

液体クロマトグラフィーによる PTH アミノ酸の分離

Analysis of Amino Acid Phenylthiohydantoin by Liquid Chromatography

山 辺 武 郎*・中 村 亘 志*・高 井 信 治*

Takeo YAMABE, Hiroshi NAKAMURA and Nobuharu TAKAI

1. はじめに

たん白質の研究において、その一次構造の解析は最も重要な問題である。たん白質の一次構造は、たん白質をアミノ酸に分解して、生成したアミノ酸誘導体を定性分析することによって決定される。構成アミノ酸の配列は主にアミノ末端から決定され、代表的なものに DNP 法¹⁾、ダンシル法²⁾、PTH 法³⁾などがある。上記の方法のうち、Edman によって開発された PTH 法は、末端から順次アミノ酸の配列を決定できるので、現在最もひろく行なわれており、自動分解装置も開発されている⁴⁾。この方法で生成した PTH アミノ酸 (アミノ酸のフェニールチオヒダントイン誘導体) の分析は、薄層⁵⁾、ペーパー⁶⁾、ガスクロマトグラフィー⁷⁾などによって行われているが、分析操作が複雑であったり、定量が困難であるなどの欠点がある。最近、液体クロマトグラフィーによる PTH アミノ酸分析例が報告されている^{8),9)}が、まだ実用的なものとはいえない。そこで、われわれは、ポラスポリマーを担体として、液体クロマトグラフィーを行ない、PTH アミノ酸を直接分離分析することを試みた。

2. 実 験

実験に使用したポラスポリマーは、東洋曹達工業株式会社・TSK-GEL-LS 110 で、スチレンを主成分とする粒径 12~15 μ の球状ゲルである。分離カラムは、内径 3 または 5 mm、長さ 50 cm のガラスカラムで、湿式法でゲルを充てんした。溶離液は、耐圧 200 kg/cm² のピストン型ポンプで送液した。PTH アミノ酸は、メタノールに溶解し、マイクロシリンジを用いてカラムに注入した。

PTH アミノ酸の検出は、セル容量 8 μ l 検出波長 254 nm の紫外検出器で行なった。PTH アミノ酸、溶離液は、いずれも試薬をそのまま使用した。

3. 実 験 結 果

TSK-GEL-LS 110 のカラムで、メタノールを溶離液として、中性、酸性、塩基性アミノ酸の誘導体を分離した結果、中性アミノ酸の誘導体は溶出するが、酸性、塩

基性アミノ酸の誘導体は溶出しないことがわかった。溶離液にトリエチルアミンまたはアンモニアを少量添加すると、酸性アミノ酸の誘導体が、酢酸を添加すると、塩基性アミノ酸の誘導体が溶出した。トリエチルアミン、酢酸の添加量の影響を調べた結果、0.5% 以上加えればよいことがわかったので、以後の実験では、トリエチルアミン、酢酸を各 1% 添加することにした。メタノールのみを溶離液として使用した場合、PTH アミノ酸はほとんど分離されない。さらに溶離液の極性を大きくする必要があると考え、メタノール/水比の溶離挙動に対する影響を調べた。図 1 に PTH-Gly, Ala, Glu, Asp のキャパシティー比 (k') と溶離液組成の関係を示す。 k' は (1) 式により計算した。

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad (1)$$

ここで、 V_R は試料の溶出容量、 V_0 は固定相と相互作用のない物質の溶出容量である。後述のように、本実験条件では、極性の大きい物質の溶出が早いので、便宜的に水の溶出容量を V_0 とした。 k' はメタノール/水比に対して直線的に変化せず、ある値から急に大きくなる。 k' のたち上るメタノール/水比は、PTH アミノ酸の種類によって異なり、C 数の大きいもの程、水の比率

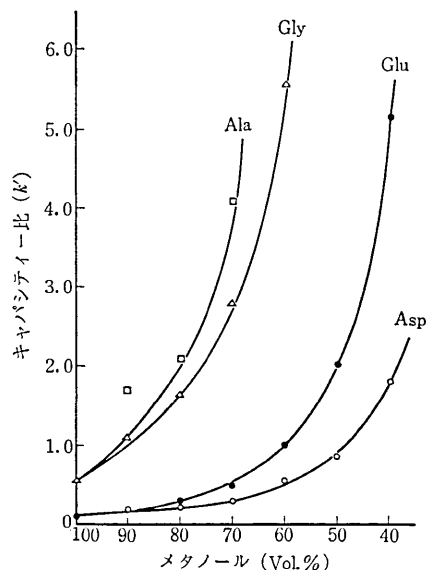


図 1 PHT-Asp, Glu, Gly, Ala のキャパシティー比と溶離液組成の関係

* 東京大学生産技術研究所 第 4 部

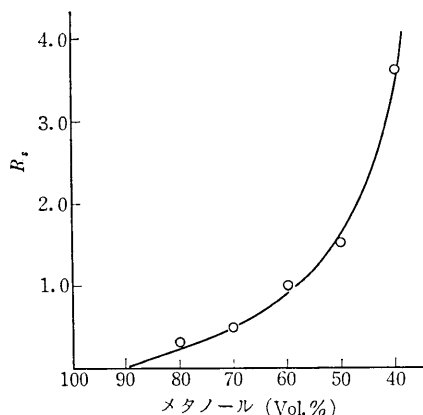


図 2 PTH-Asp と Glu の分離率 (R_s) と溶離液組成の関係

の少ない点でたち上る。

同様に、Asp, Glu の分離率 (R_s) に及ぼすメタノール/水比の影響を調べた結果を、図 2 に示す。 R_s は(2)式により計算した。

$$R_s = 2(V_{R1} - V_{R2}) / (W_1 + W_2) \quad (2)$$

ここで、 W は溶出ピークの幅を表わす。メタノールが 90% 以上の場合、Asp と Glu はまったく分離しないが、水を 20% 以上加えると分離しはじめ、水 40% で完全に分離する。 R_s も k' と同様、メタノール/水比に対して直線的に変化せず、水 50% 以上で急に大きくなる。 R_s のたち上る値は、Glu の k' のたち上る値とよく一致する。

以上の結果から、溶離液に水を添加すると溶出が遅れるが、分離率が向上することがわかったので、PTH アミノ酸 20 成分をメタノール/水系の溶離液で分離することにした。内径 3 mm のカラムを使用して、メタノール 100, 80, 70% の溶離液で測定した PTH アミノ酸の溶出容量を、表 1 に示す。溶離液にメタノール/水を使用すると、Asp, Glu などの酸性アミノ酸、Arg, His のような塩基性アミノ酸、あるいは Ser, Thr のように -OH をもつ中性アミノ酸の誘導体の溶出が早く、フェニール基、C 数の多いアルキル基をもつ誘導体の溶出が遅れる傾向がみられる。PTH-Lys は塩基性アミノ酸の誘導体であるのに、溶出が遅いのは他方の -NH₂ 基がフェニルチオカルバミル基になっているからである。

表 1 から、溶出の早いものは、水を 30% 添加した溶離液を使用しても分離できないが、溶出の遅いものは、かなり分離し、水の比率を増すと極端に溶出が遅れることがわかる。したがって、全 PTH アミノ酸を同一の溶離液で分離することは、測定時間を長くするのみで効率が悪く、実用的ではない。溶出の早いものと遅いものの 2 つのグループに分けて、別々の溶離液で分離するのが適当であると考え、PTH-Gly を基準にして、表 2 の

表 1 PTH アミノ酸の溶出容量と溶離液組成
カラム 3 mmφ×50 cm, 単位 ml

メタノール	100	80	70
水		20	30
トリエチルアミン	1	1	1
酢酸	1	1	1
PTH-Gly	4.4	7.8	11.6
Ala	4.3	9.2	15.8
Val	4.7	14.5	35.9
Leu	5.0	25.4	75
Ile	5.0	22.6	62
Phe	5.8	25.4	80
Ser	3.6	4.0	5.5
Thr	3.4	4.6	7.0
Tyr	3.7	6.8	12.4
Met	4.7	23.6	60
Pro	4.8	11.6	25.1
Asn	3.2	3.6	4.4
Gln	2.9	2.9	3.1
CySO ₃ K	3.1	3.2	3.8
Asp	3.1	3.5	4.4
Glu	3.2	4.3	6.2
Arg	3.2	3.1	3.9
Lys	5.0	6.8	—
His	3.6	4.1	5.2
Try	4.7	—	6.9


ような 2 つのグループに分類することにした。グループ I は、比較的溶出が早いもの、グループ II は、比較的溶出が遅いものからなる。

前述のように、各 PTH アミノ酸の分離率は、溶離液中の水を増量することによって改良されるが、水の粘度が大きいため、圧力損失が大きくなって、クロマトグラフを行なううえで不都合である。一般に、カラムの内径を大きくすると分離率が向上するので、内径 5 mm のカラムを使用して、溶離液中の水の比率をできるだけ少なくすることにした。グループ II を分離する場合、アンモニア、酢酸を添加する必要はないが、できるだけ溶離液の成分を同一にするのが好ましいので、両者を添加することにした。中性アミノ酸誘導体の分離に及ぼす酢酸、アンモニアの影響を調べるため、メタノール 80% の溶離液に各 1% を添加して、グループ II の溶出容量を測定した。表 3 に結果を示す。溶離液に酢酸を 1% 添加しても溶出容量は無添加の場合とほぼ同じであるが、アンモニアを 1% 添加すると溶出が早くなる。両者を 1% ずつ添加すると、いずれの場合より溶出が遅れるが、分離率にはほとんど影響しない。

グループ I, II の最適溶離条件を決定するために、メタノール/水比を 10% ずつ変えて、クロマトグラムを求めた。グループ I は、水 30% 以下では、分離が不完全で定性できない。水 40% で分離率はかなり向上す

研 究 速 報

表 2 溶出速度による PTH アミノ酸の分類

グループ I		グループ II	
Gln	R : $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2)_2- \end{array}$	Gly	R: H-
Asn	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{NCCH}_2- \end{array}$	Ala	CH ₃ -
Ser	HOCH ₂ -	Val	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Thr	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{H}_3\text{CCH}- \end{array}$	Leu	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
CySO ₃ K	KO ₃ SCH ₂ -	Ile	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Asp	HOOCCH ₂ -	Phe	C ₆ H ₅ -CH ₂ -
Glu	HOOC(CH ₂) ₂ -	Tyr	HOC ₆ H ₄ CH ₂ -
Arg	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HN}=\text{CNH}(\text{CH}_2)_3- \end{array}$	Met	CH ₃ S(CH ₂) ₂ -
His	$\begin{array}{c} \text{N}-\text{C}-\text{CH}_2- \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Lys	$\begin{array}{c} \text{NHCSNHC}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{HCH}(\text{CH}_2)_3- \end{array}$
		Try	 -CH ₂ -
		Pro	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -

PTHアミノ酸

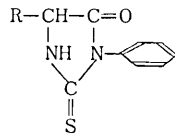


表 3 酢酸、アンモニアの溶出容量に及ぼす影響
カラム 5mmφ×50cm 単位 ml

メタノール	80	80	80	80
水	20	20	20	20
酢酸		1		1
アンモニア			1	1
PHT-Tyr	14	15	10	17
Gly	14	15	10	17
Ala	16	19	13	20
Val	18	30	22	39
Try	34	37	27	49
Ile	40	43	34	60
Met	43	46	23	63
Leu	45	49	35	66
Phe	45	49	35	68
Lys	56	61	42	88
Pro	70	73	69	102

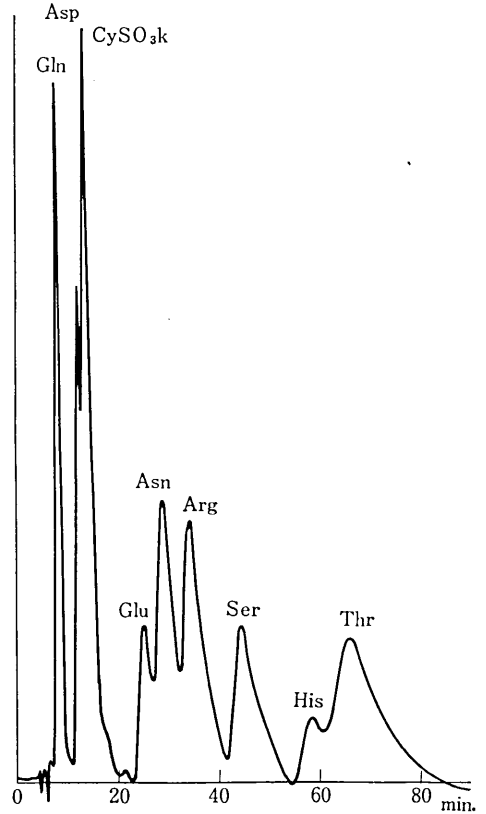


図 3 グループ I のクロマトグラム
溶離液メタノール/水/酢酸/アンモニア：40/60/1/1
流速 1.3 ml/min 圧力 48 kg/cm²

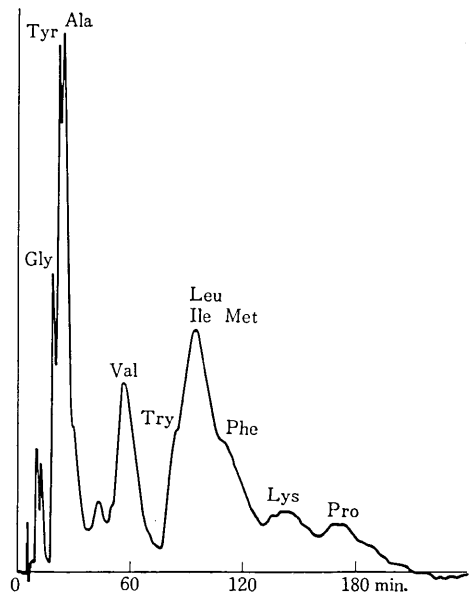


図 4 グループ II のクロマトグラム
溶離液メタノール/水/酢酸/アンモニア：70/30/1/1
流速 1.2 ml/min 圧力 43 kg/cm²

..... 研 究 速 報

るが, Asp と CySO₃K, Asn と Arg および Thr と His が分離できない。水を 50% に増量すると, Thr と His は分離するが, 前 2 者は分離できない。水 60% で全成分の分離定性が可能になる。グループ II は, I に比べて溶出が遅いので, 水の比率が比較的低い溶離液で分離できる。水 30% で Met, Ile, Leu 以外の成分は定性可能である。さらに水の添加量を増すことによって, 分離率が改良できると思われるが, 測定時間が極端に長くなるので, ここで実験を終了した。図 3, 4 にグループ I, II のクロマトグラムを示す。

4. 考 察

ポリスチレンゲルを用いて, メタノール/水系の溶離液により, PTH アミノ酸を分離する場合, 酸性, 塩基性および -OH 基をもつ中性アミノ酸の誘導体は, アルキル基のみからなるもの, フェニール基をもつもの比べて, 溶出が早い。また, Gly, Ala, Val, Leu のように, アルキル基の大きさのみ異なるアミノ酸の誘導体では, アルキル基の小さいものから溶出する。このような傾向は, オクタデシルシラン (ODS) を固定相とした場合によく似ている。PTH アミノ酸のなかで, Asn, Gln, Asp, Glu の挙動は特異であり, 上記の傾向とは一致しない。これらの誘導体は, 溶離液のわずかな組成変化によって, 溶出位置, ピークの形状が変わる。溶離液中の酸, 塩基濃度の影響によると推定される。酸性アミノ酸の誘導体は, 溶離液にアンモニアまたはトリエチルアミンを添加しないと溶出しない。酸性アミノ酸には, -COOH 基が残存しており, ポリスチレンゲルに-COOH 基の吸着活性点が存在し, アンモニア, トリエチルアミンは, -COOH 基を保護する効果があるかと考えられる。塩基性アミノ酸の誘導体についても, 同様な効果が起っているのであろう。酢酸は, 中性アミノ酸の誘導体の溶出挙動に, ほとんど影響を及ぼさないが, アンモニアは, 溶出を早くする作用がある。ポリスチレンゲルにアンモニアが配位すると, -COOH 基の吸着防止効果をうまく説明できないので, 溶離液の溶解性に関係していると考えられる。酢酸, アンモニアの両方を添加する

と, 無添加の場合に比べて, 溶出が遅れるのは, 塩析効果によるものであろう。本実験で, ポリスチレンゲルにより, Leu, Ile, Met を除く PTH アミノ酸の分離が可能であることがわかった。Leu, Ile, Met の分離ができなかったが, 溶出容量は異なるので, 1 成分づつの定性は可能である。Edman 法で, たん白質のアミノ酸配列を決定する場合は, 1 サイクルで生成する PTH アミノ酸は 1 種類であるので, 実用上問題はないと考える。

ここで行った方法では, 測定装置を 2 系列使用する必要があるが, ステップワイズあるいはグラジエント溶離法を検討すれば, 1 系列にすることができる。測定にかなり長時間を要するが, これは主に使用したカラムの耐圧性によるもので, ステンレスカラムを使用することによって, かなり短縮できると考えられる。

5. お わ り に

Edman 法によって生成する PTH アミノ酸の分離, 定性を液体クロマトグラフィーで行なうことを試みた。その結果, ポリスチレンゲルにより, 20 成分の PTH アミノ酸の定性が可能であることがわかった。液体クロマトグラフィーは, 従来行なわれている薄層クロマトグラフィーに比べて, 操作が簡単であり, 自動化, 定量性の点で優れている。今回の実験をもとに, 多少の改良を加えることによって, 全自動アミノ酸配列測定装置の開発が可能であると考えられる。

(1974 年 2 月 4 日受理)

参 考 文 献

- 1) F. Sager: Biochem. J., **39**, 507 (1945)
- 2) Gray, W.R.: Method in Enzymology, Vol. IV, Academic Press, New York, 139 (1967)
- 3) P. Edman: Arch. Biochem., **22**, 475 (1949)
- 4) P. Edman and Begg: Eur. J. Biochem., **1**, 80 (1967)
- 5) W. A. Landman: J. Am. Chem. Soc., **75**, 3638 (1953)
- 6) 間宮: 生化学, **42**, No. 10, 25 (1970)
- 7) John J. Pissano: J. Biol. Chem., **244**, 5597 (1969)
- 8) Du Pont, Liquid Chromatography Application Lab. Report
- 9) 奥山: 液体クロマトグラフ研究会講演要旨集, No. 14, 95 (1973)

正 誤 表 (3 月号)

頁	段	行	種 別	正	誤
23	右	17	本 文	29	31
25			著 者 名	落 合 淳 一	落 合 淳 一
"	左		章のタイトル	Introduction	Introduction
27			次号予告	落 合 淳 一	落 合 淳 一