

1 アミノ酸分析法〈G3-2-191〉

2 次のように改める。

3 本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。

4 三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医
5 療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

6 アミノ酸分析法は、タンパク質、ペプチド、その他の医薬品
7 のアミノ酸組成やアミノ酸含量を測定する方法をいう。タンパ
8 ク質及びペプチドはアミノ酸残基が共有結合で直鎖状に重合し
9 た高分子であり、そのアミノ酸配列はタンパク質やペプチドの
10 特性を規定している。タンパク質は通常特定のコンフォメー
11 ションを持った折りたたみ構造をとる大きな分子と考えられる。
12 一方、ペプチドは比較的小さな分子であり、2～3個のアミノ
13 酸で構成されていることもある。アミノ酸分析法は、タンパク
14 質やペプチドの定量、同定、構造解析に利用でき、ペプチド
15 マップ法におけるペプチド断片の評価、タンパク質やペプチド
16 中の異常アミノ酸の検出などにも利用できる。分析する前にタ
17 ンパク質又はペプチドを各構成アミノ酸に加水分解する必要が
18 あるが、加水分解の後に行うアミノ酸分析操作は他の医薬品中
19 の遊離アミノ酸の分析で行われている方法と同じであり、加水
20 分解試料中のアミノ酸は一般に誘導体化して分析する。

21 装置

22 アミノ酸分析に用いる方法論は通常、試料中のアミノ酸のク
23 ロマトグラフィーによる分離に基づいている。最近の技法は専
24 らアミノ酸分析用に作られた自動クロマトグラフィー装置を利
25 用している。アミノ酸分析装置は、基本的にはカラム上でアミ
26 ノ酸を分離するための移動相勾配を作成できる低圧又は高圧液
27 体クロマトグラフィー装置である。装置にはプレカラム誘導体
28 化で分析する以外はポストカラム誘導体化機能を備えていなか
29 ればならない。検出器は利用する誘導体化の方法によって異な
30 るが、通常紫外可視検出器か蛍光検出器が用いられる。記録計
31 (例えば、インテグレーター)は検出器からのシグナルをアナロ
32 グ信号に変換し、定量できるものを用いる。使用する装置はア
33 ミノ酸分析専用のものが望ましい。

34 一般的注意

35 アミノ酸分析中、分析者は目立たないところでの汚染に常に
36 注意を払う必要があり、高純度の試薬が必要となる(例えば、
37 低純度の塩酸はグリシンの混入を招くことがある)。分析試薬
38 類は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用溶媒類のみを使用
39 し、数週間ごとに定期的に交換すべきである。混入の可能性の
40 ある微生物や溶媒中に存在する異物は使用する前にろ過して除
41 き、蓋をした容器に保存し、分析装置は直射日光の当たらない
42 場所に設置する。

43 実験のやり方がアミノ酸分析の質を左右する。装置は実験室
44 内の人通りの少ない場所に設置し、室内は清潔に保つこと。ビペ
45 ト類は保守手順書に従って清潔にし、調整すること。ビペッ
46 トチップは蓋のある箱に保管し、素手でチップをつまんだりし
47 ないこと。実験者はパウダーの付いていないラテックス製の手
48 袋を着用すること。埃がグリシン、セリン及びアラニンの含量
49 を増加させることがあるので、試料バイアルの開け閉めの回数
50 は制限すること。

51 良好な分析結果を得るにはよく手入れされた装置が必要であ
52 る。分析装置が日常的に使用されている場合には、漏れ、検出
53 器・ランプの安定性、カラムの性能を毎日チェックする。装置
54 の全てのフィルター及びその他の点検箇所は規定の保守管理表
55 に従って清掃あるいは交換する。

56 標準物質

57 分析に用いるアミノ酸の標準物質としては市販品が入手可能
58 であり、通常、アミノ酸の混合水溶液となっている。アミノ酸
59 組成を測定する場合、全体の操作が完全であることを示すため
60 に、タンパク質又はペプチドの標準品/標準物質を対照として
61 試料と共に分析する。この目的のためのタンパク質としては高
62 純度のウシ血清アルブミンが用いられる。

63 装置の校正

64 アミノ酸分析装置の校正は通常、標準アミノ酸混液を分析し
65 て行い、各アミノ酸の感度係数や測定範囲を調べる。標準アミ
66 ノ酸混液の各アミノ酸濃度は既知であるので、校正にあたって
67 は、用いる分析方法で直線関係が得られると思われる濃度範囲
68 内の幾つかの異なる濃度に標準アミノ酸混液を希釈し、これら
69 について試験を繰り返す。得られた各アミノ酸のピーク面積を
70 希釈液中の各アミノ酸の既知濃度に対してプロットする。この
71 結果から、あるアミノ酸のピーク面積がアミノ酸濃度と直線関
72 係にある濃度範囲を調べることができる。正確で再現性のある
73 結果を得るには、使用する分析方法での分析限界以内(例えば、
74 直線範囲内)にある濃度の試料を調製することが重要である。

75 各アミノ酸の感度係数を調べるには、4～6種の濃度の標準
76 アミノ酸について分析する。感度係数は標準液中に存在するア
77 ミノ酸1 nmol当たりの平均ピーク面積又は平均ピーク高さとし
78 て算出する。各アミノ酸の感度係数を校正ファイルに記録し
79 ておき、試料中のアミノ酸の算出に利用する。この計算はアミ
80 ノ酸のピーク面積をそのアミノ酸の感度係数で除し、そのアミ
81 ノ酸のnmol数を求める。日常の分析では一点校正で十分であ
82 る。しかしながら、校正ファイルは異常のないことを確認する
83 ために対照標準物質の分析によって十分に吟味され頻繁に更新
84 されている必要がある。

85 再現性

86 一貫した良好な分析結果は試験の再現性に注意を払う実験室
87 から得られるものである。HPLCによるアミノ酸又はその誘導
88 体の分離では、各アミノ酸に対応する多数のピークがクロマト
89 グラム上にみられる。ピークの数が多いため、保持時間でピー
90 クを同定したり、定量のためにピーク領域を積分したりすること
91 ののできる分析システムが必要となる。一般的な再現性の評価
92 では、標準アミノ酸溶液を調製し、同一標準液を用いて多数回
93 (例えば、6回以上)分析を繰り返す。各アミノ酸の保持時間及
94 びピーク面積の相対標準偏差(RSD)を求める。更に、実験者
95 を変えた数日間にわたる複数回の測定で再現性の評価を行う。こ
96 の場合、試料の取扱いに起因する変動も調べるため、標準液の
97 希釈操作も毎回行う。標準タンパク質(例えば、ウシ血清アル
98 ブミン)のアミノ酸組成の分析も再現性の評価の一部としてし
99 ばしば行われる。変動(すなわち、RSD)を評価することによっ
100 て、その実験室から得られる分析値が管理されたものであるこ
101 とを確認するための限度値を設定することができる。最良の結
102 果を得るためには、最も低い実際のな変動の限度値を設定する
103 ことが望ましい。アミノ酸分析の変動を小さくするために注意
104 すべき事柄には、試料の調製、試薬の品質や実験操作に起因す

るスペクトル妨害，装置の性能及び保守，データの解析とその解釈，実験者の技量や癖などがある．バリデーションは，関連する全てのパラメーターについて十分に検討する．

108 試料調製

109 アミノ酸分析の正確な結果を得るためには精製されたタンパク質又はペプチド試料が必要である．緩衝液組成(例えば，塩類，尿素，界面活性剤)は分析に影響を与えることがあるので，分析の前に試料から取り除く必要があるが，一般にポストカラム誘導体化法はプレカラム誘導体化法ほどにはこれらの物質の影響を受けない．汚染の可能性を減少させ，回収率を高め，労力を減少させるためには，試料の処理操作の回数を少なくするほうがよい．タンパク質試料から緩衝液成分を除去する一般的な方法には，1)逆相HPLC装置に試料を注入し，有機性の揮発性溶媒でタンパク質を溶出させ，これを真空遠心分離で乾燥させる；2)揮発性の緩衝液又は水に対して透析する；3)緩衝液を遠心限外ろ過で揮発性の緩衝液又は水に置き換える；4)有機溶媒(例えば，アセトン)でタンパク質を沈殿させる；5)ゲルろ過，などがある．

123 内標準物質

124 アミノ酸分析中での物理的及び化学的損失及び変化をチェックするために，内標準物質を用いることが推奨される．加水分解の前にタンパク質溶液に正確な既知量の内標準物質を添加すると，タンパク質溶液からのアミノ酸の一般的な回収率が内標準物質の回収率から得られる．しかし，タンパク質中のアミノ酸の遊離又は分解の速度には違いがあるため，遊離アミノ酸の加水分解中の挙動はタンパク質に含まれるアミノ酸と同じではない．したがって，加水分解中に生じる損失を補正するために内標準物質を用いるとき，信頼できる結果が得られないことがある．結果を解釈するとき，この点を考慮に入れる必要がある．試料の分析ごとの差異及び試液の安定性や流量の変動を補正するために加水分解後のアミノ酸混液に内標準物質を添加することもできる．理想的には，内標準物質は市販品として入手可能で安価な自然界に存在しない α -アミノ酸がよい．しかも，加水分解に対して安定でなければならず，シグナル強度も濃度と直線関係にあり，他のアミノ酸と重ならない保持時間を持っていることが必要である．一般的に用いられる内標準物質にはノルロイシン，ニトロチロシン又は α -アミノ酪酸がある．

142 タンパク質の加水分解

143 タンパク質及びペプチドのアミノ酸分析にはこれら試料の加水分解が必要である．加水分解用のガラス器具には誤った結果を避けるために極力清浄にしたものを使用する必要がある．加水分解管壁面の指紋や手袋のパウダーは汚染の原因となる．ガラス製加水分解管は，1 mol/L塩酸中で1時間煮沸するか，硝酸又は塩酸／硝酸混液(1：1)に浸して洗浄する．洗浄した加水分解管は高純度の水で洗い，更にHPLC用メタノールで洗う．その後，乾燥器で一夜乾燥し，使用するまで覆いをして保存する．ガラス容器を500℃で4時間乾熱して汚染物を除去してもよい．適当な使い捨ての実験用器具を用いることもできる．

153 酸加水分解は，アミノ酸分析の前にタンパク質試料を加水分解する最も一般的な方法である．この加水分解方法は幾つかのアミノ酸を完全に又は部分的に破壊するため，分析結果に変動をもたらすことがある．トリプトファンは破壊され，セリンとトレオニン是一部破壊され，メチオニンは酸化され，システインは一般にシスチンとして回収される(ただし，シスチンの一

159 部は破壊されたりシステインに還元されるため，通常その回収率は低い)．加水分解容器の内部を適切な真空度(0.0267 kPa未満)にするか不活性ガス(アルゴン)で置換すると酸化による破壊を抑えることができる．イソロイシンやバリンを含むペプチド結合のうち，Ile-Ile，Val-Val，Ile-Val及びVal-Ileのアミド結合は一部しか切断されず，アスパラギンとグルタミンは脱アミド化されてそれぞれアスパラギン酸とグルタミン酸になる．酸加水分解中にトリプトファン，アスパラギン及びグルタミンは消失するため，定量できるのは17種のアミノ酸に限られる．以下に述べる加水分解法の幾つかはこれらの問題に対処するために利用する．また，この加水分解法の幾つか(すなわち，方法4～11)はシステイン，メチオニン，アスパラギン，グルタミンを他のアミノ酸に変換させる方法である．したがって，酸加水分解以外の方法を用いる前に，その方法を用いることの利点と問題点をよく比較検討しておく．

174 一部が破壊されるアミノ酸やペプチド結合の開裂が遅いアミノ酸の濃度を分析するために，時間経過に沿った試験(すなわち，酸加水分解時間24，48及び72時間での分析)がしばしば行われる．不安定なアミノ酸(すなわち，セリンとトレオニン)の測定濃度を加水分解時間に対してプロットし，得られた直線を時間ゼロに外挿することによりそれらの濃度を決定することができる．時間経過に沿った加水分解試験は開裂の遅いアミノ酸(例えば，イソロイシンやバリン)に対しても用いられ，これらのアミノ酸の濃度がプラトーに達した点を調べ，これをこれらのアミノ酸の濃度とする．加水分解時間が長くなりすぎるとこのアミノ酸の濃度は減少し始めるが，これはこの加水分解条件で分解することを示している．

186 時間経過に沿った試験方法に代わる方法として，標準アミノ酸を試料と同一条件で加水分解する方法がある．加水分解において，遊離アミノ酸はペプチド又はタンパク質中の不安定なアミノ酸の分解速度を完全には再現できない．このことは特に開裂の遅いペプチド結合(例えば，Ile-Val結合)についていえる．しかし，この方法によって破壊されるアミノ酸の量を測定することができる．マイクロ波による酸加水分解が利用されている．この方法は迅速ではあるが，特別な機器と注意が必要である．マイクロ波加水分解での至適条件はそれぞれの試料タンパク質又はペプチドについて調べる必要がある．一般にこの方法での処理時間は僅か数分間であるが，1分間の変動でも適切な結果をもたらさない(例えば，不安定なアミノ酸の不完全な加水分解や破壊)．数種のプロテアーゼを用いた完全タンパク質消化も利用されているが，これは処理が複雑で，厳密な調節が必要である．そのため，一般にはタンパク質よりもペプチドに適用される．

202 注：未知タンパク質を初めて分析するときには，異なる加水分解時間や温度条件で実験して至適条件を決定する．

204 方法 1

205 フェノールを含む塩酸を用いた酸加水分解がタンパク質又はペプチドの加水分解に用いられる最も一般的な方法である．フェノールの添加はチロシンのハロゲン化を防止する．

208 加水分解液 フェノールを0.1～1.0%含む6 mol/L塩酸．

209 操作法

210 液相加水分解 試料タンパク質又はペプチドを加水分解管に入れ，乾燥する．(注：試料中の水分で加水分解用の塩酸が希釈されないように，試料を乾燥する．)凍結乾燥タンパク質500

213 μg 当たり加水分解液200 μL を加え、ドライアイス—アセトン
214 浴中で凍結させた後、減圧下で管を熔封する。酸化を防ぐため、
215 通常110°Cで24時間、減圧下又は不活性ガス置換下で試料を加
216 水分解する。タンパク質が完全に加水分解されない懸念がある
217 場合は、長時間の加水分解(例えば、48、72時間)についても調
218 べる。

219 **気相加水分解** この方法は最も一般的な酸加水分解法の一つ
220 であり、試料が少量しか入手できない場合の微量分析に適して
221 いる。塩酸からの試料の汚染も本法を用いることによって最小
222 限に抑えられる。乾燥した試料の入ったバイアル瓶を適当量の
223 加水分解液を入れた容器の中に置く。このとき、加水分解液が
224 試料の入ったバイアル瓶に入らないように注意する。容器の内
225 部を不活性ガスで置換するか減圧(0.0267 kPa未満)にして、約
226 110°Cで24時間加熱する。気体状の酸が乾燥試料を加水分解す
227 る。試料バイアル瓶中での酸の凝結は最小限にする。加水分解
228 後、試料を減圧乾燥して残留する酸を除く。

229 方法 2

230 加水分解によるトリプトファンの酸化は、メルカプトエタン
231 スルホン酸を酸に用いることで減少させることができる。

232 **加水分解液** 2.5 mol/Lメルカプトエタンスルホン酸溶液。

233 **気相加水分解** 試料タンパク質又はペプチド約1 ~ 100 μg を
234 加水分解管に入れ、乾燥する。この加水分解管を加水分解液約
235 200 μL を入れたより大きなガラス管の中に入れ、この管を減
236 圧(約0.0067 kPa)下で熔封し、加水分解液を気化させる。これ
237 を170 ~ 185°Cで約12.5分間加熱する。加水分解後、加水分解
238 管を減圧下で15分間乾燥し、残留する酸を除く。

239 方法 3

240 加水分解によるトリプトファンの酸化はチオグリコール酸を
241 還元剤として用いることによって防げる。

242 **加水分解液** 10%トリフルオロ酢酸、20%チオグリコール
243 酸及び1%フェノールを含む7 mol/L塩酸溶液。

244 **気相加水分解** 試料タンパク質又はペプチド約10 ~ 50 μg を
245 試料管中で乾燥する。この試料管を加水分解液約200 μL を入
246 れたより大きなガラス管の中に入れ、この管を減圧(約0.0067
247 kPa)下で密封してチオグリコール酸を気化させ、166°Cで約15
248 ~ 30分間加熱する。加水分解後、試料管を減圧下で5分間乾燥
249 し、残留する酸を除く。この方法によるトリプトファンの回収
250 率は用いる試料の量に依存する。

251 方法 4

252 タンパク質の加水分解に先立ち、過ギ酸を用いてシステイン
253 /シスチン及びメチオニンを酸化する。

254 **酸化液** ギ酸と30%過酸化水素を9 : 1で混ぜ、1時間室温に
255 放置する。用時製する。

256 **操作法** 試料タンパク質又はペプチドをギ酸20 μL に溶かし、
257 50°Cで5分間加熱した後、酸化液100 μL を加え、10 ~ 30分間
258 放置する。この反応で、システインはシステイン酸に、メチオ
259 ニンはメチオニンスルホンに変換される。過剰の試薬は真空遠
260 心分離して試料から除く。ハロゲン化合物が存在するとチロシ
261 ンの修飾が起こる。過ギ酸酸化したタンパク質は方法1又は方
262 法2で加水分解する。

263 方法 5

264 システイン/シスチンの酸化はアジ化ナトリウムを用いた液
265 相加水分解中に行われる。

266 **加水分解液** 0.2%のフェノールを含む6 mol/L塩酸にアジ化

267 ナトリウムを最終濃度0.2 w/v%になるように加える。フェノ
268 ールはチロシンのハロゲン化を防止する。

269 **液相加水分解** 試料タンパク質又はペプチドを約110°Cで24
270 時間加水分解する。この加水分解中に、試料中のシステイン/
271 シスチンは加水分解液に含まれるアジ化ナトリウムによってシ
272 ス테인酸に変換される。この方法は方法4よりもチロシンの
273 回収率はよいが、メチオニンは定量的に回収されない。メチオ
274 ニンは一部が酸化されて、メチオニンスルホキシド及びメチオ
275 ニンスルホンに変わる。

276 方法 6

277 システイン/シスチンの酸化はジメチルスルホキシドで行わ
278 れる。

279 **加水分解液** 0.1 ~ 1.0%のフェノールを含む6 mol/L塩酸に
280 ジメチルスルホキシドを最終濃度2 vol%になるように加える。

281 **気相加水分解** 試料タンパク質又はペプチドを約110°Cで24
282 時間加水分解する。この加水分解中に、試料中のシステイン/
283 シスチンは加水分解液に含まれるジメチルスルホキシドによっ
284 てシステイン酸に変換される。ばらつきを少なくし、部分破壊
285 を補正する方法として、タンパク質1 mol当たり1 ~ 8 molのシ
286 ス테인を含む標準タンパク質を酸化的加水分解して得られる
287 システイン酸の回収率を調べることが推奨される。タンパク質
288 又はペプチドの加水分解物からの回収率は、加水分解していな
289 いシステイン酸標準品からの回収率より一般に約30%低い。
290 ヒスチジン、メチオニン、チロシン及びトリプトファンも修飾
291 されるので、本法では完全なアミノ酸組成分析は行えない。

292 方法 7

293 システイン/シスチンの還元及びアルキル化は気相ピリジル
294 エチル化反応で行われる。

295 **還元液** ピリジン83.3 μL 、4-ビニルピリジン16.7 μL 、トリ
296 プチルホスフィン16.7 μL 及び水83.3 μL を適当な容器にとり、
297 混和する。

298 **操作法** 試料タンパク質又はペプチド(1 ~ 100 μg)を加水
299 分解管にとり、この管をより大きなガラス管の中に入れる。大き
300 いガラス管の中に還元液を入れ、減圧(約0.0067 kPa)下で密封
301 し、約100°Cで5分間放置する。次に、加水分解管を取り出し、
302 減圧デシケーター中で15分間乾燥し、残留する試薬を除く。
303 ピリジルエチル化したタンパク質又はペプチドは前記の方法で
304 酸加水分解する。このピリジルエチル化反応をタンパク質1
305 mol当たり1 ~ 8 molのシステインを含む標準タンパク質につ
306 いて同時に行い、ピリジルエチル化システインの回収率を補正
307 する。ピリジルエチル化反応を長時間行くと、タンパク質中の
308 末端 α -アミノ基及びリシンの ϵ -アミノ基が修飾される可能
309 性がある。

310 方法 8

311 システイン/シスチンの還元及びアルキル化は液相ピリジル
312 エチル化反応で行われる。

313 **原液** 次の3種類の原液を調製し、ろ過する。原液A : 4
314 mmol/Lエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含むpH 8.5の
315 1 mol/Lトリス緩衝液、原液B : 8 mol/L塩酸グアニジン溶液、
316 原液C : 10% 2-メルカプトエタノール溶液。

317 **還元液** 原液B/原液A混液(3 : 1)を調製し、6 mol/L塩酸グ
318 アニジンを含む0.25 mol/Lトリス緩衝液とする。

319 **操作法** 試料約10 μg を還元液50 μL に溶かし、原液C約2.5
320 μL を加える。この液を窒素あるいはアルゴンの存在下で暗所

321 に室温で2時間放置する。次に、この液に4-ビニルピリジン
322 約2 μL を加え、更に2時間室温で暗所に放置してピリジルエチ
323 ル化反応を行う。逆相HPLCを用いてタンパク質又はペプチド
324 画分を集め、脱塩する。脱塩した試料は酸加水分解する前に、
325 真空遠心分離で乾燥させる。

326 方法 9

327 システイン/シスチンの還元及びアルキル化は液相カルボキ
328 シメチル化反応で行われる。

329 原液 方法8に従って調製する。

330 カルボキシメチル化溶液 エタノール(95) 1 mL当たりヨー
331 ドアセタミド100 mgを含む液を調製する。

332 緩衝液 方法8で調製した還元液を用いる。

333 操作法 試料を緩衝液50 μL に溶かし、原液C約2.5 μL を加
334 える。これを窒素又はアルゴンの存在下で暗所に室温で2時間
335 放置する。次に、総チオールの理論量の1.5倍量のカルボキシ
336 メチル化溶液を加え、暗所に室温で更に30分間放置する。
337 (注：タンパク質のチオール含量が不明の場合には、タンパク
338 質20 nmol当たり100 mmol/Lヨードアセタミド溶液5 μL を加
339 える。)反応は過剰の2-メルカプトエタノールを加えて停止さ
340 せる。タンパク質又はペプチドの脱塩は逆相HPLCによる分離
341 で行う。酸加水分解する前に、集めた試料は真空遠心分離で乾
342 燥させる。生成したS-カルボキシアミドメチルシステインは
343 酸加水分解の過程でS-カルボキシメチルシステインに変化す
344 る。

345 方法 10

346 システイン/シスチンはジチオジグリコール酸又はジチオジ
347 プロピオン酸と反応して混合ジスルフィドを生成する。(注：
348 ジチオジグリコール酸又はジチオジプロピオン酸のいずれを用
349 いるかはアミノ酸分析からどのような結果を望むかによる。)

350 還元液 ジチオジグリコール酸(又はジチオジプロピオン酸)
351 の0.2 mol/L水酸化ナトリウム溶液(1→100)を調製する。

352 操作法 試料約20 μg を加水分解管に入れ、還元液5 μL を加
353 える。これに2-プロパノール10 μL を加え、真空遠心分離で
354 水分を除去した後、方法1により加水分解する。この方法の利
355 点は、他のアミノ酸残基が副反応によって誘導体化されず、ま
356 た加水分解前の試料の脱塩が不必要な点である。

357 方法 11

358 酸加水分解によってアスパラギンとグルタミンはそれぞれア
359 スパラギン酸とグルタミン酸に変換され、アスパラギンとアス
360 パラギン酸を合わせてAsxで表し、グルタミンとグルタミン酸
361 を合わせてGlxで表す。タンパク質又はペプチドはビス(1,1-
362 トリフルオロアセトキシ)ヨードベンゼン(BTI)と反応し、加水
363 分解によってアスパラギン及びグルタミンはそれぞれジアミノ
364 プロピオン酸及びジアミノ酪酸に変化する。この変化によりア
365 スパラギン酸及びグルタミン酸を含むタンパク質又はペプチド
366 中のアスパラギン及びグルタミンの含量を測定することができ
367 る。

368 還元液 次の3種類の溶液を調製し、ろ過する。溶液A：10
369 mmol/Lトリフルオロ酢酸溶液、溶液B：5 mol/L塩酸グアニジ
370 ン及び10 mmol/Lトリフルオロ酢酸を含む水溶液、溶液C：用
371 時調製したビス(1,1-トリフルオロアセトキシ)ヨードベンゼ
372 ンのN,N-ジメチルホルムアミド溶液(9→250)。

373 操作法 洗浄した加水分解管に試料約200 μg をとり、溶液A
374 又は溶液B 2 mL及び溶液C 2 mLを加え、減圧下で加水分解管

375 を密封する。これを暗所で60℃、4時間加熱する。次にこの試
376 料を水に対して透析し、過剰の試薬を除く。透析した試料を同
377 量のn-ブチル酢酸で3回抽出した後、凍結乾燥する。このタ
378 ンパク質試料を前述した方法で酸加水分解する。ジアミノプロ
379 ピオン酸及びジアミノ酪酸はアミノ酸分析で用いるイオン交換
380 クロマトグラフィーでは通常リシンとは分離しない。したがっ
381 て、アミノ酸分離モードでイオン交換クロマトグラフィーを行っ
382 たときは、アスパラギン及びグルタミンの含有量は非誘導体化
383 酸加水分解とBTI誘導体化酸加水分解で得られたアスパラギン
384 酸及びグルタミン酸の量の差として求められる。(注：トレオ
385 ニン、メチオニン、システイン、チロシン及びヒスチジンの測
386 定値はBTI誘導体化によって変動することがある。したがって、
387 これらのアミノ酸の組成を求める場合は、BTIを用いない加水
388 分解法を行う必要がある。)

389 アミノ酸分析の方法論とその基本原理

390 アミノ酸の分析には多くの方法があり、どの方法を選ぶかは
391 測定に要求される感度に依存する。一般に、用いられているほ
392 ぼ半数の方法はイオン交換クロマトグラフィーで遊離アミノ酸
393 を分離した後に誘導体化(例えば、ニンヒドリンやo-フタルア
394 ルデヒドによる誘導体化)して検出するポストカラム法である。
395 この方法は塩類や尿素などの少量の緩衝液成分を含む試料に利
396 用することができ、1分析当たり通常5～10 μg のタンパク質試
397 料を必要とする。その他の方法は一般に遊離アミノ酸を誘導体
398 化(例えば、フェニルイソチオシアネート、6-アミノキノイ
399 ル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメイト、o-フタ
400 ルアルデヒド、(ジメチルアミノ)アゾベンゼンスルホニクロ
401 リド、9-フルオレニルメチルクロロギ酸、7-フルオロ-4-
402 ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールなどによる誘導体
403 化)した後に逆相HPLCで分離するプレカラム法である。この
404 方法は感度が非常に高く、通常1分析当たり0.5～1.0 μg のタ
405 ンパク質試料でよいが、試料中の塩類の影響を受けやすい。更
406 に、複数のアミノ酸誘導体を生じ、結果の解釈を複雑にする可
407 能性がある。操作上の変動に対して、一般にポストカラム法の
408 ほうがプレカラム法に比べて影響を受けにくい。

409 次に掲げる方法がアミノ酸の定量分析に利用できる。これら
410 の方法に用いる装置及び試薬類は市販されている。これらの方
411 法には、試液の調製法、反応の操作法、クロマトグラフィーの
412 システムなどが異なる多くの変法がある。特定のパラメーター
413 は実際に使用する装置や操作によって変わってくる。多くの実
414 験室では各方法の持つ利点を利用するために複数の分析方法を
415 用いている。これらの各方法では、アナログ信号がデータ取り
416 込み装置によって視覚化され、定量するためにピーク面積が計
417 算される。

418 方法 1 ニンヒドリンによるポストカラム検出法

419 ポストカラムでニンヒドリンにより検出するイオン交換クロ
420 マトグラフィーは定量的アミノ酸分析に利用される最も一般的
421 な方法の一つである。通例、より複雑な生体試料の分析には Li^+
422 を基本とした陽イオン交換系を利用し、 Na^+ を基本とした陽イ
423 オン交換系はタンパク質の加水分解で得られる単純なアミノ酸
424 混合物(通常17種のアミノ酸成分を含む)の分析に用いられる。
425 イオン交換カラム上でのアミノ酸の分離はpH及びイオン強度
426 の変化を組み合わせで行われる。分離を良くするために温度の
427 勾配変化もしばしば使用される。

428 アミノ酸がニンヒドリンと反応すると、特徴的な紫色又は黄

色を呈する。イミノ酸以外のアミノ酸は紫色を呈し、波長570 nmに吸収の極大を示す。プロリンのようなイミノ酸は黄色を呈し、波長440 nmに吸収の極大を示す。カラムから溶出したアミノ酸とニンヒドリンの反応は440 nmと570 nmの両波長で記録し、得られたクロマトグラムはアミノ酸組成の決定に利用される。

検出限界はほとんどのアミノ酸で約10 pmolであるが、プロリンでは約50 pmolである。20 pmolから500 pmolの範囲で相関係数0.999以上の良好な直線性が得られる。良好な組成値を求めるには、加水分解前の量として1 µg以上のタンパク質試料を用いるのがこの分析方法にとって最も適している。

方法2 OPAによるポストカラム蛍光検出法

o-フタルアルデヒド(OPA)はチオール化合物の存在下で一級アミンと反応し、強い蛍光を持つイソインドール化合物を生成する。この反応は、イオン交換クロマトグラフィーによるアミノ酸分析のポストカラム誘導体化法として利用される。アミノ酸の分離は方法1と同じ原理である。この方法を用いたアミノ酸分析装置とその試薬は市販されている。また、この方法には多くの変法がある。

OPAは二級アミン(プロリンなどのイミノ酸)とは反応しないので、OPAと反応するように二級アミンを次亜塩素酸ナトリウムで酸化し、蛍光誘導体を生成させる。強酸性陽イオン交換カラムを用いて遊離アミノ酸を分離し、続いて次亜塩素酸ナトリウムで酸化し、OPA及び*N*-アセチル-L-システインや2-メルカプトエタノールのようなチオール化合物を用いて誘導体化する。 α -アミノ酸の誘導体化は次亜塩素酸ナトリウムの影響をほとんど受けない。

イオン交換カラムでのアミノ酸の分離はpH及びイオン強度の変化を組み合わせて行う。溶出したアミノ酸をOPAで誘導体化した後、反応物を蛍光検出器に通過させる。OPA-誘導体化アミノ酸の蛍光強度は励起波長348 nm、蛍光波長450 nmで測定する。

検出限界はほとんどのアミノ酸誘導体で数10 pmolのレベルである。数pmolから数10 nmolの範囲で直線性が得られる。良好な組成値を求めるには、加水分解前の量として500 ng以上の試料で分析を始めるのがこの方法にとって最も適している。

方法3 PITCプレカラム誘導体化法

フェニルイソチオシアネート(PITC)はアミノ酸と反応してフェニルチオカルバミル(PTC)誘導体を生成する。この誘導体は波長254 nmで高感度に検出することができる。そのため、アミノ酸をPITCで誘導体化し、逆相HPLCで分離した後に紫外吸光度計で検出し、アミノ酸組成を分析する。

誘導体化されたアミノ酸は、試薬を減圧下で除いた後、乾燥して凍結すれば数週間は安定に保存することができる。装置に注入するために溶解したものは、冷所に保存すれば、3日間クロマトグラフ上での目立った変化は起こらない。

ODSカラムを用いた逆相HPLCでのPTC-アミノ酸の分離はアセトニトリル濃度と緩衝液のイオン強度の変化を組み合わせで行う。カラムから溶出したPTC-アミノ酸は波長254 nmで検出する。

検出限界はほとんどのアミノ酸誘導体で1 pmolである。20 pmolから500 pmolの範囲で相関係数0.999以上の良好な直線性が得られる。良好な組成値を求めるには、加水分解前の量として500 ng以上の試料を用いるのがこの分析方法にとって最も

適している。

方法4 AQCプレカラム誘導体化法

カラムに導入する前にアミノ酸を6-アミノキノリル-*N*-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメイト(AQC)で誘導体化し、逆相HPLCで分離した後に蛍光光度計で検出する方法である。

AQCはアミノ酸と反応して安定な蛍光性尿素誘導体(AQC-アミノ酸)を生成する。AQC-アミノ酸は逆相HPLCで容易に分析できる。したがって、AQCでアミノ酸を誘導体化し、逆相HPLCで分離することによって、アミノ酸組成を分析することができる。

ODSカラムでのAQC-アミノ酸の分離はアセトニトリル濃度と塩濃度の変化を組み合わせで行う。この誘導体の蛍光は励起波長250 nm、蛍光波長395 nmで選択的に検出できるので、反応液を直接カラムに注入しても蛍光試薬の主要な副生成物である6-アミノキノリンの妨害はほとんど受けない。過剰の試薬は直ちに6-アミノキノリン、*N*-ヒドロキシスクシンイミド及び二酸化炭素に加水分解されるので($t_{1/2} < 15$ 秒)、1分後にはもはや誘導体化反応は起こらない。

AQC-アミノ酸のピーク面積は反応液を室温で放置しても少なくとも1週間は変化しない。この誘導体は非常に安定であるので、自動分析装置で一晩中分析することができる。

検出限界はシステイン以外のアミノ酸で約40 ~ 320 fmolであり、システインの検出限界は約800 fmolである。2.5 ~ 200 µmol/Lの範囲で相関係数0.999以上の良好な直線性が得られる。良好なデータは、試料タンパク質又はペプチド30 ngに対応する加水分解物の分析で得られる。

方法5 OPAプレカラム誘導体化法

カラムに導入する前にアミノ酸を*o*-フタルアルデヒド(OPA)で誘導体化し、逆相HPLCで分離した後に蛍光光度計で検出する方法である。この方法では二級アミンのアミノ酸(例えば、プロリン)は検出しない。

OPAはチオール試薬の共存下で一級アミンと反応し、強い蛍光を持つイソインドール化合物を生成する。2-メルカプトエタノールや3-メルカプトプロピオン酸がチオール化合物として用いられる。OPAはそれ自体が蛍光を持たないので、妨害ピークは現れない。更に、速やかに反応することに加えて、水によく溶け、水溶液での安定性が高いことから、誘導体化と分析を自動化しやすい。この自動化には試料と試薬を混合するためのオートサンプラーを使用する。しかし、二級アミンと反応しないことが大きな欠点であり、この方法では二級アミンとして存在するアミノ酸(例えば、プロリン)が検出できない。この欠点を補うために、方法7又は方法8の分析法を組み合わせで行う。

OPAでプレカラム誘導体化したアミノ酸は逆相HPLCで分離する。OPA-アミノ酸誘導体は不安定であるので、HPLCでの分離と分析は誘導体化した後直ちに行う。HPLCにはアミノ酸誘導体を検出するために蛍光検出器を取り付ける。OPA-アミノ酸誘導体の蛍光強度は励起波長348 nm、蛍光波長450 nmで測定する。

検出限界は50 fmol以下といわれているが、実際の分析における限界は1 pmolである。

方法6 DABS-Clプレカラム誘導体化法

アミノ酸を(ジメチルアミノ)アゾベンゼンスルホニルクロリド(DABS-Cl)で誘導体化し、逆相HPLCで分離して可視光で検

537 出する方法である。

538 DABS-Clはアミノ酸の標識に用いる発色性試薬である。
539 DABS-Clで標識したアミノ酸(DABS-アミノ酸)は非常に安定
540 であり、波長436 nmに極大吸収を示す。

541 19種の天然にある全てのアミノ酸のDABS誘導体は、アセト
542 ニトリルと緩衝液からなるグラジエント溶出系を用いた逆相
543 HPLCのODSカラムで分離することができる。カラムから分
544 離して溶出したDABS-アミノ酸は可視領域の波長436 nmで
545 検出する。

546 この方法はプロリンのようなイミノ酸も他のアミノ酸と同程
547 度の感度で測定できる。また、「タンパク質の加水分解」の項
548 の方法2に示した加水分解法、すなわちメルカプトエタンスル
549 ホン酸、*p*-トルエンスルホン酸又はメタンスルホン酸のよう
550 なスルホン酸類でタンパク質又はペプチドを加水分解すること
551 によって、DABS-Cl誘導体化法はトリプトファンも同時に定
552 量できる。アスパラギンやグルタミンのような酸に不安定なア
553 ミノ酸も、「タンパク質の加水分解」の項の方法11に示した
554 タンパク質又はペプチドのBTI処理でそれぞれをジアミノプロ
555 ピオン酸及びジアミノ酪酸に変換することによって分析するこ
556 とができる。

557 非タンパク質性アミノ酸であるノルロイシンは、 α -アミ
558 ノ酸のピークと重なって溶出するので、本法の内標準物質とし
559 ては使用できない。ニトロチロシンはいずれのアミノ酸ピーク
560 とも重ならないので、内標準物質に使用できる。

561 DABS-アミノ酸の検出限界は約1 pmolである。2～5 pmol
562 の各DABS-アミノ酸が信頼性を持って定量的に測定でき、1
563 分析当たりDABS化したタンパク質加水分解物10～30 ngが必要
564 である。

565 方法7 FMOC-Cl プレカラム誘導体化法

566 9-フルオレニルメチルクロロギ酸(FMOC-Cl)によりアミノ
567 酸を誘導体化し、これを逆相HPLCで分離して蛍光で検出する
568 方法である。

569 FMOC-Clは一級アミンと二級アミンの両方と反応し、強い
570 蛍光を持つ物質を生成する。アミノ酸とFMOC-Clの反応は水
571 溶液中、緩やかな条件下で進行し、30秒で反応は完了する。こ
572 の誘導体は安定であるが、ただヒスチジン誘導体だけは分解し
573 ていく。FMOC-Clはそれ自身が蛍光を持っているが、過剰の
574 この試薬と蛍光性副生成物はFMOC-アミノ酸を消失させる
575 ことなく除くことができる。

576 FMOC-アミノ酸はODSカラムを用いた逆相HPLCで分離
577 される。この分離は、酢酸塩緩衝液/メタノール/アセトニト
578 リル混液(5:4:1)から酢酸塩緩衝液/アセトニトリル混液
579 (1:1)に直線的に変化させるグラジエント溶出で行われ、20種
580 のアミノ酸誘導体は20分で分離される。カラムから溶出した
581 各誘導体は励起波長を260 nm、蛍光波長を313 nmに設定した
582 蛍光光度計で検出される。

583 検出限界は数fmolである。0.1～50 μ mol/Lの範囲でほとん
584 どのアミノ酸は直線性を示す。

585 方法8 NBD-Fプレカラム誘導体化法

586 7-フルオロ-4-ニトロベンゼン-2-オキサー-1,3-ジエ
587 ン(7-F)によりアミノ酸を誘導体化し、これを逆相
588 HPLCで分離して蛍光で検出する方法である。

589 NBD-Fは一級アミンと二級アミンの両方と反応し、強い蛍
590 光を持つ物質を生成する。アミノ酸はNBD-Fと60℃で5時間加

591 熱することによって誘導体化される。NBD-アミノ酸誘導体
592 は、アセトニトリルと緩衝液の混液からなるグラジエント溶出
593 系を用いることによって逆相HPLCのODSカラムで分離され、
594 17種のアミノ酸誘導体は35分で分離される。 ϵ -アミノカプ
595 ロン酸はクロマトグラム領域の平坦部に溶出するので、内標準
596 物質として使用できる。カラムから溶出した各誘導体は励起波
597 長を480 nm、蛍光波長を530 nmに設定した蛍光光度計で検出
598 される。

599 この方法の感度は、OPAと反応しないプロリンを除いて、
600 OPAプレカラム誘導体化法(方法5)の感度とほとんど同じであ
601 り、OPAと比べてNBD-Fのほうが都合がよいかもしれない。
602 各アミノ酸の検出限界は約10 fmolである。最終の標識反応溶
603 液中に約1.5 μ gのタンパク質加水分解物が含まれていれば、分
604 析することができる。

605 データの計算と解析

606 タンパク質又はペプチドの加水分解物中のアミノ酸含量を測
607 定するときには、酸加水分解の段階でトリプトファンとシステ
608 インが分解されていることに注意する必要がある。セリンとト
609 レオニンは酸加水分解により一部が分解され、イソロイシンと
610 バリンは一部しか遊離されないことがある。メチオニンは酸加
611 水分解中に酸化を受け、また、あるアミノ酸(例えば、グリシ
612 ンやセリン)は外部から混入しやすい。気相加水分解で反応容
613 器中を適切な真空度(0.0267 kPa未満)にするか、又は不活性ガ
614 ス(アルゴン)で置換すると酸化による破壊の程度を低くするこ
615 とができる。したがって、タンパク質又はペプチドの加水分解
616 物中のシステイン、トリプトファン、トレオニン、イソロイシ
617 ン、バリン、メチオニン、グリシン及びセリンの定量値は変動
618 しやすく、その解析にはより一層の検討と考察が必要である。

619 計算

620 **アミノ酸のモル%** アミノ酸のモル%とは、タンパク質中の
621 100アミノ酸残基当たりの特定アミノ酸残基数である。この値
622 は試験するタンパク質の分子量が明らかでないときのアミノ酸
623 分析データを評価するのに有用である。この情報はタンパク質
624 又はペプチドの同定やその他の目的に利用できる。それぞれの
625 分析方法に従って得られたピークを注意深く同定し、面積を測
626 定する。試料中の各アミノ酸のモル%を次式により計算する。

$$627 \quad 100 \, r_U / r$$

628 r_U : 個々のアミノ酸のピーク面積から求めた量(nmol)

629 r : 試料中の全アミノ酸のピーク面積から求めた量(nmol)の
630 合計

631 得られた各アミノ酸のモル%を既知タンパク質のそれと比較
632 することにより試料タンパク質を同定することができる。

633 **未知タンパク質試料** このデータ解析法は、アミノ酸分析デ
634 ータを用いて未知タンパク質試料のタンパク質濃度を推定する
635 のに利用できる。次式により回収された各アミノ酸の質量(μ g)
636 を計算する。

$$637 \quad m M_w / 1000$$

638 m : 回収されたアミノ酸の量(nmol)

639 M_w : ペプチド結合で除かれた水分子の質量を補正したアミ
640 ノ酸の平均分子量

641 回収されたアミノ酸の質量の総計は、部分的又は完全に破壊

642 されたアミノ酸を適切に補正した後のタンパク質の総質量の推
 643 定値となる。未知タンパク質の分子量がSDS-PAGEや質量分
 644 析でわかれば、そのアミノ酸組成が予測できる。次式により各
 645 アミノ酸の残基数を計算する。

$$646 \quad m / (1000 M / M_{WT})$$

647 m : 回収されたアミノ酸の量(nmol)

648 M : タンパク質の総質量(μg)

649 M_{WT} : 未知タンパク質の分子量

650 **既知タンパク質試料** このデータ解析法は、分子量とアミノ
 651 酸組成が既知のタンパク質試料のアミノ酸組成及びタンパク質
 652 濃度をアミノ酸分析データを用いて調べるのに利用できる。分
 653 析しようとするタンパク質のアミノ酸組成が明らかなきには、
 654 あるアミノ酸の回収率は良好であるが、他のアミノ酸の回収率
 655 が完全又は部分的な破壊(例えば、トリプトファン、システイ
 656 ン、トレオニン、セリン、メチオニン)やペプチド結合の不完
 657 全開裂(すなわち、イソロイシンとバリンの開裂)又は遊離アミ
 658 ノ酸の外部からの混入(すなわち、グリシンやセリンの混入)の
 659 ために必ずしも十分でない場合にこの解析法を活用することが
 660 できる。

661 回収率の最も良いアミノ酸はそのタンパク質を代表している
 662 ので、そのアミノ酸がタンパク質を定量するのに利用される。
 663 一般に回収率の良いアミノ酸にはアスパラギン酸/アスパラギ
 664 ン、グルタミン酸/グルタミン、アラニン、ロイシン、フェニ
 665 ルアラニン、リシン、アルギニンがある。これら回収率の良い
 666 アミノ酸の種類は各自の分析装置での経験によって変わる。回
 667 収率の良い各アミノ酸の量(nmol数)をそのアミノ酸の理論量で
 668 除し、回収率の良い各アミノ酸に基づいたタンパク質量を求め、
 669 これらの値を平均する。回収率の良い各アミノ酸によって求め
 670 たタンパク質量は平均値に対して均等に分布していなければな
 671 らない。平均値から大きくはずれた値は除外する。通常、平均
 672 値からの偏差が5%を超えるものは除外の対象と考えられる。
 673 残りの値から平均値を再計算して試料のタンパク質量を求める。
 674 各アミノ酸の含量を計算で求めた平均タンパク質含量で除して
 675 試料のアミノ酸組成を求める。

676 相対組成誤差(%)を次式により計算する。

$$677 \quad 100 m / ms$$

678 m : アミノ酸の実測値(アミノ酸残基当たりのnmol)

679 ms : 当該アミノ酸の理論量

680 平均相対組成誤差は各アミノ酸の相対組成誤差の絶対値の平
 681 均であり、通常、トリプトファン及びシステインはこの計算か
 682 らは除かれる。この平均相対組成誤差はアミノ酸分析の全過程
 683 が適切に行われたかどうかについての重要な情報となる。タン
 684 パク質試料のアミノ酸組成と既知組成との一致性は試料中のタ
 685 ンパク質の同定と純度の保証に利用できる。

686