

# Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF による ペプチドマッピングのルーチン分析

## アプリケーションノート

### 著者

David L. Wong  
Agilent Technologies, Inc.  
Santa Clara, CA, USA

Jing Chen  
Agilent Technologies, Inc.  
Madison, WI, USA

### 概要

モノクローナル抗体 (mAb) は研究されているタンパク質ベース生体分子の急成長分野です。タンパク質医薬品は不均一な性質のために、広範な分析特性解析が要求されます。

液体クロマトグラフィーとエレクトロスプレー質量分析 (LC/MS) との組み合わせによるペプチドマッピングは、mAb の一次配列を確認するためにバイオ医薬品業界が使用する十分に確立した手法です。包括的な特性解析は、mAb およびその変異体の完全なアミノ酸配列だけでなく、翻訳後修飾 (PTM) および位置についての情報も提供します<sup>1,3</sup>。しかし、データ処理および結果解析のワークフローが自動化されていないことが、バイオ医薬品分析や臨床研究ラボの高速化を制限しています。

今回のアプリケーションノートでは、Agilent AssayMAP Bravo 自動分注装置、Agilent 1290 Infinity II UHPLC システム、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF、そして完全な配列マッピング解析のための Agilent BioConfirm ソフトウェアによる自動データ解析を使用した、ハイスループットワークフローを開発しました。



図 1. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム



**Agilent Technologies**

## 実験方法

### 実験方法

モノクローナル抗体 (mAb) 標準 RM 8671 は米国国立標準技術研究所 (NIST) から購入しました。DL-ジチオトレイトール (DTT)、ヨードアセトアミド (IAA)、グアニジン塩酸塩は Sigma-Aldrich 社から購入しました。高品質質量分析グレードのトリプシン/Lys-C 酵素混合液は Promega 社から入手しました。AssayMAP C18 カートリッジは Agilent Technologies 社製を使用しました。

Agilent AssayMAP Bravo 自動分注装置を使用して NIST mAb サンプルの希釈、分解、脱塩を行いました。サンプルは乾燥させた後、0.1 % TFA の DI 水で再懸濁しました。約 0.5 µg の mAb 分解サンプルを注入して各 LC/MS/MS 分析を行いました。

### LC/MS 分析

LC/MS 分析は、Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムと、Agilent デュアル JetStream ESI ソースを搭載した Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムとを組み合わせて実行しました。LC 分離には Agilent AdvanceBio ペプチドマッピンググララム (2.1 × 150 mm、2.7 µm) を使用しました。表 1 と表 2 は使用した LC/MS パラメータを示しています。

### データ処理

LC/MS/MS からの生データは Agilent MassHunter BioConfirm B.08.00 ソフトウェアを使用して処理しました。優れたアルゴリズムにより、下流のデータ解析が簡素化され、理論的に分解された NIST mAb 配列との比較によりペプチドと PTM の自動識別が可能になります。

表 1. 液体クロマトグラフィーのパラメータ。

Agilent 1290 Infinity II UHPLC システム	
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 × 150 mm、2.7 µm (p/n 653750-902)
サーモスタット	4 °C
溶媒 A	0.1 % ギ酸水溶液
溶媒 B	0.1 % ギ酸 + 90 % アセトニトリル
グラジエント	0 ~ 15 分、0 ~ 40 % B 15 ~ 18 分、40 ~ 90 % B 18 ~ 20 分、90 % B
カラム温度	60 °C
流量	0.4 mL/min
注入量	3.0 µL

表 2. MS のパラメータ

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム	
ガス温度	325 °C
乾燥ガス	13 L/min
ネブライザ	35 psig
シースガス温度	275 °C
シースガス流量	12 L/min
VCap	4,000 V
ノズル電圧	500 V
フラグメンタ電圧	175 V
スキマ	65
Quad AMU	95
参照質量	121.0509、922.0098
取り込みモード	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)
質量範囲	m/z 100 ~ 1,700
採取レート	5 スペクトル/秒
自動 MS/MS 範囲	m/z 50 ~ 1,700
最小 MS/MS 採取レート	3 スペクトル/秒
Isolation Width (選択幅)	狭い (~ 1.3 m/z)
プリカーサ/サイクル	上位 10
コリジョンエネルギー	3.6*(m/z)/100-4.8
MS/MS のスレッシュホールド	3,000 カウントと 0.001 %
ダイナミック排除	オン、3 回繰り返して 0.2 分間排除
プリカーサアバンドンススペースの スキャンスピード	あり
ターゲット	25,000
MS/MS 累積時間制限を使用	あり
純度	100 % 厳重、30 % カットオフ
同位体モデル	ペプチド
プリカーサでのソート	+2、+3、>+3 のみのアバンドンスによる

## 結果と考察

サンプル前処理およびさまざまに修飾された何百ものペプチドのデータ解析が必要なために、抗体の包括的なペプチドマッピングは複雑で時間のかかるプロセスとなることがあります。今回の実験では、ハイスループットの AssayMAP Bravo 液体ハンドリングシステム、Agilent Infinity II UHPLC、Agilent 精密

質量 AdvanceBio Q-TOF システムを使用してこれらの問題を解決しました。さらに、Agilent MassHunter BioConfirm B.08 ソフトウェアによる自動データ処理ワークフローがデータマイニング全体および結果の真度を飛躍的に向上させました。図 2 は、トリプシン/Lys-C で分解された NIST mAb からのペプチドの抽出化合物クロマトグラム (ECC) です。わずか 15 分のグラジ

エントによって優れたクロマトグラフィー分離能を実現しました。NIST mAb 軽鎖と重鎖からの同定済みペプチドにはそれぞれに該当する配列番号のラベルが付いています。

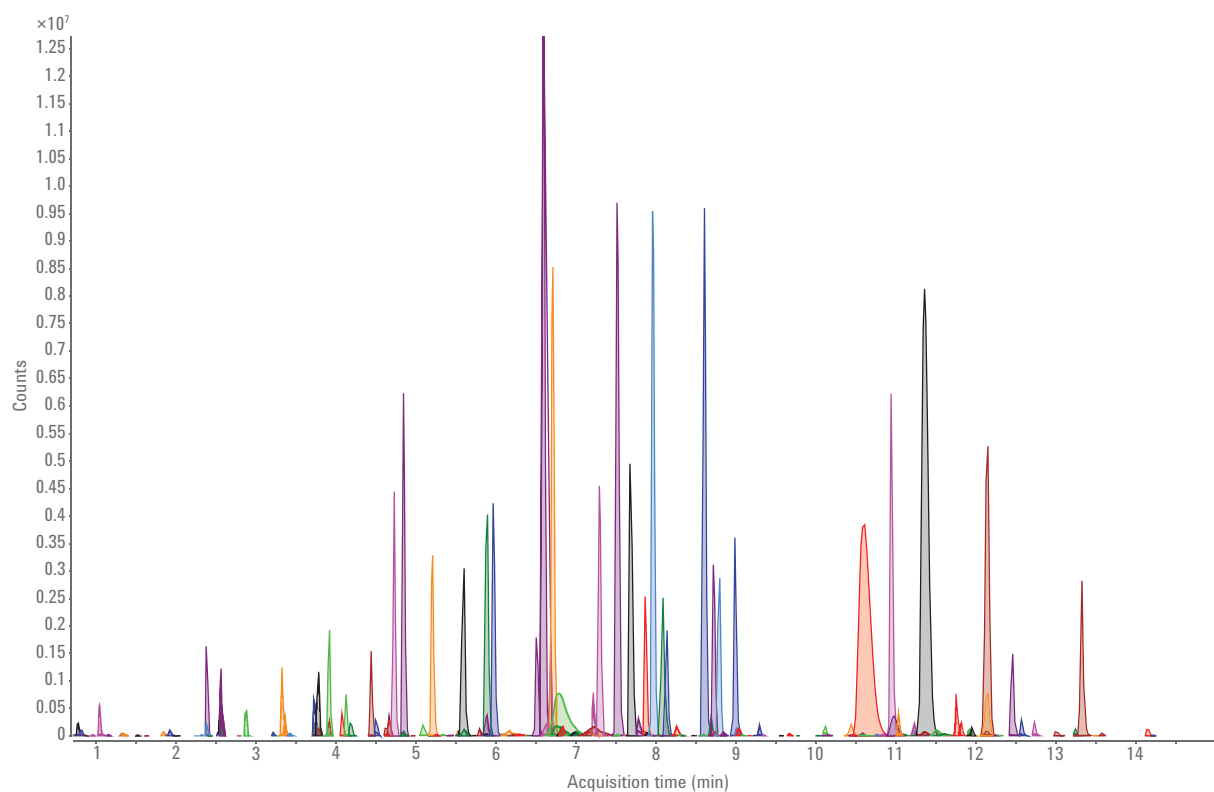


図 2. Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを用いて分離したトリプシン/Lys-C 分解済み NIST mAb 標準 RM 8671 からのペプチドの ECC。

今回のペプチドマッピングワークフローでは、すべての一致したペプチドは MS 質量誤差が <5 ppm で MS/MS スペクトルを 1 つ以上確認することを必要としました。BioConfirm スコア算出のアルゴリズムは、b および y フラグメントイオンの存在、インモニウムイオン、質量精度、MS/MS ピーク強度やその他のパラメータ要素を考慮します。図 3A は、BioConfirm ソフトウェアで同定したペプチドの詳細な例を表

示しています。同定されたペプチドのほとんどが優れた質量精度を示し、誤差は 1 ppm 未満でした。ペプチドを同定した後、mAb 配列のカバーマップが自動的にレポートされました。図 3B では、15 分の UHPLC グラジエントを使用した NIST mAb に関する 99.4 % の配列のカバーが示されています。

一致したペプチドの配列、修飾およびマッチスコアを含むペプチドの詳細情報を即座に確認できます。これにより、個別のペプチドの MS および MS/MS スペクトルとサンプルの TIC を確認できます。さらに、フラグメントイオンに伴うプリカーサ分子のアバンダンスも相対的な定量分析用に提供されます。

BioConfirm でのペプチドマッピングの結果のサマリ (図 4) では、質量、リテンションタイム、一

Score	Mass	RT	Score (MFE)	Seq Loc	Tgt Seq Mass	Diff (Bio, ppm)
88.15	1796.8876	12.1442	100	A(126-141)/ C(126-141)	1796.888	-0.18
84.09	1723.9	6.7992	87.7	B(344-358)/ D(344-358)	1723.9006	-0.33
78.65	1285.6665	7.2351	80	B(348-358)/ D(348-358)	1285.6667	-0.12
77.35	1080.5225	4.7314	100	A(19-28)/ C(19-28)	1080.5234	-0.78
77.03	2101.119	10.6051	100	A(107-125)/ C(107-125)	2101.1208	-0.85
75.94	1320.6706	7.9666	100	B(137-150)/ D(137-150)	1320.6708	-0.14
75.12	1923.0328	6.1898	80	B(342-358)/ D(342-358)	1923.0326	0.07
75.07	3043.3936	7.6842	100	B(418-442)/ D(418-442)	3043.393	0.19
74.63	1501.7518	8.9926	100	A(169-182)/ C(169-182)	1501.7512	0.44
72.94	1806.9981	11.7542	100	B(305-320)/ D(305-320)	1806.9992	-0.61
72.84	785.4405	4.5012	99	A(53-60)/ C(53-60)	785.4396	1.18
71.52	1945.0193	11.6124	80.3	A(108-125)/ C(108-125)	1945.0197	-0.21
71.46	1891.8935	7.8711	100	A(1-18)/ C(1-18)	1891.8946	-0.54
71.22	6712.3081	13.3296	100	B(151-213)/ D(151-213)	6712.3072	0.14
69.7	1872.9134	10.9458	100	B(396-412)/ D(396-412)	1872.9146	-0.6
69.36	1185.6395	9.04	100	B(125-136)/ D(125-136)	1185.6394	0.13
69.19	1160.6214	8.6107	100	B(364-373)/ D(364-373)	1160.6223	-0.81
68.93	1797.872	10.7793	100	A(126-141)/ C(126-141)	1797.872	-0.01
68.64	1676.794	8.7257	100	B(278-291)/ D(278-291)	1676.7947	-0.4
68.24	1847.7825	7.2197	100	B(84-99)/ D(84-99)	1847.7818	0.36
68.23	951.5279	7.5208	100	A(45-52)/ C(45-52)	951.5277	0.16
67.57	1787.889	12.5731	100	B(46-59)/ D(46-59)	1787.8883	0.38
67.42	659.3488	7.2981	100	B(443-449)/ D(443-449)	659.349	-0.28
67.13	1923.0327	6.3056	63.1	B(342-358)/ D(342-358)	1923.0326	0.04
66.7	2228.1847	11.2323	100	B(305-323)/ D(305-323)	2228.1841	0.26
65.35	834.4266	6.6893	100	B(252-258)/ D(252-258)	834.4269	-0.42
65.15	2138.0206	8.795	100	B(259-277)/ D(259-277)	2138.0202	0.22
64.64	487.3003	3.7822	100	A(103-106)/ C(103-106)	487.3006	-0.59
64.38	559.3119	4.4421	100	A(145-148)/ C(145-148)	559.3118	0.06
64.1	574.3323	3.9175	100	B(413-417)/ D(413-417)	574.3326	-0.6

図 3A. NIST mAb 分解物からのすべての一致したペプチドの詳細をまとめた Agilent MassHunter BioConfirm B.08 ペプチドマッピングの結果の表の例。同定済みペプチドのほとんどが質量精度 1 ppm 未満です (赤色の枠)。

Sequence Coverage Map: Intact NIST mAb (Protein Digest) (99.40%)

NIST mAb Digest\_250 ng-uL\_01.d - Intact NIST mAb

A: NIST mAb\_LC Monoisotopic mass: 23113.3043 Average mass: 23127.9774 Molecular formula: C1020H1578N270O330S7

```

1 N-term DIQMTQSPSTLSASVGRVITCSASSRVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSPR 60
61 FSGSGSGTEFTLTISSLQDDFATYYCFQGSQYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTAS 130
131 VVCLLNPFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL 200
201 SSPVTKSFNRGEC C-term 213
    
```

B: NIST mAb\_HC Monoisotopic mass: 49430.7257 Average mass: 49462.5065 Molecular formula: C2212H3430N580O673S17

```

1 N-term QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTAGMSVGIWIRQPPGKALEWLAD IWWDDKKH 60
61 YNPGLKDLRTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPVFP 130
131 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT 200
201 YICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVS 270
271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI S 340
341 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY 410
411 SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG C-term 449
    
```

図 3B. NIST mAb の配列のカバーのサマリ



図 4. 代表的なペプチドマッピングの結果とタンパク質の配列のカバーを示す、Agilent MassHunter BioConfirm B.08 ソフトウェアのスクリーンショット

図 5 は、未変性のペプチド ( $m/z = 631.6385$ 、+3 のプリカーサー) と Met-酸化ペプチド ( $m/z = 636.9698$ 、+3 のプリカーサー) の MS/MS スペクトル比較を示しています。b<sub>4</sub> ~ b<sub>7</sub> のフラグメントイオン (緑色の枠) の大きな違い (+15.99 Da) は未変性種と修飾フォームを明確に区別し、軽鎖の Met-4 が酸化の位置であることを示しています。

同様に、図 6 は、未変性ペプチドと脱アミド化ペプチドの MS/MS スペクトルを示しています。b<sub>2</sub> ~ b<sub>3</sub> フラグメントイオン (紫色の枠) はすべて 0.98 Da の特徴的な質量シフトを示し、脱アミド化が明らかに存在しています。さらに、ほとんどの  $\gamma$  イオン (Y<sub>4</sub> ~ Y<sub>8</sub>、赤で強調表示) は未変性フォーム (トップパネル) と同じままで (Y<sub>10</sub> イオンを除く)、重鎖の Asn-364 位置で脱アミド化が生じたことは明らかです。

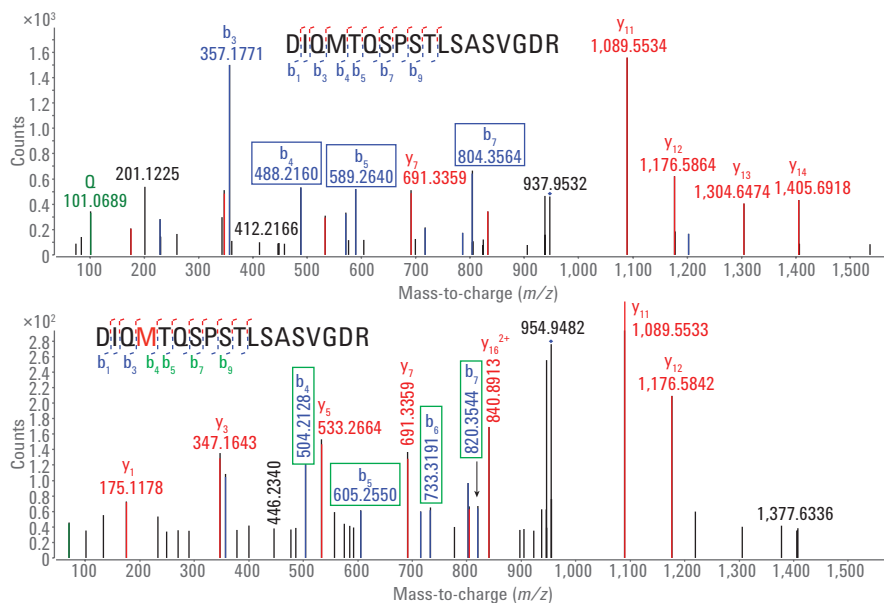


図 5. 翻訳後修飾 (メチオニン酸化) の解析。未変性ペプチドと Met-酸化ペプチドの MS/MS スペクトル (軽鎖ペプチド 1 ~ 18)。上段: 未変性ペプチド、下段: Met 4 で酸化 (緑色の枠内は確認されたフラグメントイオン)。

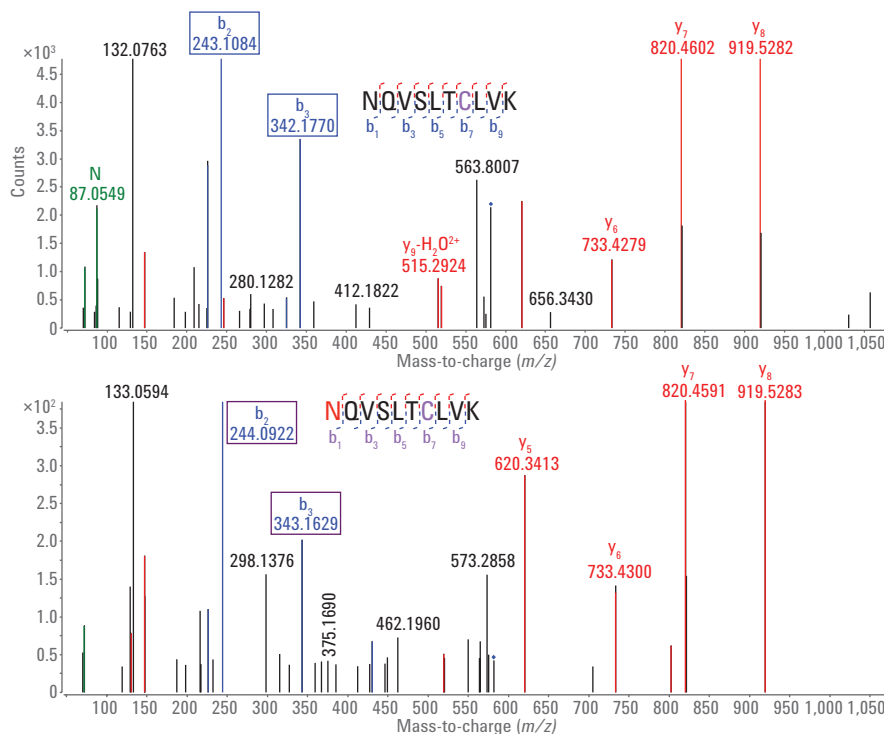


図 6. 翻訳後修飾 (脱アミド化) の解析。未変性ペプチドと脱アミド化ペプチドの MS/MS スペクトル (重鎖: 364 ~ 373)。上段: 未変性ペプチド、下段: Asn 364 での脱アミド化ペプチド。

## 結論

自動サンプル前処理、高速分離、信頼性の高い検出、合理化された処理により、ペプチドマッピングプロセスを、時間のかかる煩わしい作業からルーチンワークフローへと実現可能にするのは、Agilent AssayMAP Bravo から始まり Agilent MassHunter BioConfirm B.08 でのデータ処理までを通して提供されるプロセスの各コンポーネントの信頼できる特質および高い性能です。全分析時間は、Agilent 1290 Infinity II UHPLC と Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムの分離能力および MassHunter BioConfirm の自動処理能力によってきわめて短縮されています。また、完全なタンパク分解物の分析時にみられる均一な精度の分析結果により、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の真度と分解能を実証しました。

## 参考文献

1. Automation for LC/MS Sample Preparation: High Throughput In-Solution Digestion and Peptide Cleanup Enabled by the Agilent AssayMAP Bravo Platform, *Agilent Technologies*, publication number 5991-2957EN.
2. Fast and Efficient Peptide Mapping of a Monoclonal Antibody (mAb): UHPLC Performance with Superficially Porous Particles, *Agilent Technologies*, publication number 5991-3585EN.
3. High Resolution and Rapid Peptide Mapping of Monoclonal Antibody Using an Agilent 1290 Infinity UHPLC and an Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS System, *Agilent Technologies*, publication number 5991-3600EN.

ホームページ

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

カスタマコンタクトセンタ

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)**

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, February 22, 2017

5991-7815JAJP



**Agilent Technologies**