

ムチン型糖鎖を利用した新規バイオマーカーの探索

若尾 雅広

鹿児島大学 学術研究院理工学域工学系

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-40

TEL: 099-285-7843

要旨

本邦において、がんは死亡原因の第1位であり、早期発見による早期治療が求められている。がん関連糖鎖抗原（TACA）に分類される糖鎖は、がんの早期診断のバイオマーカーとして、また、がんワクチン標的として期待されている。しかし、早期発見・治療につながる TACA は依然として見出されていない。一方、ムチン型糖鎖に分類される O-結合型糖鎖 TACA は、細胞や組織のがん化や炎症に伴って糖鎖構造が大きく変化することが知られている。シアリル Tn 糖鎖抗原やシアリルルイス X 糖鎖抗原は O-結合型糖鎖 TACA の一つであり、がんマーカーとして広く利用されている。また糖鎖伸長不全で生合成されるムチン型母核構造も、がんなどの疾患に伴って生じることから、バイオマーカーとしての利用が期待されている。しかし、上記抗原に比べ発現量が少ないことからほとんど調べられていない。そこで本研究では、糖鎖身長不全で発現すると考えられるシアル酸含有母核構造糖鎖を調製し、調製した糖鎖がバイオマーカーの分析に利用できるか評価した。

1. 緒言

糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖であり、すべての細胞上に見られる生体分子である。細胞表面の糖鎖は、細胞間の認識において「顔」の役割を果たす¹。また近年、注目されているエクソソームなどの細胞外微粒子上も糖鎖が存在しており、糖タンパク質上の糖鎖と同様に、生体内では輸送用タグとして働く²。細胞表面や細胞外微粒子上、タンパク質上に発現する糖鎖の構造は、炎症や疾患などの生体内状況によって大きく形を変えることから、糖鎖をバイオマーカーとして利用する研究開発が国内外を問わず広範に検討されている。

糖タンパク質に見られる N-型糖鎖においては、糖タンパク質の酵素処理によって N-型糖鎖を遊離させることができ、また 2-ピリジルアミノ（PA）化などの蛍光標識法³、液体クロマトグラフィー-質量分析を用いた構造解析法が確立されており、組織、血清、尿など多種多様なサンプルでの解析が進んでいる⁴。近年では、膵がんなどのがんマーカーとしてフコシル化ハプトグロビンが見出されており⁵、臨床応用を目指した研究も行われている。

一方、ムチン型糖鎖などの O-型糖鎖においては、ヒドラジン分解などの O-型糖鎖を確実に遊離できる方法がある⁶ものの、爆発等の危険性を伴うことに加え、糖鎖の分解が起こるため、いまだ簡便かつ効率良く糖鎖を遊離させる方法がない。そのため N-型糖鎖の解析に比べ O-型糖鎖の解析は大きく遅れている。近年、酵素的または化学的に合成された O-型糖鎖を用いた糖鎖マイクロアレイが開発されている⁷が、簡単に合成できる糖鎖構造のみで解析されており、ムチン型糖鎖の母核

構造においては、ほとんど解析されていない。またバイオマーカーとしての活用も行われていない。

筆者らのグループでは、母核構造の簡便な合成法の開発に向け、種々の母核構造を系統的に合成できる二糖中間体を設計・合成している (Fig.1)。これまでの研究では、この二糖中間体を用いることで、コア3構造やコア5構造などのムチン型糖鎖が合成可能で、また合成した糖鎖を糖鎖リガンド複合体に誘導後、糖鎖チップを作製することで表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーなどのバイオセンサーで相互作用解析が行えること報告している⁷⁾。本研究では、二糖中間体を利用したシアル酸含有母核構造の合成を行い、糖鎖リガンド複合体へ誘導後、シアル酸含有母核構造を固定化した糖鎖チップの調製や糖鎖固定化ナノ粒子の調製などを行い、バイオマーカーとして使用できるか評価した。

2. 結果と考察

2.1 シアル酸含有母核構造ならびに糖鎖リガンド複合体の調製

既報⁷⁾の方法にしたがい、ガラクトサミン (GalNAc) 成分、グルコース (Glc) 成分を用いて二糖中間体を調製した (Fig.1)。続いて、シアリル Tn 構造を持つ糖鎖の合成を行った。二糖中間体に *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) 成分または *N*-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を反応させ、適宜、保護基の変換、除去を行うことで、NeuAc-Tn 構造または NeuGc-Tn 構造を有する三糖を合成した。次に、シアリルコア3構造とシアリルコア5構造の合成を行った。二糖中間体に対して、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 成分、*N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) 成分を反応させ、すべての保護基を除去することで、NeuAc-Core3 構造を有する四糖を合成した。同様に、GalNAc 成分、NeuAc 成分を反応させることで、NeuAc-Core5 構造を有する四糖を合成した。

次に、得られたシアル酸含有母核構造を用いてリンカー成分との還元アミノ化によって糖鎖リガンド複合体の合成を行った (Fig.2)。なおリンカー成分に含まれるチオクト酸成分はジスルフィド結合を持っており、金などの金属成分との金属-硫黄結合により種々の金属成分に固定化すること

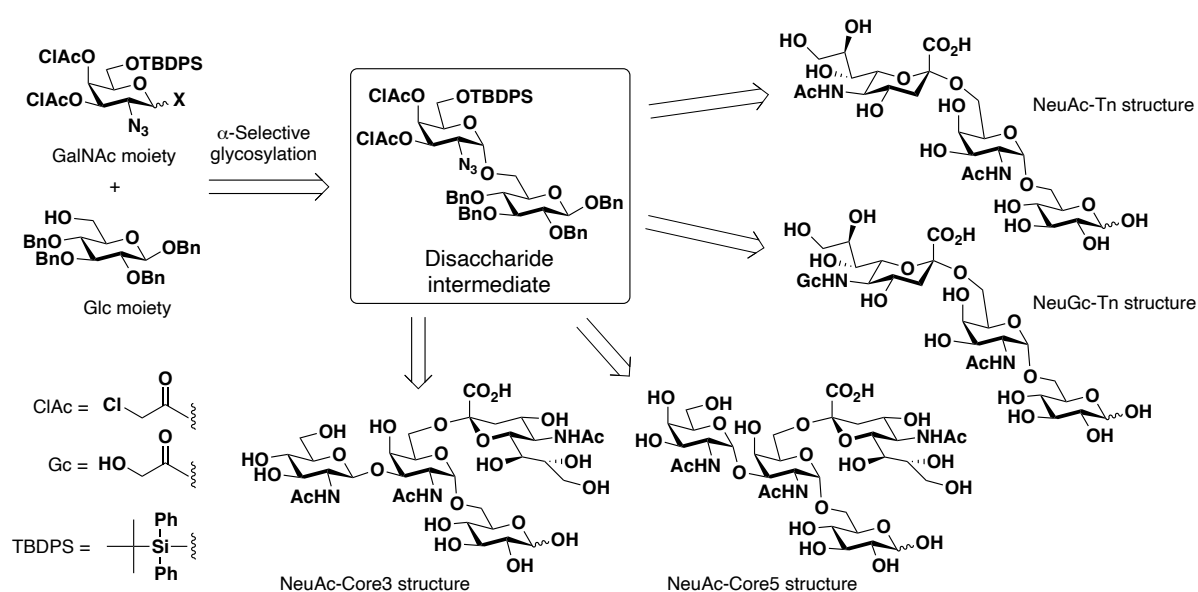


Fig.1. Synthesis of sialylated mucin core structure.

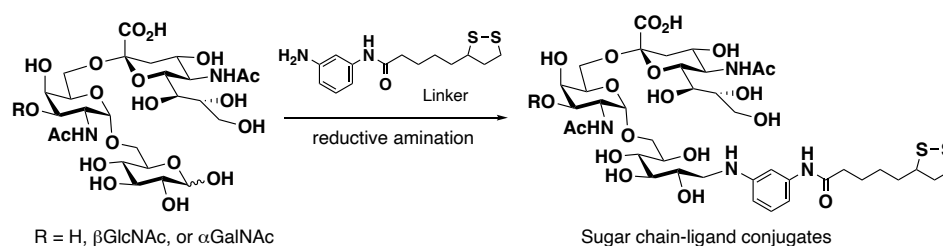


Fig.2. Synthesis of sugar chain-ligand conjugates containing mucin core structure.

ができる。シアル酸含有母核構造を持つ糖鎖とリンカー成分との還元アミノ化は、*N,N*-ジメチルアセトアミド、水、酢酸（10:10:1）の混合溶媒中、還元剤にシアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いて行い、良好な収率で目的の糖鎖リガンド複合体を調製することができた。

2. 2 糖鎖固定化金ナノ粒子の調製

酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）による糖鎖-タンパク質相互作用解析を行うため、ELISA に使用する糖鎖固定化金ナノ粒子（SGNP）の合成を行った。本実験では、ELISA プレート表面にクリック反応を用いて SGNP を固定化することから、アジド基を有する N_3 -SGNP を調製した (Fig.3A)。SGNP の合成法⁸⁾にしたがって、金イオンを水素化ホウ素ナトリウムで還元して GNP を調製し、その後、糖鎖リガンド複合体およびアジド基成分（ N_3 -TA）を加えて N_3 -SGNP を合成した。合成した N_3 -SGNP の粒径を透過型電子顕微鏡（TEM）、動的光散乱（DLS）法を用いて解析したところ、SGNP と同程度の粒子サイズを持つことがわかった (Fig.3B、C)。また糖鎖の固定化については、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-質量分析（MALDI-MS）を用いて定性的に評価した。その結果、固定化した糖鎖リガンド複合体に対応する分子イオンピークが観察されたことから、合成したシア

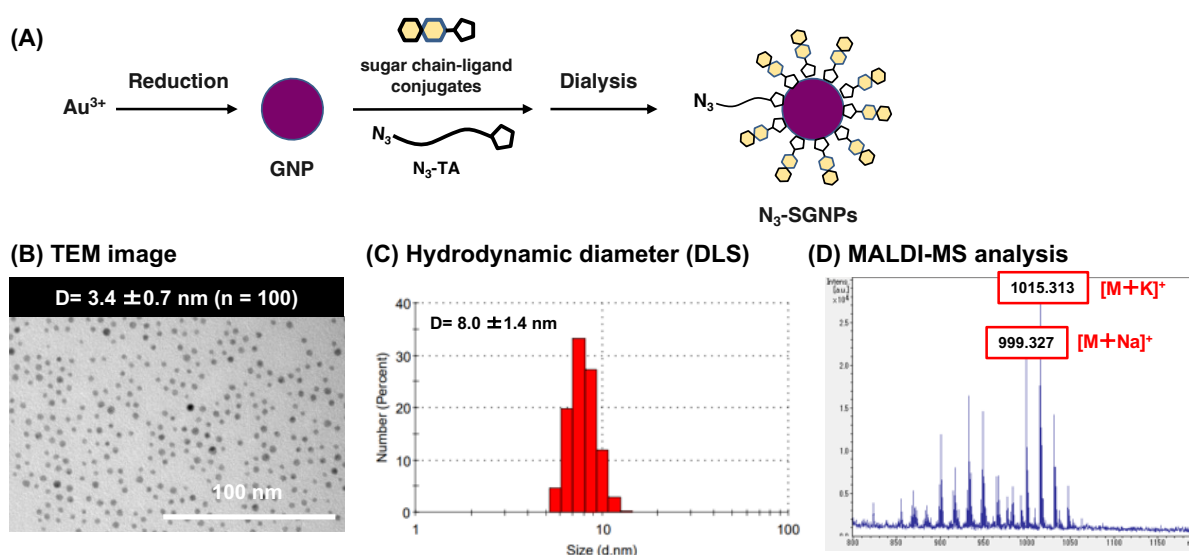


Fig.3. Preparation and characterization of N_3 -SGNPs with mucin core structure. (A) Synthetic procedure of N_3 -SGNPs. (B) TEM image of N_3 -SGNPs with NeuAc-Tn ligand conjugate. (C) DLS analysis of N_3 -SGNPs with NeuAc-Tn ligand conjugate. (D) MALDI-MS analysis of N_3 -SGNP with NeuAc-Tn ligand conjugate.

ル酸含有母核構造の糖鎖リガンド複合体についても、これまで通りの方法で固定化できることがわかった (Fig.3D)。

2.3 糖鎖-タンパク質相互作用解析

2.3.1 SPR イメージングを用いたタンパク質相互作用解析

先に合成した糖鎖リガンド複合体を用いてアレイ型糖鎖チップを作製し、その後、SPR イメージング装置を用いて糖鎖-タンパク質相互作用を解析した。糖鎖には、十分な量を確保できた 4 種の糖鎖リガンド複合体 (NeuGc-Tn、NeuAc-Tn、NeuAc-Core3、Tn) とコントロール糖鎖として NeuAc2-6Lac を使用した。糖鎖結合性タンパク質には、ヘキソサミン結合性の小麦胚芽凝集素 (WGA)、シアル酸結合性のニワトコ樹皮レクチン (SNA) と Siglec14-Fc キメラタンパク質 (Siglec14) を、糖鎖非結合性タンパク質にはウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。解析結果を Fig.4 に示す。WGA は Tn 糖鎖に対して弱いながら結合性を示した。シアル酸結合性レクチンである SNA においては、特異的な結合が観察されなかった。これまでの実験においても、糖鎖長の短い糖鎖を固定化した糖鎖チップに対しては結合性が得られていないことから、シアル酸含有母核構造においても結合性が観測されなかったと考えられる。一方、Siglec14 においては、測定したすべての糖鎖構造で結合性が見られた。Siglec14 は細胞接着に関与する受容体であるため、O 型、N 型の糖鎖を幅広く認識すると考えられる。

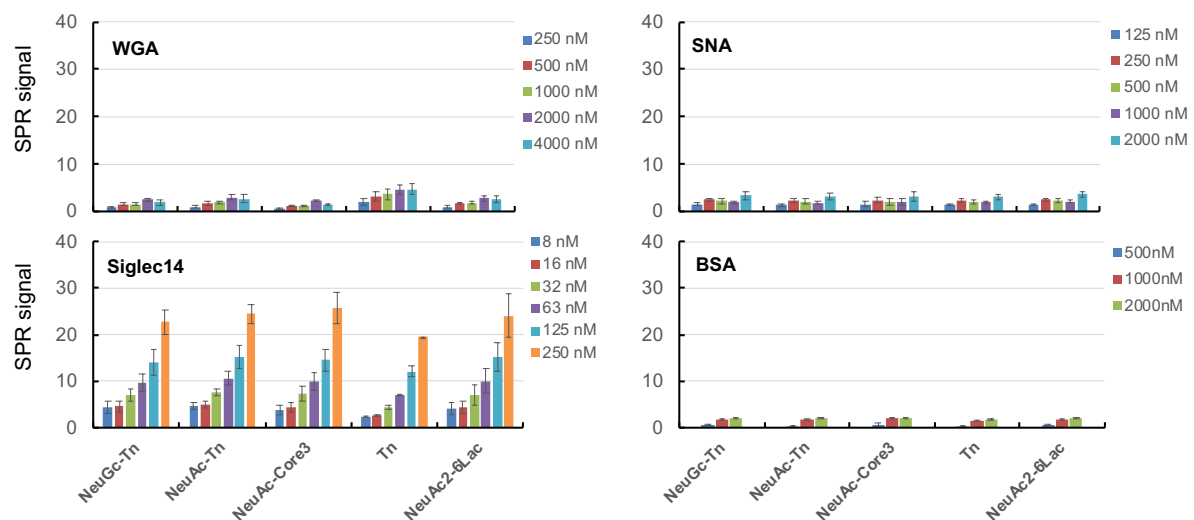


Fig.4. SPR imaging analysis.

2.3.2 ELISA を用いたタンパク質相互作用解析

SPR イメージングでシアル酸含有母核構造の糖鎖相互作用が確認されたことから、続いて、ELISA による糖鎖結合性評価について検討した。本実験では方法の最適化を行った。糖鎖には、NeuGc-Tn、NeuAc-Tn、Tn、Gal、Glc の 5 種を用いた。市販の 96 穴プレートにアルキン修飾後、N₃-SGNPs の固定化を行った。その後、ビオチン標識レクチンを作用させ、西洋ワサビセルオキシダーゼ (HRP) -ストレプトアビジン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) で処理し発色させた。N₃-SGNPs の固定化量を検討したところ、GNP 濃度が 0.37 nM (×135) においても十分なシグナル感度を得るこ

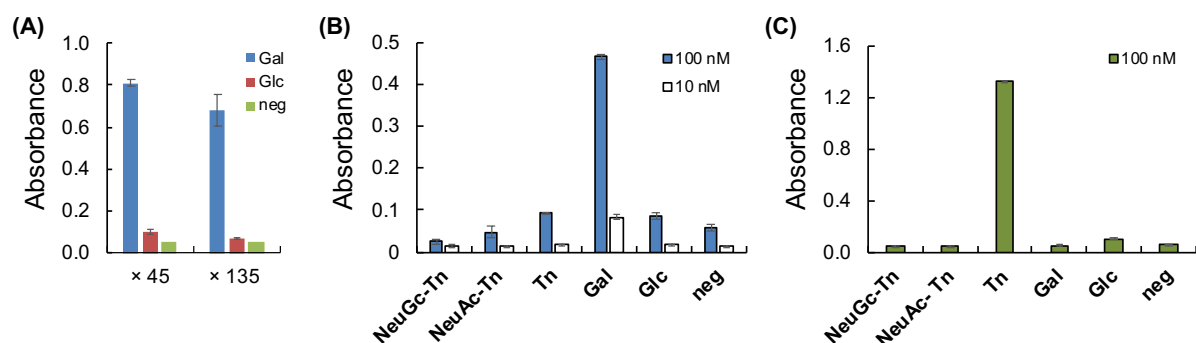


Fig.6. Glycan-protein interaction analysis by ELISA method with SGNPs. (A) Optimization of N₃-SGNP concentration. (B) Interaction analysis with PNA. (C) Interaction analysis of WGA.

とができた。続いて、糖鎖特異性の高いレクチンを用いて、特異性評価が可能か検討した。Gal 結合性を示すピーナッツ凝集素 (PNA) と WGA を用いて検討したところ、それぞれの糖に対して特異的な発色が見られた。また SPR イメージングに比べ低濃度での評価ができることがわかった。

3. 結論

本研究では、系統的合成法を用いてムチン型糖鎖であるシアル酸含有母核構造糖鎖の合成について検討した。その結果、新たに4種の糖鎖リガンド複合体を合成することができた。また合成した糖鎖を糖鎖チップと N₃-SGNPs に誘導し、SPR イメージングによる相互作用解析ならびに ELISA による相互作用解析を行った。その結果、ELISA 解析では、SPR イメージング解析より高感度で相互作用解析が可能であることが明らかとなった。今後、ELISA の最適化を進め、ムチン型糖鎖を活用したバイオマーカーの探索を行う予定である。

4. 謝辞

本研究を実施するにあたり、研究助成を頂いた公益財団法人サンケイ科学振興財団に厚く感謝申し上げます。また研究協力を頂いた増永成菜氏、橋口充紀氏に深く感謝申し上げます。

5. 引用文献

1. Varki A., Cummings R. D., Esko J. D., Stanley P., Hart G. W., Aebi M., Mohnen D., Kinoshita T., Packer N. H., Prestegard J. H., Schnaar R. L., Seeberger P. H. (Editors): Essentials of Glycobiology, 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022, NY.
2. Batista B. S., Eng W. S., Pilobello K. T., Hendricks-Muñoz K. D., Mahal L. K.: Identification of a conserved glycan signature for microvesicles, J. Proteome Res. 10, 4624-4633 (2011).
3. Hase H., High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides, Methods Enzymol., 230, 225-237 (1994).
4. Kameyama A., Kikuchi N., Nakaya S., Ito H., Sato T., Shikanai T., Takahashi Y., Takahashi K., Narimatsu H.: A strategy for identification of oligosaccharide structures using observational multistage mass spectral library. Anal. Chem. 77, 4719-4725 (2005).

5. Okuyama N., Ide Y., Nakano M., Nakagawa T., Yamanaka K., Moriwaki K., Murata K., Ohigashi H., Yokoyama S., Eguchi H., Ishikawa O., Ito T., Kato M., Kasahara A., Kawano S., Gu J., Taniguchi N., Miyoshi E., Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation, *Int. J. Cancer* 118, 2803-2808 (2006).
6. Kuraya N., Hase S., Release of O-linked sugar chains from glycoproteins with anhydrous hydrazine and pyridylation of the sugar chains with improved reaction conditions, *J. Biochem.* 112, 122–126 (1992).
7. Wakao M., Miyahara T., Iiboshi K., Hashiguchi N., Masunaga N., Suda Y., Synthesis of mucin type core 3 and core 5 structures and their interaction analysis with sugar chips, *Carbohydr. Res.* 516, 108565 (2022).
8. Shinchi H., Yamaguchi T., Moroishi T., Yuki M., Wakao M., Cottam H., Hayashi T., Carson D., Suda Y., Gold nanoparticles Coimmobilized with Small Molecule Toll-Like Receptor 7 Ligand and α -Mannose as Adjuvants, *Bioconjugate Chem.* 30, 2811-2821 (2019).

Exploration of biomarker using mucin-type oligosaccharides

Masahiro Wakao

Research Field in Engineering, Science and Engineering Area, Kagoshima University

1-21-40, Korimoto, Kagoshima 890-0065, JAPAN

TEL: 099-285-7843

Cancer is the leading cause of death and affects approximately half of people in Japan. Therefore, early detection and treatment of cancer diseases are demanded. Glycans classified as cancer-associated carbohydrate antigens (TACAs) are expected to serve as biomarkers for early cancer diagnosis and as targets for cancer vaccines. However, TACAs that can be used for early detection and treatment have not yet been discovered. On the other hand, the *O*-linked glycan TACAs, which are classified as mucin-type glycans, are known to undergo significant structural changes in the process of cancer and inflammation. Sialyl Tn and sialyl Lewis X glycan antigens are major *O*-linked glycans as TACAs and are widely used as cancer biomarkers. In addition, the core structures of mucin-type glycans, which result from a deficiency in sugar chain elongation, are expected to be used as biomarkers because they are expressed in diseases such as cancer and related diseases. However, their expression levels are very low compared to the above-mentioned antigens and their function has hardly been investigated. In this study, we prepared sialylated core structures of mucin-type *O*-glycans and evaluated whether the prepared glycans could be used as analytical tools.

Sialyl core structures were synthesized from a disaccharide intermediate using a systematic synthesis method. As a result, four types of sialyl core structures and their ligand conjugates were newly synthesized. In addition, the synthesized ligand

conjugates were used for the fabrication of array-type glycan chip and the synthesis of SGNPs. Interaction analysis was performed using SPR imaging biosensor with glycan chip and ELISA with SGNPs. The results showed that ELISA analysis can be performed interaction analysis with higher sensitivity than SPR imaging analysis. The ELISA developed in this study can be utilized for exploring biomarkers after further optimization.