

from the H-chain. On the basis of the calculated masses of the protonated molecules in the deconvoluted mass spectrum, the glycans attached to the peptide were predicted to be Man-5 and biantennary oligosaccharides (Fig. 4B). The structure of each glycan was deduced from the corresponding peak in the MS/MS spectra that were acquired using individual protonated molecules as precursors. The glycan distribution in IgG, which was determined by performing LC/MS/MS, was identical to that reported previously (20). Figure 4C shows the MS/MS spectrum obtained for agalactosyl biantennary oligosaccharides as a representative spectrum that was used for structural characterization.

### C. Glycan profiling

Profiling of the glycans released from glycoproteins is employed as an alternative method for analyzing the carbohydrate heterogeneity of glycoprotein-derived substances. This method provides additional information regarding the heterogeneity and structural details of these substances. It is useful for evaluating the consistency in the degree of glycosylation among product batches, for comparatively assessing products obtained by implementing changes in the manufacturing process, and for developing biosimilar or follow-on biological products. We demonstrate the applicability of LC/MS using monoclonal antibodies and the follicle-stimulating hormone (FSH) to glycan profiling.

#### 1) Monoclonal antibody

N-linked oligosaccharides released from the monoclonal antibody-based product described in the previous section were analyzed using an LC/MS system equipped with a graphitized carbon column (21-23). Figure 5 shows the glycan profile, as determined by performing a single MS scan for the glycans. It is difficult to distinguish the peptides attached to different glycan isomers by performing MS-based peptide mapping because glycopeptide isomers are coeluted. In contrast, LC permits separation of the liberated glycans on the basis of their subtle structural differences. Thus, LC/MS of glycans provides additional information regarding the carbohydrate heterogeneity of glycoproteins, including isomers. On the basis of the masses of the protonated molecules identified and the fragment peaks arising in the MS/MS spectra, the carbohydrate structures responsible for the peaks were predicted as shown in the image inset in Fig. 5. Table 1 shows the relative peak areas of the glycans, as were calculated by glycan profiling, using single MS scans of the released glycans (Fig. 5) and glycopeptides (Fig. 4B). These peak ratios were found to be almost identical, with the exception of Man-5, whose intensity determined

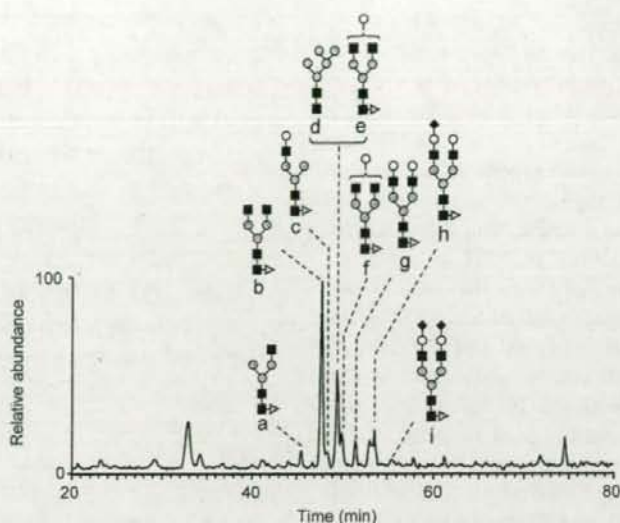
糖鎖糖鎖であることが示唆された (Fig. 4B)。検出された各糖ペプチドの糖鎖部分の構造は、各プロトン化分子を前駆イオンとした MS/MS より推定した。本分析により得られた糖鎖の分布は、既に報告されている IgG の糖鎖の分布とよく一致していた (20)。代表的スペクトルと構造帰属例として、アガラクチン 2 本鎖の MS/MS スペクトルを Fig. 4C に示す。

### C. 糖鎖プロファイリング

糖タンパク質性医薬品の糖鎖不均一性解析法としてよく利用されるもう一つの方法は、タンパク質から切り出した糖鎖のプロファイリングである。この方法は、糖鎖の不均一性や詳細構造に関する多くの情報が得られることから、ロット間の糖鎖の恒常性評価や、製造方法変更もしくはバイオ後続品開発における同等性・同質性評価法として有用である。糖鎖プロファイリングに LC/MS を用いた例として、モノクローナル抗体と卵巣刺激ホルモン (FSH) を分析した例を紹介する。

#### 1) モノクローナル抗体

前項の糖ペプチドマッピングで使用した市販のモノクローナル抗体製剤から、N 結合型糖鎖を切り出し、グラファイトカーボンカラムを接続した LC/MS システムを用いて分析した (21-23)。Fig. 5 は、シングル MS スキャンで得られた糖鎖プロファイルである。糖ペプチドの LC/MS では、糖鎖異性体が結合した糖ペプチドはほぼ同じ位置に溶出されるので、異性体同士を区別することは難しいが、遊離糖鎖の LC/MS では、糖鎖異性体は構造上のわずかな違いで分離されるので、異性体を含む多くの不均一性情報を得ることができる。Fig. 5 に見られる各ピークの糖鎖構造は、シングル MS で得られたプロトン化分子の質量と MS/MS で得られたフラグメントから図中の構造のように推定された。Table 1 は、糖ペプチドのシングル MS で得られたプロトン化分子のピーク面積比と (Fig. 4B)、糖鎖の LC/MS で得られた各糖鎖のピーク面積比 (Fig. 5) を比較した結果である。Man-5 が結合した糖ペプチドのピーク面積が高く観測されたことを除き、おおよそ一致していた。



**Fig. 5. N-linked oligosaccharide profile of the monoclonal antibody product.** LC, nanoFrontier nLC system (Hitachi High-Technologies); Column, Hypercarb (150×0.075 mm, 5 μm, Thermo Fisher Scientific); flow rate, 200 nl/min; A buffer, 5 mM ammonium acetate/2% acetonitrile (pH 9.6); B buffer, 5 mM ammonium acetate/80% acetonitrile (pH 9.6); gradient condition, 5–50% B (110 min); MS, LTQ-FT; electron voltage, 1.8 kV (positive ion mode).

**Table 1. Peak area ratios of N-linked oligosaccharides and glycopeptides of monoclonal antibody product**

Peak No.	Deduced structure	Peak area ratio <sup>a</sup>	
		Oligosaccharide	Glycopeptide
a		4.4	5.4
b		47.9	52.1
c		3.4	2.4
d		1.8	10.6
e		24.5	23.1
f		8.3	
g		6.4	3.3
h		1.8	—
i		1.6	—

<sup>a</sup> Peak area of each peak/total peak area.

by glycan profiling was higher than that determined by MS performed for the released glycopeptides.

## 2) FSH

FSH, a pituitary hormone, stimulates the growth of

## 2) FSH

下垂体ホルモンである FSH は、女性では、卵巣に作用して卵胞成長を促進させ、男性では、精巣セルトリ細胞に作用して精子形成を促す。ヒト FSH は 92 個のアミノ酸残基から

graafian follicles in the ovaries and enhances sperm development in the sertoli cells. Human FSH is composed of an  $\alpha$ -chain consisting of 92 amino acid residues and a  $\beta$ -chain consisting of 111 amino acid residues. The  $\alpha$ -chain of human FSH is similar to those of the human luteinizing hormone, human chorionic gonadotropin (hCG), and human thyrotropin. N-linked oligosaccharides are attached to 2 sites each on the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains, and these linkages are associated with the half-life of FSH in the blood (15,16). Follitropin Alfa and Follitropin Beta, whose amino acid sequences are identical to that of human FSH, are approved drugs in Japan; they are produced in CHO cells by using biotechnological techniques and consist of alfa and beta glycoforms, respectively. In Japan, Epoetins and Agalsidases are also distinguished in terms of the differences in their glycoform constituents. By performing glycan profiling, we compared Follitropin Alfa and Follitropin Beta with regard to the differences in glycosylation.

The desired proteins were isolated from additives in the products by performing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Further, glycan profiling was performed for N-linked oligosaccharides that were obtained in bands on the gel at the position corresponding to the molecular weight of FSH (Fig. 6) (9).

なる  $\alpha$  鎖 1 分子と 111 個のアミノ酸残基からなる  $\beta$  鎖 1 分子から構成されている。 $\alpha$  鎖は黄体形成ホルモン、ヒト絨毛性腺刺激ホルモン (hCG)、及び甲状腺刺激ホルモンに共通である。 $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖にそれぞれ 2 本の N 結合型糖鎖が結合しており、糖鎖は血中半減期に影響する(15,16)。日本では、ホリトロピン アルファ及びフォリトロピン ベータが承認されている。これらは CHO 細胞で産生された糖タンパク質で、それぞれアルファグリコフォーム及びベータグリコフォームからなる。このように糖鎖の違いによって異なる医薬品として区別されている医薬品は、国内では他にエポエチンとアガルシダーゼがある。我々は、糖鎖プロファイリングによって、ホリトロピン アルファとフォリトロピン ベータの糖鎖の違いを調べた。

SDS-PAGE によって製剤中の賦形剤から目的タンパク質を分離し、FSH の分子量に相当するバンドから N 結合型糖鎖を切り出して糖鎖プロファイリングを行った (Fig. 6) (9)。ホリトロピン アルファ及びフォリトロピン ベータに結合している糖鎖は、主に 2 本鎖糖鎖 (±シアル酸) で、結合している糖鎖の種類にはあまり大きな違いは見られなかった。糖鎖の違いでこの 2 つの品目を区別するためには、定量的解析を行う必要があるだろう。今後、バイオ後続品開発における糖鎖の同等性・同質性の評価に、このような簡単な精製と

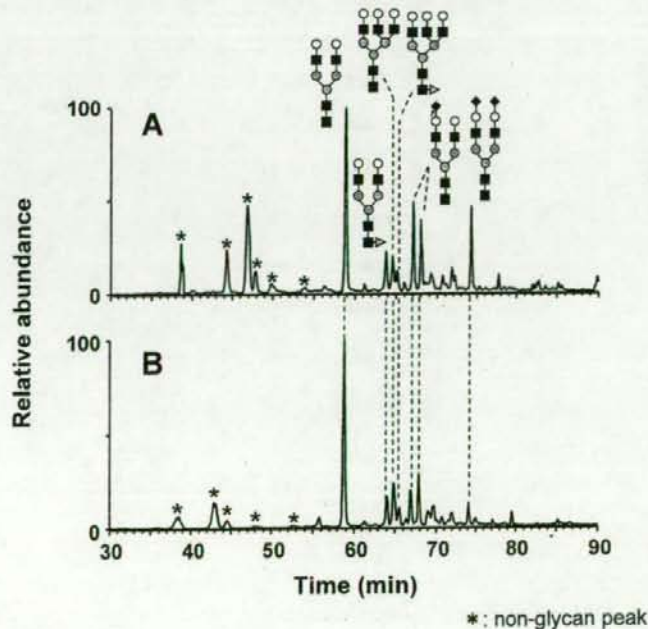


Fig. 6. N-linked oligosaccharide profiles of Follitropin Alfa (A) and Beta (B). Analytical condition: see Fig. 5.

Most of the glycans identified in both Follitropin Alfa and Follitropin Beta were biantennary oligosaccharides (containing or lacking sialic acid), and only a slightly significant difference was noted between the 2 drugs with regard to the variety in their glycan content. Quantitative analyses would be required to distinguish these drugs in terms of the degree of glycosylation. The simple isolation procedure described above, along with microanalysis, may facilitate comparative assessments of glycoproteins for the development of biosimilar or follow-on biological products.

#### D. Relative quantification of glycans

Although stable isotope-labeled compounds are generally used for quantification by MS, it is difficult to obtain isotope-labeled forms of all types of glycans due to the wide diversity of glycans. However, isotope-labeled oligosaccharides prepared from glycoprotein standards could be used for relative quantification during glycan characterization. We have previously developed a method for quantitative glycan profiling that involves the use of deuterium-labeled 2-amino pyridine, which is one of the common reagents used for glycan derivatization (24). Recently, other research groups have reported alternative methods involving deuterium labeling (25–27).

The strategy adopted for quantitative glycan profil-

微量分析が役立つかもしれない。

#### D. 糖鎖の比較定量

MSによる定量解析には通常、安定同位体標識物質が用いられるが、糖鎖は種類が多いので、すべての同位体標識糖鎖をそろえるのは困難である。しかし、糖タンパク質医薬品の糖鎖試験では、その医薬品標準物質から切り出した糖鎖を同位体で標識して比較定量に用いてもよいと考えられる。我々は、糖鎖標識化試薬として国内で最も汎用性の高い2-アミノピリジンの重水素置換体を用いた比較定量法を開発している(24)。最近、他の研究グループからも別の重水素置換法が報告されている(25–27)。

Fig. 7に、2-アミノピリジン重水素置換体を用いた糖鎖比較定量法の概略を示す。試料から切り出した糖鎖は重水素

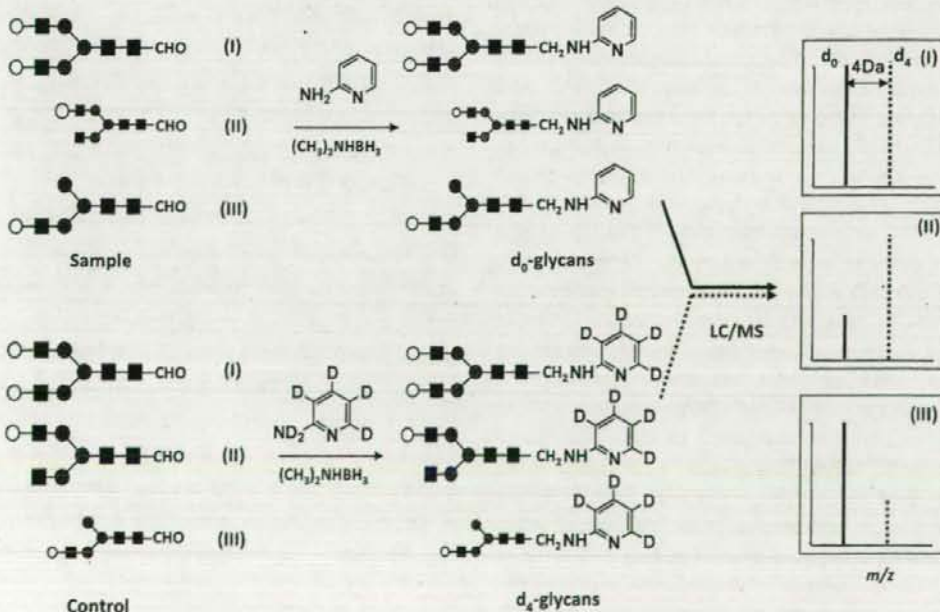


Fig. 7. The quantitative glycan profiling by using the stable isotope tagging method and LC/MS. (I) sample = control, (II) sample < control, (III) sample > control.

ing using deuterium-labeled 2-amino pyridine is illustrated in Fig. 7. Non-deuterium-labeled PA glycans ( $d_0$ -PA glycans) are derived from oligosaccharides that are released from a sample glycoprotein by tagging the oligosaccharides with non-deuterium-labeled 2-amino pyridine. Oligosaccharides derived from a glycoprotein standard are treated with deuterium-labeled 2-amino pyridine to produce tetra-deuterium-labeled glycans ( $d_4$ -PA glycans). A mixture of  $d_0$ - and  $d_4$ -PA glycans prepared from equal amounts of glycoproteins is subjected to LC/MS, and the glycans are detected as paired ions that differ by 4 Da. Although the  $d_0$ - and  $d_4$ -PA glycans are eluted at slightly different time points, the molecular ratios of individual glycans released from the sample and standard glycoproteins are calculated from the peak-area ratios of the protonated  $d_0$ - and  $d_4$ -glycans. This method was applied for the differential analysis of N-linked oligosaccharides obtained from human-derived hCG and recombinant hCG.

### 1) hCG

HCG is a glycoprotein hormone composed of an  $\alpha$ -chain, which is identical to that of FSH, and a  $\beta$ -chain consisting of 145 amino acid residues (28,29). HCG derived from the urine of healthy pregnant women is marketed in Japan, and choriogonadotropin alfa, which possesses the same amino acid sequence as hCG but different glycoforms than those of human origin, has been approved in the United States. N-linked oligosaccharides of human origin and those obtained from a recombinant protein were derivatized to  $d_0$ - and  $d_4$ -glycans and subjected to relative quantification (24). Both types of hCGs were predominantly attached to sialylated biantennary oligosaccharides, but they differed significantly with regard to some of their glycan constituents. The mass chromatogram obtained for one of the glycans—a monosialylated biantennary oligosaccharide—is shown in Fig. 8A. Three predominant isomers were found in the chromatogram. Figure 8B, C, and D shows the mass spectra obtained for peaks I, II, and III, respectively. Protonated molecules of both the  $d_0$ - and  $d_4$ -glycans were found in the mass spectra of peaks II and III, and their peak-area ratios suggested that these glycans were linked to the human-derived hCG to a greater extent than they were to the recombinant hCG. In contrast, only  $d_0$ -PA glycans were found in the mass spectrum of peak I; this suggested that this isomer was attached only to recombinant hCG. It is difficult to detect such isomeric differences by performing MS alone or even LC/MS for glycopeptides. Quantitative glycan profiling could be used in tests for characterizing the glycans in glycoprotein-based substances.

未置換 2-アミノピリジンで標識し、ビリジルアミノ化糖鎖未置換体 ( $d_0$ -PA 糖鎖) とする。一方、標準糖タンパク質から切り出した糖鎖は、重水素置換 2-アミノピリジンで標識してビリジルアミノ化糖鎖 4 重水素置換体 ( $d_4$ -PA 糖鎖) とする。等量のタンパク質から調製した  $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖を混合し、LC/MS を用いて糖鎖プロファイリングを行うと、 $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖は質量 4 Da 異なる一対のプロトン化分子として検出される。 $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖の保持時間は僅かにずれるが、 $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖のプロトン化分子のピーク面積比から、サンプルと標準タンパク質間の個々の糖鎖の量比を求めることができる。以下に、この方法をヒト由来 hCG と遺伝子組換え hCG の N 結合型糖鎖の差異解析に応用した例を示す。

### 1) hCG

hCG は、FSH と同一のアミノ酸配列を持つ  $\alpha$  鎖と 145 個のアミノ酸残基からなる  $\beta$  鎖 1 分子から構成される糖タンパク質である (28,29)。国内では健康な妊婦尿から抽出された hCG が販売されている。また、米国では、CHO 細胞で産生され、アミノ酸配列が hCG と同一で、糖鎖部分がヒト由来 hCG とは異なる choriogonadotropin alfa が承認されている。我々は、ヒト由来 hCG 及び遺伝子組換え hCG から切り出した N 結合型糖鎖をそれぞれ  $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖として、比較定量を行った (24)。いずれの hCG においても主な N 結合型糖鎖はシアル酸が結合した 2 本鎖糖鎖であったが、一部の糖鎖に有意な違いが認められた。その中の一つであるモノシアリル 2 本鎖糖鎖のマスキングマトグラムを Fig. 8A に示す。主に 3 種類の異性体が存在することがわかった。ピーク I~III のマススペクトルをそれぞれ Fig. 8B~D に示す。ピーク II 及び III のマススペクトルには  $d_0$ -及び  $d_4$ -PA 糖鎖のプロトン化分子が確認され、ピーク面積比から、この糖鎖は組換え型よりもヒト由来 hCG に多いことが確認された。これに対してピーク I のマススペクトルには  $d_0$ -PA 糖鎖しか観測されなかったことから、この糖鎖異性体は、遺伝子組換え hCG にしか結合していないことが明らかになった。このような異性体間の差異は、MS 単独による糖鎖解析、もしくは糖ペプチドの LC/MS では見つけることが難しく、今回の結果は、糖タンパク質医薬品の糖鎖試験における定量的糖鎖プロファイリングの糖鎖試験法としての可能性を示唆するものといえよう。

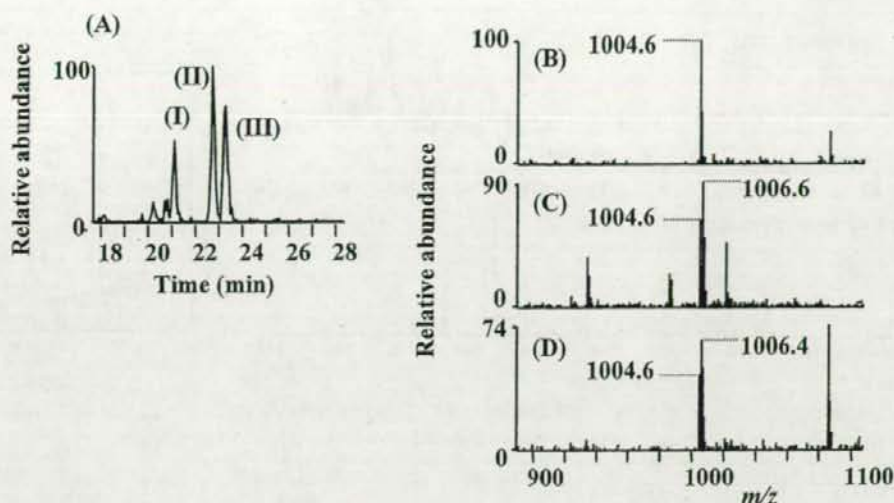


Fig. 8. (A) (24) Mass chromatogram of  $d_0$ - and  $d_4$ -PA monosialylated complex type biantennary. (B)-(D) Mass spectra of peaks (I)-(III), respectively. Intensity of the most intense ion at each scan is taken as 100%. LC, Magic 2002 HPLC system (Michrom BioResources); column, Hypercarb (150×0.2 mm, 5  $\mu$ m); flow rate, 2  $\mu$ l/min; A buffer, 5 mM ammonium acetate/2% acetonitrile (pH 8.5); B buffer, 5 mM ammonium acetate/80% acetonitrile (pH 8.5); gradient condition, 5–20% B (20 min), 20–70% B (15 min), 70–95% B (5 min); MS, TSQ7000 (Thermo Fisher Scientific); electrospray voltage, 1.5 kV (negative ion mode).

## E. Application to glycomics

Glycomics is the study of a set of glycans in cells and tissues. Investigations to identify disease-associated glycans may lead to the development of more efficient diagnostic techniques and drugs, and such investigations are therefore attracting considerable attention (30–32). The methodology proposed here for the structural characterization of glycoprotein-based substances could have applications in glycomics. Here, we demonstrate the use of LC/MS for glycomics, simultaneous glycosylation analysis of major serum glycoproteins, and differential analyses of mice with systemic lupus erythematosus (SLE) and control mice with regard to the degree of glycosylation in kidney glycoproteins.

### 1) Simultaneous glycosylation analysis of serum glycoproteins

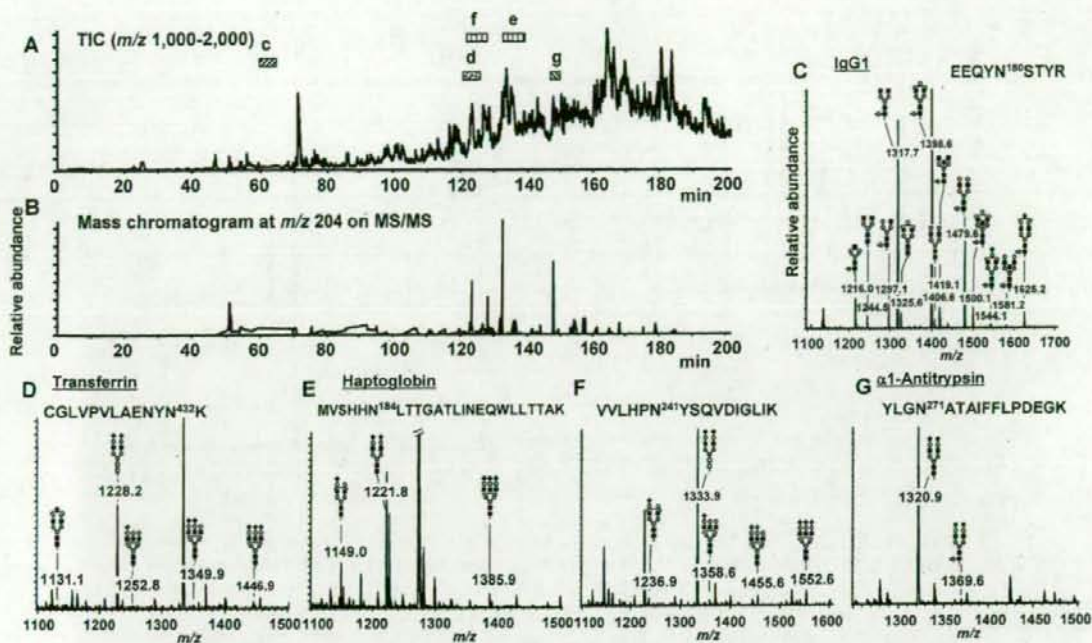
Most proteins in serum are glycosylated, and the glycan moieties in some glycoproteins are known to be altered in certain diseases. For instance, the Gal content of N-linked oligosaccharides present in IgG decreases in patients with chronic articular rheumatoid arthritis (33–35) and Crohn's disease (36). In some types of cancer, acute-phase proteins, including haptoglobin, undergo fucosylation and branching (37–42). An LCA-reactive  $\alpha$ -fetoprotein is used as a highly sensitive and specific

## E. グライコムクスへの応用

グライコムクスは、細胞や組織などに存在する糖鎖セプトを解析する研究である。中でも、疾患関連糖鎖の解析は、より効果的な診断や新規医薬品開発につながる可能性があり、高い関心を集めている(30–32)。本稿で紹介してきた糖タンパク質医薬品の構造特性解析技術は、グライコムクスにも応用可能である。ここでは、LC/MSをグライコムクスに応用した例として、血清中の主な糖タンパク質の糖鎖を一斉に解析した例と、全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウスとその対照マウスの腎臓糖鎖の差異解析を行った例を紹介する。

### 1) 血清糖タンパク質由来糖ペプチドの一斉分析

血清中のタンパク質の多くは糖鎖付加を受けており、その中のいくつかの糖タンパク質の糖鎖は、疾患に伴って変化することが知られている。例えば、慢性関節リウマチ(33–35)やクローン病(36)では、IgGに結合しているN結合型糖鎖のガラクトース含量が減少することが知られている。また、種々の癌において、ハプトグロビンなどの急性期タンパク質と呼ばれるタンパク質の糖鎖のフコシル化や分岐化が進むことが観察されている(37–42)。さらに、LCAレクチン結合性の $\alpha$ フェトプロテインは、高感度特異的な肝癌マーカーとして利



**Fig. 9.** LC/MS/MS of tryptic digest of human serum (45). (A) TIC ( $m/z$  1,000–2,000). (B) Mass chromatogram ( $m/z$  204) obtained by the data-dependent MS/MS. (C) Mass spectra of IgG1 (P01857), EEQYN<sup>180</sup>STYR; (D) transferrin (P02787) CGLVPVLAENYN<sup>432</sup>K; (E) haptoglobin (P00738), MVSHHN<sup>184</sup>LTTGATLINEQWLLTTAK; (F) haptoglobin, VVLHPN<sup>241</sup>YSQVDIGLIK; (G)  $\alpha$ 1-antitrypsin (P01009), YLGN<sup>271</sup>ATAIFFLPDEGK. LC, Paradigm MS4 HPLC system; Column, MonoCap High-Resolution 750 (750  $\times$  0.2 mm, GL Sciences); flow rate, 2  $\mu$ l/min; A buffer, 0.1% formic acid/2% acetonitrile; B buffer, 0.1% formic acid/90% acetonitrile; gradient condition, 5–65 % B (180 min); MS, Qstar pulsar i (Applied Biosystems); electrospray voltage, 1.7 kV (positive ion mode).

biomarker for the diagnosis of liver cancer (43,44). We simultaneously analyzed site-specific glycosylation in some serum glycoproteins by direct injection of tryptic serum into the LC/MS system (45).

Commercially available human serum (5  $\mu$ l), from which most of the albumin had been removed with the use of an albumin-removal kit, was carboxymethylated and digested with trypsin. Figure 9A and 9B shows the total-ion chromatogram (TIC) observed in a single MS scan of tryptic serum and the mass chromatogram of a carbohydrate-distinctive ion ( $m/z$  204) obtained by performing a data-dependent MS/MS (7, 46–48). Acquisition of the glycopeptide's MS data was confirmed in most of the peaks appearing in the mass chromatogram. The peptide moiety of each glycopeptide was deduced by performing a database search for the fragments that arose in the MS/MS and/or by comparing the calculated mass with the theoretical mass of [peptide + H]<sup>+</sup> or [peptide + HexNAc + H]<sup>+</sup>. Figure 9C–G shows the representative mass spec-

用されている(43,44)。我々は、血清のトリプシン消化物を直接LC/MSシステムに注入することによって、血清中のいくつかの糖タンパク質の部位特異的糖鎖を一斉に解析した(45)。

市販のヒト血清5  $\mu$ lからアルブミン除去キットを用いてアルブミンを除去し、還元カルボキシメチル化した後トリプシンで消化した。Fig. 9A及び9Bはそれぞれ、トリプシン消化物のシングルMSスキャンによって得られたTIC、及びデータ依存的MS/MSで生じた糖鎖特異的イオンHexNAc<sup>+</sup> ( $m/z$  204)のマス chromatogramを示したものである(7,46–48)。Fig. 9Bで現れたピーク位置にはほぼ糖ペプチドのMSデータが取り込まれていた。各糖ペプチドのペプチド部分は、MS/MSで生じたフラグメントのデータベース検索、もしくは、[peptide + H]<sup>+</sup>または [peptide + HexNAc + H]<sup>+</sup>の  $m/z$  値を理論値と照合することによって推定した。代表的な糖ペプチドのマススペクトルをFig. 9C～Gに示す。Fig. 9CはIgG1由来のペプチドEEQYN<sup>180</sup>STYRのマススペクトルで、

tra of glycopeptides in tryptic serum. Figure 9C shows the mass spectrum of EEQYN<sup>180</sup>STYR derived from IgG1, which contains the protonated molecules of agalactosyl, mono- and digalactosyl biantennary oligosaccharides. Figure 9D shows the mass spectrum of CGLVPVLAENY N<sup>432</sup>K derived from transferrin. Its major glycan peak was assigned to disialylated biantennary oligosaccharides, and the minor peaks were assigned to monosialylated biantennary and trisialylated triantennary oligosaccharides. Figure 9E and F shows the mass spectra of glycopeptides derived from haptoglobin. Most of the glycans were determined to be biantennary and triantennary oligosaccharides, and few were fucosylated glycans. The mass spectrum of an  $\alpha$ 1-antitrypsin glycopeptide (YLG<sup>N</sup><sup>271</sup>ATIAFFLPDEGK) is shown in Fig. 9G: a disialylated biantennary oligosaccharide was detected in this glycopeptide. The carbohydrate structures predicted in the present simultaneous analysis were almost identical to those predicted in previous studies, wherein isolated glycoproteins or glycopeptides were subjected to site-specific glycosylation analyses (20, 49). Advances in analytical techniques involving LC/MS have enabled site-specific glycan profiling to be performed without the need for the purification of individual glycoproteins.

## 2) Differential analysis of glycans in the kidney glycoproteins of mice with SLE and control mice

SLE is an autoimmune disease that is characterized by chronic and systemic diseases such as kidney failure, arthritis, and erythema. Murine models of SLE, wherein the mice naturally develop glomerular nephritis as an SLE-related condition, are widely used to clarify the pathogenic mechanisms underlying the development of SLE (50-52). MRL/MpJ-lpr/lpr (MRL-lpr) mice, which are commonly used in murine models of SLE, lack the gene encoding the Fas antigen that is associated with apoptosis; this results in the escape of autoreactive lymphocytes into the thymus and an increase in immune-complex deposition. Mizuochi et al reported that the serum IgG of MRL-lpr mice contains elevated amounts of glycans lacking a Gal residue (53). Further,  $\alpha$  mannosidase-II ( $\alpha$ M-II)-deficient mice have been reported to suffer from diseases associated with SLE, including kidney failure (54,55). Changes in the degree of glycosylation and the content of mannose-binding lectin may be associated with the development of SLE-associated diseases in this murine model (56-58). By using the isotope-tagging method, we compared glycosylation of proteins in the disordered kidneys of the MRL-lpr mice with those in the normal kidneys of control mice (59).

N-linked oligosaccharides were isolated from the kidneys of the MRL-lpr mice affected with glomerular nephritis and derivatized to d<sub>0</sub>-PA-glycans. A mixture of

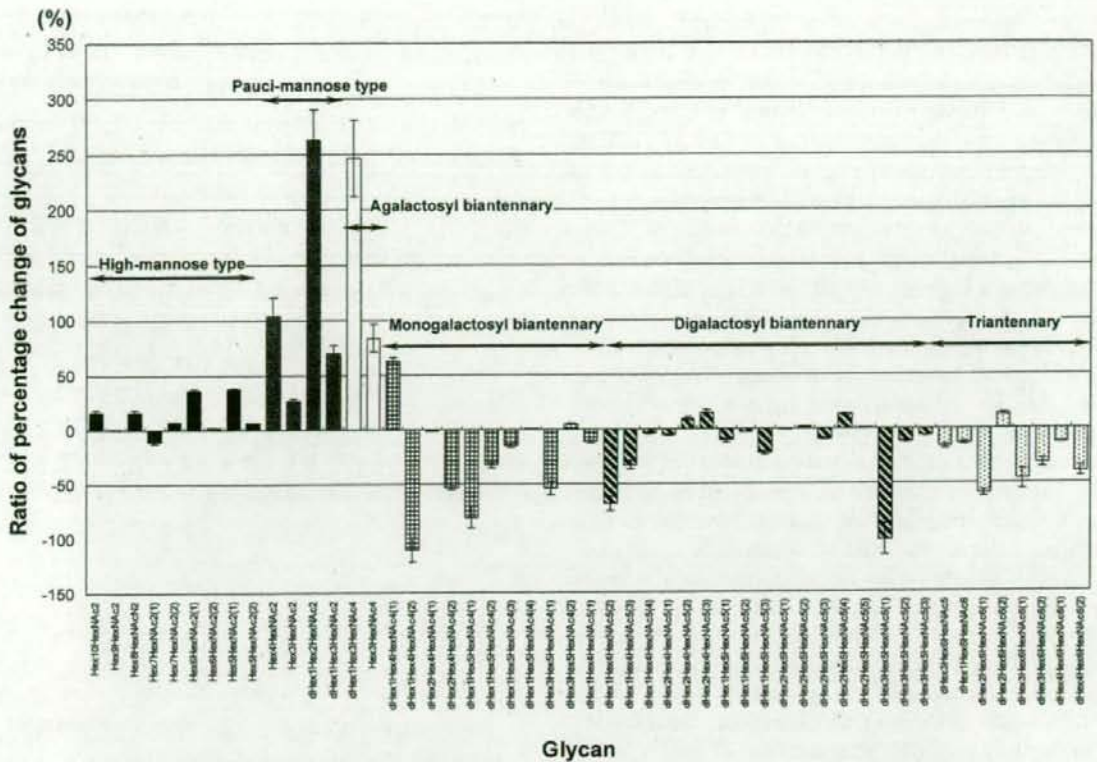
ガラクトースが0~2個結合した2本鎖糖鎖が観測された。Fig. 9Dはトランスフェリン由来のペプチド CGLVPVLAENY N<sup>432</sup>K のマススペクトルで、主な糖鎖としてジシアリル2本鎖糖鎖が、またその他のマイナー糖鎖としてモノシアリル2本鎖及びトリシアリル3本鎖糖鎖が結合していた。Fig. 9E及びFは、ハプトグロビン由来糖ペプチドのマススペクトルである。ハプトグロビンの主な糖鎖は2本鎖及び3本鎖糖鎖で、フコシル化糖鎖はほとんど認められなかった。Fig. 9Gは、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン由来のペプチド YLG<sup>N</sup><sup>271</sup>ATIAFFLPDEGK のマススペクトルで、ジシアリル2本鎖糖鎖が主に結合していた。この一斉分析によって推定された糖鎖構造は、個々の糖タンパク質を単離して解析された過去の報告にはほぼ一致した(20, 49)。このように、LC/MSを用いた糖鎖解析技術の進展によって、タンパク質を単離することなく糖鎖結合部位ごとの糖鎖のプロファイルを明らかにすることが可能になってきた。

## 2) SLE モデルマウスと対照マウスの腎臓糖鎖の差異解析

SLEは自己免疫性疾患の一つで、腎臓機能低下、関節炎、紅斑など全身性症状を呈する慢性疾患である。発症機構を解明するため、ヒトSLE様症状を自然発症する様々なモデルマウスを使った研究が進められている(50-52)。その中の一つであるMRL-lpr/lpr (MRL-lpr)マウスは、アポトーシスに関与するFas抗原遺伝子が欠損している。MRL-lprマウスの血清には、ガラクトースが欠失した2本鎖糖鎖を持つIgGが増加していることが知られている(53)。また、 $\alpha$ -マンノシダーゼIIを欠損したマウスではSLE様の糸球体腎炎を発症することが報告されている(54,55)。これらのモデルマウスにおけるSLE様症状の発症には、糖鎖構造の変化やマンノース結合レクチンが関与している可能性が指摘されている(56-58)。我々は、糖鎖の比較定量法を用いて、SLEモデルマウスと対照マウスの腎臓の糖鎖プロファイルを比較した(59)。

糸球体腎炎を発症しているモデルマウスMRL-lprの腎臓からN結合型糖鎖を切り出し、d<sub>0</sub>-PA糖鎖とした。これに、対照マウス(MRL-+/+)腎臓から調製したd<sub>4</sub>-PA糖鎖を混合して定量的糖鎖プロファイリングを行った。Fig. 10は、d<sub>0</sub>-及びd<sub>4</sub>-PA糖鎖のピーク面積比を示したものである。SLEモデルマウスでは、パウチマンノース型糖鎖(60-62)やガラクトースが欠損した低分子量の比較的単純な構造を持つ糖鎖が増加し、ガラクトースやフコースが複数結合した複雑な構造





**Fig. 10.** Rate of percentage change in  $d_0/d_4$ -glycans (59). Each value is the average from three biological repeats. The error bars correspond to the standard deviation. LC, Magic 2002 HPLC system; Column, Hypercarb (150 × 0.2 mm, 5  $\mu$ m); flow rate, 2  $\mu$ l/min; A buffer, 5 mM ammonium acetate/2% acetonitrile (pH 9.6); B buffer, 5 mM ammonium acetate/80% acetonitrile (pH 9.6); gradient condition, 5–45% B (90 min); MS, LTQ-FT; electrospray voltage, 2.0 kV (positive ion mode); resolution of FTMS, 50,000.

$d_0$ -PA glycans and  $d_4$ -PA glycans that was prepared from the kidneys of the control mice (MRL-+/+) was subjected to quantitative glycan profiling. The peak-area ratios of the  $d_0$ - and  $d_4$ -glycans are shown in Fig. 10. The differential analysis performed for the SLE-model mice revealed an increase in the number of low-molecular-mass glycans exhibiting a simple structure, such as pauci-mannose-type oligosaccharides (60–62), and of complex oligosaccharides lacking Gal residues, accompanied by a decrease in the number of complex glycans containing multiple Fuc and Gal residues. These results suggest that the number of N-glycans synthesized during the early stage of the N-glycan biosynthetic pathway increases, while that of N-glycans synthesized during the late stage decreases in mice with SLE. Our present findings may be attributed to some alteration in the biosynthetic pathway of N-glycans. Such changes in the degree of glycosylation may induce an aber-

をもつ糖鎖は減少していることが明らかになった。このことは、N結合型糖鎖合成過程の後期に生成される成熟した糖鎖は減少し、合成初期の未成熟な糖鎖が増えていることを示している。これらの結果は、糖鎖合成過程に変化が生じていることを示唆している。このような糖鎖の変化は、SLEモデルマウスにおける異常な免疫反応や腎臓障害に関係があるのかもしれない。

rant immune response and kidney disorders in mice with SLE.

#### F. Issues to be addressed in future

We have outlined the glycosylation analysis-related issues that should be considered for the manufacture of glycoprotein products, and we have discussed the potential applications of MS for the characterization, quality testing, and comparative assessment of glycoprotein-based products. For accurate evaluation of glycoprotein products by MS, it is necessary to clarify the applicability of MS to glycosylation analysis and to establish relevant methods for the MS-based analysis of glycosylation. In particular, a general glycosylation analysis protocol that is not influenced by the type of mass spectrometer and software used is required. Furthermore, the harmonization of methodologies adopted for MS-based glycosylation analysis among the United States, European Union, and Japan would aid drug-discovery research worldwide.

#### Acknowledgment

The present study was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

#### References

1. <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/new/h19pharmaceutical.html> (Accessed 4, F., 2008). 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構ホームページ.
2. 宮田直樹 (2006) 第1回 Pharm. Tech. Japan. 22, 39-43
3. Hase, S. (1994) *Methods Enzymol.* 230, 225-237
4. Jackson, P. (1991) *Anal Biochem.* 196, 238-244
5. Hardy, M. R. and Townsend, R. R. (1994) *Methods Enzymol.* 230, 208-225
6. Zaia, J. (2004) *Mass Spectrom Rev.* 23, 161-227
7. Harazono, A., Kawasaki, N., Kawanishi, T. and Hayakawa, T. (2005) *Glycobiology.* 15, 447-462
8. Sandra, K., Devreese, B., Van Beeumen, J., Stals, I. and Claeysens, M. (2004) *J Am Soc Mass Spectrom.* 15, 413-423
9. Itoh, S., Kawasaki, N., Hashii, N., Harazono, A., Matsuishi, Y., Hayakawa, T. and Kawanishi, T. (2006) *J Chromatogr A.* 1103, 296-306
10. Wuhrer, M., Koeleman, C. A., Hokke, C. H. and Deelder, A. M. (2005) *Anal Chem.* 77, 886-894
11. Itoh, S., Takakura, D., Kawasaki, N. and Yamaguchi, T. (in press) *The Protein Protocols Handbook*
12. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英 (2007) 抗体医薬の最前線.
13. Harris, R. J., Leonard, C. K., Guzzetta, A. W. and Spellman, M. W. (1991) *Biochemistry.* 30, 2311-2314
14. Pohl, G., Kenne, L., Nilsson, B. and Einarsson, M. (1987) *Eur J Biochem.* 170, 69-75
15. 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, アハメド・アブド・サイード, 徳永裕司, 春日井勲, 早川堯夫 (1994) 医薬品研究 25, 405-425
16. 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, アハメド・アブド・サイード, 徳永裕司, 春日井勲, 早川堯夫 (1994) 医薬品研究 25, 501-523
17. 一瀬白帝 (血栓・止血・血管学, 血栓症抑圧のために), 中外医学社
18. Domon, B. and Costello, C. E. (1988) *Glycoconjugate J.* 5, 397-409
19. Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H. and Presta, L. G. (2002) *J Biol Chem.* 277, 26733-26740
20. Wada, Y., Azadi, P., Costello, C. E., Dell, A., Dwek, R. A., Geyer, H., Geyer, R., Kakehi, K., Karlsson, N. G., Kato, K., Kawasaki, N., Khoo, K. H., Kim, S., Kondo, A., Lattova, E., Mechref, Y., Miyoshi, E., Nakamura, K., Narimatsu, H., Novotny, M. V., Packer, N. H., Perreault, H., Peter-Katalinic, J., Pohlentz, G., Reinhold, V. N., Rudd, P. M., Suzuki, A. and Taniguchi, N. (2007) *Glycobiology.* 17, 411-422
21. Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T. (2002) *J Chromatogr A.* 968, 89-100
22. Kawasaki, N., Itoh, S., Ohta, M. and Hayakawa, T. (2003) *Anal Biochem.* 316, 15-22
23. Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hyuga, M. and Hayakawa, T. (2000) *Anal Biochem.* 285, 82-91
24. Yuan, J., Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Kawanishi, T. and Hayakawa, T. (2005) *J Chromatogr A.* 1067, 145-152

#### F. 今後の課題

本稿では、糖タンパク質医薬品開発における重要課題の中から糖鎖関連事項を取り上げて概説するとともに、構造特性解析、糖鎖確認試験及び同源性・同質性評価におけるMSの可能性を示した。MSを糖タンパク質医薬品評価により幅広く活用していくためには、MSが糖鎖解析にどこまで適用可能なかを明確にし、開発メーカー、装置のタイプ、あるいは解析ソフト等に影響されない標準的分析方法を整備する必要がある。さらに、米国、EU及び我が国の間で糖鎖解析法をハーモナイズしていくことは、世界規模での創薬研究推進に大きく寄与することになるだろう。

#### 謝辞

本稿で紹介した内容は、厚生労働科学研究費補助金の研究成果の一部である。

25. Alvarez-Manilla, G., Warren, N. L., Abney, T., Atwood, J., 3rd, Azadi, P., York, W. S., Pierce, M. and Orlando, R. (2007) *Glycobiology*. **17**, 677–687
26. Kang, P., Mechref, Y., Kyselova, Z., Goetz, J. A. and Novotny, M. V. (2007) *Anal Chem*. **79**, 6064–6073
27. Bowman, M. J. and Zaia, J. (2007) *Anal Chem*. **79**, 5777–5784
28. Kobata, A. (1988) *J Cell Biochem*. **37**, 79–90
29. Gervais, A., Hammel, Y. A., Pelloux, S., Lepage, P., Baer, G., Carte, N., Sorokine, O., Strub, J. M., Koerner, R., Leize, E. and Van Dorsselaer, A. (2003) *Glycobiology*. **13**, 179–189
30. Wada, Y. (2007) *Eur J Mass Spectrom* (Chichester, Eng). **13**, 101–103
31. Faid, V., Chirat, F., Seta, N., Foulquier, F. and Morelle, W. (2007) *Proteomics*. **7**, 1800–1813
32. Miyamoto, S. (2006) *Curr Opin Mol Ther*. **8**, 507–513
33. Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K. and et al. (1985) *Nature*. **316**, 452–457
34. Parekh, R. B., Roitt, I. M., Isenberg, D. A., Dwek, R. A., Ansell, B. M. and Rademacher, T. W. (1988) *Lancet*. **1**, 966–969
35. Omtvedt, L. A., Royle, L., Husby, G., Sletten, K., Radcliffe, C. M., Harvey, D. J., Dwek, R. A. and Rudd, P. M. (2006) *Arthritis Rheum*. **54**, 3433–3440
36. Dube, R., Rook, G. A., Steele, J., Brealey, R., Dwek, R., Rademacher, T. and Lennard-Jones, J. (1990) *Gut*. **31**, 431–434
37. Thompson, S., Dargan, E. and Turner, G. A. (1992) *Cancer Lett*. **66**, 43–48
38. Turner, G. A. (1995) *Adv Exp Med Biol*. **376**, 231–238
39. Otake, Y., Fujimoto, I., Tanaka, F., Nakagawa, T., Ikeda, T., Menon, K. K., Hase, S., Wada, H. and Ikenaka, K. (2001) *J Biochem* (Tokyo) **129**, 537–542
40. Kossowska, B., Ferens-Sieczkowska, M., Gancarz, R., Passowicz-Muszynska, E. and Jankowska, R. (2005) *Clin Chem Lab Med*. **43**, 361–369
41. Comunale, M. A., Lowman, M., Long, R. E., Krakover, J., Philip, R., Seeholzer, S., Evans, A. A., Hann, H. W., Block, T. M. and Mehta, A. S. (2006) *J Proteome Res*. **5**, 308–315
42. Okuyama, N., Ide, Y., Nakano, M., Nakagawa, T., Yamanaka, K., Moriwaki, K., Murata, K., Ohigashi, H., Yokoyama, S., Eguchi, H., Ishikawa, O., Ito, T., Kato, M., Kasahara, A., Kawano, S., Gu, J., Taniguchi, N. and Miyoshi, E. (2006) *Int J Cancer*. **118**, 2803–2808
43. Aoyagi, Y. (1995) *Glycoconj J*. **12**, 194–199
44. Kumada, T., Nakano, S., Takeda, I., Kiriya, S., Sone, Y., Hayashi, K., Katoh, H., Endoh, T., Sassa, T. and Satomura, S. (1999) *J Hepatol*. **30**, 125–130
45. Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Matsuishi-Nakajima, Y., Kawanishi, T. and Yamaguchi, T. (2008) *J Chromatogr. B* **869**, 20–30
46. Carr, S. A., Huddleston, M. J. and Bean, M. F. (1993) *Protein Sci*. **2**, 183–196
47. Huddleston, M. J., Bean, M. F. and Carr, S. A. (1993) *Anal Chem*. **65**, 877–884
48. Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Ishii-Watabe, A., Kawanishi, T. and Hayakawa, T. (2006) *Anal Biochem*. **348**, 259–268
49. Fujii, S., Nishiura, T., Nishikawa, A., Miura, R. and Taniguchi, N. (1990) *J. Biol. Chem*. **265**, 6009–6018
50. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nagata, S. (1992) *Nature*. **356**, 314–317
51. Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R. and Nagata, S. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**, 1756–1760
52. Merino, R., Iwamoto, M., Fossati, L. and Izui, S. (1993) *J Immunol*. **151**, 6509–6516
53. Mizuochi, T., Hamako, J., Nose, M. and Titani, K. (1990) *J Immunol*. **145**, 1794–1798
54. Chui, D., Sellakumar, G., Green, R., Sutton-Smith, M., McQuistan, T., Marek, K., Morris, H., Dell, A. and Marth, J. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**, 1142–1147
55. Green, R. S., Stone, E. L., Tenno, M., Lehtonen, E., Farquhar, M. G. and Marth, J. D. (2007) *Immunity*. **27**, 308–320
56. Trouw, L. A., Seelen, M. A., Duijs, J. M., Wagner, S., Loos, M., Bajema, I. M., van Kooten, C., Roos, A. and Daha, M. R. (2005) *Mol Immunol*. **42**, 731–740
57. Holmskov, U., Malhotra, R., Sim, R. B. and Jensenius, J. C. (1994) *Immunol Today*. **15**, 67–74
58. Lhotta, K., Wurzner, R. and Konig, P. (1999) *Nephrol Dial Transplant*. **14**, 881–886
59. Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Nakajima, Y., Kawanishi, T. and Yamaguchi, T. *Immunology* (in press)
60. Hase, S., Okawa, K. and Ikenaka, T. (1982) *J Biochem*. **91**, 735–737
61. Kubelka, V., Altmann, F., Kornfeld, G. and Marz, L. (1994) *Arch Biochem Biophys*. **308**, 148–157
62. Natsuka, S., Adachi, J., Kawaguchi, M., Nakakita, S., Hase, S., Ichikawa, A. and Ikura, K. (2002) *J Biochem*. **131**, 807–813

Received on February 24, 2008, accepted on May 7, 2008

Profile of the Authors



**Nana Kawasaki** graduated from the department of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University in 1984. She is a member of the division of Biological Chemistry and Biologicals at National Institute of Health Sciences. Her current research focuses on a development of evaluation methods for glycoprotein products by mass spectrometry.



**Satsuki Itoh** graduated from the Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University in 1995 (MS). She has worked at the Division of Biological Chemistry & Biologicals, the National Institute of the Health Sciences since 2000. She received her Ph.D. degree from Osaka University in 2007. She investigates the glycosylation of glycoproteins by mass spectrometry.



**Noritaka Hashii** is a research scientist of National Institute of Health Sciences (NIHS). He received his Ph.D. from Josai University under the supervision of Prof. Seiichi Kondo in 2003. His current research interests are structural analyses of carbohydrates such as N-, O-linked oligosaccharides and glycosaminoglycans by mass spectrometry.



**Akira Harazono** graduated from the department of Physiological Chemistry, Kyoto University in 1995 and received a Ph.D. at Kyoto University in 2002. His recent research focuses on study of quality test for peptide/protein products.



**Daisuke Takakura** graduated in the Bioscience Course in 2002 at the Azabu University and received his PhD in 2007 from the same university. From 2007, he held a post-doctoral position at the Division of Biological Chemistry Biologicals in National Institute of Health Sciences.

Profile of the Authors



**Dr. Teruhide Yamaguchi** graduated from Biology at Kobe University in 1976. He is the director of the division of Biological Chemistry and Biologicals at National Institute of Health Sciences, and is engaged in investigating the safety, quality and efficacy of biologics. He is member of the Pharmaceutical and Food Affairs Council in Japan and is contributing to review quality aspects of registration applications of new drugs. He is also contributing to ICH activity as the member of Gene Therapy EWG.

# 糖鎖異常の網羅的解析

Analysis of aberrant glycosylation

川崎ナナ・橋井則貴・山口照英

糖蛋白質の糖鎖は、環境の変化や疾患などに伴って変化することが知られている。糖鎖の異常を明らかにすることは、新たな診断法や医薬品開発につながる可能性がある。糖鎖異常を網羅的に解析するためのツールの1つとして液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)がある。本稿では、LC/MSを用いた糖鎖プロファイリング、および安定同位体標識法とLC/MSを組み合わせた定量的糖鎖プロファイリングについて概説するとともに、これらを糖鎖異常の網羅的解析に応用した例を紹介する。

**Key words** ●LC/MS ●糖鎖プロファイリング ●安定同位体標識 ●比較定量

## はじめに

細胞表面に存在する糖蛋白質の糖鎖の分布は、環境の変化や疾患などに伴って変化することが明らかになってきた<sup>1-4)</sup>。糖鎖の異常を解析することは、より効果的な診断薬や新規医薬品の開発につながる可能性があることから、疾患に伴って変化する糖鎖の網羅的解析に高い関心が集まっている<sup>5)</sup>。糖鎖異常の網羅的解析には、サンプル間の糖鎖プロファイルと比較する手法がよく用いられる。糖鎖プロファイルとは、糖鎖の種類と結合量などの特徴を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)<sup>6)</sup>、キャピラリー電気泳動(CE)、および蛍光ラベル化糖鎖電気泳動システム(FACE)<sup>7)</sup>などで得られた分離パターンや、各種レクチンとの反応性で表わしたものである<sup>8)</sup>。最近では、質量分析法(MS)により得られたマススペクトルも糖鎖プロファイルとして扱うようになってきた。

図1はMS単独またはLC/MSによって得られる糖鎖のプロファイルの特徴を表わしたものである。たとえば、糖鎖Aが糖鎖BもしくはCに変化した場合、MSを用いた糖鎖プロファイリングでは、質量変化を伴うAからCへの変化を容易に見つけ出すことができるが、質量変化を伴わないAからBへの変化を見いだすことはできない(図1a)。糖鎖は、ヘキソース(Gal, Man:分子量180)、N-アセチルヘキサミン(GlcNAc, GalNAc:分子量221)、デオキシヘキソース(Fuc:分子量164)、N-アセチルノイラミン酸(NeuAc:分子量309)など限られた単糖の組合せで構成されているため、

複数の異性体が存在する可能性があり、MS単独では糖鎖異常を見落としてしまう可能性がある。

一方、LCは異性体を含む糖鎖の微細な構造の違いを識別できるので、糖鎖AからBもしくはCへの変化を見つけ出すことができる(図1b)。蛍光標識された糖鎖を蛍光検出して得られる糖鎖プロファイルは、ピーク面積比から糖鎖の結合比を知ることができるので、異常糖鎖の定量的な解析に役立つ。しかし、変化した糖鎖の構造解析には時間を要する。これに対してLC/MSを用いて得られた糖鎖プロファイルは、変化した糖鎖の構造を、質量から算出した単糖組成や(図1c)、タンデム質量分析(MS/MS)によって生じた糖鎖断片からある程度推定することができるので(図1d)、異常糖鎖の定性的な解析に利用できる。しかし、MSで得られるピーク面積比は、糖鎖の正確なモル比を反映していないことや、測定間のシグナル強度のばらつきが大きいことから、LC/MSを定量的な解析に応用するには注意を要する。この再現性や定量性の問題を克服するための1つの方法として、安定同位体標識法が開発されている<sup>9-11)</sup>。

本稿では、LC/MSを用いた糖鎖プロファイリングと、安定同位体標識法とLC/MSを組み合わせた定量的糖鎖プロファイリング法について概説するとともに、それらを糖鎖異常の網羅的解析に応用した例を紹介する。

## 1 LC/MSによる糖鎖のプロファイリング

### 1. LC/MSによる糖鎖プロファイリング

蛋白質から酵素のまたは化学的に切り出した糖鎖を直接もしくは誘導体化してLC/MS装置で分析すると、全イオンを記録したクロマトグラム(トータルイオンクロマトグラム; TIC)が得られる。TICは各糖鎖のおおよその結合量を

Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Teruhide Yamaguchi  
国立医薬品食品衛生研究所  
E-mail: nana@nihs.go.jp

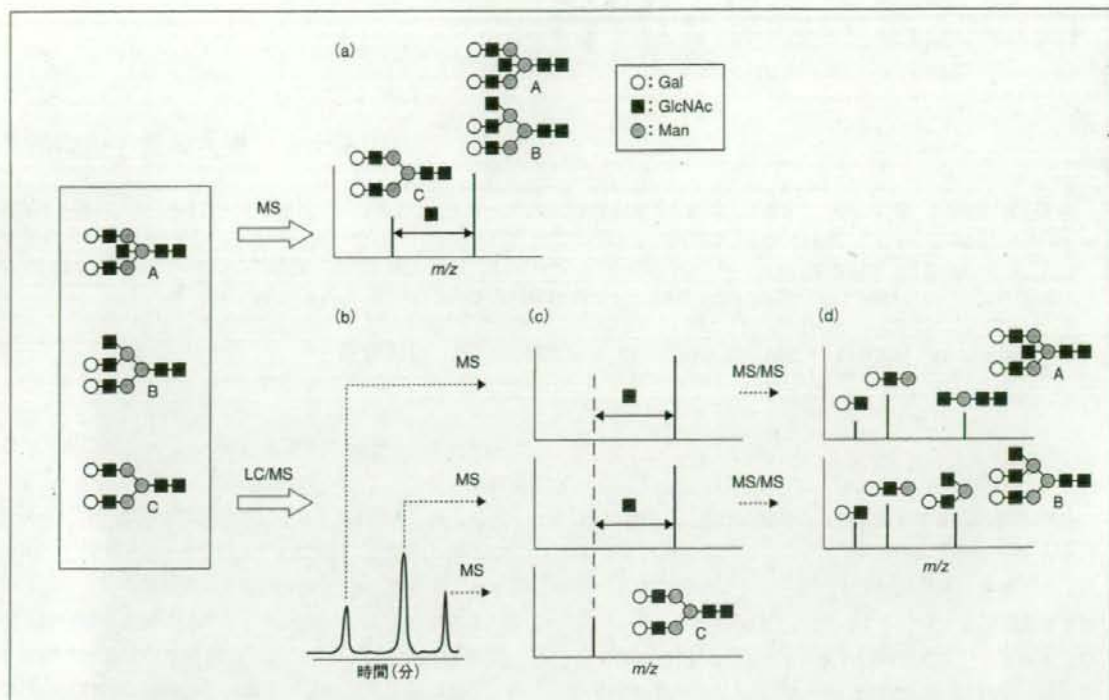


図1 MSまたはLC/MSによって得られる糖鎖プロファイル

(a) MSで得られる糖鎖プロファイル. (b) LCで得られる糖鎖プロファイル. (c) マススペクトル. (d) MS/MSスペクトル.

示しているのが、糖鎖プロファイルとみなすことができる。LCカラムとして、逆相カラム、順相カラム、およびグラファイトカーボンカラムなどが用いられる。検体と対照間で糖鎖プロファイルを比較することによって、結合量が増減した糖鎖を見つけることができる。さらに、変化が認められた糖鎖の構造を、シングルMSで得られた質量から算出した単糖組成や、MS/MSで生じた糖鎖断片から推定することができる。

## 2. 糖鎖プロファイリングを用いた糖鎖差異解析

図2a,bは、それぞれCHO細胞と、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲ (GnT-Ⅲ) 遺伝子を導入したCHO細胞の膜面に存在する糖蛋白質から切り出した*N*-結合型糖鎖のプロファイルである<sup>12)</sup>。GnT-Ⅲは、トリマンノシルコアのManにバイセクティングGlcNAcとよばれる糖をβ1-4結合させる糖転移酵素である。それぞれの細胞の膜面分から*N*-グリコシダーゼF (PNGase F)で糖鎖を切り出し、還元末端をNaBH<sub>4</sub>で還元したのち、グラファイトカーボンカラムで糖鎖を分離しながら、エレクトロスプレーイオン化(ESI)/MS

装置を用いて質量を測定した。おもなピークの糖鎖構造は、質量から算出した単糖組成を基に推定した。GnT-Ⅲ遺伝子導入CHO細胞の糖鎖プロファイルには、約25分にCHO細胞には認められない2つのピークが観察される(図2b)。これらのピークは、質量およびMS/MSで得られたフラグメントから、バイセクティングGlcNAcが1分子付加したモノシリアルフコシル2本鎖糖鎖であることが確認された(図2b挿入図)。GnT-Ⅲ遺伝子導入CHO細胞では、他の2本鎖糖鎖へのバイセクティングGlcNAcの付加も確認されたが、モノシリアル2本鎖への付加が主であることがわかった。このように、LC/MSを用いて得られた糖鎖プロファイルを比較することによって、糖鎖の変化を見いだすと同時に、その糖鎖の構造を推定することができる。

## II 安定同位体標識法による糖鎖の定量的プロファイリング

### 1. 安定同位体標識法とMSによる比較定量

MSでは測定ごとのシグナル強度のばらつきが大きいので

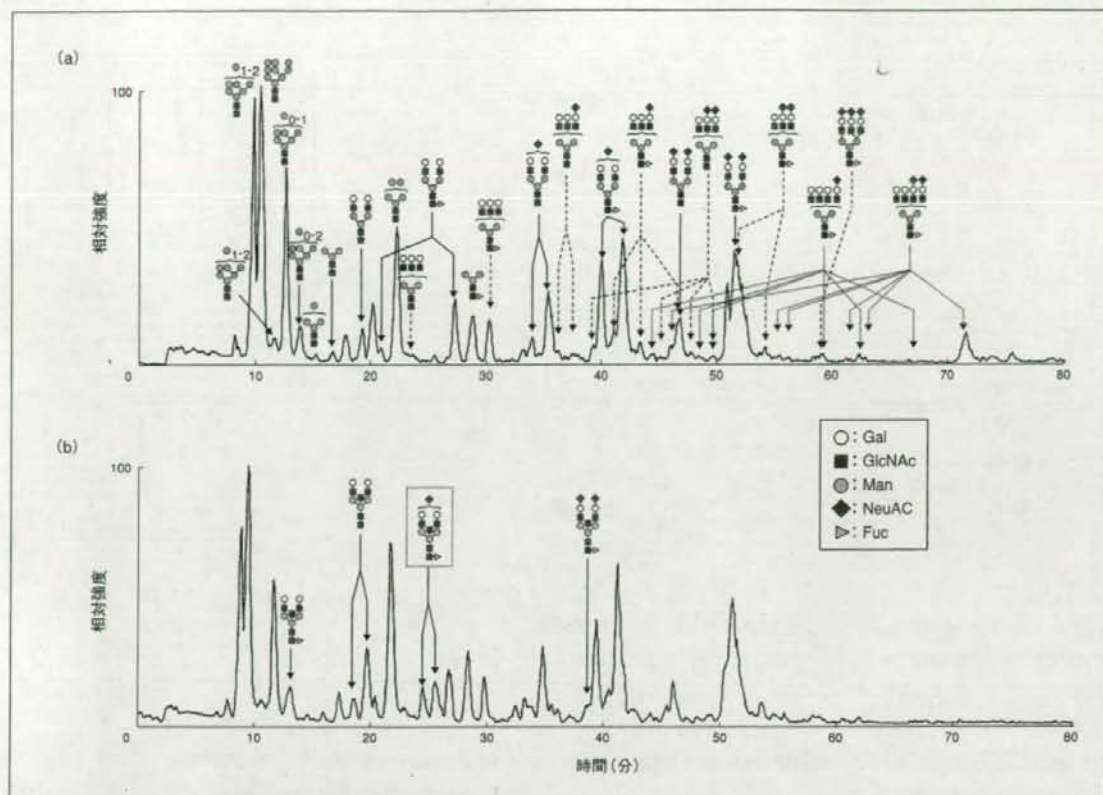


図2 LC/MSを用いた糖鎖プロファイリングの例

CHO細胞およびGnT-III遺伝子導入CHO細胞の膜面分からPNGase Fを用いて糖鎖を切り出し、NaBH<sub>4</sub>で還元したのち、シングルMSスキャンを行なった。(a) CHO細胞由来糖鎖のTIC。(b) GnT-III遺伝子導入CHO細胞由来糖鎖のTIC。

LC, Magic 2002 HPLC system (Michrom BioResources); column, Hypercarb (Thermo Fisher Scientific, 150 × 0.2 mm, 5 μm); flow rate, 2 μL/min; A buffer, 5 mM ammonium acetate / 2% acetonitrile (pH 8.5); B buffer, 5 mM ammonium acetate / 80% acetonitrile (pH 8.5); gradient condition, 10-45% B (90 min); MS, TSQ7000 (Thermo Fisher Scientific); electrospray voltage, 2.0 kV (positive ion mode)。

で、MSを定量解析に用いる場合は、サンプルに安定同位体で標識した標準物質を混合して測定間のばらつきを少なくする手法が用いられる。糖鎖解析では、すべての糖鎖標準物質をそろえることは難しいので、対照蛋白質や細胞・組織から切り出した糖鎖を安定同位体標識して標準物質として用いる<sup>9-11)</sup>。筆者らは、糖鎖の安定同位体標識化試薬として国内で最もよく利用されている2-アミノピリジンの重水素置換体を用いる方法を開発している<sup>13)</sup>。

## 2. 重水素置換2-アミノピリジン標識とLC/MSを用いた定量的糖鎖プロファイリング

図3は2-アミノピリジンを用いた糖鎖の比較定量法の概略

を示している。サンプル1から切り出した糖鎖は、重水素置換されていない2-アミノピリジンで標識してビリジルアミノ化糖鎖重水素未置換体(d<sub>0</sub>-PA糖鎖)とする。サンプル2から切り出した糖鎖は、2-アミノピリジンの重水素置換体で標識してビリジルアミノ化糖鎖四重水素置換体(d<sub>4</sub>-PA糖鎖)とする。両者の質量は4 Da異なることになる。等量の蛋白質から調製したd<sub>0</sub>-およびd<sub>4</sub>-PA糖鎖を混合し、LC/MSを用いて糖鎖プロファイリングを行なうと、d<sub>0</sub>-およびd<sub>4</sub>-PA糖鎖は質量4 Da異なる1対の分子イオンとして検出される。両者のシグナル強度を比較することによって、サンプル1と2の糖鎖ごとの結合比を正確に求めることができる(定量的糖鎖プロファイリング)。



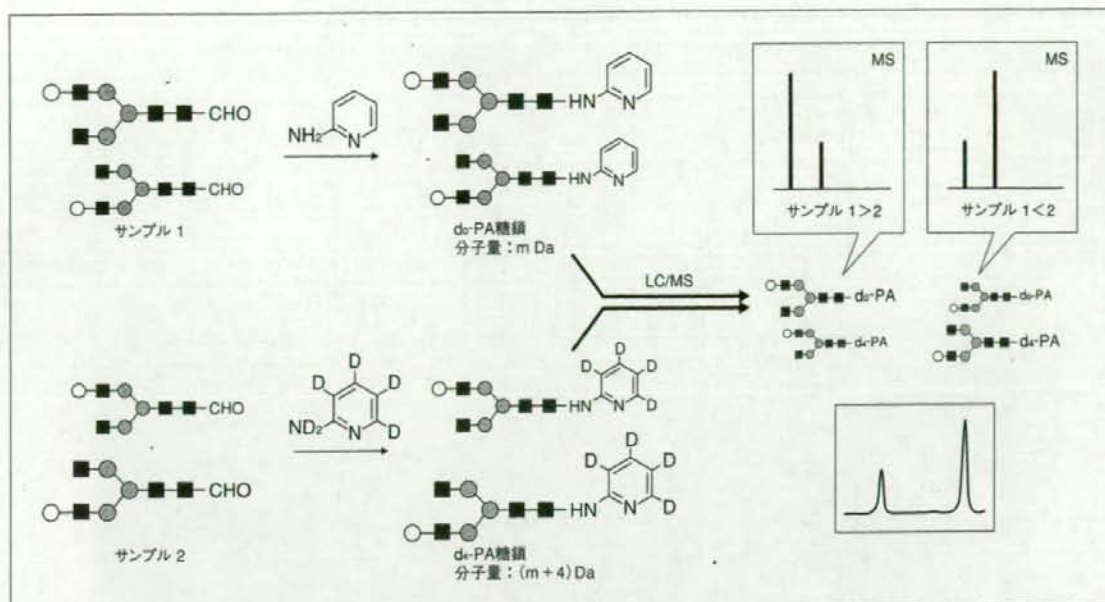


図3 重水素標識2-アミノピリジンとLC/MSを用いた定量的糖鎖プロファイリング

構造式の大きさの差は糖鎖の量を示す。右下の図はLC/MSで得られたクロマトグラムの例を示す。

次に、この方法を用いて、疾患関連糖鎖の網羅的解析に  
応用した例を紹介する。

### 3. 定量的糖鎖プロファイリングを用いた糖鎖差異 解析：全身性エリテマトーデスマウスと 対照マウスの糖鎖差異解析

全身性エリテマトーデス (SLE) は自己免疫疾患の1つで、  
腎臓、肺、肝臓など全身の多臓器が傷害される。その発症  
機序には不明な点が多く、ヒトSLEと同様な病気を自然発  
症するモデルマウスを使った研究が進められている<sup>14-16</sup>。  
SLEモデルマウスでは、Galが欠損した2本鎖糖鎖をもつイ  
ムノグロブリンGの割合が増えることや<sup>17</sup>、 $\alpha$ -マンノシダ  
ーゼII欠損マウスでは、SLE様糸球体腎炎の発症が認めら  
れることから<sup>18,19</sup>、SLEの発症もしくは症状に、糖鎖の変  
化が関与していることが指摘されている。そこで、筆者ら  
は、定量的糖鎖プロファイリングを用いて、腎炎を発症して  
いるSLEモデルマウス (MRL lpr/lpr) の腎臓と、対照マウ  
ス (MRL +/+) の腎臓のN-結合型糖鎖の差異解析を行なっ  
た<sup>20</sup>。

SLEモデルマウスの腎臓からN-結合型糖鎖を切り出し、  
d<sub>0</sub>-PA糖鎖とした (図4a)。対照マウスの腎臓から切り出し

た糖鎖をd<sub>4</sub>-PA糖鎖とし、d<sub>0</sub>-PA糖鎖に添加してLC/MS  
を行なった。シングルMSスキャンによって得られたTIC  
を図4bに示す。おもなピークのプロトン化分子のm/z値か  
ら、腎臓のおもな糖鎖は、高マンノース型糖鎖やシアル酸  
が結合していない複合型糖鎖であることがわかった。

図5aは26分前後に溶出された糖鎖のマススペクトルであ  
る。SLEモデルマウスおよび対照マウス由来糖鎖のプロト  
ン化分子がそれぞれm/z 973.40およびm/z 977.43に検出  
されている。シグナルの強度比から、この糖鎖はSLEでは  
約3.5倍に増加していることがわかる。m/z 973.40のイオ  
ンを前駆イオンとして測定したMS/MSスペクトルを図5b  
に示す。一般に糖鎖のMS/MSでは、グリコシド結合の酸  
素原子を還元末端側糖鎖に残すような開裂が優先されて、  
還元末端糖鎖側フラグメント (Yイオン) と非還元末端糖鎖  
側フラグメント (Bイオン) が生じる。この増加した糖鎖は、  
MS/MSで得られたフラグメントから、マンノース2個から  
なるバウチマンノース型とよばれる糖鎖であることがわか  
った (図5挿入図)。

図6aは、SLEモデルマウスで減少した代表的糖鎖のマス  
スペクトルである。SLEモデルマウス由来糖鎖の2価のプロ  
トン化分子 (m/z 1180.97) および対照マウスの同イオン

( $m/z$  1182.98) のシグナル強度比から、この糖鎖は、SLEモデルマウスにおいて対照マウスの半分に減少していることがわかる。図6b~dは、それぞれ $m/z$  1181.0を前駆イオンとして得られたMS/MSスペクトル、MS/MSで生じたフラグメントのなかで最も強度の高いイオン( $m/z$  1849.7)を前駆イオンとして得られたMS/MS/MSスペクトル、さらに、MS/MS/MSで生じたフラグメント( $m/z$  1338.3)を前駆イオンとして得られたMS/MS/MS/MSスペクトルである。生じたフラグメントから、この糖鎖は、ガラクトー

スとフコースが複数結合した複雑な構造をもつ糖鎖であることがわかった(図6挿入図)。

図7aは検出されたおもな糖鎖ごとに、 $d_0$ および $d_4$ -PA糖鎖のシグナル強度比( $d_0/d_4$ -PA糖鎖)をまとめたものである。プラス側の糖鎖はSLEモデルマウスで増加した糖鎖、マイナス側の糖鎖は減少した糖鎖である。N-結合型糖鎖合成過程において、初期に出現する糖鎖はMan-9である(図7b)。その後、Manがトリミングされて低分子量の単純な糖鎖になり、次にGlcNAc, Fuc, およびGalが付加され

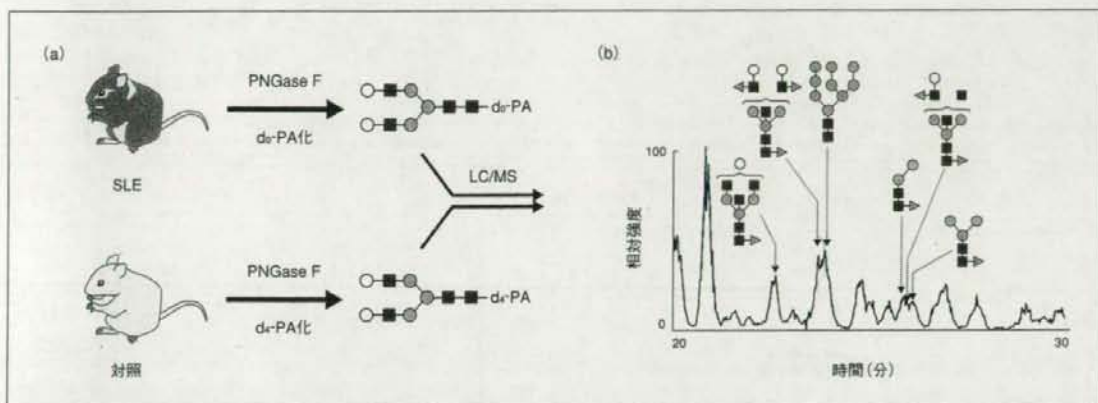


図4 LC/MSを用いた定量的糖鎖プロファイリングの例

SLEモデルマウス腎臓由来糖鎖から調製した重水素未置換PA糖鎖( $d_0$ -PA糖鎖)と、対照マウス腎臓由来糖鎖から調製した四重水素置換PA糖鎖( $d_4$ -PA糖鎖)を混合してLC/MSを行なった。

(a) 実験方法の概略。(b) シングルMSスキャンによって得られたTICとおもなピークの糖鎖構造。

LC, Magic 2002 HPLC system; column, Hypercarb (150 x 0.2 mm, 5  $\mu$ m); flow rate, 2  $\mu$ l/min; A buffer, 5 mM ammonium acetate / 2% acetonitrile (pH 9.6); B buffer, 5 mM ammonium acetate/80% acetonitrile (pH 9.6); gradient condition, 5-45% B (90 min); MS, LTQ-FT; electrospray voltage, 2.0 kV (positive ion mode); resolution of FTMS, 50,000.

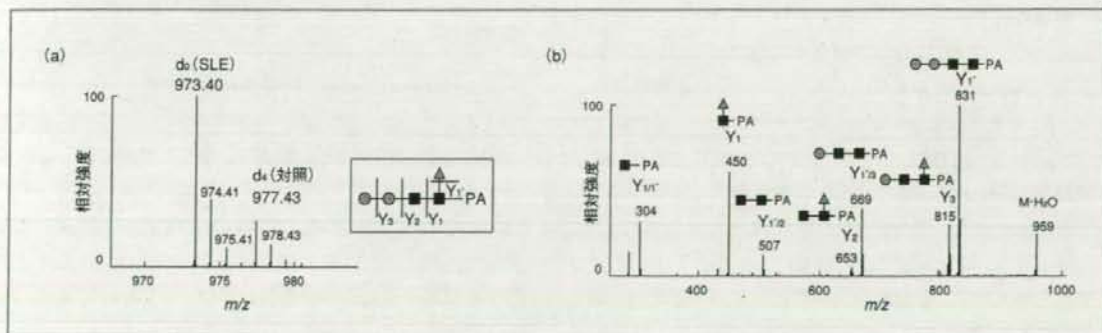


図5 SLEモデルマウスで増加していた糖鎖のMSスペクトルと推定構造

(a) マススペクトル。(b) MS/MSスペクトル。前駆イオン:  $m/z$  973.40.

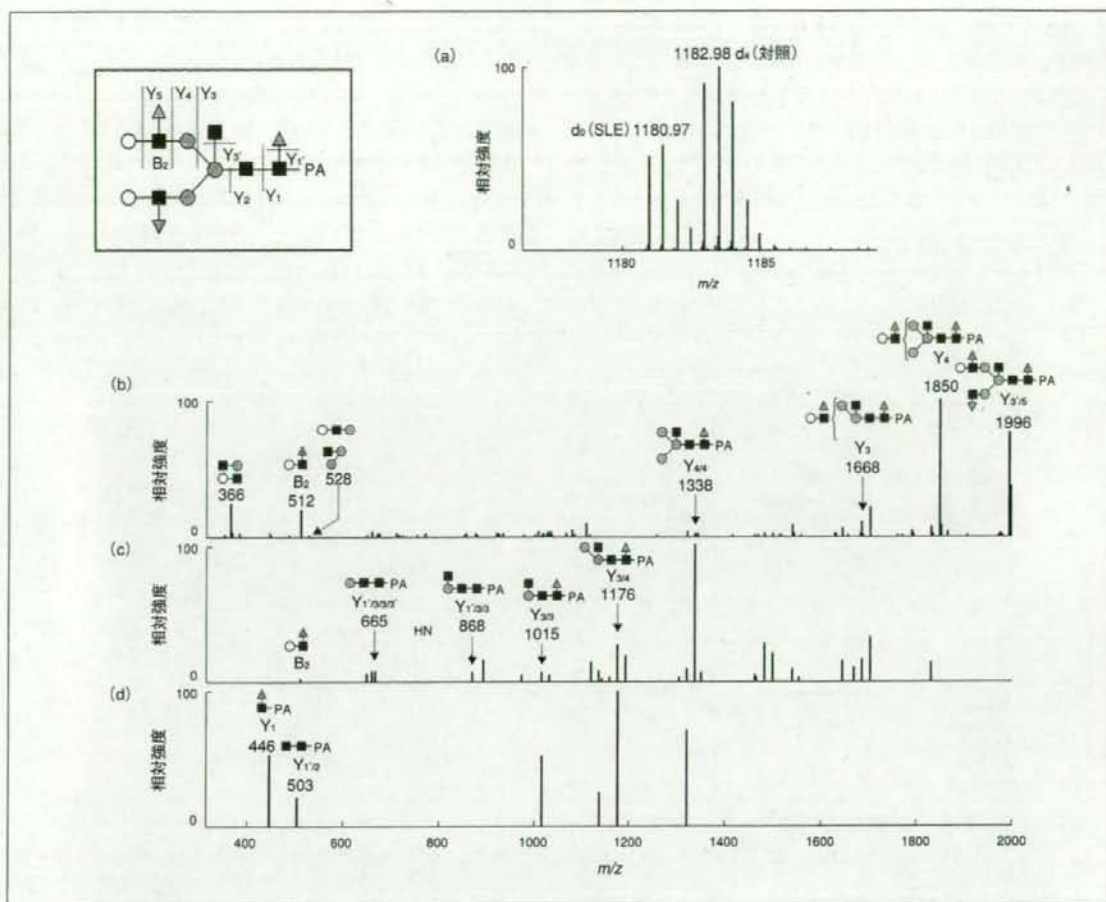


図6 SLEモデルマウスで減少していた糖鎖のMSスペクトルと推定構造

(a) シングルMSスペクトル。(b) MS/MSスペクトル。前駆イオン:  $m/z$  1181.0。(c) MS/MS/MSスペクトル。前駆イオン:  $m/z$  1849.7。(d) MS/MS/MS/MSスペクトル。前駆イオン:  $m/z$  1338.3。

て複雑な構造をもつようになる。パウチマンノース型糖鎖(小マンノース型糖鎖)は、糖鎖が複雑になるのを阻害する位置にあると考えられている<sup>21-23)</sup>。今回の差異解析により、SLEモデルマウスでは、パウチマンノース型糖鎖や合成初期のGalが付加していないシンプルな糖鎖が増加し、合成後期のFucやGalが結合した複雑な糖鎖は減少していることがわかった。また、F1H4N4のように異性体により、増減が異なることも明らかとなった。この結果は、SLEモデルマウスでは、糖鎖合成過程に何らかの変化が生じていることを示唆していると思われる。このように、定量的プロファイリングを行なうことによって、一部の糖鎖だけでなく、糖鎖全体に生じている異常を見つけ出すことができる。

## おわりに

MSの進展によって、糖鎖異常を微量でかつ迅速に解析できるようになったことはいうまでもない。とくに疾患関連糖鎖の網羅的解析などにおいて、MSが果たしている役割は大きい。しかし、糖鎖の異常は限られた糖鎖の出現・消失としてだけでなく、糖鎖不均一性の変化として表われる可能性もあるので、蛋白質や細胞を特徴づけている糖鎖セット全体を定性的かつ定量的に解析する手法の開発に、もっと目を向けていく必要があると思われる。

本稿で紹介した内容は、厚生労働研究費補助金の研究成果の一部である。

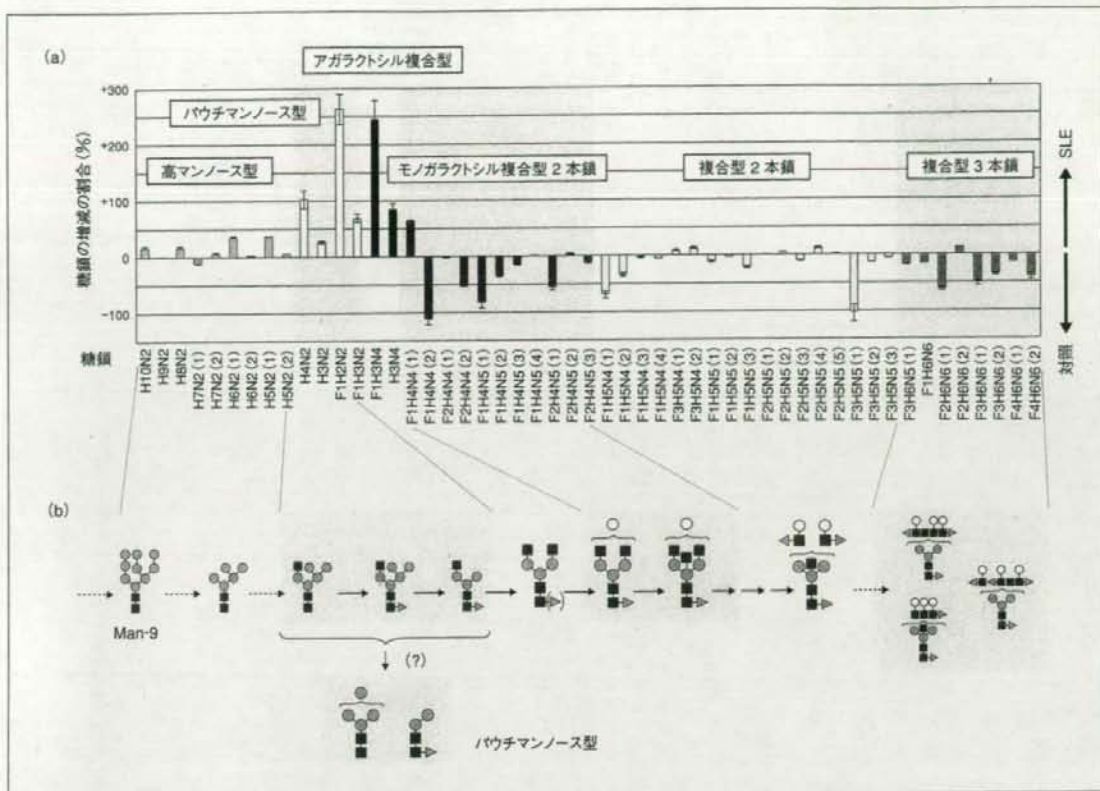


図7 d<sub>4</sub>-PA 糖鎖および d<sub>6</sub>-PA 糖鎖の分子イオンのピーク強度比

横軸は糖鎖の種類、また縦軸は d<sub>4</sub>-PA 糖鎖に対する d<sub>6</sub>-PA 糖鎖の増減の割合 (%) を示す。F: フコース、H: ヘキソース、N: N-アセチルヘキソサミン。

## 文 献

- 1) Axford, J.S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1455**, 219-229 (1999)
- 2) Feizi, T. et al: *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 591-596 (1984)
- 3) Heiskanen, A. et al: *Stem Cells*, **25**, 197-202 (2007)
- 4) Kannagi, R. et al: *Cancer Sci.*, **95**, 377-384 (2004)
- 5) Wada, Y.: *Eur. J. Mass. Spectrom. (Chichester, Eng)*, **13**, 101-103 (2007)
- 6) Hardy, M.R., Townsend, R. R.: *Methods Enzymol.*, **230**, 208-225 (1994)
- 7) Jackson, P.: *Anal. Biochem.*, **196**, 238-244 (1991)
- 8) Tateno, H. et al: *Nat. Protoc.*, **2**, 2529-2537 (2007)
- 9) Alvarez-Manilla, G. et al: *Glycobiology*, **17**, 677-687 (2007)
- 10) Kang, P. et al: *Anal. Chem.*, **79**, 6064-6073 (2007)
- 11) Bowman, M. J., Zaia, J.: *Anal. Chem.*, **79**, 5777-5784 (2007)
- 12) Hashii, N. et al: *Proteomics*, **5**, 4665-4672 (2005)
- 13) Yuan, J. et al: *J. Chromatogr. A*, **1067**, 145-152 (2005)
- 14) Watanabe-Fukunaga, R. et al: *Nature*, **356**, 314-317 (1992)
- 15) Adachi, M. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1756-1760 (1993)
- 16) Merino, R. et al: *J. Immunol.*, **151**, 6509-6516 (1993)
- 17) Mizuochi, T. et al: *J. Immunol.*, **145**, 1794-1798 (1990)
- 18) Chui, D. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1142-1147 (2001)
- 19) Green, R.S. et al: *Immunity*, **27**, 308-320 (2007)
- 20) Hashii, N. et al: *Immunology*, in press (2008)
- 21) Hase, S. et al: *J. Biochem.*, **91**, 735-737 (1982)
- 22) Kubelka, V. et al: *Arch. Bioche. Biophys.*, **308**, 148-157 (1994)
- 23) Natsuka, S. et al: *J. Biochem.*, **131**, 807-813 (2002)