

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310154

研究課題名(和文)高グリコシル化タンパク質ムチンに関する革新的分析法SMMEの高度化研究

研究課題名(英文) Sophistication of supported molecular matrix electrophoresis (SMME) for highly glycosylated proteins "mucins"

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・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：80415661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：分子マトリクス電気泳動法(SMME)は、ムチンを分析するために研究代表者が最近開発した膜電気泳動法である。本研究ではバイオマーカー探索への応用を目的として、分離能と検出感度に重点をおいたSMMEの高度化研究を進めた。再現性の良い結果を得るためのSMME膜の作成法および泳動条件を確立し、さらに新たな染色法の開発、定量評価のための膜の透明化法などを開発した。泳動分離したムチンを同定するため、温和な糖鎖遊離処理後、タンデムリピート部に対する抗体で泳動後の膜を染色する方法についても成果を得た。また、ムチンの糖鎖の違いに着目した分離を目的としてレクチン親和SMME法の開発も行った。

研究成果の概要(英文)：Supported molecular matrix electrophoresis (SMME) is a novel membrane electrophoresis which has been recently developed for mucin analysis by the principal investigator. To utilize the SMME for mucin biomarker discovery research, sophistication of SMME has been performed by making a special effort to improve both the resolution of separation and the sensitive detection of mucins. The achievement includes a preparation method for a good SMME membrane, electrophoresis condition for good separation of mucins, a novel staining method "succinylation-Alcian blue", a procedure for making the SMME membrane transparent, a staining method for mucins with anti-tandem repeat antibodies, and a lectin affinity-SMME.

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：生体機能関連物質 糖鎖 ムチン 電気泳動

1. 研究開始当初の背景

(1) ムチンは、糖鎖が分子量の 50~90%を占める巨大な($\sim 2 \times 10^6$)糖タンパク質である。CA19-9 をはじめとする糖鎖性腫瘍マーカーの多くはこのムチン分子に結合している糖鎖抗原であると考えられているが、詳細は明らかでない。ムチンは分子が巨大であるためゲル電気泳動では分析できず、また多量の糖鎖付加によりプロテアーゼによる限定分解もできない。これらの理由により、ムチンの研究はプロテオミクスで分析できる通常のタンパク質に比べ著しく立ち遅れてきた。

(2) 研究代表者はムチンを分析する新しい方法として、「分子マトリクス電気泳動法 (SMME: Supported Molecular Matrix Electrophoresis)」という膜電気泳動を考案した。そのコンセプトは、PVDF 膜繊維の周囲に親水性ポリマー分子のマトリクスを形成させ、このマトリクスを分離担体として電気泳動するものである。SMME により分離されたムチンは、Alcian Blue で染色することにより PVDF 膜上のスポットとして検出される。また、このスポットを切り取り、アルカリ溶液による糖鎖遊離処理を経て、ムチンに結合する糖鎖を分析することも可能である。

(3) 研究開始当初、腓液や胆汁中に含まれるムチンを SMME により実際に分析できることを明らかにしていた。しかし、本法は誕生してまもない未成熟な技術であり、ムチンに着目したバイオマーカー探索に活用するためには、再現性、感度、分離能などの点で多くの課題を残していた。

2. 研究の目的

本研究では、SMME をムチンバイオマーカー探索に活用できる技術へと発展させるため、以下の 4 項目の課題を設定した。

(1) SMME の物理化学的基礎研究
ムチンの泳動分離に最適な SMME 膜の作成法と泳動条件を明らかにする。

(2) ムチンの高感度検出法の開発
ナノグラムオーダーのムチンを泳動膜上で検出する方法を開発する。

(3) 分離能の高度化を目的とした発展型 SMME 法の開発
SMME によるムチン分離能の改善を目的として、レクチン親和電気泳動、等電点電気泳動、2 次元電気泳動などについて検討する。

(4) ムチンに着目したバイオマーカー探索法としての検証
上記の成果を活用して、腓液および胆汁を分析し、マーカー探索法としての問題点を抽出し、上記 1~3 の課題へフィードバックする。

3. 研究の方法

(1) SMME の物理化学的基礎研究
PVDF 膜の種類、親水性ポリマーの種類、コーティング条件を検討し、ムチン分離に最適な SMME 膜の作成法を固める。その後、泳動中の蒸散流や電気浸透流について検討し、ムチンの泳動条件の最適化を行う。

(2) ムチンの高感度検出法の開発
色素を用いる検出法のほか、特異抗体を用いた検出法、赤外分光法を用いたムチン検出を検討する。

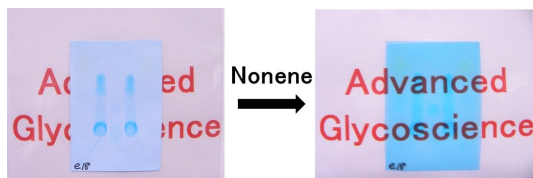
(3) 分離能の高度化を目的とした発展型 SMME 法の開発
ムチンの分子特性のひとつである糖鎖に着目した分離モードとして、レクチン親和 SMME 法を開発する。また、セルロースアセテート膜電気泳動で用いられる手法を参考にして SMME におけるムチンの等電点電気泳動や 2 次元電気泳動法を検討する。

(4) ムチンに着目したバイオマーカー探索法としての検証
上記の方法で改良された SMME 法を用いて、各種培養細胞や胆汁および腓液中のムチンを分析する。SMME におけるムチンの泳動位置、各スポットの糖鎖プロファイルを整理することを試み、検出感度、分離能などの点において、マーカー探索に利用できるレベルであるかどうかを検証する。

4. 研究成果

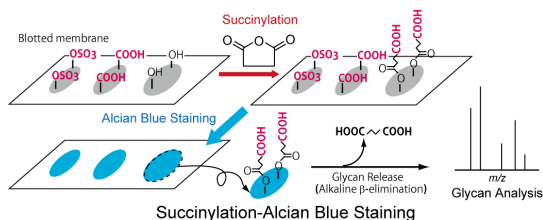
(1) SMME の物理化学的基礎研究
多孔性 PVDF 膜は、孔径を含む微細構造や膜厚がメーカーによって異なっていることがレーザー顕微鏡による観察で明らかとなった。これらは、SMME によるムチンの泳動結果に微妙な違いを与えた。また、PVDF 膜への親水性ポリマーコーティングは、ラングミュア型の吸着であり、ポリマー濃度と浸漬時間をコントロールすることで再現性よく SMME 膜を作成できることが判った。親水性ポリマーの種類については、これまで SMME においてほぼ同じ効果を有すると考えていたポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコールは、それぞれで作成した SMME 膜の接触角を測定した結果、ポリビニルアルコールが特に高い親水化効果を有することが判った。さらに、ポリビニルアルコールの分子量、鹸化度およびポリマーコーティング量が SMME に及ぼす影響について検討した。ポリビニルアルコールの分子量が高くなるにつれ、泳動されずに原点に残る試料が増える傾向がみられた。また、電気泳動中に伴って発生する蒸散流および電気浸透流についても検討を行い、PVDF 膜自身は強い電気浸透流を発生するが、コーティング後は電気浸透流がほぼ完全に抑制されることを明らかにした。

また、膜電気泳動では膜の裏表で染色像が異なることがあり、結果を定量的に評価するためには泳動後の膜を透明化することが望ましい。本研究では、ノネンに膜を浸漬することにより透明化できることを見出した。



(2) ムチンの高感度検出法の開発

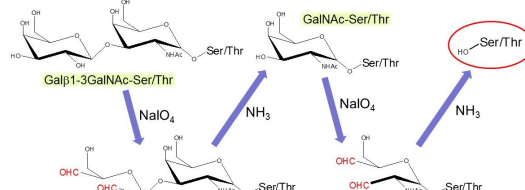
SMME で分離したムチンを色素で染色する新たな方法を開発した。従来法である Alcian Blue 染色では、シアル酸や硫酸基が少ない中性のムチンは染色されない。一方、中性ムチンを染色できる過ヨウ素酸酸化シッフ塩基法では糖鎖が分解されるため、染色後のムチンの糖鎖分析は不可能となる。そこで中性ムチンでも染色でき、かつその後の糖鎖分析も可能な新たな染色法「コハク酸 - Alcian Blue 法」を考案した。



本法では、ムチンの特徴である糖鎖クラスターにコハク酸を導入することによって、中性ムチンを酸性化する。コハク酸処理後、Alcian Blue 染色したところ、高感度な過ヨウ素酸酸化シッフ塩基法である Pro-Q Emerald よりも感度よく染色できた。さらに、本法で染色されたムチンスポットを切り取り、ムチンに結合する糖鎖分析を行った。糖鎖にはコハク酸が導入されているが、糖鎖遊離に用いるアルカリ条件によりコハク酸エステルは加水分解される。その結果、糖鎖は元の構造に戻り、従来どおりの方法で糖鎖分析できることを明らかにした。以上のように、ムチンの酸性度に関わらず染色することができ、かつ糖鎖分析も従来通り行うことができた。

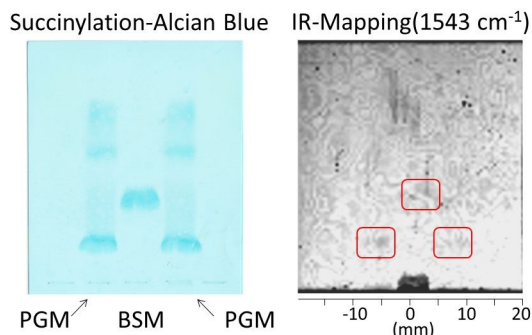
また、免疫染色についても新たな方法を開発した。ムチンは膨大な O-グリカンで覆われているため抗ムチン抗体の多くは、ムチンペプチドだけではなく糖鎖を含んだ形でのムチン構造を認識する。そのため、同じムチンでも糖鎖構造が異なれば、同じ抗ムチン抗体で染色できるとは限らない。このような問題を回避するためには、ムチンのタンデムリピート配列に対して樹立された抗体の利用が望ましいが、タンデムリピート部には糖鎖が多数付加しており、O-グリカンをはずさない限

り内部配列の抗体で検出することはできない。そこで、ペプチド部分に影響を与えずに糖鎖を除去する方法を SMME 膜上のムチンに適用した。すなわち、過ヨウ素酸酸化によりムチンの糖鎖を酸化的に部分分解し、その後、アンモニア水溶液で処理することにより糖鎖部分の分解物を除去した。



こうして得られた糖鎖除去ムチンは、タンデムリピートに対して樹立された抗体で染色することができた。この方法を用いれば、付加する糖鎖構造に関わらず、抗タンデムリピート抗体にて染色することによりムチンを同定することができると考えられた。

さらに、色素や抗体による染色ではなく、光によるムチンの検出についても検討した。SMME 膜の基材に用いられている PVDF は赤外分光法において 1500cm^{-1} 以上の領域ではほぼ透明であり、ムチンの特性吸収帯である 3400cm^{-1} 、 1740cm^{-1} 、 1680cm^{-1} 付近の吸収を妨害しない。そこで、顕微 FT-IR 法を用いて泳動後の SMME 膜をそのまま赤外マッピングし、ムチンの検出に応用することを検討した。親水性ポリマーにポリビニルピロリドンや酸化度の低いポリビニルアルコールを用いるとカルボニル基に由来する吸収がバックグラウンドとして現れるため、赤外マッピングを行なう際には、カルボニルを持たない親水性ポリマーを用いた SMME 膜を利用した。その結果、ムチンを泳動した SMME 膜を FT-IR によってマッピングすることにより、ムチンの存在する部位を特定することができることを明らかにした。ただし、感度については通常の Alcian Blue 染色に劣っており、今後、増感剤による処理などの工夫が必要であることが示唆された。

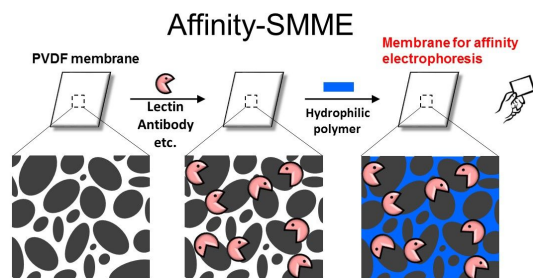


(3) 分離能の高度化を目的とした発展型 SMME 法の開発

プロテオミクスでは 2 次元電気泳動により一

度に数百のタンパク質を分離することができる。SMME を活用して同様の2次元電気泳動を開発すれば、ムチンの更なる分離が期待される。そこで、まず第一段階として SMME による等電点電気泳動について検討した。セルロースアセテート膜による等電点電気泳動の例を参考に、両性担体濃度を 30% とし、試料添加前に予備通電を行った。予備通電を 500V、2 時間とすることにより膜全体に直線的な pH 勾配が形成されることが判った。予備通電後、牛顎下腺ムチンを陰極側にアプライして泳動し、Alcian Blue で染色したところ陽極側に幅広いバンドが確認できた。さらに、牛顎下腺ムチンとブタ胃ムチンを混合し、同様の実験を試みたが、通常の SMME で分離した場合よりも不鮮明な分離となった。また、等電点電気泳動でムチンを分離した膜を、通常の SMME 膜に重ねて泳動することによる 2次元電気泳動の可能性について検討した。その結果、ムチン試料は一元目の膜から 2次元目の膜に移動することが確認された。ムチンは多量の糖鎖が結合しており等電点の幅もかなり広いことが推定される。

一方、糖鎖の違いに着目した分離能の改良としてレクチン親和 SMME 法を検討した。SMME 膜の基材である PVDF 膜は通常、ウェスタンブロットに利用される膜であり、タンパク質を疎水結合で吸着する性質がある。したがって、あらかじめレクチンを疎水結合的に PVDF 膜に吸着させておき、その後で親水性ポリマーをコーティングすれば、簡便にレクチン親和電気泳動用の膜が作成できる可能性があ



る。

実際にハプトグロビンをモデルタンパクとして予備実験をしてみると、親水性ポリマーをコーティングする前に PVDF 膜に吸着させたタンパク質は、通電しても全く移動しなかった。逆に、親水性ポリマーをコートした後にアプライしたハプトグロビンは通電により泳動した。そこで、GalNAc 認識レクチンである WFA をあらかじめ PVDF 膜に吸着させ、その後、親水性ポリマーをコーティングしてレクチン親和 SMME 膜を作成し、唾液ムチンを泳動してみた。その結果、レクチンを吸着させた膜では移動度が低下したスポットが現れ、さらに糖鎖解析の結果、移動度が低下したスポットはシアル酸含有率が低いことが明らかとなった。シアル酸で修飾された糖

鎖は WFA に認識されなくなることが知られている。このことから、この実験における移動度の遅延は WFA とムチン糖鎖の相互作用によるものであることが示唆され、レクチン親和 SMME によってムチンの分離を向上させることができる可能性が明らかとなった。今後、さまざまなレクチンを用いて同様の親和電気泳動を行うことにより、糖鎖に着目したムチン分離の可能性が広がると期待される。

(4) まとめと今後の課題

上記の成果により、SMME 膜の品質を安定させ良好な再現性でムチンを泳動することができるようになった。また単一の染色法で中性ムチンと酸性ムチンを同時に可視化し、さらに膜を透明化することで定量的な評価も可能となった。さらに、必要に応じて糖鎖に着目した分離もレクチン親和 SMME を用いることにより実現できる可能性を明らかにした。バイオマーカー探索法として利用する上で残された課題は、分離したムチンの同定である。抗タンデムリピート抗体を用いた同定法を開発したが、操作がやや煩雑であり、また利用できる抗体が少ない。マーカー探索では予想外のムチンが現れるケースも想定されるが、何種もの抗体で一枚の膜を染色することは現実的ではない。したがって、今後、泳動後のムチンを同定できる何らかの物理化学的な方法の開発が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Dong W, Matsuno YK, Kameyama A. Serum protein fractionation using supported molecular matrix electrophoresis. *Electrophoresis*. 査読有、(2013) 34:2432-2439.

DOI : 10.1002/elps.201300154.

Matsuno YK, Dong W, Yokoyama S, Yonezawa S, Narimatsu H, Kameyama A. Identification of mucins by using a method involving a combination of on-membrane chemical deglycosylation and immunostaining. *J Immunol Methods*. 査読有、(2013) 394:125-130.

DOI : 10.1016/j.jim.2013.06.002.

Dong W, Matsuno YK, Kameyama A. A procedure for Alcian blue staining of mucins on polyvinylidene difluoride membranes. *Anal Chem*. 査読有、(2012) 84:8461-8466.

DOI : 10.1021/ac301678z.

〔学会発表〕(計 18 件)

Matsuno YK, Supported Molecular Matrix Electrophoresis: Characterization of Mucins and Expanding to Affinity Electrophoresis, 27th International Carbohydrate Symposium, 2014 年 1 月

12-17 日、Indian Institute of Science, Bangalore, India

Kameyama A, FT-IR mapping of mucins on a SMME membrane, 27th International Carbohydrate Symposium, 2014 年 1 月 12-17 日、Indian Institute of Science, Bangalore, India

松野裕樹、分子マトリクス電気泳動によるレクチン親和電気泳動に関する基礎的研究、第 64 回日本電気泳動学会総会、2013 年 11 月 15-16 日、東北福祉大学、仙台市

亀山昭彦、分子マトリクス電気泳動による血清タンパク質分画と糖鎖解析、第 64 回日本電気泳動学会総会、2013 年 11 月 15-16 日、東北福祉大学、仙台市

松野裕樹、分子マトリクス電気泳動を利用したレクチン親和電気泳動に関する基礎検討、第 32 回日本糖質学会年会、2013 年 8 月 5-7 日、大阪国際交流センター、大阪市

亀山昭彦、分子マトリクス電気泳動による血清タンパク質分画、第 32 回日本糖質学会年会、2013 年 8 月 5-7 日、大阪国際交流センター、大阪市

Kameyama A, Recent Advances on Glycoconjugate Analysis Using Mass Spectrometry and Electrophoresis, 2013 International Glycoforum in Wuxi, 2013 年 9 月 16-17 日、Jaingnan University, Wuxi, China

Kameyama A, A Novel Membrane Electrophoresis Compatible with Glycoconjugate Analysis, 22nd International Symposium on Glycoconjugates, 2013 年 6 月 23-28 日、Dalian Institute of Chmical Physics, Dalian, China

董偉傑、PVDF 膜上のムチンの新規染色法、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 17-20 日、鹿児島市民文化ホール、鹿児島市

松野裕樹、分子マトリクス電気泳動 (SMME) による肝内胆管癌細胞株由来 MUC1 の分析、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 17-20 日、鹿児島市民文化ホール、鹿児島市

董偉傑、膜上に転写されたムチンの糖鎖分析と両立できる新規染色法、第 63 回日本電気泳動学会総会、2012 年 8 月 20-21 日、沖縄コンベンションセンター、宜野湾市

松野裕樹、分子マトリクス電気泳動 (SMME) による肝内胆管癌ムチンの分析、第 63 回日本電気泳動学会総会、2012 年 8 月 20-21 日、沖縄コンベンションセンター、宜野湾市

亀山昭彦、分子マトリクス電気泳動法を用いた糖タンパク質分析の新展開、第 63 回日本電気泳動学会総会、2012 年 8 月

20-21 日、沖縄コンベンションセンター、宜野湾市

亀山昭彦、分子マトリクス電気泳動の開発とアフィニティ電気泳動への応用、第 62 回日本電気泳動学会シンポジウム、2012 年 5 月 11 日、慶応義塾大学共立キャンパス、東京都

松野裕樹、分子マトリクス電気泳動 (SMME) により分離したムチンの同定法の開発、第 62 回日本電気泳動学会総会、2011 年 11 月 13 日、横浜市開港記念会館、横浜市

松野裕樹、分子マトリクス電気泳動 (SMME) によるムチンの分析と親和電気泳動 (affinity-SMME) への展開、第 30 回日本糖質学会年会、2011 年 7 月 13 日、長岡リリックホール、長岡市

松野裕樹、ムチンの免疫染色を目的とした分子マトリクス電気泳動法 (SMME) の改良、第 30 回日本糖質学会年会、2011 年 7 月 13 日、長岡リリックホール、長岡市
董偉傑、分子マトリクス電気泳動 (SMME) により分離したムチンの糖鎖プロファイル比較法、第 30 回日本糖質学会年会、2011 年 7 月 12 日、長岡リリックホール、長岡市

〔図書〕(計 1 件)

Matsuno YK, Kakehi K, Kameyama A. John Wiley & Sons, Ltd, Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity, (2014), Chapter22, 421-438.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：糖タンパク質又は多糖類の検出方法
発明者：亀山昭彦、松野裕樹、董偉傑
権利者：独立行政法人産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特願 2012-012822
出願年月日：2012 年 1 月 25 日
国内外の別：国内

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・生物プロセス研究部門・研究グループ長
研究者番号：80415661

(2) 研究分担者

米澤 傑 (YONEZAWA, Suguru)
鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：10175002

(3) 連携研究者

松野 裕樹 (MATSUNO Yu-ki)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員
研究者番号：40613550