

血清グライコプロテオミクス —LC/MS/MSを用いる血清糖タンパク質の網羅的解析—

血清タンパク質の多くは糖タンパク質である。糖タンパク質は、同一ペプチド配列に様々な糖鎖が結合した分子（グリコフォーム）からなる不均一な集合体であり、その不均一性は組織や病態で変化することが知られている。その変化をがんなどの診断に利用しようと血清糖タンパク質の網羅的解析（グライコプロテオミクス）が行われている。本稿では、糖タンパク質の特徴を述べた後、血清グライコミクス手法の一例について概説する。

高倉 大輔, 川崎 ナナ

1 血清糖タンパク質

血清タンパク質の約半分をアルブミンが占め、40%をイムノグロブリン G (IgG), トランスフェリン, フィブリノーゲン, IgA, α 2-マクログロブリン, IgM, α 1-アンチトリプシン (A1AT), 補体 C3, およびハプトグロビンなどの9種の高濃度糖タンパク質が占める。さらに残りの10%も多くの糖タンパク質によって占められている。糖タンパク質の糖鎖は生命現象や疾患などによって変化するといわれている。例えば、関節リウマチ患者の血液中のIgGの糖鎖は健康人と比べ短いことが知られている¹⁾。現在、腫瘍の血液診断に用いられている腫瘍マーカーの本質の多くは糖鎖抗原である²⁾。さらに、近年のプロテオミクスやグライコプロテオミクス技術の進展に伴い、血清糖タンパク質マーカー探索が不可能ではなくなり、^{すい}膵がんマーカーとしてのハプトグロビン³⁾や、アルツハイマー病マーカーとしてのトランスフェリン⁴⁾などが見いだされるようになった。筆者らも、A1ATのあるグリコフォームが大腸がん患者血清で増加していることを見いだしている⁵⁾。IgG, ハプトグロビン, トランスフェリン, A1ATはいずれも存在量の多い糖タンパク質である。多くの疾患マーカーが1%以下のタンパク質集団から見いだされているように、今後グライコプロテオミクスの探索研究も微量糖タンパク質に向かっていこう。また、近年の技術革新は、微量血清グライコプロテオミクスを可能としている。本稿では、糖タンパク質の糖鎖の概略と、質量分析 (MS) を用いた血清グライコプロテオミクス手法の代表例について概説する。

2 糖タンパク質の糖鎖の構造

糖タンパク質の糖鎖には N 結合型糖鎖と O 結合型糖

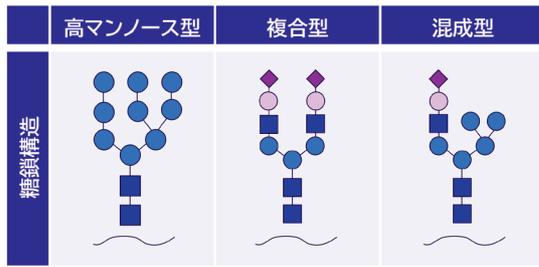
鎖がある⁶⁾。N 結合型糖鎖は Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa は Pro 以外のアミノ酸) 配列の Asn 残基に結合する。N 結合型糖鎖の還元末端はマンノース (Man) 3 個と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 2 個からなる共通のコア構造を有しており、その側鎖を構成する単糖の種類により、高マンノース型、複合型、および混成型の三つの型に分類される (図 1A)。高マンノース型は側鎖に Man のみを含み、Man5 (M5) から Man9 (M9) まである (図 1B)。複合型は GlcNAc, ガラクトース (Gal), フコース (Fuc) などからなり、側鎖の本数によって 1~4 本鎖と呼ばれる (図 1C)。非還元末端に N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) などのシアル酸が結合することがある。混成型は、高マンノース型と複合型の両方の性質を持つ。

O 結合型糖鎖は Ser または Thr 残基に結合する。還元末端糖は N-アセチルガラクトサミン (GalNAc), Fuc, グルコース (Glc), Man, キシロースまたは GlcNAc と多様である⁷⁾。もっとも頻度の高い O-GalNAc 型糖鎖はさらにコア 1~コア 8 に分類される (図 1D)。このように、糖鎖は単糖, 結合位置, 分岐構造などの違いによる多数の異性体が存在する。MS ではこれらの異性体を識別できないことが課題である。

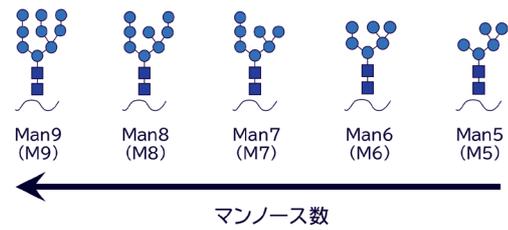
3 糖タンパク質の糖鎖の生合成

N 結合型糖鎖の生合成は小胞体からスタートする⁸⁾。ドリコールリン酸に GlcNAc, Man, および Glc が順次結合し、 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ が出来上がると、オリゴ糖転移酵素によりペプチド鎖に転移される (図 2)。非還元末端の Glc はタンパク質の高次構造形成に伴いトリミングされる。Man8 になると小胞体からゴルジ体に輸送され、様々なグリコシダーゼによるトリミングと糖転移酵素による Gal, Fuc, およびシアル酸の付加が規則的に行われる。主な O 結合型糖鎖の生合成はゴルジ体で行われる。O-GalNAc 型糖鎖は糖転移酵素により Ser または Thr 残基に GalNAc が付加されたのち、単糖が一

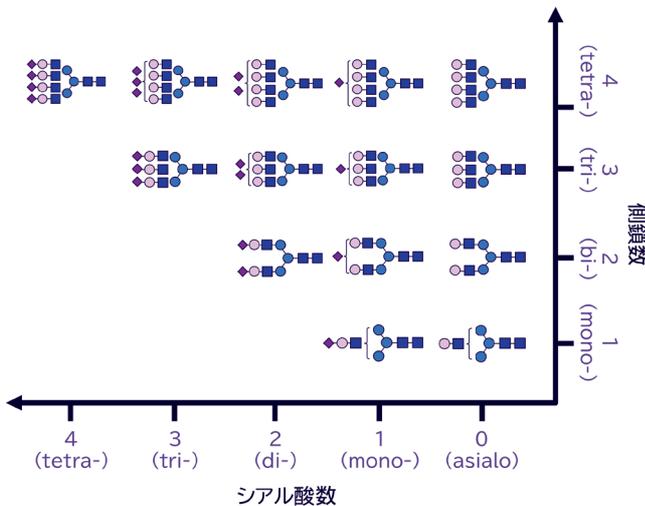
(A)



(B)



(C)



(D)

コア1	コア2	コア3	コア4
コア5	コア6	コア7	コア8

- マンノース (Man)
- ガラクトース (Gal)
- N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)
- ◆ N-アセチルノイラムिन酸 (NeuAc)
- N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)

図1 糖タンパク質の糖鎖の種類

(A) N結合型糖鎖の三つの型, (B) 高マンノース型糖鎖の種類, (C) 複合型糖鎖の種類, (D) O-GalNAc型糖鎖の種類

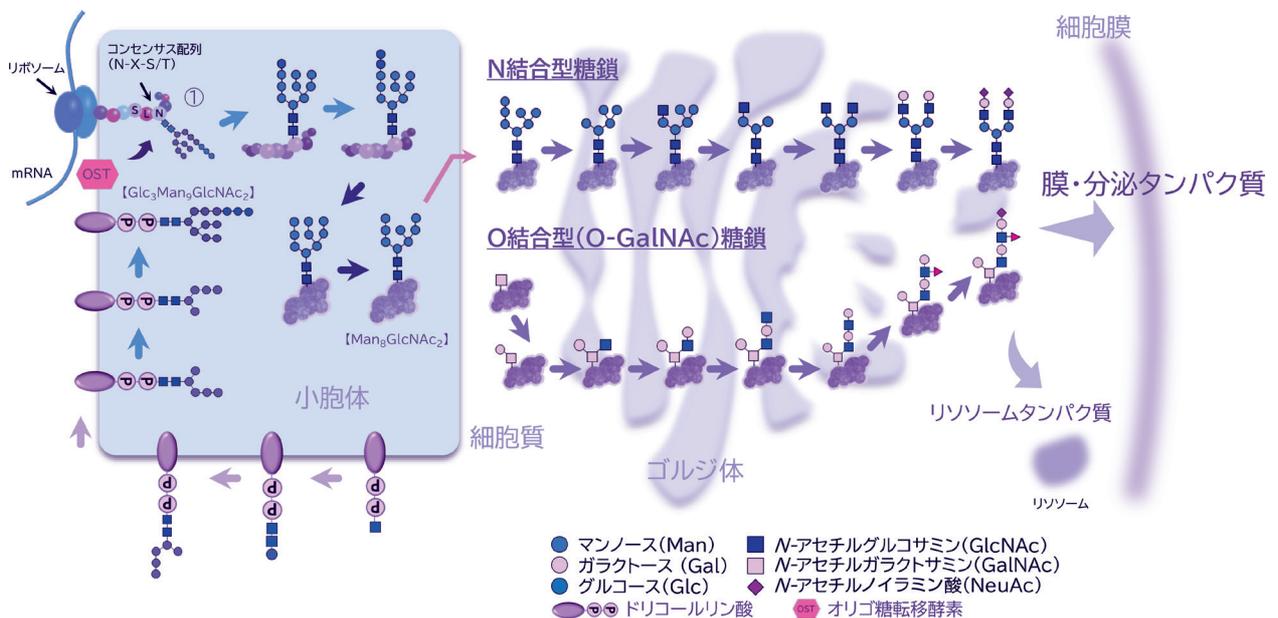


図2 糖タンパク質の糖鎖生成の概略

GlycoEpitope	Marker
Sialyl Lewis a	CA19-9, KMO-1, SPan-1, CA50, DUPAN-2
Sialyl Lewis x	SLX, NCC-ST-439, CSLEX
Sialyl Tn	STN, CA54/61, CA72-4
Mucin 16	CA125

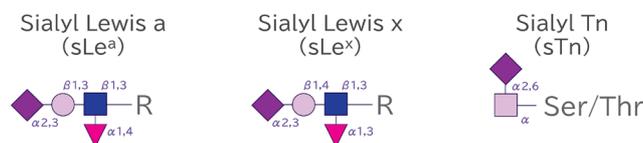


図3 糖鎖抗原と代表的腫瘍マーカーおよび糖鎖抗原の構造

つずつ付加されて伸長する。糖供給体は、外部から供給される単糖や、糖代謝で生じた糖誘導体より作られる糖ヌクレオチドである。最終的に糖タンパク質は不均一なグリコフォーム集団のまま、エキソサイトーシスにより細胞外へ、またはリソソームに輸送される。糖タンパク質の糖鎖の構造や不均一性は、修飾されるタンパク質のアミノ酸配列や高次構造、糖分解酵素や糖転移酵素の分布や活性、および糖ヌクレオチドを供給する細胞内外の環境という三つの要因によって決まる。そのため、疾患等により細胞内外の環境が変化すると、糖タンパク質の糖鎖も大きく変化すると考えられる。グライコプロテオームはゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム等の変化を統合して出来上がった集団といえよう。

4 糖鎖血清マーカー

血清糖タンパク質の多くは肝臓で作られるが、血清には様々な組織から分泌された糖タンパク質も多数混在している。先述したように、大腸がん、膵がん、卵巣がんなどの診断に用いられている診断マーカーの多くは、血清中の糖タンパク質の糖鎖の変化を指標にしている。図3に腫瘍マーカーとして利用されている代表的糖鎖マーカーと糖鎖構造をまとめる。診断では癌細胞を免疫することで得られた抗体を利用しているケースが多い。抗体の標的は糖鎖抗原であるといわれているが、その糖鎖抗原で修飾されているタンパク質の多くは不明である。

5 血清糖タンパク質の網羅的解析

近年、血清などの非侵襲性試料から疾患に関連して変動するグリコフォームを明らかにし、その糖鎖とタンパク質の両方を特異的に認識する検査法を確立しようとする研究が精力的に行われている。

5.1 課題

糖鎖構造解析には、単糖、オリゴ糖、糖ペプチド、および糖タンパク質解析の四つのアプローチがある⁶⁾。血清糖タンパク質糖鎖の解析で利用される方法は、オリゴ

糖解析と糖ペプチド解析である。オリゴ糖解析は糖鎖の詳細構造解析やプロファイル解析に適しているが、糖鎖をタンパク質から切り離すため、他のオミクス情報と連結させることができなくなる。糖ペプチド解析にはLC/MS/MSを用いる。糖ペプチドのMS/MSデータはGene IDを介してゲノム情報と連結させることができるので、どのタンパク質の、どの位置に、どのような糖鎖が、どの程度結合しているかまで解析することができる。また、タンパク質情報を介して、その糖鎖修飾の機能や局在に関する情報も得ることができる。これまで、糖ペプチドのLC/MS/MSには以下に示すような技術的な課題があったが、最近では解決策が示されるようになってきた。

第一の課題は、糖ペプチドは、糖鎖非修飾ペプチドに比ベイオン化されにくいこと、また、イオン化しやすい物質が共存するとイオン化抑制を受けさらに検出されにくくなることである。多くの糖ペプチドには多様な糖鎖が結合しているため、質量も保持時間も複数になり、益々検出は困難になる。この解決策の一つが糖ペプチドの濃縮であり、濃縮法の選択がグライコプロテオミクスの結果を左右するといつて過言ではない。

第二の課題は、糖ペプチドのMS/MSで取得されるプロダクトイオンスペクトルにはペプチド、糖鎖および糖ペプチドイオンが混在しており、元の糖ペプチドの配列推定が容易でなかったことである。近年、自動でプロダクトイオンを再構築するためのソフトウェアと、それを支えるMS用糖鎖データベースの整備が進み、糖ペプチドの構造推定が困難ではなくなってきた。

5.2 ワークフローの一例

図4に、一例として、筆者らが構築したグライコプロテオミクスのワークフローを示す。血清NおよびO結合型糖タンパク質の網羅的解析を行うにあたり、10 μL程度の血清を使用する。ステップごとに、目的を考慮した最適方法を選択する必要があるが、ここでは選択肢と選択のポイントを簡単に紹介する。

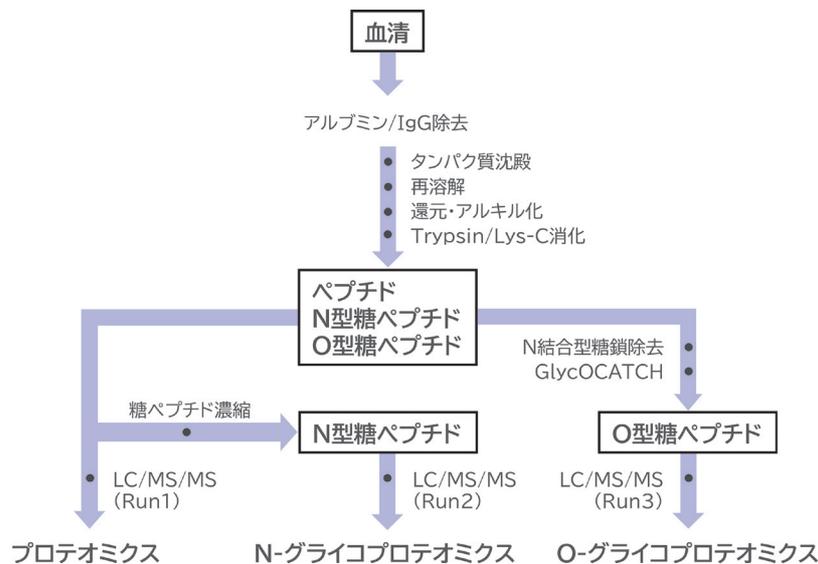


図4 血清グリコプロテオミクスのワークフローの一例

5・2・1 血清高濃度タンパク質の除去

疾患関連タンパク質などの探索を目的としたプロテオミクスでは、アルブミン、IgG および存在量の多い糖タンパク質を抗体カラムで除去し、残りの成分を解析対象とすることが多い。グリコプロテオミクスでは、糖鎖非修飾ペプチドを除去する操作があるため、このステップを省略することもある。微量糖タンパク質の解析を目的としている場合など、高濃度糖タンパク質を除去した方がよい結果が得られることもある。

5・2・2 タンパク質の沈殿法および再溶解法

タンパク質の沈殿法としてよく利用される方法として、アセトン法とクロロホルム-メタノール法がある。沈殿物の再溶解に用いられる代表的な可溶化剤として、尿素、グアニジン塩酸、デオキシコール酸ナトリウム、ProteaseMax Surfactant™ などがある。高濃度の尿素やグアニジン塩酸はトリプシン等のプロテアーゼ活性を阻害するため、次の消化ステップで希釈する必要がある。デオキシコール酸ナトリウムは酸性条件下で有機溶媒を用いて除去することができる（相関移動溶解剤法⁹⁾。しかし、溶液を酸性にするので、シアル酸結合糖鎖の解析が目的の場合は注意が必要である。沈殿法と再溶解法の選択と組み合わせは、同定数と同定糖タンパク質の種類を左右するので、目的に応じた最適な方法を選択する。

5・2・3 消化酵素

プロテオミクスでは第一選択酵素としてトリプシンが用いられる。それは、トリプシンは Lys や Arg 残基などの C 末側を切断するため、どのペプチドにも正電荷が入り、配列情報につながるプロダクトイオンが生じやすくなるからである。グリコプロテオミクスでも第一選択酵素はトリプシンや、トリプシンとリシルエンドペ

プチダーゼ (Lys-C) の併用である。その他の酵素として、Glu-C (V8 Protease), Asp-N, キモトリプシン, サーマリシンなどがあり、2種類以上の酵素を組み合わせ使用することもある。糖鎖修飾されたペプチドは親水性が高くなるため、脱塩操作で失う可能性があることや、一つのペプチドが複数の糖鎖で修飾されているとき、糖鎖の帰属が極めて困難になるなどを考慮して酵素を選択する必要がある。

5・2・4 N型糖鎖修飾ペプチドの回収

糖ペプチドを効率的に濃縮する方法としてアセトン沈殿法¹⁰⁾、並びにセファロースやセルロースなどの親水性担体およびレクチンなどを利用した方法¹¹⁾が報告されている。網羅性が高い方法はアセトン沈殿法と親水性担体を利用した方法であるが、回収される糖鎖とペプチドは必ずしも一致しないことに注意する。親水性相互作用を利用した簡便法として、G-Tip™ を用いた方法がある¹²⁾。糖鎖構造を絞ったターゲットグリコプロテオミクスにはレクチン法が適している。但し、入手可能なレクチンは限定的である。

5・2・5 O型糖鎖修飾ペプチドの回収

O型糖ペプチドの回収は容易ではないが、近年、不活性化 OpeRATOR™ を固定化させたアフィニティーレジン (GlycOCATCH™) が販売されるようになった。OpeRATOR は、O-GalNAc 型のコア1糖鎖が結合した Ser または Thr 残基の N 末端側ペプチド結合を切断する酵素である。トリプシン消化物からコア1糖鎖が結合した糖ペプチドを効率よく回収することが出来る。しかし、シアル酸が結合しているとアフィニティーレジンとの反応性が極めて弱くなるため、精製の際にはシアル酸を除去する必要がある。また、GlycOCATCH の使用に

は、タンパク質が持つ本来の糖鎖プロファイル情報を失ってしまうという課題も残る。

5・2・6 LC/MS/MS 装置と測定パラメータの設定

一般的なグライコプロテオミクスでは内径 0.075 mm の ODS カラムを用いて流速 300 nL/min で分離できる LC 装置が選択される。MS 装置は高分解能測定が可能で、 m/z の測定範囲が広いものを選択する。一般的な衝突誘起解離 (CID) では糖鎖の開裂が優先され、ペプチド配列を同定するためのフラグメントが十分に得られないことがある。電子移動解離 (ETD) を用いるとペプチド部分の開裂が優先される。糖鎖構造とペプチド配列のどちらを重視するかを考慮して MS/MS 装置とモードを選択し、測定パラメータを設定する。

5・2・7 解析ソフトウェア

近年、N 結合型糖鎖が結合したグリコフォーム (N-グリコフォーム) の配列解析は大きく進展した。解析ソフトウェアが市販され¹³⁾、糖鎖データベースの整備¹⁴⁾が進んだからである。グリコフォームの配列推定と定量解析を実施する際に、ソフトウェアの選択は重要である。著者らは定性解析用ソフトウェアとして ByonicTM を、定量解析用ソフトウェアとして Proteome DiscovererTM と OpenMS を用いている。定性解析においては、使用するデータベースに格納されている糖鎖構造の種類に留意

する必要がある。格納されていない糖鎖構造は配列推定に利用されないが、全糖鎖構造を対象とした検索は膨大な時間がかかる。定量解析においては、異性体の存在によりピーク形状が崩れ、ピークピッキングが困難になることがある。今後もグライコプロテオミクスの環境は急速に整備されると思うが、その都度、入手可能な解析ソフトウェアやデータベースの限界を理解しながら、網羅的解析に取り組んでいくのが現実的であろう。生体試料の網羅的解析においては、アミノ酸と単糖の組み合わせにより推定される糖ペプチド配列候補の数は膨大であり、自動解析にはいまだ限界がある。マスペクトルを目視で確認することが重要である。O 結合型糖鎖が結合したグリコフォーム (O-グリコフォーム) の自動解析も可能になってきたようである¹⁵⁾。

6 LC/MS/MS を用いた糖ペプチドの解析

同定結果の検証には、MS/MS におけるペプチドと糖鎖の開裂について理解しておく必要がある。最後に CID による糖ペプチドの開裂について解説する。

6・1 ペプチドの開裂

ペプチドの MS/MS では様々な位置で開裂したプロダクトイオンが生じる (図 5A)。CID では赤で示すペプチド結合の開裂が優先される。ペプチド結合が開裂して生じたイオンで、N 末端を含むペプチドフラグメント

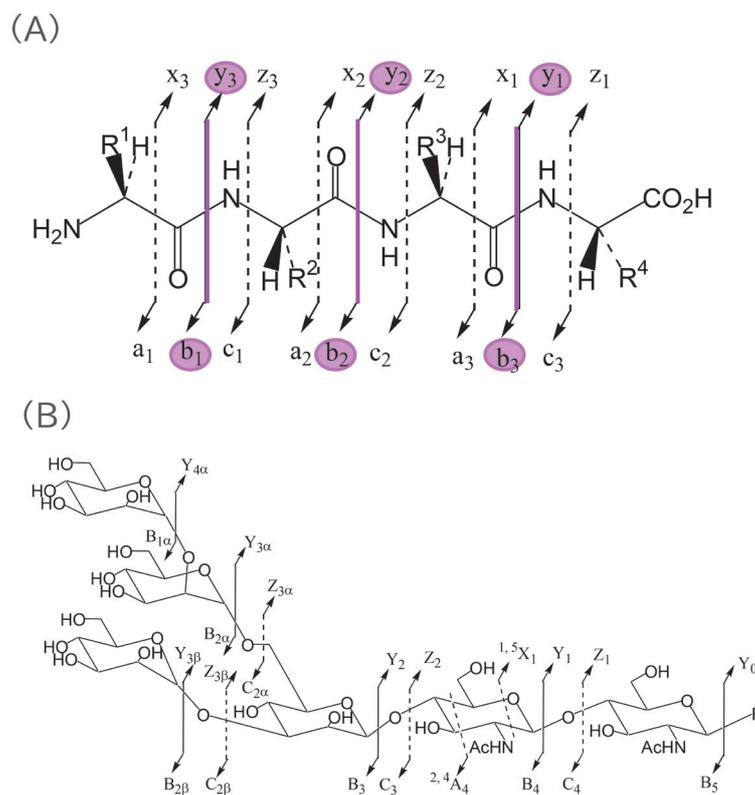


図 5 MS/MS で生じるペプチドと糖鎖の代表的開裂
(A) ペプチドの開裂, (B) 糖鎖の開裂

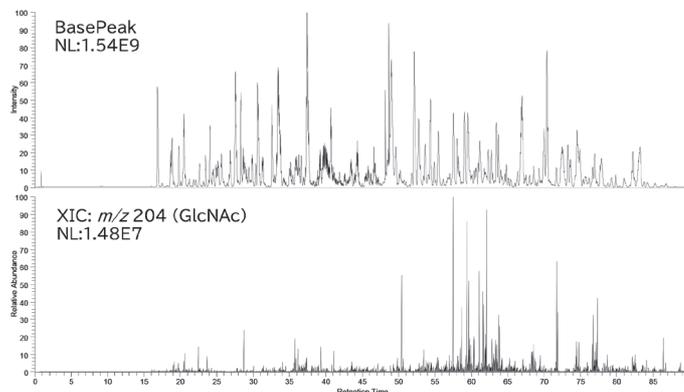
をbイオンと呼ぶ。N末端側から1番目のペプチド結合が開裂して生じたイオンをb₁、2番目のペプチド結合が開裂して生じたイオンをb₂とよぶ。C末端を含むフラグメントはyイオンと呼び、C末端側から1番目のペプチド結合が開裂して生じたイオンをy₁、2番目のペプチド結合が開裂して生じたイオンをy₂と呼ぶ。トリプシンやLys-Cで消化されたペプチドのCIDでは、C末端が塩基性アミノ酸となっているので、yイオンが比較的強く検出される。

6・2 糖鎖の開裂

糖鎖のMS/MSで生じるフラグメントを図5Bに示

す¹⁶⁾。CIDではグリコシド結合が開裂したフラグメントが生じやすい。非還元末端を含む断片をBイオン、還元末端を含む断片をYイオンと呼ぶ。Bイオンの中には糖鎖に特徴的で診断イオンとして扱われるものがある。N-アセチルヘキソサミン (HexNAc) の *m/z* 204、ヘキソース (Hex)-HexNAc の *m/z* 366、N-アセチルノイラミン酸の *m/z* 292などが糖鎖診断イオンとして利用されることが多い。糖鎖抗原の存在を示唆するイオンが生じることがある。SO₃-グルクロン酸 (GlcA)-ヘキソース (Hex)-HexNAc の HNK-1 を示唆する *m/z* 542、ジシアル酸の *m/z* 583、シアリルルイス a/x の *m/z* 803、SO₃-HexNAc-HexNAc の *m/z* 487などが代表例である。

(A)



(B)

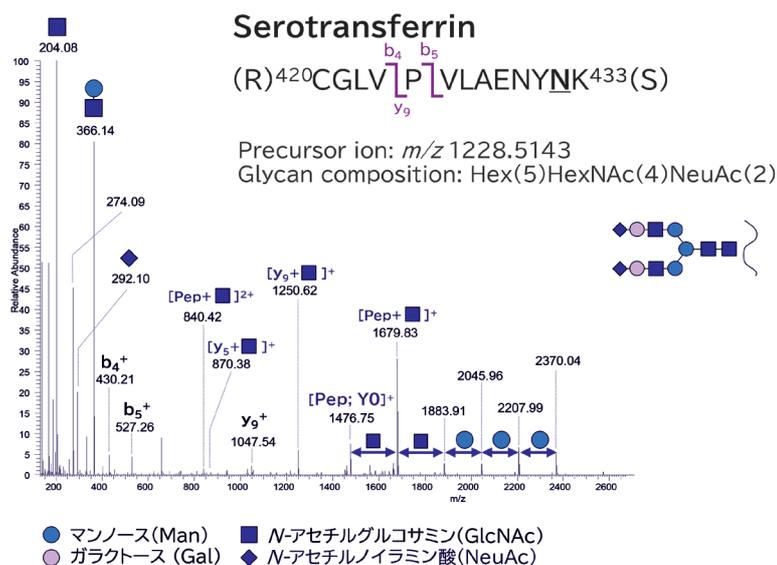


図6 血清グライコプロテオミクスの一例

(A) LC/MSで得られたベースピーククロマトグラム、(B) LC/MS/MSで得られた抽出イオンクロマトグラム (*m/z* 204)、(C) トランスフェリントリプシン消化物421～433番目のペプチドのプロダクトイオンスペクトルとフラグメントの帰属。432番目のAsn残基にジシアルル2本鎖糖鎖が結合している。

但し、フコースは転位しやすいことに注意が必要である。高エネルギー衝突解離 (HCD) を用いると、糖鎖とペプチドの両方が開裂したピークが得られる。糖鎖に由来する B および Y イオン、ペプチドに由来する b および y イオン、および糖ペプチドに由来するイオンが混在し、複雑になる。

6・3 LC/MS/MS を用いたグライコプロテオミクスの例

図 6 に血清グライコプロテオミクスで得られたクロマトグラムと代表的なマススペクトルを示す。ここでは血清からアセトン沈殿により回収したタンパク質をトリプシンと Lys-C で消化し、セルロール樹脂で濃縮した N 型糖鎖修飾ペプチドを HCD で開裂させた。図 6A (上段) は全スキャンモードの LC/MS で取得したベースピーククロマトグラムであり、図 6A (下段) はデータ依存的な MS/MS で得られた抽出イオンクロマトグラム (m/z 204) である。図 6A (下段) のピークが見られる保持時間に糖ペプチドに由来するプロダクトイオンスペクトルが取得されている。図 6B は 58 分に溶出された糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルである。スペクトル上には糖鎖に特徴的な B イオンと、ペプチドと糖鎖の結合が開裂して生じた Y0 イオン (m/z 1476.75)、および糖ペプチドイオン (m/z 1679.83, 1883.91, 2045.96, 2207.99, 2370.04) が検出されている。また、ペプチドに由来する b および y イオンも確認できる。これらフラグメントより、本糖ペプチドはトランスフェリンの 421~433 番目のペプチドで、432 番目の Asn 残基にジシリアル 2 本鎖糖鎖が結合していることが推定される。

7 展 望

糖鎖分析化学の進展により、誰もがヒト血清グライコプロテオミクスを実施できるような時代になってきた。今後、細胞グライコプロテオミクスも可能となり、糖鎖が関係する様々な生命現象が解明されていくに違いない。その成果が、糖鎖を利用した様々なモダリティ開発につながっていくことを期待したい。

謝辞 本稿の執筆にあたり、ご協力いただきました荒川憲昭先生 (国立医薬品食品衛生研究所) に感謝申し上げます。本稿で紹介した実験手順や実験結果は、横浜市立大学生命医科学研究科創薬再生科学研究室佐藤祐輔さん、および向武史さんの研究成果の一部です。本研究は科研費基盤 (B) 研究課題番号: JP18H02563 (N.K.)、科研費科研費・研究活動スタート支援研究課題番号: 20K22712 (D.T.)、神奈川県先進異分野融合プロジェクト研究 (N.K) および横浜市立大学第 5 期戦略的研究推進事業研究課題番号: SK3001 (N.K) の支援の下、実施されました。

文 献

- 1) Y. Ohmi, W. Ise, A. Harazono, H. Fukuyama, Y. Baba, M. Narazaki, H. Shoda, N. Takahashi, Y. Ohkawa, J. Shuting, F. Sugiyama, K. Fujio, A. Kumanogoh, K. Yamamoto, N. Kawasaki, T. Kurosaki, Y. Takahashi, K. Furukawa : *Nat Commun.*, **7**, 11205 (2016).
- 2) がん情報サービス : <https://ganjoho.jp/public/dia_tre/inspection/marker.html> (accessed 2021. 10. 6).
- 3) N. Okuyama, Y. Ide, M. Nakano, T. Nakagawa, K. Yamanaka, K. Moriwaki, K. Murata, H. Ohgashi, S. Yokoyama, H. Eguchi, O. Ishikawa, T. Ito, M. Kato, A. Kasahara, S. Kawano, J. Gu, N. Taniguchi, E. Miyoshi : *Int. J. Cancer*, **118**, 2803 (2006).
- 4) Y. Murakami, K. Saito, H. Ito, Y. Hashimoto : *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **95**, 198 (2019).
- 5) 川崎ナナ : *ファルマシア*, **56**, 657 (2020).
- 6) 厚生労働省 : 令和 3 年厚生労働省告示第 220 号, “第十八改正日本薬局方” (2021), 一般試験法糖鎖試験, および参考情報単糖分析とオリゴ糖/糖鎖プロファイル法.
- 7) H. H. Wandall, M. A. I. Nielsen, S. King-Smith, N. de Haan, I. Bagdonaite : *FEBS J.*, **288**, 7183 (2021).
- 8) JCGGDB CMS, JCGGDB Reports, 千葉靖典 : N-結合型糖鎖の合成機構 ; <<https://jcgddb.jp/doc/Disp.action?langType=1&projectId=3&dmsId=120&pageNo=1>> (accessed 2021. 10. 6) ; 山本一夫 : 糖タンパク質の品質管理 <<https://jcgddb.jp/doc/Disp.action?langType=1&projectId=3&dmsId=120&pageNo=1>> (accessed 2021. 10. 6).
- 9) T. Masuda, M. Tomita, Y. Ishihama : *J. Proteome Res.*, **7**, 731 (2008).
- 10) D. Takakura, A. Harazono, N. Hashii, N. Kawasaki : *J. Proteomics.*, **101**, 17 (2014).
- 11) N. M. Riley, C. R. Bertozzi, S. J. A. Pitteri : *Mol. Cell. Proteomics.*, **20**, 100029 (2021).
- 12) Y. Ohta, K. Kameda, M. Matsumoto, N. Kawasaki : *Mass Spectrom (Tokyo)*, **6**, A0061 (2017).
- 13) L. Y. Lee, E. S. X. Moh, B. L. Parker, M. Bern, N. H. Packe, M. Thaysen-Andersen : *J. Proteome Res.*, **15**, 3904 (2016).
- 14) 国際糖鎖構造リポジトリ GlyTouCan, <https://glytoucan.org/> (accessed 2021. 10. 6).
- 15) A. Singh : *Glycoproteomics. Nat. Method.*, **18**, 28 (2021).
- 16) B. Domon, C. E. Costello : *Glycoconjugate J.*, **5**, 397 (1988).



高倉大輔 (Daisuke TAKAKURA)

横浜市立大学生命医科学研究科 (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29)。《現在の研究テーマ》疾患グライコプロテオミクス。《趣味》ミニチュアハウス、神社巡り。



川崎ナナ (Nana KAWASAKI)

横浜市立大学生命医科学研究科 (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29)。《現在の研究テーマ》バイオ医薬品の特性解析, グライコプロテオミクス。《主な著書》川崎ナナ, 石井明子編集: “バイオ医薬品の品質管理戦略第 2 版”, (株式会社じほう), ISBN978-4-8407-5232-9 C3047。《趣味》ねこ, ガーデニング。