

タンパク質についての糖鎖の“つながり方”を見分ける 新解析法を開発

シアル酸結合様式を部位ごとに判別する糖ペプチド解析へー

○ 発表（研究）のポイント

- 体内のタンパク質には「糖鎖（とうさ）」と呼ばれる糖の鎖がついているものが多いです。今回、質量分析という手法を用いてこの糖鎖がついたペプチド（糖ペプチド）を詳しく調べる新しい解析法を開発しました。
- この方法により「どのタンパク質の、どの場所に糖鎖がついているか」に加えて、糖鎖の末端にある「シアル酸」という糖が、どのような向き・つながり方（結合様式）をしているかまで区別できるようになりました。
- 同じ種類・数の糖からできた糖鎖（糖鎖組成）であっても、ついているタンパク質や部位によって、シアル酸のつながり方の割合が異なることが新たにわかりました。
- シアル酸のつながり方の違いは、がんなど様々な病気と関わるということが知られています。今回の成果は、病気を見つけるためのバイオマーカーの発見や、病気の発症や進行のメカニズム解明に役立つと期待できます。

○ 研究内容の概要

タンパク質の糖鎖修飾に含まれるシアル酸は主に $\alpha 2,3$ -結合あるいは $\alpha 2,6$ -結合により付加しています。この違いは生物学的に重要であるにもかかわらず、従来の質量分析を基盤とする糖ペプチド解析法では区別することが困難でした。そこで本研究では、シアル酸結合様式特異的アルキルアミド化法（SALSA: Sialic Acid Linkage Specific Alkylamidation、図 1）を用い、結合様式まで区別できる網羅的な *N* 型および *O* 型糖ペプチド解析法を開発しました。ヒトの血漿タンパク質を解析した結果、同じタンパク質であっても修飾部位によって結合様式のパターンが異なることがわかりました。

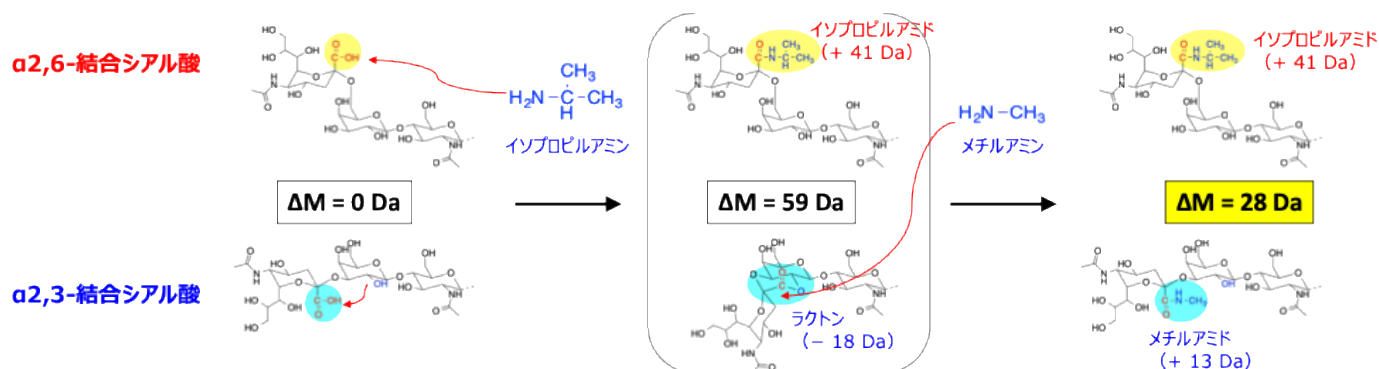


図 1. シアル酸結合様式特異的アルキルアミド化法（SALSA）の概略

○ 研究の目的

糖鎖修飾はタンパク質の翻訳後修飾の一つであり、修飾部位によって *N* 型糖鎖 (*1) と *O* 型糖鎖 (*2) に大別されます。糖鎖の構成成分の一つであるシアル酸 (*3) は $\alpha 2,3$ -結合あるいは $\alpha 2,6$ -結合により付加 (シアリル化) し、この結合様式の違いはウイルス認識やタンパク質代謝などで重要な役割を果たしています。よって、シアリル化糖鎖の生物学的な意義を明らかにするためには、結合様式まで含めて解析することが重要です。液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC-MS/MS、*4) はタンパク質の糖鎖修飾解析において必要不可欠な分析法です。しかしながら、分子量が同じ $\alpha 2,3$ -結合と $\alpha 2,6$ -結合シアル酸を区別することは困難でした。以前、我々のグループは島津製作所との共同研究により *N* 型糖鎖解析に利用できる SALSA の開発に成功していました。そこで本研究では、SALSA を用いた *N* 型および *O* 型糖ペプチド (*5) の網羅的解析法の開発を目的としました。

○ 研究成果の概要

本研究で開発した解析法の概略を図 2 に示します。酵素消化によりタンパク質をペプチドに断片化し、ペプチドに含まれるアミノ基をジメチルラベル化により保護しました。これにより、脱水縮合反応 (*6) である SALSA で生じる副生成物を抑制することができました。その後、SALSA によるシアル酸の誘導体化を行いました。誘導体化後にサンプルを二つに分け、条件の異なる親水性クロマトグラフィーにより *N* 型糖ペプチドと *O* 型糖ペプチドを濃縮して LC-MS/MS を行い、データベース検索により糖ペプチドを同定しました。

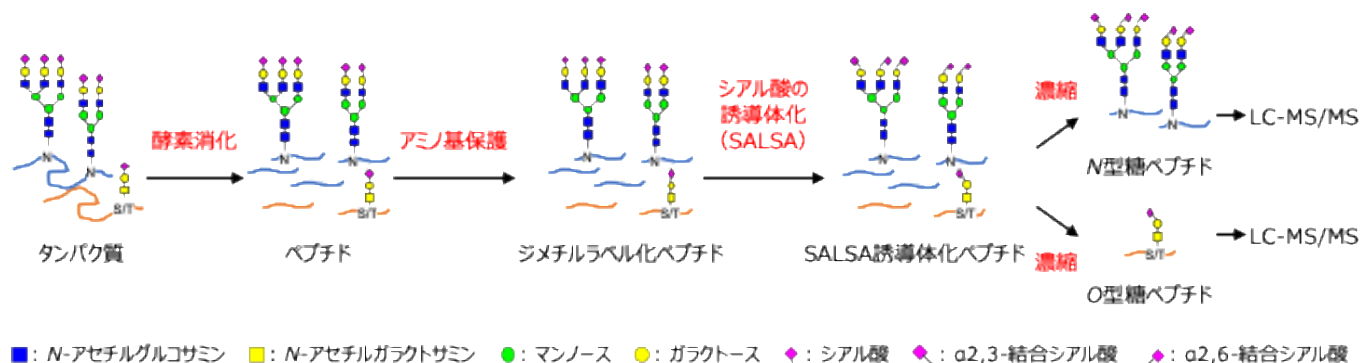


図 2. SALSA を用いた *N* 型および *O* 型糖ペプチド解析法の概略

本解析法を用いてアルブミンと免疫グロブリン G を除去したヒト血漿を解析しました。その結果、79 個のタンパク質に由来する 831 個のシアリル化 *N* 型糖ペプチド、29 個のタンパク質に由来する 75 個のシアリル化 *O* 型糖ペプチドの同定に成功しました。同定されたシアリル化 *N* 型糖ペプチドの中には同じ糖鎖組成でシアル酸結合様式が異なるものが多く同定されていました。三分岐で 3 個のシアル酸を持つ *N* 型糖鎖を例にタンパク質の修飾部位ごとに結合様式の割合を算出したところ、同じタンパク質であっても修飾部位によってシアル酸結合様式の割合が異なっていることがわかりました (図 3 の赤枠)。このような知見はこれまでの糖ペプチド解析法では得られない情報です。

- *4 液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC-MS/MS) : ペプチドの混合物のような複雑なサンプルを液体で分離する液体クロマトグラフィー部分 (LC) と、分子の質量と構造を二段階の質量分析で調べる質量分析部分 (MS/MS) を組み合わせた分析法。
- *5 糖ペプチド : 糖鎖とペプチドが結合した物質の総称。N 型糖鎖を持つものを N 型糖ペプチド、O 型糖鎖を持つものを O 型糖ペプチドと呼ぶ。
- *6 脱水縮合反応 : 二つの分子から水 (H_2O) が抜けて新しい結合を作る化学反応のこと。
(例) カルボキシル基 ($-\text{COOH}$) + アミノ基 ($-\text{NH}_2$) $\rightarrow$ アミド ($-\text{CO}-\text{NH}-$) + 水 (H_2O)

(問い合わせ先)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所
老化機構研究チーム (プロテオーム)

主任研究員 津元 裕樹

電話 : 03-3964-3241

Email : tsumoto@tmig.or.jp