

## 論文の内容の要旨

論文題目：自動化を指向したペプチドの N 末端アミノ酸逐次配列・D/L 絶対配置分析法に関する研究

氏 名：鳥羽 陽

### 【序論】

Phenylisothiocyanate (PITC)を用いるアミノ酸逐次配列分析法（エドマン法）は、1949年に登場して以来、多くの研究者によって高感度化と自動化とを目的とした改良が加えられ、その成果として開発された気相シーケンサーは現在広く用いられている。エドマン法は、PITCのようなイソチオシアノ基を有する試薬をペプチドの N 末端に反応させ、N 末端ペプチド結合を特異的に切断した後、最終的に得られるチオヒダントイン(TH-)誘導体を HPLC で同定する手法である。これまでに TH-誘導体の吸光度を測定する PITC 法の感度不足を改善するため、蛍光エドマン試薬の開発が試みられてきたが、PITC に比べて試薬骨格が大きく反応性に乏しいため、エドマン法の開発から 50 年が経過した現在でも、PITC 以外ほとんど用いられていないのが実状である。

最近、カエル、カタツムリ、クモなどの真核生物から D-アミノ酸含有ペプチドが相次いで発見され、ヒトにおいても老化と関連してタンパク質中の特定のアミノ酸残基のラセミ化が報告されている。これらの中には、D-体でないと生物学的活性が失われるものもあり、一次構造解析をする際に D/L 絶対配置をも決定することが要求される。そこで本研究では、エドマン法を基礎とし、順次遊離してくる N 末端アミノ酸誘導体を光学異性体分離することによって、アミノ酸配列及び D/L 絶対配置を決定することを基本方針とした。ベンゾフラザン骨格は他の蛍光試薬と比べて骨格が比較的小さいことから、この骨格を有する蛍光エドマン試薬を用いた、チアゾリノン(TZ-)誘導体やカルバミン酸(CA-)誘導体を測定対象と

する N 末端逐次配列・D/L 絶対配置分析法が開発されたが、市販のプロテインシーケンサーへの適用、すなわち自動化が困難で実用性に乏しいという問題があり、自動化を目的としたさらなる検討が必要とされた。

本研究では、自動化を指向した高感度 N 末端アミノ酸逐次配列・D/L 絶対配置同時分析法を開発することを目的とし、ベンゾフラザン骨格を有する蛍光エドマン試薬を用い、測定対象となりうる 3 種類の誘導体(TZ, CA, TH)を比較検討した。

## 【本論】

### 1. チアゾリノン(TZ-)誘導体を用いた逐次配列分析における蛍光エドマン試薬の比較

TZ-誘導体は、試薬とペプチドのカップリング反応、N 末端アミノ酸の切断反応の 2 段階の反応を経て生成する。従来のエドマン法における TH-誘導体への転換反応を省略できるため、分析時間の短縮が可能となる。ベンゾフラザン骨格を蛍光団とするエドマン試薬を用いて得られる TZ-誘導体は、そのパラ位置換基のハメット置換基数( $\sigma_p$ )値が大きいほど強い蛍光を示すことが報告されている。

まず、より高感度に TZ-誘導体を検出できる蛍光エドマン試薬の開発を目的として、新規合成したベンゾフラザン骨格を有する 4 種類の試薬を比較検討した。パラ位置換基の電子吸引性の増加とともに、TZ-アミノ酸の蛍光強度は増大する一方で、安定性は低下する傾向にあることが分かった。また、エドマン反応の各反応ステップにおけるパラ位置換基の反応性に対する影響を検討したところ、カップリング反応では試薬間の差は観察されなかったが、環化・切断反応に対して抵抗性を示す N 末端 Pro-His 結合を切断する際に、パラ位置換基の電子吸引性が強いほど反応に時間を要した。

3 種類の蛍光エドマン試薬を  $\beta$ -Casomorphin-7 の逐次配列分析に適用したところ、C 末端を除くすべてのアミノ酸残基を同定することができた。それぞれの試薬について、TZ-誘導体の安定性及び検出感度、反復収率、クロマトグラム上の妨害ピークについて総合的に評価した結果、7-*N,N*-dimethylaminosulfonyl-4- (2,1,3-benzoxadiazolyl) isothiocyanate (DBD-NCS) が最も自動化に適していると考えられた。しかしながら、TZ-誘導体を用いる方法は、従来のエドマン法よりもステップ数が少ないため分析時間の短縮が期待できるが、TZ-誘導体自体の安定性が低く、標準物質を得ることができない点が自動化の際に問題となることが予測できたため、DBD-NCS を用いてさらに検討を進めた。

### 2. DBD-カルバミン酸(CA-)誘導体を用いた N 末端アミノ酸逐次配列・D/L 絶対配置分析法の開発

DBD-NCS を用いて得られる DBD-TZ-誘導体を加水分解して蛍光性のない TC-誘導体とした後、さらに酸化して得られる CA-誘導体は TZ-誘導体より安定で、かつ強い蛍光を有する。

しかしながら、CA-誘導体を用いる配列分析法は、市販のシークエンサーに適用できない。その理由は、従来のエドマン反応より1ステップ増え、さらにCA-誘導体に変換する際に用いるNaNO<sub>2</sub>などの塩を含む溶液の供給が困難なためである。そこで、シークエンサーへの適用を目的としてCA-誘導体への変換過程を省略する方法、すなわち、TC-誘導体をHPLCに導入して分離した後、ポストカラム法により酸化剤を加えCA-誘導体に変換し、その蛍光を検出するシステムを開発した。

はじめに、ポストカラム法によるCA-誘導体への変換過程の最適化を行い、反応コイルの長さを10m、反応温度を62℃とした。次に、アミノ酸の同定に用いる逆相カラムでの分離の検討を行った結果、すべてのDBD-TC-アミノ酸が一斉分離でき、ポストカラム法によりCA-誘導体に変換して蛍光検出できた。次に、D/L絶対配置を決定するためにDBD-TC-アミノ酸の光学異性体分離を試みた。光学活性固定相としてPirkle型キラル固定相を用い、Glyを除く19種のDBD-TC-アミノ酸の光学分割を達成した。以上の結果を踏まえて、[D-Ala<sup>2</sup>]-Deltorphin IIのN末端アミノ酸逐次配列・D/L絶対配置分析を実施した。環化・切断反応試薬としてラセミ化を抑制できることが報告されているBF<sub>3</sub>をTFAの代わりに用い、得られたDBD-TC-アミノ酸の一部を逆相HPLCシステムに導入してアミノ酸を同定し、また別に光学活性固定相に導入して絶対配置を決定した。20%前後のラセミ化が観察されたものの、2残基目のAlaはD-体として容易に決定された。

ポストカラム法を取り入れたHPLCシステムを用いてCA-誘導体を分析する方法は、従来の転換反応の代わりに加水分解反応をシークエンサーに組み込むことで自動化が可能である。しかしながらAsp、Gluの収率が低いため分析前に側鎖をメチルエステル化する必要がある、PVDF膜などに転写したタンパク質の分析が主流となっている今日では、あらかじめエステル化することは困難である。この理由からチオヒダントイン誘導体を検出する逐次配列分析法をさらに検討した。

### 3. チオヒダントイン(TH-)誘導体を用いたN末端アミノ酸逐次配列・D/L絶対配置分析法の開発

TZ-誘導体から転換反応によって得られるTH-誘導体は、PITCを用いる従来のエドマン法における分析対象化合物であり、TH-誘導体が蛍光を有するような蛍光エドマン試薬を開発すれば、容易に市販のシークエンサーへの適用が可能となる。これまでの検討で用いた試薬から得られるTH-誘導体はすべて無蛍光であるため、新たにTH-誘導体が蛍光を有する7-methylthio-4-(2,1,3-benzoxadiazolyl) isothiocyanate (MTBD-NCS)を設計、合成した。

これまでに報告された蛍光エドマン試薬の問題点として、試薬自身や副生成物が蛍光を有するため、これらを除くための洗浄操作をする際に試料の流出を招き、反復収率の低下を引き起こすことが挙げられる。そこですでに明らかになっている4,7-位置換ベンゾフラザン化合物と蛍光との関係を利用してMTBD-NCSを設計した。ベンゾフラザン化合物の

4, 7-位置換基の Hammett 定数( $\sigma_p$ )の和を横軸に、その差を縦軸にプロットすると蛍光を有する化合物が2つの群に集まることから、蛍光の有無が予測できる。MTBD-NCS について、エドマン反応の過程で得られる各誘導体や副生成物、試薬自身の蛍光の有無をこれにあてはめて考えると、試薬自身に蛍光があるものの、TH-誘導体だけが蛍光を有することが予測できた。そこで実際に MTBD-NCS を合成し、エドマン反応の過程で生成する各誘導体の蛍光特性を調べた。同定できなかった TZ-誘導体を除いて、予測どおり TH-誘導体以外の TC-、CA-誘導体には、ほとんど蛍光がなく、反応の過程で生成する副生成物の MTBD-NH<sub>2</sub> も無蛍光であった。次に、MTBD-TH-アミノ酸の逆相 HPLC における分離の検討を行った結果、転換反応の試薬として HCl-methanol を用いた場合に生成する Asp 及び Glu のメチルエステル体、Ser 及び Thr の副生成物として生成するデヒドロ体を含めた 24 種の TH-アミノ酸が分離された。また、すべての MTBD-TH-アミノ酸は、2 種類のセルロース型光学活性固定相によって光学分割することができた。

次に、エドマン法の各反応過程を最適化した。カップリング反応は 50℃、30 分、環化・切断反応は、TFA の代わりにラセミ化を抑制できる BF<sub>3</sub> を用いて 60℃、30 分で完結した。転換反応では通常 TFA 水溶液を用いるが、TH-アミノ酸のラセミ化率が約 45%に達したため、D/L 絶対配置の決定に用いることができなかった。そこで、PTH-アミノ酸のラセミ化を抑制することが報告されている HCl-methanol を転換反応試薬として選択した。反応時間を検討したところ、Leu では 60℃、60 分で反応が完結したが、転換反応に抵抗性を示す Pro では 2 時間経っても完結しなかった。また、そのときのラセミ化率は 10%前後であったが、時間と共に増加する傾向にあった。これらのことから、TH-誘導体の生成量とラセミ化率とを考慮して HCl-methanol を用いる転換反応は、60℃、60 分で行うこととした。以上の結果を踏まえて、[D-Ala<sup>2</sup>]-Deltorphin II の N 末端アミノ酸逐次配列・D/L 絶対配置分析を実施した。逆相 HPLC と光学分割 HPLC システムとを用いてアミノ酸配列と絶対配置とを決定することができ、ごくわずかなラセミ化が観察された。

TH-誘導体を用いる場合の反応ステップは従来法と同じであり、市販のシーケンサーへの適用を容易に行うことができる。また、TH-誘導体の安定性及び酸性アミノ酸の収率は高く、前述の 2 法に比べて実用性は高いと考えられる。

#### 【結論】

ベンゾフラザン骨格を有する蛍光エドマン試薬を用いて、エドマン反応によって生成する 3 種類の誘導体を測定対象とする、N 末端アミノ酸逐次配列・D/L-絶対配置分析法を開発した。最終的に、MTBD-NCS を用いて TH-誘導体を検出するシステムが誘導体の安定性、酸性アミノ酸の収率等を考慮すると優れており、このシステムの自動化により PITC 法より高感度で、かつ D/L-絶対配置をも決定できる自動分析装置を開発できるものとする。