

学術研究助成基金助成金 研究成果報告書

平成 25 年 6 月 25 日現在

機関番号：72690
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23710246
 研究課題名（和文） 網羅的グライコプロテオミクスを指向した新規糖ペプチド分離樹脂の開発と応用
 研究課題名（英文） Development of a novel protocol based enrichment of glycopeptides for comprehensive glycoproteomics
 研究代表者
 黒河内 政樹（KUROGOCHI MASAKI）
 公益財団法人野口研究所・研究部・研究員
 研究者番号：30422009

研究成果の概要（和文）：HILIC 効果と弱陰イオン交換の性質を持つ DEAE-Sepharose を使用する事によって、生体試料から酸性糖ペプチド並びに中性糖ペプチドの抽出技術の開発を行った。これにより、ヒト Apolipoprotein B-100、ウシ Thyroglobulin 由来の糖ペプチドを中性糖ペプチド、シアリル糖ペプチド、硫酸化糖ペプチドに分離する事が出来た。

研究成果の概要（英文）：Separation of neutral and acidic glycopeptides has been developed using DEAE-Sepharose which has two characteristics, hydrophilic interaction (HILIC) and weak ion-exchange. By this method, neutral, sialylated, sulfated glycopeptides from human apolipoprotein B-100, bovine thyroglobulin could be isolated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

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：プロテオミクス・グライコプロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

近年、生体内の糖鎖の働きが注目され、グライコプロテオミクスが盛んになっている。グライコプロテオミクスは、糖ペプチドを質量分析計で解析する事によって、糖タンパク質の糖鎖の構造と結合部位の情報を得る手法である。糖ペプチドを質量分析計で解析する上で困難な点は、糖ペプチドが他の生体分子と比べてイオン化しづらく、他の分子が混在している系では、検出しにくい点である。よ

って、多くのグループらが生体試料から糖ペプチドの分離する技術を開発している。現在、糖鎖認識するレクチンアフィニティーカラム、糖鎖の親水性を利用したボロン酸担持カラム、セファロース樹脂を使用した HILIC カラム、糖鎖と金属イオンの錯体を利用した TiO₂ 担持カラム、糖の酸化反応を利用したヒドラジドカラム等が開発され、グライコプロテオミクスに使用されてきた。以前、私は酸化反応したシアル酸含有糖ペプチドの抽出

方法を開発し、グライコプロテオミクスを行って来た。

2. 研究の目的

(1)生体試料中には、シアル酸含有糖ペプチド以外に中性糖ペプチドや硫酸糖ペプチドなどの性質が異なる糖ペプチドが混在している。これらの糖ペプチドが混在している系では、性質の安定した糖鎖構造に依存して検出される為、性質が異なる糖ペプチドを同時に検出する事が非常に難しい。よって、糖ペプチドを生体試料より網羅的に抽出し、中性・酸性の性質毎に分離する手法の開発を目指した。

(2) 糖ペプチドのペプチド部分の官能基の修飾を通して、MALDI TOF-MS による糖ペプチドの検出を向上させる標識法の開発を行った。

3. 研究の方法

(1)蛍光標識した中性・酸性糖ペプチドを作成し、弱陰イオン交換と HILIC の性質がある DEAE-Sephrose 等の樹脂を用いて、吸着、分離、溶出条件の検討を蛍光分光計で定量的に行った。次に、酸性アミノ酸を有する酸性糖ペプチドと中性糖ペプチドの混合物 (IgG 由来糖ペプチド) とシアル酸を複数個持つ混合物 (Fetuin 由来糖ペプチド) を用いて、その分離性能の確認を行った。さらに、ヒト Apolipoprotein B-100、ウシ Thyroglobulin を用いて、混在する糖ペプチドの抽出・分離を試みた。

(2)糖ペプチドのペプチド鎖の N 末端側のアミノ基に数種類の化合物を標識し、糖ペプチドと標識した糖ペプチドのイオン検出の比較を行い、イオン検出が向上する標識試薬の探索を行った。次に、ペプチド鎖と糖鎖が異なる Ribonuclease B 由来、IgG 由来の糖ペプチドを用いて、ペプチド鎖の違いによるイオ

ン化促進能を調べた。

4. 研究成果

(1)DEAE-Sephrose を用いて、蛍光標識 (DBD) した中性・酸性糖ペプチドを定量的に吸着、分離、溶出させる条件が決定した。(図 1)

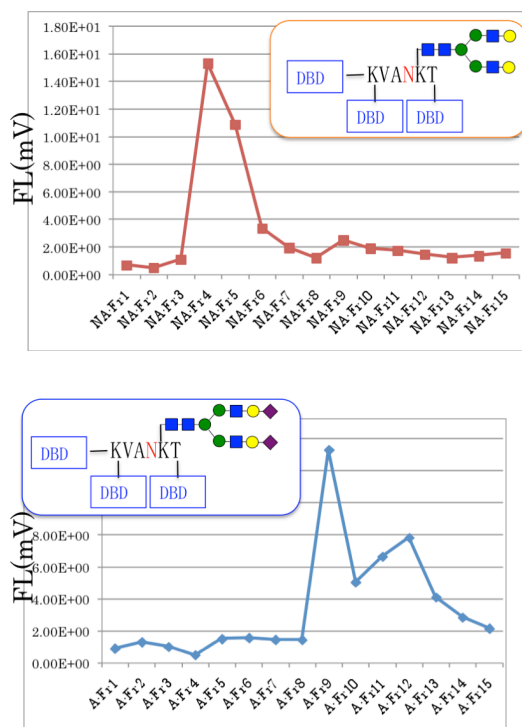


図 1. DEAE-Sephrose を用いた DBD 標識した中性・酸性糖ペプチドの溶出条件

また、IgG 由来糖ペプチドを中性糖ペプチドと酸性糖ペプチドに分離する事が出来た事 (図 2) からペプチド鎖の酸性残基には依存せずシアル酸の酸性性を利用して吸着・分離している事が分かった。また、Fetuin 由来糖ペプチドの分離・溶出からシアル酸残基の数 (モノ、ジ、トリ) に依存せず溶出する事が分かった。(図 3)

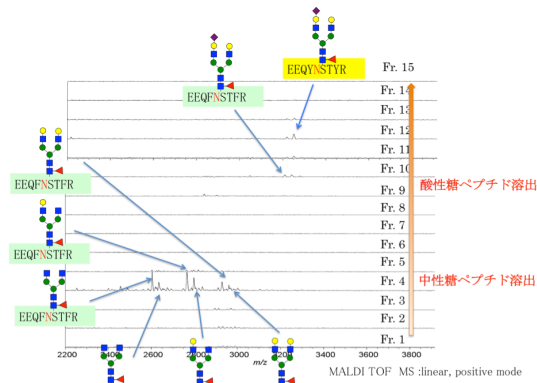


図 2. DEAE-Sepharose を用いた IgG 由来中性・酸性糖ペプチドの分離

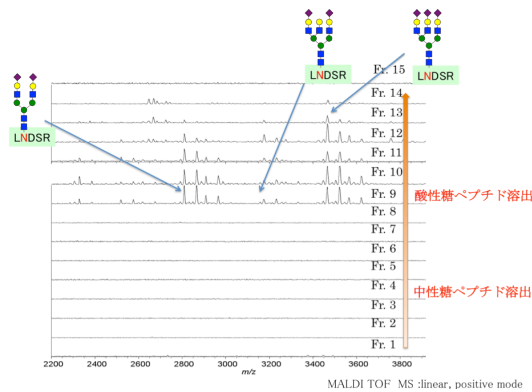


図 3. DEAE-Sepharose を用いた Fetuin 由来酸性糖ペプチドの分離

糖ペプチドの分離条件が確立したので、その応用試験として、ヒト Apolipoprotein B-100 由来の糖ペプチドを分離・解析した。(図 4) これによって、生体試料から糖ペプチドを糖鎖の極性である中性と酸性を利用して分離しながらの網羅的な糖ペプチドの抽出が可能になった。

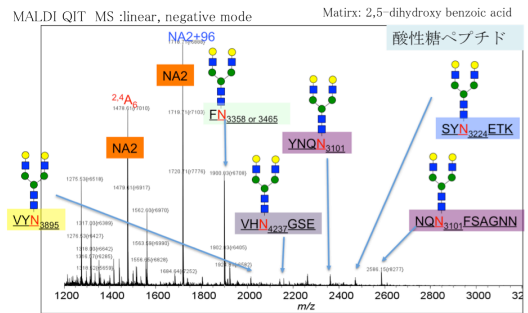


図 4. ヒト Apolipoprotein B-100 由来糖ペプチドの分離と解析

さらに、硫酸化糖鎖を持つウシ Thyroglobulin 由来の糖ペプチドの分離・解析を行う事によって、この手法が硫酸化糖ペプチドの分離にも有効である事が分かった。ウシ Thyroglobulin 由来糖鎖には、酸性糖鎖にシアリル糖鎖と硫酸化糖鎖並びにそれら混合している糖鎖がある為、中性と酸性を分けた後に酸性糖ペプチド画分をシアリダーゼで脱シアリル化を行い、再度 DEAE-Sepharose を用いて分離する事によって、中性糖ペプチド画分、シアリル化糖ペプチド画分と硫酸化糖ペプチド画分を得る事が可能となった。

(2) 糖ペプチドと標識した糖ペプチドのイオン検出の比較を行った結果、約 10 倍近くの検出ピークが向上する標識試薬を発見した。(図 5)

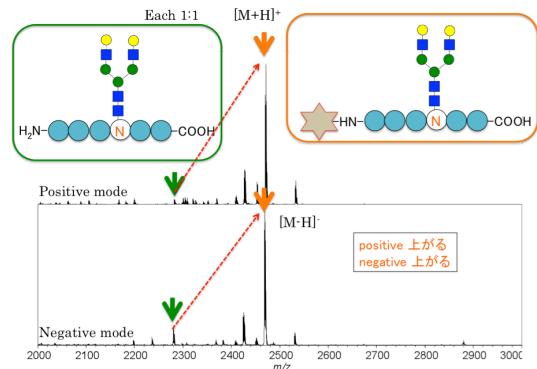
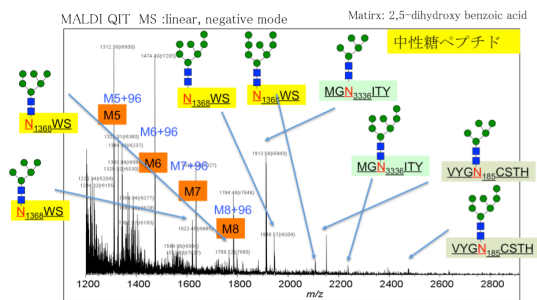


図 5. 糖ペプチドと標識した糖ペプチドのイオン検出の比較試験

標識によって糖ペプチドのイオン化は向上するが、イオン化促進度合いはペプチド鎖の性質に依存し、positive mode, negative mode 測定から正電荷、負電荷のイオン化においても促進度は異なってくる事が分かった。(図 6、7) 今後は、この特徴をより詳細に分析してよりイオン化検出能が高い糖ペプチド試薬の開発を行う。

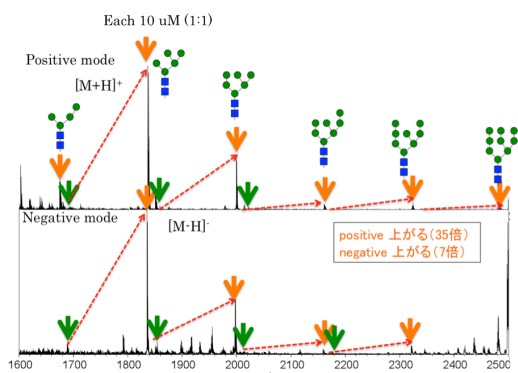


図 6. RNAB 由来糖ペプチドと標識した糖ペプチドのイオン検出の比較試験

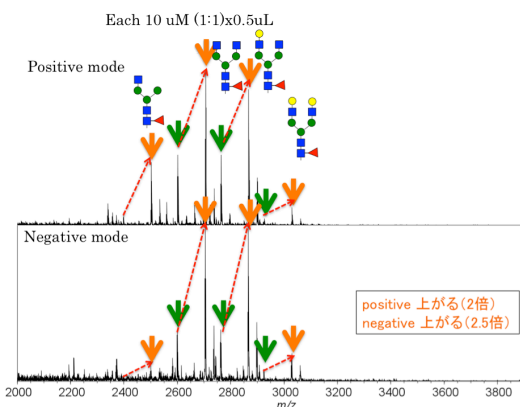


図 7. IgG 由来糖ペプチドと標識した糖ペプチドのイオン検出の比較試験

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) Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa JI, Kurogochi M, (14 名、4 番目) Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology*. 査読有、2013, 印刷中, DOI: 10.1002/hep.26262

(2) Hinou H., Miyoshi R., Takasu Y., Kai H., Kurogochi M., (16 名、5 番目) A Strategy for Neuraminidase Inhibitors Using Mechanism-Based Labeling Information, *Chem. Asian. J.* 査読有、6, 2011, 1048- 1056, DOI: 10.1002/asia.201000594

(3) Hashimoto R., Fujitani N., Takegawa Y., Kurogochi M., (14 名、4 番目) An efficient approach for the characterization of mucin-type glycopeptides: the effect of O-glycosylation on the conformation of synthetic mucin peptides, *Chem. Eur. J.* 査読有、17, 2011, 2393- 2404, DOI: 10.1002/chem.201002754

[学会発表] (計 4 件)

(1) 黒河内政樹、天野純子、DEAE-Sepharose を用いた中性・酸性糖ペプチドの分離と解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、マリンメッセ福岡(福岡)

(2) 橋本亮、富樫智章、古川潤一、黒河内政樹、大橋 哲、工藤里美、山内綾乃、三浦信明、西村紳一郎、岡田卓也、津田和実、橋尾範、村山大輔、見 付啓義、石井健太郎、福島信弘、黒田寿晴、山崎 博司、濱田和幸、全自動糖鎖プロファイル診断システムを用いたグライコミクスデータ解析、第 5 回 GFRG 研究会、2011 年 10 月 5

日、弘前大学医学部コミュニケーション
センター(弘前)

- (3) 黒河内政樹、西村紳一郎、ラット血清中のシアリル糖ペプチドの同定・解析法、第84回日本生化学会大会、2011年9月24日、京都国際会議場(京都)
- (4) 富樫智章、古川潤一、黒河内政樹、大橋哲、工藤 里美、山内綾乃、三浦信明、西村紳一郎、岡田卓也、津田和実、橋尾範、村山大輔、見付啓義、石 井健太郎、橋本亮、福島信弘、黒田寿晴、山崎博 司、濱田和幸、全自動糖鎖プロファイル診断システム及びそのデータ解析について、第84回日本生化学会大会、2011年9月24日、京都国際会議場(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒河内 政樹 (KUROGOCHI MASAKI)
公益財団法人野口研究所・研究部・研究員
研究者番号：30422009

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：