

Table 8 2.3. 製造工程の開発

- 3.2.P.3.3 で記載した製造工程に関して選択、最適化と管理について説明する。
 - ・ 製造プロセスの選択に対応しかつ成分（添加剤）の適格性を確認するために、重大な品質特性と製造方法の有効な選択肢（例えば乾燥造粒と湿式造粒）について考慮することが重要である。
- プロセスは製剤の品質を保証するような適切な規格を定めることが出来るものであるべきである。
 - ・ 申請時には限られた量のデータしか利用できず、そのことが判定基準の設定プロセスに影響を与えていること留意する。
- 無菌製剤に関しては、製剤の適切な無菌化方法と一次包装を選択し、正当化しなければならない。
- 局方に記載されている最終滅菌を用いない方法を選択した場合には、科学的な説明と合理的理由を記載しなければならない。
- 臨床の安全性及び有効性試験、生物学的利用率、生物学的同等性試験のロットあるいは主要な安定性試験のためのロットを製造する時の製造工程と 3.2.P.3.3 との違いについて記載するべきである。
- その情報はプロセスとそれに対応したロット分析 (3.2.P.5.4) の情報が容易に比較可能な方法で示されるべきである。
- 将来の工程の最適化のための柔軟性を見込むためには、製造プロセスの開発を記載するときに、重要な特性又は工程の終点をリアルタイムで、またはほとんどリアルタイム (例えば on-, at- or in-line) の条件でモニタリングする測定システムを記載することが有効である。
- 幅広い条件下における工程の堅牢性の評価は、特に構造化された手段 (structural tool) と連結することによりリスク評価とリスクの軽減にとって有効である。
 - ・ 将来の製造の最適化及びプロセスの最適化をサポートする (ICH guideline Q9 *Risk Management* 参照)。

改善して最適化のためのフレキシビリティを見込むために、リアルタイムな条件でモニターすることも重要であるという新しい概念が出ています。また、工程の頑健性の評価は、特にストラクチャツールと連携することによって、今リスク評価やリスクの軽減にとって有効であると記載されています。

7. Outstanding questions (Table 9)

議論の中で各極が解決すべき問題が三つありました。

一つ目は、Q8 の文書は 1 回限りではなく、その製品のライフサイクルの間続きますので、それをどのように取り扱い、どのような形で規制当局が実際の行為に反映させるかということです。EU とアメリカは何らかのイベントが生じるといっています。日本は承認申請時とその後のリンクが明確ではないので、継続的に維持し、査察時の有効利用を意図しているという答えをしています。

二つ目は、Q8 と Q9 が連携を取る必要があることです。

Table 9 Outstanding questions

- 更新 - ライフサイクルへの取り組み
 - ・ 各極の取り組み及び CTD 文書 P2 のライフサイクル管理のための必要事項はどのようなものか？
 - 現時点での理解
 - ・ EU and US - 何らかのイベントが生じる
 - ・ Japan - 継続的な維持と査察時の有効利用を意図
 - Q9 の統合
 - ・ Q9 のどの部分を Q8 はより充実したものにし、また統合すべきか？また例示すべきか？
 - ・ リスクの例をどのように Q8 は利用するのか
 - ・ Q9 は Q8 の視点 (Q9 には描かれていない) から何を必要とするのか
 - Q8 Part II
 - ・ 提案される Part II のについて各極の国内での期待は何か
 - ・ 各極にとって最適の Part II は何か
- 各 EWG で質問に対する回答を作成、e-mail 及び teleconference で議論

三つ目は、Q8 では Part II (補遺) が提案され、
そこで何を求めるか各極に問われています。

8. Integrating Risk in Q8 (Fig. 2)

Part II として補遺の部分を今後議論する予定です。
現在議論しているのは、Part I で、中心的な文書です。
Part II では Annex として各 dosage form などについて議論する予定です。

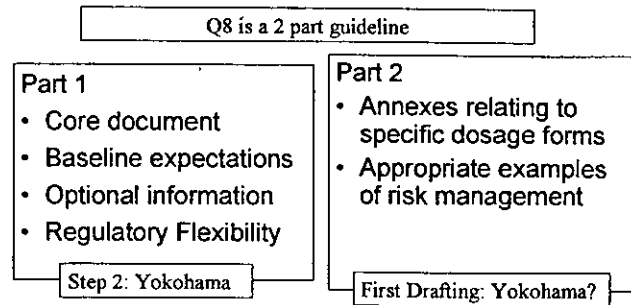


Fig. 2 Integrating Risk in Q8

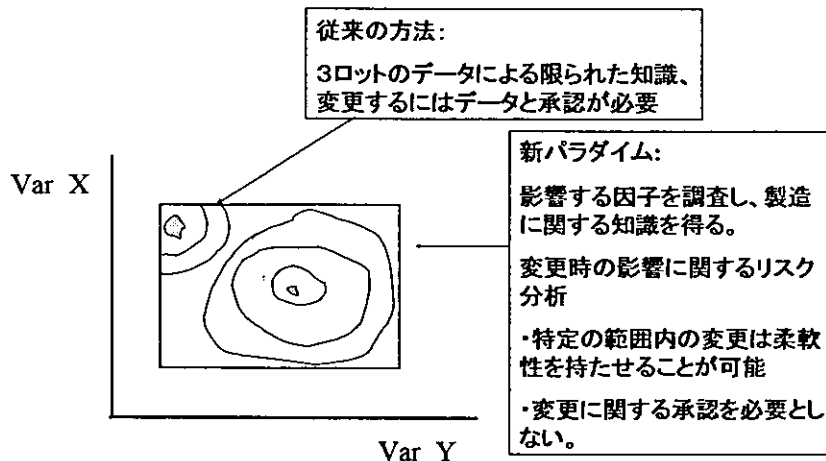


Fig. 3 ICH Q8: Discussion on Regulatory Flexibility

Table 10 今後の予定

Action Required	Date Due	Responsible
VERSION 3		
Issue current draft (Version 3.0)	10-6-04	JCB
Comments on Version 3.0 to rapporteur	15-8-04	All
Consolidated comments issued to EWG together with edited version of guideline incorporating any strategic changes	1-10-04	JCB
Acceptance of comments or proposals for final change – leading to Step 2 document	15-11-04	All
STRATEGIC QUESTIONS		
Responses to Questions to rapporteur	31-7-04	All
Consolidated responses issued to EWG	15-8-04	JCB
Interim teleconference on strategic issues, if not resolvable by email	16-9-04 or 21-9-04	JCB
Industry to assemble worked examples of 'risk management in action' for Yokohama – send tp Fritz Erni	15-10-04	FE

9. Discussion on Regulatory Flexibility

今後の目指す方法についてのワシントン会議でよく使われた図を Fig. 3 に示します。従来は、系統的な知識が明確にされていませんでした。ある限られた情報で製造していた場合、その製造条件は適正な品質が確保できるぎりぎりのところかもしれません。したがって、何か変更しようとする和不適切な範囲に落ち込んでしまうかもしれませんので、必ずデータを取って承認を求めなければなりません。全

体像が分かっているならば、自分の位置がわかりますので、少々パラメータを動かしても品質に問題ないことを主張することができます。このようなケースでは特に承認を必要としないといえます。

10. 今後の予定 (Table 10)

Draft 3.0 についてのコメントを8月に投げ返す予定としています。また、横浜会議では Step 2 文書とすることを目指し作業を進めています。

Improved sensitivity for insulin in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by premixing α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix with transferrin

Tetsu Kobayashi*, Hiroshi Kawai, Takuo Suzuki, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Received 27 February 2004; Revised 25 March 2004; Accepted 25 March 2004

This report describes an enhancement of the signal intensities of proteins and peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS). When α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) premixed with human transferrin (Tf) was used as a matrix, the signal intensity of insulin was amplified to more than ten times that of the respective control in CHCA without Tf. The detection limit of insulin was 0.39 fmol on-probe in the presence of Tf, while it was 6.3 fmol in the absence of Tf. The signal intensity of insulin was also enhanced when the CHCA matrix was premixed with proteins other than Tf (80 kDa), such as horse ferritin (20 kDa), bovine serum albumin (BSA, 66 kDa), or human immunoglobulin G (150 kDa). The optimum spectrum of insulin was obtained when the added amount of protein was in the range 0.26–0.62 pmol, regardless of the molecular weight of the added protein. Tf and BSA outperformed the other tested proteins, as determined by improvements in the resulting spectra. When the mass spectra of several peptides and proteins were recorded in the presence of Tf or BSA, the signal intensities of large peptides such as glucagon were enhanced, though those of smaller peptides were not enhanced. In addition, the signal enhancement achieved with Tf and BSA was more pronounced for the proteins, including cytochrome C, than for the large peptides. This enhancement effect could be applied to improve the sensitivity of MALDI-TOFMS to large peptides and proteins. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) and electrospray ionization mass spectrometry have been widely used in studies of protein chemistry, including proteomics studies aimed at sequence identification or quantitative analyses following enzymatic digestion by isotope-coded affinity tags and other tagging systems.^{1–8} In particular, MALDI-TOFMS has been used for the qualitative and quantitative analysis of intact proteins.^{9–11} When the MALDI technique was first introduced as an ionization method for proteins, a mixture of fine metal powder and glycerol, or nicotinic acid, was used as the matrix.^{12,13} Progress has been made with other matrix materials such as sinapinic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), which have some desirable properties such as less intense adduct peaks and a relative insensitivity to contamination.^{14–16} With the MALDI approach, analyte proteins are dispersed on a surface in a thin layer of matrix. The energy of an incident

pulse of laser photons is absorbed by the matrix to form a jet of matrix vapor that lifts the analyte proteins from the surface and transforms some of them into ions.¹³

However, the mechanisms by which laser light irradiation is able to generate macromolecular ions have not been fully verified to date. It has been reported that the ionization of macromolecules by the MALDI process is affected by several factors. For example, peptide signal intensity was increased by the use of acetone as the solvent for CHCA matrix instead of employing the commonly used solvent, a mixture of acetonitrile and aqueous 0.1% trifluoroacetic acid (TFA).¹⁷ The signal-to-noise (S/N) ratios for macromolecules are low in DHB matrix, but the addition of suitable additives (fructose, glucose, fucose, or 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid) to the DHB matrix improved its performance in the high molecular mass range.^{18–21} In the CHCA and sinapinic acid matrices, the detection of higher molecular weight proteins was improved by using polytetrafluoroethylene (Teflon) as sample support.^{22,23}

Recently, we investigated a method of identifying and quantifying proteins in blood using mass spectrometry. During the present study, we discovered that the signal intensity of human insulin was augmented more than 10-fold when transferrin (Tf) was mixed with the CHCA matrix

*Correspondence to: T. Kobayashi, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.
E-mail: kobayash@nihs.go.jp
Contract/grant sponsor: Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

solution used for MALDI-TOFMS. This phenomenon was not specific to either insulin or Tf, which suggested that such enhancements could be used more generally to improve the sensitivity of protein analysis with MALDI-TOFMS.

EXPERIMENTAL

Materials

Human atrial natriuretic peptide (hANP), glucagon, insulin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), transferrin (Tf), bovine serum albumin (BSA), horse spleen ferritin (106 mg/mL in 0.15 M NaCl), and ProteoMass Peptide & Protein, were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Human immunoglobulin G (IgG, 11.3 mg/mL in 0.01 M sodium phosphate, 0.5 M NaCl, pH 7.6) was obtained from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Tokyo, Japan). Human insulin, IGF-1, glucagon, and hANP stock solutions were prepared at concentrations of 100 pmol/ μ L by dissolving them in 0.1% TFA. Tf and BSA stock solutions were prepared at concentrations of 10 mg/mL by dissolving the materials in Millipore deionized water. ProteoMass Peptide & Protein stock solutions, which include bradykinin fragment 1-7, human angiotensin II, synthetic peptide P₁₄R, human ACTH fragment 18-39, bovine insulin oxidized B chain, bovine insulin, equine cytochrome C, equine apomyoglobin, rabbit aldolase, and BSA, were prepared at concentrations of 100 pmol/ μ L each, according to the manufacturer's instructions.

Sample application and data acquisition

The Tf-mixed CHCA was a 5:1 mixture of the CHCA solution (10 mg/mL in 50% acetonitrile in 0.1% aqueous TFA) and Tf solution (0.10 μ g/ μ L; the final concentration was approximately 8.3 ng/ μ L), corresponding to 0.21 pmol Tf on each well of the target plate, if not otherwise noted. The control CHCA was a mixture of the CHCA solution and deionized water (5:1). A portion of each sample solution was immediately mixed with an equal volume of the matrix solution with or without Tf, and an aliquot of 2 μ L (corresponding to 1 μ L of sample solution) was applied to a stainless steel target plate. Mass spectrometric analyses were performed using an AB4700 proteomics analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). The operating conditions were as follows: Nd:YAG laser (355 nm), linear mode, and detection of positive ions. The spectra were generated by signal averaging 50 laser shots into a single spectrum. The signal intensity was obtained after performing background correction and noise reduction using the Data Processor software (Applied Biosystems). This software was also used to determine the detection limit.

To confirm whether or not the matrix solution was at an optimum composition, serially diluted CHCA, DHB, or sinapinic acid solutions (from 10 to 0.078 mg/mL in 50% acetonitrile, 50% 0.1% TFA) were added to the insulin solution (100 fmol/ μ L). The most intense signal was obtained when 10 mg/mL CHCA was added to the insulin solution.

RESULTS AND DISCUSSION

Human insulin solution (6.3 fmol/ μ L) was mixed with an equal volume of Tf-mixed CHCA or control CHCA. When

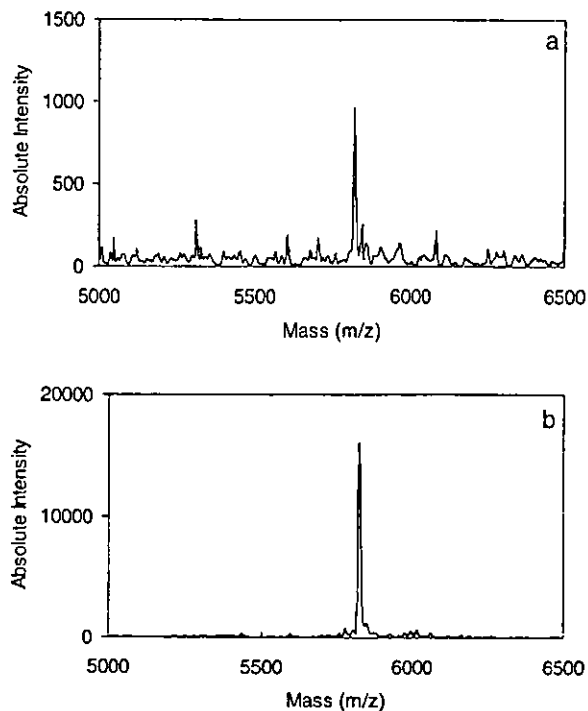


Figure 1. MALDI mass spectra of human insulin. The insulin solution (6.3 fmol/ μ L) and matrix solution were mixed together in equal volumes; 2 μ L of the resulting mixture were applied to a target plate, allowed to dry, and analyzed by MALDI-TOFMS (see Experimental). The matrix solution was a 5:1 mixture of CHCA solution (10 mg/mL in 50% acetonitrile in 0.1% aqueous TFA) with deionized water or Tf solution (0.10 μ g/ μ L). (a) Control CHCA used as matrix. (b) Tf-mixed CHCA used as matrix.

the Tf-mixed CHCA was used as matrix, the signal intensity of insulin in the MALDI-TOFMS detection system was amplified more than 10-fold relative to that achieved with the control CHCA (Fig. 1). To assess the sensitivity of insulin detection, the matrix solution was added to serially diluted insulin solutions (from 100 to 0.20 fmol/ μ L in deionized water), and samples were then spotted on a target plate. The detection limit of insulin was 0.39 fmol on the target plate in a Tf-mixed CHCA matrix under the present experimental conditions, whereas this limit was 6.3 fmol in the case of CHCA without Tf (Fig. 2).

To obtain the optimum concentration of Tf for the enhancement of insulin measurement sensitivity, the CHCA solution was mixed with serially diluted Tf solutions (from 1.0 μ g/ μ L to 7.8 ng/ μ L) before addition to the insulin solution (100 fmol/ μ L). The signal intensity increased in a Tf-concentration-dependent manner (Fig. 3(a)). However, the S/N ratio decreased when the Tf concentration was more than 125 ng/ μ L (Fig. 3(b)), though it should be noted that the S/N value was still higher than the corresponding control value, i.e., 15 ± 7 . A signal for 0.39 fmol/ μ L insulin was detected in the CHCA solution mixed with 0.1 μ g/ μ L Tf (Fig. 2), whereas the signal for 1.6 fmol/ μ L insulin was not detected in the CHCA solution mixed with 1.0 μ g/ μ L Tf (data not shown). These results suggest that the detection limit was also decreased in the presence of a high concentration of Tf.

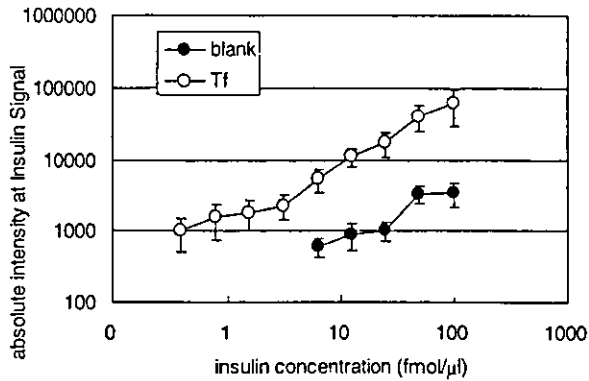


Figure 2. Dependence of insulin signals on insulin concentration. Sequentially diluted human insulin solution (100 to 0.20 fmol/ μ L in deionized water) and matrix solution were mixed in equal volumes. The matrix solution was a 5:1 mixture of the CHCA solution with either deionized water or Tf solution (0.10 μ g/ μ L). The absolute intensity of the insulin signal obtained from Tf-mixed CHCA (open circles) is compared with that obtained for the control CHCA (closed circles). Each point represents the mean \pm S.E. of four tests.

It is known that an excess amount of protein components can strongly influence the behavior of the MALDI process, resulting in partial or complete ion signal suppression.²⁴ In addition, the optimum mass ratio between the analyte and matrix for MALDI analysis has been demonstrated empirically.

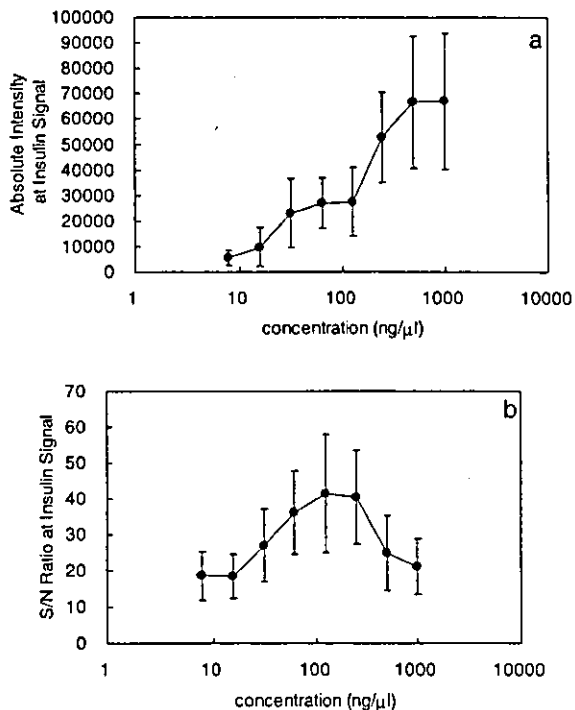


Figure 3. Dependence of insulin signal on Tf concentration. Serially diluted Tf solution was added to five volumes of the CHCA solution before mixing the resulting solution with an equal volume of human insulin (100 fmol/ μ L): (a) absolute intensity (arbitrary units) and (b) S/N ratio of the insulin signal in the MALDI analysis. Each point represents the mean \pm S.E. of four tests.

ally.¹⁵ When the CHCA was mixed with 1.0 μ g/ μ L Tf, the excess amount of Tf might have suppressed the signal intensity of insulin as well. However, if that amount is appropriate, Tf appears somehow capable of enhancing the signal.

To determine whether or not the enhancement of the insulin MALDI-TOFMS signal intensity was specific to Tf, the CHCA solution was mixed with serially diluted solutions of several peptides and proteins before its addition to the insulin solution. The insulin signal intensity was also enhanced in the presence of ferritin (20 kDa), BSA (66 kDa), or IgG (150 kDa) (Fig. 4(a)). However, this was not found to occur in a simple concentration-dependent manner in the case of either ferritin or IgG; furthermore, when the CHCA solution was mixed with more than 2.0 μ g/ μ L of these protein solutions, no insulin signal was detected. The enhancement of the insulin signal intensity was relatively small in the presence of peptides such as hANP (3.1 kDa) and glucagon (3.4 kDa). In addition, when the CHCA solution was mixed with more than 77 ng/ μ L of hANP or 87 ng/ μ L of glucagon, no insulin signal was detected. Among the tested peptides and proteins, the insulin signal intensity was enhanced most effectively in the presence of Tf (80 kDa) or BSA. Therefore, it is probable that this type of enhancement requires an added protein of moderate molecular weight, namely 66–80 kDa.

With regard to the results for the serial dilutions of the added peptides and proteins, the highest S/N values were obtained at 4.8 ng/ μ L hANP, 5.4 ng/ μ L glucagon, 66 ng/ μ L ferritin, 0.13 μ g/ μ L BSA, 0.13 μ g/ μ L Tf, or 0.57 μ g/ μ L

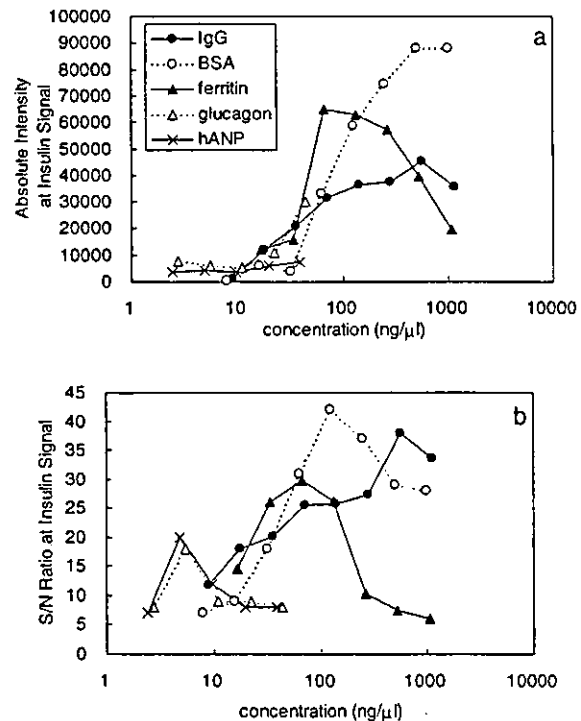


Figure 4. Dependence of insulin signal on concentrations of various added proteins. Serially diluted IgG, BSA, ferritin, glucagon, or hANP solution was added to the CHCA solution before the solution was mixed with the human insulin solution (100 fmol/ μ L): (a) absolute intensity (units) and (b) S/N ratio of the insulin signal. Each point represents the average of duplicate samples.

IgG (Figs. 3(b) and 4(b)), which correspond to 0.26 pmol, 0.26 pmol, 0.50 pmol, 0.32 pmol, 0.26 pmol, and 0.62 pmol, respectively, in each well. Thus, the optimum molar concentrations occurred in the same scale order, although the optimum mass concentrations of polypeptides required to enhance the signal differed markedly between the proteins and small peptides. In addition, the molar concentrations of excess peptides or proteins required to suppress the insulin signal were also found to exhibit the same scale in the same order. The ionization of insulin appeared to depend on the molar concentration of the peptide or protein which was mixed with the CHCA matrix solution.

To examine whether or not the signal enhancement was specific to human insulin, the CHCA solution premixed with Tf or BSA (0.10 µg/µL) was added to a solution of peptides and proteins, which included hANP, glucagon, human insulin, IGF-I, and ProteoMass Peptide & Protein at concentrations of 50 fmol/µL each. The signal intensities of [angiotensin II]⁺ (1046 Da), [synthetic peptide P₁₄R]⁺ (1534 Da), and [ACTH fragment]⁺ (2465 Da) were either not enhanced or were reduced in the matrix premixed with Tf or BSA (Table 1). However, the signal intensities of [hANP]⁺ (3080 Da), [glucagon]⁺ (3483 Da), [insulin B chain]⁺ (3494 Da), and [bovine insulin]⁺ (5730 Da) were enhanced as well as that of [human insulin]⁺ (5808 Da) (Table 1, Fig. 5). The signal intensities of [IGF-I]⁺ (7649 Da), [cytochrome C]⁺ (12 362 Da), and [cytochrome C]²⁺ were enhanced more than that of human insulin in the presence of Tf or BSA. In addition, the signals of [apomyoglobin]⁺ (16 952 Da) and [apomyoglobin]²⁺ were clearly observed in the presence of Tf or BSA, although their signals were not detected in the control matrix. In this latter case, the signal of [apomyoglobin]⁺ overlapped with that of BSA, but not of Tf; therefore, it was more advantageous to use Tf than BSA for detecting this signal. Since BSA was included in the ProteoMass Peptide & Protein solution, the signals of [BSA]⁺ (66 430 Da), [BSA]²⁺, [BSA]³⁺, and [BSA]⁴⁺ were also detected in the presence of Tf (Table 1, Fig. 5(b)).

The results reported above demonstrate that the enhancement of the signal intensity achieved with the use of Tf and

BSA was observed for both peptides and proteins, and this effect was not specific to human insulin. The degree of enhancement was dependent on the molecular weights of the peptides and proteins, and no such enhancement was observed in the case of small peptides; in this regard a dividing line appeared to exist between [ACTH fragment]⁺ (2465 Da) and [hANP]⁺ (3080 Da).

The mechanism by which signal intensity enhancement was achieved with the use of peptides and proteins mixed with the matrix solution remains unclear. However, when super DHB (a co-matrix of DHB and 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid) was used as the matrix, ion yields and S/N ratio improved, especially for the high-mass range.²⁰ It has been suggested that this signal enhancement was caused by a disorder in the DHB lattice, allowing 'softer' desorption. This type of signal enhancement has also been observed in the case of substance P in CHCA after fast evaporation of an acetone solvent, which resulted in the more homogeneous distribution of matrix and analytes.¹⁸ In addition, better mass resolution has been observed in the spectra of cytochrome C in a CHCA matrix desorbed from polyethylene and polypropylene membranes than has been observed with a CHCA matrix desorbed from stainless steel; it was thus suggested that such improved resolution might be due at least in part to the formation of relatively small matrix crystals within the membrane lattice structure.²⁵ In the present study, Tf and other proteins might have led to a similar disorganization in the CHCA lattice, resulting in the homogeneous distribution of insulin in the CHCA. However, the mechanism may differ from that suggested here, since the disorder in the CHCA lattice cannot reasonably account for why both Tf and BSA were able to enhance the insulin signal more effectively than either hANP or glucagon. As the next step, we are now planning to compare the crystals of the additive macromolecules plus matrix with those of the control matrix, using microscopic examination, to help elucidate the enhancement mechanism. We also intend to investigate whether the enhancement effect is observed in matrices other than CHCA. If crystallization is important,

Table 1. Signal intensities for proteins and peptides obtained using a matrix premixed with deionized water or with solutions of Tf or BSA

	Water	Tf	BSA
[Angiotensin II] ⁺	27 834 ± 10 757	17 057 ± 5021	19 755 ± 11 237
[P14R] ⁺	41 689 ± 15 289	30 675 ± 8588	29 237 ± 13 330
[ACTH 18–39] ⁺	4371 ± 1586	3801 ± 2246	5458 ± 3826
[hANP] ⁺	5158 ± 1323	6889 ± 2879	9523 ± 6384
[human glucagon] ⁺	435 ± 183	674 ± 324	978 ± 566
[insulin B chain] ⁺	367 ± 257	997 ± 251	715 ± 479
[bovine insulin] ⁺	639 ± 100	6266 ± 2736	7498 ± 5331
[human insulin] ⁺	1267 ± 130	13 321 ± 5057	12 982 ± 6863
[equine cytochrome C] ²⁺	166 ± 83	5668 ± 1975	3460 ± 1442
[human IGF-I] ⁺	459 ± 81	7667 ± 1808	6263 ± 2872
[equine apomyoglobin] ²⁺	nd	2249 ± 994	2217 ± 1087
[equine cytochrome C] ⁺	114 ± 43	7629 ± 1804	4006 ± 1981
[BSA] ⁴⁺	nd	52 ± 14	2459 ± 604
[equine apomyoglobin] ⁺	nd	1347 ± 700	2090 ± 1316
[BSA] ³⁺	nd	155 ± 13	3721 ± 1426
[BSA] ²⁺	nd	114 ± 27	3624 ± 1681
[BSA] ⁺	nd	25 ± 8	634 ± 433

Each entry is the average of the most intense signals from four samples. nd: no signal was detected.

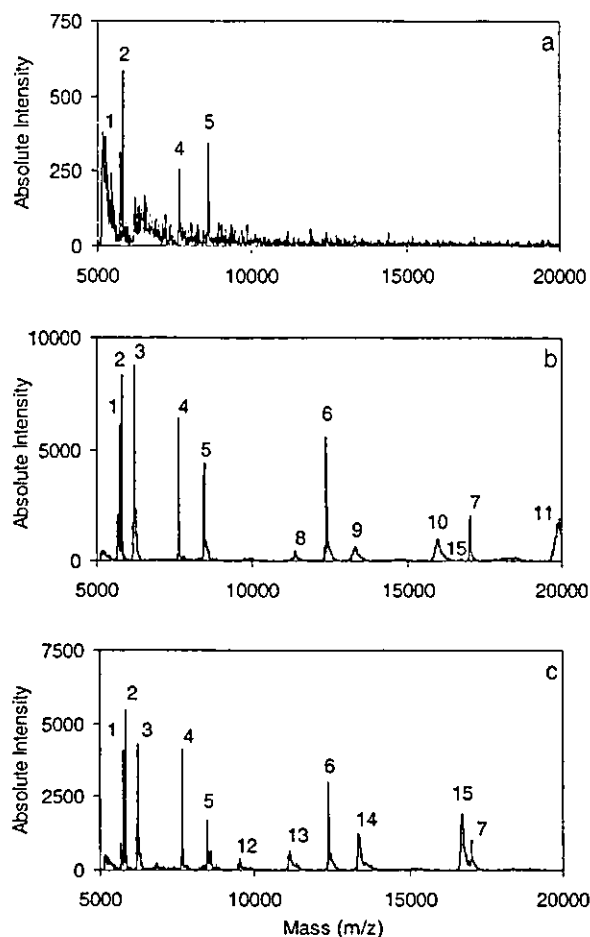


Figure 5. MALDI mass spectra of a mixture of peptides and proteins. The mixture of peptides and proteins (50 fmol/ μ L each) and the matrix solution were mixed together in equal volumes. The matrix solution was a 5:1 mixture of the CHCA solution with (a) deionized water; (b) Tf solution (0.10 μ g/ μ L); and (c) BSA solution (0.10 μ g/ μ L). Signal 1, [bovine insulin]⁺ (5730 Da); 2, [human insulin]⁺ (5808 Da); 3, [cytochrome C]²⁺; 4, [IGF-I]⁺ (7649 Da); 5, [apomyoglobin]²⁺; 6, [cytochrome C]⁺ (12 362 Da); 7, [apomyoglobin]⁺ (16 952 Da); 8, [Tf]⁷⁺; 9, [Tf]⁶⁺; 10, [Tf]⁵⁺; 11, [Tf]⁴⁺; 12, [BSA]⁷⁺; 13, [BSA]⁶⁺; 14, [BSA]⁵⁺; and 15, [BSA]⁴⁺.

the effect should not be observed when using liquid matrices.^{26,27}

The present results suggest that the enhancement brought about by either Tf or BSA could be applicable to the improvement of sensitivity in the detection of proteins by MALDI-TOFMS in general. However, when Tf or BSA was used as an enhancer in a MALDI-TOFMS system, signals from Tf and BSA were also detected, which sometimes interfered with the analysis of the target proteins. Therefore, neither Tf nor BSA appears to be the best possible enhancer. Further studies are currently underway in order to discover the best macromolecule as an enhancer.

CONCLUSIONS

We have demonstrated that the signal intensities of insulin and of several peptides and proteins were enhanced in

CHCA premixed with Tf or other peptides or proteins. The characteristics of this type of enhancement are as follows: (1) Tf (80 kDa) and BSA (66 kDa) led to better signal enhancement than did small peptides and proteins (<20 kDa) or IgG (150 kDa); (2) the optimum S/N value was observed when the added amount of peptide or protein was within the range 0.26–0.62 pmol; and (3) the signals of peptides of high molecular weight (>3000 Da) were enhanced by the addition of Tf or BSA to CHCA, although the signals of small peptides (<2500 Da) were not enhanced. This type of enhancement may be useful for the improvement of protein analyses with MALDI-TOFMS.

Acknowledgements

This study was supported in part by a research grant on Human Genome, Tissue Engineering Food Biotechnology from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

REFERENCES

- Roberts GD, Johnson WP, Burman S, Anumula KR, Carr SA. *Anal. Chem.* 1995; **67**: 3613.
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. *Nat. Biotechnol.* 1999; **17**: 994.
- Münchbach M, Quadroni M, Miotto G, James P. *Anal. Chem.* 2000; **72**: 4047.
- Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev PA, Fenselau C. *Anal. Chem.* 2001; **73**: 2836.
- Cagney G, Emili A. *Nat. Biotechnol.* 2002; **20**: 163.
- Vogt JA, Schroer K, Hözler K, Hunzinger C, Klemm M, Biefang-Arndt K, Schillo S, Cahill MA, Schlattenholz A, Matthias H, Stegmann W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 1273.
- Kuyama H, Watanabe M, Toda C, Ando E, Tanaka K, Nishimura O. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 1642.
- Wu SL, Choudhary G, Ramström M, Bergquist J, Hancock WS. *J. Proteome Res.* 2003; **2**: 383.
- Nakanishi T, Okamoto N, Tanaka K, Shimizu A. *Biol. Mass Spectrom.* 1994; **23**: 230.
- Nelson RW, Krone JR, Bieber AL, Williams P. *Anal. Chem.* 1995; **67**: 1153.
- Tubbs KA, Nedelkov D, Nelson RW. *Anal. Biochem.* 2001; **289**: 26.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988; **2**: 151.
- Karas M, Hillenkamp F. *Anal. Chem.* 1988; **60**: 2299.
- Beavis RC, Chait BT. *Anal. Chem.* 1990; **62**: 1836.
- Strupat K, Karas M, Hillenkamp F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 1991; **111**: 89.
- Beavis RC, Chaudhary T, Chait BT. *Org. Mass Spectrom.* 1992; **27**: 156.
- Vorm O, Roepstorff P, Mann M. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 3281.
- Köstler C, Castoro JA, Wilkins CL. *J. Am. Chem. Soc.* 1992; **114**: 7572.
- Billeci TM, Stults JT. *Anal. Chem.* 1993; **65**: 1709.
- Karas M, Ehring H, Nordhoff E, Stahl B, Strupat K, Hillenkamp F, Grehl M, Krebs B. *Org. Mass Spectrom.* 1993; **28**: 1476.
- Tsarbopoulos A, Karas M, Strupat K, Pramanik BN, Nagabhushan TL, Hillenkamp F. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 2062.
- Yuan X, Desiderio DM. *J. Mass Spectrom.* 2002; **37**: 512.
- Botting CH. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 598.
- Nelson RW, McLean MA. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 1408.
- Worrall TA, Cotter RJ, Woods AS. *Anal. Chem.* 1998; **70**: 750.
- Carda-Broch S, Berthod A, Armstrong DW. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 553.
- Turney K, Harrison WW. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004; **18**: 629.

- 15 Kovacs-Nolan J, Zhang JW, Hayakawa S, Mine Y: Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid. *J Agric Food Chem* 2000;48:6261-6266.
- 16 Besler M, Petersen A, Steinhart H, Paschke A: Identification of IgE-Binding Peptides Derived from Chemical and Enzymatic Cleavage of Ovomuroid (Gal d 1). Internet Symposium on Food Allergens 1999;1:1-12. <http://www.food-allergens.de>
- 17 Urisu A, Yamada K, Tokuda R, Ando H, Wada E, Kondo Y, Morita Y: Clinical significance of IgE-binding activity to enzymatic digests of ovomucoid in the diagnosis and the prediction of the outgrowing of egg white hypersensitivity. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120:192-198.
- 18 Zacharius RM, Zell TE, Morrison JH, Woodlock JJ: Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal Biochem* 1969;30:148-152.
- 19 Mine Y, Zhang JW: Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292:1070-1074.
- 20 Beyer K, Ellman-Grunther L, Jarvinen KM, Wood RA, Hourihane J, Sampson HA: Measurement of peptide-specific IgE as an additional tool in identifying patients with clinical reactivity to peanuts. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:202-207.
- 21 Mine Y, Sasaki E, Zhang JW: Reduction of antigenicity and allergenicity of genetically modified egg white allergen, ovomucoid third domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302:133-137.
- 22 Matsuda T, Gu J, Tsuruta K, Nakamura R: Immunoreactive glycopeptides separated from peptic hydrolysate of chicken egg white ovomucoid. *J Food Sci* 1985;50:592-594.
- 23 Cooke SK, Sampson HA: Allergenic properties of ovomucoid in man. *J Immunol* 1997;159: 2026-2032.
- 24 Kane PM, Holowka D, Baird B: Cross-linking of IgE receptor complexes by rigid bivalent antigens greater than 200 Å in length triggers cellular degranulation. *J Cell Biol* 1988;107: 969-980.

[シンポジウム: Functional Glycomics ミニレビュー]

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 nano-electrospray 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¹⁾。しかし、従来のプロテオミクスのアプローチ、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²⁾ 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^{3,4)}。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 µg 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 NaBH₄ 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 α -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、 α -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 α 結合していることが確認された⁵⁾. NS0 細胞産生糖タンパク質には Gal α 1-3Gal を含む糖鎖が結合していることが報告されており^{6,7)}, 今回検出された Hex-Hex も Gal α 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 α 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 μ g のヒト黒色腫細胞産生ヒト組織プラスミノージェンアクチベータ (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. NaBH₄ 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⁸⁾. 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

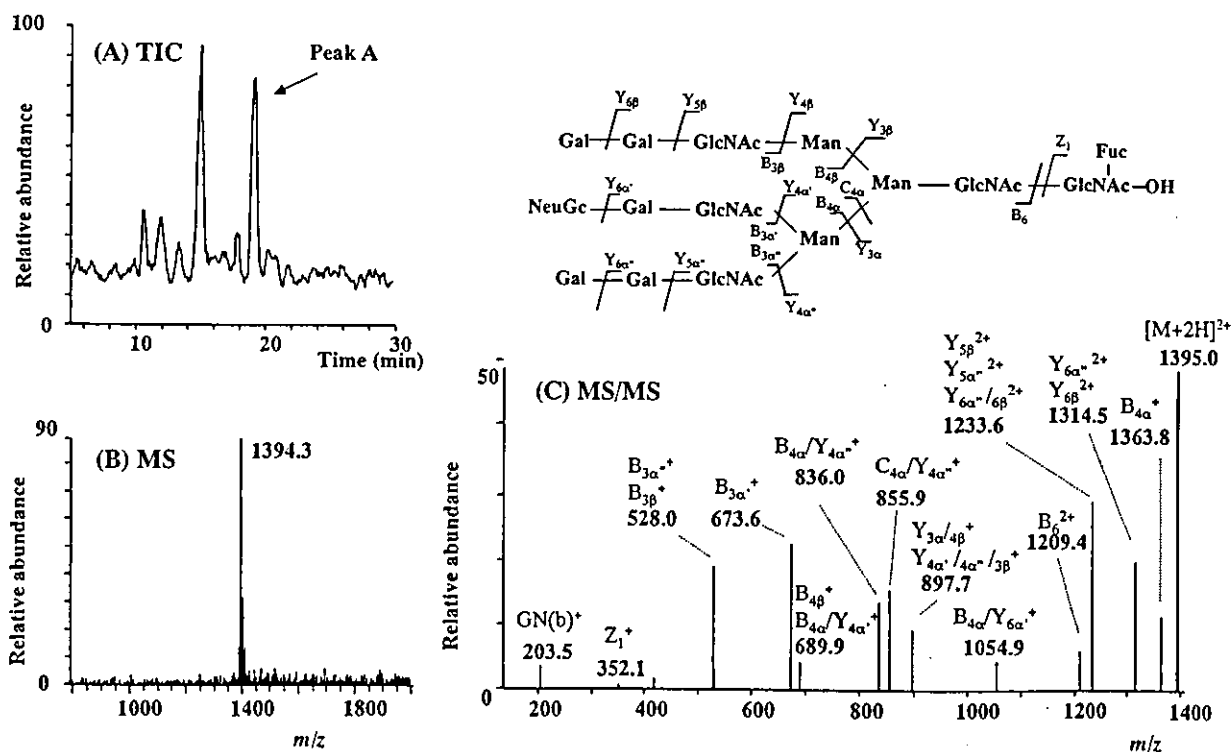


Fig. 1. (A) GCC-LC/MS によって得られた HGF の糖鎖プロファイル, (B) ピーク A のマススペクトル, (C) ピーク A のプロダクトイオンスペクトル及び推定構造

カラム, Hypercarb (0.2×150 mm); 流速, 3 μ l/min; 溶離液, 5 mM 酢酸アンモニウム/H₂O-アセトニトリル; MS, TSQ-7000 (Thermoelectron)

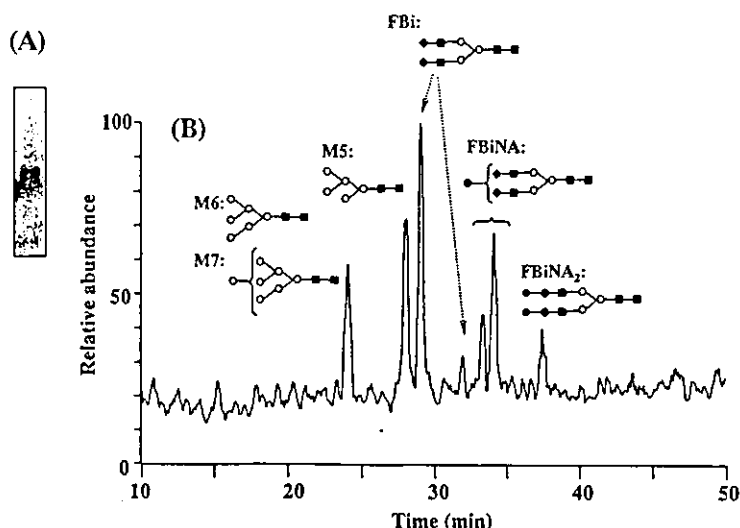


Fig. 2. (A) tPA (2 µg) の SDS-PAGE, (B) GCC-LC/MS によるゲル内 tPA 由来糖鎖のプロファイル

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⁹⁻¹¹⁾。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。

5×10^6 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画分した。それぞれの画分から PNGase F によって糖鎖を切り出し、NaBH₄ 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さ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。

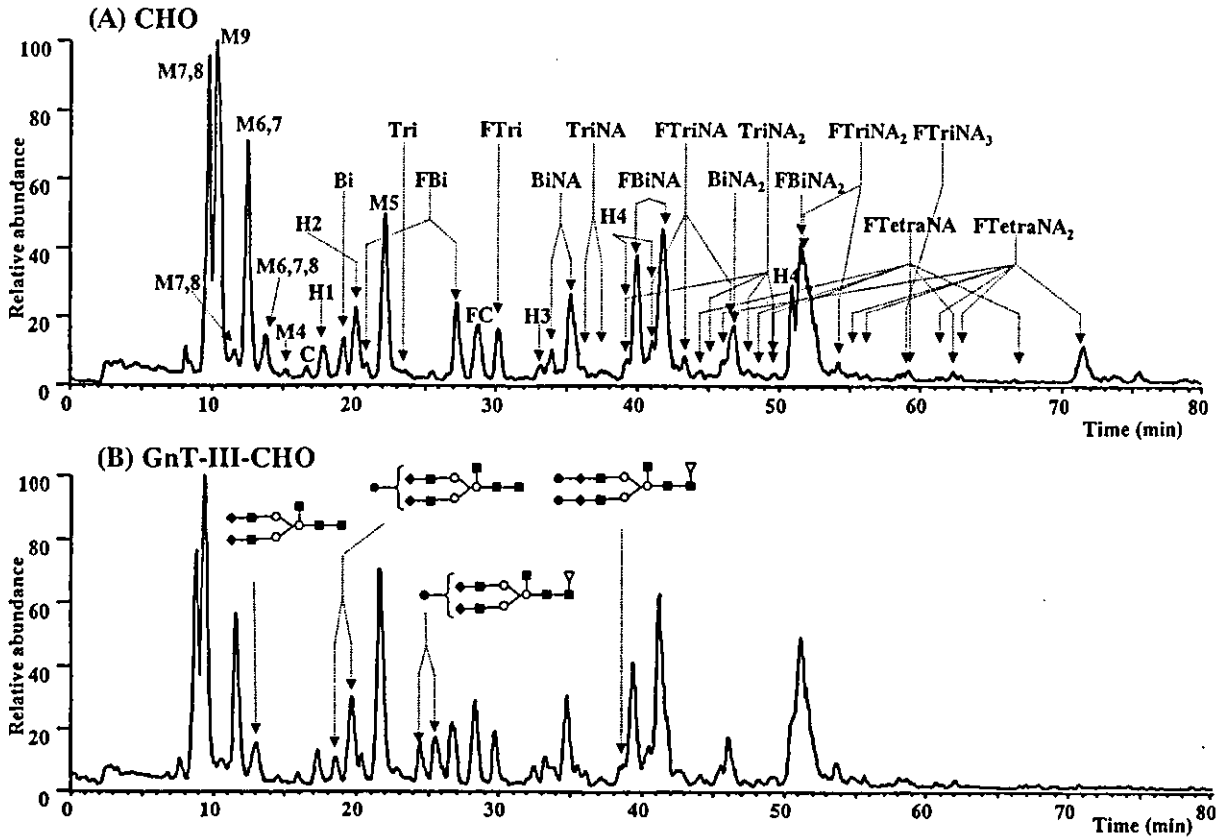


Fig. 3. (A) CHO 細胞膜画分の糖鎖プロファイル, (B) GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞の糖鎖プロファイル
 M, Man; H, hybrid; C, trimannosylcore; F, Fuc; NA, NeuAc; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary

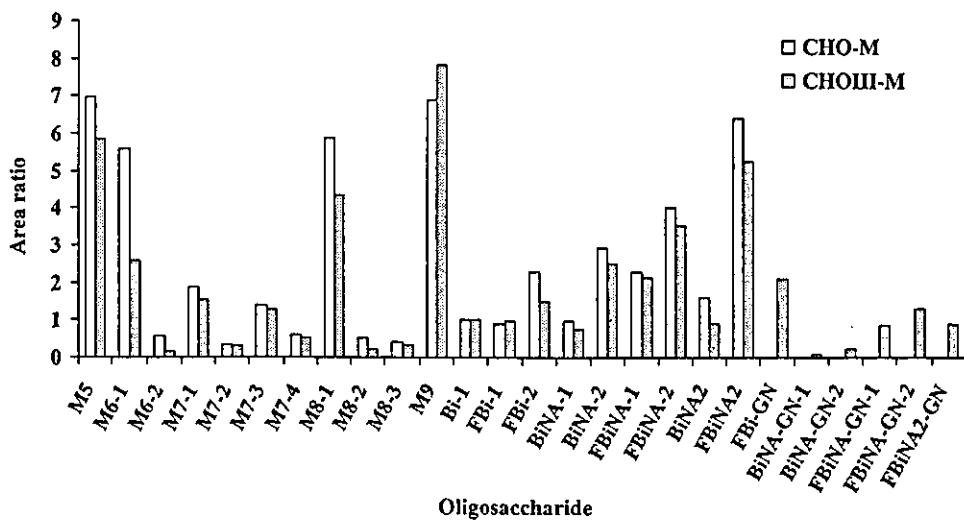


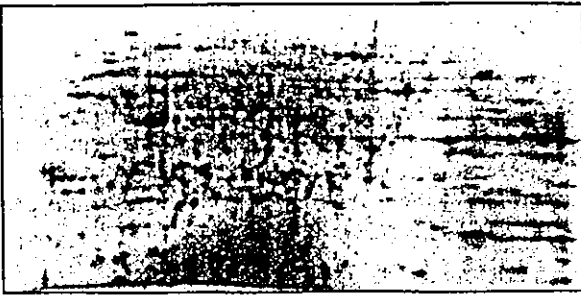
Fig. 4. CHO 細胞膜画分 (CHO-M) 及び GnT-III 遺伝子導入細胞由来膜画分 (CHOIII-M) 由来糖鎖の分布
 アシアロ 2 本鎖糖鎖を 1.0 とする

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、プロテオミクスの手法を用いて、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

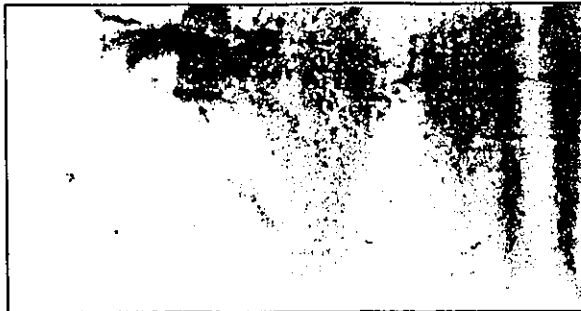


Fig. 5. GnT-III 遺伝子導入細胞膜画分の 2-DE

(A) Sypro Orange 染色, (B) PHA-E₄ 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¹²⁾。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-E₄ 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てきた。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^{13,14)}、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ー—]

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 α -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¹⁻³⁾。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⁴⁾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⁵⁾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ソニウムイオン ([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⁶⁾や、ブリーカーサーイオンキャン^{7,8)}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、ブリー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ない。これに対して、ブリーカーサーイオンキャンは、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、オキソ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^{9,10)}。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、 α -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
 - α -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¹¹⁾、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免疫ブロットを用いた早期診断に利用されている^{12,13)}。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、臈帯血由来 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]⁺) 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⁺) 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]⁺) に加えて、糖鎖に由来する m/z 168 ([HexNAc-2H₂O]⁺)、 m/z 186 ([HexNAc-H₂O]⁺) 及び m/z 366 ([Hex-HexNAc]⁺) や、シアロ糖鎖に由来する m/z 292 ([NeuAc]⁺) 及び m/z 274 ([NeuAc-H₂O]⁺) 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ー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)。

臈帯血由来 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¹⁴⁾。今回の LC/MS/MS 分析の結果で、その他に、アシアロ糖鎖、3 本鎖糖鎖や混成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

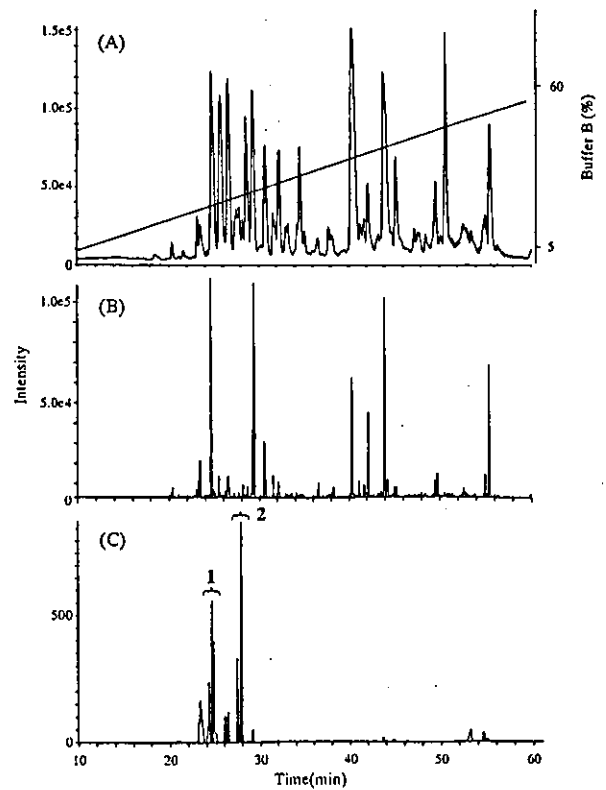


Fig. 1. LC/MS/MS of AFP, (A) TOF-MS full scan at m/z 700-2000, (B) product ion scan at m/z 100-2000, (C) product ion scan at m/z 204.

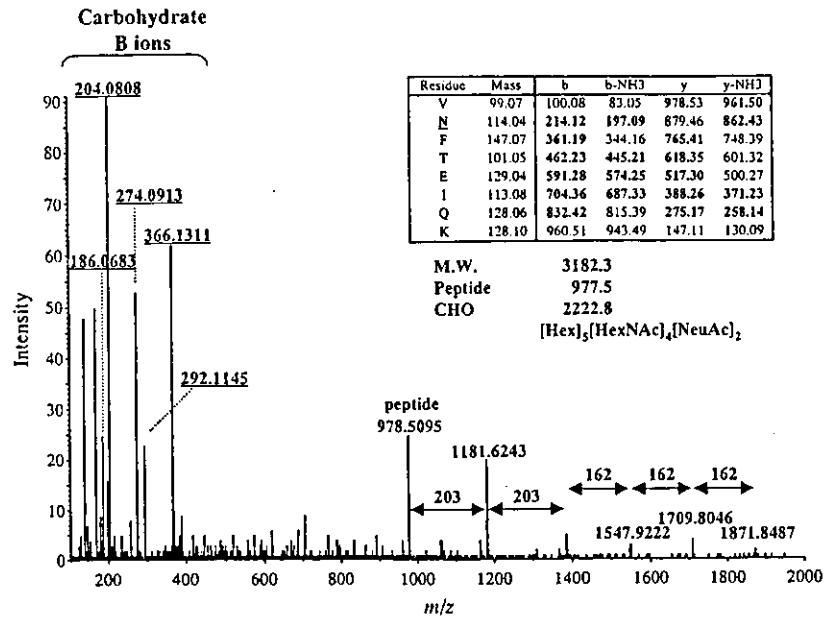


Fig. 2. Product ion spectrum of a glycopeptide (m/z 1061.83³⁺) at 24 min.

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 ^a)	Retention time (min)	Observed m/z (charge)	Carbohydrate composition	Calculated Carbohydrate mass	Theoretical carbohydrate mass ^a			
1	KVNFTFIQKL (977.5)	23	1013.43(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	2077.8	2077.7			
			1519.67(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	2077.8	2077.7			
			1081.29(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	2281.4	2280.8			
			1621.44(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	2281.4	2280.8			
			1446.62(2)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	1931.8	1931.7			
			1118.67(2)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃	1275.9	1275.5			
			1264.05(2)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	1566.6	1566.6			
			1110.48(3)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	1566.6	1566.6			
			1665.44(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2369.4	2368.8			
			1178.33(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	2572.5	2571.9			
			1061.78(3)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.9	2222.8			
			1592.17(2)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.9	2222.8			
			2	KFTKVNFTFIQKL (1353.7)	27	1236.04(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2369.4	2368.8
						1853.29(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2369.4	2368.8
1187.17(3)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.8				2222.8			
1780.23(2)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.8				2222.8			
1303.56(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	2572.0				2571.9			
1138.84(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	2077.8				2077.7			
1206.52(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	2280.9				2280.8			
1090.14(3)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	1931.7				1931.7			
1322.75(3)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	2629.6	2628.9						

^a Monoisotopic mass value.

機能に深く関わっていると考えられている¹⁵⁾。しかし、微量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⁺²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]₂[HexNAc]⁺)、 m/z 569 ([Hex][HexNAc]₂⁺)や、 m/z 512 ([Hex][HexNAc][dHex]⁺)等のB

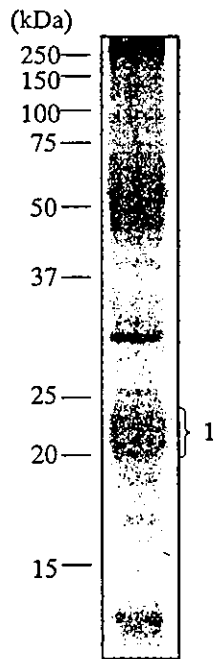


Fig. 3. SDS-PAGE of lipid-free GPI-anchored protein prepared from rat brain.

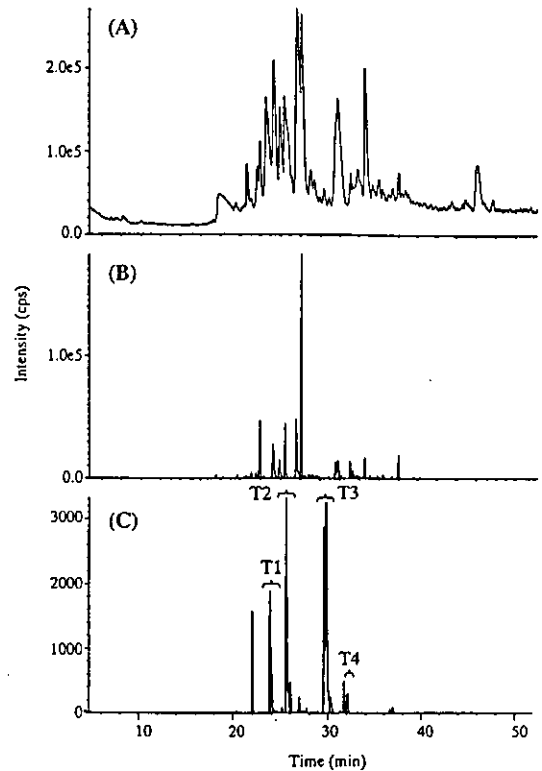


Fig. 4. LC/MS/MS of rat brain Thy-1, (A) TOF-MS full scan at m/z 700-2000, (B) product ion scan at m/z 100-2000, (C) Product ion scan at m/z 204.

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。

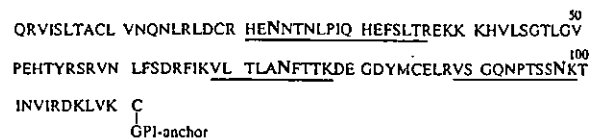


Fig. 5. Amino acid sequence of rat Thy-1.

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

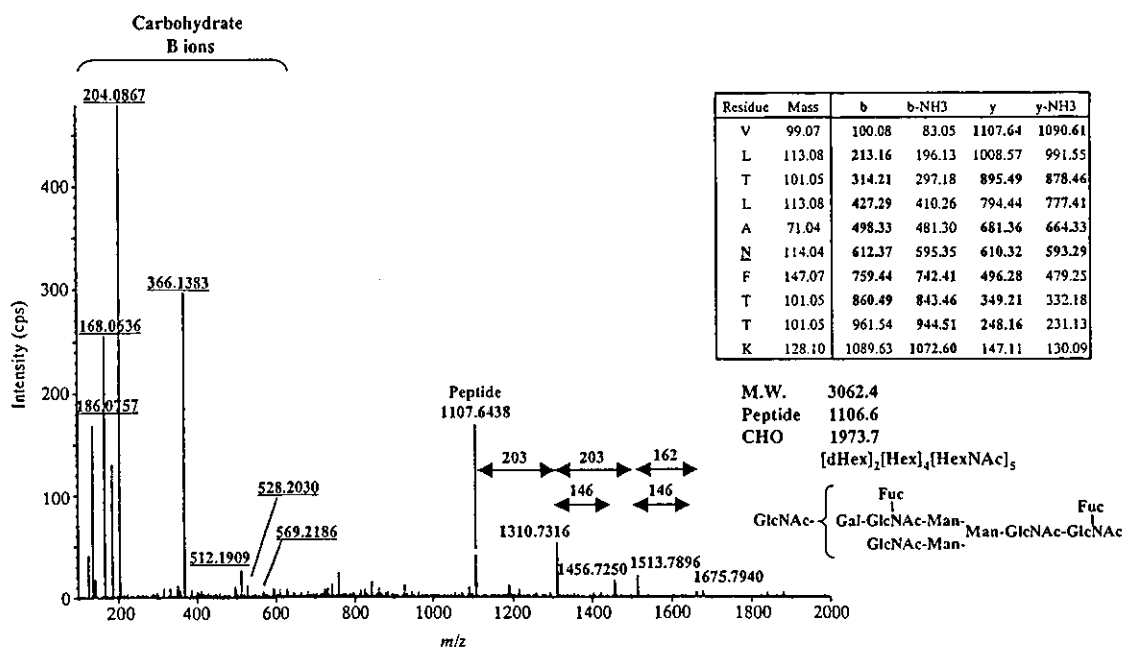


Fig. 6. Product ion spectrum of a glycopeptide (m/z 1532.2²⁺) at peak 29.5 min. Inset table shows theoretical m/z values of b and y ions, and ions detected by MS/MS are indicated by bold face.

Table 2. Glycosylation analysis of rat brain Thy-1

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

^a Monoisotopic mass value.