

Application News

シアル酸結合異性体判別用安定化試薬キット SialoCapper™-ID Kit
MALDI-TOF 質量分析計 MALDI-8020

SialoCapper-ID Kitを用いたマウス蝸牛由来 N結合型糖鎖のシアル酸結合様式判別

犬塚 ま子、西風 隆司

ユーザーベネフィット

- ◆ シアル酸結合様式のはっきりした標品を用意する必要がなく、複雑な糖鎖のシアル酸結合様式も判別できます。
- ◆ ラベル化糖鎖にも適用でき、従来の糖鎖分析フローを変えることなく、追加分析としても行えます。
- ◆ LC分離が必須ではなく、MALDI-MSのMS¹測定のみから簡便かつ迅速にシアル酸結合様式が判別できます。

■はじめに

シアル酸は、主に糖鎖の非還元末端に存在する糖のファミリー名で、N-アセチルノイラミン酸(NeuAc)やN-グリコリルノイラミン酸(NeuGc)といった単糖が含まれます。シアル酸には主にα2,3-/α2,6-といった結合様式が存在し、この結合様式の違いはウイルス感染やがんなど様々な疾患との関わりも指摘されており、生物学的に極めて重要です。

近年、糖鎖の解析には質量分析(MS)が広く利用されるようになってきました。二種の異なる分離モードのHPLC保持時間情報を用いる二次元HPLC解析にMS情報を加えた構造解析法は、糖鎖構造を決定する強力なツールとして用いられています。しかしながら、シアル酸を多く含むような複雑な糖鎖のシアル酸結合様式の判別は未だ困難な場合があります。

本稿では、二次元HPLCとLC-MSで糖鎖構造を決定したPA化糖鎖を、さらにシアル酸結合異性体判別用安定化試薬キット“SialoCapper-ID Kit”を用いて誘導体化し、MALDI-TOF質量分析計で分析することでシアル酸の結合様式を判別した例¹⁾をご紹介します。

■シアル酸結合様式特異的修飾法

当社保有の特許技術であるシアル酸結合様式特異的修飾法(SALSA法)は、シアル酸を中性化し前処理やMS分析中のシアル酸脱離を防ぎ、さらにその結合様式に応じた質量変化を与えることで、本来質量が同じであるシアル酸結合異性体をMSで判別できるようにする技術です^{2,3)}。シアル酸結合異性体判別用安定化試薬キット“SialoCapper-ID Kit”は、このSALSA法を迅速かつ簡便に行うことができます。

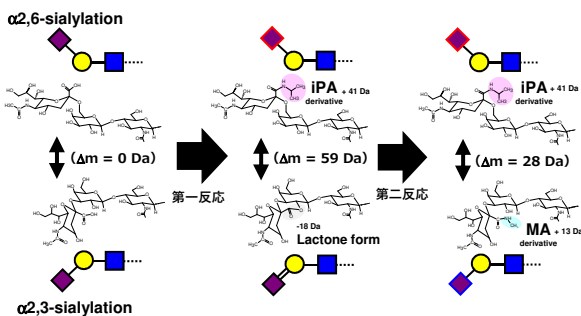


図1 SALSA法の反応概要図

二段階反応により、α2,6-シアル酸はイソプロピルアミド化(IPA)、α2,3-シアル酸はメチルアミド化(MA)し、28 Daの質量差を生じます。

■糖タンパク質からのN結合型糖鎖の遊離と二次元HPLC, LC/MSによる構造解析

マウス蝸牛血管条由来の糖タンパク質から、ヒドラジン分解でN結合型糖鎖を切り出しました。切り出した糖鎖の還元末端を2-aminopyridine(PA)でラベル化しました。

その後、陰イオン交換HPLCでシアル酸の数に従って分画し、さらにODSカラムによる逆相HPLCを用いて分画しました。この各分画糖鎖をアミドカラムによる順相HPLC及びLC-MSで分析し、逆相/順相の二次元HPLC解析とLC/MS解析結果から糖鎖構造を決定しました。

最後に、シアル酸の結合様式が決まらなかった分画画面分に対して、SialoCapper-ID Kitを用いてシアル酸結合様式特異的修飾を行い判別を試みました。

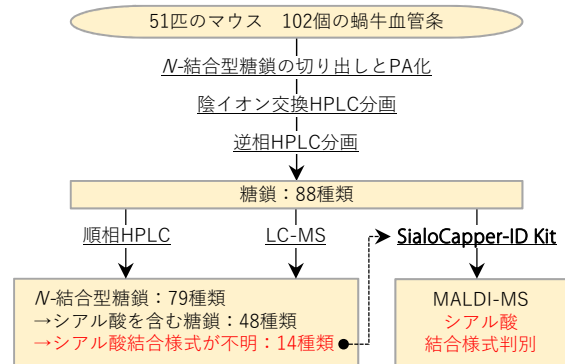


図2 マウス蝸牛由来N結合型糖鎖の構造解析の流れ¹⁾

■液相でのシアル酸結合様式特異的修飾

14画分のPA化糖鎖をカーボンチップで脱塩したのち、SialoCapper-ID Kitを用いてチューブ内液相反応として誘導体化を行い、市販のHILIC-SPEチップを用いて過剰試薬を除いたあと減圧乾固しました(図3)。分画したPA化糖の量は最大でも100 fmol~1 pmol/sample程度でした。

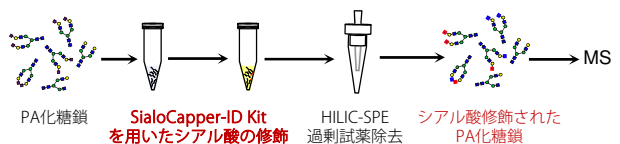


図3 SialoCapper-ID Kitを用いた液相反応でのシアル酸修飾の流れ

■ 質量分析

得られたサンプルを10 μL の水に再溶解しました。そのうち0.5 μL をMALDI ターゲットプレートに搭載し、そこにマトリックス溶液0.5 μL を重ねて乾燥させた後、MALDI-TOF 質量分析計“MALDI-8020”（図4）を用いて測定を行いました。マトリックスには塩化ナトリウムを添加したCHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) を用いました。

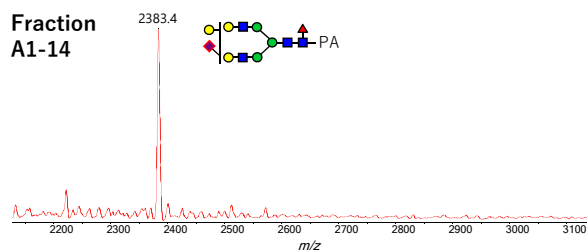


図4 MALDI-TOF MS“MALDI-8020”本体外観

■ マウス蝸牛由来N結合型糖鎖のMS¹分析

MALDI-8020を用い、PA化糖鎖サンプルを測定すると、SialoCapper-ID Kitによる誘導体化後のピークを検出できました。LC-ESI-MSによる構造推定に加えて、シアル酸結合様式特異的修飾による質量変化から、シアル酸結合様式を判別することができました。

図5にシアル酸が1個含まれるA1-14画分の解析結果を示します。単糖組成は[PA-Hex6HexNAc4dHex1NeuAc1]と推定されていましたが、NeuAcの結合様式は不明でした。シアル酸修飾を行ったあとMALDI-8020で測定すると、 m/z 2383.4にピークが観測されました。推定構造を持つ糖鎖のシアル酸修飾後の理論値と比較すると、シアル酸結合様式は α 2,6-であると判別できました。



Original	After sialic acid derivatization by SialoCapper-ID Kit		
m/z (calc, Ave.)	Sialic Acid Linkage Type	m/z (calc, Ave.)	m/z (obs.)
Glycan composition: PA-Hex6HexNAc4dHex1NeuAc1			
2342.13	NeuAc (α 2,6)-1	2383.22	2383.40
	NeuAc (α 2,3)-1	2355.17	N.D.

図5 MALDI-8020で取得したA1-14画分のマススペクトルとシアル酸結合様式判別結果

<参考>

- 1) Nonomura Y, et al. (2019) Characterisation of N-glycans in the epithelial-like tissue of the rat cochlea. *Sci Rep* 9: 1551
- 2) Nishikaze T, et al. (2017) Differentiation of Sialyl Linkage Isomers by One-Pot Sialic Acid Derivatization for Mass Spectrometry-Based Glycan Profiling. *Anal Chem* 89: 2353-2360.
- 3) Hanamatsu H, et al. (2018) Sialic Acid Linkage Specific Derivatization of Glycosphingolipid Glycans by Ring-Opening Aminolysis of Lactones. *Anal Chem* 90: 13193-13199.

SialoCapperは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

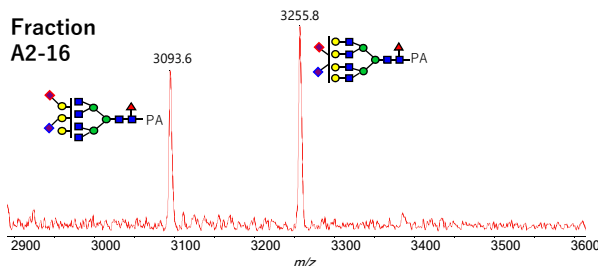
01-00109-JP 初版発行：2021年4月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

図6は、シアル酸を二つ持つ四本鎖糖鎖のシアル酸結合様式を判別した例を示しています。このような複雑な糖鎖は標品の合成が難しく、標品分析との保持時間の一致度からシアル酸の結合様式を判別するのが困難ですが、化学修飾ベースのSialoCapper-ID Kitを用いる事で、質量分析の結果からダイレクトにシアル酸の結合様式が判別できます。



Original	After sialic acid derivatization by SialoCapper-ID Kit		
m/z (calc, Ave.)	Sialic Acid Linkage Type	m/z (calc, Ave.)	m/z (obs.)
Glycan composition: PA-Hex6HexNAc6dHex1NeuAc2			
3039.77	NeuAc (α 2,6)-2	3121.96	N.D.
	NeuAc (α 2,6)-1 NeuAc (α 2,3)-1	3093.90	3093.60
	NeuAc (α 2,3)-2	3065.85	N.D.
Glycan composition: PA-Hex7HexNAc6dHex1NeuAc2			
3201.91	NeuAc (α 2,6)-2	3284.10	N.D.
	NeuAc (α 2,6)-1 NeuAc (α 2,3)-1	3256.04	3255.80
	NeuAc (α 2,3)-2	3227.99	N.D.

図6 MALDI-8020で取得したA2-16画分のマススペクトルとシアル酸結合様式判別結果

他のすべての画分からもシアル酸修飾後のピークが検出され、シアル酸結合様式が判別できました。SialoCapper-ID Kitを用いた修飾後はLC-MSでも測定が可能ですが、MALDI-MSを用いる事で簡便かつ迅速にピークの確認ができます。今回のように、分画画分が多い等、多サンプル分析を行う場合には特に効果的です。

■ まとめ

SialoCapper-ID Kitを用いることで、PAラベル化後の糖鎖にも簡単にシアル酸結合様式特異的修飾を行うことができ、MALDI-MSによるMS¹測定のみから迅速にシアル酸結合様式の判別が行えます。二次元HPLCとLC/MS解析に加え、補完的にSialoCapper-ID Kitを用いたシアル酸修飾を行う事で、シアル酸結合様式と糖鎖構造を容易に決定することができました。

■ 謝辞

マウス蝸牛血管条由来のN結合型糖鎖サンプルをご提供頂きました。新潟大学大学院医歯学総合研究科の日比野浩先生・澤村晴志朗先生に感謝申し上げます。また、PA化糖鎖の二次元HPLCとLC/MS解析を行っていただきました新潟大学理学部理学科の長東俊治先生に感謝申し上げます。