

グリコシダーゼと糖鎖

ウシ血清由来フェチュイン(Fetuin)の糖鎖解析

GlycoStation®
Technical Note

5

GlycoTechnica

グリコシダーゼについて

グリコシダーゼはグリコシド結合を加水分解する酵素の総称です。糖タンパク質から糖鎖を遊離させたい場合に、目的に応じて図1に示すような各種グリコシダーゼを使用します。本テクニカルノートでは、末端シアル酸を遊離する酵素ノイラミナーゼ(シアリダーゼともよばれる)を使用した解析事例をご紹介します。ノイラミナーゼは、私達の生活の中で意外と身近な存在として知られています。例えば、毎年流行するインフルエンザウイルスの亜型を表すH1N1の“N”は、ノイラミナーゼ(Neuraminidase)の頭文字“N”に由来します。インフルエンザウイルスは、ヒトの体内に存在する細胞に感染・増殖後、感染細胞から放出される際に細胞とウイルスを切り離すためにこの酵素を利用しています。

糖タンパク質Fetuinについて

今回はウシ血清由来フェチュイン(Fetuin)の糖鎖解析例をご紹介します。FetuinはAsnにN-グリコシド結合しているN型糖鎖とSerまたはThrにO-グリコシド結合しているO型糖鎖をそれぞれ

3本もつとされています。N型糖鎖の構造は、ヒトではおもに2本鎖であるのに対し、ウシはおもに3本鎖の複合型とされています(Green et al. 1988; Lin et al. 2018)。一方、O型糖鎖の構造は、ヒトではないし2つのシアル酸をもつCore1タイプ(シアルリT抗原(ST)およびジシアルリT抗原(DiST))であるのに対し、ウシはおもに1つのシアル酸をもつCore 1タイプ(ST)であることが報告されています(Lin et al. 2018)。

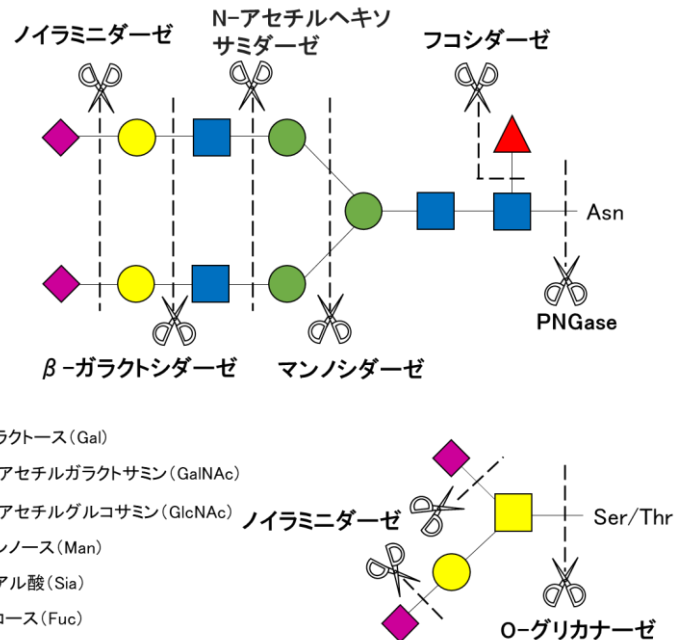
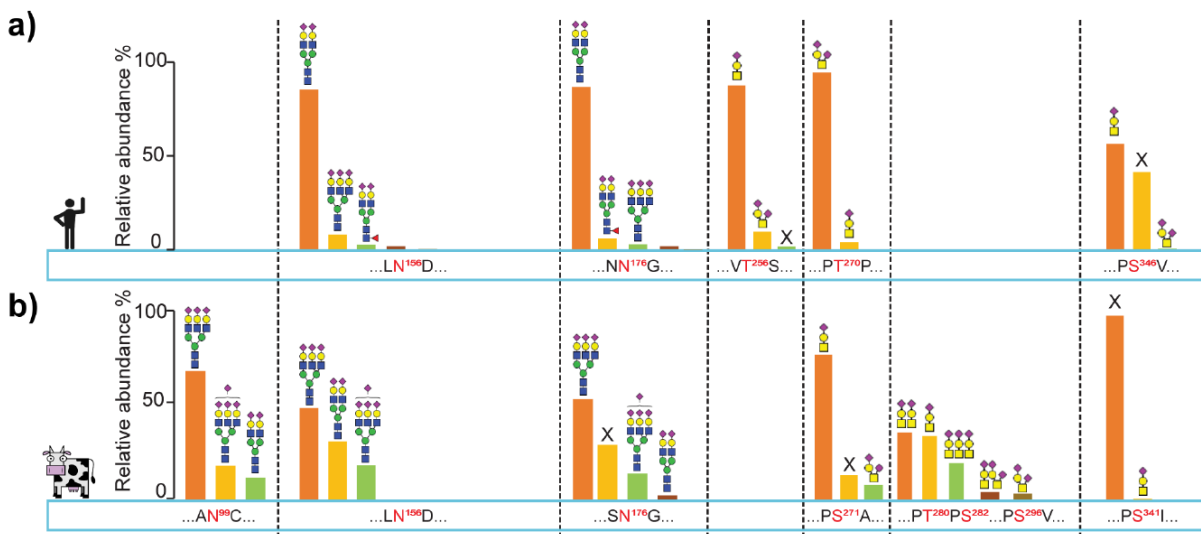


図1. グリコシダーゼによる糖鎖切断部位



参考図 (Lin et al. 2018 Fig.3より抜粋)

レクチンマイクロアレイによる測定

手順: グリコシダーゼ処理(もしくは未処理)および蛍光標識したFetuinサンプルを Probing Solutionで希釈します。LecChip®にサンプル溶液(Fetuin 10 ng相当)をアプライし、20°Cで一晩反応させます(反応時間や温度は適宜変更可能です)。反応後、LecChip®は洗浄操作なしで反応後そのままGlycoStation® Readerで測定します。

結果: ノイラミナーゼ未処理(黒バー)および処理(赤バー)条件でのFetuinのレクチン結合シグナルを比較しました(図2)。グラフの縦軸は蛍光シグナル強度、横軸は45種類のレクチンを示しています。ノイラミナーゼ処理によって末端のシアル酸が外れると、MAL・ACG(α 2-3 Sia-binder)、SNA・SSA・TJA-1(α 2-6 Sia-binder)、WGA(multivalent Sia-binder)のシグナルが減少し、ECA・RCA120・DSA・BPL・TJA-II(Gal-binder)とABA、Jacalin、ACA(Core1-binder)のシグナルが増加しました。一方で、わずかにシグナルが検出されたLEL・STL・UDA((GlcNAc)_n)においてノイラミナーゼ処理によるシグナル変化はほとんどみられませんでした。

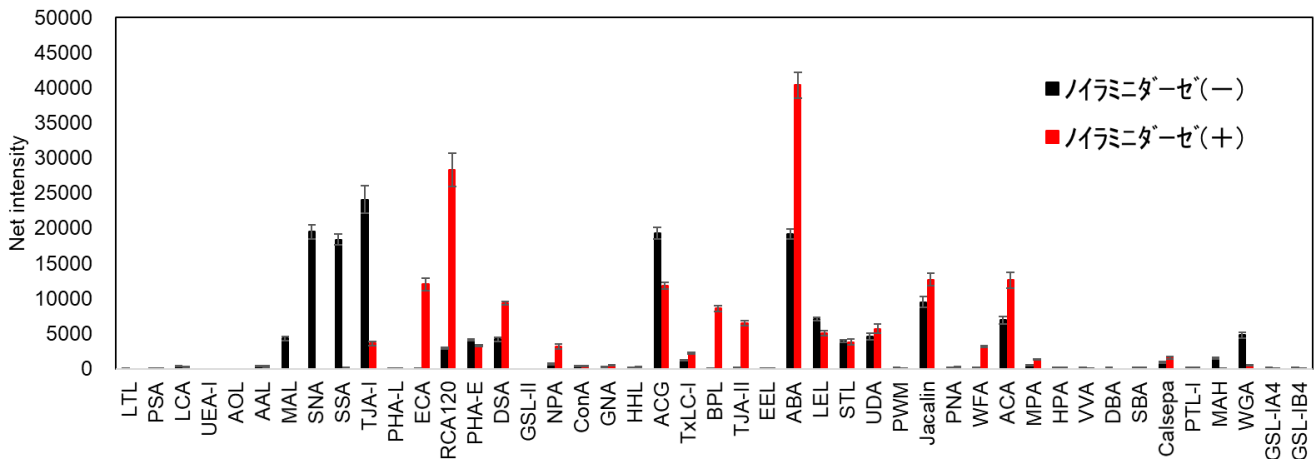


図2. ノイラミナーゼ処理によるウシ血清由来Fetuinの糖鎖プロファイリング解析

これらの結果をもとに、レクチンアレイによって推測されるN型糖鎖構造について考えてみます。ポイントは、Sia-binderレクチン群からGal-binderレクチン群へとシフトした点です。これは言い換えると、N型糖鎖の構造が複合型からアシアロ型へと変化したと考えることができます。アシアロ型構造は、末端にシアル酸をもたないN型糖鎖構造です(図3)。一方で、LEL・STL・UDA((GlcNAc)_n)はN型糖鎖のコア糖鎖配列を認識しており、シアル酸修飾の有無によるシグナル変化がみられなかったと推測されます。では次に、O型糖鎖構造についてみてみます。ここでのポイントは、ACG(α 2-3 Sia-binder)のシグナル減少と、ABA・ACA(Core1-binder)のシグナル増加です。ACGは、N型糖鎖だけでなくシアルリT抗原(ST)やジシアルリT抗原(DiST)と呼ばれる α 2-3シアル酸修飾されたO型糖鎖への結合性が高く、反対にABAとACAは、T抗原(Core1)への結合性が高いことが知られています。これらの結果から、シアルリT抗原(ST)からT抗原(Core1)への変化(α 2-3シアル酸修飾率の変化)が推測されます。上記に加えて、わずかに確認されたMAH(ジシアルリT抗原(DiST)認識レクチン)のシグナル減少とJacalin(ジシアルリT抗原(DiST)非認識レクチン)におけるシグナル増加は、微量に存在するDiSTからCore1への構造変化(α 2-6シアル酸修飾率の変化)を捉えている可能性が考えられます。

このように、レクチンマイクロアレイは少量のサンプル使用でN型糖鎖とO型糖鎖を迅速・簡便かつ高感度に同時解析できます。また、各種グリコシダーゼ処理を用いることにより、シアル酸やフコースの修飾率の比較など、サンプル間の糖鎖修飾量や糖鎖プロファイルをさらに詳細に解析することが可能となります。フェチュイン(Fetuin)など末端にシアル酸を持つ物質では、バッファーのpHや凍結融解などの物理的破壊によってシアル酸が外れやすく、精製時ロット間差があると言われるますが、そうした現象もレクチンアレイでは簡便にモニタリングすることができます。

図3. ノイラミナーゼ処理によるウシ血清由来Fetuinの糖鎖構造変化

