

## 糖鎖含有タンパク製剤の品質評価試験法に関する研究 (III)

## — エリスロポエチン製剤 その 3

伊藤さつき#, 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫

## Study on evaluating methods for the quality control of glycoprotein products. (III)

## — Erythropoietin products. Part 3

Satsuki Itoh#, Nana Kawasaki, Miyako Ohta,  
Masashi Hyuga, Sumiko Hyuga and Takao Hayakawa

We reported previously that peptide mapping using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry (LC/MS) and liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) are useful for determination of the glycosylation sites, carbohydrate structure, and site-specific carbohydrate heterogeneity of glycoproteins. Here, with intention to enhance the sensitivity and shorten the time-span of analysis to characterize glycoproteins, especially biotechnological products with carbohydrate moieties, we studied the introduction of HPLC with a microbore column to LC/MS with recombinant erythropoietin (rh-EPO). In addition, we evaluated the ability of LC/MS/MS precursor-ion scanning to make identification of glycopeptides and facilitate the analysis of carbohydrate moieties. We found that the peptide mapping with microbore HPLC is highly sensitive and more rapid than the previous method, and the precursor-ion scanning is helpful for identifying glycopeptides. Our results indicate that these methods are very useful for characterization and quality control of the carbohydrate moieties of biotechnological products.

Keywords: erythropoietin, LC/MS, LC/MS/MS, precursor-ion scan, quality control

## 緒言

近年、バイオテクノロジーを応用し、生理活性をもつ多くの糖タンパク質が、医薬品として、開発・製造されている。遺伝子組換えにより生産された糖タンパク質の糖鎖部分の構造は、産生細胞の種類、発現方法、培養条件等によって異なり、不均一性を示すことが知られている。また、糖鎖部分の構造は、生物活性、体内動態及び安定性に深く関わっていることも報告されている<sup>1)~3)</sup>。したがって、糖タンパク質の糖鎖部分の構造解析法を開発することは、糖タンパク質性医薬品の特性を解析するためだけでなく、品質を確保していくためにも重要な課題となっている。

エリスロポエチン (EPO) は、腎臓で産生される赤血球前駆細胞の分化増殖を調節する糖タンパク質であり、現在、組換え型ヒト EPO (rh-EPO) が、貧血治療を目的に使用されている。EPO には、Asn24, 38 及び 83 に結合する *N*-結合型糖鎖が 3 本と Ser126 に結合する *O*-結合型糖鎖が 1 本存在し、*N*-結合型糖鎖は、その生物活性や体内動態に深く関係していることが報告されている<sup>4), 5)</sup>。そのため、結合糖鎖の構造と分布を明らかにすることはもちろんのこと、各結合部位

の糖鎖の不均一性を解析することは、非常に重要である。

各結合部位の糖鎖不均一性の解析法として、我々は、LC/MS を用いたペプチドマッピング法を検討し、rh-EPO の糖鎖結合部位、各部位に付加している多数の糖鎖の種類と不均一性を解析できることを報告している<sup>6)~8)</sup>。一方、Carr らは、LC/MS/MS を用いたペプチドマッピングにおいて、特有のフラグメントをもつ親イオンを検出することが可能なプリカーサーイオンスキャン測定法を用いることにより、糖ペプチドを選択的に検出できること、また、LC/MS により得られたマススペクトルと同様、プリカーサーイオンスキャン測定から得られたプリカーサーイオンマススペクトルからも、結合糖鎖についての情報 (結合糖鎖の種類、不均一性) を得ることが可能であることを示している<sup>9)~11)</sup>。

今回、我々は、LC/MS を用いたペプチドマッピングによる糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造及び部位特異的不均一性の解析法のさらなる高感度化及び迅速化を図るため、rh-EPO を用いて、LC/MS の HPLC 部分へのマイクロ HPLC システムの導入を検討した。また、ペプチドマッピングにおける糖ペプチドの特定及び各糖鎖結合部位における糖鎖の不均一性の解析を容易にするため、プリカーサーイオンスキャン測定の有用性について検討を行った。

## 実験方法

## 1. 試薬

# To whom correspondence should be addressed: Satsuki Itoh; Kamiyoga 1-18-1 Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9074; Fax 03-3700-9084 E-mail: itoh@nihs.go.jp

rh-EPO は, BHK 細胞で産生させ, 精製したものをを用いた. エンドプロテイナーゼGlu-Cは, ベーリンガーマンハイム(株)社製を使用した.

## 2. 装置

HPLC: MAGIC 2002 システム (Michrom BioResource 社製)

MS: エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極MS/MS システム TSQ 7000 (Finnigan 社製)

## 3. ペプチド及び糖ペプチドの調製

rh-EPO 1 mg を 100 mM 酢酸アンモニウム溶液, pH8.0, 1 ml に溶解させた. これに, エンドプロテイナーゼGlu-C 0.25 mg を 62  $\mu$ l の 100 mM 酢酸アンモニウム溶液, pH5.6 に溶解させたものに加え, 37°C で 20 時間反応させた.

## 4. ミクロLC/MSによるペプチドマッピング

### HPLC

カラム: MAGIC C18

(Michrom BioResource 社製, 1.0  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ )

溶離液 A: 0.05% TFA を含む 2% アセトニトリル水溶液

溶離液 B: 0.05% TFA を含む 80% アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム: B液 5 ~ 45% (0 ~ 40分)

45 ~ 5% (40 ~ 41分)

5% (41 ~ 50分)

流速: 50  $\mu$ l/分

UV 検出波長: 206 nm

### ESI-MS

測定モード: ポジティブイオンモード

シースガス: 70 psi

オグジナリーガス: 10 unit

キャピラリー温度: 225°C

マルチプライヤー: 1,200 V

ESI 電圧: 4,500 V

スキャン範囲: 400-2,400

スキャン回数: 4 秒

## 5. ミクロLC/MS/MS, プリカーサーイオンスキャン測定による糖ペプチドマッピング

### HPLC

4. に準ずる.

### Collision induced dissociation (CID)-ESI-MS/MS

測定モード: ポジティブイオンモード

シースガス: 70 psi

オグジナリーガス: 10 unit

キャピラリー温度: 225°C

マルチプライヤー: 1,500 V

ESI 電圧: 4,500 V

スキャン範囲: 400-2,400

スキャン回数: 4 秒

衝突ガス: Ar, 2.0 mTorr

衝突エネルギー: -20 V

Set MS: 204

## 結 果

### 1. ミクロLC/MSを用いたペプチドマッピング

rh-EPO をエンドプロテイナーゼGlu-Cで消化し, 消化物 2  $\mu$ g について, ペプチドマッピングを行った. 得られた UV クロマトグラム (検出波長 206 nm) 及び total ion current (TIC) クロマトグラムを Fig. 1 に示す. 試料量は, 従来のセミマイクロ HPLC システムを用いた場合の 1/5 量であったが, 同様のクロマトグラムが得られた. クロマトグラム中のピークについて, 保持時間の早い順に a から i とした. マススペクトルから得られた分子量の計算値と rh-EPO のアミノ酸配列から計算されるペプチドの理論分子量と照合することにより, ピーク a, b, e 及び g については, それぞれペプチド E8, E2, E1 及び E7 と同定した (Table 1). ピーク i については, E9, E11 及び E13 の 3 ペプチドが同時に溶出したものであることが判った. また, ピーク c, d, f 及び h については, 得られたマススペクトルは複雑であった (Fig. 2). ピーク f については, ペプチド E3 に相当するイオン ( $f_4^+$ ) を検出したが, 他に, ペプチドの理論分子量と照合しても帰属できないイオンが, 数種検出された (Fig. 2(C)). このことから, ピーク f は, ペプチド E3 と糖ペプチド等のペプチド以外のものが同時に溶出したものであることが示唆された. ピーク c, d 及び h については, ペプチドを特定することがで

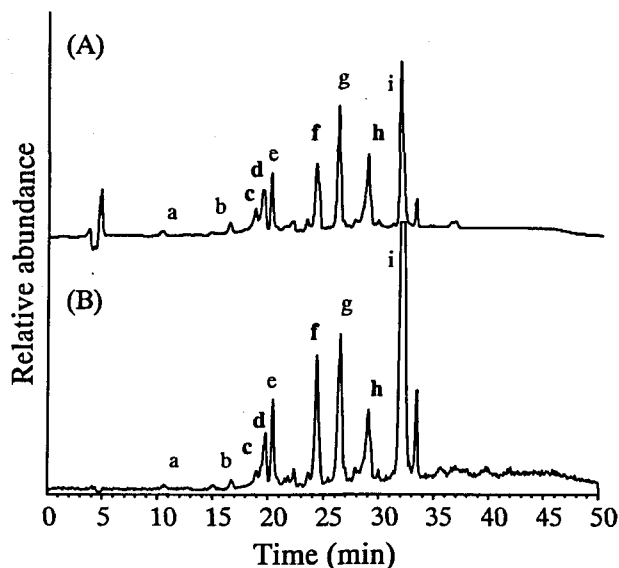


Fig. 1. UV chromatogram at 206 nm (A) and TIC chromatogram (B) of rh-EPO Glu-C digest

きず、ペプチドが翻訳後修飾(糖鎖付加等)されていることが示唆された (Fig. 2).

Table 1

Glu-C peptide numbers and amino acid residues of peaks in Fig. 1 and their theoretical masses and observed masses

Peak in Fig. 1	Peptide No.	Amino acid residues	Theoretical mass <sup>a</sup>	Observed mass
a	E8	56-62	729.8	729.4
b	E2	9-13	602.7	602.4
c	E6 <sup>b</sup>	38-43		
d	E5 <sup>b</sup>	22-37		
e	E1	(1-8)S-S(160-165)	1503.8	1503.2
f	E3	14-18	692.8	692.4
g	E7	44-55	1572.8	1572.4
h	E10 <sup>b</sup>	73-96		
i	E9	63-72	1115.3	1114.9
	E11	97-117	2212.6	2212.5
	E13	137-159	2837.4	2837.1

<sup>a</sup> Average  $m/z$  value.

<sup>b</sup> Glycopeptide.

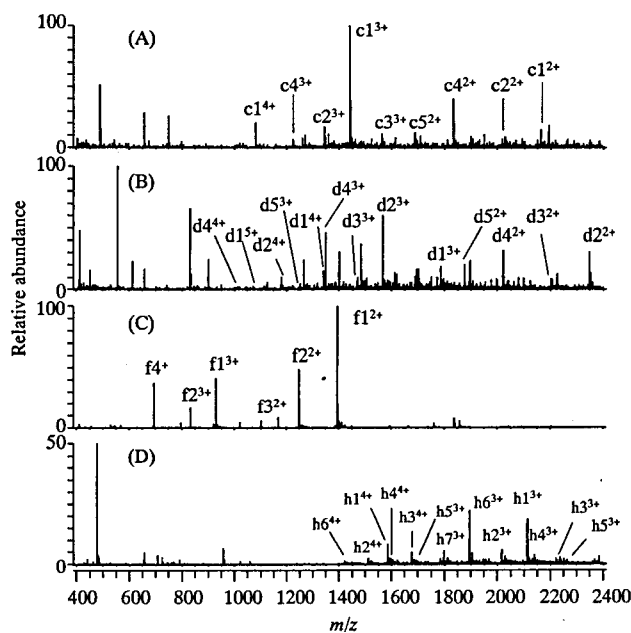


Fig. 2. Mass spectra of peak c (A), peak d (B), peak f (C) and peak h (D) in Fig. 1

## 2. ミクロ LC/MS/MS, プリカーサーイオンスキャン測定による糖ペプチドマッピング

1. の結果より、ピーク c, d, f 及び h は、糖鎖が付加されていることが示唆された。これらのピークが、糖ペプチドであることを確認し、ペプチドを同定し、結合糖鎖の構造を解析するために、ミクロ LC/MS/MS のプリカーサーイオンスキャン測定による糖ペプチドマッピングを行った。本分析では、プリカーサーイオンに *N*-結合型糖鎖及び *O*-結合型糖鎖の共通構成糖である HexNAc<sup>+</sup> (GlcNAc<sup>+</sup> 又は GalNAc<sup>+</sup>,  $m/z$  204) を設定した。rh-EPO のエンドプロテイナーゼ Glu-C 消

化物 8  $\mu$ g について、プリカーサーイオンスキャン測定を行った結果、ピーク c, d, f 及び h の溶出時間に一致する 4 本のピークが得られ (Fig. 3), これらのピークが糖ペプチドであり、ピーク f はペプチド E3 と糖ペプチドが重なったものであることが判った。これらの情報をもとに、Fig. 1 のピーク c, d, f 及び h のマスペクトルを解析した。ペプチドマッピングで帰属できなかったペプチド (E5, E6, E10 及び E12) 及び *N*-結合型糖鎖の理論分子量を組み合わせ、糖ペプチドの理論分子量を算出し、各マスペクトルのイオンの  $m/z$  値と照合することにより、各ピークについてペプチドの同定及び結合糖鎖の解析を行った。その結果、ピーク c は、Asn38 を含むペプチド E6 に、3 本鎖及び 4 本鎖の糖鎖が結合した糖ペプチドであり、糖鎖の分岐構造及びシアル酸結合数に不均一性を示すことを確認した (Fig. 2)。同様に、ピーク d は、Asn24 を含むペプチド E5 に、2 本鎖、3 本鎖及び 4 本鎖の糖鎖が結合した糖ペプチド、ピーク h は、Asn83 を含むペプチド E10 に 3 本鎖及び 4 本鎖の糖鎖が結合した糖ペプチドであり、共に糖鎖の分岐構造及びシアル酸結合数に不均一性を示すことを確認した。ピーク f は、*N*-結合型糖鎖の理論分子量との組み合わせから得られた糖ペプチドの理論分子量に一致するマスペクトルのイオンを検出することができず、*O*-結合型糖鎖が結合していると考えられた。*O*-結合型糖鎖及びペプチドの理論分子量との組み合わせから、ピーク f は、Ser126 を含むペプチド E12 に、Hex-HexNAc (core 1 構造) が結合した糖ペプチドであり、シアル酸結合数に不均一性を示すことを確認した。以上の解析結果をまとめると、Fig. 3 で示したピークのイオンは Table 2 のように帰属された。

また、糖ペプチドのプリカーサーイオンマスペクトルか

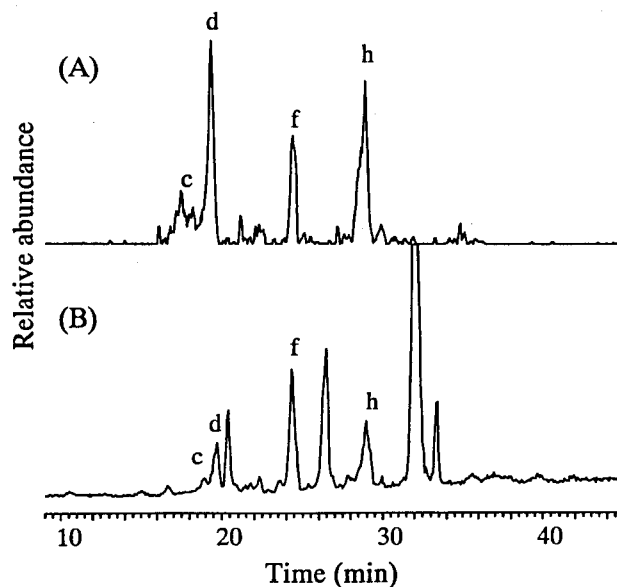


Fig. 3. TIC chromatogram of precursor-ion scan of  $m/z$  204 (A) and TIC chromatogram (B) of rh-EPO Glu-C digest

ら、結合糖鎖についての解析を試みたが、*N*-結合型糖鎖を含む3つの糖ペプチド（ピークc, d及びh）のプリカーサーイオンマススペクトルは複雑で解析することはできなかった（データ示さず）。しかしながら、*O*-結合型糖鎖を含むピークfのプリカーサーイオンマススペクトルでは、同時に溶出していたペプチドE3のイオンは消失しており（Fig. 4）、マイクロLC/MSから得られたマススペクトル（Fig. 2）と同様

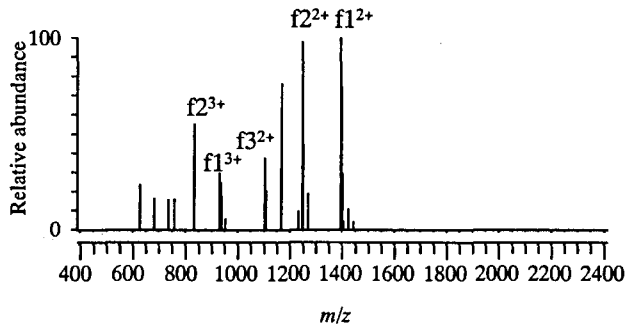


Fig. 4. Precursor-ion ( $m/z$  204) mass spectrum of peak f in Fig. 3

に解析することが可能であった。

#### 考察

今回、我々は、糖タンパク質性医薬品の特性解析及び品質評価におけるLC/MSによるペプチドマッピングの有用性を高めるため、マイクロHPLCシステムの導入による分析の高感度化、迅速化及びプリカーサーイオンスキャン測定法の導入による解析の簡便化を検討した。

rh-EPOをエンドプロテイナーゼGlu-Cで消化後、マイクロLC/MSシステムを用いて、ペプチドマッピングを行った結果、セミマイクロHPLCシステムを用いたrh-EPOの分析結果と比較して<sup>7)</sup>、試料量が、従来の1/5量でも同様のクロマトグラムが得られ、分析所要時間は、約1/3となり、高感度化及び迅速化を図ることができた。微量化及び分析時間の短縮化を図っても酵素消化によって得られる12ペプチドのうち、8ペプチドをTICクロマトグラム上で帰属することができ、4ペプチドについては、糖鎖が結合していることを予測することができた。

次に、マイクロLC/MS/MSのプリカーサーイオンスキャン測

Table 2

Structural assignments of ions in Fig. 3 and their theoretical masses and observed  $m/z$  values

Peak in Fig. 3	Peptide No.	Amino acid residues	Carbohydrate structure <sup>a</sup>	Theoretical mass <sup>b</sup>	Observed $m/z$				
					M <sup>+</sup>	M <sup>2+</sup>	M <sup>3+</sup>	M <sup>4+</sup>	M <sup>5+</sup>
c1	E6	38-43	Tetra-NA <sub>4</sub>	4323.0		2161.7	1441.7	1081.8	
c2			Tetra-NA <sub>3</sub>	4031.8		2016.9	1344.5		
c3			Tetra-Lac-NA <sub>4</sub>	4688.4			1562.9		
c4			Tri-NA <sub>3</sub>	3666.4		1833.8	1223.2		
c5			Tri-NA <sub>2</sub>	3375.2		1688.4			
d1	E5	22-37	Tetra-NA <sub>4</sub>	5355.2			1785.0	1340.0	1072.2
d2			Tri-NA <sub>3</sub>	4698.6		2348.9	1567.2	1175.1	
d3			Tri-NA <sub>2</sub>	4407.4		2203.5	1470.0		
d4			Bi-NA <sub>2</sub>	4042.1		2020.8	1348.0	1011.2	
d5			Bi-NA	3750.8		1876.0	1251.7		
f1	E12	118-136	Hex-HexNAc-NA <sub>2</sub>	2786.0		1394.3	929.3		
f2			Hex-HexNAc-NA	2494.7		1248.4	832.4		
f3			Hex-HexNAc	2203.4		1102.7			
f4	E3	14-18		692.8	693.4				
h1	E10	73-96	Tetra-NA <sub>4</sub>	6336.4			2112.6	1585.1	
h2			Tetra-NA <sub>3</sub>	6045.2			2016.1	1512.7	
h3			Tetra-Lac-NA <sub>4</sub>	6701.8			2234.2	1676.3	
h4			Tetra-Lac-NA <sub>3</sub>	6410.5			2138.9	1605.8	
h5			Tetra-Lac <sub>2</sub> -NA <sub>3</sub>	6775.9			2261.5	1695.1	
h6			Tri-NA <sub>3</sub>	5679.8			1893.9	1421.1	
h7			Tri-NA <sub>2</sub>	5388.6			1797.0		

<sup>a</sup> All carbohydrates contain a fucosylated core. Bi, bianttenary; Tri, trianttenary; Tetra, tetraanttenary; NA, NeuAc; Lac, *N*-acetylactosamine.

<sup>b</sup> Average  $m/z$  value.

定 ( $m/z$  204) を行うことにより, 多数のイオンの中から, HexNAc のフラグメントを有する親イオンのみを検出し, 溶出時間の比較から, TIC クロマトグラム上の糖ペプチドのピークを簡単に特定することができた. ペプチドと糖ペプチドの分離が不十分で, 同時に溶出している場合にも, 糖ペプチドの検出は可能であった. また, 特定した糖ペプチドの LC/MS のマススペクトルより得られた分子量の計算値とペプチド及び糖鎖の理論分子量の組み合わせから得られた糖ペプチドの理論分子量を照合することによって, ペプチド及び糖鎖結合位置を確認し, 結合糖鎖の部位特異的不均一性について解析することができた.

さらに, プリカーサーイオンスキャン測定から得られたプリカーサーイオンマススペクトルから, 糖鎖構造を解析できるかどうかを検討した. *N*-結合型糖鎖が付加しているペプチド E5, E6 及び E10 のプリカーサーイオンマススペクトルは, 非常に複雑でイオンを帰属することができなかった. これは, 結合糖鎖が多岐に渡り, さらにシアル酸結合数に不均一性を示すためと思われる. しかしながら, *O*-結合型糖鎖が付加しているペプチド E12 のように, 結合糖鎖が 1 種類の場合は, プリカーサーイオンマススペクトルからも, 結合糖鎖を解析することができた.

前報において, 我々は, High-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC 法) を用いて, rh-EPO の糖鎖構造を分析し, HPAEC 法の有用性について検討を行った<sup>12), 13)</sup>. その結果, HPAEC 法は, EPO 活性に関与している *N*-結合型糖鎖のシアル酸結合数と分岐構造等の変化を比較的高感度で簡便に解析できることがわかった. しかしながら, *O*-結合型糖鎖の分析に関しては, *O*-結合型糖鎖を切り出す万能的な酵素が存在しないために, HPAEC 法を用いる場合, 別途, アルカリ条件下で還元剤を共存させて  $\beta$  脱離反応により, 糖鎖を遊離させなければならない<sup>14)</sup>. 今回検討を行った LC/MS 及びプリカーサーイオンスキャン測定は, *O*-結合型糖鎖についても, *N*-結合型糖鎖と同時に, 結合糖鎖の構造と分布を解析できるだけでなく, HPAEC 法では不可能であった糖鎖の結合位置及び各結合部位における糖鎖の不均一性を解析できる.

糖鎖構造 (構成単糖, 分岐構造, 単糖間の結合様式等) を詳細に解析するには, 単糖組成分析, メチル化分析, 2 D マッピング, NMR 測定等と組み合わせる必要がある. 今回検討を行ったマイクロ LC/MS を用いたペプチドマッピング法も, 本分析法のみで詳細な糖鎖構造を決定することはできない. しかしながら, 糖の誘導体化のための技術や時間, 多量の試料及び誘導体化糖の標準物質は必要とせず, *N*-結合型糖鎖, *O*-結合型糖鎖に関わらず, 高感度かつ迅速に結合糖鎖の有無, 糖鎖の結合位置及びシアル酸結合数等の糖鎖構造の概略や部位特異的糖鎖の不均一性について等, 多くの情報を得ることが可能である. また, LC/MS/MS のプリカーサーイオンスキャン測定を併用することによって, 試料中の他の成

分が糖ペプチドと同時に溶出する場合や, 多数のペプチドピークによって糖ペプチドが特定できない場合に簡単に糖ペプチドを特定できるため, 解析を簡便化及び迅速化することができる.

マイクロ LC/MS 及びマイクロ LC/MS/MS (プリカーサーイオンスキャン測定) は, 他の糖タンパク質性医薬品にも応用可能であるので, 今後, 品質の評価, 品質の維持・管理等に応用されることが期待される.

## 謝 辞

本研究は, 創薬等ヒューマンサイエンス総合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・アドブ・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・アドブ・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) Hayakawa, T.: "Drug Biotechnology Regulation", eds. by Chiu, YH. and Gueriguian, JL., MARCEL DEKKER, INC., New York, pp.468-498(1991)
- 4) 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)
- 5) Misaizu, T., Matsuki, S., Strickland, TW., Takeuchi, M., Kobata, A., and Takasaki, S.: *Blood*, **86**, 4097-104(1995)
- 6) Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hashimoto, O. and Hayakawa, T.: *Anal. Biochem.* **269**, 297-303(1999)
- 7) Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hyuga, M., and Hayakawa, T.: *Anal. Biochem.* **285**, 82-91(2000)
- 8) Ohta, M., Kawasaki, N., Hyuga, S., Hyuga, M., and Hayakawa, T.: *J. Chromatogr. A*, **910**, 1-11(2001)
- 9) Huddleston, MJ., Bean, MF., and Carr, SA.: *Anal. Chem.*, **65**, 877-884(1993)
- 10) Carr, SA., Huddleston, MJ., and Bean, MF.: *Protein Sci.*, **2**, 183-196(1993)
- 11) Annan, RS. and Carr, SA.: *J. Protein Chem.*, **16**, 391-402(1997)
- 12) 川崎ナナ, 森本和滋, 早川堯夫: 衛生試験, **113**, 69-73(1995)
- 13) 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向須美子, 橋本統, 森本和滋, 早川堯夫: 衛生試験, **116**, 117-121(1998)
- 14) Kotani, N., and Takasaki, S.: *Anal. Biochem.* **252**, 40-47(1997)