

Application Note

Wyatt Technology Corporation

SEC-MALS を用いたインシュリン 会合状態の解析

P. Wahlund¹, D. Roessner² and T. Jocks²

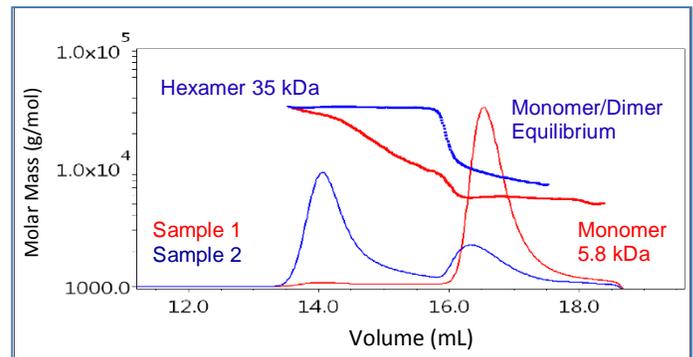
日本語訳：昭光サイエンティフィック株式会社

概要

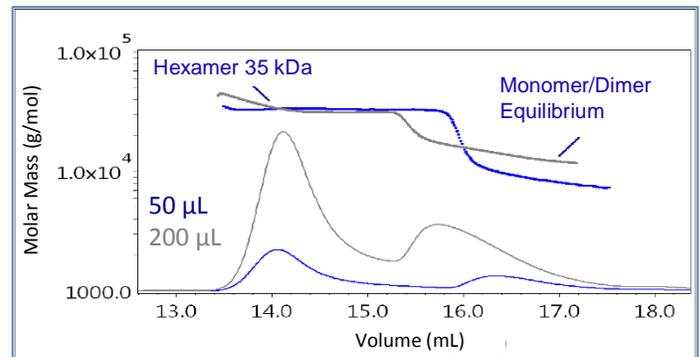
インシュリンは、最も重要な哺乳類のホルモンの 1 つであり、体内の血糖値の制御を含む、多くの代謝機能を調節しています。健康な状態では、インシュリンは膵臓のランゲルハンス島で産生されて蓄積され、代謝状態に依存して放出されます。糖尿病の患者はインシュリンを十分量産生することができず、経口または皮下注射により投与する必要があります。今日ではヒトインシュリンが遺伝子工学で改変された微生物によって工業的に大量に生産されています。

生理的条件下では、インシュリンは亜鉛イオン存在下でヘキサマーを形成します。膵臓ではこのホルモンは亜鉛複合体としても貯蔵されています。従って薬理的な調製においては、亜鉛を加えて複合体を形成させることができます。インシュリンの調製においては安全で効果的な投与が保証されるように、特定の製剤中に、どのオリゴマーが存在しているかを調べるのが非常に重要です。

本アプリケーションノートでは、カラムクロマトグラフィー (SEC/GPC) に多角度光散乱検出器 (MALS)、動的散乱検出器 (DLS) 及び示差屈折率検出器 (RI) を接続し、インシュリンのモノマー、ダイマー、ヘキサマー及び大きな凝集体を検出する方法を紹介します。このアプローチにより、各バッチの製剤を網羅的に測定して調べ、患者の為に最適な調製法、貯蔵法、投与方法を決めることができます。



2つの異なるバッファー組成で調整されたインシュリンを SEC-MALS 測定した結果 (分子量 vs 溶出時間のプロット) です。試料 1 は安定なモノマーに少量のヘキサマーを含みますが、試料 2 は動的平衡にあるモノマー、ダイマーと安定なヘキサマーが存在していることが判ります



注入量を変えて試料 2 の SEC-MALS 測定をした例です。濃度依存性なモノマー・ダイマーの動的平衡を示しています。異なる注入量は全体として異なる濃度を与え、その結果モノマーとダイマーが異なる割合で存在していることが判ります。

¹ Novo Nordisk A/S, Måløv, Denmark

² Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach, Germany



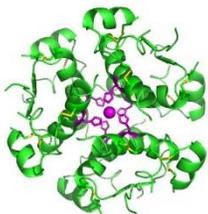
SHOKO
SCIENTIFIC



WYATT
TECHNOLOGY

序論

タンパク質やペプチドの分析では、測定条件下で分子がモノマーかダイマーもしくはより大きな凝集体を形成しているかが、しばしば問題になります。この問題は化学量論を解析することにより、タンパク質が生物的に活性状態であるか否かを推定することができます。



そのような決定の第一段階では、分子種の分離とその性状解析を行うのが一般的で、その為によく用いられている手法が、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) です。しかしながら、SEC は分子を大きさ順に分離するものであり、必ずしもそのまま

厳密的な分子量の決定にはなりません。すなわち、分子量は必ずしも溶出時間の関数ではなく、流体力学的な性質に依存するからです。

この限界を克服する技術が多角度光散乱法 (MALS) です。MALS は分子の構造に関して何の仮定も行わず、分子量標準試料も必要とせず、分子量を決定できます。その値は、第一原則に基づく測定であり、絶対値です。MALS 検出器は DLS モジュールと接続することができ、オンラインで分子の流体力学的半径を得ることもできます。更に CG-MALS (Composition Gradient-MALS) の測定もインシュリンの会合状態の検出に有用であることが示されています。(1, 2)

ここで報告する実験の材料はホルモンのインシュリンです。インシュリンは哺乳動物における血糖値、細胞の増殖及び脂質代謝の制御に重要な役割を果たしますが、ここで挙げた機能は全体のごく一部を示しているにすぎません。1921 年のインシュリンの発見は糖尿病の治療における革命の出発点となりました。ヒトのインシュリンは 21 及び 30 アミノ酸の 2 つのペプチド鎖からなり、全

体の分子量は 5.8kDa です。ヒトのインシュリンは自己会合し、亜鉛イオン存在下ではヘキサマーを形成します。ヘキサマー当たり亜鉛イオンは 2 個です。インシュリンは膵臓のβ細胞に亜鉛複合体として貯蔵されます。製剤における濃度では、インシュリンは通常、自己会合して亜鉛の添加によりさらに安定なヘキサマーを形成しています。輸送によって希釈されるとヘキサマーは解離して、血液中ではモノマーとなります。従って、オリゴマー化の研究は製剤の観点からも薬理的観点からも興味あるところ です。

材料と方法

実験はアイソクラティックポンプ式の HPLC システムを用いて行いました。検出器は、UV (280nm)、多角度光散乱検出器 [DAWN HELEOS](#) (DLS モジュール Wyatt [QELS](#) 付き)、示差屈折率検出器 [Optilab TrEX](#) を接続し、SEC-MALS 測定を行いました。カラムは Superose 12 300/10 (GEヘルスケア) を用いています。移動相は 10mM Tris, 140mM NaCl, 2mM Phenol 及び 200ppm NaN₃(pH7.7)を用いて、以下 3 種の 0.6mM インシュリンを含む試料を解析しました。

試料 1 : 亜鉛を含まないインシュリンアナログ

試料 2 : 0.1mM 亜鉛を含むヒトインシュリン

試料 3 : 0.3mM 亜鉛を含むヒトインシュリン

結果と考察

タンパク質濃度の増加に伴う可逆的なタンパク質の会合、すなわち、自己集合はよく知られた効果で、モノクローナル抗体やインシュリンで見られることがよく知られています (3)。インシュリンの場合、ダイマーと他のオリゴマーを形成し、それらは SEC によって分離することができ、光散乱法で検出することができます (4, 5)。ここでは異なるインシュリン溶液を SEC-MALS によって性状解析できることを示しています。

試料 1 の測定結果は、クロマトグラム全体にわたって分子量とともに示されています (図 1) 主要成分であるモノマーの分子量を示すピークはヘキサマーのマイナーピークからよく分離されています。UV 検出器では明確ではありませんが、光散乱のシグナルはモノマーピークからヘキサマーまでの分子量範囲をカバーしています。光散乱は大きな分子ほど非常に感度が高くなるため、UV

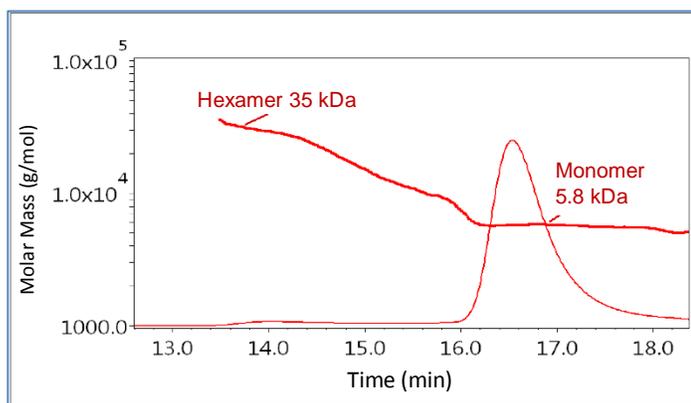


図 1. 試料 1 の分子量と溶出時間のプロット、クロマトグラムは UV(280nm)、分子量は光散乱と RI 検出器から算出したものです。

シグナルでは、ごく微量に存在することしか確認できないヘキサマーのピークを容易に検出できます。

さらに、亜鉛を加えると平衡はヘキサマー側にシフトすることが試料 3 の測定結果により判りました (図 3) 試料 3 は、もう 1 つの分子種がインシュリン分子の 12 量体として同定されています。これは分子量が 70kDa で、ごく微量にしか存在していませんが、光散乱検出器では明らかなシグナルとして検出できます。

SEC-MALS 測定を行うことで自己会合の傾向を知ることができます。ここでは同じ試料溶液を 50 μ L、200 μ L と注入量を変えて注入することで、試料の注入容量の効果を調べました。

試料注入量を増加させると明らかに試料 2 の平衡に影響を与えました (図 4 を参照)。インシュリン濃度が高くなると、モノマー・ダイマーの平衡はダイマー側にシフトします。50 μ L 注入した場合には最も小さな分子種に対応するのはモノマーで、200 μ L 注入した場合には最も小さな分子種はダイマーでした。ヘキサマーの分画は

より大きなオリゴマーに会合する傾向は見られませんでした。

試料 3 においては、基本的に注入量の違いによる影響は見られませんでした。(図 5 を参照ください) これは 0.3mM 亜鉛の存在がヘキサマーを固定し、50 と 200 μ L 注入の双方の濃度で同一の分子量が検出されたものと考えられます。この測定により、ヘキサマーの自己会合挙動はモノマーのそれとは明確に異なることが明らかになりました。

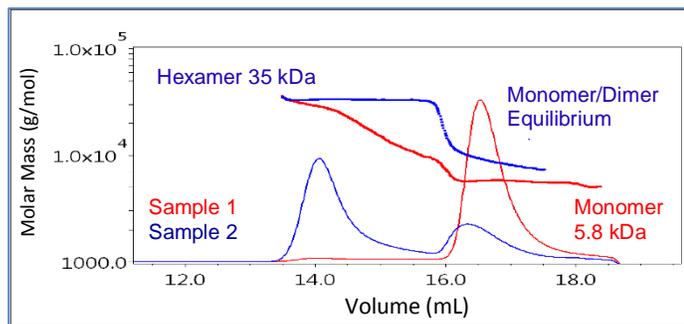


図 2: 試料 1 と 2 (モノマー、ダイマー、ヘキサマー) の分子量と溶出時間のプロット、クロマトグラムは UV(280nm)、分子量は光散乱と RI 検出器から算出しています

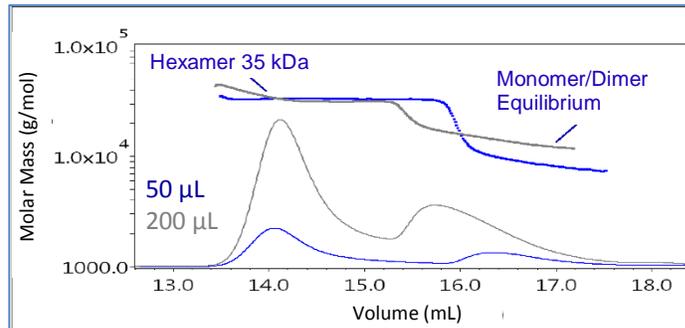


図 4: 試料 2 の分子量と溶出時間のプロット。クロマトグラムは UV(280nm)、分子量は光散乱と RI 検出器から算出しています。

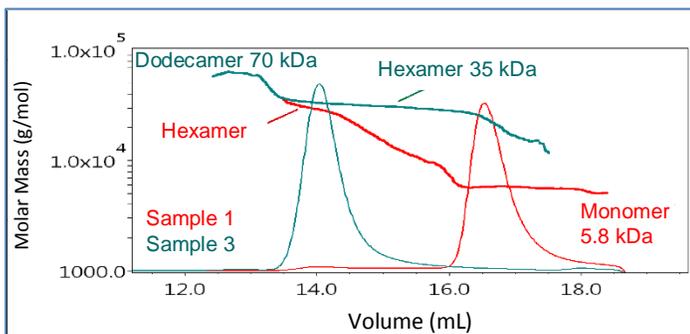


図 3: 試料 1 と 3 の分子量と溶出時間のプロット。クロマトグラムは UV(280nm)、分子量は光散乱と RI 検出器から算出しています。

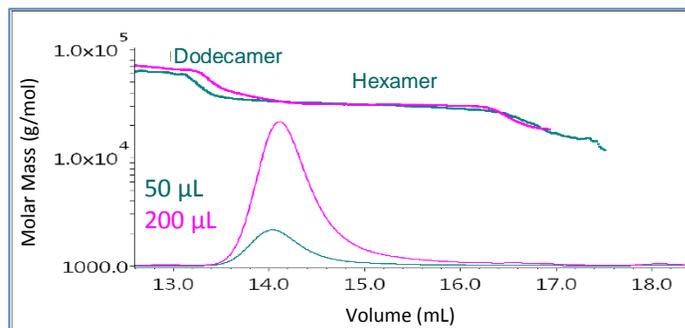


図 5: 試料 3 の分子量と溶出時間のプロット。クロマトグラムは RI 検出器、UV は高濃度試料のため、振り切れました。分子量は光散乱と RI 検出器から算出しています。

結論

多角度光散乱検出器は抗体のような大きなタンパク質の会合を調べるのに適しているだけでなく、より低分子のペプチドの測定においても有効なツールになります。タンパク質やペプチドは治療用途での需要が高まりつつあります。そのような状況の中、これらの分子の性状解析の方法として光散乱測定的重要性が高まっています。

参考文献

1. Arun K. Attri, Cristina Fernández, Allen P. Minton. pH-dependent self-association of zinc-free insulin characterized by concentration-gradient static light scattering - *Biophys. Chem.*, Vol. 148, 28-33, 2010.
2. Arun K. Attri, Cristina Fernández, Allen P. Minton. Self-association of Zn-insulin at neutral pH: Investigation by concentration gradient-static and dynamic light scattering - *Biophysical J.*, Vol. 148, 23-27, 2010.
3. D. Brett Ludwig, Jonathan N. Webb, Cristina Fernandez, John F. Carpenter, Theodore W. Randolph. Quaternary Conformational Stability: The Effect of Reversible Self-Association on the Fibrillation of Two Insulin Analogs - *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 108, 2359-2370, 2011.
4. M. H. Jensen, P.-O. Wahlund, J. K. Jacobsen, B. Vestergaard, M. van de Weert, S. Havelund. Self-association of long-acting insulin analogues studied by size exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering - *Journal of Chromatography B*, 879(28), 2945-2951, 2011
5. I. Jonassen, S. Havelund, T. Hoeg-Jensen, D. B. Steensgaard, P.-O. Wahlund, U. Ribel. Design of the Novel Protraction Mechanism of Insulin Degludec, an Ultra-long-Acting Basal Insulin - *Pharmaceutical Research*, 29(8), 2104-2114, 2012

