

# Advanced-nano-LC/MALDI-MSを用いた血漿中の糖タンパク質E-カドヘリンの糖ペプチド分析 Glycopeptide analysis of E-cadherin glycoprotein from human plasma with high sensitive advanced-nano-LC/MALDI-MS system

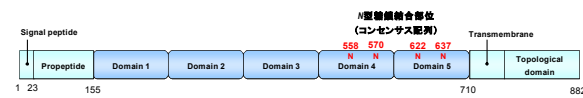
○関谷禎規・金子直樹・谷村里都子・日置雄策・児嶋浩一・岩本慎一・田中耕一 (株)島津製作所 田中最先端研究所



Sadanori Sekiya, Naoki Kaneko, Ritsuko Tanimura, Yusaku Hioki, Koichi Kojima, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka Koichi Tanaka Laboratory of Advanced Science and Technology, Shimadzu Corporation

## 1. Introduction

MALDI-MSは、プロテオミクスやグリコミクス分野において強力な分析ツールである。多種多様な成分が含まれる生体試料のMALDI-MS分析では、LCとMALDIをオフラインで接続したLC/MALDI-MSが用いられている。我々はこれまでに、①nano-LC ②ナノリットルレベルの微量滴下を実現するnano-LC用カラム一体型スポットングプレート(カラムプローブ)、③微小なDHB結晶を親水性アンカーとした高濃縮試料プレート、から構成される高感度nano-LC/MALDI-MS (Advanced-nano-LC/MALDI-MS) システムを開発した<sup>1)</sup>。今回我々は、開発したAdvanced-nano-LC/MALDI-MSを用いて、ヒト血漿中の糖タンパク質である内在性E-カドヘリンをモデル試料として糖ペプチド分析を行った。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、糖鎖の構造については詳細な解析が行われておらず不明部分が多い。また、E-カドヘリンの糖ペプチドを混合物のまま測定する簡便な“Direct-MALDI分析”との比較も行った。

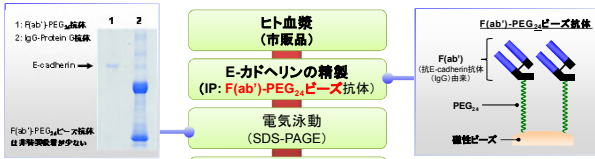


Asp-N消化で生成する糖鎖結合部位を含むペプチド配列

- Peptide-1 (Pep1): 552-DFEHVKNSTYTLALIA-567
- Peptide-2 (Pep2): 569-DNGSPVATGTGTLILLIS-586
- Peptide-3 (Pep3): 618-DLPPNTSPPTAELTHGASANWTIQYN-643

Figure 1. E-カドヘリンの構造図

## 2. Experimental Section



### Direct-MALDI

- セルロース処理(糖ペプチド精製)
- 3-AQ/CA(液体マトリックス)
- MALDI-DIT-TOFMS

### Advanced Nano-LC/MALDI

- 逆相HPLC
- カラムプローブ
- プリスポットDHB
- MALDI-DIT-TOFMS

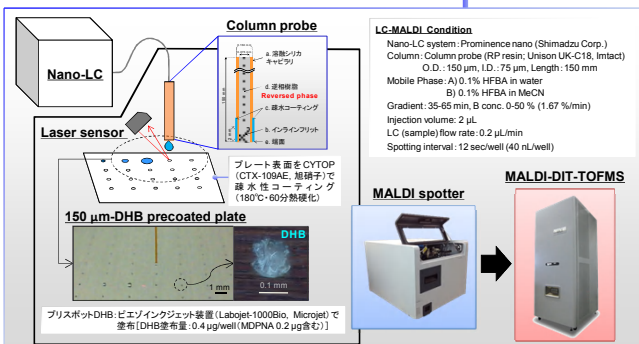


Figure 2. Advanced Nano-LC/MALDI-MS system

## 3. Results and Discussion

### 3-1. Direct-MALDI分析

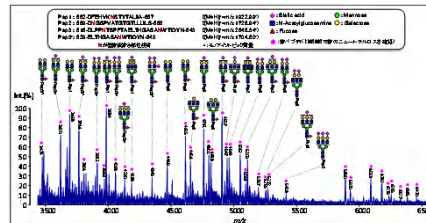


Figure 3. 組換え型E-カドヘリン(1000 ng)のマスマスペクトル

▶ 参照データとして、市販の組換え型E-カドヘリンの糖ペプチド分析を実施し、その解析結果を踏まえて内在性E-カドヘリンの糖ペプチド構造を推定した。

▶ 組換え型E-カドヘリンではpeptide-1およびpeptide-3由来の糖ペプチドが検出された。また、m/z 5800~6500付近にも糖ペプチドが検出されたが、構造は推定できていない。

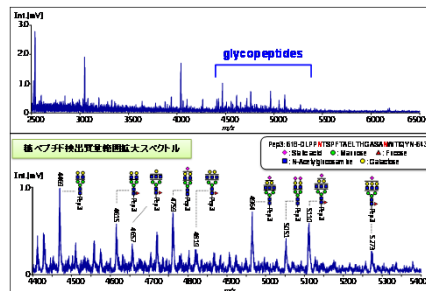


Figure 4. 内在性E-カドヘリン(血漿500 μL)のマスマスペクトル

▶ 内在性E-カドヘリンではpeptide-3由来の糖ペプチドのみが検出された。

## 4. Conclusion

- 開発したAdvanced Nano-LC/MALDIシステムを用いて、極微量の血漿(1 μL)からでもE-カドヘリンの糖ペプチド(O型糖ペプチド)を検出することができた。
- 血漿中のE-カドヘリンの糖ペプチドを質量分析した例はこれまでになく、本分析システムが生体試料の分析に対して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応用することができる。

## References

[1] Hioki Y et al. Anal. Chem. 2014, 86, 2549 - 2558

### 3-2. Advanced-Nano-LC/MALDI分析

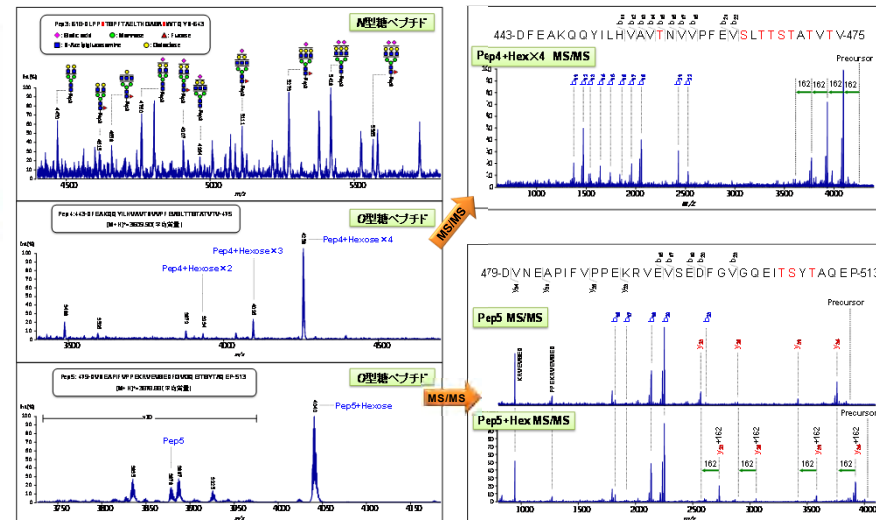


Figure 5. 内在性E-カドヘリン(血漿1000 μL)のマスマスペクトル

Figure 6. O型糖ペプチド(2種)のMS/MSマスマスペクトル

▶ 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型糖ペプチドも検出された。O型糖ペプチドのMS/MSも実施したが、糖鎖結合部位の同定には至らなかった。

▶ E-カドヘリンのO型糖ペプチドについては、我々の知る限り報告例は無く、今回が初めての解析例となる。

▶ m/z 6000~8000の範囲にも糖ペプチドと考えられるイオンピークが確認されたが、構造は推定できていない。

Table 1. 検出したE-カドヘリン糖ペプチドリット

糖型	構造	Advanced Nano-LC-MALDI				Direct-MALDI
		血漿 1000 μL	血漿 10 μL	血漿 1 μL	血漿 500 μL	
N型糖ペプチド	Pep3+HexX4	✓	✓	—	✓	
	Pep3+HexX3	✓	—	—	—	
	Pep3+HexX2	✓	—	—	—	
	Pep3+HexX1	✓	—	—	—	
	Pep3+Hexose X4	✓	—	—	—	
	Pep3+Hexose X3	✓	—	—	—	
	Pep3+Hexose X2	✓	—	—	—	
	Pep3+Hexose X1	✓	—	—	—	
	O型糖ペプチド	Pep4+Hexose X4	✓	✓	—	—
		Pep4+Hexose X3	✓	—	—	—
Pep4+Hexose X2		—	—	—	—	
Pep5+Hexose X1		✓	✓	✓	—	
Pep5+Hexose X2		—	—	—	—	

▶ Peptide-5由来のO型糖ペプチドに関しては血漿 1μLからでも検出できており、Advanced Nano-LC/MALDI分析が高感度であることが示された。

▶ 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が、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率が低下する。あるいは回収できない問題を有する。一方、Advanced Nano-LC/MALDI分析では、E-カドヘリンの酵素消化物を全てLC分析に用いるため、セルロース精製のような糖ペプチドのロス回避することができる。

## Acknowledgements

本研究は、日本学術振興会の最先端研究開発支援プログラムにより、助成を受けたものである。