

# Application News

## No. B56

MALDI-TOF 質量分析法  
MALDI-TOF Mass Spectrometry

### 高分解能 MALDI-TOF MS “MALDI-7090” を用いたモノクローナル抗体の N-末端アミノ酸配列解析

Analysis of N-Terminal Amino Acid Sequence of Monoclonal Antibody Using the High Resolution MALDI-TOF MS “MALDI-7090”

抗体などのバイオ医薬品開発では、ときとしてタンパク質の N-末端や C-末端に不均一性が生じることが知られています。末端のアミノ酸が脱離していたり、あるいは修飾されていたりする場合があります。このような構造の変化を把握することはバイオ医薬品の品質を維持するうえでとても重要です。通常、タンパク質のアミノ酸配列を決定する際には、最も信頼性の高いエドマン分解法を活用したプロテインシーケンサーを用いて、N-末端からアミノ酸を一つずつ決定してゆくという方法を用いますが、N-末端のアミノ基 ( $\alpha$ アミノ基) が修飾されている場合には、この方法を用いた解析が行えません。そのため、代替法として質量分析による配列解析が必要となる場合があります。アミノ酸には質量が似通ったものや、まったく同じものが存在しているため、質量分析でアミノ酸配列解析を行おうとした場合には、分解能の高い MS/MS が実施できる質量分析計を用いる必要があります。

ここでは、当社の高分解能 MALDI-TOF MS “MALDI-7090” を用いた抗体分子の N-末端アミノ酸配列解析をご紹介します。

S. Nakaya

### ■ タンパク質試料からの N-末端ペプチド調製

#### Preparation of N-Terminal Peptide from Protein Digest

モノクローナル抗体を分析試料として、まず SDS-PAGE を行い、抗体を長鎖と軽鎖に分離しました。N-末端ペプチドの調製は Yamaguchi らの方法<sup>1)</sup>に従いました。その概略は以下の通りです。長鎖、軽鎖それぞれのゲル片を還元アルキル化し、リジン残基のグアニジノ化と Sulfo-N-hydroxysuccinimidobiotin による N-末端アミノ基の誘導体化を行いました。次いで、トリプシンによるゲル内消化を行い、さらに消化断片を過酸化して N-末端誘導体の S-S 結合を切断したものに DITC レジンを加えました。こうして、 $\alpha$ アミノ基が露出している消化断片 (タンパク質内部配列断片) を DITC レジンに吸着させ、前述の処理によりスルホン誘導体化された N-末端ペプチドおよび末端がブロックされている N-末端ペプチドを溶液中に残存させました。この溶液を回収し MALDI-7090 を用いて MS/MS 分析を行いました。

### ■ N-末端ペプチド画分の MS 測定

#### MS Analysis of N-Terminal Peptide Fraction

抗体の長鎖と軽鎖それぞれの MS 測定を実施したところ、それぞれの N-末端ペプチドが  $m/z$  2044.10, 1850.09 に検出されました (Fig. 1)。この両者について、高エネルギー CID を用いた MS/MS 測定を行い、プリカーサイオンを起点に、検出されたプロダクトイオン間の質量差を読んでゆくことで N-末端ペプチドのアミノ酸配列を確認しました (Fig. 2, 3)。

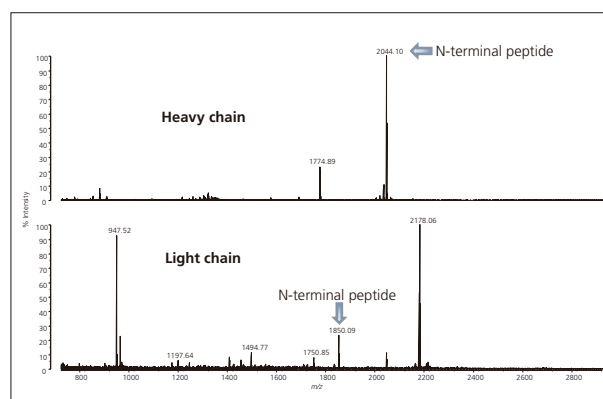


Fig. 1 モノクローナル抗体から抽出した N-末端ペプチド画分のマススペクトル  
Mass Spectra of Peptides of N-Terminal Fraction Extracted from the Monoclonal IgG

その結果、長鎖、軽鎖ともに、N-末端アミノ酸がピログルタミン酸であることが分かりました。このようにプリカーサイオンから順次プロダクトイオンを低質量側に追ってゆくことで配列を解析できることは MALDI の最大の特徴といえます。さらに、MALDI-7090 に備わっている高エネルギー CID を利用することにより、ロイシン/イソロイシンといった質量が全く同一のアミノ酸についても、それぞれの側鎖が開裂したイオン (W series) が検出できるので、両者を明確に識別することが可能となります。そして、Fig. 2 に示したように高分解能 MS/MS は、近接した質量 ( $m/z$  1462.60 と 1464.60) を明瞭に分離することができるため、配列の読み間違いを防ぐことが可能となります。

このように、プロテインシーケンサーでは解読することができないN-末端がブロックされたペプチドのアミノ酸配列解析には、MALDI-7090のような高分解能MS/MSが有効なツールとなります。

Reference

1) M. Yamaguchi et.al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22 3313-3319 (2008)

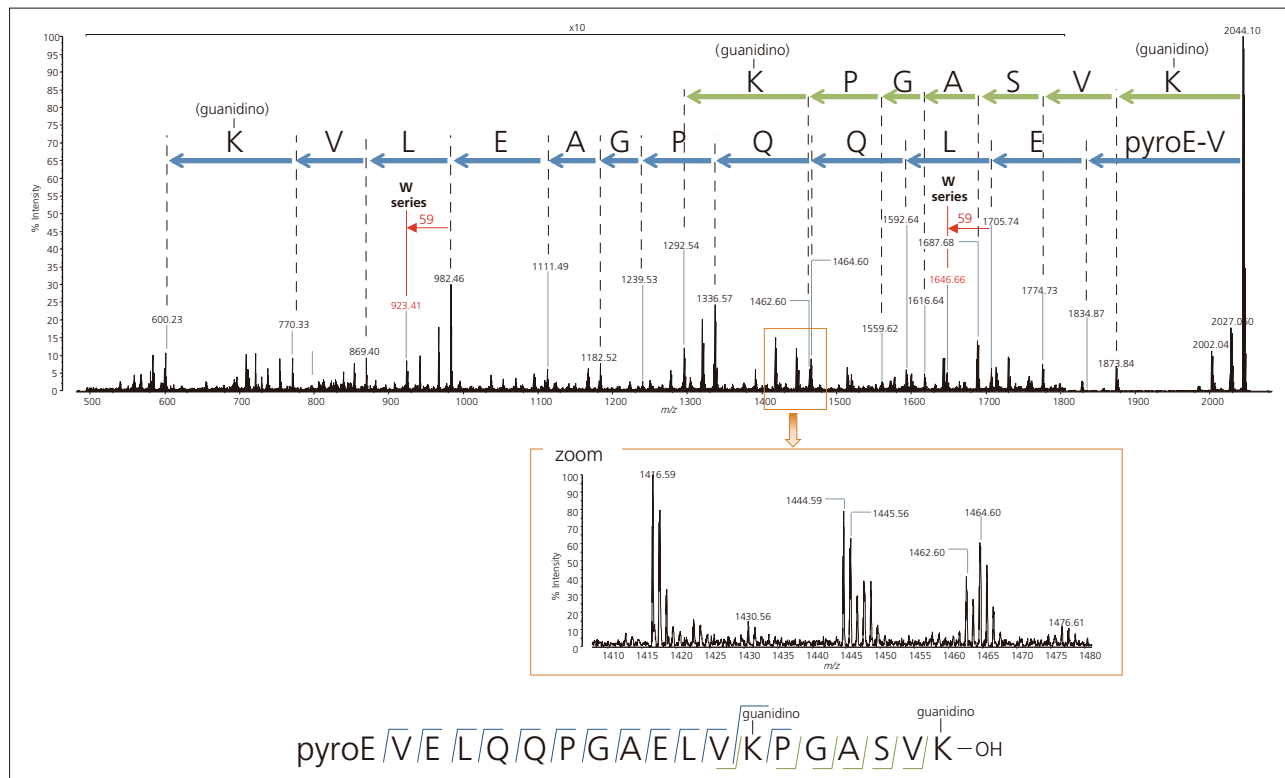


Fig. 2 モノクローナル抗体の長鎖由来N-末端ペプチド ( $m/z$  2044.10) の高分解能 MS/MS  
High Resolution MS/MS of the Blocked N-Terminal Peptide ( $m/z$  2044.10) of the Monoclonal IgG Heavy Chain

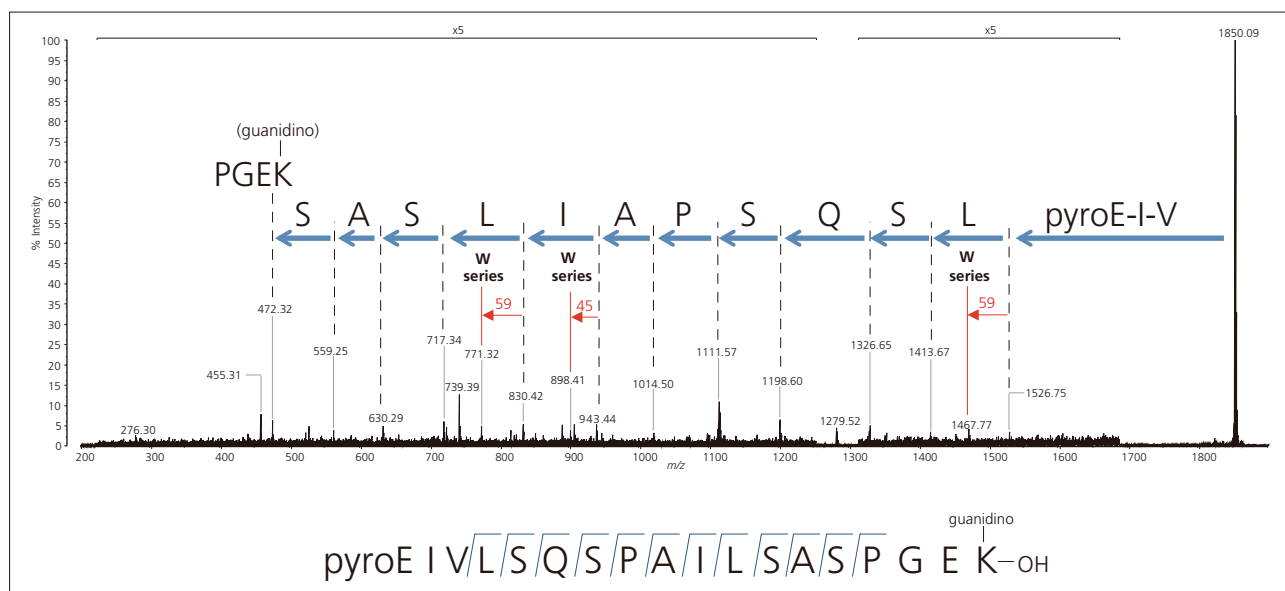


Fig. 3 モノクローナル抗体の軽鎖由来N-末端ペプチド ( $m/z$  1850.09) の高分解能 MS/MS  
High Resolution MS/MS of the Blocked N-Terminal Peptide ( $m/z$  1850.09) of Monoclonal IgG Light Chain

<謝辞>

今回の分析に使用した試料は、国立医薬品食品衛生研究所 原園先生よりご提供頂きました。御礼申し上げます。  
尚、分析の一部はH26年度厚生労働科学研究委託費により実施しました。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2015年6月  
島津コールセンター ☎ 0120-131691  
(075)813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。  
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>  
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。