SHIMADZU
Excellence in Science

Application Note

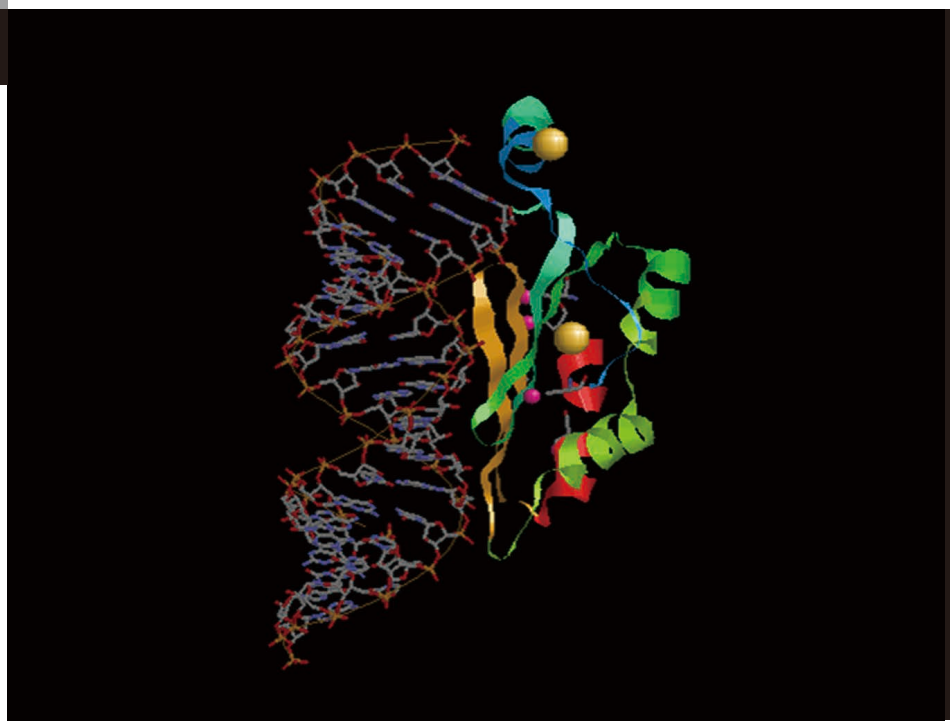
No. 12

ライフサイエンス

タンパク質・ペプチドの 1 次構造解析 – プロテインシーケンサの活用 –

Primary Structural Analysis of Protein / Peptides
– Application of Protein Sequencer –

坂本　安 [*1]，栗木智子 [*2]



Lifescience

1. はじめに

現在，病変，種差，遺伝的多様性，異形細胞等，細胞の状態に関わる組織間，細胞間での各発現タンパク質の網羅的な比較・同定を遂行し，病態や生命現象の理解を試みるためのプロテオーム（Proteome）解析が幅広い分野で進行しています。例えば，病巣組織と正常組織のプロテオーム解析から，病気の原因，治療方法を検討したりその病気のマーカータンパク質を探索したりすることです。Proteome とは 1995 年頃に作られた発現しているタンパク質全体を指す造語であり，遺伝子（ゲノム：Genome）に対応するものです。

一般的には，同一生物種におけるゲノムの変化は僅かですが，プロテオームは臓器間，細胞間における変化が多大です。生物は，遺伝子情報を機能させるためにそれを発現させなければならず，タンパク質は広範囲な遺伝子機能を発現させるための極めて重要なツール分子です。プロテオームを解析する研究は，生命現象を解き明かす上で不可欠と考えられ，プロテオミクス（Proteomics）と呼ばれます。しかしながら，歴史的に見ても網羅的にプロテオーム解析を行う事は，ゲノム解析に比較して大きな困難を伴っていました。

*1 埼玉医科大学　医学部　中央研究施設
*2 (株)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

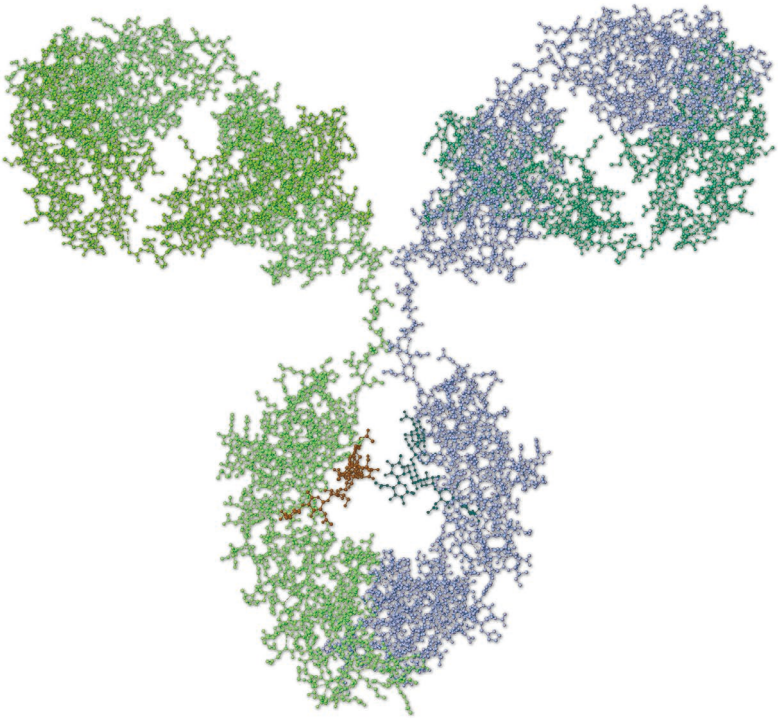
ゲノム解析では，Polymerase Chain Reaction（PCR）法の様に目的分子を増幅するような技術が試料の微量化を促進し，多くの手技がキット化されました。また，4 種類の塩基組成から成る核酸は分子が巨大化しても物性の変化は大きくないため，取り扱う条件も比較的狭い範囲で済みます。プロテオーム解析では，分析精度と感度を極限まで高めても僅かな試料から得られる微量のタンパク質を解析するには不充分であり，依然として高感度化を求められています。

また，タンパク質の構成アミノ酸は基本的に 20 種類であり，一つのアミノ酸の置換が物性を大きく変化させることもあるため溶解，分離条件も広範囲となります。さらに，末端アミノ酸の修飾に加えタンパク質分子内への糖鎖の結合，脂質の結合，リン酸化，硫酸化，メチル化等の翻訳後修飾と呼ばれる生体内反応が同一分子内でも不均一に生じ，分離技術が向上すれば同一タンパク質であっても異なった複数の分子として分画されるため，更に高感度化を余儀なくされる状況でもあります。その修飾部分の解析を行う事もタンパク質の機能を研究する上で重要となって来ています。

プロテオーム解析の中心技術である「タンパク質の 1 次構造解析」のため，2 種類の装置が主に利用されています。その一つがプロテインシーケンサであり，もう一つが田中耕一氏らにより実現化された Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry（MALDI-TOF-MS）に代表される質量分析装置です。 質量分析装置はスループットの面ではプロテインシーケンサに比べ優れていますが，データベースにないタンパク質の同定やアミノ酸配列の確定（特にデータベースに登録されていない未知配列）などではプロテインシーケンサに一日の長があります。

プロテオーム解析の成果は抗体医薬に代表される「タンパク質医薬品」に繋がって来ています。抗体医薬などの研究開発，品質管理などにも，プロテオーム解析の中心技術である「タンパク質の 1 次構造解析」が活用されています。

ここでは，「タンパク質の 1 次構造解析」に活用されている 2 種類の装置，「プロテインシーケンサ」，「質量分析装置」による特長を解説します。



2. プロテインシーケンサ

プロテインシーケンサは，1950 年に Pehr Victor Edman により開発されたエドマン反応の自動化を試みた装置であり，その反応系は次の 3 つのステップに分けることができます。

［1：カップリング（Coupling）］

反応槽（リアクタ）において塩基性雰囲気下で単離精製された試料タンパク質（ペプチドを含む）の N- 末端アミノ基に PITC（Phenyl isothiocyanate）を結合させます。

［2：切断（Cleavage）］

酸性条件で PITC の結合した N- 末端アミノ酸を切断し，アニリノチアゾリノン（Anilinothiazolinone: ATZ）誘導体として有機層に抽出します。

［3：転換（Conversion）］

有機溶媒を揮発させ，抽出された ATZ 誘導体を酸性水溶液中で PTH（Phenylthiohydantoin）アミノ酸と呼ばれる更に安定な誘導体に導きます（図 1，図 2）。

［1］でリアクタに残されたタンパク質に PITC を反応させ，以上のステップを繰り返すことにより，順次 N- 末端アミノ酸の PTH 誘導体が得られ，これをクロマトグラフィにより同定すれば試料タンパク質のアミノ酸配列を知ることができます。

この一連の化学反応，抽出，同定プロセスを完全に自動化したものが，プロテインシーケンサです。 特に，［1］において試料ペプチド等を，ポリブレン処理を付したガラスフィルタや PVDF 膜等に非共有結合させ，カップリング用試薬として PITC とトリエチルアミン，切断試薬としてトリフルオロ酢酸を各々チッソ気流にのせて気体としてリアクタに送ることで，試料のロスを極力抑えたものを気相プロテインシーケンサと言います。また，PTH アミノ酸の同定は，最終的に高速液体クロマトグラフィ（High Performance Liquid Chromatography: HPLC）が導入され，自動化に関してほぼ完成された装置として市販されています。

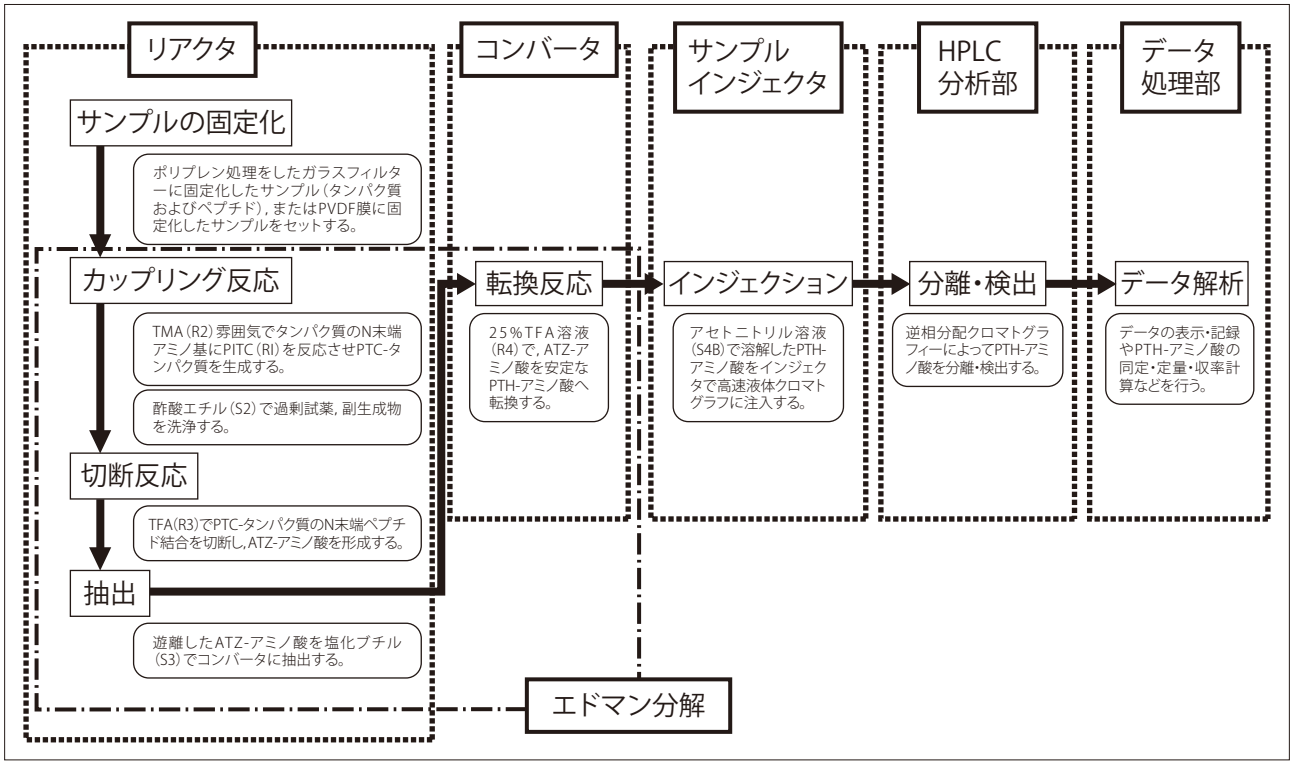


図 1　アミノ酸配列分析のフローチャート

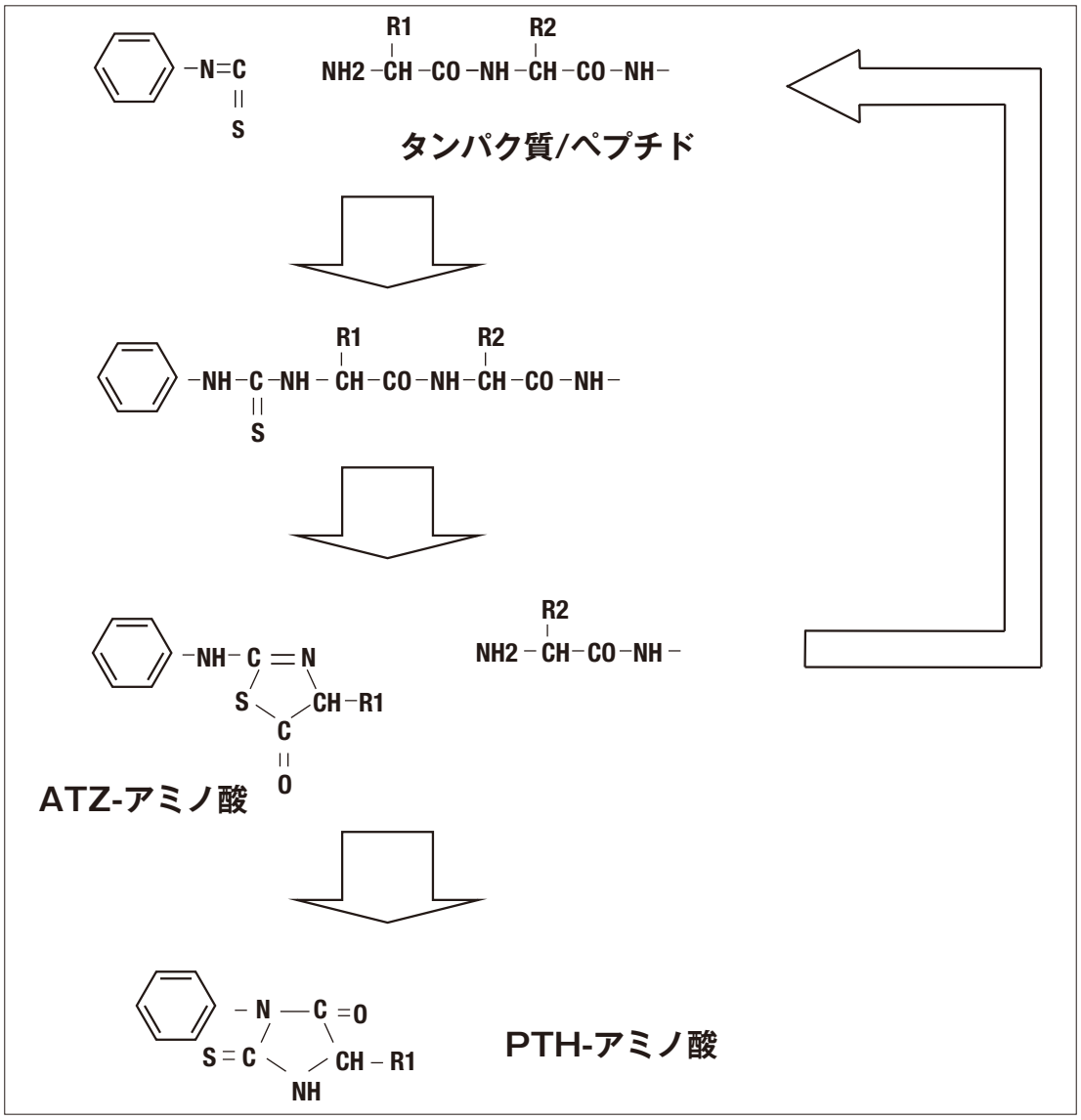


図2　エドマン反応のスキーム

エドマン反応によりアミノ酸配列を決定するには，高度に単離精製され pmol レベルのタンパク質試料が必要ですが，操作は非常に簡便です。例えば，電気泳動後に分離されたタンパク質を PVDF 膜上に電気的に転写（Electro Blotting）し，染色後膜上のタンパク質スポットを切り取り，直接リアクタに置くだけで，以降は完全な自動分析を行う事ができます。

プロテインシーケンサの特長として，次のようなものがあり，基礎研究分野以外にタンパク質医薬品の品質管理など高度な信頼性が求められる場合には特に必須の装置となっています。

■決定された配列の信頼性が非常に高く，確実なアミノ酸配列決定が行える
■タンパク質をそのまま分析可能である
■まったく同じ質量数を有する Ile と Leu を区別できる
■ S-S 結合の有無とその位置が決定できる
■操作が極めて容易である

特にこのまったく同じ質量数を有する Ile と Leu の区別は現在の質量分析（MS）技術を用いても困難を伴う作業です。一例として，Humanin と呼ばれるペプチドの合成アナログ（Gly[14]-Humanin）［アミノ酸配列：MAPRGFSCLLLLTGEIDLPVKRRA］のプロテインシーケンサによる解析を行いました。このペプチドには 1 残基の Ile[16] と 5 残基の Leu[9, 10, 11, 12, 18] が存在しますが，PTH-Ile と PTH-Leu の HPLC 上の保持時間は異なる（PTH-Ile の保持時間が小さい）ため容易に区別することができます（図 3A，B，C）。また，Cys[8] を含め完全なアミノ酸配列の決定が可能で，C- 末端アミノ酸である Ala[24] の検出・同定も充分に可能でした（図 3D）。

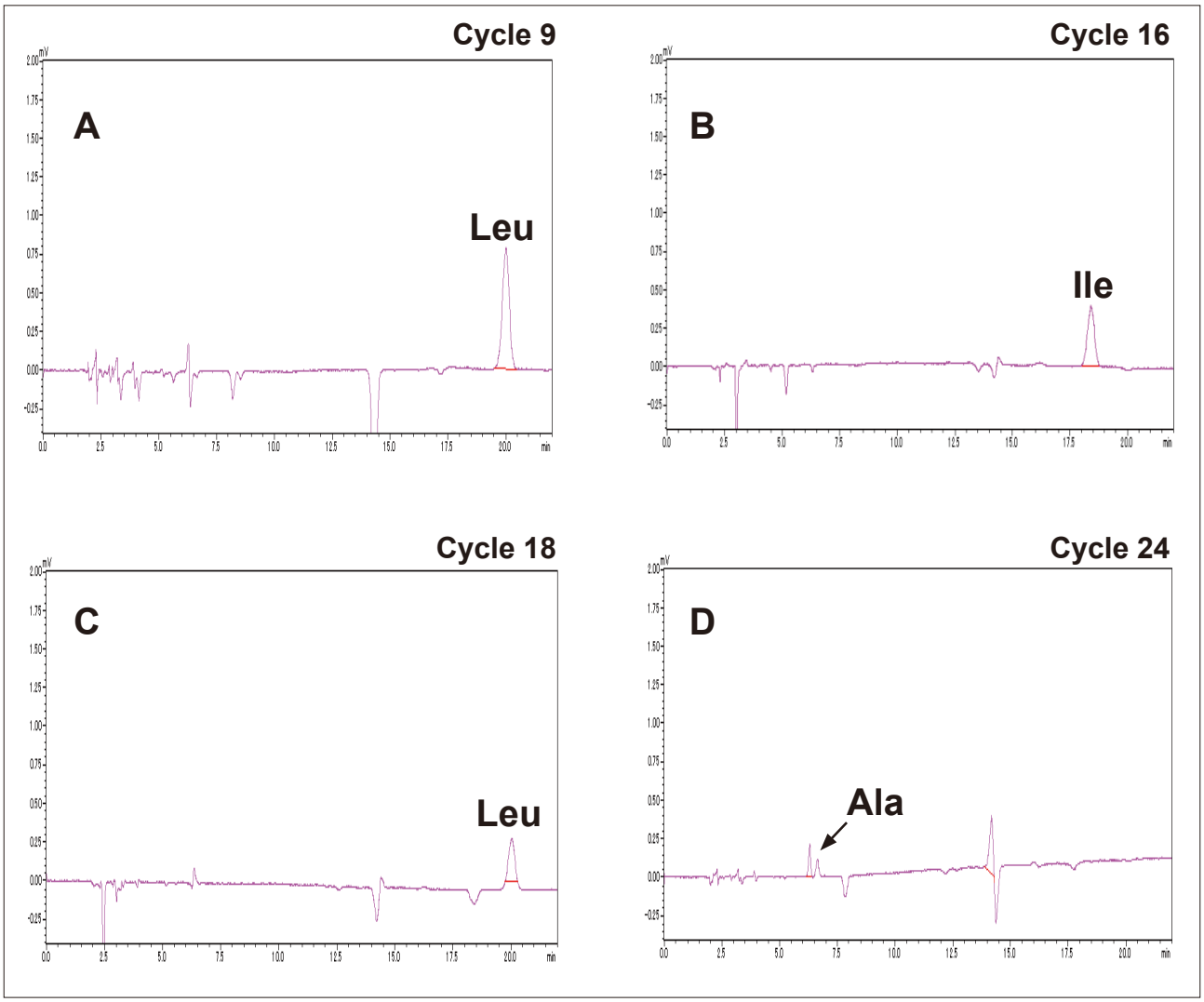


図 3　プロテインシーケンサによる Gly[14]-Humanin の解析：Leu[9]（A），Ile[16]（B），Leu[18]（C），Ala[24]（D）
（1 つ前の分析におけるクロマトグラムとのベースラインの差を計算して表示させる）

一方でプロテインシーケンサにも解決すべき課題は多くあります。例えば，タンパク質の N- 末端がブロック（アセチル化，アシル化等）されていた場合にはエドマン反応は最初から起きずアミノ酸配列情報を得ることはできません。一般的に哺乳類のタンパク質の 70 % 程度に N- 末端ブロックが生じていると言われます。N- 末端がブロックされたタンパク質からもアミノ酸配列情報を得るために，N- 末端ブロックを除去する研究も精力的に行なわれています。また，MS に比べ，感度が劣り，分析の必要なサンプル量が多いという課題もあります。

次に，現在のプロテオーム解析の主流であるタンパク質データベースを活用するタンパク質同定とアミノ酸配列（配列決定したアミノ酸残基数）との関係を考えてみます。

3. 部分アミノ酸配列情報とタンパク質データベース

PIR（Protein Information Resource）タンパク質データベースにおいて，末梢神経の髄鞘で発現されている " あるタンパク質 " の N- 末端アミノ酸配列 IVVYTDK を検索すると，2 つの種の同一タンパク質の情報が返されてきます。

特徴的とは言えない 7 残基のアミノ酸配列からでもタンパク質を特定できることを意味しています。IVVYTD までの 6 残基では検索結果が 180 件ほどとなります。この場合でも，種をヒトまたはラットに限定した場合は，タンパク質の候補は 1 種類であり，マウスで 2 種類です。このタンパク質を抽出した臓器に限定するとやはり候補は 1 つとなります。IVVYT までの 5 残基では，1210 件程度です。この場合でもヒト，ラット，マウスにおいて臓器を限定した場合の候補は 1 つです。また MS 分析を想定し，最初の Ile に自信が持てなかった場合を考慮して VVYTD で検索しても 1800 件程度に候補は増加しますが，絞り込めば結果は同様です。もし Ile を Leu と判定してしまった場合の LVVYT で検索した場合は，90 件程度の候補になりますが，当然ながら全て無関係のものです。この場合，哺乳動物のタンパク質は含まれていませんでした。

したがって，目的のタンパク質が単離・精製されているという条件下，臓器特異性のあるタンパク質で 5 残基の確実なアミノ酸配列を知ることができる場合，目的のタンパク質をほぼ同定できる可能性があります。タンパク質をあるプロテアーゼで限定的に消化し，消化ペプチドを単離して 2 つあるいはそれ以上の部分アミノ酸配列を得ることができれば，確実性はさらにアップすることになります。現実的には，1 つのタンパク質につき 5 ～ 7 残基のアミノ酸配列を複数知ることができれば，データベースを利用するタンパク質同定は可能だと思われます。

MS とデータベースの組み合わせによるタンパク質同定が広く行なわれていますが（後述），5 ～ 7 残基のアミノ酸配列が確定できれば，同じようにデータベースを活用するタンパク質の同定が可能なことが分かります。

4. 質量分析装置（Mass Spectrometry: MS）

現在，タンパク質同定のために最も一般的に使用されているのが MS であり，大別すると MALDI-MS と HPLC と組み合わされた LC-MS があります。MS は PMF（Peptide MS Fingerprint）法や MS/MS イオンサーチ法（後述）を遂行するためのツールとして使用されています。これらの方法では，タンパク質をトリプシン，リシルエンドペプチダーゼ等の限定的な分解酵素を使用して，ペプチドフラグメントにします。次に MS を用いて，ペプチドフラグメントの質量，または MS/MS から得られるペプチドフラグメントの部分配列情報と，既存のデータベースとの照合を行います。データベースとの照合作業では，一致率の高いものから結果が返されます。さらに，タンパク質の分子量，等電点，生物種，発現部位等の情報も参考にして該当するタンパク質を絞り込むこともできます。この既存のデータベースとの照合を行なうことでハイスループットにタンパク質を同定することができます。

一方，配列未知のペプチド（またはタンパク質）のアミノ酸配列を決定するには，ある質量数のイオンのみの選択的通過を制御できるようなゲートを設け，特定のペプチドイオンを選択してその自然壊裂イオンを解析することでアミノ酸配列情報を得ることのできる Post Source Decay（PSD）解析や，更に，MS の分析部をタンデムに配置した MS/MS 分析装置，イオントラップを設置した Quadrupole Ion Trap（QIT）-MS 等の発達により，PSD 解析と同様に 1 種類のペプチドイオンを選択した後に不活性ガスとの強制的な衝突の場（Collision chamber，Ion Trap 等）に導き，2 次的な壊裂（Collision Induced Dissociation: CID）イオンを生成させ，その情報の解析からアミノ酸配列を推定する方法（*de novo* sequencing）があります。この方法は精力的に研究されていますが，プロテインシーケンサを用いるアミノ酸配列決定に比べると信頼性ではまだ劣ります。また，Ile と Leu の区別の点では，その質量数が同一であるため，その決定には理論的な難しさがあります。（表 1，Immonium ion 参照）

Humanin の QIT-TOF MS 分析における MS/MS スペクトルを図 4 に示します。これは 14 残基目のアミノ酸を Ser から Gly に置換してあるため基本的にはデータベース上の情報は存在しないと思われましたが，実際には登録されており Mascot（MS データによりアミノ酸配列データベースからタンパク質を同定するためのサーチエンジン）における MS/MS サーチでは，候補の一つとして挙げられてきました。表 1 にこのアミノ酸配列を反映する実際に観測されたフラグメントイオンを示しました。データベースに登録されているので容易に解析を行うことができましたが，MS/MS/MS 解析まで行い，小さなフラグメントイオンについても検討を行いました。Leu^{9}-Leu^{12} の Leu コア部分と Pro の存在を示すフラグメントイオンの強度は極めて小さく，もしデータベースに登録されていなければこのスペクトルデータだけで確信を持って全アミノ酸配列を決定することは難しいものと思われます。

このように飛躍的な発展を遂げている MS を用いるタンパク質の 1 次構造解析でも，データベースを利用しない *de novo* sequencing や Ile と Leu の区別などの課題が依然として残っており，万能の装置ではないのが現状です。

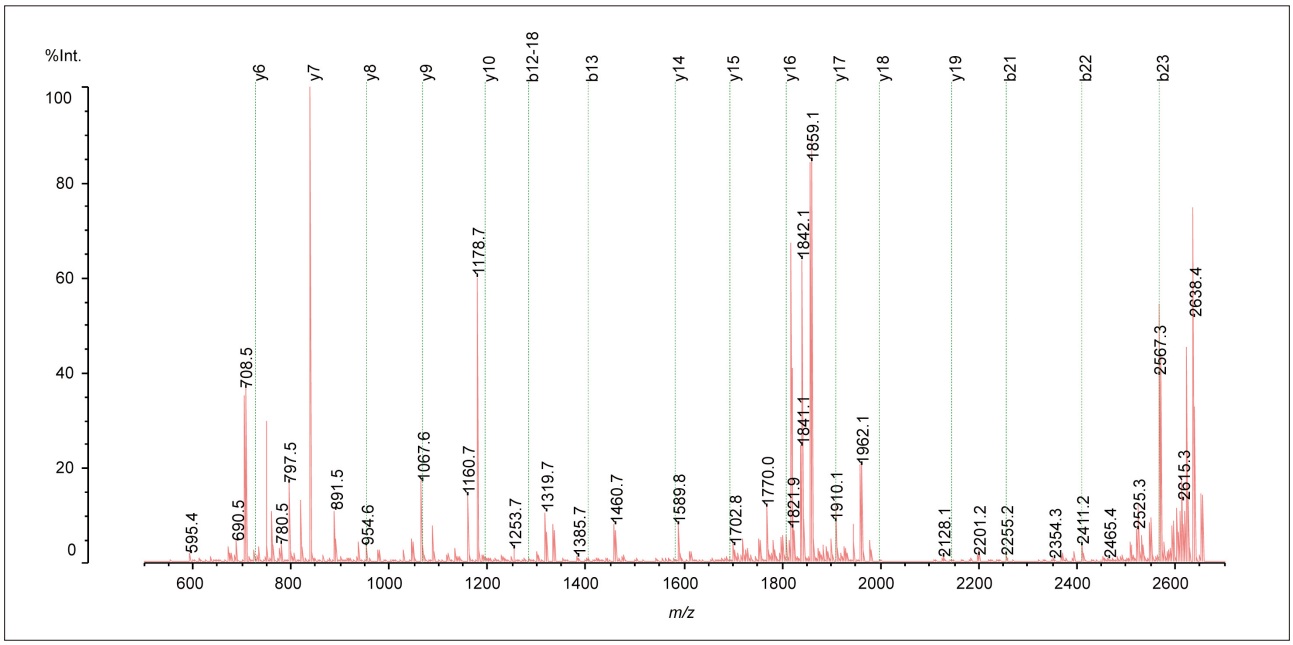


図 4　QIT-TOF-MS による MS/MS スペクトル

表 1　QIT-TOF-MS による MS/MS スペクトル

#	Immom.	a	a*	A^0	b	b*	B^0	Seq.	y	y*	y^0	#
1	104.0528							M				24
2	44.0495							A	2525.53		2507.55	23
3	70.0651							P				22
4	129.1135							R	2351.34			21
5	30.0338							G	2201.37	2183.36	2183.36	20
6	120.0808							F		2167.30	2167.30	19
7	60.0444							S		1979.26	1979.26	18
8	76.0215	822.57	805.54	804.54				C	1910.23	1892.21	1892.21	17
9	86.0964							L				16
10	86.0964							L	1694.08	1677.09	1675.10	15
11	86.0964				1189.72			L		1561.94	1561.94	14
12	86.0964				1302.79			L				13
13	74.0600				1403.84	1385.81	1385.81	T		1336.83	1336.83	12
14	30.0338				1460.86	1442.86	1442.86	G	1253.78			11
15	102.0550				1589.91	1571.91	1571.91	E		1179.40	1178.77	10
16	86.0964				1702.07	1686.05	1684.10	I	1067.72			9
17	88.0393				1818.05	1801.463	1800.07	D	954.63	937.60	936.63	8
18	86.0964							L	839.60	822.57		7
19	70.0651							P				6
20	72.0808				2167.30			V				5
21	101.1073				2255.21			K				4
22	129.1135				2411.45	2394.43	2393.47	R				3
23	129.1135				2567.57	2549.57	2549.57	R				2
24	44.0495							A				1

5. おわりに

エドマン反応は，現在に至る歴史の中で PTH アミノ酸の可視化，蛍光化を導入する目的で PITC を改良した幾つかの試薬が開発されたことがあります（表 2）[1]。しかしながら，自動化される段階で選択された方法は結果的にはオリジナルのエドマン分解反応のみでした。したがって将来的にも反応系の改良は，抽出条件と反応条件をほとんど変化させることなく高感度化が望めない限りは，装置が複雑になるだけで殆ど余地がないものと思われます。PTH アミノ酸の検出にはベンゼン環の紫外部吸収（269 nm 付近）が用いられています。高感度化が可能となっても，ベンゼン環を持ったエドマン反応副産物の量を減少させないとアミノ酸の同定精度を低下させる可能性があります。プロテインシーケンサの機械的な精度の向上，必要となる溶媒類の少量化，溶媒自体の高純度化等が課題として上げられますが，現在の技術を持ってすれば解決できる可能性も極めて大きいと思われます。

発現タンパク質の網羅的な比較・同定を行なうプロテオーム解析に加え，今後は特定のタンパク質に注目したフォーカスドプロテオーム解析もますます盛んに研究されることが予想されます。ゲノムから mRNA への転写系でのスプライシング，選択的スプライシング，RNA エディテング等のプロセスを研究する上で，タンパク質の N 末端や C 末端のアミノ酸配列解析は必須の作業と言えます。

ここまで述べてきましたように，タンパク質の同定数というスループットの面でプロテインシーケンサと MS を比べると，MS に一日の長があります。しかしながら，決定した配列の信頼性（特にタンパク質データベースに登録されていない未知タンパク質）では，逆にプロテインシーケンサに一日の長があります。

「MS を使用するタンパク質の 1 次構造解析」と「プロテインシーケンサを使用するタンパク質の 1 次構造解析」はちょうどお互いの欠点を補完するような関係にあります。物性の類似した核酸分子を対象とするゲノム解析と異なり，物性の異なる多岐に渉るアミノ酸から構成されるタンパク質を対象とした研究では，それぞれの研究目的に応じ，それぞれの研究場面で最適の分析装置を活用することが研究を切り開くことに繋がります。

表 2　これまでに報告された isothiocyanate 試薬

1. Methylisothiocyanate (Vance and Feingold, 1970), Identification by mass spectrometry (Richards and Lovins, 1972).
2. Pentafluorophenylisothiocyanate (Lequin and Niall, 1972). Identification by gas-liquid chromatography, with electron-capture detection.
3. p-Phenylazophenylisothiocyanate (Deyl. 1970). Coloured products.
4. 4-N-Dimethylamino-1-naphthyl isothiocyanate (Ichikawa et al., 1970). Fluorescent thiocarbamyl derivatives.
5. p-Sulphophenyl isothiocyanate (Birr el al., 1970). Water-soluble reagent.
6. Diphenylindenonyl isothiocyanate (Ivanov and Mancheva. 1973, 1976). Coloured reagent: sensitive delection of products by colour and fluorescence on polyamide layers (Mancheva and Vladovska-Yukhnovska, 1978).
7. 4-N, N-Dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate (Chang et al.. 1976, 1978). Coloured reagent and products.
8. Fluorescein isothiocyanate (Muramoto et al., 1978). Fluorescent derivatives.
9. 3-Isothiocyanato-4-methoxy-4'-nitrostilbene (Nowak et al., 1977), Fluorescent reagent.

付 . 島津プロテインシーケンサ PPSQ-50 シリーズ

島津プロテインシーケンサ PPSQ-50 シリーズは，アイソクラティックモードでの高速液体クロマトグラフィを用いた PTH-アミノ酸の分析安定性，簡単な操作性，使いやすいデータ解析機能の充実，さらに FDA 21 CFR Part11 対応への充実した機能など様々な特長を持っています。ここでは，PPSQ-50 シリーズの特長を応用例とともに述べます。

付 -1. 構成

PPSQ-50 シリーズは，エドマン反応部，エドマン反応より生成された PTH- アミノ酸を分析する高速液体クロマトグラフ（HPLC），制御・データ処理部（パソコン）とから構成されています（サンプルインジェクタおよび分析カラムは，エドマン反応部に内蔵）。PPSQ-51A および PPSQ-53A は，エドマン反応部であるリアクタを搭載している個数が異なり，１つのリアクタを搭載しているタイプが PPSQ-51A，3 つのリアクタを搭載しているタイプが PPSQ-53A になります。PPSQ-53A は，複数のリアクタに搭載したサンプルを 1 つずつ，連続でアミノ酸配列分析を行うことが可能です。エドマン反応部でエドマン分解を繰り返し，タンパク質・ペプチドの N 末端から順にアミノ酸を切断し，安定な PTH- アミノ酸誘導体を生成します。さらにオンラインで HPLC に注入し，分析を行います。HPLC データ（クロマトグラム）は，パソコンに保存され，PPSQ 再解析ソフトを用いて，得られたクロマトグラムの処理およびアミノ酸の同定，配列の自動推定が行われます。アイソクラティックモード分析の系を採用しており，廃液も少なく環境にやさしいエコ設計になっています。

図 5　PPSQ-50　シリーズ

図 6　PPSQ-51A　シングルリアクタ

図 7　PPSQ-53A　トリプルリアクタ

付 -2. アイソクラティックモードでの PTH- アミノ酸の同定

図 8 に PTH アミノ酸混合標品の 1 pmol の分析例を示します。PPSQ-50 シリーズにおけるアイソクラティックによる PTH アミノ酸の分析では，ベースラインが安定し，分析時間が約 21 分で行えることを示しています。また，各 PTH- アミノ酸の溶出時間の再現性が極めて高く（表 1），PTH- アミノ酸の溶出時間の修正は，シーケンス分析ごとに行うことは不要です。専用の溶離液を循環して使用するため，オペレータなどの経験に基づいた溶離液の調製（pH，イオン強度，有機溶媒濃度，グラジエント条件など）が不要です。さらに溶離液のメンテナンスが容易であり，消費量も少なく，ランニングコストが低いことを特長としています。

表 3　各 PTH- アミノ酸の溶出時間の再現性

PTH- アミノ酸	溶出時間		
	1 日目	8 日目	15 日目
Asp	2.586	2.578	2.58
Glu	2.873	2.879	2.888
Asn	3.57	3.571	3.571
Gln	3.779	3.78	3.781
Ser	3.989	3.991	3.991
Thr	4.357	4.359	4.359
His	4.71	4.714	4.719
Gly	5.002	5.005	5.006
Ala	6.429	6.434	6.438
Tyr	6.79	6.797	6.803
Arg	8.205	8.189	8.188
Dth	9.18	9.19	9.2
Met	11.431	11.45	11.463
Val	11.821	11.84	11.853
Pro	12.296	12.314	12.327
Trp	14.475	14.502	14.523
Phe	16.722	16.754	16.779
Lys	17.28	17.317	17.346
Ile	18.945	17.977	18.001
Leu	19.447	19.487	19.514

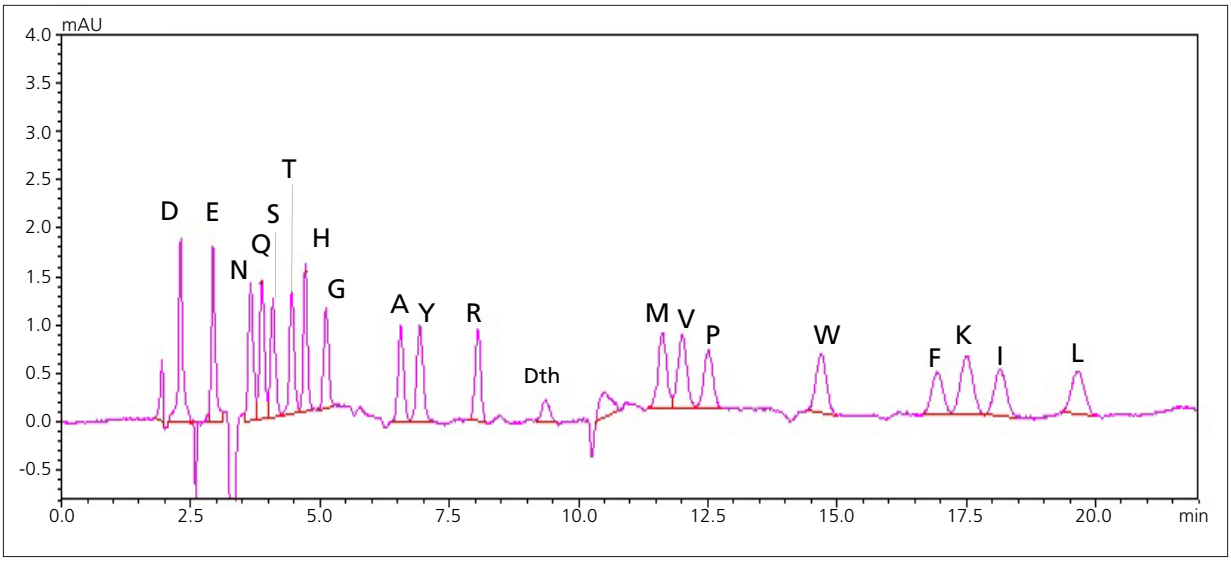


図 8　PTH- アミノ酸標準混合品　1 pmol の分析

付 -3. 制御およびデータ処理ソフト

エドマン反応部と HPLC 分析部の制御，得られたデータの解析は，それぞれの専用ソフトウェアで制御を行います。ユーザーに優しい，操作性に優れたソフトウェアです。

付 -3-1. 制御ソフト

PPSQ-50 シリーズでは，"PPSQ 分析 " というソフトウェアで制御をします。このソフトウェアは，エドアミノ酸配列分析の操作を行います。また，このウィンドウだけで 2 つのシステム（エドマン反応部と HPLC での分析部）の制御を行い，複数のウィンドウを立ちあげる必要がありません。また，クロマトグラムやそれぞれのステータスの表示より，容易に装置の状況確認が可能です。

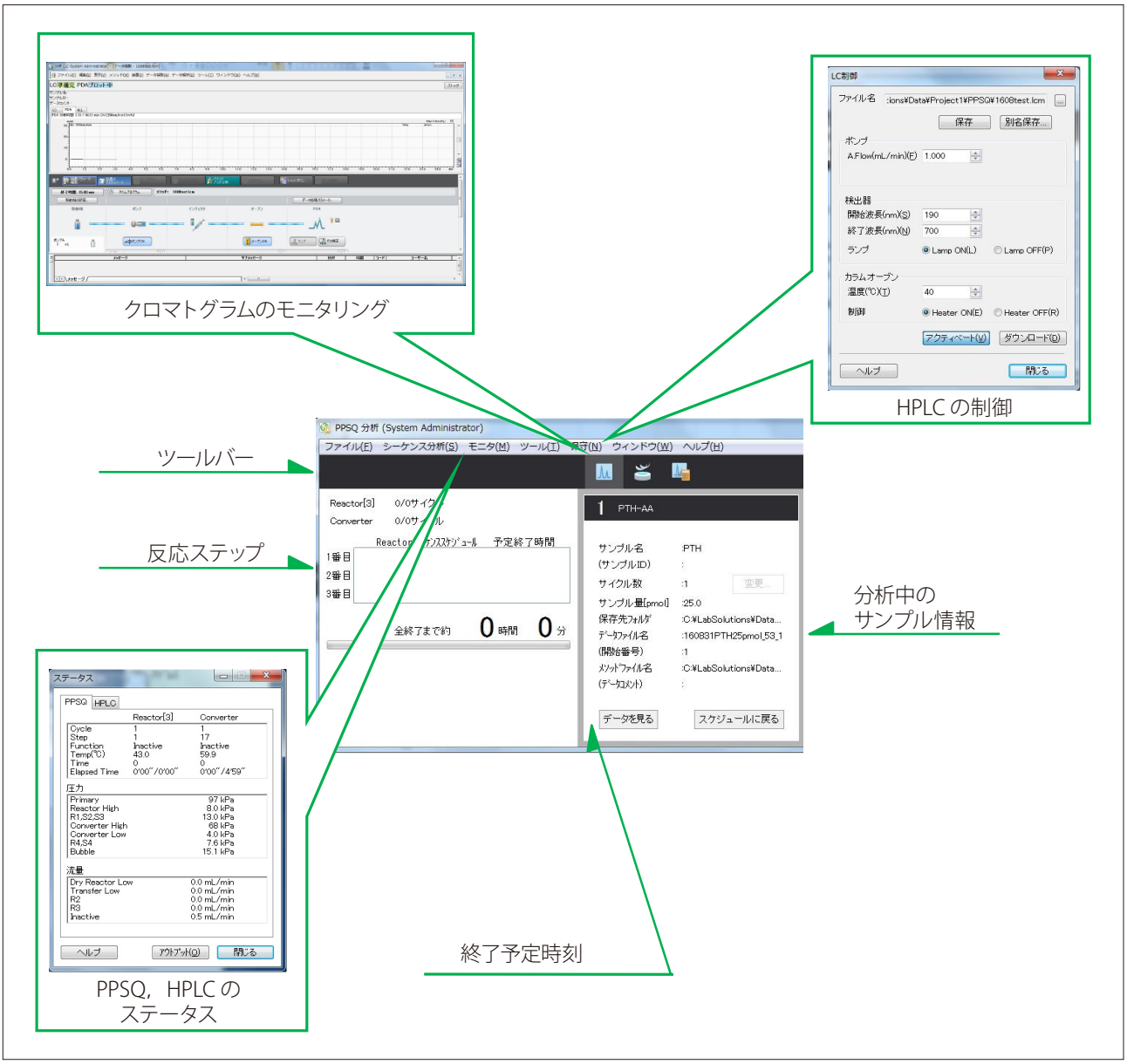


図 9　PPSQ 分析ウィンドウ

付 -3-2. データ処理ソフト

得られたクロマトグラムの解析には，“PPSQ 再解析 ” を用いて行います。このソフトウェアでは，アミノ酸配列の自動推定，収率の計算およびそのグラフ表示，さらにクロマトグラムの処理を行うことができます。

＜シーケンス推定＞

アミノ酸配列の自動推定は，推定するクロマトグラムとその 1 つ前のクロマトグラムを比較して，各アミノ酸のピーク高さの比，差をもとに独自に開発されたアルゴリズムに基づいて行われています。推定結果は，第 4 候補までのアミノ酸，第 1 候補のアミノ酸の信頼度（確からしさ），評価値（信頼度の根拠となるもの）が表示されます。第 4 候補まで，アミノ酸が表示されるので，複数のサンプルが混在している場合や推定の信頼度が低いときの検討に有用です。また，初期収率や任意に選択されたアミノ酸の収量から繰り返し収率を計算し，グラフ表示することができます。

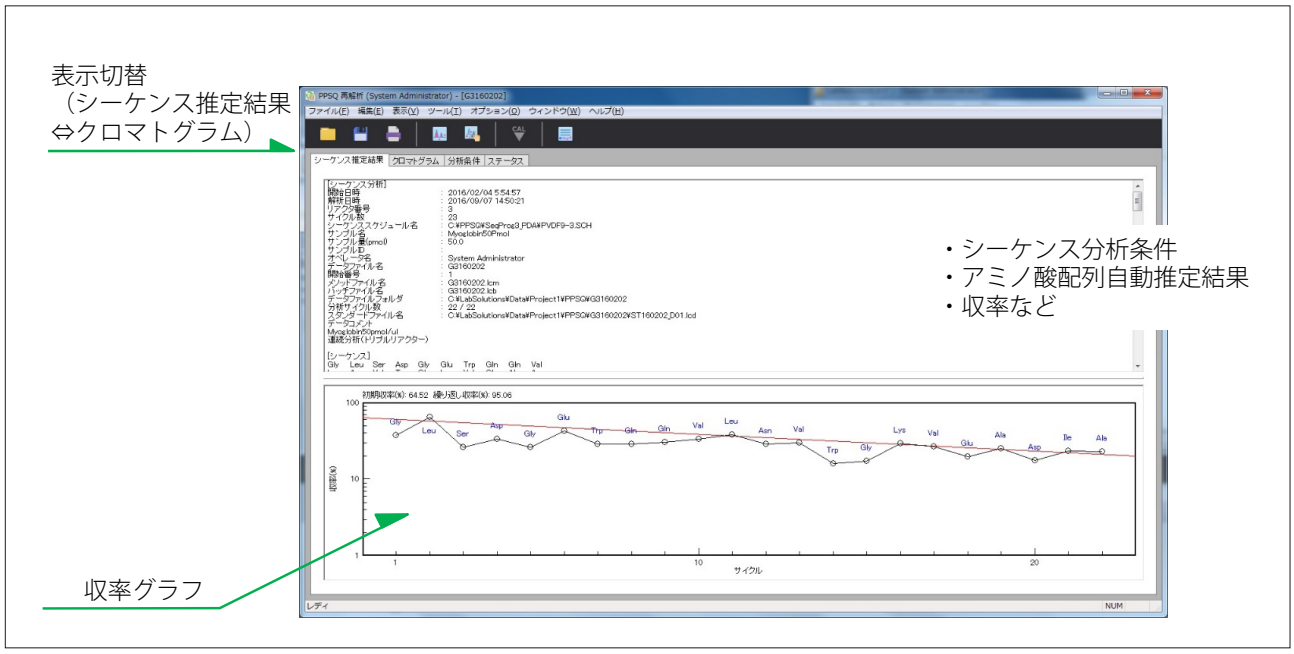


図 10　PPSQ 再解析ウィンドウ　ーシーケンス推定結果ー

<クロマトグラム>

このウィンドウでは，クロマトグラムの再処理，表示および印刷などを行います。データ解析に必要な PTH- アミノ酸のキャリブレーション，クロマトグラムの波形処理を行うことができます。また，PTH- アミノ酸の分析を溶出時間の再現性が高いアイソクラティックモードで行っていることから，前のサイクルのクロマトグラムを差し引く差クロマトグラムを作成することもできます。また，複数のクロマトグラムを一度に表示することで，各サイクルで特異的に増加している PTH- アミノ酸を容易に同定することが可能になりました。さらに，<シーケンス推定>で得られた自動推定結果とクロマトグラムが連動しているため，各サイクルでの自動推定された PTH- アミノ酸の容易に確認をすることができます。

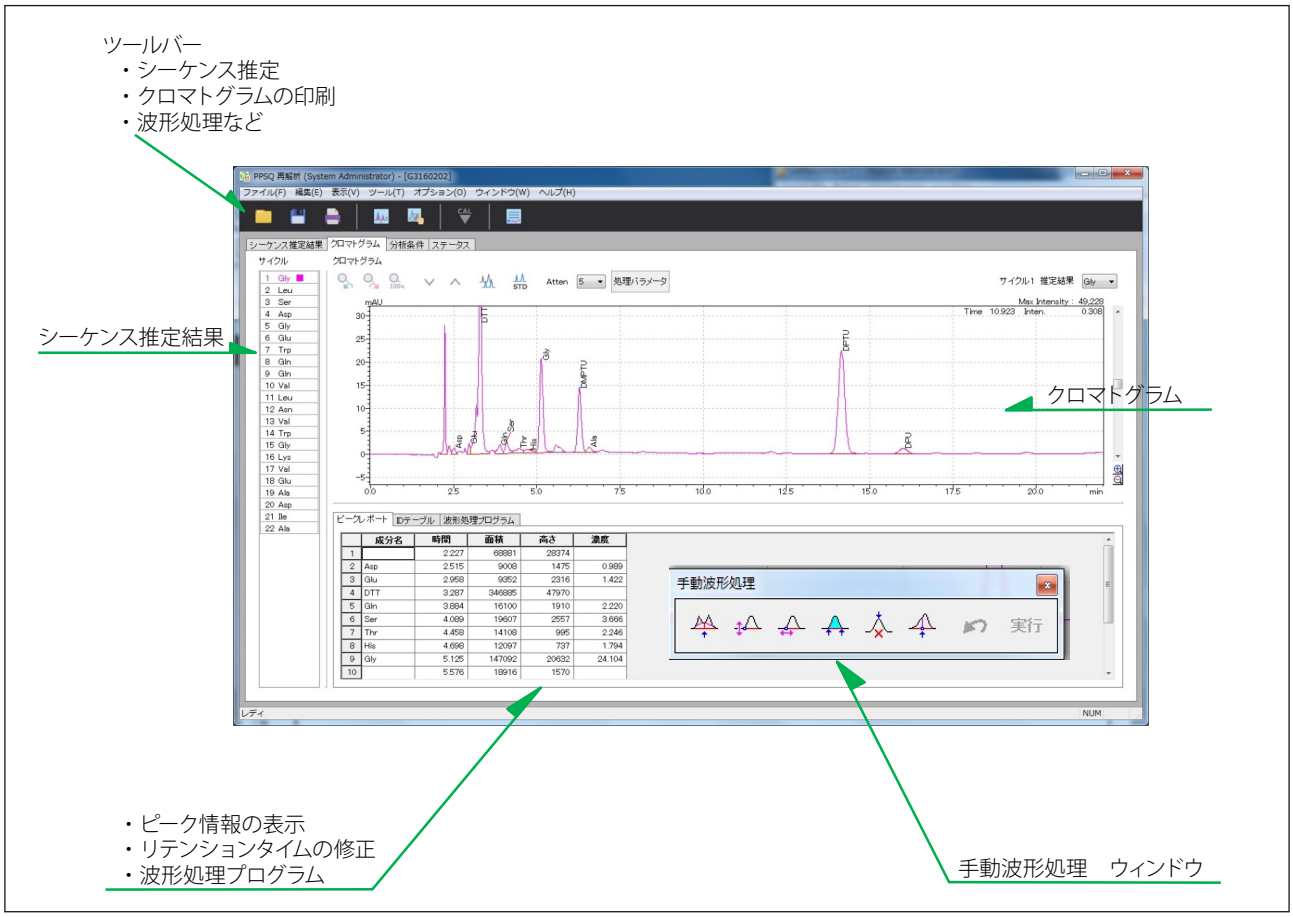
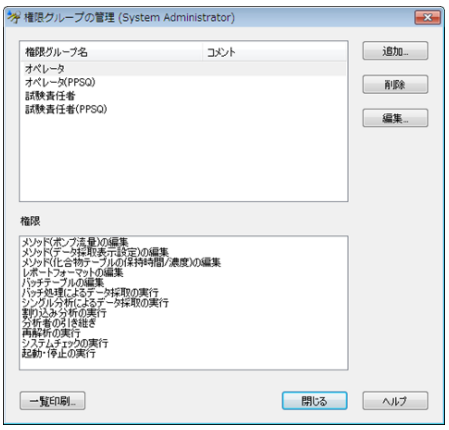


図 11　PPSQ 再解析ウィンドウ　ークロマトグラムー

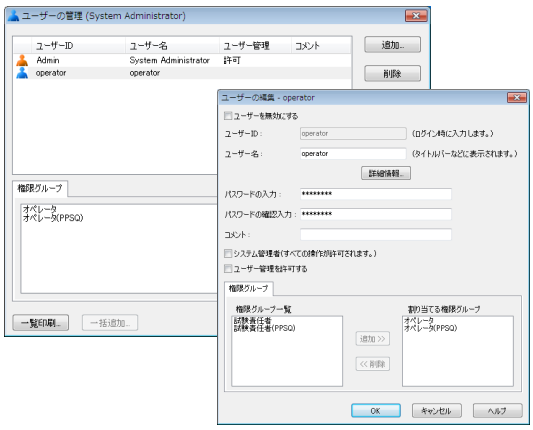
付 -3-3. FDA 21 CFR Part11 対応の機能

ラボで使用する装置は，コンピュータ化システムバリデーション（CSV）や，FDA 21 CFR Part11，PIC/S GMP ガイドライン，厚生労働省電子記録・電子署名に関する指針などの規制やガイドラインに対応していく必要があります。セキュリティポリシーやシステムポリシー，ユーザー権限やユーザー管理機能などにより，効率的なシステム運用とともにこれらの規制要件への対応が可能である充実したソフトウェアを搭載しています。

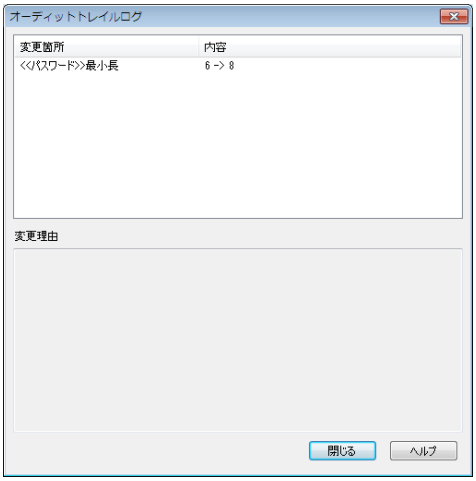
1. セキュリティ
ID / パスワードによるユーザー認証，操作履歴の記録，画面ロックなどセキュリティ要件を満たすための設定が可能



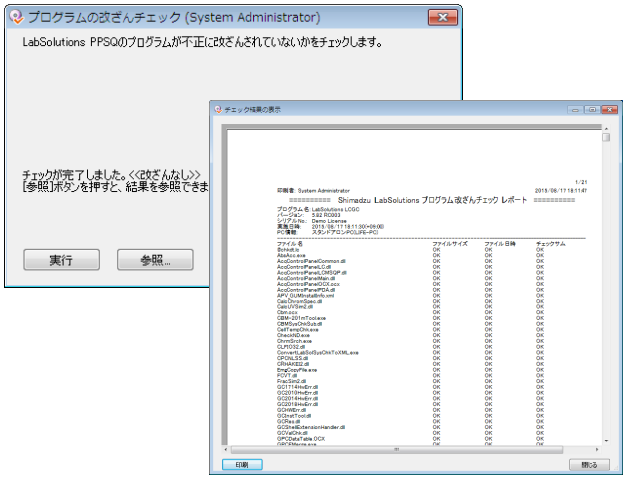
2. ユーザー管理
ログイン認証，権限による操作制限，操作履歴のトレース，また，LabSolutions DB および LabSolutions CS と連携し，ユーザー管理が可能



3. オーディットトレイル
システムへの操作履歴（オーディットトレイル：監査証跡）を，ユーザー名，日時とともに記録。記録された操作履歴はデータベースへ登録することができ，運転状況や設定変更の履歴をトレースすることが可能



4. ソフトウェアバリデーション
システムを構成するプログラムの改ざんや装置より取得した生データの改ざんをチェック。これにより，システムやデータの信頼性が担保。また改ざんチェックをプリントアウトして管理することが可能



付 -4. シーケンス分析例

エリスロポエチン（CALBIOCHEMcat#329871）5 pmol のアミノ酸配列分析結果を図 16 および図 17 に示します。1 サイクル目は生クロマトグラム，2 サイクル目以降は，差クロマトグラムで表示しています。生クロマトグラムでは，特異的に増加している PTH- アミノ酸だけでなく，各サイクルで生成される副生成物由来のピークも検出されていますが，差クロマトグラム表示にすることで，前のサイクルに検出されていた副生成物やバックグラウンドの各 PTH- アミノ酸がキャンセルされ，各サイクルで特異的に増加しているアミノ酸を容易に見つけることができます（図 17）。

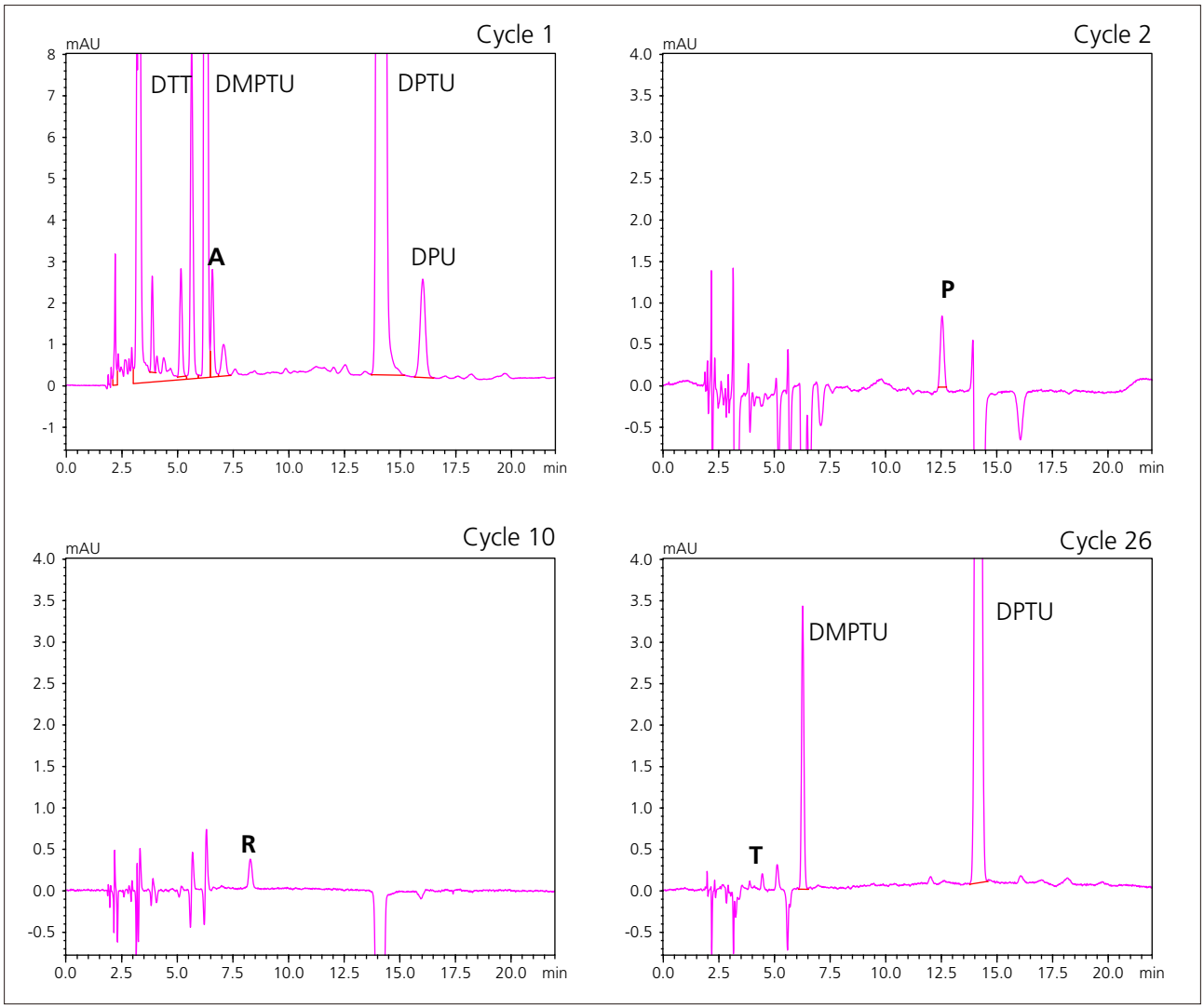


図 16　5 pmol エリスロポエチンのシーケンス分析例

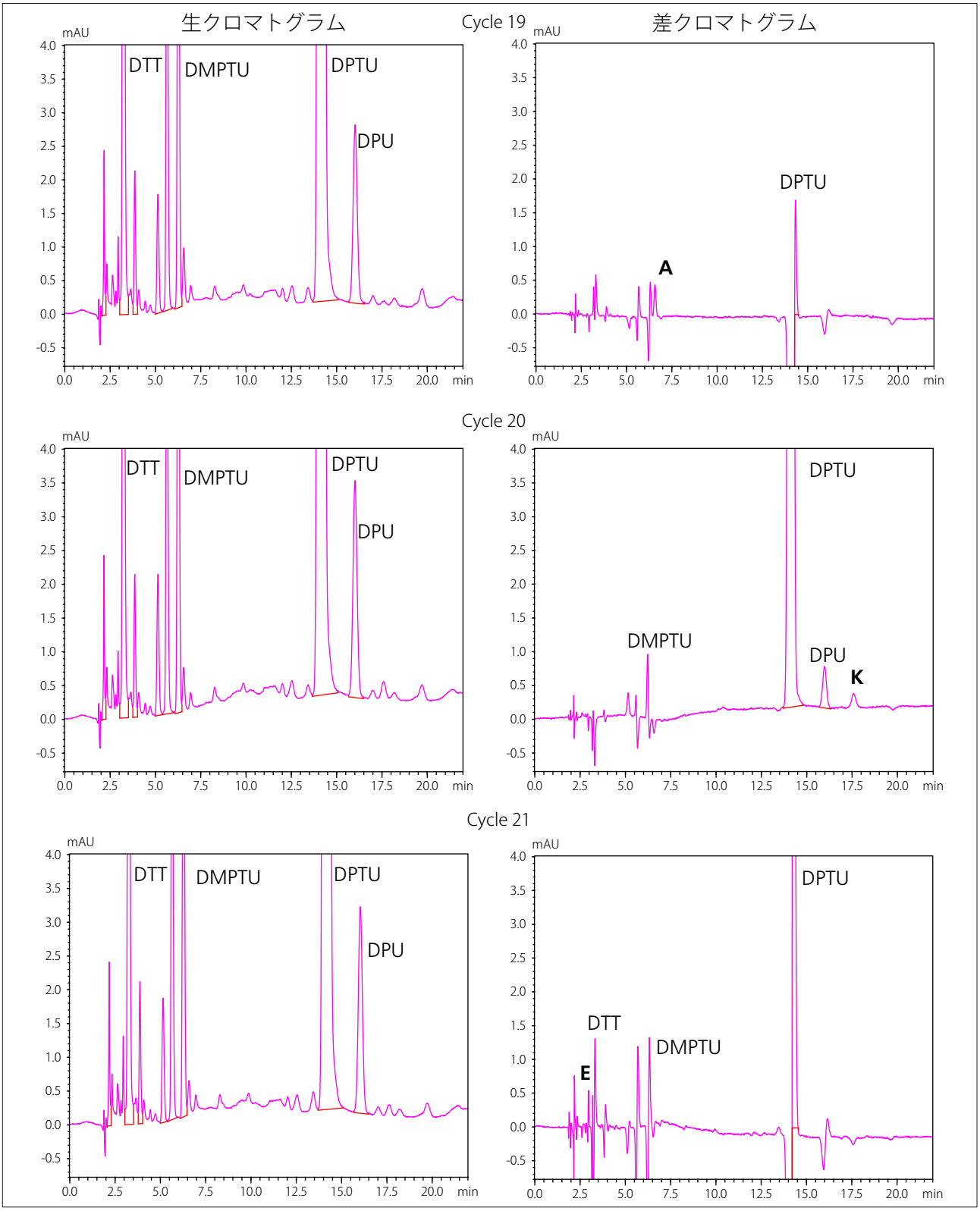


図 17　5 pmol エリスロポエチンのシーケンス分析例（生クロマトグラムと差クロマトグラム）

付 -5. リアクタ内でのピリジルエチル化によるシステインの同定例

システイン残基は，通常 S-S 結合を形成している場合が多いため，N 末端側の半シスチン残基は，エドマン分解により ATZ-半シスチンに変換されても，C 末端側の半シスチンとジスルフィド結合をしているため，溶出されず，HPLC で検出することができません。そのためシーケンス分析においては，還元アルキル化を行ってから同定するのが一般的です。PPSQ-50 シリーズでは，まずサンプルをリアクタ内でピリジルエチル化（Cys の還元アルキル化）（図 18）を行い，連続してシーケンス分析を行います。ピリジルエチル化されたシステインは，8.7 分付近に検出されます（図 19）。ほかの PTH- アミノ酸やエドマン反応の副生成物の溶出位置とも重ならないため，同じ HPLC 条件で同定をすることが可能です。Oxytocin（ヒト）をこのピリジルエチル化プログラムを用いて分析した例と通常のエドマン反応プログラムを用いて分析した例を図 20，図 21 に示します。このように，インタクトの分析では確認できなかった Cys のサイクルがピリジルエチル化をすることにより，ピリジルエチルシステインとして容易に同定できることがわかります。

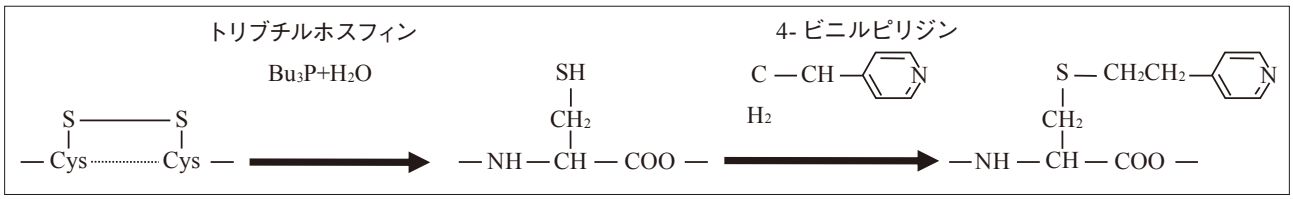


図 18　ピリジルエチル化の反応スキーム

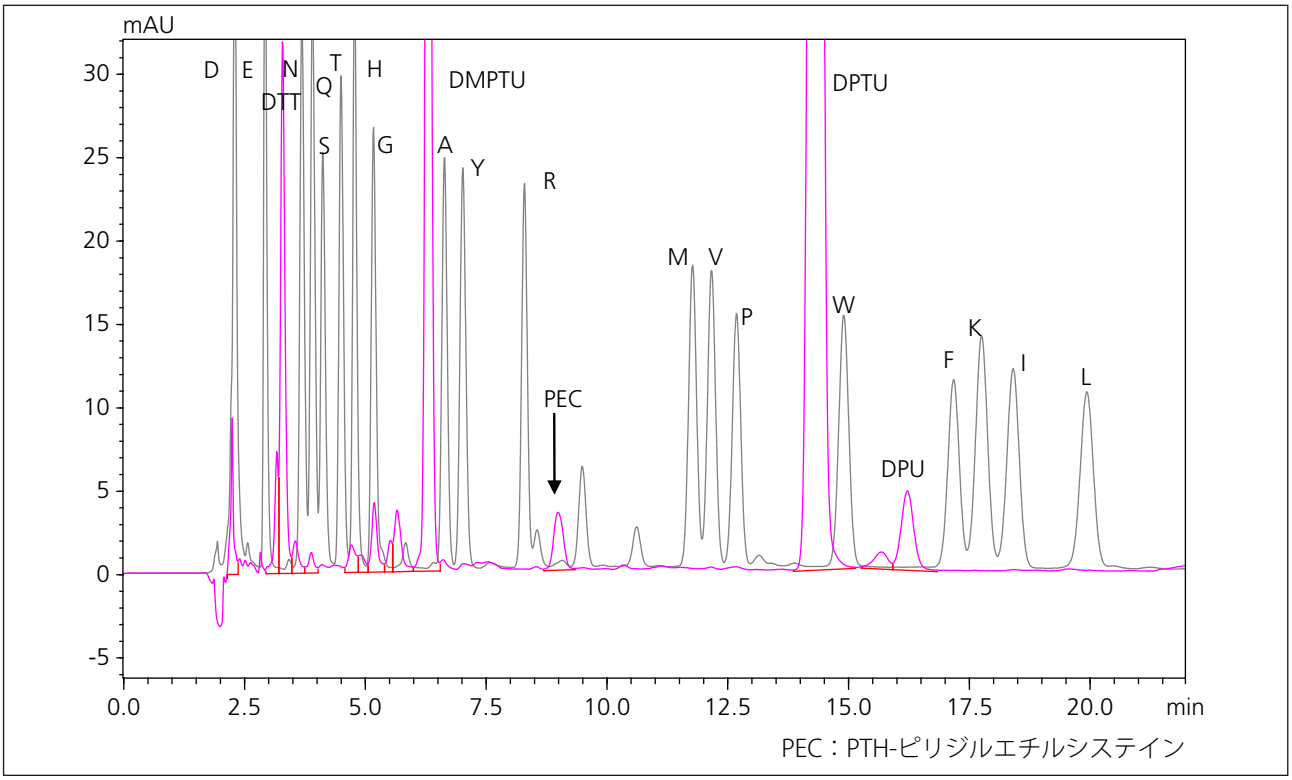


図 19　PTH- ピリジルシステインの溶出位置

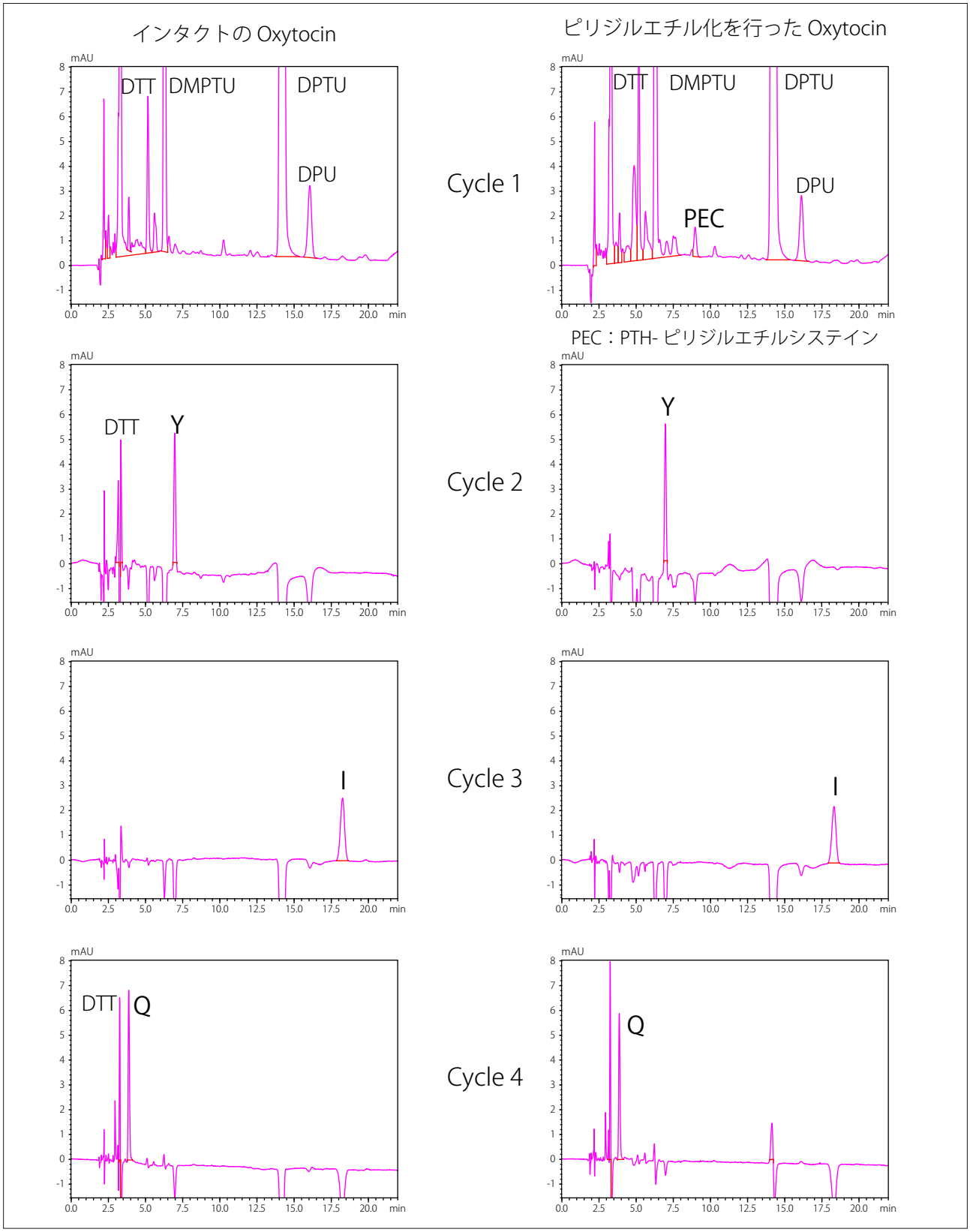


図 20　10 pmol Oxytocin（human）のシーケンス分析例（2 サイクル目以降は，差クロマトグラム）

Oxytocin : Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH_2

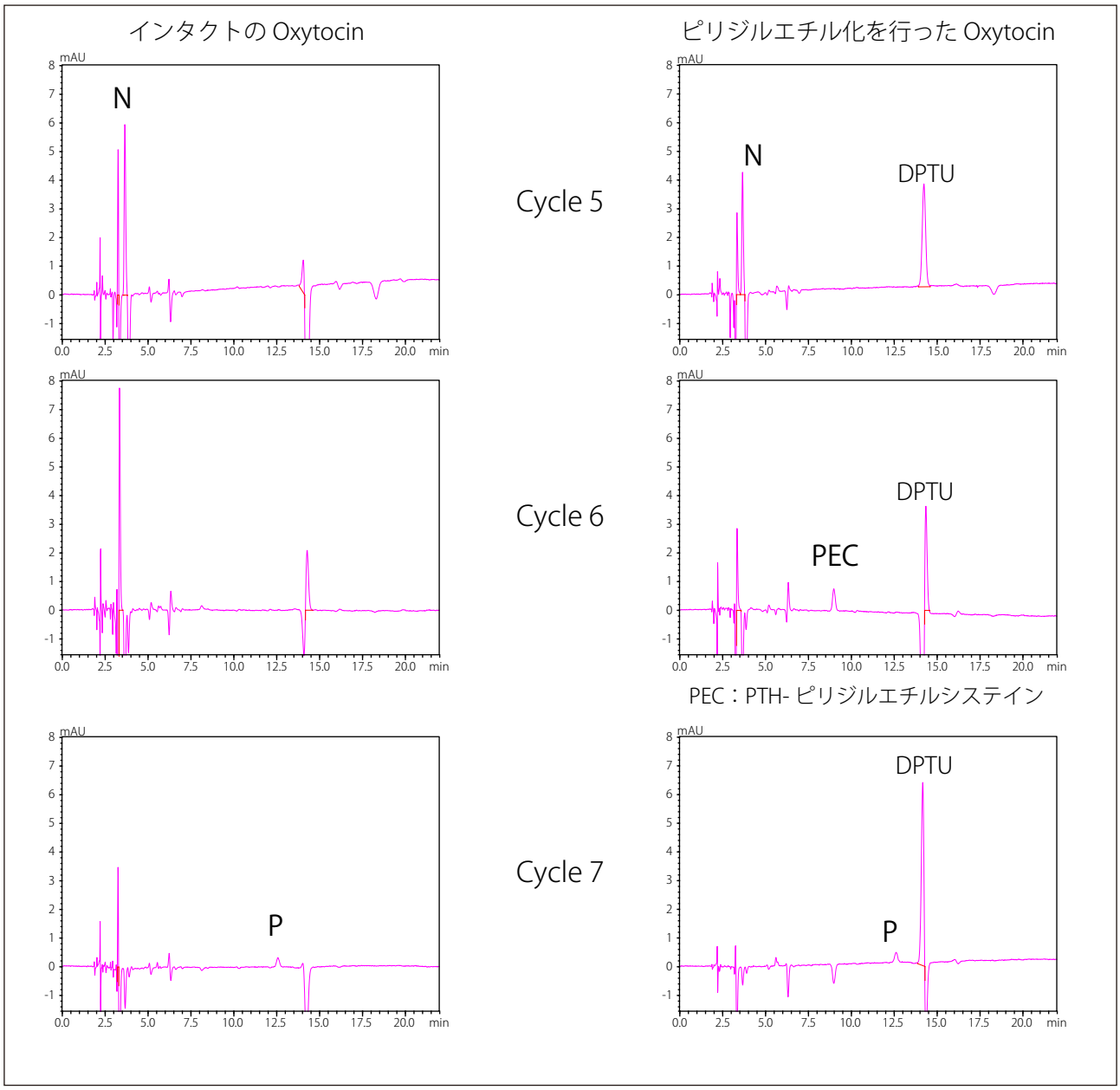


図 21　10 pmol Oxytocin（human）のシーケンス分析例（2 サイクル目以降は，差クロマトグラム）

Oxytocin : Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH_2

【参考文献】

1. G. Allen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Sequencing of Proteins and Peptides, North-Holland Publishing Company (1981)

株式会社 島津製作所
分析計測事業部　http://www.an.shimadzu.co.jp/

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。
掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。
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。
初版発行：2010 年 5 月
© Shimadzu Corporation, 2016