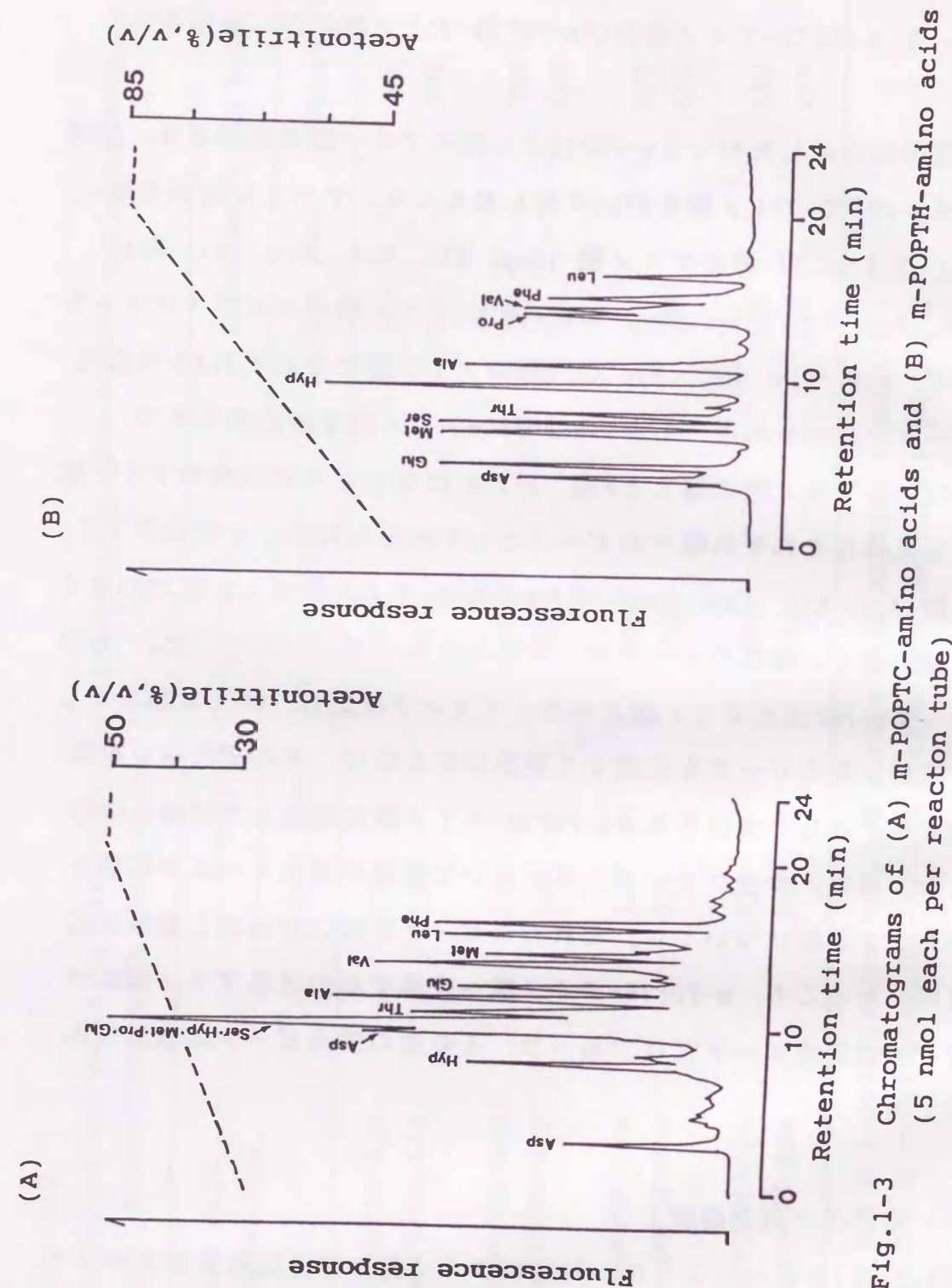


Fig.1-3 Chromatograms of (A) m-POPTC-amino acids and (B) m-POPTH-amino acids (5 nmol each per reaction tube)

液 (pH 8.5 及び 4.0), 0.1M テトラブチルアンモニウム-0.1M ギ酸混液 (pH 8.5 及び 4.0), 0.1M アンモニア-0.1M ギ酸混液 (pH 8.5 及び 3.0) を用い, アセトニトリルのグラジエント溶離で分離を検討した. これらの条件における各蛍光誘導体の保持時間を Table 1-3 に示す.

いずれの場合も pH を低くすると塩基性アミノ酸は速やかに溶出し, pH を高くすると酸性アミノ酸が速やかに溶出した. しかし, いずれの溶離液でも Leu と Ile, Asp と Asn そして Glu と Gln の m-POPTH-アミノ酸は分離されず, 21 種のアミノ酸を完全に分離できる条件は得られなかった. また保持時間は違っても, Arg や His などは比較的ブロードなピークを与え, 保持時間の近いアミノ酸のピークと重なった. 分離状態やピークの鋭さから考えると, これらの 3 種の溶離液の中では, 0.1M トリエチルアミンと 0.1M 酢酸混液 (pH 8.5) を用いたものが他のものより良い分離が得られた (Fig. 1-4).

この結果, Cys のピークは Asn および Asp のピークと重なるもののピークは確認できた. しかし Asp, Asn 及び Glu, Gln のピークが, m-POPTC-アミノ酸の場合には保持時間が異なるにもかかわらず, m-POPTH-アミノ酸になると保持時間が同じになった. おそらくチオヒダントイン誘導体形成の際に, Asn の γ -アミド基及び Gln の δ -アミド基が加水分解によってカルボキシル基になり, それぞれ Asp, Glu と同じ挙動を示すものと考えられる. また Phe が試薬由来のブランクピークと重なるので, このブランクピークをアミノ酸と分離することも必要である. HPLC の溶離液に用いる有機溶媒としてアセトニトリル, テトラヒドロフラン, メタノールを用いてそれぞれ単独あるいは混合して, グラジエント溶離を行った. Table 1-4 で示すように

Table 1-3

Effect of pH in the mobile phase on the retention times of m-POPTH-amino acids

Amino acid derivative	Retention time (min)					
	Mobile phase A		Mobile phase B		Mobile phase C	
	pH 4.0	pH 8.5	pH 3.0	pH 8.5	pH 3.0	pH 8.5
Cys	4.0	3.8	6.4	6.6	4.0	4.0
Asp	4.9	4.2	7.6	6.0	7.7	5.0
Asn	4.9	4.2	7.6	6.0	7.7	5.0
Glu	6.6	4.8	8.3	6.6	8.3	6.2
Gln	6.6	4.8	8.3	6.6	8.3	6.2
Lys	5.4	5.3	5.4	5.3	5.9	5.5
His	5.7	7.3	3.3	3.3	5.7	6.4
Met	6.6	7.0	6.6	6.5	7.0	6.7
Arg	6.8	8.2	3.7	3.9	6.2	7.3
Ser	7.3	8.2	7.2	7.2	7.7	7.3
Thr	8.0	8.0	7.8	7.7	8.2	7.7
Hyp	9.9	9.6	9.7	9.1	10.0	9.3
Gly	9.8	9.4	9.7	9.1	9.9	9.1
Tyr	11.1	10.6	11.3	10.4	11.6	10.7
Ala	11.3	10.8	11.3	10.3	11.5	10.6
Trp	11.3	10.8	11.4	10.6	11.5	10.5
Pro	14.7	13.7	14.9	12.9	15.0	13.4
Val	15.4	14.2	15.5	13.3	15.6	14.0
Phe	16.1	14.7	16.1	13.9	16.3	14.6
Leu	18.0	16.1	18.0	15.5	18.1	15.7
Ile	18.0	16.1	18.0	15.5	18.1	15.7

Mobile phase: A, 0.1M triethylamine-0.1M acetic acid(pH4.0 or 8.5):water:tetrahydrofuran:acetonitrile(10% : 30-0% : 5% : 55-85%) for 0-20min ; B, 0.1M tetrabutylammonium-0.1M formic acid(pH 3.0 or 8.5):water:tetrahydrofuran:acetonitrile(10% : 30-0% : 5% : 55-85%) for 0-20min ; C, 0.1M ammonium hydroxide-0.1M formic acid:water:tetrahydrofuran:acetonitrile(10% : 30-0% : 5% : 55-85%) for 0-20min. HPLC conditions: column, TSKgel ODS-120T (150x 4.6 mm i.d., 5 μ m); flow rate, 1.0 ml/min; detection, Ex 330 nm Em 400 nm.

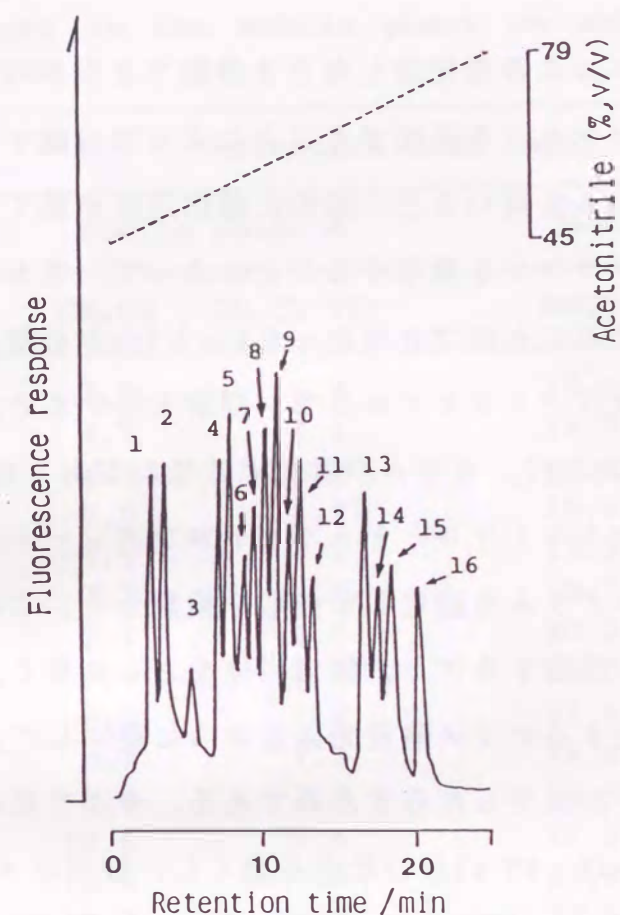


Fig.1-4 Chromatogram of m-POPTH-amino acids

HPLC conditions: column, TSKgel ODS-120T (150x4.6 mm i.d., 5 μ m); flow rate, 1ml/min; detection, Ex 330 nm Em 400 nm; mobile phase, linear gradient(0-30min) of acetonitrile(45-85%), tetrahydrofuran(5%), 0.1M triethylamine-0.1M acetic acid mixture(pH 8.5)(10%) and water(40-0%)

Peaks(5 nmol each per reaction tube): 1=Asp, Asn and Cys; 2=Glu and Gln; 3=Lys; 4=Met; 5=His and Ser; 6=Thr; 7=Arg; 8=Gly; 9=Hyp; 10=Tyr; 11=Ala; 12=Trp; 13=Pro; 14=Val; 15=Phe; 16=Leu and Ile.

アセトニトリルのみを使用したとき分離できなかったProとValを、テトラヒドロフランを添加することによって分離することができた。またメタノールを用いると一般的に溶出速度が低くなった。これにテトラヒドロフランを添加することによって、アセトニトリルでは完全に分離することができなかったAlaとTrpが分離された。しかしメタノール及びテトラヒドロフラン混液を用いると、カラム内の圧力が上昇し(約2倍)、カラムが劣化する恐れがあった。

次に、アセトニトリル-テトラヒドロフラン-メタノールのグラジエントプログラムを設定して分離を検討した。これは、アセトニトリルで早く溶出するアミノ酸蛍光体をさらに早く、またメタノールで遅く溶出するアミノ酸蛍光体をさらに遅くして、アミノ酸蛍光体の分離に好結果をもたらすためである。そこで初めにアセトニトリル濃度(35-5%, 60 min)の比率を高くし、後半にメタノール濃度(0-80%, 60 min)の比率を高めるグラジエント溶離とした。しかしやはりArgとHisがMet, SerまたはThrと重なるので、2つの塩基性アミノ酸を早く溶出させるために0.1M テトラブチルアンモニウム-0.1M ギ酸混液(pH 3.0)を用いて分離を試みた。そのクロマトグラムをFig. 1-5に示す。AspとAsn, GluとGln, IleとLeuは分離できなかったが、比較的良好な分離状態が得られた。しかし、長い溶離時間(1時間)が必要であり、ピークがブロードになった。

(2) 固定相

上述の分離条件の検討には、シリカゲル表面にオクタデシル基を結合させた TSKgel ODS-120T (150 x 4.6 mm i.d., 粒径 5 μ m, 東ソー)カラム及びTSKgel ODS-80T_H(150 x 4.6 mm i.d., 粒径 5 μ m,

Table 1-4
Effect of solvents in the mobile phase on retention time of m-POPTH-amino acids

Amino acid derivative	Retention time (min)			
	Mobile phase A		Mobile phase B	
	CH ₃ CN	CH ₃ CN-THF	MeOH	MeOH-THF
Cys	3.7	3.7	15.0	11.6
Asp	4.7	4.1	14.9	11.1
Asn	4.7	4.1	14.9	11.1
Glu	5.5	4.7	15.9	12.0
Gln	5.5	4.7	15.9	12.0
Lys	7.2	5.3	18.7	14.5
His	7.7	6.5	20.2	18.7
Met	7.7	6.7	20.2	16.7
Arg	8.1	7.2	21.6	18.5
Ser	8.1	7.3	19.4	16.4
Thr	8.6	7.8	19.8	16.8
Hyp	10.6	9.4	21.0	19.0
Gly	10.5	9.4	21.0	18.5
Tyr	11.3	10.8	23.1	20.1
Ala	11.3	10.8	23.0	20.0
Trp	11.0	10.6	23.6	20.8
Pro	15.8	13.6	25.6	21.7
Val	15.8	14.1	25.6	22.6
Phe	16.5	14.7	25.6	22.6
Leu	18.0	18.1	27.0	24.0
Ile	18.0	18.1	27.0	24.0

Mobile phase: A, acetonitrile(60-90%):0.1M triethylamine-0.1M acetic acid(pH8.5)(10%):water(30-0%) for 0-20min or acetonitrile (55-85%):tetrahydrofuran(5%):0.1M triethylamine-0.1M acetic acid (pH8.5)(10%):water(25-0%) for 0-20min; B, methanol(60-90%):0.1M triethylamine-0.1M acetic acid(pH8.5)(10%):water(30-0%) for 0-20 min or methanol(55-85%):tetrahydrofuran(5%):0.1M triethylamine-0.1M acetic acid(pH8.5)(10%):water(25-0%) for 0-20min.
HPLC conditions: column, TSKgel ODS-120T(150x4.6 mm i.d., 5 μ m); flow rate, 1.0 ml/min; detection, Ex 330 nm Em 400 nm.

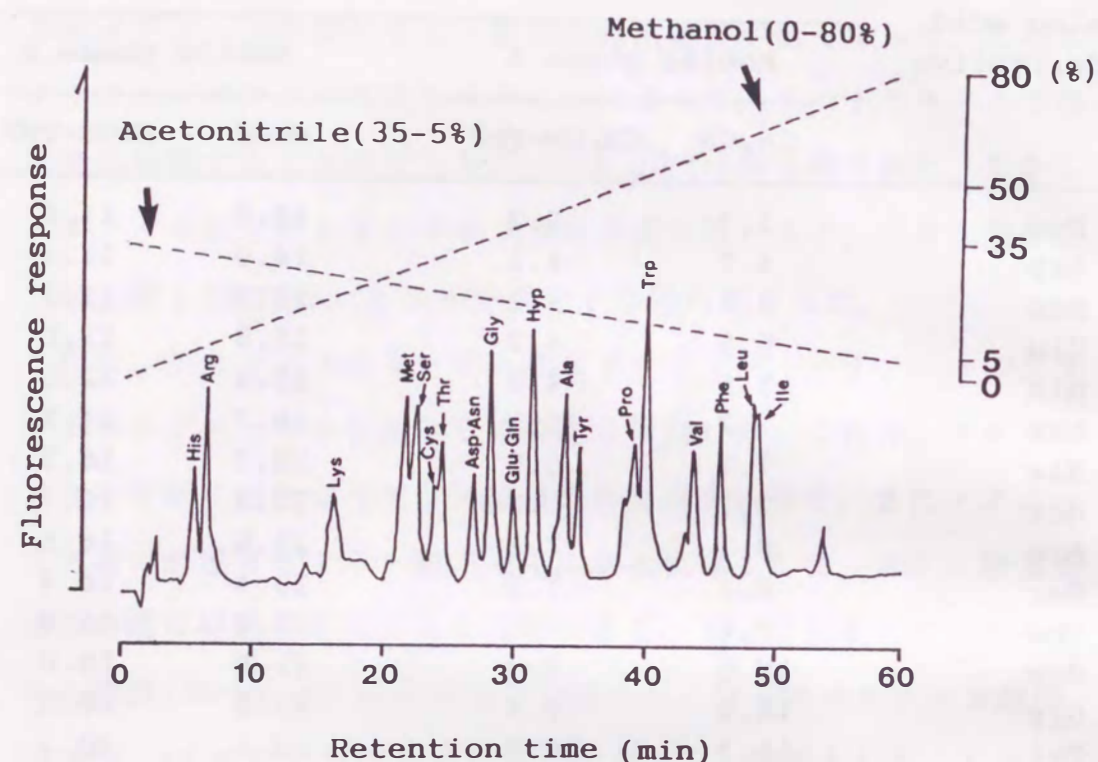


Fig.1-5 Chromatogram of m-POPTH-amino acids
(5 nmol each per reaction tube)

HPLC conditions : column, TSKgel ODS-120T
(150x4.6 mm i.d., 5 μ m); flow rate, 1 ml/min;
detection, Ex 330 nm Em 400 nm; mobile phase,
linear gradient (0-60 min) of acetonitrile
(35-5%), methanol (0-80%), tetrahydrofuran
(5%), 0.1M tetrabutylammonium-0.1M acetic
acid mixture (pH 3.0) and water (50-0%).

東ソー)並びに親水性ポリマーにオクタデシル基を結合させたTSK
gel Octadecyl-4PWカラムを用いて分離条件を検討した。これらのカ
ラムを用いて分離したアミノ酸の保持時間をTable 1-5に示す(ODS-
120TはTable 1-3)。Octadecyl-4PWはODS-120Tに比べて分離が不良で
あった。ODS-80T_MはODS-120Tと同様に鋭いピークと分離能を示した
が、ODS-120T以上の好分離は得られなかった。

分離を検討した結果、21種類すべてのアミノ酸を分離することは
できないが、10種類と11種類の分離可能な2グループのm-POPTH-アミ
ノ酸のクロマトグラムをFig. 1-6に示す。

1-4 誘導体化反応条件

m-POPICとモデル化合物として5種類のアミノ酸(Gly, Met, Trp,
Lys, Ile)について誘導体化反応条件を検討した。

(1) 試薬濃度

m-POPICの濃度(0.5 - 1.5 mM)は、1.5 mM であるときピーク高さ
が最大を示した(Fig. 1-7)。m-POPICは1.5 mM 以上になるとアセト
ニトリル-ジオキサン(1:1, v/v)溶液に溶解し難くなった。

(2) ピリジン及びトリエチルアミンの濃度

m-POPICとアミノ酸のカップリング反応は塩基性条件下で進行する
ので、塩基性触媒としてトリエチルアミン、ピリジンの2種について
反応条件を検討した。その結果1.25%(v/v)のトリエチルアミン及び
8.75%(v/v)のピリジンを含むアセトニトリル溶液50 μ lを用いたとき

Fig.1-5

Effect of reversed-phase columns on retention times of m-POPTH-amino acids

Amino acid derivative	Retention time (min)				
	Octadecyl-4PW			ODS-80T _W	
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Cys	4.0	3.7	2.4	5.2	6.2
Asp	3.5	6.0	9.3	4.9	5.0
Asn	3.5	6.0	9.3	4.9	5.0
Glu	3.8	8.5	10.0	5.2	6.4
Gln	3.8	8.5	10.0	5.2	6.4
Lys	4.9	4.9	4.9	8.0	7.3
His	7.0	7.0	4.9	10.0	9.4
Met	7.2	7.2	6.7	9.4	9.2
Arg	8.9	7.7	6.0	12.0	10.0
Ser	9.0	9.0	8.4	9.9	9.6
Thr	9.6	9.5	8.8	10.8	10.2
Hyp	11.6	11.8	10.7	12.1	11.5
Gly	11.9	12.0	11.0	11.9	11.4
Tyr	13.8	13.8	12.6	13.0	12.7
Ala	13.8	13.8	12.6	13.3	12.5
Trp	15.9	16.0	15.1	13.3	12.5
Pro	17.3	17.4	16.1	16.2	15.3
Val	19.9	20.0	18.7	16.2	15.3
Phe	22.4	22.6	21.0	17.0	16.0
Leu	24.3	24.6	23.1	18.0	17.0
Ile	24.0	24.0	22.9	18.0	16.9

HPLC conditions: flow rate, 1.0 ml/min; detection, Ex 330 nm Em 400 nm;

Octadecyl-4PW: linear gradient (0-40min) of acetonitrile (35-55%)

(a) 0.1M triethylamine-0.1M acetic acid mixture (pH 8.5)

(b) 0.1M triethylamine-0.1M acetic acid mixture (pH 4.0)

(c) 0.1M ammonia-0.1M formic acid mixture (pH 3.0)

ODS-80T_W: linear gradient (0-10-24min) of acetonitrile (35-65-85%)

(d) 0.1M triethylamine-0.1M acetic acid mixture (pH 8.5)

(e) 0.1M ammonia-0.1M formic acid mixture (pH 5.0)

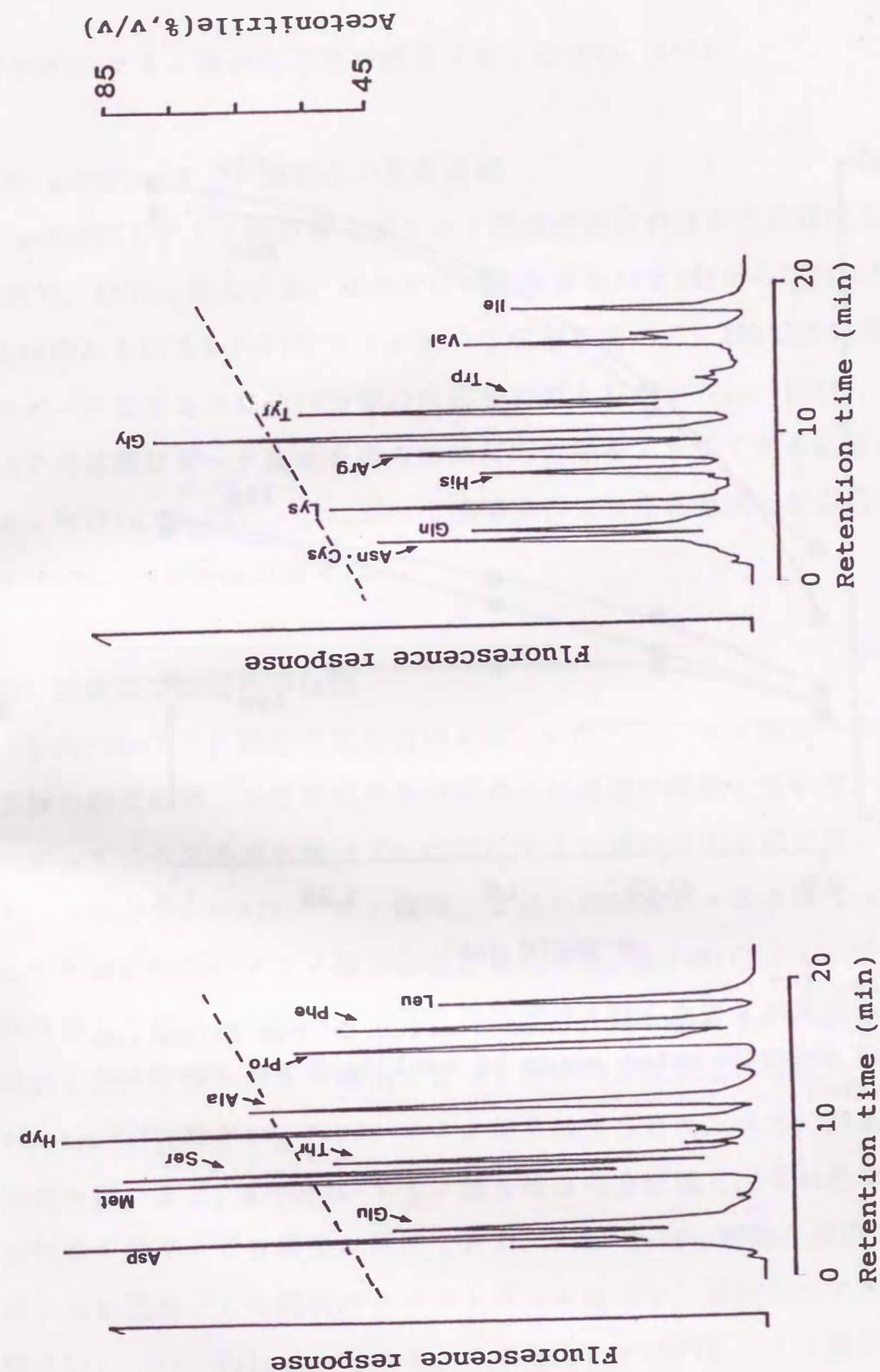


Fig. 1-6 Chromatograms of m-POPTH-amino acids (5 nmol each per reaction tube)

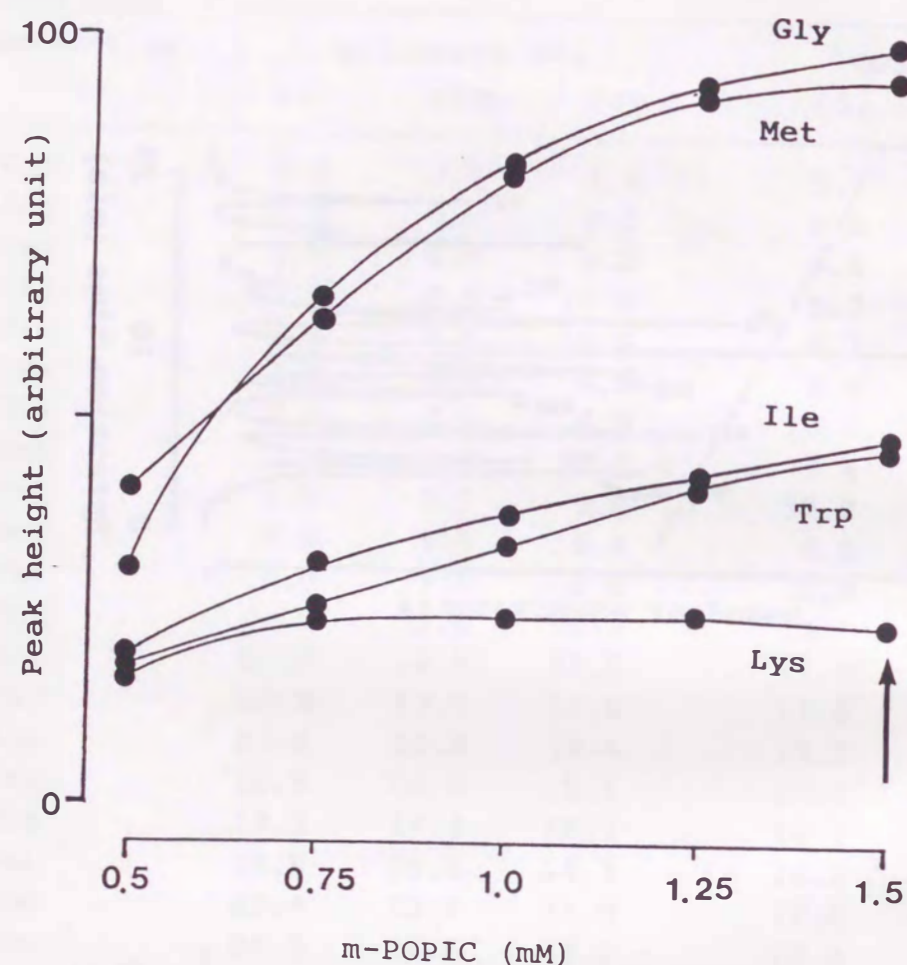


Fig. 1-7
Effect of m-POPIC concentration on the formation of m-POPTH-amino acids (5 nmol each per reaction tube)

m-POPTH-アミノ酸の生成量が最大であった (Fig. 1-8).

(3) m-POPTC-アミノ酸形成の反応時間

m-POPICとアミノ酸のカップリング形成反応における反応温度を100℃, 50℃と変化させ, それぞれの温度において2分から30分の反応時間におけるm-POPTC-アミノ酸の生成量を調べた. 100℃では最大のピークを得るのに約10分間の反応を必要としたが (Fig. 1-9A), 50℃では同じピーク高さを得るのに反応時間をより長くする必要があった (Fig. 1-9B). したがって基準操作では反応温度と反応時間を100℃, 10分間と設定した.

(4) 試薬及び副産物の抽出

m-POPTC-アミノ酸形成反応液中には, m-POPTC-アミノ酸以外にも多数の副反応物, 未反応試薬及び試薬の分解物が存在していた. したがってこの反応液を続けてm-POPTH-アミノ酸の生成反応に用いると, 大部分のm-POPTH-アミノ酸は, それらの妨害ピークと重なった. このためm-POPTC-アミノ酸を生成させたのち, m-POPTC-アミノ酸だけを残してそれらの妨害ピークとなる成分を除くために溶媒抽出を検討した. クロロホルム抽出によって妨害物質は完全に除去されたが, LeuやIleなどのm-POPTC-アミノ酸も抽出された. 一方, 四塩化炭素を用いると, m-POPTC-アミノ酸をほぼ完全に残し, その他の妨害物質を効率よく有機層に抽出できた. Fig. 1-10に四塩化炭素で抽出しない場合とした場合のクロマトグラムを示す. 検討したアミノ酸はGly, Ala, Val, Leuである. これから, m-POPTH-アミノ酸のピークと重なっていた妨害ピークが溶媒抽出操作により除去されてい

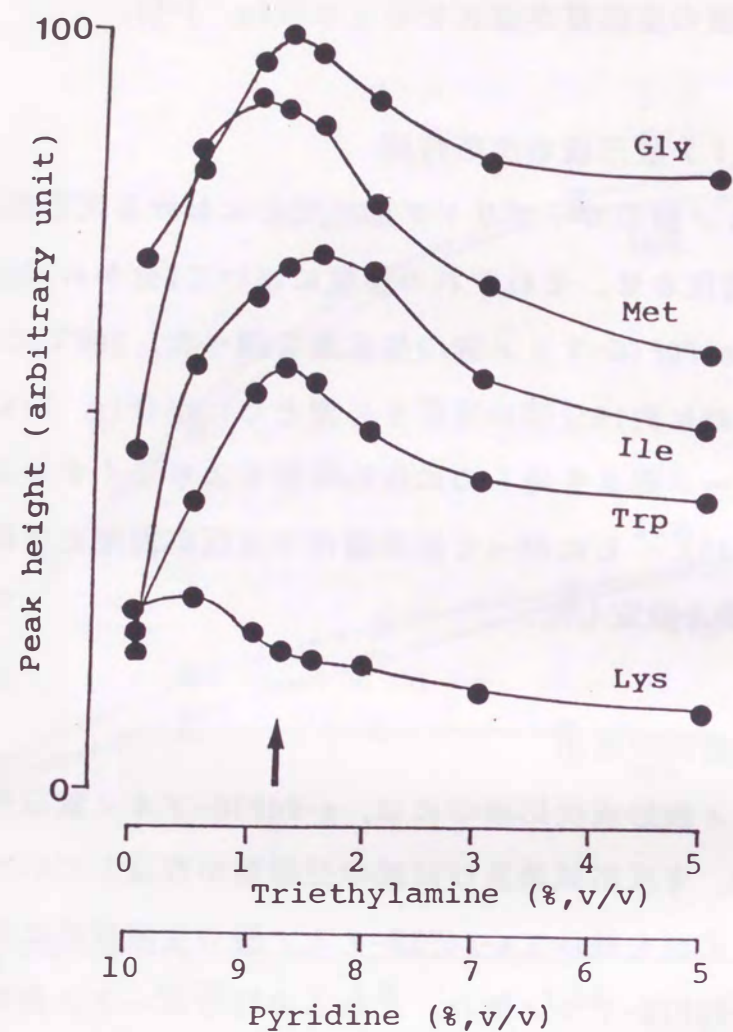


Fig. 1-8
Effect of pyridine and triethylamine concentrations on the coupling reaction of amino acids with m-POPIC (5 nmol each per reaction tube)

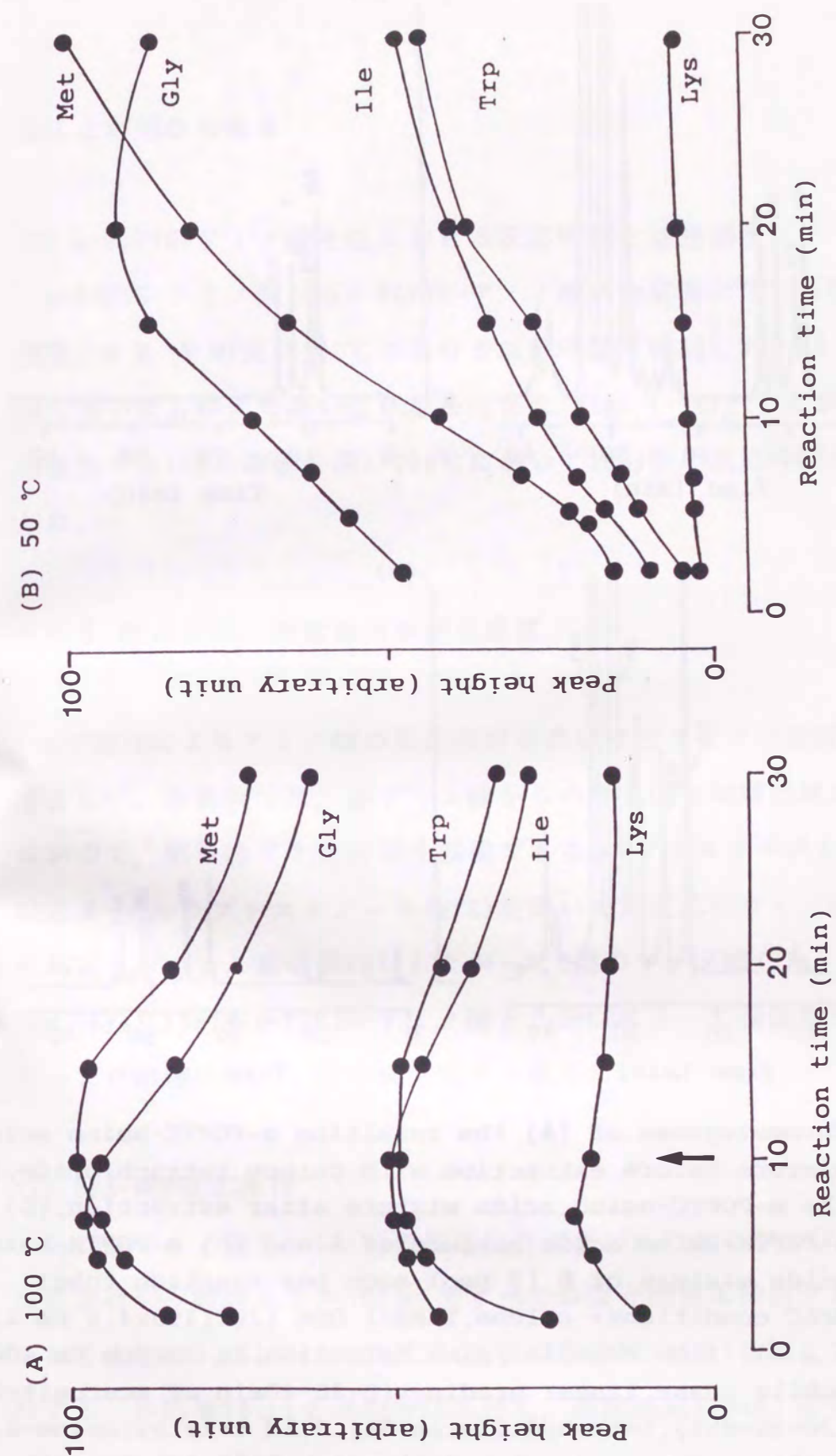


Fig. 1-9
Effect of reaction time and temperature on the formation of m-POPTC-amino-acids (5 nmol each per reaction tube)

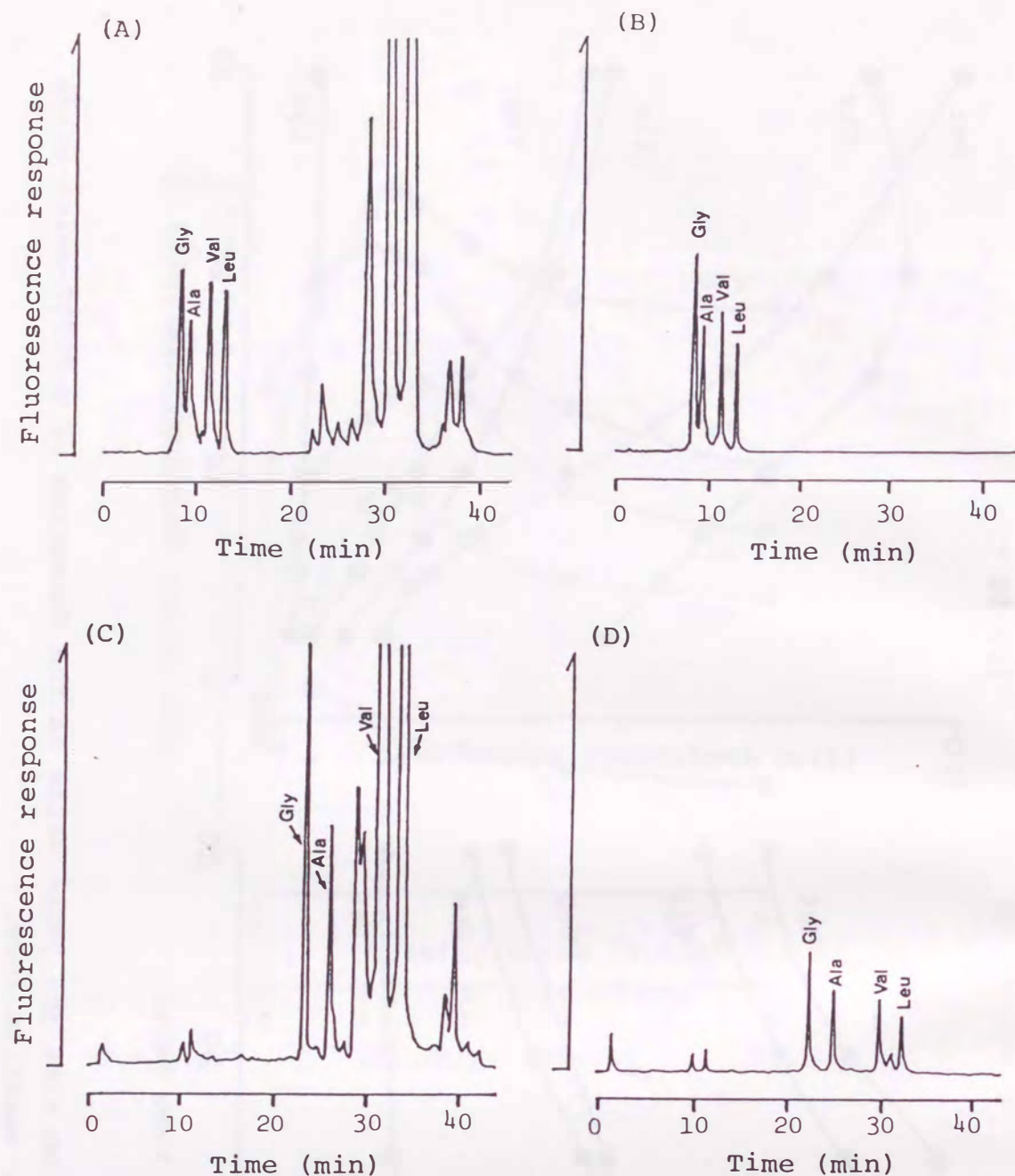


Fig.1-10 Chromatograms of (A) the resulting m-POPTC-amino acids mixture before extraction with carbon tetrachloride, (B) the m-POPTC-amino acids mixture after extraction, (C) m-POPTH-amino acids mixture of A and (D) m-POPTH-amino acids mixture of B (5 nmol each per reaction tube). HPLC conditions: column, TSKgel ODS 120T (150x4.6 mm i.d., 5 μ m); flow rate, 1 ml/min; detection, Ex 330 nm Em 400 nm; mobile phase, linear gradient (0-20-40 min of acetonitrile (30-50-85%), tetrahydrofuran (5%), 0.1M triethylamine-0.1M acetic acid mixture (pH 8.5) and H₂O (55-0%).

ることが明かである。

(5) m-POPTH-アミノ酸生成における反応時間と塩酸濃度

m-POPTC-アミノ酸からm-POPTH-アミノ酸への変換に用いる塩酸の濃度 (10 M, 5 M) 及び100℃における反応時間を検討した。10 Mの塩酸を用いた方がより高い生成量を与えた (Fig. 1-11)。したがって基準操作では10Mの塩酸を用い100℃において10分間の反応時間を設定した。

1-5 反応収率, 検量線及び検出感度

m-POPICによるアミノ酸の反応収率が高いほどエドマン分解法には好ましい。本研究では, 各アミノ酸からの蛍光体の単離は試みていないので, 第一級アミンの蛍光試薬であるo-フタルアルデヒド (OPA) と β -メルカプトエタノール (MCE) を用いて未反応のアミノ酸の量を測定した。また基準操作にしたがって5種のアミノ酸 (Gly, Met, Trp, Lys, Ile) をm-POPTH-アミノ酸としHPLCによって検量線を作成し, また21種のアミノ酸の検出限界を求めた。

(1) OPA-MCE反応操作

0.05mMアミノ酸を1-1-(1)の基準操作に従いm-POPTC-アミノ酸生成反応を行い, 酢酸エチル500 μ lですべての蛍光物質を抽出する。得られる水層100 μ lにOPA-MCE試液 (実験の部参照) 20 μ lを加え1分間攪拌する。反応液20 μ lを逆相HPLCに付し, 励起波長350nm, 発光波長460nmで検出する¹¹⁾。

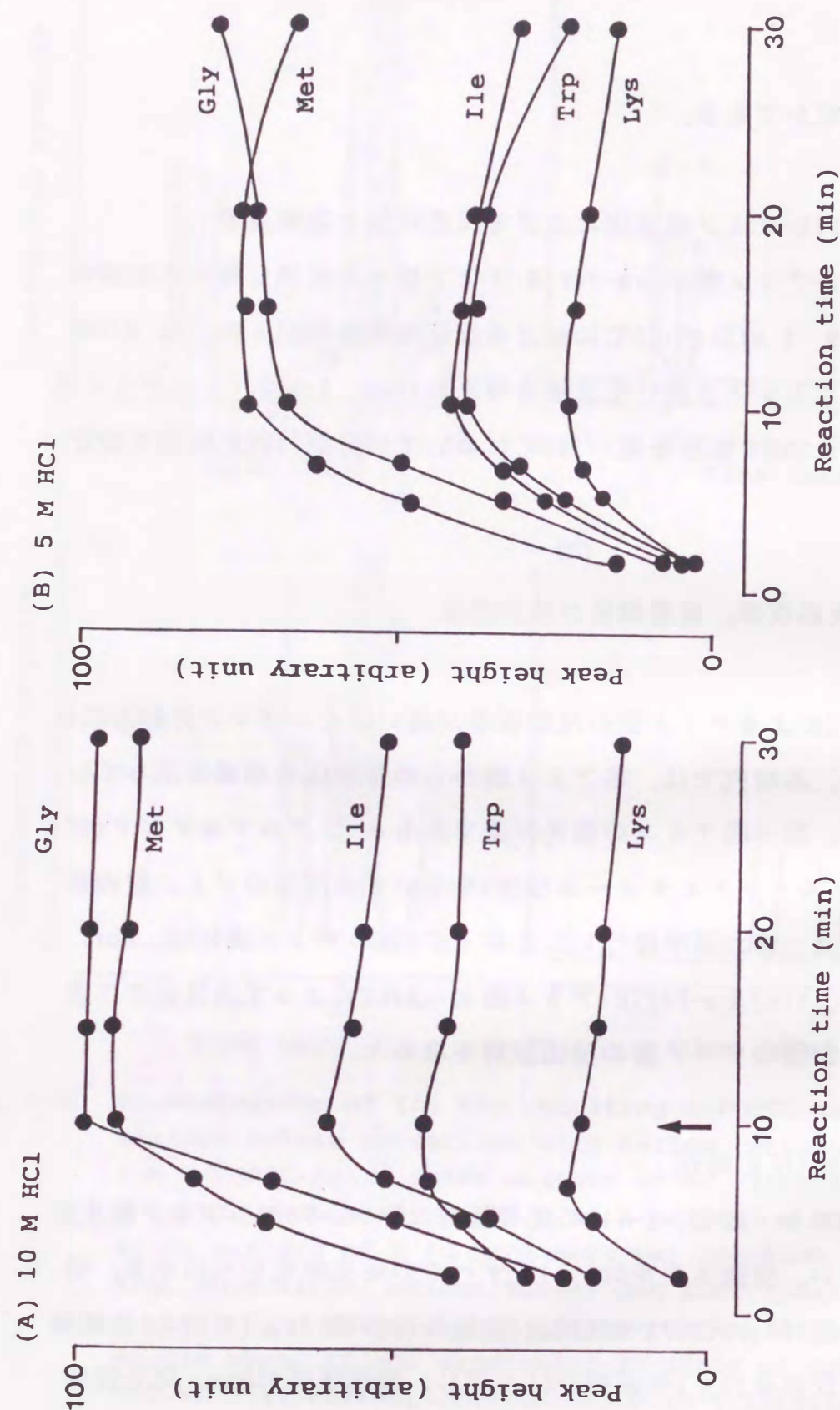


Fig. 1-11

Effect of reaction time in (A) 10 M hydrochloric acid (HCl) and (B) 5 M hydrochloric acid on the formation of m-POPTH-amino acids from m-POPTC-amino acids (5 nmol each per reaction tube)

(2) 反応収率

未反応のアミノ酸を定量した結果をTable 1-6に示す。反応に用いたアミノ酸は反応液中5 nmolであり、OPA-MCE反応によって求めた反応液中の未反応のアミノ酸は、0-0.25 nmolであるので少なくとも95-100%のアミノ酸はm-POPICと反応していることになる。これはエドマン分解を指向した他のフェニルイソチオシアネート類似試薬(DABITC:25-30%⁴⁰⁾, FITC:60%⁴⁶⁾, DNSAPITC:75-95%⁴⁸⁾)に比べてかなり高反応収率である。

(3) 検量線及び検出感度

5種のアミノ酸の検量線(Fig. 1-12)は、全てが原点を通る直線になった(相関係数 $r=0.993-0.998$, 各 $n=2$ プロット)。

20種類のアミノの検出限界($S/N=3$)は0.6-3.8 pmol/カラム注入量であった(Table 1-7)。したがって、m-POPICはFITC⁴⁶⁾及びDABITC⁴⁰⁾とほぼ同程度の感度を有することが分かった。

1-6 トリペプチドのエドマン分解

上記のm-POPTH-アミノ酸の分離条件並びにm-POPTH-アミノ酸の生成条件を利用してエドマン分解の例を、トリペプチドであるGly-Leu-Alaを使って検討した(Char. 1-2)。

(1) エドマン分解操作

1mMのペプチド溶液(アセトニトリル中)100 μ lを1-1-(1)の基準操

Table 1-6

Amounts of amino acids that remained unreacted in the reaction after the coupling reaction of amino acids (5 nmol per reaction tube) with m-POPIC

Amino acid	Amount(nmol)	Amino acid	Amount (nmol)
Asp	0.23	Gly	0.13
Asn	0.06	Hyp ^{a)}	-
Glu	0.25	Ala	0.14
Gln	0.24	Trp	0.23
Cys ^{a)}	-	Tyr	0.24
Lys	0.24	Pro ^{a)}	-
Met	0.11	Val	0.14
Ser	0	Phe	0.25
Thr	0.23	Leu	0.08
His	0.23	Ile	0.02
Arg	0.23		

a). The amino acids could not be detected by the fluorescence reaction with the o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol(OPA-MCE) reagent.

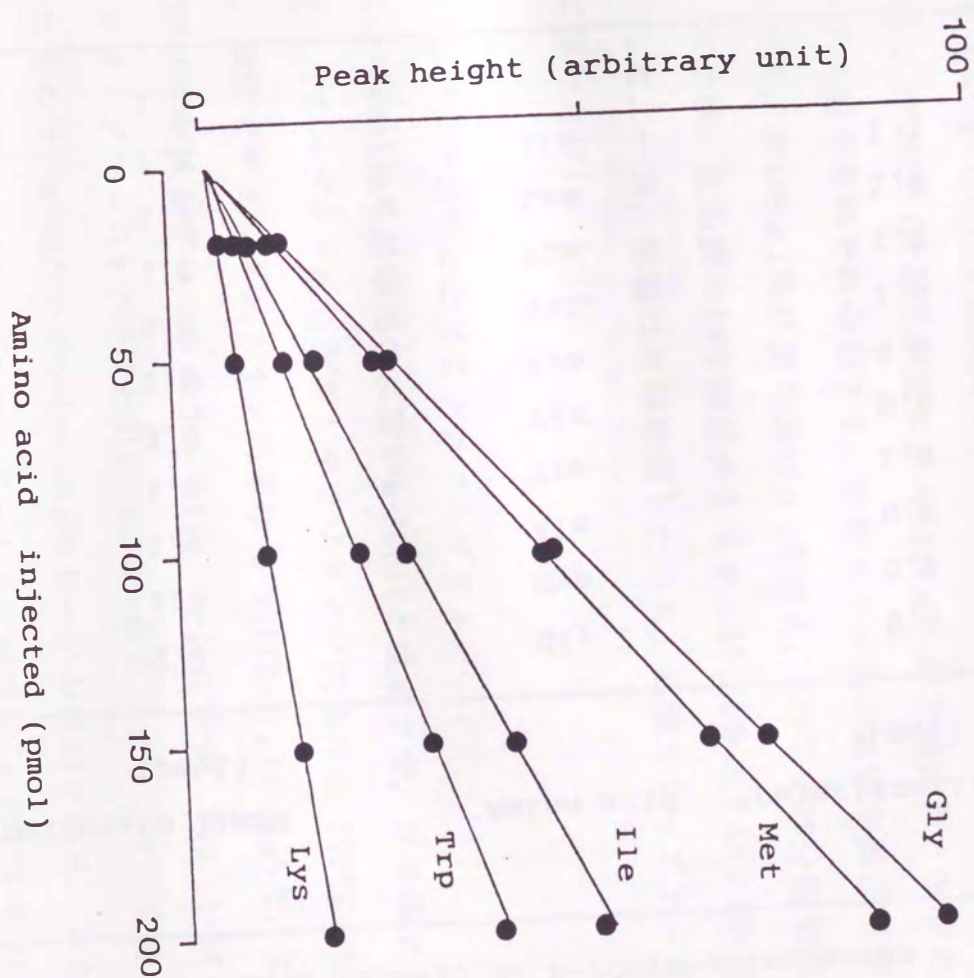


Fig. 1-12
Calibration graphs of amino acids detected
as m-POPIC-amino acids

Table 1-7 Detection limits (S/N=3) of m-POPTH-amino acids

Amino acid	Detection limit (pmol)	Amino acid	Detection limit (pmol)
Asp	2.0	Gly	0.6
Asn	1.7	Hyp	0.9
Glu	1.9	Ala	0.8
Gln	1.5	Trp	1.8
Cys	3.8	Tyr	0.8
Lys	2.6	Pro	0.9
Met	0.8	Val	1.0
Ser	1.0	Phe	1.0
Thr	1.2	Leu	1.4
His	2.2	Ile	1.3
Arg	1.0		

作に従ってm-POPICと反応させ、四塩化炭素(300 μ l $\times$ 2)で抽出する。水層(200 μ l)を分取し凍結乾燥する。次に、トリフルオロ酢酸100 μ lを加え100 $^{\circ}$ Cで10分間加熱したのち、減圧下トリフルオロ酢酸を留去し、水200 μ lを加え酢酸エチル(200 μ l $\times$ 2)で抽出後、水層と酢酸エチル層をそれぞれ分取する。酢酸エチル層の溶媒を減圧下留去したのち、水100 μ l及び濃塩酸50 μ lを加え、100 $^{\circ}$ Cで10分間加熱する。氷冷後、反応液に4M水酸化ナトリウム50 μ lを加え20 μ lをHPLCに付した。一方、水層は凍結乾燥したのち、残渣をカップリング反応に用いた(Fig. 1-13)。

(2) エドマン分解におけるクロマトグラム

Gly-Leu-Alaを基準操作に従いm-POPICと反応させ、N末端アミノ酸(Gly)をペプチドから切断しチアゾリノン誘導体(m-POPTZ-Gly)にし、酸性でチオヒダントイン誘導体(m-POPTH-Gly)に導いた。このときHPLCにおけるクロマトグラムをFig. 1-14に示す。Fig. 1-14 Aのクロマトグラムはm-POPICとGly-Leu-Alaのカップリング反応液から得たもので、m-POPTC-Gly-Leu-Alaのピークが検出される。しかしエドマン分解後ではGlyのチオヒダントイン誘導体(m-POPTH-Gly)のピーク(Fig. 1-14 B)は、同濃度のGlyを1-1-(1)の基準操作に従って蛍光検出したピークの約15%しか検出できなかった。またN末端アミノ酸が一つ少なくなったペプチド(Leu-Ala)を含む水層を凍結乾燥後、次の反応に用いたところm-POPTC-Leu-Alaのピークは確認できなかった。

同濃度のGlyをエドマン分解の基準操作に従ってカップリングさせた反応液(水層200 μ l)を、凍結乾燥して得た試料にアセトニトリル

Chart 1-2 Edman degradation of peptide with POPICs

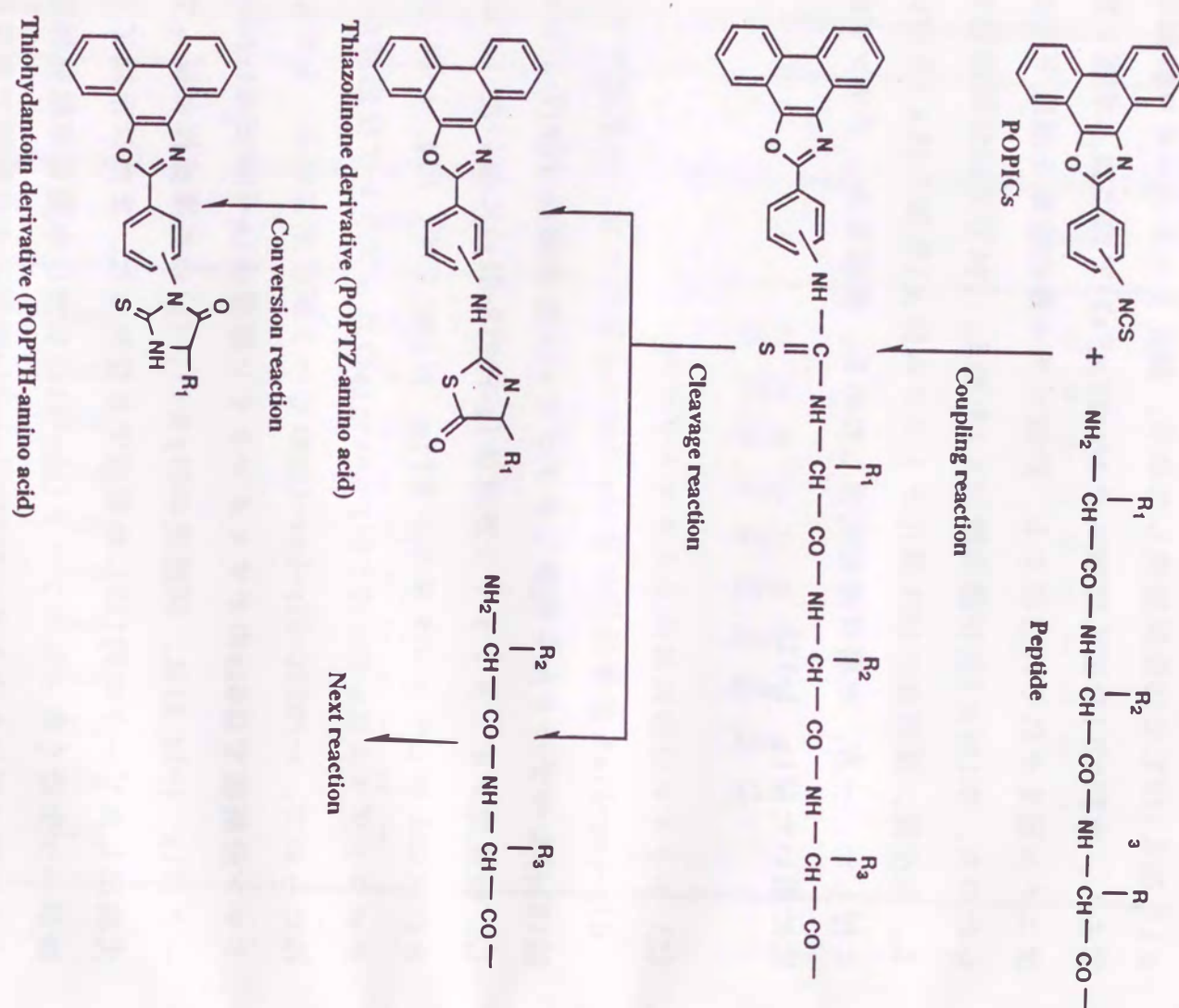
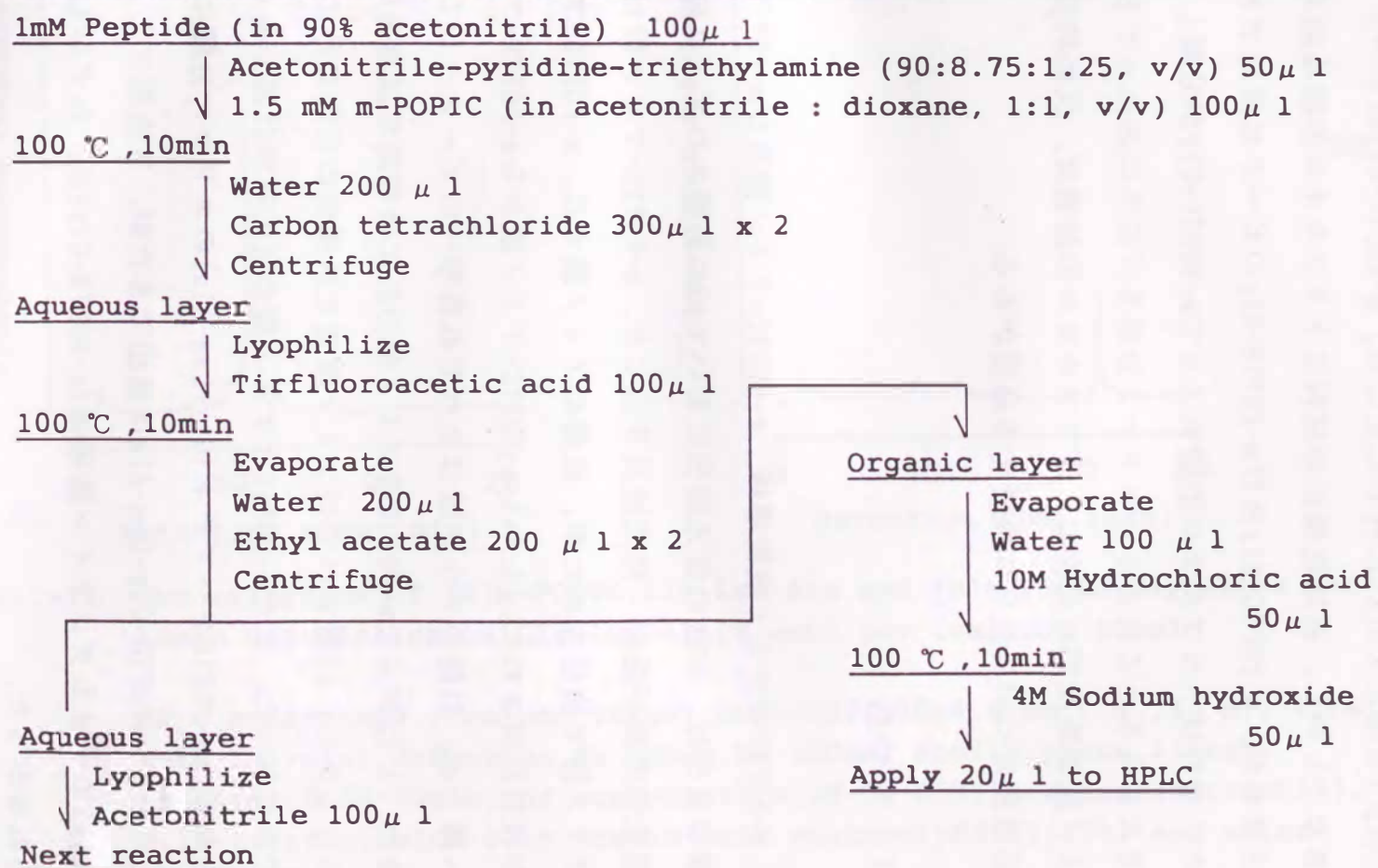


Fig. 1-13 Procedure for the Edman degradation of peptide with m-POPIC



200 μ lを加えてHPLCに付したところ, m-POPTC-Glyのピークが確認できた。しかし, 凍結乾燥後の試料にトリフルオロ酢酸を加えて反応させたが, m-POPTC-Gly及びm-POPTH-Glyのピークは確認できなかった。これはトリフルオロ酢酸によってm-POPTC-Glyが分解したものと考えられる。これより, エドマン分解を行なうにあたってN末端アミノ酸切断反応に必要な, トリフルオロ酢酸濃度, 反応時間及び反応温度についてさらに検討する必要がある。

1-7 小括

m-POPICのアミノ酸誘導体, m-POPTC-アミノ酸及びm-POPTH-アミノ酸の蛍光は, HPLCの蛍光検出においてpHに影響されず, ほぼ一定の蛍光強度及び励起・発光波長を示した。m-POPTC-アミノ酸は21種のアミノ酸で検出されたが, 数種のアミノ酸では, m-POPTC-アミノ酸が複数形成された。しかしm-POPTC-アミノ酸からm-POPTH-アミノ酸へ導くと, 21種のアミノ酸はそれぞれ各単一のピークとして検出できた。したがってm-POPICはアミノ酸分析には有用な試薬と考えられる。しかし, 21種すべてのアミノ酸蛍光誘導体の分離条件の確立はできなかった。またm-POPICとアミノ酸の反応収率は高いものと考えられる。m-POPICをペプチド(Gly-Leu-Ala)のエドマン分解に用いたところ, m-POPTC-Gly-Leu-Alaは検出できたが, N末端アミノ酸(Gly)のチオヒダントイン誘導体(m-POPTH-Gly)は, わずかしか認められなかった。

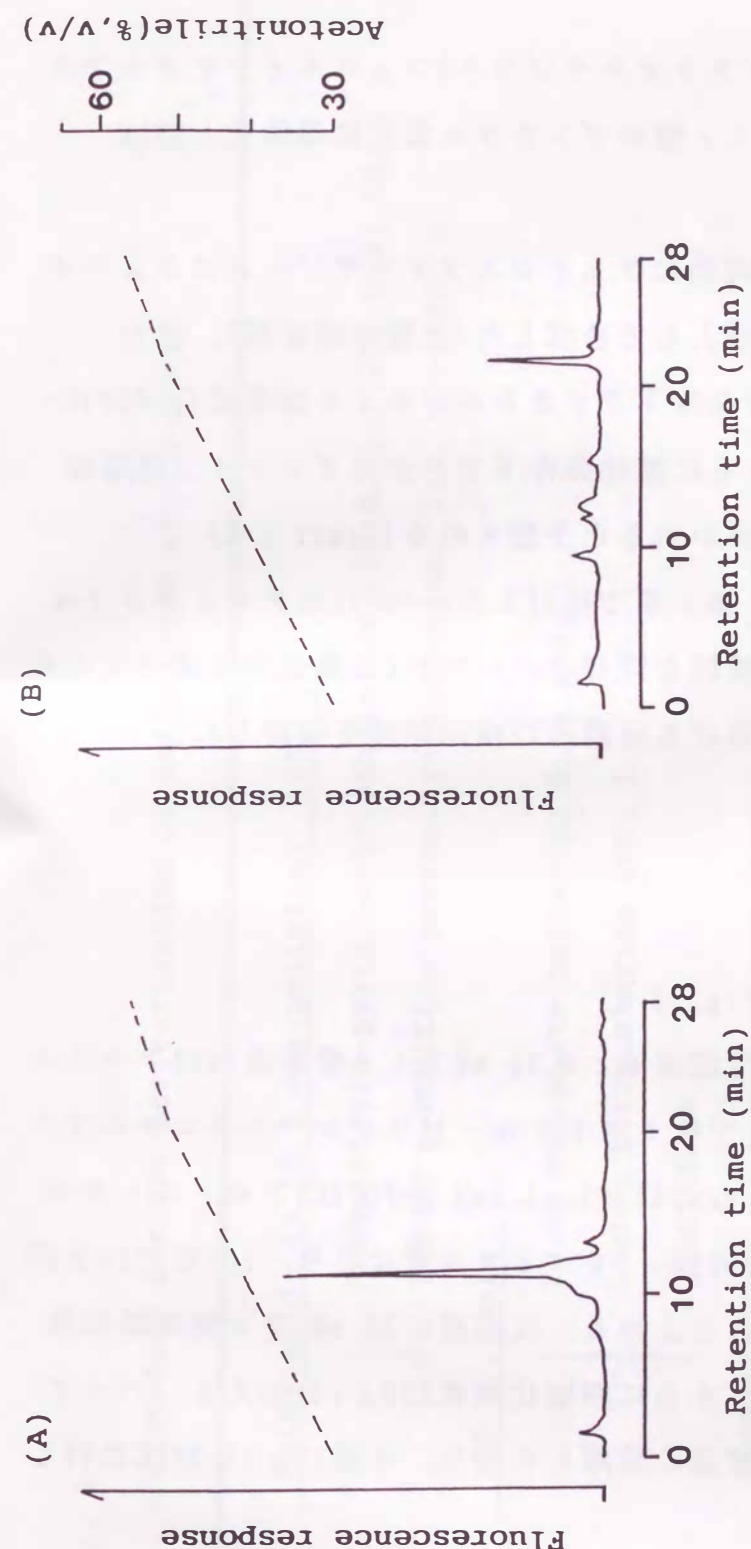


Fig.1-14 Chromatograms of (A)m-POPTC-Gly-Leu-Ala and (B)m-POPTH-Gly after the Edman Degradation of Gly-Leu-Ala(5 nmol per reaction tube)

HPLC conditions : column, TSKgel ODS-120T(150x4.6 mm i.d., 5 μ m); flow rate, 1ml/min; detection, Ex 330nm Em 400nm; mobile phase, linear gradient(0-20-40min) of acetonitrile(30-50-85%), tetrahydrofuran(5%), 0.1M triethylamine-0.1M acetic acid mixture(pH8.5)(10%) and water (55-15-0%).