質量分析による Fc 融合タンパク質医薬品の O-結合型糖鎖部位特異的解析

橋井 則 貴,* 石 井 明 子

Site-specific O-Glycosylation Analysis of Therapeutic Fc-fusion Protein by Mass Spectrometry

Noritaka Hashii* and Akiko Ishii-Watabe

*Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences;
3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan.*

(Received February 26, 2018)

Therapeutic Fc-fusion proteins, created by linking bioactive peptides or receptor proteins to the Fc moiety of IgG, are currently being developed. In this development process, a Gly-Gly-Gly-Ser linker (G4S linker) is often used to link the peptide/protein and the Fc portion. O-xylose-type core glycans of glycosaminoglycan are known to attach to the Ser residue on the GSG motif in the G4S linker peptide repeats of the Fc fusion protein produced using the Chinese hamster ovary (CHO) cell expression system. In addition, a recent report demonstrated that unexpected mucin-type O-glycosylations occurred on a peptide in a bioactive peptide-Fc fusion protein; this glycosylation affected the bioactivity of the peptide. Therapeutic proteins with non-natural structures, such as Fc-fusion proteins, undergo unintended O-glycosylations; therefore, it is increasingly important to conduct detailed O-glycosylation analysis of fusion proteins during the developmental stages. In this paper, we have summarized recent reports on the unexpected O-glycosylation in fusion proteins, general O-glycosylation types and sequence motifs, and O-glycosylation analytical techniques involving O-linked oligosaccharide analysis and site-specific O-glycosylation analysis using LC/MS. In addition, we have introduced site-specific O-glycosylation analysis of Fc-fusion proteins with GS linker peptides by LC/MS using higher-energy collisional dissociation-tandem mass spectrometry (HCD-MS/MS) and electron-transfer dissociation (ETD)-MS/MS to obtain preferential dissociation of the peptide moiety in the glycopeptide.

Key words—Fc-fusion protein; O-glycosylation; site-specific O-glycosylation analysis; LC/MS; electron-transfer dissociation

1. はじめに

血中半減期の延長や有効性の向上を目的として、ペプチド/タンパク質とヒト IgG 抗体の Fc 部分を結合させた Fc 融合タンパク質の開発が活発化している。2016 年度の世界の医薬品売上げ第 3 位であり、ヒト腫瘍壊死因子 II 型受容体 (tumor necrosis factor receptor-II; TNFR-II) の細胞外ドメインとヒト IgG の Fc 部分を融合させたエタネルセプトを筆頭に、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) 受容体と Fc の融合タンパク質であるアフリベルセプト、Fc 部分と thrombopoietin receptor (TPOR) アゴニストペプチドを

融合させたロミプロスチム、ヒト細胞傷害性 T リンパ球抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4; CTLA-4) と改変型 Fc 部分を融合させたアバタセプトなど様々な Fc 融合タンパク質がわが国において上市されている (Table 1)。特にエタネルセプトについては既に特許が失効しており今後はバイオ後続品開発は国内外で活発化するものと予想される。

エタネルセプト等のある種の受容体タンパク質等と Fc 部分の融合タンパク質に加えて、single-chain variable fragment (scFv) の Fc 融合タンパク質や Fc 部分の C 末端にタンパク質を結合させた Fc 融合タンパク質の開発も進められている。例えば、otlertuzumab は抗 CD37 に対する scFv の Fc 融合タンパク質であり、慢性リンパ性白血病 (CLL) の治療への適用が期待されている。¹⁾ また、cergutuzumab amunaleukin は、癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen; CEA) に対するヒト化抗体

国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 (〒210-9501 川崎市川崎区殿町 3-25-26)

*e-mail: hashii@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第 137 年会シンポジウム S58 で発表した内容を中心に記述したものである。

Table 1. Approved Fc-fusion Protein Products in Japan (as of January 2018)

Brand name	INN	Manufacturer	Approved year	Main indication
Embrel	etanercept	Pfizer	2005	rheumatoid arthritis
Orencia	abatacept	Bristol-Myers Squibb	2010	rheumatoid arthritis
Romiplate	romiplostim	Kyowa Hakko Kirin	2011	chronic idiopathic thrombocytopenic purpura
Eylea	aflibercept	Bayer	2012	age-related macular degeneration
Zaltrap	aflibercept beta	Sanofi	2017	metastatic colorectal cancer

の一方の H 鎖の C 末端に CD25 への結合能を欠いた改変型のインターロイキン 2 (interleukin-2; IL2) を結合させた融合タンパク質であり、制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg 細胞) の活性化抑制効果を有する CEA 陽性腫瘍の治療薬として開発が進められている。²⁾ 今後、抗体関連分子の更なる臨床適応の拡大を目的として、このような高機能化した Fc 融合タンパク質の研究・開発が加速するものと思われる。

Fc 部分とペプチドやタンパク質を融合させるために種々のリンカーが用いられている。最も汎用されるリンカーペプチドとしては Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G4S) が挙げられる。このリンカーは柔軟性がありプロテアーゼに耐性を示す点で優れている。³⁾ リンカーペプチドを利用する場合、有効性や安全性への影響を考慮するとリンカーペプチド上に翻訳後修飾が生じないことが望ましいと考えられる。既に G4S リンカーペプチドを有する Fc 融合タンパク質が承認されているが、現在までにリンカーペプチド上の翻訳後修飾は報告されていない。^{4,5)} ところが近年、チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary; CHO) 細胞発現系により産生させた Fc 融合タンパク質の G4S リンカー上にグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan; GAG) のコア糖鎖として知られている O-キシロース (xylose; Xyl) 型糖鎖が付加していることが報告された。⁶⁻⁸⁾ このような意図しない糖鎖修飾は、品質、安全性確保の観点から重要品質特性となり得ると考えられる。本稿では、これまでに報告された融合タンパク質で生じた意図しない O-結合型糖鎖修飾について紹介するとともに、O-結合型糖鎖分析手法について、G4S リンカーを有する Fc 融合タンパク質の O-結合型糖鎖部位特異性解析の実施例を踏まえて概説する。

2. 融合タンパク質に生じる意図しない O-結合型糖鎖修飾

Table 2 に意図しない O-結合型糖鎖修飾が生じた事例をまとめた。Wen らは、CHO 細胞で作製した G4S ペプチドリンカーを有する二重特異性抗体 (IgG モノクローナル抗体の H 鎖 C 末端に scFv を結合した Fc 融合タンパク質) の構造解析を行い、(1) G4S リンカーペプチドの繰り返し構造 [G4S が 3 及び 4 回以上繰り返した構造 ((G4S)₃, (G4S)₄)] の Ser 残基に Xyl が付加されること、(2) GSG 配列が Xyl 付加のコンセンサス配列であると考えられること、(3) リンカーペプチドあたりの Xyl 付加の割合は GSG モチーフの数とともに増加すること、(4) Xyl 付加は利用する CHO 細胞の clone に依存すること、(5) O-Xyl 型糖鎖は GAG のコア構造 (Xyl-Gal-Gal-GlcA 等) であることを報告している。⁸⁾ Spahr らは、lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) の C 末端に GSGGG リンカーペプチドを介して Fc 部分を結合させた Fc 融合タンパク質の解析を行い、LCAT にムチン型 Core 1 糖鎖、また、GSGGG リンカーペプチドに複数の GAG コア構造が結合していることを報告した。また Fc 部分の C 末端にタンパク質 (詳細は不明) を融合させる際に (G4S)₄ リンカーペプチドを用いた場合でも GAG コア構造がリンカーペプチドに付加することを報告している。^{6,7)} Zhong らは、ヒト抗 IL22 抗体の N 末端に G6 リンカーペプチドを介して抗 IL17A ペプチドを結合させた融合タンパク質を作製した。⁹⁾ その構造を解析した結果、IL17A ペプチドに意図しないムチン型糖鎖が付加していることを明らかにした。IL17A ペプチドをアミノ酸変異によって O-結合型糖鎖の修飾を欠損させることにより、抗 IL17A 活性が改善することから、このムチン型糖鎖は生物活性に影響を及ぼす

Table 2. Previous Reports with Respect to Unexpected *O*-Glycosylation in Fusion Proteins

Title	Year	First author	Protein structure	Cell substrate	Glycan structure ^a	Glycosylation region
Discovery and investigation of <i>O</i> -xylosylation in engineered proteins containing a (GGGS) _n linker	2013	Wen, D.	bispecific antibodies	CHO	Xyl Xyl-Gal Xyl-Gal-Gal Xyl-Gal-Gal-GlcA Xyl-Gal-NeuNAc (GAG related glycans)	(G4S) ₃ or (G4S) ₄ linkers
Recombinant human lecithin-cholesterol acyltransferase Fc fusion: analysis of <i>N</i> - and <i>O</i> -linked glycans and identification and elimination of a xylose-based <i>O</i> -linked tetrasaccharide core in the linker region	2013	Spahr, C.	lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) Fc fusion	CHO	Mucin type glycans Xyl Xyl-Gal Xyl-Gal-Gal Xyl-Gal-Gal-GlcA Xyl (+ phosphate) -Gal-Gal-GlcA (GAG related glycans)	LCAT region GSGGG linker
Pyroglutamate and <i>O</i> -linked glycan determine functional production of anti-IL17A and anti-IL22 peptide-antibody bispecific genetic fusions	2013	Zhong, X.	anti-IL17A peptide fused to <i>N</i> -terminus of human anti-IL22 antibody using G6 linker	HEK293F	di-sialyl mucin type core 1 structure	anti-IL17A peptide
<i>O</i> -glycosylation of glycine-serine linkers in recombinant Fc-fusion proteins: attachment of glycosaminoglycans and other intermediates with phosphorylation at the xylose sugar subunit	2014	Spahr, C.	Protein fused to the C-terminus of an IgG Fc domain using (G4S) ₄ linker	CHO	Xyl Xyl-Gal Xyl-Gal-Gal Xyl-Gal-Gal-GlcA Xyl-Gal-Gal-GlcA-HexNAc Xyl (+ phosphate) -Gal-Gal-GlcA Xyl (+ phosphate) -Gal-Gal-GlcA-HexNAc (GAG related glycans)	(G4S) ₄ linker

^a Xyl, xylose; Gal, galactose; GlcA, glucuronic acid; HexNAc, *N*-acetyl hexosamine; GAG, glycosaminoglycan.

ものと推察している。以上のように (G4S)₄ のような GSG モチーフを含むリンカーペプチドを用いて融合タンパク質の開発を行う際は、意図しない *O*-結合型糖鎖の有無を確認することが重要である。もし、新規の翻訳後修飾が見つかった際は可能な限り有効性及び安全性との関連性を検討することが望ましい。

3. バイオ医薬品の *O*-結合型糖鎖解析

3-1. 主な *O*-結合型糖鎖 CHO 細胞に代表される動物細胞によりタンパク質を産生すると翻訳後修飾の 1 つとして糖鎖修飾が生じ得る。結合糖鎖に

は *N*-結合型糖鎖と *O*-結合型糖鎖の 2 種類がある。*N*-結合型糖鎖はコンセンサス配列 (Asn-X-Ser/Thr) の Asn 残基の側鎖に結合することが知られており、比較的結合部位を特定し易い。一方、*O*-結合型糖鎖は Ser あるいは Thr 残基の側鎖に付加することが知られているものの、コンセンサス配列に関する知見はなく、結合部位を特定することはできない。

動物細胞に付加される主な *O*-結合型糖鎖を Fig. 1 に示した。ムチン型糖鎖は、コア糖 (還元末端糖) 残基である *N*-アセチルガラクトサミン (*N*-acetyl-

Fig. 1. The Core Structures of General O-Linked Glycans

Man, mannose; Gal, galactose; Glc, glucose; GalNAc, N-acetylgalactosamine; GlcNAc, N-acetylglucosamine; NeuNAc, N-acetylneuraminic acid; Fuc, fucose; GlcA, glucuronic acid; IdoA, iduronic acid; Xyl, xylose.

galactosamine; GalNAc) が α 結合により Ser/Thr 残基に結合することを特徴とする糖鎖である。ムチン型糖鎖は GalNAc の非還元末端に付加する糖残基の種類及び結合様式の違いにより、現在までに 8 種類のコア構造が報告されている。ムチン型糖鎖とは名前の通り腸粘膜のムチンに含まれる糖タンパク質に多くみられる糖鎖である。腸粘膜に限らず Core 1, Core 2 糖鎖が付加した糖タンパク質は様々な細胞及び組織で見られるが、Core 5–Core 8 糖鎖が見つかることは稀であるとされている。¹⁰⁾ 糖タンパク質性医薬品で報告されている主なムチン型糖鎖は Core 1 及び Core 2 構造を基本骨格とする糖鎖である。例えば、エタネルセプトの TNFR-II の C 末端付近には 13 ヲ所の O-結合型糖鎖付加部位があり、主に N-アセチルノイラミン酸 (N-acetylneuraminic acid; NeuNAc) が 1 及び 2 分子付加した Core 1 構造の O-結合型糖鎖が付加している。¹¹⁾ またエボエチンの 126 番目の Ser 残基にも Core 1 構造の O-結合型糖鎖が付加していることが明らかにされている。¹²⁾

ムチン型以外の糖鎖としては、前述した GAG 糖鎖以外に、N-アセチルグルコサミン (N-acetylglucosamine; GlcNAc)、マンノース (mannose; Man)、フコース (fucose; Fuc)、及びグルコース (glucose; Glc) をコア構造とする糖鎖がある。O-GlcNAc 修飾はリン酸化部位あるいはリン酸化部位の近傍で生じることが多く、転写や翻訳に係わるタンパク質に比較的多くみられる糖鎖である。O-Man 型糖鎖としては、基本構造の 4 糖の NeuNAc-Gal-GlcNAc-Man や human natural killer-1 (HNK-1) 型とよばれる HSO₃-GlcA-Gal-GlcNAc-Man が知られている。¹³⁾ 近年、ジストログリカンの O-Man 型糖鎖中にリビトールリン酸が結合していることが明らかにされ、同糖鎖の形成不全と筋ジストロフィー発症との関連性が示唆されており、現在、新規治療薬の開発に向けて研究が活発化している。¹⁴⁾ O-Man 修飾は酵母で産生された糖タンパク質にみられる翻訳後修飾の 1 つでもあり、ピキア酵母で作製したヒトエリスロポエチンの Ser126 に O-Man 型糖鎖が付加したことが報告されている。¹⁵⁾

Table 3. Glycoprotein Products with *O*-Glycosylation Listed in Japanese Accepted Names for Pharmaceuticals (JAN) Database

JAN	Protein structure	Deduced glycan structure ^a	Glycosylation site	Listing year
Turoctocog Alfa (Genetical Recombination)	human blood coagulation factor VIII analog	NeuNac NeuNac-Gal-GalNac	H-chain: S750	2012
		NeuNac-Gal-GalNac	L-chain: T5, T6	
Eftrenonacog Alfa (Genetical Recombination)	Fc-human blood coagulation factor IX (FIX) fusion glycoprotein	Xyl-Xyl-Glc	A-chain S53	2014
		(NeuNac-Gal-GalNac) _{0,1} -Fuc	A-chain S61	
		(SO ₃) _{0,1} NeuNac _{1,2} Hex _{1,2} HexNac _{1,2}	A-chain T159, T169	
Choriogonadotropin Alfa (Genetical Recombination)	human chorionic gonadotropin	NeuNac NeuNac-Gal-GalNac NeuNac-Gal-GalNac	No information	2014
Efralocog Alfa (Genetical Recombination)	Fc-human blood coagulation factor VIII (FVIII) fusion glycoprotein	NeuNac ₂ { Gal-GalNac	Ser741, Ser743	2014
Nonacog Beta Pegol (Genetical Recombination)	human blood coagulation factor IX analog	Xyl-Xyl-Glc	Ser53	2015
		NeuNac-Gal-GlcNac-Fuc	Ser61	
		NeuNac ₀₋₂ { Gal-GalNac	Thr159, Thr163, Thr169	
Turoctocog Alfa Pegol (Genetical Recombination)	Turoctocog Alfa with PEGylation	PEG-NeuNac-Gal-GalNac	Ser750	2015
Damocog Alfa Pegol (Genetical Recombination)	human blood coagulation factor VIII analog	NeuNac NeuNac-Gal-GalNac	No information	2015
Albutrepenonacog Alfa (Genetical Recombination)	human blood coagulation factor IX-human albumin fusion protein	Xyl-Xyl-Glc	Ser53	2016
		NeuNac-Gal-GlcNac-Fuc	Ser61	
		NeuNac ₂ { Gal-GalNac	T148, T159, T163, T169 or T172, and T179	
Octocog Beta (Genetical Recombination)	human blood coagulation factor VIII	Mucin type Core 1	No information	2016
Lonocog Alfa (Genetical Recombination)	human blood coagulation factor VIII	NeuNac NeuNac-Gal-GalNac NeuNac-Gal-GalNac	No information	2016
Etanercept (Genetical Recombination) [Etanercept Biosimilar 1]	Fc-Extracellular domain of human TNFR fusion glycoprotein	NeuNac NeuNac-Gal-GalNac NeuNac-Gal-GalNac	No information	2017

^a Deduced glycan structures were confirmed based on the JAN database. NeuNac, *N*-acetylneuraminic acid; Gal, galactose; GalNac, *N*-acetylgalactosamine; Xyl, xylose; Glc, glucose; Fuc, fucose; SO₃, sulfate group; Hex, hexose; HexNac, *N*-acetylhexosamine; PEG, polyethylene glycol.

O-Fuc 型糖鎖は血液凝固因子 VII や IX の上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF) ドメインにみられる糖鎖修飾である。¹⁶⁾ *O*-Fuc 型糖鎖は血液凝固因子以外にも Notch の EGF ドメインにもみられる糖鎖修飾であり, Notch シグナルの活性化に重要であることが報告されている。¹⁷⁾ *O*-Glc 修飾も血液凝固因子にみられる糖鎖修飾である。Glc の非還元

末端側には 2 分子の Xyl が付加していることが知られている。Nishimura らは, Xyl-Xyl-Glc が付加するコンセンサス配列として -C-X-S-X-P-C- を挙げている。¹⁸⁾

わが国で承認申請される医薬品はすべて日本医薬品一般名称 (Japanese Accepted Names for Pharmaceuticals; JAN) が付されるが, H24 年 5 月以降

Fig. 2. The Scheme of General O-Linked Glycosylation Analysis

に JAN が付されたバイオ医薬品の中で、*O*-結合型糖鎖修飾に関する情報が公開されている糖タンパク質医薬品は 11 品目あった (Table 3)。それらはエタネルセプトの後続品を除き、いずれも血液凝固因子並びにそれらの類縁体であり、主な糖鎖の推定構造はコア構造をムチン型 Core 1 型 (*O*-GalNAc 型)、*O*-Glc 型、及び *O*-Fuc 型の糖鎖である。

3-2. *O*-結合型糖鎖分析 *O*-結合型糖鎖の分析は、まず「オリゴ糖分析 (化学的にタンパク質から遊離させた *O*-結合型糖鎖の解析)」により主な糖鎖構造を推定した後に、その糖鎖情報を翻訳後修飾の情報として利用しつつデータベース検索を組み合わせたペプチドマッピングにより「部位特異的解析 (結合部位毎の糖鎖解析)」が行われることが多い (Fig. 2)。ここでは、*O*-結合型糖鎖の糖鎖分析方法について概説する。

3-2-1. オリゴ糖分析 オリゴ糖分析では糖鎖を遊離させる必要があるが、Ser/Thr 残基からすべての *O*-結合型糖鎖を切断する酵素が見つからない。そのため、*O*-結合型糖鎖は、通例、 β -脱離反応あるいはヒドラジン分解等のアルカリ処理により遊離される。¹⁹⁾ 遊離糖鎖は、親水性が高くそのままではカラムに保持され難く、イオン化効率も低いことから、一般には 2-aminobenzamide (2-AB) あるいは 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) 等で還元末端糖を標識した後に、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 等で分析される。蛍光検出が可能な 2-AB 標識法は感度の点で PMP 標

識よりも優れている。PMP 標識法はアルカリ条件下での標識が可能であり、アルカリ処理中に生じる還元末端糖の分解を避けつつ標識ができる点で優れている。²⁰⁾

LC/MS によるオリゴ糖分析では、標準糖鎖と試料中の糖鎖のピークの保持時間及び質量等が一致することを確認することで構造推定が行われる。ところが、*O*-結合型糖鎖については入手可能な参照品が少なく、糖組成は推定できるものの、詳細な構造が明らかにされないことが多い。参照品として利用可能な *O*-結合型糖鎖試薬等の拡充が今後のオリゴ糖分析の課題の 1 つとして挙げられる。

3-2-2. 部位特異的解析 *O*-結合型糖鎖の部位特異的解析は、ペプチドマッピングを応用して実施される。タンパク質を変性・還元アルキル化後、トリプシン等のプロテアーゼで分解した後、LC/MS 及びデータベース検索を組み合わせる糖ペプチド解析を実施するのが一般的である。LC/MS を用いたペプチドマッピングによりペプチドのアミノ酸配列を確認する場合は、衝突誘起解離 (collision-induced dissociation; CID) と呼ばれるフラグメンテーション方法を利用したタンデム質量分析 (MS/MS) によりペプチドイオンの断片化を行い、生成した b-/y-系列のフラグメントイオンをペプチドのフラグメントパターンの理論値と照合することによってアミノ酸配列を確認する (MS/MS 解析)。一方、糖ペプチドの MS/MS 解析では CID-MS/MS では十分なペプチド部分のフラグメントイオンが得

Fig. 3. The Characteristics of O-Linked Glycopeptide Analysis by Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) by Using Collision-induced Dissociation (CID), Higher-energy Collisional Dissociation (HCD), and Electron-transfer Dissociation (ETD)

(A) The general fragmentation pattern of peptide. The $b-/y$ -type ions and $c-/z$ -type ions are produced by CID-, HCD-, and ETD-MS/MS. The fragmentation patterns obtained by CID-MS/MS (B), HCD-MS/MS (C), and ETD-MS/MS (D). *CID using ion trap type mass spectrometer.

られないことから、電子移動解離 (electron-transfer dissociation; ETD) 等の断片化手法も併用される。CID-MS/MS では $b-/y$ -系列のフラグメントイオンが生成されるのに対して ETD-MS/MS では $c-/z$ -系列のフラグメントイオンが生じるという特徴がある [Fig. 3(A)]. 以下に、各フラグメンテーション方法により糖ペプチドを断片化した時の特徴について述べる。各手法の原理や違い等については多くの論文等が報告されていることから、詳細についてはそれらを参照頂きたい。^{21,22)}

(1) 衝突誘起解離 (CID)

CID はイオンを不活性ガスと衝突させることでイオンを断片化させる手法である。衝突エネルギーの大きさにより、マトリックス支援レーザー脱離イ

オン化法 (MALDI) を利用した time of flight (TOF)/TOF 型質量分析計による high-energy CID-MS/MS と、四重極型あるいはイオントラップ (IT) 型質量分析計による low-energy CID-MS/MS に分類される。四重極型質量分析計による CID-MS/MS は 1 次開裂により生じたフラグメントイオンがコリジョンセルを通過中に 2 次開裂により断片化されるため、低質量側のフラグメントイオンを生じ易いのが特徴である。一方、イオントラップ (IT) 型質量分析計による CID-MS/MS は 2 次開裂を起こさない。多段階 MS/MS を行うことで特定のフラグメントイオンの詳細な構造情報を入手できるという特徴がある反面、MS/MS スペクトルの低質量側の 1/3 の範囲が失われるという欠点がある。最近、

Fig. 5. Analysis of the Peptide with Mucin-type *O*-Linked Glycan (NeuNAc1Hex1HexNAc1) from Etanercept with (G4S)₄ Linker Peptide by LC/MS using ETD-MS/MS

(A) Basepeak chromatogram (upper panel) and extracted ion mass chromatogram (lower panel) of Peptide 1 (m/z 907.413) obtained by LC/MS analysis. (B) The HCD-MS/MS spectrum of Peptide 1. (C) The ETD-MS/MS spectrum of Peptide 1. (D) Identification of the peptide with mucin type *O*-linked glycan (NeuNAc1Hex1HexNAc1) by database search analysis using the BioPharma Finder 2.0 (Thermo Fisher Scientific). The *O*-linked glycan was attached to Thr at position 8 in etanercept with (G4S)₄ linker peptide. Bold characters, G4S linker peptide.

胞を用いて作製し、Protein Gにより精製した。精製したFc融合等タンパク質を還元アルキル化した後、トリプシン消化を行い、得られた消化物を試料としてHCD-MS/MS及びETD-MS/MSを用いたLC/MS分析によりペプチドマッピングを行った。Figure 4(B)にはLC/MSにより得られたベースピーククロマトグラムを示した。解析の結果、一部の配列が重複するペプチドを含めて48本のペプチドが検出され、各ピークの精密質量及びMS/MSスペクトルのフラグメントパターンについて理論値との照合により、100%のアミノ酸配列が確認された[Fig. 4(C)]。

Figure 5にG4S-エタネルセプトのムチン型糖鎖の付加部位を特定した結果を示す。約25分に溶出されたPeptide 1は測定精密質量(2718.217 Da)より、カルボキシメチル化されたN末端配列ペプチド(LPAQVAFPTPYAPEPGSTCR)にNeuNAc1Hex1

HexNAc1が付加したペプチドの計算精密質量(2718.211 Da)と一致することが明らかとなった[Fig. 5(A)]。次にPeptide AのHCD-MS/MSスペクトルを確認した結果、糖鎖由来のオキシニウムイオン(m/z 186, 204, 及び274)が検出され、HexNAc及びNeuNAcを含む糖ペプチドである可能性が示唆された[Fig. 5(B)]。さらにHCD-MS/MSスペクトルとETD-MS/MSスペクトルのデータベース検索を行った結果[Fig. 5(C)]、Peptide 1は8番目のThr残基にNeuNAc1Hex1HexNAc1が付加し、18番目のCys残基がカルボキシメチル化されたペプチドであると同定された[Fig. 5(D)]。以前にエタネルセプトの8番目のThr残基にはNeuNAc1Hex1HexNAc1が付加していることが報告されており、¹¹⁾ N末端配列付近の*O*-結合型糖鎖修飾はリンカーペプチドの導入の影響を受けないことが示唆された。

Fig. 6. Analysis of the Peptide Containing (G4S)₄ Linker by LC/MS

(A) The mass chromatograms of non-glycosylated peptide (Peptide 2), peptide with xylose (Peptide 3) and peptide with hexose-xylose (Peptide 4). (B) The full mass spectrum between m/z 880 and 1040.

Figure 6に G4S リンカーペプチドを含むペプチド (G4S ペプチド) を解析した結果を示した。非修飾ペプチド [SCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDK, m/z 885.83 (2 価イオン), 測定精密質量 1769.65 Da, 計算精密質量 1769.650 Da; Peptide 2] は 9.8 分付近にややブロードしたピークとして溶出されていることがわかる [Fig. 6(A)]。一般に糖ペプチドは非修飾ペプチドに近接して溶出されることが多い。そこで 9–11 分付近のマスペクトルを確認した結果, 10.1 分付近に非修飾ペプチド (Peptide 2) との質量差が 132 Da となるペプチド (Peptide 3 (m/z 951.85)), 10.9 分付近に Peptide 3 と

の質量差が 162 Da となるペプチド [Peptide 4 (m/z 1032.99)] が溶出されていることが明らかとなった [Fig. 6(B)]。質量差 132 Da 及び 162 Da はそれぞれ Xyl 及び Hex に相当することから, G4S リンカーペプチドに意図しない O-Xyl 型糖鎖が付加していることが示唆された。なお, Peptide 2 に対する Peptide 3 及び Peptide 4 のピーク面積比率 (%) はそれぞれ 3.5% 及び 0.8% であった。

以上, O-結合型糖鎖付加ペプチドの部位特異的解析には, HCD-MS/MS や ETD-MS/MS を利用した LC/MS 分析が有用であることを示した。特にペプチド中に複数の Ser/Thr が含まれる場合, ETD-

MS/MS は結合部位を決定するための極めて強力なツールであると思われる。また本稿ではエタネルセプトのヒンジ領域に G4S リンカーペプチドを導入した場合にリンカーペプチドに O-Xyl 型糖鎖が付加されることを示した。なおデータを示さなかったが、われわれは G4S リンカーペプチドを含む既承認 Fc 融合タンパク質においてもリンカーペプチドに意図しない O-Xyl 型糖鎖が付加する可能性があることを見い出している。リンカーペプチド中に GSG モチーフが含まれる場合は O-Xyl 型糖鎖が付加している可能性があることを考慮して構造解析を実施することが重要であると考え。

5. おわりに

本稿では、融合タンパク質の意図しない O-結合型糖鎖修飾に加えて、主に動物細胞でみられる O-結合型糖鎖の構造と種類、並びにバイオ医薬品の O-結合型糖鎖解析に関連してオリゴ糖分析、及び部位特異的構造解析技術について概説した。さらに、G4S ペプチドリリンカーを導入した Fc 融合糖タンパク質をモデルとして O-結合型糖鎖部位特異的解析の実施例を示すとともに HCD-MS/MS 及び ETD-MS/MS が有用であることを紹介した。

近年の質量分析計とペプチドマッピングに関連するデータベース検索ソフトウェアの進歩により、O-結合型糖鎖の部位特異的解析が身近なものになってきた。特に、1つのペプチドに複数の糖鎖が結合している場合でも部位毎の糖鎖不均一性解析を可能とした ETD 等の MS/MS 技術は糖鎖の部位特異的解析技術として極めて画期的な測定技術である。しかしながら、それらの糖鎖の部位特異的解析には課題も残されている。第一に糖鎖構造の推定である。例えば HexNAc あるいは Hex が付加していたとき、それぞれムチン型 (O-GalNAc 型) と O-GlcNAc 型、あるいは O-Man 型と O-Glc 型を区別することは容易ではない。また、HexNAc-HexNAc についても GlcNAc-GalNAc と GalNAc-GalNAc の識別を行うことはできない。現時点では LC/MS により部位特異的解析では糖鎖構造を推定することは困難であり、オリゴ糖分析によりあらかじめ詳細な糖鎖プロファイルを作成しておくことが部位毎の糖鎖構造を推定するための鍵になると思われる。第二の課題として網羅的な部位特異的解析が挙げられる。前述したように O-結合型糖鎖付加部位のコン

センサ配列は明らかにされていない。そのため十分な糖鎖修飾の知見がないタンパク質の場合は、概して Ser/Thr 残基を含む領域を網羅的に解析する必要が生じる。網羅的解析のためには、データベース検索ソフトウェアの利用が不可欠であるが、既存のソフトウェアは O-結合型糖鎖の部位特異解析に対応はしているものの、多種類の糖鎖修飾を同時に検索することに関してはスループット性の点で課題が残されているのが現状である。

O-結合型糖鎖は短鎖であり構造的特徴が少なく、また通例 Ser/Thr 残基はタンパク質中に多数あることから、結合部位毎の網羅的かつ詳細な不均一性を明らかにすることができないケースが生じ易い。しかし本稿で紹介したように意図しない O-結合型糖鎖修飾が生じるケースが起こり得ることから、特に新規構造を有する糖タンパク質を開発する際は、特性解析の段階で可能な限り詳細な O-結合型糖鎖の部位特異的解析を行うことが肝要となる。今後、オリゴ糖分析への適用を目的として O-結合型糖鎖参照品 (市販品) が拡充されること、及び、膨大な質量分析データを高スループットに糖鎖修飾解析を実施するためのデータベース検索技術の開発が進むことを期待したい。

謝辞 本稿の作成にあたり、G4S リンカーペプチドを導入したエタネルセプトを提供くださいました国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 鈴木琢雄博士に深く感謝を申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Robak T., Hellmann A., Kloczko J., Loscertales J., Lech-Maranda E., Pagel J. M., Mato A., Byrd J. C., Awan F. T., Hebart H., Garcia-Marco J. A., Hill B. T., Hallek M., Eisenfeld A. J., Stromatt S. C., Jaeger U., *Br. J. Haematol.*, **176**, 618–628 (2017).
- 2) Klein C., Waldhauer I., Nicolini V. G., Freimoser-Grundschober A., Nayak T., Vugts D. J., Dunn C., Bolijn M., Benz J., Stihle M., Lang S., Roemmele M., Hofer T., van Puijenbroek E., Wittig D., Moser S., Ast O., Brünker P., Gorr I. H., Neumann S., de Vera

- Mudry M. C., Hinton H., Cramer F., Saro J., Evers S., Gerdes C., Bacac M., van Dongen G., Moessner E., Umaña P., *Oncoimmunology*, **6**, e1277306 (2017).
- 3) Michaelson J. S., Demarest S. J., Miller B., Amatucci A., Snyder W. B., Wu X., Huang F., Phan S., Gao S., Doern A., Farrington G. K., Lugovskoy A., Joseph I., Bailly V., Wang X., Garber E., Browning J., Glaser S. M., *MAbs*, **1**, 128–141 (2009).
- 4) Peppel K., Crawford D., Beutler B., *J. Exp. Med.*, **174**, 1483–1489 (1991).
- 5) Semeraro F., Morescalchi F., Duse S., Parmeggiani F., Gambicorti E., Costagliola C., *Drug. Des. Devel. Ther.*, **7**, 711–722 (2013).
- 6) Spahr C., Shi S. D., Lu H. S., *MAbs*, **6**, 904–914 (2014).
- 7) Spahr C., Kim J. J., Deng S., Kodama P., Xia Z., Tang J., Zhang R., Siu S., Nuanmanee N., Estes B., Stevens J., Zhou M., Lu H. S., *Protein Sci*, **22**, 1739–1753 (2013).
- 8) Wen D., Foley S. F., Hronowski X. L., Gu S., Meier W., *Anal. Chem.*, **85**, 4805–4812 (2013).
- 9) Zhong X., Kieras E., Sousa E., D’Antona A., Baber J. C., He T., Desharnais J., Wood L., Luxenberg D., Stahl M., Kriz R., Lin L., Somers W., Fitz L. J., Wright J. F., *J. Biol. Chem.*, **288**, 1409–1419 (2013).
- 10) Brockhausen I., Schachter H., Stanley P., “Essentials of Glycobiology,” 2nd ed., ed. by Varki A., Cummings R. D., Esko J. D., Freeze H. H., Stanley P., Bertozzi C. R., Hart G. W., Etzler M. E., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2009, pp. 115–127.
- 11) Houel S., Hilliard M., Yu Y. Q., McLoughlin N., Martin S. M., Rudd P. M., Williams J. P., Chen W., *Anal. Chem.*, **86**, 576–584 (2014).
- 12) Jiang J., Tian F., Cai Y., Qian X., Costello C. E., Ying W., *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 6265–6274 (2014).
- 13) Freeze H. H., Haltiwanger R. S., “Essentials of Glycobiology,” 2nd ed., ed. by Varki A., Cummings R. D., Esko J. D., Freeze H. H., Stanley P., Bertozzi C. R., Hart G. W., Etzler M. E., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2009, pp. 163–173.
- 14) Kanagawa M., Kobayashi K., Tajiri M., Many H., Kuga A., Yamaguchi Y., Akasaka-Many K., Furukawa J. I., Mizuno M., Kawakami H., Shinohara Y., Wada Y., Endo T., Toda T., *Cell Rep*, **14**, 2209–2223 (2016).
- 15) Gong B., Burnina I., Stadheim T. A., Li H., *J. Mass Spectrom.*, **48**, 1308–1317 (2013).
- 16) Harris R. J., Ling V. T., Spellman M. W., *J. Biol. Chem.*, **267**, 5102–5107 (1992).
- 17) Okajima T., Irvine K. D., *Cell*, **111**, 893–904 (2002).
- 18) Nishimura H., Kawabata S., Kisiel W., Hase S., Ikenaka T., Takao T., Shimonishi Y., Iwanaga S., *J. Biol. Chem.*, **264**, 20320–20325 (1989).
- 19) Nishida N., Kokaji Y., Yamamoto S., Kinoshita M., Suzuki S., *Bunseki Kagaku*, **66**, 909–917 (2017).
- 20) Furukawa J., Piao J., Yoshida Y., Okada K., Yokota I., Higashino K., Sakairi N., Shinohara Y., *Anal. Chem.*, **87**, 7524–7528 (2015).
- 21) Kubota M., *Japanese Journal of Pesticide Science*, **41**, 236–238 (2016).
- 22) Hart-Smith G., *Anal. Chim. Acta*, **808**, 44–55 (2014).