

図10 図9中のピークdの(A) データ依存的MS²スペクトル、及び(B) データ依存的MS³スペクトル

おわりに

LC/MS とデータベース検索を基盤技術とするプロテオミクス的手法を糖鎖生物学分野に導入することによって、これまで「解析困難」と考えられていた細胞内糖タンパク質の構造特性が、誰にでも簡単に明らかにできるようになってきた。今後、これらのグライコーム解析技術が、診断や治療法の開発を目的とした疾患関連糖鎖・糖タンパク質の研究に貢献できるようになるものと期待される。

謝辞

本稿で紹介した内容は、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業、日本学術振興会科学研究費補助金、厚生労働科学研究費補助金、並びに CREST の支援を受けて実施した研究成果をまとめたものである。

文献

- 1) Hermjakob H, Montecchi-Palazzi L, Bader G, Wojcik J, Salwinski L, Ceol A, Moore S, Orchard S, Sarkans U, von Mering C, Roechert B, Poux S, Jung E, Mersch H, Kersey P, Lappe M, Li Y, Zeng R, Rana D, Nikolski M, Husi H, Brun C, Shanker K, Grant SG, Sander C, Bork P, Zhu W, Pandey A, Brazma A, Jacq B, Vidal M, Sherman D, Legrain P, Cesareni G, Xenarios I, Eisenberg D, Steipe B, Hogue C, Apweiler R: The HUPO PSI's molecular interaction format—a community standard for the representation of protein interaction data, *Nat Biotechnol*, **22**: 177-183, 2004.
- 2) Schachter H: Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins, *Cell Mol Life Sci*, **58**: 1085-1104, 2001.
- 3) Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, Larsen RD, Berhend TL, Marks RM: ELAM-1-dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA, *Cell*, **63**: 475-484, 1990.
- 4) Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, Perez M, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC: ELAM-1

- mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex, *Science*, **250**: 1130-1132, 1990.
- 5) Dennis JW, Granovsky M, Warren CE: Glycoprotein glycosylation and cancer progression, *Biochim Biophys Acta*, **1473**: 21-34, 1999.
 - 6) Delves PJ: The role of glycosylation in autoimmune disease, *Autoimmunity*, **27**: 239-253, 1998.
 - 7) Gleeson PA: Glycoconjugates in autoimmunity, *Biochim Biophys Acta*, **1197**: 237-255, 1994.
 - 8) Chui D, Sellakumar G, Green R, Sutton-Smith M, McQuistan T, Marek K, Morris H, Dell A, Marth J: Genetic remodeling of protein glycosylation in vivo induces autoimmune disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 1142-1147, 2001.
 - 9) 三善英知, 谷口直之: プロテオミクスから機能グライコミクスへ: 糖鎖の機能解明の重要性、*生化学*, **76**: 1337-1343, 2004.
 - 10) Taniguchi N, Ekuni A, Ko JH, Miyoshi E, Ikeda Y, Ihara Y, Nishikawa A, Honke K, Takahashi M: A glycomic approach to the identification and characterization of glycoprotein function in cells transfected with glycosyltransferase genes, *Proteomics*, **1**: 239-247, 2001.
 - 11) Morelle W, Michalski JC: Glycomics and mass spectrometry, *Curr Pharm Des*, **11**: 2615-2645, 2005.
 - 12) Dell A, Morris HR: Glycoprotein structure determination by mass spectrometry, *Science*, **291**: 2351-2356, 2001.
 - 13) Kaji H, Saito H, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Hirabayashi J, Kasai K, Takahashi N, Isobe T: Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins, *Nat Biotechnol*, **21**: 667-672, 2003.
 - 14) Qiu R, Regnier FE: Use of multidimensional lectin affinity chromatography in differential glycoproteomics, *Anal Chem*, **77**: 2802-2809, 2005.
 - 15) Hase S, Ikenaka T, Matsushima Y: A highly sensitive method for analyses of sugar moieties of glycoproteins by fluorescence labeling, *J Biochem (Tokyo)*, **90**: 407-414, 1981.
 - 16) Tomiya N, Awaya J, Kurono M, Endo S, Arata Y, Takahashi N: Analyses of N-linked oligosaccharides using a two-dimensional mapping technique, *Anal Biochem*, **171**: 73-90, 1988.
 - 17) Takahashi N, Nakagawa H, Fujikawa K, Kawamura Y, Tomiya N: Three-dimensional elution mapping of pyridylaminated N-linked neutral and sialyl oligosaccharides, *Anal Biochem*, **226**: 139-146, 1995.
 - 18) Suzuki-Sawada J, Umeda Y, Kondo A, Kato I: Analysis of oligosaccharides by on-line high-performance liquid chromatography and ion-spray mass spectrometry, *Anal Biochem*, **207**: 203-207, 1992.
 - 19) Lattova E, Perreault H: Profiling of N-linked oligosaccharides using phenylhydrazine derivatization and mass spectrometry, *J Chromatogr A*, **1016**: 71-87, 2003.
 - 20) 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*, **269**: 297-303, 1999.
 - 21) Kawasaki N, Ohta M, Itoh S, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T: Usefulness of sugar mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products, *Biologicals*, **30**: 113-123, 2002.
 - 22) 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 A*, **968**: 89-100, 2002.
 - 23) Kawasaki N, Haishima Y, Ohta M, Itoh S, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T: Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin, *Glycobiology*, **11**: 1043-1049, 2001.
 - 24) Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Hyuga M, Kawanishi T, Hayakawa T: Glycomic/glycoproteomic analysis by liquid chromatography/mass spectrometry: Analysis of glycan structural alteration in cells *Proteomics*, In press.
 - 25) Takegawa Y, Deguchi K, Ito S, Yoshioka S, Nakagawa H, Nishimura S: Structural assignment of isomeric 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides using negative-ion MSn spectral matching, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **19**: 937-946, 2005.
 - 26) Takegawa Y, Deguchi K, Ito S, Yoshioka S, Sano A, Yoshinari K, Kobayashi K, Nakagawa H, Monde K, Nishimura S: Assignment and quantification of 2-aminopyridine derivatized oligosaccharide isomers coeluted on reversed-phase HPLC/MS by MSn spectral library, *Anal Chem*, **76**: 7294-7303, 2004.
 - 27) Domon B, Costello CE: Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry,

- Biochemistry, **27**: 1534-1543, 1988.
- 28) Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Harazono A, Matsuishi Y, Hayakawa T, Kawanishi T: Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **19**:3315-3321, 2005.
 - 29) Brown DG, Warren VN, Pahlsson P, Kimber SJ: Carbohydrate antigen expression in murine embryonic stem cells and embryos. I. Lacto and neo-lacto determinants, *Histochem J*, **25**: 452-463, 1993.
 - 30) Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N: Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis, *Cancer Sci*, **95**: 377-384, 2004.
 - 31) Satomi Y, Shimonishi Y, Hase T, Takao T: Site-specific carbohydrate profiling of human transferrin by nano-flow liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **18**: 2983-2988, 2004.
 - 32) Harazono A, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI MS/MS, *Glycobiology*, **15**: 447-462, 2005.
 - 33) Itoh S, Kawasaki N, Harazono A, Hashii N, Matsuishi Y, Kawanishi T, Hayakawa T: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/multistage tandem mass spectrometry: Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J.Chromatogr A*, **1194**:105-117,2005.
 - 34) 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*, **65**: 877-884, 1993.
 - 35) Yamashita K, Hitoi A, Tateishi N, Higashi T, Sakamoto Y, Kobata A: The structures of the carbohydrate moieties of mouse kidney gamma-glutamyltranspeptidase: occurrence of X-antigenic determinants and bisecting N-acetylglucosamine residues, *Arch Biochem Biophys*, **240**: 573-582, 1985.
 - 36) Itoh S, Harazono A, Kawasaki N, Hashii N, Matsuishi Y, Kawanishi T, Hayakawa T: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: analysis of glycosylation sites and of site-specific heterogeneity, *J Electrophoresis*, **48**: 163-168, 2004.
 - 37) Wilson NL, Schulz BL, Karlsson NG, Packer NH: Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins, *J Proteome Res*, **1**: 521-529, 2002.
 - 38) Taniguchi N, Miyoshi E, Ko JH, Ikeda Y, Ihara Y: Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: gene regulation and signaling mechanism, *Biochim Biophys Acta*, **1455**: 287-300, 1999.
 - 39) 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 U S A*, **92**: 8754-8758, 1995.
 - 40) Bhaumik M, Harris T, Sundaram S, Johnson L, Guttenplan J, Rogler C, Stanley P: Progression of hepatic neoplasms is severely retarded in mice lacking the bisecting N-acetylglucosamine on N-glycans: evidence for a glycoprotein factor that facilitates hepatic tumor progression, *Cancer Res*, **58**: 2881-2887, 1998.
 - 41) Isaji T, Gu J, Nishiuchi R, Zhao Y, Takahashi M, Miyoshi E, Honke K, Sekiguchi K, Taniguchi N: Introduction of bisecting GlcNAc into integrin alpha5beta1 reduces ligand binding and down-regulates cell adhesion and cell migration, *J Biol Chem*, **279**: 19747-19754, 2004.

LC/MS in glycomics

Nana Kawasaki^{*,**}, Noritaka Hashii^{*,**},
Satsuki Itoh^{*}, Akira Harazono^{*},
Toru Kawanishi ^{*}

^{*}*National Institute of Health Sciences*

^{**}*Core Research for Evolutional Science and
Technology (CREST) of Japan Science and
Technology Agency (JST)*

Key words

LC/MS, Glycome, Glycomics, glycoprotein, glycopeptide, oligosaccharide

[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シニウムイオン ($[\text{HexNAc}]^+$; m/z 204, $[\text{Hex-HexNAc}]^+$; 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、プリカーサーイオンスキャン^{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、プ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ない。これに対して、プ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 Matsuishi, 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、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]⁺) 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)。

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關与する多数の糖タンパク質が存在し、糖鎖はこれらの

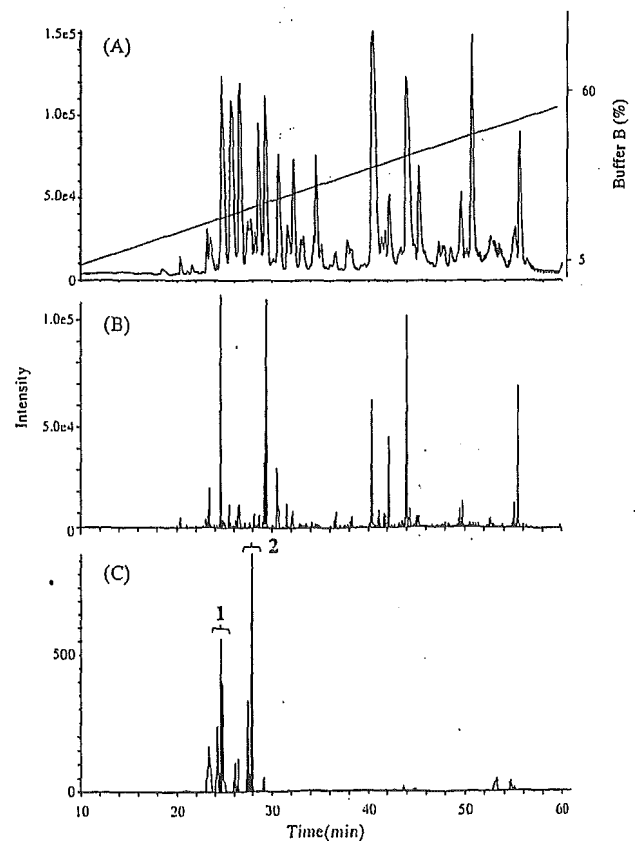


Fig. 1. LC/MS/MS of AFP, (A) TOF-MS full scan at m/z 700-2000, (B) product ion scan at m/z 100-2000, (C) product ion scan at m/z 204.

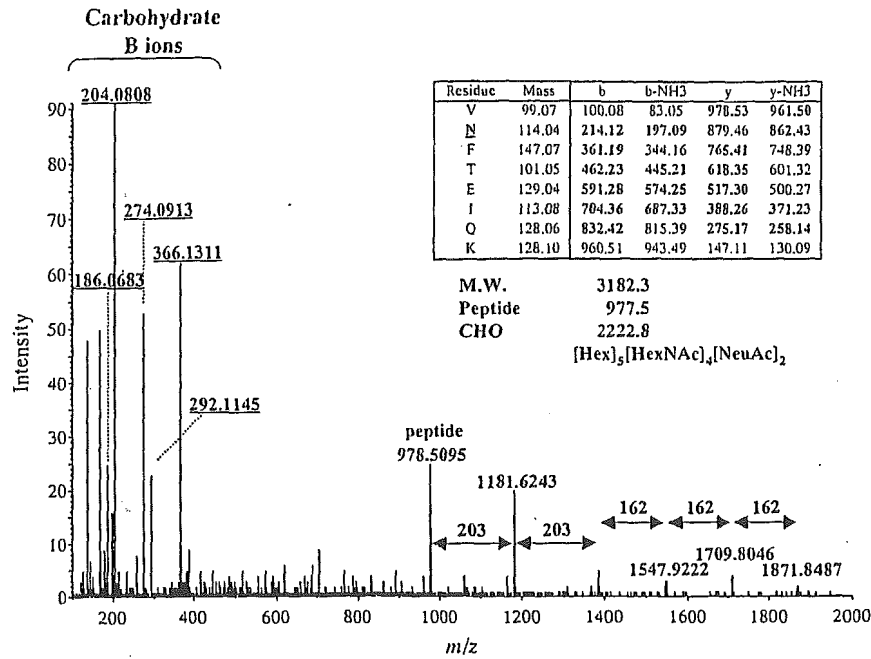


Fig. 2. Product ion spectrum of a glycopeptide (m/z 1061.83³⁺) at 24 min.

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	KVNFT ¹ EQKL (977.5)	23	1013.43(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	2077.8	2077.7
		23	1519.67(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	2077.8	2077.7
		23	1081.29(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	2281.4	2280.8
		23	1621.44(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	2281.4	2280.8
		23	1446.62(2)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	1931.8	1931.7
		23	1118.67(2)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃	1275.9	1275.5
		23	1264.05(2)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	1566.6	1566.6
		23	1110.48(3)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	1566.6	1566.6
		24	1665.44(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2369.4	2368.8
		24	1178.33(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	2572.5	2571.9
		24	1061.78(3)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.9	2222.8
		25	1592.17(2)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.9	2222.8
		2	KFTKVNFT ¹ EQKL (1353.7)	27	1236.04(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂
27	1853.29(2)			[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2369.4	2368.8
27	1187.17(3)			[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.8	2222.8
28	1780.23(2)			[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.8	2222.8
28	1303.56(3)			[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	2572.0	2571.9
28	1138.84(3)			[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	2077.8	2077.7
28	1206.52(3)			[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	2280.9	2280.8
28	1090.14(3)			[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	1931.7	1931.7
		28	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

Buffer B (%)

0-ict

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

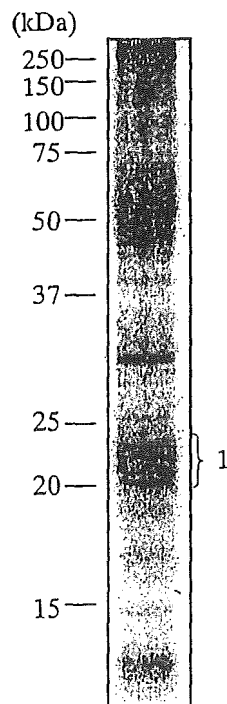


Fig. 3. SDS-PAGE of lipid-free GPI-anchored protein prepared from rat brain.

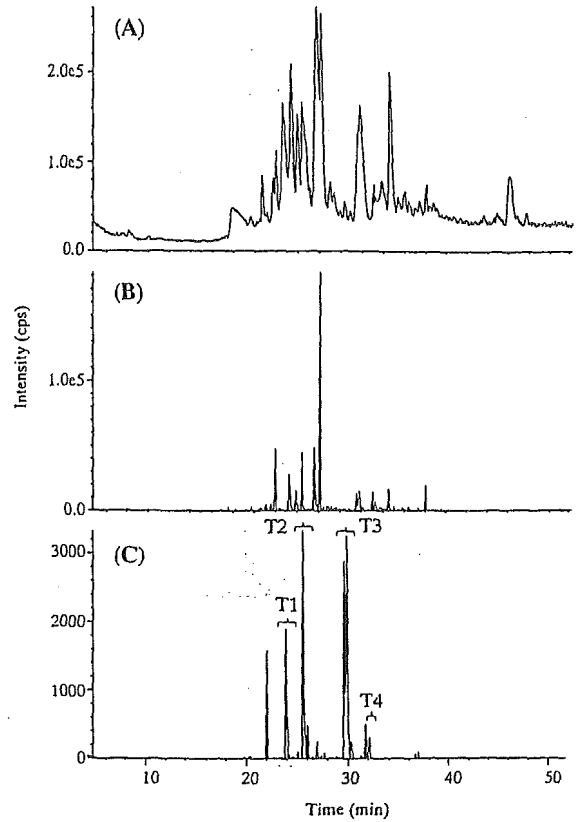


Fig. 4. LC/MS/MS of rat brain Thy-1, (A) TOF-MS full scan at m/z 700-2000, (B) product ion scan at m/z 100-2000, (C) Product ion scan at m/z 204.

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。

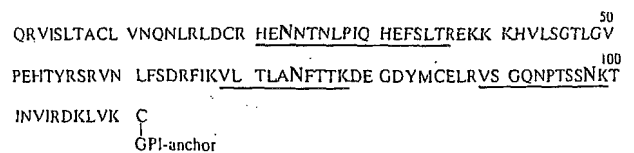


Fig. 5. Amino acid sequence of rat Thy-1.

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

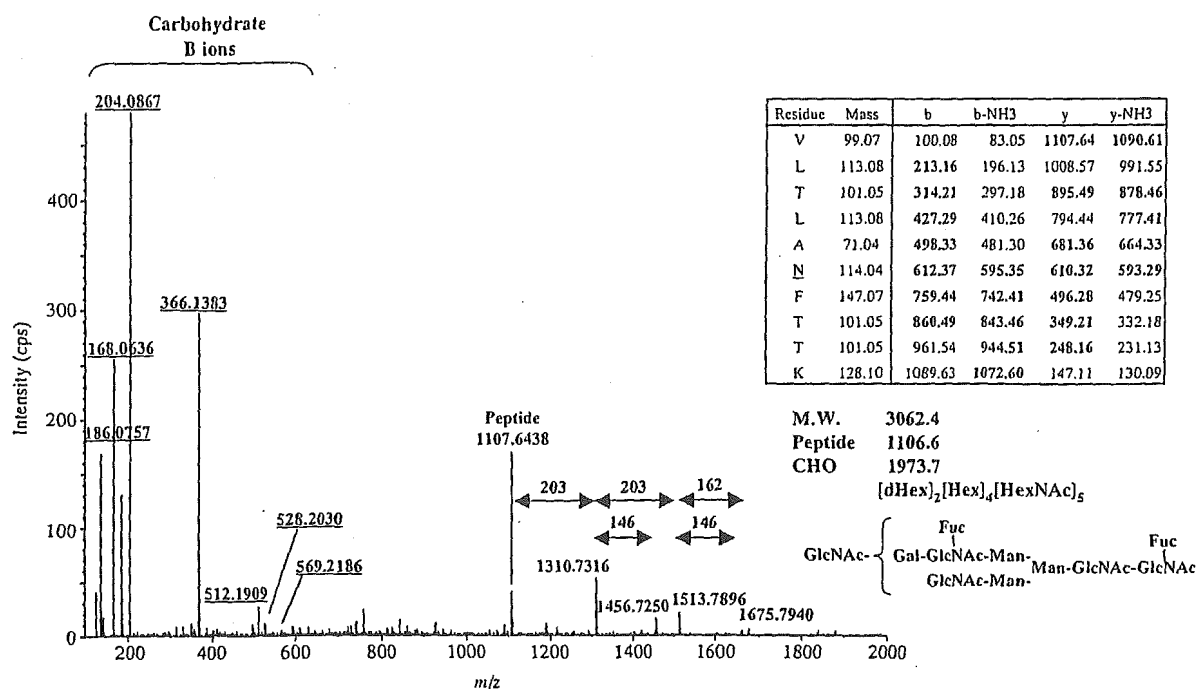


Fig. 6. Product ion spectrum of a glycopeptide (m/z 1532.22⁺) at peak 29.5 min. Inset table shows theoretical m/z values of b and y ions, and ions detected by MS/MS are indicated by bold face.

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
T2	H21-R37 (2048.99)	N23	24.0	1405.1(2)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	1234.5	1234.4
			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
T3	V69-K78 (1106.62)	N74	29.6	1124.5(3)	[dHex] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅	2282.0	2281.9
			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] ₆ [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

^a Monoisotopic mass value.

ラット脳の Thy-1 の N-結合型糖鎖については、これまでに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^{16,17)}、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 oligosaccha-

- rides 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。

LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによるグライコム解析

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 μ 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NaBH₄で還元した。200 ngのHGFに由来する糖鎖をGCC-LC/MSで

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. 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

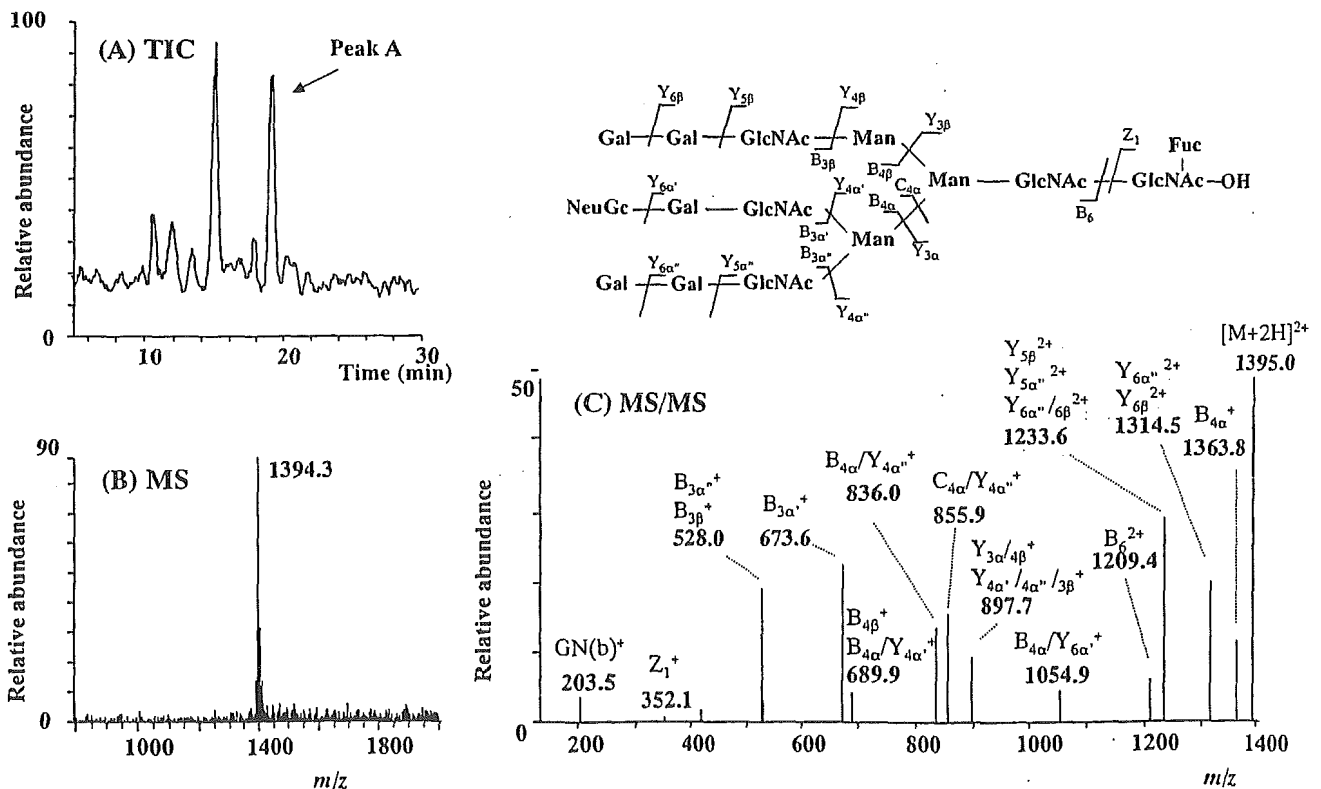


Fig. 1. (A) GCC-LC/MS によって得られた HGF の糖鎖プロファイル, (B) ピーク A のマスペクトル, (C) ピーク A のプロダクトイオンスペクトル及び推定構造

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)

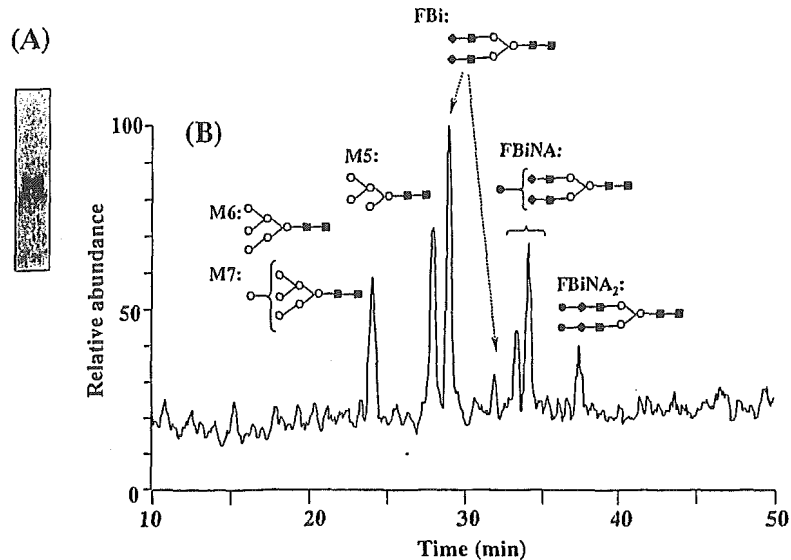


Fig. 2. (A) tPA (2 µg) の SDS-PAGE, (B) GCC-LC/MS によるゲル内 tPA 由来糖鎖のプロファイル

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、 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。

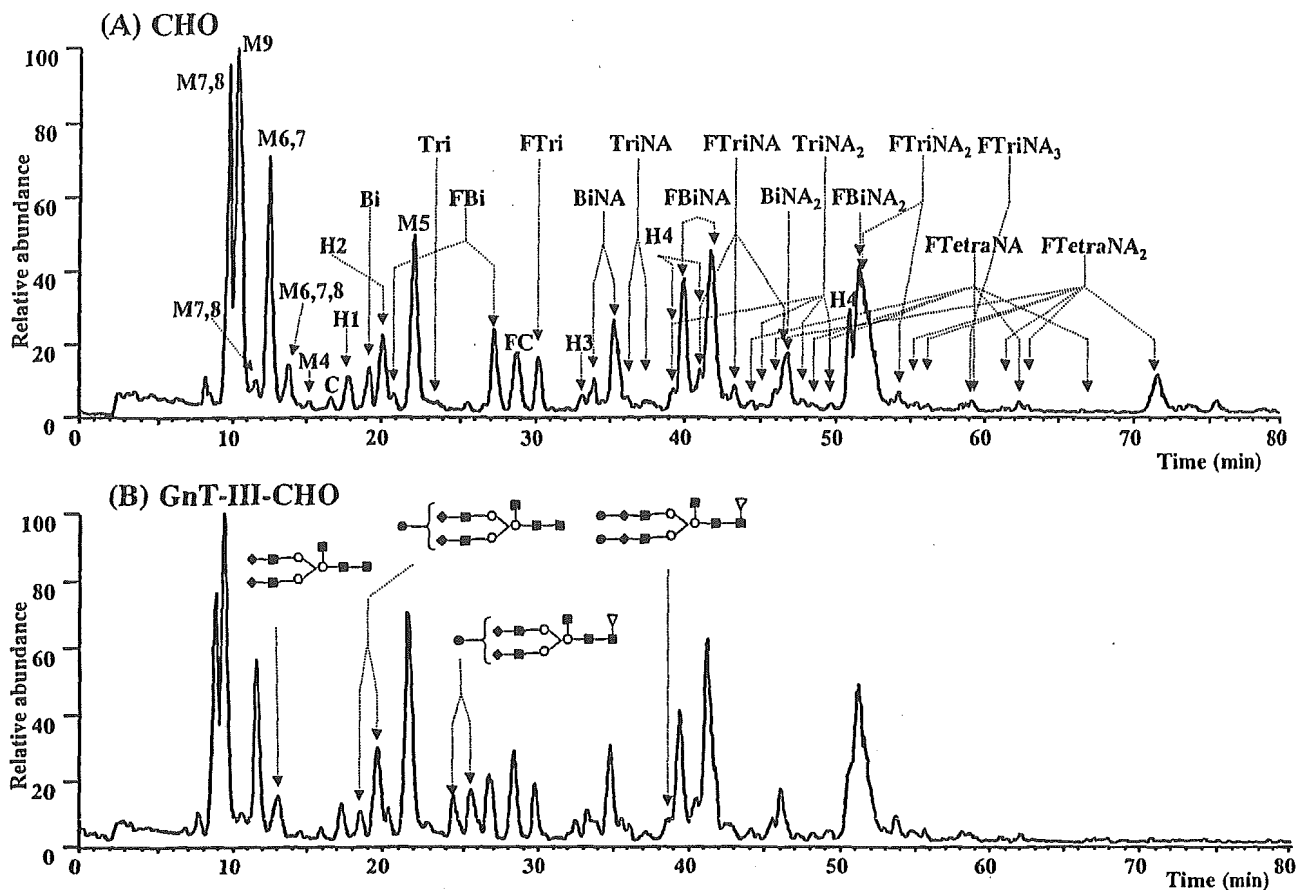


Fig. 3. (A) CHO 細胞膜画分の糖鎖プロファイル, (B) GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞の糖鎖プロファイル
 M, Man; H, hybrid; C, trimannosylcore; F, Fuc; NA, NeuAc; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary

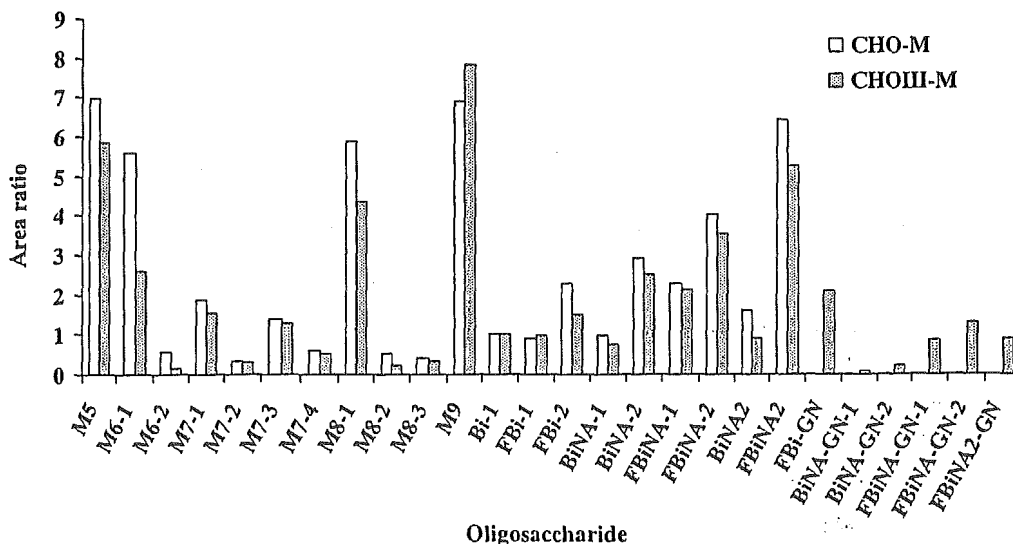


Fig. 4. CHO 細胞膜画分 (CHO-M) 及び GnT-III 遺伝子導入細胞由来膜画分 (CHOIII-M) 由来糖鎖の分布

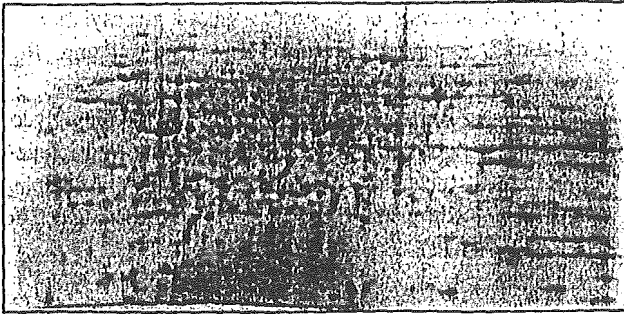
アシアロ 2 本鎖糖鎖を 1.0 とする

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、レクチン等による画分が難しいケースが多く、2-DE 後、レ

(A) 2D-PAGE



(B) Lectin blot

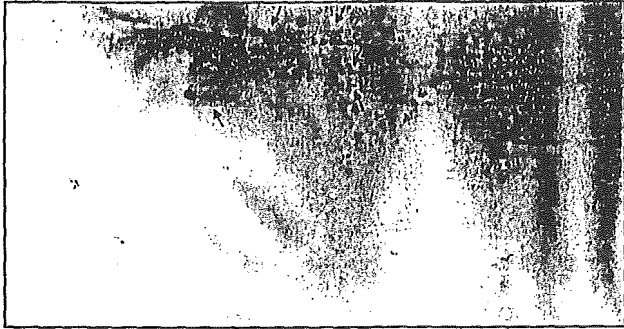


Fig. 5. GnT-III 遺伝子導入細胞膜画分の 2-DE

(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

クタ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.

抗体医薬の現状と展望

新見 伸吾*, 原島 瑞*, 川西 徹*, 早川 堯夫**

(受付:平成17年1月21日, 受理:平成17年3月9日)

State and Perspective of Antibody Therapeutics

Shingo NIIMI*, Mizuho HARASHIMA*,
Toru KAWANISHI* and Takao HAYAKAWA**

はじめに

抗体医薬の始まりは19世紀終わりのエミール・ペーリングと北里柴三郎による血清療法にさかのぼる。彼等は加熱変性させたジフテリア菌毒素をウサギに注射することにより、ジフテリアに対する抵抗性を獲得させた。更に、そのウサギの血清を他のウサギに注射すると、ジフテリアに対する抵抗性をワクチンの接種されていないウサギに移せることを発見し、これをヒトに応用したり。その後、ヒト血液から精製したガンマグロブリン製剤が開発され老人や術後の患者の日和見感染症、川崎病の自己免疫病に多用されている。

1975年にモノクローナル抗体作成技術がケラーとミルシュタインにより²⁾開発されてから、対象となるターゲットに対して高親和性と特異性の高いマウスモノクローナル抗体については基礎研究だけでなく治療薬を目指した膨大な研究が行われてきた。実際、モノクローナル抗体治療薬は①分子化合物に比較して基本的に細胞毒性が低いもしくは無い、②比較的長期にわたり血中濃度の維持が容易である、③結合対象となるリガンド選択性・特異性に優れている、④抗原の捕捉だけでなく生体内からの排除が

可能であるといったメリットがある。しかしながら、マウスモノクローナル抗体の治療薬としての利用はヒトへの免疫原性により繰り返し投与時の効果の減弱、アナフィラキシーショックの危険性のために、非常に限られたものであった。そこで今日までに、免疫原性、アナフィラキシーショックの危険性を低減し、繰り返し投与を可能にするヒト型モノクローナル抗体を作成する様々な技術が生み出された。このようにして作成されたヒト型モノクローナル抗体の一部は医薬品として承認され臨床で用いられており、現在臨床応用を目指して開発中のものも多い (Table 1, Table 2)。そこで本稿においては抗体医薬の基礎と臨床応用、問題点等について概説する。

1. 抗体医薬の作成

1.1 キメラ抗体, ヒト化抗体

キメラ抗体は遺伝子組換え技術を用いてマウスモノクローナル抗体の定常 constant (C) 領域をヒト抗体のC領域に置き換えたものである³⁾ (Fig. 1)。更にヒト化抗体は抗体タンパク質の三次元構造をもとに、抗原が実際に結合する相補性決定領域 complementarity determining region (CDR) の1から3を残して、それ以外の部分であるフレーム領域

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

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

** 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Table 1 認可された抗体医薬

商品名 (抗体名)	企業	日本での 販売元	タイプ (抗原)	適応症	認可 (年)
Repro® (Abciximab)	Centocor社/ Eli Lilly社		キメラ (gp II b III a)	PTCA 後再狭窄	1994
Rituxan® (Rituximab)	IDEC社/Roche 社/Genentech社	全薬工業 (株)	キメラ (CD20)	ノンホジキン リンホーマ	1997
Zenepax® (Daclizumab)	Roche社		ヒト化 (IL-2R)	腎移植	1997
Remicade® (Avakine)	Centocor社		キメラ (TNF- α)	クローン病 慢性関節リウマチ	1998
Synagis® (Palibizumab)	MedImmune社/ Abott社		ヒト化 (RSV)	RSV 小児感染	1998
Simulect® (Basilicimab)	Novartis社		ヒト化 (IL-2)	腎移植	1998
Herceptin® (Trastuzumab)	Genentech社/ Roche社	日本ロシュ (株)	ヒト化 (HER2)	乳癌	1998
Mylotarg® (Gemtuzumab)	Cellutech社/ AHP社		抗癌剤-コンジュゲート (CD33)	急性骨髄性白血病	2000
Zevalin® (Iritumomab)	IDEC社/ Schering AG社		⁹⁰ Y-コンジュゲート (CD20)	ノンホジキン リンホーマ	2002
Bexxar® (Tositumomab)	Coulter社/ SKB社		¹³¹ I-コンジュゲート (CD20)	ノンホジキン リンホーマ	2002

(文献 122 より許可を得て転載)

Table 2 開発中の抗体医薬

段階	数					
	合計	キメラ抗体	ヒト化抗体	完全ヒト抗体	マウス抗体	その他
発売中	11	4	5	0	2	0
申請中	3	0	1	1	1	0
フェーズⅢ	20	1	9	2	8	0
フェーズⅡ	60	7	25	15	4	9
フェーズⅠ	35	5	13	6	6	5
合計	129	17	53	24	21	14

(2003年1月時点) (文献 123 より許可を得て転載)

frame region (FR) をすべてヒト抗体に置き換えたものである⁴⁾ (Fig. 1)。以下に、マウスハイブリドーマ細胞から、遺伝子としてcDNAを用い遺伝子組換え法によるキメラ抗体、ヒト化抗体の作製法を紹介する。

第一のステップは、マウス抗体産生ハイブリドーマからのマウス抗体をコードする遺伝子 (以下マウス抗体遺伝子) のクローニングである。ハイブリド

ーマ細胞よりRNAを抽出し、①cDNAを作製後、ブランクハイブリダイゼーション法あるいはPCR法により抗体遺伝子をクローニングするか、②RNAより直接PCR法により抗体遺伝子をクローニングする方法が用いられている。ハイブリドーマ細胞は、目的の抗体遺伝子以外に、融合パートナーのミエローマ由来の抗体遺伝子、タンパク質に翻訳されない偽抗体遺伝子が含まれていることもある。

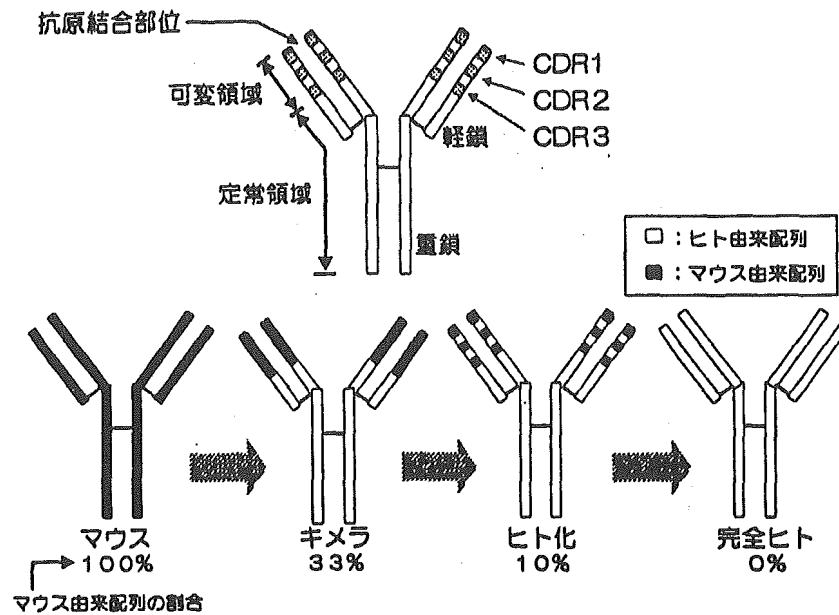


Fig.1 抗体の構造 (上段) 及びマウスモノクローナル抗体のヒトに対する抗原性低減技術の進展 (下段)
(文献 124 より許可を得て転載)

したがって、精製したモノクローナル抗体 V 領域のアミノ酸配列を一部決定し、クローニングした抗体遺伝子と一致しているか確認することが重要である。

キメラ抗体は、クローニングしたマウス抗体の variable (V) 領域遺伝子にヒトの C 領域遺伝子を連結し、適当な発現ベクターに挿入して培養細胞で生産する。また、抗体産生ハイブリドーマのマウス Ig C 領域をヒト Ig C 領域に組換える相同組換え法やトランスジェニックマウスによっても作成される。

ヒト化抗体遺伝子の作製は以下の複雑なステップからなる。ヒト化抗体作製の第一ステップでは、クローニングしたマウス抗体可変 (V) 領域における抗原との結合に寄与する超可変領域 (CDR) 配列とヒト抗体 V 領域におけるアイソタイプ固有のアミノ酸配列をもつフレームワーク領域 (FR) からなる V 領域をコードする遺伝子を構築する。ヒト化抗体作製における最も重要な点は、CDR を移植するヒト FR 領域のデザインである。マウス抗体の CDR を単純にヒト FR へ移植した抗体では、結合活性の低下、消失がみられる。これはマウス FR 領域中のいくつかのアミノ酸が CDR の高次構造維持に大きな影響を与えており、それらのアミノ酸残基を

CDR とともに移植しなければいけないことを示している。CDR の高次構造に影響を与えるアミノ酸残基がいくつか同定されているが⁵⁾、その法則は確立されておらず、コンピューターモデリングなどを組み合わせて個々の抗体で試行錯誤しているのが現状である⁶⁾。また、この方策として目的のマウス抗体 V 領域と最も高いホモロジーを示すヒト抗体 V 領域を選択し、その FR 領域を用いている場合もある。

最終的に、構築された抗体 heavy (H) 鎖及び light (L) 鎖遺伝子が挿入された発現ベクターを動物細胞に導入し、遺伝子組換え抗体を発現する。現在、上市されている抗体の製造細胞で実績があるのは、チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO 細胞、マウスミエローマ由来の NS0 細胞及び SP2/0 細胞である⁷⁾。動物細胞が産生に用いられるのは以下の理由による。まず、抗体は H 鎖及び L 鎖各 2 本が複数の S-S 結合を介して結合しており、正確な立体構造の構築には動物細胞での発現が最適である。また、抗体の Fc 領域には N 型糖鎖が結合しており、糖鎖は C_H2 ドメインの立体構造の維持、後述する複数のエフェクター活性に必須である。したがって、動物細胞で発現しないと糖鎖が付加されないため、抗体のエフェクター活性が損なわれてしまうからで

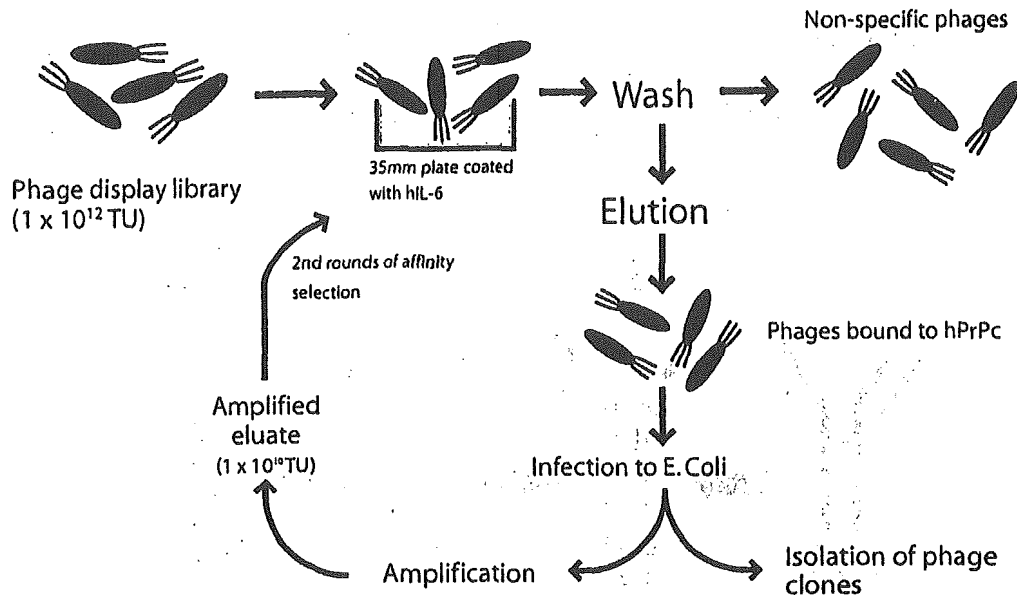


Fig. 2 ファージディスプレイライブラリーを用いたパンニング方法
(文献 125 より許可を得て転載)

ある。

1.2 ファージディスプレイ抗体

ファージディスプレイ法は大腸菌ウイルスの一つである M13 や T7 などの繊維状ファージのコートタンパク質 (g3p や g10p など) の N 末端側にファージの感染性を失わないよう外来遺伝子を融合タンパク質として発現させるシステムである⁹⁾。一度に 10^7 種類以上の多種類の分子種を呈示したライブラリーを構築でき、また粒子ごとに目的の機能や性質をもった分子種を選択できる。その技術を用いて外来遺伝子として抗体の結合部位である 2 つのポリペプチド鎖 V_H と V_L を短いリンカーで直列につないだ一本鎖 Fv single-chain Fv (scFv) をファージにディスプレイさせたものが抗体ファージライブラリーである¹⁰⁾。そしてファージライブラリーからパンニングと呼ばれる固相化された抗原分子上で特異的抗体ファージを濃縮する操作を繰り返して特異的抗体ファージをスクリーニングする¹¹⁾ (Fig. 2)。それを最終的にファージから切り離したものがファージディスプレイ抗体である。

1.2.1 抗体ファージライブラリーの種類

現在、世界中で様々な抗体ライブラリーが作製・報告されているが、その抗体遺伝子ソースの性質の違いに応じて、以下の 3 つに分類される (Fig. 3)。

1.2.1.1 免疫ライブラリー

感染症回復者や対象抗原をワクチン接種して血中抗体価を上昇させたヒト、自己抗体を保有する患者、担癌患者などのリンパ球を出発材料として RT-PCR により増幅した V 遺伝子より構築したライブラリーである。中和抗体を有する各種感染症に対する抗体の創出に有効と考えられる。

最初から目的抗体遺伝子がライブラリー中に多く含まれていることから、比較的小さなサイズのライブラリーからでもかなり高い確率で特異性、親和性の高いヒト抗体を単離することが可能である。一方、対象抗原によっては、リンパ球ソースの入手方法の点など倫理的な面で問題となることもある。更に対象抗原ごとにあるいは患者ごとにライブラリーを構築しなければならないため、手間がかかるという欠点がある。本法により、ヒト血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) に対するインヒビター抗体を有する患者より FVIII に高い親和性 ($K_d=10^{-11}M$) を有し、FVIII の活性を阻害する scFv クローンが得られている¹²⁾。

1.2.1.2 ナイーブ/非免疫ライブラリー

正常なヒトが保有する V_H , V_L 遺伝子を RT-PCR により分離し、ランダムに組み合わせた抗体可変領域ドメインを提示したライブラリーである。ヒトがもともと生体内に有し、産生している抗体可変領域を組み合わせて作製するため、ヒト抗原に対する治療用のヒト抗体作製に、最もよく利用されて

ライブラリーの種類	合成	ナイーブ	非免疫	immune
使用組織	ヒト組織	末梢血, 骨髄, 扁桃腺などのリンパ球		感染症回復者や対象抗原をワクチン接種したあるいは自己抗体を保有する患者のリンパ球
V遺伝子の由来	再構成されていないV遺伝子断片	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> IgM mRNA 由来 再構成された V 遺伝子 </div> / <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> IgG mRNA 由来 再構成された V 遺伝子 </div>		
V遺伝子の組成	コントロール可能	← コントロールは困難 →		
CDRの由来	合成・混合	← 天然型 →		
ライブラリーの構築		← 基本的に1回 →		抗原ごとに作製
得られる抗体の親和性	← ライブラリーのサイズと多様性に依存? →		ライブラリーサイズは小さくても, (10 ⁶ 程度) 目的の抗原に対して比較的高い親和性を有するクローン分離可能	
特異性	← ほとんどの抗原 →		主に標的抗原	

Fig. 3 合成, ナイーブ, 非免疫, immune 各ライブラリーの比較：ファージディスプレイヒト抗体ライブラリーの作成法による分類 (文献 126 より許可を得て転載)

いる。通常、正常人の末梢血、骨髄、扁桃腺などのリンパ球を出発材料とし、複数のドナーを用いることでより多くの多様性を有するライブラリーを構築する。このライブラリーでは用いるドナーがどのような疾病歴、抗体価、遺伝系などのバックグラウンドを有するかなどの選択が難しく、V 遺伝子の組成や由来のコントロールに課題がある。厳密に言えば抗原感作によるクラススイッチが起こっていないという観点から、IgM クラスの mRNA のみを V_H 遺伝子の増幅に用いているものが特にナイーブライブラリーと呼ばれる¹³⁾。以下にヒト抗体ライブラリーの構築 (B 細胞を出発材料としたナイーブ/非免疫ライブラリーの場合) 法の概略を示す¹⁴⁾ (Fig. 4)。

ヒトリンパ球由来 mRNA から、イムノグロブリンの γ , μ , κ , λ 鎖の C 領域に特異的なプライマーを用いて、V 遺伝子の cDNA を作製する。次に、各遺伝子 (γ , μ 鎖由来の V_H 並びに κ , λ 由来の V_L) を V 遺伝子ファミリーに特異的な DNA プライマーのセットを用いて V 遺伝子の cDNA を作製する。次に、各遺伝子 (γ , μ 鎖由来の V_H 並びに κ , λ 由来の V_L) を V 遺伝子ファミリーに特異的な DNA プライマーのセットを用いて合成し、それらリンカー DNA を用いて PCR により連結し、

scFv 遺伝子を作製する。それをファージタンパク質 g3p の N 末端に融合タンパク質遺伝子としてファージミドベクター上で連結させ (Fig. 4)、大腸菌に形質転換後、ヘルパーファージを用いて、ファージディスプレイ抗体ライブラリーを調製する。

1.2.1.3 合成ライブラリー

ヒト B 細胞内で実際に抗体産生に用いられている遺伝子を選び、V 遺伝子断片と CDR 3 領域に相当する適当な長さのランダムなアミノ酸配列をもつ合成 DNA を用いて抗体可変領域遺伝子を構築したライブラリーである^{15,16)}。最初から機能的な scFv を産生する V_H と V_L 遺伝子の組み合わせでライブラリーを構築することができるため、得られる抗体の発現効率や安定性が高いとされる。人工的なランダムオリゴ DNA を用いているため、ゲノム中の抗体遺伝子のみを利用した抗体ライブラリーより高い多様性が得られる。逆に特定の CDR 領域のみの多様性であるため、他の CDR 領域が多様性に寄与するような抗体は得られない。

1.3 トランスジェニックヒト抗体

完全なヒトモノクローナル抗体取得のもう一つの戦略は、ヒト抗体を産生するトランスジェニック動物の利用である。内因性 Ig をノックアウト (KO)