

SialoCapper-ID Kit の開発と応用

～質量分析を用いた糖鎖解析のための新しい誘導体化ツール～

西 風 隆 司, 犬 塚 ま 子

1 はじめに

糖鎖は第三の生命鎖とも呼ばれ、さまざまな生命現象に関与している。近年、全世界でパンデミックを引き起こしている新型コロナウイルス感染症 COVID-19 の原因となる重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) の感染プロセスにも、他の様々なウイルス同様に糖鎖が関与しているとみられている。SARS-CoV-2 やインフルエンザウイルス、HIV ウイルスなどのエンベロップウイルスが脂質膜構造の表面に持つスパイクタンパク質は糖タンパク質であるが、この糖鎖は体内の免疫機構を潜り抜けるため変化するとみられている。また、ウイルスが宿主へ感染する際、宿主細胞側の糖鎖構造を認識(吸着)して侵入する場合もある。ウイルスにかかわる糖鎖解析は予防や治療薬開発の観点からも重要であり、COVID-19 の収束に向け SARS-CoV-2 の糖鎖解析も進められている。

また、バイオ医薬品の多くには糖鎖が付加しており、その構造多様性も問題となっている。現在様々なバイオシミラーが存在するが、先発の医薬品と糖鎖構造が同一であることが好ましく、また先発医薬品も品質管理過程での糖鎖の制御が求められる。また、合成により均一構造のバイオ医薬品を作成する試みも進められている。

このように、近年では生物学的な観点に加え、産業応用を見越した糖鎖解析が求められるようになってきている。糖鎖解析と言えば、従来は蛍光標識による HPLC 分析が主流であったが、近年は高感度かつスループットの高い MS (mass spectrometry, 質量分析) も積極的に利用されるようになってきた。最新の日本薬局方には糖鎖解析法に対する MS の適用指針となる記述も追加されている。

MS を用いた糖鎖分析の際、特に問題となるのがシアル酸である。シアル酸はカルボキシル基を有する酸性糖で、一つの糖鎖にシアル酸を複数有する場合も珍しくない。シアル酸を持つ糖鎖をシアリル糖鎖(シアリル化糖鎖, シアル化糖鎖, シアロ糖鎖等)と呼ぶが、シアリル糖鎖の質量分析は中性糖鎖と比べて難しい。

まず、シアリル糖鎖の感度は中性糖鎖と比べて一般的

に低い。また、シアル酸残基は MS 分析途中で脱離しやすく、正確なシアル酸付加個数の把握は困難と言える。加えて、カルボキシル基に塩が付加しやすくピークが分散するため、特にシアル酸を複数持つ糖鎖はスペクトルが複雑になり、定量性も低下する。

さらに、シアル酸には $\alpha 2,3$ -や $\alpha 2,6$ -といった結合様式が存在するが、これらの結合様式の違いは異性体であり、質量が等しく高精度/高分解能質量分析計を用いても区別は不可能である。しかし、この結合異性は生化学的に重要である。例えば、インフルエンザウイルス感染にはこのシアル酸結合様式の違いが支配的にかかわる。シアル酸結合様式まで簡便に判別できる手法があれば、生命現象を容易に紐解く手がかりになると期待される。

本稿では、筆者らが最近リリースした新しい前処理試薬キット“SialoCapper™-ID Kit”を紹介する。これはシアリル糖鎖の分析を容易にする前処理試薬キットであり、本来 MS では不可能である質量の同じシアル酸結合異性体の区別を可能にする。

2 シアル酸結合様式特異的修飾法

2.1 シアリル糖鎖の質量分析技術上の問題点

先に挙げたようにシアリル糖鎖の MS で問題となるのは、①感度が悪い、②シアル酸が脱離しやすい、③塩付加が起きてスペクトルが複雑になる、の3点である。これらの点を解消する方法が、化学的誘導体化によるシアル酸の中性化である。シアル酸修飾を行うことで、他の中性糖と同じように扱うことが可能となる。これまでにエステル化やアミド化など、様々な誘導体化手法が提案されている¹⁾。

2.2 シアル酸結合様式特異的修飾法の概要

筆者らは、従来のシアル酸誘導体化法をさらに発展させ、上記のメリットに加えシアル酸の結合様式判別までも可能にする新しい修飾法を開発した²⁾³⁾。特許技術であるシアル酸結合様式特異的修飾法(sialic acid linkage specific alkylamidation: SALSA 法)は、シアル酸を確実に中性化し、さらにその結合様式に応じた質量変化を与えることで、本来質量が同じシアル酸結合様式異性体



図1 シアル酸結合様式判別用安定化試薬キット “SialoCapper-ID Kit”

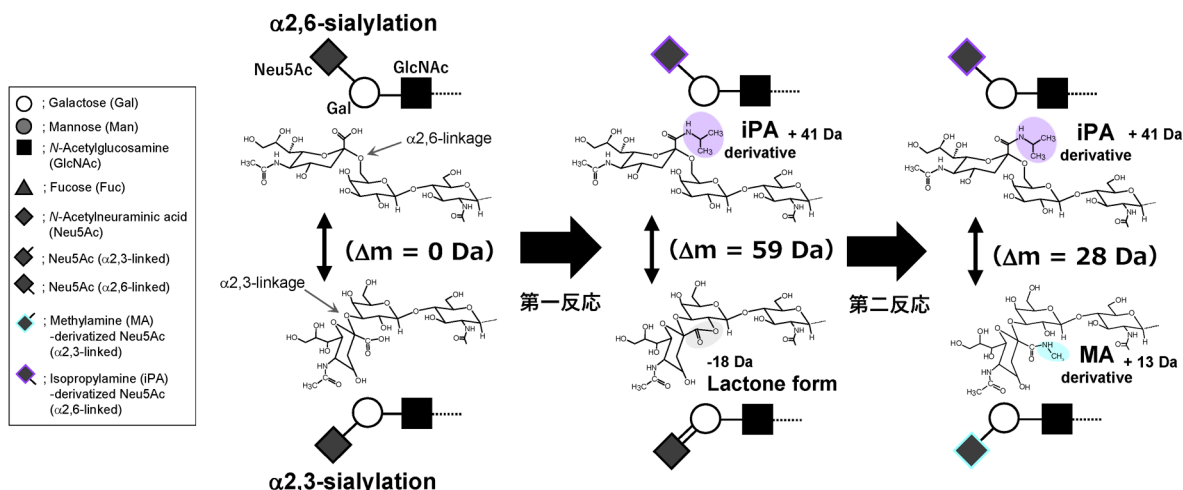


図2 シアル酸結合様式特異的修飾法（SALSA 法）の反応概要

を MS で判別できるようにする技術である。シアル酸結合異性体判別用安定化試薬キット “SialoCapper-ID Kit” は、この SALSA 法を迅速かつ簡便に行うことができる試薬キットである（図1）。

SALSA 法の原理を図2に示す。第一反応においてイソプロピルアミンを用いたアミド化を行う。この際、シアル酸付近の立体的な構造の違いにより、 $\alpha 2,6$ -は確実にアミド化されるが、 $\alpha 2,3$ -シアル酸は分子内脱水縮合によりラクトンを生じる。この時点で $\alpha 2,3$ -と $\alpha 2,6$ -には質量差が生じるので、結合様式の MS 判別が可能である。しかし、このラクトン構造はまだ不安定で、容易に元のカルボキシル基に戻る。そこで、第二反応においてラクトンをさらにメチルアミドに変換する。この第二反応は非常に迅速かつロバストであるため、冗長な反応時間や第一反応と第二反応の間での精製操作は必要ない。最終的に、 $\alpha 2,6$ -シアル酸はイソプロピルアミド化、 $\alpha 2,3$ -シアル酸はメチルアミド化され、 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -シアル酸は 28 Da 差で区別できる。

3 SialoCapper-ID Kit の効果

3.1 簡単にシアル酸結合異性体を判別可能

本キットを用いることで、 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -シアル酸に質

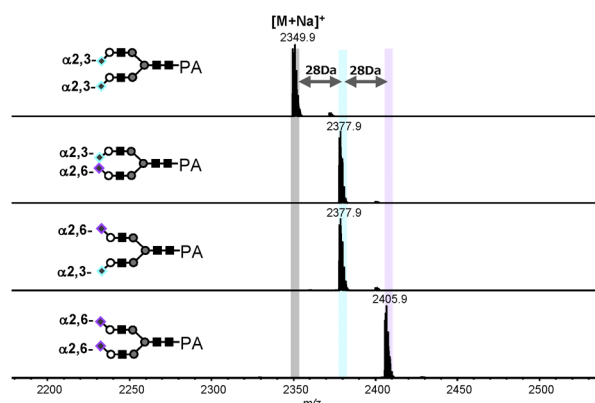


図3 SialoCapper-ID Kit で修飾したラベル化標準糖鎖のマススペクトル

量差が生じるため、MS でシアル酸結合様式判別が可能になる。図3は、ラベル化されたジシアルリ糖鎖標本を本キットで処理し、MS で測定したマススペクトルを示している。これらの四つの糖鎖は異性体であるため、もとの質量はすべて同一（ $[M+Na]^+$, m/z 2323.8）であるが、本キットを用いることでシアル酸の結合様式とその数に応じて異なる m/z にピークが観測されることが分かる。反応条件は最適化されており、シアル

酸が修飾されずに残る「未反応」や、 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -判別性能低下の原因となる「誤反応」はほぼ生じないことは確認している。

従来のシアル酸結合様式判別法としては、シアル酸結合様式が既知の標品糖鎖を用意し、LC(/MS) 分析を行い、標品とサンプルの保持時間の一致度から判別する方法や、シアリダーゼ処理前後での分析結果を比較する手法が知られていた。SialoCapper-ID Kit は化学反応を用いるため、シアル酸結合様式が既知の標品が必要ない。これは、複雑な糖鎖で標品の入手が難しい場合などは特にメリットになる。

3.2 シアリル糖鎖の感度向上

シアル酸の中性化によって分析途上のシアル酸残基の脱離が防げ、さらにカルボキシル基への塩付加も抑制される。結果としてシアリル糖鎖の感度が向上し、スペクトルもシンプルになるため解析が容易になる。定量性も向上し、一つのスペクトル内に中性糖鎖とシアリル糖鎖の両方を同等の感度で検出することが可能となる。図 4

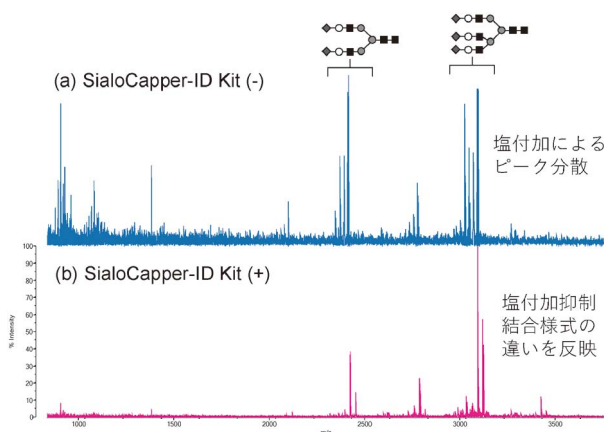


図 4 Fetuin 由来 *N*-結合型糖鎖のマスペクトル
(a) 未処理 (b) SialoCapper-ID Kit で処理

は SialoCapper-ID Kit 適用前後の Fetuin 由来 *N*-結合型糖鎖のマスペクトルの比較を示している。(a) は本キット適用前であり、ピークが分散しているのはシアル酸部への塩付加が複数起こっているためである。本キット適用後(b)は感度も向上し、塩付加が抑えられスペクトルもシンプルになっている。複数ピークが観測されているのは $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -の違いによるものである。

4 SialoCapper-ID Kit の使用方法

一般的に、バイオ医薬品などの糖タンパク質の糖鎖を MS 解析する際には、以下のステップを経る。

- 1) 糖タンパク質からの糖鎖の切り出し
- 2) 糖鎖のラベル化 (必要な場合)
- 3) 質量分析

糖鎖の切り出しには化学的な方法と酵素的な方法があるが、*N*-結合型糖鎖には酵素 (PNGaseF) が使われるケースが多い。HPLC で糖鎖の検出を行う際は UV や蛍光検出のため糖鎖還元末端のラベル化は必須であるが、質量分析で測定する際は、必須ではない。一般的には感度向上の目的で何らかの修飾がなされるのが定番である。

本キットは、一つの構成で液相反応と固相反応の両方に対応しており、糖鎖サンプルの状態や希望する糖鎖分析フローに応じて、本キットで処理するタイミングを柔軟に組み替えて使用することが可能である。すでに確立されたプロトコルを持つラボであっても、分析プロトコル内に無理なく組み込み、シアル酸結合様式判別が行うことができる。不安定なラクトン構造を残さず $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -シアル酸両方を安定化するため、他の酵素反応や化学反応との組み合わせも問題ない。糖鎖分析に一般的に用いられている還元末端ラベル化法とも併用可能である。図 5 には、一般的な糖鎖分析のための前処理の流れと、本キットで誘導体化処理するタイミングを例示し

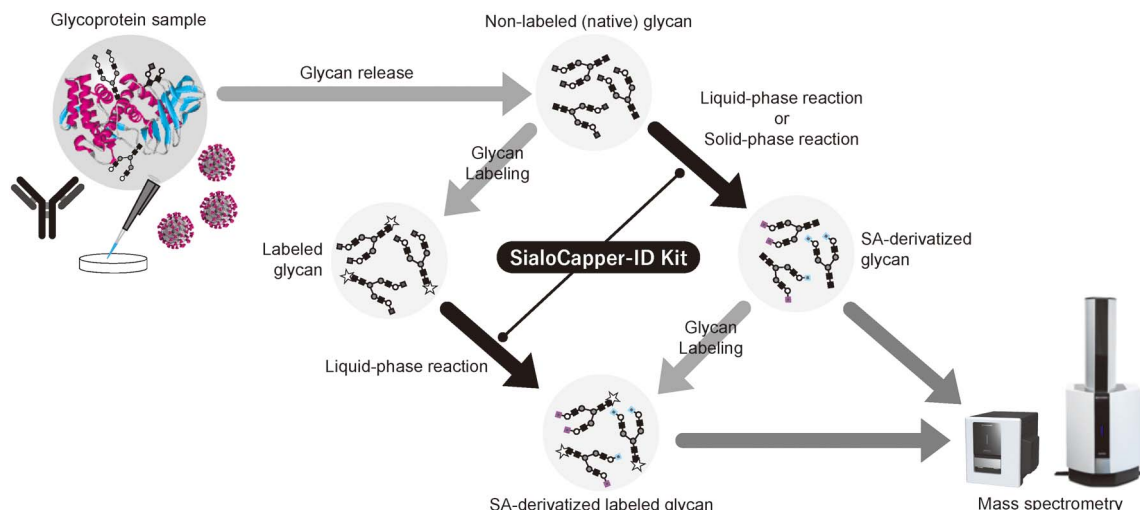
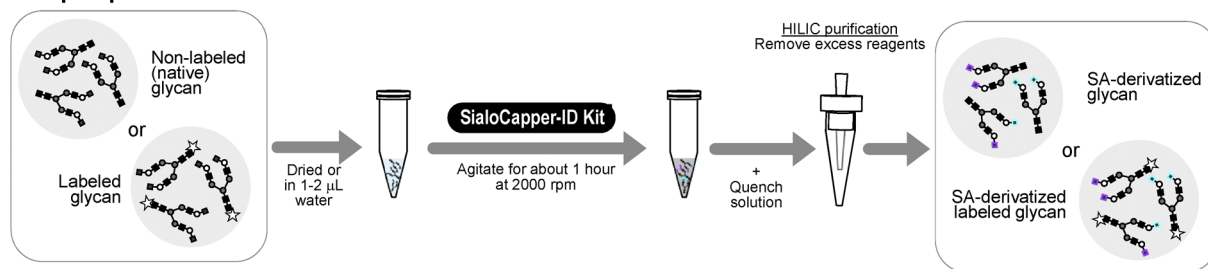


図 5 SialoCapper-ID Kit を用いる糖鎖質量分析の前処理フロー概要

□ Liquid-phase reaction



□ Solid-phase reaction

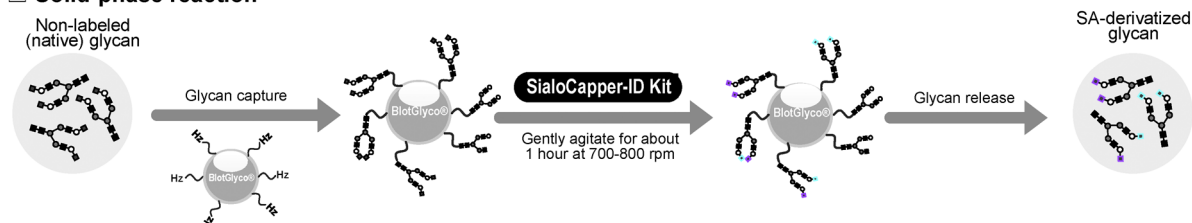


図 6 SialoCapper-ID Kit を用いた液相反応/固相反応の流れ

ている。

4・1 液相反応

チューブ内に乾固または少量の水に溶解した状態のサンプルに対して行う液相反応は、本キットの標準的な使用法である（図 6 上）。液相反応は還元末端ラベル化糖鎖と未ラベル糖鎖の両方のシアル酸修飾に対応する。キット取扱説明書に従って試薬を溶解し、順次チューブに投入して反応させる。一段階目と二段階目の反応の間で過剰試薬の除去は必要なく、二段階目の反応は瞬時に完了するので、誘導体化にかかる反応時間は合計約 1 時間である。

本キットを用いた誘導体化反応の後には、過剰試薬除去のため HILIC 担体での精製を行う必要がある。この担体はキットには含まれていないため、普段から使い慣れた HILIC チップやカラムが利用できる。推奨精製プロトコルは本キット取扱説明書に示している。

4・1・1 液相反応で副反応を抑えるポイント

本キットで行う SALSA 法は非常にロバストであり、反応条件も最適化しているので副反応などは生じにくい。しかし、副反応を誘起しやすい夾雑成分のコンタミネーションには注意しなければならない。

アモニアやメチルアミン、アルコール等の求核試薬の混入は副反応の原因となることが判明している。このような副反応が懸念される場合、誘導体化前に carbon や HILIC 等の糖鎖精製チップ/カラムであらかじめ脱塩精製することで副反応を抑制することが可能である。

糖鎖はチューブ内に乾固した状態で準備することを推奨するが、少量の水に溶解した状態でも構わない。しかし、水の量が多いと未反応や誤反応の原因となることが判明しており、通常 1~2 µL、多くとも <5 µL 以下とすることが必要である。PNGaseF 酵素処理時にアミンやアン

モニア系のバッファーを使わずに反応させることで、酵素反応液を直接本キットで処理することもできる。

4・1・2 ラベル化糖鎖の液相反応

液相反応はラベル化糖鎖のシアル酸修飾も可能であるが、ラベル化反応と本キットの使用順序に注意すべき場合がある。AA (anthranilic acid) でラベル化された糖鎖はラベル部分の -COOH 基が本キットによってアミド化されるため、最終的に AA ラベル化糖鎖を得たい場合は、ラベル化前に本キットでシアル酸を誘導体化する必要がある。他によく使用される AB (aminobenzamide) や PA (aminopyridine) でラベル化した糖鎖はこのような順序を考慮する必要はない。

4・2 固相反応

本キットを糖鎖精製ビーズと組み合わせることで、クールドサンプルからの糖鎖精製とシアル酸修飾が一度に行える（図 6 下）。また、過剰試薬除去が容易になるため、実験フローがシンプルになり実験の省力化が達成できる。

BlotGlyco® (住友ベークライト㈱) は、糖鎖還元末端を特異的に捕捉できる糖鎖精製ビーズで、ビーズ上に捕捉した糖鎖に対し本キットを用いたシアル酸結合様式特異的修飾が可能である。BlotGlyco® から糖鎖をリリースした後は、任意の還元末端誘導体化を行ってから MS 分析することも可能である。

BlotGlyco® は還元末端特異的に糖鎖を捕捉するため、還元末端がラベル化された糖鎖には固相反応は適用できないが、未ラベル糖鎖に対しては非常にロバストなソリューションになる。BlotGlyco® は糖鎖に対する特異性が非常に高く、夾雑成分も効率よく除けるため、サンプルに含まれる夾雑成分がシアル酸誘導体化反応に与える影響を考慮することなく前処理が可能である。尚、

糖鎖精製ビーズ BlotGlyco® およびそれに用いる溶媒類は本キットには含まれていないので、お客様ご自身でご準備いただく必要がある。

5 質量分析

SialoCapper-ID Kit で処理した糖鎖の測定には、糖鎖のイオン化が可能な質量分析計であれば装置の種類を問わず使用可能である。本キットの効果により、 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -結合様式は質量で区別することができるため、クロマト分離も必須ではない。したがって、通常クロマト分離を経ないマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) での分析も可能である。

5.1 マススペクトル例と解釈

図 7 に本キットで得られるマススペクトルの典型例 (Fetuin 由来 *N*-結合型糖鎖) を示す。Fetuin はシアル酸を豊富に含み、その結合様式も様々である。

シアル酸の結合様式が混在している場合、28 Da 差のピーク群がクラスターのように現れる。シアル酸を三つ持つ糖鎖の場合、本キットを適用すると $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -の組み合わせから 4 本のピークが検出される可能性がある。マススペクトル上でのこれらこの 28 Da 間隔のピーク強度比が、シアル酸の $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -比を反映している。

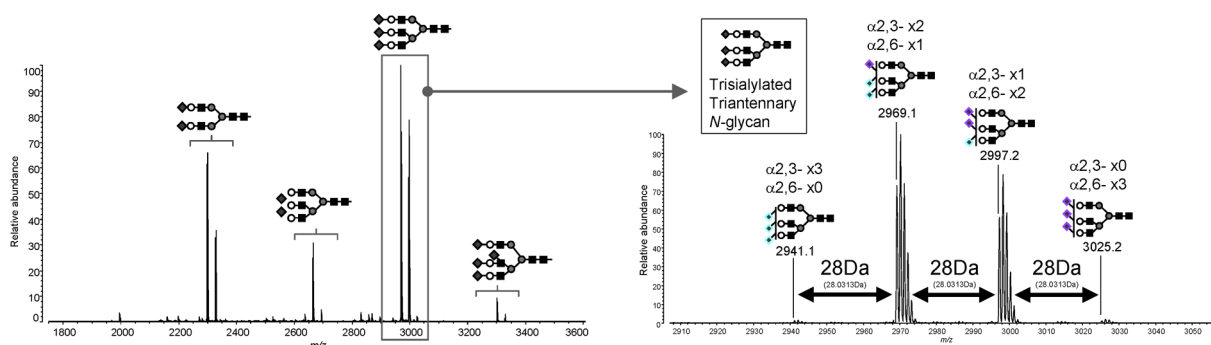


図 7 SialoCapper-ID Kit で処理した Fetuin 由来 *N*-結合型糖鎖の MALDI マススペクトル

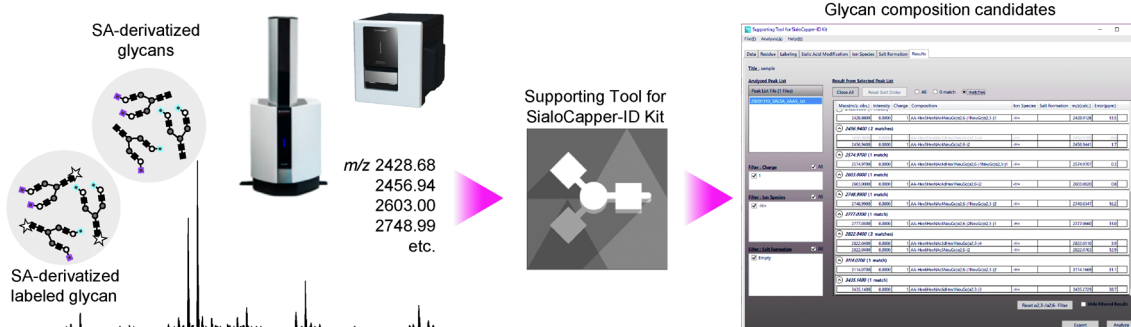


図 8 Supporting Tool for SialoCapper-ID Kit を用いたマススペクトル解析の流れ

5.2 マススペクトル解析補助ソフトウェア

糖鎖の質量分析データを解析する際のファーストステップは、得られた m/z から糖鎖の組成を推測することが一般的である。しかし、SialoCapper-ID Kit を用いて修飾を行うと、シアル酸の質量が変化し、さらに結合様式に応じたバリエーションが生まれるため、これまでのソフトウェアでは対応が難しかった。筆者らがオプションソフトウェアとして準備した“Supporting Tool for SialoCapper-ID Kit”は、シアル酸修飾による質量変化に対応した糖鎖組成推定ソフトウェアである。マススペクトル中で観測されたピークの m/z (モノアイソトピック値) と検索条件 (許容誤差、各単糖組成の上限下限、前処理法、検出されるイオン種等) を入力すると、各 m/z の糖鎖組成候補を総当たり検索にて算出し提示できる (図 8)。

6 分析例：SARS-CoV-2 受容体 ACE2 の *N*-結合型糖鎖解析

単離された糖タンパク質の糖鎖解析として、昨今のパンデミックの原因となっている新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の受容体である ACE2 の *N*-結合型糖鎖解析例について紹介する。

6.1 前処理条件

サンプルには市販の recombinant human ACE2 pro-

tein (Abcam) を用いた。変性と還元を行った後、PNGaseF を加え 37 °C で一晚反応させることで、*N*-結合型糖鎖の切り出しを行った。切り出した *N*-結合型糖鎖溶液のうち 5 μ L を直接 SialoCapper-ID Kit を用いて誘導体化した (液相反応)。その後、市販の HILIC チップを用いて過剰試薬を除いた。さらに、シアル酸結合様式特異的に修飾した糖鎖の還元末端を aminobenzamide (AB) でラベル化した。

サンプルは塩化ナトリウムを添加した Super-DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid と 5-methoxysalicylic acid の 9:1 混合物) をマトリックスとして用い、MALDI-8020 (図 9) を用いて測定を行った。

6・2 ACE2 由来 *N*-結合型糖鎖の MS 分析

ACE2 由来の *N*-結合型糖鎖を測定すると、複合型糖鎖を中心とした様々な糖鎖が検出された (図 10)。Supporting Tool for SialoCapper-ID Kit を用いて、検出された糖鎖ピークの単糖組成と、糖鎖生成経路や先行文献などを元に推定した糖鎖構造をスペクトル中に示して

いる。

本キットを用いて誘導体化を行うことでシアル酸が中性化され、中性糖鎖とシアリル糖鎖のイオン化効率を揃えることができる。これによりピーク強度を直接比較可能となり、糖鎖の相対存在量をより正確に評価することができる。中性糖鎖とシアリル糖鎖の存在割合と、シアリル糖鎖の中での α 2,3-/ α 2,6-結合様式の割合を算出すると、 α 2,6-シアル酸よりも α 2,3-シアル酸の方が多く含まれていることが分かった (図 10 右)。MS¹ マススペクトルのみから α 2,3-/ α 2,6-結合シアル酸を区別し、比較定量することができるのは SialoCapper-ID Kit ならではのメリットである。

ウイルスの世界では α 2,6-/ α 2,3-の結合様式の違いが感染性に影響する例が知られており、これらを簡便に評価できる本法は、感染機序の解明を通じてウイルスとの戦いに貢献するものと考ええる。

7 まとめ

SialoCapper-ID Kit は、液相反応と固相反応の両方に対応した、糖鎖の質量分析のためのシアル酸結合様式特異的修飾キットである。シアル酸結合様式が MS で判別できるだけでなく、シアル酸が安定化されることでマススペクトルの質と感度が向上する。マススペクトルの解析も容易になるため、シアル酸結合様式の区別が求められないケースでもメリットがある。本稿で紹介した MALDI-MS による分析例以外にも、LCMS 等でアプリケーションを拡充しており、糖鎖分析のための新しい修飾技術として、ぜひご活用いただきたい。

謝辞 SialoCapper-ID Kit で実施する SALSA 法の改良にかかわって頂きました北海道大学の古川潤一先生と花松久寿先生に感謝申し上げます。



図 9 卓上型 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” 本体外観

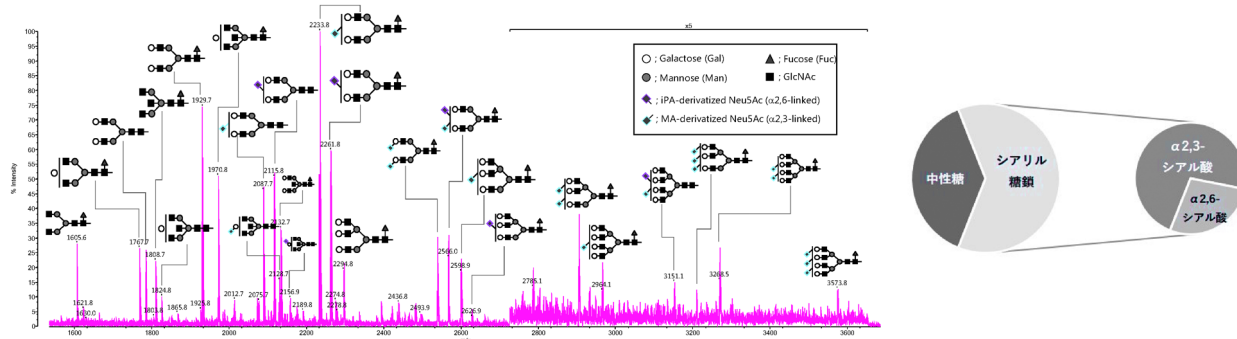


図 10 MALDI-8020 で取得した human ACE2 由来の *N*-結合型糖鎖のマススペクトルと、ピーク強度から算出した中性/シアリル糖鎖の割合、および α 2,3-/ α 2,6-シアル酸の割合。

備考

SialoCapper は、株式会社島津製作所の商標です。

BlotGlyco は、住友ベークライト株式会社の商標です。

文 献

- 1) T. Nishikaze : *Proc. Japan Acad. Ser. B*, **95**, 523 (2019).
- 2) T. Nishikaze, H. Tsumoto, S. Sekiya, S. Iwamoto, Y. Miura, K. Tanaka : *Anal. Chem.*, **89**, 2353 (2017).
- 3) H. Hanamatsu, T. Nishikaze, N. Miura, J. Piao, K. Okada, S. Sekiya, S. Iwamoto, N. Sakamoto, K. Tanaka, J. Furukawa : *Anal. Chem.*, **90**, 13193 (2018).



西風隆司 (Takashi NISHIKAZE)

株式会社島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1)。横浜市立大学大学院国際総合科学研究科ナノ科学専攻博士後期課程修了。博士(理学)。《現在の研究テーマ》糖鎖分析法の開発、MALDI-MS アプリケーションの開発。《趣味》音楽鑑賞、楽器演奏。
E-mail : nishikaz@shimadzu.co.jp



犬塚ま子 (Mako INUZUKA)

株式会社島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部 MS ビジネスユニット (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1)。奈良女子大学大学院人間文化研究科博士前期課程修了。修士(理学)。《趣味》映画鑑賞。
E-mail : inuzuka.mako.o6i@shimadzu.co.jp

会社ホームページURL :

<https://www.shimadzu.co.jp/>

関連製品ページURL :

https://www.an.shimadzu.co.jp/ms/reagents/sialo_capper_id/index.htm

原 稿 募 集

ロータリー欄の原稿を募集しています

内 容

談話室：分析化学、分析方法・技術、本会事業(会誌、各種会合など)に関する提案、意見、質問などを自由な立場で記述したもの。

インフォメーション：支部関係行事、研究懇談会、国際会議、分析化学に関連する各種会合の報告、分析化学に関するニュースなどを簡潔にまとめたもの。

掲示板：分析化学に関連する他学協会、国公立機関の主催する講習会、シンポジウムなどの予告・お知らせを要約したもの。

執筆上の注意

1) 原稿量は1200~2400字(但し、掲示板は

400字)とします。2) 図・文献は、原則として使用しないでください。3) 表は、必要最小限にとどめてください。4) インフォメーションは要点のみを記述してください。5) 談話室は、自由投稿欄ですので、積極的発言を大いに歓迎します。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(公社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]