

# Application News

## No. B59

MALDI-TOF 質量分析法  
MALDI-TOF Mass Spectrometry

### 高分解能 MALDI-TOF MS “MALDI-7090” を用いた O-結合型糖ペプチドの糖鎖結合部位決定

A Characterization of O-Glycan Binding Sites on Glycopeptides Using a Glycosidase Cocktail and a High Resolution MALDI-TOF MS “MALDI-7090”

生体で合成されるタンパク質は、その多くが糖鎖修飾を受けています。この糖鎖はグルコースやガラクトースなどの単糖が複雑に結合した構造不均一性の高い分子で、N-結合型あるいはO-結合型の糖鎖と区分されています。この一群の糖鎖はタンパク質の機能調節という重要な働きがあることが知られており、バイオ医薬品などの開発では糖鎖修飾についての情報を得ることが必須となっています。

糖鎖修飾情報の1つに、糖鎖がタンパク質のどこに結合しているかという情報があります。N-結合型糖鎖の場合、-NXS/T-という共通のアミノ酸配列が知られており、N-結合型糖鎖の潜在的結合部位を見出すのに利用されますし、糖タンパク質をプロテアーゼ消化した消化物から糖鎖結合特異性のあるレクチンで糖ペプチドを捕集し、捕集した糖ペプチドから H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 存在下で N-結合型糖鎖脱離酵素 PNGaseF を作用させ、N-結合型糖鎖結合部分を安定同位体標識して分析する方法<sup>1)</sup>や、N-結合型糖ペプチド特異的なプロダクトイオンを用いた MS<sup>n</sup> 分析<sup>2)</sup>により結合部位を特定する方法がとられます。一方で、O-結合型糖鎖と呼ばれる一群の糖鎖に関しては、タンパク質上のセリン/スレオニン側鎖に結合することは知られていますが、その周辺配列に関する情報にはいまだ未知な部分が多く、また、N-結合型糖鎖に対するように適した酵素はいまだなく、特異的なプロダクトイオンも見出されていないために、その結合部位特定は困難なものとなっています。

そこで、本稿では、複数の酵素による部分消化と高分解能 MALDI-TOF MS “MALDI-7090” による O-結合型糖鎖の結合部位特定方法についてお示しします。

S. Nakaya

#### 糖鎖脱離酵素による糖鎖の部分消化

Partial Digestion of Glycan Using Glycosidases

モデル糖ペプチドとして、Fig. 1 に示す O-結合型 FAM 標識糖ペプチドを用いました。この糖ペプチド (100 pmol) を、以下の複数の酵素、緩衝液を含むカクテルに加え、37 °C で 16 時間反応させました。

**酵素：**

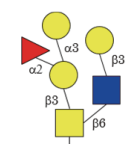
β 1-3 Galactosidase (10000 U/mL, 1 μL)  
α 1-3,6 Galactosidase (4000 U/mL, 1 μL)  
α 1-2,4,6 Fucosidase (8000 U/mL, 1 μL)  
β -N-Acetylglucosaminidase (4000 U/mL, 1 μL)

**緩衝液：**

50 mM 酢酸ナトリウム / 5 mM 塩化カルシウム水溶液

酵素カクテルを加える前の糖ペプチドおよび、上記カクテルを加え反応させた後の溶液を Ziptip μC18 にて脱塩した溶出溶液について、MALDI-7090 にて、MS 測定および MS/MS 測定を行いました。

#### Core2-Muc1A Peptide



A H G V T S A P D T R K -FAM

#### Core3-Muc1A Peptide



A H G V T S A P D T R K -FAM

Fig. 1 モデル糖ペプチドの構造  
シンボル ■; N-アセチルガラクトサミン, ■; N-アセチルグルコサミン,  
●; ガラクトース, ▲; フコース, FAM; 蛍光標識体  
Structure of Glycopeptides Used in This Study  
Symbol: ■; N-acetylgalactosamine, ■; N-acetylglucosamine,  
●; Galactose, ▲; Fucose, FAM; Fluorescent label

#### 酵素処理前後の糖ペプチド MS 測定

MS Analysis of Glycopeptides before and after Glycosidase Treatment

酵素処理を行う前後での各標識モデル糖ペプチドのマススペクトルを Fig. 2 に示しました。

酵素処理を行う前の 2 種類の糖ペプチド (Core3-Muc1A peptide/Core2-Muc1A peptide) では、それぞれの完全体糖ペプチドに該当する *m/z* 値にシグナルが検出されており、酵素処理後の各糖ペプチドでは、標識ペプチドに根元の GalNAc のみが残った状態の糖ペプチド由来のシグナルが検出されました。

このことから、酵素カクテルによる処理で、構造の異なる糖鎖から根元の GalNAc 以外の糖が全て脱離したことが確認されました。

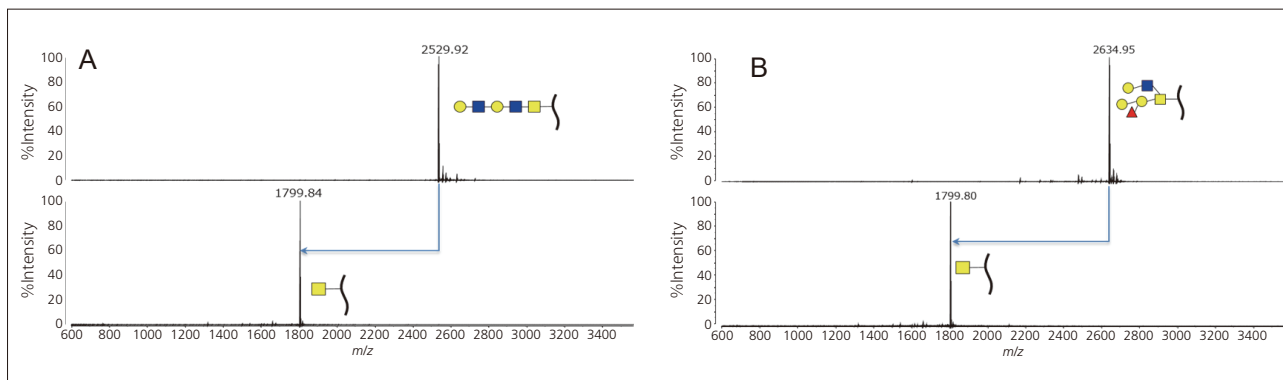


Fig. 2 酵素処理前後の糖ペプチドのマススペクトル  
 A: Core3-Muc1A (上: 酵素処理前, 下: 酵素処理後), B: Core2-Muc1A (上: 酵素処理前, 下: 酵素処理後)  
 Mass Spectra of Glycopeptides before and after Enzyme Reaction  
 A and B is the mass spectra of Core3-Muc1A and Core2-Muc1A, respectively (Top: Before enzyme reaction, Bottom: After enzyme reaction)

### 糖ペプチドイオンの MS/MS 分析 MS/MS Analysis of Glycopeptides

酵素処理前後の MS 測定にて得られた各イオンについて、MS/MS 分析を実施しました。Core3-Muc1A Peptide の酵素処理前の試料で検出されたイオンの MS/MS では、Fig. 3 に示したように、糖鎖組成やアミノ酸配列に関する情報は得られましたが、糖鎖の結合部位を特定する情報は得られませんでした。そのため、ペプチド上に存在する3つのポテンシャルサイト (5番目のスレオニン, 6番目のセリン, 10番目のスレオニン) のどこに O-結合型糖鎖が結合しているのかは

分かりませんでした。

一方、酵素処理後の試料で検出されたイオンの MS/MS では、Fig. 4 に示したように、GalNAc を側鎖に結合したスレオニンを示す質量差のプロダクトイオンが周辺のアミノ酸配列を示すプロダクトイオンとともに検出されていました。これらのプロダクトイオンをプリカーサイオンから順に追ってゆくことで、3つのポテンシャルサイトのうち5番目のスレオニンに GalNAc が結合していることが確認できました。

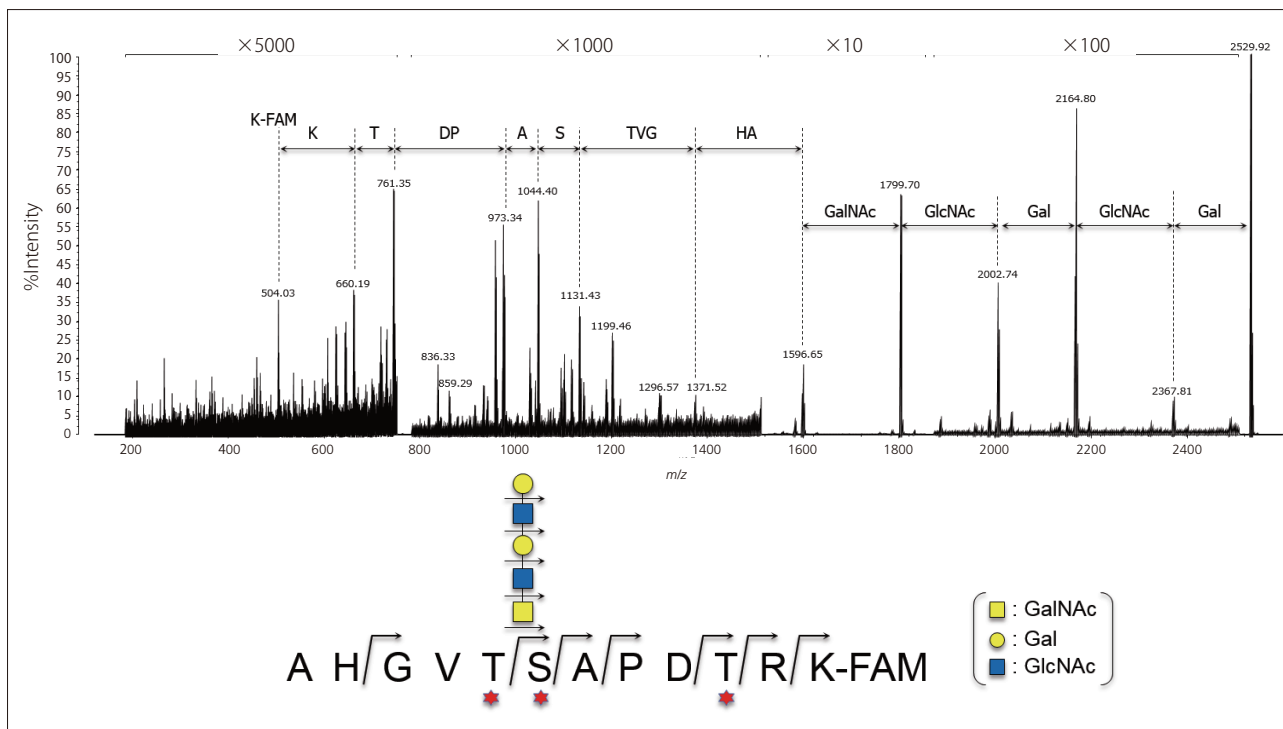


Fig. 3 酵素処理前の糖ペプチド (Core3-Muc1A peptide) の MS/MS スペクトル  
 ★: MS/MS 分析結果から得られた予想糖鎖結合部位  
 Mass Spectra of Glycopeptide (Core3-Muc1A peptide) before Enzyme Reaction  
 ★: Potential Binding Site of O-Glycan by the MS/MS Analysis

次いで、Core2-Muc1A Peptide においても、上記と同様に酵素処理前のイオンのMS/MS (Fig. 5) では、糖鎖組成やアミノ酸配列に関する情報は得られましたが、糖鎖の結合部位を特定する情報は得られませんでした。一方で酵素処理後のイオンのMS/MS (Fig. 6) では、プロダクトイオンをプリカーサイオンから順に追ってゆくことで、ペプチドのN末

端側から5番目のスレオニンにGalNAcが結合していることが容易に判別できました。

このように、糖鎖の構造が複雑で、そのままでは糖鎖結合部位が特定出来ない場合でも、糖鎖脱離酵素を利用することにより結合部位決定を比較的容易に行うことが可能となります。

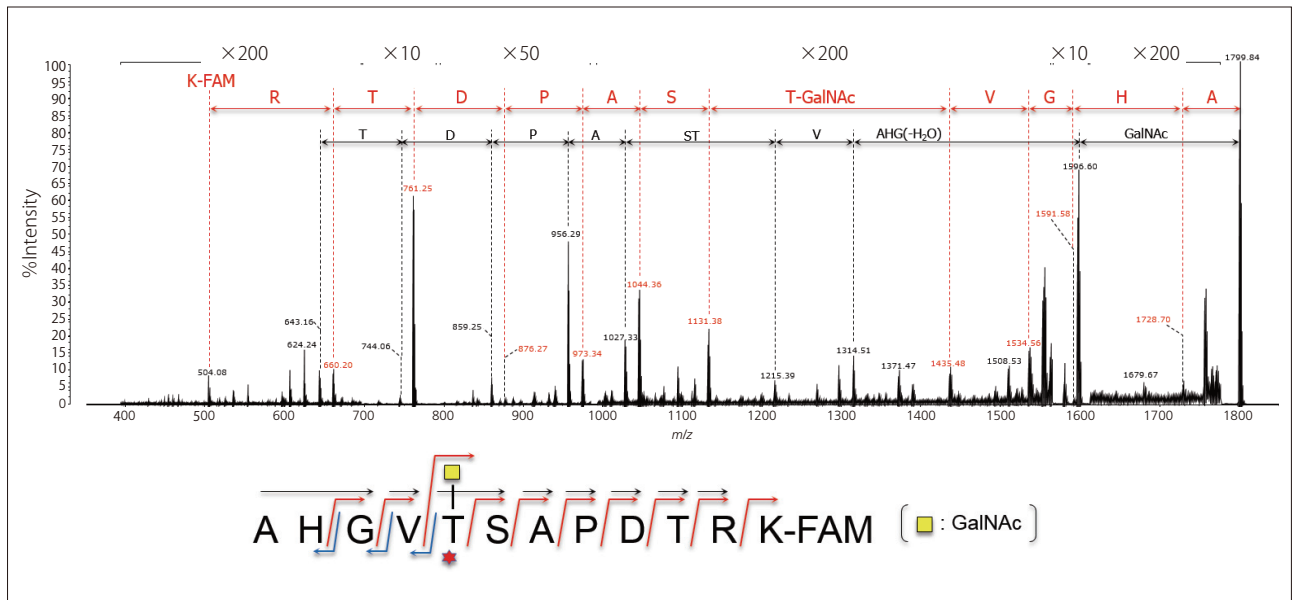


Fig. 4 酵素処理後の糖ペプチド (Core3-Muc1A peptide) のMS/MS スペクトル  
 ★: MS/MS 分析結果から得られた糖鎖結合部位  
 Mass Spectra of Glycopeptide (Core3-Muc1A peptide) after Enzyme Reaction  
 ★: Binding Site of O-Glycan by the MS/MS Analysis

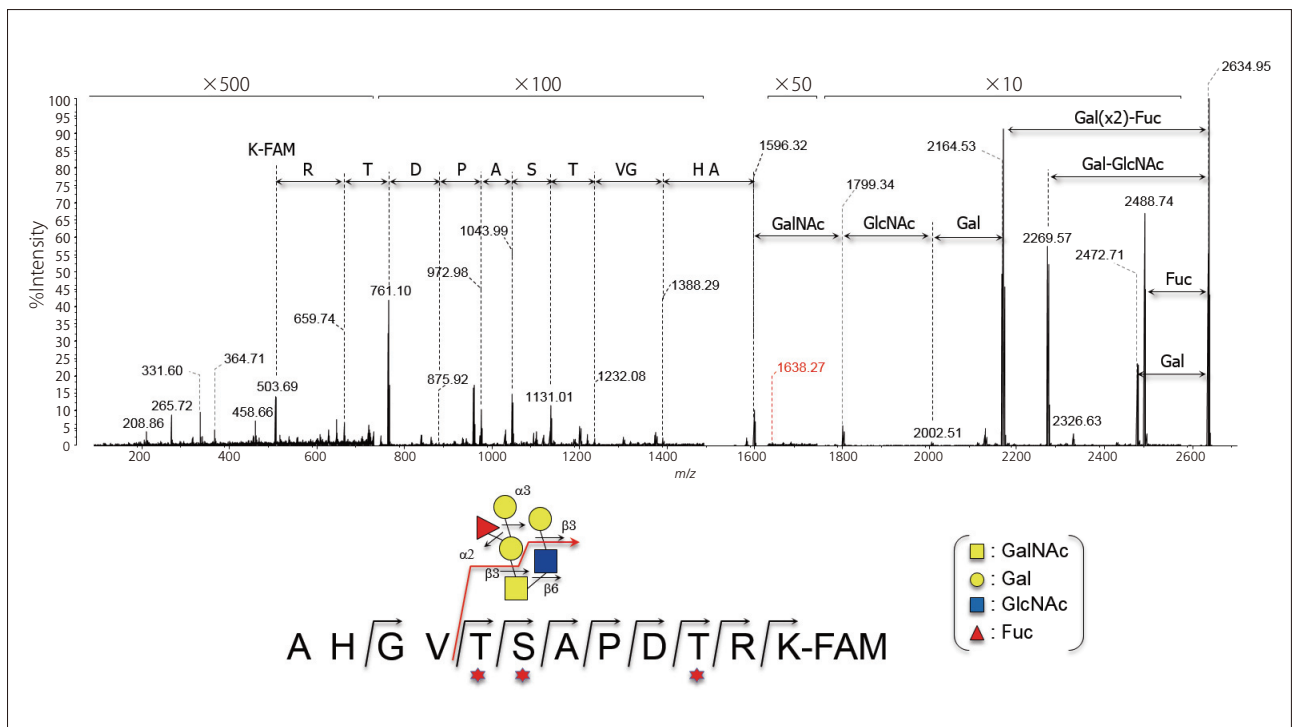


Fig. 5 酵素処理前の糖ペプチド (Core2-Muc1A peptide) のMS/MS スペクトル  
 ★: MS/MS 分析結果から得られた予想糖鎖結合部位  
 Mass Spectra of Glycopeptide (Core2-Muc1A peptide) before Enzyme Reaction  
 ★: Potential Binding Site of O-Glycan by the MS/MS Analysis

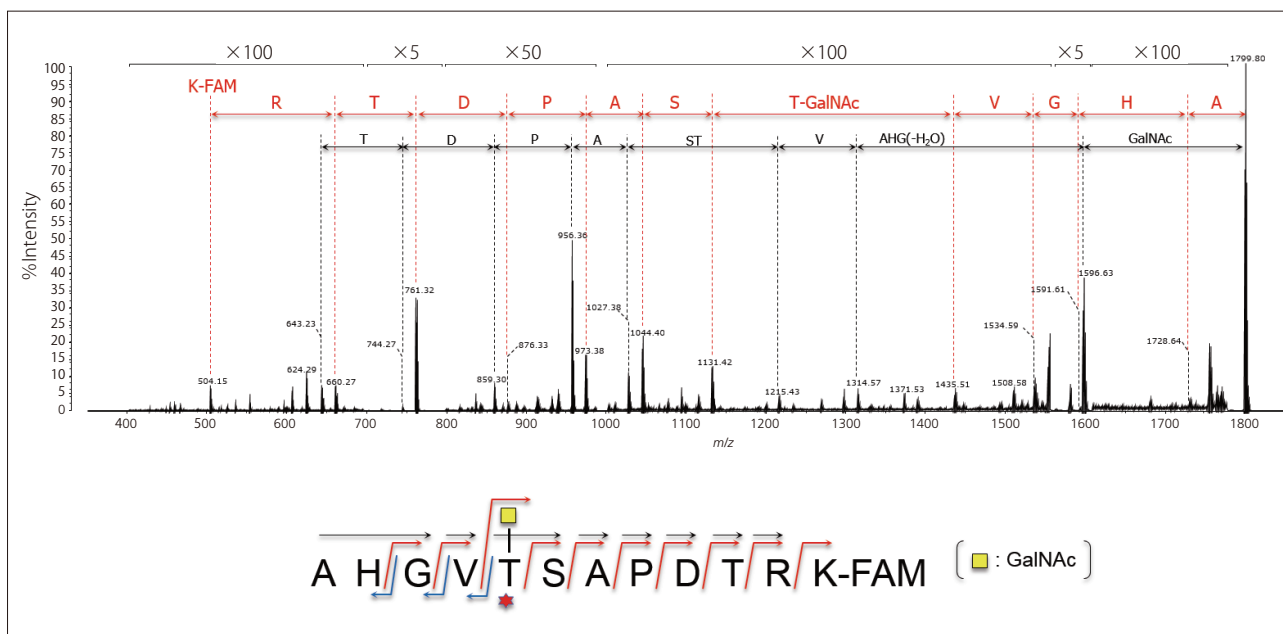


Fig. 6 酵素処理後の糖ペプチド (Core2-Muc1A peptide) の MS/MS スペクトル  
 ★ : MS/MS 分析結果から得られた糖鎖結合部位  
 Mass Spectra of Glycopeptide (Core2-Muc1A peptide) after Enzyme Reaction  
 ★ : Binding Site of O-Glycan by the MS/MS Analysis

参考文献

- 1) Kaji, H. et al. Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nat. Biotechnol.* 21(2003), 667-672.
- 2) 高分解能 MALDI-TOF MS "MALDI-7090" を用いたモノクローナル抗体の糖ペプチド解析. B55. 島津 Application News.

<謝辞>

本研究の一部は国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の「創薬基盤推進研究事業」の支援によって行いました。