

宿主細胞由来タンパク質の解析編

動物培養細胞に特定のタンパク質を産生させ、高度に精製したタンパク質製剤であっても、微量の宿主由来タンパク質(Host Cell Proteins, HCP)の混入は避けられない。これら HCP 不純物については ELISA での品質管理が行われているが課題も多く、より正確な HCP 評価には質量分析手法が適していると考えられている。NIST mAb について質量分析計を用いて HCP を測定した報告のうち、Huang ら (Anal. Chem. 2017, 89, 5436-5444) (参考文献 1) は、1ppm 以上のレベルで検出される HCP は 50 種程度に及ぶことを報告している。このうち 10ppm レベル以上の HCP は 8 種類程度検出されている。質量分析による HCP 解析の多くは、感度の高いオービトラップ型質量分析計や、ナノ LC を組み合わせたプロテオミクス用システムを用いて行われているが、我々のシステムはコンベンショナル LC に Q-TOF を組み合わせた装置であり、プロテオーム解析レベルの高感度性能を備えていない。今回、100 µg の NIST mAb を測定試料としたとき、我々のコンベンショナルシステムを用いた HCP 測定の限界を把握することも含め、HCP 解析法を種々検討した。その結果、上記文献の方法を参考にすることで、再現性の高いプロトコールを作成することができた。

上記文献では混入量の多い上位 4 種の HCP について、fructose bisphosphate aldolase A が 222 ppm、protein disulfide-isomerase が 132 ppm、fructose bisphosphate aldolase C が 55 ppm、glucose-6-phosphate isomerase が 20 ppm と報告している。今回提示する我々のプロトコールでは、これら 4 種の HCP を定量可能であった。

【材料】

β カゼイン: SIGMA-ALDRICH #C6905

0.22 µm 遠心フィルター: Ultrafree HC-GV, Millipore, #UFC30GVNB

その他、抗体標品、分析カラム、移動相溶媒、トリプシン、DTT、炭酸水素アンモニウム等は「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

【装置】

質量分析計、LC システム、遠心エバポレータは「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

【調製液】

β カゼイン原液: 2 mg/mL 水溶液を作製し-30°Cで保存する。

β カゼイン内標準: 原液を使用前にミリ Q 水で 200 倍希釈する (10 ng/µL)。

移動相液、トリプシン溶液、DTT 溶液等は「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

【酵素処理によるペプチドの調製】

還元変性処理を行わずトリプシン処理を行ったのち、分解されなかった抗体を熱変性させる。遠心して沈殿物を除いたのち残りのペプチド液を全量注入する。

<Tips>

抗体分子がトリプシン抵抗性である性質を利用して、出来る限り選択的に HCP をプロテアーゼ分解することにより、HCP 選択的なペプチドマッピングを可能にする。

① 酵素処理方法

非変性下でのトリプシン処理の方法は [図 1](#) のフローチャートを参照。

図 1

抗体の[非変性下Trypsin]処理のフローチャート

- NISTmAb (10 mg/mL), 10 μ L (100 μ g)
- ↓ 定量用内標準タンパク質として β カゼインを添加
(50 ng/5 μ L を添加, 抗体に対して 500 ppm 相当)
- ↓ 100 mM 重炭酸アンモニウム 15 μ L
- ↓ Trypsin (0.25 μ g/ μ L) 1 μ L (タンパク量:トリプシン量 = 400:1)
- ↓ 37°C, 15h 処理後、氷上保存
- ↓ 100 mM DTT 1.5 μ L
- ↓ 90°C, 10min (未分解タンパク質を熱変性させる)
- ↓ 14,000g, 5min
- ↓ 上清 約 32 μ L
- ↓ 遠心エバポレータ 60°C, 30min
- ↓ 乾固後移動相 A 液 22 μ L に再溶解 (ソニケータパスで 1 min 超音波処理)
- ↓ 0.22 μ m フィルター濾過 (フィルターはあらかじめ A 液で洗浄)
- ↓ 12,000g, 5min
- ↓ ろ液 約 22 μ L
- LC-MS 測定 注入量 20 μ L

【LC-MS 条件】

- 流速: 0.1 mL/min
- カラム温度: 55°C
- 分析時間: 175 min
- 注入量: 20 μ L

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

グラジエント

min	B%
0	2
20	8
100	20
160	35
161	98
168	98
169	2
175	2

➤162～162.3min のタイミングでキャリブレーション液に切り替える。

<Tips>

通常のペプチドマッピングより時間をかけて LC 分離することにより、できる限り小さいピークの MS/MS データを取得する。ただし、質量分析のデータ採取において Signal threshold を下げすぎると、ノイズデータを拾いデータ解析に支障を来すため、ノイズデータをカットオフしつつペプチドのシグナルを出来る限り取得できるように threshold を設定する必要がある。

それ以外の Bruker TOF/MS (maXisII)の主要パラメータは「ペプチドマッピング基礎編」と同じ。

【データ解析】

はじめに測定データを mgf ファイルに変換したのち、これを MASCOT®で解析し、タンパク質同定の可否を評価する。同定されたタンパク質について、個々のペプチド情報を得たのち、マニュアル操作にてこれらのマスクロマトグラムを描かせてピーク面積を算出する。

① MASCOT®による解析方法

1. パラメータを設定する

- Database: NCBIprot
- Taxonomy: Mouse (NISTmAb はマウス細胞由来)
(内標準の β カゼインを評価するとき、NCBIprot→Bos Taurus (ウシ))
- Enzyme: Trypsin, Allow up to: "2" missed cleavages
- Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)は設定しない
- Variable modifications: Oxidation (M)
- Peptide tol.: ± 0.02 Da (データの質に応じて変える)

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

- #13C:2
- MS/MS tol.: ± 0.02 Da (データの質に応じて変える)
- Peptide charge: 2+, 3+ and 4+
- Datafile: mgf 形式に変換済みのファイルを選ぶ
- Data format: Mascot generic
- Instrument: ESI-QUAD-TOF。

2. Start Search をクリックして解析を実行する

ペプチド 1 種類だけのヒットでは不十分であり、2 種以上のペプチドがヒットしたタンパク質について、HCP とみなす。

② 内標準タンパク質による含有量の評価

1. β カゼイン(500 ppm)の Peak Area の算出

β カゼインに対してヒットしたペプチド情報を MASCOT®より得る。測定された親イオンの m/z について、Data Analysis®を使ってマスクロマトグラムを描かせ、各ピークの Peak Area を表示させる。このうち検出量の大きい上位3種の Peak Area の平均を β カゼインの値とする。

2. HCP の定量

検出された各 HCP について、ヒットしたペプチド情報を MASCOT®より得る。測定された親イオンの m/z について、Data Analysis®を使ってマスクロマトグラムを描かせ、各ピークの Peak Area を表示させる。このうち検出量の大きい上位3種のペプチドの Peak Area の平均を、各 HCP の値とする。ペプチド 2 種しか検出されなかった場合は 2 データの平均値を採用する。 β カゼイン(500ppm)の値を基準として 1 点検量線から各 HCP の含有量を評価する。

【結果】

NIST mAb 100 μ g に相当する試料を処理し HCP 解析しときに同定されたマウスタンパク質 Protein disulfide isomerase A6 由来ペプチドとして検出されたペプチドのうち、検出量の高いペプチド 3 種のマスクロマトグラムを **図 2** に示した。同定された HCP の含有量について評価した結果を **表 1** に示した。

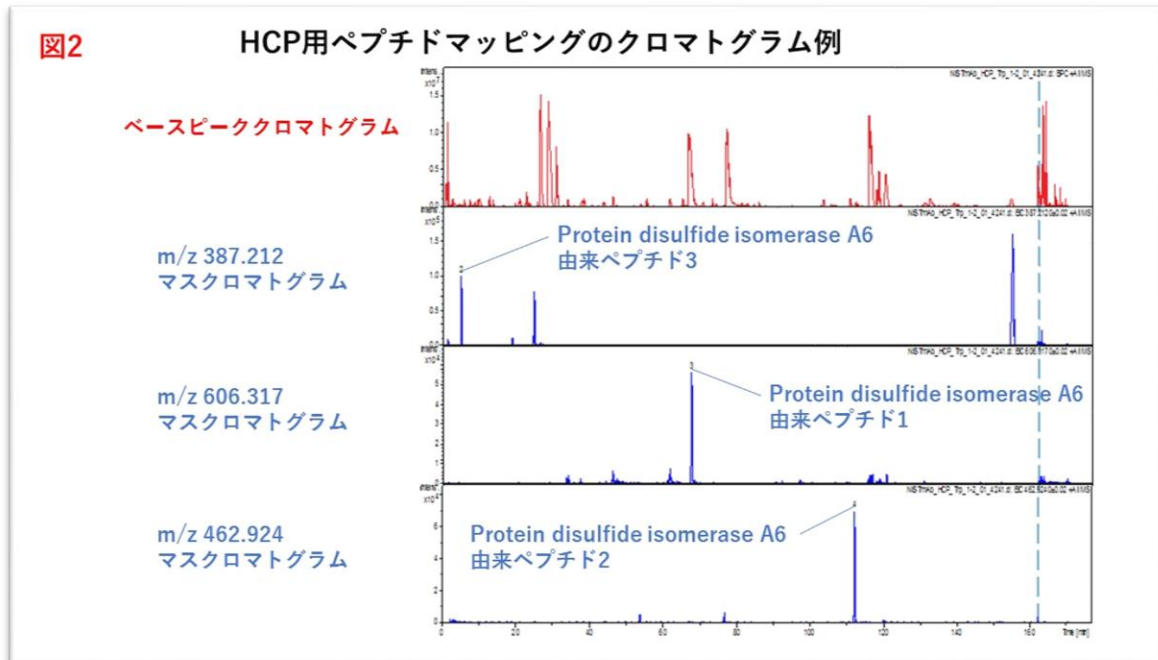


表1 HCP含有量の評価例

Protein	Peak Area					Quantification (ppm) /IS *500
	ppm	Peptide 1	Peptide 2	Peptide 3	mean	
IS (β casein)	500	5162269 (m/z 390.753)	4824839 (m/z 742.449)	2333042 (m/z 415.730)	4106717	
Fructose-bisphosphate aldolase A	(220*)	1976489 (m/z 666.853)	1631712 (m/z 703.036)	1380518 (m/z 401.245)	1662906	202
Protein disulfide-isomerase A6	(130*)	1145629 (m/z 606.317)	821096 (m/z 462.924)	698311 (m/z 387.212)	888345	108
Fructose-bisphosphate aldolase C	(55*)	655691 (674.842)	576363 (458.758)	489457 (600.828)	573837	70
Neuroleukin (Glucose-6-phosphate isomerase)	(20*)	194855 (m/z 670.021)	177339 (m/z 645.843)	137987 (m/z 889.499)	170060	21

*Huang らが報告した定量値

【考察】

我々ははじめに、抗体 100 μ g をそのままペプチドマッピング用のプロトコールに準じて測定してみた。この場合、抗体由来のペプチドシグナルが飽和した状態の中、検出下限付近の HCP 由来ペプチドを測定することになり、再現性良く複数のペプチドをヒットさせることが困難

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

であった。また、質量分析計の汚染による弊害もみられた。次に Chen らの方法(参考文献 2)に準じて、抗体を界面活性剤で処理することにより HCP と抗体分子との結合を解離させたのち、限外濾過膜を用いて抗体より小さい HCP を分画して、これらについてペプチドマッピングを行ってみた。しかしながら、処理過程でのロスが大きいいためか、必ずしも HCP を再現性良く検出することができなかった。3 番目にトライした方法が Huang らの方法(参考文献 1)であった。非変性状態でトリプシン処理を行うこの方法は、抗体の立体構造は極めて安定なため、比較的トリプシンに耐性をもつこと、そのため非変性条件下では HCP が優先的にペプチドに分解される性質を利用している。この方法は処理過程でのロスも少なく、再現性良く HCP を捉えることができた。本方法において、Huang らが報告している含有量 10~14 ppm の HCP については全く検出できなかったこと、内標準として添加した 50 ppm 相当の β カゼインについて 2 ペプチドヒットしたことから、測定限界は概ね 20~50 ppm 程度と判断した。この方法に準じて、プロテオミクス用の高感度質量分析システムを用いて測定すれば、1 ppm レベルの HCP も評価可能と予想している。

内標準タンパク質として Huang らは、異なる 3 種類のタンパク質を用いて、それらの平均値から定量を行っている。タンパク質の性質の違いを考慮しての方法と思われるが、今回、Huang らが用いた標準タンパク質を入手できなかったため、本プロトコールでは入手の容易な β カゼイン 1 種を定量用内標準として利用した。今回報告した定量値は、Huang らの報告した値と概ね同程度であったことから、 β カゼインを内標準タンパク質として利用できると判断した。

【参考文献】

1. A Novel Sample Preparation for Shotgun Proteomics Characterization of HCPs in Antibodies. Huang et al., Anal. Chem., 2017, 89, 5436-5444.
2. Improved Host Cell Protein Analysis in Monoclonal Antibody Products through Molecular Weight Cutoff Enrichment. Chen et al., Anal. Chem., 2020, 92, 3751-3757.