

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18550145
 研究課題名（和文）固相アレイに依らないグライコームワイドな擬糖鎖アレイ法
 研究課題名（英文）Research on techniques for the identification of carbohydrate binding proteins using glycome-wide oligosaccharides as affinity probes

研究代表者

篠原 康郎（SHINOHARA YASURO）
 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任教授
 研究者番号：20374192

研究成果の概要：糖鎖認識分子を探索するためには、同一組織に存在している網羅的な糖鎖（グライコーム）をプローブに用いることが合理的、理想的であるため、グライコームワイドな糖鎖を相手分子探索のプローブとして用いる研究を推進した。グライコブロットング法とイミン交換による反応を利用して、生体試料由来の糖鎖を任意の標識化合物として回収する方法論を確立し、天然由来の多様な糖鎖の固相化および光アフィニティプローブ標識が可能であることを実証した。また、相手分子を探索するモデル系として糖鎖の構造や機能がよくわかっていないマウスの表皮を用い、シアル酸の構造情報を含む定量的なグライコーム情報を初めて取得した。次いで、マウスの表皮においてユニークな発現を示した α -ガラクトースエпитープについて、ガレクチン-3が相手分子であることを示すとともに、ガレクチン-3のユニークな糖鎖認識特異性を明らかにし、糖鎖認識分子探索においてグライコームワイドな糖鎖を用いることの有用性を実証した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	720,000	4,420,000

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：糖鎖アレイ、グライコミクス、糖鎖認識分子、質量分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 複合糖質は生体内において細胞分化、物質輸送、シグナル伝達、接着、タンパク質の機能制御などの多彩な機能を担っているが、これらの多くは糖鎖を認識する分子の存在によって発揮される。糖鎖の網羅的な解析一

Glycomics-が精力的に展開され始めた一方、糖鎖認識分子の網羅的な探索やその内因性リガンドの解明は遅れている。

(2) 糖鎖認識分子探索のために、糖鎖を固相化したアレイが近年相次いで報告されている。本来、生体で実際に機能している糖鎖認

識分子を探索するためには、同一組織に存在している網羅的な糖鎖 (Glycome) をプローブに用いることが合理的であるが、微量しか存在しない個々の糖鎖を高度に単離精製することは困難である上に、遺伝子操作による増幅や生産が不可能であることから、アレイに搭載されている糖鎖は調達の容易な単純な構造のものがほとんどで、生体に存在する複雑な糖鎖を豊富にコンテンツにもつアレイは存在しない。

(3) 固相化アレイは可溶性の糖鎖認識分子を探索する上では極めて有望と考えられるが、試料調製の過程で糖結合活性を維持することが困難な膜タンパク質型の糖鎖認識分子に適用することは困難である。実際、多くの糖認識分子が膜タンパク質であると考えられているため、これは現在の糖鎖アレイの抱える重大な限界である。

(4) 一定周期 (~28 日間) で落屑し再生される表皮は糖鎖の機能を研究する上で興味深い研究対象であるが、複合糖質には糖鎖の構造多様性、修飾位置の多様性、ミクロ不均一性などに基づく膨大な複雑性があるため、表皮の糖鎖の構造解析と複合糖質が担う機能研究は遅れている。

2. 研究の目的

生体で実際に機能している糖鎖認識分子を探索するために、同一組織に存在している網羅的な糖鎖 (Glycome) をプローブに用いるアプローチの構築を目指す。

本研究では、標的組織に実際に発現している全糖鎖を糖鎖認識分子探索のプローブとして利用し、膜タンパク質を含めた包括的なタンパク質を対象に、糖鎖認識分子の網羅的な解析を行うためのシステムの構築を目指す。このために、生体試料に存在するグライコームワイドな糖鎖ライブラリーを効率的に調整し、相手分子探索のためのプローブとする戦略を構築する。また、LC-MS/MS における相手分子探索に適したプローブの設計を行う。さらに、糖鎖の機能が十分に明らかにされていない表皮をモデルに相手分子の探索を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) プローブのデザイン

nano ESI および nano SSI のネガティブモードを用いて、ヒドラゾンやオキシムを介して導入した種々の標識試薬のイオン化における N-N および N-O 切断の効率を評価した。aoWR および AcWR h は既報 (Anal Chem 76, 6989, 2004, Mol Cell Proteomics 4, 1977, 2005) に従って合成し、他のアミノオキシム、ヒドラジド型の糖鎖は購入した。装置はナノグラジエント LC-MS システム (NanoFrontier) を用い、カラムには Intersil NH2

(GL-Sciences, 150mm x 0.075mm) または ZIC-HILIC (Sequant, 150mm x 0.075mm) を用いた。移動相には A 液に 80% アセトニトリル (20mM ammonium acetate)、B 液に 100mM ammonium acetate を用い、50 分で A90→5% のグラジエント溶出を行った。

(2) 生体由来の糖鎖ライブラリーの標識技術の確立

生体由来のグライコームワイドな糖鎖を標識試薬によって標識するために、糖鎖精製のための基盤プラットフォームである glycoblotting 法において任意の標識試薬によるラベル化を実現するために、イミン交換による捕捉糖鎖の遊離および標識効率を精査した。

キトトリオース (GN3) をモデルに aoWR または AcWR 標識体を調製した。それぞれに過剰の aoWR または AcWR 試薬の重水素標識体を添加し、オキシム→オキシム、オキシム→ヒドラゾン、ヒドラゾン→オキシム、ヒドラゾン→ヒドラゾンの 4 種のイミン交換について、効率を MALDI-MS で評価した。

(3) マウス皮膚の Glycome の目録の作成---細胞や組織の中から糖鎖を高効率に遊離してくるためには、細胞や組織の破碎、タンパク質の変性、タンパク質の加水分解などの前処理操作が重要である。マウスはヘアレスマウス (♂) を用い、ヒートセパレーション法により表皮と真皮を採取した。皮膚組織から糖鎖を高効率に遊離するための条件を精査し、有効な界面活性剤の種類や、プロテアーゼ消化条件等について最適化を行った。

皮膚組織中に存在する全糖鎖の定量的解析には、前項で確立した方法論と、MALDI-TOF (/TOF) による解析で表皮組織および真皮組織について、定性かつ定量的な目録を作成した。

α -Gal エピトープ含有糖鎖のキャリアタンパク質の同定は、ConA による糖ペプチドの分画後に、MALDI-TOF/TOF (UltraFlex) によって行った。タンパク質同定は、FlexAnalysis により作成された MS/MS スペクトルのピークリストについて MASCOT (Ver 2.1) のアルゴリズムにより行った。

(4) 表皮中の糖鎖認識分子の探索

血清および糖タンパク質から既報 (Mol Cell Proteomics, 6, 1437, 2007) に従って糖鎖を調製し、BlotGlyco により精製を行った。回収サンプル中に含まれる過剰試薬の除去には Waters 社製 MassPREP™ HILIC μ Elution Plate を使用した。HPLC 分取には、アントラニロイルヒドラジン (Ah) を用いて蛍光標識化して行った。光アフィニティプローブとしてフェニルジアリジン基を有する

標識試薬は、アフィライト CHO(生化学工業)を用い、遮光条件下でオキシム化反応を行った。すべての反応については、MALDI-TOF(UltraFlex)によって生成物の確認を行った。光アフィニティ標識実験は、プローブと試料(表皮破碎液またはレクチン(Con A)用液)を混合し、遮光下に37℃で5~30分インキュベートした後に、30W長波長UVランプを用いて、氷冷下に30分間照射した。別途、 α -Gal エピトープを有する糖鎖は、ConA に吸着する画分をさらに逆相系および順相系クロマトグラフィーによって分離精製し、アミノオキシビオチンにより標識し、表面プラズモン共鳴(BIACORE)による解析に供した。

4. 研究成果

(1) イオン化における切断部位に関する検討

イオン化やMS/MS分析において、糖鎖と標識試薬間の切断を優先的に起こすことができれば、どの糖鎖が光アフィニティによるラベル化に関与していたのかを容易に知ることができる。すなわち、イオン化やMS/MSにおける切断部位の導入は本研究で企図する光アフィニティプローブを設計する上でもっとも重要となる。我々は、オキシムやヒドラゾンがイオン化の過程で切断することがあることに注目し、LC-MSにおける様々な測定モードにおけるオキシムやヒドラゾンの切断効率をナノグラジエント LC-リニアイオントラップ(LIT)-飛行時間型(TOF)質量分析計を用いて詳細に検討した。

モデル試薬として我々が独自に開発した超高感度試薬である aoW を用いて、種々の糖鎖を標識したものをを用いた。その結果、イオン源として nano SSI(ネガティブモード)を、カラムにアミノカラムまたは ZIC-HILIC カラムを用いて、アセトニトリル-ammonium acetate のグラジエント溶出を行った時に、イオン化時に N-O 間が高効率に切断されることが明らかになった(図1)。様々な糖鎖構造を用いて検討を行ったところ、採択した条件下で N-O 間の切断は 13~63% の効率で起こることが示された。また、本条件下で、シアル酸やフコース残基の脱理はほとんど認められず、本標識が企図した目的に使えることが示唆された。

同様のイオン化時における脱理がヒドラジド型試薬である AcWRh においても認められた。さらに、構造の様々な種々のアミノオキシ・ヒドラジド含有標識試薬を用い、これらの試薬で標識したモデル糖鎖(ヒト血清由来グライコム)のイオン化時のオキシム・ヒドラゾン切断時の効率を比較したところ、オキシム・ヒドラゾン切断効率は、標識試薬

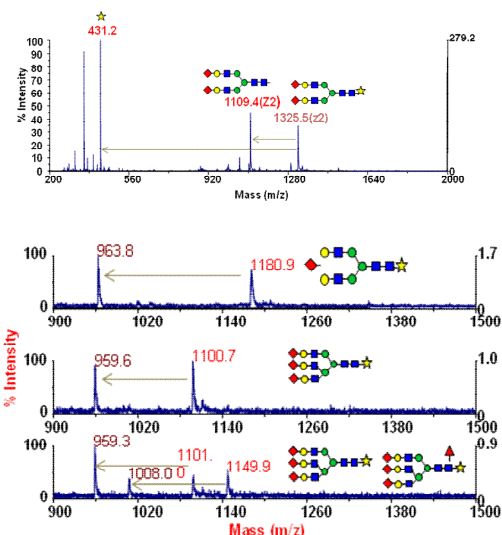


図1. アミノオキシ含有試薬(aoWR)によって標識された糖鎖誘導体はイオン化の過程でオキシムのN-O結合が優先的に切断できる

の構造に依存的であり、アミノオキシ基またはヒドラジド基の近傍にグアニジニウム基のような強力なプロトン受容体基が存在する場合に、高効率でオキシムやヒドラジドの切断が起こる傾向を見出した。

(2) 生体由来の糖鎖ライブラリーの任意の標識試薬による標識技術の確立

標的組織に実際に発現しているグライコムワイドな糖鎖ライブラリーを糖鎖認識分子探索のプローブとして利用するためには、生体組織から糖鎖を網羅的に回収し、企図する標識を施す技術の確立が不可欠となる。そのため本項では、複雑な生体試料から糖鎖を高度に精製する技術である Glycoblotting 法を改良し、精製した糖鎖を任意の標識試薬により標識する技術の確立を行った。

Glycoblotting 法は、糖鎖をタンパク質等から遊離したときに必ず還元末端にアルデヒド基と等価のヘミアセタール基を有することに着目し、アミノオキシ基を表出するビーズによって糖鎖をケモセレクトティブに捕捉することによって、生体試料中から糖鎖を高度に精製する技術である。形成したオキシム結合は酸性条件下で開裂するため糖鎖を生成することができるが収率は30%程度と問題が残る。我々は、ヒドラゾンとオキシムについて、ヒドラジド化合物およびアミノオキシ化合物によるイミン交換の効率を詳細に検討した結果、ヒドラゾンを過剰のアミノオキシ化合物存在下にほぼ定量的な収率でイミン交換を行う条件を見出した。

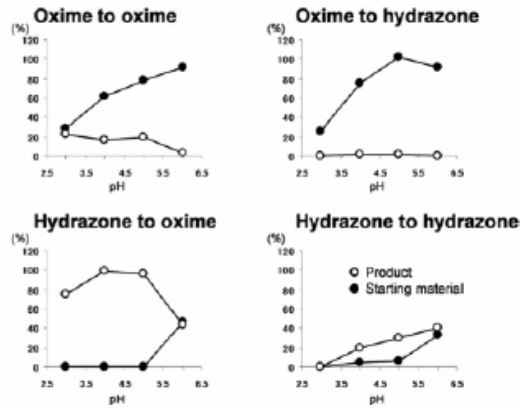


図2. 種々のイモン交換の効率の比較。ヒドラゾンからオキシムへの変換はほぼ定量的に進む。次いでヒドラゾンからヒドラゾンへのイミン交換も高効率に進む。

これらの知見に基づき、ヒドラジド基を表出するポリマーを用いて、生体由来の糖鎖ライブラリーを捕捉し、任意のアミノオキシ含有化合物によって補足した糖鎖を添加した試薬の標識体として高効率に回収できることが可能になった。また、ヒドラゾンからヒドラゾンへの高効率なイミン交換の条件も定めたため、一度糖鎖を導入した標識を目的に応じて複数回交換できる戦略も実証した。本法により、糖鎖を分離、検出、機能評価等の目的に応じて、標識を任意に交換できるようになった。

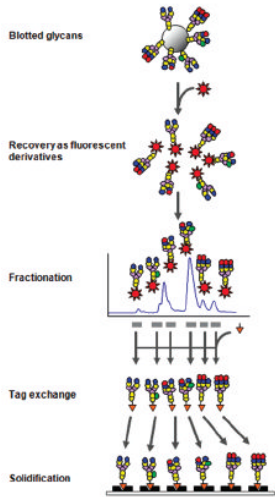


図3. シークエンシャルに異なる標識試薬への付け替え。本法により、天然由来の糖鎖をコンテンツにもつ糖鎖アレイの構築などが可能になる。

図3のような戦略をとることで、生体由来の様々な糖鎖をアレイ等に固相化することが可能である。現在糖鎖アレイに搭載されている糖鎖は調達の容易な単純な構造のもの

がほとんどで、生体に存在する複雑な糖鎖を豊富にコンテンツにもつアレイは存在しないが、今回の結果はこの限界を克服できることを示すものである。

(3) 標的試料の Glycome の解明(目録の作成)と糖鎖ライブラリーの調製

糖鎖はしばしば複合糖質として細胞表面に存在し、細胞間や細胞-細胞外マトリクスとの接着に重要な役割を担っている。このため、一定周期(〜28日間)で落屑し再生される表皮は糖鎖の機能を研究する上で興味深い研究対象である。我々は前項で確立した方法論に基づき、マウスの表皮と真皮の Glycome の解析を行った。その結果、図に示す通り、表皮および真皮に存在する糖鎖として約 80 種類の糖鎖の定性・定量情報を明らかにした。

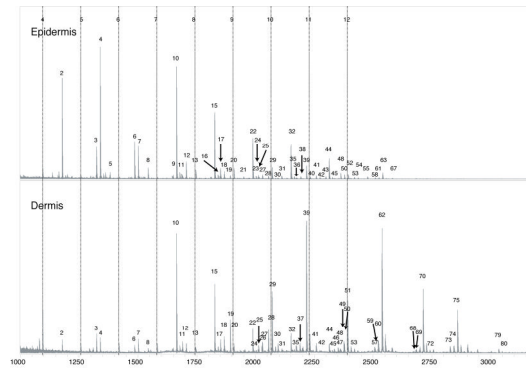


図4. マウス表皮(上)および真皮(下)のグリコームを示すMALDI-TOFスペクトル。

これらの糖鎖について、構造の特徴に基づき表皮と真皮のグリコームを比較した(図4)。表皮では高マンノース型の糖鎖が多く、特にグリコシダーゼ消化を受けた分解産物と考えられる糖鎖の割合が顕著に高かった。また、表皮においてはシアル酸、フコースな

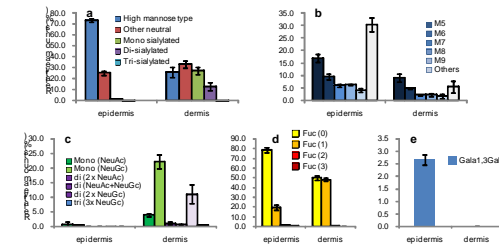


図4. マウス表皮および真皮のグリコームの比較。(a)糖鎖を高マンノース型糖鎖、それ以外の中性糖鎖、シアル酸含有糖鎖に分類して組成を比較、(b)高マンノース型糖鎖の構成の比較、(c)シアル酸含有糖鎖の構成の比較、(d)フコース含有糖鎖の構成の比較、(e) α -Gal エピトープ含有糖鎖の比較

どにより修飾された糖鎖の割合も大幅に低下していた。このことは一定周期で落屑し再生される表皮が様々な分解酵素にさらされている特異な環境にあることで説明することができる。しかしながら、表皮においては様々な糖鎖エピトープが一様に減少している中で、 α -Gal エピトープを有する糖鎖は例外的に表皮にのみ高発現していることを見出した。

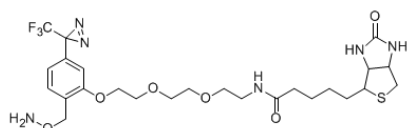
α -Gal エピトープは糖鎖の機能を評価する上で興味深いターゲットであると考えられるため、マウス表皮について、 α -Gal エピトープによって修飾されているタンパク質の同定を行い表 1 にまとめた。同定されたタンパク質はいずれも接着分子としての機能を有するという興味深い知見を得た。

表 1 α -Gal エピトープのキャリアタンパク質

Localization and protein name (gene name)	Swiss-Prot/TrEMBL Accession No.	Sequence
Desmosome		
Desmoglein (<i>Dsg1a or 1b or 1c</i>)	Q61495 or Q77SF1 or Q77SF0 P55849	LNATDADEPNLNLSMAFK
Desmocollin 1 (<i>Dsc1</i>)		NNQYNSIVVATDTAGR
Hemidesmosome		
Integrin $\beta 4$ (<i>Igb4</i>)	A2A863	TCNCSTGSLSDTOPCLR SCDCPLSNATCIDSNGGICNGR
MHC molecule		
H2-K1 protein (<i>H2-K1</i>)	P03991	YYNQSAGGSHTIQR
H2-L protein (<i>H2-L</i>)	P01897	TLLGYNQSGAGTHTIQR
Unknown		
Sushi domain-containing protein 2 (<i>Susd2</i>)	Q9DBX3	FCILDVMSTGSSVGVNATR

(4) フォトアフィニティ試薬による標識と探索

上記の結果を受けて、糖鎖ライブラリーを光アフィニティ標識試薬によって標識を行った。MS/MS においてオキシム結合を優先的に切断可能であるという知見に基づき、糖鎖捕捉のための官能基としてアミノオキシ基を、光アフィニティプローブとしてフェニルジアリジン基を、精製用のタグとしてビオチン基を有する標識試薬 (下図、アフィライト CHO, J. Org. Chem. 2000, 65, 5639-5643) による標識条件の検討を行った。



本試薬による生体由来の糖鎖ライブラリーの標識の可否を評価するために血清由来のN-結合型糖鎖を glycoblotting 法により血清中の糖鎖のみを固相担体へ捕捉し、精製した糖鎖を 1% TFA によって、還元末端が遊離の糖鎖として回収した。上記光アフィニティ

プローブと混合し、濃縮反応を行ったものについて MALDI-TOF により標識反応を評価した。図 5 に示す通り、血清わずか 2.5 μ L 由来の糖鎖ライブラリーが良好に光アフィニティ標識することを実証した。

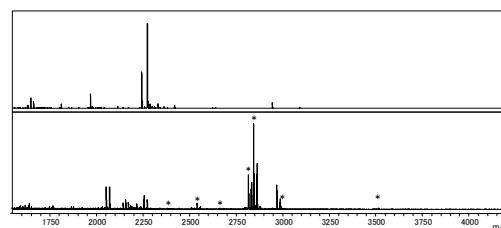


図 5. 血清糖鎖の光アフィニティ標識糖鎖の MALDI スペクトル; a) Glycoblotting 法により精製された血清糖鎖; b) 光アフィニティ標識血清糖鎖 (* 標識化糖鎖)。*がついていないシグナルは標識糖鎖がマトリクスに用いた 2,5-DHB に縮合したものと分子量が一致する。

図 3 に示したタグ交換反応による光アフィニティ標識化についても検討を加えた。RNaseB 由来の糖鎖を Glycoblotting 法により捕捉後に、蛍光標識 (Ah) 体として回収を行った。得られた Ah 標識糖鎖を順相カラムクロマトグラフィにより分画し、フラクションごとに交換反応によりこの糖鎖への光アフィニティ標識化することに成功した。これにより生体由来の特定の糖鎖について、選択的に精製、光アフィニティ標識を施すことが可能となった。

本法に基づき、マウス表皮から調製したN-結合型糖鎖ライブラリーを光アフィニティプローブにより標識し、表皮由来の細胞破砕液との反応に供したが、候補分子のつり上げはできなかった。別途、モデル糖鎖として高マンノース型糖鎖と ConA との反応について評価したところ、光アフィニティ標識反応に濃度依存性があり、生体に存在する程度の微量な糖鎖と糖認識分子間の標識を達成することは今回の検討では困難であった。

(5) GFRG による相手分子の同定

α -Gal エピトープにより修飾されるタンパク質は共通して接着分子としての機能を有しているから、本エピトープが直接接着に関与している可能性が考えられる。この可能性を別のアプローチで精査するために、表皮においてメディアン値の 10 倍以上高発現している遺伝子を公開されているマイクリアルイデータベース (SymAtlas) で検索した結果、糖結合能がアノテートされている遺伝子が 6 種類あることを見出した。そのうち、入手可能なガレクチン-3 及びガレクチン-7 について、4 種類の α -Gal エピトープ含有糖鎖を含むマウス表皮に実際に存在する種々の糖鎖を固相化し、SPR により相互作用を評価した。図 6 a に示す通り、ガレクチン-3 は幾つかの

糖鎖に対して結合を示し、その相互作用は固定化した糖鎖構造に依存して異なった。すなわちガレクチン-3の結合は α -Gal エピトープの数の増加に応じて強くなり、 α -Gal エピトープに対する親和性が実証された。興味深いことにガレクチン-3の結合は還元末端にフコースが存在するとき、更に増強した。他方、ガレクチン-7に対する結合は、用いた条件下ではいずれもほとんど認められなかった。

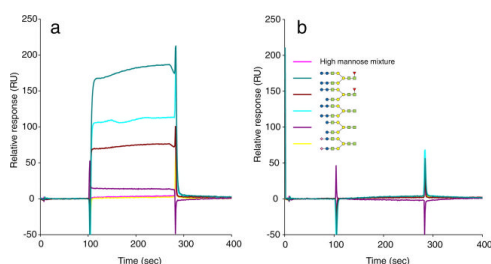


図6. 固定化した種々の糖鎖に対するマウスガレクチン-3(a)およびガレクチン-7(b)の相互作用を示すセンサーグラム。

表皮に実際に発現している様々な糖鎖をプローブに用いて候補分子との相互作用を解析することによって受容体候補の同定と糖鎖認識分子のユニークな糖鎖認識特異性の解明に成功した。このことは標的組織に実際に発現している糖鎖ライブラリーを相手分子探索のプローブとして利用する有用性を実証するものである。

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4件)

- ① Uematsu R., Shinohara Y., Nakagawa H., Kurogochi M., Furukawa J.-i., Miura Y., Akiyama M., Shimizu H., Nishimura S.-I., “Glycosylation specific for adhesion molecules in epidermis and its receptor revealed by glycoform-focused reverse genomics”, *Mol. Cell. Proteomics*, 8, 232-244 (2009) 査読有
- ② Furukawa J.-i., Shinohara Y., Kuramoto H., Miura Y., Shimaoka H., Kurogochi M., Nakano M., Nishimura S.-I., “A comprehensive approach to structural and functional glycomics based on chemoselective glycoblotting and sequential tag conversion”, *Anal. Chem.*, 4, 1094-1101 (2008) 査読有
- ③ Baudino L., Nimmerjahn F., Shinohara Y., Furukawa J.-I., Petry F., Verbeek S.,

Nishimura S.-I., Ravetch V. J., and Izui S., “Impact of a Three Amino-Acid Deletion in the CH2 Domain of Murine IgG1 on Fc-associated Effector Functions”, *J. Immunol.*, 181, 4107-4112 (2008) 査読有

- ④ Baudino L., Shinohara Y., Nimmerjahn F., Furukawa J.-I., Nakata M., Martínez-Soria E., Petry F., Ravetch V. J., Nishimura S.-I., and Izui S., “Crucial Role of Aspartic Acid at Position 265 in the CH2 Domain for Murine IgG2a and IgG2b Fc-associated Effector Functions”, *J. Immunol.*, 181, 6664-6669 (2008) 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 2008年10月21日 第22回未来・医療イノベーションセミナー(札幌) 「Glycosylation specific for adhesion molecules in epidermis and its receptor revealed by glycoform-focused reverse genomics」篠原康郎
- ② 2007年9月16-18日 第56回高分子討論会(名古屋市)「グライコミクスによる疾患マーカー探索への展開」篠原康郎
- ③ 2007年9月3日 22nd Summer University in Hokkaido (奈井江町)「ポストゲノムシーケンス時代の新規複合糖質解析技術」篠原康郎
- ④ 2007年8月1-3日 日本糖質学会(福岡) 「Glycoblotting 法と連続的な標識交換に基づく構造および機能グライコミクスのための包括的なアプローチ」古川 潤二、篠原康郎、倉本洋光、三浦嘉晃、島岡秀行、黒河内正樹、中野美佳、岩崎倫政、三浪明男、西村紳一郎
- ⑤ 2007年10月30日 第1回GFRG研究会シンポジウム(東京)「GFRGによる複合糖質マーカー探索の戦略」篠原康郎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 康郎 (SHINOHARA YASURO)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任教授

研究者番号：20374192

(2) 研究分担者

古川 潤一 (FURUKAWA JUN-ichi)
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：30374193

(3) 連携研究者

なし