

## 論文の内容の要旨

論文題目：PITC を用いるペプチド N 末端アミノ酸の逐次配列・D/L 絶対配置  
同時分析法に関する研究

氏 名：飯田 孝之

### 【序論】

近年、無脊椎動物や両生類およびヒトの生体内において、D-アミノ酸を含むペプチドや蛋白質の存在が相次いで報告されている。これらのペプチドの中には、アミノ酸の絶対配置が D から L に変わると生物活性が失われるものもあり、ペプチドや蛋白質の一次構造解析においてはアミノ酸配列だけでなく、その D/L 絶対配置も同定することが重要であると考えられる。

私は、phenylisothiocyanate (PITC) を用いた Edman 法を利用して、N 末端アミノ酸配列・D/L 絶対配置同時分析法を開発することを試みた。PITC は最も汎用されている Edman 試薬であり、自動分析装置も市販されている。従って、PITC は N 末端アミノ酸配列・D/L 絶対配置同時分析法を検討する上で最も実用的であると考えた。

### 【1. PTH-アミノ酸の光学分割を用いた N 末端アミノ酸の逐次配列・D/L 絶対配置同時分析法の開発】

最初に、通常の Edman 法の生成物である phenylthiohydantoin- (PTH-) アミノ酸を検出対象とした。Edman 法による N 末端アミノ酸配列分析は、カップリング反応、環化切断反

応、転換反応の3段階で構成されるが、ここで得られた PTH-アミノ酸はラセミ化していることが知られている。そこで、環化切断反応および転換反応において、アミノ酸のラセミ化を抑制する方法を検討した。

まず、環化切断反応で得られる anilinothiazolinone- (ATZ-) アミノ酸は、HPLC の移動相中において不安定であるため、このままラセミ化率を求めるのは困難であった。そこで、ATZ-アミノ酸を加水分解して、より安定な phenylthiocarbamoyl- (PTC-) アミノ酸とし、そのラセミ化率を求めた。環化切断反応におけるラセミ化は、すでに蛍光 Edman 試薬の 7-(N,N-dimethylamino)sulfonyl-4-(2,1,3-benzoxadiazolyl)isothiocyanate (DBD-NCS) を用いて詳細に検討され、thiazolinone の keto-enol 互変異性を介してラセミ化すると考えられた。環化切断反応試薬として通常使用される trifluoroacetic acid (TFA) を用いた場合、PITC を用いた Edman 法においても経時的・温度依存的にラセミ化率が増加することが確認された。環化切断反応におけるラセミ化は、TFA の代わりに非プロトン性ルイス酸である  $\text{BF}_3$  を用いて抑制されることが DBD-NCS において明らかにされたことから、私も環化切断反応に  $\text{BF}_3$  (濃度:8mM) を適用した。その結果、最もラセミ化率の高かった ATZ-Pro において4%のラセミ化率を維持し、50°C-5分間で反応が完結することが判明した。

次に、転換反応におけるアミノ酸のラセミ化を検討した。転換反応では、開環反応と再開環反応が連続して進行する。このうち再開環反応については、PTC-アミノ酸を用いて検討し、この段階ではラセミ化しないことを確認した。ATZ-アミノ酸より PTH-アミノ酸へのラセミ化率を調べたところ、転換反応試薬として通常使用される 20%TFA 溶液を用いた場合、Leu において高いラセミ化率が観測された。そこで、20%TFA の代わりに HCl-MeOH 溶液 (1:10, v/v) を適用したとき、ラセミ化率が低減した。これは、ATZ-アミノ酸が速く分解されて、ラセミ化の機会が少なくなったものと推察された。以上の結果から、転換反応には HCl-MeOH 溶液を用いることとした。

Edman 法より得られた PTH-アミノ酸は、後述する新規に調製した  $\beta$ -シクロデキストリン固定化カラムを用いて光学分割を検討した。 $\beta$ -シクロデキストリンの水酸基を phenylcarbonyl 修飾した 7.5Ph/CD 固定相および水酸基未修飾の Native-CD 固定相を用いて同時に検出することで、PTH-アミノ酸の種類と D/L 絶対配置を決定することが可能となった。

以上の結果を踏まえて、市販の合成ペプチドである  $\beta$ -アミロイド(1-16)ペプチド 2nmol を用い、N 末端アミノ酸配列分析・D/L 絶対配置同時分析法を実施した。アミノ酸配列は

12 残基目まで検出され、D/L 絶対配置はすべて L と同定された。また、ラセミ化した D の PTH-アミノ酸もわずかではあるが検出された。

## 【2. PTC-アミノ酸光学異性体の一斉分離法の確立】

PTH-アミノ酸を検出対象とした Edman 法では、若干ながらラセミ化が認められた。転換反応では 50℃の温度が必要であり、これがラセミ化を増加させる要因の 1 つと考えた。そこで転換反応の代わりに加水分解を適用し、緩和な条件で ATZ-アミノ酸から PTC-アミノ酸を得ることができれば、ラセミ化が抑制できると考えた。そこでまず、この方法で得られる PTC-アミノ酸の光学分割および一斉分離法を検討した。

PTC-アミノ酸の光学分割を検討するために、5 種の  $\beta$ -シクロデキストリン固定相を新規に調製した。 $\beta$ -シクロデキストリンは 1 分子に 20 個の水酸基を有し、これらの水酸基は phenylisocyanate を反応させると phenylcarbamoyl 化される。水酸基の修飾数  $n$  は、元素分析法による炭素含量から算出した。5 種の  $\beta$ -シクロデキストリン固定相 (Native-CD, 0.2Ph/CD, 3.3Ph/CD, 7.5Ph/CD, 16.9Ph/CD) における PTC-アミノ酸の分離係数  $\alpha$  を比較すると、Ser の光学分割が非常に困難であり、3.3Ph/CD 固定相を用いた場合のみ光学分割された。この 3.3Ph/CD 固定相を用いて、18 種類の PTC-アミノ酸はいずれも光学分割できることが示された。

しかしながら、PTC-アミノ酸の相互分離は必ずしも十分ではなく、特に Ser, Gly, Asn の 3 種は 3.3Ph/CD 固定相上でほぼ同時に溶出された。そこで、これらの PTC-アミノ酸を相互分離するため、逆相カラムとの連結を検討した。3 種の逆相カラム (メチル, フェニル, オクチル) における分離を比較した結果、オクチルカラムが適当と判断された。オクチルカラムおよび 3.3Ph/CD 固定相カラムのカラム温度によって PTC-アミノ酸の保持時間を調節できることから、それぞれのカラム温度を 30℃および 20℃に設定して直列に連結することで Ser, Gly, Asn の光学異性体の相互分離を可能にした。さらに Arg と Pro、また His と Ala を分離するために、HPLC 移動相に対してイオンペア試薬の添加を検討し、Gly を含む 37 種類の PTC-アミノ酸光学異性体の一斉分離法を確立した。この一斉分離法における 1 試料の分析所要時間は 150 分であり、各ピーク保持時間の再現性は良好であった。

## 【3. PTC-アミノ酸の光学分割を用いた N 末端アミノ酸の逐次配列・D/L 絶対配置同時分析法の自動化】

PTC-アミノ酸のラセミ化を抑制する Edman 法を自動配列分析装置に適用するため、各反応条件を詳細に検討した。

まず、自動配列分析装置 (Protein sequencer 477A) を用いて環化切断反応における  $\text{BF}_3$  濃度を検討した。PVDF 膜に対してミオグロビンを供し、カップリング反応後に環化切断反応を行ったところ、 $\text{BF}_3$  濃度が 40mM のときに最も高い収量を示した。また、ATZ-アミノ酸の抽出操作に用いる有機溶媒として  $\text{CH}_3\text{CN}$ , AcOEt, 1-butyl chloride を比較した結果、1-butyl chloride を用いたときに最も効率よく ATZ-アミノ酸が抽出された。これにより、自動配列分析装置における環化切断反応と ATZ-アミノ酸の抽出操作を最適化することができた。

次に、ATZ-アミノ酸の加水分解反応におけるラセミ化をマニュアル操作にて検討した。代表的なアミノ酸として Leu を用いて室温における反応の経時変化を調べたところ、 $\text{CH}_3\text{CN}$  を含む塩酸溶液を用いたとき加水分解反応は速やかに進み、ラセミ化が抑制されることが判明した。さらに、ATZ-アミノ酸の加水分解反応時のラセミ化に与える塩酸濃度の影響を調べ、代表的な 5 種のアミノ酸 (Arg, Asp, Leu, Gln, Glu) のラセミ化率を測定した。その結果、0.1M 以上の塩酸を用いたときに 5 種すべてのアミノ酸のラセミ化が抑制されたことから、加水分解時の塩酸濃度は 0.1M に設定した。

このようにして得られた最適条件を用いて、ペプチドの N 末端アミノ酸配列・D/L 絶対配置同時分析を実施した。試料は市販の合成ペプチドである  $\beta$ -アミロイド (1-40) ペプチドを 5nmol 使用し、Edman 法のカップリング反応から抽出までの操作は自動配列分析装置にて、加水分解はマニュアルにて行った。得られた PTC-アミノ酸は先に確立した一斉分離法を用いて同定し、10 残基目までのアミノ酸の種類とその D/L 絶対配置を同時に分析できることが示された。

## 【結論】

本研究では PITC を用いるペプチド N 末端アミノ酸配列・D/L 絶対配置同時分析法の開発を目的とし、PTH-アミノ酸または PTC-アミノ酸の光学分割法を応用したアミノ酸配列分析法を確立した。特に PTC-アミノ酸を検出対象とするアミノ酸配列分析法は、汎用の自動分析装置と PTC-アミノ酸光学異性体の一斉分離法を用いることから、簡便にアミノ酸配列と D/L 絶対配置を同時決定することが可能であり、ペプチドや蛋白質の一次構造解析法に応用できるものとする。