

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06539

研究課題名(和文)脊椎動物の胚から分泌される希少糖6-デオキシアルトロースを含む糖ペプチドの研究

研究課題名(英文) Studies on glycopeptides containing a rare sugar 6-deoxyaltrose secreted from vertebrate embryos

研究代表者

長束 俊治 (Natsuka, Shunji)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00243163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：希少糖である6dAltを糖鎖の末端に持つ2つの糖タンパク質を同定できた。1つはヒト癌胎児性抗原のホモログであり、ヒトでは腸の上皮細胞表面に発現していて、その糖鎖部分と微生物の相互作用を利用して病原微生物の排除に関与することが知られている。もう一つは、カテプシンLbであり、ゼブラフィッシュの当該プロテアーゼは、孵化腺特異的に発現して分泌され、孵化に関与すると考えられている。このことは6dAltが、分泌糖ペプチドに含まれることや、受精時には検出されず孵化時期に向かって検出量が増加することと非常によく一致していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖の生理機能は、生体間相互作用である外因性機能と生体内の細胞間相互作用である内因性機能に分類される。今回の研究で解明した2種のキャリアタンパク質は、共に生体外で機能するものであることから、含有糖鎖も外因性機能を持つことが示唆された。このことから、生体防御を含む糖鎖の外因性機能の解明に、本研究成果は大きく寄与する。さらに今後も研究を進めることにより、糖ペプチド性の新規な抗菌剤などの開発を通じて、社会還元につながる可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：Two glycoproteins with a rare sugar, 6dAlt, at the non-reducing end of their N-glycans were identified. One of them is a homolog of carcinoembryonic antigen (CEA), which is expressed on the surface of intestinal epithelial cells in humans and is known to play a role in the elimination of pathogenic microbes through the interaction between its sugar moiety and the microbes. The other is cathepsin Lb, a protease expressed and secreted specifically in the hatching gland of zebrafish, believed to be involved in the hatching process. This finding aligns with the observation that 6dAlt is present in secreted glycopeptides and its levels increase from undetectable at fertilization to detectable levels leading up to hatching.

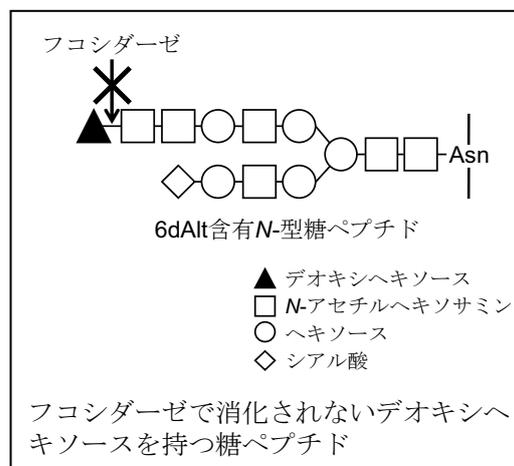
研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖解析 グライコプロテオーム解析 希少糖 ゼブラフィッシュ 胚発生

1. 研究開始当初の背景

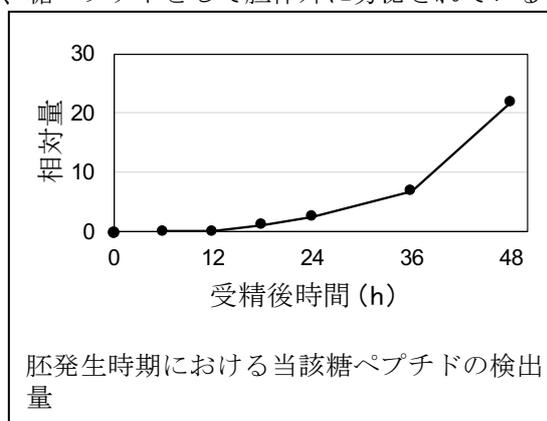
生体は核酸、タンパク質、糖鎖の三種の鎖分子を有している。前二者の役割は明確であり、核酸は遺伝情報の担い手として、タンパク質は生理現象の実行者として機能している。しかし残る糖鎖の包括的な意義はいまだ不明である。糖鎖の際立った特徴は、微小不均一性と呼ばれる分子構造の多様性であることが古くから知られている。その生理的役割の解明は、糖鎖の包括的な意義の理解につながると考えられることから、糖鎖研究領域における長年にわたる大きな目標である。これに対して、糖鎖の構造多様性は他生物との相互作用によって進化の過程で形成されてきたという仮説が提唱されている。この説は合理的かつ魅力的ではあるが、実証されるには至っていない。申請者は、糖鎖の構造多様性をゼブラフィッシュの胚発生段階に沿って観測することにより、微小不均一性の意義に関する知見を得ようとしてきた。その研究過程において、新奇な糖鎖を持つ糖ペプチドを発見した。この糖ペプチドは、胚で生合成され胚体外へと分泌されていることから、外部の例えば他生物との相互作用に寄与していること等が予想されるが、実際の機能はまだ分かっていない。そこでその機能を明らかにしようとするのが本研究の目的である。さらに本研究で得られる知見を基に、外来生物との相互作用と糖鎖の微小不均一性の関係を解析するためのモデルとして、胚分泌型糖ペプチドの研究を発展させることを目指している。

我々は、動物の形態形成における糖タンパク質糖鎖の役割を明らかにするために、ゼブラフィッシュ胚で網羅的な糖鎖構造解析を行った (Hanzawa, K. *et al.* *Glycobiology*, 2017)。その過程において、種々のフコシダーゼでは消化されないデオキシヘキソースが末端に付加した糖鎖を発見した (右図)。この新奇糖鎖を多段階 MS で分析して当該単糖がフコースでないことを示し、さらに糖組成分析を行うことにより、希少糖の一種である 6-デオキシアルトロース (6dAlt) であることを突き止めた (2017 年度日本農芸化学会大会にて報告)。通常糖鎖解析では、質量分析においてデオキシヘキソースが検出されればフコースと考えるのが常道で、それ以上の分析は行われない場合がほとんどである。このような通例に対して申請者は従来から危うさを感じており、複数の手法で分析を行うことにより構造解析の精度を上げるようにしてきた。その結果として新奇な糖鎖構造とそれを構成する希少糖 6dAlt を発見することができた。



6dAlt を含む生体分子の報告は、これまでにわずか 3 例しかない。一つは真菌 *Sordaria araneosa* が分泌する抗生物質 Sordarin の糖成分として (Hauser, D. *et al.* 1971)、二つ目はニコウイワナ卵の O-結合型糖鎖の成分として (Iwasaki, M. *et al.* 1987)、そして三つ目はキノコの一種ハツタケの細胞壁多糖の成分として発見された (Tako, M. *et al.* 2012)。これらに対して本研究が対象とする 6dAlt 含有糖鎖は、N-結合型糖鎖上に存在し、胚において生合成され胚体外に糖ペプチドとして分泌されており、既報の 3 例とはまったく異なった分子構造と発現様式を持つ。すなわち本研究は、前例のない分子種の発見から導かれた非常にオリジナリティの高い研究であり、新たな生命現象の発見につながる可能性を持つ。

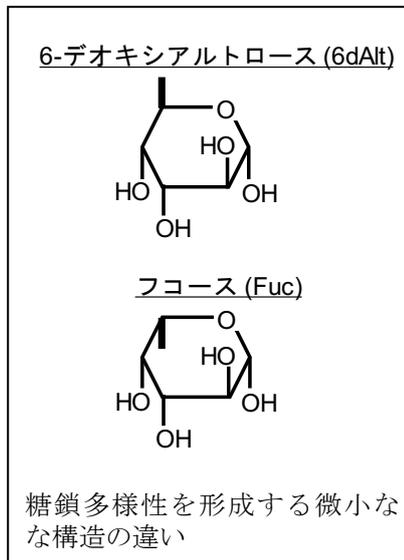
さらに当該糖鎖分子の性状を解析したところ、糖ペプチドとして胚体外に分泌されていること、受精直後の卵では検出されず胚発生の中期に増加することなどが分かった (右図)。しかしながら、これまでに検出できた当該糖ペプチドはアミノ酸部分が 1~3 残基しかなく、この状態で N-結合型糖鎖がペプチドに付加されてプロセッシングされているとは考えにくいことから、前駆体タンパク質の存在が予想された。そこで、この新奇糖ペプチドの生合成経路と生理機能を明らかにするために、前駆体糖タンパク質を同定するという着想に至った。前駆体糖タンパク質が分かれば、その遺伝子を特定できるので、ゲノム編集などの遺伝子操作による当該糖ペプチドの生理機能の解明が可能となる。



2. 研究の目的

本研究では、申請者らが発見した新奇な分泌糖ペプチドの前駆体糖タンパク質の同定を主要

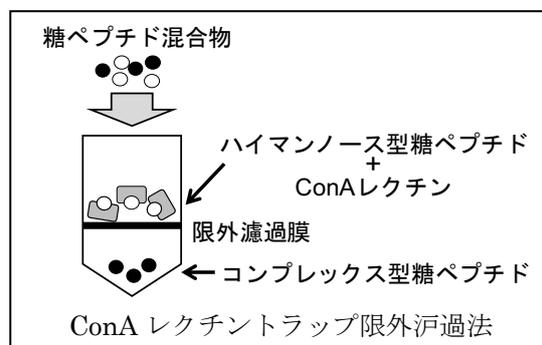
な目的としている。この糖ペプチドは、希少糖である 6dAlt (右図) を末端に持っている。希少糖はその名の通り希少な存在であり、脊椎動物での報告例はこれまで他に 1 件しかない。またすべての真核生物でも 6dAlt の報告は他に 3 例のみである。しかしながら従来の解析手法を用いた場合、6dAlt は普遍的に存在するフコースとの区別が難しいことから、実際にはその多くが見逃されてきた可能性がある。このことは、6dAlt 以外にもこれまでに発見されていない単糖が幾つも存在する可能性を示唆している。また、脊椎動物ゲノムには酵素活性不明の糖鎖生成遺伝子ホモログが多く残されており、その可能性を支持している。細菌などに比して脊椎動物は、ごく限られた種類の構成単糖しかもたないというのが、従来の糖鎖生物学におけるコンセンサスであった。例えばアルドヘキソースは 16 種類の異性体が可能であるが、これまでに脊椎動物で発見されているのはグルコース、マンノース、ガラクトースの 3 種類のみである。本研究の進展によって従来の常識が覆る可能性があり、これまでは見えていなかった数多くの糖鎖の構造と機能にアプローチするための出発点となることが期待できる。さらに、本研究のターゲットである分泌型糖ペプチドは、構造が新奇なだけでなく、従来報告されてきた受精の際に働く糖ペプチドとはまったく別種のものであることを申請者は突き止めている。この生理機能未知の糖ペプチドは、生体防御などに関わる新しいカテゴリーの機能分子である可能性をもつ。



3. 研究の方法

予備的研究の結果から、6dAlt を末端に含む糖鎖は *N*-結合型と *O*-結合型の両方に存在し、それらの多くが 1 個または数個のアミノ酸を含む糖ペプチドとして胚体外へ分泌されていることが分かっている。しかし予備的実験で観測できたペプチド部分は 1~3 残基と短いことから、前駆体糖タンパク質の同定には至っていない。そこで本研究では、以下の方法によって前駆体糖タンパク質から 6dAlt をもつ比較的長い糖ペプチドを捕捉し、アミノ酸配列を決める。これにより前駆体糖タンパク質の同定を行う。

目標とする糖ペプチドは極微量であることから、従来法では検出感度が十分でないため、幾つかの改良法を既に構築している。卵黄を除去した発生中期の胚 (数千個) から溶媒抽出 (クロロホルム : メタノール : 水) によりタンパク質画分を得る。通常の糖タンパク質は不溶性画分に、ムチンなどの糖鎖を多く持つ糖タンパク質は水層に回収される。予備的研究により、水層に標的の糖タンパク質が多く回収されることをすでに見出している。回収したタンパク質を還元アルキル化した後、トリプシン消化によりペプチドに断片化する。トリプシン消化で適当な長さの糖ペプチド断片が得られない場合は、キモトリプシンやプロナーゼ、プロテイナーゼ K などを使用する。次に、C18 カートリッジでペプチドを精製した後、大多数の単純ペプチドから糖ペプチドを Amide-Spin カートリッジによって分離する。この手法は、従来の HILIC 精製法に比べ収率、精製度ともに優れており短時間で行えることを予備実験により既に確かめている。この糖ペプチド混合物を逆相 LC-MS で解析し、MS²において目的の 6dAlt 含有糖鎖を特定する。さらに MS³ および MS⁴ 解析によってアミノ酸配列を決定する。この際、糖ペプチド混合物中にハイマンノース型糖ペプチドが多く、目的の 6dAlt 含有糖ペプチドの検出が妨げられる場合は、ConA レクチントラップ限外濾過 (右図) を行うことでハイマンノース型糖ペプチドを除去した後に LC-MS 解析にかける。この方法により、標的糖ペプチドを含むコンプレックス型糖ペプチドを、ハイマンノース型糖ペプチドとの混合物から 1000 倍以上に濃縮できることが、予備実験により既に分かっている (2019 年 International Symposium on Glycoconjugates にて報告)。以上のようにして 6dAlt 含有糖ペプチドのアミノ酸配列を決定し、ゼブラフィッシュのタンパク質データベースを参照することにより、前駆体糖タンパク質を特定する。

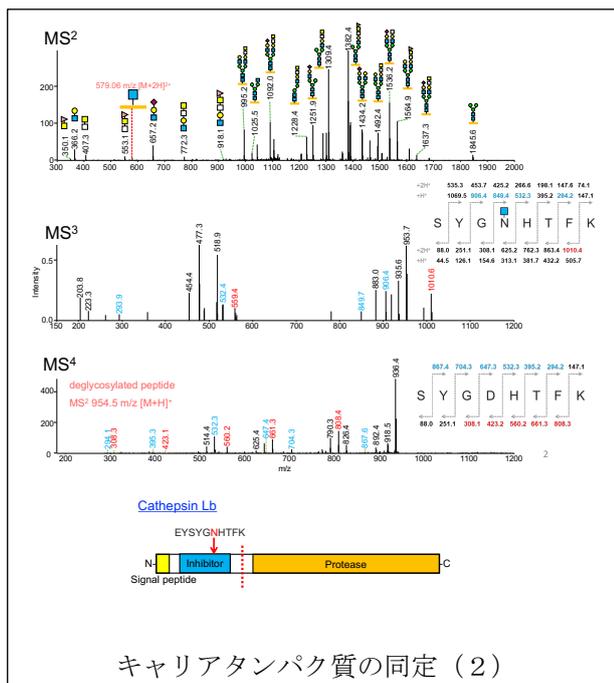
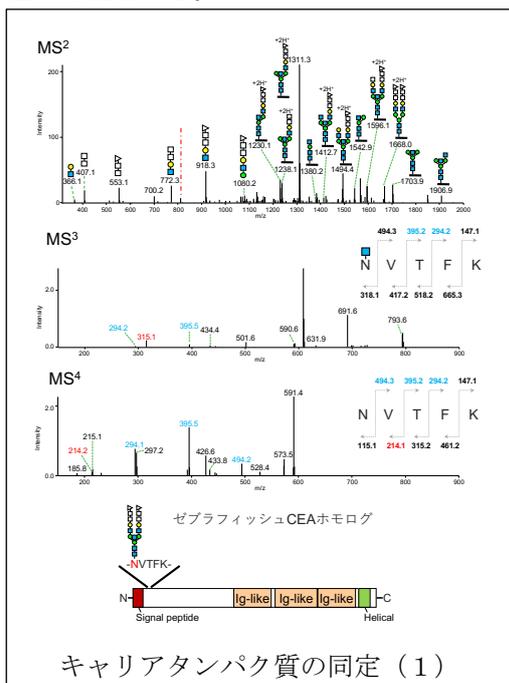


4. 研究成果

(1) キャリアタンパク質の同定

6-デオキシアルトロース (6dAlt) を糖鎖の末端に持つ糖タンパク質のタンパク質部分を解析することで、2 種類のタンパク質を同定できた。1 つはヒト癌胎児性抗原のホモログであるゼブラフィッシュのタンパク質であった (次項左図)。この糖タンパク質はヒトでは腸の上皮細胞表面に発現しておりその糖鎖部分と微生物の相互作用を利用して、病原微生物の排除に関与することが知られている。ゼブラフィッシュでは 6dAlt 含有糖ペプチドが胚体外へ分泌されている

ことを我々は既に明らかにしているので、やはり病原微生物との相互作用に関与している可能性が考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長束俊治、半澤 健、深見 颯、沢 空樹、小林響輝
2. 発表標題 希少糖を含むN-結合型糖鎖の発見
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飛弾野昂太、半澤 健、長束俊治
2. 発表標題 簡便かつ迅速な6-デオキシアルトロース(6dAlt)末端糖鎖検出法の開発
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田優真, 沢 空樹, 長束俊治
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ胚における脊椎動物特異的N-結合型糖鎖のキャリアタンパク質の探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深見 颯、長束俊治、半澤 健、飯塚紀公、沢 空樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ胚の6デオキシアルトロース含有糖鎖キャリアタンパク質の探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長束俊治、半澤 健、沢 空樹、深見 颯、山田優真
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ胚の特徴的糖鎖とそのキャリアタンパク質の解析研究
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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------