

図1 糖タンパク質性医薬品に見られるN結合型糖鎖及びO結合型糖鎖の構造

2. 糖タンパク質性医薬品の構造特性解析

糖タンパク質は不均一性が高く、構造が複雑であるので、1つの分析法ですべての糖鎖関連構造情報を得ることは難しい。したがって、構造特性解析は、糖鎖部分を加水分解して行う単糖組成分析、糖鎖部分を切り出して行う遊離糖鎖の構造解析、糖タンパク質を糖ペプチドに断片化して行う部位特異的糖鎖構造解析、および糖タンパク質のままで行うグライコフォーム解析の4つの段階に分けて行うのが一般的である。

2.1 単糖組成分析

糖鎖の特徴や結合の割合などがわかる。例えば、Manの割合が高ければ高マンノース型糖鎖の、またN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)が検出されればO結合型糖鎖の結合が示唆される。近年、質量分析法(MS)やタンデム質量分析法(MS/MS)を用いて糖鎖構造を推定することが増えているが、MSは単糖を識別できないので、予め単糖組成分析を行っておくことは有用である。

中性糖およびアミノ糖を測定する場合は、糖タンパク質を2M TFAおよび2M 塩酸中100℃で

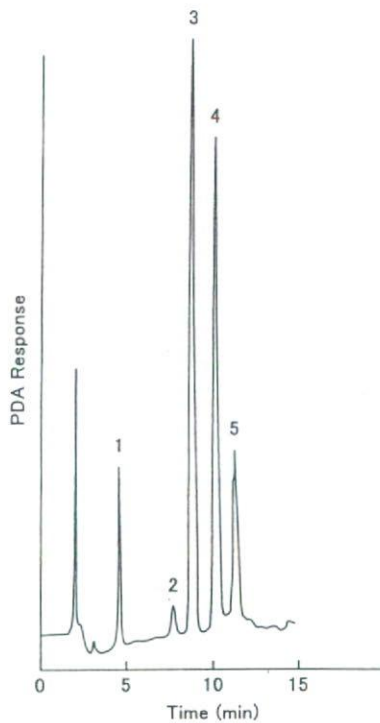


図2 HPAEC-PADを用いたエリスロポエチンの中性糖およびアミノ糖の組成分析

カラム : CarboPac PA1 (4×250 mm, ダイオネクス)
 検出 : PAD (DX-300, ダイオネクス)
 溶離液 : 15 mM NaOH
 単糖 : 1, Fuc ; 2, ガラクトサミン ; 3, グルコサミン ; 4, Gal ; 5, Man

6時間程度加熱して単糖とし、陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーパルスドアンペロメトリ検出法 (HPAEC-PAD) で定量する¹⁹⁾。図2はエリスロポエチンの単糖組成分析の例である。

シアル酸はカルボキシル基を有する酸性糖で、複数の分子種が存在する。主なシアル酸は *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) および *N*-グリコルノイラミン酸 (NeuGc) である (図3A)。NeuGcはヒトには存在しない糖鎖抗原であるが、製造過程で、異種血清や産生細胞から遺伝子組換え型ヒトタンパク質性医薬品に取り込まれることがある²⁰⁾⁻²²⁾。シアル酸は、糖タンパク質を2M酢酸で80℃3

時間加熱して遊離させ、HPAEC-PADを用いて²¹⁾、もしくは1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン (DMB) で標識した後、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) を用いて定量する²³⁾。図3BはLC/MSを用いてDMB標識NeuAcとNeuGcを分析した例である。

2.2 遊離糖鎖の分析

よく利用されている方法は、検体タンパク質から糖鎖を切り出し、HPLC、キャピラリー電気泳動またはスラブゲル電気泳動を行い、検体糖鎖の溶出位置や泳動位置を、標準糖鎖の溶出位置や泳動位置と照合させて構造を推定する方法である。また、各種エキソグリコシダーゼ消化を行い、溶出位置や泳動位置の変化、あるいはMSによって測定した質量の変化から、糖鎖構造を推定する方法も多く利用されている。

(1) 糖鎖の切り出し

*N*結合型糖鎖の切り出しには *N*-グリコシダーゼF (PNGase F) が最もよく用いられている。PNGase Fに抵抗性を示す糖タンパク質に対しては、還元アルキル化してから作用させると、界面活性剤等を添加しなくても糖鎖部分が遊離する。タンパク質はエタノール沈殿、または固相抽出法を利用して除去する。糖ペプチドから糖鎖を切り出す場合は、PNGase Fの他にグリコペプチダーゼAも利用される²⁴⁾。高マンノース型糖鎖を選択的に切り出す場合は、エンドグリコシダーゼHなどを利用する²⁵⁾。

糖タンパク質を無水ヒドラジン存在下100℃で約10時間加熱することによって *N*結合型糖鎖が遊離する²⁶⁾。ヒドラジン分解には専用の装置が市販されている。また、60℃で50時間加熱することによって、*O*結合型および *N*結合型糖鎖が遊離するという報告がある。ヒドラジンで切り出した糖鎖は脱アセチル化されているので、再アセチル化する²⁶⁾。

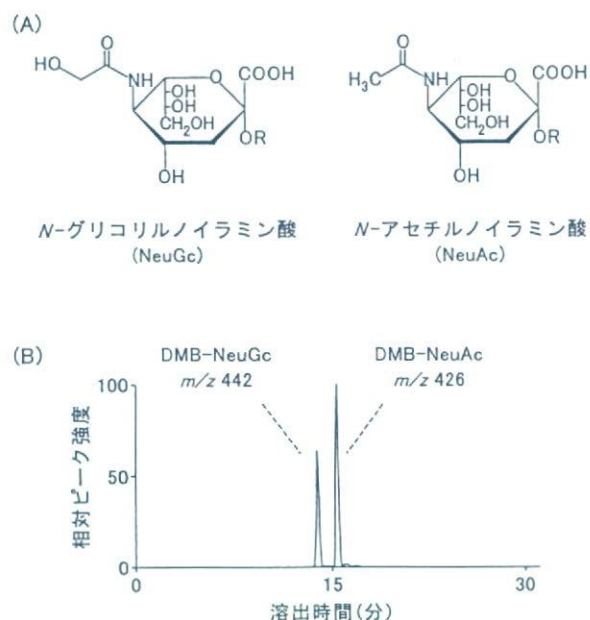


図3 シアル酸の構造 (A) と LC/MS を用いた標準シアル酸の分析 (B)

LC : カラム, MAGIC C18 (0.2×50 mm, 3 μm, マイクロームバイオリソーシーズ); 溶離液 A, 0.01% ギ酸/2% アセトニトリル; 溶離液 B, 0.01% ギ酸/90% アセトニトリル; グラジエント, 5-20% B (30 分)
MS : 装置, LTQ-FT (サーモエレクトロン); 測定モード, ポジティブ

ムチン型糖鎖の切り出しには *O*-グリカナナーゼが利用される。この酵素は、特異性が高く、切り出せる糖鎖構造は Gal β1-3GalNAc-Ser/Thr などに限られている。弱アルカリ条件下での還元的 β 脱離もよく利用されているが²⁷⁾、還元末端が還元されるので、誘導体化(後述)できないという欠点がある。

【実験例 1】hCG からの *N*結合型糖鎖の切り出し²⁸⁾

hCG (200 μg) 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 μL) に溶解し, 2-メルカプトエタノール 2 μL を加え, 室温で 2 時間放置する。モノヨード酢酸ナトリウム 5.7 mg を試料溶解溶液 45 μL に溶かして試料溶液に加え, 遮光下, 室温にて 2 時間放置する。PD-10 カラム (GE ヘルスケアバイオサイエンス)

を用いて過剰の試薬を除去し, 回収した溶液を凍結乾燥する。

還元カルボキシメチル化 hCG (100 μg) を 95 μL のリン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し, 5 単位の PNGase F (ロシュ・ダイアグノスティックス) と 37 °C で 18 時間反応させる。最終濃度が 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, 糖鎖を含む上清を減圧乾固する。

(2) HPLC

切り出した糖鎖を誘導体化せずに直接陰イオン交換カラムで分離し, 電気化学検出する HPAEC-PAD と, 誘導体化した後, 糖鎖を各種カラムで分離し, UV, 蛍光, または MS 等で検出する方法が用いられている。

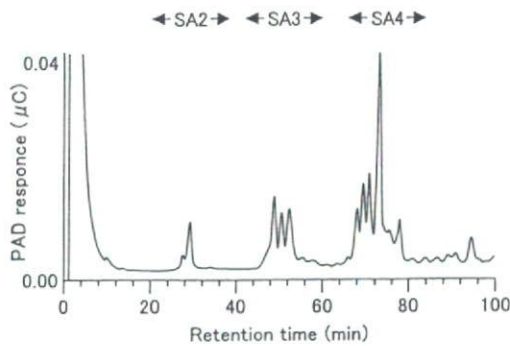


図4 エリスロポエチンのN結合型糖鎖のHPAEC-PAD

カラム : CarboPac PA1 (4×250 mm, ダイオネクス)
 検出 : PAD (DX-300, ダイオネクス)
 溶出条件 : 100 mM NaOHを含む酢酸ナトリウムのグラジエント
 糖鎖 : SA2, ジシアル糖鎖 ; SA3, トリシアル糖鎖 ; SA4, テトラシアル糖鎖

① HPAEC-PAD

糖がアルカリ性溶液中で陰イオン性を示すことを利用して陰イオン交換カラムで分離し、パルスドアンペロメトリ検出器を用いて検出する。ピコモルレベルの測定が可能である。糖鎖はシアル酸など酸性分子の結合数の違いで大きく分離し、さらに部分構造の違いでも細かく分離する^{29), 30)}。装置およびカラムはダイオネクス社から販売されている。図4はエリスロポエチンの糖鎖をHPAEC-PADを用いて分析した例である³¹⁾。シアル酸が2, 3, あるいは4分子結合した糖鎖がグループになって溶出されていることがわかる。糖鎖を誘導体化する必要がないので、誘導体化過程におけるシアル酸の遊離等の心配はないが、水酸化ナトリウムおよび酢酸ナトリウムを用いて溶出するので、MSと組み合わせる場合は素早く脱塩する必要がある。

② 2-アミノベンザミド(2-AB)標識と蛍光検出HPLC

遊離糖鎖を2-ABで誘導体化し、HPLCで分離した後、蛍光検出する³²⁾⁻³⁴⁾。標識用試薬やカラ

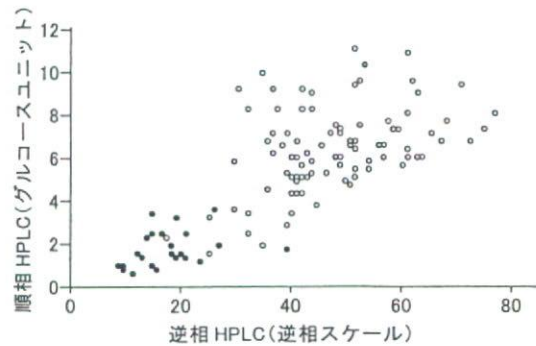


図5 PA化NおよびO結合型糖鎖の2次元糖鎖マップ
 文献37)より一部改変

○, N結合型糖鎖 ; ●, O結合型糖鎖

ムなどがProZyme (Glyko)から販売されており、欧米を中心に利用されている。陰イオン交換HPLCでシアル酸結合数の違いで分離した後、シアリダーゼでシアル酸を除去し、順相系カラムで分析する。検体糖鎖の溶出位置を標準糖鎖の溶出位置と照合して糖鎖構造を推定する。さらに、エキソグリコシダーゼ消化後の溶出位置の変化や、MSで測定した質量変化から、より詳細な構造を決定する³⁵⁾。

③ 2-アミノピリジン(2-AP)標識と蛍光検出HPLC

2-アミノピリジン(2-AP)で誘導体化し(ピリジリアミノ(PA)化として知られる), 蛍光検出する³⁶⁾⁻³⁸⁾。陰イオン交換HPLCでシアル酸結合数の違いで分離した後、シアル酸を遊離させて中性糖鎖とし、順相系アミドカラムを用いたHPLCと逆相系C18カラムを用いたHPLCを行う。検体糖鎖のアミドカラムおよびC18カラム(陰イオン交換カラムを加える場合もある)からの溶出時間を標準糖鎖の溶出時間と照合することによって糖鎖構造を推定する(図5)³⁷⁾。この方法は2(3)次元マッピングと呼ばれる³⁹⁾。インターネット上にも糖鎖構造解析のためのシステムが公開されている(<http://www.glycoanalysis.info/>)。PA化装置やPA化標準糖鎖がタカラバイオや生化学工業などから販売さ

れており、我が国で最も利用されている解析法の1つである。代表的な分析手順を以下に示す。

陰イオン交換 HPLC：カラムは TSK-GEL DEAE-5PW 等を使用する。流量は 1.0 mL/min とする。溶離液 A (トリエチルアミン水溶液 pH 9.5：アセトニトリル (9：1)) と溶離液 B (3% 酢酸トリエチルアミン緩衝液 pH 7.3：アセトニトリル (9：1)) を用いる。100% 溶離液 A で平衡化したカラムに試料を注入し、注入 7 分後から 30 分間で溶離液 B の割合を 20% とする。その後 20 分間で溶離液 B の割合を 100% とする。糖鎖は励起波長 310 nm、蛍光波長 380 nm で検出する。

逆相 HPLC：カラムは Cosmosil 5C-18P (4.6 × 150 mm) 等を使用する。流量は 1.5 mL/min に設定する。溶離液 A (100 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 pH 4.0) と溶離液 B (溶離液 A：1-ブタノール (1000：5)) を用いる。5% の溶離液 B を含む溶離液 A で平衡化したカラムに試料を注入後、55 分間で 100% 溶離液 B とする。測定波長は励起波長 320 nm、蛍光波長 400 nm とする。

サイズ分画 HPLC：カラムは Shodex Asahipak NH2P-50 2D (4.6 × 100 mm) 等を使用する。流量は 0.8 mL/min とする。溶離液 A (アセトニトリル：水：酢酸アンモニウム (930：70：3) pH 7.0) と溶離液 B (アセトニトリル：水：酢酸アンモニウム (200：800：3) pH 7.0) を用いる。溶離液 B 5% で平衡化したカラムに試料を注入後、溶離液 B ~ 15% (0~3 分)、~30% (3~20 分)、~40% (20~60 分)、~50% (60~65 分) および ~75% (65~70 分) で溶出する。

糖鎖の PA 化は、2 (3) 次元マッピングだけでなく、エキソグリコシダーゼ消化法や MS など、様々な分析法にも利用されている。

(3) キャピラリー電気泳動法

酸性蛍光物質 8-アミノナフタレン-1,3,6-トリスルホン酸 (ANTS) や 8-アミノピレン-1,3,6-トリスルホン酸 (APTS) などで還元末端を標識し

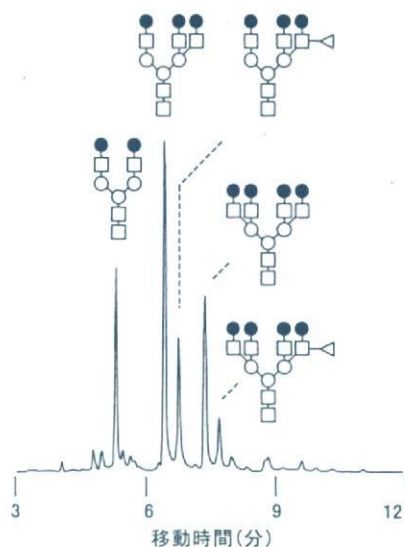


図6 α 1-酸性糖タンパク質から切り出した後、シアル酸を除去した N 結合型糖鎖のキャピラリー電気泳動

泳動：泳動用緩衝液、0.5% ポリエチレングリコール (PEG70000) を含む 100 mM トリス酢酸 (pH 7.4)；キャピラリー、eCAP N-CHO コート キャピラリー (内径 50 μ m × 30 cm)；印加電圧、10 kV；測定波長、520 nm (蛍光波長)、488 nm (励起波長)

単糖：●, Gal；○, Man；□, GlcNAc；△, Fuc

た糖鎖を内径 50 μ m 程度のフューズドシリカ管で分離し、レーザー励起蛍光検出器などを利用して検出する⁴⁰⁾。サンプル量は僅かでもよく、分析は短時間で終了する。図 6 は α 1 酸性糖タンパク質から切り出してシアル酸を除去した糖鎖を ANTS で標識して、キャピラリー電気泳動を行った例である。レクチンを作用させたときの移動度の変化から、構造を推定する方法なども報告されている⁴¹⁾。

(4) 蛍光体支援糖質電気泳動法 (FACE)

遊離糖鎖の還元末端を ANTS で標識し、ポリアクリルアミド電気泳動によって糖鎖を分離する⁴²⁾。中性オリゴ糖は分子サイズに基づいて移動するが、酸性オリゴ糖はシアル酸残基のカルボキシル基が

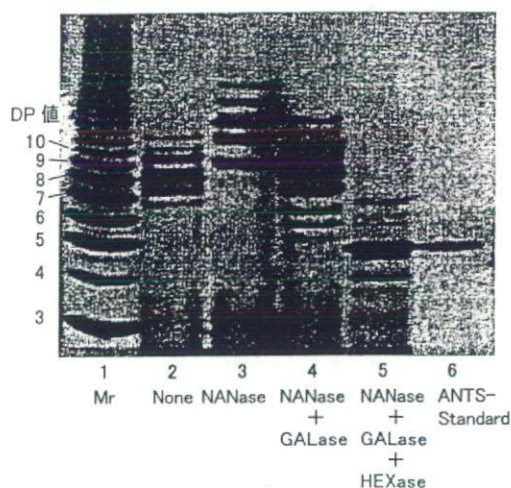


図7 エリスロポエチンのN結合型糖鎖のFACE

1. マーカー
2. エキソグリコシダーゼ未処理
3. シアリダーゼ処理
4. シアリダーゼ及びβ-ガラクトシダーゼ処理
5. シアリダーゼ、β-ガラクトシダーゼおよびβ-N-アセチルヘキソサミニダーゼ処理した ANTS 標識 エリスロポエチン N 結合型糖鎖
6. ANTS 標識 Man-(Man)Man-GlcNAc-(Fuc)GlcNAc

分子の負電荷を増大させるため移動度が大きくなる。移動度は分子サイズ指標である OLIGO ラダー標品のバンドに対する相対移動度で表す。各種エキソグリコシダーゼを作用させ、移動度の変化から糖鎖構造を推定する。図7はエリスロポエチンの糖鎖のFACE画像である⁴³⁾。装置および試薬はProZymeから販売されている。

(5) エキソグリコシダーゼ消化

エキソグリコシダーゼは、糖鎖の非還元末端から単糖を1つずつ切り離す酵素で、消化前後のHPLCにおける保持時間、電気泳動における泳動位置、あるいはMSによって測定された質量の変化から、結合している単糖の種類や結合位置および様式を決定することができる⁴⁴⁾。例えば、図7に示すエリスロポエチンの糖鎖の泳動位置は、シ

アリダーゼ、ガラクトシダーゼ、およびヘキソサミニダーゼ消化によって変化している。この結果から、側鎖にはシアル酸、Gal、GlcNAcが結合していることがわかる⁴³⁾。

(6) MS

糖鎖のイオン化法として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)およびエレクトロスプレーイオン化法(ESI)が用いられている⁴⁴⁾⁻⁴⁶⁾。分析計には飛行時間型(TOF)、四重極型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型分析計が利用されている。一段階目のMSで分子イオンが検出され、糖鎖の質量がわかる。続くMS/MSでは、グリコシド結合が開裂して、主に非還元末端側の糖を含むBイオンと、還元末端側の糖を含むYイオンが生じる(図8)⁴⁷⁾。これらのフラグメントから、糖鎖の配列が推定できる。MS/MSのフラグメントパターン(m/z 値とピーク強度)から結合位置や様式などを推定しようとする研究も盛んである。糖鎖を2-ABや2-APなどで誘導体化すると、誘導体化されていない糖鎖や還元された糖鎖(糖アルコール)に比べてイオン化効率が高まり、フェムトモルレベルの分析が可能になる。

糖鎖には異性体が多く存在するので、MSは、HPLC等で糖鎖を単離してから行うのが一般的である。単離してからオフラインでMALDI-TOFMS装置等を用いて分析する方法と、LCとESI-MS装置をオンラインで結んで分析する方法(LC/MS)がある。以下に糖鎖のLC/MS/MSの例を示す。

【実験例2】hCGのN結合型糖鎖のLC/MS/MS²⁸⁾

実験例1で調製したhCG(100μg)のN結合型糖鎖を100μLの水に溶解し、0.5M NaBH₄(100μL)を加えて室温で2時間放置する。希釈した酢酸を加えて反応を停止させ、固相抽出管ENVI-Carb C(シグマアルドリッチ)を用いて脱塩する。固相抽出管から5mMの酢酸アンモニウム/30%アセト

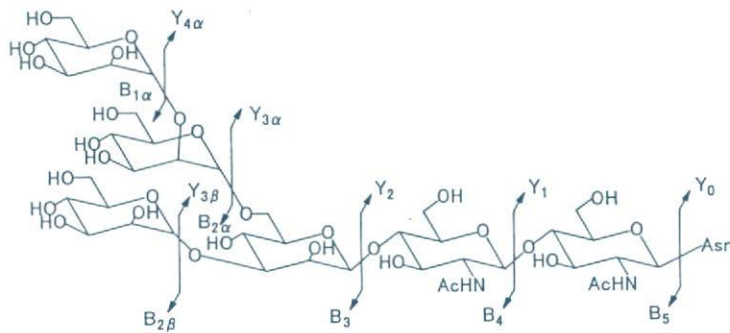


図8 ポジティブ測定MS/MSで見られる糖鎖の主な開裂

ニトリルで糖鎖を溶出させ、減圧乾固後、50 μ Lの水に溶解する。試料2 μ Lをグラフアイトカーボンカラムを用いたLC/MS/MS装置に注入し、ポジティブイオンモードでMSスキャン、およびデータ依存的MS/MSスキャンを行う。データ依存的MS/MSスキャンとは、MSの各スキャンで得られた最も強度の高いイオンを前駆イオンとしてMS/MSを行う方法である。ポジティブイオンモードは中性糖鎖およびシアル酸の少ない糖鎖、また、ネガティブイオンモードはシアル酸の多い糖鎖の分析に適している。

図9AはフルMSスキャン(ポジティブイオンモード)で得られたトータルイオンクロマトグラム(TIC)で、糖鎖のプロファイルを示している。各ピークの糖鎖構造は、MSによって測定された質量およびMS/MSスペクトルから推定した。糖鎖構造解析の一例として、図9Bに37分に溶出された糖鎖のMS/MSスペクトルと主なプロダクトイオンの帰属結果を示す。

(7) NMR

D₂O中で糖鎖の1次元NMRスペクトルを測定すると、3.5~3.9 ppmに糖骨格の複数のプロトンに由来する帰属困難なシグナルの固まりと、いくつかのよく分離したシグナルを観測することができる。後者はVliegthartらによって Structural

reporter groupと呼ばれ、構造既知の糖鎖と検体糖鎖の化学シフトおよび結合定数を照合させることによって、検体糖鎖の構造を決定することができる^{7), 48), 49)}。糖鎖解析でStructural reporter groupとして利用されているのは、アノメリックプロトン、ManのH2プロトン、GalNAcのH2, H3, H4およびH5プロトン、シアル酸のH3プロトン、FucのH5プロトンとメチルプロトン、並びにGalのH3およびH4プロトンなどである。

最近では、2次元NMRによって糖鎖のシグナルを完全に帰属し、構造を決定するのが主流である。よく用いられる方法は、隣り合う炭素原子に結合したプロトン間のクロスピークを観測するCOSY、カップリングネットワークに属するすべてのプロトン間のクロスピークを観測するHOHAHA、炭素とそれに結合しているプロトン間のカップリングを測定するHMQC、プロトン-炭素間のlong-rangeカップリングを測定するHMBC、並びに空間的に近接したプロトンのつながりを測定するNOESYなどである。

図10Aはエリスロポエチンの主糖鎖であるテトラシリアル4本鎖糖鎖の1次元NMRスペクトルである⁵⁰⁾。また、2次元NMRの一例として非還元末端の4つのGlcNAc分子(5, 5', 7, および7')のHOHAHAスペクトルを図10Bに示す。GlcNAc分子内の炭素に結合するプロトン間のク

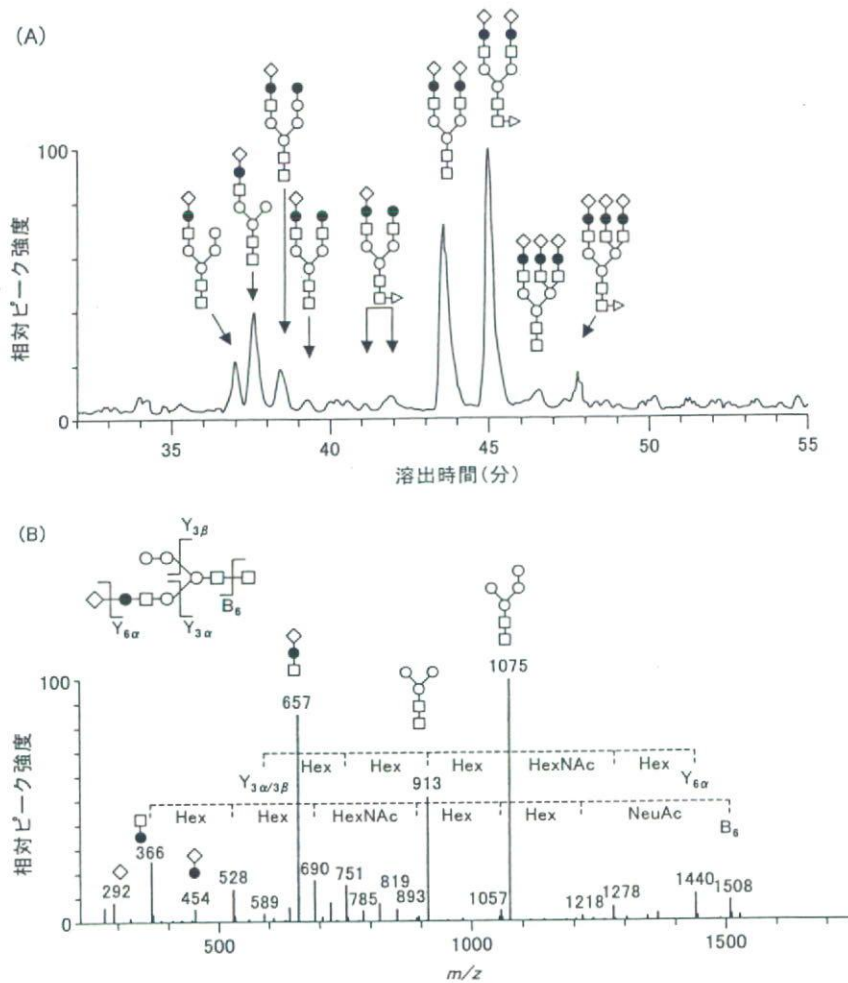


図9 hCGのN結合型糖鎖のLC/MS

(A) フルMSスキャンで得られたTIC(m/z 700-2000), (B) m/z 1731のMS/MSスペクトル

LC : カラム, Hypercarb(0.2×150 mm, 5 μ m, サーモエレクトロン); 溶離液A, 5 mM 酢酸アンモニウム(pH 9.6)/2% アセトニトリル; 溶離液B, 5 mM 酢酸アンモニウム(pH 9.6)/90% アセトニトリル; グラジエント, 5-40% B(0~60分)

MS : 装置, LTQ(サーモエレクトロン); 測定モード, ポジティブイオン

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

ロスピークが確認できる。

2.3 糖ペプチドの分析

複数の糖鎖結合部位が存在し、それぞれに異なる糖鎖が結合している場合や、特定の位置に

結合している糖鎖が活性等に影響を及ぼす場合など、結合部位ごとに糖鎖の不均一性を明らかにする必要があるときは、糖タンパク質を適切な消化酵素で糖ペプチドとしてから解析する。従来は、ペプチド部分の配列が共通である糖ペプチドを分取して糖鎖を切り出し、前項で述べた方法で糖鎖

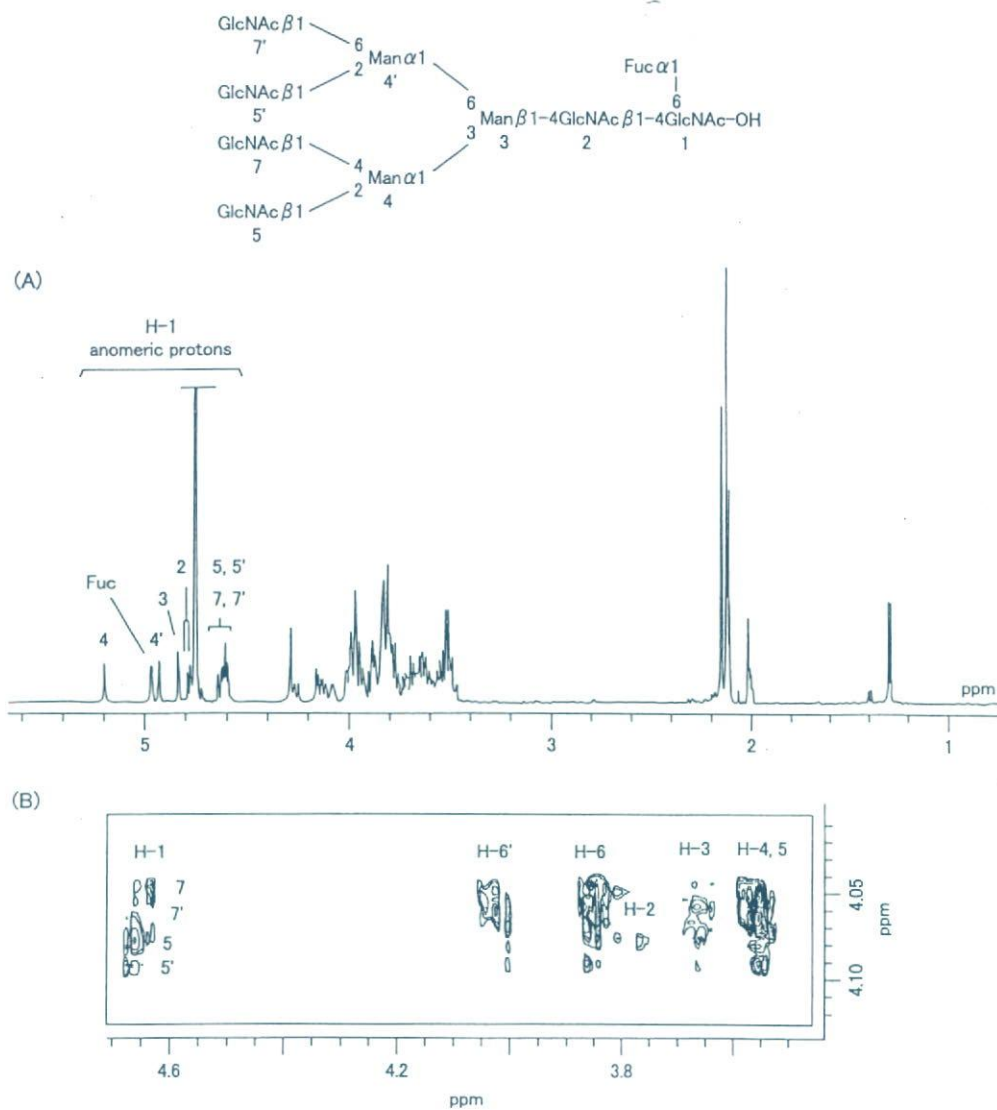


図 10 エリスロポエチンのテトラシアリル 4 本鎖糖鎖の NMR

(A) 1次元 NMR, (B) HOHAHA
装置: 600 MHz (日本電子)

構造解析を行うのが一般的であったが、最近では、糖ペプチドのマスマスペクトルから糖鎖の構造と結合比を推定するのが主流になってきている⁴⁶⁾。特に LC/MS を用いたペプチドマッピングは、ペプチドの分離と質量測定を同時にできる利便性と、一次構造、部位特異的糖鎖構造、および糖鎖以外

の翻訳後修飾に関する情報を一度に入手できる点から、医薬品構造特性解析に急速に取り入れられるようになってきた。

糖ペプチド内の N 結合型糖鎖の結合部位はアミノ酸配列から決めることができるが、ムチン型糖鎖は配列から決定することはできない。最近、

MS/MS を使って決定する方法が報告されているが⁵¹⁾、医薬品に実用化された例は少ない。現在のところ、従来通りアミノ酸シーケンサーを使って決定するのが一般的である。

(1) 消化酵素

消化酵素は、同一ペプチド内に2つ以上の糖鎖が含まれないように選択する。また、質量が大きい糖ペプチドはイオン化されにくいので、ペプチドの構成アミノ酸残基数が大きくなるように酵素を決める。質量が大きいペプチドには、2つ以上の消化酵素を組み合わせるのもよい。

(2) 糖ペプチドの分取

糖ペプチドはペプチドに比べてイオン化効率が低いので、ペプチドが混在すると良好なスペクトルが得られない場合が多い。したがって、糖ペプチドのMSを行う場合、予めペプチド混合物から糖ペプチドだけを分取しておく必要がある。糖鎖の特性を利用して糖ペプチドを回収する方法として、レクチン⁵²⁾、セファロース⁵³⁾、および順相系カラム等を用いる方法が報告されている。また、糖ペプチド濃縮用の固相抽出管が複数のメーカーから販売されている。アミノ酸配列の違いを利用して糖ペプチドを分取するには、C18などの逆相系HPLCを用いる。アミノ酸配列が同じでも、糖鎖構造が異なるとピークが分離することがある。C18カラムに保持されないような親水性が高い糖ペプチドは、吸着能の高いグラファイトカーボンカラムを用いるとよい。糖ペプチドの溶出位置はMSで確認するのが簡単であるが、糖鎖の微量検出法(例:TPTZ法⁵⁴⁾)を利用するのもよい。

(3) 糖ペプチドのMS

イオン化法として、MALDIおよびESIがよく用いられる。質量分析装置は、多段階タンデムMS(MSⁿ)が可能なイオントラップ型が適している。イオントラップ型装置を用いた場合、MSで糖ペ

プチドの分子イオンが検出される。続いてその分子イオンを前駆イオンとしてMS/MSを行うと、糖鎖部分の開裂が起き、BおよびYイオンが生じる。これらのフラグメントイオンから糖鎖構造が推定できる。MS/MSでは、糖鎖関連イオンの他にペプチドイオンやペプチドにGlcNAcが結合したイオンも検出される。これらのペプチド関連イオンを前駆イオンとしてMS/MS/MSを行うと、ペプチド骨格が開裂して、ペプチドに由来するbおよびyイオンが生じる(図11)⁵⁵⁾。これらのbおよびyイオンを、データベースに登録されているタンパク質から生じることが予想されるイオンと照合することによって、ペプチドの配列を推定することができる。タンパク質同定用の検索ソフトはMSメーカー等から販売されている。図12Aおよび12BはIgG1のトリプシン消化によって得られたあるN結合型糖鎖が結合したペプチドのMS/MSおよびMS/MS/MSスペクトルである⁵⁶⁾。MS/MSで糖鎖部分が、さらにMS/MS/MSでペプチド骨格が開裂して生じたイオンが検出されている。MS/MS/MSが困難な場合、糖ペプチドの質量から、糖鎖解析によって得られた糖鎖の質量を差し引いて得られたペプチドの質量を、cDNAから予想されるペプチドの質量と照合させてペプチドを特定する。同一ペプチド鎖を持つ糖ペプチドのピーク強度およびm/z値から、そのペプチドに結合している各糖鎖の結合比と単糖組成を推定する。さらに、糖ペプチドに由来するMS/MSスペクトルから糖鎖構造を推定する。

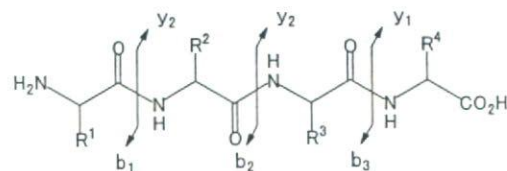


図11 MS/MSでみられるペプチドの主な開裂

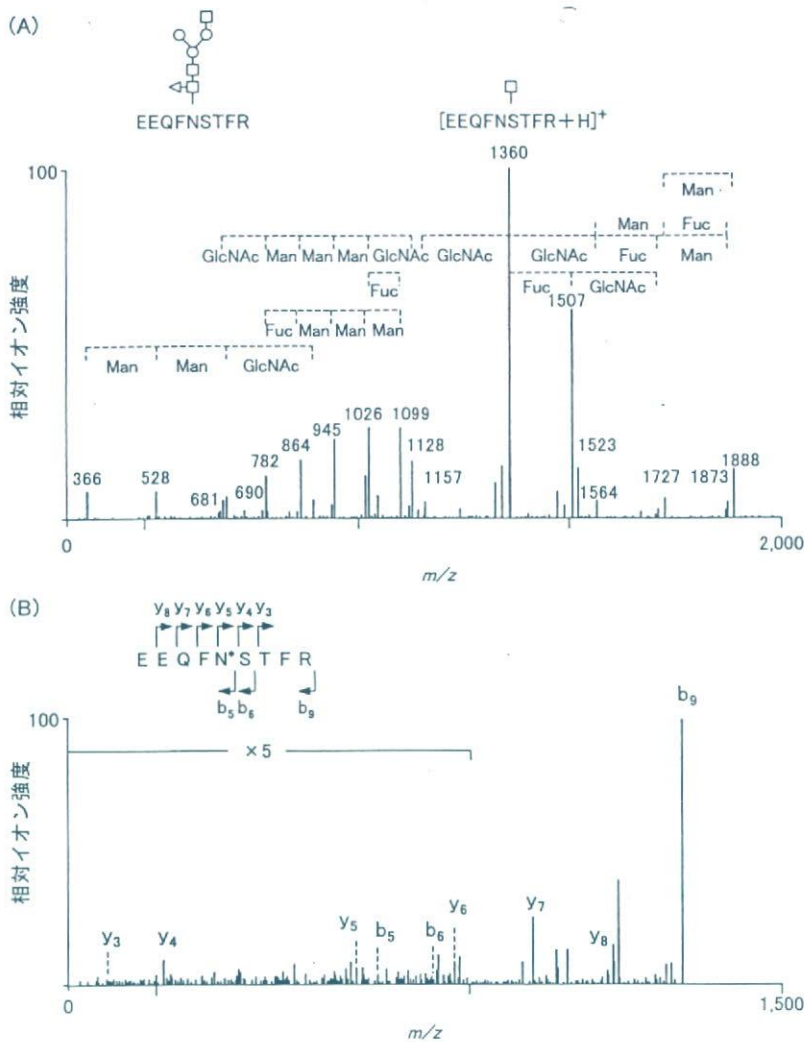


図 12 IgG1 由来糖ペプチドの MS/MS および MS/MS/MS

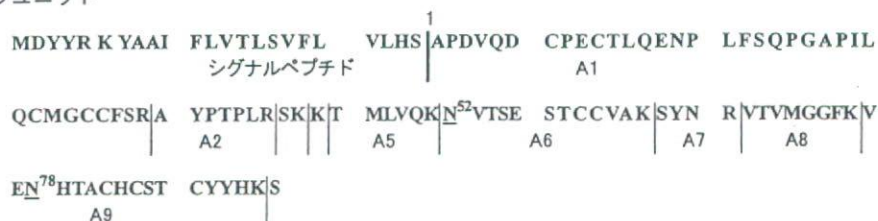
(A) IgG1 に由来する糖ペプチドの MS で検出された $(M+2H)^{2+}$ (m/z 1200) を前駆イオンとした MS/MS スペクトル, (B) m/z 1360 を前駆イオンとした MS/MS/MS スペクトル
MS: 装置, LTQ (サーモエレクトロン); 測定モード, ポジティブ

(4) LC/MS を用いたペプチドマッピング

前述したように, LC/MS を用いた糖タンパク質のペプチドマッピングでは, すべてのペプチドと糖ペプチドのマスペクトルが測定されるので, アミノ酸配列, 部位特異的糖鎖, 並びに糖鎖以外の翻訳後修飾に関する情報を得ることができる。

糖鎖に焦点を当てて解析する場合は, ペプチドマップ上の多数のピークの中から糖ペプチドのピークのみを選び出す必要がある。それにはプリカーサーイオンスキャン⁵⁷⁾, MS/MS⁵⁸⁾ またはインソースフラグメンテーション⁵⁹⁾ などを利用するとよい。プリカーサーイオンスキャンは,

αサブユニット



βサブユニット

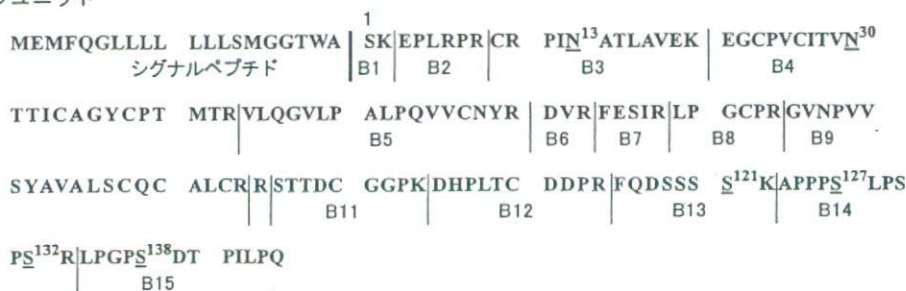


図 13 hCG の一次構造と糖鎖結合部位

A1~9 および B1~15, トリプシン消化によって得られるペプチド; 下線, 糖鎖結合部位

MS/MS において任意のプロダクトイオンを生じた前駆イオンを検出する方法で、糖ペプチドの場合は、糖鎖に特徴的な *N*-アセチルヘキソサミン (HexNAc⁺, *m/z* 204) やヘキソース (Hex)-HexNAc⁺ (*m/z* 366) を生じた前駆イオンをモニタリングすることによって溶出位置を特定する。インソースフラグメンテーションは、MS/MS が MS で検出された任意の分子イオンに気体等を衝突させて開裂させる方法であるのに対して、イオン化直後のイオンに気体等を衝突させて開裂させる方法である。どちらの方法でも、HexNAc⁺ や Hex-HexNAc⁺ が検出された時間から糖ペプチドの溶出時間を特定できる。溶出位置が特定できたら、糖ペプチドのマスおよび MS/MS スペクトルを選び出し、前項で述べた方法を用いてペプチドの同定および糖鎖構造解析を行う。

【実験例 3】 LC/MSⁿ を用いた hCG のペプチドマッピング²⁸⁾

hCG は αサブユニット、および βサブユニットのヘテロダイマーからなる糖タンパク質である。α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 (図 13)。β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, および 138 に *O* 結合型糖鎖が付加している。

実験例 1 で還元カルボキシメチル化した hCG (100 μg) を 100 mM トリス塩酸 (pH 8.0) 100 μL に溶かし、トリプシン (3 μg) を加えて、37 °C で 18 時間反応させて、*N* 結合型糖鎖が結合した 4 つの糖ペプチド (A6, A9, B3, および B4)、並びに *O* 結合型糖鎖が結合した 3 つの糖ペプチド (B13, B14, および B15) を含むペプチド混合物を得る。試料 1 μL を C18 カラムおよびギ酸/アセトニトリル系移動相を用いた LC/MS 装置に注入する。

図 14 に、イオントラップ型 MS 装置を用いて、

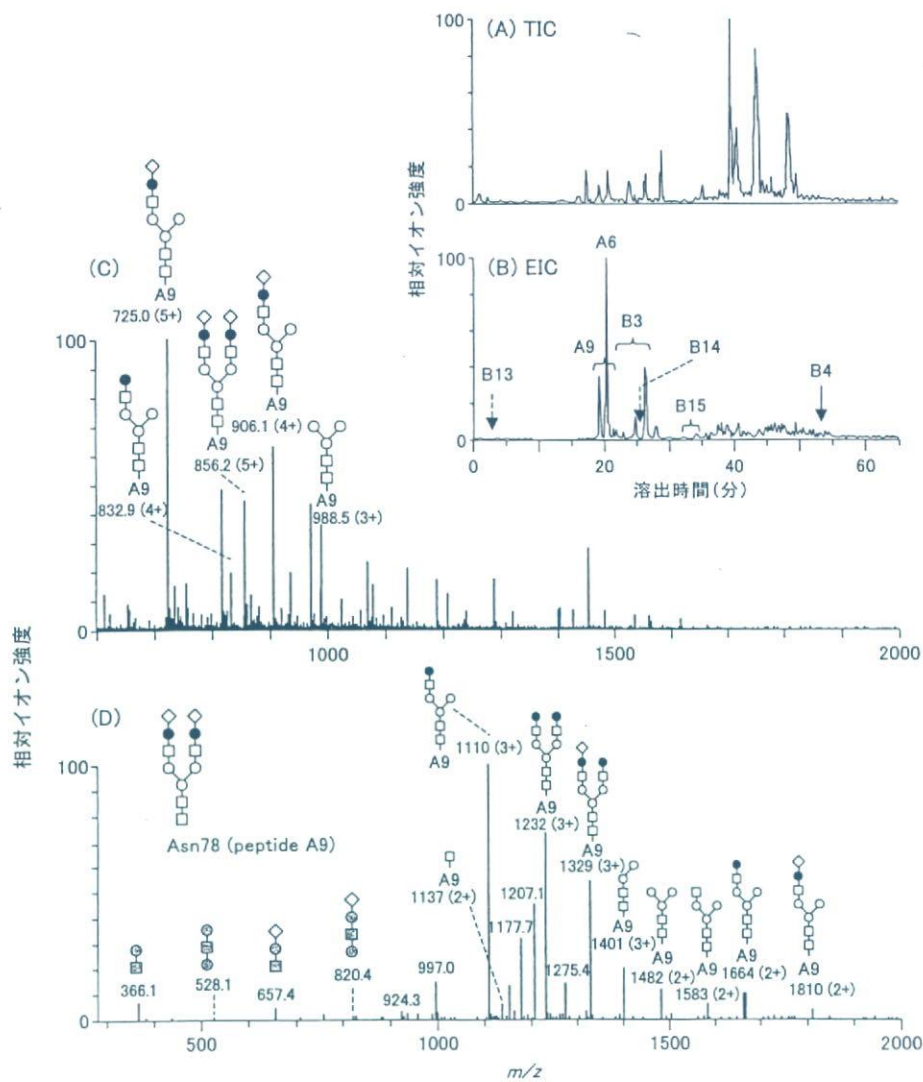


図 14 LC/MSⁿ を用いた hCG のペプチドマッピング

(A) フル MS スキャンによって得られた TIC, (B) インソースフラグメンテーションによって得られた m/z 204 のマスクロマトグラム, (C) ペプチド A9 のマススペクトル, (D) m/z 856 の MS/MS スペクトル
 LC: カラム, MAGIC C18 (0.2×50 mm, 3 μm); 溶離液 A, 0.01% ギ酸/2% アセトニトリル; 溶離液 B, 0.01% ギ酸/90% アセトニトリル; グラジエント, 5% (0~10分), 5-65% B (10~70分)
 MS: 装置, LTQ (サーモエレクトロン); スキャン方法, フル MS スキャン (m/z 700-2000), インソースフラグメンテーション (m/z 80-500), MS/MS (データ依存的); 測定モード, ポジティブ A6, 9 および B3, 4, 13, 14, 15, 糖ペプチド (図 13 参照)

ポジティブイオンモードのフル MS スキャン, インソースフラグメンテーション, およびデータ依存的 MS²⁻⁴ 測定を行った例を示す。図 14A はフ

ル MS スキャンで得られた TIC で, ほぼすべてのペプチドおよび糖ペプチドがピークとして表れている。図 14B は, インソースフラグメンテー

ションによって生じた HexNAc⁺ (*m/z* 204)のみを抜き出したマスクマトグラムで、ピークが出現した位置に糖ペプチドが溶出されている。これらピークのペプチド部分の配列は、タンパク質データベース検索エンジン TurboSEQUENT (サーモエレクトロン) を使って、MS^{2/4} データとタンパク質データベース NCBI nr に登録されているタンパク質を照合し、図 14B のように決定した (なお、B14 はペプチドの理論質量と糖鎖の質量から推定した)。部位特異的糖鎖の不均一性はマスマススペクトルから、また、個々の糖ペプチドの糖鎖構造は MS/MS スペクトルから推定した。一例として、図 14C に A9 が溶出されている位置のマスマススペクトル、また、図 14D に *m/z* 856 の糖ペプチドの MS/MS スペクトルおよび帰属結果を示す。

(5) エキソグリコシダーゼ消化

LC/MS にエキソグリコシダーゼ消化を組み合わせると、より多くの構造情報を得ることができる。以下にトリプシン消化物に各種エキソグリコシダーゼを作用させ、LC/MS で質量変化を確認しながら構造を決定する方法を示す。

【実験例 4】⁶⁰⁾

セルロプラスミン (100 μg) を還元カルボキシメチル化した後トリプシンで消化する。100 °C で 5 分間加熱してトリプシンを不活性化させた後に、各種エキソグリコシダーゼを 37 °C で 12 時間反応させる。反応生成物の質量を LC/MS 装置を用いて測定する。

図 15 は、セルロプラスミン 4 μg に α2-3 シアリダーゼ (20 mU/ml)、β1-4 ガラクトシダーゼ (30 mU/ml) および α1-3,4 フコシダーゼ (20 mU/ml) を単独または組み合わせて作用させたときの Asn119 を含むペプチドの質量の変化を示したスペクトルである。まず、図 15A のスペクトルから、Asn119 には 2 本鎖および 3 本鎖糖鎖が結合していることがわかる。α2-3 シアリダーゼを作

用させると、一部の 2 本鎖糖鎖と大部分の 3 本鎖糖鎖からシアル酸 1 分子が消失している (図 15B)。α2-3 シアリダーゼおよび β1-4 ガラクトシダーゼで消化すると、Fuc 非結合糖鎖の Gal は全て消失するが、Fuc 結合糖鎖の Gal は一部残ることがわかる (図 15C)。これに、α1-3,4 フコシダーゼを作用させると、すべての Gal および Fuc 残基は消失している (図 15D)。ガラクトシダーゼは隣接した単糖に Fuc が結合している Gal を消化できないことから、Gal β1-4 および、Fuc α1-3 結合の存在が示唆され、セルロプラスミンの Asn116 には、NeuAc α2-3Gal β1-4 (Fuc α1-3)GlcNAc-R (シアリルルイス x 構造) を持つ糖鎖が含まれることがわかる。

2.4 糖タンパク質の分析

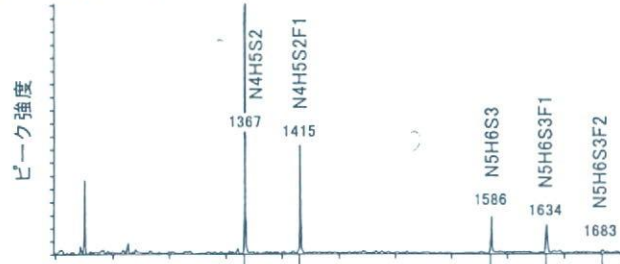
タンパク質への糖鎖付加の割合やグリコフォーム分布を調べる方法として、ゲル電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、および MS などが利用されている。これらの方法は、シアル酸結合数や質量の違いでグリコフォームを大まかに分離することができるが、詳細な構造の違いまでは識別できない。

(1) ゲル電気泳動法

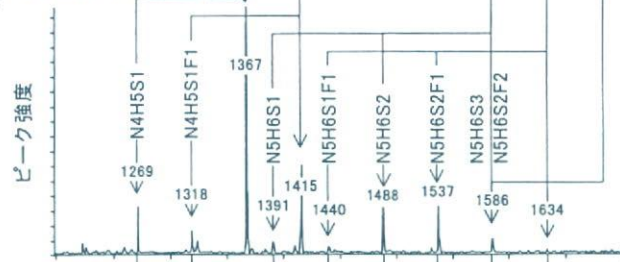
シアル酸残基、リン酸基あるいは硫酸基などの結合数によって生じる等電点の違いを利用してグリコフォームを分析するときには、等電点電気泳動法を用いる。また、糖鎖結合数の違いなどによる質量の差を分析する場合は SDS-PAGE が適している。1 次元目に等電点電気泳動法、および 2 次元目に SDS-PAGE を行う 2 次元電気泳動法は、複雑なグリコフォームの分離に優れ、今後、有用性が増すものと期待される。図 16 は、2 種類のエリスロポエチンを 2 次元電気泳動法で展開したもので、2 種類のエリスロポエチンのグリコフォーム分布が異なっていることがわかる。

Asn119 glycopeptides

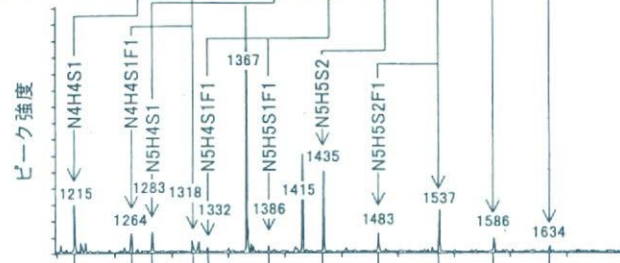
(A) エキシグリコシダーゼ (-)



(B) α 2-3ノイラミニダーゼ



(C) α 2-3ノイラミニダーゼ + β 1-4ガラクトシダーゼ



(D) α 2-3ノイラミニダーゼ + β 1-4ガラクトシダーゼ + α 1-3,4フコシダーゼ

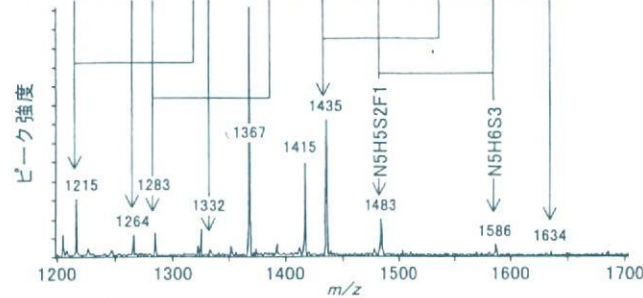


図 15 セルロプラスミンのトリプシン消化によって得られた Asn119 を含む糖ペプチドのマススペクトル(A)とエキソグリコシダーゼによる変化(B~D)

LC : カラム, MAGIC C18 (0.2×50 mm, 5 μ m); 溶離液 A, 0.01% ギ酸/2% アセトニトリル; 溶離液 B, 0.01% ギ酸/90% アセトニトリル; グラジエント, 5% B(0~10分), 5-65% B(10~90分)

MS : 装置, Qstar Pulser i(アプライドバイオシステムス); スキャン方法, フル MS スキャン(m/z 700-2000), 測定モード, ポジティブ

単糖 : N, HexNAc; H, Hex; S, NeuAc; F, Fuc

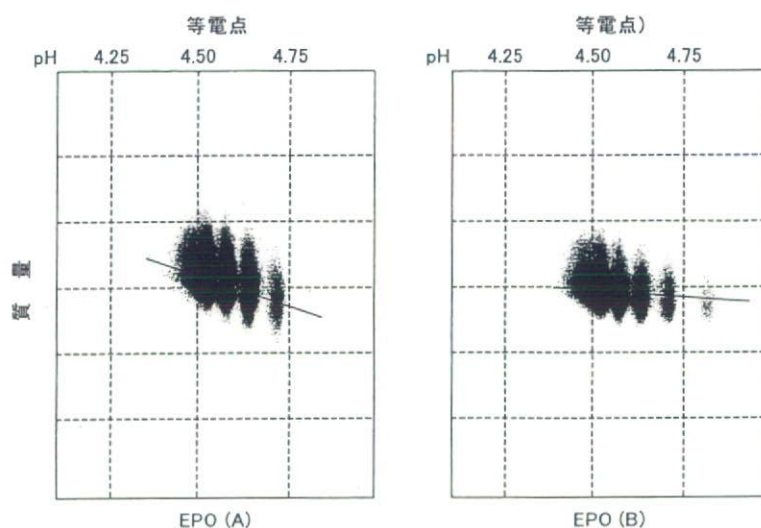


図 16 2種類のエリスロポエチンの2次元電気泳動

試料 : 2種類のエリスロポエチンを Cy3, または Cy5 で標識し, 等量で混同した。
 1次元目 : IPG ストリップ (24 cm, pH 4-7)
 2次元目 : 7.5% ポリアクリルアミドゲル (25.5×20 cm, 1 mm)
 (標識試薬, IPG ストリップおよび泳動装置は GE ヘルスケアバイオサイエンス)

(2) キャピラリー電気泳動法

等電点電気泳動法同様, シアル酸結合数によって生じる等電点の違いを識別する方法として利用されている。エリスロポエチンのように, シアル酸結合数が活性に大きく影響する医薬品の分析に有用である。図 17 はエリスロポエチンのグリコフォーム分布を分析した例である⁶¹⁾。等電点電気泳動法では検出できなかったマイナーなグリコフォームも検出されている。

(3) 質量分析法

ESI-MS 装置を用いて糖タンパク質を直接分析すると, 162Da (Hex), 203Da (HexNAc), 291Da (NeuAc) 等違いのピークが得られ, ピーク強度比からグリコフォームの存在比を概算できる。しかし, 糖鎖の不均一性が高い場合や, プロセッシング等他の翻訳後修飾を受けている場合など存在する分子種が多いときはスペクトルが複雑になる。

3. 糖鎖の規格および試験法

日本薬局方第 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, およびペプチドマッピングが参考情報として記載されたが, 糖タンパク質の糖鎖に関する試験法は記載されていない。糖鎖に関しては, 国際的にも定まった試験法がないのが現状である。現在のところ, 開発メーカーごとに, 糖鎖特性解析結果に基づいて, 糖鎖の恒常性を担保する規格および試験法が設定されている。糖鎖試験の目的は, 製造ロットの品質が, 臨床・非臨床試験で使用されたロットと同じ品質であることを確認するものであるから, 定量性および再現性の高い分析法を選択する必要がある⁴⁾。

糖鎖試験法としてよく利用されている方法は, HPLC による遊離糖鎖のプロファイリングである。

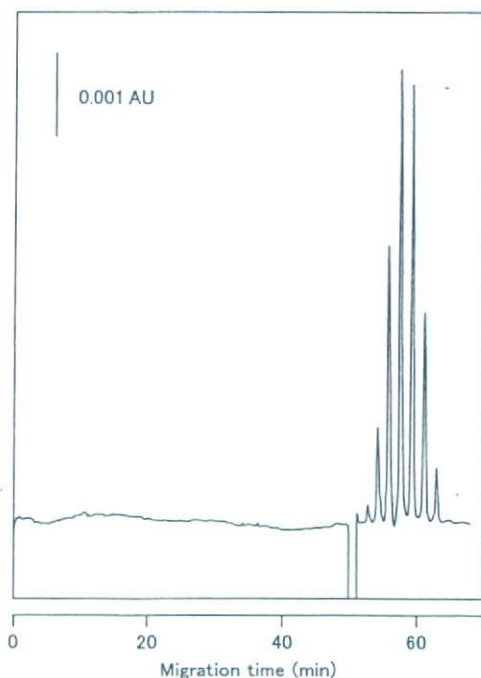


図 17 エリスロポエチンのキャピラリー電気泳動

フューズドシリカキャピラリー：内径 50 μm \times 107 cm
 泳動用緩衝液：0.01 M NaCl, 0.01 M 酢酸アンモニウム, 1,4-ジアミノブタン, 7 M ウレアを含む 0.01 M トリシン緩衝液 (pH 5.5)
 検出：UV (214 nm)

標識を必要とせず、シアル酸結合数および側鎖の構造の違いで糖鎖を分離できる HPAEC-PAD は、シアル酸結合数が生物活性に影響を与える医薬品の試験に適している。2-AB 誘導体化と HPLC、あるいは PA 化と HPLC を組み合わせた方法は、シアル酸以外の構造が活性に影響する糖タンパク質の試験法として有用性が高い。いずれも標準物質および検体から切り出した糖鎖の保持時間やピーク面積等(糖鎖プロファイル)が類似することが判定基準となる。遊離糖鎖のキャピラリー電気泳動や FACE も、標準物質および検体から切り出した糖鎖の移動度とピーク面積あるいはバンドの濃度を比較することによって、品質の恒常性を保

証できる方法である。LC/MS を用いたペプチドマッピングは、一次構造確認法としてだけでなく、今後、糖鎖結合部位や糖鎖結合数を改変した糖タンパク質性医薬品などの部位特異的糖鎖不均一性確認法としても役立つと思われる。等電点電気泳動法やキャピラリー電気泳動法などを用いたグリコフォーム分析は、シアル酸が活性等に影響を及ぼす糖タンパク質性医薬品のグリコフォーム試験法として有用である。活性と糖鎖の関係が明らかであれば、糖鎖試験やグリコフォーム試験が *in vivo* 活性試験に代わるものとして利用できる可能性がある。

現在、従来のウシ血清を使った製造方法から無血清培地を用いた製造方法への変更など、糖タンパク質性医薬品の製造方法の変更が行われている。また、糖タンパク質性医薬品の特許切れを目前に、後続バイオ製品の開発が進んでいる。このような製造方法や製造細胞等の変更は、アミノ酸配列が同じでも糖鎖付加に変化をもたらすため、生物活性等に影響を及ぼす可能性がある⁴⁾。その一方で、糖鎖構造を積極的に改変することによって、より活性の高い医薬品を生み出そうとする研究も盛んである。複雑な糖鎖に対応した構造解析技術の開発と、糖鎖の機能に基づいた糖鎖試験法の整備は、今後一層重要になるだろう。

謝 辞

本稿で紹介した実験例は、厚生労働科学研究費補助金並びに創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業における成果の一部です。

PA 糖鎖の分析方法および 2D 糖鎖マップをご供与下さいました前大阪大学大学院長谷純宏教授、キャピラリー電気泳動図をご提供下さいました近畿大学薬学部掛樋一晃教授、ならびに質量分析法に関するデータをご提供下さいました国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部伊藤さつき博士、原園景博士、橋井則貴博士にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 日本医薬品一般名称データベース. <http://moldb.nihs.go.jp/jan/>
- 2) INN のリスト <http://www.who.int/druginformation/general/innlists.shtml>
- 3) Varki A. : Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2):97-130, 1993.
- 4) 早川 堯夫 : バイオテクノロジーを応用した医薬品の特性解析, 品質及び安全性確保の評価科学. 国立医薬品食品衛生研究所報告 117:1-38, 1999.
- 5) Endo M., Hase S., Yamamoto K. and Takagaki K. : *Endoglycosidases*, Kodansya, Tokyo, 2006.
- 6) 高橋 禮子 : 糖蛋白質糖鎖研究法, 学会出版センター, 東京, 1989.
- 7) 鈴木康夫監訳 : コールドスプリングハーバー糖鎖生物学, 丸善, 東京, 2003.
- 8) Seydel W., Stang E., Roos N. and Krause J. : Endocytosis of the recombinant tissue plasminogen activator alteplase by hepatic endothelial cells. *Arzneimittelforschung*, 41(2):182-186, 1991.
- 9) 佐藤 光男, 山根 尚子, 勝弘 森, 設楽 研也 : 抗体医薬. 糖鎖科学の新展開, 谷口直之, 伊藤幸成編 : 344-352, エヌ・ティー・エス, 東京, 2005.
- 10) Higuchi M., Oh-eda M., Kuboniwa H., Tomonoh K., Shimonaka Y. and Ochi N. : Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 267:7703-7709, 1992.
- 11) Imai N., Higuchi M., Kawamura A., Tomonoh K., Oh-eda M., Fujiwara M., Shimonaka Y. and Ochi N. : Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin. *Eur. J. Biochem.*, 194:457-462, 1990.
- 12) Morimoto K., Tsuda E., Said A. A., Uchida E., Hatakeyama S., Ueda M. and Hayakawa T. : Biological and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietin fractionated by mono Q column chromatography and their modification with sialyltransferase. *Glycoconjugate J.*, 13:1013-1020, 1996.
- 13) Sasaki H., Bothner B., Dell A. and Fukuda M. : Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J. Biol. Chem.*, 262:12059-12076, 1987.
- 14) Takeuchi M., Inoue N., Strickland T. W., Kubota M., Wada M., Shimizu R., Hoshi S., Kozutsumi H., Takasaki S. and Kobata A. : Relationship between sugar chains structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7819-7822, 1989.
- 15) Takeuchi M., Takasaki S., Shimada M. and Kobata A. : Role of sugar chains in the *in vitro* biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 265:12127-12130, 1990.
- 16) Tsuda E., Kawanishi G., Ueda M., Masuda S. and Sasaki R. : The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Biochem.*, 188:405-411, 1990.
- 17) Buko A. M., Kentzer E. J., Petros A., Menon G., Zuiderweg E. R. and Sarin V. K. : Characterization of a posttranslational fucosylation in the growth factor domain of urinary plasminogen activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(9):3992-3996, 1991.
- 18) Itoh S., Kawasaki N., Ohta M. and Hayakawa T. : Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Application to recombinant human thrombomodulin. *J Chromatogr A*, 978(1-2):141-152, 2002.
- 19) Hardy M. R., Townsend R. R. and Lee, Y. C. : Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.*, 170(1):54-62, 1988.
- 20) Bardor M., Nguyen D. H., Diaz S. and Varki A. : Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J. Biol. Chem.*, 280(6):4228-4237, 2005.
- 21) Martin M. J., Muotri A., Gage F. and Varki A. : Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat. Med.*, 11(2):228-232, 2005.
- 22) Tangvoranuntakul P., Gagneux P., Diaz S., Bardor M., Varki N., Varki A. and Muchmore, E. : Human

- uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(21): 12045-12050, 2003.
- 23) Klein A., Diaz S., Ferreira I., Lamblin G., Roussel P. and Manzi A. E. : New sialic acids from biological sources identified by a comprehensive and sensitive approach : liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) of SIA quinoxalinones. *Glycobiology*, 7(3): 421-432, 1997.
- 24) 高橋禮子 : グリコペプチダーゼ, N-グリコナーゼ. 新生化学実験講座 3, 糖質 I 糖タンパク質上, 山科郁男編 : 129-137, 東京化学同人, 1990.
- 25) 高崎誠一 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ H. 新生化学実験講座 3, 糖質 I 糖タンパク質上, 山科郁男編 : 114-117, 東京化学同人, 1990.
- 26) 高崎誠一 : ヒドラジン分解と標識. 新生化学実験講座 3, 糖質 I 糖タンパク質上, 山科郁男編 : 95-98, 東京化学同人, 1990.
- 27) 天野純子 : β脱離と標識. 新生化学実験講座 3, 糖質 I 糖タンパク質上, 山科郁男編 : 98-100, 東京化学同人, 1990.
- 28) Kawasaki N., Itoh S. and Kawanishi T. : LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins. In: *Encyclopedia of Mass Spectrometry* : 923-930, Elsevier, 2006.
- 29) Lee Y. C. : High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. *Anal. Biochem.*, 189(2) : 151-162, 1990.
- 30) Rice K. G., Takahashi N., Namiki Y., Tran A. D., Lisi P. J. and Lee Y. C. : Quantitative mapping of the N-linked sialyloligosaccharides of recombinant erythropoietin : combination of direct high-performance anion-exchange chromatography and 2-aminopyridine derivatization. *Anal. Biochem.*, 206(2) : 278-287, 1992.
- 31) 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向須美子, 統 橋, 森本和滋, 早川堯夫 : 糖鎖含有タンパク質製剤の品質評価試験法に関する研究(II)-エリスロポエチン製剤 その 2. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 116 : 117-121, 1998.
- 32) Bigge J. C., Patel T. P., Bruce J. A., Goulding P. N., Charles S. M. and Parekh R. B. : Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal. Biochem.*, 230(2) : 229-238, 1995.
- 33) Guile G. R., Rudd P. M., Wing D. R., Prime S. B. and Dwek R. A. : A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal. Biochem.*, 240(2) : 210-226, 1996.
- 34) Townsend R. R., Lipniunas P. H., Bigge C., Ventom A. and Parekh R. : Multimode high-performance liquid chromatography of fluorescently labeled oligosaccharides from glycoproteins. *Anal. Biochem.*, 239(2) : 200-207, 1996.
- 35) Mattu T. S., Pleass R. J., Willis A. C., Kilian M., Wormald M. R., Lellouch A. C., Rudd P. M., Woof J. M. and Dwek R. A. : The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc alpha receptor interactions. *J. Biol. Chem.*, 273(4) : 2260-2272, 1998.
- 36) Hase S., Ikenaka T. and Matsushima Y. : Structure analyses of oligosaccharides by tagging of the reducing end sugars with a fluorescent compound. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85(1) : 257-263, 1978.
- 37) 長谷純宏 : 蛍光標識法による糖鎖の構造と機能の解析. 生産技術雑誌, 51 : 39-42, 1999.
- 38) Hase S., Natsuka S., Oku H. and Ikenaka T. : Identification method for twelve oligomannose-type sugar chains thought to be processing intermediates of glycoproteins. *Anal. Biochem.*, 167(2) : 321-326, 1987.
- 39) Tomiya N., Awaya J., Kurono M., Endo S., Arata Y. and Takahashi N. : Analyses of N-linked oligosaccharides using a two-dimensional mapping technique. *Anal. Biochem.*, 171(1) : 73-90, 1988.
- 40) 掛樋一晃, 木下充弘 : キャピラリー電気泳動による構造グライコミクスへのアプローチ. 糖鎖科学の新展開, 谷口直之, 伊藤幸成編 : 63-68, エヌ・ティー・エス, 東京, 2005.
- 41) Nakajima K., Kinoshita M., Matsushita N., Urashima T., Suzuki M., Suzuki A. and Kakehi K. : Capillary affinity electrophoresis using lectins for the analysis of milk oligosaccharide structure and its application to bovine colostrum oligosaccharides. *Anal. Biochem.*, 348(1) : 105-114, 2006.

- 42) Jackson P. : The analysis of fluorophore-labeled carbohydrates by polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol. Biotechnol.*, 5(2) : 101-123, 1996.
- 43) Morimoto K., Maeda N., Abdel-Alim A. A., Toyoshima S. and Hayakawa T. : Structural characterization of recombinant human erythropoietins by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Biol. Pharm. Bull.*, 22(1) : 5-10, 1999.
- 44) 天野純子, 山下克子 : エキソグリコンダーゼによる分離と修飾. 新生化学実験講座 3, 糖質1糖タンパク質上, 山科郁男編 : 312-340, 東京化学同人, 1990.
- 45) Dell A. and Morris H. R. : Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science*, 291(5512) : 2351-2356, 2001.
- 46) Zaia J. : Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev.*, 23(3) : 161-227, 2004.
- 47) Domon B. and Costello C. : A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.*, 5 : 397-409, 1988.
- 48) 神谷由紀子, 山口芳樹, 加藤晃一 : NMR を利用した糖鎖構造生物学. 糖鎖科学の新展開, 谷口直之, 伊藤幸成編 : 76-84, エヌ・ティー・エス, 東京, 2005.
- 49) Hard K. and Vliegthart J. F. G. : Nuclear magnetic resonance spectroscopy of glycoprotein-derived carbohydrates. *Glycobiology: A practical approach*, Ed. by Fukuda M. and Kobata A., Oxford University Press, New York, 1993.
- 50) Kawasaki N., Haishima Y., Ohta M., Itoh S., Hyuga M., Hyuga S. and Hayakawa T. : Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiology*, 11(12) : 1043-1049, 2001.
- 51) Hakansson K., Cooper H. J., Emmett M. R., Costello C. E., Marshall A. G. and Nilsson C. L. : Electron capture dissociation and infrared multiphoton dissociation MS/MS of an N-glycosylated tryptic peptide to yield complementary sequence information. *Anal. Chem.*, 73(18) : 4530-4536, 2001.
- 52) Kaji H., Saito H., Yamauchi Y., Shinkawa T., Taoka M., Hirabayashi J., Kasai K., Takahashi N. and Isobe T. : Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nat. Biotechnol.*, 21(6) : 667-672, 2003.
- 53) Wada Y., Tajiri M. and Yoshida, S. : Hydrophilic affinity isolation and MALDI multiple-stage tandem mass spectrometry of glycopeptides for glycoproteomics. *Anal. Chem.*, 76(22) : 6560-6565, 2004.
- 54) Suzuki N., Tsai I.-H., Kawasaki N., Chou C.-L. and Lee Y. C. : Colorimetric Determination of Subnanomol Carbohydrates Using Periodate and 2,4,6-Tris-2-Pyridyl-s-Triazine (TPTZ). *Carbohydr. Lett.*, 2 : 335-342, 1997.
- 55) Poepstorff P. and Fohlman J. : Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrometry*, 11 : 601, 1984.
- 56) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫 : 糖タンパク質の質量分析. 糖鎖科学の新展開, 谷口直之, 伊藤幸成編 : 69-75, エヌ・ティー・エス, 東京, 2005.
- 57) Huddleston M. J., Bean M. F. and Carr S. A. : 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.
- 58) Harazono A., Kawasaki N., Kawanishi T. and Hayakawa T. : Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI MS/MS. *Glycobiology* 15(5) : 447-462, 2005.
- 59) Sullivan B., Addona T. A. and Carr S. A. : Selective detection of glycopeptides on ion trap mass spectrometers. *Anal. Chem.*, 76(11) : 3112-3118, 2004.
- 60) Harazono A., Kawasaki N., Itoh S., Hashii N., Ishii-Watabe A., Kawanishi T. and Hayakawa T. : Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 348(2) : 259-268, 2006.
- 61) Kinoshita M., Murakami E., Oda Y., Funakubo T., Kawakami D., Kakehi K., Kawasaki N., Morimoto K. and Hayakawa T. : Comparative studies on the analysis of glycosylation heterogeneity of sialic acid-containing glycoproteins using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 866(2) : 261-271, 2000.

(川崎ナナ/早川堯夫)