

## SARS-CoV-2受容体 ACE2 のN結合型糖鎖解析 ～SialoCapper-ID Kitを用いた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

- ◆ ウイルスの感染性に深い関係を持つシアル酸結合様式を簡単に評価できます。
- ◆ LC分離やシアリダーゼ処理を行うことなく、質量分析のみから簡単にシアル酸結合様式が判別できます。
- ◆ 簡単な前処理でシアル酸を修飾安定化でき、シアリル糖鎖と中性糖鎖を同時に測定できます。

### ■はじめに

糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸には $\alpha$ 2,3-や $\alpha$ 2,6-の結合様式異性体が存在し、ウイルスの感染性に関する例も知られています。例えば、インフルエンザウイルスはシアル酸に結合して体内に侵入しますが、ヒト型は $\alpha$ 2,6-シアル酸、トリ型は $\alpha$ 2,3-シアル酸に優先的に結合します。ヒトの上気道粘膜細胞には $\alpha$ 2,6-シアル酸が多く、トリ型ウイルスは結合しません。糖鎖解析はウイルスの感染機序を明確化するため、ひいては治療薬開発の観点からも非常に重要です。

近年パンデミックを引き起こしている新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因である重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2 (SARS-CoV-2) は、アンジオテンシン変換酵素II (ACE2) を宿主細胞受容体として利用します。他のウイルス同様にシアル酸の結合様式も感染に関わっている可能性が高く、ACE2の糖鎖解析が進められています<sup>1)</sup>。

本稿では、ACE2 のN結合型糖鎖をMALDI-TOF-MSで解析した例をご紹介します。シアル酸結合異性体判別用安定化試薬キット“SialoCapper-ID Kit”を用いて誘導体化することで、シアル酸結合様式も判別しました。

### ■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<sup>2,3)</sup>。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。

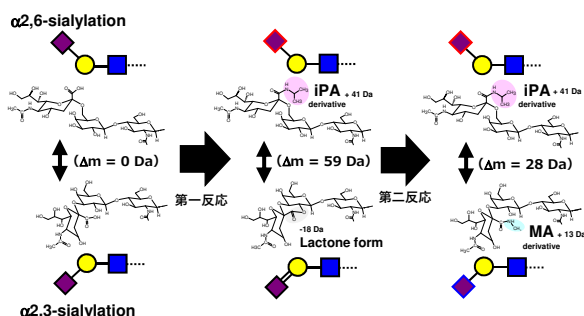


図1 SALSA法の反応概要図

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

### ■ Human ACE2からの糖鎖切り出し

サンプルには市販のrecombinant human ACE2 protein, ab151852 (Abcam) を用いました。SDSによる変性とDTTによる還元を行った後、NP-40存在下でPNGaseFを加え37°Cで一晩反応させることで、N結合型糖鎖の切り出しを行いました。

### ■シアル酸結合様式特異的修飾

ACE2から切り出したN結合型糖鎖溶液のうち5 $\mu$ Lを直接SialoCapper-ID Kitを用いて誘導体化しました。その後、GL-Tip Amide (GL Sciences Inc.)を用いて過剰試薬を除去しました。

### ■糖鎖のAB標識

シアル酸結合様式特異的修飾を行った糖鎖の還元末端を2-aminobenzamide (AB) でラベル化しました。その後、GL-Tip Amideを用いて過剰試薬の除去を行いました。

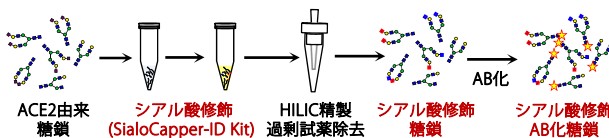


図2 SialoCapper-ID Kitを用いたACE2由来糖鎖のシアル酸修飾の流れ

### ■質量分析

0.5 $\mu$ Lのサンプル溶液をMALDIターゲットプレートに搭載し、そこに0.5 $\mu$ Lのマトリックス溶液を重層し風乾させた後、MALDI-8020 (図3) で測定を行いました。マトリックス溶液として10mg/mL Super-DHB<sup>※</sup> (50% acetonitrile, 0.5mM NaCl) を用いました。得られたマススペクトルの糖鎖ピークのm/zから、解析補助ソフトウェアSupporting Tool for SialoCapper-ID Kitを用い糖鎖組成を推定しました。

※ Super-DHB: DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) とMSA (5-methoxysalicylic acid) の9:1混合物

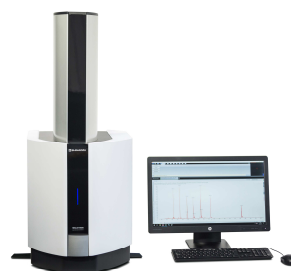


図3 MALDI-TOF 質量分析計 “MALDI-8020”本体外観

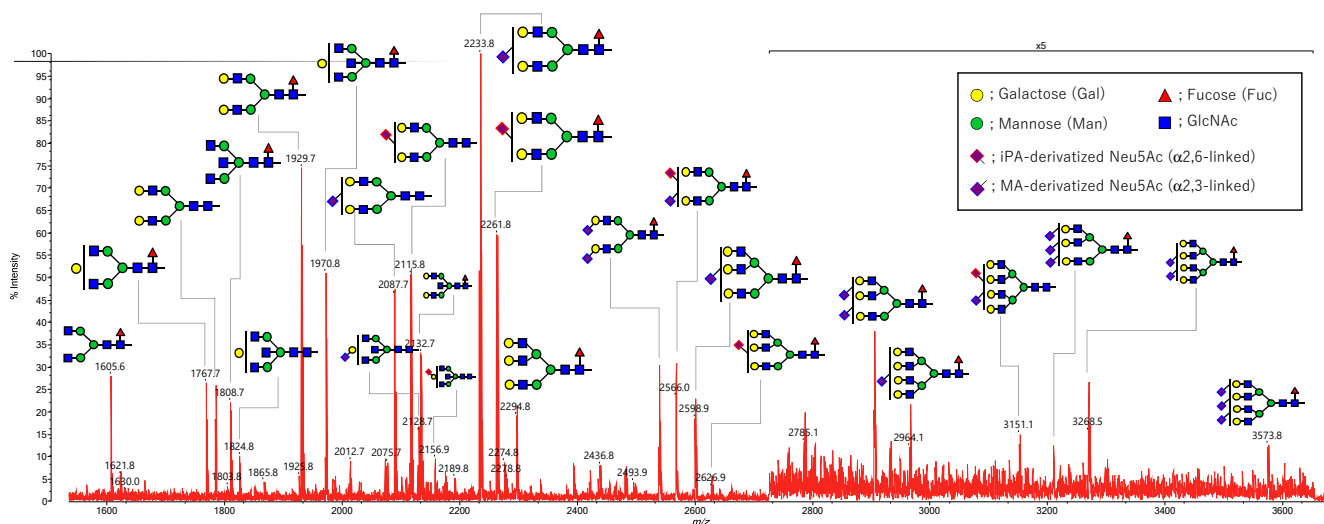


図4 MALDI-8020で取得した human ACE2 由来のN結合型糖鎖のマススペクトル

### ■ human ACE2 由来糖鎖のMS分析

MALDI-8020を用いてACE2由来のN結合型糖鎖を測定した結果、複合型糖鎖を中心とした様々な糖鎖ピークが検出されました(図4)。検出された糖鎖ピークの単糖組成を解析補助ソフトウェア“Supporting Tool for SialoCapper-ID Kit”を用いて計算し(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から推定した糖鎖構造をスペクトル内に示しています。

SialoCapper-ID Kitを用いることでシアル酸が中性化され、シアル酸を持たない中性糖鎖とシアリル糖鎖のイオン化効率が揃えられます。これによりピーク強度を直接比較することが可能になり、糖鎖の相対存在量をより正確に評価できます。得られた糖鎖ピーク強度から、中性糖鎖とシアリル糖鎖の存在割合と、シアリル糖鎖の中でのα2,3-/α2,6-結合様式の割合を算出しました(図5)。このrecombinant human ACE2にはα2,6-シアル酸よりもα2,3-シアル酸の方が多く含まれていることがわかりました。

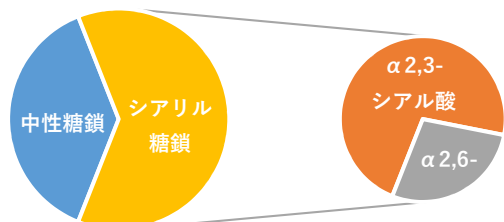


図5 ピーク強度から算出した中性糖鎖/シアリル糖鎖の割合とα2,3-/α2,6-シアル酸の割合

### ■ まとめ

SialoCapper-ID Kitを用いることで、中性糖鎖とシアリル糖鎖が一度に測定可能となり、さらにシアル酸の結合様式がMSI測定のみで判別できるようになります。本稿では、SARS-CoV-2の受容体であるACE2のN結合型糖鎖とそのシアル酸結合様式を簡単に評価できました。

#### <参考>

- 1) Shajahan A, et al. (2020) Comprehensive Characterization of N- and O-Glycosylation of SARS-CoV-2 Human Receptor Angiotensin Converting Enzyme 2. *Glycobiology* in press.
- 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

01-00111-JP 初版発行：2021年4月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本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」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>  
閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録ください。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

© Shimadzu Corporation, 2021

表1 Human ACE2から検出されたN結合型糖鎖の単糖組成

m/z (obs.)	m/z (calc.)	Glycan Composition	Intensity
1605.6	1605.60	AB-Hex3HexNAc4dHex1	40.8%
1767.7	1767.66	AB-Hex4HexNAc4dHex1	28.6%
1783.7	1783.65	AB-Hex5HexNAc4	24.5%
1808.7	1808.68	AB-Hex3HexNAc5dHex1	24.5%
1824.8	1824.68	AB-Hex4HexNAc5	10.2%
1929.7	1929.71	AB-Hex5HexNAc4dHex1	69.4%
1970.8	1970.73	AB-Hex4HexNAc5dHex1	42.9%
2087.7	2087.78	AB-Hex5HexNAc4NeuAc(α2,3)-1	42.9%
2115.8	2115.81	AB-Hex5HexNAc4NeuAc(α2,6)-1	44.9%
2128.7	2128.80	AB-Hex4HexNAc5NeuAc(α2,3)-1	12.2%
2132.7	2132.79	AB-Hex5HexNAc5dHex1	30.6%
2156.9	2156.84	AB-Hex4HexNAc5NeuAc(α2,6)-1	6.1%
2233.8	2233.84	AB-Hex5HexNAc4dHex1NeuAc(α2,3)-1	100.0%
2261.8	2261.87	AB-Hex5HexNAc4dHex1NeuAc(α2,6)-1	63.3%
2294.8	2294.84	AB-Hex6HexNAc5dHex1	20.4%
2537.9	2537.96	AB-Hex5HexNAc4dHex1NeuAc(α2,3)-2	34.7%
2566.0	2565.99	AB-Hex5HexNAc4dHex1NeuAc(α2,6)-1NeuAc(α2,3)-1	38.8%
2598.9	2598.97	AB-Hex6HexNAc5dHex1NeuAc(α2,3)-1	30.6%
2626.9	2627.00	AB-Hex6HexNAc5dHex1NeuAc(α2,6)-1	8.2%
2903.0	2903.09	AB-Hex6HexNAc5dHex1NeuAc(α2,3)-2	20.4%
2931.0	2931.13	AB-Hex6HexNAc5dHex1NeuAc(α2,6)-1NeuAc(α2,3)-1	8.2%
2963.7	2964.10	AB-Hex7HexNAc6dHex1NeuAc(α2,3)-1	10.2%
3149.6	3149.21	AB-Hex7HexNAc6NeuAc(α2,6)-1NeuAc(α2,3)-1	6.1%
3207.3	3207.22	AB-Hex6HexNAc5dHex1NeuAc(α2,3)-3	6.1%
3268.1	3268.23	AB-Hex7HexNAc6dHex1NeuAc(α2,3)-2	16.3%
3572.3	3572.35	AB-Hex7HexNAc6dHex1NeuAc(α2,3)-3	10.2%

m/zはモノアイソトピック値。ただし、m/z3000以上のm/z obs.は検出された糖鎖ピークの平均分子質量からの推定値。