

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770134

研究課題名(和文)糖ペプチドライブラリーを活用した構造解析への応用

研究課題名(英文)Applcation of glycopeptide library to structural analysis

研究代表者

伊藤 浩美 (Ito, Hiromi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00450669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖はタンパク質とは異なり、異性体や分岐構造といった構造を有しているため、質量分析計を用いた構造解析を困難にしてきたが、糖鎖や糖ペプチドライブラリーを活用することで、特に解析が困難な種々の異性体糖鎖についてその断片化情報を蓄積することができた。さらに得られたデータから、異性体の識別を可能とする糖鎖の修飾法と断片化手法の組み合わせを見出し、指標となる断片化イオン情報を抽出することができた。

研究成果の概要(英文)：Analytical difficulties of glycan structure are arising from the structural complexity of glycans such as variations in branching, linkage and stereo-chemistry. Using glycan and glycopeptide library, I have generated a reference MSn spectra data of the various isomeric glycans for high-throughput MSn analyses. Additionally, MS2 spectra of the permethylated glycan gave the unequivocal fragment ions specific for each isomer (e.g. fucosylated glycan). Thus it was possible to extract an information of the key fragment ion for distinguishing isomers.

研究分野：生物化学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：質量分析 構造解析 糖鎖 糖ペプチド

1. 研究開始当初の背景

バイオマーカー探索や糖鎖機能解析では、質量分析計を用いたアプローチが盛んに行われている。これはこれまでにプロテオミクスにおいて、質量分析装置が高スループット解析を達成してきたことが背景にある。タンパク質の翻訳後修飾のひとつである糖鎖修飾についても、プロテオミクスのように簡便に分析することができれば、質量分析計を用いたグライコミクス・グライコプロテオミクスは飛躍的に進歩することが予想される。しかしながら、糖鎖はタンパク質とは異なり、その「構造の複雑さ(結合の位置・立体異性体や分岐構造などに起因)」から、質量分析計を用いた構造解析を困難にしてきた。なぜなら、質量分析計からは質量情報のみが得られるだけなので、断片化などの質量情報からもととなる構造を説く必要があるからである。

これまでに質量分析計を用いて、糖鎖の水酸基が非修飾の糖鎖標準品とその低エネルギー衝突誘起解離(CID)断片化情報データベースによる糖鎖構造解析技術の開発に携わってきた。この手法は、各標準糖鎖構造の断片情報を参照データとし、未知試料から得られる測定データと、断片化イオンの質量電荷比(m/z)とその強度の両方を比較することで糖鎖構造を解析するというものである。この手法では個々の断片情報を詳細に解析する必要はない点は簡便な方法といえる。一方、m/z とその強度を識別の指標に使用しているため、異性体の識別を行うには分析に供する前に分離が必須となる。特に、シアル酸の位置異性体(α2-3とα2-6)については標準品の答えがあってもその区別は非常に難しい。そこで、本課題では、これまで質量分析計を用いた構造解析で一般的だった低エネルギー衝突誘起解離(CID)による断片化だけでなく、これと異なる断片化による基礎情報の蓄積を行うとともに、必要に応じて異性体分離が可能な LC/MS をベースとした糖ペプチド解析への応用を目指す。

2. 研究の目的

タンパク質の翻訳後修飾のひとつである糖鎖付加情報を解析する手段として、質量分析計は広く使われている。こうした解析をサポートするツールとして、標準糖鎖による断片化情報は有用なものになると考えられる。そこで、これまで蓄積された低エネルギー衝突誘起解離(CID)断片化パターンに加え、新たな断片パターンによるデータを蓄積することで、これまでとは違った糖鎖構造に関する情報が得られることが期待される。そこで、本研究では、CIDのほか高エネルギー衝突誘起解離(HCD)お

よび電子移動解離(ETD)を併用した新たな糖鎖構造解析手法を確立し、LC-ESI-MSⁿによる糖ペプチド構造解析への応用を目指す。

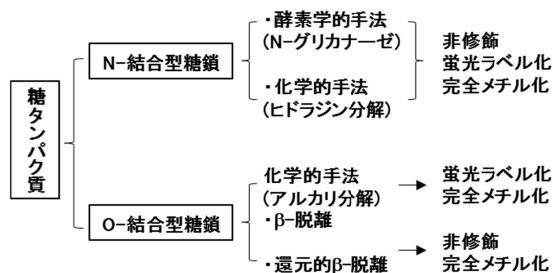
3. 研究の方法

質量分析装置を用いた糖タンパク質の翻訳後修飾、特に糖鎖付加情報を解析するための技術開発として、異なる3種類の断片化(CID、HCD、ETD)の活用ならびに併用することで、新たな基本構造情報を蓄積するとともに、解析が困難な異性体の構造識別を可能とするルールの抽出を試みた。

まずは、構造が分かっている標準品である合成糖鎖ライブラリーを用いて、糖鎖の水酸基の非修飾体、ならびに完全メチル化体について、各断片化のパターンの基礎データを蓄積する。さらに各データを比較することで、m/z 情報を基にした異性体の区別(特に識別が難しいフコシル化、シアリル化、硫酸化を有する異性体、分岐構造など)を簡便に行うためのルール抽出を行う。その後、合成糖ペプチドライブラリーを用いて糖鎖の解析から糖ペプチドへの応用について検証し、さらに最終的には、LC-ESI-MSⁿによる目的糖タンパク質の糖鎖修飾について検討した。

多段階タンデム質量分析装置を用いた糖鎖構造解析手法は、一般的に下図(糖タンパク質糖鎖の構造解析手法例)の通りである。そこで、構造解析に使用する参照データ(蓄積する断片データ)も下記の手法で解析をサポートしてくれるものが望ましい。そこで、糖鎖の水酸基の修飾としては非修飾体と完全メチル化体とし、それらについて断片化(特に、HCD と ETD について)の検証を行うこととした。

質量分析計を用いた糖鎖構造解析手法



市販品ならびに酵素合成にて、異性体である基本構造をもった糖鎖標品を調製した後、完全メチル化ならびに固相抽出によるデバイスでの粗精製を行なったものを分析に供した。

異性体の識別に有用な断片化手法および各断片化のルール抽出のために、HCD および ETD 糖鎖断片化の基礎データを取得・蓄積を行った。まずは、正・負イオンモードによる HCD 断片化の検証(非修飾および

完全メチル化糖鎖を使用)として、(i)フコシル化糖鎖:位置・構造異性体に関する情報、(ii)シアリル化糖鎖:位置異性体(α 2-3と α 2-6)に関する情報、(iii)硫酸化糖鎖:硫酸化付加位置に関する情報、(iv)分岐構造糖鎖:N-結合型糖鎖の分岐異性体に関する情報についてデータ取得を試みた。

次に、正イオンモードによるETD断片化の検証(非修飾および完全メチル化糖鎖を使用)として、ETDモードを用いた糖鎖開列実験についてはほとんどデータが存在しないため、まずは種々の糖鎖を用いたETD断片化条件の最適化を行った後、基礎データを取得・蓄積を行った。(i)フコシル化糖鎖:位置・構造異性体に関する情報、(ii)シアリル化糖鎖:位置異性体(α 2-3と α 2-6)に関する情報、(iii)硫酸化糖鎖:硫酸化付加位置に関する情報、(iv)分岐構造糖鎖:N-結合型糖鎖の分岐異性体に関する情報についてデータ取得を試みた。

また、基本糖鎖構造についての各種断片化情報の取得ならびに拡充と平行して、糖ペプチドの構造解析への応用として、標準品として酵素合成等で調製した糖ペプチド(0-結合型糖ペプチド)を用いて、3種類の断片化を組み合わせた構造解析(糖鎖の付加位置と結合している糖鎖構造解析)を試みた。

4. 研究成果

質量分析計を用いた糖タンパク質の構造解析を複雑にしているのは、その糖鎖構造情報、付加位置、タンパク質同定をすべて行わなければいけないことである。そこで、本研究課題では、質量分析でこうした解析を行うことを前提とし、まずは、糖鎖構造情報を複雑にしている以下のような代表的な異性体、(1)フコシル化の位置異性体(1-2や1-3や1-4結合したフコースなど)や構造異性体(H抗原やルイス抗原など)(2)シアリル化の位置異性体(2-3と2-6)、(3)硫酸化の付加位置の違う糖鎖について、基本となる糖鎖構造(数糖からなる糖鎖)についてその断片化情報の取得ができた。さらに、異性体を識別するための有益な構造情報がどういった断片化(低エネルギー衝突誘起解離:CID、高エネルギー衝突誘起解離:HCD、電子移動解離(ETDなど)から得られるかについては分からなかったため、基本となる位置・構造異性体糖鎖(非修飾体・メチル化体)から得られた断片化情報、特に識別困難な異性体を識別するのに有用となる断片化パターン・ルールなどの抽出を試みたところ、基本構造として使用した糖鎖が比較的小さいこともあり、CIDによる断片化の結果では、MALDIによるイオン化で得られた結果とESIによるイオン化で得られた断片化結果については、断片化パターン(得られるフラグメン

トのm/z値のパターン)は予想通り類似したものだ。ただし、シグナル強度については一致するというわけではなかった。

異性体を識別するという点では、例えば、非修飾体の糖鎖をCIDで断片化するという組み合わせの場合、生じる断片化イオンのm/zはほとんど一致していたため、それだけでは異性体の区別は不可能で、そのシグナル強度を含めて比較して初めて区別することが可能であったが、完全メチル化体とCIDの組み合わせの場合は、個々の異性体がそれぞれ固有の断片化イオンを生じることが分かった。その特徴的な断片化イオンのm/z値を指標とすることで、異性体を区別することが可能であった。このことは、分析したい試料が仮に異性体の混合物だったとしても、あらかじめ個々の単離を必要とする前処理なしに、それぞれの構造を解析できることが示唆された。実際に、あえて混合物を作製して試みたところ、個々の異性体を特徴付ける固有のシグナルのおかげで解析が可能であった。

本研究では基本糖鎖で蓄積したデータから、糖鎖構造解析に有用な糖鎖の修飾と断片化の組み合わせに関する情報を新たに得ることができた。最終目標であった糖ペプチド解析(糖鎖の付加位置と結合している糖鎖構造解析)への応用については、糖鎖では有益であった修飾法・断片化の組み合わせがうまく適応できなかったこともあり、今後解決を必要とする課題となった。ただ、これまで種々の「同一糖鎖試料(特に異性体)」の断片化情報について、異なるイオン化手法(MALDIとESIイオン化)での相関、種々の断片化(CID、HCD、ETD)による違いを検討されたことはないので、こうした標準糖鎖から得られた断片化情報は、今後の構造解析において貴重なデータになり得る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

伊藤浩美、HUP02013、横浜

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 浩美 (ITO, Hiromi)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00450669

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：