

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460934

研究課題名(和文) 胃粘膜恒常性維持におけるムチン糖鎖の役割の解明

研究課題名(英文) Role of mucin-type O-glycan on gastric mucosal homeostasis

研究代表者

五艘 行信 (Goso, Yukinobu)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：20112659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： マウス胃粘膜の2つの部位(胃体部および幽門部)からムチンを調製し、アルカリ還元法と無水ヒドラジン法で糖鎖を得、質量分析計により解析した。ヒドラジン法においては、方法の最適化を図り、マロン酸を反応に共存させることにより、糖鎖の分解が抑えられることを見いだした。確立した方法で、胃体部と幽門部のムチン糖鎖を比較した結果、部位特異的な糖鎖の存在が明らかとなった。この違いが、糖鎖改変時に幽門部でのみ発がんが起こることに関係していると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Mouse gastric mucins (MGM) were prepared from corpus and antral mucosa of C57BL/6 mouse stomach. Mucin-type O-glycans were prepared and analyzed using two methods. Firstly, the reduced-form O-glycans were obtained from MGM by alkaline-borohydride treatment and after permethylation analyzed by MALDI-TOF/MS and MS/MS. Secondly, the O-glycans bearing reducing terminal GalNAc as an intact form were obtained from MGM by treatment with anhydrous hydrazine and, after derivatized with anthranilic acid, they were separated by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and fractionated. Each O-glycan was characterized by MALDI-TOF/MS and MS/MS. In the latter methods, it was found that malonic acid suppressed O-glycan degradation during hydrazine treatment, and the method was optimized on the reaction conditions. Both methods showed that corpus and antral mucins displayed similar glycosylation patterns, but several glycans, especially acidic ones, were characteristic to each mucin.

研究分野：糖鎖生物学，糖鎖化学，生化学

キーワード：mucin O-glycan peeling glycomics stomach

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 消化管粘膜は粘液で覆われており、この粘液が様々な傷害因子から粘膜を守るバリアーとして働いている。粘液の成分であるムチンの糖鎖がバリアー機能の発現に重要であると考えられている。

(2) 胃腺癌は体部に比べ幽門部に多く見られる。その理由の一つとして、これまでヘリコバクター・ピロリ(以下、Hpと略す)感染の関与が考えられてきた。すなわち、Hpは幽門部に、より多く感染しており、これが胃癌発症を引き起こすというものである。Hp感染には上皮細胞上の複合糖質糖鎖へのHpの接着が必要であり、糖鎖が感染に係わるが、一方で、粘液中のムチンの糖鎖がHpと結合することで、Hpの粘膜上皮細胞への接着を阻止しているとも考えられる。また、腺粘液細胞産生ムチンに特異的な糖鎖が、Hpに抗菌的に働くことが、共同研究者である信州大学の中山らによって報告されている(Science, 2004)。

(3) 腺粘液ムチンの糖鎖を改変したところ、それだけで胃腺癌が生じ、しかも、発生部位は幽門部に局限していた。腺粘液細胞産生ムチンには、末端に、結合したN-アセチルグルコサミン(以下、GlcNAcと略す)を持つ特異的な糖鎖が存在している。中山らはGlcNAcを糖鎖に転移する酵素のノックアウト実験を行い、その結果、1つの糖転移酵素の欠失が胃腺癌を生じさせることを見いだした(J Clin Invest, 2012)。申請者は、この研究においてムチン糖鎖の解析を担当し、GlcNAcを持つ糖鎖が、ノックアウトマウスで完全に消失することを確認し、代わりに酸性糖鎖が増えることを明らかにした。ここで、興味深いことに、癌発生に先んじて生じる粘膜の肥厚、炎症の惹起を含めて、糖鎖改変によって生じる変化は幽門部に限定して起こっており、体部では大きな変化は観察されていない。この結果は、体部と幽門部における発癌の頻度の違いは、Hpの感染だけではなく、もともとの粘膜の粘液バリアーを形成するムチン糖鎖にも依存する可能性を考えさせる。

## 2. 研究の目的

(1) マウス胃の体部と幽門部のムチン糖鎖を質量分析計を用いて詳細に解析し、粘膜恒常性の維持に関与すると思われる糖鎖を明らかにする。

粘液ムチンの糖鎖改変は胃腺癌を引き起こしたが、癌の発生部位は幽門部に局限していた。この結果は、粘液として分泌されるムチンの糖鎖に粘膜恒常性維持の機能があり、その働きは体部と幽門部で異なることを示唆する。そこで、ムチンを体部由来と幽門部由来に分けて糖鎖のプロファイリングを行うことで、部位特異的にあるいは優位に発現

する糖鎖を特定することを目指す。申請者は、すでに述べたように、マウス胃粘膜からムチンを調製し、その糖鎖を質量分析計を用いて解析することに成功しており、この方法を用いることができる。

(2) 部位特異的な糖鎖が発現している場所を特定する。

ムチン糖鎖が粘膜の恒常性維持に係わるとすれば、作用部位として組織幹細胞がある増殖帯領域が考えられる。その予想が正しいかどうかを検証する為に、糖鎖を認識する抗体あるいはレクチンを用いて、前項(1)で特定した部位特異的な糖鎖が発現している場所を特定する。申請者らは、多数の抗ムチン糖鎖モノクローナル抗体を開発しており、この目的に使用が可能である。

(3) 部位特異的な糖鎖が結合しているムチン分子を特定する。

胃粘膜ではMUC5ACとMUC6という、異なるペプチドから成るムチンが表層粘液と腺粘液にそれぞれ存在しているが、糖鎖も両粘液で異なることが組織学的な解析によって明らかになっている。さらに、同じペプチドから成るムチンでも、その存在部位によって糖鎖が異なることが知られている。例えば、増殖帯付近のムチン糖鎖は硫酸化糖鎖を多く含むなど、他の部位の糖鎖とは異なっている。したがって、部位特異的なムチン糖鎖が結合しているムチン分子種を単離して同定することが必要になる。申請者は、ムチンをゲルろ過と産総研の亀山らが開発したPVDF膜電気泳動で解析する予備実験を開始しており、この方法を用いてムチン分子種の同定を行う。なお、プロテオーム解析に通常使われる2次元電気泳動法は、ムチンの巨大さゆえに使用できず、このような新たな手法の開発を必要とする。

(4) 特異的な糖鎖が相互作用しうる細胞および表面分子を特定する。

ムチン糖鎖が粘膜恒常性維持に何らかの機能を持つのであれば、糖鎖と相互作用をする分子を知る必要がある。糖鎖を認識するタンパク質およびそのタンパク質が発現している細胞の同定を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) マウス胃粘膜ムチンの精製 - マウス(C57BL/6)の胃体部および幽門部粘膜を別々に取り出し、既報(Goso et al. J Biochem, 1997, 2003)に従ってトライトンX-100を含むグアニジン塩酸中でホモゲナイズ処理後、ムチンを抽出した。抽出液をゲルろ過カラム(グアニジン塩酸溶液中のSepahrose CL-6B)にて分画し、高分子のムチン画分を得た。塩化セシウム密度勾配超遠心によりムチン以外のタンパク質と核酸を除去し、精製ムチンを得、その後、エタノール沈殿により

脱塩した。

(2) ムチン型糖鎖の調製およびプロファイリング - 上記(1)により得たムチンを還元剤(水素化ホウ素ナトリウム)の存在下でアルカリ分解して糖鎖を得た後、イオン交換クロマトグラフィーにより中性糖鎖と酸性糖鎖に分離した。精製した糖鎖を水酸化ナトリウムのスラリーを含む DMSO 中で処理し、完全メチル化を行なった。中和後、C18 カラムを用いて、精製された完全メチル化糖鎖を得た。メチル化糖鎖をマトリックス支援飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF-MS)およびタンデム MS を用いて解析し、その構造を決定した。

(3) 糖鎖プローブ作成のためのムチン糖鎖の調製法およびプロファイリング法の検討 - モデル糖タンパク質として、市販の豚胃ムチンを部分試製したものと牛血清フェツイン、およびラット胃ムチンを気相ヒドラジン分解し、得られた糖鎖を再アセチル化後、イオン交換クロマトグラフィーにより中性糖鎖と酸性糖鎖に分離した。アントラニル酸で蛍光標識後、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)で分画し、得られた糖鎖をMALDI-TOF-MSおよびタンデム MS で解析した。

アントラニル酸の代わりに、アントラニロイルヒドラジンをを用いて標識した糖鎖を同様に HILIC で分画し、構造を確認した後、住友ベークライト社製カルボプレートに結合させた。エピトープ既知の単クローン抗体を用いて ELISA 測定を行った。

(4) 糖鎖特異的抗体が認識するムチン分子の同定法の検討 - 精製した胃粘膜ムチンを Sepharose CL-2B で分画し、さらに PVDF 膜電気泳動により 2 次元に展開した。抗ムチン抗体を用いて免疫染色し、ムチン分子の同定を行った。さらに、2 次元目の分離に、等電点電気泳動を用いた検討も行った。

(5) 部位特異的ムチンに対する抗体の作成 - 胃腺粘液ムチンである Muc6 のペプチドを化学合成し、それをウサギに免疫することで抗血清を得た。抗体の特異性は、ラットおよびマウス胃をエタノール固定後パラフィン包埋を行い薄切して得た組織切片の免疫染色により検討した。

#### 4. 研究成果

(1) メチル化オリゴ糖アルコールの質量分析によるマウス胃体部および幽門部ムチン糖鎖の違いの検討 - マウス(C57BL/6, オス, 7 週齢)の胃粘膜をトライトン X-100 およびジチオスレイトールを含むグアニジン塩酸溶液で抽出し、抽出液をゲルろ過カラム、塩化セシウム密度勾配超遠心により処理し、精製ムチンを得た。エタノール沈殿で脱塩後、

水素化ホウ素ナトリウムの存在下でアルカリ分解して糖鎖を得、イオン交換カラムにより、中性糖鎖と酸性糖鎖に分画した。得られた糖鎖を、完全メチル化後、マトリックス支援飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF-MS)を用いて解析した結果、図 1 に示したように、胃体部と幽門部では、胃ムチンの中性糖鎖に、サイズ分布の違いが見られることがわかった。しかし、糖鎖分子種には大きな違いは認められなかった。一方、酸性糖鎖については、胃体部にほとんど認められないのに対し、幽門部では有意に多い糖鎖が認められた(図 2)。

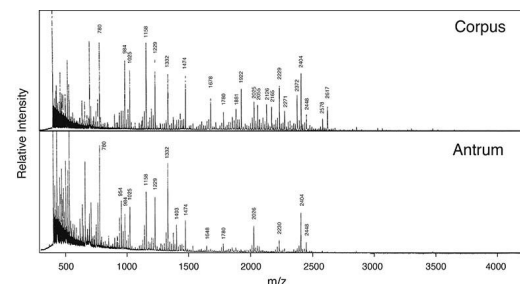


図 1. 胃体部と幽門部の中性糖鎖の比較

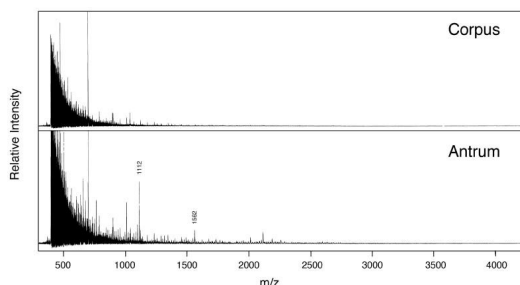


図 2. 胃体部と幽門部の酸性糖鎖の比較

#### (2) 気相ヒドラジン分解によるムチン糖鎖の調製

ヒドラジンによる糖鎖遊離における弱酸添加の検討 - 部位特異的ムチン糖鎖プローブ作成のために還元端にアルデヒド基を残した糖鎖の調製を試みた。まず、部分精製した市販の豚胃ムチンおよび牛血清フェツインをモデル糖タンパクとして、糖鎖遊離の条件検討を行った。糖タンパクを種々の条件でヒドラジン処理した後、得られた糖鎖をアントラニル酸で蛍光標識し、HILIC により分画し、さらに MALDI-TOF-MS およびタンデム MS で、解析した。これまで行っていた、無水ヒドラジン、65 °C、18 時間の反応においては、十分量のムチン糖鎖が得られるものの、同時に多量のピーリングによる分解物が生じることが判った(図 3 A)。そこで、種々の添加物を検討したところ、弱酸を添加すると、分解が抑制されることを見いだした。詳細な検討を行った結果、糖タンパク 150 μg の処理において 10 μmol のマロン酸を添加するのが最も効果的であることが判った(図 3 B)。

この方法の妥当性について、ラット胃ムチンを用いて検討した。図 4 に示したように、マロン酸存在下での気相ヒドラジン分解に

において、分解の無い糖鎖のクロマトグラムが得られ、HILIC によるムチン糖鎖のプロファイリングが可能となった。

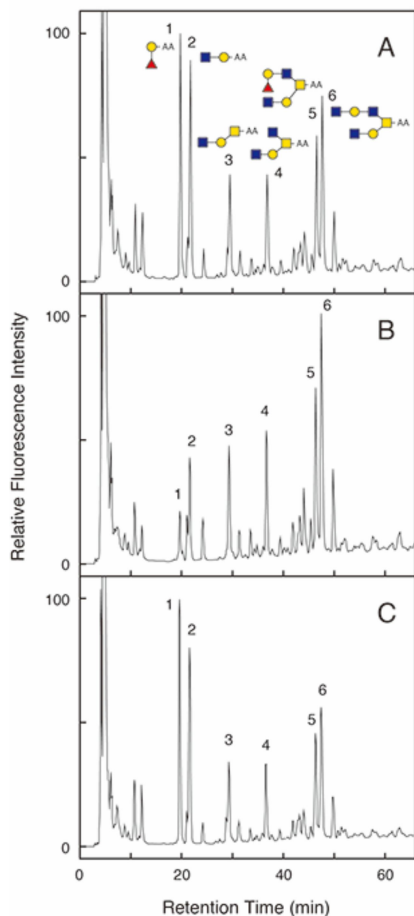


図3．ムチン糖鎖遊離条件の検討  
A．添加物無し；B．マロン酸添加；C．マロン酸二ナトリウム塩添加  
ピーク1と2は分解物，ピーク3-6は分解の無い糖鎖である。黄色丸はガラクトース，黄色四角はN-アセチルガラクトサミン，青四角はN-アセチルグルコサミン，赤三角はフコース，AAはアントラニル酸を表す。

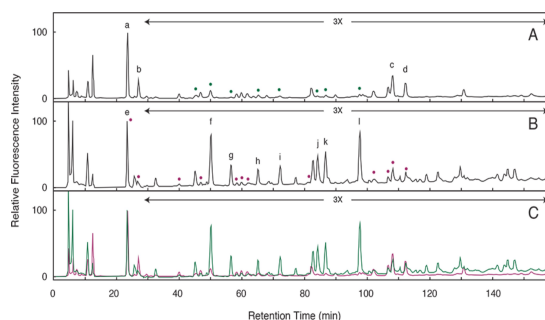


図4．ラット胃ムチン糖鎖を用いた遊離条件の検討  
A．添加物無し；B．マロン酸添加；C．両者(紫が添加物無し，緑がマロン酸添加)の重ね合わせ象  
a-eおよび紫の点はピーリングによる分解物，f-lおよび緑の点は分解の無い糖鎖を表す。

ヒドラジンによる糖鎖遊離における反応条件の検討 - 上記の条件下でラット胃粘膜から調製したムチンをヒドラジン処理したところ，十分量の分解の無い糖鎖が得られたものの，なお，ピーリングによる分解産物が含まれることが明らかとなった。そこで，更に反応条件の検討を行った。温度と時間を変えてヒドラジン処理を行い，至適条件を検索した結果，収量はほぼ半分になるものの，分解がより少ない条件(60℃, 6h)を見いだした。

ヒドラジンとともに使用されている，アンモニアによる糖鎖遊離との比較 - ヒドラジン処理は，取り扱いに若干の注意を必要とするため，より扱いが容易なアンモニアを使用する糖鎖遊離法が報告されている。そこで，上記で確立した方法との比較を試みた。ブタ胃ムチンを炭酸アンモニウムで飽和した濃アンモニア水で60℃, 40h処理後，得られた糖鎖をアントラニル酸で標識し，HILICにて解析した。その結果，ヒドラジン処理と同じ糖鎖が得られたが，さらにいくつか追加の糖鎖が得られた。それらは，上記(1)で用いた方法で解析したときには観察されず，分解物の可能性が考えられた。そこで，追加で得られた糖鎖の還元端を解析したところ，分解の無い糖鎖に存在するN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)ではなく，N-アセチルグルコサミンで有ることが明らかとなった。タンデムMSによる解析の結果から，追加で得られた糖鎖は，ピーリングによって生じた分解物であり，さらに，ヒドラジン処理の場合には，この分解物はアントラニル酸で標識されないことが明らかとなった。

上記で確立したヒドラジンによる糖鎖調製法をさらに検討するために，上記で用いた，ラット胃ムチンを用いて，還元剤存在下でのアルカリによる糖鎖遊離法との比較を行った。両者は良い一致を示し，ヒドラジン法の妥当性が確認できた。さらに，ヒドラジン遊離糖鎖のアントラニル酸標識後HILICによる解析では，メチル化糖のMSによる解析では困難な，異性体の解析も可能であった。

以上の結果から，上記で確立したヒドラジンによる糖鎖調製法が，糖鎖のグライコム解析(網羅的糖鎖プロファイル)に適していることが明らかとなった。

(3) 糖鎖プローブの作成，およびプロファイリング法の検討 - ヒドラジン法で得られたブタ胃ムチン糖鎖をアントラニロイルヒドラジンで標識し，得られた糖鎖をHILICにて分画した。アントラニル酸標識糖鎖と同様に分画され，精製糖鎖が得られた。それらを，ELISAプレートに結合し，糖鎖特異的抗体での検出を試みた。しかしながら，検出には，予想を超えた糖鎖量が必要なことが判り，更

なる検討中である。スライドガラスを用いた糖鎖アレイの使用が有効で有る可能性があり、今後の課題である。

(4) 糖鎖特異的抗体が認識するムチン分子の同定法の検討 - ラット胃ムチンを Sephadrose CL-2B カラムで分画し、表層粘液中に存在する Muc5AC ムチンのペプチドを特異的に認識する RGM23 抗体と腺粘液中に存在する Muc6 ムチンの糖鎖を認識する HIK1083 抗体を用いて検出したところ、両ムチンがこのカラムで分離されることを見いだした。そこで、更に、PVDF 膜電気泳動により 2 次元に展開した。抗ムチン抗体を用いて免疫染色し、ムチン分子の同定を行った。しかしながら、PVDF 膜電気泳動では、ラット胃ムチンの有効な分離は観察されなかった。そこで、等電点電気泳動を用いた検討を行った。ラット胃ムチンは、いくつかの画分に分離されることが明らかとなったが、詳細な解析にまでは至らなかった。

(5) 上記(4)の解析において、腺粘液ムチンである Muc6 のペプチド部を認識する抗体の無いことが、解析を困難にすると考えられた。そこで、ラット Muc6 のペプチドを認識する抗体の作成を行った。抗原能を有すると思われるペプチドを化学合成し、常法に従ってウサギに免疫して抗血清を得た。なお、この過程は、専門業者に委託して行った。得られた抗血清の特異性は、ラット胃をエタノール固定し、パラフィン包埋したブロックを薄切し、免疫染色することで行った。その結果、Muc6 の発現が報告されている、胃体部腺粘液細胞、胃幽門腺細胞、十二指腸ブルナー腺細胞を特異的に染色する抗体の作成に成功した。この抗体は、マウス組織も同様に染色した。今後の、ムチン分子種の同定に役立つことが示された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

Tsubokawa, D., Hatta, T., Maeda, H., Mikami, F., Goso, Y., Nakamura, T., Alime, M. A., Tsuji, N., A cysteine protease from *Spirometra erinacei-europaei* plerocercoid is a critical factor for host tissue invasion and migration., *Acta Tropica*, 査読有, Vol.167, 2017, pp.99 - 107, DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.12.018.  
Chimuro, T., Kuroyama, H., Goso, Y., Ishihara, K., Kurihara, M., Discrimination of rat Brunner's gland carbohydrate antigens by sitespecific monoclonal antibodies., *Carbohydr. Res.*, 査読有, Vol.432, 2016, pp.76 - 82, DOI: 10.1016/j.carres.2016.06.010.

Goso, Y., Malonic acid suppresses mucin-type O-glycan degradation during hydrazine treatment of glycoproteins., *Anal. Biochem.*, 査読有, Vol.496, 2016, pp.35 - 42, DOI: 10.1016/j.ab.2015.12.011.

Tsubokawa, D., Ishiwata, K., Goso, Y., Yokoyama, T., Kanuka, H., Ishihara, K., Nakamura, T., Tsuji, N., Induction of Sda-sialomucin and sulfated H-sulfomucin in mouse small intestinal mucosa by infection with parasitic helminth., *Exp. Parasitol.*, 査読有, Vol.153, 2015, pp.165 - 173, DOI: 10.1016/j.exppara.2015.03.008.

### 〔学会発表〕(計9件)

川島 麗, 香渡 優, 川上 文貴, 前川 達則, 菅原 節子, 石原 和彦, 五艘 行信, 市川 尊文, 放射線照射モデルを用いた H2 受容体拮抗薬の効果, 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 25 日, 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(仙台市)  
五艘 行信, 石原 和彦, 栗原 誠, 弱酸存在下でのヒドラジンガス処理によるムチン糖鎖切り出し条件の検討および応用, 第 35 回日本糖質学会年会 2016 年 9 月 3 日, 高知市文化プラザカルポート(高知市)  
香渡 優, 川島 麗, 川上 文貴, 石原 和彦, 五艘 行信, 市川 尊文, 5-Fluorouracil 起因性消化管粘膜傷害に対する成分栄養剤の防御的役割, 第 44 回日本潰瘍学会, 2016 年 9 月 2 日, 旭川グランドホテル(旭川市)

合田 瑞紀, 飯田 泰広, 門谷 裕一, 川島 麗, 五艘 行信, 石原 和彦, 市川 尊文, 栗原 誠, ラット唾液ムチンを認識するモノクローナル抗体の作製, 第 88 回日本生化学会大会, 2015 年 12 月 3 日, 神戸国際会議場(神戸市)

五艘 行信, 無水ヒドラジンによるムチン型糖鎖切りだしに及ぼす弱酸添加の影響, 第 88 回日本生化学会大会, 2015 年 12 月 2 日, 神戸国際会議場(神戸市)

Goso, Y., Malonic acid suppresses O-glycan degradation during hydrazine treatment of glycoproteins., 23rd International Symposium on Glycoconjugates, 2015 年 9 月 17 日, Split (Croatia)

小坂 裕, 飯田 泰広, 川島 麗, 五艘 行信, 石原 和彦, 市川 尊文, 栗原 誠, ラット小腸ムチン分子種を識別するモノクローナル抗体, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 16 日, 国立京都国際会館(京都市)

五艘 行信, 石原 和彦, 栗原 誠, マウス胃体部と幽門部におけるムチン糖鎖の違いの検討, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 16 日, 国立京都国際会館(京都市)

小坂 裕，兒玉 洋平，飯田 泰広，川島 麗，五艘 行信，石原 和彦，市川 尊文，栗原 誠，ラット小腸ムチンに対するモノクローナル抗体の作製，第86回日本生化学会大会，2013年9月13日，パシフィコ横浜（横浜市）

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：無水ヒドラジンによる，糖タンパク質からのO-結合型糖鎖の脱離反応における，脱離した糖鎖の分解抑制剤，キット及び方法  
発明者：五艘行信  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2014-114916  
出願年月日：2014年6月3日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://web.med.kitasato-u.ac.jp/edures/biochem/GI-tract-mucin.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

五艘 行信（GOSO, Yukinobu）

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：20112659