

27L-am14

タンパク質中のアスパラギン/アスパラギン酸残基識別を可能とする二次元キラル HPLC-MS/MS 分析法開発

○筒井 佑紀¹, 石郷 翔人¹, 佐藤 裕¹, 三次 百合香¹, 根岸 栄一², 三田 真史³, 植田 正¹, 浜瀬 健司¹ (¹九大院薬, ²資生堂医理化テクノロジー, ³資生堂)

【目的】近年の D-アミノ酸研究の進展により、タンパク質中の D-アミノ酸残基、特にアスパラギン酸 (Asp) 残基が加齢や疾患と関連することが明らかにされてきた。また、アスパラギン (Asn) 残基が経時的に D 化するタンパク質も発見されている。しかし、タンパク質中のアミノ酸分析は加水分解を伴うため、Asn/Asp の識別分析は困難であった。そこで本研究では Asn の側鎖アミドをアミノ基に変換して Diaminopropionic acid (DAPA) とするホフマン転位と二次元 HPLC-MS/MS 法を組み合わせ、Asn/Asp を識別できるキラルアミノ酸分析法開発を行った。

【方法】試料ペプチドは [Bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzene (BTI) の存在下でホフマン転位させ、減圧乾固した残渣に DCI/D₂O を加え 110°C で 20 h 気相加水分解を行った。生じたアミノ酸は 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いて誘導体化し、二次元 HPLC-MS/MS により分析を行った。

【結果・考察】一次元目に内径 0.53 mm、全長 1000 mm のモノリス型 ODS カラムを用いて分離条件の検討を行った結果、DAPA は他のタンパク質構成アミノ酸と 160 分で分離された。二次元目には内径 1.5 mm、全長 250 mm のセミマイクロ光学分割カラム (KSAACSP-001S) を使用し、30 分以内に分離係数 1.36 の良好なキラル分離が得られた。検出には三連四重極型のタンデム質量分析器を用い、フラグメントの選択、条件最適化を通して検出下限 100 fmol まで検出を可能とした。本法を用いてモデルペプチド (Gly-Asp-Ala-Asn-Gly) の分析を行った結果、ホフマン転位を行った場合のみ一次元目、二次元目ともに DAPA のピークが認められた。本分析法はタンパク質中における Asn/Asp 残基の識別及び光学異性体の識別が可能であり、今後、様々なタンパク質での分析を行う予定である。