

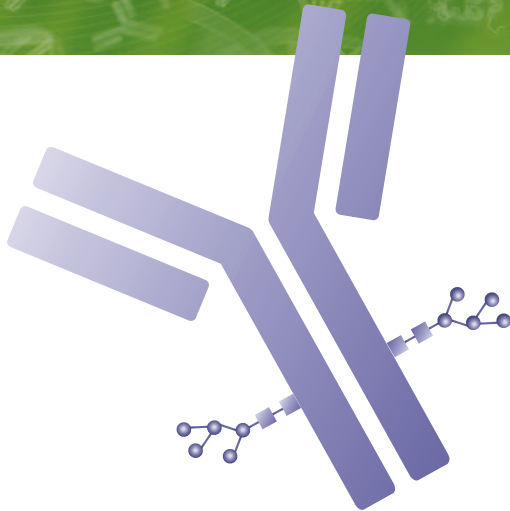
最適なペプチド分析のために

ペプチドマッピングの基礎

The Measure of Confidence



Agilent Technologies



はじめに

ペプチドマッピングは生物薬剤研究における貴重なツールで、きわめて強力なメソッドとして、組み換えタンパク質をはじめとするタンパク質同定試験に広く用いられています。大抵の場合、タンパク質の酵素分解 (通常はトリプシンを使用) によりペプチド断片を生成したのち、再現性の高い方法でそのペプチド断片を分離および同定します。これにより、単一のアミノ酸変化、酸化、脱アミド化、その他の分解を検出およびモニタリングすることができます。また、N-末端環化、C-末端リシン処理、N-グリコシル化などの一般的なモノクローナル抗体バリエーションや、その他の翻訳後修飾を直接検出することも可能です。

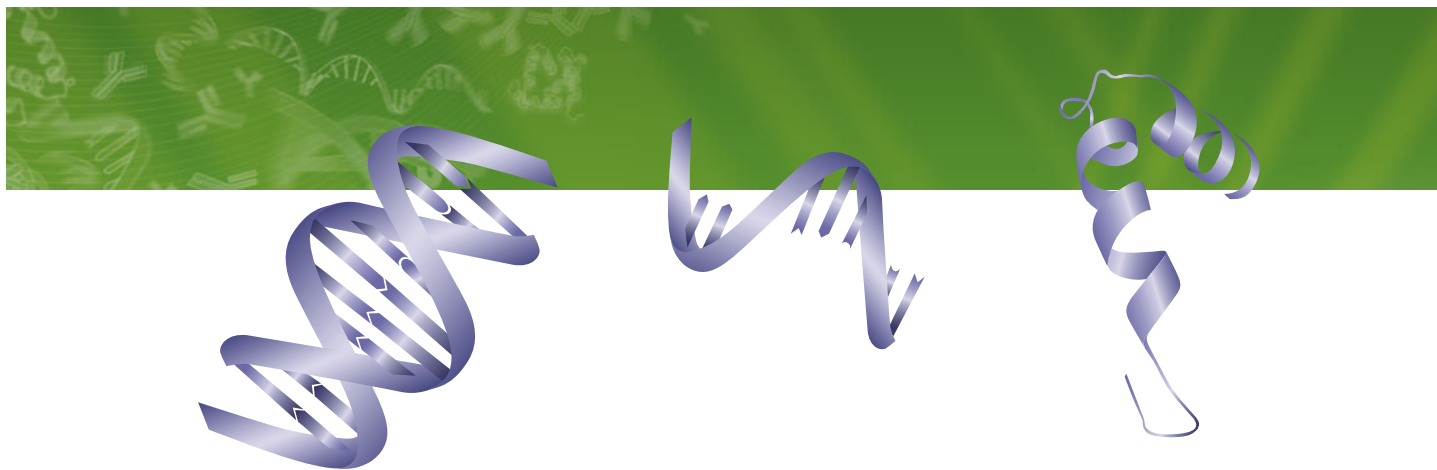
ペプチドマップは、タンパク質や複数の処理で得られる最終生成物のフィンガープリントで、分析対象のタンパク質を包括的に理解することができます。ペプチドマッピングは、タンパク質の分離精製、ペプチド結合の選択的切断、ペプチドのクロマトグラフィー分離、有効な手法によるペプチドの分析という4つの主要手順で構成されます。

ペプチドマッピングは、タンパク質の一次構造を確認し、構造中の変化を検出するための比較手法と考えられています。また、処理の一貫性や遺伝的安定性を検証することもできます。ペプチドマップについては、タンパク質の確実な同定が可能で、完全なペプチド配列を最大限カバーし、非消化タンパク質の補足的情報や配列情報が得られることが求められます。

ペプチドを分離し、ペプチドマップを作成するためのクロマトグラフィーテクニックの選択は、分析対象タンパク質や実験の目的、予想される結果によって異なります。しかし、ペプチドマッピング分離の HPLC テクニックとしては、優れた分離能を備えた逆相クロマトグラフィーが広く用いられています。逆相クロマトグラフィーは、揮発性の移動相溶媒を使用できるため、分析的分離と分取的分離のいずれにも適しています。ペプチドマッピング分離には低分子分離と同様のカラムが適しているものの、ほとんどのペプチドマッピング分離は低 pH および高温でおこなわれるため、優れた pH 安定性を備えたカラムが一般に使用されています。

ペプチドマップを適切に作成するためには、キャラクタライゼーションの方法全体を注意深く検証する必要があります。1つのプロフィールには、各ペプチドやその派生物を表す100以上のピークが含まれることもあります。そのため、サンプル前処理手法、強力な分離テクニック、有効性が実証されたプロトコルに関する知識が求められます。ペプチドマップを適切に作成するスキルと情報があれば、タンパク質分解物を最適に分離し、信頼性の高い確実なペプチド分析結果を得られます。

このペプチドマッピングの基礎では、逆相クロマトグラフィーによるペプチドマップ作成における重要点と、ペプチドマッピング手順に用いられる基本的なテクニックを紹介し、分離の最適化を行って、優れた結果を得るための方法を説明します。



タンパク質分解：ペプチドマッピング分離を向上させるタンパク質の前処理

分析に先立つタンパク質分解のステップを十分に理解すれば、完全な分解を確実に起こし、分析の信頼性を高めることができます。多くの場合、必要条件を満たす安定した LC 注入用サンプルを得るためには、独自の開発プロトコルを備えた分解手法が求められます。分解の最適化にあたって考慮すべき選択肢は

数多くありますが、従うべき一般的なアプローチがあります。タンパク質分解では、表 1 に示すように、(1) サンプル前処理、(2) 切断剤の選択、(3) アルキル化/還元、(4) 分解プロセス、(5) 濃縮/精製という 5 つのステップが用いられます。

表 1: タンパク質分解の 5 ステップ

手順	結果	一般的な手法
1. サンプル前処理	分解するサンプルの前処理	除去、濃縮、透析、脱塩
2. 切断剤の選択	特定の切断要件	なし
3. 還元およびアルキル化	還元によりジスルフィド結合が減少 アルキル化により SH 基にキャップ	還元: DTT、45 分、60 °C アルキル化: IAM、1 時間、暗所
4. 分解プロセス	タンパク質の切断	分解: pH 8、37 °C、一晚 クエンチ: TFA 添加
5. 濃縮/精製	LC または LC/MS 分析のためのサンプル前処理	C18 チップ、濃縮、透析、アフィニティカラム

ペプチドマッピング用のアジレント製カラムの詳細については、agilent.com/chem/jp をご覧ください。

ステップ1: サンプル前処理

タンパク質のサイズや構成によって、サンプル前処理のアプローチは異なります。特定の条件下では、サンプルの濃縮が必要となります。製品作成に用いた他の物質や安定剤についても、そうした物質がマッピング手順の妨げになる場合には、タンパク質と分離する必要があります。そうした手順を実施する手法は数多くあるほか、それぞれのタンパク質に適した精製手法やプロセスもあります。しかし、分解に先立つサンプル前処理にもっとも広く用いられているアプローチは、除去/濃縮、透析、ゲルろ過による脱塩です。

除去および濃縮は、高濃度のタンパク質の除去や、サンプル中のターゲットのタンパク質の分離を目的としています。除去は一般に、プロテオミクスアプリケーションにおいて、高濃度のアルブミンや免疫グロブリンが含まれる血清などの生物学サンプルの複雑さを低減するために用いられます。アジレントのマルチプルアフィニティ除去システム (MARS) HPLC カラムおよびスピカートリッジを使えば、血清や血漿などの生体液中に大量に存在する低濃度タンパク質やバイオマーカーの同定とキャラクタライゼーションが可能です。MARS を用いた 14 種類の高濃度タンパク質の除去により、総タンパク質量の最大 94 % を除去できます。除去プロセスは堅牢かつ高効率で、自動化も容易です。



MARS は、さまざまな LC カラム寸法およびスピカートリッジフォーマットで提供されています。除去されるタンパク質は、アルブミン、IgG、抗トリプシン、IgA、トランスフェリン、ハプトグロビン、フィブリノーゲン、アルファ 2-マクログロブリン、アルファ 1-酸性糖タンパク質、IgM、アポリポタンパク質 AI、アポリポタンパク質 AII、補体 C3、トランスサイレチンです。

除去では、イムノアフィニティ技術 (免疫沈降、共免疫沈降、イムノアフィニティクロマトグラフィーなど) が用いられます。また、濃縮テクニックでは、各物質に固有の生化学活性、翻訳後修飾 (PTM)、細胞内の空間的配置をもとに、細胞タンパク質のサブクラスが分離されます。翻訳後修飾 (リン酸化やグリコシル化など) は、イオン金属アフィニティクロマトグラフィー (IMAC) や固定化レクチンなどのアフィニティリガンドを用いて濃縮することができます。固有のタンパク質ケミストリを導入するためのその他のテクニックとしては、修飾アミノ酸や PTM の代謝的および酵素的導入などがあります。

シンプルなサンプルでも複雑なサンプルでも、分解に対応できるように最適化するために、透析または脱塩が必要となります。例えば、質量分析 (MS) では荷電イオンを測定することから、検出への干渉を最小限に抑えるためには、分析に先立ち塩 (特にナトリウム塩やリン酸塩) を除去する必要があります。透析および脱塩の生成物では、バッファ交換、脱塩、または低分子除去により、ダウンストリームプロセスの干渉を防止することが可能です。

透析は、サンプル中の塩濃度を下げる手法として確立されています。透析の際には、透析袋 (一定の孔隙率を持つ膜ケース) を満たし、袋を結んだのち、水またはバッファの入った水槽に袋を入れ、拡散により塩濃度を平衡化させます。袋を通過して拡散できない大きな分子は、袋のなかに残ります。水槽内の液体が水の場合、袋内の低分子の濃度が徐々に低下し、やがて袋の外と中の濃度が同じになります。平衡が成立したら、袋を破り、液体を収集容器に注ぎます。透析は数リットルまでの体積に対応できますが、塩を除去するまでに数日を要するため、大容量のサンプルでの使用は現実的ではありません。

分解に先立つサンプルの脱塩については、ゲルろ過がもっとも現実的な手法です。この手法は、分子の大きさに基づいて分離する非吸着クロマトグラフィーテクニックです。脱塩は、サンプル中の塩などの低分子量成分を完全に除去または減少させるために用いられます。それに対して、バッファ交換はサンプルバッファを別のバッファに置換するものです。



Agilent Bio SEC カラムを使えば、ペプチドマッピングアプリケーションに先立ち、タンパク質混合物を効率的に分離 (サイズに基づく) および脱塩することができます。

ゲルろ過は、アイソクラティック溶出によりサンプルを処理するため、もっとも実施が容易なクロマトグラフィー手法です。ゲルろ過 (サイズ排除クロマトグラフィーとも呼ばれます) を用いれば、分子量の差が2倍未満の分子 (タンパク質など) を分離することができます。ペプチドマッピングアプリケーションでは、分離する物質間のサイズの違いはきわめて大きいのが普通です (タンパク質と塩など)。ゲルろ過メディアについては、大きい分子を完全に除去すると同時に、小さい分子を孔隙へ自由に拡散できるものを選択します。バッファを用いてカラムを平衡化します。

このバッファは、サンプルのバッファと同じものでも違うものでも使用できます。カラムへのサンプル導入後、さらにカラムバッファ (溶出バッファ) を加え、サンプル分子をカラム下流へ流します。メディアの孔隙を通過できない大きい分子が最初にカラムから溶出し、それに続いて小さい分子が溶出します。小さい分子は孔隙に拡散するため、大きい分子よりも溶出が遅くなります。溶出バッファがサンプルとは異なる場合、大きい分子は元々の塩から離れて新しいバッファに溶出し、元のサンプルバッファと完全に分離されます。

Captiva 低タンパク除去フィルタ

どのようなサンプルを前処理する場合でも、タンパク質除去フィルタを用いたサンプルのろ過をおすすめします。

Agilent PES フィルタは、タンパク質に関連するろ過において、一貫性のある優れた低タンパク質結合特性を実現します。Agilent PES フィルタメンブレンは、ほとんどの LC 分析で PVDF メンブレンよりも適したオプションです。Agilent PES は、一般的な LC 溶媒で PVDF と同様の適合性を備え、タンパク質の結合と清潔さについてはそれ以上に優れています。

詳しくは、agilent.com/chem/jp をご覧ください。

Captiva PES フィルタ

直径 (mm)	ポアサイズ (μm)	認定	ハウジング	部品番号
15	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5096
4	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5095
4	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5094
15	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5097
25	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5098
25	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5099



ステップ2: 切断剤の選択

ペプチド結合の切断には、化学的切断と酵素的切断という2つの手法があります。化学的切断では、臭化シアン (CNBr) などの非酵素求核試薬を用いて、特定領域のペプチド結合を化学的に切断します。酵素的切断では、トリプシンなどのタンパク質分解酵素で、各種の部位特異的な切断を行います。切断手法および切断剤は、分析対象タンパク質や、分析において予想される結果によって異なります。また、選択の際には、ペプチドマッピングプロセス全体を慎重に検証し、関連する特性を考慮する必要があります。ペプチドマッピングに用いられるもっとも一般的な切断剤は、トリプシンです。これは、トリプシンの特性がきわめて明確に定義されているためです。トリプシンは、アルギニン (Arg) またはリシン (Lys) C末端側のみ加水分解します。一般的な切断剤とその特異性を表2にまとめています。

表2: ペプチド結合の切断方法

切断のタイプ	切断剤	特異性
酵素的切断	トリプシン	Arg および Lys の C-末端側
	ペプシン	非特異的
	キモトリプシン	疎水性残基の C-末端側
	グルタミルエンドペプチダーゼ	Glu および Asp の C-末端側
化学的切断	臭化シアン	Met の C-末端側
	希酸	Asp および Pro
	BNPS-スカトール	Trp

ステップ3: 変性、還元、アルキル化

タンパク質分解酵素により効率的にペプチド鎖を切断するためには、ほとんどのサンプルで、さまざまな試薬を用いた変性、還元、アルキル化をおこなう必要があります。変性と還元は、1,4-ジチオスレイトール (DTT)、メルカプトエタノール、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィンなどの試薬と加熱の組み合わせにより、しばしば同時におこなわれます。たいていは DTT が使用されます。この試薬は強力な還元剤で、ジスルフィド結合を切断し、タンパク質のシステイン間における分子間および分子内のジスルフィド形成を妨ぎます。変性と還元を組み合わせることで、変性作用因として加熱のみを用いる場合に生じる、ジスルフィ

ド結合の還元に起因する再生という問題を避けることができます。再生の可能性をさらに低くするためには、タンパク質の変性と還元につき、システインのアルキル化をおこなう必要があります。分解に先立つタンパク質サンプルのアルキル化にもっとも広く使用されている試薬は、ヨードアセトアミド (IAM) とヨード酢酸 (IAA) です。

図1は、分解に先立つモノクローナル抗体の還元およびアルキル化の完全性評価に用いられる逆相クロマトグラフィー分離メソッドの一例です。

図1 – 逆相クロマトグラフィーによる還元/アルキル化プロフィール

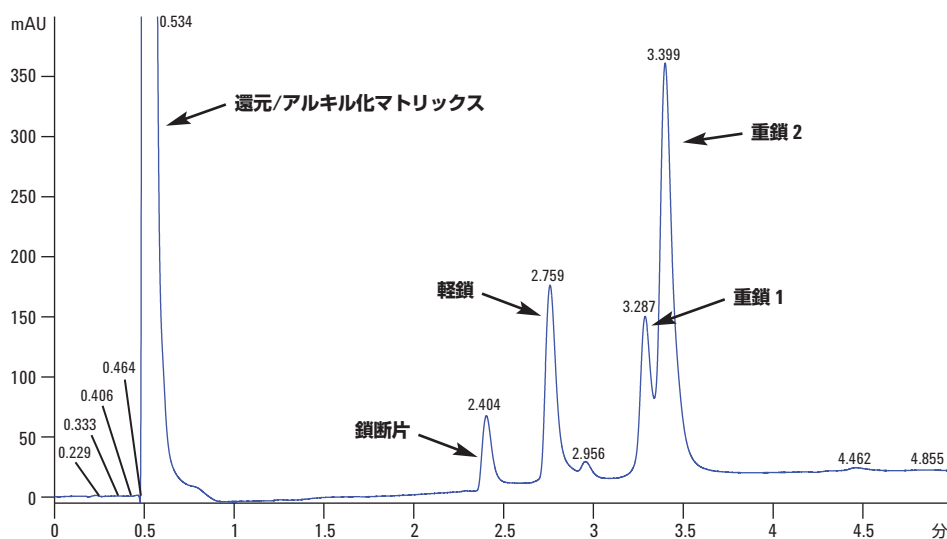


図1 – Agilent Rapid Resolution High Definition (RRHD) 300SB-C8、2.1 x 50 mm カラム (部品番号 857750-906) を用いて、分解プロトコルに先立ち還元およびアルキル化をおこなったモノクローナル抗体の逆相分離。Agilent 1290 Infinity LC で水 (0.1 % TFA)/ACN (0.08 %) のマルチセグメント条件を用いて、0.5 mL/min および 75 °C で分離しました。

ステップ4: 分解

すでに述べたように、トリプシンは特異性が明確に定義されているため、分解にもっとも広く用いられるタンパク質分解酵素です。トリプシンはタンパク質であるため、自己消化と呼ばれる過程でみずからを分解することがあります。しかし、ほとんどのサンプルに天然で存在する Ca^{++} が、トリプシン中の Ca^{++} 結合ループで結合し、自己消化を防ぎます。現在ほとんどのラボで用いられている修飾トリプシンを使えば、自己消化をさらに防ぐことができるため、通常は大きな問題にはなりません。

トリプシン消化は、一般には 37 °C で、pH 7.5~8.5 の最適な pH 範囲でおこなわれます。酵素的切断にもっとも適した pH を得るために、トリプシンの添加に先立ち、バッファ (通常は 50 mM トリエチルアンモニウムバイカーボネート (tABC) または 12.5 mM アンモニウムバイカーボネート (ABC)) を添加します。この目的には、2-アミノ-2-ヒドロキシメチルプロパン-1,3-ジオール (トリス) バッファも用いられますが、トリスバッファは MALDI や ESI-MS などの MS 分析には適合せず、固相抽出 (SPE) や ZipTip により除去しなければならない点を考慮する必要があります。分解をおこなうのに十分な (ただし多すぎない) 量の酵素を加えるためには、適切な酵素/タンパク質比を保つことが不可欠です。

タンパク質は環境によって異なる挙動を示すことがあります。また、混合物中のモデルタンパク質を分解する場合には、個別に分解する場合に比べて、分解の効率が低くなる傾向があります。その理由の 1 つは、多くのタンパク質を同時に分解するほど、トリプシン切断部位の競合が激しくなることです。また、その他にも多くの要素やパラメータ条件がタンパク質分解の完全性と効率に影響を与え、予想される結果に変動を生じさせます。そうした要素をより慎重に把握および制御すれば、分解の効率が大幅に向上します。反応の pH、分解時間および温度、使用する切断剤の量は、いずれも分解の効率に大きな影響を与えます。

・**分解物の pH**: 一般に、分解混合物の pH は、任意の切断剤の性能を最適化できるように、事前分析により決定されます。例えば、切断剤に臭化シアンを用いる場合、強酸環境 (pH 2、ギ酸など) が必要となります。しかし、切断剤にトリプシンを使用する場合は、弱アルカリ環境 (pH 8) が最適です。原則としては、分解中や断片化反応の途中で、反応環境の pH によりタンパク質の化学的完全性が変化しないようにします。

・**分解時間および温度**: 時間と温度は、最適な分解を実現するための重要な要素です。化学的反応を最小限に抑えるために、ほとんどのタンパク質分解では 25 °C~37 °C が推奨されます (トリプシン消化は通常 37 °C でおこなわれます)。しかし、反応温度が高くなるとタンパク質変性も大きくなるため、最終的にはタンパク質の種類とサイズにより反応温度が決定されます。反応時間も、分解プロトコルの最適化において考慮すべき要素です。サンプル量が十分にある場合、不完全な分解を避けて再現性の高いマップを得るために、事前分析により最適な時間を決定することを推奨します。分解時間は、サンプルのサイズや種類によって、2~30 時間と大きく異なります。反応は酸の添加や凍結により停止しますが、これによりマップに影響が出ることはありません。

・**切断酵素の濃度**: 切断剤の濃度は、マップパターンへの影響を避けるために、最小限に抑える必要があります。切断剤の量を多くすると、通常はかなり短い時間 (6~20 時間など) で分解が完了します。しかし、量を増やす場合には、慎重に考慮する必要があります。タンパク質と酵素の比率は、通常は 10:1~200:1 程度です。切断を最適化するために、切断剤を 2 回以上にわけて段階的に添加することが推奨されます。たいていの標準的なトリプシン消化手順では、そうした方法でトリプシンが添加されます。しかし、最終的な反応量は、次のペプチドマッピング手順である分離が促進される程度の量にとどめる必要があります。分析対象タンパク質を除いて、すべての試薬で分解対照を用いたブランク測定を実施すれば、その後の分析に影響を与える可能性のある分解アーチファクトを見極めることができます。

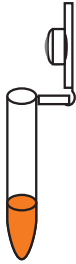
下の図 2 および 3 では、タンパク質 (0.5 mg) の還元、アルキル化、溶液内分解、精製に一般的に用いられているトリプシン消化手順をまとめています。この手順は、タンパク質の量が少ない場合にも対応できます。

図 2 – トリプシン消化手順

タンパク質 0.5 mg
アンモニウムバイカーボネート原液 25 μ L
TFE 25 μ L
DTT 原液 1.0 μ L

IAM 原液 4.0 μ L を添加

DTT 原液 1.0 μ L を添加



1. タンパク質の再懸濁、変性、還元

(ボルテックス、60 °C で 1 時間または 90 °C で 20 分加熱)

2. アルキル化

暗所で実施
(室温で 1 時間)

3. 過剰な IAM のクエンチ

暗所で実施
(室温で 1 時間)

水 300 μ L + アンモニウムバイカーボネート
原液 100 μ L を添加

トリプシン原液の添加

ギ酸または TFA 1 μ L を添加

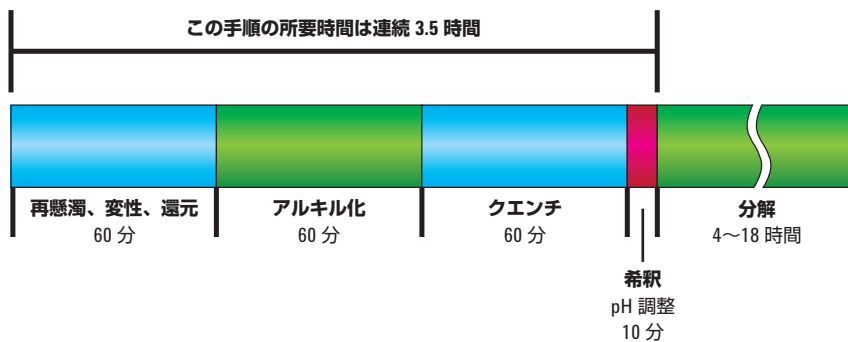


4. 希釈および pH 調整
(pH 7~9)

5. 分解
(37 °C で 4~18 時間)

6. pH を <4 へ低下

図 3 – 分解手順の所要時間



還元、アルキル化、分解用溶液の前処理 : まとめ

100 mM アンモニウムバイカーボネート : 水 100 mL をアンモニウムバイカーボネート 0.7906 g に加えます。4 °C の冷蔵庫で保管します。保管期間は最長 2 か月です。

トリプシン原液 : 修飾トリプシンは、Agilent プロテオミクスグレードトリプシン (部品番号 204310、次ページの「試薬と装置」を参照) として購入できます。このトリプシンは凍結乾燥されています。この状態のまま -20 °C で保管すれば、1 年以上にわたって、活性を大きく損なわずに保管することができます。必要に応じて、凍結乾燥されたトリプシンを 50 mM 酢酸 100 μ L に溶解してトリプシン原液を調製し、最終濃度が 1 μ g/mL となるようにします。凍結融解サイクルを最小限に抑え、保管の安定性を高めるためには、溶解したトリプシンをそれぞれ 10 μ L 程度チューブに 10 分割して入れてください。フロストフリーではない冷凍庫に入れ、-20 °C で各チューブを保管してください。この 1 μ g/ μ L の溶液を用いて、必要に応じてトリプシン中間溶液を作成します (以下を参照)。Agilent プロテオミクスグレードトリプシンには、トリプシン分解の代替プロトコルを紹介する技術文献が付属します。以下のメソッドにより、プロトコルの簡単さと信頼性が確認されています。

200 mM DTT : 1.5 mL エピペンドルフチューブ内で、水 1 mL を DTT 0.031 g に加えます。ボルテックスします。DTT 溶液を適当な量 (100 μ L など) にわけ、遠心分離管に入れます。フロストフリーではない冷凍庫で、分割した各溶液を -20 °C で保管します。保管期間は最長 1 か月です。解凍したら再冷凍しないでください。

200 mM IAM (使用直前に作成) : 1.5 mL エピペンドルフチューブ内で、水 1 mL を IAM 0.037 g に加えます。ボルテックスします。

トリプシン消化プロトコル

タンパク質の再懸濁、変性、還元

1. 総タンパク質量 0.5 mg を 0.5 mL エピペンドルフチューブに入れます。
2. アンモニウムバイカーボネート原液 25 μ L を加えます。
3. TFE 変性剤 25 μ L を加えます。
4. DTT 原液 1.0 μ L を加えます。
5. ボルテックスで混合します。
6. 以下のいずれかの条件で加熱し、変性させます。
 - ・ 60 °C で 45 分~1 時間、90 °C で 20 分 (親水性タンパク質)~1 時間 (疎水性タンパク質)
7. 室温まで冷やします。

アルキル化

1. IAM 原液 4.0 μ L を加えます。
2. 短くボルテックスします。
3. 室温の暗所 (ホイルで覆いをしたラックなど) で 1 時間、サンプルをインキュベーションします。

余分な IAM のクエンチ

1. DTT 原液 1.0 μ L を加え、余分な IAM を破壊します。
2. 室温の暗所 (ホイルで覆いをしたラックなど) で 1 時間放置します。

希釈と pH 調整

1. 水 300 μ L を加えて変性剤を希釈します。
2. アンモニウムバイカーボネート原液 100 μ L を加えて pH を高くします。
3. 必要に応じて、pH 試験紙に 0.5~1 μ L をたらし、pH を確認します。一般的な pH 値は 7.5~8.0 です。開始サンプルの pH が不明の場合は、pH の確認が特に重要です。
4. pH が 7~9 の範囲外の場合は、さらに塩基性物質 (アンモニウムバイカーボネート) を加えます。

分解

1. トリプシン保管溶液中で、新しいトリプシン原液を作成します。15 分置いて、再懸濁を完了させます。
2. 分解する総タンパク質量が 20 μ g 未満の場合は、超純水 45 μ L を加えて原液を 10 倍に希釈し、トリプシン中間溶液を作成します。この 100 ng/ μ L の溶液は、-20 °C で保管すれば、2 か月にわたって活性を大きく損なわずに保つことができます。**注意 : IAM が破壊されていないと、リシンが徐々にアルキル化されます。**
3. 酵素 : 基質 1:20~1:50 の質量でトリプシン原液を加えます。例えば、タンパク質 500 μ g の場合、トリプシン 10~25 μ g (トリプシン原液 10~25 μ L) を加えます。
4. 短くボルテックスします。
5. チューブをヒーター内に置き、37 °C で 4~18 時間インキュベーションします。
6. 溶液を冷やします。

pH 低下によるトリプシン活性の停止

1. 純ギ酸または TFA 1 μ L を加えて pH を下げ、トリプシン活性を停止させます。脱塩する場合は、精製過程でペプチドが樹脂に吸着するのを防ぐため、TFA を使用してください。
2. 短くボルテックスします。
3. 元のサンプルの pH に心配がある場合は、pH を確認してください (通常は 3.0~3.3)。pH が 4 以上の場合は、さらに酸を加えます。

分解物の精製

1. サンプルの由来によっては、MS 分析に先立ち、脱塩する必要があります。
2. 脱塩の必要はないものの、サンプルが不透明な状態の場合は、MS 分析に先立ちサンプルをろ過します。Agilent スピンフィルタ、部品番号 5185-5990 を使用してください。そうした不透明な状態は、サンプル中の細胞残屑が原因となっている可能性があります。
3. 必要に応じて、分析用のサンプルを希釈します。タンパク質の分子量が 50 kDa で、分解が完了している場合は、溶液の濃度は約 20 pmol/ μ L になります。それほど複雑ではないサンプルの場合、希釈して 50 fmol/ μ L の溶液を作成します。

ステップ5: 分解物の精製と濃縮

一般には、ペプチドマップ分析を成功させるためには、ペプチドマッピングに先立ち、精製または濃縮をおこなう必要があります。サンプルの種類や分析の目的に応じて、数多くの精製および濃縮手法があります。例えば、特定の PTM (リン酸化反応、ユビキチン化、グリコシル化など) の濃縮には、PTM 特異的抗体またはリガンドによる親和性精製が用いられます。ホスホペプチドの濃縮には、抗ホスホ特異的抗体による IP や、リン酸化セリン、チロシン、トレオニンと選択的に結合する TiO₂ によるブルダウンが用いられます。

ペプチド濃縮後には、グラファイトまたは C-18 チップまたはカラムを用いて、塩とバッファを除去することができます。また、洗浄剤については、アフィニティカラムや洗浄剤沈殿試薬により除去できます。希釈サンプルについても、さまざまな分子量カットオフ (MWC0) 範囲のコンセントレータを用いて濃縮することができます。精製が完了したら、MS 分析のための最終的な前処理をおこないます。この前処理は、分析の種類によって異なります。LC/MS または LC/MS/MS の場合、良好な LC 分離能および分析結果を得るためには、適切な移動相およびイオン対試薬が必要です。MALDI-MS の場合、ペプチドサンプルと特定のマトリックス (結晶性エネルギー吸収色素分子) を混合し、MALDI プレート上で乾燥させてから分析する必要があります。

試薬と装置

必要なアイテム	例
アンモニウムバイカーボネート、試薬グレード	Sigma カタログ #A-6141
ジチオスレイトール (DTT)、99 % 以上	Sigma カタログ #D-5545
ヨードアセトアミド (IAM)、97 %	Sigma-Aldrich カタログ #I-670-9
トリフルオロエタノール (TFE)、99 % 以上	Sigma-Aldrich カタログ #T63002-100G
修飾トリプシン	Agilent プロテオミクスグレードトリプシン (部品番号 204310)
水、18 メガオーム相当	部品番号 8500-2236
ギ酸、分析グレード、またはトリフルオロ酢酸、シーケンシンググレード	部品番号 G2453-85060
Eppendorf Safe-Lock 遠心分離管、ナチュラル、非シリコン処理	Eppendorf 部品番号 022363611 (0.5 mL、500 個ボックス)、または 部品番号 022363204 (1.5 mL、500 個ボックス)
マイクロピペッタおよびチップ: 範囲 1~1000 µL	
チューブヒーター/シェーラー	Eppendorf サーモミキサー
pH 試験紙、pH 範囲 2.5~4.5 および 7.0~9.0	EM Science ColorpHast ストリップ、カタログ #700181-2
化学天秤	
Bond Elut OMIX チップ、10 µL (溶出量 2~10 µL)	1x96 チップ (部品番号 A5700310)、6x96 チップ (部品番号 A5700310K)
Bond Elut OMIX チップ、100 µL (溶出量 10~100 µL)	1x96 チップ (部品番号 A57003100)、6x96 チップ (部品番号 A57003100K)



少量のペプチド精製： Bond Elut OMIX チップ

ペプチド分解物精製のための Bond Elut OMIX (容量 10 μ L) メソッド

サンプル前処理	2.5 % TFA 溶液を用いて、トリフルオロ酢酸 (TFA) 濃度が 0.5 %~1.0 % になるようにサンプルを調整します。
コンディショニングと平衡化	50 % アセトニトリル (ACN) : 水 10 μ L を吸引し、溶媒を捨てます。同じ手順を繰り返します。1.0 % TFA 溶液 10 μ L を吸引し、溶媒を捨てます。同じ手順を繰り返します。
サンプル導入	前処理したサンプル最大 10 μ L を OMIX チップに吸引します。最大の効率を得るためには、サンプルを 3~5 サイクルにわたって吸引および注入します。最大 10 サイクルを使用して、結合を向上させることができます。
洗浄	0.1 % TFA バッファ 10 μ L を吸引し、溶媒を捨てます。同じ手順を繰り返します。
溶出	LC/MS または LC/MS/MS 分析 : 0.1 % ギ酸または 0.1 % 酢酸を含む 50~75 % アセトニトリルまたは 50~75 % メタノール溶液 2~10 μ L を吸引し、オートサンプライアルまたはウェルプレートに注入します。

最良の結果を得るためには、平衡化、サンプル導入、洗浄ステップの際には、ピペッタをチップ容量 (10 μ L) に合わせてください。溶出の際には、正確な量の溶液を個別の容器に分け、ピペッタをチップ容量の 10 μ L に合わせ、最大容量に保ってください。

ハイスループットペプチドアプリケーション： ペプチドマッピングのための 自動サンプル前処理ソリューション

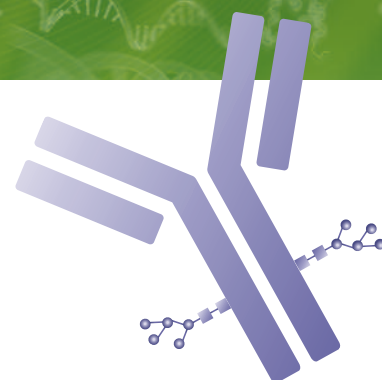
「きわめて一貫性の高い分解と、
AssayMAP による自動逆相精製を
組み合わせたことで、
これまでは考えられなかったスケールと
スループットのコラボレーション研究が
可能になりました」

Jacob D. Jaffe 博士
アシスタントディレクター
プロテオミクスプラットフォーム



ペプチドマッピング用の自動サンプル前処理の詳細については、22 ページをご覧ください。

逆相クロマトグラフィー： ペプチドマッピングに適した テクニック



ペプチドマップを作成するためのカラムとメソッドは、最終的にはマッピングするタンパク質と分析の目標によって決まります。バイオファーマ分野でもっとも広く用いられているペプチドマッピングカラムメソッドは、逆相クロマトグラフィー (RPC) です。このテクニックは分離能が高く、(質量分析と互換性のある) 揮発性移動相を使用できるため、ほとんどのペプチド分離の HPLC メソッドとして広く用いられています。RPC はスピードと効率という点で、他の HPLC 分離テクニックよりも優れています。図 4 では、ウシ血清アルブミンを用いた良好なペプチド分離例を示しています。この図から、ペプチドマッピングに RPC を用いれば、多くのペプチドピークフラグメントを分離できることがわかります。

図 4 – ペプチドマッピングにおける逆相分離

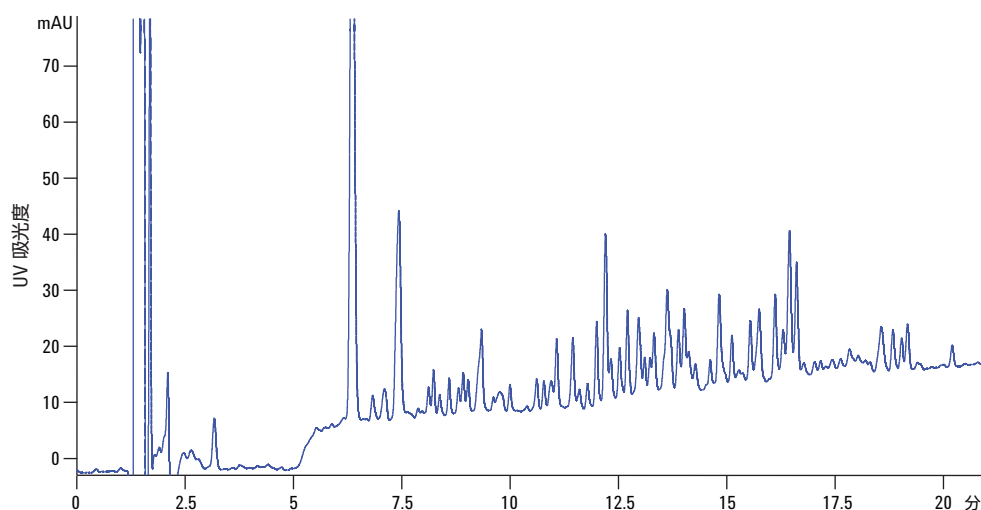


図 4 – Agilent Polaris C18-A、2.0 x 150 mm
カラム (部品番号 A2001150X020) を用いた
BSA の逆相分離

ペプチドマッピング分離を成功させるための要件



一般に、ペプチドマッピングの実用的な RPC メソッドを開発するためには、当該ペプチドに関する具体的なカラム要件およびクロマトグラフィーメソッドの開発を十分に理解する必要があります。ペプチド分離には、多くの点で低分子分離と同じクロマトグラフィー原理が適用されますが、ペプチドメソッドを最適化し、

再現性の高い確実な分離を実現するためには、多くの固有の条件を考慮する必要があります。カラム選択、カラム品質、移動相選択、検出などの要件は、いずれもペプチドマッピング分離に大きな影響を与える要素で、適切に決定すれば、ペプチドマップの品質を大きく向上させることができます。

カラムの選択

分離能の優れた信頼性の高いペプチドマッピング分離を実現するうえでもっとも重要な点は、適切なカラムを選択することです。カラムのポアサイズ、粒子のタイプおよびサイズ、結合相のケミストリ、安定性 (化学的安定性および充填ベッドの安定性) は、いずれもペプチドマッピング分離、分析の最適化、および分光分析を促進するうえで、重要な役割を果たしています。ペプチド分離に適したカラムのポアサイズは 100\AA ~ 120\AA で、一般的に最適な相は C18 です。一部の市販カラムでは、ペプチド分離用に 60\AA までのポアサイズが提供されていますが、これは通常、小さいペプチド断片の分離や標準試料分析に用いられます。同様に、短い結合相炭素鎖が用いられることもありますが、これは特定のメソッドで使用されるもので、特に疎水性が幅広い場合にはペプチドの保持に制約が出ます。

ペプチドの分離は、拡散係数が大きいと、段数が小さくなります。また、多くの場合、直径の小さい全多孔性カラムが低い流速で用いられます。そのため、より効率の良いペプチドマッピングを実現するために、サブ $2\ \mu\text{m}$ 粒子が用いられることが多くなっています。しかし、最近では、生物薬剤分野を中心に、生物学的分離に表面多孔性カラムが使われることも増えています。これは、表面多孔性カラムでは、タンパク質やペプチドの質量拡散に伴う制約に対応できるためです。表面多孔性カラムでは、拡散経路が短くなるため、小さい粒子のカラムで生じがちなシステム背圧の上昇を引き起こさずに、大きな分子を高線速度で分離することができます。図 5 に、表面多孔性カラムを用いたペプチドマップの高速高分離能分離の例を示しています。



図 5 – ウシ血清アルブミン (BSA) の高速高分離能ペプチドマッピングシーケンス

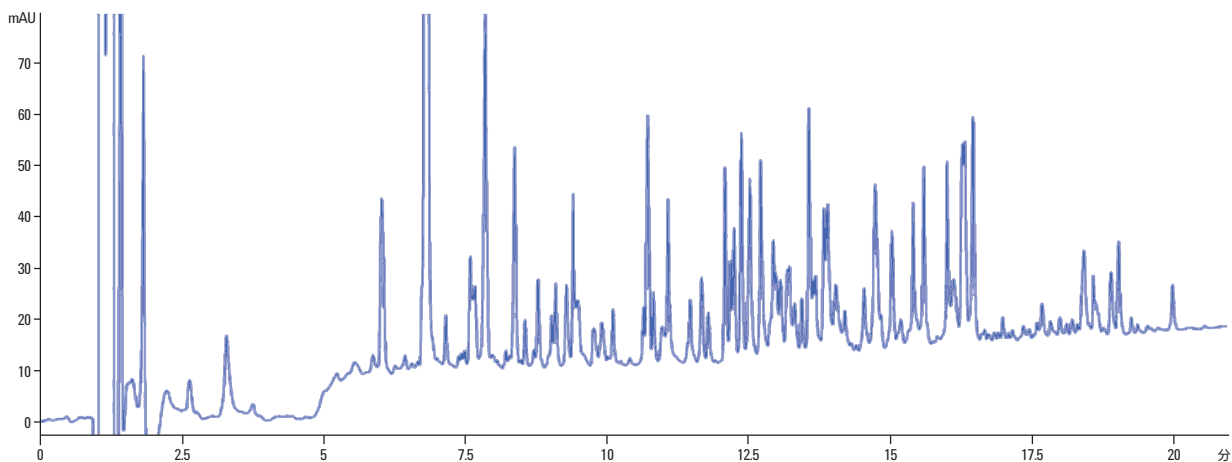


図 5 – Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング 2.1 x 150 mm カラム (部品番号 653750-902) を用いた BSA の逆相分離。水 (0.1 % TFA)/ACN (0.08 %) 直線グラジエントを用いて、0.3 mL/min、40 °C でペプチドマッピング分離を実施。

カラム品質 (分析間再現性および安定性) は、重要ですが見過ごされることの多い要素です。再現性の高い堅牢なペプチドマッピング分離を実現するためには、カラム品質は非常に重要です。一般に、ペプチドの逆相分離は、低 pH (pH < 3) および高温 (> 40 °C) でおこなわれます。正確なマッピングフィンガープリントと再現性の高いバリデーションプロトコルを実現するためには、再現性の高いカラムが重要となります。ペプチドマッピング用のカラムを選択する際には、カラム品質を最優先に考慮する必要があります。図 6 には、再現性の高いペプチドマップの例を示しています。この例では、低 pH および高温条件下で、モノクローナル抗体のトリプシン消化物を分離しています。

図 6 – LC/MS 分析におけるペプチドマッピングの再現性

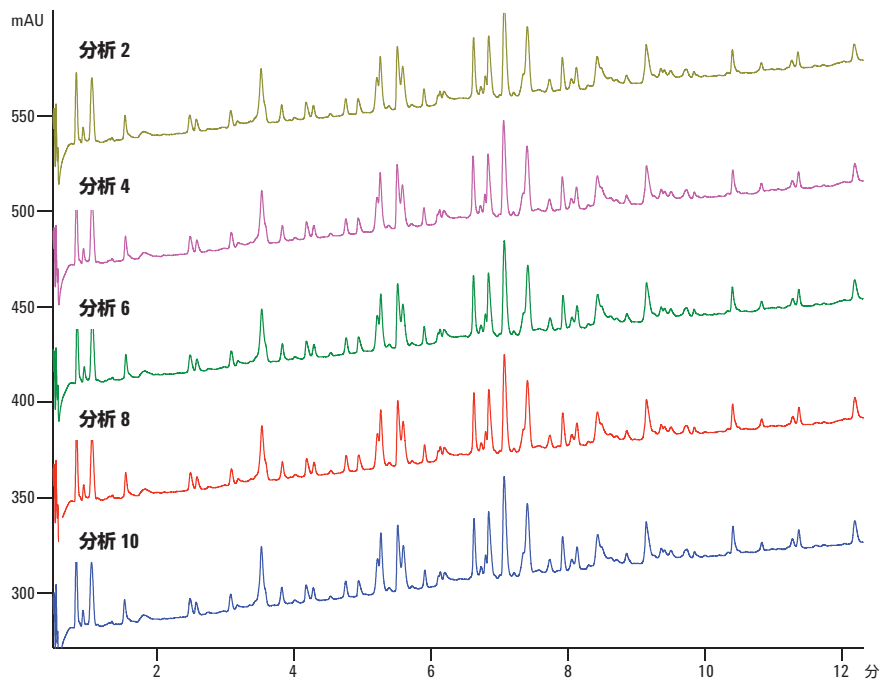


図 6 – モノクローナル抗体のトリプシン消化物を 5 回繰り返し注入により分離。6520 Q-TOF に連結した Agilent 1200 LC システムで 3.0 x 150 mm Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム (部品番号 653950-302) を使用。水 (0.1 % FA)/ACN (0.1 % FA) グラジエントを用いて、0.3 mL/min、40 °C で分離を実施。

移動相の選択

ペプチドマッピングでもっとも一般的に使用される溶媒は、0.1%のトリフルオロ酢酸 (TFA) や、ギ酸 (FA) を添加した水、アセトニトリルです。特定の状況下では、プロピルアルコールまたはイソプロピルアルコールを加えて、分解物を可溶化させることができます。ただし、添加により成分の粘度が著しく上昇しないことが条件となります。リン酸塩を含むバッファ入り移動相を使えば、pH 条件の柔軟性が得られます。3.0~5.0 の範囲で pH を変動させると、酸性残基 (グルタミン酸やアスパラギン酸など) を含むペプチドの分離が向上します。pH 2~7 (ポリマーベースの補助剤の場合はそれ以上) のリン酸ナトリウム、リン酸カリウム、酢酸アンモニウム、リン酸も、アセトニトリルグラジエントで使用されます。トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルは、きわめて頻繁に使用されます。

タンパク質およびペプチドの分析において RPC で用いられる移動相には、イオン対試薬として機能する添加剤が含まれています。この成分により、ペプチドの荷電群とのあいだでイオン対が形成され、ペプチドの疎水性が高くなります。その結果、ペプチドと疎水性固定相の相互作用が可能になり、保持力が高くなって分離が向上します。トリフルオロ酢酸 (TFA)、ギ酸 (FA)、酢酸 (AcOH) などの一般的な添加剤は pH がきわめて低く、タンパク質のアンフォールディングと変性を促進します。そのため、ペプチドなどの分子が、よりシャープで左右対称なバンドで溶出します。TFA は荷電ペプチドへの親和性を備えていることから、ペプチドおよびタンパク質の分離のイオン対試薬としてもっとも広く用いられています。

検出

ペプチドの検出は、一般に 210 nm~220 nm または 280 nm でおこなわれます (図 7)。ペプチドマッピングでは多くの場合、280 nm での検出と 210 nm での検出が並行しておこなわれます。トリプトファン、チロシン、フェニルアラニンは 280 nm で感度が高くなります。いっぽう、210 nm では、どちらかといえば非選択的に、サンプルマトリックス中の多くの生体物質が検出されます。しかし、210 nm および 220 nm での感度は、280 nm の 2~8 倍に

なります。また、ペプチドマップの検出プロフィールできわめて重要となるのが、0.1% TFA 水 (溶媒 A) と 0.08% TFA を含む ACN (溶媒 B) の混合です。これにより、溶出グラジエント過程での吸光度の変化に起因するベースラインドリフトを最小限に抑えることができます。図 7 では、220 nm~280 nm の波長におけるペプチドマッピング分離を比較し、吸光度の感度および UV ピークプロフィールの違いを示しています。

図 7 – 異なる波長におけるペプチドマッピング

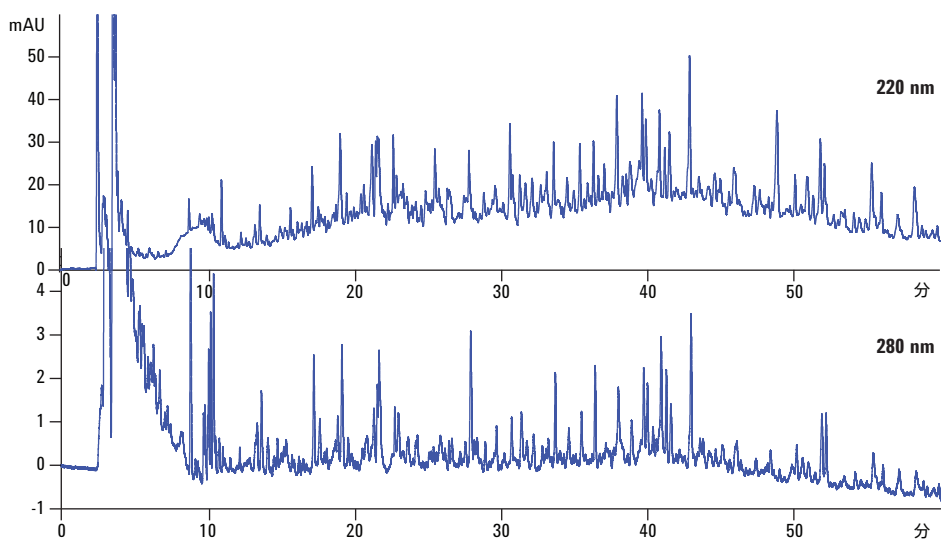
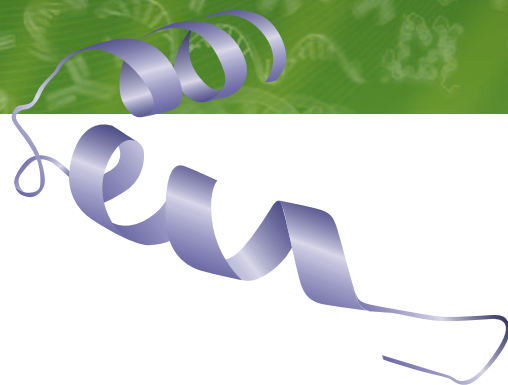


図 7 – 220 nm (上) および 280 nm (下) における e.coli 分解物のプロファイリング。Agilent 1290 Infinity LC で AdvanceBio ペプチドマッピングカラム (部品番号 651750-902)、2.1 x 250 mm を使用

効率的なペプチドマッピング メソッドの開発



ペプチドマッピング分離の RPC メソッドを開発するための一般的なアプローチは、通常の RP メソッド開発と同じですが、ペプチドマッピングメソッドの開発に固有の特別な要件もあります。このセクションでは、分離能の高いペプチドマップを作成するために推奨される基本アプローチを紹介します。具体的には、(1) 分析対象物を保持するためのグラジエント条件の最適化、(2) 選

択性を変化させるための可変要素、(3) 分析時間と分離能を効率的に調整するためのさらなるカラム条件の最適化、の3点について説明します。このメソッド開発プロセスの各ステップにおいては、常にサンプルの種類やペプチドマッピング分析の目的などを十分に考慮する必要があります。

(1) グラジエント条件の最適化

ペプチド分離には、つねに低 pH 緩衝液とアセトニトリル (ACN) とのグラジエントが推奨されます。その理由は、以下のとおりです。

- 幅広い種類および構造のペプチドの分離が促進されます。
- シラノールのイオン化が抑制されます。シラノールがイオン化すると、分子中の塩基性アミノ側鎖とのあいだで望ましくない相互作用が生じ、ピーク形状の悪化につながります。
- ペプチド断片の変性が促進され、保持力と分離能が高まります。
- 低 UV 検出 (< 210 nm) に対応できるため、最大限の検出感度が得られます。
- 移動相の粘度が低いため、幅の狭いバンドが得られます。
- 遊離アミノ末端および塩基性アミノ酸とのイオン対形成により、保持力の低い小さいペプチドの保持力が向上します (バッファに TFA を使用した場合)。

ACN の代わりにプロパノールまたはイソプロパノール (IPA) を有機修飾剤として用いれば、疎水性ペプチドの回収率が高くなります。しかし、これらの溶媒は粘度が高いため、カラムの背圧が高くなり、場合によってはバンドの幅が広がる可能性があります。また、検出に高い波長 (> 220 nm) が必要で、検出感度が低下します。

ほとんどのペプチドは、ACN が 60 % 未満で溶出しますが、場合によってはより高い濃度が必要となることもあります。初期ペプチドマッピングメソッド開発の開始点としては、45 分で 0~60 % (2 %/min) のグラジエントが適しています。しかし多くの場合、望みの分離能を得るためには、最終的なメソッドでより緩やかなグラジエントにする必要が生じます。グラジエント勾配 (%B/min) は、サンプルがカラムを移動する際のサンプルバンドの平均保持力 (k') を決定する要素です。 k' 値は、カラム寸法、流速、サンプル重量、グラジエント勾配により変化します。

(2) ペプチドマップの選択性 (α) を変化させるための可変要素

一般に、生体試料のクロマトグラフィー分析では、カラム条件 (N) を変更する前に、まずバンド間隔 (α) を向上させます。温度やグラジエント勾配は変更が容易なので (移動相やカラムの変更が不要)、ペプチドマッピング分離を最適化するには、まずバンド間隔 (α) の向上を試みるべきです。

温度の変更は、選択性を変化させるための強力な手段で、特定のペプチド残基の保持力を変化させることができます。ペプチドマッピング分離では、温度を高くすると、バンドの幅が狭くなり、システムの背圧が低くなるほか、選択性が変化します。推奨される初期温度は、30~50 °C です。ただし、特定のマッピング分離にもっとも適した温度は、分解物の種類や組成などの多くの要因に左右されます。疎水性のきわめて高いペプチドの場合、最適な回収率を得るために、60~80 °C の温度が必要となります。いっぽう、多くのサンプルでは、30~60 °C の範囲内の特定の温度で最適な選択性が得られます。

図 8 では、ミオグロビントリプシン消化物の同一グラジエント領域において、温度を 30 °C (上図) から 60 °C (下図) に変えた場合の 2 つの例を比較しています。温度を 60 °C に上げると、ピーク 1~7 で示されているように、分離プロフィールのバンド形状およびピーク位置が変化します。このクロマトグラム領域における顕著な変化として、ピーク 1、2、3 の分離が向上し、ピーク 4 および 5 のバンド位置 (選択性) が変化していることが明らかにわかります。

図 8 – ミオグロビントリプシン消化物の選択性における温度の影響

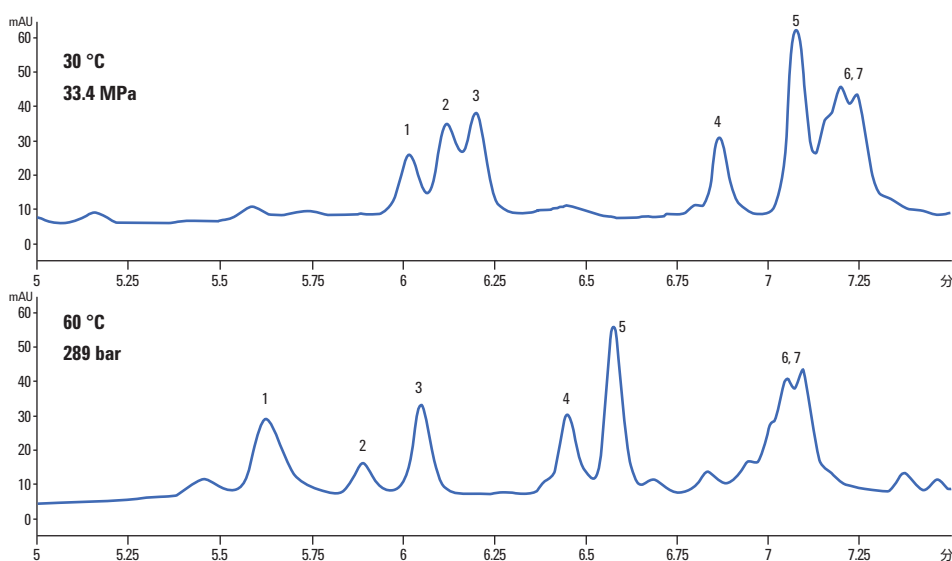


図 8 – 2.1 x 150 mm AdvanceBio ペプチドマッピングカラム (部品番号 653950-302) を用いた 20 分のグラジエントの 5.0~8.0 分におけるミオグロビントリプシン消化物のグラジエント分離。いずれの分離においても、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムで、水 (1.0 % TFA)/ACN (0.08 % TFA) の直線グラジエント、流速 0.3 mL/min、215 nm を使用しました。上のクロマトグラムは温度 30 °C、下のクロマトグラムは温度 60 °C で分離しました。



グラジエント勾配の変更により、ペプチドマッピング分離のバンド間隔を大幅に向上し、選択性を変化させることも可能です。グラジエント勾配を変化させる場合には、流速を一定に保って溶出時間を短く (勾配を急にす) または長く (勾配を緩やかにする) する方法か、分析時間を一定に保って流速を変化させる方法のいずれかを使用します。

図 9 では、グラジエント勾配の変更により生じる選択性の変化が示されています。ミオグロビントリプシン消化物を用いて、15 分の急勾配グラジエント (上図) と勾配の緩い 40 分のグラジエント (下図) を比較しました。どちらの分離でも、流速 0.6 mL/min を維持し、温度は 50 °C としました。2 つのクロマトグラムを比較し、それぞれの分離における同一のピーク (*) を見てみると、バンド間隔、ピークカウント、ピーク形状が大きく変化していることがわかります。

図 9 – ミオグロビントリプシン消化物分離におけるグラジエント勾配の影響

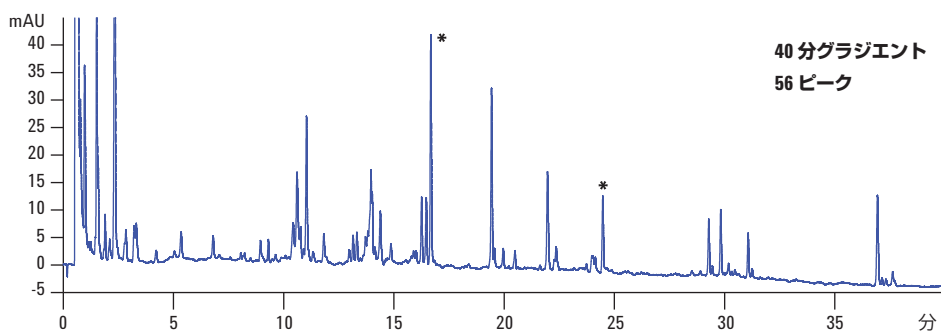
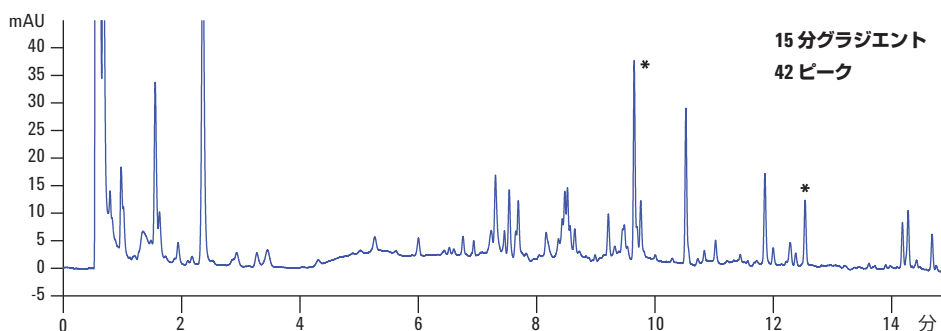


図 9 – Agilent 1260 Infinity パイオイナートクォータナリ LC システムで 2.1 x 150 mm AdvanceBio ペプチドマッピングカラム (部品番号 653950-302) を用いたミオグロビントリプシン消化物のグラジエント分離。
水 (1.0 % TFA)/ACN (0.08 % TFA) 直線グラジエントを使用。流速 0.6 mL/min、温度 50 °C。上のクロマトグラムは 15 分、下のクロマトグラムは 40 分で分離をおこないました。各クロマトグラムの*は、同一のピークを示しています。



(3) カラム条件の調整による最適化

グラジエント条件の保持力 (k') と選択性 (α) を最適化したら、カラムの長さや流速の変更により、分離をさらに向上させることが可能です。グラジエント溶出を変化させるためのカラム条件の選択方法は、基本的なアイソクラティック分離の場合と同じです。どちらのケースでも、効率 (N) の値を大きくすれば、その代わりに分析時間が長くなります。分析時間が長くなってもそれほど問題のない場合は、流速を遅くすれば、手軽に分離能を向上させることができます。しかし、分離能を大幅に向上させる必要がある場合には、一般的にはカラムを長くする方法が適しています。選択性の最適化後、分離能が必要以上に高くなっている場合は、流速を速くする、または短いカラムの使用により分析時間を短縮することができます。図 10 では、カラムの長さを 150 mm から 250 mm にして、ミオグロビントリプシン消化物のマッピング分離能を向上させた例を示しています。この例では、条件とグラジエント時間を一定に保ち、カラムの長さだけを 150 mm から 250 mm と長くしました。各分離の同じ領域を赤で囲んでいます。この領域から、250 mm カラムによる分離能の向上と、単位時間あたりのピークキャパシティの向上がわかります。

(1)、(2)、(3) で述べたグラジエント溶出、選択性の最適化に関する可変要素、およびカラム条件の最適化は、ペプチドマッピングを含むあらゆる分離を向上させるアプローチとして確立されています。前述のメソッドを、以下のステップでわかりやすくまとめています。

ペプチドマッピングメソッド 開発ステップ

1. **初期グラジエント条件の選択: カラム長さ、移動相組成、流速、温度、検出。** この初期分離条件は、保持力 (k') に合わせて最適化されます。そのためには、グラジエントを急勾配にしすぎないことが求められます。
2. **グラジエント範囲の調節。** この手順により、クロマトグラムの始めと終わりにある無駄な時間を排除し、分析時間を短くします。
3. **選択性の変更。** バンドがオーバーラップしたり、分析時間が長すぎたりする場合は、前述した選択性の調節を試してみてください。
4. **グラジエント形状の検討。** 分離能をさらに向上させる選択肢として、非直線グラジエント形状を用いれば、バンド間隔をさらに広げられる場合があります。
5. **カラム条件の調整。** バンド幅と選択性を最適化すると、分析時間またはカラムの長さの変更により、分離能または分析スピードを向上させることが可能です。

図 10 – 分離能におけるカラムの長さの影響

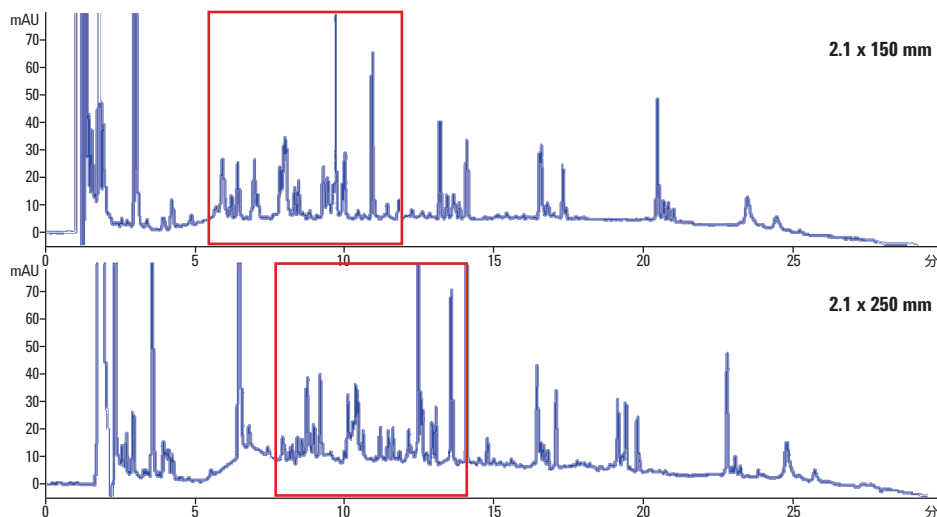


図 10 – 分離能におけるカラムの長さの影響。ミオグロビントリプシン消化物 (部品番号 651750-902) を用いたペプチドマッピングの比較分離能とピーク形状の違いを強調するために、各分離の同じ領域を赤で囲んでいます。分離にあたっては、Agilent 1260 Infinity パイオイナートクォータナリ LC システムで Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム、2.1 x 150 mm (部品番号 651750-902) を使用しました。水 (1.0 % TFA)/ACN (0.08 % TFA) 直線グラジエント、30 分で 10~60 % B、0.3 mL/min、45 °C。



質量分析によるペプチドマッピングの キャラクタライゼーション

逆相クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせたテクニックは、ペプチドおよびペプチドマップのキャラクタライゼーションに広く用いられているメソッドです。例えば、生物薬剤分野では、ターゲットとなる治療用ペプチドの配列の特定およびモニタリングはきわめて重要です。また、タンパク質製剤の安定性は、酸化、還元、グリコシル化、切断などの修飾をモニタリングするうえで重要な要素となります。MS は、製剤のライフサイクル全体を通じた遺伝的安定性を確認するうえで、純度試験として使用できます。

ペプチドは分離ペプチドの直接導入 (構造解析の場合はオンライン LC/MS を使用) により質量分析を用いて分析され、その結果がタンパク質のアミノ酸配列と関連付けられます。その後、同定されたペプチドにおいて、ペプチドマップのカバーする特定のアミノ酸配列が確認され、タンパク質が同定されます。質量分析によるペプチドマッピングは、以下に適用されます。

- 特定のタンパク質の同定の確認。
- タンパク質の詳細なキャラクタライゼーション。N-末端および C-末端ペプチドの確認、広い範囲の配列をカバーするペプチドマップ、アミノ酸置換など。
- 翻訳後修飾のスクリーニングおよび同定 (グリコシル化、ジスルフィド結合、N-末端ピログルタミン酸、メチオニン、トリプトファン酸化など)。

一般的な MS 分析としては、エレクトロスプレー、MALDI-TOF-MS、高速原子衝撃 (FAB) などがあります。修飾タンパク質の配列決定や、発生したアミノ酸修飾の種類の特定には、タンデム MS も使用されます。エレクトロスプレーイオン化 (ESI) または MALDI-MS を用いれば、タンパク質分解ペプチドをインタクト状態のままイオン化して気化させ、質量を正確に測定することができます。ほとんどのペプチド分離は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) LC/MS で実施されます。これは、LC の利便性に加えて、高品質のタンデム質量スペクトルにより、信頼性の高いタンパク質同定が可能になるためです。四重極飛行時間型 (QTOF) MS 機器では、分解能と質量精度が優れているため、特に大きなペプチドで高品質の構造情報が得られます。

MS 情報をもとにすれば、タンパク質を容易に同定することが可能です。その際には、インタクトプロテインから派生すると予想される値やタンパク質データベースに照らして、測定した質量を比較し、質量および配列情報を導き出します。ペプチドマッピングによるタンパク質のキャラクタライゼーションの目的は、理論上のタンパク質構造組成の 95 % 以上の配列と一致させ、解明することにあります。図 11 に、ESI-MS を用いて高度に最適化したエリトロポエチンタンパク質 (EPO) 分解物のペプチドマップ例を示しています。最適化したクロマトグラフィー条件と MS パラメータにより、100 % の配列をカバーできました。この例は、ペプチドマッピング分離が良好にキャラクタライゼーションされたことを示しています。

図 11 – 最適化により 100 % の配列がカバーされた EPO タンパク質のペプチドマップ

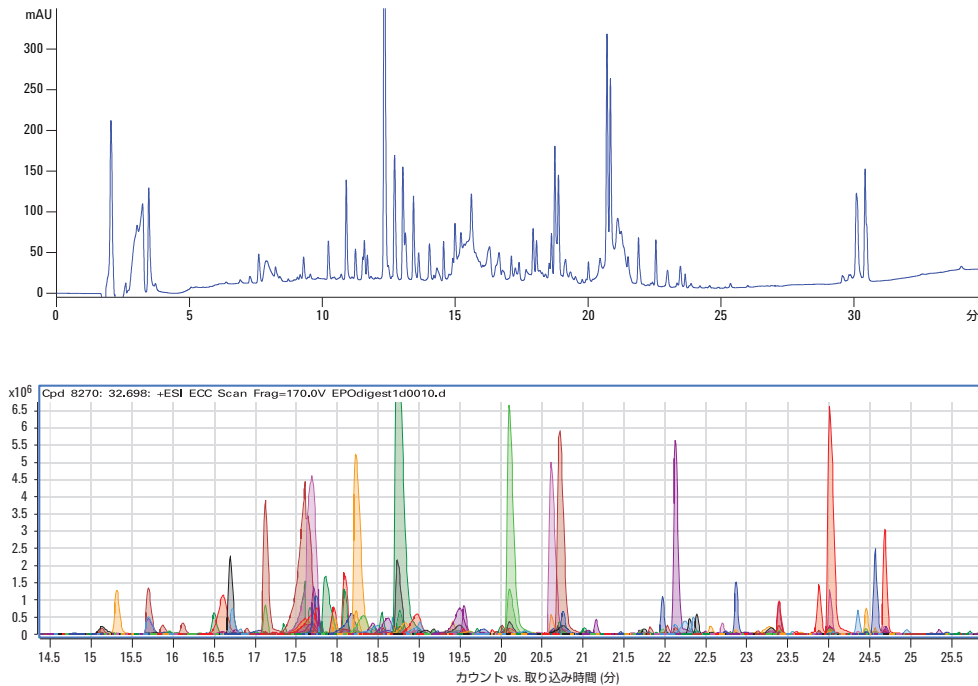


図 11 – 上のクロマトグラムは、完全に最適化した EPO 分解物のペプチドマッピング分離を示しています。分離には 2.1 x 150 mm AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを使用しました。下のクロマトグラムは、Agilent Q-TOF で得られた配列範囲の定性分析結果 (Molecular Feature Extractor を使用) を示しています。

アジレントでは、ペプチドマッピング分析に以下の製品を推奨しています。



AdvanceBio ペプチドマッピングカラム
ほとんどのアプリケーションに対応

品名	部品番号	Fast Guard 部品番号
4.6 x 150 mm, 2.7 μm	653950-902	850750-911
3.0 x 150 mm, 2.7 μm	653950-302	853750-911
2.1 x 250 mm, 2.7 μm	651750-902	851725-911
2.1 x 150 mm, 2.7 μm	653750-902	
2.1 x 100 mm, 2.7 μm	655750-902	

*Fast Guard カラムを使えば、分離スピードや分離能を損なわずに、カラム寿命を長くすることができます。

ZORBAX RRHD 300-C18 カラム
不完全な分解物または疎水性コアを含むサンプルに対応

品名	部品番号
2.1 x 50 mm, 1.8 μm	857750-902
2.1 x 100 mm, 1.8 μm	858750-902

ZORBAX RRHD 300-HILIC カラム

親水性ペプチドおよび糖ペプチドでさらなるデータを提供

品名	部品番号
2.1 x 50 mm, 1.8 μm	857750-901
2.1 x 100 mm, 1.8 μm	858750-901

ペプチド品質管理用標準試料

10-ペプチド品質管理用標準試料は、アジレントがカラムの QC に用いているものと同じものです。この標準試料を使えば、カラム使用期間を通して、高いカラム性能が得られます。この標準試料は HPLC および LC/MS に使用できます。

1 バイアルあたりの注入回数は約 20 回です。

品名	部品番号
ペプチド品質管理用標準試料、71 μg、2 mL バイアル中	5190-0583

ペプチドサンプル前処理の自動化

手作業によるペプチドサンプルの前処理には時間がかかります。MS でペプチドマッピングアプリケーションを実行する場合、自動化によりスループットを向上することができます。再現性の高いワークフローにより、分析結果の一貫性を確保することが可能です。

AssayMAP は分解、精製、断片化といったワークフローに変革をもたらし、かつてない精度とスループットを実現します。

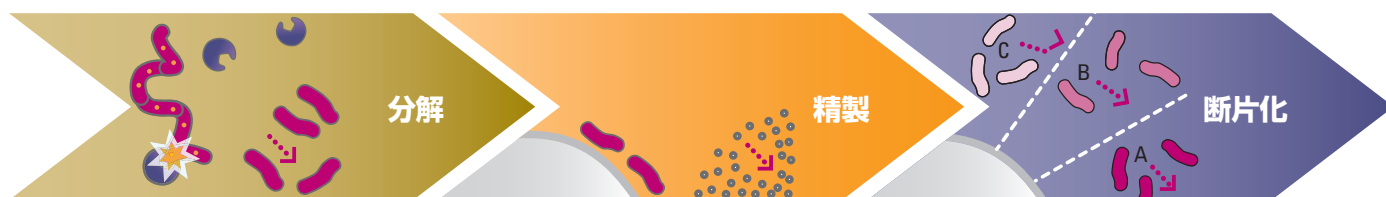
- 人的ミスの減少 (< 5 % CV) による再現性の向上
- スループットの向上 – 1 日あたり最大 384 サンプルに対応
- 操作時間の大幅な短縮 – 分析に費やせる時間が増加
- メソッド開発の迅速化 – 自動プラットフォームにより、迅速なメソッドの最適化が可能



AssayMAP Peptide Sample Prep ソリューションは、小型の充填ベッドクロマトグラフィー、最先端の Bravo Liquid Handling Platform、アプリケーションベースのシンプルなユーザーインターフェースを組み合わせています。サンプル前処理の自動化を簡単に実現できます。

AssayMAP ペプチドサンプル前処理ソリューション

質量分析用



分解:

- ユーザーの提供する試薬を用いた溶液内分解
- 96-ウェルプレート最大 4 枚を並行処理。手作業のピペッティング手順は 1 回のみ

利点:

- ユーザーによるばらつきを低減。スループットと再現性が向上

精製:

- 逆相カートリッジを用いた定量的分離メソッド。96-ウェルプレート 1 枚を並行処理

利点:

- 10 μ L 溶出により乾燥時間を短縮、または「希釈注入」メソッドに対応。プロセス管理 – あらゆるサンプルを同じように処理

断片化:

- 強カチオン交換 (SCX) カートリッジにより最大 6 フラクションを生成し、pH または塩による段階的溶出を用いてサンプルを単純化。96-ウェルプレート 1 枚を並行処理

利点:

- 断片化をオフラインでおこなうことにより LC/MS スループットが向上し、LC グラジエント時間が短縮。強力な濃縮ツールにより、サンプルを単純化し、分析に先立ちターゲットペプチドを分離

ワークフロー全体の利点:

- ワークフローのユーザーインターフェースの標準化により、使いやすさが向上し、リンクによるワークフロー統合が実現
- サンプル再分析の必要性が低下し、再分析に必要なサンプル量が減少

Agilent AssayMAP ソリューションにより、 サンプル前処理のワークフロー再現性が向上

AssayMAP Peptide Sample Prep ソリューションを用いて、2 種類のサンプル (尿素およびグアニジン HCL 中 BSA) を 64 回繰り返し分解しました。サンプル精製には AssayMAP 逆相カートリッジ、サンプル分析には Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム、Agilent 1290 Infinity LC、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 質量分

析計を使用しました。2 日目に実験を繰り返し、再現性を評価しました。表 1 に示すように、各サンプル中の 25 のペプチドについて、%CV を測定しました。各 %CV 範囲を表示し、トータルの平均 %CV における影響を示しています。再現性をさらに示すため、代表的なペプチドのピーク面積を図 12 に示しています。

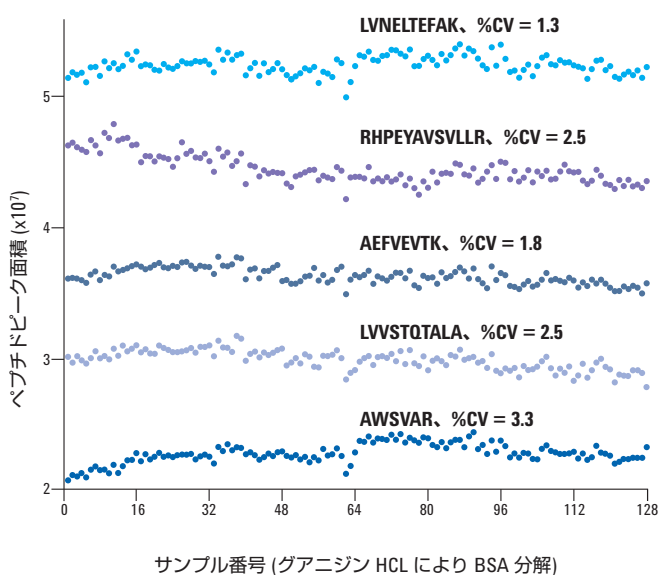


図 12 – 2 日間における 4 つのペプチドのピーク面積を示す散布図

25 ペプチド	尿素 (n=64、62)		グアニジン HCL (n=64、64)	
	1 日目	2 日目	1 日目	2 日目
平均ピーク面積 %CV	3.3	3.7	2.3	2.6
%CV < 5 のペプチド	23	21	25	23
5 > %CV < 10 のペプチド	2	3		1
%CV > 10 のペプチド		1		1

表 1 – 各 %CV 範囲における日ごとの %CV

AssayMAP によるサンプル前処理の所要時間は、1 日あたり 4 時間で、手作業による操作時間は 1 日あたりわずか 2 時間です。手作業の場合、同じワークフローに 1 日あたり 8 時間を要します。手作業による操作時間は 1 日あたり 4 時間です。

トータルのワークフロー CV は < 4 % でした。ワークフローには、AssayMAP Peptide Sample Prep システム、Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム、1290 Infinity LC システム、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 質量分析計を使用しました。

このアプリケーションの詳細については、アジレント文献 5991-2474EN (英文) をご覧ください。

優れた結果を実現するパートナー

複雑な分析では、求められる精度も高くなります。アジレントのソリューションは、バイオ医薬品分野において革新的な疾患研究を可能にし、創薬を迅速化します。また、信頼性の高い、医薬品の開発および製造をサポートします。ゲノミクス研究、自動化、分離、検出などの幅広いアジレントソリューションと、ワークフロー中心のソフトウェアソリューションは、効果的な医薬品を市場へ送り出すために必要な分析を支援しています。



www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ
0120-477-111

本資料に記載の情報は、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. 2013
Printed in Japan November 20, 2013
5991-2348JAJP



Agilent Technologies