INTEGRATED PAPER

質量分析法による糖鎖構造異性体の解析法 I: 分枝異性体の識別

A New Technique of the Isomeric Structure Analysis of Carbohydrates and Oligosaccharides by Using Mass Spectrometry I: A Method for Distinguishing between Highly Branched Isomers

山 垣 亮*
Tohru YAMAGAKI

(Received December 21, 2002; Accepted April 30, 2003)

In proteomics research field, identification of proteins was performed by a combining method of mass spectrometry data and genome and DNA sequence database. This is an elegant method but it is not enough to analyze the functions of the proteins perfectly. It is essential to analyze post-translational modifications of the proteins to understand their functions in a cell. Glycosylation is one of the most important factors controlling the functions of the proteins, so a new technique of glycosylation analysis has been desired. Until now, it is difficult to perform the structure analysis of glycosylation by only mass spectrometry, because the structures of glycosylation are very complex and they have a lot of structure isomers. Post-source decay (PSD) spectra of glycosylation and oligosaccharides show the sequence of the sugar residues. PSD method is helpful to analyze their structures but the structural isomers can not be distinguished. So, we have been studying the relative abundance of the PSD ions in the MALDI-PSD spectra of oligosaccharides. Comparing the PSD spectra of the isomers, we found that their ion abundances differed. Thus, we can distinguish between the isomers of oligosaccharides. There are general rules between the abundance of the PSD ions and the structures of the isomeric oligosaccharides.

近年, ESI-MS, MALDI-MS などの質量分析法によるタンパク質の同定は, タンパク質を酵素消化して得られるペプチド断片の質量をタンパク質のゲノム配列と照らし合わせることで行われている。洗練されたプロテオミクスの中心的手法として, 質量分析法が注目されている。しかし“タンパク質の機能”を探る際にはアミノ酸配列と同様, 翻訳後修飾も重要な要素となる。その中でも糖鎖付加によるタンパク質の修飾は, 細胞間情報伝達などの生理活性には必須の修飾であり, 生命活動を分子レベルで明らかにする上で糖鎖の解析は欠かせないものである。しかし, 質量分析法による糖鎖構造解析は糖鎖構造の複雑さのために困難である場合が多い。MALDI-TOFMS による糖鎖のポストソース分解 (Post-source decay; PSD) 解析では, 通常グリコシド結合の切断によって生じる連続的プロダクトイオンを順に追跡することで, 糖残基の配列解析がなされている。分枝構造をもたない直鎖型糖鎖であれば, ある程度の構造情報を得ることはできるが, 複雑な分枝型糖鎖やグリコシド結合の結合様式, 糖残基間の区別などは解析が困難であった。我々は糖鎖構造異性体の区別を PSD 測定によって生じるプロダクトイオンのイオン強度に注目し, 研究を行っている。異性体同士の PSD イオンピークを比較すると, 各々の構造の違いがイオン強度の変化として観測できることを我々は見いだしている。多くの糖鎖について系統的な研究を進める中で, イオン強度と糖鎖構造との相関関係に一般的な法則を見いだすことができた。ここでは質量分析法による新たな糖鎖構造解析法を提案したい。

1. はじめに

ヒトの全塩基配列のドラフトが発表された昨今, ポストゲノム研究としてプロテオーム解析が精力的に行われており, その中心的なテクノロジーは質量分析法であろう。細胞内のタンパク質を網羅的に抽出・分離し, 病理・病態に關与するタンパク質や老化にかかわるタンパク質を質量分

析法によって同定する研究が行われている。現在, 極微量タンパク質の解析は質量分析計の改良やデータベースの開発・整備によりすでにルーチン化しつつあるが, タンパク質の機能に大きくかわる翻訳後修飾, 特にグリコシレーション (糖鎖付加) の解析は大きく遅れている。ここでは質量分析法による新しい糖鎖構造解析法を紹介する¹⁾。

タンパク質はペプチド結合によりアミノ酸残基が直鎖状に縮合してできているのに対し, 糖鎖は残基間の結合様式が多様であり, 数種類のグリコシド結合が存在するため, 糖残基の配列順序のみを解析しただけではその構造が一義的に決定されない。例えば 2 残基のグルコース (Glc) が結合している場合, 1→2, 1→3, 1→4, 1→6 結合が存在し, さ

* 東京大学大学院理学系研究科化学専攻 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)
Department of Chemistry, School of Science, University of Tokyo (7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)
E-mail address: yamagaki@chem.s.u-tokyo.ac.jp

らにグルコース 1 位のヒドロキシル基の配向によって α -, β -結合が存在するので、八つもの異性体が存在する。これらの糖鎖は質量分析において同じ質量を示し、同じ配列情報を与える。また糖タンパク質糖鎖には分枝の種類によってバイアンテナリー（二分枝）、トリアンテナリー（三分枝）、テトラアンテナリー（四分枝）などの基本分枝構造が存在し、非還元末端でさらに高度に分枝するなど複雑な構造をもつ。この高度分枝構造も質量分析法による糖鎖構造解析を難しくする要因の一つである。また糖鎖を構成する糖残基はそれぞれ異性体の関係にあるものが多く、それぞれが同じ質量をもつため各々を区別することが極めて難しい。例えばグルコースは六炭糖（ヘキソース）と呼ばれるが、ほかにマンノース、ガラクトースなどがある。マンノースはグルコースの 2 位ヒドロキシル基がアキシアル配向の 2-エピマーであり、ガラクトースはグルコースの 4 位ヒドロキシル基がアキシアル配向の 4-エピマーである。それぞれがグルコースの構造異性体であり、ヒドロキシル基の配向の違いのみによってそれぞれの性質、生体内での役割が大きく異なる。このように糖鎖の分子構造には多くのバリエーションがあり、生命の多様性を分子レベルで説明する一つのカギとなる生体分子とも言えるであろう。

生物の多様性にも似た糖鎖のバリエーションは特に生体内情報伝達に関与しており、細胞間認識やシグナル伝達が糖鎖の多様性によって精密に調節されている。例えば血液型もこの糖鎖構造の違いに起因している。血液型検査はそれぞれの血液型に特徴的な糖鎖に結合するタンパク質を加えることで行われている。細胞の表面糖鎖はガン化により糖鎖異常を示し、糖鎖構造の変化がガンの転位に重要な役割を果たしていると考えられている。また慢性関節リウマチ疾患では免疫グロブリン G (IgG) の糖鎖異常、主にガラクトース欠損が認められ、この糖鎖異常を指標とした免疫抗体反応によるリウマチ診断が行われている。特に糖タンパク質では糖鎖部分がその機能に大きく関わっていることが多い。また、糖鎖異常を検出することで病理学的な知見が得られたり、ある病態の糖鎖異常を指標とした臨床診断なども行われている。発現しているタンパク質の種類や量を研究するだけでなく、糖鎖構造の解析が生体系全体を理解する上で極めて重要な要素であることは間違いない。ごく最近では細胞内のタンパク質を網羅的に扱おうとするプロテオミクスに対して、糖タンパク質糖鎖、糖脂質糖鎖などの解析、およびそのマイクロヘテロジェネティク解析などを網羅的に行おうとする「グライコミクス」なる分野が誕生しつつある^{2), 3)}。現在、米国 NIH はこのグライコミクスを国際的な戦略の下に推し進める「ファンクショナル・グライコミクス・コンソーシアム (<http://glycomics.scripps.edu/index.html>)」という組織に 5 年間で 3,400 万ドルの研究助成を行い、ヒトゲノムやプロテオミクスと同様、大規模解析を進行させている。グライコミクス解析を大規模に進める上で、中心的役割を果たすのもやはり質量分析法である。

通常、糖タンパク質糖鎖の解析は HPLC を用い ODS カ

ラムおよびアミドカラムにて二次元に展開する糖鎖二次元マッピング法⁴⁾で行われる。一方、質量分析法による解析法はいまだに確立されておらず、特に糖鎖構造に多数存在する結合位置の異性体の解析はそれほど進んでいない。現在行われている一つの方法は完全メチル化法を用いた GC-MS による手法である。糖鎖の構造のうち、結合に関与していないフリーのヒドロキシル基 (-OH) をすべてメチル基で保護し、加水分解と還元を行うと、結合に関与するヒドロキシル基のみがメチル基で置換されずに残るので、これをガスクロマトグラフィー質量分析計で分析する手法である。その他、糖鎖の MS/MS 分析を行う際、やや強い条件でフラグメンテーションを行うと、糖残基の環状構造が壊れて生成するプロダクトイオン (cross-ring cleavage ion) が観測されることがある。これらのイオンは置換されているヒドロキシル基の位置に依存したフラグメンテーションによって生じるので、糖残基の結合様式にかかわる情報を含む場合が多い。しかしながら cross-ring cleavage はすべての糖残基上では起こらないことが多く、条件によっても変化するので配列解析に用いるのが難しい。また、cross-ring cleavage ion が生じるような条件で MS/MS 測定を行うと、イオンピークの数が増加し、解析をより複雑にするという欠点もある。Garozzo らは二糖類の結合様式を解析する手法として、FAB-MS による解析^{5), 6)}を行い、最近ではこのフラグメンテーションに対する理論計算からのアプローチ⁷⁾も報告されているが、この Garozzo らの手法は還元末端の糖で生じるフラグメンテーションを利用した解析であり、二糖レベルでの解析および還元末端の解析にとどまっている。

2. 質量分析計の現状

近年、飛行時間質量分析計はその改良が進み、感度や分解能の向上が著しい。四重極/飛行時間質量分析計などは極めて高い分解能、質量精度を実現した。もちろんフーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析計ではさらに高い精度が得られる。現在糖鎖の構造解析では、精密質量からインターネット上のデータベースを検索することで、どのような糖残基から糖鎖分子が成り立っているかを調べることができる^{8), 9)}。もちろん従来法により単糖レベルまで加水分解して、誘導化した後 GC-MS にて分離同定する手段も用いられている。巨大なデータベースと質量分析計などの精度・分解能が飛躍的に向上した現在、分子量の大きな分子でもその精密質量を測定することができるので、単に精密質量のみから得られる情報も多い。さらに MS/MS 法により糖残基の一次配列解析も可能である。精密質量に加え配列順序の情報も合わせると、より精度の高い解析が可能となる。MALDI-MS ではレーザー照射を強く行うことで分子に過剰の内部エネルギーをもたせ、分子イオンを積極的に真空中のイオン源内で自己崩壊させることができる。これをポスト・ソース分解 (Post-source decay; PSD) と呼ぶ。一般にペプチドなどでは、ペプチド結合が主に切断され断片化されたプロダクトイオン (y -イオン, b -イオン)

が観測できる。これを利用したマスフィンガープリンティング法などでタンパク質、ペプチドのアミノ酸配列解析が行われている。糖鎖のPSDでは、環内酸素原子とグリコシド結合の酸素原子との間、すなわちグリコシド結合の非還元末端側のC-O結合部分で主に切断が起こる。糖鎖のフラグメンテーションに対するDomonらの提唱した系統的命名法に従えば、これらのイオンは y -, b -イオンと呼ばれる¹⁰⁾。PSD測定で生じるプロダクトイオンを追跡することで、どのような構成糖がどのような順序で並んでいるかわかる。例えばHex-Hex-HexNAc-Hex-といった具合である。低エネルギーCID MS/MS解析でもほぼ同様の結果が得られる。糖鎖Hex-Hex-HexNAc-Hex-において途中のグリコシド結合の様式の異なる糖鎖を測定しても、PSDでは全く同じ位置で切断が起こるため、どの結合が切断された場合でもプロダクトイオンは同じ m/z 値に観測される。このため糖鎖結合の異性体を区別することは極めて困難であった。そこで、我々はPSDイオンのイオン強度に注目し構造解析への利用を試みた。これまでのPSDスペクトルでは、飛行時間質量分析計のイオン反射器の制約から狭い質量範囲のイオンの測定を行い、それぞれの質量範囲を別個に測定した後、それぞれをつなぎあわせることで全質量範囲のスペクトルを得ていた。このためイオン強度は狭い領域は別として、一般的に強度を議論することは難しく、意味のない要素であるとして無視されていた。そこで一度の測定で全質量範囲を測定するためにCotterらが開発したカーブドフィールドリフレクトロン(Curved-field Reflectron)を用い測定を行った^{11), 12)}。この手法はリフレクターで段階的な曲線状の電位を形成することで全領域のイオンを同時に測定することを可能にする。この手法を用いることで全く同じ条件で全スペクトルを得ることができるので、イオン強度を議論することが容易になるとともにイオン強度を議論する論理的な裏づけが得られた。D. J. Herveyはカーブドフィールドリフレクトロンがイオン強度を議論する上で有益であることを評価し、*Mass Spectrometry Review* 誌の中で我々の論文を引用し、将来への発展として記している¹³⁾。原理的には四重極/飛行時間質量分析計や飛行時間/飛行時間質量分析計を用いたCID-MS/MS測定においても、全測定範囲のMS/MSスペクトルを一度に取り込めるため、将来これらの装置でも応用されるであろうと考えている。

筆者らは近年広く一般に用いられるようになったMALDI-TOFMSによる糖鎖構造解析について研究を行い、これまで困難であった糖鎖の構造異性体の区別を行う新しい手法を開発した。質量分析法による糖鎖の解析では以下の3点が大きな問題であると考えている。

- 1) 糖鎖における分枝構造の問題
- 2) 糖鎖における結合異性体、Linkage Analysisの問題
- 3) 構造ユニットである単糖の異性体の区別

これらの問題に対して種々のモデル糖鎖を用い、解析を行っている。植物細胞壁を構成する高度に分枝した多糖鎖

の構造解析や、ドラッグデリバリーシステム(DDS)などに応用される多分枝シクロデキストリン(CD)の構造解析、種々の生理活性糖鎖、オリゴ糖鎖を対象としながらMALDI-MSにおける糖鎖のPSD-フラグメンテーションの基礎的研究を行い、質量分析法による新しい糖鎖構造解析法の研究を行っている。本稿では糖鎖における分枝構造の問題について詳しく述べる。

3. 分枝構造の解析

糖タンパク質のN-結合型糖鎖の分枝構造は非常に複雑で構成糖も数種類含まれていることから、もっと単純な研究対象が必要であった。ここでは多分枝モデル糖鎖として環状糖鎖シクロデキストリンの分枝糖鎖と植物細胞壁多糖キシログルカンを取り上げ、PSD法による構造解析研究について詳しく述べる。

3.1 環状糖鎖シクロデキストリンの解析^{14)~18)}

シクロデキストリン(CD)は α -D-glucopyranoseからなる環状糖鎖で、6残基から8残基のグルコースが α 1 $\rightarrow$ 4結合により結合した環状分子を慣例として α -CD、 β -CD、 γ -CDと呼んでいる。シクロデキストリンは内部に疎水性のキャビティー構造をもち、ホスト-ゲスト包摂化合物として用いられる。実用的には水に不溶の医薬品を効率良く吸収させる目的や、DDSなどに広く用いられ、例えばワサビなどの香料成分などの封入にシクロデキストリンが用いられている。超分子化合物として広く知られているシクロデキストリンは学問的にも幅広く研究されており、最近の*Chemical Review* 誌でも取り上げられている¹⁹⁾。

シクロデキストリン本体の溶解性を高めたり、包摂能を調節したりする目的から分枝糖鎖をもつCD化合物が広く研究されている。Fig. 1に示す3種のCD誘導体、 γ -CD、Maltosyl- α CD (Glc₂- α CD)、Diglucosyl- α CD (Glc₁, Glc₁- α CD)はそれぞれ同じ分子量をもち、すべて α -D-glucopyranose 8残基から構成されている。質量分析によりそれぞれを区別することは困難であるが、PSD法によってそれぞれを明瞭に区別することができた。Fig. 2に示すように環状の γ -シクロデキストリンのPSDスペクトルでは、5本のPSDイオンが観測され、それぞれ162 u ずつの質量差を示している。162 uはグルコース1残基分の脱離に相当する。マルトースの分枝をもつmaltosyl- α CDのPSDスペクトルをFig. 3に示す。PSDイオンは γ -CDで観測されたイオンと同じ m/z 値に観測されていて、 m/z の値では両者を区別できないが、イオン強度は γ -CDとmaltosyl- α CDとで全く異なる傾向を示した。この結果を分枝構造をもつmaltosyl- α CDのPSDスペクトルで解釈すると次のようになる。Fig. 3の強度の高い[M-Glc]⁺、[M-Glc₂]⁺イオンは分枝maltosyl-部分より生じ、より強度の低い[M-Glc_{3,4,5}]⁺の三つのイオンは環状のシクロデキストリン部分から生じていると考えている。すなわちFig. 4に示すようにMaltosyl- α CD (Glc₂- α CD)の分枝構造部分からはグリコシド結合1カ所の切断によってプロダクトイオン([M-Glc₁]⁺, [M-Glc₂]⁺)が生じるが、環状構

Fig. 1. Structure of α -cyclodextrin (α -CD), maltosyl- α -cyclodextrin (G2- α CD), and diglucosyl- α -cyclodextrin (G1, G1- α CD).

Fig. 2. The MALDI-PSD spectrum of α -CD.

造部分 (CD) ではプロダクトイオンの生成に 2 カ所のグリコシド結合の切断が必要である ($[M-Glc_{3-5}]^+$). グリコシド結合 1 カ所の切断で生成するプロダクトイオンは 2 カ所の切断が必要なプロダクトイオンよりもイオン強度が高いことは理解しやすい. PSD スペクトルは, Maltosyl- α CD の分枝構造を正確に表しており, 他の糖鎖の解析からも PSD スペクトルがオリゴ糖鎖の詳細な構造をよく反映していることがわかる. 先に示した 3 種の糖鎖構造の異性体 (Fig. 1) もこの手法で明瞭に区別することができ, PSD 法が分枝構造の解析に有用な手法であることがわかった.

これまで糖鎖分枝シクロデキストリン誘導体については FAB-MS による解析が行われてきた^{20)~23)}. FAB-MS によ

るフラグメント解析では, 分枝構造部分からのグルコースの脱離でのみイオンが生じ, シクロデキストリン部分からはグルコースの脱離は生じず, プロダクトイオンも生成しないとの報告がある^{20)~23)}. PSD 法による解析では直鎖分枝構造部分, 環状シクロデキストリン部分の両構造部位からプロダクトイオンが生成し, 一つの PSD スペクトル中に同時に観測することができた. さらにそれぞれのイオンピークをイオン強度によって区別することが可能であった. 質量分析法による情報として m/z の値という 1 次元の情報に加え, フラグメントイオンピークのイオン強度という全く性質の異なる 2 次元目の情報を追加することにより, これまでは解析の難しかった分枝構造異性体の構造解析や識別を行うことができた.

Fig. 3. The MALDI-PSD spectrum of maltosyl- α CD. Fig. 4. Scheme of the PSD fragmentation of maltosyl- α CD.

3.2 植物細胞壁多糖キシログルカンの解析^{24)~27)}

キシログルカンは高度に分枝した構造をもつ植物細胞壁多糖類で、細胞壁を構成するセルロース繊維と相互作用し、セルロースの繊維同士をつなぎ合わせる役割を果たしている (Fig. 5)。この働きにより、細胞壁は強固な形状を保つことができる。一方、種子などの初期胚芽細胞では細胞分裂する際にこのキシログルカンとセルロース繊維との相互作用が弱まり、一時的に細胞壁が緩んだ状態になる。このとき細胞分裂が行われ、細胞壁も分裂を果たし、細胞の分裂が完了する。その後またセルロース繊維同士はキシログルカンと相互作用し、お互いに連結して強固な細胞壁を再形成する。キシログルカンとセルロース繊維との相互作用は、キシログルカンの分枝構造によって厳密に制御され、細胞分裂時には還元末端にフコースの置換が増大し、セルロースとの相互作用が弱まると考えられている。植物細胞壁キシログルカンは植物の発生や分化に重要な役割を果たしている^{28)~31)}。

キシログルカンの構造はグルコースが $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合で連なるセルロースの骨組みにキシロースが $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合した繰返し構造を取っている。さらにそのキシロースにガラク

「細胞工学」産業調査バイオテクノロジー情報センター刊より

Fig. 5. Illustration of cross-linked cellulose fibers by xyloglucan.

トース残基が $\beta 1 \rightarrow 2$ 結合している部分や、さらにそのガラクトースにフコース残基が結合する部分もある複雑な多分枝の多糖である。その複雑な構造は7~10糖の規則正しいオリゴ糖ユニットから構成されている。このキシログルカン多分枝オリゴ糖について PSD 法による解析を行った。

キシログルカン 8 糖 (XG8) の構造を Fig. 6 に示す。 $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合した4残基のグルコース、そのグルコースに $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で置換した3残基のキシロース、さらにガラク

トースが $\beta 1 \rightarrow 2$ 結合で結合している。このキシログルカン 8 糖には、Fig. 6 に示すようにガラクトースの置換位置の異なる 2 種類の置換異性体が存在する。Fig. 7 には XG8 異性体 1 の PSD スペクトルを示した。それぞれのフラグメントイオンの間隔は 132 u, 162 u, 182 u であり、アンヒドロ・キシロース、アンヒドロ・グルコース（もしくはアンヒドロ・ガラクトース）、およびグルシトールに対応する。キシログルカン 8 糖の PSD スペクトルには計 17 本のイオンピークが観測されており、グリコシド結合 1 カ所の切断で得られるイオンだけでなく多点切断によってイオンが生成していることがうかがえる。PSD スペクトルの解析は、すべての PSD イオンについてイオン化学種の帰属を行うことから始まる。まずは還元末端を含む y-タイプのイオンと還元末端を含まない b-タイプのイオンもしくは double- or multi-cleavage イオンとに分類すると、イオンの帰属がわかりやすいかもしれない。ここでは還元末端のグルシトールが指標となり、還元末端グルシトールを含む A~I のイオングループとグルシトールを含まない J~Q のイオングループとに分類できる。それぞれの PSD イオンの質量から hexose (Glc or Gal) がいくつで pentose (Xyl) がいくつ入っているのかを計算し、糖組成を検

Fig. 6. Structure of xyloglucan octaose isomers. Glycol at the reducing end means a glucitol.

討する。プリカーサーイオンから PSD イオンを順に追跡し、hexose や pentose がいくつずつ脱離して生成するイオンであるのかを質量の大きいイオンから順に帰属していくのも有効である。キシログルカン 8 糖の PSD イオンは非常に複雑で一つのイオンが複数の化学種に由来している。一連のキシログルカン・オリゴ糖を PSD 解析していくと、あらかじめオリゴ糖鎖の分枝構造を与えられなくとも、PSD イオンを解析することで糖鎖の分枝構造を再構築することが可能であった。MALDI-PSD では、グリコシド結合の多点切断で生成する PSD イオンもすべて検出されるという優れた特徴があり、これを利用して分枝構造の再構築を行う。すなわち単糖組成から予想されるすべての構造、分枝構造を組み上げ、それぞれの糖鎖分子の PSD スペクトルを予測する。可能性のあるすべての PSD イオンが観測されるはずであるから、実際に測定した PSD スペクトルでは観測されないイオンが予想スペクトルに含まれる場合、その糖鎖構造は“真”ではないと判断できる。このような計算処理を行うことで実際に得られた PSD スペクトルから、測定試料の分枝構造を同定もしくは予測することができる。ここでの詳しい解析は別稿に譲ることとし、本稿では帰属の完了した PSD イオンの相対イオン強度解析について詳しく述べることにする。これまで FAB-MS によるキシログルカン多糖の研究^{32)~34)}が一般的であったが、キシログルカンにおいてもグリコシド結合 1 カ所の切断で生じるフラグメントイオンを観測するのが主であり、3 カ所のグリコシド結合が切断しないと生成しないイオンなどが網羅的に生成するようなスペクトルは MALDI-PSD 法でのみ得られた。多点切断によるフラグメントイオンが網羅的に観測される場合、得られる情報量も多く糖鎖の分枝構造解析が可能となる。しかし m/z 値のみのデータだと得られるデータの質が限られており、完全な分枝糖鎖構造を同定するまでには至らないこともある。ここでは複雑になったデータから、ある特定の PSD イオンに注目し、その相対イオン強度を精密に研究すること

Fig. 7. The MALDI-PSD spectrum of xyloglucan octaose isomer 1.

で、分枝糖鎖構造がよりはっきりと見えてくる例を紹介しよう。

キシログルカン 8 糖の多分枝構造から生成するプロダクトイオンとしてイオン A, C, G を選択し、それぞれのイオンのピーク強度を比較した。イオン A, C, G は Fig. 8 に示すようにキシロースとグルコースとの間のグリコシド結合が切断されて生成するイオンであり、イオン A はグリコシド結合 1 カ所の切断で生じる。イオン C, イオン G はそれぞれグリコシド結合 2 カ所, 3 カ所の切断で生成する。イオン A, C, G では生成の際切断されるグリコシド結合がいずれも $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合であり、切断箇所の数とイオン強度の関係を解析するにはイオン A, C, G のピークを比較するのが最も良いと考えた。

ここまで述べてきた PSD イオン強度解析法では、PSD スペクトル中のどの PSD イオンとどの PSD イオンのイオン強度を比較するかを適切に選択することが最も重要であり、その選択が適切でない場合には、せっかく意味のあるイオン強度情報を利用できないだけでなく、誤った解釈にもつながりかねない。各々の PSD イオンの絶対強度を見積もることは、再現性などの要素を考慮すると現段階においてかなり困難である。したがって、連続的 PSD スペクトルの中で基準となりうる PSD イオンを的確に選択し、基準イオンに対し相対強度を評価することでスペクトルを解釈する必要がある。もしくは類似の構造類縁体を比較対照とする必要がある。すなわち目的とする化合物の構造のうち、ある一部分の構造のみが異なる構造類縁体もしくは構造異性体をまず基準物質として選択し、同じ構造部分から生じる PSD イオンのイオン強度を基準として、目的の構造部分から生じる PSD イオンのイオン強度を評価する必要がある。これは新しい糖鎖構造解析法のパート II として別稿に述べるグリコシド結合の結合異性体解析での中心的戦略である。

Fig. 6 に示した化合物 1 と 2 の PSD イオン A, C, G のイオン強度を Fig. 9 に示す。イオン A が最も強度が高く、続いてイオン C, イオン G の順となる。すなわち、PSD によって生じるイオンは 1 カ所切断で生じるイオン (A) が最も強度が高く、つづいて 2 カ所切断 (イオン B), 3 カ所切断で生じるイオン (C) の順でイオン強度が観測された。これはグリコシド結合の結合様式などがそろっていれば、生成するイオンのイオン強度はイオン生成時に必要とされるグリコシド結合切断箇所数に依存していることを示しており、分枝構造をもつ糖鎖の構造解析に有用なデータとな

Fig. 9. The relative abundances of the PSD ions A, C, G, and H in the PSD spectrum of xyloglucan octaose.

る。先に示したシクロデキストリンの例は環状糖鎖という特殊な構造についての解析ではあったが、同様にキシログルカン 8 糖のような通常の非環状糖鎖においても PSD フラグメンテーションのイオン強度はグリコシド結合の切断箇所数に依存した傾向を示しており、PSD フラグメンテーションの一般的な理解が可能であった。

PSD イオンのイオン強度を詳細に解析することで、ガラクトースの置換位置のみ異なるキシログルカン 8 糖の構造異性体 1, 2 を識別することが可能であった。両者の PSD スペクトルには全く同じ数の PSD イオンが、全く同じ位置 (m/z 値) に観測されて、質量の解析のみでは両者を識別することは不可能であった。またそれぞれのイオンの強度もそのほとんどの PSD イオンが同じ傾向を示していたが、イオン H の強度は異性体 1 と 2 とで大きく異なっていた。(Fig. 9) イオン H のイオン強度が強く観測された異性体 1 について対応するイオン種を解析すると、真中のグルコース-グルコース間のグリコシド結合 1 カ所の切断で生じるイオン種を含む 3 種類が対応している (Fig. 10)。それに対しイオン H のイオン強度が低かった異性体 2 では、1 カ所切断で生じるイオン種がなく、2 カ所もしくは 3 カ所切断で生じるイオン種のみからイオン H が生成している。これらの解析から異性体 1 の 1 カ所切断で生じるイオン種が異性体 1 のイオン H のイオン強度に大きく寄与していることがわかる。このようにしてガラクトース置換構造異性体の識別を PSD 法により行うことができた。

多分枝糖鎖では、どの枝に糖残基が置換しているかを特定する必要があり、PSD イオンのイオン強度解析が糖残基置換位置の特定に非常に有効であることがわかった。

4. N-結合型糖鎖

糖タンパク質に結合する代表的な糖鎖として N-結合型糖鎖が挙げられる。これらは多分枝の複雑な構造をとっており、幾種類もの構造異性体が存在していて質量分析法での解析が困難となっている。ここではパイアンテナリー糖鎖の解析例を簡単に紹介しよう。Fig. 11 に示した糖鎖は二つの分枝をもち、非還元末端にガラクトース (Gal) が 1

Fig. 8. Chemical species of the ions A, C, and G in the PSD spectrum of xyloglucan octaose.

Fig. 10. Chemical species of PSD ion H of xyloglucan octaose 1 and 2. The squares marked by oblique line mean the lost sugar residues from the molecule by the PSD.

Fig. 11. Isomers of N-linked oligosaccharides. PA means 2-aminopyridine group.

残基結合した構造をしている。この二つの糖鎖は Gal が上の枝に結合しているか、下の枝に結合しているかというだけの違いであり、MS/MS 質量分析法では全く同じプロダクトイオンが観測される。そこで各プロダクトイオンのイオン強度に注目し解析を行うと、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とヘキソース (Hex) 1 残基が脱離して生じる $[M - \text{GlcNAc} - \text{Hex}]^+$ イオンを基準とし、GlcNAc 1 残基が脱離して生じる $[M - \text{GlcNAc}]^+$ イオンの強度を比較したとき、それぞれを明瞭に識別することが可能であった。これらのプロダクトイオンのイオン強度比は単純にグリコシド結合の違いや切断箇所の数の違いによって説明できるものではなく、糖鎖の立体構造も含めたイオンの安定性などを考慮してフラグメンテーションメカニズムを検討する必要がある。現在 *N*-結合型糖鎖についてはさらに研究を進めており、糖タンパク質糖鎖を網羅的かつ定量的に質量分析法で解析する新たな糖鎖構造解析法を開発すべく研究を続けている。

5. ま と め

一連の研究を通じてフラグメンテーションにおけるグリコシド結合切断の際の一般的な規則を見だし、プロダクトイオンのイオン強度比を理論的に説明することを目指し、日々研究を行っている。我々の研究の応用分野の一つとして、先に述べたプロテオーム研究が挙げられる。タンパク質の機能解析にはアミノ酸の 1 次配列決定に加え、翻訳後修飾、特に糖鎖付加の解析が非常に重要になってくるであろう。我々の開発した新しい糖鎖の解析法はタンパク質のグリコシルーションを迅速に解析する有力な手段になると考えている。糖鎖分子の観点から生物・生体系を理解しようとする糖鎖生物学・グライコバイオロジーが大きな成果を上げている。例えば正常細胞のガン化や遺伝子のヒエラルキー形成に糖鎖がかかわっており、細胞の分化・発生に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた⁵⁵⁾。現在ではグライコミクスという分野も登場しており、糖鎖生物学の立場から生命現象の解明を目指し、大規模な国際的協力体制が整いつつある。その中でも質量分析法が中心的なテクノロジーとして機能しており、今後ますます質量分析法への期待が高まると思われる。

謝 辞 (株)島津製作所の川畑慎一郎氏には研究当初から数々の貴重なアドバイスをいただきました。ここに感謝いたします。いち早く分子構造と PSD イオン強度との相関を指摘し、ディスカッションいただきました(株)島津製作所の田中耕一氏に感謝いたします。一連の研究をまとめ、カンファレンスでの発表の機会をいただきました。

BMS カンファレンス実行委員の先生方に感謝いたします。なお、本稿は第 29 回 BMS カンファレンス若手公募発表講演内容の一部をまとめたものです。

文 献

- 1) T. Yamagaki and H. Nakanishi, *Proteomics*, **1**, 329 (2001).
- 2) A. Dell and H. R. Morris, *Science*, **291**, 2351 (2001).
- 3) J. Hrabayashi, Y. Arata, and K. Kasai, *Proteomics*, **1**, 295 (2001).
- 4) <http://www.gak.co.jp/FCCA/indexj.html> 内「糖鎖マップ」
- 5) D. Garozzo, M. Giuffrida, G. Impallomeni, A. Ballistreri, and G. Montaudo, *Anal. Chem.*, **62**, 279 (1990).
- 6) D. Garozzo, G. Impallomeni, G. Montaudo, and E. Spina, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 550 (1992).
- 7) B. Mulrone, J. B. Peel, and J. C. Traeger, *J. Mass Spectrom.*, **34**, 856 (1999).
- 8) C. A. Cooper, E. Gasteiger, and N. H. Packer, *Proteomics*, **1**, 340 (2001).
- 9) <http://www.expasy.ch/tools/glycomod>.
- 10) B. Domon and C. E. Costello, *Glycoconj. J.*, **5**, 397 (1988).
- 11) T. J. Cornish and R. J. Cotter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 781 (1993).
- 12) M. M. Cordero, T. J. Cornish, R. J. Cotter, and I. A. Lys, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 1356 (1995).
- 13) D. J. Harvey, *Mass Spectrom. Rev.*, **18**, 349 (1999).
- 14) T. Yamagaki, Y. Ishizuka, S. Kawabata, and H. Nakanishi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1887 (1996).
- 15) T. Yamagaki and H. Nakanishi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 2199 (1999).
- 16) T. Yamagaki, *Trends in Glycosci. Glycotechnol.*, **11**, 227 (1999).
- 17) T. Yamagaki and H. Nakanishi, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **50**, 204 (2002).
- 18) T. Yamagaki, K. Hamayasu, H. Hashimoto, and H. Nakanishi, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, in submitted.
- 19) "Cyclodextrins," *Chemical Reviews*, **98**, Issue 5, 1741–2076 (1998).
- 20) K. Koizumi, T. Tanimoto, Y. Okada, N. Nakanishi, and N. Kato, *Carbohydr. Res.*, **215**, 127 (1991).
- 21) K. Koizumi, T. Tanimoto, K. Fujita, K. Hara, N. Kuwahara, and S. Kitahata, *Carbohydr. Res.*, **238**, 75 (1993).
- 22) K. Koizumi, T. Tanimoto, Y. Okada, K. Hara, K. Fujita, H. Hashimoto, and S. Kitahata, *Carbohydr. Res.*, **278**, 129 (1995).
- 23) K. Koizumi, T. Tanimoto, Y. Okada, S. Takeyama, K. Hamayasu, H. Hashimoto, and S. Kitahata, *Carbohydr. Res.*, **314**, 115 (1998).
- 24) T. Yamagaki, Y. Mitsuishi, and H. Nakanishi, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4051 (1998).
- 25) T. Yamagaki, Y. Mitsuishi, and H. Nakanishi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1411 (1997).
- 26) T. Yamagaki, Y. Mitsuishi, and H. Nakanishi, *Chem. Lett.*, **98**, 57 (1998).
- 27) T. Yamagaki, Y. Mitsuishi, and H. Nakanishi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2470 (1998).
- 28) S. C. Fry, R. C. Smith, K. F. Rrnwick, D. J. Martin, S. K. Hodge, and K. J. Matthews, *Biochem. J.*, **282**, 821 (1992).
- 29) V. Farkas, E. Sulova, R. Hanna, and G. A. MacLachlan, *Biophys. Arch. Biochem.*, **298**, 365 (1992).
- 30) C. Fanutti, M. J. Gidley, and J. S. G. Reid, *Plant J.*, **3**, 691 (1993).
- 31) I. Potter and S. C. Fry, *Plant Physiol.*, **103**, 235 (1993).
- 32) W. S. York, H. V. Halbeek, A. G. Darvill, and P. Albersheim, *Carbohydr. Res.*, **200**, 9 (1990).
- 33) M. Hisamatsu, W. S. York, A. G. Darvill, and P. Albersheim, *Carbohydr. Res.*, **227**, 45 (1992).
- 34) W. S. York, L. K. Harvey, R. Guillen, P. Albersheim, and A. G. Darvill, *Carbohydr. Res.*, **248**, 285 (1993).

Keywords: Isomer, MALDI-MS, PSD, Oligosaccharide, Structure analysis