

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14426

研究課題名(和文) 系統的な糖鎖付加位置特異的グリコーム分析による糖鎖不均一性生成機構の解明

研究課題名(英文) Development of a method to analyze glycosylation site-specific glycome at proteome-scale for study on significance of glycan heterogeneity

研究代表者

梶 裕之(Kaji, Hiroyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・研究グループ長

研究者番号：80214302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖タンパク質の糖鎖は糖転移酵素など多数の酵素群によって合成されるため多様で不均一である。細胞ごとに酵素群の発現が異なるため糖鎖パラエティーも細胞ごとに異なる。またタンパク質ごと、さらには糖鎖付加部位ごとにも異なる、といわれているが実態はほとんど知られていない。付加位置ごとの糖鎖パラエティー(グリコーム)を大規模に分析するには、糖ペプチドを直接分析し、ペプチド配列と糖鎖組成を同定する必要があるが、多段階断片化を利用した質量分析は感度が悪い。そこで多段階MS/MSに依存しない解析法を開発し、マウス組織の付加部位ごとのグリコーム情報を大規模に収集し、その糖鎖不均一性の実態を解析した。

研究成果の概要(英文)：Since glycans on glycoproteins are synthesized by many glycan synthesis-related enzymes, they have diverse and heterogeneous structures. Since the expression profile of the enzyme varies depending on the cell type, the glycan variety (glycomes) varies from cell to cell. Furthermore, glycomes are recognized to be different for each type of protein, and at each attachment site. However, little is known about the actual state of glycan heterogeneity. Direct analysis of glycopeptides is essential for analyzing site-specific glycomes, and several methods using MS analysis based on multi-step dissociation have been developed. However, its sensitivity is quite low. Therefore, we developed an MS/MS-independent method for site-specific glycome analysis, and applied it to the glycopeptides obtained from several major mouse tissues. We could obtain large scale information of site specific glycomes; about 12,000 site-specific glycoforms at about 1,200 sites on ca 800 glycoproteins.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：グリコプロテオミクス 糖鎖修飾 翻訳後修飾 質量分析 糖鎖不均一性 マウス グリコーム
プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖タンパク質を選択的かつ網羅的に同定するグライコプロテオミクスの実験では、試料タンパク質のプロテアーゼ消化物から糖ペプチドを捕集し、ペプチド部分の配列を LC/MS 法で同定することが直接的な方法だと考えられる。しかし糖ペプチドを、ペプチドの同定と同様に衝突誘起解離 (CID) 法で断片化しようとしても、糖鎖部分を構成するグリコシド結合が解離し、ペプチド部分はほとんど断片化されず、同定することが困難である。そこで糖鎖、特に N 型糖鎖の場合、糖鎖を普遍的に切除することができるので、糖鎖を酵素で切除した後にペプチド部分を同定する手法が考案された。この酵素 PNGase で糖鎖を切除すると、糖鎖のついていた Asn 残基は Asp 残基 (脱アミド化の形) に変換され、1 Da 質量が増えるので、この Asn が糖鎖付加部位であった証拠としても利用できる。そのため、この酵素を用いた分析法が今も糖ペプチド同定に広く使われている。

(2) 一方、糖鎖は多数の糖鎖合成関連酵素によって合成されるので多様かつ不均一な構造をもつ。これらの酵素の発現は細胞の種類によって異なるので、糖鎖の構造バラエティー (グライコーム) は細胞ごとに異なる。またグライコームはタンパク質ごと、さらには糖鎖付加部位ごとに異なるともいわれている。このため、たとえばルイス x 構造をもつ糖鎖は特定のタンパク質上に合成されていると考えられているように思われる。すると、糖鎖を切除してペプチド部分を同定しても各部位に結合していた糖鎖の構造が不明となり、糖鎖修飾の情報が失われてしまう。糖鎖とペプチドの関係性を保ったまま、部位ごとのグライコームを知るには糖ペプチドを直接分析することが必要となる。糖ペプチドの糖鎖組成とペプチド部分の両方を同定する技術として、CID より強いエネルギーで断片化させる HCD を利用した MS2、CID で糖鎖部分が全部あるいはほとんど失われたイオンを再選択して CID する MS3 法、糖鎖部分を壊さずペプチドだけを断片化する電子移動 (捕獲) 解離 (ETD/ECD) 法を利用した MS2 法、が開発された。しかしこれらの多段階断片化は分析感度が非常に悪いため、網羅的な分析に適用するのが困難であり、新たな糖ペプチド解析法が開発が望まれていた。

2. 研究の目的

グライコームは細胞ごとに異なり、またタンパク質種、さらには付加部位ごとに異なるといわれているが、その実態はほとんど知られていない。これを分析するには多段階断片化法を用いれば可能であるが、感度が悪い等のために大規模な分析に利用困難である。そこで、多段階断片化に依存しない方法を開発し、細胞ごと、タンパク質ごと、付加部位ごとのグライコーム情報を大規模に収集し、その実

態を明らかにすることによって、糖鎖修飾や糖鎖不均一性の意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 多段階断片化に依存しない糖ペプチド同定法の開発： 前述のように糖ペプチドを試料としてこれを質量分析でペプチド配列と糖鎖付加部位、及び結合している糖鎖組成を同定するための測定法としては基本的に 3 種類の多段階断片化法を利用した方法に限られている。CID-MS3、HCD-MS2、および ETD-MS2 で、これらを任意に組み合わせることも可能である。しかし多段階 MS 分析法はデータ取得に時間がかかり、かつ利用可能なシグナルを得るためには比較的少量の試料が必要であるため、複雑な混合物への適用は困難で、ある程度精製された配列既知の糖タンパク質の解析に適用されることが多い。糖鎖不均一性のために極めて多種の未知糖ペプチドを含む混合物を LC で分離しながら網羅的に構造解析するためには、感度低下や解析の困難さの主要原因である多段階断片化に依存しない糖ペプチド解析法が必須であると考え、その方法を考案した。この方法は以下のような原理を利用している。1) 各糖鎖付加部位の糖鎖は不均一な構造をもっている、2) ペプチド部分は同一で糖鎖構造 (組成) が異なる糖ペプチドグライコフォームは、逆相 LC において比較的接近した保持時間に溶出し、糖鎖の大きい方が早めに溶出する、3) ペプチド部分が同一の一群の糖ペプチドグライコフォームのメンバー間の質量差は単糖のそれに相当する、4) 糖鎖を切除してペプチド部分のみを高感度に同定し、その計算質量のリストを作成しておき、糖ペプチドの実測の精密質量と比較することで、糖鎖組成を推定して検索することができる。これらの原理に基づき、糖ペプチド同定ソフトを開発した。ソフトは 2 つのモジュールから成り、前半は糖ペプチドを逆相 LC-MS 分析し、得られた全シグナルの間の保持時間と精密質量を比較し、糖ペプチドの特性を示すシグナルを選別するモジュール、後半は糖ペプチドの実測精密質量と糖ペプチドコアの計算質量を比較し、ペプチドと糖鎖組成の組み合わせを推定し、さらに最も確からしい組み合わせを選別するモジュール、となっている。

(2) この方法のための試料調製法や分析条件の至適化：細胞抽出液などのタンパク質混合物中の糖タンパク質の割合は約 10% である；タンパク質の平均分子量は約 5 万 (500 アミノ酸から構成されるとみなす)；これをトリプシンで消化するとリジン (K) とアルギニン (R) の平均含量は各 5% のため、500 アミノ酸のポリペプチドは約 50 のペプチドに分解される；1 分子中の糖鎖付加位置は平均 2 か所とするとペプチド中の糖ペプチドの割合は、 $10\% \times 2/50 = 0.4\%$ と推定される。糖ペプチドは非糖ペプチドと比較するとイオン

化効率が 1/10 から 1/100 といわれているため、糖ペプチドを解析するためには、試料消化物から糖ペプチドをエンリッチする必要があります。Asn (N) 結合型糖鎖をもつペプチドは親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) で網羅的に捕集できるので、これを利用して糖ペプチド試料を得る。従来から行われている脱糖鎖ペプチドの同定はイオン化効率及び糖鎖不均一性の解消を考えると糖ペプチド試料の 1-5% で実施できる。糖ペプチドのイオン化を改善するためには試料の複雑性を減少させることが重要である。そのために糖鎖不均一性を増大させているシアル酸を除去し、分析時の逆相 LC とは異なるモードで試料を前分画して複雑性を減少させる。分析感度をなるべく下げないように分離条件 (グラジエント時間など) を至適化する。そのほか、質量分析の条件も種々検討し、試料調製手順、分析条件、解析条件を至適化した。

(3) マウス組織部位特異的グリコーム情報の大規模収集: 前述の通り、糖鎖バラエティー (グリコーム) は細胞ごと、タンパク質ごと、糖鎖付加部位ごとに異なる、といわれている。そこではじめに、その実態を探求する試料として、マウスの組織を用い、各組織の分析を実施し、糖鎖、糖タンパク質、糖鎖付加部位ごとのグリコームを比較する。

4. 研究成果

(1) ソフトウェアの開発

図1のようなフローでデータを取得し、そのデータを解析する。このための解析ソフトウェア (大まかに4種) を作成した。

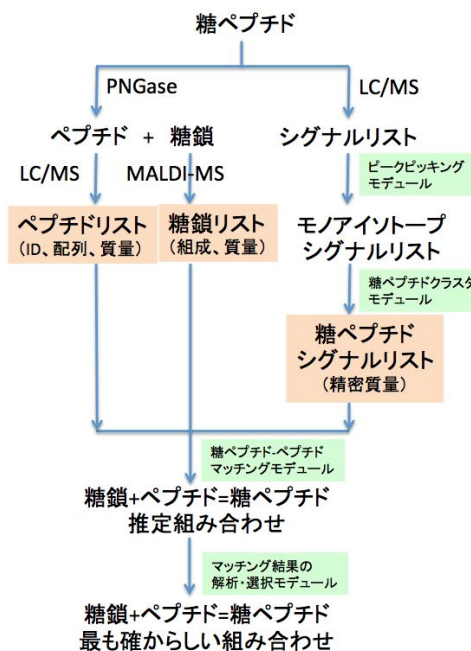


図1 データ解析フロー

(2) ソフトウェアの正当性検証

ソフトウェアの動作確認のため、血清糖タンパク質セルロプラスミン (CP) の糖ペプチドを捕集し、分析及び解析を実施した。解析結果をフィードバックし、各モジュールの設定パラメーターを調節して正答率を改善した。より具体的には、1) CP から4箇所の糖鎖付加部位を含むペプチドコアおよび試料に混在する血清タンパク質由来のペプチドを同定した、2) CP より PNGase で糖鎖を切り出し、MALDI-MS で糖鎖プロファイルを得た、3) CP のトリプシン消化物から糖ペプチドを捕集し、LTQ-Orbitrap 質量分析計 (サーモ社) を用いて LC/MS 分析した、4) 質量分析データを処理し (図1のピークピッキングおよび糖ペプチドクラスタリング)、糖ペプチドシグナルをクラスターとして検出した (図2)、5) 同定されたペプチドの計算質量、検出された糖鎖組成、およびクラスターとして検出された糖ペプチドの実測精密質量を比較し、ペプチド-糖鎖の組み合わせを予測した、5) 一つの糖ペプチド群に複数のペプチド-糖鎖の組み合わせがヒットした場合、どちらの組み合わせがより確からしいかを判別するパラメーターを設定した。この解析の結果、CP の4カ所の付加部位ごとのグリコームは良く類似していた。ただそのうちの一カ所には多分岐、ポリラクタサミン構造が特徴的に観測された。

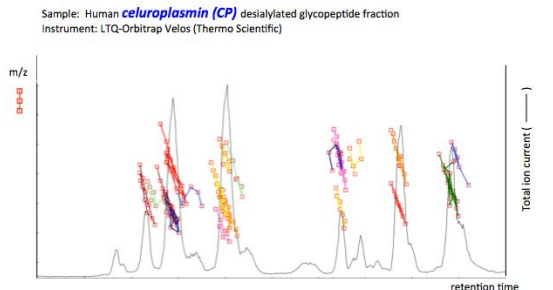


図2 CP より検出された糖ペプチドクラスター

762(NVS)				138(NTT)				358(HKS)				397(NLT)			
Hex	HexNAc	diHex	TriHex	Hex	HexNAc	diHex	TriHex	Hex	HexNAc	diHex	TriHex	Hex	HexNAc	diHex	TriHex
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

図3 CP の4カ所の付加位置グリコーム

(3) 大規模分析に向けた試料調製手順、分析条件設定の検討: 細胞ごと、タンパク質ごと、糖鎖付加部位ごとのグリコームの実態を分析する試料として、マウスの組織を選択した。はじめに、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、精巣を選択し、各組織から同じ条件でタンパク質を抽出し、還元アルキル化、トリプシン消化の後、アミド-80 カラムを用いた HILIC によって糖ペプチドを捕集した。酸処理によってシアル酸を除去した。各糖ペプチド試料の一部を用いて、脱糖鎖 (IGOT) ペプ

チドの同定、遊離糖鎖のプロファイリング、糖ペプチドの精密質量分析、を実施し、試料調製に問題がないかを確認した。次いで、糖ペプチドシグナルをより多数取得するため、中性 pH で逆相 (C18) 分離し、試料の複雑性を減少させた。手間と効率 (同定数) を勘案して、5 つの画分に分離することにした。それぞれの分析結果を集積した結果と未分画の結果を比較し、分画の効果を確かめた (図 4)。

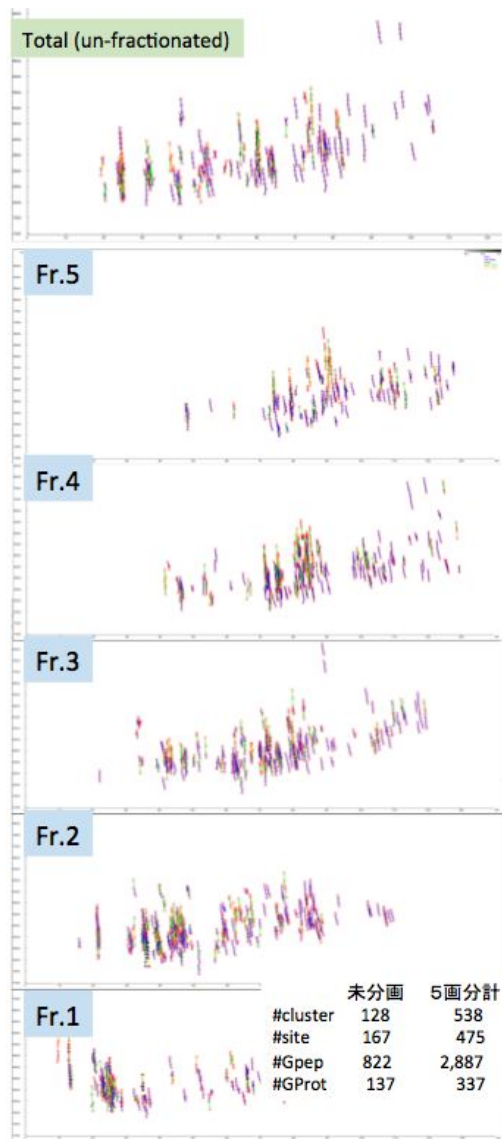


図 4 マウス肝臓糖ペプチドクラスターの検出

(4) マウス組織ごとの糖鎖付加部位特異的グリコーム分析: 上述の6組織より得た糖ペプチドから脱糖鎖ペプチド (IGOT 処理) および遊離された糖鎖を調製し、プロファイリングした。このデータを基礎として、糖ペプチドの精密質量を分析し、開発した解析モジュールで処理し、最終的に合計で約 800 糖タンパク質、約 1,200 部位、約 12,000 糖ペプチドグリコフォームを同定した。肝臓については詳細な比較を開始し、同一糖タンパク質上に複数の糖鎖付加部位があった場合の

部位ごとのグリコームを比較した。その結果、すべての部位がハイマンノース型糖鎖であった場合、すべての部位が複合型糖鎖であった場合、部位によって糖鎖のタイプが異なっていた場合、の3パターンに分類されることが分かった (図 5)。この相違とタンパク質のどの特性が関連しているかを現在解析している。

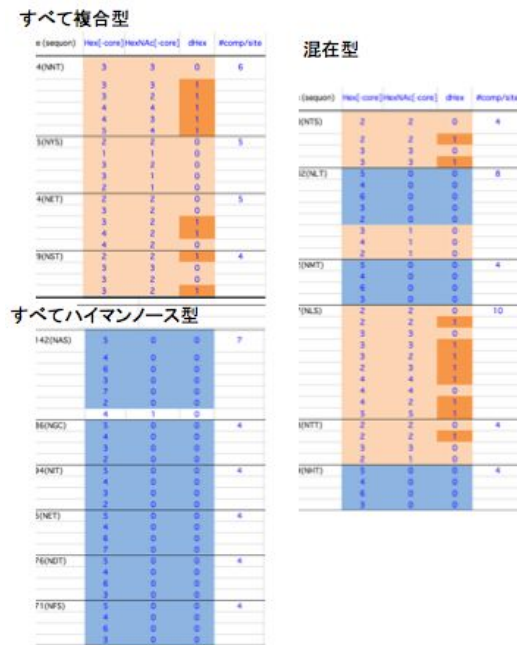


図 5 部位ごとの糖鎖タイプのパターン

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mitani Y, Oshima Y, Mitsuda N, Tomioka A, Sukegawa M, Fujita M, Kaji H, Ohmiya Y. Efficient production of glycosylated Cypridina luciferase using plant cells. Protein Expr Purif. (査読有) 2017, 133:102-109, doi: 10.1016/j.pep.2017.03.008.

〔学会発表〕(計 5 件)

梶 裕之, 富岡あづさ, 野呂絵里花, 藤田弥佳, 助川昌子, 岡谷千晶, 鹿内俊秀, 成松久. Accurate mass- and glycan composition-based assignment of glycosylation site-specific glycomes of complex glycoprotein mixture. Human Proteome Organization World Congress (2016/09/20, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan)

梶 裕之, 富岡あづさ, 野呂絵里花, 藤田弥佳, 助川昌子, 岡谷千晶, 鹿内俊秀, 成松久. 糖タンパク質の糖鎖不均一性の大規模解析. 日本生化学会大会 (2016/09/27, 仙台国際センター、宮城県)

仙台市)

梶 裕之, 最近のグライコプロテオミクス: 糖鎖付加部位ごとの糖鎖不均一性の大規模解析法の開発. 日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (2016/11/01, お茶の水ソラシティカンファレンスセンター、東京都千代田区)

梶 裕之, 富岡あづさ, 野呂絵里花, 藤田弥佳, 助川昌子, 岡谷千晶, 鹿内俊秀, 成松久. 糖タンパク質大規模解析とデータベース構築: 糖鎖付加位置マッピングから位置ごとのグライコム解析へ, 日本分子生物学会年会 (2016/11/30, 神奈川県横浜市)

梶 裕之, 富岡あづさ, 野呂絵里花, 藤田弥佳, 助川昌子, 岡谷千晶, 鹿内俊秀, 成松久. グライコプロテオミクス: 糖鎖付加位置特異的グライコームの大規模分析, 日本プロテオーム学会2016年大会 (2016/07/28, 北里大学薬学部、東京都港区)

〔図書〕(計 1 件)

梶 裕之、富岡あづさ、野呂絵里花、梅谷内晶、佐藤隆、羊土社、実験医学「糖鎖を狙う(仮題)」, 2017(確定)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

GlycoProtDB: A glycoprotein database
http://acgg.asia/gpdb2/index?request_locale=ja

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶 裕之 (KAJI, Hiroyuki)
産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・
研究グループ長
研究者番号: 80214302

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()

(4) 研究協力者

富岡あづさ (TOMIOKA, Azusa)
藤田弥佳 (FUJITA, Mika)
助川昌子 (SUKEGAWA, Masako)
岡谷千晶 (OKATANI, Chiaki)
鹿内俊秀 (SHIKANAI, Toshihide)
成松 久 (NARIMATSU, Hisashi)