

Application News

No. B63A

プロテインシーケンサ

IgG 抗体の N 末端アミノ酸配列分析

■はじめに

製薬の分野において最近よく耳にする “バイオ医薬品” という言葉があります。またはバイオ製剤とも言いますが、これは遺伝子組換え、細胞融合、細胞培養などのバイオテクノロジーを利用して開発製造されたタンパク質性医薬品、抗体医薬品などを示しています。これに対して従来の薬は、“低分子医薬品” と呼ばれ、化学合成されています。どちらも化合物なのですが、バイオ医薬品は化学合成されている低分子医薬品と比べると、圧倒的に分子量が大きいのが特徴です。2015 年の世界での全医薬品売上トップ 10 薬剤のうち、実に 7 製品がバイオ医薬品で占めています。

バイオ医薬品は、薬効が高い、副作用も少ない、適用できる病気の利用範囲も広い医薬品として期待されています。しかし、残念なことに、これまで主流であった低分子医薬品とは違って、バイオ医薬品は、化学合成品のような大量生産ができません。バイオ医薬品の生産には製造、精製、製剤設計、貯蔵などの複数の工程があります。バイオ医薬品の品質を保証するには、製品に関する品質試験を行うだけではなく、原材料や製造プロセスに起因する影響も考慮しなければなりません。そのため、医薬品の製造管理や品質管理においては、化学合成品の低分子医薬品とは異なった対応が求められることとなります。現在、バイオ医薬品には、品質評価のためのガイドラインがあります。その中に特性解析が必要とされており、その特性解析の一つに N 末端アミノ酸配列分析があります。この分析は、遺伝子配列から推定される N 末端アミノ酸配列と製造されたバイオ医薬品の N 末端アミノ酸配列とを比較、確認するために行われています。分析手法として、エドマン法を用います。この分析手法は、タンパク質の N 末端側からアミノ酸を順次に切断して、アミノ酸配列を決定する方法で、信頼性の高いアミノ酸配列結果を得ることが可能です。この手法を自動化したシステムがプロテインシーケンサ PPSQ™-51A/53A イソクラティックシステムです。この装置では、目的のタンパク質およびペプチドの N 末端側からのアミノ酸配列を容易に同定することができます。

ここでは、バイオ医薬品の N 末端アミノ酸配列解析の分析例として、プロテインシーケンサ PPSQ-50A イソクラティックシステムを用いたマウス血清由来 IgG のアミノ酸配列分析例をご紹介します。

T. Kuriki

■方法

抗体の基本的な構造は、それぞれ 2 本の H 鎖（重鎖ともいう、分子量の大きい方）と L 鎖（軽鎖ともいう、分子量の小さい方）から構成されています。インタクトの抗体は、分子量が大きいため（おおよそ 150kDa）、そのままではプロテインシーケンサによる N 末端アミノ酸配列分析は、非常に困難です。この分析例では、IgG マウス血清由来 (SIGMA-ALDRICH cat#15381) 10pmol を SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) を用いて H 鎖と L 鎖にそれぞれ分離した後、PVDF 膜へのエレクトロブロットングを行いました。その CBB 染色をした L 鎖、H 鎖それぞれの PVDF 膜を PPSQ-53A イソクラティックシステムで分析しました。

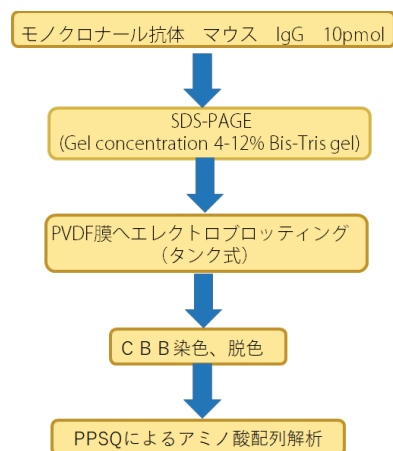


図1 N末端アミノ酸配列分析のプロトコール

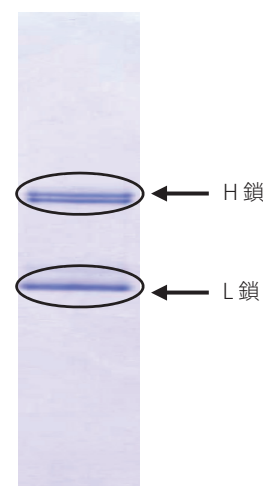


図2 エレクトロブロットング後の PVDF 膜

■ N 末端アミノ酸配列分析結果

図3および図4は、IgG マウス血清由来 (SIGMA-ALDRICH cat#15381) の L 鎖、H 鎖の N 末端アミノ酸配列分析結果です。それぞれのサンプルの 1 から 5 サイクルまでのクロマトグラム (1 サイクル目は生クロマトグラム、2 サイクル以降は差クロマトグラム) を示します。図3より、L 鎖の第1サイクルの結果から N 末端のアミノ酸残基はアスパラギン酸 (Asp)、第2サイクルの結果から N 末端の2番目のアミノ酸残基はイソロイシン (Ile) と同定されました。21 残基までの分析を行った結果、その配列は N 末端側から Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ser-Ala (Val)-Ser-Val-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Ile と同定され、データベース検索で Immunoglobulin kappa light chain であると確認できました。

同様に図4に H 鎖の第5サイクルまでの結果を示します。その配列は N 末端側から Glu-Val-Gln-Leu-Gln-Glu-Ser-Gly-Pro-Glu-Leu-Val-Lys-Pro-Gl-Ala-Ser と推定し、データベース検索の結果、immunoglobulin alpha heavy chain であると確認できました。このように、プロテインシーケンサで分析を行うことで N 末端部の配列を容易にかつ正確に同定することが可能であり、プロテインシーケンサは、バイオ医薬品の品質管理に有用なシステムといえます。

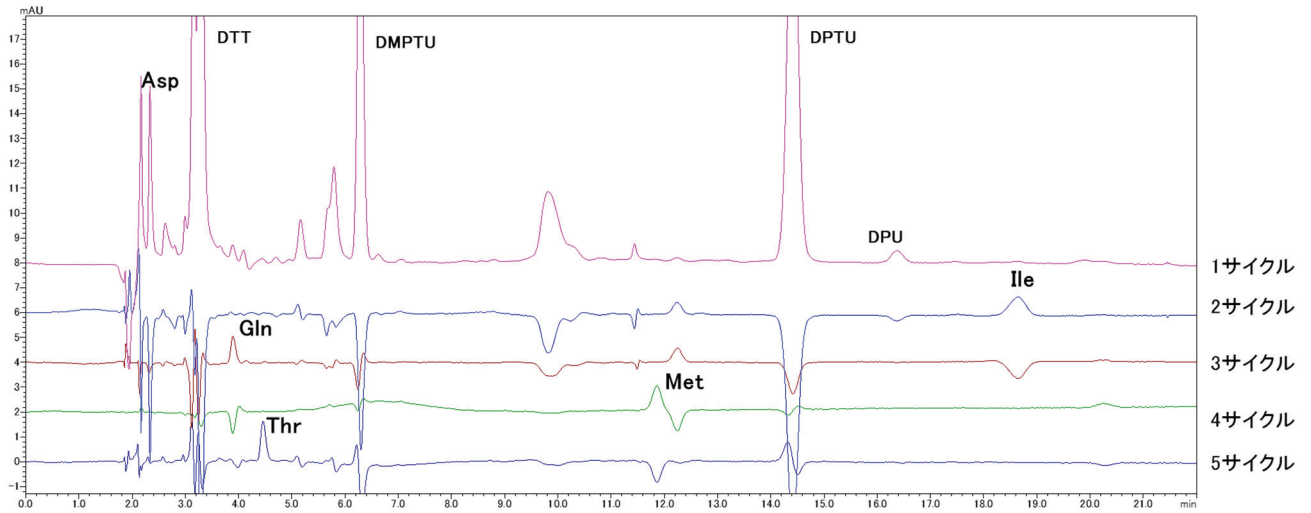


図3 L鎖クロマトグラム (1~5 サイクル)

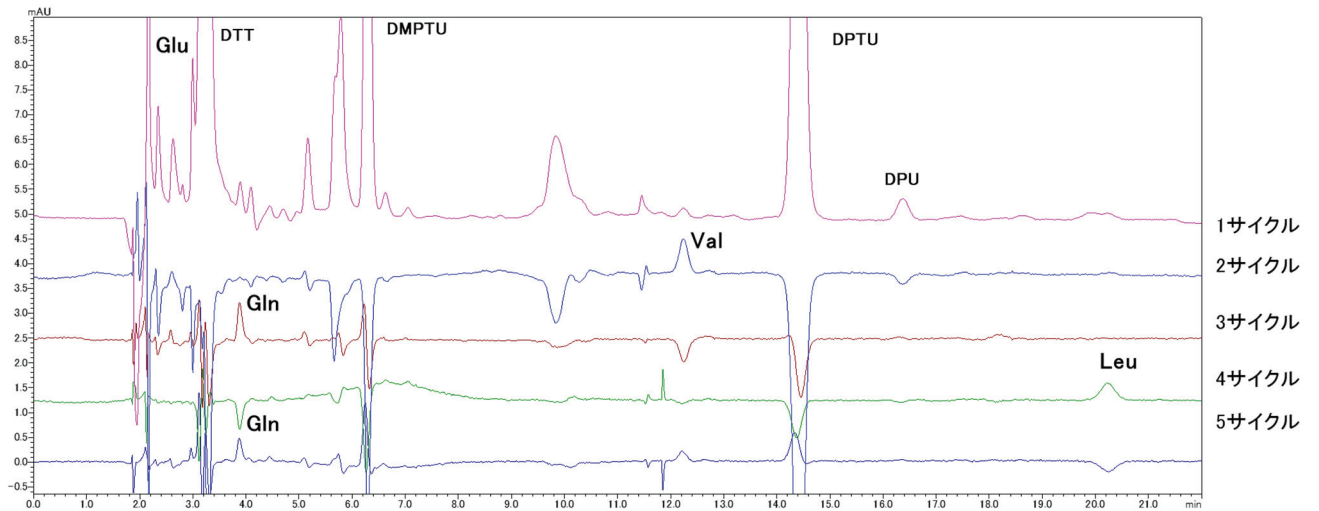


図4 H鎖クロマトグラム (1~5 サイクル)

PPSQ は株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。

なお、本文中には TM、®マークを明記していません。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

A 改訂版発行：2019年2月

初版発行：2017年5月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。