

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19750133
 研究課題名 (和文) マイクロドメイン糖脂質レプリカを用いた細胞特異的認識ペプチドの探索
 研究課題名 (英文) Searching cell specific recognition peptide
 using a glycosphingolipid replica nanoparticle
 研究代表者 長堀 紀子 (NAGAHORI NORIKO)
 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任助教
 研究者番号: 90372268

研究成果の概要： 本研究では、異なる細胞を見分けるマーカー分子として細胞表面に存在する糖脂質に着目し、(1) 細胞表面糖脂質をナノ微粒子表面に提示した“糖脂質レプリカナノ微粒子”の作製に成功した。(2) 生体試料中(細胞や組織)に含まれる糖脂質の発現プロファイルを網羅的に解析する方法を確立した。(3) ナノ微粒子と質量分析計を用いて、糖鎖に特異的に結合する分子を検出する方法を新たに構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野： 化学

科研費の分科・細目： 複合化学・生体関連化学

キーワード： 糖脂質 グライコミクス ナノ微粒子 ペプチド グライコミクス

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質は、発生や分化、ガンなどの疾患においてその組成が著しく変化することが知られている。例えばリンパ球では、B細胞系とT細胞系では糖脂質のパターンが異なる。また、最近胚性幹細胞や胚性ガン細胞のマーカーとして同定された化合物も糖脂質である。このように糖脂質は、異なった細胞を見分けるマーカー分子として機能する。

一方、糖脂質は細胞膜表面で様々なシグナル分子と共に集合し、マイクロドメインと呼ばれるクラスターを形成しており、糖脂質はその集合状態を含めて標的分子に対して高い認識性を示すことが示唆される。

これまでに我々は、チオール基(R-SH)と金(Au)との特異的結合を介して表面に糖鎖を集合化して作製した水溶性の糖鎖金ナノ微粒子が、糖転移酵素の優れた基質となることを見いだした。

また、糖鎖金ナノ微粒子のMALDI-TOF MS測定を行うと、Au-S間の結合がレーザー照射によって切断し、表面の糖鎖チオール化合物が高感度にイオン化された。すなわち金属ナノ微粒子は、その広大な表面積と乱反射効果のため、表面に化学吸着した化合物のイオン化に非常に有利な状況を提供することが実験によって示された。

2. 研究の目的

そこで本提案では、細胞の個性を見分けるマーカーとして糖脂質に着目し、細胞特異的認識ペプチドの探索を目的とする。細胞の個性を見分けることができれば、ガン幹細胞の識別などへの応用が可能となり、さらに人工抗体やイメージング技術との融合によって、分子標的医薬や早期診断などへの展開が期待できる。

3. 研究の方法

本提案における個別の研究項目を以下に挙げる。

(1) マイクロドメイン糖脂質レプリカナノ微粒子の作製

①糖脂質由来糖鎖のナノ微粒子への提示方法確立

②ナノ微粒子の非特異吸着に関する評価

(2) 標的細胞由来の糖脂質発現プロファイルの解析

①糖脂質の網羅的発現解析法の確立

②標的細胞特異的糖脂質パターンの探索

(3) 標的細胞特異的認識ペプチドの探索

①糖鎖ナノ微粒子およびMALDI-TOF MSを用いた糖鎖認識分子の迅速探索法の確立

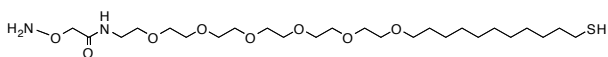
②標的細胞特異的認識ペプチドの探索

4. 研究成果

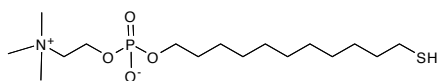
(1) マイクロドメイン糖脂質レプリカナノ微粒子の作製

①糖脂質由来糖鎖のナノ微粒子への提示方法確立

アミノオキシ基末端に有するチオール化合物（化合物1）および官能基密度を調節するためのスパーサー分子（化合物2）を化学合成し、金(Au)-チオール(-SH)結合によって官能基を金ナノ微粒子表面に提示した。



化合物1



化合物2

スフィンゴ糖脂質のオゾン分解によって生じるアルデヒド基とナノ微粒子表面のアミノオキシ基との化学選択的反応を利用することで、任意の糖脂質をナノ微粒子表面に提示する方法を確立した。

目的の糖脂質がナノ微粒子表面に提示されたことは、MALDI-TOF MSにて確認した。微量成分については、ナノ微粒子上でのオキシム交換反応によるラベル化処理を施す事によって検出できることが分かった。

②ナノ微粒子の非特異吸着に関する評価

既知の糖鎖認識タンパク質および血清混合物と糖鎖提示ナノ微粒子をインキュベートし、生じたナノ微粒子の凝集体を洗浄後、SDS-PAGEを行ったところ、ナノ微粒子に提示された糖鎖が特異的認識能を保持していることが示された。

(2) 標的細胞由来の糖脂質発現プロファイルの解析

①糖脂質の網羅的発現解析法の確立

動物細胞や組織中に含まれる糖脂質含量は少なく、総脂質の約数~10%である。そのため、従来糖脂質の構造解析には総脂質より糖脂質画分の単離が必須であった。本研究では、生体試料細胞本研究室にて確立された糖鎖構造解析法であるGlycoBlotting法を応用することで、糖脂質画分の単離が不要でハイスループットなスフィンゴ糖脂質の発現プロファイル網羅的解析法を確立した。

具体的には、生体試料よりクロロホルム-メタノールを用いて総脂質の抽出を行い、これに対してオゾン酸化およびアルカリ分解を行う。このようにして得られた遊離糖鎖をglycoblotting法（高密度アミノオキシ基を担持したビーズ上での糖鎖捕捉+シアル酸のメチル化反応+ヒドラゾン-オキシム交換反応による糖鎖のラベリング+溶出）によって、MALDI-TOF MS測定に適したラベル化が施された糖脂質由来糖鎖を得る。サンプルのMS測定を行う事で、標的細胞由来の糖脂質発現プロファイルを取得できるようになった。

さらに、糖鎖の配列を解析するために、ラベル化の種類を変えてMS/MS測定を行ったところ、ラベル化糖鎖が還元末端側から開裂する条件と非還元末端側から開裂する条件が見つかり、単一のラベルを用いた場合よりも、より精度良く糖鎖構造解析が可能であった。

また、内部標準試料を用いることで、糖脂質の量に関する考察ができるようになった。

②標的細胞特異的糖脂質パターンの探索

確立した糖脂質糖鎖の網羅的解析法によって、細胞特異的な糖脂質の探索を行った。その結果、細胞の種類によって特徴的な糖脂質糖鎖パターンが得られた。例えばヒト培養細胞 (A549 (肺がん)) では、ガングリオシドGM2が多く存在する特徴的なパターンを示した。

(図 1)

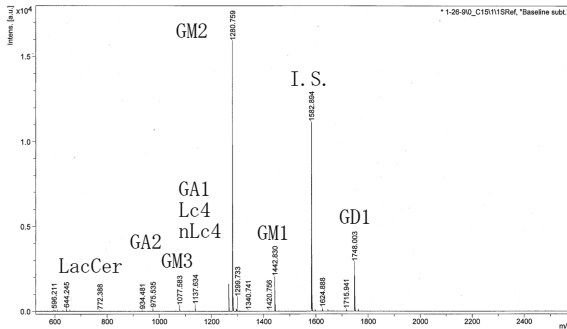
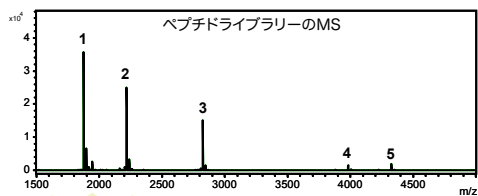


図 1 A549細胞由来糖脂質糖鎖

(3) 標的細胞特異的認識ペプチドの探索

①糖鎖ナノ粒子およびMALDI-TOF MSを用いた糖鎖認識分子の迅速探索法の確立

既知の糖鎖認識ペプチドを含むペプチド混合物と糖鎖提示ナノ粒子をインキュベートし、一定時間後に限外濾過によってナノ粒子を洗浄し、回収した微粒子をサンプルとしてMALDI-TOF MS測定を行ったところ、糖鎖認識ペプチドが選択的に検出された。(図 2)



レプリカナノ粒子による糖鎖特異的ペプチドの釣り上げ

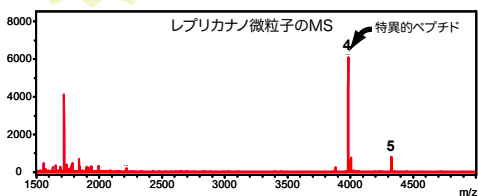


図 2 糖鎖微粒子に結合したペプチドの検出

本方法では、糖鎖ナノ粒子に結合したペプチドを溶出する操作が不要である。このように、標的分子に特異的に結合するペプチドの簡便迅速な検出方法を構築できた。

また、内部標準ペプチドを利用し、結合定数の算出を試みた。本アッセイ系において非特異吸着は極めて少なく、比較的弱い ($K_d \sim 1$ mM) 相互作用の検出も可能であった。本方法を用いる事で、ペプチド混合物の中から選択的に結合する分子の同定および相互作用の解析が同時に可能であり、糖鎖認識分子の大規模スクリーニングに有用であると期待される。

②標的細胞特異的認識ペプチドの探索

ヒト肺がん細胞株 (A549) 細胞表面に特徴的に多く含まれるGM2を標的糖脂質として選択した。先述した方法に従って、GM2を表面に担持した金ナノ粒子を作製した。今後引き続き、ナノ粒子とMALDI-TOF MSを用いて糖鎖特異的ペプチドの探索を、様々なペプチドソースより行う予定である。

<その他>

ペプチドを用いた生体イメージングに関する予備検討

先に合成した化合物の、半導体量子ドット (QDs) の表面修飾への利用に関する検討を行った。蛍光性ナノ粒子であるQDsは、高い蛍光強度を示し、かつ長時間の露光においても退色しにくい性質を持っているため、生体イメージングにとって適した材料である。化合物 1、2 を用いて、QDs表面金属とチオール基 (-SH) との特異的共有結合によって修飾を施すことで、生理的条件下で極めて安定なQDsの作製に成功した。これにより、糖鎖、ペプチドなどの生体分子を、その物性 (酸性、中性、塩基性) に関わらず容易にQDs表面に提示可能となった。

予備的な計測により、化合物 2 で票得ん修飾したQDsは、生体毒性を示さず、安定に体内を循環することが示された。(図 3 ; 3分で全身を巡り、徐々に肝臓に集積)

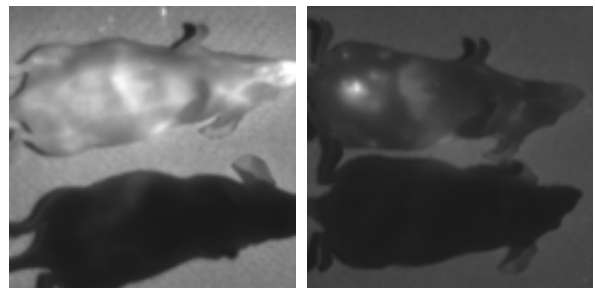


図 3 糖鎖微粒子に結合したペプチドの検出

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. Nagahori N., Abe M. and Nishimura S.-I. "Structural and functional glycosphingolipidomics by glycoblotting with aminoxyyl-functionalized gold nanoparticle" *Biochemistry*, 48, 583-594 (2009), 査読<有>
2. Nakagawa H., Ohira M., Hayashi S., Abe S., Saito S., Nagahori N., Monde K., Shinohara Y., Fujitani N., Kondo H., Akiyama S.-I., Nakagawara A., and Nishimura S.-I. "Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells is caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system", *Cancer Lett.* 270, 295-301 (2008), 査読<有>
3. Miura Y., Shinohara Y., Furukawa J., Nagahori N., and Nishimura S.-I. "Rapid and quantitative solid-phase esterification of sialic acid residues permits high throughput and reliable glycomics by mass spectrometry", *Chem. Eur. J.*, 13, 4797-4804 (2007), 査読<有>

[学会発表] (計 5 件)

1. 大柳達也、長堀紀子、嶋脇健、山下匡、佐々木章、金城正孝、西村紳一郎
"Highly Stable Carbohydrate-conjugated Quantum Dots Library for Live Cell/Animal Imaging" 日本化学会第89春季年会 2009年3月27~30日、船橋
2. 大柳達也、長堀紀子、佐々木章、金城正孝、西村紳一郎
「Quantum Dotsを用いた糖鎖機能の可視化」第42回高分子学会北海道支部研究発表会、2008年1月29日、札幌
3. 中島康仁、植松季栄、黒河内政樹、長堀紀子、中川裕章、西村紳一郎
「マウス生殖細胞分化におけるN結合型糖鎖の構造と機能の解明」第42回高分子学会北海道支部研究発表会、2008年1月29日、札幌
4. 笠島勇也、長堀紀子、西村紳一郎
「表層タンパク質提示酵素sortaseを用いた糖鎖認識環状ペプチドの探索」第42回高分子学会北海道支部研究発表会、2008年1月29日、札幌

5. 長堀紀子、大柳達也、阿部翠、西村紳一郎

「糖脂質レプリカナノ微粒子」第27回日本糖質学会年会、2007年8月1~3日、福岡

[図書] (計 1 件)

1. 長堀紀子、西村紳一郎、"糖鎖ケミカルバイオロジー"、蛋白質核酸酵素、共立出版、52, 1742-1750 (2007)

[その他]

ホームページ

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g4/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長堀 紀子 (NAGAHORI NORIKO)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院
・特任助教

研究者番号：90372268

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし