

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年2月1日 (01.02.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/013701 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 30/88 (2006.01) *G01N 30/86* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/315549
- (22) 国際出願日: 2006年7月31日 (31.07.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2005-221994 2005年7月29日 (29.07.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社 (EISAI R & D MANAGEMENT CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東京都文京区小石川四丁目6番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石濱 泰 (ISHI-HAMA, Yasushi) [JP/JP]; 〒9970017 山形県鶴岡市大宝寺日本国374-62 サンライズ日本国302 Yamagata (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR DETECTION OF PEPTIDE SEQUENCE BASED ON CHROMATOGRAPHY RETENTION TIME

(54) 発明の名称: クロマトグラフィー保持時間によりペプチド配列を検定する方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for verifying the reliability of an amino acid sequence of a peptide. The method comprises the steps of comparing an estimate $\log k_0$ value of a peptide of interest with a found $\log k_0$ value of the peptide and verifying the reliability of the deduced amino acid sequence based on the difference in the comparison, wherein an estimate $\log k_0$ value means an estimate value of $\log k_0$ which is a measure of the retention of the peptide and is calculated based on a deduced amino acid sequence of the peptide, and a found $\log k_0$ value is calculated based on the LC retention time.

(57) 要約: 本発明は、ペプチドのアミノ酸配列の確かさを検証する方法を提供することを目的とする。本発明は、推定されたアミノ酸配列から計算して得られるペプチドの保持尺度 $\log k_0$ の推定値を、LC保持時間から計算される $\log k_0$ の実測値と比較し、その差異から予想したアミノ酸配列の確かさを検定する方法を提供する。



WO 2007/013701 A1

明 細 書

クロマトグラフィー保持時間によりペプチド配列を検定する方法

5 技術分野

本発明は、予想されたアミノ酸配列から計算される液体クロマトグラフィー分析における保持尺度 ($\log k_0$) の推定値と、実際の保持時間から変換される保持尺度の実測値とを比較して、予想されたアミノ酸配列の確かさを検定する方法に関する。

10

背景技術

近年、液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) の発展により、タンパク質消化ペプチド混合物の検出・同定が簡便に行えるようになってきた。この分析では、個々のペプチドについて、その液体クロマトグラフィー (以下「LC」と称する場合がある) から保持時間の情報が得られ、質量分析 (以下「MS」と称する場合がある) から質量・電荷比(m/z)の情報が得られ、そして、MS/MS スペクトルからペプチドの部分配列の情報が得られる。これらの情報のうち、質量・電荷比(m/z)の情報及び部分配列の情報は、タンパク質同定エンジンなどにより解析されて、ペプチド配列の同定に次いでタンパク質の同定に至る。

しかし、試料に含まれるペプチド数が非常に多い場合には、すべてのペプチドについて MS/MS スペクトルを取得できない場合があり、試料中のすべてのペプチドの同定は困難である。そのような場合に、あらかじめ過去の LC 分析におけるペプチドの保持時間及び LC-MS/MS 分析による同定結果を登録しておくことによって、保持時間と質量の情報から MS/MS スペクトル無しでタンパク質を同定できることが報告されている (E.F. Strittmatter, P.L. Ferguson, K. Tang, R.D. Smith, J Am Soc Mass Spectrom 14 (2003) 980)。また、LC-MS/MS により、タンパク質消化ペプチド混合物の同定を行う際、ペプチド同定のための

付加的な情報として、保持時間の推定値と実測値の差を用いる例も報告されている (K. Petritis, L. J. Kangas, P. L. Ferguson, G. A. Anderson, L. Pasa-Tolic, M. S. Lipton, K. J. Auberry, E. F. Strittmatter, Y. Shen, R. Zhao, and R. D. Smith, *Anal Chem* 75 (2003) 1039)。

- 5 これまでに、ペプチドの逆相 LC における保持時間はアミノ酸組成からある程度は推定が可能であることが知られているが (Meek, J. L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1632-6 (1980))、一般的に LC の保持時間は再現性を保つことが難しいといわれている。同じ試料を複数回分析して得られたデータについて遺伝的アルゴリズムを用いて、個々のペプチドが同じ保持時間になるように補正をすることにより、再現性が向上することが報告されている (K. Petritis, L. J. Kangas, P. L. Ferguson, G. A. Anderson, L. Pasa-Tolic, M. S. Lipton, K. J. Auberry, E. F. Strittmatter, Y. Shen, R. Zhao, and R. D. Smith, *Anal Chem* 75 (2003) 1039)。しかし、この方法では、新たに試料を分析するたびに、今までの全データと合わせて改めて補正をかけなおす必要があり、また、同じ試料もしくは組成のよく似た試料にしか適用できないという問題点があった。
- 10 15

- LC のグラジエント分析における保持時間は、流速やグラジエントの傾き、移動相の調製バラツキや配管の長さなどに依存しており、特に流速 $1 \mu\text{L}/\text{min}$ 以下で行われるナノ LC では、保持時間自体の再現性を保つのは容易ではなく、日内で連続分析することによってのみ高い再現性を得ることが可能である。前述の変
- 20 動因子に依存せず、移動相と固定相にのみ依存する保持パラメータが簡便に得られれば、保持情報を高精度で得ることができるため、タンパク質の同定精度やスループットの精度が向上することが期待された。

発明の開示

- 25 本発明の課題は、逆相 LC の保持時間を、ペプチドのアミノ酸組成に依存し、流速やグラジエントの傾き、配管の長さなどの LC 分析条件に依存しない保持尺度に変換する方法を提供することにある。

別の態様において、本発明の課題は、ペプチドのアミノ酸組成と保持尺度との関連を基に、推定されたアミノ酸配列の確かさを検証する方法を確立することにある。

また、別の態様において、本発明の課題は、MS を用いてペプチドのアミノ酸配列を決定し同定する際に、同定エンジンから出力される候補リスト中のアミノ酸配列が、正しいか否かを検定するための情報を LC 分析における保持時間から得ることにある。

本発明者は、LC におけるペプチドの保持時間はアミノ酸組成からある程度は推定が可能であること、また、LC-MS/MS によりタンパク質消化ペプチド混合物の同定を行う際、ペプチド同定のための付加的な情報として保持時間の推定値と実測値の差を用いている例があることから、LC における保持時間を普遍的で再現性の高い保持尺度に変換し、その推定値と実測値の差を解析すれば、ペプチドの同定精度を上げることができると考えた。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、逆相 LC のグラジエント分析においてペプチドの保持時間を記述する Stadalius ら (Chromatogr., 296 (1984) 31-59) の LSS (Linear Solvent Strength) 理論に着目した。そして、LSS 理論における $\log k_0$ 値と保持時間の関係式により、保持時間を変換して得られる $\log k_0$ の値が、LC 分析条件に依存しない保持尺度として利用できることを見出した。そして更に、 $\log k_0$ の値がペプチドのアミノ酸組成に依存し、ペプチドのアミノ酸配列が判れば $\log k_0$ の推定値を得ることができることを明らかにした。

また本発明者は、LSS 理論において $\log k$ 値の有機溶媒量に対する変化率として記述される S 値が、ペプチドのアミノ酸組成から導き出せることを見出し、その関係式を明らかにした。

これらの関係式から、本発明者は MS を用いて推定されたペプチドのアミノ酸配列から計算されるアミノ酸組成を元に計算された S 値を用いて、LSS 理論により保持時間から変換された保持尺度 ($\log k_0$) の実測値と、アミノ酸組成と $\log k_0$ との関係から得られる $\log k_0$ の推定値とを比較することにより、推定さ

れたアミノ酸配列が正しいか否かを検定することが可能であることを明らかにし、本発明を完成した。

すなわち本発明は、以下の通りである。

(1) ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときのペプチドのアミノ酸組成と下記式(8)中の S 値との関係を解析する方法であって、

$$\log k = \log k_0 - S \phi \quad (8)$$

[式中、

k は固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数との比であり、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

$\log k_0$ は $\phi=0$ のときの $\log k$ の値であり、

S は当該ペプチドに固有の値である。]

以下の工程：

- 15 (a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する工程、
- (b) 工程(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、S 値及び k_0 値の関係式に代入して、S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値と
- 20 を算出する工程、
- (c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める工程、並びに
- (d) 複数のペプチドについて、工程(b)から得られた S 値と、工程(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式(1)に代入して線形重回帰分析を行って、下記式(1)の各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C を求める工程
- 25 を含む、上記方法。

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

[式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

(2) 工程(b)におけるペプチドの保持時間、 S 値及び k_0 値の関係式が、下記式 (2) から導かれる式、又は式 (2) から導かれる近似式である、(1) に記載の方法。

$$\int_0^{t_g - t_0 - t_D} \frac{d[f^{-1}(\phi)]}{10^{(\log k_0 - S\phi)}} = t_0 - \frac{t_D}{k(a)} \quad (2)$$

5 [式中、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、時間 t と共に下記式 (3) に従って変化するものであり、

$$\phi = f(t) \quad (3)$$

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

10 t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

t_g は当該ペプチドの保持時間であり、

$k(a)$ は移動相中の有機溶媒の初期濃度 a の時の k の値である。]

(3) 工程(c)におけるアミノ酸配列情報が、当該ペプチドを質量分析により分析し、得られた質量情報又はアミノ酸配列情報を基に、当該ペプチドを同定
15 することによって得られた当該ペプチドのアミノ酸配列情報である、(1) または (2) に記載の方法。

(4) ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときのペプチドのアミノ酸組成と下記式 (8) 中の k_0 値との関係を解析する方法であって、

$$20 \log k = \log k_0 - S\phi \quad (8)$$

[式中、

k は固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数との比であり、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

25 $\log k_0$ は $\phi=0$ のときの $\log k$ の値であり、

S は当該ペプチドに固有の値である。]

以下の工程：

- (a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する工程、
- (b) 工程(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、S 値及び k_0 値の関係式に代入して、S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値とを算出する工程、
- (c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める工程、並びに
- (d) 複数のペプチドについて、工程(b)から得られた k_0 値と、工程(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式(4)に代入して線形重回帰分析を行って、下記式(4)の各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D を求める工程を含む、上記方法。

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

[式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

- (5) 工程(b)におけるペプチドの保持時間、S 値及び k_0 値の関係式が、下記式(2)から導かれる式、又は式(2)から導かれる近似式である、(4)に記載の方法。

$$\int_0^{t_g - t_0 - t_D} \frac{d[f^{-1}(\phi)]}{10^{(\log k_0 - S \phi)}} = t_0 - \frac{t_D}{k(a)} \quad (2)$$

[式中、

- ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、時間 t と共に下記式(3)に従って変化するものであり、

$$\phi = f(t) \quad (3)$$

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

- t_g は当該ペプチドの保持時間であり、

$k(a)$ は移動相中の有機溶媒の初期濃度 a の時の k の値である。]

(6) 工程(c)におけるアミノ酸配列情報が、当該ペプチドを質量分析により分析し、得られた質量情報又はアミノ酸配列情報を基に、当該ペプチドを同定することによって得られた当該ペプチドのアミノ酸配列情報である、(4) または(5)に記載の方法。

- 5 (7) ϕ が下記式(5)に従って時間 t と共に直線的に変化する、(2)、(3)、(5)、及び(6)のいずれか一項に記載の方法。

$$\phi = f(t) = \frac{\Delta\phi}{t_G}t + a \quad (5)$$

[式中、

t は時間であり、

- 10 $\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

t_G はグラジエント時間であり、

a は移動相中の有機溶媒の初期濃度である。]

(8) 式(2)から導かれる式が下記式(6)である(7)に記載の方法。

$$t_g = \{t_G / (S\Delta\phi)\} \log \{2.3k_0 t_0 (S\Delta\phi / t_G) + 1\} + t_0 + t_D \quad (6)$$

- 15 [式中、

$\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

t_G はグラジエント時間であり、

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

- 20 t_g は当該ペプチドの保持時間である。]

(9) ペプチドのアミノ酸配列の確かさを検証する方法であって、以下の工程：

(a) ペプチドを、ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときの、ペプチドの保持時間を測定する工程、

(b) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める工程、

(c) 工程(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに(4)～(6)のいずれか一項に記載の方法により求めた各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D であって、

工程(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式(4)に代入して、当該ペプチドの k_0 の推定値を計算する工程、

(d) 工程(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに(1)～(3)のいずれか一項に記載の方法により求めた各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C であって、

5 工程(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式(1)に代入して、当該ペプチドの S 値を計算する工程、

(e) 工程(a)で得られた当該ペプチドの保持時間、工程(d)で得られた S 値、並びに工程(a)の液体クロマトグラフィー分析条件において測定された t_0 、 t_D 、 t_G 、 a 及び $\Delta\phi$ を、下記式(7)に代入して k_0 の実測値を計算する工程、並びに

10 (f) 工程(c)で得られた k_0 の推定値の対数と、工程(e)で得られた k_0 の実測値の対数の差を指標として、工程(b)で同定されたペプチド配列の確かさを判断する工程

を含む、上記方法。

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

15 $S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$

$$k_0 = \frac{t_G}{2.3S \Delta\phi t_0} [-1 + 10^{S\{(t_g - t_0 - t_D) \Delta\phi / t_G\}}] \quad (7)$$

[式(4)、(1)及び(7)中；

n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数であり、

$\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

20 t_G はグラジエント時間であり、

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

t_g は当該ペプチドの保持時間である。]

(10) 工程(e)が以下の工程；

25 (e') 工程(a)で得られた当該ペプチドの保持時間、工程(d)で得られた S 値を下記式(7)に代入し、 t_0 、 t_D 、 $\Delta\phi / t_G$ を変数にして k_0 の実測値を計算し、得られた k_0 実測値の対数と、工程(c)で得られた k_0 推定値の対数との間で残差平方和

が最小になるように最小二乗法を行い t_0 、 t_D 、 $\Delta \phi / t_G$ を求めて、 k_0 の実測値を計算する工程

である、(9) に記載の方法。

$$k_0 = \frac{t_g}{2.3S \Delta \phi t_0} [-1 + 10^S \{(t_g - t_0 - t_D) \Delta \phi / t_g\}] \quad (7)$$

5 [式中；

$\Delta \phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

t_G はグラジエント時間であり、

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

10 t_g は当該ペプチドの保持時間である。]

(11) 固定相が C18 カラムであり、移動相が 0.5% 酢酸水と有機溶媒とからなる緩衝液である (9) 又は (10) に記載の方法であって、

工程(c)において、(4) ~ (6) のいずれか一項に記載の方法により求めた各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D に代えて、表 3 に記載の E_j 及び D を用いる上記方法。

表 3

k_0 値の各アミノ酸の係数と定数項																				
E_j																				D
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	
0.08	-0.27	-0.01	0.11	0.01	0.11	0.01	0.01	-0.28	0.4	0.49	-0.31	0.36	0.57	0.08	0.02	0.1	0.5	0.31	0.27	0.54

20 (12) 固定相が C18 カラムであり、移動相が 0.5% 酢酸水とアセトニトリルとからなる緩衝液である (9) ~ (11) のいずれか一項記載の方法であって、工程(d)において、(1) ~ (3) のいずれか一項に記載の方法により求めた各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C に代えて、表 4 に記載の D_j 及び C を用いる上記方法。

25

表 4

S値の各アミノ酸の係数と定数項

Di																			C	
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y		V
0.22	0.2	0.36	0.6	0.37	0.48	0.43	0.16	-0.05	0.11	-0.07	0.21	-0.05	-0.07	0.35	0.31	0.23	-0.3	0.35	0.22	9.92

(13) ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行った
 5 ときのペプチドのアミノ酸組成と下記式(8)中のS値との関係を解析する
 ためのシステムであって、

$$\log k = \log k_0 - S\phi \quad (8)$$

[式中、

kは固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数と

10 の比であり、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

$\log k_0$ は $\phi=0$ のときの $\log k$ の値であり、

Sは当該ペプチドに固有の値である。]

以下の手段：

15 (a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロ
 マトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する手段、

(b) 手段(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、S値及び k_0 値の関係
 式に代入して、S値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平
 方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドのS値と k_0 値と
 20 を算出する手段、

(c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める
 手段、並びに

(d) 複数のペプチドについて、手段(b)から得られたS値と、手段(c)から得られ
 たアミノ酸組成とを、下記式(1)に代入して線形重回帰分析を行って、下
 25 記式(1)の各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項Cを求める手段

を含む、上記システム。

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

[式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

(14) ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときのペプチドのアミノ酸組成と下記式(8)中の k_0 値との関係を解析するためのシステムであって、

$$5 \quad \log k = \log k_0 - S\phi \quad (8)$$

[式中、

k は固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数との比であり、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

10 $\log k_0$ は $\phi=0$ のときの $\log k$ の値であり、
 S は当該ペプチドに固有の値である。]

以下の手段：

(a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する手段、

15 (b) 手段(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、 S 値及び k_0 値の関係式に代入して、 S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値とを算出する手段、

(c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める
 20 手段、並びに

(d) 複数のペプチドについて、手段(b)から得られた k_0 値と、手段(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式(4)に代入して線形重回帰分析を行って、下記式(4)の各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D を求める手段を含む、上記システム。

$$25 \quad \log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

[式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

(15) ペプチドのアミノ酸配列の確かさを検証するためのシステムであって、
 以下の手段：

- (a) ペプチドを、ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときの、ペプチドの保持時間を測定する手段、
- (b) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、
- 5 (c) 手段(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに (14) に記載のシステムにより求めた各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D であって、手段(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式 (4) に代入して、当該ペプチドの k_0 の推定値を計算する手段、
- (d) 手段(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに (13) に記載のシステムにより求めた各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C であって、手段(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式 (1) に代入して、当該ペプチドの S 値を計算する手段、
- 10 (e) 手段(a)で得られた当該ペプチドの保持時間、手段(d)で得られた S 値、並びに手段(a)の液体クロマトグラフィー分析条件において測定された t_0 、 t_D 、 t_G 、 a 及び $\Delta\phi$ を、下記式 (7) に代入して k_0 の実測値を計算する手段、並びに
- 15 (f) 手段(c)で得られた k_0 の推定値の対数と、手段(e)で得られた k_0 の実測値の対数の差を指標として、手段(b)で同定されたペプチド配列の確かさを判断する手段
- を含む、上記システム。

20 $\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$

$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$

$k_0 = \frac{t_G}{2.3S \Delta\phi t_0} [-1 + 10^{S\{(t_g - t_0 - t_D) \Delta\phi / t_G\}}] \quad (7)$

[式 (4)、(1) 及び (7) 中；

n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数であり、

25 $\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

t_G はグラジエント時間であり、

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

t_g は当該ペプチドの保持時間である。]

(16) ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときのペプチドのアミノ酸組成と下記式(8)中の S 値との関係を解析する

5 ためのプログラムであって、

$$\log k = \log k_0 - S \phi \quad (8)$$

[式中、

k は固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数との比であり、

10 ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

$\log k_0$ は $\phi=0$ のときの $\log k$ の値であり、

S は当該ペプチドに固有の値である。]

コンピュータを、以下の手段：

(a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する手段、

15

(b) 手段(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、 S 値及び k_0 値の関係式に代入して、 S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値とを算出する手段、

20 (c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、並びに

(d) 複数のペプチドについて、手段(b)から得られた S 値と、手段(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式(1)に代入して線形重回帰分析を行って、下記式(1)の各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C を求める手段

25 として機能させるためのプログラム。

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

[式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

(17) ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときのペプチドのアミノ酸組成と下記式(8)中の k_0 値との関係を解析するためのプログラムであって、

$$\log k = \log k_0 - S\phi \quad (8)$$

5 [式中、

k は固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数との比であり、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

$\log k_0$ は $\phi=0$ のときの $\log k$ の値であり、

10 S は当該ペプチドに固有の値である。]

コンピュータを、以下の手段：

(a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する手段、

(b) 手段(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、 S 値及び k_0 値の関係式に代入して、 S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値とを算出する手段、

(c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、並びに

20 (d) 複数のペプチドについて、手段(b)から得られた k_0 値と、手段(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式(4)に代入して線形重回帰分析を行って、下記式(4)の各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D を求める手段として機能させるためのプログラム。

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

25 [式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

(18) ペプチドのアミノ酸配列の確かさを検証するためのプログラムであって、コンピュータを、以下の手段：

- (a) ペプチドを、ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときの、ペプチドの保持時間を測定する手段、
- (b) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、
- 5 (c) 手段(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに (17) に記載のプログラムにより求めた各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D であって、手段(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式 (4) に代入して、当該ペプチドの k_0 の推定値を計算する手段、
- (d) 手段(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに (16) に記載のプログラム
- 10 により求めた各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C であって、手段(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式 (1) に代入して、当該ペプチドの S 値を計算する手段、
- (e) 手段(a)で得られた当該ペプチドの保持時間、手段(d)で得られた S 値、並びに手段(a)の液体クロマトグラフィー分析条件において測定された t_0 、 t_D 、 t_G 、
- 15 a 及び $\Delta\phi$ を、下記式 (7) に代入して k_0 の実測値を計算する手段、並びに
- (f) 手段(c)で得られた k_0 の推定値の対数と、手段(e)で得られた k_0 の実測値の対数の差を指標として、手段(b)で同定されたペプチド配列の確かさを判断する手段

として機能させるためのプログラム。

20 $\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$

$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$

$k_0 = \frac{t_G}{2.3S \Delta\phi t_0} [-1 + 10^{S\{(t_g - t_0 - t_D) \Delta\phi / t_G\}}] \quad (7)$

[式 (4)、(1) 及び (7) 中；

n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数であり、

25 $\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

t_G はグラジエント時間であり、

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

t_D は溶媒変化の遅延時間であり、
 t_g は当該ペプチドの保持時間である。]

本発明により、クロマトグラフィー保持尺度とアミノ酸組成との関係を明らかにすることが可能となった。

本発明により、MS により得られた質量情報あるいはアミノ酸配列情報を基に、データベース検索を行って推定されたアミノ酸配列が正しいか否かを検証するにあたり、LC における保持時間の情報を用いることが可能となった。

10 図面の簡単な説明

図 1 は、異なる条件の LC 分析の間の、ペプチドの保持時間の相関関係を示す図である。

図 2 は、異なる条件の LC 分析の間の、ペプチドの保持尺度 ($\log k_0$) の相関関係を示す図である。

15 図 3 は、 $\log k_0$ の推定値と実測値の間の差 ($\Delta \log k_0$) と、Mascot の Probability score との関係を示す図である。

図 4 は、本発明のシステムの構成例を示すブロック図である。

図 5 は、中央コンピューターの詳細構成例を示す図である。

図 6 は、制御ユニットの動作の例を示すフローチャートである。

20 図 7 は、制御ユニットの動作の例を示すフローチャートである。

符号の説明

30 : 中央コンピューター、401 : 制御ユニット、402 : クロマトグラフィー分析ユニット、403 : アミノ酸配列情報解析ユニット、404 : 計算ユニット、501 : CPU、502 : 情報通信送信／受信部、503 : 入力部、504 : 出力部、505 : ROM、506 : RAM、507 : HDD、508 : CD-ROM ドライブ、509 : データベース (DB)、510 : CD-R、CD-RW 用ドライブ、511 : ネットワーク回線

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施の形態について説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態にのみ限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、さまざまな形態で実施をすることができる。

5 なお、本明細書において引用した文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、2005年7月29日に
10 出願し、本願優先権主張の基礎となる特願 JP2005-221994 号の特許請求の範囲、明細書、図面及び要約書の開示内容は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

本発明は、LC 解析における保持尺度とペプチドのアミノ酸組成との関係を解析する方法を提供する。

15 また、本発明は、MS 解析によるペプチド同定の正否を、LC からの保持時間情報から得られるパラメータを用いて検証する方法を提供する。すなわち、本発明は、MS 解析で推定されたアミノ酸配列から計算される LC 解析における保持尺度の推定値と、実際の保持時間から変換される保持尺度の実測値とを比較して、推定されたアミノ酸配列の確かさを検証する方法を提供する。

20 本発明により検証されるアミノ酸配列は、主に MALDI-MS データによるペプチドマスフィンガープリント (PMF) 法で得られたペプチドの質量情報からデータベースを検索する方法により推定されたアミノ酸配列、及び主に ESI-MS/MS などのタンデムマススペクトルから得られたペプチドのアミノ酸配列情報からデータベースを検索する方法により推定されたアミノ酸配列である。

25 本発明において、LC の固定相、移動相は所望の溶質を溶出できるのであれば特に限定されず、当業者であれば適宜選択することができる。また、移動相に含まれる有機溶媒は特に限定されず、当業者であれば適宜選択することができる。

本発明において LC は逆相 LC である。本発明において、LC の溶質はペプチドである。

以下に、本発明について、詳しく記載する。

5 1. アミノ酸組成と S 値との関係を解析する方法

(1) S 値を求める方法

保持尺度「k」は、固定相中の溶質（ペプチド）のモル数と、移動相中の溶質のモル数との比で定義され、イソクラティック条件において、溶質の溶出に要した移動相の容量を、カラム容積の倍数で表したものに等しい。なお、本発明において、k の対数「log k」を保持尺度と称する場合もある。「イソクラティック」は、移動相に一定の組成の溶媒を使用することを意味する。Stadalius らの LSS (Linear Solvent Strength) 理論では、k の対数である log k は、移動相に含まれる有機溶媒の量 ϕ と一次の関係式として記述されることが見出された。

「S 値」はその一次の係数であって有機溶媒量の変化に対する log k の変化率である (式 8)。

$$\log k = \log k_0 - S \phi \quad (8)$$

ここで「log k₀」は、有機溶媒量に 0 を外挿した時の log k の値である。本発明において、「k₀」または「log k₀」を保持尺度と称する場合もある。

S 値は、ある固定相及びある移動相において、溶質に固有の値である。

また、溶質がペプチドの場合、S 値はペプチドの分子量の関数であることが知られている (Stadalius M. A., et al., *Chromatogr.*, 296 (1984) 31-59、Y. Sakamoto et al., *J Chromatogr* 442 (1988) 69)。

Stadalius らの方法に従えば、各溶質について、複数のイソクラティック条件で得られた k と ϕ を式 (8) に当てはめ、最小二乗法により log k と ϕ との間の一次関係式を得ることができる。LC-MS から得られたペプチドの分子量と、S 値の間の回帰式を求めることにより、S 値と分子量との間の関係式を導くことができる。この関係式を用いることにより、S 値が未知のペプチドであっても、分子量から S 値を求めることが可能である。

本発明において、好ましくは、 S 値は、複数の条件下での LC の保持時間を用いて、以下の工程(a)、(b)に従って求めることが望ましい。本方法は、Quarry M.A.et al., Anal. Chem. 58 (1986) 907) にも記載されている。

- 5 (a) ペプチドを、ある固定相及びある移動相の下で、複数の分析条件で LC 分析を行って、各ペプチドの保持時間 t_g を測定する工程

本工程で分析する対象は、ペプチド、好ましくはペプチド混合物試料である。本発明において、「ペプチド混合物試料」は、組織又は細胞から、通常の破碎、溶解、抽出及び／又は分画などの公知の処理によって得ることができる。また、

- 10 「ペプチド混合物試料」は、適宜、還元、アルキル化、酵素消化などの処理を施すこともできる。前記組織又は細胞の由来は特に限定されない。また細胞は、真核細胞であっても原核生物であってもよく、培養細胞株でも初代培養細胞であってもよい。

- 本工程では、ペプチド、好ましくはペプチド混合物試料を、ある固定相及びある移動相の下で、流速やグラジエントの傾き、配管の長さなどの LC 分析条件を変えた複数の条件、好ましくは 4 以上の条件で LC 分析を行い、分析条件毎における各ペプチドの保持時間 t_g を求める。ここで、「LC 分析条件」は、所定の固定相及び移動相における、LC 分析結果に影響する様々な条件を意味し、例えば、流速やグラジエントの傾き、配管の長さなどを挙げることができる。本発明において、「複数の分析条件で LC 分析する」とは、上記の条件のうち 1 以上の条件の異なる複数の条件で LC 分析することを意味する。ただし、分析間での固定相及び移動相の条件は同一である。

また、分析条件毎に定まる以下のパラメータを求めることもできる。

- 25 t_0 : カラムに保持されない試料の溶出時間であり、例えばブランク溶液 (0.1% トリフルオロ酢酸(TFA)等) を注入した時のピークより算出することができる。
 t_D : 溶媒変化の遅延時間であり、例えば移動相を切り替えた時のベースライン変化の遅延時間から算出することができる。

(i) 有機溶媒量 ϕ が、時間に依らず一定の場合（以下、「イソクラティック」と称す）は、加えて以下のパラメータを求める。

$$f(t) = a \quad (9)$$

a : 移動相中の有機溶媒の初期濃度であり、例えば LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使うことができる。

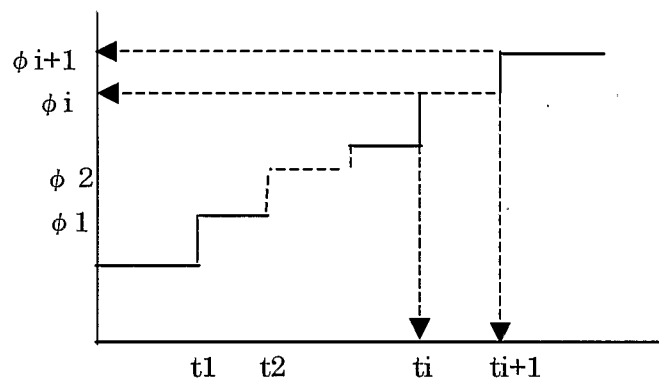
(ii) 有機溶媒量 ϕ が、表 5 に示す通り段階的に変化する場合（以下、ステップグラジエントと称す）は、加えて以下のパラメータを求める。

a : 移動相中の有機溶媒の初期濃度であり、例えば LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使うことができる。

10 t_i : i 回目に ϕ が変化した時間であり、例えば LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使うことができる。

ϕ_i : i 回目に ϕ が変化した後の ϕ であり、例えば LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使うことができる。

表 5



(iii) 有機溶媒量 ϕ が、下記式 (5) に従って時間 t と共に直線的に変化する場合（以下、「リニアグラジエント」と称す）は、加えて以下のパラメータを求める。

$$\phi = f(t) = \frac{\Delta\phi}{t_G} t + a \quad (5)$$

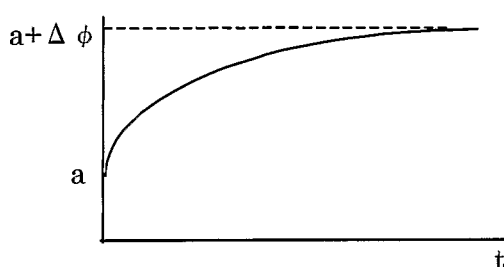
20 $\Delta\phi$: グラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、例えば LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使って算出することができる。

t_g : グラジエント開始から終了までの時間 (グラジエント時間) であり、例えば LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使うことができる。

a : 移動相中の有機溶媒の初期濃度であり、例えば LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使うことができる。

- 5 (iv) 有機溶媒量 ϕ が、表 6 に示す通り、時間 t に対して指数的に変化する場合 (以下、「指数関数的グラジエント」と称す) は、加えて以下のパラメータを求める。

表 6



10 $\phi = f(t) = \Delta \phi \{1 - \exp(-Ft/V_m)\} + a \quad (18)$

a : 移動相中の有機溶媒の初期濃度であり、例えば LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使うことができる。

V_m : グラジエントミキサーの体積であり、設定値をそのまま使うことができる。

- 15 F : 流速であり、例えば LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使うことができる。

$\Delta \phi$: グラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量、すなわち、有機溶媒の初期濃度とグラジエントミキサーに流入する有機溶媒濃度との差であり、設定値をそのまま使うことができる。

- 20 本工程において、上記(i)～(iv)に示した ϕ の変化は、組み合わせて使用することも可能である。

(b) 工程(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間(t_g)、 S 値及び k_0 値の関係式に代入して、 S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差

平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの k_0 値と S 値とを算出する工程

本工程において使用される保持時間(t_g)、 S 値及び k_0 値の関係式は、以下の通り導かれる。

- 5 LSS 理論では、前述のように、保持尺度 k の対数 $\log k$ は、有機溶媒量 ϕ の一次の関係式として記述される。 S 値はその一次の係数であり、 $\log k_0$ は有機溶媒量に 0 を外挿した時の $\log k$ の値である (式 8)。

$$\log k = \log k_0 - S\phi \quad (8)$$

- (i) $\phi = a$ のイソクラティック条件の場合、 k は移動相をカラム容積の何倍流した時に溶質が溶出されるかを表しているため、以下の式 (10) を得ることができる。

$$k = (t_g - t_0)/t_0 \quad (10)$$

これを式 (8) に代入すると、保持時間(t_g)、 S 値及び k_0 値の関係式が導かれる (式 11)。

$$15 \quad t_g = t_0 \{1 + 10^{(\log k_0 - Sa)}\} \quad (11)$$

- (ii) 同様にして、ステップグラジエントの場合、保持時間(t_g)、 S 値及び k_0 値の関係式は、下記式 (12) の通り導かれる。

$$1 = \sum_{i=1}^{t_g - t_0 - t_D} \left\{ (t_{i+1} - t_i) \times \frac{1}{1 + 10^{(\log k_0 - S\phi_i)}} \right\} + \frac{t_0 + t_D}{1 + 10^{(\log k_0 - Sa)}} \quad (12)$$

- (iii) P. J. Schoenmakers らの論文 (J. Chromatography, 149, 519-37, 1978) によれば、下記式 (3) に従って有機溶媒量が変化するグラジエント溶出時の保持時間(t_g)は、下記式 (13) で記述される (P. J. Schoenmakers et al., の式 8)。

$$\phi = f(t) \quad (3)$$

$$\int_0^{t_g - t_0 - t_D} \frac{d[f^{-1}(\phi)]}{k(\phi)} = t_0 - \frac{t_D}{k(a)} \quad (13)$$

- 25 ここで t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、 t_D は溶媒変化の遅延時間であり、 t_g は当該ペプチドの保持時間であり、いずれも工程(a)から求め

られる。また $k(\phi)$ は有機溶媒量が ϕ の時の保持尺度 k の値であり、 $k(a)$ は移動相中の有機溶媒の初期濃度 a の時の k の値である。

式 (8) より、

$$k(\phi) = 10^{(\log k_0 - S\phi)} \quad (8')$$

5 これを式 (13) に代入して、下記式 (14) が得られる。

$$\int_0^{t_g - t_0 - t_D} \frac{d[f^{-1}(\phi)]}{10^{(\log k_0 - S\phi)}} = t_0 - \frac{t_D}{k(a)} \quad (14)$$

式 (14) は、 $f(t)$ により解析的にも、近似的にも、また数値解法によっても解くことが可能であり、保持時間 (t_g) と $\log k_0$ 値及び S 値との関係式を計算することができる。例えば数値解法の場合は、ある k_0 値及び S 値が与えられた時に、
10 式 (14) の ϕ の値を $f(0)$ から少しずつ増加させて計算される $d[f^{-1}(\phi)] / 10^{(\log k_0 - S\phi)}$ の値を順次加算していき、加算した値が $t_0 - t_D/k(a)$ の値と等しくなった時の $f(t_g - t_0 - t_D)$ となる t_g の値として保持時間 t_g を求めることができる。

また、 $f(t)$ をリニアグラジエントをつないで近似し、下記のリニアグラジエントの場合の式を用いて保持時間 (t_g)、 $\log k_0$ 値及び S 値との関係式を計算しても良い。
15

特に、 $f(t)$ が時間 t と共に直線的に式 (5) に従って変化するリニアグラジエントの場合は、式 (14) は解析的に解くことができ、その解は下記式 (15) である。

$$20 \quad \phi = f(t) = \frac{\Delta\phi}{t_g} t + a \quad (5)$$

$$k_0 = \frac{t_g}{2.3S\Delta\phi(t_0 - t_D/k(a))} [-10^a + 10^{S\{a + (t_g - t_0 - t_D)\Delta\phi/t_g\}}] \quad (15)$$

ここから t_g は近似的に下記式 (6) で表すことができる。

$$t_g = \{t_g/(S\Delta\phi)\} \log \{2.3k_0 t_0 (S\Delta\phi/t_g) + 1\} + t_0 + t_D \quad (6)$$

(iv) 指数的グラジエントの場合は、下記式 (16) を式 (13) に代入することにより保持時間 (t_g) と $\log k_0$ 値及び S 値との関係式を計算することができる。
25

$$k(\phi) = 10^{(\log k_0 - S \Delta \phi \{1 - \exp(-Ft/V_m)\}) + a} \quad (16)$$

上記 ϕ の時間的な変化を組み合わせた場合には、関係式はこれらの式の足し合わせとして計算できる。例えば、複数のグラジエントを組み合わせた場合の関係式は、下記式 (17) で表される。

$$5 \quad t_o - \frac{t_D}{k(a)} = \int_0^{t_i - t_0 - t_D} \frac{d[f^{-1}(\phi)]}{10^{(\log k_0 - S \phi)}} + \sum_1^{t_g} \int_{t_i - t_0 - t_D}^{t_{i+1} - t_0 - t_D} \frac{d[f^{-1}(\phi)]}{10^{(\log k_0 - S \phi)}} \quad (17)$$

工程(a)で得られる LC の分析条件による各パラメータ $\Delta \phi$ 、 t_g 、 t_0 、及び／又は t_D 、並びにペプチドの保持時間を、保持時間(t_g)、 S 値及び k_0 値の関係式、例えば式 (11)、(12)、(14)、(15)、(6) または (17) に代入し、 k_0 及び S を変数として計算される t_g の計算値と t_g の実測値の間の残差平方和が最小となるように、最小二乗法、好ましくは非線形最小二乗法（例えば MS-EXCEL2000 version9.0.4402 SR-1 のソルバー機能にて、例えば条件：準ニュートン法、制限時間 100 秒、反復回数 1000、精度 0.00000000001、公差 5%、収束 0.0001）を行い、各ペプチドについて k_0 と S を算出することができ
15 10 15 る。

(2) S 値とアミノ酸組成との関係式を求める方法

本発明者は、 S 値が、ペプチドのアミノ酸組成に依存することを見出し、ある固定相及びある移動相の下での S 値をアミノ酸組成から導く関係式を明らかに
20 した。本発明の方法に基づけば、 S 値はペプチドのアミノ酸組成から下記式 (1) により求めることができる。

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

式 (1) 中の D_j 、 C の値は、以下の工程(c)、(d)により求めることができる。
各アミノ酸の係数 D_j 及び C の値は、ある固定相及びある移動相の組み合わせに
25 固有の値である。

(c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める工程

LC にて保持時間を求めたペプチドが既知であれば、そのアミノ酸配列をデータベースから得て、アミノ酸組成を計算することができる。

5 好ましくは当該ペプチドのアミノ酸組成は、当該ペプチドを質量分析により分析し、得られた質量情報又はアミノ酸配列情報を基に、データベース検索を行って当該ペプチドを同定し、同定された当該ペプチドのアミノ酸配列情報から求める。

具体的には、LC 分析により分離された各ペプチドは、タンデムマススペクトルを用いて同定することができる。タンデム質量分析は、Q(quadrupole)-TOF(time of flight)、TOF-TOF、Q-Q、Q-IT(ion trap)などが使用される。タンデムマススペクトルの装置としては例えば AB/MDS-Sciex QSTAR pulsar I や ThermoElectron 社の Finnigan LCQ advantage を使うことができるがこれらに限定されない。MS に導入されたペプチドは MS の内部での衝突解離によりフラグメント化され、その際得られるスペクトル (MSMS スペクトル、タンデムマススペクトル、フラグメントスペクトル、または CID スペクトル) からペプチドのアミノ酸配列の部分情報が得られる。得られた当該ペプチドのアミノ酸配列の部分情報を元に、データベース、例えば NCBI Inr データベース中のタンパク質から得られる情報を、例えば Mascot (Matrixscience 社)などのサーチエンジンを用いて検索することにより当該ペプチドを同定することができる

10 (J.K. Eng, A.L. McCormack, I. Yates, John R., Journal of the American Society for Mass Spectrometry 5 (1994) 976、M. Mann, M. Wilm, Anal Chem 66 (1994) 4390、Perkins, DN, Pappin, DJ, Creasy, DM and Cottrell, JS, Electrophoresis 1999; 20(18):3551-3567)。

20 また、具体的には、LC 分析により分離された各ペプチドは、マススペクトルを用いて同定することができる。質量分析計としては、上記のタンデム質量分析計に加えて、4重極型、TOF 型などが使用される。装置としては例えば AB-Voyager DE を使うことができるがこれらに限定されない。MS に導入されたペ

プチドは、MS スペクトルを用いてその分子量を得ることができるので、データ
 ベース、例えば NCBI Inr データベース中のタンパク質を、実際に用いた消化酵
 素の特性に基づいて *in silico* で切断し、測定されたペプチドの分子量とのマッ
 チングを、例えば Mascot (Matrixscience 社)などのサーチエンジンを用いて検
 5 索することにより当該ペプチドを同定することができる (Henzel, W. J.,
 Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C. and Watanabe, C.
 (1993). Proc Natl Acad Sci USA, 90, 5011-5., James, P., Quadroni, M.,
 Carafoli, E. and Gonnet, G. (1993)., Biochem Biophys Res Commun 195,
 58-64., Mann, M., Hojrup, P. and Roepstorff, P. (1993). Biol Mass
 10 Spectrom 22, 338-45., Pappin, D. J. C., Hojrup, P. and Bleasby, A. J.
 (1993). Curr. Biol. 3, 327-32. Yates, J. R., 3rd, Speicher, S., Griffin, P. R.
 and Hunkapiller, T. (1993). Anal Biochem 214, 397-408.)。

上記のように同定したペプチドのアミノ酸配列から、当該ペプチドのアミノ酸
 組成を計算することができる。

15 (d) 複数のペプチドについて、工程(b)から得られた S 値と、工程(c)から得られ
 たアミノ酸組成とを、下記式 (1) に代入して線形重回帰分析を行って、下
 記式 (1) の各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C を求める工程
 複数のペプチドについて、工程(b)で得られた当該ペプチドの S 値、及び工程
 20 (c)で得られた当該ペプチドのアミノ酸組成を下記式 (1) に代入し、線形重回
 帰分析を行って各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C を求めることができる。

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

式 (4) 中、 n_j は、当該ペプチドの各アミノ酸の個数である。

線形重回帰分析は、ガウスの消去法により行うことができる。

25 例えば、固定相が C18 カラム (ODS、Octadecyl 化シリカゲル、以降「C18
 カラム」と称す) であり、移動相が 0.5%酢酸水とアセトニトリルとからなる緩
 衝液の場合、上記で得られた式 (1) 中の D_j 、C の値として、下記「S 値の各
 アミノ酸の係数と定数項」の表に記載の値を使用することも可能である (表 7)。

表 7

S値の各アミノ酸の係数と定数項

Dj																			C	
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y		V
0.22	0.2	0.36	0.6	0.37	0.48	0.43	0.16	-0.05	0.11	-0.07	0.21	-0.05	-0.07	0.35	0.31	0.23	-0.3	0.35	0.22	9.92

本発明の方法に基づけば、所定の固定相および移動相において、S 値は各ペプチドのアミノ酸組成から式 (1) により求めることが可能になった。

5

2. アミノ酸組成と k_0 値との関係を解析する方法

$\log k_0$ は前述した通り、保持尺度 k の対数 $\log k$ の、有機溶媒量に 0 を外挿した時の値である。ここで、 $\log k$ は、LSS 理論において有機溶媒量 ϕ の一次の関係式として記述される。

$$10 \quad \log k = \log k_0 - S \phi \quad (8)$$

本発明者らは、 $\log k_0$ 値がペプチドのアミノ酸組成に依存することを見出し、 $\log k_0$ 値をアミノ酸組成から導く関係式を明らかにした。本発明の方法に基づけば、 $\log k_0$ 値はペプチドのアミノ酸組成から下記式 (4) により推定することができる。

$$15 \quad \log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

式 (4) 中、 n_j は、当該ペプチドの各アミノ酸の個数である。

式 (4) 中の E_j 及び D の値は、以下の工程(a)～(d)により求めることができる。各アミノ酸の係数 E_j 、及び定数項 D の値は、ある固定値及びある移動相の組み合わせに固有の値である。

20

(a) ペプチドを、ある固定相及びある移動相の下で、複数の分析条件で LC 分析を行って、各ペプチドの保持時間 t_g を測定する工程

本工程は、上記「1. (1) S 値を求める方法」の工程(a)と同様である。

25 (b) 工程(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間(t_g)、S 値及び k_0 値の関係式に代入して、S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差

平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの k_0 値と S 値とを算出する工程

本工程は、上記「1. (1) S 値を求める方法」の工程(b)と同様である。

- 5 (c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める工程

本工程は、「1. (2) S 値とアミノ酸組成との関係式を求める方法」の工程(c)と同様である。

- 10 (d) 複数のペプチドについて、工程(b)から得られた k_0 値と、工程(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式(4)に代入して線形重回帰分析を行って、下記式(4)の各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D を求める工程

複数のペプチドについて、工程(b)で得られた当該ペプチドの k_0 値、及び工程(c)で得られた当該ペプチドのアミノ酸組成を下記式(4)に代入し、線形重回

- 15 帰分析を行って各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D を求めることができる。

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

式(4)中、 n_j は、当該ペプチドの各アミノ酸の個数である。

例えば、固定相が C18 カラムであり、移動相が 0.5%酢酸水と有機溶媒とからなる緩衝液の場合、上記で得られた式(4)中の E_j 、 D の値として、下記「 k_0

- 20 値の各アミノ酸の係数と定数項」の表に記載の値を使用することも可能である(表8)。有機溶媒は、好ましくはアセトニトリルである。

表 8

k_0 値の各アミノ酸の係数と定数項																			
E_j																			D
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
0.08	-0.27	-0.01	0.11	0.01	0.11	0.01	0.01	-0.28	0.4	0.49	-0.31	0.36	0.57	0.08	0.02	0.1	0.5	0.31	0.27
																			0.54

- 25 3. ペプチドのアミノ酸配列の確かさを検証する方法

本発明において、式（４）で示すように $\log k_0$ 値がペプチドのアミノ酸組成に依存することから、質量分析から得られた情報を基にペプチドを同定し、当該ペプチドのアミノ酸配列から計算されたアミノ酸組成を式（４）に代入して得られる $\log k_0$ の推定値と、LC 分析における当該ペプチドの保持時間から計算される $\log k_0$ の実測値とを比較することにより、質量分析で同定したペプチドのアミノ酸配列の確かさを検証することが可能となった。

ペプチドのアミノ酸配列の確かさは、具体的には以下の工程により検証することができる。

- 10 (a) ペプチドを、ある固定相及びある移動相により LC 分析を行ったときの、ペプチドの保持時間を測定する工程

本工程では、ペプチドを、ある固定相及びある移動相の下で、LC 分析を行い、ペプチドの保持時間を求める。分析条件により定まる a 、 t_i 、 ϕ_i 、 $\Delta\phi$ 、 t_g 、 V_m 、 F などのパラメータ及びペプチドの保持時間 t_g は、「１．（１）S 値を求める方法」の工程(a)と同様に求めることができる。

- (b) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める工程

本工程は、「１．（２）S 値とアミノ酸組成との関係式を求める方法」の工程

- 20 (c)と同様の工程である。

- (c) 工程(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D であって、工程(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式（４）に代入して、当該ペプチドの k_0 の推定値を計算する工程

- 25 工程(b)で求めたアミノ酸組成を、「２．アミノ酸組成と k_0 値との関係を解析する方法」の工程(a)～(d)に記載の方法に従って、工程(a)と同じ固定相及び移動相の下で求めた各アミノ酸の係数 E_j 、定数項 D と共に、下記式（４）に代入し、 $\log k_0$ の推定値を計算する。

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

式(4)中、 n_j は、当該ペプチドの各アミノ酸の個数である。

例えば、固定相が C18 カラムであり、移動相が 0.5%酢酸水と有機溶媒とからなる緩衝液の場合は、上記 2. の工程(a)～(d)に記載の方法で求めた各アミノ酸

- 5 の係数 E_j 、定数項 D に代えて、下記「 k_0 値の各アミノ酸の係数と定数項」の表 (表 9) に記載されたアミノ酸の係数 E_j 、定数項 D を使うことも許される。

表 9

k_0 値の各アミノ酸の係数と定数項																				
E_j																				D
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	
0.08	-0.27	-0.01	0.11	0.01	0.11	0.01	0.01	-0.28	0.4	0.49	-0.31	0.36	0.57	0.08	0.02	0.1	0.5	0.31	0.27	0.54

- 10 (d) 工程(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C であって、工程(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式(1)に代入して、当該ペプチドの S 値を計算する工程

工程(b)で求めたアミノ酸組成を、「1. アミノ酸組成と S 値との関係を解析する方法」の工程(a)～(d)に記載の方法に従って、同じ固定相及び同じ移動相の

- 15 下で決められた D_j 、定数項 C と共に、下記式(1)に代入し、 S 値を計算する。

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

式(1)中、 n_j は、当該ペプチドの各アミノ酸の個数である。

例えば、固定相が C18 カラムであり、移動相が 0.5%酢酸水とアセトニトリルとからなる緩衝液の場合は、「1. アミノ酸組成と S 値との関係を解析する方

- 20 法」で決められたアミノ酸の係数 D_j 、定数項 C に代えて、下記「 S 値の各アミノ酸の係数と定数項」の表 (表 10) に記載された D_j 、定数項 C を使うことも許される。

表 10

S 値の各アミノ酸の係数と定数項																				
D_j																				C
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	
0.22	0.2	0.36	0.6	0.37	0.48	0.43	0.16	-0.05	0.11	-0.07	0.21	-0.05	-0.07	0.35	0.31	0.23	-0.3	0.35	0.22	9.92

(e) 工程(a)で得られた当該ペプチドの保持時間、工程(d)で得られた S 値、並びに工程(a)の液体クロマトグラフィー分析条件において測定された t_0 、 t_D 、 t_G 、 a 及び $\Delta\phi$ を、下記式 (7) に代入して k_0 の実測値を計算する工程

5 工程(a)で得られた当該ペプチドの保持時間(t_g)、工程(d)で得られた S 値、及び工程(a)の逆相グラジエント液体クロマトグラフィー分析条件における t_0 、 t_D 、 t_G 、 $\Delta\phi$ を、下記式 (7) に代入して k_0 の実測値を計算する。ここで、 t_0 、 t_D 、 t_G 、 $\Delta\phi$ は以下の通り実験的に決めることができる。

$$k_0 = \frac{t_g}{2.3S\Delta\phi t_0} [-1 + 10^{S\{a + (t_g - t_0 - t_D)\Delta\phi / t_g\}}] \quad (7)$$

10 $\Delta\phi$: グラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、例えば LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使って算出することができる。

t_G : グラジエント開始から終了までの時間 (グラジエント時間) であり、例えば LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使うことができる。

t_0 : カラムに保持されない試料の溶出時間であり、例えばブランク溶液 (0.1% TFA 等) を注入した時のピークより算出することができる。

15 t_D : 溶媒変化の遅延時間であり、例えば移動相を切り替えた時のベースライン変化の遅延時間から算出することができる。

また、LC 分析するペプチドが複数、好ましくは 4 以上、更に好ましくは 10 以上の場合 t_0 、 t_D 、 t_G 、 $\Delta\phi$ は、以下の通り最小二乗法により決めて k_0 の実測値を計算しても良い。

20 複数のペプチドに対し、工程(a)で得られたペプチドの保持時間(t_g)、工程(d)で得られた S 値を式 (7) に代入し、 t_0 、 t_D 、 $\Delta\phi/t_G$ を変数にして当該ペプチドの k_0 実測値を計算して得られた k_0 実測値の対数と、工程(c)で得られた当該ペプチドの k_0 推定値の対数との間で最小二乗法を行って、残差平方和が最小になるように t_0 、 t_D 、 $\Delta\phi/t_G$ を決める。それら決められた値を下記式 (15) に代入し当該ペプチドの k_0 実測値を計算する。

$$k_0 = \frac{t_g}{2.3S \Delta \phi(t_0 - t_D / k(a))} [-10^a + 10^b S \{a + (t_g - t_0 - t_D) \Delta \phi / t_g\}] \quad (15)$$

また、下記式 (6) を用いて、当該ペプチドの k_0 実測値を求めてもよい。例えば、 t_0 、 t_D 、 $\Delta \phi / t_g$ を変数として保持時間の実測値(t_g)の $\log k_0$ 推定値への回帰計算を行い、 t_0 、 t_D 、 $\Delta \phi / t_g$ を決定すると共に $\log k_0$ の実測値を求めることもできる。

$$t_g = \{t_g / (S \Delta \phi)\} \log \{2.3k_0 t_0 (S \Delta \phi / t_g) + 1\} + t_0 + t_D \quad (6)$$

上記最小二乗法により t_0 、 t_D 、 t_g 、 $\Delta \phi$ を求める方法においては、そのうち幾つかのパラメーターを、実験的に求めることも許される。

- 10 (f) 工程(c)で得られた k_0 の推定値の対数と、工程(e)で得られた k_0 の実測値の対数の差を指標として、工程(b)で同定されたペプチド配列の確かさを判断する工程

- 本発明において、ペプチド配列の確かさは、工程(c)で得られた k_0 の推定値の対数と、工程(e)で得られた k_0 の実測値の対数を比較することで検証することができる。すなわち、ペプチド配列の確かさは、保持尺度 k_0 の測定値の対数と実測値の対数の差を指標に用いて検証することができる。例えば、この差が小さい、好ましくは差が 1 以下、更に好ましくは 0.5 以下の場合、工程(b)で同定されたペプチド配列は正しいと判断される。反対に、その差が大きい、好ましくは差が 1 を超える場合、更に好ましくは 1.5 を超える場合は、工程(b)で同定されたペプチド配列は誤っている可能性が高いと判断される。ペプチド配列の正誤を判断するための値は、工程(b)でペプチドを同定するときに用いる検索エンジンの同定条件や、他の確かさの指標を用いるか否か等の条件によって適宜設定することができる。例えば、ペプチドを同定するための検索エンジンが Mascot の場合は、保持尺度 k_0 の測定値の対数と実測値の対数の差が 0.5 以下のペプチドを正しいと判断することができ、更に他の確かさの指標を併せて用いる場合には、より広い範囲の候補が含まれるよう 1 以下を基準とすることもできる。

これらの検定の結果は、アミノ酸配列を推定する時の正しさの指標、例えばデータベース検索エンジン（例えば Mascot）のスコアの同定判定の閾値などと共に総合的に判断して、推定したアミノ酸配列が正しいか否かの検証を行う際に用いても良い。

- 5 また、データベース中のアミノ酸配列に対して LC 保持時間による検証を行い、候補アミノ酸配列を推定するためのパラメータとして使用することも可能である。

4. 解析システム

- 10 (1) 本発明の解析システムは、ペプチドのアミノ酸組成と上記式 (8) 中の S 値との関係を解析する方法を実行するためのシステムであり、以下の手段を含むものである。

- (a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する手段、
- (b) 手段(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、S 値及び k_0 値の関係式に代入して、S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値とを算出する手段、
- 15 (c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、及び
- 20 (d) 複数のペプチドについて、手段(b)から得られた S 値と、手段(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式 (1) に代入して線形重回帰分析を行って、下記式 (1) の各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C を求める手段

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

[式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

25

- (2) また、本発明の解析システムは、ペプチドのアミノ酸組成と上記式 (8) 中の k_0 値との関係を解析する方法を実行するためのシステムであり、以下の手段を含むものである。

- (a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する手段、
- (b) 手段(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、 S 値及び k_0 値の関係式に代入して、 S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値とを算出する手段、
- 5 (c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、及び
- (d) 複数のペプチドについて、手段(b)から得られた k_0 値と、手段(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式 (4) に代入して線形重回帰分析を行って、下記式 (4) の各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D を求める手段
- 10
$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$
- [式中 ; n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]
- (3) さらに、本発明は、ペプチドのアミノ酸配列の確かさを検証する方法を実行するためのシステムであり、以下の手段を含むものである。
- 15 (a) ペプチドを、ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときの、ペプチドの保持時間を測定する手段、
- (b) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、
- 20 (c) 手段(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに上記 (2) に記載のシステムにより求めた各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D であって、手段(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式 (4) に代入して、当該ペプチドの k_0 の推定値を計算する手段、
- (d) 手段(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに上記 (1) に記載のシステムにより求めた各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C であって、手段(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式 (1) に代入して、当該ペプチドの S 値を計算する手段、
- 25

(e) 手段(a)で得られた当該ペプチドの保持時間、手段(d)で得られた S 値、並びに手段(a)の液体クロマトグラフィー分析条件において測定された t_0 、 t_D 、 t_G 、a 及び $\Delta\phi$ を、下記式 (7) に代入して k_0 の実測値を計算する手段、並びに
 (f) 手段(c)で得られた k_0 の推定値の対数と、手段(e)で得られた k_0 の実測値の対
 5 数の差を指標として、手段(b)で同定されたペプチド配列の確かさを判断する
 手段

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

$$k_0 = \frac{t_G}{2.3S \Delta\phi t_0} [-1 + 10^{S\{(t_g - t_0 - t_D) \Delta\phi / t_G\}}] \quad (7)$$

10 [式中；

$\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

t_G はグラジエント時間であり、

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

15 t_g は当該ペプチドの保持時間である。]

(4) 本発明のシステムのブロック図の例を図 4 に示す。

制御ユニット 401 は、本発明の方法を実行するために必要な各ユニットの動作全体を制御するユニットであり、中央コンピュータ 30 (図 5) からなる。ク
 20 ロマトグラフィー分析ユニット 402、アミノ酸配列情報解析ユニット 403 及び計算ユニット 404 は、制御ユニット 401 にそれぞれ接続され、互いに独立して、又は各ユニットと連携して実行するように制御ユニット 401 により制御される。

クロマトグラフィー分析ユニット 402 は、カラム内のペプチドを溶出させるためのユニットであり、カラム、固定相、移動相、ペプチド回収器などを備える。

25 クロマトグラフィー分析ユニットに含まれる各構成要素は、制御ユニット 401 の指令に従って、独立して、又は各構成要素と互いに連携して制御される。

アミノ酸配列情報解析ユニット 403 は、クロマトグラフィー分析ユニットにより溶出されたペプチドのアミノ酸配列、またはデータベース等に保存されているアミノ酸配列を解析するユニットであり、例えば、クロマトグラフィーにより得られたペプチドを質量分析にかけた後の結果に基づいてアミノ酸配列を解析する工程などを制御する。従って、アミノ酸配列情報解析ユニット 403 は、アミノ酸配列解析のための質量分析ユニット（図示せず）を含むものであり、クロマトグラフィー分析ユニットと独立した構成としてもよく、あるいはクロマトグラフィー分析ユニットとタンデムに連結させる構成としてもよい。アミノ酸配列情報解析ユニット 403 は制御ユニット 401 に接続されている。

- 10 計算ユニット 404 は、ペプチドの保持時間を所定の関係式に代入する処理、ペプチドの S 値、 k_0 値を算出する処理、アミノ酸配列情報からアミノ酸組成を求める処理、各アミノ酸の係数 D_j 又は E_j 、定数項 C 又は D を算出する処理などを行うユニットである。また、これらの情報から、 k_0 の実測値や推定値を求める処理も行う。計算ユニット 404 におけるこれらの構成要素は制御ユニット
- 15 401 に接続されており、制御ユニット 401 の指令に従って計算処理を実行する。

5. コンピュータプログラム

本発明の解析プログラムにおいて、コンピュータを実行させるための手段を示す構成例を図 5 に示す。

- 20 図 5 に示すように、中央コンピュータ 30 は、CPU501、ROM505、RAM506、入力部 503、情報通信送信/受信部 502、出力部 504、ハードディスクドライブ(HDD)507 及び CD-ROM ドライブ 508、データベース(DB)509 等を備える。

- 25 CPU501 は、中央コンピュータ 30 の情報記憶手段（例えば磁氣的及び／又は光学的記録媒体）に記憶されているプログラムに従って、解析データ処理システム全体を制御する。そして、入力部 503 などから受け取った情報を出力部 504 に供給する。また、ネットワーク回線 511 を通じて受け取った情報に基づいて解析処理を実行することもできる。入力部 503 は、キーボードやマウス等であ

り、解析処理を実行する上で必要な条件又はデータを入力するときに操作される。
ROM505 は、本発明の解析処理システムの動作に必要な処理を命令するプログラム等を格納する。RAM506 は、解析処理システムにおける処理を実行する上で必要なデータを一時的に格納する。

- 5 情報通信送信／受信部 502 は、CPU501 の命令に基づいて、ネットワーク回線 511 等との間で情報通信（データの送受信処理）を実行するものであり、例えばモデム、ルーター等が例示される。出力部 504 は、入力手段 503 から入力されたペプチド解析データ、その他各種条件等を、CPU501 からの命令に基づいて情報表示処理する（例えば表示画面、プリンタ）。CD-ROM ドライブ 508
- 10 は、CPU501 の指示に基づいて、CD-ROM に格納されている解析処理システムを機能させるためのプログラム又はデータ等を読み出し、例えば RAM506 に格納する。CD-ROM の代わりに記録媒体として書き換え可能な CD-R、CD-RW を用いることもできる。その場合には、CD-ROM ドライブ 508 の代わりに CD-R 又は CD-RW 用ドライブ 510 を設ける。また、上記媒体の他に、DVD、MO
- 15 とそれらの媒体を用い、それに対応するドライブを備える構成としてもよい。

- 本発明のプログラムは、例えば C 言語、Java（登録商標）、Perl、Fortran、Pascal 等で書くことができ、そしてクロスプラットフォームに対応できるように設計されている。従って、このソフトウェアは Windows(登録商標)95/98/2000/XP 等、Linux、UNIX(登録商標)、Macintosh で作動させること
- 20 とが可能である。

以下、制御ユニットの動作の例を、図面（図 6 及び 7）を用いて説明する。

- 制御ユニット 401 の中央コンピュータ 30 は、本発明の実施に必要なクロマトグラフィー装置に、LC の実行に必要な各種条件を設定し、LC 分析を行ってペ
- 25 プチドを溶出するよう命令するとともに（S601a、S601b）、ペプチドの保持時間を測定するよう命令する。クロマトグラフィーが完了すると、中央コンピュータ 30 は、次に、保持時間を、保持時間と、S 値と、 k_0 値との関係式に代入し、S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となる

ように最小二乗法を行い、ペプチドの S 値と k_0 値を算出するよう計算ユニットに命令する (S602a、S602b)。ここで、保持時間と、 S 値と、 k_0 値との関係式は、移動相のグラジエントの態様により異なるため、LC においてどの態様の移動相を使用したか、その条件設定に基づいて、中央コンピュータ 30 はどの関係式を採用するかを選択する。例えば、中央コンピュータ 30 は、リニアグラジエントの移動相によりクロマトグラフィーを行うように条件設定された場合は、式 (2) 又は式 (2) から導かれる近似式を使用することを、計算ユニットに命令する。リニアグラジエントのときは、中央コンピュータ 30 は、移動相を式 (5) に従って変化させる条件を採用するよう計算ユニットに命令することが好ましい。なお、式 (2) から導かれる近似式としては、例えば式 (6) が挙げられる。

次に、中央コンピュータ 30 は、LC 及びアミノ酸配列解析結果 (例えば質量分析の結果) から得られたアミノ酸配列情報から、アミノ酸組成を求めるようアミノ酸配列情報解析ユニットに命令する (S603a、S603b)。S603a と S602a とを実行する順番は特に限定されず、例えば、中央コンピュータ 30 は、S603a を S602a の後 (または先) に実行するように命令してもよいし、あるいは、それらを同時に行うように命令してもよい。S602b および S603b を実行するタイミングについても同様である。その後、中央コンピュータ 30 は、上記 S 値とアミノ酸組成とを式 (1) に代入して線形重回帰分析を行って式 (1) におけるアミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C を求めるよう、計算ユニットに命令し、計算ユニットはその計算を実行する (S604a)。係数 D_j 及び定数項 C の計算は、クロマトグラフィーにより得られた複数のペプチドに対して行われる。

一方、中央コンピュータ 30 は、ペプチドのアミノ酸組成と式 (8) 中の k_0 値との関係を解析する手段も実行するため、S602b において得られた k_0 値と、S603b において得られたアミノ酸組成とを、式 (4) に代入して線形重回帰分析を行って式 (4) におけるアミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D を求めるよう、計算ユニットに命令し、計算ユニットはその計算を実行する (S604b)。

以上の通り計算されたデータは、中央コンピュータ 30 内のデータベースに蓄積される (S605a、S605b)。

さらに、本発明においては、ペプチドのアミノ酸配列の確かさを検証するためのプログラムも提供する。この場合の制御ユニットの動作を、図面 (図 7) を用

5 いて説明する。

中央コンピュータ 30 は、本発明の実施に必要なクロマトグラフィー装置に、LC の実行に必要な各種条件を設定し、LC 分析を行ってペプチドを溶出するよう命令する (S701)。このステップは、上記 S601a 及び S601b と同様である。その後、中央コンピュータ 30 は、アミノ酸配列情報解析ユニットに、アミノ酸組成を求めるよう命令する。次に、中央コンピュータ 30 は、上記アミノ酸組成の情報、並びに各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D を、式 (4) に代入してペプチドの k_0 値の推定値を計算するよう計算ユニットに命令し、計算ユニットはその計算を実行する (S703)。他方、中央コンピュータ 30 は、上記アミノ酸組成の情報、並びに各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C を、式 (1) に代入してペプチドの S 値を計算するよう計算ユニットに命令し、計算ユニットはその計算を実行する (S704)。

また、中央コンピュータ 30 は、S701 で得られたペプチドの保持時間、S704 で得られた S 値、並びにクロマトグラフィー分析条件における各種値を式 (7) に代入して k_0 値の実測値を計算するよう計算ユニットに命令し、計算ユニットはその計算を実行する (S705)。 k_0 値はペプチドのアミノ酸組成に依存した LC 保持時間の指標となるものであるから、 k_0 値の実測値と k_0 値の推定値 (計算値) とが近い値であるときは、計算に用いたアミノ酸組成が正しいと判定され、このことから S702 で同定されたアミノ酸配列が正しいと判定することができる。この判定をコンピュータに実行させるに際し、本発明においては、 k_0 の推定値の対数と k_0 の実測値の対数の差を利用する。コンピュータは、上記 k_0 の推定値の対数と k_0 の実測値の対数の差を計算するよう計算ユニットに命令する。そして、中央コンピュータ 30 は、この差が 1 以下好ましくは 0.5 以下のと

きは同定されたペプチド配列は正しいと判定し、1、好ましくは1.5を超えたときは正しくないと判定するよう、計算ユニットに命令する(S706)。

中央コンピュータ 30 は、アミノ酸配列情報、 k_0 の推定値及び実測値、並びに判定結果のデータを既存の情報と照会するとともに、ハードディスクに蓄積して

5 データベース化を実行する (S707) 。

6. コンピュータ用記録媒体

本発明のプログラムは、コンピュータ読み取り可能な記録媒体又はコンピュータに接続しうる記憶手段に保存することができる。本発明のプログラムを含有するコンピュータ用記録媒体又は記憶手段も本発明に含まれる。記録媒体又は記憶手段としては、磁氣的媒体（フレキシブルディスク、ハードディスクなど）、光学的媒体（CD、DVD など）、磁気光学的媒体（MO、MD）などが挙げられる。

実施例

15 以下に実施例を用いて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の例に限定されるものではない。

以下に、MS から得られたアミノ酸配列情報を基にデータベース検索を行い、推定されたアミノ酸配列を LC の保持時間により検定した具体例を示す。

20 実施例 1 : S 値及び k_0 値とアミノ酸組成との関係式における各アミノ酸の係数及び定数項の決定

LC 分析の試料には大腸菌細胞抽出液可溶画分 $5 \mu\text{g}$ を用いた。尿素 (Bio-Rad 社 Cat. No. 161-0731) 8 M を含む 0.05 M Tris 緩衝液 (pH 9.0, Sigma 社製) $50 \mu\text{L}$ で大腸菌細胞抽出液可溶画分を溶解し、10 mM ディチオスレイトール (和光純薬 Cat. No. 045-08974: DTT) を $5 \mu\text{L}$ 加え、37 度で 30 分インキュベーションしてタンパク質中のシステイン残基を還元した。その後、55 mM のヨードアセトアミドを $5 \mu\text{L}$ 加え、37 度で 30 分インキュベーションしてシステイン残基をアルキル化した。そこに 0.5 mg/mL のエンドプロテアーゼ

Lys-C(和光純薬)を $5\mu\text{L}$ 加え、 37°C で 4 時間インキュベーションしタンパク質を消化した。 135 mL の 50 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液を加えた後、 0.5 mg/mL のトリプシン (プロメガ社製、Cat. No. V5111) を $10\mu\text{L}$ 加え、 37°C で 10 時間インキュベーションし、Lys-C 消化ペプチドおよび未消化タンパク質を消化した。消化後 1%トリフルオロ酢酸水溶液を $10\mu\text{L}$ 加え、トリプシンを失活させ、以後冷蔵保存した。LCMS 分析用試料は、あらかじめアセトニトリルで洗浄後、0.1%TFA 水でコンディショニングしておいた StageTip C18 (自家製、J. Rappsilber, Y. Ishihama, M. Mann, Anal Chem 75 (2003) 663) に $20\mu\text{L}$ アプライした。続いて StageTip C18 を 5%アセトニトリルを含む 0.1% TFA 水 $20\mu\text{L}$ で 3 回洗浄し、試料を $20\mu\text{L}$ の 70%アセトニトリルを含む 0.1%TFA 水で溶出することにより脱塩した。Speedvac で溶媒を揮発させ、 $20\mu\text{L}$ の 5%アセトニトリルを含む 0.1%TFA 水で再溶解した。

次に、この HPLC により分離した試料を LC (C18 column) / MS (Applied Biosystems/MDS-Sciex QSTAR Pulsar i) で測定を行った。このときの条件は、HPLC 側としては C18 シリカゲル (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, $3\mu\text{m}$) を充填した自家製のエレクトロスプレー型カラム (Y. Ishihama, J. Rappsilber, J.S. Andersen, M. Mann, J Chromatogr A 979 (2002) 233.) $0.1 \times 150\text{ mm}$ に移動相 A として 0.5%酢酸水、移動相 B として 80%アセトニトリルを含む 0.5%酢酸水を用いて、初期 B 濃度を 5%として、30 分間、60 分間、120 分間および 180 分間の 4 条件で直線的に 60%とした (表 11)。

表 11

	t_{G} (分)	$\Delta\phi$	t_0 (分)	t_{D} (分)
条件 1	30	0.44	5.4	11
条件 2	60	0.44	6.0	11
条件 3	120	0.44	6.0	11
条件 4	180	0.44	6.0	11

ここでグラジエント時間 t_{G} は、LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使った。グラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量 $\Delta\phi$ は、LC 制御装置にプログラムした設定値をそのまま使って算出した。カラムに保持されな

い試料の溶出時間 t_0 は、ブランク溶液 (0.1%TFA 等) を注入した時のピークより算出した。溶媒変化の遅延時間 t_D は、移動相を切り替えた時のベースライン変化の遅延時間から算出した。

装置には島津製作所の LC-10A シリーズの ROM をマイクロ対応として、また、
5 ミキシングチャンバーとしては付属の島津製作所製を外してバルコ社の T コネクターを採用した。流速としては Flow-splitting 方式を採用し、カラムには約毎分 300 nL の流速となるように調整した。サンプルを CTC 社のオートサンプラーPAL によって 3 μ L 注入し、サンプルを一度インジェクターのサンプルループに注入した後に分析カラムに送り込んだ。

- 10 Protana 社製 XYZ ステージを装備した Applied Biosystems|MDS-Sciex 社の QSTAR Pulsar i に日京テクノス社に特注したカラムホルダーを装着し、エレクトロスプレー一体型カラムの位置を任意に調整できるようにした。ESI 電圧として 2.4 kV をカラムのポンプ側のバルコ社製金属コネクターを通して印加した。測定は、Information dependent acquisition モードで、1 秒間の
15 Survey スキャンの後、最大 4 つの MSMS スキャン (各 1.5 秒) を行った。M SMS mode から Survey scan へのスイッチは 1 スペクトルとした。

得られたデータから、Mascot (Matrixscience 社) および Swiss-Prot データベースを用いてタンパク質の自動同定を行い、Mascot のクライテリア (95%信頼値) を満たすペプチドについてアミノ酸配列を出力した。

- 20 上記 4 条件で大腸菌細胞抽出液可溶画分を各々 1 回ずつ分析し、得られた保持時間 (実測値) を式 (6) に代入した。上記表 1 1 中の定数を下記式 (6) に代入し、 k_0 と S を変数として、保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように、非線形最小二乗法 (MS-EXCEL2000 version9.0.4402 SR-1 のソルバー機能、条件: 準ニュートン法、制限時間 100 秒、反復回数 1000、精度
25 0.00000000001、公差 5%、収束 0.0001) を行い、 k_0 と S を算出した。この時の実測値と計算値の回帰直線の決定係数 (R^2) の最大値、最小値、平均値および標準偏差は、それぞれ 1.0000、0.9987、0.9998、0.0002 であった。

$$t_g = \{t_d / (S \Delta \phi)\} \log \{2.3k_0 t_0 (S \Delta \phi / t_d) + 1\} + t_0 + t_D \quad (6)$$

得られた $\log k_0$ に対し、アミノ酸配列からアミノ酸組成を用いて下記式（４）について、線形重回帰分析を行い、各アミノ酸の係数 E_j および定数項 D を表 1 2 の通り算出した。また、 S についても下記式（１）を用いて各アミノ酸の係数 D_j および定数項 C を表 1 3 の通り求めた。

- 5 保持時間 t_g から線形重回帰分析を行って、 t_g と各アミノ酸の係数および定数項を求めた場合の決定係数（ R^2 ）が **0.8584** であったのに対し、 $\log k_0$ に対して線形重回帰分析を行った場合の R^2 は **0.8986** と誤差が少なかった。アミノ酸組成と S 値、 $\log k_0$ 値との関係を解析するには、保持時間の値を直接用いるよりも保持時間の値から求めた保持尺度である $\log k_0$ の方が適切であると考えられた。

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

表 1 2

 k_0 値の各アミノ酸の係数と定数項

E_j																				D
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	
0.08	-0.27	-0.01	0.11	0.01	0.11	0.01	0.01	-0.28	0.4	0.49	-0.31	0.36	0.57	0.08	0.02	0.1	0.5	0.31	0.27	0.54

表 1 3

 S 値の各アミノ酸の係数と定数項

D_j																				C
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	
0.22	0.2	0.36	0.6	0.37	0.48	0.43	0.16	-0.05	0.11	-0.07	0.21	-0.05	-0.07	0.35	0.31	0.23	-0.3	0.35	0.22	9.92

解 析 に は PasTAN for windows v1.6.6

(<http://homepage2.nifty.com/MicroToshi/>)を用いた。

- 20 実施例 2 : k_0 値の推定値と実測値の比較による同定したペプチド配列の確かさの検証

ペプチドの試料として、マウス神経芽細胞種 Neuro2A の細胞抽出液を用いた。

Neuro2A の培地には、10 % 牛胎児血清（MOREGATE 社、BATCH 32300102）、100U/ml ペニシリン G、100 μ g/ml ストレプトマイシン

- 25 （GIBCO 社、15140-122）を含む RPMI-1640（Sigma 社、R-7130）を用い、

5% CO₂ 下 37 度で培養した (15cm 径皿 2 枚)。得られた細胞を超音波により破砕し、得られたタンパク質混合物溶液の 1% (210 μ g 相当) を SpeedVac にて凍結乾燥した。尿素 (Bio-Rad 社 Cat. No. 161-0731) 8 M を含む 0.05 M Tris 緩衝液 (pH 9.0, Sigma 社製) 50 μ L で再溶解し、10 mM ディチオスレイ
 5 トール (和光純薬 Cat. No. 045-08974: DTT) を 5 μ L 加え、37 度で 30 分インキュベーションしてタンパク質中のシステイン残基を還元した。その後、55 mM のヨードアセトアミドを 5 μ L 加え、37 度で 30 分インキュベーションしてシステイン残基をアルキル化した。そこに 0.5 mg/mL のエンドペプチダーゼ Lys-C(和光純薬)を 5 μ L 加え、37 度で 4 時間インキュベーションした。135
 10 mL の 50 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液を加えた後、0.5 mg/mL のトリプシン (プロメガ社製、Cat. No. V5111) を 10 μ L 加え、37 度で 10 時間インキュベーションし、タンパク質を消化した。消化後 1%トリフルオロ酢酸水溶液を 10 μ L 加え、トリプシンを失活させ、以後冷蔵保存した。

LCMS 分析用試料は、あらかじめアセトニトリルで洗浄後、0.1%TFA 水でコ
 15 ンディショニングしておいた StageTip C18 (自家製、J. Rappsilber, Y. Ishihama, M. Mann, Anal Chem 75 (2003) 663) に 20 μ L アプライした。続いて StageTip C18 を 5%アセトニトリルを含む 0.1%TFA 水 20 μ L で 3 回洗浄し、試料を 20 μ L の 70%アセトニトリルを含む 0.1% TFA 水で溶出することにより脱塩した。Speedvac で溶媒を揮発させ、20 μ L の 5%アセトニトリルを
 20 含む 0.1% TFA 水で再溶解した。

表 1 4

条件	LCMS システム	グラジェント	流速 (nL/min)	測定日	カラム	充填剤
1	LCQ	long	750	Day1	150 μ mID, 15 cmL	ReproSil 5 μ m
2	QSTAR	long	300	Day2	100 μ mID, 15 cmL	ReproSil 3 μ m
3	LCQ	long	750	Day3	150 μ mID, 15 cmL	L-column 5 μ m
4	QSTAR	short	300	Day4	条件 2 と同じ	
5	LCQ	long	1000	Day1	条件 1 と同じ	

次に、この試料を表 1 4 に示す 5 つの条件で 2 つの異なる LC-MS/MS システム (LCQ システムおよび QSTAR システム) を用いて LC-MS/MS 分析を行った。

- LCQ システムの HPLC 装置としては C18 シリカゲル (ReproSil-Pur 120
5 C18-AQ, 5 μ m 径、Dr.Maisch 社もしくは L-column ODS, 5 μ m 径、化学物質評価研究機構) を充填した自家製のエレクトロスプレー型カラム (Y. Ishihama, J. Rappsilber, J.S. Andersen, M. Mann, J Chromatogr A 979 (2002) 233.) 0.15 x 150 mm に移動相 A として 0.5%酢酸水、移動相 B として
10 B 濃度を 5%として、最初の 5 分間で移動相 B を直線的に 10%、次の 60 分間で直線的に 30%、その後 5 分間で直線的に 100%とし、その後移動相 B を 100%にして 10 分間維持、その後移動相 B を 5%として 30 分後に次のサンプルを注入した。装置には島津製作所の LC-10A シリーズの ROM をマイクロ対応として、
15 また、ミキシングチャンバーとしては付属の島津製作所製を外してバルコ社の T コネクターを採用した。流速としては Flow-splitting 方式を採用し、カラムには約毎分 750-1000nL の流速となるように調整した。サンプルを CTC 社のオートサンプラーPAL によって 8 μ L 注入し、サンプルを一度インジェクターのサンプルループに注入した後に分析カラムに送り込んだ。質量分析装置は、AMR 社製 XYZ ステージを装備した ThermoElectron 社の Finnigan LCQ
20 Advantage に自家製のカラムを装着し、エレクトロスプレー型カラムの位置を任意に調整できるようにした。ESI 電圧としては 2.4kV をカラムのポンプ側のバルコ社製金属コネクターを通して印加した。測定は、Data Dependent モードで Dynamic Exclusion の Repeat を 1 とした。なお、スキャン回数を稼ぐために Zoom Scan モードを外したいわゆるダブルプレーモードで測定した。
- 25 QSTAR システムの HPLC 装置としては C18 シリカゲル (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 3 μ m 径、Dr.Maisch 社) を充填した自家製のエレクトロスプレー型カラム (Y. Ishihama, J. Rappsilber, J.S. Andersen, M. Mann, J Chromatogr A 979 (2002) 233.) 0.1 x 100 mm に移動相 A として LCQ シス

テムのグラジエントと同じく、0.5%酢酸水、移動相 B として 80%アセトニ
 リルを含む 0.5%酢酸水を用いた。グラジエント溶出条件は傾きを変えた 2 種類
 (long および short) のものを用いた。Long グラジエント条件は、初期 B 濃度
 を 5%として、最初の 65 分で B 濃度を 5%から 30%にし、その後、5 分間で
 5 100%とし、その後移動相 B を 100%にして 10 分間維持、その後移動相 B を
 5%として 30 分後に次のサンプルを注入した。Short グラジエント条件は、初
 期 B 濃度を 5%として、最初の 10 分間で直線的に 30%、その後 5 分間で直線的
 に 100%とし、その後移動相 B を 100%にして 10 分間維持、その後移動相 B
 を 5%として 30 分後に次のサンプルを注入した。装置には島津製作所の LC-
 10 10A シリーズの ROM をマイクロ対応として、また、ミキシングチャンバーとし
 ては付属の島津製作所製を外してバルコ社の T コネクターを採用した。流速と
 しては Flow-splitting 方式を採用し、カラムには約毎分 300 nL の流速となる
 ように調整した。サンプルを CTC 社のオートサンプラーPAL によって 3 μL 注
 入し、サンプルを一度インジェクターのサンプルループに注入した後に分析カ
 15 ムに送り込んだ。Protana 社製 XYZ ステージを装備した Applied Biosystems
 /MDS-Sciex 社の QSTAR Pulsar i に日京テクノス社に特注したカラムホルダ
 ーを装着し、エレクトロスプレー—体型カラムの位置を任意に調整できるように
 した。ESI 電圧として 2.4 kV をカラムのポンプ側のバルコ社製金属コネクター
 を通して印加した。測定は、Information dependent acquisition モードで、1
 20 秒間の Survey スキャンの後、最大 3 つの MSMS スキャン (各 0.6 秒) を行っ
 た。MSMS mode から Survey scan へのスイッチは 1 スペクトルとした。

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

$$t_g = \{t_g / (S \Delta \phi)\} \log \{2.3k_0 t_0 (S \Delta \phi / t_g) + 1\} + t_0 + t_D \quad (6)$$

25 得られたデータについては、Mascot (Matrixscience 社) および Swiss-Prot
 データベース用いてタンパク質の自動同定を行った。個々のペプチドのマスコッ
 トスコアが 95%の同定精度以上のもののみを選択し出力した。出力されたペプ
 チドのアミノ酸配列から上記式 (1), (4) を用いて S 値および log k₀ の推

定値を求めた。また上記式 (6) を用いて t_0 、 t_D 、 $\Delta\phi/t_G$ を変数として保持時間の実測値の $\log k_0$ 推定値への回帰計算を行い、 t_0 、 t_D 、 $\Delta\phi/t_G$ を決定すると共に $\log k_0$ の実測値を求めた。

その結果、条件 5 で得られたペプチドの保持時間に対して、条件 1 から 4 で得られたペプチドの保持時間をプロットすると図 1 に示すように、それぞれ直線関係は認められるものの、保持時間の値自体はまったく違う数字を示した。これに対し、保持時間を $\log k_0$ に変換した後、条件 5 で得られた値に対して、他の条件での値をプロットすると図 2 に示すように $y=x$ の相関直線が得られた。この時、条件 5 の保持尺度に対する他の条件での保持尺度の差を調べると、平均値 0.035、標準偏差 0.025 が得られた。

本発明の方法により、異なる条件下で得られた保持時間を、測定条件とは独立な値 $\log k_0$ に変換できることが明らかとなり、 $\log k_0$ が保持時間に変わる保持尺度として使用できることが明らかとなった。

さらに条件 2 で得られたペプチドについて、 $\log k_0$ の推定値と実測値の差 ($\Delta \log k_0$) を、Mascot で同定する際の Probability score に対してプロットした (図 3)。信頼値が 95% 以下である Probability score 30 以下では $\log k_0$ 値の推定値と実測値との差が大きいのに対し、信頼値が 95% 以上である Probability score 30 以上では差は小さく、ほぼ 0.5 以下に収まっていた。

以上の結果より、 $\log k_0$ の推定値と実測値の差を、ペプチドの同定結果の検証に用いることが可能であることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

本方法は、プロテオーム技術においてペプチドを同定するにあたり、MS により得られた質量情報あるいはアミノ酸配列情報を基に、データベース検索を行って推定されたアミノ酸配列が正しいか否かの検証に、LC の保持時間の情報を用いることが可能となり、ペプチドの同定をより精度高く行うことができるようになった。

請求の範囲

1. ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときのペプチドのアミノ酸組成と下記式（８）中の S 値との関係を解析する方法であって、

$$\log k = \log k_0 - S \phi \quad (8)$$

[式中、

k は固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数との比であり、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

$\log k_0$ は $\phi=0$ のときの $\log k$ の値であり、

S は当該ペプチドに固有の値である。]

以下の工程：

- (a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する工程、
- (b) 工程(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、 S 値及び k_0 値の関係式に代入して、 S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値とを算出する工程、
- (c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める工程、並びに
- (d) 複数のペプチドについて、工程(b)から得られた S 値と、工程(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式（１）に代入して線形重回帰分析を行って、下記式（１）の各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C を求める工程を含む、上記方法。

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

[式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

2. 工程(b)におけるペプチドの保持時間、 S 値及び k_0 値の関係式が、下記式 (2) から導かれる式、又は式 (2) から導かれる近似式である、請求項 1 に記載の方法。

$$\int_0^{t_g - t_0 - t_D} \frac{d[f^{-1}(\phi)]}{10^{(\log k_0 - S\phi)}} = t_0 - \frac{t_D}{k(a)} \quad (2)$$

5 [式中、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、時間 t と共に下記式 (3) に従って変化するものであり、

$$\phi = f(t) \quad (3)$$

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

10 t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

t_g は当該ペプチドの保持時間であり、

$k(a)$ は移動相中の有機溶媒の初期濃度 a の時の k の値である。]

3. 工程(c)におけるアミノ酸配列情報が、当該ペプチドを質量分析により分析し、得られた質量情報又はアミノ酸配列情報を基に、当該ペプチドを同定
15 することによって得られた当該ペプチドのアミノ酸配列情報である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

4. ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときのペプチドのアミノ酸組成と下記式 (8) 中の k_0 値との関係を解析する方法であって、

$$20 \quad \log k = \log k_0 - S\phi \quad (8)$$

[式中、

k は固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数との比であり、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

25 $\log k_0$ は $\phi=0$ のときの $\log k$ の値であり、

S は当該ペプチドに固有の値である。]

以下の工程：

- (a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する工程、
- (b) 工程(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、S 値及び k_0 値の関係式に代入して、S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値とを算出する工程、
- (c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める工程、並びに
- (d) 複数のペプチドについて、工程(b)から得られた k_0 値と、工程(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式(4)に代入して線形重回帰分析を行って、下記式(4)の各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D を求める工程を含む、上記方法。

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

[式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

5. 工程(b)におけるペプチドの保持時間、S 値及び k_0 値の関係式が、下記式(2)から導かれる式、又は式(2)から導かれる近似式である、請求項4に記載の方法。

$$\int_0^{t_g - t_0 - t_D} \frac{d[f^{-1}(\phi)]}{10^{(\log k_0 - S\phi)}} = t_0 - \frac{t_D}{k(a)} \quad (2)$$

[式中、

- ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、時間 t と共に下記式(3)に従って変化するものであり、

$$\phi = f(t) \quad (3)$$

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

t_g は当該ペプチドの保持時間であり、

$k(a)$ は移動相中の有機溶媒の初期濃度 a の時の k の値である。]

6. 工程(c)におけるアミノ酸配列情報が、当該ペプチドを質量分析により分析し、得られた質量情報又はアミノ酸配列情報を基に、当該ペプチドを同定することによって得られた当該ペプチドのアミノ酸配列情報である、請求項4または5に記載の方法。

5 7. ϕ が下記式 (5) に従って時間 t と共に直線的に変化する、請求項2、3、5、及び6のいずれか一項に記載の方法。

$$\phi = f(t) = \frac{\Delta\phi}{t_g} t + a \quad (5)$$

[式中、

t は時間であり、

10 $\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

t_g はグラジエント時間であり、

a は移動相中の有機溶媒の初期濃度である。]

8. 式(2)から導かれる式が下記式(6)である請求項7に記載の方法。

$$t_g = \{t_g / (S\Delta\phi)\} \log \{2.3k_0 t_0 (S\Delta\phi / t_g) + 1\} + t_0 + t_D \quad (6)$$

15 [式中、

$\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

t_g はグラジエント時間であり、

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

20 t_g は当該ペプチドの保持時間である。]

9. ペプチドのアミノ酸配列の確かさを検証する方法であって、以下の工程：

(a) ペプチドを、ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときの、ペプチドの保持時間を測定する工程、

(b) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める工程、

25

(c) 工程(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに請求項4～6のいずれか一項に記載の方法により求めた各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D であって、

工程(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式(4)に代入して、当該ペプチドの k_0 の推定値を計算する工程、

(d) 工程(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに請求項1～3のいずれか一項に記載の方法により求めた各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C であって、

5 工程(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式(1)に代入して、当該ペプチドの S 値を計算する工程、

(e) 工程(a)で得られた当該ペプチドの保持時間、工程(d)で得られた S 値、並びに工程(a)の液体クロマトグラフィー分析条件において測定された t_0 、 t_D 、 t_G 、 a 及び $\Delta\phi$ を、下記式(7)に代入して k_0 の実測値を計算する工程、
10 並びに

(f) 工程(c)で得られた k_0 の推定値の対数と、工程(e)で得られた k_0 の実測値の対数の差を指標として、工程(b)で同定されたペプチド配列の確かさを判断する工程

を含む、上記方法。

15
$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

$$k_0 = \frac{t_G}{2.3S\Delta\phi t_0} [-1 + 10^{S\{(t_g - t_0 - t_D)\Delta\phi / t_G\}}] \quad (7)$$

[式(4)、(1)及び(7)中；

n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数であり、

20 $\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

t_G はグラジエント時間であり、

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

t_g は当該ペプチドの保持時間である。]

25 10. 工程(e)が以下の工程；

(e') 工程(a)で得られた当該ペプチドの保持時間、工程(d)で得られた S 値を下記式(7)に代入し、 t_0 、 t_D 、 $\Delta\phi / t_G$ を変数にして k_0 の実測値を計算し、得

られた k_0 実測値の対数と、工程(c)で得られた k_0 推定値の対数との間で残差平方和が最小になるように最小二乗法を行い t_0 、 t_D 、 $\Delta\phi/t_G$ を求めて、 k_0 の実測値を計算する工程

である、請求項 9 に記載の方法。

$$5 \quad k_0 = \frac{t_G}{2.3S\Delta\phi t_0} [-1 + 10^{S\{(t_g - t_0 - t_D)\Delta\phi/t_G\}}] \quad (7)$$

[式中；

$\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

t_G はグラジエント時間であり、

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

10 t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

t_g は当該ペプチドの保持時間である。]

1 1. 固定相が C18 カラムであり、移動相が 0.5%酢酸水と有機溶媒とからなる緩衝液である請求項 9 又は 10 に記載の方法であって、

15 工程(c)において、請求項 4～6 のいずれか一項に記載の方法により求めた各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D に代えて、表 1 に記載の E_j 及び D を用いる上記方法。

表 1

k ₀ 値の各アミノ酸の係数と定数項																				
E _j																				D
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	
0.08	-0.27	-0.01	0.11	0.01	0.11	0.01	0.01	-0.28	0.4	0.49	-0.31	0.36	0.57	0.08	0.02	0.1	0.5	0.31	0.27	0.54

1 2. 固定相が C18 カラムであり、移動相が 0.5%酢酸水とアセトニトリルとからなる緩衝液である請求項 9～11 のいずれか一項記載の方法であって、

20 工程(d)において、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法により求めた各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C に代えて、表 2 に記載の D_j 及び C を用いる上記方法。

表 2

S値の各アミノ酸の係数と定数項

D _j																			C	
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y		V
0.22	0.2	0.36	0.6	0.37	0.48	0.43	0.16	-0.05	0.11	-0.07	0.21	-0.05	-0.07	0.35	0.31	0.23	-0.3	0.35	0.22	9.92

- 1 3. ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときのペプチドのアミノ酸組成と下記式 (8) 中の S 値との関係を解析するためのシステムであって、

$$\log k = \log k_0 - S \phi \quad (8)$$

[式中、

k は固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数との比であり、

- 10 ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

$\log k_0$ は $\phi=0$ のときの $\log k$ の値であり、

S は当該ペプチドに固有の値である。]

以下の手段：

- (a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する手段、
- 15 (b) 手段(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、S 値及び k_0 値の関係式に代入して、S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値とを算出する手段、
- 20 (c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、並びに
- (d) 複数のペプチドについて、手段(b)から得られた S 値と、手段(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式 (1) に代入して線形重回帰分析を行って、下記式 (1) の各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C を求める手段
- 25 を含む、上記システム。

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

[式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

- 1 4. ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときのペプチドのアミノ酸組成と下記式 (8) 中の k_0 値との関係を解析するためのシステムであって、

$$\log k = \log k_0 - S \phi \quad (8)$$

5 [式中、

k は固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数との比であり、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

$\log k_0$ は $\phi = 0$ のときの $\log k$ の値であり、

10 S は当該ペプチドに固有の値である。]

以下の手段：

- (a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する手段、
- (b) 手段(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、 S 値及び k_0 値の関
- 15 係式に代入して、 S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値とを算出する手段、
- (c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、並びに
- 20 (d) 複数のペプチドについて、手段(b)から得られた k_0 値と、手段(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式 (4) に代入して線形重回帰分析を行って、下記式 (4) の各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D を求める手段を含む、上記システム。

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

25 [式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

- 1 5. ペプチドのアミノ酸配列の確かさを検証するためのシステムであって、以下の手段：

(a) ペプチドを、ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときの、ペプチドの保持時間を測定する手段、

(b) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、

5 (c) 手段(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに請求項 1 4 に記載のシステムにより求めた各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D であって、手段(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式 (4) に代入して、当該ペプチドの k_0 の推定値を計算する手段、

10 (d) 手段(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに請求項 1 3 に記載のシステムにより求めた各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C であって、手段(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式 (1) に代入して、当該ペプチドの S 値を計算する手段、

15 (e) 手段(a)で得られた当該ペプチドの保持時間、手段(d)で得られた S 値、並びに手段(a)の液体クロマトグラフィー分析条件において測定された t_0 、 t_D 、 t_G 、 a 及び $\Delta\phi$ を、下記式 (7) に代入して k_0 の実測値を計算する手段、並びに

(f) 手段(c)で得られた k_0 の推定値の対数と、手段(e)で得られた k_0 の実測値の対数の差を指標として、手段(b)で同定されたペプチド配列の確かさを判断する手段

20 を含む、上記システム。

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

$$k_0 = \frac{t_G}{2.3S \Delta\phi t_0} [-1 + 10^{S\{(t_g - t_0 - t_D) \Delta\phi / t_G\}}] \quad (7)$$

[式 (4)、(1) 及び (7) 中；

25 n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数であり、

$\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、

t_G はグラジエント時間であり、

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、

t_D は溶媒変化の遅延時間であり、

t_g は当該ペプチドの保持時間である。]

- 1 6. ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったと
5 きのペプチドのアミノ酸組成と下記式 (8) 中の S 値との関係を解析するためのプログラムであって、

$$\log k = \log k_0 - S \phi \quad (8)$$

[式中、

k は固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数
10 との比であり、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

$\log k_0$ は $\phi=0$ のときの $\log k$ の値であり、

S は当該ペプチドに固有の値である。]

コンピュータを、以下の手段：

- 15 (a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する手段、
(b) 手段(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、 S 値及び k_0 値の
関係式に代入して、 S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残
差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と
20 k_0 値とを算出する手段、
(c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求め
る手段、並びに
(d) 複数のペプチドについて、手段(b)から得られた S 値と、手段(c)から得ら
れたアミノ酸組成とを、下記式 (1) に代入して線形重回帰分析を行って、
25 下記式 (1) の各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C を求める手段
として機能させるためのプログラム。

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

[式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

- 1 7. ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときのペプチドのアミノ酸組成と下記式 (8) 中の k_0 値との関係を解析するためのプログラムであって、

$$\log k = \log k_0 - S \phi \quad (8)$$

5 [式中、

k は固定相中の当該ペプチドのモル数と、移動相中の当該ペプチドのモル数との比であり、

ϕ は移動相中の有機溶媒量であり、

$\log k_0$ は $\phi=0$ のときの $\log k$ の値であり、

10 S は当該ペプチドに固有の値である。]

コンピュータを、以下の手段：

(a) ペプチドを、当該固定相及び当該移動相の下で、複数の分析条件で液体クロマトグラフィー分析して、各ペプチドの保持時間を測定する手段、

(b) 手段(a)で得られたペプチドの保持時間を、保持時間、 S 値及び k_0 値の関係式に代入して、 S 値と k_0 値を変数として保持時間の実測値と計算値の残差平方和が最小となるように最小二乗法を行い、当該ペプチドの S 値と k_0 値とを算出する手段、

(c) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、並びに

20 (d) 複数のペプチドについて、手段(b)から得られた k_0 値と、手段(c)から得られたアミノ酸組成とを、下記式 (4) に代入して線形重回帰分析を行って、下記式 (4) の各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D を求める手段として機能させるためのプログラム。

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

25 [式中； n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数である。]

- 1 8. ペプチドのアミノ酸配列の確かさを検証するためのプログラムであって、コンピュータを、以下の手段：

(a) ペプチドを、ある固定相及びある移動相により液体クロマトグラフィー分析を行ったときの、ペプチドの保持時間を測定する手段、

(b) 当該ペプチドのアミノ酸配列情報から当該ペプチドのアミノ酸組成を求める手段、

5 (c) 手段(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに請求項 1 7 に記載のプログラムにより求めた各アミノ酸の係数 E_j 及び定数項 D であって、手段(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式 (4) に代入して、当該ペプチドの k_0 の推定値を計算する手段、

10 (d) 手段(b)で得られたアミノ酸組成の情報、並びに請求項 1 6 に記載のプログラムにより求めた各アミノ酸の係数 D_j 及び定数項 C であって、手段(a)の当該固定相及び当該移動相の下で求めたものを、下記式 (1) に代入して、当該ペプチドの S 値を計算する手段、

15 (e) 手段(a)で得られた当該ペプチドの保持時間、手段(d)で得られた S 値、並びに手段(a)の液体クロマトグラフィー分析条件にいて測定された t_0 、 t_D 、 t_G 、 a 及び $\Delta\phi$ を、下記式 (7) に代入して k_0 の実測値を計算する手段、並びに

(f) 手段(c)で得られた k_0 の推定値の対数と、手段(e)で得られた k_0 の実測値の対数の差を指標として、手段(b)で同定されたペプチド配列の確かさを判断する手段

20 として機能させるためのプログラム。

$$\log k_0 = \sum (E_j \times n_j) + D \quad (4)$$

$$S = \sum (D_j \times n_j) + C \quad (1)$$

$$k_0 = \frac{t_G}{2.3S\Delta\phi t_0} [-1 + 10^{S\{(t_g - t_0 - t_D)\Delta\phi / t_G\}}] \quad (7)$$

[式 (4)、(1) 及び (7) 中；

25 n_j は、当該ペプチド中の各アミノ酸の個数であり、
 $\Delta\phi$ はグラジエントにおける移動相中の有機溶媒の変化量であり、
 t_G はグラジエント時間であり、

t_0 はカラムに保持されない試料の溶出時間であり、
 t_D は溶媒変化の遅延時間であり、
 t_g は当該ペプチドの保持時間である。]

図1

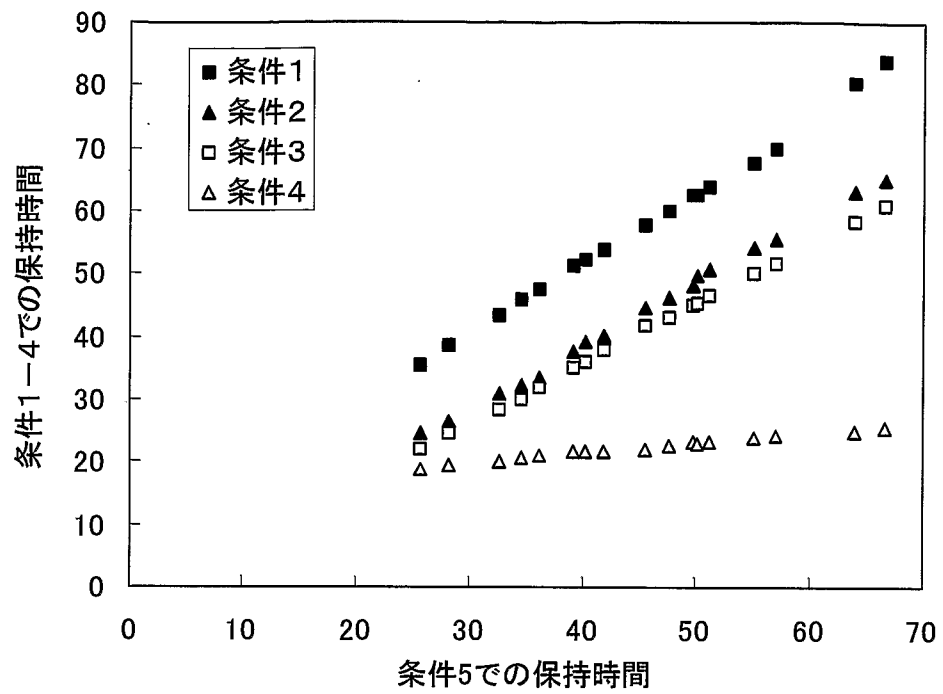


図2

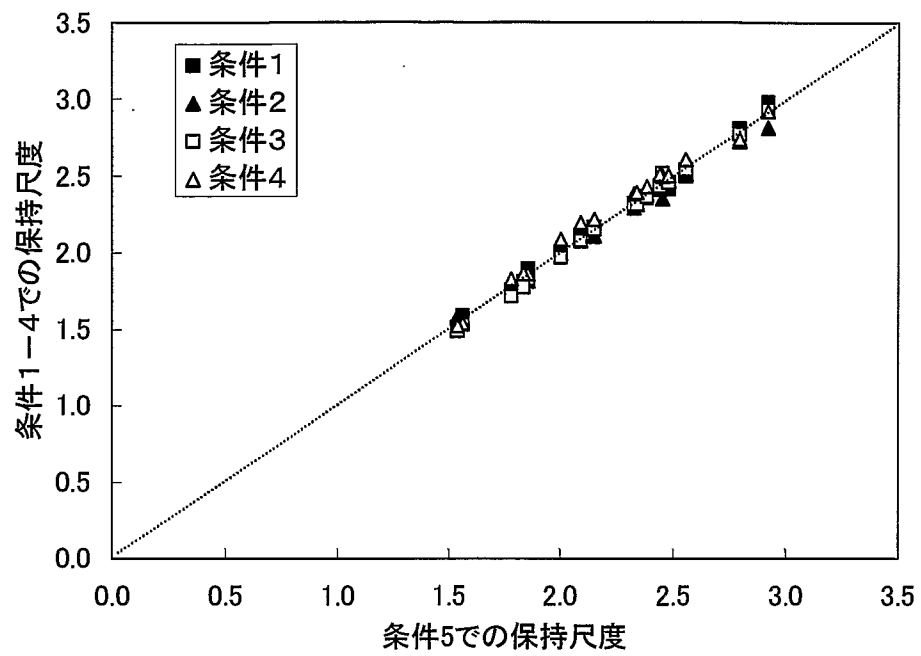


図3

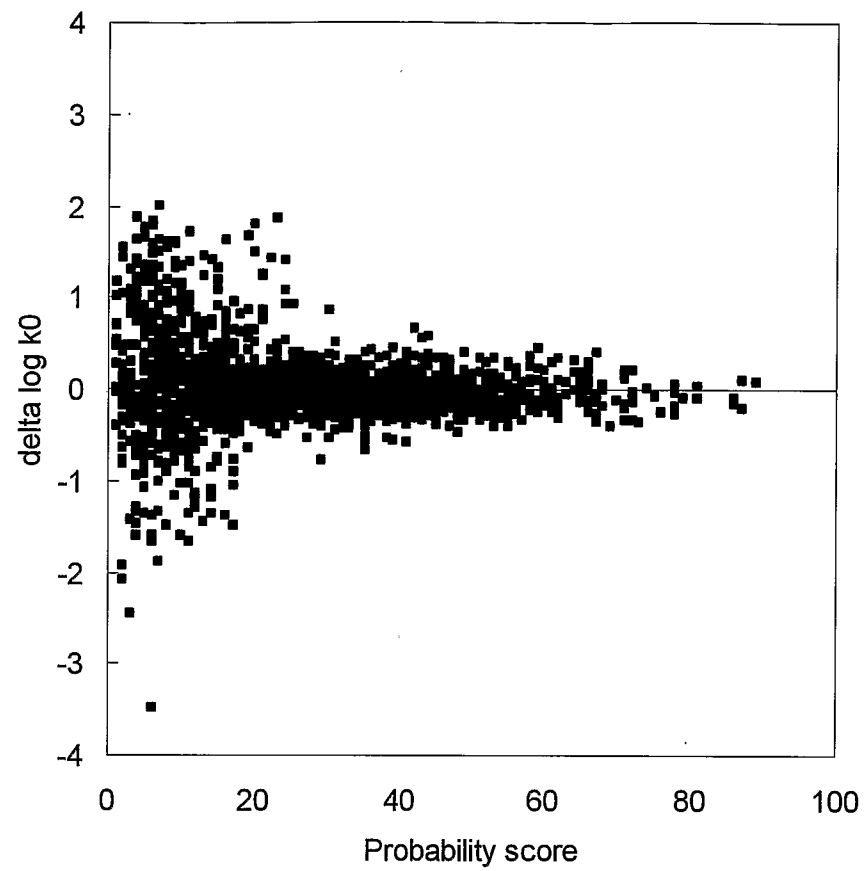


図4

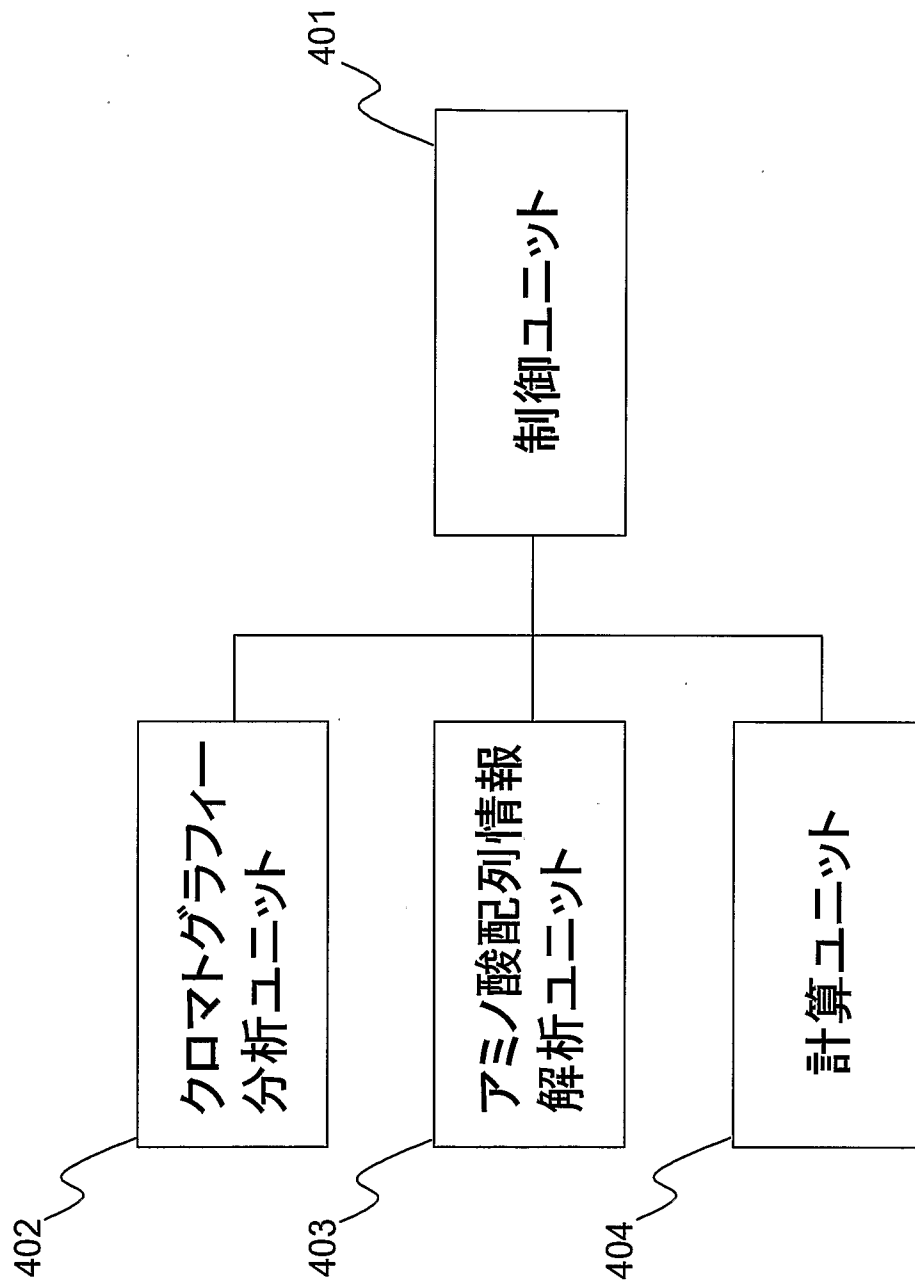


図5

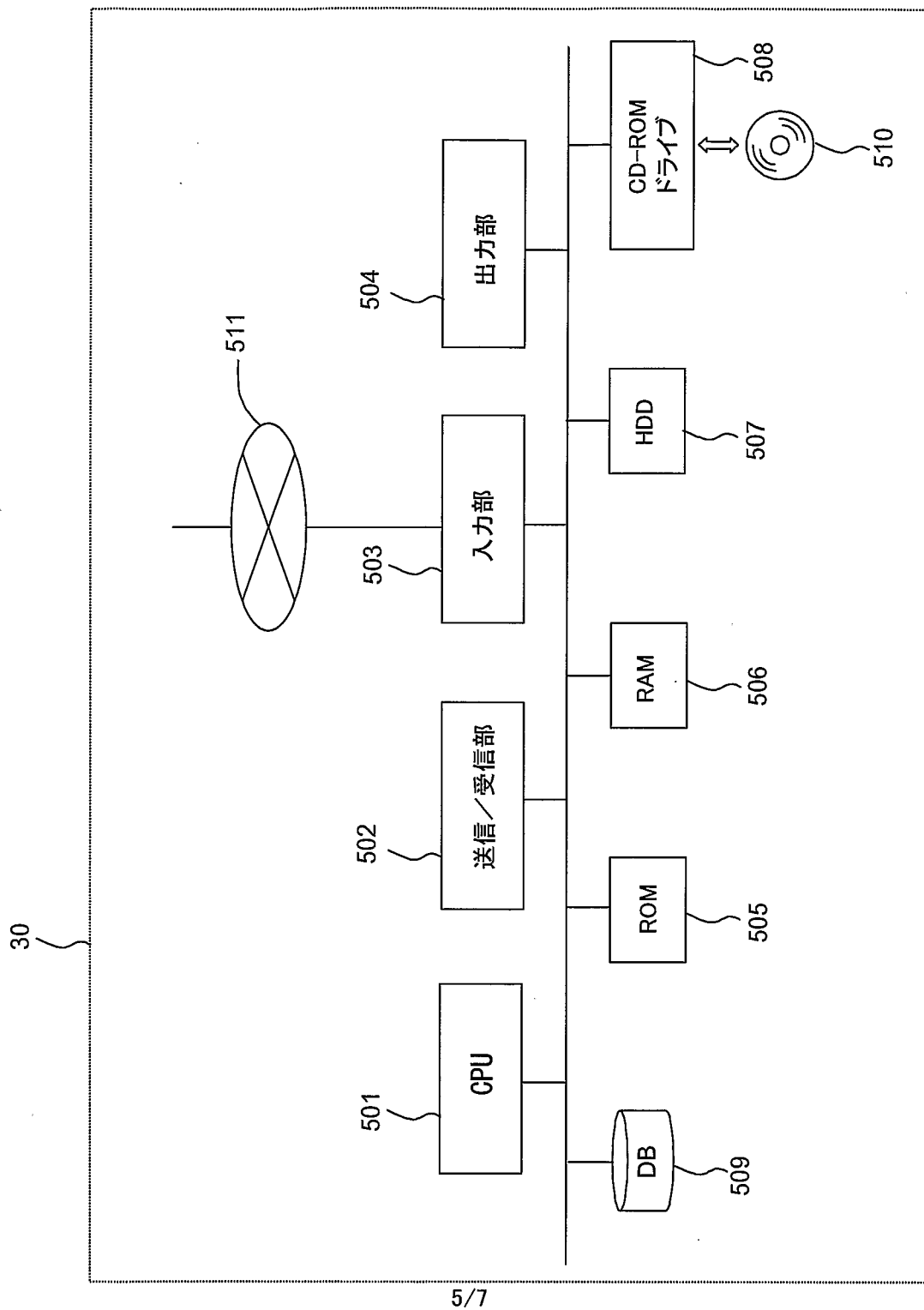


図6

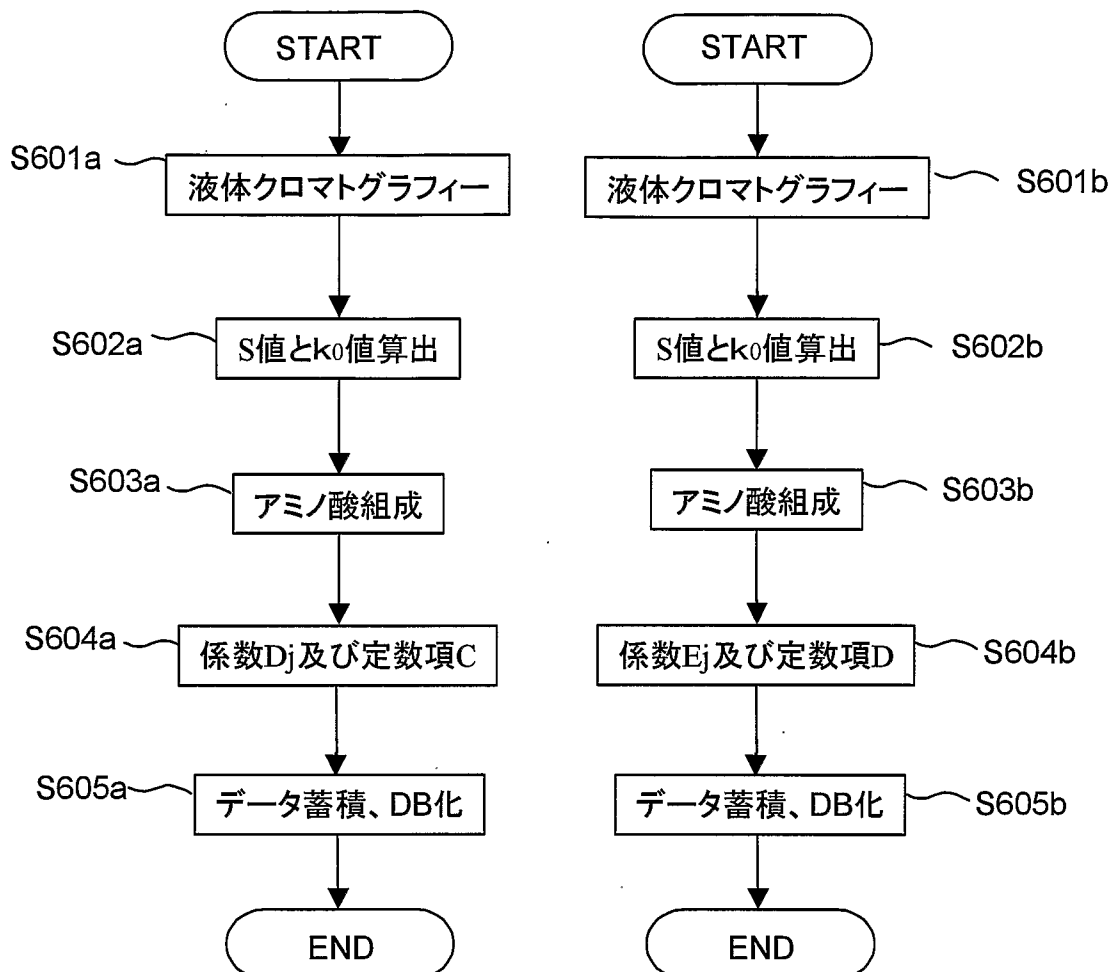
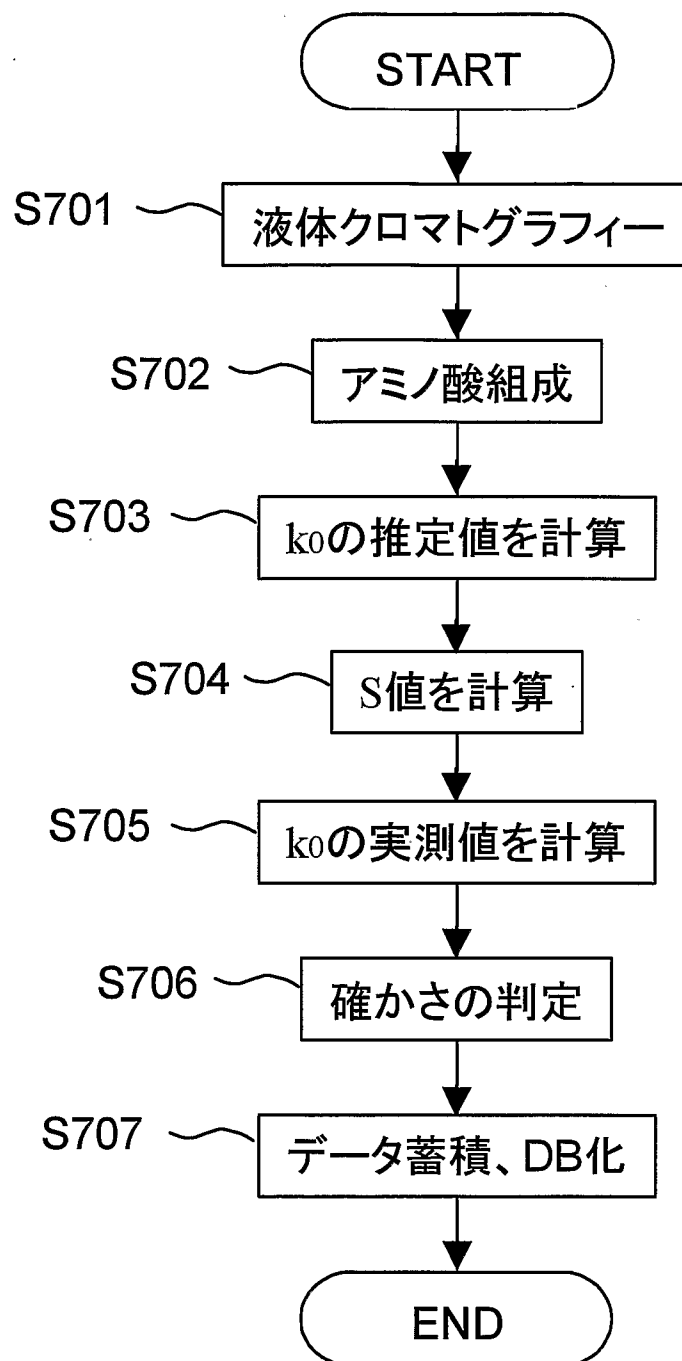


図7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/315549

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N30/88(2006.01) i, G01N30/86(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N30/88, G01N30/86

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Tatsunari Yoshida, Calculation of peptide retention coefficients in normal-phase liquid chromatography, Journal of Chromatography A, vol.808, p.105-112, 1998	1-18
A	G.Vivo-Truyols, Error analysis and performance of different retention models in the transfer of data from/to isocratic/gradient elution, Journal of Chromatography A, vol.1018, p.169-181, 2003	1-18
A	Tatsunari Yoshida, Prediction of peptide retention times in normal-phase liquid chromatography with only a single gradient run, Journal of Chromatography A, vol.841, p.19-32, 1999	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October, 2006 (23.10.06)

Date of mailing of the international search report

31 October, 2006 (31.10.06)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N30/88(2006.01)i, G01N30/86(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N30/88, G01N30/86			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 0 6 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 0 6 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 0 6 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	Tatsunari Yoshida, Calculation of peptide retention coefficients in normal-phase liquid chromatography, Journal of Chromatography A, vol.808, p.105-112, 1998	1-18	
A	G.Vivo-Truyols, Error analysis and performance of different retention models in the transference of data from/to isocratic/gradient elution, Journal of Chromatography A, vol.1018, p.169-181, 2003	1-18	
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 2 3 . 1 0 . 2 0 0 6		国際調査報告の発送日 3 1 . 1 0 . 2 0 0 6	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 宮澤 浩 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2	2 J 9 4 0 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Tatsunari Yoshida, Prediction of peptide retention times in normal-phase liquid chromatography with only a single gradient run, Journal of Chromatography A, vol.841, p.19-32, 1999	1-18