

< 研究課題 >

**シアル酸結合様式を区別した N 結合型糖鎖解析による健康長寿マーカーの開発**

代表研究者 東京都健康長寿医療センター研究所 研究員 津元裕樹

**【まとめ】**

本研究課題は、N 結合型糖鎖解析法を確立し、それにより超百寿者に特徴的な糖鎖構造を明らかにすることを目的とする。期間内には、新規シアル誘導体化法と MALDI-MS を用いた血漿タンパク質 N 結合型糖鎖解析法を確立した。また、高分岐かつ高シアル酸糖鎖の増加とフコシル化の亢進が超百寿者に特徴的であることを明らかにした。以上により、糖鎖構造変化は健康長寿に関与し、健康長寿マーカーとしての可能性が示唆された。

**1. 研究の目的**

**1-1. 研究の背景**

少子高齢化社会において、介護などを必要としない自立生活が可能な“健康寿命”をいかにしてのばすかが大きな課題である。そのため、健康寿命を延長させるための病気の予防や生活習慣の改善などによる健康増進法の開発が期待される。そのような開発研究において、効果の指標となるバイオマーカーの存在は有用である。しかしながら、健康長寿に関するバイオマーカー（健康長寿マーカー）はない。

**1-2. タンパク質の糖鎖修飾**

タンパク質の糖鎖修飾は、分子認識、細胞間相互作用、タンパク質の局在、活性化、安定性などに重要な翻訳後修飾の一つである。糖鎖修飾は様々な酵素の働きによって制御されているため、その生合成は細胞の状態に左右されやすい。よって、老化や疾患などで変化するタンパク質の糖鎖構造変化を明らかにすることができれば、老化や疾患などの要因解明やバイオマーカー開発につながる事が期待される。

**1-3. これまでの研究成果と問題点**

そこで我々は、ヒトの健康長寿モデルと考えられる超百寿者（105歳以上）の血漿タンパク質の糖鎖解析から超百寿者に特徴的な糖鎖構造を明らかにすることができれば、健康長寿の要因解明あるいはバイオマーカー開発につながると考えた。

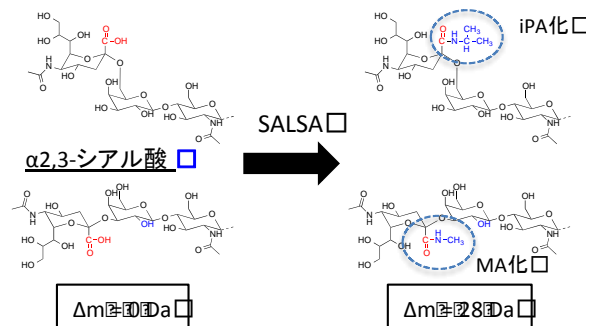
これまでに、液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析

(LC-ESI-MS) を用いた超百寿者の血漿タンパク質 N 結合型糖鎖解析を行い、高分岐かつ高シアル酸含有糖鎖の増加が超百寿者群に特徴的であることを明らかにした（参考論文1）。しかしながら、LC-ESI-MS は分析のスループット性が悪く、多検体での検証に向かないといった問題があった。また、シアル酸には主として  $\alpha$ 2,3-および  $\alpha$ 2,6-シアル酸の二つの結合様式が存在し、タンパク質の機能を調整している。よって、今後はそれらを区別して解析することが生物学的意義を明らかにするうえで重要である。しかしながら、LC-ESI-MS ではシアル酸の結合様式を区別することは困難であった。

**1-4. 新規シアル酸誘導体化法**

最近我々は、新規シアル酸誘導体化法である“Sialic Acid Linkage Specific Alkylamidation (SALSA)”を報告した（参考論文2）。SALSAは、 $\alpha$ 2,6-および  $\alpha$ 2,3-シアル酸のカルボン酸がアミンと反応してアミドを形成する際の反応性の違いを利用し、それぞれイソプロピルアミド (iPA) 化およびメチルアミド (MA) 化する方法である。これにより、 $\alpha$ 2,6-および  $\alpha$ 2,3-シアル酸の間で 28 Da の分子量差が生じるため、質量分析で容易に区別することを可能とした (Figure 1)。

**$\alpha$ 2,6-シアル酸 □**



**Figure 1.** 新規シアル酸誘導体化法“SALSA”の概略。

**1-5. 本研究課題の目的**

そこで本研究では、新規シアル酸誘導体化法“SALSA”と分析スループット性の高いマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析

(MALDI-MS) を組み合わせた N 結合型糖鎖解析法を確立し、これを用いた血漿タンパク質 N 結合型糖鎖解析により超百寿者に特徴的な糖鎖構造 (健康長寿マーカー) を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究方法と経過

### 2-1. 血漿サンプル

本研究では、高齢者を対象にした長期縦断的研究である SONIC 研究により収集・保管された血漿をサンプルとして用いた (東京都健康医療センター研究所倫理委員会 承認番号 17)。超百寿者群 (40 例、107.0±1.0 歳)、90 歳群 (40 例、89.9±1.2 歳)、80 歳群 (40 例、80.0±0.9 歳) および 70 歳群 (40 例、69.9±0.8 歳) から無作為に選択し、実験に用いた。

### 2-2. 血漿の前処理

Albumin & IgG Depletion SpinTrap (GE ヘルスケア社) を用い、血漿 25  $\mu$ L からアルブミンと IgG を除去後、タンパク質沈殿、再溶解、タンパク質定量を行い、糖鎖解析用サンプルとした。申請時とは計画を変更し、4 群の各 20 例 (合計 80 例) では使用しないこととした。

### 2-3. N 結合型糖鎖解析

本研究課題で確立したタンパク質 N 結合型糖鎖解析法の概略を Figure 2 に示す。糖鎖解析用サンプルを N-glycosidase F (Roche 社) で処理して N 結合型糖鎖を遊離させ、タンパク質 50  $\mu$ g 相当のサンプルを BlotGlyco ビーズ (住友ベークライト社) に添加して遊離糖鎖の固定化反応を行った。ビーズ上で SALSA によるシアル酸の誘導体化反応後、ビーズから糖鎖を再遊離させ、2-アミノ安息香酸 (AA) による糖鎖還元末端の誘導体化、アミドチップおよびカーボンチップによる AA 化糖鎖の精製を行い、質量分析用サンプルとした。

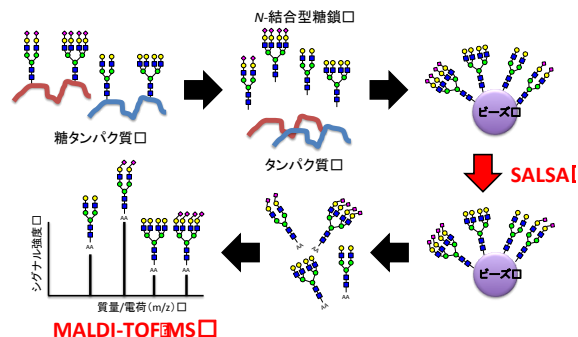


Figure 2. N 結合型糖鎖解析法の概略.

### 2-4. 質量分析

質量分析は MALDI-TOF/TOF 5800 (SCIEX 社) を用い、リフレクトロンネガティブイオンモードで行った。マトリックスは 2,5-ジヒドロ

キシ安息香酸、測定プレートは  $\mu$ Focus 700 $\mu$ m (Hudson Surface Technology 社) を用いた。

## 2-5. データ解析

質量分析により検出されたピークの  $m/z$  値 ( $[M-H]^-$ ) から糖鎖組成を推定し、検出されたすべての糖鎖ピークのピークエリアを算出した。また、その総和に対する各ピークの割合をピークエリア (%) として算出し、多変量解析ソフトウェア SIMCA (Umetrics 社) を用いて判別分析 (OPLS-DA) を行った。

## 3. 研究の成果

### 3-1. 再現性について

プール血漿 (70 歳群、9 例、アルブミン/IgG 除去なし) を用い、ビーズ上への糖鎖の固定化から MALDI-MS までの再現性について、3 回の実験 (n=2) で検討を行った。得られた MS スペクトルを Figure 3a に示す。また、ピーク強度の高さが上位 41 のピークについて、ピークエリア (%) と RSD (%) をプロットした (Figure 3b)。RSD (%) の幅は 1.7-22.8 (平均値 6.5) であり、ほとんどのピークは 15% 以内であったことから、再現性の良い分析法であることを実証できた。

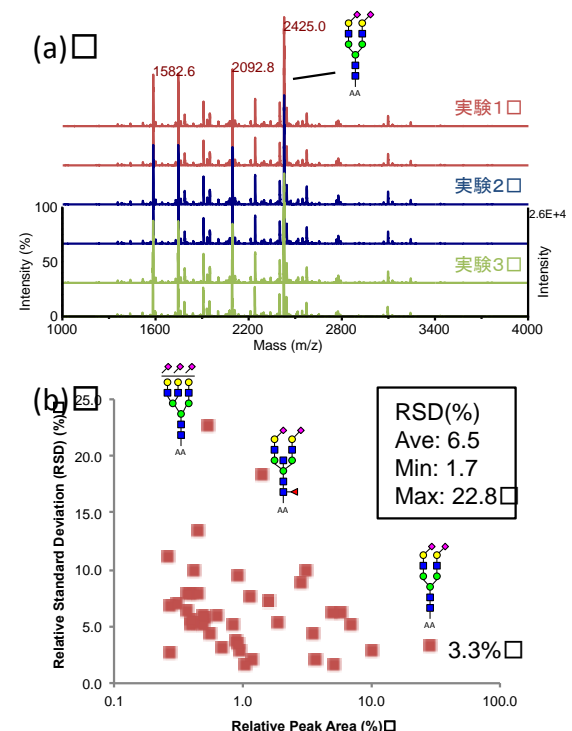


Figure 3. N 結合型糖鎖解析法の再現性.

### 3-2. アルブミン/IgG 除去前後の比較

IgG には三分岐以上の糖鎖は知られていない。よって、血漿タンパク質で含量の多いアルブミンと IgG を除去することにより、その他の

タンパク質が濃縮され、目的とする高分岐糖鎖（三分岐以上）の検出感度が向上すると考えた。2名の超百寿者血漿を例に、アルブミン/IgG除去前後のMSスペクトル ( $m/z$  3300-4300) を Figure 4 に示す。検出されたピークに違いはなかったが、予想通り、高分子領域のシグナル強度は、除去前と比較して除去後の方が約2倍高かった。よって、多くがこの領域に含まれる高分岐糖鎖を感度よく検出するにはアルブミン/IgG除去が有効であることが実証された。

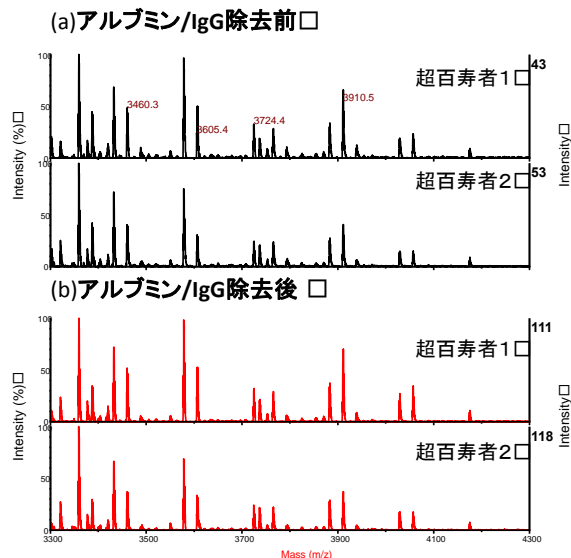


Figure 4. アルブミン/IgG 除去前後の MS スペクトル.

### 3-3. シアリダーゼ処理

検出された糖鎖ピークがシアル酸を含むかどうかを確認するため、シアリダーゼ処理前後のMSスペクトルを比較した (Figure 5)。その結果、シアル酸を含むと推定された糖鎖ピークはシアリダーゼ処理で消失した。一方、含まないと推定されたピークは消失しなかった。よって、シアル酸の有無に関して、推定された糖鎖組成が正しいことが証明された。

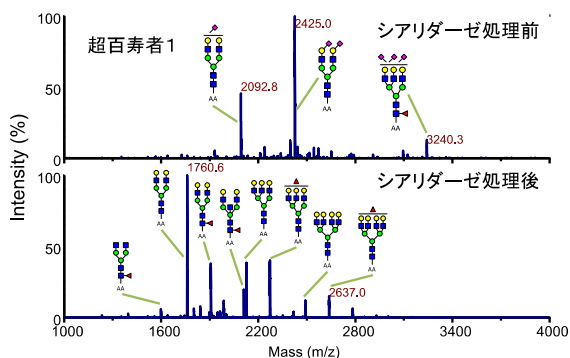


Figure 5. シアリダーゼ処理前後の MS スペクトル.

### 3-4. 検出された糖鎖ピークについて

アルブミン/IgG 除去後の血漿タンパク質 50  $\mu\text{g}$  を用いて糖鎖解析を行った結果、96 の糖鎖ピークが検出された。そのうちの 72 ピーク (75%) がシアル酸を含んでいることがわかった。また、72 ピークのうち、 $\alpha$ 2,3-シアル酸のみを含む糖鎖が 15 (21%)、 $\alpha$ 2,6-シアル酸のみを含む糖鎖が 29 (40%)、 $\alpha$ 2,3-/ $\alpha$ 2,6-シアル酸を含む糖鎖が 28 (39%) であった。

### 3-5. 多変量解析

本研究期間内では申請時から検体数を追加し、超百寿者群 (20 例) と 70 歳群 (20 例) の MS データを取得した。そこで、これらのデータ用い、判別分析 (OPLS-DA) を行った (Figure 6)。その結果、超百寿者群と 70 歳群がスコアプロットによりよく分離されることが明らかになった。また、ローディングプロットから、その分離に寄与する 28 種類の糖鎖ピークが明らかになった ( $pq[1]/SE > 1.5$  とした場合)。

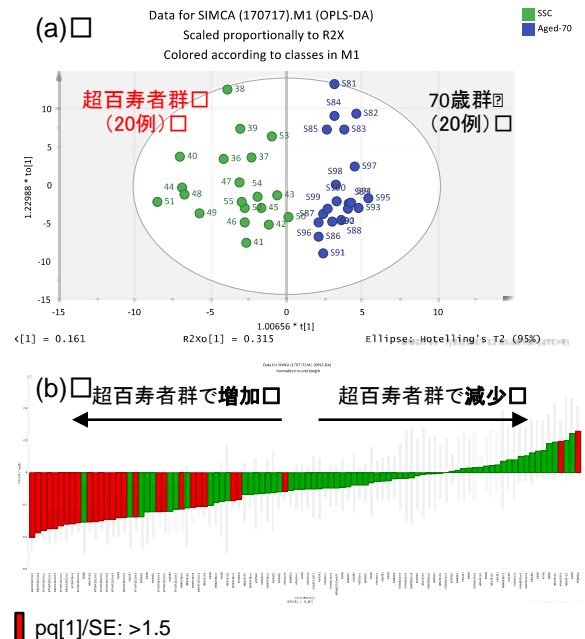


Figure 6. 多変量解析の結果. (a)スコアプロット. (b) ローディングプロット.

超百寿者群で増加した 26 種類、および減少した 2 種類の糖鎖ピークについて、その推定構造を Figure 7 に示す。

先行研究 (参考論文 1) と同様、超百寿者群では三分岐以上で三つ以上のシアル酸を有する 17 種類の糖鎖 (赤枠) が増加することが明らかとなった。先行研究とは異なる血漿サンプルと分析手法にも関わらず、同様の結果が得られたことから、高分岐かつ高シアル酸糖鎖の増加は、健康長寿に大きく関与する可能性が示唆された。

また、本研究結果では、フコース (赤色▲)

を有する 23 種類の糖鎖が検出され、フコシル化が亢進している可能性も示唆された。フコシル化の割合をピークエリア比から算出した結果、2 倍以上に増加していた糖鎖は 7 種類あり、すべて三分岐以上であった。よって、シアル酸と同様、高分岐糖鎖におけるフコシル化の増加が健康長寿に関与する可能性が示唆された。

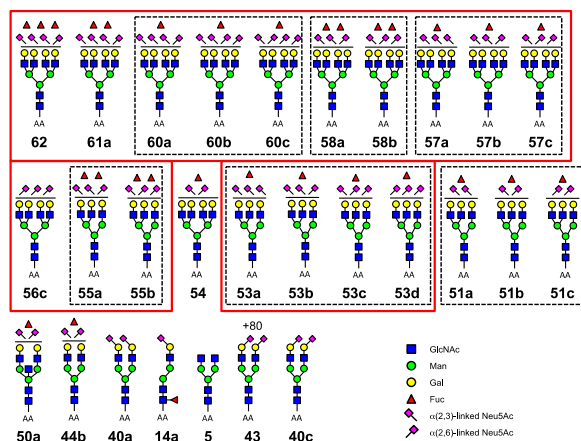


Figure 7. 超百寿者群に特徴的な糖鎖の推定構造。

### 3-6. 96 ウェルプレートを用いた多検体同時処理

本研究課題では、前処理のスループット化を目指し、96 ウェルプレートを用いた多検体同時処理について検討を行った。プール血漿 (70 歳群、9 例、アルブミン/IgG 除去なし) を用い、BlotGlyco ビーズによる糖鎖固定化などを 96 ウェルプレートで行った。その結果、従来法の結果 (Figure 3a) と同様のピークを二つのプレート間では再現性よく検出できた (Figure 8)。しかしながら、従来法と比較して、シグナル強度が約 1/10 しか得られず、本研究期間内ではデータ解析まで行うことが出来なかった。

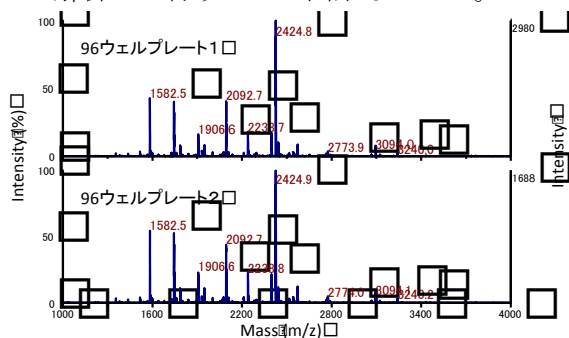


Figure 8. 96 ウェルプレートの再現性。

### 3-7. まとめ

本研究では、新規シアル酸誘導体化法“SALSA”と MALDI-MS を組み合わせた N 結合型糖鎖解析法を確立した。また、確立した解析法を用い、以前の研究と合わせて超百寿者群 (20 例) と 70 歳群 (20 例) の糖鎖解析を行っ

た。多変量解析の結果、高分岐かつ高シアル酸糖鎖の増加とフコシル化の亢進が超百寿者に特徴的であることが明らかになった。以上の結果より、これらの糖鎖構造変化が健康長寿に関与し、健康長寿マーカーとしての可能性が示唆された。

## 4. 今後の課題

糖鎖に着目した健康長寿マーカーを開発するためには、糖鎖構造変化の生物学的意義を明らかにする必要がある。そのためには、糖鎖が付加されるタンパク質および修飾部位までを明らかにする必要がある。今後は糖ペプチドで解析できる分析手法を開発し、糖鎖構造変化と健康長寿の関連を明らかにしていきたい。

## 5. 研究成果の公表方法

本研究に関連する研究成果を以下の学会で発表した (予定も含む)。また、原著論文として学術誌へ投稿する予定である。

### 【学会発表】

1. Tsumoto, H.; Nishikaze, T.; Hashii, N.; Abe, Y.; Arai, Y.; Iwamoto, S.; Ishii-Watababe, A.; Hirose, N.; Tanaka, K.; Miura, Y.; Endo, T. MALDI-TOF MS analysis of *N*-glycans on plasma proteins from Japanese semisupercentenarians. 第 40 回日本基礎老化学会大会、名古屋、2017.6.14-16.
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. (予定)

## 6. 参考論文

1. Miura, Y.; Hashii, N.; Tsumoto, H.; Takakura, D.; Ohta, Y.; Abe, Y.; Arai, Y.; Kawasaki, N.; Hirose, N.; Endo, T. Change in *N*-Glycosylation of Plasma Proteins in Japanese Semisupercentenarians. *PLoS One*. **2015**, *10*, e0142645.
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.* **2017**, *89*, 2353–2360.