INTEGRATED PAPER

ポストソース分解法による糖鎖構造の研究[†]Studies of Post-source Decay of Carbohydrates and
Their Structure Analyses山 垣 亮*
Tohru YAMAGAKI

(Received January 31, 2004; Accepted March 4, 2004)

When we analyze oligosaccharides by mass spectrometry, the fragment ions at glycosyl linkages show their sequences. However, it is difficult to distinguish between the linkage isomers or to analyze the types of glycosyl linkages. We have studied the post-source decay (PSD) of oligosaccharides in MALDI-MS, and we focused our attention on the abundance of the PSD ions to distinguish the linkage isomers. For example, the PSD ions produced by the cleavage of the α 1 $\rightarrow$ 4 glycosyl linkage had higher abundance than those of α 1 $\rightarrow$ 6 glycosyl linkage. The PSD ions produced by the cleavage of sialyl 2 $\rightarrow$ 3 linkages showed higher abundance than those of sialyl 2 $\rightarrow$ 6 linkages, and so on. These analyses of the linkage isomers of oligosaccharides have been performed systematically by MALDI-TOF mass spectrometry equipped with curved-field reflectron.

1. はじめに

糖鎖は生体内で細胞間認識や生体内情報伝達などにかかわる重要な生体物質の一つであり、「糖鎖」から生命現象を理解しようとする糖鎖生物学の分野も研究が盛んである²⁾。しかしプロテオーム解析、ゲノム解析などタンパク質や核酸の解析などと比べると、糖鎖の構造解析法についてはそれほど研究が進んでいない。その理由として糖鎖がタンパク質や核酸などに比べ、その構造が非常に複雑であることが挙げられる。糖鎖は糖残基同士がグリコシド結合を介し結合しているが、グリコシド結合の結合様式は多様であり、1 $\rightarrow$ 2, 1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4, 1 $\rightarrow$ 6 結合、さらに α -、 β -の立体異性が存在する。MS/MS 解析や MALDI-MS によるポストソース分解などでグリコシド結合が切断されて生じるフラグメントイオンの解析を行っても、複雑なグリコシド結合の差異はほとんどわからない。これら結合様式異性体に加え、糖鎖には高度に分岐した構造も存在する。このように複雑な糖鎖構造を質量分析法によって解析し、構造異性体を明瞭に識別することは困難な問題であった。本研究はこの糖鎖構造異性体の識別の問題を中心に、MALDI-MS によるポストソース分解メカニズムと糖鎖構

造との関連を研究し、その結果を基に質量分析法による新たな糖鎖構造解析法の確立を目指したものである^{1), 3), 4)}。

質量分析法による糖鎖構造解析についての問題点をまとめると、次の三つの問題を解決しなければならないと考えている。

1. 分岐構造の問題
2. 結合異性体の問題
3. 単糖間の識別の問題

このうち、1. 分岐構造の問題については本誌の論文¹⁾にまとめてあるので、そちらを参照していただきたい。糖鎖についての背景や筆者らが扱っている環状オリゴ糖シクロデキストリン (CD) や植物細胞壁多糖キシログルカンについての説明も簡単にまとめてある。本稿では 2. 結合異性体の識別について詳しく述べることにする。

これまでポストソース分解で生じたイオンの強度はそれほど議論されずにきたが、筆者らは構造異性体を識別する新たなパラメーターとして、グリコシド結合切断により生じるポストソース分解イオンのイオン強度に注目した。ポストソース分解スペクトルはイオン収束にかかわる制約から狭い質量範囲に分割して測定され、最終的に複数のスペクトルをつなぎ合わせたものであり、イオン強度を比較するためには測定条件を統一する必要がある。筆者らは Cotter らの Curved-field reflectron^{5), 6)} を利用することで測定条件を統一しポストソース分解 (post-source decay; PSD) スペクトルを測定した。また、最近では四重極/飛行時間質量分析計や飛行時間/飛行時間質量分析計などのハイブリッド型の分析計により、スペクトルの走査なしで MS/MS スペクトルを得ることができる。これらの装置も利用した。

[†] 本論文は 2003 年度日本質量分析学会奨励賞を受賞いたしました機会に執筆いたしました。先に執筆いたしました論文¹⁾の続編として「質量分析法による糖鎖構造異性体の解析法 II: グリコシド結合の識別」の内容といたしたいと思います。

* 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, The University of Tokyo (7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-0033, Japan)
E-mail address: yamagaki@chem.s.u-tokyo.ac.jp

2. 結合様式の解析

オリゴ糖の PSD 測定, MS/MS 測定を行い, グリコシド結合が切断して生じるプロダクトイオンの相対イオン強度を詳細に解析し, グリコシド結合に関する情報を得る. 一つの戦略として, 結合様式が 1 カ所だけ異なる構造異性体オリゴ糖を選び, プロダクトイオンの比較がしやすいようにした. グリコシド結合切断によるプロダクトイオンはそのイオン化学種が複数の可能性をもつことが多く, 単純に比較することは難しいが, 分岐構造の解析を進めるなかで, グリコシド結合の差が明らかとなる試料を選び, その差を検討した. 例えば 2.1 で述べる panosyl-CD と maltotriosyl-CD の比較は, おそらく panose と maltotriose とを単純に比較するより結果の解釈が容易であったと考えられる. Y-タイプのイオンのみが分岐部分から生成することが大きなメリットであった. いくつかの研究の積み重ねから, 2.4 に述べるような lacto-*N*-tetraose と lacto-*N*-neotetraose のような還元末端と非還元末端をもつ糖鎖の比較も確証をもって行うことができた. もう一つの戦略は, 同一分子内に含まれる 2 種類のグリコシド結合を比較することである. このとき, ペントースとヘキソースなど質量が異なる単糖ユニットを含むオリゴ糖であることがポイントであった. 2.2 で述べるキシログルカンには $\beta 1 \rightarrow 4$ 結

合と $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合の 2 種類の結合様式を含む糖鎖で, 骨格のセルロース部分はグルコースが $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合で結合し, キシロースが $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で分岐している. このため, 同一分子内でも $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合が切断されて生じるイオンと, $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合が切断されて生じるイオンとを m/z の値から区別することができ, $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合と $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合とを比較することができた. グリコシド結合の切断で生じるイオンを比較する場合, 多くの化学種を想定しなければならない. それらをいかに比較するか, もしくは可能性の低い化学種をいかに排除するかを検討し, 最終的にどのプロダクトイオンのイオン強度にも論理的に説明を行える規則を見出すことを最終的な目的とした.

2.1 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合と $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合について⁷⁾

シクロデキストリンは環状オリゴ糖で疎水性化合物を包摂する機能をもつ. 糖鎖分岐を導入して溶解性の向上などさらなる機能を付加する試みがなされており, panosyl-CD と maltotriosyl-CD もその一つである (Fig. 1). 両者は分岐構造が同じで末端のグルコース残基の結合様式のみが異なる異性体であり, panosyl は末端が $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合, maltotriosyl は $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合でグルコースが結合している. Fig. 2 に maltotriosyl-CD の PSD スペクトルを示す. 分岐シクロデキストリンのポストソース分解では, 分岐部分からグリコシド結合 1 カ所切断でプロダクトイオンが生

Fig. 1. Structures of maltotriosyl- α CD and panosyl- α CD.

Fig. 2. The PSD spectrum of maltotriosyl- α CD. Fig. 3. The relative abundance of the product ions produced from the branch in the PSD spectra of maltotriosyl- α CD and panosyl- α CD. The abundance was normalized to the ion $[M-Glc_2+Na]^+$.

成し、環状糖鎖部分からグルコースが脱離するには少なくとも2カ所のグリコシド結合切断が必要である。このため分岐部分からはグルコースの脱離が容易で、イオン強度も高く観測される。Fig. 3には分岐部分から生成したプロダクトイオンのイオン強度を panosyl-CD と maltotriosyl-CD のものを比較して載せた。これまでの研究から、グルコースが1残基脱離して生成するプロダクトイオン $[M-Glc+Na]^+$ は、主に分岐構造の末端グルコースが脱離して生成することがわかっている^(8), 9)。panosyl-CD の $[M-Glc+Na]^+$ は $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合が切断されて生じたイオンであり、maltotriosyl-CD の $[M-Glc+Na]^+$ は $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合が切断されて生じたイオンである。イオン $[M-Glc+Na]^+$ の化学種は複数存在するが、少なくとも Fig. 1 の矢印で示したイオン化学種がイオン $[M-Glc+Na]^+$ の強度のほとんど

を占めていることが他の実験から明らかになっている。そのためそれぞれのイオン $[M-Glc+Na]^+$ に対応するイオン化学種も同一と考えて良く、プロダクトイオンのイオン化効率を考慮する必要はない。Fig. 3 から panosyl-CD の $[M-Glc+Na]^+$ のイオン強度は maltotriosyl-CD のものより低く観測されることから、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合は $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合よりも切断されにくいと推論できる。

この実験事実はプルラン・オリゴ糖の PSD 解析でも成立する。プルランは maltotriose の3糖ユニットが $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合した構造をしており、その結合様式は ($\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合, $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合, $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合) といった繰返し構造をもっている。このプルラン直鎖9糖 ((Glc $\alpha 1 \rightarrow 4$ Glc $\alpha 1 \rightarrow 4$ Glc $\alpha 1 \rightarrow 6$)₃) の解析を行ったところ、還元末端側の Y-タイプイオン A~F と非還元末端側の B-タイプイオン G~L が観測された (Fig. 4, 5)。このうち Y-タイプのプロダクトイオンに注目すると、プルラン・オリゴ糖の結合様式によく一致したイオン強度パターンを示した。すなわちイオン A; $[M-Glc_1+Na]^+$ とイオン B; $[M-Glc_2+Na]^+$ の強度は高く観測され、イオン C; $[M-Glc_3+Na]^+$ はそれらと比べ低い強度を示した。さらにイオン D; $[M-Glc_4+Na]^+$ とイオン E; $[M-Glc_5+Na]^+$ のイオンは高い強度を示し、イオン F; $[M-Glc_6+Na]^+$ はそれらよりも低い強度を示した。これらのイオン強度は切断されるグリコシド結合の種類に対応しており、 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合が切断されて生じるイオンはイオン強度が高く観測され、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合が切断されて生じるイオンはイオン強度が低く観測されることがわかった。この結果は先に分岐シクロデキストリンで得られた結果と一致する。B-タイプのイオンのイオン強度は3本ごと (G, H, I; J, K, L) にそれぞれ同程度のイオン強度を示しており、これらのプロダクトイオンも3糖繰返し構造を反映したイオン強度を与えているように見える。B-タイプと Y-タイプイオンとでイオン強度の傾向に違いが認められたことは興味深い。フラグメントイオンの形成時においてグリコシド結合の切断されやすさは、特に Y-タイプイオンの強度を左右

Fig. 4. The PSD spectrum of pullulan nonaose.

Fig. 5. The fragmentation of pullulan nonaose.

する。それに対し、B-タイプのイオンでは、カチオンとの複合体を形成する際の安定性なども考慮することで、そのイオン強度をより詳細に理解できるかもしれない。ここではその可能性を述べるにとどめ、今後の研究課題であると考えている。

一般に、Y-タイプのフラグメントイオンでは $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合が切断されて生じたイオンは、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合の切断により生じるイオンよりもイオン強度が高く観測される。すなわちポストソース分解において、グリコシド結合の $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合は $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合よりも切断されやすいという規則を見いだすことができた。

$\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合 $>$ $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合

2.2 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合と $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合について¹⁰⁾

キシログルカンは植物種子の細胞壁に存在する多糖で、食品などの増粘剤に用いられている。植物の細胞壁は主にセルロースが束になり、繊維を形成して強固なコンパートメントを形成するのだが、ここでセルロース繊維同士を非共有結合でつなぎ止める役割を果たしているのがキシログルカンである。細胞分化・分裂の際にはこのキシログルカ

ンのフコシル置換の程度が変化することで、セルロースとの相互作用が弱くなり、細胞の分裂が可能となる。このキシログルカンは高度に分岐した構造をもち、7~10糖の繰返し構造をもっている。ここではキシログルカン7糖 Fig. 6 についての詳細な解析を紹介する¹⁰⁾。

キシログルカン7糖は最も基本的なユニットの一つで、セルロース骨格にキシロースが $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で結合した構造をもつ。分子内には $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合で連なるグルコース4糖と $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で分岐したキシロースがあり、分岐のキシロース残基は五炭糖であることから、六炭糖のグルコースとは質量分析計で明瞭に識別可能である。キシログルカン7糖のPSDスペクトルを Fig. 7 に示す。ここでも還元末端側のY-タイプイオンA~Fについて議論することとした。非還元末端側のイオンはイオン化学種が複雑で議論が難しいことと、イオン強度はY-タイプのプロダクトイオンの方が強度も強く観測されたこともあり、Y-タイプのイオンのみを解析した。

プロダクトイオンA~Fそれぞれについて、すべてのイオン化学種を挙げてイオン強度との相関関係を解析するこ

Fig. 6. Structure of xyloglucan heptaose.

Fig. 7. The PSD spectrum of xyloglucan heptaose.

* The ions were B-type fragment ions.

とした。Fig. 8 にはグリコシド結合の切断で失われる糖鎖に影を付けた。その際、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合が切断される場合には円で欠落する糖鎖を囲み、 $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合が切断されて糖鎖が失われる場合には四角で糖残基を囲むことにした。プロダクトイオン A~F のイオン強度を最も強度の高かったイオン A を基準としてグラフにまとめた (Fig. 9)。イオン A, B は他のイオン C~F と比べてイオン強度が高く観測されている。イオン A は $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合の 1 カ所切断で生成するイオンであり、イオン B は $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合の 2 カ所切断、イオン D は 3 カ所切断でそれぞれ生成することから、イオン強度が $A > B > C$ の順に高く観測されることは分岐シクロデキストリンの研究結果とも一致する^{(8), (9)}。しかし、イオン C, F に注目するとその生成には 1 カ所切断しか要さないにもかかわらず、イオン A, B よりもその強度ははるかに低い (Fig. 7~9)。確かにイオン化学種が 3 種あることも強度に影響すると思われるが、3 カ所切断で生成しそのイオン化学種が一つであるイオン D とイオン C, F との強度を比較すると、ほとんど同じ程度の強度であることがわかる。切断されるグリコシド結合の種類が異なることがその主な原因であろう。イオン C, F は $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合の 1 カ所切断で生じるイオンであるのに対し、イオン D は 3 カ所の $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合の切断により生じるイオンである。すなわち、単純に考えると $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合は $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合の 3 倍切断されにくいことになる。また他のイオン強度についてもこの規則に従って説明することができる。イオン E は 2 カ所切断

で生じるイオンであるが、 $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合と $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合とを切断する必要がある。同じ 2 カ所切断で生じるイオン B は $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合の 2 カ所切断で生成するので、イオン E と B の強度を比較するとその強度関係は明らかで、イオン E の強度は極めて弱い。切断される二つのグリコシド結合のうち、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合は共通であり、その強度差は $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合と $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合の切断されやすさの違いに起因するものであろう。このキシログルカン 7 糖の PSD 解析から、 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合が $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合よりも切断されやすいという規則を導くことができた。

$$\alpha 1 \rightarrow 6 \text{ 結合} > \beta 1 \rightarrow 4 \text{ 結合}$$

2.3 α -結合と β -結合について

上に述べた 2.1, 2.2 の関係からアノメリック位のコンフィグレーションについても α -コンフィグレーションをとるグリコシド結合の方が、 β -コンフィグレーションをとる結合よりも切断されやすいことがわかる。

$$\alpha 1 \rightarrow 4 \text{ 結合} > \alpha 1 \rightarrow 6 \text{ 結合}$$

$$\alpha 1 \rightarrow 6 \text{ 結合} > \beta 1 \rightarrow 4 \text{ 結合}$$

$$\alpha 1 \rightarrow 4 \text{ 結合} > \beta 1 \rightarrow 4 \text{ 結合}$$

$$\alpha \text{-結合} > \beta \text{-結合}$$

これらの規則についても種々の糖鎖で検討した結果、他の糖鎖でもよく成り立つ規則であることがわかった。

2.4 2 糖類の酸加水分解反応とグリコシド結合の切れやすさ

ポストソース分解におけるグリコシド結合の切断されや

Fig. 8. The fragmentation of xyloglucan heptaose. The gray circles show the remove of the sugar residues from the molecule by the cleavage of $\alpha 1 \rightarrow 6$ linkage. The gray squares show the remove of the sugar residues from the molecule by the cleavage of $\beta 1 \rightarrow 4$ linkage.

すさを理解する上で、それぞれの結合様式の酸加水分解反応の速度を比較することは有用かもしれない。Table 1 に 2 糖類の酸加水分解速度を示した¹¹⁾。マルトース ($\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合) の加水分解速度はセロビオース ($\beta 1 \rightarrow 4$ 結合) よりも速く、容易に切断されることがわかる。しかしながら、同じ $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合でもセロビオースとラクトースとでは加水分解を受ける速度は大きく異なっている。糖鎖のポストソース分解におけるグリコシドドナー残基の影響は、グル

コースの 2 位エピマーであるマンノースにおいて顕著であるが、グルコース 4 位エピマーであるガラクトースはグルコースとほとんど差がないことがわかっている。すなわち、セロビオースとラクトースとはポストソース分解において同じ程度のグリコシド結合切断が起こると考えている。これは酸加水分解速度の傾向とは一致しない。もちろん液相での反応がそのまま気相での反応と一致することはないが、マルトースとセロビオースの加水分解反応の傾向

Fig. 9. The relative abundance of the product ions in the PSD spectrum of xyloglucan heptaose. The abundance was normalized to ion A.

はポストソース分解の結果を理解するための参考になるかもしれない。またレーザーによる複雑な励起反応もポストソース分解には関係が深いであろうと思われるので、今後糖鎖のポストソース分解を他方面から研究し、理解を深めていきたい。

2.5 $\alpha 2 \rightarrow 3$ シアリル結合と $\alpha 2 \rightarrow 6$ シアリル結合について¹²⁾

毎年インフルエンザの流行が騒がれており、鳥インフルエンザウイルスも話題になっている。インフルエンザウイルスが動物に感染するとき、細胞表面の糖鎖構造を認識して感染する。ウイルスがどの糖鎖を認識するかによってインフルエンザウイルスの「型」が分類されている。これは

ヒトに感染するしないといったこととも密接に関係しているから、インフルエンザの予防にも役立てられている。動物などの細胞表層糖鎖にはシアリ酸が末端に置換していることが多く、しかもインフルエンザウイルスはシアリ酸の結合様式を認識して細胞に結合する。 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 結合を認識して結合するウイルスなのか、 $\alpha 2 \rightarrow 6$ 結合を認識して結合するウイルスなのかを特定することはインフルエンザ予防にも大いに役立つ。シアリ酸とその結合様式はその他いろいろな生体内の認識機構にかかわっており、シアリル結合の迅速な識別方法は病理学の解明や臨床への応用なども期待される。筆者らはシアリ酸を含む糖鎖のフラグメンテーション解析から、シアリル結合の識別を行った。

3'-シアリルラクトース (3'-SL) と 6'-シアリルラクトース (6'-SL) は非還元末端シアリ酸の結合様式のみが異なる構造異性体で、シアリル結合が切断されて生じるプロダクトイオンは同じ m/z 値を示す。このプロダクトイオンのイオン強度を比較することで両者の識別を行った。分子関連イオン $[M-H+2Na]^+$ をプリカーサーとした PSD の正イオン測定では、B-タイプのイオン $[NeuNAc+2Na]^+$ が観測され、3'-SL の B イオンの相対強度は 6'-SL の相対強度よりも高く観測された (Fig. 10)。 $[M-H]$ -イオンをプリカーサーとした PSD 負イオン測定でも、プロダクトイオンは B-タイプのイオン $[NeuNAc-H]^-$ が観測され、その相対強度は 3'-SL の方が 6'-SL のものよりも強度が高く観測された。このことから、 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 結合は $\alpha 2 \rightarrow 6$ 結合よりも切断されやすいといった規則を得ることができた。また、ESI-MS による CID-MS/MS 測定においても同様の結果を得ることができたので、筆者らが得た糖鎖のフラグメンテーション規則が一般性の高いものであることがわかった。

2.6 1 $\rightarrow$ 3 結合と 1 $\rightarrow$ 4 結合について¹³⁾

1 $\rightarrow$ 3 結合と 1 $\rightarrow$ 4 結合は糖鎖構造によく見られる結合様式で、例えばルイス型糖鎖の骨格 3 糖に含まれている。ルイス 3 糖はグルコース (Glc) または N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の 3 位と 4 位のヒドロキシ基にガラクトース (Gal) もしくはフコース (Fuc) が置換した構造の異性体、ルイス x (Le^x) 3 糖とルイス a (Le^a) 3 糖があり、この構造異性体を PSD 法で解析した結果、1 $\rightarrow$ 3 結合の方が 1 $\rightarrow$ 4 結合よりも切断されやすいことがわかった。詳しくは 2003 年の本誌、JMSSJ 第 2 号の「解説」³⁾ に掲載されている。

Table 1. The Reaction Rate of the Hydrolysis of Bioses¹¹⁾

Oligosaccharide	Rates $k/aH^+ \times 10^{-6} (s^{-1})$	Activation energy (cal mol ⁻¹)	Structure	
Trehalose	0.864	40,180	α -Glucosido-1-(α)glucose	Glc α 1 $\rightarrow$ 1 α Glc
Melibiose	15.5	38,590	α -Galactoside-6-glucose	Gal α 1 $\rightarrow$ 6Glc
Gentiobiose	1.24	33,390	β -Glucosido-6-glucose	Glc β 1 $\rightarrow$ 6Glc
Turanose	11.9	32,450	α -Glucosido-6-fructose	Glc α 1 $\rightarrow$ 6fGlc
Maltose	16.8	30,970	α -Glucosido-4-glucose	Glc α 1 $\rightarrow$ 4Glc
Cellobiose	5.89	30,710	β -Glucosido-4-glucose	Glc β 1 $\rightarrow$ 4Glc
Lactose	16.6	26,900	β -Galactosido-4-glucose	Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc
Sucrose	146×10^2	25,830	α -(γ)Fructosido-1-(β)glucose	fGlc α 1 $\rightarrow$ 1 β Glc

Fig. 10. The positive-mode PSD spectra of 3'-sialyllactose and 6'-sialyllactose.

* The ions were produced by the cross-ring cleavages and dehydration.

 Fig. 11. Structures of lacto-*N*-neotetraose and lacto-*N*-tetraose.

るのでそちらをご参照ください。ここではラクトテトラオース (Lacto-*N*-tetraose; LNT) とラクトネオテトラオース (Lacto-*N*-neotetraose; LNnT) についての解析を紹介する。LNT と LNnT はヒトミルクに含まれる一連のオリゴ糖の基本骨格となる糖鎖で、非還元末端のガラクトース (Gal) が *N*-アセチルグルコサミン残基 (GlcNAc) の 3 位もしくは 4 位に結合した構造異性体である (Fig. 11)。ピリジルアミノ化などで還元末端を修飾した試料では Y-タイプのプロダクトイオンが観測され、直接 1→3 結合と 1→4 結合の差が観測されるが、還元末端がフリーのままの試料ではより複雑なスペクトルとなる。

[M+Na]⁺ (*m/z* 730) をプリカーサーとした LNnT と

Fig. 12. The PSD spectra of lacto-*N*-neotetraose (A) and lacto-*N*-tetraose (B).
 * The ions were produced by the cross-ring cleavages.

Fig. 13. The fragmentation of lacto-*N*-neotetraose.

LNT の PSD スペクトルでは、H~L の 6 本のプロダクトイオンがそれぞれ観測され、シグナルの数と m/z の値は全く同じであった (Fig. 12). これは LNT と LNT の配列 (Hex-HexNAc-Hex-Hex) が全く同じであることから予想された結果であった。そこで、それぞれのプロダクトイオンのイオン強度とイオン化学種について考察することとした。LNT の PSD スペクトルでは、 m/z 568 のイオン H は非還元末端のガラクトース (Gal) が anhydro の形で脱離した Y-タイプのイオン ($[M-\text{anGal}+\text{Na}]^+$; Y₃) と考えられる。 m/z 365 のイオン L は、ガラクトースと *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が anhydro の形で脱離して生成する $[M-\text{anGal}-\text{anGlcNAc}+\text{Na}]^+$ の化学種に対応するプロダクトイオン Y₂ であり、非還元末端側の配列を示す Y-タイプのプロダクトイオンである。イオン I (m/z 550), イオン K (m/z 388) は B-タイプのプロダクトイオンで、還元末端側からグルコース (Glc) とガラクトース (Gal) がそれぞれ脱離して生成するイオン $[M-\text{Glc}+\text{Na}]^+$ (B₃), $[M-\text{Glc}-\text{Gal}+\text{Na}]^+$ (B₂) に相当する。イオン K については還元末端のグルコースと非還元末端のガラクトースが脱離しても生成する (Y₃/B₃) が 2 カ所のグリコシド結合の切断を要するため、この化学種のイオン K に対する寄与は小さいものと考えられる。イオン K は主に B₂ のフラグメンテーションによって生じるものと考えられる。イオン J (m/z 406) は C₂ に当たるグリコシド結合の 1 カ所切断により、還元末端の (グルコース+ガラクトース) が脱離して生成するイオン C₂ ($[M-\text{anGlc}-\text{anGal}+\text{Na}]^+$) に相当するイオンである。LNT のイオン化学種について帰属を行い、Fig. 13 にまとめた。

先に述べたとおり、LNT と LNT の PSD スペクトルでは同じ m/z の位置に同じ数のイオンが観測される。LNT と LNT の構造上の違いは非還元末端ガラクトースの結合が $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合であるか $\beta 1 \rightarrow 3$ 結合であるかの違いなので、Y₃ イオンと帰属されたイオン H の相対イオン強

度を比較すると、LNT のイオン H の方が LNT のイオン H よりも強度が高く、 $\beta 1 \rightarrow 3$ 結合の方が $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合よりも切断されやすいと推察できる。しかしながらその強度差はそれほど大きく観測されているわけではない。そこで、PSD スペクトル中のイオン I と K に注目することとした。これらのイオンは LNT と LNT の PSD スペクトルで最も強度差の大きいイオンである。LNT の PSD スペクトルでは、イオン K の強度はイオン I よりも高い強度で観測されている。イオン K は GlcNAc と Gal 間のグリコシド結合が切断されて生成するイオンで、GlcNAc がグリコシルドナーである。 $(-\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal})_n$ といった繰返し構造から構成されるラクトサミノグリカンの FAB-MS による研究では、GlcNAc と Gal 間のアミノグリコシド結合が特異的に切断されて生成するイオンが主に観測されている^{14), 15)}。FAB-MS によるフラグメンテーションから考察すれば、PSD スペクトルにおいてアミノグリコシド結合が切断されて生じるイオン K のイオン強度が高く観測されることは理解しやすい。

LNT に対して、LNT の PSD スペクトルではイオン K のイオン強度はイオン I よりも低く観測されている。LNT においてもイオン K はアミノグリコシド結合が切断されて生じるイオンであるにもかかわらず、イオン K の相対イオン強度は LNT のそれに比べはるかに強度が低く観測されている。LNT では非還元末端のガラクトース残基が *N*-アセチルグルコサミン残基の 3 位に結合している。負イオン測定モードの FAB-MS における研究では、3 位結合即ち $1 \rightarrow 3$ 結合を含む糖鎖では、その $1 \rightarrow 3$ 結合が Z-タイプのフラグメンテーションにより特異的に切断されるという結果が報告されている¹⁶⁾。C-3 位における β -脱離によるフラグメンテーションと考えられている。PSD においても *N*-アセチルグルコサミン残基の 3 位置換において、3-*O* β -脱離が観測されている。したがって、*N*-アセチルグルコサミン残基の 3 位に非還元末端のガラクトースが置

Fig. 14. The fragmentation of lacto-*N*-tetraose.

Fig. 15. The chemical species of ions J and K in lacto-*N*-tetraose. The chemical species of ions J and K are sodium adducts, which correspond to $[M - \text{anGlc} - \text{anGal} + \text{Na}]^+$ and $[M - \text{anGlc} - \text{Gal} + \text{Na}]^+$, respectively.

換した構造を含む LNT では、LNnT よりも 3-*O*β-脱離が生じやすいと考えられる (Fig. 14).

LNnT のプロダクトイオン K に対するイオン化学種は非還元末端側の Gal-GlcNAc であり、PSD スペクトル中最も強度が高く観測される。LNT の場合にはこのイオン化学種 Gal-GlcNAc が生成する際、Y3-のフラグメンテーションが起こると同様に 3-*O*β-脱離による Z3-タイプのフラグメンテーションも同時に起こっていると考えられる (Fig. 15)。そのためイオン K のイオン強度が極端に減少しているものと推論した。このように LNT のイオン K の相対強度が LNnT よりもかなり低く観測されるのは、3-*O*β-脱離によるものと考えられる。

LNT の PSD スペクトルではイオン I が最も高い強度で観測されている。*N*-アセチルグルコサミン残基への 3-*O* 結合を含む糖鎖では、Z-タイプのフラグメンテーションが Y-タイプのフラグメンテーションよりも優先して起こる。そのため、LNT の非還元末端 Galβ1→3GlcNAc の部分では Z-タイプのフラグメンテーション (Z3, m/z 550) が Y-タイプのフラグメンテーション (Y3, m/z 568) よりも優先して起こっていると考えられる。そのため、LNT のイオン I (m/z 550) は、この Z3 フラグメンテーションに基づく化学種 ($[M - \text{Gal} + \text{Na}]^+$) と B3 フラグメンテーションに基づく化学種 ($[M - \text{Glc} + \text{Na}]^+$) の 2 種の化学種の総和としてイオン強度が観測されるため、イオン K よりも強度が強く、LNT の PSD スペクトル中最も強度の高いプロダクトイオンとして観測される。

先に LNT と LNnT についてイオン H (m/z 568) の相対イオン強度を比較することで β1→3 結合の方が β1→4

結合よりも切断されやすいということを述べた。しかし、その強度差はわずかなものであった。ここで、もう一度イオン H について考察してみたい。LNT のイオン H は Y3-タイプのフラグメンテーションによって生成するイオンである。ここで、LNT と LNnT の各プロダクトイオンの帰属を比較してみると、LNT ではガラクトースが 1→3 結合で *N*-アセチルグルコサミンに結合しているために、3-*O*β-脱離が生じ、Z3-タイプのフラグメンテーションも同時に Gal, GlcNAc 間で起こっている。すなわち、LNT のイオン H の強度は純粋に 1→3 結合が切断されて生成する分のイオン強度ではなく、Z3-タイプのフラグメンテーションが同じグリコシド結合で優先的に起こっていて、その分の強度が減少していると考えられる。その減少分はかなり大きいと見積もれるので、LNT と LNnT のイオン H におけるイオン強度差が、純粋に β1→3 結合と β1→4 結合の切断されやすさを反映すれば、その差はもっと大きくなるであろうと推論できる。

3. ま と め

ポストソース分解イオンの強度と糖鎖構造との関連性について系統的な研究を行った。例えば α1→4 結合と α1→6 結合とを比較すると α1→4 結合の方が切断されやすく、α1→4 結合と β1→4 結合とを比較すると α1→4 結合の方が切断されやすいといった結果を得た。単純オリゴ糖を系統的に分析することで糖鎖のポストソース分解メカニズムについての知見を得て、さらに高度に分岐した構造についても基本的なポストソース分解機構について研究を行った。これらの結果をより複雑な糖タンパク質糖鎖の解析にも応用し、構造異性体の識別と、さらにはイオン強度に基づく定量的な構造異性体の識別分析も行っている。

細胞内タンパク質を網羅的に分析するプロテオーム解析が今日盛んである一方、生命現象を糖鎖の立場から理解し、糖鎖の網羅的な解析から糖鎖生物学を発展させようとする“グライコーム”研究が現在盛んになりつつある。プロテオーム同様グライコームにおいても質量分析法が中心的技術になることは間違いない¹⁷⁾。質量分析法による新たな糖鎖構造解析法の確立が望まれており、MALDI-MS を基盤とした糖鎖のポストソース分解メカニズム解析の研究が、グライコームを志向した新たなテクノロジーとして発展していくことを期待している。

謝 辞 糖鎖の面白さ、研究の楽しさを教えていただき、終始ご指導ご鞭撻賜りました埼玉大学名誉教授前田昌徹先生に感謝いたします。つくばでの研究を支えていただきご指導いただきました産業技術総合研究所教授中西洋志先生に感謝いたします。この研究のはじめの時点から良きアドバイスを絶えずいただいている (株)島津製作所 川畑慎一郎氏、田中耕一氏に感謝いたします。私のとりとめの話をもいつも聴いていただき感謝します。現在この研究をさらに発展させる機会をいただいている東京大学大学院理学系研究科教授 橘和夫先生に感謝いたします。本研

究を日本質量分析学会奨励賞にご推薦いただきました横浜市立大学大学院総合理科学研究科助教授 高山光男先生に感謝いたします。またこれまでご指導いただきました日本質量分析学会の諸先生方に感謝いたします。さらなるご指導ご鞭撻いただければ幸いです。

なお、本研究の一部は、経済産業省の研究開発制度の一環として、NEDO（独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構）より委託を受けて実施された糖鎖エンジニアリングプロジェクト研究の一部です。また、本研究の一部は 21 世紀 COE プログラム「フロンティア基礎化学」研究拠点形成事業の下に行いました。

文 献

- 1) T. Yamagaki, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 398 (2003).
- 2) A. Varki, "Essentials of Glycobiology," Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- 3) T. Yamagaki, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 374 (2003).
- 4) T. Yamagaki and H. Nakanishi, *Proteomics*, **1**, 329 (2001).
- 5) T.J. Cornish and R. J. Cotter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 1037 (1993).
- 6) T. J. Cornish and R. J. Cotter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 781 (1998).
- 7) T. Yamagaki, Y. Ishizuka, S. Kawabata, and H. Nakanishi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 527 (1997).
- 8) T. Yamagaki, Y. Ishizuka, S. Kawabata, and H. Nakanishi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1887 (1996).
- 9) T. Yamagaki, K. Hamayasu, H. Hashimoto, and H. Nakanishi, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 550 (2003).
- 10) T. Yamagaki, Y. Mitsuishi, and H. Nakanishi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 307 (1998).
- 11) E. A. Moelwyn-Hughes, *Trans. Faraday Soc.*, **25**, 435 (1929).
- 12) T. Yamagaki and H. Nakanishi, *Glycoconjugate J.*, **16**, 385 (1999).
- 13) T. Yamagaki and H. Nakanishi, *Anal. Sci.*, **17**, 83 (2001).
- 14) A. Dell and H. R. Morris, *Carbohydr. Res.*, **115**, 41 (1983).
- 15) M. Fukuda, A. Dell, and M. N. Fukuda, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4782 (1984).
- 16) D. Garozzo, G. Impallomeni, and E. Spina, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 550 (1992).
- 17) A. Dell and H. R. Morris, *Science*, **291**, 2351 (2001).

Keywords: Post-source decay, Oligosaccharide, Linkage isomers, MALDI