

28PB-am010

糖鎖のリン酸化及び硫酸化にフォーカスしたグライコミクス技術の開発

○山田 佳太¹, 栢原 春奈², 木下 充弘², 鈴木 茂生², 坂崎 文俊¹, 関 庚善¹ (¹大阪大谷大薬, ²近畿大薬)

[背景]硫酸化糖鎖やリン酸化糖鎖は、多くの生体分子のリガンドとなり、生命情報の伝達で重要な役割を担うことが明らかになりつつある。したがって、硫酸化-リン酸化糖鎖の構造情報の取得は、生命科学に必須であると考えられる。しかしながら、生体中に発現する微量の硫酸化-リン酸化糖鎖の構造解析技術は、未だ確立しておらず、解析は困難を極めている。特に、糖鎖上の硫酸基とリン酸基の物理化学的性質は酷似しているため、それらを識別することが難しい。本研究では、2D-HPLCを用いた、生体試料中の硫酸化-リン酸化糖鎖の精製及び識別法を開発した。

[方法]2-aminobenzoic acid(2AA)で蛍光標識化したリン酸化グルコサミン並びに硫酸化グルコサミンをモデル試料とし、硫酸化-リン酸化糖鎖の精製法及び両者の識別法について検討した。確立した方法を用いて、ニワトリオバルブミンやアルグルコシダーゼアルファ等の糖タンパク質試料や、培養細胞中に発現する硫酸化-リン酸化糖鎖の分析に適用した。

[結果]セロトニンアフィニティークロマトグラフィーを用いることで、生体試料中に存在する微量の硫酸化-リン酸化糖鎖を精製することに成功した。さらに、精製した硫酸化-リン酸化糖鎖含有フラクションを、順相 HPLC で分析することで、硫酸化糖鎖とリン酸化糖鎖を識別することができた。確立した手法をニワトリオバルブミンに発現するアスパラギン結合型糖鎖解析に適用した結果、硫酸化された高マンノース型糖鎖を確認することができた。また、本法を培養細胞に適用した結果、細胞中に観察されるリン酸化糖鎖の多くは、リン酸基が、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)でキャップされている(GlcNAc-PO3-R)ことが明らかになった。