

# Application News

## No. B60

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

### タンパク質凝集体の検出 - High Molecular Detector を搭載した MALDI-TOF MS を用いた 多量体タンパク質検出 - Detection of the Aggregated Protein - Multimerized Protein Detection Using MALDI-TOF MS Combined the High Molecular Detector -

タンパク質医薬品開発や様々なタンパク質を用いた研究においては、意図しないタンパク質の凝集体形成が、対象となるタンパク質の機能低下や抗原性発現の要因となりかねません。そのため、環境変化によるタンパク質の凝集体形成をモニターすることは、安定的な生化学的データの取得や医薬品の品質管理といった場面で非常に重要な評価項目となります。本稿では、超高質量検出が可能な MALDI-TOF MS を利用したタンパク質凝集体の検出についてご紹介します。

S. Nakaya

#### ■凍結融解処理あるいは加温処理により生成したタンパク質多量体の検出

Detection of Multimerized Protein Generated by Freeze-Thaw or Heating Treatment

研究用マウス抗体 (1 μM, 10 μL) を用いて、2 回の凍結融解処理 (-80 °C / 室温) を行った試料と、50 °C 環境下に 3 時間静置した試料をそれぞれタンパク質のリンカー試薬である K200 Stabilizer (CovalX 社製) と混合した後、室温環境下で 1 時間反応させました。

反応後の試料溶液を MALDI マトリックス (Sinapinic acid, 10 mg/mL, 50 % アセトニトリル水溶液 / 0.1 % トリフルオロ酢酸水溶液) と混合し、High molecular detector を搭載した MALDI-TOF MS を用いて測定を行いました。合わせて、未処理の抗体を K200 Stabilizer と室温環境下で 1 時間反応させた試料についても測定を行いました。

未処理の市販抗体を High Molecular Detector を搭載した MALDI-TOF MS で測定すると、148k Da 付近に抗体由来のシグナルが強く検出され、若干ですが、抗体の二量体のシグナルも検出されました (Fig. 1)。

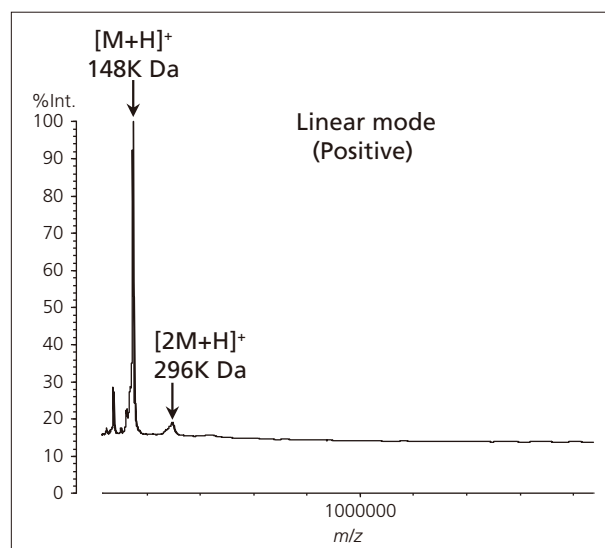


Fig. 1 未処理試料のマススペクトル  
Mass Spectrum of Non-Treatment Sample

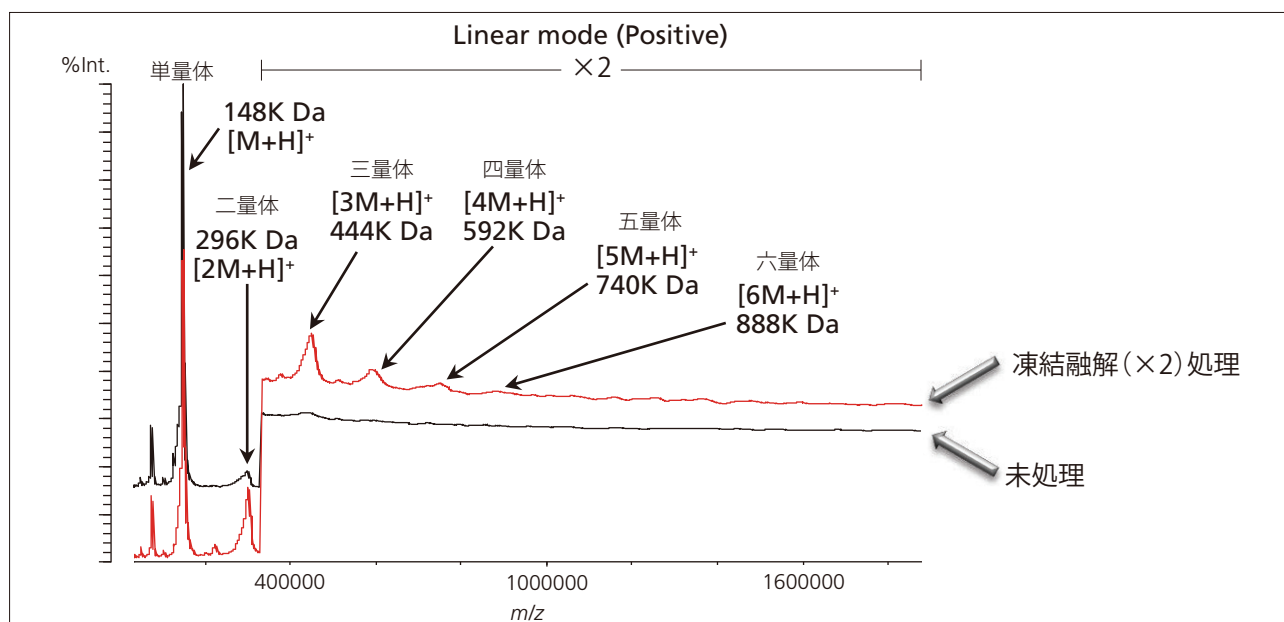


Fig. 2 凍結融解処理後のマススペクトルと未処理のマススペクトルの比較  
Comparison of the Mass Spectra between Freeze-Thaw Treatment Sample and Non-Treatment Sample

一方、凍結融解を繰り返した試料では、未処理の抗体試料に比べ、二量体由来のシグナルが強く検出され、さらに三量体～六量体までのシグナルが検出されました (Fig. 2)。また、高温環境下においた試料においても、凍結融解処理を行った試料と同様に、抗体の多量体由来のシグナルが顕著に検出されるようになりました (Fig. 3)。

このように、多量体を形成したタンパク質に対して、リンカー試薬による架橋と、高質量分子を検出可能な High Molecular Detector を搭載した MALDI-TOF MS で分析することで、特定の環境下でのタンパク質凝集の変化を捉えることが可能です。

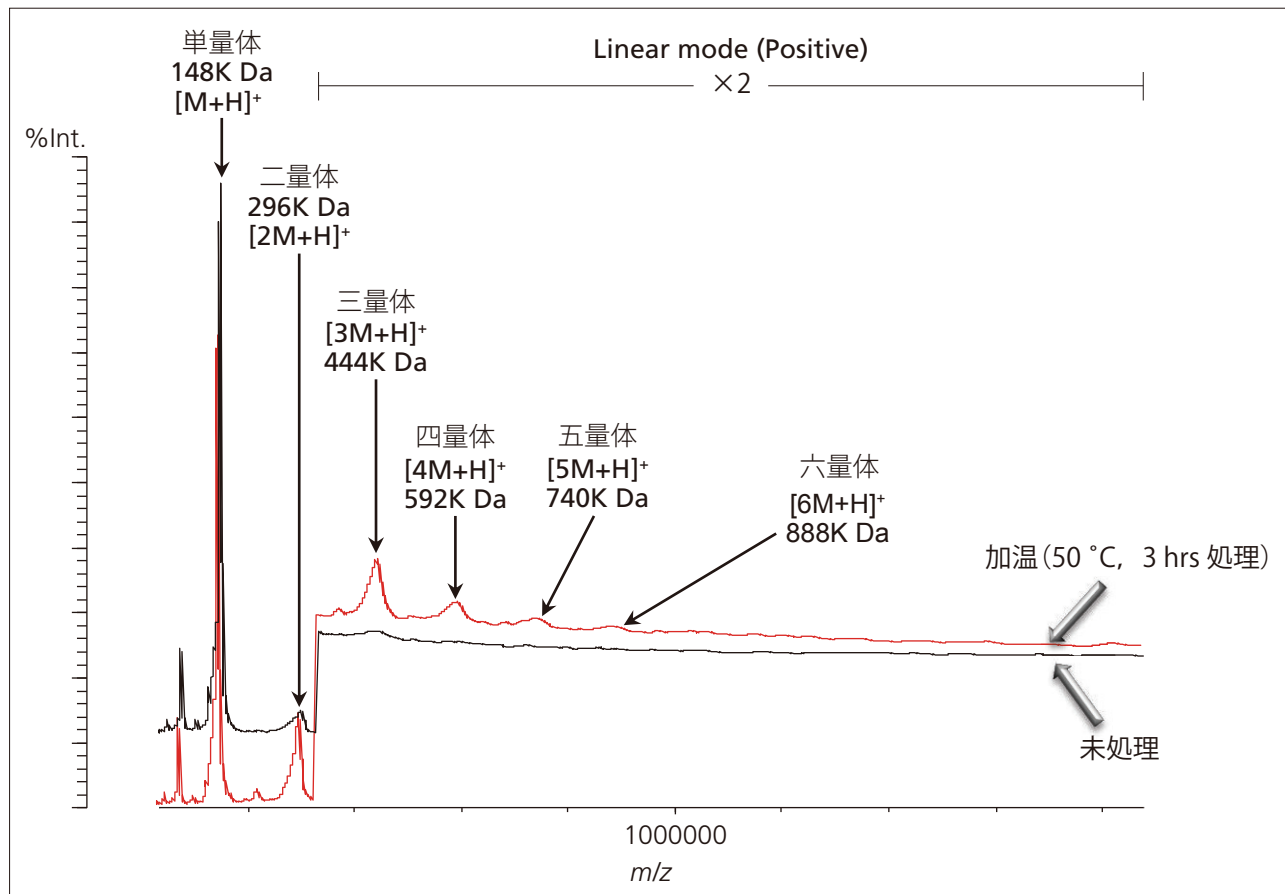


Fig. 3 加温 (50 °C, 3 時間) 処理後のマスペクトルと未処理のマスペクトルの比較  
Comparison of the Mass Spectra between Heated (50 °C, 3 hours) Sample and Non-Treatment Sample