

MALDI-7090とSialoCapper-ID Kitを用いた 遺伝子KOマウス血清由来N結合型糖鎖解析

犬塚 ま子、西風 隆司

ユーザーベネフィット

- ◆ LC分離やシアリダーゼ酵素処理を行うことなく、質量分析のみからシアル酸結合様式異性体が判別できます。
- ◆ 糖鎖精製ビーズ“BlotGlyco®”と組み合わせることで、糖鎖精製とシアル酸の修飾安定化が一度に行え簡便です。
- ◆ MS²測定を併用することでより確実にシアル酸結合様式を判別でき、他の生化学的実験による検証の手間を省きます。

■はじめに

タンパク質に対する糖鎖修飾は様々な生体現象に関与しています。特に糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸は、その有無や結合様式がウイルス感染やがんとの関わりも指摘されるなど、重要な単糖として知られています。

シアル酸結合異性体の判別にはLC分離やシアリダーゼ処理が用いられていますが、標品が必要であったり複雑な糖鎖では判別が難しいなど技術的な課題があります。

近年、高感度・ハイスループットな質量分析(MS)が糖鎖解析に広く利用されるようになりましたが、シアル酸残基が分析途中で脱離しやすく、また質量の同じ結合異性体が区別できないといった本質的な問題がありました。

本稿では、シアル酸転移酵素KOマウスの血清糖タンパク質から切り出したN結合型糖鎖を、シアル酸結合様式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質量分析計でシアル酸の結合異性体判別を含めて解析した例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。

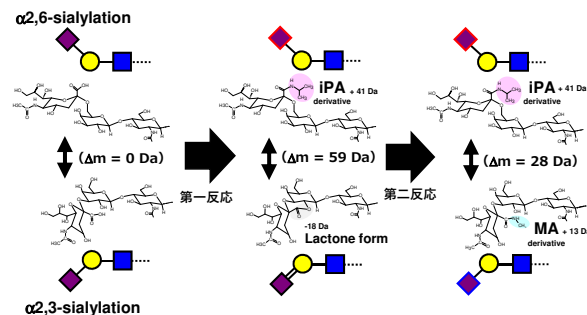


図1 SALSA法の反応概要図

二段階反応により、 α 2,6-シアル酸はイソプロピルアミド化(iPA)、 α 2,3-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。

■シアル酸転移酵素KOマウス

代表的な α 2,6-シアル酸転移酵素であるST6-Gal1とST6-Gal2をノックアウト (KO) したマウスの血清をサンプルとして用いました。比較として、KOなし (WT)、ST6Gal1-KO、ST6Gal2-KOに加え、両方の酵素をKOしたマウス血清 (DKO) も用意しました。

■糖タンパク質からの糖鎖切り出し

シアル酸転移酵素KOマウスの血清糖タンパク質を、SDSとDTTで変性・還元を行い、NP-40存在下でPNGaseF酵素を加え37°Cで一晩インキュベーションすることでN結合型糖鎖を切り出しました。

■糖鎖精製とシアル酸結合様式特異的修飾

切り出した糖鎖は糖鎖精製ビーズBlotGlyco®(住友ベークライト株式会社)を用いて精製しました。BlotGlyco®は糖鎖還元末端を特異的に捕捉して精製できる固相担体で、SialoCapper-ID Kitと組み合わせる事で糖鎖の精製とシアル酸の修飾が一度に行えます (図2)。

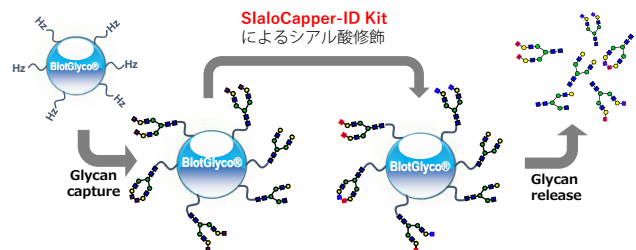


図2 BlotGlyco®とSialoCapper-ID Kitを用いた糖鎖精製とシアル酸修飾 (固相SALSA法) の流れ

■糖鎖のラベル化と質量分析

BlotGlyco®から遊離した糖鎖の還元末端を2-amino-benzoic acid (2AA) でラベル化し、市販のHILIC-SPEチップを用いて過剰試薬を除きました。

サンプル溶液とマトリックス溶液をMALDIターゲットプレートに搭載し乾燥させた後、MALDI-7090 (図3) の負イオンフレクトロンモードを用いて分析を行いました。マトリックスにはSuper-DHBを用いました。

MS²測定にはASDF(Axial Spatial Distribution Focusing: 軸方向空間分布収束)機能を用いました。これによりhigh-energy CID条件下でも高分解能MS²スペクトルが取得できるため、より正確な解析が可能です。



図3 MALDI-TOF MS“MALDI-7090”本体外観

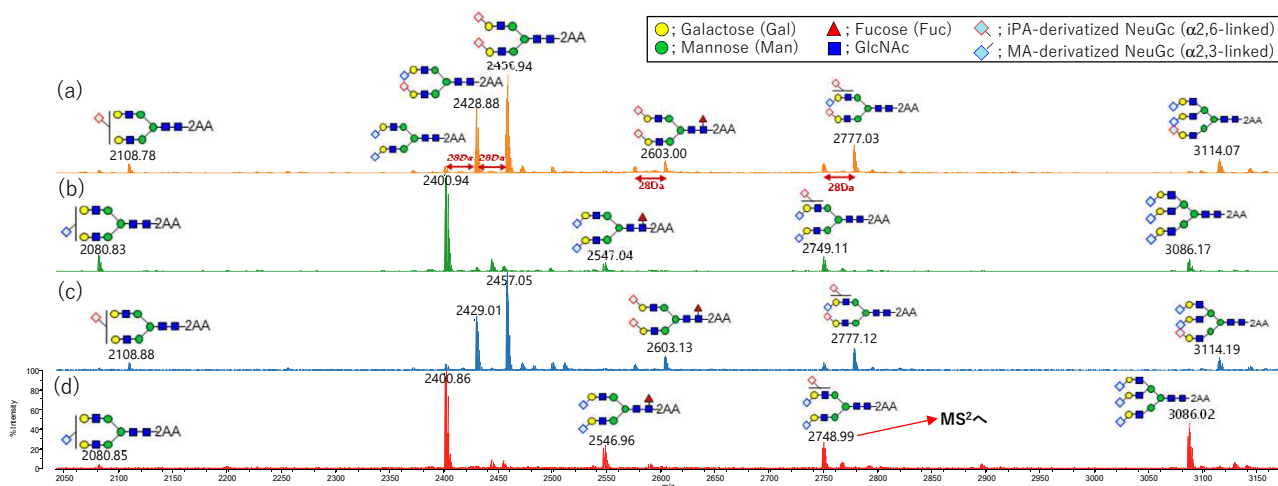


図4 MALDI-7090で取得したマウス血清糖タンパク質由来N結合型糖鎖のマススペクトル (MS¹)
(a) WT, (b) ST6Gal1-KO (c) ST6Gal2-KO (d) DKO

■ マウス血清由来N結合型糖鎖のMS¹分析

マウス血清糖タンパク質からは、 α 2,3-/ α 2,6-の違いに相当する28 Da差を有する様々な糖鎖ピークが検出されました(図4)。これらのm/zをソフトウェアSupporting Tool for SialoCapper-ID Kitで解析し、単糖組成を算出しました(表1)。この結果をもとに過去の文献やN結合型糖鎖の生合成経路を考慮し、糖鎖構造を推定しました。二本鎖糖鎖に着目すると、ST6Gal1-KOとDKOで α 2,6-シアル酸が消失していることから、この α 2,6-シアル酸の付与に関係する酵素はST6Gal1であることが分かります。

表1 マウス血清由来N結合型糖鎖の単糖組成

m/z (calc.)	Glycan Composition
2080.76	AA-Hex5HexNAc4NeuGc(α 2,3-)1
2108.79	AA-Hex5HexNAc4NeuGc(α 2,6-)1
2400.88	AA-Hex5HexNAc4NeuGc(α 2,3-)2
2428.91	AA-Hex5HexNAc4NeuGc(α 2,6-)1NeuGc(α 2,3-)1
2456.94	AA-Hex5HexNAc4NeuGc(α 2,6-)2
2546.94	AA-Hex5HexNAc4dHex1NeuGc(α 2,3-)2
2603.00	AA-Hex5HexNAc4dHex1NeuGc(α 2,6-)2
2749.03	AA-Hex5HexNAc4NeuGc(α 2,6-)1NeuGc(α 2,3-)2
2777.07	AA-Hex5HexNAc4NeuGc(α 2,6-)2NeuGc(α 2,3-)1
3086.14	AA-Hex6HexNAc5NeuGc(α 2,3-)3
3114.17	AA-Hex6HexNAc5NeuGc(α 2,6-)1NeuGc(α 2,3-)2

Supporting Tool for SialoCapper-ID Kitは、シアル酸修飾した糖鎖の組成候補を推定することができる解析補助ソフトウェアです。

検索条件：
Mass Tolerance 0.2 Da,
Hex 3-10, HexNAc 2-10, dHex 0-1, Neu5Gc 0-4

<参考>

- Ohmi Y. et al. (2020) Majority of alpha2,6-sialylated glycans in the adult mouse brain exist in O-glycans: SALSA-MS analysis for knockout mice of alpha2,6-sialyltransferase genes. *Glycobiology* in press
- 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.
- 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 島津製作所の商標です。
BlotGlycoは、住友ベークライト株式会社の商標です。

■ High-energy CIDとASDFによるMS²分析

二種の α 2,6-シアル酸転移酵素をKOしたDKOサンプルからも、 α 2,6-シアル酸の含有が示唆されるm/z 2749のピークがありました。このピークのMS²分析を行ったところ、イソプロピルアミド化NeuGcに相当する348 Daの脱離が観測されました(図5)。これは α 2,6-シアル酸の存在を示唆しており、今回KOした二種のシアル酸転移酵素以外の酵素によって α 2,6-シアル酸が付加されていることを示しています。

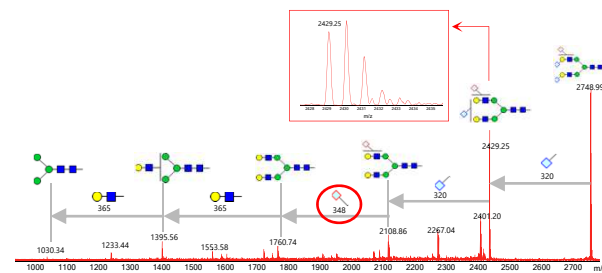


図5 m/z 2749のMS²スペクトル

■ まとめ

BlotGlyco®とSialoCapper-ID Kitを用いる事で、糖鎖の精製とシアル酸結合様式特異的修飾がone-pot反応として簡便に行えます。本キットで処理した糖鎖はMS¹測定のみからシアル酸結合様式が判別できますが、MS²測定も行うことで想定外の結果にも確証を得る事ができます。今回は、KOした酵素とは別の酵素で制御されている α 2,6-シアル酸の存在を知ることができました。

■ 謝辞

シアル酸転移酵素KOマウスの血清を分析する機会をいただきました中部大学古川鋼一先生、大海雄介先生に感謝申し上げます。