

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26620142

研究課題名(和文) ムチンにおける周波数依存性マイクロ波効果の探索と応用

研究課題名(英文) Discovery and application of frequency dependence of microwave-assisted degradation of mucin

研究代表者

亀山 昭彦 (KAMEYAMA, AKIHIKO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・上級主任研究員

研究者番号：80415661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ波によるムチン分子近傍の束縛された水分子の活性化を介した新たなムチン分解法の開発を目的として研究を進めた。モデル化合物として、MUC2ムチンのタンデムリピート内に8箇所のGalNAc付加部位を有する16残基糖ペプチドの合成に成功した。また、分解実験はムチンと同様に束縛された水分子を有するヒアルロン酸をモデルとして行った。ヒアルロン酸の分解をモニターする方法として粘度測定その他、ポリエチレンイミンを用いた分子マトリックス電気泳動法を開発した。ヒアルロン酸分解の周波数依存性としては、1～2GHzを境に低周波数側では導電加熱が、また高周波数側では誘電加熱が生じることが明確に区別された。

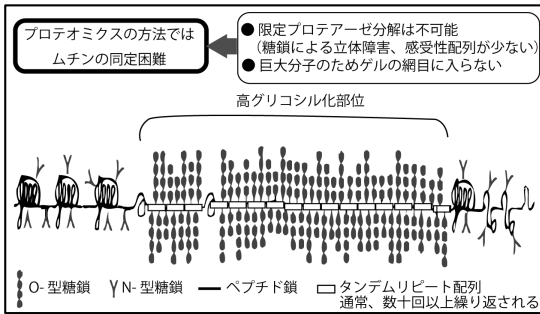
研究成果の概要(英文)：We have studied a microwave-assisted degradation of mucins that have bound water molecules. MUC2 tandem repeat of 16 mer peptide containing 8 GalNAc residues has been synthesized as a model compound. As a model compound for degradation experiments, we used hyaluronic acid which should have bound water molecule as with mucins. For monitoring degradation of hyaluronic acid, we have developed affinity supported molecular matrix electrophoresis using 1% polyethyleneimine in polyvinyl alcohol. We have revealed that microwave-assisted heating of hyaluronic acid was dielectric heat in higher frequency than 1 to 2 GHz, while it was induction heat in lower frequency.

研究分野：複合糖質構造解析

キーワード：ムチン ヒアルロン酸 マイクロ波 糖ペプチド

1. 研究開始当初の背景

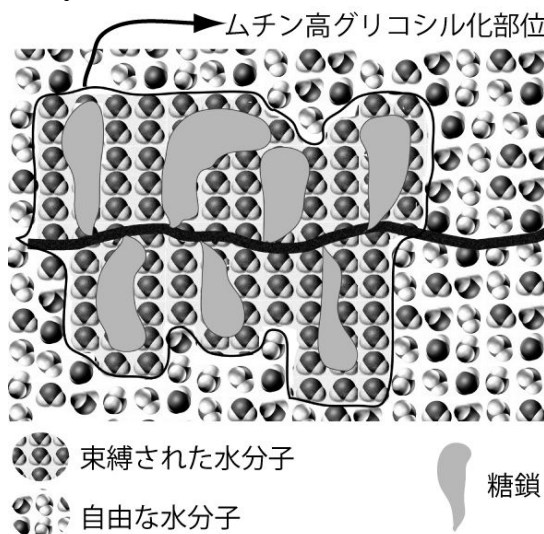
(1) ムチンやその糖鎖はがんや感染との関連が古くから示唆されてきた。しかし、分子量 100 万を超える巨大分子である上に、多量の糖鎖による立体障害のためにプロテアーゼ分解が困難であることなどの技術的な理由により、ムチンは近年のプロテオミクスによる進歩からも取り残された未開拓領域である。研究開始当初、研究代表者はムチンを簡便に分離し、その糖鎖構造を解析する方法を開発した。しかし、ムチンを分離できても、それを同定する技術がまだ世の中になく、その開発が切望されていた。



(2) 研究分担者(清水)は、マイクロ波を活用した有機合成研究を進めてきた。これまでマイクロ波は効率的加熱効果により化学反応を加速すると考えられてきたが、研究開始当初、清水はマイクロ波の非加熱効果の存在を糖鎖合成やペプチド合成において見出していた。

(3) 研究分担者(杉山)はマイクロ波効果の周波数依存性について理論的研究を進め、水和により束縛された水分子と自由な水分子では、活性化に最適な周波数が異なることを示唆していた。

(4) ムチンは多数の糖鎖を有するためムチン分子周囲には水和により束縛された水分子が存在する。ある周波数のマイクロ波により、この束縛された水分子を選択的に活性化できれば、ムチンの分解が飛躍的に加速することが期待された。分解できれば、その分解パターンなど各ムチンに固有の情報が得られムチン同定の足がかりとなる可能性があった。



2. 研究の目的

(1) 通常の電子レンジで使われる 2.45 GHz では、水はマイクロ波を良く吸収し効率的に加熱されるが、氷はそうではない。このように同じ物質でも物性が異なればマイクロ波に対する反応性が異なる。また、異なる周波数では吸収効率も変わる。本研究は、マイクロ波効果の周波数による違いを生体分子に対して検討する初めての試みである。ムチンは糖鎖含量が極めて高く、水和により多くの水分子を束縛していると考えられるため、ムチン溶液中の束縛されていない自由な水分子に対する効果とは異なる結果が期待される。さらに、基質近傍を最適な周波数のマイクロ波で直接加熱することにより、副反応を抑えた活性化が実現すれば、ムチンの限定分解など、これまで不可能とされていた反応を実現できる可能性がある。加えて、マイクロ波の非加熱効果による予期しない効果が得られる可能性もある。

(2) ムチンをタンパク質レベルで同定するために、ムチンの特徴であるタンデムリピート配列に着目した。この配列はムチン種ごとに異なり、また一分子中に数十回以上繰り返される。したがって特定のペプチド結合を選択的に分解できれば、特徴的な分解物が高濃度で得られると期待される。この特徴的な分解パターンを各ムチンの固有値として活用することにより、全く新しいムチン種同定法(ムチンフィンガープリント法)が開発できる。しかし、このタンデムリピート配列はトリプシンなど、通常プロテオーム解析で使用されるプロテアーゼでは分解できない。また臭化シアンなどの化学分解でも不可能である。そこで、マイクロ波を用いた分解反応を種々検討する。背景で述べたようにムチンペプチド骨格の周囲には糖鎖に束縛された水分子があると考えられ、それをある周波数のマイクロ波で効率的に活性化することで分解反応を促進する。

(3) 本研究では周波数の異なるマイクロ波を照射することにより、ムチンにおける周波数依存性マイクロ波効果を実証するとともに、マイクロ波効果による選択的なムチン分解反応を見出し、それを活用した全く新しいムチン同定法(ムチンフィンガープリント法)の開発へとつなげることを最終的な目標とした。

3. 研究の方法

(1) 研究体制としては、ムチンの実験材料の調製、分解反応の化学条件の設定、および分解物の分析を研究代表者(亀山)が担当し、合成ムチンペプチドおよび糖ペプチドの材料調製を研究分担者(清水)が担当、周波数の異なるマイクロ波照射(産総研独自システム)および結果の電磁気学的解析を研究分担者(杉山)が担当した。

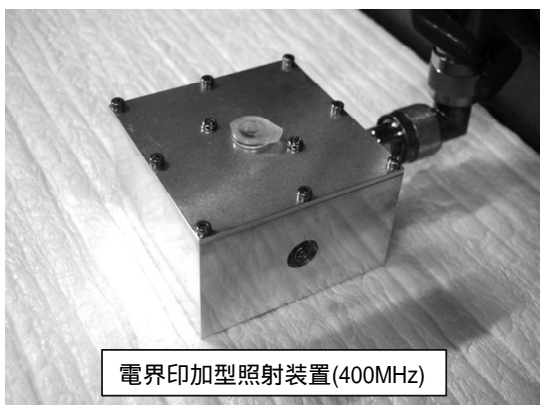
(2) マイクロ波を用いたヒアルロン酸分解

の検討

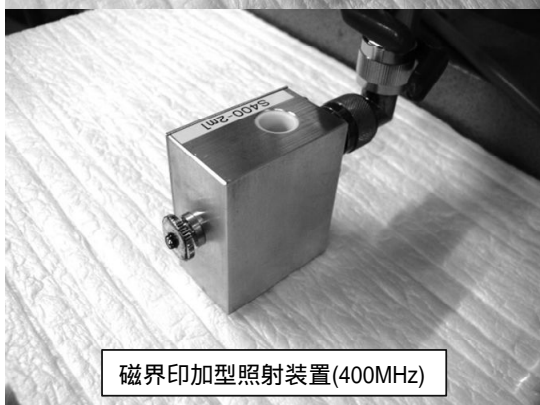
ムチンを用いた各種分解反応の検討は、ムチンが極めて多様性の高い分子であり、分解物の解析があまりにも複雑になることから、まずモデル化合物としてヒアルロン酸を用いた実験を行った。ヒアルロン酸もムチンと同様に粘度の高い水溶液となり、ヒアルロン酸分子周辺には束縛された水分子が存在すると思われる。

ヒアルロン酸の試料は分子量範囲の異なる3種のヒアルロン酸ナトリウム(キッコーマンバイオケミファ社製)を、100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)に各1.0%の濃度で溶解したものをを用いた。

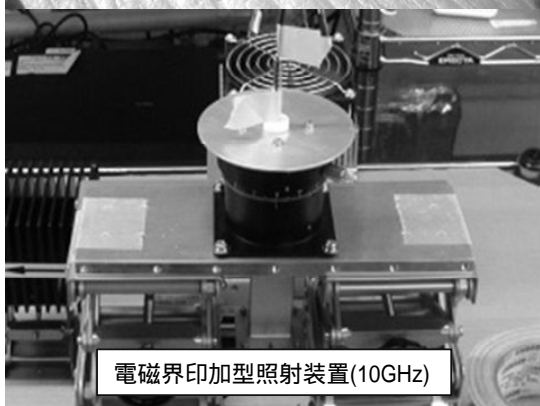
マイクロ波照射は、コンデンサを原型とした電界印加型照射装置およびコイルを原型とした磁界印加型装置を用いて400MHzの印加を行った。また、導波管終端器を原型とした電磁界印加型照射装置を用いて10GHzの印加を行った。



電界印加型照射装置(400MHz)



磁界印加型照射装置(400MHz)



電磁界印加型照射装置(10GHz)

分解状態の解析は、アガロース電気泳動、

分子マトリックス電気泳動、粘度測定により行った。アガロース電気泳動は1 mMのEDTAを含むトリスホウ酸緩衝液(pH 8.3)にて作成した1.5%アガロースゲルを用い、泳動されたヒアルロン酸はStains All染色により可視化した。

分子マトリックス電気泳動は、ポリエチレンイミンとポリビニルアルコールを各種の割合で混合した親水性ポリマー溶液をポリビニリデンジフルオリドのフィルターに浸漬後、乾燥して作成した膜を用いた。泳動緩衝液は0.1 Mピリジン-ギ酸緩衝液(pH 4.0)を用い、膜の幅1 cmあたり1 mAの電流を40分間、通電し泳動を行った。泳動されたヒアルロン酸はアルシアンブルーにて染色した。

粘度測定は標準粘度液で校正した音叉型振動式粘度計を用い、測定対象をそのまま、または適宜定数倍希釈して測定した。

(3) ムチン型糖ペプチドの合成

ペプチド分解のためのモデル分子として分泌ムチンの一種であるMUC2の部分構造を有するムチン型糖ペプチド(16残基)の合成を進めた。ターゲット糖ペプチドは16残基中8か所のトレオニン(Thr)全ての側鎖に α -GalNAcが導入されており、また糖アミノ酸(The- α GalNAc)が最長で5残基連続した構造を有している。ペプチド固相合成法ではアミノ酸シントンを1残基ずつ伸長させるが、このムチン型糖ペプチド合成は、側鎖に糖をもったかさ高い糖アミノ酸シントンを最大5回連続して導入する必要があると予想された。そこで清水らの有するマイクロ波加熱ペプチド合成法の知見を応用して、合成研究にとりかかった。

まず、配列自体に合成困難な順列があるかどうかを認識するため、糖を有しない16残基ペプチドの合成を行った。反応力ラムにH-Pro-Triyl-ChemMatrix resin(0.29mmol/g, 150mg)を入れ、DMF中に室温で2時間浸し膨潤させ、マイクロ波使用固相合成用ペプチド合成装置(GPS-1000、東京理化機械)にセットした。樹脂に対し5当量のFmoc化アミノ酸(Fmoc-Thr(tBu)-OH 86.5 mg, Fmoc-Pro-OH 73.4 mg, Fmoc-Ser(tBu)-OH 83.4 mg)、Fmoc化アミノ酸に対し1当量のCOMU(93.2 mg)、2当量のDIEA(75.8 μ L)を使用してペプチド伸長反応をおこなった。すなわち、まずFmoc-Thr(tBu)-OH、COMU、DIEAをDMF(1ml)に溶かし、樹脂に加え、マイクロ波照射(最大出力300W)しながら50で5分間処理し、アミノ酸縮合反応を進めた。反応後、DMFで樹脂を洗浄し、2mLの20% piperidine/DMF溶液を加え、マイクロ波照射(最大出力500W)しながら50で2分間処理し、Fmoc基の脱保護反応を進め、樹脂をDMFで洗浄した。この縮合と脱保護の操作を繰り返し、樹脂上に16残基ペプチド鎖を伸長させ、最終的にはDMFと塩化メチレンで樹脂を洗浄し、減圧下乾燥させた。この樹脂のうち1/2量を分け取

り(21.8 μmol 相当)、そこに切り出しカクテルを 2 mL (TFA:H₂O:TIS=95:2.5:2.5) 加えて室温で 2 時間反応を行った。ろ液を回収し、冷エーテル (10mL X 3 回) により粗精製を行い、これを HPLC により精製し、MUC2 の 16 残基ペプチド体(7.2mg, 21%)を得た。(Inertsil ODS-3, 40 , 4mL/min, UV 220nm, A:0.1% TFA/H₂O, B:0.1%TFA/CH₃CN, グラジエント A:B/90:10-60:40 over 40min)

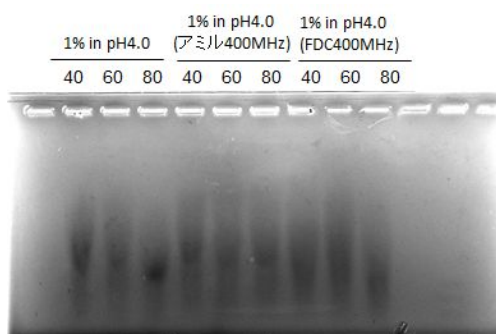
MUC2 の 16 残基ペプチドは問題なく合成できたため、次に 8 か所のトレオニン(Thr)全ての側鎖に α -GalNAc が導入された 16 残基糖ペプチドの合成に着手した。反作用カラムに H-Pro-Triptyl-ChemMatrix resin(0.29mmol/g, 100mg)を入れ、DMF 中に室温 2 時間浸し膨潤させ、マイクロ波使用固相合成用ペプチド合成装置(GPS-1000、東京理化機械)にセットした。樹脂に対し 5 当量の Fmoc 化アミノ酸 (Fmoc-Pro-OH 48.9 mg, Fmoc-Ser(tBu)-OH 55.6 mg) もしくは 1.3 当量の Fmoc 化糖アミノ酸 (Fmoc-Thr(GalNAc(Ac)₃)-OH 25.3 mg) 、アミノ酸シントンに対し 1 当量の COMU (62.1 mg for Fmoc-AA-OH, 16.2 mg for Fmoc-Thr(GalNAc(Ac)₃)-OH)、2 当量の DIEA (50.5 μL for Fmoc-AA-OH, 13.1 μL for Fmoc-Thr(GalNAc(Ac)₃)-OH)、溶媒として DMF を Fmoc 化糖アミノ酸導入反応では 0.7mL、Fmoc 化アミノ酸導入反応では 1mL 使用して、先の 16 残基ペプチド合成と同様の方法で糖ペプチド固相合成をおこなった。8 か所の糖アミノ酸 (Fmoc-Thr(GalNAc(Ac)₃)-OH) 導入反応と、7 番目と 15 番目になる糖アミノ酸残基への Pro 導入反応では、マイクロ波照射(最大出力 300W)しながら 50 で 15 分間その他のアミノ酸縮合反応は、マイクロ波照射(最大出力 300W)しながら 50 、5 分間の条件で縮合反応を進めた。脱 Fmoc 反応は、マイクロ波照射(最大出力 500W)しながら 50 で 5 分間の条件で進めた。縮合反応と脱保護の操作を繰り返し樹脂上にペプチド鎖を伸長後、塩化メチレンで樹脂を洗浄し乾燥させた。この樹脂のうちの 1/3 量を分けとり(9.7 μmol 相当)、そこに切り出しカクテル 2mL (TFA:H₂O:TIS=95:2.5:2.5) を加えて室温にて 2 時間処理した。この段階では糖のヒドロキシル基がアセチル基(Ac)で保護されており、物質の脂溶性が高くなることが予想されたので、エーテル沈殿による粗精製は行わなかった。ろ液を回収し、濃縮後、HPLC により精製し、MUC2 の糖部分が Ac 保護された 16 残基糖ペプチド体 (5.0mg, 12%) を得た。(Inertsil ODS-3, 40 , 5ml/min, UV 220nm, A:0.1% TFA/H₂O, B:0.1%TFA/CH₃CN, グラジエント A:B/80:20-40min-30:70) 得られた 16 残基 MUC2Ac 保護体(5.0mg)を 2mL のメタノールに溶かし、1mol/L NaOH をてき触媒量加え、けん化により Ac 基の脱保護を行った(室温、3h)。酢酸を加えて中和したのち、濃縮と凍結乾燥して得られた粗生成物を HPLC で精製し、MUC2 (3.8mg, quant.) を得た。

(Inertsustain C-18, 30 , 1ml/min, UV 220nm, A:0.1% TFA/H₂O, B:0.1%TFA/CH₃CN, グラジエント A:B/95:5-85:15 over 40 min)

4. 研究成果

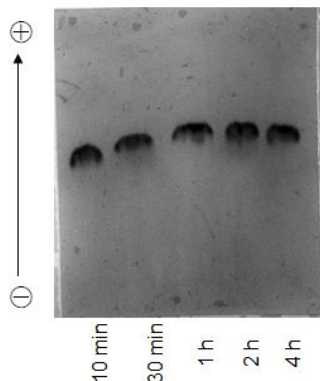
(1) ヒアルロン酸分析用の分子マトリックス電気泳動法の開発

マイクロ波照射によるヒアルロン酸分解をモニターするためアガロース電気泳動で分析を試みたが、Stains All による染色では感度が低い上に、長く尾を引いたバンドとなり分解のモニターには不適当であることが判明した。



そこで、ヒアルロン酸がシャープなバンドとなる分子マトリックス電気泳動によってモニターすることを検討した。通常の条件 (SMME 膜:0.25%PVA-PVDF、緩衝液:0.1M ピリジン-ギ酸 pH4.0) で泳動した場合、確かにバンドはシャープになるが、1 mM アスコルビン酸をヒアルロン酸に添加して分解した低分子ヒアルロン酸と分解前のヒアルロン酸の間に泳動位置の違いは観察されなかった。この理由は、通常の SMME では移動度は分子の質量電荷比に依存するためと推定された。次に、酸性のポリマーと強く相互作用するポリエチレンイミンを SMME 膜に添加することにより、分子量の異なるヒアルロン酸を分離できないか検討した。PVA に 1% の濃度でポリエチレンイミンを添加したポリマーを用いて SMME 膜を作成し、0.1M ピリジン-ギ酸 (pH4.0) の緩衝液でヒアルロン酸を泳動したところ、分解が進むにつれて移動度が高くなるという結果が得られた。しかし、各バンドはいずれもアプライした位置から長く伸びるテーリングを示した。テーリングがあるとバンドがどうしても希釈され染色が不鮮明になる。そこで、テーリングを抑制するために、陽極側と陰極側の緩衝液の濃度を変えて実験を行った。陽極側には通常の 0.1 M ピリジン-ギ酸 (pH4.0) 、陰極側には 1.0 M ピリジン-ギ酸 (pH4.0) 緩衝液を用いて泳動実験を行ったところ、図に示すようにアスコルビン酸添加後の時間に応じて、ヒアルロン酸バンドの移動度が高くなり、かつテーリングを示さないシャープなバンドとして検出できることが判明した。

+側: 泳動緩衝液: 0.1 M pyr-formic acid (pH4.0)



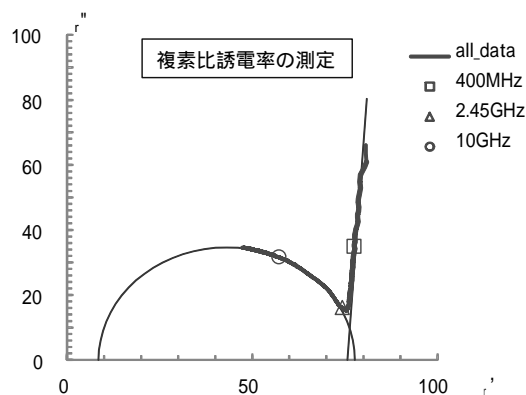
-側: 泳動緩衝液: 1.0 M pyr-formic acid (pH4.0)

(2) マイクロ波によるヒアルロン酸分解における周波数依存性

照射に先立ち、照射対象の電磁波特性を調べるために、ヒアルロン酸ナトリウム(1%)の酢酸ナトリウムバッファー水溶液の複素比誘電率 ϵ'' を計測した。

対象の液体が導電体的性質を示す場合、周波数の変化によって実部-虚部の相関軌跡は直線を描くのに対して、誘電体的性質を示す場合、軌跡は半円弧を描く。測定の結果、400MHz の電磁波を加熱源として用いた場合は導電加熱による加熱が、また 10GHz の電磁波を加熱源として用いた場合は、誘電加熱による加熱が顕著に表れると予測された。

また得られた半円の軌跡には大きな扁平は見られなかったことから、水分子の緩和時間に分布が生じていることは明確にはならなかった。すなわち、束縛された水分子と自由な水分子を明確に分離して検出することはできなかった。しかしながら 1~2GHz を境に低周波数側ではイオン導電性加熱(導電加熱)が、また高周波数側では水分子振動加熱(誘電加熱)が生じることが明確に区別されたことから、照射周波数として 400MHz および 10GHz の 2 つの周波数帯を選定し、イオン導電性加熱と水分子誘電加熱の比較を試みた。



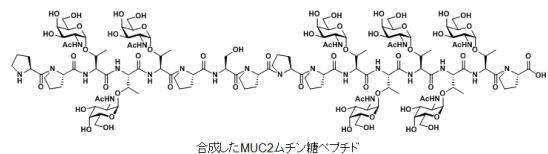
初めに、コンデンサを原型とした電界印加型照射装置およびコイルを原型とした磁界印加型装置を用い、400MHz の印加によるヒア

ルロン酸分解反応を検討した。60 にて分解反応を行った後の電気泳動等の結果から、わずかに前者の進行が優勢である結果が示された。

一方、水分子による誘電加熱が顕著と見られる 10GHz のマイクロ波の照射では、高濃度ヒアルロン酸ナトリウム水溶液(10%)において特異的な反応が見られた。60 のブロックバスを用いて外部から伝熱加熱した物は 60 分後でも粘度がほとんど低下しなかったのに対し、10GHz のマイクロ波を照射して内部温度を 45 に保った物は同時間後に粘度が低下する傾向が見られた。これは粘性による温度拡散の低下が局所的な加熱(蓄熱)を誘導し、計測温度(全体温度)上は低くても、分子量低下に至る温度上昇がマイクロ波によって誘発されることが推察された。

(3) モデル分子としてのムチン型糖ペプチド合成

ムチン型糖ペプチドは糖の重量比が非常に高く、その合成では糖鎖をどの様に導入するかがカギとなる。当初、Thr に GalNAc を導入する酵素の利用も検討したが、本研究における 16 残基糖ペプチド合成では反応部が 8 カ所もあり、現実的には不可能と判断した。一方、化学合成では、糖を有する Thr が最大 5 残基連続するため、Fmoc 化糖アミノ酸シント(Fmoc-Thr (GalNAc(Ac)₃)-OH) の導入反応率を危惧していた。しかし実際合成を進めたところ、糖なし 16 残基ペプチドが総収率 21%、8 カ所に GalNAc が導入された糖ペプチド体が 12% と、予想以上の高収率で得ることができた。この要因は、比較検討していないので断言はできないがマイクロ波の利用による反応性の向上が得られたことや、配列として構造のゆらぎが少なく反応におけるエントロピー損失が小さくなると考えられるプロリン残基が多く存在したため、などが考えられる。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

亀山昭彦、アフィニティ分子マトリックス電気泳動の新たな技術展開、第 67 回日本電気泳動学会総会、2016 年 08 月 27 日、釧路市観光国際交流センター(北海道釧路市)

〔図書〕(計 1 件)

清水弘樹、R&D 支援センター、マイクロ波

加熱の基礎と産業応用（第5章第2節「マイクロ波照射による糖鎖・糖ペプチド合成」）
2017年5月15日、総ページ数：17ページ
(2801-2817)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀山 昭彦 (KAMEYAMA, Akihiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・上級主任研究員

研究者番号：80415661

(2) 研究分担者

杉山 順一 (SUGIYAMA, Junichi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・主任研究員

研究者番号：10235905

清水 弘樹 (SHIMIZU, Hiroki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：30344716

(3) 連携研究者

該当なし ()

(4) 研究協力者

該当なし ()