

アミノ酸分析を用いた精確なタンパク質定量法

信頼性の高い定量法の開発と「C反応性蛋白標準液」開発への応用



加藤 愛

かとう めぐみ

katou-megu@aist.go.jp

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
研究員
(つくばセンター)

2005年に計測標準研究部門に入所し、主にタンパク質やその構成単位であるアミノ酸・ペプチドなどの高精度な定量法の開発およびそれらの技術を利用した認証標準物質の開発を行っています。今後も分析法の開発、標準物質の供給を通して、特に医療・バイオ・食品分野において安心・安全な社会づくりに貢献したいと考えています。

関連情報：

● この研究成果をもとに、国際度量衡委員会主催の国際比較 (CCQM-P55) に参加し、「アミノ酸分析によるペプチドの定量」を行いました。ペプチド中の4種のアミノ酸に関して参加国間の測定値の比較が行われ、私たちの開発したIDMS法の妥当性と測定技術の確かさが示されました。

精確なタンパク質定量法の開発

血液や尿中に存在するタンパク質のいくつかは、人の健康状態に応じて濃度が大きく変化することが知られており、臨床検査の測定項目となっています。これらの濃度を正確に定量するためには、「濃度の基準」が必要であることから、私たちは「精確な濃度値を付与したタンパク質標準液」の開発を目指して研究を行っています。

タンパク質粉末を溶かして標準液を調製しても、タンパク質の精確な純度がわからなければ標準液の濃度を定めることはできません。そこでタンパク質をその構成単位であるアミノ酸 (最大20種類) にまで分解して定量する方法 (アミノ酸分析法) により標準液のタンパク質濃度を決定することにしました。アミノ酸分析によるタンパク質定量では、目的タンパク質を加水分解することにより得られたアミノ酸を定量します。タンパク質1分子に含まれる各アミノ酸の個数はタンパク質ごとに決まっているので、それぞれのアミノ酸を定量すると、もとのタンパク質濃度が算出できます (図)。しかし、加水分解過程においてはタンパク質の立体構造やアミノ酸そのものの安定性の違いなどにより、常に全種類のアミノ酸の回収率が100%になるわけではありません。そこで私たちは“同位体希釈質量分析法 (IDMS法) を利用したアミノ酸分析法”を確立しました。この方法で内部標準物質として用いる安定同位体標識アミノ酸は、目的アミノ酸と理論上ほぼ同一の挙動をするた

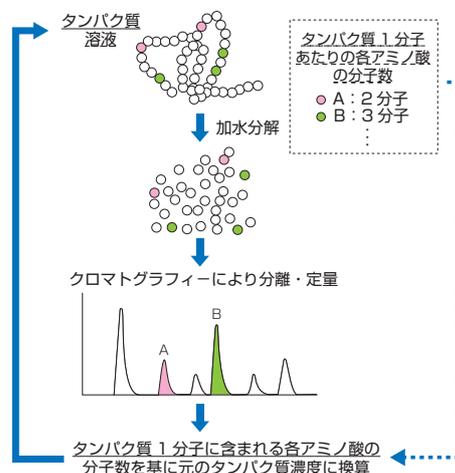
め、加水分解をはじめとした分析操作上の影響を最小限に抑えることができます。さらにさまざまな実験結果や文献情報をもとに加水分解条件に影響されにくく、より定量に適したアミノ酸を選定することで、より信頼性の高いタンパク質定量法を確立しました。

C反応性蛋白標準液の開発

C反応性蛋白は炎症反応マーカーとして臨床検査で利用されているタンパク質です。私たちは前述したアミノ酸分析法をはじめとしたいくつかのタンパク質定量法を組み合わせ、C反応性蛋白溶液の濃度を決定し、認証標準物質 (NMIJ CRM6201-a) を開発しました (写真)。タンパク質認証標準物質にはこれまで血清由来精製品が多用されてきましたが、この標準物質は夾雑タンパクが少なく均質性の高い遺伝子組換え (ヒト型) C反応性蛋白を原材料としていることを特徴としています。濃度の認証値は $(39.5 \pm 1.9) \mu\text{mol} / \text{kg}$ (参考値: $(0.91 \pm 0.04) \text{g} / \text{kg}$) (\pm 以下は拡張不確かさ) です。

今後の展開

アミノ酸分析に関しては、より精確に、より早く、より高感度に、そしてより多種類のアミノ酸の測定を目指した測定法の検討を継続し、タンパク質定量がより精確に行えるよう努めていきたいと考えています。



アミノ酸分析によるタンパク質定量



開発したC反応性蛋白標準液 (NMIJ CRM6201-a)