

令和元年6月11日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01852

研究課題名(和文)健康長寿の指標となる糖鎖構造とその生物学的意義の解明

研究課題名(英文)Glycosylation of plasma proteins as a biomarker of successful aging

研究代表者

三浦 ゆり (Miura, Yuri)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号：00216574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超百寿者(105歳以上)の血漿糖鎖に多い高分岐かつ高シアル酸含有糖鎖のキャリアタンパク質を調べるためグライコプロテオミクスを行い、そのひとつがハプトグロビンであることを明らかにした。また、シアル酸の結合様式を識別して分析する化学誘導体化法(SALSA)を用いて、超百寿者においてシアル酸の結合様式が変化する糖鎖があることを明らかにした。今後さらに、これらの糖鎖の健康長寿における生物学的役割を明らかにしていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、超百寿者の血漿グライコプロテオミクスから、健康長寿に特徴的な糖鎖のキャリアタンパク質のひとつがハプトグロビンであることを明らかにし、これらの糖鎖の生物学的役割を明らかにする端緒を作った。また、健康長寿に特徴的な糖鎖のシアル酸結合様式について、新たな知見を得ることができ、健康長寿マーカーを利用した新たな健康管理システムへの展開につなげる。本研究成果は、従来の基礎老化研究からは得られない健康長寿の実現に向け道を切り拓くものである。

研究成果の概要(英文)：We performed glycoproteomics using plasma of semi-super centenarians (SSCs, older than 105 years) and identified core proteins conjugated multi-branched and highly sialylated N-glycans that are characteristic of extreme human longevity. We found that tri-antennary and sialylated N-glycans of haptoglobin characterised SSCs. Furthermore, combining glycomics with derivatization termed sialic acid linkage specific alkylamidation (SALSA), we suggested that sialic acid linkage was likely to change in N-glycans of plasma proteins in SSCs.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：健康長寿 糖鎖 グライコプロテオミクス 超百寿 バイオマーカー 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾はヒトのタンパク質の約 50%に起きる最も頻度の高い翻訳後修飾であり、分岐や繰り返しなど複雑で多様な構造をもつ。これらの糖鎖修飾は、タンパク質の局在、代謝、機能を制御し、タンパク質が正常に働く上で重要な役割を果たしているが、それだけではなく、糖鎖の構造自体が様々な生物学的変化を反映して変化することも知られている。ところで、ヒトの老化や健康長寿には、遺伝的な因子だけではなく、生活習慣や運動習慣、社会的背景など様々な環境的因子が関与している。このため、健康長寿や老化に関する研究には、これら多様な環境的因子を反映するマーカーが必要である。そこで我々は「生物学的変化のマーカー」としての糖鎖修飾に着目し、老化や健康長寿のマーカーとして糖鎖の構造変化に注目した。そしてこれまでに、ヒトの長寿モデルと考えられる超百寿者(105歳以上)の血漿タンパク質から N-結合型糖鎖を切り出し、液体クロマトグラフ/質量分析装置(LC-MS/MS)と多変量解析(O-PLS)を用いて超百寿者に特徴的な糖鎖構造を調べた。その結果、高分岐かつ高シアル酸含有糖鎖が超百寿者血漿に多く含まれることを明らかにした[Miura Y. *PLOS ONE*, 10, e0142645, (2015)]. これらの糖鎖は炎症に反応して増加する糖鎖であった。健康な超百寿者では慢性炎症が亢進することから、ヒトの健康長寿には、加齢によって亢進する慢性炎症に対応するため、高分岐かつ高シアル酸含有糖鎖を多く持つことが重要なのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では健康長寿者に多い糖鎖構造について、高分岐かつ高シアル酸含有糖鎖は、どの血漿タンパク質に結合しているのか、また糖鎖が変化することによってそのタンパク質の機能はどのように変化するのか、N-結合型糖鎖のシアル酸には、免疫機能や感染症に深く関わる異なる2つの結合様式があるが(α -2,3-結合と α -2,6-結合)、健康長寿に関連するのはどちらの結合様式なのか、的を絞って明らかにする。血漿タンパク質はほとんどが糖タンパク質であり、高分岐かつ高シアル酸含有糖鎖が結合する可能性のあるタンパク質は数多くある。結合するタンパク質によって、糖鎖修飾によるタンパク質機能への影響は異なるので、キャリアタンパク質(糖鎖が結合しているタンパク質)を明らかにすることで、健康長寿に特徴的な糖鎖の真の生物活性が解明される。また、シアル酸の α 2,6-結合は獲得免疫に、 α 2,3-結合は自然免疫に関与することが知られている。超百寿者に特徴的な糖鎖のシアル酸結合様式を明らかにすることで、健康長寿における糖鎖を介した免疫機能の精緻な制御メカニズムが解明されるものと考えられる。

具体的には、糖鎖が結合しているキャリアタンパク質について明らかにするため、レクチンを用いて糖タンパク質を濃縮し、LC-MS/MSを用いた糖ペプチド解析を行って、タンパク質の同定とその糖鎖修飾について明らかにする。シアル酸の結合様式を明らかにするため、 α 2,3-結合と α 2,6-結合を質量分析(MS)で区別するための誘導体化のシステムを構築し、超百寿者の血漿についてシアル酸含有糖鎖の結合様式を識別した詳細な解析を行う。

3. 研究の方法

1) レクチンを用いた糖タンパク質の濃縮と LC-MS/MS による糖ペプチド解析

高分岐の N-結合型糖鎖を認識するレクチン(*Erythrina cristagalli* agglutinin: ECA)を磁気ビーズに固定し、血漿中より ECA に結合する糖タンパク質を回収した。回収した ECA 結合糖タンパク質について、還元アルキル化及びトリプシン消化を行い、LC-MS/MS (LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific)を用いて糖ペプチド解析(キャリアタンパク質の同定及び糖鎖構造の同定)

を行った。同定された糖ペプチドについて、若齢群、老齢群、超百寿者群における LC のピーク面積を求め、糖ペプチドの加齢変化を調べた。また、糖鎖を持たないペプチドのピーク面積を測定してタンパク質発現量の補正を行った。

2) シアル酸の誘導体化システムの構築

シアル酸の α 2,3-結合と α 2,6-結合は質量が同じであるため、MS で区別して観測することは難しい。このため、誘導体化試薬を用いて α 2,3-結合シアル酸と α 2,6-結合シアル酸をそれぞれ質量の異なる化合物に置き換えることが必要となる。そこで本研究では、誘導体の安定化と回収率の向上を図り、さらに MALDI-TOF/MS で検出することを考慮して、誘導体のイオン化効率を上げるための独自の工夫を行った。

3) 超百寿者におけるシアル酸結合様式の解析

2) で開発した化学誘導体化によるシアル酸結合様式の識別システムを用いて、超百寿者群及び対照群の血漿タンパク質における N-結合型シアル酸含有糖鎖を誘導体化した。超百寿者群と老齢対照群 (70 歳代) について MALDI-TOF/MS を用いて解析を行った。

4. 研究成果

1) レクチンを用いた糖タンパク質の濃縮と LC-MS/MS による糖ペプチド解析

超百寿者群 (106-107 歳) 高齢対照群 (80 歳代) 若齢対照群 (20-30 歳) の血漿中より、*Erythrina cristagalli* agglutinin (ECA) レクチンに結合する糖タンパク質を回収した。トリプシン消化後、LC-MS/MS (LTQ-FT) を用いてキャリアタンパク質の同定と糖鎖構造解析を行ったところ、47 種類のタンパク質が同定され、35 種類の糖ペプチドが同定された。これらの糖ペプチドのピーク面積を用いて多変量解析 (OPLS-DA) を行ったところ、ハプトグロビンの 2 か所のアスパラギン残基 (207N と 211N) に結合した高シアル酸含有 3 本鎖糖鎖が、超百寿者に特徴的であることを明らかにした。

2) Sialic acid linkage specific alkylamidation (SALSA) 法を開発した。この方法は、2,3-結合と 2,6-結合の立体的な違いを利用して、それぞれ異なる分子量の誘導体にするものである。具体的には、イソプロピルアミド化とメチルアミド化を組み合わせることにより、2,3-結合シアル酸と 2,6-結合シアル酸に 28Da の分子量差をつけ、質量分析でこれらを区別することが可能であることを明らかにした。

3) シアル酸誘導体化法 (Sialic acid linkage specific alkylamidation (SALSA)) を超百寿者血しょうの糖鎖解析に応用し、超百寿者と老齢コントロール (70 歳代) の血しょう糖鎖解析を行った。その結果、超百寿者血しょうは老齢コントロールの血しょうに比べて、高分岐でシアル酸を多く含む糖鎖が多いことが検証された。また、超百寿者で増加した糖鎖には、フコースを含む糖鎖が多いことも明らかになった。さらに、老齢対照群と超百寿者群においてシアル酸結合様式が変化する糖鎖があることを発見した。

4) さらに、超百寿者に特徴的な糖鎖 (高分岐高シアル酸含有糖鎖) の生物学的な役割を明らかにするため、高分岐高シアル酸含有糖鎖を多く持つモデル動物の作成に取り組んだ。まず、マウスにシアル酸を飲水投与して血漿タンパク質の N-結合型糖鎖の糖鎖解析を行い、高分岐高シアル酸含有糖鎖が増加するかどうかを調べた。糖鎖脱離酵素である N-グリカナーゼ F (PNGase F) を用いて血漿タンパク質より糖鎖を切り離し、シアル酸誘導体化法 (SALSA) 法を用いてシアル酸の結合様式を区別するための前処理を行った後、MALDI-TOF MS を用いて測定した。その結果、糖鎖と推定できる 58 のピークを検出した。さらにそれぞれのピークについて全体に対する相対ピーク面積比を求め、シアル酸投与による影響について調べたところ、最もメジャーなピ

ークである2つの 2,6-グリコリルノイラミン酸を含む2本鎖糖鎖が有意に増加した。また、シアル酸を含まない高マンノース型糖鎖などの減少が認められた。しかしながら、3分岐3シアル酸含有糖鎖については、シアル酸投与による有意な増加は認められず、この条件では高分岐高シアル酸含有糖鎖を多く持つモデル動物を作成することができなかった。

以上より、健康長寿者に多い高分岐高シアル酸含有糖鎖のキャリアタンパク質のひとつがハプトグロビンであることを明らかにした。また、シアル酸の結合様式を質量分析装置で識別して分析する化学誘導体化法を開発し、超百寿者においてシアル酸の結合様式が変化する糖鎖が存在することを明らかにした。今後さらに、これらの糖鎖の健康長寿における生物学的役割を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Miura, Y., Hashii, N., Ohta, Y., Itakura, Y., Tsumoto, H., Suzuki, J., Takakura, D., Abe, Y., Arai, Y., Toyoda, M., Kawasaki, N., Hirose, N., and Endo, T. : Characteristic glycopeptides associated with extreme human longevity identified through plasma glycoproteomics, *Biochim. Biophys. Acta, -General Subjects*, 1862, 1462-1471, (2018) 査読あり doi: 10.1016/j.bbagen.2018.03.025.
2. Nishikaze, T., Tsumoto, H., Sekiya, S., Iwamoto, S., Miura, Y., Tanaka, K. : Differentiation of sialyl linkage isomers by one-pot sialic acid derivatization for mass spectrometry-based glycan profiling, *Anal. Chem.* 89, 2353-2360, (2017) 査読あり doi: 10.1021/acs.analchem.6b04150

〔学会発表〕(計9件)

1. 三浦ゆり、橋井則貴、太田悠葵、鈴木淳也、高倉大輔、津元裕樹、阿部由紀子、新井康通、川崎ナナ、広瀬信義、遠藤玉夫 : 血漿タンパク質の糖ペプチド解析による健康長寿に特徴的な糖鎖修飾の探索、日本薬学会第138年会、金沢、2018.3.25-28
2. 津元裕樹、西風隆司、橋井則貴、阿部由紀子、新井康通、広瀬信義、石井明子、関谷禎規、岩本慎一、田中耕一、三浦ゆり、遠藤玉夫 : 超百寿者血漿タンパク質のN-結合型糖鎖解析による健康長寿マーカー探索、日本薬学会第138年会、金沢、2018.3.25-28
3. 鈴木秀行、津元裕樹、岩本真知子、野田義博、西風隆司、関谷禎規、岩本慎一、田中耕一、武藤昌図、遠藤玉夫、三浦ゆり : マウス血漿N-結合型糖鎖に及ぼすシアル酸投与の影響、第61回日本薬学会関東支部大会、東京、2017.9.16
4. 三浦ゆり、橋井則貴、太田悠葵、鈴木淳也、高倉大輔、津元裕樹、阿部由紀子、新井康通、川崎ナナ、広瀬信義、遠藤玉夫 : 日本人超百寿者に特徴的な血漿タンパク質糖鎖の解析、日本プロテオーム学会2017年大会、大阪、2017.7.26-28
5. Miura, Y., Hashii, N., Tsumoto, H., Takakura, D., Ohta, Y., Abe, Y., Arai, Y., Kawasaki, N., Hirose, N., Endo, T. : N-glycomics of plasma proteins in Japanese semisupercentenarians. 理研シンポジウム、東京、2016.11.17
6. 津元裕樹、西風隆司、橋井則貴、三浦ゆり、阿部由紀子、新井康通、岩本慎一、広瀬信義、田中耕一、遠藤玉夫 : 超百寿者血漿糖タンパク質のシアル酸結合様式の解析、第35回日本糖質学会年会、高知、2016.9.1-3

7. 津元裕樹、西風隆司、岩本慎一、田中耕一、三浦ゆり、遠藤玉夫：シアル酸結合様式を区別した血漿N結合型糖鎖解析法の開発、TOBIRA 第5回研究交流フォーラム、東京、2016.5.23
8. 津元裕樹、西風隆司、三浦ゆり、阿部由紀子、新井康通、岩本慎一、広瀬信義、田中耕一、遠藤玉夫：超百寿者血漿のN-結合型糖鎖におけるシアル酸結合様式の解析、第64回質量分析総合討論会、大阪、2016.5.18-20
9. Nishikaze, T., Tsumoto, H., Yamazaki, Y., Iwamoto, S., Miura, Y., Tanaka, K. : Sialyl linkage-specific glycan profiling using solid-phase SALSA: A simple and versatile derivatization approach, The 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry, San Antonio, TX, USA, 2016.6.5-9

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 <https://www.tmgig.jp/research/index.html>

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：津元 裕樹

ローマ字氏名：TSUMOTO,hiroki

研究協力者氏名：橋井 則貴

ローマ字氏名：HASHII,noritaka

研究協力者氏名：遠藤 玉夫

ローマ字氏名：ENDO,tamao

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。