

## UV-Vis によるタンパク質の吸光係数と濃度の決定

Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計による  
ラボの効率と生産性の向上



### 著者

Aveline Neo  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

本研究では、タンパク質の吸光係数を決定する際に、Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計と Agilent Cary ワークステーションソフトウェアの高度な機能が有効であることを明確に示します。これらの測定により、タンパク質濃度の正確な計算が可能になります。自動化されたソフトウェア機能を使用することにより、タンパク質濃度の測定が効率化され、アプリケーションの効率と精度が向上します。これらの測定は、モノクローナル抗体 (mAb) やワクチンの創薬から製造や品質管理 (QC) に至るまで、医薬品開発のあらゆる段階においてきわめて重要になります。また、本研究では、2 種類のバイオシミラー (Reditux と Truxima) の吸光係数を先発品 (Ristova) と比較することにより、アミノ酸組成の類似性も評価しています。

## はじめに

タンパク質濃度の測定は、タンパク質間の相互作用やタンパク質とリガンド間の相互作用の研究、および酵素活性の評価においてきわめて重要です。また、モノクローナル抗体 (mAbs) やワクチンなどのタンパク質ベースの治療薬のバイオ医薬品開発および製造においても不可欠です。タンパク質の吸光係数を使用すると、UV 分光分析を用いた 280 nm での吸光度測定により、その濃度を決定することができます。トリプトファン、チロシン、システインなどの芳香族アミノ酸は、280 nm の紫外線を強く吸収するため、溶液中のタンパク質濃度の信頼性の高い指標になります。タンパク質の吸光係数の計算は、ソフトウェアを用いて自動化することができるため、タンパク質の特性解析ラボの研究科学者は、ラボの効率と生産性を向上させることが可能になります。このアプリケーションノートでは、Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアの自動カスタム式計算機能が、タンパク質の吸光係数の決定において有効であることを実証します。

バイオシミラーとは、すでに認可を受けた先発品と同等の品質、安全性、効能を実現するように設計されたバイオ医薬品です。<sup>1</sup> 先発品との分析的類似性を確立することは、バイオシミラー製品の開発および規制当局の承認において不可欠です。<sup>2</sup> 本研究では、Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis を用いた、先発品とバイオシミラー製品の吸光係数の解析の概要についても説明します。

## 実験方法

### 使用装置

データ取り込みは、表 1 に記載のパラメータを用いて、Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis により実施しました。光路長 10 mm、充填量 70  $\mu$ L の超微量角型セル (部品番号 5062-2496) を使用しました。各セルで 50  $\mu$ L のサンプル量を使用しました。Cary 3500 UV-Vis の高度に恒久的に集束されたビームは、小さな開口部も容易に通過するため、少量測定における分析精度が保証されます。可動部のないマルチセルホルダはアライメントが不要で、オペレータが調整しなくても、1 回の実験において最大 8 個のマイクロキュベットで再現性の高い測定結果を得ることができます。

表 1. Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計のパラメータ

パラメータ	値
X モード	nm
Y モード	吸光度測定
収集モード	スキャン
スキャン範囲開始	325 nm
スキャン範囲停止	240 nm
平均化時間	0.020 秒
データ間隔	1.00 nm
スキャン速度	3,000 nm/min
スペクトルバンド幅	2.00 nm
検出器モジュール	マルチセルペルチェ UV-Vis

### 試薬と試料

リゾチーム (鶏卵白、L-6876)、 $\beta$ -カゼイン (C6905)、オボアルブミン (A5503)、塩酸グアニジン (G4505) は、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。先発品 (Ristova) および 2 種類のリツキシマブバイオシミラー (Reditux と Truxima) は、シンガポールの地元の販売代理店から購入しました。

超純水は、0.22  $\mu$ m メンブレンフィルターを装着した Milli-Q Integral システム (Millipak, Merck-Millipore、マサチューセッツ州ビレリカ、米国) で製造しました。

### 実験方法

**Beer-Lambert の法則を用いたタンパク質の吸光係数の決定:** Cary UV ワークステーションソフトウェアには、UV-Vis スキャンから自動的に式を計算する式機能が標準搭載されており、Beer-Lambert の法則を用いたタンパク質の吸光係数の決定が容易になります。リゾチーム、 $\beta$ -カゼイン、オボアルブミン、Ristova を、6 M 塩酸グアニジン中で 1 mg/mL の濃度で調製しました。タンパク質の吸光係数は、Beer-Lambert の法則を用いて決定しました。

Cary ワークステーションソフトウェアの式機能により、式 1 に示すように、タンパク質の吸光係数を自動的に計算しました。

#### 式 1.

$$A = \epsilon cL$$

$$\epsilon = A/cL$$

ここで、A は 280 nm における吸光度、c はモル濃度、L は光路長、 $\epsilon$  はモル吸光係数 ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) です。

沈殿物が存在する場合の散乱の可能性を考慮するために、320 nm での吸光度を補正することを推奨します。

**吸光度測定：**さまざまなタンパク質サンプルの吸光度を 280 nm で測定し、6 M 塩酸グアニジンをブランクとして使用して、ベースライン補正を実施しました。すべての測定は、7つのサンプルチャンネルと1つの参照チャンネルで構成される単一ゾーンにおいて、Cary 3500 UV-Vis により実施しました（図 1）。Cary 3500 マルチセルの 8つのセル位置を考慮して、リゾチーム、β-カゼイン、オボアルブミンは 2 回測定し、Ristova とブランクに対しては単一の位置を使用しました。

Cary UV ワークステーションソフトウェアに標準搭載の式機能により、式をカスタマイズすることができます（図 2）。本研究では、濃度 (mg/mL)、分子量 ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )、光路長 (cm) などのパラメータを、ソフトウェア内で定義しました。その後、式エディタを用いて、吸光係数式を次のように入力しました。ValueAt(280)/(Pathlength × Concentration/MolecularWeight)。この式により、サンプルのタンパク質の吸光係数の自動計算とレポート作成が可能になります。

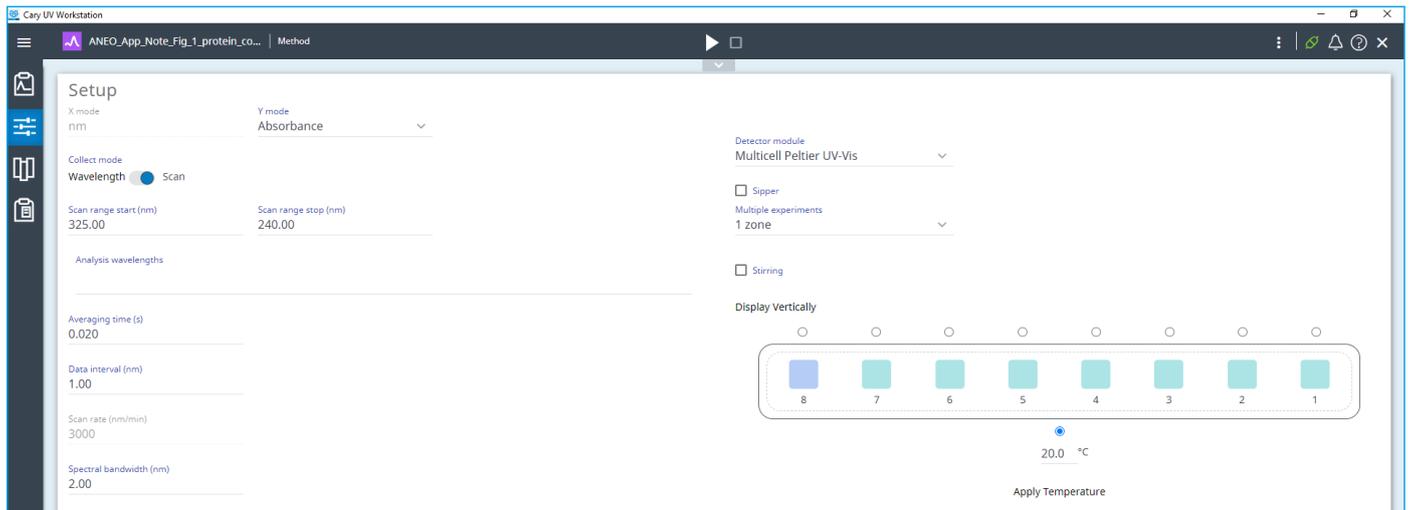


図 1. Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis の単一ゾーン複数実験機能のスクリーンショット。緑色と紫色は、それぞれ単一ゾーン内のサンプルと参照の位置を表しています。

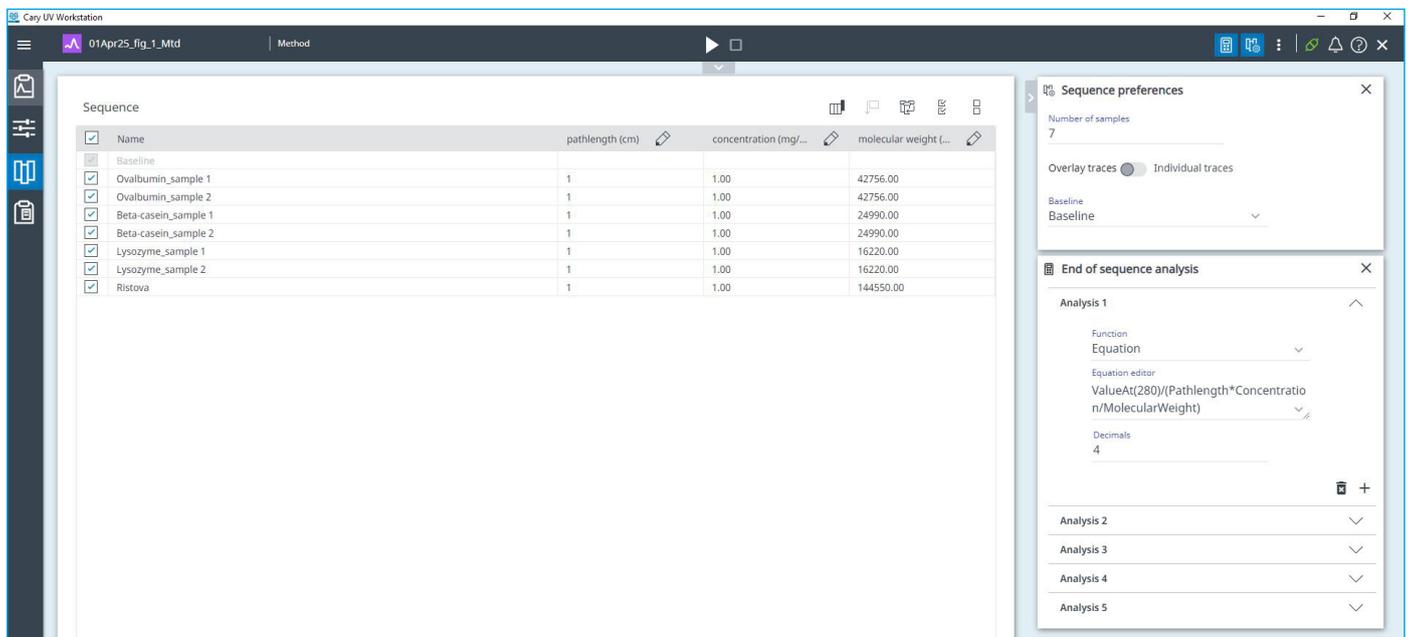


図 2. Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアに標準搭載の式機能により、タンパク質の吸光係数の計算を自動的に実行することができます。

**配列を用いたタンパク質の吸光係数の決定：**タンパク質の吸光係数は、既知のアミノ酸組成またはタンパク質配列データを用いて推定することができます。例えば、6 M 塩酸グアニジン中の変性タンパク質のモル吸光係数は、式 2 を用いて計算することができます。

**式 2.**

$$\epsilon \text{ 塩酸グアニジン} = a\epsilon \text{ Tyr} + b\epsilon \text{ Trp} + c\epsilon \text{ Cys}$$

ここで、

- $\epsilon \text{ Tyr}$ ,  $\epsilon \text{ Trp}$ ,  $\epsilon \text{ Cys}$  は、使用した波長におけるチロシン、トリプトファン、システイン残基のモル吸光係数です。モル吸光係数の値を表 2 に示します。<sup>3</sup>
- a, b, c は、タンパク質分子あたりのそれぞれの残基数です。<sup>3</sup>

**表 2.** 配列を用いて決定した、6.0 M 塩酸グアニジンおよび 0.02 M リン酸緩衝液、pH 6.5 中のトリプトファン、チロシン、システインの吸光係数<sup>3</sup>

アミノ酸残基	さまざまな波長における吸光係数				
	276 nm	278 nm	279 nm	280 nm	282 nm
$\epsilon \text{ Trp}$	5,400	5,600	5,660	5,690	5,600
$\epsilon \text{ Tyr}$	1,450	1,400	1,345	1,280	1,200
$\epsilon \text{ Cys}$	145	127	120	120	100

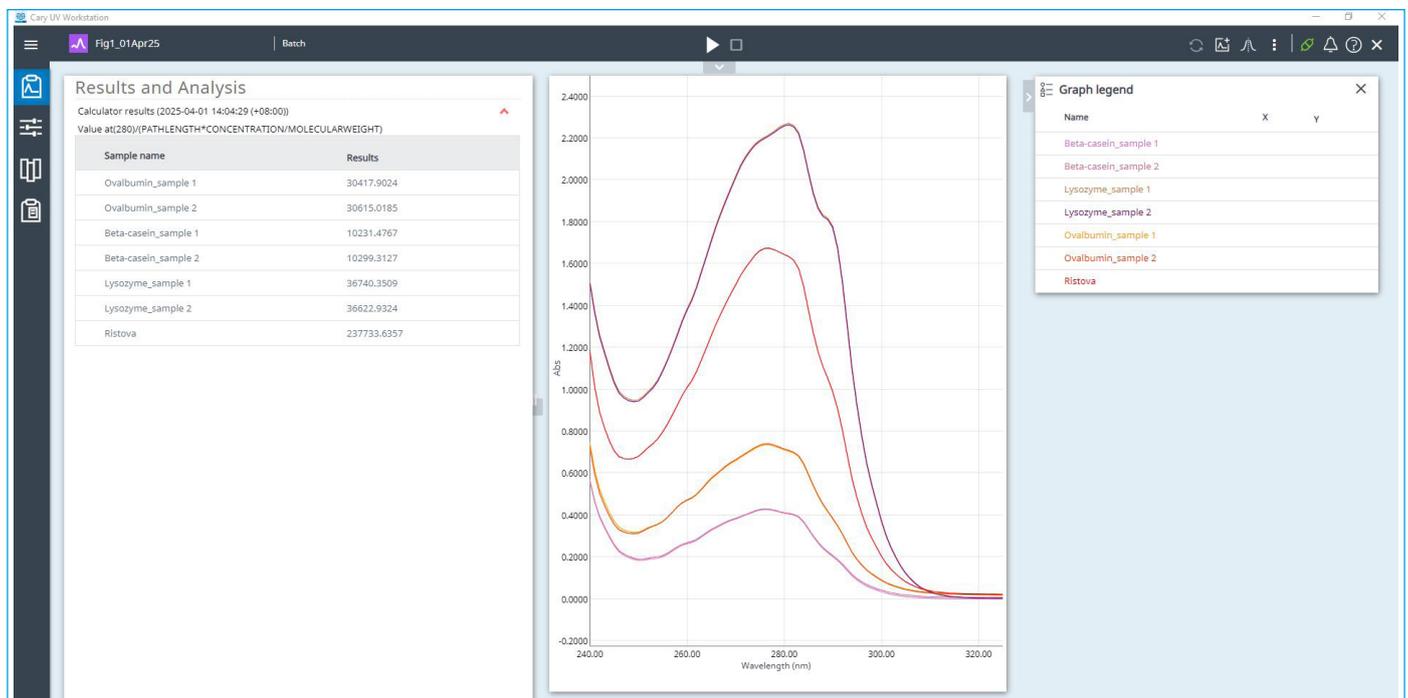
**吸光係数を用いた先発品とバイオシミラーの比較：**本研究では、バイオシミラーと先発品の吸光係数の類似性を評価しました。Ristova (先発品) および Reditux と Truxima (バイオシミラー) を、6 M 塩酸グアニジン中で 0.5 および 1 mg/mL の濃度で分析しました。20 °C で 280 nm における吸光度を測定し、Cary UV ワークステーションソフトウェアを用いて吸光係数を計算しました。

**タンパク質濃度の推定：**Cary ワークステーションに標準搭載の検量線ソフトウェア機能は、280 nm での UV 吸光度を用いた mAb 濃度の推定を容易にするため、mAb 生産のバイオプロセス工程において有用です。6 M 塩酸グアニジン希釈液として使用し、0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2 mg/mL の濃度で Ristova を用いて、検量線を作成しました。

**結果と考察**

**タンパク質の吸光係数の簡単な決定**

Cary ワークステーションソフトウェアにより、オボアルブミン、 $\beta$ -カゼイン、リゾチーム、Ristova のタンパク質の吸光係数を同時に自動計算しました。図 3 に示すように、結果には、吸光度対波長のグラフと計算された吸光係数値が含まれており、これらは各サンプルの「Results (結果)」列に表示されています。



**図 3.** 各種タンパク質における吸光度スキャンとタンパク質吸光係数の結果。タンパク質吸光係数は、Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアにより自動的に計算されました。

既知のタンパク質配列と無料で使用可能なオンラインツール<sup>4</sup>を用いて、7種類のサンプルのタンパク質のモル吸光係数を計算しました。本研究で実験的に決定した吸光係数は、タンパク質配列を用いて計算されたモル吸光係数、および文献で報告されている値と一致していました（表3）。結果が良好に一致していることは、Cary 3500 UV-Visを用いたメソッドが、モル吸光係数の正確な決定に適していることを実証しています。

表3. Agilent Cary 3500 UV-VisによるA<sub>280</sub>測定値、タンパク質配列を用いて計算したモル吸光係数および文献値の比較

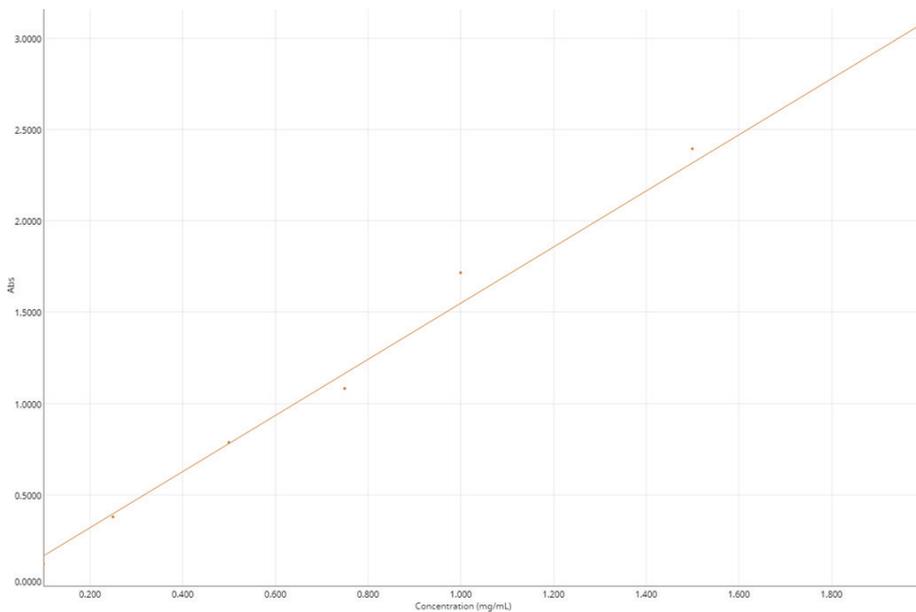
タンパク質	分子量 (g.mol <sup>-1</sup> )	モル吸光係数 (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )		
		A <sub>280</sub> を用いた計算値	タンパク質配列とオンラインを用いた計算値	文献での報告値
オボアルブミン サンプル 1	42,756	30,418	30,590	29,972 <sup>3</sup>
オボアルブミン サンプル 2	42,756	30,615	30,590	29,972
B-カゼイン サンプル 1	24,990	10,231	11,460	12,142 ~ 14,191 <sup>5</sup>
B-カゼイン サンプル 2	24,990	10,299	11,460	12,142 ~ 14,191
リゾチーム サンプル 1	16,220	36,740	37,470	37,932 <sup>3</sup>
リゾチーム サンプル 2	16,220	36,623	37,470	37,932
Ristova	144,550	237,734	235,380	196,166 ~ 224,104 <sup>6</sup>

**吸光係数の比較による先発品とバイオシミラーの一致：**表4に示すように、バイオシミラー (RedituxとTruxima)の吸光係数は、試験した1 mg/L および0.5 mg/Lの両濃度において先発品 (Ristova)の値と一致しました。測定値は、タンパク質配列から計算された吸光係数と一致しており、異なる濃度におけるこの分析の堅牢性が実証されました。これらの結果は、バイオシミラーと先発品タンパク質が、類似した芳香族アミノ酸組成を有している可能性があることを示しています。

表4. 先発品 (Ristova) およびバイオシミラー (RedituxとTruxima)の吸光度とモル吸光係数の比較。測定された吸光係数は、タンパク質配列から計算された値と同等でした。

タンパク質	濃度 (mg/mL)	吸光度 (280 nm)	モル吸光係数 (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	
			A <sub>280</sub> を用いた計算値	タンパク質配列を用いた計算値
Ristova	1	1.6042	231,887	235,380
Truxima	1	1.5794	228,302	235,380
Reditux	1	1.5843	229,011	235,380
Ristova	0.5	0.8447	244,203	235,380
Truxima	0.5	0.7975	230,557	235,380
Reditux	0.5	0.8054	232,841	235,380

**未知タンパク質濃度の推定のための検量線機能：**Cary UV ワークステーションソフトウェアの「Concentration (濃度)」機能を用いて、先発品 (Ristova)の濃度検量線を作成しました。Ristovaは、0.1 ~ 2 mg/mLの範囲で良好な直線性を示しており、R<sup>2</sup>値は0.9918でした（図4）。このアプリケーションは、プロセスの各段階で生成されるmAbの濃度測定が必要なバイオプロセスにおいて有用です。



Graph legend

Name	Equation	r <sup>2</sup>
280.00	y = 1.5357 * x + 0.0142	0.9918

図 4. 0.1 ~ 2 mg/mL の範囲の Ristova の検量線 (R<sup>2</sup> = 0.9918)

## 結論

Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計は、タンパク質の吸光係数と濃度を決定できる機能により実証されているように、バイオ医薬品アプリケーションにおいて非常に効果的なツールです。使いやすいデザインと高度な機能を備えた Cary 3500 UV-Vis により、7 種類のサンプルと 1 種類の参照の同時測定が可能になりました。Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアの式機能は、測定の効率をさらに向上させ、各サンプルの結果を即座に提供しました。

先発品 (Ristova) と 2 種類のバイオンミラータンパク質 (Reditux と Truxima) の間のアミノ酸プロファイルの類似性を評価するために、Cary 3500 マルチセル UV-Vis を用いたメソッドにより、2 つの濃度における吸光係数を迅速に計算しました。

結果から、タンパク質の類似性が確認されると同時に、タンパク質配列から導出された吸光係数にも良好に一致していました。

Cary UV ワークステーションソフトウェアの濃度および検量線機能は、モノクローナル抗体の製造のさまざまな時点での抗体濃度を推定することが可能であり、最終製品の品質の確保を支援します。

高度な機能と革新的なソフトウェアを備えた Cary 3500 マルチセル UV-Vis は、ワークフローを効率化して、タンパク質を正確かつ高い信頼性で測定することにより、バイオ医薬品業界に大きな価値をもたらします。

## 参考文献

1. Rathore, A. S. Follow-On Protein Products: Scientific Issues, Developments and Challenges. *Trends in Biotech*, **2009**, *27*(12), 698–705.
2. Nupur, N.; Chhabra, N.; Dash, R.; Rathore, A. S. Assessment of Structural and Functional Similarity of Biosimilar Products: Rituximab as a Case Study. *MAbs*, **2018**, *10*(1), 143–158.
3. Gill, S. C.; Von Hippel, P. H. Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Anal. Biochem.* **1989**, *182*(2), 319–326.
4. Protein Extinction Coefficients and Concentration Calculation, *NovoPro Bioscience Inc*, <https://www.novoprolabs.com/tools/protein-extinction-coefficient-calculation> (accessed April 22, 2025).
5. Petrat-Melin, B.; Andersen, P.; Rasmussen, J. T.; Poulsen, N. A.; Larsen, L. B.; Young, J. F. In Vitro Digestion of Purified B-Casein Variants A1, A2, B, and I: Effects on Antioxidant and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Capacity. *J. Dairy Sci.*, **2015**, *98*(1), 15–26.
6. Lee, K. H.; Lee, J.; Bae, J. S.; Kim, Y. J.; Kang, H. A.; Kim, S. H.; Lee, S. J.; Lim, K. J.; Lee, J. W.; Jung, S. K.; Chang, S. J. Analytical Similarity Assessment of Rituximab Biosimilar CT-P10 to Reference Medicinal Product. *MAbs*, **2018**, *10*(3), 380–396.

## 詳細情報

- Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計
- Cary UV ワークステーションソフトウェア
- UV-Vis 分光分析および分光光度計の概要

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-006480

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025, 2026

Printed in Japan, March 16, 2026

5994-8320JAJP