

# バイオ医薬品の糖鎖

## エリスロポエチン製剤の糖鎖プロファイリング

GlycoStation™

# 4

Technical Information  
Glycotechnica

近年、タンパク質製剤や抗体医薬品のもつ糖鎖が、その薬効に大きな影響を与えることが知られています。ここでは、その一例としてエリスロポエチンと糖鎖の関係をご紹介します。その糖鎖プロファイリングをレクチンマイクロアレイで行なった結果について示します。

### ◆ エリスロポエチンの機能と製剤としての活用

エリスロポエチン (EPO) は、主に腎臓で作られているアミノ酸 165 個からなるホルモンの一つで、造血組織において赤血球前駆細胞上の受容体に結合し、この細胞の増殖と分化を促進することにより赤血球産生を調節する作用があります。腎機能が正常な場合は、貧血に伴い EPO の産生分泌が増加し、貧血が是正されます。

しかしながら、腎不全に伴う腎性貧血の場合、EPO の産生が低下し、赤血球の産生が抑制されて、貧血に至ります。この治療目的で、遺伝子組み換え産物のエリスロポエチン製剤が用いられています。このエリスロポエチン療法の問題点の一つは、頻繁に皮下注射をする必要があることです。これを解決すべく、糖鎖を改変させることで半減期を長くした第二世代のエリスロポエチン製剤が開発されました。

### ◆ 第二世代のエリスロポエチン製剤

EPO は、3 本の N 結合型糖鎖と 1 本の O 結合型糖鎖が結合しており、その糖含量は約 40% にも及びます。N 結合型糖鎖は、複合型の 2 ~ 4 本鎖で、Asn-24 には 2 本鎖もしくは 3 本鎖、Asn-38 と Asn-83 には主に 4 本鎖が結合しています。3 本鎖及び 4 本鎖構造はさらに、N-アセチルラクトサミン (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) の繰返し構造 (ポリラクトサミン) も見出されています。O 結合型糖鎖の構造は、Gal $\beta$ 1-3GalNAc の二糖にシアル酸が 1 残基結合した三糖構造 (sialyl-T) または 2 残基結合した四糖構造 (disialyl-T) をしています。(Fig.1)

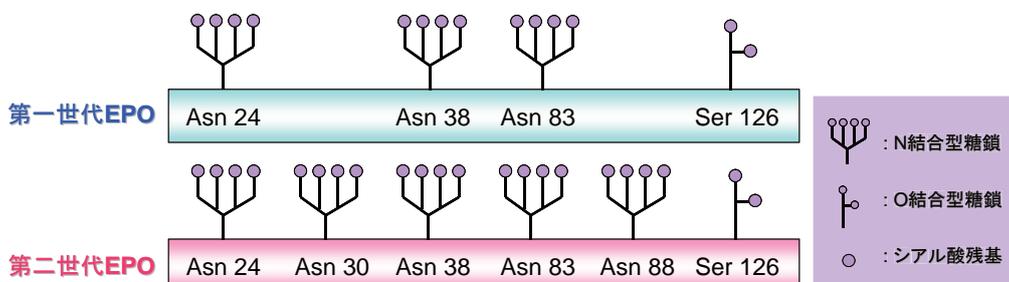


Fig.1 EPO の糖鎖構造

EPO は、シアル酸と結合していない露出したガラクトース残基と結合する肝臓のガラクトース結合タンパク質に結合されると、肝細胞内に取り込まれて代謝されます。通常シアル酸残基は EPO 1 分子あたり約 10 残基結合して、この代謝から守っています。したがって、EPO の in vitro 活性は、レセプターに早く結合するためシアル酸残基数が少ないほど強いのにに対し、in vivo 活性では、肝臓でのクリアランスを妨げるため、シアル酸残基数が多いほど強くなります。このような背景に基づき、第二世代 EPO では、受容体に対する結合親和性は低下するものの、血中滞留時間を延長させて造血活性の向上をはかるため、2ヶ所に N 結合型糖鎖を新たに導入してシアル酸側鎖数を増加させています。(Table I)

Table I EPO の薬学上及び臨床上的特徴

第一世代EPO		第二世代EPO
30,400 Da	分子量	37,100 Da
14個	最大シアル酸側鎖数	22個
40%	糖鎖の割合	51%
高い	受容体結合親和性	低い
短い	血中消失半減期	長い
弱い	造血効果	強い

(参考 : Pharmacological and clinical profiles of long-lasting erythropoietin (darbepoetin alfa; NESP®), Nobuo Nagano, 日薬理誌 (Folia Pharmacol, Jpn.)131, 291 ~ 299)

## ◆ レクチンマイクロアレイによる測定

レクチンマイクロアレイにより第一世代及び第二世代のエリスロポエチン製剤の糖鎖プロファイリングを行いました (Fig.2)。その結果、EPO のもつ N 型及び O 型糖鎖の構造を反映した結果が得られました。

N 結合型糖鎖認識レクチンにおいて、4 本鎖構造を認識する PHA-L、3,4 本鎖構造を認識する ACG で高いシグナルが検出されていることから、4 本鎖もしくは 3 本鎖に分岐した糖鎖構造の発現率が高いことが推定されます。また ACG は  $\alpha$ 2,3 シアル酸修飾された糖鎖との親和性が高いため、その影響を受けていることが考えられます。1~4 本鎖に分岐した糖鎖のコアフコースを認識する AOL, AAL のシグナルが検出されていることや、 $\alpha$ 2,6 シアル酸を認識する SNA, SSA, TJA I ではシグナルが検出されず  $\alpha$ 2,3 シアル酸を認識する MAL I では高いシグナルが検出されていることから、N 結合型糖鎖のコアフコース修飾や  $\alpha$ 2,3 シアル酸修飾があることが分かります。また、ラクトサミンおよびポリラクトサミン構造をもつことを反映した PHA-E, DSA, LEL, STL のシグナルも検出されています。

O 結合型糖鎖認識レクチンのシグナルとして、disialyl-T を認識する MAH や T 抗原や sialyl-T を認識する ABA が検出されています。これらのシグナルは他のレクチンシグナルに比べて小さいですが、サンプル濃度を上げると濃度依存的に輝度の上昇がみられます (Fig.3)。これに対して T 抗原を認識する PNA ではシグナルは検出されず、これは Ser-126 にもつ disialyl-T もしくは sialyl-T を反映した結果であるといえます。

第一世代 EPO と第二世代 EPO の違いは 1 分子あたりの N 結合型糖鎖の数ですが、これを反映して 4 本鎖構造を認識するレクチン PHA-L のシグナルは第二世代 EPO で高くなっています。また、AOL, AAL シグナルの違いから第二世代 EPO でコアフコースの発現率が高いことが推測されます。(Fig.2)

## - 測定方法 -

### 1. 濃縮と Buffer 交換

- 1-1. エリスロポエチンサンプルを限外ろ過フィルター<sup>1)</sup> にアプライして遠心し、濃縮します。
- 1-2. サンプルに PBS<sup>2)</sup> を加えて遠心することを繰り返し行い、サンプルを回収します。

### 2. 蛍光標識

- 2-1. Micro BCA Protein Assay Reagent Kit<sup>3)</sup> を用いてタンパク定量します (反応時間 2h)。
- 2-2. PBS で、サンプル 50  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ l を調製し、これを Cy3 Mono-Reactive dye 100  $\mu$ g labeling<sup>4)</sup> に混合します。

### Note

- 1) Amicon Ultra-15, Ultracel-5K(Millipore, #UFC900596)
- 2) PBS(-) pH7.3
- 3) Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE, #23235)
- 4) Cy3 Mono-Reactive dye pack (GE, #PA23011) を 1/10 ずつ分けたものを用いる。
- 5) TBS pH7.5
- 6) Zeba™ Desalt Spin Columns, 0.5ml (Thermo, #89883)

- 2-3. 2-2 を室温、暗所で 1h 反応させます。

- 2-4. TBS<sup>5)</sup> で洗浄したゲルろ過カラム<sup>6)</sup> を用いてゲルろ過を行い、未反応の Cy3 を除きます。

### 3. レクチンマイクロアレイの測定

- 3-1. サンプルを Probing Solution<sup>7)</sup> でアプライする濃度に希釈します。
- 3-2. LecChip™<sup>8)</sup> を Probing Solution で 3 回洗浄後、サンプルをアプライします (100  $\mu$ l/well)。
- 3-3. 20°C で LecChip を O.N. 反応させます。
- 3-4. サンプルをアプライしたままの状態 で LecChip を GlycoStation™ Reader 1200<sup>9)</sup> で測定します。
- 3-5. Array-Pro Analyzer<sup>10)</sup>、GlycoStation™ Tools<sup>11)</sup> で解析します。

- 7) Probing Solution (Glycotecnica)

- 8) LecChip™ (Glycotecnica)

- 9) GlycoStation™ Reader 1200 (Glycotecnica)

- 10) Array-Pro® Analyzer ver.4.5(MEDIA CYBERNETICS)

- 11) GlycoStation™ Tools (Glycotecnica)

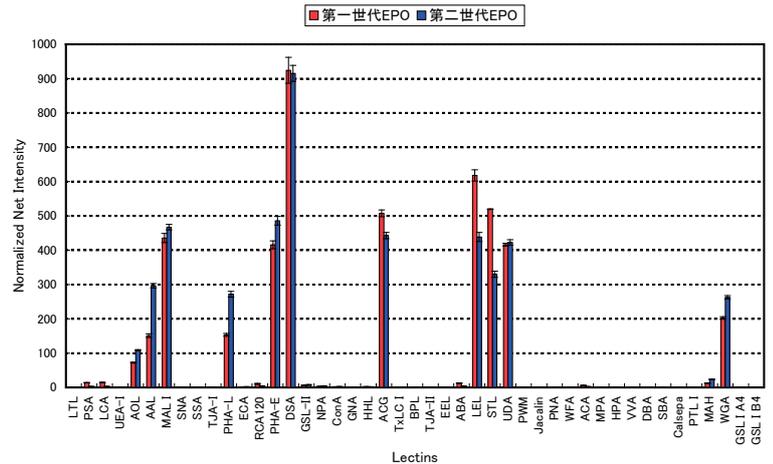


Fig. 2 第一世代 EPO と第二世代 EPO の糖鎖比較

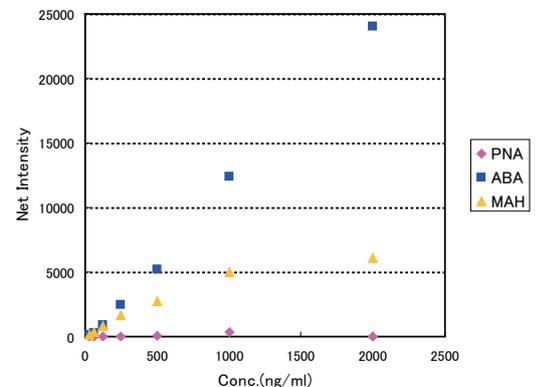


Fig. 3 O 結合型糖鎖認識レクチンのサンプル濃度依存性 (第一世代 EPO)