

奨励賞

山垣 亮氏 (東京大学大学院理学系研究科, 博士(理学))



〔業績〕 ポストソース分解法による糖鎖構造の研究

山垣 亮氏は1996年埼玉大学大学院理工学研究科修士課程生化学専攻を修了後、同博士課程に進学。1999年に埼玉大学より博士を取得後、日本学術振興会博士特別研究員(PD)を経て、1999年8月には東京大学大学院理学系研究科化学専攻助手に採用され、現在に至っている。学生当時は前田昌徹埼玉大学名誉教授の下で糖鎖構造の研究を行うとともに、つくば市の(独)産業技術総合研究所にて中西洋志室長の下、高分解能NMRやMALDI-TOFMSなど、その当時最新の分析装置を駆使し、糖鎖の立体構造に関する研究を行った。それまで質量分析法による糖鎖の構造解析には負イオンFAB-MSおよびCID法の利用が一般的であったが、山垣氏はナトリウムイオン付加分子がMALDI-TOFMSで高強度に観測できること、およびCID法に代わるポストソース分解(PSD)法が構造異性体の解析に有用であることに着目した。特に米国ジョンズ・ホプキンス大のコッターらが開発したCurved-field reflectronを用いたPSDスペクトルの生成イオンパターンから、これまで識別の困難であった糖鎖構造異性体の識別に成功した。1999年、埼玉大学より「MALDI-TOF質量分析法及び高分解能NMRスペクトル法による糖鎖構造の研究」によって博士(理学)の学位を授与され、その後現在まで一貫して糖鎖の構造研究を続けている。

糖鎖はタンパク質や核酸などと異なり、その構造は極めて複雑で、(1)多様な分岐異性体と(2)種々の結合様式を有し、糖鎖の機能発現に重要な役割を果たしている。この構造の多様性が質量分析法による糖鎖解析において大きな障害となっていたが、山垣氏は糖鎖構造とPSDスペクトルの生成イオンパターンとの関係を綿密に解析し、以下の研究成果と同時にPSD法による新たな糖鎖構造解析法への道を拓いた。

(1) PSD法を用いたオリゴ糖分岐異性体の構造解析

高度分岐オリゴ糖では質量の全く同じ分岐異性体が存在する。これらの分岐異性体をPSD法で解析し、生成イオンのピーク強度と異性体構造との関係を詳細に解析した。その結果、同じ質量の生成イオンが生じるには異性体によってグリコシド結合の切断箇所数が異なり、そのことがPSDの生成イオン強度に大きく影響していることを明らかにした。

また、微細な構造の違いをもつ糖鎖の中には、PSD法においても構造の識別が極めて困難なものも存在する。山垣氏はPSDの原因の中で、MALDIにおけるレーザー照射後の爆発で分子同士が衝突して起こるCIDの仮説に注目し、加速電圧を変化させ、衝突エネルギーを変えるとPSDの生成イオンの強度が変化することを確かめた。これにより、それまでPSD法では差異の認められなかった微細な構造上の違いをピーク強度の違いとして観測することに成功した。

(2) PSD法を用いた糖鎖結合様式の解析

糖鎖はタンパク質や核酸などと異なり、種々の結合様式をもち、それらは細胞認識や生理活性発現と密接に関係する。質量分析法による結合様式の決定は困難な問題の一つであったが、山垣氏はPSDの生成イオンの強度を系統的に比較することで、PSD法を用いるグリコシド結合の開裂から糖鎖結合様式の新規解析法を提出した。例えば、 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合と $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合とを比較すると $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合が開裂しやすいことを見いだした。この結果は種々の糖鎖についても同様の傾向が観測できたことから、PSD法に一般的な傾向であることを確認した。さらに、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合と $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合とでは、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合が $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合よりも開裂しやすいことを見いだした。以上、一連の研究から糖鎖結合様式につき、開裂しやすさの順序として $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合 $>$ $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合 $>$ $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合の関係を得た。この関係は、糖鎖結合様式の解析に有用であるだけでなく、アノメリック位における立体配座の違いについても α 結合 $>$ β 結合の関係に導く。山垣氏はこのほかの結合様式についても研究を行っており、現在もPSD法による糖鎖結合様式の決定法の確立を目指し、さらなる系統的研究を進めている。

これら山垣氏のユニークな研究手法は国際的評価も高く今後の発展も期待されることから、2003年度日本質量分析学会奨励賞にふさわしいと認められた。

主要文献リスト

- 1) T. Yamagaki and H. Nakanishi, Negative-mode matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of maltoheptaose and cyclomaltooligosaccharides. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **50**, 204–207 (2002).
- 2) T. Yamagaki and H. Nakanishi, Ion intensity analysis of post-source decay fragmentation in curved-field reflectron matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of carbohydrates: For structural characterization of glycosylation in proteome. *Proteomics*, **1**, 329–339 (2001).
- 3) T. Yamagaki and H. Nakanishi, Distinguishing of linkage isomers of lactotetra oligosaccharides by using the relative ion intensity analysis of post-source decay fragment ions in curved-field reflectron matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Sci.*, **17**, 83–87 (2001).
- 4) T. Yamagaki and H. Nakanishi, Post-source decay fragmentation analyses of linkage isomers of Lewis-type oligosaccharides in curved-field reflectron MALDI-TOF mass spectrometry; Combined in-source decay/post-source decay experiments and relative ion intensity analysis. *J. Mass Spectrom.*, **35**, 1300–1307 (2000).
- 5) Y. Feng, Y. G. Joh, K. Ishikawa, H. Ishida, S. Ando, T. Yamagaki, H. Nakanishi, S. G. Cao, I. Matsui, and Y. Kosugi, Thermophilic phospholipase A2 in the cytosolic fraction from archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **77**, 1147–1152 (2000).
- 6) M. Nakagawa, T. Yamagaki, and H. Nakanishi, Fluorescent modification for peptide sequencing by post-source decay MALDI mass spectrometry. *Electrophoresis*, **16**, 1651–1652 (2000).
- 7) T. Yamagaki, A new analytical method for oligosaccharides and glycoconjugates using post-source decay fragmentation by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Trends in Glycosci. Glycotechnol.*, **11**, 227–232 (1999).
- 8) T. Yamagaki and H. Nakanishi, A new technique distinguishing $\alpha 2 \rightarrow 3$ sialyl linkage from $\alpha 2 \rightarrow 6$ linkage in sialyllactoses and sialyl-*N*-acetylglucosamines by post-source decay fragmentation method of MALDI-TOF mass spectrometry. *Glycoconj. J.*, **16**, 385–389 (1999).
- 9) T. Yamagaki and H. Nakanishi, Influence of acceleration voltages on relative ion intensities in the post-source decay fragmentation of isomeric cyclic oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 2199–2203 (1999).
- 10) T. Yamagaki, A new technique of carbohydrate analysis using post-source decay fragmentation by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *分析化学*, **48** (10), 949–950 (1999).
- 11) T. Yamagaki, Y. Mitsuishi, and H. Nakanishi, Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by the post-source decay fragmentation method of MALDI-TOF mass spectrometry: Influence of the degree of substitution by branched Gal, Xyl, and Fuc on the fragment ion intensities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2470–2475 (1998).
- 12) T. Yamagaki and H. Nakanishi, Influence of stereo-isomeric glucose, galactose, and mannose residues on fragmentation at their glycosidic linkages in post-source decay fragment analyses for oligosaccharides using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 1069–1074 (1998).
- 13) T. Yamagaki, Y. Mitsuishi, and H. Nakanishi, Determination of structural isomers of xyloglucan octasaccharides using post-source decay fragment analysis in MALDI-TOF mass spectrometry. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4051–4054 (1998).
- 14) J. B. Lee, T. Yamagaki, M. Maeda, and H. Nakanishi, Structural study of rhamnan sulfate from the cell wall of *Monostroma latissimum*. *Phytochemistry*, **48**, 921–925 (1998).
- 15) T. Yamagaki, Y. Mitsuishi, and H. Nakanishi, Influence of different glycosidic linkages on relative ion intensities in post-source decay fragmentation of xyloglucan hepta-oligosaccharide

- using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 307–311 (1998).
- 16) T. Yamagaki, Y. Mitsuishi, and H. Nakanishi, Post-source decay fragment analysis of a highly branched nonasaccharide of xyloglucan using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Chem. Lett.*, 57–58 (1998).
 - 17) Y. Momose, N. Fujii, T. Kodama, T. Yamagaki, H. Nakanishi, and M. Kodama, Specific racemization of the aspartyl residue of A-crystallin in aged mouse lenses. *Viva Origino*, **26**, 329–340 (1998).
 - 18) T. Yamagaki, Y. Mitsuishi, and H. Nakanishi, Structure analyses of xyloglucan heptasaccharide by post-source decay fragment method using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1411–1414 (1997).
 - 19) T. Yamagaki, Y. Ishizuka, S. Kawabata, and H. Nakanishi, Analysis of glycosidic linkages in saccharide compounds by post-source decay fragment methods in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 527–531 (1997).
 - 20) N. Fujii, Y. Momose, M. Yamasaki, T. Yamagaki, H. Nakanishi, T. Uemura, M. Takita, and I. Ishii, The conformation formed by the domain after alanin-155 induces inversion of aspartic acid-151 in A-crystallin from aged human lenses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 918–923 (1997).
 - 21) T. Yamagaki, M. Maeda, K. Kanazawa, Y. Ishizuka, and H. Nakanishi, Structures of *Caulerpa* cell wall microfibril xylan with detection of β -1,3-xylooligo-saccharides as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1222–1228 (1996).
 - 22) T. Yamagaki, Y. Ishizuka, S. Kawabata, and H. Nakanishi, Post-source decay fragment spectra of cyclomalto-octaose and branched cyclomalto-hexaose by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1887–1890 (1996).