

# 薬学研究科薬品分析学研究室

## 1. 研究課題名

「天然由来糖鎖化合物の構造解析および生体機能性分子の網羅的定量分析法の確立」

## 2. 研究メンバー

鈴木 茂生 近畿大学薬学研究科薬品分析学研究室・教授  
久保 兼信 近畿大学薬学研究科薬品分析学研究室・准教授  
多賀 淳 近畿大学薬学研究科薬品分析学研究室・講師  
山本 佐知雄 近畿大学薬学研究科薬品分析学研究室・RA

## 3. 研究成果

糖はヘパリンのようなプロテオグリカンとして、あるいは糖タンパク質や糖脂質の糖鎖として存在し、様々な生体内反応に関与するといわれている。しかし、糖鎖は複雑な酵素系によって合成されることから、糖鎖の構造と糖鎖の有する機能の関連には不明な点が多い。近年、この糖鎖の構造と機能の関連を網羅的に解析するための研究が盛んに進められようとしているが、その多くは LC-MS などのタンパク質解析のために開発された手法を流用している。しかし、ペプチドの分離条件では糖鎖の構造に基づく分離はほとんど期待できない上、極性が高くイオン性のない糖鎖のような化合物群の MS における感度は低い。従って糖鎖のもつ構造多様性を解析するには、糖鎖のエンリッチ法を検討すべきである。当研究室では、この糖鎖の高感度網羅的解析のための特異的エンリッチ法について検討している。

### 3-1. セロトニン結合シリカゲルによる固相抽出<sup>1</sup>

#### 3-1-1. セロトニン結合シリカゲルの調製と評価

糖は動植物を問わずすべての細胞腫に存在し、細胞間の相互作用、情報伝達など、様々な役割を果たしている。中でも、*N*-アセチルノイラミン酸 (Fig. 1a) などのシアル酸は様々な糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の非還元末端に存在する。シアル酸によってタンパク質分子に負電荷が導入され、膜タンパク質にあっては、細胞間コミュニケーションの調

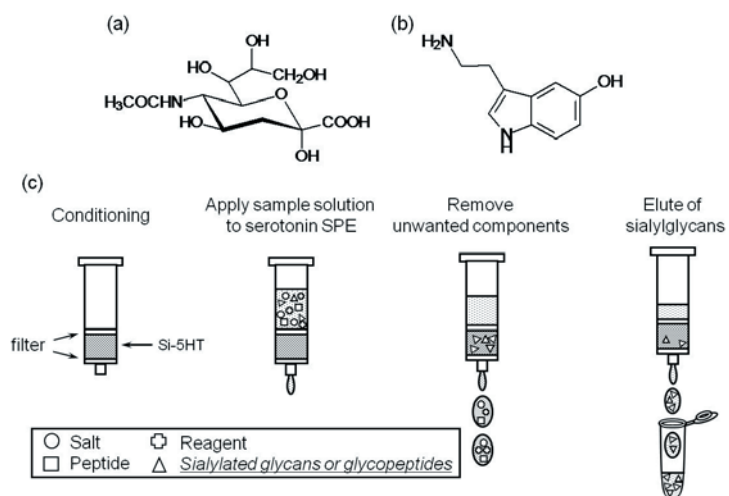


Fig. 1 Chemical structure of *N*-acetylneuraminic acid (NeuAc) (a), serotonin (b), and procedure for purification of sialylated glycan derivatives or peptides using Si-5HT SPE (c).

節やウィルスの侵入からの生体防御など、様々な役割をもつ。シアル酸を含有する糖鎖や糖ペプチドを効率的にエンリッチできれば、LC-MSにおける感度向上ばかりではなく、糖鎖の蛍光標識化後の、糖鎖誘導体の精製にも利用できる。ここでは、このシアル酸と特異的に結合する性質をもつセロトニン(5HT, Fig. 1b)をシリカゲルに固定化し、その結合特性の解析および、糖鎖の精製およびエンリッチ方法の検討を行った。

5HT 固定化シリカゲルは、市販の固相抽出用シリカゲルを  $\gamma$ -グリシドキシプロピルトリメトキシシランで処理し、加水分解ならびに過ヨウ素酸酸化を経て調製したアルデヒド型シリカと 5HT のアミノエチル基を縮合後、還元的アミノ化して調製した。得られた 5HT 結合シリカの固定化量は 190  $\mu\text{g/g}$  であった。

5HT 結合シリカへのシアル酸の結合条件を検討したところ、数 mM アンモニア水溶液中でシアル酸は効率的に保持され、200 mM アンモニア/100 mM 酢酸で溶出された。回収率はおよそ 95%であった。また、非特異的な吸着はメタノールを 30%添加することで解消された。

### 3-1-2. セロトニン結合シリカゲルによるシアル酸含有糖鎖の還元的アミノ化誘導体の精製

まず最初に定量性を確認するために、還元的アミノ化の中で、誘導体化後の精製操作が煩雑な 2-アミノピリジン標識糖鎖の精製を試みた。結果を Fig. 2 を示す。本誘導体化では過剰の試薬の除去にトルエンとの共沸とゲル濾過精製が必要である。そこで、ヒトトランスフェリンから調製した糖鎖を常法に従って誘導体化し、ゲル濾過精製を行わずに液体クロマトグラフィーで分析した。その結果、多量の試薬が 5 分前後に観察された他、35 分から 40 分にかけても数

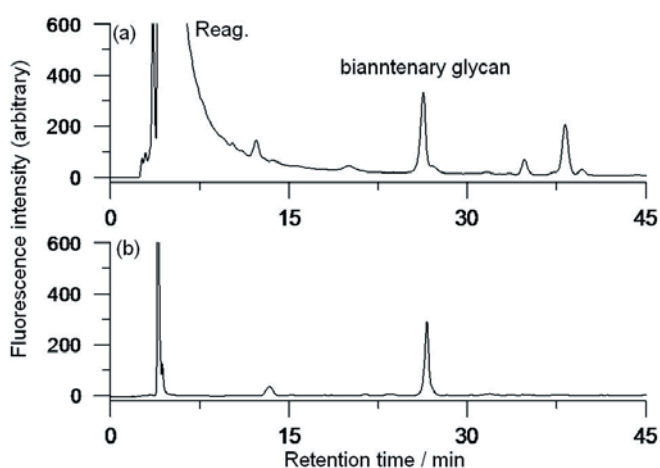


Fig. 2 Reversed phase HPLC analysis of AP-labeled glycans derived from human transferrin before (a) and after (b) specific extraction with serotonin silica. Analytical conditions: column, ODS-silica column (6.0  $\times$  150 mm); buffer, (A) 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.8), (B) buffer A containing 0.5% 1-BuOH; eluent, 70% to 5% (A) for 100 min; flow rate, 1.0 ml/min; detection, 310 (ex)/390 (em) nm.

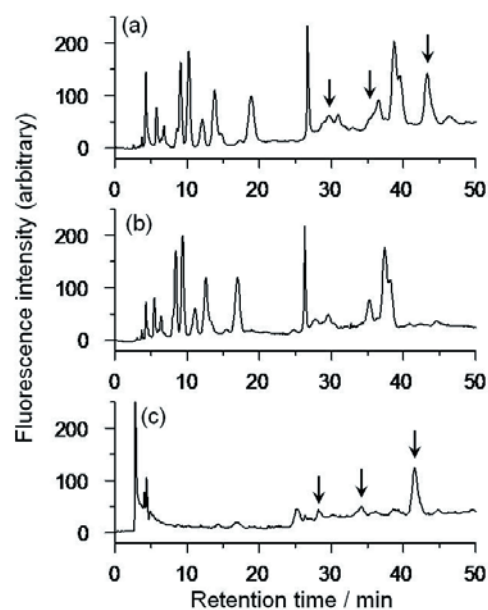


Fig. 3 Reversed phase HPLC analysis of AP-labeled glycans derived from porcine thyroglobulin (a), and its unbound (b) and bound (c) fractions to serotonin silica. Arrows indicate peaks that disappeared after neuraminidase digestion.

本のピークが現れた(Fig. 2a). この試料を 5HT 固定化シリカで精製したものを Fig. 2b に示す. 過剰試薬ならびに妨害ピークが完全に消失し, 2 本鎖糖鎖のピークが 25 分に観察された. 蛍光検出であるために, 定量性が保証されるが, 糖鎖ピークの強度はほとんど低下しておらず, 定量的に回収できることがわかった. この他にもフェツインなどいくつかの糖タンパク質に適用したが良好な精製効率が得られた.

本法を用いれば, 複雑な糖鎖混合物からシアル酸含有糖鎖だけを分画できる. そこで, 中性糖鎖とシアル酸含有糖鎖の両方を含むチログロブリンについて, 5HT 結合シリカを用いて, これらを分離した. AP 化したチログロブリン糖鎖を Fig. 3a に, 5HT シリカに保持されない成分と保持された成分の分析結果をそれぞれ Fig. 3b および 3c に示す. 矢印で示した成分が保持されことからシアル酸含有糖鎖であることがわかる.

### 3-1-3. セロトニン結合シリカゲルによるシアル酸含有糖ペプチドの精製

次に LC-MS における糖ペプチドのエンリッチに利用することを検討した. ヒト  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質のトリプシン消化物に適用した結果を Fig. 4 に示す. この糖タンパク質には 3 種類の変異種が知られ, アミノ酸残基の 22 残基の変異が知られる. また, 糖含量が高く, Asn33, Asn56, Asn72, Asn93 および Asn103 の 5 カ所に糖鎖が結合している.

この 5HT 結合シリカで抽出する前後のデータを Fig. 4a および 4b に示す. また, 5HT シリカ抽出画分について, SIM 検出した (Fig. 4c). 合計 34 種の糖ペプチドが検出された.

それぞれのシグナルの解析結果を Table 1 に示す. LC-MS では糖ペプチドに比べて, 疎水性の高いペプチドの方が感度は高い. 従って, 糖ペプチドはペプチドに比べて検出感度

が低い上に糖鎖のバリエーションによる異性体が見られる. Fig. 4a と 4b を比較してもわかるように, 5HT 結合シリカで回収された成分を注入すると, TIC における糖ペプチドの検出感度が向上し, 糖ペプチドの解析が容易になった. Table 1 に検出された糖ペプチドの推定構造を示すが, 存在が知られているすべての糖ペプチド計 34 種が検出された.

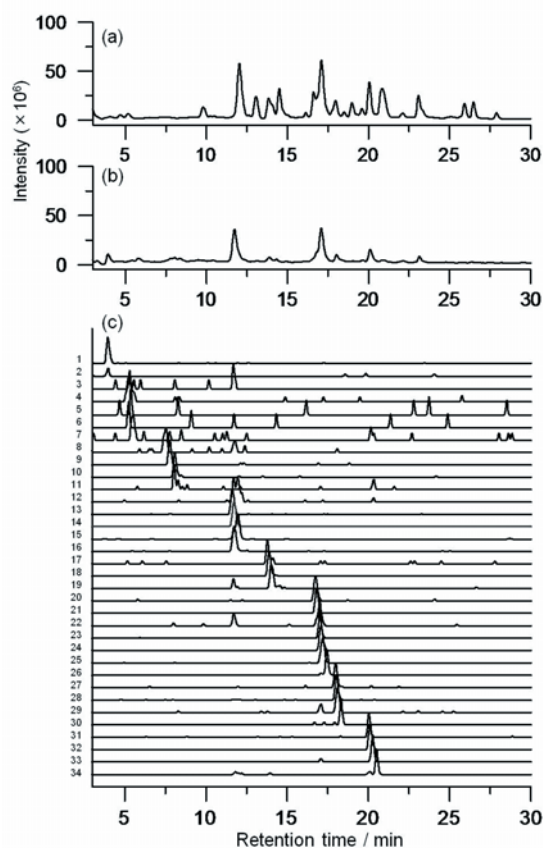


Fig. 4. Total ion current chromatograms of reversed-phase LC/ESI-MS analysis of glycopeptides derived from human serum  $\alpha_1$ -acid glycoprotein digested with trypsin before (a) and after (b) specific extraction with serotonin silica. Selected ion monitoring (c) is listed in Table 1.

**Table 1.** List of possible glycopeptides detected by LC-ESI/MS in Fig. 4c.

No.	measured <i>m/z</i>	<i>z</i>	glycosylation site	glycan structure with identification based on <i>m/z</i>	peptide mod <sup>a</sup>	
1	1501.3977	2	Asn52	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>		
2	1220.2630	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>		
3	1432.1311	4	Asn93	[Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [dHex] <sub>2</sub> [NeuAc] <sub>4</sub>		
4	1359.3543	4		[Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [NeuAc] <sub>4</sub>		
5	1286.6082	4		[Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>		
6	1213.7294	4		[Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>		
7	1690.4846	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [dHex] <sub>2</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>		
8	1479.0778	3		[Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [dHex][NeuAc] <sub>4</sub>		
9	1382.3824	3		[Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [dHex][NeuAc] <sub>3</sub>		
10	1260.3467	3	Asn103	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [dHex][NeuAc] <sub>3</sub>		
11	1561.4398	2		[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [dHex][NeuAc] <sub>2</sub>		
12	1473.1269	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [dHex][NeuAc] <sub>3</sub>	PyroCMC <sup>b</sup>	
13	1424.4529	3	Asn33	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	PyroCMC <sup>b</sup>	
14	1327.4334	3	AGP1S	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	PyroCMC <sup>b</sup>	
15	1807.5806	2	[26-38]	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	PyroCMC <sup>b</sup>	
16	1662.0493	2		[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc]	PyroCMC <sup>b</sup>	
17	1588.1549	3	Asn33 AGP1S [23-38]	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [dHex][NeuAc] <sub>3</sub>		
18	1539.4734	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>		
19	1442.4552	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>		
20	1582.4719	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [dHex][NeuAc] <sub>3</sub>	PyroCMC <sup>b</sup>	
21	1534.1840	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	PyroCMC <sup>b</sup>	
22	1437.1199	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	PyroCMC <sup>b</sup>	
23	1596.8505	3		Asn72	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [dHex][NeuAc] <sub>3</sub>	
24	1548.1726	3	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>			
25	1451.1509	3	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>			
26	1329.4566	3	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>			
27	1712.2024	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [dHex][NeuAc] <sub>3</sub>		
28	1663.5293	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>		
29	1566.5113	3	Asn33 AGP1F [23-42]	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>		
30	1444.4747	3		[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>		
31	1706.5237	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [dHex][NeuAc] <sub>3</sub>	PyroCMC <sup>b</sup>	
32	1657.5227	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	PyroCMC <sup>b</sup>	
33	1560.8332	3		[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	PyroCMC <sup>b</sup>	
34	1438.8007	3			[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	PyroCMC <sup>b</sup>

### 3-2 レクチンを用いる構造選択的糖鎖特異的回収法<sup>2</sup>

レクチンは糖と特異的に結合するタンパク質の総称であり、古くから糖鎖解析のツールとして利用されてきた。レクチンは単糖ばかりではなく、糖鎖構造の微妙な違いを区別できることが知られている。例えば、タチナタマメレクチン(Con A)とレンズマメレクチン(LCA)はともにグルコースやマンノース認識レクチンであるが、Con Aは高マンノース型や、分岐マンノース側鎖をもつ混成型糖鎖に強い親和性を示し、複合型では二本鎖糖鎖に対してのみに弱いながらも結合性を示す。一方、LCAは高マンノース型糖鎖を認識せず、還元末端側がフコースで修飾された複合型糖鎖を選択的に認識する。このようなレクチンの持つ特性を組み合わせることで、グライコームに代表される糖鎖の網羅的解析が急速に進められている。このレクチンアフィニティーカラムは、既に糖タンパク質などの複合糖質の分離や遊離糖鎖の精製にも利用されている。しかしながら、タンパク質の固定化には煩雑な操作が必要な上に、その安定性にも問題がある。しかもディスポーザブルカラムとして用いるには、安定性だけでなくコスト面についても問題がある。これらの現状を踏まえ、我々は糖鎖の部分構造を認識するレクチンと限外ろ過膜を用いて糖鎖構造選択的な糖ペプチドの簡易精製・回収法の検討を行った。

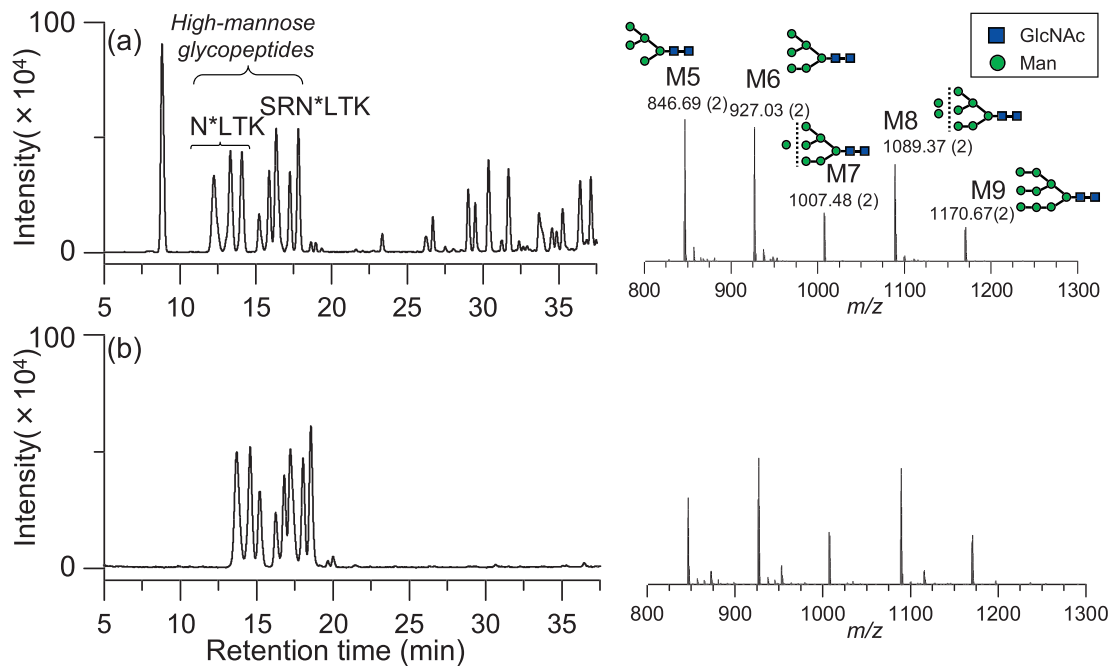


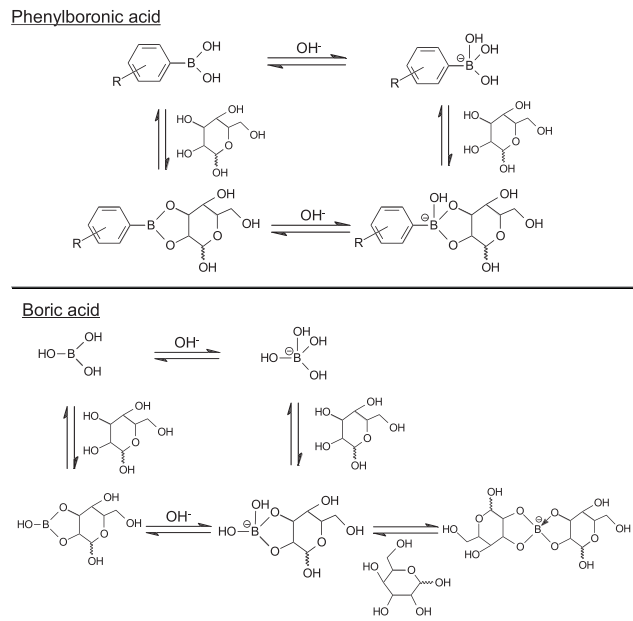
Fig. 5. Total ion current chromatograms of reversed-phase LC/ESI-MS of tryptic digests of ribonuclease B before (a) and after (b) specific extraction with Con A. MS scan range: 1000-1700 m/z.

本法の操作を次に示す。レクチン 250  $\mu\text{g}$  を 0.2 M NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝液に溶解後、100  $\mu\text{g}$  相当の目的試料溶液とともに分画分子量 10,000 の限外濾過用遠心分離型チューブに充填する。その後緩衝液および精製水で洗浄し、不要成分を 4°C で遠心しながら除去する。最終的に TFA を含む酢酸水溶液 2 mL を用いて、レクチンを酸性条件下で変性させ、保持された成分を回収した。各々のレクチンは糖ペプチドと予想通りの選択性で特異的に結合し、試料溶液中に含まれる非特異成分は緩衝液および水で溶出することができた。Fig. 5 に RNaseB 由来の高マンノース型糖ペプチドの精製に Con A を用いた結果を示す。遊離ペプチドはほとんど保持されることなく目的糖ペプチドのみを特異的

に回収することが出来た。また、シアル酸含有糖鎖をもつヒト血清トランスフェリンや  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質の糖ペプチドはシアル酸認識レクチンである SSA を用いることで、特異的に回収することができた。本法により、糖タンパク質糖鎖の部分構造情報と分子量を同時に決定できることから糖鎖のより詳細な解析が可能になる。

### 3-3. ホウ酸型イオン交換樹脂を使った糖ペプチドの固相抽出<sup>2</sup>

ボロン酸は Scheme 1 に示すようにフルクトースなどの糖残基のシス-ジオール基と可逆的に五～六員環複合体を形成し、強く結合することが知られている。しかも、塩基性条件下ではホウ素原子にさらに OH<sup>-</sup>イオンが配位してアニオン型となり安定性が増大する。この糖とボロン酸の親和性の高さを利用して、フェニルボロン酸をリガンドとするアフィニティー担体が古くから知られている。最近では、ジボロン酸を磁性ビーズに固定化したマトリックスや、アガロース系担体にフェニルボロン酸を結合させたゲルのほか、糖ペプチドを特異的にエンリッチすることを目的として、フェニルボロン酸



Scheme 1. Complexation between boric acid or phenylboronic acid and saccharides.

を多孔質シリカゲルに固定した担体も登場した。しかし、ボロン酸の認識は直鎖のポリアルコールや5員環のフルクトースなどの単糖に限定され、実際の応用例の多くはシアル酸含有糖鎖など、ポリアルコール構造を有する糖ペプチドに限定されている。一方、ほとんどの糖類はホウ酸イオンに配位することが知られ (Scheme 1 参照), ホウ酸型陰イオン交換カラムは糖分析に広く利用されてきた。そこで、

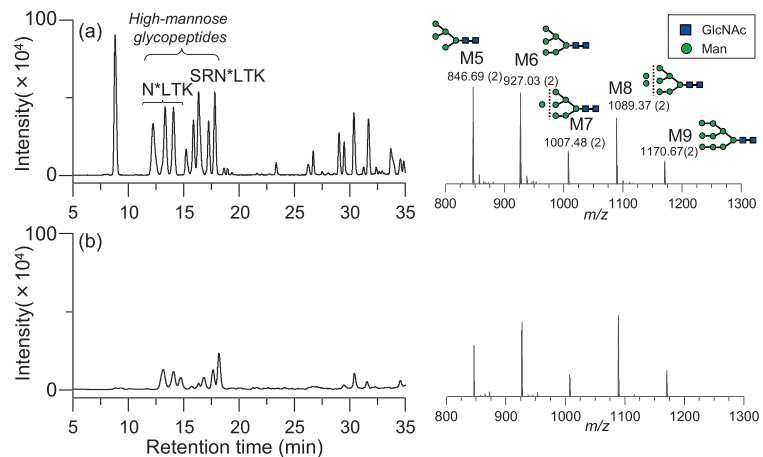


Fig. 6. Total ion current chromatograms of reversed-phase LC/ESI-MS of tryptic digests of ribonuclease B before (a) and after (b) specific extraction with borate form anion exchange resins. MS scan range: 1000-1700 m/z.

中性糖鎖あるいは糖ペプチドのエンリッチを目的として、ホウ酸結合型陰イオン交換樹脂を利用した固相抽出法(ホウ酸SPE)による糖試料のエンリッチについて検討を試みた。

糖試料を1%アンモニア水に溶解したのち、ホウ酸結合型イオン交換樹脂に結合させ、アセトニトリル水で夾雑物を洗浄・除去した後、糖鎖はホウ酸アンモニウム(pH 10.0)で溶出させた。トリプシン消化により調製したウシ膵臓リボヌクレアーゼB (RNase B)由来糖ペプチドに適用した結果をFig. 6 に示す。なお解析はLC/MS で行った。本糖タンパク質は5 種の高マンノース型糖鎖を含み、一カ所のアスパラギン残基に結合していることが知られている。トリプシン消化直後のTIC(Fig. 6(a))では、10 分付近に高マンノース型糖ペプチドが観察された。また、22.5分以降に夾雑物に由来するピークが観測されているが、ホウ酸SPE を通すことにより、5~9残基のマンノースを含む糖ペプチドのスペクトルが明瞭に観察され、夾雑物由来のシグナルは消滅した(Fig. 6(b))。ここには示していないが、他の糖ペプチドに関しても同様にエンリッチすることができた。先述のセロトニン結合シリカ固相抽出法と組み合わせて使用することにより、従来の煩雑な操作を必要とする糖鎖分析の問題点を大幅に改善することができ、ハイスループット分析が可能になると考えている。しかしながら、まだ回収率が低いため、現在は溶出条件などの検討を行っている。

#### 引用文献

- 1) Masahiro Yodoshi, Tomoko Ikuta, Yukie Mouri, Shigeo Suzuki, Specific Extraction of Sialic-Acid-containing Glycans and Glycopeptides Using Serotonin-bonded Silica, *Anal. Sci.*, 26, 75-81 (2010).
- 2) 吉年正宏, 生田朋子, 毛利幸恵, 小山武裕, 鈴木茂生. "複合糖質のLC/MS 分析のための特異的濃縮法の開発." *Chromatography* 30, 61-67 (2009).