

生物薬品の特性・品質解析，品質評価法の検討

分担研究者： 川崎ナナ （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第1室長）
協力研究者： 橋井則貴 （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

要 旨

これまで我々は、液体クロマトグラフィー／エレクトロスプレーイオン化-質量分析法（LC/ESI-MS）を用いた糖鎖プロファイリング法を開発し、様々な糖タンパク質性医薬品の構造解析や、国際的重要課題となっているバイオ医薬品の同等性／同質性評価に応用することを検討してきた。本年度は、糖鎖プロファイリングを糖鎖試験法として利用することを目的として、安定同位体標識糖鎖を内部標準物質として用いることによって、分析の再現性及び定量的を向上させることを検討した。その結果、2-アミノピリジンで標識された被検体糖タンパク質由来単糖または糖鎖に、内部標準物質として6重水素置換2-アミノピリジンで標識された標準単糖または標準糖鎖を添加し、LC/MSで分析することによって、再現性よく、且つ定量的に単糖及び糖鎖を解析できることを確認した。

A. 研究目的

近年、従来型の組換えタンパク質性医薬品に加え抗体医薬品、融合タンパク質、糖鎖改変タンパク質等、新しい分子設計に基づくバイオ医薬品が続々と開発されている。それらバイオ医薬品の多くは糖鎖含有タンパク質である。エリスロポエチン、組織プラスミノゲンアクチベータや抗体医薬品に関する研究に代表されるように、糖タンパク質の糖鎖部分は活性等において重要な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし、糖鎖の付加を人為的に制御することは依然として困難であり、糖鎖含有タンパク質性医薬品の特性・品質解析、及び品質評価において、最終産物の糖鎖構造を解析することは重要である。また、糖鎖付加は製造方法の変更の影響を大きく受けることから、昨今の国際的重要課題の一つである製造方法変更時における同等性／同質性評価において、糖タンパク質の同等性／同質性評価

がとりわけ大きな問題となっている。このような背景のもと、糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の構造を簡便・迅速に解析する技術の開発が国際的に望まれている。

我々はこれまで、グラファイトカーボンカラムを用いたLCによって糖鎖を分離し、オンラインESIMSを用いて構造を解析する糖鎖プロファイリング法を開発し、糖鎖含有タンパク質性医薬品の特性解析、及び同等性／同質性評価に応用することを検討してきた。平成13年度は、起源の異なる3種類のEPOを類似糖タンパク質のモデルとして用い、糖鎖プロファイリング法が3種のEPO間の糖鎖の構造と不均一性の差異を識別できることを確認し、糖タンパク質性医薬品の同等性／同質性評価として有用性であることを示した。平成14年度は、糖鎖プロファイリング法の有用性の拡大をめざして、キャピラリーLC/MSによる微量化と分析時間の短縮を検討し、

遺伝子組換え型甲状腺刺激ホルモン(rTSH), 及びヒト脳下垂体由来甲状腺刺激ホルモン(pTSH)の糖鎖解析を行った。

本研究事業において本年度は, 糖鎖プロファイリングを糖タンパク質性医薬品の糖鎖試験法として利用することを検討した。糖鎖試験法としては, 単糖分析や各種 HPLC を用いた糖鎖プロファイリングが用いられているが, 情報量が限られていること, また, 規格値が設定しにくいこと等の問題が残されている。我々は, LC/MS を試験法として利用するためには, 再現性と定量性の向上が重要課題であると考え, 安定同位体標識化合物を用いた内部標準法の導入を検討した。糖鎖標識法としては, 現在国内で最も利用されているピリジルアミノ化(PA)を採用し, この重水素置換体を内部標準物質として用いることによって, LC/MS の特性を生かし, 且つ再現性及び定量性に優れた単糖組成分析, 及び糖鎖プロファイリング法の開発を目指した。

B. 研究方法

1) 試料

PA 単糖はタカラ社より購入した。標準単糖は生化学工業製を用いた。尿由来ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(uhCG)及び遺伝子組換え型ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(rhCG)はシグマ社より購入した。N-グリコシダーゼ F (PNGase F) は Roche Diagnostic GmbH 社製を用いた。ピリジルアミノ(PA)化用試薬はタカラ社より購入した。6 重水素置換 2-アミノピリジン(d₆-AP)は和光純薬より購入した。

2) 標準単糖の PA 化

カップリング試薬及び還元試薬は以下の溶液を使用した。

カップリング試薬 : 40%メタノールを含む

6.7M AP-酢酸溶液

還元試薬 : 1.0M ボランジメチルアミン複合体
-酢酸溶液

10 μ l のカップリング試薬を凍結乾燥した単糖に加えて 90 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた。溶媒を 60 $^{\circ}$ C で 20 分間, 窒素気流下減圧除去後, 10 μ l の還元試薬を残

渣に加えて 90 $^{\circ}$ C で 35 分間還元した。過剰の未反応試薬は残渣にメタノール(20 μ l)及びトルエン(40 μ l)を加えた後, 窒素気流下減圧除去した (50 $^{\circ}$ C, 10 分間, 2 回)。さらに 50 μ l のトルエンを残渣に加えた後, 窒素気流下減圧乾固した (50 $^{\circ}$ C, 10 分間, 1 回)。アミノ糖はメタノール/ピリジン/水 (30/15/10) 50 μ l に溶かし, 2 μ l の無水酢酸を加えて室温で 30 分間反応させ N-アセチル化し, 反応試薬を SpeedVac で除去後, 同様に PA 化した。また 4 重水素置換 PA 単糖(d₄PA) は d₆AP を用いて同様に反応させて調製した。

3) 糖鎖加水分解及び PA 化

糖タンパク質 (25 pmol) 及び標準単糖を 2M TFA-2MHCl (20 μ l) で 100 $^{\circ}$ C, 6 時間加水分解した。反応液は窒素気流下減圧除去した後, 前述と同様に N-アセチル化した。得られた単糖は d₀-AP を用いて d₀-PA 化し, 標準単糖は d₆-AP を用いて d₄-PA 化して内部標準とした。

4) 糖鎖の切り出し

uhCG 及び rhCG (100 μ g) を 8M グアニジン塩酸塩, 5mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6 (360 μ l) に溶解し, 2-メルカプトエタノール 2.6 μ l を加え, 室温で 2 時間反応させた。モノヨード酢酸ナトリウム 7.56 mg を試料溶解溶液 60 μ l に溶かして試料溶液に加え, 遮光下, 室温で 2 時間反応させた。PD-10 カラム(Amersham Biosciences, USA) を用いて脱試薬し, 得られた試料溶液を凍結乾燥した。還元カルボキシメチル化 uCG を 100 μ l のリン酸緩衝液 (pH 6.4) に溶解し, 2 単位の PNGaseF と 37 $^{\circ}$ C で 48 時間反応させて糖鎖を切り出した。70%冷エタノールを加えてタンパク質を沈殿させ, 上清を SpeedVac で減圧乾固した。

5) 糖鎖の PA 化

カップリング試薬及び還元試薬は以下の溶液を使用した。

カップリング試薬 : 12.8M AP-酢酸溶液

還元試薬 : 3.3M ボランジメチルアミン複合体
-酢酸溶液

10 μ lのカップリング試薬を還元カルボキシメチル化した uhCG 及び rhCG (100 μ g)由来糖鎖に加えて 90 $^{\circ}$ Cで 60 分間反応させた。反応液に 10 μ l の還元試薬を加えて 80 $^{\circ}$ Cで 60 分加熱して還元した。反応液にトリエチルアミン-メタノール(20 μ l)及びトルエン(40 μ l)を加えた後、窒素気流下減圧乾固した(60 $^{\circ}$ C, 10 分間, 1 回)。過剰の未反応試薬は残渣にメタノール(20 μ l)及びトルエン(40 μ l)を加えた後、窒素気流下減圧除去し(60 $^{\circ}$ C, 10 分間, 2 回), さらに 50 μ l のトルエンを残渣に加えた後、窒素気流下減圧乾固した(50 $^{\circ}$ C, 10 分間, 1 回)。d₄-PA 糖鎖は d₆-AP を用いて同様に反応させて調製した。

6) 単糖組成分析

①HPLC :

装置 : Magic2002 (Michrom BioResource 社製)

カラム : Hypercarb (Michrom BioResource 社製,
0.2 \times 150 mm)

溶離液 A : 2%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸
アンモニウム水溶液 (pH 8.5)

溶離液 B : 80%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸
アンモニウム水溶液 (pH 8.5)

グラジエントプログラム : B 液 10~45% (0~
60 分)

流速 : 100 μ l/分

② ESI-MS:

装置 : ESI-トリプルステージ四重極型 MS/MS
システム TSQ-7000 (Finnigan 社)

測定モード : ポジティブイオンモード
(ESI 電圧 : 2.0kV)

キャピラリー温度 : 175 $^{\circ}$ C

マルチプライヤー : 1200 V

SIM 測定 : m/z 243, 247, 259, 263, 300,
304

スキャン速度 : 0.5 秒/1 スキャン

7) 糖鎖プロファイリング

①HPLC :

装置 : Magic2002 (Michrom BioResource 社製)

カラム : Hypercarb (Michrom BioResource 社製,
0.2 \times 150 mm)

溶離液 A : 2%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸
アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

溶離液 B : 80%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸
アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

グラジエントプログラム : B 液 5~20% (0~
20 分), 20~70% (20~35 分), 70~95%
(35~40)

流速 : 100 μ l/分

② ESI-MS:

装置 : ESI-トリプルステージ四重極型 MS/MS
システム TSQ-7000 (Finnigan 社)

測定モード : ポジティブイオンモード
(ESI 電圧 : 2.0kV)

: ネガティブイオンモード
(ESI 電圧 : 1.5kV)

キャピラリー温度 : 175 $^{\circ}$ C

マルチプライヤー : 1000 V

スキャン範囲 : m/z 700-2200

スキャン速度 : 3 秒/1 スキャン

C. 研究結果

1. 安定同位体標識化の検討

外部標準法を用いた場合の MS の再現性は 20% 前後とも言われており, MS を試験法として導入するためには再現性の向上が重要な課題である。そこで, 糖鎖プロファイリングにおける再現性を高めるため, 安定同位体標識糖鎖を内部標準物質として用いる方法を検討した。糖鎖の標識方法として, 還元末端を AP で還元アミノ化し, PA 糖鎖とする方法がよく用いられている。我々は, 標準単糖または糖鎖の還元末端を d₆-AP で標識して d₄-PA 糖鎖とし, 内部標準糖鎖として用いることを検討した(Fig 1)。標準単糖を用いて標識化を検討したところ, 市販の d₆-AP に含まれる不純物のため d₁, d₂, d₃-PA-単糖が得られたが, これらはキャピラリー-GCC カラムを用いた LC/MS (CapGCC-LC/MS)による d₀-PA 単糖の分析

には影響を与えないことが確認された(Table 1).

2. 単糖組成分析

はじめに、市販の d_0 -PA-単糖 (Gal, Man, Glc, Fuc, GlcNAc 及び GalNAc, 各 1 pmol) を CapGCC-LC/MS に注入し, SIM モードで分析を行った. Fig. 2A は m/z 259 (d_0 -PA-Gal, d_0 -PA-Man 及び d_0 -PA-Glc), m/z 243 (d_0 -PA-Fuc), 及び m/z 300 (d_0 -PA-GlcNAc 及び d_0 -PA-GalNAc)をモニターしたときに得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC)である. すべての d_0 -PA 単糖が2分程度の差でベースラインにおいて分離され, ピーク形状も良好であった. また, 検出限界(S/N=3)は 45 fmol であった.

つぎに, d_6 -AP を用いて d_4 -PA 単糖を調製し, 内部標準物質として d_0 -PA 単糖に添加して CapGCC-LC/MS 分析を行い, m/z 243, 259, 300 と, m/z 263 (d_4 -PA-Gal, d_4 -PA-Man 及び d_4 -PA-Glc), m/z 247 (d_4 -PA-Fuc) 並びに m/z 304 (d_4 -PA-GlcNAc 及び d_4 -PA-GalNAc) をモニターした (Fig. 2B). Fig. 2C-2H は各ピークのマススペクトルを示している. すべてのピークにおいて m/z 4 異なるペアイオンが検出されていることが確認された.

本分析法の定量性を確認するため, 様々な濃度の d_0 -PA 単糖 に対して 1 pmol の d_4 -PA 単糖を内部標準物質として添加し, LC/MS 分析を行った. d_4 -PA 単糖のピーク面積に対する d_0 -PA 単糖のピーク面積比と d_0 -PA 単糖の濃度の間には 0.05 pmol 以上で直線性が認められた. また, Table 2 に示すように, 内部標準単糖を用いることによって, 良好な再現性が得られることが確認された.

つぎに, 1 から 1000 pmol の単糖(Gal, Man, Glc, Fuc, GlcN 及び GalN)を用いてアセチル化, d_0 -PA 化, 過剰試薬の除去操作を行った後, 併行して同様に調製した d_4 -PA (4 または 20 pmol) を内部標準として添加し, CapGCC-LC/MS 分析を行った. 6 種類の単糖のアセチル化, PA 化, 脱試薬, 及び LC/MS 分析の全過程を通した真度は 80-100% であった(Fig. 3). また, 再現性は 7% 前後であった.

モデル糖タンパク質としてフェツイン及びエリス

ロポエチンを用いて, 本分析法の単糖組成分析法としての有用性を評価した. 一般に, 糖酸加水分解の条件として, 中性単糖分析には糖タンパク質を 2M TFA 中 100°C で 4 時間加熱する方法, また, アミノ単糖分析用には 4M HCl 中 100°C で 6 時間加熱する方法が用いられているが, 2 回の加水分解操作を行うことになるので, 今回, フェツイン及びエリスロポエチン (25 pmol) を 2M HCl-2M TFA 中 100°C で 6 h 加熱する方法を採用した. そして, 糖タンパク質の加水分解と併行して, 内部標準物質用の Gal, Man, Glc, Fuc, GlcN 及び GalN (各 100 pmol) を同様に 2M HCl-2M TFA 中 100°C で 6 h 加熱した. 加水分解後, 糖タンパク質由来単糖, 及び標準単糖をそれぞれ d_0 -AP 及び d_6 -AP で標識し, GCC-LC/MS に同時注入した. Figs. 4A 及び 4B はそれぞれフェツイン及びエリスロポエチンの単糖組成分析の結果を示している. この図の中で (1), (3), 及び (5) はサンプル(d_0 -PA 単糖)のクロマトグラムを示し, (2), (4), 及び (6)は標準単糖 (d_4 -PA 単糖)のクロマトグラムを示している. d_0 -PA 及び d_4 -PA 単糖のピーク面積比から算出された単糖組成分析の結果は文献値によく一致した (Table 3).

3. 糖鎖プロファイリング

つぎに, 安定同位体標識法を LC/MS による定量的糖鎖プロファイリングに応用することを検討した. モデル糖タンパク質として用いた hCG は胎盤のシンシチウム細胞で産生される糖タンパク質性ホルモンで, 特に妊娠初期に多量に分泌され胎盤形成に寄与していることから, 排卵誘発剤として利用されている. hCG は分子量 14.7 kDa の α サブユニットと分子量 23.0 kDa の β サブユニットの二量体で形成されており, α サブユニットの Asn-52, Asn-78 及び β サブユニットの Asn-13, Asn-30 に N 結合型糖鎖が結合していることが報告されている. 今回は hCG から N グリカナーゼ処理により糖鎖を切り出し, PA 化後, 分析に用いた.

(1) PA 化糖鎖のイオン化の最適化

我々はこれまで NaBH_4 還元糖鎖の ESIMS 分析を

行ってきた。ESIMS において、糖鎖のイオン化効率は脂質、タンパク質及びペプチドなど他の有機物と比較して著しく低く、糖鎖分子の揮発性を高める PA 化などの標識化は、検出感度を向上させるために非常に有用であることが知られている。しかしながら、糖鎖のラベル化はイオン化効率が向上する反面、糖鎖のイオン化に必要とするイオン化エネルギーが減少するため、余剰エネルギーによるフラグメンテーションを引き起こす原因となる。フラグメントイオンはイオン化の際にプロトネーションされるために m/z 値から分子イオンと区別することができない。このようにして生じたフラグメントイオンは糖鎖のプロファイリングを困難にすることが予想される。そこでまず、ESIMS における PA 化糖鎖の最適なイオン化条件の設定を試みた。

ポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードで d_6 -PA-uhCG 糖鎖を分析し、アシアロ複合型 2 本鎖糖鎖に相当するイオンのみを抽出した (Fig. 5)。ポジティブイオンモード (Fig. 5A) で測定した場合、ピーク a とともにマイナーピーク b 及び c が検出されたが、ネガティブイオンモード (Fig. 5A') ではピーク a に相当するピーク a' のみが検出され、b 及び c に相当するピークは検出されなかった。我々は、ESIMS 分析において、低分子量糖鎖であるアシアロ複合型 2 本鎖糖鎖の分子イオンピークは両イオンモードで検出されることを確認している。従って Fig. 5A で検出されたピーク b 及び c は、ネガティブイオンモードでは検出されなかったことから、分子イオンピークではなく他の糖鎖から生成したフラグメントイオンピークであることが考えられた。

Fig. 5B, B' は両イオンモードにおいて共通して検出されたピーク a 及び a' のマススペクトルである。ピーク a のマススペクトル (Fig. 5B) ではアシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (分子量 1724.6 Da) に由来する 2 価イオン ($m/z=863.3$) の他に、アシアロ複合型 2 本鎖糖鎖よりヘキソース (Hex) 1 分子、及び N-アセチルヘキソサミン 1 分子分小さい糖鎖 (アシアロ 1 本鎖糖鎖, $m/z=1359.4$, 分子量 1359.3 Da), 及びこれよりさらに Hex 1 分子分小さい糖鎖 ($m/z=1197.2$, 分子量 1197.2 Da) に相当するスペクトルが強く検出

された。一方、ネガティブイオンモードではアシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (分子量 1724.6 Da) に由来するイオン ($m/z=860.9$) のみしか検出されなかった。

以上の結果から、ポジティブイオンモードで測定した場合はフラグメントイオンが生成し、マススペクトルが非常に複雑になることが明かとなった。従ってポジティブイオンモードでは PA 化糖鎖の分子イオンピークの同定が難しいことから ESIMS による糖鎖のプロファイリングにはネガティブイオンモードによる測定が適していると考えられた。

(2) 安定同位体標識法による uhCG 及び rhCG 由来糖鎖の定量的プロファイリング

rhCG を被検体糖タンパク質、また uhCG を標準糖タンパク質とし、それぞれを d_0 -AP 及び d_6 -AP で標識して d_0 PA-rhCG 糖鎖及び、 d_4 PA-uhCG 糖鎖とし、1 対 1 で混合した。両サンプル中に同一糖鎖が存在する場合、4 Da 差のペアイオンが検出され、イオン強度比から相対結合量が求められるはずである。また、一方の hCG にのみ結合している糖鎖が存在する場合、1 本のイオンとして検出されると予想される。

Fig. 6A は d_0 PA-rhCG 及び d_4 PA-uhCG の等量混合液 (1 μ g) の TIC である。約 20~25 分に多数のピークが検出された。Fig. 7 は糖鎖のプロファイルを保持時間と m/z の 2 次元で表したものである。また、Fig. 7 上の各ピークのマススペクトルを Fig. 8 に示した。

各マススペクトルを解析した結果、両 hCG には合計 32 種類の糖鎖が結合していることが明らかになり、主な糖鎖は混成型、一本鎖及び 2 本鎖の複合型糖鎖と推定された (Table 4, 5)。11 種類検出された混成型糖鎖のうち、ペアイオンが検出されたのは糖鎖 a1 ($m/z=757.5, 759.5$) のみであった。これらは m/z 値の差から 2 価イオンであることがわかり、計算分子量 1517.0, 1521.0 Da から、糖組成式 $[\text{Hex}]_s[\text{HexNAc}]_3$ の混成型糖鎖と推定された。19 種類検出された複合型糖鎖のうち糖鎖 n1, n2, n4, n5, r1, r2 及び r4 の 7 ピークからペアイオンが検出された。これらはマススペクトルの値からフコースが結合していないモノシアロ及びジシアロ複合型 2 本鎖糖鎖

と推定された。

共通糖鎖の結合量の違いを調べるため、uhCG に結合している糖鎖に対する rhCG の糖鎖の相対結合比を求めた(Fig. 9)。糖鎖 n1, n2, n4 及び n5 は両 hCG に共通に存在する異性体であるが、rhCG にはいずれも uhCG の 50~70%程度しか結合していないことがわかった (Fig. 9A)。また、ジシアロ複合型 2 本鎖糖鎖についても同様に検討した結果 (Fig. 9B), rhCG では r2 が主要な糖鎖であり、結合量は uhCG の約 4 倍であるが、uhCG では r4 が最も結合量が多く、rhCG の約 2 倍の結合量であることがわかった。以上のように、モノシアロ糖鎖は uhCG に多く、ジシアロ糖鎖は rhCG に多いこと、また、複合型糖鎖の異性体分布に差が認められることから、ヒトと CHO 細胞ではシアル酸転移酵素や複合型糖鎖合成酵素の発現に差があることが示唆された。

同位体標識法による糖鎖プロファイリングにおいて、どちらか一方に特異的に結合している糖鎖はマススペクトル上で単独のイオンとして検出される。Table 4 に示したように、rhCG では 9 種類の糖鎖が単独イオンとして検出され、そのうち 6 種類は混成型糖鎖であった。複合型糖鎖で単独イオンとして検出されたものは 3 種類で、このうちモノシアロ複合型 2 本鎖糖鎖(n3)及びジシアロ複合型 2 本鎖糖鎖(r3)は、共通糖鎖として検出された糖鎖 n1, n2, n4, n5 及び r1, r2, r4 の異性体であり、rhCG にしか結合していない異性体が存在することが明らかになった。

uhCG にのみに結合している糖鎖として、12 種類の糖鎖が検出された (Table 4)。その中で 4 種類は混成型で、8 種類は複合型糖鎖であった。これらの糖鎖の多くはフコースが結合していることが明らかになった。

以上の結果から rhCG には混成型糖鎖が多く結合しているのに対して、uhCG にはフコシル化糖鎖が多く結合していることが明らかになった。また、フコースが結合していないモノ及びジシアロ複合型 2 本鎖糖鎖のように、一方にのみ結合している異性体が存在することが明らかとなった。uhCG と rhCG を同時に分析して得られた Fig. 7 上のすべてのピークをアサインし、uhCG 由来糖鎖と rhCG 由来糖鎖をそ

れぞれ抽出した結果、Fig. 5B, 5C のようなパターンが得られ、両者は全く異なった糖鎖プロファイルを有していることが分かった。今回のモデル実験により、同位体標識法を利用することによって、同一クロマトグラム上での糖鎖の定量的差異解析が可能であることが確認された。同位体標識法では単回分析、つまり同一測定条件における分析が可能のため、1 回の測定で迅速且つ正確な定量的差異解析が可能である。従って同位体標識法は糖鎖試験法として有用なツールになり得ると考えられる。

D. 考察

これまで我々は LC/ESI-MS を用いた独自の糖鎖プロファイリング法を開発し、様々な糖鎖含有タンパク質性医薬品の特性・品質解析、品質評価、及び同源性/同質性評価に役立てることを検討してきた。平成 13 年度は起源の異なる 3 種類の EPO の糖鎖のプロファイリングを行い、糖鎖プロファイリング法が糖鎖構造や不均一性の違いを識別できることを確認し、特性解析はもちろんのこと、同源性/同質性評価法としても有用であることを明らかにした。平成 14 年度は本分析法の微量化を目指し、CapLC/ESI-Q/TOFMS の導入により従来法の 20 分の 1 のサンプル量で十分な糖鎖プロファイルが得られることを確認した。以上のように、MS は特性解析法としては威力を発揮することが明らかになってきたわけであるが、試験法としての潜在能力は不明であった。そこで、本研究では、標準単糖や標準糖タンパク質由来糖鎖を安定同位体標識し、被検体糖鎖と同時に分析することによって、MS の課題である再現性を克服し、糖鎖試験法として利用することも可能であることを明らかにした。

はじめに単糖組成分析を検討し、糖タンパク質の加水分解に併行して標準単糖を同条件下加熱し、糖タンパク質由来単糖を d₀-AP で、また、標準単糖を d₆-AP で標識した後、同時注入することによって、精度及び真度が改善されることを確認した。本分析法は、従来の HPAEC-PAD と比較して感度も高く、今後、医薬品のみならず、グライコミクスなどへも応用が可能と考えている。

つぎに安定同位体標識法を定量的糖鎖プロファイリングに応用することを検討した。uhCG を標準糖タンパク質、また rhCG を被検体糖タンパク質としてそれぞれ d₆-及び d₀-AP で標識し、1対1で混合して同時注入することによって、一方にしか存在しない糖鎖の構造推定、あるいは共通糖鎖の構造推定と相対結合比の算出が可能であることを確認した。今後、分析例を増やすことによって、糖鎖試験法としての有用性を総合的に判断していきたいと考えている。

E. 結論

- 1) 安定同位体標識標準単糖と LC/MS を用いた単糖組成分析法を開発した。
- 2) 標準糖タンパク質由来糖鎖から調製した安定同位体標識糖鎖を内部標準として用いた定量的糖鎖プロファイリング法を開発した。

F. 健康危害情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography / mass spectrometry, *J. Electrophoresis*, 48, (2004)
- 2) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, and Takao HAYAKAWA: Analyses of glycoproteins and glycopeptides by liquid chromatography/mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Methods Molecular Biology*, 251, HPLC of Peptides and Proteins, Edited by M. I. Aguilar, 263-274 (2003)
- 3) Masashi HYUGA, Sumiko Hyuga, Nana KAWASAKI, Miyako Ohta, Satsuki ITOH, Shingo NIIMI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Enhancement of hepatocyte growth

factor-induced cell scattering in N-acetylglucosaminyltransferase III-transfected HepG2 cells, *Biol. Pharm. Bull.* (投稿中)

- 4) Masashi HYUGA, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako Ohta, Akiko ISHII, Sumiko HYUGA, and Takao HAYAKAWA: Analysis of site-specific glycosylation in recombinant human follistatin expressed in Chinese hamster ovary cells, *Biologicals*, (2004) (投稿中)

2. 学会発表

- 1) 川崎ナナ, 早川堯夫: LC/MS を用いた糖鎖のプロファイリングと構造解析. 第 53 回電気泳動学会シンポジウム (2003 年, 大阪)
- 2) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 蜂須賀暁子, 橋井則貴, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫: 2次元電気泳動及び LC/MS を用いたグライコム解析. 科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第一回夏期シンポジウム (2003 年, 浜松)
- 3) 川崎ナナ: 糖タンパク質の質量分析. 横浜バイオテクノロジー懇談会平成 15 年度第 1 回リカレント講座「マスマスプロトメトリーとプロテオミクスー蛋白質研究の最前線」(2003, 8, 29) 横浜
- 4) Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Jin Yuan, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akiko Ishii, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Isotope tag method for quantitative oligosaccharide analyses by LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 5) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Mawanishi, Takao Hayakawa: Oligosaccharide profiling of cell membrane by LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 6) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Analysis of IgLON family protein in rat brain by gel electrophoresis and capillary LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会

(2003年, 横浜)

- 7) Kayoko Takagi, Reiko Teshima, Haruyo Okunuki, Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, Jun-ichi Sawada: Digestive stability and allergenic potential of chicken egg white ovomucoid and their pepsin-fragments. 第76回日本生化学会大会 (2003年, 横浜)
- 8) Akiko Ishii-Watabe, Edwin Chang, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, John Cooke: Transcriptional profiling in nicotine-treated human microvascular endothelial cells. 第76回日本生化学会大会 (2003年, 横浜)
- 9) 川崎ナナ: 糖鎖関連医薬品の現状と課題. 第3回糖鎖科学名古屋拠点研究会(2004年, 名古屋)
- 10) 川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の質量分析. 日本薬学会第124年会(2004年, 大阪)
- 11) 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 日向昌司, 川西 徹, 早川堯夫: 糖鎖プロファイリングを用いた差異解析に基づくグライコーム解析. 日本薬学会第124年会(2004年, 大阪)
- 12) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 蜂須賀暁子, 手島玲子, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫: 2次元電気泳動と LC/MS を用いたラット脳内 GPI アンカー型タンパク質の解析. 日本薬学会第124年会(2004年, 大阪)
- 13) 原園 景, 川崎ナナ, 川西 徹, 早川堯夫: LC/MS/MSによる apolipoprotein B100 の部位特異的糖鎖構造解析. 日本薬学会第124年会(2004年, 大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Table 1 CapGC-IC/MS を用いた PA 単糖分析における PA 糖鎖安定同位体の影響

Ion (m/z)	SIM ion intensity (peak area ratio %) derived from d ₀ -PA and d ₄ -PA-monosaccharides											
	d ₀ PA-Fuc	d ₄ PA-Fuc	d ₀ PA-Gal	d ₄ PA-Gal	d ₀ PA-Man	d ₄ PA-Man	d ₀ PA-Glc	d ₄ PA-Glc	d ₀ PA-GlcNAc	d ₄ PA-GlcNAc	d ₀ PA-GalNAc	d ₄ PA-GalNAc
243	86.6	-	-	-	-	-	88.6	-	87.6	-	-	-
244	11.7	-	-	-	-	-	9.9	-	11.1	-	-	-
245	1.7	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
246	-	4.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
247	-	82.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
248	-	10.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
249	-	1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
259	-	-	87.4	-	-	-	88.6	-	87.6	-	-	-
260	-	-	11.0	-	-	-	9.9	-	11.1	-	-	-
261	-	-	1.6	0.7	1.5	0.4	1.5	1.3	0.8	0.8	0.8	0.8
262	-	-	-	4.1	-	2.9	-	-	4.1	-	-	-
263	-	-	-	83.1	-	78.7	-	-	79.3	-	-	-
264	-	-	-	10.5	-	14.4	-	-	13.4	-	-	-
265	-	-	-	1.6	-	3.6	-	-	2.4	-	-	-
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	86.0	-	85.5
301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.3	-	12.9
302	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	0.4	1.6
303	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.1	-
304	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81.0	-
305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.5	-
306	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0	-

10 pmol PA or d₄PA-monosaccharide was injected

Table 2

内部標準単糖を用いた CapGCC-LC/MS による d₀-PA-単糖分析の再現性(RSD)

	d ₀ -PA-monosaccharides (pmol)								
	0.05			0.5			5		
	IS(-)	IS(A)	IS(B)	IS(-)	IS(A)	IS(B)	IS(-)	IS(A)	IS(B)
Gal	16.2	15.5	5.7	11.6	8.3	2.1	5.0	5.5	2.3
Man	12.7	15.3	4.7	9.7	7.1	1.8	7.2	4.6	1.7
Glc	12.9	17.5	3.9	8.9	7.6	4.8	10.9	5.1	1.1
Fuc	23.9	17.3	4.2	9.9	7.6	1.9	5.4	6.1	0.8
GlcNAc	15.2	7.7	3.5	9.0	5.6	2.0	5.4	6.0	1.2
GalNAc	16.0	21.0	9.4	11.4	7.4	4.7	9.8	3.5	1.5

Note. n=5. IS, internal standard. A, PA-rhamnose; B, d₄-PA-monosaccharides.

Table 3

内部標準単糖を用いた CapGCC-LC/MS による単糖組成分析

Glycoprotein	Monosaccharide	mol/mol ^a	mol/mol
Fetuin	Fuc	0.3	0 ^b
	Gal	10.4	12
	Man	7.6	9
	GlcNAc	14.7	15
	GalNAc	3.4	3
Erythropoietin	Fuc	3.4	4.1 ^c
	Gal	12.8	13.8
	Man	8.1	8.7
	GlcNAc	15.6	17.2
	GalNAc	1.5	0.9

^aValues were expressed as mol detected in 1 mol glycoprotein. ^bRef, *Anal. Biochem.* 197, (1991) 132-136; ^cRef, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 12059-12076

Table 4 Fig. 7 で検出されたピーク a-s の帰属

Peak No.	Carbohydrate composition	Deduced structure	Theoretical mass (d ₀ PA-sugar)	Observed <i>m/z</i>		
				d ₀ PA-rhCG	d ₄ PA-uhCG	
				M ²⁻	M ³⁻	M ²⁻
a1	{Hex} ₅ [HexNAc] ₃	Hybrid(1)	1517.5	757.5		759.5
b1	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	Bi(1)NA ₂	2303.1		768.2	
c1	[Fuc] ₁ {Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	FBi(1)NA ₂	2449.3		816.7	
d1	{Hex} ₄ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Mono(1)NA	1646.6			824.3
d2	{Hex} ₄ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Mono(1)NA	1646.6			824.0
e1	{Hex} ₆ [HexNAc] ₃	Hybrid(2)	1679.6	838.6		
f1	{Hex} ₆ [HexNAc] ₃	Hybrid(2)	1679.6			840.6
g1	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄	Bi(1)	1720.7	858.9		
h1	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄	Bi(1)	1720.7			861.2
i1	{Hex} ₅ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Hybrid(1)NA	1807.7	902.9		
i2	{Hex} ₅ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Hybrid(1)NA	1808.7			905.0
j1	[Fuc] ₁ {Hex} ₅ [HexNAc] ₄	FBi(1)	1866.8			934.0
k1	{Hex} ₆ [HexNAc] ₄	Hybrid(3)	1882.8	940.2		
l1	{Hex} ₅ [HexNAc] ₅	Bi(1)-GN	1924.9			962.7
m1	{Hex} ₆ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Hybrid(2)NA	1970.8			986.8
m2	{Hex} ₆ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Hybrid(2)NA	1970.8			986.2
n1	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Bi(1)NA	2011.9	1004.7		1006.7
n2	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Bi(1)NA	2011.9	1004.6		1007.3
n3	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Bi(1)NA	2011.9	1004.6		
n4	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Bi(1)NA	2011.9	1004.6		1006.5
n5	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Bi(1)NA	2011.9	1004.6		1006.4
o1	{Hex} ₇ [HexNAc] ₄	Hybrid(4)	2044.9	1021.4		
p1	[Fuc] ₁ {Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	FBi(1)NA	2158.0			1079.8
p2	[Fuc] ₁ {Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	FBi(1)NA	2158.0			1079.8
p3	[Fuc] ₁ {Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	FBi(1)NA	2158.0			1079.8
q1	{Hex} ₆ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Hybrid(3)NA	2174.0	1085.6		
q2	{Hex} ₆ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Hybrid(3)NA	2174.0	1085.7		
r1	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	Bi(1)NA ₂	2303.1	1150.3		1152.1
r2	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	Bi(1)NA ₂	2303.1	1150.2		1152.2
r3	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	Bi(1)NA ₂	2303.1	1150.1		
r4	{Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	Bi(1)NA ₂	2303.1	1150.3		1152.4
s1	[Fuc] ₁ {Hex} ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	FBi(1)NA ₂	2449.3			1225.4

Hex: hexose, HexNAc: *N*-acetyl-hexosamine, NeuNAc, NA: neuraminic acid, Fuc, F: fucose, mono: monoantennary, bi: biantennary, GN: bisecting GlcNAc

Table 5 Table 4 に示した糖鎖の構造

Abbreviation	Structure ^a	Theoretical mass ^b
Hybrid(1)		1440.3
Hybrid(2)		1602.5
Hybrid(3)		1440.3
Hybrid(4)		1805.6
Mono(1)		1278.2
Bi(1)		1643.5
Bi(1)-GN		1846.7
FBi(1)		1789.7

^a Man, mannose; Fuc, fucose; Gal, galactose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine.

The structure are based upon the known structure of hCG.

^b Average mass value.

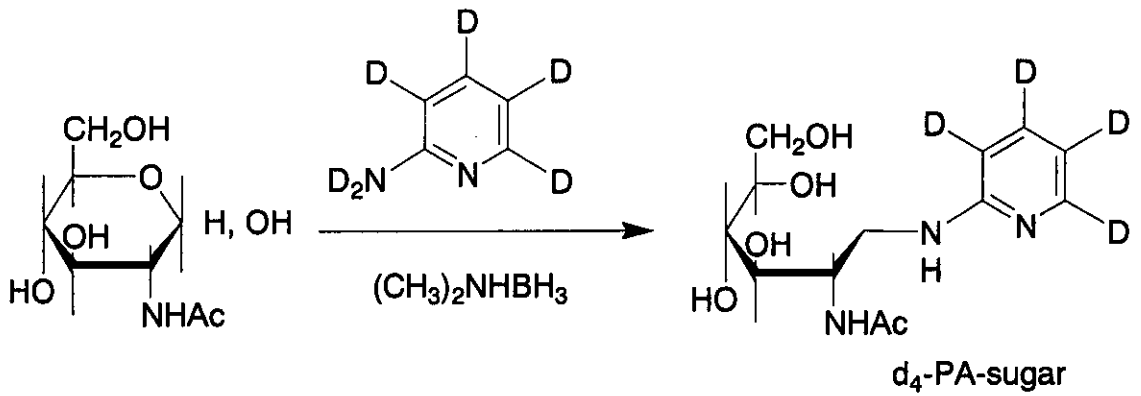


Fig. 1 糖鎖の安定同位体標識化

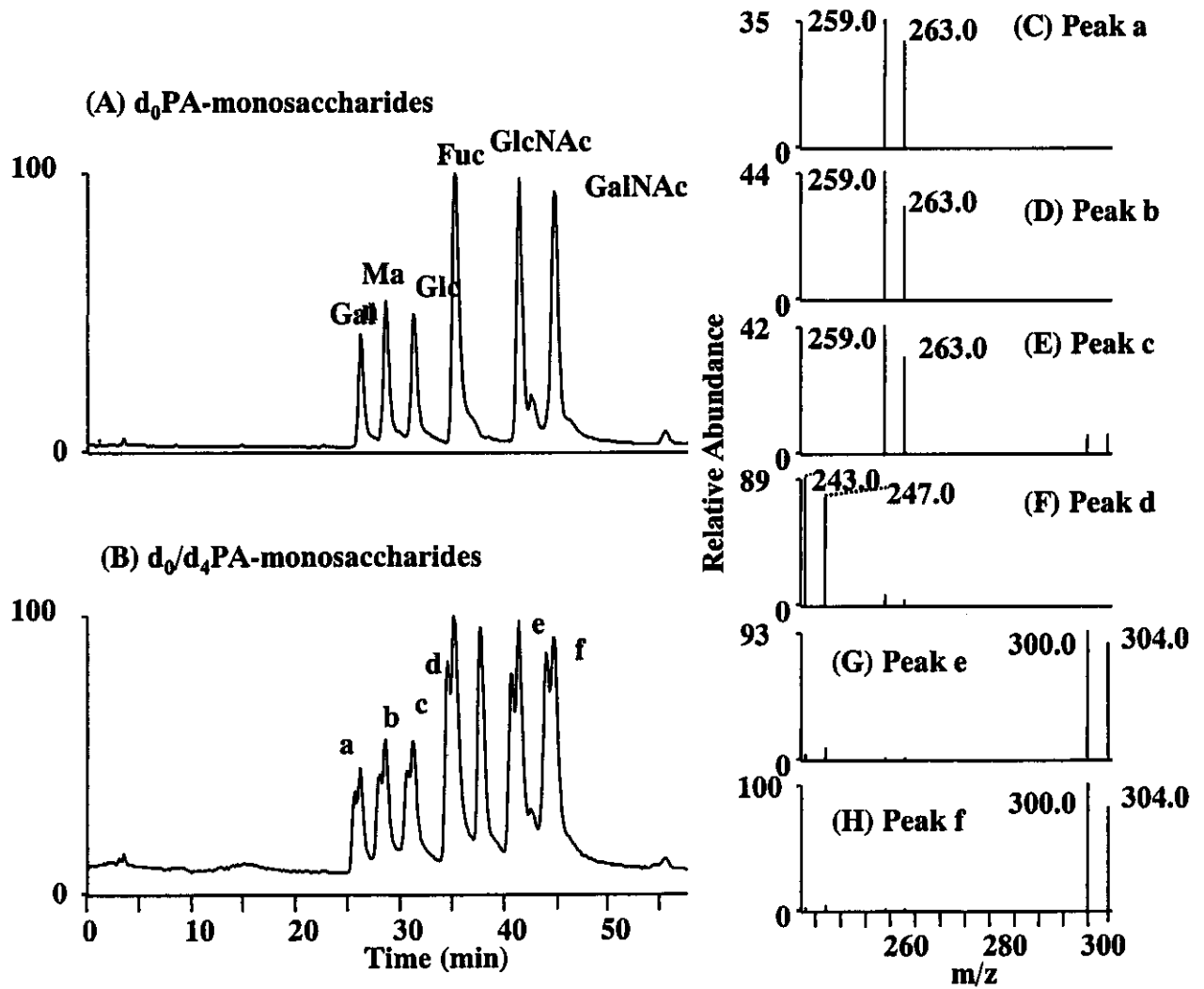


Fig. 2 CapGCC-LC/MSを用いた単糖分析

(A) d_0 PA-単糖のクロマトグラム、(B) d_0/d_4 PA-単糖のクロマトグラム、(C)-(H) ピークa-fのマススペクトル

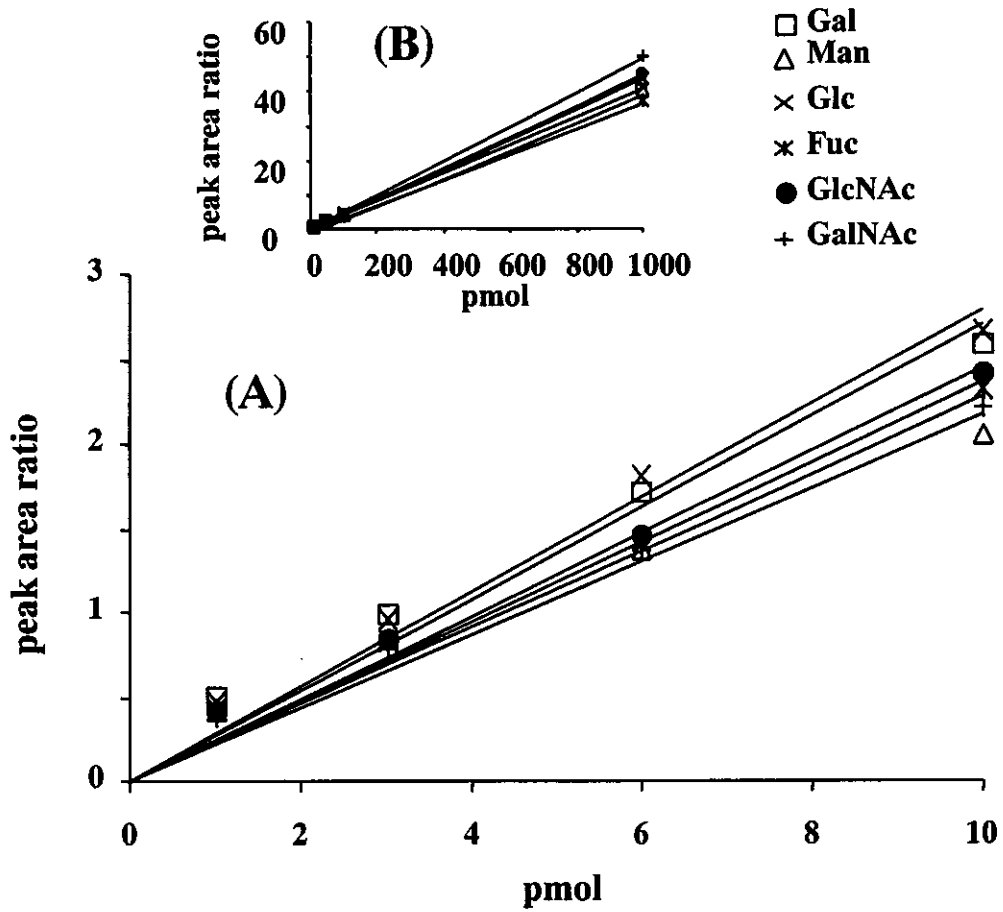


Fig. 3 安定同位体標識単糖及びCapGCC-LC/MSを用いた単糖分析法の定量性

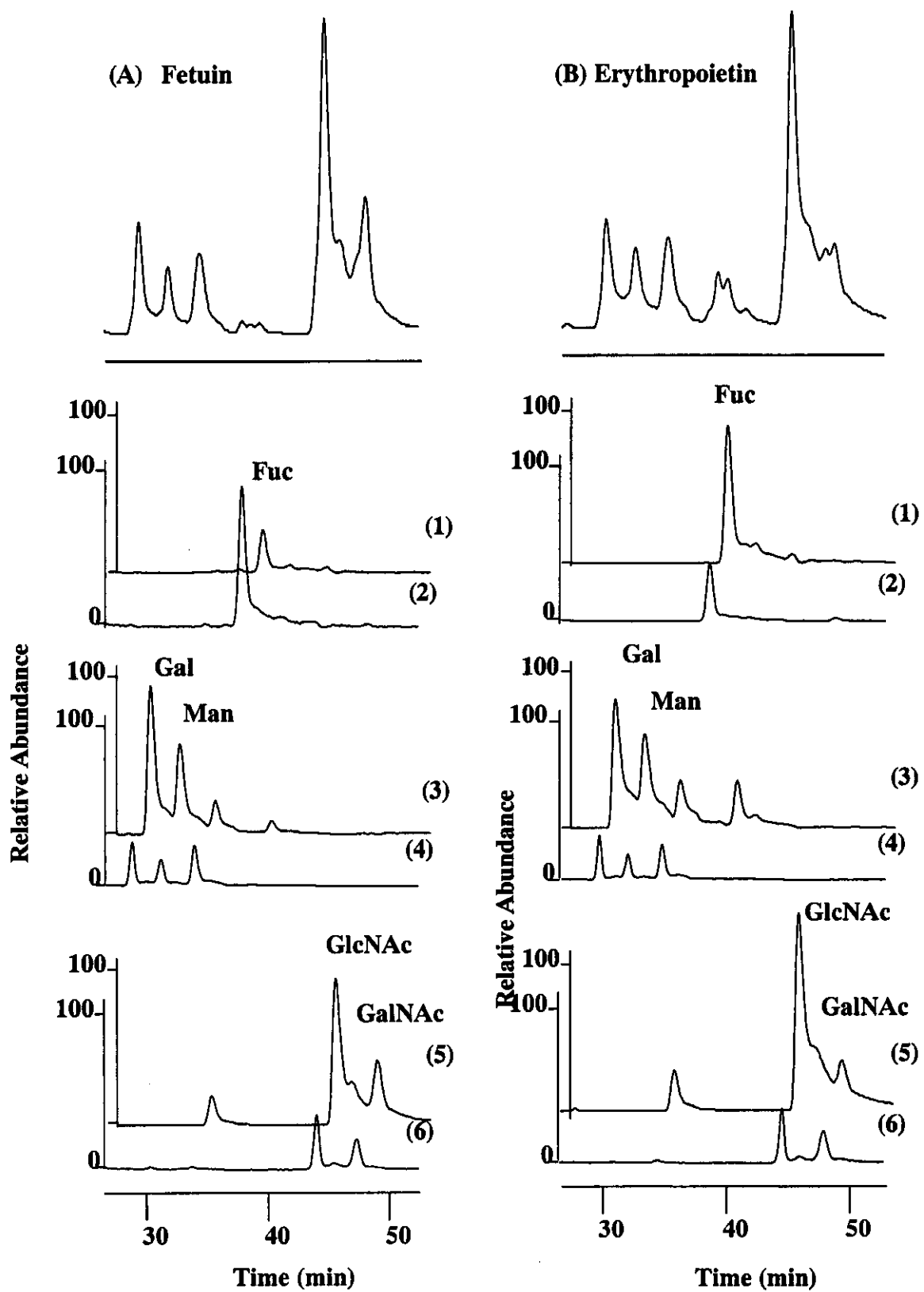


Fig. 4 フェツイン(A)及びエリスロポエチン(B)の単糖組成分析
 マスクロマトグラム m/z 243 (1), 247 (2), 259 (3), 263 (4), 300 (5), 304 (6)

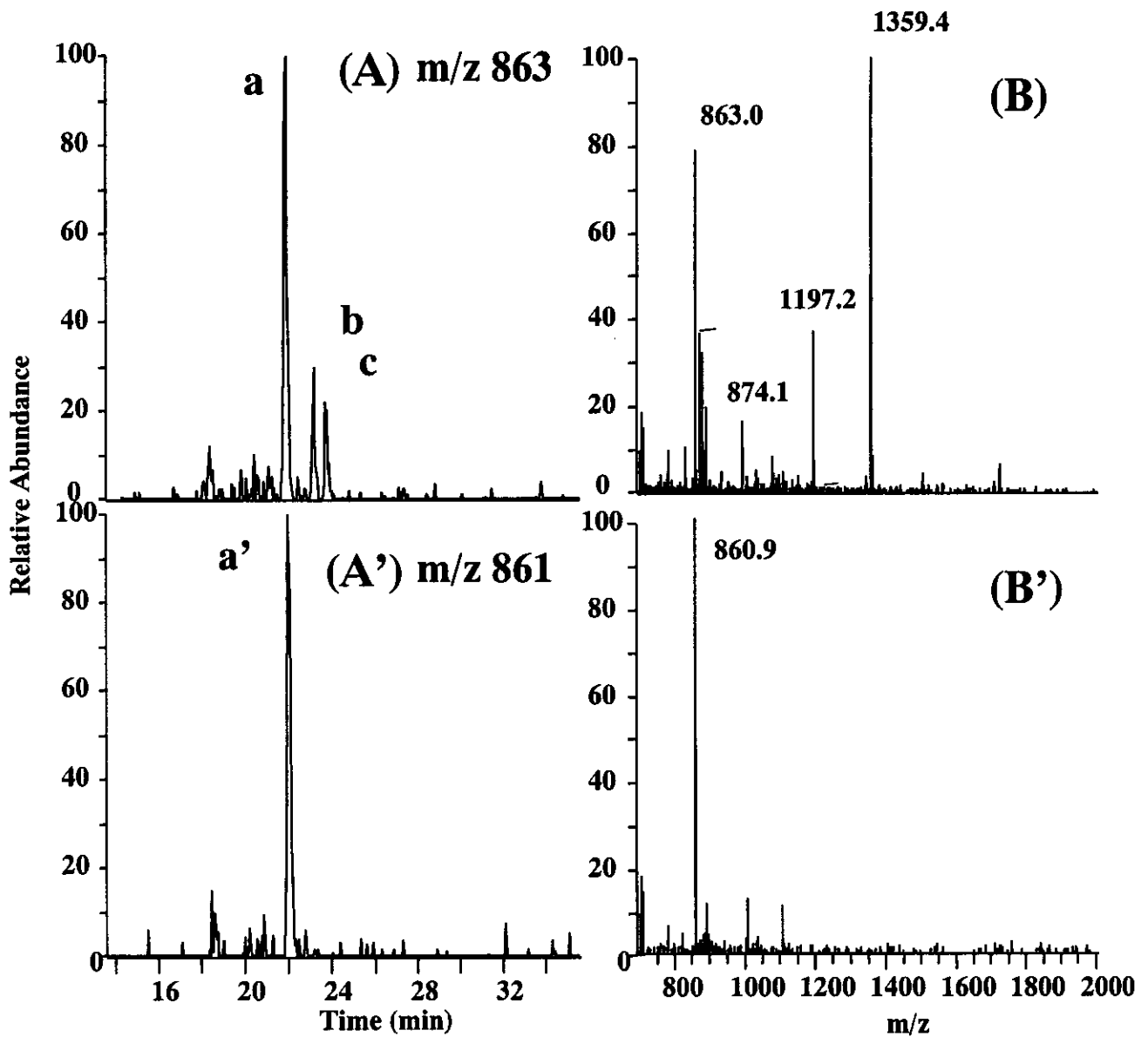


Fig. 5 uhCG由来 d_4 -PA化アシアロ2本鎖糖鎖のCapGCC-LC/MS

(A), (A'), マスクロマトグラム; ピークa, a'のマススペクトル(B), (B')
 (A), (B), positive ion mode; (A'), (B'), negative ion mode

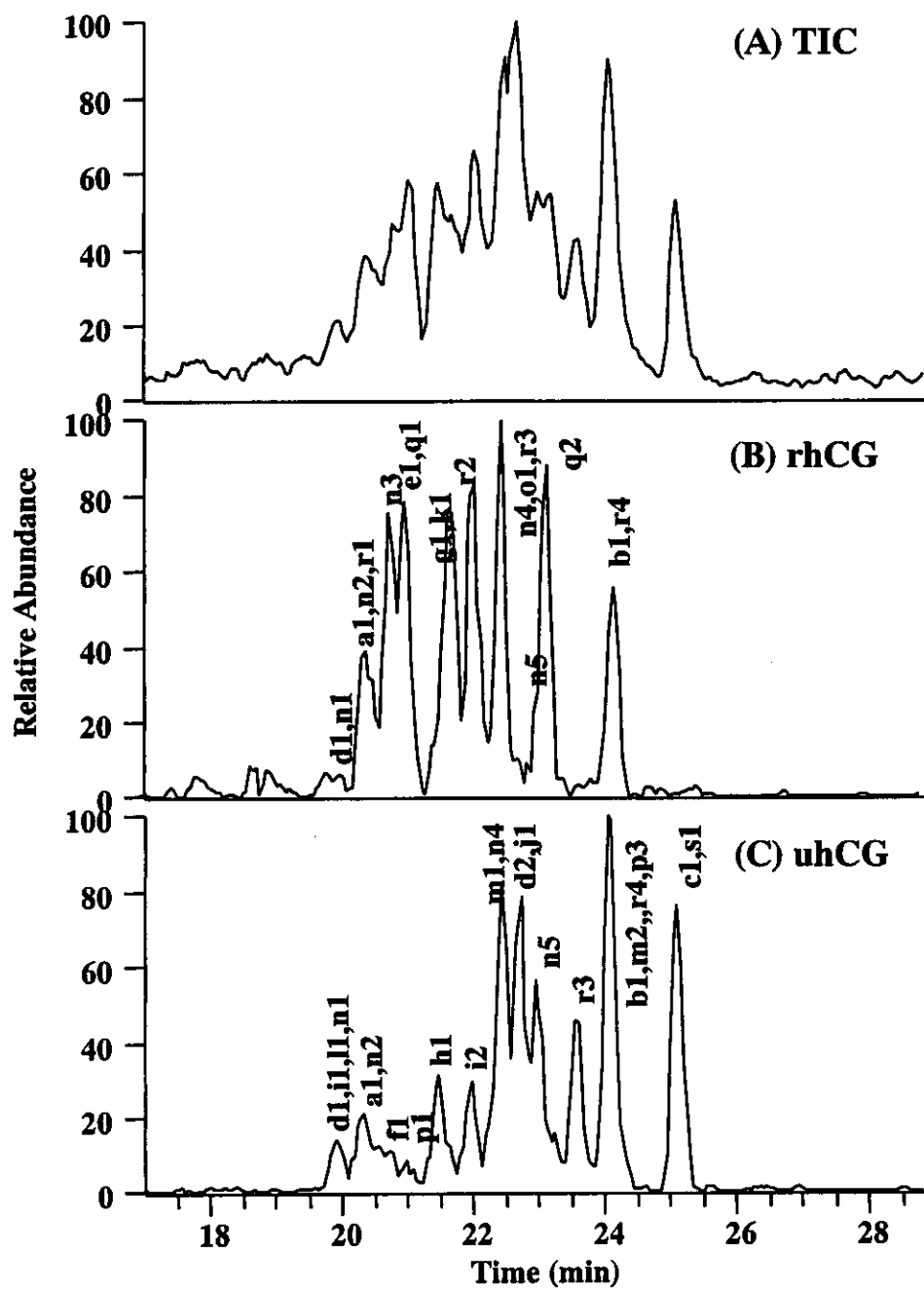


Fig. 6 PA化hCG由来糖鎖のプロファイル

(A), d₄PA-uhCG 及び d₀PA-rhCG 混合物のTIC; (B), d₄PA-uhCGのTIC; (C), d₀PA-rhCG のTIC

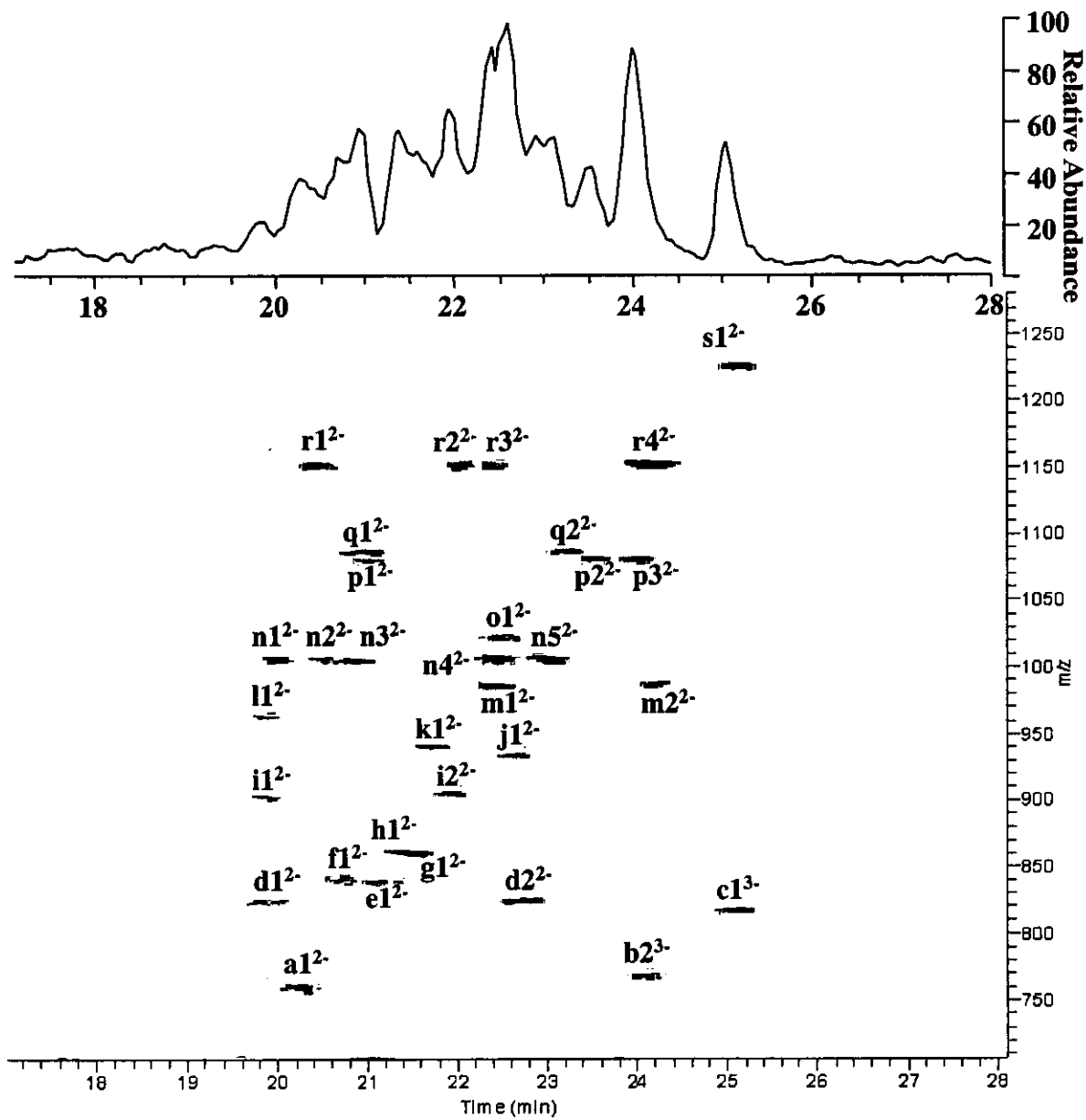


Fig. 7 d₀PA-rhCG 及び d₄PA-uhCG 混合物のTICの2D表示

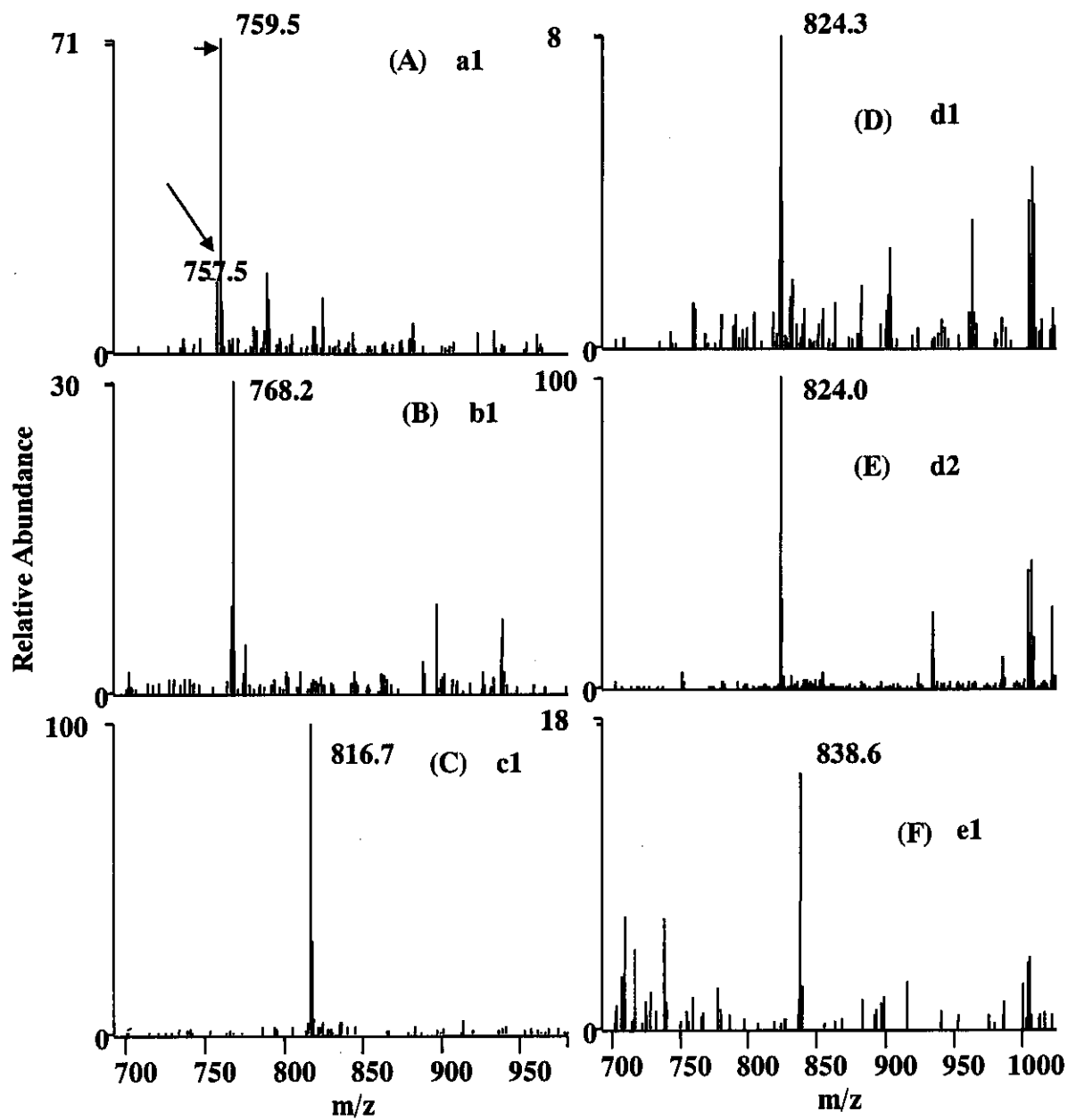


Fig. 8 Fig. 7中のピーク a~s のマススペクトル

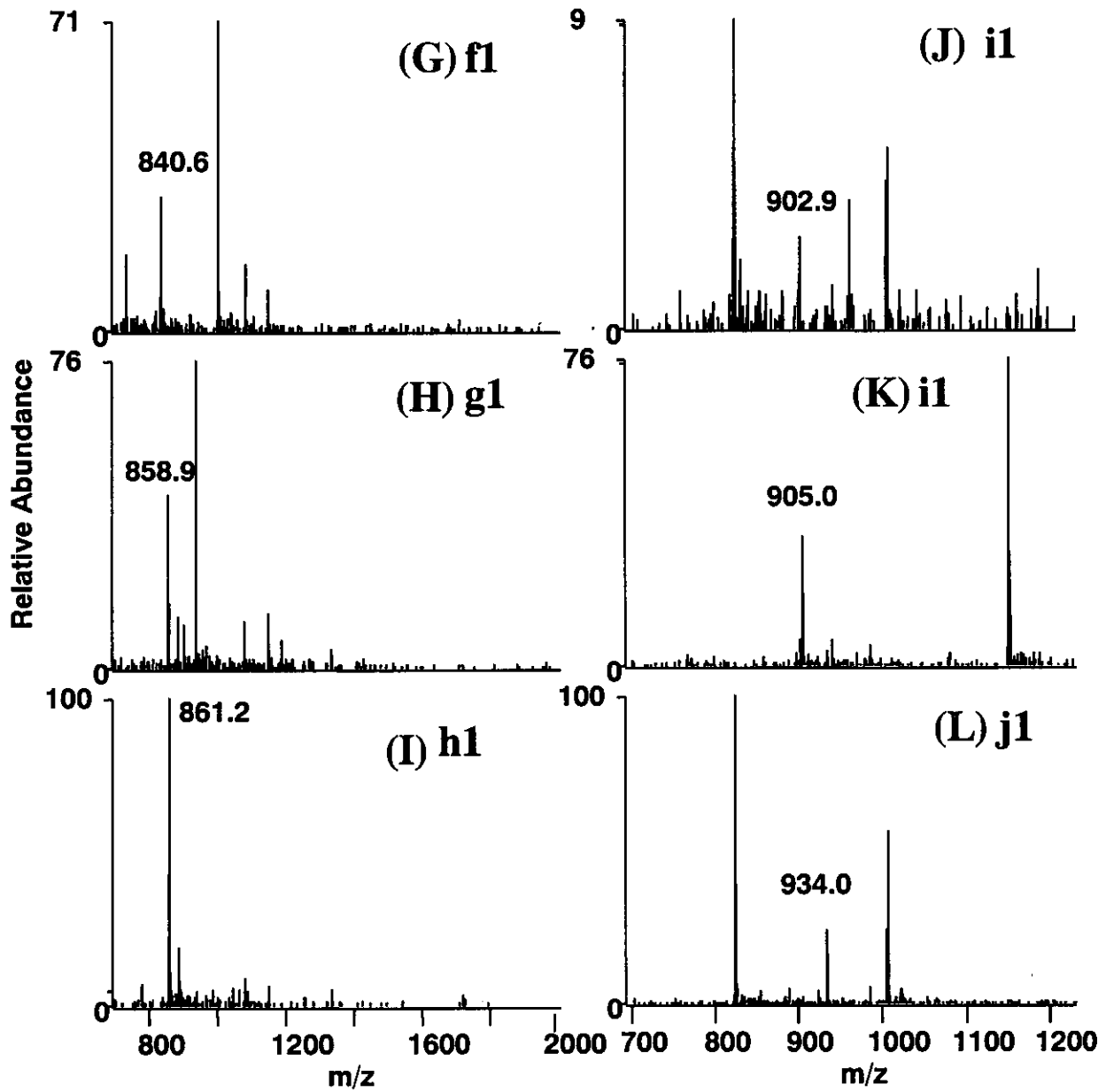


Fig. 8 つづき