

## Application News

# No. B64

MALDI-TOF 質量分析法

## バイオ医薬品中の糖鎖評価法の検討

-O-glycan 分析前処理における Peeling 反応の抑制-

抗体医薬品に代表されるようなタンパク質性バイオ医薬品の多くは、CHO (Chinese hamster ovary) 細胞など真核生物由来の培養細胞で合成されます。そのため、生合成されたタンパク質には必然的に多くの翻訳後修飾が存在します。その中でも糖鎖の修飾は、タンパク質の機能調節に関わっている他、構造によっては抗原性を生じてしまう場合もあるため、バイオ医薬品の品質に関する評価項目として注目されています。しかしながら、糖鎖の評価には様々な技術的課題が存在します。特に O-結合型糖鎖(O-glycan)は、酵素を用いてタンパク質から糖鎖を網羅的に切り出すことが難しいために、化学的に切り出す方法としてヒドラジンによる脱離反応やアルカリ触媒による脱離反応が主に利用されているのですが、この方法には改善しなければならない課題があります。ヒドラジンによる脱離反応では爆発性試薬の取り扱いに細心の注意が必要となるため手軽に実施するというわけにはいきませんし、アルカリ触媒を用いた方法では連続的なβ脱離反応により糖鎖が段階的に分解してしまう Peeling 反応が起こることが知られています。これまで、アルカリ触媒を用いた O-glycan の分析では、アルカリ条件での糖鎖切り出しと還元剤による糖鎖の根元部分の還元を同時に行う還元的アルカリ触媒β脱離法を用いて、連続的なβ脱離反応を起こさせないように糖鎖の切り出しが行われてきましたが、この方法では糖鎖の根元部分を完全に還元してしまうため、糖鎖切り出し後に蛍光試薬などでの標識を行うことができずに分析手法が限定されてしまうというデメリットがありました。また、このようにして得られた糖鎖を質量分析を用いて分析する場合にも、糖鎖自身のイオン化効率が低いためにペプチド分析のように高感度に分析することはできませんでした。そこで、糖鎖の根元を還元せずに 2-AB や PA などの蛍光標識試薬を結合させる方法として非還元的アルカリ触媒β脱離/蛍光標識法が検討されてきたのですが、連続的なβ脱離反応を大幅に抑制するには至っていません。それでも、これまでの O-glycan を分析対象とした学術的研究の中では、この Peeling 反応による副生成物の存在が研究の大きな妨げになるほどの問題にはなりません。しかしながら、バイオ医薬品などヒトの体に投与することが前提となる医薬品においては品質管理の面で糖鎖を評価しなければならず、その際に生じる副生成物の存在をどのように取り扱うべきかは大きな問題となります。

本稿では、Peeling 反応を抑制した O-glycan の化学的な切り出し方法について、PMP 標識法<sup>1)</sup>をベースに検討した結果を報告します。

S. Nakaya

### ■ アルカリ試薬を改変した One-pod-PMP 標識

アルカリ触媒による糖鎖の切り出しと、切り出した糖鎖の PMP 標識については、28%アンモニア水を用いる Wang ら<sup>2)</sup>の One-Pod 法をベースとして用いました。Peeling 反応の抑制効果を期待し、アルカリ触媒としてカルバミン酸アンモニウムを検討しました。サンプルにはフェツイン (Fetuin from fetal bovine serum; Sigma-Aldrich F3004-25MG) を用い、次の方法で O-glycan の切り出しと標識を行いました。

10 mg のフェツインを 1 mL の水に溶解した後に 10 μL ずつ 1.5 mL ねじ口キャップ付アシストチューブに分注し、室温環境下で減圧乾固しました。その後、糖鎖切り出し/標識試薬溶液として、次の 2 種類の試薬溶液を作製しました。

まず、17.4 mg の PMP (1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, Sigma-Aldrich) に 200 μL の 28%水酸化アンモニウム (Sigma-Aldrich) を加えて溶解したものを「アンモニア水 PMP 標識溶液」としました (PMP 終濃度: 0.5 M、アンモニア終濃度: 28%)。次いで、34.8 mg の PMP に 200 μL のメタノール溶液を加えて溶解したものと、390 mg のカルバミン酸アンモニウムを 1 mL の水に溶解した水溶液を等量混ぜ合わせたものを「カルバミン酸アンモニウム PMP 標識溶液」としました (PMP 終濃度: 0.5 M、カルバミン酸アンモニウム終濃度: 2.5 M)。

これらの溶液をそれぞれ 50 μL ずつ、乾固したフェツインに加え、50℃で 16 時間反応させて糖鎖のタンパク質からの切り出しと PMP 標識を同時に行いました。反応後の溶液をガラス製マイクロチューブに移し、500 μL の水を加えてよく攪拌した後、室温環境下で遠心乾固しました。乾固した反応試料に 1%酢酸水溶液 (500 μL) とクロロホルム (500 μL) を加えて強く攪拌し、遠心して水層 (上層) とクロロホルム層 (下層) とに分離した後、水層を新たなガラス製マイクロチューブに移しました。移した水層にクロロホルムを加えて液/液分離する作業をさらに 2 回繰り返した後、PMP 標識糖鎖を含む水層を 1.5 mL チューブに回収しました。

回収した水溶液を室温環境下で減圧乾固して 1 mL の水に再溶解したものを、2 mL のアセトニトリルと 2 mL の水で洗浄した C18 SPE カートリッジ (SupelClean LC-18 SPE Tube 1 mL, Supelco) に注入し、3 mL の 3%アセトニトリル水溶液で洗浄した後、1 mL の 30%アセトニトリル水溶液で PMP 標識糖鎖を溶出しました。溶出した溶液を室温環境下で遠心乾固し、50 μL の 50%アセトニトリル水溶液に再溶解して適量を質量分析および液体クロマトグラフ分析に用いました。

## ■ PMP 標識 O-glycan の MALDI-TOF MS 分析

PMP 標識 O-glycan 試料 (2  $\mu\text{L}$ ) に 0.1% トリフオロ酢酸 (TFA) 水溶液 (10  $\mu\text{L}$ ) を加えてよく攪拌し、1 M 水酸化ナトリウム (10  $\mu\text{L} \times 3$ )、水 (10  $\mu\text{L} \times 5$ )、50% アセトニトリル/0.1% TFA 水溶液 (10  $\mu\text{L} \times 3$ )、0.1% TFA 水溶液 (10  $\mu\text{L} \times 5$ ) で洗浄した NuTip Carbon (glygen) に吸着させ、0.1% TFA 水溶液で洗浄した後、50% アセトニトリル/0.1% TFA 水溶液 (約 3  $\mu\text{L}$ ) で溶出した溶液を全量 MALDI ターゲットプレートに搭載しました。搭載した試料溶液が乾燥した後、この試料の上に 0.5  $\mu\text{L}$  の MALDI 用マトリックス溶液を重層して乾燥させ、さらに 0.2  $\mu\text{L}$  のエタノールで再

結晶化させたものを測定しました。尚、MALDI 用マトリックスには 5 mg DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid, Shimadzu GLC) を 50% アセトニトリル/0.05% TFA 水溶液 (500  $\mu\text{L}$ ) に溶解したものを使用し、測定にはマトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-7090、Shimadzu/Kratos) を用いました。

測定の結果、図 1 に示したように、28% アンモニア水を用いた場合に比べ、終濃度 2.5 M のカルバミン酸アンモニウムを用いた場合の方が、Peeling 反応産物のシグナル強度が弱く検出されました。

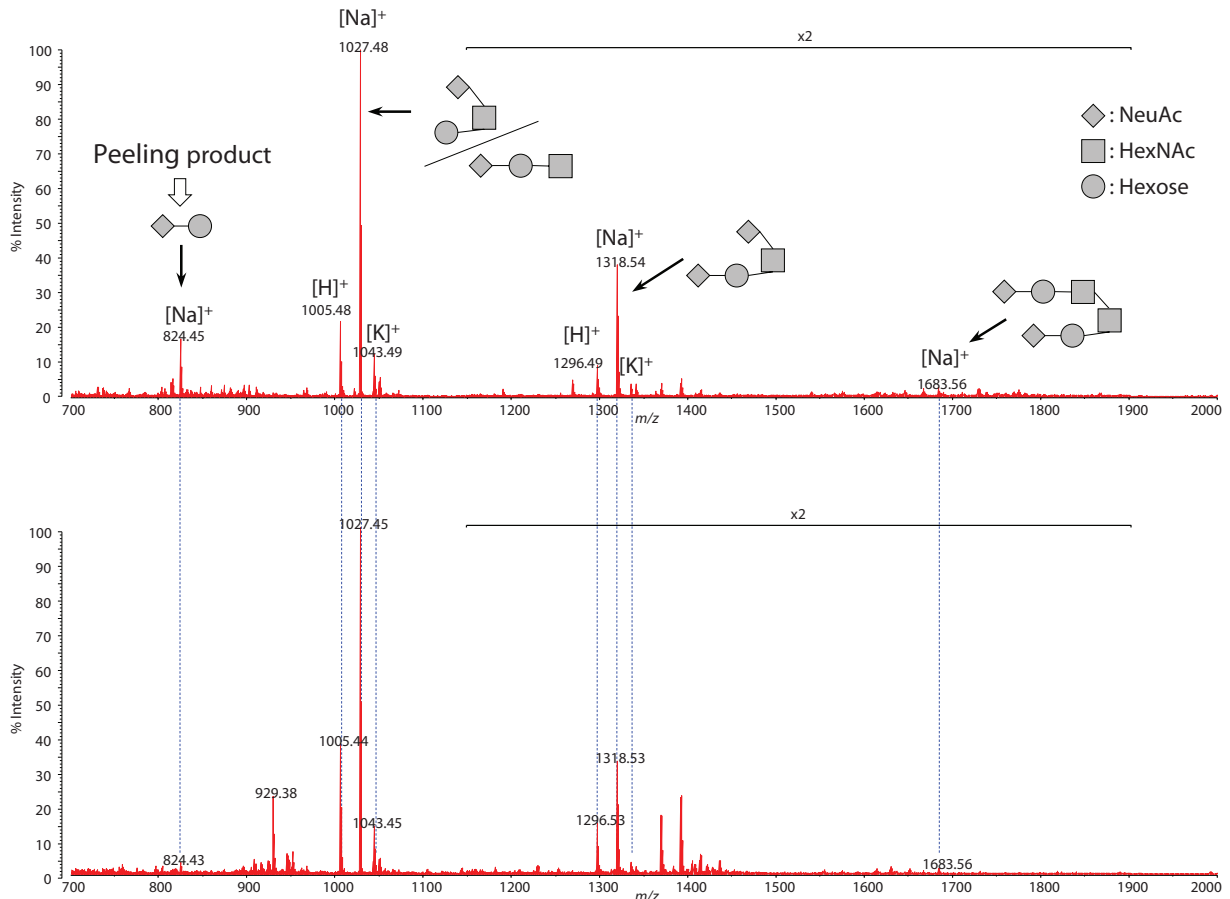


図 1 フェツインの PMP 標識 O-glycan の MALDI-TOF マススペクトル  
上：終濃度 28% アンモニア水を用いた反応、下：終濃度 2.5 M カルバミン酸アンモニウムを用いた反応

## ■ PMP 標識 O-glycan の LC 分析

調製した PMP 標識 O-glycan 試料を表 1 に示した条件で LC 分析しました。尚、試料の調製はアルカリ触媒の異なる前処理で各 2 回ずつ実施しました。また、28% アンモニア水を用いた試料は 20  $\mu\text{L}$ 、カルバミン酸アンモニウムを用いた試料は 40  $\mu\text{L}$  を注入して分析しました。

表 1 PMP 標識 O-glycan の LC 分析条件

Instrument	: Nexera
Column	: GlycanPac AXH-1, Analytical 1.9 $\mu\text{m}$ 150 mm L 2.1 mm I.D. (Thermo Scientific)
Mobile phase A	: 100 mM Ammonium formate (pH 4.5)
Mobile phase B	: Acetonitrile
Total flow rate	: 0.25 mL/min
Concentration of mobile phase B	: 0~15 min: 90%, 15~40 min: 90→45%, 40~45 min: 30%, 45~50 min: 90%
Column temp.	: 40 $^{\circ}\text{C}$
Detection	: UV absorption 245 nm (SPD-M30A)

分析の結果、図 2 に示すように Peeling 反応産物由来のピークは 28% アンモニア水を用いた前処理では検出されたのに対し、終濃度 2.5 M カルバミン酸アンモニウムを用いた前処理ではほとんど検出されませんでした。Peeling 反応産物および主要 O-glycan のピーク面積を表 2 にまとめたところ、28% アンモニア水を用いた場合の Peeling 反応産物は全体の約 12% で、終濃度 2.5 M カルバミン酸アンモニウムを用いた場合では約 2% となっており、カルバミン酸アンモニウムの使用により Peeling 反応が抑制されたことが示唆されました。しかしながら、O-glycan の切り出し/標識反応の効率に関してはアンモニア水を用いた場合よりも低いことも分かりました。

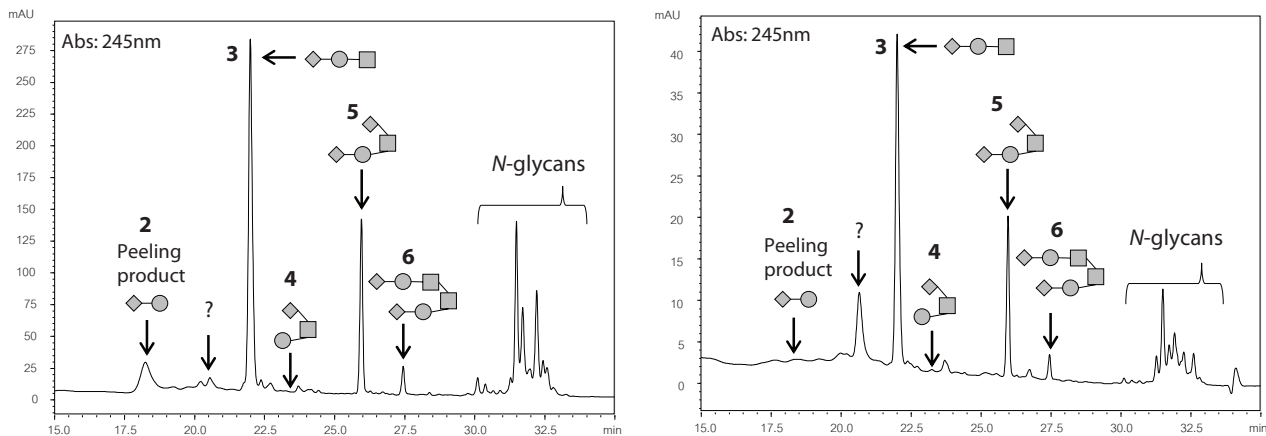


図2 PMP 標識 O-glycan の LC クロマトグラム例  
左：終濃度 28%アンモニウム水での反応、右：終濃度 2.5 M カルバミン酸アンモニウムでの反応

表2 PMP 標識 O-glycan の LC プロファイリング (n=2)

28 % Ammonia												
Peak No.	保持時間			面積			%面積			高さ		
	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD
1	18.2	0.01	0.04	470403.0	174277.78	37.05	12.53	1.35	10.78	17485.5	6695.59	38.29
2	22.0	0.01	0.03	2334391.0	543258.83	23.27	63.39	2.31	3.64	239416.0	52457.42	21.91
3	23.3	0.01	0.02	2882.0	87.68	3.04	0.08	0.02	23.85	424.5	16.26	3.83
4	26.0	0.01	0.02	766212.0	241747.08	31.55	20.57	1.02	4.96	113022.0	34481.36	30.51
5	27.5	0	0.01	126936.0	32437.82	25.55	3.44	0.04	1.29	18832.0	4775.8	25.36

2.5 M Ammonium carbamate												
Peak No.	保持時間			面積			%面積			高さ		
	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD
1	18.3	0.04	0.24	13180.0	10096.07	76.6	2.21	1.48	67.07	436.5	355.67	81.48
2	22.0	0.01	0.05	401757.0	53148.97	13.23	70.18	0.29	0.41	43209.5	4999.95	11.57
3	23.2	0.00	0.01	2356.5	259.51	11.01	0.41	0.01	1.82	265.0	29.70	11.21
4	26.0	0.00	0.01	134460.0	7737.16	5.75	23.6	1.67	7.1	20017.5	979.34	4.89
5	27.4	0.01	0.03	20582.5	2150.31	10.45	3.6	0.09	2.39	3207.0	294.16	9.17

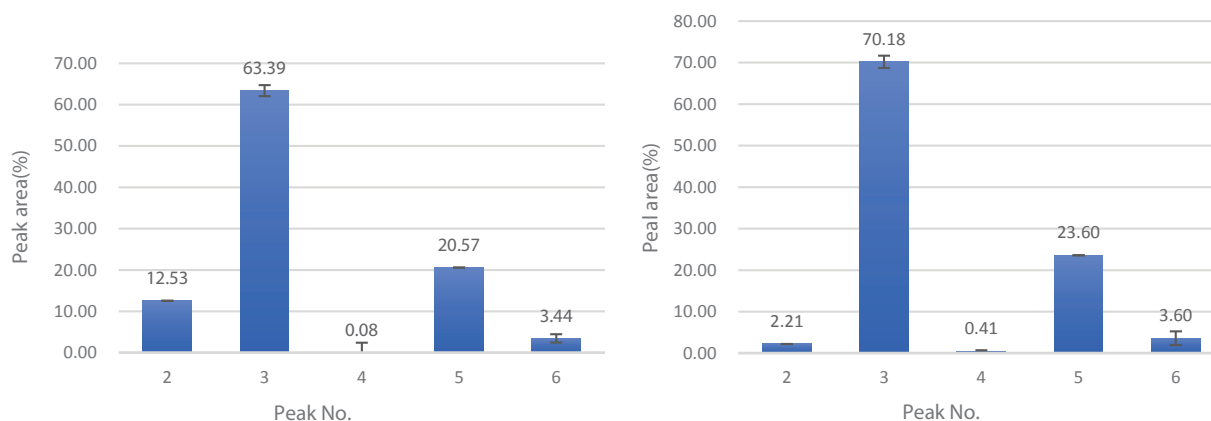


図3 PMP 標識 O-glycan の LC プロファイリンググラフ (n=2)  
左：終濃度 28%アンモニウム水での反応、右：終濃度 2.5 M カルバミン酸アンモニウムでの反応

## ■ 考察

今回の実験結果から、正確な O-glycan プロファイリングを行おうとする際に問題となるアーティファクトである Peeling 反応産物の生成が、One-pot PMP 標識をカルバミン酸アンモニウムを用いて行うことにより、O-glycan 全体の数 % にまで抑制可能であることが確認され、必要とするサンプル量など制限はあるものの、この手法が O-glycan プロファイリングに利用可能であることが示唆されました。

しかしながら、今回こころみた試薬や反応条件は糖鎖の切り出し効率や標識効率という点では他の手法に比べ高いも

のではありませんでした。糖鎖の切り出しと標識を同時に行う手法自体は Peeling 反応を抑制するには効果的だと考えられますが、PMP 標識の場合は LC での検出が UV 吸収であり PA 標識や 2-AB 標識などの蛍光検出に比べて検出感度は低くなりますし、夾雑した試薬などによるバックグラウンドの影響も受けやすくなります。これらの影響を排除するためには、切り出し/標識を同時に実施できる反応効率の良い試薬の探索と反応条件のさらなる検討が必要であると思われる。

## Reference

- 1) S Honda. et al., High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal. Biochem.* 1989, 180, 351–357.
- 2) C Wang. et al., One-pot nonreductive O-glycan release and labeling with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone followed by ESI-MS analysis. *Proteomics.* 2011, 11, 4229–4242

## 謝辞

本研究は H28 年度 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の「創薬基盤推進研究事業」の支援によって行いました。