

NMRによる糖鎖構造解析 株式会社東ソー分析センター 南陽事業部 解析グループ 田中 孝 大阪大学 理学研究科 真木 勇太 梶原 康宏 株式会社東ソー分析センター 解析グループ 南陽事業部 谷本 典之

1. はじめに

糖鎖は単糖がエーテル結合により連なった構造をし ており、生体内において糖脂質や糖タンパク質といっ た複合糖質、及び遊離糖鎖として普遍的に存在する。 これらの糖鎖は細胞の分化、タンパク質の構造安定性 の制御、タンパク質寿命の決定など、その構造により 様々な生物活性に関与する。ヒトにおいては、糖鎖を 構成する単糖には修飾体も含めると10種類以上存在 し、発現する場所により特徴的な単糖種が選択され、 多様な糖鎖構造を形成、多様な機能を発現する。

抗体 (本稿では特に Immunoglobulin G; IgG を指す) は糖タンパク質であり、これを有効成分とする抗体医 薬品は、近年急速に研究開発が進められているバイオ 医薬品の1種である。抗体機能と糖鎖構造は密接に関 わりがあり、糖組成および糖鎖構造はアミノ酸組成や 配列等と並び、医薬品規制調和国際会議(ICH)のガ イドライン(Q6B)に解析の必要性が示されている¹¹。 そこで本報告では、抗体機能と糖鎖構造の関連、及び 主に NMR を用いた糖鎖構造解析技術についてまとめ た。なお、本技術は SDGs で掲げる国際目標「すべて の人の健康と福祉」という社会課題に対し、分析技術 の深化と発展により高機能かつ安全な医薬品の開発に 貢献することを目指す。

2. 糖鎖構造と抗体機能

抗体は2本の重鎖と2本の軽鎖から構成される 150kDaの糖タンパク質であり、重鎖CH2ドメイン中 の297番目のアスパラギン(Asn297)残基に1対の糖 鎖が結合している(Fig.1a,b)。この糖鎖はAsn側鎖の 窒素(N)に結合していることから、一般にN-結合 型糖鎖と総称される。本稿では以降、抗体のAsn297 に付加するN-結合型糖鎖のことを「抗体糖鎖」と記 載する。またセリン(Ser)及びスレオニン(Thr)残 基の酸素(O)に結合する、O-結合型と総称される糖 鎖の存在の報告もあるが本稿では取り上げない。 抗体糖鎖を構成する主要な単糖は、中性糖のガラク トース (Gal)、マンノース (Man)、フコース (Fuc)、 アミノ糖の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、酸 性糖の N-アセチルノイラミン酸 (NeuNAc) の5種 類である (Fig.1c)。これらの構成単糖はいずれも6 員環であり、その炭素及び水素には1~6位 (NeuNAc は1~9位)の番号付けがされている。このうち、2、 3、4、6位には、他の糖とグリコシド結合できる水酸 基が存在する (Fig.1d)。また、1位の水酸基が、環と 同一平面上に位置する equatorial 配置の β アノマーと 水酸基が環に垂直な axial 配置の α アノマーの2種類 が存在する (Fig.1e)。

抗体糖鎖は(i)多種の単糖から構成される「複合型」、(ii)マンノース残基が大半を占める「高マンノー ス型」、(iii)(i)と(ii)が複合した「混成型」の3種 類に大別される。また、例えば単に「複合型」といっ ても、生合成メカニズムの不完全性により、構成単糖 の種類や数、分岐や結合様式により多様な構造が見ら



Fig. 1 a) 3D structure of IgG (PDB ID: 1IGY). N-Linked glycans are represented by red sticks. b) An example of the N-linked glycan of anti-bodies. c) Main constituent monosaccharides of antibodies. d) The hydroxy groups which can form the glycosidic bonds. The numbing of carbon and hydrogen atoms is annotated by blue letters. e) The anomers of Gal.

れる²⁾。

抗体糖鎖の構造は抗体の活性や動態、安全性等と密 接に関わりがある。抗体糖鎖の還元末端のFucを除去、 またはバイセクティング GlcNAc の付加量が増加する と抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性が増強される。 また、非還元末端 Gal が増加すると、補体依存性細胞 傷害活性が増強されるとされている³⁾。抗体の薬理活 性を制御するためには、抗体糖鎖の構造を把握するこ とが重要である。

3. 抗体糖鎖の構造解析

抗体糖鎖を測定、同定する技術としては、HPLC/ 蛍光検出法、キャピラリー電気泳動法、高速陰イオ ン交換クロマトグラィー/電気化学検出器法、質量分 析法が現在広く用いられている。特に、質量分析法 (MALDI-TOF/MS、LC-ESI-MS) はngオーダー 試料から分子量やフラグメント等の構造情報を得るこ とが可能であり、弊社でも質量分析法を用いた糖鎖同 定手法を確立、分析事業を展開している。中でも LC -ESI-MS/MS 法は高精度に糖鎖構造を同定可能で あるが、解析には標品の LC 分離パターン、MS 及び MS/MS スペクトルとの照合が必須である。

また、溶液 NMR による糖鎖構造解析技術も発展してきた。これまでに2次元構造および3次元構造解析、動態解析、相互作用解析等の様々な測定、解析手法が確立されている⁴⁾。

溶液 NMR の利点は主に以下の 2 点である。

①試料を D₂O 等の溶媒に溶解することで簡易的に 測定でき、非侵襲的で測定後の試料の回収が可能で ある。

②溶液内における糖鎖の構造や動態に関する情報を 原子レベルで得ることができる。

特に構造解析については、原子を繋げていくことで単 糖種やグリコシド結合を解析するため標品が必要無 く、構造未知な抗体糖鎖を解析可能である。一方で、 上記で述べた他の測定法に対して低感度であり、比較 的大量の試料が必要であるという問題点がある。

弊社では 2018 年に、検出系を極低温にして熱 ノイズを軽減した微量溶液用プローブ(1.7mm CryoProbe)を装着した 700MHz NMRを導入し、特 に¹H 原子について単位質量当たり国内最高感度を誇 る。本報告では、この装置を用いた測定、解析技術の 検討結果と展望について報告する。なお、本研究は大 阪大学 理学研究科 梶原康宏教授及び真木勇太助教と の共同研究により実施した。

4. NMR による糖鎖構造解析技術の導入

NMRによる糖鎖構造の解析技術導入のため、測定 及び構造解析手法の導入を検討した。

[1] 検討試料

[2] 前処理

S2G2 1.0mg を PP 製サンプルチューブに量り取り、 99.96%の重水(2 H₂O、以下 D₂O)約 100 μ L に溶解し た後、N₂パージにて乾固した。この操作を追加で2 回繰り返した後、1.7mm NMR 試料管に封入した。

(NMR 測定では主に ¹H 原子を観測する。そのため、 試料の解離性 ¹H やサンプルチューブ壁面に付着した 軽水 (¹H₂O) は解析の妨げとなる。特に微量での測定、 解析の場合、その影響は自ずと大きくなる。上記の操 作は、これらの影響を最小限にする。)

[3] NMR 測定及びデータ処理

1.7mm CryoProbe を装着した 700MHz NMR を用 い、1 次元¹H NMR 及び各種 2 次元 NMR スペクトル を測定した (**Table. 1**)。2 次元 NMR スペクトルでは、 各¹H 原子の置かれた周辺環境に応じて 2 次元方向に 分離することで¹H ピークの重なりを緩和し、解析の 曖昧さを除くことができる。2 次元方向のデータは離 散的に取得し、高速フーリエ変換 (FFT) により処理 することでスペクトルを得た (通常手法)。解析には TopSpin4.0.6 及び sparky ver.3.114⁵⁾ を用いた。

Experiments	Sampling points ¹⁾ NS ²⁾		Duration ³⁾ (min)
DQF-COSY	2,048 (¹ H)	2	133
TOCSY	2,048 (¹ H)	4	271
edited-HSQC	4,096 (¹³ C)	2	220
edited-HSQC4)	2,048 (¹³ C)	2	113
HSQC-TOCSY	2,048 (¹³ C)	8	458
HMBC	1,024 (¹³ C)	8	497
Total ⁵⁾	_	_	1,692

Table. 1 2D NMR spectra measured for 1.0 mg of S2G2.

1) Total points for indirectly observed dimensions.

2) Number of Scans per FID.

3) Measurement time.

4) The splitted cross peaks via ${}^{1}J_{CH}$.

5) Total measurement time.

[4] 解析結果

糖鎖の¹H-NMR では、炭化水素に由来する¹H ピー クのみ観測する (3-[2]参照)。単糖の1位 (NeuNAc 以外)が低磁場側に、GlcNAc と NeuNAc のアセタミ ド基メチルが 2.2 ppm 付近に、NeuNAc の3位が 1.9 ppm と 2.6 ppm に比較的単離して観測された。3~4 ppm 付近では、構成単糖はいずれも6員環であり、互 いに似た構造であることから激しい重なりが観測され た。解析結果の例を **Fig.2a** に示した。

また、各種2次元NMRにより解析した結果を併せ て示した。HSQCスペクトル上の相関ピークに帰属し (Fig.2b)、HMBCスペクトルにより各構成単糖の1位 ¹³Cと他の構成単糖の相関を解析することで、グリコ シド結合位置を解析した(Fig.2c)。

Gal、GlcNAc の1位の水酸基の位置は、隣接¹H と のカップリング (${}^{3}J_{HH}$) による1位の¹H ピークの分裂 幅(約 8Hz)から β -アノマーであると決定した(Fig.2b, in box)。Man については、 ${}^{3}J_{HH}$ による¹H ピークの分 裂幅が α と β -アノマーでほぼ同一であるが、直接結 合する 13 C とのカップリング (${}^{1}J_{CH}$) による¹H ピーク の分裂幅が α -アノマーでは約 170Hz、 β -アノマーで は約 160Hz の分裂を与える。そのため、 ${}^{1}J_{CH}$ で¹H 方 向にピークを分裂した 1 H - 13 C edited - HSQC スペクト ルを用いて解析した (Fig.2d)。

以上より、各構成単糖の帰属、立体異性、グリコシ ド結合位置の解析手法を導入し、抗体糖鎖の構造解析 技術を構築した(Fig.2e)。

5. 微量糖鎖構造解析へ向けた技術基盤の構築

ここでは 0.1mg 糖鎖の構造解析技術の構築と、更な る微量糖鎖構造解析の展望について述べる。



Fig. 2 a) 1D ¹H-NMR spectrum of S2G2 in D₂O. b) 2D ¹H-¹³C edited-HSQC spectrum of S2G2 in D₂O. The assignments of Gal and GlcNAc are annotated in red and blue letters, respectively. The anomeric ¹H peaks of Gal are also shown in a box with J-coupling constants. c) A slice extracted from 2D ¹H-¹³C HMBC spectrum. The sequential connectivity between Gal and GlcNAc is represented by the dashed red lines. d) The analysis of anomer type of Man residues.
e) The structure of S2G2 analysed by NMR spectroscopy. The assignments of monosaccharide residues are annotated with letters and numbers.

[1] 不均一サンプリングと圧縮センシング

NMRの感度は試料量に比例し、基本的には試料量 を1/10にすると感度も1/10となる。そこで、積算 で感度を10倍にしようとすると、NMRの感度は積算 回数の平方根に比例して上昇するため、100倍の積算、 つまり100倍の時間が必要である。4-[3]において、1.0 mg 糖鎖の各種測定に要した時間は約1日であるので、 0.1 mg 糖鎖では100日必要と試算される(あくまで単 純に100倍した時の試算値である)。これは少なくと も企業レベルで受託できるタイムスケール(約3日) と比較すると非現実的である。

この問題について本研究では、不均一サンプリング (NUS) による高速測定と圧縮センシング (CS) によ るデータ処理を検討した。NUS と CS は近年の NMR 装置に組み込まれており、比較的簡便に使用可能であ るというメリットがある。

NUS は通常の離散的なサンプリングは行わず、同 一のサンプリング空間において測定ポイントをランダ ムに"間引く"ことで、分解能を損なわず測定時間を 短縮可能な測定法である。例えば、測定ポイント数を 1/8にすると、測定時間を1/8まで短縮でき、節約 した時間を積算や分解能の増加に充てることができる (Fig.3a,b)。



Fig. 3 2D ¹H-¹³C HSQC spectra of 1mg of SG2Fb. 512 points were linearly acquired and processed by FFT (a), and 512 points selected from 2,048 sampling space were non-linearly acquired and processed by CS (IRLS) (b). The assignments are also annotated. c) The structure of SG2Fb.

NUS により間引いて測定したデータは FFT で処理 できない。そのため CS により、測定したポイントの データを参照し、間引いた測定ポイントのデータを再 構成することで2次元 NMR スペクトルを得た。

[2] 0.1 mg 糖鎖の構造解析

試料調製には 0.1 mg S2G2 を用い、4-[2]と同様に 実施した。また測定、解析手法としての有用を確認す るため、G2、SG2Fb、M9 を用いて構造解析を検討した。

[3] NMR 測定及びデータ処理

装置及び測定法は基本的に 4-[3]と同一である。測 定項目及びパラメータを Table. 2 にまとめた。NUS には sine 関数で重み付けした poisson gap sampling を 採用した $^{6,7)}$ 。また、CS には反復再重み付け最小二乗 法 (IRLS) ⁸⁾ を用いた。

[4] 解析結果

S2G2 について、¹H-NMR スペクトルの他、良好な 各種 2 次元 NMR スペクトルを 3 日以内に取得する ことに成功し、100%の帰属と構造解析に成功した。 S2G2 の¹H-NMR スペクトル、2D¹H-¹³C edited-HSQC スペクトル及び帰属を **Fig.4** に示した。

Table. 2 2D NMR spectra measured for 0.1mg of S2G2

Experiments	Sampling space ¹⁾	Sampling points ²⁾ (%)	NS ³⁾	Duration ⁴⁾ (min)
DQF-COSY	2,048 (¹ H)	512(25%)	8	126
TOCSY	2,048 (¹ H)	512(25%)	8	127
edited-HSQC	4,096 (¹³ C)	512(12.5%)	32	434
edited-HSQC ⁵⁾	2,048 (¹³ C)	256(12.5%)	32	210
HSQC-TOCSY	2,048 (¹³ C)	512(25%)	64	909
HMBC	1,024 (¹³ C)	256(25%)	128	1,848
Total ⁶⁾	_	_	_	3,654

1) Conventional regularly sampling space for indirectly observed dimensions.

2) Total points selected in a poisson-gap non-linear sampling scheduling.

3) Number of Scans per FID.

4) Measurement time.

5) The splitted cross peaks via ${}^{1}J_{CH}$.

6) Total mesurement time.



Fig. 4 2D ¹H-¹³C HSQC spectra of 0.1mg of S2G2. The extracted regions; CH (except for anomeric groups) (a). anomeric CH (b), CH₂ (c) and acetamide CH₃ groups (d), are displayed. The assignments are also annotated in each spectrum.

また同様に、G2、SG2Fb 及び M9 においても一意 的な構造解析に成功した(Fig.5b,c,d)。このことから、 100 μg の糖鎖試料で構造解析に必要なレベルの各種 2 次元 NMR スペクトルを3日以内で取得でき、かつ様々 な抗体糖鎖の構造解析に有用な測定手法であることを 証明した。

本技術の内、特に¹H-¹³C HMBC スペクトルは一意 的なグリコシド結合情報を与える一方で低感度であ り、これまでに 0.1 mg の抗体糖鎖(10 糖残基程度) で測定に成功した例は報告されておらず、我々の知る



Fig. 5 *N*-Linked glycans (0.1mg) analysed by NMR spectroscopy. The structure of S2G2 (a), G2 (b), SG2Fb (c) and M9 (d) are uniquely determined.

限り初めての成功例である。本技術は、抗体医薬品等 から分取した糖鎖の高精度な構造解析に有用であると 考えられる。

[5] 更なる微量糖鎖構造解析への展望

¹H-¹³C 相関 NMR 測定では、天然存在比 1%程度の ¹³C 核を用いるために大きく感度を失ってしまう。そ のため、¹H-¹H 相関 NMR 測定のみを用いた測定技術 検討を進めている。今後、1 ~ 10 µg 程度でも一意的 な構造解析が可能となれば、今まで解析が困難であっ た抗体糖鎖の構造解析への糸口となると考えられる。

6. まとめ

抗体糖鎖の構造を解明する手段として、NMRによ る糖鎖構造の解析技術を導入した。また、NUS及び CSを用いることで 0.1 mg 糖鎖の構造解析を可能し、 様々な糖鎖に有用かつ堅牢な構造解析技術であること を証明した。

本手法は、LC-MS法等と異なり標品が無くても一 意的な構造解析が可能なため、抗体医薬品より分取し た N-結合型糖鎖の解析手法として有用であると考え られる。

参考文献

 ICH Steering Committee, *ICH harmonized tripartite guideline*, International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. (1999)

- 2) A. Varki *et al., Essentials of Glycobiology, 3rd edition*. (2017)
- 3) Y. Yagi & S. Suzuki, *CHROMATOGRAPHY*, 34 (2), 83-88 (2013)
- 4) K. Kato, et al., NMR in Glycoscience and Glycotechnology (2017)
- 5) T.D. Goddard & D.G. Kneller, *SPARKY 3*, Univ. of California, San Francisco.
- 6) S.G. Hyberts, K. Takeuchi and G. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.*, **132** (7), 2145-2147 (2010)
- 7) P.C. Aoto et al., J. Magn. Reson., 246, 31-35 (2014)
- 8) K. Kazimierczuk. & V.Y. Orekhov, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 50 (24), 5556-5559 (2011)