

タンパク質標準物質に関する調査研究

坂口洋平*

(平成 26 年 6 月 20 日受理)

A survey on protein reference materials

Yohei SAKAGUCHI

Abstract

Recently, protein reference materials have been becoming increasingly important in many fields such as clinical laboratory test and biopharmaceutical industries. However, in comparison with low molecular weight compounds, enough protein reference materials have not been provided yet. One of the reasons is difficulty in evaluation and quantitation of proteins which stems from the complexity and instability of proteins. Therefore, in this survey, the present state of protein reference materials and useful analytical methods and techniques for development of protein reference materials were discussed. For pure protein reference materials, analytical techniques for evaluation of purity, homogeneity, stability tests, identification and quantification were discussed. For protein matrix reference materials, useful analytical methods and techniques of quantitative proteomics were surveyed and enzymatic ^{18}O -labeling, AQUA, SILAC, isobaric mass tagging and different mass tagging, were selected and discussed.

1. 緒言

タンパク質は、約 20 種類の L-アミノ酸で構成される生体高分子である。タンパク質の構造は、アミノ酸の配列順序（一次構造）を基本とし、糖鎖及びリン酸基などがタンパク質の種類によって存在する。さらにこれらが水素結合により局所的にヘリックス構造などの二次構造を形成し、ペプチド鎖が折りたたまれて三次構造を形成する。また、場合によっては、タンパク質の単量体同士がサブユニットを形成（四次構造）する。単量体を構成する一本のペプチド鎖の長さもアミノ酸 100 個程度から数千個に達するものと様々であり、構成するアミノ酸の種類だけでなく修飾する糖鎖やリン酸基の種類も違うことから、タンパク質は生体内において極めて多様な性質または機能を有する。例えば、酵素、ホルモン、抗体、

毒素、輸送分子など、様々な固有の生理活性を有しており、これらタンパク質の特異的な性質を利用し、臨床検査やバイオ医薬品などの分野においてタンパク質が用いられている。近年、プロテオミクス技術の発展により、バイオマーカー探索やバイオ医薬品の創薬が盛んに行われ、新規臨床検査や新規バイオ医薬品は年々増加しており、今後、生体中のバイオマーカータンパク質の定量やバイオ医薬品の品質管理など、タンパク質計測の需要が高くなることが予想される。しかしながら、生理活性タンパク質に関連した産業における標準化や標準物質の開発・供給は、未だ十分に整備されているとは言い難いのが現状である。標準物質とは、一般に、一つまたはいくつかの特性値（質量や濃度など）が確定した物質であり、測定方法及び装置の校正や評価に用いられ、計量学的なトレーサビリティの確保ができさらに、検査機関の間の検査結果における相違を小さくすることができる。しかし、臨床検査においては、タンパク質を対象とした検査項目における標準物質の供給が不十分であることから、

*計測標準研究部門有機分析科バイオメディカル標準研究室

測定方法、装置及び検査機関の間の相違が大きい検査項目がある。バイオ医薬品の分野に関しては、同一性、力価、純度、不純物プロファイルなど、製品の特性を確認する評価法が現在は十分に確立されていないが、今後標準物質が必要になると考えられる。これらの分野は、現在発展途上の分野である一方で、人々の健康及び安全に直結した分野でもあり、タンパク質計測または評価方法に関わる標準化や、標準物質の供給は人々の健康及び安全を守るという意味でも重要である。

現在、臨床化学分野におけるタンパク質の標準物質は、いくつかの計量機関によって開発・頒布されている。臨床化学分野における標準物質は、高純度かつ確定した純度を有する物質もしくはそれを単純に溶解した標準液である純物質系標準物質と実際の試料と類似した組成（臨床検査の分野では、血清、血漿、尿など）を持ち、その中の成分濃度が決定された物質である実試料系（組成）標準物質に分けられる。実際、臨床化学分野における測定では、血清、血漿、尿などを対象とした場合が多く、また測定において試料中の成分による影響を受けやすいため、実試料系標準物質を用いた校正が望ましいとされる。そのため臨床化学分野における標準物質は、図1に示すように、SI（International System of Units, 国際単位系）を頂点とし、純物質系標準物質、実試料系標準物質を経てユーザーへと繋がるトレーサビリティ体系を構築することが最も理想的である。特に臨床検査の分野では、BIPM（Bureau International des Poids et Mesures, 国際度量衡局）、IFCC（International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 国際臨床化

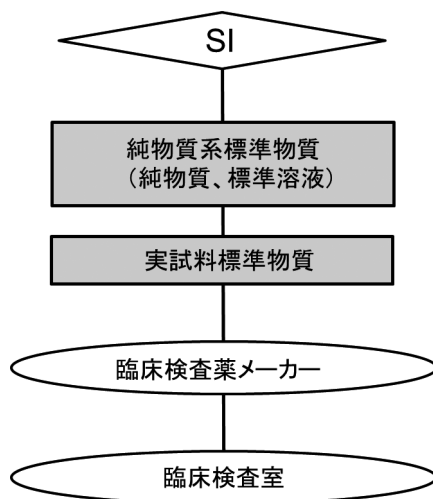


図1 理想的なトレーサビリティ体系図

学連合)、WHO (World Health Organization, 世界保健機構)、ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation, 国際試験所認定機構) が中心となって設立された、JCTLM (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, 検査医学のトレーサビリティに関する合同委員会) は、2003年12月からヨーロッパで施行された「欧州におけるIVD (体外診断検査) に関するEU指令」に対応して、臨床化学分野における国際整合性の取れた測定法や標準物質を定義することを目指している。タンパク質標準物質について、JCTLM Database に登録されている Reference Material List I または II¹⁾ (同データベースは約150種類の標準物質が登録されているが、その中で List I は SI トレーサブルあるいは国際的承認の得られた測定法により値付けされたもののリストであり、List II は非 SI トレーサブル標準物質もしくは国際的承認の得られた測定法が存在しない物質についてのリストである) より抜粋したものを表1および2に示す。対象タンパク質の定義があいまいなどの理由により List II の標準物質が多く、タンパク質標準物質の種類に関しても、十分に供給されていないというのが現状である。

タンパク質標準物質として国際的に共通に使用されている代表的なものに、ERM-DA-470k (血漿タンパク標準品)²⁾ がある。同製品は EU (European Union, 欧州連合) の IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) により開発された、15項目の血漿タンパク質のために設定された実試料系標準物質である (表3)。本製品を国内あるいは国際間で共通に使用することにより、測定法間あるいは施設間の誤差が大いに減少したとの報告も多く³⁾、標準物質の功績は大きいと言える。しかし、ERM-DA-470k は免疫学的測定法 (ELISA など) を用いて複数の計量機関や試薬メーカーなどによる共同実験にて認証値を算出している。免疫学的測定法は、精確にタンパク質の構造を同定し、定量しているわけではなく、製造ロットによる反応性の相違や交差反応などによる誤検出が存在する。そのため、化学量論的な方法により特性値を決定することが理想的である。ERM-DA-470k だけでなく、他の実試料系標準物質においても、国際的な標準物質が少なく、あったとしても化学量論的な方法を使っていないといった課題がある。

これらの課題の原因として、低分子化合物に比べ、タンパク質は測定あるいは評価が困難であることがあげられる。低分子化合物の標準物質開発について、コルチゾールを例に説明する。まず純物質系標準物質であるコルチゾール標準物質 (NMIJ CRM 6007-a) を開発する際、

主成分を同定し、予想される不純物成分濃度を求め、差数法により純度を決定している。次に実試料系標準物質であるコルチゾール分析用ヒト血清 (NMIJ CRM 6401) は、コルチゾール標準物質 (NMIJ CRM 6007-a) をキャリブレーションとし、同位体希釈質量分析法 (Isotope dilution mass spectrometry, ID-MS) を用いて、ヒト血清中コルチゾール濃度を決定している。ID-MS 法とは、試料に測定対象物と同じ構造の安定同位体標識化合物を添加し、その同位体比率を質量分析によって測定することで測定試料間の操作・検出におけるかたよりをキャンセルし、ばらつきを小さくすることができる定量法であり (図 2)、国際度量衡委員会 (CIPM) の物質質量諮問委員会 (CCQM) の定める一次標準測定法である。タンパク質標準物質も低分子化合物と同じように開発するのが理想的であるが、まず、純物質系のタンパク質標準物質を開発する際、前述の通り、タンパク質は複雑な高次構造を持つ高分子であることから、タンパク質の精密な

同定や定量が難しく、また温度など環境の変化の影響を受けやすいため、タンパク質の継時的変化を確認することが困難である。さらに実試料系タンパク質を開発する際は、低濃度にしか含まれていないタンパク質も多く、多種多様な対象以外のタンパク質も存在するため、高い選択性と高感度な測定法が要求される。また、ID-MS 法を適用するためには、安定同位体標識タンパク質あるいは、ペプチドを用意することが求められるが、低分子化合物のように入手、作成が容易ではない。このような状況を踏まえ、本調査研究においては、先に報告されている純物質系タンパク質標準物質に関する報告⁴⁾も参考にしながら、タンパク質標準物質を整備する上で必要なタンパク質測定技術や現状での値付け法、タンパク質標準物質開発に応用できるプロテオミクス分野のタンパク質測定技術を調査するとともに今後の課題についても考察した。

表 1 JCTLM データベースに登録されているタンパク質標準物質 (純物質系)

タンパク質	マトリックス	標準物質名	認証機関	物理量	認証値	不確かさ*	リスト
Alphafoetoprotein	Purified alphafoetoprotein	BCR-486	IRMM ^{a)}	質量	100 µg	9 µg	List II
Apolipoprotein A I	Purified apolipoprotein A I	BCR-393	IRMM ^{a)}	溶解後の質量濃度	1.06 g/L	0.05 g/L	List II
Apolipoprotein A II	Purified apolipoprotein A II	BCR-394	IRMM ^{a)}	溶解後の質量濃度	0.321 g/L	0.019 g/L	List II
Bovine serum albumin	Aqueous solution	SRM 927c	NIST ^{b)}	質量濃度	71.57 g/L	0.74 g/L	List I
HbA1c	Hemoglobin in buffer	JDS Lot 2	ReCCS ^{c)}	質量比	4.04~12.63 %	0.08~0.13 %	List I
Human cardiac troponin I (cTnI)	Aqueous solution	SRM 2921	NIST ^{b)}	質量濃度	31.2 mg/L	1.4 mg/L	List II
C-peptide	Lyophilized phosphate buffer saline	NMIJ CRM 6901-a	NMIJ ^{d)}	溶解後の質量濃度	80.7 mg/L	6.2 %	List I
Total C-peptide	Lyophilized phosphate buffer saline	NMIJ CRM 6901-a	NMIJ ^{d)}	溶解後の質量濃度	81.7 mg/L	6.2 %	List I
Prostate specific antigen	Purified prostate specific antigen	BCR-613	IRMM ^{a)}	質量	70.8 µg	6.2 µg	List II
Tyroglobulin	Purified tyroglobulin	BCR-457	IRMM ^{a)}	溶解後の質量濃度	0.324 g/L	0.018 g/L	List II

a) IRMM; Institute for Reference Materials and Measurements (欧州).

b) NIST; National Institute of Standards and Technology (米国).

c) ReCCS; Reference Material Institute for Clinical Chemistry Standards (日本).

d) NMIJ; National Metrology Institute of Japan (日本).

* 不確かさ=包含係数を2とする拡張不確かさ

2. 純物質系タンパク質標準物質の開発

純物質系タンパク質標準物質の開発は、「純度」「物質の同定」「均質性」「安定性」「濃度の決定」の大きく5つの項目についての評価、実験を行うことが必要である。また、「濃度の決定」は認証値を決定するものであり、特に重要である。しかし、タンパク質は、測定あるいは評価が困難であること、不安定な構造であることから、各項目についてタンパク質特有の問題点が存在する。そこで2章では、以下に、既存のCRM各々の評価における主要な分析方法や問題点について説明する。

2.1 タンパク質の純度評価

精製品を用いるタンパク質の純度評価においては、同物質が別のタンパク質を含んでおらず、タンパク質としての純度が確保されているかの確認を行う。生体組織や細胞を原材料として目的タンパク質の精製を行う場合、ファミリータンパク^{*1}やアイソザイム^{*2}、スプライスバリエーション^{*3}、など相同性の高い配列を持った目的外のタンパク質と一緒に精製されてくる場合があり、純度評価は測定方法を変えるなどして、厳密に行う必要がある。純度評価によって不純物が認められた場合には、同定を行い、場合によっては再度目的タンパク質の精製を繰り返すといった操作も必要である。純度評価の主な方法と

表2 JCTLM データベースに登録されているタンパク質標準物質 (実試料系)

タンパク質	マトリックス	標準物質名	認証機関	物理量	認証値	不確かさ*	リスト
α 1 Acid glycoprotein (AAG)	Human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	0.617 g/L	0.013 g/L	List I
α 1 Antitrypsin (AAT)	Human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	1.12 g/L	0.03 g/L	List I
α 2 Macroglobulin (A2M)	Human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	1.43 g/L	0.06 g/L	List I
Albumin (ALB)	Human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	37.2 g/L	1.2 g/L	List I
Carbohydrate deficient transferrin	Human serum	ME 30830 ME 30840	LGC ^{b)}	-	-	-	List II
Complement 3c (C3c)	Human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	1 g/L	0.04 g/L	List I
Complement 4 (C4)	Human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	0.162 g/L	0.007 g/L	List I
Cystatin C	Processed human serum	ERM-DA471	IRMM ^{a)}	溶解後の質量濃度	5.48 mg/L	5.33~5.63 mg/L	List I
Glycated haemoglobin	Human haemolysate	BCR-405	IRMM ^{a)}	ピーク強度比 (HPLC)	6.29 %	0.18 %	List I
Haemoglobinocyanide	Blood lysate	BCR-522	IRMM ^{a)}	質量濃度	800.3 mg/L	1.3 mg/L	List I
haptoglobin (HPT)	Human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	0.889 g/L	0.021 g/L	List I
immunoglobulin A (IgA)	Human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	1.8 g/L	0.05 g/L	List I
immunoglobulin G (IgG)	Human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	9.17 g/L	0.18 g/L	List I
immunoglobulin M (IgM)	Human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	0.723 g/L	0.027 g/L	List I
C-reactive protein (CRP)	Processed human serum	ERM-DA474	IRMM ^{a)}	質量濃度	41.2 mg/L	2.5 mg/L	List I
transferrin (TRF)	human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	2.36 g/L	0.08 g/L	List I
transthyretin (TTR)	human serum	ERM-DA470k	IRMM ^{a)}	質量濃度	0.22 g/L	0.018 g/L	List I

a) IRMM; Institute for Reference Materials and Measurements (欧州).

b) LGC; LGC Limited (英国).

* 不確かさ=包含係数を2とする拡張不確かさ

しては2.1.1 電気泳動分析, 2.1.2 クロマトグラフィー分析, 2.1.3 質量分析がある.

2.1.1 電気泳動分析

電気泳動分析は, ポリアクリルアミドゲルなどの支持体の中でタンパク質試料を分離分析する方法である. ポリアクリルアミドゲルは網目状の構造を持っているので, 一定の方向に電場をかけた場合, 小さい分子は網目をすり抜けながら速く移動し, 大きい分子は網目にひっ

かかりながら, よりゆっくりと移動する. これを「分子ふるい効果」と呼び, タンパク質を個々の大きさに応じて分離する手段として利用されている.

一般には, タンパク質をあらかじめドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulphate; SDS) という界面活性剤で処理し, タンパク質を棒状の分子にしてから, 電気泳動分析に供する (Laemmli 法⁸⁾). SDS はほとんどのタンパク質に同じ割合で結合するため, この処理に

表3 血漿タンパク標準品 ERM-DA470k の成分表

タンパク質	認証値 ^{a)} (g/L)	不確かさ ^{b)} (g/L)
α ₂ Macroglobulin (A2M)	1.43 ^{c)}	0.06
α ₁ Acid glycoprotein (AAG)	0.617 ^{d)}	0.013
α ₁ Antitrypsin (AAT)	1.12 ^{d)}	0.03
Albumin (ALB)	37.2 ^{c)}	1.2
Complement 3c (C3c)	1.00 ^{c)}	0.04
Complement 4 (C4)	0.162 ^{c)}	0.007
Haptoglobin (HPT)	0.889 ^{c)}	0.021
Immunoglobulin A (IgA)	1.80 ^{c)}	0.05
Immunoglobulin G (IgG)	9.17 ^{c)}	0.18
Immunoglobulin M (IgM)	0.723 ^{c)}	0.027
Transferrin (TRF)	2.36 ^{d)}	0.08
Transthyretin (TTR)	0.220 ^{d)}	0.018

- a) ERM-DA470をキャリブレーションとして, 5-14の研究機関によって得られた認証値. 認証値は非加重平均 (n = 6-14) によって算出⁵⁾.
- b) 不確かさ = 包含係数を2とする拡張不確かさ
- c) ERM-DA470の認証値は, キャリブレーションとして用いられているUSNRP 12-0575C⁶⁾の質量濃度値にトレーサブル.
- d) ERM-DA470の認証値は, 純物質をキャリブレーションとして用いられているため⁷⁾ International System of Units (SI)にトレーサブル.

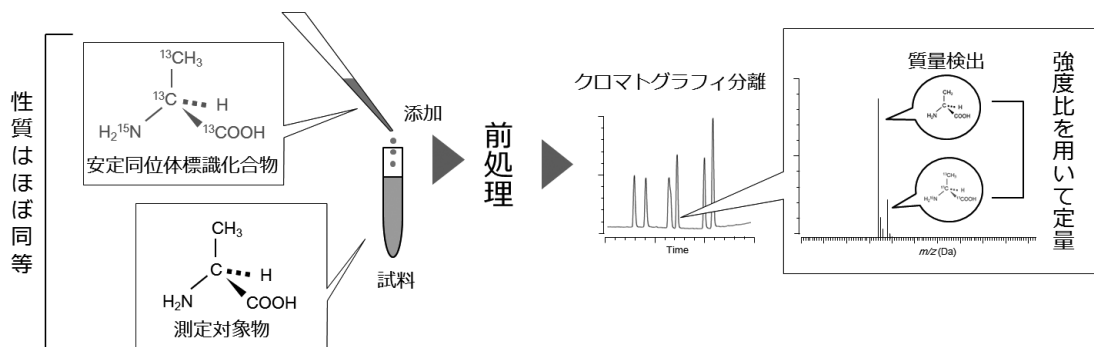


図2 同位体希釈質量分析法の概略

よってタンパク質のもともとの電荷は覆われ、SDSで処理したタンパク質は皆同じ割合の電荷、同じような形を持つ。したがって、タンパク質は分子量によって分離される。タンパク質の相対的移動度は分子量の対数に逆比例するので、分子量既知のマーカータンパク質とともに電気泳動して、目的タンパク質の分子量を推定することができる。また、目的外のタンパク質についても、個々の存在量と分子量を一枚のゲル上で同時に測定することができる。同時に多数のサンプルを分析することができ、操作も簡便であるが、分解能が低く、精密な純度評価を行う際には不向きである。

2.1.2 クロマトグラフィー分析

クロマトグラフィー分析は、タンパク質と固定相との様々な相互作用を利用して、目的のタンパク質と他のタンパク質を分離する方法である。クロマトグラフィー分析の分離モードは、高次構造を保持したままタンパク質を分離したいのか、あるいは高次構造は破壊されていてもポリペプチドとして分離されれば良いのか、によって大きく2つに分けられる。一般に前者の要求を満たすには、分離モードはゲルろ過クロマトグラフィー⁹⁾が最適である。一方、後者の場合は、溶解度が許す限り様々な取り扱いが可能である。分離モードとしては、逆相クロマトグラフィー⁹⁾が汎用されている。以下、各々の分離モードについて簡単に説明する。

ゲルろ過クロマトグラフィーは、タンパク質の分子サイズ、すなわち大きさと形状の差を利用して分離する手法で、原理的には充填剤粒子の細孔にタンパク質がどの程度拡散できるかによって、溶出される時間が異なってくる。大きな分子サイズのタンパク質は充填剤の細孔内に拡散できないため早く、小さな分子のタンパク質は充填剤の細孔内に十分に拡散するため、遅く溶出されることになる。溶離液は目的のタンパク質の高次構造が安定的に保たれるように、穏和なイオン強度、pH、有機溶媒濃度を検討し、アイソクラティックモードで分離することが多い。タンパク質を、生理活性を持った状態で分離可能であり定量再現性が高く、高次構造を維持して純度を評価したい場合、有用であるが、2種のタンパク質間での分子量に数十万以上の差がなければ分離は難しいといった問題点も存在する。逆相クロマトグラフィーは、固定相の表面にリガンドとして、疎水基（アルキル基、フェニル基など）を化学的に結合させたシリカや合成ポリマーを利用し、含水有機溶媒で試料を溶出させる方法である。試料と固定相との結合は主として疎水の相互作用であり、そこに疎水性の強い溶媒を加えて、疎水度の小さい順に溶出を行う分析法である。溶離液として

は、一般的にアセトニトリルやメタノール、イソプロパノールなどの有機溶媒を用いる。また、固定相とタンパク質とのイオンの相互作用をなくすために、イオン対試薬であるトリフルオロ酢酸（Trifluoroacetic acid; TFA）を加え、グラジエントモードで分離することが多い。分離度が比較的高く、定量再現性も高いため純度評価に適しているが、タンパク質が変性してしまうため高次構造を維持した場合の純度評価が困難である。

2.1.3 質量分析法

質量分析法は、試料をイオン化し、生じたイオン分子を真空中で飛行あるいは運動させ、その質量/電荷比 (m/z) に基づいて分離、検出する方法である。分子固有の質量あるいは電荷のわずかな違いにより分離を行うことができるため、分解能が非常に高いのが特徴である。質量分析計は以下の3つの部分から構成されている。

- 1) イオン源：試料をイオン化し、生成したイオンを質量分析部へ加速
 - 2) 質量分析部：イオンを m/z に基づいて分離
 - 3) イオン検出部： m/z により分離されたイオンの検出
- 各々の部分について、原理の違う様々な分析装置が存在するが、タンパク質を試料とした場合、イオン源としてはマトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization）¹⁰⁾を、質量分析部としては飛行時間型質量分析法（TOF-MS, time-of-flight mass spectrometry）¹⁰⁾を組み合わせる用いられることが多い。MALDIはタンパク質やDNAなどの高分子物質を結晶マトリックスに包み込み、パルスレーザーを照射することにより、イオン化された分子を気体中に放出させる方法である（図3）。ほぼ一価のイオンだけが生成するので、マススペクトルの解析が容易であり、ソフトなイオン化なので、測定中の試料分子の断片化が起りにくく、タンパク質をイオン化するのに適した方法である。TOF-MSとは、イオン化された試料を電場によって加速、一定距離を飛行させ、その飛行時間を測定することで試料の分子量を求める、といった原理を持つ装置である（図4）。原理上測定できる質量に制限がなく、

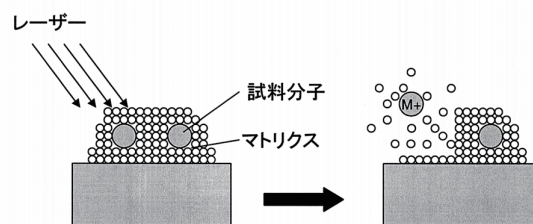


図3 MALDIによるイオン化の概略

精密な質量数を測定することができるため、タンパク質の一次構造情報を得ることができる。その一方でイオン化の条件検討が個別に必要であり、定量再現性が低いため、精密な純度評価には不向きである。不純物タンパク質の同定に非常に有用である。

2.1.4 各 CRM における純度評価法

BCR-457 (IRMM) : 電気泳動分析 (2.1.1) のみでの解析を行っている。同タンパク質は糖鎖付加型タンパク質であるため、還元剤存在下・非存在下での泳動や等電点電気泳動など、泳動条件をいくつか変化させ、糖鎖修飾の度合いについて分析を行っている。

BCR-486 (IRMM) : 電気泳動分析 (2.1.1) のみでの解析を行っている。同タンパク質もまた糖鎖付加型タンパク質であるため、還元剤非存在下での泳動や等電点電気泳動など、泳動条件をいくつか変化させて電気泳動分析を行っている。

BCR-613 (IRMM) : 電気泳動分析 (2.1.1)、クロマトグラフィー分析 (2.1.2)、質量分析 (2.1.3) と、3つの方法により分析を行っている。同タンパク質もまた糖鎖付加型タンパク質である。電気泳動分析は還元剤存在下での泳動と等電点電気泳動を行っている。クロマトグラフィー分析は、アセトニトリルのグラジエント勾配を変えた2種類のパターンで分解能を変えた逆相 HPLC を行っている。質量分析は MALDI-TOF-MS により、糖鎖修飾構造の違う5種類のアイソフォームの検出を行っている。

SRM-927d (NIST) : クロマトグラフィー分析 (2.1.2)、質量分析 (2.1.3) を行っている。クロマトグラフィーは逆相 HPLC を、質量分析は ESI-MS (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, エレクトロスプレーイオン化-質量分析法) により分子量の違う2種類の分子の検出を行っている。

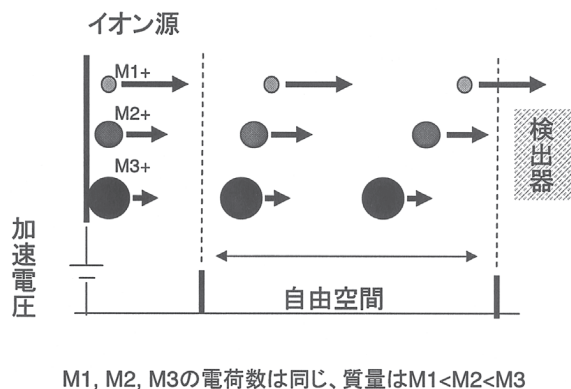


図4 TOFによる質量分析の概略

NMIJ CRM 6901-a (NMIJ) : クロマトグラフィー分析 (2.1.2)、質量分析 (2.1.3) を行っている。逆相 HPLC を用いて分離分析を行い、各成分を分取して、MALDI-TOF-MS による質量分析を行っている。この方法により分子量の違う3種類の分子の検出を行っている。

2.2 タンパク質の同定

タンパク質の同定では、精製されたタンパク質が目的のタンパク質であるか、あるいは不純物が何であるかを評価する。主な方法としては2.2.1 ウェスタンブロットリング、2.2.2 アミノ酸配列決定法、2.2.3 質量分析法がある。

2.2.1 ウェスタンブロットリング

ウェスタンブロットリング¹¹⁾は抗原である目的タンパク質に対し、それを認識する抗体が特異的に反応することを利用した物質の同定法である。抗体とはそもそも、生体内に病原菌やウイルスなどが感染した際に、それらを異物として認識・結合し、免疫機構を活性化させる役割を担った分子であるが、現在は、精製したタンパク質をマウスやウサギなどの小動物に投与し、免疫を獲得させることで、任意のタンパク質を特異的に認識する抗体が得られる。一般に分析頻度の高いタンパク質については、市販品の抗体も多数存在する。本法での分析の際には、まず電気泳動分析により、目的のタンパク質が他のタンパク質と分離されている必要があるが、電気泳動法の詳細については2.1.1に記した通りである。電気泳動分析後のタンパク質試料をニトロセルロース膜に転写、固定後、抗体溶液を加えてメンブレン上で抗原抗体反応を行わせると、目的のタンパク質であれば、抗体が結合し、検出されることになる(図5)。本法は、感度が高く、特異的な検出が可能であるが、目的のタンパク質以外と抗体が反応(交差反応)することがあるため、簡易的な確認試験などに適している。

2.2.2 アミノ酸配列決定法

タンパク質は20種類のアミノ酸が任意に連なったポリペプチドであり、タンパク質は各々固有のアミノ酸配

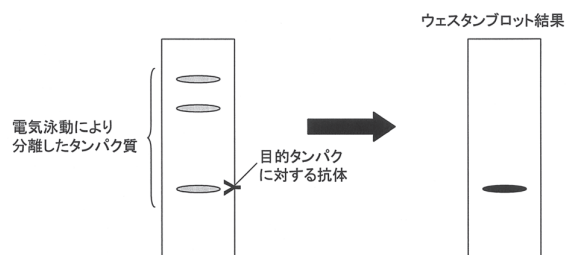


図5 ウェスタンブロットリング反応の概略

列を有している。そのため、アミノ酸配列があらかじめ知られているものであれば、アミノ酸配列決定法は目的のタンパク質を同定するのにも非常に有効である。アミノ酸配列決定法の中で最も一般的なものに、エドマン分析法¹²⁾がある。本法は以下の3つのステップから構成されている(図6)。

- 1) PITC (Phenylisothiocyanate, フェニルイソチオシアネート) とタンパク質のε-アミノ基が反応する過程(カップリング反応)
- 2) カップリング反応で生成した2-アニリノ、5-チアゾリン-アミノ酸誘導体(PTZアミノ酸)を酸で加水分解する過程(クリーベッジ反応)
- 3) PTZアミノ酸を安定で同定に適したPTHアミノ酸に変換する過程(コンバージョン反応)

生成されたPTHアミノ酸は逆相HPLC等で分析するが、その溶出位置とピークの大きさを各種PTHアミノ酸標準品の溶出パターンと比較することにより、切断されたアミノ酸の種類と量が同定される。2) クリーベッジ反応後のタンパク質はN末端アミノ酸が1残基短くなったものとなり、以後、1)~3)の反応を繰り返すことで、N末端からの配列が順次解析されていくことになる。現在では種々の改良が行われ、HPLCによるPTHアミノ酸の検出操作までを全自動化した装置が開発されている。本法は、タンパク質の一次構造情報を得ることができるため、正確にタンパク質を同定することができ

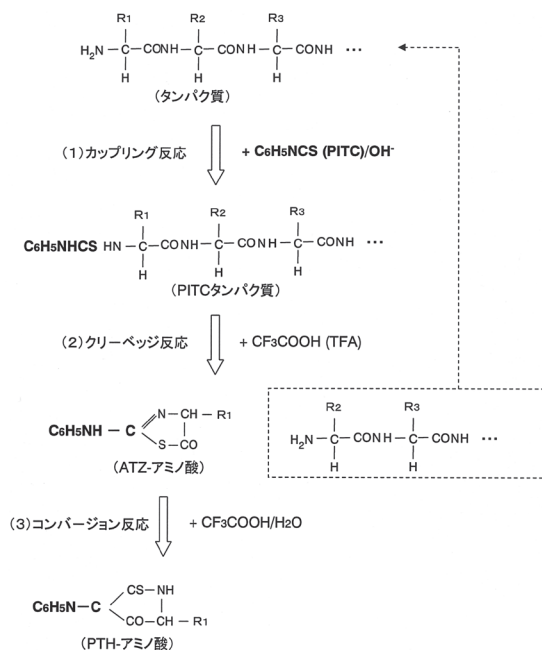


図6 エドマン分析における主な反応

る。しかし、N末端が修飾等によりブロックされているタンパク質は分析が難しいといった問題点も存在する。

2.2.3 ペプチドマスフィンガープリンティング法 (PMF法)

近年のゲノムプロジェクトの進展に伴い、ほぼすべてのDNA塩基配列が決定されている生物種が数多く存在している。そのような生物種については、質量分析の測定結果とデータベースとを照合することによるタンパク質の同定が可能である。質量分析法によるタンパク質の同定においては代表的なものにPMF (peptide mass finger printing, ペプチドマスフィンガープリンティング)^{13,14)}法がある。PMF法においては、まずタンパク質をトリプシンなどのペプチダーゼにより消化する。ペプチダーゼの多くは厳密な基質特異性を有し、それによって生成したペプチドは固有の断片化様式(表4)、および各々のアミノ酸組成に応じた固有の質量値を持つことになる。一方で、データベース上では、あるタンパク質について、あるペプチダーゼで消化を行った場合に生成すべきペプチドの各々の理論上の質量値が登録されている。断片化ペプチドの実測の質量値と、登録されているタンパク質の断片の理論分子量の全てを照合すれば、目的のタンパク質であるかどうかを確認することが可能である。本法は、断片化して得られたペプチドからタンパク質の一次構造情報を推測するため、正確な同定が可能である。

2.2.4 各CRMにおける同定法

BCR-457 (IRMM): ウェスタンブロットティング(2.2.1)アミノ酸組成分析(2.5.1)による同定を行っている。ウェスタンブロットティングは還元剤存在下でサンプルを電気泳動後、ポリクローナル抗体により目的タンパク質を検出している。アミノ酸組成分析においては、測定により得られた各アミノ酸の物質質量分率を、cDNAの配列から推測される理論値と比較している。

BCR-486 (IRMM): ウェスタンブロットティング(2.2.1)による同定を行っている。ウェスタンブロットティングは還元剤存在下でサンプルを電気泳動後、5種類の市販抗体により目的タンパク質を検出している。

BCR-613 (IRMM): アミノ酸配列決定(2.2.2)、アミノ酸組成分析(2.5.1)による同定を行っている。アミノ酸配列決定においてはN末端配列の他に、ペプチダーゼ消化により得られた分子内配列についても2箇所について分析を行っている。最終的に得られたペプチド配列の分子量の理論値は、ペプチダーゼ分解産物の電気泳動分析による分子量の測定値とも比較を行い、一致することを確認している。アミノ酸組成分析においては、測定

により得られた各アミノ酸の物質質量分率を、cDNAの配列から推測される理論値と比較している。

SRM-927c (NIST) : 質量分析 (2.1.3) における分子量の測定値が理論値と一致することを確認し、目的タンパク質の同定を行っている。

NMIJ CRM 6901-a (NMIJ) : 質量分析 (2.1.3) における分子量の測定値が理論値と一致することを確認し、目的タンパク質の同定を行っている。

2.3 均質性評価

タンパク質標準物質は一度にある程度まとまった量を作製し、それらを等量ずつアンプルに小分けにする。均質性評価は、各アンプルに小分けにした標準物質の「特性値」に関してアンプル間差がないかどうかを評価する。特定の起源の特定のタンパク質を、多数個、同時に測定する必要があるため、評価の方法としては簡便性が高くばらつきの少ないものが好まれる。また本評価においては、得られた定量値そのものというよりも、そのばらつきの度合いを測定したいとの理由から、何か便宜的な物質を用いて検量線作成による定量を行っても良い。代表的なものに、2.3.1 比色定量法、2.3.2 吸光度測定法、2.3.3 標識抗体法がある。

2.3.1 比色定量法

本法は、ある色素がタンパク質中のあるアミノ酸と特異的に結合する性質を利用し、タンパク質-色素複合体が固有に示す吸光度の変化から定量を行う方法である。タンパク質に結合させる色素の違いによって、いくつかの方法が存在するが、その中で最も汎用されている方法にLowry法¹⁵⁾、BCA法¹⁶⁾、Bradford法¹⁷⁾がある。Lowry法は、フェノール試薬 (リンモリブデン酸、リンタングステン酸混液) とタンパク質中の芳香族アミノ酸 (チロシン、トリプトファン) とが結合する際の吸光度の変化 (λ_{\max} = 750 nm) を測定する。BCA法は Cu^{2+} が強アルカリ性の条件下でポリペプチドと錯塩を形成して呈色した

ものを吸光計 (λ_{\max} = 562 nm) により測定する。Bradford法は、色素Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) が、タンパク質のアルギニン残基および芳香族アミノ酸の側鎖と結合する際の吸光度の変化 (λ_{\max} = 595 nm) を測定する。これらの方法はいずれも迅速かつ操作が非常に簡便であり、多数個の試料を同時に測定できるが、妨害物質 (還元剤、EDTA など) が多いため、試料の組成に注意を払う必要がある。

2.3.2 吸光度測定法

本法は、ある一定波長の紫外光を試料に与えると、物質濃度に比例して吸光度が変化する (Lambert-Beerの法則^{*4)}) ことをタンパク質濃度測定に応用した方法で、紫外光の波長の違いにより測定対象が若干変わる。 λ_{\max} = 280 nmで測定する場合には、タンパク質中の芳香族アミノ酸 (チロシン、トリプトファン) の吸光度を測定する¹⁸⁾。一方、 λ_{\max} = 215-225 nmで測定する場合には、ペプチド結合の吸光度を測定する¹⁸⁾。測定感度としては、後者の方が数倍良いが、 λ_{\max} = 215-225 nmの波長域に吸光を示す溶媒も多いので、サンプルによって適当な波長を選択する。本法は、操作が非常に簡便で、多数個の試料を同時に測定できるが、感度は必ずしも良くなく、また紫外部に吸光を示す共存物質が存在する場合には、それらを除去する必要がある。

2.3.3 標識抗体法¹⁹⁾

本法は、抗原抗体反応により目的タンパク質と抗体が特異的に反応生成した複合体の量から、目的タンパク質の定量を行う方法である。抗体もしくは抗原タンパク質はあらかじめ標識物質により標識されているため、複合体を分離精製後、標識物質由来の活性もしくは光強度を測定すれば定量が行える。測定原理 (競合法、非競合法) および標識物質 (放射性同位体、蛍光物質、酵素など) によって、RIA (放射性同位体標識競合法)、IRMA (放射性同位体標識非競合法)、EIA (酵素標識競合法)、ELISA (酵素標識非競合法) など多くの測定方法が開発

表4 ペプチダーゼの切断特異性

酵素 (エンドペプチダーゼ)	酵素源	特異性*
トリプシン	ウシ膵臓	$R_{n-1}=\text{Arg, Lys}; R_n \neq \text{Pro}$
キモトリプシン	ウシ膵臓	$R_{n-1}=\text{Phe, Trp, Tyr}; R_n \neq \text{Pro}$
エラスターゼ	ウシ膵臓	$R_{n-1}=\text{Ala, Gly, Ser, Val}; R_n \neq \text{Pro}$
サーモライシン	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	$R_n=\text{Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, Val}; R_n \neq \text{Pro}$
ペプシン	ウシ胃粘膜	$R_n=\text{Leu, Phe, Trp, Tyr}; R_n \neq \text{Pro}$
エンドペプチダーゼV8	<i>Staphyrococcus aureus</i>	$R_n=\text{Glu}$

* R_1 =N末端残基; R_n =C末端残基

されている。競合法の場合、標識抗原と非標識抗原が抗体に対して、競合的に結合することを利用する。つまり、一定量の抗体に対し、一定量の標識抗原と非標識抗原を反応させると、標識抗原と抗体との結合を非標識抗原が競合阻害する。反応後、抗原抗体複合体 (Bound) と未結合抗原 (Free) の分離 (B/F 分離) を行い、標識抗原の遊離型または結合型の量を測定し、試料中の抗原量を算出する。非競合法の場合、汎用法としてサンドイッチ法があり、予め固相に固定した十分量の一次抗体に対して目的のタンパク質抗原が結合し、一次抗体に結合した抗原のみを標識した二次抗体と反応させる。共通のタンパク質上の別々のエピトープ^{*5} 部位を認識する抗体でサンドイッチすることにより、特異性の向上を図ることができる。これらの方法はいずれも選択性が高く、高感度に測定することができるが、抗体を必要とするため操作がやや煩雑で交差反応を起こすことがあるといった問題点がある。

2.3.4 各 CRM における均質性評価法

BCR-457 (IRMM) : 比色定量法 (2.3.1) と酵素標識法 (2.3.3) による均質性評価を行っている。前者においては、凍結乾燥標品 20 本のアンプルについて同様に滅菌水で溶解後、各々のアンプルにつき測定を行っている。測定に関しては、市販のウシ血清アルブミンを用いて検量線を作成し、Lowry 法による定量を行っている。一方、後者においては、こちらも 20 本のアンプルについて同様に滅菌水に希釈後、各々のアンプルにつき測定を行っている。測定に関しては、目的タンパク質の精製標品を用いて検量線を作成し、RIA 法による定量を行っている。

BCR-486 (IRMM) : 吸光度測定法 (2.3.2) による均質性評価を行っている。約 30 本のアンプルについて同様に緩衝液で溶解後、各々のアンプルにつき $\lambda_{\max} = 280$ nm での吸光度を測定している。

BCR-613 (IRMM) : 均質性評価の詳細は不明である。

SRM-927c (NIST) : 均質性評価の詳細は不明である。

NMIJ CRM 6901-a (NMIJ) : クロマトグラフィー分析 (2.1.2) による均質性評価を行っている。10 本のアンプルについて同様に安息香酸ナトリウムを内標準物質として添加し、緩衝液で溶解後、各々のアンプルにつき $\lambda_{\max} = 214$ nm での吸光度を測定している。

2.4 安定性評価

安定性評価はタンパク質標準物質を長期的に保存した場合の安定性を評価する。保存状態の悪いタンパク質はすぐに分解したり、分解せずとも立体構造が壊れて抗原

抗体反応が起こらなくなり臨床検査に使用できなくなったりするため、同評価は非常に重要である。概ね生化学的にどの程度安定かをみる生化学的安定性評価と、抗原抗体反応を起こすのに十分な立体構造をとっているかをみる免疫学的安定性評価に分けられる。代表的な方法として、2.4.1 電気泳動分析、2.4.2 クロマトグラフィー分析、2.4.3 標識抗体法がある。いずれの測定法に関しても、長期間データを得る必要があるため、その間安定してデータを得ることが求められる。

2.4.1 電気泳動分析

生化学的安定性評価の代表的な手法として汎用される。原理の詳細については、「2.1.1 電気泳動分析」に同じ。

2.4.2 クロマトグラフィー分析

電気泳動分析と同じく、生化学的安定性評価の代表的な手法として汎用される。原理の詳細については、「2.1.2 クロマトグラフィー分析」に同じ。

2.4.3 標識抗体法

免疫学的安定性評価の代表的な手法として汎用される。原理の詳細については、「2.3.3 標識抗体法」に同じ。

2.4.4 各 CRM における安定性評価法

BCR-457 (IRMM) : 標識抗体法 (2.4.3) による安定性評価を行っている。凍結乾燥品をある一定温度 (-70°C , 4°C , 20°C , 37°C , 45°C , 56°C) で、一定期間 (1, 3, 5, 9ヶ月) 保存した後、滅菌水で溶解したものについて測定を行い、 -70°C で同期間保存したサンプルに対する相対的な安定性を算出している。測定系に関しては RIA 法と、抗体の違う 2 種類の IRMA 法の、合計 3 種類の方法を採用している。また、同試験は 1 研究機関のみで行っているが、測定機関間差に関しては、予め別にデータを取っている。

BCR-486 (IRMM) : 標識抗体法 (3.4.3) と吸光度測定法 (3.3.2) による安定性評価を行っている。評価の内容としては、前者の場合、長期安定性試験について、後者の場合、凍結融解安定性試験について分析を行っている。長期安定性試験の場合、凍結乾燥品を一定温度 (-20°C , 4°C , 20°C , 37°C , 45°C , 56°C) で、一定期間 (1, 2, 3, 4, 5, 6ヶ月) 保存した後、滅菌水で溶解したものについて測定を行い、 -20°C で同期間保存したサンプルに対する相対的な安定性を算出している。同試験においては、3つの研究機関が参加し、各々 RIA 法、IRMA 法、ELISA 法といった別の測定原理や抗体を用いた測定を行っている。凍結融解安定性試験の場合、10 本のアンプルについて、一ヶ月おきに凍結融解を繰り返す。最大 2ヶ月間保存したサンプルについて、 $\lambda_{\max} = 280$

nmでの吸光度を測定している。また、同試験は1研究機関のみで行っている。

BCR-613 (IRMM)：電気泳動分析 (3.4.1)，カラムクロマトグラフィー分析 (3.4.2)，質量分析 (3.3.1)，標識抗体法 (3.4.3) による安定性評価を行っている。いずれの分析においても、凍結乾燥品を一定温度 (-20℃, 4℃, 20℃, 37℃, 45℃) で、一定期間 (1, 2, 4ヶ月) 保存した後、滅菌水で溶解したのについて測定を行い、-20℃で同期間保存したサンプルとの結果を比較している。標識抗体法に関しては、ELISA法で1研究機関が試験を行っている。

SRM-927c (NIST)：安定性評価の詳細は不明である。

NMIJ CRM 6901-a (NMIJ)：クロマトグラフィー分析 (2.1.2) と吸光度測定法 (2.3.2) による安定性評価を行っている。標準液を-80℃または-20℃で、一定期間 (1, 2, 5, 12, 18, 24か月) 保存した後、精製水1gを加え、内標準物質として安息香酸ナトリウムを加えHPLC分析を行っている。同試験は1研究機関のみで、各試料3回の繰り返し測定を行い、 $\lambda_{\max} = 214 \text{ nm}$ での吸光度を測定している。

2.5 タンパク質の純物質系標準物質の濃度の決定

タンパク質標準物質のタンパク質を同種のタンパク質を用いずに、正確に測定する。主な方法として、3.5.1 アミノ酸組成分析、3.5.2 窒素含量分析、3.5.3 乾燥質量秤量法がある。但し、タンパク質の高次構造が壊れてしまった場合、標準物質として使用することが難しくなるため、濃度決定はタンパク質溶液のまま行うのが望ましい。

2.5.1 アミノ酸組成分析

アミノ酸はタンパク質およびペプチドの基本構造単位である。アミノ酸組成分析法²⁰⁾は、タンパク質、ペプチド、その他の医薬品のアミノ酸成分を測定する方法をいう。タンパク質をアミノ酸にまで分解し、HPLCで分離定量し、その総和から加水分解に要した水の量を差し引けば、原理的にはほぼ完全なタンパク質の定量法となる。しかし実際は、加水分解の段階において、アミノ酸によって回収率が違ってくるといった現象が見られるので、目的タンパク質のアミノ酸組成および分子量がわ

かっている場合には、回収率に関し最もばらつきの少ないアミノ酸の定量値 (物質質量) を、「同アミノ酸がタンパク質1分子に含まれる分子数」で割って、タンパク質の定量値 (物質質量) を求めた後、「タンパク質の分子量」を掛けることで、タンパク質の定量値 (質量) を得ることができる。

アミノ酸組成分析を行うには、まずタンパク質をアミノ酸に加水分解する必要がある。加水分解の方法は酸、アルカリおよび加水分解酵素による方法の三つに分類されるが、酸加水分解が最も一般的に用いられている。この反応により、タンパク質のペプチド結合が加水分解反応により切断され、タンパク質を構成していた各々のアミノ酸が遊離した状態で得られる (図7)。分解後に得られた遊離アミノ酸は、HPLCとID-MS法により分離・分析することで量を求めることができる²¹⁾。アミノ酸組成分析法においての定量は、予め化学量論的に正確な値付けしたアミノ酸標準液を用いて作成した検量線を用いれば、原理的にはSIトレーサブルな測定が可能となる。本法は、検出感度が高く、タンパク質を構成する最小単位であるアミノ酸から算出するため、信頼性の高い値を得ることができる。しかし、操作がやや煩雑で、目的とするタンパク質や加水分解の条件検討不足によっては、完全に加水分解できない場合があるので、注意を払う必要がある。

2.5.2 窒素含量分析

窒素は、高分子有機化合物の中で、炭水化物や糖には含まれず、タンパク質に固有に含まれる原子であることから、タンパク質の定量に用いられる。簡易的にはタンパク質の窒素含量を16%として計算する場合もある。タンパク質の分子式が正確にわかっている場合は、1分子に含まれる窒素原子数がわかるため、実験的に得られた窒素濃度を用いて、正確なタンパク質の定量を行うことができる。本法は、比較的ばらつきが小さい値を得ることができるが、他の窒素含有化合物を完全に分離・除去する必要がある。

一般的な窒素含量分析には (1) ケルダール法²²⁾、(2) デュマ法²³⁾の2つがある。

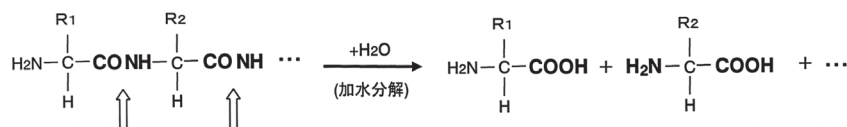


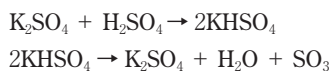
図7 アミノ酸組成分析における加水分解反応

(1) ケルダール法

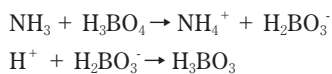
本法は、試料を熱濃硫酸により分解してアンモニアとし、 NH_4^+ の形で滴定により定量する方法である。分解反応によるアンモニアの生成機構を以下に示す。

- 1) 硫酸は有機物をまず脱水し、ついで炭化させてCを生成する。
- 2) このCは硫酸を還元して SO_2 を生じさせ、Cは CO_2 になる。
- 3) SO_2 はNを還元して NH_3 を生じ、 SO_2 は SO_3 になる。
- 4) 有機物の分解過程で生じるHは、 NH_3 の生成を促進する。

この場合、アンモニアは硫酸アンモニウムの形で安定化され、反応途中に生ずる水および無水硫酸は、高温のために揮発し去る。分解促進剤である硫酸カリウムは、次式にしたがって、まず硫酸を分解する。



この結果、 K_2SO_4 の濃度が次第に高まり、沸点は上昇し、残存する有機物に対する作用が益々強くなる。また、特に分解促進のために、 HgO 、 CuSO_4 または SeOCl_2 などが触媒として微量添加される。生成されたアンモニアの定量法としては、一次標準測定法である滴定法を用いる。得られた分解液を強アルカリ性として、水蒸気蒸留法によってアンモニアを蒸留しホウ酸液に捕集後、アンモニアとホウ酸の反応で生じたホウ酸アンモニウムを濃度既知の酸で滴定する。この反応は次式により表すことができる。

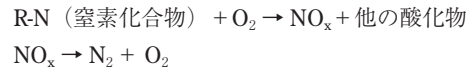


本法は日本薬局方の窒素定量法として認知されているが、サンプルの調製に時間がかかり、検出感度が低いといった問題点がある。本法の推奨測定範囲は5 mg ~ 10 mg/タンパク質(固体)であり、通常扱う濃度レベルのタンパク質溶液を直接濃度決定することは難しい。

(2) デュマ法

本法は、試料を燃焼させて得られた N_2 ガスをガスクロマトグラフィーにより定量する方法である。まず、試料に対して適切な酸素供給量を制御し、高温で試料を完全燃焼させる。燃焼によって生成したガスはキャリアガ

ス(ヘリウム)によって還元管内に送られ、 NO_x は N_2 に還元されるとともに、過剰の酸素は吸収される。以上の反応は次式により表すことができる。



生成ガスはさらにガスクロマトグラフィーにより精製され、 N_2 はキャリアガスにより熱伝導度検出器(TCD)に送り込まれ、予め適当な標準物質を用いて作成した検量線を用いて、試料中の窒素の定量が行われる(図8)。ケルダール法と比較し、非常に短時間での分析が可能であり、有害な溶媒・触媒によるサンプルの前処理を必要としないが、検出感度が低く、本法の推奨測定範囲は1 mg ~ 1 g/タンパク質(固体)であり、通常扱う濃度レベルのタンパク質溶液を直接濃度決定することは難しい。

2.5.3 各CRMにおけるタンパク質濃度決定法

BCR-457 (IRMM) : アミノ酸組成分析(3.5.1)、窒素含量分析(3.5.2)、比色定量法(3.3.1)、吸光度測定(3.3.2)による定量を行っている。アミノ酸組成分析においては、3研究機関により個別に行い、それらの平均値を定量値としている。窒素含量分析においては、5研究機関でケルダール分析を行い、平均値を定量値としている。比色定量法、吸光度測定においてはいずれもウシ血清アルブミンを用いて検量線を作成し、定量を行っている。前者については、Lowry法により11研究機関が測定した結果の平均値、またBCA法により1研究機関が測定した結果を、各々定量値としている。後者においては、 $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ での吸光度測定を4研究機関が行い、定量値を算出している。以上、複数の方法で定量を試みてはいるものの、最終的には、過去にLowry法と窒素含量分析の測定結果が良く一致したとの理由で、Lowry法

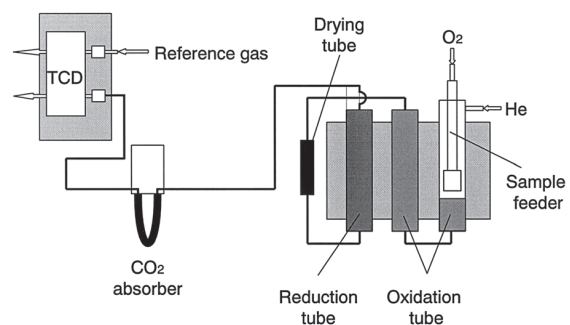


図8 デュマ法の測定装置の概略

で得られた定量値を認証値としている。

BCR-486 (IRMM)：アミノ酸組成分析 (3.5.1) のみによる定量を行っている。同分析においては、回収率が最も高いアミノ酸のひとつであるアラニンの「物質質量」に「タンパク質 1 分子当たりに含まれるアラニンの分子数の逆数」と「タンパク質の分子量」を掛けたものをタンパク質の定量値としている。あるひとつのサンプルについてアミノ酸組成分析と吸光度測定を行い、モル吸光係数を求めたのち、吸光度測定を行うことで定量値の均質性の確認を行っている。同分析は 3 研究機関により行い、それらの平均値を認証値としている。

BCR-613 (IRMM)：CRM-486 の方法と同様。

SRM-927d (NIST)：アミノ酸組成分析 (3.5.1)、窒素含量分析 (3.5.2) による定量を行っている。認証値としてアミノ酸組成分析で得られた定量値を選択しており、窒素含量分析で得られた定量値は総タンパク質量として表記している。

NMIJ CRM 6901-a (NMIJ)：アミノ酸組成分析 (3.5.1) による定量を行っている。130℃、48 時間気相での塩酸加水分解を行ったのち、プレカラム誘導体化法による逆相クロマトグラフィー / 質量分析法および親水性相互作用クロマトグラフィー / 質量分析法の 2 つの方法による測定を行い、得られた定量値を認証値としている。

3. 実試料系タンパク質標準物質の開発

実試料系タンパク質標準物質の開発は、先に述べた純物質系タンパク質標準物質とは異なり、対象とするタンパク質以外にも他の多種多様なタンパク質が存在する試料を用いる。また、対象とするタンパク質によっては、実試料中に微量しか含まれない場合もある。そのため、実試料系タンパク質標準物質の開発に必要な「均質性」「安定性」「濃度の決定」を評価する際、純物質系タンパ

ク質標準物質の開発で用いた定量法は適用することができず、選択性が高く、高感度な分析法が必須となる。また、精確かつ SI トレーサブルな実試料系タンパク質標準物質を開発するには、コルチゾール分析用ヒト血清 (NMIJ CRM 6401) などに代表されるような低分子化合物の標準物質開発に用いられている ID-MS 法による定量が望ましい。これを達成するためには、まず多種多様なタンパク質が存在する試料中において、タンパク質の構造を同定し高感度かつ高選択的に定量すること、また ID-MS 法に用いる安定同位体標識タンパク質あるいは、ペプチドを用意することが求められる。しかし、タンパク質は低分子化合物に比べ、構造を同定し高感度かつ高選択的に定量することが困難であり、安定同位体タンパク質あるいは、ペプチドの入手または合成が難しいといったことが実試料系タンパク質標準物質を開発する上で大きな妨げとなっている。

これらの現状を踏まえ、実試料系タンパク質標準物質の開発に有用となる新規タンパク質量法を確立すべく、実試料中タンパク質を定量する分野である定量プロテオミクス²⁴⁾に着目し、各測定法が実試料系タンパク質標準物質の開発に応用可能であるかを考察した。

定量プロテオミクスは、質量分析計を用いてプロテオームを構成するすべてのタンパク質を精確に同定した上で、それぞれのタンパク質を定量する手法の総称である²⁴⁾(図 9)。一般に、定量プロテオミクスは、対象となるタンパク質を酵素などで消化し、得られたフラグメントペプチドから、タンパク質構造を同定し定量する方法と、酵素などで消化せずにタンパク質の精密質量数から構造を同定し定量する方法がある。通常は、対象となる試料とコントロール試料との相対定量により評価を行う。いくつかの定量プロテオミクス技術は、相対定量を行う際、安定同位体標識化合物を用いており、これを ID-MS 法に応用できる可能性がある。図 9 は、定量プ

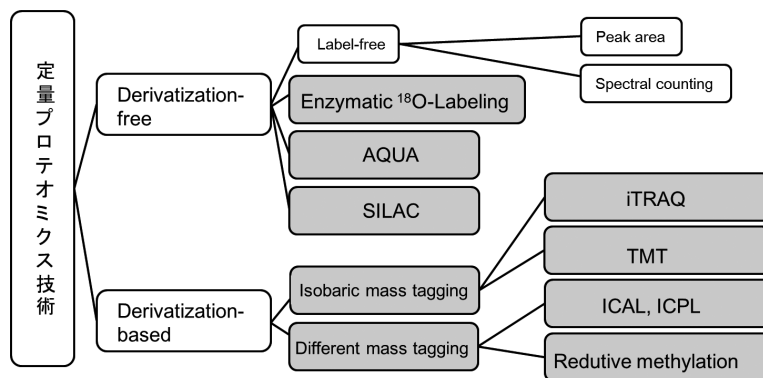


図 9 定量プロテオミクス技術²⁴⁾

ロテオミクスに用いられる手法を示したものであり²⁴⁾、タンパク質そのものを安定同位体標識するものと、誘導体化を利用した標識化に分けることができる。ID-MS法に応用可能な定量プロテオミクス技術について図9の灰色の部分に示している。以下に、示した各タンパク質測定技術について詳細を説明する。

3.1 Enzymatic ^{18}O -labeling²⁵⁾

いずれのタンパク質においても酵素によって消化される際、ペプチド結合が加水分解することでフラグメントペプチドが得られる。そのため、あらかじめ重水 (H_2^{18}O) 中で対象となるタンパク質を酵素消化することで、ペプチド分子内に存在するカルボキシル基の酸素はいずれも重酸素 (^{18}O) に置換され、同位体標識ペプチドフラグメントを得ることができる。対象タンパク質を同じ酵素によって消化し、得られたフラグメントペプチドに対し、この同位体標識ペプチドフラグメントを添加することで、ID-MS分析が可能となる(図10)。比較的 low cost で同位体標識化合物を得ることができ、迅速かつ簡単に同位体標識できる手法も開発されている。しかし、得られた同位体標識化合物が不安定であり、酵素反応より後の操作しか補正がされないため、本法を、標準物質開発のための実試料中タンパク質量法に応用するためには、酵素反応がほぼ完全に進行している場合のみしか適用できず、厳密な酵素反応条件の検討が必要となる。

3.2 AQUA (absolute quantitation for protein)²⁶⁾

タンパク質消化酵素は厳密な基質特異性を有し、それによって生成したペプチドは固有の断片化様式および各々のアミノ酸残基組成に応じた固有の質量値を持つことになる。本法は、あらかじめ、対象タンパク質を酵素消化することにより得られるペプチドの同位体標識体を合成し、その濃度をアミノ酸組成分析により決定し、内

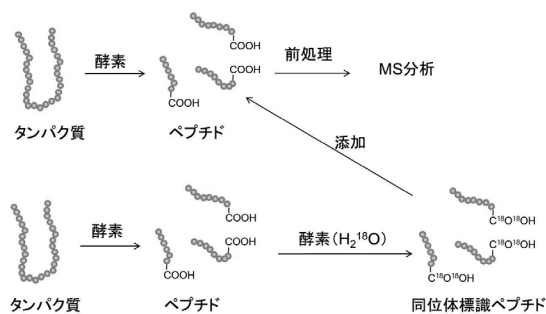


図10 Enzymatic ^{18}O -labeling の概略

標準物質として用いる(図11)。既知濃度の同位体標識体を内標準物質として用いるため、純物質系タンパク質標準物質を必要とせず、SIトレーサブルな定量が可能である。しかし、酵素反応がほぼ完全に進行している場合にのみしか適用できず、厳密な酵素反応条件の検討が必要となる。

3.3 SILAC (stable isotope labeling using amino acids in cell culture)²⁷⁾

リコンビナントタンパク質とは、遺伝子組み換え技術によって人工的に作製されたタンパク質のことをいう。通常、大腸菌や動植物又は昆虫の細胞株の遺伝子を組み換えてタンパク質を作らせることができる。そのため、自然界に微量しかないタンパク質でも大量に作り出すことができる。タンパク質を遺伝子組み換え技術によって合成する際、同位体標識アミノ酸を含む培地で行うことで、対象となるタンパク質の同位体標識体を得ることができる。これを内標準物質として用いることで、ID-MS法による分析が可能となる(図12)。同位体標識タンパク質を用いることにより、操作の殆どが補正することができるため、純物質系タンパク質標準物質を用いること

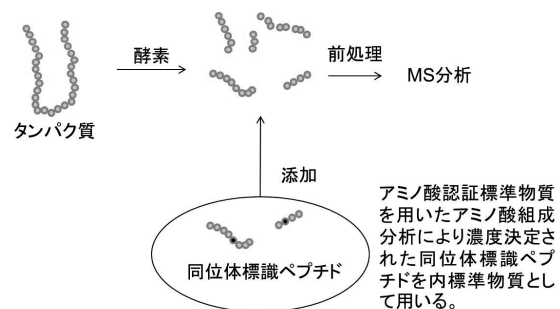


図11 AQUA (absolute quantitation for protein) の概略

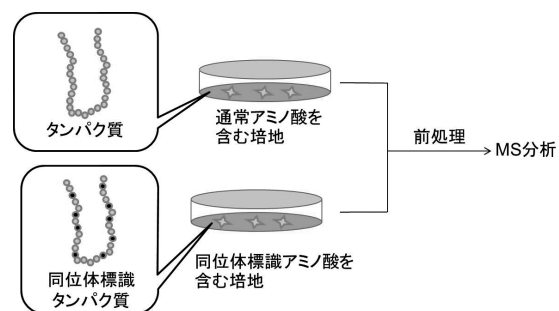


図12 SILAC (stable isotope labeling using amino acids in cell culture) の概略

でマトリックス中のタンパク質量が可能となる。しかし、同位体標識タンパク質を得るために、タンパク質そのものを合成する必要があるため、コスト面や複雑な構造のタンパク質を合成するのが困難であるといった問題がある。

3.4 Isobaric mass tagging

本法は、iTRAQ 試薬²⁸⁾や TMT 試薬²⁹⁾など、構造中の一部を安定同位体に置き換えた誘導体化試薬を用い、相対定量を行う方法である。これらの試薬は構造中にレポーターグループとバランスグループと呼ばれる部位を持っている。レポーターグループの分子構造を変えずに一部の原子を安定同位体に置き換え、バランスグループも安定同位体を用いて、誘導体化試薬全体の分子量が変わらないように調整することにより、安定同位体の位置は異なるが、同じ分子量の誘導体化試薬が複数作成することができる。これらをタンパク質またはペプチドに付加することにより、全体としては同じ構造、同じ質量ながら、MS/MS 分析において、質量数が異なるフラグメントイオンを検出することができ、二つの系でのタンパク質量の比率などの相対定量が可能となる (図 13)。この試薬の一方を測定対象物に反応させ、もう一方で反応させたものを内標準物質にすることで ID-MS 法に類似した分析が可能と考えられる。純物質系タンパク質標準物質がある場合、誘導体化試薬を用意するのみで比較的容易に定量が可能であり、誘導体化により MS 分析における高感度化も可能であるが、さらに誘導体化反応にお

ける収率を補正することができないため、誘導体化反応がほぼ完全に進行している場合にのみしか適用できず、厳密な誘導体化反応条件の検討が必要となる。

3.5 Different mass tagging³⁰⁻³³⁾

本法は、3.4. Isobaric mass tagging と同様に、誘導体化試薬構造中の一部を安定同位体に置き換えることで相対定量を可能とする方法である。相違点として、得られる誘導体化反応物の質量数が異なる点、誘導体化試薬構造の自由度が高い点などがあげられる。本法も純物質系タンパク質標準物質がある場合、誘導体化試薬を用意するのみで比較的容易に定量が可能であるが、誘導体化反応における収率を補正することができないため、誘導体化反応がほぼ完全に進行している場合にのみしか適用できず厳密な誘導体化反応条件の検討が必要となる。

3.6 小括

これまでに紹介した技術はいずれも、安定同位体標識化合物による操作・検出の補正を行うが、各技術によって補正できる範囲が限られている³⁴⁾(図 14)。これらは、対象とするタンパク質の分子サイズ及び使用する質量分析計の種類によって使い分けられる。図 10 の技術の中で、唯一 SILAC 法のみ、すべての操作について補正可能である。しかし、安定同位体標識化合物の入手の容易さは、図 14 の下流に行くほど容易であり、SILAC 法が最も安定同位体標識化合物の入手が難しい。また、誘導体化を伴う、Isobaric mass tagging, Different mass

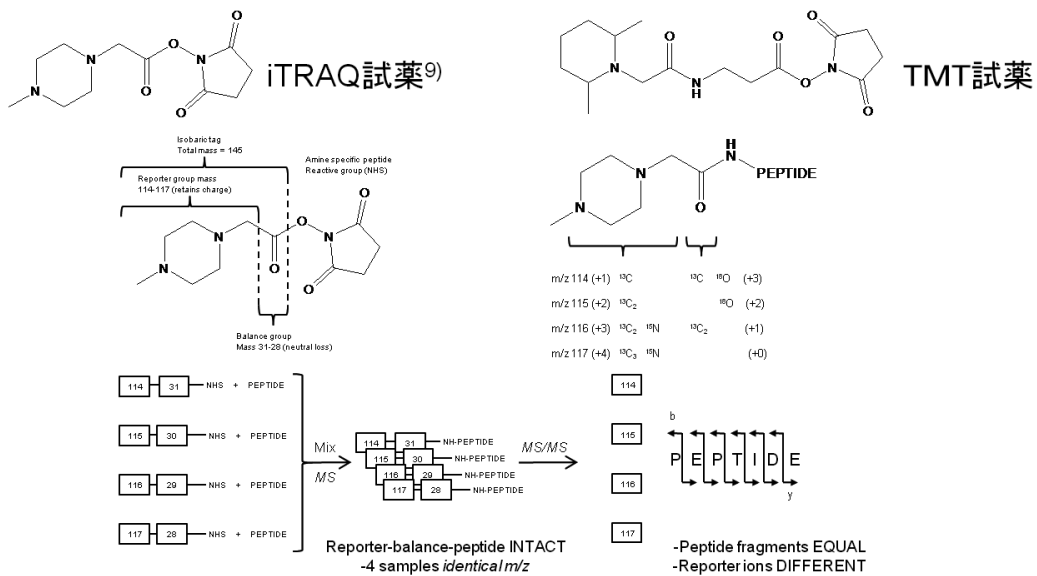


図 13 Isobaric mass tagging の概略^{28, 29)}

tagging などは、MS 分析における高感度化が可能であり、低濃度の実試料中タンパク質定量に有利に働くと考えられる。そのため、これらの技術を十分理解し、対象となるタンパク質の性質や標準物質としてのニーズに応じて、選択・組み合わせることが必要である。

4. まとめ

本稿では、まず国内外において、未だ十分にタンパク質標準物質の供給されていない点や、実試料系では、上位の標準へのトレーサビリティの明示が十分でないといった課題があるといった点や、今後、バイオ産業がさらに発展する中で、タンパク質標準物質に関しても、SI に直結したトレーサビリティ体系を構築することは非常に重要だという点について述べた。そこで、純物質系タンパク質標準物質の開発に必要な測定技術や、SI にトレーサブルな実試料系タンパク質標準物質の開発を可能とする測定技術を調査した。純物質系標準物質の開発は、「純度」「物質の同定」「均質性」「安定性」「濃度の決定」の5つの項目について評価を行う必要がある。タンパク質は、低分子化合物にはない特有の性質、特性があることから、各項目についてタンパク質特有の問題点が存在することがわかった。また、精確かつ SI にトレーサブルな実試料系タンパク質標準物質を開発するには、純物質系タンパク質標準物質をキャリブレーションとし、ID-MS 法による定量が必要である。そこで、実試料中タンパク質を定量する分野である定量プロテオミクスに着目し、各測定法が実試料系タンパク質標準物質の開発に利用可能であるかを考察した。調査の結果、いくつかの測定法に関して利用可能であり、対象とするタンパク質の性質、特性に加えマトリックスの成分、濃度などを

考慮する必要があることが分かった。今回調査した測定技術を選択・組み合わせることで、これまでほとんど例がない精確かつ SI にトレーサブルな実試料系タンパク質標準物質の開発やそれに用いる新しい測定法の開発に取り組んでいきたいと考えている。今後は、臨床試験の中でもプライオリティの高いものから順次、タンパク質の純物質系標準物質および実試料系標準物質を整備し、産業界や臨床分野の関係者との連携により、臨床検査値の信頼性の向上に貢献できればと考えている。

謝辞

本調査研究をまとめるにあたり、貴重なご指導・ご助言をいただきました高津章子科長、山田善郎首席研究員、榎原研正招聘研究員には心より感謝いたします。またバイオメディカル標準研究室の皆様にもご協力いただき、深く感謝いたします。

*¹ファミリータンパク：生物種、細胞種を問わず保存性が高く、分子間で相同性の高いドメイン領域を有するタンパク質群の総称。

*²アイソザイム：同一個体中にあり、化学的には異なるにもかかわらず、同じ化学反応を触媒する酵素。遺伝子上の突然変異により、アミノ酸配列が一部変化して生成されることが多い。

*³スプライスバリエント：真核生物の mRNA はゲノム上の何箇所かに分散されてコードされていることが多い。成熟した mRNA が生成される際には、ゲノム上の不必要な部分 (intron, イントロン) が切り取られ、mRNA になる部分 (exon, エキソン) が張り合わされる。この生成過程をスプライシング (splicing) と

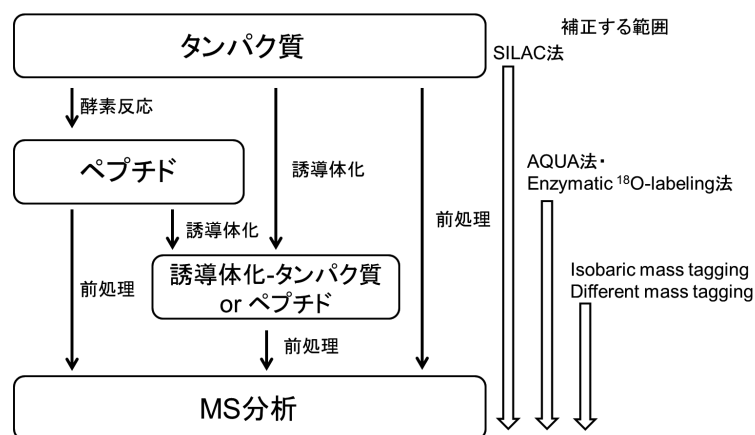


図 14 タンパク質測定の流れおよび各技術の補正範囲

いう。遺伝子によっては、このスプライシングの過程において、エキソンの一部を除いたものとそうでないもののいくつかを生成するものがあり、これら生成物のことをスプライスバリエント (splice variant) と呼ぶ。

*⁴Lambert-Beerの法則：試料の入ったセルに光を当てた際、透過する光の強度をI、試料の入っていない溶媒のみの入ったセルを透過した光の強度をI₀とした場合、 $\log(I_0/I)$ を吸光度という。Lambert-Beerの法則は、セル長l [cm]、濃度c [mol/l]、吸光係数ε [l/mol·cm]としたとき、 $[\log(I_0/I) = \epsilon \cdot c \cdot l]$ の関係が成り立つことを示したもので、この式より、吸光度測定をもとに物質濃度を求めることができる。

*⁵エピトープ：構造の明らかな抗原決定部位のこと。タンパク質分子あるいは細胞などは一般に多数のエピトープから成る。

*⁶プロテオミクス：プロテオーム (proteome) + 学 (ics) で、「全タンパク質の研究」、すなわち一般的にはタンパク質の大規模研究を示す言葉として使用されている。プロテオーム (protein + ome) はゲノム (genome = gene + ome) に対する造語。

参考文献

- 1) I. Zegers, W. Schreiber, S. Linstead, M. Lammers, M. McCusker, A. Muñoz, Y. Itoh, G. Merlini, S. Trapmann, H. Emons, J. Sheldon, H. Schimmel, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 48 (2010) 805-813.
- 2) S. Baudner, J. Bienvenu, S. Blirup-Jensen, A. Carlstrom, A.M. Johnson, A. Milford-Ward, R.F. Ritchie, P.J. Svendsen, J. Whicher, Community Bureau of Reference, Commission of the European Communities, Brussels. (1993) 1-172.
- 3) F. Dati, G. Schumann, L. Thomas, F. Aguzzi, S. Baudner, J. Bienvenu, O. Blaabjerg, S. Blirup-Jensen, A. Carlström, P.H. Petersen, A.M. Johnson, A. Milford-Ward, R.F. Ritchie, P.J. Svendsen, J. Whicher, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 34 (1996) 517-520.
- 4) 加藤愛, 産総研計量標準報告, 4 (2006) 270-283.
- 5) C.B. Reimer, S.J. Smith, T.W. Wells, R.M. Nakamura, P.W. Keitges, R.F. Ritchie, G.W. Williams, D.J. Hanson, D.B. Dorsey, *Am. J. Clin. Pathol.*, (1982) 77, 12-19.
- 6) S. Blirup-Jensen, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 39 (2001) 1090-1097.
- 7) JCTLM database : Laboratory medicine and *in vitro* diagnostics.
- 8) U. K. Laemmli, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- 9) 牧野圭祐：生体高分子の高速液体クロマトグラフィ・タンパク質・拡散・多糖類のHPLC (廣川書店, 1992) 1-42.
- 10) 丹羽利充：ポストゲノム・マススペクトロメトリー - 生化学のための生体高分子解析・化学フロンティア 10 (化学同人社, 2003) 3-18.
- 11) 竹縄忠臣：タンパク質実験ハンドブック (羊土社, 2004) 152-157.
- 12) P. Edman, G. Begg, *Eur. J. Biochem.*, 1(1967) 80-91.
- 13) J. A. McCloskey, *Methods Enzymol.*, 193 (1990) 351-538.
- 14) J. J. Villafranca, *Academic Press*, (1990) 105-116.
- 15) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.
- 16) P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76-85.
- 17) Read, S.M., and Northcote, D.H., Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 116(1) (1981) 53-64.
- 18) G.C. Webster, *Biochem. Biophys. Acta*, 207 (1970) 371-373.
- 19) 金井正光編：臨床検査法提要 (金原出版, 2005) 56-64.
- 20) 厚生省医薬安全局審査管理課監修：日本薬局方フォーラム 7 (2) (1998) 49-57.
- 21) D.M. Bunk, M.S. Lowenthal, *Methods Mol. Biol.*, 828 (2012) 29-38.
- 22) J.M. Lynch, D.M. Barbano, *J. AOAC Int.*, 82 (1999) 1389-1398.
- 23) P.G. Wiles, I.K. Gray, R.C. Kissling, *J. AOAC Int.*, 81 (1998) 620-32.
- 24) X. Yao, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 4427-4439.
- 25) D. López-Ferrer, K.K. Hixson, H. Smallwood, T.C. Squier, K. Petritis, R.D. Smith, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 6272-6277.
- 26) C.G. Arsene, R. Ohlendorf, W. Burkitt, C. Pritchard, A. Henrion, G. O'Connor, D.M. Bunk, B. Güttler, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 4154-4160.
- 27) S.J. Shah, K.H. Yu, V. Sangar, S.I. Parry, I.A. Blair, *J. Proteome Res.*, 8 (2009) 2407-2417.

- 28) P.L. Ross, Y.N. Huang, J.N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlet-Jones, F. He, A. Jacobson, D.J. Pappin, *Mol. Cell. Proteomics*, 3 (2004) 1154-1169.
- 29) L. Dayon, A. Hainard, V. Licker, N. Turck, K. Kuhn, D.F. Hochstrasser, P.R. Burkhard, J.C. Sanchez, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 2921-2931.
- 30) K.C. Hansen, G. Schmitt-Ulms, R.J. Chalkley, J. Hirsch, M.A. Baldwin, A.L. Burlingame, *Proteomics*, 2 (2003) 299-314.
- 31) R. Ahrends, S. Pieper, B. Neumann, C. Scheler, M.W. Linscheid, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 2176-2184.
- 32) J.L. Hsu, S.Y. Huang, N.H. Chow, S.H. Chen, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6843-6852.
- 33) J. Zhai, X. Liu, Z. Huang, H. Zhu, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 20 (2009) 1366-1377.
- 34) M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, B. Kuster, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 (2007) 1017-1031.