

IgG (Figs. 3(b) and 4(b)), which correspond to 0.26 pmol, 0.26 pmol, 0.50 pmol, 0.32 pmol, 0.26 pmol, and 0.62 pmol, respectively, in each well. Thus, the optimum molar concentrations occurred in the same scale order, although the optimum mass concentrations of polypeptides required to enhance the signal differed markedly between the proteins and small peptides. In addition, the molar concentrations of excess peptides or proteins required to suppress the insulin signal were also found to exhibit the same scale in the same order. The ionization of insulin appeared to depend on the molar concentration of the peptide or protein which was mixed with the CHCA matrix solution.

To examine whether or not the signal enhancement was specific to human insulin, the CHCA solution premixed with Tf or BSA (0.10 µg/µL) was added to a solution of peptides and proteins, which included hANP, glucagon, human insulin, IGF-I, and ProteoMass Peptide & Protein at concentrations of 50 fmol/µL each. The signal intensities of [angiotensin II]<sup>+</sup> (1046 Da), [synthetic peptide P<sub>14</sub>R]<sup>+</sup> (1534 Da), and [ACTH fragment]<sup>+</sup> (2465 Da) were either not enhanced or were reduced in the matrix premixed with Tf or BSA (Table 1). However, the signal intensities of [hANP]<sup>+</sup> (3080 Da), [glucagon]<sup>+</sup> (3483 Da), [insulin B chain]<sup>+</sup> (3494 Da), and [bovine insulin]<sup>+</sup> (5730 Da) were enhanced as well as that of [human insulin]<sup>+</sup> (5808 Da) (Table 1, Fig. 5). The signal intensities of [IGF-I]<sup>+</sup> (7649 Da), [cytochrome C]<sup>+</sup> (12362 Da), and [cytochrome C]<sup>2+</sup> were enhanced more than that of human insulin in the presence of Tf or BSA. In addition, the signals of [apomyoglobin]<sup>+</sup> (16 952 Da) and [apomyoglobin]<sup>2+</sup> were clearly observed in the presence of Tf or BSA, although their signals were not detected in the control matrix. In this latter case, the signal of [apomyoglobin]<sup>+</sup> overlapped with that of BSA, but not of Tf; therefore, it was more advantageous to use Tf than BSA for detecting this signal. Since BSA was included in the ProteoMass Peptide & Protein solution, the signals of [BSA]<sup>+</sup> (66 430 Da), [BSA]<sup>2+</sup>, [BSA]<sup>3+</sup>, and [BSA]<sup>4+</sup> were also detected in the presence of Tf (Table 1, Fig. 5(b)).

The results reported above demonstrate that the enhancement of the signal intensity achieved with the use of Tf and

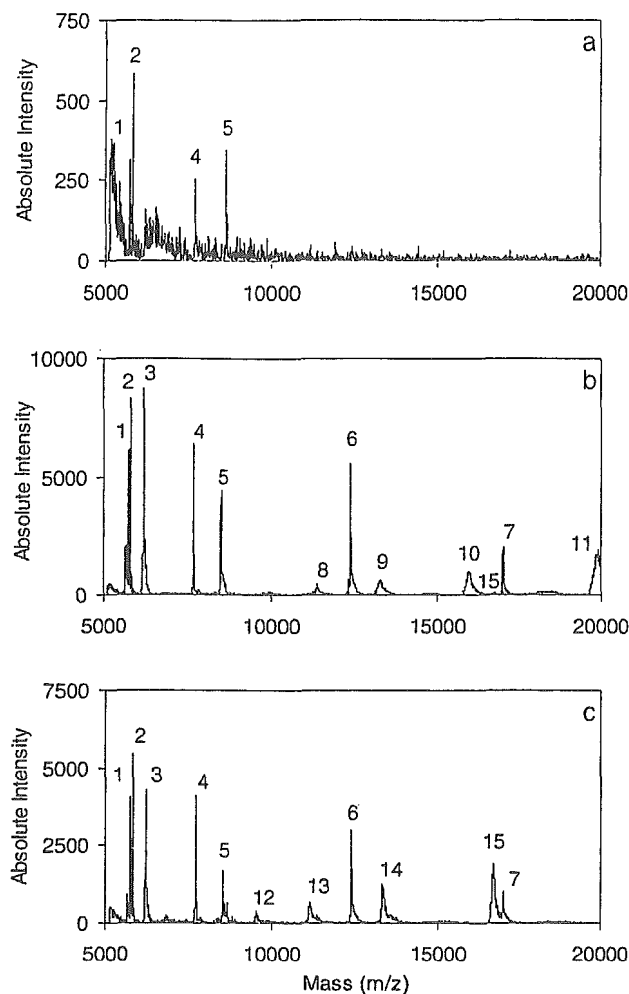
BSA was observed for both peptides and proteins, and this effect was not specific to human insulin. The degree of enhancement was dependent on the molecular weights of the peptides and proteins, and no such enhancement was observed in the case of small peptides; in this regard a dividing line appeared to exist between [ACTH fragment]<sup>+</sup> (2465 Da) and [hANP]<sup>+</sup> (3080 Da).

The mechanism by which signal intensity enhancement was achieved with the use of peptides and proteins mixed with the matrix solution remains unclear. However, when super DHB (a co-matrix of DHB and 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid) was used as the matrix, ion yields and S/N ratio improved, especially for the high-mass range.<sup>20</sup> It has been suggested that this signal enhancement was caused by a disorder in the DHB lattice, allowing 'softer' desorption. This type of signal enhancement has also been observed in the case of substance P in CHCA after fast evaporation of an acetone solvent, which resulted in the more homogeneous distribution of matrix and analytes.<sup>18</sup> In addition, better mass resolution has been observed in the spectra of cytochrome C in a CHCA matrix desorbed from polyethylene and polypropylene membranes than has been observed with a CHCA matrix desorbed from stainless steel; it was thus suggested that such improved resolution might be due at least in part to the formation of relatively small matrix crystals within the membrane lattice structure.<sup>25</sup> In the present study, Tf and other proteins might have led to a similar disorganization in the CHCA lattice, resulting in the homogeneous distribution of insulin in the CHCA. However, the mechanism may differ from that suggested here, since the disorder in the CHCA lattice cannot reasonably account for why both Tf and BSA were able to enhance the insulin signal more effectively than either hANP or glucagon. As the next step, we are now planning to compare the crystals of the additive macromolecules plus matrix with those of the control matrix, using microscopic examination, to help elucidate the enhancement mechanism. We also intend to investigate whether the enhancement effect is observed in matrices other than CHCA. If crystallization is important,

**Table 1.** Signal intensities for proteins and peptides obtained using a matrix premixed with deionized water or with solutions of Tf or BSA

	Water	Tf	BSA
[Angiotensin II] <sup>+</sup>	27 834 ± 10 757	17 057 ± 5021	19 755 ± 11 237
[P14R] <sup>+</sup>	41 689 ± 15 289	30 675 ± 8588	29 237 ± 13 330
[ACTH 18–39] <sup>+</sup>	4371 ± 1586	3801 ± 2246	5458 ± 3826
[hANP] <sup>+</sup>	5158 ± 1323	6889 ± 2879	9523 ± 6384
[human glucagon] <sup>+</sup>	435 ± 183	674 ± 324	978 ± 566
[insulin B chain] <sup>+</sup>	367 ± 257	997 ± 251	715 ± 479
[bovine insulin] <sup>+</sup>	639 ± 100	6266 ± 2736	7498 ± 5331
[human insulin] <sup>+</sup>	1267 ± 130	13 321 ± 5057	12 982 ± 6863
[equine cytochrome C] <sup>2+</sup>	166 ± 83	5668 ± 1975	3460 ± 1442
[human IGF-I] <sup>+</sup>	459 ± 81	7667 ± 1808	6263 ± 2872
[equine apomyoglobin] <sup>2+</sup>	nd	2249 ± 994	2217 ± 1087
[equine cytochrome C] <sup>+</sup>	114 ± 43	7629 ± 1804	4006 ± 1981
[BSA] <sup>4+</sup>	nd	52 ± 14	2459 ± 604
[equine apomyoglobin] <sup>+</sup>	nd	1347 ± 700	2090 ± 1316
[BSA] <sup>3+</sup>	nd	155 ± 13	3721 ± 1426
[BSA] <sup>2+</sup>	nd	114 ± 27	3624 ± 1681
[BSA] <sup>+</sup>	nd	25 ± 8	634 ± 433

Each entry is the average of the most intense signals from four samples. nd: no signal was detected.



**Figure 5.** MALDI mass spectra of a mixture of peptides and proteins. The mixture of peptides and proteins (50 fmol/ $\mu$ L each) and the matrix solution were mixed together in equal volumes. The matrix solution was a 5:1 mixture of the CHCA solution with (a) deionized water; (b) Tf solution (0.10  $\mu$ g/ $\mu$ L); and (c) BSA solution (0.10  $\mu$ g/ $\mu$ L). Signal 1, [bovine insulin]<sup>+</sup> (5730 Da); 2, [human insulin]<sup>+</sup> (5808 Da); 3, [cytochrome C]<sup>2+</sup>; 4, [IGF-I]<sup>+</sup> (7649 Da); 5, [apomyoglobin]<sup>2+</sup>; 6, [cytochrome C]<sup>+</sup> (12 362 Da); 7, [apomyoglobin]<sup>+</sup> (16 952 Da); 8, [Tf]<sup>7+</sup>; 9, [Tf]<sup>6+</sup>; 10, [Tf]<sup>5+</sup>; 11, [Tf]<sup>4+</sup>; 12, [BSA]<sup>7+</sup>; 13, [BSA]<sup>6+</sup>; 14, [BSA]<sup>5+</sup>; and 15, [BSA]<sup>4+</sup>.

the effect should not be observed when using liquid matrices.<sup>26,27</sup>

The present results suggest that the enhancement brought about by either Tf or BSA could be applicable to the improvement of sensitivity in the detection of proteins by MALDI-TOFMS in general. However, when Tf or BSA was used as an enhancer in a MALDI-TOFMS system, signals from Tf and BSA were also detected, which sometimes interfered with the analysis of the target proteins. Therefore, neither Tf nor BSA appears to be the best possible enhancer. Further studies are currently underway in order to discover the best macromolecule as an enhancer.

## CONCLUSIONS

We have demonstrated that the signal intensities of insulin and of several peptides and proteins were enhanced in

CHCA premixed with Tf or other peptides or proteins. The characteristics of this type of enhancement are as follows: (1) Tf (80 kDa) and BSA (66 kDa) led to better signal enhancement than did small peptides and proteins (<20 kDa) or IgG (150 kDa); (2) the optimum S/N value was observed when the added amount of peptide or protein was within the range 0.26–0.62 pmol; and (3) the signals of peptides of high molecular weight (>3000 Da) were enhanced by the addition of Tf or BSA to CHCA, although the signals of small peptides (<2500 Da) were not enhanced. This type of enhancement may be useful for the improvement of protein analyses with MALDI-TOFMS.

## Acknowledgements

This study was supported in part by a research grant on Human Genome, Tissue Engineering Food Biotechnology from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

## REFERENCES

- Roberts GD, Johnson WP, Burman S, Anumula KR, Carr SA. *Anal. Chem.* 1995; **67**: 3613.
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. *Nat. Biotechnol.* 1999; **17**: 994.
- Münchbach M, Quadroni M, Miotto G, James P. *Anal. Chem.* 2000; **72**: 4047.
- Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev PA, Fenselau C. *Anal. Chem.* 2001; **73**: 2836.
- Cagney G, Emili A. *Nat. Biotechnol.* 2002; **20**: 163.
- Vogt JA, Schroer K, Hözler K, Hunzinger C, Klemm M, Biefang-Arndt K, Schillo S, Cahill MA, Schlattenholz A, Matthies H, Stegmann W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 1273.
- Kuyama H, Watanabe M, Toda C, Ando E, Tanaka K, Nishimura O. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 1642.
- Wu SL, Choudhary G, Ramström M, Bergquist J, Hancock WS. *J. Proteome Res.* 2003; **2**: 383.
- Nakanishi T, Okamoto N, Tanaka K, Shimizu A. *Biol. Mass Spectrom.* 1994; **23**: 230.
- Nelson RW, Krone JR, Bieber AL, Williams P. *Anal. Chem.* 1995; **67**: 1153.
- Tubbs KA, Nedelkov D, Nelson RW. *Anal. Biochem.* 2001; **289**: 26.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988; **2**: 151.
- Karas M, Hillenkamp F. *Anal. Chem.* 1988; **60**: 2299.
- Beavis RC, Chait BT. *Anal. Chem.* 1990; **62**: 1836.
- Strupat K, Karas M, Hillenkamp F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 1991; **111**: 89.
- Beavis RC, Chaudhary T, Chait BT. *Org. Mass Spectrom.* 1992; **27**: 156.
- Vorm O, Roepstorff P, Mann M. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 3281.
- Köstler C, Castoro JA, Wilkins CL. *J. Am. Chem. Soc.* 1992; **114**: 7572.
- Billeci TM, Stults JT. *Anal. Chem.* 1993; **65**: 1709.
- Karas M, Ehring H, Nordhoff E, Stahl B, Strupat K, Hillenkamp F, Grehl M, Krebs B. *Org. Mass Spectrom.* 1993; **28**: 1476.
- Tsarbopoulos A, Karas M, Strupat K, Pramanik BN, Nagabhushan TL, Hillenkamp F. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 2062.
- Yuan X, Desiderio DM. *J. Mass Spectrom.* 2002; **37**: 512.
- Botting CH. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 598.
- Nelson RW, McLean MA. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 1408.
- Worrall TA, Cotter RJ, Woods AS. *Anal. Chem.* 1998; **70**: 750.
- Carda-Broch S, Berthod A, Armstrong DW. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 553.
- Turney K, Harrison WW. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004; **18**: 629.

## 〔シンポジウム：Functional Glycomics ミニレビュー〕

## LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによるグライコーム解析

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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>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ー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<sup>3,4)</sup>。この糖鎖プロファイリング法は、グライコー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、グライコー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 $\mu$ g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NaBH<sub>4</sub>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  $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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  $\alpha$  結合していることが確認された<sup>5)</sup>. NS0 細胞産生糖タンパク質には Gal $\alpha$ 1-3Gal を含む糖鎖が結合していることが報告されており<sup>6,7)</sup>、今回検出された Hex-Hex も Gal $\alpha$ 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 $\alpha$ 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  $\mu$ g のヒト黒色腫細胞産生ヒト組織プラスミノーゲンアクチベータ (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. NaBH<sub>4</sub> 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<sup>8)</sup>. 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

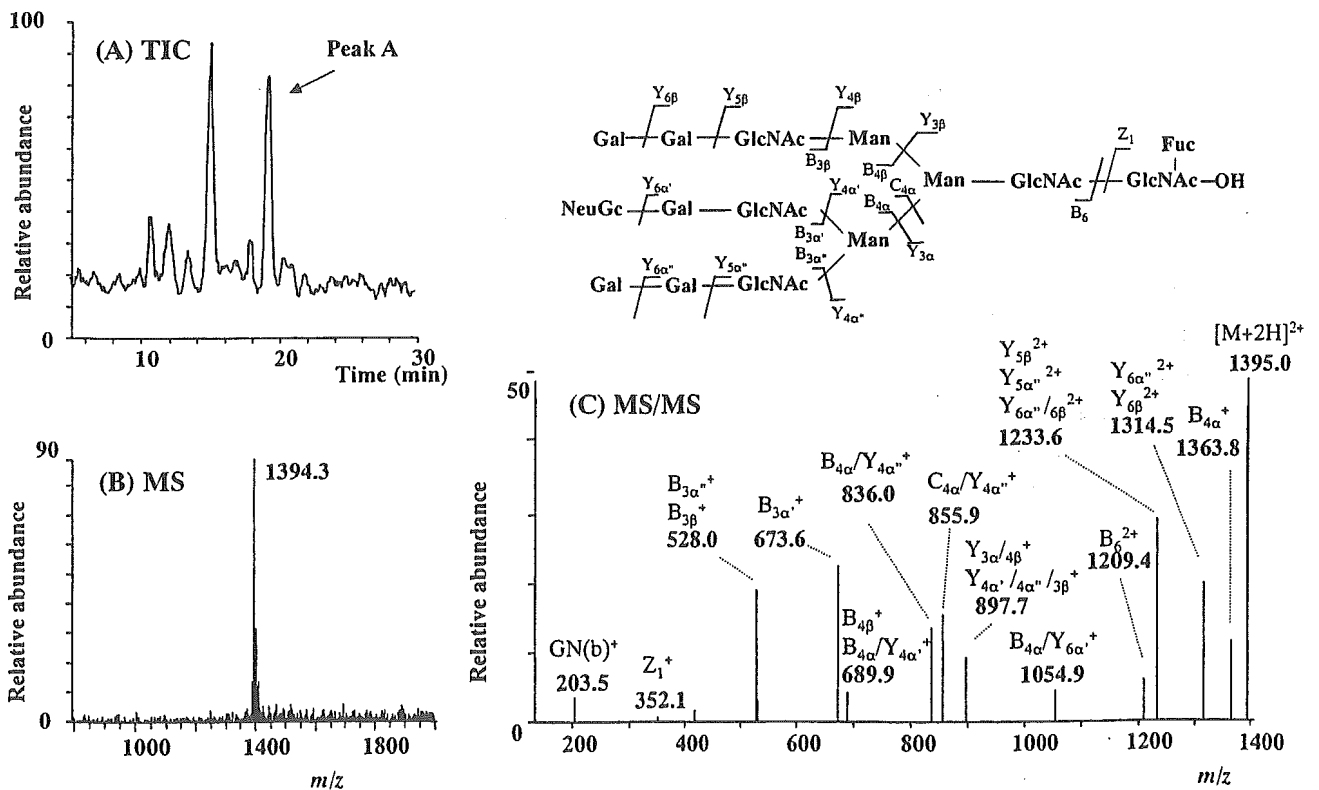


Fig. 1. (A) GCC-LC/MS によって得られた HGF の糖鎖プロファイル, (B) ピーク A のマスペクトル, (C) ピーク A のプロダクトイオンスペクトル及び推定構造

カラム, Hypercarb (0.2×150 mm); 流速, 3  $\mu$ l/min; 溶離液, 5 mM 酢酸アンモニウム/H<sub>2</sub>O-アセトニトリル; MS, TSQ-7000 (Thermoelectron)

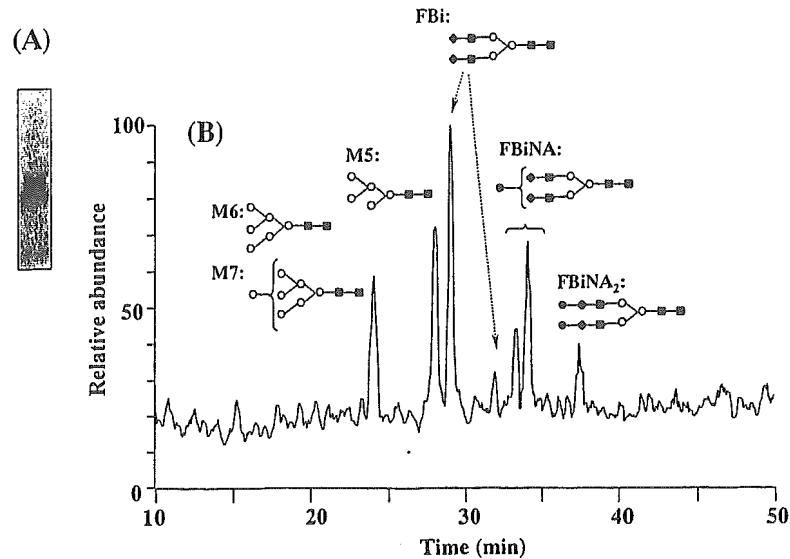


Fig. 2. (A) tPA (2 µg) の SDS-PAGE, (B) GCC-LC/MS によるゲル内 tPA 由来糖鎖のプロファイル

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<sup>9-11)</sup>。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。

$5 \times 10^6$  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、 $\text{NaBH}_4$  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-アセチルヘキソサミン (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。

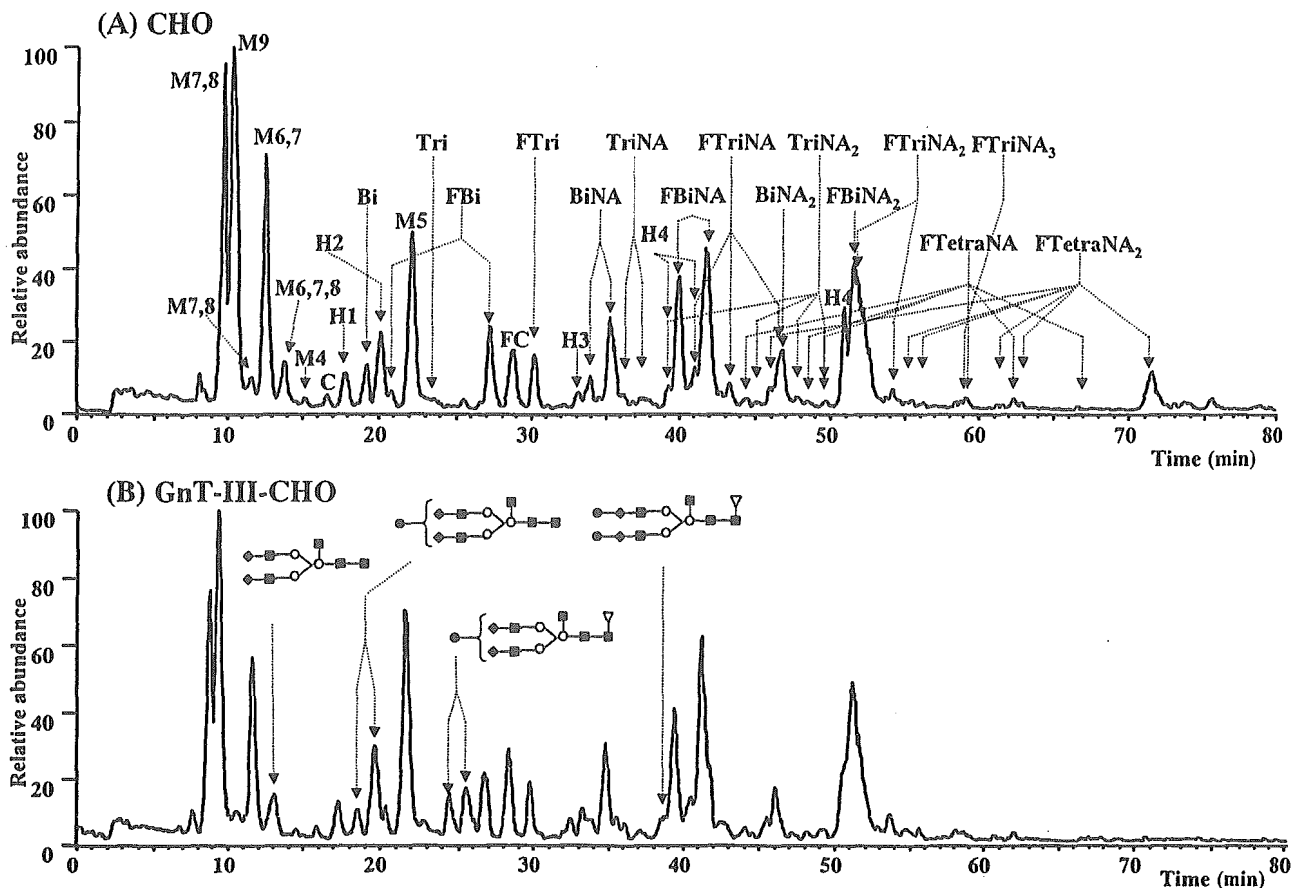


Fig. 3. (A) CHO 細胞膜画分の糖鎖プロファイル, (B) GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞の糖鎖プロファイル  
 M, Man; H, hybrid; C, trimannosylcore; F, Fuc; NA, NeuAc; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary

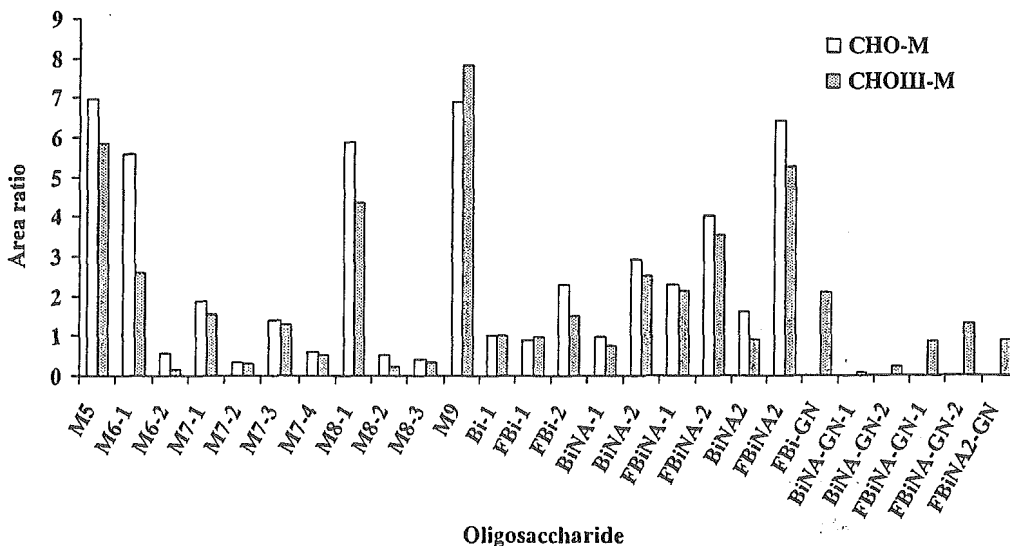


Fig. 4. CHO 細胞膜画分 (CHO-M) 及び GnT-III 遺伝子導入細胞由来膜画分 (CHOIII-M) 由来糖鎖の分布

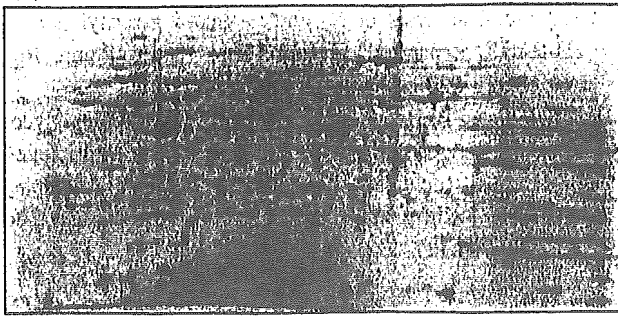
アシアロ 2 本鎖糖鎖を 1.0 とする

## 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、プロテオミクス的手法を用いて、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-E<sub>4</sub> 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

クチンブ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<sup>12)</sup>。しかし後者の場合、泳動ゲルとレクチンブ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-E<sub>4</sub> レクチンを用いてレクチンブロットを行った結果 (B) を示している。レクチンブロットによって、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、レクチンブ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<sup>13,14)</sup>、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.



[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  $\alpha$ -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<sup>1-3)</sup>。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<sup>4)</sup>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 で分離するグライコキャッチ法<sup>5)</sup>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]<sup>+</sup>;  $m/z$  204, [Hex-HexNAc]<sup>+</sup>;  $m/z$  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<sup>6)</sup> や、プリカーサーイオンスキューン<sup>7,8)</sup> 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、プ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、プリカーサーイオンスキューンは、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ン

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 Matsushita, 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<sup>9,10</sup>。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、 $\alpha$ -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解析を紹介する。

**I. LC/MS/MS を用いた糖タンパク質の糖鎖構造解析**  
**— $\alpha$ -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<sup>11</sup>、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<sup>12,13</sup>。LC/MS/MS を用いて、AFP の糖鎖を詳細に解析できるようになれば、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 ( $[\text{HexNAc}]^+$ ) 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<sup>+3</sup>) 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 ( $[\text{HexNAc}]^+$ ) に加えて、糖鎖に由来する  $m/z$  168 ( $[\text{HexNAc}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ )、 $m/z$  186 ( $[\text{HexNAc}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ) 及び  $m/z$  366 ( $[\text{Hex}-\text{HexNAc}]^+$ ) や、シアロ糖鎖に由来する  $m/z$  292 ( $[\text{NeuAc}]^+$ ) 及び  $m/z$  274 ( $[\text{NeuAc}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ) 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<sup>14</sup>。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、部位特異的な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関与する多数の糖タンパク質が存在し、糖鎖はこれらの

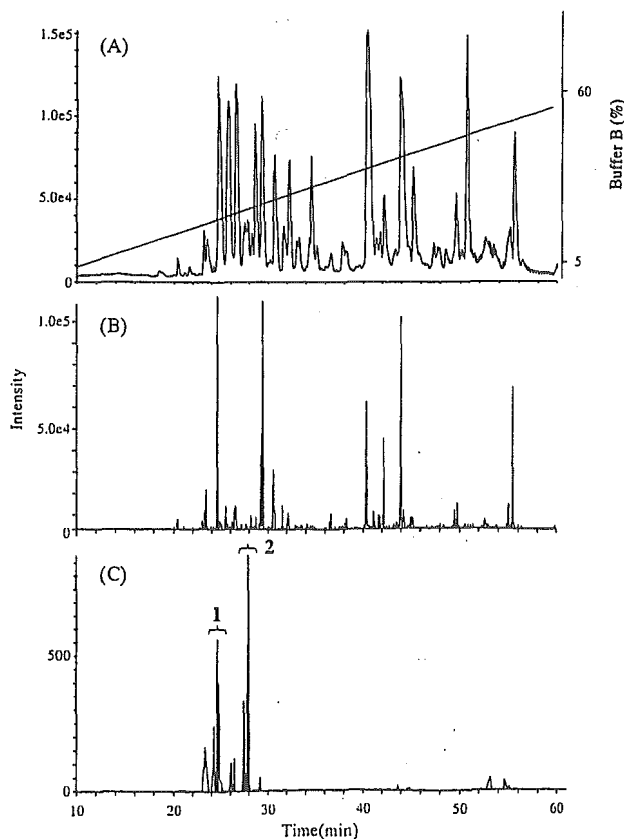
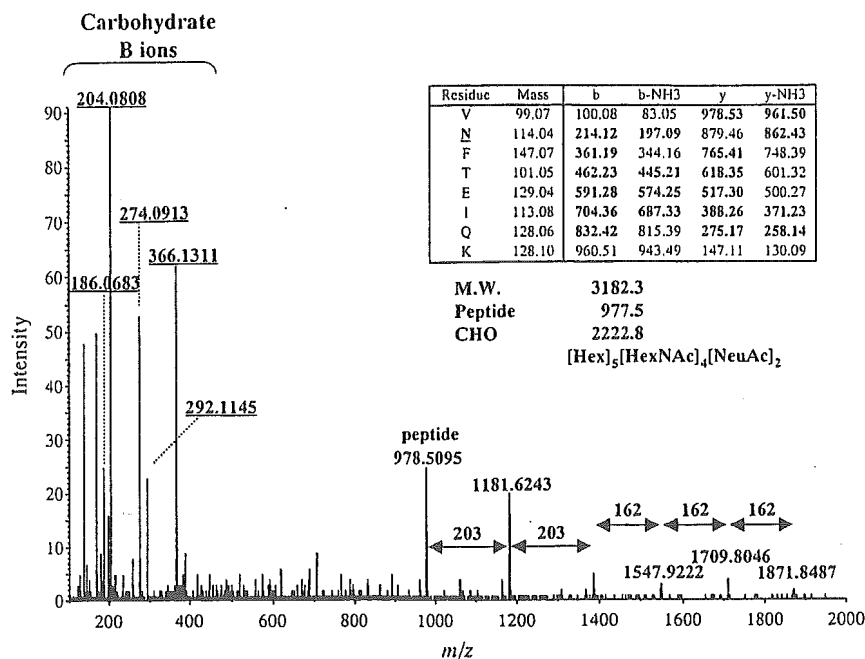


Fig. 1. LC/MS/MS of AFP, (A) TOF-MS full scan at  $m/z$  700–2000, (B) product ion scan at  $m/z$  100–2000, (C) product ion scan at  $m/z$  204.

Fig. 2. Product ion spectrum of a glycopeptide ( $m/z$  1061.83<sup>3+</sup>) 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 <sup>a</sup> )	Retention time (min)	Observed $m/z$ (charge)	Carbohydrate composition	Calculated Carbohydrate mass	Theoretical carbohydrate mass <sup>a</sup>
1	KVNFTETIQL (977.5)	23	1013.43(3)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2077.8	2077.7
		23	1519.67(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2077.8	2077.7
		23	1081.29(3)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2281.4	2280.8
		23	1621.44(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2281.4	2280.8
		23	1446.62(2)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	1931.8	1931.7
		23	1118.67(2)	[Hex] <sub>4</sub> [HexNAc] <sub>3</sub>	1275.9	1275.5
		23	1264.05(2)	[Hex] <sub>4</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	1566.6	1566.6
		23	1110.48(3)	[Hex] <sub>4</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	1566.6	1566.6
		24	1665.44(2)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2369.4	2368.8
		24	1178.33(3)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2572.5	2571.9
		24	1061.78(3)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2222.9	2222.8
		25	1592.17(2)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2222.9	2222.8
		2	KFTKVNFTETIQL (1353.7)	27	1236.04(3)	[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>
27	1853.29(2)			[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2369.4	2368.8
27	1187.17(3)			[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2222.8	2222.8
28	1780.23(2)			[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2222.8	2222.8
28	1303.56(3)			[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2572.0	2571.9
28	1138.84(3)			[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2077.8	2077.7
28	1206.52(3)			[dHex] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	2280.9	2280.8
28	1090.14(3)			[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	1931.7	1931.7
28	1322.75(3)	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	2629.6	2628.9		

<sup>a</sup> Monoisotopic mass value.

機能に深く関わっていると考えられている<sup>15)</sup>。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プリカーサーイオンの 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<sup>+2</sup> 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]<sub>2</sub>[HexNAc]<sup>+</sup>)、 $m/z$  569 ([Hex][HexNAc]<sub>2</sub><sup>+</sup>) や、 $m/z$  512 ([Hex][HexNAc][dHex]<sup>+</sup>) 等の B

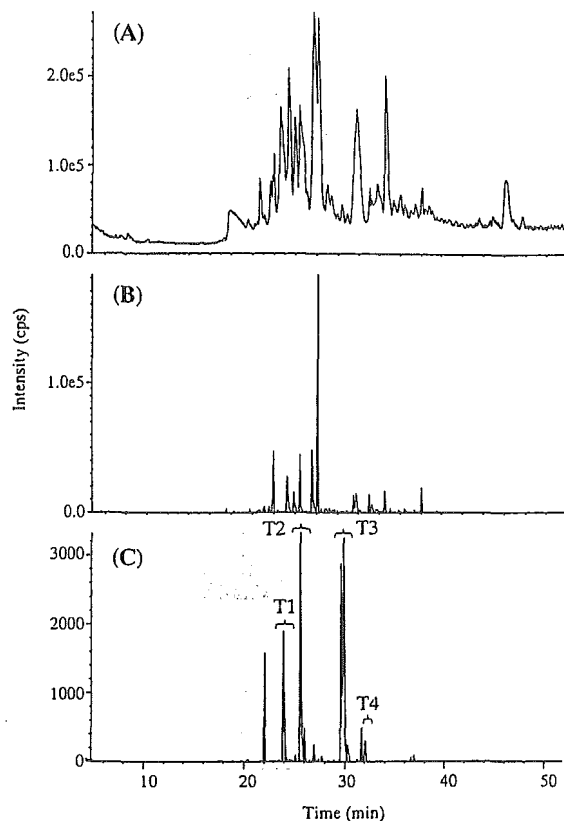


Fig. 4. LC/MS/MS of rat brain Thy-1, (A) TOF-MS full scan at  $m/z$  700-2000, (B) product ion scan at  $m/z$  100-2000, (C) Product ion scan at  $m/z$  204.

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。

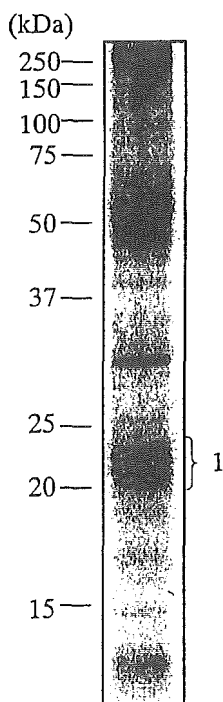


Fig. 3. SDS-PAGE of lipid-free GPI-anchored protein prepared from rat brain.

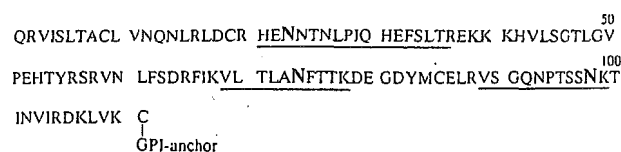


Fig. 5. Amino acid sequence of rat Thy-1.

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

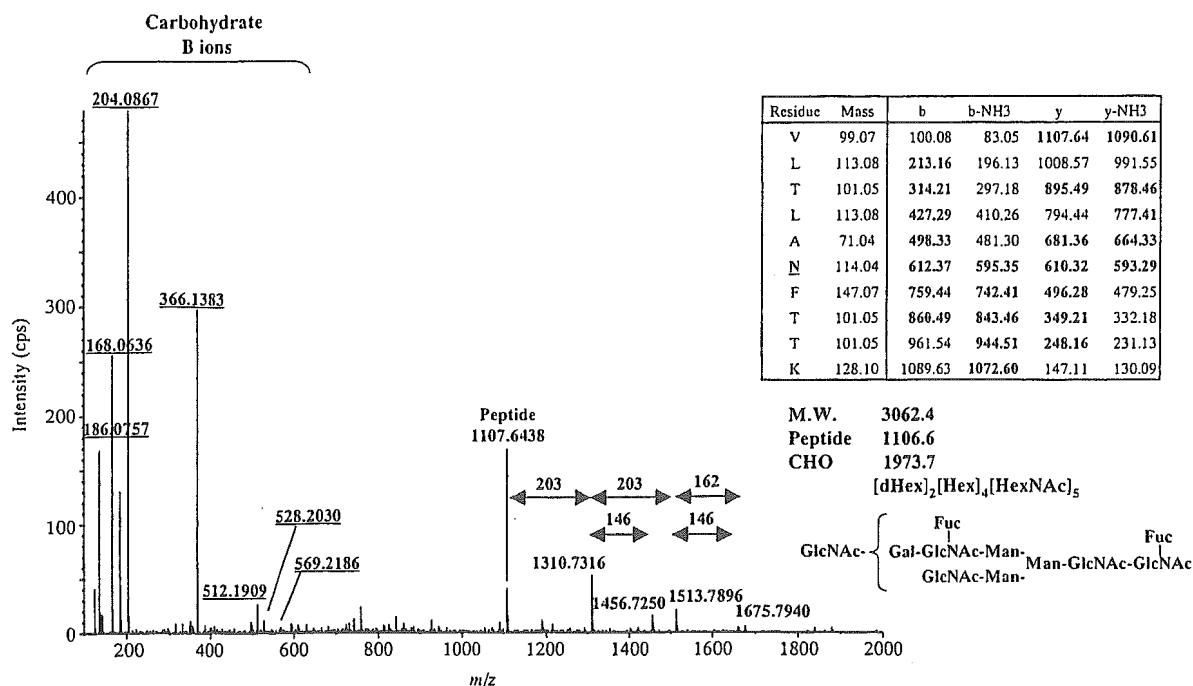


Fig. 6. Product ion spectrum of a glycopeptide ( $m/z$  1532.2<sup>2+</sup>) at peak 29.5 min. Inset table shows theoretical  $m/z$  values of b and y ions, and ions detected by MS/MS are indicated by bold face.

Table 2. Glycosylation analysis of rat brainThy-1

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

<sup>a</sup> 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<sup>16,17)</sup>、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。

## Kinetic Analysis of Pepsin Digestion of Chicken Egg White Ovomucoid and Allergenic Potential of Pepsin Fragments

Kayoko Takagi<sup>a</sup> Reiko Teshima<sup>a</sup> Haruyo Okunuki<sup>a</sup> Satsuki Itoh<sup>a</sup>  
Nana Kawasaki<sup>a</sup> Toru Kawanishi<sup>a</sup> Takao Hayakawa<sup>a</sup> Yoichi Kohno<sup>b</sup>  
Atsuo Urisu<sup>c</sup> Jun-ichi Sawada<sup>a</sup>

<sup>a</sup>National Institute of Health Sciences, Tokyo; <sup>b</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, and <sup>c</sup>Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine, Aichi, Japan

### Key Words

Ovomucoid · Allergen · Digestion · Simulated gastric fluid · Fragment, pepsin-digested · Human serum IgE

### Abstract

**Background:** The allergenic potential of chicken egg white ovomucoid (OVM) is thought to depend on its stability to heat treatment and digestion. Pepsin-digested fragments have been speculated to continue to exert an allergenic potential. OVM was digested in simulated gastric fluid (SGF) to examine the reactivity of the resulting fragments to IgE in sera from allergic patients. **Methods:** OVM was digested in SGF and subjected to SDS-PAGE. The detected fragments were then subjected to N-terminal sequencing and liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry analysis to confirm the cleavage sites and partial amino acid sequences. The reactivity of the fragments to IgE antibodies in serum samples from patients allergic to egg white was then determined using Western blotting (n = 24). **Results:** The rate of OVM digestion depended on the pepsin/OVM ratio in the SGF. OVM was first cleaved near the end of the first domain, and the resulting fragments were then further digested into smaller fragments. In the Western blot analysis, 93% of the OVM-reactive sera also bound to the 23.5- to 28.5-kDa fragments, and 21% reacted with

the smaller 7- and 4.5-kDa fragments. **Conclusion:** When the digestion of OVM in SGF was kinetically analyzed, 21% of the examined patients retained their IgE-binding capacity to the small 4.5-kDa fragment. Patients with a positive reaction to this small peptide fragment were thought to be unlikely to outgrow their egg white allergy. The combination of SGF-digestibility studies and human IgE-binding experiments seems to be useful for the elucidation and diagnosis of the allergenic potential of OVM.

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

### Introduction

Chicken egg white is one of the strongest and most frequent causes of food allergies among young children [1–5]. Egg white contains several allergens, including ovalbumin, ovotransferrin, lysozyme and ovomucoid (Gal d 1, OVM). OVM accounts for about 11% of all egg white proteins [6] and has a molecular weight of 28 kDa, containing a carbohydrate content of 20–25% [7]. OVM is known to be stable to digestion and heat, and cooked eggs can cause allergic reactions in OVM-specific allergic patients [8–11]. One possible reason for this is that OVM contains linear epitopes that are only slightly affected by conformational changes induced by heat denaturation.

**KARGER**

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2005 S. Karger AG, Basel  
1018-2438/05/1361-0023\$22.00/0

Accessible online at:  
www.karger.com/iaa

Correspondence to: Dr. Reiko Teshima  
National Institute of Health Sciences, Division of Biochemistry and Immunochemistry  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku  
Tokyo 158-8501 (Japan)  
Tel. +81 3 3700 1141, ext. 243, Fax +81 3 3707 6950, E-Mail rteshima@nihs.go.jp

OVM consists of 186 amino acids divided into three domains of about 60 amino acids each; the third domain has been reported to be the most important domain with regard to allergenicity [12]. In a previous report, N-glycans in the third domain were suggested to be essential for allergenicity [13]; however, a recent report found that the deletion of the N-glycans did not affect the allergic reactivity.

We previously reported the digestibility of 10 kinds of food proteins in simulated gastric fluid (SGF) [8, 14]. OVM was digested relatively rapidly, but several fragments were detected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by Coomassie blue (CBB) staining. The reactivity of these fragments with IgE antibodies from the sera of patients with egg white allergy is very important to understanding the mechanism of OVM allergy.

A few previous reports have described the reactivity of IgE in sera from patients with egg white allergies with OVM-derived fragments. Kovacs-Nolan et al. [15] separated pepsin-digested fragments of OVM using high-performance liquid chromatography (HPLC) and examined the IgE-binding activities of each fragment using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Besler et al. [16] investigated the reactivity of pepsin-digested fragments with patient IgE using Western blotting and showed that the fragments retain their binding capacity to human IgE in some serum samples from OVM-allergic patients. However, little attention has been paid to the digestive conditions, and the number of serum samples has been somewhat small in these studies. Urisu et al. [17] reported that the sera of subjects that tested positive or negative during an oral egg white challenge exhibited a significant difference in their reactivity with pepsin fragments.

In the present report, kinetic data for different generations of SGF-stable OVM fragments were obtained, and the reactivity of the fragments with serum IgE from patients with egg white allergies was investigated using Western blotting.

## Materials and Methods

Pepsin (catalog number P6887) and chicken egg white OVM (T2011, Trypsin Inhibitor, Type III-O) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). The concentration of the OVM test solution was 5 mg/ml of water. The gels and reagents used for the SDS-PAGE analysis were purchased from Invitrogen (Carlsbad, Calif., USA).

### *Serum Specimens*

Sera from 24 patients with egg white allergies and a healthy volunteer were used after obtaining informed consent from the patients and ethical approval by the Institutional Review Board of the National Institute of Health Sciences. Twenty-two of the patients had been diagnosed as having an egg white allergy at hospitals in Japan, based on their clinical histories and positive IgE responses to egg white proteins by radioallergosorbent test (RAST), while the remaining 2 allergen-specific sera were purchased from Plasma Lab International (Everett, Wash., USA); the commercial sera originated from adult Caucasians who had been diagnosed as having several food allergies, including egg white, based on their clinical history and skin tests. The commercial sera also showed positive IgE responses to egg white proteins when examined using RAST.

### *Preparation of SGF*

Pepsin (3.8 mg; approximately 13,148 units of activity) was dissolved in 5 ml of gastric control solution (G-con; 2 mg/ml NaCl, pH adjusted to 2.0 with distilled HCl), and the activity of each newly prepared SGF solution was defined as the production of a  $\Delta A_{280}$  of 0.001/min at pH 2.0 and 37°C, measured as the production of trichloroacetic acid-soluble products using hemoglobin as a substrate. The original SGF was prepared at a pepsin/OVM concentration of 10 unit/ $\mu$ g, and this solution was diluted with G-con for the experiments performed at pepsin/OVM concentrations of 1 and 0.1 unit/ $\mu$ g. The SGF solutions were used within the same day.

### *Digestion in SGF*

SGF (1,520  $\mu$ l) was incubated at 37°C for 2 min before the addition of 80  $\mu$ l of OVM solution (5 mg/ml). The digestion was started by the addition of OVM. At each scheduled time point (0.5, 2, 5, 10, 20, 30, and 60 min), 200  $\mu$ l of the reaction mixture was transferred to a sampling tube containing 70  $\mu$ l of 5  $\times$  Laemmli buffer (40% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 10% SDS, 0.33 M Tris, 0.05% bromophenol blue, pH 6.8) and 70  $\mu$ l of 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. For the zero-point samples, the OVM solution (10  $\mu$ l) was added to neutralized SGF (190  $\mu$ l of SGF, 70  $\mu$ l of 5  $\times$  Laemmli buffer, and 70  $\mu$ l of 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). All neutralized samples were then boiled at 100°C for 3 min and subjected to SDS-PAGE.

### *SDS-PAGE Analysis and Staining Procedure*

Samples (15  $\mu$ l/lane) were loaded onto a 10–20% polyacrylamide Tris/Tricine gel (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) and separated electrophoretically. The gels were fixed for 5 min in 5% trichloroacetic acid, washed for 2 h with SDS Wash (45.5% methanol, 9% acetic acid), stained for 10 min with CBB solution (0.1% Coomassie Brilliant blue R, 15% methanol, 10% acetic acid), and destained with 25% methanol and 7.5% acetic acid. The stained gel images were then analyzed using Image Gauge V3.1 (Fuji Film, Tokyo, Japan), and the density of each band was quantified. Periodic acid-Schiff (PAS) staining [18] was used to detect the glycosylated fragments.

### *N-Terminal Sequence Analysis*

OVM (1.5 mg) was digested in SGF containing 1 unit/ml pepsin, concentrated by centrifugation using Centriprep YM-3 (Millipore Corporation, Bedford, Mass., USA) and subjected to SDS-PAGE followed by electrical transblotting to a 0.2- $\mu$ m polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad, Richmond, Calif., USA) and CBB staining. The detected fragment bands were then cut out and sequenced using a Procise 494HT Protein Sequencing System (Applied Biosys-



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  $\mu$ l 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/ $\mu$ l in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ).

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  $\times$  50 mm, 3  $\mu$ m, 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  $\mu$ l/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

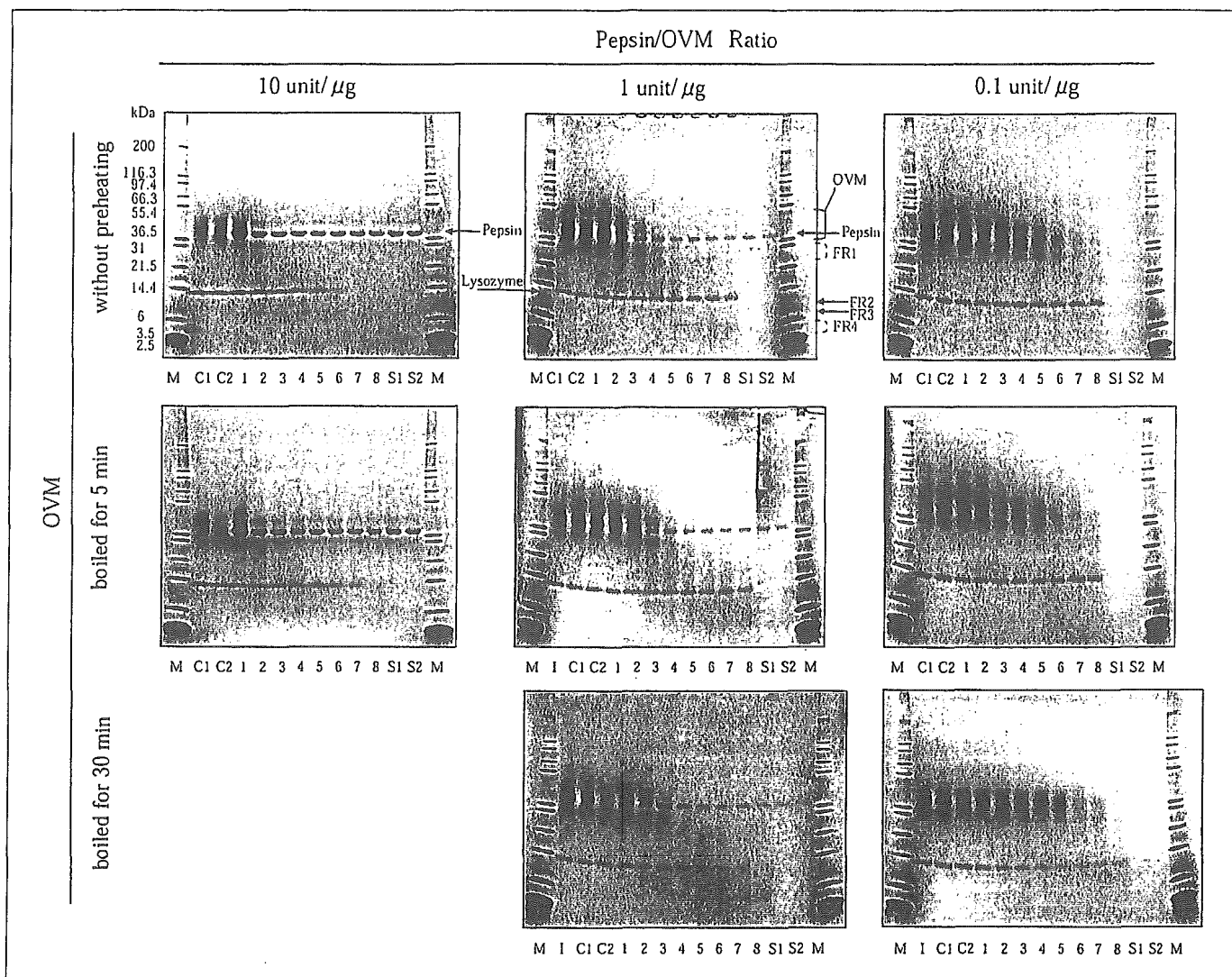
appeared at about 34–49 kDa in the SDS-PAGE gel because of the presence of five N-linked sugar chains. The pepsin band was detected at 39 kDa, overlapping with the intact OVM band, and lysozyme (14 kDa) contamination was detected in the OVM sample that was used. Intact OVM rapidly disappeared within 0.5 min in SGF (pepsin/OVM = 10 unit/ $\mu$ g), and a fragment band was detected at 7 kDa. When the pepsin content in SGF was reduced to 1 and 0.1 unit/ $\mu$ g, the digestion rate markedly decreased. Intact OVM was still detected after 30 min when the pepsin/OVM ratio was 0.1 unit/ $\mu$ g. The fragment bands were clearer (fig. 2) when a concentrated SGF-digested OVM solution (pepsin/OVM = 1 unit/ $\mu$ g, 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/ $\mu$ g. 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 % <sup>a</sup>	
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

<sup>a</sup> 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.

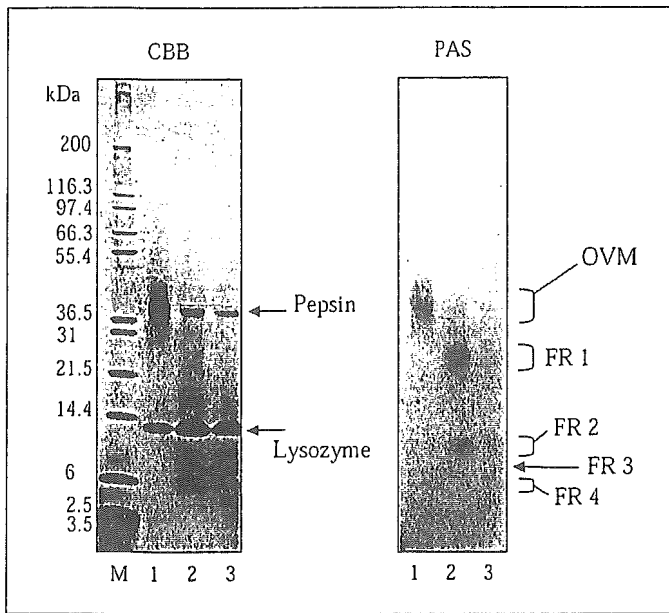
#### Sequence Analysis of OVM Fragments

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.

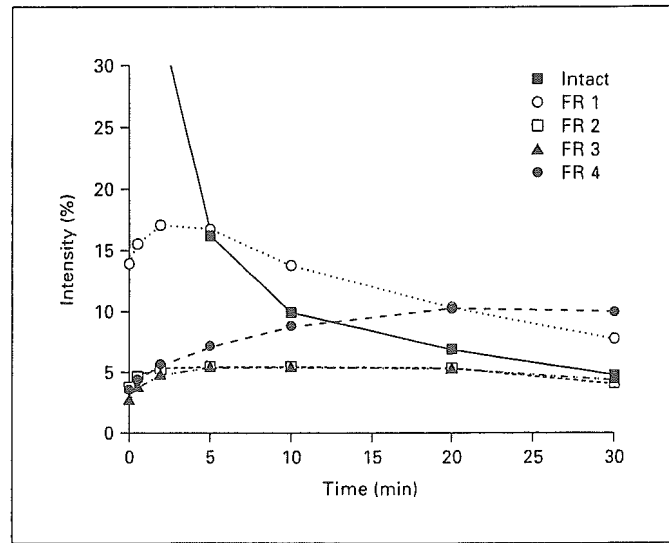
The internal sequences of the FR 1, FR 3, and FR 4 fragments were also identified by LC/MS/MS and are shown in table 2 and in the upper panel of figure 4.

#### 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/ $\mu$ g) for 5 and 30 min. Lane M = Molecular weight markers; lane 1 = original OVM (2.5  $\mu$ g/lane); lanes 2 and 3 = OVM digested for 5 and 30 min, respectively, and concentrated (12  $\mu$ 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/ $\mu$ 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	AFNPVCGTDGVITYD
		90-112	AFNPVCGTDGVITYDNECLLCAHK
		90-122	AFNPVCGTDGVITYDNECLLCAHKVEQGASVDKR
		113-122	VEQGASVDKR
5 min	FR 3	90-112	AFNPVCGTDGVITYDNECLLCAHK
		90-122	AFNPVCGTDGVITYDNECLLCAHKVEQGASVDKR
		104-111	NECLLCAH
		104-112	NECLLCAHK
		104-121	NECLLCAHKVEQGASVDK
		104-122	NECLLCAHKVEQGASVDKR
		113-122	VEQGASVDKR
		134-159	VSVDCSEYKPKDCTAEDRPLCGSDNK
165-185	CNFCNAVVESNGTLTLSHFGK		
30 min	FR 4	90-112	AFNPVCGTDGVITYDNECLLCAHK
		104-111	NECLLCAH
		104-112	NECLLCAHK
		104-122	NECLLCAHKVEQGASVDKR
		112-122	KVEQGASVDKR
		113-121	VEQGASVDK
		113-122	VEQGASVDKR
165-185	CNFCNAVVESNGTLTLSHFGK		

1            11            21            31            41            51

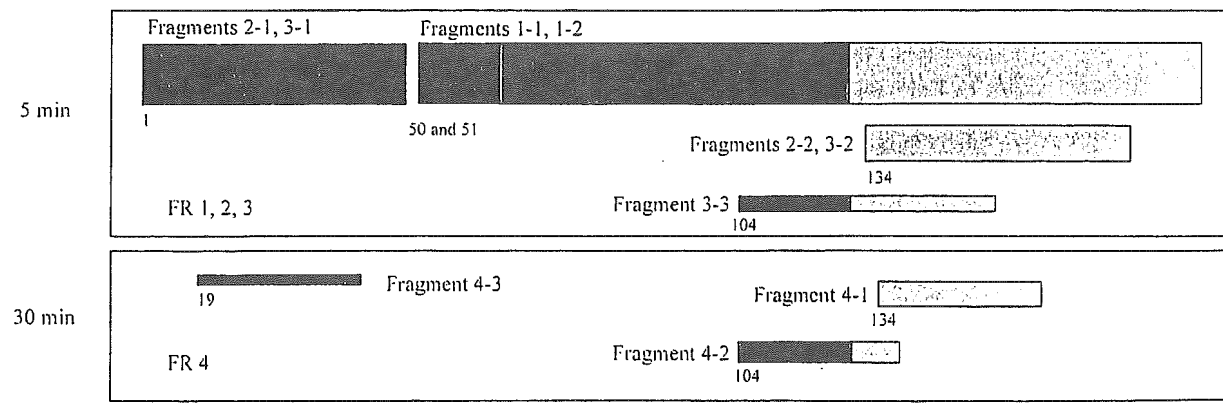
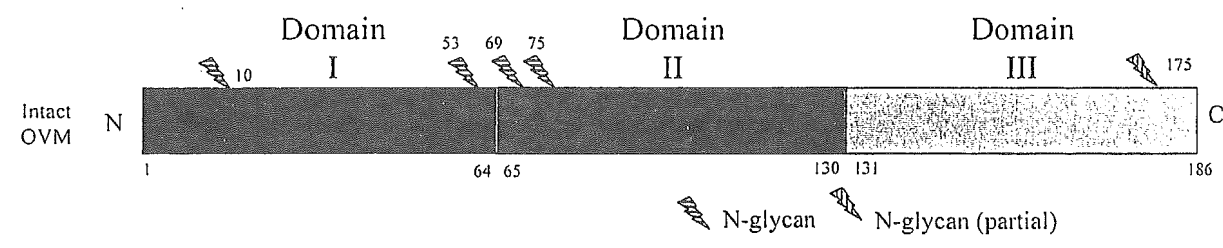
|            |            |            |            |            |

1 AEVDCSRFPN ATDKEGKDVL VCNKDLRPIC GTDGVITYND CLLCAYSIEE GTNISKEHDG 60

61 ECKETVPMNC SSYANTTSED GKVMVLCNRA FNPVCGTDGV TYDNECLLCA HKVEQGASVD 120

121 KRHDGGCRKE LAAVSVCSE YPKPDCTAED RPLCGSDNKT YGNKCNEGNA VVESNGTLTL 180

181 SHFGKC



4