

method using nanoLC/FTMS and nanoLC/MS/MS allows not only the determination of DMB-derivatives with similar sensitivity as the fluorescence detection but also the identification of sialic acid species.

3.2. Quantification of NeuAc and NeuGc in membrane fraction of HL-60RG cells

Using HL-60RG cells as model cells, the potential of this method for the quantification of NeuGc on the cell membrane was evaluated. The membrane fraction from cells (1×10^6) cultured with 10% FCS was prepared by ultracentrifugation. Sialic acids were released by treatment with 2 M acetic acid at 80 °C for 3 h and derivatized with DMB. DMB derivatives (2.5×10^3 cells) were subjected to nanoLC/MS and nanoLC/MS/MS in SIM mode. As shown in Fig. 4A, some peaks appeared in EIC at m/z 442.12–442.16. Based on the retention time as well as the m/z value of molecular ion (m/z 442.145), peak a that appeared at 14 min was assigned to be a peak of NeuGc (Fig. 4B). Fig. 4C shows the MS/MS spectrum acquired from $[M+H]^+$ (m/z 442.145) as precursor. The NeuGc-characteristic ions at m/z 406 and 388 together with other product ions at m/z 313, 283 and 229 clearly indicate the presence of NeuGc in the membrane fraction of HL-60RG cells. In the EIC at m/z 426.13–426.17, the single peak was observed at 15 min (Fig. 5A). The molecular ion at m/z 426.150, and product ions at m/z 390, 372, 313, 283 and 229 acquired at 15.13 min suggest that DMB-NeuAc is eluted in peak b (Fig. 5B and C). The levels of NeuGc and NeuAc in the membrane fraction from HL-60RG cells (2.5×10^3 cells) cultured with 10% FCS were 55.4 ± 4.6 fmol and 13.5 ± 0.6 pmol, respectively (Fig. 6).

After the cultivation of HL-60RG cells with human serum for 10 days (medium was changed four times), NeuGc and NeuAc were determined by the proposed method. Fig. 7A shows the EIC at m/z 442.12–442.16 obtained by nanoLC/MS. In spite of cultivation in human serum, an obvious peak still appeared at 14 min. Molecular ion (m/z 442.145) and NeuGc-characteristic product ions found in the MS/MS spectrum acquired from the molecular ion clearly indicate the presence of NeuGc in the membrane fraction (Fig. 7B and C). The levels of NeuGc and NeuAc in cells (2.5×10^3) cultured in 10% human serum were 29.2 ± 2.4 fmol and 21.0 ± 1.4 pmol, respectively (Fig. 6).

In contrast, no significant peaks appeared in EIC at m/z 442.12–442.16 when HL-60RG cells were cultured in serum-free medium for 14 days (medium was changed four times). The level of NeuAc in cells cultured in serum-free medium was 20.5 ± 1.6 pmol (Fig. 6).

As shown in Figs. 4A and 7A, there are many different molecules detected at m/z 442.14–442.16 in the cells, which makes it difficult to determine a small amount of NeuGc in the membrane fraction by the low-resolution mass spectrometry. The DMB-NeuGc-specific detection was achieved by acquisition of both the accurate mass by FTMS and the characteristic product ions arisen from DMB-NeuGc by MS/MS.

Our method needs only 2.5×10^3 cells for one injection and is applicable to the determination of NeuGc in cell ther-

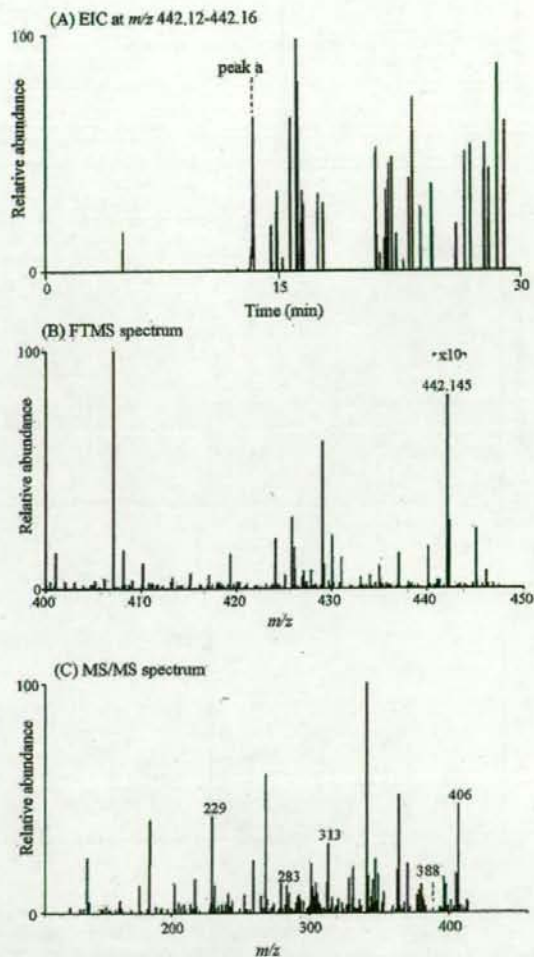


Fig. 7. Detection of DMB-NeuGc in the membrane fractions of HL-60RG cells (2.5×10^3) cultured with 10% human serum. (A) EIC at m/z 442.12–442.16 obtained by SIM. (B) Typical MS spectrum of peak a. (C) MS/MS spectrum of $[M+H]^+$ (m/z 442.145) acquired from around peak a.

apy products. The incorporation of dietary NeuGc into human serum has been reported by Tangvoranuntalul et al. [23], which has raised concerns about NeuGc contamination of cell therapy products through cultivation with human serum. Although using our method, we demonstrated the existence of NeuGc in human cells cultured with human serum, NeuGc could not be detected in human cells cultured in serum-free medium in which no NeuGc exists. These results suggest the difficulty of avoiding NeuGc contamination of cell therapy products during the manufacturing process. Further study to assess the immunogenicity of incorporated NeuGc is necessary to ensure the safety and efficacy of cell therapy products, and our method is useful for the sensitive and quantitative analysis of NeuGc in cell therapy products.

Acknowledgements

This study was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health Labor and Welfare, and Core Research for the Evolutional Science and Technology Program, Japan Science and Technology Corp.

References

- [1] C. Traving, R. Schauer, *Cell Mol. Life Sci.* 54 (1998) 1330.
- [2] T. Angata, A. Varki, *Chem. Rev.* 102 (2002) 439.
- [3] A. Varki, *Glycobiology* 2 (1992) 25.
- [4] R. Schauer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40 (1982) 131.
- [5] S. Kitazume, K. Kitajima, S. Inoue, S.M. Haslam, H.R. Morris, A. Dell, W.J. Lennarz, Y. Inoue, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6694.
- [6] R. Schauer, J. Haverkamp, M. Wember, J.P. Kamerling, J.F. Vliegthart, *Eur. J. Biochem.* 62 (1976) 237.
- [7] N. Kawasaki, S. Itoh, M. Ohta, T. Hayakawa, *Anal. Biochem.* 316 (2003) 15.
- [8] M. Nakano, K. Kakchi, M.H. Tsai, Y.C. Lee, *Glycobiology* 14 (2004) 431.
- [9] E.A. Muchmore, S. Diaz, A. Varki, *Am. J. Phys. Anthropol.* 107 (1998) 187.
- [10] A. Irie, S. Koyama, Y. Kozutsumi, T. Kawasaki, A. Suzuki, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 15866.
- [11] H.H. Chou, H. Takematsu, S. Diaz, J. Iber, E. Nickerson, K.L. Wright, E.A. Muchmore, D.L. Nelson, S.T. Warren, A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 11751.
- [12] H. Higashi, M. Naiki, S. Matuo, K. Okouchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79 (1977) 388.
- [13] J.M. Merrick, K. Zadarlik, F. Milgrom, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 57 (1978) 477.
- [14] M.J. Martin, A. Muotri, F. Gage, A. Varki, *Nat. Med.* 11 (2005) 228.
- [15] A. Heiskanen, T. Satomaa, S. Tiitinen, A. Laitinen, S. Mannelin, U. Impola, M. Mikkola, C. Olsson, H. Miller-Podraza, M. Blomqvist, A. Olonen, H. Salo, P. Lehenkari, T. Tuuri, T. Otonkoski, J. Natunen, J. Saarinen, J. Laine, *Stem Cells* 25 (2007) 197.
- [16] A.E. Manzi, S. Diaz, A. Varki, *Anal. Biochem.* 188 (1990) 20.
- [17] S. Hara, M. Yamaguchi, Y. Takemori, K. Furuhashi, H. Ogura, M. Nakamura, *Anal. Biochem.* 179 (1989) 162.
- [18] M. Bardor, D.H. Nguyen, S. Diaz, A. Varki, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 4228.
- [19] M. Ito, K. Ikeda, Y. Suzuki, K. Tanaka, M. Saito, *Anal. Biochem.* 300 (2002) 260.
- [20] F.N. Lamari, N.K. Karamanos, *J. Chromatogr. B* 781 (2002) 3.
- [21] A. Klein, S. Diaz, I. Ferreira, G. Lamblin, P. Roussel, A.E. Manzi, *Glycobiology* 7 (1997) 421.
- [22] H.H. Chou, T. Hayakawa, S. Diaz, M. Krings, E. Indriati, M. Leakey, S. Paabo, Y. Satta, N. Takahata, A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 11736.
- [23] P. Tangvoranuntakul, P. Gagneux, S. Diaz, M. Bardor, N. Varki, A. Varki, E. Muchmore, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 12045.

1. 液体クロマトグラフィー/質量分析を用いた糖タンパク質構造特性解析

川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英

液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) の登場によって、「煩雑」で「難しい」というイメージの強かった糖タンパク質の糖鎖解析が「短時間」で「簡単」に行えるようになってきた。また、最近では、LC/MSと生化学的手法やプロテオミクスの技術を組み合わせた様々な糖タンパク質構造特性解析方法が報告されている。本稿では、LC/MSを用いた糖タンパク質構造特性解析例として、電気泳動で単離した糖タンパク質の構造を解析した例、単離が難しい糖タンパク質を混合物のままでも解析した例、さらにグライコミクスに応用した例を紹介する。

はじめに

液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS)¹⁾は、混合物を分離・溶出しながらイオン化し、質量を測定する方法である。特定のイオンを選び、タンデム質量分析 (MS/MS) や多段階質量分析 (MSⁿ) を行うと、さらに構造情報が得られる。これらの方法をタンパク質から切り出した糖鎖 (oligosaccharide) 混合物に応用すると、各糖鎖の分子量、単糖組成および配列情報が得られる。また、糖タンパク質の消化物 (ペプチド/糖ペプチド混合物) に応用すると、糖ペプチド (gly-

copeptide) の糖鎖構造情報とペプチド配列情報が得られる^{1)~4)}。最近では、LC/MSと生化学的従来法や最新のプロテオミクスの技術を組み合わせることによって、微量糖タンパク質や糖タンパク質混合物からでも「短時間」で「簡単」に多くの糖鎖構造情報を入手することができるようになってきた。本稿では、LC/MSを用いた糖タンパク質構造特性解析例として、電気泳動で単離した糖タンパク質の構造を解析した例、単離が難しい糖タンパク質を混合物のままでも解析した例、さらにグライコミクス (glycomics) に応用した例について概説する。

[キーワード&略語]

MS, LC/MS, 糖鎖, 糖ペプチド, グライコミクス

EIC : extracted ion chromatogram
(エクストラクトイオンクロマトグラム)

ITMS : ion trap mass spectrometer
(イオントラップ質量分析計)

LC/MS : liquid chromatography/mass spectrometry (液体クロマトグラフィー/質量分析)

MS : mass spectrometry (質量分析)

MS/MS : tandem mass spectrometry
(タンデム質量分析)

MSⁿ : multiple mass spectrometry
(多段階質量分析)

Q/TOFMS : quadrupole/time-of-flight mass spectrometer (四重極飛行時間質量分析計)

TIC : total ion chromatogram
(トータルイオンクロマトグラム)

The use of liquid chromatography/mass spectrometry for the structural characterization of glycoproteins
Nana Kawasaki/Satsuki Itoh/Akira Harazono/Noritaka Hashii/Teruhide Yamaguchi : Division of Biological Chemistry & Biologicals, National Institute of Health Sciences (国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部)

1 単離した糖タンパク質の構造特性解析—LC/MSと電気泳動の利用

LC/MSを用いると、電気泳動で分離されたわずかな量の糖タンパク質からでも、多くの糖鎖構造情報を引き出すことができる。ここでは、マウス脳膜画分に存在するGPI結合タンパク質をSDS-PAGEで分離し、LC/MSおよびLC/MS/MSを用いて解析した例を紹介する(図1)^{5) 6)}。

マウス脳膜画分からGPI結合タンパク質を分画し、SDS-PAGEで分離後、クーマシー染色した(図1A)。はじめに、ゲル内トリプシン消化およびLC/MS/MS(方法a)により、20~25 kDaのバンドのタンパク質をThy-1と同定した(図1B)。

次に、ゲル内N-グリコシダーゼF消化によりN-結合型糖鎖を遊離させ、NaBH₄で還元した後、LC/MSおよびLC/MS/MSによる糖鎖プロファイリング⁷⁾を行った(方法b)。図1Cの実線および破線はそれぞれ、ポジティブイオンおよびネガティブイオンモードで得られたトータルイオンクロマトグラム(TIC)で、おおよそ中性糖鎖と酸性糖鎖のプロファイルを表している。主なピークの糖鎖構造はMS/MSスペクトルから推定することができる。一例として、図1DにピークaのMS/MSスペクトルを示す。糖鎖のMS/MSでは、主にグリコシド結合が開裂したBイオン(非還元末端側糖鎖断片)およびYイオン(還元末端側糖鎖断片)が生じる⁷⁾。ピークaの糖鎖構造は、生じたBおよびYイオンから、図1D中の構造式のように推定することができた。

Thy-1は、分子内に3カ所(Asn23, 74, 98)のN-結合型糖鎖結合部位をもつ糖タンパク質である⁸⁾。結合部位ごとの糖鎖構造を明らかにするため、糖タンパク質をゲルから抽出した後トリプシンで消化し、LC/MSおよびLC/MS/MSを行った(方法c)。図1EはLC/MSで得られたTICで、多くのペプチドがピー

クとして表れている。糖ペプチドの溶出位置は、MS/MSで生じた糖鎖に特徴的なイオン(例: HexHexNAc⁺, m/z 366)を指標にして推定した。図1Fは、 m/z 366のイオンを抽出したエクストラクトイオンクロマトグラム(EIC)である。ピークが出現した位置に糖ペプチドが溶出されていると仮定し、そのピーク周辺から糖ペプチドのMS/MSスペクトルを選び出して、糖鎖構造とペプチド部分を推定した。一例として図1Gに、ピークbの典型的MS/MSスペクトルとイオンピークの帰属結果を示す。イオンピーク間の値がヘキソース(H)およびN-アセチルヘキソサミン(HX)の質量に一致することから、これらは糖鎖に由来するイオンであることがわかる。フラグメントパターンからこの糖鎖はMan5と推定された。糖鎖構造が判明すれば、 m/z 899のイオンをGlcNAcが結合したペプチドイオン([Peptide + GlcNAc + 2H]²⁺)と帰属できる。ペプチド部分の質量から、このペプチドはAsn23を含むペプチドと推定できた。以下同様にして、Thy-1の3カ所に結合しているN-結合型糖鎖の主な構造を、図1Hのように推定することができた。

2 単離が難しい糖タンパク質の構造特性解析—LC/MSとタンパク質データベースの利用

糖ペプチドのMS/MSやMS³では、糖鎖だけでなくペプチド部分も開裂するので、糖鎖が結合しているペプチドのアミノ酸配列を推定できる。したがって、分離が難しい糖タンパク質でも、混合物のままトリプシン消化してLC/MSを行うことにより、糖タンパク質ごとの部位特異的糖鎖構造情報が得られる。ここでは、IgGの糖鎖構造を解析した例を紹介する。IgGは2本のH鎖と2本のL鎖から成る糖タンパク質で、配列に多様性が見られる可変部と配列が一定している定常部から構成されている。IgGは定常部の配列の違いからIgG1~IgG4の4つのサブクラスに分類され、定常部の1カ所にN-結合型糖鎖が結合している⁹⁾。我々は、還元カルボキシメチル化したヒトIgGをトリプシン消化し、2種類の装置を用いて、存在量の多いIgG1とIgG2の糖鎖を同時に解析した。

1) イオントラップ質量分析計(ITMS)を用いた糖ペプチド解析例

図2はITMSを用いたIgGトリプシン消化物の解

※1 液体クロマトグラフィー/質量分析

液体クロマトグラフィーで分離・溶出された物質をイオン化させて質量スペクトルを測定する方法。

※2 糖鎖プロファイリング

糖鎖を液体クロマトグラフィーや電気泳動法などで分離・分類し、その特徴を記載する方法。

析例である。図2Aおよび2Bはそれぞれ、LC/MSで得られたTIC、およびMS/MSによって生じたHexHexNAc⁺ (*m/z* 366)のEICである。主なピークのMS/MSスペクトルを確認し、糖鎖関連イオンが観測されていることから、ピークcとdを糖ペプチドのピークと特定した。

図2CはピークcのMSスペクトルである。同一アミノ酸配列から成る糖ペプチドはほぼ同じ時間に溶出されることから、複数のイオンピークは糖鎖の不均一性を示していると考えられる。各イオンの糖鎖構造は、これらのイオンを前駆イオンとしたMS/MSおよびMS/MS/MSスペクトルから推定した。一例として、*m/z* 933 (3価)のMS/MSスペクトル(図2D)、MS/MSで生じた*m/z* 1297 (2価)のMS/MS/MSスペクトル(図2E)を示す。また、糖鎖のフラグメントから推定した糖鎖構造を図2右上に示す。糖鎖構造がわかれば、図2Eの*m/z* 1393 (1価)が[Pepptide + GlcNAc + H]⁺であることがわかる。このイオンに対してMS/MS/MS/MSを行ったところ、ペプチド部分が開裂して、bイオン(N末端側断片)およびyイオン(C末端側断片)が観測された(図2F)¹⁰⁾。これらのイオンとペプチドの質量から、ピークcはIgG1由来のEEQYNSTYRと帰属された。さらに、このペプチドに結合している他の糖鎖の構造は、図2Cで検出された糖ペプチドイオンの質量とそれらのプロダクトイオンスペクトルから図2Cのように推定された。同様に、ピークdは、MS~MS/MS/MSスペクトル(図2G~I)から、IgG2由来EEQFNSTFRと帰属された。

タンパク質データベースとその検索エンジンを利用することによって、糖ペプチドの溶出位置とペプチドの配列を簡単に同定できることがある。一例として図2Jに、LC/MS~MS/MS/MS/MSデータを使ってAsnにHexNAcが結合している可能性を追加してデータベース検索(検索エンジンBioWorks, Thermo Fisher Scientific社)した結果を示す。12.12分にIgG1由来糖ペプチドが検出されていることが示されている。

2) 四重極飛行時間質量分析計(Q/TOFMS)を用いた糖ペプチド解析例

図3にQ/TOFMSを用いた解析例を示す。LC/MSで得られたTIC(図3A)、およびMS/MSで生じたHexNAc⁺ (*m/z* 204)のEIC(図3B)から、ピークeとfを糖ペプチドと特定した。図3CはピークeのMSスペクトルである。その中の*m/z* 1399 (2価)を前駆イオンとしたMS/MSスペクトルを図3Dに示す。低*m/z*側に糖鎖Bイオン(*m/z* 168, 186, 204および366など)、中央にペプチドbおよびyイオン、また、高*m/z*側に糖鎖が解離した糖ペプチドYイオンが検出されている。そこで、MS/MSデータからBおよびYイオンを除き、前駆イオンとしてペプチド由来イオン(ここでは*m/z* 1189)を設定してMascotデータベース検索を行ったところ、このペプチドはIgG1由来EEQYNSTYRと同定された。

図3Eと3FはピークfのMSおよびMS/MSスペクトルである。同様にしてこのピークは、IgG2由来糖ペプチドと同定された。IgG1とIgG2の糖鎖不均一性は、糖ペプチドの計算質量とペプチドの理論質量の差から計算した単糖組成から、図3Cおよび3Eのよ

図1 LC/MS/MSを用いたゲル内糖タンパク質の構造特性解析(前ページ図)

[サンプル] マウス脳膜画分から調製したGPI結合タンパク質のトリプシン消化物
[MS装置] LTQ (Thermo Fisher Scientific社)

A) SDS-PAGE

B) タンパク質同定結果

C) 糖鎖のLC/MSによって得られたTIC。[LC条件] カラム: グラファイトカーボンカラム (0.2 × 150 mm, 5 μm)。A溶媒: 2%アセトニトリル/5 mM酢酸アンモニウム (pH 9.6), B溶媒: 80%アセトニトリル/5 mM酢酸アンモニウム (pH 9.6), グラジエント条件: 5~30%B (0~60 min)

D) ピークaの典型的MS/MSスペクトルと推定糖鎖構造

E) トリプシン消化物のLC/MSによって得られたTIC。[LC条件] カラム: C18 (0.2 × 50 mm, 3 μm), A溶媒: 2%アセトニトリル/0.1%ギ酸, B溶媒: 90%アセトニトリル/0.1%ギ酸, グラジエント条件: 5%B (0~10 min) および5~65%B (10~50 min)

F) トリプシン消化物のLC/MS/MSによって得られたイオン (*m/z* 366)のEIC

G) ピークbの典型的MS/MSスペクトル (前駆イオン: *m/z* 937)

H) Thy-1の主な糖鎖構造

[略語] H: ヘキソース, F: フコース, HX: N-アセチルヘキソサミン, Man: マンノース, Gal: ガラクトース, GN: N-アセチルグルコサミン, N23, N74, N98: Asn23, Asn74, Asn98を含む糖ペプチド

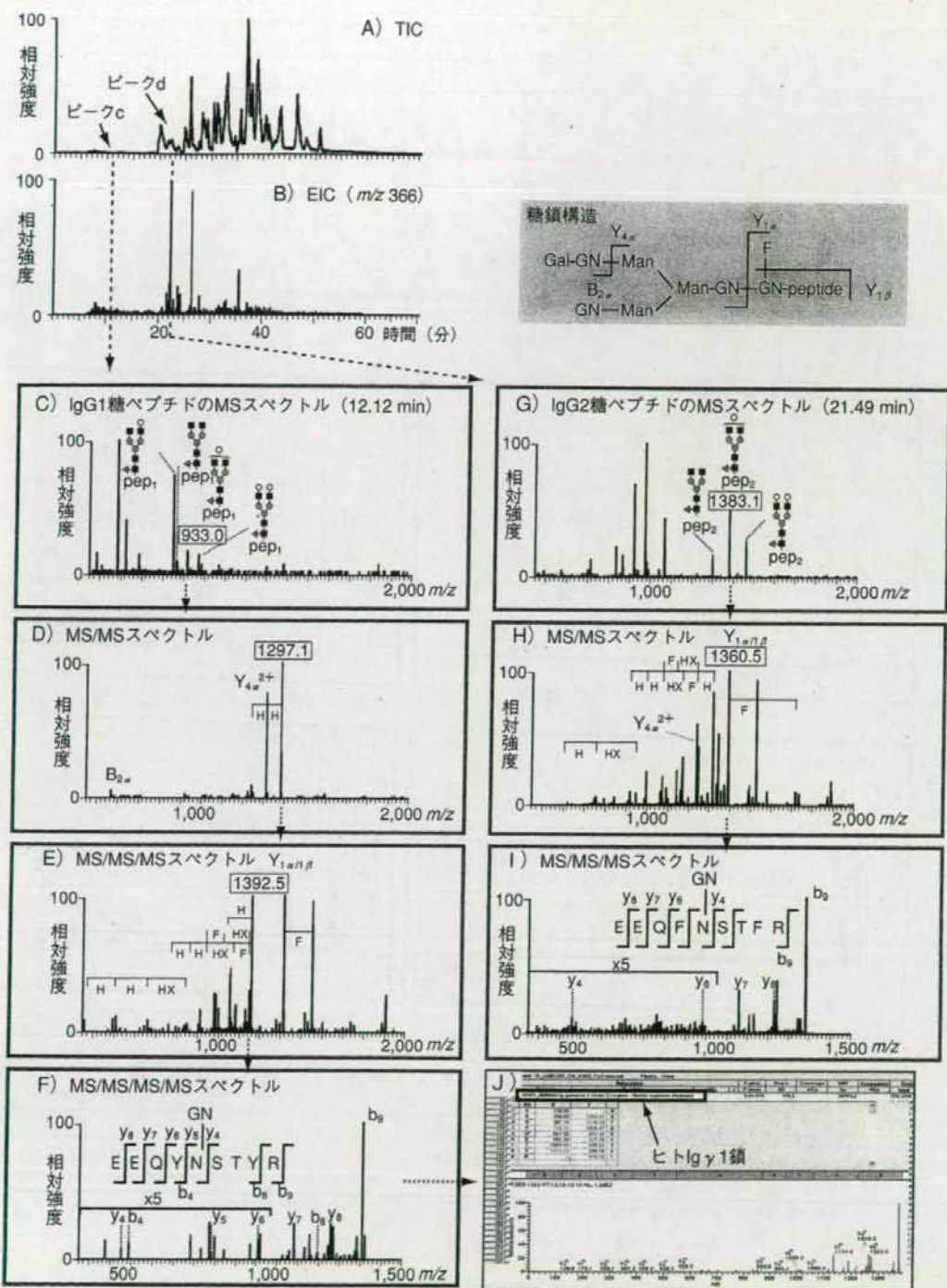


図2 LC/MS~MS/MS/MSを用いた糖タンパク質混合物の部位特異的糖鎖構造解析 (1) ITMS

〔サンプル〕 ヒトIgGトリプシン消化物。〔MS装置およびLC条件〕 図1Eに準ずる。A) LC/MSによって得られたTIC。B) LC/MS/MSによって得られたイオン (m/z 366) のEIC。C) ピークcのMSスペクトル。D) ピークcの典型的MS/MSスペクトル (前駆イオン: m/z 933)。E) ピークcの典型的MS/MS/MSスペクトル (前駆イオン: m/z 1297)。F) ピークcの典型的MS/MS/MS/MSスペクトル (前駆イオン: m/z 1392)。G) ピークdのMSスペクトル。H) ピークdの典型的MS/MSスペクトル (前駆イオン: m/z 1383)。I) ピークdの典型的MS/MS/MSスペクトル (前駆イオン: m/z 1360)。J) データベース検索エンジンを用いたピークcの同定結果

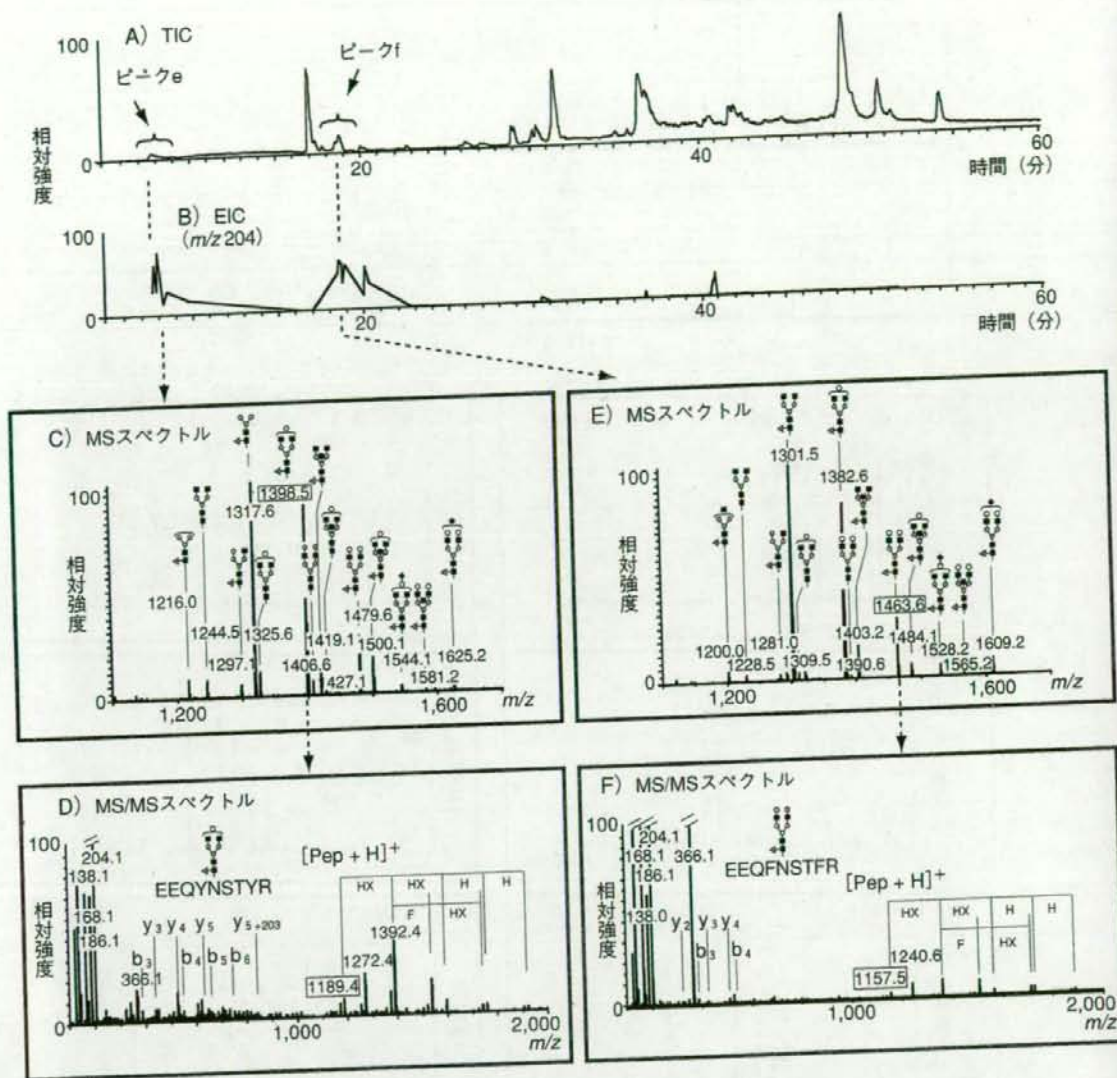


図3 LC/MSおよびMS/MSを用いた糖タンパク質混合物の部位特異的糖鎖構造解析(2) Q/TOFMS

[サンプル] ヒトIgGトリプシン消化物

[MS装置] QSTAR-Pulser i (Applied Biosystems社)

[LC条件] カラム: Monolith C18 (0.1 × 150 mm), A溶媒: 2%アセトニトリル/0.1%ギ酸, B溶媒: 90%アセトニトリル/0.1%ギ酸, グラジエント条件: 5% B (0~5 min) および 5~80% B (5~80 min)

A) LC/MSによって得られたTIC

B) LC/MS/MSによって得られたイオン(m/z 204)のEIC

C) ピークeのMSスペクトル

D) ピークeの典型的MS/MSスペクトル(前駆イオン: m/z 1399)

E) ピークfのMSスペクトル

F) ピークfの典型的MS/MSスペクトル(前駆イオン: m/z 1464)

うに推定された。

以上のようにMS装置の種類によって異なるマススペクトルが得られるが、データの取り扱いを工夫する

ことによって、糖ペプチドを同定し糖鎖構造を推定することができる^{5) 11)~18)}。現在では、全血清のトリプシン消化物から直接IgG1とIgG2の糖鎖を解析す

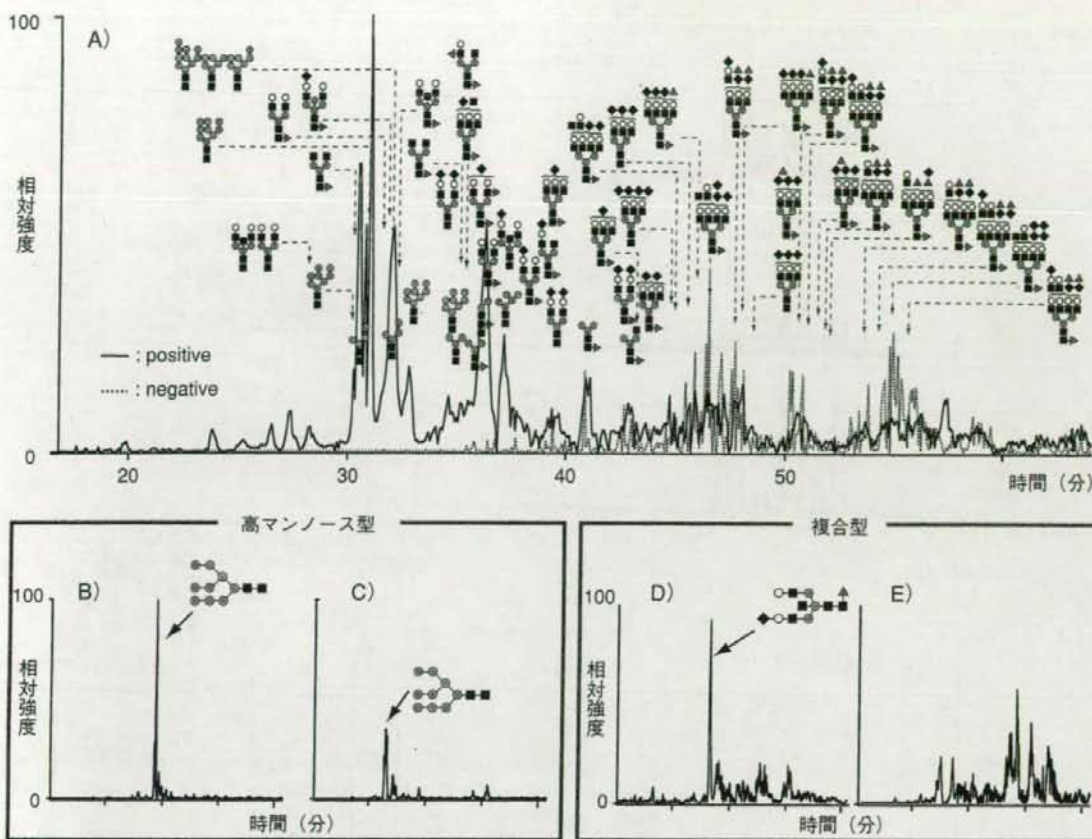


図4 LC/MS~MS/MS/MSを用いたグリコーム解析
(MS装置およびLC条件) 図1Cに準ずる

- A) 10% FCS添加培地で培養したHL-60細胞由来N-結合型糖鎖のLC/MSにより得られたTICと推定糖鎖構造
- B) 無血清培地で培養した細胞の高マンノース型糖鎖のプロファイル
- C) 10%ヒト血清添加培地で培養した細胞の高マンノース型糖鎖のプロファイル
- D) 無血清培地で培養した細胞の複合型糖鎖のプロファイル
- E) 10%ヒト血清添加培地で培養した細胞の複合型糖鎖のプロファイル

ことも可能である。

3 細胞由来糖鎖の解析— LC/MSを用いたグリコーム解析

細胞に存在する全糖鎖のセットはグリコームとよばれる。グリコームは、分化、発生や疾患などに伴って変動することから^{19) 20)}、グリコーム解析(グリコミクス)を基盤とした創薬・診断ターゲットの探索に注目が集まっている^{1) 2) 21)}。図1Cで紹介したLC/MS~MS^oを用いた糖鎖プロファイリングは、グリコミクスの技術としても利用可能である。ここでは、ヒト培養細胞株HL-60を使って、培養条件が

細胞全体のN-結合型糖鎖の分布に及ぼす影響を調べた例を紹介する。

通常の培養条件である10%FCSを含む培地で培養したHL-60細胞から酵素を使ってN-結合型糖鎖を切り出し、NaBH₄で還元した後、細胞1×10⁶個相当の糖鎖を用いて、LC/MS~MS/MS/MSを行った。図4AはLC/MSで得られたTICで、実線および破線はそれぞれ、ポジティブイオンおよびネガティブイオンモードで得られた糖鎖プロファイルを表している。主なピークの糖鎖構造は、プロダクトイオンスペクトルから、図4Aのように推定された。

図4B~Eは、無血清培地、およびヒト血清を含む

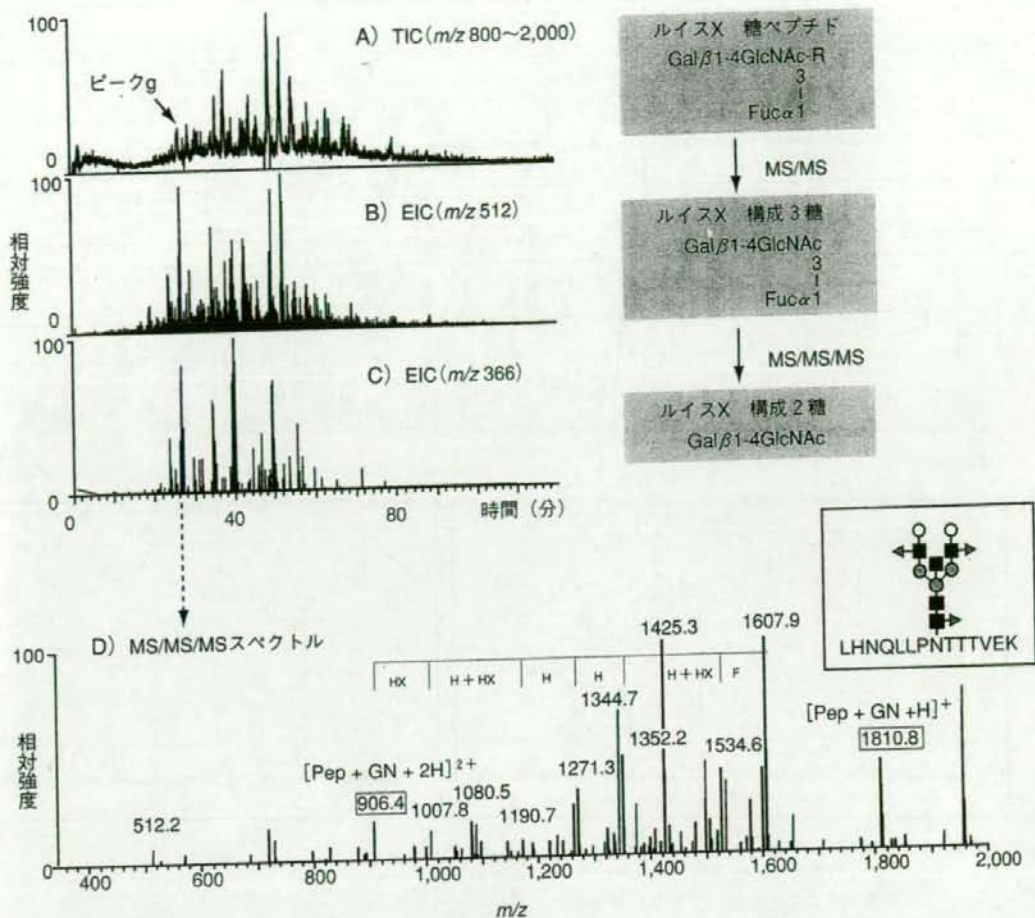


図5 LC/MS~MS/MS/MSを用いた特定の糖鎖が結合したペプチドの特有的検出と同定
 [サンプル] マウス腎臓ホモジネートトリプシン消化物のレクチンカラム吸着画分

[MS装置] 図1に準ずる

[LC条件] カラム: C18 (0.2 × 50 mm, 3 μm), グラジエント条件: 5~65% B (0~120 min), その他: 図1に準ずる

A) LC/MSによって得られたTIC

B) LC/MS/MSによって得られたイオン (m/z 512) のEIC

C) LC/MS/MSで生じたイオン (m/z 512) を前駆イオンとしたLC/MS/MS/MSによって得られたイオン (m/z 366) のEIC

D) ピークgの典型的MS/MS/MSスペクトルと推定糖鎖構造

培地で培養したときのHL-60細胞の高マンノース型および複合型糖鎖のプロファイルを表したものである。高マンノース型糖鎖のプロファイルと比較すると、無血清培地 (図4 B) では、ヒト血清で培養した場合 (図4 C) に比べ、Man9糖鎖の割合が増加していることがわかった。また、複合型糖鎖のプロファイルを比べると、無血清培地 (図4 D) で培養した場合、ヒト血清で培養したとき (図4 E) にはほとんど検出さ

れないbisected二本鎖糖鎖が出現することがわかった。今回の結果は、培養条件によって、細胞の糖鎖プロファイルが変化することを示している。このようなLC/MS~MS³は、10⁶個程度の細胞からでも、その細胞のグリコームの特徴を明らかにすることが可能である。

4 糖鎖構造特異的糖ペプチドの検出と同一 LC/MS を用いたグライコプロテオミクス

タンパク質などの機能やいくつかの疾患と、ある種の部分糖鎖構造との間に、何らかの関連があることが明らかになってきた。現在、その糖鎖構造を有するタンパク質を特異的に検出し同定することに関心が集まっている。糖ペプチドのMSⁿでは、糖鎖構造に特徴的なイオン（診断イオン）が生じることがある。例えば、硫酸基 (m/z 80), ルイス x [Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc⁺, m/z 512], ルイス a [Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc⁺, m/z 512], シアリルルイス x およびシアリルルイス a (m/z 803), HNK-1 (m/z 622), およびジシアル酸 (m/z 583) などがそれである²²⁾。これらの診断イオンを利用すると、全糖ペプチドの中から、その部分構造をもつ糖ペプチドだけを特異的に検出することができる。さらに、図2で紹介した方法によって、選び出した糖ペプチドのペプチド配列と糖鎖構造を推定することができる。図5に、マウス腎臓に存在するルイス x 構造をもつ糖鎖のコアタンパク質を同定した例を示す。

マウス腎臓にはルイス x をもつ糖鎖が多く存在する²⁴⁾。マウス腎臓ホモジネートのトリプシン消化物から、*Aleuria aurantia* lectin (AAL) アフィニティークロマトグラフィーによりフコースが結合した糖ペプチドを回収し、LC/MS~MS/MS/MSを行った。図5 A および 5 B は、LC/MS で得られた TIC と MS/MS によって生じたルイス x 構成 3 糖 (Gal + Fuc + GlcNAc) に相当するイオン (m/z 512) の EIC である。さらに、 m/z 512 のイオンを前駆イオンとして MS/MS/MS を行い、生じたルイス x 構成 2 糖 (Gal + GlcNAc) に相当するイオン (m/z 366) を指標にしてルイス x 結合糖ペプチドの溶出位置を特定した (図 5 C)。図 5 D はピーク g の MS/MS/MS スペクトルである。フラグメントパターンから、このペプチドにはルイス x が結合していることが確認された (図 5 D 右上に推定構造を示す)。また、図 5 D の m/z 906 のイオンが [peptide + GlcNAc + 2H]²⁺ と帰属された。そこで、このイオンを前駆イオンとして MS/MS/MS/MS を行い、図 2 J で紹介したデータベース検索を行った結果、このペプチドは γ -グルタミ

ルトランスフェラーゼの LHNQLLPN*TTTVEK (*HexNAc 結合) と同定された。同様にして、複数のルイス x 結合糖タンパク質を同定することができた。このように、LC/MS~MS/MS/MS とタンパク質データベースをうまく利用することによって、任意の糖鎖をもつペプチドを特異的に選び出し、ペプチド配列を推定することが可能になってきた。

おわりに

本稿で紹介したように、LC/MS を利用することによって、微量で単離が難しい糖タンパク質からでも、多くの構造情報を入手できるようになってきた。また、従来のようにタンパク質単位で糖鎖を解析するのではなく、特定の糖鎖単位でタンパク質を解析することも可能となってきた。しかし、LC/MS~MSⁿ で得られる構造情報には限界があり、現段階では LC/MS~MSⁿ 単独で糖鎖や糖ペプチドを同定することは難しい。また、MS には再現性・定量性に関する課題も残されている。より確かな構造情報・質的情報を得るためには、プロテオミクスの技術や、糖鎖構造解析分野で蓄積されてきた技術、すなわち糖鎖の誘導体化と LC、エキソグリコシダーゼ消化法、レクチンや抗体を利用した方法などをうまく組み合わせることが重要であると思われる。

文献

- 1) Morelle, W. et al.: *Proteomics*, 6: 3993-4015, 2006
- 2) Wührer, M. et al.: *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, Oct 16, [Epub ahead of print], 2006
- 3) Wührer, M. et al.: *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 825: 124-133, 2005
- 4) Zaia, J.: *Mass Spectrom. Rev.*, 23: 161-227, 2004
- 5) Itoh, S. et al.: *J. Chromatogr. A.*, 1094: 105-117, 2005
- 6) Itoh, S. et al.: *J. Chromatogr. A.*, 1103: 296-306, 2006
- 7) Domon, B. & Costello, C. E.: *Glycoconjugate. J.*, 5: 397-409, 1988
- 8) Parekh, R. B. et al.: *EMBO J.*, 6: 1233-1244, 1987
- 9) Dwek, R. A. et al.: *J. Anat.*, 187: 279-292, 1995
- 10) Roepstorff, P. & Fohlman, J.: *Biomed. Mass Spectrom.*, 11: 601, 1984
- 11) Demelbauer, U. M. et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18: 1575-1582, 2004
- 12) Hakansson, K. et al.: *Anal. Chem.*, 73: 4530-4536, 2001
- 13) Harazono, A. et al.: *Glycobiology*, 15: 447-462, 2005
- 14) Hui, J. P. et al.: *Glycobiology*, 12: 837-849, 2002

- 15) Krokhin, O. et al. : Rapid Commun. Mass Spectrom., 18 : 2020-2030, 2004
- 16) Nemeth, J. F. et al. : Biochemistry, 40 : 3109-3116, 2001
- 17) Wada, Y. et al. : Anal. Chem., 76 : 6560-6565, 2004
- 18) Wuhler, M. et al. : Rapid Commun. Mass Spectrom., 18 : 741-1748, 2004
- 19) Kannagi, R. et al. : Cancer Sci., 95 : 377-384, 2004
- 20) Zak, I. et al. : Acta Biochim. Pol., 47 : 393-412, 2000
- 21) Bosques, C. J. et al. : Nat. Biotechnol., 24 : 1100-1101, 2006
- 22) Hashii, N. et al. : Rapid Commun. Mass Spectrom., 19 : 3315-3321, 2005
- 23) Satomi, Y. et al. : Rapid Commun. Mass Spectrom., 18 : 2983-2988, 2004
- 24) Yamashita, K. et al. : Arch. Biochem. Biophys., 240 : 573-582, 1985

<著者プロフィール>

川崎ナナ：北海道大学薬学部修士課程修了後，厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部に入所。1998年から生物薬品部長室長，薬学博士。研究テーマは，LC/MSなどを用いたバイオ医薬品および細胞治療薬の特性解析および品質・安全性評価技術の開発。

山口照英：神戸大学理学部大学院（細胞生化学）修了，東京都臨床医学総合研究所で白血球活性化酸素生成酵素の生化学に関する研究に従事し，その後国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部でバイオ医薬品の品質・安全性などに関する研究を行う。2002年から遺伝子細胞薬部長として，遺伝子治療薬や細胞治療薬の品質・有効性に関する基盤研究を実施。2006年から生物薬品部長としてバイオ医薬品の品質・安全性などに関する研究を行っている。

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業）

HIV感染を阻害する
シュードプロテオグリカン型薬剤の作用メカニズム

（別冊： 論文別刷3）

平成18～20年度 総合研究報告書

研究代表者 小川 温子

平成21（2009）年 4月

ビトロネクチンのコラーゲンおよび線 溶系因子との相互作用

佐野琴音 小川温子

1 ビトロネクチンの構造と機能

細胞外マトリックス (ECM) は、細胞を固定、維持する物理的な「足場」であるだけでなく、細胞の接着、移動、増殖、発育、分化などを調節している。細胞接着性糖タンパク質ビトロネクチン (VN) は ECM の主要糖タンパク質の 1 つであり、0.2-0.4 mg/ml の高濃度で血液中にも存在する。VN は細胞の ECM への接着、分化、増殖などに関与する上に、血液凝固系、線維素・組織溶解系、補体系など、種々のタンパク質分解カスケードを制御する多機能性糖タンパク質である¹⁾。外科手術や急性・慢性炎症時に産生が増加する急性期反応物でもあることから、組織修復・再生における VN の機能が注目されている²⁾。本稿では、VN の基本的性質とともに、組織修復に関わる生物学的活性が糖鎖修飾によって調節されるという最近の発見を紹介する。

1. VN の局在

VN は主に肝実質細胞によって産生され血中に分泌されるが、脳、心臓、骨格筋、肺、子宮、精巣、胸腺などにも mRNA が発現している³⁾。また血小板、尿、羊水、脳脊髄液などにも VN が検出される。血小板では α -顆粒中に多量体の形で蓄積しており、血小板が活性化した際に血中へ放出される²⁾。

免疫蛍光分析により、VN は *in vivo* で骨格筋、腎基底膜、肺のマトリックス等に繊維状に分布していることが報告されている⁴⁾。また正常ヒト皮膚ではエラスチン線維に結合しているほか、アポトーシスを起こしているケラチノサイトにも結合している⁵⁾。

2. VN の一次構造

ヒト VN は 459 のアミノ酸残基から構成され、図 1 に示すように、N 末端側からソマトメジン B、コネクティング領域、ヘモペキシシン I、ヘモペキシシン II の 4 つのドメインからなる。N 末端のソマトメジン B 領域には 1 型プラスミノゲン活性化因子阻害因子 (PAI-1) やウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体 (uPAR) との結合部位があり、この領域に隣接してインテグリン結合部位である Arg-Gly-Asp (RGD) 配列が存在する。ヘモペキシシン II ドメインは塩基性アミノ酸に富み、ヘパリン、補体複合体 C5b-7、PAI-1 などが結合する領域が存在する。コラーゲン結合部位は細胞結合部位付近にあると考えられていたが⁶⁾、ヘモペキシシン I および II 領域に存在することが明らかになった⁷⁾。

VN の糖鎖修飾には多様性があり、ラット、ウサギ、ウシなどは O-結合型糖鎖も含むが、ヒトやブタでは N-結合型糖鎖が主である⁸⁾。ヒト VN は 3 箇所の N-型糖鎖付加部位をもち(図 1)、1 箇所はコネクティング領域、残りの 2 箇所はヘモペキシシン I 領域に存在する。N-結合型糖鎖付加部位はラットを含む種間でよく保存されており、糖鎖付加は VN の機能上不可欠な意義を持っていると考えられる。

3. VN の生物学的機能

VN は細胞表面受容体であるインテグリンを介したシグナル伝達によって、細胞接着や増殖を誘導する⁹⁾。インテグリンは α と β の 2 つのサブユニットからなり、その組み合わせにより 20 種以上の分子を構成するが、VN 受容体としては主に $\alpha_v\beta_3$ と $\alpha_v\beta_5$ が機能する。また、細胞表面の uPAR は、組織溶解調節機能に加えて細胞内シグナル伝達機能も有し、VN が uPAR に結合するとシグナル伝達を誘導する¹⁰⁾。

一方、VN は線維素溶解系および組織溶解系の抑制因子である PAI-1 の生体内唯一の安定化因子である¹¹⁾。活性型 PAI-1 は生理的条件下で自然発生的なコンホメーション変化により反応中心 (Arg346-Met347) のペプチド結合が切断されることなく潜在型になるという性質がある。活性型か

ら潜在型への移行の半減期は約 2 時間であるが、VN と結合することによって安定化され¹²⁾、2・10 倍半減期が延びる。その結果プラスミン産生を抑制する。

2 VN のコラーゲン結合性と多量体形成

VN は少なくとも 2 つのコンホメーションをとる。ヘパリン等の結合部位が不活性な状態で存在する単量体型と、リガンド結合活性をもつ多量体型が存在する。組織中の VN は活性多量体型で、コラーゲンやプロテオグリカンなど様々なマトリックスリガンドと結合する¹³⁾。一方、血漿中の VN はほとんどがリガンド結合において不活性な単量体型で存在するが¹⁴⁾、尿素変性や熱処理、あるいはヘパリン、トロンビン・アンチトロンビン III 複合体、膜侵襲複合体などの特定のリガンド存在下で構造変化が起こり、多量体形成を伴ってリガンド結合性を獲得する¹⁵⁾。最近、我々は VN の多量体形成による多価の効果がコラーゲン結合を増大させることを見出し、さらにこの多量体形成は VN 上の糖鎖によって調節されることを証明した¹⁶⁾。

糖鎖末端のシアル酸をシアリダーゼ処理して除去するか、または N-結合型糖鎖をペプチド・N-グリコアミダーゼ F(PNGase F) 処理により除去した VN の多量体形成状態を超遠心分析法により観察したところ、図 2 に示すように、いずれも高分子の多量体を形成することが示された。これらの糖鎖除去 VN はいずれも、ELISA 法による結合実験で未処理の VN よりも高いコラーゲン結合性を示した。

3 肝再生時の VN の糖鎖と活性変化

組織再生モデルである部分肝切除手術 24 時間後のラット血漿 VN (PH-VN) では、シアル酸をはじめとする糖含量が著しく減少することを我々は見出した¹⁷⁾。PH-VN のコラーゲン結合活性と多量体形成能を、非手術 (NO-VN) および偽手術

ラット血漿 VN (SH-VN) と比較したところ、PH-VN では酵素による糖鎖除去 VN と同様に、NO-VN と比較してコラーゲン結合活性が著しく増強することが SPR 法と ELISA による相互作用解析から示され、同時に多量体形成が増加した¹⁸⁾ (図 3)。

肝切除後のコラーゲン結合の増強は、VN の糖鎖変化により高分子量の多量体形成と架橋安定化が誘導され、多価の効果が発揮されるためと考えられる。

4 細胞外マトリックス分解への VN の関与

血栓溶解 (線溶) および組織再構築の際起こるマトリックス分解は、多くはプラスミンやマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などのセリンプロテアーゼにより引き起こされる。プラスミンはフィブロネクチン、VN、ラミニンのようなマトリックス糖タンパク質も分解する。さらに、MMP は潜在型として産生されプラスミンなどによる分解を受けて活性型になることから、プラスミンの活性制御が ECM 分解調節に大きく関わる¹⁸⁾。

プラスミンの前駆体であるプラスミノゲンを活性化するのは主に 2 つのプラスミノゲン活性化因子で、組織型 (tPA) ならびにウロキナーゼ型 (uPA) がある。血栓の溶解反応ではフィブリンに結合性をもつ tPA が主要因子として働くのに対し、マトリックス分解系では、主に uPA が働く (図 4)¹⁰⁾。可溶性の uPA は uPAR を介して細胞表面に結合する¹⁰⁾。VN は uPA、uPAR の両者に結合し、細胞表面の局所的な溶解反応を促進する。一方、VN は tPA、uPA の主要阻害因子である PAI-1 とも結合し、その阻害活性を安定させ半減期を伸ばす。この結合は線溶、組織溶解を抑制する方向にはたらく。

最近の我々の知見では、肝切除ラットの産生する PH-VN の PAI-1 結合活性は著しく減弱する一方、uPA に対する結合活性は増強する。この変化は肝再生初期におけるプラスミン産生の増大を導き、傷害組織の溶解除去が促進されると考えられる。一方、VN の N-結合型糖鎖の逐次消化による

活性変化から、PAI-1 結合は VN 糖鎖の内部構造の影響を受けて結合活性が減弱することが示唆された（著者ら、未発表）。

我々は部分肝切除手術 72 時間後の血漿中では、肝由来星細胞存在下におけるプラスミン産生が亢進されることも見出している。このことは VN と uPAR などの因子間相互作用により、星細胞表面での局所的な溶解活性が増強する機構を示唆する。

肝再生の初期には傷害を受けた組織の除去のため、組織溶解が必要である一方、循環血液中の線溶促進は止血血栓の形成を妨げ、血栓を溶解して後出血を起こす原因となる。細胞表面特異的な溶解活性促進の機構解明は、組織の再生調節に加え、血栓症や線維症などの治療法の確立にも応用できるものと期待される。

おわりに

VN の糖鎖変化によって、組織溶解を開始するプラスミン生成過程、コラーゲンマトリックス構築など、組織修復の多段階を制御しうる可能性が提示された。また肝障害・肝硬変組織において、通常時にはほとんど検出されない VN の沈着が起こることが報告されており^{19,20)}、この過程でも糖鎖修飾の変化が起こることを我々は明らかにした。これらの機構の解明は、正常な修復または線維化進展（異常な修復）、癌化の機構解明にも結びつくと考えられる。新しい肝線維化の治療法確立へ向けてのターゲットとしても VN 活性の糖鎖調節機構には関心が持たれる。

特に肝線維化に関して、インターフェロンを代表とする従来の治療法は進行を食い止めることに主眼を置いており、一度完成されてしまった肝線維症を積極的に治療する方法は未だ確立されていない。このような肝線維症に対しては、沈着した細胞外マトリックスの分解系の亢進や、過剰に増殖した星細胞にアポトーシスを誘導するといった方策が有効であると考えられる。VN を介してコラーゲン沈着、組織溶解系、さらには星細胞の生存、活性化、増殖を制御することが可能になれば、

今後、線維化の治療法確立の基礎として一つの方向性を示すものと期待される。

- 1) Preissner, K. T. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 275-310, 1991
- 2) Seiffert, D. *Histol. Histopathol.* 12: 787-97, 1997
- 3) Seiffert, D., Keeton, M., Eguchi, Y., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88: 9402-6, 1991
- 4) Hayman, E. G., Pierschbacher, M. D., Ohgren, Y., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 80: 4003-7, 1983
- 5) Hintner, H., Stanzl, U., Dahlback, K., et al. *J. Invest. Dermatol.* 93: 656-61, 1989
- 6) Izumi, M., Shimo-Oka, T., Morishita, N., et al. *Cell Struct. Funct.* 13: 217-25, 1988
- 7) Yoneda, A., Ogawa, H., Kojima, K., et al. *Biochemistry* 37: 6351-60, 1998
- 8) Kitagaki-Ogawa, H., Yatohgo, T., Izumi, M., et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1033: 49-56, 1990
- 9) Leavesley, D. I., Ferguson, G. D., Wayner, E. A., et al. *J. Cell Biol.* 117: 1101-7, 1992
- 10) Preissner, K. T., Kanse, S. M., and May, A. E. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 621-8, 2000
- 11) Kost, C., Stuber, W., Ehrlich, H. J., et al. *J. Biol. Chem.* 267: 12098-105, 1992
- 12) Mimuro, J., Muramatsu, S., Kurano, Y., et al. *Biochemistry* 32: 2314-20, 1993
- 13) Preissner, K. T., and Seiffert, D. *Thromb. Res.* 89: 1-21, 1998
- 14) Izumi, M., Yamada, K. M., and Hayashi, M. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 101-8, 1989
- 15) Hayashi, M., Akama, T., Kono, I., et al. *J. Biochem. (Tokyo)* 98: 1135-8, 1985
- 16) Sano, K., Asanuma-Date, K., Arisaka, F., et al. *Glycobiology* 17: 784-94, 2007
- 17) Uchibori-Iwaki, H., Yoneda, A., Oda-Tamai, S., et al. *Glycobiology* 10: 865-74, 2000
- 18) Hahn-Dantona, E., Ramos-DeSimone, N.,

Sipley, J., et al. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 878:
372-87, 1999

19) Kobayashi, J., Yamada, S., and Kawasaki, H.
Hepatology 20: 1412-7, 1994

20) Inuzuka, S., Ueno, T., Torimura, T., et al.
Hepatology 15: 629-36, 1992