

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2007 ~ 2008

課題番号: 19750132

研究課題名(和文) 相互作用解析を目的とした機能性糖鎖ライブラリーの迅速構築法

研究課題名(英文) Functional Glycan Library for Analysis of Sugar-Protein Interaction Based on Glycoblotting Technology

研究代表者

古川 潤一 (FURUKAWA JUN-ICHI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究所・特任助教

研究者番号: 30374193

研究成果の概要: 本研究ではこのようなアミノオキシ基もしくはヒドラジド基による糖鎖選択的な反応をさらに発展させ、混合物中に存在する糖鎖を迅速かつ大量に精製する技術を確立し、さらにはシークエンシャルな糖鎖タグの付け替えにより目的に応じた糖鎖ライブラリーを調製する新たな手法の開発を行う。

交付額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	0	2,800,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,300,000	150,000	3,450,000

研究分野: 化学

科研費の分科・細目: 複合化学・生体関連化学

キーワード: グライコミクス、ケミカルバイオロジー、糖鎖認識分子、質量分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 「第3の生命鎖」と呼ばれる糖鎖は複合糖質として細胞表面に多種多様に存在しており、細胞認識や感染症・炎症の原因、ガン転移等に大きな役割を有している。特にガン化や発生においては劇的な細胞表面糖鎖の変化を伴うことが示されており、細胞間や細胞と基質間の認識における糖鎖の役割について議論され、糖鎖に基づく細胞間相互作用に関する多くのモデルが提唱されている。このような糖鎖機能解析を行うため様々な糖鎖が必須であるが、生体試料からの糖鎖精製には煩雑な一連の前処理操作が必要であり、また化学合成による糖鎖調製のアプローチにしても保護・脱保護の非常に時間の掛かる長い繰り返しが必要とされる。ゆえに糖鎖機能を解析するための糖鎖ライブラリーは十

分に準備されておらず、糖鎖の生物活性に関する様々な研究は網羅的なものではなく、研究者の興味の対象に委ねられてきたのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 生体由来試料は多様な糖鎖が十分量含まれており、糖鎖ライブラリー構築には好都合であるが、タンパク質をはじめ様々な夾雑物が多量に含まれているため、糖鎖のみを迅速かつ大量に精製する事は非常に困難である。そこで本研究では糖鎖捕捉ビーズを用いて糖鎖を迅速かつ選択的に精製する手法を開発する。特に糖鎖捕捉ビーズの官能基密度を高くすることで、分析レベルではなく分取レベルでの糖鎖精製を行う。

(2) イミン、ヒドラゾンおよびオキシムの p

Hおよび温度での安定性とイミン交換反応による効率について詳細な条件検討を行う。得られた条件によりシークエンシャルなタグ交換反応法を開発し、最終的には得られた糖鎖ライブラリーによる用いて相互作用解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 糖鎖大量調製法のための検討

糖鎖捕捉ビーズの官能基の保護法について検討する。具体的にはアセチル化に変わる可逆的なキャッピング、言い換えれば Boc 基などの容易に脱離可能なキャッピング法を用いた効率の糖鎖回収およびビーズについて検討する。

(2) 糖鎖分離法の開発

2-アミノピリジンによる PA 化糖鎖の分離条件はすでに確立されている。そこで、糖鎖ライブラリーを構築するため、HPLC に適した擬似 PA 試薬の開発を行う。また、試薬のヒドラゾンおよびオキシム形成収率などを評価し、液体クロマトグラフィで分取について検討する。

(3) シークエンシャルなタグ交換反応

glycoblotting 法を基盤技術として、標識試薬によるシークエンシャルなタグ交換を効率的に行うため、イミン交換による捕捉糖鎖の遊離および標識効率を精査した。

キトトリアース (GN3) をモデルに aoWR または AcWR 標識体を調製した。それぞれに過剰の aoWR または AcWR 試薬の重水素標識体を添加し、オキシム、オキシム、オキシム、ヒドラゾン、ヒドラゾン、オキシム、ヒドラゾン、ヒドラゾンの 4 種のイミン交換について、効率を MALDI-MS で評価した。またイミン交換の結果に基づき、HPLC 用に導入した PA タグから MALDI さらには SPR 等への固定化タグへとさまざまな用途に応じた機能性タグへの変換についても検討する。

(4) 相互作用解析を目指したフォトアフィニティ試薬導入の検討

相互作用解析のツールの一つとして光アフィニティプローブについて検討する。光アフィニティプローブには、生化学工業のアフライト CHO を用い、遮光条件化でオキシム化反応を行った。すべての反応については、MALDI-TOF (UltraFlex) によって生成物の確認を行った。

(5) 糖鎖ライブラリーによる糖鎖相互作用解析

皮膚のグリコーム解析により明らかとなったマウス表皮の特異的な糖鎖構造に着目し、開発されたシークエンシャルなタグ交換法により目的とする糖鎖を調製した後、ピアコアにより相互作用分子の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 糖鎖捕捉ビーズの官能基密度を高くす

ることで、分析レベルではなく分取レベルでの糖鎖精製を行うことが可能であった。実際に調製した糖鎖捕捉ポリマーは官能基が $2 \mu\text{mol}/\text{mg}$ と現在市販されているヒドラジド担体と比較すると $50 \sim 100$ 倍の官能基を有することが明らかとなり、これにより生体試料より 1 nmol 程度の濃度での糖鎖精製を行うことができ、分取レベルでの解析が可能であることが判明した。また、Boc 基などの可逆的なキャッピングについては、交換反応における Boc 基の脱保護が起こるため、回収量の若干の低下が観測された。

(2) 糖鎖分離条件の検討

糖鎖の分離分析に代表的な 2 AB 標識糖鎖と構造が類似なアントラニロイルヒドラジンにより蛍光ラベル化された糖鎖 (Ah 化糖) の HPLC による分離精製について検討を行った (図 1)。順相系のアミノカラムにより、標識化された糖鎖を分離することが可能であり、これまでに報告されている分離パターンを保持できることが明らかとなった。また、(3) で述べるが、本試薬で得られる標識化合物はヒドラジド化合物であるため、さらにアミノオキシ含有試薬により効率的に標識交換を行うことが可能であった。

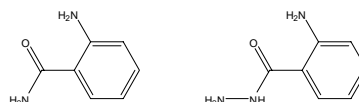


図 1. 蛍光標識試薬 左が 2 AB、右がアントラニロイルヒドラジン (Ah)

(3) イミン交換反応

Glycoblotting 法を改良し、精製した糖鎖を任意の標識試薬により標識する技術の確立を行った。

Glycoblotting 法は、糖鎖をタンパク質等から遊離したときに必ず還元末端にアルデヒド基と等価のヘミアセタール基を有することに着目し、アミノオキシ基を表出するビーズによって糖鎖をケモセレクトティブに捕捉することによって、生体試料中から糖鎖を高度に精製する技術である。形成したオキシム結合は酸性条件下で開裂するため糖鎖を生成することができるが収率は 30% 程度と問題が残る。我々は、ヒドラゾンとオキシムについて、ヒドラジド化合物およびアミノオキシ化合物によるイミン交換の効率を詳細に検討した結果、ヒドラゾンを過剰のアミノオキシ化合物存在下にほぼ定量的な収率でイミン交換を行う条件を見出した。

イミン交換反応の結果に基づき、ヒドラジド基を表出するポリマーを用いて、生体由来の糖鎖ライブラリーを捕捉し、任意のアミノオキシ含有化合物によって補足した糖鎖を添加した試薬の標識体として高効率に回収で

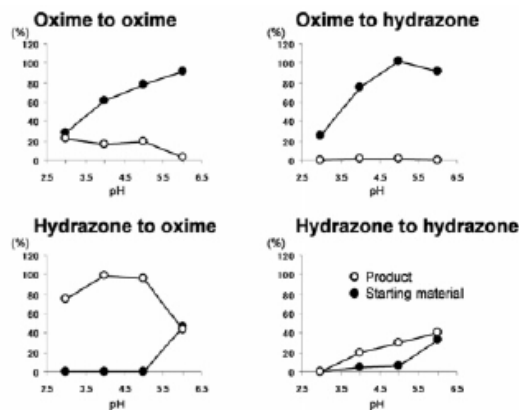


図2. 種々のイミン交換の効率の比較。ヒドラゾンからオキシムへの変換はほぼ定量的に進む。次いでヒドラゾンからヒドラゾンへのイミン交換も高効率に進む。

ることが可能になった(図3)。また、ヒドラゾンからヒドラゾンへの高効率なイミン交換の条件も定めたため、一度糖鎖に導入した標識を目的に応じて複数回交換できるストラテジーも実証した。本法により、糖鎖を分離、検出、機能評価等の目的に応じて、標識を任意に交換できるようになった。

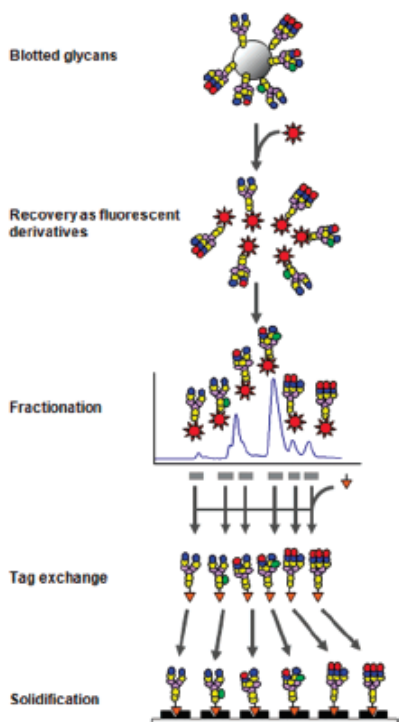


図3. シークエンシャルに異なる標識試薬への付け替え。本法により、天然由来の糖鎖をコンテンツにもつ糖鎖アレイの構築などが可能になる。

(4) フォトアフィニティ試薬による標識と探索

上記の結果を受けて、糖鎖ライブラリーを光アフィニティ標識試薬によって標識を行った。MS/MSにおいてオキシム結合を優先的に切断可能であるという知見に基づき、糖鎖捕捉のための官能基としてアミノオキシ基を、光アフィニティプローブとしてフェニルジアリジン基を、精製用のタグとしてピオチン基を有する標識試薬(図4、生化学工業)による標識条件の検討を行った。

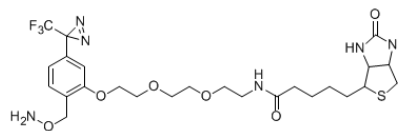


図4. 光アフィニティプローブ

本試薬による生体由来の糖鎖ライブラリーの標識の可否を評価するために血清由来のN-結合型糖鎖を glycoblotting 法により血清中の糖鎖のみを固相担体へ捕捉し、精製した糖鎖を1%TFAによって、還元末端が遊離の糖鎖として回収した。上記光アフィニティプローブと混合し、濃縮反応を行ったものについてMALDI-TOFにより標識反応を評価した。図5に示す通り、血清わずか2.5μL由来の糖鎖ライブラリーが良好に光アフィニティ標識することを実証した。

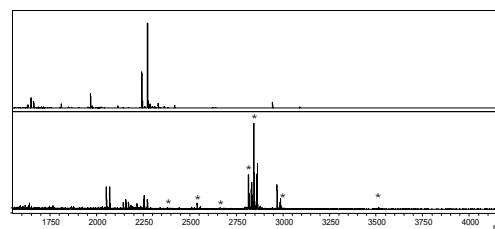


図5. 血清糖鎖の光アフィニティ標識糖鎖のMALDIスペクトル; a)Glycoblotting法により精製された血清糖鎖; b)光アフィニティ標識血清糖鎖(*標識化糖鎖)。*がついていないピークは標識糖鎖とマトリクスに用いた2,5-DHBの縮合体と分子量が一致

また、Ah標識糖鎖からの交換反応も可能であり、リボヌクレアーゼBの糖鎖よりハイマンノース型糖鎖のM5のみをHPLCにより分取し、光アフィニティ標識することに成功した(図6)。得られたM5標識糖鎖をモデル糖鎖としてConAとの反応について評価したところ、光アフィニティ標識反応に濃度依存性があり、生体に存在する程度の微量な糖鎖と糖認識分子間の標識を達成することは困難であることが示され、低濃度サンプルの相互作用解析手法の開発が今後の課題である。

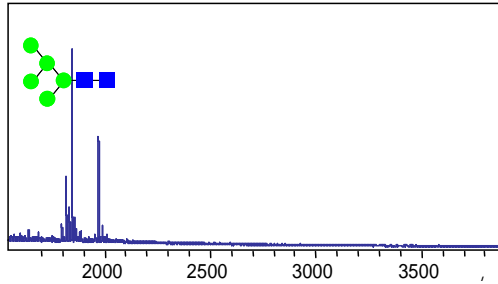


図6 . M5 糖鎖のフォトアフィニティ標識体の MALDI スペクトル

(5) GFRG による相手分子の同定

-Gal エピトープにより修飾されるタンパク質は共通して接着分子としての機能を有しているから、本エピトープが直接接着に関与している可能性も考えられる。本可能性を検討するために、表皮においてメジアン値の10倍以上高発現している遺伝子を公開されているマイクロアレイデータベース (SymAtlas) で検索した結果、糖結合能がアノテートされている遺伝子が6種類あった。そのうち、入手可能なガレクチン-3及びガレクチン-7について、4種類の -Gal エピトープ含有糖鎖を含むマウス表皮に実際に存在する糖鎖を固相化し、SPR により相互作用を評価した。図6aに示す通り、ガレクチン-3は幾つかの糖鎖に対して結合をしめし、その相互作用は固定化した糖鎖構造に依存して異なった。すなわちガレクチン-3の結合は -Gal エピトープの数の増加に応じて強くなり、 -Gal エピトープに対する親和性が実証された。興味深いことにガレクチン-3の結合は還元末端にフコースが存在するとき、更に増強した。他方、ガレクチン-7に対する結合は、用いた条件下ではいずれもほとんど認められなかった。

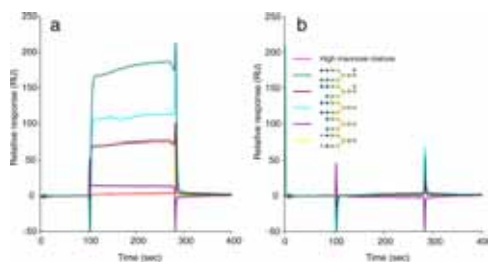


図6 . 固定化した種々の糖鎖に対するマウスガレクチン-3(a)およびガレクチン-7(b)の相互作用を示すセンサーグラム。

表皮に実際に発現している様々な糖鎖をプローブに用いて候補分子との相互作用を解析することによって受容体候補の同定と糖鎖認識分子のユニークな糖鎖認識特異性

の解明に成功した。このことは標的組織に実際に発現している糖鎖ライブラリーを相手分子探索のプローブとして利用する有用性を実証するものである。

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4件)

Uematsu R., Shinohara Y., Nakagawa H., Kuroguchi M., Furukawa J.-i., Miura Y., Akiyama M., Shimizu H., Nishimura S.-I., "Glycosylation specific for adhesion molecules in epidermis and its receptor revealed by glycoform-focused reverse genomics", *Mol. Cell. Proteomics*, 8, 232-244 (2009) 査読有

Baudino L., Shinohara Y., Nimmerjahn F., Furukawa J.-I., Nakata M., Martínez-Soria E., Petry F., Ravetch V. J., Nishimura S.-I., and Izui S., "Crucial Role of Aspartic Acid at Position 265 in the CH2 Domain for Murine IgG2a and IgG2b Fc-associated Effector Functions", *J. Immunol.*, 181, 6664-6669 (2008) 査読有

Baudino L., Nimmerjahn F., Shinohara Y., Furukawa J.-I., Petry F., Verbeek S., Nishimura S.-I., Ravetch V. J., and Izui S., "Impact of a Three Amino-Acid Deletion in the CH2 Domain of Murine IgG1 on Fc-associated Effector Functions", *J. Immunol.*, 181, 4107-4112 (2008) 査読有

Furukawa J.-i., Shinohara Y., Kuramoto H., Miura Y., Shimaoka H., Kuroguchi M., Nakano M., Nishimura S.-I., "A comprehensive approach to structural and functional glycomics based on chemoselective glycoblotting and sequential tag conversion", *Anal. Chem.*, 4, 1094-1101 (2008) 査読有

[学会発表](計1件)

! 2007年8月1日 - 3日 日本糖質学会 (福岡)「Glycoblotting法と連続的な標識交換に基づく構造および機能グライコミクスのための包括的なアプローチ」古川 潤一、篠原康郎、倉本洋光、三浦嘉晃、島岡秀行、黒河内正樹、中野美佳、岩崎倫政、三浪明男、西村紳一郎

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古川 潤一 (FURUKAWA JUN-ichi)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・

特任助教

研究者番号：30374193

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし