

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07025

研究課題名(和文) 特異的誘導体化法を用いた新規シアリル化糖鎖・糖ペプチド解析法の開発と応用

研究課題名(英文) Development of a method for analysis of sialyl glycans and glycopeptides using sialic acid linkage-specific derivatization

研究代表者

津元 裕樹 (Tsumoto, Hiroki)

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・主任研究員

研究者番号：00409385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題により、シアル酸結合様式まで容易に区別することができる糖鎖・糖ペプチド解析法を開発し、ヒト血漿タンパク質のN型糖鎖解析および網羅的なN型糖ペプチド解析に応用した。ヒト健康長寿モデルとされる105歳以上の超百寿者群と90歳、80歳、70歳群の血漿検体を用いて比較解析し、alpha1-acid glycoprotein 1に由来する糖ペプチドが超百寿者群において特徴的であることを明らかにした。このような糖鎖構造変化がヒトの健康長寿の要因の一つである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題により開発された解析法を用いることにより、これまではLC分離や標準品入手が困難で解析不可能であった高分岐かつ高シアリル化糖鎖や糖ペプチドの結合様式の違いを容易に区別できる。それにより、より詳細なグライコミクスやグライコプロテオミクス研究の推進や疾患バイオマーカーの探索研究への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, a method for analysis of sialyl glycans and glycopeptides using sialic acid linkage-specific derivatization was developed to discriminate between alpha2,3- and alpha2,6-sialic acid.

Semi-supercentenarians (SSCs, older than 105 years old) are a good example of human longevity, therefore physiological and biochemical analyses of SSCs can contribute to the understanding of healthy human aging. Using a combination of the developed method and LC-MS/MS, N-glycomics and N-glycoproteomics of plasma proteins obtained from SSCs and younger control groups were performed. As a result of LC-MS/MS analyses, 1676 N-glycopeptides from 91 proteins were identified and quantified. Among them, 366 N-glycopeptides were altered in SSCs compared to younger control groups. Furthermore, multivariate analysis identified 10 N-glycopeptides which were characteristic of SSCs. Most of the identified N-glycopeptides were derived from alpha1-acid glycoprotein 1.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：質量分析 糖鎖 糖ペプチド シアル酸 誘導体化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質翻訳後修飾の一つである糖鎖修飾は、60%以上のタンパク質におこる高頻度な修飾である。修飾部位により、アスパラギン (N) 残基の N 型糖鎖とセリン/スレオニン残基の O 型糖鎖に大別される。糖鎖の構造多様性はタンパク質の局在、代謝、相互作用など様々な機能制御に関わるだけでなく、生物学的な環境変化によりその構造自体が変化することから、がんなどの疾患や老化のバイオマーカーとしても注目されている。

多くの糖鎖の非還元末端には N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) に代表されるシアル酸が、2,3-あるいは 2,6-結合により付加 (シアル化) している (図 1)。この結合様式の違いは生体内における細胞認識やタンパク質の代謝などにおいて重要な役割を果たしている。よって、シアル化糖鎖の生物学的な意義を明らかにするためには、結合様式まで含めて解析することが重要である。

近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) およびエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を用いた質量分析法 (MS) は、タンパク質の糖鎖修飾解析に必要不可欠な分析法となっている。糖鎖や糖ペプチドを分析対象とした誘導體化、濃縮、MS の技術開発により、MS による糖鎖修飾部位、ペプチド配列 (タンパク質) 同定、糖鎖構造などが同定され、糖鎖生物学の発展に大きく寄与している。

しかしながら、糖鎖の複雑性や不均一性は解析を困難にし、特に、シアル化糖鎖・糖ペプチドの MS では、カルボン酸の負電荷による検出感度低下や MS における不安定化のため容易ではない。さらに、2,3-および 2,6-結合の違いは MS で区別することは不可能である。生物学的に重要な役割を果たしているシアル酸について、その結合様式まで含めた汎用性の高い解析法は確立されていない。よって、シアル酸結合様式まで区別できる汎用性の高い高感度なシアル化糖鎖・糖ペプチド解析法の開発が求められていた。

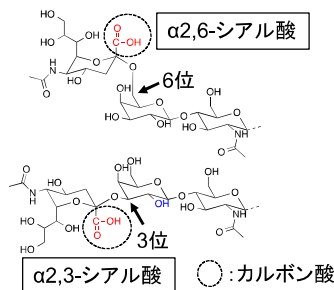


図 1.

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に開発したシアル酸結合様式特異的アルキルアミド化法 (SALSA) (図 2A) と LC-MS/MS を組み合わせた新規シアル化糖鎖・糖ペプチド解析法の開発を目的とする (図 2B)。また、開発した解析法をヒトの健康長寿モデルである超百寿者の血漿タンパク質糖鎖・糖ペプチド解析に応用し、健康長寿に関連する糖鎖構造変化を明らかにする。

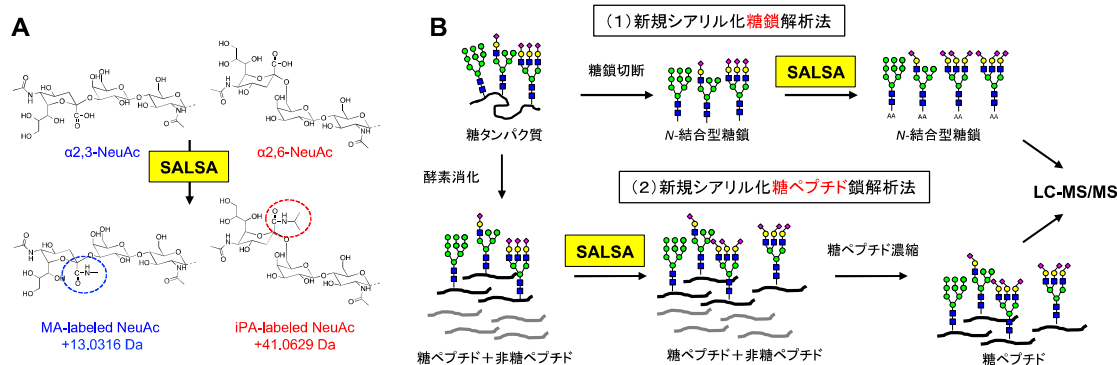


図 2.

3. 研究の方法

(1) 新規シアル化糖鎖解析法の開発

我々はこれまでの研究において、SALSA と MALDI MS を組み合わせたヒト血漿タンパク質 N 型糖鎖解析法を確立した。具体的には、血漿からアルブミンと IgG を除去後、タンパク質から糖鎖を切断、担体上への固定化、SALSA、糖鎖の再遊離、還元末端の誘導體化、精製法について検討をした。MALDI MS は分析スループット性が高いなどの利点があるが、定量性に乏しいことや構造異性体などを分離して検出できないなどの問題があった。そこで本研究では、より詳細な解析を行うため、糖鎖解析においても高感度・高分解能な LC-MS/MS を用いた。定量的な解析は分析対象とする糖鎖の抽出イオンクロマトグラムからピークエリアを算出して相対的に行った。確立した解析法を超百寿者、90 歳、80 歳、70 歳群 (各 20 例) のヒト血漿タンパク質の N 型糖鎖解析に応用した。

(2) 新規シアリル化糖ペプチド解析法の開発

本研究では、タンパク質を酵素消化してペプチド混合物としたのち、アミノ基の保護、SALSA、N型糖ペプチドを濃縮してLC-MS/MSを行い、データベース検索による同定およびラベルフリー定量法による相対的定量解析、多変量解析を行った。市販のシアリル化糖ペプチド標準品、血漿由来の精製タンパク質、ヒトプール血漿を用いて条件検討を行い、解析法を確立した。確立した解析法を超百寿者、90歳、80歳、70歳群（各20例）の血漿タンパク質N型糖ペプチド解析に応用した。

4. 研究成果

(1) 新規シアリル化糖鎖解析法の開発

LC-MSにより得られた糖鎖の抽出イオンクロマトグラムを図3Aに示す。シアリル結合様式をm/z値により容易に区別することができた。しかしながら、同じm/z値に対して保持時間が異なるピークが存在することもわかった。本研究では複数ピークのエリア値は合算し、シアリル結合様式が異なる三分岐糖鎖について相対的な定量解析を行った。その結果、MALDI MSと同様、フコシル化糖鎖は70歳と比較して超百寿者（SSC）群で有意に増加する結果が得られた（図3B）。今後はLCで分離したピークまでも区別して解析することが加齢と詳細な糖鎖構造変化の関連を明らかにするための課題と言える。

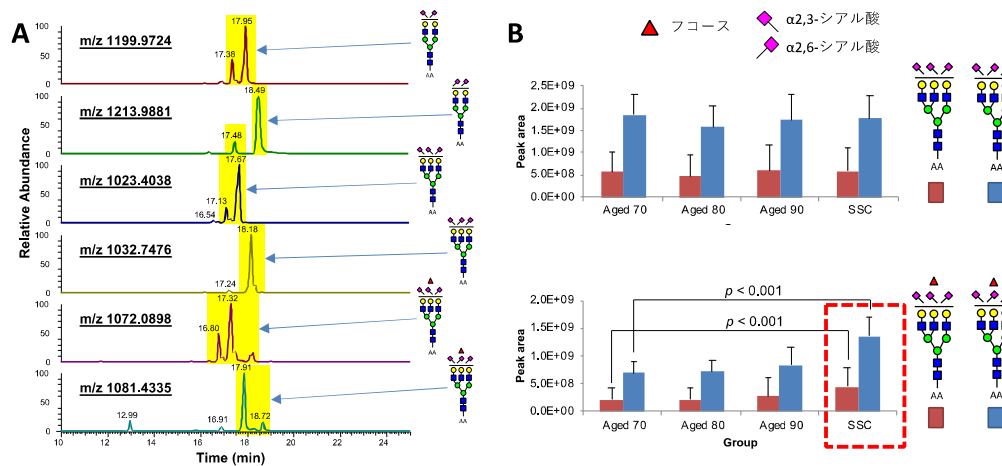


図 3.

(2) 新規シアリル化糖ペプチド解析法の開発

最初に、シアリル化糖ペプチド標準品として 2,3-および 2,6-SGP（図4）を用いて検討を行った。SALSAを行わない場合、これらの分子量は同じであるためMSおよびMS/MSでは区別できなかった（図4A, B）。一方、SALSAを行った場合、分子量に差が生じるため、MSで容易に区別することができた。さらにMS/MSでは 2,3-シアリル酸を有するSGPからはシアリル由来のm/z 305および287が検出され、2,6-シアリル酸を有するSGPからはm/z 333および315が検出された（図4C, D）。これらのフラグメントイオンは糖ペプチドに付加したシアリル結合様式を判断する有用な診断イオンになり同定結果の信頼性を向上させることと考えられる。

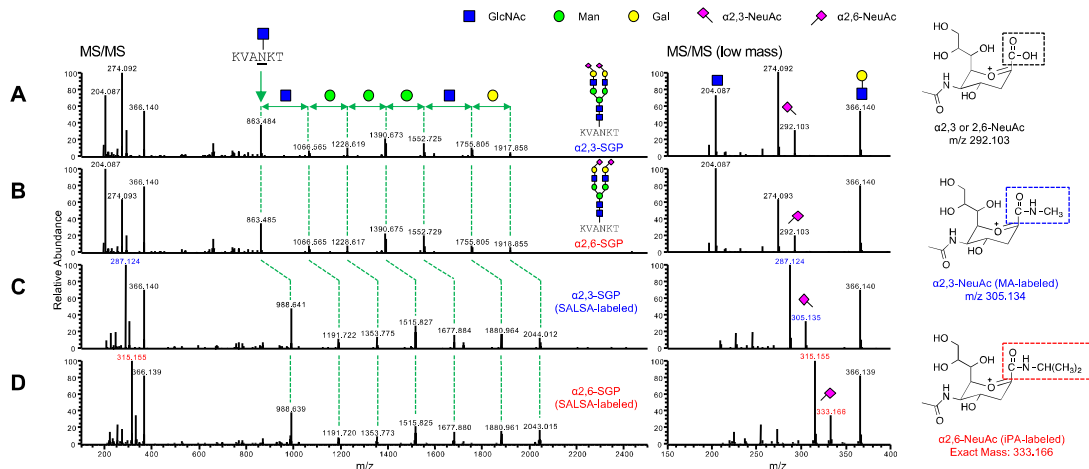


図 4.

次に、ヒト血漿由来タンパク質として alpha-1-acid glycoprotein 1 (AGP1) を用いて N 型糖ペプチド解析法の検討を行った。SALSA 誘導体化されたペプチド混合物を LC-MS/MS を用いて分

析し、データベース検索により誘導体化シアル酸を含む糖ペプチドを同定・定量できる解析系を構築した。それにより、シアル酸結合様式を区別し、修飾部位特異的に糖鎖の存在比を算出することが可能であること、四分岐・四シアル酸のような大きな糖鎖にも有用であった(図 5)。また、誘導体化された N 型糖鎖においても N-グリコシダーゼ処理により N 型糖鎖を切断できることを実証し、本分析法が網羅的な O 型糖ペプチド解析にも利用できる可能性が示唆された。

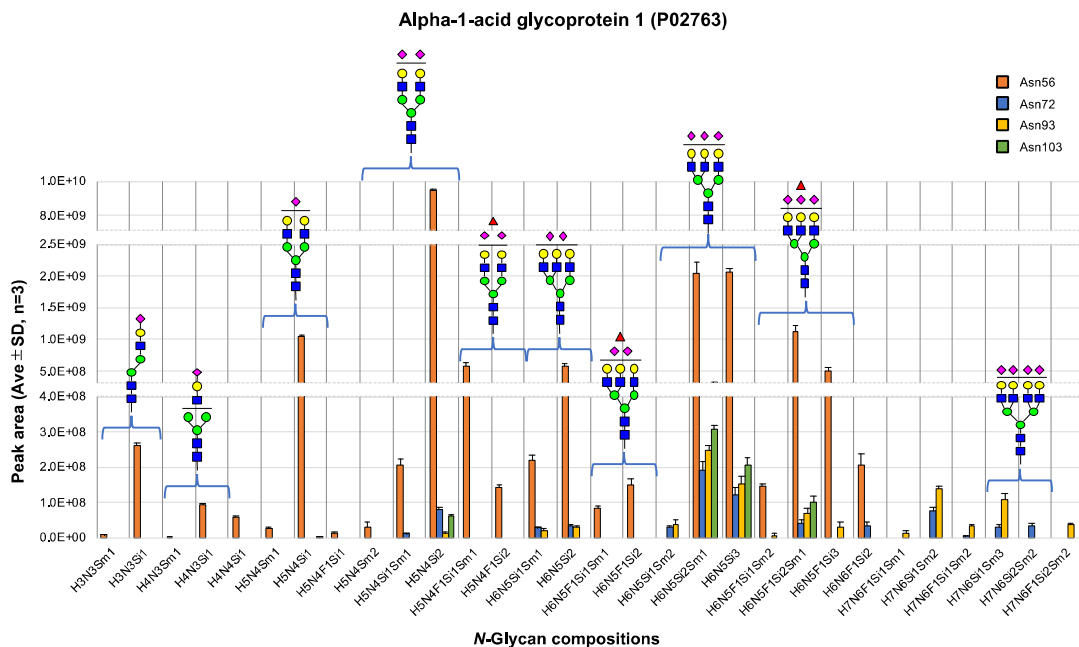


図 5.

より複雑なヒトプール血漿を用いた検討では、N 型糖ペプチドの同定数を向上させるため、親水性相互作用クロマトグラフィーによる精製条件、注入量、LC の分離条件、MS のパラメータなどを最適化した。その結果、79 種類のタンパク質から 831 種類のシアル化糖ペプチドの同定に成功した。そのうち、シアル酸数が 1, 2, 3, 4 のペプチドは 372, 338, 110, 11 種類あり、結合様式では、2,6-結合のみが 574 と最も多く、混合型が 199, 2,3-結合のみが 58 であった。また、N-グリコシダーゼ F 処理を併用した O 型糖ペプチド解析では 36 種類のタンパク質から 98 種類の糖ペプチドの同定に成功した。

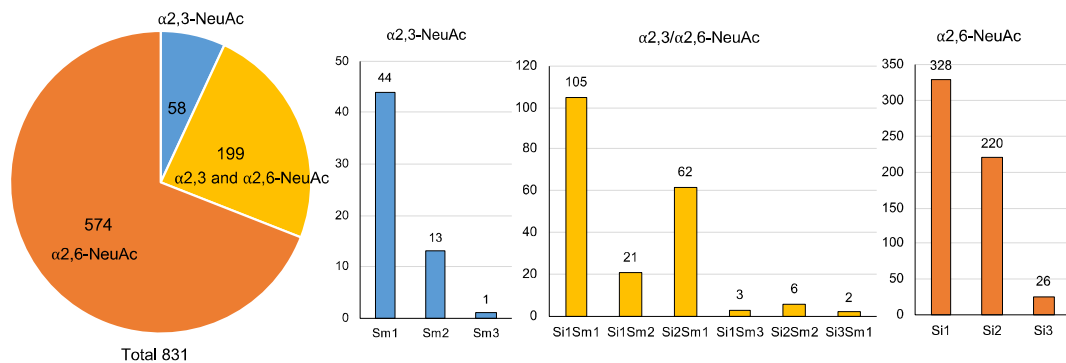


図 6.

最後に、確立した解析法を超百寿者、90 歳、80 歳、70 歳群(各 20 例)の血漿タンパク質 N 型糖ペプチド解析に応用した。その結果、91 種類のタンパク質に由来する 1676 種類の N 型糖ペプチドの同定に成功した。そのうち、366 種類は 70 歳群と比較して超百寿者、90 歳、80 歳のいずれかで二倍以上変動していた。特に、急性期タンパク質として知られる 1-acid glycoprotein (AGP)1 と haptoglobin 由来のものがそれぞれ 46 と 48 種類と多く同定された。

変動した 366 種類を用いて主成分分析を行った結果、超百寿者群とその他の三群で良好な分離が得られた。そこで、超百寿者群に特徴的な N 型糖ペプチドを明らかにするため、70 歳群との判別分析を行った(図 7A)。その結果、超百寿者群で増加した 9 種類と減少した 1 種類の N 型糖ペプチドが二群の分離に寄与していることがわかった(図 7B)。増加したもののほとんどは AGP1 由来の N 型糖ペプチドであった。また、それらの糖鎖構造は、ほとんどが三分岐糖鎖でシアル酸を二つ以上かつフコースを有していた。特に、2,3-結合を一つと 2,6-結合を二つ含むシアル酸結合様式の三分岐・三シアル酸糖鎖は三カ所の糖鎖修飾部位で増加していた。そこで三分岐・三シアル酸糖鎖を有する Asn56 を含む糖ペプチドに着目して解析した。その結果、フコース

のない三分岐・三シアル酸糖鎖を含む糖ペプチドは四群で変動していないにも関わらず、フコースを1～2つ有するものは超百寿者群で有意に増加していた。以上の結果より、超百寿者群ではAGP1のN型糖鎖のフコシル化の亢進が特徴的であり、このことが健康寿命の要因の一つである可能性が示唆された。

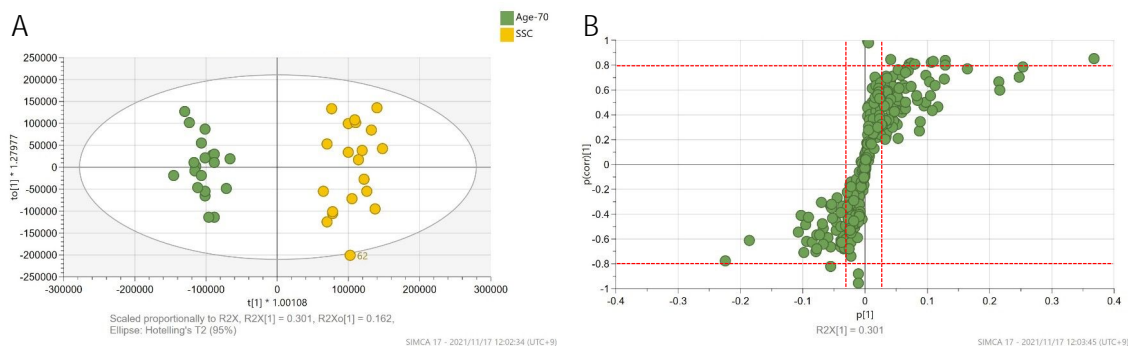


図 7.

以上、本研究課題の遂行により、シアル酸結合様式特異的アルキルアミド化法 (SALSA) と LC-MS/MS を組み合わせた新規シアリル化糖鎖・糖ペプチド解析法の開発に成功した。さらに、ヒトの健康長寿モデルである超百寿者の血漿タンパク質の糖鎖・糖ペプチド解析に応用し、超百寿者群に特徴的な糖鎖構造とその修飾部位の同定に成功した。

今後は得られた知見を多検体で検証することで健康長寿マーカー開発へ発展すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 三浦 ゆり、津元 裕樹、遠藤 玉夫	4. 巻 92
2. 論文標題 健康長寿とグライコミクス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 343-348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 三浦 ゆり、津元 裕樹、遠藤 玉夫	4. 巻 56
2. 論文標題 プロテオミクスを用いた健康長寿バイオマーカーの探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 999-1003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.56.11_999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hanamatsu Hisatoshi, Nishikaze Takashi, Tsumoto Hiroki, Ogawa Koji, Kobayashi Takashi, Yokota Ikuko, Morikawa Kenichi, Suda Goki, Sho Takuya, Nakai Masato, Miura Nobuaki, Higashino Kenichi, Sekiya Sadanori, Iwamoto Shinichi, Miura Yuri, Furukawa Jun-ichi, Tanaka Koichi, Sakamoto Naoya	4. 巻 91
2. 論文標題 Comparative Glycomic Analysis of Sialyl Linkage Isomers by Sialic Acid Linkage-Specific Alkylamidation in Combination with Stable Isotope Labeling of 2,3-Linked Sialic Acid Residues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 13343-13348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.9b03617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroki Tsumoto, Mako Inuzuka, Takashi Nishikaze, Yusaku Hioki, Md. Amir Hossen, Yasumichi Arai, Kazunori Ikebe, Tatsuro Ishizaki, Kei Kamide, Yasuyuki Gondo, Yukie Masui, Nobuyoshi Hirose, Yoshihiro Hayakawa, Yuri Miura, Tamao Endo
2. 発表標題 N-Glycan profiling in plasma proteins of semi-supercentenarians using sialic acid linkage-specific derivatization and negative-ion MALDI-TOF MS
3. 学会等名 70th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津元裕樹, 西風隆司, 新井康通, 池邊一典, 石崎達郎, 神出計, 権藤恭之, 増井幸恵, 梅澤啓太郎, 川上恭司郎, 広瀬信義, 早川禎宏, 三浦ゆり, 遠藤玉夫
2. 発表標題 シアル酸結合様式特異的誘導体化法を用いた超百寿者の血漿N-グリコプロテオミクス
3. 学会等名 第70回質量分析総合討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津元裕樹, 西風隆司, 梅澤啓太郎, 川上恭司郎, 早川禎宏, 三浦ゆり, 遠藤玉夫.
2. 発表標題 シアル酸結合様式特異的誘導体化法を用いたヒト血漿タンパク質の糖ペプチド解析.
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津元裕樹, 西風隆司, 関谷禎規, 梅澤啓太郎, 川上恭司郎, 岩本慎一, 田中耕一, 三浦ゆり, 遠藤玉夫.
2. 発表標題 シアル酸結合様式特異的誘導体化法を用いたO-結合型糖ペプチド解析法の開発.
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦ゆり, 川上恭司郎, 井出野佑太, 増井幸恵, 稲垣宏樹, 小野口航, 津元裕樹, 梅澤啓太郎, 新井康通, 池邊一典, 石崎達郎, 神出計, 権藤恭之, 遠藤玉夫.
2. 発表標題 血しょうタンパク質糖鎖修飾の健康寿命延伸を目指したバイオマーカーとしての可能性.
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花松久寿, 西風隆司, 津元裕樹, 小川浩司, 横田育子, 森川賢一, 須田剛生, 庄拓也, 中井正人, 三浦信明, 関谷禎規, 岩本慎一, 三浦ゆり, 田中耕一, 坂本直哉, 古川潤一.
2. 発表標題 安定同位体を用いたSALSA法による比較質量分析法の開発.
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津元裕樹, 西風隆司, 関谷禎規, 岩本慎一, 田中耕一, 三浦ゆり, 遠藤玉夫.
2. 発表標題 シアル酸結合様式特異的誘導体化法を用いた糖ペプチド解析法の開発
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 質量分析方法、質量分析装置およびプログラム	発明者 西風隆司, 津元裕樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-135344	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------