

機関番号：34419  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21790050  
 研究課題名（和文） 加齢により変動する血清糖タンパク質糖鎖の解析と加齢マーカーとしての可能性の検証  
 研究課題名（英文） Investigation of change of serum glycoproteins with aging and its application to aging marker  
 研究代表者 木下 充弘 (KINOSHITA MITSUHIRO)  
 近畿大学・薬学部・講師  
 研究者番号：40330279

研究成果の概要(和文):生体内の糖鎖は複数の遺伝子産物の協調作業により生合成されるため、細胞の生理的環境の変化を受け容易に変化する。細胞レベルにおけるこれらの微細な変化の蓄積は、老化の過程においても重要な一面を担うと考えられ、種々のバイオマーカー開発の標的としても興味深い。本研究では、抗加齢医学の実践に欠くことのできない加齢マーカーとしての糖鎖の可能性を検証するため、キャピラリー電気泳動(CE)を用いてラット血清糖タンパク質糖鎖の加齢に伴う変化を追跡した。また、メタボリックシンドロームモデル作製用至高脂肪食で飼育したラットの加齢及び食環境の違いが血清糖鎖プロファイルに及ぼす変化を明らかにした。

研究成果の概要(英文): Since structural alterations of glycans are known to be associated with changes of physiological environments, glycans have been received attention as target molecules for clinical biomarkers. In this study, we analyzed N- and O-glycans of glycoproteins from rat serum samples using capillary electrophoresis, and found that N-glycans showed distinctive changes with age or high-fat diet. The present results indicate that glycans will be one of the useful biomarkers for aging.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学

## 1. 研究開始当初の背景

予防医学領域における究極の目標であるアンチエイジング医学のための基盤形成は、高齢化が進む我が国において重要かつ急務な生命科学領域の研究課題のひとつとなりつつある。アンチエイジング医学の基本は老

化の進行に抵抗するため、まず老化度を判定しその結果を踏まえて食事指導や運動指導を行い、病気にならない身体づくりを行うことを基本とする。すなわち、老化の原因により引き起こされる「ホルモン低下」、「酸化ストレス」および「免疫力低下」などを加齢マ

ーカーを用いて判定し、さらに加齢マーカーを指標にしながら体質改善プログラム等によりアンチエイジング医学を実践していく必要がある。アンチエイジング医学のための取り組みの中でも、加齢マーカーの開発はアンチエイジング医学の実践における最重要課題であり、疾患の兆候として引き起こされる生体分子（遺伝子・タンパク質・糖鎖・脂質）の質的・量的変化を解析し、加齢マーカーとなりうる候補群より疾患の予防等に役立つ加齢マーカーを開発することは重要な研究課題であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では研究代表者である木下らが開発してきた糖鎖解析技術を基盤として、研究期間前半は実験動物（マウス・ラット）を用いて血清糖タンパク質糖鎖の加齢に伴う変化を追跡し、加齢マーカーとなりうる候補糖鎖群を明らかにする。研究期間後半は自然発症疾患モデル動物（糖尿病および高血圧）を用いて、発症に至るまでの期間中に加齢マーカー候補糖鎖群の質的・量的変動を解析し、血清糖タンパク質糖鎖の加齢マーカーとしての可能性を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究ではこれまでに開発してきた糖タンパク質糖鎖の解析技術を駆使して、実験動物（ラット・マウス）の血清中に存在する糖タンパク質糖鎖について、週令ごとに糖鎖を解析した。血清糖タンパク質糖鎖の解析は、血清より糖タンパク質分画を調製後、酵素的あるいは化学的糖鎖遊離法により糖鎖を遊離後、2-アミノ安息香酸で蛍光ラベル化する。ラベル化糖鎖は蛍光 HPLC 分析、エレクトロスプレーイオン化-イオントラップ-TOF 型質量分析装置を用いて含まれる糖鎖同定を行った後、ルーチン分析にはレーザー励起蛍光検出-キャピラリー電気泳動により多検体定量分析を行った。

## 4. 研究成果

ラット血清中の糖タンパク質糖鎖の加齢に伴う変化を定量的に解析した結果、N-結合型糖鎖では 15 週齢までに全糖鎖量が約 2 倍に増加した (Fig. 1)。一方、O-結合型糖鎖では 15 週齢までに全糖鎖量の著しい増減は観察されなかった。N-結合型糖鎖を詳細に解析した結果、全 38 種類の糖鎖が観察され、最も含量の高い糖鎖非還元末端に N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) を 2 残基持つジシアロ 2 本鎖糖鎖のうち、NeuAc の O-アセチル体を持つジシアロ 2 本鎖糖鎖が 3 週齢~15 週齢までに 3.5 倍以上に増加することがわかった。一方、高脂肪食で飼育したラットでは NeuAc

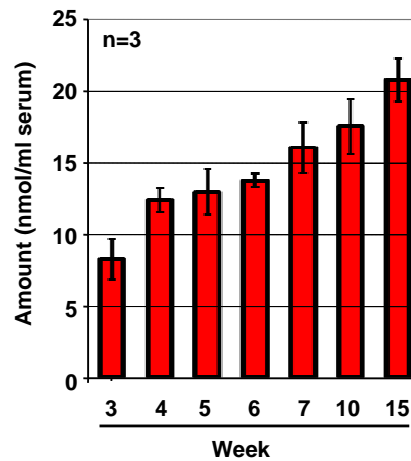


Fig. 1. Change of total amount of N-glycans in rat serum glycoproteins with aging

の O-アセチル体は減少傾向であり、通常食で飼育したラットと逆の特徴的な変動パターンを示した (Fig. 2)。

N-結合型糖鎖のうち複合型 2 本鎖糖鎖の非還元末端に位置するラクトサミン (Gal-GlcNAc) の結合様式について詳細に解析した結果、通常食で飼育したラットでは、Gal  $\alpha$  1-4GlcNAc を持つ糖鎖が多く、高脂肪食で飼育した場合では特に 6 週齢以下で Gal  $\alpha$

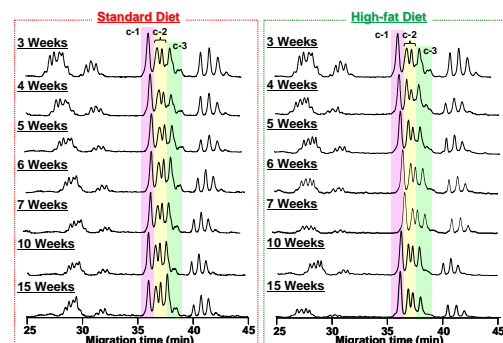


Fig. 2. CE analysis of N-glycans in serum samples of rats raised with standard diet and high-fat diet.

1-3GlcNAc を持つ糖鎖が顕著に増加することがわかった。以上のように、血清糖タンパク質糖鎖の変化は、加齢や食環境による個々の血清糖タンパク質群の量的変化を反映した結果であると考えられた。

## 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 3 件)

① Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K.

Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection.

査読有 Biomed. Chromatogr. 25 2011, 588-593

② Yamada K, Watanabe S, Kita S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K.

Determination of Tn antigen released from cultured cancer cells by capillary electrophoresis.

査読有 Anal Biochem. 396(1) 2010, 161-163

③ Kinoshita M, Ohta H, Higaki K, Kojima Y, Urashima T, Nakajima K, Suzuki M, Kovacs KM, Lydersen C, Hayakawa T, Kakehi K.

Structural characterization of multibranched oligosaccharides from seal milk by a combination of off-line high-performance liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption / ionization-time-of-flight mass spectrometry and sequential exoglycosidase digestion.

査読有 Anal Biochem. 388(2) 2009, 242-253.

〔学会発表〕(計4件)

①能登啓介、奥田茜、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

加齢マーカーとしての糖鎖の可能性: エイジングと生活習慣による血清糖鎖プロファイルの変動

第83回日本生化学会大会合同大会 2010年12月9日神戸

②能登啓介、奥田茜、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 加齢マーカーとしての糖鎖の可能性~CEによる血清糖鎖プロファイルの加齢ならびに生活習慣に伴う変動追跡~

第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム 2010年11月17日岐阜

③能登啓介、奥田茜、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

加齢により変動する血清糖タンパク質糖鎖の解析と加齢マーカーとしての可能性の検証

第59回日本薬学会近畿支部大会 2009年10月23日東大阪

④①能登啓介、奥田茜、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

加齢に伴うラット血清糖タンパク質糖鎖の変化-加齢マーカーとしての糖鎖の可能性-

第29回日本糖質学会年会 2009年8月2日飛騨高山

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 充弘 (KINOSHITA MITSUHIRO)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号 : 40330279

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし