

tems, Foster City, Calif., USA) or an HP G1005A Protein Sequencing System (Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif., USA); each fragment was analyzed for 5 cycles.

Carboxymethylation and Peptide Mapping Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC/MS/MS)

The digested OVM sample was separated electrophoretically as described above, stained with CBB, and the stained bands were cut out. The gel pieces were homogenized in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.1% SDS and the proteins were extracted. The extracts were concentrated and purified by acetone precipitation. The acetone precipitates were incubated with 2-mercaptoethanol (92.5 mM) in 72 µl of 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.6) containing 8 M guanidine hydrochloride and 5 mM EDTA at room temperature for 2 h. To this solution, 1.5 mg of monoiodoacetic acid was added, and the mixture was incubated at room temperature for 2 h in the dark. The reaction mixture was desalted using a MicroSpin G-25 column (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) and lyophilized. Reduced and carboxymethylated proteins were digested with trypsin (50 ng/µl in 50 mM NH₄HCO₃).

Tandem electrospray mass spectra were recorded using a hybrid quadrupole/time-of-flight spectrometer (Qstar Pulsar i; Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) interfaced to a CapLC (Magic 2002; Michrom BioResources, Auburn, Calif., USA). Samples were dissolved in water and injected into a C18 column (0.2 × 50 mm, 3 µm, Magic C18, Michrom BioResources). Peptides were eluted with a 5–36% acetonitrile gradient in 0.1% aqueous formic acid over 60 min at a flow rate of 1 µl/min after elution with 5% acetonitrile for 10 min. The capillary voltage was set to 2,600 V, and data-dependent MS/MS acquisitions were performed using precursors with charge states of 2 and 3 over a mass range of 400–2,000.

Western Blotting of Digested Fragments with Human Serum IgE

The digested OVM samples were applied to a 10–20% polyacrylamide Tris/Tricine 2D gel, followed by electrical transfer to a nitrocellulose membrane. The membrane was then blocked with 0.5% casein-PBS (pH 7.0) and cut into 4-mm strips. The strips were incubated with diluted human serum (1/4 to 1/5) in 0.2% casein-PBS (pH 7.0) at room temperature for 1 h and then at 4°C for 18 h. After washing with 0.05% Tween 20-PBS, the strips were incubated with rabbit anti-human IgE (Fc) antibodies (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, The Netherlands) at room temperature for 1 h, and then with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit Ig antibodies (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) at room temperature for 1 h. Finally, the strips were reacted with Konica ImmunoStain HRP-1000 (Konica, Tokyo, Japan), according to the manufacturer's protocol.

Results

Kinetics of OVM Digestion by Pepsin

OVM was digested in SGF containing various concentrations of pepsin, and the fragments were separated by SDS-PAGE and stained with CBB (fig. 1). The molecular weight of OVM, based on its amino acid sequence, is about 20 kDa, but a broad band representing intact OVM

appeared at about 34–49 kDa in the SDS-PAGE gel because of the presence of five N-linked sugar chains. The pepsin band was detected at 39 kDa, overlapping with the intact OVM band, and lysozyme (14 kDa) contamination was detected in the OVM sample that was used. Intact OVM rapidly disappeared within 0.5 min in SGF (pepsin/OVM = 10 unit/µg), and a fragment band was detected at 7 kDa. When the pepsin content in SGF was reduced to 1 and 0.1 unit/µg, the digestion rate markedly decreased. Intact OVM was still detected after 30 min when the pepsin/OVM ratio was 0.1 unit/µg. The fragment bands were clearer (fig. 2) when a concentrated SGF-digested OVM solution (pepsin/OVM = 1 unit/µg, digestion times 5 and 30 min) was used, followed by SDS-PAGE. As shown in figure 2, a strong 23.5- to 28.5-kDa band (FR 1) was detected at 5 min, while 10- (FR 2), 7- (FR 3) and 4.5- to 6-kDa (FR 4) bands were detected after 30 min. FR 1 and FR 2 were both positively stained by PAS, suggesting that the FR 1 and FR 2 fragments have high carbohydrate contents. The time courses for the amounts of intact OVM and the four fractions are plotted in figure 3, where the pepsin/OVM ratio is 1 unit/µg. FR 1 rapidly increased but slowly disappeared after 2 min. FR 2 and FR 3 also rapidly reached maximum values at 5 min and then slowly disappeared. On the other hand, FR 4 gradually increased throughout the entire period of the experiment.

Preheating (at 100°C for 5 or 30 min) of the OVM solution (5 mg/ml in water) did not influence the digestion pattern (fig. 1).

Table 1. N-Terminal sequences of pepsin fragments

Digestion period	Fraction	Fragment Residues	Sequence	Ratio % ^a	
5 min	FR 1	1-1	50–54	FGTNI	73.1
		1-2	51–55	GTNIS	11.6
		1-3	1–5	AEVDC	6.9
5 min	FR 2	2-1	1–5	AEVDC	68.8
		2-2	134–138	VSVDC	28.2
5 min	FR 3	3-1	1–5	AEVDC	48.4
		3-2	134–138	VSVDC	24.3
		3-3	104–108	NECLL	9.6
		3-4	85–89	VLCNR	6.5
30 min	FR 4	4-1	134–138	VSVDC	30.6
		4-2	104–108	NECLL	24.0
		4-3	19–23	VLVCN	20.6

^a Molar ratios of the fragments to the total amount in each fraction.

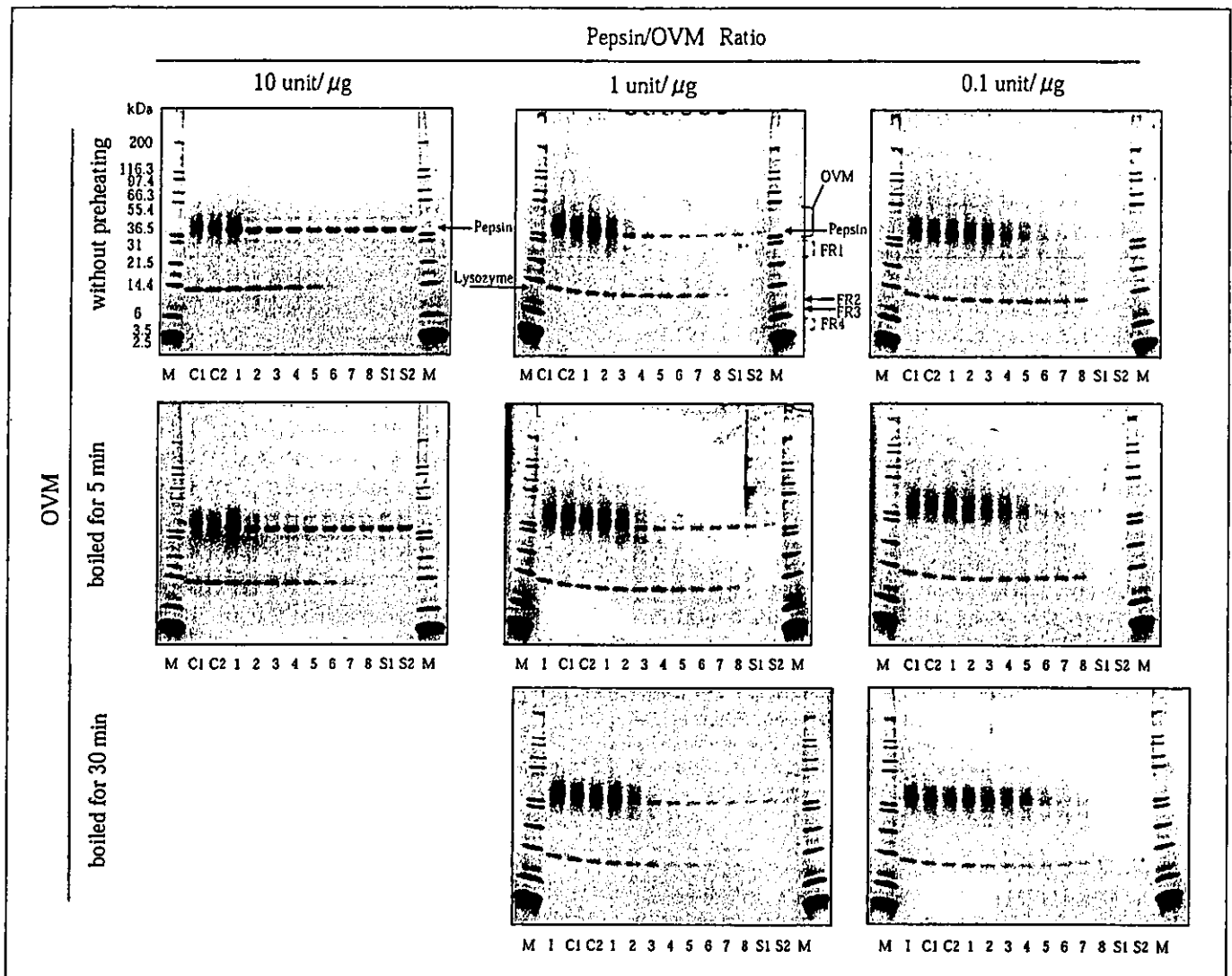


Fig. 1. Kinetic patterns of OVM digestion in SGF-containing pepsin. Digested samples were analyzed by SDS-PAGE followed by CBB staining. The digestion patterns of OVM without preheating (upper panels), preheated at 100°C for 5 min (middle panels), and preheated at 100°C for 30 min (lower panels) are shown. The ratio of pepsin to OVM was 10 unit/1 μg (left), 1 unit/1 μg (middle), and 0.1 unit/1 μg (right). Lane M = Molecular weight markers; lanes C1 and

C2 = OVM without pepsin at 0 (C1) and 60 (C2) min; lanes 1–8 = SGF-digested OVM at 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 and 60 min, respectively; lanes S1 and S2 = SGF alone at 0 (S1) and 60 (S2) min; lanes I = OVM without preheating; FR 1 = fraction 1 containing a fragment at 23.5–28.5 kDa; FR 2 = fraction 2 containing a 10-kDa fragment; FR 3 = fraction 3 containing a 7-kDa fragment; FR 4 = fraction 4 containing 4.5- to 6-kDa fragments.

Sequence Analysis of OVM Fragments

The sequences of the five N-terminal residues in each fragment were analyzed, and the data are summarized in table 1. Figure 4 schematically depicts the identified fragments; the arrows in the upper panel indicate the sites of pepsin cleavage.

The internal sequences of the FR 1, FR 3, and FR 4 fragments were also identified by LC/MS/MS and are shown in table 2 and in the upper panel of figure 4.

Reactivity of the Fragments with Serum IgE from Patients with Egg White Allergy

Western blot analysis using patient sera as the source of the primary antibodies was performed to identify sera that reacted with intact OVM and the SGF fragments. Representative blotting data are shown in figure 5, and all the results are listed in table 3. Ninety-two percent of the serum samples from allergic patients reacted with OVM, and 93% of the OVM-positive sera reacted with FR 1

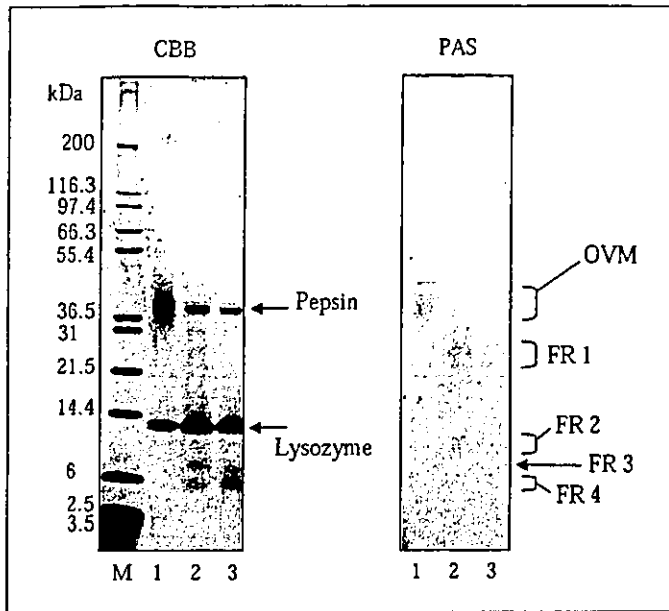


Fig. 2. CBB and PAS staining of OVM fragments following digestion in SGF (pepsin/OVM = 1 unit/ μ g) for 5 and 30 min. Lane M = Molecular weight markers; lane 1 = original OVM (2.5 μ g/lane); lanes 2 and 3 = OVM digested for 5 and 30 min, respectively, and concentrated (12 μ g, equivalent to the original OVM/lane). Samples were applied to two SDS-PAGE gels and electrophoresed. One plate (left panel) was stained with CBB reagent, and the other (right panel) was stained with PAS reagent.

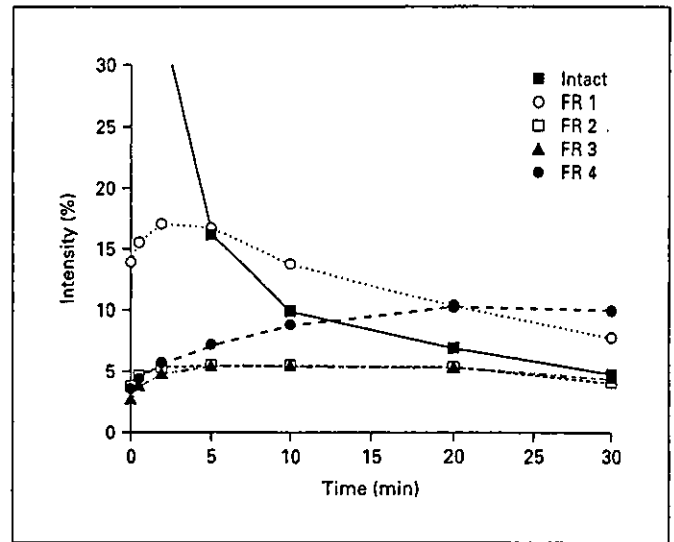
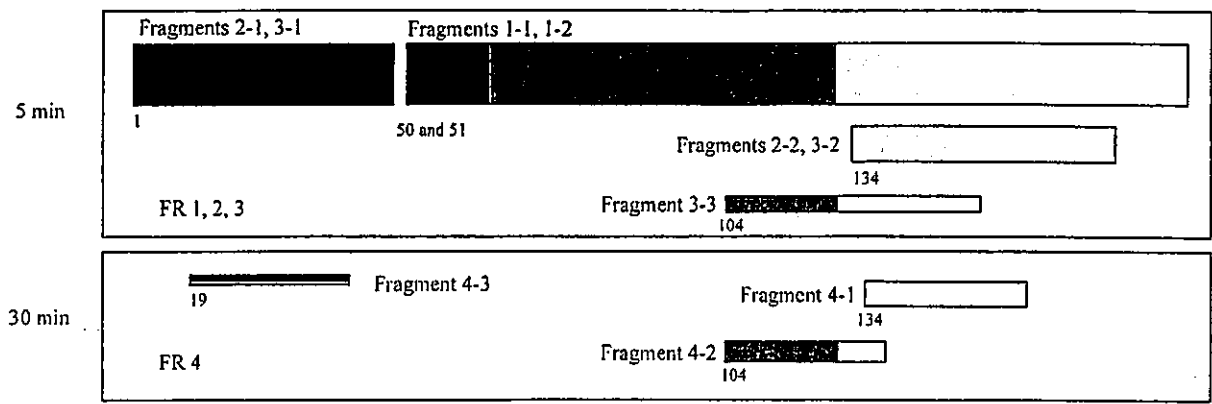
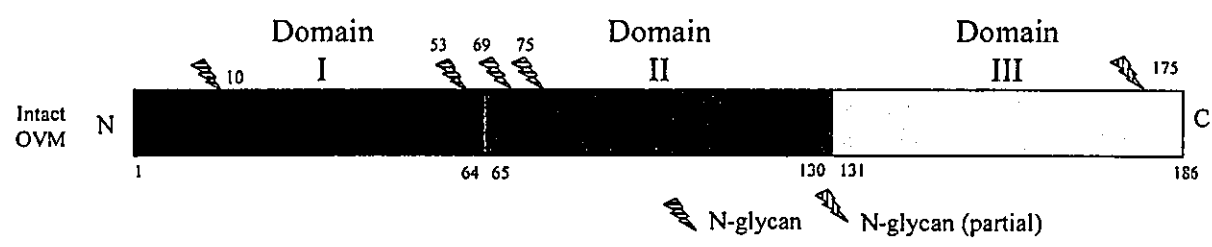


Fig. 3. Quantification of the SGF-digestion pattern of intact OVM and the digestion fragments at a pepsin/OVM ratio of 1 unit/ μ g. The intensity of each band was calculated using the ratio of the band's density to the total density of the originally detected band at $t = 0$. Values are the mean of duplicate analyses. Similar results were observed in another set of experiments.

Table 2. Identified inside sequences in pepsin- and trypsin-digested OVM

Pepsin digestion	Fraction	Residues	Sequence
5 min	FR 1	83–89	VMVLCNR
		90–103	AFNPVCGTDGVTYD
		90–112	AFNPVCGTDGVTYDNECLLCAHK
		90–122	AFNPVCGTDGVTYDNECLLCAHKVEQGASVDKR
		113–122	VEQGASVDKR
5 min	FR 3	90–112	AFNPVCGTDGVTYDNECLLCAHK
		90–122	AFNPVCGTDGVTYDNECLLCAHKVEQGASVDKR
		104–111	NECLLCAH
		104–112	NECLLCAHK
		104–121	NECLLCAHKVEQGASVDK
		104–122	NECLLCAHKVEQGASVDKR
		113–122	VEQGASVDKR
		134–159	VSVDCSEYKPKDCTAEDRPLCGSDNK
165–185	CNFCNAVVESNGTLTSLSHFGK		
30 min	FR 4	90–112	AFNPVCGTDGVTYDNECLLCAHK
		104–111	NECLLCAH
		104–112	NECLLCAHK
		104–122	NECLLCAHKVEQGASVDKR
		112–122	KVEQGASVDKR
		113–121	VEQGASVDK
		113–122	VEQGASVDKR
		165–185	CNFCNAVVESNGTLTSLSHFGK

1 11 21 31 41 51
 | | | | | |
 1 AEVDCSRFPN ATDKEGKDVL VCNKDLRPIC GTDGVTYTND CLLCAYSIEF GTNISKEHDG 60
 61 ECKETVPMNC SSYANTTSED GKVMVLCNRA FNPVCGTDGV TYDNECLLCA HKVEQGASVD 120
 121 KRHDGGCRKE LAAYSDVDCSE YKPDCTAED RPLCGSDNKT YGNKCNFCNA VVESNGTLTL 180
 181 SHFGKC



4

after 5 min of digestion. Three of the serum samples also reacted with FR 2, FR 3, and FR 4 after 30 min of digestion.

The three samples that react with FR 2, FR 3, and FR 4 were obtained from patients who exhibited persistent allergies to egg white. One of these serum samples, No. 4, was obtained from a 3-year-old girl who is presently 6 years old; her total IgE level has decreased slightly to 4,450 IU/ml, but the specific IgE level for egg white remains at more than 100 IU/ml, and the patient has not outgrown her hypersensitivity to eggs. Another patient, No. 13, was a 1-year-old boy; 7 years later, his total and egg white-specific IgE levels had been reduced to 947 and 6.85 IU/ml, respectively, but eating raw eggs still caused allergic symptoms. The third FR 4-positive patient, No. 19, was an 11-year-old boy whose total IgE level decreased to 3,940 IU/ml and whose egg white-specific IgE decreased to 13.5 IU/ml after a period of about 2 years; however, this patient has also not outgrown his allergies. These cases and our previously reported data [17] indi-

cate that the induction of egg white tolerance may be difficult in patients whose serum IgE exhibits binding activity to digested small fragments of OVM.

Discussion

In the SGF-digestion system, preheating the OVM (100°C for 5 or 30 min) did not affect the OVM digestion pattern (fig. 1), consistent with the results of previous reports [9] in which heat treatment did not markedly decrease the allergenicity of OVM. On the other hand, a decrease in the pepsin/OVM ratio dramatically reduced the digestion rate, suggesting that digestibility may vary depending on the amount of OVM intake and the conditions of the individual's digestion system. In its native state, OVM possesses serine protease inhibitor activity. Fu et al. [11] and our group [10] previously reported that intact OVM was stable for 60 min in simulated intestinal fluid. Kovacs-Nolan et al. [15] also reported that pepsin-

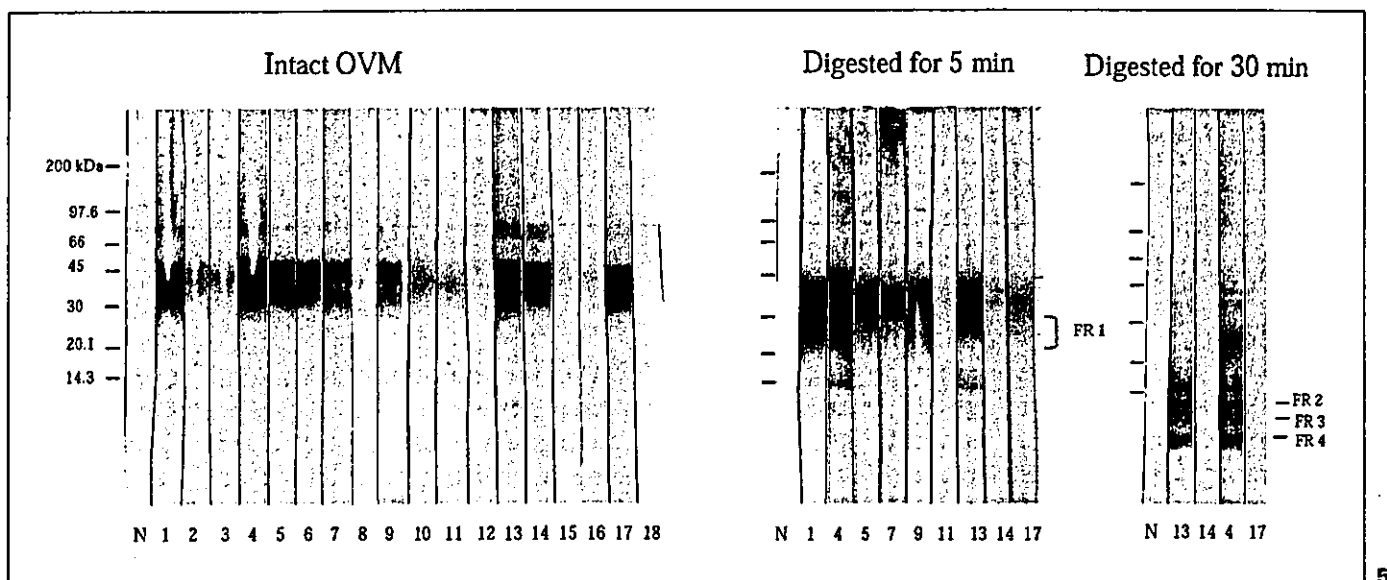


Fig. 4. Amino acid sequence and schematic representation of the SGF-digestion pattern of OVM. The amino acid sequence of OVM is shown in the upper panel. The arrows indicate the SGF-digested points according to the results of an N-terminal analysis of the OVM fragments (table 1); and the underlined regions indicate sequences identified by LC/MS/MS. Solid line = FR 1; dotted line = FR 3; dashed line = FR 4. Shaded areas represent reported human IgE epitopes [16]. The lower panel is a summary of the OVM digestion pattern according to N-terminal analysis.

Fig. 5. Western blot analysis of intact OVM and the fragments with serum IgE from egg white allergic patients and a normal volunteer. The fragments were prepared as described in the legend of figure 2. The number of each strip corresponds to the sample numbers in table 2.

Table 3. Reactivity of OVM and pepsin fragments with patient serum IgE

No.	IgE content, IU/ml		Reactivity with patient IgE ¹				
	total	egg white-specific	intact OVM	FR 1	FR 2	FR 3	FR 4
1	3,700	>100	+++	++	-	-	-
2	402	3.74	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	251	6.85	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	6,510	>100	+++	+++	+	+	++
5	2,060	>100	++	++	-	-	-
6	1,240	12.4	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	4,180	31.3	++	++	-	-	-
8	56	20.1	±	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	1,355	50.7	++	++	-	-	-
10	22,810	2.11	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	1,463	4.65	+	-	-	-	-
12	14,230	0.70-3.49	±	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	8,000	>100	+++	+++	+	+	++
14	22,490	1.05	+++	±	-	-	-
15	934	66.3	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16	345	20.1	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17	1,500	80	++	+	-	-	-
18	3,300	>10	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19	20,500	26.8	+++	++	±	±	±
20	138	45.4	++	+	-	-	-
21	940	2.44	+	+	-	-	-
22	91	0.70-3.49	+	±	-	-	-
23	828	0.9	++	+	-	-	-
24	21	3.50-17.4	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	positive/tested		22/24 (92%) ²	13/14 (93%) ³	3/14 (21%) ³	3/14 (21%) ³	3/14 (21%) ³

n.d. = Not done.

¹ Intensity of the reactivity of each band was evaluated by the ratio to normal serum: - = <1; ± = 1-2; + = 2-5; ++ = 5-10; +++ = >10.² Percent of egg white-positive samples.³ Percent of intact OVM-positive samples.

digested OVM retains its trypsin inhibitor activity. Therefore, OVM and its pepsin-digested fragments were thought to be stable in the small intestine.

At a pepsin/OVM ratio of 1 unit/μg, FR 1 reached a maximum level after 2 min of digestion, while both FR 2 and FR 3 reached maximum levels after 5 min of digestion; thereafter, FR 1, FR 2, and FR 3 gradually decreased. However, FR 4 increased continuously throughout the 30-min period of digestion and the major fragments were seen after 30 min of digestion (fig. 3). FR 4 was mainly composed of three fragments whose N-terminals were 134V, 104N and 19V (table 1). A C-terminal sequence, 165N-185C, was also identified in FR 4 (table 2). These fragments contain known IgE epitopes [19] and therefore may cause allergic responses. Three of the

OVM-positive sera from patients with egg white allergy reacted positively with the FR 4 fragments (table 3).

The present results are consistent with the previous finding that pediatric subjects with a higher IgE-binding activity to pepsin-treated OVM were unlikely to outgrow their egg allergy [17]. For peanut allergies, differences in IgE-binding epitopes have been reported between the patients with clinically active peanut allergies and those who developed a tolerance, regardless of the presence of high or low peanut-specific IgE levels [20].

The N-terminal residue of the major fragment (4-1) of FR 4 was Val-134 (30%; table 1). This fragment retains most of domain III, which has been reported to have significantly higher human IgG- and IgE-binding activities than those of domains I and II [12]. A domain-III OVM

variant has also been reported to cause a reduction in immunogenicity and allergenicity [21].

Domains I, II, and III contain one, three, and one N-glycosylation sites, respectively [7]. The possible relation between the carbohydrate chain in domain III and allergenicity is interesting. One report suggested that this carbohydrate chain may play an important role in allergenic determinants against human IgE antibody [13], and another report suggested that the carbohydrate chains of OVM may protect against peptic hydrolysis [22]. However, the carbohydrate moieties have been shown to have only a minor effect on allergenicity [23]. As shown in figure 2, intact OVM, FR 1, and FR 2 fragments were detected using PAS staining, suggesting the presence of carbohydrate chains, but FR 4 was not stained with the PAS reagent, despite being clearly detected with CBB. Therefore, FR 4 might contain little or no carbohydrate chains. Since FR 4 seems to maintain its allergenic potential, as described above, the absence of the carbohydrate chains in FR 4 suggests that they are not necessary for OVM allergenicity. Since the minimum peptide size capable of eliciting significant clinical symptoms of allergic reactions is thought to be 3.1 kDa [24], FR 4 may be able to trigger mast cell activation and elicit clinical symptoms.

In this report, the SGF-digestion kinetic pattern of OVM was investigated in detail, and the partial sequences

of the fragments in the 4 fractions separated by SDS-PAGE were determined. Furthermore, the reactivity of the fragments with a number of serum samples from patients with egg white allergies was detected using Western blotting. The four fractions were separated according to their molecular weight and consisted of more than one fragment, as determined by N-terminal analysis. The identified sequences that started at Asn-104 and Val-134 in FR 3, as determined using LC/MS/MS (table 2), coincided with the 3-2 and 3-3 fragments in the N-terminal analysis (table 1), and the sequence that started at Asn-104 in FR 4 coincided with fragment 4-2. Moreover, the LC/MS/MS analysis indicated that FR 3 and FR 4 contained other parts of domain II and the C-terminal sequence N165-C185, which are thought to be minor components of these fractions. The combination of SGF digestion and patient IgE may provide useful information for the diagnosis and prediction of potential OVM allergenicity.

Acknowledgement

This study was supported by a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare, and the Cooperative System for Supporting Priority Research of Japan Science and Technology Agency.

References

- 1 Sampson HA, McCaskill CC: Food hypersensitivity and atopic dermatitis: Evaluation of 113 patients. *J Pediatr* 1985;107:669-675.
- 2 Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, Zeiger RS, Lehrer S, Sachs M, Bush RK, Metcalfe DD: Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: A manual. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:986-997.
- 3 Bock SA, Atkins FM: Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of double-blind, placebo-controlled food challenges. *J Pediatr* 1990;117:561-567.
- 4 Boyano-Martinez T, Garcia-Ara C, Diaz-Pena JM, Martin-Esteban M: Prediction of tolerance on the basis of quantification of egg white-specific IgE antibodies in children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:304-309.
- 5 Kotaniemi-Syrjanen A, Reijonen TM, Romppanen J, Korhonen K, Savolainen K, Korppi M: Allergen-specific immunoglobulin E antibodies in wheezing infants: The risk for asthma in later childhood. *Pediatrics* 2003;111:e255-e261.
- 6 Li-Chan E, Nakai S: Biochemical basis for the properties of egg white. *Crit Rev Poultry Biol* 1989;2:21-58.
- 7 Kato I, Schrode J, William J, Kohr WJ, Laskowski M Jr: Chicken ovomucoid: Determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains. *Biochemistry* 1987;26:193-201.
- 8 Matsuda T, Watanabe K, Nakamura R: Immunochemical and physical properties of peptic-digested ovomucoid. *J Agric Food Chem* 1983;31:942-946.
- 9 Honma K, Aoyagi M, Saito K, Nishimuta T, Sugimoto K, Tsunoo H, Niimi H, Kohno Y: Antigenic determinants on ovalbumin and ovomucoid: Comparison of the specificity of IgG and IgE antibodies. *Arerugi* 1991;40:1167-1175.
- 10 Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Sawada J: Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol Pharm Bull* 2003;26:969-973.
- 11 Fu TJ, Abbott UR, Hatzos C: Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study. *J Agric Food Chem* 2002;50:7154-7160.
- 12 Zhang JW, Mine Y: Characterization of IgE and IgG epitopes on ovomucoid using egg-white-allergic patients' sera. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:124-127.
- 13 Matsuda T, Nakamura R, Nakashima I, Hasegawa Y, Shimokata K: Human IgE antibody to the carbohydrate-containing third domain of chicken ovomucoid. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;129:505-510.
- 14 Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, Fu TJ, Glatt CM, Hadfield N, Hatzos C, Hefle SL, Heylings JR, Goodman RE, Henry B, Herouet C, Holsapple M, Ladics GS, Landry TD, MacIntosh SC, Rice EA, Privalle LS, Steiner HY, Teshima R, Van Ree R, Woolhiser M, Zawodny J: A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004;39:87-98.

- 15 Kovacs-Nolan J, Zhang JW, Hayakawa S, Mine Y: Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid. *J Agric Food Chem* 2000;48:6261-6266.
- 16 Besler M, Petersen A, Steinhart H, Paschke A: Identification of IgE-Binding Peptides Derived from Chemical and Enzymatic Cleavage of Ovomuroid (Gal d 1). Internet Symposium on Food Allergens 1999;1:1-12. <http://www.food-allergens.de>
- 17 Urisu A, Yamada K, Tokuda R, Ando H, Wada E, Kondo Y, Morita Y: Clinical significance of IgE-binding activity to enzymatic digests of ovomucoid in the diagnosis and the prediction of the outgrowing of egg white hypersensitivity. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120:192-198.
- 18 Zacharius RM, Zell TE, Morrison JH, Woodlock JJ: Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal Biochem* 1969;30:148-152.
- 19 Mine Y, Zhang JW: Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292:1070-1074.
- 20 Beyer K, Ellman-Grunther L, Jarvinen KM, Wood RA, Hourihane J, Sampson HA: Measurement of peptide-specific IgE as an additional tool in identifying patients with clinical reactivity to peanuts. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:202-207.
- 21 Mine Y, Sasaki E, Zhang JW: Reduction of antigenicity and allergenicity of genetically modified egg white allergen, ovomucoid third domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302:133-137.
- 22 Matsuda T, Gu J, Tsuruta K, Nakamura R: Immunoreactive glycopeptides separated from peptic hydrolysate of chicken egg white ovomucoid. *J Food Sci* 1985;50:592-594.
- 23 Cooke SK, Sampson HA: Allergenic properties of ovomucoid in man. *J Immunol* 1997;159: 2026-2032.
- 24 Kane PM, Holowka D, Baird B: Cross-linking of IgE receptor complexes by rigid bivalent antigens greater than 200 Å in length triggers cellular degranulation. *J Cell Biol* 1988;107: 969-980.

[シンポジウム：プロテオミクスの新技術—電気泳動とマスペクトロメトリー—]

LC/MS/MS を用いた糖タンパク質の糖鎖解析 —糖鎖結合位置及び結合糖鎖の解析—

伊藤さつき・原園 景・川崎ナナ・橋井則貴・松石 紫・川西 徹・早川堯夫

SUMMARY

Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) is a powerful tool for the analysis of glycosylation sites and of site-specific glycosylation in a glycoprotein. The glycopeptides in a complex mixture of tryptic digest can be separated and monitored by using oxonium ions produced from a carbohydrate moiety through CID-MS/MS. Based on b and y ions in the product ion mass spectra, peptides can be identified, and the structure of carbohydrates can be deduced from B ions and the molecular weight of precursor glycopeptide. Here we show the site-specific glycosylation analysis of α -fetoprotein and an SDS-PAGE gel-separated GPI-anchored protein.

Key words: LC/MS/MS, glycopeptide, product ion scan, QqTOF-MS, gel-separated protein.

はじめに

生体内に存在する全タンパク質の半分以上が糖鎖付加を受けていると言われるように、糖鎖付加は、主要な翻訳後修飾の1つである。糖タンパク質の糖鎖部分には、結合部位ごとに不均一性が存在し、病気・発生・老化等によって変化することが知られている¹⁻³⁾。様々な生命現象における糖タンパク質の糖鎖の役割を解明するためには、結合する糖鎖構造の変化を明らかにすることはもちろんであるが、構造が変化した糖鎖がどの位置に結合していたかを明らかにすることが重要である。

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) は、タンパク質の酵素消化によって得られたペプチドと糖ペプチドの混合物を LC で分離しながら、オンラインで MS/MS 分析を行うのに用いられている。糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルにはペプチドだけでなく、糖鎖構造に関する多くの情報が含まれているので、LC/MS/MS は部位特異的糖鎖解析に非常に有用である。しかし、無数のペプチドピークの中から糖ペプチドピークを特定するのは難しく、いかに糖ペプチドのピークを選別するかが、糖ペプチド解析の鍵となっている。

ペプチド・糖ペプチドの中から、糖ペプチドを選別する

方法として、LC 上で選別する方法と、MS/MS で選別する方法がある。前者の方法として、 C_{18} カラムと酢酸アンモニウム系溶離液を用いて糖ペプチドだけを選択的に溶出させる方法⁴⁾ や、レクチンカラムを用いて糖ペプチドを回収し、さらに HPLC で分離するグリコキャッチ法⁵⁾ 等が報告されている。MS/MS で選別する方法としては、糖鎖に特徴的なオキシニウムイオン ([HexNAc]⁺; m/z 204, [Hex-HexNAc]⁺; m/z 366 等) を利用して、糖ペプチドを特定する方法が知られ、インソースフラグメンテーション⁶⁾ や、ブリカーサーイオンスキャン^{7,8)} を利用した方法が報告されている。インソースフラグメンテーションを用いた場合、クロマトグラム上でのおよその糖ペプチドの溶出位置を特定することはできるが、ブリカーサーイオンを特定することができず、溶出位置付近のマスペクトル及びプロダクトイオンスペクトルの特徴から、糖ペプチドのイオンを特定しなければならない。これに対して、ブリカーサーイオンスキャンは、糖ペプチドイオンを特定することはできるが、プロダクトイオンスペクトルが得られないため、ペプチドや糖鎖に関する情報が得られないといった問題がある。

そこで、我々は、得られた無数のペプチド・糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルの中から、オキシニウムイオンを指標として、糖ペプチドに由来するプロダクトイオ

Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: analysis of glycosylation sites and of site-specific heterogeneity.

Satsuki Itoh, Akira Harazono, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa; 国立医薬品食品衛生研究所

Correspondence address: Nana Kawasaki; National Institute of Health Science, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

第 54 回日本電気泳動学会シンポジウム

(受付 2004 年 10 月 4 日, 受理 2004 年 10 月 28 日, 刊行 2004 年 12 月 15 日)

ンスペクトルを選択的に取り出し、ペプチドを同定すると同時に、結合糖鎖を解析する方法を用いている^{9,10}。以下に四重極飛行時間型質量分析計 (quadrupole time of flight-MS, QqTOF-MS) を用いて、部位特異的に糖タンパク質の糖鎖を解析した例として、 α -フェトプロテイン (AFP) と、電気泳動で分離されたラット脳内 Glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型タンパク質の分析を紹介する。

**I. LC/MS/MS を用いた糖タンパク質の糖鎖構造解析
— α -フェトプロテイン (AFP) の解析—**

血液中に存在する糖タンパク質の中には、疾患等により結合糖鎖構造が変化することから、診断マーカーとして用いられているものがあり¹¹、その代表的なタンパク質として AFP が知られている。AFP は、N-結合型糖鎖付加部位 (Asn233) が一箇所存在する分子量約 68,000 の血清糖タンパク質で、肝細胞癌において、還元末端 GlcNAc のフコシル化率が増加することから、レクチンアフィニティー電気泳動とイムノブロットを用いた早期診断に利用されている^{12,13}。LC/MS/MS を用いて、AFP の糖鎖を詳細に解析できるようにすれば、今後、より簡便に、且つ微量のサンプルで、早期診断が可能になることが期待される。ここでは、臍帯血由来 AFP について解析を行った例を示す。

Fig. 1 (A) は、AFP を還元カルボキシメチル化し、脱塩後、トリプシン消化を行い、LC/MS 分析を行ったものである。ペプチド・糖ペプチド混合物のため多くのイオンが検出されているが、データ依存的 MS/MS データ (Fig. 1 (B)) 中の m/z 204 ([HexNAc]⁺) をモニターすることによって (Fig. 1 (C))、糖ペプチドに由来するプロダクトイオンスペクトルを取り出すことができる。

例えば、Fig. 2 は、24 分に溶出された糖ペプチド (m/z 1061.8⁺³) のプロダクトイオンスペクトルである。低分子量側に、 m/z 204 ([HexNAc]⁺) に加えて、糖鎖に由来する m/z 168 ([HexNAc-2H₂O]⁺)、 m/z 186 ([HexNAc-H₂O]⁺) 及び m/z 366 ([Hex-HexNAc]⁺) や、シアロ糖鎖に由来する m/z 292 ([NeuAc]⁺) 及び m/z 274 ([NeuAc-H₂O]⁺) の B イオンが検出されている。高分子量側には、ペプチド VNFTEIQK に由来するイオン (m/z 978.5) と、b 及び y イオンが検出されている。Fig. 2 中の表はペプチド VNFTEIQK から生じる b 及び y イオンの理論 m/z 値を示し、その中で太字で示された値は、実際、プロダクトイオンスペクトル上で検出されたイオンを示している。さらに、ペプチドに HexNAc が 1 または 2 分子、さらに Hex が 1~3 分子結合したイオンが検出され、N-結合型糖鎖のコア部分を確認することができる。糖鎖構造は、プロダクトイオンスペクトル上の B イオンと、TOF-MS で得られた糖ペプチドの分子量 (3182.3 Da) からペプチドの理論分子量 (977.5 Da) を差し引くことにより得られた分子量 (2222.8 Da) から、シアロ酸が 2 分子

結合した 2 本鎖糖鎖であると推定される。このように、 m/z 204 が検出されたプロダクトイオンスペクトルとそのプリカーサーイオンを解析することによって、AFP に結合する糖鎖を推定することが可能である (Table 1)。

臍帯血由来 AFP の結合糖鎖は、これまでにメチル化分析やレクチン分画等によって分析されており、主にジシアロ 2 本鎖型糖鎖であることが報告されている¹⁴。今回の LC/MS/MS 分析の結果で、その他に、アシアロ糖鎖、3 本鎖糖鎖や混成型糖鎖等が結合していることが示唆され、簡単な操作で、より詳細に糖鎖構造が解析できることがわかる。

以上のように、オキシニウムイオンを指標として、糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを選び出す方法は、ペプチドの b, y イオン及び糖鎖の B イオンをもとにペプチドの同定と結合糖鎖の構造推定を行うことが可能であることから、部位特異的糖鎖構造解析に有用である。次に、LC/MS/MS による糖ペプチド解析法を、電気泳動法で分離された糖タンパク質の解析に応用した例を示す。

**II. ゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析
—ラット脳内 GPI アンカー型タンパク質の解析—**

脳・神経系の細胞膜上には、細胞間認識やシグナル伝達に参与する多数の糖タンパク質が存在し、糖鎖はこれらの

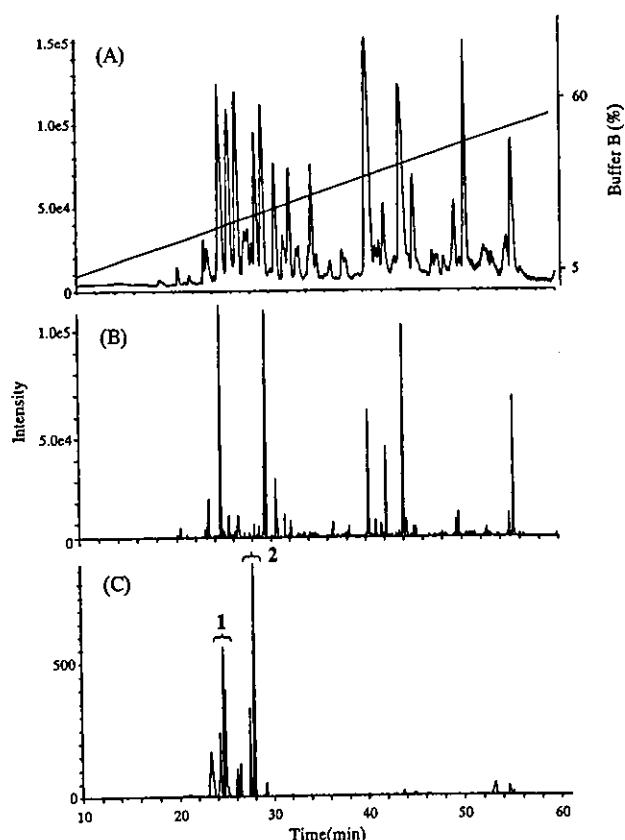


Fig. 1. LC/MS/MS of AFP, (A) TOF-MS full scan at m/z 700-2000, (B) product ion scan at m/z 100-2000, (C) product ion scan at m/z 204.

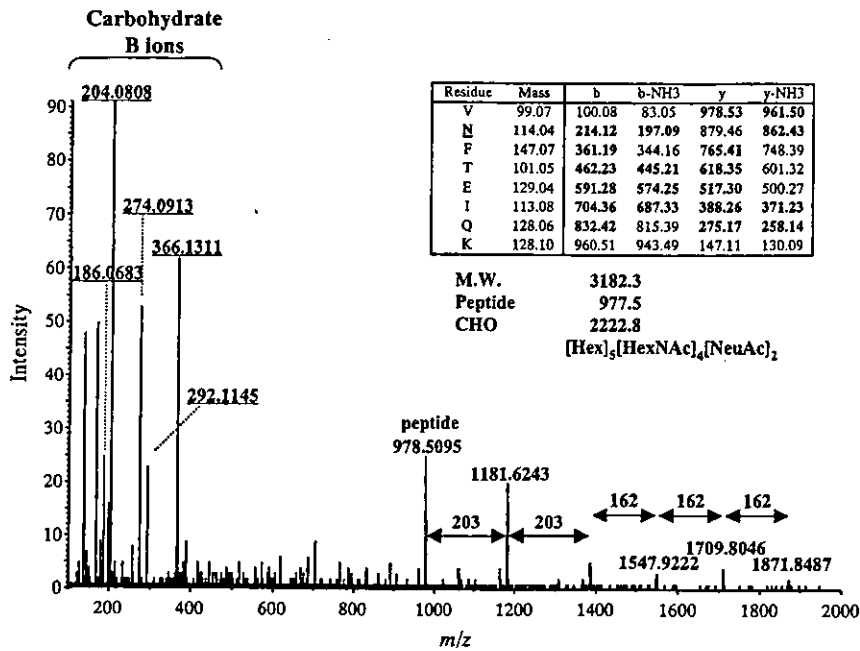


Fig. 2. Product ion spectrum of a glycopeptide (m/z 1061.83³⁺) at 24 min.

Inset table shows theoretical m/z values of b and y ions, and ions detected by MS/MS are indicated by bold face.

Table 1. Glycosylation analysis of AFP

Peak No.	Peptide sequence (theoretical peptide mass ^a)	Retention time (min)	Observed m/z (charge)	Carbohydrate composition	Calculated Carbohydrate mass	Theoretical carbohydrate mass ^a		
1	KVNFTFIQKL (977.5)	23	1013.43(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	2077.8	2077.7		
		23	1519.67(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	2077.8	2077.7		
		23	1081.29(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	2281.4	2280.8		
		23	1621.44(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	2281.4	2280.8		
		23	1446.62(2)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	1931.8	1931.7		
		23	1118.67(2)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃	1275.9	1275.5		
		23	1264.05(2)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	1566.6	1566.6		
		23	1110.48(3)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	1566.6	1566.6		
		24	1665.44(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2369.4	2368.8		
		24	1178.33(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	2572.5	2571.9		
		24	1061.78(3)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.9	2222.8		
		25	1592.17(2)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.9	2222.8		
		2	KFTKVNFTFIQKL (1353.7)	27	1236.04(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2369.4	2368.8
				27	1853.29(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2369.4	2368.8
27	1187.17(3)			[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.8	2222.8		
28	1780.23(2)			[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	2222.8	2222.8		
28	1303.56(3)			[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	2572.0	2571.9		
28	1138.84(3)			[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	2077.8	2077.7		
28	1206.52(3)			[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	2280.9	2280.8		
28	1090.14(3)			[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	1931.7	1931.7		
28	1322.75(3)			[Hex] ₅ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₂	2629.6	2628.9		

^a Monoisotopic mass value.

機能に深く関わっていると考えられている¹⁵⁾。しかし、微量膜タンパク質であることから、精製が困難で、解析に必要な量が得られず、多くの糖タンパク質の糖鎖構造は明らかにされていない。タンパク質混合物の分離に適した電気泳動とLC/MS/MSを活用することによって、これらの糖鎖構造を解析できると期待される。以下は、GPIを介して膜

に結合する GPI アンカー型タンパク質の糖鎖解析を行った例である。

ラット脳の膜画分から、Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC) 消化によって得られた可溶性 GPI アンカー型タンパク質群を、還元カルボキシアミドメチル化後、SDS-PAGE で分離した (Fig. 3)。通常、ゲル内のタ

ンパク質同定は、ゲル内プロテアーゼ消化後、抽出されたペプチドのみを用いて行われているが、糖鎖構造解析を行う場合、すべての糖ペプチド断片を同程度の収率で回収する必要がある。そこで、ゲルより糖タンパク質を抽出後、トリプシン消化を行う方法を選んだ。

Fig. 4 (A) は、バンド1を切り出し、1%SDSを用いてタンパク質を抽出後、トリプシン消化を行い、LC/MS/MS分析を行ったものである。まず、データベース検索の結果、バンド1は、Thy-1と同定された。Thy-1は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するGPIアンカー型タンパク質であり、3箇所のN-結合型糖鎖付加部位(Asn23, 74, 98)を有するアミノ酸残基数111の糖タンパク質である(Fig. 5)。

次に、AFPと同様に、 m/z 204を指標として、全ペプチドのプロダクトイオンスペクトルの中から、糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを選択的に取り出した(Fig. 4 (C))。それらのプロダクトイオンスペクトル及びブリーカーイオンのTOF-MSから、T1及びT2に溶出された糖ペプチドは、それぞれ高マンノース型糖鎖が結合したAsn23を含む糖ペプチド、His21-Phe33、及びHis21-Arg37であり、T3及びT4は、複合型及び混成型糖鎖が結合したAsn74を含む糖ペプチド、Val69-Lys78であることが判った(Table 2)。

Fig. 6は、T3に溶出された糖ペプチドのうち、 m/z 1532.2⁺²を示す糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルである。低分子量側に、AFPで検出されたイオン、 m/z 168, 186, 204, 366に加え、 m/z 528 ([Hex]₂[HexNAc]⁺)、 m/z 569 ([Hex][HexNAc]₂⁺)や、 m/z 512 ([Hex][HexNAc][dHex]⁺)等のB

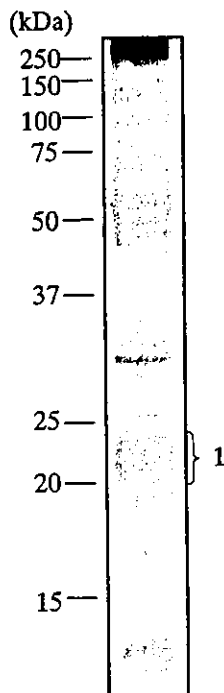


Fig. 3. SDS-PAGE of lipid-free GPI-anchored protein prepared from rat brain.

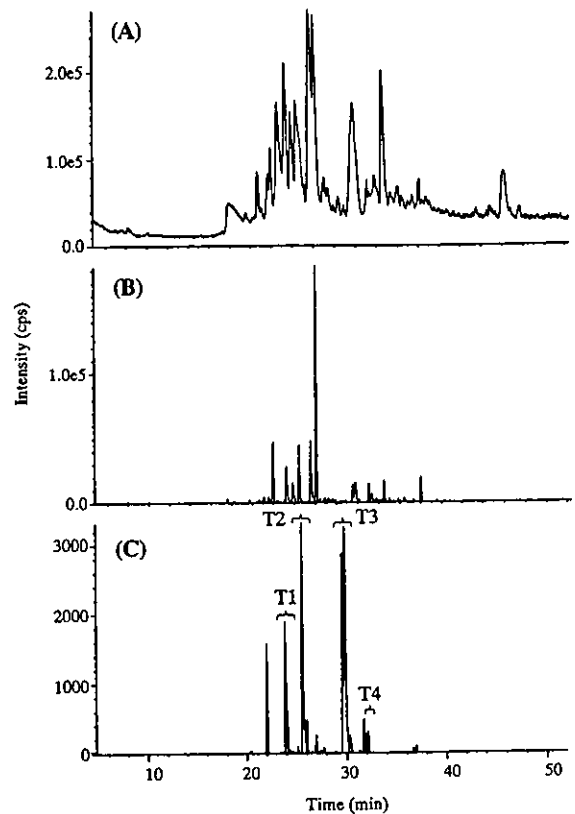


Fig. 4. LC/MS/MS of rat brain Thy-1, (A) TOF-MS full scan at m/z 700-2000, (B) product ion scan at m/z 100-2000, (C) Product ion scan at m/z 204.

イオンが検出されており、Gal1-3(4)(Fuc1-4(3))-GlcNAc構造を含むことが推定される。高分子量側には、ペプチドに由来するイオン(m/z 1107.6)とb及びyイオンが検出され、VLTLANFTTKと同定された(Fig. 6中の表)。また、ペプチドにHexNAc, HexNAc-HexNAc, HexNAc-HexNAc-Hexが結合したイオンが検出されている他、さらに、これらにdHexが1分子結合したイオンが検出されていることから、結合糖鎖のコア部分がフコシル化されていることが判る。結合糖鎖は、TOF-MSで得られた糖ペプチドの分子量(3062.4 Da)から、ペプチドの理論分子量(1106.6 Da)を差し引くことにより得られた糖鎖分子量(1973.7 Da)から、Fig. 6中に示すような構造であると推定される。Table 2は、同様に解析した結果、Thy-1に結合すると推定された糖鎖構造である。

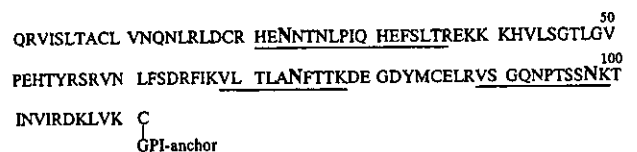


Fig. 5. Amino acid sequence of rat Thy-1.

Glycopeptides produced by trypsin are underlined. N-glycosylation sites are indicated by bold face.

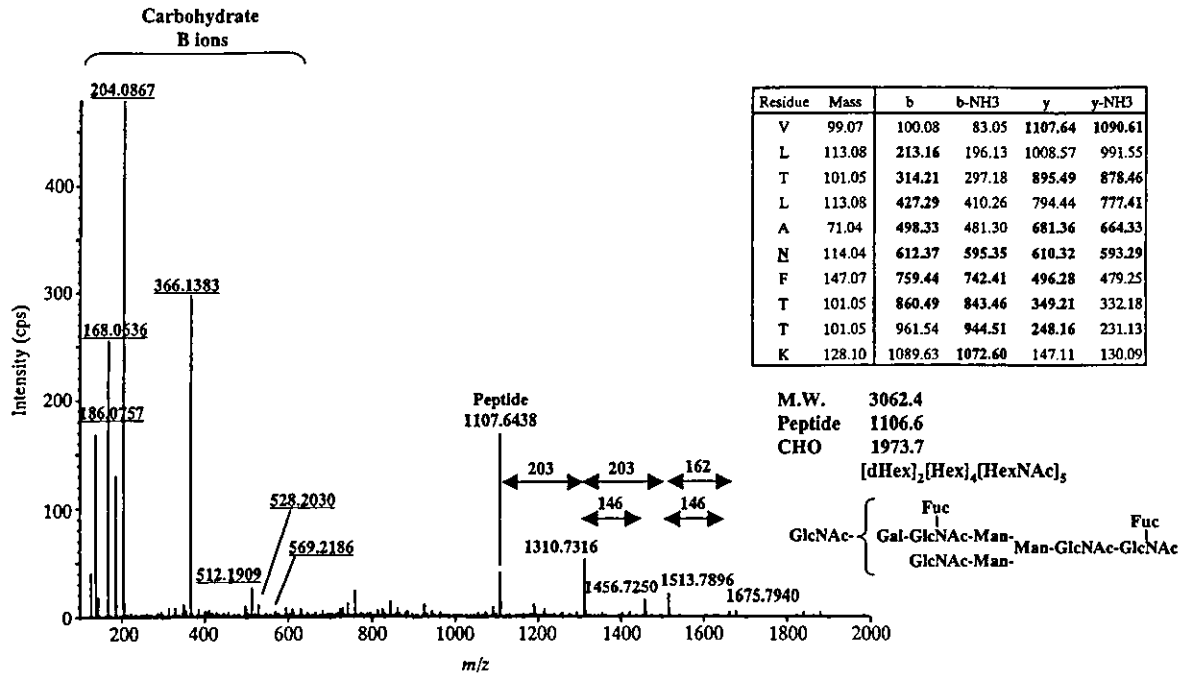


Fig. 6. Product ion spectrum of a glycopeptide (m/z 1532.2²⁺) at peak 29.5 min. Inset table shows theoretical m/z values of b and y ions, and ions detected by MS/MS are indicated by bold face.

Table 2. Glycosylation analysis of rat brainThy-1

Peak No.	Peptide sequence (theoretical peptide mass ^a)	Glycosylation site	Retention time (min)	Observed m/z (charge)	Carbohydrate composition	Calculated carbohydrate mass	Theoretical carbohydrate mass ^a
T1	H21-F33 (1591.73)	N23	23.9	991.1(3)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂	1396.6	1396.5
			23.9	1486.2(2)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂	1396.6	1396.5
			23.9	1045.1(3)	[Hex] ₇ [HexNAc] ₂	1558.7	1558.5
			24.0	1567.2(2)	[Hex] ₇ [HexNAc] ₂	1558.6	1558.5
			24.0	937.1(3)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	1234.5	1234.4
T2	H21-R37 (2048.99)	N23	24.0	1405.1(2)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	1234.5	1234.4
			25.5	1197.6(3)	[Hex] ₇ [HexNAc] ₂	1558.6	1558.5
			25.6	1143.5(3)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂	1396.6	1396.5
			25.6	857.9(4)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂	1396.6	1396.5
			25.7	1089.5(3)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	1234.5	1234.4
			25.7	817.4(4)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	1234.6	1234.4
			25.9	1633.8(2)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	1234.5	1234.4
T3	V69-K78 (1106.62)	N74	29.5	1686.3(2)	[dHex] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅	2282.0	2281.9
			29.6	1124.5(3)	[dHex] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅	2282.0	2281.9
			29.6	1532.2(2)	[dHex] ₂ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	1973.9	1973.7
			29.6	1021.8(3)	[dHex] ₂ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	1973.9	1973.7
			29.7	1162.6(2)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	1234.5	1234.4
			29.7	1491.2(2)	[dHex] ₂ [Hex] ₆ [HexNAc] ₃	1891.8	1891.7
			29.7	1592.8(2)	[dHex] ₂ [Hex] ₆ [HexNAc] ₄	2094.9	2094.8
			29.8	1378.2(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₅	1665.7	1665.6
			29.9	919.1(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₅	1665.7	1665.6
			29.8	1438.7(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	1786.8	1786.7
			30.3	959.5(3)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	1786.8	1786.7
			29.9	1511.7(2)	[dHex] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	1932.8	1932.7
			30.0	1008.1(3)	[dHex] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	1932.8	1932.7
			30.0	1519.7(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₄	1948.8	1948.7
			30.0	1572.2(2)	[dHex] ₂ [Hex] ₇ [HexNAc] ₃	2053.9	2053.7
			30.1	1499.2(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₇ [HexNAc] ₃	1907.8	1907.7
			30.2	1276.6(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₄	1462.6	1462.5
			30.2	1337.2(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₃	1583.7	1583.6
			31.7	1860.4(2)	[dHex] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₁	2630.1	2630.0
			31.7	1240.6(3)	[dHex] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₁	2630.1	2630.0
31.9	1706.3(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₁	2321.9	2321.9			
T4	V69-K78 (1106.62)	N74	32.1	1563.7(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	2036.8	2036.7
			32.1	1482.7(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	1874.7	1874.7
			32.1	1584.2(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	2077.8	2077.8
			32.1	1584.2(2)	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	2077.8	2077.8

^a Monoisotopic mass value.

ラット脳の Thy-1 の N-結合型糖鎖については、これまでに抗体カラム等を用いて精製された Thy-1 をトリプシン消化後、糖ペプチドごとに糖鎖を切り出し、ゲルろ過や、エキソグリコシダーゼ消化等を用いて分析した例が報告されている。Asn23 には、高マンノース型 (M5, 6) が、Asn74 には、コアがフコシル化された複合型糖鎖と、マイナー糖鎖としてハイブリッド型糖鎖及び高マンノース型糖鎖が結合していることが明らかにされているが^{16,17)}、電気泳動と LC/MS/MS を組み合わせることによって、微量の膜タンパク質を、抗体を使用せずに簡便且つより詳細に解析できることがわかる。尚、Asn98 に結合する糖鎖及び GPI アンカーについては、トリプシン消化によって得られた糖ペプチドの親水性が高く、LC カラムに保持されなかったため、他の酵素消化によって得られた糖ペプチドを解析することによって明らかにしている (データ省略)。

以上のように、LC/MS/MS によるペプチド・糖ペプチドマッピングにおいて、糖鎖に特徴的なオキシニウムイオンを用いて糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを取り出す方法は、タンパク質を同定すると同時に、糖鎖結合部位を決定し、結合部位ごとの糖鎖構造を推定することを可能にする。2次元 HPLC との組み合わせや、2次元電気泳動で分離された糖タンパク質の解析も可能であることから、今後、グライコプロテオミクスの分野で役立つことが期待される。

文 献

- 1) Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993;3:97-130.
- 2) Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473:21-34.
- 3) Sato Y, Kimura M, Yasuda C, Nakano Y, Tomita M, Kobata A, Endo T. Evidence for the presence of major peripheral myelin glycoprotein P0 in mammalian spinal cord and a change of its glycosylation state during aging. *Glycobiology* 1999;9:655-660.
- 4) Ohta M, Kawasaki N, Hyuga S, Hyuga M, Hayakawa T. Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography—electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2001;910:1-11.
- 5) Hirabayashi J, Arata Y, Kasai K. Glycome project: concept, strategy and preliminary application to *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics* 2001;1:295-303.
- 6) Sullivan B, Addona TA, Carr SA. Selective detection of glycopeptides on ion trap mass spectrometers. *Anal Chem* 2004;76:3112-3118.
- 7) Carr SA, Huddleston MJ, Bean MF. Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccha-

- rides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Protein Sci* 1993;2:183-196.
- 8) Huddleston MJ, Bean MF, Carr SA. Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests. *Anal Chem* 1993;65:877-884.
- 9) Nemeth JF, Hochgesang GP Jr, Marnett LJ, Caprioli RM, Hochgesang GP Jr. Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry. *Biochemistry* 2001;40:3109-3116.
- 10) Harazono A, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T. Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Glycobiology in press*.
- 11) Durand G, Seta N. Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem* 2000;46:795-805.
- 12) Aoyagi Y. Carbohydrate-based measurements on alpha-fetoprotein in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Glycoconj J* 1995;12:194-199.
- 13) Aoyagi Y, Isokawa O, Suda T, Watanabe M, Suzuki Y, Asakura H. The fucosylation index of alpha-fetoprotein as a possible prognostic indicator for patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1998;83:2076-2082.
- 14) Yamashita K, Taketa K, Nishi S, Fukushima K, Ohkura T. Sugar chains of human cord serum alpha-fetoprotein: characteristics of N-linked sugar chains of glycoproteins produced in human liver and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:2970-2975.
- 15) Schachner M, Martini R. Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci* 1995;18:183-191.
- 16) Parekh RB, Tse AG, Dwek RA, Williams AF, Rademacher TW. Tissue-specific N-glycosylation, site-specific oligosaccharide patterns and lentil lectin recognition of rat Thy-1. *Embo J* 1987;6:1233-1244.
- 17) Williams AF, Parekh RB, Wing DR, Willis AC, Barclay AN, Dalchau R, Fabre JW, Dwek RA, Rademacher TW. Comparative analysis of the N-glycans of rat, mouse and human Thy-1. Site-specific oligosaccharide patterns of neural Thy-1, a member of the immunoglobulin superfamily. *Glycobiology* 1993;3:339-348.

要 約

LC/MS/MS は、アミノ酸配列情報に加え、糖鎖構造に関する情報についても得ることができ、糖ペプチドの解析にも有用である。QqTOF-MS を用いた LC/MS/MS は、糖ペプチドのピークを特定し、ペプチドを同定し、結合糖鎖構造に関する情報も得ることができる。本稿では、糖ペプチドの解析例として、APF 及び電気泳動で分離された GPI アンカー型タンパク質の解析例を示す。

LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによるグライコム解析

川崎ナナ・橋井則貴・伊藤さつき・日向昌司・川西 徹・早川堯夫

SUMMARY

Liquid chromatography/mass spectrometry equipped with a graphitized carbon column is useful for the simultaneous analysis of oligosaccharides. By using capillary column and nanoelectrospray ion source, the method can be used for the oligosaccharide profiling of sub microgram quantities of glycoproteins. This oligosaccharide profiling is expected to be a powerful tool for the glycome analysis. We demonstrate a potential application of oligosaccharide profiling in glycomics with two examples, the structural analysis of *N*-linked oligosaccharides from a gel-separated glycoprotein, and the differential analysis of *N*-linked oligosaccharides in cells.

Key words: LC/MS, oligosaccharide profiling, 2-dimensional electrophoresis, glycomics.

はじめに

糖タンパク質の糖鎖の構造や不均一性は、発生・加齢・疾病等に関連して変化することが知られている¹⁾。しかし、従来のプロテオミクス的アプローチ、すなわち、2次元電気泳動(2-DE)等でタンパク質発現量を比較し、差異の認められたタンパク質を質量分析法(MS)とデータベース検索により同定するという方法²⁾では、糖鎖の変化によって引き起こされる生命現象を捉えることはできない。糖タンパク質の糖鎖部分に関係する様々な現象を解明するには、糖鎖の定性的・定量的解析に基づくグライコム解析技術の開発が不可欠である。

MSと液体クロマトグラフィー(LC)をオンラインで結んだLC/MSは、分子量情報だけでなく、多くの異性体が存在する糖鎖の詳細な構造や不均一性に関する情報を提供してくれることから、今後、糖鎖生物学分野においても有力なツールとなることが期待されている。我々は、極性物質の吸着能が高く、エレクトロスプレーイオン化(ESI)に適した溶媒で糖鎖を分離・溶出できるグラファイトカーボンカラム(GCC)を用いることによって、高マンノース型、複合型、混成型糖鎖や、酸性糖鎖、中性糖鎖など様々な糖鎖

を一度に分離・検出できる糖鎖プロファイリング法を開発した^{3,4)}。この糖鎖プロファイリング法は、グライコム解析の様々なステップにおいても役立つと思われる。本稿では、グライコム解析における糖鎖プロファイリングの可能性として、2-DEで分離されたゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析に応用した例と、細胞発現糖タンパク質の糖鎖の差異解析に応用した例を紹介する。

I. ゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析

1. 糖鎖プロファイリング法の微量化

一般に2-DEとクマシーブルー(CBB)染色によって検出可能な糖タンパク質量は1 µg程度といわれているが、ゲルからの回収率や操作中の損失等を考慮に入れると、サブマイクログラムのタンパク質に由来する糖鎖を解析できる分析システムが必要となる。そこで、キャピラリーカラムとナノスプレーイオン源を用いて、糖鎖プロファイリングの微量化を検討した。

NS0細胞産生遺伝子組換え型ヒト肝細胞増殖因子(HGF)に*N*-グリコシダーゼF(PNGase F)を作用させて*N*結合糖鎖を切り出し、anomerの分離を避けるためNaBH₄で還元した。200 ngのHGFに由来する糖鎖をGCC-LC/MSを

Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography/mass spectrometry.

Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa; 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

Correspondence address: Nana Kawasaki; Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

第53回日本電気泳動学会シンポジウム

(受付2003年11月13日, 受理2003年11月20日, 刊行2004年3月15日)

用いて分析したところ、トータルイオンクロマトグラム (TIC) 上に2つの大きなピークと、複数の小さいピークが確認された (Fig. 1A)。ピーク A は、マスペクトル (Fig. 1B)、及びプロダクトイオンスペクトル (Fig. 1C) から、*N*-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) 及びヘキソース (Hex)-Hex を部分構造とする複合型糖鎖であることが示唆された。他のピークについても同様に、NeuGc 及び Hex-Hex 構造が存在することが推定された。そこで、Hex-Hex 構造を確認するため、糖鎖を α -ガラクトシダーゼで消化し、再度 LC/MS で分析を行ったところ、Fig. 1A 上で検出されたピークが消失し、新たに複数のピークが出現することが確認された。これらのピークの分子量は、 α -ガラクトシダーゼ消化前の糖鎖から Gal が1または2分子消失した糖鎖の分子量に一致することから、HGF の非還元末端には1または2分子の Gal が α 結合していることが確認された⁵⁾。NS0 細胞産生糖タンパク質には Gal α 1-3Gal を含む糖鎖が結合していることが報告されており^{6,7)}、今回検出された Hex-Hex も Gal α 1-3Gal 結合であると推定された。これらのことから、ピーク A の糖鎖構造は Fig. 1C 上図のように推定され、他のピークについても、NeuGc 及び Gal α 1-3Gal 結合を部分構造とする複合型糖鎖であると考えられた。

以上のように、キャピラリーカラムとナノスプレーイオ

ン源を用いることによって、サブマイクログラムの糖タンパク質の糖鎖のプロファイリングが可能となった。また、LC/MS/MS、及びエキソグリコシダーゼ消化と LC/MS を組み合わせることによって、より詳細な構造情報が得られることが確認された。

2. ゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析

つぎに、GCC-LC/MS を用いた電気泳動ゲル内糖タンパク質の糖鎖のプロファイリングを検討した。2 μ g のヒト黒色腫細胞産生ヒト組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA) を SDS-PAGE で展開し (Fig. 2A)、ゲル内 PNGase F 消化により糖鎖を切り出した。NaBH₄ 還元糖鎖を LC/MS で分析したところ Fig. 2B のような糖鎖プロファイルが得られ、ゲルから抽出された tPA の糖鎖の分離パターンは、泳動前の分離パターンとはほぼ同様であることが確認された。

以上のように、CBB 染色される程度の糖タンパク質があれば、ゲル内タンパク質であっても、GCC-LC/MS による糖鎖プロファイリングが可能であることが確認された。ゲル内タンパク質糖鎖の解析法として、2-aminobenzamide 誘導体化後、イオン交換や順相 LC で分離し、オフライン MALDI-TOFMS で解析する手法が報告されている⁸⁾。我々は、GCC-LC/MS を用いた解析は誘導体化における糖鎖の分解が生じ

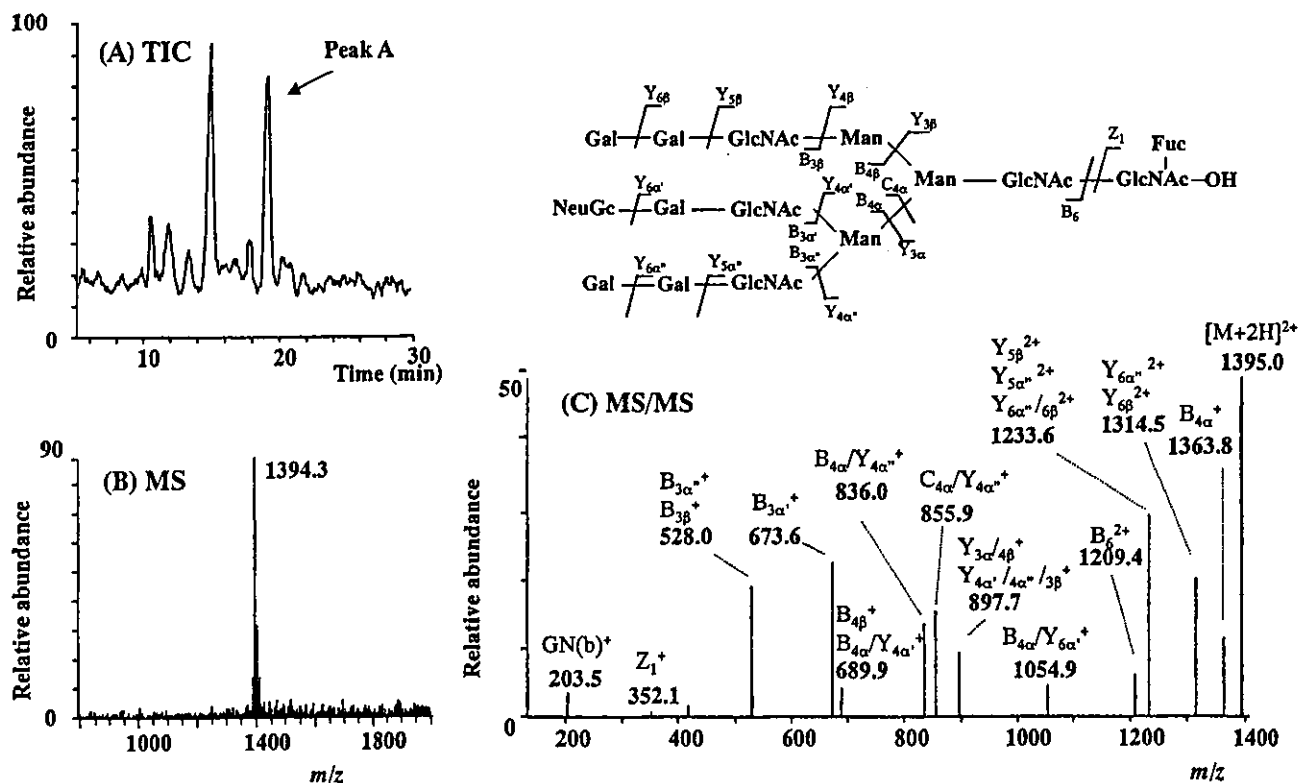


Fig. 1. (A) GCC-LC/MS によって得られた HGF の糖鎖プロファイル, (B) ピーク A のマスペクトル, (C) ピーク A のプロダクトイオンスペクトル及び推定構造

カラム, Hypercarb (0.2×150 mm); 流速, 3 μ l/min; 溶離液, 5 mM 酢酸アンモニウム/H₂O-アセトニトリル; MS, TSQ-7000 (Thermoelectron)

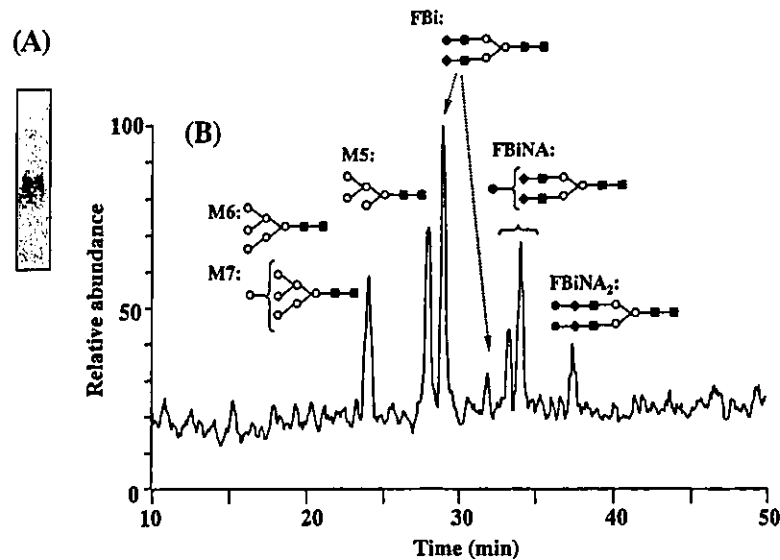


Fig. 2. (A) tPA (2 μ g) の SDS-PAGE, (B) GCC-LC/MS によるゲル内 tPA 由来糖鎖のプロファイル

ないこと、1回の LC で異性体を含む様々な糖鎖を分離できること、ESI を用いているのでシアル酸結合糖鎖や硫酸化糖鎖の解析にも応用できること、オンライン MS による簡便・迅速な分析が可能で、マイナー成分の取りこぼしがないこと等の利点があると考えている。

II. 細胞・組織発現糖タンパク質糖鎖の差異解析

1. 糖鎖の差異解析

疾患組織と健常組織に発現している糖タンパク質の糖鎖の分布を直接比較し、疾患関連糖鎖遺伝子や糖タンパク質を見つけ出すことができれば、新たな診断法の開発や糖鎖と疾患の関係の解明につながるものと期待される。そこで、GCC-LC/MS を用いて、簡単な操作と実行可能なサンプル量で、サンプル間の糖鎖の差異解析を行うことを検討した。モデルとして、糖鎖遺伝子導入によって糖鎖の構造と分布が変化していることが予想される細胞を用いた。N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) は、複合型 2 本鎖糖鎖に bisecting GlcNAc を付加する糖転移酵素で、細胞接着や癌転移と関係があることが報告されている^{9~11)}。ここでは、GnT-III 遺伝子を導入した CHO 細胞を病態モデルとして、糖鎖プロファイリング法によって糖鎖の変動を捉えることができるかどうかを検証した。

5×10^6 個程度の CHO 細胞と GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞を界面活性剤処理し、膜画分及び可溶性画分に分離した。それぞれの画分から PNGase F によって糖鎖を切り出し、NaBH₄ で還元後、LC/MS によるプロファイリングを行った。Fig. 3A は CHO 細胞の膜画分の糖鎖プロファイルである。各ピークのマスマスペクトルから、CHO 細胞の膜タンパク質に付加している糖鎖は高マンノース型糖鎖とシアル酸が結合した複合型 2 本鎖糖鎖が中心で、さらに混成型、

トリマンノシルコア部分のみの糖鎖や、1 本鎖糖鎖などの比較的小さな糖鎖も結合していることが確認された。

Fig. 3B は、GnT-III 遺伝子導入細胞の膜画分の糖鎖プロファイルで、矢印で示す位置に CHO 細胞からは検出されない新たなイオンが検出された。GCC で糖鎖を分離した場合、bisecting GlcNAc が付加した糖鎖は付加されていない糖鎖より早く溶出される傾向がある。GnT-III 遺伝子導入によって新たに出現した糖鎖の分子量は、その後溶出された 2 本鎖糖鎖の分子量より N-アセチルヘキサミン (HexNAc) 1 分子分増加していることから、bisecting GlcNAc を有する 2 本鎖糖鎖であることが示唆された。

同様に可溶性画分についても糖鎖プロファイリングを行ったところ、膜画分とは異なるパターンが得られ、マスマスペクトルから、可溶性タンパク質に結合している糖鎖は主に高マンノース型であることがわかった。また、膜ほどではないが、GnT-III 遺伝子導入細胞の可溶性画分からも bisecting GlcNAc が付加していると思われる糖鎖が検出された。

Fig. 4 は CHO 細胞、及び GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞から切り出された主な糖鎖のピーク面積をアシアロ 2 本鎖糖鎖のピーク面積を 1.0 として相対的に表したもので、糖鎖分布の変化を示している。このグラフから、GnT-III の発現によって bisecting GlcNAc が付加したと思われる糖鎖は出現するものの、糖鎖全体の分布に大きな変化は生じていないことがわかる。これは、GnT-III 発現によって糖鎖構造に変化が生じたタンパク質が全体の一部分であることを示唆していると考えられる。このように、GCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは糖鎖の構造や分布の違いを簡単に識別できることから、健常及び病態サンプル間の糖鎖の差異解析法として有用であると思われる。

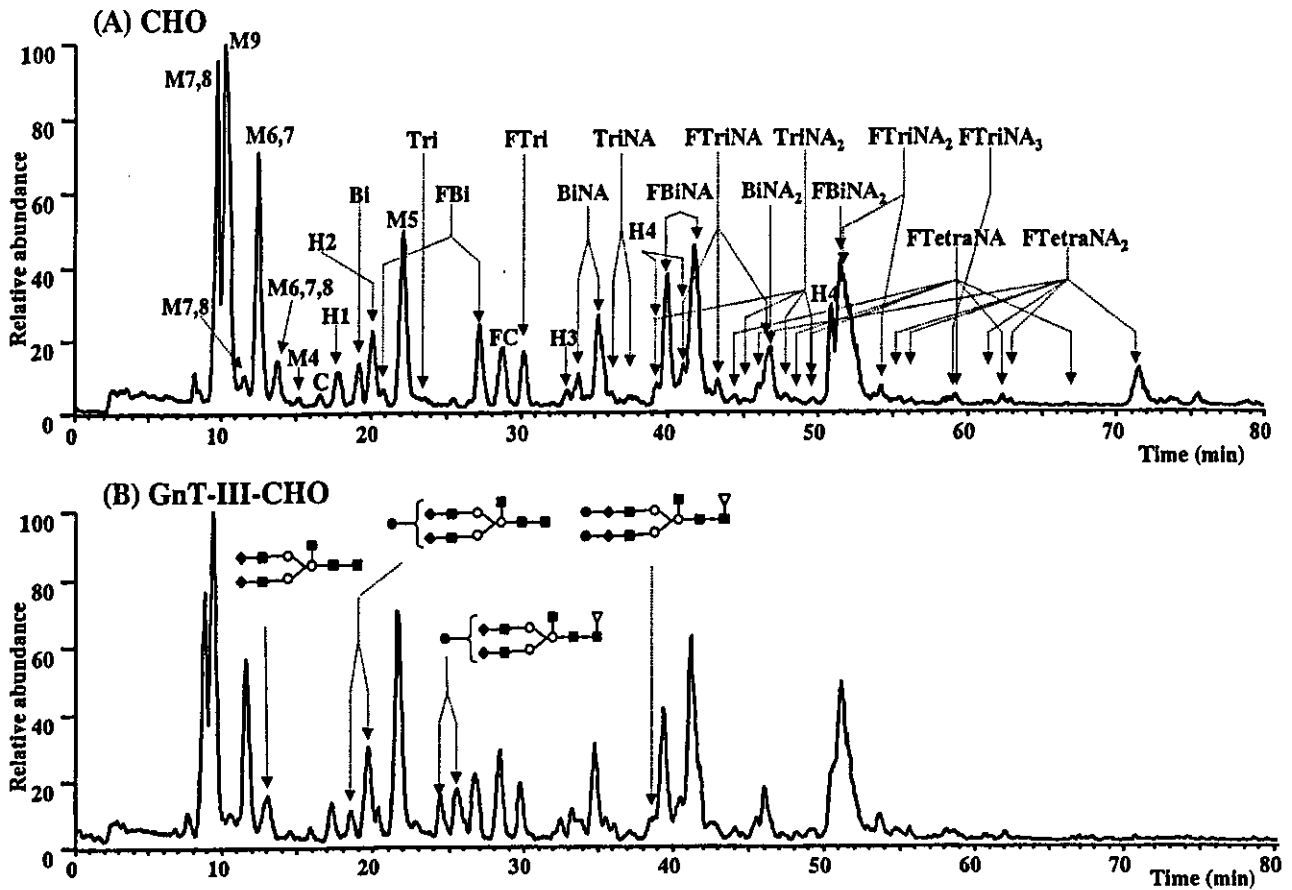


Fig. 3. (A) CHO 細胞膜画分の糖鎖プロファイル, (B) GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞の糖鎖プロファイル
 M, Man; H, hybrid; C, trimannosylcore; F, Fuc; NA, NeuAc; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary

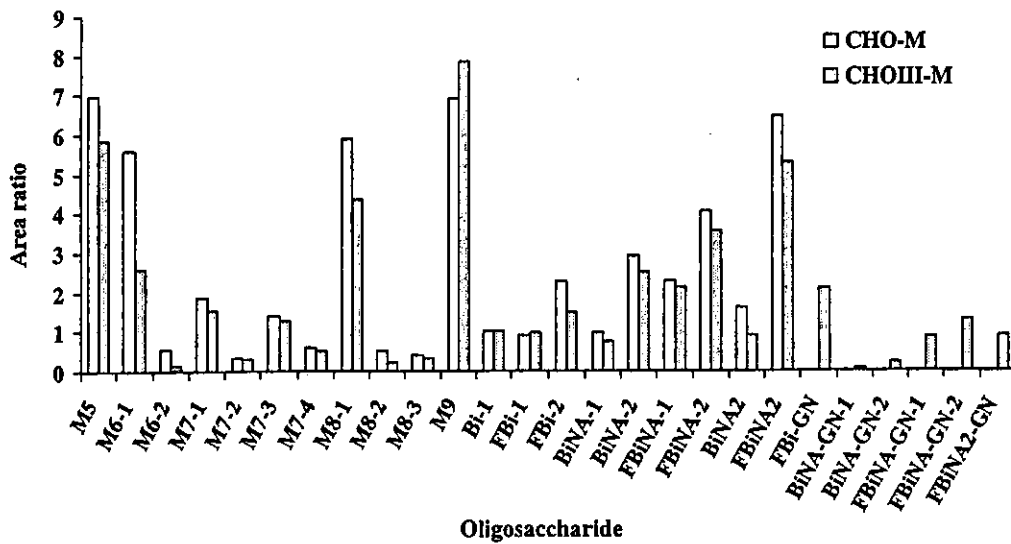


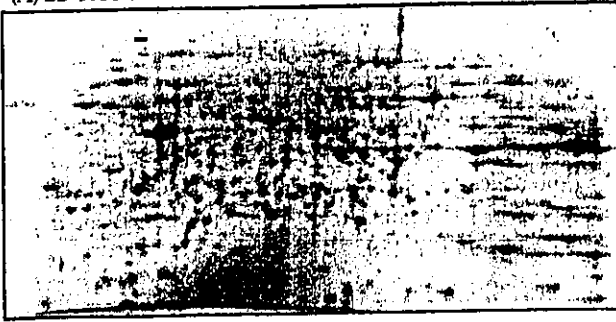
Fig. 4. CHO 細胞膜画分 (CHO-M) 及び GnT-III 遺伝子導入細胞由来膜画分 (CHOIII-M) 由来糖鎖の分布
 アシプロ 2 本鎖糖鎖を 1.0 とする

2. 糖タンパク質の同定と特性解析

糖鎖差異解析によって疾患関連糖鎖を見出すことができれば、プロテオミクスの手法を用いて、その糖鎖が付加しているタンパク質の同定と特性解析を行うことになる。可

溶性タンパク質であれば、レクチンカラムや免疫沈降法などで得られた画分を SDS-PAGE 等で展開して目的糖タンパク質を得ることができるが、不溶性膜タンパク質の場合、レクチン等による分画が難しいケースが多く、2-DE 後、レ

(A) 2D-PAGE



(B) Lectin blot



Fig. 5. GnT-III 遺伝子導入細胞膜画分の 2-DE

(A) Sypro Orange 染色, (B) PHA-E₄ プロット
IEF, pH 3-10, 18 cm, 33,500 Vhr; SDS-PAGE, 12.5% gel
(24×11 cm), 20 mA-0.5 hr, 50 mA-1.2 hr

クタンプロットなどにより糖タンパク質の位置を特定することになる¹²⁾。しかし後者の場合、泳動ゲルとレクチンプロット膜のマッチング、及び特定されたゲル上タンパク質に目的糖鎖が付加していることの検証が必要となってくる。

Fig. 5 は、GnT-III 遺伝子導入細胞の膜画分を 2 枚のゲルで展開し、Sypro Orange で全タンパク質を染色した結果 (A)、及び bisecting GlcNAc を認識する PHA-E₄ レクチンを用いてレクチンプロットを行った結果 (B) を示している。レクチンプロットによって、酸性側の 70-80 kDa 周辺に、糖タンパク質に特徴的な train 状のスポットが複数組検出され、一部のタンパク質の糖鎖に bisecting GlcNAc が付加されていることが確認された。我々は、レクチンプロット上のスポットの位置から特定された泳動ゲル上の糖タンパク質の糖鎖の解析にも糖鎖プロファイリングが役立つと考えている。現在、bisecting GlcNAc が付加していると推定されたスポットについて、ゲル内トリプシン消化に先立ち PNGase F 消化を行って糖鎖を切り出し、GCC-LC/MS を用いた bisecting GlcNAc の有無の確認と糖鎖構造解析を行っているところである。

おわりに

GCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは、糖タンパク質性医薬品の特性・品質解析を目的として開発されたものである。この糖鎖プロファイリングが、2-DE 等のプロ

テオミクス的手法と組み合わせることによって、医薬品開発型研究のグライコミクスにも応用できる可能がでてきた。電気泳動ゲル上の全タンパク質の中から糖タンパク質を検出する方法は報告されているが^{13,14)}、特定の糖鎖を付加している糖タンパク質のみを検出・抽出する方法は確立されておらず、それらを効率的に検出する方法の確立が今後の課題であろう。

文 献

- 1) Durand G, Seta N. Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem* 2000;46:795-805.
- 2) Fenselau C. MALDI MS and strategies for protein analysis. *Anal Chem* 1997;69:661A-665A.
- 3) Kawasaki N, Ohta M, Hyuga S, Hashimoto O, Hayakawa T. Analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein using liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999;269:297-303.
- 4) Itoh S, Kawasaki N, Ohta M, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T. Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr* 2002;168:89-100.
- 5) Kawasaki N, Itoh S, Ohta M, Hayakawa T. Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003;316:15-22.
- 6) Baker KN, Rendall MH, Hills AE, Hoare M, Freedman RB, James DC. Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 2001;73:188-202.
- 7) Sheeley DM, Merrill BM, Taylor LC. Characterization of monoclonal antibody glycosylation: comparison of expression systems and identification of terminal alpha-linked galactose. *Anal Biochem* 1997;247:102-110.
- 8) Rudd PM, Colominas C, Royle L, Murphy N, Hart E, Merry, AH, Hebestreit HF, Dwek RA. A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of N-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands. *Proteomics* 2001;1:285-294.
- 9) Sheng Y, Yoshimura M, Inoue S, Oritani K, Nishiura T, Yoshida H, Ogawa M, Okajima Y, Matsuzawa Y, Taniguchi N. Remodeling of glycoconjugates on CD44 enhances cell adhesion to hyaluronate, tumor growth and metastasis in B16 melanoma cells expressing beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III. *Int J Cancer* 1997;73:850-858.
- 10) Yoshimura M, Nishikawa A, Ihara Y, Taniguchi S, Taniguchi N. Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8754-8758.

- 11) Yoshimura M, Ihara Y, Matsuzawa Y, Taniguchi N. Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis. *J Biol Chem* 1996;271:13811-13815.
- 12) Ekuni A, Miyoshi E, Ko JH, Noda K, Kitada T, Ihara S, Endo T, Hino A, Honke K, Taniguchi N. A glycomic approach to hepatic tumors in *N*-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) transgenic mice induced by diethylnitrosamine (DEN): identification of haptoglobin as a target molecule of GnT-III. *Free Radic Res* 2002;36:827-833.
- 13) Wilson NL, Schulz BL, Karlsson NG, Packer NH. Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins. *J Proteome Res* 2002;1:521-529.
- 14) Schulenberg B, Beechem JM, Patton WF. Mapping glycosylation changes related to cancer using the Multiplexed Proteomics technology: a protein differential display approach. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;793:127-139.