

GnT-III Counteracts the Effect of GnT-V

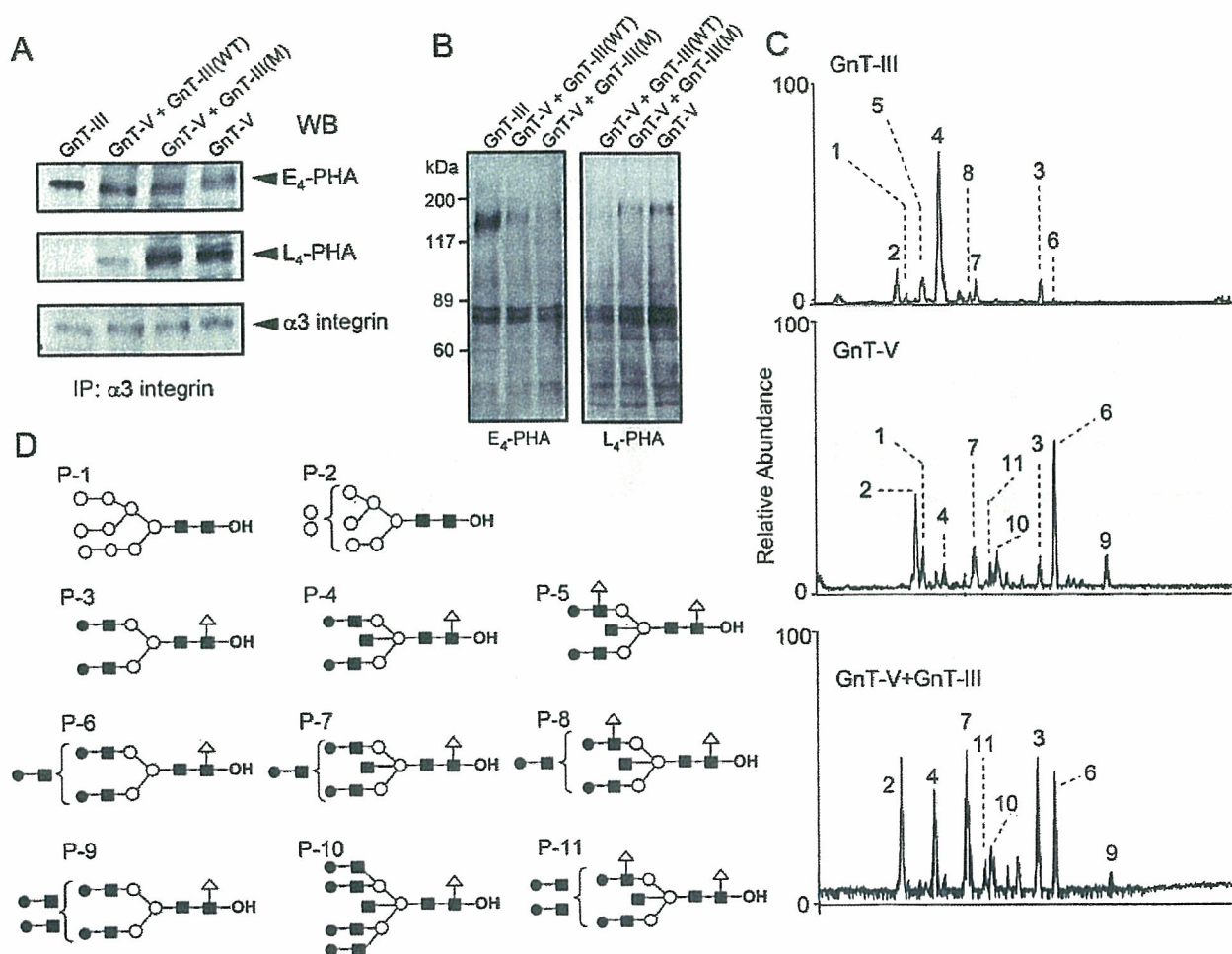


FIGURE 6. Increased product of GnT-III but decreased product of GnT-V on integrin  $\alpha 3$  subunit after transfection of GnT-III into GnT-V transfectant. A, whole cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti- $\alpha 3$  antibody, and the resulting immunocomplexes were subjected to 7.5% SDS-PAGE under reducing conditions. The blots were probed by E<sub>4</sub>-PHA (top), L<sub>4</sub>-PHA (middle) and anti- $\alpha 3$  antibody (bottom), respectively. B, lectin blotting was performed with E<sub>4</sub>-PHA and L<sub>4</sub>-PHA using cell lysates from different transfectants. C, base peak chromatograms and observed *m/z* values (charge number) obtained by a full MS1 scan (*m/z* 450–2000) of *N*-linked oligosaccharides extracted from the gel-separated  $\alpha 3$  subunit expressed in transfectants: GnT-III transfectant (top), GnT-V transfectant (middle), and GnT-III plus GnT-V transfectant (bottom). D, deduced structures of peaks 1–11.  $\Delta$ , fucose;  $\bullet$ , galactose;  $\circ$ , mannose;  $\blacksquare$ , *N*-acetylglucosamine. WB, Western blot.

the functions of GnT-V by competing for the modification of the same protein in living cells, resulting in the positive or negative regulation of its biological functions.

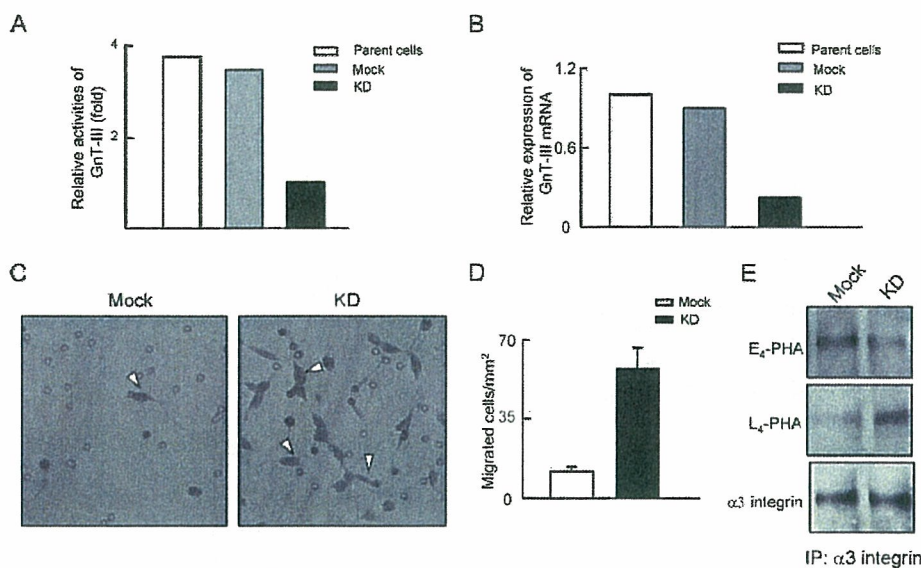
DISCUSSION

It has long been thought that the product of GnT-V,  $\beta 1,6$ -GlcNAc branching of *N*-glycans, contributes directly to cancer progression and metastasis (6). Animal studies have shown that GnT-V-deficient transgenic mice experience attenuated tumor growth and metastasis (3). In human, the activity and/or expression of GnT-V is elevated in multiple types of tumors (41, 42), and high levels of these enzymes or their cognate sugars are correlated with metastasis and a poor patient prognosis (41, 43). In addition, GnT-V-modified cell surface receptors prolonged the turnover by inhibiting endocytosis (10) or resistance to degradation by protease (26). These results suggest that GnT-V may contribute to cancer metastasis through stabilizing target proteins. On the other hand, the introduction of GnT-III leads to a reduced metastatic potential. Moreover, those trans-

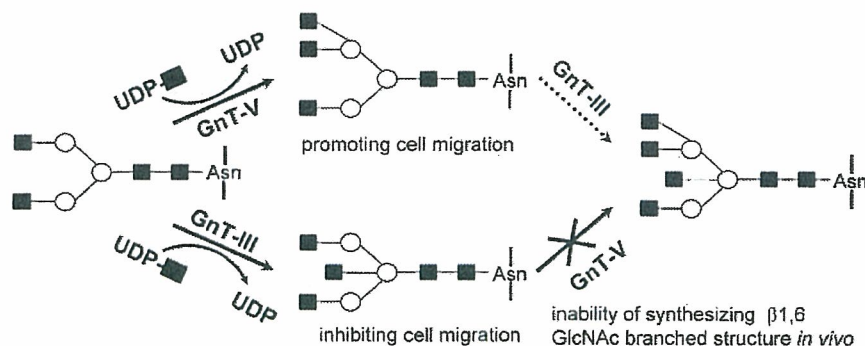
fectants displayed decreased cell motility and attachment to laminin and collagen (14). Thus, it appears that GnT-V and GnT-III regulate cell migration and invasion as well as metastasis in opposite manners. In fact, GnT-III could be considered to be an antagonist of GnT-V, because bisecting GlcNAc renders the biantennary substrate inaccessible to GnT-V *in vitro* (13).

The  $\alpha 3\beta 1$  integrin is one of the most important proteins that mediate cell motility and invasion and appears to be one of the plausible target proteins of GnT-V in promoting cancer metastasis. In fact, Pochec *et al.* (25) reported that  $\beta 1,6$ -branched structures were highly expressed in high metastatic melanoma, compared with low metastatic melanoma. In the present study, we found for the first time that GnT-III and GnT-V competitively modify the same target, integrin  $\alpha 3$  subunit, thereby regulating its functions. We demonstrated that GnT-III transfection to the GnT-V transfectant resulted in the inhibition of  $\alpha 3\beta 1$  integrin-mediated cell migration, due to an increase of





**FIGURE 7. Increased cell migration and increased GnT-V product on  $\alpha 3$  subunit in GnT-III knockdown cells.** *A*, activities of GnT-III in GnT-III knockdown CHP134 cells. *B*, mRNA expression of GnT-III in knockdown cells. Quantitative analysis was performed by real time PCR. *C*, cell migration on LN5 (5 nm). Representative fields were photographed using a phase-contrast microscope. *Arrowheads*, migrated cells. *D*, quantification of migration of mock and GnT-III knockdown cells. The number of migrated cells were quantified and expressed as the means  $\pm$  S.D. from three independent experiments. *E*, whole cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti- $\alpha 3$  antibody, and the resulting immunocomplexes were subjected to 7.5% SDS-PAGE under reducing condition. The blots were probed by E<sub>4</sub>-PHA (top), L<sub>4</sub>-PHA (middle), and anti- $\alpha 3$  antibody (bottom), respectively. KD, GnT-III knockdown cells.



**FIGURE 8. Hypothetical model for the competition of GnT-III and GnT-V for integrin  $\alpha 3$  subunit modification.** The product of GnT-V contributes to the promotion of cell migration. The reaction represented by a dashed line may not be predominant *in vivo*, whereas it could occur *in vitro*. On the other hand, the product of GnT-III suppresses cell migration. More importantly, this product cannot be utilized as a substrate by GnT-V, which is represented with a cross. Therefore,  $\alpha 3\beta 1$ -mediated cell migration induced by GnT-V can be blocked due to competition with GnT-III. O, mannose; ■, N-acetylglucosamine.

bisecting GlcNAc, but a decreased  $\beta 1,6$ -GlcNAc, on the  $\alpha 3$  subunit. However, the transfection of the GnT-III inactive mutant failed to induce such changes. Conversely, the competition was further confirmed by an RNA interference strategy to silence GnT-III in CHP134 cells, which express endogenous GnT-V and GnT-III. We found that GnT-III knockdown resulted in increased GnT-V product on the  $\alpha 3$  subunit. Taken together, to the best of our knowledge, we presented a previously uncharacterized demonstration of the existence of competition for the same substrate between GnT-III and GnT-V in living cells (Fig. 8).

Two mechanisms have been proposed for the inhibition of cell motility by the overexpression of GnT-III: an enhancement in cell-cell adhesion and the down-regulation of cell-ECM

adhesion (39). Our present study suggested one more; GnT-III competed with GnT-V for the modification of  $\alpha 3$  subunit, causing a decrease in the product of GnT-V on  $\alpha 3$  subunit. Luo *et al.* (40) had suggested that the changes in the glycan structure of integrin can affect its conformation and activity. They reported that in CHO-K1 cells, the addition of a glycan at the  $\beta 1$  I-like domain caused an increase in the distance between the  $\beta 1$  head and stalk domains, therefore inducing the integrin dimer to be a more extended (activated) integrin conformation (40). We suggested that the competition of GnT-III and GnT-V for the modification of  $\alpha 3$  may cause changes in the glycan within key regions of this integrin, therefore causing the decreased cell migration. Details of the effect of glycans on this integrin are a subject of further investigation in our future study.

It is noteworthy that GnT-III and GnT-V do not always oppositely regulate all glycoproteins. In this study, we found that GnT-III transfection causes a similar decrease, but to a lesser extent, in cell migration on COL compared with the result on LN5. However, on COL, GnT-V transfection did not result in an increase in cell migration, compared with mock. This suggested that  $\beta 1,6$ -GlcNAc modification has little effect or only mild effects on  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrin, which are receptors for COL. In fact, we reported that the introduction of the bisecting GlcNAc to the  $\alpha 5$  subunit resulted in a reduced affinity in

the binding of  $\alpha 5\beta 1$  integrin to FN, resulting in a decreased cell migration (38). We thus assumed that the GnT-III affects the  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\alpha 3$  subunits similarly, which caused the decreased cell migration on LN5 and COL. However, the modification of  $\beta 1,6$ -GlcNAc to  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  subunits may not affect their binding to COL. Considering that  $\alpha 3\beta 1$  integrin is a strong adhesive receptor that promotes cell migration (37), the selective competition between GnT-III and GnT-V for  $\alpha 3$  might play an important role in cancer metastasis.

Concerning metastasis, other important glycosyltransferases cannot be overlooked (*e.g.* sialyltransferases). The modification of the  $\beta 1$  subunit by sialyltransferase makes this integrin capped with the negatively charged sugar, sialic acid. The abundance of sialic acids, especially elevated  $\alpha 2,6$ -sialylation (44), contributes



## GnT-III Counteracts the Effect of GnT-V

to cell motility and invasion (25, 45–47). Thus, it is possible that GnT-V mediates at least some of its effects on cell behavior via increased sialylation (41). The effect of GnT-III on sialylation is a topic that also merits further exploration.

In conclusion, this study reports for the first time that GnT-III competes with GnT-V for the modification of integrin  $\alpha 3$  subunit in living cells (Fig. 8). This competition results in the inhibition of  $\alpha 3 \beta 1$  integrin-mediated cell migration induced by GnT-V. The finding suggests that the competition between both enzymes occurs not only *in vitro* but also *in vivo* and might provide a new insight into unraveling the molecular mechanism of tumor metastasis.

### REFERENCES

1. Yamashita, K., Totani, K., Iwaki, Y., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Endo, T., and Kobata, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17873–17881
2. Pierce, M., and Arango, J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 10772–10777
3. Granovsky, M., Fata, J., Pawling, J., Muller, W. J., Khokha, R., and Dennis, J. W. (2000) *Nat. Med.* **6**, 306–312
4. Cummings, R. D., Trowbridge, I. S., and Kornfeld, S. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13421–13427
5. Shoreibah, M., Perng, G. S., Adler, B., Weinstein, J., Basu, R., Cupples, R., Wen, D., Browne, J. K., Buckhaults, P., and Fregien, N. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15381–15385
6. Dennis, J. W., Laferte, S., Waghorne, C., Breitman, M. L., and Kerbel, R. S. (1987) *Science* **236**, 582–585
7. Demetriou, M., Nabi, I. R., Coppolino, M., Dedhar, S., and Dennis, J. W. (1995) *J. Cell Biol.* **130**, 383–392
8. Seberger, P. J., and Chaney, W. G. (1999) *Glycobiology* **9**, 235–241
9. Lu, Y., Pelling, J. C., and Chaney, W. G. (1994) *Clin. Exp. Metastasis* **12**, 47–54
10. Partridge, E. A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G. M., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I. R., Wrana, J. L., and Dennis, J. W. (2004) *Science* **306**, 120–124
11. Narasimhan, S. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10235–10242
12. Schachter, H. (1986) *Biochem. Cell Biol.* **64**, 163–181
13. Gu, J., Nishikawa, A., Tsuruoka, N., Ohno, M., Yamaguchi, N., Kangawa, K., and Taniguchi, N. (1993) *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 614–619
14. Yoshimura, M., Nishikawa, A., Ihara, Y., Taniguchi, S., and Taniguchi, N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8754–8758
15. Takeichi, M. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 806–811
16. Hirohashi, S. (1998) *Am. J. Pathol.* **153**, 333–339
17. Yoshimura, M., Ihara, Y., Matsuzawa, Y., and Taniguchi, N. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 13811–13815
18. Hynes, R. O. (2002) *Cell* **110**, 673–687
19. Tsuji, T., Kawada, Y., Kai-Murozono, M., Komatsu, S., Han, S. A., Takeuchi, K., Mizushima, H., Miyazaki, K., and Irimura, T. (2002) *Clin. Exp. Metastasis* **19**, 127–134
20. Plopper, G. E., Domanico, S. Z., Cirulli, V., Kiosses, W. B., and Quaranta, V. (1998) *Breast Cancer Res. Treat.* **51**, 57–69
21. Melchiori, A., Mortarini, R., Carlone, S., Marchisio, P. C., Anichini, A., Noonan, D. M., and Albini, A. (1995) *Exp. Cell Res.* **219**, 233–242
22. Tysnes, B. B., Larsen, L. F., Ness, G. O., Mahesparan, R., Edvardsen, K., Garcia-Cabrera, I., and Bjerkvig, R. (1996) *Int. J. Cancer* **67**, 777–784
23. Wang, H., Fu, W., Im, J. H., Zhou, Z., Santoro, S. A., Iyer, V., DiPersio, C. M., Yu, Q. C., Quaranta, V., Al-Mehdi, A., and Muschel, R. J. (2004) *J. Cell Biol.* **164**, 935–941
24. Guo, H. B., Lee, L., Kamar, M., Akiyama, S. K., and Pierce, M. (2002) *Cancer Res.* **62**, 6837–6845
25. Pochec, E., Litynska, A., Amoresano, A., and Casbarra, A. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1643**, 113–123
26. Ihara, S., Miyoshi, E., Ko, J. H., Murata, K., Nakahara, S., Honke, K., Dickson, R. B., Lin, C. Y., and Taniguchi, N. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 16960–16967
27. Saito, H., Nishikawa, A., Gu, J., Ihara, Y., Soejima, H., Wada, Y., Sekiya, C., Niikawa, N., and Taniguchi, N. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 318–327
28. Miwa, K., Matsui, K., Terabe, M., Ito, K., Ishida, M., Takagi, H., Nakamori, S., and Sano, K. (1985) *Gene (Amst.)* **39**, 281–286
29. Taniguchi, N., Nishikawa, A., Fujii, S., and Gu, J. G. (1989) *Methods Enzymol.* **179**, 397–408
30. Nishikawa, A., Gu, J., Fujii, S., and Taniguchi, N. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1035**, 313–318
31. Sato, Y., Takahashi, M., Shibukawa, Y., Jain, S. K., Hamaoka, R., Miyagawa, J., Yaginuma, Y., Honke, K., Ishikawa, M., and Taniguchi, N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 11956–11962
32. Kariya, Y., Ishida, K., Tsubota, Y., Nakashima, Y., Hirotsaki, T., Ogawa, T., and Miyazaki, K. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)* **132**, 607–612
33. Gehlsen, K. R., Sriramarao, P., Furcht, L. T., and Skubitz, A. P. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 449–459
34. Kikuchi, M., Hatano, N., Yokota, S., Shimozawa, N., Imanaka, T., and Taniguchi, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 421–428
35. Kuster, B., Wheeler, S. F., Hunter, A. P., Dwek, R. A., and Harvey, D. J. (1997) *Anal. Biochem.* **250**, 82–101
36. Itoh, S., Kawasaki, N., Hashii, N., Harazono, A., Matsuishi, Y., Hayakawa, T., and Kawanishi, T. (2006) *J. Chromatogr. A* **1103**, 296–306
37. Gu, J., Sumida, Y., Sanzen, N., and Sekiguchi, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 27090–27097
38. Isaji, T., Gu, J., Nishiuchi, R., Zhao, Y., Takahashi, M., Miyoshi, E., Honke, K., Sekiguchi, K., and Taniguchi, N. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 19747–19754
39. Gu, J., and Taniguchi, N. (2004) *Glycoconj. J.* **21**, 9–15
40. Luo, B. H., Springer, T. A., and Takagi, J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2403–2408
41. Fernandes, B., Sagman, U., Auger, M., Demetrio, M., and Dennis, J. W. (1991) *Cancer Res.* **51**, 718–723
42. Seelentag, W. K., Li, W. P., Schmitz, S. F., Metzger, U., Aeberhard, P., Heitz, P. U., and Roth, J. (1998) *Cancer Res.* **58**, 5559–5564
43. Handerson, T., and Pawelek, J. M. (2003) *Cancer Res.* **63**, 5363–5369
44. Le Marer, N., and Stehelin, D. (1995) *Glycobiology* **5**, 219–226
45. Bellis, S. L. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1663**, 52–60
46. Chammas, R., Veiga, S. S., Travassos, L. R., and Brentani, R. R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1795–1799
47. Yamamoto, H., Oviedo, A., Sweeley, C., Saito, T., and Moskal, J. R. (2001) *Cancer Res.* **61**, 6822–6829

## 平成 15 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告

 糖タンパク質性医薬品の試験法に関する研究\*\*  
 —LC/MS/MS を用いたペプチドマッピング—

川崎 ナナ, 原園 景, 川西 徹\*

## 1. はじめに

ペプチドマッピングは、タンパク質性医薬品の一次構造や翻訳後修飾等の有無を確認することを目的とした品質試験法の一つである。従来は UV 検出法によって得られたクロマトグラム中のいくつかのピークの保持時間や面積を標準物質のそれらと比較し、大きな違いがないことが判定基準として設定されてきた。しかし最近では、液体クロマトグラフィ—質量分析法 (LC/MS) と組み合わせ、MS で測定されたペプチドの  $m/z$  値が、理論値と一致することを判定基準に加えた試験も設定されるようになってきた。更には、LC/MS/MS によって得られたプロダクトイオンのいくつかをペプチドの配列を確認する目的で規格に取り入れることも検討されるようになってきている。この MS/MS を利用したペプチド配列解析は、プロテオミクスの技術として知られる方法で、MS/MS によってペプチドから生じた  $b$  イオン及び  $y$  イオン<sup>1)</sup> を、データベースに登録されているタンパク質から生じるペプチドに由来する  $b$  及び  $y$  イオンの理論値と照合することによって、ペプチドの配列を推定するものである<sup>2)</sup>。この方法を品質試験に取り入れることによって、より確かな定性的な確認が可能になると思われる<sup>3,4)</sup>。

多くのバイオ医薬品の本質は糖タンパク質である。従来の糖タンパク質のペプチドマッピングでは、糖ペプチドは糖鎖の不均一性のためピーク形状がブロードになる傾向があり、判定の対象からはずされることが多かった。また、LC/MS/MS を用いた糖タンパク質のペプチドマッピングにおいては、MS/MS によって糖ペプチドの糖鎖部分が優先的に開裂

するためデータベースとの照合が難しく、データベース検索による糖ペプチドの同定は避けられてきた。しかし、最近のプロテオミクス/グライコミクスの進展により、糖ペプチドの MS 及び MS/MS スペクトルからペプチド部分の配列や部位特異的な糖鎖構造情報を得ることが可能になってきた<sup>5-9)</sup>。

本研究では、糖タンパク質性医薬品の糖鎖結合部位を含むペプチドの一次構造確認、及び糖鎖構造確認における LC/MS/MS を用いたペプチドマッピングの応用可能性を検証した。糖タンパク質性医薬品のモデルとして、ヒト血清セルロプラスミンを選んだ。セルロプラスミンは 1046 アミノ酸残基からなる糖タンパク質で (Fig. 1), 7 箇所の推定糖鎖結合部位のうち, Asn119, 339, 378 及び 743 に主にシアル酸が結合した 2 本鎖及び 3 本鎖複合型糖鎖が結合していることが報告されているが<sup>10)</sup>, 結合部位毎の糖鎖構造に関する報告はない。

## 2. 実験方法

## 【試薬・材料】

セルロプラスミンは Calbiochem 社より購入した。トリプシンは、Promega 社製の修飾トリプシンを使用した。

## 【トリプシン消化】

セルロプラスミン (200  $\mu\text{g}$ ) を 8 M グアニジン塩酸, 5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6 (270  $\mu\text{L}$ ) に溶解し, 2-メルカプトエタノール 2  $\mu\text{L}$  を加え, 室温で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 5.7 mg を試料溶解溶液 45  $\mu\text{L}$  に溶かして試料溶液に加え, 遮光下, 室温にて 2 時間放置した。

\* 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)

\*\* 本研究は日本公定書協会の「日本薬局方の試験法に関する研究」により行ったものである。

KEKHYYIGII ETTWDYASDH GEKKLISVDT EHSNIYLQNG PDRIGRLYKK ALYLQYTDET  
 FRTTIEKPVW LGFLGPIIKA ETGDKVYVHL KNLASRPYTF HSHGITYYKE HEGAIYPDNT<sup>119</sup>  
 TDFQRADDKV YPGEQYTYML LATEEQSPGE GDGNCVTRIY HSHIDAPKDI ASGLIGPLII  
 CKKDSLDKEK EK<sup>208</sup>HIDREFVV MFSVVDENFS WYLEDNIKTY CSEPEKVDKD NEDFQESNRM  
 YSVNGYTFGS LPGLSMCAED RVKWLFLGMG NEVDVHAAFF HGQALTNKNY RIDTINLFPA  
 TLFDAYMVAQ NPGEWMLSCQ NLNHLKAGLO AFFQVQECNK<sup>339</sup> SSSKDNIRGK HVRHYIAAE  
 EIIWNYAPSG IDIFTKENLT<sup>378</sup> APGSDSAVFF EQGTRIGGS YKKLVYREYT DASFTNRKER  
 GPEEEHLGIL GPVIWAEVGD TIRVTFHNKG AYPLSIEPIG VRFNKNNEG<sup>569</sup>T YSPNYPQS  
 RSVPPSASHV APTETFTYEW TVPKEVGPTN ADPVCLAKMY YSAVDPTKDI FTGLIGPMKI  
 CKKGS<sup>569</sup>SLHANG RQKDV<sup>569</sup>DKEFY LFPTVFDENE SLLLEDNIRM FTTAPDQVDK EDEDFQESNK  
 MHSMNGFMYG NQPGLTMCKG DSVVWYLFSA GNEADVHGIY FSGNTYLWRG ERRDTANLFP  
 QTSLTLHMWP DTEGTFNVEC LTTDHYTGGM KOKYTVNOCR ROSEDSTFY<sup>743</sup>L GERTYIIAAV  
 EVEWDYSPQR EWEKELHHLO EQNVSNAFLD<sup>743</sup> KGEFYIGSKY KKVYROYTD STFRVPVERK  
 AEEEHLGILG POLHADVGDK VKIIFKNMAT RPYSIHAGV QTESSTVTPT LPGETLTYVW  
 KIPERSGAGT EDSACIPWAY YSTVDQVKDL YSGLIGPLIV CRRPYLKVFN PRRKLEFALL  
 FLVFDENESW<sup>907</sup> YLDDNIKTYS DHPEKVNKDD EEFIESNKM<sup>907</sup>H AINGRMFGNL QGLTMHVGDE  
 VNWYLMGMGN EIDLHTVHFH GHSFOYKHRG VYSSDVFDIF PGTYQ<sup>907</sup>TLEMF PRTPGI<sup>907</sup>WLLH  
 CHVTDHIHAG METTYTVLQ<sup>907</sup>N EDTKSG

Fig. 1 ヒトセルロプラスミンのアミノ酸配列

LC/MS/MS 及びデータベース検索により同定されたアミノ酸配列部分を下線で示す。□, 糖鎖結合部位

PD-10 カラム (Amersham Bioscience) を用いて脱試薬し, 得られた試料溶液を凍結乾燥した。還元カルボキシメチル化したセルロプラスミンを 50 mM 重炭酸アンモニウム (200  $\mu$ L) に溶かした。試料溶液 100  $\mu$ L をとり, 1  $\mu$ g/ $\mu$ L の修飾トリプシン溶液を 1  $\mu$ L 加え, 37°C で 16 時間消化した。消化後, 測定まで -20°C に保存し酵素反応を停止させた。

【ペプチドマッピング】

セルロプラスミンのトリプシン消化産物を 0.1% ギ酸水溶液で適度に稀釈し, 以下の条件で LC/MS/MS を行った。サンプル量は,  $m/z$  400~2000 で測定した場合はタンパク量に換算して 0.2  $\mu$ g, また,  $m/z$  1000~2000 で測定した場合は, タンパク量に換算して 0.4  $\mu$ g を使用した。

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)

カラム : MAGIC C18 (Michrom BioResource 社, 0.2  $\times$  50 mm, 3  $\mu$ )

溶離液 A : 0.1% ギ酸を含む 2% アセトニトリル水溶液

溶離液 B : 0.1% ギ酸を含む 90% アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム :

B 液 : 5% (0~10 分)

5~65% (10~70 分)

流速 : ポンプ 2  $\mu$ L/min, スプリッター使用

MS

装置 : ハイブリッド型 LC/MS/MS システム Qstar Puler i (Applied Biosystem 社)

イオン化 : ESI

測定モード : ポジティブイオンモード

スプレー電圧 : 2,500 V

検出 : Q/TOF-MS

MS スキャン範囲 ( $m/z$ ):

ペプチド検出: 400~2,000

糖ペプチド検出: 1000~2,000

MS/MS スキャン範囲: 100~2,000 (データ依存的に MS/MS を行った. コリジョンエネルギーはイオンの価数及び大きさに応じて自動的に変化させた).

#### 【データベース検索】

LC/MS/MS で得られたデータを, Mascot 検索エンジンを用いて SwissPlot のヒトデータベースに対して検索を行い, ペプチドイオンを帰属した. 検索の条件として, シス테인残基のカルボキシメチル化, 消化ミスの許容数を 1, プリカーサーイオン及びプロダクトイオンの質量数の理論値との差の許容範囲をそれぞれ 2 u 及び 0.8 u と設定した. また, 別途, 検索エンジン ProID を用いて同様に検索を行い, 片方の検索エンジンのみでヒットしたヒトセルロプラスミン由来ペプチドについては, 目視によりスペクトルを確認した.

### 3. 実験結果

#### 3.1 ペプチド同定

セルロプラスミンを還元カルボキシメチル化し, そのトリプシン消化物を C18 カラムを接続した LC/MS/MS 装置を用いて分析した. Fig. 2 はフル MS スキャン ( $m/z$  400~2000) によって得られた

ベースピーククロマトグラムである. 各スキャンで検出されたイオンのうち強度の高い 2 価の分子イオンは, 自動的なデータ依存的 MS/MS に供されている. そこで, データベース検索エンジン MASCOT 及び ProID を用いて, ヒトデータベース (Swiss-Plot) 検索を行ったところ, セルロプラスミンのアミノ酸残基の約 70% がデータベースと一致した (Fig. 1 下線). 検索結果を基に, ペプチドマップの各ピークの帰属を行い (Table 1), 主なピークのアミノ酸配列を確認することができた. 三個の推定 *N* 結合型糖鎖結合部位を含むペプチドも検出されていた. データベース検索によって同定されなかったペプチドは, 分子量の小さなペプチド, 糖ペプチド, 又は親水性が高く, C18 カラムに吸着されなかったペプチドと考えられた.

#### 3.2 糖ペプチド同定

トリプシン消化によって生じたペプチドの多くは分子量 2000 Da 以下であるが, *N* 結合型糖鎖は 900 Da 以上であるので, 糖ペプチドの分子量はペプチドに比べて大きくなる. したがって, スキャン範囲を  $m/z$  1000 以上に設定すると, 多くのペプチドの 2 価イオンは検出されず, 主に糖ペプチドが検出されることになる. また, 糖ペプチドの MS/MS では, GlcNAc の B イオンに由来する  $m/z$  204 のプロダクトイオンが強く検出される. そこで, フル MS スキャンの範囲を  $m/z$  1000~2000 に設定し, 更にデ

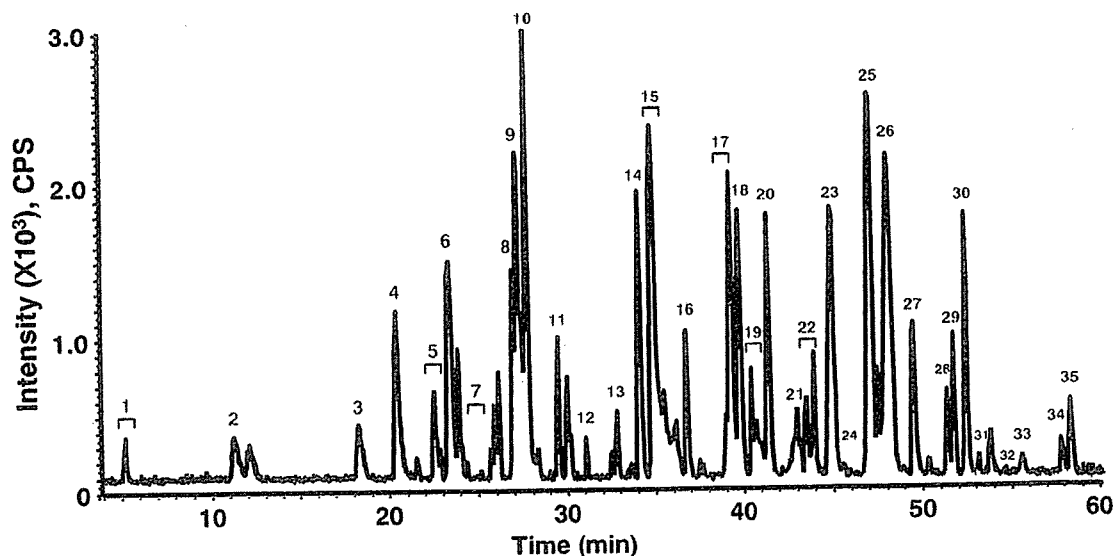


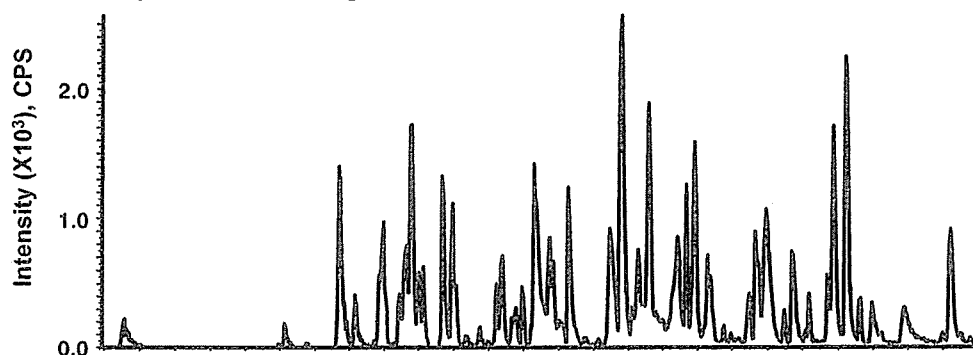
Fig. 2 ヒトセルロプラスミントリプシン消化物の LC/MS によって得られたベースピーククロマトグラム ( $m/z$  400~2000)

ータ依存的な MS/MS で生じた  $m/z$  204 のイオンを抽出することによって、糖ペプチドの溶出位置を推定することができた。Fig. 3A に  $m/z$  1000~2000 で測定したフル MS スキャンのベースピーククロマトグラム、Fig. 3B にデータ依存的な MS/MS のトータルイオンクロマトグラム (TIC), また、Fig. 3C に MS/MS で生じた  $m/z$  204 のマスクロマトグラムを示す。この方法で浮かび上がった4つのピー

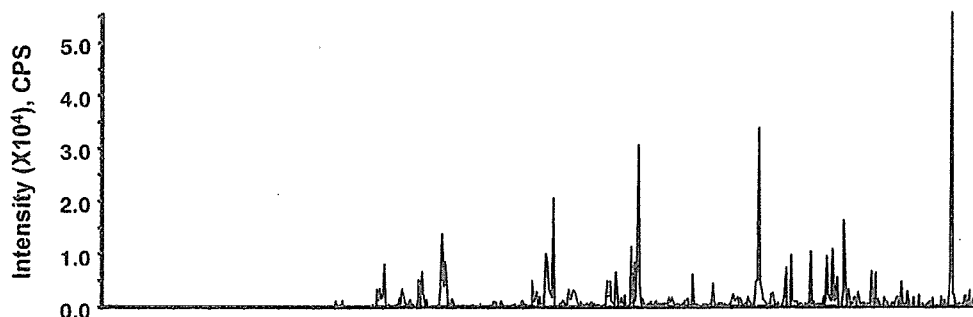
ク近傍から  $m/z$  204 のイオンが検出されている MS/MS スペクトル (ピーク A, B, C, 及び D) を選び出し、解析を行った。

Fig. 4 は4つのピーク周辺から選び出した代表的な MS/MS スペクトルである。Fig. 4A に示す糖ペプチド (ピーク A) のペプチド部分は、ペプチドイオン ( $m/z$  1892.8) から、Asp110-Arg125 と同定された。更に、MS/MS スペクトルを詳細に調べた

(A) Base peak chromatogram



(B) TIC of MS/MS



(C)  $m/z$  204 of MS/MS

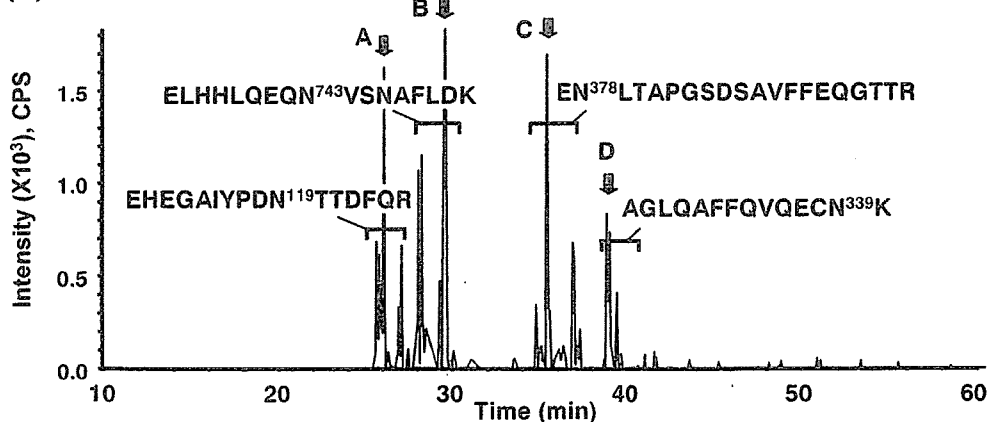


Fig. 3 ヒトセルプラスミントリプシン消化物の LC/MS によって得られたベースピーククロマトグラム ( $m/z$  1000~2000) (A), LC/MS/MS によって得られた TIC (B), 及び LC/MS/MS によって生じた  $m/z$  204 のマスクロマトグラム (C)

Table 1 ヒトセルプラスミンのトリプシン

Retention time (min)	Peak No.	Calculated			Peptide Sequence	amino acid residue	Theoretical MW	No. of missed cleavage
		<i>m/z</i>	Charge..	MW				
5	1	590.8	+2	1179.7	IYHSHIDAPK	159-168	1179.6	0
5	1	798.4	+2	1594.8	VDKDNEDFQESNR	227-239	1594.7	1
5	1	532.6	+3	1594.8				
11	2	509.2	+2	1016.5	QYTDSTFR	767-774	1016.5	0
18	3	783.9	+2	1565.8	VNKDDEEFIESNK	926-938	1565.7	1
18		522.9	+3	1565.8				
20	4	602.3	+2	1202.6	EYTDASFTNR	408-417	1202.5	0
22	5	450.7	+2	899.5	GEFYIGSK	752-759	899.4	0
22	5	626.8	+2	1251.6	MFTTAPDQVDK	580-590	1251.6	0
23	6	952.4	+2	1902.9	NNEGTYYSFNYPQSR	466-481	1902.8	0
24	7	529.9	+3	1586.8	RQSEDSTFYLGER	701-713	1586.7	1
24	7	719.1	+3	2154.2	NLASRPYTFHSHGLTYK	92-109	2154.1	0
24	7	765.0	+3	2292.1	FNKNNEGTYYSFNYPQSR	463-481	2292.0	1
27	8	716.3	+2	1430.7	QSEDSTFYLGER	702-713	1430.6	0
27	8	868.0	+2	1733.9	LVYREYTDASFTNR	404-417	1733.8	1
27	9	786.4	+2	1470.8	EVGPTNADPVCLAK	505-518	1470.7	0
27	9	752.8	+3	2255.3	KAEELHLGILGPQLHADVGDK	780-800	2255.2	1
27		564.8	+4	2255.3				
27	10	1237.6	+2	2473.1	MFTTAPDQVDEKEDDFQESNK	580-600	2473.1	1
27		825.4	+3	2473.1				
28	10	1150.1	+2	2298.2	KLISVDTEHSNIYLQNGPDR	24-43	2298.2	1
28		575.6	+4	2298.2				
29	11	1064.6	+2	2127.1	AEEELHLGILGPQLHADVGDK	781-800	2127.1	0
29		710.0	+3	2127.1				
29		532.8	+4	2127.1				
29	11	1086.1	+2	2170.1	LISVDTEHSNIYLQNGPDR	25-43	2170.1	0
29		724.4	+3	2170.1				
31	12	550.0	+3	1646.9	KALYLQYTDVETFR	50-62	1646.8	1
32	13	1103.0	+2	2204.0	MHSMNGFMYGNGPGLTMCK	601-619	2203.9	0
32		735.7	+3	2204.0				
34	14	760.4	+2	1518.8	ALYLQYTDVETFR	51-62	1518.7	0
35	15	686.4	+2	1370.8	GAYPLSIEPIGVR	450-462	1370.8	0
35	15	1266.2	+2	2530.3	SVPPSASHVAPTETFTYEWTVPK	482-504	2530.2	0
35	15	1291.7	+3	3872.0	NMATRPYSIAHGVQTESSTVPTLPGETLTYVWK	807-841	3871.9	0
35		969.0	+4	3872.1				
37	16	842.8	+3	2525.3	HYYIGIETTTWDYASDHGEKK	4-24	2525.2	1
39	17	1199.6	+2	2397.2	HYYIGIETTTWDYASDHGEK	4-23	2397.1	0
39		800.1	+3	2397.2				
39		600.3	+4	2397.2				
39	18	836.1	+3	2505.2	SGAGTEDSACIPWAYYSTVDQVK	846-868	2505.1	0

All masses are monoisotopic. The peptides including the potential *N*-glycosylation site are in bold type. Cystein

ところ、ペプチドに由来するbイオン及びyイオンが生じていることが明らかになった。このことから、糖ペプチドであっても、ペプチドの配列を確認できることが明らかになった。

同様に、Fig. 4Bの糖ペプチド（ピークB）は、ペプチドの2価イオン（*m/z* 1011.7）から、Asp735-Lys751と推定され、その配列由来のb及びyイオンが検出されていることを確認した。Fig. 4Cに示す糖ペプチド（ピークC）のMS/MSスペクトルには、ペプチドイオン及びペプチドに糖鎖が結合したイオンは検出されなかったが、yイオンシ

リーズから、Asp379-Arg396と同定された。また、Fig. 4Dの糖ペプチド（ピークD）は、ペプチドイオン（*m/z* 1640.8）及びGlcNAcが結合したペプチドイオン（*m/z* 1843.9）から、Ala327-Lys340と同定された。推定糖鎖結合部位である227, 588, 及び929番目のAsnを含む糖ペプチドは検出されなかったことから、糖鎖が結合していないことが確認された。

### 3.3 糖鎖解析

糖鎖の構造は、各糖ペプチドのMS/MSスペクトルと糖鎖部分の分子量から推定した。Fig. 4Aに



## 消化ペプチドのLC/MS/MSによる同定

Retention time (min)	Peak No.	Calculated			Peptide Sequence	amino acid residue	Theoretical MW	No. of missed cleavage
		<i>m/z</i>	Charge	MW				
40	19	1240.3	+3	3717.9	TPGIWLLHCHVTDHIHAGMETTYTVLQNEDETK	1013-1044	3717.8	0
40	19	930.7	+4	3718.9				
40	19	1232.3	+3	3693.8	ADDKVYPGEQYTYMLLATEEQSPGEGDGNCVTR	126-158	3693.6	1
41	20	596.4	+2	1190.7	DIFTGLIGPMK	529-539	1190.6	0
41	20	1045.5	+2	2089.0	TYIIAAVEVEWDYSPQR	714-730	2089.0	0
43	21	1089.2	+3	3264.5	VYPGEQYTYMLLATEEQSPGEGDGNCVTR	130-158	3264.4	0
43	22	1228.6	+2	2455.1	MYSVNGYTFGSLPGLSMCAEDR	240-261	2455.0	0
43		819.4	+3	2455.2				
44	22	1174.1	+2	2346.2	MYSAVDPTKDIIFTGLIGPMK	519-539	2346.2	1
44		783.1	+3	2346.3				
44	22	1426.7	+2	2851.4	WYLFMGNEVDVHAAFFHQALTNK	264-288	2851.4	0
44		713.9	+4	2851.5				
44	23	785.9	+2	1469.9	DIASGLIGPLICK	169-182	1469.8	0
45	23	1122.3	+4	4485.2	RDTANLFPQTSITLHMWPDETEGFNVECLTTDHYTGGMK	653-691	4485.0	1
45	24	1386.7	+2	2771.5	ERGPEEHLGILGPVIWAEVGDITR	419-443	2771.4	1
45		924.8	+3	2771.5				
45		693.9	+4	2771.5				
46	25	1168.3	+3	3501.8	QSEDSTFYLGERTYIIAAVEVEWDYSPQR	702-730	3501.6	1
47	25	788.9	+2	1575.9	DLYSGLIGPLIVCR	869-882	1575.8	0
47		526.3	+3	1575.9				
47	25	956.6	+2	1911.2	TTIEKPVWLGFGLPIIK	63-79	1911.1	0
47		638.1	+3	1911.2				
48	26	1083.3	+4	4329.1	DTANLFPQTSITLHMWPDETEGFNVECLTTDHYTGGMK	654-691	4328.9	0
48	26	1244.2	+2	2486.3	GPREEHLGILGPVIWAEVGDITR	421-443	2486.3	0
48		829.8	+3	2486.4				
48		622.6	+4	2486.4				
49	27	1357.7	+2	2713.4	HYYIAAEEIIWNYAPSGIDIFTK	354-376	2713.3	0
49		905.5	+3	2713.5				
51	28	1141.9	+3	3422.8	GDSVVWYLFSAAGNEADVHGIYFSGNTYLWR	620-649	3422.6	0
51	29	1054.2	+3	3159.6	DVDKEFYLFPTVFDEN <sup>569</sup> ESLLEDNIR	554-579	3159.5	1
52	30	1335.2	+2	2668.4	GVYSSDVFDI FPGTYQTFLEMFPR	990-1012	2668.3	0
52		890.4	+3	2668.3				
53	31	1352.2	+2	2702.4	EFYLFPTVFDEN <sup>569</sup> ESLLEDNIR	558-579	2702.3	0
54	32	1077.9	+3	3230.7	HIDREFVVMFSVVDEN <sup>208</sup> FSWYLEDNIK	193-218	3230.5	1
55	33	1355.7	+2	2709.4	EFVVMFSVVDEN <sup>208</sup> FSWYLEDNIK	197-218	2709.3	0
58	34	1481.3	+2	2960.5	KLEFALLFLVFDEN <sup>907</sup> ESWYLDNLIK	894-917	2960.5	1
58		987.9	+3	2960.7				
58	35	1356.0	+3	4065.1	IDTINLFPATLFDAYMVAQNPGEWMLSCQNLNHLK	292-326	4065.0	0
58		1017.3	+4	4065.2				
61		1417.2	+2	2832.5	LEFALLFLVFDEN <sup>907</sup> ESWYLDNLIK	895-917	2832.4	0

residue was carboxymethylated.

は *m/z* 204 (HexNAc<sup>+</sup>) 及び 366 (Hex-HexNAc<sup>+</sup>) などの糖鎖に由来するフラグメントに加え, *m/z* 292 のイオンが認められることから, この糖ペプチドにはシアル酸含有糖鎖が結合していることが推定された。さらに, 糖ペプチド全体の計算分子量 4096.7 Da からペプチドの理論分子量 1891.8 Da を引いて得られた糖鎖部分の分子量から単糖組成を推定し, 糖鎖構造は, ジシアロ 2 本鎖糖鎖と推定された。同様にして, ピーク A 周辺から *m/z* 204 が検出されている MS/MS スペクトルを選び出して解析したところ, 糖鎖分子量の異なる糖ペプチドが存

在しており, それぞれフコシルジシアロ 2 本鎖糖鎖やトリシアロ 3 本鎖糖鎖などが結合していることが推定された (Table 2)。

同じ要領で, 他の 3 つのピークについても糖鎖構造解析を行った。Fig. 4B の糖ペプチドの糖鎖部分は, 糖ペプチド分子量 4882.1 Da からペプチドの理論分子量 2021.0 Da を引いた値 2879.1 Da から, トリシアロ 3 本鎖糖鎖と推定された。また, Fig. 4C から Asn743 にはジシアロ 2 本鎖糖鎖が結合していることが推定された。更に, Fig. 4D から, Asn339 に結合している糖鎖についても, フコースが結合し

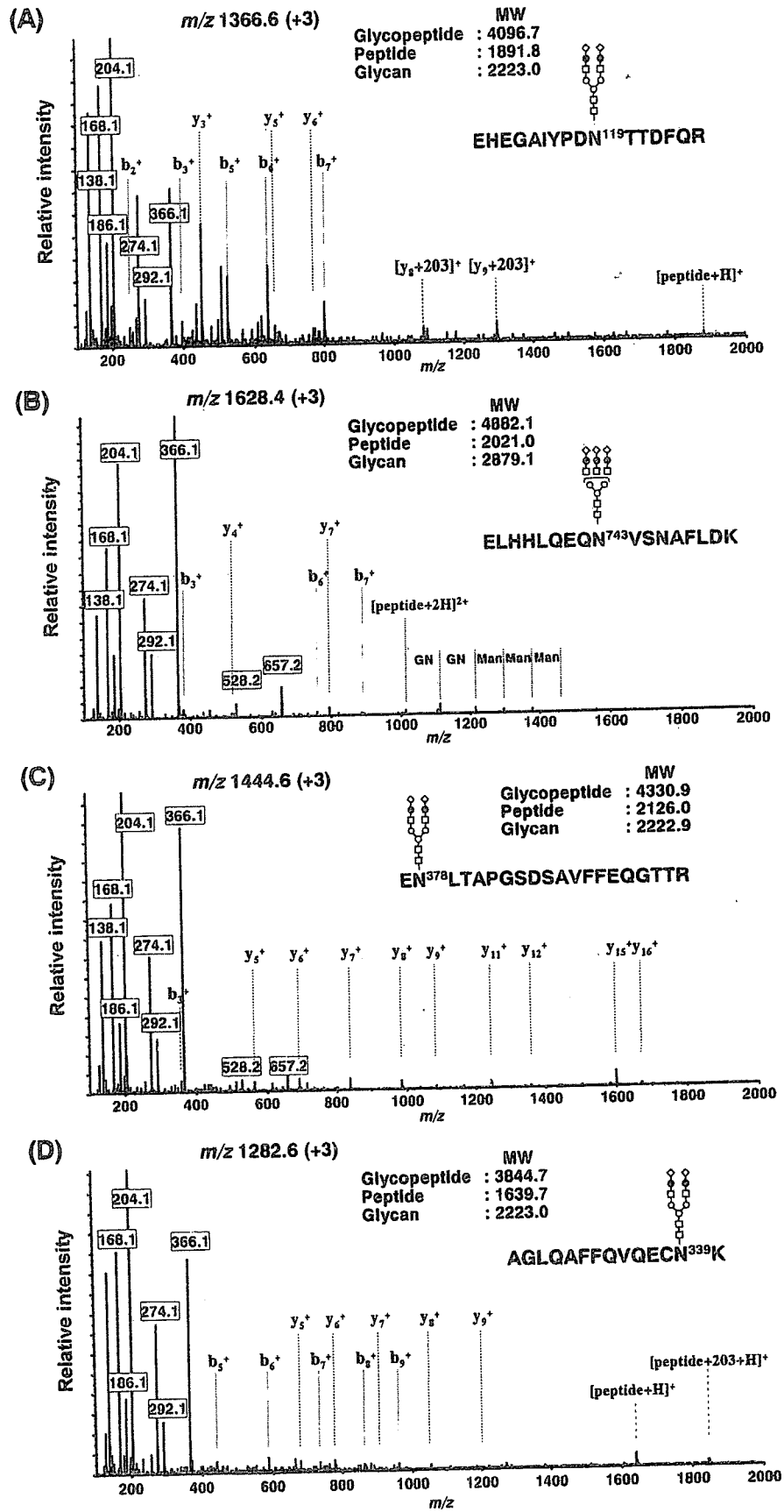


Fig. 4 Fig. 3C で示したピーク A, B, C, 及び D の MS/MS スペクトル

Table 2 ヒトセルロプラスミンの部位特異的糖鎖解析の結果

Retention time (min)	Glycopeptides		Relative peak intensity <sup>a</sup> %	Peptide Sequence	Theoretical MW	Oligosaccharide	
	<i>m/z</i>	Charge				Calculated MW	Theoretical Composition <sup>b,c</sup>
26	1415.3	+3	52	EHEGAIYDPN <sup>19</sup> TTDFQR	1891.8	2351.0	[HexNAc]4[Hex5[NeuAc]2[Fuc]1
26	1366.6	+3	100	EHEGAIYDPN <sup>19</sup> TTDFQR	1891.8	2204.9	[HexNAc]4[Hex5[NeuAc]2
27	1682.7	+3	6	EHEGAIYDPN <sup>19</sup> TTDFQR	1891.8	3153.3	[HexNAc]5[Hex6[NeuAc]3[Fuc]2
27	1634.0	+3	21	EHEGAIYDPN <sup>19</sup> TTDFQR	1891.8	3007.2	[HexNAc]5[Hex6[NeuAc]3[Fuc]1
27	1585.3	+3	24	EHEGAIYDPN <sup>19</sup> TTDFQR	1891.8	2861.2	[HexNAc]5[Hex6[NeuAc]3
28	1458.3	+3	35	ELHHLQEQN <sup>743</sup> VSN AFLDK	2021.0	2351.0	[HexNAc]4[Hex5[NeuAc]2[Fuc]1
28	1409.6	+3	100	ELHHLQEQN <sup>743</sup> VSN AFLDK	2021.0	2204.9	[HexNAc]4[Hex5[NeuAc]2
29	1725.8	+3	5	ELHHLQEQN <sup>743</sup> VSN AFLDK	2021.0	3153.5	[HexNAc]5[Hex6[NeuAc]3[Fuc]2
29	1677.1	+3	29	ELHHLQEQN <sup>743</sup> VSN AFLDK	2021.0	3007.2	[HexNAc]5[Hex6[NeuAc]3[Fuc]1
29	1628.4	+3	43	ELHHLQEQN <sup>743</sup> VSN AFLDK	2021.0	2861.1	[HexNAc]5[Hex6[NeuAc]3
31	1895.8	+3	2	ELHHLQEQN <sup>743</sup> VSN AFLDK	2021.0	3663.4	[HexNAc]6[Hex7[NeuAc]4[Fuc]1
31	1847.1	+3	3	ELHHLQEQN <sup>743</sup> VSN AFLDK	2021.0	3517.4	[HexNAc]6[Hex7[NeuAc]4
35	1493.3	+3	6	EN <sup>378</sup> LTAPGSDSAVF FEQGTTR	2126.0	2351.0	[HexNAc]4[Hex5[NeuAc]2[Fuc]1
35	1444.6	+3	100	EN <sup>378</sup> LTAPGSDSAVF FEQGTTR	2126.0	2204.9	[HexNAc]4[Hex5[NeuAc]2
37	1712.1	+3	8	EN <sup>378</sup> LTAPGSDSAVF FEQGTTR	2126.0	3007.2	[HexNAc]5[Hex6[NeuAc]3[Fuc]1
37	1663.4	+3	23	EN <sup>378</sup> LTAPGSDSAVF FEQGTTR	2126.0	2861.1	[HexNAc]5[Hex6[NeuAc]3
39	1331.3	+3	14	AGLQAFFQVQECN <sup>339</sup> K	1639.7	2351.1	[HexNAc]4[Hex5[NeuAc]2[Fuc]1
39	1282.6	+3	100	AGLQAFFQVQECN <sup>339</sup> K	1639.7	2205.0	[HexNAc]4[Hex5[NeuAc]2
41	1501.3	+3	6	AGLQAFFQVQECN <sup>339</sup> K	1639.7	2861.1	[HexNAc]5[Hex6[NeuAc]3

<sup>a</sup> Relative peak intensity was calculated by comparing triply-charge state glycopeptide ions. The intensity of the glycoform with maximum at each glycosylation site was taken as 100 %.

<sup>b</sup> The oligosaccharide composition was deduced from the molecular weight of the oligosaccharide.

<sup>c</sup> Fuc, fucose; Hex, Hexose; HexNAc, N-acetylhexosamine; NeuAc, N-acetylneuraminic acid.

All masses are monoisotopic.

Cysteine residue was carboxymethylated.



ていないジシアロ 2 本鎖糖鎖と推定された。

#### 4. 考 察

本研究では、LC/MS/MS を用いたペプチドマッピングの糖タンパク質性医薬品の品質試験法としての応用可能性を検証した。まず、データベース検索を利用することによって、ペプチドマップ中の糖鎖非結合ペプチドを容易に帰属できることを確認した。溶出位置からペプチドを推定する方法と比較して、より確実に一次構造を確認できること、また、プロセッシングやその他の翻訳後修飾の有無を確認できることから、品質試験法として優れていると思われる。

データベースを用いた方法のみでは糖ペプチドを同定することはできなかった。そこで、糖ペプチドの MS/MS スペクトルを選び出し、ペプチド部分のアミノ酸配列と糖鎖部分の構造を推定することを検討した。糖ペプチドの MS/MS スペクトルを選び出すためには、まず、ペプチドマップにおける糖ペプチドの溶出位置を特定する必要がある。複雑なペプチドマップにおいて糖ペプチドの溶出位置を推定する方法として、糖鎖に特徴的なプロダクトイオン ( $m/z$  204, 366 など) を診断イオンとしたインソースフラグメンテーションやプリカーサーイオンスキャンが知られている<sup>10,11)</sup>。これらは、糖ペプチドの溶出位置の推定には適しているが、前駆イオンの分子量や糖ペプチドの開裂情報が得られないため、ペプチドや糖鎖の配列を推定するためには、別途データ依存的 MS/MS が要求される。そこで我々は、データ依存的に取り込んだ MS/MS スペクトルで生じた糖鎖由来イオン ( $m/z$  204, HexNAc) を指標として糖ペプチドの MS/MS スペクトルを探し出す方法を見出した<sup>8,9)</sup>。この方法を用いて選び出した MS/MS スペクトルを基にペプチド配列と糖組成を推定し、セルロプラスミンの 4 箇所糖鎖結合位置に付加している糖鎖の特徴を明らかにすることに成功した。

これまで、糖ペプチドの MS/MS では糖鎖部分が優先的に開裂するため一次構造情報が得られにくく、MS/MS を糖ペプチドの配列確認や糖鎖構造確認に利用するのは難しいといわれてきた。しかし、今回用いた分析システムとコリジョンエネルギーの条件ではペプチドの一次構造情報が得られているこ

とを確認した。これは、糖ペプチドであってもアミノ酸配列を確認できることを意味している。また、ペプチドを特定することによって、糖鎖構造を確認することも可能であった。

以上のことから、糖タンパク質のペプチドマッピングにおいて、ペプチド部分はデータベースを利用することによって容易に配列を確認できること、また、糖ペプチドの場合は、MS/MS スペクトルを選び出して解析することによって、ペプチド部分の配列と部位特異的な糖鎖構造の概略を確認できることが明らかになった。この方法は、一次構造と糖鎖を含む翻訳後修飾を同時に確認できるものであり、糖タンパク質性医薬品の品質試験法として応用可能であると思われる。

#### 文 献

- 1) Roepstorff, P., Fohlman, J.: *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 601 (1984).
- 2) Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., Cottrell, J. S.: *Electrophoresis*, **20**, 3551-3567 (1999).
- 3) Hirayama, K., Yuji, R., Yamada, N., Kato, K., Arata, Y., Shimada, I.: *Anal. Chem.*, **70**, 2718-2725 (1998).
- 4) Bongers, J., Cummings, J. J., Ebert, M. B., Federici, M. M., Gledhill, L., Gulati, D., Hilliard, G. M., Jones, B. H., Lee, K. R., Mozdzanowski, J., Naimoli, M., Burman, S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21**, 1099-1128 (2000).
- 5) Wang, F., Nakouzi, A., Angeletti, R. H., Casadevall, A.: *Anal. Biochem.*, **314**, 266-280 (2003).
- 6) Nemeth, J. F., Hochgesang, G. P., Jr. Marnett, L. J., Caprioli, R. M.: *Biochemistry*, **40**, 3109-3116 (2001).
- 7) Krokhin, O., Ens, W., Standing, K. G., Wilkins, J., Perreault, H.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 2020-2030 (2004).
- 8) Harazono, A., Kawasaki, N., Kawanishi, T., Hayakawa, T.: *Glycobiology*, **15**, 447-462 (2006).
- 9) Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Ishii-Watabe, A., Kawanishi, T., Hayakawa, T.: *Anal. Biochem.*, **348**, 259-268 (2006).
- 10) Takahashi, N., Takahashi, Y., Ortel, T. L., Lozier, J. N., Ishioka, N., Putnam, F. W.: *J. Chromatogr.*, **317**, 11-26 (1984).

- 
- 11) Guzzetta, A. W., Basa, L. J., Hancock, W. S., Keyt, B. A., Bennett, W. F.: *Anal. Chem.*, **65**, 2953-2962 (1993).
- 12) Carr, S.A., Huddleston, M. J., Bean, M. F.: *Protein Sci.*, **2**, 183-196 (1993).

平成 16 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告  
 局方組換えタンパク質性医薬品の糖鎖試験法に関する研究\*\*  
 —LC/MS<sup>n</sup> を用いた糖鎖プロファイリング—

川崎 ナナ, 伊藤さつき, 橋井 則貴, 日向 昌司, 川西 徹\*

### 1. はじめに

日本薬局方第 14 改正に組換え医薬品として初めてヒトインスリンが記載され、今後多くの組換え医薬品が新規記載されることが予想されている。現在までに承認された組換え医薬品や開発段階にある組換え医薬品の多くが糖タンパク質であることを考えると、新規記載品の多くが糖タンパク質性医薬品となることは確実であろう。糖タンパク質は同一ポリペプチド鎖に様々な糖鎖が結合した複数の分子からなる不均一な集合体で、その不均一性の変化は、活性、体内動態、安定性、溶解性、及び安全性に直接影響を与えることが多くの研究により明らかにされている<sup>1)</sup>。しかも糖鎖付加は、人為的に制御することが困難である上、製造方法に依存して変動することから、糖タンパク質関連医薬品の品質評価において、糖鎖部分の恒常性を確認することが重要である。

第 15 改正に SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、タンパク質定量法、等電点電気泳動法、アミノ酸分析法、キャピラリー電気泳動法、及びペプチドマップ法が参考情報として記載される。しかし、糖タンパク質の糖鎖に関する試験法の記載は、検討されていない。それは、糖鎖の構造が複雑で不均一性が高く、解析が容易ではないことに起因している。現在のところ、糖鎖分析法として、単糖組成分析や、各種 HPLC 及び電気泳動法を用いた糖鎖プロファイリングなどが検討されているが、国際的にも定まった試験法がないのが現状である。製造方法変更に伴うバイオ医薬品の同等性/同質性評価や、バイオ

後発品の同等性/同質性評価において、糖鎖部分の評価が重要視されている昨今、糖鎖試験法の整備は急務である。

我々はこれまで、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) を用いた独自の糖鎖プロファイリング法を開発し、様々な糖タンパク質の糖鎖構造解析に応用してきた<sup>2-4)</sup>。この方法は、グラファイトカーボンカラム (GCC) を用いて多様な糖鎖を分離しながら、直接エレクトロスプレーイオン化 (ESI) MS 及びタンデム MS (MS/MS) で分子量測定と糖鎖配列解析を行うもので、1 回の分析で、糖鎖の不均一性や個々の糖鎖の構造情報を得ることができ、本研究では、短時間でより多くの糖鎖を識別し、構造情報を得ることを目的として、LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法の改良を行った。すなわち、ポジティブ及びネガティブイオンモードにおける連続多段階 MS (MS<sup>n</sup>) の利用、並びに LC/MS に適した試料調製法として、従来の糖鎖の還元化に加えて、国内での汎用性の高いピリジルアミノ (PA) 化の利用を検討した。更に、糖タンパク質のモデルとして遺伝子組換え型ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (rhCG)、及び糖鎖構造を改変した組換え型ヒトフォリスタチンを用い、糖鎖試験法としての可能性を検証した。

### 2. 研究方法

#### 【試薬・材料】

還元糖鎖は Ludger 社及び GLYCO 社より購入した。PA 化糖鎖はコスモ・バイオ社より購入した。

\* 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)

\*\* 本研究は日本公定書協会の「日本薬局方の試験法に関する研究」により行ったものである。



遺伝子組換え型 rhCG はシグマ社より購入した。フォリスタチンは、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 転移酵素-III (GnT-III) 遺伝子を導入した CHO 細胞で発現させ、硫酸化セルロフエインカラム及び C4 カラムを用いた HPLC で精製した。

#### 【rhCG 糖鎖の調製】

rhCG (200  $\mu$ g) を 8 M グアニジン塩酸塩, 5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6 (270  $\mu$ L) に溶解し, 2-メルカプトエタノール 2  $\mu$ L を加え, 室温で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 5.7 mg を試料溶解溶液 45  $\mu$ L に溶かして試料溶液に加え, 遮光下, 室温にて 2 時間放置した。PD-10 カラム (Amersham Bioscience) を用いて脱試薬し, 得られた試料溶液を凍結乾燥した。還元カルボキシメチル化 rhCG (100  $\mu$ g) を 95  $\mu$ L の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し, 5  $\mu$ L の *N*-グリコシダーゼ F (PNGaseF) と 37°C で 18 時間反応させて糖鎖を切り出した。終濃度が 70% になるように冷エタノールを加えてタンパク質を沈殿させ, 上清を SpeedVac で減圧乾固した。糖鎖を 50  $\mu$ L の水に溶解し, 0.5 M NaBH<sub>4</sub> (50  $\mu$ L) と反応させて糖アルコールとした。カーボンカートリッジ ENVI-Carb (Supelco) を用いて脱塩し, 減圧乾固後, 50  $\mu$ L の水に溶解して試料溶液とした。

#### 【フォリスタチン糖鎖の調製】

精製したフォリスタチン (200  $\mu$ g) を還元カルボキシメチル化し, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で PNGase F (5 単位) と 37°C で 16 時間反応させて糖鎖を切り出した。70%冷エタノールを加えてタンパク質を沈殿させ, 上清を SpeedVac で減圧乾固した。糖鎖に 20  $\mu$ L のカップリング試薬 (12.8 M AP-酢酸溶液) を加えて 90°C で 60 分間反応させた。反応液に 20  $\mu$ L の還元試薬 (3.3 M ボランジメチルアミン複合体-酢酸溶液) を加えて 80°C で 60 分加熱して還元した。更に, 反応液にトリエチルアミン-メタノール (40  $\mu$ L) 及びトルエン (50  $\mu$ L) を加えた後, 窒素気流下減圧乾固した (60°C, 15 分間)。過剰の未反応試薬は残渣にメタノール (20  $\mu$ L) 及びトルエン (40  $\mu$ L) を加えた後, 窒素気流下減圧除去した (60°C, 10 分間)。更に 50  $\mu$ L のトルエンを残渣に加えた後, 窒素気流下減圧乾固した (50°C, 10 分間)。PA 糖鎖を 5 mM 酢酸アンモニウム溶液に溶解し, ENVI-Carb を用いて脱塩した後, 50  $\mu$ L

の 5 mM 酢酸アンモニウム溶液に溶かして試料溶液とした。

#### 【LC/MS<sup>n</sup>】

##### HPLC:

装置: Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)

カラム: Hypercarb (Thermo Electron 社, 0.2 又は 0.1 $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ )

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

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

グラジエントプログラム:

B 液: 5~40% (0~60 分) (還元化糖鎖の分離)

: 10~45% (0~60 分) (PA 化糖鎖の分離)

流速: 2  $\mu$ L/min

##### MS<sup>n</sup>:

装置: LTQ-FT (Thermo Electron 社)

イオン源: nanoESI (AMR 社)

キャピラリー温度: 200°C

キャピラリー電圧: 1.8 kV

スキャン範囲 (*m/z*): 450~2,000

衝突エネルギー: 35%

### 3. 実験結果

#### 3.1 糖鎖プロファイリング法の改良

還元糖鎖のアノマーは逆相系 HPLC によって互いに分離されるので, LC/MS を行うにあたって, あらかじめ還元末端を誘導体化しておく必要がある。そこで, 標準糖鎖 (Fig. 1A, B, C 及び D) を NaBH<sub>4</sub> で還元して糖アルコール (各 0.5 pmol) とし, これらをモデル糖鎖として LC/MS<sup>n</sup> を用いた糖鎖プロファイリングの改良を検討した。分離用カラムとして内径 0.1 mm のグラファイトカーボンカラム, 及び質量分析装置としてナノ ESI を接続したイオントラップ型 MS-イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (ITMS-FT ICRMS) 装置を用い, ポジティブイオンモードにおける FT ICRMS を用いたフル MS<sup>1</sup> スキャン及び ITMS を用いたデータ依存的 MS<sup>2-4</sup> スキャン, 並びにネガティブイオンモードにおける FT ICRMS を用いたフル MS<sup>1</sup> スキャン及び ITMS を用いたデータ依存的 MS<sup>2-4</sup> スキャンを 1 サイクルとして LC/MS<sup>n</sup> を行った。なお, デ

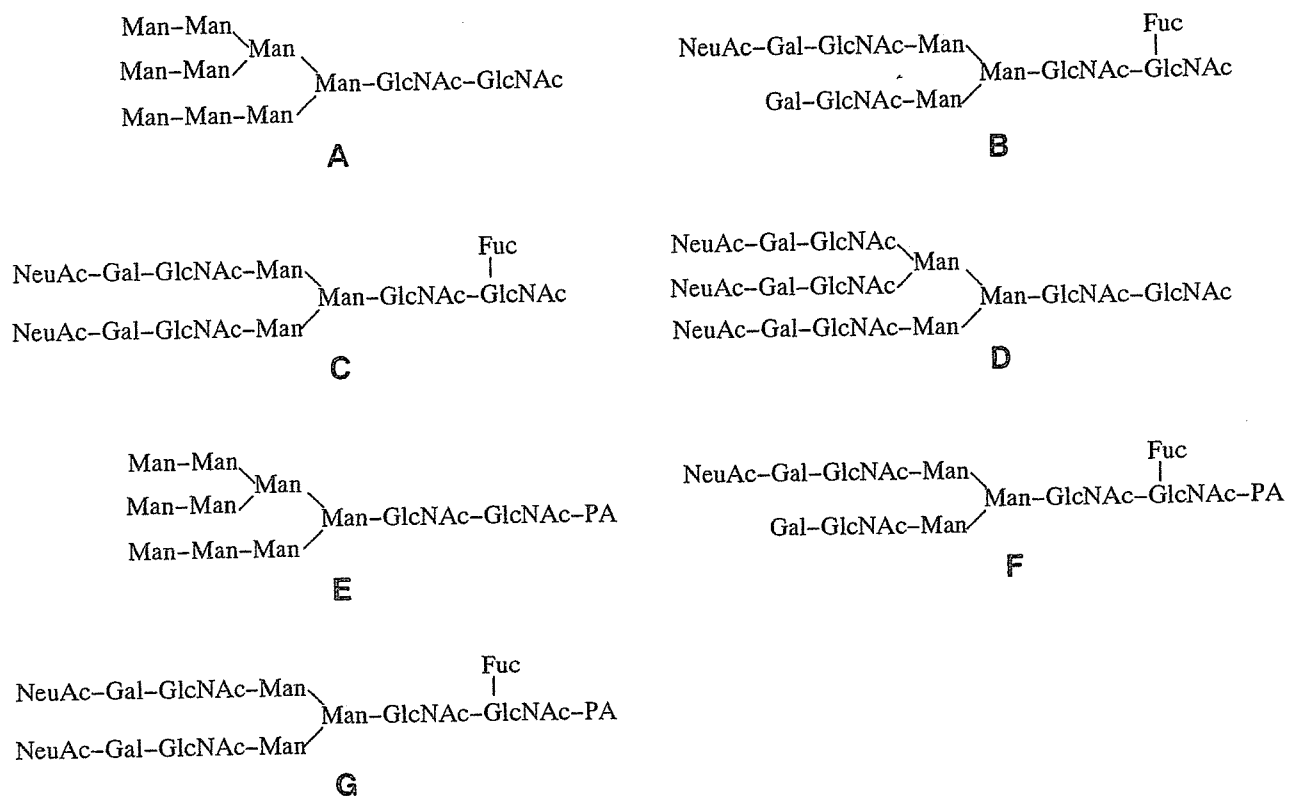


Fig. 1 標準糖鎖

ータ依存的 MS<sup>2-4</sup> は、その前のスキャンにおいて最も強度の高い前駆イオンに対して行った。

Fig. 2A 及び B は、ポジティブ及びネガティブイオンモードにおいて FT ICRMS を用いたフル MS<sup>1</sup> スキャンによって得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) である。検出された 5 つのピーク (ピーク 1~5) は、MS<sup>1</sup> で得られた分子量と MS<sup>2-4</sup> で得られたプロダクトイオンから、Fig. 2 中に示すように、マンノース 9 分子からなる糖鎖 (Man<sub>9</sub>) (Fig. 1A), *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) が 1 個結合したフコシル 2 本鎖糖鎖 (Fig. 1B), NeuAc が 2 分子結合したフコシル 2 本鎖糖鎖 (Fig. 1C), 及び 2 種類のトリシアロ 3 本鎖糖鎖 (Fig. 1D) と帰属された。一例として、Fig. 3A, B, 及び C に、ピーク 2 のポジティブ及びネガティブイオンモードにおける FT ICRMS を用いたフル MS<sup>1</sup> スペクトル, 及び *m/z* 1040.89 のイオンを前駆イオンとした MS<sup>2</sup> スペクトルを示す。MS<sup>1</sup> で得られた分子量, 及び MS<sup>2</sup> スペクトルに観測された一連の B イオンシリーズ, 及び Y イオンシリーズは、モノシアロフコシル 2 本鎖糖鎖 (Fig. 1B) の構造と

矛盾がない。

ポジティブイオンモードで強く検出される Man<sub>9</sub> は、ネガティブイオンモードでは小さなピークとして検出された。このことは、中性糖鎖はポジティブイオンモードでの測定が適していることを示唆している。酸性糖鎖であるトリシアロ 3 本鎖糖鎖は、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードで検出されたが、糖鎖にはより酸性度の高い硫酸化糖鎖やポリシアロ糖鎖などが存在することから、ネガティブイオンモードでの検出が必要と考えられる。以上のように、ポジティブ及びネガティブイオンモードにおける MS<sup>1-4</sup> を 1 サイクルとして連続分析することによって、多様な構造を含む糖タンパク質の糖鎖を一度に解析することが可能となった。

### 3.2 rhCG 糖鎖プロファイリングへの応用

hCG は局方収載の代表的糖タンパク質で、 $\alpha$  サブユニット, 及び  $\beta$  サブユニットから構成されている<sup>5)</sup>。 $\alpha$  サブユニットは 92 アミノ酸残基からなり、Asn52 と 78 に *N* 結合型糖鎖が結合している。 $\beta$  サブユニットは 145 アミノ酸残基からなり、Asn13 と 30 に *N* 結合型糖鎖, 並びに Ser121, 127, 132,

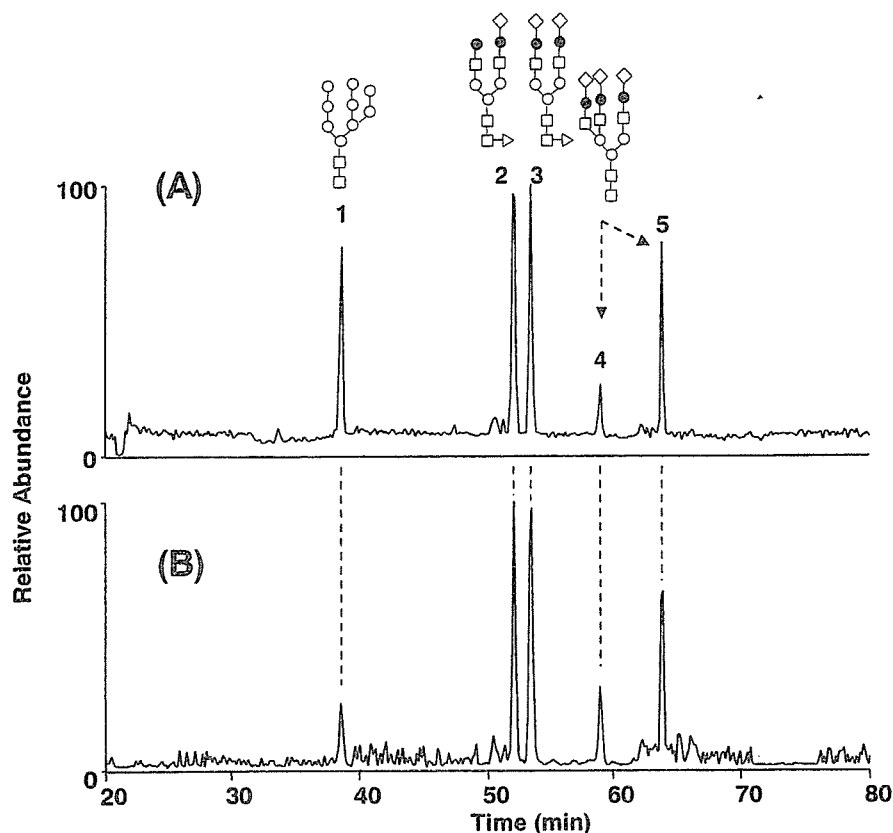


Fig. 2 標準糖鎖 (Fig. 1A-D) の LC/MS<sup>1</sup> によって得られた TIC と主なピークの糖鎖構造

(A) ポジティブイオンモード (B) ネガティブイオンモード

◇, NeuAc; ○, Man; ●, Gal; □, GlcNAc; △, Fuc

及び 138 に O 結合型糖鎖が付加している。LC/MS<sup>n</sup> を用いた糖鎖プロファイリング法を、rhCG の N 結合型糖鎖の解析に応用した。

糖鎖の切り出しを完全に行うため、rhCG を還元カルボキシメチル化した後、PNGaseF を作用させた。切り出した糖鎖は、NaBH<sub>4</sub> を用いて還元した。Fig. 4A 及び B は、ポジティブ及びネガティブイオンモードにおけるフル MS<sup>1</sup> スキャンによって得られた rhCG (6 μg) の糖鎖プロファイルである。各ピークの糖鎖構造は、MS<sup>1</sup> によって測定された分子量及び MS<sup>2</sup> によって検出されたプロダクトイオンから推定した。その結果、Fig. 4 中に示すように、rhCG の主な糖鎖の構造はシアル酸が結合した混成型及び複合型 2 本鎖で、一部 3 本鎖糖鎖が含まれることが確認された。このように改良型糖鎖プロファイリング法は、糖タンパク質糖鎖の分布と個々の糖鎖の構造の確認に利用できることが示された。

### 3.3 PA 化標準糖鎖を用いた糖鎖プロファイリング

PA 化法は長谷らによって開発された糖鎖誘導体法で、PA 化法と 2(3)種類の HPLC を組み合わせた糖鎖解析法は、2(3)次元糖鎖マッピングとしてよく知られている<sup>6,7)</sup>。PA 化された糖鎖が標準物質として入手可能であることや、解析のためのプロトコールが整備されていることから、PA 化と HPLC の組み合わせは、国内で最も利用されている糖鎖構造解析法・試験法の一つとなっている。PA 化は汎用性が高い糖鎖誘導体法であることから、つぎに、PA 化糖鎖の LC/MS<sup>n</sup> を検討した。

Fig. 5 は、LC/MS<sup>1</sup> によって得られた PA 化標準糖鎖 (Figs. 1E, F, 及び G, 各 5 pmol) のベースピーククロマトグラムである。各ピークの糖鎖の構造は、分子量とデータ依存的に測定した MS<sup>2</sup> スペクトルから帰属した。Fig. 6 に一例としてピーク 3



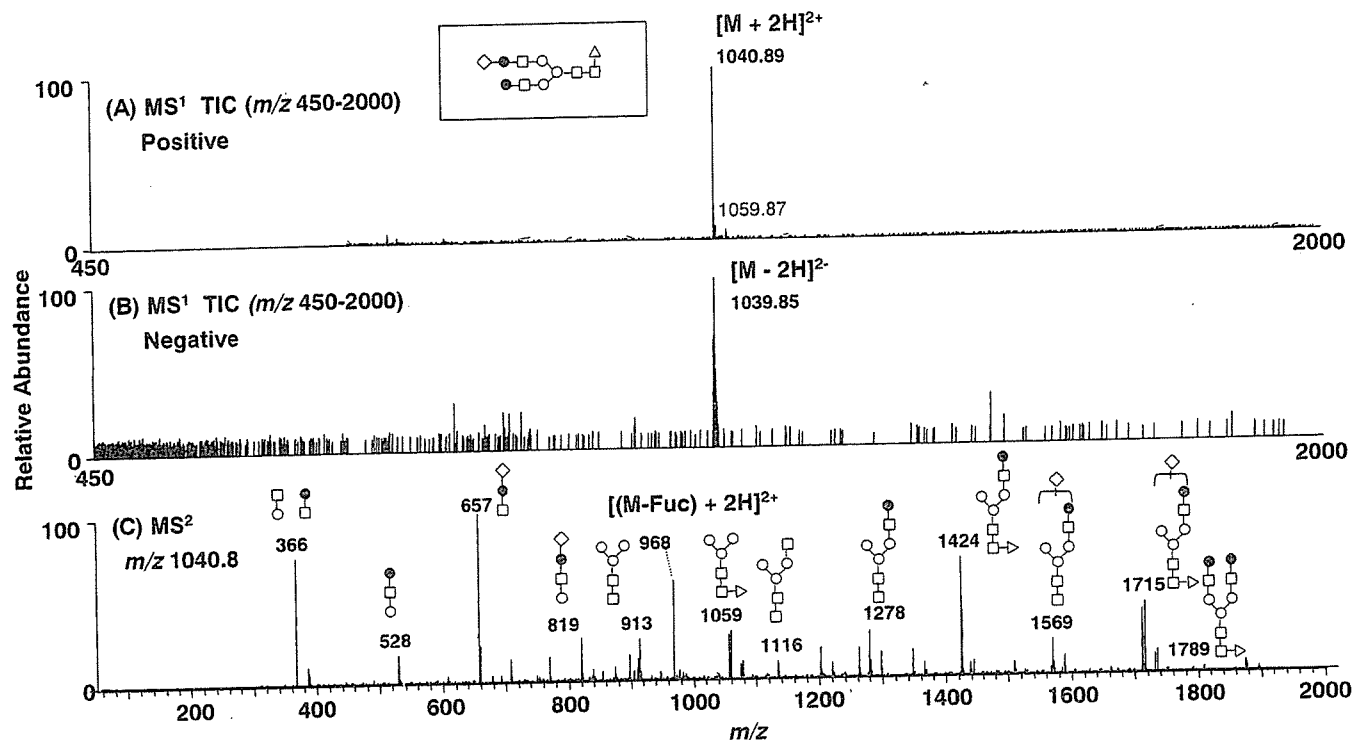


Fig. 3 Fig. 2 中のピーク 2 の代表的マススペクトル (A) フル MS<sup>1</sup>, ポジティブイオンモード (B) フル MS<sup>1</sup>, ネガティブイオンモード (C) MS<sup>2</sup>, 前駆イオン:  $m/z$  1040.8, ポジティブイオンモード

の MS<sup>2</sup> スペクトルを示す。還元化糖鎖と同様に、B イオンシリーズ及び Y イオンシリーズが検出され、糖鎖の配列に関する情報が得られていることが確認された。このように、PA 化糖鎖の LC/MS<sup>n</sup> は、NaBH<sub>4</sub> 還元化糖鎖と同様な構造情報が得られることから、糖タンパク質の糖鎖解析及び確認に適していることが示唆された。

### 3.4 糖鎖改変タンパク質の糖鎖プロファイリングへの応用

LC/MS<sup>n</sup> を、今後バイオ医薬品として開発される可能性が高い糖鎖改変型タンパク質の糖鎖試験に適用することを目的として、糖鎖改変遺伝子組換え型ヒトフォリスタチンの糖鎖プロファイリングを行った。フォリスタチンは、細胞の分化・増殖を促す因子であるアクチビンと複合体を形成することによって、アクチビンの受容体への結合を阻害し、アクチビンの様々な作用、すなわち、赤芽球系細胞の分化誘導、神経細胞生存維持、及び生殖細胞の分化誘導作用等を中和する糖タンパク質である<sup>8)</sup>。先に我々は、フォリスタチンの Asn95 及び Asn259 に

N 結合型糖鎖が部分的に結合していること、及びそれらの糖鎖構造を明らかにしている<sup>9)</sup>。本研究では、N 結合型糖鎖のトリマンノシルコアのマンノースに bisecting と呼ばれる GlcNAc を  $\beta$ 1-4 結合させる GnT-III の遺伝子を導入した CHO 細胞でフォリスタチンを発現させ、PA 標識と LC/MS<sup>n</sup> を用いた糖鎖プロファイリングが、糖鎖構造の変化を明らかにすることができるかを調べた。

Fig. 7 は PA 化した糖鎖改変フォリスタチン由来糖鎖の LC/MS<sup>1</sup> によって得られたベースピーククロマトグラムである。MS<sup>1</sup> によって得られた分子量及び MS<sup>2</sup> によって得られた糖鎖配列情報から、糖鎖改変フォリスタチンの主な糖鎖構造は、Fig. 7 に示すように推定された。主なピークの糖鎖構造は、先に我々が報告した CHO 細胞由来組換え非改変型フォリスタチンの糖鎖の構造に一致していたが、改変型フォリスタチンには非改変型フォリスタチンには認められなかった糖鎖 (ピーク a) が認められた。ピーク a は、分子量からモノガラクトシル 2 本鎖糖鎖に GlcNAc が 1 分子付加した糖鎖と推定され

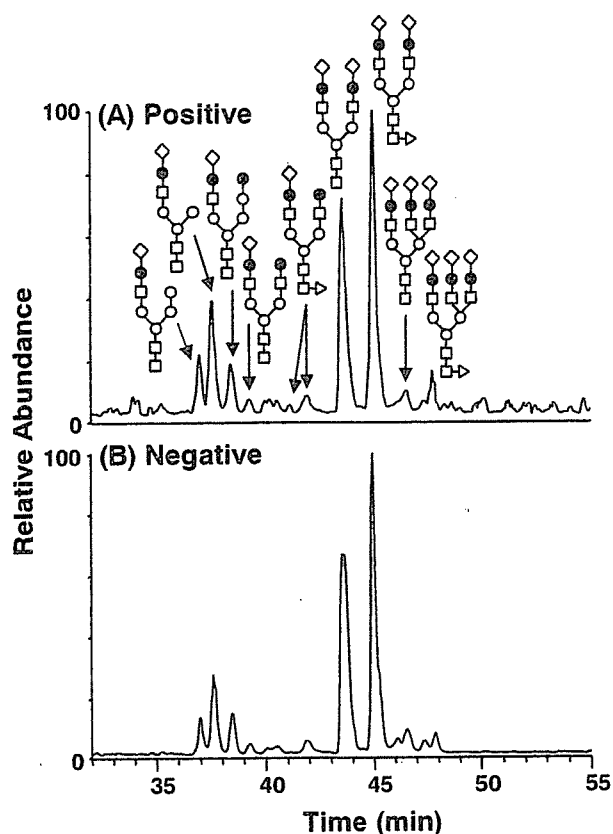


Fig. 4 rhCG由来還元化N結合型糖鎖のLC/MS<sup>n</sup>によって得られたトータルイオンクロマトグラム  
(A) ポジティブイオンモード (B) ネガティブイオンモード

たが、分子量からは、3本鎖糖鎖か、bisecting GlcNAcが結合した2本鎖糖鎖であるかを決定できなかった。そこで、MS<sup>2,3</sup>スペクトルを精査したところ、MS<sup>3</sup>スペクトルの  $m/z$  869.3及び1015.3にbisecting GlcNAcに特徴的なプロダクトイオンが検出されていることが確認された (Fig. 8)。これらのイオンから、この糖鎖は、GnT-III遺伝子導入によって出現したbisecting GlcNAcが結合した2本鎖糖鎖であることが明らかになった。このように、LC/MS<sup>n</sup>を用いた糖鎖プロファイリングは、糖鎖の僅かな変化を明らかにできること、また、配列が異なる異性体を識別できることから、糖鎖改変型タンパク質の糖鎖確認に応用可能であることが示された。

#### 4. 考察

糖鎖部分の恒常性を確保するため、多くの糖タンパク質性医薬品の品質試験において、遊離糖鎖のプロファイリングが設定されている。これまでは、2-アミノピリジンや2-アミノベンザミドによる糖鎖の標識とHPLCの組み合わせや、HPAEC-PADが糖鎖プロファイリングに利用されてきた。これらの方法は定量性には優れているが、溶出位置が接近している糖鎖を識別できないなどの問題があることから、定性的にもすぐれた試験法の開発が望まれている。

我々は、豊富な構造情報が得られるLC/MSを取り入れた独自の糖鎖プロファイリング法を開発し、エリスロポエチン<sup>2)</sup>、肝細胞増殖因子<sup>3)</sup>、甲状腺刺激ホルモン、トロンボモジュリン<sup>4)</sup>等の構造特性解析に応用してきた。この方法の試験法への応用を目的として、本研究ではまず、NaBH<sub>4</sub>で還元した標準的なN結合型糖鎖を用いて、精密分子量測定、ポジティブ及びネガティブイオンモードにおける連続MS<sup>n</sup>を取り入れた改良型糖鎖プロファイリング法を検討し、一度の分析で中性糖鎖及び酸性糖鎖を迅速・簡便に解析することに成功した。また、国内での汎用性が高く、様々な標準糖鎖が市販されているPA化糖鎖を使って糖鎖プロファイリングを行うことを検討し、還元化糖鎖と同様に構造解析できることを確認した。更に、LC/MS<sup>n</sup>を用いた糖鎖プロファイリング法は、代表的糖タンパク質のrhCGや、糖鎖改変によって僅かに変化した糖鎖のプロファイリングにも利用できることを確認した。

本研究を通してLC/MS<sup>n</sup>を用いた糖鎖プロファイリングは、LC上の溶出位置の違いだけでなく、分子量の違い、更には糖鎖配列の違いから糖鎖を識別できることが確認された。以上のことから、LC/MS<sup>n</sup>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糖鎖試験法として応用可能であることが示唆された。また、本分析法は、糖鎖の識別だけでなく、構造解析にも有用であることから、新規糖タンパク質性医薬品の特性解析・品質評価、糖鎖改変タンパク質の糖鎖解析、製造方法変更時における同等性/同質性評価、並びにバイオ後発医薬品の評価等にも応用できると思われる。

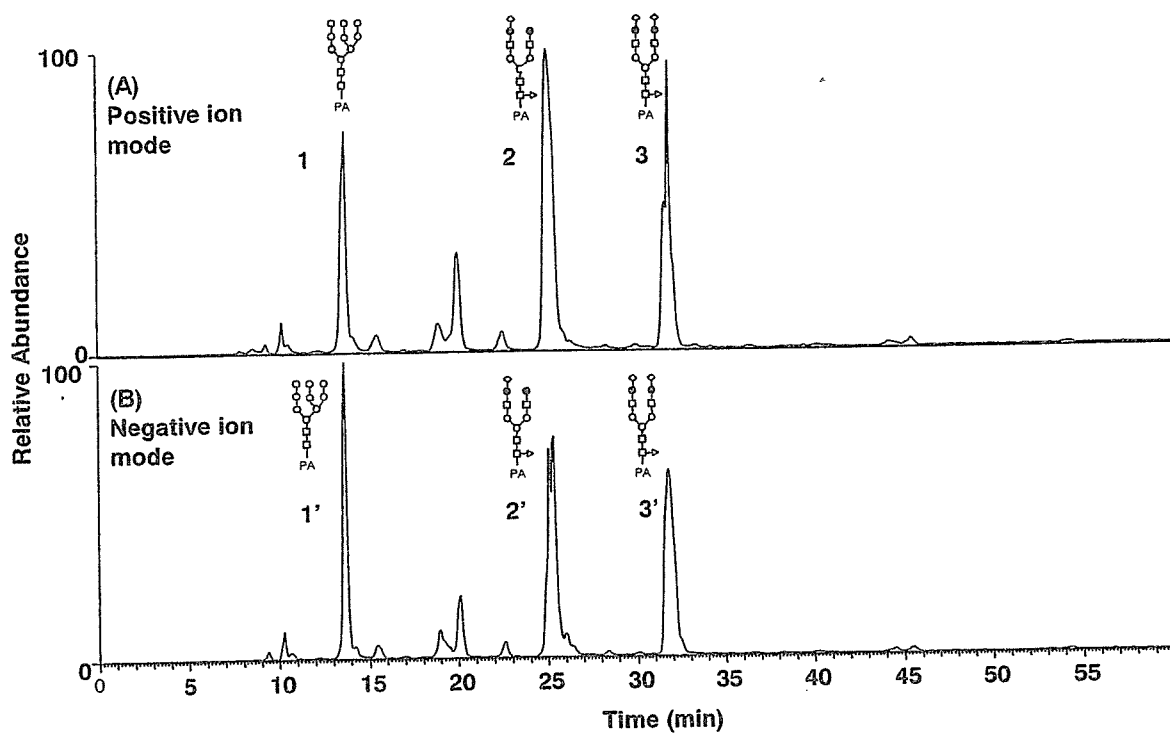


Fig. 5 標準 PA 糖鎖 (Fig. 1E-G) の LC/MS<sup>1</sup> によって得られたベースピーククロマトグラムと主なピークの糖鎖構造  
(A) ポジティブイオンモード (B) ネガティブイオンモード

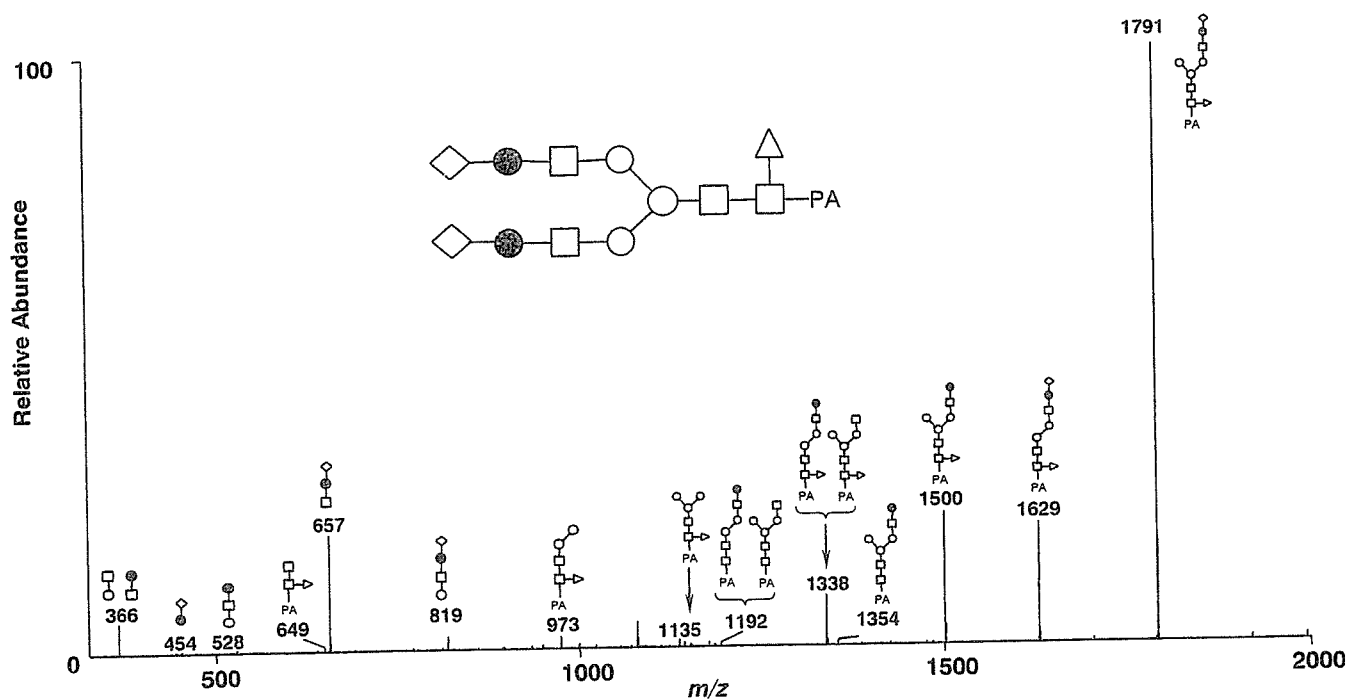


Fig. 6 Fig. 5 中のピーク 3 の代表的 MS<sup>2</sup> スペクトル  
前駆イオン:  $m/z$  1225, ポジティブイオンモード