〔特集：最新の電気泳動技術〕

部分導入アフィニティーキャピラリー電気泳動による 糖タンパク質糖鎖の高感度解析技術の開発

鈴木 茂生

近畿大学薬学部薬品分析学研究室

Sensitive Analysis of Glycoprotein Glycans Using Partial Filling Affinity Capillary Electrophoresis

Shigeo Suzuki

E-mail: suzuki@phar.kindai.ac.jp

(受付 2014 年 5 月 22 日, 受理 2014 年 5 月 29 日)

はじめに

糖タンパク質の糖鎖は細胞間認識や細胞接着, あるいはタンパク質の体内動態や寿命に影響を与える¹⁾. 近年, 抗体医薬品を始め, 多くの糖タンパク質性医薬品が開発されている. 抗体医薬品に結合した糖鎖は単純な二本鎖複合型糖鎖であるが, 還元末端のフコース(Fuc)を除去したり, β -結合マンノース(Man)残基の4位に結合した *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)をもつ糖鎖が多い場合に, 薬理活性の本体である抗体依存性細胞障害(ADCC)活性が増加すること, および非還元末端の Gal 残基が多いほど補体依存性障害(CDC)活性が増強されることが知られる²⁾. また, ハイマンノース型糖鎖を含む抗体の血中クリアランスが速いと報告もある. これら抗体医薬品の糖鎖パターンは製造に用いる細胞系や培養条件によって変化するので, 製薬メーカーはその開発段階から糖鎖パターンを定量的に把握する必要がある.

糖鎖の解析手段としては, 糖鎖を切り出した後に適切な蛍光試薬で標識し, 蛍光検出器を用いる液体クロマトグラフィー(LC)やキャピラリー電気泳動(CE)で分析する方法と, 糖タンパク質やそのプロテアーゼ消化物を質量分析計(MS)や LC-MS で解析する方法が採用されている. 前者は糖鎖パターンを再現性よく定量的に解析できるが, 分離された成分ごとに別の方法で糖鎖構造を決定する必要があり, ペプチド鎖上の糖鎖分布を調べることはできない. 一方, 後者は糖鎖パターンと結合部位を同時に解析できるが, 定量性に欠ける.

ここでは, 糖鎖の高感度解析と糖鎖構造の同時解析を目的として, レクチンやグリコシダーゼなど, 様々な糖鎖認識タンパク質を用いる部分導入アフィニティーキャピラリー電気泳動法を検討したので, 本研究で得られた知見を紹介する³⁻⁷⁾.

部分導入アフィニティーキャピラリー 電気泳動法の原理

糖鎖を特異的に捕捉するタンパク質であるレクチンを用いた部分導入アフィニティーキャピラリー電気泳動法をモデルとして本法の概要を述べる(図1).

図1 レクチン(●)を用いた部分導入アフィニティーキャピラリー電気泳動法による APTS 標識オリゴ糖解析の概念図. キャピラリーには中性になるように被覆されたものを使用した. オリゴ糖の移動度の特異的な遅れはキャピラリーの一部に満たしたレクチンとの相互作用を示している.

なお, キャピラリーは PDMS 被覆されたものを用いて電気浸透流の影響を抑えた. 糖鎖は共通して 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS) で標識した. APTS は 3 つのスルホン酸基を有するので, APTS 標識糖鎖は電場中を速やかに陽極へと移動する. まず, 中性の泳動液で満たしたキャピラリーの陰極端からレクチン溶液を少量(キャピラリー長にして 2 cm 程度)圧力導入し, 次いで APTS 標識糖鎖を導入した後, -15 kV の電圧を印加する. 電気浸透流が抑えられているのでレクチン層はほとんど移動しないが, APTS は陽極へと移動するので,

レクチン層を速やかに通過する。もし、このときレクチンと相互作用する特異的な構造をもつ糖鎖が通過すると、その糖鎖はレクチンによって捕捉され、ピークの遅延、拡散あるいは消失などが観察される。一方レクチンに認識されない糖鎖はレクチン層を素通りするので、レクチンを加えなかった場合とほぼ同様の泳動プロファイルを示す。従って、レクチンに対して得られたピークプロファイルの一連の変化を調べることで、糖鎖の部分構造に関する情報が得られる。

一連のレクチンを用いた糖鎖解析技術の開発

市販されている代表的なレクチンを用いて、糖鎖の泳動挙動を調査した。その結果を図2に示す。なお、糖鎖にはブタ由来チログロブリンより調製した糖鎖を用いた。チログロブリンには一連の二本鎖複合型糖鎖と高マンノース型糖鎖が存在する。レクチンには、 α 2,3-結合シアル酸を認識する MAM, ポリラクトサミンや四本鎖糖鎖を認識する DSA, ポリラクトサミン糖鎖を認識する PWM, 三本鎖および四本鎖糖鎖を認識する PHA-L₄, α 2,6-結合シアル酸を認識する SSA, 二本鎖糖鎖を認識する LCA, β -Gal を認識する ECA, シアル酸や非還元末端の GlcNAc 残基を認識する WGA, 二本鎖および高マンノース型糖鎖を認識する Con A, Fuc を認識する AAL, 二本鎖および三本鎖糖鎖を認識する PHA-E₄ を選び、それぞれ 1 mg/mL 溶液を調製し、部分導入法による糖鎖の泳動プロファイルの変化を観察した。その結果、MAM, DSA, PWM および PHA-L₄ についてはチログロブリン糖鎖の泳動パターンに大きな変化は見られなかったことから、これらのレクチンが認識できる糖鎖はチログロブリンに含まれないことがわかる。一方、残りのレクチンについては非常に特徴的なプロファイルが得られた。SSA を導入するとすべての複合型糖鎖のピークが、また Con A ではすべての糖鎖のピークが拡散し、ほとんど消失しているように見える。一方、その他のレクチンでは、認識されたピークだけが 1 分から 2.5 分ほど遅延し、若干の広がりが観察された。レクチンを加えないときの泳動位置からシアル酸の数や糖鎖の重合度が、また、ピーク強度から糖鎖量の推定が可能であるが、さらに十種類ほどのレクチンについて相互作用を調べれば、それぞれの糖鎖の部分構造を特定できるので、糖鎖の定量的な構造解析が可能となる³⁾。

マルチ導入レクチンアフィニティー電気泳動法

ところで一群の糖鎖を確認するには、例えば目的成分

を認識するレクチンの混合液を用いて解析する方法が有効と考えられる。しかし、レクチンの一部は糖タンパク質であることから、複数のレクチンを混合すると沈殿を生成することがある。しかし、本法のようにレクチンを部分的に導入する方法ではレクチン間の接触が起こらないので、複数のレクチンによる解析を一度で達成できる。

図2 オリゴ糖の構造(A)およびブタ由来チログロブリンより調製したAPTS標識オリゴ糖を用いた各種レクチン部分導入アフィニティーキャピラリー電気泳動法(B)、レクチン溶液(1 mg/mL, Con A の場合は 0.25 mg/mL)を 0.5 psi で 30 秒間導入し、APTS 標識オリゴ糖(糖タンパク質として 0.1 mg/mL)を 0.5 psi で 30 秒間導入した。実験条件:泳動緩衝液, 0.8% hydroxylpropylcellulose を含む 50 mM Tris-酢酸緩衝液, pH 7.0; キャピラリー, PDMS-被覆, 内径 50 μ m, 40 cm/50 cm; 印加電圧, -15 kV。文献3より許可の上転載。

先のチログロブリン糖鎖の泳動パターンを見ると、モノシアル複合型糖鎖と高マンノース型糖鎖の分離が不完全であり、定量分析を行うことは難しい。そこで、複合型糖鎖に特異的な MAM, SSA, ECA および AAL をこの順にキャピラリーに導入して複合型糖鎖を捕捉させることで、チログロブリン中の高マンノース型糖鎖だけを特異的に

ピークとして検出できるかを調査したところ、予想通りすべての複合型糖鎖のピークが消失し、高マンノース型糖鎖のみのピーク群が観察され、定量が可能であった。

様々な糖鎖認識分子を利用した解析 および高感度化

本法では、レクチンに限らず糖鎖に対して特異性をもつ様々な分子を用いた解析が可能である。特にAPTS糖鎖の電気泳動移動度はpHの影響をほとんど受けないので、導入する分子種に合わせて泳動液の条件を任意に設定できるというメリットもある。本研究の一部は製薬企業との共同研究で実施されたが、その過程で人体に有害と考えられる α -結合Gal残基やN-グリコシルノイラミン酸(NeuGc)を特異的に検出できる方法の開発を検討した⁵⁾。当初、 α -Galに特異的なレクチンGSL I-B₄を用いることを検討したが、弱いながらもモノシアロ二本鎖複合型糖鎖に対して親和性をもつことが判明した。これに代わる方法として α -ガラクトシダーゼを部分導入して加水分解する方法を検討した。結果は省略するが、75 U/mLの濃度で添加したところ、完全に α -Gal残基が加水分解され、分解物と同じ泳動位置にピークを与えた。また、NeuGcについては特異的なレクチンは見つかっていない。そこで、抗NeuGc抗体を用いるところ、市販抗体の一部にNeuGcを含む糖鎖の存在を確認することができた⁶⁾。

おわりに

以上に述べたように部分導入キャピラリー電気泳動法は、自動化が容易で汎用性が高い。また、APTS標識化によって非常に高感度で糖鎖を検出できる。実際にタンパク質として数十 μ gもあれば、糖含量の低い糖タンパク質でも十分に解析が可能である。また、これらの方法は糖以外の分野でも応用が可能であり、CEが親和性解析と分離分析を組み合わせた方法として広く利用できると考えられる。

文 献

- 1) Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993; 3:97-130.
- 2) Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:317-327.
- 3) Yamamoto S, Kakehi K, Suzuki S, et al. Partial

filling affinity capillary affinity electrophoresis of glycoprotein oligosaccharides derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid. *J Chromatogr A*. 2011;1218:4772-4778.

- 4) Yagi Y, Suzuki S. Focusing review – Characterization of oligosaccharides in therapeutic antibodies. *Chromatography*. 2013;34:83-88.
- 5) Yagi Y, Ohyama T, Suzuki S. *et al*. Application of partial filling capillary electrophoresis using lectins and glycosidases to the characterization of oligosaccharides in therapeutic antibody. *Electrophoresis* 2011;32:2979-2985.
- 6) Yagi Y, Ohyama Y, Suzuki S, *et al*. Specific detection of N-glycolylneuraminic acid and Gal α 1-3Gal epitopes of therapeutic antibodies by partial-filling capillary electrophoresis. *Anal Biochem*. 2012; 431:120-126.
- 7) Yagi Y, Yamamoto S, Suzuki S. Partial filling affinity capillary electrophoresis using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump for sensitive profiling of glycoprotein-derived oligosaccharides. *J Chromatogr A*. 2012; 1246:84-89.