

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15597

研究課題名(和文)新規シアル酸様式特異的修飾法を応用したシアリル化糖鎖・糖タンパク質解析法の開発

研究課題名(英文)The development of analytical method for sialylated glycans and glycoproteins by aminolysis-SALSA

研究代表者

花松 久寿(Hanamatsu, Hisatoshi)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：70734185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者が開発した 2,3シアル酸開環アミノリシスを基盤としたシアル酸結合様式特異的修飾法(Aminolysis-SALSA)を応用し、安定同位体試薬を用いた糖鎖比較 MS 解析法、ビオチン誘導体化アミン試薬を用いた糖タンパク質/ペプチドの精製・濃縮法を開発した。また、エステル化により調製したシアリル化糖鎖と直鎖型一級アミン試薬を反応させることで、2,3結合シアル酸のみが分子内ラクトン環を形成し、環開裂アミノリシスにより選択的にアミド交換を行うことができるエステル-アミド交換法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した、安定同位体試薬を用いた 2,3シアル酸特異的修飾法、ビオチン誘導体化アミン試薬を用いたシアリル化糖タンパク質/ペプチドの修飾法は、疾患糖鎖バイオマーカー探索、投薬による治療効果のモニタリング、血液、細胞、組織など多様な生体サンプルからの 2,3シアル酸を有する糖タンパク質/ペプチド特異的な精製・濃縮などへの応用が期待される。また、エステル-アミド交換法はシアル酸結合様式の識別だけではなく、分岐構造を持つ糖鎖の識別も可能であり、より詳細な糖鎖構造異性体の識別に繋がる。

研究成果の概要(英文)：In order to develop novel analytical methods for sialylated glycans and glycoproteins/peptides, we investigated the application of sialic acid linkage-specific alkylamidation via lactone ring-opening aminolysis, termed as aminolysis-SALSA. In this study, we developed comparative and quantitative glycomic analysis by isotope labeling of 2,3-linked sialic acid residues and purification and concentration method of sialylated glycoproteins/peptides using biotin-derivatized amine reagents. Moreover, we found that 2,3 sialyl linkage-specific amidation of esterified sialoglycans can be achieved via an intramolecular lactone, and reported as lactone-driven ester-to-amide derivatization method.

研究分野：分析化学

キーワード：糖鎖解析 シアル酸 質量分析 グライコミクス

1. 研究開始当初の背景

生体膜に存在する糖タンパク質や糖脂質における糖鎖は非還元末端に酸性糖鎖の1つであるシアル酸を豊富に有している。シアル酸は糖タンパク質では主に $\alpha 2,3$ および $\alpha 2,6$ 結合、糖脂質においては $\alpha 2,3$ および $\alpha 2,8$ 結合といった多様な結合様式で存在しており、その結合様式の違いに起因して莫大な数の糖鎖構造異性体が存在する。近年、シアル酸結合様式の違いがウイルス感染やその防御機能などに大きな影響を与えることなどが報告され(引用文献①)、シアル酸結合様式の詳細な解析は非常に重要である。しかながら、シアル酸結合様式に起因する構造異性体は同一の質量を保つため、高感度検出可能な質量分析装置による分析でも構造異性体の識別は困難であった。申請者は $\alpha 2,3$ シアル酸開環アミノリシスを基盤とした結合様式特異的アミド化法を開発し、質量分析装置を用いた迅速なシアル化糖鎖の構造異性体識別法(Aminolysis-Sialic Acid Linkage Specific Alkylamidation [SALSA]法)を報告した(引用文献②)。本手法は図1に示すように、 $\alpha 2,3$ および $\alpha 2,8$ 結合シアル酸が形成する分子内ラクトン環の開裂とアミド基への誘導化を瞬時に行うことができるため、従来のSALSA法(引用文献③)の反応工程の簡略化と反応時間の大幅な短縮が達成されている。また、Aminolysis-SALSA法の最大の特徴は、さまざまな直鎖1級アミン試薬でシアル酸を誘導体化することが可能な点であり、シアル化糖鎖や糖タンパク質/ペプチド解析などへの応用が期待される。

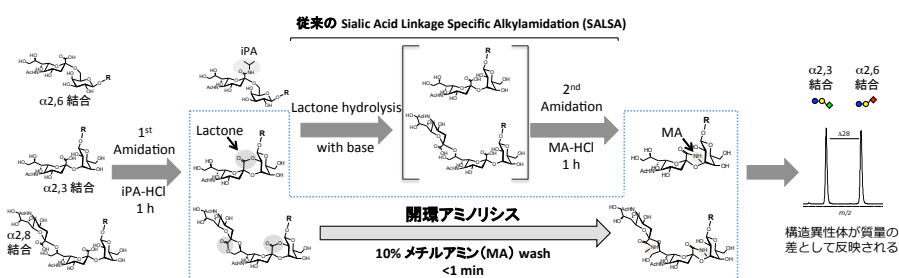


図1 Aminolysis-SALSA法の反応スキーム概要

2. 研究の目的

本研究では、 $\alpha 2,3$ シアル酸開環アミノリシスを基盤としたシアル酸結合様式特異的修飾法(Aminolysis-SALSA法)を応用することで、安定同位体試薬を用いた糖鎖比較解析法、シアル酸結合糖タンパク質/ペプチドの精製・濃縮法などの開発を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 安定同位体アミン試薬の導入による糖鎖比較定量解析法の開発

重水素化されたメチルアミン d3 やエチルアミン d5 などの安定同位体試薬は塩酸塩として販売されており、有機溶媒への難溶性や酸性 pH を示すため Aminolysis-SALSA 法に適用するには課題が残されていた。そこで、強塩基性イオン交換樹脂による塩酸の除去を検討した。また、tert-ブチルアミンとアミン塩酸塩を併用した Aminolysis-SALSA 法についても検討を行った。

(2) ビオチン誘導体化アミン試薬を用いた糖タンパク質/ペプチド精製・濃縮法の開発

$\alpha 2,3$ および $\alpha 2,6$ 結合の2つのシアル酸を有する di-sialy T 糖鎖をスレオニン残基を持つ合成糖ペプチドを用いて、Aminolysis-SALSA 法でビオチン誘導体化アミン試薬であるビオチン-PEG2-アミンによる $\alpha 2,3$ 結合シアル酸の修飾を検討した。また、アビジンビーズを用いた糖ペプチドの回収についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) 安定同位体アミン試薬の導入による糖鎖比較定量解析法の開発

強塩基性イオン交換樹脂を用いて調製した重水素化アミンを用いることで、Aminolysis-SALSA 法による $\alpha 2,3$ 結合シアル酸特異的なアミド誘導化に成功した。また、tert-ブチルアミンとアミン塩酸塩を併用した Aminolysis-SALSA 法を検討した結果、立体障害の大きい tert-ブチルアミンではラクトン環開裂アミノリシス反応は進行せずに反応液中の pH を塩基性へとシフトでき、共存している重水素化アミン塩酸塩によるラクトン環開裂アミノリシスを介した $\alpha 2,3$ 結合シアル酸の特異的なアミド誘導化にも成功した (iSALSA 法、図2)。

本手法を用いて、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH: nonalcoholic steatohepatitis) 患者の血

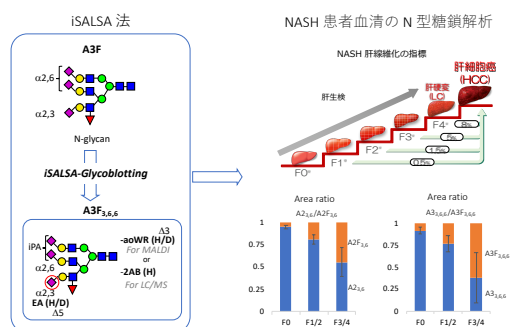


図2 iSALSA法の概要およびNASH血清N結合型糖鎖解析

清 [線維化なし (F0)、中程度 (F1/2)、重度 (F3/4)] の比較定量解析を行った結果、肝線維化の進展により $\alpha 2, 3$ 結合シアル酸を含むフコシル化 N 結合型糖鎖 (A2F_{3,6} および A3F_{3,6,6}) とその合成の前駆体 (A2_{3,6} および A3_{3,6,6}) の血中存在比の変動が認められた (図 2)。

(2) ビオチン誘導体化アミン試薬を用いた糖タンパク質/ペプチドの精製・濃縮法の開発

合成糖ペプチドを用いて、Aminolysis-SALSA 法による $\alpha 2, 3$ シアル酸へのビオチン誘導体化アミン試薬であるビオチン-PEG2-アミンの導入を検討したところ、図 3 に示すようにアミン試薬との反応時間が短い場合はビオチン-PEG2-アミンの反応が不十分であったが、5 分間の反応時間を設けることで $\alpha 2, 3$ シアル酸を完全に修飾することに成功した。次にアビジンビーズを用いた糖ペプチドの精製法について検討したところ、糖ペプチドを回収することはできたが、ギ酸を用いた溶出過程でペプチド側に予期せぬ修飾が生じることから、溶出条件の詳細な検討が必要であることがわかった。

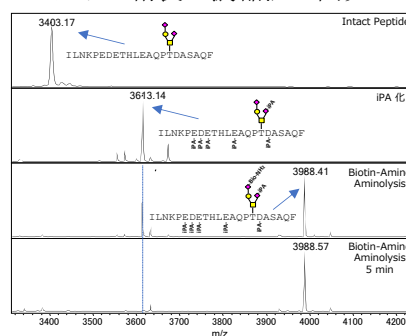


図3 Aminolysis-SALSA 法によるビオチンアミド修飾後 (Bio-NH₂) の酸性糖ペプチドのMALDI-TOF MS スペクトル

(3) エステル-アミド交換法によるシアル酸結合様式識別法の開発

エステル化修飾した糖鎖を調製し、直鎖 1 級アミン試薬と混合したところ、 $\alpha 2, 6$ 結合シアル酸はエステル化されたままであったが、 $\alpha 2, 3$ 結合シアル酸のエステル基はアミド基へと交換される興味深い現象を見出した。そこで、結合様式特異的なシアル酸のエステル-アミド交換の反応を詳細に検討するため、ラクトン形成の分子エネルギー計算やアミド交換反応の条件について検討を行った。分子エネルギー計算の結果、シアル酸の結合様式の違いが分子内ラクトンの安定性に与えることが示唆され

(図 4)、実験においてもアミンを加えることで分子内ラクトンが安定とされる $\alpha 2, 8$ もしくは $\alpha 2, 3$ 結合のシアル酸エステルだけが鍵中間体とされるラクトン形成を経由した環開裂アミノリシスによりアミド基へと選択的に交換されることが明らかとなった (LEAD [Lactone-driven Ester-to-Amide Derivatization]-SALSA 法)。さらに、ラクトン形成に関わる隣接する糖の水酸基の位置やエステル化の官能基の違いが分子内ラクトンの安定性に影響を与えることが示されたため、官能基をメチルエステルからエチルエステルに変えたスフィンゴ糖脂質 GM3、GM2 および GM1 糖鎖を用いてエステル-アミド交換を検証した (図 5)。その結果、分岐構造を持たない GM3 は安定なラクトンを形成できるためプロピルアミド基へと交換されたが、ガラクトースの 4 位の水酸基に GalNAc が結合し分岐構造を持つ GM2 および GM1 ではアミド交換反応が全く進行しなかった。これらの結果より、LEAD-SALSA 法は、シアル酸の結合様式だけではなく、隣接する糖鎖の分岐構造も識別できる新規な方法であることを実証した。また、Aminolysis-SALSA 法および本手法を用いて、自然老化マウスの腓腹筋、心筋、血清、肝臓などの臓器横断的な N 結合型糖鎖解析を行い、心筋において特定の糖鎖のシアル酸構造異性体が増加に伴い発現増加することを見出した。

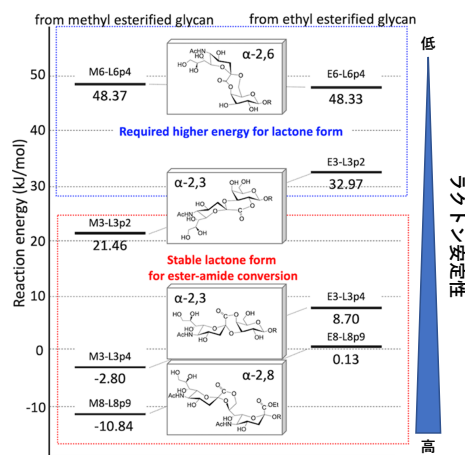


図4 ラクトン形成の分子エネルギー計算

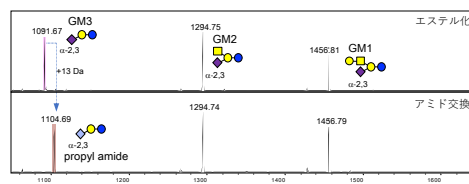


図5 エステル-アミド交換によるGSL糖鎖の構造識別

引用文献

- ① Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., et al. (2009). Essentials of Glycobiology, 2nd edition. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ② Hanamatsu H, Nishikaze T, Miura N, Piao J, Okada K, Sekiya S, Iwamoto S, Sakamoto N, Tanaka K, Furukawa, JI. Sialic Acid Linkage Specific Derivatization of Glycosphingolipid Glycans by Ring-Opening Aminolysis of Lactones. Anal Chem. 2018 Nov 20;90(22):13193-9.
- ③ Nishikaze T, Tsumoto H, Sekiya S, Iwamoto S, Miura Y, Tanaka K. Differentiation of Sialyl Linkage Isomers by One-Pot Sialic Acid Derivatization for Mass Spectrometry-Based Glycan Profiling. Anal Chem. 2017 Feb 21;89(4):2353-60.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Furukawa Jun-ichi, Hanamatsu Hisatoshi, Nishikaze Takashi, Manya Hiroshi, Miura Nobuaki, Yagi Hirokazu, Yokota Ikuko, Akasaka-Manya Keiko, Endo Tamao, Kanagawa Motoi, Iwasaki Norimasa, Tanaka Koichi	4. 巻 92
2. 論文標題 Lactone-Driven Ester-to-Amide Derivatization for Sialic Acid Linkage-Specific Alkylamidation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 14383 ~ 14392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c02209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pecori Federico, Yokota Ikuko, Hanamatsu Hisatoshi, Miura Taichi, Ogura Chika, Ota Hayato, Furukawa Jun-ichi, Oki Shinya, Yamamoto Kazuo, Yoshie Osamu, Nishihara Shoko	4. 巻 11
2. 論文標題 A defined glycosylation regulatory network modulates total glycome dynamics during pluripotency state transition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1276 ~ 1276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79666-4	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 Miura Nobuaki, Hanamatsu Hisatoshi, Yokota Ikuko, Okada Kazue, Furukawa Jun-Ichi, Shinohara Yasuro	4. 巻 10
2. 論文標題 Toolbox Accelerating Glycomics (TAG): Glycan Annotation from MALDI-TOF MS Spectra and Mapping Expression Variation to Biosynthetic Pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10101383	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 Xu Liang, Hanamatsu Hisatoshi, Homan Kentaro, Onodera Tomohiro, Miyazaki Takuji, Furukawa Jun-ichi, Hontani Kazutoshi, Tian Yuan, Baba Rikiya, Iwasaki Norimasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Alterations of Glycosphingolipid Glycans and Chondrogenic Markers during Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Chondrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1622 ~ 1622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10121622	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 Pecori Federico, Akimoto Yoshihiro, Hanamatsu Hisatoshi, Furukawa Jun-ichi, Shinohara Yasuro, Ikehara Yuzuru, Nishihara Shoko	4. 巻 133
2. 論文標題 Mucin-type O-glycosylation controls pluripotency in mouse embryonic stem cells via Wnt receptor endocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 245845 ~ 245845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.245845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 花松 久寿、古川 潤一	4. 巻 92
2. 論文標題 糖鎖一次構造解析技術の開発要素	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 360 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920360	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hanamatsu Hisatoshi, Nishikaze Takashi, Tsumoto Hiroki, Ogawa Koji, Kobayashi Takashi, Yokota Ikuko, Morikawa Kenichi, Suda Goki, Sho Takuya, Nakai Masato, Miura Nobuaki, Higashino Kenichi, Sekiya Sadanori, Iwamoto Shinichi, Miura Yuri, Furukawa Jun-ichi, Tanaka Koichi, Sakamoto Naoya	4. 巻 91
2. 論文標題 Comparative Glycomic Analysis of Sialyl Linkage Isomers by Sialic Acid Linkage-Specific Alkylamidation in Combination with Stable Isotope Labeling of 2,3-Linked Sialic Acid Residues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 13343 ~ 13348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b03617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花松久寿, 西風隆司, 津元 裕樹, 小川浩司, 横田育子, 森川賢一, 須田剛生, 荘拓也, 中井正人, 三浦信明, 関谷禎規, 岩本慎一, 三浦ゆり, 田中 耕一, 坂本直哉, 古川潤一
2. 発表標題 安定同位体を用いたSALSA法による比較質量分析法の開発
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花松久寿, 古川潤一
2. 発表標題 ケミカルグライコムクスを用いた加齢による糖鎖変化の包括的解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花松久寿
2. 発表標題 シアル酸結合様式特異的な化学修飾による構造異性体識別法の開発
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 分析用試料の作成方法	発明者 花松 久寿、西風 隆司、横田 育子、 古川 潤一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-130188	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関