

異常血色素に関する研究Ⅲ：Edman-Dansyl 法 によるペプチドのアミノ酸配列決定法について

川崎医科大学・生化学教室

井内岩夫，仲田克子，日高和夫，原野昭雄

(昭和52年10月3日受理)

Studies on the abnormal hemoglobin III. Determination of amino acid sequence in a peptide of abnormal hemoglobin by the Edman-Dansyl method.

Iwao IUCHI, Katsuko NAKATA, Kazuo HIDAHA and Teruo HARANO

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Oct. 3, 1977)

要 約

異常血色素の一次構造異常をつきとめるための一手段として、ペプチドのアミノ酸配列を逐次決定する Edman-Dansyl 法について吟味し、私共の方法を確立した。試料はフィンガープリントマップに、ニンヒドリンを薄く噴霧して発色させたペプチドを抽出したもので、これにはニンヒドリンと反応したペプチドと、反応していないペプチドの二種類を含むが、本法では、後者のニンヒドリンと未反応のペプチドを対象とし、アミノ酸配列を決定する。私共の操作で、ペプチドのフェニルイソチオシアネートを用いる PTC 化反応ならびにダンシルクロリドを用いるダンシル化反応などは、概ね Gray ならびに Hartley の方法¹⁾を踏襲したが、いずれの反応についても収率を高めるために、いくつかの操作を短縮、もしくは改変した。

ダンシルアミノ酸は、ポリアミドシート上で電気泳動 (pH 6.4) とクロマト法 (ベンゼン：酢酸 = 9 : 1 混液) を用いて二次元展開することにより同定した。

ペプチドのアミノ酸配列を決定するうえの困難としては、i) 反応の特質から、ii) ペプチド試料の特殊なアミノ酸配列状態から必然的に惹起されるもの、iii) 本法の方法論上から起こるものがあり、これらについて吟味し、経験を述べた。そして、結局、各反応段階の操作を確実に実施し、避けられない副反応生成物に注意すれば、一枚のフィンガープリント (50~400 nmole) から抽出したペプチドを用い、10種類程度のアミノ酸配列を決定することができた。実際の異常血色素の一次構造決定には、他の酵素分解等を併用して、アミノ酸が10個以内の小さいペプチドに分断し、その後本法を適用するので、この程度の配列決定がないうれば、十分に目的を達成しうることがわかった。本法は、ペプチドのアミノ酸配列決定法としては、比較的容易に実施することができ、判定も確実であるので推奨に値しうる。

Summary

In order to determine the amino acid sequence in a polypeptide chain of abnormal hemoglobin, a devised Edman-Dansyl method has been established after careful and

detailed examinations of the procedure.

The specimens were the peptide (50~400nmole) eluted from a fingerprint map colorized faintly by the ninhydrin spray, so that it might be constitute the mixture of the two forms of a peptide, namely, with and without free α NH_2 -terminal.

Therefore, a peptide with free α NH_2 -terminal is an objective specimen in this method although NH_2 -depleted form of a peptide did not show any interferences in the processing. Our procedures were basically followed to that of Gray and Hartley in the Edman's PTC coupling degradation, and dansylation techniques, but the procedures were slightly modified for conditioning of the reaction and the abbreviation of the steps to raise up an yield and simplicity.

Identification of the dansylated amino acid released from a peptide was performed by subjecting the specimen to two dimensional developments on a polyamide sheet in a way of electrophoresis (pH6.4) in one direction and ascending chromatography (Benzene : Acetic Acid=9 : 1) in another rectangular direction.

Some difficulties in the sequence determination arised by i) the specific characters of the reagents, ii) specific amino acid arrangement of a peptide and iii) our methodological procedures have also been discussed together with our its usage experienced.

Emphases were made on to carry out the procedures strictly following to the direction, so that the determination of ten amino acid sequence from the N-terminal in a peptide which was extracted from one fingerprint map might be securely possible.

It was, therefore, concluded that our modified method was very useful and recommendable for the analyses of primary structure of abnormal hemoglobin because a large peptide can be split into small peptide fragments constituting below ten amino acid by enzyme treatments such as chymotrypsin, pepsin thermolysin and so forth.

はじめに

蛋白質，殊に異常血色素 (abn. Hb) を取扱う私共の研究領域では，abn. Hb の物理的，化学的性質の異常を解明し，これらの諸性質と，患者が示す臨床的異常所見の関連について追求するのは当然のことであるが，それらは結局 abn. Hb のグロビン (蛋白部分) の一次構造に起因していることを思えば，abn. Hb の一次構造異常の決定が，この領域の研究に如何に根本的に大切なものであるか理解しえよう。

しかしながら，このように大切な一次構造異常の決定も必ずしも容易なことではなく，いくつかの複雑な過程を経て異常ペプチドを抽出し，そのアミノ酸配列を調べることによってはじめて異常が確定する。

私共は，限られた少量の試料量で目的を達成しうる方法として，Edman-Dansyl 法^{2),3),4)}を選び吟味した。そして私共の方法を確立したので，それをここに紹介し，使用経験を報告することにしたい。

方 法

Edman-Dansyl 法によりペプチドのアミノ酸配列を決定する原理は，i) ペプチドを構成す

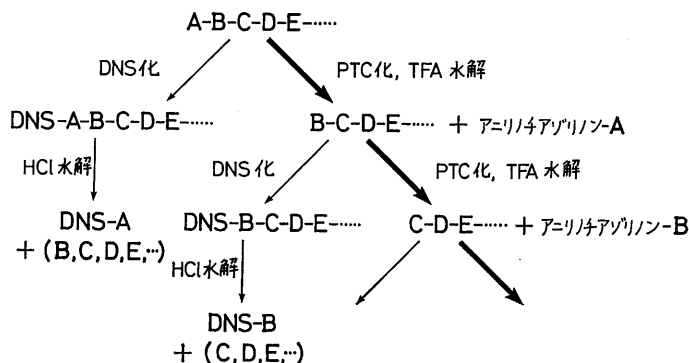


図1：ペプチドのEdman分解とDNS化反応の原理図

るアミノ酸を一操作ごとに1個ずつ遊離させるEdman (PTC)*1法^{5),6)}と、ii) ペプチドのN末端アミノ酸を高感度に検出し確認するダンシル (DNS)*2化法^{7),8)}とを組合せ、ペプチドのアミノ酸配列を決定してゆくことにある。すなわち、種類の異なるアミノ酸、A, B, C, D, Eがアミド結合したペプチドA-B-C-D-Eを仮想し、その配列を決定するには(図1)、まずペプチドの一部を用いてダンシル化反応を進行させ、DNS-A-B-C-D-Eを得る。次いで、6N-HClでこれをDNS-AとB, C, D, Eに加水分解し、蛍光を有するDNS-Aをクロマト法等で同定する。他方、残りのペプチドについては、PTCをカップリングさせ(これをEdman反応という)、PTC-A-B-C-D-Eを得る。これをTFA*3で温和な条件下に加水分解し、アニリノチアゾリノン-Aと、AがはずれたペプチドB-C-D-Eに分断する。分断ペプチドB-C-D-Eは、その一部をDNS化反応に、残りをPTC化反応に使用する。前者からはBを同定し、後者からはペプチドC-D-Eを得ることになる。この操作を順に繰り返すことによって、最終的にペプチドA-B-C-D-Eのアミノ酸配列を決定するわけである。従って、ここでは方法の記述として、i) DNS化反応とダンシルアミノ酸の確認法、ii) Edman法によるペプチドのPTC化反応に区別し、私共の確立した方法を述べることにする。

〔I〕ダンシル化反応

A) 試料：私共が使用した試料は、ヘモグロビンの α , β 鎖をトリプシン消化し、それをフィンガープリントにかけ、抽出した数個~数十個のアミノ酸から成るペプチドである。すなわち、ニンヒドリンを薄く片面に噴霧して発色させたフィンガープリントマップより目的ペプチドを含む部分をハサミで切り出し、多量のアセント液でできるだけニンヒドリンを除去し風乾する。30%酢酸を用いて風乾した汚紙からドリップ法でペプチドを抽出し、抽出液を凍結乾燥させて試料とする⁹⁾。

*1 PTC : Phenylisothiocyanate

*2 DNS : Dansylation

*3 TFA : Trifluoroacetic acid

B) 試薬

i) 0.25% ダンシルクロリド (DNS-Cl)^{*4}・アセトン溶液

ダンシルクロリド (東京化成) 2.50 mg をアセトン 1.0 ml に溶解する。

ii) 0.1 M トリエチルアミン緩衝液 (pH, 8.5~9.0)

0.1 M トリエチルアミン溶液に、ガラス電極 pH メーターの電極を挿入し、炭酸ガスをボンベより吹き込んで pH 8.5~9.0 に調整する。

iii) 6N-HCl

市販濃塩酸 (特級) を蒸留水で 2 倍に薄め、ガラス製蒸留装置を用いて蒸留し、定沸点留分 (B.P. 110°C) を集める。

iv) 水飽和酢酸エチル

酢酸エチルと蒸留水を分液漏斗に入れて振り混ぜ、酢酸エチル層を遠心し上澄液を使用する。

C) 操作

1) 小試験管 (12mm×105mm) 内のペプチド試料 (100~400 nmole) に、20 μ l のトリエチルアミン緩衝液、20 μ l のダンシルクロリド・アセトン液を加えて混和し、パラフィルムで密封して室温で 3 時間 (37°C ならば 30 分間) 反応させる。ダンシル化反応は定量的に進行し、過剰のダンシルクロリドは、DNS-OH^{*5} もしくは DNS-NH₂^{*6} に変化する。

2) 時間がきたら、反応液を減圧乾燥させる。乾固は 30 分で完了するが、更に 20 分ぐらい乾固し続け、揮発性緩衝液を十分に除去する。

3) 試験管を火炎で伸ばしてアンプル状にし、乾固物に 0.2 ml の 6N-HCl を加える。N₂ ガス置換をした後、減圧融封し、90°C で 16 時間加水分解する。

4) 試料管を開管し、加温 (60°C) しながら減圧乾固し塩酸を逸散させる。

5) 乾固物にエタノール 50 μ l を加えて、アンプル内壁に付着した試料を管底に集め、再び減圧乾固して完全に HCl および水分を除く。

6) 乾固物に 0.1 ml の水飽和酢酸エチルを加え、ミキサーを用いて内容物を烈しく攪拌抽出する。遠心後、酢酸エチル層を別の試験管に移し入れる。この操作を更に一回繰り返す。DNS アミノ酸は酢酸エチル層に抽出され、DNS-Cl の副生物 (例えば DNS-OH, DNS-NH₂) の大部分は水層 (試験管内に付着) に留まる。

抽出後の水層が入った試験管は捨てずに保存する。

7) 抽出した酢酸エチル層を集めて一緒にし、酢酸エチル除去後、電気泳動用ピリジン酢酸緩衝液 (pH 6.4) に溶かし同定用試料とする。

*4 DNS-Cl : Dansyl chloride

*5 DNS-OH : 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonic acid

*6 DNS-NH₂ : 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonamide

〔Ⅱ〕 DNS-アミノ酸の同定

DNS-アミノ酸の同定は、試料を電気泳動とクロマトにより二次元的に展開し、DNS-アミノ酸の蛍光作用を利用して位置を知り確定する。

A) 試薬

i) ピリジン酢酸緩衝液 (pH 6.5), 電気泳動用

ピリジン (半井・クロマト用), 酢酸 (半井・クロマト用) および H_2O を, 容積比で 150 : 4 : 846 に混和し使用する。

ii) クロマト用ベンゼン酢酸展開液

蒸留ベンゼンならびに酢酸 (半井・クロマト用) を容積比で 9 : 1 に混和し使用する。

B) 器具

i) 高圧電気泳動装置

定電圧直流電源 (7000 V, 100 mA) を使用する。泳動槽は, 冷却装置を付した泳動槽を使用する。(図 2)

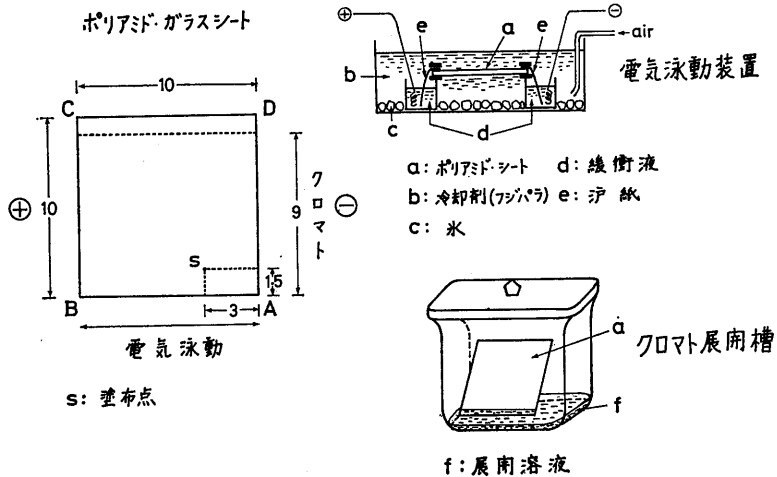


図 2 : DNS-アミノ酸同定装置

ii) ポリアミドガラスシート

ポリアミドガラスシート TLC-G1600 (Carl Schleicher & Schüll Co) 10×20 cm を 10×10cm の 2 枚に切断して使用する¹⁰⁾。

iii) 紫外線ランプ

波長 365 nm の紫外線を照射するものを使用する。

C) 操作

1) ポリアミドシート (10×10cm) の A 隅から 1.5cm と 3.0cm の座標点(S)に, DNS

化した試料を直径 2.0 mm 以内の大きさに塗布する。(図 2)

2) 塗布した試料がよく乾いてから、ピリジン酢酸緩衝液を全体に噴霧する。

3) ポリアミドシートの AD 側を陰極, BC 側を陽極として泳動槽に装着し, 300 V (6 mA), 10 分間, 次いで 1000 V (20~50 mA), 90 分間泳動する。泳動中は, とどき紫外線照射をしてスポットの移動を監視する。

4) 時間ができたら, 電源を切ってシートを取り出し十分に乾燥させる。AB 側をクロマト用展開溶液につけてクロマトを行ない, 展開溶液の上端が 9 cm に達したら取り出して乾燥する。この場合も, クロマト展開中にとどき紫外線を照射し, スポットの移動を監視することが望ましい。

5) 二次元展開が終わったら, 取り出して風乾し, 紫外線ランプを照射してスポットの展開位置を移る。移動度を計算し, ダンシルアミノ酸を同定する。

〔Ⅲ〕Edman 法によるペプチド PTC 化反応

A) 試薬

i) 5% PTC 溶液

PTC (和光・特級; 蒸留により精製する場合は, 76.2~76.6°C/4 mmHg の留分を集める。) 0.05 ml とピリジン 0.95 ml を混和して使用する。混和は使用直前に行ない, 一回使用すれば以後は使用しないようにする。

ii) 60%ピリジン溶液

ピリジン (半井・クロマト用) 60 ml と蒸留水 40 ml を混和して使用する。

iii) トリフルオロ酢酸 (TFA)

TFA (和光・アミノ酸分析用) をそのまま使用する。

iv) 酢酸ブチル

蒸留したものを使用する。

B) 操作

1) 小試験管 (12mm×120mm) に入ったペプチド試料 (仮に A-B-C-D-E とする) (50~400 nmole) に, 0.2 ml の 60%ピリジン液, 0.15 ml の 5% PTC 液を順に加えて混和し, N₂ ガス置換の後密栓し, 40°C で 60 分間反応させる。これにより PTC-ペプチドの生成は完了する。

2) 減圧下乾固し, 揮発性溶媒ならびに揮発性副反応物をできるだけ除去する。

3) 乾固物に 0.5 ml の TFA を加え, N₂ ガス置換をし, 45°C で 30 分間加水分解する。PTC-A-B-C-D-E ペプチドは, 誘導体アニリノチアゾリノン-A や PTC-A とペプチド B-C-D-E に分断される。

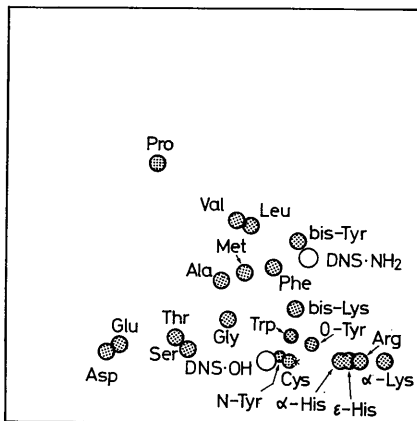
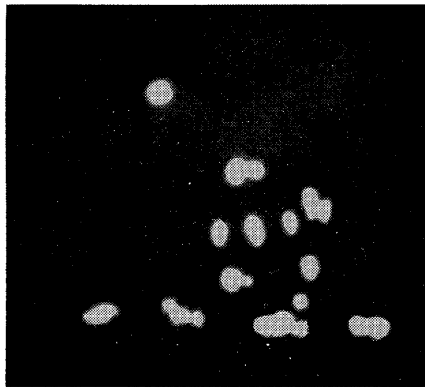
4) 時間がきたら減圧乾固し, 乾固物に 0.2 ml の水を加え, 更に 1.5 ml の酢酸ブチルを

加えて烈しく振る。遠心後、酢酸ブチル層にアニリノチアゾリノン誘導体-Aおよびデフェニルチオウレア等の副反応物を移行させる。副反応物の抽出操作は3回繰り返す、酢酸ブチル層を除く。

5) 抽出後の水層はペプチド B-C-D-E を含むから、これをダンシル化によるN末端アミノ酸検出用とPTC化によるBアミノ酸除去用に配分し、各々を凍結乾燥する。

成績と考察

DNS-アミノ酸は、紫外線照射により一般には黄緑色の蛍光を発したが、O-DNS-Tyr, bis-DNS-Tyrなどは橙色に、また、副反応生成物としてのDNS-NH₂ならびにDNS-OHはそれぞれ青緑ならびに青色の蛍光を発し、他のDNS-アミノ酸との鑑別は容易であった。ことに後二者は上述の操作でいつも抽出液中に適當濃度含まれてくるので、DNS-アミノ酸の相対移動度表現の基準として用いられることがわかった。表1および図3に、本法によるDNS-ア



十) ← 電気泳動 → (-)

図3：標準DNS-アミノ酸の二次元展開図

表1：電気泳動とクロマト法による標準DNS-アミノ酸の移動度。それぞれ原点からのDNS-NH₂とDNS-OHの移動度を1.0として表示した。

DNSアミノ酸	移動度	
	電気泳動	クロマト
DNS-NH ₂	0.00	<u>1.00</u>
DNS-OH	<u>1.00</u>	0.00
Arg	-1.25	0.00
α-His	-0.78	0.00
bis-His	0.32	0.00
α-Lys	-1.88	0.00
ε-Lys	0.94	0.00
Gly	1.97	0.39
Ala	2.09	0.78
Val	1.73	1.34
Leu	1.40	1.31
Ser	2.90	0.10
Thr	3.20	0.22
Cys-SH	0.43	0.00
Met	1.54	0.85
Phe	0.85	0.89
N-Tyr	0.72	0.04
O-Tyr	-0.09	0.16
bis-Tyr	0.24	1.16
Trp	0.41	0.23
Pro	3.64	1.90
Asp	4.83	0.08
Glu	4.52	0.14

ミノ酸の相対移動度を示した。電気泳動の場合は⁷⁾、試料塗布点と DNS-OH 間の距離を1.00とし、クロマトの場合は、原点と DNS-NH₂ 間の距離を1.00として DNS-アミノ酸の移動度を示した。表1中、負の移動度は DNS-OH と反応方向に泳動されることを示す。

いずれのアミノ酸も、きれいな鋭い小スポットとして分離され、再現性もすぐれており同定に困難はなかった。また、実際にペプチドのアミノ酸配列を決定してゆく場合には、図3のごとく多数のアミノ酸が同時に出現するのではなく、一操作一種類のアミノ酸であり、しかもペプチドのアミノ酸の数と種類は事前にアミノ酸分析で確定したものを取り扱うので、同定に迷うことはなかった。しかし、同じアミノ酸でもペプチド中での位置、前に受けた反応の履歴により、異なった DNS-アミノ酸を生じるので注意を必要とした。例えば、表1にもアミノ酸の種類によっていくつかの DNS 誘導体を記しているが、DNS 化反応は、ペプチドの N 末端アミノ酸の NH₂ 基以外にも、ペプチドに含まれる Tyr の OH 基、His のイミダゾール(Im)基、Cys の SH 基、Lys の ϵ -NH₂ 基とも反応し、それぞれの DNS 結合体をつくる^{2),7)}。このうち、Im-DNS-His、S-DNS-Cys は、次の 6N-HCl 加水分解時に分解して DNS-OH として遊離し検出されないが、O-DNS-Tyr、 ϵ -DNS-Lys は酸分解に抵抗するので、N 末端アミノ酸でないのに出現し、紛わしい判定の原因となった。もちろん、Tyr、Lys が N 末端アミノ酸の場合は、bis-DNS-Tyr、bis-DNS-Lys がポリアミドシート上で別の位置に出現するので、判定に特に困難はなかった。

また、表1中、Tyr および Lys の α -アミノ基のみが DNS 化された誘導体 (N-Tyr、 α -Lys) は、ペプチドの N 末端アミノ酸が Lys もしくは Tyr であり、しかも、すでに PTC 化反応を先行させている場合に多量に出現した。これは、PTC 基が Tyr の OH 基、Lys の ϵ -NH₂ 基に導入されており、それをそのまま DNS 化すると、これらの基に DNS 基が導入されず、 α -NH₂ 基にのみ DNS 基が導入され、次の酸加水分解操作により PTC 基が遊離したせいと考えられた。さらに、実際のペプチドのアミノ酸配列の決定には、量的には少量であるが確認しようとする前のアミノ酸も出現するという困難もあった。これは、PTC 化反応がときに不完全で、ペプチドから遊離させておかねばならぬアミノ酸が遊離しておらず、もとのままのペプチドが DNS 化反応に紛れこんだせいと考えられ、各操作のステップを確実に実施してゆくことが大切であった。

本法の方法論上の問題点としては、まず私共が使用したペプチド試料がフィンガープリントから抽出されたものであるため、ニンヒドリン発色により N 末端アミノ酸が変化し、DNS 化反応、PTC 化反応を受けつけない、配列決定に無効なペプチドになっている点であった。すなわち、完全に発色させてしまったペプチドは本法に使用することはできなかった。従って、ニンヒドリンをフィンガープリント用紙の片面に薄く噴霧し、薄く発色させて目的ペプチドを早く取り出し、過剰のニンヒドリンをアセトンで十分に除いて無効ペプチドの生成を抑え、有効ペプチドの収率を上げることに心掛ける必要があった。しかしながら、この無効ペプチドが不純物として共存していても、有効ペプチドのアミノ酸配列決定そのものに妨害とはならな

った。

次に、本法によってペプチドA-B-C-D-Eのアミノ酸配列を逐次決定していく場合、最終段階でのDNS-アミノ酸A, B, C, D, Eの絶対量を同一にする, すなわち同じ強さの蛍光を発せしめる事が必要である。このためには、各段階で用いる試料量を、DNS化反応とPTC化反応の収率, ならびに配列決定しようとするアミノ酸数(操作数)によって決めなければならない。私共のPTC化反応ならびにDNS化反応の収率は、それぞれ約70%, 100%とみなし得たので、例えば5回操作、ペプチドA~Eまでを決定するには、DNS化反応へまわすペプチドの試料量は、各段階のペプチド量を1.0とみなし、 $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{6}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{3}$, 残り全部というように分取することが必要であった。ちなみに、7個までのペプチドのアミノ酸配列を決定するためには、DNS化反応に使用する各段階のペプチド量は、 $\frac{1}{25}$, $\frac{1}{17}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{7}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 残り全部というような配分となる。

DNSペプチドの6N-HClによる加水分解は、通常90°C, 16時間で充分であった。これ以上長時間になると、アミノ酸の種類により差があるが、DNS-アミノ酸の収率が低下した。しかし、ペプチドのアミノ酸配列がDNS-Val-Val-..., DNS-Val-Leu-...などの例では、ほとんどDNS-Valは検出されず、DNS-Val-Val, DNS-Val-Leuとして検出され、加水分解条件を110°C, 24時間にしようやくDNS-Valの検出が可能であった^{10), 11)}。

Gray⁸⁾によると、このような例としてDNS-Ile-Val-..., DNS-Ile-Ile-...例が報告されているが、abn. Hbにはこのような例がないので、私共は経験していない。

水飽和酢酸エチルによるDNS-アミノ酸の分別抽出では、 α -DNS-His, α -DNS-Lys, DNS-Cys, DNS-ArgなどはDNS-OH, DNS-NH₂と同様に分子極性が強く、水層に大部分が残留した。従って、この種のアミノ酸配列を疑う場合、水層をピリジン酢酸緩衝液にとかし、吟味する必要があった^{8), 13)}。

また、ペプチド成分として、AspとAsn, GluとGlnの区別は本法ではなし得なかった。これは、DNS化反応後に酸加水分解を行なうので当然のことであろう。この場合、多少感度は落ちるが、PTH誘導体を蛍光プレートクロマト法にかけることにより区別が可能であった。

以上、本法は一枚のフィンガープリント(約400 nmoleのペプチド)より抽出したペプチドから約10個のアミノ酸配列を決定することができた。そしてこの程度まで分析を可能にすると、実際の異常血色素の一次構造決定には、アミノ酸残基数が大きいペプチドの場合でも、他の酵素による水解を併用してそれを10個以内の小ペプチドに分断し、本法を適用するので、支障はなかった。

本法は、ペプチドのアミノ酸配列決定法としては比較的容易に実施でき、同定も確実にこなえるので推奨しうと思う。

References

- 1) Gray, W. R. and Hartley, B. S. : The structure of a chymotryptic peptide from *Pseudomonas* cytochrome c-551. *Biochem. J.*, 89 : 379-380, 1963.
- 2) Gray, W. R. : Sequence analysis with dansyl chloride. In Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N. : *Methods in Enzymology*, 25 Part B : 333-344, Acad. Press (N. Y.) 1972.
- 3) Percy, M. E. and Buchwald, B. M. : A manual method of sequential Edman degradation followed by dansylation for the determination of protein sequences. *Anal. Biochem.*, 45 : 60-67, 1972.
- 4) Weiner, A. M., Platt, T. and Weber, K. : Amino-terminal sequence analysis of proteins purified on a nanomole scale by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 247 : 3242-3251, 1972.
- 5) Konigsberg, W. : Subtractive Edman degradation. In Hirs, C. H. W. : *Methods in Enzymology*, 11 : 461-469, Acad. Press (N. Y.) 1967.
- 6) Gray, W. R. : Sequential degradation plus dansylation. In Hirs, C. H. W. : *Methods in Enzymology*, 11 : 469-475, Acad. Press (N. Y.) 1967.
- 7) Gray, W. R. : End-group analysis using dansyl chloride. In Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N. : *Methods in Enzymology*, 25 Part B : 121-138, Acad. Press (N. Y.) 1972.
- 8) Gray, W. R. : Dansyl chloride procedure. In Hirs, C. H. W. : *Methods in Enzymology*, 11 : 139-151, Acad. Press (N. Y.) 1967.
- 9) 日高和夫, 井内岩夫, 吉田克子 : 異常血色素の α 鎖および β 鎖のトリプシン消化法, ならびにフィンガープリント法による異常ペプチドの分離と同定について : *川崎医学会誌, 一般教養篇* 2 : 37-47, 1976.
- 10) Woods, K. R. and Wang, K. T. : Separation of dansyl-amino acids by polyamide layer chromatography, *Biochim. Biophys. Acta*, 133 : 369-370, 1967.
- 11) 吉田久信, 久保博昭 : 生体試料の分析法(II), アミノ酸・ペプチド・蛋白の分析法(I), *代謝*, 6 : 663-678, 1969.
- 12) 田村善蔵, 中嶋暉躬 : DNS法について, *蛋白質・核酸・酵素*, 12 : 729-736, 1967.
- 13) Gros, C. and Labouesse, B. : Study of the dansylation reaction of amino acids, peptides and proteins. *Eur. J. Biochem.*, 7 : 463-470, 1969.