

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に比べて、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