

22R-am05

タンパク質中のグルタミン/グルタミン酸残基を識別する二次元キラル HPLC-MS/MS アミノ酸分析法開発

○田川 茂奈¹, 石井 千晴¹, 秋田 健行¹, 三田 真史², 植田 正¹, 浜瀬 健司¹ (¹九大院薬, ²資生堂)

【目的】近年、タンパク質中で D-アミノ酸残基が報告され、加齢や疾患との関連も示されてきた。グルタミン (Gln) も、生理活性ペプチドで D 体が発見され、タンパク質での D 化解析や機能変化との関連解明が期待されている。しかし、Gln は加水分解に伴い Glu に変換されるため、両残基を識別可能な分析法が切望されている。そこで本研究では、ホフマン転位により Gln を Diaminobutyric acid (DABA) に変換し、Gln/Glu を識別可能なキラル分析法開発を行った。

【方法】試料ペプチドを、[Bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzene を用いて 60°C、4 h でホフマン転位した後、²HCl/²H₂O を用いて 90°C、24 h で気相加水分解した。生じたアミノ酸を 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いて誘導體化し、二次元 HPLC-MS/MS を用いて分析した。

【結果・考察】標品 Glu および DABA を用いて逆相 (一次元目) およびキラル分割 (二次元目) の分離条件を検討した。その結果、一次元目は微粒子充填型 C18 カラム (KSAARP, 1.0 x 250 mm) を固定相とし、10-25%アセトニトリルを含む 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液を移動相として NBD-Glu は 40 分、NBD-DABA は 130 分で溶出し、他のアミノ酸から分離された。二次元目には光学分割カラム (KSAACSP-001S, 1.5 x 250 mm) を用いて分析を行った。その結果、NBD-Glu、NBD-DABA とともに 30 分以内に分離度 1.8 以上の良好な光学分割を達成した。モデルペプチドとして H-Gly-Glu-Ala-Gln-Gly-OH をデザインし、開発した二次元 HPLC-MS/MS 法を用いて分析を行った。その結果、ホフマン転位に伴って一次元目、二次元目ともに Glu に加えて DABA のピークが認められ、Gln と Glu を識別した鏡像異性体の分離および検出が可能であった。今後様々なタンパク質試料へ適用する予定である。