

RapiZyme™ トリプシンおよび IonHance™ DFA を使用する LC-UV-MS ベースの高速で頑健なペプチドマッピング

Abraham S. Finny, Nick Zampa, Balasubrahmanyam Addepalli, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

要約

多くの労力が必要で時間のかかるペプチドマッピングプロトコルは、新しい RapiZyme トリプシンと IonHance ジフルオロ酢酸（DFA）を使用することにより、より高速かつ頑健になります。高い活性および強化された自己消化耐性により、RapiZyme トリプシンをより大量に使用できるようになり、タンパク質構造解析メソッドで採用された従来の酵素-タンパク質比や長い消化時間（3 時間以上）と比較して、消化時間が短縮されました（約 1 時間）。ペプチドマッピングワークフローで IonHance DFA を移動相添加剤として使用することにより、付加イオンによる干渉なしで、高品質の質量スペクトル（MS）および UV データの取り込みが可能になりました。Waters MassPREP™ ペプチド標準混合液と NISTmAb をタンパク質消化標準試料として使用して、付加イオンが含まれていないターゲットペプチド分子イオンの MS^e ベースのフラグメンテーションにおける、配列情報を提供するフラグメントイオンの高いシグナル強度を維持しつつ、高品質の UV および MS データの直接アライメントを実証します。その結果として、最初の実験で特定の保持時間のペプチドピークに注釈を付けた後、以降の品質管理（QC）分析で UV のみの分析を検討できます。このような改善された技法により、高品質のデータが得られる簡素化と効率化の結果として、医薬品用タンパク質の試験が加速されることが期待されます。

アプリケーションのメリット

- RapiZyme トリプシンを使用すると、酵素-タンパク質比 1:5 での消化が可能になり、消化時間が短縮
- 合計サンプル前処理時間は 3 時間未満であり、多くの従来のペプチドマッピングワークフローよりも大幅に短縮

- ギ酸と比較して、IonHance DFA は配列に依存せずに UV 感度が向上し、存在量の少ないペプチドのモニタリングが可能になる
- IonHance DFA のイオンペアリング特性により、ペプチド保持時間の再現性がさらに向上する一方で、関連する付加イオンなしで感度が維持される

はじめに

ペプチドマッピングは、タンパク質を同定および特性評価するために、プロテオミクスおよびバイオ医薬品の特性解析で使用される手法です。単鎖のタンパク質は、ポリペプチドとも呼ばれます。ポリペプチドは、ペプチド結合で結合されるアミノ酸の配列によって識別されます。プロテオミクス実験では、トリプシンなどのプロテアーゼによってペプチド結合を開裂させ、タンパク質をより小さなペプチドに分解してから、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) を用いて分離と質量分析を行います。得られたペプチドマップは、タンパク質の同定とその一次構造の決定に使用できます。いくつかの理由から、頑健なペプチドマッピングが必要です。第一に、タンパク質のアイデンティティの確認に使用でき、これは品質管理およびバリデーションの目的にとって重要です。第二に、ペプチドマッピングを使用して、タンパク質の一次構造を決定することができ、これは初期の研究プログラムに不可欠です。最後に、ペプチドマッピングにより、タンパク質の機能や安定性に影響する可能性のあるアミノ酸配列での翻訳後修飾を検出できます。

このアプリケーションノートでは、ペプチドマッピングへの RapiZyme トリプシンと IonHance DFA の使用に焦点を当て、迅速なペプチドマッピングワークフロー、UV レスponsと MS レスponsの同時最適化、付加イオンのないマスマスペクトルを促進するこの組み合わせのユニークな利点について説明します。

実験方法

サンプル前処理

NIST mAb サンプル [10 µg/µL で 10 µL] を 90 µL の 6 M グアニジン塩酸塩 (GuHCl) [最終濃度 5.4 M] 溶液で変性し、5 mM ジチオスレイトール (DTT) [250 mM 2 µL] で周囲条件下で 30 分間還元しました。この後、10 mM ヨードアセトアミド (IAM) [350 mM を 3 µL] を用いて、周囲条件下でさらに 30 分間アルキル化しました。

脱塩プロトコル

10 mM 塩化カルシウム (CaCl₂) 含有 0.1 M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩 (Tris-HCl) からなる消化バッファーを、Waters Tris CaCl₂ バッファー塩、pH 7.5、4 本入り (製品番号: [186010111](#) <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186010111-quick-prep-tris-cacl2-buffer-salts-ph-75-4-pk.html>>) から最初に調製しました。重力流サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) ベースの脱塩カートリッジに、400 μ L の消化バッファーを 3 回ロードし、毎回溶離液を廃棄することにより、コンディショニングしました。次に、変性 NIST mAb サンプル 100 μ L をカラムにロードし、通過画分を廃棄しました。カラムを 100 μ L の消化バッファーで洗浄し、通過画分を廃棄しました。カートリッジに液滴が残っていないことを確認した後、サンプル収集容器をカートリッジの下に配置し、300 μ L の消化バッファーと脱塩したタンパク質を収集しました。

タンパク質推定

正しい量の変性およびアルキル化した NIST mAb が消化に使用されたことを確認するために、脱塩ステップ後にタンパク質推定を実行しました。UV-Vis プレートリーダーを使用した A280 測定により、正確な濃度の測定値を取得しました。代替方法として、タンパク質推定は液滴の UV-Vis 測定によっても達成できます。このオプションのステップにより、消化に正しいタンパク質の量が確実に使用され、酵素-タンパク質比の値が一貫して維持され、複数の消化物にわたって再現性のあるシグナル挙動が得られます。

タンパク質消化

変性、還元、アルキル化した NIST mAb 20 μ g (200 μ L 中) を 300 μ L の PCR (ポリプロピレン) チューブに取り、4 μ g (4 μ L 中) の RapiZyme トリプシン (製品番号: [186010108](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186010108-rapizyme-trypsin-ms-grade-4-pk.html) <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186010108-rapizyme-trypsin-ms-grade-4-pk.html>>) を添加して 1:5 の酵素-タンパク質比で消化を行いました。この溶液を、回転型 PCR ブロックで 300 RPM、37 °C で 1 時間培養しました。消化後、20 μ L の 1% ギ酸 (最終濃度 0.1%) でサンプルを酸性化することによって、反応を停止しました。サンプルをボルテックス混合し、LC-MS 分析用に Qsert バイアルに定量的に移しました。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY™ UPLC™ I-Class PLUS
検出:	ACQUITY TUV/PDA
波長:	219 nm
バイアル:	透明ガラス 12 × 32 mm スクリューネック Qsert バイアル、容量 300 μ L (製品番号: 186002804)
カラム:	ACQUITY Premier Peptide CSH™ C ₁₈ カラム、130

	Å、1.7 µm、2.1 × 150 mm（製品番号 ： 186009489）
カラム温度：	65 °C
サンプル温度：	6 °C
注入量：	50 µL
流速：	0.25 mL/分
移動相 A：	0.1% (v/v) IonHance DFA（製品番号 ： 186009201）含有 LCMS グレード水
移動相 B：	0.07% (v/v) IonHance DFA 含有 LCMS グレードア セトニトリル
グラジエント：	以下の表を参照してください。

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
0.00	0.250	99.0	1.0	初期条件
5.00	0.250	99.0	1.0	6
65.00	0.250	60.0	40.0	6
68.00	0.250	30.0	70.0	6
70.00	0.250	30.0	70.0	6
71.00	0.250	99.0	1.0	6
85.00	0.250	99.0	1.0	6

MS 条件

MS システム:	ACQUITY RDa
イオン化モード:	フラグメンテーションによるフルスキャン
取り込み範囲:	低 (m/z 50 ~ 2000)
キャピラリー電圧:	1.20 kV
コーン電圧:	20 V
フラグメンテーションコーン電圧:	60 V~120 V
極性:	ポジティブ
スキャンレート:	2 Hz
脱溶媒温度:	350 °C

データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア:	UNIFI™ v 3.0.0.15、Empower™ 3 (UV 分析専用)
MS ソフトウェア:	UNIFI v 3.0.0.15
インフォマティクス:	UNIFI v 3.0.0.15

MassPREP ペプチド混合液（製品番号：186002337）	
ペプチド	配列
P1	RGDSPASSKP
P2	DRVYIHP
P3	RPPGFSPFR
P4	DRVYIHPF
P5	DRVYIHPFHL
P6	DRVYIHPFHLLVYS
P7	WLTGPQLADLYHSLMK
P8	YPIVSIEDPFAEDDWEAWSHFFK
P9	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ

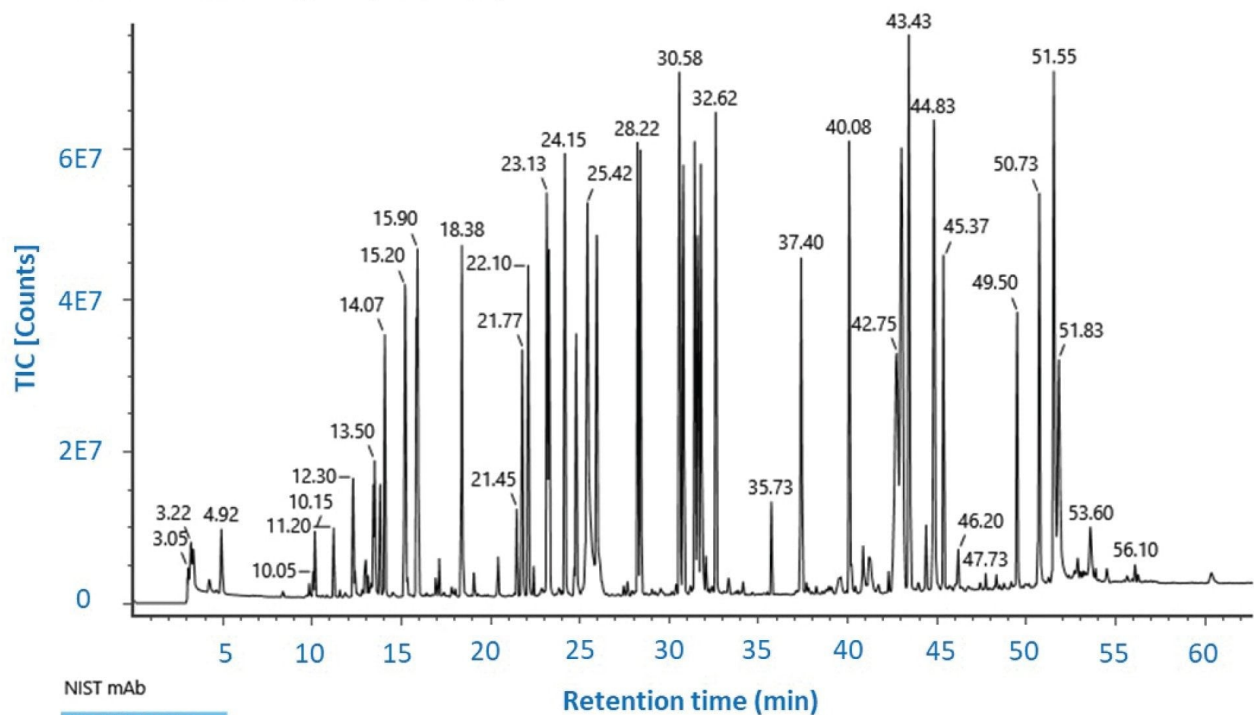
MassPREP ペプチド混合液中の 9 種類のペプチドのペプチド配列

結果および考察

現在の試験の目的は、迅速で頑健な LC-UV-MS ペプチドマッピングワークフローで使用する RapiZyme トリプシンおよび IonHance DFA のメリットを実証することです。対象のバイオ医薬品タンパク質の例として NIST mAb を使用して、RapiZyme トリプシンの有効性を、酵素-タンパク質比 1:5、消化時間 1 時間で評価しました。結果として得られたペプチドは、移動相添加剤として IonHance DFA を使用して、液体クロマトグラフィーで LC-UV-MS 分析しました。

この分析により、重鎖と軽鎖の両方の 100% アミノ酸シーケンスカバー率が明らかになりました（図 1）。同様のことがギ酸移動相で予測され、DFA 修飾移動相によってイオンペアリング付加イオンが生成されることはなく（図 2）、配列情報が含まれているプロダクトイオンの取り込みを含み、質量スペクトルデータの全体的品質での逆効果も見られませんでした。さらに、UV クロマトグラムでは、最小限のベースラインドリフトによる UV シグナルの強化が示されました。プロトコルの再現性は、個別に独立して調製されたタンパク質消化物の一貫した UV および BPI クロマトグラムによって、実証されました（図 3～4）。

Item name: Control 3 All Fresh reagents NISTmAb
Channel name: 1: TOF MS^e (50-2000) 20V ESI+ (TIC)



NIST mAb

Identified: 100%

1: 1 to 70	DIQMTQSPST	LSASVGDRV	ITCSASSRVG	YMHWYQQKPG	KAPKLLIYDT	SKLASGVPSR	FSGSGSGTEF
1: 71 to 140	TLTISSLQPD	DFATYYCFQG	SGYPFTFGGG	TKVEIKRTVA	APSVFIFPPS	DEQLKSGTAS	VVCLLNMFYP
1: 141 to 210	REAKVQWKVD	NALQSGNSQE	SVTEQDSKDS	TYSLSSLTTL	SKADYEKHKV	YACEVTHQGL	SSPVTKSFNR
1: 211 to 213	GEC						
2: 1 to 70	QVTLRESGPA	LVKPTQTLTL	TCTFSGFSLS	TAGMSVGWIR	QPPGKALEWL	ADIWDDKKH	YNPSLKDRLT
2: 71 to 140	ISKDTSKNQV	VLKVTNMDPA	DTATYYCARD	MIFNFYFDVW	GQGTTVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG
2: 141 to 210	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS
2: 211 to 280	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNN
2: 281 to 350	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
2: 351 to 420	VYTLPPSREE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
2: 421 to 450	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK				

図 1. トータルイオンクロマトグラム (TIC) の代表的なクロマトグラムと、観察された NISTmAb 配列のシーケンスカバー率。約 5 µg のタンパク質消化物を、分析法に記載されているように、BioAccord LC-MS システムを使用して LC-UV-MS 分析で分析しました。MS^e データを UNIFI ベースのペプチドマッピングデータ分析メソッドで分析して、トリプシンペプチドの信頼性の高いアミノ酸配列を同定し、シーケンスカバー率を計算しました。

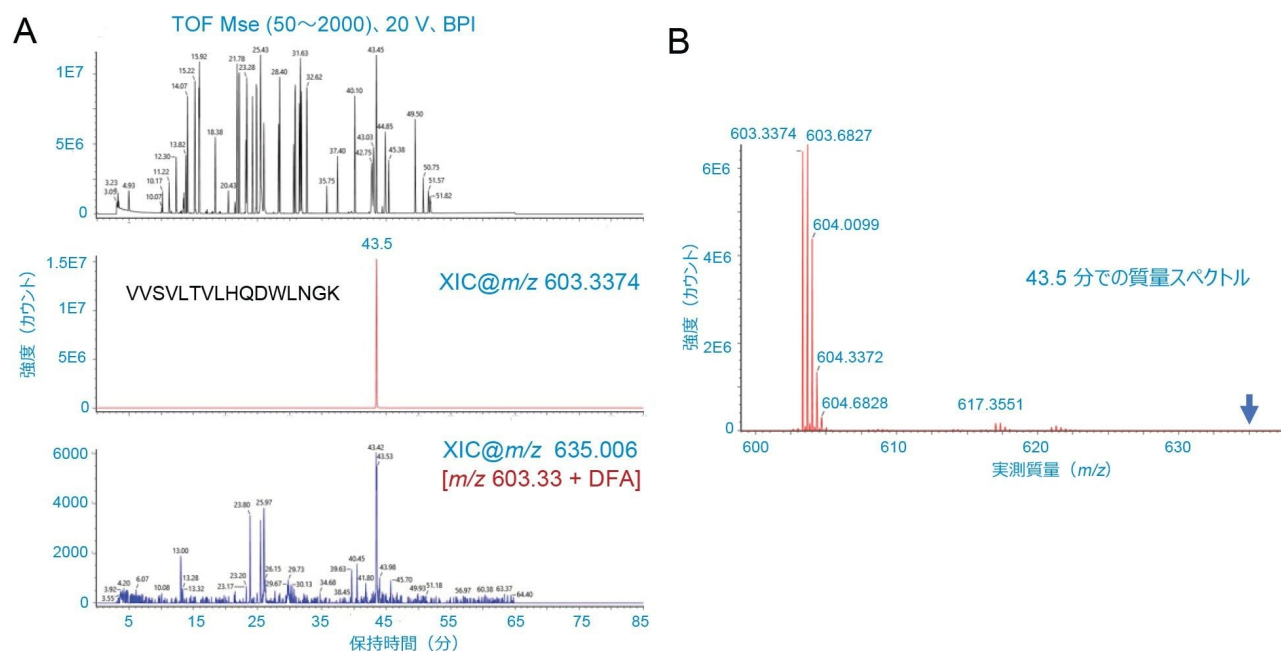


図 2.DFA 付加イオンの LC-MS スペクトルの分析

(A) 上のパネルに、*RapiZyme Trysin* で消化した *NISTmAb* タンパク質のベースピークイオンクロマトグラム (*BPI*) が示されています。43.5 分のペプチドピークが、*BPI* およびペプチド *VVSVLTVLHQDWLNGK* に対応する *m/z* 603.3374 (中央のパネル) の抽出イオンクロマトグラム (XIC) の両方に見られる、最も高いイオン存在量を示しました。付加イオンが形成される場合、これはこの最も豊富なペプチドシグナルにより、容易に気付かれるはずです。ただし、*DFA* 付加イオン (プロトン交換後 +95 Da) に対応する *m/z* 635.006 (下のパネル) の XIC では、シグナルがベースラインレベルであるため、明確なピークは得られませんでした (下のパネルの強度を参照)。

(B) 43 ~ 43.5 分に対応する質量スペクトルでは、付加イオンに対応するイオンの存在は示されませんでした (矢印を参照)。

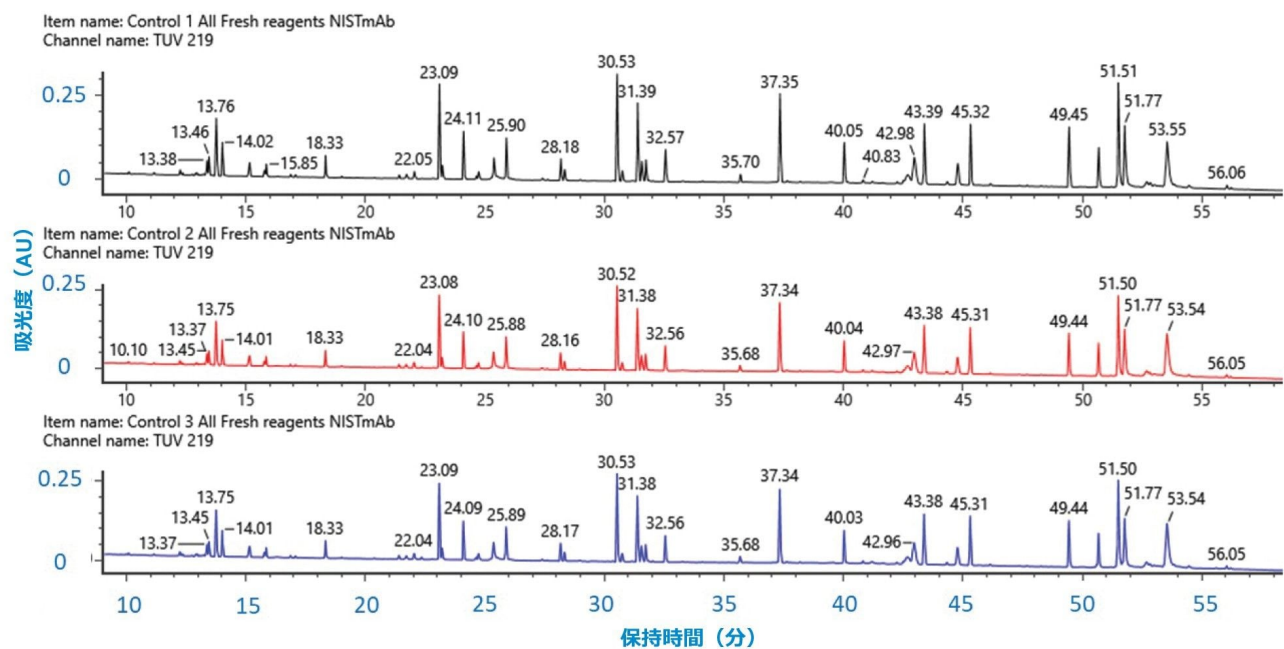


図 3. NISTmAb の消化物を 3 回繰り返して個別に独立して前処理して得られた、UV クロマトグラムの再現性。219 nm での UV シグナルは 3 つの消化物すべてで一定しており、再現性が高いことが示されました。

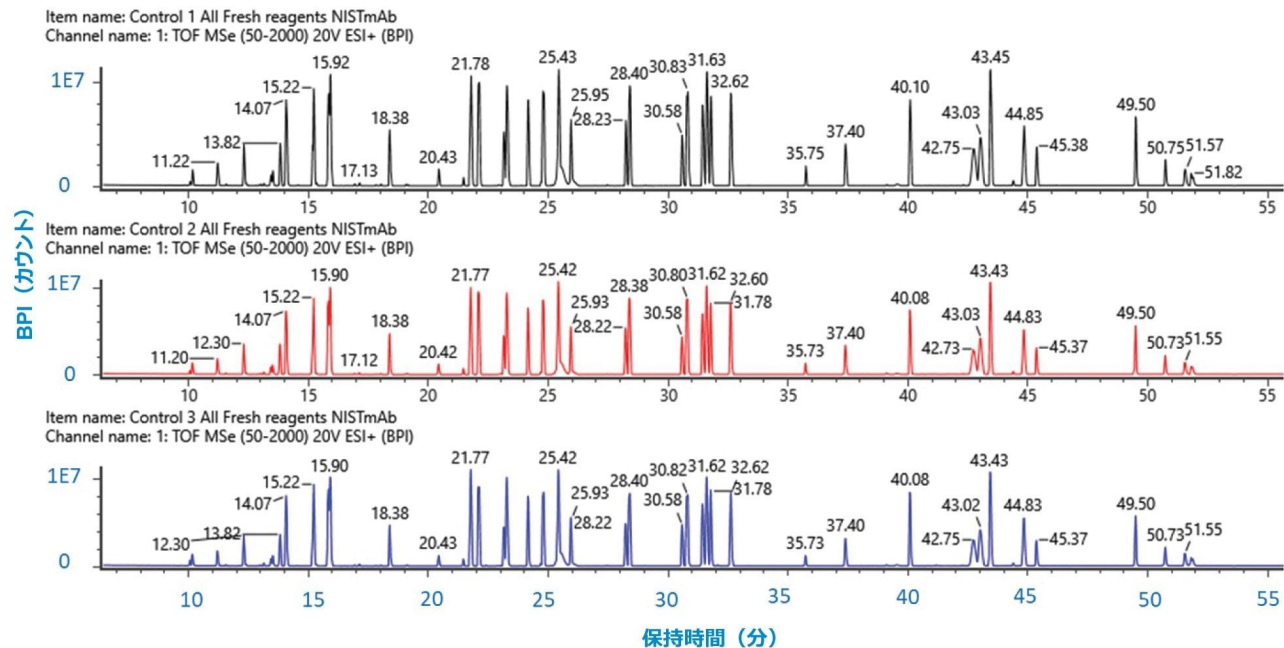


図 4. NISTmAb の消化物を 3 回繰り返して個別に独立して前処理して得られた、BPI クロマトグラムの再現性。219 nm での UV シグナルは 3 つの消化物すべてで一定しており、再現性が高いことが示されました。

このプロトコルの第一の利点は 3 時間未満の迅速なサンプル前処理プロセスです。これは部分的には、高い酵素-タンパク質比を用いる消化を容易にする、RapiZyme トリプシンの能力によるものです。第二の利点は、クロマトグラムで高い UV シグナル強度が示されたことです。これは、DFA とギ酸の屈折率特性の差異、および DFA イオンペアリングによって得られるピーク形状の向上に起因すると言えます。第三の利点は、付加イオンのないマススペクトルを可能にする IonHance DFA の役割です。最後に、独立したサンプル前処理の間の UV および BPI クロマトグラムを比較することにより、ペプチドマッピングの優れた再現性が実証されました。

素早いペプチドマッピングワークフローが必要な理由

迅速なペプチドマッピングワークフローにより、タンパク質医薬品の研究、開発、発売に取り組んでいるラボや企業は、タイムリーに結果を取得できます。消化およびサンプル前処理にかかる時間が長くなると、サンプルにアーティファクトが形成されることや、分析の品質が悪影響を受けるか、受ける可能性があります。迅速なペプチドマッピングワークフローにより、大規模試験でのハイスループット分析の自動化も可能になり、QC 分析が迅速になり、エラーが低減します。結果までの時間の短縮は迅速な意思決定を意味し、アーティファクトの減少は、プロジェクト作業の最初のパスで正しい結果を報告するのに役立ちます。

UV を強化するために IonHance DFA を使用する理由

MS レスポンスの感度が高く、付加イオンのない質量スペクトルが得られるため、ほとんどの LC-MS ベースのペプチドマッピング分析で、トリフルオロ酢酸 (TFA) よりもギ酸が通常好まれます。ただし、一部のペプチドは、ギ酸ベースの移動相では簡単には検出できません (図 5 の例)。これは、この移動相にはクロマトグラフィー保持を向上する TFA のイオンペアリング特性がないためです¹。これは、MassPREP ペプチド混合液 (製品番号: [186002337 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002337-massprep-peptide-mixture.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002337-massprep-peptide-mixture.html)) に UV ベースの検出を行う場合の動作から明らかでした。これらの条件下で試験したあらゆる波長 (210 ~ 225 nm) で、ペプチド 1 は検出できませんでした。このペプチドが部分的にまたは完全にボイドボリュームに押し込まれてシグナルの喪失につながったかは、明らかではありません。

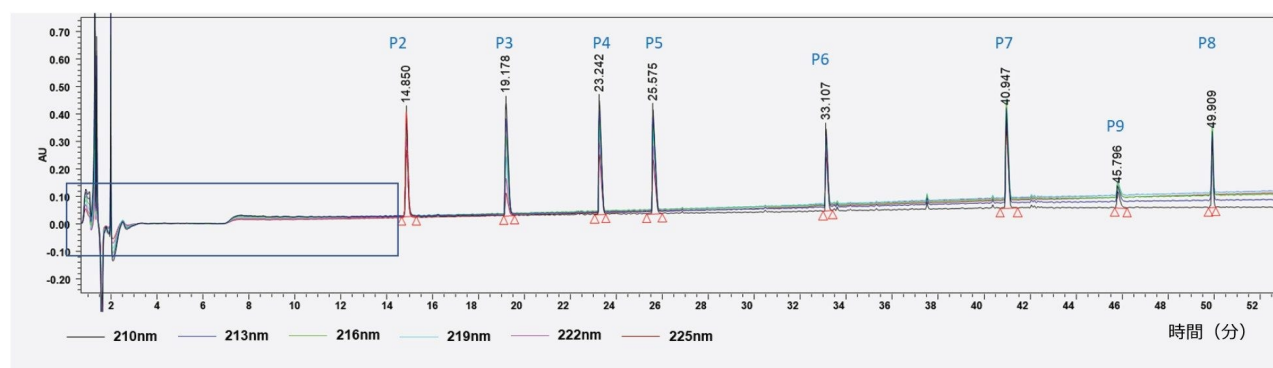


図 5. ギ酸ベースの移動相を使用した、MassPREP ペプチド混合液 (P1 ~ P9) からのペプチドの LC-UV ベースの検出。P1 の存在をこのプロファイルから、明確に解読することはできません (クロマトグラムの四角形の領域を参照)。P8 と比較した場合の P9 の溶出パターンの変化に注意してください。

一方、IonHance DFA はイオンペアリング特性 (TFA に近い) を示します。このため、ペプチドとは無関係な方法で、より優れた保持と UV 感度が予想されます。当社ではこの見識に基づいて、可能な最高品質の UV クロマトグラムを達成しようとしてきました。IonHance DFA を使用する場合にペプチド測定に最適な UV 波長を特定するため、MassPREP ペプチド混合液を、210 ~ 225 nm の検出波長で LC-UV 分析で分析しました。MassPrep ペプチド混合液で予想される 9 種類のペプチドは、UV ベースラインが波長依存性のドリフトを示したにもかかわらず、すべての状況で検出できました (図 6)。最大シグナルは 210 nm で観察されましたが、ベースラインが下にドリフトしており、定量に干渉する可能性があります。一方、219 nm でのベースラインは比較的安定しており、この波長ではペプチドシグナルの重大な喪失はありませんでした (図 7)。移動相 B 中の DFA の濃度をわずかに下げると、再現性のある向上したベースライン動作が得られました。重要な点として、ペプチド 1 などの予想されるすべてのペプチドが明確に検出されました。これにより、219 nm を、同じ高さのベースラインおよびペプチドに依存しない UV シグナルの取り込みを実現するための、理想的な波長として特定しました。

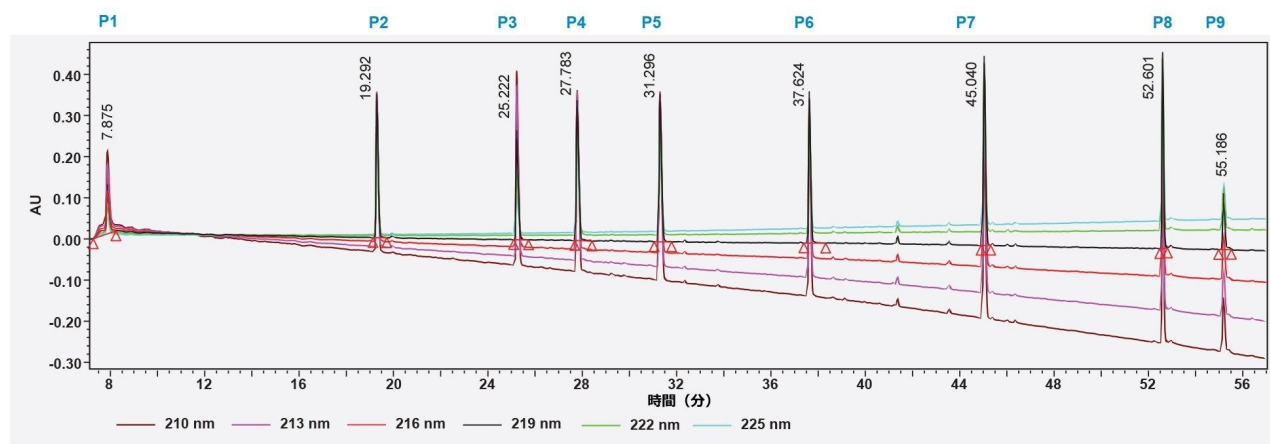


図 6. *IonHance DFA* ベースの移動相を使用した、*MassPREP* ペプチド混合液 (*P1* ~ *P9*) からのペプチドの *LC-UV* ベースの検出。このプロファイルから、*P1* の存在を簡単に明確に解釈できます。ギ酸ベースの移動相と比較して、*P9* の溶出順序が変わることおよびシグナルが向上することに注意してください。

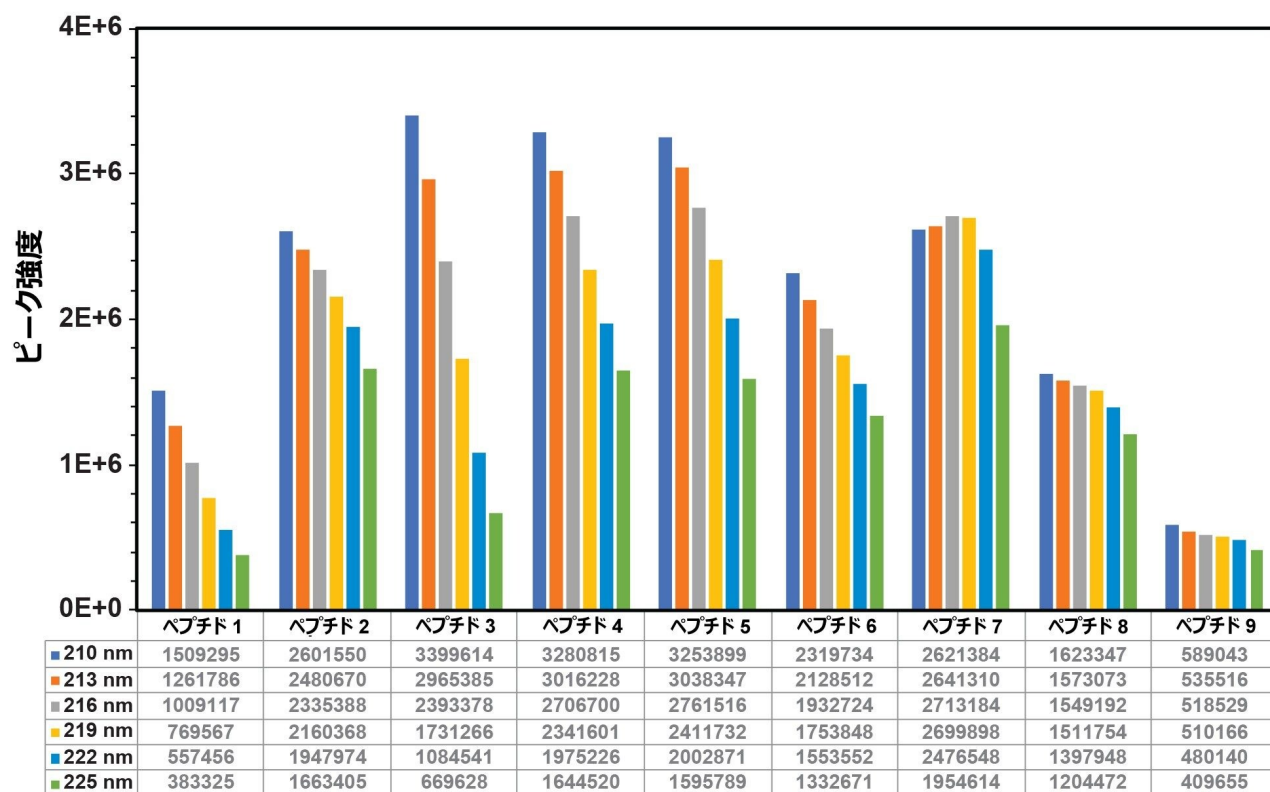


図 7. UV 波長 210 ~ 225 nm で、IonHance DFA ベースの移動相を使用して検出したすべてのペプチドのピーク面積の比較

強力で信頼できる紫外 (UV) シグナルは、ペプチドマッピングでいくつかの利点を提供できます。

- 感度の向上: 配列に依存しない UV ベースの認識により、低存在量のペプチドを効率的に検出できます²。
- 正確さの向上: クロマトグラムで、明確で十分に定義されたピークが提供されます³。
- 分離度の改善: クロマトグラムでの共溶出が減少し、複雑なペプチド混合物の分析が向上します²。
- 再現性の改善: より一貫した信頼性の高い結果が得られます³。

また、ユーザーが LC-MS 手法をまだ使用していない可能性のある QC 環境で、高品質の UV クロマトグラムにより、分析者は MS データ取り込みを繰り返すことなく、必要なペプチドマッピング情報を取り込むことができます。これは、分析レベルでの最初の LC-UV-MS 分析が、LC プロファイルのペプチドピークに注釈を付けるのに役立ち、中間のデータの喪失や曖昧さなしに、QC に簡単に転送できるためです。

結論

ペプチドマッピングのワークフローは通常、複雑で時間がかかります。このため、バイオ医薬品業界の場合のように、信頼性の高い QC 分析およびモニタリングを容易にすることができる、簡単に再現性があり、堅牢なワークフローが必要です。サンプルの前処理はこれらのワークフローで非常に重要なステップであり、通常は時間がかかります。ただし、このアプリケーションノートで示されているように、RapiZyme Trypsin により、ユーザーはサンプル前処理時間を短縮できます。さらに、IonHance DFA を移動相添加剤として使用することにより、高品質で再現性のあるデータ取り込みによる、頑健な LC-UV-MS ペプチドマッピングを経験できます。この種類のメソッドには、プラットフォームメソッドになり、高度に規制された環境でタンパク質医薬品のタイムリーな評価が可能になる見込みがあります。

参考文献

1. J. M. Nguyen, J. Smith, S. Rzewuski, C. Legido-Quigley, and M. A. Lauber, ‘High Sensitivity LC-MS Profiling of Antibody-Drug Conjugates With Difluoroacetic Acid Ion Pairing’ , *MAbs*, vol.11, no.8, pp.1358–1366, Nov. 2019, doi: 10.1080/19420862.2019.1658492/SUPPL_FILE/KMAB_A_1658492_SM8763.DOCX.
2. M. L. Gross, G. Chen, and B. N. Pramanik, ‘Protein and Peptide Mass Spectrometry in Drug Discovery’ , p. 464, 2012.
3. T. Mouchahoir and J. E. Schiel, ‘Development of an LC-MS/MS Peptide Mapping Protocol for the NISTmAb’ , *Anal Bioanal Chem*, vol.410, no.8, pp.2111–2126, Mar. 2018, doi: 10.1007/S00216-018-0848-6/FIGURES/9.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <<https://www.waters.com/514228>>

ACQUITY UPLC PDA 検出器 <<https://www.waters.com/514225>>

ACQUITY RDa 検出器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>>

UNIFI 科学情報システム <<https://www.waters.com/134801648>>

Empower クロマトグラフィーデータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシーポリシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [法的通知およびプライバシー通知](#) [Cookies](#)
[Cookie 環境設定](#)