

タンパク質の部分変性を回避！ 新たなタンパク質消化法

抗体医薬に代表されるバイオ医薬品の研究開発が加速しています。このセクションでは、抗体医薬の研究・評価試験のうち従来法の問題を新たな技術で克服したアッセイや、従来法では対応できなかった新しいニーズに応えるアッセイをシリーズでご紹介していきます。

第五回目は「ペプチドマッピング」のお話です。

バイオ医薬品の多くが抗体やホルモンなどのタンパク質製剤です。タンパク質製剤の品質管理ではタンパク質一次構造の解析が重要項目の一つであり、この解析法の一つにペプチドマッピング（ペプチドマップ法）があります。ペプチドマッピングとは、タンパク質を化学的または酵素的に消化してペプチド断片化し、ペプチド単位で検討する方法です。アミノ酸配列をはじめとする様々な情報が得られるため、特に酵素消化による断片化プロトコルはバイオ医薬品の品質評価法として広く使用されており、アメリカ、EU、日本の3者間で国際調和が検討されているテーマの一つです。

ただし現状では解決すべき問題もあります。そのうちの 하나가タンパク質分解中にアミノ酸残基の脱アミド化やジスルフィド結合スクランプリングといった**変性**が起こってしまうことです。これらの問題はタンパク質品質評価を困難にさせ、長い間タンパク質解析担当者を悩ませてきました。この問題を解決すべく、プロメガは脱アミド化やジスルフィド結合スクランプリングを最低限に抑えられるタンパク質酵素消化システム **AccuMap™ Low pH Protein Digestion kit** を開発しました。

①タンパク質脱アミド化の抑制

タンパク質が脱アミド化されると、主にアスパラギン残基がアスパラギン酸またはイノアスパラギン酸に変換されます（図1左）。この反応が起きると、もともとアスパラギン酸だったのか、サンプル調製中に変換されたのか見分けがつかなくなり、アミノ酸配列決定に大きな影響を与えます。この脱アミド化はアルカリ性条件で起こりやすいため、アルカリ性条件で反応させるトリプシン消化ステップが原因の一つでした。脱アミド化を最低限に抑えるためには酸性条件下でトリプシン処理すればよいのですが、酸性ではトリプシン活性が低下してしまい断片化が不十分になるジレンマがありました。**プロメガはこの問題を解決するため様々な検討を行い、酸性条件下ではトリプシンのリジン残基切断効率のみが低下し、アルギニン残基の切断活性には影響がないことを突き止め、酸性条件下でも活性を保つ特別な Lys-C と組み合わせることにより脱アミド化を起こさず効率よくペプチド断片化できる手法を開発しました（図1右）。**

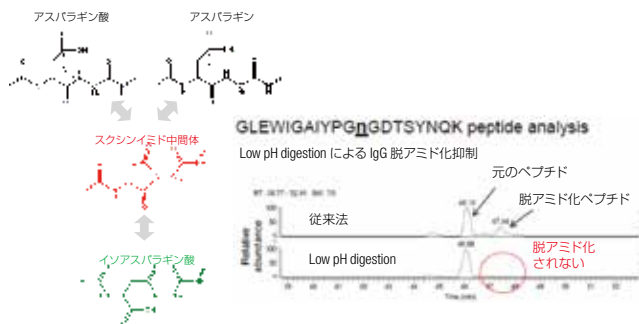


図1. 脱アミド化メカニズム（左）と Low pH digestion による脱アミド化抑制（右）

②ジスルフィド結合スクランプリングの抑制

脱アミド化と並んで大きな問題となっているのがジスルフィド結合スクランプリングです。

ジスルフィド結合は適切な三次元構造を確立・維持するのに重要であり、タンパク質製剤などの機能維持に非常に重要です。このためジスルフィド結合の位置を決定することはタンパク質構造解析上重要な項目です。しかし、ペプチド断片化処理ステップにおいては、ネイティブなジスルフィド結合が開裂するだけでなく、しばしば本来とは異なる位置で結合を形成してしまいます。これがジスルフィド結合スクランプリングと呼ばれる現象であり、タンパク質のシステイン残基数が増加するにつれて飛躍的に解析が困難になります。たとえばシステイン残基8個を含むタンパク質の場合、対を形成しうるジスルフィド結合の組み合わせが計105

個あります。抗体医薬品としては最も多いヒト IgG1 やヒト化 IgG1 にはジスルフィド結合を形成しうるシステイン残基が 28~32 個あると言われており、組み合わせはより複雑になります。

ジスルフィド結合スクランプリングもアルカリ性条件で起こりやすいため、脱アミド化抑制と同じく酸性条件でサンプル処理すれば大幅に抑制できます（図2）。

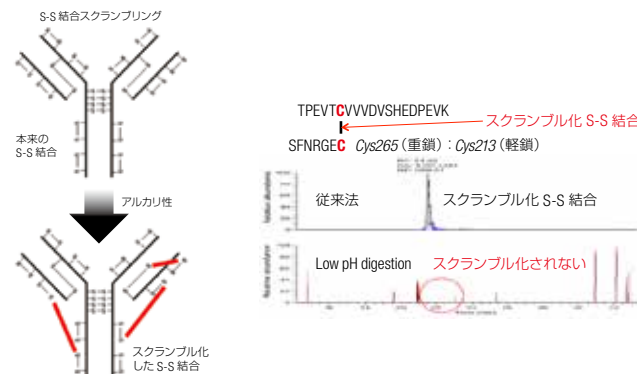


図2. ジスルフィド結合スクランプリング

③酸化防止およびその他の条件検討

脱アミド化、ジスルフィド結合スクランプリングに次いで、メチオニン残基の酸化もペプチドマッピング解析に悪影響を与えます。プロメガでは様々な脱酸素剤を検討し、もっとも酸化防止効果が高かったものを Oxidation Suppressant としてキットに添付しています。

また酵素反応条件を酸性に最適化するため、タンパク質変性ステップや還元アルキル化ステップの条件もすべて最適化しており、ペプチドマッピング解析サンプル調製全ステップをカバーするプロトコルを開発しました。解析したいタンパク質と AccuMap™ Low pH Protein Digestion kit だけ用意すれば、ペプチドマッピングの悩みは解決します！お困りの方はぜひ一度お試しください。

短時間でも優れた消化を示す Rapid Digestion Kit

サンプルが届いたら、とにかくすぐに結果がほしい！という方には Rapid Digestion Kit がお勧めです。

サンプルを化学的に変性させるのではなく、熱変性させることにより大幅な時間短縮が可能になりました。これまで一晩かかっていた酵素消化ステップがたったの30分で終了します！

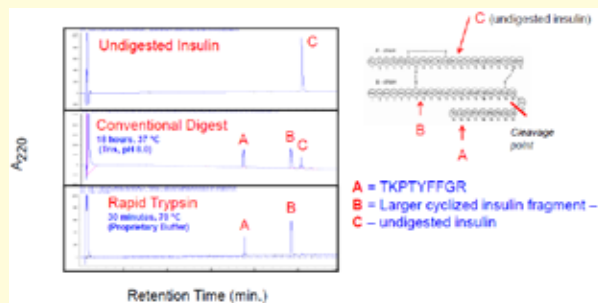


図3. Rapid Digestion Kit によるインシュリンの消化

抗体の構造解析に必須の IdeS や IdeZ プロテアーゼはご存知ですか？

※ IdeS や IdeZ はかわら版 2016 年夏号をご覧ください ▶ http://www.promega.co.jp/pdf/kawara1607_p2.pdf

関連製品

| 製品名 | サイズ | カタログ番号 | 価格(¥) |
|---------------------------------------|--------|--------|---------|
| AccuMap™ Low pH Protein Digestion kit | — | — | お問合せ下さい |
| Rapid Digestion Kit - Trypsin | 100 µg | VA1060 | 35,000 |
| Rapid Digestion Kit - Trypsin/Lys-C | 100 µg | VA1061 | 53,000 |