

- of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**:21–50.
- 12 Das H, Atsumi T, Fukushima Y *et al.* Diagnostic value of anti-agalactosyl IgG antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2004; **23**:218–22.
 - 13 Raghav SK, Gupta B, Agrawal C, Saroha A, Das RH, Chaturvedi VP, Das HR. Altered expression and glycosylation of plasma proteins in rheumatoid arthritis. *Glycoconj J* 2006; **23**:167–73.
 - 14 Elliott MA, Elliott HG, Gallagher K, McGuire J, Field M, Smith KD. Investigation into the concanavalin A reactivity, fucosylation and oligosaccharide microheterogeneity of alpha 1-acid glycoprotein expressed in the sera of patients with rheumatoid arthritis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; **688**:229–37.
 - 15 Rops AL, van den Hoven MJ, Bakker MA *et al.* Expression of glomerular heparan sulphate domains in murine and human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2007; **22**:1891–902.
 - 16 Chui D, Sellakumar G, Green R *et al.* Genetic remodeling of protein glycosylation *in vivo* induces autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:1142–7.
 - 17 Green RS, Stone EL, Tenno M, Lehtonen E, Farquhar MG, Marth JD. Mammalian N-glycan branching protects against innate immune self-recognition and inflammation in autoimmune disease pathogenesis. *Immunity* 2007; **27**:308–20.
 - 18 Wada Y. Mass spectrometry in the detection and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* 2007; **13**:101–3.
 - 19 Faïd V, Chirat F, Seta N, Foulquier F, Morelle W. A rapid mass spectrometric strategy for the characterization of N- and O-glycan chains in the diagnosis of defects in glycan biosynthesis. *Proteomics* 2007; **7**:1800–13.
 - 20 Miyamoto S. Clinical applications of glycomic approaches for the detection of cancer and other diseases. *Curr Opin Mol Ther* 2006; **8**:507–13.
 - 21 Yuan J, Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Kawanishi T, Hayakawa T. Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005; **1067**:145–52.
 - 22 Alvarez-Manilla G, Warren NL, Abney T, Atwood J III, Azadi P, York WS, Pierce M, Orlando R. Tools for glycomics: relative quantitation of glycans by isotopic permethylation using 13CH₃L. *Glycobiology* 2007; **17**:677–87.
 - 23 Kang P, Mechref Y, Kyselova Z, Goetz JA, Novotny MV. Comparative glycomic mapping through quantitative permethylation and stable-isotope labeling. *Anal Chem* 2007; **79**:6064–73.
 - 24 Bowman MJ, Zaia J. Tags for the stable isotopic labeling of carbohydrates and quantitative analysis by mass spectrometry. *Anal Chem* 2007; **79**:5777–84.
 - 25 Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; **356**:314–7.
 - 26 Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of *lpr* mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**:1756–60.
 - 27 Merino R, Iwamoto M, Fossati L, Izui S. Polyclonal B cell activation arises from different mechanisms in lupus-prone (NZB × NZW)F₁ and MRL/MpJ-*lpr/lpr* mice. *J Immunol* 1993; **151**:6509–16.
 - 28 Homma H, Tozawa K, Yasui T, Itoh Y, Hayashi Y, Kohri K. Abnormal glycosylation of serum IgG in patients with IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2006; **10**:180–5.
 - 29 Hase S, Okawa K, Ikenaka T. Identification of the trimannosylchitobiose structure in sugar moieties of Japanese quail ovomucoid. *J Biochem* 1982; **91**:735–7.
 - 30 Kubelka V, Altmann F, Kornfeld G, Marz L. Structures of the N-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cell lines (Sf-21, IZD-Mb-0503, Bm-N). *Arch Biochem Biophys* 1994; **308**:148–57.
 - 31 Natsuka S, Adachi J, Kawaguchi M, Nakakita S, Hase S, Ichikawa A, Ikura K. Structural analysis of N-linked glycans in *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem* 2002; **131**:807–13.
 - 32 Altmann F, Schwihla H, Staudacher E, Glossl J, Marz L. Insect cells contain an unusual, membrane-bound beta-N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans. *J Biol Chem* 1995; **270**:17344–9.
 - 33 Guo S, Sato T, Shirane K, Furukawa K. Galactosylation of N-linked oligosaccharides by human beta-1,4-galactosyltransferases I, II, III, IV, V, and VI expressed in Sf-9 cells. *Glycobiology* 2001; **11**:813–20.
 - 34 Jeddi PA, Lund T, Bodman KB *et al.* Reduced galactosyltransferase mRNA levels are associated with the agalactosyl IgG found in arthritis-prone MRL-*lpr/lpr* strain mice. *Immunology* 1994; **83**:484–8.
 - 35 Cameron JS. Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**:413–24.
 - 36 Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; **344**:1058–66.
 - 37 Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001; **344**:1140–4.
 - 38 Botto M. Links between complement deficiency and apoptosis. *Arthritis Res* 2001; **3**:207–10.
 - 39 Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, Nagata S. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 2004; **304**:1147–50.
 - 40 Arason GJ, Steinsson K, Kolka R, Vikingsdottir T, D'Ambrogio MS, Valdimarsson H. Patients with systemic lupus erythematosus are deficient in complement-dependent prevention of immune precipitation. *Rheumatology (Oxford)* 2004; **43**:783–9.
 - 41 Cook HT, Botto M. Mechanisms of disease: the complement system and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; **2**:330–7.
 - 42 Gunnarsson I, Sundelin B, Heimburger M, Forslid J, van Vollenhoven R, Lundberg I, Jacobson SH. Repeated renal biopsy in proliferative lupus nephritis – predictive role of serum C1q and albuminuria. *J Rheumatol* 2002; **29**:693–9.
 - 43 Buyon JP, Tamerius J, Belmont HM, Abramson SB. Assessment of disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison of the use of complement split products and conventional measurements of complement. *Arthritis Rheum* 1992; **35**:1028–37.
 - 44 Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol* 2007; **171**:715–27.
 - 45 Sturfelt G. The complement system in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2002; **31**:129–32.
 - 46 Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today* 1994; **15**:67–74.

Differential analysis of N-glycan in the kidney in a SLE mouse model

- 47 Weis WI, Drickamer K, Hendrickson WA. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 1992; **360**:127-34.
- 48 Takahashi M, Mori S, Shigeta S, Fujita T. Role of MBL-associated serine protease (MASP) on activation of the lectin complement pathway. *Adv Exp Med Biol* 2007; **598**:93-104.
- 49 Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996; **17**:532-40.
- 50 Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today* 1994; **15**:67-74.
- 51 Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM *et al*. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997; **386**:506-10.
- 52 Lhotta K, Wurzner R, Konig P. Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1999; **14**:881-6.
- 53 Ohsawa I, Ohi H, Tamano M *et al*. Cryoprecipitate of patients with cryoglobulinemic glomerulonephritis contains molecules of the lectin complement pathway. *Clin Immunol* 2001; **101**:59-66.
- 54 Trouw LA, Seelen MA, Duijs JM *et al*. Activation of the lectin pathway in murine lupus nephritis. *Mol Immunol* 2005; **42**:731-40.
- 55 Jørgensen TN, Gubbels MR, Kotzin BL. New insights into disease pathogenesis from mouse lupus genetics. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**:787-93.
- 56 Lauwerys BR, Wakeland EK. Genetics of lupus nephritis. *Lupus* 2005; **14**:2-12.

Mass spectrometric analysis of carbohydrate heterogeneity for the characterization of glycoprotein-based products

糖タンパク質医薬品の特性・品質評価における
質量分析法を用いた糖鎖不均一性解析

Nana, Kawasaki*; Satsuki, Itoh; Noritaka, Hashii;
Akira, Harazono; Daisuke, Takakura; and Teruhide, Yamaguchi

National Institute of Health Sciences 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501
Tel: 81-03-3700-9074; Fax: 81-03-3700-9084; E-mail: nana@nihs.go.jp

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

Key Words: liquid chromatography/mass spectrometry, glycoprotein, oligosaccharide, glycopeptide

Abstract

Analysis of the carbohydrate heterogeneity of glycoprotein-based substances is crucial for establishing the nomenclature and definition of biological substances, ensuring consistency in the quality of these products, comparatively assessing the products obtained after the implementation of changes in the manufacturing process, and developing biosimilar or follow-on biological products. Liquid chromatography/mass spectrometry is recognized as one of the most useful techniques for analyzing the carbohydrate heterogeneity of glycoprotein substances. Here, we demonstrate the utility of LC/MS for analyzing the carbohydrate heterogeneity by using some representative glycoproteins such as tissue-plasminogen activator, a monoclonal antibody, the follicle-stimulating hormone, and human chorionic gonadotropin. Further, we demonstrate that MS-based glycoprotein analysis has potential applications in glycomics.

A. Introduction

Recent advances in the field of biotechnology have enabled the development of various proteins, protein derivatives, and fusion proteins for use as drugs in medicine. Most biotechnological drugs that have been approved in Japan in 2007 are glycoprotein derivatives; these drugs include Alglucosidase Alfa, Bevacizumab, Darbepoetin Alfa, and Idursulfase (1). The carbohydrate moieties present in most glycoprotein derivatives are known to affect the biological activity of these substances. Glycan analysis is therefore considered important for the characterization and evaluation of the quality of drugs.

Analysis of the carbohydrate heterogeneity of glycoproteins is becoming increasingly important. The heterogeneity of glycan moieties is a crucial factor to be

要約

糖タンパク質医薬品の糖鎖の不均一性解析は、医薬品の命名・定義、品質の恒常性確保、並びに製造方法変更及びバイオ後続品開発の際の同等性・同質性評価において重要である。液体クロマトグラフィー/質量分析法は、糖タンパク質医薬品の糖鎖不均一性解析法として最も有用性の高い分析法の一つとして知られている。本稿では、組織プラスミノゲンアクチベータ、モノクローナル抗体、卵巣刺激ホルモン及びヒト絨毛性腺刺激ホルモンなどの代表的糖タンパク質の分析例を示しながら、糖鎖不均一性解析におけるLC/MSの有用性を概説する。また、質量分析法を用いた糖タンパク質解析法をグライコムクスに適用した例を紹介する。

A. はじめに

遺伝子組換え技術の進展に伴い、様々なタンパク質、タンパク質改変体、あるいは融合タンパク質が医薬品として開発されている。2007年に日本で承認されたバイオ医薬品の多くは、アルグルコシダーゼ アルファ、ベバシズマブ、ダルベポエチン アルファ、及びイデュルスルファゼのような糖タンパク質である(1)。多くの糖タンパク質医薬品の糖鎖が生物活性等に影響を与えることが知られていることから、特性解析や品質評価における糖鎖解析は重要である。

さらに別の側面からも、糖鎖不均一性解析の重要性が認識されるようになってきた。すなわち、糖鎖不均一性は、医薬品を命名・定義する上で重要であるということである。医薬品の名称は、基原や臨床効果に基づき、世界保健機関

considered for establishing the nomenclature and definition of glycoprotein-based substances. The International Nonproprietary Names (INN) committee of the World Health Organization (WHO) proposes names for new drugs on the basis of the origins and clinical effects of the drugs (2). Different names are proposed for drugs containing different amino acid sequences. Glycoproteins that contain identical amino acid sequences but comprise different glycoforms are distinguished from each other by the use of Greek letters such as *alpha* and *beta*. For instance, epoetins, whose amino acid sequences are identical to that of human erythropoietin, are assigned different Greek letters on the basis of differences in their glycoforms. As of 2007, the INN had recognized 9 different epoetins and had assigned them letters from *alpha* to *zeta*. The terms "epoetin *alpha*" and "epoetin *beta*" are used to refer to epoetins consisting of the *alpha* and *beta* glycoforms, respectively; these drugs are marketed as different substances in Japan. However, the degree of glycosylation is known to change during various manufacturing processes; hence, a method for comparative assessment of the degree of glycosylation is required for the development of biosimilar or follow-on biological products as well as for the implementation of changes in the processes adopted for the manufacture of glycoprotein-based products. The establishment of the general criteria to be considered and of a relevant method for analyzing carbohydrate heterogeneity is a high-priority issue related to the manufacture of glycoprotein products in the United States, European Union, and Japan.

The methods most commonly used for analyzing the carbohydrate heterogeneity of glycoprotein substances are high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (3), capillary electrophoresis, fluorescence-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) (4), and high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) (5). Recently, mass spectrometry (MS) has gained popularity as a method for analyzing the carbohydrate heterogeneity of glycoproteins (6). Although MS is advantageous in that it can provide structural information in considerable detail, it has limitations with regard to reproducibility and quantification. Investigations focusing on these limitations should be performed in order to extend the applications of MS to the analysis of glycans in glycoprotein substrates. Here, we demonstrate the utility of MS, especially liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI-MS) for analyzing the carbohydrate heterogeneity in glycoprotein-based substances. Further, we discuss the applications of MS-based analyses in glycomics.

(WHO) の医薬品国際一般名称 (INN) 委員会が命名する (2)。アミノ酸配列が異なる医薬品には、異なる名称が与えられる。ペプチド部分が同一でグリコフォームが異なる医薬品は、名称の後に *alpha* や *beta* などの異なるギリシャ文字が追加されて、区別される。例えば、ヒトエリスロポエチンと同一のアミノ酸配列を持つエポエチンには、グリコフォームの違いで異なるギリシャ文字が与えられており、現在 INN にはアルファからゼータまで 9 種類のエポエチンが記載されている。日本で販売されているエポエチン アルファ及びエポエチン ベータは、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を持つ異なる医薬品である。しかし、グリコフォームは製造工程が変わると変化するため、製造方法の変更やバイオ後続品の開発にあたっては、糖鎖不均一性の同等性・同質性評価が要求される。そのために、米国、ヨーロッパ及び日本において、糖タンパク質医薬品の糖鎖の不均一性をどの程度解析すべきか等の基本的考え方、並びに解析のための適切な方法を確立することが、バイオ後続品開発における重要課題となっている。

糖タンパク質医薬品の糖鎖の不均一性解析法としてよく利用されている方法は、HPLC/蛍光検出法 (3)、キャピラリー電気泳動法、蛍光標識糖鎖電気泳動法 (FACE) (4) 及び高速陰イオン交換クロマトグラフィー/パルス電流検出法 (HPAEC-PAD) (5) であろう。さらに最近、質量分析法 (MS) が不均一性解析に利用されるようになってきた (6)。MS は、多くの構造情報を提供できる点で優れているが、定量性や再現性に問題がある。今後、定量性や再現性について新たな手法が導入されれば、糖鎖試験法としての有用性はさらに広がるものと思われる。本稿では、糖タンパク質の糖鎖不均一性解析法としての MS、特に液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (LC/ESI-MS) の有用性について概説する。さらに、MS をグライコミクスに応用した例についても紹介する。

B. LC/MS of proteolytic glycoproteins

Peptide mapping is performed to confirm amino acid sequences and identify posttranslational modifications for the structural characterization of almost all recombinant proteins, and it is used to test the quality of these substances. In recent studies, LC/MS has frequently been employed for peptide mapping. The MS-based peptide mapping of proteolytic glycoproteins enables not only the analysis of amino acid sequences but also the detection of site-specific glycosylation (7-10). As an example of peptide mapping, here, we describe the MS-based peptide mapping that has previously been performed for tissue-plasminogen activator (t-PA) (11), which is an anticoagulant, and for a monoclonal antibody (12).

1) t-PA

t-PA is a single-chain glycoprotein consisting of 527 amino acid residues (molecular weight (MW): approximately 70,000). It contains 3 potential N-glycosylation sites—at Asn117, Asn184, and Asn448—and is attached to Fuc at Thr61 (Fig. 1) (13,14). The order of domains present in this protein from the N-terminal end is as follows: finger, epidermal growth factor (EGF), kringle 1, kringle 2, and catalytic domains. The single polypeptide is converted to a heterodimer through plasmin-mediated cleavage at Arg275-Ile276. t-PA is rapidly cleared from the blood, and high-mannose-type oligosaccharides that

B. 糖タンパク質消化物の LC/MS

ペプチドマッピングは、タンパク質部分の一次構造や翻訳後修飾を確認するための方法として、多くの遺伝子組換えタンパク質医薬品の特性解析及び品質試験に用いられている。最近では、LC/MS がペプチドマッピングによく利用されるようになってきた。LC/MS を用いて糖タンパク質消化物マッピングを行うと、アミノ酸配列だけでなく、部位特異的な糖鎖の不均一性も同時に確認することができる(7-10)。LC/MS を用いたペプチドマッピングの代表例として、以下に、血栓溶解剤である組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) (11) とモノクローナル抗体(12)のペプチドマッピングを紹介する。

1) t-PA

t-PA は、527 個のアミノ酸残基からなる分子量約 7 万の 1 本鎖糖タンパク質で、分子内の 3 箇所 (Asn117, 184, 448) に N 結合型糖鎖が、また、Thr61 にフコースが結合している (Fig. 1)(13,14)。t-PA は、N 末側から、フィンガードメイン、EGF ドメイン、クリングル 1 ドメイン、クリングル 2 ドメイン、catalytic ドメインから構成されている。t-PA は、プラスミンにより Arg 275-Ile276 が切断されると 2 本鎖 t-PA になる。t-PA は、血中からの消失が早く、肝臓での代謝には、クリングル 1 ドメイン上の Asn117 に結合している高マンノース型糖鎖や EGF ドメインが関与していると考えられている (15,16)。

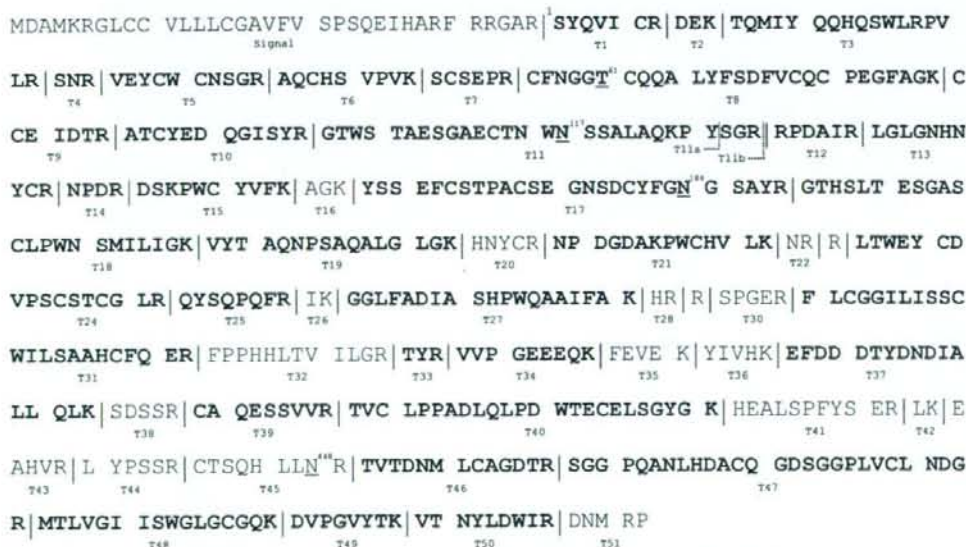


Fig. 1. Amino acid sequences of t-PA and tryptic peptides T1-T51. Boldface type indicates the peptides identified by the database search analysis with the SEQUEST search engine (Thermo Fisher Scientific). Potential N-glycosylation sites are underlined. Thr61 is fucosylated.

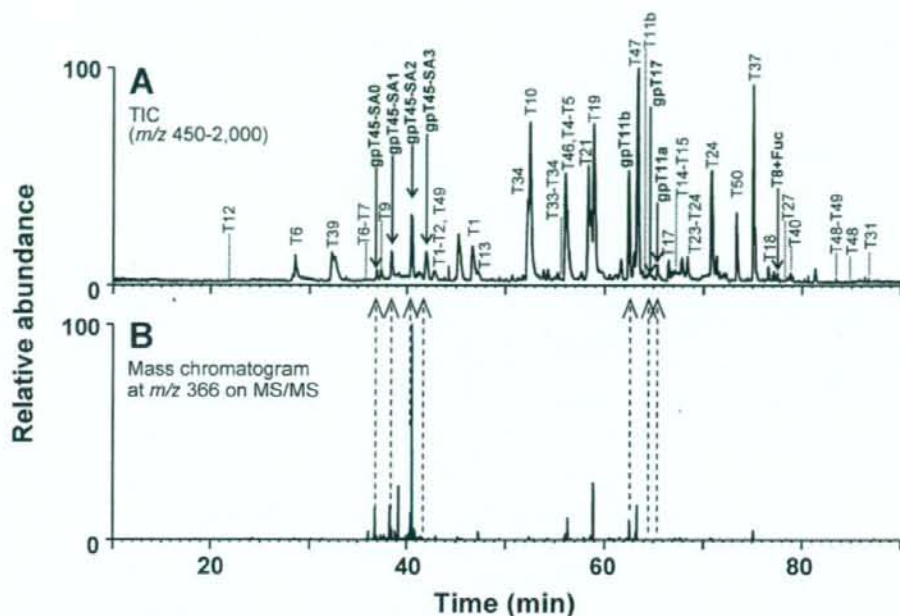


Fig. 2. Mass spectrometric peptide map of tryptic digest of carboxymethylated t-PA from human melanoma cell (Wako Pure Chemical Industries). (A) Total ion chromatogram (TIC) obtained by a single MS scan (m/z 450-2,000) in the positive ion mode. (B) Mass chromatogram at m/z 366 obtained by MS/MS. LC, Paradigm MS4 system (Michrom Bioresources); column, L-column (C18, 150×0.075 mm, $3 \mu\text{m}$, Chemicals Evaluation and Research Institute); flow rate, 300 nl/min; A buffer, 0.1% formic acid/2% acetonitrile; B buffer, 0.1% formic acid/90% acetonitrile; gradient condition, 2-45% of B (100 min); MS, LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific); electrospray voltage, 1.8 kV (positive ion mode).

are present at the Asn117 residues of the kringle 1 and EGF domains are involved in its rapid clearance via the liver (15,16). Site-specific glycosylation analysis as well as amino acid sequencing is important for the characterization of t-PAs. Alteplase, which is marketed worldwide, is a glycoprotein consisting of an amino acid sequence identical to that of human t-PA. Two t-PA analogs (monteplase and pamiteplase) that have been genetically modified in order to prolong their half-life in blood are also marketed in Japan, and 2 other analogs, namely, reteplase and tenecteplase, have been approved in the United States and the European Union (17).

Figure 2A shows a tryptic map of t-PA (derived from human melanoma cells), as observed in a single MS scan. Each peak in the map was identified by running the MSⁿ data that was acquired in a data-dependent manner through a database search (with 85% amino acid coverage). Fucosylated T8 (T8+Fuc), non-glycosylated T11b, glycosylated T11b (gpT11b), and non-glycosylated T17 were successfully identified by using the possible

t-PA はアミノ酸配列だけでなく、部位特異的な糖鎖不均一性の確認が必要な医薬品の一つといえよう。現在、国内外で販売されているアルテプララーゼは、ヒト t-PA と同じアミノ酸配列を持つ糖タンパク質医薬品である。さらに、血中での滞留時間を延長させるために、遺伝子工学的に t-PA を改変した医薬品が国内では 2 品目 (モンテプララーゼ、パミテプララーゼ)、欧米でも異なる 2 品目 (reteplase, tenecteplase) が販売されている (17)。

Fig. 2A に、シングル MS スキャンで得られた t-PA (ヒト黒色腫細胞由来) のトリプシン消化物マップを示す。マップ上の各ピークは、データ依存的に取り込まれた MSⁿ データを用いたデータベース検索によって帰属した (アミノ酸配列の 85% を確認した)。また、Asn に HexNAc (203 Da), Ser/Thr に dHex (146 Da) が結合している可能性を追加してデータベース検索することによって、Fuc 結合 T8 (T8+Fuc)、糖鎖非結合 T11b、糖鎖結合 T11b (gpT11b)、及び糖鎖非結合 T17 を同定することができた。データベース検索では T45 を

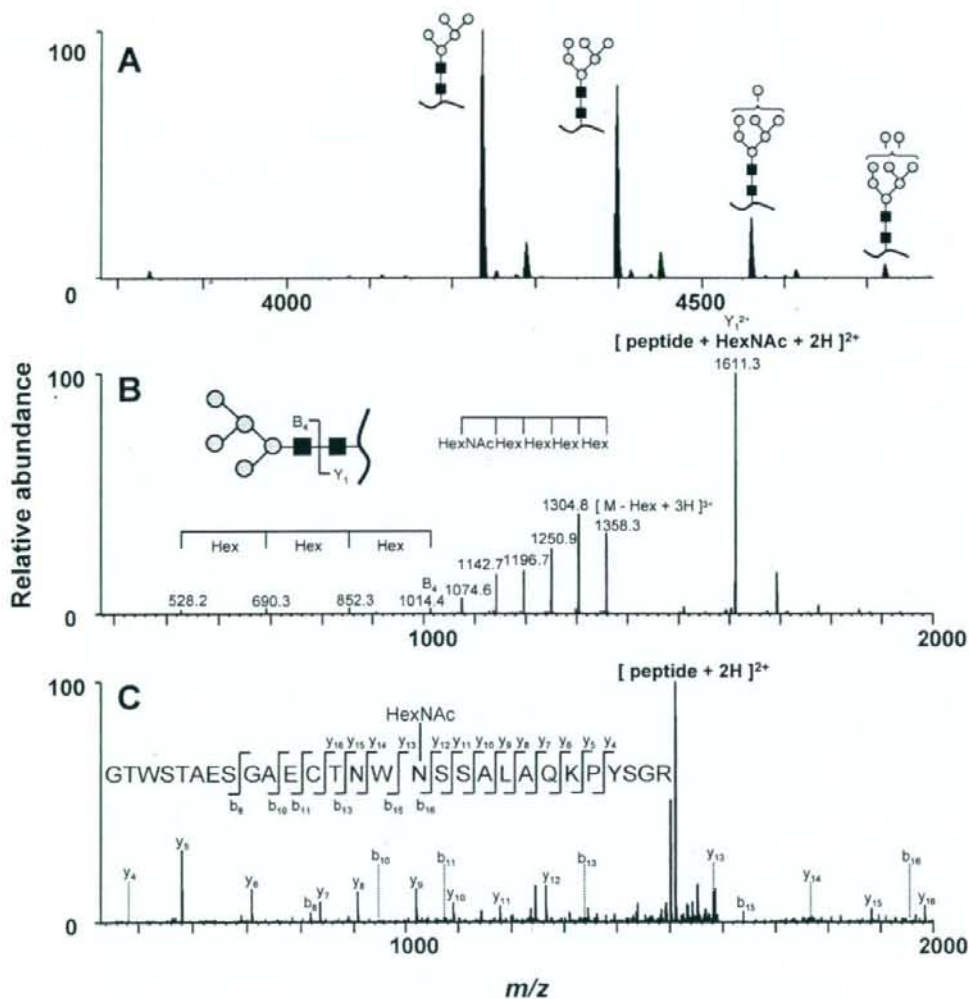


Fig. 3. Mass spectra of glycopeptide T11b. (A) Deconvoluted mass spectrum acquired at elution position of glycopeptides T11b (62.22–62.68 min). (B) MS/MS spectrum acquired from $[M + 3H]^{3+}$ (m/z 1411.94) as a precursor ion. Carbohydrate structure was deduced from the fragment pattern. (C) MS/MS/MS spectrum acquired from $[peptide + GlcNAc + 2H]^{2+}$ (m/z 1611.3) as a precursor ion. The peptide sequence and glycosylation site were identified by the database search analysis.

modifications of HexNAc (203 Da) on Asn and dHex (146 Da) on Ser/Thr. The final peptide, i.e., T45, could not be identified by a database search. However, using the glycan-distinctive Hex,HexNAc $_{1}^{+}$ ions (m/z 366) that yielded peaks in the MS/MS, the acquisition positions of the glycopeptide MS data were mapped (Fig. 2B). The T45 glycopeptides (gpT45) were separated into 4 peaks based on the number of sialic acid residues present in the glycans (gpT45-SA0-SA3).

Figure 3A shows the deconvoluted mass spectrum

特定できなかったが、MS/MSによって生じた糖鎖に特徴的なイオン Hex,HexNAc $_{1}^{+}$ (m/z 366) を用いることによって、糖ペプチドのMSデータが取り込まれている位置を特定することができた (Fig. 2B)。糖ペプチド T45 (gpT45) は、シアル酸結合数によって異なる4つのピークに分離されていた (gpT45-SA0-SA3)。

Fig. 3A は、糖ペプチド gpT11b のマスマスペクトルをデコンボリューションしたものである。主なイオンの計算質量から、高マンノース型糖鎖 (Man-5, -6, -7 及び -8) の結合が

of gpT11b. The linkages of Man-5, Man-6, Man-7, and Man-8 were deduced from the calculated masses of the predominant ions. Figure 3B shows the MS/MS spectrum acquired using $[M+3H]^{3+}$ (m/z 1411.9) as a precursor ion; this spectrum suggests that the attachment of Man-5 is determined by the product ions. MS/MS reveals that peptide fragments attached to the reducing-end GlcNAc residue generally arise from N-glycosylated peptides. Further, MS/MS/MS reveals that these peptide-related ions yield b- and y-ions via cleavage of the peptide backbone (18). The peptide sequence can be deduced by running these fragments through a database search. The ion at m/z 1611.3 in Fig. 3B can be assigned to $[\text{peptide} + \text{GlcNAc} + 2H]^{2+}$ of T11b. As shown in the MS/MS/MS spectrum obtained using the peptide-related ion as a precursor (Fig. 3C), the sequence of peptide T11b could be confirmed from the b- and y-ions arising from the peptide region.

Thus, through the peptide mapping by LC/MS/MS, it was confirmed that Asn117, 184, and 448 of t-PA were attached to high-mannose-type oligosaccharides, monosialylated, biantennary oligosaccharide, and bi- and triantennary oligosaccharides containing 0-3 Neu-Acs, respectively. These results were consistent with those in previous reports.

2) Monoclonal antibody

Monoclonal antibody-derived biological substances are being developed globally, and as of November 2007, the INN had named 144 monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies produced in cells such as CHO cells by biotechnological techniques are now being used as drugs. These antibodies are categorized on the basis of their origin as murine, chimeric, humanized, and human-derived antibodies. In 2007, 3 chimeric antibodies (Basiliximab, Infliximab, and Rituximab) and 5 humanized ones (Tocilizumab, Bevacizumab, Palivizumab, Trastuzumab, and Gemtuzumab Ozogamicin) were approved in Japan. The CH₂ domain in the H-chain of IgGs is commonly attached to an N-linked oligosaccharide. Since the antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of most antitumor drugs derived from IgG1 is influenced by core fucosylation in the N-linked oligosaccharide attached to the CH₂ domain (19), it is necessary to analyze the carbohydrate heterogeneity and to establish a test for glycan characterization in order to apply monoclonal antibody-based drugs. The test for glycan characterization could be replaced with an *in vivo* assay if the glycan profile is found to be strongly associated with the *in vivo* activity of the drug. The establishment of a quantitative and qualitative method for glycan characterization that can be used as an alternative to animal experiments is crucial for the development of glycoprotein-based drugs.

Fig. 3Bは、 $[M+3H]^{3+}$ (m/z 1411.9)を前駆イオンとして得られたMS/MSスペクトルで、生じたフラグメントから、Man-5であることが確認された。N結合型糖鎖付加ペプチドのMS/MSでは、ペプチドに還元末端GlcNAcが結合したイオンが生じることが多い。これらのペプチド関連イオンを前駆イオンとしてさらにMS/MS/MSを行うと、ペプチド部分が開裂してb-及びy-イオンが生じる(18)。これらのフラグメントを使ってデータベース検索すると、ペプチドの配列を推定することができる。Fig. 3Bでは、 m/z 1611.3のイオンをT11bの $[\text{peptide} + \text{GlcNAc} + 2H]^{2+}$ と帰属することができる。Fig. 3Cは、このイオンを前駆イオンとして得られたMS/MS/MSスペクトルである。ペプチド部分から生じたb-及びy-イオンから、ペプチドT11bの配列を確認できる。

以上のようにLC/MS/MSを用いたペプチドマッピングによって、t-PAのAsn117, 184, 及び448にそれぞれ高マンノース型糖鎖、モノシリアル2本鎖型糖鎖、及びシアル酸を0-3個含む2及び3本鎖型糖鎖が結合していることが確認された。この結果は、既知の結果とよく一致している。

2) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体を基原とする医薬品の開発が世界中で進められており、2007年11月現在、INNに144品目が収載されている。現在医薬品として用いられているモノクローナル抗体は、遺伝子組換え技術によってCHO細胞などを用いて製造されたものである。モノクローナル抗体は基原によって、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体などに分類される。現在国内では、キメラ抗体3品目(バシリキシマブ、リツキシマブ、インフリキシマブ)及びヒト化抗体5品目(トシリズマブ、ベバシズマブ、パリシズマブ、トラツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン)が承認されている。IgGのH鎖のCH₂ドメインには共通してN結合型糖鎖が結合している。この位置に結合しているN結合型糖鎖のコアフコースの有無は、IgG1を基原とする抗腫瘍薬の抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)に影響を及ぼすことから(19)、このようなモノクローナル抗体の承認申請にあたっては、糖鎖不均一性解析と糖鎖試験法の設定が必要になるだろう。特に、糖鎖試験の結果と*in vivo*活性試験の間に相関がある場合は、糖鎖試験法を*in vivo*活性試験におきかえられる可能性があり、動物実験代替法として、糖鎖を定性的かつ定量的に分析する試験法を設定することは重要であろう。

Fig. 4Aは、あるモノクローナル抗体製剤のトリプシン消化物マップである。32分前後に検出されているピークがH鎖

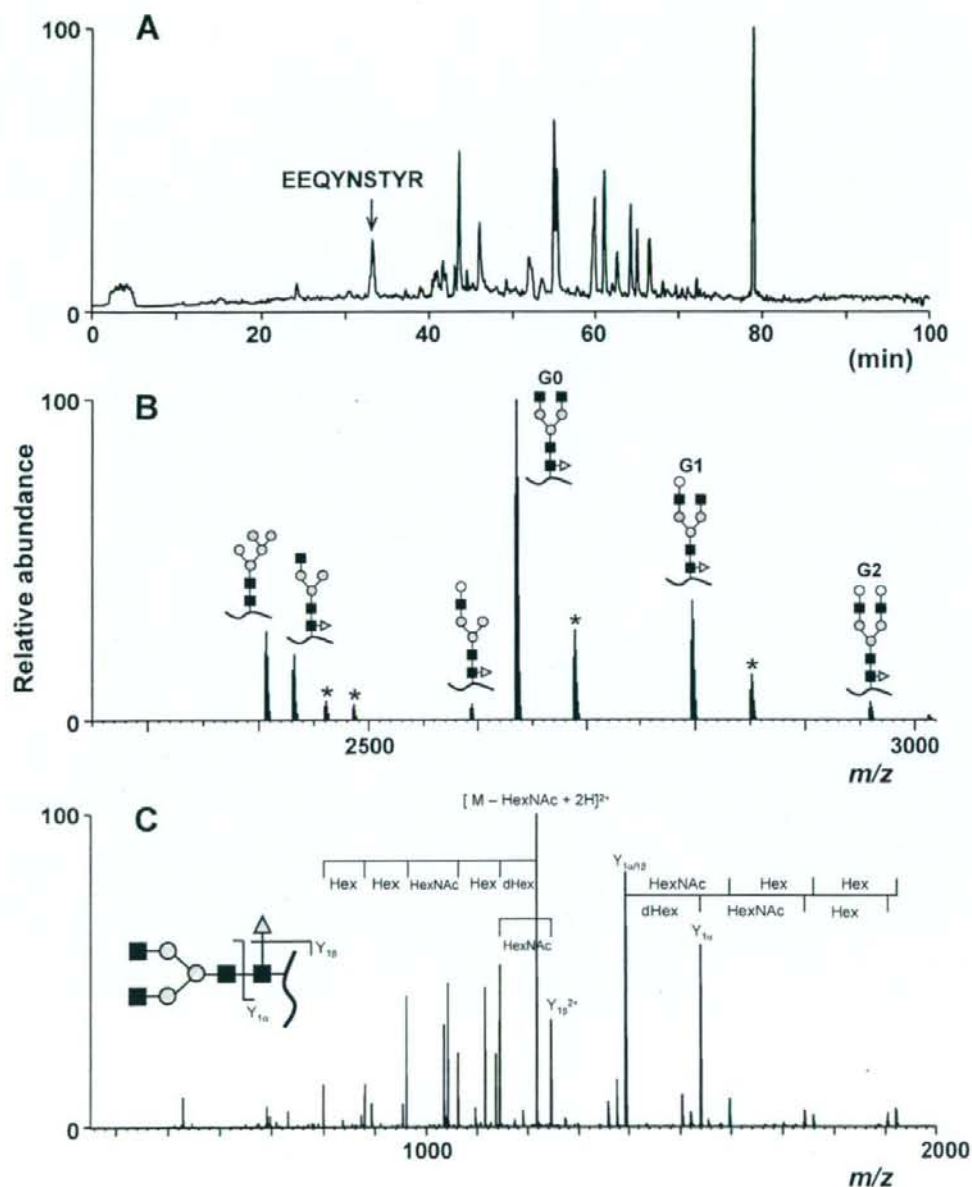


Fig. 4. Mass spectrometric peptide map of tryptic digest of the carboxymethylated monoclonal antibody. (A) TIC obtained by single MS scan (m/z 450-2,000) in the positive ion mode. (B) Deconvoluted mass spectrum at the elution position of the glycopeptides (32.57-33.66 min). * Non-glycopeptide signal (C) Representative MS/MS spectrum acquired from $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1318.04) as a precursor ion. Analytical condition: see Fig. 2.

Figure 4A shows the tryptic map of a commercially available monoclonal antibody-based drug. The peak detected at 32 min was assigned to the glycopeptide derived

に由来する糖ペプチドのピークと帰属された。このペプチドに結合している糖鎖は、デコンホリユーションしたマスマスペクトル上のプロトン化分子の計算質量から、Man-5及び2本

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、アガクトシル 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胞刺激ホルモン (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。

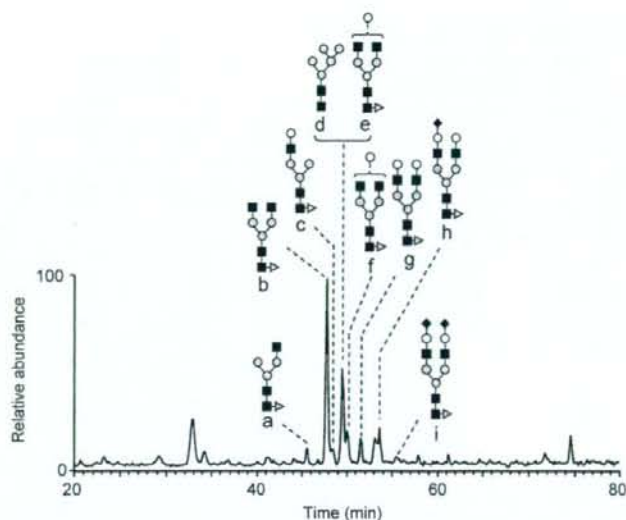


Fig. 5. N-linked oligosaccharide profile of the monoclonal antibody product. LC, nanoFrontier nLC system (Hitachi High-Technologies); Column, Hypercarb (150 × 0.075 mm, 5 μm, Thermo Fisher Scientific); flow rate, 200 nL/min; A buffer, 5 mM ammonium acetate/2% acetonitrile (pH 9.6); B buffer, 5 mM ammonium 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 ^a	
		Oligosaccharide	Glycopeptide
a		4.4	8.4
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	
h		1.8	—
i		1.6	—

^a 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 α -chain consisting of 92 amino acid residues and a β -chain consisting of 111 amino acid residues. The α -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 α - and β -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 α 鎖1分子と111個のアミノ酸残基からなる β 鎖1分子から構成されている。 α 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。 α 鎖及び β 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

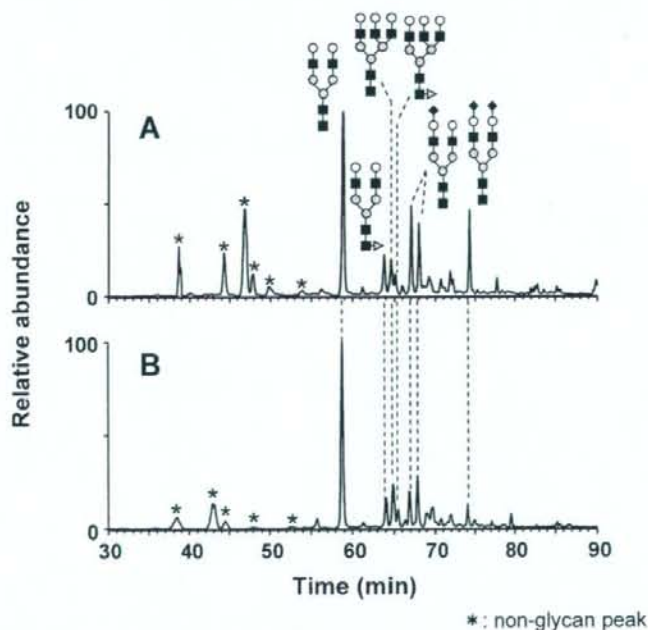


Fig. 6. N-linked oligosaccharide profiles of Follitropin Alfa (A) and Beta (B). Analytical condition: see Fig. 5.

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

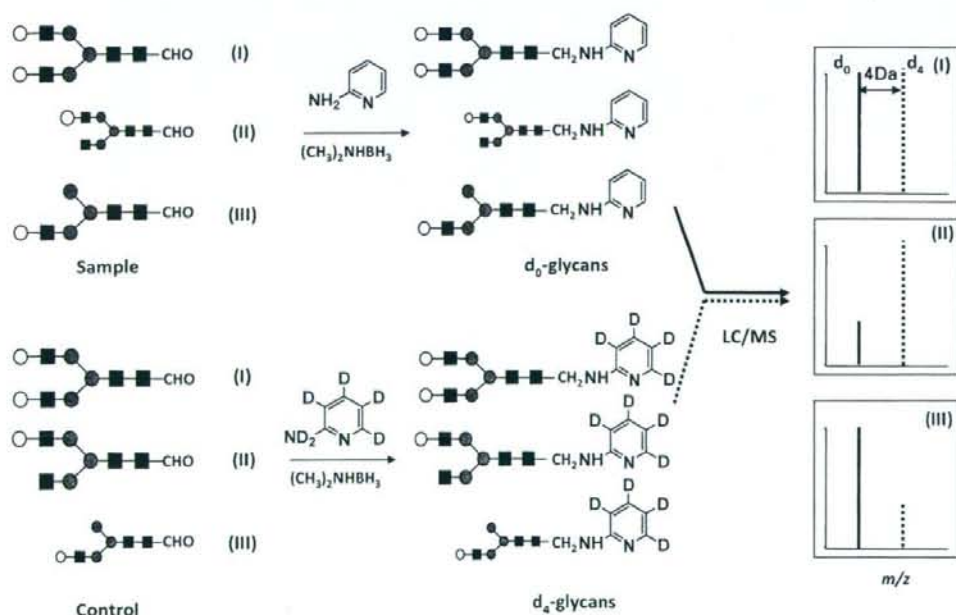


Fig. 7. The quantitative glycan profiling by using the stable isotope tagging method and LC/MS. (I) sample = control, (II) sample < control, (III) sample > control.

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 α -chain, which is identical to that of FSH, and a β -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、ビリジリ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リアミノ化糖鎖 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 α 鎖と 145 個のアミノ酸残基からなる β 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 本鎖糖鎖のマスキロマトグラムを 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。

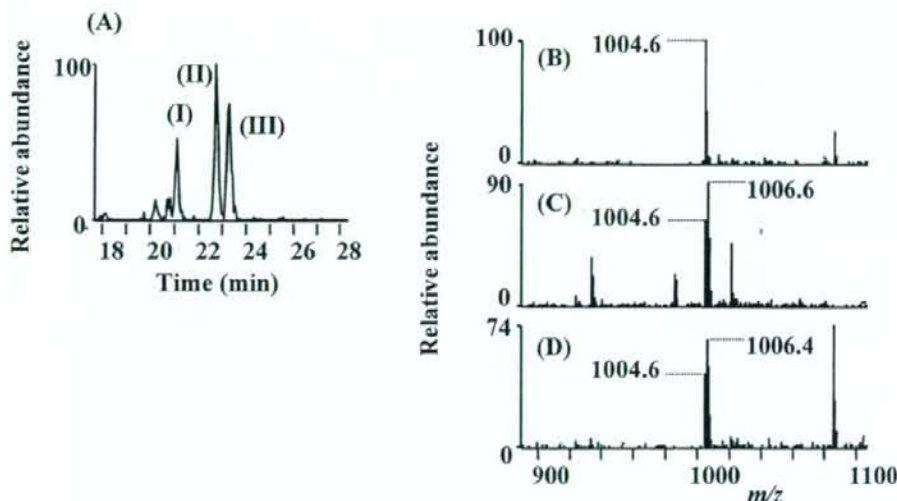


Fig. 8. (A) (24) Mass chromatogram of d_0 - and d_4 -PA monosialylated complex type biantennary. (B)-(D) Mass spectra of peaks (I)-(III), respectively. Intensity of the most intense ion at each scan is taken as 100%. LC, Magic 2002 HPLC system (Michrom BioResources); column, Hypercarb (150 \times 0.2 mm, 5 μ m); flow rate, 2 μ 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 α -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ッ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 α 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

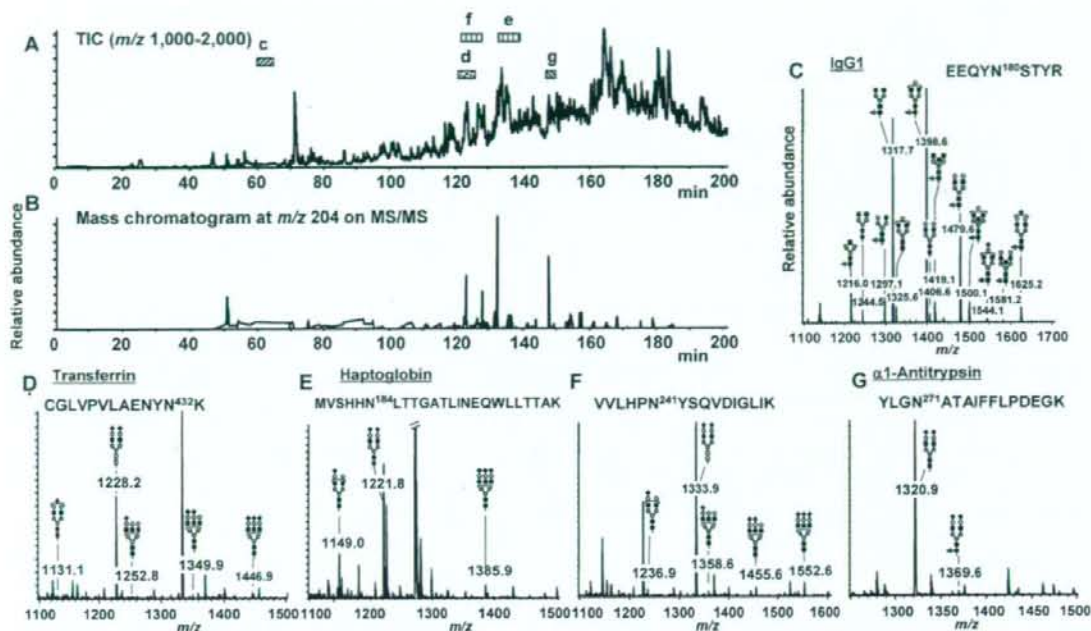


Fig. 9. LC/MS/MS of tryptic digest of human serum (45). (A) TIC (m/z 1,000–2,000). (B) Mass chromatogram (m/z 204) obtained by the data-dependent MS/MS. (C) Mass spectra of IgG1 (P01857), EEQYN¹⁸⁰STYR; (D) transferrin (P02787) CGLVPVLAENYN⁴³²K; (E) haptoglobin (P00738), MVSHHN¹⁸⁴LTTGATLINEQWLLTTAK; (F) haptoglobin, VVLHPN²⁴¹YSQVDIGLIK; (G) α 1-antitrypsin (P01009), YLGN²⁷¹ATAIFFLPDEGK. LC, Paradigm MS4 HPLC system; Column, MonoCap High-Resolution 750 (750 \times 0.2 mm, GL Sciences); flow rate, 2 μ 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 μ 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]⁺ or [peptide + HexNAc + H]⁺. 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 μ 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⁺ (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]⁺ または [peptide + HexNAc + H]⁺ 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 EEQYN¹⁸⁰STYR のマススペクトルで、

tra of glycopeptides in tryptic serum. Figure 9C shows the mass spectrum of EEQYN¹⁸⁰STYR derived from IgG1, which contains the protonated molecules of agalactosyl, mono- and digalactosyl biantennary oligosaccharides. Figure 9D shows the mass spectrum of CGLVPVLAENY N⁴³²K 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 α 1-antitrypsin glycopeptide (YLG²⁷¹ATIAFFLPDEGK) 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, α mannosidase-II (α 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 d₀-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 N⁴³²K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、 α 1-アンチトリプシン由来のペプチドYLG²⁷¹ATIAFFLPDEGK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、 α -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、d₀-PA糖鎖とした。これに、対照マウス(MRL-+/+)腎臓から調製したd₀-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、d₀-及びd₀-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失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

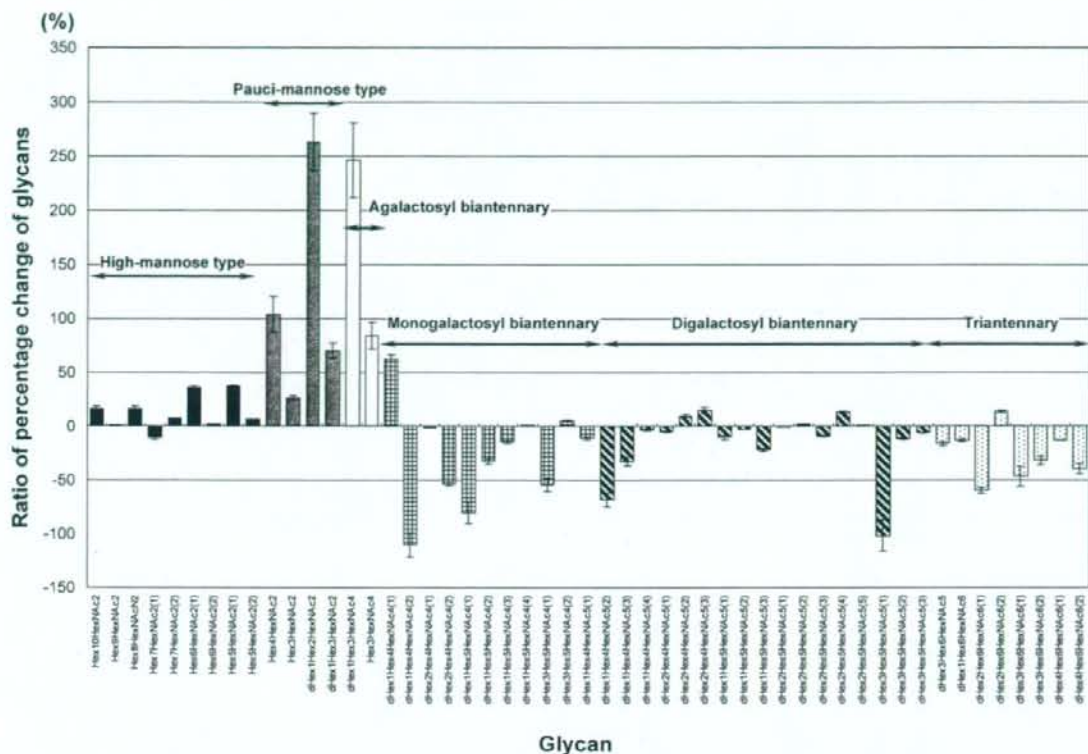


Fig. 10. Rate of percentage change in d_0/d_4 -glycans (59). Each value is the average from three biological repeats. The error bars correspond to the standard deviation. LC, Magic 2002 HPLC system; Column, Hypercarb (150 × 0.2 mm, 5 μ m); flow rate, 2 μ l/min; A buffer, 5 mM ammonium acetate/2% acetonitrile (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. Wuhler, 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