

P-3 二次元電気泳動を用いた抗体医薬の分離手法の開発

○木下英樹、矢部公彦、筒井 藍、松永貴輝、鶴沼 豊

シャープ株式会社 新規事業推進本部 健康医療事業推進センター

【背景】抗体の特異的結合性を利用した抗体医薬は副作用の少ない効果的な治療薬として注目されているが、より詳細な抗体医薬の不均一性の評価技術の開発が望まれていた。二次元電気泳動法はタンパク質の電荷と分子量の差を同時に分離できるために抗体医薬の不均一性をより詳細に分離できると予想された。しかしながら、抗体医薬は 2 本の H 鎖と 2 本の L 鎖とがジスルフィド結合により共有結合しており、非還元条件下では高分子量（≒160kDa）で塩基性の等電点を有しているために、抗体医薬を高分解能で分離できる等電点ゲルの開発が望まれていた。

【方法】等電点ゲルは、低比重溶液として所定濃度のアクリルアミド溶液を含む酸性アクリルアミドバッファ混合液と高比重溶液として同濃度のアクリルアミド溶液を含む塩基性アクリルアミドバッファ混合液を所望の p H 勾配を有するようにグラジエントミキサを用いて混合しながらゲル作製器具に充填して作製した。また、二次元電気泳動は Auto2D 装置（シャープマニファクチャリングシステム（株））を用いて評価した。二

次元電気泳動条件は、還元剤を添加しない非還元条件および非変性条件にて行った。

【結果および考察】高分子量タンパク質の吸収を向上させるためにアクリルアミド濃度と架橋度の検討を行った結果、T=3.6%,C=2.7%のときに高分子量タンパク質のスポット強度が向上した。抗体医薬の高次構造が等電点電気泳動によって変化するか確認をするために、等電点電気泳動のみ Dithiothreitol を添加しない条件下（非還元）で 2 次元電気泳動を行なったところ、H 鎖と L 鎖の等電点の位置がほぼ同じ位置に検出されたため、非還元条件下での等電点電気泳動では抗体医薬目的成分の構造が保たれていると推察された。次に、等電点電気泳動および SDS-PAGE とともに非還元条件下で Auto2D を用いて抗体医薬の 2 次元電気泳動分離を行なったところ、高い解像度でタンパク質を分離することができた。

さらに、非変性条件で等電点電気泳動を行うために、変性剤を含まない等電点電気泳動用緩衝液に非界面活性剤型スルホベタインを添加して二次元電気泳動を行った結果、同様の高い解像度を得ることができた。

P-4 蛍光標識内部標準を用いた補正による Pro-Q Diamond 染色リン酸化タンパク質 二次元電気泳動スポットの比較定量解析手法の開発

◎井野洋子¹⁾、木之下節夫²⁾、平野 久¹⁾、戸田年総¹⁾

1) 横浜市立大学 先端医科学研究センター、2) プロメディコ株式会社

【背景と目的】Pro-Q Diamond 染色によるリン酸化タンパク質の解析では、検出後に Sypro Ruby で二重染色する方法が一般的に行われている。しかし蛍光波長の重複が大きいため、Sypro Ruby 染色後のゲルで、リン酸化タンパク質と全タンパク質を検出し分けることはできない。本研究では、1 枚のゲル上でリン酸化タンパク質と全タンパク質を検出し分けるためにあらかじめ蛍光標識したサンプルを泳動し、Pro-Q Diamond 染色後にそれぞれの波長で検出する手法の開発を目指した。また、共通の内部標準を用いることで、サンプル間でのリン酸化タンパク質比較定量解析をさらに高精度化することを目指した。【方法】①サンプル標識用蛍光試薬の検討:Pro-Q Diamond とは波長の異なる Cy2 と Cy5 で標識したタンパク質を電気泳動後 Pro-Q Diamond 染色し、各波長で検出し分けることができるか検討した。②共通内部標準の有効性評価:内部標準を用いたスポットマッチングに優れたプロメディコ社の画像解析ソフトを使用。全タンパク質量とスポット位置の補正用内部標準(内部標準 1)として細胞抽出タンパク質の混合

物を、リン酸化タンパク質定量補正用内部標準（内部標準 2）として α -casein を用いて実際に解析が可能であるか検討した。【結果】①Cy2 の蛍光波長は Pro-Q Diamond 染色の蛍光波長とは重複しないが励起波長との重複が大きく、染色後の検出はできないことが確認されたため、サンプルは Cy5 で標識することとした。②解析は 2 つの電気泳動操作の結果を統合することで行った。操作 1 で得られた全タンパク質量と位置の補正情報は操作 2 に反映。操作 2 では Pro-Q Diamond により検出されたリン酸化タンパク質量を α -casein のスポット強度により補正した。

標識	泳動操作 1	泳動操作 2
Cy3	内部標準 1	(Pro-Q Diamond)
Cy5	サンプル	サンプル
Cy2		内部標準 2

この解析手法により、異なるサンプル間で同じ内部標準による補正を行うことが可能となり、ミニゲル上で約 2000 スポットの比較解析を行うことができた。さらに、この手法により前立腺癌細胞の解析を行い、その結果をショットガン解析による結果と比較したので報告する。