

Application News

No. B101

MALDI-TOF 質量分析法

小型MALDIデジタルイオントラップ質量分析計 "MALDImini™-1"を用いたN結合型糖鎖解析 – シアル酸結合様式異性体の識別と構造推定 –

タンパク質に対する N結合型糖鎖修飾は様々な生体現象に関与することが知られています。特に、糖鎖末端に存在するシアル酸とその結合様式は、抗原性やウイルス感染など、多くの疾患にかかわる重要な因子であることが知られています。

シアル酸結合様式の判別にはHPLCが主に用いられますが、シアル酸を多く有する糖鎖の場合は判別が困難である等の技術的課題がありました。近年では糖鎖の分析に質量分析計が広く利用されるようになりましたが、シアル酸残基はその不安定さから分析途上で脱離しやすく、また結合異性体が区別できないといった課題があります。

本稿では、血清由来の N結合型糖鎖に対して、当社で開発したシアル酸結合様式特異的修飾法を用いてシアル酸残基を安定化し、小型 MALDI デジタルイオントラップ質量分析計 "MALDImini-1" で検出・解析を行った例をご紹介します。

T. Nishikaze

糖タンパク質からの N結合型糖鎖の切り出し

血清は研究用に市販されているものを用いました。まず、市販血清 5 μL を SDS (Sodium dodecyl sulfate) と DTT (Dithiothreitol) により変性・還元し、NP-40 (Nonidet P-40) を添加後、PNGaseF (Peptide-N-glycosidase F) を加え 37 °C で 18 時間反応させることで糖タンパク質から N結合型糖鎖を切り出しました。

シアル酸結合様式特異的修飾法

当社開発のシアル酸結合様式特異的修飾法 (SALSA 法^{*1}) は、シアル酸を化学的に中性化しシアル酸の脱離を防ぐだけでなく、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 で区別できるようにする技術です (図 1)^{1), 2)}。

糖タンパク質から切り出した N結合型糖鎖のうち 4 μL を直接 SALSA の反応溶液 20 μL と混合し、室温で一時間反応させました。その後、ラクトン構造の安定化試薬を加え、軽く混合した後、GL-Tip Amide (GL サイエンス) を用いて過剰試薬を除きました。

*1 特許第 06135710 号

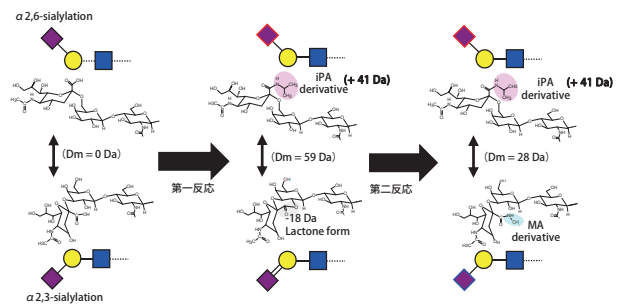


図 1 シアル酸結合様式特異的修飾法 SALSA の概要図。二段階の反応により、α2,6-シアル酸はイソプロピルアミン (iPA) でアミド化、α2,3-シアル酸はメチルアミン (MA) でアミド化することで質量差を生じさせ、MS で区別を可能にします。

糖鎖の 2AB 標識と MALDI プレートへの搭載

シアル酸結合様式特異的に修飾した糖鎖の還元末端を 2-aminobenzamide (2AB) でラベル化しました。その後、GL-Tip Amide を用いて過剰試薬を除きました。

サンプル溶液 (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) を重層して乾燥させた後、小型 MALDI-DIT 質量分析計 "MALDImini-1" (図 2) を用いて MSⁿ 分析を行いました。

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。

* "MALDImini-1"の詳細については、アプリケーションニュース B100 をご参照下さい。



図 2 小型 MALDI-DIT 質量分析計 "MALDImini™-1" 本体外観

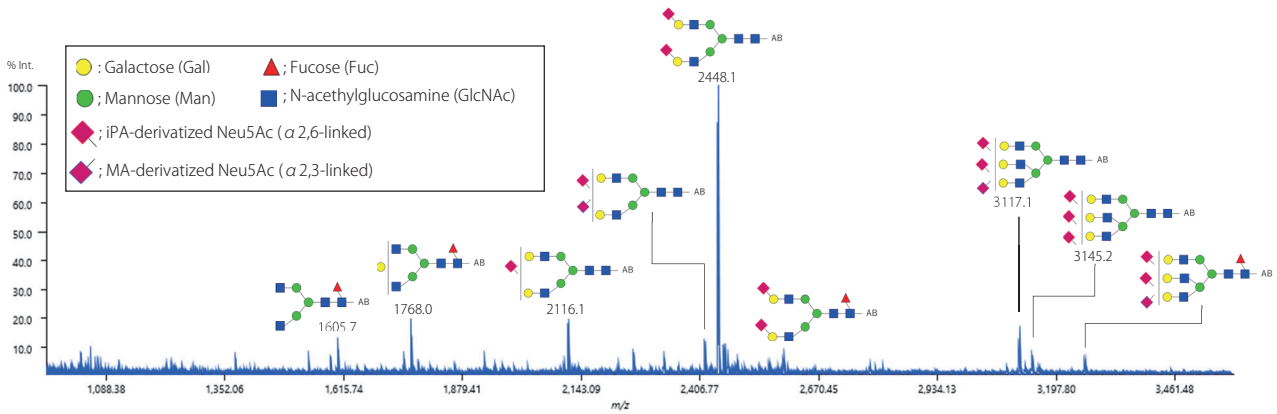


図3 MALDImini-1で取得した血清糖タンパク質由来 N結合型糖鎖のマススペクトル (MS)

MS²分析によるシアル酸結合様式の確認

血清糖タンパク質由来 N結合型糖鎖からは、複合型糖鎖を中心とした、二分岐・三分岐など様々な糖鎖が検出されました (図3)。

MALDImini-1で取得した三分岐糖鎖のMS²スペクトル比較を図4に示しました。この二つの糖鎖は28Da差で検出されていることから、α2,3-/α2,6-のみが異なる糖鎖であることが推測できます。MS²では修飾されたシアル酸に相当する質量がニュートラルロスしており、シアル酸の結合様式の違いを裏付けるデータが得られました。m/z3117.1はα2,3-/α2,6-の混合、m/z3145.2はα2,6-のみであることがわかりました。

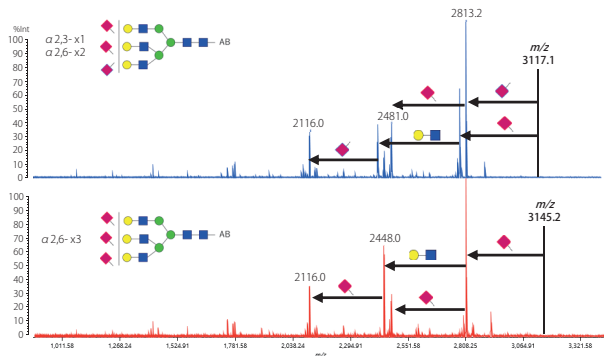


図4 MSで検出された三分岐糖鎖 m/z3117.1と3145.2のMS²マススペクトルの比較。非還元末端のシアル酸脱離ニュートラルロスの質量から、その結合様式が判別できる。

MSⁿ分析による糖鎖構造解析

糖鎖のMS²解析では、グリコシル結合の開裂によるフラグメントイオンが多く検出されますが、糖鎖のように同じ質量の残基を多く含む場合、糖鎖のどの部分から生じたフラグメントイオンであるか、判断が難しい場合があります。

MS³を行うことで、フラグメントイオンの由来を明確にできます (図5)。例えば m/z 2448.1 の二本鎖糖鎖のMS²における m/z720.0のフラグメントイオンは、非還元末端側からの逐次的な糖鎖脱離では説明できません。そこで、シアル酸を含むフラグメントイオン (m/z2107.0) と含まないフラグメントイオン (m/z1783.9) のMS³を比較すると、後者からは m/z720.0のフラグメントイオンが検出されませんでした。このことから、m/z720.0のフラグメントイオンがシアル酸を含む非還元末端側の三糖に由来することがわかりました。また、フラグメントイオン m/z 1053.4のMS³からは N結合型糖鎖のコア構造の解析が可能でした。

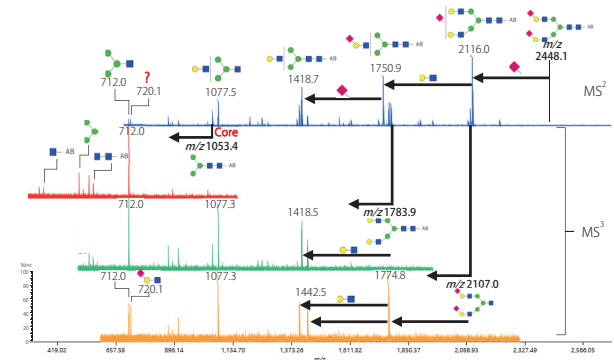


図5 MSで検出された二本鎖糖鎖 m/z2448.1のMSⁿマススペクトル

まとめ

今回の実験で示したように、SALSA法によるシアル酸の安定化と小型MALDI-DIT質量分析計「MALDImini-1」によるMS³分析の組み合わせは、シアル酸の結合様式を含んだ糖鎖構造解析に対しての有効な手段であるといえます。

<参考>

- 1) 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.
- 2) Hanamatsu H, et al. (2018) Sialic Acid Linkage Specific Derivatization of Glycosphingolipid Glycans by Ring-Opening Aminolysis of Lactones. *Anal Chem* 90(22):13193-13199.

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。MALDImini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

初版発行：2019年6月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※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。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

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/>
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。