報 文

マイクロ液体クロマトグラフィー/高速原子衝撃質量分析法による
マウス胸腺細胞に存在するジシアロガングリオシドの構造解析鈴木 實^{®*}, 中村 京子^{*}, 長江 徳和^{**}, 鈴木 明身^{*}Structural characterization of disialogangliosides
in mouse thymocytes by micro LC/FAB-MSMinoru SUZUKI, Kyoko NAKAMURA^{*}, Norikazu NAGAE^{**} and Akemi SUZUKI^{*}^{*}The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113^{**}Nomura Kagaku Ltd., 851, Anabuki-cho, Seto-shi Aichi 489

(Received 16 January 1996, Accepted 16 February 1996)

A micro method of high-performance liquid chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry (LC/FAB-MS), which involves a micro silica gel column and a micro LC apparatus working at a flow rate of 6 ml/min, has been developed for the structural characterization of disialogangliosides of mouse thymocytes. Four disialogangliosides extracted from 2.2×10^9 thymocytes were identified as [GD1c(NeuAc, NeuAc), GD1c(NeuAc, NeuGc), GD1c(NeuGc, NeuAc) and GD1c(NeuGc, NeuGc)] from the obtained mass spectra. This micro LC/FAB-MS system is useful not only for the structural characterization of neutral glycosphingolipid and monosialoganglioside mixtures, as reported previously, but also disialoganglioside mixtures prepared from a limited number of isolated cells.

Keywords : micro LC/FAB-MS; disialogangliosides in mouse thymocytes; fast atom bombardment mass spectra of GD1c(NeuAc, NeuAc), GD1c(NeuAc, NeuGc), GD1c(NeuGc, NeuAc) and GD1c(NeuGc, NeuGc).

1 緒 言

動物細胞膜の重要な構成成分の一つであるガングリオシドは、ある種の毒素、ウィルス、バクテリアのレセプターとしての働きを有している¹⁾。又、最近、膜成分の一つとして膜中に存在する各種糖タンパク質レセプターの機能を修飾する活性²⁾、細胞の分化の方向性を決定する機能も注目されてきている³⁾⁴⁾。このような状況下で、

生体微量成分であるガングリオシドの機能を明らかにするためには、マウス等の実験動物から分離された各種細胞あるいは培養細胞を用いた機能解析は必須であり、それ故微量ガングリオシドの構造解析法の確立は極めて重要な問題となっている。

ガングリオシドは、その構造から容易に推察されるように不揮発性物質である。加えて、比較的揮発性の高い誘導体であるメチル誘導体としても糖鎖の異なるガングリオシド混合物の気-液クロマトグラフィー/質量分析 (GLC/MS) は、ごく一部の糖鎖の短い糖脂質を除いて不可能である。著者らは、これらの制約を克服するた

^{*} (財)東京都臨床医学総合研究所・生体膜研究部門: 113
東京都文京区本駒込 3-18-22

^{**} 野村化学株式会社: 489 愛知県瀬戸市穴田町 851

Fig. 1 Schematic diagram of micro LC/FAB-MS

め、GLC/MSに替わる微量糖脂質混合物の分析手段として液体クロマトグラフィー (LC) と高速原子衝撃 (FAB) イオン化質量分析をオンラインで結合した方法 (LC/FAB-MS) に着目して検討を加えている。FAB-MSは、単に糖脂質の分子量に対する情報を提供するだけでなく、あたかもタンパク化学におけるエドマン分解のように、糖脂質を構成する各単糖の種類 (デオキシヘキソース, ヘキソース, *N*-アセチルヘキソサミン, *N*-アセチルノイラミン酸及び *N*-グリコリルノイラミン酸など) 及び結合順序に関する情報も提供することができる極めて有用かつ確立された方法である^{5)~14)}。

これまで著者らは、セミマイクロのシリカゲルカラムを用い FAB イオン源を装着した LC/FAB-MS により各種中性糖脂質及びモノシアログングリオシド混合物の構造解析が各々 5 µg 注入量で可能であることを報告した¹⁵⁾¹⁶⁾。しかしこのシステムでは、注入量の 1/20 のみが質量分析計へ導入されるに過ぎず、微量ガングリオシドの構造解析法の確立のためには注入量の全量が導入可能なシステムの確立が望まれた。

今回著者らは、マウス胸せん (腺) 細胞に存在するジシアログングリオシド混合物の構造解析を、注入量の全量が質量分析計に導入可能なマイクロシリカゲルカラムを装着したマイクロ LC を用いかつフリットインターフェースを装着したマイクロ LC/FAB-MS の系¹⁷⁾により検討したので報告する。

2 実 験

細胞数 2.2×10^9 個の WHT/Ht マウス胸腺細胞に存

在するジシアログングリオシド画分の調製は、各 40 ml のクロロホルム-メタノール (2:1 及び 1:1, v/v) 及びクロロホルム-メタノール-水 (30:60:8, v/v) により総脂質抽出後アルカリ処理, DEAE トヨパールカラム (650C, 酢酸型, 0.8 cm i.d.×2 cm) によるイオン交換カラムクロマトグラフィー, LH-20 カラムを用いた脱塩の操作により行った¹⁸⁾。

分析に使用したマイクロ LC/FAB-MS のシステムを Fig. 1 に示した。LC には Applied Biosystem120 型を用い、カラムはマイクロシリカゲルカラム (0.3 mm i.d.×50 mm, 野村化学製) とした。LC 溶媒は、イソプロパノール-ヘキサン-3 M 水酸化アンモニウム-水 [165:120:15:0 (A), 及び 170:5:15:30 (B)] を用い、10% B から 100% B (1 分) の濃度こう配としてガングリオシドの溶出を行った¹⁸⁾。流量は 6 µl/min とした。マトリックスとしてはトリエタノールアミンを用い、A 液及び B 液にそれぞれ 0.9% 導入した。UV セルの部分は、熔融シリカ表面を透明になるまで削ったものを用いその容量を 0.1 µl となるように作製した。又、油拡散ポンプトラップには液体窒素を導入した。負イオン FAB 質量スペクトルは、日本電子 JMS-HX110 型質量分析計を用い Xe⁰ を一次ビームとし、JMA-DA5000 データシステムを用いて得た。マスキロマトグラフィーは m/z 400 から 2200 までの質量範囲を 10 秒/スキャンの条件で行った。

なお、ガングリオシドのマイクロ LC/FAB-MS には、マウス胸腺細胞由来ジシアログングリオシド画分の 1/10 を供した。

3 結果及び考察

GD1c ガングリオシドは、非還元末端のガラクトースにシアル酸が2分子直列に結合した構造を有している (SA-SA-Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer, SA: シアル酸, Cer: セラミド)。このようなガングリオシドは、Fig. 2 に示したように脱 CO_2 及び脱 H_2 に起因するフラグメントイオンが生成することが知られている¹⁹⁾。更にシアル酸種には、*N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) 及び *N*-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) の2種類の存在が知られている。そこで、マウス胸腺細胞由来 GD1c ジシアロガングリオシド画分のマスキロマトグラフ分析に際して、 m/z 585 (NeuGc-NeuGc-), m/z 569 (NeuGc-NeuAc-及び NeuAc-NeuGc-) 及び m/z 553 (NeuAc-NeuAc-) を用いて検討することとした。その結果、保持時間7分から12分にかけてA, B及びCの3本のピークが検出された (Fig. 3)。

Fig. 4 及び 5 には、ピーク A, B, C の質量スペクトル及び、各種 GD1c の負イオン FAB-MS における $[\text{M}-\text{H}]^-$ イオンとフラグメントイオンを示した。これらのスペクトルで、 $[\text{Cer}]^-$ に起因すると考えられる m/z 536 及び 646 のピークが共通して出現している。このことは、これらジシアロガングリオシドを構成して

Fig. 2 Fragmentation due to disialyl linkage of disialogangliosides by negative FAB ionization

Fig. 3 Mass chromatograms of disialogangliosides from mouse thymocytes

Fig. 4 Negative-ion mass spectra of disialo gangliosides from mouse thymocytes

* : matrix

	<u>SA</u>	<u>SA</u>	<u>Gal</u>	<u>GalNAc</u>	<u>Gal</u>	<u>Glc</u>	<u>Cer</u>
GD1c(NeuAc, NeuAc):	1807	1516	1225	1063	860	698	536
	1917	1626	1335	1173	970	808	646
GD1c(NeuAc, NeuGc):	1823	1532	1225	1063	860	698	536
	1933	1642	1335	1173	970	808	646
GD1c(NeuGc, NeuAc):	1823	1516	1225	1063	860	698	536
	1933	1626	1335	1173	970	808	646
GD1c(NeuGc, NeuGc):	1839	1532	1225	1063	860	698	536
	1949	1642	1335	1173	970	808	646

Fig. 5 [M-H]⁻ and fragment ions of four GD1c gangliosides

いる主要なセラミドの分子種は、それぞれ C16:0-d18:1 及び C24:1-d18:1 であることを示唆している。更に [Glc-Cer]⁻, [Gal-Glc-Cer]⁻, [GalNAc-Gal-Glc-Cer]⁻ 及び [Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer]⁻ に起因すると考えられるピークが、 m/z 698 及び 808, m/z 860 及び 970, m/z 1063 及び 1173, m/z 1225 及び 1335 にそれぞれ明らかに観察されている。一方スペクトル A では、[M-H]⁻ に由来する m/z 1807 及び 1917, NeuAc が順次解裂したことに起因すると考えられるピークが m/z 1516 及び 1626, m/z 1225 及び 1335 に観察されていることから、このガングリオシドは、2 分子の NeuAc を有するジシアロガングリオシドであることが容易に推定できる。スペクトル B では、[M-H]⁻ に由来するピークがスペクトル A より 16 amu 高質量側にシフトして m/z 1823 及び 1933 に出現している。このことは、このガングリオシドは 1 分子の NeuAc と 1 分子の NeuGc をそれぞれ有していることを示している。更に、末端のシアル酸脱離に起因すると考えられるピークが m/z 1532 及び 1642, m/z 1516 及び 1626 に、更に内側のシアル酸の脱離に起因すると考えられるピークが m/z 1225 及び 1335 に出現している。以上の事実から、ピーク B はシアル酸配列が NeuAc-NeuGc- 及び NeuGc-NeuAc- である 2 種のジシアロガングリオシド混合物の質量スペクトルであることを明らかに示している。スペクトル C では、[M-H]⁻ に由来するピークが m/z 1839 及び 1949 に、NeuGc が順次解裂したことに起因すると考えられるピークが m/z 1532 及び 1642, m/z 1225 及び 1335 に観察されることから、このガングリオシドは、2 分子の NeuGc を有するジシアロガングリオシドであることを示唆している。これまでアシアロ GM1 骨格 (Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer) を有するジシアロガングリオシドとして GD1a [Gal (-SA)-GalNAc-Gal (-SA)-Glc-Cer], GD1b [Gal-GalNAc-Gal (-SA-SA)-Glc-Cer], GD1α [Gal (-SA)-GalNAc (-SA)-

Gal-Glc-Cer], 及び GD1c [SA-SA-Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer] の 4 種類の存在が報告されている。更に、NeuAc 及び NeuGc のシアル酸種を考慮すると、合計 16 種類のジシアロガングリオシドの存在の可能性が考えられる。しかし、前述の 4 種類のジシアロガングリオシドの質量スペクトルでは GD1a, GD1b 及び GD1α それぞれに特徴的なフラグメントイオンが全く検出されなかったことから、これらジシアロガングリオシドがアシアロ GM1 骨格を有する、シアル酸種の異なる GD1c ガングリオシド [GD1c (NeuAc, NeuAc), GD1c (NeuAc, NeuGc), GD1c (NeuGc, NeuAc), GD1c (NeuGc, NeuGc)] であると考えられた。事実、マウス胸腺細胞由来ジシアロガングリオシド画分を薄層クロマトグラフィーで展開後、末端ガラクトースに結合したシアル酸のみを切断する酵素処理後にアシアロ GM1 抗体で染色したところ、3 本のバンドが明らかに検出され、LC/FAB-MS の結果と極めて良好な一致が得られた。以上、順相のマイクロカラムを用いたフリットインターフェースを装着したマイクロ LC/FAB-MS によりマウス胸腺細胞に存在するジシアロガングリオシド画分の構造解析を行った結果、2 分子のシアル酸が直列に結合した 4 種類のジシアロガングリオシド [GD1c (NeuAc, NeuAc), GD1c (NeuAc, NeuGc), GD1c (NeuGc, NeuAc) 及び GD1c (NeuGc, NeuGc)] が明らかに確認された。著者らはこれまで、本システムを用いて中性糖脂質混合物及びモノシアロガングリオシド混合物の構造解析に関して報告している。今回の結果は、本システムは微量のジシアロガングリオシドの構造解析に対しても又極めて有効であることを示していると考えられる。

マウス免疫担当細胞に特徴的に存在する GD1c の機能は現時点では不明である。しかし GD1c (NeuGc, NeuGc) に対するモノクローナル抗体を用いて分布を解析した結果、胸腺細胞の CD4⁺CD8⁻ 細胞の一部に強く CD4⁻CD8⁺ 細胞の一部に弱く発現し、未成熟な CD4⁺CD8⁺ 細胞や CD4⁻CD8⁻ 細胞には発現していないことが明らかになった。更に GD1c は、T リンパ球の中でも CD4⁺ の T リンパ球にしか発現しておらず、CD4⁺ のヘルパー T 細胞の中でも主に IL-2 を産生する細胞に発現し、逆に GD1c⁻ 細胞は IL-4 を産生していることが明らかになっている²⁰⁾。このことから、GD1c は、主としてナイーブ T の細胞表面に存在し、これらの細胞に特異的な認識にかかわる可能性が考えられる。

文 献

- 1) A. Varki: *Glycobiology*, **3**, 97 (1993).
- 2) S. Hakomori, Y. Igarashi: *J. Biochem.*, **118**, 1091 (1995).
- 3) S. Tsuji, J. Nakajima, T. Sasaki, Y. Nagai: *J. Biochem.*, **97**, 969 (1993).
- 4) H. Nojiri, J. Nakajima, M. Nakamura, K. Kirito, Y. Emoto, M. Saito: *J. Biol. Chem.*, **263**, 7443 (1988).
- 5) K. L. Rinehart, Jr.: *Science* (Washington, D.C.) **218**, 254 (1982).
- 6) H. Egge, J. Peter-Katalinic: *Mass Spectrom. Rev.*, **6**, 331 (1987).
- 7) M. Suzuki, K. Nakamura, Y. Hashimoto, A. Suzuki, T. Yamakawa: *Carbohydr. Res.*, **151**, 213 (1986).
- 8) K. Nohara, M. Suzuki, F. Inagaki, H. Ito, K. Kaya: *J. Biol. Chem.*, **265**, 14335 (1990).
- 9) M. Sugita, H. Fujii, F. Inagaki, M. Suzuki, C. Hayate, T. Hori: *J. Biol. Chem.*, **267**, 22595 (1992).
- 10) 鈴木 實, 大橋陽子, 鈴木明身: “糖鎖工学”, p. 434 (1992), (産業調査会).
- 11) K. Hidari, F. Irie, M. Suzuki, K. Kon, S. Ando, Y. Hirabayashi: *Biochem. J.*, **296**, 259 (1993).
- 12) K. Yokoyama, H. Nojiri, M. Suzuki, M. Setaka, A. Suzuki, S. Nojima: *FEBS Lett.*, **368**, 477 (1995).
- 13) K. Nomura, N. Nakajyo, K. Hidari, H. Nomura, M. Murata, M. Suzuki, K. Yamana, Y. Hirabayashi: *Biochem. J.*, **306**, 821 (1995).
- 14) 鈴木 實: “ガングリオシド研究法 I”, p. 149 (1995), (東京化学同人).
- 15) M. Suzuki, M. Sekine, T. Yamakawa, A. Suzuki: *J. Biochem.*, **105**, 829 (1989).
- 16) M. Suzuki, T. Yamakawa, A. Suzuki: *J. Biochem.*, **108**, 92 (1990).
- 17) M. Suzuki, T. Yamakawa, A. Suzuki: *J. Biochem.*, **109**, 503 (1991).
- 18) K. Nakamura, M. Suzuki, C. Taya, F. Inagaki, T. Yamakawa, A. Suzuki: *J. Biochem.*, **110**, 832 (1991).
- 19) H. Egge, J. Peter-Katalinic: “*Gangliosides and Modulation of Neuronal Functions*”, p. 71 (1987), (Springer-Verlag, Berlin).
- 20) K. Nakamura, H. Suzuki, Y. Hirabayashi, A. Suzuki: *J. Biol. Chem.*, **24**, 3876 (1995).

要 旨

順相のミクロカラムを用いかつフリットインターフェースを装着したマイクロ液体クロマトグラフィー/高速原子衝撃質量分析 (LC/FAB-MS) により, マウス胸腺細胞に存在するジシアロガングリオシド画分の構造解析を行った. 細胞数 2.2×10^9 個の胸腺細胞を用いて構造解析を行った結果, アシアロ GM1 骨格の非還元末端に 2 分子のシアル酸が直列に結合した 4 種類のジシアロガングリオシド {GD1c (NeuAc, NeuAc), GD1c (NeuAc, NeuGc), GD1c (NeuGc, NeuAc) 及び GD1c (NeuGc, NeuGc)} の存在が確認された. ミクロ LC/FAB-MS は, 中性糖脂質及びモノシアロガングリオシド混合物の構造解析だけでなく, 細胞に存在する微量なジシアロガングリオシド混合物の構造解析に対しても極めて有用な手法であると考えられる.