

LC/MS/MS によるアレルギー性タンパク質由来ペプチドの分離

Separation of Peptides derived from Allergenic proteins by LC/MS/MS

食物アレルギーの検査方法として、定量法には ELISA 法、定性法には PCR 法が広く使用されています。いずれも簡便な方法ですが、ELISA 法は、対象アレルギーに限られるために一斉分析が難しく、交差反応による誤検出があることが知られています。また、PCR 法は、DNA を検出するためアレルギー性タンパク質を直接測定出来ない等の課題が指摘されています。

そのため、複数のアレルギーを総括的に検出する方法の確立を目的として、アレルギー性タンパク質由来のペプチドを分析種とした LC/MS による一斉分析法が検討されています。また、アレルギーの品種の違いによる誤検出を防ぐため、品種間で共通して検出される特異的なペプチドの探索も進められています。本報では、乳及び卵の代表的なアレルギー性タンパク質に由来するペプチドを分離検出した例を紹介します。

$\alpha$ -カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、オボアルブミンの3種類のアレルギー性タンパク質を対象とし、還元アルキル化した後にトリプシン消化したものを測定試料としました。実試料へ適用した場合の定性能を高める目的で、アレルギー性タンパク質 1 種類に対して 6 種類のペプチドを分析種とし、ペプチド 1 種類あたり 1~4 組の SRM トランジションを設定しました。分析カラムには、TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m を使用し、0.1% ギ酸を含む水/アセトニトリルのグラジエント溶離条件で分析を行いました。

各ペプチドの SRM クロマトグラムを図 1 に示します。また、ペプチドのアミノ酸配列、溶出時間及びシグナルの直線範囲(酵素消化前のアレルギー性タンパク質の濃度換算)を表 1 に示します。いずれの分析種も、3 オーダーの濃度範囲での直線性が確認出来ました。

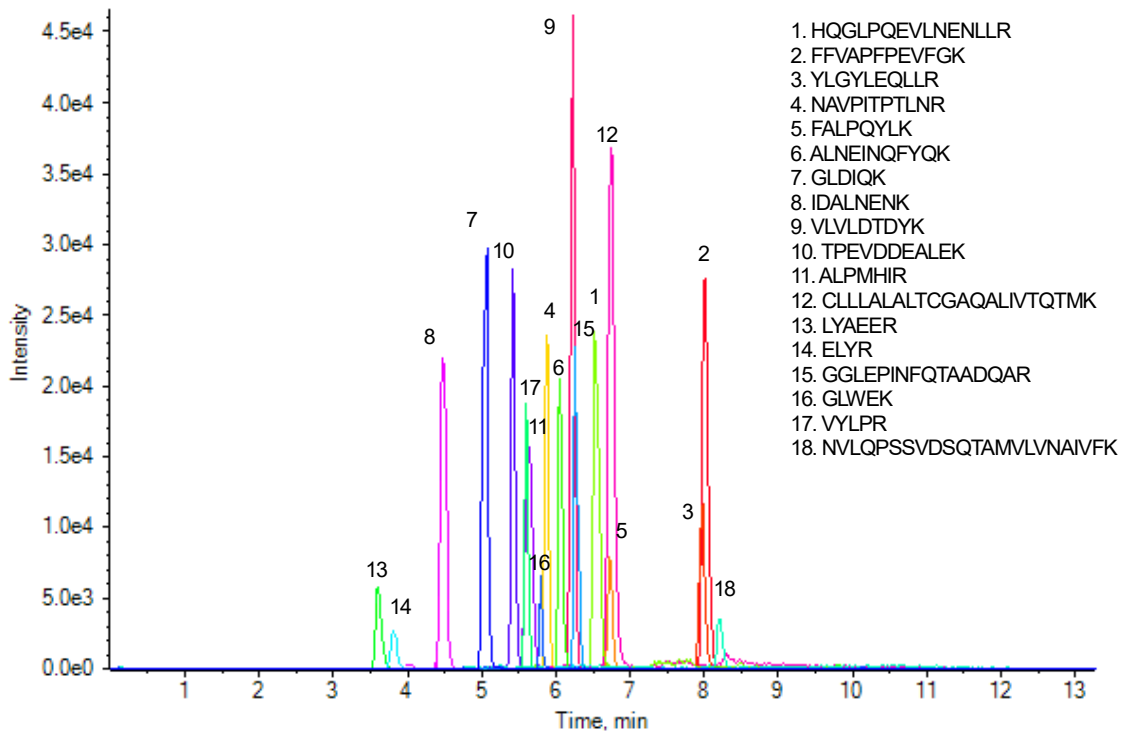


図 1 3 種類のアレルギー性タンパク質に由来するペプチドのクロマトグラム

表 1 における太字斜体のトランジションのクロマトグラムを表示

表1 分析種としたペプチドの溶出時間、トランジション及び定量範囲

α-Casein					β-Lactoglobulin				
Peptides	R.t. (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Calibration range(mg/L)	Peptides	R.t. (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Calibration range(mg/L)
HQGLPQEVLNENLLR	6.54	<b>880.8</b>	y15(+2) <b>880.5</b> y11(+1) 1324.7 b4(+1) 436.2	0.5-500 5-1,000 10-1,000	GLDIQK	5.05	<b>337.2</b>	y4(+1) <b>503.3</b> y2-17(+1) 258.1 y3(+1) 388.3	0.05-500 0.2-500 0.5-500
FFVAPFPEVFGK	8.01	<b>692.9</b>	y8(+1) <b>920.5</b> y9(+1) 991.5 y10(+1) 1090.6	0.05-500 0.2-500 0.2-500	IDALNENK	4.47	<b>458.7</b>	y6(+1) 688.4 y7(+1) <b>803.4</b> b2(+1) 229.1 y4(+1) 504.2	0.1-500 0.1-500 0.5-500 0.2-500
YLGYLEQLLR	7.97	<b>634.4</b>	y6(+1) 771.5 y8(+1) <b>991.6</b> b2(+1) 277.2 b4(+2) 249.1	0.5-500 0.1-500 0.5-500 0.5-500	VLVLDTDYK	6.23	<b>533.3</b>	y6(+1) 754.4 y7(+1) <b>853.4</b> b2(+1) 213.2 y5(+1) 641.3	0.2-500 0.1-500 0.5-500 0.5-500
NAVPIPTLNR	5.88	<b>598.3</b>	y8(+2) <b>456.3</b> b3(+1) 285.2	0.5-500 0.5-1,000	TPEVDDEALEK	5.42	<b>623.3</b>	y7(+1) 819.4 y8(+1) 918.4 y9(+1) 1047.5 y10(+2) <b>572.8</b>	0.5-500 1-1,000 2-1,000 1-1,000
FALPQYLK	6.73	<b>490.3</b>	y5(+1) <b>648.4</b> y6(+1) 761.5 b2(+1) 219.1	0.2-1,000 0.5-1,000 0.5-1,000	ALPMHIR	5.63	<b>419.2</b>	y5(+2) <b>327.2</b> y4(+1) 556.3 y3(+1) 426.3 y1-18(+1) 157.1	0.05-500 0.5-500 0.5-500 0.5-500
ALNEINQFYQK	6.06	<b>684.4</b>	y6(+1) 827.4 y7(+1) 940.5 y9(+1) <b>1183.6</b>	10-1,000 1-1,000 1-1,000	CLLLALALTCGAQALIV TQTMK	6.74	<b>1138.1</b>	y22(+2) <b>1138.1</b>	0.5-500

Ovalbumin				
Peptides	R.t. (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Calibration range(mg/L)
LYAEER	3.59	<b>390.7</b>	y4(+1) <b>504.2</b> y5(+1) 667.3	1-1,000 2-1,000
ELYR	3.81	<b>580.3</b>	y4(+1) <b>580.3</b>	1-1,000
GGLEPINFQTAADQAR	6.26	<b>844.4</b>	y16(+2) <b>844.4</b> y12(+2) 666.3 y12(+1) 1331.7	0.5-1,000 5-1,000 5-1,000
GLWEK	5.79	<b>632.3</b>	y5(+1) <b>632.3</b>	1-1,000
VYLPR	5.60	<b>324.2</b>	y3(+1) 385.3 y4(+1) <b>548.3</b> y2(+1) 272.2	1-1,000 0.5-500 2-1,000
NVLQPSSVDSQTAMV LVNAIVFK	8.20	<b>1230.7</b>	y23(+2) <b>1230.7</b>	1-1,000

表2 分析条件

Column : TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  150 mm, 3  $\mu$ m)  
 Eluent : A ; 0.1 % HCOOH in H<sub>2</sub>O  
 B ; 0.1 % HCOOH in CH<sub>3</sub>CN  
 Gradient : B conc. (0 min) 10 %  $\rightarrow$  (15-17 min) 100 %  $\rightarrow$  (17.1-20 min) 10 %  
 Flow rate : 0.2 mL/min  
 Column temp. : 40  $^{\circ}$ C  
 Injection volume : 2  $\mu$ L  
  
 Instrument : TripleTOF 5600\* (SCIEX)  
 Ionization : ESI  
 Polarity : Positive

品番	品名	粒子径	カラムサイズ
0021810	TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m	3 $\mu$ m	2.0 mm I.D. $\times$ 150 mm



※ “TSKgel”は、日本における東ソー株式会社の登録商標です。  
 ※ 掲載のデータ等は、その数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください。