

令和元年5月13日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21662

研究課題名（和文）C末端標識によるタンパクの高感度かつ高精度LC-MS法と脱アミド化評価法の開発

研究課題名（英文）Development of sensitive and selective LC-MS method for protein and assessment method for deamidation of protein using carboxy group derivatization

研究代表者

坂口 洋平（Sakaguchi, Yohei）

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：10712507

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではタンパク質またはペプチド中のカルボキシル基を対象とした誘導体化LC-MS法の開発を行った。高極性なカルボキシル基を誘導体化することにより、他の官能基を誘導体化した場合と比べ、効率的にMSにおける感度を向上することができた。さらにタンパク質の主要な劣化である脱アミド化は、劣化前後で質量がほとんど変わらないため、LC-MS分析において評価が困難とされているが、本法を用いることで劣化前後で明確に構造を変化させることができ、容易に評価することが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規臨床検査項目や新規バイオ医薬品が年々増加しているなかで、それらを安全に信頼して利用していただくためにも、タンパク質の構造変化をとらえる分析手法が必須だと考える。本研究において開発した分析法は、LC-MS分析におけるタンパク質またはペプチドの高感度化と、これまで正確な評価が困難だった脱アミド化を容易に評価することを可能とした。

研究成果の概要（英文）：In this study, a carboxyl groups derivatization LC-MS method for proteins or peptides was developed. By derivatizing the highly polar carboxyl group, it was possible to efficiently improve the sensitivity in LC-MS analysis. Furthermore, deamidation, which is a major degradation of proteins, is considered difficult to evaluate in LC-MS analysis because the mass hardly changes before and after degradation. However using this method it was possible to change the structure clearly before and after deterioration, and it was possible to evaluate easily.

研究分野：分析化学

キーワード：LC-MS タンパク質 ペプチド アミノ酸 誘導体化 カルボキシル基

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

LC-MS 法に誘導体化法を組み合わせた分析手法は、目的対象物を高感度かつ高精度分析へと導く方法として、あらゆる分野に応用されている。タンパク質分析もその一つであるが、そのほとんどが、タンパク質が持つアミノ基またはチオール基を誘導体化対象としたものであり、カルボキシル基を誘導体化対象とした方法はほとんど報告されていない。カルボキシル基を誘導体化することで、高感度化がされるのはもちろんのことであるが、さらに、タンパク質の劣化の一つとされる、アスパラギンまたはグルタミン残基の脱アミド化の評価が可能となると考え、本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

本研究ではタンパク質量に有効な新しい方法論を提供すべく、LC-MS 分析における高感度化と品質評価を可能とするカルボキシル基を対象とした新規誘導体化法の確立を目指した。更に生体試料分析への適用実験を通じて、本誘導体化 LC-MS 法の有用性の実証を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1)カルボキシル基誘導体化による高感度化

本研究に最適な試薬を LC-MS の感度と分析対象物への反応性の両方の側面から評価し選定した。選定した試薬を用いて誘導体化反応条件や LC-MS 分析条件など各種条件の最適化を行い、感度や操作性だけでなく、分析法の信頼性(真度,再現性)も検討した。最適化した分析法は、実際のタンパク質分析に応用した。その足掛かりとして、生理活性ペプチド、インスリンの血清中分析を行い本法の有用性を評価した。

#### 実験方法

分析対象:アンジオテンシン I、II、III、IV、ブラジキニン、ニューロテンシンまたはヒトインスリン。  
誘導体化:ペプチド溶液に対し、acetaldehyde 溶液を加え、ボルテックスした後、減圧乾固した。残渣に対し誘導体化試薬 1-(2-pyrimidinyl)piperazine 及び縮合剤 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) 及び 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) を加え、ボルテックスした後、0.1M HCl で希釈し、LC へ注入した。LC 条件:カラムは Capcell pak C18 MG (100 × 1.0 mm I.D., 5 μm, Shiseido, Japan) を使用し、水-CH<sub>3</sub>CN-HCOOH の混液によるグラジエント溶離 (50 μL/min, 50 ) を行った。MS/MS 条件:装置はトリプル四重極型 MS (LCMS-8040, Shimadzu) を用い、ESI ポジティブ検出を行い、MRM モードで測定した。

### (2)脱アミド化評価法の開発

脱アミド化評価の機能性を確認するため、既知の濃度比で調製したアスパラギンとアスパラギン酸やグルタミンやグルタミン酸及びこれらを含む短鎖ペプチドを用いて検討を行った。

#### 実験方法

分析対象:BSA のトリプシン消化により得られるフラグメントペプチド (PDPNTLCDEFK, 117-127; YNGVVFQECQAEDK, 160-173; LGEYGFQNAL-IVR, 397-409) とその脱アミド化ペプチド及び BSA。  
誘導体化:ペプチド溶液に対し、acetaldehyde 及び 100 mM 2-picoline borane を加え、室温で 30 分静置。反応後、遠心エバポレーターを用い減圧乾固。残渣に対し誘導体化試薬 400 mM ethylamine、1 M 1-hydroxy-7-azabenzotriazole 及び 1 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide を加え、室温 60 分静置。ギ酸溶液で希釈後、LC-MS に注入。

LC-MS/MS 条件:LC 部カラムは XSelect<sup>®</sup> CSH<sup>™</sup> C18 (50 × 2.1 mm i.d., 2.5 μm, Waters) を使用し、水-CH<sub>3</sub>CN-HCOOH のグラジエント溶離 (0.2 mL/min, 60°C) を行った。

MS 部 装置はトリプル四重極型 MS (LCMS-8050, Shimadzu) を用い、ESI 正イオン検出を行い、MRM モードで測定した。MRM トランジション: PDPNTLCDEFK 誘導体 746.8 98.2, CE -54.0 eV; PDPDTLCDEFK 誘導体 760.3 98.2, CE -54.0 eV; YNGVFQECCQAEDK 誘導体 618.6 192.3, CE -45.0 eV; YDGVFQECCQAEDK 誘導体 627.8 192.3, CE -45.0 eV; LGEYGFQNALIVR 誘導体 795.9 142.3, CE -45.0 eV; LGEYGFQDALIVR 誘導体 809.9 142.3, CE -45.0 eV

#### 4. 研究成果

##### (1) カルボキシル基誘導体化による高感度化

まず高感度化に最適な誘導体化試薬の検討を行った。検討に用いた誘導体化試薬は、アルキルアミン、ピリジン、ピリミジン、ピペリジン、ピペラジンをいずれか含む化合物を用いた。誘導体化反応は誘導体化試薬のアミノ基とカルボキシル基との縮合反応を用いた。反応後に得られる誘導体化物を LC-MS で測定したときに得られるピーク面積を比較し、最適な誘導体化試薬、縮合剤の検討を行った。その結果、Fig. 1 に示す誘導体化試薬が最適であることが確認された。

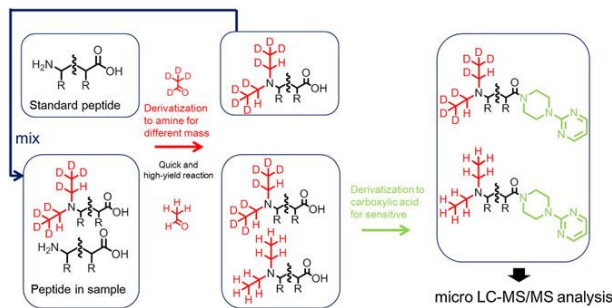


Fig.1. Derivatization reaction for bioactive peptide in this study.

また、カルボキシル基誘導体化前に、アミノ基を重水素ラベルされたアセトアルデヒドを内標準物質として用いることで、誘導体化反応効率、LC-MS 分析におけるマトリックス効果の影響を受けない正確な定量が可能となった。本法を血清中生理活性ペプチドへ応用した際のクロマトグラムを Fig 2 に示す。

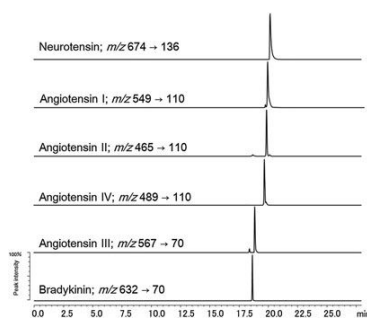


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatograms for the 500 pmol/l standard solutions of peptides using the present method.

初めに本法を用いてヒト血清中に含まれる極微量ペプチド分析へ適用した。その結果、従来法と比べ 20 倍以上感度向上が見られ、血清分析 (数 ppt レベル) を達成した。

##### (2) 脱アミド化評価法の開発

先に、上記のタンパク質ペプチドを対象としたアミノ基、カルボキシル基誘導体化-LC-MS 法を開発した。

今回、この手法を応用して、タンパク質脱アミド化評価法の開発を試みた。本誘導体化を用いることで、脱アミド化により生じたカルボキシ基にも誘導体化が進行するため、構造の違いが明確になり、さらに脱アミド化を受けた分だけ導入される誘導体化試薬の数が増えるため、分子量においても明確な違いを持たせることができる。そのため、LC 及び MS における脱アミド化されたタンパク質の識別が容易となる (Fig.3)。

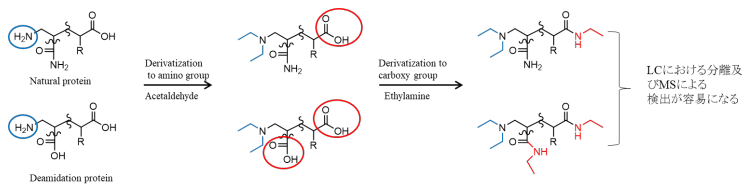


Fig. 3 Derivatization reaction of natural/deamidation protein in this study

本研究では、ウシ血清アルブミン (BSA) をモデルタンパク質として用い、タンパク質の脱アミド化度の経時変化が追跡可能な評価法の構築を行った。誘導体化法により、LC-MS において検出されたペプチドはいずれも脱アミド化数に応じてカルボキシル基に対する誘導体化数が増えることを確認した。そのため、MS においてナチュラルペプチドと脱アミド化ペプチドの識別、定量が容易になった (Fig.4)。

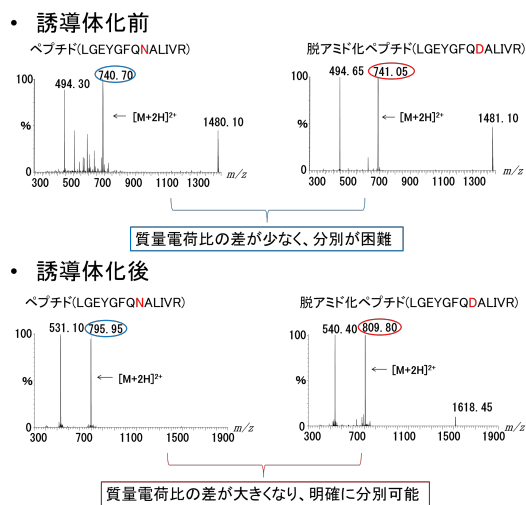


Fig.4 Mass spectra obtained from underivatized peptides and derivatized peptides

また、acetaldehyde- $d_4$  によって得られる安定同位体誘導体化ペプチドを用いる安定同位体希釈質量分析法によりペプチド濃度測定を行った。定量に用いた検量線は、いずれも  $r^2 = 0.9945$  と良好な直線性を示した (Fig.5)。

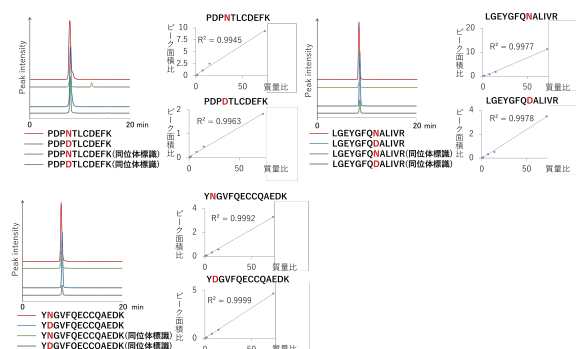


Fig.5 Chromatograms and calibration curves obtained from BSA-fragment peptide used in this study

本評価法の正確性を確認するため、ナチュラルペプチドと脱アミド化ペプチドを任意の割合で混合し、その調製値と本評価法で得られる実測値を比較した。その結果、両者は標準偏差内で一致したことが確認された (Table 1)。そのため本評価法はタンパク質の脱アミド化度を正確に測定できることが示された。今後、本法の有用性を確認するため、BSA の加速劣化試験へ応用する予定である。

Table 1 Comparison study between preparation value and quantification value

ペプチド	調製値 <sup>1)</sup>	実測値 <sup>2)</sup> (平均値±標準偏差) n=3
PDPDTLCDEFK /PDPNTLCDEFK	0.499	0.499 ± 0.00466
LGEYGFQDALIVR /LGEYGFQNALIVR	0.496	0.499 ± 0.00195
YDGVVFQECQAEDK /YNGVVFQECQAEDK	0.500	0.499 ± 0.00135

$$1) \text{ 調製値} = \frac{\text{脱アミド化ペプチドの物質質量}}{\text{ナチュラルペプチドの物質質量} + \text{脱アミド化ペプチドの物質質量}}$$

$$2) \text{ 実測値} = \frac{\text{脱アミド化ペプチドの定量値}}{\text{ナチュラルペプチドの定量値} + \text{脱アミド化ペプチドの定量値}}$$

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 5 件)

Y. Sakaguchi, J. Ikenaga, H. Yoshida, T. Hayama, M. Itoyama, K. Todoroki, O. Imakyure, M. Yamaguchi, H. Nohta 「Selective and sensitive liquid chromatographic determination method of 5-hydroxyindoles with fluororous and fluorogenic derivatization」 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 査読あり, 2015 年 114 巻, 348-354. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.06.003

Y. Sakaguchi, T. Kinumi, T. Yamazaki, A. Takatsu 「Quantification of glycosylated N-terminal peptide of hemoglobin using derivatization for multiple functional groups of amino acids followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry」 Biomedical Chromatography, 2016 年 30 巻, 280-284. DOI: 10.1002/bmc.3524

Y. Sakaguchi, T. Kinumi, A. Takatsu 「Quantification of peptides using N-terminal isotope coding and C-terminal derivatization for sensitive analysis by micro liquid chromatography-tandem mass spectrometry」 Journal of Mass Spectrometry, 査読あり, 2016 年 51 巻, 1111-1119. DOI: 10.1002/jms.3845.

T. Kinumi, Y. Sakaguchi, A. Takatsu 「Development of a certified reference material of human serum albumin: certification and value assignment via amino acid analyses」 Analytical Methods, 査読あり, 2017 年 9 巻, 4574-4580. DOI: 10.1039/C7AY01415E

Y. Sakaguchi, T. Kinumi, A. Takatsu 「Isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry for sensitive quantification of human insulin in serum using derivatization-technique」 Analytical Biochemistry, 査読あり, 2017 年 537 巻, 26-32. DOI: 10.1016/j.ab.2017.08.019

(学会発表) (計 14 件)

坂口洋平, 絹見朋也, 高津章子 「二官能基誘導体化-LC-MS/MS による生理活性ペプチド類の高感度分析」 2015 年、第 63 回質量分析総合討論会

坂口洋平, 絹見朋也, 高津章子 「二官能基誘導体化とマイクロ LC-MS/MS による生理活性ペプチド類の高感度分析」 2015 年、第 26 回クロマトグラフィー科学会

坂口洋平, 絹見朋也, 高津章子 「カルボキシル基誘導体化 LC を用いたタンパク質脱アミド化の評

価法の開発」2016年、日本分析化学会第65年会

Y. Sakaguchi, T. Kinumi, A. Takatsu「A dual functional-group derivatization liquid chromatography-tandem mass spectrometry method; application for quantification of human insulin using enzymatic digestion」2016年、HPLC2016

坂口洋平, 絹見朋也, 高津章子「新規アミノ酸分析法を応用したヒトインスリン溶液認証標準物質の開発」2017年、第65回質量分析総合討論会

Y. Sakaguchi, T. Kinumi, A. Takatsu「Development of a carboxyl group derivatization LC method for monitoring the deamidation of protein」2017年、HPLC2017

甲斐永美里, 古賀鈴依子, 坂口洋平, 三田真史, 井手友美, 吉田秀幸, 能田均, 浜瀬健司  
「キヌレニン鏡像異性体を対象とした高選択的二次元 HPLC 分析法の開発」2017年、第36回九州分析化学若手の会夏季セミナー

赤穂健太, 吉田秀幸, 坂口洋平, 古賀鈴依子, 能田均「フルオラス誘導体化 LC-MS 法による貝毒成分のオカダ酸及びドウモイ酸の分析」2017年、第36回九州分析化学若手の会夏季セミナー

田坂友里恵, 矢野恵奈, 巴山忠, 古賀鈴依子, 坂口洋平, 吉田秀幸, 能田均「パーフルオロポリエーテルカルボン酸の金属塩を利用したリン脂質の選択的抽出及び LC-MS/MS 分析」2018年、第31回バイオメディカル分析科学シンポジウム

濱岡祐司, 矢野恵奈, 巴山忠, 古賀鈴依子, 坂口洋平, 吉田秀幸, 能田均「ヒト血漿中クルクミンのフルオラス誘導体化 LC-MS/MS 分析」2018年、第31回バイオメディカル分析科学シンポジウム

吉田秀幸, 河村梨那, 中山絵梨奈, 古賀鈴依子, 矢野(清川)恵奈, 坂口洋平, 山口政俊, 能田均  
「蛍光誘導体化 HPLC によるオカダ酸分析法の開発」2018年、日本分析化学会第67年会

古賀鈴依子, 甲斐永美里, 篠島朋子, 三田真史, 井手友美, 坂口洋平, 吉田秀幸, 能田均, 浜瀬健司  
「多次元 HPLC を用いる代謝関連キラルアミノ酸の高選択的分析法開発」2018年、第14回 D-アミノ酸学会学術講演会

赤穂健太, 坂口洋平, 河村梨那, 吉田秀幸, 古賀鈴依子, 能田均「フルオラス誘導体化 LC-MS 法による二枚貝中のオカダ酸分析」2018年、フルオラス科学研究会第11回シンポジウム

川末慎葉, 坂口洋平, 古賀鈴依子, 吉田秀幸, 能田均「カルボキシル基誘導体化 LC-MS 法によるタンパク質の脱アミド化評価法の開発」2019年、日本薬学会第139年会

(〔産業財産権〕)

取得状況(計1件)

名称: アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基を対象としたプレカラム誘導体化 LC-MS 分析法、発明者: 坂口洋平, 絹見朋也, 高津章子、権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所、特許第 6359365 号、(2018年6月)、種類: 特許、番号: 特許第 6359365 号、取得年: 2018年、国内外の別: 国内