超高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法による キトオリゴ糖の一斉配列解析

Simultaneous Sequence Analysis of Chitooligosaccharides by Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

横山祐介*・岡 秀行

Yusuke YOKOYAMA and Hideyuki OKA

株式会社東ソー分析センター南陽事業部解析グループ Analysis & Research, Nanyo Division, Tosoh Analysis
and Research Center Co., Ltd., Shunan, YAMAGUCHI, JAPAN

Chitooligosaccharides are used in medicines, cosmetics and foods due to their bioactivity and non-toxicity in the human body. Because they are frequently present as complex mixtures, with various degrees of polymerization, degrees of acetylation and isobars that have a number of sequences, simultaneous analysis can be a challenging task. Here, we report on a method for the simultaneous sequencing of chitooligosaccharides by the UHPLC-tandem MS analysis. Chitooligosaccharides that were produced by digestion with chitinase were labeled with 2-aminopyridine to label the reducing end. After the purification by preparative-SEC, we identified the sequence of chitooligosaccharides (DP 1-5) from MS/MS spectra by the UHPLC-tandem MS analysis. In this method, the MSⁿ analysis, the decrease in the sensitivity of MS spectra is not important, because the chitooligosaccharides are first separated by chromatography. This sequencing method can be used in the characterization of deacetylase and structural studies of other bioactive chitooligosaccharides.

DOI: 10.5702/massspec.15-69

(Received March 9, 2015; Accepted May 14, 2015)

1. 序 論

キチン（ポリβ-(1→4)-N-アセチル-D-グルコサミン）は甲殻類や昆虫の外骨格，菌類の細胞壁に多く含まれるムコ多糖類であり，地球上でセルロース（ポリβ-(1→4)-D-グルコース）に次ぐ豊富なバイオマス資源と言われている¹⁾．濃アルカリ溶液中での加熱などにより部分的または完全に脱アセチル化したキチンをキトサンと呼ぶ．キトサンはグルコサミン（D）とN-アセチルグルコサミン（A），またはDのみから構成されるポリマーである．キチンは分子内および分子間の水素結合により一般的な有機溶媒および希酸，希アルカリに不溶だが，脱アセチル化後のキトサンは希酸に可溶となる．キチンやキトサンは生体高分子のため，生物分解性を持ち人体への安全性が高く，医薬品，化粧品，食品，バイオテクノロジー分野，環境分野，農業分野などへ利用されている^{2)~5)}．

キチンやキトサンを化学処理や酵素処理により解重合して得られるオリゴ糖をキトオリゴ糖という．キトオリゴ糖には，重合度（degree of polymerization; DP）が等しくてもアセチル化度（degree of acetylation; DA）が異なる場合

（例えば，3量体としてD₃, D₂A₁, D₁A₂, A₃）や，DPおよびDAが等しくても配列が異なる場合（例えば，D₁A₂としてDAA, ADA, AAD（還元末端は右側とする））が存在し，その構造は多様である．このように配列だけが異なる異性体をヘテロキトアイソマーと呼ぶ．ヘテロキトアイソマーD_xA_yの異性体の総数は， $(x+y)!/(x!y!)$ で表される⁶⁾．

キトオリゴ糖は生体内の代謝において重要な役割を果たす．キトオリゴ糖とキチン結合レクチン（YKL-40）との親和性は研究されており，A₆やD₅A₆は高い親和性を，D₂A₄（DADAAAが主成分）やD₃A₃（DDADAAとDADDAAが同程度）は中程度の親和性を示す．一方，D₆はYKL-40との親和性を持たない⁷⁾．また小麦の葉において，DP≥7のGlcNAcオリゴマーはペルオキシダーゼ活性を促進するが，GlcNオリゴマーは活性を示さない⁸⁾．配列を指定してキトオリゴ糖を調製することは，レクチンや酵素活性に関する研究のために重要性が高まっている．一方，キトオリゴ糖は保湿性，抗菌性などから化粧品に，コレステロール低下効果，抗菌性などから食品に使用される．さらに，抗炎症作用，免疫増強効果から医薬品としての効果が期待されている⁵⁾．キトオリゴ糖の配列は，それらの効能の大小や溶解性などの物性（例えばD比率が高いほど水溶性が高いなど）に影響を与える可能性があり，AとDの配列は重要なパラメーターと言える．そのため，さまざまな組成や配列を持つキトオリゴ糖混合物の詳細な構造解析や各成分の分離精製は，キトオリゴ糖のさらなる用途開発のために必須である．

* Correspondence to: Yusuke YOKOYAMA, Analysis & Research, Nanyo Division, Tosoh Analysis and Research Center Co., Ltd., 4560 Kaisei-cho, Shunan, Yamaguchi 746-0006, JAPAN, e-mail: yokoyama@tosoh-arc.co.jp
横山祐介，株式会社東ソー分析センター南陽事業部解析グループ，〒746-0006 山口県周南市開成町 4560

キトオリゴ糖の分析手法として、HPLC⁹⁾、イオン交換クロマトグラフィー¹⁰⁾、アフィニティークロマトグラフィー¹¹⁾、キャピラリー電気泳動¹²⁾、質量分析^{6), 13)~15)}などが用いられる。中でも質量分析は、接続したHPLC等の分離分析装置から保持時間、質量分析計から質量、また場合によっては多段質量分析(MSⁿ)を行うことにより部分構造情報が得られるため、標準物質がなくても目的成分の定性が可能であることから、キトオリゴ糖の同定に用いられてきた。Kimらは、HPLC-四重極イオントラップMSを用いて、キトオリゴ糖(DP 2~12)についてDPとDAの関係性を議論した¹⁴⁾。HPLCによりキトオリゴ糖を分離後、MS/MS測定を行い、各DPにおける0~4アセチル化体をイオン量から定量したが、HPLCにおいてはDPごとにキトオリゴ糖を分離したのみであり、配列の異なるヘテロキトアイソバーごとの分離、定性、定量は行われていない。例えばDP3のピークからは0アセチル化体および1アセチル化体が検出されたが、1アセチル化体の配列がADD, DAD, DDAのいずれか、あるいはそれらの組み合わせであるのかは不明である。Haebelらは、DP 5~9までのヘテロキトアイソバーについて、MALDI-リニアイオントラップMSを用いて配列を同定した⁶⁾。本手法は、遊離アミノ基をトリデューテロアセチル化、また還元末端を3-(アセチルアミノ)-6-アミノアクリジン誘導体化したキトオリゴ糖について、複数のヘテロキトアイソバーを含有するプリカーサーイオンのMSⁿプロダクトイオンの強度比から配列を求める手法である。定量性のある優れた手法であるが、MS³, MS⁴...とMSⁿ操作を繰り返すうちにイオン量が低くなる問題がある。また、測定前に2回の誘導体化が必要であり、前処理が煩雑である。Tangらは、ホモオリゴマー(A₆)をアセチルキシランエステラーゼAで部分的に脱アセチル化し、HPLC-イオントラップMSにより配列を推定した¹⁵⁾。還元末端の誘導体化なしでMS/MSプロダクトイオンから配列を推定したが、ヘテロキトアイソバーのクロマトグラフィーによる分離がなされていないため、プロダクトイオンの数が多く解析に困難を伴う。還元末端がマーキングされていないことから、MS/MSにおいてグリコシド結合が開裂する位置と電荷の位置の組み合わせにより、Y, Z, B, Cイオンがすべて検出されることもMS/MSスペクトル複雑化の一因である(開裂がグリコシド結合の酸素原子よりも非還元末端側で生じた場合、その開裂により生じた還元末端側および非還元末端側のプロダクトイオンをそれぞれYイオンおよびBイオンと呼び、開裂が酸素原子よりも還元末端側で生じた場合、還元末端側および非還元末端側のプロダクトイオンをそれぞれZイオンおよびCイオンと呼ぶ¹⁶⁾)。また文献6, 14, 15のどの手法も、ヘテロキトアイソバーが未分離で一度にイオン化されることに起因するイオンサプレッションにより、微量成分が検出されない可能性がある。

本研究の目的は、ヘテロキトアイソバーを含むキトオリゴ糖混合物のより容易かつ高感度な一斉配列解析手法を構築することである。本研究ではキトオリゴ糖混合物につい

て、HPLCよりも分離に優れた超高速液体クロマトグラフ(UHPLC)を用いてヘテロキトアイソバーの成分分離を試みた。ピリジルアミノ(PA)誘導体化によりキトオリゴ糖の還元末端をマーキングし、UHPLCとタンデム型(四重極-飛行時間型)質量分析計(タンデムMS)を接続したシステム(UHPLC-タンデムMS)によりMS/MS解析することで、感度低下を伴うMSⁿ操作の必要がない配列解析法を確立した。文献6の手法では、クロマトグラフィーによる分離を行わず、一つのプリカーサーイオンに複数のヘテロキトアイソバー成分が含まれているためMSⁿ操作が必要となるのに対し、本手法ではUHPLCによりヘテロキトアイソバーの成分分離を行うため、プリカーサーイオンは1成分とみなされ、MS/MSにより解析可能である。各成分を分離後にイオン化するため、イオンサプレッションによる感度低下の可能性も考えにくい。本報告では確立した分析法を用いて、酵素による生化学的手法で調製したキトオリゴ糖の複雑な混合物について一斉分析し、配列の同定を行った。本分析法により、文献15にあるようなヘテロキトアイソバー生成物の解析による脱アセチル化酵素特性評価の研究において、解析がより容易かつ微量成分の検出が可能になると考えられる。さらに進んで、生理活性作用を持つ可能性がある特定配列のヘテロキトアイソバーの解析および分離・精製へ応用可能である。

2. 実験

2.1 試薬

キトサン(white mushroom由来, *M_v* 60,000~120,000, high purity), キチナーゼ(*Streptomyces griseus*由来), ボラン-ジメチルアミン錯体(DMAB), テトラデューテロ酢酸(酢酸-d₄)(重水素化率99.9%), デキストラン(*Leuconostoc mesenteroides*由来, GPC標準)はシグマアルドリッチより購入した。2-アミノピリジン(2-AP), ギ酸, ギ酸アンモニウム, 酢酸アンモニウム, D-グルコースは特級試薬を和光純薬工業より購入した。酢酸, D-マルトースは特級試薬をキシダ化学より購入した。移動相に用いたアセトニトリルはHPLC用グレードをメルク社より購入した。水は蒸留水をオルガノ製PURELAB Ultraで処理したものをを用いた。

2.2 装置

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)は、東ソー製8020シリーズにSECカラムを接続して測定した。移動相は1%ギ酸水溶液(10 mM ギ酸アンモニウム含有), カラムは東ソーTSKgel SuperAW6000(粒径9 μm, 6.0×150 mm)1本とTSKgel SuperAW2500(粒径4 μm, 6.0×150 mm)2本を接続したものをを用いた。カラム温度は40°C, 移動相の流速は0.6 mL min⁻¹, 注入量は20 μLとした。検出器は示差屈折率検出器(RID)を40°Cに設定して用いた。

分取SECは島津製作所製Prominence分取システムLC-20APを用いた。移動相は1%酢酸水溶液(10 mM 酢酸アンモニウム含有)を、カラムは東ソーTSKgel G3000PW(粒径17 μm, 21.5×300 mm)を用いた。カラム温度は室温とし、移動相の流速は5.8 mL min⁻¹, 注入量は5 mLとし

Fig. 1. Separation of a mixture of chitooligosaccharides by SEC analysis. (a); Chitosan (reagent). (b); The chitooligosaccharides were produced by chitinase digestion for 4 h, (c); 24 h, (d); 96 h, (e); 168 h. The peaks were assigned based on their mass spectra (data not shown).

た。検出器はUV/Vis検出器を用い、UV波長は228 nmに設定した。

UHPLCシステムはWaters製ACQUITY UPLC H-Classシステムを用いた。誘導体化前のキトオリゴ糖の測定では、移動相はa) 1% 硝酸水溶液, b) アセトニトリルを用い、グラジエント条件をa/b = 2/8 (0~3 min) → 7/3 (30 min, リニアグラジエント) → 7/3 (35 min) とした。カラムはWaters ACQUITY UPLC BEH Amide (粒径1.7 μm , 2.1 $\times$ 100 mm)を用い、カラム温度50°C, 移動相の流速は0.5 mL min⁻¹, 注入量は2 μL とした。検出器は荷電化粒子検出器 (CAD, Dionex製Corona ultra)を用いた。PA化キトオリゴ糖の測定では、移動相はc) 1% 硝酸水溶液 (10 mM 硝酸アンモニウム含有), d) アセトニトリルを用い、グラジエント条件をc/d = 2/8 (0~3 min) → 38.3/61.7 (50 min, リニアグラジエント) とした。カラムはWaters ACQUITY UPLC BEH Glycan (粒径1.7 μm , 2.1 $\times$ 150 mm)を用い、カラム温度80°C, 移動相の流速は0.4 mL min⁻¹, 注入量は2 μL とした。微小ピークの解析時は注入量を10 μL とした。検出器はUV/Vis検出器を用い、UV波長は288 nmに設定した。

タンデムMSはBruker Daltonics製Compactを用いた。イオン化法はESIポジティブモードとし、キャピラリー電圧を4,500 V, ドライヒーターを200°C, ドライガスを8.0 mL min⁻¹に設定した。プリカーサーイオン検出時

Fig. 2. Comparison of the average molecular weight of the chitooligosaccharides produced by chitinase digestion estimated from the results of the SEC analysis. The calibration curve was recorded using standard dextran samples with known molecular weights (147,600, 23,800, 5,220, and 1,270) and D-maltose and D-glucose. The molecular weight of sample 0 h could not be calculated because of the exclusion limit of the columns.

(MSスキャン分析) のフラグメンテーションを抑制するため、四重極のイオンエネルギーを3.0 eV, コリジョンエネルギーを6.0 eVに設定した。MS/MSは、MSスキャン分析の結果から自動的にプリカーサーイオンを選択してMS/MS測定を行うAutoMS/MSモードを使用したが、一部の微小なピークについては手動設定でMS/MS測定を行った。

Fig. 3. Preparative-SEC chromatograms of the mixture obtained by the PA-derivatization. (a); Entire chromatogram of the reaction mixture. (b); Magnification of chromatogram (a).

m/z 50~2,000を測定範囲とし、UHPLCのシャープなピークに対応できるよう測定周波数を5 Hzとした。制御ソフトはCompass otofControl 3.4, 解析ソフトはCompass Data-Analysis 4.2を使用した。

2.3 キトサンのオリゴマー化

キトサンの酵素分解はLopatinらの方法¹⁷⁾を参考にした。キトサン 10 mgに0.5%酢酸水溶液を1 mL加え、溶解させた。キチナーゼを0.5 mg添加し、37°Cでそれぞれ4, 24, 96, 168時間加熱した。その後アルミブロックヒーターで100°Cに加熱し、反応を停止した。得られたキトオリゴ糖をそれぞれ溶離液で10倍希釈し、ディスポーザブルフィルター（東ソーマイショリディスクW-13-2）でろ過後、SEC分析に供した。

2.4 キトオリゴ糖のPA誘導体化

キトオリゴ糖のPA化は近藤らの方法¹⁸⁾を参考にした。96時間酵素分解したキトオリゴ糖溶液に対し、酵素を除去するため限外ろ過を行った。限外ろ過カートリッジは東ソーULTRACENT-10（分画分子量：10,000）を用いた。ろ液から100 μ Lを反応容器に取り、窒素パージで水分を除去した。2-APを12.8 Mとなるよう酢酸- d_4 に溶解させ、そのうち240 μ Lをキトオリゴ糖の入った反応容器へ添加し、加熱した（80°C, 1.5時間）。つづいてDMABを3.4 M

となるよう酢酸- d_4 に溶解させ、250 μ Lを反応容器へ添加し、加熱した（80°C, 1時間）。反応液を窒素パージで一晩濃縮し、分取SECで余剰の誘導体化試薬を除去した。得られた分画（PA化キトオリゴ糖）を窒素パージで濃縮乾固した。

2.5 PA化キトオリゴ糖の配列解析

分取SECで精製した分画に対し、1%ギ酸水溶液200 μ Lとアセトニトリル800 μ Lを添加して、ディスポーザブルフィルター（東ソーマイショリディスクH-13-2）でろ過した。得られたろ液をUHPLC-タンデムMS分析に供した。

3. 結果と考察

3.1 キトサンのオリゴマー化

キトサンからキトオリゴ糖を調製するため、キトサンの酵素によるオリゴマー化を行った。得られたキトオリゴ糖のSEC分析から、平均分子量を確認した。SECクロマトグラムをFig. 1に示す。酵素分解時間が長くなるに従って、メインピークの保持時間が遅延し、オリゴ糖由来のピーク（12~16分）の強度が増加した。標準デキストランによる換算平均分子量の変化をFig. 2に示す。キトオリゴ糖の生成量は不明であるが、酵素分解によるキトサンの低分子量化が確認された。

Fig. 4. UHPLC and extracted ion chromatograms of chito-oligosaccharides produced by chitinase digestion for 96 h. (a); UHPLC chromatogram recorded by CAD. The separation mode of UHPLC is the HILIC mode. Separation was achieved on a BEH Amide column. The peaks were assigned based on their mass spectra. (b); Extracted ion chromatograms acquired by MS. Extracted ions, m/z 222.098, 383.167, 272.622, 374.161, and 289.463 correspond to A_1 , D_1A_1 , D_2A_1 , D_2A_2 , and D_4A_1 , respectively.

3.2 キトオリゴ糖のPA誘導体化

配列解析のため、キトオリゴ糖を誘導体化せずに UHPLC-タンデム MS 測定を行ったが、プロダクトイオンの Y イオンと C イオン、また Z イオンと B イオンの区別が付かなかったため困難であった（データ記載なし）。そこで PA 化により還元末端を選択的に誘導体化し、プロダクトイオンの還元末端側をマーキングすることで、識別を可能とした。また、PA 化時の溶媒として酢酸を用いた場合、PA 化の副反応としてキトオリゴ糖のアセチル化が進行した（データ記載なし）。D がアセチル化した場合、質量が 42 Da 増加し A となる ($D + 42 \text{ Da} = A$) ため、試料のキトオリゴ糖が本来持つ D と A の配列情報が失われる。そこで PA 化時の溶媒として酢酸- d_4 を用いることで、副反応由来のアセチル基を識別した。すなわち、副反応により D がトリデューテロアセチル化した場合、 $D + 45 \text{ Da} = A + 3 \text{ Da}$ となり、A がトリデューテロアセチル化すれば $A + 45 \text{ Da}$ となる。このようにして、質量の増加分から試料本来の D と A の配列を解読することが可能となった。

PA 化反応後、反応液から余剰の誘導体化試薬を除去するため、分取 SEC による精製を行った。SEC クロマトグラ

Fig. 5. UHPLC and extracted ion chromatograms of the PA-chito-oligosaccharides after purification by preparative-SEC. (a); UHPLC chromatogram recorded by CAD. The peaks were assigned based on their mass spectra. UHPLC method is equivalent to that shown in Fig. 4 (a). (b); Extracted ion chromatograms acquired by MS. Extracted ions, m/z 222.098, 383.167, 272.622, 374.161, and 289.463 correspond to A_1 , D_1A_1 , D_2A_1 , D_2A_2 , and D_4A_1 , respectively. (c); Extracted ion chromatograms recorded by MS. Extracted ions, m/z 300.156, 231.116, 503.235, 208.103, 332.656, and 413.190 correspond to A_1 -T, D_1A_1 -T, A_2 -T, D_2A_1 -T, D_1A_2 -T, and D_2A_2 -T, respectively (T: PA group).

ムを Fig. 3 に示す。主成分である約 17 分のピークは MS 測定から 2-AP と同定した（データ記載なし）。PA 化キトオリゴ糖は 2-AP よりも高分子量と考えられ、より保持時間の短い 13.7~16.8 分のピークを分取した。このようにして PA 化キトオリゴ糖 (4.6 mg) を得た。

PA 化反応の進行は、誘導体化前のキトオリゴ糖および分取精製した分画 (PA 化キトオリゴ糖) を UHPLC-タンデム MS 測定し、MS スペクトルを定性することにより

Table 1. Overview of the possible PA-chitooligosaccharide species (DP 1–5). D, A, and T indicate glucosamine, *N*-acetylglucosamine, and 2-PA group, respectively.

DP	Species	Precursor ion (m/z)	R.T. (min)	DP	Species	Precursor ion (m/z)	R.T. (min)
1	D ₁ -T	258.145 (M+H) ⁺	2.9	4	D ₄ -T	371.180 (M+2H) ²⁺	N.D.
	A ₁ -T	300.156 (M+H) ⁺	2.1		D ₃ A ₁ -T	392.185 (M+2H) ²⁺	40.9
	A ₁ -T + 3 Da	303.175 (M+H) ⁺	N.D.		D ₃ A ₁ -T + 3 Da	393.695 (M+2H) ²⁺	N.D.
2	D ₂ -T	419.214 (M+H) ⁺	13.0		D ₂ A ₂ -T	413.190 (M+2H) ²⁺	25.2
			13.4				28.3
			28.9				29.2
			4.4				30.2
			4.5		D ₂ A ₂ -T + 3 Da	414.700 (M+2H) ²⁺	30.2
	D ₁ A ₁ -T	461.225 (M+H) ⁺	4.4		D ₂ A ₂ -T + 6 Da	416.209 (M+2H) ²⁺	N.D.
			4.5		D ₁ A ₃ -T	434.196 (M+2H) ²⁺	↑
			8.8				15.0
			9.0		D ₁ A ₃ -T + 3 Da	435.705 (M+2H) ²⁺	18.1
	D ₁ A ₁ -T + 3 Da	464.244 (M+H) ⁺	7.6				18.5
			7.8				19.1
			3.6				19.6
			3.8				20.7
	A ₂ -T	503.235 (M+H) ⁺	3.6				22.0
			3.8				22.9
			4.8		D ₁ A ₃ -T + 6 Da	437.214 (M+2H) ²⁺	N.D.
			5.1				↑
			10.3		D ₁ A ₃ -T + 9 Da	438.724 (M+2H) ²⁺	↑
			11.5				↑
			12.4		A ₄ -T	455.201 (M+2H) ²⁺	↑
			12.8				↑
	A ₂ -T + 3 Da	506.254 (M+H) ⁺	3.6		A ₄ -T + 3 Da	456.710 (M+2H) ²⁺	9.5
			3.8				12.0
			4.5		A ₄ -T + 6 Da	458.220 (M+2H) ²⁺	13.7
			4.8				N.D.
			5.1				↑
			13.4		A ₄ -T + 9 Da	459.729 (M+2H) ²⁺	↑
			13.9				↑
			15.8		A ₄ -T + 12 Da	461.239 (M+2H) ²⁺	↑
	A ₂ -T + 6 Da	509.273 (M+H) ⁺	N.D.				↑
3	D ₃ -T	580.283 (M+H) ⁺	↑	5	D ₅ -T	451.714 (M+2H) ²⁺	↑
			18.0		D ₄ A ₁ -T	472.720 (M+2H) ²⁺	↑
			23.6		D ₄ A ₁ -T + 3 Da	474.229 (M+2H) ²⁺	↑
	D ₂ A ₁ -T	622.294 (M+H) ⁺	24.1		D ₃ A ₂ -T	493.725 (M+2H) ²⁺	↑
			N.D.		D ₃ A ₂ -T + 3 Da	495.234 (M+2H) ²⁺	44.3
			13.1		D ₃ A ₂ -T + 6 Da	496.744 (M+2H) ²⁺	N.D.
	D ₂ A ₁ -T + 3 Da	625.312 (M+H) ⁺	13.4		D ₂ A ₃ -T	514.730 (M+2H) ²⁺	↑
			13.6		D ₂ A ₃ -T + 3 Da	516.239 (M+2H) ²⁺	34.3
			13.9		D ₂ A ₃ -T + 6 Da	517.749 (M+2H) ²⁺	34.5
	D ₁ A ₂ -T	664.304 (M+H) ⁺	15.9		D ₂ A ₃ -T + 9 Da	519.258 (M+2H) ²⁺	N.D.
			10.7		D ₁ A ₄ -T	535.735 (M+2H) ²⁺	↑
			12.6				↑
	D ₁ A ₂ -T + 3 Da	667.323 (M+H) ⁺	13.1		D ₁ A ₄ -T + 3 Da	537.245 (M+2H) ²⁺	↑
			13.4		D ₁ A ₄ -T + 6 Da	538.754 (M+2H) ²⁺	↑
			13.9		D ₁ A ₄ -T + 9 Da	540.264 (M+2H) ²⁺	↑
			14.3		D ₁ A ₄ -T + 12 Da	541.773 (M+2H) ²⁺	↑
			14.7		A ₅ -T	556.741 (M+2H) ²⁺	↑
			15.8				↑
			17.9		A ₅ -T + 3 Da	558.250 (M+2H) ²⁺	↑
			N.D.				↑
	A ₃ -T	706.315 (M+H) ⁺	17.4		A ₅ -T + 6 Da	559.759 (M+2H) ²⁺	↑
			17.7				↑
	A ₃ -T + 3 Da	709.334 (M+H) ⁺	N.D.		A ₅ -T + 9 Da	561.269 (M+2H) ²⁺	↑
			5.8				↑
	A ₃ -T + 6 Da	712.352 (M+H) ⁺	6.2		A ₅ -T + 12 Da	562.778 (M+2H) ²⁺	↑
			6.8				↑
			7.5		A ₅ -T + 15 Da	564.288 (M+2H) ²⁺	↑
			8.0				↑
			8.9				
			9.3				
	A ₃ -T + 9 Da	715.371 (M+H) ⁺	N.D.

Fig. 6. UHPLC and total ion chromatograms of the PA-chitooligosaccharides after purification by preparative-SEC. (a); UHPLC chromatogram recorded by the UV/Vis detector set at a wavelength of 288 nm. The peaks were assigned based on their mass spectra. The separation mode of UHPLC is HILIC mode. Separation was achieved on the BEH Glycan column. (b); Base peak chromatogram acquired by MS.

行った. 誘導体化前のキトオリゴ糖のUHPLCクロマトグラムおよび抽出イオンクロマトグラムをFig. 4に示す. また, PA化キトオリゴ糖のUHPLCクロマトグラムおよび抽出イオンクロマトグラムをFig. 5に示す. 誘導体化前に検出されたキトオリゴ糖のピーク (m/z 222.098: A_1 (1価イオン), 383.167: D_1A_1 (1価イオン), 272.622: D_2A_1 (2価イオン), 374.161: D_2A_2 (2価イオン), 289.463: D_4A_1 (3価イオン)) が誘導体化後ではほとんど検出されず, その代わりにPA化されたキトオリゴ糖のピーク (m/z 300.156: A_1 -T (1価イオン), 231.116: D_1A_1 -T (2価イオン), 503.235: A_2 -T (1価イオン), 208.103: D_2A_1 -T (3価イオン), 332.656: D_1A_2 -T (2価イオン), 413.190: D_2A_2 -T (2価イオン)) が検出された (T: Tag (PA基)). 上記イオンはすべてプロトン付加イオンとして検出された. 以上より, キトオリゴ糖のPA誘導体化反応の進行を確認した. なお, 2-APのSEC分画からもPA化キトオリゴ糖が検出された (データ記載なし) が, 2-APとの分離が困難であったため, 配列解析には使用しなかった.

3.3 PA化キトオリゴ糖の配列解析

PA化キトオリゴ糖の一斉配列解析のため, UHPLC-タンデムMSによる解析を行った. 3.2節のUHPLC条件では

Fig. 7. Extracted ion chromatograms of the PA-chitooligosaccharides after purification by preparative-SEC. (a); Extracted ion chromatograms acquired by MS. Extracted ions, m/z 258.145 and 300.156 correspond to D_1 -T and A_1 -T, respectively. (b); Extracted ions, m/z 419.214, 461.225, 464.244, 503.235, and 506.254 correspond to D_2 -T, D_1A_1 -T, D_1A_1 -T + 3 Da, A_2 -T, and A_2 -T + 3 Da, respectively. (c); Extracted ions, m/z 622.294, 664.304, 667.323, 706.315, and 712.352 correspond to D_2A_1 -T, D_1A_2 -T, D_1A_2 -T + 3 Da, A_3 -T, and A_3 -T + 6 Da, respectively. (d); Extracted ions, m/z 392.185, 413.190, 414.700, 435.705, and 458.220 correspond to D_3A_1 -T, D_2A_2 -T, D_2A_2 -T + 3 Da, D_1A_3 -T + 3 Da, and A_4 -T + 6 Da, respectively. (e); Extracted ions, m/z 495.234, 516.239, and 517.749 correspond to D_3A_2 -T + 3 Da, D_2A_3 -T + 3 Da, and D_2A_3 -T + 6 Da, respectively.

Fig. 8. MS/MS spectra of the PA-chitooligosaccharides. (a); The precursor ion is m/z 461.225 (D_1A_1 -T) at 9.0 min. The ion indicating A-T (m/z 300.157) is detected as the product ion, so the sequence of this compound is DA. (b); The precursor ion is m/z 506.254 (A_2 -T + 3 Da) at 3.6 min. The ion indicating A-T (m/z 300.157) is detected as the product ion, so the sequence of this compound is (A + 3) A-T. The original sequence of this compound is DA because (A + 3) is translated to D. (c); The precursor ion is m/z 622.294 (D_2A_1 -T) at 24.1 min. The sequence of this compound is DDA. (d); The precursor ion is m/z 667.323 (D_1A_2 -T + 3 Da) at 13.4 min. The original sequence of this compound is ADDA. (e); The precursor ion is m/z 413.190 (D_2A_2 -T) at 28.9 min. The sequence of this compound is ADDA. (f); The precursor ion is m/z 435.705 (D_1A_3 -T + 3 Da) at 18.1 min. The original sequence of this compound is ADDA. (g); The precursor ion is m/z 516.239 (D_2A_3 -T + 3 Da) at 34.3 min. The original sequence of this compound is DDDAA.

ピークがブロード化しており (Fig. 5), カラムおよび溶離液などの条件を変更した. すなわち, カラムをBEH AmideからBEH Glycanに変更し, 水系溶離液 (1%ギ酸水溶液) に塩 (ギ酸アンモニウム) を添加した. さらにグラジエント勾配を緩やかにし, 移動相の流速を 0.5 mL min^{-1} から 0.4 mL min^{-1} へ, カラム温度を 50°C から 80°C へと最適化し, ピークを先鋭化させた. クロマトグラムを Fig. 6 に示す. MS スキャン分析より, 理論上可能性のあるPA化キトオリゴ糖の由来の化合物として, D_1 -T, A_1 -T, D_2 -T, D_1A_1 -T, D_1A_1 -T + 3 Da, A_2 -T, A_2 -T + 3 Da, D_2A_1 -T, D_1A_2 -T, D_1A_2 -T + 3 Da, A_3 -T, A_3 -T + 6 Da, D_3A_1 -T, D_2A_2 -T, D_2A_2 -T + 3 Da, D_1A_3 -T + 3 Da, A_4 -T + 6 Da, D_3A_2 -T + 3 Da, D_2A_3 -T + 3 Da, D_2A_3 -T + 6 Da が検出された (Table 1). 3 Da および 6 Da の増加は, PA化副反応であるトリデューテロアセチル化由来と推定した. 抽出イオンクロマトグラムを Fig. 7 に示す. UHPLCとHILICを組み合わせて分離を行うことで, 質量が等しい成分で複数のピークが検出され, 配列の異なる成分 (ヘテロキトアイソマー), 立体配座の異なる成分 (エピマー), トリデューテロアセチル基の位置が異なる異性体由来と考えられた. UHPLCの分離モードはHILIC (親水性相互作用クロマトグラフィー) を採用しており, 同じDPならば, 極性が高い化合物 (例えば D_2) はカラムの高極性充填剤との相互作用から, 極性が低い化合物 (例えば A_2) よりも遅く溶出した. 6量体以上は微量のため, あるいは質量が大きいためイオン化効率が低く,

検出されなかった.

MS スキャン分析で得られたイオン (Table 1) に対して, 同UHPLC条件でMS/MS測定を行った. 代表的なピークのMS/MSスペクトルを Fig. 8 に示す. MS/MSにより, キトオリゴ糖はグリコシド結合で開裂し, Yイオンが主に検出されるシンプルなMS/MSスペクトルが得られた. 還元末端を誘導体化しない場合, カチオン付加の位置によって, Y, Zイオン, またはB, Cイオンが検出されるが, PA基導入により, プロトン付加型のYイオンが顕著に検出されるようになった. 強度はYイオンよりも低いものの, Zイオンも一部検出された (Fig. 8(a)). これは, PA基がプロトンを付加しやすいことを示している. D_1A_3 -T + 3 Da (18.1 min) の解析手順を下記に示す. 1) m/z 435.705 (2価イオン) をプリカーサーイオンとして, m/z 300.157, 506.256, 667.323 のプロダクトイオン (すべてYイオン) を検出した. 2) m/z 300.157はA-T, m/z 506.256はA-Tより (A + 3) A-T, m/z 667.323はA-Tおよび (A + 3) A-TよりD (A + 3) A-Tに相当する. 3) プリカーサーイオンの組成 (D_1A_3 -T + 3 Da) から, 本成分の配列はAD (A + 3) A-Tと帰属される. 4) A + 3ユニットは前述のようにDがPA化副反応によりトリデューテロアセチル化されたものであるから, 本来の配列はADDAということになる. 配列解析の結果を Table 2 に示す. 一部成分から, Aがさらにアセチル化されたA + Acユニットが検出された (A + 42 Da). これは重水素が関与していないことからPA化副反応由来ではなく, 酢酸水溶

Table 2. Sequence analysis of the PA-chitooligosaccharides by UHPLC-MS. Sequence (Actual measurement) is the intact sequences expressed in mass spectra. PA-chitooligosaccharides containing trideuteroacetyl groups are highlighted in gray. Sequence (Translation) is the original sequence of chitooligosaccharides before PA derivatization. The reducing end is noted on the right. A + 3 and A + Ac + 3 units are translated to D and A units, respectively.

DP	Species	Precursor ion (m/z)	R.T. (min)	Sequence (Actual measurement)	Sequence (Translation)
1	D ₁ -T	258.145 (M + H) ⁺	2.9	D-T	D
	A ₁ -T	300.156 (M + H) ⁺	2.1	A-T	A
			2.2	↑	↑
2	D ₂ -T	419.214 (M + H) ⁺	13.0	DD-T	DD
			13.4	↑	↑
	D ₁ A ₁ -T	461.225 (M + H) ⁺	4.4	AD-T	AD
			4.5	↑	↑
			8.8	DA-T	DA
			9.0	↑	↑
	D ₁ A ₁ -T + 3 Da	464.244 (M + H) ⁺	7.6	D (A + 3)-T	DD
			7.8	(A + 3) D-T	↑
	A ₂ -T	503.235 (M + H) ⁺	3.6	AA-T	AA
			3.8	↑	↑
			4.8	↑	↑
			5.1	↑	↑
			10.3	D (A + Ac)-T	D (A + Ac)
			11.5	↑	↑
			12.4	↑	↑
			12.8	↑	↑
	A ₂ -T + 3 Da	506.254 (M + H) ⁺	3.6	(A + 3) A-T	DA
			3.8	↑	↑
			4.5	D (A + Ac + 3)-T	↑
			4.8	↑	↑
			5.1	DA-T	↑
			13.4	(A + 3) A-T	↑
			13.9	↑	↑
			15.8	D (A + Ac + 3)-T	↑
3	D ₂ A ₁ -T	622.294 (M + H) ⁺	18.0	ADD-T	ADD
			23.6	DDA-T	DDA
			24.1	↑	↑
	D ₁ A ₂ -T	664.304 (M + H) ⁺	13.1	ADA-T	ADA
			13.4	DAA-T	DAA
			13.6	↑	↑
			13.9	ADA-T	ADA
			15.9	DD (A + Ac)-T	DD (A + Ac)
	D ₁ A ₂ -T + 3 Da	667.323 (M + H) ⁺	10.7	(A + 3) DA-T	DDA
			12.6	↑	↑
			13.1	↑	↑
			13.4	D (A + 3) A-T	↑
			13.9	↑	↑
			14.3	(A + 3) DA-T	↑
			14.7	↑	↑
			15.8	DD (A + Ac + 3)-T	↑
			17.9	D (A + 3) A-T	↑
	A ₃ -T	706.315 (M + H) ⁺	17.4	AD (A + Ac)-T	AD (A + Ac)
			17.7	↑	↑
	A ₃ -T + 6 Da	712.352 (M + H) ⁺	5.8	(A + 3) (A + 3) A-T	DDA
			6.2	↑	↑
			6.8	(A + Ac + 6) DA-T	↑
			7.5	(A + 3) D (A + Ac + 3)-T	↑
			8.0	D (A + 3) (A + Ac + 3)-T	↑
			8.9	(A + 3) (A + 3) A-T	↑
			9.3	D (A + Ac + 6) A-T	↑
4	D ₃ A ₁ -T	392.185 (M + 2H) ²⁺	40.9	DDDA-T	DDDA
	D ₂ A ₂ -T	413.190 (M + 2H) ²⁺	25.2	ADDA-T	ADDA
			28.3	↑	↑
			28.9	↑	↑
			29.2	↑	↑
	D ₂ A ₂ -T + 3 Da	414.700 (M + 2H) ²⁺	30.2	D (A + 3) DA-T	DDDA
	D ₁ A ₃ -T + 3 Da	435.705 (M + 2H) ²⁺	15.0	AD (A + 3) A-T	ADDA
			18.1	↑	↑
			18.5	↑	↑
			19.1	D (A + 3) AA-T	DDAA
			19.6	↑	↑
			20.7	ADD (A + Ac + 3)-T	ADDA
			22.0	DDA (A + Ac + 3)-T	DDAA
			22.9	AD (A + 3) A-T	ADDA
	A ₄ -T + 6 Da	458.220 (M + 2H) ²⁺	9.5	A (A + 3) (A + 3) A-T	↑
			12.0	AD (A + 3) (A + Ac + 3)-T	↑
			13.7	A (A + 3) (A + 3) A-T	↑
5	D ₃ A ₂ -T + 3 Da	495.234 (M + 2H) ²⁺	44.3	DD (A + 3) DA-T	DDDDA
	D ₂ A ₃ -T + 3 Da	516.239 (M + 2H) ²⁺	34.3	D (A + 3) DAA-T	DDDA
	D ₂ A ₃ -T + 6 Da	517.749 (M + 2H) ²⁺	34.5	DD (A + 3) (A + 3) A-T	DDDDA

Table 3. Summary of the sequences of the PA-chitooligosaccharides treated in this paper. The reducing end is noted on the right. A+Ac unit is equal to acetylated N-acetylglucosamine.

1mer	2mer	3mer	4mer	5mer
D	DD	DDA	DDDA	DDDDA
A	DA	DD (A+Ac)	DDAA	DDDA
	D (A+Ac)	ADD	ADDA	
	AD	DAA		
	AA	ADA		
		AD (A+Ac)		

液中での酵素分解時における副反応由来と推定した。また、質量およびMS/MSスペクトル（配列）は等しいが保持時間が異なる成分が検出されたが、これは同じ構成糖単位の中でトリデューテロアセチル基が導入された位置が異なる異性体由来の可能性があり、あるいは試料に元々含まれるか、前処理中に生成したエピマーと考えられる。エピマー同士はMS/MSスペクトルが変化しないため、本手法では構造推定が困難であった。まとめると、本実験ではD, A, DD, DA, D (A+Ac), AD, AA, DDA, DD (A+Ac), ADD, DAA, ADA, AD (A+Ac), DDDA, DDAA, ADDA, DDDDA, DDDAA（還元末端は右側とする）のキトオリゴ糖が検出された（Table 3）。このように1~5量体について、18種類のキトオリゴ糖の配列を同定した。本UHPLC条件では、低DPのヘテロキトアイソマーの分離を優先したため、DPが増加すると溶出時間が遅くなる。DPが高いとMS感度の低下が予想されることもあり、本研究で同定された18種のキトオリゴ糖が酵素消化物全体に占める割合は不明である。構造に依らずMS感度が一定と仮定すれば検出成分の定量は可能と考えられる。

本手法では、UHPLCとHILICを組み合わせることでヘテロキトアイソマーを分離したため、それらの分離なしではイオン量の減少を伴うMSⁿ操作が必要などところ、MS/MSのみで配列解析が可能という利点がある。つまり、従来法⁶⁾ではMSⁿによるプロダクトイオンの質量差からヘテロキトアイソマーの分離を行ったが、本手法ではUHPLCによりヘテロキトアイソマーを分離し、感度低下の少ないMS/MSで解析可能とした。ヘテロキトアイソマー分離後にイオン化するため、イオンサプレッションによる微量成分の感度低下も考えにくい。また、本法は誘導体化の回数が酢酸-d₄を用いたPA化の1回で済み、前処理が簡便となった。さらに、PA基の導入によりYイオンが主に検出されるシンプルなMS/MSスペクトルとなり、配列解析が容易である。しかしながら、本実験で用いたUHPLC条件では、DP 2~4のヘテロキトアイソマーの分離は可能であったが、より大きなDPになると分離が困難になると考えられる。例えばDP 6 (D₃A₃) のヘテロキトアイソマーの総数は20に上り、HILICにおける分離のパラメーターであるアイソマー同士の極性も似通ってくることから、UHPLCによる分離の困難が予想される。他の成分分離手段の利用を含め、今後も検討すべき課題である。

4. 結 論

キトサンの解重合で得られるキトオリゴ糖は、DP, DA および配列に幅を持つ複雑な混合物であるため、成分分離などの前処理なしで個々の成分を構造解析することは困難である。本研究では還元末端のPA誘導体化によるマーキングおよびUHPLC-タンデムMSを用いたMS/MS解析により、キトオリゴ糖混合物の一斉配列解析法を確立した。UHPLCによりヘテロキトアイソマーを分離することでMSⁿ操作が必要なくなり、MS/MSでの配列解析が可能となった。これによりMSⁿおよびイオンサプレッションによる感度低下が回避できる。また、PA誘導体化により強度の高いYイオンを用いて解析できる点も有用である。本分析法は、キチンオリゴ糖を用いた脱アセチル化酵素の特性評価や、生理活性作用を持つ特定配列のキトオリゴ糖の詳細解析および分離・精製への応用が期待される。

文 献

- 1) 矢吹 稔, 石川文保, 大宝 明, 島原健三, 戸倉清一, 大石邦夫, 古賀大三, 滝口泰之, 平野茂博, “最後のバイオマス キチン, キトサン”, キチン, キトサン研究会編, 技報堂出版, 東京 (1988), 第1章, p. 1.
- 2) P. K. Dutta, J. Dutta, and V. S. Tripathi, *J. Sci. Ind. Res.*, **63**, 20 (2004).
- 3) B. B. Aam, E. B. Heggset, A. L. Norberg, M. Sørle, K. M. Vårum, and V. G. Eijsink, *Mar. Drugs*, **8**, 1482 (2010).
- 4) B. K. Park and M. Kim, *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 5152 (2010).
- 5) W. Xia, P. Liu, J. Zhang, and J. Chen, *Food Hydrocolloids*, **25**, 170 (2011).
- 6) S. Haebel, S. Bahrke, and M. G. Peter, *Anal. Chem.*, **79**, 5557 (2007).
- 7) J. M. Einarsson, S. Bahrke, B. T. Sigurdsson, C. H. Ng, P. H. Petersen, O. E. Sigurjonsson, H. Jonsson Jr., J. Gislason, F. R. Thormodsson, and M. G. Peter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **434**, 298 (2013).
- 8) P. Vander, K. M. Vårum, A. Domard, N. E. E. Gueddari, and B. M. Moerschbacher, *Plant Physiol.*, **118**, 1353 (1998).
- 9) I. Tsigos, N. Zydowicz, A. Martinou, A. Domard, and V. Bouriotis, *Eur. J. Biochem.*, **261**, 698 (1999).
- 10) K. Tokuyasu, M. Mitsutomi, I. Yamaguchi, K. Hayashi, and Y. Mori, *Biochemistry*, **39**, 8837 (2000).
- 11) F. L. Dévédec, L. Bazinet, A. Furtos, K. Venne, S. Brunet, and M. A. Mateescu, *J. Chromatogr. A*, **1194**, 165 (2008).
- 12) T. Hattori, N. Anraku, and R. Kato, *J. Chromatogr.*, **878**, 477 (2010).
- 13) O. Hekmat, K. Tokuyasu, and S. G. Withers, *Biochem. J.*, **374**, 369 (2003).
- 14) J. Kim, J. Kim, J. Hong, S. Lee, S. Park, J.-H. Lee, and J. Kim, *Carbohydr. Res.*, **372**, 23 (2013).
- 15) M.-C. Tang, A. Nisole, C. Dupont, J. N. Pelletier, and K. C. Waldron, *J. Biotechnol.*, **155**, 257 (2011).
- 16) B. Doman and C. Costello, *Glycoconjugate J.*, **5**, 397 (1988).
- 17) S. A. Lopatin, M. M. Ilyin, V. N. Pustobaev, Z. A. Bezchetnikova, V. P. Varlamov, and V. A. Davankov, *Anal. Biochem.*, **227**, 285 (1995).
- 18) A. Kondo, J. Suzuki, N. Kuraya, S. Hase, I. Kato, and T. Ikenaka, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2169 (1990).

Keywords: Chitooligosaccharides, Chitin, Chitosan, Ultra high performance liquid chromatography, Hydrophilic interaction chromatography, Mass spectrometry