

卓上型MALDI-TOFMSとFc領域の アフィニティ精製を用いた IgGのグリコシル化プロファイル

タンパク質の糖鎖修飾は、タンパク質の立体構造の安定化から結合特異性の発現まで、生物学のプロセスにおいて広範囲に重要な役割を果たします。この見地から、特にバイオ医薬品の開発において、*N*-*O*-結合型糖鎖の特性評価は非常に重要です。今までハイエンドの質量分析計を使用して糖鎖修飾の正確な特性評価が積極的に行われてきましたが、スクリーニングや QA/QC を想定したバッチ分析用途では、比較的安価で使い勝手の良い市販装置が要望されていました。卓上型 MALDI-TOFMS である MALDI-8020 は、一般的なプロファイリングに十分な仕様、スループット、およびコスト効率の点で使用しやすい機器であるため、このような用途に適していると考えられます。本報告では、MALDI-8020 を使用して、糖鎖を遊離させずに IgG の糖鎖修飾をプロファイリングすることを試みました。そのために、酵素による断片化とアフィニティビーズを使用する前処理を検討しました。

Y. Yamazaki

■ Fc 領域の精製

図 1 に Fc 領域を生成するワークフローを示します。NIST mAb、マウス血清由来の IgG、およびミエロマ IgG を MS 分析の対象としました。IdeZ および Protein-A 磁気ビーズ (Mag Sepharose™) は、それぞれ Promega および GE Healthcare から購入しました。トリス-NaCl バッファーに溶解した IgG を IdeZ とともに 37 °C で 2 時間インキュベートしました。その結果得られた Fc および F(ab')₂ を含む溶液はトリスバッファーで平衡化した磁気ビーズと混合したのち、同じバッファーで数回洗浄してビーズに非吸着の成分を除きました。最後に、プロテイン A に吸着した Fc を酸性溶液で溶出し、ZipTip® C18 で脱塩しました。

■ MALDI-TOFMS

正イオンモードでのすべての MS 分析は、卓上型リア MALDI-TOFMS (MALDI-8020) を使用して行いました。シナピン酸 (SA) とフェルラ酸 (FA) をそれぞれ 0.1 % TFA を含む 50 % アセトニトリル/ミリ Q 水に 20 mg/mL に溶解し、マトリックスとして MS 分析に適用しました。



MALDI-8020

■ 統計解析

eMSTAT Solution™ (Shimadzu Corp., Japan) を適用して、糖鎖修飾された Fc 領域の分類/差異解析を行いました。

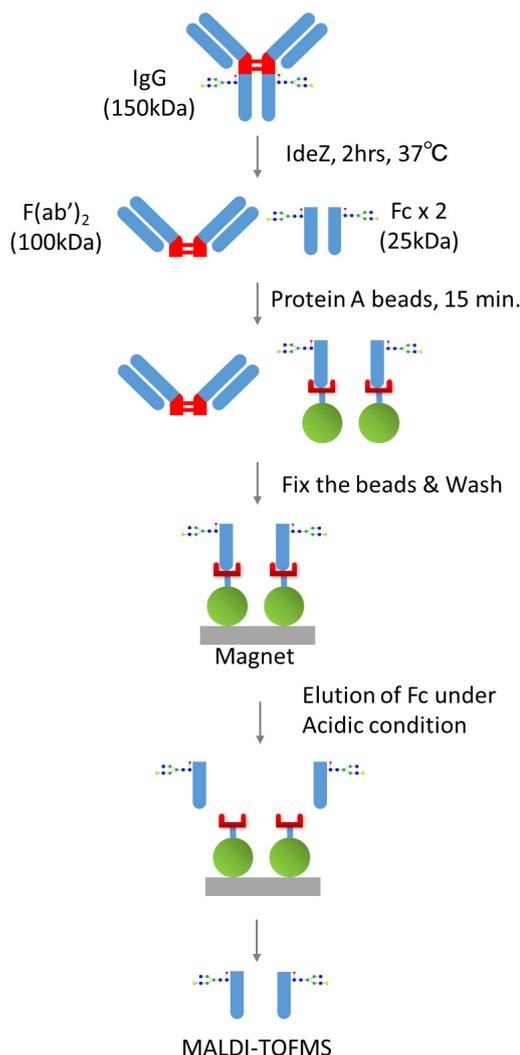


図 1 Fc のアフィニティ精製を用いたワークフロー

■ 結果

図 2 に IgG 全体の質量スペクトルを示します。150 kDa 付近にこれら IgG の分子量は容易に観察されました。しかし、このような高分子量の *m/z* 範囲では質量分解能が不十分なため、糖鎖修飾の情報はほとんど得られませんでした。

次に、糖鎖修飾を受けた Fc 領域を精製するために、すべての IgG に図 1 に示すワークフローを適用しました。精製された Fc の分子量はほぼ 25 kDa と期待され、この分子量領域では MALDI-8020 の MS 分解能は、糖鎖修飾のバラエティを認識するのに十分と考えられました。

図1のワークフローで精製した3種類のFcのマススペクトルを図3に示します。各スペクトルのピーク間の質量ギャップは、糖ユニットを示し、修飾に起因するバラエティが観測されています。3種類のFcの各マススペクトルは、主に糖鎖修飾の違いに起因した、明確に異なるパターンを示しました。

各FcのMS測定を3回繰り返し、eMSTAT Solutionを使用して統計分析を行いました。エクスポートされた質量スペクトルのピークリストは、図4に示すように、「IgG」フォルダーの下に配置された「myelo」、「nist」、および「serum」という名前の一連のデータフォルダーにテキストファイルとして保存されました。eMSTAT Solutionを使用して統計分析を実行するには、「IgG」フォルダーを開くだけです。Fcのデータセットを読み込んだ後、いくつかのパラメーターを最小限に調整するだけで、図4に示すスコアプロットがすばやく得られました。

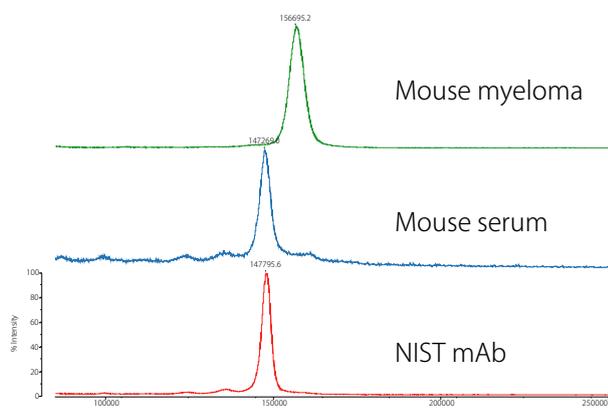


図2 IgGのマススペクトル

結論

酵素により断片化されたIgGをアフィニティビーズにより精製し、卓上型MALDI-TOFMSであるMALDI-8020で分析することによりIgGの糖鎖修飾に関するProfilingが可能になります。MALDI-8020のMS分解能は、糖鎖修飾のバラエティが異なる3つのFcを認識するのに十分です。さらに、eMSTAT Solutionによる統計分析により、3種類のFcをスムーズかつ迅速に分類でき、バッチ分析やQA/QCなどに適用できます。

eMSTAT Solutionは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
Sephacroseは、GE Healthcare社の商標です。
ZipTipは、Merck KGaAの登録商標です。
その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。
なお、本文中にはTM、®マークを明記していない場合があります。

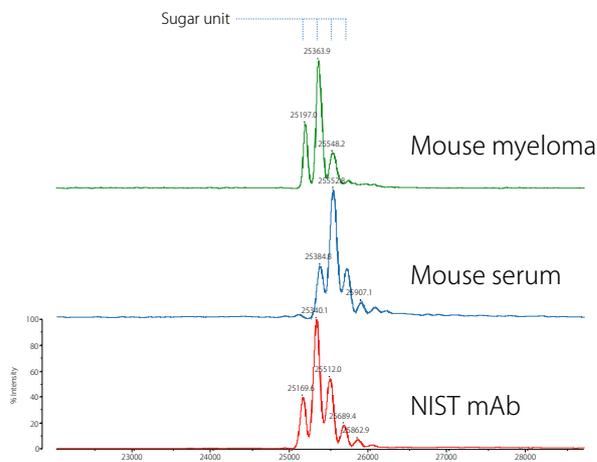
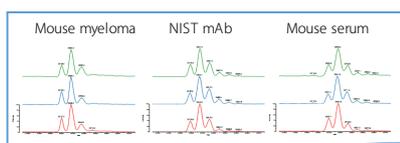
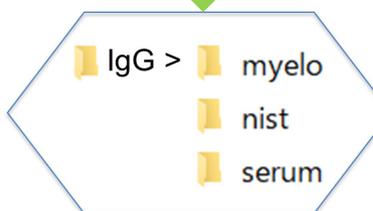


図3 アフィニティ精製したFcのマススペクトル

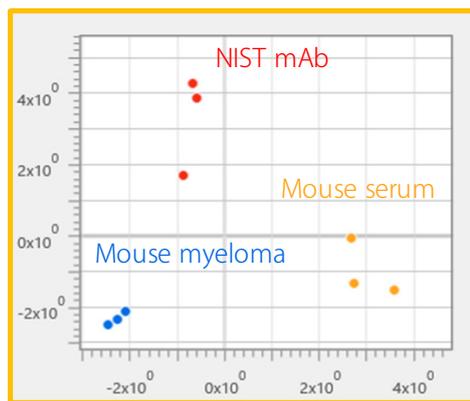


A data set of various Fc

Save peak lists in each folder



Open "IgG" folder in eMSTAT Solution



Generation of Score Plot in a minute

図4 eMSTAT Solutionを用いたFc領域の分類