

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06991

研究課題名(和文)糖鎖アトラス作成のための網羅的な糖鎖解析技術の開発とデータの収集および公開

研究課題名(英文)Development of methods for making glycan atlas, and data collection for database publishing

研究代表者

長束 俊治(Natsuka, Shunji)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00243163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖の構造と発現量の網羅的データベースである糖鎖アトラスを作成するための手法を種々の存在形態の糖鎖分子にも適応できるようにした。そしてその手法を用いてゼブラフィッシュの胚発生時期における糖鎖構造の変遷を網羅的に分析することに成功し、その一部は既に論文として発表した。一方、糖タンパク質標品や動物組織の網羅的糖鎖構造解析を行って構造と発現量に関するデータを蓄積することにも成功し、それらのデータを二次元糖鎖マップに編集してインターネット上で公開した。本研究により、マウスの糖鎖アトラスさらにはヒトの糖鎖アトラス作成のための技術的問題点を克服することに成功した。

研究成果の概要(英文)：A preparing method for glycan atlas, which is a comprehensive database of glycan structure and expression level, was adapted to glycan molecules of various forms. Using this method, we succeeded in comprehensively analyzing the changes in glycan structure during the embryonic development of zebrafish, and some of these results have been published. On the other hand, we also succeeded to accumulate data on structure and expression level by analyzing glycan structure of glycoproteins and animal tissues and published on internet as 2 dimensional glycan maps. This study overcame the technical problems for producing of mice and human glycan atlases.

研究分野：機能生物化学

キーワード：糖鎖 グライコーム 網羅的解析 データベース

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は第三の生命鎖と呼ばれ、その構造多様性から様々な機能が予測されているが、未だ不明な部分が多かった。糖鎖の機能解明が進んでいない大きな理由の一つに構造分析の難しさがあった。これに対して研究代表者は、長年にわたって糖鎖構造解析の手法開発を行ってきた()。しかし、構造解析を専門としない研究者が複雑な糖鎖構造を一から分析するには多大な労力が必要であり、構造機能相関の解析が手軽に行える状況にはなかった。そこで研究代表者は、どの部位にどのような構造の糖鎖がどれだけ発現しているのかを示したデータベースがあれば、糖鎖解析の手間が大幅に削減でき、機能研究の飛躍的な進展が期待できるとの着想に至った。

この着想を具体化するために、生物種が持つ糖鎖の全体像を描いた見取り図である糖鎖アトラスの作成に着手した。本研究開始当初までの研究で、糖タンパク質がもつ *N*-結合型糖鎖の網羅的解析手法を確立し、ヒトの血清を分析して得られた糖鎖情報をまとめ、論文として報告していた()。その成果は、新聞(科学新聞他)やテレビニュースなどでも取り上げられた。またインターネット上で、それまでに得られた糖鎖情報を広く公開しており、糖鎖アトラス作成のための最初のステップをすでに踏み出していた。

一方、国内外の他の研究グループによって類似の発想の元に行われている研究もあったが、本研究は、糖鎖の特徴である多数のアイソマー構造の分別決定や定量精度において他のグループよりも優れていた。これらのことから糖鎖アトラスは、最も優れしかも実用性の高い糖鎖データベースとなることが期待できた。

2. 研究の目的

本研究では以下の項目の開発研究を行うことで網羅的な糖鎖解析を実現し、さらに得られた糖鎖情報を論文とインターネット上で公開することを目的としている。

(1) 細胞内には機能道であるが相当量(1 μ M)の遊離糖鎖が存在している。他の糖鎖種と同様に構造は多様であり、生理機能も示唆されている。しかし細胞由来の試料にはグルコースのオリゴ糖が大量に含まれており、従来法では解析が妨害される難点があった。そこで本研究では、アミラーゼやグルコアミラーゼなどのグルコシダーゼを用いてグルコースオリゴ糖を分解することにより、細胞内遊離糖鎖の詳細な構造解析を可能にすることを目指した。

(2) *O*-結合型糖鎖の代表であるムチン型糖鎖は、タンパク質からの遊離時に従来法では糖鎖の分解反応を多く伴うことが最大の難点であった。糖タンパク質糖鎖の中でもムチン型糖鎖は特に不安定であり、現在用いられている条件下では20~50%が、主にピーリング反応により分解してしまう。しかも本研究の

標的である組織サンプルを用いた場合には、精製された糖タンパク質よりも、個の分解はさらに顕著になることが知られていた。これに対して研究開始当時、カルシウムなどの2価金属イオンの除去によって劇的に分解反応が抑えられることが報告された()。そこで我々の手法にそれを応用することによって、ムチン型糖鎖を含む *O*-結合型糖鎖の精細な構造解析を可能にすることを目指した。

(3) 種々の生体試料に対して、本研究で構築した手法を用いて網羅的糖鎖構造解析を行い、得られたデータを公開することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 遊離オリゴ糖調製法の改良

遊離オリゴ糖を水抽出により生体サンプルから抽出した後、エンド型およびエキソ型の種々のグルコシダーゼ処理を単独および組み合わせで検討した。評価には目的の遊離オリゴ糖の収率、網羅性、およびグルコースオリゴ糖の除去効率を指標とした。

(2) ムチン型糖鎖調製法の改良

ムチン型糖鎖をヒドラジン処理によりタンパク質から切り出す前に、サンプルを EDTA、EGTA、カルボン酸を含む種々の有機酸あるいはそれらのナトリウム塩で処理した。手法の評価には、ムチン型糖鎖の分解率の低減と収率を指標とした。

(3) ゼブラフィッシュ胚の糖鎖解析

従来法()に従いゼブラフィッシュの受精卵を培養することにより、特定の発生時間の胚を得た。卵膜と卵黄を除いた胚からヒドラジン処理により糖鎖を切り出した。糖鎖を蛍光標識した後、数種の HPLC と質量分析器を用いて構造を解析した。その際、ムチン型糖鎖と遊離糖鎖調製には、本研究で確立した改良法を用いた。

(4) 2次元マップの作成()

個々の蛍光標識糖鎖の逆相 HPLC とサイズ分画 HPLC における溶出時間を逆相スケール値またはグルコースユニット値にそれぞれ換算した。逆相スケール値を横軸、グルコースユニット値を縦軸にとり、2次元の散布図として示した。このマップ上での位置を比較することにより迅速かつ簡便に糖鎖の構造を予測することができる。

(5) ヤツメウナギの糖鎖解析

ヤツメウナギを解剖して脳、消化管、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、精巣を摘出しゼブラフィッシュ胚の場合と同様にして *N*-結合型糖鎖の構造解析を行った。

(6) マウス臓器の糖鎖解析

8週令の ICR マウスから脳、腎臓、肝臓、血清を調製し、ゼブラフィッシュ胚の場合と同様にして *N*-結合型糖鎖の構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 糖鎖調製法の改良に関する成果

細胞内遊離糖鎖の調製の際、グルコースオリゴ糖の混入が分析を妨げ分析法の感度を著

しく下げる原因となっていた。これに対して本研究において、グルコース分解酵素を組み合わせてグルコースオリゴ糖を除去する手法を検討した結果、グルコアミラーゼと α -アミラーゼを共に作用させた時に効率よく除去できることを見出した。これにより細胞内遊離糖鎖の効率的かつ高感度な分析が可能となった。

ムチン型糖鎖の構造解析において、ピーリング反応による糖鎖の分解が大きな問題であった。特に生体組織等を用いた場合、分解率は上昇するので、糖鎖アトラスの作成には大きな障害となっていた。これに対して二価カチオンの除去がピーリング反応を抑えるという報告があった。そこで本研究では、フマル酸、マレイン酸、クエン酸などの有機酸や EDTA、EGTA などのキレート剤を用いて金属二価カチオンの除去を試みたところ、EDTA による処理が最も効果的かつ再現性良くピーリング反応による分解を最も抑え、良い収率をもたらすことが分かった。これによりムチン型糖鎖の効率的かつ高感度な分析が可能となった。

以上の改良により、これまでに確立していた組織サンプル由来の *N*-結合型糖鎖の網羅的解析に加え、遊離糖鎖および *O*-結合型糖鎖にも精細な網羅的解析を行うことが可能となった。

(2) 糖鎖構造解析法の改良に関する成果

ヒドラジン処理によって糖鎖を調製する場合、アミノ糖から外れた *N*-アセチル基をアセチル化反応で戻す必要がある。しかしその際に 1% 程度 *O*-アセチル化も起こってしまう。この副生成物は糖鎖アトラスのための精細な構造解析の障害となっていた。そこで、蛍光標識糖鎖をアルカリ処理することにより *O*-アセチル基だけを選択的に除去する条件を検討し設定することに成功した。これにより、含量が 0.1% 以下の極微量の糖鎖まで分析が可能となり、糖鎖情報の網羅性を大幅に上げることができた。

(3) ゼブラフィッシュ胚の糖鎖に関する成果

本研究により開発確立した糖鎖の網羅的解析手法を用いることにより、ゼブラフィッシュの胚発生時期における糖鎖構造の変遷を網羅的に分析することに成功し、*N*-結合型糖鎖に関する部分を査読付き論文として発表することができた。ゼブラフィッシュの胚発生においてステージ特異的に *N*-結合型が劇的な構造変化を遂げていることが分かった。初め真核生物や後生動物に共通な糖鎖構造がほとんどであったが、胚が脊椎動物に特徴的な形態をとるステージに入ると、脊椎動物に特徴的な糖鎖構造が劇的に増加することが分かった。その代表的な構造は、 $\text{Sia } 2\text{-}6\text{Gal } 1\text{-}4\text{GlcNAc } 1\text{-}2\text{Man } 1\text{-}3(\text{Gal } 1\text{-}4\text{GlcNAc } 1\text{-}2\text{Man } 1\text{-}6)\text{Man } 1\text{-}4\text{GlcNAc } 1\text{-}4\text{GlcNAc}$ であった。この結果は、脊椎動物の形態形成に脊椎動物特異的な糖鎖構造が関与している可能性を示唆しており、生合成

遺伝子の K0 実験などで示唆されていた結果と符合するものである。またその解析の中で、希少糖を末端に持つ新奇な糖鎖を発見した [Hanzawa, K., *et al.* Glycobiology, 2017, 228-245]。希少糖を含む *N*-結合型糖鎖の発見は世界初であり、本研究における大きな成果である。さらに、*O*-結合型糖鎖と遊離糖鎖の解析も行い、多くの新規構造糖鎖のデータを得ることができた。これらの内容については、現在論文を投稿準備中である。

(4) 糖タンパク質標品の糖鎖に関する成果

数種類の糖タンパク質標品 (タカアミラーゼ、ニワトリオボアルブミン、ウズラオボムコイド、ウシフェツイン、ヒト 1-酸性糖タンパク質、ウシリボヌクレアーゼ B、ブタチログロブリン、ウシ γ -グロブリン) の網羅的糖鎖構造解析を行い、糖鎖構造と発現量に関するデータを蓄積することに成功した。その中には既報にない微量成分も含まれている。例えば、タカアミラーゼからは、従来知られている生合成経路からは生じ得ない構造の糖鎖が検出された。それらのデータを二次元糖鎖マップという形式に編集して、一部は既にインターネット上で公開した。さらに、標準糖鎖の糖鎖マップデータの件数を大幅に増加したデータベースの改訂版を公開した [<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biology/index/natsuka/methods.html>]。

(5) ヤツメウナギの糖鎖に関する成果

糖鎖アトラスの簡易版の作成を目的として、ヤツメウナギの各臓器 (脳、肝臓、心臓、腎臓、消化管、卵巣、精巣) から糖鎖を調製して解析を行い、各臓器の糖鎖マップを作成した。それぞれの臓器の糖鎖は、特徴的な構造と発現量を示していることが分かった。特に卵巣はまったく異なる構造パターンを示しており、おそらくは卵黄の特殊な糖鎖構造を反映しているものと予想された。この簡易版糖鎖アトラスの作成を行ったことにより、本手法を用いることで糖鎖データベースを構築できることを実地で示すことができた。本研究による簡易版作成で得られた情報は限られたものであったにもかかわらず、各臓器の糖鎖構造の特徴を明瞭に示すことができたことは、マウスやヒトなどの汎用性の高い動物種を選び、さらに糖鎖情報の精細度を上げ、部位数を大幅に増やせば、非常に有用性の高い糖鎖データベースを構築できることを示唆している。この成果に関する論文も投稿準備中である。

(6) マウス糖鎖アトラスに関する成果

最終年度には、前年度までに技術的課題を概ね克服できたので、当初予定していた計画をさらに進めてマウスを対象にした糖鎖の大規模解析に着手し始めた。最終年度終了時までにはマウスの臓器等数種 (肝臓、脳、腎臓、血清) の網羅的解析を行うことができた。各臓器当たり *N*-結合型糖鎖だけでも 100 種類以上の構造を検出することができ、それぞれの構造と発現量を定めることができた。これは

ヤツメウナギで作成した簡易版の5倍以上の情報量に相当する。マウスでもやはり臓器ごとに特徴的な糖鎖構造を有しており、生合成経路が各臓器で独特であることが確かめられた。また、マウス血清のN-結合型糖鎖の分岐様式はヒト血清の糖鎖とは明確に異なることが分かり、部位特異性だけでなく種特異性もまた顕著に表れることが確かめられた。現在、得られた解析データの公開に向けて公開用フォーマットの検討を行っている。

(7) 今後の展開に向けて

本研究によって、マウスやヒトの網羅的な糖鎖の構造及び発現量データベース、すなわち糖鎖アトラスの作成が可能となった。しかし本研究において作成した簡易版ではなく、大きな情報量を有する本格的な糖鎖アトラスを実際に作るには、現在よりも多くの機器設備とマンパワーが必要であることもまた明らかとなった。今回の研究結果から推定されるマウス糖鎖アトラス作成に必要な期間は、十分なファンドが供給された場合、3～5年程度と見積もることができる。さらに疾患特異的な糖鎖変化を含むヒト糖鎖アトラスの作成にはさらに大きなファンドが必要であるが、技術的な問題点は概ね本研究によりクリアすることができた。

<引用文献>

- Shunji Natsuka, Sumihiro Hase. Analysis of N- and O-glycans by pyridylation. In *Method in Molecular Biology, Vol. 76: Glycoanalysis Protocols* (Hounsell, E.F. ed) Humana Press Inc., 1998, 101-113
- 長谷純宏, 長束俊治, 中北慎一, 石水毅 共著, 「ピリジルアミノ化による糖鎖解析」, 長谷純宏 編集, 大阪大学出版会, 2009
- 長束俊治, 長谷純宏, O-結合型糖鎖の構造解析, 「タンパク質修飾解析プロトコル」稲垣昌樹 編集, 羊土社, 2005, 81-88
- 長束俊治, 糖タンパク質よりO-結合型糖鎖の化学的切り出し, オリゴ糖の2次元HPLCによる分離, 平衡透析を用いた糖鎖-タンパク質相互作用の解析, 「未来を拓く糖鎖科学」永井克孝 監修, 金芳堂, 2005, 5, 14, 78
- Shunji Natsuka. "Release of O-glycans by chemical methods", "Separation of oligosaccharides by 2D HPLC", "Equilibrium dialysis". In *Experimental Glycoscience: Glycochemistry*, (ed. by Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Y., Narimatsu, H., Kawasaki, T., Hase, S.), Springer, 2008, 12-13, 28-29, 132-133
- 長束俊治, 糖鎖分析の統合オペレーティングシステムとしてのピリジルアミノ化法, 「糖鎖科学の新展開」谷口直之, 伊藤幸成 監修, NTS, 2005, 56-62
- 長束俊治, アスパラギン結合型糖鎖の多

様性形成機構, 「ポストゲノムの糖鎖生物学がわかる」谷口直之 編集, 羊土社, 2002, 30-36

Shunji Natsuka. Analysis of glycan expression by fluorescence labeling method. *Japan Journal of Electrophoresis*, 46 巻, (2) 2002, 35-38

長束俊治, 長谷純宏, ピリジルアミノ(PA)化法による糖鎖の蛍光標識と分離, 細胞工学別冊「グライコバイオロジー実験プロトコル」谷口直之・鈴木明身・古川清・菅原一幸 監修, 秀潤社, 1996, 12-17

長束俊治, 長谷純宏, ピリジルアミノ化法による糖鎖の高感度分析, 化学増刊「糖その多様性を探る」小川智也・楠本正一 編, 化学同人, 122 巻, 1992, 125-132.

Shunji Natsuka, Mayumi Masuda, Wataru Sumiyoshi, Shin-ichi Nakakita. Improved method for drawing of a glycan map, and the first page of glycan atlas, which is a compilation of glycan maps for a whole organism. *PLoS One*, 9 巻 (7), 2014, e102219

Kozak RP, Royle L, Gardner RA, Bondt A, Fernandes DL, Wuhrer M. Improved nonreductive O-glycan release by hydrazinolysis with ethylenediamine-tetraacetic acid addition. *Anal Biochem*. 453 巻, 2014, 29-37

Westerfield M. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish, University of Oregon Press, 1994

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Ken Hanzawa, Noriko Suzuki, Shunji Natsuka. Structures and developmental alterations of N-glycans of zebrafish embryos. *Glycobiology*, 査読有, 27 (3), 2017, 228-245

[図書](計1件)

長束俊治, 糖鎖機能解析のキーテクノロジー: 遺伝子改変: 小型魚類(4), 「未来を創るグライコサイエンス 我が国のロードマップ」, 日本糖鎖科学コンソーシアム編・発行, 2018, 229-230

[学会発表](計18件)

長束俊治, ワムシのN-結合型糖鎖, 比較グライコム研究会, 口頭発表, 2018年6月9日, 高松

飯塚紀公, 長束俊治, ゼブラフィッシュ卵黄の糖タンパク質糖鎖解析, 第11回東北糖鎖研究会, 2017年11月18-19日, 桐

生
沢空樹、長束俊治、糖鎖生合成阻害剤キフネンシンによる脊椎動物胚の形態形成異常、第 11 回東北糖鎖研究会、2017 年 11 月 18-19 日、桐生
長束俊治、半澤健、6-デオキシアルトロースを含むゼブラフィッシュ胚の分泌糖ペプチド、第 11 回東北糖鎖研究会、2017 年 11 月 18 日、桐生
長束俊治、半澤健、田幸正邦、石田秀治、希少糖 6-デオキシアルトロースを末端に持つ N-結合型糖鎖の発見と解析、第 66 回日本応用糖質科学学会大会、2017 年 9 月 6 日、藤沢
長束俊治、半澤健、飯塚紀公、ゼブラフィッシュ胚発生における糖タンパク質糖鎖構造の変遷、第 36 回日本糖質学会年会、2017 年 7 月 21 日、旭川
飯塚紀公、長束俊治、ゼブラフィッシュの卵黄由来糖鎖の解析、第 58 回新潟生化学懇話会、2017 年 6 月 24 日、新潟
長束俊治、半澤健、ゼブラフィッシュ胚の糖鎖について、比較グライコーム研究会、2017 年 6 月 10 日、福岡
長束俊治、半澤健、田幸正邦、石田秀治、希少糖 6-デオキシアルトロースを含む N-結合型糖鎖の発見、2017 年年度農芸化学学会大会、2017 年 3 月 18 日、京都
長束俊治、半澤健、佐藤朋史、ゼブラフィッシュの発生と N-結合型糖鎖、比較グライコーム研究会、2016 年 6 月 11 日、福岡
長束俊治、糖鎖の形を調べる意義、第 2 回 N-Hybrid Conference、2016 年 1 月 30 日、新潟
佐藤朋史、半澤健、長束俊治、ゼブラフィッシュ胚におけるゴルジ -マンノシダーゼ II の阻害が形態形成と糖鎖構造に与える影響の解析、第 88 回日本生化学学会大会、2015 年 12 月 2 日、神戸
半澤健、長束俊治、ゼブラフィッシュ胚で発現する N-結合型糖鎖の解析、第 88 回日本生化学学会大会、2015 年 12 月 2 日、神戸
長束俊治、脊椎動物に特徴的な 2 型ラクトサミン構造に関する研究、第 88 回日本生化学学会大会、2015 年 12 月 2 日、神戸
長束俊治、ゼブラフィッシュ胚 N-結合型糖鎖の網羅的解析、第 9 回東北糖鎖研究会、2015 年 9 月 4 日、仙台
半澤健、佐藤朋史、長束俊治、ゼブラフィッシュ胚発生における N-結合型糖鎖の変化の解析、第 34 回日本糖質学会年会、2015 年 7 月 31 日、東京
江間一旭、半澤健、橋本渉、村田幸作、長束俊治、グライコミックツールとしての細菌由来 -マンノシダーゼの組換え体調製と基質特異性の解析、第 34 回日本糖質学会年会、2015 年 7 月 31 日、東京
長束俊治、半澤健、佐藤朋史、ゼブラフ

ィッシュ胚の N-結合型糖鎖について、比較グライコーム研究会、2015 年 6 月 6 日、福岡

[その他]
ホームページ
<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biology/index/natsuka/methods.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

長束 俊治 (NATSUKA, Shunji)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号： 0 0 2 4 3 1 6 3

(2) 連携研究者

鈴木 詔子 (SUZUKI, Noriko)
新潟大学・自然科学系・助教
研究者番号： 5 0 4 0 1 2 3 7