

- cgi?MODE=hourei&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=462)
- 18) 治験薬の製造管理及び品質管理基準並びに治験薬の製造施設の構造設備基準、厚生省薬務局長通知 薬発第480号, 1997 ([http://www.hourei.mhlw.go.jp/%7Ehourei/cgi-bin/t\\_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3213](http://www.hourei.mhlw.go.jp/%7Ehourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3213))
- 19) 臨床研究に関する倫理指針、厚生労働省告示 第255号, 2003 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/2003/07/d1/tp0730-2b.pdf>)
- 20) ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律、法律第146号, 2000 ([http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/main.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/main.htm))
- 21) ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針、文部科学省告示 第155号, 2001 ([http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/main.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/main.htm))
- 22) 特定胚の取扱いに関する指針、文部科学省告示 第173号, 2001 ([http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/main.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/main.htm))
- 23) 総合科学技術会議 生命倫理専門調査会：ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方(中間報告書)、2003 (<http://www.8.cao.go.jp/cstp/tyousakai/life/pubcom/chukan.pdf>)
- 24) 丸山英二：わが国の医学・生命科学に関する政府指針、ジュリスト 1247: 37-48, 2003

TOPICS

# バイオ医薬品の現状と将来

早川 堯夫・石井 明子

バイオ医薬品とは、生命現象の分子的解明を基にバイオテクノロジーなどの先端技術を応用して製造される医薬品を指す。具体的には、①組換え細胞や培養細胞などの細胞基材より生産されるタンパク質性医薬品(ホルモン、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、ワクチン、抗体など)、②遺伝子治療薬、③細胞治療薬・医療機器、④トランスジェニック(Tg)動物/植物由来タンパク質性医薬品、⑤ Tg 動物由来細胞治療薬など、⑥核酸医薬品(アンチセンス、リボザイム、siRNA、デコイ、DNA ワクチン)などがあげられる。

1980年代以降、まず、遺伝子組換え技術などを応用して、従来の手法では入手困難であったヒト型のタンパク質や微量活性タンパク質が組換え大腸菌や動物細胞から生産され、医薬品として臨床

に供された。その後さらに、ヒト型のモノクローナル抗体、遺伝子治療薬や細胞治療薬などがバイオ医薬品として開発されてきた(表1)<sup>1)</sup>。

ポストゲノム時代を迎えて、生命現象の維持に関与し、あるいは疾患に関連する新たな遺伝子やタンパク質の探索および機能解明が熾烈な国際競争となっている。機能が明らかにされた新たな遺伝子やタンパク質に医療上の有用性が期待される場合には、それ自体あるいは誘導体を有効成分とする遺伝子治療薬やタンパク質性医薬品が開発される。また、新機能遺伝子で改変された細胞が細胞治療や再生医療に活用されることも考えられる。さらに、疾患関連タンパク質などを分子標的として制御する抗体医薬品や、特定の遺伝子発現を制御する塩基配列を有する各種核酸医薬品など

表1 わが国で臨床応用されているバイオ医薬品など(分類と代表的な効能・効果)

<p>●細胞基材由来タンパク質性医薬品</p> <p>酵素：t-PA/ウロキナーゼ(急性心筋梗塞)、グルコセレブロシダーゼ(ゴーシェ病)</p> <p>血液凝固因子：血液凝固第Ⅶ/Ⅷ因子(血友病)</p> <p>ホルモン：インスリン(糖尿病)、成長ホルモン(下垂体性小人症)、ソマトメジンC(高インスリン血症、成長障害)、ナトリウム利尿ペプチド(急性心不全)、グルカゴン(低血糖時の救急処置)</p> <p>ワクチン：A/B型肝炎ワクチン(A/B型肝炎の予防)</p> <p>サイトカイン：インターフェロン<math>\alpha</math>(B/C型慢性肝炎、腎癌)、インターフェロン<math>\beta</math>(多発性硬化症)、インターフェロン<math>\gamma</math>(腎癌、菌状息肉症)、エリスロポエチン(腎性貧血)、G-CSF(癌化学療法による好中球減少)、インターロイキン-2(血管肉腫、腎癌)、bFGF(褥瘡、皮膚潰瘍)</p> <p>モノクローナル抗体：抗HER2抗体(転移性乳癌)、抗CD20抗体(リンパ腫)、抗RSウイルス抗体(RSウイルス感染)、抗TNF<math>\alpha</math>抗体(関節リウマチ、クローン病)、抗CD25抗体(腎移植後の急性拒絶反応)</p>
<p>●遺伝子治療薬(臨床研究および計画段階のもの：20プロトコール)</p> <p>ベクター(件数)：アデノウイルス(9)、レトロウイルス(6)、センダイウイルス(1)、プラスミド(2)、リボソーム(2)</p> <p>対象疾患(件数)：癌(14)、遺伝性疾患(3)、血管関連疾患(3)</p>
<p>●細胞治療薬など(治験および臨床研究段階のもの)</p> <p>培養皮膚(皮膚潰瘍、熱傷など)、樹状細胞(多発性骨髄腫、前立腺癌)、軟骨細胞(軟骨損傷など)、リンパ球から細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導し癌治療など、骨髄細胞より軟骨/骨芽細胞/血管/皮膚などに分化させ適用、角膜の再生</p>

の開発も期待される。

一方、幹細胞などを基にした細胞治療や再生医療のための各種細胞・組織製品、バイオ製品(たとえば細胞)と医療機器あるいは異なるバイオ製品を組み合わせた複合型の製品、癌ワクチン、異なるタンパク質の機能ドメインを組み合わせた製品、糖鎖改変タンパク質、新規担体の利用などによる製剤学的工夫を施された製品なども開発されると想定される。

新規バイオ医薬品の開発・臨床応用においては、急速な学問と技術の進歩に応じた品質・安全性確保策という科学面での課題はもとより、適正な規制・基準の設定、ヒトの遺伝子や細胞・組織を操作し、個人の遺伝情報を扱ううえでの社会的理解や認知、および倫理的妥当性の確保という課題があり、関係者の英知を結集して解決していく必要がある<sup>2,3)</sup>。



- 1) 早川堯夫, 他: 先端的バイオロジクス開発の現状と新たなバイオ創薬に向けての課題. 医薬品研究 33(11): 693-729, 2002.<遺伝子組換えを含めた最新技術を応用した医薬品開発の現状と今後の展望が書かれている>
- 2) 早川堯夫, 他: 生物薬品の開発の現状とトランスレーショナルリサーチへの条件. 医学のあゆみ 200(7): 539-543, 2002.<先端技術を応用した医薬品開発における探索的臨床研究の意義や課題について述べられている>
- 3) 早川堯夫: バイオテクノロジー応用医薬品. 内藤周幸(編): 臨床試験 2003, pp157-179, 薬事日報社, 2003.<バイオテクノロジーを応用して生産した医薬品について, 医薬品の特徴と臨床試験実施上の留意点が述べられている>

はやかわ たかお, いしい あきこ  
国立医薬品食品衛生研究所  
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1  
Tel: 03-3700-2859 Fax: 03-3700-1340

## ●臨床医・研究者・教育者として生きたオスラー博士の講演集

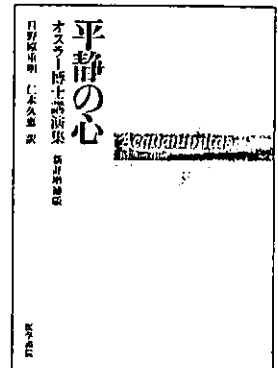
# 平静の心

オスラー博士講演集 新訂増補版  
Aequanimitas

新刊

著 William Osler  
訳 日野原重明 聖路加国際病院名誉院長・理事長  
仁木久恵 前東海大学教授

臨床医・研究者・教育者として生きたウィリアム・オスラー博士の講演集。「平静の心」の新訂版発行後に判明した新知見などをとに、訳・註を全面的に見直した。



●A5 頁624 2003年  
定価3,990円(本体3,800円+税5%) [ISBN4-260-12708-X]



医学書院 〒113-8719 東京都文京区本郷5-24-3 (販売部) TEL 03-3817-5657 FAX 03-3815-7804  
E-mail sd@igaku-shoin.co.jp http://www.igaku-shoin.co.jp 振替 00170-9-96693

## バイオ創薬の新たな展開と 効果的な推進に向けて

早川 堯夫

現在は創薬史上に類のない時機である。ゲノム解読後のゲノム科学をベースにした創薬、幹細胞学の発展などをベースにした細胞治療や再生医療用の製品開発、その他の生命科学や先端技術の進展を背景にした創薬など、いずれも熾烈な国際的競争が展開されている。医薬品などが疾病の予防、診断、治療を通して保健衛生の向上に寄与するものであり、それゆえに人類に恩恵をもたらす共通の資産であるという本質を考えれば、創薬が国際競争により推進されることは、当然望ましいことである。わが国としては、科学技術立国を目指すということも含めて、米・欧に伍して、産・官・学あげてこの課題に取り組む必要がある。

創薬は、シーズ探索・発見と、およびそれをもとにした医薬品候補の探索・選択・最適化、製法の検討、品質・有効性・安全性評価という二つのステージに大別される。

ゲノム科学をベースにした創薬の場合、第1のステージは、疾患や薬物の作用、生体の恒常性維持に関する新規遺伝子や蛋白質の探索とその機能解明である。このためには、各種ゲノミクス、プロテオミクス、バイオインフォマティクスなどの包括的・網羅的なアプローチや、これらにより絞り込み、推定された遺伝子や蛋白質機能の実証的な解析・確認が必要とされる。しかし、キーとなる“機能の実証的解析・確認”は、

適切な技術基盤が必ずしも十分に開発、整備されておらず律速段階となっている。したがって、この点をブレイクスルーすれば、米・欧に匹敵する“新規日の丸遺伝子や蛋白質”を見いだすことも可能であり、わが国独自の技術開発や研究の進展に期待したい。

第2のステージは、明らかにした遺伝子や蛋白質の機能に基づく創薬である。その際、機能が明らかにされた新たな遺伝子、蛋白質、関連機能分子自体が医薬品候補(有効成分)となるケースや、新たに機能解明された遺伝子や蛋白質を分子標的としてこれらを制御できるもの、たとえば、アンチセンスやsiRNAなどの核酸、抗体類、分子標的の化学合成品、

テーラーメイド型製品などが医薬品候補となるケースが考えられる。第2ステージで最も重要なことは、有効性・安全性確保の観点から最終的にあるべき薬剤の姿を想定しながら開発を進めることであり、そこでDDS研究の果たす役割は大きい。

医薬品は有効成分によって第1の特性を与えられるが、DDS技術によって第2の特性を与えられる。それは、臨床目的に応じた薬物治療の最適化、究極的には、必要な場で、必要な時間、必要な濃度で有効成分が作用するという特性の賦与である。蛋白質性医薬品、核酸医薬品、遺伝子治療薬、分子標的薬などは有効成分において画期的なものであるとともに、DDS研究による適切な特性の賦与により最も有効に活用される先端的医薬品となるものが多い。また、細胞をベースにした製品のあるものは、適用された生体側とのコミュニケーションにより効能効果を示すという理想的な薬剤を目指すものである。最適なDDSは集学的に統合化して達成されるが、わが国には充実した研究基盤があり、世界をリードできる潜在力がある。

新規遺伝子・蛋白質機能解明や再生医学・細胞治療に有用な細胞の開発と、DDS研究の推進・統合により、わが国のバイオ創薬が効果的に推進され、国益に適うとともに、平和的で素晴らしい国際貢献にもなることを心から期待したい。



はやかわ たかお  
国立医薬品食品衛生研究所副所長

## LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによるグライコーム解析

川崎ナナ・橋井則貴・伊藤さつき・日向昌司・川西 徹・早川堯夫

## SUMMARY

Liquid chromatography/mass spectrometry equipped with a graphitized carbon column is useful for the simultaneous analysis of oligosaccharides. By using capillary column and nanoelectrospray ion source, the method can be used for the oligosaccharide profiling of sub microgram quantities of glycoproteins. This oligosaccharide profiling is expected to be a powerful tool for the glycome analysis. We demonstrate a potential application of oligosaccharide profiling in glycomics with two examples, the structural analysis of *N*-linked oligosaccharides from a gel-separated glycoprotein, and the differential analysis of *N*-linked oligosaccharides in cells.

Key words: LC/MS, oligosaccharide profiling, 2-dimensional electrophoresis, glycomics.

## はじめに

糖タンパク質の糖鎖の構造や不均一性は、発生・加齢・疾病等に関連して変化することが知られている<sup>1)</sup>。しかし、従来のプロテオミクス的アプローチ、すなわち、2次元電気泳動 (2-DE) 等でタンパク質発現量を比較し、差異の認められたタンパク質を質量分析法 (MS) とデータベース検索により同定するという方法<sup>2)</sup>では、糖鎖の変化によって引き起こされる生命現象を捉えることはできない。糖タンパク質の糖鎖部分に関係する様々な現象を解明するには、糖鎖の定性的・定量的解析に基づくグライコーム解析技術の開発が不可欠である。

MS と液体クロマトグラフィー (LC) をオンラインで結んだ LC/MS は、分子量情報だけでなく、多くの異性体が存在する糖鎖の詳細な構造や不均一性に関する情報を提供してくれることから、今後、糖鎖生物学分野においても有力なツールとなることが期待されている。我々は、極性物質の吸着能が高く、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) に適した溶媒で糖鎖を分離・溶出できるグラファイトカーボンカラム (GCC) を用いることによって、高マンノース型、複合型、混成型糖鎖や、酸性糖鎖、中性糖鎖など様々な糖鎖

を一度に分離・検出できる糖鎖プロファイリング法を開発した<sup>3,4)</sup>。この糖鎖プロファイリング法は、グライコーム解析の様々なステップにおいても役立つと思われる。本稿では、グライコーム解析における糖鎖プロファイリングの可能性として、2-DE で分離されたゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析に応用した例と、細胞発現糖タンパク質の糖鎖の差異解析に応用した例を紹介する。

## I. ゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析

## 1. 糖鎖プロファイリング法の微量化

一般に 2-DE とクマシーブルー (CBB) 染色によって検出可能な糖タンパク質量は 1  $\mu$ g 程度といわれているが、ゲルからの回収率や操作中の損失等を考慮に入れると、サブマイクログラムのタンパク質に由来する糖鎖を解析できる分析システムが必要となる。そこで、キャピラリーカラムとナノスプレーイオン源を用いて、糖鎖プロファイリングの微量化を検討した。

NS0 細胞産生遺伝子組換え型ヒト肝細胞増殖因子 (HGF) に *N*-グリコシダーゼ F (PNGase F) を作用させて *N* 結合糖鎖を切り出し、anomer の分離を避けるため NaBH<sub>4</sub> で還元した。200 ng の HGF に由来する糖鎖を GCC-LC/MS を

Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography/mass spectrometry.

Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa; 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

Correspondence address: Nana Kawasaki; Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

第 53 回日本電気泳動学会シンポジウム

(受付 2003 年 11 月 13 日, 受理 2003 年 11 月 20 日, 刊行 2004 年 3 月 15 日)

用いて分析したところ、トータルイオンクロマトグラム (TIC) 上に2つの大きなピークと、複数の小さいピークが確認された (Fig. 1A). ピーク A は、マススペクトル (Fig. 1B), 及びプロダクトイオンスペクトル (Fig. 1C) から、*N*-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) 及びヘキソース (Hex)-Hex を部分構造とする複合型糖鎖であることが示唆された. 他のピークについても同様に、NeuGc 及び Hex-Hex 構造が存在することが推定された. そこで、Hex-Hex 構造を確認するため、糖鎖を  $\alpha$ -ガラクトシダーゼで消化し、再度 LC/MS で分析を行ったところ、Fig. 1A 上で検出されたピークが消失し、新たに複数のピークが出現することが確認された. これらのピークの分子量は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ消化前の糖鎖から Gal が1または2分子消失した糖鎖の分子量に一致することから、HGF の非還元末端には1または2分子の Gal が  $\alpha$  結合していることが確認された<sup>5)</sup>. NS0 細胞産生糖タンパク質には Gal $\alpha$ 1-3Gal を含む糖鎖が結合していることが報告されており<sup>6,7)</sup>、今回検出された Hex-Hex も Gal $\alpha$ 1-3Gal 結合であると推定された. これらのことから、ピーク A の糖鎖構造は Fig. 1C 上図のように推定され、他のピークについても、NeuGc 及び Gal $\alpha$ 1-3Gal 結合を部分構造とする複合型糖鎖であると考えられた.

以上のように、キャピラリーカラムとナノスプレーイオ

ン源を用いることによって、サブマイクログラムの糖タンパク質の糖鎖のプロファイリングが可能となった. また、LC/MS/MS, 及びエキソグリコシダーゼ消化と LC/MS を組み合わせることによって、より詳細な構造情報が得られることが確認された.

## 2. ゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析

つぎに、GCC-LC/MS を用いた電気泳動ゲル内糖タンパク質の糖鎖のプロファイリングを検討した. 2  $\mu$ g のヒト黒色腫細胞産生ヒト組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA) を SDS-PAGE で展開し (Fig. 2A), ゲル内 PNGase F 消化により糖鎖を切り出した. NaBH<sub>4</sub> 還元糖鎖を LC/MS で分析したところ Fig. 2B のような糖鎖プロファイルが得られ、ゲルから抽出された tPA の糖鎖の分離パターンは、泳動前の分離パターンとほぼ同様であることが確認された.

以上のように、CBB 染色される程度の糖タンパク質があれば、ゲル内タンパク質であっても、GCC-LC/MS による糖鎖プロファイリングが可能であることが確認された. ゲル内タンパク質糖鎖の解析法として、2-aminobenzamide 誘導体化後、イオン交換や順相 LC で分離し、オフライン MALDI-TOFMS で解析する手法が報告されている<sup>8)</sup>. 我々は、GCC-LC/MS を用いた解析は誘導体化における糖鎖の分解が生じ

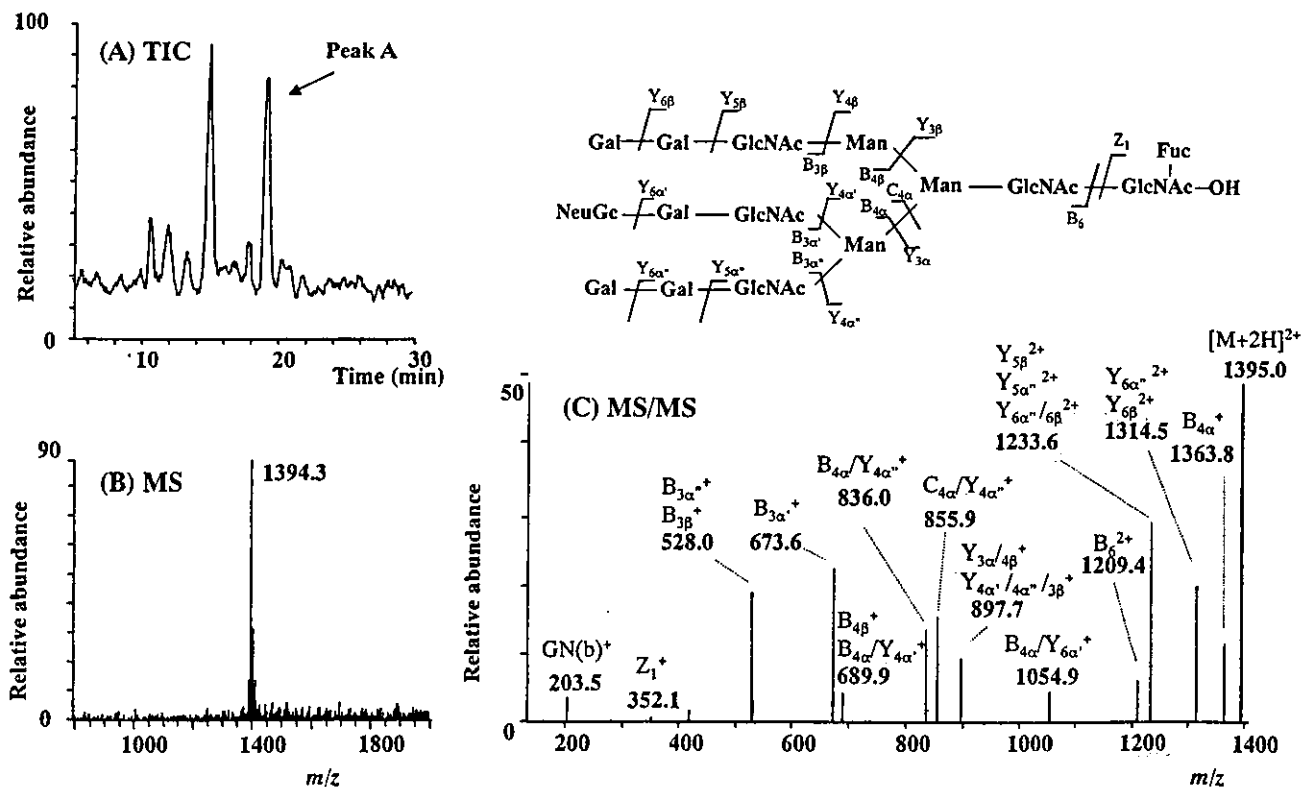


Fig. 1. (A) GCC-LC/MS によって得られた HGF の糖鎖プロファイル, (B) ピーク A のマススペクトル, (C) ピーク A のプロダクトイオンスペクトル及び推定構造

カラム, Hypercarb (0.2×150 mm); 流速, 3  $\mu$ l/min; 溶離液, 5 mM 酢酸アンモニウム/H<sub>2</sub>O-アセトニトリル; MS, TSQ-7000 (Thermoelectron)

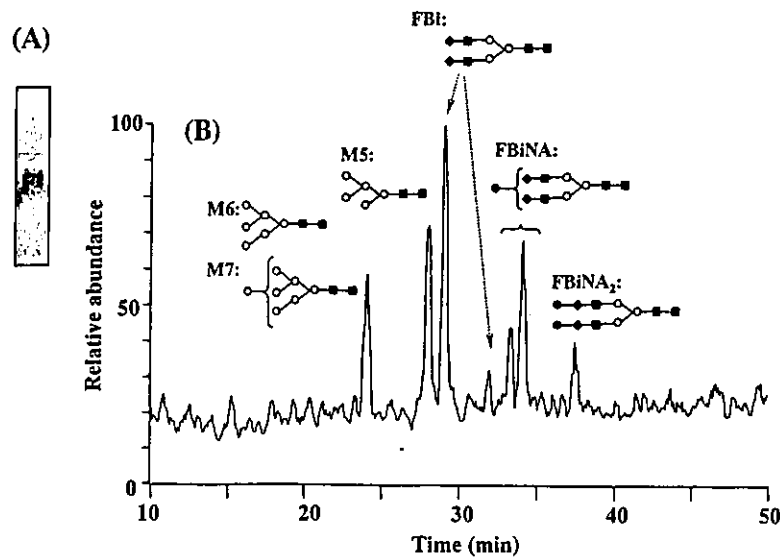


Fig. 2. (A) tPA (2 µg) の SDS-PAGE, (B) GCC-LC/MS によるゲル内 tPA 由来糖鎖のプロファイル

ないこと、1回の LC で異性体を含む様々な糖鎖を分離できること、ESI を用いているのでシアル酸結合糖鎖や硫酸化糖鎖の解析にも応用できること、オンライン MS による簡便・迅速な分析が可能で、マイナー成分の取りこぼしがないこと等の利点があると考えている。

## II. 細胞・組織発現糖タンパク質糖鎖の差異解析

### 1. 糖鎖の差異解析

疾患組織と健常組織に発現している糖タンパク質の糖鎖の分布を直接比較し、疾患関連糖鎖遺伝子や糖タンパク質を見つけ出すことができれば、新たな診断法の開発や糖鎖と疾患の関係の解明につながるものと期待される。そこで、GCC-LC/MS を用いて、簡単な操作と実行可能なサンプル量で、サンプル間の糖鎖の差異解析を行うことを検討した。モデルとして、糖鎖遺伝子導入によって糖鎖の構造と分布が変化していることが予想される細胞を用いた。N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) は、複合型 2 本鎖糖鎖に bisecting GlcNAc を付加する糖転移酵素で、細胞接着や癌転移と関係があることが報告されている<sup>9-11)</sup>。ここでは、GnT-III 遺伝子を導入した CHO 細胞を病態モデルとして、糖鎖プロファイリング法によって糖鎖の変動を捉えることができるかどうかを検証した。

$5 \times 10^6$  個程度の CHO 細胞と GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞を界面活性剤処理し、膜画分及び可溶性画分に分離した。それぞれの画分から PNGase F によって糖鎖を切り出し、 $\text{NaBH}_4$  で還元後、LC/MS によるプロファイリングを行った。Fig. 3A は CHO 細胞の膜画分の糖鎖プロファイルである。各ピークのマスペクトルから、CHO 細胞の膜タンパク質に付加している糖鎖は高マンノース型糖鎖とシアル酸が結合した複合型 2 本鎖糖鎖が中心で、さらに混成型、

トリマンノシルコア部分のみの糖鎖や、1 本鎖糖鎖などの比較的小きな糖鎖も結合していることが確認された。

Fig. 3B は、GnT-III 遺伝子導入細胞の膜画分の糖鎖プロファイルで、矢印で示す位置に CHO 細胞からは検出されない新たなイオンが検出された。GCC で糖鎖を分離した場合、bisecting GlcNAc が付加した糖鎖は付加されていない糖鎖より早く溶出される傾向がある。GnT-III 遺伝子導入によって新たに出現した糖鎖の分子量は、その後溶出された 2 本鎖糖鎖の分子量より N-アセチルヘキソサミン (HexNAc) 1 分子分増加していることから、bisecting GlcNAc を有する 2 本鎖糖鎖であることが示唆された。

同様に可溶性画分についても糖鎖プロファイリングを行ったところ、膜画分とは異なるパターンが得られ、マスペクトルから、可溶性タンパク質に結合している糖鎖は主に高マンノース型であることがわかった。また、膜ほどではないが、GnT-III 遺伝子導入細胞の可溶性画分からも bisecting GlcNAc が付加していると思われる糖鎖が検出された。

Fig. 4 は CHO 細胞、及び GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞から切り出された主な糖鎖のピーク面積をアシアロ 2 本鎖糖鎖のピーク面積を 1.0 として相対的に表したもので、糖鎖分布の変化を示している。このグラフから、GnT-III の発現によって bisecting GlcNAc が付加したと思われる糖鎖は出現するものの、糖鎖全体の分布に大きな変化は生じていないことがわかる。これは、GnT-III 発現によって糖鎖構造に変化が生じたタンパク質が全体の一部分であることを示唆していると考えられる。このように、GCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは糖鎖の構造や分布の違いを簡単に識別できることから、健常及び病態サンプル間の糖鎖の差異解析法として有用であると思われる。

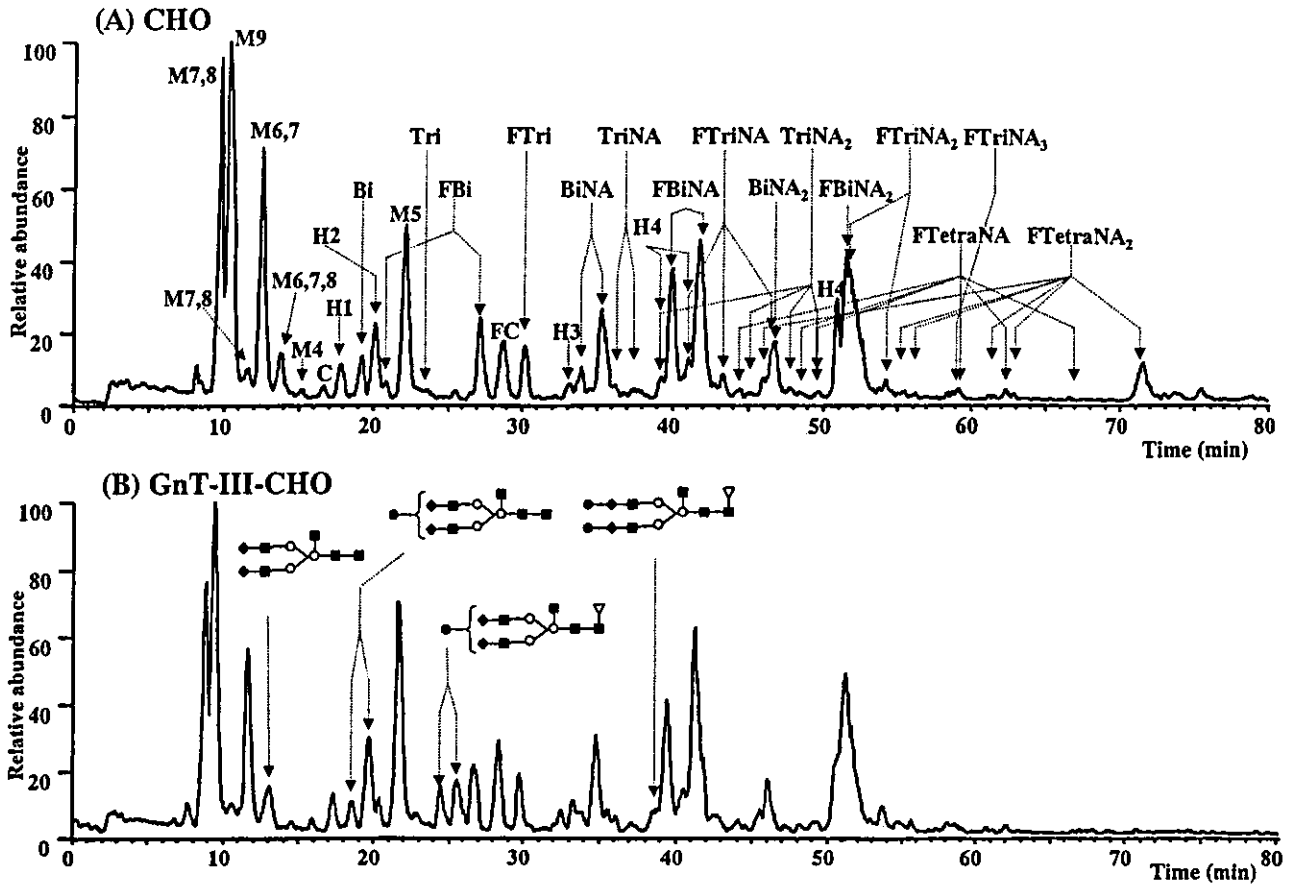


Fig. 3. (A) CHO 細胞膜画分の糖鎖プロファイル, (B) GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞の糖鎖プロファイル  
 M, Man; H, hybrid; C, trimannosylcore; F, Fuc; NA, NeuAc; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary

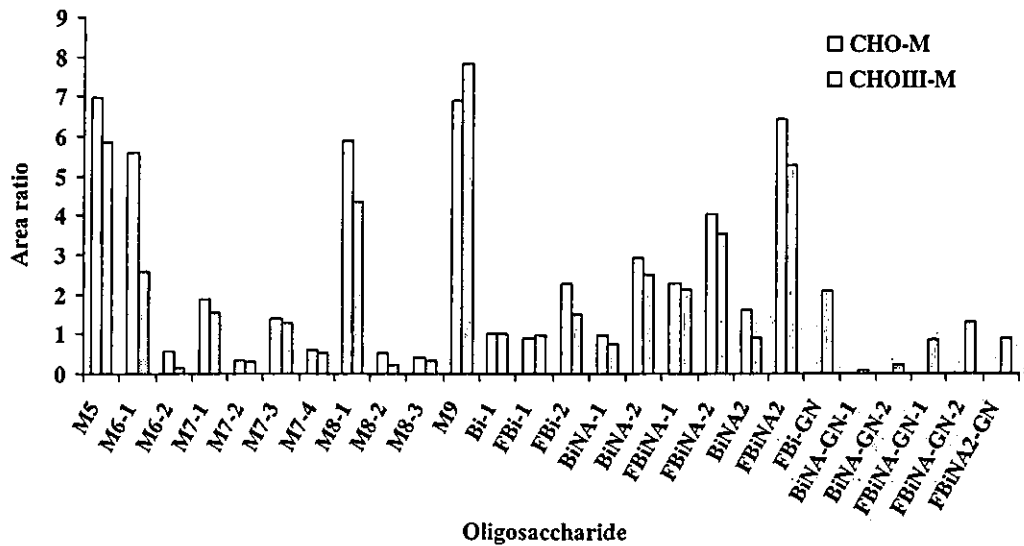


Fig. 4. CHO 細胞膜画分 (CHO-M) 及び GnT-III 遺伝子導入細胞由来膜画分 (CHOIII-M) 由来糖鎖の分布

アシアロ 2 本鎖糖鎖を 1.0 とする

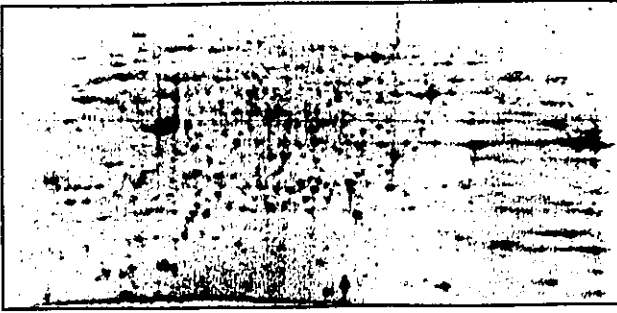
2. 糖タンパク質の同定と特性解析

糖鎖差異解析によって疾患関連糖鎖を見出すことができれば、プロテオミクス的手法を用いて、その糖鎖が付加しているタンパク質の同定と特性解析を行うことになる。可

溶性タンパク質であれば、レクチンカラムや免疫沈降法などで得られた画分を SDS-PAGE 等で展開して目的糖タンパク質を得ることができるが、不溶性膜タンパク質の場合、レクチン等による分画が難しいケースが多く、2-DE 後、レ



(A) 2D-PAGE



(B) Lectin blot

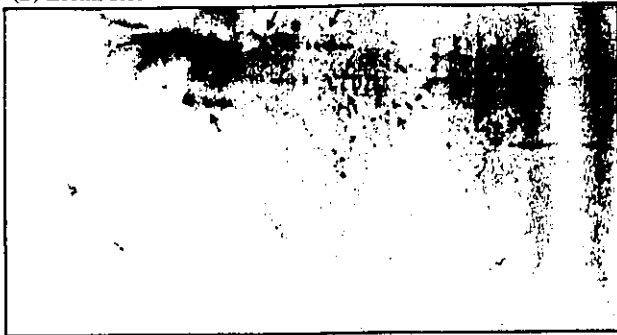


Fig. 5. GnT-III 遺伝子導入細胞膜画分の 2-DE

(A) Sypro Orange 染色, (B) PHA-E<sub>4</sub> プロット  
IEF, pH 3-10, 18 cm, 33,500 Vhr; SDS-PAGE, 12.5% gel  
(24×11 cm), 20 mA-0.5 hr, 50 mA-1.2 hr

クチンプロットなどにより糖タンパク質の位置を特定することになる<sup>12)</sup>。しかし後者の場合、泳動ゲルとレクチンプロット膜のマッチング、及び特定されたゲル上タンパク質に目的糖鎖が付加していることの検証が必要となってくる。

Fig. 5 は、GnT-III 遺伝子導入細胞の膜画分を2枚のゲルで展開し、Sypro Orange で全タンパク質を染色した結果 (A)、及び bisecting GlcNAc を認識する PHA-E<sub>4</sub> レクチンを用いてレクチンプロットを行った結果 (B) を示している。レクチンプロットによって、酸性側の 70-80 kDa 周辺に、糖タンパク質に特徴的な train 状のスポットが複数組検出され、一部のタンパク質の糖鎖に bisecting GlcNAc が付加されていることが確認された。我々は、レクチンプロット上のスポットの位置から特定された泳動ゲル上の糖タンパク質の糖鎖の解析にも糖鎖プロファイリングが役立つと考えている。現在、bisecting GlcNAc が付加していると推定されたスポットについて、ゲル内トリプシン消化に先立ち PNGase F 消化を行って糖鎖を切り出し、GCC-LC/MS を用いた bisecting GlcNAc の有無の確認と糖鎖構造解析を行っているところである。

#### おわりに

GCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは、糖タンパク質性医薬品の特性・品質解析を目的として開発されたものである。この糖鎖プロファイリングが、2-DE 等のプロ

テオミクスの手法と組み合わせることによって、医薬品開発型研究のグライコミクスにも応用できる可能ができた。電気泳動ゲル上の全タンパク質の中から糖タンパク質を検出する方法は報告されているが<sup>13,14)</sup>、特定の糖鎖を付加している糖タンパク質のみを検出・抽出する方法は確立されておらず、それらを効率的に検出する方法の確立が今後の課題であろう。

#### 文 献

- 1) Durand G, Seta N. Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem* 2000;46:795-805.
- 2) Fenselau C. MALDI MS and strategies for protein analysis. *Anal Chem* 1997;69:661A-665A.
- 3) Kawasaki N, Ohta M, Hyuga S, Hashimoto O, Hayakawa T. Analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein using liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999;269:297-303.
- 4) Itoh S, Kawasaki N, Ohta M, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T. Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr* 2002;168:89-100.
- 5) Kawasaki N, Itoh S, Ohta M, Hayakawa T. Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003;316:15-22.
- 6) Baker KN, Rendall MH, Hills AE, Hoare M, Freedman RB, James DC. Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 2001;73:188-202.
- 7) Sheeley DM, Merrill BM, Taylor LC. Characterization of monoclonal antibody glycosylation: comparison of expression systems and identification of terminal alpha-linked galactose. *Anal Biochem* 1997;247:102-110.
- 8) Rudd PM, Colominas C, Royle L, Murphy N, Hart E, Merry AH, Hebestreit HF, Dwek RA. A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of N-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands. *Proteomics* 2001;1:285-294.
- 9) Sheng Y, Yoshimura M, Inoue S, Oritani K, Nishiura T, Yoshida H, Ogawa M, Okajima Y, Matsuzawa Y, Taniguchi N. Remodeling of glycoconjugates on CD44 enhances cell adhesion to hyaluronate, tumor growth and metastasis in B16 melanoma cells expressing beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III. *Int J Cancer* 1997;73:850-858.
- 10) Yoshimura M, Nishikawa A, Ihara Y, Taniguchi S, Taniguchi N. Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8754-8758.

- 11) Yoshimura M, Ihara Y, Matsuzawa Y, Taniguchi N. Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis. *J Biol Chem* 1996;271:13811-13815.
- 12) Ekuni A, Miyoshi E, Ko JH, Noda K, Kitada T, Ihara S, Endo T, Hino A, Honke K, Taniguchi N. A glycomic approach to hepatic tumors in N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) transgenic mice induced by diethylnitrosamine (DEN): identification of haptoglobin as a target molecule of GnT-III. *Free Radic Res* 2002;36:827-833.
- 13) Wilson NL, Schulz BL, Karlsson NG, Packer NH. Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins. *J Proteome Res* 2002;1:521-529.
- 14) Schulenberg B, Beechem JM, Patton WF. Mapping glycosylation changes related to cancer using the Multiplexed Proteomics technology: a protein differential display approach. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;793:127-139.

[シンポジウム：プロテオミクスの新技術—電気泳動とマスペクトロメトリ—]

## LC/MS/MS を用いた糖タンパク質の糖鎖解析 —糖鎖結合位置及び結合糖鎖の解析—

伊藤さつき・原園 景・川崎ナナ・橋井則貴・松石 紫・川西 徹・早川堯夫

### SUMMARY

Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) is a powerful tool for the analysis of glycosylation sites and of site-specific glycosylation in a glycoprotein. The glycopeptides in a complex mixture of tryptic digest can be separated and monitored by using oxonium ions produced from a carbohydrate moiety through CID-MS/MS. Based on b and y ions in the product ion mass spectra, peptides can be identified, and the structure of carbohydrates can be deduced from B ions and the molecular weight of precursor glycopeptide. Here we show the site-specific glycosylation analysis of  $\alpha$ -fetoprotein and an SDS-PAGE gel-separated GPI-anchored protein.

Key words: LC/MS/MS, glycopeptide, product ion scan, QqTOF-MS, gel-separated protein.

#### はじめに

生体内に存在する全タンパク質の半分以上が糖鎖付加を受けていると言われるように、糖鎖付加は、主要な翻訳後修飾の1つである。糖タンパク質の糖鎖部分には、結合部位ごとに不均一性が存在し、病気・発生・老化等によって変化することが知られている<sup>1-3)</sup>。様々な生命現象における糖タンパク質の糖鎖の役割を解明するためには、結合する糖鎖構造の変化を明らかにすることはもちろんであるが、構造が変化した糖鎖がどの位置に結合していたかを明らかにすることが重要である。

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) は、タンパク質の酵素消化によって得られたペプチドと糖ペプチドの混合物を LC で分離しながら、オンラインで MS/MS 分析を行うのに用いられている。糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルにはペプチドだけでなく、糖鎖構造に関する多くの情報が含まれているので、LC/MS/MS は部位特異的糖鎖解析に非常に有用である。しかし、無数のペプチドピークの中から糖ペプチドピークを特定するのは難しく、いかに糖ペプチドのピークを選別するかが、糖ペプチド解析の鍵となっている。

ペプチド・糖ペプチドの中から、糖ペプチドを選別する

方法として、LC 上で選別する方法と、MS/MS で選別する方法がある。前者の方法として、 $C_{18}$  カラムと酢酸アンモニウム系溶離液を用いて糖ペプチドだけを選択的に溶出させる方法<sup>4)</sup>や、レクチンカラムを用いて糖ペプチドを回収し、さらに HPLC で分離するグライコキャッチ法<sup>5)</sup>等が報告されている。MS/MS で選別する方法としては、糖鎖に特徴的なオキシニウムイオン ( $[HexNAc]^+$ ;  $m/z$  204,  $[Hex-HexNAc]^+$ ;  $m/z$  366 等) を利用して、糖ペプチドを特定する方法が知られ、インソースフラグメンテーション<sup>6)</sup> や、ブリカーサーイオンスキャン<sup>7,8)</sup> を利用した方法が報告されている。インソースフラグメンテーションを用いた場合、クロマトグラム上でのおよその糖ペプチドの溶出位置を特定することはできるが、ブリカーサーイオンを特定することができず、溶出位置付近のマスペクトル及びプロダクトイオンスペクトルの特徴から、糖ペプチドのイオンを特定しなければならぬ。これに対して、ブリカーサーイオンスキャンは、糖ペプチドイオンを特定することはできるが、プロダクトイオンスペクトルが得られないため、ペプチドや糖鎖に関する情報が得られないといった問題がある。

そこで、我々は、得られた無数のペプチド・糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルの中から、オキシニウムイオンを指標として、糖ペプチドに由来するプロダクトイオ

Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: analysis of glycosylation sites and of site-specific heterogeneity.

Satsuki Itoh, Akira Harazono, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Yukari Matsuiishi, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa; 国立医薬品食品衛生研究所

Correspondence address: Nana Kawasaki; National Institute of Health Science, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

第 54 回日本電気泳動学会シンポジウム

(受付 2004 年 10 月 4 日, 受理 2004 年 10 月 28 日, 刊行 2004 年 12 月 15 日)

ンスペクトルを選択的に取り出し、ペプチドを同定すると同時に、結合糖鎖を解析する方法を用いている<sup>9,10)</sup>。以下に四重極飛行時間型質量分析計 (quadrupole time of flight-MS, QqTOF-MS) を用いて、部位特異的に糖タンパク質の糖鎖を解析した例として、 $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) と、電気泳動で分離されたラット脳内 Glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型タンパク質の分析を紹介する。

**I. LC/MS/MS を用いた糖タンパク質の糖鎖構造解析  
— $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) の解析—**

血液中に存在する糖タンパク質の中には、疾患等により結合糖鎖構造が変化することから、診断マーカーとして用いられているものがあり<sup>11)</sup>、その代表的なタンパク質として AFP が知られている。AFP は、N-結合型糖鎖付加部位 (Asn233) が一箇所存在する分子量約 68,000 の血清糖タンパク質で、肝細胞癌において、還元末端 GlcNAc のフコシル化率が増加することから、レクチンアフィニティー電気泳動とイムノブロットを用いた早期診断に利用されている<sup>12,13)</sup>。LC/MS/MS を用いて、AFP の糖鎖を詳細に解析できるようになれば、今後、より簡便に、且つ微量のサンプルで、早期診断が可能になることが期待される。ここでは、臍帯血由来 AFP について解析を行った例を示す。

Fig. 1 (A) は、AFP を還元カルボキシメチル化し、脱塩後、トリプシン消化を行い、LC/MS 分析を行ったものである。ペプチド・糖ペプチド混合物のため多くのイオンが検出されているが、データ依存的 MS/MS データ (Fig. 1 (B)) 中の  $m/z$  204 ([HexNAc]<sup>+</sup>) をモニターすることによって (Fig. 1 (C))、糖ペプチドに由来するプロダクトイオンスペクトルを取り出すことができる。

例えば、Fig. 2 は、24 分に溶出された糖ペプチド ( $m/z$  1061.8<sup>+</sup>) のプロダクトイオンスペクトルである。低分子量側に、 $m/z$  204 ([HexNAc]<sup>+</sup>) に加えて、糖鎖に由来する  $m/z$  168 ([HexNAc-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>)、 $m/z$  186 ([HexNAc-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) 及び  $m/z$  366 ([Hex-HexNAc]<sup>+</sup>) や、シアロ糖鎖に由来する  $m/z$  292 ([NeuAc]<sup>+</sup>) 及び  $m/z$  274 ([NeuAc-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) の B イオンが検出されている。高分子量側には、ペプチド VNFTEIQK に由来するイオン ( $m/z$  978.5) と、b 及び y イオンが検出されている。Fig. 2 中の表はペプチド VNFTEIQK から生じる b 及び y イオンの理論  $m/z$  値を示し、その中で太字で示された値は、実際、プロダクトイオンスペクトル上で検出されたイオンを示している。さらに、ペプチドに HexNAc が 1 または 2 分子、さらに Hex が 1~3 分子結合したイオンが検出され、N-結合型糖鎖のコア部分を確認することができる。糖鎖構造は、プロダクトイオンスペクトル上の B イオンと、TOF-MS で得られた糖ペプチドの分子量 (3182.3 Da) からペプチドの理論分子量 (977.5 Da) を差し引くことにより得られた分子量 (2222.8 Da) から、シアロ酸が 2 分子

結合した 2 本鎖糖鎖であると推定される。このように、 $m/z$  204 が検出されたプロダクトイオンスペクトルとそのブリッカーイオンを解析することによって、AFP に結合する糖鎖を推定することが可能である (Table 1)。

臍帯血由来 AFP の結合糖鎖は、これまでにメチル化分析やレクチン分画等によって分析されており、主にジシアロ 2 本鎖型糖鎖であることが報告されている<sup>14)</sup>。今回の LC/MS/MS 分析の結果で、その他に、アシアロ糖鎖、3 本鎖糖鎖や混合型糖鎖等が結合していることが示唆され、簡単な操作で、より詳細に糖鎖構造が解析できることがわかる。

以上のように、オキシニウムイオンを指標として、糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを選び出す方法は、ペプチドの b, y イオン及び糖鎖の B イオンをもとにペプチドの同定と結合糖鎖の構造推定を行うことが可能であることから、部位特異的糖鎖構造解析に有用である。次に、LC/MS/MS による糖ペプチド解析法を、電気泳動法で分離された糖タンパク質の解析に応用した例を示す。

**II. ゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析  
—ラット脳内 GPI アンカー型タンパク質の解析—**

脳・神経系の細胞膜上には、細胞間認識やシグナル伝達に関与する多数の糖タンパク質が存在し、糖鎖はこれらの

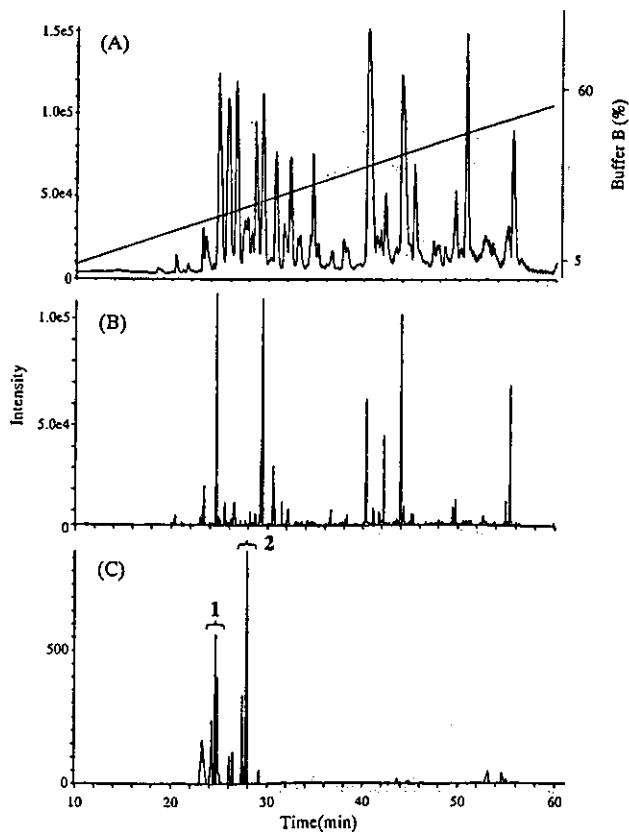


Fig. 1. LC/MS/MS of AFP. (A) TOF-MS full scan at  $m/z$  700-2000, (B) product ion scan at  $m/z$  100-2000, (C) product ion scan at  $m/z$  204.

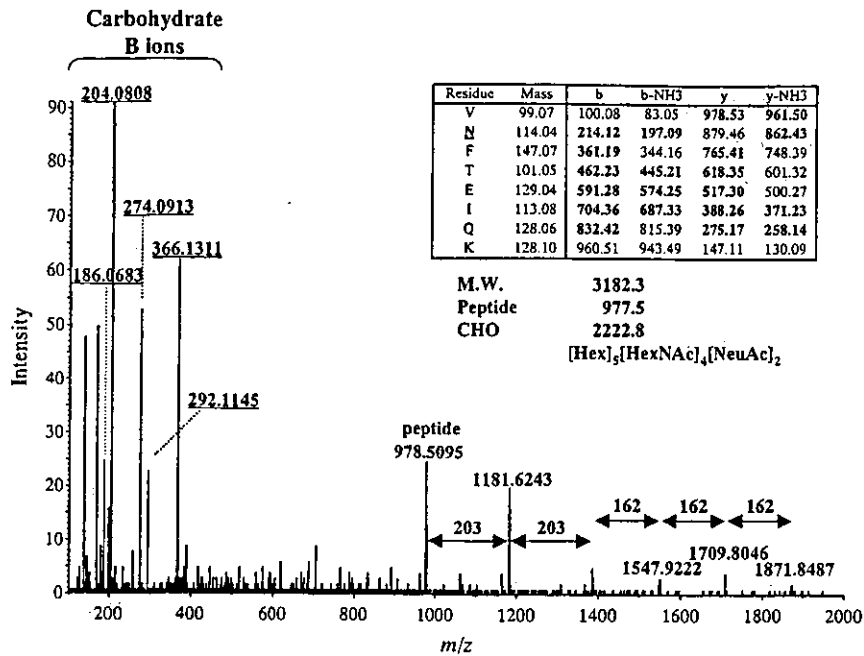


Fig. 2. Product ion spectrum of a glycopeptide ( $m/z$  1061.83<sup>3+</sup>) at 24 min.

Inset table shows theoretical  $m/z$  values of b and y ions, and ions detected by MS/MS are indicated by bold face.

Table 1. Glycosylation analysis of AFP

Peak No.	Peptide sequence (theoretical peptide mass <sup>a</sup> )	Retention time (min)	Observed $m/z$ (charge)	Carbohydrate composition	Calculated Carbohydrate mass	Theoretical carbohydrate mass <sup>a</sup>		
1	KVNFT <del>E</del> IQKL (977.5)	23	1013.43(3)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2077.8	2077.7		
		23	1519.67(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2077.8	2077.7		
		23	1081.29(3)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2281.4	2280.8		
		23	1621.44(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2281.4	2280.8		
		23	1446.62(2)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	1931.8	1931.7		
		23	1118.67(2)	[Hex] <sub>4</sub> [HexNAc] <sub>3</sub>	1275.9	1275.5		
		23	1264.05(2)	[Hex] <sub>4</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	1566.6	1566.6		
		23	1110.48(3)	[Hex] <sub>4</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	1566.6	1566.6		
		24	1665.44(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2369.4	2368.8		
		24	1178.33(3)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2572.5	2571.9		
		24	1061.78(3)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2222.9	2222.8		
		24	1592.17(2)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2222.9	2222.8		
		2	KFTKVNFT <del>E</del> IQKL (1353.7)	27	1236.04(3)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2369.4	2368.8
				27	1853.29(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2369.4	2368.8
27	1187.17(3)			[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2222.8	2222.8		
28	1780.23(2)			[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2222.8	2222.8		
28	1303.56(3)			[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2572.0	2571.9		
28	1138.84(3)			[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2077.8	2077.7		
28	1206.52(3)			[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2280.9	2280.8		
28	1090.14(3)			[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	1931.7	1931.7		
28	1322.75(3)			[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2629.6	2628.9		

<sup>a</sup> Monoisotopic mass value.

機能に深く関わっていると考えられている<sup>15)</sup>。しかし、微血膜タンパク質であることから、精製が困難で、解析に必要な量が得られず、多くの糖タンパク質の糖鎖構造は明らかにされていない。タンパク質混合物の分離に適した電気泳動とLC/MS/MSを活用することによって、これらの糖鎖構造を解析できると期待される。以下は、GPIを介して膜

に結合する GPI アンカー型タンパク質の糖鎖解析を行った例である。

ラット脳の膜画分から、Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC) 消化によって得られた可溶性 GPI アンカー型タンパク質群を、還元カルボキシアミドメチル化後、SDS-PAGE で分離した (Fig. 3)。通常、ゲル内のタ

ンパク質同定は、ゲル内プロテアーゼ消化後、抽出されたペプチドのみを用いて行われているが、糖鎖構造解析を行う場合、すべての糖ペプチド断片を同程度の収率で回収する必要がある。そこで、ゲルより糖タンパク質を抽出後、トリプシン消化を行う方法を選んだ。

Fig. 4 (A) は、バンド1を切り出し、1%SDSを用いてタンパク質を抽出後、トリプシン消化を行い、LC/MS/MS分析を行ったものである。まず、データベース検索の結果、バンド1は、Thy-1と同定された。Thy-1は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する GPI アンカー型タンパク質であり、3箇所の N-結合型糖鎖付加部位 (Asn23, 74, 98) を有するアミノ酸残基数 111 の糖タンパク質である (Fig. 5)。

次に、AFPと同様に、 $m/z$  204を指標として、全ペプチドのプロダクトイオンスペクトルの中から、糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを選択的に取り出した (Fig. 4 (C))。それらのプロダクトイオンスペクトル及びプリカーサーイオンの TOF-MS から、T1 及び T2 に溶出された糖ペプチドは、それぞれ高マンノース型糖鎖が結合した Asn23 を含む糖ペプチド、His21-Phe33、及び His21-Arg37 であり、T3 及び T4 は、複合型及び混成型糖鎖が結合した Asn74 を含む糖ペプチド、Val69-Lys78 であることが判った (Table 2)。

Fig. 6 は、T3 に溶出された糖ペプチドのうち、 $m/z$  1532.2<sup>+2</sup>を示す糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルである。低分子量側に、AFP で検出されたイオン、 $m/z$  168, 186, 204, 366 に加え、 $m/z$  528 ([Hex]<sub>2</sub>[HexNAc]<sup>+</sup>)、 $m/z$  569 ([Hex][HexNAc]<sub>2</sub><sup>+</sup>) や、 $m/z$  512 ([Hex][HexNAc][dHex]<sup>+</sup>) 等の B

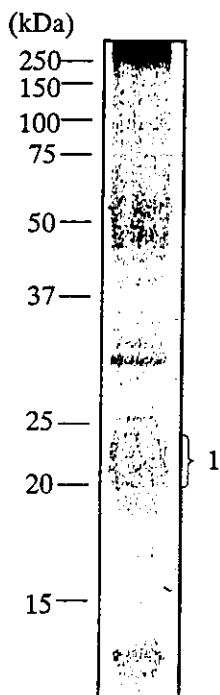


Fig. 3. SDS-PAGE of lipid-free GPI-anchored protein prepared from rat brain.

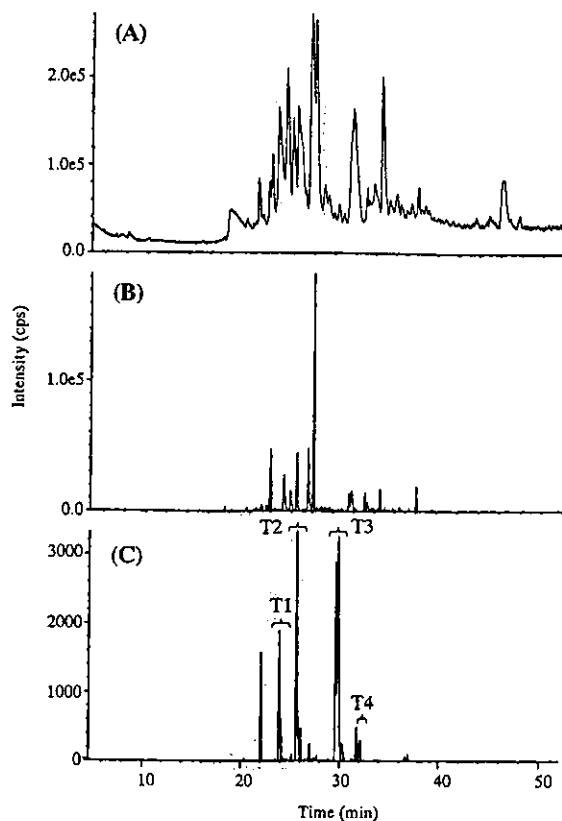


Fig. 4. LC/MS/MS of rat brain Thy-1, (A) TOF-MS full scan at  $m/z$  700-2000, (B) product ion scan at  $m/z$  100-2000, (C) Product ion scan at  $m/z$  204.

イオンが検出されており、Gal1-3(4)(Fuc1-4(3))-GlcNAc 構造を含むことが推定される。高分子量側には、ペプチドに由来するイオン ( $m/z$  1107.6) と b 及び y イオンが検出され、VLTLANFTTK と同定された (Fig. 6 中の表)。また、ペプチドに HexNAc, HexNAc-HexNAc, HexNAc-HexNAc-Hex が結合したイオンが検出されている他、さらに、これらに dHex が 1 分子結合したイオンが検出されていることから、結合糖鎖のコア部分がフコシル化されていることが判る。結合糖鎖は、TOF-MS で得られた糖ペプチドの分子量 (3062.4 Da) から、ペプチドの理論分子量 (1106.6 Da) を差し引くことにより得られた糖鎖分子量 (1973.7 Da) から、Fig. 6 中に示すような構造であると推定される。Table 2 は、同様に解析した結果、Thy-1 に結合すると推定された糖鎖構造である。

```

ORVLSLAQL VNQNLRLCDR HENNTNLPIQ HEFLSTREKK KHVLSGTLGV50
PEHTYRSRVN LFSDRFIKVL TLANFTTKDE GDYMCELRVS GQNPTSSNKT100
INVIRDKLVK C
                |
                GPI-anchor
    
```

Fig. 5. Amino acid sequence of rat Thy-1.

Glycopeptides produced by trypsin are underlined. N-glycosylation sites are indicated by bold face.

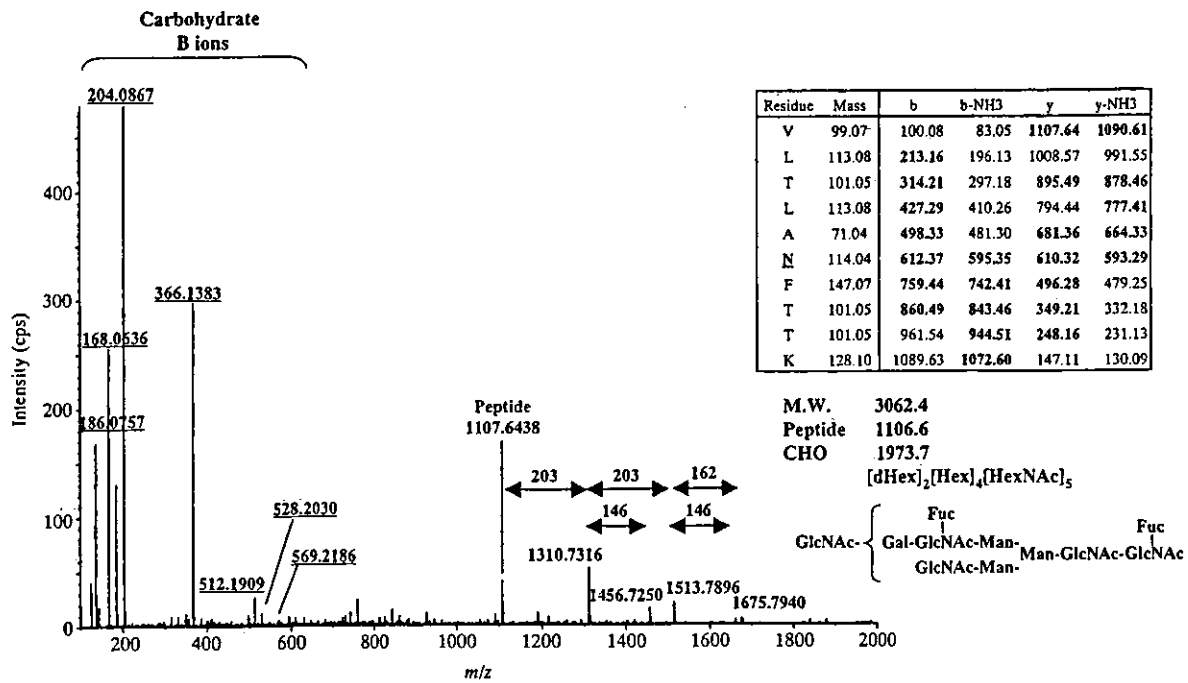


Fig. 6. Product ion spectrum of a glycopeptide ( $m/z$  1532.2<sup>2+</sup>) at peak 29.5 min. Inset table shows theoretical  $m/z$  values of b and y ions, and ions detected by MS/MS are indicated by bold face.

Table 2. Glycosylation analysis of rat brainThy-1

Peak No.	Peptide sequence (theoretical peptide mass <sup>a</sup> )	Glycosylation site	Retention time (min)	Observed $m/z$ (charge)	Carbohydrate composition	Calculated carbohydrate mass	Theoretical carbohydrate mass <sup>a</sup>
T1	H21-F33 (1591.73)	N23	23.9	991.1(3)	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1396.6	1396.5
			23.9	1486.2(2)	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1396.6	1396.5
			23.9	1045.1(3)	[Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1558.7	1558.5
			24.0	1567.2(2)	[Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1558.6	1558.5
			24.0	937.1(3)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1234.5	1234.4
T2	H21-R37 (2048.99)	N23	24.0	1405.1(2)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1234.5	1234.4
			25.5	1197.6(3)	[Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1558.6	1558.5
			25.6	1143.5(3)	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1396.6	1396.5
			25.6	857.9(4)	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1396.6	1396.5
			25.7	1089.5(3)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1234.5	1234.4
			25.7	817.4(4)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1234.6	1234.4
			25.9	1633.8(2)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1234.5	1234.4
T3	V69-K78 (1106.62)	N74	29.5	1686.3(2)	[dHex] <sub>3</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub>	2282.0	2281.9
			29.6	1124.5(3)	[dHex] <sub>3</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub>	2282.0	2281.9
			29.6	1532.2(2)	[dHex] <sub>2</sub> [Hex] <sub>4</sub> [HexNAc] <sub>5</sub>	1973.9	1973.7
			29.6	1021.8(3)	[dHex] <sub>2</sub> [Hex] <sub>4</sub> [HexNAc] <sub>5</sub>	1973.9	1973.7
			29.7	1162.6(2)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>2</sub>	1234.5	1234.4
			29.7	1491.2(2)	[dHex] <sub>2</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>3</sub>	1891.8	1891.7
			29.7	1592.8(2)	[dHex] <sub>2</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	2094.9	2094.8
			29.8	1378.2(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>3</sub> [HexNAc] <sub>5</sub>	1665.7	1665.6
			29.9	919.1(3)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>3</sub> [HexNAc] <sub>5</sub>	1665.7	1665.6
			29.8	1438.7(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	1786.8	1786.7
			30.3	959.5(3)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	1786.8	1786.7
			29.9	1511.7(2)	[dHex] <sub>2</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	1932.8	1932.7
			30.0	1008.1(3)	[dHex] <sub>2</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	1932.8	1932.7
			30.0	1519.7(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	1948.8	1948.7
			30.0	1572.2(2)	[dHex] <sub>2</sub> [Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>3</sub>	2053.9	2053.7
			30.1	1499.2(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>3</sub>	1907.8	1907.7
			30.2	1276.6(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>3</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	1462.6	1462.5
30.2	1337.2(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>3</sub>	1583.7	1583.6			
31.7	1860.4(2)	[dHex] <sub>2</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2630.1	2630.0			
31.7	1240.6(3)	[dHex] <sub>2</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2630.1	2630.0			
31.9	1706.3(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>4</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2321.9	2321.9			
T4	V69-K78 (1106.62)	N74	32.1	1563.7(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2036.8	2036.7
			32.1	1482.7(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	1874.7	1874.7
			32.1	1584.2(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2077.8	2077.8

<sup>a</sup> Monoisotopic mass value.

ラット脳の Thy-1 の N-結合型糖鎖については、これまで抗体カラム等を用いて精製された Thy-1 をトリプシン消化後、糖ペプチドごとに糖鎖を切り出し、ゲルろ過や、エキソグリコシダーゼ消化等を用いて分析した例が報告されている。Asn23 には、高マンノース型 (M5, 6) が、Asn74 には、コアがフコシル化された複合型糖鎖と、マイナー糖鎖としてハイブリッド型糖鎖及び高マンノース型糖鎖が結合していることが明らかにされているが<sup>16, 17)</sup>、電気泳動と LC/MS/MS を組み合わせることによって、微量の膜タンパク質を、抗体を使用せずに簡便且つより詳細に解析できることがわかる。尚、Asn98 に結合する糖鎖及び GPI アンカーについては、トリプシン消化によって得られた糖ペプチドの親水性が高く、LC カラムに保持されなかったため、他の酵素消化によって得られた糖ペプチドを解析することによって明らかにしている (データ省略)。

以上のように、LC/MS/MS によるペプチド・糖ペプチドマッピングにおいて、糖鎖に特徴的なオキシニウムイオンを用いて糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを取り出す方法は、タンパク質を同定すると同時に、糖鎖結合部位を決定し、結合部位ごとの糖鎖構造を推定することを可能にする。2次元 HPLC との組み合わせや、2次元電気泳動で分離された糖タンパク質の解析も可能であることから、今後、グライコプロテオミクスの分野で役立つことが期待される。

#### 文献

- 1) Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993;3:97-130.
- 2) Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473:21-34.
- 3) Sato Y, Kimura M, Yasuda C, Nakano Y, Tomita M, Kobata A, Endo T. Evidence for the presence of major peripheral myelin glycoprotein P0 in mammalian spinal cord and a change of its glycosylation state during aging. *Glycobiology* 1999;9:655-660.
- 4) Ohta M, Kawasaki N, Hyuga S, Hyuga M, Hayakawa T. Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography—electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2001;910:1-11.
- 5) Hirabayashi J, Arata Y, Kasai K. Glycome project: concept, strategy and preliminary application to *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics* 2001;1:295-303.
- 6) Sullivan B, Addona TA, Carr SA. Selective detection of glycopeptides on ion trap mass spectrometers. *Anal Chem* 2004;76:3112-3118.
- 7) Carr SA, Huddleston MJ, Bean MF. Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Protein Sci* 1993;2:183-196.

- 8) Huddleston MJ, Bean MF, Carr SA. Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests. *Anal Chem* 1993;65:877-884.
- 9) Nemeth JF, Hochgesang GP Jr, Marnett LJ, Caprioli RM, Hochgesang GP Jr. Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry. *Biochemistry* 2001;40:3109-3116.
- 10) Harazono A, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T. Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Glycobiology* in press.
- 11) Durand G, Seta N. Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem* 2000;46:795-805.
- 12) Aoyagi Y. Carbohydrate-based measurements on alpha-fetoprotein in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Glycoconj J* 1995;12:194-199.
- 13) Aoyagi Y, Isokawa O, Suda T, Watanabe M, Suzuki Y, Asakura H. The fucosylation index of alpha-fetoprotein as a possible prognostic indicator for patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1998;83:2076-2082.
- 14) Yamashita K, Taketa K, Nishi S, Fukushima K, Ohkura T. Sugar chains of human cord serum alpha-fetoprotein: characteristics of N-linked sugar chains of glycoproteins produced in human liver and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:2970-2975.
- 15) Schachner M, Martini R. Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci* 1995;18:183-191.
- 16) Parekh RB, Tse AG, Dwek RA, Williams AF, Rademacher TW. Tissue-specific N-glycosylation, site-specific oligosaccharide patterns and lentil lectin recognition of rat Thy-1. *Embo J* 1987;6:1233-1244.
- 17) Williams AF, Parekh RB, Wing DR, Willis AC, Barclay AN, Dalchau R, Fabre JW, Dwek RA, Rademacher TW. Comparative analysis of the N-glycans of rat, mouse and human Thy-1. Site-specific oligosaccharide patterns of neural Thy-1, a member of the immunoglobulin superfamily. *Glycobiology* 1993;3:339-348.

#### 要約

LC/MS/MS は、アミノ酸配列情報に加え、糖鎖構造に関する情報についても得ることができ、糖ペプチドの解析にも有用である。QqTOF-MS を用いた LC/MS/MS は、糖ペプチドのピークを特定し、ペプチドを同定し、結合糖鎖構造に関する情報も得ることができる。本稿では、糖ペプチドの解析例として、APF 及び電気泳動で分離された GPI アンカー型タンパク質の解析例を示す。



# PHARM TECH JAPAN

(別刷)

平成 年 月 Vol. No.

じほう

# 医薬品の品質管理のグローバル化と リスク管理の取り込み

Globalized Quality Assurance  
with Risk Management

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

檜山行雄

YUKIO HIYAMA

Division of Drugs, National Institute of Health Sciences

## はじめに

本稿では、薬事法改正と医薬品国際調和会議における品質関連の議論をリスク管理の取り込みと合わせ、解説する。

## 活発化する国際調和議論

日本においては、薬事法の大改正が来年4月から施行され、製造販売承認体系の基礎である承認書製造法記載・変更手続き、GMPの承認要件化が国内外同一の規制として準備されつつある。米国においてはGMPのみならず、品質関連全般の見直しとして「21世紀のGMPイニシアチブ」が2002年8月より2年計画で行われており、本稿が出るころにはすでに発表されているはずである。欧州では欧州内での調和がすすみ、EUの拡大にもあわせ、GMP査察の相互認証など欧州域外の調和に積極的である。

このような各極事情をかかえての国際調和の議論が展開されている。

## (1) GMPワークショップ

2003年7月ベルギーで、FDAの提案により、ICH専門家会議中にGMPワークショップが開催された。当初、CTD P2(Pharmaceutical Development)およびGMPの調和を目指したが議論がまとまらず、「科学とリスク管理でメリハリをつけた、医薬品のライフサイクル全般に適用可能な調和された品質保証：A harmonised pharmaceutical quality system applicable across the lifecycle of the product emphasizing an integrated approach to risk management and science」とのビジョンを採択した。その上でさらなる調和の基礎を固めるため、まず、Pharmaceutical Development(Q8)とQuality Risk Management(Q9)をトピックとする方向が決定された。この後もGMPワークショップの伝統を引き継ぎ、GMP Plenaryは現在も専門家会議ごとに正式トピック会議前後に開催されている。

## (2) ICH ガイドラインQ8

ICH ガイドラインQ8「製剤開発」は当初、新薬の承認申請時にCTD 3.2.P.2「製剤開発の経緯」の項に記載

する内容に関するガイドラインとしてスタートしたが、承認後も継続して行われる製造開発とも密接に関連し、製品のライフサイクルを通じて作成管理され、製法変更に使われる文書と位置付けられた。本ガイドラインは製剤開発研究が適切に行われ、文書化され、規制当局に提出されることにより、重要工程に焦点を絞った審査や効率的な査察が可能になることを意図している。またさらに開発時に、より高度な研究が行われることにより、製造法変更の自由度が増大することも目的としている。今秋開催される横浜会合でstep2到達を目指し、現在、draft 3.1の作成に至っている。

課題としては医薬品のライフサイクルを通じ、「各極行政でQ8をどのように使うか」、「個別の製剤にどこまで踏み込むか」、「Q9との連携をどうするか」があがっている。

わが国において、2005年4月以降の承認後の変更管理に関する薬事規制下でのCTD P2の取扱いとしては、「特に品質に影響を与える可能性の大きい変更を行うときは、変更を実施する前に規制当局に資料と承認事項一部変更申請を提出し、承認を受ける。その際には必要に応じて資料として改訂されたP2文書が提出される。規制当局はP2文書およびその他の資料を審査・GMP調査し、承認の適否を審査する。一方、品質に影響を与える危険性の少ない軽微な変更に関しては、製造業者は品質に影響のないことを確認後、変更した内容を変更後30日以内に規制当局に届ける。その際にはCTD第3部に相当する文書の提出の必要はないが、各製造業者は当該文書を保管する義務を有する。GMP査察官は査察時に変更が適切に行われたことを、保管された資料から確認することとなる。したがって、その時にP2文書も査察の対象となると考えられる。わが国におけるP2文書のライフサイクルにおける管理は、承認後における変更の適

否を審査するために、あるいは査察において変更の妥当性を確認するための重要文書となる」と想定される。

一方、Q9との連携を明確にするためには、製剤開発から製造管理への流れをリスク管理のサイクルが読み取れるように、Q8ガイドラインを仕上げるべきであろう。

### (3) 品質にかかわるリスク管理(Q9)

品質にかかわるリスク管理(Q9)は他分野で成功しているリスク管理を医薬品品質分野にどう取り込むべきかを議論し、業界・行政に医薬品の製品ライフサイクルを通じた、品質にかかわるリスクに関する効果的で一貫した意思決定の原則と手法の提供をゴールとしている。それに際し、既存の品質に関する手法、要求、基準、ガイドラインについても支持し、認め、Q8との連携をとる方針である。ICH Q9におけるリスク管理のサイクル(図1)には、リスクアセスメント(リスク分析、リスク評価)、リスクコントロール(リスク緩和、リスク軽減、リスク許容)、リスクコミュニケーションおよびレビューの段階を含めると規定された。

Q9ガイドラインの内容には序論、適用範囲、品質にかかわるリスク管理の原則、リスク管理の一般的なプロセス、リスク管理のツール/統計手法、企業活動への組み込み、用語定義および付属文書(例示)が含まれる計画である。

企業活動への組み込みとしては、①開発領域(開発、R&D/商業生産の接点)、②品質マネジメント領域(監査と自己点検、教育と訓練、逸脱/矛盾、苦情、回収の管理、変更マネジメント/変更管理)、③設備、装置および施設(建物/設備の設計、設備の衛生面、設備/装置/施設の適格性試験、装置と環境の洗浄管理、予防的保守、コンピュータシステムとコンピュータ制御装置)、④原材料管理(供給業者の評価と委託生産、出発

**Particle Counter によるクリーンゾーンの清浄度を検証**

60th

リオン株式会社  
おかげさまで60年



リオン株式会社

計測器営業部

総合カタログをご請求ください  
東京都国分寺市東元町3丁目20番41号 〒185-8533  
TEL 042-359-7458 URL: <http://www.rion.co.jp/>

DM資料請求カードNo.339

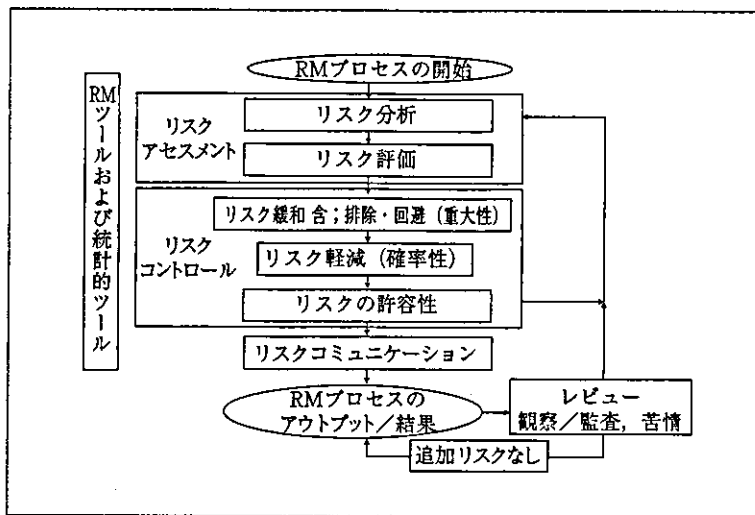


図1 QRMの一般的なプロセス

物質、原材料の出庫、原材料の再使用、保管と配送状況)、⑤製造(バリテーション、工程内検体採取と試験、報告と傾向)、⑥試験室管理(安定性試験、規格外試験結果、再試験/使用期限設定、規格設定と試験方法の選択)および、⑦包装と包装表示(栓容器システム)があげられている。

①開発領域(開発、R&D/商業生産の接点)をリスク管理の言葉で説明すると以下のようになる。

基礎データ収集、製品設計、プロセス設計、評価法設計を理化学試験、臨床試験、科学的判断に基づいて行われる開発はリスクアセスメント段階ととらえられ、開発段階で決められた製造プロセスに従い製造し、品質試験の結果により品質の恒常性を保証しようとする実生産は、リスクコントロール段階ととらえることができる。品質関連の重要文書となるCTD P2は企業から行政へ対するリスクコミュニケーションの道具となり、定期的な品質照査はレビューの段階となる。

Q9自身から新たな要件は出てこないように思われるが、他のガイドラインあるいは行政方針の基礎となるような重要ガイドラインとなることが期待される。

## わが国における薬事法改正のポイント

さてわが国に目を向けてみよう。品質関連の薬事法改

正のポイントとしては、元売承認制度の創設により全面的な委託製造の実現で、多様なビジネスモデルに対応する制度の構築が必要となったことである。製造工程の承認書への記述が求められ、それを援助するための、原薬等登録原簿(マスターファイル)制度が導入された。さらにGMPが承認要件とされた。

日本独自の制度である承認書は、従来、その機能を發揮していなかったことが、品質再評価事業から浮かび上がった問題点からうかがえる。品質再評価は先発品の溶出プロファイルに後発品のプロファイルを合わせるといふプロトコルで始まったが、先発品のプロファイルが一貫しない例がいくつも出てきた。先発品のプロファイルが製剤設計が良くて元から悪かったのか、それとも変更管理が行われていなかったために、いつの間にか悪くなってしまったのか、生物学的同等性や溶出性に関するデータがないために、どちらかわからない状態にある。有効性、安全性が担保されたバイオバッチのプロファイルを、実生産の段階まで変更管理でしっかりつないでいくことがなされなかった結果である。薬事法改正以前の制度では承認書には製造工程が記述されず、またGMPでは省令レベル以上では、変更管理が要件とされなかったためであろう。

承認書は行政から見れば、製品標準書が適切に書かれているかの判断における起点文書であり、企業から見れば変更管理における最重要事項の記述がなされるべき文