

COSMOSIL

光学分割ラベル化剤 L-FDVDA

DL-*allo*-Thr と DL-*allo*-Ile を含むペプチドの配列解析

Technical Note

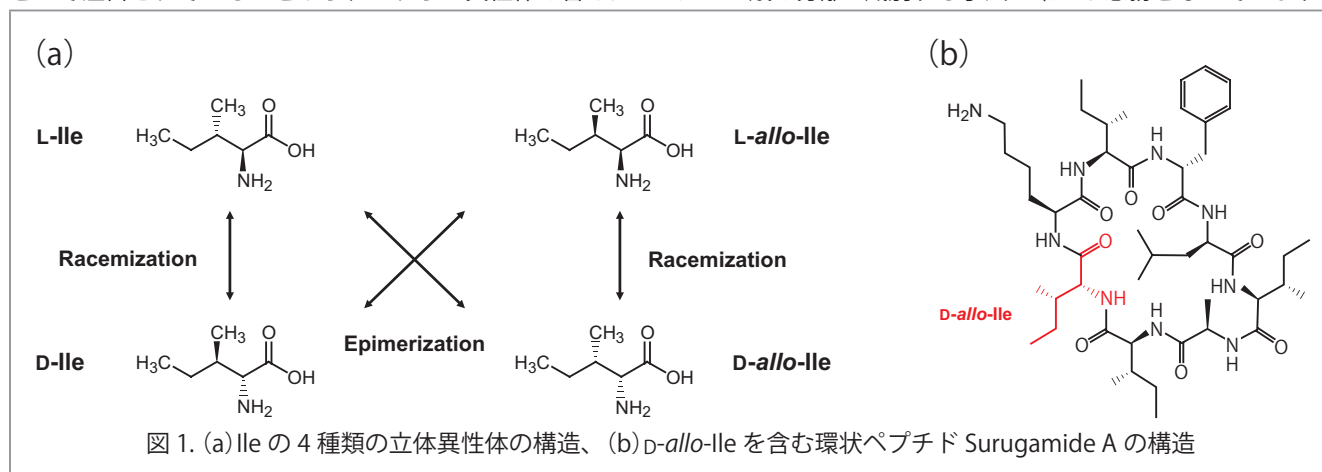
29-3

はじめに

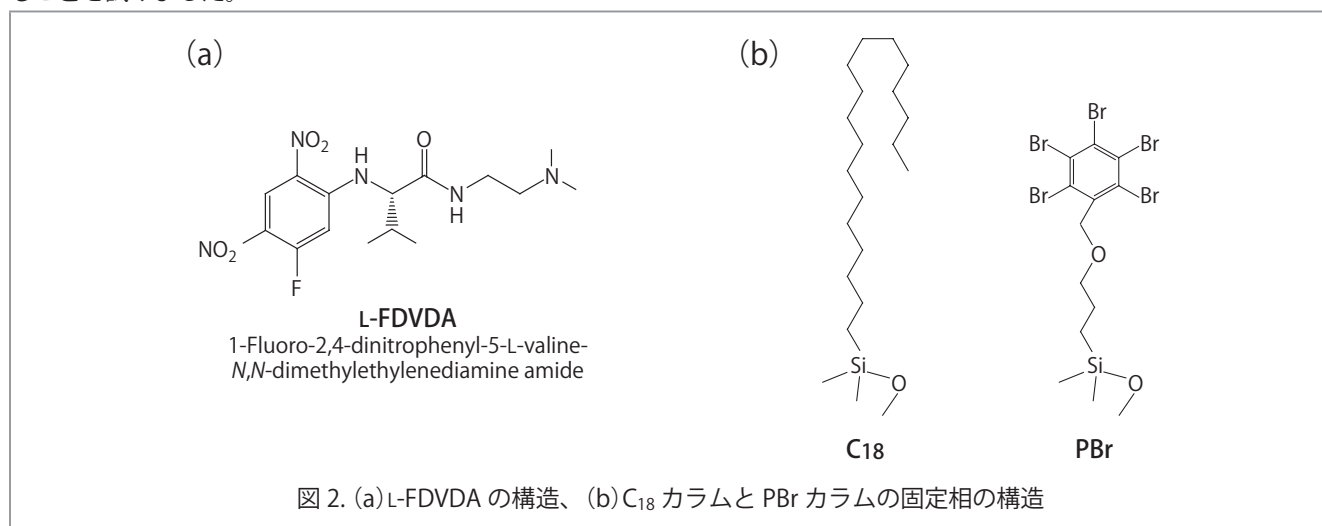
スレオニン(Thr)とイソロイシン(Ile)の4種類の立体異性体を含む43個のDL-アミノ酸を、光学分割ラベル化剤L-FDVDAとコスモシル 3C₁₈-AR-II カラムおよび3PBr カラムを用いて、液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)により分離・識別することができましたので、紹介します。本研究成果は、Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 2023;71:824-831. に掲載されています。

● Thr と Ile の立体異性体について

生体内に存在するアミノ酸の大部分はL体ですが、近年の分析技術の進展に伴い、D体のアミノ酸も生体内に存在し、さまざまな機能を担うことが明らかにされてきました。ThrとIleは、その他のアミノ酸とは違い、2つの不斉炭素を持つことから、4種類の立体異性体(DL-formとDL-*allo*-form)が存在します[図1(a)]。その中でも、DL-*allo*-Ileは、抗菌活性やがん細胞の増殖抑制を示す生理活性ペプチドに含まれることや[図1(b)]、指定難病であるメープルシロップ尿症のバイオマーカーとして注目されていることから、これらの異性体を含めたDL-アミノ酸を分離・識別する手法の確立が急務となっています。



現在、DL-ThrとDL-*allo*-Thrは、その他のDL-アミノ酸と同様に、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、キラルカラムでの分離、もしくは、キラルラベル化剤により誘導体化(ラベル化)した後、汎用的なC₁₈カラムで分離することができます。しかしながら、DL-IleとDL-*allo*-Ile、同一分子量であるDL-ロイシン(Leu)の分離は非常に難しく、精密に分離することができる分析法は確立されていません。そこで弊社が販売している高感度タグを修飾した光学分割ラベル化剤L-FDVDA[図2(a)]とペンタプロモベンジル基を修飾したコスモシル PBr カラム[図2(b)]を用いて、DL-IleとDL-*allo*-Ile、DL-Leuを分離することを試みました。




■ L-FDVDA を用いてラベル化した DL- アミノ酸の LC-MS 分析

DL- アミノ酸ラベル化キット (ラベル化剤 : D-FDLDA #19942-74) の各種反応溶液を使用し、L-FDVDA で DL- アミノ酸をラベル化した後、C₁₈ カラムを用いて、LC-MS で分析しました。


① サンプル溶液 → ② L-FDVDA 溶液 ③ 反応開始液 → 攪拌 5秒 → ④ 脱ラベル化液 (側鎖用) → 攪拌 5秒 → ⑤ 反応停止液 → ⑥ 希釈 → HPLC または LC-MS 分析

※ DL- アミノ酸ラベル化キット (ラベル化剤 : D-FDLDA #19942-74) と同様のラベル化方法です。
Marfey's 試薬と同様の方法でラベル化することも可能です。Carlsberg Res. Commun. 1984, 49, p. 591-596. をご参照ください。

図 3. L-FDVDA を用いた DL- アミノ酸のラベル化プロトコール

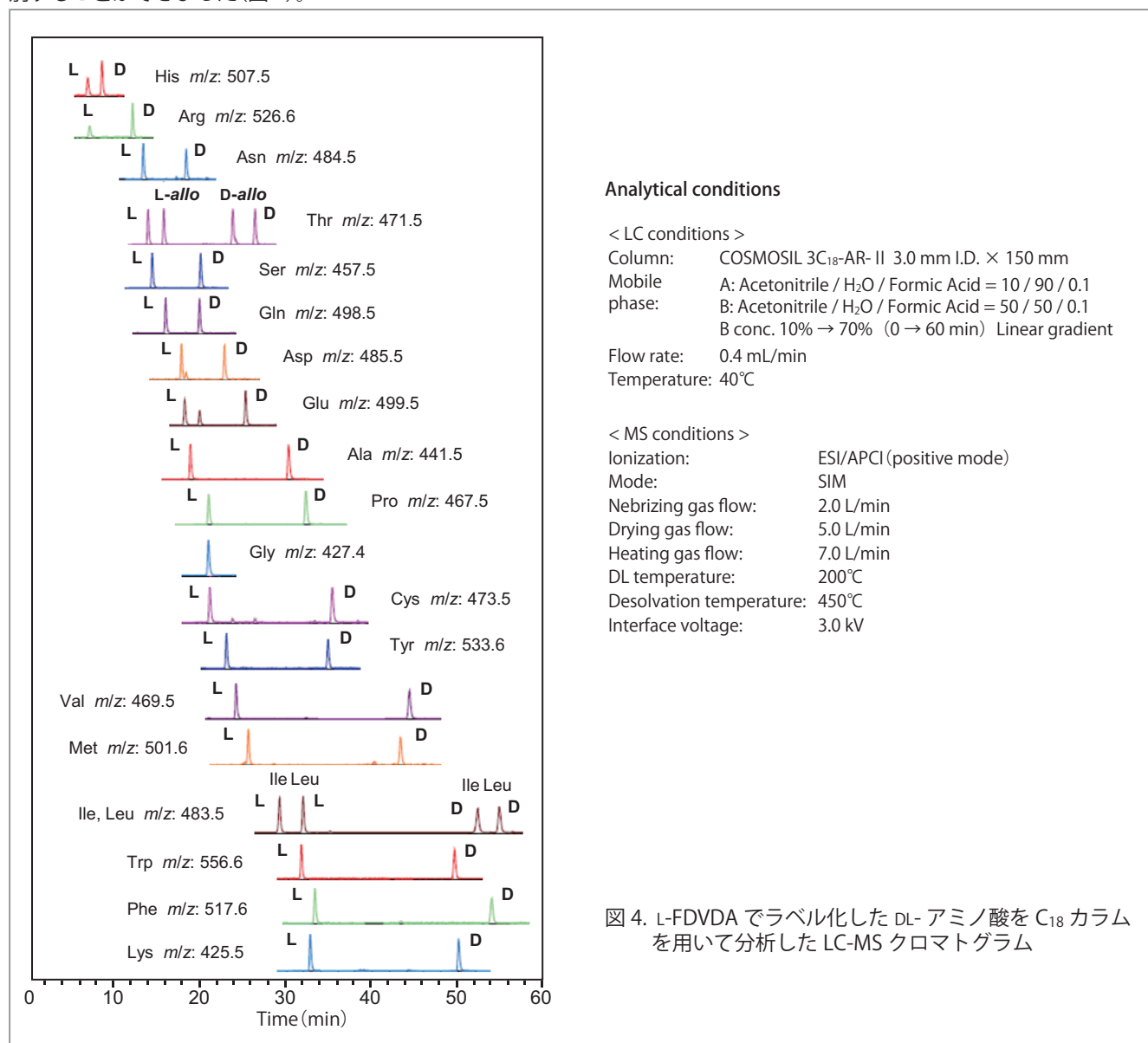


L-FDVDA を用いてアミノ酸をラベル化する際の注意点を動画で説明しています。QR コードからアクセスください。



L-FDVDA を用いたアミノ酸のラベル化手順

図 3 に示すラベル化のプロトコールにより、DL- アミノ酸を L-FDVDA を使用しラベル化することで、DL-*allo*-Thr を含めた 20 種類の DL- アミノ酸およびグリシン (Gly) の 41 個のアミノ酸を、汎用される C₁₈ カラムを用いて、LC-MS により分離・識別することができました (図 4)。



■ PBr カラムを用いた DL-Ile と DL-allo-Ile の分離・識別

C₁₈ カラムでは DL-Ile と DL-allo-Ile のピークが重なり、分離することができませんでしたが、コスモシル PBr カラムに変更することで DL-Ile と DL-allo-Ile、同一分子量である DL-Leu を分離・識別することができました。L-FDVDA では、L-Ile と L-allo-Ile はベースライン分離することはできませんでしたが、ラベル化剤を D-FDLDA (DL-アミノ酸ラベル化キット)に変更することで、溶出順が逆になり分離が改善しました(図5)。

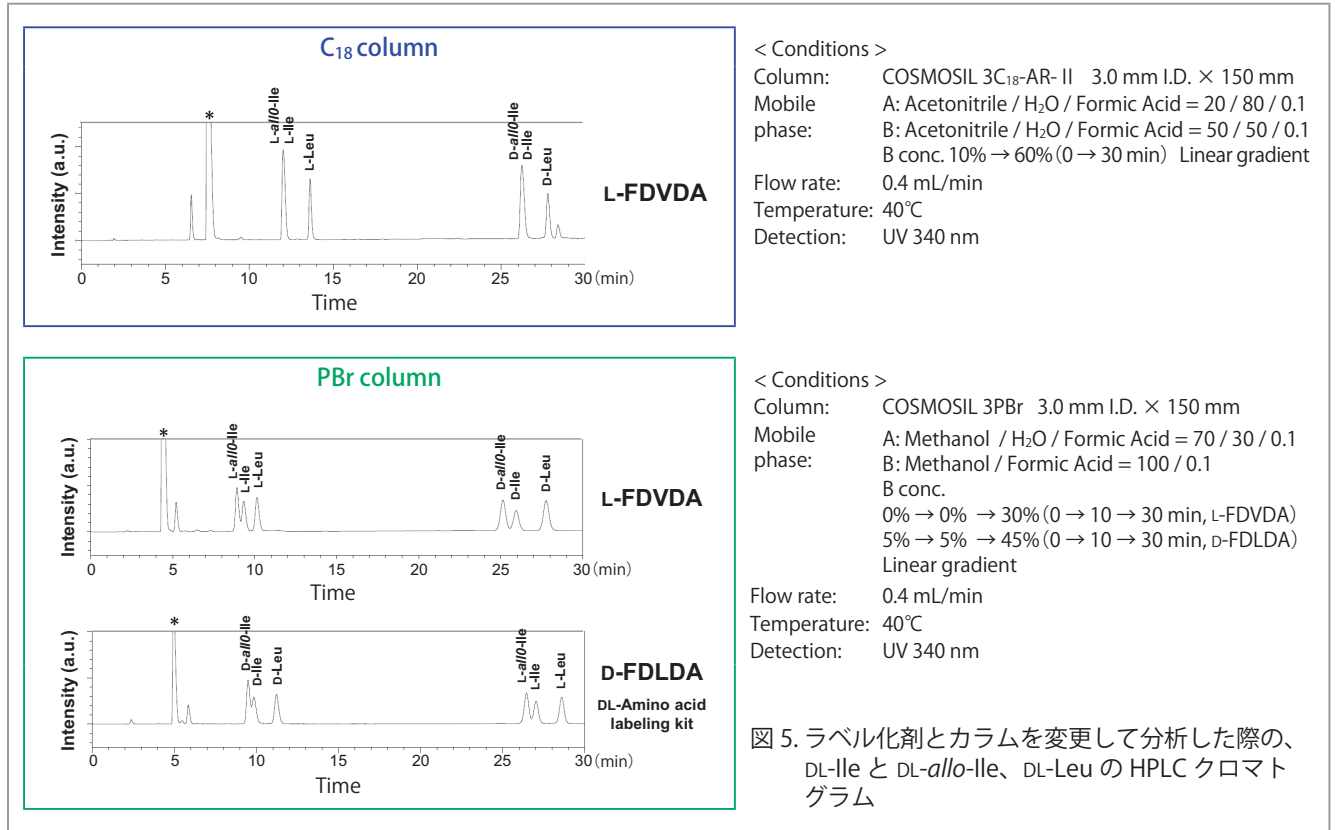


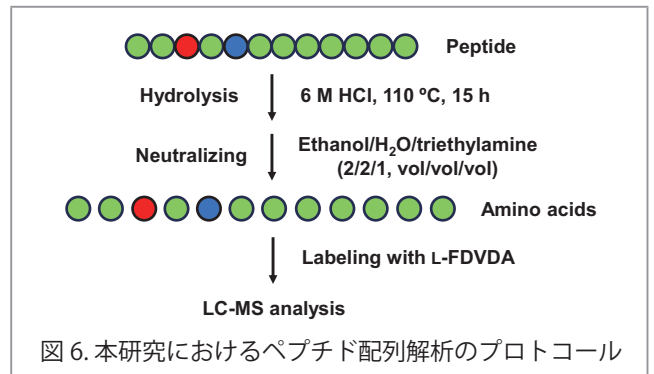
図5. ラベル化剤とカラムを変更して分析した際の、DL-Ile と DL-allo-Ile、DL-Leu の HPLC クロマトグラム

■ Thr と Ile の立体異性体を有するペプチドの配列解析

Thr と Ile の立体異性体を有する ShK 毒素の部分配列をモデルに、Thr と Ile の立体異性体を異なる組み合わせで有する 4 種類のペプチドを、Fmoc 固相合成法により合成しました(表1)。合成したペプチドを 6 M の塩酸を用いて、110°C で 15 時間加水分解し、中和処理を行った後、図3の方法でラベル化しました。

表1. Thr と Ile の立体異性体を有する ShK 毒素の部分配列

Peptide	Sequence
Fragment 1	H-Arg-Cys- ³ D-Ile-Asp- ⁵ D-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-NH ₂
Fragment 2	H-Arg-Cys-D-Ile-Asp-D-allo-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-NH ₂
Fragment 3	H-Arg-Cys-D-allo-Ile-Asp-D-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-NH ₂
Fragment 4	H-Arg-Cys-D-allo-Ile-Asp-D-allo-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-NH ₂



加水分解時の注意点

- ☞ 加水分解操作の際は、コンタミネーションを防ぐため、必ず手袋を着用してください(タンパク質成分の混入を防止)。
- ☞ ペプチドの配列によっては、分解しづらい場合があります。ペプチドの未分解物由来のピークが確認された場合は、加水分解時間を長くしてください。

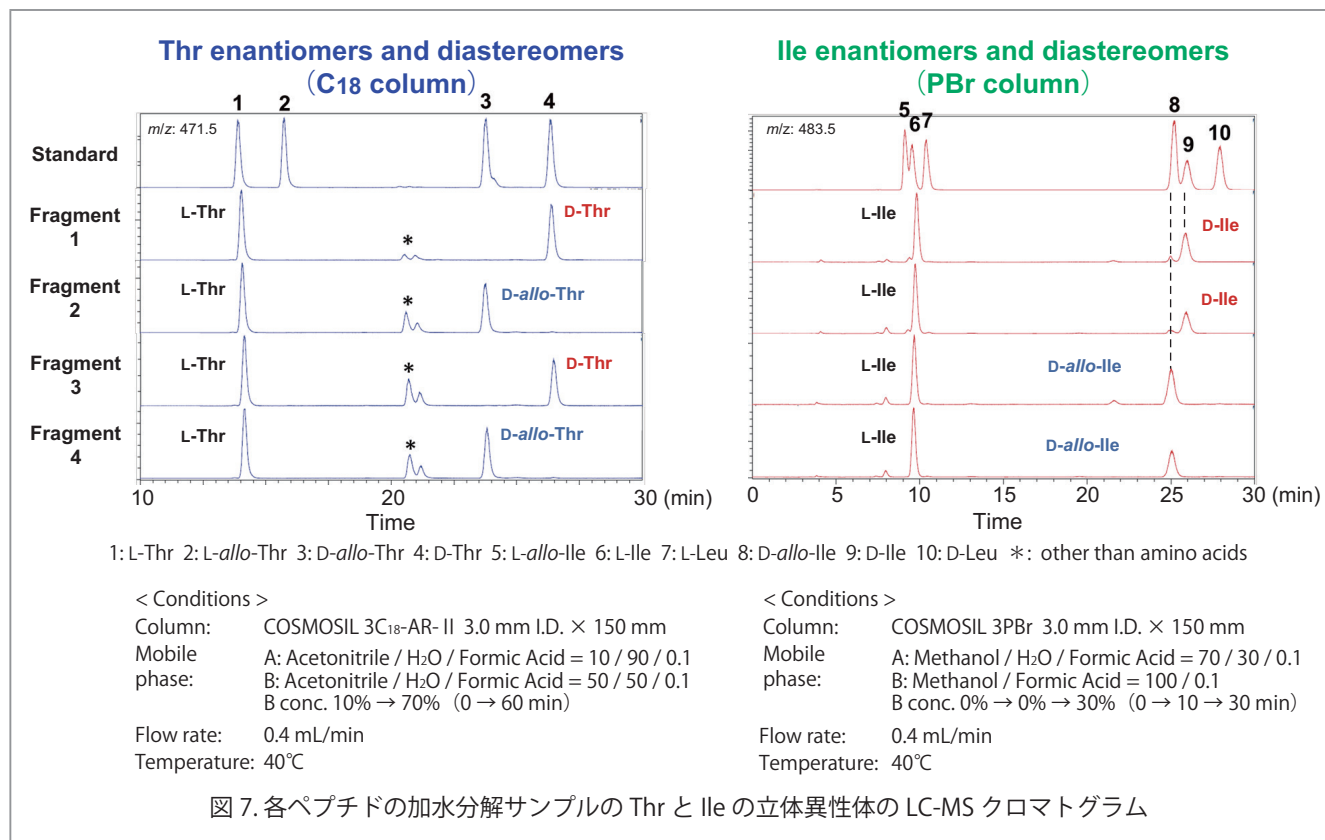


アミノ酸ラベル化前のペプチドの加水分解方法

サンプルを加水分解する際の注意点は動画で説明しています。
QRコードからアクセスください。



ラベル化した各ペプチドの加水分解サンプルを LC-MS で解析したところ、各ペプチドの Thr と Ile の立体異性体を精密に分離・識別することができました(図7)。その他アミノ酸の LC-MS の結果は、論文の Supplementary Information をご参照ください。※ Ile の立体異性体以外の DL-アミノ酸は各アミノ酸同士でピークが重なるため、C₁₈カラムで分析することを推奨します。



本分析法は、血漿や食品中の遊離アミノ酸のラセミ化やエピメリ化だけでなく、生理活性を有するタンパク質やペプチド中の、Thr と Ile の立体異性体を含む DL-アミノ酸を検出できると考えられます。そのため、メープルシロップ尿症や、Ile 立体異性体をバイオマーカーとした診断法、微量の新規生理活性タンパク質やペプチドの高感度配列解析などの研究への利用が期待できます。

参考文献

Ozaki M, Shimotsuma M, Kuranaga T, Kakeya H, Hirose T. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 2023;71: 824-831.

本研究で使用した製品

製品名	メーカー / 規格	製品番号	容量 / サイズ 内径 × 長さ (mm)	価格
1-フルオロ-2,4-ジニトロフェニル-5-L-バリン-N,N-ジメチルエチレンジアミンアミド(L-FDVDA)	SP (高速液体 クロマトグラフ用)	20363-24	50 mg	20,000
DL-アミノ酸ラベル化キット		19942-74	100 tests	30,000
コスモシール 3PBr パックドカラム		19352-91	3.0 mm I.D. × 150 mm	68,000
コスモシール 3C ₁₈ -AR-II パックドカラム		21782-91	3.0 mm I.D. × 150 mm	48,000
ギ酸		08965-82	25 mL	5,450
メタノール		21929-81	1 L	2,000
アセトニトリル		00430-41	1 L	8,000
マイティーバイアル No.02	アズワン	5-115-02	1 箱 (200 本入り)	22,000

COSMOSIL
 コスモシールはナカライテスク株式会社の登録商標です。
 QR コードは株式会社デンソーウェブの登録商標です。

ご注意 試験・研究用以外には使用しないでください。

※掲載内容は予告なく変更になる場合があります。
 ※掲載価格は 2024 年 6 月現在のものです(消費税は含まれていません)。

nacalai tesque
 The quality for certainty.

● URL
<https://www.nacalai.co.jp/cosmosil/>

■ 販売取扱店

● 価格・納期のご照会
試薬はご注文
 0120-489-552

ナカライテスク株式会社
 〒604-0855 京都市中京区二条通烏丸西入東玉屋町498

● 製品に関する技術的なご照会
<https://www.e-nacalai.jp/URL/?P=Contact>
 TEL:075-211-2703