

令和 元年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05804

研究課題名(和文) BEPを基盤としたO-結合型糖タンパク質のグライコプロテオミクスによる同定法

研究課題名(英文) Identification of O-glycoproteins by Glycoproteomics based on BEP procedure

研究代表者

古川 潤一 (Furukawa, Jun-ichi)

北海道大学・医学研究院・特任准教授

研究者番号：30374193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、O-結合型糖タンパク質に着目した汎用的な疾患マーカー探索技術の開発を目的として、1)これまでに BEP法により解析が困難であったシアリル化 O-結合型糖鎖の解析法の改良、そして2) O-結合型糖鎖およびキャリアタンパク質の一斉解析法について検討を行った。N-結合型糖鎖およびスフィンゴ糖脂質糖鎖については、ラクトン環開裂を経由したシアリル酸結合様式特異的標識法を開発し、O-結合型糖ペプチドへの適用できることが明らかとなった。またBEP法では、詳細な反応条件を検討により両アミノ酸残基からの効率的な O-型糖鎖の切断およびセリン残基への選択的なマイケル付加が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でのシアリル酸の構造上の識別法、スレオニン残基修飾糖鎖の切断法、そしてマイケル付加反応の効率についての研究により、これまでに詳細な情報がなく、本研究の成果が糖タンパク質に関連する診断マーカー探索研究や糖鎖付加部位さらにはキャリアタンパク質を同定するために重要な情報取得に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Serine (Ser) and threonine (Thr) residues are modified by the O-GalNAc type, typical of mucin. The characterization of O-glycans has remained particularly challenging because no analogous endoglycosidase is known.

We investigated the BEP method for the identification of structural isomer and O-glycosylation sites of proteins/peptides. We developed that aminolysis-SALSA could successfully distinguish sialylated N- and GSL-glycan isomers by mass spectrometry. This method could be applied to the analysis of sialylated O-glycopeptides.

In addition, we investigated the BEP procedure focused on Michael addition. In this study, it was revealed that only serine residues act as Michael acceptor and perform selective Michael addition. Furthermore, we made it clear that the efficiency of cleavage of O-glycan differed between Ser and Thr residue.

研究分野：分析化学

キーワード：糖タンパク質 グライコミクス 脱離反応 マイケル付加 O-結合型糖鎖 BEP法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾は翻訳後修飾の一つであり、分泌タンパク質では90%以上、膜タンパク質では半数以上が糖鎖修飾を受けているとされている。糖鎖修飾はセリン/スレオニン残基が糖鎖修飾を受けたO-結合型糖鎖とアスパラギン残基が修飾であるN-結合型糖鎖に分類される。N-結合型糖鎖に関する研究は、タンパク質より糖鎖を切断する酵素 (peptide N-glycosidase F, PNGase F) を使用した構造解析が多数行われているが、O-結合型糖鎖の解析については構造非依存的に切り出す酵素がないため、糖鎖の遊離は化学法に依存しているのが現状である。化学法ではピーリング反応による分解を避けるために糖アルコールへと還元する Carlson 法が標準的な方法 (引用文献) となっているが、還元末端を利用する精製やラベル化が行えないこと、そしてタンパク質も分解を受けるなど問題も残されている。申請者は、これまでにO-結合型糖鎖解析を目的としてBEP法を開発し(引用文献)、様々な生体試料を対象としたO-結合型糖鎖の発現変動における診断マーカー探索への道筋を開いてきた。しかし汎用的な技術へと展開するためには、結合様式を含む糖鎖の構造情報やキャリアタンパク質、つまり糖鎖結合部位を簡便に同定できる技術が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、O-結合型糖タンパク質に着目しBEP法に基づく汎用的な解析技術の開発を目的として、1) これまでにBEP法により解析が困難であったシアリル化O-結合型糖鎖の解析法の開発、そして2) O-結合型糖鎖およびキャリアタンパク質の一斉解析法の確立が本申請での研究目的である。

### 3. 研究の方法

申請者が開発を進めているBEP法は、ピラゾロン共存下で脱離反応を行う方法であり、糖タンパク質からのO-結合型糖鎖の切断と標識を同時に行うことができる。さらにBEP法では脱離・マイケル付加反応による化学修飾法 (BEMA法)と同様の作用機序で脱グリコシル化ペプチドをピラゾロン試薬によって標識できるため、糖タンパク質のO-結合型糖鎖結合部位の同定に応用することが可能である。しかし、リン酸化を受けたタンパク質も脱離・マイケル付加反応によりピラゾロン試薬で標識されるため、グリコシル化やリン酸化を区別する手法が必要となる。本研究では、まずプロテインフォスファターゼ処理によるリン酸基の除去について検討した。また、プロテオミクス解析で一般的に用いられている還元アルキル化やトリプシン消化によるサンプル調整法について検討した。

また、N-結合型糖鎖のシアリル酸の結合様式を判別するための方法として、シアリル酸結合様式特異的誘導体化法 (SALSA法) が報告されているが、本研究ではO-結合型糖タンパク質解析への適用について検討を進め、シアリル酸の誘導化による結合様式の識別について検討した。

ピラゾロン共存下で脱離反応 (BEP法) は、O-結合型糖鎖の切断と標識、脱グリコシル化ペプチドの糖鎖結合部位へのマイケル付加を同時に行うことができる。本研究ではO-型糖タンパク質の解析法の確立を目的として、セリンおよびスレオニン残基にムチン型糖鎖が付加している糖ペプチドを用いて詳細な反応条件の検討を行った。

### 4. 研究成果

プロテインフォスファターゼによりリン酸基を加水分解した後、界面活性剤除去カラムを用いて精製し、MALDI-TOF MSにより確認したところ、脱リン酸化が効率的に進行していることが確認できた。次にO-結合型糖ペプチドおよびリン酸化ペプチドの混合物をプロテインフォスファターゼ処理を行い、続いてBEP反応を行なったところ、脱グリコシル化ペプチドのみが選択的にピラゾロン試薬で標識できた(図1)。さらにペプチド同定の際に汎用されるシステインの還元アルキル化処理についても検証し、本手法によりO-結合型糖鎖結合部位のみを標識できることが明らかとなった。

またシアリル酸の結合様式については、スフィンゴ糖脂質糖鎖やN-結合型糖鎖の解析を目的としてaminolysis-SALSA法を開発した。この方法は2,3結合のシアリル酸のカルボキシル基が特異的に分子内ラクトンを形成することを利用しており、ラクトン環の開裂とアミド化を同時に行うことにより2,3結合のシアリル酸を特異的に誘導化する方法である。本手法をO-結合型糖タンパク質に適用したところ、エタノール沈殿法によりSALSA法で用いるアミド化試薬を効率よく除去でき、反応効率の改善は必要だがsialyl Tの70%程度が特異的にアミド化修飾されることが明らかとなった。次に2,3と2,6結合の二つのシアリル酸を含むdi-sialyl Tをスレオニン残基に持つ糖ペプチ

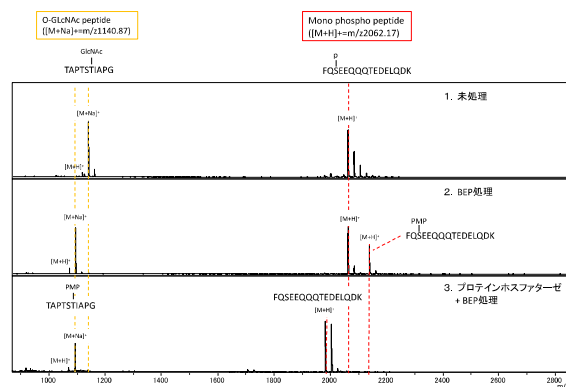


図1 プロテインフォスファターゼ後にBEP反応を行ったO-GlcNAcおよびリン酸ペプチドのMALDI-TOF MSスペクトル

ドを用いて aminolysis-SALSA 法を検討したところ、2,3 結合のシアル酸が特異的にかつ完全に標識されることが明らかとなった (図 2)。

セリン残基に修飾されている O 型糖鎖は、BEP 法により効率よく 脱離反応が進行し、同時に脱グリコシル化ペプチドへのピラゾロン試薬によるマイケル付加が進行した。その一方でスレオニン残基に修飾された O 型糖鎖は、切断効率が 3%程度であった。さらに脱グリコシル化ペプチドもマイケル付加反応が進行しなかった。そこで BEP 法の塩基条件や試薬濃度を詳細に検討した結果、両アミノ酸に付加している O 型糖鎖を切断できる条件を見出すことができ、網羅的な O-結合型糖鎖の解析へと繋がることが考えられる。

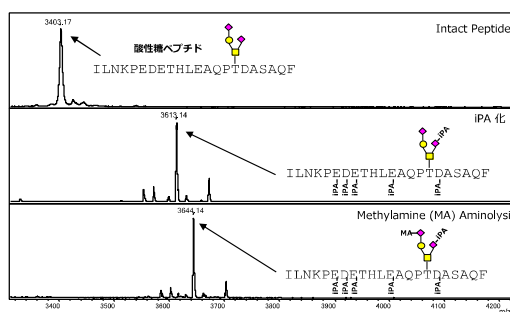


図 2 Aminolysis-SALSA 法による誘導化後のシアリル化糖ペプチドの MALDI-TOF MS スペクトル

## 引用文献

Carlson, D.M. J. Biol. Chem. 1968, 243, 616-626.

Furukawa J.-i., Fujitani N., Araki K., Takegawa Y., Kodama K., Shinohara Y. A versatile method for analysis of serine/threonine posttranslational modifications by  $\beta$ -elimination in the presence of pyrazolone analogues. Anal Chem. 2011, 83(23), 9060-7.

Furukawa J.-i., Piao J., Yoshida Y., Okada K., Yokota I., Higashino K., Sakairi N., Shinohara Y., Quantitative O-Glycomics by Microwave-Assisted  $\beta$ -Elimination in the Presence of Pyrazolone Analogues. Anal Chem. 2015, 87(15), 7524-8.

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Hashii N, Suzuki J, Hanamatsu H, Furukawa J.-i, Ishii-Watabe A (4 番目/5 人中) In-depth site-specific O-Glycosylation analysis of therapeutic Fc-fusion protein by electron-transfer/higher-energy collisional dissociation mass spectrometry, 査読有, Biologicals. 2019 Mar;58:35-43. doi: 10.1016/j.biologicals.2019.01.005.

Momma D, Onodera T, Homan K, Matsubara S, Sasazawa F, Furukawa J.-i, Matsuoka M, Yamashita T, Iwasaki N (6 番目/9 人中) Coordinated existence of multiple gangliosides is required for cartilage metabolism, 査読有, Osteoarthritis Cartilage. 2019 Feb;27(2):314-325. doi: 10.1016/j.joca.2018.11.003.

Hanamatsu H, Nishikaze T, Miura N, Piao J, Okada K, Sekiya S, Iwamoto S, Sakamoto N, Tanaka K, Furukawa J.-i (10 番目/10 人中) Sialic Acid Linkage Specific Derivatization of Glycosphingolipid Glycans by Ring-Opening Aminolysis of Lactones, 査読有, Anal Chem. 2018 Nov 20;90(22):13193-13199. doi: 10.1021/acs.analchem.8b02775.

Yoshida Y, Furukawa J.-i, Naito S, Higashino K, Numata Y, Shinohara Y (2 番目/6 人中) Identification of unique glycoisoforms of vitamin D-binding protein and haptoglobin as biomarker candidates in hepatocarcinogenesis of STAM mice, 査読有, Glycoconj J. 2018 Oct;35(5):467-476. doi: 10.1007/s10719-018-9838-3.

Fujihira H, Usami K, Matsuno K, Takeuchi H, Denda-Nagai K, Furukawa J.-i, Shinohara Y, Takada A, Kawaoka Y, Irimura T (6 番目/10 人中) A Critical Domain of Ebolavirus Envelope Glycoprotein Determines Glycoform and Infectivity, 査読有, Sci Rep. 2018 Apr 3;8(1):5495. doi: 10.1038/s41598-018-23357-8.

Furukawa J.-i, Soga M, Okada K, Yokota I, Piao J, Irie T, Era T, Shinohara Y (1 番目/8 人中) Impact of the Niemann-Pick c1 Gene Mutation on the Total Cellular Glycomics of CHO Cells, 査読有, J Proteome Res. 2017 Aug 4;16(8):2802-2810. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00070.

Matsuoka M, Onodera T, Homan K, Sasazawa F, Furukawa J.-i, Momma D, Baba R, Hontani K, Joutoku Z, Matsubara S, Yamashita T, Iwasaki N (5 番目/12 人中) Depletion of Gangliosides Enhances Articular Cartilage Repair in Mice, 査読有, Sci Rep. 2017 Mar 2;7:43729. doi: 10.1038/srep43729.

Yoshida Y, Furukawa J.-i, Naito S, Higashino K, Numata Y, Shinohara Y (2 番目/6 人中) Quantitative analysis of total serum glycome in human and mouse, 査読有, Proteomics. 2016 Nov;16(21):2747-2758. doi: 10.1002/pmic.201500550.

Miyaji K, Furukawa J.-i, Suzuki Y, Yamamoto N, Shinohara Y, Yuki N (2 番目/6 人中)

Altered gene expression of glycosyltransferases and sialyltransferases and total amount of glycosphingolipids following herpes simplex virus infection 査読有, Carbohydr Res. 2016 Nov 3;434:37-43. doi: 10.1016/j.carres.2016.08.004.

Furukawa J.-i, Okada K, Shinohara Y (1 番目/3 人中) Glycomics of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells, 査読有, Glycoconj J. 2016 Oct;33(5):707-15. doi: 10.1007/s10719-016-9701-3.

[学会発表](計 19 件)

古川 潤一, 花松 久寿, 西風 隆司, 三浦 信明, 朴 錦花, 岡田 和恵, 坂本 直哉, 関谷 禎規, 岩本 慎一, 田中 耕一, 開環アミノリシスに基づく SALSA 法によるスフィンゴ糖脂質糖鎖の解析, 第 91 回日本生化学会大会 (国内学会), 2018 年 9 月 24-26 日, 国立京都国際会館 (京都)

岡田 和恵, 赤阪-萬谷 啓子, 萬谷 博, 花松 久寿, 朴 錦花, 古川 潤一, 遠藤 玉夫, 加齢に伴うマウス血清中の N-結合型糖鎖の網羅的解析, 第 91 回日本生化学会大会 (国内学会), 2018 年 9 月 24-26 日, 国立京都国際会館 (京都)

宝満 健太郎, 花松 久寿, 古川 潤一, 岡田 和恵, 横田 育子, 朴 錦花, 小野寺 智洋, 岩崎 倫政, 軟骨細胞肥大における総合グライコム解析, 第 37 回日本糖質学会年会 (国内学会), 2018 年 8 月 28-30 日, 仙台国際センター (仙台)

花松 久寿, 西風 隆司, 三浦 信明, 朴 綿花, 岡田 和恵, 坂本 直哉, 関谷 禎規, 岩本 慎一, 田中 耕一, 古川 潤一, 開環アミノリシスによる新規シアル酸結合様式特異的修飾法, 第 37 回日本糖質学会年会 (国内学会), 2018 年 8 月 28-30 日, 仙台国際センター (仙台) Takashi Nishikaze, Hisatoshi Hanamatsu, Jun-ichi Furukawa, Sadanori Sekiya, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka, Simple and versatile two-step derivatization method for discriminating 2,3-/ 2,6-linked sialic acids, 米国質量分析学会 ASMS (国際学会), 2018 年 6 月 3-7 日, (サンディエゴ, 米国)

西風 隆司, 花松 久寿, 古川 潤一, 関谷 禎規, 岩本 慎一, 田中 耕一, 新規反応系導入によるシアル酸結合様式特異的修飾法 SALSATM の改良と高汎用化, 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会 (国内学会), 2018 年 5 月 15-18 日, ホテル阪急エキスポパーク (吹田市, 大阪)

花松 久寿, 西風 隆司, 三浦 信明, 岡田 和恵, 朴 錦花, 坂本 直哉, 関谷 禎規, 岩本 慎一, 田中 耕一, 古川 潤一, SALSA-glycoblotting 法によるスフィンゴ糖脂質糖鎖のシアル酸構造異性体識別, 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会 (国内学会), 2018 年 5 月 15-18 日, ホテル阪急エキスポパーク (吹田市, 大阪)

花松 久寿, 西風 隆司, 横田 育子, 岡田 和恵, 坂本 直哉, 関谷 禎規, 岩本 慎一, 田中 耕一, 古川 潤一, Glycoblotting-SALSA 法によるスフィンゴ糖脂質糖鎖の網羅的解析, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (国内学会), 2017 年 12 月 6-9 日, 神戸ポートアイランド (神戸)

朴 錦花, 古川 潤一, 曾我 美南, 岡田 和恵, 横田 育子, 入江 徹美, 江良 拓実, 篠原 康郎, ニーマン・ピック病 C 型の診断及び治療効果をモニタリングするための糖鎖関連マーカーの探索, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (国内学会), 2017 年 12 月 6-9 日, 神戸ポートアイランド (神戸)

古川 潤一, 総合グライコムクスで幹細胞を記述する, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(招待講演), 2017 年 12 月 6-9 日, 神戸ポートアイランド (神戸)

花松 久寿, 西風 隆司, 横田 育子, 岡田 和恵, 坂本 直哉, 古川 潤一, Glycoblotting-SALSA 法によるヒト血清スフィンゴ糖脂質糖鎖の網羅的解析, 第 36 回 日本糖質学会(国内学会), 2017 年, 7 月 19-21 日, 旭川市民文化会館 (旭川)

岡田 和恵, 横田 育子, 花松 久寿, 大西 俊介, 湯山 耕平, 酒井 祥太, 伊東 信, 五十嵐 靖之, 坂本 直哉, 篠原 康郎, 古川 潤一, BEP 法を基盤とした糖鎖および糖鎖結合部位の同定法, 第 36 回 日本糖質学会 (国内学会), 2017 年, 7 月 19-21 日, 旭川市民文化会館(旭川)

古川 潤一, 総合グライコムクスで細胞を記述する, 第 14 回 糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム(招待講演) (国内学会), 2016 年 11 月 01-02 日, 御茶ノ水ソラシティカンファレンスセンター(東京都千代 田区)

横田 育子, 古川 潤一, 花松 久寿, 大西 俊介, 岡田 和恵, 湯山 耕平, 酒井 祥太, 伊東 信, 五十嵐 靖之, 坂本 直哉, 篠原 康郎, 血清中に含まれる血液型特異的スフィンゴ糖脂質および遊離オリゴ糖鎖の同定, 第 89 回 日本生化学会大会 (国内学会), 2016 年 09 月 25-27 日, 仙台国際センター/東北大学(仙台)

三浦 信明, 古川 潤一, 横田 育子, 岡田 和恵, 篠原 康郎, 大規模グライコムクスにおける発現とマイニングへのインフォマティクスからのアプローチ -スフィンゴ糖脂質-, 第 89 回 日本生化学会大会 (国内学会), 2016 年 09 月 25-27 日, 仙台国際センター/東北大学(仙台)

三浦 信明, 古川 潤一, 横田 育子, 岡田 和恵, 篠原 康郎, 大規模グライコムクスにおけ

る発現解析へのインフォマティクスからのアプローチ:スフィンゴ糖脂質, 第35回日本糖質学会年会(国内学会), 2016年09月01-03日, 高知市文化プラザ かるぼーと(高知)  
萬谷 博、金川 基、小林 千浩、田尻 道子、久我 敦、山口 芳樹、萬谷-赤坂 啓子、古川 潤一、水野 真盛、川上 宏子、篠原 康朗、和田 芳直、戸田 達史、遠藤 玉夫、リビトールリン酸を含む0-マンノース型糖鎖の新奇構造と生合成機構, 第35回日本糖質学会年会(国内学会), 2016年09月01-03日, 高知市文化プラザ かるぼーと(高知)  
岡田 和恵、古川 潤一、横田 育子、花松 久寿、大西 俊介、湯山 耕平、酒井 祥太、伊東 信、五十嵐 靖之、坂本 直哉、篠原 康朗, エタノール沈殿法による血液型特異的スフィンゴ糖脂質および遊離オリゴ糖鎖の血液型抗原の同定, 第35回日本糖質学会年会(国内学会), 2016年09月01-03日, 高知市文化プラザ かるぼーと(高知)  
Jun-ichi Furukawa, Total cellular glycome analysis: Method development and its application to biological samples, 6th Charles Warren Workshop 2016(招待講演)(国際学会), 2016年08月24-26日, 北海道大学(札幌)

〔図書〕(計1件)

古川 潤一, 岩崎 倫政, 篠原 康郎, タンパク質の糖鎖修飾解析のための前処理法, 羊土社, 実験医学, 2017年 Vol.35 No.11(7月号) 1877-1883.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

1. 名称: 試料の調製方法及び分析方法

発明者: 花松 久寿, 西風 隆司, 古川 潤一

権利者: 島津製作所

種類: 特願

番号: 2018-036367

出願年: 2018

国内外の別: 国外

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。