



Title	N-Mansyl-N'-bromoacetylenediamineの合成法とチオール化ウサギ血清アルブミンとの反応
Author(s)	関川, 勲; 小野寺, 昌彦; 塩川, 洋之
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 38, 53-55
Issue Date	1978-03
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/26509">http://hdl.handle.net/2115/26509</a>
Type	bulletin (article)
File Information	38_P53-55.pdf



[Instructions for use](#)

# N-Mansyl-N'-bromoacetylethylenediamine の合成法と チオール化ウサギ血清アルブミンとの反応

関川 勲\* 小野寺昌彦\*\* 塩川洋之\*\*

(北海道大学免疫科学研究所 \*化学部門・\*\*生化学部門)

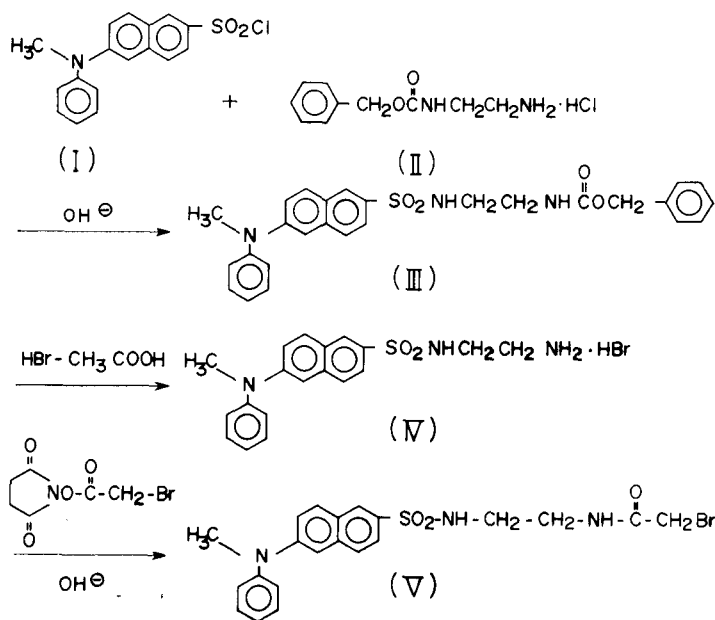
(昭和 52 年 11 月 25 日受付)

我々は前報で、N-methyl-2-anilidonaphthalene-6-sulfonyl 基 (MANS 基) が抗 MANS 抗体に結合すると、MANS 基の蛍光が数百倍に増加することと、結合 MANS 基の蛍光極大波長が抗 MANS 抗体結合部位の構造を反映して変化することを述べた<sup>1-3)</sup>。これらのことから、MANS 基は抗体量の変化、クローンの比較、結合部位構造の研究に適したハブテンであると結論した。

この論文では、抗 MANS 抗体の結合部位に特異的に MANS 基を共有結合で結合させる目的で開発した affinity labeling 試薬、N-mansyl-N'-bromoacetylethylenediamine の合成法を述べる。Bromoacetyl 基の臭素はカルボニル基の電子吸引性の為に反応性が高く、温和な条件下でシステインの SH 基、チロシンの

OH 基、リジンの NH<sub>2</sub> 基などと反応することが知られているので<sup>4-6)</sup>、この affinity labeling 試薬の MANS 基の部分が抗 MANS 抗体の結合部位に結合すると同時に、bromoacetyl 基が結合部位又は近傍のこれらアミノ酸残基と反応を開始すると期待できる。

N-Mansyl-N'-bromoacetylethylenediamine (V) は Scheme 1 に従って合成した。先ず最初に、W. B. Lawson 等の方法<sup>7)</sup> によって得られた N-benzyloxycarbonylethylenediamine (II) と mansylchloride(I)<sup>8)</sup> とを塩基の存在下に縮合せしめ、N-mansyl-N'-benzyloxycarbonylethylenediamine (III) とした。(III) の PMR スペクトルは  $\delta$  5.1~5.5 の範囲に 2 個分の broad のシグナルが存在するが、之は D<sub>2</sub>O を加える事により消失するので、-SO<sub>2</sub>-NH-, -CO-NH- のシ

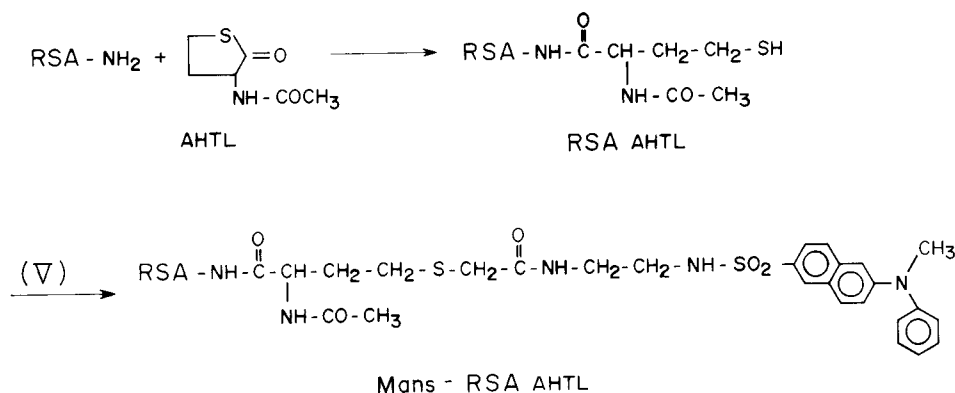


Scheme 1

グナルと考えられる。次に (III) の脱ベンジルオキシカルボニルの為に, (III) を 13% HBr-CH<sub>3</sub>COOH で処理すると, 加水分解が進むにつれて炭酸ガスを発生し約 15 分後に黄色の油状の N-mansylethylenediamine hydrobromide (IV) が析出し結晶化する。此の hydrobromide (IV) と O-bromoacetyl-N-hydroxysuccinimide ester との縮合反応は, P. H. Strausbauch 等の方法<sup>5)</sup>によった。得られた N-mansyl-N'-bromoacetyl-ethylenediamine (V) の PMR スペクトルは -CO-CH<sub>2</sub>-Br のシグナルが  $\delta$  3.72 に, -SO<sub>2</sub>-NH- と -CO-NH- のシグナルが aromatic hydrogen の領域に観

察された。IR スペクトルは (III) の carbomate に由来する 1690 cm<sup>-1</sup> の吸収が消失し, 新たに 1640 cm<sup>-1</sup> に sec. amide の吸収がみられた。

次にウサギの血清アルブミン (RSA) に (V) を結合させた。その際, 結合部位を増やす為に F. H. White Jr. の方法<sup>9)</sup> (Scheme 2) を利用して蛋白の表面に多数の SH 基を導入した。すなわち RSA を N-acetylhomocysteine thiolactone (AHTL) でチオール化し, 生成した RSA<sub>AHTL</sub> に塩基の存在下に (V) を反応せしめた。得られた MANS-RSA<sub>AHTL</sub> は RSA<sub>AHTL</sub> 1 mole あたり 28 mole の MANS 基が結合している。



Scheme 2

### 実験の部

IR スペクトルは島津分光光度計 IR-27G 型, NMR スペクトルは日立 R-20B 型により測定し, NMR スペクトルデータは TMS を内部標準とする  $\delta$  値で示した。

#### N-Mansyl-N'-benzyloxycarbonylethylenediamine (III)

N-Benzyloxycarbonylethylenediamine 塩酸塩(II)<sup>7)</sup> 2.3 gr, 無水炭酸ナトリウム 0.8 gr をピリジン 20 ml, トリエチルアミン 10 ml の混合物に加え, 室温で攪拌下に mansylchloride (I) 3.3 gr のベンゼン溶液 60 ml を滴下し, 2 時間攪拌した後, 更に 60°C で 6 時間攪拌を続ける。冷却後不溶物を濾別し, 濾液を減圧で濃縮し, 残渣を酢酸エチルに溶解し, 水, 希塩酸, 水で洗滌後, 硫酸ナトリウムで乾燥, 酢酸エチルを留去し, 残留物に少量のアルコールを入れると, 約 1.7 gr の結晶を得る。之をベンゼン-チクロヘキサンより再結晶して, mp 103° 半融 110~113°C の白色結晶 1.4 gr (29%) を得る。分析値 C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S としての理論値 C, 66.24; H, 5.56; N, 8.58. 実測値 C, 65.99; H, 5.52; N, 8.33%.

IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$  cm<sup>-1</sup>: 3300, 3250 (NH), 1690, 1540 (-NH-C(=O)-), 1590, 1490 (aromatic), 1320, 1150 (-SO<sub>2</sub>-). NMR (CDCl<sub>3</sub>): 3.0~3.5 (4H, m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.42 (3H, s, >N-CH<sub>3</sub>), 5.02 (2H, s, -O-CH<sub>2</sub>-Ar), 5.1~5.5 (2H, br, >NH), 7.1~8.2 (16H, aromatic)

#### N-Mansyl-N'-bromoacetyl-ethylenediamine (V)

N-Mansyl-N'-benzyloxycarbonylethylenediamine (III) 1.2 gr を酢酸 5 ml に溶解し, 13% HBr-CH<sub>3</sub>CO-OH 溶液 12 ml を加え, 15 分間室温に放置すると油状物質が析出する。無水エーテル 100 ml を加えると N-mansylethylenediamine hydrobromide (IV) が白色結晶となる。収量 0.78 gr (74%)。此の結晶をジオキサン 10 ml, 1 規定の水酸化ナトリウム 2.5 ml, 1 規定の炭酸水素ナトリウム 5.0 ml の混合溶液に溶かし, 之に N-hydroxysuccinimide 0.27 gr と, bromoacetyl bromide 0.72 gr より得られた O-bromoacetyl-N-hydroxysuccinimide ester のジオキサン溶液 15 ml を室温で攪拌下に滴下する。更に 6 時間攪拌を続けた後, 不溶物を濾別し, 濾液を減圧下に濃縮し残渣を酢酸エチルで抽出,

水洗・乾燥後酢酸エチルを留去すると、白色結晶 0.78 gr を得る。之をシリカゲル 7 gr を用いてクロマトグラフィに付し、ベンゼン-クロロフォルム=1:4 (v/v) 溶出部からの結晶をアルコール 10 ml より再結晶すると mp. 157~158°C の白色結晶 0.6 gr (70%) を得る。分析値  $C_{21}H_{22}BrN_3O_3S$  としての理論値 C, 52.94; H, 4.65; N, 8.82. 実測値 C, 52.78; H, 4.65; N, 8.81%. IR $_{\text{max}}^{\text{NaCl}}$

$\text{cm}^{-1}$ : 3280 (NH), 1640, 1540 ( $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-$ ), 1590, 1490 (aromatic), 1325, 1150 ( $-\text{SO}_2-$ ). NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.82~3.50 (4H, m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 3.40 (3H, s,  $>\text{N}-\text{CH}_3$ ), 3.72 (2H, s,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ ), 7.1~8.2 (13H, aromatic,  $>\text{NH}$ ).

#### チオール化 RSA の作製

800 mg の N-acetylhomocysteine thiolactone (AHTL) を 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 10 ml に溶解し、窒素ガスを通し酸素を除去する。次に RSA 結晶粉末 200 mg を加え溶解し、一昼夜搅拌しながら放置する。セファデックス G-50 (coarse) カラムを通し、0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (脱酸素) 溶液 (pH 7.9) で溶出する。155 mg の蛋白質溶液 10 ml を得た。SH 基 (エルマン試薬による)<sup>10)</sup>, 17 moles/mole of RSA<sub>AHTL</sub>.

次に上記の 10 ml RSA<sub>AHTL</sub> 溶液にジチオスレイトール (DTT) 結晶粉末 20 mg を加え、搅拌し溶解し SH 基を活性化する。約 20 分後、セファデックス G50 (coarse) カラムを通し、0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 (脱酸素) で溶出する。110 mg の蛋白質を含む溶液 10 ml を得た。RSA<sub>AHTL</sub> 1 mole あたり 37 mole の SH 基を含む。

#### RSA<sub>AHTL</sub> と N-Mansyl-N'-bromoacetylethylenediamine (V) との反応

55 mg の RSA<sub>AHTL</sub> (SH 基活性化直後の試料) を含む 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 5 ml に、13 mg の N-mansyl-N'-bromoacetylethylenediamine を溶解した 0.5 ml

アセトン溶液を加え、搅拌する。最初白濁するが、後透明となる。一昼夜搅拌を続け放置する。反応混液全量を透析チューブに入れ、10 mM リン酸緩衝液溶液-0.15 M NaCl (pH 7.1) に対して数日透析する。生じたわずかな不溶物は遠心分離にて除く。44 mg の蛋白質が得られる。結合した MANS 基の数は、330~335 nm における吸光度により計算した (モル吸光係数は 18,000 と仮定した)。RSA<sub>AHTL</sub> 1 モルに 28 モルの MANS 基が結合した MANS-RSA<sub>AHTL</sub> が得られた。

#### References

- 1) Onodera, M. and Shiokawa, H.: J. Biochem., **81**, 891, 1977.
- 2) 小野寺昌彦・塩川洋之: “螢光測定の生化学研究への応用”, 八木国夫・関根隆光編, 化学の領域, 別冊, p. 79, 南江堂, 東京, 1976.
- 3) 小野寺昌彦・塩川洋之・関川 勲: 日本免疫学会総会記録, **6**, 380, 1976.
- 4) Cuatrecasas, P., Wilchek, M. and Anfinsen, C. B.: J. Biol. Chem., **244**, 4316, 1969.
- 5) Strausbauch, P. H., Weinstein, Y., Shaltiel, S. and Givol, D.: Biochemistry, **10**, 4342, 1971.
- 6) Jocelyn, P. G.: “Biochemistry of the SH group”, Academic Press, New York, p. 63, 1972.
- 7) Lawson, W. B., Leafer, M. D. Jr., Tewes, A. and Rao, G. J. S.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., **349**, 251, 1968.
- 8) Cory, R. R., Becker, R. R., Rosenbluth, R. and Isenberg, I.: J. Amer. Chem. Soc. **90**, 1643, 1968.
- 9) Hirs, C. H. and Timasheff, S. N.: “Methods in Enzymology” **25**, 541, 1973, Academic Press, New York.
- 10) Ellman, G. L.: Archs. Biochem. Biophys., **82**, 70, 1959.

## Synthesis of N-Mansyl-N'-bromoacetylethylenediamine and Its Reaction with Thiolated Rabbit Serum Albumin

Isao SEKIKAWA, Masahiko ONODERA  
and Hiroyuki SHIOKAWA

N-Mansyl-N'-bromoacetylethylenediamine was conveniently synthesized in 70% yield by the reaction of N-mansylethylenediamine with O-bromoacetyl-N-hydroxysuccinimide ester at room temperature. The compound was easily conjugated covalently with the thiolated rabbit serum albumin. The usefulness of the dye as “affinity labeling reagent for the combining sites of the anti-MANS antibody” is under examination.