

4P084

## N-アセチルノイラミン酸ラクトース異性体のエレクトロスプレー イオン化マスペクトルにおけるフラグメンテーションの理論的研究

(奈良女大理\*, AIST\*\*, CREST-JST\*\*\*, 大阪母子センター\*\*\*\*)

竹内孝江\*\*\*, 田尻道子\*\*\*, 和田芳直\*\*\*\*

**【序】**糖ペプチドは生命現象に深い関わりのある生体分子であり、その構造解析は病態の解明や新薬開発のために重要である。ソフトイオン化の開発により生体高分子のイオン化が可能になり、質量分析法は、高感度、高精度で迅速な同定法として糖ペプチドなどの構造解析には必要不可欠な方法である。マスペクトルから分子の構造情報を得るためには、分子イオンにフラグメンテーションを起こさせ、生成したフラグメントイオンの質量から元の分子構造を推定することが必要であるが、糖鎖や糖ペプチドのマスペクトルで観測されるイオンのフラグメンテーションを予測できる統一的な理論はまだ完成されていない。多くの場合、実測のマスペクトルを経験に基づいて解析しているのが現状である。オリゴ糖や糖鎖のマスペクトルのフラグメンテーションは今までに多くの研究グループによって報告されており、また、糖鎖構造解析に関しては産業技術総合研究所が中心となって実験的、理論的研究が進んでいるが、糖ペプチドの理論予測には到っていない。これは、アミノ酸を基本としたポリペプチド鎖やタンパクのシーケンスを予測するプログラムが開発され、改良されているのと比べて対照的である。

そこで私達は、糖ペプチドや糖鎖のフラグメンテーションを統一的に予測する理論の構築を行うために、まず、糖ペプチドの部分構造である aspartoylglycosylamine のプロトン化分子 ( $[\text{GlcNAcAsn} + \text{H}]^+$ )、およびシアル酸を部分構造にもつ sialylgalactopyranose の Na イオン付加分子 ( $[\text{Neu5Ac-Gal} + \text{Na}]^+$ 、 $[\text{Neu5AcGal} - \text{H} + 2\text{Na}]^+$ )、3'-sialyllactose (3'-SL, Neu5Ac  $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3 Gal  $\beta$ 1-4 Glc)、6'-sialyllactose (6'-SL, Neu5Ac  $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 6 Gal  $\beta$ 1-4 Glc) のプロトン化分子および Na イオン付加分子のポテンシャルエネルギー曲線を *ab initio* 分子軌道法および密度汎関数理論 (DFT)法を用いて計算し、その結果からフラグメンテーション過程を解明し報告した。<sup>1,2)</sup> 本研究では 3'-sialyllactose (3'-SL, Neu5Ac $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1-4 Glc)、6'-sialyllactose (6'-SL, Neu5Ac $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 6Gal $\beta$ 1-4 Glc) の正イオンおよび負イオンからのフラグメンテーション過程を、*Ab initio* 分子軌道法および密度汎関数理論(DFT)法を用いて理論的に検討した。

**【実験方法】**nano-ESI または MALDI でプロトン化分子またはナトリウムイオン付加分子を生成させ、CID の衝突エネルギーを変化させてエネルギー依存性を観測した。

**【計算方法】**フラグメンテーション反応の始状態である 3'-Sialyllactose および 6'-Sialyllactose のプロトン化分子および Na<sup>+</sup>付加分子、反応中間体イオン、遷移状態イオン、生成物イオンの最適化構造とエネルギーを B3LYP/6-31+G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) を用いて計算した。<sup>3)</sup> 数多

くのコンホーマーが存在するので可能な安定なコンホーマーのすべてについて理論計算を行った。また、可能と考えられるフラグメンテーション過程のポテンシャルエネルギー曲面を計算した。振動解析計算により、計算で求められた平衡構造が安定構造と遷移状態構造のどちらであるのかを確かめた。また、中程度の大きさの糖鎖や糖ペプチドイオンの計算が可能である半経験的 PM3 および PM5 分子軌道法を用いて、同様のフラグメンテーション過程のポテンシャルエネルギー曲面を計算した。これらの半経験的方法による計算結果を *Ab initio* 計算の結果と比較して、半経験的分子軌道計算によるフラグメンテーション解析の妥当性と適用範囲も検討した。

**【結果と考察】** *Ab initio* 計算によって求められたエネルギー的に安定な 5 個の 6'-Sialyllactose のプロトン化分子コンフォーマーでは、Sialyl 基はラクトース部分と比較的近い位置にあり、N-acetyl 基はグルコース部分の CH<sub>2</sub>OH 基と近い位置にあった。一方、linear 構造のコンフォーマーのエネルギーは、上述のコンフォーマーのエネルギーよりも高く、より不安定であることがわかった。

Sialyllactose の Na<sup>+</sup>付加分子の安定構造では、Na<sup>+</sup>は 1 個以上の官能基(ヘテロ原子)と相互作用し、弱く結合していた。複数個のヘテロ原子と 1 個の Na<sup>+</sup>との間の弱い結合のために、Sialyllactose の Na<sup>+</sup>付加分子は安定で、分解しにくいと考えられた。

ポテンシャルエネルギー曲面の計算結果から、シアル酸部とラクトースの間のグリコシド結合の開裂の障壁エネルギーは小さく、このグリコシド結合は開裂しやすいことがわかった。

#### 【参考文献】

- 1) (a) T. Takeuchi, S. Akiuchi, R. Kiyama, M. Tajiri, and Y. Wada., 53rd ASMS Conference, 2005, 033; (b) T. Takeuchi, M. Tajiri, and Y. Wada., 54th ASMS Conference, 2006, WP19-354.  
(c) T. Takeuchi, A. Nakao, M. Tajiri, and Y. Wada., 55th ASMS Conference, 2007, TPK205.
- 2) 竹内孝江,田尻道子,和田芳直, 第 54 回質量分析総合討論会(2006), 2F-P-45.
- 3) Gaussian 03, Revision B.05, M. J. Frisch et al., Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.