

Application News

ペプチド医薬品の品質管理 —アミノ酸配列の同定—

赤木 美穂、山口 久美子、栗木 智子

ユーザーベネフィット

- ◆ N末端からのアミノ酸配列を確実に同定することができます。
- ◆ 通常はエドマン分解に対し不安定で検出困難なシステイン残基も、還元アルキル化の前処理により同定可能です。
- ◆ MALDI-TOF MSの結果と組み合わせることにより、より確実なアミノ酸配列解析が可能です。

■はじめに

プロテインシーケンサPPSQ-50Aシリーズは、エドマン分解を用いてタンパク質・ペプチドのアミノ酸配列を同定する装置です。エドマン分解は、タンパク質・ペプチドのN末端より逐次的にペプチド結合を切断する手法で、データベースに依存しないアミノ酸配列解析が可能です。

本稿では、化学合成ペプチド医薬品の合成確認を目的として、プロテインシーケンサを用いて合成ペプチドのアミノ酸配列解析を行った例を紹介します。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF MS) と相補的に使用することで、より確実なアミノ酸配列の同定が実現可能です。

■ PTH-アミノ酸混合標準品の分析

プロテインシーケンサでは、エドマン分解で得られたフェニルチオヒダントイン(PTH)-アミノ酸を高速液体クロマトグラフ (HPLC) により分離・検出します。PPSQ-53A イソクラティックシステムおよびグラジエントシステムを用いて、PTH-アミノ酸混合標準品を分析しました。分析条件を表1、2に、クロマトグラムを図1、2に示します。

表1 分析条件 (イソクラティックシステム)

System	: PPSQ-53A isocratic system
Column	: Wakopak Wakosil PTH-II (250 mm x 4.6 mm I.D.)
Mobile phase	: PTH-amino Acids Mobile Phase
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Detection	: UV 269 nm (SPD-M30A), High sensitivity flow cell

表2 分析条件 (グラジエントシステム)

System	: PPSQ-53A gradient system
Column	: Wakopak Wakosil PTH-GR (S-PSQ) (250 mm x 2.0 mm I.D.)
Mobile phase	: A) PTH-amino Acids Mobile Phase A (for Gradient Elution) B) PTH-amino Acids Mobile Phase B (for Gradient Elution)
Flow rate	: 0.3 mL/min
Time Program	: B Conc. 0%(0 min)-0%(4 min)-100%(17-30 min)-0%(30.01-45min)
Column temp.	: 35 °C
Detection	: UV 269 nm (SPD-M30A), High sensitivity flow cell

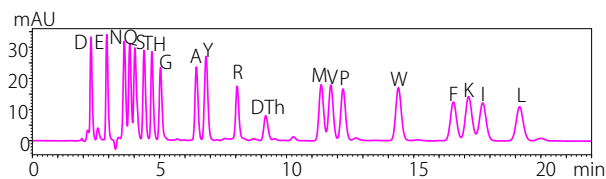


図1 PTH-アミノ酸混合標準品のクロマトグラム(イソクラティック)

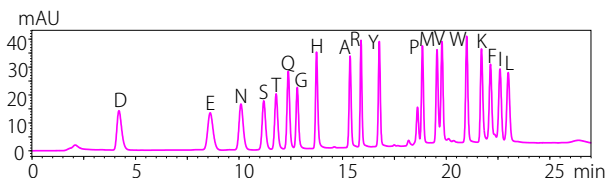


図2 PTH-アミノ酸混合標準品のクロマトグラム(グラジエント)

■直鎖型合成ペプチドのアミノ酸配列解析

合成ペプチド、パラトルモン(1-34)は、34残基のアミノ酸からなる直鎖型ペプチドです(図3)。このペプチド50 pmolを、ポリブレン処理を行ったガラスファイバーディスク (GFD)にロードし、PPSQ-53Aイソクラティックシステムで分析しました。図4にパラトルモンの分析で得られたクロマトグラムの例を示します。なお、本稿の図では1サイクル目は生クロマトグラム、それ以降は差クロマトグラムを示しています。C末端部のアミノ酸である34残基目のフェニルアラニンまで、容易に同定することができました。



図3 パラトルモン(1-34)のアミノ酸配列

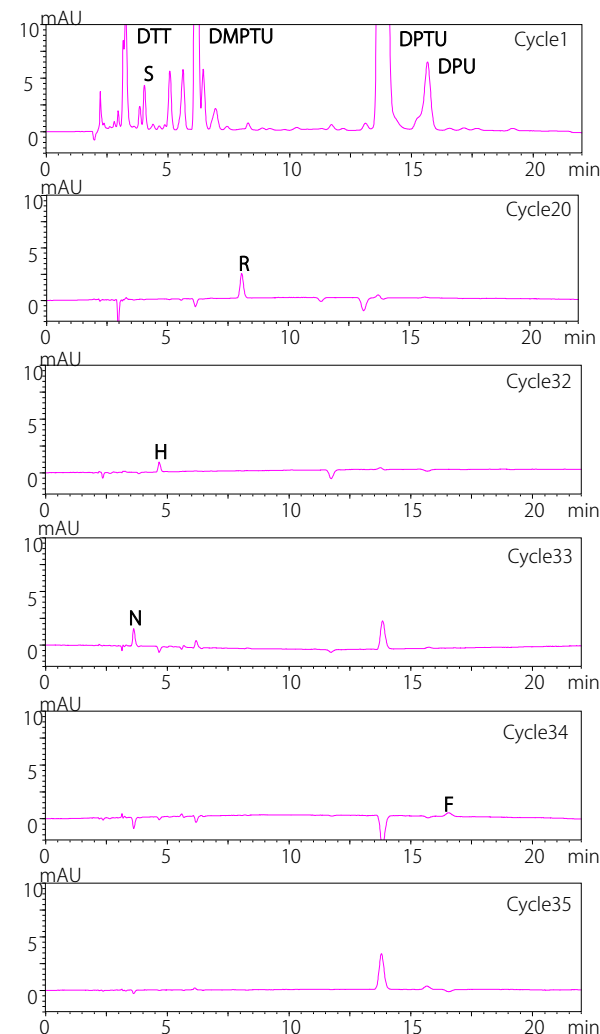


図4 合成ペプチドパラトルモン(1-34)のクロマトグラム

■環状型合成ペプチドのアミノ酸配列解析

システインは側鎖(-SH基)がエドマン分解に対して不安定であるため、そのままではプロテインシーケンサによる同定は困難です。確実なシステイン残基の同定のためには、還元アルキル化等の前処理が必要となります。

合成ペプチド、ソマトスタチンは14残基からなるペプチドホルモンで、分子内にジスルフィド結合を有します(図5)。 intactのソマトスタチン100 pmolについて、PPSQ-53A グラジエントシステムで分析を行った場合、3サイクル目と14サイクル目のシステインは検出・同定することが困難でした(図7)。しかし、図6のようなカルバミドメチル(CAM)化を行うことで、3サイクル目・14サイクル目のシステインをカルボキシメチルシステインC(CAM)として容易に同定することができました(図8)。

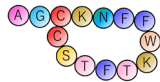


図5 ソマトスタチンのアミノ酸配列

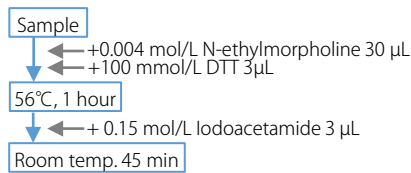


図6 CAM化の前処理プロトコル

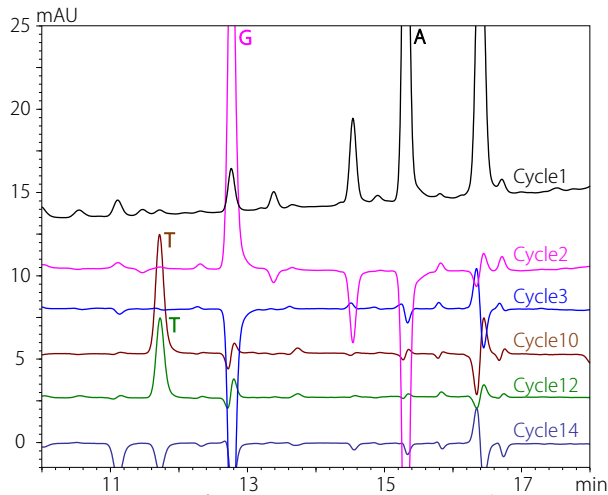


図7 合成ペプチドソマトスタチンのクロマトグラム

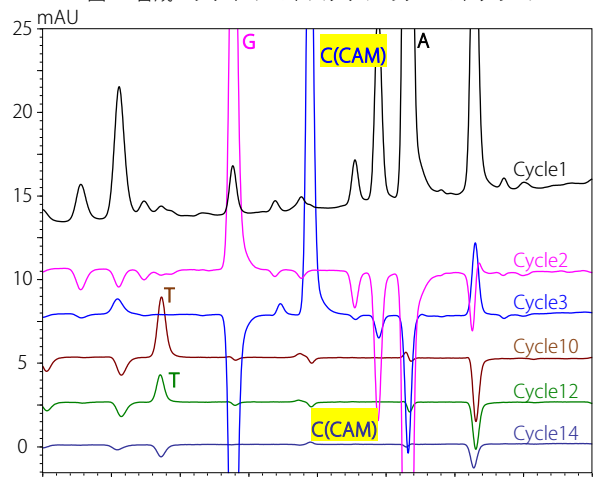


図8 合成ペプチドソマトスタチン(CAM化あり)のクロマトグラム

PPSQは、株式会社島津製作所または富士フィルム和光純薬株式会社の日本およびその他の国における商標です。

■プロテインシーケンサ・MALDI-TOF MSを用いた合成ペプチドのアミノ酸配列解析

タンパク質・ペプチドのアミノ酸配列解析手法には、プロテインシーケンサを用いたエドマン分解法のほかに、MALDI-TOF MSを用いた手法があります。アプリケーションニュースNo.B105で紹介したように、各手法に利点および欠点があるため、相補的に使用することでより確実な解析が可能となります。ここでは、副腎皮質刺激ホルモンACTH 1-17のアミノ酸配列解析例を紹介します。

まず、PPSQ-53Aイソクラティックシステムを用いてACTH 1-17のアミノ酸配列解析を行いました。その結果、16サイクル目のリジンまでは同定可能でしたが、17サイクル目のアルギニンは検出できませんでした。また、15サイクル目・16サイクル目はリジンが連続しているため、16サイクル目の差クロマトグラムではリジンのピークは確認できません(図10a)。

次に、MALDI-8030を用いてACTH 1-17のモノアイソトピック質量を測定した結果、2093.1となりました(図10b)。なお、マトリックスには α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA)を使用しました。プロテインシーケンサにより同定できた16サイクル目までのモノアイソトピック質量が1935.98であったことから、質量の差分により17残基目はアルギニンと同定できました。



図9 ACTH 1-17のアミノ酸配列

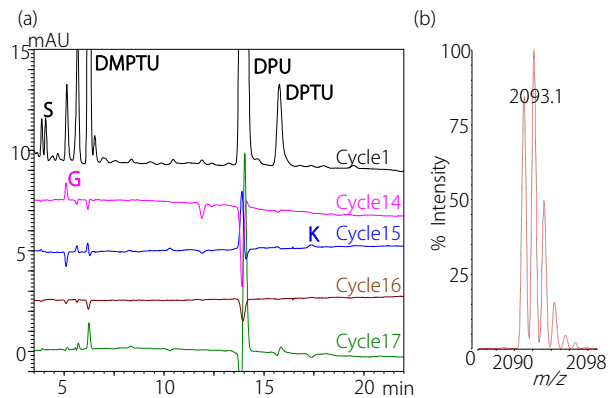


図10 ACTH 1-17のクロマトグラムおよびMSスペクトル

■まとめ

プロテインシーケンサを用いることで、ペプチド医薬品と同一の配列をもつ合成ペプチドのアミノ酸配列を同定できました。通常は検出が困難なシステイン残基を含む試料についても、還元アルキル化の前処理により同定可能でした。

プロテインシーケンサとMALDI-TOF MSそれぞれの長を踏まえ、適宜組み合わせることを推奨します。

<関連アプリケーション>

1. タンパク質分析プラットフォーム MALDI-TOF MS(MALDI-8020)とプロテインシーケンサ (PPSQ™-50Aグラジエントシステム) の組み合わせによるペプチドのN末端部アミノ酸配列解析 — [Application News No.B105](#)
2. MALDI-TOF MSおよびプロテインシーケンサを用いた合成ペプチドのアミノ酸配列解析 — [Application News No.01-00776](#)

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



▶ PPSQ-51A/53A
プロテインシーケンサ



▶ MALDI-8030
マトリックス支援レーザー脱離イオン化
飛行時間型質量分析計

関連分野

▶ 医薬・バイオ医薬品

開発（タンパク質・ペプチ
ド分析、糖鎖分析、観察、
アジュバント）

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ