



LC/MSによる糖鎖解析 ー糖ペプチドとオリゴ糖の分析

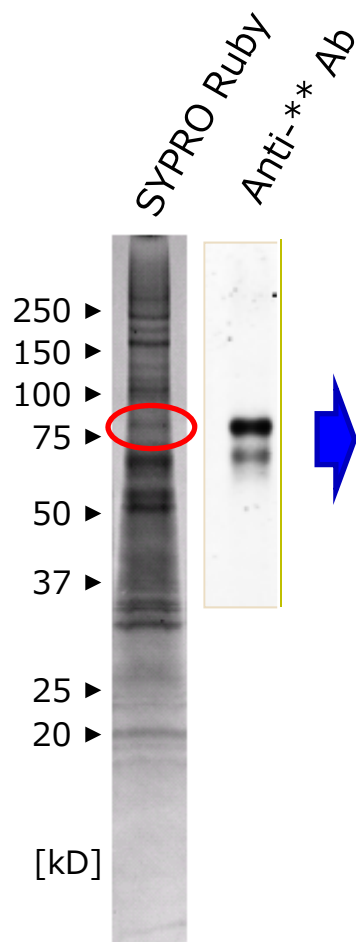
高倉大輔 橋井則貴 川崎ナナ

国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部
(連携) 北海道大学・横浜市立大学

MSによる糖鎖研究支援

1. タンパク質同定
2. 遊離糖鎖の解析
3. 糖ペプチド分析（部位特異的糖鎖解析）
 - a. 精製糖タンパク質
 - b. SDS-PAGEゲル内糖タンパク質
4. GAGオリゴ糖

SDS-PAGEゲル内糖タンパク質解析



タンパク質同定：

イオン化しやすいペプチド2本
同定できればよい

部位特異的糖鎖解析：

すべての糖ペプチドを分析

糖鎖はイオン化効率を低下させる

イオン化効率の悪いペプチドも分析

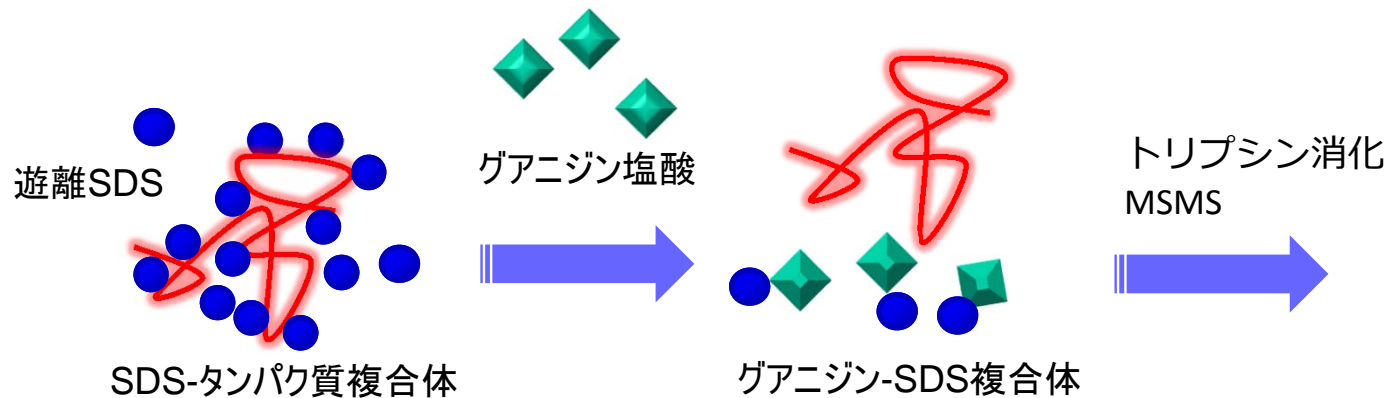
複数の糖鎖が結合している場合がある

不均一が高いとピークが分離し不利

糖ペプチドのゲルからの回収率は悪い

Guanidinium Hydrochloride Improved Method

D. Takakura *et al.* Proteomics, in press



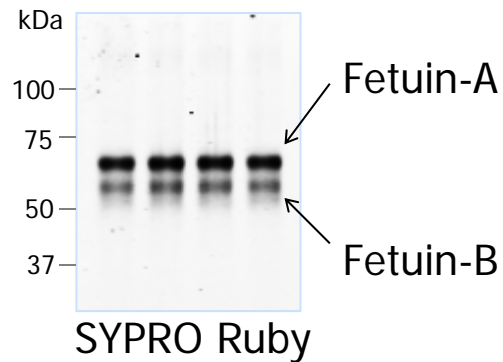
泳動後SDSが残存

- イオン化抑制
- バックグラウンド影響
- 糖鎖ほど影響を受けやすい?
(回収率が悪いわけではない)

タンパク質同定の改善

実測スペクトルと理論スペクトルとのマッチングの質

Fetuin (0.1 μ g) SDS-PAGE



Score (Xcorr)	
- GuHCl	+ GuHCl
158	180

Score (Xcorr)		PSMs	
- GuHCl	+ GuHCl	- GuHCl	+ GuHCl
6	18.6	2.0	6.7

グアニジン塩酸によってMSMSスペクトルの質が向上

糖ペプチドマススペクトルの改善

Alpha 1 –acid glycoprotein (5 *N*-glycosylation sites)

Protein name	aa	Sequence	M.W.	Glycan	MS/MS spectrum		RT (min)		
					-GuHCl	+GuHCl			
Alpha-1-acid glycoprotein 1	52-57	NEEY N K	3000.12	H5N4S2	+	+	6.8		
			3656.35	H6N5S3	+	+	6.8		
			3802.41	H6N5S3F1	+	+	6.8		
	102-108	EN G TISR	3636.39	H6N5S3	+	+	6.8		
			3782.45	H6N5S3F1	+	+	6.8		
			4001.52	H7N6S3	-	+	6.8		
			4292.62	H7N6S4	+	+	6.8		
			4438.68	H7N6S4F1	-	+	6.8		
	87-101	QDQC I Y N TTYLNVQR	4485.79	H6N5S2	+	+	26.2		
			4776.88	H6N5S3	+	+	26.6		
			4922.94	H6N5S3F1	+	+	26.6		
			4850.92	H7N6S2	+	+	26.0		
			4996.98	H7N6S2F1	+	+	26.0		
			5142.01	H7N6S3	+	+	26.4		
Alpha-1-acid glycoprotein 2	58-73	SVQ E IQATFF Y FTP N K	5579.17	H7N6S3F1	+	+	28.0		
			4123.73	H5N4S2	-	+	32.1		
			4488.86	H6N5S2	-	+	31.9		
			4779.95	H6N5S3	-	+	32.5		
			4926.01	H6N5S3F1	-	+	32.5		
			4853.99	H7N6S2	-	+	31.8		
			5145.09	H7N6S3	-	+	32.3		
			5291.14	H7N6S3F1	-	+	32.3		
			5436.18	H7N6S4	-	+	32.8		
			19-42	QIPLCANLVPVPIT N ATLDQITGK	4764.17	H5N4S2	-	+	34.8
			19-38	QIPLCANLVPVPIT N ATLDR	5129.30	H6N5S2	+	+	34.6
					5420.40	H6N5S3	+	+	35.1
					5566.45	H6N5S3F1	-	+	35.0
					4392.96	H5N4S2	-	+	33.8
4758.09	H6N5S2	-			+	33.6			
5049.19	H6N5S3	+			+	34.1			

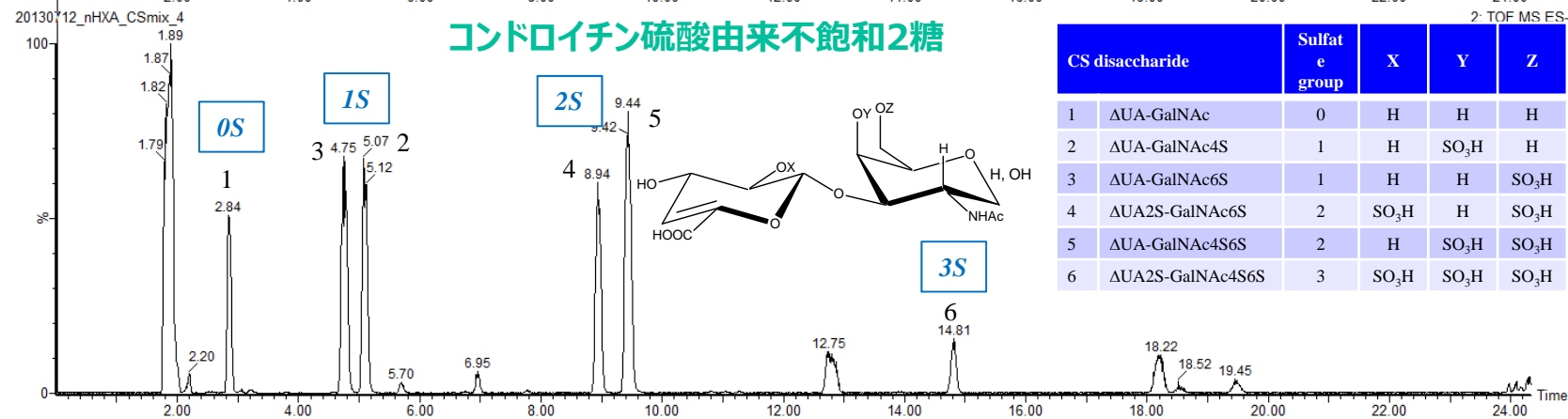
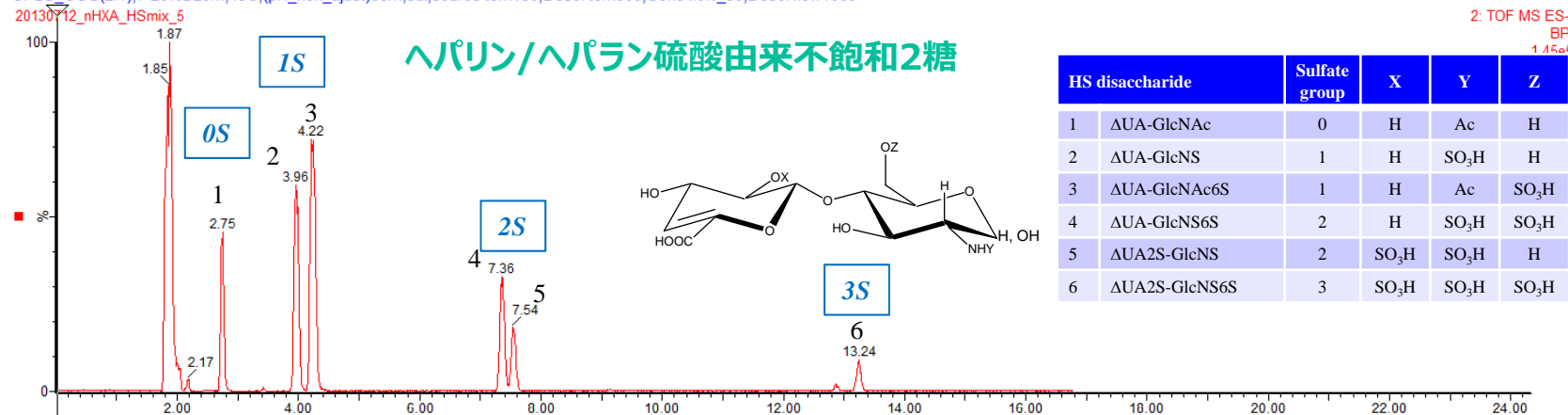
同定された糖ペプチドが増加

LC/MSによるGAGオリゴ等のプロファイリング



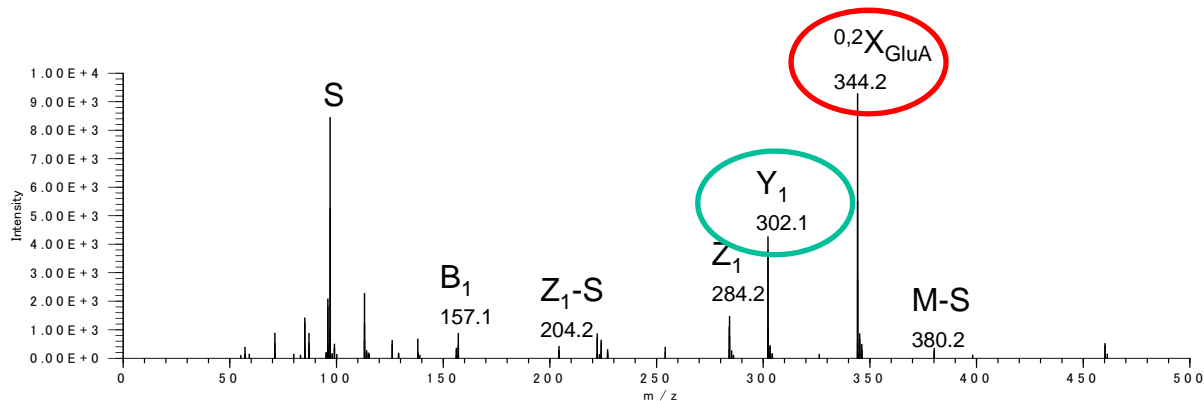
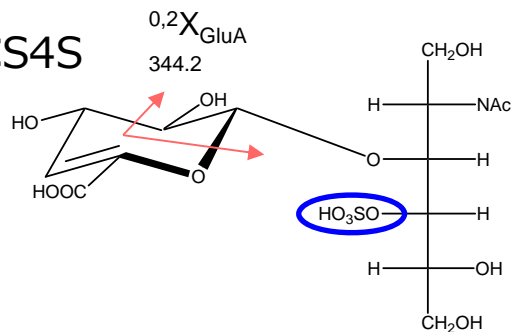
LC: ACQUITY UPLC
 Column: graphitized carbon column(2.1×10 cm)
 MS: Synapt G2S (Waters)
 Polarity: negative ion mode
 Ion pairing reagent: *n*-hexylamine

UPLC_GCC(2.1),7-20%B20m,45C,(pH_non_ajust)60m,5ul,source tem150,Desol tem300,Cone flow_50,Desol flow1000

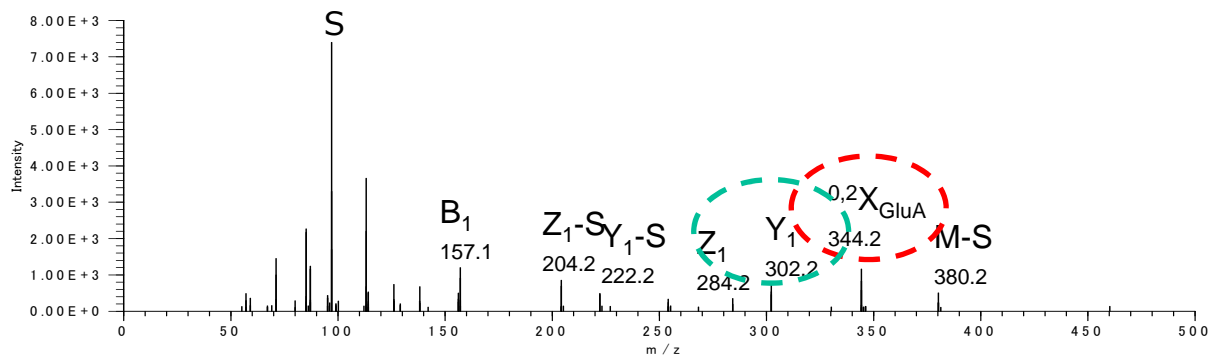
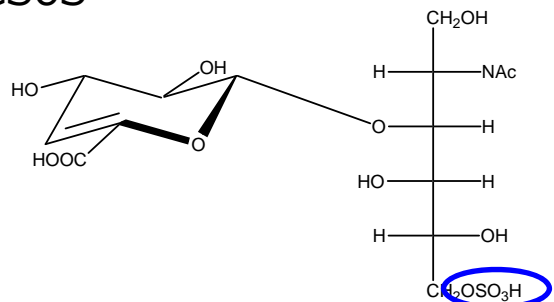


硫酸オリゴ糖の識別 MS/MS

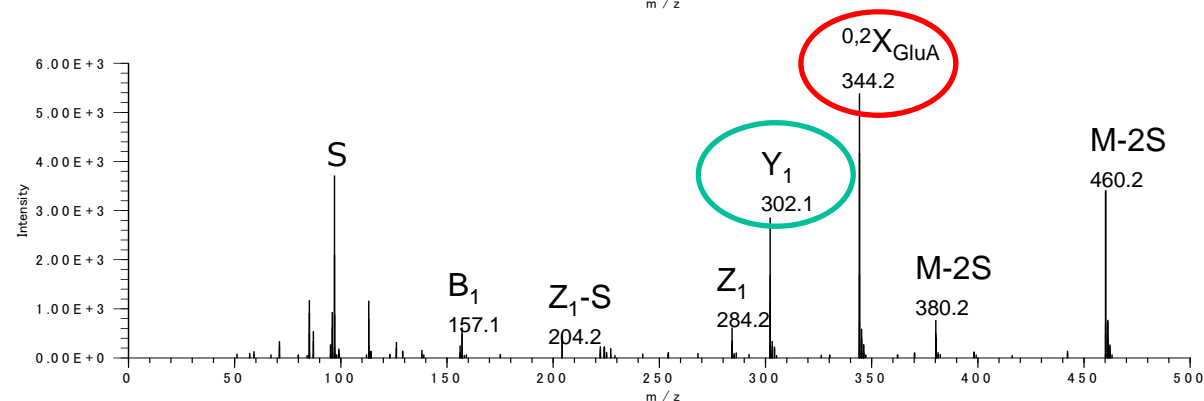
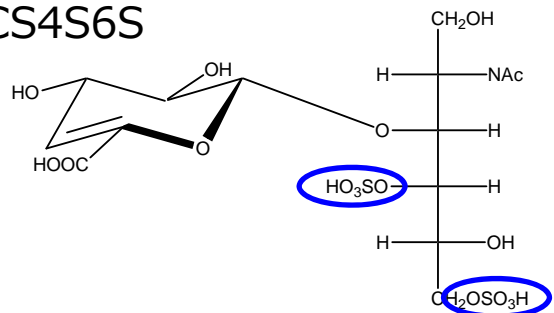
CS4S



CS6S



CS4S6S



まとめ

- グアニジン塩酸を用いたゲル内トリプシン消化法を開発し、糖ペプチドのマススペクトル取得が可能になった。
- GAGオリゴ糖のLC/MS条件を設定した。MSMSにより異性体が識別できる可能性がある。