

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510212

研究課題名（和文）糖鎖バイオマーカー探索を目的とした新規シアロ糖ペプチドエンリッチメント法の開発

研究課題名（英文）Development of enrichment methods of sialoglycopeptides towards glycobiomarker discovery

研究代表者

亀山 昭彦（KAMEYAMA AKIHIKO）

独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・研究チーム長

研究者番号：80415661

研究成果の概要（和文）：糖タンパク質はバイオマーカー探索のターゲットとして期待されている。本研究ではシアル酸を有する糖タンパク質にフォーカスしたマーカー探索へのアプローチとして、シアル酸を介した新規なシアロ糖タンパク質の濃縮法を考案し、その開発を進めた。シアル酸と固相担体との結合法について種々検討した結果、アルデヒドとオキシアミンの反応によるオキシム形成によるカップリング方法が有効である可能性を見出し、そのためのリンカーを設計し合成した。

研究成果の概要（英文）：Glycoproteins have great potential as novel clinical biomarkers. We studied on the development of a novel enrichment method of sialoglycoproteins which contain sialic acids on their glycan moieties, as an approach to biomarker discovery focused on sialoglycoproteins. After intensive trials, we found that oxime formation is one of the most practical methods for coupling of sialoglycoproteins and resin beads. Then, we designed and synthesis of a linker which can introduce oxyamine group at sialic acid moiety.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：グライコミクス

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：化学修飾、糖ペプチド、シアル酸、バイオマーカー、固相反応

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖タンパク質の糖鎖は、癌などの疾患や細胞の分化によって大きく変化することが知られており、バイオマーカー探索のターゲットとして期待されている。特にシアル酸を含有する糖鎖にはシアリルルイスXやCA19-9など癌関連抗原としてよく知られたものもある。また、シアル酸の変化は細胞の接着や運動能に影響を与え、浸潤・転移など、

癌細胞の悪性形質との密接な関連性が報告されてきた。したがって、シアロ糖タンパク質に焦点を当てた疾患バイオマーカー探索は大いに期待されている。

(2) バイオマーカー探索では、臨床試料をそのまま分析しても有望なバイオマーカーは見つからず、ある特定の分子やある特徴を持った分子のみにフォーカスして解析する手

法に期待が集まっている。上に述べた理由から「シアル酸を有する糖タンパク質」をフォーカスする対象として選択することは極めて有望なアプローチである。しかし、研究開始当初、シアル酸を有する糖タンパク質のみを濃縮・分離する良い方法はなかった。酸化チタンを用いる方法が報告されているが、ウロン酸含有タンパク質やリン酸化タンパク質・硫酸化タンパク質も濃縮されてくる。MAL や SNA といったシアル酸認識レクチンを用いる方法では非特異的結合が避けられないばかりでなく、レクチンと糖鎖の K_d 値は通常 mM レベルであり操作条件の微妙な差異により結果の定量性に大きな影響を与える。これに対し、化学的に共有結合でシアル酸を何らかの担体に固定化できれば、シアロ糖タンパク質の効率的な新規濃縮・分離法の開発につながることを期待された。

(3) 研究代表者は、本研究開始に先立ち、硫酸化された糖ペプチドを効率的に濃縮するための手法開発の過程で、糖ペプチドに含まれるすべてのカルボン酸（シアル酸を含む）を高効率にアミド化する方法を見出した。この知見を基礎としてシアロ糖ペプチドを有機化学的に固相担体に結合させる方法を開発することにより、理想的なシアロ糖タンパク質の濃縮・分離法として利用することを思い立った。

2. 研究の目的

(1) シアル酸を含有する糖ペプチドをシアル酸のカルボキシル基を介して、固相担体へ有機化学的に結合させる方法を開発することを目的とする。

(2) 固相担体に結合したシアロ糖ペプチドからペプチド部分のみを遊離させ、遊離したペプチドのペプチドシーケンスを解析する方法を開発する。

(3) 本手法によって捕捉されたシアロ糖ペプチドの 2 群間（例えばノックアウトマウスとそのコントロールなど）の比較定量解析法を開発する。

3. 研究の方法

(1) シアル酸を介した固相担体への化学的な結合手法の開発は、液相でのシアル酸修飾でこれまでに得た知見（高効率アミド化法）を応用することから検討を開始する。材料は、はじめはシアル酸を含有する糖鎖と、各種官能基を有する樹脂ビーズを用いる。適切な反応条件を見出した後、シアル酸を含有する糖ペプチドを用いて同様の実験を行い条件を最適化する。反応条件のみならず、固相担体の素材についても検討する。

(2) 固相担体に固定化された糖ペプチドのペプチド部分を N-グリコナーゼにより遊離させる条件を検討する。N-グリコナーゼによる遊離で収率が思わしくない場合でも、Endo-M やシアリダーゼなど他のグリコシダーゼによる遊離を検討する。

(3) 本手法で補足したシアロ糖ペプチドから酵素的に遊離させたペプチド部分を、質量分析計により解析しタンパク質を同定する手法を検討する。またグリコフォーム解析の手法を検討する。この際、ペプチド部分のカルボキシル基は固相担体への固定化時に修飾される可能性（クエンチの方法による）があるので通常のデータベースサーチでは同定できない可能性が高い。その部分の検討を中心に行う。

(4) 固相担体からペプチド部分を遊離する際に、シアリダーゼを用いてそれを達成できた場合には、糖鎖のバリエーションを反映した糖ペプチド群が得られる。これを質量分析計やキャピラリー電気泳動で解析して糖ペプチドのグリコフォームを解析する手法を検討する。

(5) 糖鎖バイオマーカー探索への応用として、N-グリコナーゼ処理を $H_2^{18}O$ と $H_2^{16}O$ 中でそれぞれ行うことにより、ディファレンシャルに 2 群間のシアロ糖タンパク質の量を相対比較する手法を検討する。他の相対定量のアプローチとしては安定同位体を用いてディファレンシャルにペプチド由来カルボキシル基をクエンチする方法などが考えられる。この場合は、糖ペプチドの状態で相対定量が可能となる。両方法を検討し、精度、スループット、コストを勘案して良いほうを選択する。

(6) 固相担体からペプチド部分を遊離する際に、N-グリコナーゼを用いた場合には、固相担体に糖鎖が結合した形で残ることになるが、その糖鎖の還元末端は遊離の形で存在する。したがって、その糖鎖の還元末端に 2-アミノピリジンなどの糖鎖分析用蛍光標識剤を還元アミノ化法により標識できる。そこで、固相担体に糖鎖を固定した状態での還元アミノ化法を検討する。さらに蛍光標識化された糖鎖をシアリダーゼや弱酸などの処理により、固相担体から遊離させることにより蛍光標識糖鎖が得られることになり、シアロ糖鎖に焦点を絞った比較解析の検討が可能となる。

4. 研究成果

(1) 固相担体へのシアロ糖鎖の固定化反応

アミド化による糖鎖固定化法

シアル酸のカルボキシル基はシアル酸のグリコシド結合の位置によって反応性が異なり、ガラクトースの3位に結合したシアル酸は6位に結合したシアル酸よりも反応性が低く、通常の中性条件では3位に結合したシアル酸のカルボキシル基はアミド化されない。シアル酸に着目したバイオマーカー探索におけるシアロ糖鎖の濃縮では、この反応性の違いが大きなバイアスとなる。私は酸性条件 (pH 2.5) で 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) を縮合剤とし、求核剤としてアセトヒドラジドを用いることでシアル酸の結合様式に関わらず定量的にシアル酸のカルボキシル基をアセトヒドラジド化できることを見出していた(図1)。

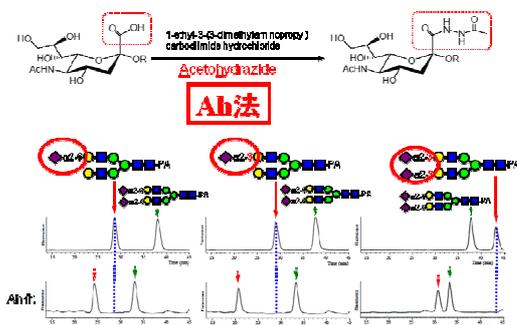


図1. アセトヒドラジド(Ah)によるシアル酸の修飾。シアル酸の結合様式に関わらず定量的に進行している。

本研究では、この反応をシアロ糖鎖の固相担体への固定化に応用することをはじめに検討した。官能基としてヒドラジド基を含有する固相担体には市販の物が複数あるが、本研究は血清試料からのバイオマーカー探索を最終的な目標としているため、糖ペプチド混合物を水溶液中で固相担体に結合させることが求められる。したがって、固相担体の基材は水溶液中でも収縮しない親水性ポリマーをベースとしたものが適していると考えた。ヒドラジド基を含有する市販の親水性固相担体として、UltraLink Hydrazide Gel (Pierce社)、AffiGel Hz (Bio-Rad社)、BlotGlyco (住友ベークライト社)を選定し実験に用いた。EDC存在下、少量(5 pmol)のシアロ糖鎖試料を用いて固相担体へのローディングを種々検討したが、いずれの場合においても良好な結果は得られなかった。

蛍光色素を反応基質としたアミド化法の検討

液相反応の条件を固相反応にそのまま応用することは難しいと判断し、まず蛍光クロモフォアを有するカルボン酸を用いてローディングの最適条件を探ることとした。これは蛍光クロモフォアを持つカルボン酸が固相

担体にローディングされることにより固相担体が蛍光を発するようになるので、反応結果のモニターが簡便になると考えたからである。実験の結果、大過剰の蛍光クロモフォアを用いた場合には、固相担体へのローディングができるが、バイオマーカー探索のソースとして想定される希薄な溶液ではいずれの固相担体を用いてもローディングが難しいことが判明した。これらの結果より液相反応では大過剰のアセトヒドラジドを用いていたが、本研究の固相反応ではヒドラジドの濃度は固相担体のヒドラジドローディング率に依存しており、液相反応で行ったような高濃度条件を固相反応で再現できないことが、固定化できなかった理由であると考えた。

オキシアミンリンカーの合成

シアル酸と固相担体の結合をアミド結合ではなく別のケミストリーで実現することを考えることとした。利用できる反応の条件としては、水溶液中で反応ができること、反応性が高く、希薄な溶液中でも定量的に反応すること、糖鎖やペプチドを分解しないこと、の3点が求められる。種々検討の結果、本研究では、別途試薬を加えることなく、混合するだけでオキシムを形成し結合する、アルデヒドとオキシアミンとの反応を応用することとした。アルデヒドを含有する親水性固相担体は市販されているので、シアル酸のカルボキシル基をオキシアミンへ変換する方法が開発できれば、シアロ糖鎖の固相担体への結合が可能となるはずである。しかし、シアル酸のカルボン酸を糖鎖やペプチドを壊すことなく化学的にオキシアミンに変換するのは難しい。そこで、シアル酸のカルボン酸を介してオキシアミンを導入するリンカーを用いることを考えた。リンカーのシアル酸結合部は、液相反応でシアル酸とカップリングさせるためのアミノ基を有し、また固相担体結合部はフタルイミド基で保護されたオキシアミンを有する図2に示すようなリンカーを設計した。

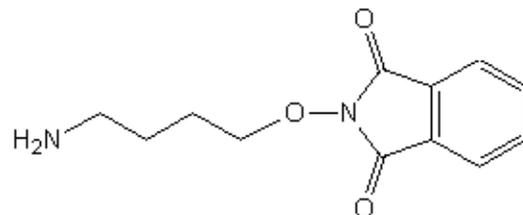


図2. リンカーの構造

フタルイミド基は、固相担体とのカップリングの直前に脱保護する。このリンカーの合成は、N-Boc-4-aminobutanolを出発物質として、N-ヒドロキシフタルイミドをミツノブ反応により縮合させ、その後、Boc基をトリフルオロ酢酸で除去することにより得られた

(図 3)

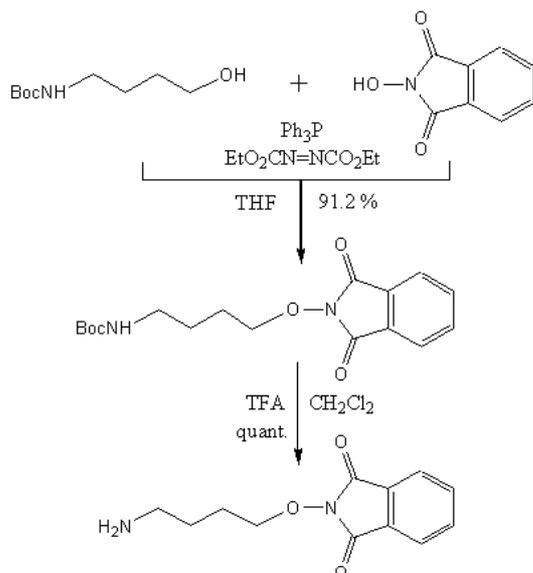


図 3 . リンカーの合成スキーム

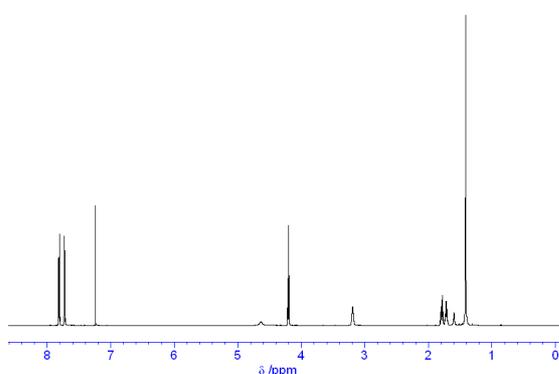


図 4 . 合成したリンカー (Boc 保護体) の 1H-NMR スペクトル

なお、Boc 基を脱保護すると不安定になるので TFA による Boc 基除去は使用時に行うこととした。

(2) 固定化されたシアロ糖ペプチドの遊離
シアロ糖ペプチドの固定化反応の開発に時間がかかっていたため固定化されたシアロ糖ペプチドを用いた遊離条件の検討はできていないが、予備検討としてカルボキシル基をアセトヒドラジドで保護したシアロ糖鎖を基質としたシアリダーゼ消化の検討を行った。実験では、Arthrobacter ureafaciens 由来のシアリダーゼを用いた。検討の結果、シアロ糖のカルボキシル基がヒドラジドで保護されるとシアロ糖のグリコシド結合はシアリダーゼで分解されなくなることが判明した。したがって、固定化されたシアロ糖ペプチドをシアリダーゼによって遊離させることは難しいことが判った。

(3) 今後の展望

シアロ糖のカルボキシル基にリンカーを介してオキシアミン基を導入できる方法に目処をつけることができた。今後は、アルデヒド基を有する親水性固相担体とのカップリング反応を検討し、さらにはペプチド部分の遊離、遊離したペプチドのタンパク質同定へと進展させる。その際、最大の課題となるのは、ペプチド部分に含まれる酸性アミノ酸およびC末端のカルボキシル基の存在である。シアロ糖ペプチドにリンカーを導入することに先立ち、プロテアーゼ限定分解の組み合わせにより、可能な限り酸性アミノ酸を含む糖ペプチドを減少させるなどの工夫が必要となると思われる。

糖ペプチド混合物に化学修飾を施して、特定の構造を有する分子をエンリッチするという点で、カルボキシル基の定量的なヒドラジド化は、シアロ糖のみならず他の構造に着目したバイオマーカー探索にも活用できる。例えば、硫酸化糖タンパク質に着目したバイオマーカー探索では、トリプシン消化物に含まれる硫酸基以外の酸性残基をヒドラジド化により中性化できる。これにより硫酸基の酸性に着目したエンリッチが可能となり、実際に小細胞肺がんのマーカー候補を同定することに成功している。

本研究で設計および合成されたリンカーは、カルボキシル基を介してオキシアミン基を導入できる。オキシアミン基はアルデヒド基との反応性が極めて高く、水溶液中でも高収率にオキシムを形成するのでライフサイエンス分野の研究で応用範囲が広いと考えられる。本研究ではシアロ糖にオキシアミン基を導入して固相担体に固定化することを検討したが、例えばカルボン酸を有する蛍光標識剤にこのリンカーを付与すれば、アルデヒドを有する生体分子 (例えば糖鎖など) を簡便に水溶液中で蛍光標識できるようになる。

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)

[学会発表] (計 1 件)

亀山昭彦、化学修飾を活用した糖タンパク質分析の新展開、第 8 回日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、2010 年 11 月 29 日、東京コンファレンスセンター・品川

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/rcmg/ci/index.ht>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

亀山 昭彦 (KAMEYAMA AKIHIKO)
独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医
工学研究センター・研究チーム長
研究者番号：80415661

(2)研究協力者

豊田 雅哲 (TOYODA MASAOKI)
独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医
工学研究センター・特別研究員