

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03808

研究課題名(和文) グライコミクスを革新する新たな分析基盤の構築

研究課題名(英文) Development of a new analytical platform to innovate glycomics

研究代表者

亀山 昭彦 (Kameyama, Akihiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：80415661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：0-型糖鎖に関するグライコミクス基盤の確立を目的として、ウシフェツイン、ブタ胃ムチン、ウシ顎下腺ムチンから独自の糖鎖遊離法である脱離オキシム化反応を利用して約20種の0-型糖鎖ライブラリーを得た。さらに酵素合成によるライブラリー充実のため、コア1からコア4までの4種の糖鎖を有するスレオニンを出発物質として各種糖転移酵素による糖鎖伸長を行った。また、得られた糖鎖アミノ酸から糖鎖を中性条件で遊離できる新たな手法を確立した。こうした一連の手法を用いて0-型糖鎖グライコミクスの基盤となるライブラリー構築法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今世紀に入りポストゲノム研究の興隆そして日進月歩で発展した質量分析計に牽引される形で、糖鎖構造解析技術も大きな発展を遂げてきた。しかし発展したのは主にN-グリカンの解析であり、O-グリカンについては大きく後れを取っていると言わざるを得ない。本研究では、O-グリカンのグライコミクスの基盤をなす糖鎖標品ライブラリーを迅速に構築する方法を確立した。今後、これを用いた糖鎖分析データベースを開発することにより、O-型糖鎖の迅速分析が可能となり、ムチン関連腫瘍マーカーをはじめとする各種のバイオマーカー探索やバイオ医薬の品質管理等への活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To develop an analytical platform for O-glycomics, we made an O-glycan library consisting of 20 glycans isolated from bovine fetuin, porcine gastric mucin, and bovine submaxillary mucin by using eliminative oximation that is our original method for glycan liberation. To expand the library, we studied a simple and rapid method for the construction of glycosyl threonine library by using a variety of glycosyltransferases and glycans threonine derivatives with O-glycan core structure (core1 to 4) as the starting materials. Furthermore, we developed a glycan releasing method under the neutral condition from the glycosyl threonine derivatives. Thus we established a general scheme for the rapid construction of the O-glycan library using a series of techniques developed in this study.

研究分野：グライコミクスにおける新技術の開発およびその応用

キーワード：グライコミクス 糖鎖 糖転移酵素 ムチン O-グリカン 脱離オキシム化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリコシル化は翻訳後修飾の中でも最も広汎かつ多様な修飾であり、細胞の分化、がん化、老化、感染、毒素のレセプター、タンパク質の分解や動態、細胞接着など、細胞個性の顕現や細胞間・分子間の相互作用に深く関与する。これら糖鎖機能の解明は、糖タンパク質から N-結合型糖鎖を遊離する酵素の発見を発端とする糖鎖構造解析法の進歩により牽引されてきた。近年では 21 世紀初頭からの質量分析計を活用したグライコミクスの開発と普及により疾患バイオマーカーや幹細胞マーカーとしての糖鎖研究が大規模に進められ成果をあげている。グリコシル化は、Asn が修飾される N-結合型と Ser または Thr が修飾される O-結合型 (ムチン型糖鎖とも総称される) に大別されるが、現状のグライコミクスは主として N-結合型の解析を対象としたものである。その理由は、糖タンパク質から糖鎖を遊離する上述の酵素は N-結合型のみを基質としており、O-結合型糖鎖の分析に利用できる酵素は多数の研究者が長年探索したにも関わらず未だ発見されていないためである。そのため、O-結合型糖鎖の遊離には 40 年以上前に開発された還元脱離法やヒドラジン分解などの化学的糖鎖遊離法が現在でも利用されている。前者の方法は糖鎖の標識部位であるアルデヒド基が還元されるため蛍光標識できず、後者は毒物であり爆発性でもある無水ヒドラジンを完全無水条件下で扱う必要があるため高度な専門技術を要する上に、糖鎖の分解が避けられず収率が低い。またどちらの反応も後処理まで含めると 2 日間程度の時間を要する。

しかしながら、従来より腫瘍マーカーとして多用されてきた CA19-9 や最近発見された幹細胞マーカーである rBC2LCN などはムチン様分子上の O-結合型糖鎖であり、腫瘍や幹細胞などの新規マーカー探索研究を進めるためには O-結合型糖鎖の解析が必須である。またタンパク質性のバイオ医薬品にも O-結合型糖鎖修飾を受けるものがあり薬効や動態に影響を及ぼすため、品質管理上、その解析が求められている。そのため、簡便かつ迅速な新しい O-結合型糖鎖の解析法が切望されていた。そこで、研究代表者は O-結合型糖鎖のグライコミクスを開拓すべく、まずムチンの簡便な分離法「分子マトリックス電気泳動法」を開発した。さらに分離したムチンから O-結合型糖鎖を遊離する新たな化学反応の探索を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究では、O-結合型糖鎖に対応した新たなグライコミクスの技術基盤を構築するため、O-結合型糖鎖の新たな化学的遊離法を確立する。さらに、その遊離法を活用して各種 O-結合型糖鎖の大規模ライブラリーを作成し、HPLC、キャピラリー電気泳動および多段階タンデム質量分析における各糖鎖の分析固有値を取得することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) O-結合型糖鎖の新たな化学的遊離法の確立

ウシフェツインをモデル試料として、遊離反応の条件、すなわち試薬濃度、反応時間、温度等を種々検討し、最適条件を見出す。また、反応後の後処理法を検討する。得られた糖鎖は蛍光標識を付与し、HPLC にて分析する。反応結果の判断については、HPLC における糖鎖収量、ピーリング産物の量、フェツインから遊離された糖鎖のプロファイルを指標とする。

(2) 市販糖タンパク質からの O-結合型糖鎖標品の分離収集

ウシフェツイン、ウシ顎下腺ムチンおよびブタ胃ムチンを材料として、上記で確立した糖鎖遊離反応により O-結合型糖鎖を遊離し、蛍光標識を付与して HPLC にてそれぞれ分取精製する。

(3) 糖鎖アミノ酸を出発物質とする O-結合型糖鎖ライブラリーの構築

O-結合型糖鎖の基本構造であるコア 1 からコア 4 までの 4 種の糖鎖により水酸基がグリコシル化されたスレオニン誘導体 (糖鎖スレオニン) を出発物質として、糖転移酵素を用いた糖鎖伸長を行い、各種 O-結合型糖鎖ライブラリーを構築する。具体的には以下の手順で進める。

糖鎖スレオニンへの蛍光標識導入

糖転移酵素の調製

蛍光標識糖鎖スレオニンの糖転移酵素による糖鎖伸長

蛍光標識糖鎖スレオニンからの糖鎖遊離

(4) 各種 O-結合型糖鎖の分析固有値の取得

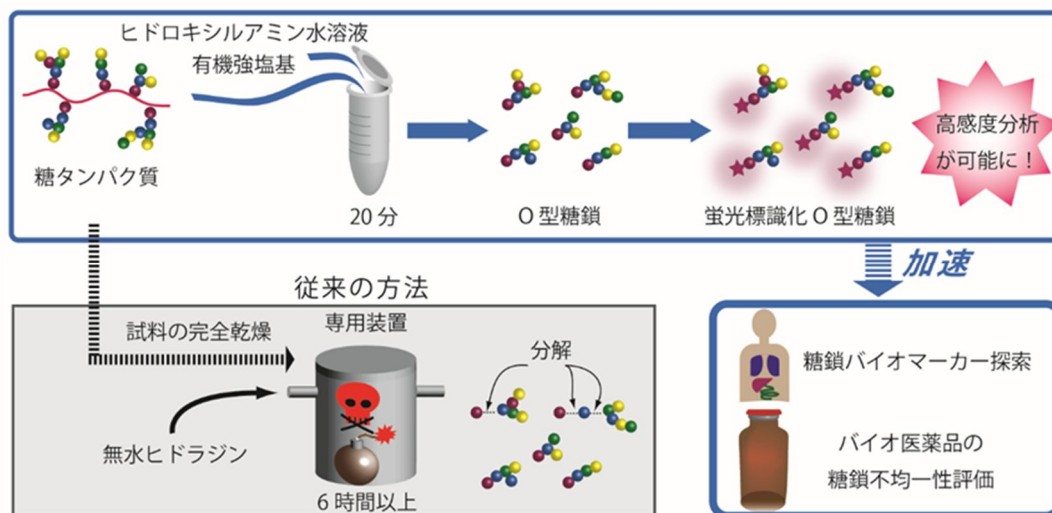
調製した O-結合型糖鎖は、蛍光標識して HPLC およびキャピラリー電気泳動で分析しグルコースオリゴマーとの溶出位置の相対比較により固有値を取得する。また、多段階タンデム質量分析については、完全メチル化後、MALDI-イオントラップ飛行時間型質量分析計にて MS³ までのスペクトルデータを取得する。

4. 研究成果

(1) O-結合型糖鎖の新たな化学的遊離法の確立

O-結合型糖鎖はアルカリ条件下で遊離するが、遊離した糖鎖が直ちに分解することが問題であった。アルカリ条件下での糖鎖の分解を抑制するために、本研究では反応系内にヒドロキシルアミンを添加することにより遊離した糖鎖をオキシムとして安定化することに成功した。また糖鎖を遊離させるための塩基触媒として有機強塩基であるジアザビスクロウンデセンを用いることにより、分解物の減少と反応時間の短縮、さらに固相抽出における試薬の除去を達成した。実試料には界面活性剤や変性剤などが含まれていることが多いが、それらのこの反応への影響に

についても検討した。その結果、ジチオスレイトールやメルカプトエタノールなどの還元剤は収量の低下を招くことが明らかとなった。また変性剤としては、尿素は問題なく使用できるがグアニジン塩酸塩はこの反応を妨害した。他の界面活性剤や緩衝液は問題なく使用できることを明らかにした。また、この反応によって得られる糖鎖は糖鎖オキシムである。糖鎖オキシムへの蛍光標識はピコリンボランとアニリン系蛍光標識剤による還元アミノ化反応により達成した。これにより従来糖鎖分析に用いられてきた 2-アミノピリジン、2-アミノベンズアミド、2-アミノ安息香酸などを用いた O-結合型糖鎖の分析が可能となった。また、N グリコシルシアル酸 (NeuGc) を含む糖鎖も今回開発した方法では問題なく分析できることが判明した。これは 40 年以上進歩してこなかった O-結合型糖鎖の分析に革新をもたらし、新たなグライコミクス技術基盤の構築を通じて、広く糖鎖生物学の発展に寄与する成果といえる。



(2) 市販糖タンパク質からの O-結合型糖鎖標品の分離収集

開発した O-結合型糖鎖遊離法を活用して、市販の糖タンパク質から糖鎖を遊離し蛍光ラベル後に HPLC で分離精製して標品とした。材料とした糖タンパク質は、ウシフェツイン、ウシ顎下腺ムチン、ブタ胃ムチンである。分取した糖鎖は質量分析計にて構造を確認し、20 種類の O-結合型糖鎖標品を得た。

(3) 糖鎖アミノ酸を出発物質とする O-結合型糖鎖ライブラリーの構築

糖転移酵素の調製

O-結合型糖鎖を *in vitro* で酵素合成するためのリコンビナント酵素の調製を行った。産総研ヒト糖鎖遺伝子ライブラリーを利用して、シアル酸、フコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンおよび N-アセチルガラクトサミンの伸長に關与する各種ヒト糖転移酵素遺伝子の酵素活性領域を発現ベクターに組換え、HEK293T 等のヒト培養細胞で可溶性酵素として発現させた。あらかじめ付加しておいたタグ配列を利用して、各糖転移酵素をリコンビナント酵素として培養液からビーズに回収・精製し、糖鎖アミノ酸合成反応に用いた。

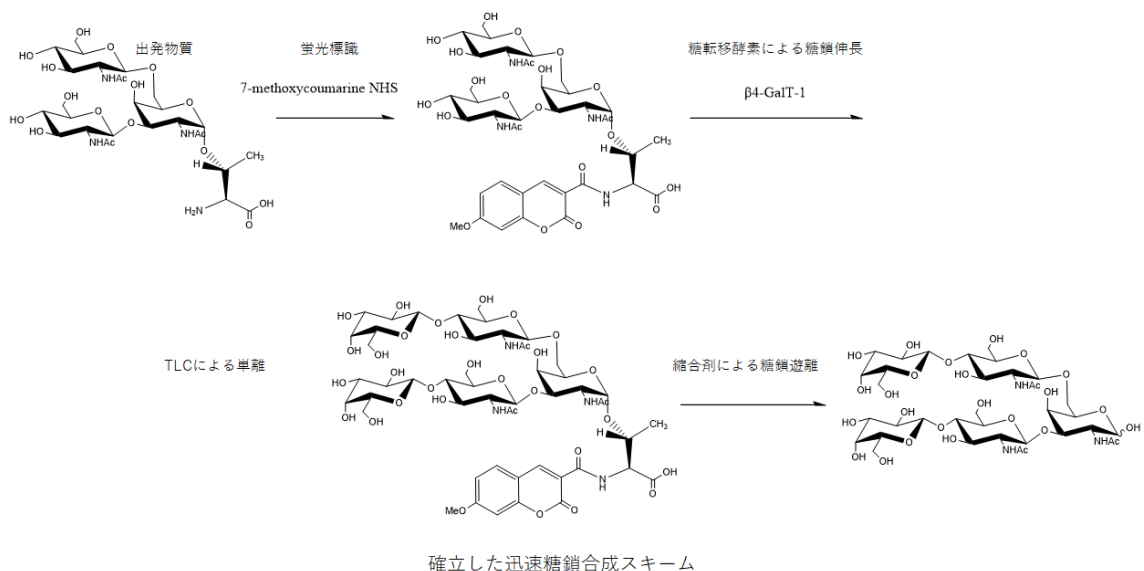
糖鎖スレオニンへの蛍光標識導入

糖転移酵素で糖鎖伸長した糖鎖アミノ酸の HPLC や TLC による高感度分取を目的として、出発原料である糖鎖スレオニンに蛍光標識を導入することを検討した。蛍光標識は、スレオニンの N 末端に常法にて導入した。ただし、次の項目で述べるように蛍光標識の種類によって糖鎖スレオニンから糖鎖を遊離することが難しくなることが判明した。その知見を踏まえ、糖鎖スレオニンの N 末端にはアシル系の蛍光標識を導入し糖転移酵素による糖鎖伸長を進めることとした。

糖鎖スレオニンからの糖鎖遊離

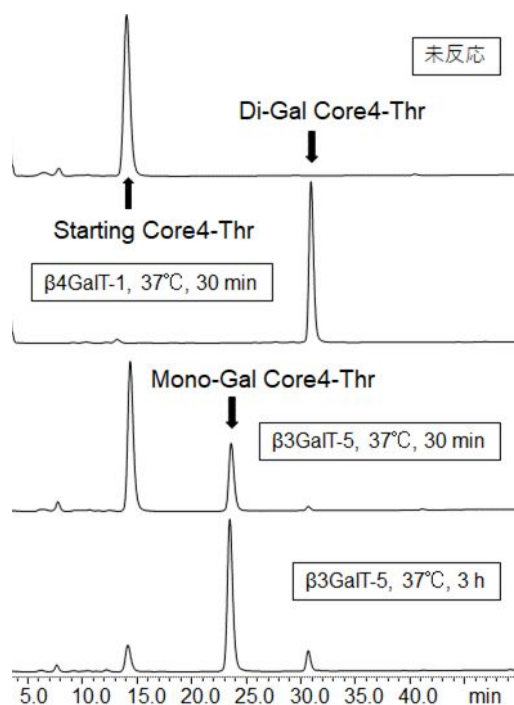
糖鎖スレオニンから糖鎖を遊離させるために上記の糖鎖遊離反応を行ったが、糖鎖は全く得られなかった。これはアミノ酸の C 末端のカルボキシル基が遊離であるため塩基を添加しても脱離がおきないことによると考えられた。そこで、N 末端に 7-フルオレニルメチル (Fmoc) 基を導入後、C 末端のカルボキシル基をアミド化して実験したが、結果は同じであった。次に C 末端をアミドではなくエチル基または tert-ブチル基などのエステル系保護基で保護し、糖鎖遊離反応を行うことを検討した。エチル基の場合は、糖鎖遊離反応時に添加する塩基ではずれてしまうため糖鎖は遊離できなかった。tert-ブチルエステルとした場合は、塩基によるエステルの分解は起きなかったが、やはり糖鎖は得られなかった。以上の結果から、N 末端のカーバメート系保護基である Fmoc 基による位の不活性化を原因ではないかと疑った。そこで、N 末端にアシル系保護基であるベンゾイル基を導入してみることにした。C 末端の解離をなくすためアミド化しようとしたところ、偶然にも糖鎖が部分的に遊離していることを見出した。このことは、糖鎖スレオニンの N 末端にアシル系の保護基を導入しておけば、(1)に記載した糖鎖遊離反応で処理せずとも、縮合剤を用いることにより中性条件下で糖鎖を遊離することができることを意味すると

考えられた。これらの知見を元に糖鎖スレオニンにアシル系の蛍光標識剤である 7-メトキシクマリン酸を導入し、縮合剤を用いて中性条件下で糖鎖を遊離する反応スキームを確立することができた。



糖鎖スレオニンの糖転移酵素による糖鎖伸長糖鎖スレオニンに で作成した糖転移酵素固定化ビーズを用いて糖鎖伸長反応を行った。core4スレオニンは末端にGlcNAcが2か所ある。GlcNAcの4位水酸基にガラクトースを転移する代表的な酵素である 4GalT1を用いてガラクトースを転移させると両方のGlcNAcにガラクトースが付加された。一方、GlcNAcの3位水酸基にガラクトースを付与する酵素である 3GalT5を用いた場合には、片方のGlcNAcに優先的にガラクトースが付加された。ガラクトースが付加された部位の構造解析は現在実施中であるが、糖転移酵素はこのような基質特異性が高く、種々のO-結合型糖鎖の合成に関して各糖転移酵素の基質特異性を明らかにしていくこともライブラリー構築のみならず糖鎖生物学の進歩に重要であると考えられる。

合成した各種糖鎖アミノ酸を TLC により単離することができれば迅速なライブラリー構築に有用である。そこで、 および で開発した 7-メトキシクマリン酸を導入した糖鎖スレオニンを用いて TLC による分取について検討した。TLC はシリカゲル 60 F254 を用い、展開液はアセトニトリル : 0.2%塩化カルシウム=3:1 を用いた。UV 光(360 nm)を照射することにより、糖鎖スレオニンは青い蛍光を示すシャープなバンドとして検出された。このバンドを削り取り、アセトニトリルを含む水溶液に懸濁させることにより、糖鎖アミノ酸を溶液中に回収することができた。今後、この方法を用いて糖鎖ライブラリーを拡充していく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Isaji Tomoya, Im Sanghun, Kameyama Akihiko, Wang Yuqin, Fukuda Tomohiko, Gu Jianguo	4. 巻 294
2. 論文標題 A complex between phosphatidylinositol 4 kinase II and integrin $\alpha 3 \beta 1$ is required for N-glycan sialylation in cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 4425-4436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.005208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kameyama Akihiko, Thet Tin Wai Wai, Toyoda Masaaki, Sakaguchi Midori	4. 巻 513
2. 論文標題 A practical method of liberating O-linked glycans from glycoproteins using hydroxylamine and an organic superbase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 186 ~ 192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 亀山昭彦
2. 発表標題 ムチンを調べる新しいプラットフォームの開発
3. 学会等名 第17回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀山昭彦
2. 発表標題 Breakthrough of O-glycan liberation and its application to analysis of mucins separated by supported molecular matrix electrophoresis
3. 学会等名 25th International Symposium on Glycoconjugates（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀山昭彦、ウェイウェイテッティン、豊田雅哲、阪口碧
2. 発表標題 0-型糖鎖遊離法のブレークスルーと分子マトリックス電気泳動によるムチン分析への応用
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀山昭彦
2. 発表標題 粘性糖タンパク質ムチンの解析：分子マトリックス電気泳動と糖鎖解析法のブレークスルー
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 隆 (Sato Takashi) (90371046)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	