

## 抗体のペプチドマッピング基礎編

抗体分子の特性解析においてペプチドマッピングは、アミノ酸配列の確認やアミノ酸残基の修飾割合を把握する上で重要かつ基本的な解析手法である。また、ホストセルタンパク質の検出法としても利用されうる手法である。ここでは、基本的なペプチドマッピングについて解説する。

プロテオミクスで用いられるタンパク質同定を目的としたペプチドマッピングでは、シーケンスカバー率\*は20%程度であっても同定できれば問題ないのに対し、アミノ酸配列の確認等の特性解析を目的としたペプチドマッピングでは、100%近いシーケンスカバー率が必要となるため、同じペプチドマッピングでも注意すべき点は異なる。本プロトコールの方法に従えば、NISTmAbのシーケンスカバー率<sup>a)</sup>は95%以上(～100%)、フラグメントカバー率<sup>b)</sup>は92%以上(～94%)を達成できる。

本方法を発展させた「ジスルフィド結合解析」、「糖ペプチドの解析」および「ホストセルタンパク質の解析」は別途解説する。

### 【材料】

カラム: Waters AQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm 1.0x100mm

抗体医薬品: NISTmAb, Humanized IgG1k Monoclonal Antibody, Cat# RM8671, 10 mg/mL

ギ酸: 和光純薬, LC-MS 用, Cat# 067-04531

アセトニトリル: 関東化学, LC-MS 用

Tuning Mix (Calibrant): ESI-L Low Concentration Tuning Mix, アジレント, Cat# G1969-85000

トリプシン: Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega, Cat# V528A, 100 μg

8 M 塩酸 Guanidinium 溶液(8M Guanidinium HCl): 富士フィルム和光 生化学用, Cat# 071-02891

ヨードアセトアミド (IAA): 富士フィルム和光, プロテオミクス用, Cat# 099-05591

ジチオスレイトール(DTT): 富士フィルム和光, 分子生物学用, Cat# 048-29224

トリフルオロ酢酸 (TFA): 富士フィルム和光, 高速液体クロマトグラフ用, Cat# 206-10731

1 M Tris-HCl (pH 8.0): NIPPON GENE, Cat# 312-90061

EndoS: IgGZERO Enzyme, Genovis, Cat# A0-IZ1-010, 1000 U

キモトリプシン: Chymotrypsin Endoproteinase, TLCK treated, Thermo Scientific, MS Grade, Cat# 90056

重炭酸アンモニウム: 和光純薬, プロテオミクス用, Cat# 018-21742

塩化カルシウム: 和光純薬, 特級

脱塩カラム: Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO, Thermo Scientific, Cat# 89882

低吸着バイアル 0.6 mL: Maximum Recovery 0.6 mL Microtube, AXY, Cat# MCT-060-L-C

注意: 本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

低吸着バイアル 1.5 mL: プロテオセーブ 1.5mL マイクロチューブ, 住友ベークライト, Cat# MS-4125M

低吸着チップ 200  $\mu$ L: Maximum Recovery 200  $\mu$ L Tip, AXY, Cat# T-200-C-L

低吸着チップ 10  $\mu$ L: Maximum Recovery 10  $\mu$ L Tip, AXY, Cat# T-300-L

LC 用低吸着バイアル 0.3 mL: AMR, Cat# PSVial 100

リン酸緩衝生理食塩水(PBS): ナカライ, 細胞培養用, 14249-25

0.45  $\mu$ m 遠心フィルター: Ultrafree-MC-HV, Millipore, Cat# UFC30HVNB

### 【装置】

高分解能質量分析計: Bruker maXisII

UHPLC: 島津 LC20A システム (バイオイナート仕様)

遠心エバポレータ: TITEC Spin Dryer Lite VC-36R / EyELA UT-100

### 【調製液】

移動相 A 液: 0.1%ギ酸を含む超純水

移動相 B 液: 0.1%ギ酸を含むアセトニトリル

トリプシン溶液: 1  $\mu$ g/ $\mu$ L になるよう 0.3%酢酸で溶かす。-80 $^{\circ}$ Cで保存。5回まで凍結融解可。

EndoS 溶液: 1000U を超純水 50  $\mu$ L に溶解 (20 units/ $\mu$ L)。溶液は 4 $^{\circ}$ Cで1カ月間保存可能。

キモトリプシン溶液: 25  $\mu$ g を 1 mM HCl 溶液 125  $\mu$ L に溶かす (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ L)。-80 $^{\circ}$ Cで保存。5回まで凍結融解可。

100 mM IAA: ヨードアセトアミドを超純水に溶かして調製。用事調製, 遮光する。

100 mM DTT: ジチオスレイトールを超純水に溶かして調製。-30 $^{\circ}$ C保存。

### 【酵素処理によるペプチドの調製】

塩酸グアニジンと DTT により変性還元させたのちシステイン残基をカルバミドメチル化する。その後脱塩処理で緩衝液に置換したのちプロテアーゼにてペプチドに断片化する。プロテアーゼは主にトリプシンを用いるが、フラグメントカバー率を上げるために別途キモトリプシンを使用する。

#### ① 酵素処理方法 (還元変性+トリプシン消化)

還元変性処理、脱塩処理、酵素処理は  1 のフローチャートを参照。

#### <Tips>

- 脱塩処理といっても水等に置換するわけではなく 100 mM の緩衝液に置換する操作。塩濃度が低いとゲル濾過スピンカラムでの回収率が低下してしまう。

- カルバミドメチル化したペプチドは質量が 57.02 Da 増える。
- 最終調製液を減圧乾固して移動相 A 液の最小量に再溶解する場合は、100 mM Tris の代わりに揮発性の 100 mM 重炭酸アンモニウムを用いる。
- 酸化やデアミドーションを抑制する場合、トリプシン消化時間を 4h に短縮する。

## 図1A

## NISTmAb の[Guanidine, 還元, 脱塩, Trypsin]処理のフローチャート

NISTmAb (10mg/mL) 5  $\mu$ L (50  $\mu$ g)  
 ↓ PBS 5  $\mu$ L  
 ↓ 8M Guanidine HCl 33  $\mu$ L  
 ↓ 100mM DTT 1.5  $\mu$ L  
 ↓ 37°C, 30min  
 ↓ 100mM IAA 3.5  $\mu$ L  
 ↓ 遮光室温, 15min  
 ↓ 100mM DTT 2  $\mu$ L  
 液量約50  $\mu$ L  
 ↓  
 脱塩処理 (脱塩のフローチャート参照)  
 ↓  
 約70  $\mu$ Lの脱塩液  
 ↓ Trypsin (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L (タンパク量:トリプシン量 = 50:1)  
 ↓ 遮光37°C, 4hまたは一晩 (酸化や脱アミノ化を抑えたいなら4h)  
 ↓ 100% ギ酸 1  $\mu$ L  
 液量約72  $\mu$ L (タンパク濃度0.7  $\mu$ g/ $\mu$ L)

【以下は、できる限り多量の試料量を注入したいときの濃縮操作 (緩衝液は重炭酸アンモニウムとする)】

↓ 遠心エバポレータにて溶媒留去 (40°C)  
 ↓ 乾固した残渣に移動相A液50  $\mu$ Lで再溶解  
 ↓ 0.45  $\mu$ m遠心フィルターにて濾過 (フィルターはあらかじめ移動相A液で洗浄)  
 液量約50  $\mu$ L (タンパク濃度 1  $\mu$ g/ $\mu$ L)

## 図1B

## NISTmAb の[Guanidine, 還元]処理後の脱塩のフローチャート

Zeba Spin Desalting Column, 7K MWCO  
 (よく攪拌後、先端を折り蓋を緩めて廃液用PPチューブにせつとする)  
 (蓋は以降の操作においても緩めた状態とする)  
 ↓ 1500g for 1min  
 (遠心の方向を毎回同じにするため、外側にペンでしるしをつけておく)  
 ↓ ろ液を捨てる  
 ↓ 100mM Tris(pH8) 300  $\mu$ L (Tris緩衝液の代わりに100mM重炭酸アンモニウムでも可)  
 ↓ 1500g, 1min  
 ↓ ろ液を捨てる  
 ↓ 100mM Tris(pH8) 300  $\mu$ L (Tris緩衝液の代わりに100mM重炭酸アンモニウムでも可)  
 ↓ 1500g, 1min  
 ↓ ろ液を捨てる  
 ↓ 新しい1.5 mlチューブ (低吸着バイアル) にセットする  
 ↓ 抗体溶液 50  $\mu$ L (Guanidine, DTT処理したもの) を注意深くのせる  
 (カラムベッドの中央に液滴を垂らす)  
 ↓ 100mM Tris(pH8) 15  $\mu$ Lを注意深くのせる (Tris緩衝液の代わりに100mM重炭酸アンモニウムでも可)  
 ↓ 1500g, 2min  
 ろ液約70  $\mu$ L

## ② 酵素処理方法 (EndoS + 還元変性 + トリプシン消化)

EndoS 消化をはじめに行う。

NIST mAb (10 mg/mL)	5 $\mu$ L (50 $\mu$ g)
PBS	5 $\mu$ L
EndoS (20 units/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L (final 0.8 unit / 1 $\mu$ g of IgG)

-----  
Total 12  $\mu$ L

37°C, 30 min インキュベートしたのちは、①のグアニジン還元処理から同様に行う。容量が 2  $\mu$ L 増えるがそのまま操作を行う。

## ③ 酵素処理方法 (還元変性 + キモトリプシン消化)

トリプシンの代わりにキモトリプシン溶液 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ L を 5  $\mu$ L 加える。ただし脱塩処理の際に、100 mM Tris-HCl(pH8.0), 2 mM CaCl<sub>2</sub> に置換する。その他は①と同じ。

## 【LC-MS 条件】

流速:	0.1 mL/min
カラム温度:	55°C
分析時間:	65 min
NISTmAb 終濃度:	0.7 $\mu$ g/ $\mu$ L (回収率 100%の場合)
注入量:	5 $\mu$ L (回収率 100%と仮定すると 3.5 $\mu$ g)

## グラジエント

min	B%
0	2
0.5	7
1	8
30	20
50	40
51	98
58	98
59	2
65	2

➤52～52.3min のタイミングでキャリブレーション液に切り替える。

Bruker TOF/MS (maXisII)の主要パラメータは次のとおり(ペプチドマッピング用)。

Polarity: positive  
Mode : Auto MS/MS  
Capillary: 4500 V  
Nebrizer: 1.4  
Dry Gas: 5.0  
Dry temp: 200  
Mass Range: 100 to 3000 m/z  
Spectra Rate: 5 Hz～20 Hz (data dependent)

#### 【データ解析】

データ解析方法はソフトウェアによって異なるため詳述しない。現在、我々が使用しているマニュアル用解析ソフト(Bruker 製 DataAnalysis<sup>®</sup>)による解析処理の流れは次のとおり。

1. 測定ごとのキャリブレーションデータを使って、測定データごとに再キャリブレーション。
2. ベースピーククロマトを表示させて溶出ピークを確認。
3. 親イオンのモノアイソトピック質量の値からペプチド種を同定。

マニュアル解析用ソフトで全体のピーク強度、分離パターン、MS/MS データの取得具合を確認したのち、自動解析ソフト(Bruker 製 BiopharmaCompass<sup>®</sup>)を使って、あらかじめ登録しておいた NISTmAb の配列データから各ペプチドの帰属を行う。およそのワークフローは次のとおり。

4. NISTmAb 用ペプチドマッピングメソッドを選択。

あらかじめ配列情報のほかに、糖鎖修飾等の情報も含めておく。

5. 各パラメータの確認。

- Charge State, Enzyme, Miss cleavage, Modification などを設定する。
- Modification のうちカルバミドメチルシステインは Fix、それ以外は Variable とする。
- <sup>13</sup>C の考慮数は 2 とする。

6. 計算後、シーケンスカバー率とフラグメントカバー率を確認。

#### <Tips>

シーケンスカバー率が 95%以上あれば測定自体は一定のレベルをクリアしていると判断。ただし特性解析という点ではできるかぎり 100%に近づきたい。一方、フラグメントカバー率については、配列の正しさを検証するという点から 100%を目指したいが、困難であるため 92%以上を目標とする。

**【結果】**

NISTmAb 6  $\mu\text{g}$  相当を注入したペプチドマッピングの結果を図 2 に示した。トリプシンペプチドのデータのみでは、フラグメントカバー率は 81.6~86.4%となり目標の 92%に到達しなかった。このためキモトリプシンペプチドの測定を行い、得られた2つのデータをマージすることにより、フラグメントカバー率は 93.3~97.7%となった。一方で、注入量を 20  $\mu\text{g}$  相当に増加させたとき(トリプシン処理時の緩衝液を重炭酸アンモニウムに変更し、得られたペプチド溶液の溶媒を減圧留去したのち少量の移動相 A 液に再溶解)、含量の多いペプチド種のシグナルは飽和したものの、シーケンスカバー率は 100%、フラグメントカバー率は 94.4~95.3%と高いカバー率の結果が得られた(図 3)。

NISTmAb 4  $\mu\text{g}$  相当のトリプシンペプチドのデータを使って、同一ペプチド内の Met 酸化率および Asn 脱アミド化率を評価した結果を図 4 に示した。

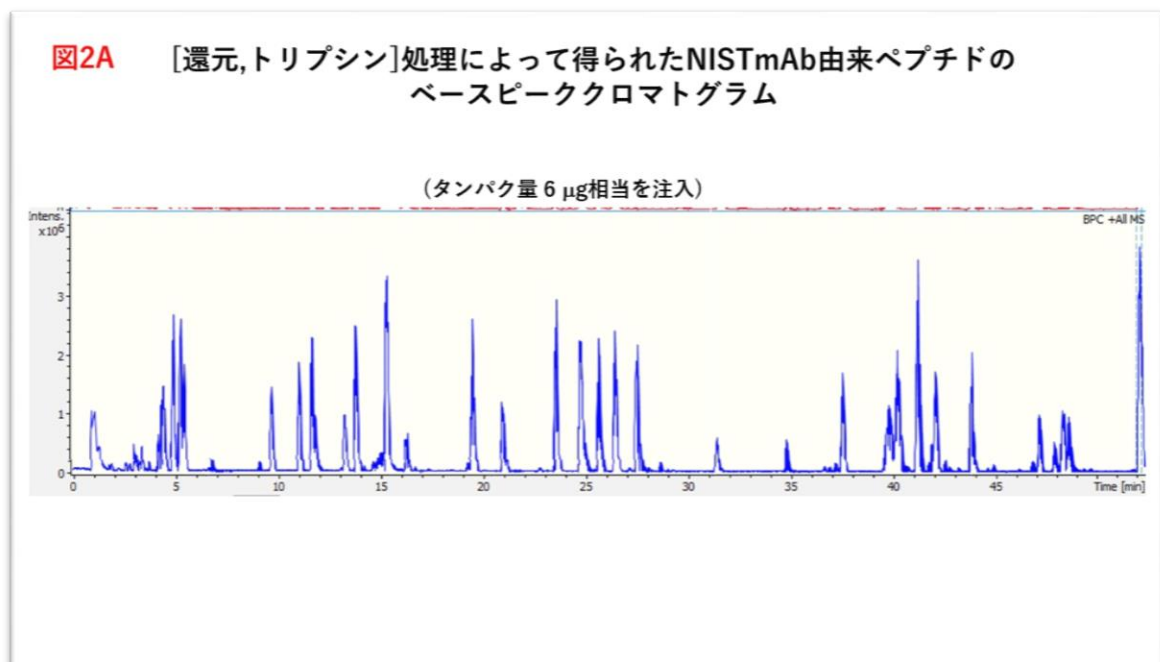
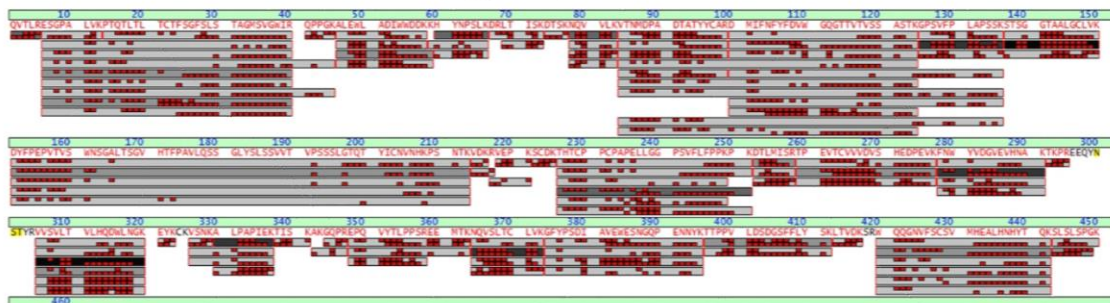


図2B

[還元, トリプシン]処理サンプルのペプチドマッピング

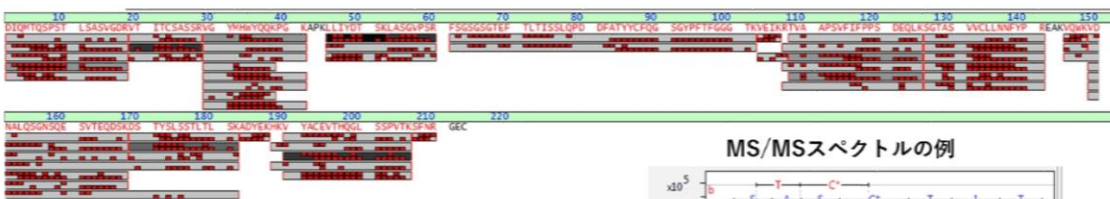
Heavy Chain



シーケンスカバー率：97.1%  
フラグメントカバー率：81.6%

図2C

Light Chain



シーケンスカバー率：95.8%  
フラグメントカバー率：86.4%

MS/MSスペクトルの例

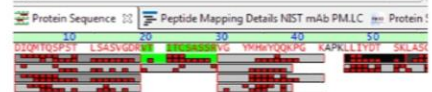
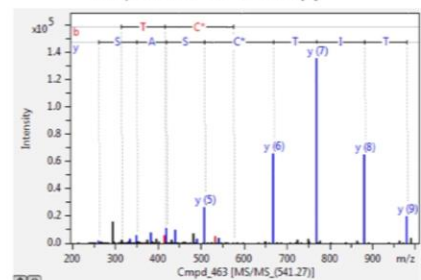
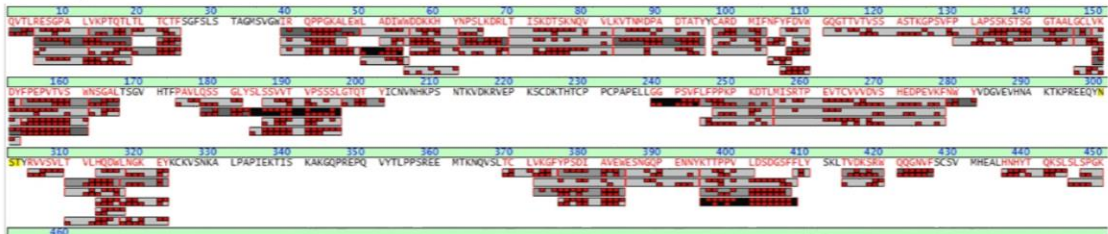




図2D

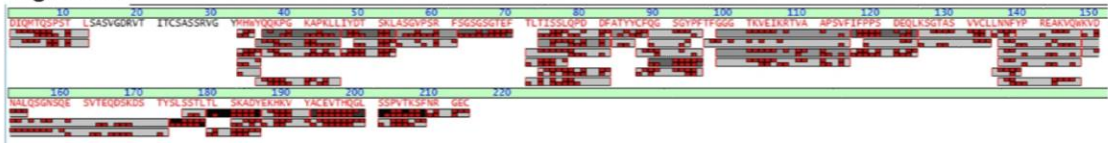
[還元, キモトリプシン]処理サンプルのペプチドマッピング

Heavy Chain



シーケンスカバー率：69.1%，フラグメントカバー率：61.6%

Light Chain



シーケンスカバー率：90.6%，フラグメントカバー率：81.7%

図2E

異なる2種類のペプチドマッピングデータをマージした結果

	シーケンスカバー率 (%)		フラグメントカバー率 (%)	
	Heavy Chain	Light Chain	Heavy Chain	Light Chain
トリプシン	97.1	95.8	81.6	86.4
キモトリプシン	69.1	90.6	61.6	81.7
トリプシン/キモトリプシン	97.8	100	93.3	97.7



図3A

タンパク量20 µg相当を注入したときのペプチドマッピング  
 (還元トリブシン処理)

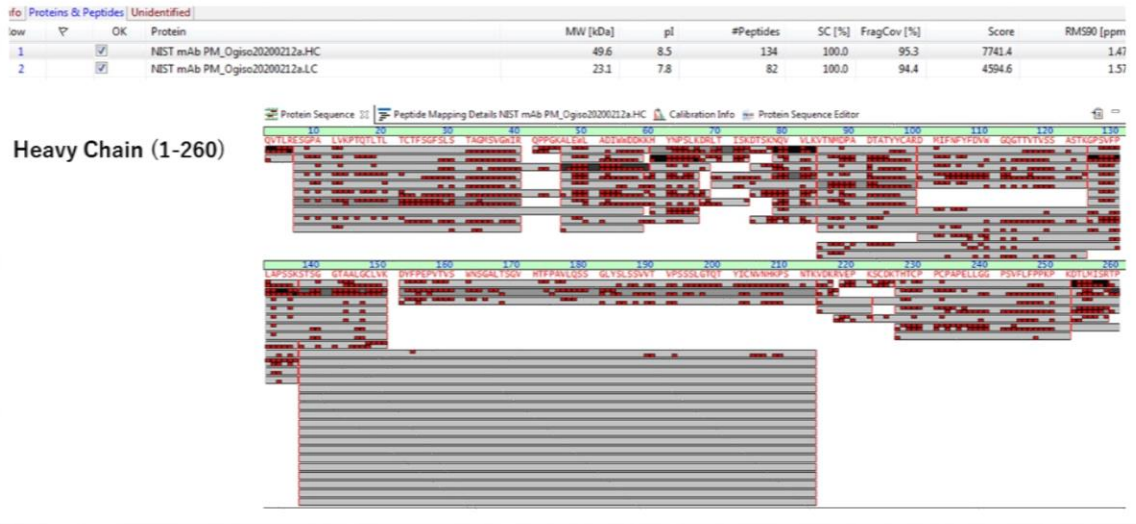
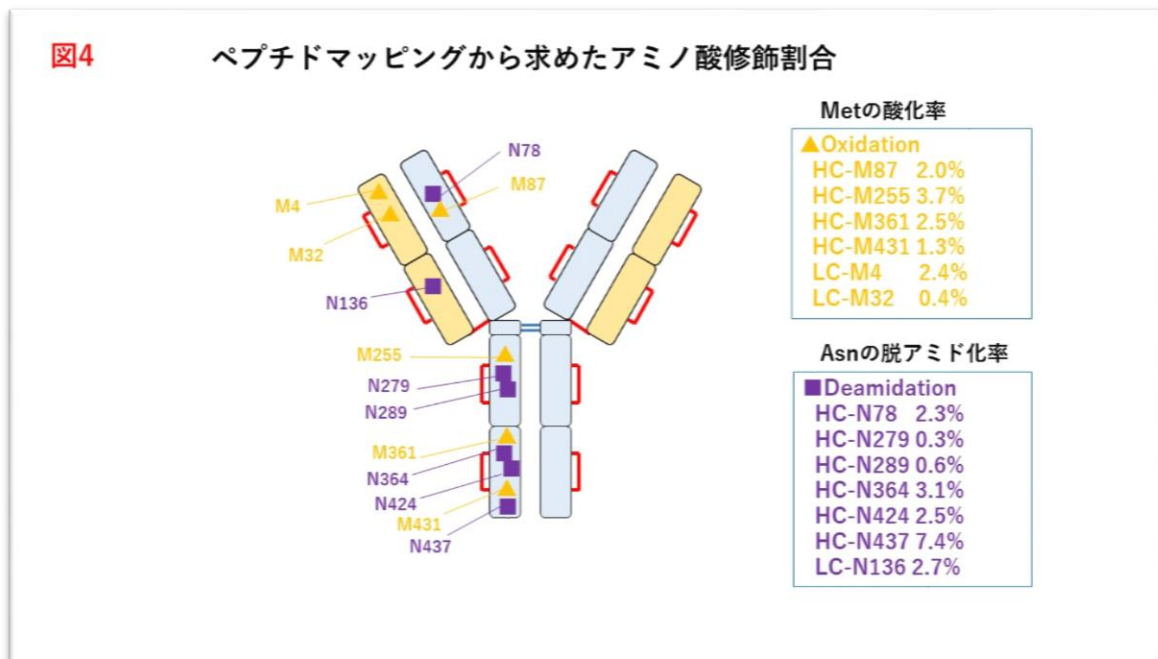
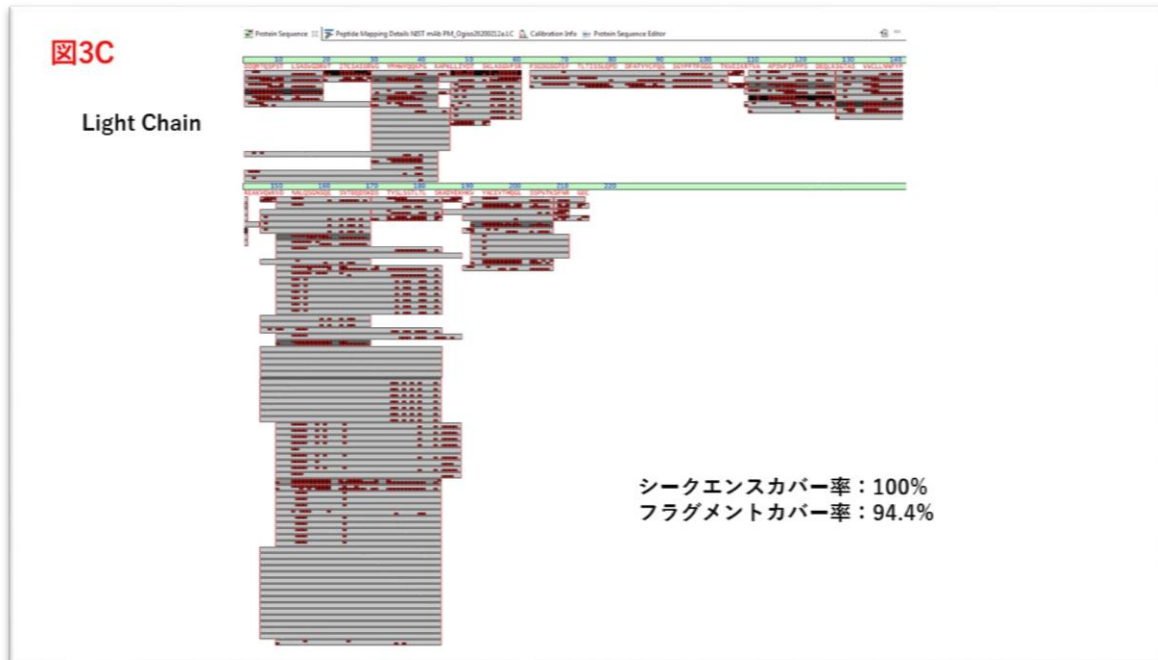


図3B

Heavy Chain (261-450)



シーケンスカバー率：100%  
 フラグメントカバー率：95.3%



【考察】

NISTmAb およそ 5  $\mu$ g 相当のトリプシンペプチドおよびキモトリプシンペプチドを測定することにより、シーケンスカバー率 97%以上、フラグメントカバー率 92%以上のペプチドマッピング精度下で、アミノ酸配列の確認ができた。また Met 酸化および Asn 脱アミノ化の位置と割合

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

を知ることができた。一方で、NISTmAb 20 µg 相当のトリプシペプチドの測定のみからでも同様のカバー率が達成できることがわかった。これらの情報および方法を踏まえた上で、特性解析したい対象試料に応じて、効率的にペプチドマッピングを行うのがよさそうである。

なお、今回の測定でいくつかのペプチドにおいてモノグリコシデーシオンの修飾も検出された。しかしながらグリコシデーシオンが起こる可能性のあるアミノ酸残基は Lys や Ser 等複数あり、位置を特定することはできなかった。またグリコシデーシオンが起きているペプチドのほとんどは miss cleavage であるため、修飾されていない同一ペプチドが検出されていないことから、修飾率を求めることはできなかった。モノグリコシデーシオン化ペプチドは必ず miss cleavage を起こすことから、Lys に糖付加が起きているものと推察している。

また Asn300 の N 結合糖鎖について、トリプシン消化による糖ペプチドはほとんど検出されなかったか、検出されても主要3種の糖鎖が付加したペプチドがわずか見えるにすぎなかった。これは糖ペプチドが逆相 C18 分離の条件ではほとんど分離しないこと、他のイオン化しやすいペプチドと重なってイオンサプレッションを受けていることが原因と思われる。このため糖ペプチドの解析には、糖ペプチドに特化した方法に変える必要があり、別途プロトコールを設定した。

#### \* 用語説明

- a) シーケンスカバー率： 全配列のうち、検出(同定)されたペプチドの割合。
- b) フラグメントカバー率： 全アミノ酸配列のうちペプチドの MS/MS フラグメントで確認された割合。