技術論文

アルカリ β 脱離法により遊離させた *N*- 及び *O*- 結合型糖タンパク質由来糖鎖の HPLC 分析

西田 憲晃¹, 小鍛治靖子¹, 山本佐知雄^{*1}, 木下 充弘^{1,2}, 鈴木 茂生^{1,2}

糖タンパク質糖鎖は多様な構造を有し、大きく *N*- 結合型糖鎖と *O*- 結合型糖鎖に分類される。糖鎖の機能解析や構造解析は盛んに行われているが、その多くは酵素的遊離法が確立されている *N*- 結合型糖鎖に集中しており、*O*- 結合型糖鎖の分析例は少ない。そこで本研究では信頼できる *O*- 結合型糖鎖の分析法の確立を目的として、現在までに報告されている化学的遊離法を用いて遊離させた糖鎖を 7-アミノ-4-メチルクマリン (7-amino-4-methylcoumarin, AMC) で蛍光標識化したのち、HPLC で分析することで遊離効率を比較した。また、*O*- 結合型糖鎖と共に遊離される *N*- 結合型糖鎖については迅速かつ簡便で非特異的な *N*- 結合型糖鎖の遊離法の確立を目的として、既存の PNGase F を用いる酵素的な遊離法と比較し、その有用性について評価を行った。

1 緒 言

ヒトの全遺伝子配列の決定に続き、ゲノム情報の解読が進展し、生命科学分野における関心は翻訳後修飾へと移行しつつある。転写・翻訳によって合成されたタンパク質の多くは、リン酸化やメチル化、糖鎖付加などの様々な翻訳後修飾を受けることが知られている。その中でも糖鎖付加はタンパク質の主要な翻訳後修飾であり、生体内のタンパク質の 50 % 以上は糖鎖が結合した糖タンパク質として存在する^{1)~4)}。タンパク質に付加した糖鎖は、タンパク質の折りたたみと輸送、分泌、認識応答などの機能発現や構造の安定化に寄与していることが知られている⁵⁾。さらに、細胞表層に分布する糖鎖は細胞間のシグナル伝達や分子認識など、生命現象において重要な役割を果たしている⁶⁾⁷⁾。実際に、^{がん}腫^{8)~10)}、遺伝子疾患¹¹⁾や、糖尿病¹²⁾¹³⁾など、多くの疾患の発症や進行とともに糖鎖構造が変化することが知られる。また、疾病の種類によっては特異的な構造を持つ糖鎖が発現することが明らかとなっており、近年では診断用のバイオマーカーとしても注目されている¹⁴⁾。

ところで、分泌型糖タンパク質を構成する糖鎖は主にアスパラギン (Asn) に結合した *N*- 結合型糖鎖と、セリン (Ser) やスレオニン (Thr) に結合した *O*- 結合型糖鎖に分類される。*N*- 結合型糖鎖と *O*- 結合型糖鎖は結合様式や構

成する単糖が大きく異なるため、生体内での機能も大きく異なる。例えば、一部の *N*- 結合型糖鎖の先天的な欠損は糖タンパク質糖鎖不全症候群と呼ばれ、小脳形成不全や肝障害、末梢神経障害などの重篤な病態を呈する¹⁵⁾。一方、*O*- 結合型糖鎖は消化管での感染防御や免疫系、受精等において重要な役割を担っており^{16)~18)}、免疫グロブリンの一種である IgA 抗体が腎臓の糸球体に沈着することで発症する IgA 腎症では *O*- 結合型糖鎖の異常が関与していると報告されている¹⁹⁾。その他にも、末端部分に *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) や本来ヒトには存在しないはずの *N*-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) などのシアル酸やフコース (Fuc) が付加した *O*- 結合型糖鎖が癌細胞において大量に発現することが知られている⁹⁾¹⁰⁾。このように、糖鎖は数多くの疾患に関与しているため、糖鎖を解析することで病気の診断が可能になると考えられているが、*N*-結合型糖鎖に比べ、*O*-結合型糖鎖はその解析例が極端に少ない。これは、*O*-結合型糖鎖には Ser/Thr 残基から網羅的に糖鎖を切断する酵素が見つからないことに由来する。*O*-結合型糖鎖の遊離法としては、Ser/Thr 残基と *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の α グリコシド結合を化学的に切断する方法が一般的であるが、酵素消化に比べて特異性が低く定量的な糖鎖の遊離が困難である²⁰⁾。このような背景から *O*-結合型糖鎖は癌などの重篤な疾患に深く関与しているにもかかわらず、*N*-結合型糖鎖のように解析が進んでいないのが現状である。

ところで、エリスロポエチンのような生体由来の糖タンパク質性医薬品が昔から知られており、近年では抗体を中心に様々な治療を目的としたバイオ医薬品が盛んに研究さ

* E-mail: yamamoto@phar.kindai.ac.jp

¹ 近畿大学薬学部創薬科学科: 577-8502 大阪府東大阪市小若江 3-4-1

² 近畿大学アンチエイジングセンター: 577-8502 大阪府東大阪市小若江 3-4-1

れている。動物細胞を用いる抗体医薬品の製造にはマウス骨髄腫細胞等が用いられるが、この細胞で製造された遺伝子組換えタンパク質には NeuGc や Gal α 1-3Gal などの非ヒト型の糖残基が糖鎖に付加することがある²¹⁾²²⁾。非ヒト型の糖残基は生体内で免疫反応を引き起こすことが報告されており²³⁾、抗体医薬品の製造の際に発現した糖鎖を網羅的に解析する必要がある。現在、抗体医薬品のような糖タンパク質の *N*-結合型糖鎖を解析するには PNGase F を用いる酵素的な遊離法が一般的である。しかし、抗体医薬品は製造の際に Asn 以外のアミノ酸にも *N*-結合型糖鎖が発現する場合や^{24)~26)}、ごくまれにはあるが PNGase F で遊離されない糖鎖も報告されている²⁷⁾。したがって、未知の糖鎖群を網羅的に解析するには酵素のような特異性を持たず、すべての糖鎖を定量的に遊離できる方法が必要とされる。

以上の現状を踏まえて、本研究では信頼できる *O*-結合型糖鎖の分析法の確立と *O*-結合型、及び *N*-結合型糖鎖を同時に遊離することが可能な化学的遊離法の構築を目的として、現在までに報告されている化学的遊離法を用いて遊離させた糖鎖を 7-アミノ-4-メチルクマリン (7-amino-4-methylcoumarin, AMC) で蛍光標識化したのち、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析を行うことで遊離効率や副反応、分解反応などを比較し最適化を行った。また、本法を *N*-結合型糖鎖の遊離にも応用し、迅速かつ簡便で非特異的な *N*-結合型糖鎖の遊離法の開発を行った。

2 実 験

2.1 試料と試薬

含水ヒドラジン、ノイラミニダーゼ (*Arthrobacter ureafaciens* 由来, EC 3.2.1.18), 無水トリフルオロメタンスルホン酸 (TFMS), トリフルオロ酢酸, アセトニトリルはナカライテスクより購入した。TPCK 処理トリプシン (ウシ膵臓由来, EC 3.4.12.4), ウシ顎下腺ムチン (bovine submandibular gland mucin, BSM), ヒト AB 型血清, ヒト血清トランスフェリン, ウシ膵臓リボスクレアーゼ B, ヒト γ -グロブリン (IgG) 強陽イオン交換 (SCX) タイプの固相抽出 (SPE) カートリッジ (100 mg/mL), 水系逆相型固相抽出カラム Oasis[®] HLB (60 mg/3 mL), 25G Graphite Carbon Cartridge (100 mg/6 mL) は Sigma-Aldrich Japan より購入した。PNGase F は Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) のものを用いた。AMC, カルバミン酸アンモニウムは東京化成工業より購入した。 β -ガラクトシダーゼ (Jack bean 由来, EC 3.2.1.23), β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (Jack bean 由来, EC 3.2.1.52) は生化学工業より購入した。ウシ胎児血清フェツインは LIFE TECHNOLOGIES (Grand Island N.Y. U.S.A.) より購入した。アバタセプトはブリストルマイヤーズのものを用いた。ハーセプチンは中外製薬のものを用いた。その他の試薬類は市販の特級品あるいは

HPLC 用のものを用いた。

2.2 AMC 標識化糖鎖の調製

2.2.1 PNGase F による遊離糖鎖の切り出し 1 mg/100 μ L になるように調製した糖タンパク質 10 μ L に 1 M 重炭酸アンモニウム水溶液, 120 mmol L⁻¹ ジチオスレイトール水溶液をそれぞれ 2 μ L 加えて 60 $^{\circ}$ C で 30 分間加熱した。その後, 123 mmol L⁻¹ ヨードアセトアミド水溶液 4 μ L 加え, 遮光下室温にて 60 分間静置した。続いて 1 mmol L⁻¹ HCl 溶液で 40 unit/ μ L となるように調製したトリプシン 4 μ L を加え, 37 $^{\circ}$ C で 2 時間加温することで、ペプチド鎖の加水分解を行った。反応後のトリプシン溶液は 100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱することでトリプシンを変性させた。放冷後, PNGase F (5 μ L, 5 U) を加え, 37 $^{\circ}$ C で 16 時間加温し, *N*-結合型糖鎖を遊離させた。反応後, 100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱することで反応を停止させ, 反応液に冷エタノール 243 μ L を加えタンパク質を沈殿として除去した。最後に, 上澄液を減圧乾固して糖鎖試料とした。

2.2.2 ヒドラジン分解法による遊離糖鎖の切り出し²⁸⁾²⁹⁾ 糖鎖分析用前処理装置として市販されているヒドラクラブ (J-OIL MILLS) を用いた。ヒドラクラブ付属の反応容器を 80 $^{\circ}$ C で 2 時間真空ポンプを用いて乾燥させたのち, あらかじめ乾燥させておいた 500 μ g の糖タンパク質を反応容器内に入れた。ヒドラジンを注入後, 80 $^{\circ}$ C で 6 時間加熱し, *O*-結合型糖鎖を遊離させた。濃硫酸の入ったトラップを用い, 真空ポンプを用いて 30 分間ヒドラジンの除去を行ったのち, 酢酸アンモニウム緩衝液 200 μ L, トリメチルピリジン 10 μ L を加え攪拌した。次に, 無水酢酸 10 μ L を加え素早く攪拌し, 室温で 20 分間反応させた後, *N*-アセチル化を行ったのち, 減圧乾固して糖鎖試料とした。

2.2.3 含水ヒドラジン法による遊離糖鎖の切り出し³⁰⁾³¹⁾ 糖タンパク質 500 μ g を乾燥させ, 0.2 mol L⁻¹ トリエチルアミンで調製した 50 % ヒドラジン 50 μ L を加え溶解させたのち, 45 $^{\circ}$ C で 18 時間加熱した。その後, ヒドラジンを除去するため 0.1 mol L⁻¹ 塩酸 50 μ L, トルエン 50 μ L を加え減圧乾固させる操作を 3 回行った。ヒドラジン除去後, 飽和炭酸水素ナトリウム溶液 40 μ L を加え, 次いで無水酢酸 2 μ L を加えたのち, 室温で 20 分間反応させ, *N*-アセチル化を行った。反応後の試料を NAP-5 Columns Sephadex G-25 DNA Grade を用いて脱塩精製し, エバポレーターで約 100 μ L まで濃縮し, 回収したものを減圧乾固させた。その後, 試料を 20 % アセトン 50 μ L に溶解させたのち, 55 $^{\circ}$ C で 24 時間加熱し, 減圧乾固して糖鎖試料とした。

2.2.4 カルバミン酸アンモニウム法による遊離糖鎖の切り出し カルバミン酸アンモニウム 37.5 mg に糖タン

Fig. 1 HPLC analysis of AMC-labeled glycans derived from BSM released by the hydrazine method (a), aqueous hydrazine method (b), ammonium carbamate method (c), ammonia method (d), and TFMS method (e)

Analytical conditions: column, Capcell Pak C18 MGII (5 μ m, 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm); flow rate, 0.5 mL/min; eluent, (A) 0.1 % TFA in water (B) 0.1 % TFA in acetonitrile; gradient program, 10 % to 20 % B for 30 min; fluorometric detection, 348 nm (excitation)/445 nm (emission)

パク試料 25 μ L (500 μ g) を加え 60 $^{\circ}$ C で 20 時間加熱した。反応後、試料溶液を 60 $^{\circ}$ C で蒸発・乾固した³²⁾。また、最適化した条件での反応は炭酸水素ナトリウムを 100 mg 添加し、同様の手順を実施した。

2・2・5 濃アンモニア法による遊離糖鎖の切り出し³³⁾³⁴⁾ 28 % 飽和アンモニア 500 μ L と炭酸アンモニウム 100 mg を乾固させた糖タンパク試料 500 μ g に加え 60 $^{\circ}$ C で 40 時間加熱した。反応後、試料溶液を 60 $^{\circ}$ C で蒸発・乾固し、糖鎖試料とした。

2・2・6 TFMS 法による遊離糖鎖の切り出し³⁵⁾³⁶⁾ 糖タンパク質 500 μ g を乾燥させ、無水 TFMS 50 μ L を加えて溶解させたのち、0 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。その後、混合物を -20 $^{\circ}$ C まで冷却させ、60 % ピリジン溶液 200 μ L を徐々に加えながら攪拌した。その後、25G Graphite Carbon Cartridge を用いて精製を行った。

2・2・7 AMC による遊離糖鎖の蛍光標識化³⁷⁾ 0.5 mg の糖タンパク質を 500 μ L のネジ式ポリプロピレン製

チューブに採取し、60 mmol L⁻¹ AMC/DMF 溶液 20 μ L と 0.2 mol L⁻¹ ピリジンボラン/酢酸溶液 20 μ L を加え、70 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。氷冷下で精製水 60 μ L を加え反応を停止させたのち、SCX-SPE カラムに 30 % メタノール水 3 mL を通液することで過剰試薬を除去し、HLB カートリッジに 30 % アセトニトリル水 9 mL を通液することで脱塩したものを試料とした。

2・2・8 25 % アンモニアによる遊離糖鎖の切り出し 25 % アンモニア 100 μ L を乾固させた糖タンパク試料 100 μ g に加え 70 $^{\circ}$ C で 3 時間加熱した。反応後、減圧乾固して糖鎖試料とした。

2・2・9 AMC 標識化糖鎖の HPLC 分析 HPLC のポンプには LC20AD を 2 台、蛍光検出器 RF-10A_{XL}、データ解析装置 LCMS Solution (Shimadzu) を使用した。カラムは Capcell Pak C18 MGII (5 μ m; 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm, Shiseido) を用いた。溶出液は (A) 0.1 % TFA 水溶液、(B) 0.1 % TFA アセトニトリル溶液を用い 10 % B から 20 % B まで 30 分の直線濃度勾配をかけて溶出した。流量は 0.5 mL/min, 検出波長は 348 nm (ex)/445 nm (em) として測定した。

3 結果と考察

3・1 糖タンパク質由来 O-結合型糖鎖の化学的遊離法の比較と最適化

O-結合型糖鎖の化学的な遊離法としては Carlson らが報告したアルカリボロハイドライド法³⁸⁾をはじめとする様々な方法がある。いずれの遊離法にも何らかの問題点があり、これらの方法を用いた場合の糖鎖の遊離効率や分解反応を比較した報告はない。そこで、信頼できる O-結合型糖鎖の遊離法の確立を目的として、現在までに報告されている O-結合型糖鎖の遊離法の中から有望と判断した 5 種類の遊離法を選び、これらの方法を用いて糖タンパク質標品から糖鎖を遊離させ AMC で蛍光標識化したのち、HPLC で分析を行うことで遊離効率や副反応、分解反応を比較した。化学的遊離法にはヒドラジン分解法 (気相法)²⁸⁾²⁹⁾、含水ヒドラジン法³⁰⁾³¹⁾、カルバミン酸アンモニウム法³²⁾、濃アンモニア法³³⁾³⁴⁾、TFMS 法³⁵⁾³⁶⁾ を選んだ。5 種類の遊離法を用いて BSM から糖鎖を遊離させ、HPLC で分析した結果を Fig. 1 に示す。また、Fig. 1 に示した分析結果から算出した各遊離法の遊離効率及び検出された全糖鎖のピーク面積に対してシアル酸を有する酸性糖鎖の比率と糖鎖別回収率を Fig. 2 に示す。ただし、ヒドラジン系の反応では N-アシル基が加水分解されるため N-アセチル化を行った。GalNAc を BSM に添加した試料と BSM のみから得られた GalNAc のピーク面積を比較することで算出した BSM 中の GalNAc の mol 数に対して Fig. 1 (a) に示した糖鎖由来ピーク面積の GalNAc に対する割合を計算したところヒドラジ

Fig. 2 Releasing efficiency and rate of sialylated and non-sialylated glycans, the percent recovery of each glycans released from BSM by the five methods

The structures of *O*-linked glycans are the same as those described in Fig. 1. The releasing efficiencies were referred to mild hydrazine method as 100 %

ン分解法の遊離糖鎖量はおよそ 341 nmol/mg であった。ところで, Tettamanti らは BSM の *O*-結合型糖鎖には *N*-アセチルヘキソサミンが 25.6 % 含まれており, そのうち GalNAc が 66.6 % を占めると報告している³⁹⁾。GalNAc は還元末端にのみ存在するので GalNAc のモル数は糖鎖のモル数に等しい。この計算を行うと BSM 1 mg あたり糖鎖は 770 nmol 含まれている計算になるので, 糖鎖の遊離効率は最も高いヒドラジン分解法を用いてもおよそ 44 % 程度と低いことになる。本研究では 5 種類の化学的遊離法を比較するにあたり, ノイラミニダーゼやヘキソサミニダーゼなどの加水分解酵素を用いてピークを同定し, これら同定したピークの総量に対して最も総ピーク面積の値が高かったヒドラジン分解法を遊離効率 100 % として算出した。その結果, 濃アンモニア法が 46.1 %, カルバミン酸アンモニウム法が 13.4 % となった。含水ヒドラジン法と TFMS 法はそれぞれ 0.02 % と 0.07 % となり, 遊離効率が著しく低い結果となった。BSM には Fig. 1 に示した 3, 4, 6, 7 番の糖鎖が主要な糖鎖として含まれており, カルバミン酸アンモニウム法と濃アンモニア法で比較的高い収率が得られた。さらに, これらの遊離法では, 主要な糖鎖以外にも末端に NeuAc あるいは NeuGc が付加したと考えられる比較的重合度の高い糖鎖も検出され, 糖鎖ピークの総数は 15 本と最も多い。酸性糖鎖の比率はヒドラジン分解法よりもアンモニアを用いるアルカリ β 脱離法が高く, ヒドラジン分解法では 45.6 % だったのに対し, カルバミン酸アンモニウム法で 69.4 %, 濃アンモニア法で 60.3 % となり, 同じ β 脱離法でも濃アンモニア法の比率が 10 % 程度低いことが分かった。これはカルバミン酸アンモニウム法では, アルカリ条件での *O*-結合型糖鎖の代表的な分解反応であるピーリング反応を最小限に抑えることができるためと考

えられる。また, Fig. 1 に示したヒドラジン分解法や含水ヒドラジン法の分析結果で NeuGc 含有糖鎖に相当するピーク 5 や 7 の位置近傍にピークが観察されたが, これらの遊離法では糖鎖遊離後に *N*-アセチル化を行っているため NeuGc 含有糖鎖ではないと考えられる。また, 試行回数 3 回における遊離効率の再現性を調査した結果, 相対標準偏差はヒドラジン分解法で 1.6 %, 含水ヒドラジン法で 14.1 %, カルバミン酸アンモニウム法で 4.5 %, 濃アンモニア法で 17.1 %, TFMS 法で 161.3 % であった。試料に酸性糖鎖を含むフェツインを用いて同様の検討を行ったところ遊離効率は前と同程度であったが酸性糖鎖の比率は BSM と異なり, ヒドラジン分解法が 89.8 % だったのに対しカルバミン酸アンモニウム法が 84.4 %, 濃アンモニア法が 84.6 % となった。以上の結果から, 糖鎖の網羅的な解析を行うには遊離効率がヒドラジン分解法よりも低かったものの, NeuGc 含有糖鎖や重合度の高い糖鎖を確認できたカルバミン酸アンモニウム法や濃アンモニア法が有用であると考えられる。しかしながら, この二つの遊離法は共に非還元的アルカリ β 脱離法に分類されるが, 遊離効率や酸性糖鎖の比率, 糖鎖別回収率が大きく異なっていた。濃アンモニア法は遊離効率が 40 % 以上あったが, 重合度の高い糖鎖や酸性糖鎖の比率が低いことからピーリング反応が避けられない。一方, カルバミン酸アンモニウム法の遊離効率は 10 % 程度であるものの, ピーリングを最小限に抑えることができた。したがって, この二つの遊離法を基に反応条件の最適化を行うことで, ピーリング反応を抑えつつ遊離効率を向上させることが可能であると考えた。そこでカルバミン酸アンモニウムの濃度や塩の種類などについて詳細に最適化を行ったが, 糖タンパク質によって遊離効率に差があり, 統一された条件を設定できないことが判明した。したがって, 信頼性の高い糖鎖含量を得るには糖タンパク質試料ごとに反応条件を検討する必要がある。例えば, 多少の分解を伴うが遊離効率を追求するならば濃アンモニア法, 遊離効率が低い糖鎖パターンなどの詳細な分析を行うならばカルバミン酸アンモニウム法を基にそれぞれの糖タンパク質に適した塩の種類や量を用いることが推奨される。また, カルバミン酸アンモニウムは *N*-結合型糖鎖も遊離可能な方法とされている³²⁾。そこで試料にフェツインを用いカルバミン酸アンモニウム法を基に炭酸アンモニウム, カルバミン酸アンモニウム, 炭酸水素アンモニウム三種類の塩をそれぞれ 0, 50, 100, 150 mg 添加した際の遊離効率を比較した。その結果 100 mg の炭酸水素アンモニウムを加えると PNGase F で消化したものと比べ *N*-結合型糖鎖を 85.1 % と比較的高収率で回収することができた。これにより, *O*-結合型及び *N*-結合型糖鎖を同時に網羅的に分析したい場合に応用することが可能である。最終的に, 遊離効率は低いもののピーリング反応を最

Fig. 3 HPLC analysis of AMC-labeled glycans derived from AB-type human serum (a) and fetuin (b)

The analytical conditions are the same as those in Fig. 1 (d)

小限に抑えることができ、さらにN-結合型糖鎖も同時に遊離される反応条件、すなわちカルバミン酸アンモニウム法に100 mg 炭酸水素アンモニウムを加える条件を最適とした。

3・2 最適化したカルバミン酸アンモニウム法による抗体医薬品及び生体成分中の糖タンパク質糖鎖への応用

カルバミン酸アンモニウム法に100 mg 炭酸水素アンモニウムを加える遊離方法を抗体医薬品や生体成分中の糖タンパク質糖鎖へ応用した。試料には、ヒトAB型血清及び抗体医薬品のアバタセプトを用いた。

血清には血液型によって異なる糖鎖が含まれており、O-結合型糖鎖だけでなくN-結合型糖鎖も含まれている。また、血清に含まれる糖タンパク質の糖鎖は、血液型に関係なく、その99%以上がGalβ1-3GalNAcであると報告されている⁴⁰⁾。Fig. 3にAB型血清由来糖鎖をHPLCで分析した結果を示す。AB型血清の分析結果ではピーク1が27.5分付近に比較的大きなピークとして観察された。参照のためフェツインの分析結果をFig. 3 (b)に示すが、ピーク1はフェツインで同定したGalβ1-3GalNAcと同じ時間に溶出されていた。

抗体医薬品のアバタセプトはCHO細胞を使って産生され、358個のアミノ酸残基からなるサブユニット2分子から構成される分子量92000の糖タンパク質である。遺伝子組換え融合タンパク質で、構成するアミノ酸配列の1～125番目はヒト細胞障害性Tリンパ球抗原、126番目～358番目はヒトIgG抗体に由来する改変型Fc領域からなり、131、137、140及び149番目のアミノ酸残基がセリンに置換されている。アバタセプトの承認審査情報では、O-結合型糖鎖が1種類とIgG由来のN-結合型糖鎖が報告されている。

Fig. 4 HPLC analysis of AMC-labeled glycans derived from abatacept (a) and fetuin (b)

The analytical conditions are the same as those in Fig. 1

O-結合型糖鎖の構造はNeuAc-Hex-HexNAcと記されており、結合様式や単糖の種類については詳細に記されていない。Fig. 4にアバタセプト由来糖鎖をHPLCで分析した結果を示す。26分付近に比較的大きなピークが観察され、27.5分にもピークが観察された。参照のためフェツインの分析結果をFig. 4 (b)に示すが、ピーク1、2はそれぞれGalβ1-3GalNAc、NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcと同じ時間に溶出した。

3・3 25%アンモニアによるN-結合型糖鎖のアルカリβ脱離反応条件の最適化

3・1においてフェツインを用いたO-結合型糖鎖の遊離反応条件を検討している過程で、市販の25%アンモニアを用いることでN-結合型糖鎖を効率的に遊離できることが分かった。また、市販の25%アンモニアに炭酸アンモニウムを加えることで作製した28%飽和アンモニアでは遊離効率が低下することが分かった。そのため、25%アンモニアを用いN-結合型糖鎖の遊離に応用した。Fig. 5にPNGase F及び25%アンモニアにより遊離させたフェツイン由来糖鎖をHPLCで分析した結果を示す。Fig. 5を見ると、糖鎖の溶出パターンがPNGase Fを用いる遊離法とほぼ一致していることが分かる。すなわち、この反応条件においてN-結合型糖鎖を定量的に分析することが可能であることが分かった。また、Fig. 5 (b)に示した分析結果では25分以降にO-結合型糖鎖と思われるピークとアンモニアにより生じた糖由来の副生成物と思われる小さな妨害ピークが数本確認された。ところで、今回用いた温度や時間などの遊離反応条件は濃アンモニア法を基準としており、O-結合型糖鎖の遊離を目的としていたため反応時間が40時間と長く迅速な遊離法とは言い難い。これは、O-結

Fig. 5 HPLC analysis of AMC-labeled glycans derived from fetuin released by PNGase F (a) and 25 % ammonia solution (b)

The analytical conditions are the same as those in Fig. 1

合型糖鎖に多い還元末端が3位置換されたGalNAcがペーリング反応を受けやすいためであり、アルカリや高温条件下での分解してしまうために60℃以下という緩和な条件下での反応を行う必要があったためである。一方、N-結合型糖鎖は、ほとんどが比較的安定な1-4結合である。したがって、N-結合型糖鎖にアルカリβ脱離反応を応用する場合、反応温度を高くすることで、反応効率の向上や時間短縮が期待できる。まず、25 % アンモニアを用いた際の反応温度を検討した。試料にフェツインを用い反応温度を50, 60, 70, 80, 90℃に設定し、遊離効率や糖鎖の溶出パターンなどを、PNGase Fを用いて遊離させた糖鎖と比較することで評価した。Fig. 6にフェツインの分析結果と、分析結果から算出した遊離効率を示す。

得られた結果では50, 60, 70℃でPNGase Fとほぼ同様の溶出パターンが観察され、70℃で遊離効率が最大となった。遊離糖鎖パターンは50, 60, 70℃の順にピーク8のようなシアル酸の数が多い糖鎖の割合が増加しており、70℃で最もPNGase Fと遊離パターンが類似した。また、80℃と90℃では溶出パターンが変化し、遊離効率も大幅に低下した。PNGase Fの遊離効率を100%としたとき、70℃での遊離効率はフェツインで162.4%となった。これは、フェツインの3か所のN-結合型糖鎖結合部位のうち、今回用いたPNGase Fの消化条件ではそのいずれかが遊離されない可能性を示唆するものとなった。

次に、同じ試料を用い70℃における反応時間の影響を調べた。反応時間を1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 40時間に設定し、遊離効率や糖鎖の溶出パターンなどをPNGase Fを用いて遊離させた糖鎖と比較した。Fig. 7にこの結果を示すが、反応時間40時間がもっとも回収率が高く、反応時間とともに、顕著に遊離効率が上昇した。PNGase Fと比較す

Fig. 6 HPLC analysis of AMC-labeled glycans derived from fetuin released by PNGase F and 25 % ammonia solution at specified temperature (a) and their releasing efficiencies of N-linked glycans (b)

The other analytical conditions are the same as those in Fig. 1

ると反応時間が短くなるに伴い、ピーク8のようなシアル酸の数が多い糖鎖の割合がわずかに増加していた。また、反応時間が3時間未満になると遊離効率が顕著に減少したが、反応時間が1時間でもピーク5のような微量糖鎖を検出することは可能であった。同様の条件でハーセプチンを用いて検討を行ったが、ハーセプチンにおいても反応時間70℃、反応時間40時間がもっとも回収率が高く、反応時間とともに顕著に遊離効率が上昇した。また、フェツインではシアル酸の数が多い糖鎖の割合が増加していたが、ハーセプチンでは、ほぼ同様の遊離糖鎖パターンが観察された。フェツイン及びハーセプチン共に3時間以上の遊離反応で時間の経過と共に遊離効率が向上する結果となったが、溶出パターンは時間に依存しなかったため、迅速な反応条件を確立するため、70℃、3時間を採用した。この条件において試行回数3回における遊離効率の再現性を調査した。その結果、フェツインで相対標準偏差が10.0%、ハーセプチンで1.9%であり、再現性も許容範囲であった。

Fig. 7 HPLC analysis of AMC-labeled glycans derived from fetuin released by PNGase F and 25 % ammonia solution with specified reaction time (a), and their releasing efficiencies of *N*-linked glycans (b)

The other analytical conditions are the same as those in Fig. 1

3.4 最適化したアルカリ β 脱離反応条件の他の糖タンパク質試料への適応

最適化した *N*-結合型糖鎖のアルカリ β 脱離反応条件をヒト血清トランスフェリン, IgG へ応用した。ヒト血清中のトランスフェリンは, アルコール中毒に伴って糖鎖構造が変化することが知られる。長期的なアルコールの多量摂取により糖鎖末端の NeuAc, Gal, GlcNAc など欠いたものが多く発現し, いわゆる糖鎖欠損トランスフェリンが血中に多く存在するようになる。このことから長期間のアルコール多量摂取のマーカーとして γ -GTP よりも高い指標となると考えられている⁴¹⁾。糖鎖構造は比較的単純で, ジシアロ 2 本鎖糖鎖が全体の 90 % を占める。

Fig. 8 に PNGase F と 25 % アンモニアにより遊離したトランスフェリン由来糖鎖を HPLC で分析した結果を示す。PNGase F と比較した結果, 25 % アンモニアによる遊離効率はおおよそ 39.8 % であった。糖鎖の溶出パターンはピーク 1, 2, 3 でわずかに差異があったものの, ほぼ PNGase F と同じパターンが観察された。また, 25 % アンモニアの分析結果では 16.5 分付近に比較的高度の高いピークが観察されたが, PNGase F ではこのピークは観察されず, トランスフェリンには *O* 結合型糖鎖が存在しているといった

Fig. 8 HPLC analysis of AMC-labeled glycans derived from human transferrin released by PNGase F and 25 % ammonia solution

The analytical conditions are the same as those in Fig. 1

Fig. 9 HPLC analysis of AMC-labeled glycans derived from human IgG released by PNGase F and 25 % ammonia solution

The analytical conditions are the same as those in Fig. 1

報告もないため, アンモニアにより生じた副生成物の妨害ピークと考えられる。IgG は抗体医薬品の基本骨格に用いられる糖タンパク質で, 糖鎖構造は非還元末端に Gal が 0 ~ 2 個結合し, 還元末端に Fuc が結合したフコシル化 2 本鎖 *N*-結合型糖鎖の存在が知られている⁴²⁾⁴³⁾。

Fig. 9 に PNGase F と 25 % アンモニアにより遊離した IgG 由来糖鎖を HPLC で分析した結果を示す。PNGase F と比較した結果, 25 % アンモニアによる遊離効率はおおよそ 8.8 % であった。溶出パターンは PNGase F とほぼ同じパ

ターンが観察された。また、25 % アンモニアの分析結果では16.5分付近にトランスフェリンと同様に妨害ピークが観察された。以上より、本遊離法はN-結合型糖鎖の遊離法として利用できることが分かった。

4 結 言

本研究では信頼できるO-結合型糖鎖の分析法の確立を目的として、現在までに報告されている化学的遊離法を用いて遊離させた糖鎖をAMCで蛍光標識化したのち、HPLCで分析を行うことで遊離効率や副反応、分解反応などを比較し最適化を行い、N-結合型糖鎖の遊離にも応用した。

5種類の化学的遊離法を比較検討した結果、非還元的アルカリβ脱離法に分類されるカルバミン酸アンモニウム法や濃アンモニア法の有用性が示唆された。カルバミン酸アンモニウム法では遊離効率が低く、濃アンモニア法ではピーリングが観察されたため、それぞれの遊離法について遊離反応条件の再検討を行った結果、それぞれの遊離法の問題点を改善するには至らなかったが、カルバミン酸アンモニウム法の反応時に100 mgの炭酸水素アンモニウムを加え、60℃で20時間反応させる条件でO-結合型糖鎖と同時にN-結合型糖鎖も同時に遊離されることを見いだした。次に糖タンパク質からの迅速かつ簡便で非特異的なN-結合型糖鎖の遊離法の確立を目的として、25 % アンモニアを用いるアルカリβ脱離反応条件の検討を行った。N-結合型糖鎖を対象とした遊離反応条件の最適化を行った結果、70℃で3時間を最適な反応条件とした。本法では糖タンパク質により遊離効率が大きく異なるが、いずれの糖タンパク質においても、PNGase Fを用いる遊離法と比較して糖鎖の溶出パターンにそれほど大きな違いは見られず、PNGase Fと同等の定量的な分析が可能である。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金「若手研究(B)」(15K18852, 17K15439)、「基盤研究(C)」(16K08209)及び文部科学省、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(S1411037)の支援によりなされたことを付記し、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon : *Biochim. Biophys. Acta.*, **1473**, 4 (1999).
- 2) R. A. Dwek : *Chem. Rev.*, **96**, 683 (1996).
- 3) P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek : *Science*, **291**, 2370 (2001).
- 4) A. Varki : *Glycobiology*, **3**, 97 (1993).
- 5) D. J. Moloney, V. M. Panin, S. H. Johnston, J. Chen, L. Shao, R. Wilson, Y. Wang, P. Stanley, K. D. Irvine, R. S. Haltiwanger, T. F. Vogt : *Nature*, **406**, 369 (2000).
- 6) J. W. Dennis, M. Granovsky, C. E. Warren : *Biochim.*

- Biophys. Acta.*, **1473**, 21 (1999).
- 7) Y. Sato, M. Kimura, C. Yasuda, Y. Nakano, M. Tomita, A. Kobata, T. Endo : *Glycobiology*, **9**, 655 (1999).
- 8) U. V. Santer, F. Gilbert, M. C. Glick : *Cancer Res.*, **44**, 3730 (1984).
- 9) G. F. Springer : *Science*, **224**, 1198 (1984).
- 10) K. Kumamoto, Y. Goto, K. Sekikawa, S. Takenoshita, N. Ishida, M. Kawakita, R. Kannagi : *Cancer Res.*, **61**, 4620 (2001).
- 11) T. W. Rademacher, P. Williams, R. A. Dwek : *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**, 6123 (1994).
- 12) G. R. Hayes, D. H. Lockwood : *J. Biol. Chem.*, **261**, 2791 (1986).
- 13) B. Venerando, A. Fiorilli, G. Croci, C. Tringali, G. Goi, L. Mazzanti, G. Curatola, G. Segalini, L. Massaccesi, A. Lombardo, G. Tettamanti : *Blood*, **99**, 1064 (2002).
- 14) G. Durand, N. Seta : *Clin. Chem.*, **46**, 795 (2000).
- 15) M. Metzler, A. Gertz, M. Sarkar, H. Schachter, J. W. Schrader, J. D. Marth : *Embo j.*, **13**, 2056 (1994).
- 16) N. L. Perillo, K. E. Pace, J. J. Seilhamer, L. G. Baum : *Nature*, **378**, 736 (1995).
- 17) L. G. Baum, M. Pang, N. L. Perillo, T. Wu, A. Delegeane, C. H. Uittenbogaart, M. Fukuda, J. J. Seilhamer : *J. Exp. Med.*, **181**, 877 (1995).
- 18) H. M. Florman, P. M. Wassarman : *Cell*, **41**, 313 (1985).
- 19) A. C. Allen, E. M. Bailey, P. E. Brenchley, K. S. Buck, J. Barratt, J. Feehally : *Kidney Int.*, **60**, 969 (2001).
- 20) S. Yamamoto, M. Kinoshita, S. Suzuki : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **130**, 273 (2016).
- 21) D. M. Sheeley, B. M. Merrill, L. C. Taylor : *Anal. Biochem.*, **247**, 102 (1997).
- 22) E. M. Yoo, K. R. Chintalacheruvu, M. L. Penichet, S. L. Morrison : *J. Immunol. Methods*, **261**, 1 (2002).
- 23) B. M. Kumpel, T. W. Rademacher, G. A. Rook, P. J. Williams, I. B. Wilson : *Hum. Antibodies Hybridomas*, **5**, 143 (1994).
- 24) J. F. Valliere-Douglass, P. Kodama, M. Mujacic, L. J. Brady, W. Wang, A. Wallace, B. Yan, P. Reddy, M. J. Treuheit, A. Balland : *J. Biol. Chem.*, **284**, 32493 (2009).
- 25) J. F. Valliere-Douglass, C. M. Eakin, A. Wallace, R. R. Ketchum, W. Wang, M. J. Treuheit, A. Balland : *J. Biol. Chem.*, **285**, 16012 (2010).
- 26) M. Tanaka, A. Koga, A. Kobe, Y. Sekimori, Y. Aso, K. Terada : *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **83**, 123 (2013).
- 27) V. Tretter, F. Altmann, L. Marz : *Eur. J. Biochem.*, **199**, 647 (1991).
- 28) L. Royle, T. S. Mattu, E. Hart, J. I. Langridge, A. H. Merry, N. Murphy, D. J. Harvey, R. A. Dwek, P. M. Rudd : *Anal. Biochem.*, **304**, 70 (2002).
- 29) R. P. Kozak, L. Royle, R. A. Gardner, D. L. Fernandes, M. Wuhler : *Anal. Biochem.*, **423**, 119 (2012).
- 30) C. A. Cooper, N. H. Packer, J. W. Redmond : *Glycoconj. J.*, **11**, 163 (1994).
- 31) D. Kisiel, A. Gindzienski, A. Gadek : *Acta. Biochim. Pol.*, **46**, 753 (1999).
- 32) Y. Miura, K. Kato, Y. Takegawa, M. Kurogochi, J. Furukawa, Y. Shinohara, N. Nagahori, M. Amano, H. Hinou, S. Nishimura : *Anal. Chem.*, **82**, 10021

- (2010).
- 33) Y. Huang, Y. Mechref, M. V. Novotny : *Anal. Chem.*, **73**, 6063 (2001).
 - 34) G. Yu, Y. Zhang, Z. Zhang, L. Song, P. Wang, W. Chai : *Anal. Chem.*, **82**, 9534 (2010).
 - 35) A. S. Edge, C. R. Faltynek, L. Hof, L. E. Reichert, Jr., P. Weber : *Anal. Biochem.*, **118**, 131 (1981).
 - 36) H. T. Sojar, O. P. Bahl : *Arch. Biochem. Biophys.*, **259**, 52 (1987).
 - 37) M. Yodoshi, A. Tani, Y. Ohta, S. Suzuki : *J. Chromatogr. A*, **1203**, 137 (2008).
 - 38) D. M. Carlson : *J. Biol. Chem.*, **243**, 616 (1968).
 - 39) G. Tettamanti, W. Pigman : *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 41 (1968).
 - 40) M. Podbielska, S. A. Fredriksson, B. Nilsson, E. Lisowska, H. Krotkiewski : *Arch. Biochem. Biophys.*, **429**, 145 (2004).
 - 41) H. Bell, C. M. E. Tallaksen, K. Try, E. Haug : *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **18**, 1103 (1994).
 - 42) L. A. Gennaro, O. Salas-Solano, S. Ma : *Anal. Biochem.*, **355**, 249 (2006).
 - 43) Y. Yagi, S. Yamamoto, K. Kakehi, T. Hayakawa, Y. Ohyama, S. Suzuki : *Electrophoresis*, **32**, 2979 (2011).

HPLC Analysis of *N*- and *O*-linked Glycans from Glycoproteins Released by Alkaline β -Elimination

Noriaki NISHIDA¹, Yasuko KOKAJI¹, Sachio YAMAMOTO^{*1}, Mitsuhiro KINOSHITA^{1,2} and Shigeo SUZUKI^{1,2}

* E-mail : yamamoto@phar.kindai.ac.jp

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kindai University, 3-4-1, Kowakae, Higashi-Osaka-shi, Osaka 577-8502

² Antiaging Center, Kindai University, 3-4-1, Kowakae, Higashi-Osaka-shi, Osaka 577-8502

(Received July 11, 2017; Accepted September 13, 2017)

Compared to *N*-linked oligosaccharides, *O*-linked oligosaccharides were rarely reported for their analysis due to the absence of glycanases having wide substrate specificity to release all *O*-linked oligosaccharides. Therefore, *O*-linked oligosaccharides have often been released by chemical methods, such as hydrazinolysis and β -elimination under alkaline conditions, but the liberated oligosaccharides released by these methods are susceptible to alkaline conditions which cause epimerization and degradation, called peeling reaction and the hydrolysis of *N*-acetyl groups. To compare the releasing efficiency and the degradation rate of previously reported releasing methods, we developed a novel HPLC method for the analysis of *O*-linked oligosaccharides: oligosaccharides released from glycoproteins are labeled quantitatively with 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) and separated by reversed-phase HPLC, and then fluorimetrically detected with high sensitivity. In the releasing methods, we found that 25 % ammonia is most optimal, and can be applied to the release of *N*-linked oligosaccharides. We established a method that could be applied to the rapid and simple and nonspecific release of *N*-linked oligosaccharides. Various AMC-labeled *N*-linked oligosaccharides released from glycoproteins were used as samples, and were separated by reversed-phase HPLC and fluorimetrically detected with high sensitivity for comparing with the enzymatic releasing method using PNGase F.

Keywords: *O*-linked glycans; *N*-linked glycans; glycoproteins; chemical releasing methods; 7-amino-4-methylcoumarin.