

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550089

研究課題名(和文) プロテオグリカンの共通四糖橋渡し構造および糖鎖結合部位の一斉解析

研究課題名(英文) Simultaneous analysis of glycosaminoglycan-protein linkage region and glycosylation site of proteoglycan

研究代表者

古川 潤一 (Furukawa, Jun-ichi)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：30374193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではピラゾロン試薬共存下での脱離反応を利用した糖鎖および脱修飾化ペプチド解析法の基盤技術を発展させ、「プロテオグリカンの共通四糖橋渡し構造および糖鎖結合部位の一斉解析法」の開発を目的として研究を遂行した。まず、マイクロ波支援BEP反応を検討し、糖タンパク質からのO結合型糖鎖の切断およびピラゾロン試薬による標識効率が向上し、反応条件の最適化を行うことで、これまで16時間必要とした反応が2時間で完了した。また、ペプチドグリコサミノグリカンのエンリッチ法およびグライコプロット法と併用することでプロテオグリカンの共通四糖橋渡し構造、GAG二糖構造、および糖鎖結合部位の同定法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Serine (Ser) and threonine (Thr) residues can be modified by various types of sugar chains, such as the O-GalNAc type typical of mucin and the O-GlcNAc, O-Fuc, O-Man, and O-Xyl types. The characterization of O-glycans has remained particularly challenging because no analogous endoglycosidase is known, and alternative chemical protocols are either incomplete, lack specificity, or degrade products. We recently reported a novel method for the analysis of Ser/Thr post-translational modifications, in which samples were subjected to β -elimination in the presence of pyrazolone derivatives. We report here applications of BEP reaction for the analyses of glycosaminoglycan-protein linkage region, GAG disaccharides, and glycosylation site of proteoglycan.

研究分野：分析化学

キーワード：プロテオグリカン グライコミクス 脱離反応 グリコサミノグリカン

1. 研究開始当初の背景

セリンとスレオニンはリン酸化や糖鎖修飾を受ける代表的なアミノ酸残基であり、ムチン型糖鎖 (O-GalNAc) をはじめ、発見が比較的最近である糖鎖修飾 (O-GlcNAc, O-Fuc, O-Man 等) もセリンとスレオニンの翻訳後修飾であり、シグナル伝達や分化制御などの明確な機能が明らかにされてきている。糖タンパク質のなかでもアスパラギン残基の修飾である N-glycan は構造非依存的に糖鎖を切り出す酵素 (PNGase F) を用いた糖鎖解析が勢力的に行われているが、ムチン型糖鎖については構造非依存的に切り出す酵素がないため、糖鎖の遊離は専ら化学法に依存しているのが現状である。化学法ではピーリング反応による分解を避けるために糖アルコールへと還元する Carlson 法が標準的な方法 (引用文献) となっているが、還元末端を利用する精製やラベル化が行えないなど問題も多く残されている。申請者は、ピラゾロン共存下 脱離反応を行うことで、化学的な糖鎖切断と標識を同時に行う解析手法の開発を進めてきた。さらには脱グリコシル化したペプチドの糖鎖結合部位が同時に修飾されることを見出している (図1) (引用文献)。

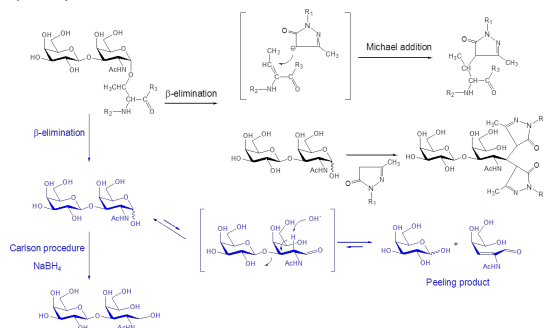


図1. ピラゾロン共存下 脱離反応

2. 研究の目的

本研究ではピラゾロン試薬共存下での 脱離反応を利用した糖鎖および脱修飾化ペプチド解析法の基盤技術をさらに発展させ、有用な新規ピラゾロン試薬の開発、さらにはセリン残基修飾の一つである「プロテオグリカンの共通四糖橋渡し構造および糖鎖結合部位の一斉解析法」の開発を目的としている。

3. 研究の方法

(1) これまでのピラゾロン試薬共存下での 脱離反応に対するマイクロ波放射の効果について検討を行った。糖タンパク質としては O 結合型糖鎖を有するブタ胃ムチンを使用し、マイクロ波支援 BEP 反応の詳細な検討を行った。

(2) プロテオグリカンの一斉解析スキームを図2に示したが、まずグリコサミノグリカンを有する糖ペプチドの効率的なエンリッチ法の確立を目的として、プロテオグリカンの一つである尿トリプシン阻害剤 (Urinary Trypsin Inhibitor) のペプチドグリコサミノグリカンのエンリッチ法について検討した。

さらに、得られたペプチドグリコサミノグリカンをを用いて共通四糖橋渡し構造、グリコサミノグリカン二糖構造、および糖鎖結合部位の解析を検討した。

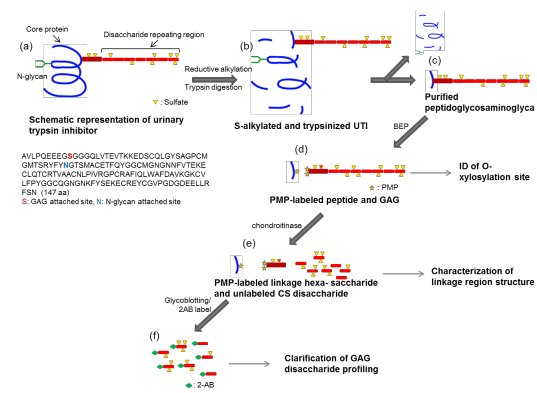


図2. プロテオグリカンの共通四糖橋渡し構造、グリコサミノグリカン二糖構造、および糖鎖結合部位の解析スキーム

(3) 蛍光基導入ピラゾロン試薬を合成し、BEP 反応の有用性について評価した。

4. 研究成果

(1) マイクロ波放射ピラゾロン共存下 脱離反応を行うことで、BEP 反応が向上し、120 で反応を行うことで、これまで16時間必要であった反応時間を2時間まで短縮でき、O 結合型糖鎖の回収量も2倍以上向上することが明らかとなった (図3)。本手法と固相抽出法を併用することで、血清や組織など様々な生体試料の O 結合型糖鎖の解析を行うことができた。本手法はプロテオグリカンを含むすべての O 結合型糖鎖解析へ応用できる。

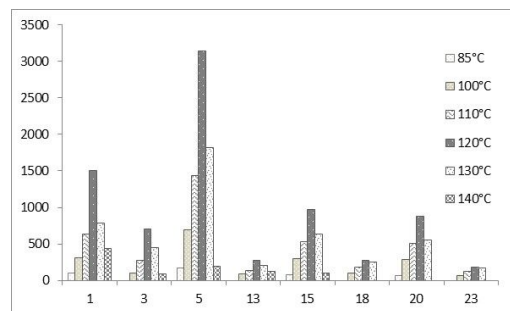


図3. マイクロ波支援ピラゾロン共存下 脱離反応における O 結合型糖鎖の回収量の比較

(2) 尿トリプシン阻害剤をトリプシン消化し、エタノール沈殿を行うことで、ペプチドグリコサミノグリカンをエンリッチできるが評価した。エタノール沈殿により回収した残差を BEP 反応によりペプチドをピラゾロン試薬により標識することでペプチドグリコサミノグリカンの回収を評価した。(図4)。上段に示すように、エタノール沈殿を行わなければ、BEP 反応後に目的のペプチドは検出できないが、エタノール沈殿を行うことで、

ペプチドグリコサミノグリカンが効率的にエンリッチできていることが明らかとなった。さらに PMP 標識ペプチドの MSMS 解析により、プロテオグリカンの糖鎖結合位置を同定できた。

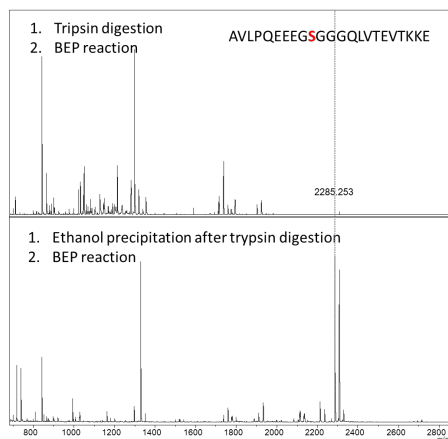


図4 . ペプチドグリコサミノグリカンのエタノール沈殿によるエンリッチ

さらにコンドロチナーゼを用いてグリコサミノグリカンを二糖単位へと消化した後、BEP 反応の結果、硫酸基を二つ有する六糖構造を検出できた (図 5)

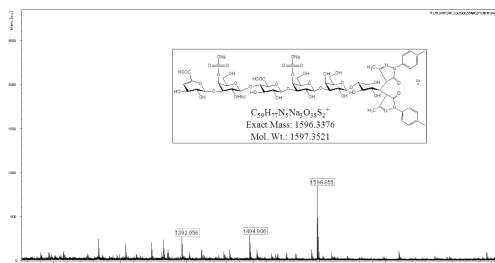


図5 . 六糖橋渡し構造の MALDI TOF-MS スペクトル

さらに、コンドロチナーゼにより切断した GAG 二糖をグリコプロッティング法により精製し HPLC 分析した結果、CS-0S および CS-4S が主成分であることが判明した(図 6)

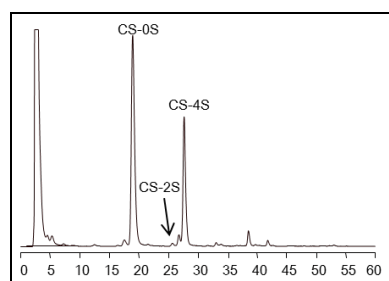


図6 . GAG 二糖の HPLC 解析

以上より、BEP 反応とグリコプロッティン

グ法によりプロテオグリカンの共通六糖橋渡し構造、GAG 二糖構造、および糖鎖結合部位を一度に解析する方法を開発した。

(3) 蛍光基導入ピラゾロン試薬の合成は達成し、糖鎖標識後の蛍光も確認できている。しかし、新規蛍光基導入ピラゾロン試薬の溶解性が低いためこれまで行ってきた BEP 反応条件を用いることができません、今後さらに詳細な反応条件を検討する必要があります。

<引用文献>

Don M. Carlson, Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J. Biol. Chem.* 1968, 243, 616-626.

Jun-ichi Furukawa, Naoki Fujitani, Kayo Araki, Yasuhiro Takegawa, Kota Kodama, and Yasuro Shinohara, A Versatile Method for Analysis of Serine/Threonine Posttranslational Modifications by β -Elimination in the Presence of Pyrazolone Analogues, *Anal. Chem.*, 83 (23), 2011, 9060-9067.

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 6 件)

Jun-ichi Furukawa, Masumi Tsuda, Kazue Okada (1 番目 / 7 人中) Comprehensive glycomics of a multistep human brain tumor model reveals specific glycosylation patterns related to malignancy, 査読有, *Plos ONE*, in press <http://www.plosone.org/>

古川潤一、篠原康郎、総合グライコミクスで細胞を記述する、査読無、*化学と生物*, in press

http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/

古川潤一、岡田和恵、篠原康郎、糖タンパク質および糖脂質の糖鎖の新たな解析手法の開発 - ウシ乳グライコム解析への応用 - 、査読無、*応用糖質科学*, 4, 295-301 (2014)

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009893014>

Jun-ichi Furukawa, Naoki Fujitani, Yasuro Shinohara, Recent Advances in Cellular Glycomic Analysis, *Biomolecules*, 3, 査読無, 198-225 (2013), DOI: 10.3390/biom3010198

Yasuro Shinohara, Naoki Fujitani, Jun-ichi Furukawa, Total Cellular Glycomics: A Glycomic Approach to Describe Cells and Streamline the

Discovery Process for Cellular Biomarkers, 査読有, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 25(143), 103-116 (2013), <http://www.fcca.gr.jp/TIGG/> Naoki Fujitani, Jun-ichi Furukawa, Kayo Araki (2 番目/12 人中) Total cellular glycomics allows characterizing cells and streamlining the discovery process for cellular biomarkers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有 110 (6), 2105-2110 (2013), DOI: 10.1073/pnas.1214233110

〔学会発表〕(計 8 件)

古川潤一、マイクロ波支援ピラゾロン共存下 脱離反応による O 結合型糖鎖の解析、グライコバイオロジクス研究会、2014 年 11 月 1 日、臨床研究情報センター(兵庫県、神戸市)

Jun-ichi Furukawa, Masumi Tsuda, Kazuo Okada, Taichi kimura, Jinhua Piao, Shinya Tanaka, Yasuro Shinohara, Glycomic analysis of human astrocytes establishes causal relationship between altered glycosylation and deregulated cellular pathways, 未来創薬・医療イノベーション拠点形成国際シンポジウム、2014 年 9 月 4 日～5 日、北海道大学(北海道、札幌市)

古川潤一、藤谷直樹、荒木香代、岡田和恵、朴錦花、藤岡剛、中村幸夫、篠原康郎、ES/iPS 細胞の糖鎖の網羅的解析、日本生化学会、2014 年 8 月 10 日～12 日、名古屋大学(愛知県、名古屋市)

古川潤一、藤谷直樹、朴錦花、岡田和恵、篠原康郎、ピラゾロン共存下マイクロ波支援 脱離反応による迅速な O 結合型糖鎖の解析法、日本生化学会、2013 年 9 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

古川潤一、朴錦花、藤谷直樹、岡田和恵、篠原康郎、マイクロ波放射を用いたピラゾロン共存下マイクロ波支援 脱離反応による迅速な O 結合型糖鎖の解析法、日本糖質学会、2013 年 8 月 5 日～7 日、大阪国際交流センター(大阪府、大阪市)

古川潤一、藤谷直樹、朴錦花、篠原康郎、ピラゾロン共存下 脱離反応に基づく幹細胞の O 結合型糖鎖の解析、日本化学会、2013 年 3 月 22 日～25 日、立命館大学(滋賀県、草津市)

古川潤一、藤谷直樹、朴錦花、荒木香代、山田修平、坂入信夫、菅原一幸、篠原康郎、ピラゾロン共存下 脱離反応に基づく O 結合型糖鎖の新規解析法、日本生化学会、2012 年 12 月 14 日～16 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

古川潤一、朴錦花、藤谷直樹、荒木香代、坂入信夫、篠原康郎、ピラゾロン共存下 脱離反応による細胞 O 結合型糖鎖の定量解析、日本糖質学会、2012 年 9 月

17 日～20 日、鹿児島市民文化ホール(鹿児島県・鹿児島市)

〔図書〕(計 2 件)

Yasuro Shinohara, Jun-ichi Furukawa, Yoshiaki Miura, Springer Science, General Methods in Biomarker Research and their Applications, in presss DOI 10.1007/978-94-007-7740-8_23-1 Yasuro Shinohara, Jun-ichi Furukawa, Springer Protocols, Lectins, Methods Mol. Biol., 2014, 613(185-205) DOI: 10.1007/978-1-4939-1292-6_17

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 修飾基を遊離し、標識するための方法及びその方法のためのキット、修飾基の解析方法及び解析するためのキット並びに遊離糖鎖の標識方法

発明者: 篠原康郎、古川潤一

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 2013-115782

出願年月日: 2013 年 5 月 31 日

取得年月日:

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 潤一 (FURUKAWA, Jun-ichi)

北海道大学大・先端生命化学科学研究所・

特任助教

研究者番号: 30374193