

## 審査の結果の要旨

氏名 飯田 孝之

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。そのため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絶対配置を決定することが重要と考えられる。しかしながら、アミノ酸配列とD/L絶対配置の同時分析法が実用に供された例は少なく、また特定のアミノ酸が同定できないなどの分析法の問題点も抱えていた。本論文では、最も汎用されているEdman試薬であるphenylisothiocyanate (PITC)を用いるN末端アミノ酸逐次配列・D/L絶対配置同時分析法の開発について述べられている。

まず、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N末端アミノ酸逐次配列・D/L絶対配置同時分析法の開発を試みた。Edman法の環化切断反応および転換反応におけるアミノ酸のラセミ化を検討した結果、反応試薬としてそれぞれborontrifluoride (BF<sub>3</sub>)および塩酸-メタノール溶液(1:10, v/v)を適用することでアミノ酸のラセミ化は約10%まで抑制することが可能となった。さらに得られたPTH-アミノ酸についてD/L絶対配置を同定するために、β-シクロデキストリン固定相を用いた光学分割HPLC法を検討した。β-シクロデキストリンの水酸基が未修飾である固定相および水酸基がフェニルカルバモイル修飾された固定相の2種類を用いることで、18種類のPTH-アミノ酸の光学分割に成功した。そして、改良したEdman法とPTH-アミノ酸光学分割法を組み合わせることで、N末端アミノ酸逐次配列・D/L絶対配置同時分析法が確立された。

しかしながら、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。Edman法の転換反応におけるアミノ酸のラセミ化を避けるために、転換反応ではなく加水分解反応を適用することを考えた。すなわち、anilinothiazolinone-

(ATZ-)アミノ酸の加水分解反応で得られるphenylthiocarbamoyl-(PTC-)アミノ酸を検出対象とした。まず、4種類のフェニルカルバモイル化ベータシクロデキストリン固定相(0.2Ph/CD, 3.3Ph/CD, 7.5Ph/CD, 16.9Ph/CD)および未修飾のベータシクロデキ

ストリン固定相 (Native-CD) の計 5 種類を新規に調製して光学分割を検討した結果、3.3Ph/CD 固定相において 18 種類の PTC-アミノ酸の光学分割が達成された。さらに個々の PTC-アミノ酸光学異性体を分離するために、逆相系のオクチルカラムと 3.3Ph/CD 固定相カラムを連結することで、グリシンを含む全 37 種類の PTC-アミノ酸光学異性体の一斉分離に初めて成功した。

また、PTC-アミノ酸を得るための Edman 法について、操作の簡便化を図るために自動配列分析装置を用いた。環化切断反応試薬として trifluoroacetic acid (TFA) の代わりに 40mM  $\text{BF}_3$  を適用し、自動配列分析装置において環化切断反応と ATZ-アミノ酸の抽出操作を最適化した。さらに ATZ-アミノ酸の加水分解反応におけるラセミ化を検討し、0.1M 以上の塩酸溶液を用いたときラセミ化が抑制されることを明らかにした。最後に、自動配列分析装置と PTC-アミノ酸光学異性体の一斉分離法を組み合わせたアミノ酸逐次配列分析法の有用性を示すために、市販の合成ペプチドである  $\beta$ -アミロイド (1-40) ペプチドを測定した。その結果、10 残基目までのアミノ酸の種類とその D/L 絶対配置を同時に測定できることが示された。

以上、本研究は新規光学活性固定相 (3.3Ph/CD) の開発を含め、18 種類の PTH-アミノ酸または PTC-アミノ酸の光学分割法を検討し、ペプチド N 末端アミノ酸逐次配列・D/L 絶対配置同時分析法を確立したものである。PTC-アミノ酸光学異性体の一斉分離法と汎用の自動配列分析装置の組み合わせでは、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、本研究は分析化学、生化学に寄与するものとして博士 (薬学) に値する論文であると認めた。