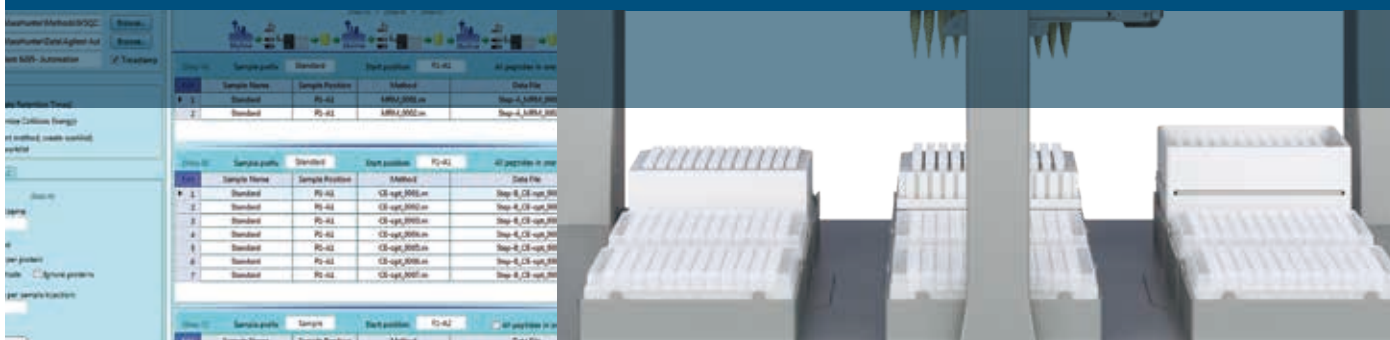
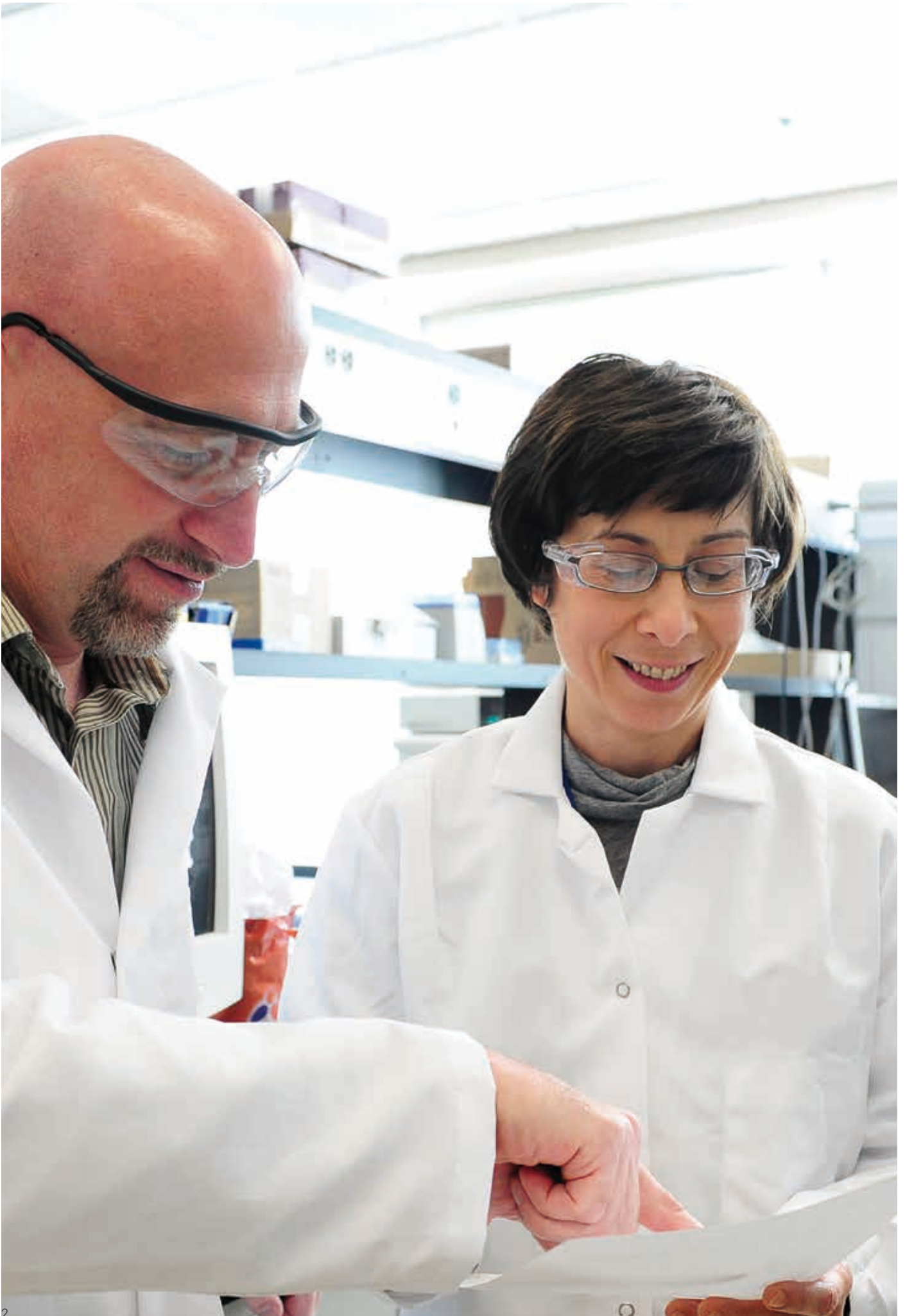


ペプチド定量ガイド

臨床研究





臨床研究ラボにおけるペプチド定量

ペプチド定量は臨床研究で急速に成長している分野であり、科学者は基礎研究で同定したペプチドバイオマーカーを臨床研究で実用化に向けて応用しています。この定量手法では、予備知識に基づいて、臨床研究サンプル内に存在すると予想されるタンパク質から一意のペプチドを測定します。すなわち、文献、ゲノミクス研究とプロテオミクス研究、またはこれらを組み合わせたプロテオゲノミクス分析を活用するということです。

アジレントは、臨床研究用のペプチド定量メソッドの開発に関して専門的なアドバイスをすることができ、サンプル前処理、液体クロマトグラフィー（分離用のカラム、消耗品、分析手法）、高感度のトリプル四重極を用いたペプチド質量分析、信頼性の高いソフトウェアによるデータ解析など、あらゆる段階を網羅したソリューションを提供しています。

アジレントの確かな技術が、ペプチド定量のプロセス全体を包括的にサポートします。



アジレントのペプチド定量ソリューション: (左から) Agilent AssayMAP Bravo Liquid Handling システム、Agilent 1290 Infinity II 液体クロマトグラフィーシステム、Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システム、Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム

低分子分析と高分子分析

低分子の分析と、ペプチドのような高分子の分析は、根本的に異なる作業です。従来の低分子分析におけるサンプル前処理では、分析対象物に応じて、抽出や除タンパク処理などのさまざまな手法が必要になります。これに対し、ペプチド分析には比較的標準のプロトコルを用います。溶液中のタンパク質は酵素分解する前に、変性、還元、アルキル化されます。ペプチドの分析でも同じ種類の液体クロマトグラフィーと類似の移動相が使用されますが、サンプルの複雑さが原因でグラジエントが非常に浅くなり、分析時間が長くなる場合があります。



ペプチドの質量分析のメソッドを開発する場合、単一のペプチドが複数の荷電状態で存在している可能性や、多数のプロダクトイオンが存在し、その一部の m/z がプリカーサイオンよりも高い可能性があることを考慮する必要があります。また、アバンダンスが非常に

高いプロダクトイオンは干渉することがあるため、分析には最適ではない可能性があることにも注意が必要です。MRM トランジションを最適化することにより、選択性と感度の両方が向上します。従来の低分子分析の場合と同様に、データを取得することは最初の段階にすぎま

せん。データを解析するために必要なのは、高度な機能を備えながらも操作が容易で、実験結果から最大限の情報を抽出できるソフトウェアです。

ペプチド分析のための自動サンプル前処理システム

臨床研究では、サンプル前処理の再現性が常に重要になります。ペプチドサンプルの前処理には多数の手順と試薬の添加作業が含まれており、それによって分析の再現性に影響が及ぶことがあります。前処理プロセスを自動化すれば、サンプル追跡のばらつきを抑え、操作ミスをなくすことができます。Agilent AssayMAP Bravo Platform は、LC/MS 分析におけるタンパク質とペプチドサンプルの前処理を効率的に実行します。シンプルなユーザーインターフェースを備え、ラボ試験済みのペプチドおよびタンパク質サンプルの前処理プロトコルに対応しているため、臨床研究に最適なプラットフォームです。

Agilent AssayMAP Bravo によるペプチドの自動サンプル前処理



ペプチド定量時のサンプル前処理には一連の手順が必要になりますが、一部には任意の手順もあります。AssayMAP Bravo Platform のソフトウェアインターフェースに組み込まれている Peptide Sample Prep Workflow Navigator では、各種のペプチドサンプル前処理ワークフローがわかりやすく表示され、最適

なワークフローを選択して使用できるようになっています。必要に応じて変更できる使いやすいプロトコルと、ワークフローガイドを備えた試薬カリキュレータが、すべてのワークフローに用意されています。ジスルフィド結合の変性、還元、アルキル化と、酵素分解のための溶液内分解ワークフローは、常時実行されます。

ペプチド精製ワークフローは、LC/MS 分析前にサンプルを脱塩するためのオプションの手順です。アジレントはこれらのワークフローごとに AssayMAP Bravo アプリケーションを開発しているため、臨床研究ラボは自動サンプル前処理の要件に合わせてワークフローを組み合わせることができます。



Agilent AssayMAP Bravo Liquid Handling システム

クロマトグラフィーによる分離

サンプルを前処理して分析の準備が完了したら、次の手順はターゲットペプチドの効率的なクロマトグラフィーメソッドの開発です。Agilent 1290 Infinity II 液体クロマトグラフィーシステムには、困難な分離を実行する機能が備わっており、信頼性と堅牢性が非常に優れています。Agilent 1290 Infinity II LC システムの UHPLC 機能は幅広い流量とカラムに対応しているため、生体サンプルのような複雑なマトリックス中のターゲットペプチドのクロマトグラフィーメソッドを最適化することができます。



「高流量で柔軟にトリプル四重極分析を実行できるため、堅牢性と再現性が向上します。1290 Infinity II LC システムの高流量を利用することで、リテンションタイムの精度と再現性を確保し、ピークを目視で確認しなくても、ピーク面積をほぼ積分できます。臨床試験に進むにあたり、大半のデータを自動的に抽出できることがますます重要になってきます。アジレント機器のツール、再現性、ソフトウェアによって、これが可能になると考えています。」

– **Stephen R. Pennington**, Professor of Proteomics and Senior Fellow at the Conway Institute of Biomolecular and Biomedical Research, University College Dublin. Founder, CEO, and CSO of Atturo Ltd.

通常、ペプチド分離に使用されるクロマトグラフィーカラムには高分子に対応するための大きなポアが備えられており、回収率を向上させるために分析対象物の非特異的な結合を最小化するクロマトグラフィー充填剤が含まれています。Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムは、ペプチドの分離および特性評価において一貫した高品質の性能を提供します。

この表面多孔質カラムはポアサイズが120 Åであり、タンパク質の酵素分解により生成されたペプチドを分析するのに最適です。粒子サイズが2.7 μmであるため、複雑な混合物内のターゲットペプチドで高流量と良好な分離能を達成できます。質量分析と組み合わせて使用す

ると、クロマトグラフィー分離能が向上して干渉が低減します。また、クロマトグラフィーのピーク形状がシャープになることで感度が向上するため、データ処理が簡単になり結果の信頼性も向上します。さらに、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムは、分析困難なペプチド混合物に関する特別な試験が実施されており、ペプチドの信頼性の高いクロマトグラフィー分離とカラム間の再現性を実現します。多くのペプチド定量分析はリテンションタイムウィンドウを使用して多重処理されているため、堅牢な分析メソッドと高スループット環境を実現するためには、リテンションタイムの安定性が重要になります。

また、Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムはギ酸を使用する際にも最適です。120 Å 表面多孔質粒子カラムであることに加えて、荷電表面 C18 ハイブリッドカラムでもあります。これらの特性により、ギ酸および異なる選択性を使用した際に優れたピーク形状が実現し、脱アミド化種のような溶出時間の近い翻訳後修飾を適切に分離できます。

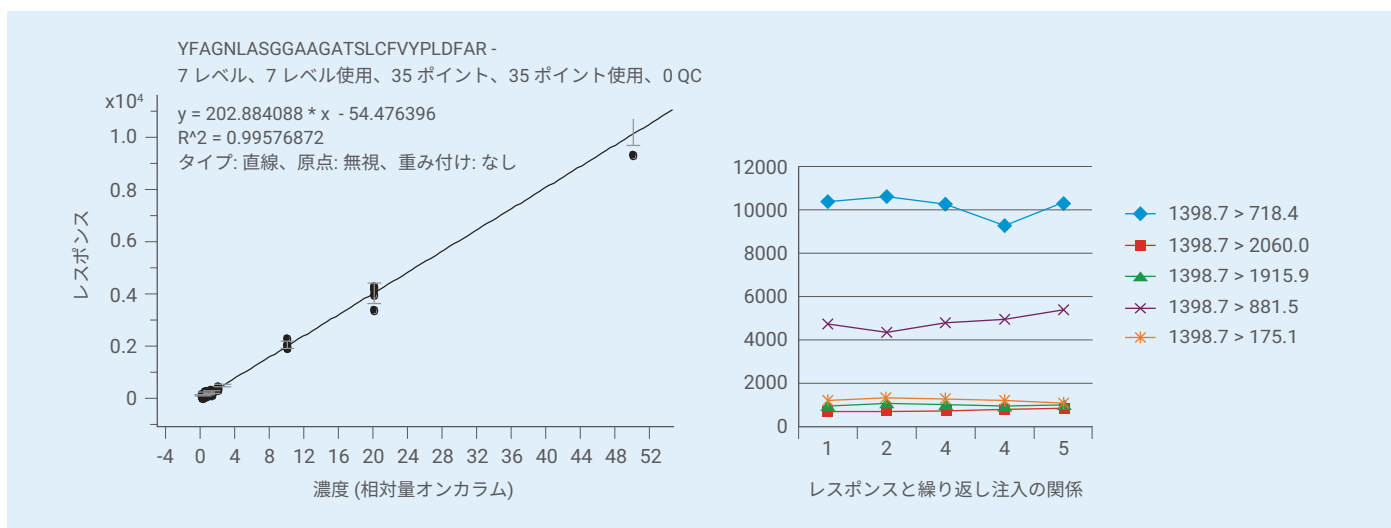
いずれのカラムも堅牢性に優れたUHPLCに近い結果が得られ、質量分析のカラムの切り替えとコンディショニングに関連するダウンタイムが短縮します。



Agilent 1290 Infinity II 液体クロマトグラフィーシステムと Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム

質量分析による検出

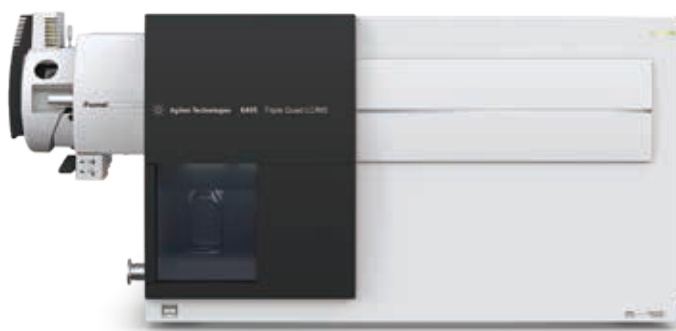
ペプチド定量においては、生体サンプル中のタンパク質濃度が何桁もの範囲にわたっている場合があるため、感度が高くダイナミックレンジが広いことが重要になります。Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムには、iFunnel 技術が搭載されています。iFunnel 技術を Agilent Jet Stream イオン源と組み合わせることにより、イオンサンプリング効率が劇的に増大し、検出下限が下がります。Agilent 6495 は、優れた感度、信頼性、システム堅牢性を必要とする定量アプリケーションにおいて実績のあるシステムです。メンテナンスが必要な場合、新しく組み込まれたゲートバルブを使用することで機器をベントする必要がなくなるため、キャピラリを交換するだけで稼働率が高まり、生産性が向上します。



Agilent 6495 では質量範囲が拡張されており (最大 m/z が 3000)、さまざまなプリカーサイオンとプロダクトイオンを選択することができるため、タンパク質

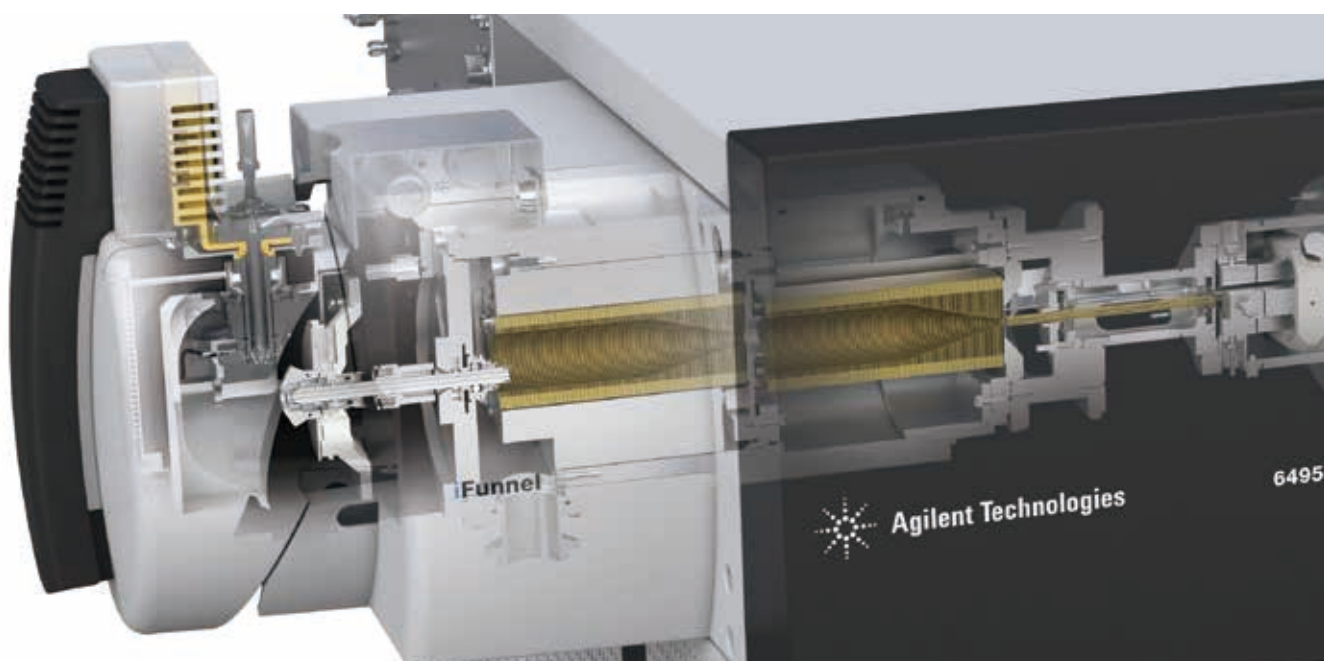
の定量を最適化する際のペプチドおよび MRM トランジションの選択範囲が広がります。上の例では、選択したプロダクトイオンのうちの 2 つの m/z が 1900 より

高いペプチドの定量を示しています。このような高 m/z プロダクトイオンは、ターゲットペプチドの確認において高い特異性を示します。



Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムには、iFunnel 技術と Agilent Jet Stream イオン源が合わせて組み込まれています。

アジレント独自の Jet Stream イオン源により、標準的なエレクトロスプレーイオンソースよりも感度が 3 ~ 5 倍高く、濃度に依存しないインターフェースが提供されます。そのため、標準的な内径 2.1 mm のカラムを使用しても、このような手法に伴う感度の低下を発生させずに、LC の流量を増大させることができます。ペプチド定量では、サンプルによる制限を受けない臨床研究者は、従来フローの HPLC と Jet Stream イオン源を用いてナノフローに近い HPLC 感度を達成できます。これにより、複雑なプロテオミクスサンプルの LC/MS 分析が高速化し、堅牢で再現性の高い結果を得られます。



Agilent Jet Stream は、エレクトロスプレーに比べて 3 倍から 5 倍のシグナルを提供します。

MassHunter ソフトウェア

Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアには、機器コントロール用の取り込みモジュールと、定量および定性データ解析機能が備えられています。MassHunter 定量分析ツールによりデータ処理が自動化されるため、ペプチド定量の結果が迅速に得られます。これらのツールにより、使用する結果基準をカスタマイズすることができ、詳細な確認を必要とする結果が強調して表示されます。



また、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアは、ラボラトリーインフォメーションシステム (LIS) と直接統合することもできるため、分析用のサンプルリストをインポートして、最終的な結果をエクスポートすることができます。

Skyline ソフトウェア

Agilent MassHunter ソフトウェアは、Skyline ソフトウェアと緊密に統合されています。Skyline ソフトウェア (ワシントン大学の MacCoss グループが開発) はプロテオミクス研究向けに設計されており、MassHunter 内で MRM、ダイナミック MRM (dMRM)、トリガー MRM (tMRM) の各モードをサポートしているため、複雑さを増すサンプル内で目的の定量および定性シグナルを取り込むことができます。

Agilent Skyline Automation ツールによる 3 ステップの簡易な自動 MRM 測定

1 RT の決定	2 CE の最適化	3 最終メソッドの作成
<ul style="list-style-type: none">- Skyline のドキュメントの作成- タンパク質/ペプチド情報の追加- MRM メソッドのエクスポート- MRM 分析の実行	<ul style="list-style-type: none">- MRM 結果のインポート- CE 最適化メソッドのエクスポート- CE 最適化の実行	<ul style="list-style-type: none">- CE 最適化の結果のインポート- 最終ダイナミック MRM メソッドのエクスポート- 最終メソッドの実行



アジレント独自の Skyline 自動化ツールは、重要なメソッドの開発および最適化プロセスを自動化することによって新しいメソッドの作成をより簡単にします。Skyline と MassHunter は連携して動作し、容易に設定可能なソリューションを提供します。サンプルをバイアルに置きパラメータをセットアップするだけで、残りの最適化はソフトウェアが実行します。プログラムによってメソッドが作成され、サンプルを実行する準備が整います。

カラムやメソッドの交換時、複雑なメソッドではリテンションタイムの調整に時間がかかる場合があります。MassHunter Acquisition ソフトウェアのリテンションタイムキャリブレーションツールは、リテンションタイムの変更に対処するためにメソッドを容易に調整できるように設計されています。Skyline は、ペプチドリテンションタイムを保存し予測できる iRT 機能も備えています。つまり、Agilent

MassHunter および Skyline ソフトウェアにより、ペプチドの定量分析が高速化し、容易になるとともに、生産性が向上します。

アジレントは、サンプル前処理、LC/MS 分析、データ処理を含む、ペプチド定量ワークフローのあらゆる側面に対応するソリューションを提供しています。
アジレントは、臨床研究でペプチド定量を用いる多くのラボに選ばれています。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018
Printed in Japan, June 7, 2018
5991-9412JAJP

