

ペプチド吸着制御 LC の開発と創薬への貢献

合 田 竜 弥

1 はじめに

ペプチド及びタンパク質は、遺伝子の最終産物であり、細胞の形態や機能を直接制御している。個々のペプチド及びタンパク質の発現量や翻訳後修飾等は、様々な疾患によって細胞の形態や機能が変化する過程において変化する。これらの変化は、疾患の早期診断の指標として、又、創薬における患者の層別化、薬効及び毒性評価等のためのバイオマーカー等として利用可能である。また、疾患の原因解明の為に評価され、さらには医薬品開発研究における新しい創薬モダリティとしても活用されている。

医薬品及び内因性としてのペプチド及びタンパク質の定量には、特異的な抗体を用いるリガンド結合法 (ligand binding assay, LBA) が一般的に用いられている。しかし、抗体作成の難しさ、抗体の交差性等の問題により、LBA 法では定量出来ない場合も存在する。一方、liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) 法は、 m/z 及び溶出時間の組み合わせによる高い選択性を有しており、例えば LBA 法では測定困難な 1 アミノ酸残基違いのペプチド及びタンパク質を容易に分離定量出来る。また、継続的な技術的發展は、MS 装置自体の感度を年々向上させ、LBA 法に匹敵又は凌駕する定量感度を達成可能としている。こうした背景から、LC/MS を用いた標的ペプチド及びタンパク質の高感度定量に加えて、1 万近いタンパク質を一度に検出可能な網羅的な測定 (プロテオミクス) 等も精力的に実施されている。

2 ペプチド及びタンパク質の固体に対する吸着能の相転移現象の発見

LC/MS を用いたペプチド及びタンパク質量を実施する際に注意すべき点の一つが、ペプチド及びタンパク質の容器等の固体に対する吸着である。低分子有機化合物の場合には、その吸着を回避する為に有機溶媒を添加する方法が一般的に用いられている。そこで、アミノ酸残基数 40、分子量 4696 のウロコルチンをモデルペプチドとして用いて、様々な有機溶媒がウロコルチンの吸着に与える影響を評価した。その結果、図 1 左に示すようにウロコルチンの固体に対する吸着能が、各有機溶媒が示す臨界含量 (臨界値, $f_n=1$) を境に急激かつ可逆的に変化 (相転移) することを見いだした¹⁾。つまり、ペプチド及びタンパク質は、臨界値より小さい有機溶媒含量 ($f_n<1$) の溶液中ではその吸着能を発揮できるが、臨界値より大きい有機溶媒含量 ($f_n>1$) の溶液中では吸着能を喪失した状態で存在する。相転移現象の最も身近な例として、水の三相 (固相・液相・気相) が挙げられるが、今回のペプチド及びタンパク質の吸着能の相転移は、図 1 右に示すようなキュリー温度を臨界値とする磁性の相転移と同様の現象と考えられる。

この吸着能の相転移を引き起こす要因は、ウロコルチン溶液を用いた CD スペクトル解析から、有機溶媒によって惹起されるペプチド及びタンパク質の高次構造変化であることが確認された。また、この高次構造変化が可逆的であることも確認され、吸着能の変化は可逆的である。

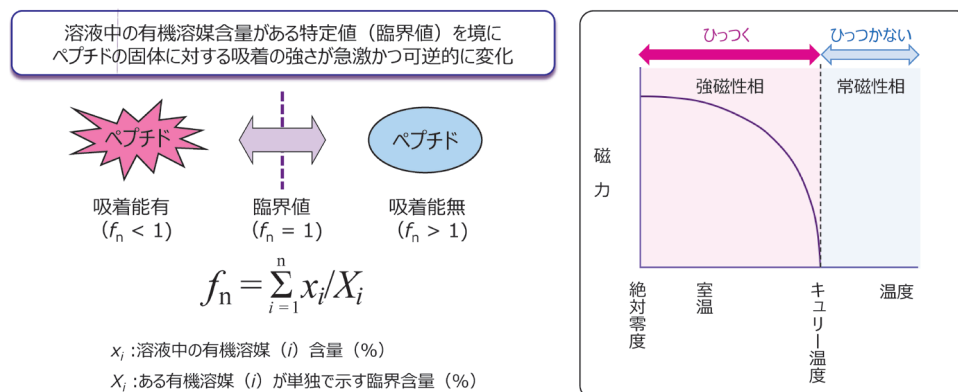


図 1 ペプチドの固体に対する吸着能 (左) 及び磁性の相転移 (右)

あることが示唆された。さらに、吸着能の相転移現象は、様々な大きさのペプチド及びタンパク質において確認され、その普遍性が示された²⁾。

一方で、この吸着能の相転移現象は、LC 測定で得られるクロマトグラムに大きな影響を与えていることが明らかとなった。例えば、ペプチド及びタンパク質を定量的に扱うために $f_n > 1$ を示す溶液を用いてペプチドを LC に導入する場合、カラムに保持したペプチドピーク（以後、保持ピーク）だけでなく、カラムに全く保持されないペプチドピーク（以後、非保持ピーク）を同時に発生させる。これは、 $f_n > 1$ を示す溶液中ではペプチドは吸着能を喪失しており、この溶液組成が維持されたままカラムを通過する場合、ペプチドはカラムに保持されないまま非保持ピークとして溶出する一方、後ろから流れてくる移動相とペプチド溶液が混合され $f_n < 1$ を示す溶離液中に存在することとなったペプチドは吸着能を回復させてカラムに保持できるようになり、保持ピークとして溶出されると考えられる。

この非保持ピークの発生は、ペプチド定量における大きな問題を発生させる。つまり、非保持ピークの発生は、本来よりも小さな保持ピークを発生させて定量感度を低下させる。また、非保持ピークの発生が、保持ピーク強度（面積）の再現性を低下させ、定量値のバラツキの原因となることも確認されている³⁾。そのため、精度の高い測定を実施するためには、非保持ピークを発生させない程度の極微量の試料を導入する、又は、容器等への吸着を回避しつつ非保持ピークを発生させない臨界値近傍の有機溶媒含量の溶液を導入用溶液として使用する

必要がある。ただし、前者の場合、試料導入料が制限されるために高感度化が難しく、後者の場合、臨界値の大きく異なる複数のペプチドを非保持ピーク又は吸着による損失なく定量することが難しい。つまり、精度の高い複数ペプチドの高感度定量を成立させることが出来ないという課題に直面することとなる。

さらに、注意すべき点として、非保持ピークが発生した場合でも保持ピークの形状は良好であることが多く、非保持ピークが発生していることに気が付かない点が挙げられる。これは、LC/MS を用いた生体試料測定においては、MS 内部の無駄な汚染を回避するために非保持ピークが発生する前後の溶離液を MS 内部導入しないことが一般的であり、そもそも検出されていないためである。また、例え MS に導入した場合でも、多数の夾雑成分及びマトリックス効果等によって正確な非保持ピークの検出は困難である可能性が高い。このように、目的ペプチドが 1 本のピークとして確実に溶出されている確証を得ることが難しいことから、このような問題点を全て解決可能な分析システムの構築が、正確なペプチド定量のために必要であった。

3 ペプチド吸着制御 LC の開発

従来の LC（標準 LC）を用いる場合のペプチド定量における問題点を解決するために、ペプチド及びタンパク質の吸着能の相転移現象を利用したペプチド吸着制御 LC（peptide adsorption-controlled LC, PAC-LC）を開発した¹⁾⁴⁾。図 2 に示す通り、PAC-LC は、標準 LC におけるオートサンプラーとカラムの間にポンプを 1 台加え

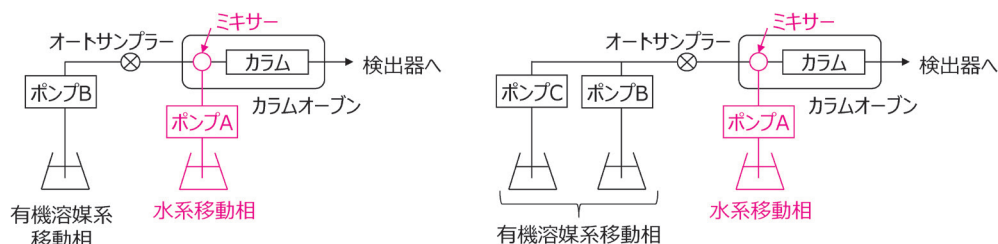


図2 ペプチド吸着制御 (peptide adsorption-controlled, PAC)-LC : 2液 PAC-LC (左), 3液 PAC-LC (右)

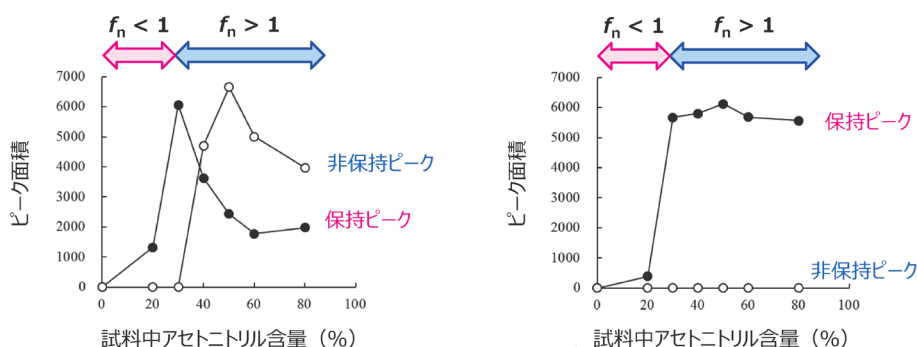


図3 アセトニトリル含量の異なるウロコリン溶液を測定した時に得られるカラム保持及び非保持のピーク面積；標準 LC (左), PAC-LC (右)

た構成である。これにより LC に導入されたペプチド溶液に対してカラム直前で水系移動相を混合させることが可能となり、ペプチド及びタンパク質を含む溶離液中の有機溶媒含量を強制的に $f_n > 1$ まで低下させることが可能となる。その結果として、吸着能を急激に回復させたペプチドはカラムに保持することが可能となる。

実際に、標準 LC 及び PAC-LC を用いて溶液中アセトニトリル含量の異なるウロコリン溶液を測定した時に得られるピーク面積値を図 3 に示す。PAC-LC を用いた場合には非保持ピークは確認されず、また、 $f_n > 1$ のペプチド溶液を導入した場合に、ほぼ一定のピーク面積値が得られた。この結果は、 $f_n > 1$ の溶液を用いることで定量的な操作も可能であることも示唆している。さらに、非保持ピークを発生させないために、精度の高い測定が可能であることも確認されている。したがって、PAC-LC は、非保持ピークの発生を抑制することにより感度及び測定精度の損失を回避可能な LC システムであり、また、操作時の定量性を確保するために $f_n > 1$ を示す溶液を用いることを許容可能な LC システムと言える。

PAC-LC を用いることで得られるその他のメリットとしては、PAC-LC への試料導入量が理論上無制限であることが挙げられる。これは、保持時間とグラジエント勾配との間に認められるべき乗則から、イソクラティック溶出条件下では、カラムに保持したペプチドはカラム内を移動しない（保持時間は無限大となる）と考えられることに基づく²⁾。つまり、カラムへの確実な保持が可能

な条件下でペプチド試料の導入を続ける限り、カラムでのペプチド濃縮が可能となる。実際に、試料導入量を 10 mL 迄増加させた場合に、グラジエント開始から同じ保持時間のまま導入量に比例した高感度化が可能であることが示されている³⁾。

さらに、PAC-LC では、試料溶液中の有機溶媒含量にかかわらず複数ペプチドを再現性高く同時測定出来るメリットを有している。標準 LC では、先に述べた通り、臨界値の異なるすべてのペプチドの吸着及び非保持ピークの発生の両方を同時に回避することは困難である。一方、PAC-LC では、すべてのペプチドの固体に対する吸着を回避可能な溶液を用いつつ、PAC-LC における初期混合比、つまり有機溶媒含量を全てのペプチドが保持可能な条件に設定することですべてのペプチドをカラムに保持した各 1 本のピークとして検出することが可能である。実際に、6 種のトリプシン消化ペプチド断片を、アセトニトリル含量が 10, 50, 80 % の溶液を用いて調製し、標準 LC 及び PAC-LC で測定した時に得られるピーク面積値を図 4 上に示す。PAC-LC では、保持の強い二つのペプチド（Pep5 及び 6）において、10 % アセトニトリル含量を用いた場合に、LC 導入前の吸着によるピーク面積の損失が確認される以外、アセトニトリル含量にかかわらずほぼ一定のピーク面積が得られている。一方、標準 LC を用いた場合、6 種すべてのペプチドに共通した最適なアセトニトリル溶液はなく、吸着および非保持ピーク発生による両方の損失なく同時定量することが困難であることが示されている。一方、図 4 下は、

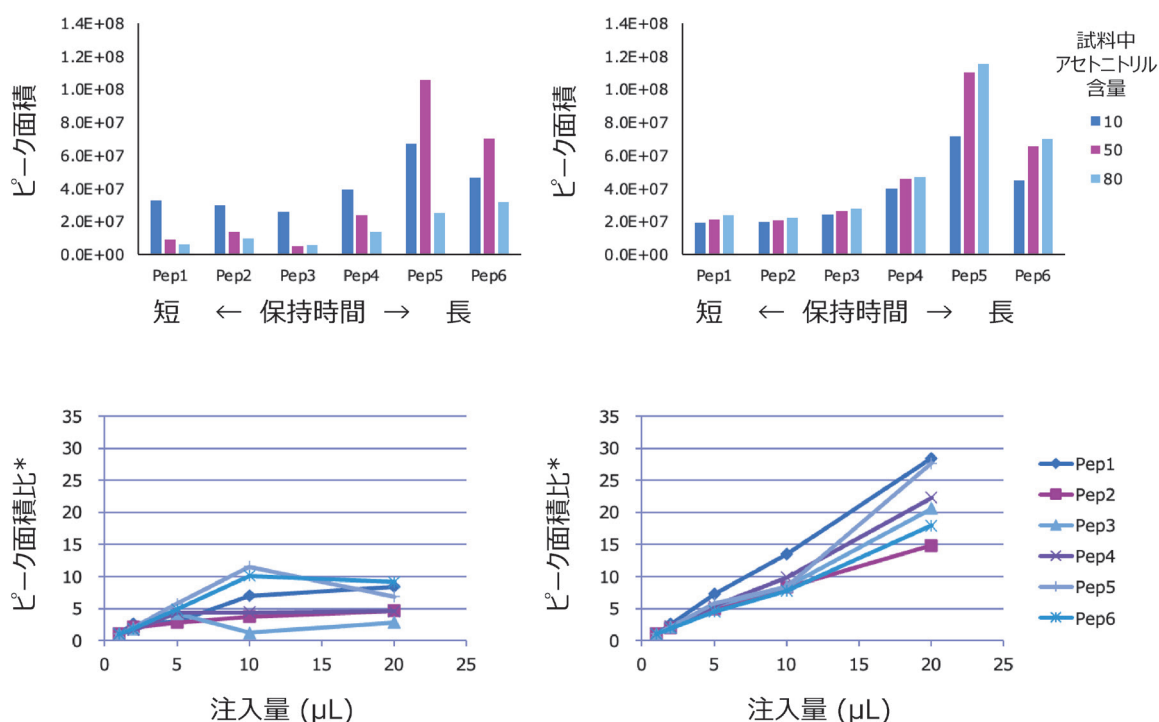


図 4 アセトニトリル含量の異なるペプチド混合溶液を測定した時に得られるピーク面積（上段）及び 50 % アセトニトリルのペプチド溶液の導入量を変化させた時のピーク面積比；標準 LC（左）、PAC-LC（右）

50 % アセトニトリル含量ペプチド溶液を 1, 2, 5, 10, 20 μL と変化させて導入した時に得られるピーク面積から算出したピーク面積比 (1 μL 基準) を示す。標準 LC では、保持の弱い 4 種ペプチドについては 5 μL 程度、保持の強い 2 種ペプチドについては 10 μL 程度でピーク面積が頭打ちになっているが、PAC-LC では、導入量に比例したピーク面積が得られており、試料導入量増加による高感度化が可能であることが明確に示されている。

4 PAC-LC の創薬への貢献

抗体医薬品は、ヒトの生体防御に寄与するタンパク質である免疫グロブリンを遺伝子組み換え技術等を応用して作成したバイオ医薬品である。近年では、こうした抗体にリンカーを介して強力な細胞毒性を有する低分子化合物を結合させた抗体薬物複合体 (antibody drug conjugate, ADC) 等の様々な抗体医薬品の開発が盛んに行われている。この ADC の薬物動態プロファイル評価のために、ADC (ペイロードが一つ以上付加している抗体医薬品)、トータル抗体医薬品 (ペイロードがすべて外れた抗体医薬品を含む全抗体医薬品) 及び遊離ペイロードの測定が必要とされている。ADC 及びトータル抗体医薬品の定量には通常 LBA 法が用いられているが、ADC を測定するために使用されるペイロードに対する特異的抗体は、ADC のペイロード数の違いを区別出来ないために、ADC の生体内変換により引き起こされる薬物抗体比 (drug antibody ratio, DAR) を算出することは困難である。DAR は ADC のクリアランスに影響を与え、安全性と有効性に影響を与える ADC の重要な品質特性の一つであり、積極的な評価が望まれている。そこで、LC/MS を用いた DAR 評価が様々な形で実施されている。その一つが、抗原を用いた免疫沈降 (immunoprecipitation, IP) により精製した生体試料を用いて ADC をインタクト測定する方法⁵⁾であり、その他にも、IP により精製した生体試料中の ADC のペイロードを酵素等で遊離させてペイロードを定量する方法⁶⁾等がある。前者の場合、高感度化が難しいという課題が、後者の場合、代謝されたリンカー部位を評価することが困難という課題がある。そこで、DAR のより詳細な評価のために、トリプシン消化法によって得られる個々のペイロード付加ペプチド断片を定量する方法も検討されている。この評価では、複数のペプチドの高精度かつ高感度な同時定量を必要とすることから、PAC-LC が極めて大きな威力を発揮することとなる。

また、PAC-LC とトリプシン消化法との組み合わせは、特異的な抗体が存在しない、または LBA 法で正確な定量が困難な内因性タンパク質バイオマーカー定量等においても積極的に活用されている。ここで、タンパク濃度算出に用いるトリプシン消化ペプチド断片は最終的に一つに決定されるが、定量法開発の過程においては、タン

パク質の消化効率、トリプシン消化ペプチド断片の安定性、夾雑ピークとの重なり等のリスクを考慮すると、複数のトリプシン消化ペプチド断片を測定しておくことが望ましいためである。このように、PAC-LC を利用することにより、効率的なタンパク質定量法開発に大きく貢献することが可能である。

一方、トリプシン消化法を用いないインタクトペプチド定量法開発においても PAC-LC は大きく貢献している。例えば、アンジオテンシン (以後、Ang と略) は、血圧調節を担うレニン-アンジオテンシン系において産生されるペプチド群であり、Ang I, II, III, IV, A, 1-9, 1-7 等が存在する。特に、Ang II は、Ang II 受容体の AT1 に結合することで血管を収縮させ血圧を上昇させる等の作用を有するため、創薬の標的となっている。一方、腎臓や心臓等の各臓器における Ang の役割も注目されており、生体試料中の Ang の正確な測定が病態の解明や診断等のために必要とされている。Ang は 6~10 残基のアミノ酸で構成されており、アミノ酸配列の相同性が高いことから個々に特異的な抗体を作成するには限界がある。例えば、ある市販の Ang II 測定キットで用いられている抗体は Ang I に対する交差性を 4 % 程度示す。この交差性は、生体試料を用いた際の測定誤差として考えると一見問題ないようにも考えられる。しかし、血漿中 Ang I が Ang II よりも 10 倍以上高い濃度で存在する場合も考えると、このキットで得られる Ang II の濃度値は、Ang I 濃度の影響を大きく受けている可能性が高い。一方、LC/MS 法では、その高い選択性によりこうした問題は発生しない。実際に、市販ラット血漿から固相抽出法を用いて Ang を溶出し、溶出液をそのまま PAC-LC に導入することで、Ang A を除くすべての Ang を同時検出可能であった。この測定においても、PAC-LC を用いることで、固相からの溶出液をそのまま大量に導入可能となり、乾固及び再溶解の手間や影響を無くすことで前処理時間の短縮による評価の高速化が可能となっている。

5 最後に

ペプチド及びタンパク質定量において標準 LC と比較して様々な利点を有する PAC-LC は、医薬品及び内因性バイオマーカーとしてのペプチド及びタンパク質定量において極めて重要なツールである。既に医薬品のバイオトランスフォーメーション評価やプロテオミクスにも展開され、さらに、ペプチドと同様の吸着能の相転移現象を示すオリゴ核酸医薬品の定量においても活用されている。一方で、現在においても、さらなる高感度化が求められており、装置面での技術的發展と、装置面以外での技術的發展、例えば、血漿中に大量に存在する免疫グロブリン及びアルブミン等の夾雑タンパク質から目的のペプチド及びタンパク質を効率的に分離するための新しい

前処理法の開発等への期待も高い。今後も、こうした関連技術のさらなる発展と共に PAC-LC が疾患やバイオマーカーに関する新規知見の獲得に貢献することを期待したい。

文 献

- 1) R. Goda, K. Sudo : *Biomed. Chromatogr.*, **21**, 1005 (2007).
- 2) R. Goda, H. Masumoto, O. Okazaki, K. Sudo : *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 857 (2008).
- 3) R. Goda, K. Sudo : *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 81 (2008).
- 4) R. Goda, N. Kobayashi : *J. Chromatogr B*, **895–896**, 137 (2012).
- 5) N. Hashii, Y. Haruyama, R. Hirayama, R. Kajita, Y. Kishino, T. Mochizuki, K. Inoue, R. Goda, M. Hoshino, I. Kuroiwa, H. Aikawa, N. Ueda, K. Nagumo, Y. Oda, Y. Saito, A. Ishii-Watabe : *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **1258**,

124608 (2025).

- 6) H. Habara, H. Okamoto, Y. Nagai, M. Oitate, H. Takakusa, N. Watanabe : *Biopharm Drug Dispos*, **44**, 380 (2023).



合田 竜弥 (GODA Ryoya)

Future Peak 株式会社 (〒211-0065 神奈川県川崎市中原区今井仲町 3-48). 東京大学大学院薬学系研究科薬学専攻修士課程修了. 博士 (薬学). 《現在の研究テーマ》生体試料中ペプチド・タンパク質定量の高感度化. 《主な著書》公益社団法人日本分析化学会 液体クロマトグラフィー研究懇談会編: “LC/MS, LC/MS/MS Q&A100 獅子の巻”. 中村洋監修 (2021). 《趣味》スポーツ, スポーツ観戦.

E-mail : goda.ryoya@future-peak.co.jp

原 稿 募 集

ロータリー欄の原稿を募集しています

内容

談話室: 分析化学, 分析方法・技術, 本会事業 (会誌, 各種会合など) に関する提案, 意見, 質問などを自由な立場で記述したもの.

インフォメーション: 支部関係行事, 研究懇談会, 国際会議, 分析化学に関連する各種会合の報告, 分析化学に関するニュースなどを簡潔にまとめたもの.

掲示板: 分析化学に関連する他学協会, 国公立機関の主催する講習会, シンポジウムなどの予告・お知らせを要約したもの.

執筆上の注意

- 1) 原稿量は 1200~2400 字 (但し, 掲示板は 400

字) とします. 2) 図・文献は, 原則として使用しないでください. 3) 表は, 必要最小限にとどめてください. 4) インフォメーションは要点のみを記述してください. 5) 談話室は, 自由投稿欄ですので, 積極的発言を大いに歓迎します.

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください. 原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします.

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(公社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]