

Application News

質量分析を用いた糖鎖分析のための新しい誘導体化ツール：SialoCapper-ID Kit

犬塚ま子、西風 隆司

ユーザーベネフィット

- ◆ 標品糖鎖と比較することなく、MS分析のみからシアル酸の結合様式を判別でき、実験の省力化に貢献します。
- ◆ シアリル糖鎖の感度が向上するため、微量サンプルも解析しやすくなり、サンプルを無駄にしません。
- ◆ 従来の糖鎖分析手法と親和性が高く、既存の実験系に柔軟に組み込むことができます。

■はじめに

糖鎖は第三の生命鎖とも呼ばれ、生体内に様々な形で存在しています。タンパク質に対する糖鎖修飾は、ウイルス感染やがんなどの疾病に加え、ホルモンやバイオ医薬品の活性とも深い関わりを持っています。生体現象や医薬品効果の理解には糖鎖構造の把握が不可欠です。

シアル酸 (sialic acid: SA) は、糖鎖を構成する単糖のうち、通常最も外側に位置する酸性残基のファミリー名です。シアル酸の関連する生体現象は多く、例えばインフルエンザ感染ではシアル酸が中心的な役割を担っています。

糖鎖解析と言えば、従来は蛍光標識によるHPLC分析が主流でしたが、近年は高感度かつスループットの高い質量分析 (mass spectrometry: MS) も積極的に利用されるようになってきました。しかしながら、シアル酸を持つ酸性糖鎖は中性糖鎖と比べて分析が難しいという問題がありました。

本稿では、シアル酸含有糖鎖 (シアリル糖鎖) の質量分析を容易にするための新しい修飾法である、シアル酸結合様式特異的修飾法とそのキット“SialoCapper-ID Kit”をご紹介します。

さらに、シアル酸には質量が同じ α 2,3-/ α 2,6-の結合様式異性体が存在します。インフルエンザウイルスの感染機序など、その違いが重要となる生体現象も多く、糖鎖解析ではシアル酸結合様式の判別まで求められます。このような質量が同じ異性体の識別は、MSにおけるチャレンジングなテーマの一つです。

■シアル酸結合様式特異的修飾法

シアル酸が付加することによる分析上の問題点を解消するのが、化学的誘導体化によるシアル酸の中性化です。シアル酸修飾を行うことで、シアル酸残基の脱離と塩付加によるピークの分散を防ぎ、感度と定量性が向上します。

当社では、従来のシアル酸修飾法をさらに発展させ、上記のメリットに加えシアル酸の結合様式判別までも可能にする新しい修飾法を開発しました。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、シアル酸を確実に中性化し、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様式異性体をMSで判別できるようにする技術です^{1,2)}。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。

SialoCapper-ID Kitで行うSALSA法は二段階の反応からなりますが、第二反応は非常に迅速かつロバストであるため、助長な反応時間や第一反応と第二反応の間での精製操作は必要ありません。最終的に、 α 2,6-シアル酸はイソプロピルアミド化、 α 2,3-シアル酸はメチルアミド化されるため、 α 2,3-/ α 2,6-シアル酸は28Da差で区別できるようになります (図1)。

■シアリル糖鎖の質量分析技術上の問題点

シアル酸はカルボキシル基を有する酸性糖で、一般的にMSでの感度を低下させます。また、MS分析途中で脱離しやすく、正確なシアル酸付加個数の把握は困難です。加えて、カルボキシル基に塩が付加しやすくピークが分散するため、特にシアル酸を複数持つ糖鎖はスペクトルが複雑になり、定量性も低下します。

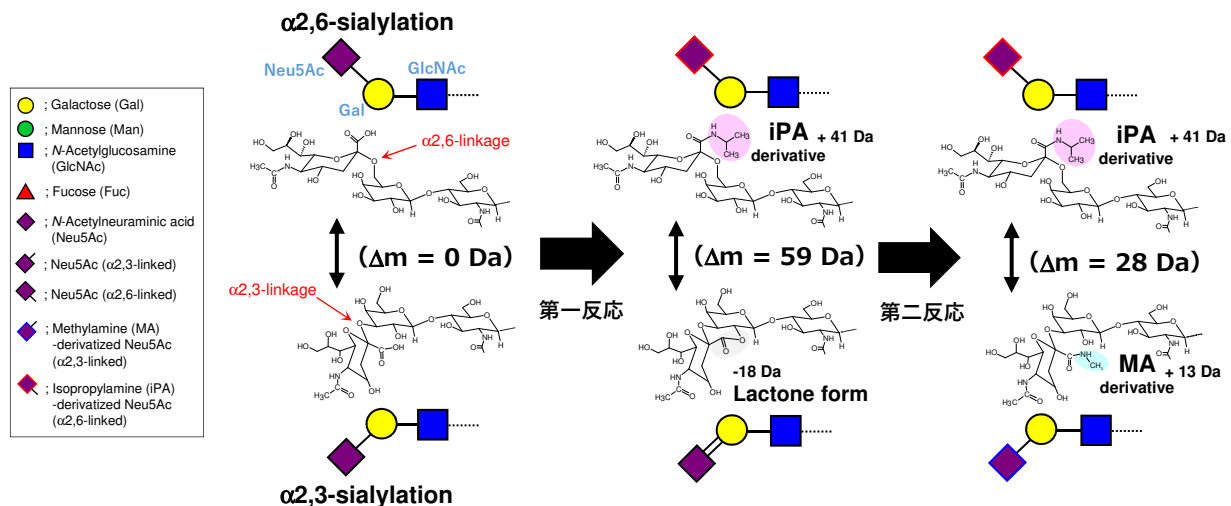


図1 SALSA法の反応概要図

SialoCapper-ID Kitで行うSALSA法は、当社開発の技術を北海道大学 古川潤一先生・花松久寿先生との協力により改良したものです。

■ SialoCapper-ID Kitの特長

SialoCapper-ID Kitの特長は以下の三点です。

- A. 簡単にシアル酸結合異性体を解析
- B. シアリル糖鎖の感度向上
- C. 高い汎用性と拡張性

以下で詳細をご説明します。A. B. は本キットの効果、C. は本キットの使用方法に関連します。

■ 特長A: 簡単にシアル酸結合異性体を解析

本キットを用いる事で、 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -シアル酸に質量差が生じるため、MSでシアル酸結合様式の判別が可能になります。図2は、ラベル化されたジアリル糖鎖標品を本キットで処理し、MSで測定したマスペクトルを示しています。これらの4つの糖鎖は異性体であるため、もともとの質量は全て同一 ($[M+Na]^+$, m/z 2323.8) ですが、本キットを用いる事でシアル酸の結合様式とその数に応じて異なる m/z にピークが観測されていることがわかります。反応条件は最適化されており、シアル酸が修飾されずに残る「未反応」や、 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -判別性能低下の原因となる「誤反応」はほぼ生じません。

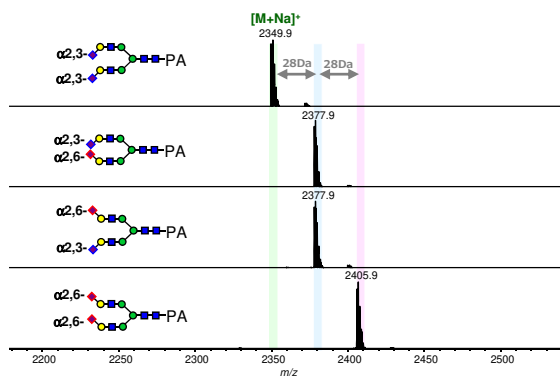


図2 SialoCapper-ID Kitで処理したラベル化糖鎖標品のマスペクトル

従来のシアル酸結合様式判別法としては、シアル酸結合様式が既知の標品糖鎖を用意し、LC/MS分析を行い、標品とサンプルの保持時間の一致度から判別したり、シアリダーゼ処理前後での分析結果を比較する手法が知られていました。

SialoCapper-ID Kitは化学反応を用いるため、シアル酸結合様式が既知の標品が必要ありません。これは、複雑な糖鎖で標品の入手が難しい場合などは特にメリットになります。

■ 特長B: シアリル糖鎖の感度向上

シアル酸の中性化によって分析途上のシアル酸残基の脱離が防げ、さらにカルボキシル基への塩付加も抑制できます。結果としてシアリル糖鎖の感度が向上し、スペクトルもシンプルになるため解析が容易になります。定量性も向上し、一つのスペクトル内に中性糖鎖とシアリル糖鎖の両方を検出することもできます。

図3はSialoCapper-ID Kit適用前後のFetuin由来N結合型糖鎖のマスペクトルの比較です。本キット適用後は感度も向上し、塩付加が抑えられスペクトルもシンプルになっています。

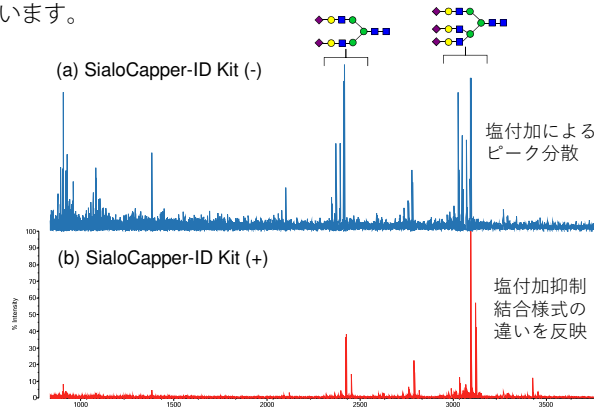


図3 Fetuin由来N結合型糖鎖のマスペクトル (a) 未処理 (b) SialoCapper-ID Kitで処理

■ 特長C: 高い汎用性と拡張性

糖タンパク質由来糖鎖の質量分析を行う場合、一般的には以下のステップが必要です。

- 1) 糖鎖の切り出し
- 2) 糖鎖のラベル化 (必要な場合)
- 3) 質量分析

各ステップの間には、適切な精製処理が必要になる場合もあります。すでに糖鎖分析を行っているラボでは確立されたプロトコルが存在するかもしれませんが、SialoCapper-ID Kitは、一つのキットで液相反応と固相反応の両方に対応しており、すでに確立されたプロトコルをお持ちのラボであっても、分析プロトコル内に無理なく組み込み、シアル酸結合様式の判別が行うことが可能です。 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -シアル酸両方を安定化するため、他の酵素反応や化学反応との組み合わせも問題ありません。もちろん、糖鎖分析に一般的に用いられている還元末端ラベル化法とも併用が可能です。図4には、一般的な糖鎖分析のための前処理の流れと、本キットで誘導体化処理するタイミングを例示しています。

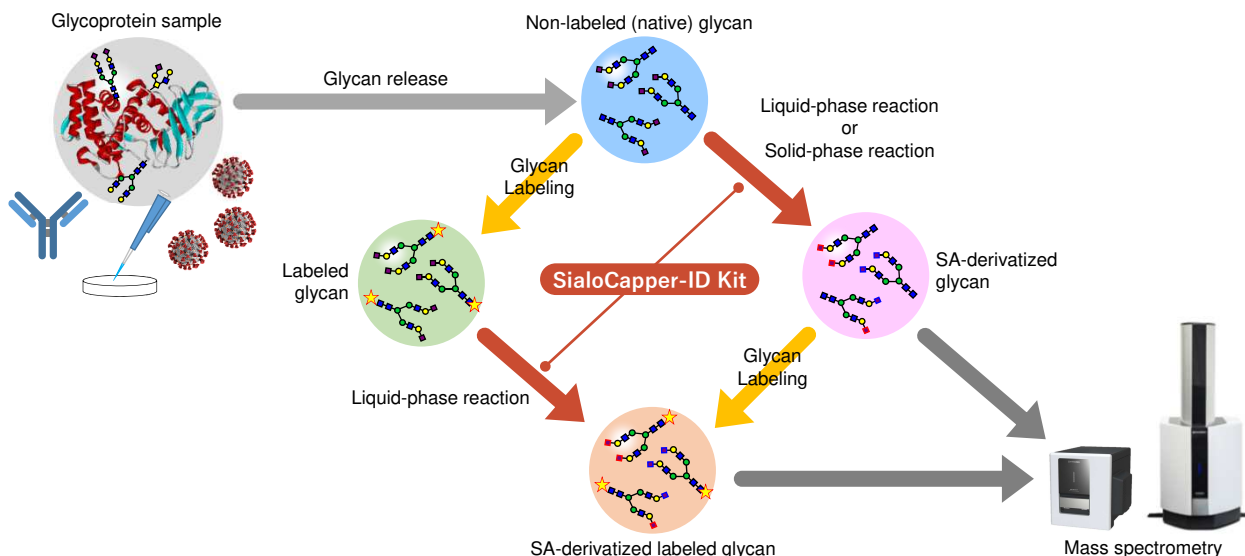


図4 SialoCapper-ID Kitを用いる糖鎖質量分析の前処理フロー概要



図5 SialoCapper™-ID Kitの外観と内容物

■ SialoCapper-ID Kitの使用方法

本キット（図5）を用いて、以下の二つの方法でのシアル酸結合様式特異的誘導体化が可能です（図6）。

I. 液相反応

チューブ内の糖鎖サンプルに反応溶液を加え誘導体化

II. 固相反応

固相担体に結合させた糖鎖に反応溶液を加え誘導体化
糖鎖サンプルの状態や糖鎖分析フローに応じて、本キットで処理するタイミングを柔軟に組み替えて使用できます。

■ 液相反応

チューブ内に乾固または少量の水に溶解した状態のサンプルに対して行う液相反応は、本キットの標準的な使用方法です。還元末端ラベル化糖鎖と未ラベル糖鎖の両方のシアル酸修飾に対応します。キット取扱説明書に従って試薬を溶解し、順次チューブに投入して反応させます。一段階目と二段階目の反応の間で過剰試薬の除去は必要ありません。また、二段階目の反応は瞬時に完了するので、誘導体化にかかる反応時間は合計約1時間です。

本キットを用いた誘導体化反応の後は、過剰試薬除去のためHILIC担体での精製を行います。この担体はキットには含まれていないため、使い慣れたHILICチップやカラムをお使いいただけます。推奨精製プロトコルは本キット取扱説明書をご覧ください。

■ 固相反応

本キットを糖鎖精製ビーズと組み合わせることで、クルードサンプルからの糖鎖精製とシアル酸修飾が一度に行えます。また、過剰試薬除去が容易になるため、実験フローがシンプルになり実験の省力化に貢献します。

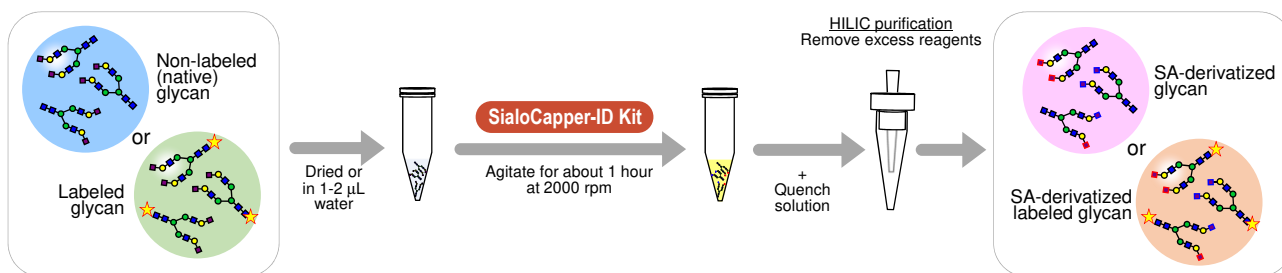
BlotGlyco®（住友ベークライト株式会社）は、糖鎖還元末端を特異的に捕捉できる糖鎖精製ビーズで、ビーズ上に捕捉した糖鎖に対し本キットを用いたシアル酸結合様式特異的修飾が可能です。BlotGlyco®から糖鎖をリリースした後は、任意の還元末端誘導体化を行ってからMS分析することもできます。

BlotGlyco®は還元末端特異的に糖鎖を捕捉するため、還元末端がラベル化された糖鎖には本固相反応は適用できませんが、未ラベル糖鎖に対しては非常にロバストなソリューションとなります。BlotGlyco®は糖鎖に対する特異性が非常に高く、夾雑成分も効率よく除けるため、サンプルに含まれる夾雑成分がシアル酸誘導体化反応に与える影響を考慮することなく前処理が可能です。

■ 本キット以外に必要なもの

本キットは一つの構成で液相反応と固相反応の両方に対応させるため、シアル酸誘導体化反応に用いる化学物質のみが含まれています。過剰試薬除去のための担体や、糖鎖精製ビーズ（BlotGlyco®）、各種精製に必要な溶液類は含まれておりません。お客様ご自身でご準備ください。

□ Liquid-phase reaction



□ Solid-phase reaction

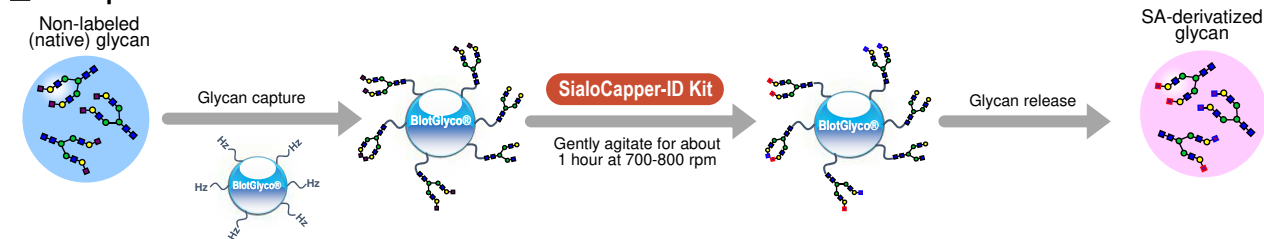


図6 SialoCapper-ID Kitを用いた液相反応／固相反応の流れ

【液相反応実施時の注意】

- 糖鎖はチューブ内に乾固した状態で準備することを推奨しますが、少量の水に溶解した状態でも構いません。水の量が多いと未反応や誤反応の原因となりますので、通常1~2 µL、多くとも< 5 µLを目安としてください。
- アンモニアやメチルアミン、メタノール等の求核試薬の混入は副反応の原因となります。副反応が懸念される場合、誘導体化前にcarbonやHILIC等の糖鎖精製チップ/カラムであらかじめ脱塩精製してください。

- Anthranilic acid (AA) でラベル化された糖鎖は、ラベル部分の-COOH基がSialoCapper-ID Kitによりアミド化されます。AA化ラベル化糖鎖を得たい場合は、ラベル化前にSialoCapper-ID Kitで誘導体化してください。

【処理可能な糖鎖サンプル数】

- 本キットに10本含まれるReagent Bは溶解後の保管ができず使い切りです。Reagent B 1本で液相反応は50サンプル、固相反応は10サンプルまで処理できるので、1キットで処理可能なサンプル数は最大で液相反応の場合500サンプル、固相反応の場合100サンプルになります。

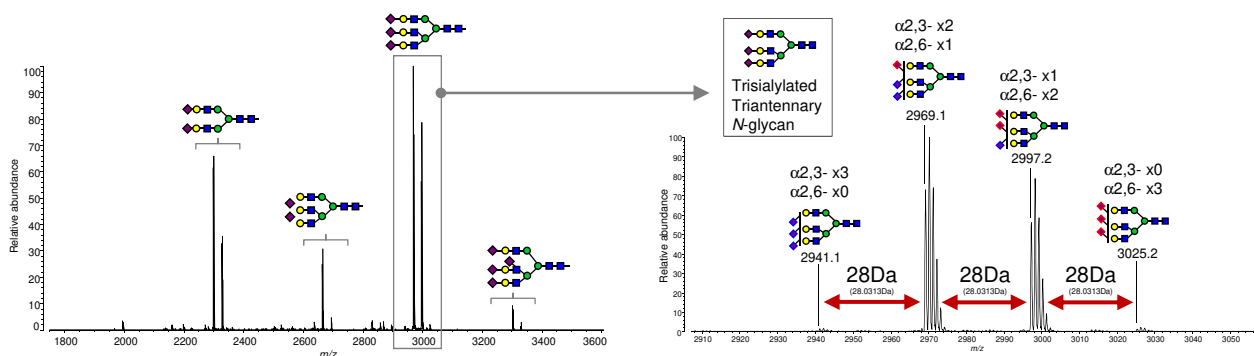


図7. SialoCapper-ID Kitで処理したFetuin由来N-結合型糖鎖のMALDIマスペクトル

■ 質量分析

SialoCapper-ID Kitで処理した糖鎖の測定には、糖鎖のイオン化が可能な質量分析計であれば装置の種類を問わずお使いいただけます。本キットの効果により、 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -結合様式は質量で区別することができますので、クロマト分離も必須ではありません。したがって、通常クロマト分離を経ないマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) での分析も可能です。

■ マスペクトル例と解釈

図7に本キットで得られるマスペクトルの典型例 (Fetuin由来N-結合型糖鎖) を示します。Fetuinはシアル酸を豊富に含み、その結合様式も様々です。

シアル酸の結合様式が混在している場合、28 Da差のピーク群がクラスターとして現れます。これらはもともとシアル酸結合様式の異性体です。シアル酸を三つ持つ三分岐型糖鎖の場合、本キットを適用すると $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -の組み合わせから4本のピークが検出される可能性があります。マスペクトル上でのこれらこの28 Da間隔のピーク強度比が、シアル酸の $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -比を反映しています。

■ マスペクトル解析補助ソフトウェア

糖鎖の質量分析データを解析する際のファーストステップは、得られたm/zから糖鎖の組成を推測することです。しかし、SialoCapper-ID Kitを用いて修飾を行うと、シアル酸の質量が変化し、さらに結合様式に応じたバリエーションが生まれるため、これまでのソフトウェアでは対応が出来ませんでした。

当社が開発した解析補助ソフトウェア“Supporting Tool for SialoCapper-ID Kit”は、シアル酸修飾に対応した糖鎖組成推定ソフトウェアです。

マスペクトル中で観測されたピークのm/z (モノアイソトピック値) と検索条件 (許容誤差、各単糖組成の上下限、前処理法、検出されるイオン種等) を入力すると、各m/zの糖鎖組成候補を総当たり検索にて算出し提示します (図8)。

■ 分析例：MALDImini™-1による血清糖鎖分析

ここでは、血清由来のN-結合型糖鎖をSialoCapper-ID Kitで誘導体化し、小型MALDIデジタルイオントラップ質量分析計“MALDImini-1” (図9) で検出・解析を行った例をご紹介します。

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 μ L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 $^{\circ}$ 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。

糖タンパク質から切り出したN-結合型糖鎖のうち4 μ Lを直接SialoCapper-ID Kitを用いて誘導体化しました (液相反応)。その後、GL-Tip Amide (GL Sciences Inc.)を用いて過剰試薬を除きました。

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 (AB) でラベル化しました。その後、GLTip Amideを用いて過剰試薬を除きました。

サンプル溶液 (0.5 μ L) 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 μ L) を重層して乾燥させた後、“MALDImini-1”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、別途アプリケーションニュース (B100) をご参照下さい。



図9. 小型MALDI-DIT質量分析計“MALDImini™-1”本体外観

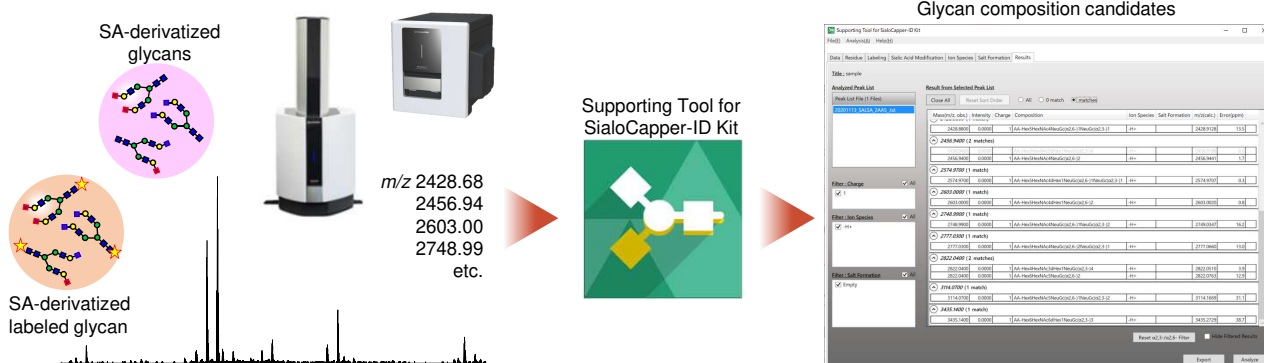


図8 Supporting Tool for SialoCapper-ID Kitを用いたマスペクトル解析の流れ

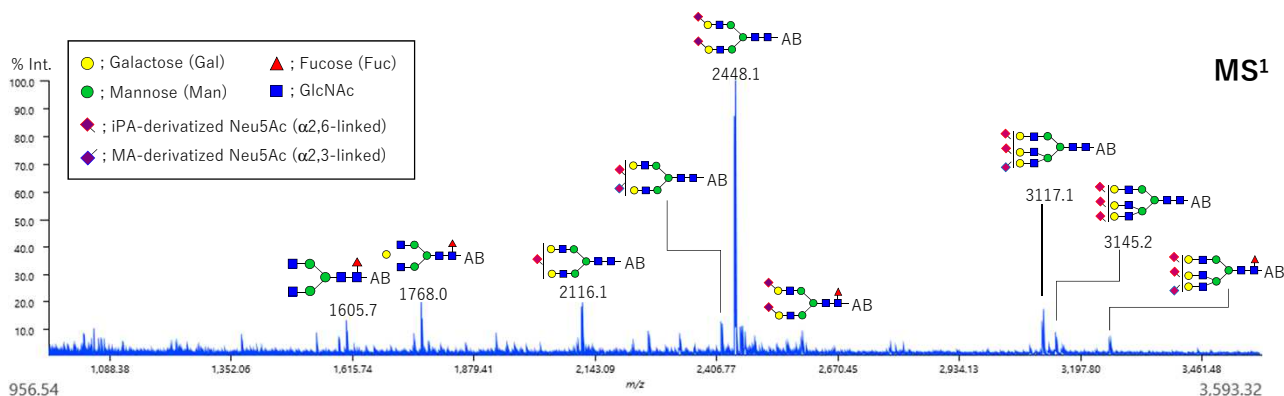


図10. MALDImini-1で取得した血清糖タンパク質由来N結合型糖鎖のマススペクトル (MS¹)

■ 血清由来N結合型糖鎖のMS, MS²分析

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10)。

m/z 3117.1と3145.2の二つの糖鎖は28 Da差で検出されていることから、シアル酸の $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -のみが異なる糖鎖であることが推測できます。しかし、Supporting Tool for SialoCapper-ID Kitの解析結果 (表1) では、 m/z 3117.1は一意的に糖鎖組成が決まったのに対して、 m/z 3145.2は候補Aと候補Bが二つ算出されました。N結合型糖鎖の生合成経路を考慮すると候補Bがもっともらしいですが、それを裏付けるためMS²を取得しました (図11)。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、そのピークに含まれるシアル酸の結合様式が確認できました。 m/z 3117.1は $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -の混合であり、 m/z 3145.2は $\alpha 2,6$ -のみの候補Bであることが分かりました。

尚、Supporting Tool for SialoCapper ID Kitには、シアル酸とその結合様式の含有数に着目して見出した制約条件を、組成候補絞り込みのためのフィルタ機能として実装しています。この $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ - Filterを用いることでも、Aを候補から除外することができました。

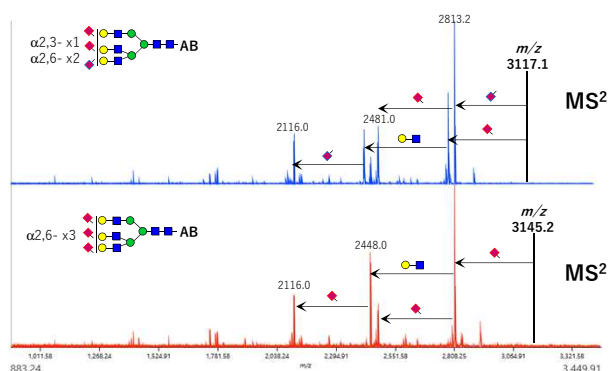


図11. 三分岐糖鎖 m/z 3117.1と3145.2のMS²マススペクトルの比較
シアル酸残基脱離のニュートラルロスから、その糖鎖に含まれているシアル酸の結合様式を確実に判別できます。

表1. Supporting Tool for SialoCapper-ID Kitを用いて算出した血清由来N結合型糖鎖の単糖組成候補

m/z (obs.)	m/z (calc.)	Glycan Composition
1605.7	1605.602	AB-Hex3HexNAc4dHex1
1768.0	1767.655	AB-Hex4HexNAc4dHex1
2116.1	2115.808	AB-Hex5HexNAc4NeuAc($\alpha 2,6$)-1
2420.1	2419.935	AB-Hex5HexNAc4NeuAc($\alpha 2,6$)-1NeuAc($\alpha 2,3$)-1
2448.1	2447.967	AB-Hex5HexNAc4NeuAc($\alpha 2,6$)-2
2594.1	2593.914	AB-Hex10HexNAc4
2594.1	2593.999	AB-Hex5HexNAc2NeuAc($\alpha 2,3$)-4
2594.1	2594.025	AB-Hex5HexNAc4dHex1NeuAc($\alpha 2,6$)-2
3117.1	3117.226	AB-Hex6HexNAc5NeuAc($\alpha 2,6$)-2NeuAc($\alpha 2,3$)-1
3145.2	3145.147	AB-Hex10HexNAc3dHex1NeuAc($\alpha 2,3$)-2 A
3145.2	3145.257	AB-Hex6HexNAc5NeuAc($\alpha 2,6$)-3 B
3263.1	3263.284	AB-Hex6HexNAc5dHex1NeuAc($\alpha 2,6$)-2NeuAc($\alpha 2,3$)-1

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。

■ まとめ

SialoCapper-ID Kitは、液相反応と固相反応の両方に対応した、糖鎖の質量分析のためのシアル酸結合様式特異的修飾キットです。シアル酸結合様式がMSで判別できるだけでなく、シアル酸が安定化されることでマススペクトルの質と感度が向上します。マススペクトルの解析も容易になるため、シアル酸結合様式の区別が求められないケースでもメリットがあります。糖鎖分析のための新しい修飾技術として、ぜひご活用ください。本キットの他の適用例は別途アプリケーションニュース (01-00109, 01-00110, 01-00111 etc.) をご参照ください。

■ 謝辞

SALSA法の改良に関わって頂きました北海道大学の古川潤一先生と花松久寿先生に感謝申し上げます。

<参考>

- 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.

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



関連分野

▶ ライフサイエンス

▶ バイオ医薬品

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ