

糖鎖含有タンパク製剤の品質評価試験法に関する研究 (II)  
— エリスロポエチン製剤 その2

川崎ナナ<sup>#</sup>・太田美矢子・日向須美子・橋本 統  
森本和滋・早川堯夫

Study on evaluating methods for the quality control of glycoprotein products. (II)  
— Erythropoietin products. Part 2

Nana Kawasaki<sup>#</sup>, Miyako Ohta, Sumiko Hyuga, Osamu Hashimoto,  
Kazushige Morimoto and Takao Hayakawa

Using recombinant human erythropoietin (rh-EPO) from three different sources, the usefulness of HPAEC-PAD (high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection) for evaluation of carbohydrate moieties of rh-EPO products was evaluated. It is well known that *in vivo* bioactivity and metabolic fate of EPO are dependent on the number of sialic acids and the degree of branching in the carbohydrate moieties. Here we show that HPAEC analysis reveals differences in the number of sialic acids as well as in the structure of desialylated *N*-glycans among the rh-EPO products. Therefore, HPAEC is useful for evaluation of the quality of rh-EPO products.

**Keywords:** erythropoietin, HPAEC-PAD, quality control

緒 言

バイオテクノロジーを応用した医薬品開発の進展はめざましく、生理活性を有する様々な糖タンパク質が新薬あるいは関連医薬品として開発・製造されている。遺伝子組換え糖タンパク質において、タンパク質部分の一次構造は挿入遺伝子によって決定されるが、糖鎖部分の構造は、生産細胞が有する糖転移酵素群の発現状況に依存するため、細胞の種類、発現方法、培養条件などの要因によって左右されること、また、糖タンパク質の各糖鎖結合部位に結合している糖鎖の構造には、常に多かれ少なかれ不均一性が存在することが知られている。さらに、糖鎖部分の構造は、生物活性、体内動態および安定性等に大きく寄与していることが明らかにされており、糖鎖含有タンパク製剤を評価するにあたって、糖鎖部分の分子多様性を正しく解析することが必要であるとされている<sup>1,2)</sup>。しかし、糖鎖構造解析には、依然として長い時間と特別な技術が必要とされており、迅速かつ簡便な標準的試験法の確立が期待されている。

エリスロポエチン (EPO) は、赤芽球細胞の増殖分化に不可欠な糖鎖含有造血ホルモんで、組換え型ヒト

EPO (rh-EPO) は、多くの透析患者によって貧血治療薬として用いられている。EPO には、3本の *N*-結合型糖鎖と1本の *O*-結合型糖鎖が結合しており、特に、*N*-結合型糖鎖は EPO の生物活性ならびに体内挙動に大きく関与していることが報告されている<sup>3)</sup>。筆者らは、前報において<sup>4)</sup>、HPAEC-PAD (High-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection) を用いて2種の rh-EPO の糖鎖を分析し、HPAEC は rh-EPO のシアロ糖鎖の分布を解析する手段として有用であることを示した。今回は、HPAEC を用いて、3種の rh-EPO の糖鎖部分についてシアロ糖鎖およびアシアロ糖鎖の分析を行い、EPO 製剤の糖鎖部分の評価法としての HPAEC 法の有用性についてさらに検討した。

実験方法

1. 試 薬

3種の rh-EPO はキリンビール(株)社、中外製薬(株)社並びに雪印乳業(株)社より供与された (rh-EPO-A, rh-EPO-B および rh-EPO-C と記す (順不同))。50%水酸化ナトリウム溶液は、フィッシャーケミカル(株)社製を、酢酸ナトリウムは、和光純薬(株)社製を用いた。また、*N*-グリコシダーゼ F およびシアリダーゼはそれぞれペーリンガーマンハイム(株)社およびナカライテスク(株)社のもを使用した。

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Nana Kawasaki; Kamiyoga 1-18-1 Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel:03-3700-9074; Fax:03-3707-6950; E-mail:nana@nihs.go.jp

## 2. 装 置

HPAEC : ダイオネックスイオンクロマトグラフィーステム DX-300

検出器 : ダイオネックスパルスドエレクトロケミカル検出器 (PED)

## 3. N-結合型シアロ糖鎖の遊離

rh-EPO (200  $\mu$ g) を200  $\mu$ l の10 mM 酢酸アンモニウム溶液, pH 8.5に溶解させ, N-グリコシダーゼF (660 mU) を37  $^{\circ}$ Cで20時間反応させた。反応終了後, 440  $\mu$ l の冷エタノールを加えて4  $^{\circ}$ Cで24時間放置した。オリゴ糖を上清として回収し, 遠心濃縮装置を用いて乾固した。200  $\mu$ l の蒸留水を加えて試料溶液とし, その25  $\mu$ l をHPAECで分析した。

## 4. アシアロ糖鎖の調製

上記で調製したN-結合型シアロ糖鎖溶液100  $\mu$ l にシアリダーゼ20 mUを加えて37 $^{\circ}$ C18時間反応させた。つぎに, ACIPLEX カートリッジ AC-230-10を用いたマイクロアライザーS1 (旭化成(株)製)により遊離シアル酸を一部除去し, 遠心濃縮装置を用いて試料を乾固した。200  $\mu$ l の蒸留水を加えて試料溶液とし, 10  $\mu$ l をHPAECに注入した。

## 5. シアロ糖鎖およびアシアロ糖鎖の HPAEC

カラム : PA-1カラム (ダイオネックス社製, 0.46 x 25 cm)

溶離液 A : 100 mM NaOH

溶離液 B : 100 mM NaOH

500 mM 酢酸ナトリウム

グラジエントプログラム

アシアロ糖鎖の分析 : B液 0~30% (0~25分)

シアロ糖鎖の分析 : B液 6~40% (0~100分)

流速 : 1 m l /min

印加電圧プログラム :

E<sub>1</sub> : 0.05 V t<sub>1</sub> = 480 ms

E<sub>2</sub> : 0.6 V t<sub>2</sub> = 120 ms

E<sub>3</sub> : -0.6 V t<sub>3</sub> = 60 ms

ポストカラム試液 : 500 mM NaOH

ポストカラム試液流速 : 0.8 m l /min

## 結 果

### 1. シアロ糖鎖の HPAEC

3種のrh-EPO (rh-EPO-A, rh-EPO-B およびrh-EPO-C) をN-グリコシダーゼFで処理し, 遊離されたN-結合型シアロ糖鎖をHPAEC-PADを用いて分析した。前報<sup>4)</sup>で用いた分離条件は, シアル酸結合数の違いを比較するには充分であったが, シアル酸結合数が同じである糖鎖間の分離には不十分であったため, 今回は異なる分離条件を用いた。その結果得られたクロマトグラムを Fig. 1 に示す。また, 各クロマトグラム中のピークには, 保持時間の早い

順に1から14の番号を付けた。まず, HPAECによって3種のEPOの糖鎖は, いずれもオリゴ糖あたりのシアル酸結合数の違いによってピークが大きくわかれることが確認された。さらに, 各クロマトグラムのジシアロ糖鎖, トリシアロ糖鎖およびテトラシアロ糖鎖の溶出位置にそれぞれいくつかのピークが検出され, HPAECによってEPO糖鎖は, シアル酸結合数が同じ糖鎖間においても構造の違いによって分離されることが確認された。また, 各EPO糖鎖の溶出パターンを比較することによって, rh-EPO-A と rh-EPO-B に結合している糖鎖はほぼ同じ種類のものであること, 一方, rh-EPO-Cについては, テトラシアロ糖鎖の分布 (ピーク9~14) はrh-EPO-A およびrh-EPO-B のテトラシアロ糖鎖の分布と類似しているが, トリシアロ糖鎖およびジシアロ糖鎖部分 (ピーク3~8) に違いがあることが明らかになった。

つぎに, 各EPOにおいて, Fig. 1 で得られたピーク1から14の面積比を比較したところ, rh-EPO-A およびrh-EPO-B は, 構成糖鎖の種類は同じであるが, 糖鎖の構成比に差があることが明確となり, rh-EPO-A はジシアロ糖鎖およびトリシアロ糖鎖の割合が高く, rh-EPO-B はテトラシアロ糖鎖の割合が高いことが確認された (Fig. 2)。また, rh-EPO-C は, 他のEPOよりテトラシアロ糖鎖の割合が高いことが明らかになった。

### 2. アシアロ糖鎖の HPAEC

各EPO糖鎖をシアリダーゼで処理し, 得られたアシアロ糖鎖をHPAECで分析したところ, Fig. 1 で認められた多数のピークはいくつかのピークに集約されることが確認され, 各EPO糖鎖のマイクロ不均一性は, シアル酸の結合状態の違いに起因するところが大きいことが示唆された (Fig. 3)。3種のEPO由来アシアロ糖鎖の溶出パターンを比較すると, シアロ糖鎖の分布が類似していたrh-EPO-A およびrh-EPO-B 由来糖鎖は, アシアロ糖鎖においても類似した溶出パターンを示すことが確認された。また, rh-EPO-Cからは, rh-EPO-A やrh-EPO-B には認められないピークも検出され, HPAECを用いることによって, EPOに結合している糖鎖について, シアル酸の結合状態の違い以外の構造変化を調べることができると確認された。

## 考 察

EPOの糖鎖部分は, 生物活性, 体内動態及び安定性に影響を及ぼすことが報告されている<sup>1)</sup>。特にシアル酸については, EPOの *in vivo* 活性はシアル酸含量が増加するにつれて増加すること<sup>3,7)</sup>。また,  $\alpha$ 2,6-sialyltransferaseを用いて糖鎖の非還元末端にシアル酸を導入することによって活性が増大することから<sup>7)</sup>。シアル酸結合数が大きいほど活性が高いことが明らかにされている。さらに, 2本鎖糖鎖の割合が高いEPOは, 4本鎖糖鎖に富むEPOに比

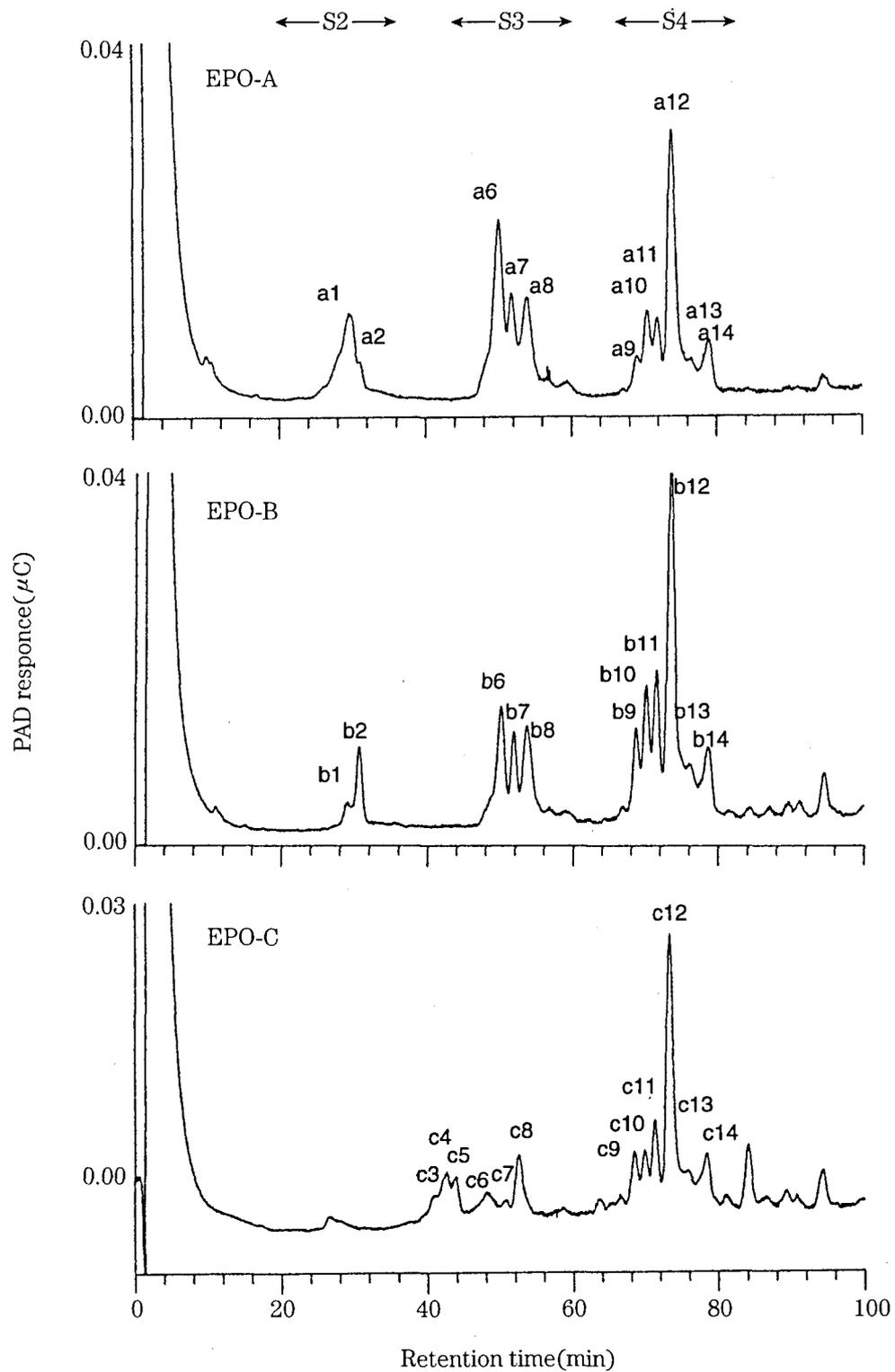


Fig. 1. HPAEC analysis of sialo-*N*-linked oligosaccharides from rh-EPO-A, rh-EPO-B and rh-EPO-C  
S2, disialylated oligosaccharides; S3, trisialylated oligosaccharides; S4, tetrasialylated oligosaccharides.

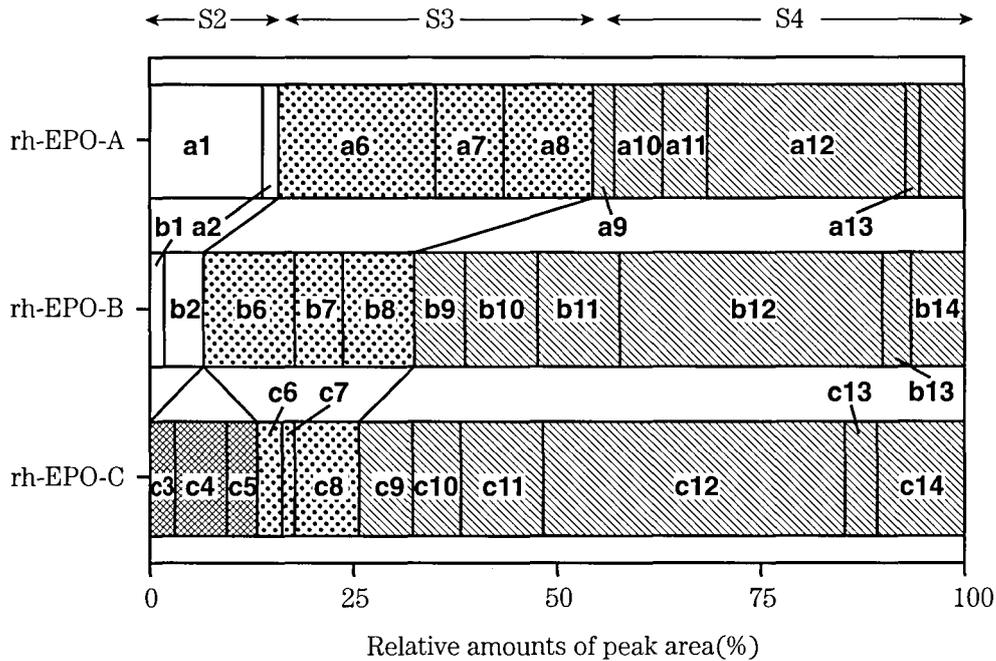


Fig. 2. Relative amounts of peak areas in rh-EPO-A, rh-EPO-B and rh-EPO-C. Peaks a1-a14, b1-b14 and c1-c14; see Fig. 1.

べて腎臓に移行する割合が高いことが見出され、分岐構造が体内動態に大きく影響を与えることが示唆されている<sup>5,6)</sup>。以上のことから、EPO製剤の品質を確保するためには、シアロ糖鎖と分岐鎖数の違いを質的量的に分析できる方法を確立することが必要であると考えられる。今回、3種類のrh-EPOに由来する糖鎖を分析することによって、HPAECは、発現細胞の違い、あるいは培養条件等の違いによって生じた糖鎖構造の相違を、シアル酸結合数の違いに基づいて解析できることが明らかになった。また、HPAECにおいて、糖鎖はシアル酸結合数だけでなく、フコースの有無や分岐及び結合位置の違い等によって分離されることが報告されており<sup>8,9)</sup>、HPAECによるEPOのアシアロ糖鎖の溶出パターンは、分岐鎖数等の違いも反映しているものと思われる。以上のことから、EPOのシアル酸結合数と分岐構造等の変化を解析できるHPAECは、EPOの糖鎖部分の評価法として有用であると考えられる。EPO製剤の糖鎖部分のシアル酸結合数や分岐鎖数を解析する方法として、トリチウム標識化または2アミノベンズアミドなどで標識化された糖鎖を各種クロマトグラフィーを用いて解析する方法<sup>10)</sup>や、糖鎖自動解析装置の導入<sup>9)</sup>が検討されている。これらの方法と比較すると、HPAECは、PAD検出において各糖鎖が示すピーク強度が糖鎖の種類によって多少異なるため、ピーク面積比が糖鎖の構成比に必ずしも一致しないという欠点があるが、特別な標識法を必要とせず、簡便、迅速に、しかも比較的高感度でEPO活性に関与しているシアル酸結合状態および分岐構造を解析できることから、品質評価ならびに品質管理において糖

鎖構造のマイクロ不均一性および恒常性を確認する方法として有用な方法であると考えられる。さらに、他の糖タンパク質においても、非還元末端のシアル酸が活性やクリアランスに影響を及ぼしている例が報告されており<sup>1)</sup>、今後、HPAECが他の糖鎖含有タンパク製剤の糖鎖部分の評価にも応用されることが期待される。

#### 謝 辞

本研究は、ヒューマンサイエンス基礎研究事業の支援を受けて行われたものである。

#### 文 献

- 1) 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, アハメド・アブド・サイド, 徳永裕司, 春日井 勲, 早川堯夫: 医薬品研究, **25**, 405-425 (1994)
- 2) 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, アハメド・アブド・サイド, 徳永裕司, 春日井 勲, 早川堯夫: 医薬品研究, **25**, 501-523 (1994)
- 3) Imai, N., Higuchi, M., Kawamura, A., Tomonoh, K., Oh-eda, M., Fujiwara, M., Shimonaka, Y. and Ochi, N.: *Eur. J. Biochem.*, **194**, 457-462 (1990)
- 4) 川崎ナナ, 森本和滋, 早川堯夫: 衛生試験, **113**, 69-73 (1995)
- 5) 早川堯夫: 平成7年度ヒューマンサイエンス基礎研究事業官民共同プロジェクト研究報告, 第2分野, 65-74 (1996)
- 6) 早川堯夫: 平成8年度ヒューマンサイエンス基礎研究事業官民共同プロジェクト研究報告, 第2分野, 51-60 (1997)
- 7) Morimoto, K., Tsuda, E., Said, A. A., Uchida, E., Hatakeyama, S., Ueda, M. and Hayakawa, T.: *Glyco-*

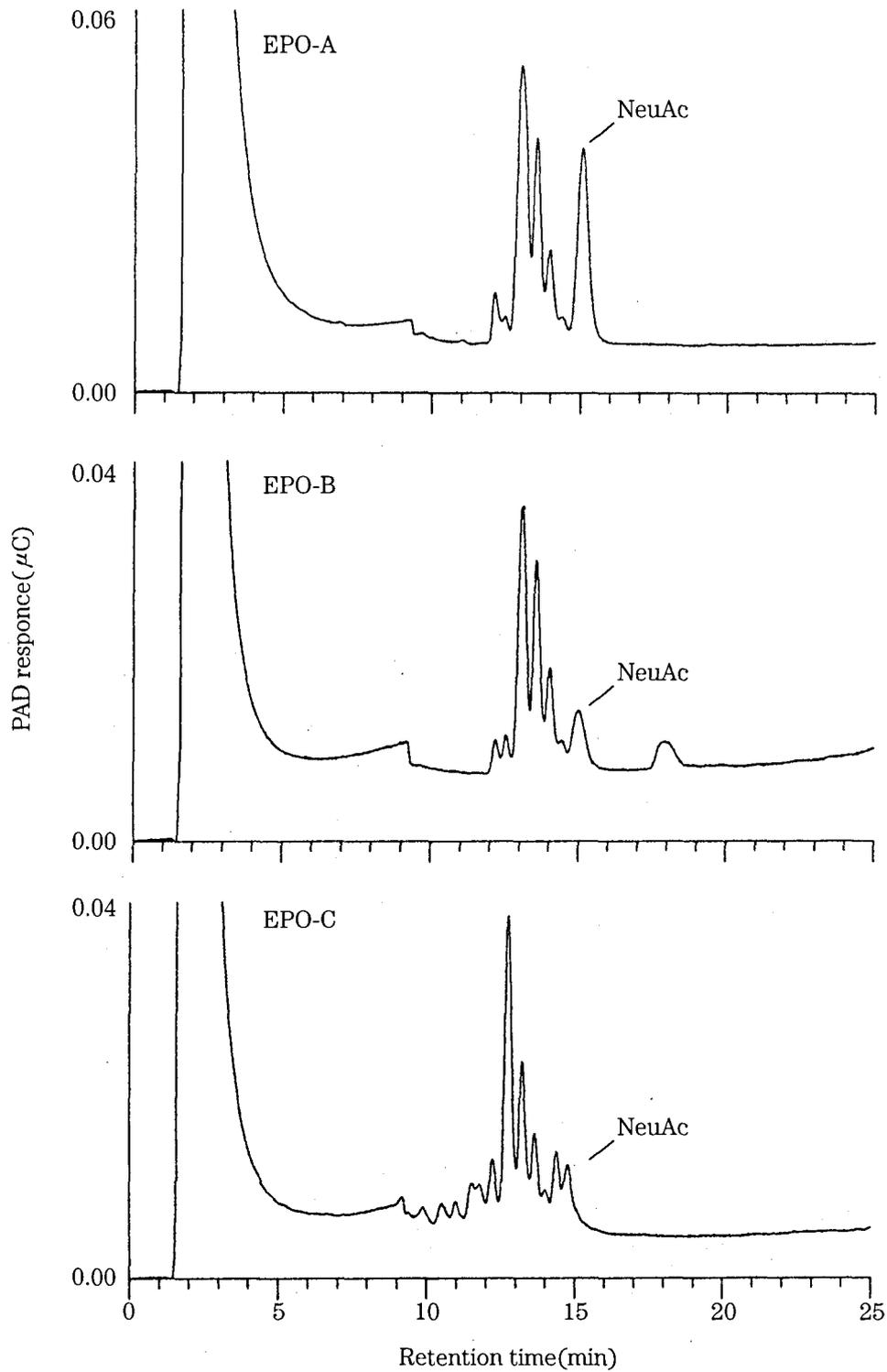


Fig. 3. HPAEC analysis of asialo-N-linked oligosaccharides from rh-EPO-A, rh-EPO-B and rh-EPO-C

*conjugate J.*, **13**, 1013-1020 (1996)

8) Lee, Y. C.: *Anal. Biochem.*, **189**, 151-162 (1990)

9) Lee, Y. C.: *J. Chromatogr. A*, **720**, 137-149 (1996)

10) 早川堯夫：平成9年度ヒューマンサイエンス基礎研究  
事業官民共同プロジェクト研究報告，第2分野  
(1998)印刷中