第 57 回日本電気泳動学会学会賞（児玉賞）受賞者論文
論文種目：総合論文

分子マトリックス電気泳動法の開発

亀 山 昭 彦*

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門

（受付 2019 年 1 月 4 日，受理 2019 年 1 月 16 日）

SUMMARY

Supported molecular matrix electrophoresis (SMME) is a membrane electrophoresis to characterize mucins that have been the holy grail of glycoproteomics. This review describes a principle of the SMME, some examples of SMME with biological samples, and related techniques including succinylation Alcian Blue staining, glycan stripping, mucin imaging by infrared spectroscopy mapping, and affinity SMME. On the basis of these technical developments, SMME study is gradually shifting towards application of researches using clinical samples for biomarker discovery.

Key words: mucin, polyvinylidene difluoride, hydrophilic polymer, glycan, membrane electrophoresis

はじめに

プロテオーム解析の技術は近年急速に進歩し，疾患バイオマーカー探索などへの応用が世界中で盛んに進められている．タンパク質自身の発現解析のみならず翻訳後修飾を含めた解析法についても新たな技術や方法論が開発され，プロテオーム解析の解像度が高められてきた^{1,2)}．タンパク質のグリコシル化は，細胞の分化，腫瘍化などに応じて変化することが知られており，タンパク質の量的変動のみならず糖鎖修飾という質的変動に着目したバイオマーカー探索にも期待が高まっている^{3,4)}．

しかしながら，これらの技術をもってしても試料中に含まれる全てのタンパク質が分析できているわけではない．粘膜や粘液の主要な構成成分として知られるムチンは分子量 100 万を超えるものが多く，さらに多種類の糖鎖の付加により構造的多様性にも富んでいる．その糖鎖量は通常，分子量の 50% 以上にも及び，さらにその糖鎖の立体障害によりプロテオーム解析で用いられる各種プロテアーゼにも耐性がある．このような分子的特性のため，ムチンは SDS-PAGE やアガロース電気泳動においてゲル内を移動することが極めて難しく，移動できた場合でも，その泳動像は電場方向に長く伸びるため希釈され，その後の分析が難

しくなる．さらに，通常のペプチド断片に比して糖鎖修飾されたペプチドは質量分析におけるイオン化効率が低く，仮にイオン化された場合でも衝突誘起乖離では糖鎖の分解反応が優先するため，電子捕獲解離や電子移動解離のような非エルゴード的な断片化法を用いなければペプチド配列に関する情報は得られない⁵⁾．これらの理由により，ムチンは糖鎖修飾を受けていない一部のペプチド部分を除いてプロテオーム解析で見出されることはほとんどない．

その一方で，ムチンはがんや感染症等との関連が古くから示唆されてきた．腫瘍マーカーとして利用されている CA19-9 を始めとする各種の腫瘍関連糖鎖抗原の多くもムチン上の糖鎖であると考えられている⁶⁾．ムチンに焦点を当てた解析から，新たな疾患バイオマーカーや病態解明に繋がる知見が得られることが期待されるが，そのためには多数の試料に含まれるムチンを糖鎖部分も含めて簡便に分析できる方法論の開発が切望されていた．

分子マトリックス電気泳動

セルロースアセテート（セ・ア）膜電気泳動法は簡便な血清タンパク質分画法として臨床検査で広く利用されてきた．また，ヒアルロン酸ナトリウムやデルマタン硫酸エステルの品質試験法として日本薬局方にも記載されている．

Development of supported molecular matrix electrophoresis
Akihiko Kameyama

Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

* Corresponding author: Akihiko Kameyama; AIST, 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki 305-8568, Japan

E-mail: aki-kameyama@aist.go.jp

第57回日本電気泳動学会学会賞（児玉賞）受賞者論文

ムチンもセ・ア膜電気泳動によって簡便に分離することができるが、ムチンの糖鎖を分析するため泳動後に膜のアルカリ処理を行うと、セ・ア膜からグルコースオリゴマーを大量に生じ、これがムチンの糖鎖分析を著しく妨害する。そこで、アルカリ処理を施しても糖鎖分析に干渉する副生成物を生じない膜電気泳動法を考案した。

この方法では、セ・ア膜の代わりに親水性ポリマーを含む浸させた多孔性フィルター膜を用いる (Fig. 1a)。親水性ポリマーのマトリックスを泳動担体としているため本法を分子マトリックス電気泳動 (Supported Molecular Matrix Electrophoresis: SMME) と名づけた⁷⁾。ムチン分析を目的とする場合は、親水性ポリマーとしてポリビニルアルコール (PVA)、多孔性フィルター膜としてポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜が適している。そしてセ・ア膜電気泳動と同様の装置と緩衝液を用いて電気泳動を行うことが可能である。ムチンやムコ多糖を分析する場合は、0.1 M ピリジノーギ酸緩衝液 (pH 4.0) を泳動緩衝液として、1 mA/cm にて 30 分間の通電を行う。泳動後の膜をアルシアンブルーで染色するとムチンやムコ多糖が青色のバンドとして可視化される。バンドを切り取り、50 mM 水酸化ナトリウムに溶解した 0.5 M 水素化ホウ素ナトリウムに浸し 45°C で一晩放置すると糖鎖がアルジトールとして遊離される。ムチンの場合は得られたアルジトールを完全メチル化して質量分析、プロテオグリカンの場合は適当な酵素で 2 糖単位まで分解しキャピラリー電気泳動など

で分析する (Fig. 1b)。この際、SMME 膜は糖鎖分析を妨害する副生成物を全く生じない。また、ウェスタンブロッティングに使用される PVDF 膜を支持体に用いているため、泳動後の膜を特異抗体で染色することも可能である。

分析例

(1) 株化細胞のムチン分析⁸⁾

乳がん細胞株 (T47D) と膵がん細胞株 (HPAF-II および BxPC3) をホモジナイズし、トリプシンで消化後、遠心フィルター (100 KDa cut-off) を用いて未消化のまま残存している分子を濃縮した。これを 8 M ウレアに溶解し、還元アルキル化処理後、SMME 膜にアプライし 0.1 M ピリジノーギ酸緩衝液 (pH 4.0) を用いて泳動した。泳動後の膜をアルシアンブルーで染色したところ各細胞抽出物からそれぞれ複数のスポットが現れた (Fig. 2a)。市販のブタ胃ムチン (PSM) はムチンだけでなくヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸型プロテオグリカンを含不純物として含有している。それぞれ泳動位置が異なるので、筆者は市販 PSM を SMME の泳動マーカーとして利用している。市販 PSM に含まれる各不純物の泳動位置を参照することにより、最も移動度の高いスポット (T1, H1, B1) はプロテオグリカン類であり、他のスポット (T2, H2, H3, B2, B3) がムチンであると推定された。さらに膜結合型ムチンの一種である MUC1 に対する特異抗体でこの SMME 膜を染色したところ、T2, H2, B3 が染色された (Fig. 2b)。

Fig. 1 Supported molecular matrix electrophoresis (SMME)

a) Conceptual overview of SMME, b) schematic diagram for the characterization of mucins using SMME. (From ref. 7. Reproduced with the permission of American Chemical Society, copyright 2009)

これらの結果から同じ MUC1 でも細胞株により SMME における移動度が異なることが明らかとなった。一方、各ムチンスポットの糖鎖を調べたところ、同じ MUC1 でも乳がん細胞株と膵がん細胞株では全く異なる糖鎖プロファイルが得られ、膵がん細胞株間では類似していた (Fig. 3)。同じタンパク質でも由来する組織によって糖鎖修飾が異なる好例である。

(2) 血清⁹⁾

セ・ア膜電気泳動と同様に、SMME はムチンだけではなく血清のタンパク質分画にも利用できる。PVDF 膜は負のゼータ電位を有するため泳動中に強い電気浸透流を発生するが、PVA で処理した SMME 膜ではほとんど生じず、セ・ア膜電気泳動に類似した結果が得られる。ヒト血清を 0.06 M バルビタール緩衝液 (pH 8.6) にて SMME で分画し、ボンソー S にて染色したところ、アルブミン、 α_1 , α_2 , β , γ に相当するバンドが出現した。SMME 膜をそれぞれの分画を代表するタンパク質に対する抗体で染色

した結果を示す (Fig. 4)。各バンド (5 分画) を切り取り糖鎖を分析したところ、糖鎖を有しないアルブミンを除き、N-結合型糖鎖については移動度の高いバンドほどシアル酸含有量が高かった。O-結合型糖鎖については含有量は少ないが、いずれの分画からもほぼ同様の糖鎖が得られた。これらの結果から、血清タンパク質分画の膜電気泳動移動度は、タンパク質を修飾する糖鎖の酸性残基の数の影響を受けている可能性が示唆された。

(3) その他

マウスの顎下腺に含まれるムチンを分析し、加齢によってムチンの種類が変化することを見出した^{10,11)}。これについては、稿を改めて紹介したい。その他、これまでに膵液や胆汁中のムチン分析⁷⁾、マウス糞便中に含まれるムチンの分析、海藻類に含まれる粘性多糖類の分析、卵白オボムチンの分析など、幅広く応用範囲を広げている。

膜の特性を活用した周辺技術の開発

(1) コハク酸-アルシアンブルー染色¹²⁾

SMME 膜の支持体である PVDF 膜は化学的に不活性であり、種々の化学反応に耐性がある。この性質を利用してムチンの新しい染色法を開発した。PSM などに含まれる中性ムチン (シアル酸や硫酸基などの酸性残基を有さないムチン) は、ムチンやムコ多糖の染色剤として広く使われているアルシアンブルーに染色性を示さない。ムチンは多量の糖鎖を有しているため、SMME 膜上のムチン存在領域には糖鎖由来の水酸基が密集して存在する。この水酸基をコハク酸モノエステル化するとムチン存在領域には酸性残基が密集することになる。その結果、アルシアンブルーで染色できなかった中性ムチンも他のムチンやムコ多糖と同時に染めることが可能となる。コハク酸モノエステルは、ムチンから糖鎖を遊離するためのアルカリ処理により速やかに分解されるため、糖鎖分析の際には全く影響を与えない (Fig. 5)。この染色法を用いる場合、注意すべき点

Fig. 2 SMME analysis of mucins from cancer cell lines

Mucins were visualized by Alcian Blue staining (a) and immunostaining with MY1E12 (b). (From ref. 8. Reproduced with the permission of John Wiley and Sons, copyright 2011)

Fig. 3 Comparison of glycan profiles in SMME-separated mucin spots

(From ref. 8. Reproduced with the permission of John Wiley and Sons, copyright 2011)

は SMME 膜を作成する際に用いる親水性ポリマーの組成である。PVA は水酸基を有するため一部がコハク酸で修飾され、アルシアンブルー染色ではバックグラウンドの濃色化を招く。そのため、ポリエチレングリコール (PEG) やポリビニルピロリドン (PVP) など水酸基を含まない親水性ポリマーが望ましいが、これらはムチンの分離能の低下を招く。筆者の研究室では PVA:PVP (1:1) の混合ポリマーを使用して SMME 膜を作成することにより、分離能とバックグラウンド淡色化のバランスを図っている。

(2) 糖鎖ストリッピング法¹³⁾

ムチンを泳動した SMME 膜は各種抗ムチン抗体で染色することができる。しかし抗ムチン抗体には、糖鎖まで含めた構造をエピトープとするもの、タンデムリピート領域の糖鎖のない合成ペプチドを抗原とするもの等がある。ムチンは上述のように組織や細胞によって糖鎖修飾が異なるため、同じ種類のムチンであってもこれらの抗体を用いた染色では結果が異なることが多い。そこで、ムチンを泳動した SMME 膜を化学処理することにより、ペプチド部分にできるだけ影響を与えず糖鎖を剥がす方法を開発した。

0.1 M HCl 中、70°C にてムチンのシアル酸を除去した後、

Fig. 4 Immunostaining of serum proteins on the SMME membrane

i: reference image (Ponceau S); ii: α 1-antitrypsin; iii: haptoglobin; iv: transferrin; v: immunoglobulin G. (From ref. 9. Reproduced with the permission of John Wiley and Sons, copyright 2013)

過ヨウ素酸酸化とアンモニア水による温和な β 脱離反応を数回繰り返すと、SMME 膜上のムチンに結合している糖鎖を剥がすことができる。ムチンに結合している糖鎖の長さによって過ヨウ素酸酸化とアンモニア処理の繰返し数を変える必要がある。最も普通に存在する O-結合型糖鎖であるシアリル T やジシアリル T であれば 2 回の繰返しで糖鎖を剥がすことができる。乳がん細胞株 (T47D) 由来のムチンを SMME で分離し、糖鎖ストリッピング処理後に MUC1 のタンデムリピートペプチドを抗原として作成された抗体 (DF3) を用いて染色したところ、糖鎖ストリッピング処理前には染色されなかった MUC1 が明瞭に染色された。本手法を用いれば、各種ムチンの抗タンデムリピート抗体によるムチンの同定が可能になると期待される。

(3) 赤外分光法 (IR) による泳動像イメージング¹⁴⁾

PVDF は IR において 1400 cm^{-1} から 2800 cm^{-1} の領域には吸収がない。PVA も醗化度 100% のものであれば、ほぼ同様の特性を有する。一方、ムチンにはペプチドや糖鎖のアミド基およびカルボン酸基の吸収帯が 1500 cm^{-1} から 1800 cm^{-1} の領域に存在するので、この点に着目して、SMME 膜上のムチンの IR によるイメージングについて検討した。SMME 膜は醗化度 100% の PVA を用いて作成し、IR 測定には顕微フーリエ変換赤外分光装置による顕微マッピングモードを用いた。ウシ顎下腺ムチン (BSM) と PSM を 0.1 M ピリジン-ギ酸緩衝液 (pH 4.0) にて SMME を行い、泳動後、十分に乾燥させたのち顕微 IR マッピング測定を行った。この際、顕微マッピングでは膜の平面性を保つことが重要なため、2 枚のフッ化カルシウム板に膜を挟んで測定した。その結果、3329, 1727, 1655, 1543 cm^{-1} によるマッピングにおいてそれぞれムチンバンドを可視化することができた。3329 および 1655 cm^{-1} では PSM, 1727 cm^{-1} では BSM, 1543 cm^{-1} では両方のムチンが可視化された。BSM にはシアル酸が多く含まれているが PSM には存在しない。波長による可視化

Fig. 5 Outline of succinylation-Alcian Blue staining

(From ref. 12. Reproduced with the permission of American Chemical Society, copyright 2012)

の違いはムチンに含まれる官能基の種類と数を反映していると考えられる。IR によるムチンの可視化は、感度の点でアルシアンブルー染色法に劣るが、非破壊的に泳動検体の構造情報が得られる点ではユニークな方法といえる。

アフィニティ分子マトリックス電気泳動

PVDF 膜は、疎水結合によりタンパク質を吸着する性質がある。この特性を利用し、レクチンなど各種プローブ分子をあらかじめ吸着固定した PVDF 膜に親水性ポリマーを含浸させるとプローブ分子が固定化された SMME 膜を作成することができる。この膜を用いて電気泳動を行うと、プローブに対応したリガンドを有する分子との相互作用に基づくアフィニティ電気泳動が可能となる¹⁵⁾。プローブとしてはレクチンや抗体などのタンパク質の他、糖脂質など PVDF 膜に疎水結合により固定化できるものであれば利用できる。

アフィニティ SMME の例としてコンカナバリン A (Con A) 固定化膜を用いて、 α 1-酸性糖タンパク質 (AGP) を泳動した結果を示す (Fig. 6)。AGP は通常 1 本のバンドとして泳動されるが、Con A を固定化した膜では 2 本のバンドに分離される。下のバンドの移動度は、固定化に使用した Con A の濃度に依存して遅れており、この遅れは Con A と AGP グライコフォーム (糖鎖の違いにより区別されるサブポピュレーション) との相互作用に基づくものと考えられる。

膜電気泳動であるアフィニティ SMME は操作が簡便なこと、そして分離後のタンパク質の糖鎖を解析できることが利点である。アフィニティ電気泳動法は、分子間の弱い相互作用を検出するのに適した手法であり、肝細胞がんマーカーの AFP-L3 など、糖鎖の違いに基づくマーカー分子を検出する方法として臨床検査でも利用されてきた。最近、特定のレクチンに反応性を示すムチンが、癌などの疾

Fig. 6 Affinity-SMME of AGP. AGP was visualized by immunostaining with anti-AGP polyclonal antibody (From ref. 15. Reproduced with the permission of Japanese Electrophoresis Society, copyright 2014)

患マーカーや iPS 細胞などの未分化細胞マーカーとして見出されている^{16,17)}。このようなムチンを分離し、その糖鎖構造を詳細に解析する場合などにも本法が有効なツールとして活用できると期待される。

おわりに

ムチンの簡便分析を目的として、SMME およびその関連技術の開発を進めてきた。それでもなお、ムチンコアタンパク質の同定法開発、遊離した O-型糖鎖の解析のためのグライコミクス基盤構築、SMME 分析のための各種生体試料の前処理法開発など、まだ解決すべき課題は山積しており、引き続き努力していきたい。一方で、SMME を用いた単純なムチン分離と糖鎖解析は技術的に成熟してきており、今後は各種臨床試料のムチン分析を通じてムチンが関連する疾患の病態解明やマーカー探索へ活用する段階へと駒を進めていく予定である。

本論文に関して開示すべき利益相反状態は無い。

謝 辞

SMME の開発初期から共に研究を進めてきた松野裕樹博士、董偉傑博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854: 601-608.
- 2) Thaysen-Andersen M, Packer NH, Schulz BL. Maturing glycoproteomics technologies provide unique structural insights into the N-glycoproteome and its regulation in health and disease. *Mol Cell Proteomics*. 2016;15:1773-1790.
- 3) Pan S, Chen R, Aebersold R, *et al*. Mass spectrometry based glycoproteomics—from a proteomics perspective. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10:R110.003251.
- 4) Narimatsu H, Sawaki H, Kuno A, *et al*. A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics. *FEBS J*. 2010;277:95-105.
- 5) Jensen PH, Kolarich D, Packer NH. Mucin-type O-glycosylation—putting the pieces together. *FEBS J*. 2010;277:81-94.
- 6) Kirwan A, Utratna M, O'Dwyer ME, *et al*. Glycosylation-based serum biomarkers for cancer diagnostics and prognostics. *Biomed Res Int*. 2015;2015:490531.
- 7) Matsuno YK, Saito T, Gotoh M, *et al*. Supported molecular matrix electrophoresis: a new tool for characterization of glycoproteins. *Anal Chem*. 2009;81:3816-3823.
- 8) Matsuno YK, Dong W, Yokoyama S, *et al*. Improved method for immunostaining of mucin separated by supported molecular matrix electrophoresis by optimizing the matrix composition and fixation procedure. *Electrophoresis*. 2011;32:1829-1836.
- 9) Dong W, Matsuno YK, Kameyama A. Serum protein fractionation using supported molecular matrix electrophoresis.

- Electrophoresis. 2013;34:2432–2439.
- 10) Kameyama A, Yamakoshi K, Watanabe A. A rapid separation and characterization of mucins from mouse submandibular glands by supported molecular matrix electrophoresis. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2019;1867:76–81.
 - 11) Iida M, Matsuno YK, Watanabe A, *et al*. A sialo-oligosaccharide-rich mucin-like molecule specifically detected in the submandibular glands of aged mice. *Arch Oral Biol*. 2019;97:52–58.
 - 12) Dong W, Matsuno YK, Kameyama A. A procedure for Alcian blue staining of mucins on polyvinylidene difluoride membranes. *Anal Chem*. 2012;84:8461–8466.
 - 13) Matsuno YK, Dong W, Yokoyama S, *et al*. Identification of mucins by using a method involving a combination of on-membrane chemical deglycosylation and immunostaining. *J Immunol Methods*. 2013;394:125–130.
 - 14) 亀山昭彦. 分光学的性質に着目した分子マトリックス電気泳動の新たな応用. *電気泳動*. 2015;59:97–99.
 - 15) 松野裕樹, 亀山昭彦. アフィニティー分子マトリックス電気泳動. *電気泳動*. 2014;58:27–29.
 - 16) Matsuda A, Kuno A, Nakagawa T, *et al*. Lectin Microarray-Based Sero-Biomarker Verification Targeting Aberrant O-Linked Glycosylation on Mucin 1. *Anal Chem*. 2015;87:7274–7281.
 - 17) Tateno H, Onuma Y, Ito Y, *et al*. A medium hyperglycosylated podocalyxin enables noninvasive and quantitative detection of tumorigenic human pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2014;4:4069.