蛋白質の選択的な化学修飾法における最近の進歩

北 川 常 廣*

Recent Progress in the Methods for Selective Modification of Proteins.

Tsunehiro KITAGAWA*

Methods for preparations of protein-protein and protein-hapten conjugates are reviewed from the view point of selective formation of the conjugates. The methods are classified into four types depending upon the chemical structures of the modifiers of proteins. The specific methods applied for mono-functional haptens having a carboxylic acid, amino or thiol group and non-specific ones used for polyfunctional modifiers in aids of homo-bifunctional reagents. The selective method utilizing the structural specificities of the protein and also the newly developed selective methods using hetero-bifunctional cross-linkers such as the maleimide succinimidyl ester type are discussed.

はじめに

蛋白質-蛋白質複合体の作製法¹⁻⁵⁾は、種々の臨床検査法や、生化学的、薬理学的に有用な物質の調製法として、近年ますます重要になってきた。蛋白質は基本的に多種類のアミノ酸で構成される高分子化合物で、アミノ基、カルボン酸基、水酸基、チオール基やフェノール基等、数多くの官能基を有する。しかし生理機能を示す蛋白質は失活しやすいので、選択的に蛋白質-蛋白質の結合反応を行い、しかもこの際に個々の蛋白質の生理機能を保持させるのは容易でなかった。

蛋白質-蛋白質の複合反応とともに、低分子のホルモンや、薬剤等で蛋白質を化学修飾する反応は薬物の抗原作製法^{5,6)}や酵素標識法⁷⁻¹²⁾、あるいはアフィニティークロマト法³⁾等にも重要である。これらの反応も基本的に蛋白質の選択的な化学修飾法を応用して蛋白質複合体を調製するので、蛋白質の選択的な化学修飾法の観点から最近の進歩を紹介する。

2. 蛋白質の化学修飾反応に要求される条件

蛋白質の不安定な生理機能の失活をさけるために、化学修飾反応は次の5条件を満たす反応であることが必要

である⁷⁾。従ってこの5条件を基準にして、蛋白質の化学修飾法の進歩を取り挙げる。

- I. 蛋白質が所持する、またはⅢ～Ⅴの条件下に導入できる官能基を利用する反応であること。
- II. 選択的に反応が進行して副反応が起きにくいこと。
- III. ほぼ中性の水溶液中で反応すること。
- IV. 室温以下の温度で短時間に反応が完結すること。
- V. 生成した結合は安定であること。

この5条件を満たす蛋白質の化学修飾法は、まずアフィニティークロマト法の技術で必要な酵素等の固定化法が研究され³⁾、さらに免疫測定法の分野で特に酵素標識法⁹⁻¹²⁾の研究過程で発展してきた。

3. 蛋白質の化学修飾に用いられる官能基

蛋白質の分子中にあり化学修飾に利用される官能基^{13,14)}と、それに対応するアミノ酸を表1に示す。

表 1 蛋白質分子中の官能基

官 能 基	含有アミノ酸
アミノ基、イミノ基	Lys, Arg, His, Try
カルボン酸基	Asp, Glu
水酸基	Ser, Thr, Tyr
フェノール基	Tyr
芳香環	Tyr, Phe, Try, His
チオール基	Cys

これらの官能基以外に、蛋白質を構成する糖鎖も後述

* 長崎大学薬学部薬学科 ()

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University ()

する如く化学修飾反応に重用される。

4. 簡単な構造の化合物との蛋白質複合体の作製法

低分子化合物であるハプテンの抗原作製法^{5,6, 15-17)}を中心としてその作製法が研究された。単一の官能基、カルボン酸基、水酸基、アミノ基等のみを持つ低分子化合物は、以下の反応を利用してほぼ選択的に蛋白質の化学修飾できる。

4.1. カルボン酸基 ペプチド合成法¹⁸⁾に常用される活性化法を用いて蛋白質のアミノ基に選択的に結合できる。主として次の2法が用いられる。

4.1.1. 酸無水物法¹⁹⁻²³⁾ アルキルクロロホルメートを用いる水溶液反応が主である。

4.1.2. *N*-ヒドロキシサクシイミド法²⁴⁻²⁷⁾ 本基は活性エステルの中で最も水溶性の構造を有し、多用される。

4.2 アミノ基のみを有する化合物

4.2.1. 芳香族アミノ基 酸性水溶液中でジアゾ化後アルカリ性でジアゾカップリングする²⁸⁻³⁰⁾。

1つだけ脂肪族アミノ基を持つ化合物は次の中間反応

を経てジアゾカップリング反応が応用された³⁰⁻³¹⁾。

以上これらの反応はいずれも蛋白修飾反応の5条件を完全には満たしていないので、各方法に対応した実験条件を選ぶ必要はあるが、蛋白質の重合反応が起らない点で、選択的な蛋白質の修飾反応に分類できる。

5. 同反応性2価試薬を用いる蛋白質の化学修飾反応

蛋白質-蛋白質の複合反応には、同じ官能基間を結合する、種々の同反応性2価試薬類(homo-bifunctional reagents)が用いられてきた^{1,2)}。

通常蛋白質は分子内に同じ官能基を多数持つので、この場合には一般式で示すと(式1)に示す複雑な組成の複合体を与える^{7,32)}。

従って、目的の複合体(Ia; $x=y=z=1$)を選択的に生成する、あるいは複雑な混合生成物から単離するのは容易でない欠点を有するが、実用上便利なので種々の方法が開発された¹⁻¹⁰⁾。この型の試薬としては、アミノ基同志を結合する型と、チオール基間を縮合する型の試薬が知られている。

5.1. アミノ基用同反応性2価試薬 この型の試薬類は主反応のアミノ基以外にチオール基や水酸基とも反応する。通常アルカリ性下で反応するので条件II~IVを満たし難い。

5.1.1. ジハロゲン試薬

一般式 $X-R-X$

く^{63,64})遊離型で存在しにくい。チオール基は前記の緩和な条件下の反応で蛋白質に容易に導入できる⁶⁴⁻⁷²)。

β -ガラクトシダーゼは遊離のチオール基を有し、このチオールは酵素活性に関与しないので加藤ら⁶⁷)はインスリンに導入したチオール基を、*o*-フェニレンジマレイミドを介して β -ガラクトシダーゼと結合するのに成功し、さらに家兎 IgG の Fab フラグメントも同様に酵素標識に成功した⁷²)。

6. 糖鎖を反応に利用した選択的な蛋白質修飾

法: 過ヨウ素酸酸化法⁷³⁻⁷⁶)

特殊な蛋白質では、含有する糖鎖を過ヨウ素酸酸化して選択的にジアルデヒドに開裂し、ジアルデヒドは緩和な条件下に水溶液中でアミノ基と結合できる。西洋わさびのパールオキシダーゼは構成糖を有し、さらにアミノ基を保護しても失活しないので、まずアミノ基をジニトロベンゼンで保護後に糖を開裂して、生じたジアルデヒドを抗体や抗原等の(蛋白質の)アミノ基に結合し、生じたシッフ塩基を還元安定化する方法で、パールオキシダーゼの構造特異性を巧みに応用した選択的なパールオキシダーゼの標識法が開発された^{76,77})。

① $\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)-\text{F}$ との反応; ② IO_4^- 酸化反応; ③ 蛋白質のアミノ基とジアルデヒドの反応; ④ NaBH_4 による還元反応。

本法で作製された酵素標識抗体や抗原は酵素免疫測定法⁷⁻¹²)や組織免疫法⁷⁶⁻⁷⁸)に多用されている。

7. 異反応性 2 価試薬 (hetero-bifunctional reagents) による選択的な蛋白質修飾法

7.1. 選択的な蛋白質修飾試薬の開発 1976年に筆者らは異反応性 2 価試薬による選択的な蛋白質修飾法を開発した⁷⁹)。蛋白質修飾反応を選択的に進行させるために、第 1 反応は蛋白質 I と反応し、第 2 反応は蛋白質 II とのみ反応して蛋白質 I とは反応しない型式である。

この際に用いる両反応は、前述の蛋白質修飾条件 I と III ~ V を満たす必要があり、さらに条件 II もできる限り満たす反応を用いた。第 1 反応には *N*-ヒドロキシサクシイミド法 (4.1.2 参照) を応用した。本法はペプチド合成法として開発された²⁴)が、筆者らはいち早くその親水性の構造に着目し、水溶液反応の応用研究を行ってバイオマイシン (VM) のアシル化に成功して分子式を決定し²⁵)、さらに構造決定⁸⁰)にも応用できた。さらにこの際アシル化剤のモル数を制限すれば選択的に二つのアミノ基の一方がアシル化できて^{26,81})、条件 II をかなり満足することを知った。従ってこの反応を反応 1 に用いることにした。第 2 反応にはマレイミド基 (5.2 参照) を選び異反応性 2 価試薬 *N*-(*m*-マレイミドベンゾイルオキシ)サクシイミド (MBS) を開発した^{23,79})。

7.2. 新しい酵素標識法 異反応性 2 価試薬, MBS を用いると簡単な二段階反応でインスリンを β -ガラクトシダーゼで標識できた^{79,82})。この際の結合反応は蛋白質修飾法として必要な 5 条件をほぼ満足する。その結果 MBS 法を用いると低分子の VM²³)やアンジオテンシン I⁸³)、ブラジキニン⁴⁰)からインスリン⁷⁹)やさらに高分子のヒト胎盤性ゴナドトロピン⁸⁴)や IgG 類^{3,54,85})まで簡単に酵素標識ができて、それぞれの高感度の酵素免疫測定法 (EIA) が開発できた。

Chromatography on Sepharose 6B Column

Fig. 1 Preparation of insulin- β -D-galactosidase conjugate.

7.3. MBS 型試薬の構造と反応性, 安定性の相関関係 MBS 型架橋剤 10 種類について, 活性エステルの反応性とマレイミド基の安定性が検討された^{15, 32, 80)}。

図 2 は使用した架橋剤の構造式を示す。表 2 は各試薬 1 μ モルをアミノ酸のリジン (Lys) とロイシン (Leu) それぞれ 1 μ モルに 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0, 7.5, 8.0) 中で 25 $^{\circ}$ C, 20 分間反応した時のアシル化収率を示す。

表 3 は各試薬 1 mM 濃度溶液を各緩衝液 (pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) 中で 30 $^{\circ}$ C, 30 分間および pH 7.5 で 20 分間インキュベート後のマレイミド基の分解率を示す。

芳香族の架橋剤は構造の差が活性エステルの反応性とマレイミド基の安定性に大きく影響した。すなわち *o*-型 (1a), *m*-型 (1b) と *p*-型 (1c) では *m*-型が最も活性

Fig. 2 Chemical structures of the hetero-bifunctional cross-linkers used.

Table 2 Acylation percents of the hetero-bifunctional cross-linkers with leucine and lysine in 0.05 M phosphate buffers, pH 7.0, 7.5 and 8.0, at 30 $^{\circ}$ C for 20 minutes.

	pH 7.0		pH 7.5		pH 8.0	
	Leu	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys
1a	20.4	37.1	19.1	34.5	21.2	32.0
1b	21.0	40.9	31.5	44.9	36.0	46.0
1c	17.7	28.7	20.1	39.1	26.2	33.8
1d	—	—	31.3	40.4	—	—
1e	15.8	26.5	16.6	33.6	20.5	46.3
1f	17.5	31.0	33.2	46.5	38.8	48.0
1g	9.3	22.6	9.1	28.8	20.6	27.9
1h	5.1	21.1	11.3	29.0	14.9	26.0
1i	11.9	22.6	13.5	33.0	29.1	35.8
1j	9.5	24.0	14.1	27.1	25.3	38.3

Table 3 Decomposition percents of maleimide groups of the hetero-bifunctional cross-linkers incubated in 0.05 M phosphate (pH 6.0, 7.0 or 8.0) and citrate (pH 5.0) buffers at 30 $^{\circ}$ C for 30 minutes and also in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.5, at 30 $^{\circ}$ C for 20 minutes.

Sample	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 7.5
1a	3.1	6.2	21.4	69.0	18.8
1b	2.9	2.5	7.1	43.8	9.4
1c	3.8	6.6	32.0	52.0	37.5
1d	3.2	1.5	18.3	48.7	29.6
1e	17.0	15.2	26.9	44.0	—
1f	3.0	0.7	2.0	41.0	8.3
1g	22.9	18.7	41.9	56.1	—
1h	5.0	2.4	6.0	12.2	8.9
1i	4.7	2.0	6.3	7.5	8.0
1j	5.3	3.0	4.5	8.4	5.0

なエステルと安定なマレイミド基を有する。脂肪族架橋剤は構造の差がそれほど影響せず, 安定なマレイミド基を有する。この結果電子吸引基は活性エステルの反応性とマレイミド基の安定性をともに減じると推定された。そこで電子供与基を *o*-または *p*-位に有する架橋剤 1d ~ 1g まで合成した。1f は最も高い活性エステル反応性と安定なマレイミド基を有する (表 2, 3 参照)。また MBS 1b もこれに準ずる性状を有する。残念ながら 1f は 1b に比較すると水溶性で劣っていた。

7.4. 簡単な改良酵素標識法の開発 EIA とラジオイムノアッセイ (RIA) を比較すると, 感度, 精度ともに前者は遜色なく, さらに放射能による障害の恐れがない点で優れている⁴⁻¹²⁾。しかし, 蛋白質などの高分子には¹²⁵I によるヨード化反応は操作が簡単なので⁸⁷⁻⁸⁹⁾, ¹²⁵I の半減期が 60 日であり, 2 ヶ月ごとに標識体を作成する必要や, さらに放射能障害の恐れがあるにもかかわらず, 高分子蛋白の抗体や抗原の標識に最も多用されている。従って筆者らは¹²⁵I の標識法より操作が簡便な改良酵素標識法を開発した^{84, 90, 91)}。すなわち, 7.3. の結果 MBS 型試薬類は 0.1 μ mol/ml の低濃度でも良好な反応性を示すが, マレイミド基は分解しやすいので, 第 1 段階のアシル化の際に試薬に対するアミノ基のモル比を 10 倍以上にすることで反応収率を高め, 反応終了後過剰の試薬を除く操作なしに直接第 2 反応を行って酵素標識後に 1 回のクロマトグラフィーで目的の酵素標識体が得られる。この操作は 1 日で完了し得る。この方法は低分子の VM⁹⁰⁾, 分子量約 1 万のネオカルチノスタチン⁹¹⁾から高

分子のヤギ抗家兔 IgG 抗体⁹⁴⁾の酵素標識法に応用できた。現在、筆者の研究室では、初心者の特別実習生でも、抗原や抗体の酵素標識体を1日で調製している。その結果現在最も多用されている RIA 法の EIA 法に比する優利な点は、標識活性測定に自動化された γ -シンチレーターが使用できる点が唯一の利点であると筆者は考えている。

7.5. 医薬品の新しい抗原作製法 酵素標識法とともに重要な蛋白修飾法の応用は薬物の抗原作製法である。低分子の薬物はハプテンに属し、それ自体では抗原性を持たず、蛋白との複合体に誘導して始めて抗原性が得られる^{5, 6, 28)}。簡単な構造の薬物の抗原作製法は4節で述べた方法が適用できるが、少し複雑な構造の薬物には5節で述べた非選択的な方法で調製されたので、この場合には千倍以上に希釈しても免疫測定法に使用できる良好な抗血清を得ることは容易でなかった。筆者らも VM の抗血清作製研究²³⁾でこのことを痛感したので、MBS 型架橋剤を利用する3段階の反応を行なう新しい薬剤の抗原作製法を開発した¹⁵⁻¹⁷⁾。

第1反応: MBS 型架橋剤によるハプテンのアミノ基へのマレイミド基導入 (酵素標識法の第1反応と同じ)。

第2反応: 蛋白質へのチオール基導入 (ジスルフィド結合のチオール交換反応、還元反応、あるいはアミノ基にチオール基を導入する方法が利用可能; 5.2節参照)。

第3反応: 第1反応で得たマレイミド導入ハプテンと第2反応で得たチオール導入蛋白を混合するだけのハプテン-蛋白複合反応。

この新方法を開発した結果、それまで作製が困難であった種々の薬剤、ペニシリン^{70, 92, 93)}、セファロスポリン⁹⁴⁾、VM^{90, 92)}、プラストサイジン S⁷¹⁾、カナマイシン⁹⁵⁾、トブラマイシン⁹⁶⁾、ゲンタマイシン⁹²⁾、ダウノマイシン⁶⁸⁾、マイトマイシン⁹⁷⁾、ピューロマイシン⁹⁸⁾、ペプレオマイシン⁹⁹⁾、スベルミン¹⁰⁰⁾、ブレオマイシン¹⁰¹⁾、その他 (投稿準備中) の薬剤に対する良好な特異抗血清が得られ、それぞれの高感度な EIA が開発されたが、この場合全ての抗血清は1万倍以上の希釈溶液が使用されている。

7.6. ガンミサイル療法の研究 抗腫瘍剤や放射元素は腫瘍細胞に特異的に作用しないので、このような細胞毒を選択的にガン治療に用いようとする研究が盛んになってきた¹⁰²⁻¹⁰⁶⁾。ガン細胞にのみ存在して正常な組織に存在が認められない抗原¹⁰⁷⁻¹⁰⁸⁾に対する特異抗体に細胞毒物質を結合して腫瘍細胞まで運ばせて、腫瘍細胞を殺そうとする考え方である。放射標識特異抗体が腫瘍細胞に集まることは Pressman ら¹⁰⁹⁾により初めて観察され、

これを利用してがんの局在場所診断の試みとして、放射標識ポリクロナル抗体¹¹⁰⁻¹¹²⁾や最近ではモノクロナル抗体^{113, 114)}を用いる研究で、抗体のガン局所集合性も証明されている。抗体に毒性物質を結合する方法は5節と6節で紹介した方法が主として用いられていて、クロラムブシル^{115, 116)}、ダウノマイシン¹¹⁷⁾、ホスホリパーゼ C¹¹⁸⁾、や最近では -S-S- 結合による選択的な架橋剤 (後述) を用いて、ジフテリア毒素^{119, 120)}やヒマ毒素リシン^{121, 122)}の有毒フラグメントを抗体に結合している。これらの有毒物質複合体を用いた治療効果については種々の問題点はあるが¹²³⁾この分野の研究の一層の発展が期待される。

7.7. 異反応性2価試薬に関する最近の研究 MBS 出現後、種々の異反応性2価試薬が広く各国で研究され、種々の構造の試薬類が市販されるようになった。いずれもアミノ基とチオール基を利用する方法で、試薬類の基本構造は MBS 型と SPDP 型に分類される。

MBS 型試薬には MBS⁷⁹⁾ (Pierce 社, Rockford; 和光純薬), GMBS⁹¹⁾; $R = -(CH_2)_3-$, (同仁化学): EMCS¹²⁴⁾; $R = -(CH_2)_4-$, (同仁化学): CHM¹²⁵⁾;

[ジーベンケミカル (株)] などが市販されている。

SPDP 型試薬は Carlson¹²⁶⁾らが開発したチオール導入試薬である ($R =$). チオール基の特殊性を応用して、選択性には少し問題があるが、以下の反応で蛋白質間の複合反応に応用できる。

この手法は上述のリシン¹²²⁾やジフテリア毒素¹²⁰⁾のミサイル療法に応用されている。

最近石川らはチオール基を導入した抗体に MBS 型試薬 CHM でマレイミド基を導入したパーオキシダーゼ¹²⁷⁾やグルコースオキシダーゼ¹²⁵⁾で標識した EIA を報告した。

おわりに

当初は放射標識法の代用にと研究された酵素標識法の研究過程で発展した、選択的な蛋白質の修飾法が開発された結果、2つの生理機能を有する蛋白複合体が比較的容易に得られるようになった。蛋白複合体は今までになかった新しい2つの生理機能を兼ねそなえる特徴を持

っている。この新しい複合体の特徴を生かした研究も筆者の研究室では始めており、たとえば、特異抗体の抗原結合部位の高次構造が初めて解析できた研究¹²⁸⁾など二、三の新しい研究成果も得られかけているが、これらの研究は直接修飾法とは関係がなく、紙数の制限もあるので、他の機会に紹介したい。

現在までの選択的な蛋白修飾研究は、今まで述べたごとく、主として免疫化学の分野に応用される各種の蛋白複合体の作製が中心研究課題であった。選択的な蛋白修飾法は単に蛋白質の修飾反応のみに適用できる方法ではなく、簡単に核酸や多糖類、リン脂質にも応用できる方法で、さらにその方法を組み合わせれば、2つの生理機能に止まらず、3つあるいはそれ以上のマルチ機能を有する複合体の作製にも使用可能な方法であると筆者は考えている。このような研究はまだ報告されていないが、今後マルチ機能を持った複合体が細胞生理学の新しい分野の扉を開くのではないかと夢みている。

最後に紹介した筆者らの研究に関し、酵素標識法の開発研究は長崎大・医・相川教授(生理)との協同研究によるものである。またアンジオテンシン I, 相川教授, 橋場教授(同医・三内); インスリン相川教授・土屋教授(同医・二外); HCG, 同薬・菊谷教授, 石黒助教授(生化), 山辺教授(同医・産婦); プラジキニン, 北里大・医・鹿取教授(薬理); トブラマイシン, 富山医薬大・矢野教授(一内); 各種抗ガン剤, 長崎大・薬・藤原助教授(微生物)の各研究は各先生とその教室の方々が中心となって研究を進展されたものである。そのほか, 長崎大医・原教授(二内), 市村教授(原研内科), 奈良医大・小西教授(腫瘍病理); 大日本製薬西村研究所長の諸先生方のご教示ご協力を得た。また種々のご配慮を

たまわりました大阪大山村学長, 微化研梅沢研究所長に感謝いたします。

(昭和59年1月9日受理)

文 献

- 1) J. H. Kennedy, L. J. Kricka, P. Wilding, *Clin. Chim. Acta*, **70**, 1 (1976)
- 2) F. Wold, in "Methods in Enzymology", (C. H. W. Hirs, S. N. Timasheff, eds.) Academic Press, New York, **25**, 623 (1972)
- 3) O. R. Zaborsky, *Immobilized Enzymes*, CRC Press, Cleveland, Ohio (1973)
- 4) J. L. Langone, H. Van Vunakis eds., *Methods in Enzymology*, Vol. 73, Academic Press, New York (1981)
- 5) V. P. Butler, Jr., *Pharmacol. Rev.*, **29**, 103 (1978)
- 6) B. F. Erlanger, *ibid.*, **25**, 271 (1973)
- 7) 北川常廣, *ファルマシア*, **19**, 781 (1983); 北川常廣, 免疫学(大沢利昭, 小山次郎編) 南江堂 p. 127 (1984)
- 8) M. J. O'Sullivan, V. Marks, in *Methods in Enzymology* (S. P. Colowick, and N. O. Kaplan, eds.), Academic Press, New York, **73**, 147 (1981)
- 9) E. Ishikawa, T. Kawai, K. Miyai, eds., *Enzyme Immunoassay*. Igaku-Shoin, Tokyo (1981)
- 10) S. B. Pal, ed. *Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs*, Walter de Gruyter and Co., Berlin (1978)
- 11) 山本 格, 有化化, **38**, 151 (1980)
- 12) 石川栄二, 河合 忠, 宮井 深編, 酵素免疫測定法, 医学書院 (1982)
- 13) 崎山文雄, 石井信一, 谷沢和隆, 笠井献一, 金岡

- 祐一, 横沢英良, 生化学実験講座1, タンパク質の化学IV, p.3 (1977)
- 14) 石井信一, 吉田信男, タンパク質化学3, 共立出版, p.1 (1973)
- 15) T. Kitagawa, in "Enzyme Immunoassay", (E. Ishikawa, T. Kawai, K. Miyai, eds.) Igakushoin, Tokyo-New York, pp.136 (1981)
- 16) 北川常廣, 臨床病理, **30**, 377 (1982)
- 17) 北川常廣, 藤原邦雄, 谷森英明, 免疫実験操作法, 免疫学会 **11**, 3529 (1982)
- 18) 矢島治明, 生化学実験講座1, タンパク質の化学IV, p.207 (1977)
- 19) Th. Wieland, W. Kern, R. Sehring, *Ann. Chem.*, **569**, 117 (1950)
- 20) N. F. Albertson, "Organic Reaction", John Wiley and Sons, New York, **12**, 157 (1962)
- 21) B. F. Erlanger, S. M. Beiser, *J. Biol. Chem.*, **228**, 713 (1957)
- 22) B. F. Erlanger, G. Borek, S. M. Beiser, S. Lieberman, *ibid.*, **234**, 1090 (1959)
- 23) T. Kitagawa, T. Fujitake, H. Taniyama, T. Aikawa, *J. Biochem.*, **83**, 1493 (1978)
- 24) G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3039 (1964)
- 25) T. Kitagawa, T. Miura, H. Taniyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 2176 (1972)
- 26) T. Kitagawa, T. Miura, M. Takaishi, H. Taniyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2123 (1975)
- 27) H. Hosoda, Y. Sakai, H. Yoshida, S. Miyairi, K. Ishii, T. Nambara, *ibid.*, **27**, 742 (1979)
- 28) K. Landsteiner, The Specificity of Serological Reactions, Harvard Univ. Press. Cambridge, Mass., (1945)
- 29) R. M. Hamburger, *Science*, **152**, 203 (1966)
- 30) I. H. Silman, E. Katshalski, *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 373 (1966)
- 31) B. P. Surinov, S. E. Manoylov, *Biochemistry* (Engl. Transl. Biokhimiya), **31**, 387 (1967)
- 32) T. Kitagawa, T. Shimozono, T. Aikawa, T. Yoshida, H. Nishimura, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1130 (1981)
- 33) H. Fasold, U. Groschel-Stewart, F. Turba, *Biochem. Z.*, **339**, 487 (1964)
- 34) C. B. Hiremath, R. A. Day, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5027 (1964)
- 35) H. Ozawa, *J. Biochem.*, **62**, 531 (1967)
- 36) H. Zahn, H. Zuber, *Chem. Ber.*, **86**, 172 (1953)
- 37) H. Zahn, H. Stuerle, *Biochem. Z.*, **331**, 29 (1958)
- 38) G. Kay, E. M. Crook, *Nature*, **216**, 514 (1967)
- 39) R. J. H. Wilson, G. Kay, M. D. Lilly, *Biochem. J.*, **108**, 845 (1968)
- 40) A. Ueno, S. Oh-ishi, T. Kitagawa, M. Katori, *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 1659 (1981)
- 41) T. L. Goodfriend, L. Leviene, G. D. Fasman, *Science*, **144**, 1344 (1964)
- 42) H. Zahn, F. Schade, *Chem. Ber.*, **96**, 1747 (1963)
- 43) H. Zahn, F. Schade, E. Siepmann, *Angew. Chem.*, **75**, 377 (1963)
- 44) D. J. Herzig, A. W. Rees, R. A. Day, *Biopolymers*, **2**, 349 (1964)
- 45) F. M. Richards, J. R. Knowles, *J. Mol. Biol.*, **37**, 231 (1968)
- 46) B. R. Brooks, O. L. Klammer, *Eur. J. Biochem.*, **5**, 178 (1968)
- 47) F. A. Quiocho, F. M. Richards, *Pro. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **52**, 833 (1964)
- 48) G. N. Reeke, J. A. Hartsuck, M. L. Ludwig, F. A. Quiocho, T. A. Steitz, W. P. Lipscomb, *ibid.*, **58**, 2220 (1967)
- 49) P. D. Weston, S. Avrameas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1574 (1971)
- 50) S. Avrameas, *Immunochimistry*, **6**, 43 (1969)
- 51) S. Avrameas, T. Ternynck, *ibid.*, **8**, 1175 (1971)
- 52) T. J. Greenwalt, E. McF. Swierk, E. A. Steane, *J. Immunol. Methods*, **8**, 351 (1975)
- 53) R. M. Hendry, J. E. Herrmann, *ibid.*, **35**, 285 (1981)
- 54) H. Tanimori, F. Ishikawa, T. Kitagawa, *ibid.*, **62**, 123 (1983)
- 55) N. H. Alexander, *Anal. Chem.*, **30**, 1292 (1958)
- 56) E. Roberts, G. Rouser, *ibid.*, **30**, 1291 (1958)
- 57) J. E. Moore, W. H. Ward, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2414 (1956)
- 58) D. G. Smyth, A. Nagamatsu, J. S. Fruton, *ibid.*, **82**, 4600 (1960)
- 59) P. Kovacic, R. W. Hein, *ibid.*, **81**, 1187 (1959)
- 60) H. Zahn, L. Lumper, Hoppe-Seyler's, *Z. Physiol. Chem.*, **349**, 485 (1968)
- 61) P. O. Tawney, R. H. Scyder, R. P. Conger, K. A. Lubbrand, C. H. Stiteler, A. W. Williams, *J. Org. Chem.*, **26**, 15 (1961)
- 62) W. B. Freedberg, J. K. Hardman, *J. Biol. Chem.*, **246**, 1439 (1971)
- 63) 松本 博, 国則登代, 生物化学実験法10, 学会出版センター (1978)
- 64) 石黒正恒, 生物化学実験法8, 学会出版センター (1978)
- 65) J. Carlson, R. Axen, T. Unge, *Eur. J. Biochem.*, **59**, 567 (1975)
- 66) I. M. Klotz, R. E. Heiney, *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 605 (1962)
- 67) K. Kato, Y. Hamaguchi, H. Fukui, E. Ishikawa, *J. Biochem.*, **78**, 235 (1975)

- 68) K. Fujiwara, M. Yasuno, T. Kitagawa, *J. Immunol. Methods*, **45**, 195 (1981)
- 69) G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959)
- 70) T. Kitagawa, T. Kanamaru, H. Wakamatsu, H. Kato, S. Yano, Y. Asanuma, *J. Biochem.*, **84**, 491 (1978)
- 71) T. Kitagawa, T. Kawasaki, H. Munechika, *ibid.*, **92**, 585 (1982)
- 72) K. Kato, H. Fukui, Y. Hamaguchi, E. Ishikawa, *J. Immunol.*, **116**, 1554 (1976)
- 73) J. Porath, in *Methods in Enzymology*, (W. B. Jakoby and M. Wilchek eds.) Academic Press, New York (1974)
- 74) T. Kristiansen, L. Sundberg, J. Porath, *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 93 (1969)
- 75) A. Kawaoui, P. K. Nakane, *Fed. Proc.*, **32**, 840 (1973)
- 76) P. K. Nakane, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, Vol. 37, 133 (1975)
- 77) D. M. Weir ed., *Handbook of Experimental Immunology*, 3rd Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)
- 78) A. Kawamura, Jr. ed., *Fluorescence antibody techniques and their applications*, 2nd ed. Univ. Tokyo Press (1977)
- 79) T. Kitagawa, T. Aikawa, *J. Biochem.*, **79**, 233 (1976)
- 80) T. Kitagawa, T. Miura, K. Fujiwara, H. Taniyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 2215 (1972)
- 81) T. Kitagawa, T. Miura, C. Takaishi, H. Taniyama, *ibid.*, **24**, 1324 (1976)
- 82) 北川常廣, 武部勝海, 江藤省三, 伊藤俊哉, 土屋涼一, 相川忠臣, *臨床化学*, **6**, 178 (1978)
- 83) T. Aikawa, S. Suzuki, M. Murayama, K. Hashiba, T. Kitagawa, E. Ishikawa, *Endocrinology*, **150**, 1 (1979)
- 84) M. Kikutani, M. Ishiguro, T. Kitagawa, S. Imamura, S. Miura, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **47**, 980 (1978)
- 85) M. J. O'Sullivan, E. Gnemmi, D. Morris, G. Chieriegatti, M. Simmons, J. W. Bridges, V. Mark, *FEBS Lett.*, **95**, 311 (1978)
- 86) T. Kitagawa, T. Shimoazono, T. Aikawa, H. Nishimura, in *Peptide Chemistry* (T. Nakajima, ed.), Protein Research Foundation, Osaka, pp. 21 (1976)
- 87) 入江 實編, *続ラジオイムノアッセイ*, 講談社 (1979)
- 88) T. Chard, *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, North Holland Publ., Amsterdam, (1978)
- 89) E. T. John, M. H. William, in *Methods in Enzymology*, (J. J. Langone, H. Van Vunakis eds.) Academic Press, **73**, 79 (1981)
- 90) T. Kitagawa, H. Tanimori, K. Yoshida, H. Asada, T. Miura, K. Fujiwara, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2487 (1982)
- 91) H. Tanimori, T. Kitagawa, T. Tsunoda, R. Tsuchiya, *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 812 (1981)
- 92) T. Kitagawa, T. Kanamaru, H. Kato, S. Yano, Y. Asanuma, in *Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs*, (S. B. Pal. ed.) pp. 59, Walter de Gruyter and Co., Berlin New York (1978)
- 93) T. Miura, H. Kouno, T. Kitagawa, *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 706 (1981)
- 94) 大谷 渡, 木ノ上千保子, 藤原邦雄, 北川常廣, 日本薬学会第 102 年会発表 (1982)
- 95) T. Kitagawa, K. Fujiwara, S. Tomonoh, K. Takahashi, M. Koida, *J. Biochem.*, **94**, 1165 (1983)
- 96) H. Suzuki, H. Kato, N. Nakano, S. Yano, T. Kitagawa, *J. Antibiotics*, **34**, 1195 (1981)
- 97) K. Fujiwara, H. Saigusa, M. Yasuno, T. Kitagawa, *Cancer Res.*, **42**, 1487 (1982)
- 98) K. Fujiwara, A. Ogawa, H. Asada, H. Saikusa, H. Nakamura, S. Ono, T. Kitagawa, *J. Biochem.*, **92**, 1599 (1982)
- 99) K. Fujiwara, M. Yasuno, T. Kitagawa, *Cancer Res.*, **41**, 4121 (1981)
- 100) K. Fujiwara, H. Asada, T. Kitagawa, K. Yamamoto, T. Ito, R. Tsuchiya, M. Sohda, N. Nakamura, K. Hara, Y. Tomonaga, M. Ichimaru, S. Takahashi, *J. Immunol. Methods*, **61**, 217 (1983)
- 101) K. Fujiwara, M. Isobe, H. Saikusa, H. Nakamura, T. Kitagawa, S. Takahashi, *Cancer Treatment Reports*, **67**, 363 (1983)
- 102) T. Ghose, A. Blair, *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**, 657 (1978)
- 103) R. D. Ruebns, *Lancet*, **1**, 498 (1974)
- 104) G. Gregoriadis, *Nature*, **265**, 407 (1977)
- 105) M. Szwedler, K. S. Driscoll, *Eur. J. Cancer*, **13**, 529 (1977)
- 106) J. H. Fendler, A. Romero, *Life Sci.*, **20**, 1109 (1977)
- 107) D. W. Weiss, *Cancer Immunol. Immunother.*, **2**, 11 (1977)
- 108) G. Klein, E. Klein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 2121 (1977)
- 109) D. Pressman, R. Pressman, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **18**, 617 (1965)
- 110) M. S. Mahaley, Jr., J. L. Mahaley, E. D. Day, *Cancer Res.*, **25**, 779 (1965)
- 111) T. Koji, N. Ishii, T. Munechisa, S. Nakamura, A. Tamenishi, A. Hara, K. Kobayashi, Y. Tsukada, H. Hirai, *Cancer Res.*, **40**, 3013

- (1980)
- 112) D. M. Goldenberg, E. E. Kim, F. H. Deland, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 7754 (1981)
- 113) D. Colcher, M. Zalvtsky, W. Kaplan, D. Kufe, F. Austin, J. Schlom, *Cancer Res.*, **43**, 736 (1983)
- 114) A. E. Frankel, R. V. Rouse, M. C. Wang, /T. M. Chu, L. A. Herzenberg, *ibid.*, **42**, 3714 (1982)
- 115) T. Ghose, S. P. Niganm, *Cancer*, **29**, 1398 (1972)
- 116) I. Fleghner, *Eur. J. Cancer*, **9**, 741 (1972)
- 117) E. Hurwitz, R. Maron, M. Sela, *Cancer Biochem. Biophys.*, **1**, 197 (1976)
- 118) R. A. Rlickinger, S. R. Trost, *Eur. J. Cancer*, **12**, 159 (1976)
- 119) F. L. Moolten, S. R. Cooperband, *Science*, **169**, 68 (1970)
- 120) T. E. Bumol, Q. C. Wang, R. A. Reisfeld, N. O. Kaplan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 529 (1983)
- 121) L. L. Houston, R. C. Nowinski, *Cancer Res.*, **41**, 3913 (1981)
- 122) D. M. Neville, Jr., R. Youle, *Immunol. Rev.*, **62**, 75 (1982)
- 123) 岩城裕一, 菊地浩吉, 免疫, **20**, 1537 (1983)
- 124) O. Keller, J. Rudinger, *Helv. Chim. Acta*, **58**, 531 (1975)
- 125) S. Yoshitake, Y. Yamada, E. Ishikawa, R. Masseyeff, *Eur. J. Biochem.*, **101**, 395 (1979)
- 126) J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, *Biochem. J.*, **173**, 723 (1978)
- 127) S. Yoshitake, M. Imagawa, E. Ishikawa, *Anal. Lett.*, **15** (B2), 147 (1982)
- 128) T. Kitagawa, H. Tanimori, K. Yoshida, T. Miura, K. Fujiwara, *J. Biochem.*, **91**, 1601 (1982)

書 評

「高分解能 NMR」

E. D. Becker 著 東京化学同人
 斉藤 肇・神藤平三郎 訳 3,800 円

NMR スペクトル程化学に大きなインパクトを与えた技術はない。NMR 装置はその後にも進歩を続け、 ^{13}C NMR や、核オーバーハウザー効果の他、パルスフーリエ変換法などの急速な発達を遂げた。これらの新技術は超伝導磁石の開発にささえられて大変めざましい利用価値を示した。

本書はこれらの新技術を基本装置と基本理論を基礎にして解説した、“High Resolution NMR-Theory and Chemical Applications” Second Edition の邦訳であって、1) 歴史的背景、2) 理論、3) 装置および測定技術、4) 化学シフト、5) 電子スピン-スピン相互作用、6) 構造決定への利用、7) 複雑なスペクトルの解析、8) 緩和、9) 二重共鳴法、11) パルスフーリエ変換法、11) 変換過程：動的 NMR、12) 溶媒効果と水素結合、13) 定量分析への NMR の利用、14) 最近の進歩、よりなる。構造解析を志す学生諸君に大変便利なテキストであろう。章末には練習問題が付けられ、こ

れは巻末にまとめられた未知のプロトン NMR スペクトルに対応している。このプロトン NMR スペクトルには必要に応じて ^{13}C NMR スペクトルのケミカルシフト値が与えられていて総合的解析に便利である。一応解析力を身につけた初心者には、特にこの 40 種のスペクトル解説を推める。不明の点があったら再び本文に戻って理解するよう心掛ければ、本書の NMR テキストとしての価値をより一層高めると信ずる。

更に、本書の訳者らの専門分野である二次元 NMR と固体高分解能 NMR について訳者補遺がつけられている。この部分は原著にないものであるが、最近の NMR の最先端を知るのに大変便利で、本書の価値を高めるのに役立つ。

これから NMR を勉強しようとする学生諸君や、もう一度知識の整理を心掛ける研究者に最高のテキストとなるであろう。

(小倉治夫)