

Application News

No. B55

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糖ペプチド解析

Analysis of Glycopeptides of a Monoclonal Antibody Using the High Resolution MALDI-TOF MS “MALDI-7090”

バイオ医薬品に活用されている抗体は多くの場合糖鎖修飾を受けています。この糖鎖はグルコースやマンノースなどの単糖が複雑に結合した構造不均一性の高い分子で、且つその複雑な構造にはタンパク質の機能調節という重要な働きがあることが知られています。しかしながら、糖鎖の複雑な構造や、糖鎖がタンパク質のどの部位に結合しているかという情報は、遺伝子にあらかじめ書き込まれているものではなく、タンパク質の生合成過程で働く多くの糖転移酵素の働きにより形作られてゆく情報です。そのため、抗体を産生させる細胞の生育状態によって、同じタンパク質骨格を持っていても異なる糖鎖構造を持っていたり、糖鎖が結合していると予想される箇所には糖鎖が結合していなかったりといった現象が見られます。そのため、バイオ医薬品として抗体を生合成させる場合などには、その構造や結合部位を明らかとすることが求められます。現在では多くの場合、この糖鎖の結合部位に関しては質量分析計が用いられています。

ここでは、抗体に結合している糖鎖の構造と結合部位に着目して、高分解能 MALDI-TOF MS “MALDI-7090” を用いた分析をご紹介します。

S. Nakaya

糖タンパク質からの糖ペプチド調製

Preparation of Glycopeptides from a Glycoprotein

市販モノクローナル抗体を試料として、まず溶液中での還元アルキル化を行いました。その後、この溶液にトリプシンを加えて 37 °C で 2 時間酵素消化し、酵素消化後の溶液を、あらかじめブタノール：エタノール：水 = 4：1：1 で

平衡化しておいた Sepharose CL4B ゲルを詰めたスピンカラムに加えて溶液を自然落下させることで糖ペプチドをゲルに吸着させました。その後、平衡化溶液で洗浄することでペプチドを除き、エタノール水溶液で糖ペプチドを回収しました。回収した糖ペプチドをターゲットプレートに載せ、MALDI-7090 を用いて分析しました。マトリックスには DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) を用いました。

糖ペプチド画分の MS 測定

MS Analysis of the Glycopeptide Fraction

回収した糖ペプチド画分のマスペクトルを Fig. 1 に示しました。検出されたシグナルの内、 m/z 2405.72, 2430.75, 2567.72, 2592.73, 2633.74, 2795.74, 2957.74 が糖ペプチド由来のシグナルであると考えられました。糖鎖はその構造に不均一性をもつため、1つのペプチド骨格に複数の異なる糖鎖構造が存在します。MALDI-TOF MS ではシグナルが 1 価イオンとなるので、MS 測定で検出されたシグナル間の m/z の差を確認し、糖鎖の構成成分由来の差と合致するものを探索することで、複数の検出シグナルから容易に糖ペプチド由来のシグナルを見つけ出すことが可能です。

MS/MS による糖鎖、アミノ酸配列解析

Glycan and Amino Acid Sequence Analysis Using MS/MS

こうして見つけ出された糖ペプチド由来シグナルの中から、一例として m/z 2795.74 を選択し、高エネルギー CID を用いた MS/MS 分析を実施しました (Fig. 2)。その結果、プリカーサイオンから近い高質量領域に糖鎖由来の開裂イオンが検出され、プリカーサイオンから遠い低質量領域にペプ

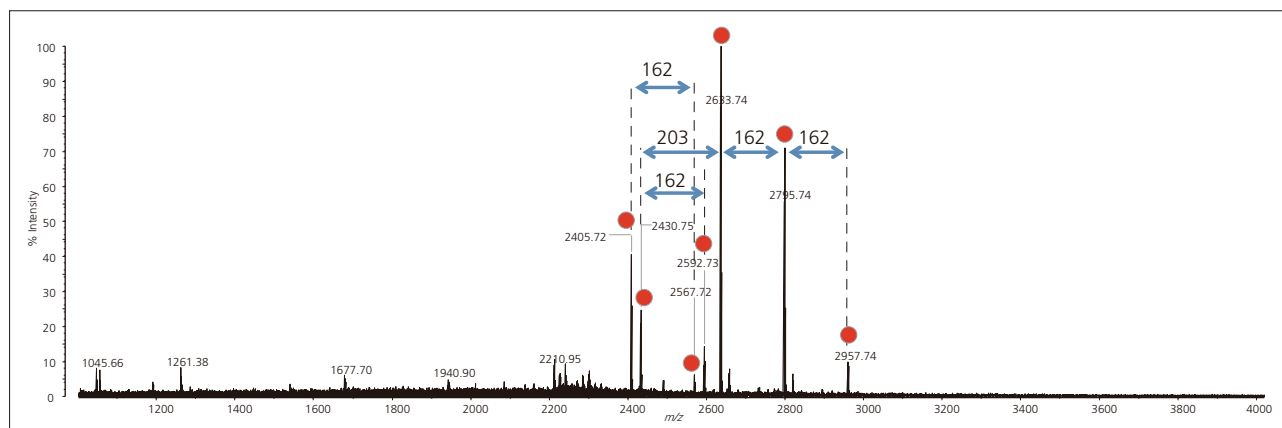


Fig. 1 モノクローナル抗体から抽出した糖ペプチド画分のマスペクトル
赤丸で示されたピークが糖ペプチドシグナルを示しています。
Mass Spectrum of the Glycopeptide Fraction from the Monoclonal IgG
Glycopeptide signals were shown in red circle.

チド骨格由来の開裂イオンが検出されました。糖鎖由来の開裂イオンから、 m/z 2795.74 の糖ペプチド上の糖鎖構造がコアフコースを持つ 2 本鎖 agalacto/galacto N-結合型糖鎖であることが示唆されました。また、ペプチド骨格由来の開裂イオンから糖鎖が結合しているペプチド骨格のアミノ酸配列は EEQYNSTYR であることが確認できました。N-結合型糖鎖の結合部位配列は -NXS/T- であることが知られており、このことから、糖鎖の結合部位が EEQYNSTYR の N (アスパラギン) であることが確認できました。このようにして、MS

測定で得られた 7 つの糖ペプチド由来シグナルは Fig. 3 に示した構造であることが示唆されました。

通常、CID による糖ペプチドの MS/MS ではペプチド由来の開裂イオンがほとんど検出されないために解析は困難で、CID ではない機構による開裂が必要であるとされていますが、MALDI-7090 の持つ 20 keV の高エネルギー CID による高分解能 MS/MS では、糖鎖由来の開裂イオンだけでなくペプチド骨格由来の開裂イオンも検出されるようになるため、糖ペプチドの定性分析に有用なツールとなります。

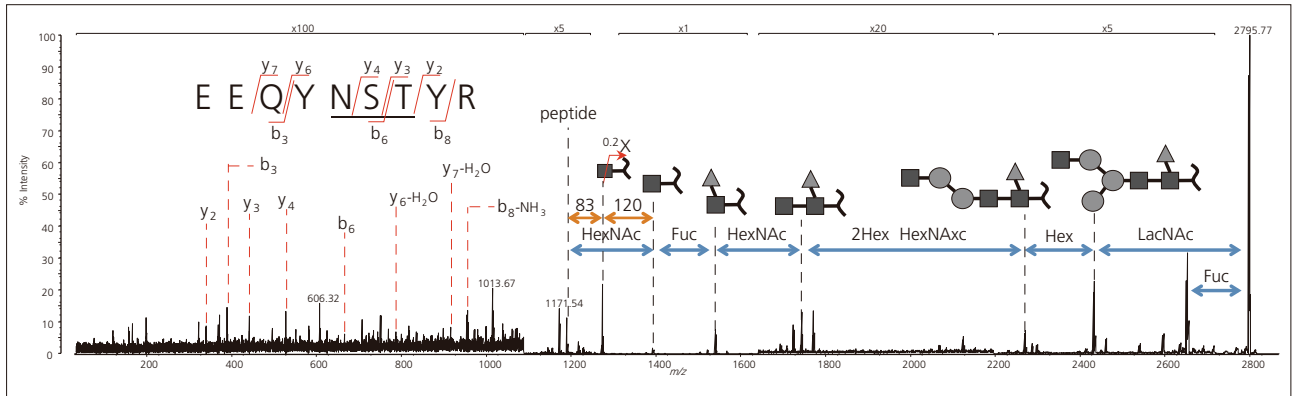


Fig. 2 モノクローナル抗体由来糖ペプチド (m/z 2795.74) の高分解能 MS/MS
EEQYNSTYR は MS/MS 分析で確認されたペプチド骨格のアミノ酸配列です。N-結合型糖鎖の結合部位配列に下線を表示しました。糖鎖構成要素の略号は次の通りです。HexNAc : N-acetylhexosamine, Fuc : fucose, Hex : hexose, LacNAc : N-acetylglucosamine
High Resolution MS/MS Analysis of the Glycopeptide (m/z 2795.74) from the monoclonal IgG
EEQYNSTYR was the peptide sequence of the analyte which was confirmed by MS/MS analysis. The consensus sequence of the N-glycan binding site was underlined. HexNAc, Fuc, Hex, and LacNAc is the abbreviation of N-acetylhexosamine, fucose, hexose, and N-acetylglucosamine, respectively

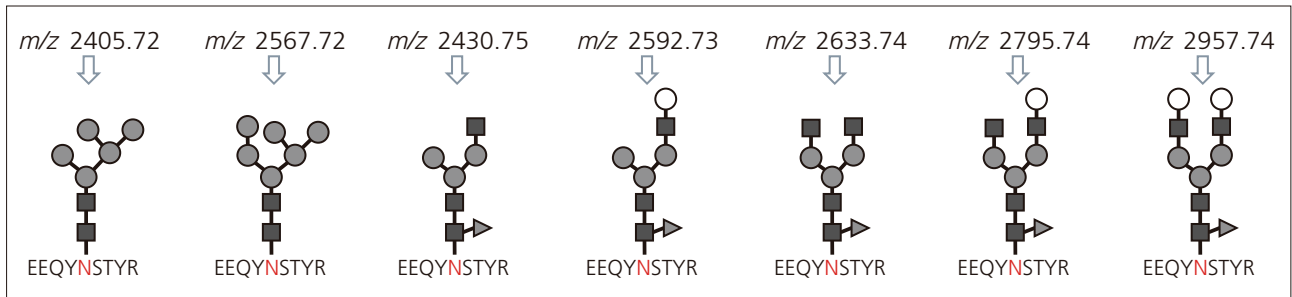


Fig. 3 モノクローナル抗体由来の推定糖ペプチド構造
EEQYNSTYR は MS/MS 分析で確認されたペプチド骨格のアミノ酸配列です。N-結合型糖鎖の結合部位を赤く表示しました。
シンボル: ■; N-アセチルヘキサミン, ○●; ヘキソース, ▲; フコース
Identified Glycopeptide Structures from the Monoclonal IgG
EEQYNSTYR was the peptide sequence of the analyte and the amino acid residue of N-glycan binding site was shown in Red.
Symbols: ■; N-acetylhexosamine, ○●; Hexose, ▲; Fucose

< 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。