

(博士論文要約)

網羅性と選択性を指向した LC-MS 手法の開発：  
**predicted multiple selected reaction monitoring**  
**(pSRM)** によるタンパク質解析への応用研究

東北大学 大学院薬学研究科  
生命薬科学専攻  
臨床分析化学分野

**B2YD1011 大崎史雄**

**網羅性と選択性を指向した LC-MS 手法の開発：  
predicted multiple selected reaction monitoring (pSRM) によるタンパク質解析への応用研究  
臨床分析化学分野 大崎史雄**

**【結論】**

質量分析を用いたタンパク質解析は、「網羅的」にタンパク質を分析する定性プロテオミクスと「選択的」に標的タンパク質を分析する定量プロテオミクスの2つに大別される。網羅性と選択性は分析上相反するものであり、それらの両立は一般に困難である。そこで私は、対象タンパク質を限定し、この点を解決する手法を開発した。即ち、対象タンパク質のアミノ酸配列情報とプロテアーゼの基質特異性などにより得られるペプチドを予測し、それら全ての MS/MS 条件を設定する predicted multiple selected reaction monitoring (pSRM) である。本研究では、pSRM 法の有用性検証を目的に、(I) 反応性代謝物によるタンパク質修飾部位の解析、さらに応用例として、(II) 抗体医薬品の定量法構築の迅速化を検討した。

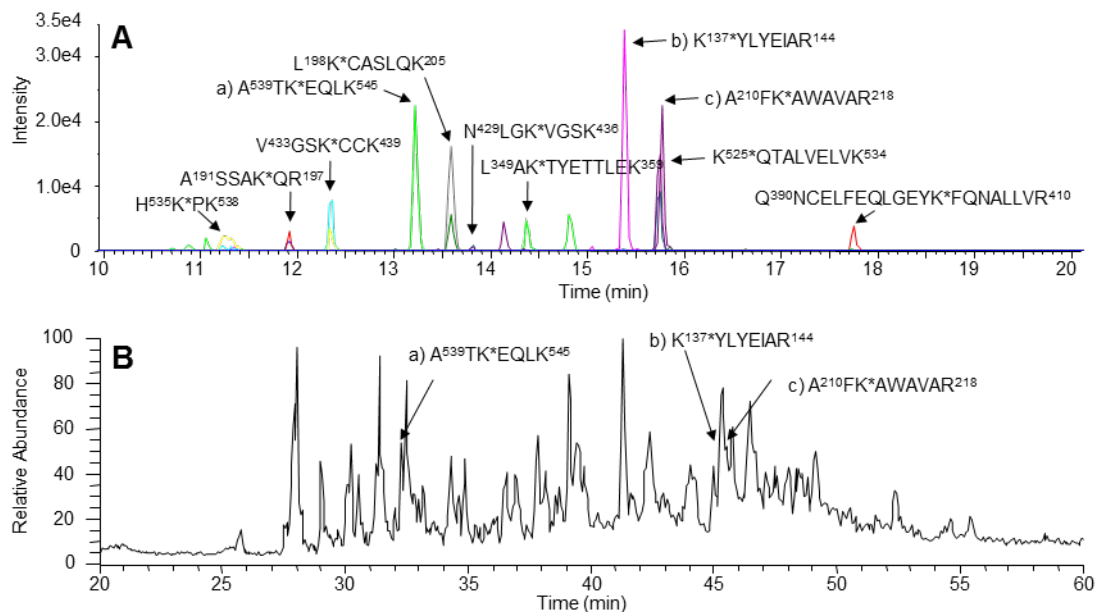
**【(I) 活性化薬物修飾ヒト血清アルブミン (HSA) の解析法の構築<sup>[1]</sup>】**

**背景・目的：**エポキシドやキノンなどの求電子性化合物に代謝される医薬品は、タンパク質など生体高分子との共有結合を介した副作用リスクを有する。医薬品候補のリスク評価に汎用されるグルタチオンなどを用いたトラッピング法は、簡便な系であるが、反応性代謝物を与えるか否かの情報を与えるに過ぎず、毒性を示唆する物ではない。それ故、別途タンパク質との結合様式や部位を同定し、活性変化や毒性への影響を精査する必要がある。そこで、血清中最も豊富なタンパク質である HSA (アミノ酸 585、66.5 kDa、半減期 19 日、血中タンパク質の 60%) をモデルタンパク質とした活性化薬物修飾解析を試み、pSRM 法の有用性を検証した。

**実験デザイン：**想定し得るトリプシン消化後の全ての薬物修飾ペプチドに対して pSRM を行った。①スクリーニングを目的とした pSRM 条件は： $Q1$  = 求核性アミノ酸残基 (Lys、Cys、および His) を含むペプチドのモノアイソトピック質量 +  $\Delta$  (別途トラッピング法などより求めた薬物修飾による質量変化値) から予想される 2~4 価イオン、 $Q3$  = 各ペプチドの  $b_2$  および  $y_2$  イオンとした。②同定を目的とした pSRM

条件は: Q1=スクリーニングで検出した値、Q3=各修飾ペプチド候補の全ての b および y 系列イオンと、修飾を想定した b+ $\Delta$  および y+ $\Delta$  イオン系列とした。試料は、HSA と反応性代謝物をインキュベーション後 (モル比 1:10、37 °C、24 h)、常法により還元アルキル化、トリプシン消化した物を用いた。

**結果と考察:** モデル反応性代謝物の ketoprofen-*N*-hydroxysuccinimidyl ester (ketoprofen-glucuronide の等価体) および *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (acetaminophen の酸化体) との反応では、それぞれ 11 か所 (Lys<sup>137</sup>, 195, 199, 212, 351, 402, 432, 436, 525, 536, and 541) と 1 か所 (Cys<sup>34</sup>) の修飾部位を検出し (Fig. 1A)、同定できた。本手法では、煩雑な SRM の設定と 2 度の分析を必要とするが、従来法 (フルスキャンとデータディペンデント MS/MS の組合せ) による修飾解析 (Fig. 1B) で問題となる、大量の非修飾体の影響を排除し、選択的な検出ができたことから、偽陽性の排除を含め、データマイニングが容易であった。pSRM 法では対象タンパク質を絞ることで微小なピークも逃さず検出可能で、網羅性と選択性の両立が可能であった。



**Figure 1. Analyses of ketoprofen-modified HSA after tryptic digestion.** (A) Proposed strategy (1<sup>st</sup> pSRM for screening, Lys channel). (B) Common ion trap MS strategy (for comparison, TICC) using slower gradient. Arrows in (B) indicate the retention times of three major modified peptides found in (A). (a) A<sup>539</sup>TK\*EQLK<sup>545</sup>; (b) K<sup>137</sup>\*YLYEIAR<sup>144</sup>; (c) A<sup>210</sup>FK\*AWAVAR<sup>218</sup>. An asterisk indicates a site of modification.

## 【(II) 3ステップの条件最適化と類縁抗体を内標準物質に用いた抗体定量法構築の迅速化<sup>[2]</sup>】

**背景・目的:** 抗体など高分子医薬品の体内動態の把握には、定量法の構築が必要である。従来汎用されてきたリガンド結合法による定量では、構築に時間とコストがかかる。一方、これに代わる方法として、酵素消化後の分析対象ペプチド（サロゲートペプチド）の LC-MS 法による検出も試みられているものの、ペプチドの選定、安定同位元素標識した内標準物質の調製などの問題を抱えている。そこで、迅速かつ安価に定量法を構築することを目標に、(I) で有用性が示された pSRM 法を応用し、「3ステップの条件最適化」および「内標準物質としての類縁抗体の利用」を試みた。

**実験デザイン:** トリプシン消化で得られる可変領域のペプチドから、①サロゲートペプチドの選定、②定量用プロダクトイオンの選定、③パラメーター最適化を、3回の予備的 SRM で行った。ちなみに分析法構築の迅速化のため、試料には、標品を初めから血漿にスパイクした物を用いた。また、ハイスループット化を考慮し高流速で使える LC カラム（core-shell 型 C18）を採用し、グラジエントおよび前処理（Pellet digestion 法）は、一般的かつ汎用性の高い条件に固定し、さらなる検討は行わなかった。内標準物質には、サロゲートペプチドのアミノ酸配列と高い相同性（50%以上）を有するペプチドを与える抗体を選定した。

**結果と考察:** 市販の 4 抗体（Infliximab、Ofatumumab、Alemtuzumab、および Bevacizumab）を検討した。その結果、一台の定量用三連四重極 MS で、サロゲートペプチドの選定と MS/MS 条件の最適化が 3 回の注入のみで可能であり、1 日で分析法を構築できた。本法で構築した定量法は、相同性の高い内標準の組合せを用いる場合、定量精度・正確度・検量線の相関係数ともに満足であった（%CV<20%, %RE<±20%, n=6;  $r^2>0.99$ , n=1）（Table 1）。ちなみに、Bevacizumab の測定に、相同性の低い（0%）Ofatumumab 由来のペプチドを内標準物質に使用した場合、定量精度・正確度の低下が見られた（%CV, 2.5~13.3%; %RE, 14.2~33.4%）。本アプローチでは、ペプチド標品や内標準物質の安定同位元素標識を伴わないことから、定量法構築を迅速化できた。さらに類縁抗体を内標準物質とするため、従来問題であった回収率・吸着・酵素消化効率の影響など全工程のばらつきをも補正可能と考える。

**Table 1. Summary of calibration curve, accuracy, and precision.**

Calibration curves were prepared as follows: Infliximab and Bevacizumab, 1–500 µg/mL; Alemtuzumab, 5–500 µg/mL. \*Homology was calculated by the number of amino acids on the surrogate peptides (SP) of antibodies (mAb) between analyte and internal standard. \*\*NT indicates “not tested”. \*\*\*S<sup>92</sup>NWPITFGQGTR<sup>103</sup> (homology, 0%) was used as an inappropriate internal standard for comparison.

Analyte	mAb	Infliximab	Alemtuzumab	Bevacizumab	Bevacizumab
	SP	G <sup>44</sup> LEWVAEIR <sup>52</sup>	L <sup>46</sup> LIYNTNNLQTGVPSR <sup>61</sup>	V <sup>46</sup> LIYFTSSLHSGVPSR <sup>61</sup>	V <sup>46</sup> LIYFTSSLHSGVPSR <sup>61</sup>
Internal standard	mAb	Alemtuzumab	Bevacizumab	Alemtuzumab	Ofatumumab
	SP	G <sup>44</sup> LEWIGFIR <sup>52</sup>	V <sup>46</sup> LIYFTSSLHSGVPSR <sup>61</sup>	L <sup>46</sup> LIYNTNNLQTGVPSR <sup>61</sup>	***S <sup>92</sup> NWPITFGQGTR <sup>103</sup>
*Homology		67%	63%	63%	0%
Standard		%RE	r <sup>2</sup>	%RE	r <sup>2</sup>
(n=1)		-16.9–19.4	0.994	-13.4–17.5	0.993
		%RE	%CV	%RE	%CV
QC		1.9	7.9	**NT	NT
(n=6)		2.0	7.2	3.7	10.0
		-1.6	9.0	3.1	9.2
				16.9	5.2
					33.4
					12.0

## 【結論】

質量分析を用いたタンパク質解析方法として pSRM 法を開発した。(I) で実施した、pSRM による HSA 上の薬物修飾スクリーニングは、従来法より、データマイニングが簡便で、感度・選択性の高い分析法であり、予期せぬ副作用の原因となる微小な変化をとらえられる可能性がある。また、SRM をベースにしていることから、検出された修飾ペプチドに関して定量条件を容易に設定でき、酵素消化した血清試料中薬物修飾ペプチドの毒性バイオマーカーとしての利用も可能になる。さらに本手法は mechanism based inhibition を考察のためにチトクローム P450 に適用するなど他のタンパク質への幅広い応用も期待できる。

(II) で検討した、pSRM に基づく「3ステップの条件最適化」および「内標準物質としての類縁抗体の利用」は、抗体医薬品の定量法構築にかかる時間の大幅な短縮を可能にした。本手法は、カセット投与を含め創薬初期段階で実施される候補抗体の体内動態評価に応用できる。また、リガンド結合法と相補的に用いることで、血漿中非結合型分率などの考察が可能になる。

以上の結果から、pSRM 法というタンパク質分析の新たなアプローチを提案できた。本手法は、特に、簡便さと迅速さが求められる創薬初期段階でのタンパク質の定性・定量分析への利用が期待できる。

## 【文献】

- [1] Osaki, Goto, Lee, Oe: *Anal. Biochem.*, **449**, 59 (2014).
- [2] Osaki, Tabata, Miyashita, Oe: in preparation.