

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：



第2章 4-(2-フェナンスラオキサゾール)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

p-POPICもm-POPICと同様にフェナンスラオキサゾールにフェニルイソチオシアネートを導入して合成した(実験の部参照)。またm-POPICと同様に塩基性条件下でチオカルバモイル誘導体(p-POPTC-アミノ酸)を形成し、さらに酸性条件下でチオヒダントイン誘導体(p-POPTH-アミノ酸)に導かれると予想される(Chart 1-1)。

p-POPICについても、第1章で検討したm-POPICのチオヒダントイン誘導体化反応条件の検討と同様に、p-POPICの最適誘導体化反応条件を求め、逆相HPLCにおける分離及び検出感度を検討した。

2-1 基準操作

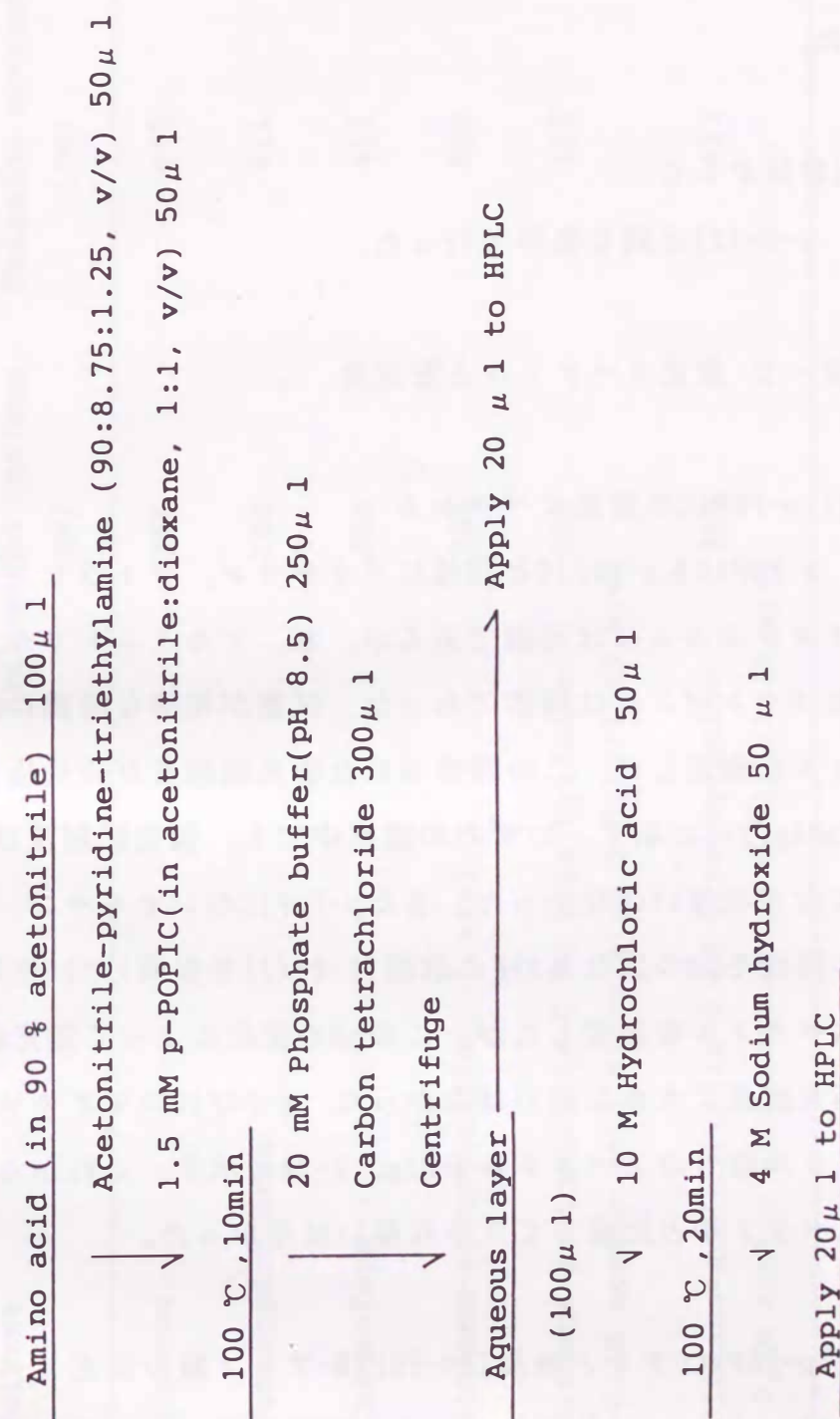
(1) 蛍光誘導体化反応(Fig. 2-1)

① p-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, 1.5mM p-POPIC(アセトニトリル-ジオキサン, 1:1, v/v)50 μ lをバイアル管にとり、100℃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たのち、水層20 μ lをHPLCに付した。

② p-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20分間加熱する。氷冷して反応を止め、反応液に

Fig. 2-1

Procedure for the derivatization of amino acids with p-POPIC



4M 水酸化ナトリウム水溶液 $50\mu\text{l}$ を加える。その $20\mu\text{l}$ を HPLC に付した。

(2) H P L C

1-2-(2) と同じ条件で行った。

2-2 蛍光スペクトルと安定性

(1) p-POPIC の蛍光スペクトル

p-POPIC も m-POPIC と同様にジオキサン、テトラヒドロフラン及びクロロホルムには可溶であるが、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。この時得られた蛍光励起及び発光極大波長を Table 2-1 に示す。いずれの溶媒中でも、蛍光励起及び発光極大波長に大きな違いはなかった。また p-POPIC のジオキサン-アセトニトリル溶液を pH の異なる 2 種の溶液 (1-2-(1) を参照) で 10 倍希釈して蛍光スペクトルを測定したが、この pH の変化によって蛍光励起及び発光極大波長に大きな違いはなかった。p-POPIC のジオキサン-アセトニトリル溶液のスペクトルを Fig. 2-2A に示す。これから、m-POPIC のスペクトルと比較して大きな違いはなかった。

(2) p-POPTC-アミノ酸及び p-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、p-POPIC と反応させた。この反応液を逆相 HPLC に付し、p-POPTC-アミノ酸及び p-POPTH-アミノ酸のピークを前述の pH の異なる 2 種の溶離液で分離分

Table 2-1
Excitation and emission maxima of the fluorescence of P-POPIC in various solvents

Solvent	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)
Dioxane	368	410
Tetrahydrofuran	368	412
Chloroform	368	412
Dioxane-acetonitrile (1:1, v/v)	365	409
Dioxane-acetonitrile-0.1M triethylamine -0.1M acetic acid mixture (pH 5.0) (1:1:18, v/v)	365	413
Dioxane-acetonitrile-0.1M triethylamine -0.1M acetic acid mixture (pH 8.5) (1:1:18, v/v)	364	412

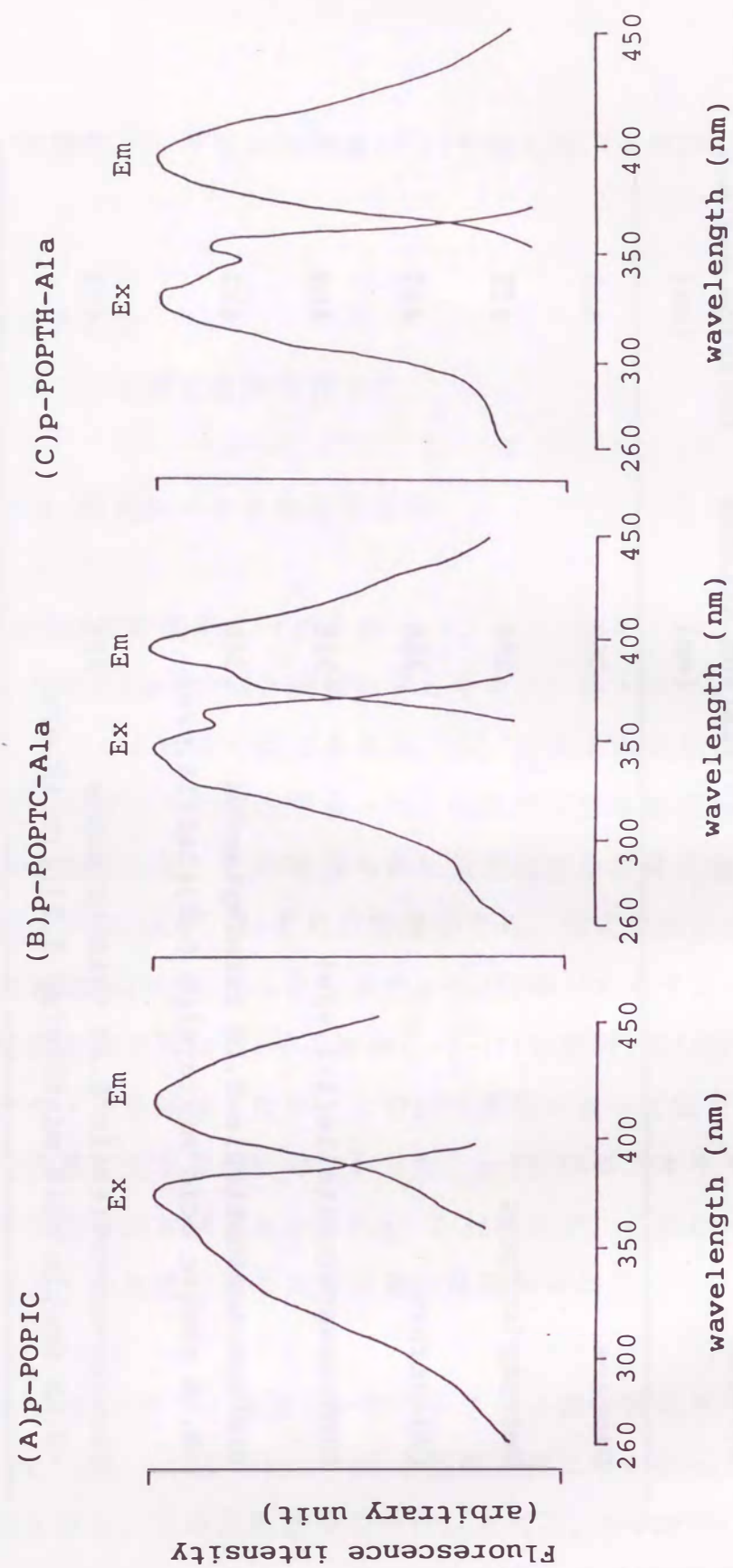


Fig.2-2 Fluorescence excitation and emission spectra of (A)1.5 mM p-POPIC in dioxane-acetonitrile(1:1,v/v), (B)p-POPTC-Ala and (C)p-POPTH-Ala in aqueous acetonitrile containing 0.1M triethylamine-0.1M acetic acid mixture (pH 8.5).

取した。各分画の蛍光励起及び発光極大波長をTable 2-2に示す。
m-POPICの場合と同じようにp-POPTC-Ala及びp-POPTH-Alaから得た蛍光スペクトルはいずれも良く似た形を示し(Fig. 2-2 B,C), 検討した他の3種のアミノ酸による違いもなかった。またpHによる違いも認められなかった
(Table 2-2)。m-POPICと比較すると、スペクトルの形は類似していたが、m-POPICはm-POPTH-アミノ酸の方が励起波長が長波長域にあるのに対し、p-POPICはp-POPTC-アミノ酸の方が励起波長が長波長域にあるという違いが見られた。p-POPTC-アミノ酸は約3時間、p-POPTH-アミノ酸は約1時間安定であった。またm-POPICの場合と同様にアミノ酸との誘導体の励起波長が試薬のそれと違いがあるのでHPLC検出に適している。p-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及び発光波長400 nmで蛍光検出した。

2-3 アミノ酸誘導体のHPLC分離

m-POPTH-アミノ酸を分離したHPLC条件(1-3参照)に従い、21種のp-POPTH-アミノ酸を分離した(Fig. 2-3)。図から明らかなようにm-POPICの場合と同様に一部のアミノ酸で相互分離のできないものがあった。したがって、以下m-POPICの場合と同様に10種類と11種類のアミノ酸のグループに分けてそれらの混液を反応させ分離検出した(Fig. 2-4)。これから、各アミノ酸についてそれぞれ単一のピークが得られた。しかし、p-POPICはp-POPTC-アミノ酸からp-POPTH-アミノ酸への変換が円滑に進行せず、保持時間2分から6分の間に残存するp-POPTC-アミノ酸が認められ、早く溶出する数種(Asp, Asn, Glu,

Table 2-2

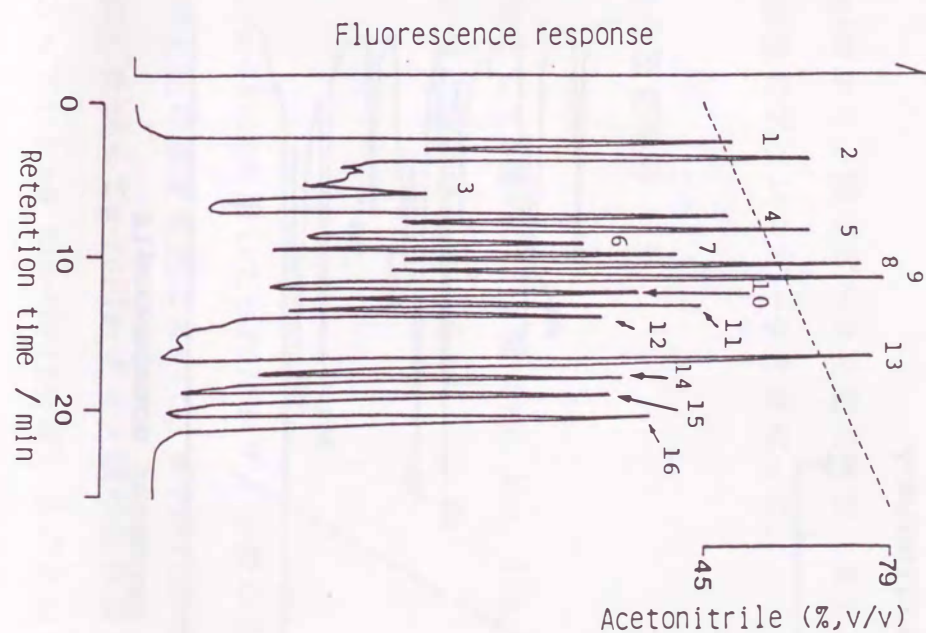
Excitation and emission maxima of the fluorescence of p-POPTC- and p-POPTH-amino acids in solutions with pHs 5.0 and 8.5

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)
p-POPTC-Ala	344	395	344	395
p-POPTH-Ala	335	402	335	402
p-POPTC-Hyp	344	395	344	395
p-POPTH-Hyp	335	402	335	403
p-POPTC-His	344	395	343	394
p-POPTH-His	335	402	335	403
p-POPTC-Asn	344	395	344	395
p-POPTH-Asn	335	402	335	402

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

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

Fig. 2-3 Chromatogram of p-POPTH-amino acids



HPLC conditions: column, TSKgel ODS-120T (150x4.6 mm i.d., 5 μ m); flow rate, 1 ml/min; detection, Ex 340 nm Em 400 nm; mobile phase, linear gradient (0-30 min) of acetonitrile (45-85%), tetrahydrofuran (5%), 0.1 M triethylamine-0.1 M 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 + reagent-blank; 14=Val; 15=Phe; 16=Leu and Ile.

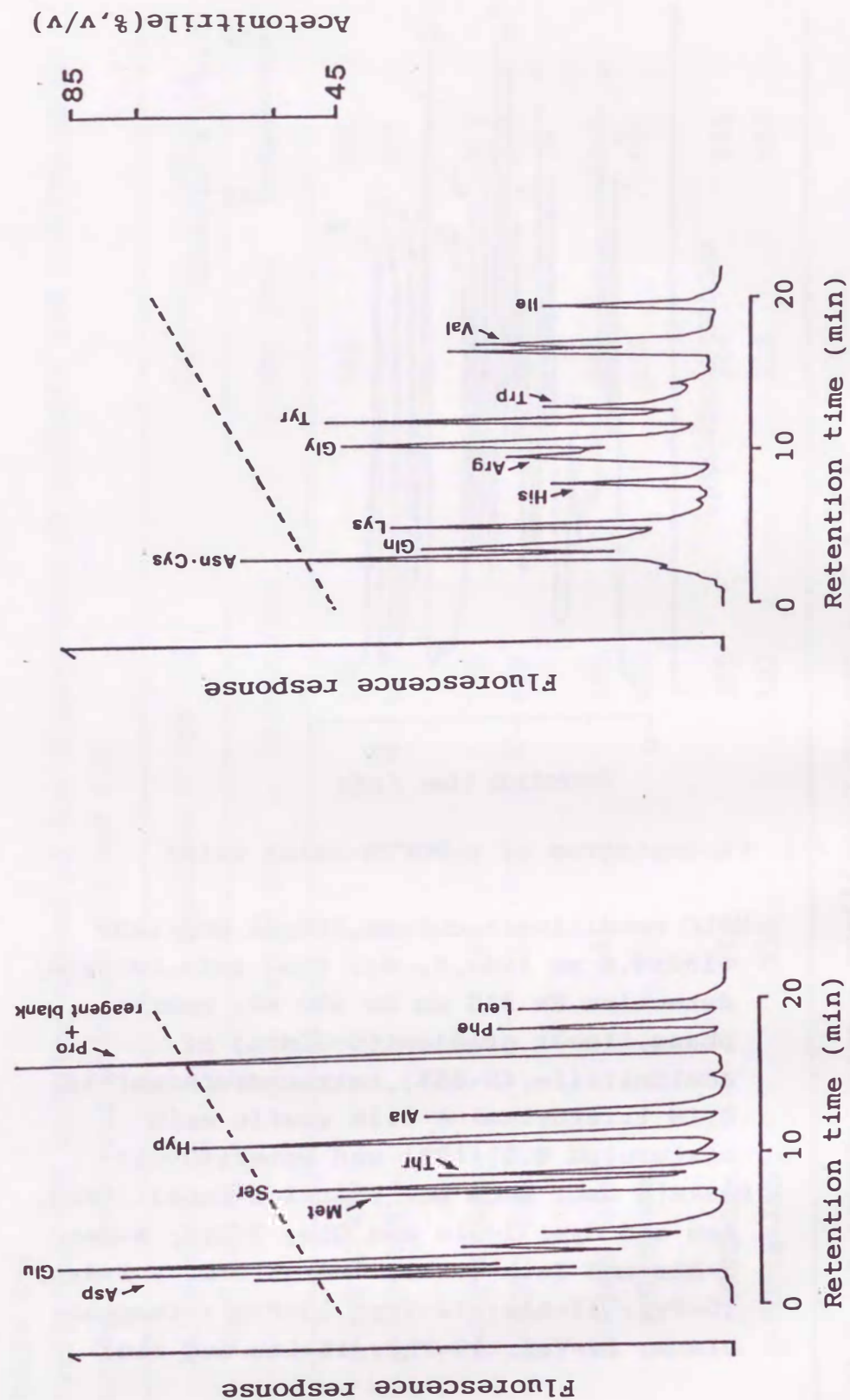


Fig. 2-4 Chromatograms of p-POPTH-amino acids (5 nmol each per reaction tube)

Gln, Cys, Lys)のアミノ酸のピークと重なった。またp-POPTH-Proのピークが試薬由来のブランクピークと重なった。

2-4 誘導体化反応条件

モデル化合物として5種のアミノ酸 (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

0.5-1.5 mMのp-POPICを用いてp-POPTH-アミノ酸の生成ピークを調べた。この結果上記の濃度範囲において、m-POPICの場合と同様に濃度を高くするにしたがってp-POPTH-アミノ酸の生成量が多くなった (Fig. 2-5)。よって1.5 mM のp-POPICを用いることにした。

(2) ピリジン及びトリエチルアミンの濃度

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。アセトニトリル50 μ l中の1.25%トリエチルアミン及び8.75%ピリジンを用いたとき大部分のアミノ酸において、p-POPTC-アミノ酸の生成量が最大であった (Fig. 2-6)。この反応条件はm-POPICのそれと同じだった。

(3) p-POPTC-アミノ酸生成反応の反応時間

p-POPICとアミノ酸のp-POPTC-アミノ酸生成反応における温度を100°Cと50°Cに設定し、各温度における反応時間(2-30分)の影響を調べた。m-POPICと同様に100°Cでは最大のピークを得るのに約10分間

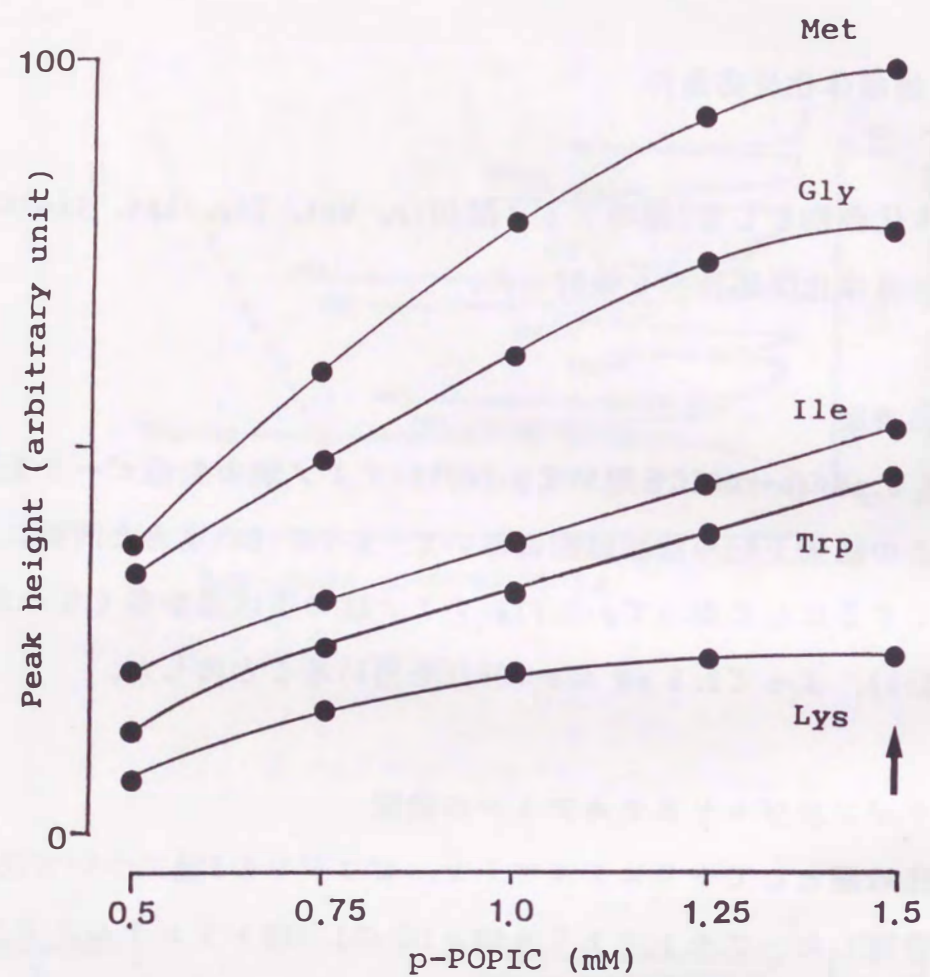


Fig. 2-5
Effect of p-POPIC concentration on the formation of p-POPTH-amino acids (5 nmol each per reaction tube)

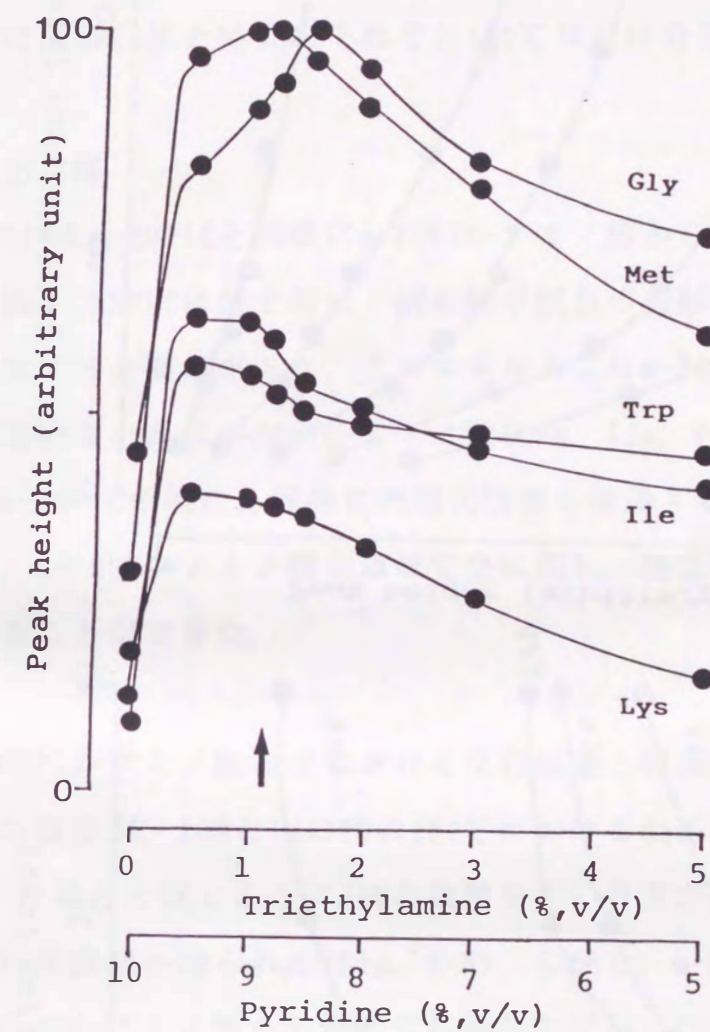


Fig. 2-6
Effect of pyridine and triethylamine concentrations on the coupling reaction of amino acids with p-POPIC (5 nmol each per reaction tube)

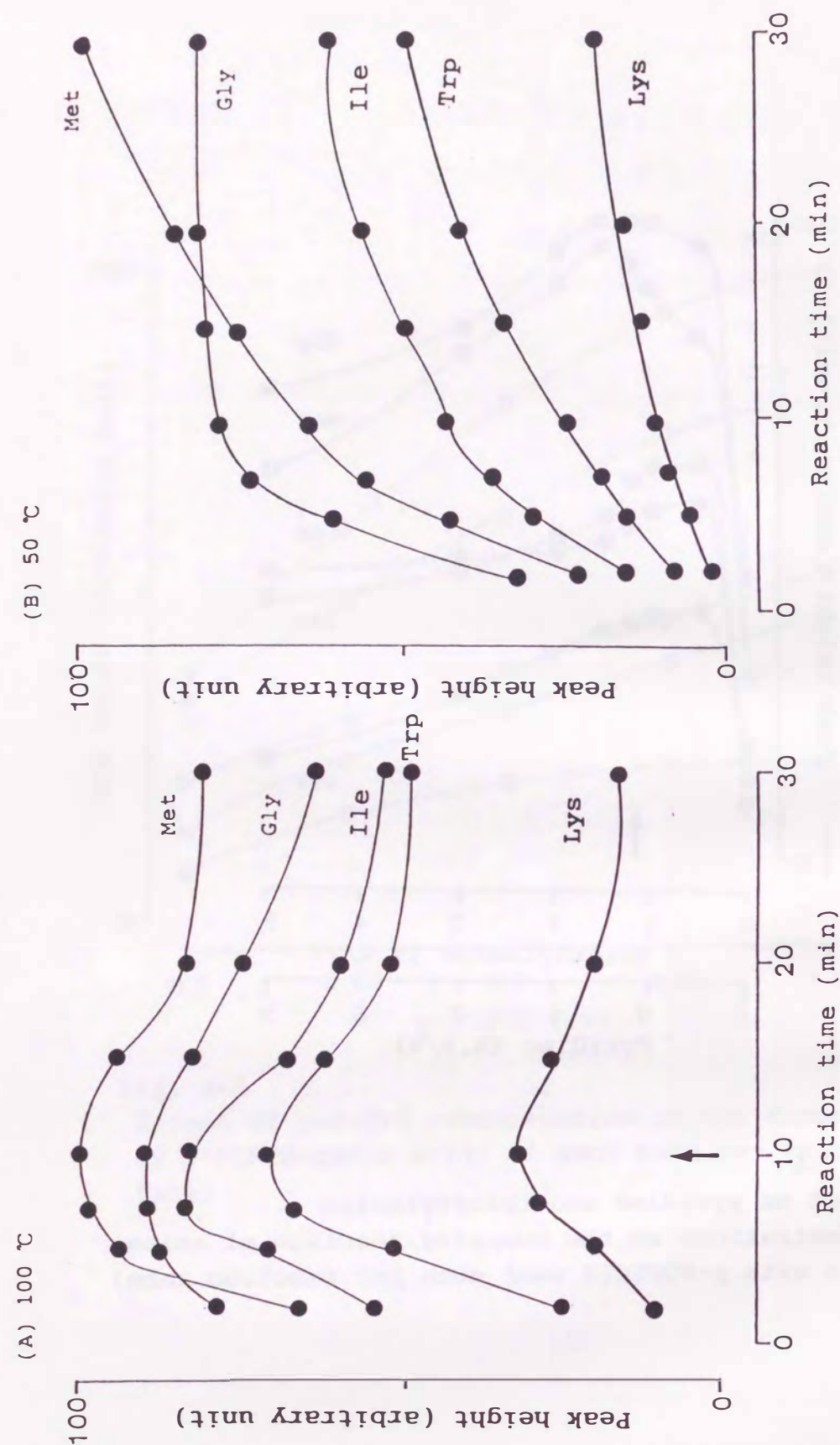


Fig. 2-7

Effect of reaction time and temperature on the formation of p-POPTC-amino-acids
(5 nmol each per reaction tube)

の反応時間を必要としたが(Fig. 2-7A), 50°Cでは同じピーク高さを得るのに長時間の反応が必要であった(Fig. 2-7B). したがって基準操作では反応温度と時間をそれぞれ100°C及び10分間に設定した.

(4) 抽出溶媒

p-POPICもm-POPICと同様にp-POPTC-アミノ酸からp-POPTH-アミノ酸へ変換してHPLCに付す前に, 副産物や試薬の分解物などの妨害物質を除去する必要がある. クロロホルムではm-POPICの場合と同様に, 妨害物質と共にp-POPTC-アミノ酸(Leu, Ile, Phe)も抽出されるので, m-POPICの場合と同様に四塩化炭素を使用することにした. この結果, p-POPTC-アミノ酸をほぼ完全に残し, 妨害物質を効率よく抽出することができた.

(5) p-POPTH-アミノ酸生成における反応温度と塩酸濃度

塩酸の濃度が, 10Mと5Mの時の100°Cにおける反応時間を検討した. m-POPICの場合と同じように10Mの塩酸を用いる方がp-POPTH-アミノ酸の高い生成率が得られた(Fig. 2-8). しかし, m-POPICの場合と異なりp-POPTH-アミノ酸への変換に長時間を要し, 100°Cにおいて20分間で最大の生成量を得た. したがって, 基準操作においては, 10Mの塩酸を用い, 100°Cにおいて20分間の反応時間を設定した.

2-5 反応収率, 検量線及び検出限界

1-5-(1)の基準操作にしたがってOPA-MCE試液を用いてp-POPICとアミノ酸の反応収率を求めた. 未反応のアミノ酸を定量した結果を

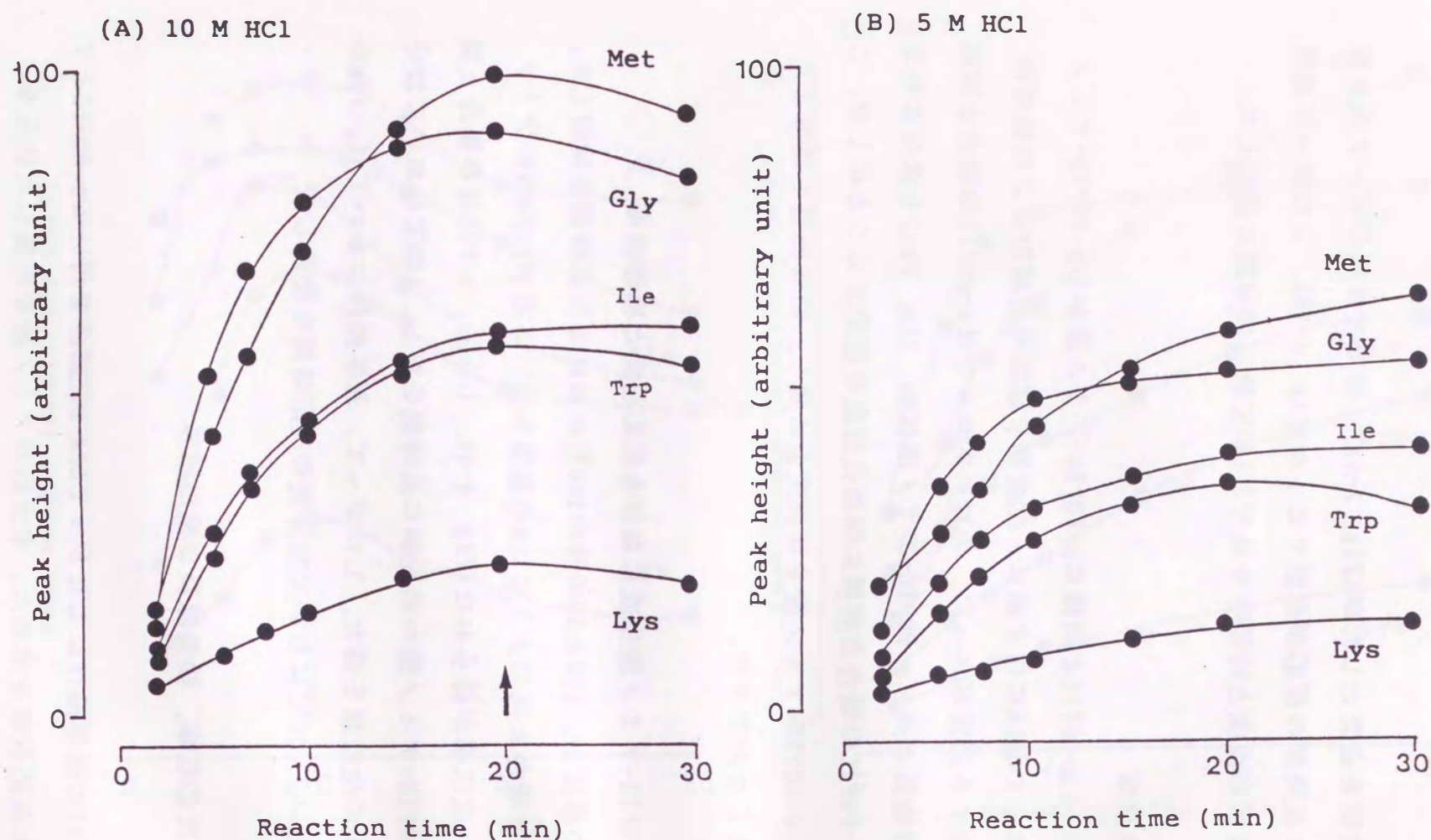


Fig. 2-8

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

Table 2-3

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

Amino acid	Amount(nmol)	Amino acid	Amount (nmol)
Asp	0.15	Gly	0.15
Asn	0	Hyp ^{a)}	-
Glu	0.19	Ala	0
Gln	0.14	Trp	0
Cys ^{a)}	-	Tyr	0.21
Lys	0.25	Pro ^{a)}	-
Met	0.04	Val	0
Ser	0	Phe	0.21
Thr	0.12	Leu	0
His	0	Ile	0
Arg	0		

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

Table 2-3に示す。反応に用いたアミノ酸は反応液中5 nmolであり、未反応のアミノ酸は0-0.25 nmolであるので、p-POPICとアミノ酸の反応収率は少なくとも95-100%であることが分かった。

また基準操作に従ってアミノ酸をp-POPTH-アミノ酸とし、検量線を作成した(Fig. 2-9)。いずれの検量線も原点を通る直線を示した(相関係数 $r=0.992-0.998$, 各 $n=2$ プロット)。検出限界($S/N=3$)は0.2-2.4 pmol/HPLC注入量であった(Table 2-4)。

2-6 小括

p-POPICもm-POPICと同様にp-POPTH-アミノ酸へ導くと、それぞれのアミノ酸に対し単一の蛍光ピークを示したが、m-POPICの場合よりp-POPTH-アミノ酸への変換には長時間を要した。またm-POPICに比べ、試薬由来のブランクピークも高い。しかし検出限界においては、p-POPICの方がm-POPICに比べ1.5-3倍高いという利点があった。

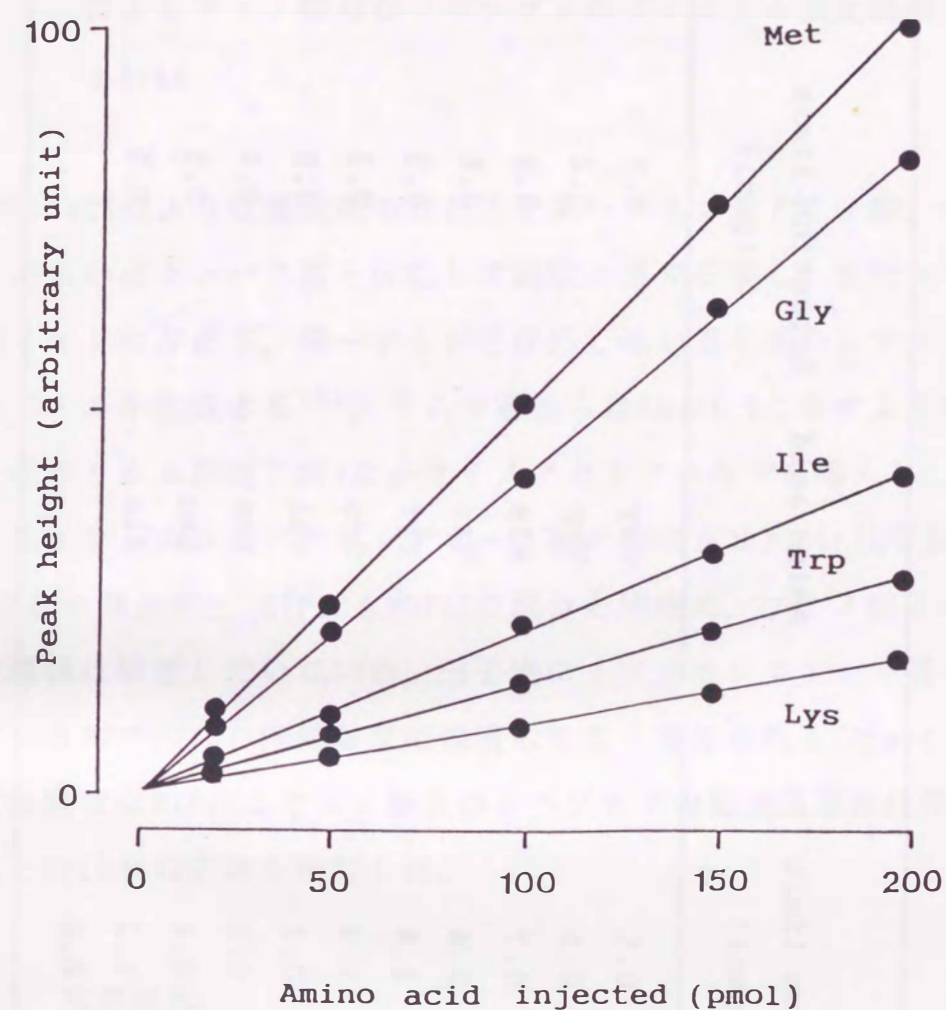


Fig. 2-9
Calibration graphs of amino acids detected as p-POPTH-amino acids

Table 2-4 Detection limits (S/N=3) of p-POPTH-amino acids

Amino acid	Detection limit (pmol)	Amino acid	Detection limit (pmol)
Asp	0.5	Gly	0.3
Asn	0.5	Hyp	0.2
Glu	0.7	Ala	0.4
Gln	0.6	Trp	0.6
Cys	2.4	Tyr	0.3
Lys	1.3	Pro	0.3
Met	0.2	Val	0.5
Ser	0.3	Phe	0.4
Thr	0.4	Leu	0.5
His	1.3	Ile	0.5
Arg	0.8		

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

OPAはMCEのような還元剤の存在下で第一アミン、アミノ酸、ペプチドあるいはタンパク質と反応して鋭敏に蛍光を呈し、またシアノ化物イオンの存在下、第一アミンと反応し強い蛍光性のシアノイソインドールを生成する¹⁵⁾。そこで著者らはChart 3に示すようにシアニ化カリウム存在下OPAにp-アミノアセトアニリドを導入し、アセチル化後フェニルイソチオシアネート基に変換させたCIPICを合成した(実験の部参照)。CIPICもPOPICの場合と同様に、アミノ酸との蛍光誘導体は単離していないが、分子内にイソチオシアネート基を有しているのでPITCと同様な反応機構になると考えられる(Chart 3-1)。本章ではCIPICとアミノ酸及びジペプチドの蛍光誘導体化条件の検討とHPLCへの応用を検討した。

3-1 基準操作

(1) 蛍光誘導体化反応(Fig. 3-1)

①チオカルバモイル誘導体(CIPTC-アミノ酸・ペプチド)生成反応 : 0.1mM アミノ酸溶液あるいはジペプチド(Ala-Gly, Leu-Ala)(アセトニトリル-水, 9 : 1, v/vの溶液)50 μ lに、塩基触媒としてアセトニトリル-ピリジン-トリエチルアミン混液(90 : 8.75 : 1.25, v/v)50 μ l, ペプチド溶液にはアセトニトリル-トリエチルアミン混液(9 : 1, v/v)50 μ l及び10mM CIPIC アセトニトリル溶液 100

Chart 3-1
Possible derivatization of amino acid with CIPIC

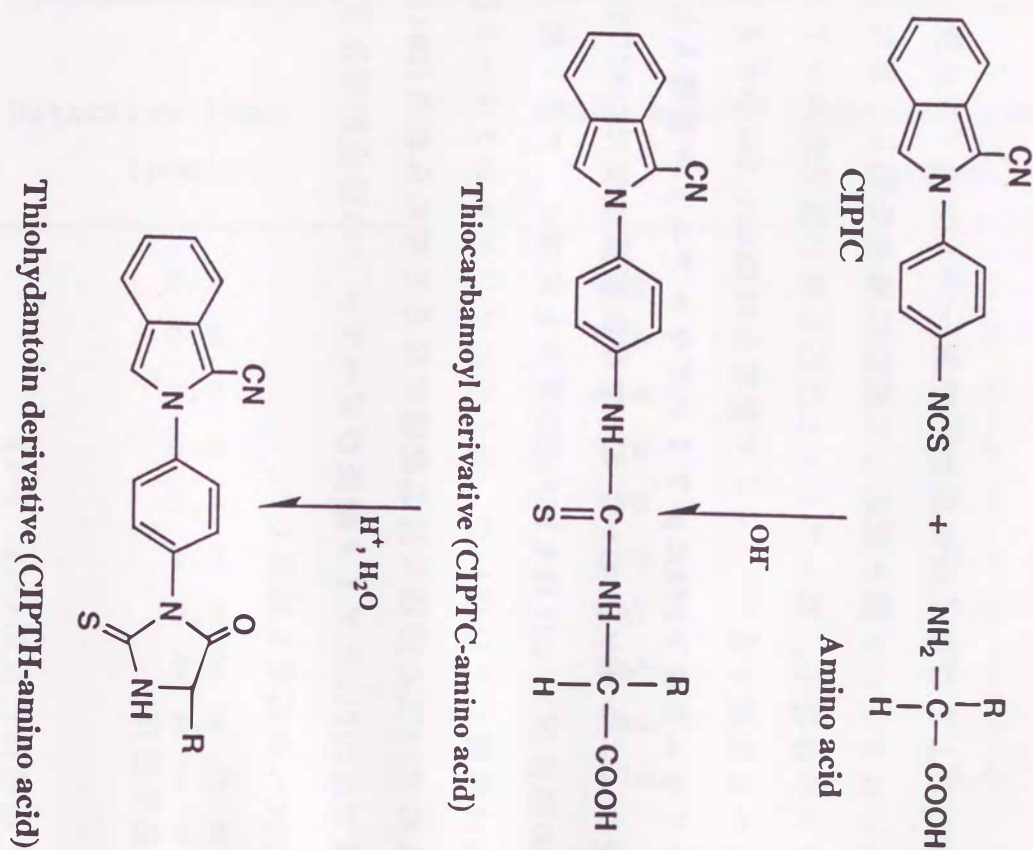
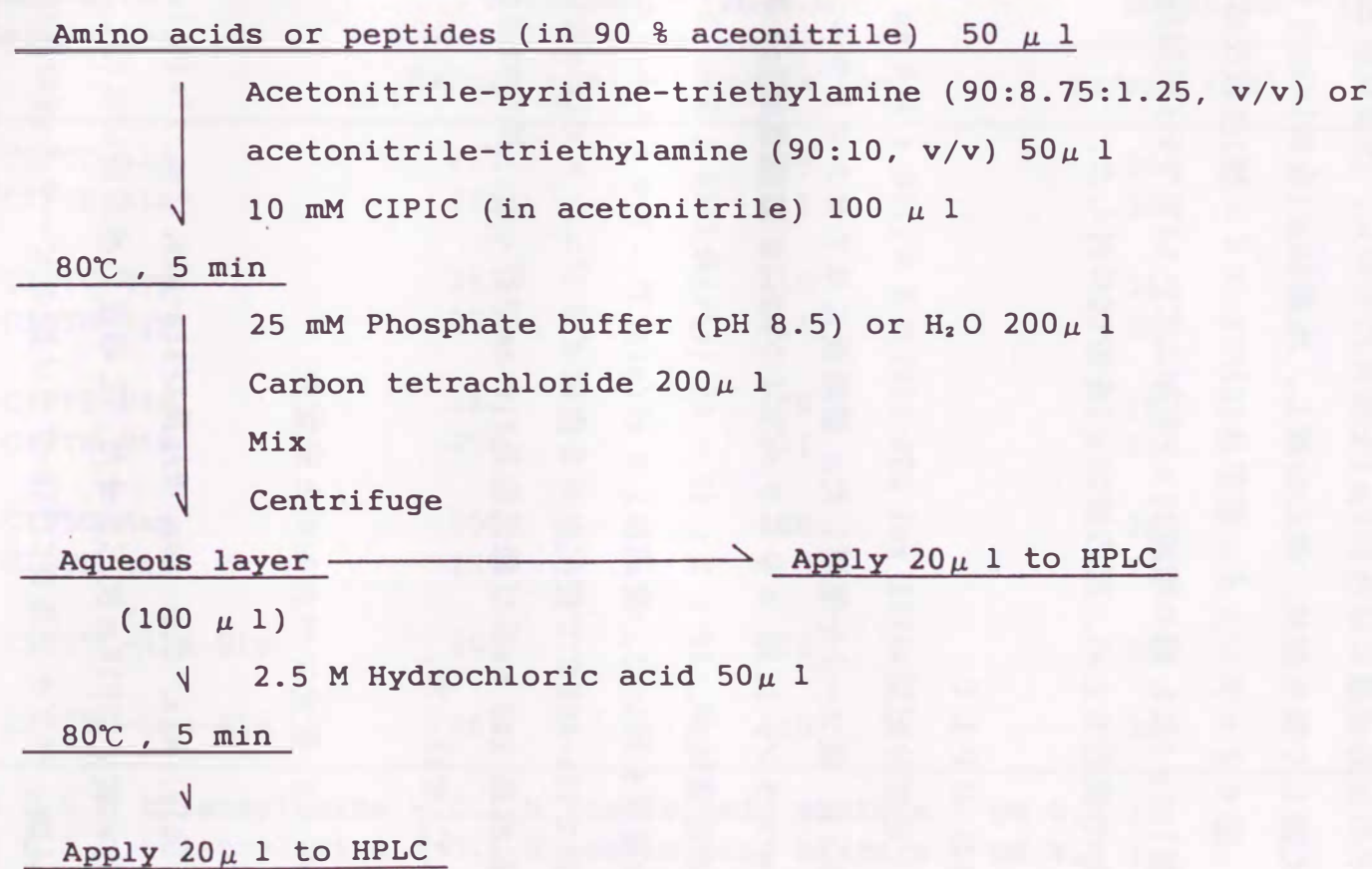


Fig. 3-1

Procedure for HPLC determination of amino acids and peptides by precolumn fluorescence derivatization with CIPIC



μ lを加え、80℃で5分間加熱する。氷冷して反応を止める。次にアミノ酸の反応液には25mM リン酸塩緩衝液(pH 8.5)200 μ lを、ペプチドの反応溶液には水200 μ lを加えたものに、四塩化炭素200 μ lを加え激しく振り混ぜ、遠心分離し、水層20 μ lをHPLCに付した。

②チオヒダントイン誘導体(CIPTH-アミノ酸)生成反応：上記の水層100 μ lに2.5Mの塩酸50 μ lを加えて、80℃で5分間加熱する。氷冷して反応をとめ、反応液20 μ lをHPLCに付した。

(2) H P L C

逆相分配型のTSK gel 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, 20 : 5 : 10 : 65 (v/v)及び80 : 5 : 10 : 5 (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40分間で20%-80%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 260 nm及び発光波長410 nmで行った。操作は室温(22 $\pm$ 4℃)で行った。

3 - 2 蛍光スペクトルと安定性

Gly, Ala, His, Asp, Hyp及びAla-Gly, Leu-Ala(各1mM)を基準操作に従いCIPICと反応させた。この反応液をHPLCに付し, CIPTC-アミノ酸・ペプチド及びCIPTH-アミノ酸のピークを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 3-1に示す。またCIPTC-Ala, CIPTH-Alaの蛍光スペクトル及びCIPTC-

Table 3-1
Excitation and emission maxima of the fluorescence of CIPTC-amino acids and peptides,
and CIPTH-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)
CIPTC-Ala	267	409	268	408
CIPTH-Ala	259	411	259	411
CIPTC-Hyp	263	410	262	410
CIPTH-Hyp	259	411	258	411
CIPTC-His	262	408	262	409
CIPTH-His	258	411	258	411
CIPTC-Asp	268	406	269	405
CIPTH-Asp	259	410	258	409
CIPITC-Ala-Gly	265	409	266	408
CIPITC-Leu-Ala	267	410	267	409

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)

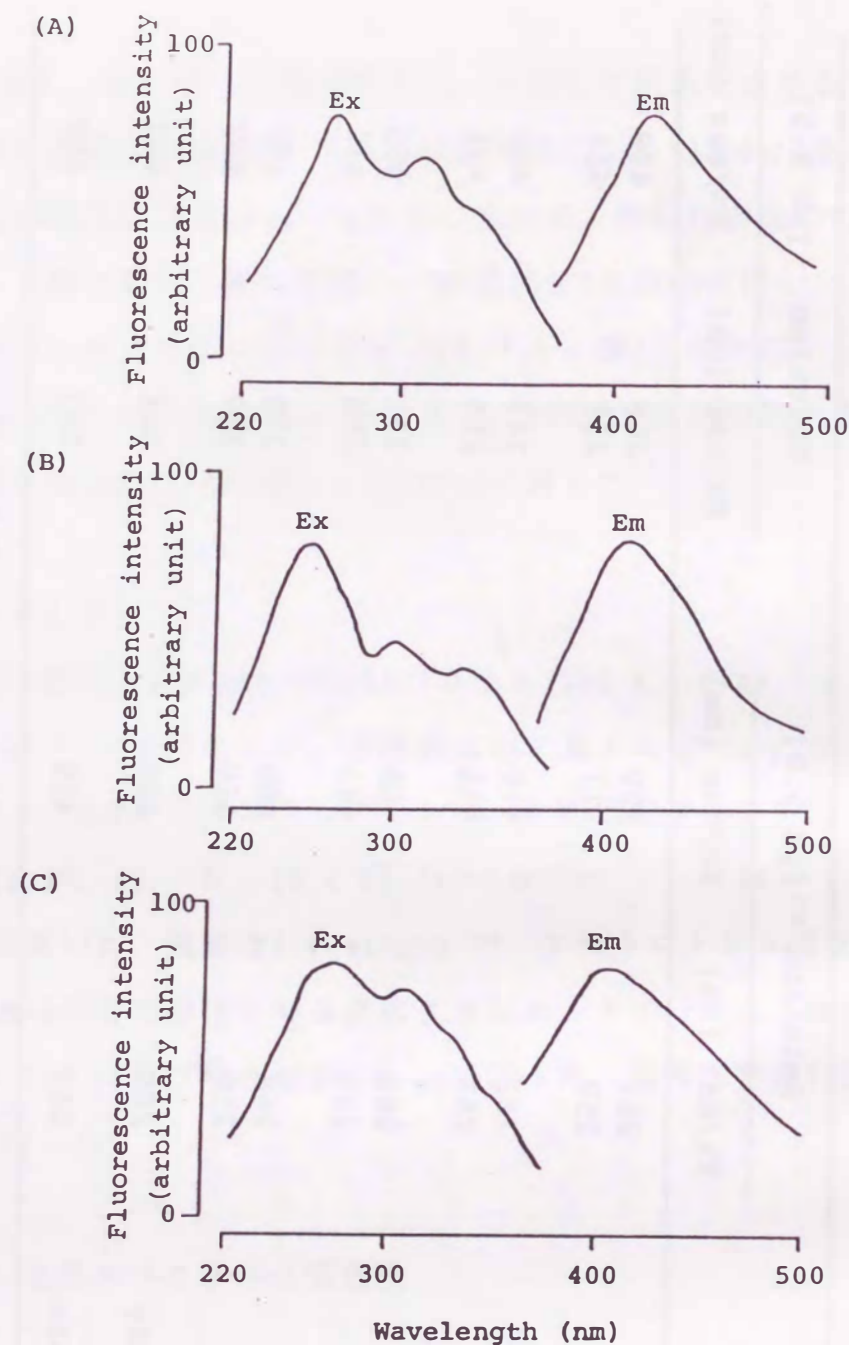


Fig. 3-2
Fluorescence excitation and emission spectra of
HPLC fractions of (A) CIPTC-Ala, (B) CIPTH-Ala
and (C) CIPTC-Ala-Gly.

Ala-Glyの蛍光スペクトルをFig. 3-2に示す。他のアミノ酸及びペプチドの誘導体の蛍光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。室温でCIPTC-アミノ酸、CIPTC-ペプチド及びCIPTH-アミノ酸はそれぞれの反応液中で約1時間安定であった。よってCIPIC及びその誘導体はHPLC検出に適していることが分かった。

3-3 アミノ酸誘導体のHPLC分離

Gly, Ala, Leu をモデル化合物として、CIPICとのカップリング反応及びそれに続く酸変換反応後の反応液のクロマトグラムをFig. 3-3に示す。CIPICとアミノ酸とのカップリング反応によって生成したCIPTC-アミノ酸はアンモニア及び試薬由来のブランクより早く溶出した(Fig. 3-3A)。保持時間が14-30分であるそのブランクピークは、CIPTH-アミノ酸の蛍光ピークの検出を困難にした(Fig. 3-3A and C)。したがって基準操作では反応溶液中の妨害物質を取り除くために、カップリング反応後に四塩化炭素で抽出した(Fig. 3-3B)。

CIPICとのカップリング反応では上記のアミノ酸に対しそれぞれ2本のピークを与えた(Fig. 3-3A 及び B)。それぞれのアミノ酸で遅く検出されるピーク(peak 1, 2 及び 3)が、CIPTH-アミノ酸に変換され、早く検出されるピーク(peak 1', 2' 及び 3')は各アミノ酸に由来する副反応物であることが分かった(Fig. 3-3B 及び C)。その副反応物は酸変換反応後も分解しないで反応液中に残り、20種のアミノ酸からそれぞれ検出された。

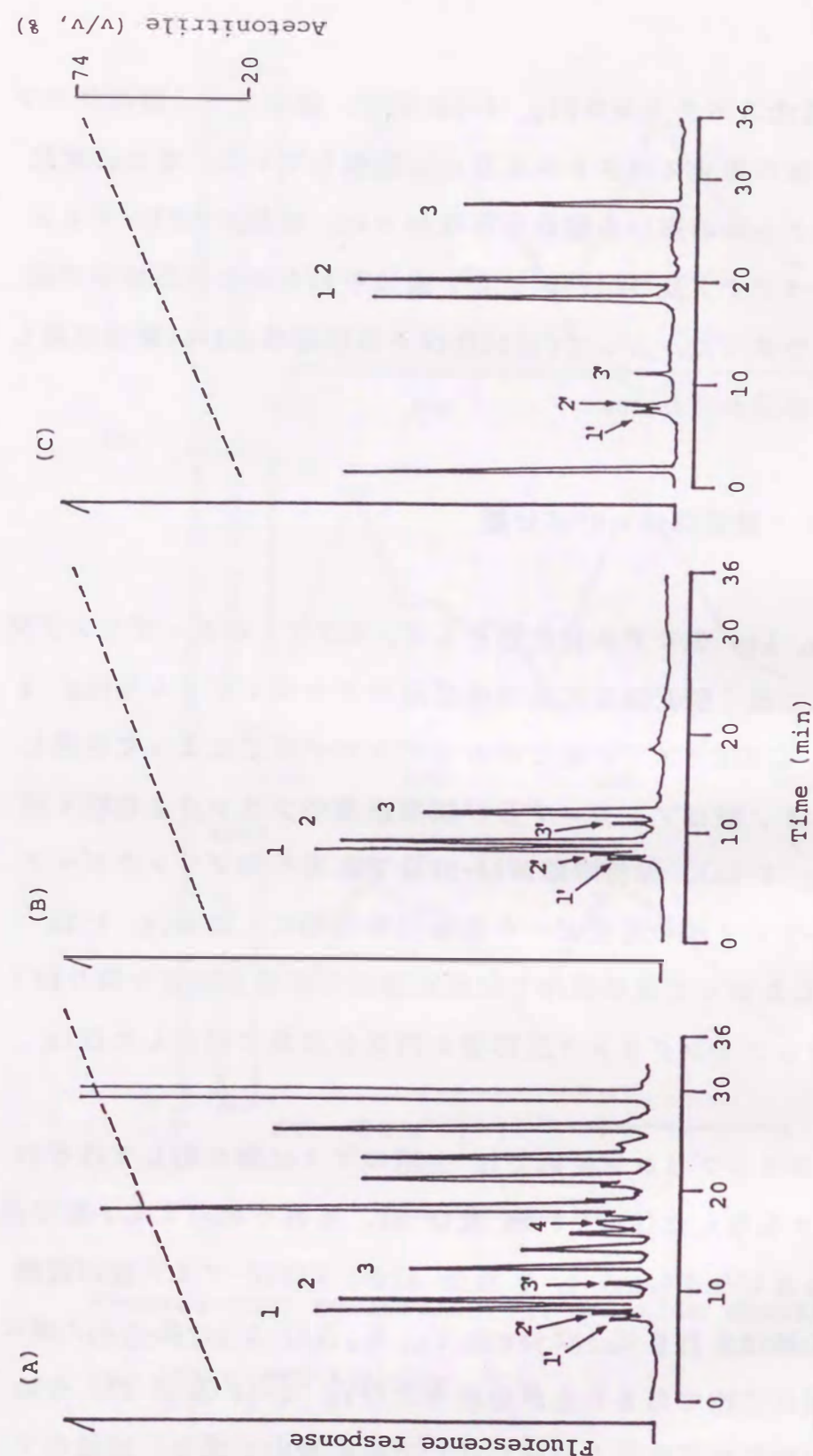


Fig. 3-3

Chromatograms of a coupling reaction mixture (A) before and (B) after washing with carbon tetrachloride, and of (C) its conversion reaction mixture of the amino acids (5 nmol each per reaction tube). Peaks: 1=Gly; 1'=by-product for Gly; 2=Ala; 2'=by-product for Ala; 3=Leu; 3'=by-product for Leu; 4=ammonia; others=reagent blank.

Fig. 3-4に20種のアミノ酸の最終反応液のクロマトグラムを示す。20種全てのCIPTC-アミノ酸は酸変換反応によってそのアミノ酸に相当する各単一ピークを示すCIPTH-アミノ酸に導かれた。各アミノ酸の副反応物は分解及び変換せずに保持時間5-15分に検出された。しかしながらGlnとHis, MetとProの蛍光ピーク(CIPTH-アミノ酸)がそれぞれ重なり、移動相中アセトニトリル濃度(20-74 %, v/v, 30 min)の直線グラジエント溶離でそれらの誘導体を完全に分離することはできなかった。しかしPOPICと比較すると, AspとAsn及びGluとGlnの蛍光ピークが分離できるなど, 良好な点が観察された。

3-4 ジペプチド誘導体のHPLC分離

Ala-Gly及びLeu-AlaもCIPICと反応しCIPTC-Ala-Gly及びCIPTC-Leu-Alaを生成した(Fig. 3-5A, peak 1 及び 2)。カップリング反応ではアミノ酸のときと同じように, それぞれのジペプチドに対し副反応物を与えた(Fig. 3-5A, peak 1' 及び 2')。次に, 酸変換反応を行なうと, 反応時間とともにCIPTC-Ala-Gly 及びCIPTC-Leu-Alaの蛍光ピークは減少し, N末端アミノ酸(Fig. 3-5B 及び C, peak 3 及び 4)のCIPTH-Ala 及びCIPTH-Leuが生成された。これらの誘導体の生成は, 基準操作に従い各ペプチドで確認した。これによりジペプチドのN末端アミノ酸の決定が可能であることが分かった。

3-5 誘導体化反応条件

7種のアミノ酸(Glu, Gly, Ala, Arg, Val, Trp, Leu)及びジペプ

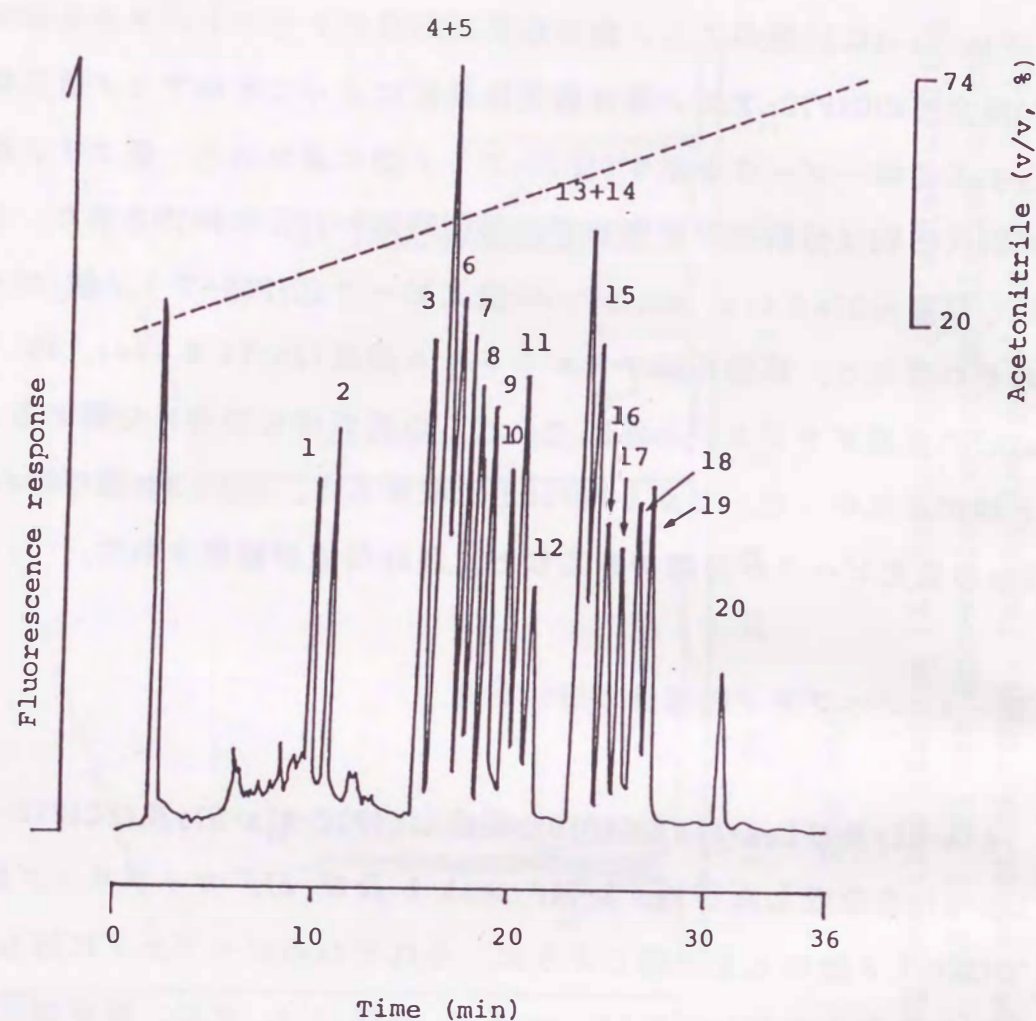


Fig. 3-4

Chromatograms of the CIPTH-amino acids (5 nmol each per reaction tube) in the conversion reaction mixture following the coupling reaction. Peaks: 1=Asp; 2=Glu; 3=Asn; 4=His; 5=Gln; 6=Ser; 7=Thr; 8=Arg; 9=Gly; 10=Hyp; 11=Ala; 12=Tyr; 13=Pro; 14=Met; 15=Val; 16=Trp; 17=Phe; 18=Ile; 19=Leu; 20=Lys; others=by-product and reagent blank.

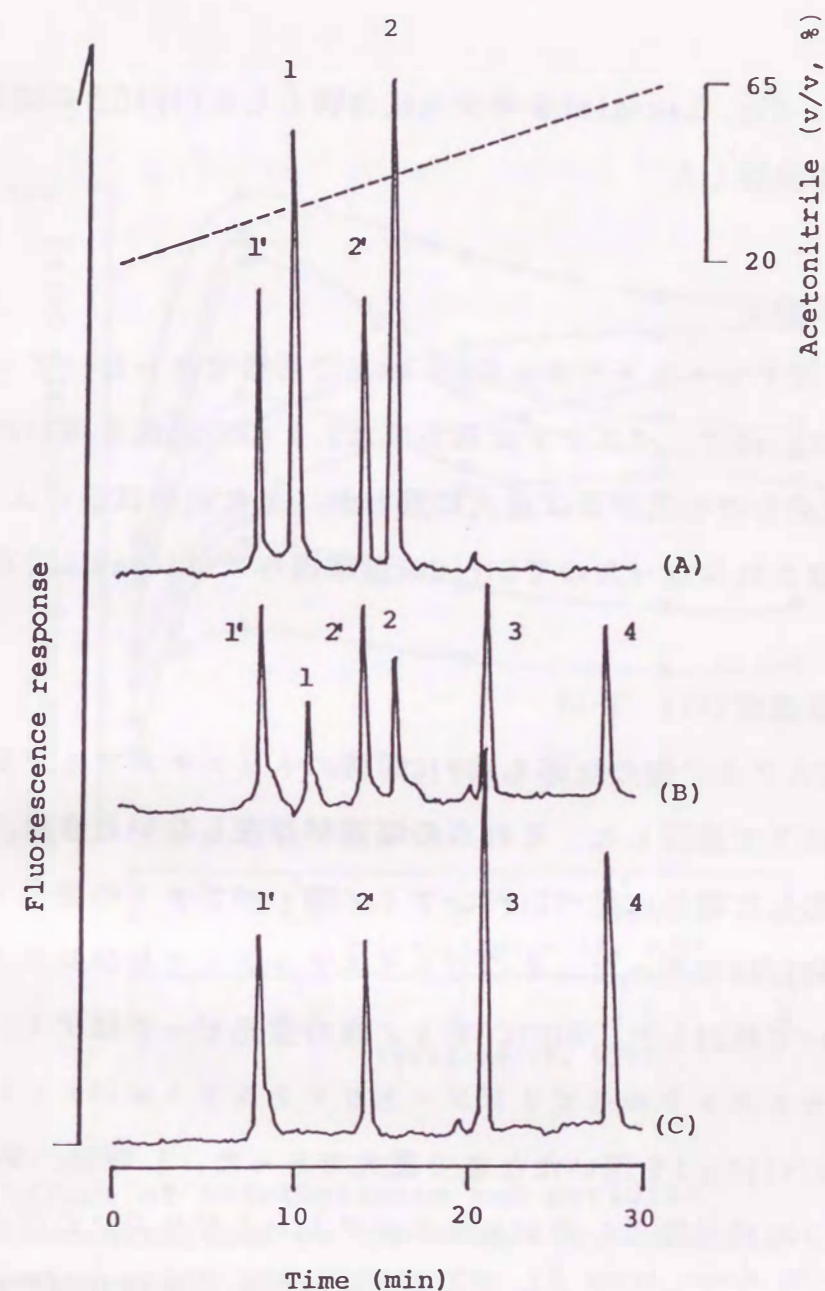


Fig. 3-5

Chromatograms of (A) a coupling reaction mixture and its conversion reaction mixture of Ala-Gly and Leu-Ala (5 nmol each per reaction tube) for reaction times of (B) 2 min and (C) 5 min. Peaks: 1=Ala-Gly; 1'=by-product for Ala-Gly; 2'=Leu-Ala; 2'=by-product for Leu-Ala; 3=N-terminal Ala; 4=N-terminal Leu.

チド (Ala-Gly, Leu-Ala) をモデル化合物として CIPIC との誘導体化反応条件を検討した。

(1) 試薬濃度

CIPIC はアセトニトリルに約 15 mM まで可溶であった。アミノ酸に対しては 5 mM で、ペプチドに対しては 7.5 mM の濃度を用いたとき CIPIC 蛍光体の生成がほぼ最大に達した。また過剰試薬による反応阻害は観察されなかったので CIPIC の基準操作では 10 mM に設定した。

(2) 塩基濃度 (Fig. 3-6)

CIPIC とアミノ酸の反応も POPIC 同様に トリエチルアミン及びピリジン存在下で進行した。それらの塩基が存在しないときは、基準操作で反応した場合に比べ CIPIC-アミノ酸・ペプチドの蛍光ピークの生成は約 1/20 であった。そこで トリエチルアミン及びピリジンの濃度について検討した。CIPIC-アミノ酸の蛍光ピークはアミノ酸の場合、アセトニトリル-ピリジン-トリエチルアミン (90 : 8.75 : 1.25, v/v) 50 μ l を用いたときで最大であった。しかし、ジペプチドの場合、塩基触媒として トリエチルアミンとピリジンの混液を用いたときより、トリエチルアミンのみを用いたときの方がより高いピーク高さを得ることができた。そこでアセトニトリル 50 μ l 中トリエチルアミンの濃度を 0-20 % まで変化させカップリング条件を検討した。その結果、アセトニトリル-トリエチルアミン (90 : 10, v/v) 50 μ l を用いたとき最も高いピーク高さが得られた。

(3) 反応温度と反応時間

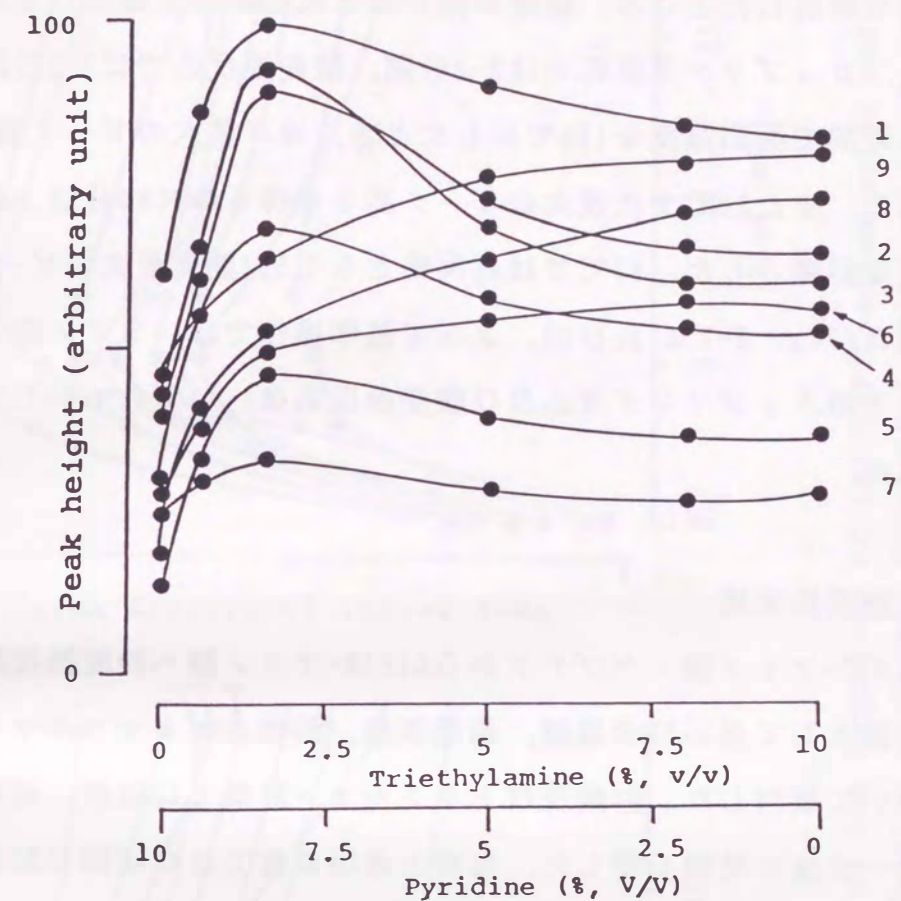


Fig. 3-6
Effect of triethylamine and pyridine concentrations on the coupling reaction of the amino acids and dipeptides (5 nmol each per reaction tube).
Curves: 1=Gly; 2=Ala; 3=Arg; 4=Val; 5=Leu; 6=Glu; 7=Trp; 8=Ala-Gly; 9=Leu-Ala.

カップリング反応及び酸変換反応において50-100℃の範囲で反応時間を検討したところ、温度が高いほど反応が早く進むことが分かった。カップリング反応では2-4分間、酸変換反応では2-3分間の各反応時間で反応温度を100℃にしたとき、ほぼ最大のピーク高さが得られた。また50℃では最大のピーク高さを得るのに60分以上の反応時間を必要とした。80℃では両反応とも5分間で最大のピーク高さを得た(Fig. 3-7 A 及びB)。よって基準操作では、アミノ酸とジペプチドのカップリング反応及び酸変換反応は、いずれも80℃5分に設定した。

(4) 酸変換反応

CIPTC-アミノ酸・ペプチドからCIPTH-アミノ酸への変換反応に用いる酸として各2.5Mの塩酸、過塩素酸、酢酸及びトリフルオロ酢酸について検討した。酢酸及びトリフルオロ酢酸では塩酸、過塩素酸に比べ変換に時間を要した。塩酸と過塩素酸ではほぼ同じ結果を得たが、ベースラインの乱れがより少ない塩酸の2.5Mを反応に用いた。

(5) カップリング反応における副反応物

カップリング反応液中の水の量が副反応物の収率に影響していることが分かった(Fig. 3-8)。アミノ酸のカップリング反応溶液200 μ l中の水の量を2.5-50%(v/v)まで増やすと、CIPTC-アミノ酸の生成が減少していく(約2/3倍)のに反し、副反応物は増加した(約4-20倍)。一方、ペプチドでは上述の範囲でCIPTC-ペプチドの生成は同様に減少したが(約2/3-1/2倍)、副反応物も減少した(約2/3-1/2倍)(Fig. 3-9)。また塩基触媒としてピリジンのみを用いると、副反応

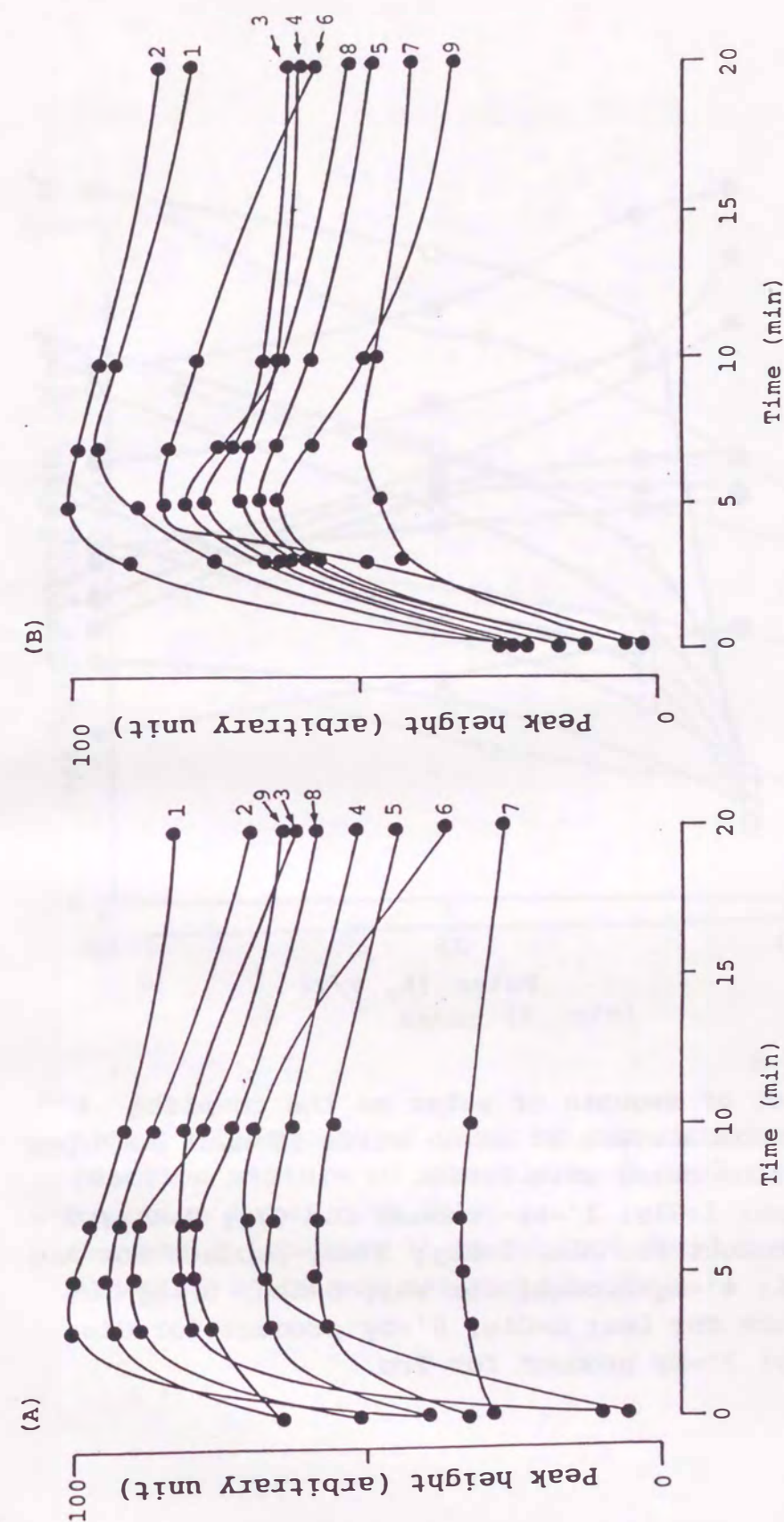


Fig. 3-7

Effect of reaction times on the formation of (A) CIPTC-amino acids and dipeptides, and (B) CIPTH-amino acids and N-terminal amino acids of the dipeptides (5 nmol each per reaction tube) at 80 °C. Curves: 1=Gly; 2=Ala; 3=Arg; 4=Val; 5=Leu; 6=Glu; 7=Trp; 8=Ala-Gly; 9=Leu-Ala.

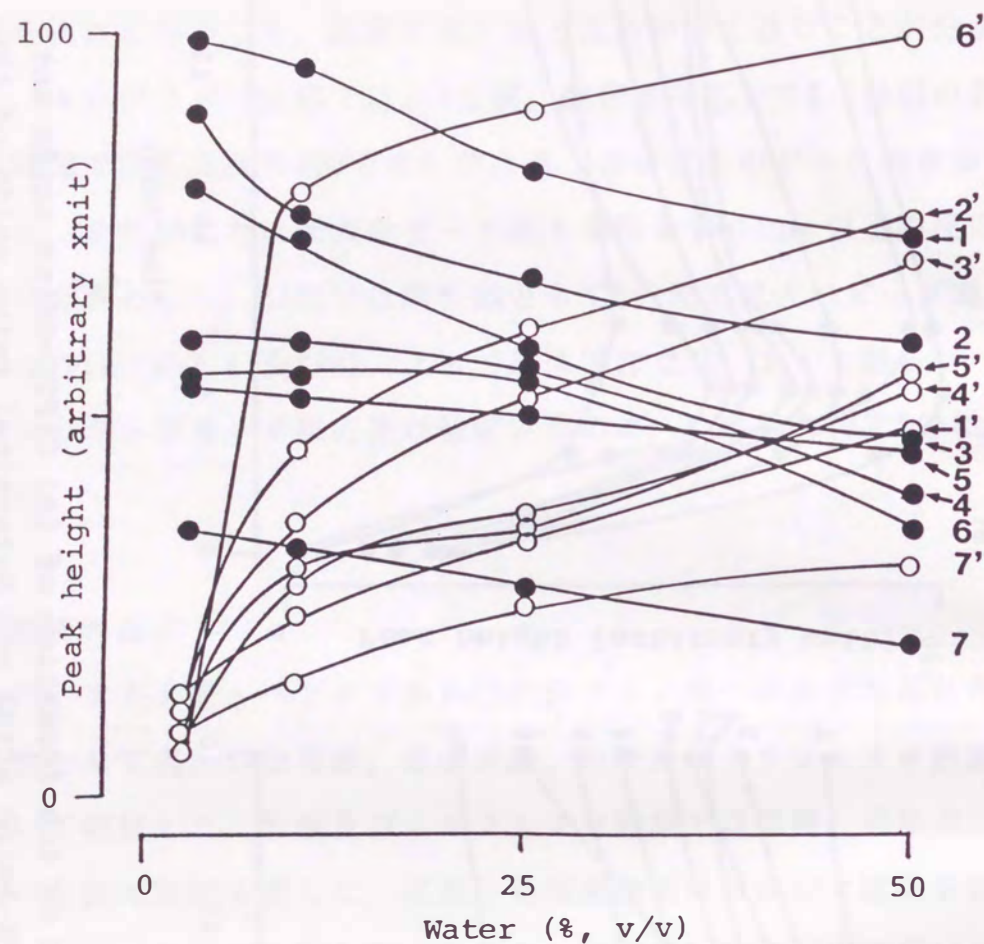


Fig. 3-8

Effect of amounts of water on the coupling reaction mixture of amino acids (5 nmol each per reaction tube) with CIPIC.

Curves: 1=Gly; 1'=by-product for Gly; 2=Ala; 2'=by-product for Ala; 3=Arg; 3'=by-product for Arg; 4=Val; 4'=by-product for Val; 5=Leu; 5'=by-product for Leu; 6=Glu; 6'=by-product for Glu; 7=Trp; 7'=by product for Trp.

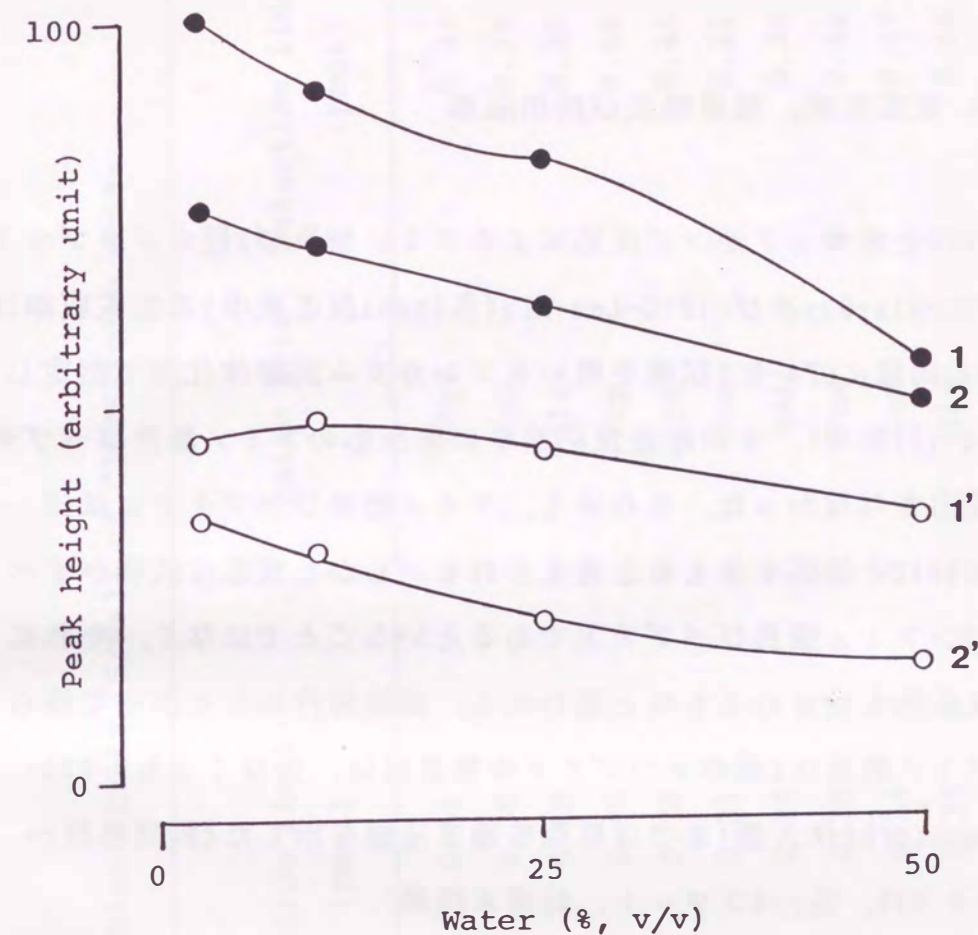


Fig. 3-9

Effect of amounts of water on the coupling reaction mixture of dipeptides (5 nmol each per reaction tube) with CIPIC.

Curves: 1=Leu-Ala; 1'=by-product for Leu-Ala; 2=Ala-Gly; 2'=by-product for Ala-Gly.

物は減少した(第4章)。その副反応物の構造については未確認である。

3-6 反応収率, 検量線及び検出限界

CIPICとのカップリング反応によるアミノ酸及び2種のジペプチドのCIPTC-Ala-Gly及びCIPTC-Leu-Ala(各5nmol反応液中)の生成収率はPOPICと同様にOPA-MCE試液を用いるプレカラム誘導体化法で測定した(1-5-(1)参照)。その結果反応液中に未反応のアミノ酸及びペプチドは検出されなかった。それゆえ, アミノ酸及びペプチドはほぼ100 %CIPICと反応するものと考えられる。しかし反応生成物がすべてCIPTC-アミノ酸及びペプチドであるということではなく, それには副反応物も含まれるものと思われる。基準操作にしたがって得られるアミノ酸及び2種のジペプチドの検量線は, 少なくとも0.025-2.5 nmol(HPLC注入量)までは原点を通る直線を示した(相関係数 $r=0.994-0.999$, 各 $n=2$ プロット, 結果未掲載)。

アミノ酸の検出限界($S/N=3$)は, 0.3 - 0.7 pmol/HPLC注入量であった(Table. 3-2)。

3-7 小括

新規に合成したCIPICはエドマン試薬であるPITCと同様な反応条件下で, アミノ酸と反応し, それらの蛍光誘導体化に適していた。HPLCでの蛍光検出感度は, UV検出HPLCでのPITC試薬を用いたときより, 少なくとも2桁高く, m-POPICより高くp-POPICとは同等であった。

Table 3-2 Detection limits ($S/N=3$) of CIPTH-amino acids

Amino acid	Detection limit (pmol)	Amino acid	Detection limit (pmol)
Asp	0.51	Gly	0.31
Asn	0.39	Hyp	0.36
Glu	0.48	Ala	0.30
Gln	0.49	Trp	0.66
Lys	0.70	Tyr	0.46
Met	0.31	Pro	0.31
Ser	0.34	Val	0.34
Thr	0.38	Phe	0.46
His	0.34	Leu	0.57
Arg	0.36	Ile	0.66

またCIPICのアミノ酸及びペプチドとの反応性は極めて高く、CIPICを用いたこの反応条件によって、ジペプチドのN末端アミノ酸の決定が可能であった。よって蛍光エドマン分解への応用が期待できる。

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

エドマン分解を行うにあたって、試薬がペプチドあるいはタンパク質と完全にカップリングすることがまず重要な条件となる。しかし、これまで報告されている大部分のエドマン類似試薬はペプチドとのカップリング反応における収率が十分ではない。また含水条件下では、通常エドマン分解時にペプチドの解裂を引き起こすので、無水有機溶媒中でチアゾリノン誘導体を形成させエドマン分解させている。この場合煩雑な脱水操作を必要とする。

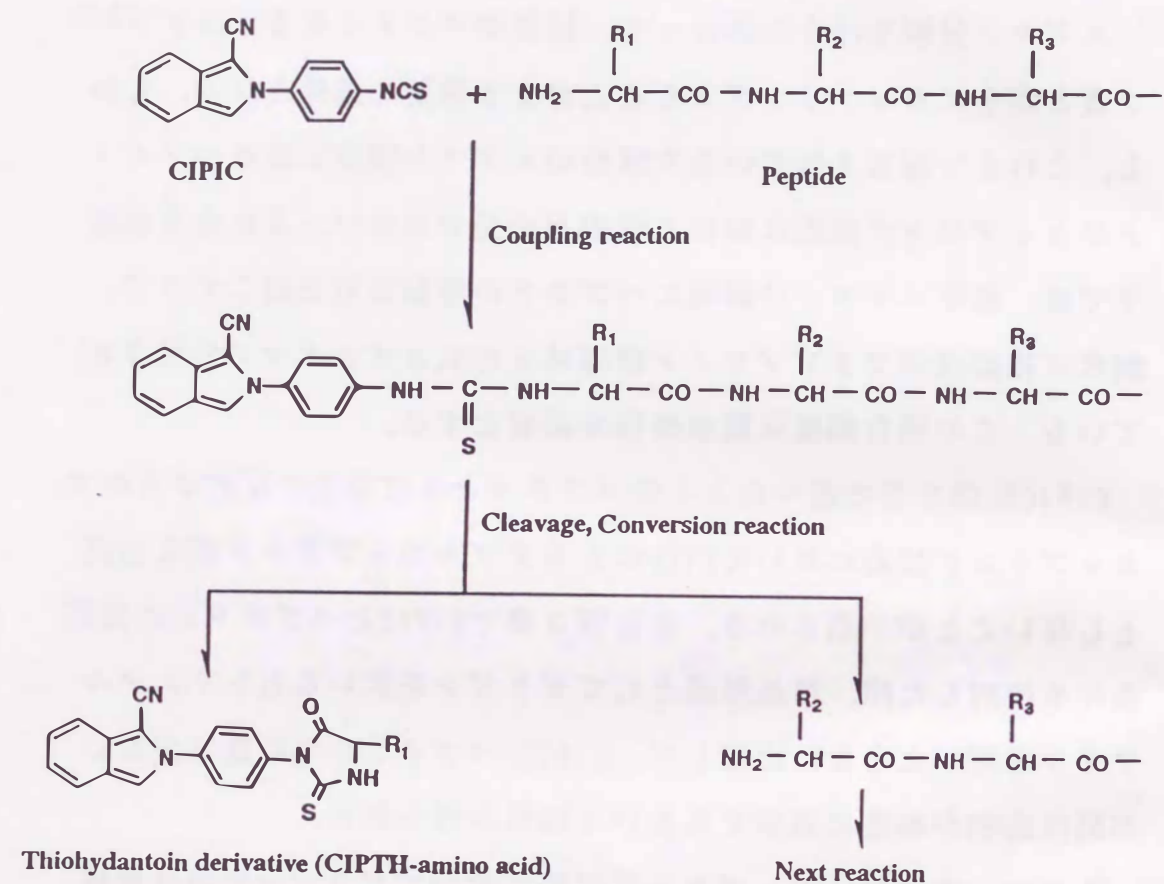
CIPICは第3章で述べたようにペプチドとほぼ完全に反応するので、カップリング反応においてPITCによるダブルカップリング法を必要としないことが予期される。また第3章でCIPICとペプチドとの反応条件を検討した際、塩基触媒としてピリジンを用いるとトリエチルアミンを用いたときに比較して、CIPIC-ペプチドの生成量は少ないが副反応物が極端に減少するという知見が得られた。

そこで本章では、カップリング反応においてピリジンを塩基触媒として用いた反応条件について検討し、またエドマン分解における操作を従来の方法より簡便にする目的で、含水条件下にN末端アミノ酸を切断すると同時にCIPIC-アミノ酸に変換するという新しいエドマン分解操作について検討した(Chart 4-1)。

4-1 基準操作

(1) エドマン分解操作(Fig. 4-1)

Chart 4-1 Edman degradation of peptide with CIPIC



ペプチド(アセトニトリル-水, 1:4, v/vの溶液)50 μ l, アセトニトリル-ピリジン混液(3:2, v/v)50 μ l, 10mM CIPIC 溶液 100 μ lをバイアル管にとり, 80 $^{\circ}$ Cで 10分間加熱する. 氷冷して反応を止める. 反応溶液に水200 μ lを加え, さらに四塩化炭素200 μ lを加え激しく振り混ぜ遠心分離し, 水層20 μ lをHPLCに付した. 水層300 μ lを凍結乾燥する. これに250 μ lの水及び5M塩酸50 μ lを加え, 80 $^{\circ}$ Cで5分間加熱する. 氷冷して反応を止め, 反応液20 μ lをHPLCに付した. 残りの反応液に酢酸エチル200 μ lを加え攪拌し遠心分離する. 分取した水層を凍結乾燥し, 残渣を水-アセトニトリル混液(4:1, v/v)に溶かし, 次の反応に用いた.

(2) H P L C

3-1-(2)と同じ条件で行った.

4-2 カップリング反応条件

モデル化合物としてAla-Leu-Gly, Ala-Gly及びLeu-Alaの3種のペプチドを用いてカップリング条件を検討した.

(1) 反応液中の水の量

カップリング反応液(200 μ l)中の水の量について検討した(Fig. 4-2). 反応液中10%の水を用いたときが最もCIPTC-ペプチドの生成量が多かった. 一方副反応物は反応液中の水の量を増加させるに従って減少する傾向がみられ, 20%以上では副反応物がほぼ一定の生成量になった. そこで副反応物の生成量が比較的少ない結果を与える水

Fig. 4-1

Edman degradation cycle of peptide with CIPIC using pyridine in the coupling reaction

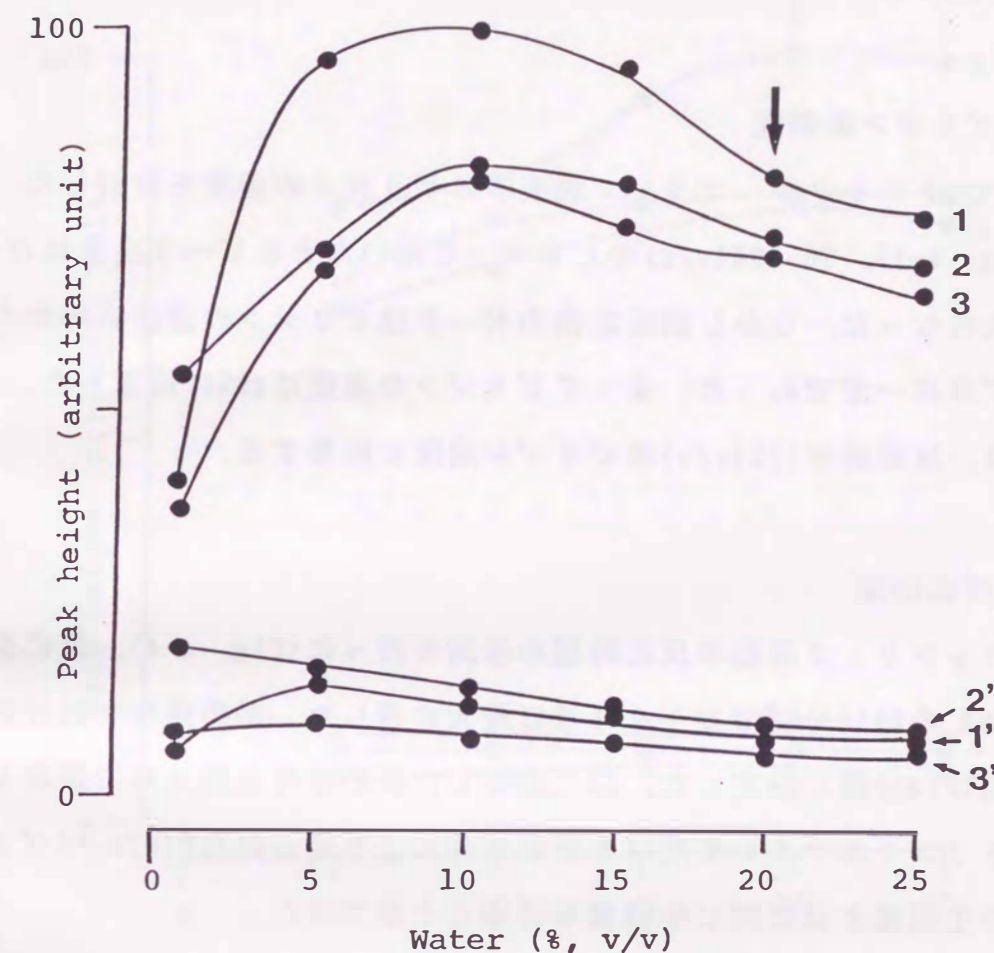
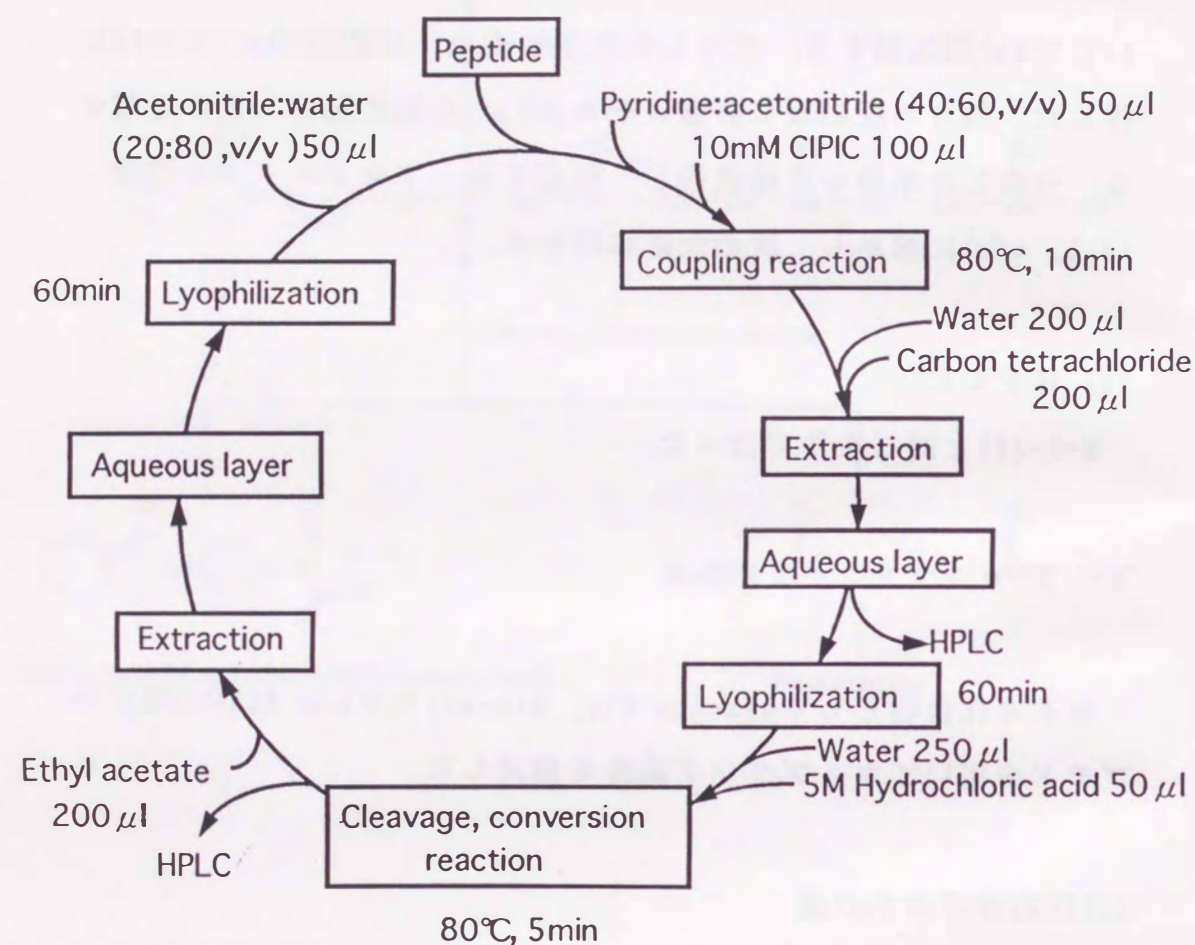


Fig. 4-2

Effect of amounts of water on the coupling reaction mixture of peptides (5 nmol each per reaction tube) with CIPIC.

Curves: 1=Ala-Gly; 1'=by-product for Ala-Gly; 2=Leu-Ala; 2'=by-product for Leu-Ala; 3=Ala-Leu-Gly; 3'=by-product for Ala-Leu-Gly.

20%を用いて諸条件を検討した。この水の量はペプチド試料溶液で調整した。

(2) ピリジンの濃度

アセトニトリル-ピリジン混液中のピリジンの濃度を検討した (Fig. 4-3)。30-40%(v/v)のピリジンを用いたときピーク高さはほぼ最大になった。しかし副反応物のピークはピリジンの濃度にかかわらずほぼ一定であった。よってピリジンの濃度は40%に設定した。これは、反応液中10%(v/v)のピリジン濃度に相当する。

(3) 反応時間

カップリング反応の反応時間の検討を行った (Fig. 4-4)。反応温度80℃の時10分間でピークはほぼ最大に達した。基準操作では反応時間は10分間に設定した。以上設定した反応条件は第3章で設定したトリエチルアミンを用いる反応条件により得られたCIPTC-ペプチドの生成量とほぼ同じ生成量を得ることができた。

4-3 反応収率と検量線

ピリジン存在下におけるCIPICと3種のペプチドのカップリング反応収率を、OPA-MCE試液を用いるプレカラム誘導体化法で測定した (1-5-(1)参照)。5 nmolのペプチドを用いたとき、反応液中に未反応のペプチドは検出されなかった(0.01nmol以下)。したがって、塩基触媒としてピリジンを用いる条件でも、CIPICとペプチドの反応収率は、ほぼ100%であると推測できた。

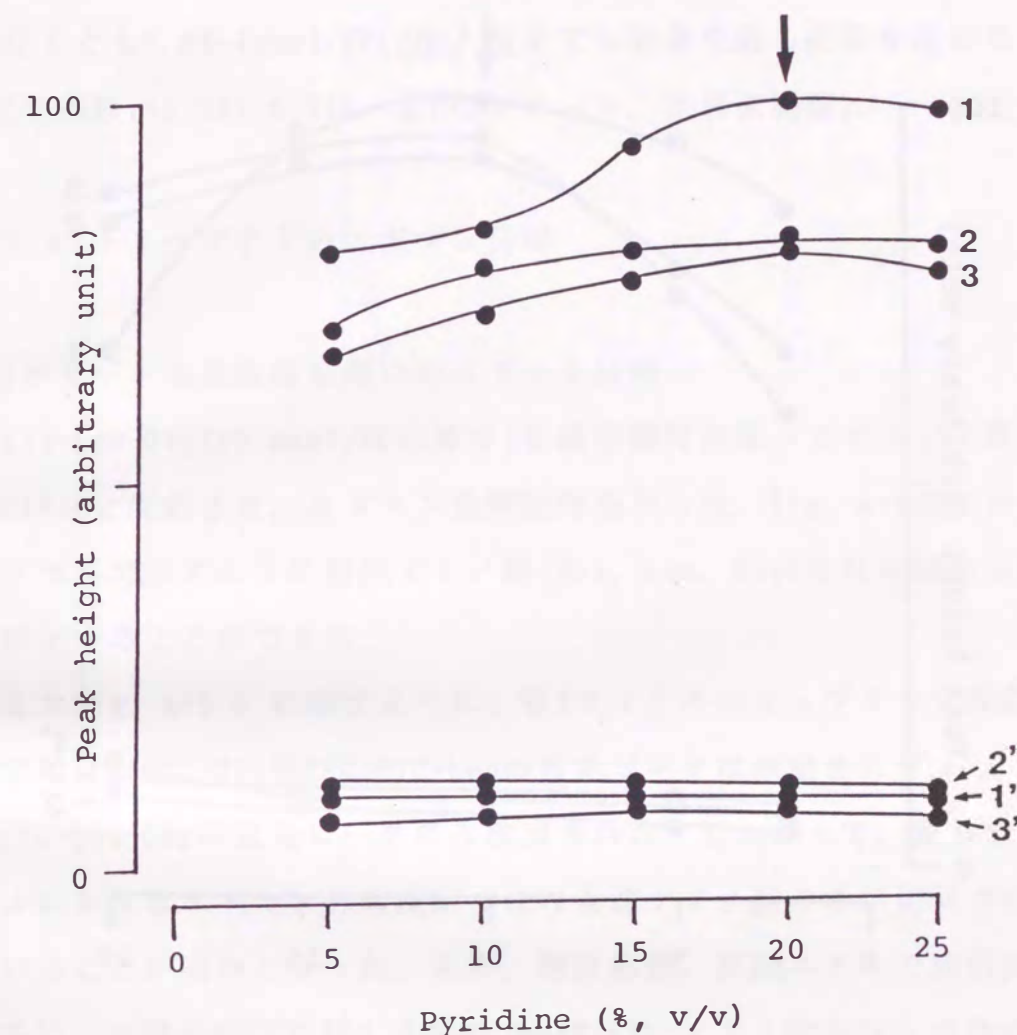


Fig. 4-3

Effect of pyridine concentration on the the coupling reaction mixture of peptides (5 nmol each per reaction tube) with CIPIC.
Curves: 1=Ala-Gly; 1'=by-product for Ala-Gly; 2=Leu-Ala; 2'=by-product for Leu-Ala; 3=Ala-Leu-Gly; 3'=by-product for Ala-Leu-Gly.

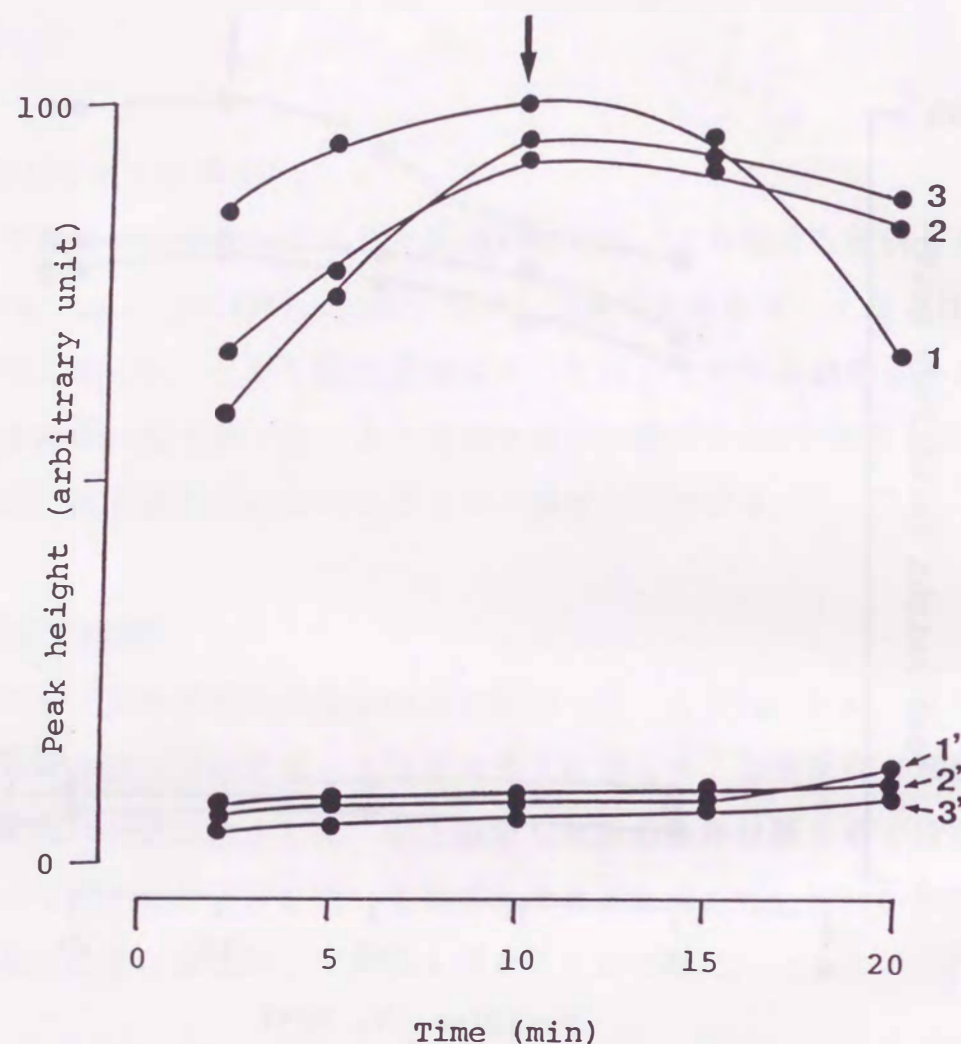


Fig. 4-4
Effect of reaction time for the coupling reaction mixture of peptides (5 nmol each per reaction tube) with CIPIC.
Curves: 1=Ala-Gly; 1'=by-product for Ala-Gly; 2=Leu-Ala; 2'=by-product for Leu-Ala; 3=Ala-Leu-Gly; 3'=by-product for Ala-Leu-Gly.

基準操作にしたがって得られる3種のCIPTC-ペプチドの検量線は、少なくとも0.04-4nmol/HPLC注入量までは原点を通る直線を示した(相関係数 $r=0.997-0.998$, 各 $n=2$ プロット, 結果未掲載)。

4-4 トリペプチドのエドマン分解

(1) ピリジン塩基触媒を用いたエドマン分解

Ala-Leu-Gly(10 nmol/反応液中)を基準操作に従ってピリジン存在下CIPICと反応させ、エドマン分解操作を行った。Fig. 4-5のクロマトグラムで示すように組成アミノ酸(Ala, Leu, Gly)をN末端から逐次検出することができた。

またFig. 4-6 A に示すように、第2サイクルのカップリング反応液中にはCIPTC-Gly及びCIPTC-Leuの蛍光ピークは検出されず、CIPTC-Leu-Glyの蛍光ピークのみ検出された。したがって、第1サイクルにおけるエドマン分解反応ではN末端アミノ酸のみが切断されていることが明かとなった。また、酸反応後、酢酸エチルで抽出操作を行い水層をHPLCに付したところ、CIPTH-アミノ酸及びその他の副反応物の蛍光ピークは検出できなかった。よって酢酸エチルでの抽出操作により蛍光物質は完全に除去されたものと考えられる。

このアミノ酸配列決定操作では、酸変換反応で用いた塩酸とピリジンの塩が凍結乾燥後にもバイアル中に残り次のカップリング反応を阻害したので、酸変換反応の前にピリジンを含むカップリング反応液を凍結乾燥する必要がある。塩酸のかわりに5 Mトリフルオロ酢酸を用いた場合も同様の結果を得、カップリング反応を阻害した。

ペプチドと同濃度のアミノ酸を同様に処理し、クロマトグラムの

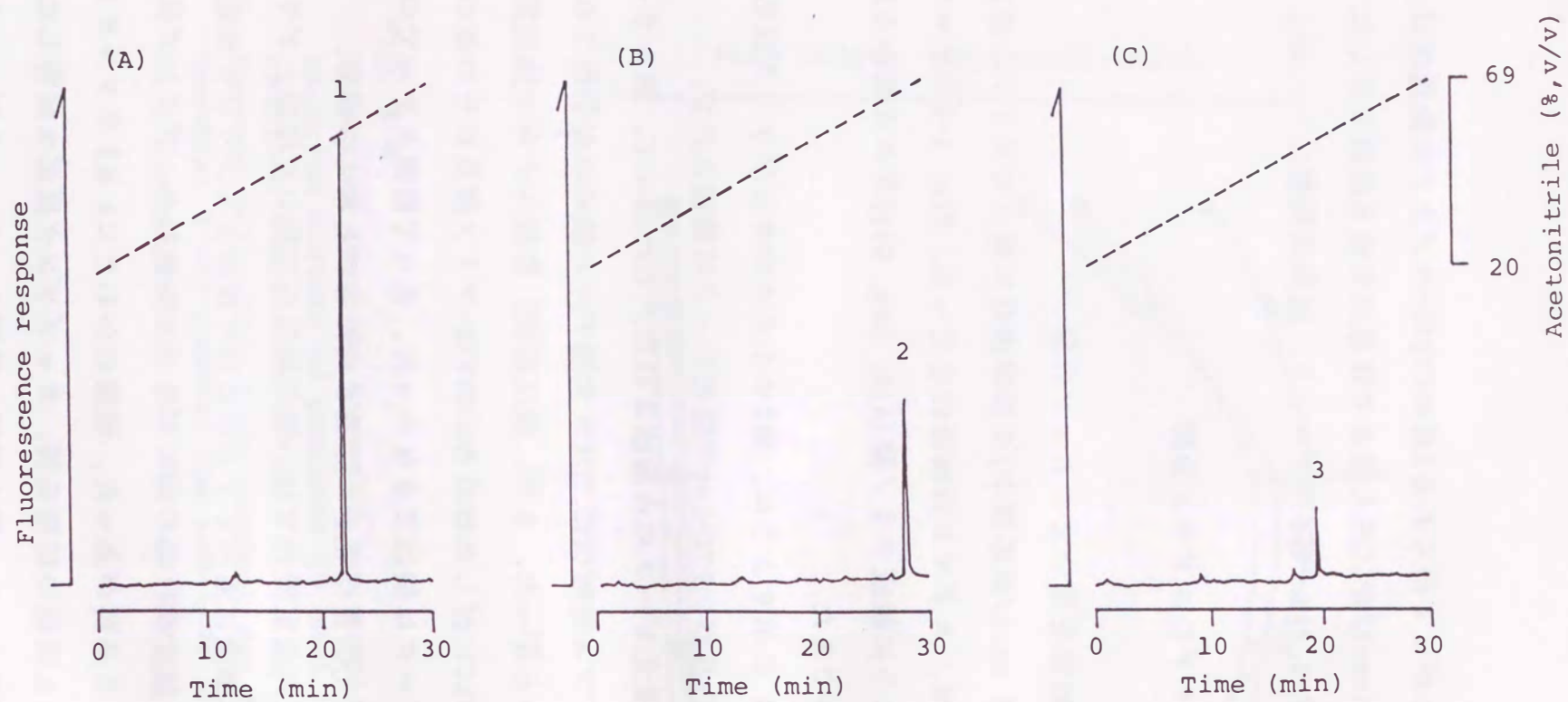


Fig. 4-5

Chromatograms obtained in the Edman degradation of Ala-Leu-Gly using CIPIC

Chromatograms (A), (B) and (C) are of the resulting mixtures after 1st, 2nd and 3rd cleavage reactions, respectively. Peaks: 1=Ala; 2=Leu; 3=Gly.

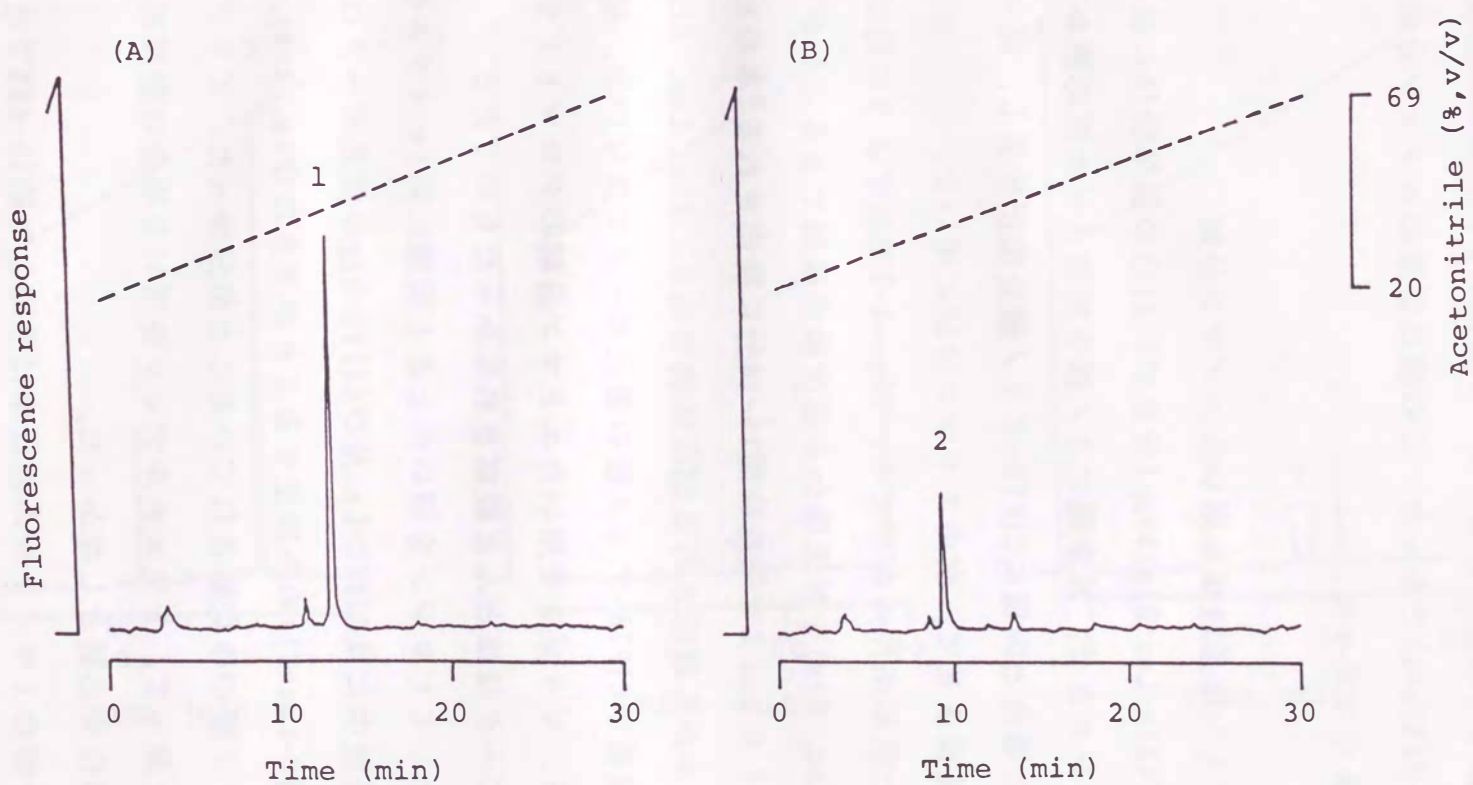


Fig. 4-6

Chromatograms obtained in the Edman degradation of Ala-Leu-Gly using CIPIC

Chromatograms (A) and (B) are of the resulting mixtures after 2nd and 3rd coupling reactions, respectively. Peaks: 1=Leu-Gly; 2=Gly.

ピーク高さを比較して求めたこのエドマン分解の1サイクルの回収率は平均して約40-50%(n=5)であった。この値は従来のエドマン分解法に比べやや低いものであった。

(2) トリエチルアミン塩基触媒を用いたエドマン分解

0.2mMペプチド(Ala-Leu-Gly) 50 μ lをまず3-1(1)の基準操作に従いCIPICとカップリングさせ、N末端アミノ酸を解裂させた反応液からピリジンを用いた場合と同様にCIPTH-アミノ酸を抽出除去し、得られる水層を凍結乾燥させて、次のエドマン分解に用いた。

第3章で求めた反応条件においても、Fig. 4-7で示すように組成アミノ酸(Ala, Leu, Gly)をN末端から逐次検出確認できることが分かった。Fig. 4-7 B and Cで保持時間16-18分に検出される2本のピークは第2サイクルから確認される副反応物であり、Ala, Leu, GlyのCIPTC-アミノ酸及びCIPTH-アミノ酸の蛍光ピークではないが、構造は未確認である。ピリジンを用いたエドマン分解のクロマトグラムではこれらのピークはほとんど観察されなかったものである。

また塩基触媒としてピリジンを用いたときと同様に第2サイクルのカップリング反応液中にはCIPTC-Leu及びCIPTC-Glyの蛍光ピークは検出されず、CIPTC-Leu-Glyのみ検出することができた(Fig. 4-8)。よってN末端アミノ酸のみ切断されていることが分かった。ピリジンを用いた場合と違って、トリエチルアミンを用いる場合は酸反応の前に凍結乾燥操作を必要としなかった。

このエドマン分解の1サイクルの回収率は平均して約50-60%であった。

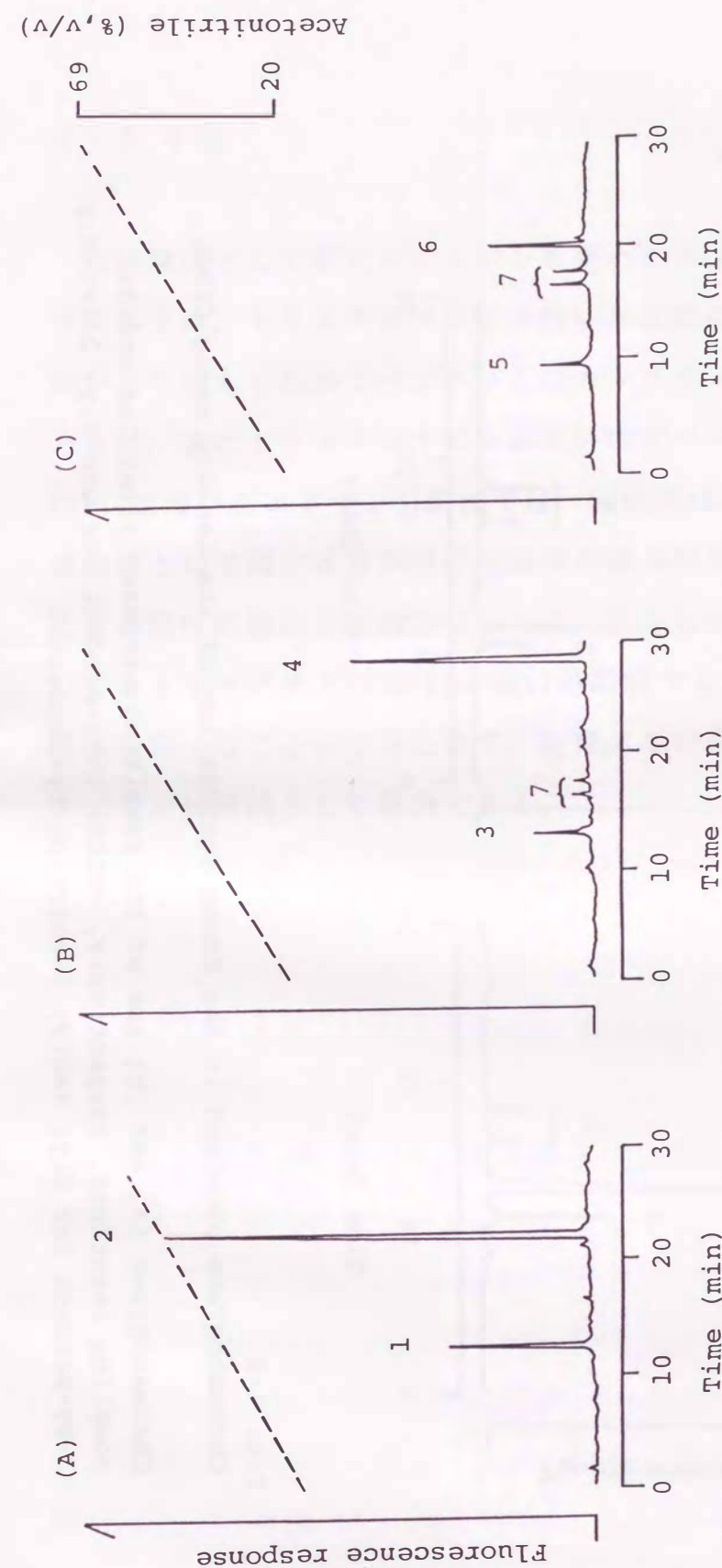


Fig. 4-7

Chromatograms obtained in the Edman degradation of Ala-Leu-Gly using CIPIC

Chromatograms (A), (B) and (C) are of the resulting mixtures after 1st, 2nd and 3rd cleavage reactions, respectively. Peaks: 1=by-product for Ala-Leu-Gly; 2=Ala; 3=by-product for Leu-Gly; 4=Leu; 5=by-product for Gly; 6=Gly; 7=reaction by-products.

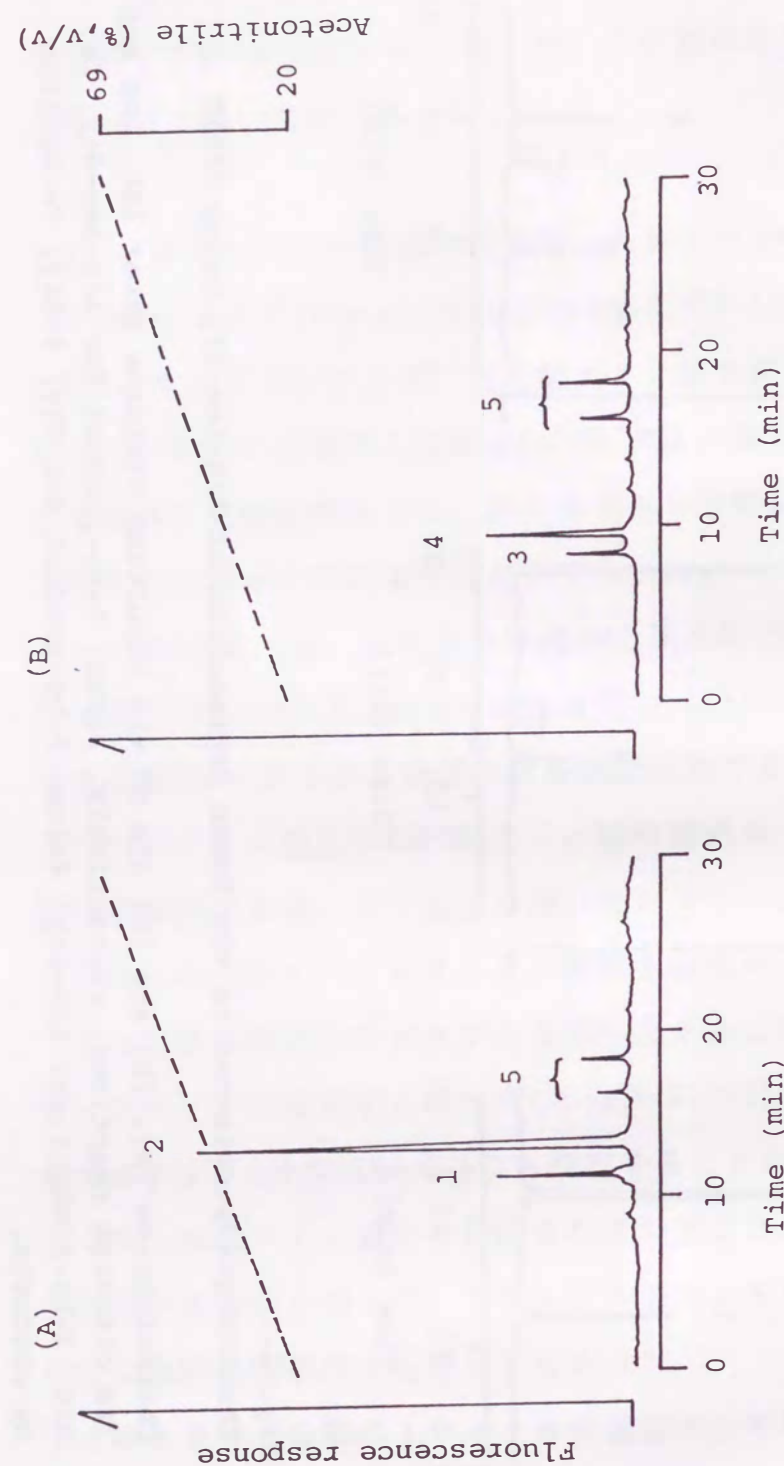


Fig. 4-8
Chromatograms obtained in the Edman degradation of Ala-Leu-Gly using CIPIC
Chromatograms (A) and (B) are of the resulting mixtures after 2nd and 3rd
coupling reactions, respectively. Peaks: 1=by-product for Leu-Gly; 2=Leu-Gly;
3=by-product for Gly; 4=Gly; 5=reaction by-products.

4-5 小括

塩基触媒として新たにピリジンを用いたペプチドとのカップリング反応では、トリエチルアミンを用いた反応に比べ副反応物の生成がかなり抑えられかつペプチドとのカップリング反応もほぼ完全であった。またトリエチルアミンあるいはピリジン存在下におけるCIPICを用いたエドマン分解法では、回収率はトリエチルアミンを塩基触媒として用いる方が良好な結果が得られたが、ピリジンを用いる方が副反応物の生成が少なかった。しかしいずれの塩基触媒においてもトリペプチド(Ala-Leu-Gly)の組成アミノ酸をN末端から順に検出確認することができたので、従来にない含水条件下での簡便なエドマン分解法として期待できる。

総括

本研究では、アミノ酸及びペプチドの蛍光誘導体化試薬として分子内にイソチオシアネート基を有するm- or p-POPIC及びCIPICの3種を合成し、アミノ酸及びペプチドとの反応条件の検討、HPLCへの応用、さらにペプチドのエドマン分解への適応性について研究した。

m-POPIC及びその誘導体であるm-POPTC-アミノ酸、m-POPTH-アミノ酸のそれぞれの蛍光スペクトル及び蛍光強度は溶液の液性(酸性・塩基性)による変化はなかった。次にHPLCを用いてこれらの誘導体化アミノ酸の分離を検討した。m-POPTC-アミノ酸の中には蛍光ピークが複数検出されるものがあったが、m-POPTH-アミノ酸に導くとそれぞれ単一の蛍光ピークとして検出できた。そこでm-POPTH-アミノ酸のHPLC分離条件を検討した。しかし21種全てのアミノ酸を完全に分離するには至らなかった。そこでアミノ酸を分離可能ないくつかのグループに分けて誘導体化条件を検討した。設定した最適基準操作に従い誘導体化したアミノ酸の検出限界は、0.6-3.8 pmol(HPLC注入量, S/N=3)で、アミノ酸との反応収率は95-100%と他のエドマン類似試薬に比べ高いものであった。また、設定した反応条件に基づきトリペプチド(Gly-Leu-Ala)のエドマン分解を試行したが、組成アミノ酸をN末端から逐次検出することはできなかった。(第1章)。

p-POPICについてもm-POPICと同様にHPLC用蛍光誘導体化試薬として、蛍光特性、誘導体化条件及び分離条件について検討した。諸条件においてm-POPICと同様の結果が得られたが、p-POPICはm-POPICに比べp-POPTH-アミノ酸への酸変換反応に長時間を要するなどの問題点があった。しかしm-POPICに比べ検出感度が1.5-3倍高く(0.2-2.4

pmol/HPLC注入量, S/N=3), アミノ酸との反応収率も95-100%とm-POPICと同等であった(第2章)。

CIPICによるアミノ酸及びジペプチドの蛍光誘導体化条件をHPLCを用いて検討した。カップリング反応ではすべてのアミノ酸またはペプチドにおいて副反応物が認められ、HPLCによる分離を困難なものにした。しかし、それらをCIPTH-アミノ酸へ導くと、副反応物の蛍光ピークと分離することができた。最適反応条件により測定したCIPTH-アミノ酸の検出感度(S/N=3)は、0.3-0.7 pmol/HPLC注入量であり、これは他の蛍光エドマン類似試薬と同様であった。またアミノ酸及びペプチドに対するCIPICのカップリング反応の収率はほぼ100%であった。よってエドマン分解に期待ができた(第3章)。

塩基触媒としてピリジンを用いると副反応物の生成が少ないという結果を得た。ピリジン存在下におけるペプチドとのカップリング反応条件を検討し、最適条件を設定した。また第3章でのトリエチルアミンを用いた反応条件及び新たに設定したピリジンを用いた反応条件を基に、従来にない含水溶液中での簡便なエドマン分解を試みた。その結果、モデルペプチドとして用いたトリペプチド(Ala-Leu-Gly)の組成アミノ酸をN末端から逐次決定することができた(第4章)。

以上検討したPOPIC及びCIPIC蛍光試薬は、他の蛍光エドマン類似試薬とほぼ同じ検出感度を有し、反応収率は他の試薬より高反応収率を示すものとなった。特にCIPICを用いた含水溶液中でのエドマン分解法は、従来になく簡便であり、今後の他のペプチドのアミノ酸配列決定法への応用が期待できる。

謝辞

本研究に際し、終始変わらざる御懇切な御指導と御鞭撻を賜りました九州大学薬学部薬品分析化学教室大倉洋甫教授に謹んで感謝致します。また御助言を頂きました同教室財津 潔助教授に感謝致します。本研究を遂行するにあたり、直接御指導、御協力を頂きました九州大学薬学部薬品分析化学教室甲斐雅亮博士に謹んで感謝致します。また御助言を頂きました同教室能田 均博士に感謝致します。さらに実験に御協力頂きました穂山桃子女史、また貴重な試薬を提供して頂いた折本祐治、田上健一氏に感謝します。最後に数々の討論に参加頂き、また暖かい言葉をかけて頂いた同教室の皆様に謹んで感謝致します。

実験の部

各章に共通な事項

(1) 水(蒸留水)

脱イオン水を蒸留したものを使用。

(2) ガラス器具

中性洗剤で洗浄後、市販硝酸を水で2倍希釈した液に一昼夜以上浸し、水及び蒸留水で洗浄し乾燥後使用。

(3) 試薬及び緩衝液

特記しない限り市販の特級品あるいは得られる最上級品を使用。

アミノ酸標準液：10 mM水溶液を調製。0-4℃暗所保存下、少なくとも1カ月間使用可能。使用時に適時水あるいはアセトニトリルで希釈する。

ペプチド標準液：各ペプチド10 mMの水-メチルセロソルブ(1 : 1, v/v)溶液を調製。-20℃暗所保存下、少なくとも2週間使用可能。使用時に適宜水あるいはアセトニトリルで希釈する。

OPA-MCE試液：OPA50mgをメタノール1.25mlに溶かし、MCE50 μ l及び0.4M ホウ酸塩緩衝液(pH 9.5)11.2mlに加えて調製する。

0.1 M トリエチルアミン-0.1 M 酢酸混液：トリエチルアミン6.95 mlを水に溶かし全量を500 mlに調製。これに酢酸2.88 mlを水に溶かし全量を500 mlに調製したものを適量加えて、所要pHに調整。

0.1 M リン酸塩緩衝液(pH 8.5)：リン酸二ナトリウム(無水)

3.55 gを水に溶かし全量を500 mlに調製。これにリン酸二水素ナトリウム水和物1.38 gを水に溶かし200 mlに調製したものを適量加えてpH 8.5に調整。

0.1 M テトラブチルアンモニウム塩-0.1 M ギ酸混液：市販の0.5 M水酸化テトラブチルアンモニウム溶液50 mlを水で希釈して250 mlに調製。これにギ酸1.90 mlを水で希釈して500 mlに調製したものを適量加えて所要pHに調整。

0.1 M アンモニア-0.1 M ギ酸混液：市販の28%アンモニア水3 mlを水で希釈して500 mlに調製。これにギ酸1.9 mlを水で希釈して500 mlにしたものを適量加えて所要pHに調整。

0.4 M ホウ酸塩緩衝液(pH 9.5)：四ホウ酸ナトリウム3.81 gを水に溶かし全量を100mlに調製。これにホウ酸2.47 gを水に溶かし全量を100mlに調製したものを適量加えてpH 9.5に調整。

0.1 M 酢酸塩緩衝液(pH 7.2)：酢酸ナトリウム6.80 gを水に溶かし全量を500mlに調製。これに酢酸2.88mlを水に溶かし全量を500mlに調製したものを適量加えてpH 7.2に調整。

(4) 機器

分光蛍光光度計：日立 MPF-4型(第1,2章)及びF-2000 型(第3章)分光光度計を使用。スリット幅は励起側，発光側ともに10nmに設定。測定には角型石英セル(1 x 1 cm)を使用。

高速液体クロマトグラフ：移動相溶媒プログラムを内蔵した日立 655 型及び655-A12型クロマトグラフを使用。

蛍光検出器：東ソー FS-8010 及び日立 F-1000型蛍光検出器を使用。

記録計：東京理化電機卓上R-22及びR-02レコーダーを使用。

pHメーター：堀場試験管用複合電極6028-10Tを接続した日立堀場 M-7型pHメーターを使用。

整温器：Pierce Reacti-Thermを使用。

凍結乾燥機：東京理化電機 COOL EC-50を使用。

¹H-NMRスペクトル：JEOL JNM-PS-110型 270NMz核磁気共鳴装置を使用。内標準物質にテトラメチルシランを用いて測定。

IRスペクトル：日本分光 DS-710G型赤外分光光度計を使用し，KBr錠剤法で測定。

Massスペクトル：JEOL JNM-3500データシステムを装備したJEOL JMS-DX300型質量分析計を使用。

融点：Yanaco融点測定装置で測定，未補正值を記載した。

第1，2章に関する実験

(1) m- 及び p-POPICの合成(Chart 2)

2-(3 or 4-ニトロフェニル)フェナンスラオキサゾール(compound I) は3- or 4-ニトロベンズアルデヒドとフェナンスラキノンからクライゼンオキサゾール法により合成した^{5,6)}。compound I 0.4g をジオキサン100mlに溶かし，エタノール4mlを加えた。これに塩化コバルト(6水塩)0.4g及び水素化ホウ素ナトリウム0.5gを加え，1時間還流しニトロ基の還元を行った。反応液を濃縮し，残渣を水3mlに懸濁した。懸濁液中の不溶物質を濾取し，エタノール-水(1 :1, v/v)で再結晶し，それぞれのアミノフェニルフェナンスラオキサゾール(compound II)を無色の針状結晶として得た(収量，約 0.2g)。

つぎにcompound II 0.2gをテトラヒドロフランとベンゼンの混液(1 : 1, v/v)80mlに溶かし, トリエチルアミン0.13g及びチオホスゲン0.08gを加えて1時間還流した。濃縮した反応液をシリカゲル(40g)クロマトグラフィーに付し, 溶離液として酢酸エチルとベンゼン(1 : 1, v/v)を用いて精製を行い, POPICを無色の針状結晶として得た。POPICの構造は元素分析及び質量, IR及び¹H-NMRの各スペクトルにより確認した。

m-POPIC: 収量, 0.14g; 融点 (未補正), 214°C; 質量スペクトル (m/z), 352 (M⁺); 元素分析: C₂₂H₁₂N₂OSに対する計算値: C 74.98, H 3.43, N 7.95%; 実験値: C 74.95, H 3.44, N 7.95 %; IR スペクトル (ν_{max}, cm⁻¹), 2190 及び 1057 (N=C=S), 1475 (C-O-C); ¹H NMR スペクトル (δ, ppm), 7.31-7.51 (2H, 多重線, フェニルプロトン), 7.66-7.70 (2H, 多重線, フェナンスレンプロトン), 7.70-7.75 (2H, 多重線, フェナンスレンプロトン), 8.15 (1H, 三重線, フェニルプロトン), 8.18-8.23 (1H, 二重線, フェニルプロトン), 8.27-8.31 (1H, 多重線, フェナンスレンプロトン), 8.54-8.59 (1H, 二重線, フェナンスレンプロトン), 8.67-8.74 (2H, 多重線, フェナンスレンプロトン)。

p-POPIC: 収量, 0.12g; 融点 (未補正), 244°C; 質量スペクトル (m/z), 352 (M⁺); 元素分析: C₂₂H₁₂N₂OSに対する計算値: C 74.98, H 3.43, N 7.95%; 実験値: C 74.78, H 3.47, N 7.95%; IR スペクトル (ν_{max}, cm⁻¹), 2180 及び 1055 (N=C=S), 1485 (C-O-C); ¹H NMR スペクトル (δ, ppm), 7.29-7.32 (2H, 多重線, フェニルプロトン), 7.64-7.77 (4H, 多重線, フェナンスレンプロトン), 8.25-8.28 (3H, 二重線, 2H フェニルプロトン及び 1H フェナンス

レンプロトン), 8.54-8.57 (1H, 二重線, フェナンスレンプロトン), 8.68-8.73 (2H, 多重線, フェナンスレンプロトン)。

(2) POPIC溶液

POPICをアセトニトリル-ジオキサン(1 : 1, v/v)に溶かし, 1.5 mMに調製。4°C暗所保存下で少なくとも2カ月使用可能。

第3章に関する実験

(1) CIPICの合成 (Chart 3)

o-フタルアルデヒド536mg, p-アミノアセトアニリド600mg及び水1mlに溶かしたシアン化カリウム260mgをメタノール15mlに溶かし, 室温(20-28°C)で90分間攪拌する。不溶物質(compound III)を濾過し5mlの冷メタノールで洗う。compound IIIをメタノール60mlに懸濁し, この溶液に1M塩酸30mlを加え10時間還流する。反応液を濃縮し無色の粉末を得た(compound IV, 約100mg)。compound IV 0.84mgをベンゼン-テトラヒドロフラン(1 : 1, v/v)40mlに懸濁し, トリエチルアミン65mg及びチオホスゲン40mgの存在下1時間還流した。反応液を濃縮した後, アセトニトリルで再結晶しCIPICの無色の針状晶を得た。CIPICの構造は元素分析, 質量スペクトル, ¹H-NMRスペクトルにより確認した。

CIPIC: 収量, 37mg (3.3 %, OPAを出発物質として); 融点 (未補正), 172°C; 質量スペクトル (m/z), 275 (M⁺); 元素分析: C₁₆H₉N₃Sに対する計算値: C 69.82, H 3.27, N 15.27 %, 実験値: C 69.67, H 3.29, N 15.22 %; ¹H NMR スペクトル (δ, ppm),

7.14-7.75 (9H, 多重線, 芳香族プロトン).

(2) CIPIC 溶液

CIPIC をアセトニトリルに溶かし 10 mM に調製する。4℃ 暗所保存下で少なくとも 2 週間使用可能。

参考文献

- 1) P. B. Hamilton, Anal. Chem., 35 (1963) 2055.
- 2) S. Moore and W. H. Stein, J. Biol. Chem., 192 (1951) 663.
- 3) S. Moore, D. H. Spakman and W. H. Stein, Anal. Chem., 30 (1985) 1185.
- 4) D. H. Sparkman and W. H. Stein, Anal. Chem., 30 (1985) 1190.
- 5) 雁野重威, 若林清史, 八木芳子, 崎山文夫, “タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー(II)”, 化学増刊117, 池中徳治, 崎山文夫, 化学同人, 1990, pp. 3-12.
- 6) S. Udenfriend, S. Stein, P. Bohlen, W. Dairman, W. Leimgruber and M. Weigele, Science, 178 (1972) 871.
- 7) N. Seiler, J. Chromatogr., 143 (1977) 221.
- 8) P. Lindroth and K. Mopper, Anal. Chem., 51 (1979) 1667.
- 9) B. R. Larsen and F. G. West, J. Chromatogr. Sci., 19 (1981) 259.
- 10) J. D. H. Cooper and D. C. Turnell, J. Chromatogr., 227 (1982) 158.
- 11) B. N. Jones and J. P. Gilligan, J. Chromatogr., 266 (1983) 471.
- 12) J. D. H. Cooper, G. Ogden, J. McIntosh and D. C. Turnell, Anal. Biochem., 142 (1984) 98.

- 13) J. Haginaka and J. Wakai, J. Chromatogr., 396 (1987) 297.
- 14) M. Eslami and J. D. Stuart, J. Chromatogr., 411 (1987) 121.
- 15) K. Imai and Y. Watanabe, Anal. Chim. acta., 130 (1981) 377.
- 16) Y. Watanabe and K. Imai, J. Chromatogr., 239 (1983) 723.
- 17) Y. Watanabe and K. Imai, Anal. Chem., 282 (1983) 495.
- 18) H. Kotaniguchi, M. Kawakatsu, T. Toyooka and K. Imai, J. Chromatogr., 420 (1987) 141.
- 19) R. G. Carlson, K. Srinivasachar, R. S. Givens and B. K. Matuszewski, J. Org. Chem., 51 (1986) 3978.
- 20) M. C. Roach and M. D. Harmony, Anal. Chem., 59 (1987) 411.
- 21) P. D. Monigny, J. F. Stobaugh, R. S. Givens, R. G. Carlson and K. Srinivasachar, Anal. Chem., 59 (1987) 1096.
- 22) B. K. Matuszewski, R. S. Givens, K. Srinivasachar, R. G. Carson and T. Higuchi, Anal. Chem., 59 (1987) 1102.
- 23) E. Bayer, E. Grom, B. Kaltenegger and R. Uhmman, Anal. Chem., 48 (1976) 1106.
- 24) Y. Tapuhi, D. E. Schmidt, W. Lindner and B. L. Karger, Anal. Biochem., 115 (1981) 123.
- 25) C. D. Jong, G. J. Hughes, E. V. Wieringen and K. J.

- Wilson, J. Chromatogr., 241 (1982) 345.
- 26) N. Kaneda, M. Sato and K. Yagi, Anal. Biochem., 127 (1982) 49.
- 27) A. Negro, S. Garbisa, L. Gotte and M. Spina, Anal. Biochem., 160 (1987) 39.
- 28) F. Sanger, Biochem. J., 39 (1945) 507.
- 29) F. Sanger and E. O. P. Thompson, Biochem. J., 53 (1953) 353.
- 30) W. R. Gray, Methods Enzymol., 25 (1972) 475.
- 31) P. Edman, Arch. Biochem. Biophys., 22 (1949) 475.
- 32) G. E. Tarr, in "Methods in protein sequencing analysis", ed. M. Elizinga, p. 233, Humana Press, NJ, 1982.
- 33) S. A. Cohen, B. A. Bidlingmeyer and T. L. Tavin, Nature [London], 320 (1986) 769.
- 34) 小林龍二・G. E. Tarr, 蛋白質核酸酵素, 31 (1986) 991.
- 35) W. S. Reith and N. M. Waldron, Biochem. J., 56 (1954) 116.
- 36) S. Kastuki, J. E. Scott and I. Yamashina, Biochem. J., 97 (1965) 25c.
- 37) R. M. Lequin and H. D. Niall, Biochem. Biophys. Acta, 257 (1972) 76.
- 38) C. P. Ivanov and I. N. Mancheva, Anal. Biochem., 53 (1973) 420.
- 39) Z. Deyl, J. Chromatogr., 48 (1970) 231.

- 40) J. Y. Chang, E. H. Creaser and K. W. Bentley, *Biochem. J.*, 153 (1976) 607.
- 41) J. Salnikow, A. Lehmann and B. W-Liebold, *Anal. Biochem.*, 117 (1981) 433.
- 42) R. Knecht, U. Seemuller, M. Liersch, H. Fritz, D. G. Braun and J. Y. Chang, *Anal. Biochem.*, 130 (1983) 65.
- 43) A. Lehmann and B. W-Liebold, *FEBS lett.*, 176 (1984) 360.
- 44) 平野 久, 蛋白質核酸酵素, 29 (1984) 374.
- 45) H. Ichikawa, T. Tanimura, T. Nakajima and T. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.*, 18 (1970) 1493.
- 46) H. Kawauchi, K. Tuzimura, H. Maeda and N. Ishida, *J. Biochem.*, 66 (1969) 783.
- 47) K. Muramoto, H. Kawauchi and K. Tuzimura, *Agric. Biol. Chem.*, 42 (1978) 1559.
- 48) S-W. Jin, G-X. Chen, Z. Palacz and B. W-Liebold, *FEBS Lett.*, 198 (1986) 150.
- 49) 平野 久, 蛋白質核酸酵素, 34 (1989) 876.
- 50) Z. Palacz, J. Salnikow, S-w. Jin and B. W-Liebold, *FEBS Lett.*, 176 (1984) 365.
- 51) J. J. L'italien and S. B. H. Kent, *J. Chromatogr.*, 283 (1984) 149.
- 52) K. Imai, S. Uzu, K. Nakashima and S. Akiyama, *Biomed. Chromatogr.*, 7 (1993) 56.
- 53) J. Y. Chang, D. Brauer and B. W-Liebold, *FEBS Lett.*, 93 (1978) 205.

- 54) K. Muramoto, H. Kamiya and H. Kawauchi, *Anal. Biochem.*, 141 (1984) 446.
- 55) H. Hirano and B. W-Liebold, *Biol. Chem.^m Hoppe-Seyler*, 367 (1986) 1259.
- 56) W. I. Awad and A. R.A Raouf, *J. Amer. Chem. Soc.*, 77 (1955) 1013.

