

生体試料中に存在する糖鎖の高感度機器分析法の現状



米野 雅大

1 はじめに

食品や生体試料中の有機化合物の分離には逆相高速液体クロマトグラフィーがよく用いられる。なかでも糖類は親水性が高い化合物であり、逆相系カラムでの保持が悪い。糖類の検出は示差屈折検出器や金電極を用いた電気化学検出器などで可能であるが、これらの検出法では移動相組成に制約がある。汎用される検出器であるUV/VIS 検出器や蛍光検出器では糖類の主要な官能基が水酸基であることや発蛍光性がほとんど見られないこともあり検出が困難である。そこで、糖類の分離・検出にはカラムへの保持・検出感度向上のため誘導体化法による蛍光や質量分析計 (mass spectrometry, MS) での検出が主流となっている。本稿では糖鎖の誘導体化法による蛍光や MS/MS での検出法を紹介する。

2 糖鎖分析の難しさ

糖は生体試料中では単糖が無数に結合した多糖つまり糖鎖の形で存在する。糖鎖は核酸、タンパク質に次ぐ第三の鎖ともいわれ、微生物から動植物など生物界に広く存在する。糖鎖は細胞表面のタンパク質・脂質に結合する形で存在し、細胞の保護、細胞内・間の情報伝達に関与している。糖鎖は構成する糖の配列や修飾が一つ違えば異なった生物機能を有するため、その大きさと構造を正確に分析することが極めて重要である。しかしながら糖鎖はタンパク質や脂質などの生体高分子とは異なり、決まった大きさ (分子量) がなく分子量が不均一なため、インタクトな状態での分析は難しい。そこで酵素や酸により単糖やオリゴ糖に分解してから分析に供する方法が一般的である。

3 プレカラム蛍光誘導体化法による糖鎖分析

糖は還元末端に反応性に富むアルデヒド基やケト基が

存在することが化学構造的な特徴として挙げられる。糖の誘導体化はこれらの官能基と芳香族アミン系化合物をアミノ化反応させる方法が汎用されている。汎用される誘導体化試薬には、2-アミノベンズアミド、2-アミノ安息香酸、PA (2-アミノピリジン)、2-アミノアクリドン、7-アミノメチル-クマリンなどが挙げられる。これら化合物は単糖・オリゴ糖の還元末端を還元的アミノ化および自身がつ発色団の付与を行う。しかしながら一般にはケトースやシアル酸は還元的アミノ化反応の標識には適さない。一方で DMB (1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン) は α -ケト酸と特異的に反応する試薬であり、強い蛍光性のキノキサリン誘導体を与えるが、この反応条件では試薬と誘導体の酸化を妨げるため高濃度の還元剤が必要となる。そこで Anumula らは *o*-フェニレンジアミンを用いる方法で DMB と比べ、反応が簡便でシアル酸結合糖鎖を高感度かつ定量的に分析ができることを報告している¹⁾。誘導体化糖は逆相クロマトグラフィーやホウ酸錯体を形成させた後に陰イオン交換クロマトグラフィーで分離する方法が一般的である。その後分離した誘導体化糖は蛍光検出器により検出する。ただしプレカラム蛍光誘導体化法では、試料および誘導体化試薬の純度が求められるほか、過剰に加えた誘導体化試薬が分離・検出に影響を与えないように、必要に応じて誘導体化糖の精製が必要となる。

4 ポストカラム蛍光誘導体化法による糖鎖分析

簡便な糖の発色定量法は濃硫酸を用いるものが多く、HPLC で使用するには装置やラインの腐食が問題となる。また感度も不十分であることから誘導体化法への利用は困難である。このような背景から、強酸を使用しないオンラインでの高感度ポストカラム誘導体化法の開発が精力的に進められている。分離した糖とエチレンジアミン²⁾、2-シアノアセトアミド³⁾、タウリン⁴⁾、アルギニン⁵⁾などと反応させる方法が開発されている。糖類は第一級、二級アミンと反応することから、アルカリ条件下でアミンやアミド、アミノ酸と反応させる方法が主流である。ポストカラム誘導体化法は誘導体化試薬用のポンプ、恒温反応槽、冷却槽が必要にはなるが、夾雑成分の影響により誘導体化効率に変化することが少なく、誘導体化反応の自動化により再現性が高いことから汎用されている。

5 MS による糖鎖分析

MS/MS は誘導体化の有無にかかわらず糖鎖が検出可能なことまた、質量から構成糖組成を把握できることから近年汎用されている。ただし生体試料中糖鎖の MS/MS 検出においてはシアル酸が脱離しやすいこと、カルボキシ基を有することから塩が付与されやすくスペクトルが複雑になり定量性も低下しやすいため注意が必要となる。MS での糖の分離は糖鎖の親水性の高さや MS と

の相性の良さから HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) カラムで行われることが多くみられる。また日本薬局方では第十七改正より一般試験法として、オリゴ糖や糖ペプチドの糖鎖プロファイリングに対する MS の適用指針が示されるなど糖鎖分析における MS/MS 検出の役割はますます高くなると考えられる。MS/MS で糖鎖を検出する場合、基本的にはソフトイオン化法であるエレクトロスプレーイオン化 (ESI) やマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) によりイオン化する方法が主流である。質量分析部としては酸や酵素により分解した単糖や短いオリゴ糖では三連四重極型の TQ (triple quadrupole)-MS/MS、高分子な糖鎖や糖タンパク質、糖脂質では四重極型と飛行時間型を組み合わせた QTOF-MS やフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型である FT-ICR MS やキングドントラップ型の Orbitrap MS を用いられることが多い。

6 ESI-MS による糖鎖の解析

ESI は脱離しやすい酸性基 (シアル酸, ウロン酸) を脱離させることなく分析できるため、糖においては次項で述べる MALDI よりも優れている。また、液体クロマトグラフィーとの高い互換性があり誘導体化した糖類との相性も良い。一方で、サンプルの詳細な特性評価を行うにはフラグメントの数が不十分であることや多価イオンの質量スペクトルが生じることにより、解析は MALDI と比較すると難易度が高い。しかし汎用性の高さや HPLC との相性が良いこと、解析が容易なネガティブイオンを生成しやすいことから ESI-MS/MS での糖鎖やオリゴ糖の分析・定量法が盛んに進められている。最近では、ヒトの脳脊髄液中の N 結合型糖鎖をパーメチル化 (permethylation) し、HPLC で分離、ESI でイオン化し Quadrupole-Orbitrap MS により検出する方法が報告されている⁶⁾。イオンのモニタリング法としてイオンをスキャンするために高解像度の Orbitrap または TOF MS を採用しイオン選択性を高めることで、SRM (selected reaction monitoring)/MRM (Multiple reaction monitoring) に比べて大きな利点がある PRM (parallel reaction monitoring) が用いられている。サンプル糖鎖はパーメチル化することにより、LC 分離の際の保持向上のみならず、シアル酸脱離やフコース再配置を防ぐなど糖鎖を安定化させることに寄与している⁷⁾。

7 MALDI-MS による糖鎖の解析

生体に存在する糖鎖は高分子であることから MALDI を用いたイオン化および飛行時間型もしくはイオントラップ型の MS/MS 検出と相性がよく、生体中の修飾糖鎖の構造解析によく利用されている。糖鎖を MALDI でイオン化する際によく使用される 2,5-ジヒドロキシ安息香酸や PA などはプロトン負荷イオンや、糖と親和性が高いアルカリ金属が付加されたイオンも生じやすいた

め、MALDI ではポジティブイオンモードでの解析が主流となっている。ポジティブイオンモードでの測定では構造異性体間の結合様式解析においてイオン強度の比較といった詳細な解析が要求されるほか、カルボン酸のカウンターイオンのバリエーションによりネガティブイオンモードと比較して一般的に難易度が高い。またシアル酸や硫酸基が付与された糖鎖はレーザー照射によるインソース分解 (in-source decay, ISD) や検出までのポストソース分解 (post-source decay, PSD) のいずれによっても脱離しやすく解析が非常に困難になる一因である。ESI-MS や FAB-MS ではネガティブイオンモードで中性糖鎖が解析されることから、MALDI においてもネガティブイオンモードでの解析法の開発が期待されている。MALDI でのネガティブイオンを生成でき得る適切なマトリックス分子の探索が進められており、 β -Carboline alkaloid の一種である harmine や norharman が報告されているが⁸⁾、未だ少ないのが現状である。

8 おわりに

誘導体化法の開発や機器の技術進歩とともに過去には知ることが困難であった糖鎖の構造や量を誰でも分析することが可能になってきた。分子量や構造が不均一で親水性が高い高分子化合物である糖鎖は、酸や酵素分解しない状態では定性・定量分析と相性が悪い化合物である。しかしながら、分析技術の発展とともに糖鎖解析も進化してきており、今後の更なる発展が期待される。

文 献

- 1) KR. Anumula : *Anal Biochem.*, **230**, 24 (1995).
- 2) T. Kato, T. Kinoshita : *Anal Biochem.*, **106**, 238 (1980).
- 3) S. Honda, Y. Matsuda, M. Takahashi, K. Kakehi, S. Ganno : *Anal Chem.*, **52**, 1079 (1980).
- 4) H. Mikami, Y. Ishida : *Bunseki Kagaku*, **32**, 207 (1983).
- 5) 加藤武彦, 飯沼文夫, 木下俊夫 : 日本化学会誌, **1982**, 1603.
- 6) BG.Cho, CD. Gutierrez Reyes, M. Goli, S. Gautam, A. Banazadeh, Y. Mechref : *Anal Chem.*, **94** (44), 15215 (2022).
- 7) S. Zhou, L. Veillon, X. Dong, Y. Huang, Y. Mechref : *Analyst*, **142**, 4446 (2017).
- 8) T. Yamagaki, H. Suzuki, and K. Tachibana : *Anal. Chem.*, **77**, 1701 (2005).



米野 雅大 (KOMENO Masahiro)
東京理科大学薬学部 (〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641)。近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻博士後期課程修了。博士 (工学)。《現在の研究テーマ》糖鎖と生物機能の解析。