研究結果報告書

2019 年 12 月 30 日

＜研究課題＞　糖鎖を利用した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】

本研究課題では、質量分析を基盤とする独自の N-結合型糖鎖解析法を用い、長期縦断追跡調査で得られた 105 歳以上、90 歳、80 歳および 70 歳群の糖鎖解析を行った。年齢および炎症マーカーと組み合わせて多変量解析を行った結果、糖鎖の変化が加齢および炎症マーカー増加と相関することがわかった。これにより、糖鎖の変化が炎症に対する防御機構の一つである可能性、また、健康長寿マーカーになる可能性が示唆された。

１．研究の目的

超高齢化社会を迎えた現代において、自立生活が可能な“健康寿命”をいかにして延ばすかが大きな課題であり、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では効果の指標となるバイオマーカーが必要とされる。しかしながら、健康長寿を反映するバイオマーカー（健康長寿マーカー）は確立されていない。

タンパク質翻訳後修飾の一つである糖鎖修飾は、分子認識、細胞間相互作用、タンパク質の局在、活性化、安定性などに重要である。糖鎖修飾は様々な酵素により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ことが期待される。

そこで本研究では、質量分析を基盤とする独自の N-結合型糖鎖解析法を用いて長期縦断追跡調査で得られた高齢者の血漿検体の糖鎖解析を行い、糖鎖構造変化と加齢や炎症マーカーとの関連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　血漿検体

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（http://www.sonic-study.jp/）により収集・保管された血漿を用いた（東京都健康医療センター研究所倫理委員会 承認番号 17）。その中より、臨床情報としてアルブミン、C-reactive protein（CRP）、interleukin-6（IL-6）、tumor necrosis factor-α（TNF-α）の情報が付与された超百寿者群（20 例、106.4±0.7 歳）、90 歳群（20 例、89.3±1.0 歳）、80 歳群（20 例、80.2±0.9 歳）および 70 歳群（20 例、70.0±0.7 歳）を解析に用いた。

2-2　N-結合型糖鎖解析

血漿 35～50 μL から Albumin & IgG Depletion SpinTrap（GE ヘルスケア社）を用いてアルブミン・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。

タンパク質の N-結合型糖鎖解析法の概略を図 1 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 μg 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。ビーズ上でシアル酸結合様式特異的アルキルアミド化（SALSA）（*Anal. Chem.* **2017**, *89*, 2353-2360）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。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 μFocus 700μm（Hudson Surface Technology 社）を用いた。

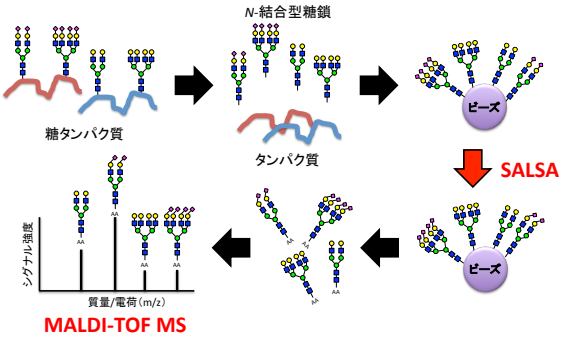

図 1. N-結合型糖鎖解析法の概略.

2-3　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 SIMCA16（Umetrics 社）を用いて多変量解析を行った。

３．研究の成果

3-1　シアル酸誘導体化反応の最適化

最近、代表研究者らが開発したシアル酸誘導体化法 SALSA（従来法）をより簡便に改良した方法として “aminolysis-SALSA”（改良法）が報告された（*Anal. Chem.* 2018, *90*, 13193–13199）。多検体処理において前処理の簡便化は重要な課題である。そこで、サンプルとして 70 歳のヒト血漿 10 例の混合血漿を用い、従来法と改良法の比較を行った。最もピーク強度の高い m/z 2425 を 100 としてノーマライズし、各ピークの割合を算出し、強度の高い 35 種の糖鎖についてピークエリア比をまとめた（図２）。その結果、ほとんどの糖鎖ピークについて従来法と改良法で大きな差がないことがわかった。そこで本研究では、改良法を用いて解析することとした。

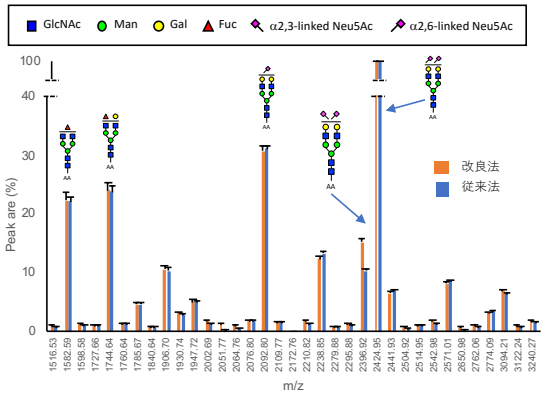

図 2. SALSA-AA 化糖鎖のピークエリア比の比較.

3-2　N-結合型糖鎖解析

アルブミン・IgG 除去前および除去後のヒト血漿タンパク質から得られた N-結合型糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトルを図３に示す。これまでの研究により、96 種類の糖鎖ピークが検出されることがわかっていた（三井住友海上福祉財団 2016 年度［高齢者福祉］助成研究結果報告 No. 12）。本研究でもこれらを解析対象として各糖鎖のピークエリア比を算出し、多変量解析を行った。

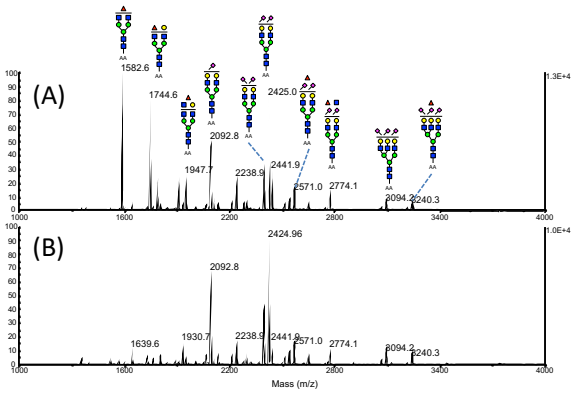

図 3. ヒト血漿糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトル. アルブミン・IgG 除去前（A）および除去後（B）.

3-3　多変量解析（１）: MOCA

本研究課題では、研究期間内に取得したアルブミン・IgG 除去後のデータ（80 検体）に加え、これまでに取得した同一検体の除去前のデータ（80 検体）も併せて解析した。

まず最初に、糖鎖データと臨床データの相関を検討するため、マルチブロック直交成分分析（MOCA；Multiblock Orthogonal Component Analysis）を行った。MOCA のスコアプロットを図４に示す。アルブミン・IgG 除去の前後に関わらず、4 群が良好に分離できることがわかった。

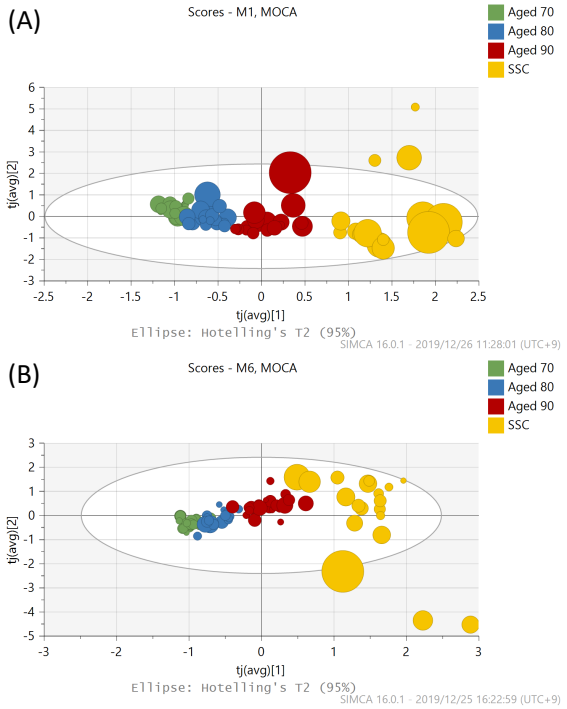

図 4. MOCA のスコアプロット. アルブミン・IgG 除去前（A）および除去後（B）.

そこで、図５に示すローディンプロットを確認したところ、炎症マーカー（●：CRP、IL-6、TNF-α）の増加と多くの糖鎖（●）の増

加が相関していることがわかった。このことは、加齢に伴って慢性的な炎症状態になりながらも糖鎖構造変化により炎症に対応している可能性を示唆するものである。一方、加齢によって減少することが知られているアルブミンはこれらの糖鎖とは負の相関を示していた。このことは、本解析モデルの有用性を示す結果と考えられる。

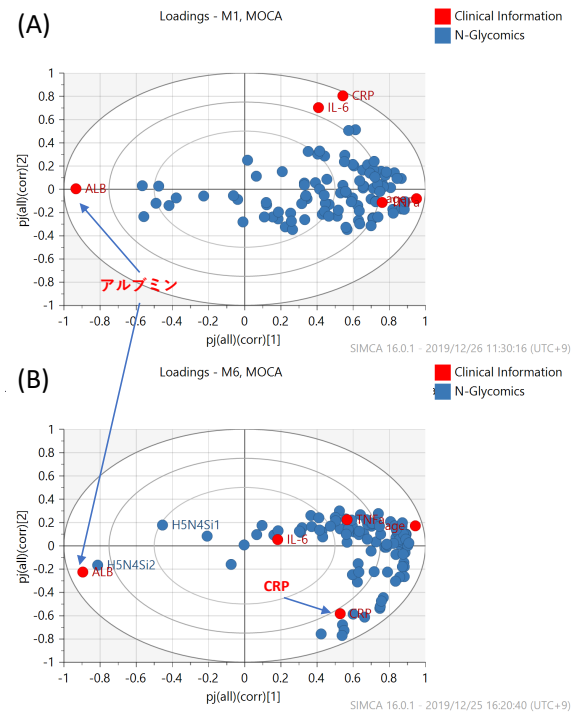

図 5. MOCA のローディンプロット．アルブミン・IgG 除去前（A）および除去後（B）．

3-4　多変量解析（２）：OPLS-DA

次に、MOCA で最も分離していた超百寿者群（SSC、●）と 70 歳群（●）のデータを用いて判別分析（OPLS-DA）を行った。OPLS-DA のスコアプロットおよび S-プロットをそれぞれ図 6 と図 7 に示す。

図 6 のスコアプロットより、アルブミン・IgG 除去の前後に関わらず、超百寿者群（SSC、●）と 70 歳群（●）が良好に分離できることがわかった。そこで、図 7 の S-プロットからその分離に寄与している糖鎖を調べた。信頼性の高い糖鎖を抽出するため、縦軸 p(corr)[1]の絶対値 0.8 以上かつ横軸 p [1]の絶対値 0.03 以上と設定した。その結果、アルブミン・IgG 除去前では 17 種類（図 7A、●）、除去後では 31 種類（図 7B、●）が超百寿者群に特徴的な糖鎖として抽出された。

特に、最も分離に寄与しているとされる赤矢印で示した糖鎖はアルブミン・IgG 除去前後で同一の糖鎖であった。超百寿者群でその割合が増加することから健康長寿マーカー候補として有用である可能性が示唆された。

将来的にさらに多検体で解析をする場合、前処理としてアルブミン・IgG 除去を行うことは費用と処理時間の問題がある。今回の結果は、より簡便でスループット性の高い検証実験が可能になる可能性を示唆している。

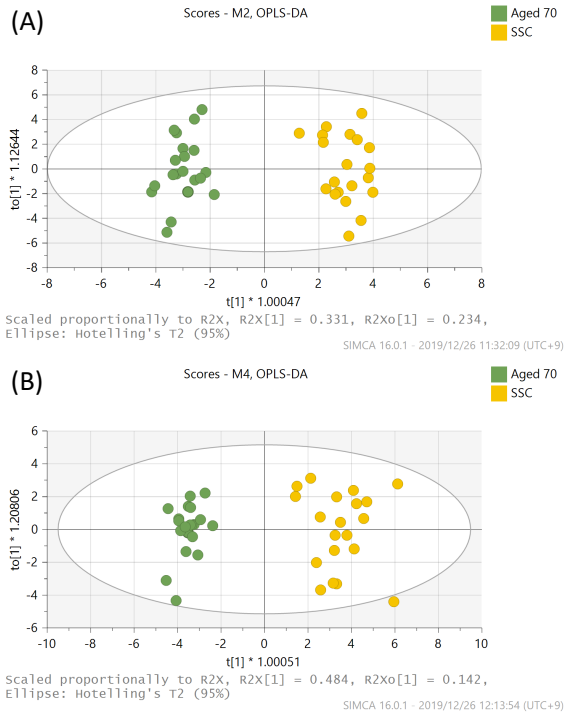

図 6. OPLS-DA のスコアプロット．アルブミン・IgG 除去前（A）および除去後（B）．

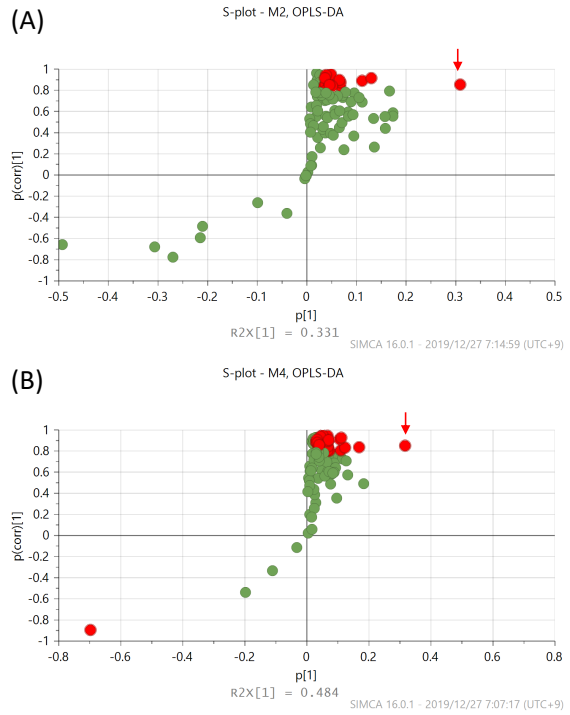

図 7. OPLS-DA の S-プロット．アルブミン・IgG 除去前（A）および除去後（B）．●：縦軸 p(corr)[1]の絶対値 0.8 以上かつ横軸 p [1]の絶対値 0.03 以上

４．今後の課題

本研究課題で明らかになった糖鎖が付加されるタンパク質および修飾部位を同定し、その糖鎖構造変化の生物学的意義を明らかにすることが課題である。そのためにも、今後は“糖ペプチド”として解析していくことが必要不可欠である。それにより、より信頼性の高い健康長寿マーカーの開発に発展させていきたいと考えている。

５．研究成果の公表方法

本研究に関連する研究成果は国内外での学会発表をするとともに、原著論文として学術誌へ投稿する予定である。

以上