

## 液体クロマトグラフィー／多段階質量分析 による糖タンパク質の構造解析

### 1. はじめに

液体クロマトグラフィー／質量分析 (LC/MS) は、混合物を LC で分離しながら、MS により質量を測定する方法である。特定のイオンを選別して、タンデム MS (MS/MS) や MS/MS を逐次的に繰り返す多段階 MS (MS<sup>n</sup>) を行うと、さらに構造情報が得られる。これらの方法を糖タンパク質のプロテアーゼ消化物 (ペプチドと糖ペプチドの混合物) に応用すると、糖ペプチドの糖鎖構造とアミノ酸配列の両方を推定することができる<sup>1,2)</sup>。近年、LC 及び MS 装置の性能が向上し、単離された糖タンパク質だけでなく糖タンパク質混合物であっても、LC/MS<sup>n</sup> により、それぞれの糖タンパク質の糖鎖の構造や結合位置に関する情

報を得ることができるようになってきた。また、目的とする糖鎖構造を認識する抗体やレクチン等を用いた糖鎖濃縮法と LC/MS<sup>n</sup> を組み合わせることにより、目的糖鎖構造をもつ糖タンパク質を網羅的に解析することも可能になりつつある。

本稿では、LC/MS<sup>n</sup> により糖タンパク質を構造解析した例として、①糖タンパク質混合物の部位特異的糖鎖構造解析、及び②目的の糖鎖構造をもつ糖タンパク質の網羅的解析について紹介する。

### 2. 糖タンパク質混合物の部位特異的糖鎖構造解析

SDS-PAGE 等のゲル電気泳動法は、迅速かつ簡便なタンパク質分画法の一つであるが、糖タンパク質は糖鎖構造の違いによって幅広い分子量分布をもつことが多いため、他のタンパク質と十分に分離できないことが多い。そのような場合でも、ゲルから回収した糖タンパク質混合物を LC/MS<sup>n</sup> を用いて分析することにより、それぞれの糖タンパク質の部位特異的糖鎖構造を明らかにすることができ

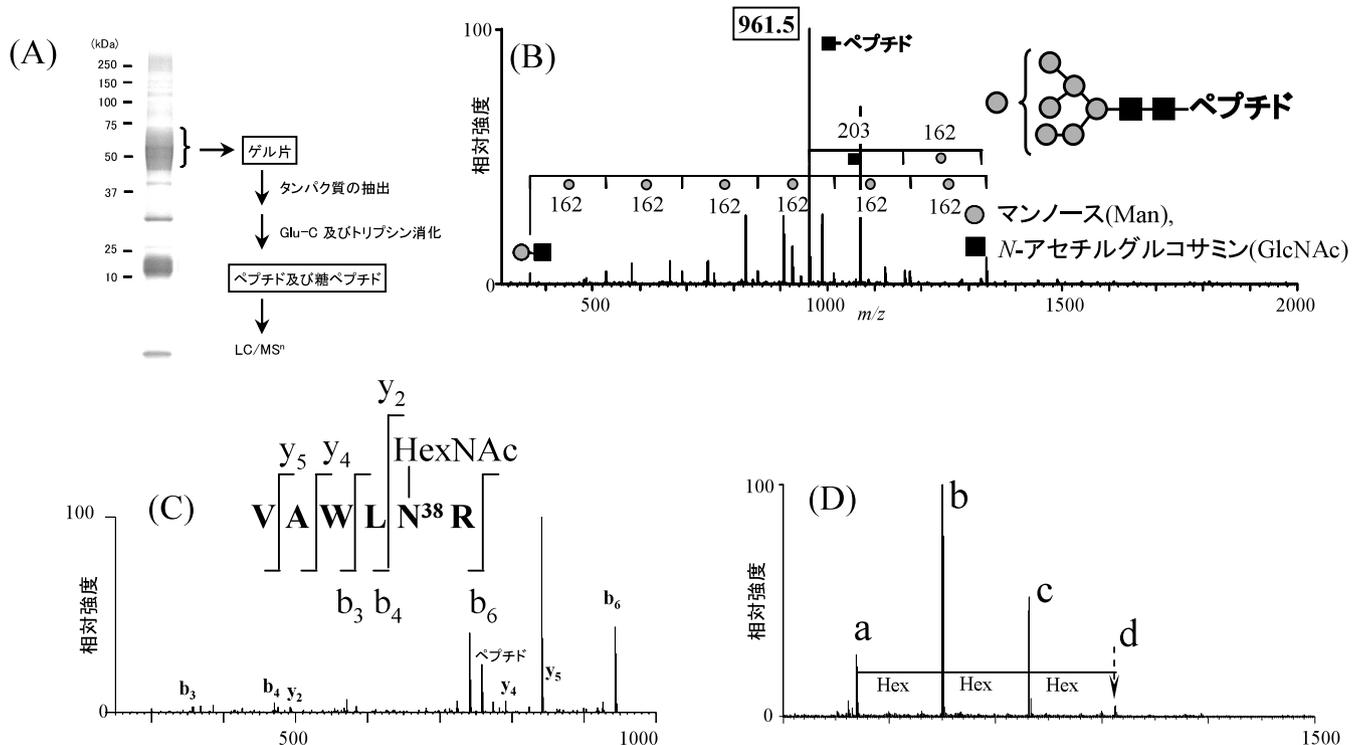


図1 糖タンパク質混合物の部位特異的糖鎖構造解析

(A) ラット脳由来 GPI アンカー型タンパク質の SDS-PAGE, (B) 28 分付近に検出された  $m/z$  1149.99 (2 価イオン) を前駆イオンとして得られた MS/MS スペクトル及び帰属された糖鎖構造, (C) ペプチド関連イオンの MS/MS/MS スペクトル及び帰属されたアミノ酸配列, (D) ペプチド関連イオン ( $m/z$  961.5) が検出された溶出位置付近のマスクロマトグラム. a~d, 高マンノース型糖鎖 M6~M9 が付加した糖ペプチド.

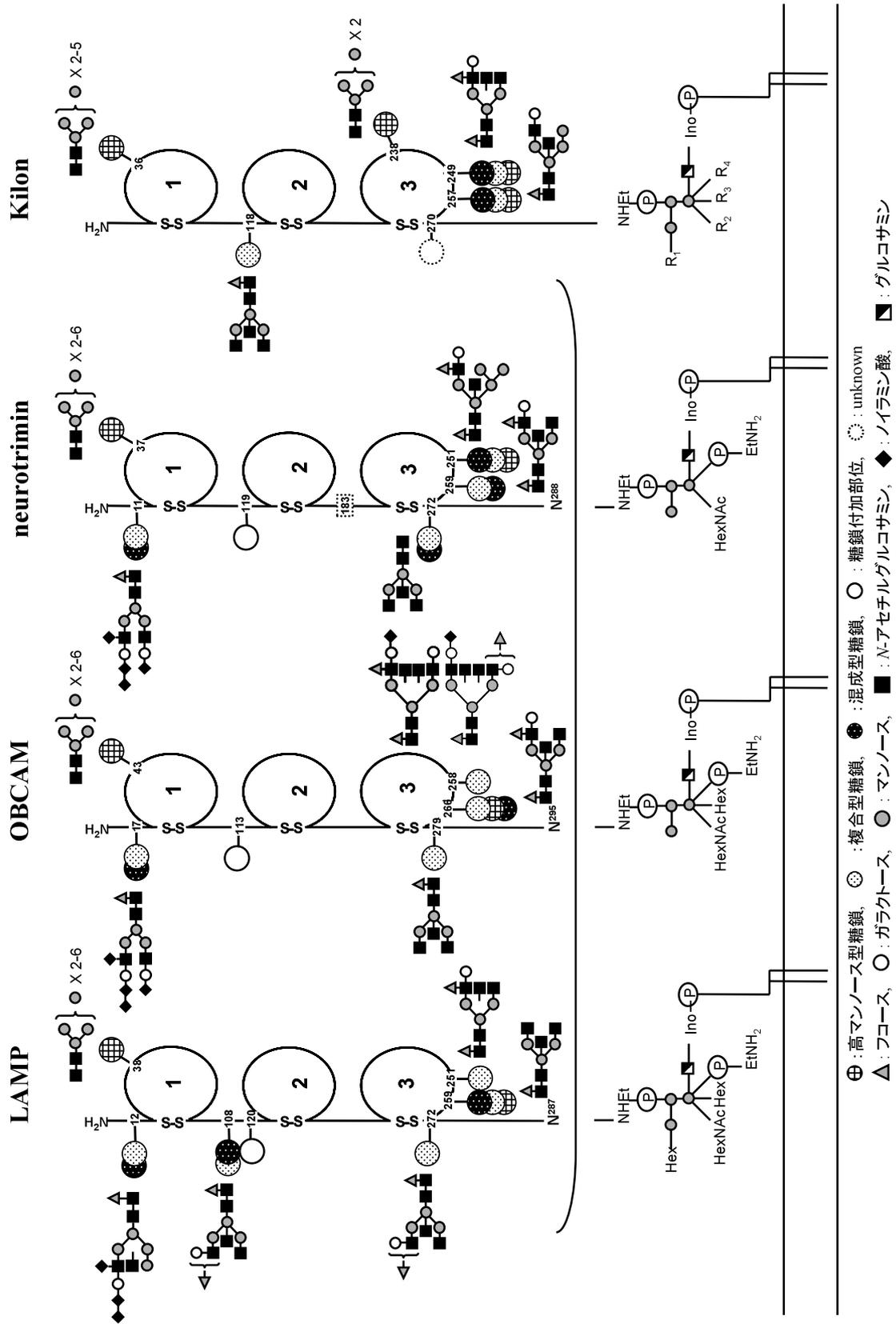


図2 IgLON ファミリータンパク質の部位特異的糖鎖構造解析の要約

る<sup>2)</sup>。

中枢神経組織には様々なグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質が存在し、神経網形成等に関与していることが知られている。その多くは糖タンパク質であり、糖鎖が細胞間相互作用に関係していると考えられている。図 1A は、マウス脳膜画分から得られた GPI アンカー型タンパク質混合物の SDS-PAGE の結果である。プロテオミクスの手法により、45~70 kDa 付近に集中しているタンパク質は、IgLON ファミリータンパク質と呼ばれる limbic-associated membrane protein (LAMP), opioid-binding cell adhesion molecule (OBCAM), neurotrimin 及び Kilon と同定された (図 2)。これらのタンパク質はいずれも、三つのイムノグロブリンドメインと 6~7 箇所の N 結合型糖鎖結合部位をもつ GPI 結合型タンパク質であるが、構造上の特徴がよく似ていることから単離が困難で、糖鎖や GPI 部分の構造は明らかにされていなかった。我々は、ゲルから回収したタンパク質の混合物を、そのままトリプシン及びグルタミルエンドペプチダーゼ (Glu-C) で消化し、LC/MS/MS/MS を行うことにより、四つのタンパク質それぞれに結合している主な糖鎖の構造を明らかにすることができた<sup>3)</sup>。

ここでは、ある糖ペプチドのスペクトルを例に、どのように糖鎖とペプチド部分を帰属したかを示す。まず、膨大なスペクトルデータの中から、162 u (ヘキソース, Hex) や 203 u (N-アセチルヘキソサミン, HexNAc) 間隔のフラグメントを指標として、糖ペプチドの MS/MS スペクトルを探し出した (図 1B)。MS/MS における一般的な断片化法としては、衝突誘起解離法 (CID) がよく用いられる。CID による糖ペプチドの MS/MS では、糖鎖部分が開裂したイオンが生じやすいので、フラグメントイオンを帰属することによって、糖鎖構造を推定することができる。図 1B では、七つのフラグメントイオンの間隔がいずれも 162 u (Hex) であることから、糖鎖構造は、7 分子のマンノース (Man) と 2 分子の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) からなる高マンノース型糖鎖 (M7) と推定された (図 1B 右上図)。また、 $m/z$  961.5 のフラグメントがペプチドに還元末端の GlcNAc が結合した [peptide + GlcNAc + H]<sup>+</sup> と帰属された。

つぎにペプチド部分の amino acid 配列を推定するために、[peptide + GlcNAc + H]<sup>+</sup> ( $m/z$  961.5) を前駆イオンとして得られた MS/MS/MS スペクトルを用いて、データベース検索を行った。その結果、このペプチドは VAWLNR であり、N に GlcNAc が結合しているものと推定された

(図 1C)。また、この amino acid 配列は、LAMP の推定 N 結合糖鎖結合部位 N<sup>38</sup> を含むペプチドと一致した。

さらに VAWLNR のマイクロ不均一性を確認するために、MS/MS により生じた  $m/z$  961.5 を指標として、N<sup>38</sup> を含む糖ペプチドのデータを探したところ、28 分付近に 4 種類の糖ペプチド (a~d) のマススペクトルが取り込まれていることが分かった (図 1D)。これらは、質量差 162 u から、Hex の数が異なる糖鎖 (高マンノース型糖鎖 M6~M9) であることが示唆された。同様にして、四つのタンパク質の合計 22 箇所の部位特異的糖鎖構造を明らかにすることができた (図 2)。

### 3. 目的の糖鎖構造をもつ糖タンパク質の網羅的解析

抗体が認識する部分糖鎖構造は、グライコエピトープと呼ばれる。現在までに、100 種類以上のグライコエピトープの存在が確認されており、その中には細胞の接着、増殖及び分化等の生命現象や疾患に関与するものがあることが知られている<sup>4-7)</sup>。ある種のグライコエピトープは、特定のタンパク質の特定部位に結合することでタンパク質の機能や局在性等を調節していると考えられており、グライコエピトープと生命現象や疾患との関連性を解明するためには、目的とするグライコエピトープが付加した糖タンパク質を網羅的に解析することが不可欠である。

糖ペプチドの MS/MS 及び MS/MS/MS では、図 3A に示したようなグライコエピトープに特徴的なイオン (診断イオン) が検出されることがある<sup>8-11)</sup>。それらの診断イオンを指標とすることで、多くのスペクトルデータの中から、目的のグライコエピトープ付加糖ペプチドのデータのみを選び出すことができる。さらに、前節で紹介した糖ペプチド構造解析法により、選別したスペクトルデータを解析することで、目的のグライコエピトープが付加したタンパク質を同定することができる。

ここでは、ルイス x 糖鎖 (図 3A 左上) を多く発現していることが知られているマウス腎臓をモデルとして、組織中のルイス x 付加糖タンパク質を網羅的に解析した例を示す<sup>12,13)</sup>。まず、マウス腎臓のホモジネートをトリプシンで消化した後、*Aleuria aurantia* lectin (AAL) アフィニティークロマトグラフィーによりフコシル糖ペプチドを濃縮し、LC/MS/MS/MS を行った。前節では、糖鎖の MS/MS で共通して検出される 162 u や 203 u 間隔のフラグメントイオンを指標として、すべての糖ペプチドのスペクトルデータを探し出した。ここではルイス x 付加糖ペプチドだけを解析したいので、ルイス x の診断イオン [Gal (Fuc)

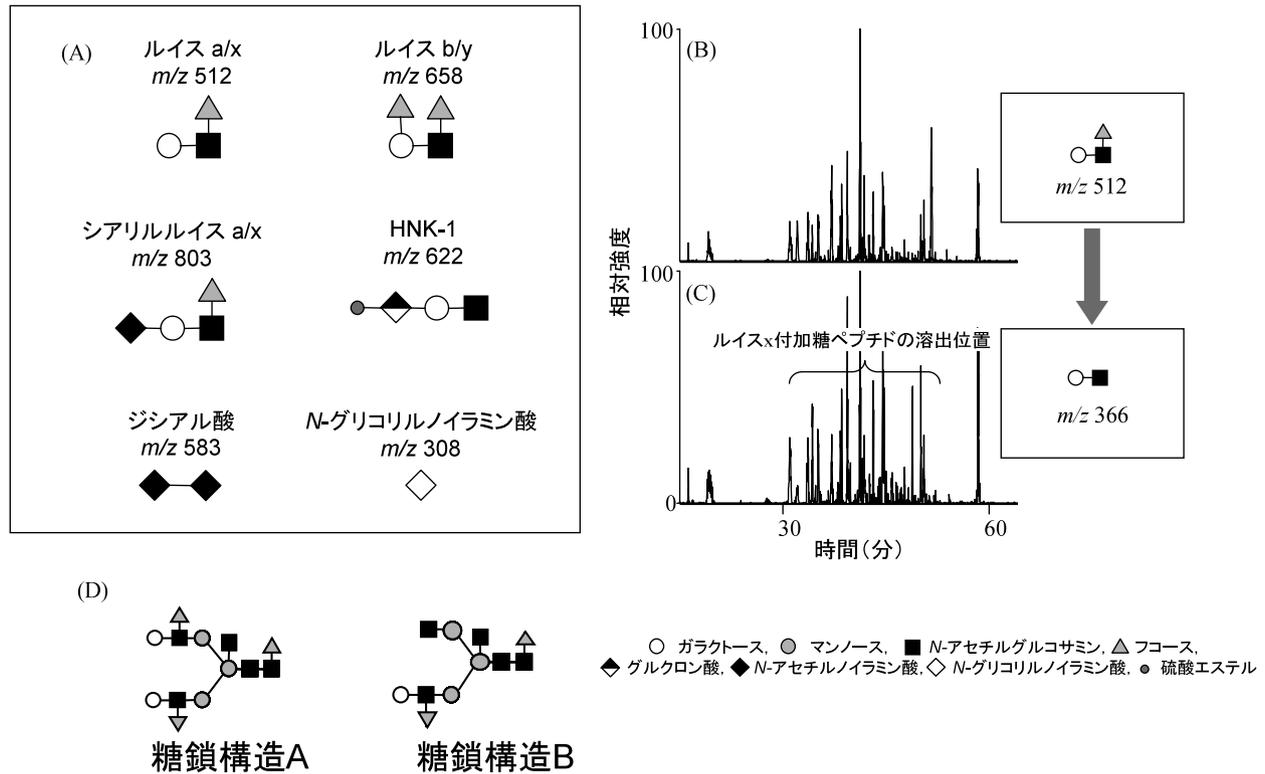


図3 目的の糖鎖構造をもつ糖タンパク質の網羅的解析

(A) 代表的なグライコエピトープの構造と診断イオン. 構造 (診断イオン); ルイス a/x ( $m/z$  512); ルイス b/y ( $m/z$  658); シアリルルイス a/x ( $m/z$  803); HNK-1 ( $m/z$  622); ジシアル酸 ( $m/z$  583); グリコルルノイラミン酸 ( $m/z$  308), (B) MS/MS により生じたルイス x 診断イオン ( $m/z$  512) の EIC, (C) ルイス x 診断イオンの MS/MS/MS により生じた HexHexNAc<sup>+</sup> ( $m/z$  366) の EIC, (D) ルイス x 糖ペプチドに付加していた糖鎖構造. 糖鎖構造 A 及び B は, 表1の糖鎖構造のタイプに対応している.

表1 同定されたルイス x 結合糖ペプチド

アミノ酸配列	同定されたタンパク質	GenInfo Identifier number	糖鎖構造のタイプ
T <sup>1491</sup> WSAFQN*GTDKR <sup>1502</sup>	low density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP2)		A
T <sup>1491</sup> WSAFQN*GTDKR <sup>1502</sup>	low density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP2)		B
N <sup>1676</sup> QSVVMYSVPQPLGIIAHP <sup>1698</sup>	low density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP2)	124487372	A
H <sup>1723</sup> YSCACPSGWN*LSDDSVNCVR <sup>1743</sup>	low density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP2)		B
V <sup>3444</sup> VLVN*TTHKPFDIHVLHPYR <sup>3463</sup>	low density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP2)		A
N <sup>*343</sup> MSSEFYATQLR <sup>354</sup>	$\gamma$ -glutamyltransferase 1 ( $\gamma$ -GTP1)		A
N <sup>*343</sup> MSSEFYATQLR <sup>354</sup>	$\gamma$ -glutamyltransferase 1 ( $\gamma$ -GTP1)	6679995	B
L <sup>503</sup> HNQLLPN*TTTVEK <sup>516</sup>	$\gamma$ -glutamyltransferase 1 ( $\gamma$ -GTP1)		A
E <sup>1800</sup> GN*ATGHLMGR <sup>1810</sup>	Cubilin precursor	88909268	A
Y <sup>1811</sup> CGNSLPGN*YSSIEGHNLWVR <sup>1831</sup>	Cubilin precursor		A
N <sup>*519</sup> LSYEAAPDHK <sup>529</sup>	cadherin 16	6680900	A
R <sup>331</sup> N <sup>#</sup> WTETEVR <sup>339</sup>	dipeptidase 1	6681217	A
Y <sup>105</sup> YN*QSAGSHTFQR <sup>118</sup>	H-2 class I histocompatibility antigen, K-K alpha precursor	122159	A
S <sup>599</sup> GQEDHYWLDVEKN*QSAK <sup>610</sup>	alanyl (membrane) aminopeptidase	225637487	A

\*, GlcNAc 付加位置; #, GlcNAc + Fuc 付加位置. 糖鎖構造のタイプは, 図 3D に示した糖鎖構造 A 及び B に相当する.

GlcNAc<sup>+</sup>,  $m/z$  512], さらにその診断イオンを開裂させたときに生じる GalGlcNAc<sup>+</sup> ( $m/z$  366) を指標として, ルイス x 付加糖ペプチドの MS/MS スペクトルを探した. 図 3B 及び図 3C は, それぞれ MS/MS により生じたルイス x 診断イオン ( $m/z$  512), 及びそこから MS/MS/MS によって生じた GalGlcNAc<sup>+</sup> ( $m/z$  366) のエクストラクテッドイオンクロマトグラム (EIC) である. ピークが認められた位置付近から, ルイス x 付加糖ペプチドと推定されたスペクトルデータを取り出した.

つぎに, 前節で示した糖ペプチド解析の手順に従い, MS/MS スペクトルのフラグメントイオンを帰属した. その結果, 主なピーク付近に溶出されたルイス x 付加糖ペプチドの糖鎖は, 1 あるいは 2 分子のルイス x 構造, バイセクティング GlcNAc 及び還元末端 GlcNAc に Fuc が結合した複合型二本鎖糖鎖であることが明らかとなった (図 3D). さらに, ペプチド関連イオン ([peptide+GlcNAc+nH]<sup>+</sup>) を前駆イオンとして得られた MS/MS/MS/MS スペクトルを用いて, データベース検索を行ったところ, 表 1 に示したように, 14 種類のルイス x 付加糖ペプチドの糖鎖構造とアミノ酸配列を帰属することができた.

#### 4. おわりに

糖鎖関連フラグメントイオンを指標とすることにより, 糖タンパク質の混合物であっても糖鎖結合部位ごとの糖鎖構造解析が可能となった. また, グライコエピトープの診断イオンを指標とすることで, 目的の糖鎖が付加した糖タンパク質の網羅的な解析もできるようになってきた. しかし, 糖ペプチドはペプチドよりもイオン化されにくいこと, また LC/MS<sup>n</sup> により得られる構造情報は限られていることから, 現段階において LC/MS<sup>n</sup> 単独で, 複雑な試料中の糖ペプチドを同定することは難しい. 糖ペプチドを高感度に検出し, より詳細な構造情報を得るためには, 本稿で示したような SDS-PAGE やレクチンなどで糖タンパク質あるいは糖ペプチドを事前に濃縮する方法や, 糖鎖構造を確認できるエキソグリコシダーゼ消化法などと組み合わせることが重要である. また, レクチン等を用いる濃縮法では, 特定の糖鎖が付加した糖ペプチドしか回収することができないので, 糖ペプチドのみを効率良く回収する方法も開発する必要があるかもしれない. そのような回収法と我々が紹介した分析法を組み合わせることで, 様々な種類の糖鎖が付加した糖ペプチドを網羅的に同定することが可能になるものと思われる.

- 1) Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Matsuishi-Nakajima, Y., Kawanishi, T., & Yamaguchi, T. (2008) *J. Chromatogr. B (Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.)*, 869, 20–30.
- 2) Itoh, S., Kawasaki, N., Harazono, A., Hashii, N., Matsuishi, Y., Kawanishi, T., & Hayakawa, T. (2005) *J. Chromatogr. A*, 1094, 105–117.
- 3) Itoh, S., Hachisuka, A., Kawasaki, N., Hashii, N., Teshima, R., Hayakawa, T., Kawanishi, T., & Yamaguchi, T. (2008) *Biochemistry*, 47, 10132–10154.
- 4) <http://www.glyco.is.ritsumei.ac.jp/epitope/> [accessed 10.04.28].
- 5) Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., & Kimura, N. (2004) *Cancer Sci.*, 95, 377–384.
- 6) Zak, I., Lewandowska, E., & Gnyp, W. (2000) *Acta Biochim. Pol.*, 47, 393–412.
- 7) Lau, K.S., Partridge, E.A., Grigorian, A., Silvescu, C.I., Reinhold, V.N., Demetriou, M., & Dennis, J.W. (2007) *Cell*, 129, 123–134.
- 8) Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Harazono, A., Matsuishi, Y., Hayakawa, T., & Kawanishi, T. (2005) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 3315–3321.
- 9) Satomi, Y., Shimonishi, Y., Hase, T., & Takao, T. (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18, 2983–2988.
- 10) Morita, I., Kakuda, S., Takeuchi, Y., Itoh, S., Kawasaki, N., Kizuka, Y., Kawasaki, T., & Oka, S. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 30209–30217.
- 11) Itoh, S., Kawasaki, N., Hashii, N., Harazono, A., Matsuishi, Y., Hayakawa, T., & Kawanishi, T. (2006) *J. Chromatogr. A*, 1103, 296–306.
- 12) Chui, D., Sellakumar, G., Green, R., Sutton-Smith, M., McQuistan, T., Marek, K., Morris, H., Dell, A., & Marth, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 1142–1147.
- 13) Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Nakajima, Y., Harazono, A., Kawanishi, T., & Yamaguchi, T. (2009) *J. Proteome Res.*, 8, 3415–3429.

橋井 則貴, 伊藤 さつき  
(国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部)

Liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry in structural analysis of glycoproteins

Noritaka Hashii and Satsuki Itoh (Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

### 核内受容体を標的とした Th17 細胞制御と自己免疫疾患

はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis ; 以下 MS) は, 中枢神