

プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究者 川崎ナナ

研究要旨 本研究の目的は、プロテオミクスや構造生物学の技術を利用して、バイオ医薬品の特性解析・品質評価の迅速化・簡便化・高精度化・効率化を図ることである。本年度は、LC/MSを用いたペプチドマッピングにデータベース検索、CID-MS/MSによる構造特異的解析法、Cross link 修飾法、または $H_2^{18}O$ による同位体標識法を組み合わせることによって、バイオ医薬品の一次構造、翻訳後修飾、高次構造、不純物・類縁物質・分解物を解析できることを見出した。また、多次元 HPLC 法、及び糖鎖データベース検索を基本とする糖鎖解析法、並びにリン酸化プロテオーム解析を基本とする生物学的性質評価法を検討した。さらに、ホモジニアスアッセイ法、及び糖転移酵素一斉分析に基づくバイオ医薬品産生細胞基材評価法を開発した。

分担研究者

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所 川西 徹
- 2) 株式会社(株)医薬カパニ生産本部 石川リカ
- 3) 中外製薬(株)生物技術研究部
村田 博 (～平成 16 年 10 月)
名瀬義明 (平成 16 年 10 月～)
- 4) (財)化学及血清療法研究所 菅原敬信
- 5) 山之内製薬(株)創薬研究本部
横田祥士 (～平成 16 年 12 月)
山口秀人 (平成 16 年 12 月～)
- 6) 住友製薬(株)製剤技術研究所 秋丸仁朗
- 7) 協和発酵(株)東京研究所 内田和久
- 8) 大阪大学大学院理学研究科 長谷純宏
- 9) 近畿大学薬学部 掛樋一晃
- 10) 名古屋市立大学大学院薬学研究科 加藤晃一

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用技術の進展に伴い、様々なタンパク質がバイオ医薬品として研究開発されている。バイオ医薬品は生体による生合成過程を生産に利用していることから、生物由来の不純物が混在する可能性や分子構造上不均一なものが産生される可能性、及び翻訳後修飾や高次構造など人為的に制御できない理由により生物活性が変化する可能性などが指摘されており、化学薬品とは異なる評価法の確立が必要である。さらに最近では、従来型のタンパク質やポリペプチドに加え、新しい分子設計に基づく融合タンパク質など

様々な分子がバイオ医薬品として開発されていることから、バイオ医薬品の試験法の一般化は容易ではなく、個々のバイオ医薬品の製造工程や特性に応じた試験法の設定が求められている。

近年、タンパク質研究分野に、プロテオミクスや構造生物学に代表される新しいタンパク質構造、及び機能解析の方法論が登場した。質量分析法 (MS)、NMR 及びバイオインフォマティクスを基本としたタンパク質翻訳後修飾、高次構造、及び機能解析のための新しい技術は、昨今のタンパク質研究の飛躍的な進展に貢献している。

本研究の目的は、プロテオミクス及び構造生物学の革新的技術をバイオ医薬品の評価に取り入れることによって、バイオ医薬品特性解析・品質評価の迅速化・簡便化・高精度化・効率化を図ることである。本年度は、MS、NMR、及び各種データベースを利用したバイオ医薬品の構造解析及び物理的・化学的性質評価法、リン酸化プロテオーム解析を基本とした生物学的性質評価法、並びにホモジニアスアッセイ法、及び糖転移酵素一斉分析に基づくバイオ医薬品産生細胞基材評価法を検討した。

B. 研究方法

- (1) MS を利用したバイオ医薬品の構造解析、及び物理的・化学的性質評価の開発
 - ① プロテオーム解析用データベースを利用した一次構造・不純物解析法

抗体医薬品モデルとしてマウスモノクローナル抗体を用いた。還元カルボキシメチル化後、トリプシン消化し、ペプチドマッピングを行った。

LC, Magic2002 (Michrom BioResource); MS, LTQ (Thermo Electron); 分離カラム, Magic C₁₈ (3 μ 100 Å, 0.2 x 50 mm); 検索エンジン, BioWorks (Thermo Electron)

② 構造特異的フラグメントを利用した糖鎖解析

抗体医薬品モデルとしてヒト IgG を用いた。還元カルボキシメチル化後、トリプシン消化し、LC/MS/MS を用いてペプチドマッピングを行った。

LC, Paradigm MS4 (Michrom BioResource); MS, Qstar Puler i (Applied Biosystem); 分離カラム, Magic C₁₈; 検索エンジン, Mascot (Matrix Science)

③ Cross link 試薬を利用した高次構造解析

モデルタンパク質として、最も出現頻度の高い一次配列をもつ遺伝子組換え型 Interferon-α (IFN-α) である CIFN (Consensus interferon) を用いた。Cross link 試薬は Bis (sulfosuccinimidyl) suberate (BS³) を使用した。還元カルボキシメチル化後、トリプシン消化し、ペプチドマッピングを行った。

LC, HP1100 (Agilent); MS, API4000 (ABI); カラム, Protein & peptide C18 (2.1x250 mm, Vydac); Cross linked ペプチドの同定, ASAP ver 1.9 (Automated Sequence Assignment Program)

④ 同位体標識を利用した分解物・類縁物質解析

ヒトモノクローナル抗体を凍結乾燥後、H₂O 又は H₂¹⁸O に溶解し、50°C 1 カ月間保存した。還元-アルキル化後、トリプシン消化し、ペプチドマッピングを行った。MS, LCQDeca (Thermo Electron).

⑤ プロテオミクスの技術を用いた新規タンパク質の特性解析

MDCK 培養上清濃縮液から Hitrap Heparin FF (Amersham-Bioscience) で精製したプロテアーゼインヒビター (PI) を SDS-PAGE 後 PVDF 膜に転写し、クーマシーブリリアントブルー R250 で染色した。バンドを切り出し、プロテインシークエンサー (PROCISE, ABI) を用いて N 末端アミノ酸配列分析した。分子量は LTQ, 及び BIFLEX β, (Bruker) で測定した。さらに、還元カルボキシアミドメチル化後、トリプシン消化し、ペプチドを分離した。プロテインシークエンサー (G1000A, HEWLETT PACKARD) を用いて各ペプチドの N 末端アミノ酸配列を分析した。

(2) 多次元 HPLC 及び糖鎖データベースを利用した糖鎖解析

IgG, IgA 及びマウス脳由来タンパク質から glycoamidase A またはヒドラジン分解により遊離させた糖鎖を 2-アミノピリジンで標識し、多種類の HPLC カラム (DEAE, アミド, ODS) における溶出時間を糖鎖データベースと照合し糖鎖を同定した。

(3) NMR を利用した高次構造解析

¹³C と ¹⁵N で均一に標識された藻体の加水分解物に 7 種類の ¹³C, ¹⁵N 標識アミノ酸 (Arg, Asn, Cys, Gln, His, Trp, Tyr), [¹³C₃]ピルビン酸, [¹³C₄]コハク酸, [¹³C₆]グルコースを加えて調製した無血清培地中でハイブリドマを培養し、ポリペプチド鎖と糖鎖が ¹³C および ¹⁵N で均一に標識された IgG を 70 mg 調製した。様々な糖鎖前駆体 ([1-¹³C]グルコサミンなど) を用いた代謝標識および糖転移酵素反応を利用して、糖鎖部分選択的安定同位体標識を施した。IgG をパバインで限定分解して Fc を調製し、NMR 測定に供した。

(4) リン酸化プロテオーム解析を利用したバイオ医薬品の生物学的性質評価

NRK-49F 由来タンパク質から PhosphoProtein Purification Kit (キアゲン), PhosphoCruz (サンタクルズ), Phosphoprotein Enrichment Lit (カルピオケム) を使用してリン酸化タンパク質を抽出した。コントロールサンプルを Cy3, PDGF 刺激サンプルを Cy5 でラベルし、2次元ディファレンシャル電気泳動 (2D-DIGE), 及びタンパク質同定を行った。

ゲルイメージ解析, DeCyder-DIA version 3.0 software; MSⁿ, LCQ; データベース, NCBIInr; 検索エンジン, Mascot.

(5) バイオ医薬品の細胞基材評価技術の開発

① 抗体医薬品産生細胞選抜プロセスの効率化

ユーロピウム (Eu) 標識抗体, ビオチン化 anti-IgG モノクローナル抗体, アロフィコシアニン標識ストレプトアビジンを各 4 μl 添加した 96 穴ハーフウェルプレートに、ヒト抗体 (0.2~10.0 μg/ml) 2 μl を添加してインキュベーションした。EnvisionTM (PerkinElmer) を用いて、615 nm (Eu), 及び 665 nm (アロフィコシアニン) の蛍光強度を求めた。標準物質 (組換えヒト IgG) を用いて検量線を作成した。

② グライコミクスの技術を用いた細胞基材評価技術の開発

6種類の複合型2本鎖糖鎖含有糖ペプチドを5-Carboxyfluorescein succinidyl ester (5-FAM, 50 nmol)で標識し、5-FAM-Asn-glycopeptideとした。糖ペプチド混合物を糖ヌクレオチド、及び酵素溶液(2 µl)またはHCT15細胞可溶性画分(2 µl, 5×10⁵個)に加え、6時間反応させた。反応液をアルゴンレーザー励起蛍光検出P/ACE MDQ Glycoprotein System (Beckman Coulter)で分析した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各施設の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施し、倫理審査の承認を得て行った。また、ヒト由来の生体試料を用いた場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で行った。

C. 研究結果

(1) MSを利用したバイオ医薬品の構造解析・物理的・化学的性質評価法の開発

MSは日本薬局方一般試験法としてまだ記載されていないが、バイオ医薬品の構造解析、及び物理的・化学的性質評価法として欠かせない分析法である。本研究では、ペプチドマッピング(日本薬局方14局第二追補記載)にLC/MS/MSを導入し、さらに、プロテオミクス・構造生物学的手法を組み合わせることによって、新しい一次構造・翻訳後修飾・高次構造・不純物・類縁物質・分解物等評価法の開発を行った。

① プロテオーム解析用データベースを利用した一次構造・不純物解析

プロテオミクスでは、タンパク質酵素消化物のLC/MS/MSによって得られたプロダクトイオンを利用してデータベース検索し、タンパク質を同定する方法が利用されている。この技術を、バイオ医薬品の確認試験、及び不純物同定に応用することを検討した。

LC/MSⁿを用いて可変部の一次構造、及びサブタイプ未知のモノクローナル抗体のペプチドマッピングを行った。図1は、Full MS scanにより得られたベースピーククロマトグラム(上)、及びデータ依存的CID-MS/MS scanによって得られたトータルイオンクロマトグラム(TIC)である。ここで得られたMSⁿデータを用いてMascotによるデータベース検索を行ったところ、この抗体はマウスκ及びγ1からなるIgG1と同定された。図2は

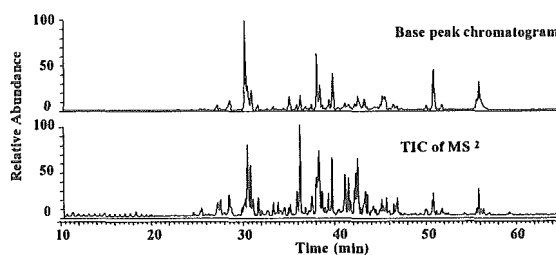
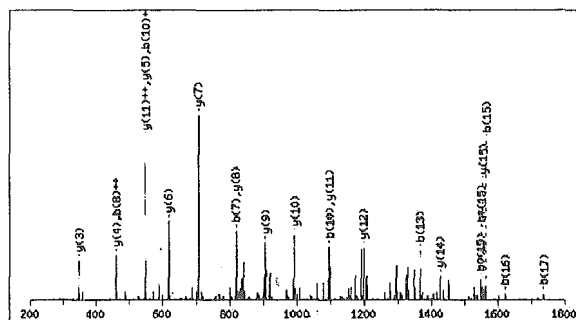


図1 LC/MS/MSを用いたモノクローナル抗体のペプチドマッピングフルスキャンのベースピーククロマトグラム(上)、データ依存的CID-MS/MSスキャンのTIC(下)



#	b	b ²⁺	b ³⁺	b ⁴⁺	b ⁵⁺	b ⁶⁺	b ⁷⁺	b ⁸⁺	b ⁹⁺	b ¹⁰⁺	b ¹¹⁺	b ¹²⁺	b ¹³⁺	b ¹⁴⁺	b ¹⁵⁺	b ¹⁶⁺	b ¹⁷⁺	b ¹⁸⁺	b ¹⁹⁺	b ²⁰⁺
1	116.03	58.52				98.02	49.52	D												
2	229.12	115.06				211.11	106.06	F	1795.89	898.45	1778.66	889.93	1777.87	889.44	17					
3	347.18	179.09	340.15	170.58		339.17	170.09	Q	1662.80	841.90	1665.77	833.39	1664.79	832.90	16					
4	465.22	244.61	471.19	236.10		470.21	235.61	M	1854.74	777.88	1837.72	769.36	1836.73	768.87	15					
5	589.27	295.14	572.24	286.62		571.25	286.13	T	1423.70	712.35	1406.68	703.84	1405.69	703.35	14					
6	717.32	359.17	700.39	350.65		699.31	350.16	Q	1322.65	661.83	1305.63	653.32	1304.64	652.83	13					
7	818.37	409.69	801.34	401.16		800.36	400.68	T	1194.60	597.80	1177.57	589.29	1176.59	588.80	12					
8	919.42	460.21	902.39	451.70		901.41	451.21	T	1093.55	547.28	1076.52	538.76	1075.54	538.27	11					
9	1096.45	549.73	989.42	495.22		988.44	494.72	S	901.50	496.75	975.47	488.24	974.49	487.74	10					
10	1093.48	547.25	1076.46	538.73		1075.47	538.24	S	905.47	453.24	888.44	444.72	887.46	444.23	9					
11	1206.57	603.79	1189.54	595.27		1188.56	594.75	L	818.44	409.72	801.41	401.21	800.43	400.72	8					
12	1293.60	647.30	1276.57	638.79		1275.59	638.30	S	705.33	353.18	688.33	344.67	687.34	344.17	7					
13	1364.64	682.82	1347.61	674.31		1346.63	673.82	A	618.32	309.66	601.29	301.15	600.21	300.66	6					
14	1451.67	726.34	1434.64	717.82		1433.66	717.33	S	547.28	274.15	530.26	265.63	529.27	265.14	5					
15	1564.75	782.85	1547.73	774.37		1546.74	773.87	L	460.25	230.63	443.22	222.12	442.24	221.62	4					
16	1621.77	811.39	1604.75	802.88		1603.76	802.39	G	347.17	174.09	330.14	165.57	329.16	165.06	3					
17	1736.80	865.90	1719.77	860.39		1718.79	859.90	D	290.15	145.58	273.12	137.06	272.14	136.57	2					
18								R	175.12	88.06	158.09	79.55			1					

図2 同定されたペプチドのプロダクトイオンスペクトルとプロダクトイオンの理論値(表)

同定されたペプチドの一つのプロダクトイオンスペクトルで、このペプチドの予想プロダクトイオンの理論値(図2表)によく一致していることから、このペプチドがDIQMTQTTSSLSASLGPRの配列を有していることが確認された。従来のUV検出に基づくペプチドマッピングの判定基準は、主なピークパターンが標準物質と類似していることであったが、MSⁿデータとデータベースを利用することによって、簡単にアミノ酸配列を確認できることが分かった。今回用いたモノクローナル抗体の可変部の同定率は、アミノ酸配列がデータベースに登録されていないので低かったが、抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品は全アミノ酸

配列が決定されているので、配列を予めデータベースに入力しておくことによって、全一次構造を迅速・簡便に確認することが可能になると期待される。また、不純物や類似物質が混在している場合、その同定に役立つものと思われる。

② 構造特異的フラグメントを利用した糖鎖解析

糖鎖部分は、有効性・安全性に影響を及ぼすことが知られているが、構造が複雑であるため、解析が困難である場合が多い。我々は、データ依存的 CID-MS/MS スキャンによって得られたペプチド由来プロダクトイオンの中から、糖鎖構造特異的イオン（例、 $[\text{HexNAc}]^+$ 、 m/z 204）を指標に糖ペプチドのプロダクトイオンを選び出すことによって、糖鎖不均一性、及び構造を解析できることを見出している。本研究では、この手法を一次構造未知で、かつ類似タンパク質混合物であるポリクローナル抗体に応用した。

LC/MS/MS を用いてヒトポリクローナル抗体トリプシン消化物のペプチドマッピングを行い、データ依存的 CID-MS/MS スペクトルの中から m/z 204 イオンを取り出したところ、7-12 分及び 18-21 分に糖ペプチドが溶出されていることが確認された（図 3）。図 4 は、18 分に検出された分子イオン $[m/z$ 1382.6] $^{2+}$ の MS/MS スペクトルである。これまで糖ペプチドの同定は困難とされてきたが、MS/MS スペクトルから糖鎖由来のフラグメントイオンを除き、親イオンとして m/z 1157.4 を設定し、Mascot データベース検索を行うことによって、このイオンピークを IgG2 の Fc 糖鎖結合部位を含むペプチド EEQFNSTFR と同定することに成功した。また、糖ペプチド及びペプチド部分の分子量から糖鎖部分の分子量（1624.7）を計算し、糖鎖の組成（ $[\text{Hex}]_4[\text{HexNAc}]_4[\text{Fuc}]_1$ ）を決定した。同様にして、7-12 分に溶出している糖ペプチドを IgG1 の Fc 糖鎖結合部位を含む糖ペプチド（EEQYNSTYR）と同定し、糖鎖構造を推定することができた。

以上の結果から、LC/MS/MS によるペプチド/糖ペプチドマッピングは、データベースを使用することによって、ペプチド同様に糖ペプチドのペプチド部分を同定し、糖鎖構造推定ができることが明らかになった。

③ Cross link 試薬を利用した高次構造解析

バイオ医薬品の活性発現において、立体構造の形成は最も重要な要素の一つである。MS3D は、立体構造を保持させたタンパク質に種々の cross link 試薬を反応させ、LC/MS を用いて修飾アミノ

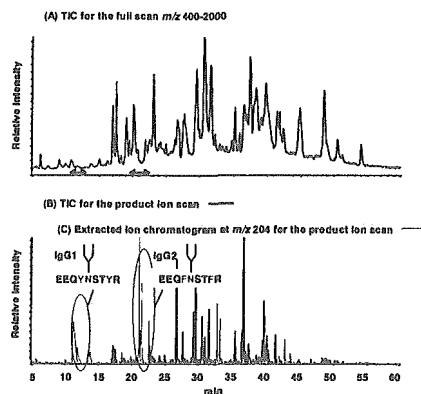


図 3 LC/MS/MS を用いたヒト IgG のペプチドマッピング フルスキャンの TIC (上) 及び m/z 204 のマスクロマトグラム

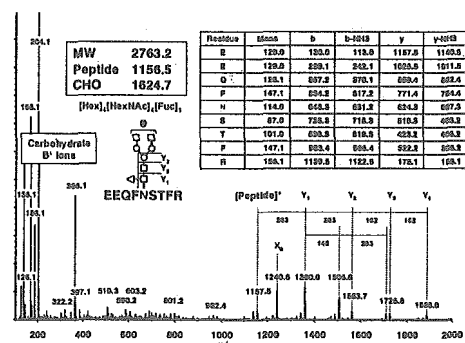


図 4 分子イオン (m/z 1382.6) のプロダクトイオンスペクトル 糖鎖構造 (挿入図) 及びプロダクトイオンの理論値 (表)

酸残基を特定し、cross link 試薬の spacer の長さから残基間の空間的な距離情報を求め、立体構造を類推する方法である。本研究では、MS3D のバイオ医薬品質保証への適用の可否を検討した。今回 cross link 試薬として用いた BS3 は、1 級アミノ基を修飾するものである。また、モデルとして用いた IFN α は、NMR や X 線結晶構造解析により立体構造が決定され、Protein Data Bank に登録されている。その IFN α のコンセンサス配列を有する CIFN には 9 つの Lys 残基が存在するので、BS 3 の反応部位は N 末端を加え 10 箇所になる。

まず、Intact 及び BS 3 修飾 CIFN のペプチドマッピングと ASAP 検索により分子内 cross linking を同定し、IFN α の立体モデル構造にマッピングした（図 5）。同定された K31 と K134 は、C29-C139 のジスルフィド結合のため、cross link が形成されやすい位置に存在する。K31-K135 結合は、K31 がループ構造の上に位置し、K135 がヘリックス末

端後の可動し易い場所に位置していることから、cross link を形成したものと考えられる。K31-K122 結合は立体構造モデル上では残基間距離が spacer の約 2 倍である上、K122 は非常に堅いヘリックスの中位に位置し、可動性が少ないことから、分子内ではなく、分子間 cross link の可能性が高い。

つぎに、intact CIFN と BS³ 修飾 CIFN のマスクロマトグラムを解析し、同定箇所を含むペプチドの相対残存率を求めたところ、残存率は 20% または 50% であり、ASAP 検索結果とよく一致することが分かった。

以上のことから、cross link 試薬による修飾と、LC/MS による残存率の算出は、高次構造確認に利用できることが示唆された。

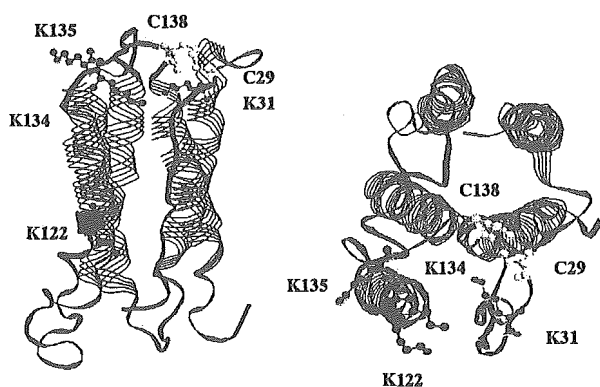


図5 インターフェロン α -2b の3次元構造
Side view (左) Top view (右)

④ 同位体標識を利用した分解物・類縁物質解析

タンパク質性医薬品の製造もしくは保存中に、多数の分解物が生じる。分解物の構造解析に MS は有用であるが、Asn の脱アミド化及び、Asp の異性化反応において生じる質量変化は小さい、もしくは質量変化を伴わないため、反応部位の同定が困難な場合がある。そこで、反応部位の同定方法の一つとして、 $H_2^{18}O$ 中で ^{18}O が分子内へ取り込まれる反応機構を利用した構造解析方法を検討した。

未処理の IgG 及び 50°C・1 カ月間保存試料をトリプシン消化し、ペプチドマッピングを行った。全ての Asn 及び Asp を含むペプチド断片のマスクロマトグラムを解析した結果、3 つのペプチド断片、H5、H32、L6 に分子量変化が認められた。H5 は、2 つの Asn 及び Asp のうち、1~複数のアミノ酸残基が反応したと推測された。H32 はペプチド内に

3 つの Asn 及び 1 つの Asp を含む。それらの 1~複数のアミノ酸残基が反応したと推測された。L6 はペプチド内に 1 つ存在する Asp が反応したと推測された。

以上のように、本試験方法を用いることによって、より明確に脱アミド化反応に伴う分子量増加を確認できることが示された。

⑤ プロテオミクスの技術を用いた新規タンパク質の特性解析

現行のインフルエンザワクチンは、発育鶏卵を培養基材とするため、ワクチンの製造に 9 ヶ月程度の時間を要すること、廃卵の処理に伴う環境負荷が大きいこと、残存する卵由来の不純物による副作用の心配があること、などの問題が存在する。現在、これらの問題解決のために、培養基材を発育鶏卵からイヌ腎臓由来 MDCK 細胞へ変更することを検討している。その過程で、MDCK 細胞にインフルエンザウイルス培養に必須のトリプシンを阻害する PI が存在することが明らかになったので、その特性解析を行った。

Heparin カラム・クロマトグラフィー、分子量測定、MS/MS 及びデータベース検索の結果、MDCK 細胞の培養上清には 2 種類の PI が存在し、既知の SPI (Submandibular proteinase inhibitor) と V¹GNAWKAGLCPSVPPDRCLSGFEKF²⁵ 配列を有する新規タンパク質であることが明らかになった。そこで、単離した 16 種のペプチドのアミノ酸配列を決定し、検索ソフト Genetyx を用いて GenBank の Web サイト上でイヌ・ゲノム遺伝子の TBLAST 検索を行ったところ、イヌ・ゲノム遺伝子、第 24 番染色体の Shotgun クローニング配列中に部分的に一致する配列が発見された。この PI は、ヒト SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) に類似するものであった。

(2) 多次元 HPLC、及び糖鎖データベースを用いた抗体糖鎖の分析

抗体医薬品の糖鎖部分は、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC 活性) に影響することが知られており、糖鎖構造解析と試験法の整備は必須である。そこで、糖鎖試験法として国内で最も利用されているピリジルアミノ化 (PA 化) と多次元 HPLC が、抗体医薬品の糖鎖解析及び糖鎖試験法としても利用可能であるかを、様々な抗体の糖鎖を分析することによって検証した。その結果、自己免疫疾患 ウェゲナー肉芽腫症患者由来の IgG では Fc 領域糖鎖の非還元末端ガラクトース含有量が減少していること、また、健常人の IgG ではフコシル糖鎖が主成分であるのに対し、IgG 型多発性骨髄腫の

患者では、フコースをもたない糖鎖が主成分であることが明らかとなった。さらに、IgA 腎症のN結合型糖鎖の25%は高マンノース型糖鎖であり、健常人のIgAの5%を大きく上回っていることが明らかとなった。このようにPA化と多次元HPLCにより、抗体の糖鎖の微細な変化を分析できることが明らかとなった。

また、細胞に発現する糖鎖特異的タンパク質解析法として、PA化及び多次元HPLCによる糖鎖解析法とプロテオミクスの技術を組み合わせた方法を開発し、脳特異的糖鎖BA-2結合タンパク質の探索を行った。

(3) NMR を利用したバイオ医薬品の高次構造解析

糖タンパク質をNMRにより解析するためには糖タンパク質を安定同位体標識することが重要になる。抗体のNMR解析にあたり、均一 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識Fc及び糖鎖に選択的な安定同位体標識を施したFc試料を調製した。HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, CBCANHをはじめとする各種3次元NMRスペクトルを解析することによりポリペプチド主鎖の連鎖帰属を行った。また、HCCH-COSY, HCCH-TOCSYなどにより糖鎖由来のシグナルの帰属を行った。帰属の確定したシグナルをプローブとして、糖鎖も含めたFcの高次構造と運動性を原子レベルで解析することが可能となった。例えばNMRシグナルの線幅の比較から、Fcに結合している2本鎖複合型糖鎖のMan α 1-6アームは、Man α 1-3アームと比べて極端に運動性が低いことが明らかとなった(図6)。さらに、Fcのポリペプチド主鎖NH基に由来するシグナルをプローブとして、グリコフォームの改変に伴ってポリペプチド鎖に誘起される高次構造変化を追跡した結果、糖鎖を還元末端側の2糖にまで短鎖化すると、糖鎖結合部位の遠位に存在するヒンジ領域にまで高次構造変化が誘起されることが明らかとなった(図7)。この領域はFc γ レセプターの結合部位にあたる。一方、IgGのFc γ レセプターとの結合能は糖鎖を2糖にまで短鎖化すると劇的に低下した。

このような糖タンパク質を対象とした安定同位体利用NMRの方法論は、バイオ医薬品の高次構造評価、及びリガンドとの相互作用解析へと応用することが可能である。

(4) リン酸化プロテオーム解析を利用したバイオ医薬品の生物学的性質評価技術の開発

リン酸化は、種々の代謝パスウェイ酵素の活性やシグナル伝達に関係しており、リン酸化タンパ

ク質発現解析は、薬剤の作用機序を考える上で重要である。今までに金属アフィニティーを利用する方法、抗リン酸化チロシン抗体を用いる方法、リン酸基を置換し化学修飾する方法などが報告されている。本研究では、これらの方法により、どの程度のリン酸化タンパク質が検出できるのか、また、リン酸化タンパク質の検出と2D-DIGEの併用は、バイオ医薬品の作用機序解析や活性、品質管理などに活用できるのかを検証した。

まず、3種類のリン酸化タンパク質濃縮キットの評価を行った。ラット脳から抽出したリン酸化タンパク質をSDS-PAGEで分析し、総タンパク質、

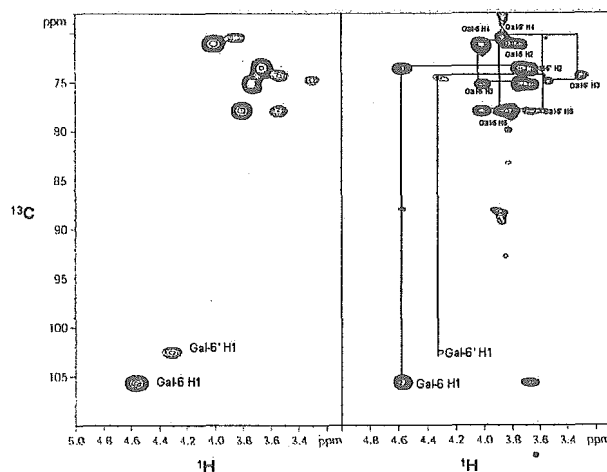


図6 Galを ^{13}C 標識したFcの $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQCスペクトル(左)とHCCH-COSYスペクトル(右)



図7 Fcに結合している糖鎖を2糖まで短鎖化した場合に化学シフト変化を示した残基(赤)のマッピング。Fc γ レセプター結合部位を丸で囲んだ

及びリン酸化タンパク質をそれぞれ Sypro Ruby 及び Pro-Q Diamond で染色した。各キットのアプリケーションサンプル及び素通りサンプルから Pro-Q 染色されるバンドは検出されなかったが、キアゲン社とサンタクルーズ社のキットで抽出されたサンプルからはバンドが検出され、リン酸化タンパク質が濃縮されていること、また、キアゲン社の方がバンドの数及び強度とも優れていることがわかった。

つぎに、モデル実験として、PDGF 刺激した NRK 細胞を用いて、2D-DIGE を行った。リン酸化タンパク質を濃縮することにより、変動するスポットの数が 27 個から 75 個に増えること、及び変動率が増加し、濃縮により今まで見えていなかった微量なタンパク質の変動が検出できるようになった (図 8)。変動した大部分のスポットが LC/MS/MS により決定できた。同定された多くのタンパク質はリン酸化修飾されることがすでに報告されているものであった。

以上のことから、リン酸化タンパク質の濃縮と 2D-DIGE は、リン酸化プロオテーム発現解析に有用であり、生物学的性質評価法として利用できる可能性が示唆された。

(5) バイオ医薬品の細胞基材評価技術の開発

① 抗体医薬品産生細胞選抜プロセスの効率化

抗体医薬品産生細胞の選抜プロセスには、これまで ELISA 法や Protein A 法が用いられてきた。ELISA 法は、前処理、洗浄などの煩雑な操作が伴うとともに、測定プレート間にレスポンスの差があること、また、Protein A 法は大きなサンプル液量を必要とするなどの問題点があった。そこで本研究では、細胞選抜プロセスの効率化を目指し、

より測定操作が簡便なホモジニアスアッセイ法を検討した。本分析法は、時間分解蛍光測定、及び蛍光共鳴エネルギー移動を組み合わせたものである。

本分析法の測定プレート内、及び測定プレート間精度が高いことが確認された。また、添加回収率の平均値は、添加した 3 水準の濃度において 90~100% で、その相対標準偏差 (CV) は 2~5% であった。インキュベーション時間がレスポンスに与える影響はほとんど認められなかった。4 種類の組換えヒト抗体生産細胞培養上清液を用いて、Protein A カラムを用いた定量法との定量値の比較を行ったところ、両法による平均値はよく一致していた。

以上のバリデーション結果と合わせて、今回検討したホモジニアスアッセイ法は、洗浄、分離操作が不要で、測定時間も短いことから、細胞選抜プロセスの効率化に役立つことが示された。

② グライコミクスの技術を用いた細胞基材評価技術の開発

バイオ医薬品の本質の多くは糖タンパク質である。タンパク質部分は人為的制御が可能であるが、糖鎖部分は、細胞が持つ糖転移酵素によって制御されるため、糖鎖部分の恒常性を維持するためには、培養細胞の糖転移酵素活性の一定性を保つことが重要である。糖鎖は、ゴルジ体においてさまざまなプロセッシングを受け生合成される。ゴルジ体におけるプロセッシングのうち、ガラクトース、フコース及びシアル酸の付加反応は、糖タンパク質の機能調節を司る重要な過程である。今回、アスパラギン結合型糖鎖の生合成に関わる糖転移酵素のうち、ガラクトース、フコース及びシアル酸

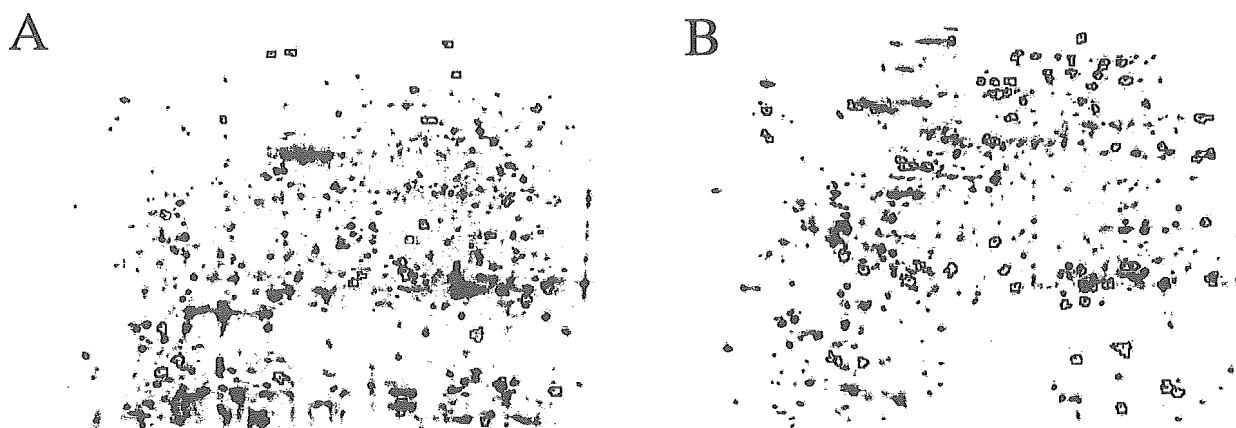


図 8 PDGF 刺激した NRK 細胞の 2 次元電気泳動
リン酸化タンパク質精製前 (左) 及びリン酸化タンパク質精製後 (右)

転移酵素に的を絞り、これらの酵素活性の一斉解析法について検討した。

はじめにモデル実験として、5-FAM-Asn-glycoprotein 6種類を含む混合物をβ1-4ガラクトース転移酵素、α2-3シアリルトランスフェラーゼ、またはα1-3フコシルトランスフェラーゼと反応させ、キャピラリー電気泳動により分析した。ガラクトース、シアリ酸、またはフコースが付加された糖鎖のピークが増加することが確認され、酵素の基質特異性をよく反映した結果が観察された。そこで、本分析法をヒト結腸癌由来 HCT15 細胞の可溶性画分中のガラクトシルトランスフェラーゼ活性測定に応用したところ、非還元末端に N-アセチルグルコサミンが露出した糖鎖 I のピークが完全に消失し、ガラクトースがそれぞれ1及び2残基付加された糖鎖が観察され、細胞中のガラクトース転移酵素活性を追跡できることを確認した (図9)。

以上のように、本分析法は細胞内糖転移酵素活性の測定にも応用できたことから、細胞基材の糖鎖に関する同等性評価法として利用できる可能性が示唆された。

D. 考察

本研究の目的は、プロテオミクスや構造生物学分野で利用されている MS, NMR 及び各種データベースをバイオ医薬品の特性解析・品質評価に活用し、バイオ医薬品研究開発、品質評価、及び品質管理の迅速化・簡便化・微量化・効率化・高精度化を図ることである。

第一に、MS, NMR, 及びデータベースを利用したバイオ医薬品の構造解析、及び物理的・化学的性質評価法について検討を行った。まず、一次構造確認試験として利用されているペプチドマッピングに、LC/MS/MS とデータベースを併用することによって、従来のピークパターン比較に基づく判定だけでなく、各ペプチドのアミノ酸配列や糖鎖確認に基づく判定基準の設定が可能となること、また、不純物・類縁物質の同定が容易になることが示唆された。また、プロテオミクス・グライコミクスで同定困難とされてきた糖ペプチドも、データを加工することによって、ペプチド同定が可能になることを見出した。さらに、cross link 試薬修飾と LC/MS により高次構造を確認できること、¹⁸O-水中での脱アミド化と LC/MS によって、タンパク質医薬品の分解物/類縁物質の構造解析が可能になることを見出した。つぎに、NMR による高次構造解析についても検討を行い、安定同位体標識を施した IgG の NMR 解析により、Fc 領域の動的高次構造を明らかにすることに成功した。

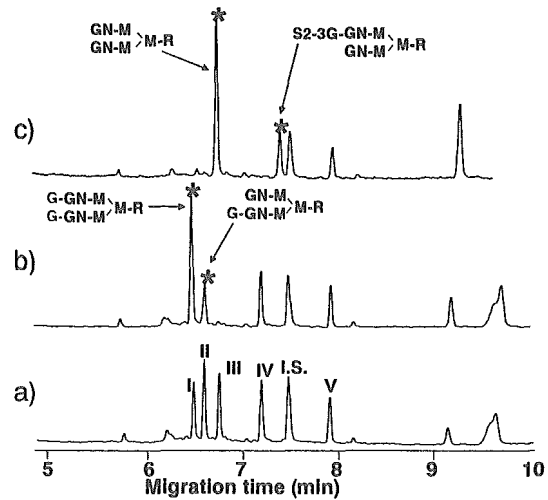


図9 キャピラリー電気泳動法による HCT15 細胞のガラクトシルトランスフェラーゼ活性測定
細胞可溶性画分非添加 (a), 細胞可溶性画分添加 (b), 細胞可溶性画分及び UDP-Gal 添加 (c)

第二に、リン酸化プロテオーム解析を基本とする生物学的性質評価法を検討した。PDGF 刺激によるモデル実験を行い、リン酸化タンパク質の濃縮、2D-DIGE 及び LC/MS/MS によるリン酸化タンパク質発現解析が、薬剤の作用機序解析、及び活性測定に利用できることが示唆された。

第三に、細胞基材評価法として、時間分解蛍光測定、及び蛍光共鳴エネルギー移動原理を応用した効率の組換えヒト抗体生産細胞選抜法、並びに糖転移酵素活性一斉測定を基本とした細胞糖鎖評価法を開発した。

これらの方法は、バイオ医薬品の研究開発において、構造解析、及び機能解析法として直ちに利用できるものであり、本研究の成果は、今後の日本薬局方における一般試験法やバイオ医薬品の試験法の整備に貢献できるものと期待される。

E. 結論

LC/MS を用いたペプチドマッピングとデータベース検索、CID-MS/MS による構造特異的解析法、cross link 修飾法、または H₂¹⁸O による同位体標識法を組み合わせたバイオ医薬品の一次構造、翻訳後修飾、高次構造、不純物・類縁物質・分解物解析法を開発した。糖鎖解析法として、グライコミクスで利用されている多次元 HPLC 法及び糖鎖データベース検索が有用であること、また、リン酸化プロテオーム解析を利用した生物学的性質評価法において、リン酸化タンパク質濃縮と 2D-DIGE が有用であることを実証した。さらに、ホモジニアスアッセイ法、及び糖転移酵素一斉分析に基づくバイオ医薬品産生細胞基材評価法を開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harazono, A., Kawasaki, N., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI-MS/MS, *Glycobiology*, in Press.
- 2) Yuan, J, Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Kawanishi, T., Hayakawa, T.: Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, in Press.
- 3) Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H., Itoh, S., Kawasaki, N., Kawanishi, T., Hayakawa, T., Kohno, Y., Urisu, A., Sawada, J.: Kinetic analysis of peptide digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential pepsin fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 136, 23-32 (2005)
- 4) Itoh, S., Harazono, A, Kawasaki, N., Hashii, N., Matsuishi, Y., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS. Analysis of glycosylation sites and of site-specific heterogeneity, *J. Electrophoresis*, 48, 163-168 (2004)
- 5) Kawasaki, N., Hashii, N., Itoh, S., Hyuga, M., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography / mass spectrometry, *J. Electrophoresis*, 48, 5-10 (2004)
- 6) Hyuga, M., Hyuga, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Niimi, N., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: Enhancement of hepatocyte growth factor-induced cell scattering in N-acetylglucosaminyltransferase III-transfected HepG2 cells, *Biol. Pharm. Bull.* 27, 781-785 (2004)
- 7) Hyuga, M., Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Ishii, A., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Analysis of site-specific glycosylation in recombinant human follistatin expressed in Chinese hamster ovary cells, *Biologicals*, 32, 70-77 (2004)
- 8) Kobayashi, T., Kawai, H., Suzuki, T., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: Improved sensitivity of insulin in MALDI-TOF MS by premixing matrix CHCA with transferring, *Rapid. Com. In Mass Spec.*, 18, 1156-1160 (2004)
- 9) Kamoda, S., Nomura, C., Kinoshita, M., Nishiura, S., Ishikawa, R., Kakehi, K., Kawasaki, N., Hayakawa, T.: Profiling analysis of oligosaccharides in antibody pharmaceuticals by capillary electrophoresis *J. Chromatogr A*. 1050, 211-216 (2004)
- 10) Gao Y, Eguchi A, Kakehi K, Lee YC Efficient preparation of glycoclusters from silsesquioxanes *Org Lett.* 6, 3457-3460 (2004)
- 11) Matsuno YK, Kinoshita M, Kakehi K Electrophoretic analysis of di- and oligosaccharides derived from glycosaminoglycans on microchip format *J Pharm Biomed Anal.* 36, 9-15 (2004)
- 12) Nakajima K, Kinoshita M, Oda Y, Masuko T, Kaku H, Shibuya N, Kakehi K. Screening method of carbohydrate-binding proteins in biological sources by capillary affinity electrophoresis and its application to determination of *Tulipa gesneriana* agglutinin in tulip bulbs *Glycobiology*. 14, 793-804 (2004)
- 13) Hayashi T, Yasueda S, Nakanishi Y, Ohta H, Kinoshita M, Miki Y, Masuko T, Kakehi K. Capturing of acidic macromolecules from biological samples using a temperature-responsive polymer modified with poly-l-lysine *Analyt.* 129, 421-427 (2004)
- 14) Nakano M, Kakehi K, Tsai MH, Lee YC. Detailed structural features of glycan chains derived from alpha1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues *Glycobiology*. 14:431-441 (2004)
- 15) Kawabata A, Nishikawa H, Saitoh H, Nakaya Y, Hiramatsu K, Kubo S, Nishida M, Kawao N, Kuroda R, Sekiguchi F, Kinoshita M, Kakehi K, Arizono N, Yamagishi H, Kawai K. A Protective role of protease-activated receptor 1 in rat gastric mucosa *Gastroenterology*. 126:208-219 (2004)
- 16) Sasaki, A., Ishimizu, T., Geyer, R., and Hase, S.: Synthesis of beta-mannosidase using the transglycosylation activity of endo-beta-mannosidase from *Lilium longiflorum*. *FEBS J.* in press
- 17) Ishimizu, T., Uchida, T., Sano, K., and Hase, S.: Chemical Synthesis uridine 5'-diphospho-alpha-xylopyranose. *Tetrahedron Asymmetry*, 126, 309-311 (2005)
- 18) Takemoto, T., Natsuka, S. Nakakita, S., and Hase, S.: Expression of complex-type N-glycans in developmental periods of zebrafish embryo. *Glycoconjugate J.*, 22, 21-26 (2005)
- 19) Sasaki, A., Ishimizu, T., Hase, S.: Substrate specificity and molecular cloning of endo-beta-mannosidase acting on N-glycan in *Lilium longiflorum*. *J. Biochem.*, 137, 87-93 (2005)
- 20) Kitamura, M., Hojo, H., Nakakita, Y., Ishimizu, T., and Hase, S.: Synthesis and conformational characterization of the epidermal growth factor-like domain of blood coagulation factor IX carrying xylosyl-glucose. *Glycoconjugate J.*, 2004, 21, 197-203 (2004)
- 21) Akemura, T., Hojo, H., Kamakita, y., Ishimizu, T., and Hase, S.: Application of fmoc-amino acid carrying an unmasked carbohydrate to the synthesis of the epidermal growth factor like domain of bovine blood coagulation factor IX. *Org. Biomol. Chem.*, 2, 133-136 (2004)
- 22) Ishimizu, T., Sasaki, A., Okutani, S., Maeda, M., Yamaguchi, M., and Hase S.: Endo-beta-mannosidase, a plant enzyme acting on N-Glycan, Molecular cloning and characterization. I. *Biol. Chem.*, 279, 38555-38562 (2004)
- 23) 中北慎一, 長東俊治, 池中一裕, 長谷純宏: 脳特異的糖鎖と生合成に関わる“脳型”ガラクトース転移酵素. *生物物理化学*, 48, 1-4 (2004)
- 24) Ishimizu, T., and Hase, S.: Pectin biosynthesis. In *advances in plant physiology*. Vol. 7, (Ed. Hemantarajan, A) Scientific Publishers. Jodhpur, India, 183-201 (2004)
- 25) Kato, K., Yamaguchi, Y., Takahashi, N., Nishimura, M., Iwamoto, E., Sekiya, S., and Tanaka, K. (2004) Discrimination of isomeric fragment ions observed in tandem mass spectra of biantennary oligosaccharides by use of selective isotope labeling. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 52, 284-288
- 26) Yamaguchi, Y., and Kato, K. (2005) in *Handbook of modern Magnetic Resonance*, in press
- 27) Mizushima, T, Hirano, T, Yashida, Y., Lee, S. J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Tsukuhara, T., and Tanaka, K. (2004) Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11, 365-370

2. 学会発表

- 1) Kawasaki, N., Harazono, A., Hashii, N., Itoh, S., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS. 第2回ヒトプロテオーム学会 (2004. 5) 東京
- 2) 川崎ナナ: 糖タンパク質の質量分析. 第54回日本電気泳動学会シンポジウム(2004. 6) 横浜
- 3) 川崎ナナ: LC/MSによる糖タンパク質の糖鎖解析. シンポジウムゲノムと生物機能 (2004. 7) 札幌
- 4) Kawasaki, N., Hashii, N., Itoh, S., Harazono, A., Matsuishi, Y., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: Isotope tag method for quantitative glycome analysis by LC/MS. 1st Workshop for human disease glycomics/proteome initiative of HUPO. (2004. 8) Osaka
- 5) Terada, M., Inoue, R., Kadowaki, N., Khoo, K., Kawasaki, N., Kawasaki, T., and Kawasaki, N.: Characterization of mannose-binding protein ligands expressed on human colon cancer cells. 第77回日本生化学会大会 (2004. 10) 横浜
- 6) Harazono, A., Kawasaki, N., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: Site-specific glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: Identification of glycopeptides on the basis of product ion spectra. 第77回日本生化学会大会 (2004. 10) 横浜
- 7) Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: Profiling of N-glycans in kidney of mice by GCC-LC/MS. 第77回日本生化学会大会 (2004. 10) 横浜
- 8) Takehara, Y., Kawasaki, N., Hashii, N., Kawanishi, T., Nomura, K., Matsushita-Oikawa, H., and Ogawa, H.: Characterization of the glycans of bovine erythrocyte membrane glycoprotein. 第77回日本生化学会大会 (2004. 10) 横浜
- 9) Itoh, S., Kawasaki, N., Hashii, N., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: N-glycosylation analysis of glycoprotein in polyacrylamide gel by LC/MS. 第77回日本生化学会大会 (2004. 10) 横浜
- 10) Harazono, A., Kawasaki, N., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: Site-specific N-glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI/MS/MS. Joint meeting of the Japanese and American consortia for glycomics. (2004. 11) Hawaii
- 11) 野村和子, 水口惣平, 安藤恵子, 三谷昌平, 平林義雄, 松石 紫, 川崎ナナ, 出嶋克史, 野村一也: 二次元電気泳動を用いた線虫 Acetyl CoA トランスポーターの解析. 第27回日本分子生物学会年会 (2004.12) 神戸
- 12) 川崎ナナ, 原園 景, 伊藤さつき, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: 抗体の LC/MS. バイオロジクスフォーラム第2回学術集会「新しいバイオロジクスの開発動向と規制」(2004. 11) 東京
- 13) 川崎ナナ: 糖鎖結合部位と糖鎖の解析. タンパク質研究所セミナー「翻訳後修飾のプロテオミクス」(2005. 1) 大阪
- 14) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: LC/ESI/MS/MSによるヒト Ceruloplasmin の部位特異的糖鎖解析. 日本薬学会第125年会(2005. 3) 東京
- 15) 小林 哲, 河合 洋, 鈴木琢雄, 川西 徹, 早川堯夫: Protein signal enhancement in MALDI-TOF MS. 第52回質量分析総合討論会 (2004, 6) 名古屋
- 16) 小林 哲, 河合 洋, 鈴木琢雄, 川西 徹, 早川堯夫: MALDI-TOF MSにおけるタンパク質のシグナル増強 Part2, 日本薬学会第125年会(2005. 3) 東京
- 17) Yamaguchi, Y., Nishimura, M., Hirao, T., Kato, K.: Development and application of NMR techniques for structural glycoproteomics, Pharmaceutical Sciences World Congress, 2004年6月 (京都)
- 18) Yagi, H., Takahashi, N., Yamaguchi, Y., Kimura, N., Kannagi, R., Kato, K.: Development and application of multi-dimensional HPLC mapping of N-linked glycans, Pharmaceutical Sciences World Congress, 2004年6月 (京都)
- 19) Kato, K., Yamaguchi, Y., Hirao, T., Kamiya, Y., Yagi, H., Takahashi, N.: An NMR approach to structural glycomics, The 1st Human Disease Glycomics/Proteome Initiative Workshop, 2004年8 (大阪)
- 20) 加藤晃一, 西村真美子, 長野真弓, 山口芳樹, 高橋 禮子: 抗体のNMR分析, バイオロジクスフォーラム第2回学術集会, 2004年11月 (東京)
- 21) 山口芳樹, 西村真美子, 長野真弓, 矢木宏和, 高橋 禮子, 内田和久, 設楽研也, 加藤晃一: 免疫系タンパク質の分子認識における糖鎖修飾の役割. 第27回日本分子生物学会年会, 2004年12 (神戸)
- 22) 長野真弓, 西村真美子, 山口芳樹, 高橋 禮子, 内田和久, 設楽研也, 加藤晃一: グライコフォームの変化に伴う IgG-Fc の高次構造変化のNMR解析: 日本薬学会第125年会 2005年3月 (東京)
- 23) 加藤晃一, 山口芳樹, 高橋 禮子: NMR と糖鎖ライブラリーを利用した構造グライコミクスへのアプローチ. 日本薬学会第125年会, 2005年3月 (東京)
- 24) Natsuka, S., Ishida, M., Ichikawa, A., Kura, K., and Hase, S.: Structure analysis of squid N-glycans from comparative biochemical view. 22nd International carbohydrate symposium July 2004 (Glasgow)
- 25) Ohashi, T., Ishimizu, T., and Hase, S.: Characterization of polygalacturonic acid synthase from pea epicotyl. X cell wall meeting August 2004 (Sorrento)
- 26) Ishimizu, T., Sasaki, A., Okutani, S., Maeda, M., Yamagishi, M., and Hase, S.: Endo-beta-mannosidase, A plant enzyme acting on N-glycan: purification, substrate specificity, and molecular cloning. US/Japan Glyco 2004, 2004.11 (Hawaii)
- 27) Natsuka, S., and Hase, S.: Structure analysis of invertebrate N-glycan by comparative biochemical view. Satellite symposia from chemistry to systems glycobiology. November 2004 (Hawaii)

G. 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