【研究目的】

本プロジェクトで開発した、①前処理法(F(ab')-PEGビーズ)、②MALDIイオン化法(液体マトリックス)、 ③質量分析装置(DIT-FP機)、④データ解析ソフトウェア(Mass++)から構成される"高感度MALDI分析シ ステム"の性能を、ヒト血漿中のE-cadherin(図1)をモデル試料に用いて評価した。E-cadherinは細胞接着 分子でN型糖鎖をもつ糖タンパク質であり、糖鎖が癌の転移や浸潤などに関係することが知られている。し かしながら、糖鎖の構造は詳細な解析が行われておらず不明な部分が多い。そこで本分析システムを用い てE-cadherinの糖ペプチド分析を行うことで、本システムの実用性を評価した。評価にあたっては、 E-cadherinの糖ペプチドを混合物のまま測定する簡便な"Direct-MALDI分析"とE-cadherinの酵素消化混 合物を液体クロマトグラフィー(LC)で分離・分析する"Advanced Nano-LC/MALDI分析"の2つの分析法を 用いた(図2)。

Signal neotide					N型糖鏡結合部位 (コンセンサス配列)		Transmembrane	
					558 670	622 637		
	Propeptide	Domain 1	Domain 2	Domain 3	N N Domain 4	N N Domain 5		Topological domain
1	23 15	i5					710	882

図1 ヒトE-cadherinの構造

N型糖鎖が結合するコンセンサス配列(Asn-X-Ser/Thr;XはProを除く)が4カ所存在し、558,570,622,637番目のAsn(N) がN型糖鎖の結合部位の候補である。

【研究成果】

方法

試料調製は図2に示すフローで行った。



図2 分析フロー

市販のヒト血漿(E-cadherin含有量:524 ng/mL、コージンバイオ)から抗E-cadherin抗体(F(ab')-PEGビーズ)(図 3)を用いてE-cadherinを分離した。抗E-cadherin抗体からE-cadherinを溶出し、還元アルキル化を行った後、 Endoproteinase Asp-Nを用いて酵素消化を行った。Direct-MALDI分析ではセルロースによる糖ペプチド濃縮を行 い、3-aminoquinoline/*p*-coumaric acid(3-AQ/CA)をマトリックスに用いてDIT-FP機による分析を行った。試料プレ ートはµFocus plate 900 µm(Hudson Surface Technology Inc.)を用いた。Advanced Nano/LC-MALDI分析では、 ナノフローLCを用いて試料を分離し、溶出液をDHBマトリックスがあらかじめ搭載された(プリスポットDHB;スポット 径100 µm)試料プレートに滴下し、DIT-FP機による分析を行った。データ解析にはMass++を用いた。 結果

① F(ab')-PEGビーズの抗原選択性

抗体を用いたタンパク質の精製では、抗体のFc領域と特異的に結合する性質をもつProtein G(あるい はProtein A)ビーズに抗体を結合させた"IgG-Protein Gビーズ"を用いるのが一般的である(図3)。しかし、 Protein G(Protein A)や抗体のFc領域は目的以外のタンパク質と非特異的吸着する性質があるため、目 的タンパクに加えて、夾雑タンパク質も回収されるという問題がある。一方、本プロジェクトで開発した F(ab')-PEGビーズは、Fc領域を持たず、抗原認識領域であるF(ab')のみで構成される。また、ポリエチレン グリコール(PEG:重合度24(PEG₂₄))が親水性であるため、夾雑タンパク質との非特異的吸着が生じ難い という特徴がある。そのため、F(ab')-PEGビーズは生体試料中から高い選択性で目的タンパク質を精製す ることができる利点をもつ。図4にこのF(ab')-PEGビーズによる免疫沈降の結果を示す。



図3 F(ab')-PEGビーズとIgG-Protein Gビーズの模式図

F(ab')-PEGビーズはポリエチレングリコール(PEG:重合度24(PEG₂₄))を磁性ビーズに結合させ、PEG₂₄に市販の抗 E-cadherin抗体(Human E-Cadherin MAb Clone 180215(Cat. No.:MAB1838、R&D systems, Inc.)の抗原認識領域である F(ab')を結合させた。



図4 F(ab')-PEGビーズの抗原選択性

血漿900 µL中のE-cadherinをF(ab')-PEGビーズもしくは通常のIgG-Protein Gビーズで回収した試料を電気泳動した (CBB染色)。F(ab')-PEGビーズで回収した試料はIgG-Protein Gビーズと比較してE-cadherin以外の夾雑タンパク質 が少ないことが分かる。 ② 液体マトリックスによる高感度化

MALDI法においては試料に応じた適切なマトリックスの選択と調製を行うことで、システムの感度を高めることができる。液体マトリックスは高真空中でも液状を維持しており、そのことで多数回のレーザ照射でもイオンが生成するという特徴がある。この液体マトリックスを用いることでE-cadherinに対する感度が向上するかを糖ペプチドで頻用されるDHB(0.5% MDPNAを含む)と比較した。

液体マトリックスとして3-AQ/CAを用いた。試料は1 µgの組み換え型E-cadherin (rE-cadherin; Sino Biological Inc.)を電気泳動し、定法に従ってゲル内酵素消化(Asp-N)した後にセルロース精製により不要 なペプチドを除去した。このようにして得られた試料はさまざまな分子量の糖ペプチド混合物となっており、 これを段階希釈した同一溶液からMALDIプレート(µFocus plate 900 µm)の2カ所に滴下し、一方に 3-AQ/CAをもう片方にDHBを添加した。マススペクトルはMALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)を用いて正イ オンモードで測定した。

3-AQ/CAを用いた場合とDHBを用いた場合のマススペクトルをそれぞれ図5A、図5Bに示す。 E-cadherinの相当量が減少するに従い、測定される糖ペプチドに該当するピーク数も減少している。しかし 3-AQ/CAの場合はDHBと比較すると、より多くのピークが観測されている。このように3-AQ/CAをマトリック スとして用いることでE-cadherinの糖ペプチドに対する感度が向上しており、液体マトリックスが本システム の感度向上に寄与していることがわかった。



図5 3-AQ/CAとDHBの感度比較

組み換え型E-cadherinを電気泳動し、Asp-Nでゲル内消化後セルロース精製した。その試料を図中に示す量に希釈しマトリック スとして3-AQ/CAを用いてMALDI-QIT-TOFMS(正イオン)によるMS測定した(A)。同様にマトリックスとしてDHBを用いて測定し た(0.5% MDPNA含む)(B)。E-cadherinが100 ng相当量の時、3-AQ/CAでは15本の糖ペプチドに由来するピーク(赤印、S/N > 3)が観察されているのに対しDHBでは7本であった。同様に50 ngの時は14本に対して5本、25 ngの時は5本に対して4本、13 ngの時は両方で検出されなかった。

③ Direct-MALDI分析

血漿中のE-cadherin(内在性E-cadherin)を分析するにあたって、事前に組み換え型のE-cadherin (rE-cadherin)を用いて糖ペプチド分析を実施した。糖ペプチドの構造推定は検出されたイオンの質量およ びMS、MS/MS測定で検出される糖のニュートラルロスの情報を用いた。図6に検出されたN型糖ペプチド を示す。次に、血漿500 µLを用いて内在性E-cadherinを分析した結果、m/z 4,500~5,500の質量範囲に 糖のニュートラルロスを示すピーク群が検出された。質量およびrE-cadherinの分析結果から糖ペプチドの 構造を推定した(図7)。組換え型と異なり、内在性E-cadherinからはPep3に由来する糖ペプチドしか検出 できず、内在性E-cadherinは組換え型と糖鎖の付加状態が異なることが示唆された。以上の結果は、 Direct-MALDI分析法を用いた本システムがLCを用いることなく簡便に生体中の糖タンパク質のN型糖ペプ チドを分析できることを示している。



図6 rE-cadherin (1,000 ng) のDIT-FP機 マススペクトル(Direct-MALDI分析) (モード3:*m/z* 1,600-9,000)/ I-TOFモード(正イオン))

Pep2由来の糖ペプチドは検出されず、Pep1およびPep3に由来する糖ペプチドが検出された。糖鎖構造を示していない糖ペ プチドピークは構造が推定できていない。



(モード3:*m/z* 1,600-9,000/ I-TOFモード(正イオン)) 血漿は500 μL使用。質量およびrE-cadherinの分析結果を考慮して糖ペプチドの構造を推定した。血漿中の

E-cadherinからはPep3由来の糖ペプチドのみが検出された。

④ Advanced Nano-LC/MALDI分析

Advanced Nano-LC/MALDI分析では、N型糖ペプチドに加えて、Direct-MALDI分析では検出されなか ったO型糖ペプチドが検出された(図8、図9および表1)。Direct-MALDI分析で利用したセルロースによる糖 ペプチド精製法は簡便ではあるものの、この手法は親水性相互作用を利用して糖ペプチドを回収するため、 親水性の低い糖ペプチドは回収効率が低下する、あるいは回収できない問題を有する。Advanced Nano-LC/MALDI分析では、E-cadherinの酵素消化物を全てLC分析に用いるため、セルロース精製で生 じる糖ペプチドのロスを回避することができる。このことがO型糖ペプチドの検出につながったと考えられる。 E-cadherinIこO型糖ペプチドが存在することはこれまでに報告がなく、本分析システムにより新たに発見さ れた糖鎖修飾となる。なお、Advanced Nano/LC-MALDI分析で10 µLという微量な血漿からE-cadherinの 糖ペプチドを検出できることをも確認している。以上の結果は、Advanced Nano/LC-MALDI分析法を用い た本分析システムが、生体中の糖タンパク質のN型およびO型糖ペプチドを高感度に分析できる能力を有 することを示している。



図8 内在性E-cadherinのDIT-FP機マススペクトルの1例

(Advanced Nano-LC/MALDI分析)

(モード3: m/z 1,600-9,000/ I-TOFモード(正イオン)

血漿は1,000 μL使用。質量およびrE-cadherinの分析結果を考慮して糖ペプチドの構造を推定した。Pep3由来のN型 糖ペプチドに加えて、Direct-MALDI分析では検出されなかったO型糖ペプチド(2種類)が検出された。



図9 Advanced Nano-LC/MALDI分析による内在性E-cadherin分析データのMass++によるヒートマップ表示例 血漿は50 µL使用。DIT-FP機(モード3:*m/z* 1,600-9,000/イオントラップTOFモード(正イオン))で取得したデータを用いて Mass++によりヒートマップを作成した。(A)全体表示。(B)*N*型糖ペプチド検出領域の拡大表示。(C)O型糖ペプチド検出領 域の拡大表示。

表1 検出された内在性E-cadherinの糖ペプチドリスト (Direct-MALDI分析とAdvanced Nano-LC/MALDI分析の比較)

Pep3:618-DLPPNTSPFTAELTHGASANWTIQYN-643 Pep4:443-DFEAKQQYILHVAVTNVVPFEVSLTTSTATVTV-475 Pep5:479-DVNEAPIFVPPEKRVEVSEDFGVGQEITSYTAQEP-513

♦: Sialic acid
●: Mannose
▲: Fucose
■: N-Acetylglucosamine
●: Galactose

種類	構造	Advance LC-M	Direct-MALDI	
		血漿1000 µL	血漿10 µL	血漿500 µL
	Pep3-mooleo	1	1	1
	Pep3	1	1	
	Pep3	1	1	1
	Pep3	1	1	
	Pep3	1	1	1
N	Pep3	1	1	
型糖	Pep 3 poo	1	1	1
ペプ		1	1	
チド	Pep3	1	1	
4	Pep3	1	1	1
	Pep3ma			1
	Pep 3 g	1	1	1
	Pep3	1	1	1
	Pep3-000000000000000000000000000000000000	1	1	
	Pep3 Pep3	1		
0 刑	Pep4 + Hexose × 4	1	1	
土糖ペ	Pep4 + Hexose × 3	1	1	
プエ	Pep4 + Hexose × 2	1		
チド	Pep5 + Hexose × 1	1	1	

【結論】

本プロジェクトで開発した高感度MALDI-MS分析システムを用いてヒト血漿中のE-cadherinの糖ペプチ ド分析を行い、糖鎖構造を解析した。Direct-MALDI分析では多数のN型糖ペプチドを簡便に検出すること ができ、Advanced Nano-LC/MALDI分析では、微量の血漿(10 µL)からN型およびO型糖ペプチドを分析 することができた。血漿中の内在性E-cadherinの糖ペプチドを質量分析した例はこれまでになく、生体試料 の分析に対して本分析システムの性能が実用レベルにあることが示された。本分析システムを分析対象試 料に応じてカスタマイズすることによって、他の様々なバイオマーカー分析への応用が可能となる。

【参考文献】

[1] Salomé S. Pinho, Hugo Osório, Mihai Nita-Lazar, Joana Gomes, Célia Lopes, Fátima Gärtner, Celso A. Reis. Role of E-cadherin N-glycosylation profile in a mammary tumor mode. Biochemical and Biophysical Research Communications 379 1091 (2009).