



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	N-Methyl-2-anilinonaphthalene-6-sulfonyl基の結合したGramicidin Sの調製
Author(s)	小野寺, 昌彦; ONODERA, Masahiko; 田中, 恭介 他
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 38, 56-58
Issue Date	1978-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26510
Type	departmental bulletin paper
File Information	38_P56-58.pdf



N-Methyl-2-anilinonaphthalene-6-sulfonyl 基の 結合した Gramicidin S の調製

小野寺昌彦 田中恭介
高沢俊英 塩川洋之
(北海道大学免疫科学研究所生化学部門)
(昭和52年12月2日受付)

ハプテンに対する抗体を得るためには、通常血清アルブミンやヘモシアニンのような分子量の大きな蛋白質(carrier)に、多数のハプテンを結合させて調製した抗原を動物に注射する必要がある。このようにして得られた抗ハプテン抗体では、多くの場合不均一な分子の集団(結合定数や等電点分画法によるパターンについて)となる¹⁻³⁾。しかし最近ジニトロフェニル基やアデニン環を Gramicidin S (5種類のアミノ酸が10個環状に結合したペプチド)のオルニチン残基の2個のアミノ基に結合させたハプテン-Gramicidin S 複合物を抗原として用いると、著しく抗ハプテン抗体の不均一性が減少することが示された⁴⁻⁶⁾。この不均一性の減少によって、ミエローマ蛋白質で行なわれたような、クローンの比較や化学構造の研究が^{7,8)}、誘発された抗ハプテン抗体でも可能となると期待されている。

我々は、ウシ血清アルブミンやヘモシアニンを carrier として用いて、ケイ光色素 N-methyl-2-anilinonaphthalene-6-sulfonyl 基 (MANS 基) に対する抗体 (抗 MANS 抗体) をウサギに産生させる方法を示した^{9,10)}。また、MANS 基のケイ光は、抗 MANS 抗体に結合すると数百倍に増加することと、結合 MANS 基のケイ光極大波長が抗 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^{11,12)}。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プテンであると結論された。

この報告では、MANS 基の2個結合した、Gramicidin S の調製法を述べる。MANS chloride と Gramicidin S とをアルカリ性アセトン水溶液中で反応させ、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー、続いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ない、容易に (MANS)₂-GS を得ることが出来た。この物質の同定はアミノ酸分析により行なった。

実験方法及び試薬

MANSate は Cory 等の方法で合成し¹³⁾、MANS

chloride は Sachdev 等¹⁴⁾の方法で合成した。Gramicidin S は Sigma 社製 Gramicidin J の塩酸塩を用いた。Sephadex LH-20 は Pharmacia 社製、カラムクロマトグラフィー用シリカゲルは Merck 社製 Kieselgel 0.05~0.2 mm (70-325 mesh ASTM) を用いた。薄層クロマトグラフィーには Merck 社製 DC-Alufolieren kieselgel 60 を用いた。

Gramicidin S と MANS-Gramicidin S 複合体の構成アミノ酸の検出は、これらの化合物を 6N HCl で 110°C、23時間加水分解した後 HCl をエバポレーターで除いて、薄層クロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリン反応によって行なった。Gramicidin S と (MANS)₂-Gramicidin S のアミノ酸分析は、110°C で 6N HCl による加水分解物を日立アミノ酸分析器 (Model KLA-3B) を用いて行なった。加水分解時間は、Gramicidin S については 24時間、(MANS)₂-Gramicidin S の場合は 24, 72, 96時間であった。

結果と考察

(1) (MANS)₂-Gramicidin S の合成

0.5 ml のアセトンに 43.5 mg の MANS chloride を溶解する。このアセトン溶液に 50 mM Borax (pH 9.3) 溶液 0.5 ml 加える。さらに 50 mg の Gramicidin S の溶解した 1 ml アセトン溶液を加え、反応を開始し一昼夜室温または 25°C 恒温槽中で放置する。エバポレーターを用いて溶媒を除き乾燥させる。1 ml のエタノールで溶解し (完全には溶けない)、この全量をエタノールで平衡化してある Sephadex LH-20 カラム (35 cm × 1 cm^φ) に供し、エタノールで溶出し最初に溶出するケイ光画分を集めた。この画分は、薄層クロマトグラフィー (展開液 butanol/acetic acid = 20/1) で大まかに 3つの成分に分離することが示された (図-1)。すなわち、最先端まで泳動した大きなケイ光スポット、Rf 0.5~0.6 のスポットおよび原点にとどまるスポットの3個である。Rf 0.5 のスポットはケイ光を発生し、かつニンヒドリン反応陽性で

あったので、MANS 基の1個結合した Gramicidin S と思われる。また原点のスポットもニンヒドリン反応陽性であり未反応の Gramicidin S と考えられる。最先端まで泳動したスポットはニンヒドリン反応陰性であり (MANS)₂-Gramicidin S と思われるので、この画分をさらに精製するために、次にシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なった。

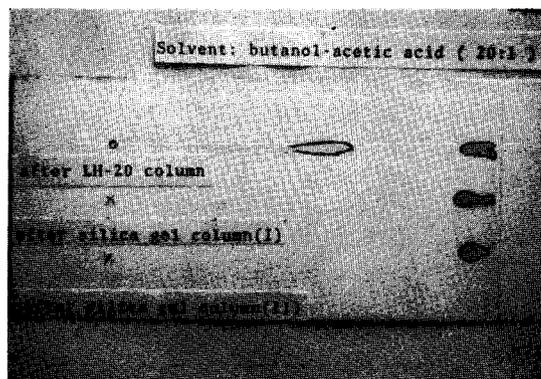


図-1 MANS-Gramicidin S の薄層クロマトグラム

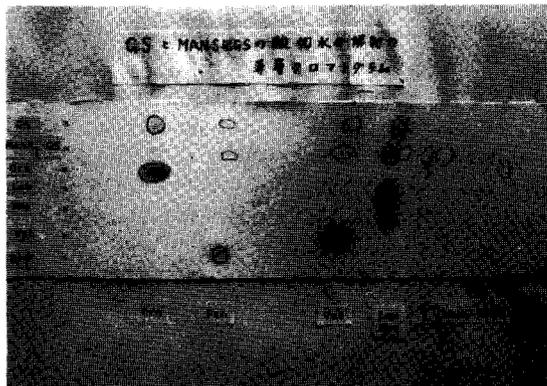


図-2 Gramicidin S および MANS-Gramicidin S 複合体の加水分解物の薄層クロマトグラム

Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーで溶出した最初の画分を集め、シリカゲルを少量加え、濃縮し、シリカゲルに溶出物を出来るだけ均一に吸着させる。この溶出物を吸着したシリカゲルをあらかじめ ethylacetate/benzene; 1/1 溶液で平衡化したシリカゲルカラム (35 cm×1.5 cm φ) の上に重層した後 (約 2 cm)、平衡化に用いたものと同じ溶液で溶出する。最初に溶出する画分を集め、45~50°C で溶媒を除き乾燥させる。10.5 mg の白色粉末が得られた。このものは薄層クロマトグラ

フィーで単一のケイ光スポットを示した (図-2)。(実験の初期には、溶出液として ethylacetate を用いていたが、この場合ごく小さなスポットが主スポットに遅れて泳動するのが見られたので、ethylacetate/benzene; 1/1 溶液でシリカゲルクロマトグラフィーを繰り返すことにより、この小さな成分を除く必要があった)。

(2) 得られた主成分の氨基酸分析

(1) の薄層クロマトグラフィーで均一な物質と Gramicidin S とを各々 6N HCl, 110°C で 23 時間加水分解した後、HCl をエバポレーターで除いた後、薄層クロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリン反応によって検出した。Gramicidin S の構成氨基酸の Orn, Leu, Phe, Val, Pro も対照として同時に泳動した。展開液として butanol-酢酸-水 (3:1:1) を用いた。Leu と Phe は同位置に泳動し、続いて Val, Pro, Orn の順に遅れて泳動した。Gramicidin S の分解物では、これら 4 個のスポットすべてが見られたが、(1) で得られた最終精製物では、4 個のスポットの内 Orn のスポットが著しく弱くなり、新たに、Leu+Phe のスポットよりも先に泳動した、ニンヒドリン反応陽性でかつケイ光を発するスポットが出現した。加えて、ニンヒドリン反応陰性で、弱いながらケイ光を発するスポットがさらに 3 個出現した。これらの結果は、最終精製物は Orn が MANS 化された Gramicidin S であることを強く示唆している。

表-1 Gramicidin S および MANS-Gramicidin S の構成氨基酸のモル比

化合物	Gramicidin S	MANS-Gramicidin S			
		24時間	24時間	72時間	96時間
	(モル比)	(モル比)	(モル比)	(モル比)	
ア Orn	0.86	0.13	0.39	0.49	
ミ Pro	0.93	1.02	0.97	0.99	
ノ Val	0.94	0.82	0.92	0.98	
酸 Leu	0.98	1.04	0.98	0.98	
Phe	1.0	1.0	1.0	1.0	

表-1 に Gramicidin S および MANS-Gramicidin S 複合体の構成氨基酸のモル比を示した (Phe を 1 とした)。Gramicidin S においても MANS-Gramicidin S 複合体においても Orn 以外の氨基酸のモル比は 1 に近い値を示している。Orn の値が Gramicidin S では 0.8 とやや低いのは、このペプチドが環状ペプチドであるために、24 時間の加水分解時間が短かったことによる

ものである。MANS-Gramicidin S は Orn の値が低く、24時間の加水分解ではわずかに0.13であり、分解時間を延長して96時間にしても0.49という値しか示さなかった。これはMANS基とOrnの結合がペプチド結合に比べて非常に強く、98時間後においても約半数のOrnがMANSと結合したままであると思われる。

Sephadex LH-20 およびシリカゲルクロマトグラフィーによって精製されたMANS-Gramicidin S 複合物は、(1) butanol-acetic acid 系の薄層クロマトグラフィーにおいて、ケイ光は発するが、ニンヒドリン反応陰性であるスポットを与えること、(2) さらに加水分解によりGramicidin Sの構成アミノ酸であるPhe, Leu, Val, Pro, Ornを与えることから、MANS基がGramicidin Sの2個のOrnに結合した(MANS)₂-Gramicidin S であると考えられる。ただし、Ornの回収率は96時間の加水分解によっても約50%であり、この点加水分解の条件を検討する必要がある。

結 論

N-methyl-2-anilino-naphthalene-6-sulfonyl (MANS) chloride と Gramicidin S を反応させた後、Sephadex LH-20 およびシリカゲルクロマトグラフィーにより、(MANS)₂-Gramicidin S 複合体を調製した。この複合物は、薄層クロマトグラム上でケイ光発光とニンヒドリン発色および加水分解物のアミノ酸分析により(MANS)₂-Gramicidin S であることを確認した。

文 献

- 1) Eisen, H. N. and Siskind, G. W.: *Biochemistry*, **3**, 996, 1964.
- 2) Kreth, H. W. and Williamson, A. R.: *European J. Immunol.*, **3**, 141, 1973.
- 3) Margolies, M. N., Cannon, L. E. III, Strosberg, A. D. and Haber, E.: *Pro. Natl. Acad. Sci., USA*, **72**, 2180, 1975.
- 4) Montgomery, P. C., Rockey, J. H. and Williamson, A. R.: *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 228, 1972.
- 5) Montgomery, P. C., Rockey, J. H., Kahn, R. L. and Skandera, C. A.: *J. Immunol.*, **115**, 904, 1975.
- 6) Cameron, D. J. and Erlanger, B. F.: *Immunochem.*, **13**, 263, 1976.
- 7) Richards, F. F., Konigsberg, W. H., Rosenstein, R. W. and Varga, J. M.: *Science*, **187**, 130, 1975.
- 8) Potter, M., Rudikoff, S., Varga, M., Rao, D. N. and Mushinski, E. B.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **41**, 661, 1976.
- 9) Onodera, M., Shiokawa, H. and Takagi, T.: *J. Biochem.*, **79**, 195, 1976.
- 10) 小野寺昌彦: 蛋白質・核酸・酵素 別冊, p.189, 共立出版, 東京, 1974.
- 11) Onodera, M. and Shiokawa, H.: *J. Biochem.*, **81**, 891, 1977.
- 12) 小野寺昌彦・塩川洋之: 化学の領域 別冊, p.79, 南江堂, 東京, 1976.
- 13) Cory, R. P., Becker, R. R., Rosenbluth, R. and Isenberg, I.: *J. Am. Chem. Sci.*, **90**, 1643, 1968.
- 14) Sachdev, G. P., Brownstein, A. D. and Fruton, J.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 6292, 1973.
- 15) Stahl, E. (Editor): *Thin-layer Chromatography*, p. 889, Springer-Verlag, Berlin, 1969.

Preparation and Purification of Bis-N-methyl-2-anilino-naphthalene-6-sulfonyl-Gramicidin S

Masahiko ONODERA, Kyōsuke TANAKA, Toshihide TAKASAWA
and Hiroyuki SHIOKAWA

Bis-N-methyl-2-anilino-naphthalene-6-sulfonyl-Gramicidin S was prepared and purified by chromatography on Sephadex LH-20 and silica gel. Amino acid analyses and thin layer chromatography indicate that two N-methyl-2-anilino-naphthalene-6-sulfonyl group are bound to one molecule of Gramicidin S.