INTEGRATED PAPER

多段階質量分析における酸性糖鎖のフラグメンテーション則：
グリコサミノグリカンの配列解析を目指してFragmentation Rules of Acidic Carbohydrates in
Multiple-Stage Mass Spectrometry:
Toward Establishment of a Method to Determine
Glycosaminoglycan Sequence

南澤俊和

Toshikazu MINAMISAWA

生化学工業株式会社中央研究所 *Central Research Laboratories, SEIKAGAKU CORPORATION,*
Higashiyamato, TOKYO, JAPAN

I focus on the fragmentation rules derived by inspection of the multistage product ion mass spectra of glycosaminoglycan (GAG)-related carbohydrates. To establish a sophisticated sequencing method for GAGs using mass spectrometry, systematic understanding of fragmentation rules is essential. This review proposes an attractive protocol for GAG sequencing based on such knowledge, and shows that multiple-stage mass spectrometry is a powerful and promising technology to decipher highly heterogeneous GAG structures.

(Received February 4, 2009; Accepted April 16, 2009)

1. 序 論

われわれの体にある、構造的にユニークな酸性糖鎖に目を向ける。硝子体や皮膚の構成成分であるヒアルロン酸、関節軟骨に存在するコンドロイチン硫酸やケラタン硫酸、さらに、肥満細胞に局限して生合成されるヘパリンや、細胞表面に存在しさまざまな生理機能タンパク質と相互作用を繰り返すヘパラン硫酸。これらはすべて、グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan: GAG) という呼称で括られる酸性糖鎖である。これらのうちいくつかのものは、その動物由来品が研究用試薬として、また医薬品やサプリメントとして製品化されているため、糖鎖の専門家でなくとも聞き覚えがあるかもしれない。そのGAGの科学に立脚した創薬研究、あるいは疾病診断技術の開発の場において、昨今、多段階質量分析 (multiple-stage mass spectrometry, MSⁿ) のもつポテンシャルが極めて有望視されている。本稿は、そのMSⁿを用いたGAGの構造解析について総括的に述べていく。

MSⁿが糖鎖構造解析において魅力的かつ強力な手法であることは、もう強調するまでもないだろう。MSⁿを使うことにより、今や糖鎖を構成する糖残基の種類、グリコシド結合の位置と立体配置、さらに修飾基の位置などが高い精度で決定できるようになりつつある。かつてはヒドロキシ基の完全メチル化等の誘導化を施さないと得られなかった構造情報も、装置の高感度化とMSⁿの技術的な進歩によって、それが非誘導化のまま取得できるようになった。そしてまだ記憶に新しい、グライコミクス研究を目した標準糖鎖の網羅的なMSⁿスペクトル・データベース構築の全盛期を迎える。これについては、データベースの統合¹⁾、データ互換性²⁾という、より現実的な情報共有性、ユーザー・フレンドリー性を求める議論も開始された。そして完成されたデータベースは、ヒューマン・グリコパオロロジーに精力的に活用され始めている。

しかし、ここで気づくことがある。すでに公開されている糖鎖のMSⁿスペクトル・データベースのなかで、GAGのコンテンツが充実しているものは皆無ではなからうか。その理由はいくつか考えられる。スペクトル・データが圧倒的に充実している糖タンパク質糖鎖に比べ、GAGは、①研究者人口が少ない、②容易に入手できる標準糖鎖の種類が極めて少ない、③化学的に不安定な硫酸基が数多く結合するため、イオン化法、すなわち分析に使用できる装置に制限が生じる、などが挙げられる。では、これらの問題

Correspondence to: Toshikazu MINAMISAWA, *Central Research Laboratories, SEIKAGAKU CORPORATION, 3-1253 Tateno, Higashiyamato, Tokyo 207-0021, JAPAN*, e-mail: toshikazu.minamisawa@seikagaku.co.jp
南澤俊和, 生化学工業株式会社中央研究所, 〒207-0021 東京都東大和市立野 3-1253

が解決されたならば GAG の充実したスペクトル・データベースができればかという、必ずしもそうではないだろう。GAG の研究者がそれぞれ独自に MSⁿ データを取得し、「データベース非依存型」の構造解析プロトコルを模索していったことは^{3)~9)}、実は必然であった。その根本的な理由は、計数不能といってよい GAG の構造異性体の多さと不均一性にある。言い換えれば、GAG の構造上の特殊性が、他の糖鎖を相手にする場合とは異なるアプローチを MS 解析者に要求した。

MSⁿ を用いて GAG 関連糖鎖を構造解析した報告は、実は少なくない。しかし、そこでせきかく得られたフラグメンテーションに関する知識に対して普遍性を追求し、系統立てて解説した例というのは、全くといってよいほど見受けられない。けれども筆者は、むしろそのことこそが GAG の構造解析手法の確立に不可欠だと考えている。したがって本稿では、GAG およびそのモデルとなる酸性糖鎖の MSⁿ における「フラグメンテーション則」に焦点を当てて記述していくことにする。このことにより、現状において GAG の MSⁿ により取得可能な構造情報（わかるこ

と）とそうでないもの（わからないこと）を整理し、普遍性はもちろんのこと、信頼性の高い構造解析プロトコルを提案することを目指した。ここに記載することは、言うまでもなく、GAG 以外のカテゴリーに属する糖鎖の MSⁿ に関する研究にもヒントを与えるものと考えている。

2. GAG の化学構造

最初に GAG の構造的特徴について解説する必要がある。生体には貯蔵糖鎖に代表される単純糖質のほかに、複合糖質として糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンが存在する。それらのうち、プロテオグリカンに結合する一定の構造的特徴（後述）をもった糖鎖を、GAG と称する¹⁰⁾。GAG の糖鎖長は、例外的なものを除けばおよそ 50 から 100 糖程度とされている。したがっていわゆる天然形の場合は、糖鎖というよりも多糖と呼ぶべきであろう。また、GAG は一つの名称に対応する糖鎖長や糖配列が必ずしも定まらない。むしろ多様な分子群をひとまとめにして指すことが多い。実際、生体から単離される GAG のほとんどは、先の 2 点（糖鎖長と糖配列）において極めて不均

Scheme 1. GAG の二糖構造単位。アミノ糖 (GalNAc または GlcNAc) とウロン酸 (GlcA または IdoA, KS は例外的に Gal) が結合し、さまざまな位置に硫酸基が導入される。[文献 18 より許可を得て改変。©2006 FCCA (Forum: Carbohydrates Coming of Age)]

一な分子の集合体であるから、生体内に存在する GAG を一つの化学構造式で正確に記載することは不可能に近い。

そんな GAG の糖配列は、非常にユニークである (Scheme 1)。一つの例外 [ケラタン硫酸 (keratan sulfate: KS)] を除いて、アミノ糖 (GalNAc または GlcNAc) とウロン酸 (GlcA または IdoA) の規則的な交互共重合体の骨格構造をなす (uniformity)。さらに、多くの GAG においてその骨格に対する硫酸化修飾が行われる。硫酸基は位置特異的硫酸転移酵素に触媒されてさまざまな位置のヒドロキシル基に導入されることが知られている (diversity)。そのため、事実上、硫酸基配置が均一 (単一繰返し構造) な GAG は存在しないと考えてよい。すなわちそこに、無限大と表現しうる配列多様性が発揮される余地がある。糖鎖科学には uniformity と diversity の両方が重要、との指摘がある¹¹⁾。これは GAG の構造化学をとらえるには最適の表現である。

もう少し詳しく見ていく。GAG の構造の最大の特徴は、異性体構成糖の多さにある。二糖繰返し構造 (Scheme 1) を見ながら整理すると、以下の組み合わせを挙げることができる。

- ①ヒアルロナン (hyaluronan: HA) とコンドロイチン (chondroitin: CH) は、アミノ糖 (HexNAc) の C-4 位ヒドロキシル基の立体配置のみが異なる (C-4 エピマー)。
- ②HA と *N*-アセチルヘパロサン (*N*-acetylheparosan: NAH) は、ウロニド結合の位置とヘキササミニド結合の立体配置が異なる (グリコシド結合位置異性およびアノマー立体異性)。
- ③コンドロイチン硫酸 A (chondroitin sulfate A: CSA) とデルマタン硫酸 (dermatan sulfate: DS) は、ウロン酸 (HexA) の C-5 位カルボキシル基の立体配置のみが異なる (C-5 エピマー)。
- ④CSA と CSC (chondroitin sulfate C)、また CSD (chondroitin sulfate D) と CSE (chondroitin sulfate E) は、それぞれ硫酸基の結合位置のみが異なる (硫酸基位置異性)。

基本構造を眺めただけでもこれだけの異性体がある。言うまでもなく、MSⁿ によってこれらの一つひとつを正確に識別していくことは必須の課題である。

これに加えて前述のとおり、硫酸基とウロン酸 C-5 エピマーの分子上の局在が、GAG の糖配列の複雑さにいっそうの拍車をかける。CS (chondroitin sulfate) とヘパリン/ヘパラン硫酸 [Hep (heparin)/HS (heparan sulfate)] は、その生合成プロセスにおいて一分子上のさまざまな場所に硫酸化を受ける。また、さまざまな位置のウロン酸に C-5 位エピマー化が生じる^{12), 13)}。この結果、比較的短いオリゴ糖鎖であっても数多くの糖配列バリエーションが構築されることになる。

試しに CS 骨格の二糖を考えてみる。GlcA-GalNAc 配列の硫酸化のバリエーション (硫酸基の数および位置) を仮に 5 通りとするならば、計算上、4 糖になると $5 \times 5 = 25$

通りの糖配列ができ上がる。これに加えて逆配列の GalNAc-GlcA 型も考慮すれば (これもまた、GAG に独特の配列異性体である)、2 倍の 50 通りになる。さらに GlcA のエピマー化や希少な硫酸基配置¹⁴⁾ までを考慮すると、構造解析手法 (ここでは MSⁿ) がカバーすべき 4 糖配列は容易に 200 通りを超えてしまう。GAG の研究対象となるのは 4 糖だけではないから、5 糖、6 糖…と考えていくと、無限に diverse な配列があることを前提に構造解析法を考えなければならないことが容易に理解できる。

3. MS を用いる GAG の構造解析法 ～フラグメンテーション則の重要性

GAG の糖配列パターンは数え切れないとわかっている。そうであるから、それを解析する MSⁿ の手法を確立するにあたっては、限られた構造群だけを見分ければよいという場合を除いて、広い構造網羅性、高い普遍性を確保することを目標にするのが妥当だろう。あえてその終着点を表現するならば、「種々の分離精製技術、あるいは MS 装置内において単一構造に分離しうる限り、より長鎖、より複雑な GAG の構造を同定しうる方法の確立」ということになる。

Scheme 2 に、GAG を対象とすることを前提とした糖鎖の MSⁿ 解析手順の概略を描いた。これまでに 200 種類あまりの GAG 関連糖鎖を MSⁿ を利用して解析してきた筆者の経験上、少なくとも短鎖のオリゴ糖鎖であれば、MSⁿ で識別できない GAG 構造の組み合わせというものはない。すなわち、構造が異なる糖鎖は、極めて高い確率で異なるプロダクトイオンスペクトルを与える。ということは、被検糖鎖となるであろう構造に相当する標準化合物の MSⁿ の各段階のプロダクトイオンスペクトルを予めデータベース中に格納しておけば (Scheme 2A)、被検糖鎖の実測スペクトル (Scheme 2B) との照合型構造同定を達成しうる (Scheme 2C)。特に糖タンパク質糖鎖や糖脂質糖鎖では市販の標準糖鎖が充実しているために、この照合型同定法が一定の功を奏しているようである^{15), 16)}。

GAG の構造解析においても、初期手段としてはこの照合型同定法を採れるだろう。それこそ、数種類の分子を母集団として迅速解析を行う場合は、当該法の選択が適切かもしれない。しかしこの方法は、原則的に被検糖鎖の標準スペクトルがデータベース中に登録されていることを要求する。標準スペクトルが存在しない構造は同定できないばかりか、本来識別すべき類似スペクトルを寛容的に同一視してしまうミスを生じかねない。もっと深刻な問題として、GAG の「数え切れない種類」の標準糖鎖を合成してそのスペクトルを取得しなければ、この方法は極めて限定的にしか成り立たないことになる。これは、普遍性を求める観点から考えれば現実的でない。

そこで、標準糖鎖の「種類の」充実度が構造解析の成否に直接反映されない方策を考える。すなわち、適切に選択された標準糖鎖群のスペクトルから帰納的に MSⁿ におけるフラグメンテーション則を導き、それを知識データとし

Scheme 2. MSⁿによる糖鎖構造解析の手順概略. GAGの構造解析はスペクトル照合型同定(C)のみで達成されることはまれである. 蓄積されたスペクトル・データからフラグメンテーション則を導き(D), 演繹的にアプローチ(E)することが必要になる. (DB: データベース)

Scheme 3. MSⁿによるGAGの構造解析法確立に向けたアプローチ. GAGのモデル化合物として, 硫酸化単糖の位置異性体のフラグメンテーション則(A)を明らかにすることにより, 重要な基盤情報を得る. 次いで硫酸基のみ(B), あるいはカルボキシル基のみ(C)を有するGAGのフラグメンテーション則を徹底解明し, (A), (B), (C)の知見を検証しながら難度の高いGAGの解析に挑んだ(D). 以上で得たフラグメンテーション則を統合的に理解することで, MSⁿによる新しいGAG構造解析プロトコルを提案することを目指した.

で蓄積する (Scheme 2D). これは, 類似構造間でフラグメンテーションにおける「共通項」を見だし, 整理していく作業である. ここで得たフラグメンテーション則を被検

スペクトルの帰属結果に演繹的に適用することで (Scheme 2E), 構造同定を達成する. この方法の成否の鍵を握るのは, 帰納プロセスの精度であろう. したがって,

帰納-演繹プロセスを繰り返し検証し、その精度を高めていく作業が欠かせなくなる。また、導かれたフラグメンテーション則を可能な限りそのメカニズムに則って考察し、さらに実験的に裏づけていく姿勢も重要である。この手法を採る場合の標準糖鎖の位置づけは、構造解析される糖鎖そのものではなく、「正しいフラグメンテーション則を導くために有用な糖鎖」となる。ここでは、照合型同定法においては考慮されることのない非天然型糖鎖も解析対象になる。この構造解析アプローチを採ることのメリットは、同定することのできる糖鎖構造の範囲が標準糖鎖の数（種類）に制限されないこと、標準糖鎖の合成にかける（永遠の）労力を節減できること、装置間差をある程度吸収できること、にある。ただし、構造同定のうえで特にキーとなる標準糖鎖の合成が困難な場合には、Scheme 2 に示す方法 C も E も同様に成り立たないことを承知しておく必要がある。

さて、本稿の構成について述べる (Scheme 3)。本稿の話題を支えるものは、筆者が自ら取得し蓄積した MSⁿ スペクトル・データである。まず、GAG を特徴づける要素として最も重要と考えられるのは硫酸基の結合位置である。そこで、最も単純化された GAG モデル化合物として、種々の位置に硫酸基が導入された単糖について MSⁿ を行い、帰納的にフラグメンテーション則を導いた (Scheme 3A)。続いて、電荷中心として硫酸基だけをもちカルボキシル基（ウロン酸）をもたない GAG として、KS オリゴ糖の MSⁿ (Scheme 3B) を行った。ここでも新たなフラグメンテーション則を得るとともに、Scheme 3A で得た規則性情報を演繹的に活用した。一方、硫酸基をもたない GAG の異性体オリゴ糖鎖の MSⁿ の比較解析により、フラグメンテーションにおけるウロン酸カルボキシル基の寄与についても議論する (Scheme 3C)。以上で得られた知見をもとに、硫酸基とカルボキシル基の両方をもつ GAG に解析対象を展開した (Scheme 3D)。Scheme 3 の戦略は、構造が比較的単純な化合物のフラグメンテーションに関する基礎的理解が得られて初めて、より複雑な構造の解析が可能になるだろう、との発想に基づく。そして、この一連の MSⁿ を利用した解析のなかで得られる種々のフラグメンテーション則について、帰納-演繹プロセスを繰り返し検証していくことになる。

4. 実験方法概略

MSⁿ スペクトル取得に供した標準糖鎖のうち、硫酸化単糖および GAG 不飽和二糖については、市販の研究用試薬を精製せずに使用した。それ以外のものについては、生化学工業(株)中央研究所、(独)産業技術総合研究所糖鎖工学研究センター、愛知医科大学分子医科学研究所において常法（それぞれの原著を参照）に従い調製された。調製糖鎖の構造は NMR (nuclear magnetic resonance) もしくは酵素化学的手法により決定し、HPLC (high-performance liquid chromatography) もしくはキャピラリー電気泳動により、標準糖鎖としての使用目的において適切な純度

（おおむね 95% 以上）であることを確認した。

試料溶媒はメタノール：純水＝1：1 を基本組成として、1.0～10 pmol/μL の糖鎖濃度で調製した。必要に応じて 0.01～1 mM 酢酸や 5 mM 酢酸アンモニウム、0.3% アンモニア等を添加するか、H⁺ 型イオン交換樹脂に通液するなどした。この処理は、ナトリウムイオンをはじめとするカウンター・イオンのスペクトルへの影響を最小限にし、感度向上を図るものである。試料溶液は 60～360 μL/h の速度で装置に直接注入（インフュージョン法）した。

すべての MSⁿ スペクトルは、負イオンモード ESI (electrospray ionization, エレクトロスプレーイオン化) 法により取得した。その理由は次のとおりである。GAG の代表的特徴ともいえる糖硫酸基は、イオン化時に分子に付与されるエネルギーにより脱離しやすい。これは硫酸基の位置についての情報を取得することの深刻な妨げとなるため、少なくとも MS¹ における脱硫酸化は最小限に抑制する必要がある。その点、目下最も安定した（硫酸基を保持したままイオン化できる）評価を得ているのが ESI 法である^{17), 18)}。また、GAG は硫酸基のみならずカルボキシル基も多く持つために陰性に荷電しやすい。このことは、負イオンモードでの高感度検出を有利にする。なお、MSⁿ におけるフラグメンテーションは、すべて CID (collision-induced dissociation, 衝突誘起解離) 法（低エネルギー CID）を用いた。使用した装置は Esquire 3000 plus (Bruker Daltonics), 4000 Q Trap (Applied Biosystems), LCMS-IT-TOF（島津製作所）であり、図示するスペクトルにおいて特に説明しない限りは Esquire 3000 plus を用いて取得したデータを掲載している。

5. 硫酸化単糖

MSⁿ によって GAG を解析するうえで最も重視したいことは、硫酸基配置を間違えることなく決定できることである。そのためには、硫酸基位置異性体をそのフラグメンテーション・パターンによって識別することは勿論、それが立脚するイオン開裂メカニズムを理解することが重要である。そこでまず、GAG の最小構造単位としてモノ硫酸化単糖を MSⁿ を用いて解析した。そこに見出されるフラグメンテーション則が、二糖以上のオリゴ糖鎖の構造解析の基盤になると考えた。

硫酸化単糖異性体の比較フラグメンテーション解析は、FABMS (fast atom bombardment mass spectrometry, 高速原子衝撃質量分析) を用いて先行報告がなされた。1988 年にメチル-α-ガラクトシドの硫酸基位置異性体が¹⁹⁾、1996 年に HexNAc の硫酸基位置異性体が²⁰⁾、それぞれ FAB-CID-MS/MS (tandem mass spectrometry) によって識別可能であることが示された。いずれの報告も、硫酸基の位置を反映する糖環開裂 (cross-ring cleavage) イオンを検出できることを指摘している。これらは、硫酸基位置決定における MS/MS のポテンシャルを示した先駆けのデータであった。しかしながら、いずれもフラグメンテーション・メカニズムへの言及が充分ではなかった。

(A)

(B)

(C)

Fig. 1. 硫酸化単糖の MSⁿ 解析. (A) 解析に供されたモノ硫酸化単糖の化学構造. (B) モノ硫酸化 *N*-アセチルヘキソサミン (HexNAc) 異性体のプロダクトイオン・スペクトル比較. (C) HexNAc6S の MS³ において生じる [OSO₃H]⁻ イオン (m/z 97) の [OCHCH₂OSO₃]⁻ イオン (m/z 139) に対する相対強度比. 5 回の実験における平均値±標準偏差で示した. 統計学的解析には, 対応のない Student の *t* 検定法を用いた. (文献 21 より許可を得て改変. ©2005 John Wiley & Sons, Ltd.)

(A) C-6 位硫酸

(B) C-4 位硫酸

(C) C-2 位硫酸

(D) C-3 位硫酸

Scheme 4. モノ硫酸化単糖の推定フラグメンテーション・メカニズム. C-6 位硫酸化単糖 (A) および C-4 位硫酸化単糖 (B) では、MS² においてレトロ・アルドール反応に従って環開裂が生じ、^{0,2}A イオンが生成する. C-2 位硫酸化単糖 (C) は同様の反応によって ^{0,2}X イオンを与える²⁵⁾. C-3 位硫酸化単糖 (D) は環開裂を起こさず、二つの機構によって硫酸水素イオン [OSO₃H][−] を与える.

筆者らの実験は ESI-IT (ion trap, イオントラップ) MS を用い、上の知見を掘り下げる目的で行われた²¹⁾。MSⁿ に供したモノ硫酸化単糖 (Fig. 1A) は、硫酸基位置異性体と C-4 エピマー (ジアステレオマー) を含む。例としてモノ硫酸化 HexNAc のプロダクトイオン・スペクトルを Fig. 1B に示した。まず一見して、GlcNAc3S のみが MS² における挙動が例外的であることがわかる。MS² における [OSO₃H]⁻ (*m/z* 97) の単一出現は、実際に測定を行った中では GlcNAc3S と Glc3S, すなわち C-3 位硫酸エステルのみで共通であった。一方の C-4 位と C-6 位に硫酸基を持つ単糖では、^{0,2}A イオン (*m/z* 199, 以下、すべて Domon and Costello の命名法²²⁾ に従う) が主体に生成し、特に HexNAc6S の場合には脱水イオン (*m/z* 282) も併せて観測されることがわかった (この脱水は Hex6S では観測されない; 後述)。このように、ESI-CID-MSⁿ を用いた測定でも硫酸基の位置がスペクトルパターンに明確に反映されること、そして MS² により HexNAc の硫酸基位置異性体が識別される (硫酸化 Hex の場合は 3 段階質量分析で識別される) ことが示された。

一方、C-4 エピマーの GalNAc6S と GlcNAc6S (データ省略) は互いに酷似したプロダクトイオン・スペクトルを与えた。すなわち、プロダクトイオンの *m/z* 値に基づく両者の識別は不可能であった。しかしながら、Fig. 1C に示すように、3 段階質量分析 (MS³) における二つのプロダクトイオン ([OSO₃H]⁻; *m/z* 97 と [OCHCH₂OSO₃]⁻; *m/z* 139) の強度比を算出することによって、再現性をもって両エピマーの識別が可能であった。HexNAc6S のエピ

マーのみならず、Hex6S のエピマー (Gal6S と Glc6S) の比較においても同様の結果が示されたことから、「C-2 位の官能基に非依存的に、*gluco*-6S に比べて *galacto*-6S のほうが [OSO₃H]⁻ が強く出現する」ことの一般性が示された。

ここでイオン開裂メカニズムについて考察する。還元糖のフラグメンテーションにおいて、特に C-3 位が遊離ヒドロキシル基の場合に ^{0,2}A イオンが優勢に生じることはすでに指摘されている^{23), 24)}。われわれが得た結果でも、C-3 位硫酸エステルの場合には ^{0,2}A イオンが生じず、C-4 位および C-6 位硫酸エステルの場合 (すなわち C-3 位が遊離ヒドロキシル基) にはそれが必ず生成した。すなわちこれは既報の指摘に完全に従った。すでに報告されているイオン開裂メカニズムによれば、C-1 位のヘミアセタール性ヒドロキシル基と C-3 位の遊離ヒドロキシル基 (プロトン源) さえ存在すれば、他のヒドロキシル基の置換基の有無によらずにレトロ・アルドール反応によって ^{0,2}A イオンが生成する (Schemes 4A, B)。もし C-2 位に硫酸基があれば、同じ様式の開裂によって ^{0,2}X イオンが生成するだろう (Scheme 4C)^{24), 25)}。以上のことは、還元末端を露出した硫酸化糖の構造を推定する際に有用な規則性であると考えられる。このような硫酸化糖の環開裂は、その開裂反応における電荷の直接関与を考慮し難いため、チャージリモートフラグメンテーション (charge-remote fragmentation)^{26)~28)} であると考えてよい²⁴⁾。

続いて C-3 位硫酸エステルの場合を考える。[OSO₃H]⁻ の生成を説明するメカニズムとしては、求核置換反応と β

Fig. 2. C-3 位硫酸化グルコースのプロダクトイオン・スペクトル (4000 Q Trap). (A) 未標識体を H₂O/MeOH に溶解して測定. (B) 重水素置換体を D₂O/MeOD に溶解して測定. 後者では [OSO₃H]⁻ (*m/z* 97) と [OSO₃D]⁻ (*m/z* 97) の 2 本のシグナルが観測されたことから、二つのフラグメンテーション機構が同時進行していることが示唆された。

Scheme 5. C-6 位硫酸化単糖の CID において、C-2 位の置換基が脱水イオン生成に与える影響。

脱離反応の二つの可能性が考えられる (Scheme 4D). これを明らかにするため、Glc3S の重水素置換体のフラグメンテーション解析を試みた (Fig. 2). すると興味深いことに、MS² において [OSO₃H]⁻ (*m/z* 97) と [OSO₃D]⁻ (*m/z* 98) の両方が観測された. これは、上記二つのメカニズムの両方が成立していることを意味する. さらに気づくことは、これらの脱硫酸化メカニズムは C-4 位および C-6 位の硫酸エステルの場合も成立するにもかかわらず、実際のスペクトル上には [OSO₃H]⁻ がほとんど観測されないことである. これはすなわち、^{0,2}A イオンを生じる環開裂が [OSO₃H]⁻ 生成に比べて格段に速い反応であることを物語っている.

HexNAc6S の MS² における脱水に話を戻す. この水分子の脱離は一分子のみ起こり、二分子以上の脱水は観測されない. その脱水位置は、重酸素水 (H₂¹⁸O) を用いた標識実験によって C-2 位と C-3 位の間であることが確認された²¹⁾. そこで比較として、C-2 位に電子供与性のアミノ基を有する GlcN6S のプロダクトイオン・スペクトルを測定したところ、脱水イオンは生じなかった (Scheme 5). すなわち、C-2 位の電子吸引基が当該脱水反応を促進することが強く示唆された. この脱水イオン生成の有無も、将来の構造解析において有効な指標となる可能性がある.

最後に、ジアステレオマー間の比較 (Fig. 1C) について触れる. MS³ において共通に観測された二つのプロダクトイオン ([OSO₃H]⁻ と [OCHCH₂OSO₃]⁻) は、*gluco*-配置と *galacto*-配置の由来のいかんにかかわらず、同一のメカニズム (Scheme 4A) に則って生成すると考えられる. また、[OSO₃H]⁻ の生成は C-4 位ヒドロキシル基の立体配置の影響を受けないことも同時に推測される. この過程について energy-resolved mass spectrometry (ERMS) 法^{29), 30)} 様の比較解析を行ったところ、両立体配置のプリカーサーイオンが崩壊を開始する CID エネルギー値と、プロダクトイオン生成がプラトーに達する CID エネルギー値は、ともに明確な差を与えなかった (データ省略). したがって Fig. 1C の結果は、熱力学的に相対的に安定な *gluco*-配置由来のプリカーサーイオン (^{0,2}A) が、*galacto*-配置に比べて速度論的にやや有利な遷移状態を経て [OCHCH₂OSO₃]⁻ イオンを与えた、ことの反映であると推察された. ここでは、「糖ヒドロキシル基のエピマーはそれに特異的なプロダクトイオンを与えないが、特定のプロダクトイオンの強度比に差を生じる」という仮説を構築しうる. これは後に、多くの実験結果によって支持されることになる.

この項では硫酸化単糖の MSⁿ におけるフラグメンテーションについて、その検討内容を詳しく述べた. 単糖は複雑な糖鎖の一構成単位に過ぎないが、それでもイオン開裂

メカニズムを類縁化合物と詳細に照らし合わせることで、オリゴ糖鎖にも適用可能と思われる、一般性の高いフラグメンテーション則を見いだせることがわかった.

6. ウロン酸をもたない硫酸化 GAG~KS

ケラタン硫酸 (KS) は GAG の中では特殊な構造をもつ (Scheme 1). 構成単糖は GlcNAc と Gal で、これらが交互に結合することにより、いわゆるポリ-*N*-アセチルラクタサミン構造を成す. GAG の中では唯一ウロン酸 (カルボキシル基) をもたない. 生体由来のものは GlcNAc の C-6 位に必ず硫酸基が結合し、それに加えて Gal の C-6 位がところどころに硫酸化されている. 糖鎖長はもちろんのこと、その硫酸化パターンと、非還元末端に結合するシアル酸に KS 鎖の生物学的な意義が込められていると考えられている. そこで筆者らは前項で得た知識を足掛かりに、フラグメンテーション則に立脚した普遍性の高い KS の配列解析法を確立することを目指した.

KS オリゴ糖鎖の網羅的な MS は、FAB-CID-MS/MS を用いて 2000 年に報告された³¹⁾. この報告では、正イオンモード MS² においてグリコシド結合の切断が優先的に起こること、また負イオンモード MS² では環開裂イオン (^{0,2}A_r および ^{2,4}A_r; ここでは *r* は還元末端糖を指す) と脱水イオンが優勢に生じること、が示された. 昨今、酸性糖鎖の MS は負イオンモードで行われることが当然となりつつあるが、当該報告では正負両イオンモードで相補的に構造情報を取得できることが示唆されており興味深い.

この報告に追随し、筆者らは ESI-ITMS を用いて 10 種類超の KS 由来オリゴ糖鎖 (2~6 糖) の MSⁿ を行った⁸⁾. 本項ではテトラ硫酸化 4 糖のスペクトルを例示し (Fig. 3), シアル酸結合体などの例外構造は除外して解説する. KS オリゴ糖鎖の負イオンモード ESI-MS を最適化された条件下で行うと、硫酸基の脱離をほとんど認めることなく、硫酸基数 (*m*) に等しい価数の脱プロトン化分子 [M-*m*H]^{m-} を単一シグナルとして観測できる (注: 筆者の経験上、価数分布に装置間差が現れる場合がある). これに基づく、まず MS¹ において、容易に被検オリゴ糖鎖の糖組成を算出できる (例示 4 糖の場合、2HexNAc, 2Hex, 4sulfates). この [M-*m*H]^{m-} をプリカーサーイオンとして MS² を行うと、ほぼ全種の KS オリゴ糖鎖が環開裂イオン ^{0,2}A_r と脱水イオン [M-H₂O-*m*H]^{m-} を与えた. この観測事実は、前項の HexNAc6S のフラグメンテーション則を踏襲している. さらに ^{0,2}A_r イオンをプリカーサーイオンとして MS³ を行うと、今度は高い強度で ^{2,4}A_r イオンが生じた. このとき同時に [OCHCH₂OSO₃]⁻ イオン (*m/z* 139) が観測されれば、還元末端糖の C-6 位が硫酸化され

Fig. 3. KS4 糖 (モノアイソトピック質量 1068.1) のプロダクトイオン・スペクトル (LCMS-IT-TOF). MS¹ では硫酸基数に等しい 4 価の脱プロトン化分子のみが観測された (m/z 266.0). これを開裂させると (MS²), 先の HexNAc6S のフラグメンテーション則に従い, $^{0.2}A_4^{4-}$ イオン (m/z 240.8) と脱水イオン (m/z 261.5) のみが生成した. さらに $^{0.2}A_4^{4-}$ イオンのフラグメンテーションを行うと (MS³), $^{2.4}A_4^{3-}$ イオン (m/z 274.7) と, その際に遊離した $[OCHCH_2OSO_3H]^-$ イオン (m/z 139.0) が観測された. そして $^{2.4}A_4^{3-}$ イオンに対して MS⁴ を行うと, 一連のグリコシド結合がすべて開裂し, B/Y イオンを与えた. すなわち, MS⁴ データに基づいて KS オリゴ糖鎖の配列決定が可能であることが示された. ここで, MS³ で観測された $[OCHCH_2OSO_3H]^-$ イオンが MS⁴ に認められなかったことは, 当該イオンが還元末端糖に由来することを示す. MS⁴ で生じた各 B イオンを MS⁵ に供したが, 硫酸基結合位置を C-6 位であると想定しうるプロダクトイオンは生成しなかった.

ている証拠になる (Scheme 6, 下段). 実は, ここまでの 2 段階の CID-MS では, 糖鎖末端アルデヒドが環開裂のトリガーの役目を果たした. しかし, 次の段にはそのような反応点が存在しない. そこで $^{2.4}A_r$ イオンの 4 段階質量分析 (MS⁴) を試みたところ, 面白いことに B/Y イオン主体のグリコシド結合の切断が糖鎖全体にわたって生じた. そ

れぞれのプロダクトイオンの m/z 値と価数はその硫酸基数を反映しており, しかも還元末端側には一定の質量を与えるタグ様構造が残っている. そのため, 骨格構造が二糖単位の繰返しであるものの, プロダクトイオンの末端方向を間違えることなく糖配列を決められることが判明した. この一連のフラグメンテーション則は, 2 糖から 6 糖

Scheme 6. KS オリゴ糖鎖の MS² および MS³ におけるフラグメンテーション機構⁸⁾. 還元末端 GlcNAc の C-6 位が硫酸化されていれば ($R=SO_3^-$), MS³ において $[OCHCH_2OSO_3]^-$ イオン (m/z 139) が観測される. (文献 8 より許可を得て改変. ©2006 American Chemical Society)

Scheme 7. CID における三酸化硫黄 (SO_3) 分子の脱離. 硫酸基は脱プロトン化していれば, 低エネルギー CID において比較的安定である. しかしながら遊離酸の場合, CID 下で容易に SO_3 を失い (-80 Da), ヒドロキシル基に変換される³²⁾.

までのさまざまな硫酸基数の KS オリゴ糖鎖に共通であることを確認した.

このようにして確立したフラグメンテーション則に基づく KS 配列解析法であるが, その適用においては二つの制約がある. 第一に, MS² のフラグメンテーションに供される脱プロトン化分子は, すべての硫酸基が脱プロトン化していなければならない. 価数の小さい, すなわち遊離酸の硫酸基をもつプリカーサーイオンを CID に供すると, 当該部位での三酸化硫黄 (SO_3) の脱離 (Scheme 7) が極めて優先的に起こり³²⁾, 結果として硫酸基の配置に関する情報を失う⁸⁾. また, $0,2A_r$ イオンも得られず, MS³ 以降の解析が成り立たなくなる. 第二に, 上記のプロトコールは GlcNAc (硫酸化されていてもよい) の還元末端を有する KS 糖鎖についてのみ有効である. Scheme 4A および Scheme 6 に示すように, $0,2A_r$ イオンの生成のためには原則的に還元末端が必要である. 例えばアグリコン導入により還元末端構造を閉じると, Fig. 4 のように MS² の段階で $0,2A_r$ イオンに代わり B/Y イオンを生じる. これを見ると, MS⁴ までの解析を行わずに済みそうであることから有利なことにように映るが, 被検試料を調製する段階において硫酸基をインタクトに保持したままアグリコンを導入することは合成化学的に難しい. また, 最後にも述べるが, GAG の酵素消化で得るオリゴ糖鎖について未標識のまま MSⁿ を行いたいと考える筆者の研究スタンスにも沿わない.

おわりに, 未解決の問題についても述べておく. それは,

Fig. 4. KS2 糖メチルグリコシド (モノアイソトピック質量 557.1) のプロダクトイオン・スペクトル. プリカーサーイオンは $[M-2H]^{2-}$ (m/z 277.5). 還元末端にアグリコンが存在すると, MS² においてグリコシド結合の切断が主体に生じる.

MS⁴ で観られるグリコシド結合の開裂結果がなぜ B/Y イオン主体なのかということの理由と, その B/Y イオンを 5 段階質量分析 (MS⁵) に供しても硫酸基位置が C-6 位であると完全に絞り込めなかったという事実, の 2 点である. 前者については, 当該グリコシド結合のイオン開裂メカニズムの解明に寄与すると推測される, 硫酸基位置の異なる誘導体を合成し, その MSⁿ を行うことによって考察を深める必要があるだろう. 一方, 後者の打開策としては, 硫酸化単糖グリコシドを入手し, イオン化後の CID によって B イオンを装置内に生成せしめる. さらに次段の CID においてフラグメンテーション則を導き, それをもって上記 MS⁵ の結果を演繹的に解釈すればよい. これについては今後の実施課題である.

7. 非硫酸化 GAG~CH, HA, NAH

前項までは硫酸化糖のフラグメンテーション則について記述した. 本項では非硫酸化 GAG に焦点を当てる. 第 2 項にも記したとおり, 一般的な GAG の生合成ではアミノ

糖とウロン酸の繰返し糖鎖が先に形成され、そののちに硫酸基が導入される。ここで必要性を感じることは、硫酸化 GAG の前駆体構造にあたる非硫酸化 GAG を MSⁿ によって解析することである。それによって明らかになるフラグメンテーション則を考察することが、構造が一層複雑な硫酸化 GAG を解析する前段階として不可欠であると考えた。解析対象としたのは、コンドロイチン (CH), ヒアルロンタン (HA), *N*-アセチルヘパロサン (NAH) の三つの骨格のオリゴ糖鎖である。これらの繰返し構造単位を改めて示す。

CH: $-4\text{GlcA}\beta 1\rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1-$

HA: $-4\text{GlcA}\beta 1\rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1-$

NAH: $-4\text{GlcA}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\alpha 1-$

これらの GAG は、糖鎖長が等しければ、分子量が同一の構造異性体である。従来から、非硫酸化 GAG の MSⁿ における挙動に関しては知見がほとんどなかった。そこで本項では、まずそれぞれの構造異性体が MSⁿ によって識別されるか否かを確認する。さらに、それを支持するフラグメンテーション則を可能な限り明らかにすることを試みる。

非硫酸化 GAG オリゴ糖鎖の ESI-MS では、第 6 項に記述した硫酸基 (KS) とは異なり、カルボキシル基のすべてが脱プロトン化するとは限らない。糖鎖長が長くなるほどカルボキシル基数よりもイオン価数が少なくなる傾向がある^{33), 34)}。このことが、MS² におけるフラグメンテーション則の考察をやや難しくする側面がある。また、それに関連してプリカーサーイオンの m/z 値が大きくなる傾向も発生することから、四重極型装置を用いる場合には測定結果が low mass cut off 効果³⁵⁾の影響を受けることがあり、解釈に注意が必要である。

7.1 不飽和オリゴ糖鎖

「不飽和オリゴ糖鎖」とは非還元末端に不飽和ウロン酸 (4-deoxy- α -L-threo-hex-enopyranosyluronic acid) を結合するものをいう。それは一般に細菌由来の脱糖酵素を用いた GAG の分解によって調製される。非硫酸化かつ不飽和の GAG オリゴ糖鎖の MSⁿ の測定例としては、まず 2003 年の HA の 4 糖から 12 糖までのデータが挙げられる³⁶⁾。その報告には、プリカーサーイオンがフラグメンテーションによって GlcNAc 残基を一つ失うことのみが記載されている。

より具体的なフラグメンテーション規則性を最初に論じたのは、NAH の 2 糖から 20 糖までを解析した筆者らの報告³⁷⁾である。Scheme 8 に示すように、グリコシド性酸素原子を GlcNAc 残基が受け取る様式で、規則的なフラグメンテーションが起こることが確認された。この開裂は Scheme 9 のように、GlcA のピラノース環の反転を前提としたチャージ・インデュースト・フラグメンテーション (charge-induced (mediated) fragmentation)²⁸⁾ によって説明できる。また、前項までに記述したフラグメンテーション則のとおり、^{0,2}A_r イオンと脱水イオンも併せて観察された。仮に、この規則的な NAH の構造に変化が生じ

Scheme 8. NAH オリゴ糖鎖のフラグメンテーションにおけるグリコシド結合開裂の規則性。(文献 37 より転載。©2006 John Wiley & Sons, Ltd.)

るならば、MS² におけるプロダクトイオンの m/z 値もその箇所を境にして変化することが予想される³⁸⁾。すなわち当該報告では、単調な構造が単調なデータを与えることの重要性も強調したつもりである。

次に、CH, HA, NAH の不飽和オリゴ糖鎖間で、フラグメンテーション・パターンの差がどのように現れるかを確かめた。ここでは構造が単純な 2 糖と 4 糖³⁹⁾の結果を示す (Fig. 5)。比較的鎖長の短い非硫酸化 GAG オリゴ糖鎖では、ESI-MS² において還元末端の HexNAc を失った C イオンが高い強度で出現する (ベース・ピークであることが多い) のが特徴である。おそらくこのグリコシド結合が化学的に最も不安定であることの現れであろう。これについては、筆者らが比較解析したいずれのオリゴ糖鎖にも共通であった。

ここでまず、NAH と HA を比較する。GlcA のグリコシドが $\beta 1\rightarrow 4$ 結合 (NAH) と $\beta 1\rightarrow 3$ 結合 (HA) の場合とで、スペクトル上に ^{0,2}A_r イオンの有無という明確な差が現れる。すなわち、C-3 位ヒドロキシル基へのグリコシド結合が ^{0,2}A イオン生成反応の妨げになることが示されている。また、NAH 4 糖に観測された C₂ イオンおよび Z₂ イオン (m/z 378) は、GlcNAc の α -アノマーに特徴的なものと考えられた。実際、NAH 6 糖の MS² においてもこれに相当するプロダクトイオンが観測される。しかしながら、HexNAc が β -アノマーである HA と CH ではそれが生成しない。このことは、中性糖鎖の MS² において $\alpha 1\rightarrow 4$ 結合が $\beta 1\rightarrow 4$ 結合よりも容易に開裂するとして過去の報告とも矛盾しない^{29), 40)}。以上のことから、等しい鎖長の NAH と HA のオリゴ糖鎖は、^{0,2}A_r イオンと α -グリコシド切断イオン (C/Z イオン) の有無に基づいて識別可能であると結論した。

続いて CH と HA の比較結果について述べる。両者の構造の違いは HexNAc の C-4 位ヒドロキシル基の立体配置のみである。まず、2 糖の MS² で生成したのは両構造とも C₁ イオン (m/z 175) のみであった。これでは識別が不可能であるため、この C₁ イオンの生成における CID エネルギー依存性を確認した (データ省略)。すると、ESI-ITMS では両糖鎖に全く差が認められなかったが、ESI-QqLIT (quadrupole-linear ion trap; 四重極-リニアイオントラップ) MS ではそれらを明確に識別することができた。

(A) Formation of B/Y ions

(B) Formation of C/Z ions

Scheme 9. NAH オリゴ糖鎖の推定フラグメンテーション・メカニズム. グルクロン酸残基のピラノース環の反転を想定することにより, チャージ・インデュースト・フラグメンテーションによる説明が可能となる.

この, 装置間で異性体識別可否に差が生じた理由はわからない. 一方, 4 糖の比較ではどちらの骨格にも特異的なプロダクトイオンが現れた. しかし, これらに相当するプロダクトイオンが 6 糖以上には見られなかったため, その一般性は低いものと判断した. CH と HA の不飽和オリゴ糖鎖を見分ける普遍的な MSⁿ 手法は, 現在も未確立である. 各鎖長の CH 不飽和オリゴ糖鎖を高効率に調製するのはもともと難度が高いため, この課題については飽和オリゴ糖鎖で得られる知見に基づいて解決していくことになるだろう.

7.2 飽和オリゴ糖鎖

「飽和オリゴ糖鎖」とは, 非還元末端に結合するウロン酸残基が不飽和型でない, すなわち炭素-炭素二重結合をも

たないウロン酸であるものをいう. 飽和オリゴ糖鎖は, 哺乳動物などを起源とする加水分解酵素を用いた分解によって調製されることが多い⁴¹⁾. 現在 HA と CH について, その飽和オリゴ糖鎖の調製法が確立している^{42), 43)}.

飽和 HA オリゴ糖鎖の ESI-MSⁿ データは, 2003 年に発表された⁴⁴⁾. そこではプロダクトイオンの帰属は難しいとしながらも, 末端糖の切断を基本とする規則性を指摘している. また CH オリゴ糖鎖については, 2008 年に別の研究者らによって 16 糖までの MS² データが取得された⁴⁵⁾. それによると, 観測されたプロダクトイオンは, すべての糖鎖長において還元末端 GalNAc を失った C イオンであった. 当該報告では, 飽和 CH オリゴ糖鎖と, 同じ鎖長の HA オリゴ糖鎖との間でプロダクトイオン・スペクト

Fig. 5. NAH, HA, CH それぞれの不飽和 2 糖 (モノアイソトピック質量 379.1) および不飽和 4 糖 (同 758.2)³⁹⁾ のプロダクトイオン・スペクトル (MS²). プリカーサーイオンはそれぞれ 1 価の脱プロトン化分子であり, スペクトル中にその m/z を示した (▼).

Fig. 6. 飽和 CH4 糖 (A) および飽和 HA4 糖 (B) (ともにモノアイソトピック質量 776.2) のプロダクトイオン・スペクトル (MS²). プリカーサーイオンは 2 価の脱プロトン化分子 (m/z 387) であり, スペクトル中にその m/z を示した (▼). (C) に構造を示す. (文献 39 より転載. ©2007 The Mass Spectrometry Society of Japan)

—269—

Fig. 7. CH, HA それぞれの飽和4糖（モノアイソトピック質量 776.2）および飽和6糖（同 1155.3）のプロダクトイオン・スペクトル (MS²). 4糖のプリカーサーイオンは1価の脱プロトン化分子 (m/z 775), 6糖のプリカーサーイオンは2価の脱プロトン化分子 (m/z 576.5) であり, スペクトル中にその m/z を示した (▼).

いるが³⁹⁾, 詳細は未検討である.

続いて, 4糖の1価プリカーサーイオンおよび6糖の2価プリカーサーイオンのフラグメンテーションの比較を行った (Fig. 7). いずれも還元末端 HexNAc を失った C イオンがベース・ピークである. ここでもまた, CH と HA の間でプロダクトイオンの m/z 値に違いはない. しかし, 4糖と6糖ともに C_{ev} (ev: 偶数を示す) イオンの相対強度が $HA > CH$ であることに気づく. このことは, 「プリカーサーイオンの価数 < 分子中のカルボキシル基数」の条件下, より長鎖のオリゴ糖鎖であっても両骨格構造を判別する規則性として利用できそうである (注: 4糖のスペクトルで C_2 イオンおよび Y_2 イオンとして帰属されるシグナルは, Y_2 イオンの寄与が僅少であることを確認済みである).

この C_{ev} イオンは, Scheme 11 に示すチャージ・インデュースト・フラグメンテーション機構で生成すると推定される. このイオン開裂において, HexNAc の C-4 位ヒドロキシル基の立体効果はおそらく直接的には及ばないだろう. したがってスペクトルにおけるプロダクトイオンの相対強度の差は, HexNAc 残基の熱力学的安定性の差を反映していると思われる. ただし, ここでの強度の差は, 還元末端 HexNAc を遊離した C イオンをベース・ピークとした場合の相対的關係であるに過ぎないことを断っておく.

以上のように, ヒドロキシル基エピマー糖鎖の MSⁿ による識別は, 特定のプロダクトイオンの検出に依存するこ

Scheme 11. CH オリゴ糖鎖および HA オリゴ糖鎖のヘキソサミニド結合の開裂メカニズム. グルクロン酸残基のピラノース環の反転を経由し, C イオンのみを与える.

とはできず, 相対強度を指標とするほかはなさそうである. しかもその相対強度に差を生じるプロダクトイオンは, プリカーサーイオンの価数により異なることがわかった. 本題材で気づくことのできたイオン相対強度の差は, 残念ながら明瞭なものではなかった. よって実際の構造解

析シーンを想定するならば、現状では手元に標準糖鎖を持たない限り、この異性体識別は非常に困難ということになる。これについては、より高い次元で一般化が可能な方法を求めている。

8. 不飽和二糖

本項から、硫酸基とカルボキシル基の両方を有する GAG のフラグメンテーションを扱う。これら両方の酸性基を有する GAG 糖鎖のうち、構造が単純なものとして不飽和二糖 (Scheme 12) を思いつく。文献的に見ると、LC-MSⁿ を用いて不飽和二糖を定量分析した報告 (いわゆる二糖分析) はかなりの数にのぼる³²⁾。しかし定量目的で MSⁿ が用いられる場合、そこで生じるプロダクトイオンの m/z 値や強度値は注目されても、フラグメンテーション則やそのメカニズムに触れられることは全くない。すなわち、不飽和二糖を純粋にフラグメンテーション解析したという報告には乏しいという現状をまず知っておく。

1990 年代前半、さまざまな GAG の不飽和二糖について網羅的に FAB-CID-MS² が行われ、相次いで報告された^{46)~48)}。いずれの研究結果も、MS² のプロダクトイオンスペクトルにおいて、グリコシド切断イオンの出現パターンと環開裂イオンに着目することにより、不飽和二糖の硫酸基位置異性体をすべて識別できることを示していた。当時の結果は、GAG の構造解析分野に MS² の可能性を大きくアピールすることとなった。

やがて、HPLC やキャピラリー電気泳動との接続が可能な ESI-MS が普及することになり、改めて ESI-CID-MSⁿ のデータが取得され始めた。2000 年と 2001 年にそれぞれ別の研究者が、CS 骨格の不飽和二糖異性体 (Δ UA-

GalNAc4S と Δ UA-GalNAc6S; Δ UA は不飽和ウロン酸残基を示す) のプロダクトイオン・スペクトルを報告している^{49), 50)}。そこで共通に観られたフラグメンテーション・パターンは、のちに筆者が取得した結果ともまた共通であった¹⁸⁾ (Fig. 8)。すなわち、 Δ UA-GalNAc4S の MS² では Y₁ イオン (m/z 300) と ^{0,2}X₁ イオン (m/z 342) が生じ、 Δ UA-GalNAc6S では Z₁ イオン (m/z 282) が生じる。これは、さきに触れた負イオンモード FAB-CID-MS² の結果⁴⁶⁾でも同様であった。したがってこれらのフラグメンテーション則は、極めて高い普遍性をもっていることがわかる。このイオン開裂メカニズムについては、以下のように考察した。 Δ UA-GalNAc4S では、硫酸基に近接する Δ UA 残基 C-2 位のヒドロキシル基が C-1 位との間にオキシラン環を形成し Y₁ イオンを生じる (Scheme 13A)。一方の Δ UA-GalNAc6S では、GalNAc 残基の C-4 位ヒドロキシル基が起点となって C-3 位との間にオキシラン環を形成し、Z₁ イオンを生じる (Scheme 13B)。 Δ UA-GalNAc4S のスペクトルのみに認められた ^{0,2}X₁ イオンは、本来は Δ UA-GalNAc6S のフラグメンテーションでも生じうる^{24), 51)}、後者のオキシラン環形成反応のほうがより速く進行するために、 Δ UA-GalNAc6S では観測されない。以上のように推察した。CS のウロニド結合は β 1 $\rightarrow$ 3 結合であるために ^{0,2}A₂ イオンは生じない。したがってグリコシド結合の開裂が主体に起こることは容易に納得できる。ちなみに、 Δ UA-GalNAc4S の MS² で生成した Y₁ イオンを MS³ に供すると、GalNAc4S 標準化合物の MS² (第 5 項) と酷似したスペクトルが得られる (データ省略)。このように MSⁿ の性能を活用することで、硫酸基の結合位置を同定する根拠を積み重ねることができる。

CS/DS骨格不飽和二糖

Disaccharide	R ₁	R ₂	R ₃	Fw*
Δ UA-GalNAc	H	H	H	379.1
Δ UA-GalNAc4S	SO ₃ H	H	H	459.1
Δ UA-GalNAc6S	H	SO ₃ H	H	459.1
Δ UA2S-GalNAc6S	H	SO ₃ H	SO ₃ H	539.0
Δ UA-GalNAc4S6S	SO ₃ H	SO ₃ H	H	539.0
Δ UA2S-GalNAc4S6S	SO ₃ H	SO ₃ H	SO ₃ H	619.0

* Monoisotopic

Hep/HS骨格不飽和二糖

Disaccharide	R ₄	R ₅	Y	Fw*
Δ UA-GlcNAc	H	H	Ac	379.1
Δ UA2S-GlcNAc	SO ₃ H	H	Ac	459.1
Δ UA-GlcNAc6S	H	SO ₃ H	Ac	459.1
Δ UA-GlcNS	H	H	SO ₃ H	417.0
Δ UA2S-GlcNAc6S	SO ₃ H	SO ₃ H	Ac	539.0
Δ UA2S-GlcNS	SO ₃ H	H	SO ₃ H	497.0
Δ UA-GlcNS6S	H	SO ₃ H	SO ₃ H	497.0
Δ UA2S-GlcNS6S	SO ₃ H	SO ₃ H	SO ₃ H	577.0
Δ UA2S-GlcN6S	SO ₃ H	SO ₃ H	H	497.0
Δ UA-GlcN6S	H	SO ₃ H	H	417.0
Δ UA2S-GlcN	SO ₃ H	H	H	417.0
Δ UA-GlcN	H	H	H	337.1

* Monoisotopic

Scheme 12. CS/DS 骨格および Hep/HS 骨格の代表的な不飽和二糖の構造。

Fig. 8. CS 骨格不飽和 2 糖 Δ UA-GalNAc4S および Δ UA-GalNAc6S の MS および MS² スペクトル. [文献 18 より許可を得て改変. ©2006 FCCA (Forum: Carbohydrates Coming of Age)]

(A) Δ UA-GalNAc4S

(B) Δ UA-GalNAc6S

Scheme 13. Δ UA-GalNAc4S (A) および Δ UA-GalNAc6S (B) の推定フラグメンテーション・メカニズム. GalNAc の C-4 位に硫酸基が存在する場合 (A), 不飽和ウロン酸の C-2 位ヒドロキシル基が基点となってオキシラン環が形成され, Y₁ イオン (m/z 300) を生じる. 一方, GalNAc の C-6 位に硫酸基が存在する場合 (B), GalNAc の C-4 位ヒドロキシル基が C-3 位との間にオキシラン環を形成し, Z₁ イオン (m/z 282) を生じる.

Hep/HS 骨格についての解析例も紹介する. 市販の 12 種類の Hep/HS 骨格不飽和二糖 (Scheme 12) について, ESI-MSⁿ によるフラグメンテーションを詳細に検討した報告²⁴⁾がある. すべてのプロダクトイオンが帰属され, ミクスチュア分析において硫酸基位置異性体を識別するためのいわゆる ‘diagnostic ion’ も決められた. 硫酸基の位置は, グリコシド切断イオン, 環開裂イオン, 脱硫酸化イオンの出現パターンから同定が可能であった. また, これらの二糖のグリコシド結合は β 1 $\rightarrow$ 4 結合であることから, すべての二糖の MS² において ^{0.2}A₂ イオン (スルファミド基を有するものについては ^{0.2}X₀ イオン) が観測されている. 脱プロトン化分子からの脱水イオンもすべての二糖に生成した. ただし, 還元末端糖の C-2 位が遊離アミノ基 (–NH₂) の二糖については, その相対強度は極めて低かった. 当該

報告が評価される点は, 試料糖鎖の重水素 (D) 置換および重酸素 (¹⁸O) 置換後のプロダクトイオン・スペクトルを取得し, その考察に従って各プロダクトイオンの生成メカニズムを提示したことである. また, それらのメカニズムがチャージ・リモート・フラグメンテーションであることも結論している. このような豊富な知見をもとにして, 同著者らは 2005 年に Hep/HS オリゴ糖鎖の配列解析支援ソフトウェアを開発し, HOST (Heparin Oligosaccharide Sequencing Tool) と名づけた⁷⁾. またそれとは別に, GAG の酵素分解溶液 (構成不飽和二糖のミクスチュア) を, HPLC 分離を行わず直接 ESI-IT 質量分析計に注入することによる二糖分析法も新規に確立した. その手法を使い, 起源の異なる Hep/HS の二糖組成プロファイリングや脱硫酸化酵素の反応産物解析などを達成している⁵²⁾. なお

HOSTの詳細については当該原著を参照いただきたい。同ソフトウェアは公開され無償で利用できる。

不飽和二糖の分析は、GAGの組成 (composition) を明確にすることはできるが、糖配列に関する情報は一切得られない。また、ウロン酸のC-5エピマーについての情報も得ることができない。したがって、不飽和二糖のMSⁿにおけるフラグメンテーションの特徴が明らかにされると、次にMSⁿが解析対象とすべき相手は長鎖GAG鎖ということになる。不飽和二糖を解析対象にして蓄積した細かな知見が、より長鎖かつ複雑なGAGに通用するものであるのか否か。あるいは通用させるためにどのような発想が必要になるのか。それが、この後に述べることの焦点になる。

9. ウロン酸をもつ硫酸化GAG~CS, Hep/HS

本カテゴリーに分類されるGAGは、各種CSならびにDS, Hep/HSである。なかでもHep/HSは、硫酸基密度が高い糖配列を含むことから電荷反発による脱硫酸化を起こしやすい特徴があり、それを起こさないイオン化条件を探索する段階から分析難度が高い。加えて、O-硫酸構造だけでなくスルファミド (–NH₂SO₃[–]) 構造も有し、さらにウロン酸C-5エピマーも含むという著しい ‘heterogeneity’ を呈することから、その解析はGAGの中では最高難度と考えるとよい。実際、ESI-MSⁿによりHep/HSオリゴ糖鎖のフラグメンテーション則を明らかにしようとする試みはあるものの^{53), 54)}、実用に耐える普遍性を獲得するまでには至っていない。これについては今後何らかの方法論上のブレークスルーが必要になる。

以下、CSオリゴ糖鎖 (原則的には4糖以上) のフラグメンテーションについて述べる。CSは、その糖配列の多様性に照らした生理活性あるいは疾病との関連性が、多くの生化学者によって研究されている⁵⁵⁾。当然、MSⁿによるCS配列解析法の確立に対する期待は高い。まず1995年、抗CSモノクローナル抗体 (MO-225) の認識エピトープである、トリ硫酸化およびテトラ硫酸化4糖のFAB-CID-MS²の結果が報告された⁵⁶⁾。そこで観察されたフラグメンテーション・パターンは、Scheme 14に示すように構造が類似した二つのオリゴ糖鎖に共通であった。この結果で着目したいのは、①GlcA2S-GalNAc6Sのグリコシド結合の開裂において、グリコシド酸素の両側が開裂し得てBイオンとC/Zイオンを生じること、②GlcA2Sが特徴的な環開裂を起こしていることから、それに基づいて硫酸基位置

とグリコシド結合位置を明確に決定しうること、である。①の開裂様式はGalNAc6S構造を反映する規則性であると推測されるため、のちにESI-MS²の結果と併せて議論する。②については、今後そのフラグメンテーション則の普遍性を高めていくうえで、C-5エピマーのIdoA2Sとの識別可否が鍵になるだろう。興味深いことに、当該論文ではFAB-MSにおいて観測されたC₂イオンのCID-MS²も実施している。Scheme 14の2種類の4糖に由来するC₂イオンは、それぞれΔUA-GalNAc4SとΔUA-GalNAc4S6Sの構造に相当すると考えられる。そして、それら (C₂イオン) をプリカーサーイオンとした際のフラグメンテーション・パターンは、相応する構造の標準不飽和二糖のFAB-CID-MS²のパターンとよく一致した。すなわち、前項の不飽和二糖に関する知見が、より長い糖鎖の解析に貢献するという、理想的な構造解析が達成された。

次に、CS骨格の硫酸基位置異性体に着目したESI-MS²の研究を紹介する。CSを加水分解酵素 (ほ乳類精巢由来ヒアルロニダーゼ) を用いて適切な条件下で限定分解すると、4糖から6糖、8糖…と2糖ごとの長さのオリゴ糖鎖の混合物が得られる。2001年、市販のCSAおよびCSCについてこれを行いゲルろ過クロマトグラフィーでサイズ分画した4糖、6糖、8糖の画分が、それぞれESI-CID-MS²の比較解析に供された (原著では不飽和オリゴ糖画分も調製しMS²を行っている)⁵⁾。ここで「画分」としたのは、天然由来のCSは配列が均一ではないため (第2項で述べた)^{57), 58)}、ここで解析されるオリゴ糖「画分」はGlcA-GalNAc4SやGlcA-GalNAc6Sの構造がそれぞれ均一に

Scheme 15. 既報^{5), 6)}におけるCSオリゴ糖鎖画分のESI-MS²におけるフラグメンテーション・パターン。CSAおよびCSCから調製された飽和オリゴ糖鎖画分は、MS²においてB/Yイオンを主体に生成する。そのプロダクトイオンの相対強度をCSA由来とCSC由来のオリゴ糖鎖画分で比較すると、CSA > CSCの傾向が顕著である。

Scheme 14. モノクローナル抗体MO-225によって認識されるCS由来4糖 [ΔUA-GalNAc4S ± 6S-GlcA2S-GalNAc6S] のFAB-CID-MS²におけるフラグメンテーション・パターン⁵⁶⁾。

繰り返した分子のみで構成されない, という意味合いがある. まず, 上記すべてのオリゴ糖画分のプロダクトイオン・スペクトルにおいて, 糖鎖中のグルクロニド結合が主体に開裂し, 一連の B/Y イオンを生じることが確かめられた (Scheme 15). これが CS 骨格の第一のフラグメンテーション則といえそうである. この規則性は, 硫酸基をもたない CH オリゴ糖鎖が MS² において C イオンを与えるという, 第 7 項に記した知見と異なる点において興味深い. さらに, そこで観られた B イオンの相対強度については, CSC 画分に比べて CSA 画分のほうが例外なく高い, という第二の規則も観られた. この第二の規則は, 後に 12 糖まで従うことが確認された⁶⁾. 続いて行われたことは, 糖鎖長の等しい CSA と CSC の画分を種々の割合で混合して MS² データを取得することである. すると, いくつかの B/Y イオンにおいて, 混合比に対応して相対強度の変化が認められた. これはすなわち, 今後どのような CS オリゴ糖鎖画分を解析しても, 各 B/Y イオンの強度の測定によって対応するグリコシド結合部分の CSA/CSC 構造の含有比が判明し, そのまま配列の推定につながる, という仕組みである. 後に, ウロン酸エピマーの DS を含めた同様の混合解析も, 同研究者らが報告した⁶⁾. この一連の

研究の特徴は, さまざまな比率で異性体オリゴ糖画分を混合した試料を MSⁿ に供することによって一般則を引き出した, という点にある. この工夫によって, 調製難度の高い均一配列の標準オリゴ糖鎖を取得する労力を回避したという点で, 発想がユニークであるとともに一定の説得力もある. しかし, 配列が均一な糖鎖のフラグメンテーション挙動を基盤としていないこの配列解析法は, 目的にもよるだろうが, 構造同定手法として決定力を欠くことも否めない. この研究は, GAG の標準物質が容易には得られないことによる研究上の制約を如実に示したと言えるかもしれない.

ここから筆者の取り組みについて述べる. 筆者は, フラグメンテーション則に基づいて CS の配列解析を達成するためには標準糖鎖が均一構造であるべき, という点にこだわった. すなわち, CSA ユニット (GlcA-GalNAc4S) および CSC ユニット (GlcA-GalNAc6S) の組成がそれぞれ 100 パーセントである均一配列のオリゴ糖鎖を調製し (Scheme 16), ESI-IT-MSⁿ に供した. それぞれの CS オリゴ糖鎖の MS¹ では, 分子内の硫酸基数に等しい価数の脱プロトン化分子が主体に観測された (データ省略). すなわち, 基本的にはすべての硫酸基が脱プロトン化し, ウロン

(A) Sequence-homogeneous CSA oligosaccharides

Commercial CSA (sturgeon, approx. 90 % of GlcA-GalNAc4S sequence)

(B) Sequence-homogeneous CSC oligosaccharides

Commercial CH

Chemical sulfation → Sulfated CH (GlcA-GalNAc6S sequence is formed mainly)

n=0: Disaccharide (Fw. 477.1)
n=1: Tetrasaccharide (Fw. 936.2)
n=2: Hexasaccharide (Fw. 1395.2)

Scheme 16. ESI-MS² に供した均一配列 CS オリゴ糖鎖の調製の流れ. チョウザメ (sturgeon) 由来の CSA は GlcA-GalNAc4S 構造に富んでいるため, 陰イオン交換クロマトグラフィーにより高効率に均一配列オリゴ糖鎖を調製できる (A). 一方, 天然 (サメ) 由来 CSC は GlcA-GalNAc6S 構造の含量が必ずしも高くないため (70% 程度), 均一配列のオリゴ糖鎖の調製原料としてはやや不便である. そこで, 硫酸基をもたない CH を化学的に硫酸化し, 一級水酸基 (C-6 位) 優先的に硫酸基を導入した試料を得た. これを酵素分解ののち陰イオン交換クロマトグラフィーに供し, GlcA-GalNAc6S 均一配列のオリゴ糖鎖を得た (B).

Fig. 9. 飽和 CSA2 糖 (A), 4 糖 (B), 6 糖 (C) のプロダクトイオン・スペクトル (MS²). プリカーサーイオンはそれぞれ硫酸基数に等しい価数の脱プロトン化分子 (2 糖: [M-H]⁻; m/z 476, 4 糖: [M-2H]²⁻; m/z 467, 6 糖: [M-3H]³⁻; m/z 464) である. それぞれのプロダクトイオンの帰属を (D), (E), (F) に示した.

Fig. 10. 飽和 CSC2 糖 (A), 4 糖 (B), 6 糖 (C) のプロダクトイオン・スペクトル (MS²). プリカーサーイオンはそれぞれ硫酸基数に等しい価数の脱プロトン化分子 (2 糖: [M-H]⁻; m/z 476, 4 糖: [M-2H]²⁻; m/z 467, 6 糖: [M-3H]³⁻; m/z 464) である. それぞれのプロダクトイオンの帰属を (D), (E), (F) に示した.

酸のカルボキシル基は遊離酸 (-COOH) をなしていることが推測された. 以下に, そのイオンをプリカーサーイオンとしたプロダクトイオン・スペクトルを精査していく.

Fig. 9 は, CSA オリゴ糖鎖の MS² の結果である. ここで共通に認められるフラグメンテーション則は, ①すべて

のプロダクトイオンが硫酸基を保持していること, ②脱硫酸化を示唆するプロダクトイオンが一切観察されないこと, ③還元末端糖が遊離した Y₁ イオン (m/z 300) が非常に高い強度で出現し, ④それがさらに環開裂を起こした Y₁^{0.2}A_r イオン (m/z 199) が同時に観測されていること,

⑤グルクロニド結合がすべて開裂してB/Y イオンを生成していること、の5点である。①は、すべてのプロダクトイオンにおける電荷が依然硫酸基上に位置していることを示唆し、すべての開裂がチャージ・リモート・フラグメンテーションにより起こっていることを推測させる。②はこの後の、CSC オリゴ糖との比較において重要である。③の還元末端糖の優先的な開裂については第7項でも触れた。しかしCHではCイオンが生成（カルボキシル基が脱プロトン化）したのに対し、CSAではB/Yイオンが生成していることに着目する必要がある（これも後に考察する）。⑤は前に紹介した例⁵⁾と一致した。なお、Y₁イオンをMS³に供した際のフラグメンテーション・パターン（データ省略）は、GalNAc6S標準品のMS²におけるそれ(Fig. 1)とよく一致した。

次に示すのが、同じ鎖長のCSC オリゴ糖鎖のMS²の結果である(Fig. 10)。一見してCSAとは全く異なる様相を呈していることから、異性体識別という観点で眺めるならば、それが容易に達成されていることがわかる。これらに共通して見られるフラグメンテーション則は以下のとおりである。①同一鎖長のCSA オリゴ糖鎖に認められたプロダクトイオンが、すべて観測されている。②すべてのプロダクトイオンが硫酸基を保持しているわけではない。硫酸基をもたないプロダクトイオンは必ずカルボキシル基をもっている。③プリカーサーイオンから三酸化硫黄(SO₃)が失われた[M-SO₃-nH]⁻イオンがベース・ピークとし

て出現する。この場合にイオン価数を減じていない。また、グリコシド切断イオンにも、SO₃を失ったものが散見される。④グルクロニド結合に着目すると、CSA オリゴ糖鎖がB/Yイオンのみ与えたのに対し、CSCではそれらとともにC/Zイオンも生成している。以上である。これらの規則性のうち①以外は、前に紹介した他研究者による結果⁵⁾と一致しない。その理由についてはわからない。しかし④は興味深いことに、本項のはじめに記したFAB-CID-MS²の結果⁵⁶⁾と一致している。

以上のように明らかになったフラグメンテーション則の比較をもって、CS配列解析法のプロトタイプ確立を目指す。見てのとおり、上記の結果(Fig. 9, 10)においては硫酸基位置を直接判断しうる環開裂イオンが生成していない。そのため、出現したプロダクトイオンの m/z 値もしくはイオン強度で硫酸基の位置を決めていかねばならない。一つ前に挙げた研究例⁵⁾では、その判断をグルクロニド結合の切断で生じるB/Yイオンの強度差に依存していた。しかしわれわれのデータでは、幸いなことにB/Yイオンに加えてC/Zイオンも観測された。そこで、それが配列解析の指標として使えるという仮説のもとでイオン開裂メカニズムを考察することにした。すなわち「グルクロニド結合の切断様式は、その結合に関与するGalNAc残基の硫酸基位置を直接反映する」ことのメカニズムを描くことができれば、目標を達成したことになる。

A. B/Y イオンを生成するグルクロニド結合の開裂

Scheme 17. CS オリゴ糖鎖のESI-MS²における推定フラグメンテーション・メカニズム。(A) CSA および CSC オリゴ糖鎖に共通する、チャージ・リモート・フラグメンテーションによるB/Yイオンの生成。(B) CSC オリゴ糖鎖に想定しうる、カルボキシル基のイオン化を経るチャージ・インデュースト・フラグメンテーションによるC/Zイオンの生成。(C) CSC オリゴ糖鎖のみに観測されるSO₃分子の脱離。

この開裂は、GalNAc 残基に硫酸基が存在する CSA および CSC 構造において起こるが、硫酸基をもたない CH では起こらない。まず、ここで生成する Y イオンについては、開裂するグリコシド結合の酸素原子を獲得してヒドロキシル基を形成した構造に間違いのないと思われる (Scheme 17A)。一方の B イオンについては、先の Scheme 13A に示したようにオキシラン環生成構造と、2007 年に提案された⁵⁹⁾ ラクトン環生成構造 (Scheme 17A) の 2 通りを想定できる。ここで後者の報告を確認すると、GlcA のカルボキシル基をメチルエステル化した際に B/Y イオンを生じる開裂が起こらず、代わって C/Z イオンが観測されている。この結果は、B/Y イオン生成に GlcA のカルボキシル基が直接関与していることを示唆している。したがって、ここ (飽和グルクロン酸構造) では Scheme 13A の経路を経ることなく、Scheme 17A に示したチャージ・リモート・フラグメンテーションによりラクトン環生成反応が起こっている可能性が高いと考えた。

B. C/Z イオンを生成するグルクロニド結合の開裂

この開裂反応は CSC 構造においては起こるが、CSA 構造では起こらない。よって第一の開裂メカニズムとして、Scheme 13B と同様の経路が想定可能である。一方、硫酸基をもたない CH 構造でも同様の開裂を認めており、筆者らはそれが脱プロトン化したカルボキシル基によるチャージ・インデュースト・フラグメンテーションであると推察した (第 7 項参照)。ここで第二のメカニズムとして考えられることは、CSC 構造において一部のカルボキシル基が脱プロトン化し、それが CH と同じチャージ・インデュースト・フラグメンテーションのメカニズムにしたがって C/Z イオンを与えている、という仮説である (Scheme 17B)。MS¹ におけるイオン化では、原則的には酸性度が圧倒的に高い硫酸基のみが脱プロトン化していると考えられる。しかし CSC 構造に限っては、その電荷が GlcA のカルボキシル基に移動しやすい、と推測する。実際に分子模型を組み立てると明らかであるが、GlcA が立体化学的に最も安定である ⁴C₁ コンフォメーションにおいて、そのカルボキシル基は GalNAc の C-4 位硫酸基とは全く異なる方向に向くが、C-6 位硫酸基とは極めて近接する。すなわち CSC では、イオン化に際してカルボキシル基と硫酸基との間での分子内プロトン授受が可能であると考ええる。そうすると CID により、CH と同様のフラグメンテーション・メカニズムを経て、C/Z イオンが生成しうる。このメカニズムもまた GalNAc の C-4 位ヒドロキシル基が遊離であることが必要であるから、C-4 位ヒドロキシル基が硫酸化されている CSA 構造においてこの C/Z イオンが生成しないこととの整合性も保たれる。このプロトン授受仮説が確からしい理由は次項 (C) にも述べる。

C. 三酸化硫黄 (SO₃) の脱離

この反応も CSC 構造においてのみ観測された。第 6 項 (Scheme 7) でも触れたが、負イオンモードにおいて脱プロトン化した硫酸基 (−OSO₃[−]) は、低エネルギー CID 下で比較的安定である。しかしそれが遊離酸 (−OSO₃H) になる

と容易に SO₃ 分子を失い、ヒドロキシル基へと変換される³²⁾。このことを基にして CSC オリゴ糖鎖に特徴的な [M−SO₃−nH][−] イオンの生成理由を考えるならば、前項 (B) に記したとおり、当初脱プロトン化した硫酸基の一部がカルボキシル基のプロトンを受け取り、CID によって SO₃ 分子を失った、と考えることが可能である (Scheme 17C)。

以上の考察に立脚し、グルクロニド結合の開裂パターンに基づいた CS 配列解析法のプロトタイプはひとまずの完成と言ってよいのではないだろうか^{60), 61)}。すなわちグルクロニド結合の開裂様式が、①GalNAc4S であれば B/Y イオン、②非硫酸化 GalNAc であれば C/Z イオン、③GalNAc6S であればそれら両方、である。これ以外の位置に硫酸基が結合する場合も、開裂メカニズムに則った配列解析が可能であろうことは言うまでもない。これまでに述べたことは、均一配列の標準糖鎖を実験に使用したからこそ明確に導かれたフラグメンテーション則であることを強調しておきたい。今後取り組むべきことは、配列がヘテロな CS オリゴ糖鎖、あるいは上記以外の硫酸基位置の標準糖鎖を実際に用意し、上で得た規則性を演繹的に検証していくことである。

10. ウロン酸エピマー

GAG の生理活性が GlcA と IdoA の違いにより大きな差を生じる例が知られていることから⁶²⁾、この構造もまた GAG の生化学ではよく注目されている。当然、この構造異性体について MSⁿ で同定できるようになることへの要請も高い。しかし、現状の GAG の MSⁿ においては、この C-5 エピマーに関する知見が最も不足していると言える。その大きな理由は、普遍則を導くのに適切な標準糖鎖を容易に調製できないことにある。以下に、ごく限られた解析例を紹介する。

1996 年、CH 2 糖の GlcA-GalNAc とその C-5 エピマーの IdoA-GalNAc が FAB-CID-MS² により識別できることが報告された⁶³⁾。これは正イオンモード MS² のみの報告であるが、GlcA よりも IdoA のほうが化学的に不安定であることを反映するように、IdoA 由来のプロダクトイオンが多く、また強く観測されているのが特徴である。

筆者が負イオンモード ESI-MS² により CSA と DS の 4 糖のフラグメンテーションを比較した経験においても、IdoA のほうがプロダクトイオンを多く生成した (Fig. 11)。しかし、これも系統的な解析に乏しく、フラグメンテーション則を見いだすには至っていない。

CSA と DS のオリゴ糖画分混合分析によって、C-5 エピマーの配列解析が可能であるとした報告がある⁶⁾ ことについては、前項でも紹介した。同じ研究者らによる最近の報告では、CSA, CSC, DS それぞれの 4 糖画分を還元末端標識してプロダクトイオン・スペクトルを比較測定し、グリコシド切断イオンおよび脱硫酸イオンの強度比からそれらを明確に識別、定量できることを示している⁶⁴⁾。

目新しい技術として、最近、FT (Fourier-transform,

Fig. 11. ウロン酸エピマーの MS² におけるプロダクトイオン・スペクトルの比較. (A) CSA 不飽和 4 糖, (B) DS 不飽和 4 糖. それぞれプリカーサーイオンは 2 価の脱プロトン化分子 ([M-2H]²⁻; m/z 458) である.

フーリエ変換型) 質量分析計を用いて, EDD (electron detachment dissociation) 法により HS4 糖の C-5 エピマーを識別できることが報告された⁶⁵⁾. ウロニド結合の開裂およびウロン酸残基の環開裂において, それぞれのエピマーに特徴的なプロダクトイオンが認められた点, またそれらがイオン開裂メカニズムに照らして考察可能であった点において, 該手法の有用性は高いと言える. あとは, 現状においてこの解析が可能なのが FT 質量分析計保有施設に限られることをどのようにとらえるかである.

以上のように, ウロン酸 C-5 エピマーがプロダクトイオン・スペクトルに与える影響についてはまだ知見が散発的である. 今後, よりいっそう系統的な解析がなされ, さまざまな GAG の配列にスムーズに適用可能な規則性が提案されることを期待している.

11. 総 括

本稿は, GAG の各構造要素について系統的に MSⁿ データを収集し, そのフラグメンテーションの本質的機構を帰納的に明らかにする作業を通じて, GAG 配列解析プロトコルを完成することを目標とした. いまだ基盤情報量と検証例に不備があることは否めないが, 今後, 過去に測定歴のない糖鎖の構造決定の場面にあっても, 一定の確証をもって推定構造を提案できるだけの地盤は整えられたと考えている. 以下に, 本稿の内容全体を踏まえた GAG の MSⁿ による解析プロトコルを提案する (Scheme 18).

①GAG オリゴ糖鎖は, MSⁿ によって単糖単位もしくは二糖 (偶数糖) 単位まで開裂させうる.

この作業は, 何番目の糖残基にいくつの硫酸基が結合しているか, という情報を与える.

ここで, 二糖単位フラグメントの生成挙動として,

①-i) HexNAc の C-4 エピマーは, グリコシド切断のプロダクトイオン強度に反映される.

①-ii) HexNAc グリコシドのアノマーの違いは,

当該グリコシド結合の開裂において異なるプロダクトイオンの生成として反映される.

①-iii) CS の硫酸基位置 (4S, 6S, 硫酸基なし) は, ウロニド結合の開裂様式に明確に現れる.

①-iv) ウロン酸の C-5 エピマーは, ウロニド結合の開裂により生じるプロダクトイオンの強度に反映されると考えられる.

また, 単糖単位のケースとして,

①-v) KS は, 定められたプリカーサーイオンのフラグメンテーションを繰り返し, MS⁴ において単糖単位のプロダクトイオンを生じる.

②硫酸基の結合位置を決定する手段は画一的ではなく, 以下の各手法を使い分けることができる.

②-i) MSⁿ の初期のフラグメンテーションにおいて環開裂イオンの m/z 値から判断する.

②-ii) 上記①のステップで生成した単糖もしくは二糖のプロダクトイオンのフラグメンテーションをさらに繰り返し, 最終的に環開裂断片を生成せしめて位置決定する.

②-iii) 上記①のステップで生成した単糖もしくは二糖のプロダクトイオンをさらにもう一段開裂させ, プリカーサーイオンに相当する構造の単糖もしくは二糖の標準品の MS² の結果と照合する.

②-iv) 上記①-iii) のとおり, CS の場合はグリコシド結合の開裂パターンから判断する.

②-v) 本稿では記述しなかったが, 位置特異的脱硫酸化酵素の作用前後でのフラグメンテーション挙動の差を総合的に判断する.

③上記①と②にあたり留意されるべきことがある.

③-i) 還元末端構造をもつプリカーサーイオンをフラグメンテーションした場合, ^{0,2}A (^{0,2}X) イオンおよび脱水イオンの有無は, 該構造を推

Scheme 18. 本稿が提案する、MSⁿ手法によるGAGの構造解析。GAG試料を、適当な手法を用いてイオン化可能な糖鎖長まで低分子化し、MSⁿ測定に供する。MS¹における m/z 値および同位体組成から、糖鎖長および硫酸基結合数を知る。次いで、本稿が勧めるプリカーサーイオンを順次フラグメンテーションさせてMSⁿデータを取得し、すでに明らかにしたフラグメンテーション則に基づいて糖配列情報を得る。ここで生成した単糖あるいは二糖のプロダクトイオンをさらに開裂させ、そのデータに標準単糖および標準二糖のフラグメンテーション則を適用することで、硫酸基位置情報を含めた詳細構造情報を取得する。

定する手掛かりとなる。

- ③-ii) プリカーサーイオンの価数が糖鎖中の硫酸基数を下回る場合、そのフラグメンテーションにおいてはSO₃の脱離が先行して構造情報を失うことが想定される。

以上である。これらのことは、フラグメンテーション則を議論するのに適切な糖鎖標準品を用いて地道にデータを取得し、さらにそれを可能な限りイオン開裂メカニズムにまで踏み込んで考察することによって明らかにできた。特に、メカニズムを理解することは「こうなるはず」という情報に加えて「こうならないであろう」という情報ももたらす。この点が、普遍的かつ安定感のある構造解析法を確立するうえで重要だと考えている。

ところで、本稿では折に触れて、標準GAGオリゴ糖鎖が容易に得られないことによりMSⁿフラグメンテーションの研究が制約を受けていると述べた。本稿の主旨からは外れるので詳しく述べないが、現在知られているGAGオリゴ糖鎖の調製法^{66)~68)}は、いずれも技術的難度が高く、作業時間を要するものばかりである。それらの手法のブ

レックスルーは是非期待したいが、われわれはそれをただじっと待っているわけにもいかない。この問題については、米国の糖鎖コンソーシアム⁶⁹⁾のように、研究リソースの共有化や役割分担による効率的な研究促進体制が、我が国においても広く産学官協調によって敷かれることを望みたい。それによって、単に質量分析研究のみならず、広範なGAG研究が飛躍的に発展し、最終的にはヒトの健康の維持増進に資するはずである。

解析糖鎖についても一つ触れておく。本稿で扱ったMSⁿデータは、そのほとんどが還元性糖鎖を対象として得られたものである。筆者がかかわる創薬研究の都合上、それを医薬原薬としやすく、かつ生物試験の結果をスムーズに理解しやすいという理由で、非標識糖鎖を中心に扱っている。しかしながら、個々の分析目的が許しメリットが生じるのであれば、還元末端標識法を検討するのも一つの選択肢だろう^{6), 64)}。その場合、筆者らが見いだしたフラグメンテーション則のうち、還元末端が反応点となるものに関しては適用できなくなる、ということに留意すればよい。

使用装置についても記載しておくのがよいだろう。本稿

に掲載した筆者らのデータのほとんどは、ESI-ITMSを利用して取得された。上に記したようにフラグメンテーション則に基づいて硫酸化GAGを構造解析する場合、MSⁿは欠かせないと考えてよい。MS²までの性能に限られる装置や、MS²とMS³以降のフラグメンテーション方法が異なる装置の使用は、経験上不便と言わざるを得ない。一方、分解能にも一定の要求がある。例えば糖タンパク質糖鎖の質量分析では1価イオンをプリカーサーイオンとしてMSⁿデータが取得されることが多いが、GAGの場合には酸性官能基が増えるに従って、すなわち長鎖オリゴ糖鎖になるほど、プリカーサーイオンの価数が増大する（負イオンモード）。すると、10糖前後の解析に及ぶとTOF（time-of-flight, 飛行時間）型に匹敵する分解能が必要になってくる。仮に分解能が不足すれば、プロダクトイオンの鎖長すら明らかにできない状況に陥る。これらのことを考慮すると、GAGのMSⁿにはIT-TOFMS、より好ましくはlow mass cut off効果の心配が不要で、かつさまざまなフラグメンテーション方法を使用できる^{70), 71)} FT質量分析計が適しているということになる。なお、筆者らは昨年ESI-IT-TOFMSを採用して良好な成績を上げていることを付記しておく。

12. 結 語

GAGの糖配列が自在に読めるようになれば、GAGの科学に基づく創薬研究は一気に加速する^{72), 73)}。なぜならば、GAGの糖配列の限らない多様性が、その生物学的機能の本質をまだ多く隠しもっているに違いないのだから^{72)~76)}。GAGの生理情報の発現に必須な、まだ明らかにされていない構成成分を見だし、その情報に立脚した創薬研究を推進、成功させるために、「似て非なるもの」ばかりのGAGの構造を精度高く決定する手段が必須である。そこに、MSⁿの活用意義がある。

本稿では、MSⁿの糖鎖構造異性体の識別能力についてはもちろんのこと、「なぜ」「どのように」その構造が開裂するのか、という点を意識することを貫いた。そのことが、いまの質量分析技術で「わかること」と「わからないこと」を極力明確にし、信頼性の高い構造解析プロトコルを提供することにつながると考えた。このように発想した原点にはもちろん、冒頭に記したGAGの構造的多様性に起因するアプローチ上の制約があった。しかしそれだけではなく、本来人間の頭で考えるべき事項をインフォマティクス・ツールに過剰に依存することによって、ないがしろにしてしまうことに対する危機感もあった。質量分析計はイオンの質量とその強度しか語らないが、そのデータから有用な理化学情報を十分に引き出し展開を図れるのは、結局のところ分析対象の特徴をよく把握している人間の頭をおいてほかにないだろう。

さて、糖鎖の構造異性体をMSⁿにより識別するという研究課題においては、我が国の研究者の貢献が目立つ。かつて大橋守博士は、不飽和二糖異性体をはじめとするGAG関連糖鎖の解析にFAB-CID-MS²をいち早く適用

し、硫酸基位置異性体を明確に識別できることを網羅的に示した⁷⁷⁾。当時のプロダクトイオンの帰属情報は、今も後進の手本となっている。また、山垣亮博士は主に中性糖を題材として、プロダクトイオンの m/z 値だけでなくイオンの相対強度で糖異性体を識別する手法の汎用性を証明し、普及させた⁷⁸⁾。特に、グリコシド結合の位置と立体がフラグメンテーションに及ぼす影響を綿密に比較検討するアプローチは、そのまま筆者の取り組みに外挿しうるものであった。さらに、大橋陽子博士は、スペクトルに現れる糖異性体のフラグメンテーション挙動のわずかな違いを、そのメカニズムと結び付けて理解することの重要性を示した⁷⁹⁾。CIDにおける糖ピラノース環の反転が提唱されたことによって、本稿における考察が大いに促進された。このように、国内の錚々たる先駆者たちによって牽引された糖鎖質量分析研究の功績が存在したからこそ、拙稿を執筆できた。そのことを最後に記しておく。

謝 辞 本稿に示したデータは、筆者が生化学工業株式会社中央研究所もしくは独立行政法人産業技術総合研究所糖鎖工学研究センターに在籍中に取得したものです。当該期間に極めて有益な助言とご鞭撻を賜りました平林淳博士（産業技術総合研究所）、亀山昭彦博士（同）、山垣亮博士（サントリー生物有機化学研究所）、大橋陽子博士（理化学研究所）に篤く御礼申し上げます。また、本稿執筆の機会を頂戴するとともに種々の指針を賜りました山垣博士に重ねて感謝いたします。

文 献

- 1) URL: <<http://jcggdb.jp/>>
- 2) O. Kanie, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **20**, 67 (2008).
- 3) G. Venkataraman, Z. Shriver, R. Raman, and R. Sasisekharan, *Science*, **286**, 537 (1999).
- 4) H. Desaire, T. L. Sirich, and J. A. Leary, *Anal. Chem.*, **73**, 3513 (2001).
- 5) J. Zaia, J. E. McClellan, and C. E. Costello, *Anal. Chem.*, **73**, 6030 (2001).
- 6) J. Zaia, X.-Q. Li, S.-Y. Chan, and C. E. Costello, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**, 1270 (2003).
- 7) O. M. Saad and J. A. Leary, *Anal. Chem.*, **77**, 5902 (2005).
- 8) T. Minamisawa, K. Suzuki, and J. Hirabayashi, *Anal. Chem.*, **78**, 891 (2006).
- 9) B. Tissot, A. Ceroni, A. K. Powell, H. Morris, E. A. Yates, J. E. Turnbull, J. T. Gallagher, A. Dell, and S. M. Haslam, *Anal. Chem.*, **80**, 9204 (2008).
- 10) R. V. Iozzo and A. D. Murdoch, *FASEB J.*, **10**, 598 (1996).
- 11) 大橋陽子, 第54回質量分析総合討論会講演要旨集, p. 8 (2006).
- 12) K. Prydz and K. T. Dalen, *J. Cell Sci.*, **113**, 193 (2000).
- 13) H. Habuchi, O. Habuchi, and K. Kimata, *Glycoconj. J.*, **21**, 47 (2004).
- 14) F. N. Lamari and N. K. Karamanos, *Adv. Pharmacol.*, **53**, 33 (2006).
- 15) Y. Takegawa, S. Ito, S. Yoshioka, K. Deguchi, H. Nakagawa, K. Monde, and S.-I. Nishimura, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 385 (2004).
- 16) A. Kameyama, N. Kikuchi, S. Nakaya, H. Ito, T. Sato, T. Shikanai, Y. Takahashi, K. Takahashi, and H. Nari-matsu, *Anal. Chem.*, **77**, 4719 (2005).

- 17) J. Zaia, *Mass Spectrom. Rev.*, **23**, 161 (2004).
- 18) T. Minamisawa and J. Hirabayashi, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **18**, 293 (2006).
- 19) W. Heerma, C. Versluis, W. Kulik, R. R. Contreras, and J. P. Kamerling, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **17**, 257 (1988).
- 20) N. G. Karlsson, H. Karlsson, and G. C. Hansson, *J. Mass Spectrom.*, **31**, 560 (1996).
- 21) T. Minamisawa and J. Hirabayashi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 1788 (2005).
- 22) B. Domon and C. E. Costello, *Glycoconj. J.*, **5**, 397 (1988).
- 23) J. Carroll, D. Willard, and C. Lebrilla, *Anal. Chim. Acta*, **307**, 431 (1995).
- 24) O. M. Saad and J. A. Leary, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **15**, 1274 (2004).
- 25) B. Tissot, J.-Y. Salpin, M. Martinez, M.-P. Gaieot, and R. Daniel, *Carbohydr. Res.*, **341**, 598 (2006).
- 26) J. Adams, *Mass Spectrom. Rev.*, **9**, 141 (1990).
- 27) M. L. Gross, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **118/119**, 137 (1992).
- 28) 大橋陽子, 有機合成化学協会誌, **51**, 529 (1993).
- 29) A. Kurimoto, S. Daikoku, S. Mutsuga, and O. Kanie, *Anal. Chem.*, **78**, 3461 (2006).
- 30) S. Daikoku, T. Ako, A. Kurimoto, and O. Kanie, *J. Mass Spectrom.*, **42**, 714 (2007).
- 31) M. Kubota, K. Yoshida, A. Tawada, and M. Ohashi, *Eur. J. Mass Spectrom.*, **6**, 193 (2000).
- 32) J. Zaia, *J. Biomacromol. Mass Spectrom.*, **1**, 3 (2005).
- 33) K. N. Price, A. Tuinman, D. C. Baker, C. Chisena, and R. L. Cysyk, *Carbohydr. Res.*, **303**, 303 (1997).
- 34) T. Minamisawa, K. Suzuki, N. Kajimoto, M. Iida, H. Maeda, and J. Hirabayashi, *Carbohydr. Res.*, **341**, 230 (2006).
- 35) R. E. March, *Int. J. Mass Spectrom.*, **200**, 285 (2000).
- 36) A. V. Kühn, H. H. Rüttinger, R. H. H. Neubert, and K. Raith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 576 (2003).
- 37) T. Minamisawa, K. Suzuki, and J. Hirabayashi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 267 (2006).
- 38) W. Chai, C. Leteux, C. Westling, U. Lindahl, and T. Feizi, *Biochemistry*, **43**, 8590 (2004).
- 39) T. Minamisawa, K. Suzuki, H. Maeda, S. Shimokata, N. Sugiura, K. Kimata, and J. Hirabayashi, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, 1 (2007).
- 40) T. Yamagaki and H. Nakanishi, *Proteomics*, **1**, 329 (2001).
- 41) S. Ernst, R. Langer, C. L. Cooney, and R. Sasisekharan, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 387 (1995).
- 42) A. Tawada, T. Masa, Y. Oonuki, A. Watanabe, Y. Matsuzaki, and A. Asari, *Glycobiology*, **12**, 421 (2002).
- 43) N. Volpi, *Glycobiology*, **13**, 635 (2003).
- 44) A. V. Kühn, K. Raith, V. Sauerland, and R. H. H. Neubert, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1531 (2003).
- 45) N. Volpi, Z. Zhang, and R. J. Linhardt, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 3526 (2008).
- 46) D. J. Lamb, H. M. Wang, L. M. Mallis, and R. J. Linhardt, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **3**, 797 (1992).
- 47) T. Ii, S. Okuda, T. Hirano, and M. Ohashi, *Glycoconj. J.*, **11**, 123 (1994).
- 48) T. Ii, M. Kubota, S. Okuda, T. Hirano, and M. Ohashi, *Glycoconj. J.*, **12**, 162 (1995).
- 49) H. Desaire and J. A. Leary, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**, 916 (2000).
- 50) J. Zaia and C. E. Costello, *Anal. Chem.*, **73**, 233 (2001).
- 51) J. E. McClellan, C. E. Costello, P. B. O'Connor, and J. Zaia, *Anal. Chem.*, **74**, 3760 (2002).
- 52) O. M. Saad, H. Ebel, K. Uchimura, S. D. Rosen, C. R. Bertozzi, and J. A. Leary, *Glycobiology*, **15**, 818 (2005).
- 53) J. Zaia and C. E. Costello, *Anal. Chem.*, **75**, 2445 (2003).
- 54) E. F. Naggar, C. E. Costello, and J. Zaia, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **15**, 1534 (2004).
- 55) C. Malavaki, S. Mizumoto, N. Karamanos, and K. Sugahara, *Connect. Tissue Res.*, **49**, 133 (2008).
- 56) T. Ii, M. Kubota, T. Hirano, M. Ohashi, K. Yoshida, and S. Suzuki, *Glycoconj. J.*, **12**, 282 (1995).
- 57) K. Yoshida, S. Miyauchi, H. Kikuchi, A. Tawada, and K. Tokuyasu, *Anal. Biochem.*, **177**, 327 (1989).
- 58) URL: <http://www.seikagakubbb.co.jp/bio/02tech/a01_tou/01pr/p03-3.htm>
- 59) J. Zaia, M. J. C. Miller, J. L. Seymour, and C. E. Costello, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 952 (2007).
- 60) 生化学工業株式会社, 特許出願中 (特願 2008-115764).
- 61) 南澤俊和, 第 56 回質量分析総合討論会講演要旨集, p. 466 (2008).
- 62) C. A. A. Boeckel and M. Petitou, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 1671 (1993).
- 63) M. Kubota and M. Ohashi, *Eur. Mass Spectrom.*, **2**, 79 (1996).
- 64) A. M. Hitchcock, C. E. Costello, and J. Zaia, *Biochemistry*, **45**, 2350 (2006).
- 65) J. J. Wolff, L. Chi, R. J. Linhardt, and I. J. Amster, *Anal. Chem.*, **79**, 2015 (2007).
- 66) K. Takagaki and K. Ishido, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **12**, 295 (2000).
- 67) J. Tamura, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **13**, 65 (2001).
- 68) S. Yamada and K. Sugahara, *Methods Mol. Biol.*, **213**, 71 (2003).
- 69) URL: <<http://glycomics.scripps.edu/CFGad.html>>
- 70) J. J. Wolff, I. J. Amster, L. Chi, and R. J. Linhardt, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 234 (2007).
- 71) J. J. Wolff, T. N. Laremore, H. Aslam, R. J. Linhardt, and I. J. Amster, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **19**, 1449 (2008).
- 72) R. Sasisekharan, R. Raman, and V. Prabhakar, *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, **8**, 181 (2006).
- 73) B. Gesslbauer, A. Rek, F. Falsone, E. Rajkovic, and A. J. Kungl, *Proteomics*, **7**, 2870 (2007).
- 74) I. Capila and R. J. Linhardt, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 390 (2002).
- 75) K. Sugahara, T. Mikami, T. Uyama, S. Mizuguchi, K. Nomura, and H. Kitagawa, *Curr. Opin. Str. Biol.*, **13**, 612 (2003).
- 76) R. J. Linhardt and T. Toida, *Acc. Chem. Res.*, **37**, 431 (2004).
- 77) M. Ohashi, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **47**, 392 (1999).
- 78) T. Yamagaki, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **52**, 72 (2004).
- 79) Y. Ohashi, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, 311 (2007).

Keywords: Fragmentation, Glycosaminoglycan, Isomer, MSⁿ, Oligosaccharide