

令和元年6月20日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15097

研究課題名(和文) 網羅的O型糖タンパク質定量プロファイル法の開発

研究課題名(英文) Development of profiling method for O-glycopeptides

研究代表者

芳賀 淑美 (HAGA, Yoshimi)

公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター がんオーダーメイド医療開発プロジェクト・研究員

研究者番号：40525789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、微量の生体試料中のO型糖鎖結合部位を網羅的に定量プロファイル解析する技術の開発に基づく、がん特異的O型糖鎖修飾タンパク質の同定を目的とした。O型糖鎖修飾部位を複数持つことが知られているモデルタンパク質を用いた実験では、非常に高い糖ペプチドの濃縮効率を達成し、未報告の新規O型糖鎖付加部位を複数同定することができた。さらにかん細胞抽出物を用いた解析では、ムチンやNF- κ Bなど、がんに関連する分子に実際にO型糖鎖修飾が起こっていることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖のうちN型糖鎖は付加部位のコンセンサス配列や基幹構造と呼ばれる共通の基礎構造があり、全N型糖鎖を遊離可能な酵素PNGase-Fも知られているため比較的研究がよく進んでいる。しかし、O型糖鎖はこれらの規則、ツールが全て無く、従来法や最新の質量分析計を駆使しても単一タンパク質のO型糖鎖付加部位を決定することさえ困難な状況であった。本開発技術は、あらゆる生体サンプル中から網羅的にO型糖鎖付加部位の同定と付加頻度の定量化を一度の質量分析で同時に可能とする世界初の分析手法である。

研究成果の概要(英文)：To identify cancer-specific O-linked glycosylated proteins comprehensively, we developed a profiling technology that quantify and profile O-linked glycosylation sites in a very small amount of biological intact samples. We achieved high enrichment efficiency of O-glycopeptides and was able to identify plural unreported O-linked glycosylation sites on a model protein which was known to be multiply O-glycosylated. Furthermore, by the analysis using a cancer cell extract, we confirmed that cancer-related molecules such as mucins and NF- κ B are certainly O-glycosylated.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 質量分析 グライコプロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のO型糖鎖修飾は多くの生理機能を持つことが知られている。特にがんでは特異的な糖鎖構造異常が高頻度に見られ、がん細胞の浸潤、転移、微小環境構築などに関わるだけでなく腫瘍マーカーとしても利用されている。

従来の研究では、N型・O型糖鎖の構造を解析する際に「様々なレクチンに対する親和性を調べる」、または「化学的・酵素的にタンパク質から切り離した糖鎖を蛍光標識してHPLCや質量分析計などで解析する」といった手法によってきた。しかし、これらの分析法では糖鎖がタンパク質のどの部位にどのような付加頻度で結合しているかという重要な情報が得られず、糖鎖が持つ生理機能解明の本質に迫ることが困難であった。特に本研究でターゲットとするO型糖鎖に関しては、全てのO型糖鎖をペプチド鎖から切断、遊離させる酵素が存在せず、付加部位の同定、構造の解明は極めて難しかった。そのため、O型糖鎖が持つ生理機能はごく限られた断片的な知見しか得られていない。

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究では微量の生体試料中のO型糖鎖結合部位を網羅的に定量プロファイル解析する技術の開発に基づく、がん特異的O型糖鎖修飾タンパク質の同定と分子生物学的機能解明を目的としている。

申請者はこれまでに、独自の網羅的O型糖タンパク質量定量プロファイル法開発を行ってきた。O型糖鎖が付加した糖ペプチドを特殊なアルカリ条件下で処理すると構造の種類によらず全てのO型糖鎖に脱離反応が起こり、糖鎖付加を受けていない同じ骨格のペプチドと比べて-1Daの質量シフトが観測される。

本研究では本法を発展させ、脱離で生じたアミノ基を利用したO型糖ペプチド特異的濃縮法を確立する。さらに、元から存在するアミノ基(全ペプチドのN末端、及びリジンの側鎖)をブロックすると同時にサンプル間比較定量も可能とする安定同位体ラベリングも組み合わせた。これにより、あらゆる生体試料に対して網羅的なO型糖鎖付加部位の同定と、その付加頻度の相対定量解析が同時に実施可能となる。

以上の解析より、癌腫に特異的な基質を網羅的に解析することにより、新規糖鎖標的治療薬・診断薬のターゲット探索をはじめ、O-グライコプロテオーム研究に革新をもたらす基盤技術となることが期待できる。

3. 研究の方法

一般的なプロテオミクス解析同様、タンパク質をトリプシンによって質量分析可能なペプチドサイズに消化する。脱離反応はリン酸基に対しても起こることが分かっているためホスファターゼ処理によりリン酸基を除去しておく。ペプチドのN末端、および、リジンの側鎖の1級アミンをアミン反応性試薬でラベル化し、ブロックすると同時にサンプル間定量を可能にする。得られたラベル化ペプチドを高濃度アンモニア水と特殊条件下で反応させることにより、O型糖鎖をペプチドから遊離させる(脱離反応)。O型糖鎖が付加したセリン・スレオニンでは

脱離が起こり、セリン・スレオニンの水酸基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換される。脱離によって露出したアミノ基を、アミンカップリング法によりピオチンプロープでラベル化する。その際に、ラベル化および精製の至適条件の検討を行う。ピオチン化された糖ペプチドのみをストレプトアビジンビーズで濃縮した後、ペプチドを溶出、回収する。LTQ-Orbitrap-Fusion Lumos 質量分析計(ThermoFisher Scientific社)にて溶出ペプチドの分析を行い、Mascot 検索により、必要なデータ処理後にO型糖鎖付加部位の同定を行った。その際、本法用にLC-MS分析パラメータを至適化した。具体的には、Nano-flow HPLCのグラジエントの検討、最適な開裂モードの検討、その他質量分析装置の各種電圧条件の決定、Mascot 検索におけるパラメータの決定を行った。

以上について、既知のO型糖鎖付加タンパク質、付加部位を含むより多くのO型糖鎖付加部位が同定可能な一連の分析条件の確定を試みた。

4. 研究成果

(1) O型糖鎖付加モデルタンパク質を用いた特異的濃縮法の確立

本法の有効性を検証するために、まずはモデルタンパク質としてO型糖鎖修飾部位を複数持つことが知られているウシフェツインを用いた。比較のために、O型糖タンパク質量定量プロファイル法にて濃縮を行わないウシフェツインのトリプシン消化物も調製し、同一条件で解析を行った。

トリプシン消化物をそのまま質量分析計で測定した場合、O型糖鎖修飾糖ペプチドは全ペプチドの0.4%しか存在が確認できなかった。しかし本法を用いることにより、サンプル中の含有率が76%まで上昇した。非常に高い糖ペプチドの濃縮効率を達成したことにより、既報の4倍もの未報告O型糖鎖付加部位を同定することに成功した。図1に示す通り、これまでに報告の

ない新規付加部位 18 か所を含む、24 か所の O 型糖鎖付加部位が同定された。

	リン酸化部位	O型糖鎖付加部位
データベース既報	8	6
LC-MS分析	8	15
本法 (糖ペプチド濃縮)	-	24

図1 ウシフェツインの O 型糖鎖付加部位の同定

(2) 各種がん細胞株における O 型糖鎖付加基質の網羅的同定

上記の開発した手法を使用し、ヒト子宮頸がん細胞株(HeLa)、ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株(A549)、ヒト結腸腺がん細胞株(HCT116) など、様々ながん細胞株の O 型糖鎖修飾タンパク質の網羅的解析を行った。解析の結果、ムチンや NF- B など、がんに関連する分子に実際に O 型糖鎖修飾が起こっていることを確認した。さらに HeLa 細胞抽出物を用いた解析では、既存の手法で解析した場合と比較して 5 倍もの O 型糖鎖付加部位を同定することに成功した。生体サンプル内で存在量の少ない O 型糖タンパク質を網羅的に捕捉する新規技術の確立に向けて、手法のさらなる高感度化を目指している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Yoshimi Haga, Motohide Uemura, Satoko Baba, Kentaro Inamura, Kengo Takeuchi, Norio Nonomura and Koji Ueda; Identification of Multisialylated LacdiNAc Structures as Highly Prostate Cancer Specific Glycan Signatures on PSA, Analytical Chemistry, 査読有, 91(3): 2247-2254 (2019)
DOI: 10.1021/acs.analchem.8b04829

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Yoshimi Haga, Motohide Uemura, Satoko Baba, Kentaro Inamura, Kengo Takeuchi, Norio Nonomura and Koji Ueda; Development of a specificity-enhanced secondary biomarker for prostate cancer: PSA G-Index, 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research, 2019 年 2 月 11 日, ハワイ (USA)
2. Yoshimi Haga, Motohide Uemura, Kentaro Inamura, Kengo Takeuchi, Norio Nonomura and Koji Ueda; Rapid profiling of prostate cancer-specific PSA glycoforms as a specificity-enhanced secondary biomarker, HUP0 2018, 2018 年 10 月 2 日, フロリダ (USA)
3. 芳賀淑美、植村元秀、稲村健太郎、竹内賢吾、野々村祝夫、植田幸嗣; 前立腺癌特異的 PSA 糖鎖構造の同定による高特異度前立腺癌マーカー PSA G-index の開発, 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年 9 月 28 日, 大阪
4. Yoshimi Haga, Motohide Uemura, Norio Nonomura and Koji Ueda; Identification of highly prostate cancer-specific PSA glyco-isoforms (PSA G-index), International Symposium "Systems Glycobiology and Beyond", 2017 年 11 月 17 日, 埼玉
5. Yoshimi Haga, Motohide Uemura, Norio Nonomura and Koji Ueda; Identification of highly prostate cancer-specific PSA glyco-isoforms (PSA G-index), 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月 28 日, 横浜

〔図書〕(計 1 件)

1. “糖鎖構造の不均一性を定量化する—Erexim 法によるバイオ医薬品エンジニアリング”, 芳賀淑美, 植田幸嗣, 実験医学 2017 年 6 月号 Vol.35 No.9, 糖鎖がついにわかる! 狙える! 診断薬・治療薬イノベーションを導く生命鎖 (植田幸嗣, 久野 敦 / 企画), 羊土社, pp. 1428-1433, 2017

〔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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

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。